

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra anorganické a organické chemie

Antimykobakteriální isostery salicylanilidů

Disertační práce

2007

Mgr. Josef Matyk

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Inorganic and Organic
Chemistry

Antimycobacterial isosters of salicylanilides

PhD Thesis

2007

Mgr. Josef Matyk

Rád bych touto cestou poděkoval mému školiteli prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DrSc. za jeho pomoc v průběhu mého studia i práce, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Csc. za změřeni NMR spekter, Ivě Vencovské za změřeni IČ spekter, MUDr. Jarmile Kaustové a jejímu kolektivu ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě na Oddělení pro diagnostiku mykobakterií za provedení antimykobakteriálního hodnocení mých látek, prof. Hans-Martinu Dahsemu z Hans-Knöll Institute of Natural Products Research z Jeny za testování cytotoxicity, prof. Utte Möllmannové z Hans-Knöll Institute of Natural Products Research z Jeny za testování látek na rychle rostoucí bakterie, doc. V. Buchtovi, CSc. z katedry biologických a lékařských věd FaF UK za antifungální testování látek, prof. M. Mikovi z katedry mikrobiologie a biochemie z Slovenské technické university v Bratislavě za biologické testování.

Dále bych rád poděkoval celému kolektivu katedry anorganické a organické chemie za jejich cenné rady a zkušenosti.

OBSAH

1. Úvod	8
1.1. Tuberkulóza	8
1.2. Léčba tuberkulózy	9
1.3. Vývoj nových antituberkulotik	13
2. Cíl práce	15
3. Teoretická část	16
3.1. Salicylanilidy	16
3.2. 3-Aryl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-diony	19
3.3. 3-Aryl-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-ony a 3-aryl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithiony	21
3.4. Závěry vyplývající z teoretické části	22
4. Metodická část	23
4.1. Syntéza salicylanilidů	23
4.2. Syntéza heterocyklických salicylamidů	23
4.3. Syntéza 3-aryl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	24
4.4. Syntéza 3-aryl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-4(3 <i>H</i>)thioxo-2-onů a 3-aryl-2 <i>H</i> -1,3- benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)dithionů	24
4.5 Syntéza 3-heteroaryl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	25
4.6. Volba postupů	26
4.6.1 Příprava salicylanilidů	26
4.6.2 Příprava heterocyklických salicylamidů	26
4.6.3 Příprava 3-(alkyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	26
4.6.4 Příprava 3-(alkyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3 <i>H</i>)-onů a 3-(alkyfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	26
4.6.5 Příprava 3-pyridyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	26
4.7. QSAR	
4.7.1. Přehled přístupů	27
4.7.2. Volba metody	29
5. Experimentální část	30
5.1. Postup přípravy salicylanilidů	30
5.1.1. Přehled připravených salicylanilidů	30
5.2. Postup přípravy heterocyklických salicylamidů	37
5.2.1. Přehled připravených fenylsalicylátů	38

5.2.2. Přehled připravených heterocyklických salicylamidů	39
5.3. Postup přípravy 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	42
5.3.1. Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	42
5.4. Postup přípravy 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3 <i>H</i>)-2-onů a 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	49
5.3.1. Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	50
5.4.2. Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	53
5.5. Postup přípravy 3-(heteroaryl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	56
6. Biologická aktivita látek	58
6.1. Hodnocení antimykobakteriální aktivity	58
6.1.1. Antimykobakteriální aktivita salicylanilidů	58
6.1.2. Antimykobakteriální aktivita heterocyklických salicylamidů	60
6.1.3. Antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	61
6.1.4. Antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-4-thioxo-(3 <i>H</i>)-2onů	
6.1.5. Antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	64
6.1.6. Antimykobakteriální aktivita 3-(heteroaryl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	65
6.2. Antimykotická aktivita připravených látek	66
6.3. Antiproliferativní a cytotoxická aktivita	66
6.4. Antimikrobiální aktivita vybraných salicylanilidů	67
7. QSAR výpočty	68
8. Diskuze	70
8.1. Úvod	70
8.2. Salicylanilidy	70
8.3. Heterocyklické salicylamidy	71
8.4. 3-(4-Alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-diony	72
8.5. 3-(4-Alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3 <i>H</i>)-2ony a 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithiony	72

8.6. 3-(Heteroaryl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-diony	73
9. Závěr	74
10. Literatura	75
11. Seznam T-čísel	81
12. Seznam publikací	83
13. Přílohy	85

1. ÚVOD

1.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza neohrožuje jen tzv. rozvojový svět, ale stále víc i vyspělé země. Počet nových tragických případů se množí i u nás. Zcela nechrání ani očkování. Navíc se objevují nové kmeny bakterií, které odolávají dosud užívaným lékům. Ještě v polovině 19. století měla tuberkulóza (lidový název součotiny či úbytě) na svém kontě asi čtvrtinu celkového počtu úmrtí. Byla hlavní příčinou úmrtí dětí a mladých lidí. Jejího původce – *Mycobacterium tuberculosis hominis* - odhalil v roce 1882 Robert Koch. (Tak dostal název Kochův bacil.) Dokáže zasáhnout jakýkoli orgán v těle. Nejčastější je tuberkulóza plic. Viník způsobuje zvláštní formu zánětu, při kterém vznikají tuberkulózní uzlíky. Ty vytvářejí (vyprázdněním zkapalněného tuberkulózního ložiska) chorobné dutiny, tzv. kaverny, a mohou způsobit odumření orgánů. Při TBC plic dochází k rozpadu plicní tkáně. Neléčená TBC bývá smrtelná. V druhé polovině devadesátých let 20. století počet nových infekcí prudce narůstá.

V současné době na celém světě přes 30 milionů lidí sužuje aktivní (nikoli jen možná) tuberkulóza. Ročně zemrou přes tři miliony postižených – o třetinu více než je obětí obávaná malárie. Ovšem celá třetina světové populace už v sobě hostí bakterie TBC. Ty číhají na chvíli, kdy bude organismus člověka, jeho imunitní systém oslaben nebo narušen. Není třeba dlouze vysvětlovat, že jejich hlavním spojencem je bída, hlad, podvýživa. Proto dosud TBC byla – a zatím zůstává – největším prokletím rozvojových zemí.

TBC má mnoho podob. V povědomí většiny lidí se onemocnění tuberkulózou spojuje s **postižením plic**. Ačkoli to představuje přes 80 % případů, TBC však může zasáhnout mnohem víc orgánů. V některých případech totiž nejsou primárně infikovány plíce, ale lymfatické (mízní) uzliny (zejména na krku), střevní trakt, kosti, ledviny, mozkomíšní pleny, nitrohruďní uzliny apod. **Tuberkulóza periferních uzlin:** Vedle plic se jedná se o nejčastější postižení. Zasahuje hlavně uzliny krční, projevem je mj. nebolestivé zduření. **Tuberkulózní zánět orofaciální oblasti:** V ústní dutině je výskyt této choroby jako primární vzácností. Objevuje se tak u člověka, který se s TBC ještě nesetkal – například u kojenců, batolat, dětí předškolního věku. Jinak jde většinou o sekundární projevy, které jsou vyvolány zachycením mykobakterií z jiného (nejčastěji plicního) ložiska. **Tuberkulóza kůže a podkoží:** Pochází většinou z lymfatických uzlin, kloubů nebo infikovaných slizničních TBC vředů v ústech. **Tuberkulózní zánět páteře:** Představuje 40 % všech onemocnění ortopedické TBC. Dále sem řadíme postižení kolenního či kyčelního kloubu. **Tuberkulóza urogenitální:** Původcem je *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se pouze o sekundární

postižení, objevuje se však asi ve čtvrtině případů. Narůstá souběžně s pandemií HIV. **Tuberkulóza střev:** Vzácné onemocnění se objevuje při primární rozsáhlé plicní tuberkulóze. Pouhé procento všech onemocnění TBC se pojí s osteoartikulární oblastí (onemocnění pohybového aparátu).

TBC z 80 – 85 % postihuje plíce, takže nejdůležitějším příznakem je dlouhodobý kašel, někdy doprovázený vykašláváním krve. Přidává se bolest na hrudi, dušnost, zvýšená teplota až horečka (nad 38°C), pocení (zejména v noci), zhoršená chuť k jídlu a úbytek na váze, únava, malátnost. Lékař diagnózu stanoví pomocí rentgenového vyšetření hrudníku, kožních testů a analýzy slin. Důležitý je tzv. tuberkulinový test. Tuberkulin je protein (bílkovina) získaný z kultur tuberkulózního bacilu. Užívá se jak k rozpoznání onemocnění TBC, tak k aktivní imunizaci (vakcinaci). Smyslem tohoto očkování je především zabránit smrtelným formám TBC. Tou je zejména tzv. miliární tuberkulóza – rozsev tuberkulózních bacilů krví po celém těle. Hrozbou je i tuberkulózní zánět mozkových blan¹.

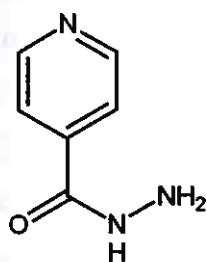
1.2. Léčba tuberkulózy

V období druhé světové války se objevila léčiva tuberkulózy, tzv. antituberkulotika. Vysvitla naděje, že tuberkulóza přestane být metlou lidstva. Nejprve se antituberkulotika dělila na dvě skupiny. Mezi léčiva první řady se řadily nejméně úspěšné látky o nízké toxicitě. Pokud léčba byla neúspěšná, používala se léčiva druhé řady, která však byla toxičtější. Dnes se k léčení tuberkulózy používají dvou až čtyřkombinace antituberkulotik. Především se jedná o isoniazid (INH), pyrazinamid, rifampicin, ethambutol jako léčiva podávaná orálně a streptomycin jako látka užívaná parenterálně. Důvodem pro využívání kombinací těchto pěti sloučenin je snaha o předcházení vzniku rezistence na tyto léky, dosažení nižší toxicity a menších vedlejších účinků. Bohužel se u určité části pacientů objevuje rezistence i na tyto nejméně účinné preparáty, a proto je nutné používat v léčbě další, mnohdy značně toxické látky, jejichž používání je přísně individualizováno a vychází ze zjištěné citlivosti kmene nebo klinického efektu². Právě zvyšující se výskyt rezistence na jednotlivé léky a často i na jejich vzájemné kombinace je faktorem, který upozorňuje, že je nutné věnovat zvýšenou pozornost vývoji a výzkumu nových antimykobakteriálních chemoterapeutik.

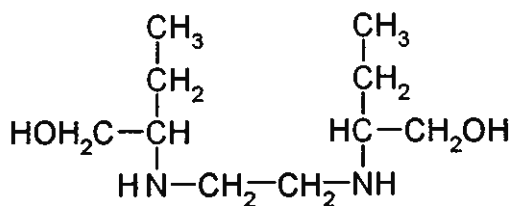
Mezi doplňující léčiva patří *p*-aminosalicylová kyselina (PAS), ethionamid, prothionamid, viomycin, kapreomycin, cykloserin a jeho derivát terizidon, ze sulfonů dapson, moderní fluorochinolony – perfloracin, ofloxacin, ciprofloracin, levofloxacin, sparfloracin, a

také případně makrolidy jako azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, skupina aminoglykosidů - např. amikacin a kanamycin, rifamyciny – rifabutin, rifapentin.

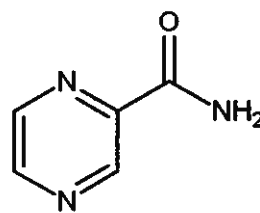
Mechanismy účinku jsou známy jen u některých antituberkulotik^{1,3} V případě mechanismu účinku INH (I) je známo, že mechanismus vede k oxidaci na isonikotinovou kyselinu, k začlenění do NAD a k následnému zablokování NAD a ke vzniku oxo- a peroxoradikálů. Výsledným efektem je inhibice mykolových kyselin, které jsou důležitým stavebním kamenem buněčných stěn a membrán mykobakterií. Spektrum účinku isoniazidu (I) zahrnuje kmeny *M.tuberculosis* a *M.bovis*. V rámci snahy o preventivní opatření pro vznik rezistencí se využívá kombinace isoniazidu s dalšími léky první řady ethambutolem (II), rifampicinem (IV), streptomycinem či thiacetazonem⁴.



I

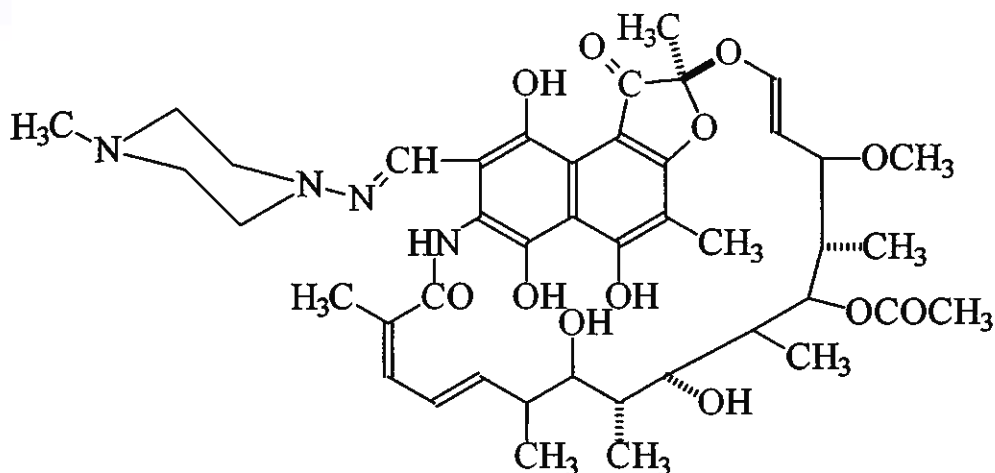


II



III

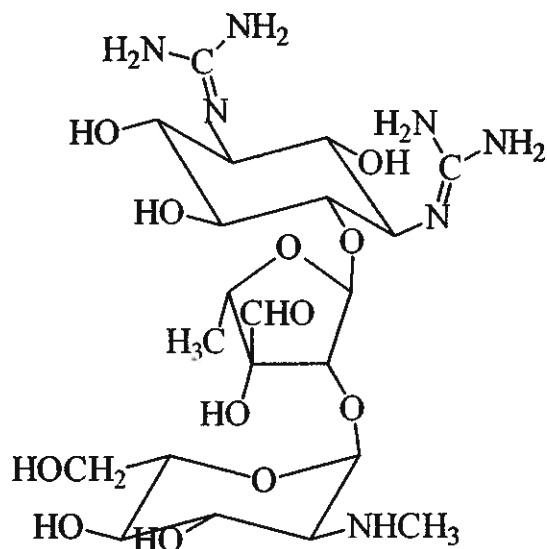
Podobný účinek jako INH související s metabolismem nikotinamidu projevuje pyrazinamid (III), který působí jen na *M.tuberculosis*. Naopak mechanismus účinku rifampicinu (IV) spočívá v inhibici na DNA závislých RNA-polymeráz – účinek na téměř latentní zárodky. Kromě dalších typů bakterií působí na *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* a na atypické mykobaktérie jako jsou *M. kansasii*, *M. avium*, *M.intracellulare* a *M. marinum*.



IV

V případě syntetického ethambutolu **II** není zcela znám jeho mechanismus účinku. Proniká do mykobaktérií a zdá se, že potlačuje multiplikaci interferencí se syntézou RNA. Je specificky účinný proti rostoucím mikroorganismům rodu *Mycobacterium* jako *M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. leprae* (s MIC 0,5 – 8 $\mu\text{g/ml}$), ale má malou sterilizační aktivitu.⁵ Je rovněž účinný proti některým podmíněně patogenním mykobaktériím včetně *M. kansasii*. Účinek proti jiným mikroorganismům nebyl prokázán. Ethambutol se nepoužívá samostatně, ale je přidáván do lékových kombinací pacientům s prokázanou nebo předpokládanou rezistencí na izoniazid. Zkřížená rezistence nebyla prokázána. Primární rezistence na ethambutol je v rozvinutých zemích řídká, ale pokud se ethambutol používá samotný, snadno vznikají rezistentní kmeny *M. tuberculosis*.

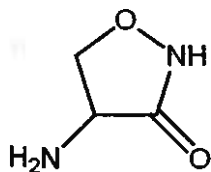
Parenterálně podávaný streptomycin (**V**) podléhá extracelulární distribuci a je užitečný v boji proti extracelulárním formám *M. tuberculosis* a *M. bovis* a proti podmíněně patogenním mykobaktériím. Zpomaluje proteosyntézu a způsobuje zabudování chybných aminokyselin do polypeptidických řetězců, které jsou syntetizovány v jeho přítomnosti. Chybně sestavené bílkoviny pak pozbývají svých biologických funkcí a dojde k tomu, že se částečně nebo úplně zastaví procesy v buňce. V systému *in vitro* se prokázalo, že v přítomnosti streptomycinu vznikají při překladačnické RNA chyby ve čtení. Uvažuje se, že streptomycin způsobuje deformaci ribosomů, a tím dochází právě k chybám čtení. Mutací se mohou bakteriální kmeny citlivé na streptomycin stát rezistentními. Tuto rezistenci lze prokázat i s buněčnými extrakty ve zkumavce. Není tedy způsobena nepropustností buněčné stěny, ale pozměněnými ribosomy. Z výsledků pokusů plyne, že streptomycin zřejmě zasahuje na podjednotce 30S.



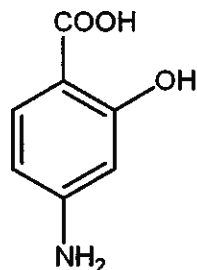
V

Rifapentin je cyklopentylový derivát rifamycinu (IV) a stejně jako on inhibuje DNA dependentní RNA polymerázy v citlivých kmenech *M. tuberculosis*. *In vitro* je rifapentin účinnější než rifampicin, ale bohužel mezi těmito léčivy existuje zkřížená rezistence. V případě dalších antituberkulotik druhé volby má i ethionamid mechanismus účinku opět blízký INH a zasahuje kmeny *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* a *M. kansasii*.

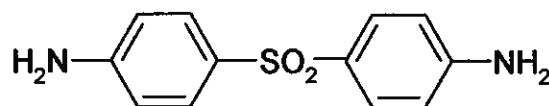
Capreomycin, který je určen k parenterálnímu podávání se aplikuje při rezistenci na streptomycin v boji proti *M. tuberculosis*. Cykloserin (VI) a kondenzační produkt cykloserinu terizidon je bakteriostatický proti typickým i atypickým mykobakteriím. PAS (VII) způsobuje inhibici syntézy listové kyseliny díky kompetici s PABA (*p*-aminobenzoovou kyselinou). Účinek výhradně jen na *M. tuberculosis*. Dapson (diafenylsulfon) (VIII) opět vede k inhibici listové kyseliny díky kompetici s PABA. V současné chemoterapii se uvedených látek téměř nepoužívá.



VI

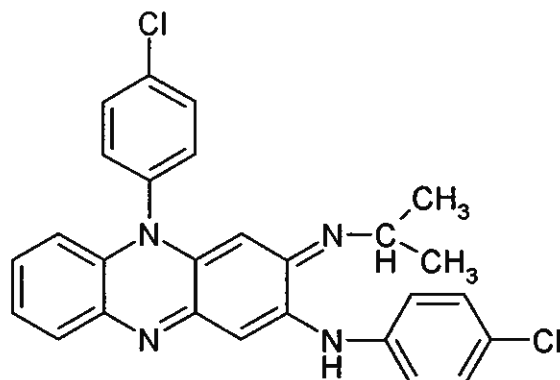


VII



VIII

Clofazimin (**IX**) je slabě baktericidní sloučeninou. Význam má pouze při chemoterapii kmene *M. leprae* a proti některým podmíněně patogenním mykobakteriím.



IX

Z tohoto přehledu v současné době nejfrekventovaněji používaných antituberkulotik plyne, že zvyšující se výskyt rezistence na jednotlivé léky, případně častá zkřížená rezistence je faktorem, který upozorňuje, že je nutné věnovat zvýšenou pozornost vývoji a výzkumu nových antimykobakteriálních chemoterapeutik.

1.3. Vývoj nových antituberkulotik

Vývoj nových antituberkulotik lze rozdělit na dvě části: a) hledání předlohové struktury, b) obměny předlohové struktury. K návrhu předlohové struktury lze dospět na základě analýz sloučenin s požadovanou biologickou aktivitou, dedukcí na základě systematického screeningu nebo využitím znalostí o mechanismech účinku, případně pomocí farmakoforové analýzy.

Nejrychlejší cestou, která vede k biologicky účinným sloučeninám, se jeví volba předlohové struktury již známé biologicky aktivní látky, ať již se využívá jejího základního účinku nebo se pracuje s vedlejšími účinky. Podmínkou však je, aby nové látky v některém směru výrazně překonávaly původní předlohu (nižší toxicitou, delší dobou setrvání v organismu, menšími nežádoucími účinky či lepší formou podání). V tomto případě se většinou směřuje k látkám s podobným mechanismem účinku jako má původní předlohová struktura.

Systematický screening poskytuje nejzajímavější výsledky, nicméně je velmi nákladnou záležitostí. Při hledání předlohové struktury lze jej doplnit matematickými přístupy.

Znalosti mechanismu účinku jednotlivých látek jsou vynikajícím zdrojem informací použitelných pro výběr předlohové struktury, ale zatím syntéza nových látek předchází znalostem o jejich mechanismu účinku.

Farmakoforová analýza se pokouší stanovit přesnou strukturu farmakoforu, což bývá spojeno s mechanismem účinku na molekulární úrovni, a proto lze biologickou aktivitu spojit s více farmakofory. Pokud se tedy podaří rozpoznat strukturu farmakoforu, nemusí být hledání předlohových struktur vázáno na jednu skupinu organických sloučenin. Tento druh analýzy rovněž vyžaduje určitou databázi vstupních informací, a často se zde uplatňuje opět metoda systematického screeningu⁶.

Dospěje-li se jednou z uvedených metod k nějaké konečné předlohové struktuře s předpokládanou biologickou aktivitou, lze ji dále modifikovat různými obměnami. Nejčastěji se používají záměny substituentů. V případě, že se jedná o obměnu uvnitř skeletu, lze hovořit o izosterii. Základním předpokladem je, že atomy se stejným počtem valenčních elektronů mohou do molekuly vnést podobné sterické vlastnosti, což může vést k další biologicky aktivní sloučenině. Podstatou izosterie je podobná geometrie molekul, která může vyvolat téměř identickou interakci biologicky aktivních látek s receptory. Podmínkou je, že nesmí být změněna povaha nevazebných interakcí při vazbě na receptor. Jinak by mohlo dojít k vyvolání zcela rozdílné biologické odezvy a z metabolitu se pak může stát antimetabolit, případně vzniknout biologicky neúčinná sloučenina.

Ke strukturním obměnám může docházet i jinými způsoby než obměnou substituentů či pomocí izosterie. Jedná se o obměny týkající se polohové či prostorové izomerie, hydrogenace či dehydrogenace nebo obměn v uhlovodíkových zbytcích a kruzích.

Z hlediska výskytu multirezistentních kmenů mykobaktérií se za nejvýznamnější pokládá vývoj nových antituberkulotik směřovaný na látky o odlišném mechanismu účinku od dnes používaných léčiv.

2. CÍL PRÁCE

Ve skupině prof. Waissera byl vývoj nových potenciálních antituberkulotik směřován na látky o novém mechanismu účinku. Perspektivní se jevíly salicylanilidy a jejich isostery. Cílem práce bylo vypracovat přehled studií, které se zajímaly touto problematikou.

Z předchozího výzkumu vyplynuly některé další úkoly:

1. Vypracovat metodiku, která by umožnila připravovat *N*-heteroarylsalicylamidy za nižších teplot, než jsou používány dnes při jejich přípravě. Některé heterocyklické aminy (např. aminooxazoly) se při 180 °C již rozkládají.
2. Na základě předchozích QSAR studií zvolit skupinu nových salicylanilidů pro syntézu a hodnocení. Využít připraveného souboru látek k přípravě odpovídajících nových 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, 3-aryl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů, které také patří mezi potenciální antituberkulotika.
3. Pokusit se metodikou použitou při přípravě 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů uplatnit při syntéze nových 3-pyridyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů.
4. Vyslovit hypotézu, jakým směrem by se výzkum mohl dále směřovat.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Salicylanilidy

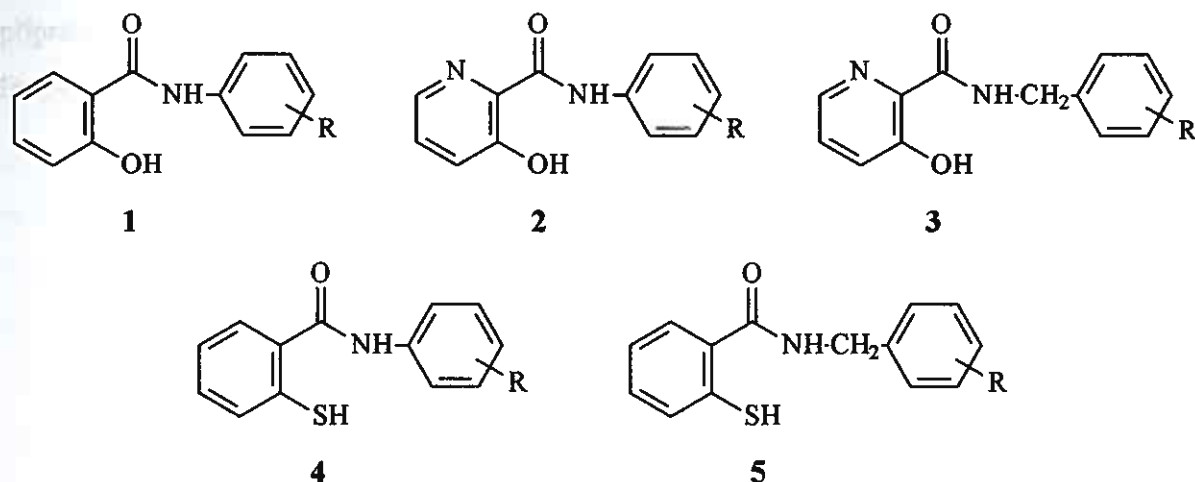
Salicylanilidy pro svoji biologickou aktivitu byly předmětem zájmu řady výzkumných skupin. Byla u nich nalezena obecná antibakteriální aktivita jak proti gram pozitivním tak proti gram negativním bakteriím. Již v roce 1963 byla zjištěna aktivita 5-brom-4-methoxysalicylanilidu. 4,5'-salicylanilid byl doporučován jako účinná látka proti tuberkulóze kůže. Řada strukturních obměn byla spojena s poklesem aktivity. Podobně byla studována jejich antimykotická aktivita, avšak bez většího významu. Dříve než se začalo antimykobakteriální aktivitou zabývat naše pracoviště byla vypracována podrobná rešeršní studie⁷. Nejdůležitější práce⁸ věnovaná obecné antibakteriální aktivitě salicylanilidů vyšla v roce 1990.

První studie zaměřená na antimykobakteriální aktivitu⁹ salicylanilidů vznikla na našem pracovišti mnohem později. V práci bylo připraveno 57 salicylanilidů. Látky byly v acylové části substituované v poloze 5, v anilinové části molekuly v poloze 3' nebo 4'. Substituenty v poloze 5 byly halogeny (fluor, chlor nebo brom), dále nitroskupina. Acylová část byla případně i nesubstituovaná. V anilinové části molekuly v poloze 3' byl přítomen fluor, chlor nebo nitroskupina. Bohatší byla rozmanitost substituentů v poloze 4'. Byl tam přítomen methyl, methoxy skupina, dimethylamino skupina, fluor, chlor, nebo brom. Do souboru byly zařazeny v anilinové části substituované 3', 4'-dichlor deriváty a nesubstituované deriváty. Látky byly hodnoceny na Šulově půdě vůči *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium* při 14 a 21 dnech inkubace. K hodnocení byly používány pouze standardní kmeny (CNTC). Práce byla doplněna QSAR analýzou. Korelační vztahy byly hledány jak přístupem podle Freeho a Wilsona, tak modifikovaným přístupem podle Hansche s přiřazením vlivu elektronových (σ) tak lipofilních (π) lokálních parametrů na výslednou antimykobakteriální aktivitu. V témže roce vznikla ještě jedna práce, jejíž smyslem bylo rozšíření skupiny salicylanilidů o další substituenty v poloze 4' (4'-CN, 4'-CSNH₂, 4'-CF₃, 4'-COOC₂H₅, v acylové části nebyly substituenty)¹⁰ a dále syntéza odpovídajících 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů. Antimykrobiální hodnocení bylo provedeno vůči stejným kmenům jako v předchozí práci. Zmíněná druhá skupina potenciálních antituberkulotik bude probrána však samostatně v další kapitole.

V roce 1998 byly uveřejněny dvě práce pracovníků z R.W. Johnsonova farmaceutického výzkumného ústavu z New Jersey v USA, které ukazovaly na další význam salicylanilidů. Obě studie zjistily ve skupinách salicylanilidů rozdílný mechanismus účinku od

ostatních antibakteriálních látek^{11,12}. Dvoukomponentové systémy se skládají z histidin-proteinkinasy a regulátoru odpovědi. Jsou to signální transdukční umožňující bakteriím vnímat změny v jejich životním prostředí a rychle na ně reagovat. Na jejich základě vznikla jedna z nejrozsáhlejších prací věnovaná antimykobakteriální aktivitě salicylanilidů¹³. Ve studii byla hodnocena antimykobakteriální aktivita více jak 140 látek. Většina z nich byla syntetizována v rámci této práce, nicméně údaje byly doplněny také hodnotami antimykobakteriálních aktivit již dříve připravenými sloučenin kolektivu prof. Weissera. Z QSAR analýzy vyplývalo, že perspektivní je substituce acylové části halogeny a dále zvýšení lipofility sloučenin. Později byla uveřejněna práce, která na nových látkách (anilidech 5-methoxysalicylové kyseliny) potvrdila platnost prognóz korelačních rovnic¹⁴.

Při hledání dalších možností obměn byly hodnoceny strukturální obměny na aktivitu. Strukturální obměny jsou znázorněny na obr. 1.



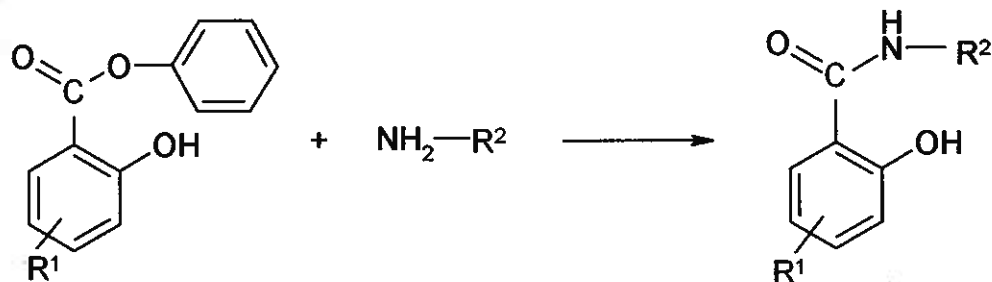
		R		R		
1	a	H	f	4-Br	k	3-NO ₂
2	b	4-CH ₃	g	4-F	l	4-OCH ₃
3	c	4-Cl	h	3-F	m	N(CH ₃) ₂
4	d	3-Cl	i	4-CF ₃	n	COOEt
5	e	3,4-Cl ₂	j	4-NO ₂	o	CN

Obr. 1. Obměny salicylanilidů

Ve skupině obsahující více okolo 50 látek byla hodnocena antimykobakteriální aktivita vůči stejným kmenům jako v předchozích sděleních. QSAR analýza byla provedena

přístupem podle Freeho a Wilsona. Bylo zjištěno, že perspektivní by mohl být přechod od salicylanilidů k *N*-benzylsalicylamidům. Ke zvýšení aktivity také přispívá záměna hydroxyly v salicylamidech za sulfanyl. Naproti tomu záměna v acylovém cyklu uhlíku v poloze 5 za dusík (tj. přechod k derivátům pikolinové kyseliny) se projeví poklesem aktivity. Acylové části molekul nebyly substituovány. Substituční obměny se týkaly pouze amidové části. Ve studii byla sledována i antitungální aktivita, avšak z 9 patogenních kmenů (*Trichophyton mentagrophytes* 445, *Microsporium gypseum*, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Candida albicans* ATCC 44859 and *Microsporium gypseum*) byla aktivita nalezena pouze u dvou (*M. gypseum* a *T. mentagrophytes*). Pouze v těchto dvou případech bylo možné provést analýzu QSAR¹⁵.

Velmi nás zajímalo, jak se antimykobakteriální aktivita změní, když v anilinové části na místo derivátů anilinu budou heterocyklické aminy. Nejprve se jednalo o deriváty pyridinu¹⁶, později i dalších heterocyklických aminů¹⁷. U těchto látek bylo nutné změnit přípravu sloučenin, na místo ze salicylové kyseliny s heterocyklickými aminy reagovaly fenylestery salicylové kyseliny.



U připravených pyridinových analogů salicylanilidů byly řešeny některé teoretické otázky, např. hledány rovnice QSAR¹⁸ hodnocení vlivu sterických zábran na aktivitu¹⁹, přípravu *N*-pyridinyl-5-methylsalicylanilidů²⁰ a obdobných analogů jiných heterocyklických sloučenin²¹. Na některých z těchto řešených otázek se Mgr. Matyk také podílel. Nejdůležitější nově řešené problémy byly:

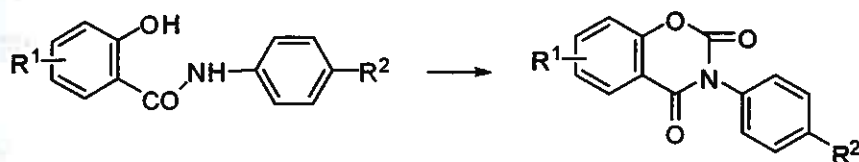
- Podle QSAR studie uveřejněné v citaci¹² připravit skupinu v acylové části halogenem substituovaných *N*-(4-alkylfenyl)salicylamidů a po ověření jejich struktury je předat k hodnocení.
- Zlepšit metodiku přípravy heterocyklických analog salicylamidů, zvláště v případech, kdy při běžném způsobu přípravy dochází k rozkladu látek

3.2. 3-Aryl-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony

Výzkum těchto antimykobakteriálních sloučenin začal na Farmaceutické fakultě UK. První studie byly málo významné. Vycházely ze struktury PAS. Ve studii byly hodnoceny *N,N*-dimethylaminosalicylová kyselina a její anilidy a odpovídající 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony. Aktivita látek byla však velmi nízká²². Proto se další výzkum ubíral jiným směrem. Teprve po 7 letech se pracovní skupina k problematice 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů vrátila²³. Ukázalo se, že antimykobakteriální aktivita není nevýznamná. Bylo nutné sepsat přehledný referát²⁴. Ukázalo se, že se jedná o významnou skupinu biologicky látek (obecná antibakteriální aktivita, antihelmintická aktivita, herbicidní aktivita a u některých látek i analgetická a protizánětlivá aktivita). Pokud se na strukturu látek podíváme, zjistíme, že se jedná o cyklické karbamáty salicylanilidů. Hlavní pozornost pracovní skupiny na Farmaceutické fakultě UK byla však věnována jiným skupinám látek. Proto systematický výzkum 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů byl zahájen teprve v roce 1996²⁵. Látky byly původně nazývány 3-aryl-2*H*,4*H*-benz[e][1,3]oxazine-2,4-diony. Název 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony začal být používán po diskuzi jejich názvosloví s pracovníky redakce Sci. Pharm. z Vídně. Z dnešního pohledu lze oba názvy považovat za správné. První 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony byly hodnoceny MUDr. Želmírou Odlerovou v Ústavu preventivního a klinického lékařství v Bratislavě. Později jejich hodnocení prováděla MUDr. Kaustová ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Protože obě pracovnice se liší experimentální metodikou nelze výsledky obou pracovišť spojovat.

Skupina pracovníků Farmaceutické fakulty UK se zprvu o salicylanilidy příliš nezajímala. Větší význam přikládala 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionům. Bohužel řada salicylanilidů nebyla ani na antimykobakteriální aktivitu hodnocena, i když to byly dostupné látky (výchozí látky pro přípravu 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů)²⁶. Půději však byla problematika antimykobakteriálních 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů řešena spolu s problematikou antimykobakteriálních salicylamidů případně i 3-fenylchinazolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů²⁷. V uvedené práci byly hodnoceny salicylanilidy a jim odpovídající 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony a dále anthranilidy a jim odpovídající 3-fenylchinazolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony. Substituce byly prováděny na fenylu v anilidové části salicylanilidů a anthranilidů a na fenylu vázaném v poloze 3 odpovídajících heterocyklických sloučenin. Bylo zjištěno, že deriváty anthranilové kyseliny a 3-fenylchinazolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů jsou téměř neúčinné.

Nejjednodušší přípravou 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů je reakce odpovídajících salicylanilidů s estery kyseliny chlormravenčí. Pro možné sterické zábrany nejvýhodnějším esterem je methylester.



Jako byla dříve analogicky studována antimykobakteriální aktivita anilidů substituovaných v acylové části v poloze 5 s variací substituentů v amidové části molekul byla připravena skupina 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. V dalším vývoji se projevila antimykobakteriální aktivita 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. Substituční obměny byly zde v poloze 6 a dále na fenylu vázaném v poloze 3. Celkem bylo hodnoceno 90 látek²⁸. V další práci byla skupina 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů již studována spolu s antimykobakteriální aktivitou salicylanilidů používaných k jejich přípravě⁹. Protějškem rozsáhlé studie vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou salicylanilidů¹³ byla studie vztahu mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů²⁹, kde byly hledány vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v souboru téměř 150 látek. Prognostické předpovědi byly však méně významné, než byly provedeny pro salicylanilidy¹⁴. Záměna atomu kyslíku v poloze 1 za atom dusíku byla spojena se ztrátou antimykobakteriální aktivity³⁰. Podobný efekt byl již dříve pozorován u athranilanilidů. Zajímavé bylo zjištění, že antimykobakteriální aktivita salicylanilidů a odpovídajících 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů spolu korelují. Na jejím základě byl vysloven předpoklad podobnosti mechanismů účinku³¹. Podobně jako salicylanilidy, tak i 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony jsou aktivní vůči některým houbám (převážně dermatofitům)³². Jedním z nepříznivých vedlejších účinků je cytotoxicita³³.

Na základě uvedené rešerše vyplynul úkoly:

- a) u syntetizovaných *N*-(4-alkylfeny)salicylamidů připravit odpovídající 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony.
- b) pokusit se o přípravu 3-pyridinyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů.

3.3. 3-Aryl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony a 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony

Mnoho látek, které se dostaly do praxe, obsahovalo thioxo skupinu. Např. lze uvést ethionamid, prothionamid a thiosemikarbazony aromatických aldehydů. Lákavá proto byla záměna u syntetizovaných 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů oxoskupiny za thioxoskupinu. První sdělení, které iniciovalo výzkum těchto látek, vzniklo v rámci spolupráce s Farmaceutickou fakultou vídeňské univerzity³⁴. První thiolaktamy [3-(4-cyklohexylfenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on a 3-(4-cyklohexylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion] překonávaly antimykobakteriální thiolaktamy připravené ve Vídni. Úspěch byl výzvou k dalším syntézám. Jeden rok po tomto poznatku vznikla nová práce³⁵ věnována látkám s chlorem vázaným v poloze 6 a s dalšími obměnami na fenylu fázaném v poloze 3 (H, 4-CH₃, 4-Br, 4-Cl, 3,4-Cl₂ a 3-Cl). Celkem se jednalo o 12 látek. Pro porovnání byly uváděny i hodnoty antimykobakteriální aktivity výchozích 6-chlor-3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. Nové látky výchozí sloučeniny překonávaly antimykobakteriální aktivitou zvláště vůči *M. tuberculosis* a klinicky izolovanému kmenu *M. kansasii* 6509/96 o který bylo rozšířeno hodnocení pomocí standardních kmenů. Toto rozšíření ostravské pracoviště provádělo i v dalších publikacích. Řada nových látek překonávala INH. Výsledky vyvolaly zájem o další navazující studie. Cílem bylo rozšiřování substitučních obměn^{36,37}. Např. v první citované práci nebyl substituent na kruhu B, fenyl byl substituovaný v poloze 4 (COOC₂H₅, CN, CF₃, CSNH₂), ve druhém citovaném sdělení vedle na kruhu B nesubstituovaných sloučenin byly připraveny také 6,8-dichlorderiváty (obměny na fenylu H, 4-Br, 4-CH₃, 4-Cl, 3-Cl) a 3-arylchinazolin-2,4(1*H*, 3*H*)-dithiony (obměny na fenylu H, 4-Br, 4-CH₃, 4-Cl, 3,4-Cl₂). Bylo zjištěno, že zcela neaktivní analogy chinazolinové řady se po záměně oxo skupiny za thioxo skupinu stanou středně silnými antimykobakteriálními sloučeninami. Ze syntetického hlediska je zajímavá záměna substituent ethoxykarbonylu v poloze 4 na fenylu na ethoxythiokarbonyl při přípravě 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů³⁸. Zde však studie uvedených látek končí. Vzbudily však pozornost zahraničních teoretiků³⁹, jimiž bylo vyhodnoceno, že na růstu aktivity se nejvýznamněji podílí záměna oxo skupiny za thioxo skupinu v poloze 4 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. Z provedené rešerše vyplývá, že pokud připravíme 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony, bylo by vhodné se u nich pokusit o záměnu oxo skupin za thioxo skupiny.

3.4. Závěry vyplývající z teoretické části

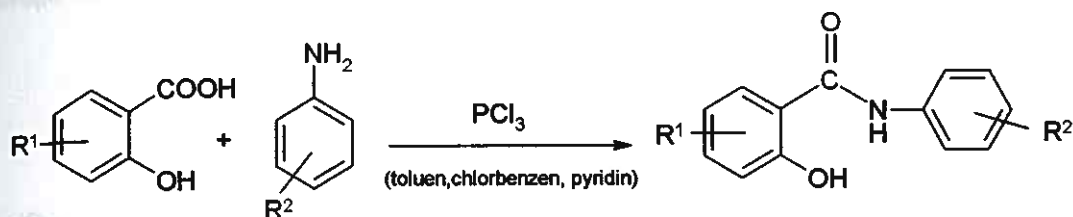
Ve skupině salicylanilidů jsem zvolil *N*-(4-alkylfenyl)salicylamidy, protože růst lipovility v poloze 4 fenylu může zvýšit aktivitu látek.

Kromě uvedeného úkolu je nutné najít účinnější reagentie, které při přípravách *N*-heteroarylsalicylamidů umožnily pracovat při teplotách, kdy ještě nedochází k rozkladu reagujících heterocyklických aminů. Ve skupině dříve připravených *N*-pyridylsalicylaminů bude potřeba studovat jejich cyklizace na 3-pyridyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. V této souvislosti je třeba řešit některé další otázky ve skupině *N*-pyridylsalicylaminů, jako je např. vliv sterické zábrany na antimykobakteriální aktivitu.

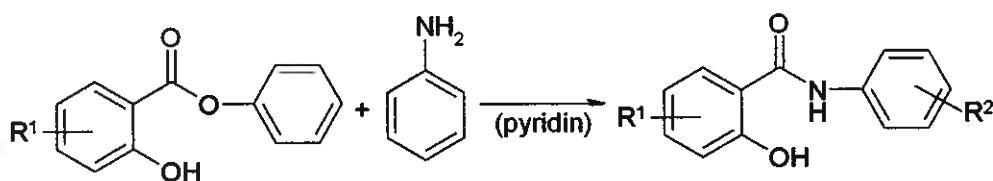
4. METODICKÁ ČÁST

4.1. Syntéza salicylanilidů

Při syntéze salicylanilidů vycházíme z příslušné substituované kyseliny salicylové a anilínu. Reakce probíhá za přítomnosti chloridu fosforitého v chlorbenzenu⁴⁰, nebo pyridinu.

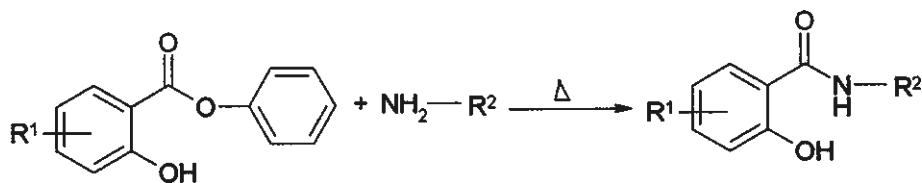


Salicylanilidy je možné také připravit z fenylesteru příslušné salicylové kyseliny^{8,41,42}, a anilínu. Syntézy fenylesterů jsou dobře popsány⁴³.



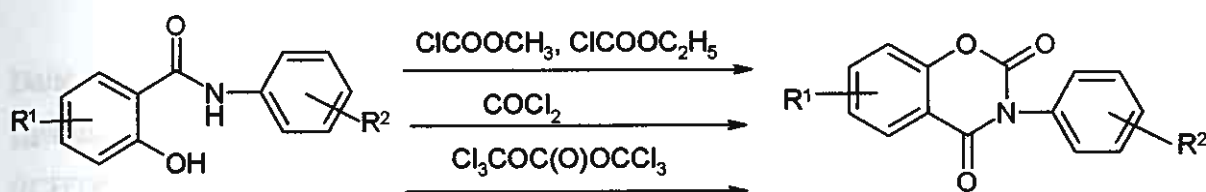
4.2. Syntéza heterocyklických salicylamidů

Jedním z možných postupů přípravy heterocyklických salicylamidů je reakce fenylesteru salicylové kyseliny s aminopyridinem v 1,2,4-trichlorbenzenu nebo tavením fenylesteru salicylové kyseliny s příslušnou heterocyklickou sloučeninou^{8,42} při teplotě 190-210 °C. Výhodou této reakce je absence rozpouštědla. Reakce má však i své nevýhody, zejména v termické nestabilitě některých aminoheterocyklů.

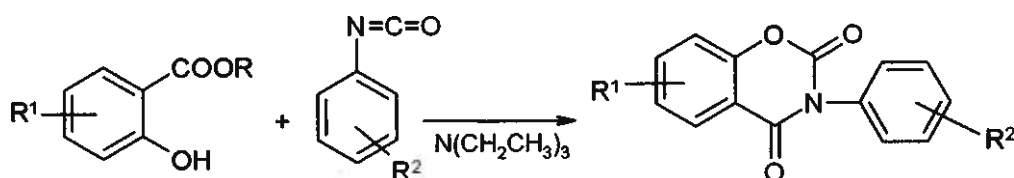


4.3. syntéza 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Výchozími látkami při přípravě syntézy 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů mohou být salicylanilidy. Reakce je prováděna v prostředí pyridinu, toluenu nebo THF. Jako cyklizační činidla lze použít metyl, ethyl ester kyseliny chlormravenčí, fosgen, trifosgen. V reakční směsi je nutná přítomnost pomocné báze (pyridin, triethylamin)^{44,45}, která umožňuje vázat odštěpující vodík z hydroxylové skupiny.

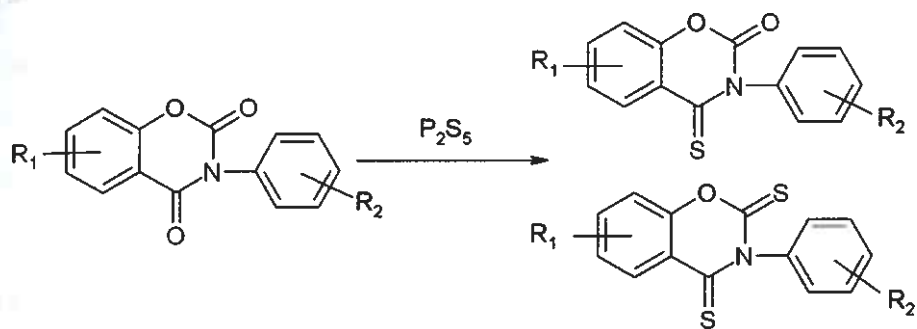


Dalším možným postupem při přípravě 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů je použití methyl nebo ethyl esteru k. salicylové a fenylišokyanátu. Reakce probíhá v prostředí triethylaminu⁴⁶.

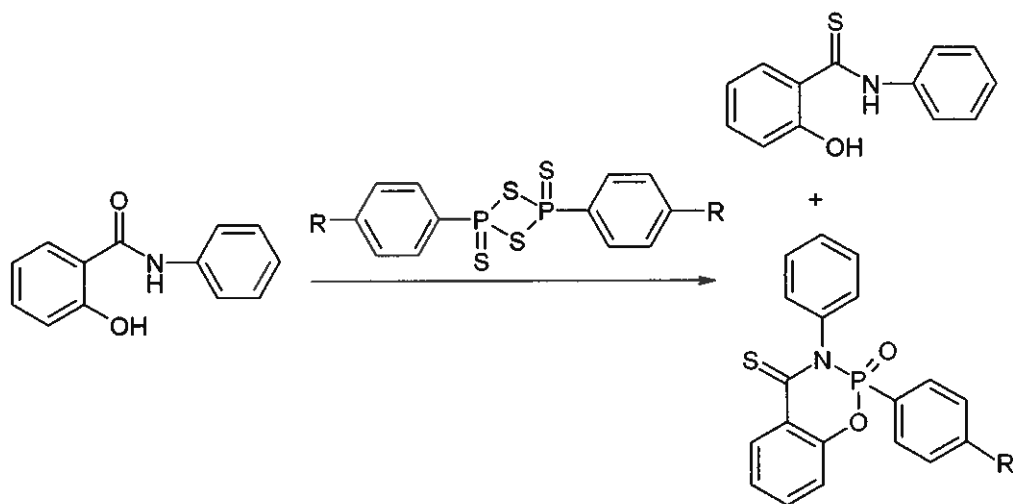


4.4. Syntéza 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-4(3H)thio-2-onů a 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

Substituce karbonylové skupiny za thiokarbonylovou je možná pomocí sulfidu fosforečného^{47,48}. Reakci lze provést za varu v rozpouštědle (toluen, benzen, pyridin)⁴⁴ nebo tavením. Tavením lze výrazně zkrátit reakční dobu. Při této reakci vzniká směs monosírných a disírných produktů.



Další metodou, jak převést karbonylovou skupinu na thiokarbonylovou je použití Lawessonova činidla⁴⁹ Jako rozpouštědlo byl použit hexamethylfosfodiimid $((CH_3)_3N)_3P(O)$. Použitím tohoto rozpouštědla se odstranil problém s rozpustností Lawessonova činidla a minimalizoval se vznik bočních reakcí na hydroxy a aminoskupině. Reakci lze také provést v suchém toluenu nebo benzenu.



4.5 Syntéza 3-heteroaryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Syntéza těchto látek nebyla dosud popsána. S využitím poznatků se syntézou 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů bude vhodné použít již výše popsané postupy.

4.6. Volba postupů

4.6.1 Příprava salicylanilidů

Při syntéze salicylanilidů jsme vycházeli z osvědčeného postupu, kterým je reakce odpovídající kyseliny salicylové s příslušným anilínem. Jako činidlo byl použit chlorid fosforitý. Místo chlorbenzenu byl použit méně toxický a dostupnější toluen.

4.6.2 Příprava heterocyklických salicylamidů

Pro přípravu heterocyklických salicylamidů byl použit postup s fenylesterem salicylové kyseliny a aminoheterocyklem. Z důvodů zvýšení reaktivity byly použity substituované estery v para poloze na fenolové části. Substituenty byly elektron-akceptorové povahy (-NO₂, -Cl, -CF₃).

4.6.3 Příprava 3-(alkyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Pro přípravu byl zvolen postup cyklizace methylchlorformiátem v pyridinu, při kterém se vycházelo z již dříve připravených salicylanilidů. Methylchlorformiát byl záměrně zvolen z důvodu jeho vyšší reaktivity oproti ethylchlorformiátu. Reakci s fosgenem a trifosgenem jsme nerealizovali pro jejich toxické vlastnosti.

4.6.4 Příprava 3-(alkyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4-thio-2(3*H*)-onů a

3-(alkyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

Při syntéze těchto látek bylo použito tavení se sulfidem fosforečným. Reakce je časově nenáročná. Tavení trvá v řádech několika minut. Směs obou látek, které při reakci vznikají lze velmi snadno izolovat na chromatografické koloně

4.6.5 Příprava 3-pyridyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Bylo zvolena příprava jako u 3-(alkyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)dionů. Viz odstavec 4.6.3.

4.7. QSAR

4.7.1. Přehled přístupů

Zkratka QSAR dnes je všeobecně rozšířena a používá se k označení metod hledajících matematické nebo logické vyjádření vztahů mezi strukturou a aktivitou. Byla vytvořena z anglického výrazu Quantitative structure-activity relationships, tj. kvantitativní vztahy mezi strukturou a aktivitou. I když průkopnické práce vznikaly již od konce minulého století⁵⁰ za zakladatele oboru lze považovat Corvina Hansche. Dříve se jednalo o ojedinělé nebo specifické studie, které měly jen omezenou platnost. Hansch vytvořil obecnou rovnici, ve které dal do korelace biologickou aktivitu s fyzikálními a fyzikálně-chemickými parametry⁵¹. Matematickým základem byla regresní rovnice která vyjadřovala vztah mezi parametry biologické aktivity a strukturálními parametry, které byly rozdělovány do 3 skupin, a to na hydrofobní, elektronové a sterické. Z hydrofobních parametrů měl největší význam logaritmus rozdělovacího koeficientu systému oktanol/voda. Dále to byly substituentové konstanty π , fragmentární hydrofobní konstanty f a údaje z rozdělovací chromatografie na tenkých vrstvách (R_M) nebo z kapalinové chromatografie (k'). Z elektronových parametrů to byly Hammettovy konstanty σ a jim odpovídající další konstanty (např. F a R), některé experimentální hodnoty, jako je pK , δ , λ , $E_{1/2}$. Ze sterických parametrů lze uvést Taftovy sterické konstanty, van der Waalsovy atomové průměry, hodnoty minimální sterické deviace (MSD) a minimální topologické deviace (MTD), sterické parametry odvozené od molekulových obrysů a další. Hansch se spolupracovníky v následujících množstvích prací (jejich počet dosahoval snad několik set sdělení) dokázal platnost svého přístupu. Proto může být právem považován za zakladatele oboru. Za druhou významnou metodu opírající se o regresní analýzu, lze považovat přístup podle Freeho a Wilsona⁵². Na rozdíl od Hansche Free a Wilson se nesnažili svůj přístup dokazovat dalšími pracemi, a proto vývoj jejich metody byl později v rukou jiných následovníků. Předpokladem je, že molekulové fragmenty se na výsledné aktivitě podílejí lineárně. V dané metodě se korelaci dává do vztahu k přítomnosti, nebo nepřítomnosti obměňovaných molekulových částí, zpravidla substituentů. Parametry proto nabývají hodnot 0 nebo 1. Aby soustava rovnic byla řešitelná, musí být docíleno nezávislosti závislých proměnných. Toho lze docílit dvojím způsobem. V původním přístupu podle Free a Wilsona byly zavedeny tak zvané „symetrické rovnice“, které předpokládaly, že součet příspěvků molekulových fragmentů na aktivitu v každém obměňovaném místě musí být roven 0. Vypočítané hodnoty vyjadřují odchylky od průměrné hodnoty aktivity celého souboru. Druhý způsob, navržený Fujitou a Banem, při výpočtu vynechá v každém

obměňovaném místě hodnoty odpovídající jednomu substituentu. Výpočet uvádí odchylky od hodnot náležejících vynechanému substituentu (hodnoty vynechaného substituentu jsou rovny 0). Metodika postupů je dobře vysvětlena v příručce používané na naší fakultě⁶. Protože nepoužívá fyzikálních a fyzikálně-chemických parametrů je také nazývána metoda De novo. Přehled dalšího vývoje metody systematicky shromáždil Kubinyi⁵³. Ukazuje se však, že regresní postupy lze používat jen v omezených případech. Často se používá kombinace přístupů podle Hansche, Freeno a Wilsona. Nejjednodušší je zavedení indikátorové proměnné (nabývající také hodnot 0 nebo 1) do Hanschových rovnic. Lze tak chápat, že některou z molekulových změn na místo fyzikálních a fyzikálně-chemických proměnných vyjádříme podobně jako v přístupu podle Free a Wilsona. Druhá možnost je naopak, doplnit proměnné podle Free a Wilsona také dalšími parametry vyjadřujícími fyzikální nebo fyzikálně chemické vlastnosti. Kubinyi⁵³ doporučuje použití logaritmu rozdělovacího koeficientu (nebo jeho druhé mocniny). Další způsob kombinace obou přístupů provede analýzu podle Free a Wilsona, a potom fyzikální vlastnosti látek koreluje s vypočtenými fragmentárními příspěvky na biologickou aktivitu. Na závěr dojde ke vztahům podobným Hanschovým, avšak vzhledem k lokálním částem molekul⁵⁴. Jak v přístupu podle Hansche, tak v přístupu podle Free a Wilsona, se doporučuje pro biologickou aktivitu použít ekviefektivní způsob hodnocení tj. sledují se koncentrace látek, které vyvolají stejnou biologickou odezvu. Doporučuje se také používat logaritmu hodnot koncentrací. Při mikrobiologických hodnoceních je to minimální inhibiční koncentrace (MIC, koncentrace antimikrobiální látky zastavující růst mikrobů) a doporučuje se používat hodnot $\log \text{MIC}$ ⁵⁵. Regresní analýza však nemůže vyřešit veškeré vztahy mezi strukturou a aktivitou. Rozenblit a Golender⁵⁶ rozdělili vztahů struktura-biologická aktivita do skupin: a) biologická aktivita se mění plynule v závislosti na parametrech. b) Biologická aktivita se mění náhle s měnícím se parametrem. c) biologická aktivita na parametrech nezávisí. d) se změnou parametru dochází k uplatnění všech předchozích vztahů, tj. biologická aktivita v určité oblasti na parametrech nezávisí, v určité oblasti dochází k náhlým změnám a v určité oblasti k plynulým změnám. Sám se snažil vytvářet postupy, které by na místo matematiky operovaly s logikou (logickými závislostmi).

Snaha o obsáhnutí kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou i v případech, kde regresní analýza selhávala vedla k hledání dalších postupů. Jednalo se např. o uplatnění metod chemometricky (např. metoda hlavní komponenty), klasifikačních postupů, např. diskriminační analýza, metody rozpoznávání vzorů (obecně nazývané pattern recognition). Na tyto postupy lze jen odkázat na speciální literaturu^{57, 58}.

Poslední dobou do této oblasti stále více zasahuje molekulové modelování a kvantové výpočty. Proto bývalá mezinárodní QSAR Society změnila název na QSAR & Modelling Society.

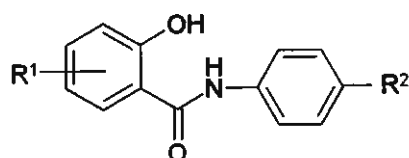
4.7.2. Volba metody

Při volbě metody jsme byli odkázáni na programová vybavení dostupná na fakultě UK. Klemmerou vypracované programy Linreg a Multireg umožňují používat korelační analýzu, a to ať již přístup podle Hansche, tak podle Freeho a Wilsona (případně jejich kombinace). Dále je tu Klemmerou vypracovaný program QSARnew, opírající se o logické vztahy. K dalšímu postupu jsme zvolili program Multireg a přístup podle Free a Wilsona. Aplikace Hanschovy metody na látky podobné látkám této disertace v předchozích sdělení se ukázaly velmi složité a zpravidla musely být zahájeny analýzou podle Freeho a Wilsona (většinou vedly k uplatnění vlivu lokálních parametrů).

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Postup přípravy salicylanilidů

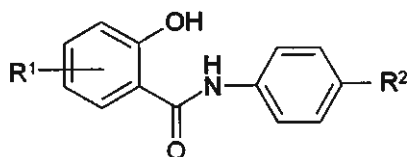
Substituovaná kyselina salicylová byla suspendována v bezvodém toluenu (0,005 molu kyseliny v 20 ml toluenu), poté byl přidán substituovaný anilín a postupně přikapán chlorid fosforitý (0,002 molu). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 3 hodiny, potom se nechala volně chladnout 24 hodin. Produkt byl zfiltrován a rekrystalizován v ethanolu.



$R^1 = 4\text{-Cl}; 5\text{-Cl}; 5\text{-Br}; 3,5\text{-Br}_2$

$R^2 = \text{propyl, butyl, terc-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, oktyl}$

5.1.1. Přehled připravených salicylanilidů



	R^1		R^2		R^2
1	4-Cl	a	4'-propyl	e	4'-hexyl
2	5-Cl	b	4'-butyl	f	4'-heptyl
3	5-Br	c	4'-terc-butyl	g	4'-oktyl
4	3,5-Br ₂	d	4'-pentyl		

4-Chlor-4'-propyl-salicylanilid (1a) T5701

Bílé krystaly, b.t. 187-189 °C. Výtěžek: 71%. Sumární vzorec $C_{16}H_{16}ClNO_2$ (289,76), % nalezeno (vypočteno): C 66,29 (66,32); H 5,59 (5,57); N 4,66 (4,83). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1615. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, s, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H6), 7.63-7.53 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.22-7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.07-6.98 (2H, m, H3, H5), 2.52 (2H, t, $J=7.3$ Hz, CH_2), 1.64-1.48 (2H, m, CH_2), 0.87 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.4, 138.4, 137.6, 135.9, 130.9, 128.8, 121.2, 119.4, 117.1, 117.0, 36.9, 34.3, 13.8.

4-Chlor-4'-butyl-salicylanilid (1b) T5537

Bílé krystaly, b.t. 167-168 °C. Výtěžek: 77%. Sumární vzorec $C_{17}H_{18}ClNO_2$ (303,79), % nalezeno (vypočteno): C 67,51 (67,21); H 6,18 (5,97); N 4,34 (4,61). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1618. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.19 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, s, OH), 7.95 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.61-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.21-7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.03 (1H, d overlapped, $J=1.7$ Hz, H3), 7.02 (1H, dd overlapped, $J=8.5$ Hz, $J=1.7$ Hz, H5), 2.54 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH_2), 1.60-1.46 (2H, m, CH_2), 1.36-1.20 (2H, m, CH_2), 0.88 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.4, 138.6, 137.6, 135.8, 130.9, 128.7, 121.2, 119.4, 117.1, 117.0, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0

4-Chlor-4'-terc-butyl-salicylanilid (1c) T5508

Bílé krystaly, b.t. 232-233 °C. Výtěžek: 76%. Sumární vzorec $C_{17}H_{18}ClNO_2$ (303,79), % nalezeno (vypočteno): C 67,17(67,21); H 6,08 (5,97); N 4,59 (4,61). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1623. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.33 (1H, s, OH), 7.96 (1H, d, $J=9.1$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-7.00 (2H, m, H3, H5), 1.27 (9H, s, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 146.9, 137.6, 135.6, 130.9, 125.6, 120.9, 119.4, 117.1, 34.3, 31.4.

4-Chlor-4'-heptyl-salicylanilid (1f) T5536

Bílé krystaly, b.t. 166-167 °C. Výtěžek: 65%. Sumární vzorec $C_{20}H_{24}ClNO_2$ (345,87), % nalezeno (vypočteno): C 69,54 (69,45); H 6,97 (6,99); N 3,93 (4,05). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1620. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, s, OH), 7.99-7.93 (1H, m, H6), 7.61-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.21-7.11 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-7.00 (2H, m, H3, H5), 2.53 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2), 1.62-1.46 (2H, m, CH_2), 1.32-1.15 (8H, m,

CH₂), 0.83 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.4, 138.6, 137.6, 135.8, 130.9, 128.7, 121.2, 119.4, 117.1, 117.0, 34.8, 31.5, 31.3, 28.8, 28.8, 22.3, 14.2-

4-Chlor-4'-oktyl-salicylanilid (1g) T5509

Bílé krystaly, b.t. 163-164 °C. Výtěžek: 68%. Sumární vzorec C₂₁H₂₆ClNO₂ (359,90), % nalezeno (vypočteno): C 69,91 (70,08); H 7,05 (7,28); N 3,75 (3,89). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1625. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.23 (1H, bs, NH), 10.32 (1H, s, OH), 7.95 (1H, d, J=8.8 Hz, H₆), 7.61-7.53 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.21-7.12 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 7.04-7.00 (2H, m, H₃, H₅), 2.53 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.61-1.45 (2H, m, CH₂), 1.32-1.15 (10H, m, CH₂), 0.83 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.4, 159.2, 138.3, 137.3, 135.6, 130.6, 128.4, 120.9, 119.1, 116.8, 116.8, 34.5, 31.2, 31.0, 28.8, 28.6, 28.6, 22.0, 13.9.

5-Chlor-4'-propyl-salicylanilid (2a) T5702

Bílé krystaly, b.t. 186-187 °C. Výtěžek: 71%. Sumární vzorec C₁₆H₁₆ClNO₂ (289,76), % nalezeno (vypočteno): C 65,92 (66,32); H 5,35 (5,57); N 4,61 (4,83). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1628. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.94 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.00-7.94 (1H, m, H₆), 7.63-7.54 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.49-7.41 (1H, m, H₄), 7.22-7.12 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 6.99 (1H, d, J=8.8 Hz, H₃), 2.52 (2H, t, J=7.3 Hz, CH₂), 1.65-1.47 (2H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, J=7.3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 138.4, 135.8, 133.3, 128.8, 128.5, 1229, 121.1, 119.5, 119.3, 36.9, 24.3, 13.8..

5-Chlor-4'-butyl-salicylanilid (2b) T5538

Bílé krystaly, lit.⁶⁵, b.t. 162-163 °C. Výtěžek: 79%. Sumární vzorec C₁₇H₁₈ClNO₂ (303,79), % nalezeno (vypočteno): C 67,05 (67,21); H 5,95 (5,97); N 4,38 (4,61). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.93 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, J=2.5 Hz, H₆), 7.61-7.55 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.46 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.5 Hz, H₄), 7.22-7.13 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 7.00 (1H, d, J=8.8 Hz, H₃), 2.54 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.60-1.45 (2H, m, CH₂), 1.36-1.21 (2H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, J=7.4 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.5, 119.3, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0.

5-Chlor-4'-terc-butyl-salicylanilid (2c) T5512

Bílé krystaly, lit.⁶⁵, b.t. 221-222 °C. Výtěžek: 73%. Sumární vzorec C₁₇H₁₈ClNO₂ (303,79), % nalezeno (vypočteno): C 67,08 (67,21); H 5,93 (5,97); N 4,61 (4,61). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1627. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.37 (1H, s, OH), 7.98 (1H, d, J=2.6 Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, J=8.9 Hz, J=2.6 Hz, H4), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, J=8.9 Hz, H3), 1.27 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 147.0, 135.6, 133.3, 128.5, 125.6, 122.9, 120.9, 119.4, 34.3, 31.4.

5-Chlor-4'-pentylfenyl-salicylanilid (2d) T5510

Bílé krystaly, b.t. 181-182 °C. Výtěžek: 79%. Sumární vzorec C₁₈H₂₀ClNO₂ (317,82), % nalezeno (vypočteno): C 68,01 (68,03); H 6,46 (6,34); N 4,33 (4,41). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1627. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.94 (1H, bs, NH), 10.36 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, J=2.7 Hz, H6), 7.62-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.7 Hz, H4), 7.21-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, J=8.8 Hz, H3), 2.53 (2H, t, J=7.0 Hz, CH₂), 1.62-1.47 (2H, m, CH₂), 1.36-1.16 (4H, m, CH₂), 0.84 (3H, t, J=7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.5, 119.3, 34.8, 31.1, 30.9, 22.2, 14.2.

5-Chlor-4'-hexyl-salicylanilid (2e) T5512

Bílé krystaly, b.t. 172-173 °C. Výtěžek: 71%. Sumární vzorec C₁₉H₂₂ClNO₂ (331,85), % nalezeno (vypočteno): C 68,91 (68,77); H 6,76 (6,68); N 4,08 (4,22). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1621. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.94 (1H, bs, NH), 10.37 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, J=2.8 Hz, H6), 7.62-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.8 Hz, H4), 7.21-7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, J=8.8 Hz, H3), 2.53 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.60-1.46 (2H, m, CH₂), 1.33-1.17 (6H, m, CH₂), 0.84 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.8, 121.1, 119.5, 119.3, 34.8, 31.3, 31.2, 28.5, 22.3, 17.2

5-Chlor-4'-heptyl-salicylanilid (2f) T5539

Bílé krystaly, b.t. 170-172 °C. Výtěžek: 64%. Sumární vzorec C₂₀H₂₄ClNO₂ (345,87), % nalezeno (vypočteno): C 69,33 (69,45); H 6,96 (6,99); N 3,90 (4,05). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1628. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 7.98 (1H, d, J=2.6 Hz, H6), 7.63-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.6 Hz, H4), 7.20-

7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.99 (1H, d, J=8.8 Hz, H3), 2.52 (2H, t, J=7.1 Hz, CH₂), 1.61-1.44 (2H, m, CH₂), 1.33-1.12 (8H, m, CH₂), 0.83 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.4, 119.3, 34.8, 31.5, 31.3, 28.8, 28.8, 22.3, 14.2.

5-Chlor-4'-oktyl-salicylanilid (2g) T5534

Bílé krystaly, b.t. 170-172 °C. Výtěžek: 77%. Sumární vzorec C₂₁H₂₆ClNO₂ (359,90), % nalezeno (vypočteno): C 69,85 (70,08); H 7,33 (7,28); N 3,69 (3,89). IR: (ν_{c=O}, cm⁻¹) 1628. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.94 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, J=2.6 Hz, H6), 7.61-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.6 Hz, H4), 7.20-7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, J=8.8 Hz, H3), 2.53 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.62-1.47 (2H, m, CH₂), 1.34-1.14 (10H, m, CH₂), 0.83 (3H, t, J=6.6 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 138.7, 135.8, 133.2, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.4, 119.3, 34.8, 31.5, 31.2, 29.1, 28.9, 28.8, 22.3 14.2.

5-Brom-4'-propyl-salicylanilid (3a) T5703

Bílé krystaly, b.t. 196-197 °C Výtěžek: 72%. Sumární vzorec C₁₆H₁₆BrNO₂ (334,22), % nalezeno (vypočteno): C 55,73 (55,50); H 4,62(4,83); N 3,99 (4,19). IR: (ν_{c=O}, cm⁻¹) 1628. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.09 (1H, d J=2.6 Hz, H6), 7.62-7.54 (2H, m, AA', BB' overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd overlapped, J=8.8 Hz, J=2.6 Hz, H4), 7.22-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, J=8.8 Hz, H3), 2.52 (2H, t, J=7.3 Hz, CH₂), 1.66-1.48 (2H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, J=7.3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.7, 138.4, 136.1, 135.8, 131.3, 128.8, 121.1, 120.0, 119.7, 110.3, 36.9, 24.3, 13.8.

5-Brom-4'-butyl-salicylanilid (3b) T5535

Bílé krystaly, b.t. 189-190 °C. Výtěžek: 66%. Sumární vzorec C₁₇H₁₈BrNO₂ (348,24), % nalezeno (vypočteno): C 58,48 (58,63); H 5,13 (5,21); N 3,85 (4,02). IR: (ν_{c=O}, cm⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.09 (1H, d, J=2.2 Hz, H6), 7.63-7.52 (3H, m, H4, H2', H6'), 7.22-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, J=8.8 Hz, H3), 2.54 (2H, t, J=7.5 Hz, CH₂), 1.61-1.45 (2H, m, CH₂), 1.36-1.21 (2H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, J=7.5 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.8, 138.6, 136.1, 135.8, 131.3, 128.7, 121.1, 120.0, 119.7, 110.3, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0.

5-Brom-4'-pentyl-salicylanilid (3d) T5515

Bílé krystaly, b.t. 186-187 °C. Výtěžek: 67%. Sumární vzorec $C_{18}H_{20}BrNO_2$ (359,90), % nalezeno (vypočteno): C 59,46 (59,68); H 5,56 (5,33); N 3,76 (3,87). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1627. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.09 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.62-7.53 (3H, m, H4, H2', H6'), 7.21-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.53 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2), 1.62-1.47 (2H, m, CH_2), 1.37-1.18 (4H, m, CH_2), 0.85 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.7, 138.7, 136.1, 135.8, 131.3, 128.7, 121.1, 120.0, 119.8, 110.3, 34.8, 31.1, 30.9, 22.2, 14.2.

3.55 (2H)

5-Brom-4'-hexyl-salicylanilid (3e) T5513

Bílé krystaly, b.t. 183-184 °C. Výtěžek: 69 %. Sumární vzorec $C_{19}H_{22}BrNO_2$ (376,30), % nalezeno (vypočteno): C 60,50 (60,65); H 5,80 (5,89); N 3,59 (3,72). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1628. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.09 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.61-7.53 (3H, m, H4, H2', H6'), 7.20-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.53 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2), 1.62-1.46 (2H, m, CH_2), 1.32-1.18 (6H, m, CH_2), 0.84 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.7, 138.7, 136.1, 135.8, 131.3, 128.7, 121.1, 120.0, 119.8, 110.3, 34.8, 31.3, 31.2, 28.5, 22.3, 14.2.

3.55

5-Brom-4'-heptyl-salicylanilid (3f) T5540

Bílé krystaly, b.t. 184 °C. Výtěžek: 65 %. Sumární vzorec $C_{20}H_{24}BrNO_2$ (390,32), % nalezeno (vypočteno): C 61,58 (61,54); H 6,20 (6,20); N 3,43 (3,59). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}) 1629. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.99 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.62-7.52 (3H, m, H4, H2', H6'), 7.19-7.12 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.52 (2H, t, $J=7.1$ Hz, CH_2), 1.61-1.45 (2H, m, CH_2), 1.32-1.15 (8H, m, CH_2), 0.83 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.8, 138.7, 136.1, 135.8, 131.3, 128.7, 121.1, 119.9, 119.8, 110.3, 34.8, 31.5, 31.3, 28.8, 28.8, 22.3, 14.2.

2

5-Brom-4'-oktyl-salicylanilid (3g) T5704

Bílé krystaly, b.t. 179-180 °C. Výtěžek: 63 %. Sumární vzorec $C_{21}H_{26}BrNO_2$ (404,35), % nalezeno (vypočteno): C 62,29 (62,38); H 6,47 (6,48); N 3,33 (3,46). IR: ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}). 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.98 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 8.09 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.61-7.54 (3H, m, H4, H2', H6'), 7.20-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.53 (2H, t, $J=7.1$ Hz, CH_2), 1.61-1.45 (2H, m, CH_2), 1.32-1.16 (10H, m,

CH₂), 0.85 (3H, t, J=6.6 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.8, 138.7, 136.1, 135.8, 131.3, 128.7, 121.1, 119.9, 119.7, 110.3, 34.8, 31.5, 31.2, 29.1, 28.9, 28.8, 22.3, 14.2.

3,5-Dibrom-4'-butyl-salicylanilid (4b) T5546

Bílé krystaly, b.t. 119 °C. Výtěžek: 59 %. Sumární vzorec C₁₇H₁₇Br₂NO₂ (427,14), % nalezeno (vypočteno): C 47,67 (47,80); H 3,91 (4,01); N 3,12 (3,28). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1648. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.59 (1H, s, OH), 8.30 (1H, d, J=2.3 Hz, H₆), 8.00 (1H, d, J=2.3 Hz, H₄), 7.59-7.51 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 2.55 (2H, t, J=7.5 Hz, CH₂), 1.60-1.47 (2H, m, CH₂), 1.36-1.22 (2H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, J=7.5 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.8, 156.8, 139.4, 138.8, 135.1, 129.8, 128.7, 122.1, 118.3, 112.5, 110.0, 34.5, 33.3, 21.9, 14.0.

3,5-Dibrom-4'-pentyl-salicylanilid (4d) T5544

Bílé krystaly, b.t. 121 °C. Výtěžek: 52 %. Sumární vzorec C₁₈H₁₉Br₂NO₂ (441,17), % nalezeno (vypočteno): C 48,83 (49,01); H 4,10 (4,34); N 2,95 (3,17). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1650. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.61 (1H, s, OH), 8.30 (1H, d, J=2.3 Hz, H₆), 8.00 (1H, d, J=2.3 Hz, H₄), 7.60-7.55 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 2.55 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.62-1.47 (2H, m, CH₂), 1.37-1.17 (4H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, J=6.9 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.8, 156.9, 139.5, 138.8, 135.0, 129.8, 128.7, 122.1, 118.3, 112.6, 110.0, 34.8, 31.1, 30.9, 22.2, 14.1

3,5-Dibrom-4'-hexyl-salicylanilid (4e) T5543

Bílé krystaly, b.t. 120 °C. Výtěžek: 64 %. Sumární vzorec C₁₉H₂₁Br₂NO₂ (455,19), % nalezeno (vypočteno): C 49,85 (50,14); H 4,60 (4,65); N 2,90 (3,08). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1649. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.59 (1H, s, OH), 8.30 (1H, d, J=2.3 Hz, H₆), 8.00 (1H, d, J=2.3 Hz, H₄), 7.60-7.51 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.23-7.15 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 2.54 (2H, t, J=7.0 Hz, CH₂), 1.62-1.46 (2H, m, CH₂), 1.33-1.18 (6H, m, CH₂), 0.83 (3H, t, J=7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.8, 156.9, 139.5, 138.8, 135.0, 129.8, 128.7, 122.1, 118.3, 112.5, 110.0, 34.8, 31.3, 31.1, 28.5, 22.3, 14.2.

3,5-Dibrom-4'-heptyl-salicylanilid (4f) T5542

Bílé krystaly, b.t. 115-116 °C. Výtěžek: 61 %. Sumární vzorec C₂₀H₂₃Br₂NO₂ (469,22), % nalezeno (vypočteno): C 51,03 (51,20); H 4,79 (4,94); N 2,86 (2,99). IR: (ν_{C=O}, cm⁻¹) 1650. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.59 (1H, s, OH), 8.30 (1H, d, J=2.2 Hz, H₆), 8.00 (1H, d, J=2.2

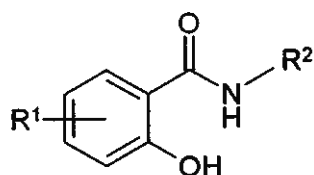
Hz, H4), 7.59-7.51 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.54 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.63-1.47 (2H, m, CH₂), 1.34-1.15 (8H, m, CH₂), 0.84 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.8, 156.8, 139.5, 138.8, 135.0, 129.8, 128.7, 122.1, 118.3, 112.5, 110.0, 34.8, 31.5, 31.2, 28.8, 28.8, 22.3, 14.2.

5.2. Postup přípravy heterocyklických salicylamidů

Při syntéze heterocyklických salicylamidů byl použit fenylester příslušné kyseliny salicylové (0,001 molu) substituovaný chlorem nebo trifluormethylem v poloze para na fenolové části. Na přípravu fenylesteru⁴³ byla použita příslušná kyselina salicylová (0,01 molu) a substituovaný fenol (0,01 molu). Směs byla zahřívána na 80 – 85 °C a poté byl přikapán POCl₃ (0,05 molu). Po uplynutí 3 hodin byla směs nalita do roztoku 10 % NaHCO₃. Produkt byl izolován na chromatografické koloně. Mobilní fáze byla směs hexan-aceton (20:1).

Při syntéze salicylamidů byl použit aminoheterocykl (0,001 molu) a substituovaný salicylát (0,01). Směs byla tavena při teplotě 185 – 210 °C po dobu tří hodin. Půběh reakce byl sledován na TLC chromatografii. U aminothiazolů byla reakční doba zkrácena na 1 hodinu. Vzniklý produkt byl zfiltrován a promyt ethanolem. Na rekrystalizaci byl použit ethanol 96%.

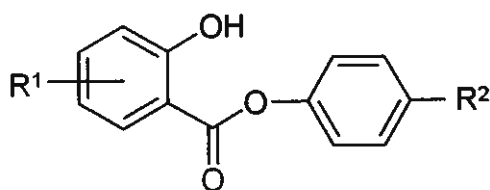
Při syntéze salicylamidů, které obsahovaly izoxazolový kruh bylo nutné použít fenylnsalicylátu substituovaný trifluormethylem v poloze para na fenolové části. Tavení bylo prováděno při teplotě max. 135 °C. Reakční doba byla prodloužena na 24 hodin. Produkt byl izolován na chromatografické koloně. Mobilní fázi jsme použili hexan-aceton v poměru (20 : 1).



R¹ = H, 4-CH₃O, 4-Cl, 5-Cl, 5-F, 5-Br

R² = thiazol-2-yl
 4-methylthiazol-2-yl
 5-methylisoxazol-3-yl
 pyrimidin-2-yl
 4-methylpyrimidin-2-yl
 4,6-dimethylpyrimidin-2-yl

5.2.1. Přehled připravených fenylsalicylátů



	R ¹	R ²
5	H	CF ₃
6	4-CH ₃ O	a

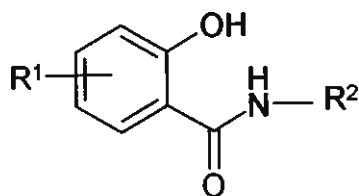
4-Trifluormethylfenyl-salicylát (5a) T5548

Bílé krystaly, b.t. 89-90 °C, výtěžek 48 %. Sumární vzorec C₁₄H₃F₃O₄ (282,22), % nalezeno (vypočteno): C 58,41 (59,58); H 3,36 (3,21); F 20,19 (20,20). IR: (ν_(C=O), cm⁻¹) 1681. ¹H NMR (300 MHz,) δ 10.26 (bs, 1H, OH), 8.02-7.96 (m, 1H, H₆), 7.89-7.82 (m, AA', BB', 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.60-7.51 (m, 3H, H₄, H_{2'}, H_{6'}), 7.09-6.97 (m, 2H, H₃, H₅). ¹³C NMR (75 MHz,) δ 166.2, 160.3, 153.4, 136.3, 131.2, 127.2 (q, J= 3.7 Hz), 127.0 (q, J=32.1 Hz), 124.2 (q, J=272.0 Hz), 123.4, 119.7, 117.9, 113.4.

4-Trifluormethylfenyl-4'-methoxysalicylát (6a) T5547

Bílé krystaly, b.t. 119-121 °C, výtěžek 37 %. Sumární vzorec C₁₂H₁₁F₃O₄ (312,25), % nalezeno (vypočteno): C 57,48 (57,70); H 3,60 (3,55); F 18,20 (18,25). IR: ($\nu_{\text{C=O}}$, cm⁻¹) 1685. ¹H NMR (300 MHz): δ 10.39 (bs, 1H, OH), 7.94 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H6), 7.89-7.79 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 7.59-7.49 (m, AA', BB', 2H, H2', H6'), 6.63-6.59 (m, 2H, H3, H5), 3.83 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz) δ 166.5, 166.0, 163.2, 153.3, 132.6, 127.1 (q, $J=3.7$ Hz), 126.9 (q, $J=32.3$ Hz), 124.2 (q, $J=272.0$ Hz), 123.4, 107.9, 105.2, 101.4, 55.9.

5.2.2. Přehled připravených heterocyklických salicylamidů



	R ¹		R ²
7	H	a	5-methylisoxazol-3-yl
8	4-CH ₃ O	b	thiazol-2-yl
9	4-Cl	c	4-methylthiazol-2-yl
10	5-F	d	4,6-dimethylpyrimidin-2-yl
11	5-Br	e	4-methylpyrimidin-2-yl
12	5-Cl	f	pyrimidin-2-yl

N-(5-Methylisoxazol-3-yl)salicylamid (7a) T5517

Bílé krystaly, b.t. 183-185 °C. výtěžek 22 %, Sumární vzorec C₁₁H₁₀N₂O₃ (218,21), % nalezeno (vypočteno): C 60,71 (60,55); H 4,75 (4,62); N 12, 83(12,84). IR: (ν_(C=O), cm⁻¹) 1653. ¹H NMR (300 MHz) δ 11.73 (bs, 1H, NH), 11.05 (bs, 1H, OH), 7.97 (dd, 1H, J=8.0 Hz, J=1.7 Hz, H6), 7.50-7.41 (m, 1H, H4), 7.05-6.93 (m, 2H, H3, H5), 6.76 (d, 1H, J=0.8 Hz H4'), 2.40 (d, J=0.8 Hz, 3H, CH₃), ¹³C NMR (75 MHz,) δ 170.1, 165.4, 158.1, 157.9, 134.5, 130.3, 119.7, 117.4, 117.2, 97.1, 12.4.

4-Methoxy-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)salicylamid (8a) T5556

Žluté krystaly, b.t. 194-196 °C, výtěžek 26 %. Sumární vzorec C₁₂H₁₂N₂O₄ (248,24), % nalezeno (vypočteno): C 57,90(58,06); H 4,85 (4,87); N 11,11 (11,28). IR: (ν_(C=O), cm⁻¹) 1649. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.12 (bs, 1H, NH), 10.98 (bs, 1H, OH), 7.99 (d, 1H, J=8.8 Hz, H6), 6.73 (bs 1H, H4'), 6.59-6.47 (m, 2H, H3, H5), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 169.9, 166.0, 164.4, 161.0, 158.2, 131.4, 109.0, 106.9, 101.5, 97.3, 55.7, 12.4.

4-Methoxy-*N*-(thiazol-2-yl)salicylamid (8b) T5519

Žluté krystaly, b.t. 264-265 °C, výtěžek 80 %, Sumární vzorec C₁₁H₁₀N₂O₃S (250,28), % nalezeno (vypočteno): C 53,01 (52,79); H 4,21 (4,03); N 11,25 (11,19); S 12,83 (12,82). IR: (ν_(C=O), cm⁻¹) 1669. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.28 (bs, 1H, NH), 7.98 (d, 1H, J=8.8 Hz, H6), 7.53 (d, 1H, J=3.4 Hz, H4'), 7.23 (d, 1H, J=3.4 Hz, H5'), 6.56 (d, 1H, J=8.8 Hz, H5), 6.51 (bs, 1H, H3), 3.78 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 167.2, 164.3, 160.6, 131.9, 131.8, 128.9, 113.6, 109.7, 107.0, 101.5, 55.6.

4-Methoxy-*N*-(4-methylthiazol-2-yl)salicylamid (8c) T5516

Žluté krystaly, b.t. 245-246 °C, výtěžek 85 %. Sumární vzorec C₁₂H₁₂N₂O₃S (264,31), % nalezeno (vypočteno): C 54,33 (54,53); H 4,55 (4,58); N 10,48 (10,60); S 12,20 (12,13). IR: (ν_(C=O), cm⁻¹) 1667. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.39 (bs, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, J=8.8 Hz, H6), 6.73 (s, 1H, H5'), 6.52 (dd, 1H, J=8.8 Hz, J=2.2 Hz, H5), 6.48 (d, 1H, J=2.2 Hz, H3), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 166.9, 164.3, 161.0, 131.7, 110.1, 107.6, 106.9, 101.4, 55.6, 15.8.

4-Chlor-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)salicylamid (9d) T5550

Žluté krystaly, b.t. 264-266 °C. výtěžek 45 %. Sumární vzorec $C_{13}H_{12}ClN_3O_2$ (277,71), % nalezeno (vypočteno): C 56,21 (56,23), H 4,29 (4,36); N 15,09 (15,13); Cl 12,85(12,77). IR: ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1662. 1H NMR (300 MHz): δ 12.09 (bs, 1H, NH), 10.86 (bs, 1H, OH), 7.96 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H6), 7.04-6.96 (m, 3H, H3, H5, H5'), 2.36 (s, 6H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 169.0, 163.8, 158.3, 157.1, 137.9, 132.3, 119.9, 117.8, 116.9, 116.2, 23.6.

4-Chlor-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)salicylamid (9e) T5551

Žluté krystaly, b.t. 276 °C, výtěžek 52 %. Sumární vzorec $C_{12}H_{10}ClN_3O_2$ (263,69), % nalezeno (vypočteno): C 54,40 (54,66); H 3,99 (3,82); N 15,95 (15,94); Cl 13,39 (13,45). IR: ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1683. 1H NMR (300 MHz): δ 12.07 (bs, 1H, NH), 10.94 (bs, 1H, OH), 8.53 (d, 1H, $J=4.9$ Hz, H6'), 7.95 (d, 1H, $J=8.3$ Hz, H6), 7.11 (d, 1H, $J=4.9$ Hz, H5'), 7.05-6.98 (m, 2H, H3, H5), 2.41 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 168.7, 163.6, 158.1, 157.3, 137.9, 132.4, 119.9, 117.9, 117.0, 116.9, 23.8.

5-Fluor-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)salicylamid (10d) T5552

Žluté krystaly, b.t. 275-276 °C, výtěžek 46 %. Sumární vzorec $C_{13}H_{12}FN_3O_2$ (261,26), % nalezeno (vypočteno): C 59,70 (59,77); H 4,48 (4,63); N 16,20 (16,08); F 7,24 (7,27). IR: ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1668. 1H NMR (300 MHz) δ 11.65 (bs, 1H, NH), 10.91 (bs, 1H, OH), 7.70 (dd, 1H, $J=9.5$ Hz, $J=3.3$ Hz H6), 7.36-7.24 (m, 1H, H4), 7.00 (dd overlapped, 1H, $J=9.5$ Hz, $J=4.7$ Hz, H3) 6.98 (s 1H, H5'), 2.35 (s, 6H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz) δ 168.0, 163.0, 155.4 (d, $J=237.4$ Hz), 153.6, 121.0 (d, $J=23.2$ Hz), 119.4 (d, $J=6.6$ Hz), 118.9 (d, $J=7.4$ Hz), 116.3, 115.9 ($J=24.7$ Hz), 23.6

5-Fluor-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)salicylamid (10e) T5553

Žluté krystaly, b.t. 286-287 °C, výtěžek 40 %, Sumární vzorec $C_{12}H_{10}FN_3O_2$ (247,23), % nalezeno (vypočteno): C 58,55 (58,30); H 4,23 (4,08); N 16,87 (17,00); F 7,65 (7,68). IR: ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1682. 1H NMR (300 MHz) δ 11.66 (bs, 1H, NH), 11.01 (bs, 1H, OH), 8.65 (d, 1H, $J=5.1$ Hz, H6'), 7.70 (dd, 1H, $J=9.5$ Hz, $J=3.3$ Hz, H6), 7.36-7.25 (m, 1H, H4), 7.12 (d, 1H, $J=5.1$ Hz, H5'), 7.02 (dd, 1H, $J=9.5$ Hz, $J=4.7$ Hz, H3), 2.42 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz) δ 168.7, 163.0, 158.2, 157.2, 155.4 (d, $J=235.4$ Hz), 153.5, 121.1 (d, $J=23.5$ Hz), 119.5 (d, $J=6.6$ Hz), 118.9 (d, $J=7.4$ Hz), 117.1, 116.0 (d, $J=24.6$ Hz), 23.8.

5-Brom-N-(thiazol-2-yl)salicylamid (11b) T5554

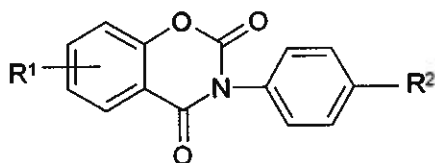
Bílé krystaly, b.t. 272-273 °C, výtěžek 53 %, Sumární vzorec $C_{10}H_7BrN_2O_2S$ (299,15), % nalezeno (vypočteno): C 40,05 (40,15); H 2,53 (2,36); N 9,10 (9,36); Br 26,55 (26,71). IR: ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1668. 1H NMR (300 MHz): δ 12.59 (bs, 1H, NH), 8.03 (d, 1H, $J=2.8$ Hz, H6), 7.59-7.53 (m, 2H, H4, H4'), 7.25 (d, 1H, $J=3.8$ Hz, H5'), 6.94 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 165.6, 157.9, 136.5, 132.3, 120.0, 119.8, 113.6, 110.3.

5-Chlor-N-(pyrimidin-2-yl)salicylamid (12f) T5555

Žluté krystaly, b.t. 99-101 °C, výtěžek 65 %, Sumární vzorec $C_{11}H_8ClN_3O_2$ (249,66), % nalezeno (vypočteno): C 53,10 (52,92); H 3,46 (3,23); N 16,95 (16,83); Cl 14,24 (14,20). IR: ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1697. 1H NMR (300 MHz) δ 8.67 (d, 2H, $J=4.4$ Hz, H4', H6'), 7.80 (d, 1H, $J=2.1$ Hz, H6), 7.23 (dd, 1H, $J=8.7$ Hz, $J=2.1$ Hz, H4), 7.17 (t, 1H, $J=4.4$ Hz, H5'), 6.81 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz) δ 163.8, 163.5, 158.7, 158.1, 133.2, 129.4, 121.6, 119.6, 118.3, 116.7.

5.3. Postup přípravy 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

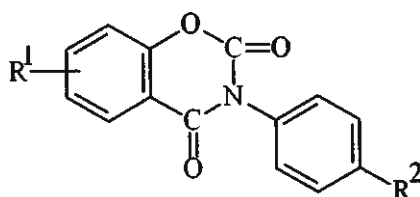
Salicylanilid (0,003 molu) byl rozpuštěn v bezvodém pyridinu. Směs byla 5 minut chlazená na ledové lázni a poté byl za stálého míchání přikapán methylchlorformiát (0,004 molu) Po půl hodině byla reakční nádoba odstraněna z ledové lázně a zahřívána hodinu pod zpětným chladičem. Potom jsme nechali směs volně chladnout a po 24 hodinách byla nalita do 5-ti procentní HCl. Po filtraci byl nadbytečný HCl neutralizován 5-ti procentním roztokem Na_2CO_3 . Vzniklý produkt rekrystalizován v ethanolu. Pro TLC chromatografii byla použita mobilní fáze hexan – aceton v poměru (3:1).



$R^1 = 6\text{-Cl}; 7\text{-Cl}; 6\text{-Br}; 6,8 \text{ Br}_2$

$R^2 = \text{propyl, butyl, terc-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, oktyl}$

5.3.1. Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů



	R ¹		R ²
13	6-Cl	a	propyl
14	7-Cl	b	butyl
15	6-Br	c	<i>terc</i> -butyl
16	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	oktyl

6-Chlor-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (13a) T5705

Bílé krystaly, b.t. 188-190 °C. Výtěžek: 60 %, sumární vzorec C₁₇H₁₄ClNO₃ (315,76); % nalezeno (vypočteno): C 64,32 (64,67); H 4,31 (4,47); N 4,22 (4,44); IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1773, 1703. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95-7.91 (1H, m, H7), 7.89 (1H, d, J=2.4 Hz, H5), 7.56 (1H, d, J=8.5 Hz, H8), 7.36-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.61 (2H, t, J=7.4 Hz, CH₂), 1.73-1.54 (2H, m, CH₂), 0.93 (3H, t, J=7.4 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 147.5, 143.1, 136.1, 132.8, 129.4, 129.1, 128.4, 126.5, 119.0, 116.7, 37.1, 24.2, 14.0.

6-Chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (13b) T5578

Bílé krystaly; b.t. 189-190 °C. Výtěžek: 58 %, sumární vzorec C₁₈H₁₆ClNO₃ (329,79); % nalezeno (vypočteno): C 65,38 (65,59), H 4,88 (4,89), N 4,05 (4,25), IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1771, 1705. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.96-7.87 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, J=8.8 Hz, H8),

7.36-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.64 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH₂), 1.67-1.53 (2H, m, CH₂), 1.43-1.26 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 147.5, 143.3, 136.1, 132.7, 129.4, 129.1, 128.4, 126.5, 119.0, 116.7, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0.

6-Chlor-3-(4-terc-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (13c) T5573

Bílé krystaly, b.t. 215-215 °C. Výtěžek: 61 %, sumární vzorec C₁₈H₁₆ClNO₃ (329,79), % nalezeno (vypočteno): C 65,42 (65,56), H 4,70 (4,89), N 4,12 (4,25), IR ($\nu_{C=O}$, cm⁻¹): 1770, 1709. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.94-7.88 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, dd overlaped, $J=8.8$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.55-7.49 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.33 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 151.4, 147.6, 136.1, 132.6, 129.4, 128.1, 126.5, 126.1, 118.9, 116.7, 34.7, 31.3.

6-Chlor-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (13d) T5563

Bílé krystaly, b.t. 181-182 °C. Výtěžek: 52 %, sumární vzorec C₁₉H₁₈ClNO₃ (343,81), % nalezeno (vypočteno): C 66,54 (66,38), H 5,14 (5,28), N 3,82 (4,07), IR ($\nu_{C=O}$, cm⁻¹): 1773, 1702. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95-7.87 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.36-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.71-1.53 (2H, m, CH₂), 1.43-1.22 (4H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 147.5, 143.3, 136.1, 132.7, 129.4, 129.1, 128.4, 126.5, 118.9, 116.7, 35.0, 31.2, 30.8, 22.2, 14.1.

6-Chlor-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (13e) T5564

Bílé krystaly, b.t. 162-165 °C. Výtěžek: 52 %, sumární vzorec C₂₀H₂₀ClNO₃ (343,81), % nalezeno (vypočteno): C 66,54 (66,38), H 5,14 (5,28), N 3,82 (4,07), IR ($\nu_{C=O}$, cm⁻¹): 1776, 1699. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95-7.88 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.70-1.50 (2H, m, CH₂), 1.40-1.20 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 147.6, 143.3, 136.1, 132.8, 129.4, 129.1, 128.4, 126.5 119.0 116.7, 35.1, 31.3, 31.1, 28.6, 22.3, 14.2.

6-Chlor-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (13g) T5577

Bílé krystaly, b.t. 181-182 °C. Výtěžek: 50 %, sumární vzorec $C_{22}H_{24}ClNO_3$ (343,81), % nalezeno (vypočteno): C 66,54 (66,38), H 5,14 (5,28), N 3,82 (4,07), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1773, 1702. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95-7.87 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.34-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2), 1.69-1.47 (2H, m, CH_2), 1.37-1.17 (10H, m, CH_2), 0.85 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 147.5, 143.3, 136.1, 132.7, 129.4, 129.1, 128.7, 126.5, 118.9, 116.7, 35.1, 31.5, 31.2, 29.1, 29.0, 28.9, 22.3, 14.2.

7-Chlor-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14a) T5706

Bílé krystaly, b.t. 158-160 °C. Výtěžek: 63 %, sumární vzorec $C_{17}H_{14}ClNO_3$ (315,76), % nalezeno (vypočteno): C 64,27 (64,67), H 4,24 (4,47), N 4,13 (4,44), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1777, 1696. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.61 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH_2), 1.71-1.54 (2H, m, CH_2), 0.93 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 143.1, 140.5, 132.8, 129.2, 129.1, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 37.1, 24.2, 14.0.

7-Chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14b) T5576

Bílé krystaly, b.t. 161-162 °C. Výtěžek: 66 %, sumární vzorec $C_{18}H_{16}ClNO_3$ (329,79), % nalezeno (vypočteno): C 65,46 (65,56), H 4,85 (4,89), N 4,04 (4,25), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1776, 1708. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.97 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH_2), 1.67-1.52 (2H, m, CH_2), 1.42-1.25 (2H, m, CH_2), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 143.3, 140.5, 132.8, 129.2, 129.1, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0.

7-Chlor-3-(4-terc-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14c) T5561

Bílé krystaly, b.t. 214-215 °C. Výtěžek: 66 %, sumární vzorec $C_{18}H_{16}ClNO_3$ (329,79), % nalezeno (vypočteno): C 65,29 (65,56), H 4,74 (4,89), N 3,97 (4,25), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1767, 1716. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.55-7.48 (3H, m, H6, H2', H6'), 7.35-7.27 (2H, m, AA', BB' H3', H5'), 1.39 (9H, s, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.4, 153.3, 151.5, 147.7, 140.6, 132.6, 129.3, 128.2, 126.2, 125.9, 125.7, 120.9, 116.9, 114.2, 34.7, 31.4

7-Chlor-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14d) T5559

Bílé krystaly, b.t. 136-137 °C. Výtěžek: 56 %, sumární vzorec $C_{19}H_{18}ClNO_3$ (343,81), % nalezeno (vypočteno): C 66,08 (66,38), H 5,22 (5,28), N 4,04 (4,07), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1777, 1708. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.68-1.52 (2H, m, CH₂), 1.40-1.23 (4H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 143.3, 140.5, 132.8, 129.2, 129.1, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 35.0, 31.2, 30.8, 22.2, 14.1.

7-Chlor-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14e) T5560

Bílé krystaly, b.t. 146-148 °C. Výtěžek: 51 %, sumární vzorec $C_{20}H_{20}ClNO_3$ (357,84), % nalezeno (vypočteno): C 66,93 (67,13), H 5,60 (5,63), N 3,71 (3,91), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1776, 1708. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.97 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.34-7.26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.68-1.46 (2H, m, CH₂), 1.41-1.19 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 143.3, 140.5, 132.8, 129.2, 129.0, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 35.0, 31.3, 31.1, 28.6, 22.3, 14.2.

7-Chlor-3-(4-heptylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14f) T5529

Bílé krystaly, b.t. 134-135 °C. Výtěžek: 56 %, sumární vzorec $C_{21}H_{22}ClNO_3$ (371,87), % nalezeno (vypočteno): C 67,54 (67,83), H 5,68 (5,96), N 3,61 (3,77), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1777, 1708. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=1.7$ Hz, H6), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.70-1.50 (2H, m, CH₂), 1.39-1.17 (8H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 143.3, 140.5, 132.8, 129.2, 129.0, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 35.0, 31.5, 31.1, 28.9, 28.8, 22.3, 14.2

7-Chlor-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (14g) T5562

Bílé krystaly, b.t. 141-142 °C. Výtěžek: 67 %, sumární vzorec $C_{22}H_{24}ClNO_3$ (385,89), % nalezeno (vypočteno): C 68,14 (68,48), H 6,21 (6,27), N 3,52 (3,63), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1777, 1708. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.97 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5), 7.76 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.34-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH_2), 1.70-1.50 (2H, m, CH_2), 1.41-1.15 (10H, m, CH_2), 0.85 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 143.3, 140.5, 132.8, 129.2, 129.1, 128.4, 125.8, 116.8, 114.2, 35.1, 31.5, 31.1, 29.1, 29.0, 28.9, 22.3, 14.2.

6-Brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15a) T5707

Bílé krystaly, b.t. 193-194 °C. Výtěžek: 58 %, sumární vzorec $C_{17}H_{14}BrNO_3$ (360,21), % nalezeno (vypočteno): C 56,32 (56,69), H 4,78 (3,92), N 3,57 (3,89), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1774, 1700. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.06-8.00 (2H, m, H5, H8), 7.49 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=0.6$ Hz, H7), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.61 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2), 1.71-1.55 (2H, m, CH_2), 0.93 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 152.0, 147.5, 143.1, 138.9, 132.8, 129.5, 129.1, 128.4, 119.2, 117.1, 117.0, 37.1, 24.2, 14.0.

6-Brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15b) T5574

Bílé krystaly, b.t. 194-195 °C. Výtěžek: 63 %, sumární vzorec $C_{18}H_{16}BrNO_3$ (374,24), % nalezeno (vypočteno): C 57,28 (57,77), H 4,17 (4,31), N 4,17 (4,31), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1770, 1702. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.06-8.00 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH_2), 1.67-1.51 (2H, m, CH_2), 1.43-1.26 (2H, m, CH_2), 0.92 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 152.0, 147.5, 143.3, 138.9, 132.8, 129.5, 129.1, 128.4, 119.2, 117.1, 117.0, 34.7, 33.3, 22.0, 14.0.

6-Brom-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15d) T5566

Bílé krystaly, b.t. 179-180 °C. Výtěžek: 64 %, sumární vzorec $C_{19}H_{18}BrNO_3$ (388,26), % nalezeno (vypočteno): C 58,84 (58,78), H 4,58 (4,67), N 3,32 (3,61), IR ($\nu_{C=O}$, cm^{-1}): 1777, 1702. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.99 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8),

7.35-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH₂), 1.69-1.54 (2H, m, CH₂), 1.40-1.24 (4H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 152.0, 147.6, 143.4, 139.0, 132.8, 129.6, 129.2, 128.5, 119.3, 117.2, 117.1, 35.1, 31.3, 30.9, 22.3, 14.2

6-Brom-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15e) T5565

Bílé krystaly, b.t. 168-169 °C. Výtěžek: 58 %, sumární vzorec C₂₀H₂₀BrNO₃ (402,29), % nalezeno (vypočteno): C 59,35 (59,71), H 4,92 (5,01), N 3,48 (3,17), IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1774, 1701. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.06-7.99 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.25 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.70-1.52 (2H, m, CH₂), 1.40-1.20 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 147.5, 143.3, 138.9, 132.7, 129.5, 129.1, 128.4, 119.2, 117.1, 117.0, 35.1, 31.3, 31.1, 28.6, 22.3, 14.2

6-Brom-3-(4-heptylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (15f) T5568

Bílé krystaly, b.t. 158-160 °C. Výtěžek: 62 %, sumární vzorec C₂₁H₂₂BrNO₃ (416,32), % nalezeno (vypočteno): C 60,42 (60,59), H 5,31 (5,33), N 3,26 (3,36), IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1774, 1701. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.98 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.34-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH₂), 1.69-1.53 (2H, m, CH₂), 1.40-1.18 (8H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 147.5, 143.3, 138.9, 132.7, 129.5, 129.0, 128.4, 119.2, 117.0, 35.1, 31.5, 31.1, 29.0, 28.8, 22.3, 14.2.

6,8-Dibrom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16b) T5575

Bílé krystaly, b.t. 168-169 °C. Výtěžek: 47 %, sumární vzorec C₁₈H₁₅Br₂NO₃ (453,13), % nalezeno (vypočteno): C 59,35 (59,71), H 4,92 (5,01), N 3,48 (3,17), IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1774, 1701. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H5), 8.05 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H7), 7.36-7.30 (2H, m, AA', BB' H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB' H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.66-1.52 (2H, m, CH₂), 1.42-1.26 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.5, 149.2, 146.9, 143.5, 140.8, 132.6, 129.2, 129.1, 128.3, 118.2, 117.2, 110.8, 34.7, 33.2, 22.0, 14.0

6,8-Dibrom-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16d) T5571

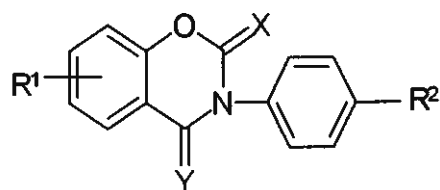
Bílé krystaly, b.t. 197-198 °C. Výtěžek: 58 %, sumární vzorec C₁₉H₁₇Br₂NO₃ (467,13), % nalezeno (vypočteno): C 48,51 (48,85), H 3,54 (3,67), N 3,48 (3,00), IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1780, 1701. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.42 (1H, d, J=2.2 Hz, H5), 8.05 (1H, d, J=2.2 Hz, H7), 7.36-7.23 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, J=7.7 Hz, CH₂), 1.69-1.53 (2H, m, CH₂), 1.39-1.24 (4H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.4, 149.2, 146.9, 143.5, 140.8, 132.6, 129.1, 129.0, 128.2, 118.2, 117.2, 110.8, 35.0, 31.2, 30.8, 22.2, 14.1

6,8-Dibrom-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (16e) T5570

Bílé krystaly, b.t. 196-199 °C. Výtěžek: 48 %, sumární vzorec C₂₀H₁₉Br₂NO₃ (481,19), % nalezeno (vypočteno): C 49,60 (49,92), H 3,85 (3,67), N 3,48 (3,98), IR (ν_{C=O}, cm⁻¹): 1781, 1703. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (1H, d, J=2.3 Hz, H5), 8.05 (1H, d, J=2.3 Hz, H7), 7.36-7.23 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.63 (2H, t, J=7.5 Hz, CH₂), 1.68-1.51 (2H, m, CH₂), 1.40-1.21 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, J=6.9 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.4, 149.2, 146.9, 143.5, 140.8, 132.6, 129.1, 129.1, 128.2, 118.2, 117.2, 110.8, 35.1, 31.3, 31.1, 28.7, 22.3, 14.2.

**5.4. Postup přípravy 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-
zonů a 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů**

Benzoxazindion (0,002 molu) byl smíchán s P₂S₅ (0,002 molu) a taven při 200 °C na kovové lázni po dobu 5 minut. Směs se zbarvila do hnědočervena a poté byla zchlazena. Do baňky se ztuhlou taveninou byl nalit chloroform, aby se tavenina dokonale rozpustila. Následovalo vytřepání s 5 % roztokem NaHCO₃. Směs monosírného a disírného derivátu byla rozdělena na chromatografické koleně. Jako eluční směs byla použita soustava toluen - hexan (1:3). Vniklý produkt byl rekrystalizován v ethanolu.

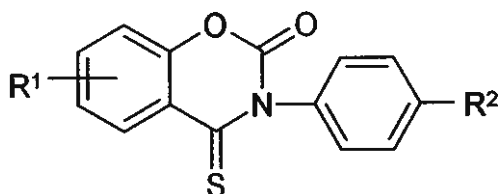


R¹ = 6-Cl, 7-Cl, 6-Br, 6,8-Br₂

R² = propyl, butyl, *tert*-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, oktyl

X = S, O Y = S

5.4.1. Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-onů



	R ¹	a	R ²
17	6-Cl	a	propyl
18	7-Cl	b	butyl
19	6-Br	c	<i>tert</i> -butyl
20	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	oktyl

6-Chlor-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (17g) T5598

Žluté krystaly, b.t. 151-152 °C. Výtěžek: 35 %. Sumární vzorec C₂₂H₂₄ClNO₂S (402,0), % nalezeno (vypočteno): C 65,70 (65,74), H 5,88 (6,02), N 3,23 (3,48). IR (ν_(C=O), cm⁻¹) 1773. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.21 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 7.91 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.55 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.36-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.21 (2H, m,

AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.69-1.52 (2H, m, CH₂), 1.39-1.17 (10H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃)

7-Chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (18b) T5588

Žluté krystaly, b.t. 148-150 °C. Výtěžek: 30 %. Sumární vzorec C₁₈H₁₆ClNO₂S (345,9), % nalezeno (vypočteno): C 62,4 (62,51), H 4,66 (4,44), N 3,93 (3,48), S 3,93 (3,93). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm⁻¹) 1766. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.93 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.1$ Hz, H6), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.22 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH₂), 1.69-1.52 (2H, m, CH₂), 1.42-1.26 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.9, 150.2, 144.5, 143.1, 140.7, 137.6, 133.0, 129.3, 128.0, 126.2, 120.1, 116.8, 34.7, 33.2, 22.0, 14.0

7-Chlor-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (18e) T5590

Žluté krystaly, b.t. 133-134 °C. Výtěžek: 32 %. Sumární vzorec C₂₀H₂₀ClNO₂S (373,9), % nalezeno (vypočteno): C 63,86 (64,25), H 5,19 (5,39), N 3,57 (3,75), S 8,56 (8,58). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm⁻¹) 1781. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.34-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.22 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.69-1.53 (2H, m, CH₂), 1.41-1.21 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.9, 150.2, 144.5, 143.2, 140.7, 137.6, 133.0, 129.3, 128.0, 126.2, 120.1, 116.8, 35.1, 31.3, 31.0, 28.6, 22.3, 14.2

6-Brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (19a) T5709

Žluté krystaly, b.t. 192-194 °C. Výtěžek: 39 %. Sumární vzorec C₁₇H₁₄BrNO₂S (379,3), % nalezeno (vypočteno): C 53,87 (54,27), H 3,56 (3,75), N 3,56 (3,72), S 8,46 (8,52). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm⁻¹) 1760. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.01 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.29-7.23 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.61 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH₂), 1.71-1.55 (2H, m, CH₂), 0.93 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.3, 149.1, 144.5, 143.0, 138.6, 137.7, 133.0, 129.4, 127.9, 122.5, 119.4, 117.4, 37.2, 24.2, 13.9

6-Brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (19b) T5582

Žluté krystaly, b.t. 148-151 °C. Výtěžek: 36 %. Sumární vzorec $C_{18}H_{16}BrNO_2S$ (402,0), % nalezeno (vypočteno): C 55,62 (55,39), H 3,97 (4,13), N 3,37 (3,37), S 8,20 (8,20). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1758. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.4$ Hz, H7), 7.48 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.22 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH_2), 1.67-1.52 (2H, m, CH_2), 1.42-1.23 (2H, m, CH_2), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 144.5, 143.2, 138.6, 137.6, 133.1, 129.4, 128.0, 122.6, 119.4, 117.4, 34.7, 33.2, 22.0, 14.0

6-Brom-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (19d) T5586

Žluté krystaly, b.t. 147-148 °C. Výtěžek: 44 %. Sumární vzorec $C_{19}H_{18}BrNO_2S$ (403,3), % nalezeno (vypočteno): C 56,83 (56,44), H 4,26 (4,49), N 3,20 (3,46), S 8,01 (7,93), IR ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1772. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.22 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2), 1.69-1.52 (2H, m, CH_2), 1.41-1.21 (4H, m, CH_2), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 144.5, 143.2, 138.6, 137.6, 133.1, 129.4, 129.0, 122.5, 119.4, 117.4, 35.0, 31.2, 30.7, 22.2, 14.1.

6-Brom-3-(4-heptylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (19f) T5594

Žluté krystaly, b.t. 136-137 °C. Výtěžek: 37 %. Sumární vzorec $C_{21}H_{22}BrNO_2S$ (432,4), % nalezeno (vypočteno): C 58,20 (58,34), H 5,05 (5,13), N 3,11 (3,24), S 7,57 (7,42); IR ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1774. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.21 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2), 1.67-1.53 (2H, m, CH_2), 1.38-1.18 (8H, m, CH_2), 0.86 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 144.5, 143.2, 138.6, 137.6, 133.0, 129.4, 127.9, 122.5, 119.4, 117.4, 35.1, 31.5, 31.1, 28.9, 28.7, 22.3, 14.2

6-Brom-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (19g) T5580

Žluté krystaly, b.t. 144-145 °C. Výtěžek: 42 %. Sumární vzorec $C_{22}H_{24}BrNO_2S$ (446,4), % nalezeno (vypočteno): C 59,20 (59,19), H 5,50 (5,42), N 3,11 (3,14), S 7,44 (7,18). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm^{-1}) 1773. 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=1.8$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.39-7.18 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.62

(2H, t, $J=7.4$ Hz, CH₂), 1.69-1.50 (2H, m, CH₂), 1.41-1.14 (10H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, $J=6.6$ Hz, CH₃)

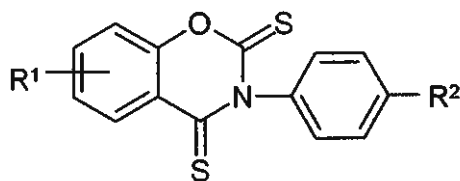
6,8-Dibrom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (20b) T5585

Žluté krystaly, b.t. 218-220 °C. Výtěžek: 32 %. Sumární vzorec C₁₈H₁₅Br₂NO₂S (462,2), % nalezeno (vypočteno): C 45,80 (46,08), H 2,97 (3,22), N 2,81 (2,99), S 7,00 (6,83). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm⁻¹) 1770. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H5), 8.32 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H7), 7.37-7.29 (2H, m, AA', BB' H2', H6'), 7.27-7.21 (2H, m, AA', BB' H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.66-1.51 (2H, m, CH₂), 1.42-1.26 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 190.6, 146.6, 144.0, 143.3, 140.4, 137.5, 123.8, 129.5, 127.8, 123.4, 117.4, 111.2, 34.7, 33.2, 22.1, 14.0.

6,8-Dibrom-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4thioxo-2(3H)-on (20e) T5592

Žluté krystaly, b.t. 187-188 °C. Výtěžek: 35 %. Sumární vzorec C₂₀H₁₉Br₂NO₂S (497,3), % nalezeno (vypočteno): 48,05 (48,31), 3,68 (3,85), 2,67 (2,82), 6,28 (6,45). IR ($\nu_{(C=O)}$, cm⁻¹) 1758. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.32 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H7), 7.36-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.20 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.69-1.52 (2H, m, CH₂), 1.41-1.21 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 190.6, 146.6, 144.0, 143.4, 140.4, 137.5, 132.8, 129.5, 127.8, 123.4, 117.4, 111.1, 35.1, 31.3, 31.0, 28.6, 22.3, 14.2

5.4.2. Přehled připravených 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů



	R ¹		R ²
21	6-Cl	a	propyl
22	7-Cl	b	butyl
23	6-Br	c	<i>terc</i> -butyl
24	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	oktyl

6-Chlor-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (21g) T5599

Červené krystaly, b.t. 94-95 °C. Výtěžek: 30 %. Sumární vzorec $C_{22}H_{24}ClNOS_2$ (418,0), % nalezeno (vypočteno): 63,01 (63,21), 5,76 (5,76), 3,20 (3,35), 15,09 (15,34). 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.12 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H5), 7.93 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.7$ Hz, H7), 7.62 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.34-7.27 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.61 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.69-1.52 (2H, m, CH₂), 1.39-1.16 (10H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 143.1, 141.5, 136.2, 130.7, 130.0, 129.6, 127.7, 123.6, 118.9, 35.1, 31.5, 31.0, 29.0, 28.9, 28.9, 22.3, 14.2

7-Chlor-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (22b) T5589

Červené krystaly, b.t. 147-148 °C. Výtěžek: 32 %. Sumární vzorec $C_{22}H_{24}ClNOS_2$ (361,9), % nalezeno (vypočteno): C 59,42 (59,7), H 4,22 (4,46), N 3,72 (3,87), S 17,53 (17,72). 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.19 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.82 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.1$ Hz, H6), 7.34-7.27 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.66-1.51 (2H, m, CH₂), 1.42-1.25 (2H, m, CH₂), 0.91 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.3, 177.8, 150.1, 143.0, 141.4, 141.2, 133.1, 129.6, 127.8, 127.1, 121.5, 116.5, 34.7, 33.1, 22.0, 14.0

7-Chlor-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (22e) T5591

Červené krystaly, b.t. 117-118 °C. Výtěžek: 29 %. Sumární vzorec $C_{20}H_{20}ClNOS_2$ (390,0), % nalezeno (vypočteno): C 61,55 (61,90), 4,97 (5,17), 3,35 (3,59), 16,76 (16,44). 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.19 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.82 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.34-7.24 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.67-1.50 (2H, m, CH₂), 1.39-1.18 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.4, 177.9, 150.1, 143.0, 141.4, 141.2, 133.1, 129.6, 127.8, 127.1, 121.5, 116.5, 35.1, 31.3, 30.9, 28.6, 22.3, 14.1

6-Brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (23a) T5710

Červené krystaly, b.t. 181-182 °C. Výtěžek: 37 %. Sumární vzorec $C_{17}H_{14}BrNOS_2$ (392,3), % nalezeno (vypočteno): C 51,93 (52,04), 3,37 (3,60), N 3,40 (3,57), S 15,92 (16,05). 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.04 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.35-7.26 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.60 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH₂), 1.71-1.55 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, $J=7.4$ Hz,

CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 142.8, 141.5, 138.9, 133.0, 129.7, 127.7, 123.9, 119.0, 118.5, 37.1, 24.1, 13.9

6-Brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (23b) T5583

Červené krystaly, b.t. 138-140 °C. Výtěžek: 40 %. Sumární vzorec C₁₈H₁₆BrNOS₂ (406,4), % nalezeno (vypočteno): C 53,33 (53,20), H 3,95 (3,97), N 3,50 (3,45), S 15,51 (15,78). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H5), 8.05 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.4 Hz, H7), 7.55 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.35-7.27 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, *J*=7.7 Hz, CH₂), 1.67-1.51 (2H, m, CH₂), 1.42-1.24 (2H, m, CH₂), 0.91 (3H, t, *J*=7.3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 143.0, 141.5, 138.9, 133.1, 129.6, 127.8, 123.9, 119.0, 118.5, 34.7, 33.1, 22.0, 14.0.

6-Brom-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (23d) T5587

Červené krystaly, b.t. 136-138 °C. Výtěžek: 39 %. Sumární vzorec C₁₉H₁₈BrNOS₂ (420,4), % nalezeno (vypočteno): C 53,96 (54,29), H 4,18 (4,32), N 3,19 (3,33), S 15,25 (15,25). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 8.05 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.55 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.35-7.26 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, *J*=7.3 Hz, CH₂), 1.68-1.53 (2H, m, CH₂), 1.39-1.24 (4H, m, CH₂), 0.87 (3H, t, *J*=7.3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 143.1, 141.5, 138.9, 133.1, 129.6, 127.8, 123.9, 119.1, 118.5, 35.0, 31.2, 30.7, 22.2, 14.1.

6-Brom-3-(4-heptylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (23f) T5595

Červené krystaly, b.t. 114-115 °C. Výtěžek: 36 %. Sumární vzorec C₂₁H₂₂BrNOS₂ (448,5), % nalezeno (vypočteno): C 56,08 (56,25), H 4,84 (4,94), N 2,97 (3,12), S 14,17 (14,30). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 8.05 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.55 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.35-7.26 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, *J*=7.7 Hz, CH₂), 1.68-1.52 (2H, m, CH₂), 1.39-1.17 (8H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, *J*=6.7 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 143.1, 141.5, 138.9, 133.1, 129.6, 127.7, 123.9, 119.1, 118.5, 35.1, 31.4, 31.0, 28.9, 28.7, 22.3, 14.2

6-Brom-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (23g) T5581

Červené krystaly, b.t. 96-96 °C. Výtěžek: 31 %. Sumární vzorec C₂₂H₂₄BrNO₂S (462,3), % nalezeno (vypočteno): C 57,20 (57,14), H 5,09 (5,23), N 2,90 (3,03), S 13,12 (13,87). ¹H

NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.04 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.34-7.26 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.61 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.68-1.51 (2H, m, CH₂), 1.38-1.16 (10H, m, CH₂), 0.85 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 143.1, 141.5, 138.9, 133.0, 129.6, 127.7, 123.9, 119.0, 118.5, 35.1, 31.5, 30.9, 29.0, 28.9, 28.9, 22.3, 14.2

6,8-Dibrom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (24b) T5584

Červené krystaly, b.t. 212-215 °C. Výtěžek: 40 %. Sumární vzorec C₁₈H₁₅Br₂NOS₂ (485,3), % nalezeno (vypočteno): C 44,70 (44,85), H 2,93 (3,12), N 2,70 (2,89), S 13,20 (13,22). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.45 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H5), 8.22 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H7), 7.37-7.28 (2H, m AA', BB' H2', H6'), 7.23-7.14 (2H, m AA', BB' H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.67-1.51 (2H, m, CH₂), 1.42-1.24 (2H, m, CH₂), 0.91 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.1, 177.0, 146.8, 143.1, 141.5, 140.5, 132.7, 129.7, 127.6, 124.8, 118.4, 110.6, 34.7, 33.1, 22.0, 14.0

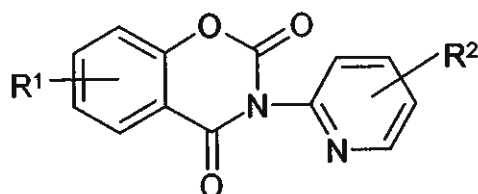
6,8-Dibrom-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (24f) T5593

Červené krystaly, b.t. 145-146 °C. Výtěžek: 33 %. Sumární vzorec C₂₀H₁₉Br₂NOS₂ (513,3), % nalezeno (vypočteno): C 46,55 (46,80), H 3,47 (3,73), N 2,57 (2,73), S 12,35 (12,49). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.45 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.22 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H7), 7.36-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.22-7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.62 (2H, t, $J=7.7$ Hz, CH₂), 1.69-1.52 (2H, m, CH₂), 1.38-1.21 (6H, m, CH₂), 0.86 (3H, t, $J=6.7$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.1, 177.0, 146.8, 143.2, 141.5, 140.6, 132.7, 129.7, 127.6, 124.8, 118.4, 110.6, 35.1, 31.3, 30.9, 28.6, 22.3, 14.1

5.5. Postup přípravy 3-(heteroaryl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Heterocyklický salicylamid byl rozpuštěn v bezvodém pyridinu. Směs byla 5 minut chlazená na ledové lázni a poté byl za stálého míchání přikapán methylchlorformiát. Po půl hodině byla reakční nádoba odstraněna z ledové lázně a zahřívána hodinu pod zpětným chladičem. Potom jsme nechali směs volně chladnout a po 24 hodinách byla nalita do 5-ti procentní HCl. Po filtraci byl nadbytečný HCl neutralizován 5-ti procentním roztokem

Na_2CO_3 . Vzniklý produkt rekrystalizován v ethanolu. Pro TLC chromatografii byla použita mobilní fáze hexan – aceton v poměru (3:1).



$\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}, \text{CH}_3$

	R^1		R^2
25	H	a	H
26	6- CH_3	b	4- CH_3
		c	5- CH_3

3-(Pyridin-2-yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (25a) T5520

Bílé krystaly, b.t. 251-252 °C. Výtěžek 42 %. Sumární vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ (240,22), % nalezeno (vypočteno): C 64,95 (65,00); H 3,41 (3,36); N 11,57 (11,66). IR: ($\nu_{\text{C=O}}$, cm^{-1}) 1774,1700. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.65-8.60 (1H, m, H6'), 8.10-7.97 (2H, m, H5, H4'), 7.93-7.85 (1H, m, H7), 7.66-7.44 (4H, m, H6, H8, H3', H5'). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.7, 152.9, 149.7, 148.7, 147.4, 139.4, 137.0, 127.7, 125.8, 125.1, 124.2, 116.8, 114.7

3-(4-Methylpyridin-2-yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (25b) T5526

Bílé krystaly, b.t. 158-161 °C. Výtěžek 52%, IR: sumární vzorec $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ (254,25), % nalezeno (vypočteno): C 66,16 (66,14); H 3,87 (3,96); N 10,87 (11,02) IR: ($\nu_{\text{C=O}}$, cm^{-1}) 1765,1704. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.47 (d, 1H, $J=4.95$ Hz, H6'), 8.00 (dd, 1H, $J=7.83$ Hz, $J=1.78$ Hz, H5), 7.92 – 7.84 (m, 1H, H7), 7.55 – 7.37 (m, 4H, H6, H8, H2', H5'), 2.40 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.7, 152.9, 150.4, 149.3, 148.6, 147.4, 137.0, 127.6, 125.9, 125.8, 124.5, 116.8, 114.7, 20.6

3-(5-Methylpyridin-2-yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (25c) T5524

Bílé krystaly, b.t. 283-286 °C. Výtěžek 47 %; sumární vzorec $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ (254,25), % nalezeno (vypočteno): C 66,22 (66,14); H 3,99 (3,96); N 10,88 (11,02). IR ($\nu_{\text{C=O}}$, cm^{-1}) 1775, 1697. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.46-8.42 (m, 1H, H6'), 8.02-7.98 (m, 1H, H5), 7.92-

7.81(m,2H, H7, H4'), 7.55-7.44 (m, 3H, H6, H8, H3'), 2.38 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.7, 152.9, 149.7, 147.5, 146.2, 139.6, 136.9, 134.6, 127.7, 125.8, 123.4, 116.8, 114.7, 17.8

6-Methyl-3-(pyridin-2yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (26a) T 5530

Bílé krystaly, b.t. 218-220 °C. Výtěžek 49 %. Sumární vzorec: C₁₄H₁₀N₂O₃ (254,25), % nalezeno (vypočteno): C 65,93 (66,14); H 3,91 (3,96); N 10,86 (11,02). IR: (ν_{c=O}, cm⁻¹) 1768, 1699. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.65-8.59 (1H, m, H6'), 8.05 (1H, dt, *J*=7.7 Hz, *J*=1.9 Hz, H4'), 7.84-7.77 (1H, m, H5), 7.69 (1H, dd, *J*=8.5 Hz, *J*=2.2 Hz, H7), 7.63-7.52 (2H, m, H3', H5'), 7.42 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H8), 2.40 (3H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.7, 151.0, 149.7, 148.6, 147.5, 139.4, 137.7, 135.4, 127.1, 125.0, 124.2, 116.6, 114.3, 20.3

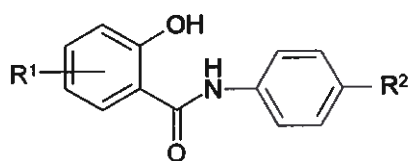
6. BIOLOGICKÁ AKTIVITA LÁTEK

6.1. Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Testování antimykobakteriální aktivity připravených látek bylo provedeno ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. Hodnocení bylo realizováno *in vitro* na kmenech české národní sbírky kmenových kultur (CNCTC) *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 330/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a kmenu *M. kansasii* 6509/96 izolovaném z klinického vzorku od pacienta. Antimykobakteriální aktivita látek byla stanovena na Šulově semisyntetické půdě (SEVAC, Praha), která obsahuje bílkoviny. Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2, 1 a 0,5 μmol dm⁻³. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), která byla stanovena po 14 a 21 dnech při inkubaci při 37 °C, je nejnižší koncentrace testované látky, při které ještě dochází k inhibici růstu. Jako standard bylo použito přední účinné antituberkulotikum isoniazid (INH).

6.1.1. Antimykobakteriální aktivita salicylanilidů

Tabulka č.1 Minimální inhibiční (MIC(μmol/l) salicylanilidů



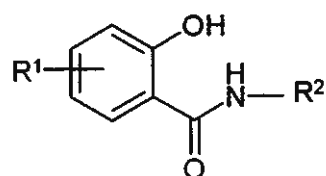
	R ¹		R ²		R ²
1	4-Cl	a	4'-propyl	e	4'-hexyl
2	5-Cl	b	4'-butyl	f	4'-heptyl
3	5-Br	c	4'- <i>terc</i> -butyl	g	4'-oktyl
4	3,5-Br ₂	d	4'-pentyl		

Salicylanilidy			MIC(μmol/l)			
			doba inkubace 14 d/21 dní			
R ¹	R ²		<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
1a	4-Cl	propyl	2/2	8/8	8/32	8/8
1b	4-Cl	butyl	4/4	8/8	8/8	8/8
1c	4-Cl	<i>terc</i> -butyl	16/16	32/62,5	-	32/62,5
1f	4-Cl	heptyl	4/8	8/16	4/8	8/16
1g	4-Cl	oktyl	16/16	16/16	8/16	16/16
2a	5-Cl	propyl	2/2	16/16	8/8	16/16
2b	5-Cl	butyl	4/4	8/8	8/8	4/8
2c	5-Cl	<i>terc</i> -butyl	8/16	16/16	16/32	16/16
2d	5-Cl	pentyl	16/16	16/16	16/16	16/16
2e	5-Cl	hexyl	16/16	16/16	8/16	16/16
2f	5-Cl	heptyl	4/4	8/8	4/8	8/8
2g	5-Cl	oktyl	2/4	4/4	8/32	4/4
3a	5-Br	propyl	2/2	4/8	16/16	4/8
3b	5-Br	butyl	8/8	8/8	8/16	8/8
3d	5-Br	pentyl	8/8	32/32	-	16/16

3e	5-Br	hexyl	8/16	32/32	8/16	16/16
3f	5-Br	heptyl	8/8	8/8	8/8	8/8
3g	5-Br	oktyl	2/4	4/4	8/8	4/4
4b	3,5-Br ₂	butyl	16/32	32/32	62.5/62.5	32/32
4d	3,5-Br ₂	pentyl	32/32	32/32	62.5/62.5	32/32
4e	3,5-Br ₂	hexyl	16/32	32/32	32/62,5	32/32
4f	3,5-Br ₂	heptyl	16/16	32/32	32/32	32/32
INH			1/2	250/250	250/250	8/8

6.1.2. Antimykobakteriální aktivita heterocyklických salicylamidů

Tabulka č.1 Minimální inhibiční (MIC(μmol/l) salicylamidů



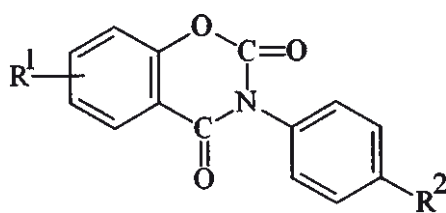
	R ¹		R ²
7	H	a	5-methylisoxazol-3-yl
8	4-CH ₃ O	b	thiazol-2-yl
9	4-Cl	c	4-methylthiazol-2-yl
10	5-F	d	4,6-dimethylpyrimidin-2-yl
11	5-Br	e	4-methylpyrimidin-2-yl
12	5-Cl	f	pyrimidin-2-yl

Salicylamidy			MIC($\mu\text{mol/l}$)			
			doba inkubace 14 dní			
R ¹	R ²		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
			My 331/ 88	My 235/ 80	My 330/ 88	6 509/ 96
7a	H	5-methylthiazol-2yl	-	-	-	-
8a	4-CH ₃ O	5-methylizoxazol-3yl	125	250	250	250
8b	4-CH ₃ O	thiazol-2yl	250	500	500	500
8c	4-CH ₃ O	4-methylthiazol-2yl	125	250	250	250
9d	4-Cl	4,6-dimethylpyrimidin-2yl	n	n	n	n
9e	4-Cl	4-methylpyrimidin-2yl	62,5	1000	500	1000
10d	5-F	4,6-dimethylpyrimidin-2yl	n	n	n	n
10e	5-F	4-methylpyrimidin-2yl	n	n	n	n
11b	5-Br	thiazol-2yl	62,5	250	125	250
12f	5-Cl	pyrimidin-2yl	n	n	n	n
INH			1/2	250/250	250/250	8/8

n- nedošlo k rozpuštění vzorku

6.1.3. Antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Tabulka č.3 Minimální inhibiční (MIC($\mu\text{mol/l}$)) 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů



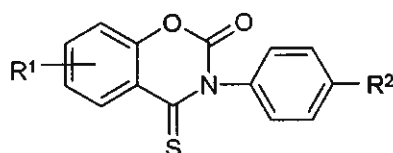
	R ¹		R ²
13	6-Cl	a	propyl
14	7-Cl	b	butyl
15	6-Br	c	<i>terc</i> -butyl
16	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	oktyl

3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-diony			MIC(μmol/l) doba inkubace 14 d/21 dni			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	
		My 331/ 88	My 235/ 80	My 330/ 88	6 509/ 96	
13a	6-Cl	propyl	16/16	8/8	16/16	8/16
13b	6-Cl	butyl	8/8	8/8	8/8	8/16
13c	6-Cl	<i>terc</i> -butyl	8/16	8/16	16/32	8/8
13d	6-Cl	pentyl	8/4	8/16	8/16	8/16
13e	6-Cl	hexyl	8/8	8/16	8/8	8/16
13g	6-Cl	oktyl	8/8	4/8	8/8	4/4
14a	7-Cl	propyl	8/8	8/16	16/16	8/16
14b	7-Cl	butyl	8/8	8/16	16/16	8/16
14c	7-Cl	<i>terc</i> -butyl	4/4	8/16	4/8	8/8
14d	7-Cl	pentyl	8/8	8/8	4/8	8/16
14e	7-Cl	hexyl	4/8	8/8	4/8	8/8
14f	7-Cl	heptyl	16/32	8/8	16/32	8/16
14g	7-Cl	oktyl	8/16	8/16	8/16	8/16
15a	6-Br	propyl	16/16	8/16	16/16	8/16
15b	6-Br	butyl	4/4	8/8	8/8	8/8

15d	6-Br	pentyl	4/4	8/16	8/8	8/8
15e	6-Br	hexyl	4/8	8/16	4/8	8/8
15f	6-Br	heptyl	4/8	8/16	4/4	4/8
16b	6,8-Br ₂	butyl	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
16d	6,8-Br ₂	pentyl	16/32	16/16	62.5	32/32
16e	6,8-Br ₂	hexyl	62.5/62.5	32/32	62.5	62.5/62.5
INH			1/2	250/250	250/250	8/8

6.1.4. Antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-2onů a 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

Tabulka č. 4 Minimální inhibiční (MIC(μmol/l) 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-2onů



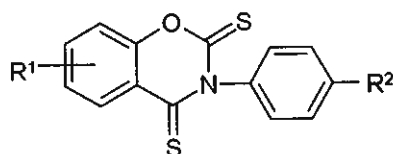
	R ¹		R ²
17	6-Cl	a	propyl
18	7-Cl	b	butyl
19	6-Br	c	terc-butyl
20	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	oktyl

3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-2ony		MIC [μmol/l] doba inkubace 14 d/21 dní			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
17	6-Cl oktyl	4/4	4/4	4/4	4/8
18	7-Cl butyl	16/16	16/16	8/8	8/8

18	7-Cl	hexyl	2/2	8/8	2/2	8/8
19	6-Br	propyl	1/1	8/16	32/32	8/8
19	6-Br	butyl	16/16	16/16	16/32	16/16
19	6-Br	pentyl	32/32	32/32	62.5/62.5	32/32
19	6-Br	heptyl	2/2	4/8	8/16	4/8
19	6-Br	oktyl	8/16	8/16	8/16	8/16
20	6,8-Br ₂	butyl	n/n	32/62.5	n/n	n/n
20	6,8-Br ₂	hexyl	16/32	32/32	n/n	32/32
INH			1/2	250/250	250/250	8/8

6.1.5. Antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

Tabulka č. 5 Minimální inhibiční (MIC(μmol/l)) 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů



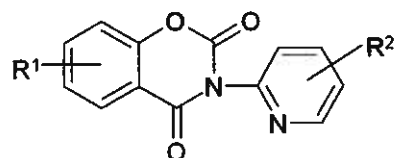
	R ¹		R ²
21	6-Cl	a	propyl
22	7-Cl	b	butyl
23	6-Br	c	terc-butyl
24	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	oktyl

3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů			MIC [μmol/l]			
			doba inkubace 14 d/21 dní			
R ¹	R ²		<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
21	6-Cl	oktyl	2/4	4/8	4/8	4/8
22	7-Cl	butyl	8/8	8/8	4/8	8/8

22	7-Cl	hexyl	2/2	8/8	2/4	8/8
23	6-Br	propyl	1/1	8/16	32/32	8/8
23	6-Br	butyl	32/32	32/32	16/32	16/16
23	6-Br	pentyl	32/32	32/32	16/32	32/32
23	6-Br	heptyl	2/4	4/8	8/8	4/8
23	6-Br	oktyl	8/8	8/8	8/16	4/8
24	6,8 Br ₂	butyl	N/N	N/N	N/N	62.5/62.5
24	6,8 Br ₂	hexyl	32/32	16/32	62.5	32/32
INH			1/2	>250/>250	>250/>250	8/8

6.1.6. Antimykobakteriální aktivita 3-(heteroaryl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

Tabulka č. 6 Minimální inhibiční (MIC(μmol/l)) 3-(heteroaryl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů



	R ¹		R ²
25	H	a	H
26	6-CH ₃	b	4-CH ₃
		c	5-CH ₃

3-(heteroaryl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony			MIC(μmol/l) doba inkubace 14 d/21 dní			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96	
21a	H	H	-	500/500	250/500	500/500
21b	H	4-CH ₃	62,5/125	250/500	125/250	500/500
21c	H	5-CH ₃	62,5/62,5	-	-	250/500
22a	6-CH ₃	H	250/250	500/500	250/250	500/500

6.2. Antimykotická aktivita připravených látek

Salicylanilidy a 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony byly testovány⁵⁹ (4'-propyl-4-chlor-salicylanilid (**1a**), 4'-pentyl-4-chlor-salicylanilid, 4'-propyl-5-chlor-salicylanilid (**2a**), 4'-hexyl-5-chlor-salicylanilid, 4'-terc-butyl-5-chlor-salicylanilid, 4'-butyl-5-brom-salicylanilid, 4'-hexyl-5-brom-salicylanilid, 4'-butyl-3,5-dibrom-salicylanilid (**4b**), 4'-butyl-3,5-dibrom-salicylanilid, 6-chlor-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (**13a**), 7-chlor-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (**14a**), 6-brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (**15a**)) na tyto kmeny: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon beigelii* 1188, *Trichophyton mentagrophytes* 445, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272. Látky však byly účinné pouze vůči *Trichophyton mentagrophytes*.

Tabulka č. 1 Minimální inhibiční koncentrace (MIC; $\mu\text{mol/l}$) halogenovaných 4'-alkylfenylsalicylanilidů a halogenovaných 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů testovaných na kmen *Trichophyton mentagrophytes*

testované látky	MIC ($\mu\text{mol/l}$) doba inkubace 72 h/120 h	testované látky	MIC ($\mu\text{mol/l}$) doba inkubace 72 h/120 h
1a	62.5/62.5	13a	3.91/3.91
2a	3.91/7,81	14a	3.91/3.91
4b	1.95/3.91	15a	1.95/3.91

6.3. Antiproliferativní a cytotoxická aktivita

Z předchozích antimykobakteriálních testů byly vybrány nejaktivnější salicylanilidy⁶¹, (4'-propyl-4-chlor-salicylanilid (**1a**), 4'-propyl-5-chlor-salicylanilid (**2a**), 6-brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-on (**19a**) a 6-brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (**23a**) vybrány k preklinickým testům⁶⁰.

Tabulka č. 1 Antiproliferativní (GI₅₀) und cytotoxická (CC₅₀) activity

Compounds.	L-929	K-562	HeLa
	GI ₅₀ [μg/ml]	GI ₅₀ [μg/ml]	CC ₅₀ [μg/ml]/ CC ₁₀ [μg/ml]
1a	2.5	1.0	4.2 /0.4
2a	2.3	0.5	2.9 /0.4
S.E.M.	0.7	10.3	

GI₅₀ růst inhibice

CC₅₀ cytotoxická koncentrace

6.4. Antimikrobiální aktivita vybraných salicylanilidů

4-chlor-4'-propylsalicylanilid (**1a**) a 5-chlor-4'-propylsalicylanilid (**2a**) byly otestovány na bakteriální kmeny⁶²: *Staphylococcus aureus* 994/MRSA, *Staphylococcus aureus* 134/93 MRSA, *Enterococcus vaccae* 10670, *Mycobacterium smegmatis* SG 987, *Mycobacterium fortuitum* B, *Candida albicans*.

Tabulka č. 1 antimikrobiální aktivita studovaných látek

Mikrobiální kmeny	látky			
	Amphotericin B	Ciprofloxacin	1a	2a
<i>S. aureus</i> 994/93 MRSA	i)	100	1.56	3.12
<i>S. aureus</i> 134/93 MRSA	i)	25	3.12	3.12
<i>Enterococcus faecalis</i> 1528 VRE	i)	0.78	>100	>100
<i>Mycobacterium vaccae</i> 10670	i)	0.4	0.78	0.4
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	i)	0.78	6.25	3.12
<i>Mycobacterium aurum</i> SB66	i)	<0.05	1.56	1.56
<i>Mycobacterium fortuitum</i> B	i)	0.1	0.4	0.4
<i>Candida albicans</i>	0.1	i)	>100	>100

i) neaktivní

7. QSAR VÝPOČTY

V předložené disertaci jsme QSAR výpočty prováděli pouze ve dvou skupinách látek, a to ve skupině v acylové části substituovaných halogenem *N*-(4-alkylfenyl)salicylamidů a skupině v polohách 6 nebo 5 substituovaných halogenem 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. V obou skupinách jsme použili metodu Freeho a Wilsona a to v jejich původní metodice výpočtu. Jedním obměňovaným substitučním místem byla acylová část salicylanilidů nebo substituenty kruhu B v případě 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a druhým byla poloha 4 na fenylu vázaném k atomu dusíku ve skupině salicylanilidů nebo na fenylu vázaném v poloze 3 u 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů).

Výsledky, které jsou shrnuty v následujících tabulkách, byli uveřejněny v našich publikacích^{61,63}. Z QSAR analýzy

Z QSAR analýzy halogenovaných *N*-(4-alkylfenyl)salicylanilidů vyplývá, že na výslednou aktivitu má největší vliv substituce bromem nebo chlorem v poloze 5 v acylové části molekuly. Z alkylů vázaném na fenylu je to propyl a oktyl. Pro další studie jsme zvolili látky na fenylu substituované propylem a v acylové části chlorem, protože při případném použití *in vivo* látky příliš lipofilní nejsou vhodné.

U v polohách 6 nebo 7 substituovaných halogenem 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů výsledky nebyly již tak vyhraněné. Doporučovali bychom substituci bromem v poloze 6 a pentyl jako alkyl v poloze 4 fenylu. Vzhledem k významnější aktivitě halogenovaných *N*-(4-alkylfenyl)salicylanilidů jsme se touto skupinou více nezabývali.

Tabulka č. 1 vypočítané příspěvky substituentů na antimykobakteriální aktivitu halogenovaných *N*-(4-alkylfenyl)salicylanilidů a statistická významnost korelace

Parameter	$\Delta \log \text{MIC} [\mu\text{mol/l}]$			
	inkubace 14 d / 21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
4-Cl	0.0405/-0.0131	0.0303/0.0928	-0.2556/-0.0819	0.0426/0.0912
5-Cl	-0.1193/-0.1357	-0.1121/-0.1584	-0.1936/-0.1439	-0.1161/-0.1294

5-Br	-0.1077/-0.096	-0.099/-0.0793	-0.037/-0.1505	-0.1154/-0.1478
3,5-Br ₂	0.3196/0.3966	0.3067/0.2802	0.6405/0.5219	0.3815/0.3343
4'-propyl	-0.4697/-0.546	-0.1579/-0.1108	0.127/0.0805	-0.1013/-0.0698
4'-butyl	-0.0401/-0.0655	-0.0997/-0.1429	-0.098/-0.0814	-0.1407/-0.1189
4'- <i>tert</i> -butyl	0.2577/0.3466	0.3478/0.3589	0.3586/0.8818	0.3032/0.3874
4'-pentyl	0.3373/0.2178	0.2499/0.2267	0.2415/0.066	0.1857/0.1492
4'-hexyl	0.2373/0.3178	0.2499/0.2267	-0.0716/0.0791	0.1857/0.1492
4'-heptyl	-0.0401/-0.0655	-0.0997/-0.0679	-0.1736/-0.231	-0.0657/-0.0439
4'-oktyl	-0.1697/-0.046	-0.2579/-0.3107	0.027/0.0804	-0.2013/-0.2698
μ_o	0.832/0.927	1.118/1.159	1.035/1.245	1.0772/1.1318
r	0.864/0.925	0.842/0.860	0.965/0.887	0.868/0.888
s	0.254/0.197	0.230/0.219	0.134/0.207	0.2064/0.1865
F	3.91/7.89	3.26/3.81	15.10/4.13	4.14/4.95
n	22/22	22/22	20/20	22/22

Tabulka č. 2 vypočítané příspěvky substituentů na antimykobakteriální aktivitu v polohách 6 nebo 7 substituovaných halogenem 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů a statistická významnost korelace

Parameter	$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/l}$) inkubace 14 d / 21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
R ¹ : 6-Cl	0.0209/-0.207	-0.1121/x	-0.0435/-0.0646	-0.1383/-0.062
7-Cl	-0.0935/-0.0842	-0.0638/x	-0.1504/-0.0569	-0.0696/-0.006
6-Br	-0.2664/-0.2469	0.0023/x	-0.2318/-0.2654	-0.1459/-0.235
6,8-Br ₂	0.6204/0.6494	0.5133/x	0.8247/0.7043	0.7451/0.5321
R ² : propyl	0.2701/0.1744	0.0152/x	0.2991/0.1718	0.0322/0.1585
butyl	-0.0444/-0.1423	0.0901/x	0.0575/-0.0365	0.0572/0.679
<i>tert</i> -butyl	-0.1566/-0.0904	0.0165/x	-0.0458/0.1037	0.0182/-0.208
pentyl	-0.1132/-0.1423	-0.0597/x	-0.0926/-0.0365	-0.0178/0.0002
hexyl	-0.0382/0.0078	0.0153/x	-0.0962/-0.115	0.0572/0.0002
heptyl	0.1371/0.3227	0.0025/x	0.0483/0.054	-0.128/0.028
oktyl	-0.0066/0.0596	-0.1335/x	-0.0458/-0.0464	-0.1318/-0.207
μ_o	0.943/1.043	0.9714/x	1.043/1.157	0.1015/0.1724
r	0.881/0.878	0.928/x	0.915/0.860	0.971/0.901
s	0.2033/0.2087	0.1253/x	0.211/0.238	0.1015/0.1724
F	4.24/4.12	7.57/x	6.25/3.48	20.42/5.25
n	21/21	21/21	21/21	21/21

8. DISKUZE

8.1. Úvod

Průmyslově rozvinuté země (Evropa a Severní Amerika) jsou ohrožovány multirezistentními kmeny mykobaktérií. Tuberkulóza se stává opět vážnou chorobou, na kterou se často umírá. Pátrání po antimykobakteriálně účinných látkách nové struktury se stalo náplní práce mnoha vědeckých ústavů. Zatím co před dvaceti lety Chem. Abstr. zaznamenal do roka okolo 50 sdělení směřovaných na zmíněnou tematiku, v roce 2006 to již bylo 3 000. Do této oblasti je cílená i moje disertace. V diskuzi chci shrnout všechny naše snahy hledání nových struktur potenciálních antituberkulotik. Roztřídiil jsem ji podle struktur připravovaných látek.

8.2. Salicylanilidy

Při syntéze salicylanilidů jsem vycházel osvědčeného postupu (viz odstavec 5.1.). Jako rozpouštědlo jsem však používal toluen, kterým jsem nahradil dosud používaný chlorbenzen. Toluén je méně toxický, levnější a snáze dostupný. Reakce poskytovala přibližně stejné výtěžky jako v chlorbenzenu.

Vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou látek jsem analyzoval metodou podle Freeho-Wilsona. Jednalo se o 22 látek. Soubor dat byl zpracován programem pro vícenásobnou regresní analýzu MULTIREG (Doc. Klemera) v Microsoft Excel. Z výsledků získaných postupem podle Free -Wilsona jsem zjistil, že v acylové části molekuly je antimykobakteriální aktivita vůči *M. tuberculosis* 331/88; *M. kansasii* 235/80 a *M. kansasii* 6509/96 je ovlivněna substituenty v tomto pořadí (nejvíce aktivní-nejméně aktivní) 5-chlor > 5- brom > 4-chlor > 3,5-dibrom. Vůči *M. avium* 330/88 je pořadí ovlivnění aktivity substituenty poněkud jiné (4-chlor > 5-chlor > 5-chlor > 3,5 dibrom).

Anilidové části molekuly jsme zjišťovaly vliv lipofilního řetězce na antimykobakteriální aktivitu. Jednalo se o homologickou řadu substituentů propyl až oktyl, výjimku tvořil *tert*-butyl. U mykobateriálních kmenů *M. tuberculosis* 331/88, *M kansasii* 235/80 a *M kansasii* 6509/96 nejvíce zvyšovaly aktivity tyto alkyly propyl, butyl, heptyl, oktyl. Vliv alkyly na aktivitu vůči *M. avium* 330/88 byl opět odlišný. Ukázalo se, že největší vliv má butyl, hexyl a heptyl.

Minimální inhibiční koncentrace MIC uváděná v ($\mu\text{mol} / \text{l}$) se pohybovala v rozmezí (2 – 62,5). Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu pro *M. tuberculosis* vykazovaly tyto látky 4-propyl-4'-chlor-salicylanilid **1a**, 4-propyl-5'-chlor-salicylanilid **2a**, 4-propyl-5'-brom-salicylanilid. **3a**. Hodnota MIC (14/21 dní inkubace) byla 2/2 ($\mu\text{mol/l}$). Pro srovnání uváděno antituberkulotikum izoniazid (INH), který má MIC 2/1. U patogenních kmenů *M. kansasii* a *M. avium* byly tyto látky účinnější než INH. Jejich mechanismus účinku je pravděpodobně inhibice ATP v bakteriální buňce.

Látky **1a**, **2a** měly také antifungální účinek, ale pouze na kmen *Trichophyton mentagrophytes*. Obě látky byly účinné proti *S. aureus* 994/93 MRSA, (který je rezistentní vůči Ciprofloxacinu), *S. aureus* 134/93 MRSA a rychle roustoucím kmenům mykobakterii.

Vybrané látky **1a**, **2a** byly podrobeny cytotoxickým testům a bylo zjištěno, že se jedná o středně cytotoxické látky. Protože léčba antituberkulotiky probíhá několik měsíců i středně cytotoxické látky nejsou při ni použitelné.

8.3. Heterocyklické salicylamidy

Při syntéze jsme používali reakce fenylsalicylátů s heterocyklickými aminy. Cílem této práce bylo studium zvýšení reakční rychlosti reakce pomocí substituce esterového fenylu. Studie byla nutná pro přípravu isosterů salicylanilidů obsahujících v amidové části isoxazol, neboť samotný 2-aminoisoxazol se rozkládal při teplotě používané při reakci. Substituenty na fenolové části jsme zvolili tak, aby byly elektron-akceptorové povahy ($-\text{NO}_2$, $-\text{Cl}$, CF_3), t.j. s kladnou Hammettovou konstantou v poloze para. Zvětšením kladného náboje na karbonylovém uhlíku u esteru dochází ke snadnějšímu ataku volného el. páru dusíku u aminoheterocyklu. Nejreaktivnější fenylsalicylát byl substituovaný v poloze para skupinou $-\text{CF}_3$ méně reaktivní se ukázal se substituovaných chlorem. 4-nitro-fenylsalicyláty byly pro tuto reakci nevhodné-docházelo k nežádoucím oxidacím.

Pro QSAR analýzu byly vybrán kombinovaný přístup metody podle Freeho-Wilsona a Hansche. Při postupu jsme použili fyzikálně-chemické parametry: $\log P$, $\delta(\text{N-H})$ z $^1\text{H-NMR}$ a dále parametry přítomnosti substituentů v acylové části a druhu heterocyklu v amidové části molekuly. Hodnocení bylo provedeno na 53 až 65 heterocyklických salicylamidech. Růst lipofility vyjádřený pomocí $\log P$ aktivitu snižoval. Naproti tomu elektronakceptorové vlastnosti heterocyklu, vyjádřené hodnotami $\delta(\text{N-H})$ z NMR aktivitu zvyšovaly. Nejúčinnějším heterocyklickým substituentem v druhé části molekuly byl isoxazolyl a benzimidazolyl. Pořadí vlivu substituentů v acylové části při hodnocení aktivity vůči *M.*

tuberculosis bylo 4-CH₃O > 4-CH₃ > 4-Cl > 5-Cl > 5-F, 5-Br. Pořadí u jiných kmenů mykobakterií se však lišilo.

8.4. 3-(4-Alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony

Příprava látek byla provedena v bezvodém pyridinu, byl vyzkoušen i toluen. Nevýhodou toluenu bylo nedokonalé rozpuštění produktu a vzniku suspenze. Výsledkem byla nedělitelná směs anilidu a benzoxazindionu. Proto doporučujeme pyridin. Jako činidlo jsme použily methylchloroformiát, který je reaktivnější než dříve používaný ethylchloroformiát.

Z výsledků antimykobakteriálních testů byla použita QSAR analýza (Metoda Free-Wilsona). Soubor tvořil 22 připravených látek. Zabývali jsme se otázkou, jaký vliv mají halogeny na aromatickém kondezovaném kruhu a také jaký vliv mají alkyly na fenylové části molekuly. Benzoxazindiony můžeme brát jako cyklické isostery salicylanilidů a proto nás také zajímalo jak budou biologicky aktivní v porovnání vůči salicylanilidům. Všechny substituenty (halogeny, alkyly) byly stejné jako u salicylanilidů. Zjistili jsme, že u kmene *M. tuberculosis* nejvíce zvyšuje biolog. aktivitu vázaný brom v poloze 6. Chlor v poloze 6 má přibližně stejný vliv jako v poloze 7. Nejnižší antimykobakteriální aktivitu měly 6,8-dibromované deriváty. Rozsah MIC u celého souboru látek byl mezi 4 - 62,5 (μmol/l.). Nejčastější aktivita byla v rozmezí 4-16 (μmol/l.). U dibromovaných derivátů 32 - 62,5 (μmol/l.). Nejprůhodnějšími byly alkyly o 4-5 atomech uhlíku (např. *terc*butyl, butyl, pentyl.)

Lze konstatovat, že proti patogenním kmenům *M.kansasii* a *M. avium* studované benzoxazindiony jsou účinnější než nejvýznamnější antituberkulotikum INH (a také než odpovídající salicylanilidy). Proti *M. tuberculosis* jsou benzoxaziny méně účinné než salicylanilidy .

Vybrané benzoxazindiony [6-chlor-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion 17a, 7-chlor-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion 18a, 6-brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion 6a] byly testovány na antifungální aktivitu, ale účinné byly pouze na kmen *Trichophyton mentagrophytes*.

8.5. 3-(4-Alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-4-thioxo-2(3H)-ony a 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony

Při syntéze těchto látek jsme sledovali vliv činidla (P₂S₅) na poměr monosírného a disírného produktu. Konkrétně u látky 7-chlor-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-

dion. Při konstantní době reakce, která činila 5 minut, jsme prováděli sérii reakcí s polovičním, ekvimolárním a dvojnásobným počtem molu (P_2S_5). Zjistili jsme, že při použití polovičního počtu molu (P_2S_5) vzniká 2/3 molárního množství monosírného a 1/3 disírného derivátu. Při ekvimolárním množství (P_2S_5) je poměr molárního množství monosírného a disírného derivátu 1:1. Pokud jsme použili dvojnásobného molární množství (P_2S_5) vznikla 1/3 mol. množství monosírného a 2/3 disírného derivátu. K výměně atomu síry za atom kyslíku na karbonylu dochází nejprve v poloze 4. (potvrzeno 2D NMR spektrem).

U látek nemohla být provedena QSAR analýza. Jednalo se o malý soubor látek s mnoha parametry. Byla však zjištěna významná korelace mezi monosírnými a disírnými deriváty. Substitucí karbonylové skupiny za thiokarbonylovou dojde ke zvýšení antimykobakteriální aktivity. Další atom síry v molekule t.j. (3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion) nemá prakticky žádná vliv na zvýšení aktivity. Hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 1- 62,5 ($\mu\text{mol/l}$). Nejvyšší hodnoty MIC vykazovaly dibromované sloučeniny. Vysokou antimykobakteriální aktivitu měly tyto sloučeniny: 6-brom-3-(4-propylfenyl)benzoxazin-4thioxo-2(3*H*)-on 19a, 6-brom-3-(4-propylfenyl)benzoxazin(3*H*)-2,4-dithion *č.* Tyto látky byly účinnější než INH proti všem testovaným kmenům.

8.6. 3-(Heteroaryl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony

U některých heterocyklických salicylanilidů byly zkoušeny reakce s chlormethylformiátem s předpokladem vzniku 3-(heteroaryl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. Dílčích úspěchů bylo dosaženo pouze u reakcí izosterů salicylanilidů, které v amidové části obsahovaly místo fenylu 2-pyridyl. Byly připraveny pouze nesubstituované nebo látky na pyridinu substituované methylem. Methylová skupina jako donor elektronů pravděpodobně zvyšovala hustotu elektronů na atomu dusíku v amidové skupině. Pokud byl přítomen elektron- akceptorový substituent na acylové nebo na pyridinové části molekuly, cyklizace se nedařila. Podobně se nám nepodařilo cyklizovat *N*-(2-thiazolyl)salicylamid.

Antimykobakteriální aktivita připravených látek byla nízká, minimální inhibiční koncentrace se pohybovaly v rozmezí 125 – 1000 ($\mu\text{mol/l}$). Můžeme se domnívat, že u připravených látek se záporně může projevit i sterický efekt methylové skupiny (bránění přístupu k thioamidové skupině).

Pyridinyl byl nahrazen thiazolyem ale také nedocházelo k cyklizaci. Reakčním činidlem byl methylchloroformiát. Pro nízkou biologickou aktivitu dosud připravených látek jsme syntézu dále nerozvíjely, a proto reakce s fosgenem a trifosgenem nebyly uskutečněny.

9. ZÁVĚR

V rámci této disertační práce bylo připraveno celkem 79 látek (potenciálních antituberkulotik). Z toho 2 látky byly popsány v odborné literatuře⁶⁵.

U všech připravených sloučenin byla *in vitro* zjištěna antimykobakteriální aktivita, změřena IČ a NMR spektra, potvrzena jejich struktura, stanoveny některé fyzikálně-chemické vlastnosti a provedena elementární analýza.

Výsledky antimykobakteriálního hodnocení provedené ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě umožnily vypočítat vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou. Analýza výsledků byla provedena pomocí metody QSAR. Antimykobakteriální aktivita připravených salicylanilidů, 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a jejich sirných analog byla velmi dobrá. V případě kmene *M. tuberculosis* My 331/88 se několik derivátů vyrovnalo aktivitě INH, což je soudobé nejúčinnější antituberkulotikum. U příležitostně patogenních kmenů *M. avium* My 330/88, *M. kansasii* My 235/80 a *M. kansasii* 6509/96 byla většina látek účinnější než INH. Ostatní heterocyklické salicylamidy a 3-(4-heteroaryl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony nebyly tolik účinné.

10. LITERATURA


1. HOMOLA J., VOTAVA V.: Tuberkulóza. Karolinum, Praha 2003.
2. HLADŮVKOVÁ J., WAISSER K., KAUSTOVÁ J.: Vývoj chemoterapie tuberkulózy, Česk. Slov. Farm. 50, 2001, 4-11.
3. WAISSER K.: Biologicky aktivní organické látky. Gaudeamus, Hradec Králové 2006
4. KATZUNG B.G., et al.: Základní klinická farmakologie, 2. vydání, H&H, Jinočany 1994.
5. DOLEŽAL T.: Remedia 9, 1999, 255
6. WAISSER K., PALÁT K.: Bioorganická chemie, 2. vydání, Karolinum, Praha 2001.
7. KUBICOVÁ L., WAISSER K.: Biologická aktivita salicylanilidů. Českoslov. Farm. 41, 1992 208-216
8. DAIDONE O., MAGGI B., SCHILLACI D., : Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimycobacterial activity. Pharmazie, 45, 1990, 441-447.
9. WAISSER K., HLADŮVKOVÁ J., KUNEŠ J., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KARAJANNIS P., KAUSTOVÁ J.: Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in position 5. Chem. Pap. 55, 2001, 121-129.
10. WAISSER K., GREGOR J., HOLÝ P., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: Antimykobakteriální salicylanilidy a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)- diony. Česk. Slov. Farm. 50, 2001, 148-152
11. HLASTA D. J., DEMERS J. P., FOLENO B. D., FRAGO-SPANO S. A., GUAN J., HILLIAR J. J., MACIELANG M. J., OHEMENG K. A., SHEPPARD CH. M., SUI Z., WEBB G. C., WEIDNER-WELL, M. A., WERBLOOD H., BARREN J. F.: Novel inhibitors of bacterial two-component system with grampositive antibacterial activity. Pharmacophore identification based on the screening hit closantel. Biorg. Med. Chem. Letters 8, 1998, 1923-1938.
12. MACIELANG M. J., DEMERS J. P., FRAGO-SPANO S. A., HLASTA D. J., JOHNSON S. G., KANOI I. M., RUSSEL R. K., SUI Z., WEIDNER-WELL, M. A., WERBLOOD H., FOLENO B. D., GOLDSCHMIEDT R. M., LOELOFF M. L., WEBB G. C., BARRETT J. F.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory system in bacteria. J. Med. Chem. 41, 1998, 2939-2943

13. WAISSER K., BUREŠ O., HOLÝ P., KUNEŠ J., OSWALD R., JIRÁSKOVÁ L., POUR M., KLIMEŠOVÁ V., KUBICOVÁ L., KAUSTOVÁ J.: Relationships between structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanides. *Arch. Pharm.* 336, 2003, 53-71.
14. WAISSER K., PEŘINA M., HOLÝ P., POUR M., BUREŠ O., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., BUCHTA V., KUBANOVÁ P., KAUSTOVÁ J.: Antimycobacterial and antifungal isosters of salicylamides. *Arch. Pharm.* 336, 2003, 322-335.
15. WAISSER K., OSWALD R., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Antimycobacterial activity of 4-methoxysalicylanilides and 7-methoxy-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31-32, 2004, 33-40.
16. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: Antimycobacterial *N*-pyridinylsalicylamides, isosters of salicylamides. *Farmaco*, 59, 2004, 615-625.
17. MATYK J., WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., PALÁT K. JR., KAUSTOVÁ J.: Heterocyclic isosters of antimycobacterial salicylanilides. *Farmaco* 60, 2005, 399-408.
18. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., PALÁT K.: QSAR analysis of antimycobacterial *N*-pyridinylsalicylamides. *Folia Pharmaceutica Univ. Carol.* 33, 2005, 7-11.
19. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Heterocyclic Isosters of Antimycobacterial Salicylanilides: *N*-Pyridyl-salicylamide with Steric Hindrance of Amide Group. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31-32, 2004, 41-46.
20. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Study of antimycobacterial 5-methyl-*N*-pyridylsalicylamides. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31-32, 2004, 53-58.
21. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Heterocyclic Isosters of Antimycobacterial 5-Methylsalicylanilides with other heterocyclic moiety as pyridine. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31-32, 2004, 47-52.
22. WAISSER K., ČECH J., MACHÁČEK M., VANŽURA J., ČELADNÍK M., ODLEROVÁ Ž.: 4-dimethylaminosalicylanilid. *Česk. Farm.* 35, 1986, 220-273.
23. WAISSER K., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., ODLEROVÁ Ž.: New group of antituberculotics: 3-aryl-2*H*,4*H*-benz[e][1,3]oxazine-2,4-diones. Comparison of the Topliss approach with regression analysis. *Collect. Czech Chem. Commun.* 58, 1993, 2977-2982.

24. WAISSER K., KUBICOVÁ L.: Biologické účinky látek podobných salicylanilidům. 3-Aryl-2*H*,4*H*-benz[e][1,3]oxazin-2,4-diony a thiosalicylanilidy. Česk. Farm. 42, 1993, 218-222.
25. WAISSER K., HLADŮVKOVÁ J., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., BUCHTA V., ODLEROVÁ Ž.: Differences between the structure and activity of potentially antimycobacterial and antifungal compounds. 3-Aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. Comparison of the Topliss approach with regression analysis. Sci. Pharm. 64, 1996, 701-707.
26. WAISSER K., HLADŮVKOVÁ J., GREGOR J., RADA T., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: Relationships between the chemical structure of antimycobacterial substances and their activity against atypical strains. Part 14: 3-Aryl-6,8-dihalogeno-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. Arch. Pharm. (Pharm. Med. Chem.) 331, 1998, 3-6.
27. WAISSER K., MACHÁČEK M., DOSTÁL H., GREGOR J., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KUNEŠ J., PALÁT K. JR., HLADŮVKOVÁ J., KAUSTOVÁ J., MÖLLMANN U.: Relationships between the chemical structure of substances and their antimycobacterial activity against atypical strains. Part 18. 3-Fenyl-2,4-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones and isosteric 3-Fenylquinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones. Collect. Czech. Chem. Commun 64, 1999, 1902-1924.
28. WAISSER K., HLADŮVKOVÁ J., HOLÝ P., MACHÁČEK M., KARAJANNIS P., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: 2*H*-1,3-Benzoxazin-2,4(3*H*)-diones substituted in position 6 as antimycobacterial agents. Chem. Pap. 55, 2001, 323-334.
29. WAISSER K., BUREŠ O., HOLÝ P., KUNEŠ J., OSWALD R., JIRÁSKOVÁ L., POUR M., PALÁT K., KAUSTOVÁ J., DANSE H.-M., MÖLLMANN U.: Antimycobacterial 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. Pharmazie 58, 2003, 83-94.
30. WAISSER K., GREGOR J., DOSTÁL H., KUNEŠ J., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: Influence of the replacement of the oxo function with the thioxo group on the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichloro-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones and 3-arylquinazoline-2,4(1*H*, 3*H*)-diones. Farmaco, 56, 2001, 803-807.

31. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., HOLÝ P., PALÁT K. JR., KAUSTOVÁ J.: Correlation of antimycobacterial activity of substituted salicylanilides and 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 29-30, 2003, 17-20.
32. WAISSER K., KUBICOVÁ L., BUCHTA V., KUBANOVÁ P., JIRÁSKOVÁ L., BEDNAŘÍK O., BUREŠ O., HOLÝ P.: *In vitro* antifungal activity of 3-fenyl-2*H*-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. *Folia Microbiol.* 47, 2002, 488-492.
33. DANSE H.-M., MÖLLMANN U., WAISSER K., PALÁT K. JR., BUREŠ O., HOLÝ P.: Antiproliferative and cytotoxic activities of derivatives of 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dione. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 27-28, 2002, 29-34.
34. WAISSER K., KUBICOVÁ L., KAUSTOVÁ J., BARTSCH J., ERKER T., HANUŠ VL.: Some antimycobacterial thiolactams. *Sci. Pharm.* 67, 1999, 123-127.
35. WAISSER K., GREGOR J., KUBICOVÁ J., KLIMEŠOVÁ V., KUNEŠ J., MACHÁČEK M., KAUSTOVÁ J.: New group of antimycobacterial agents: 6-chlor-3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-ones and 6-chlor-3-fenyl-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithions. *Eur. J. Med. Chem.* 35, 2000, 733-741.
36. WAISSER K., GREGOR J., HOLÝ P., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: Antimykobakteriální salicylanilidy a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony (Antimycobacterial salicylanilides and 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones). *Česk. Slov. Farm.* 50, 2001, 148-152.
37. WAISSER K., GREGOR J., DOSTÁL H., KUNEŠ J., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: Influence of the replacement of the oxo function with the thioxo group on the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichlor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diones and 3-arylquinazoline-2,4(1*H*, 3*H*)-diones. *Farmaco*, 56, 2001, 803-807.
38. WAISSER K., HOLÝ P., BUREŠ O., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Nové skupiny potenciálních antituberkulotik: 3-(4-ethoxythiokarbonylfenyl)-2*H*-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony a 3-(4-ethoxythiokarbonylfenyl)-4-thioxy-2*H*-benzoxazin-2(3*H*)-ony. *Česk. Slov. Farm.* 52, 2003, 42-47.
39. GALLEGOS A., CARBÓ-DORCA R., PONEC R., WAISSER K.: Similarity approach to QSAR. Application to antimycobacterial benzoxazins. *Int. J. Pharmaceutics* 269, 2004, 51-60.
40. LEMAIRE H., SCHRAMM C. H., CAHN A.: Synthesis and gemicidal activity of halogenated salicylanilides and related compounds. *J. Pharm. Sci.* 51, 1961, 831-837.

41. Org. Synth. Coll. Vol. 3, 765-767. Salicyl-o-toluidin. Wiley, New York 1955.
42. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.:
Antimykobakterial *N*-pyridinylsalicylamides, isosters of salicylamides, *Farmaco*
59, 2004, 615-625.
43. Org. Synth. Coll. Vol. 4, 178-179, *p*-Chlorfenyl salicylate. Wiley, New York 1963.
44. WAGNER G., SINGER D., WEUFFEN W.: Untersuchungen über
2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Pharmazie* 21, 1966, 161-
166.
45. O. BUREŠ: Vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v poloze 4
substituovaných salicylanilidů a jim odpovídající 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-
2,4(3*H*) dionů a jejich sirných derivátů.. *Disertační Práce, FaF UK, 2002.*
46. HENRY L.: *Ann. Chem. Pharm.* 152, 1969, 148. *Disertační Práce, FaF UK, 2002*
47. WISLICENUS J.: *Z. Chem.* 9, 1969, 324. *Disertační Práce, FaF UK, 2002.*
48. KLINGSBERG E., PAPA D.: Thion with phosphorus pentasulfide in pyridine solution.
J. Am. Chem. Soc. 73, 1951, 4988-4989.
49. SCHEIBYE S., PEDERSEN B. S., LAWESSON S. O.: Studies on organophosphorous
coumpounds, XXI. The dimer of *p*-methoxyfenylthiophosphine sulfide as thialiton
agents. A new route to thiocarboxamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87, 1978, 229-
238.
50. WAISSER K.: Předchůdci Hansche. *Chem. Listy* 92, 1998. 867-869.
51. HANSCH C, MUIR R., FUJITA T., MALONEY P., GREIGER P., STRDÍCH M.: The
correlation of biological aktivty of plant growth regulators and chlormycetin
derivatives with Hammett constants and partition coefficients. *J. Am. Chem. Soc.*
85, 1963, 2817-2824.
52. FREE F., WILSON J. W.: A matematical contribution to structure activities studies.
J. Med. Chem. 7, 1964. 395-399.
53. KUBINIY H.: The Free-Wilson Metod and relationship to the extra thermodynamic
approaches, str. 550-643. In *Comprehensive medicinal chemistry* (Eds. Hansch C.,
Sammes P., Tailor J. B-), vol. 4, Pergamon Press, Oxford 1993.
54. WAISSER, K.: Local parameters in QSAR. In: *Rational Approaches to Drug Design*,
p. 214-218. Prous, Barcelona 2001.
55. WAISSER K.: Vyhodnocování mikrobiologických dat a kvantifikace vztahů mezi
strukturou a aktivitou. Str. 307-307. V *Chemie a léčiva* (Eds. Holý A., Kohout L.),
ÚOChB ČSAV, Praha 1989.

56. ROZEMBLIT A. B., GOLENDER V. E.: Logiko-kombinatornye metody v konstruirovanii lekarstv. Zinatne, Riga 1983.
57. FRANKE R.: Theoretical drug design methods. Akademie Verlag, Berlin 1984.
58. Kuchař M., Rejholec V.: Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou. Academia, Praha 1987.
59. WAISSER K., BUCHTA V., VALE-SILVA L. A., MATYK J.: A note on the antifungal activities of halogenated 4'-alkylfenylsalicylanilides and halogenated 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dione. Folia Pharmaceutica Univ. Carol. 34, 2006, 17-19.
60. WAISSER K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: High active potential antituberculotics: 3-(4-alkyl)fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dihiones substituted in ring B by halogen. Eur. J. Med. Chem.. Přijato do tisku
61. WAISSER K., MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J., MÖLLMAN U., DAHSE H. M., MIKO M.: The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 339, 2006, 616-620.
62. MÖLLMAN U., WAISSER K., MATYK J.: Antimicrobial Activity of 4-Chlor-4'-propylsalicylanilide and 5-Chlor-4'-propylsalicylanilide: Folia Pharmaceutica Univ. Carol. 35. Přijato do tisku
63. WAISSER K., MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: The Oriented Development of Antituberculotics: (part 2.) Halogenated 3-(4-Alkylfenyl)benzoxazin-2,4(3*H*)-diones. Arch. Pharm. Life Sci., 340, 2007, 264-267.
64. WAISSER K., ODLEROVÁ Ž.: The Alkylgroup Bond to the Electron-Deficient Atom of Carbon as the Pharmacophore of Antituberculotic Activity: Folia Pharmaceutica Univ. Carol. 18, 1995, 35-39.
65. MUTO, SUSUMU, ITAI, AKIKO: Preparation of phenol or phenyl acetate derivatives for treatment of allergic diseases. Patent č. WO 2003-JP710. Citováno podle Chem. Abstrakt. 

11. Seznam T-čísel

Číslo T	Název sloučeniny
5508	4-chlor-4'-terc-butyl-salicylanilid
5509	4-chlor-4'-oktyl-salicylanilid
5510	5-chlor-4'-pentyl-salicylanilid
5512	5-chlor-4'-terc-butyl-salicylanilid
5513	5-brom-4'-hexyl-salicylanilid
5514	5-brom-4'-terc-butyl-salicylanilid
5515	5-brom-4'-pentyl-salicylanilid
5516	4-methoxy-N-(4-methylthiazol-2yl)salicylamid
5517	N-(5-methylizoxazol-3-yl)salicylamid
5519	4'-methoxy-N-(thiazol-2yl)salicylamid
5520	3-(pyridin-2yl)benzoxazin-2,4(3H)-dion
5524	3-(5-methylpyridin-2-yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5526	6-methyl-3-(pyridin-2yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5529	7-chlor-3-(4-heptylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5530	6-methyl-3-(pyridin-2yl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5534	5-chlor-4'-oktyl-salicylanilid
5535	5-brom-4'-butyl-salicylanilid
5536	4-chlor-4'-heptyl-salicylanilid
5537	4-chlor-4'-butyl-salicylanilid
5538	5-chlor-4'-butyl-salicylanilid
5539	5-chlor-4'-heptyl-salicylanilid
5540	5-brom-4'-heptyl-salicylanilid
5542	3,5-dibrom-4'-heptyl-salicylanilid
5543	3,5-dibrom-4'-hexyl-salicylanilid
5544	3,5-dibrom-4'-pentyl-salicylanilid
5546	3,5-dibrom-4'-butyl-salicylanilid
5547	p-trifluormethylfenyl ester kyseliny-4-methoxy salicylové
5548	p-trifluormethylfenyl ester kyseliny salicylové
5550	4-chlor-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2yl)salicylamid
5551	4-chlor-N-(4-methylpyrimidin-2yl)salicylamid
5552	5-fluor-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2yl)salicylamid
5553	5-fluor-N-(4-methylpyrimidin-2yl)salicylamid
5554	5-brom-N-(thiazol-2yl)salicylamid
5555	5-chlor-N-(pyrimidin-2yl)salicylamid
5556	4-methoxy-N-(5-methylizoxazol-3yl)salicylamid
5559	7-chlor-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5560	7-chlor-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5561	7-chlor-3-(4-tercbutylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5562	7-chlor-3-(4-oktylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5563	6-chlor-3-(4-pentylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5564	6-chlor-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion
5565	6-brom-3-(4-hexylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

- 5566 6-brom-3-(4-pentylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5568 6-brom-3-(4-heptylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5570 6,8-dibrom-3-(4-hexylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5571 6,8-dibrom-3-(4-pentylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5573 6-chlor-3-(4-terc-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5574 6-brom-3-(4-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5575 6,8-dibrom-3-(4-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5576 7-chlor-3-(4-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5577 6-chlor-3-(4-oktylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5578 6-chlor-3-(4-oktylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5580 6-brom-3-(oktylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazie-4thiooxo-2(3*H*)-on
 5581 6-brom-3-(oktylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5582 6-brom-3-(butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4thiooxo-2(3*H*)-on
 5583 6-brom-3-(butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5584 6,8-dibrom-3-(butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5585 6,8-dibrom-3-(butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4-thiooxo-2(3*H*)-on
 5586 6-brom-3-(4-pentylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazie-4-thiooxo-2(3*H*)-on
 5587 6-brom-3-(4-pentylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5588 7-chlor-3-(4-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4thiooxo-2(3*H*)-on
 5589 7-chlor-3-(4-butylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5590 7-chlor-3-(4-hexylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4-thiooxo-2(3*H*)-on
 5591 7-chlor-3-(4-hexylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5592 6,8-dibrom-3-(4-hexylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4-thiooxo-2(3*H*)-on
 5593 6,8-dibrom-3-(4-hexylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5594 6-brom-3-(heptylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4 thiooxo-2(3*H*)-on
 5595 6-brom-3-(heptylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5598 6-chlor-3-(4-oktylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4 thiooxo-2(3*H*)-on
 5599 6-chlor-3-(4-oktylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion
 5701 4'-propyl-fenyl-4-chlor-salicylamid
 5702 4'-propyl-5-chlor-salicylanilid
 5703 4'-propyl-5-brom-salicylanilid
 5704 4'-oktyl-5-brom-salicylanilid
 5705 6-chlor-3-(4-propylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion
 5706 7-chlor-3-(4-propylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4-dion
 5707 6-brom-3-(4-propylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4-dion
 5709 6-brom-3-(propylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-4-thiooxo-2(3*H*)-on
 5710 6-brom-3-(propylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazie-2,4-dithion

Původní práce

1. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Heterocyclic Isosters of Antimycobacterial Salicylanilides: *N*-Pyridyl-salicylamide with Steric Hindrance of Amide Group. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31-32, 2004, 41-46.
2. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J.: Heterocyclic Isosters of Antimycobacterial 5-Methylsalicylanilides with Other Heterocyclic Moiety as Pyridine. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 31-32, 2004, 47-52.
3. WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., MATYK J., PALÁT K.: QSAR analysis of antimycobacterial *N*-pyridinylsalicylamides. *Folia Pharmaceutica Univ. Carol* 33, 2005, 7-11.
4. MATYK J., WAISSER K., DRAŽKOVÁ K., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., PALÁT K. JR., KAUSTOVÁ J.: Heterocyclic isosters of antimycobacterial salicylanilides. *Farmaco* 60. 2005, 399-408.
5. WAISSER K., BUCHTA V., VALE-SILVA, L. A. MATYK J.: A note on the antifungal activities of halogenated 4'-alkylphenylsalicylanilides and halogenated 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione. *Folia Pharmaceutica Univ. Carol.* 34, přijato do tisku.
6. WAISSER K., MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., MÖLLMANN U., DAHSE H. M., MIKO M.: The oriented development of antitubercotics: Salicylamides. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 339, 2006, 616-620.
7. WAISSER K., MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., KUNEŠ J., KLIMEŠOVÁ V., KAUSTOVÁ J.: The Oriented Development of Antitubercotics: (part 2.) Halogenated 3-(4-Alkylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. *Arch. Pharm. Life Sci.*, 340, 2007, 264-267.
8. WAISSER K., KUNEŠ J., MATYK J.: Structural evidence of halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides. *Folia Pharmaceutica Univ. Carol.* 35, přijato do tisku.

9. MÖLLMANN U., WAISSER K., MATYK J.: Antimicrobial activity of 4-chloro-4'-propylsalicylanilide and 5-chloro-4'-propylsalicylanilide. *Folia Pharmaceutica Univ. Carol.* 35, přijato do tisku.
10. WAISSER K., MATYK J., KUNEŠ J., KAUSTOVÁ J., DAHSE H. M.: High active antimycobacterial compounds: 3-(4-alkyl)phenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dihiones substituted in ring B by halogen. *Eur. J. Med. Chem.*, přijato do tisku.

Předběžná sdělení uveřejněná v časopisech

1. ADAMEC J., MATYK J., WAISSER K.: Antibakteriální 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazoly. (Antibacterial 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles). *Chem. Listy* 98, 2004, 670-671. 56. sjezd chemických společností. Ostrava 6.- 9. 9. 2004.
2. MATYK J., WAISSER K., ADAMEC J.: Heterocyklická analoga 3-fenylbenzoxazin-2,4(3*H*)-dionů. (Heterocyclic analogs 3-phenylbenzoxazine-2,4(3*H*)-diones). *Chem. Listy* 98, 2004, 671. 56. sjezd chemických společností. Ostrava 6.- 9. 9. 2004.
3. MATYK J., ADAMEC J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., WAISSER K.: Příprava antimykobakteriálních salicylanilidů s předpokládaným výrazným účinkem. (Synthesis of salicylanilides with expected high activity). *Farm. Obzor* 73, 2004, 248. 32. konference Syntéza a analýza léčiv. Nitra 9.- 11. 9. 2004
4. MATYK J., DIVIŠOVÁ H., HUSÁKOVÁ P., WAISSER K.: Vysoce účinné antimykobakteriální salicylanilidy. (High active antimycobacterial salicylanilides). *Chem. Listy* 98, 2004, 1041. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii. Nymburk 26.-28. 11. 2004
5. MATYK J., WAISSER K., KAUSTOVÁ J.: Cílený výzkum vysoce účinných antituberkulotik: v acylové části halogenované *N*-(4-alkylfenyl)salicylamidy. (Oriented research high active antituberculotics, in acyl moiety halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides). *Chem. Listy* 99, 2005, 859. Symposium

Pokroky v organické bioorganické a farmaceutické chemii. Nymburk
18. - 20. 11 2005



Heterocyclic isosters of antimycobacterial salicylanilides

Josef Matyk^a, Karel Waisser^{a,*}, Kateřina Dražková^a, Jiří Kuneš^a, Věra Klimešová^a,
Karel Palát Jr.^a, Jarmila Kaustová^b

^a Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, CZ 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department for Diagnostics of Mycobacteria, Regional Institute of Public Health, Ostrava, Parýzánské nám. 7, CZ-70200 Ostrava, Czech Republic

Received 26 January 2005; received in revised form 11 February 2005; accepted 19 February 2005

Available online 12 April 2005

This paper is dedicated to Professor Otto Exner on the occasion of his 80th birthday

A series of 64 derivatives of substituted heterocyclic analogues of salicylanilides was synthesized. The compounds were evaluated for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and two strains of *Mycobacterium kansasii*. For the QSAR study, the combination of Free–Wilson approach with Hansch approach was used. The molecules were separated on the heterocyclic and salicyl moieties and the study of influences of electronic and hydrophobic properties was used as well. The compounds are a new group of potential antituberculotics.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Tuberculostatic; Antituberculotics; Salicylamides; QSAR; Structure–activity relationships; Heterocycles

1. Introduction

The study of antimycobacterial properties of salicylanilides [1,2] is of great interest, as salicylanilides can inhibit bacterial two-component systems [3,4]. We have published several papers oriented on the antimycobacterial benzylsalicylamides [5,6], the activity of isosters of salicylanilides: 2-sulfanylbzenzanilides [7], *N*-benzylsulfanylbzenzamidés [7], 3-hydroxypicolinanilides [7], *N*-benzyl-3-hydroxypicolinamidés [7]. In our previous paper, we published in this journal, the first part of heterocyclic isosters of amide moiety was presented, e.g., *N*-pyridinylsalicylamides [8]. The goal of this paper was to study the antimycobacterial activity of other isosters of salicylanilides with other heterocyclic rings in amide moiety of compounds (pyrimidine, pyrazine, thiazole, benzothiazole, benzimidazole and isoxazole).

2. Chemistry

The synthetic pathway leading to *N*-heteroarylsalicylamides is depicted in Fig. 1. *N*-heteroarylsalicylamides

were prepared by the treatment of phenyl-salicylate with heteroaromatic compound substituted by amino group. An overview of the compounds under study is in Fig. 1. The synthesis of some *N*-(5-methylisoxazol-3-yl)salicylamides by this pathway was not often successful because of the thermal decomposition of the product. In these cases we have succeeded by use more active 4-trifluoromethylphenyl-salicylate. The use of 4-nitrophenyl-salicylate usually was going to destruction of product, as well.

The structural assignment is based on ¹H NMR and ¹³C NMR spectra and IR spectra. In the IR spectra, the carbonyl vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ was observed in the region 1620–1697 cm⁻¹. The antimycobacterial activity of the synthesized *N*-benzylsalicylamides is given in Table 1.

3. Result and discussion

Compounds under study are a new group of the potential antituberculotics. For the QSAR analysis, we used the combination of Hansch and Free–Wilson approaches. According to the Free–Wilson method the molecules were separate on two moieties. We used the experimental values from physical measurements as electronic parameters. We suppose $\delta(\text{N-H})$ from ¹H-NMR spectrum is the describing influence of electronic properties of the heterocyclic moiety. We used the cal-

* Corresponding author. Fax: +4204955144330.

E-mail addresses: waisser@faf.cuni.cz (K. Waisser),
jarmila.kaustova@zuova.cz (J. Kaustová).

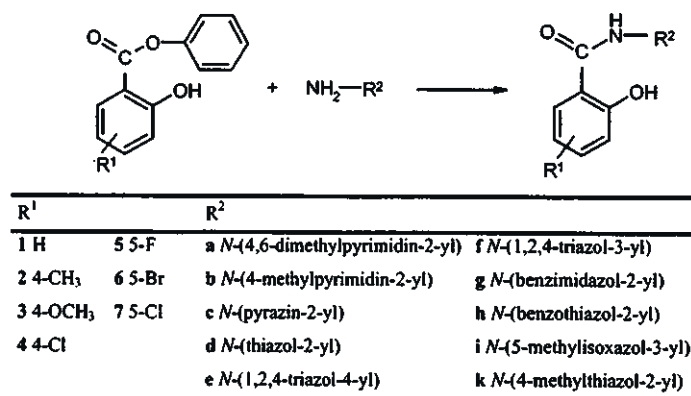


Fig. 1. Synthesis of *N*-heteroaryl-2-hydroxy-benzamides.

culated logarithm of partition coefficients for expression of the hydrophobic properties of molecules. The result is summarised in Table 2. All equations were statistically significant (confidence level more as 95%, significant level less as 0.05).

It seems that substitution in position 4 and 5 on the acyl moiety increases antimycobacterial activity against all strains of *Mycobacterium*. From heterocyclic moieties, benzimidazolyl brings to molecules good antimycobacterial activity, isoxazolyl has the strongest influence on the increase of the activity against *M. tuberculosis*. Some compounds under study are more active against potentially pathogenic strains (*M. kansasii* 250/80 and *M. avium* 330/88, e.g., **2c**, **7i**) than isoniazid.

4. Experimental

4.1. Chemistry

The melting points were determined on a Kofler apparatus. The samples for analysis and antimycobacterial tests were dried over P₂O₅ at 61 °C and 66 Pa for 24 h. Elemental analyses (C, H, N) were performed on a CHNS-O CE elemental analyzer (Fisons EA 1110, Milan) and were within ±0.4% of the theoretical values. The IR spectra were measured in KBr pellets on a Nicolet Impact 400 apparatus; the wavenumbers are given in cm⁻¹. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator Silufol UV 254 + 366 (Kavalier Votice, Czech Republic), cyclohexane-acetone (3:1) was used as the mobile phase. The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of new compounds were recorded in DMSO-*d*₆ solutions at ambient temperature on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H NMR, and 75 MHz for ¹³C NMR. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and being indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (2.49 for ¹H or 39.7 for ¹³C).

4.1.1. Synthesis of 4-trifluoromethylphenyl-salicylates

To the mixture of 0.1 mol salicylic acid (or substituted salicylic acid) and 0.1 mol 4-trifluoromethylphenol 0.04 mol of

phosphorus oxychloride was added. The mixture was heated at 75–80 °C for 4 h and then poured into a solution of 12 g sodium carbonate in 80 ml of water. The product was filtered and recrystallised from ethanol.

4.1.1.1. *Synthesis of 4-trifluorophenyl-salicylate*. White crystals. Yield 48%, m.p. 89–90 °C, IR: ν(C=O) 1681 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, δ) 10.26 (bs, 1H, OH), 8.02–7.96 (m, 1H, H6), 7.89–7.82 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 7.60–7.51 (m, 3H, H4, H2', H6'), 7.09–6.97 (m, 2H, H3, H5). ¹³C NMR (75 MHz, δ) 166.2, 160.3, 153.4, 136.3, 131.2, 127.2 (q, *J* = 3.7 Hz), 127.0 (q, *J* = 32.1 Hz), 124.2 (q, *J* = 272.0 Hz), 123.4, 119.7, 117.9, 113.4.

4.1.1.2. *Synthesis of 4-trifluorophenyl-4-methoxysalicylate*. White crystals. Yield 37%, m.p. 119–121 °C, IR: ν(C=O) 1685 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, δ) 10.39 (bs, 1H, OH), 7.94 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H6), 7.89–7.79 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 7.59–7.49 (m, AA', BB', 2H, H2', H6'), 6.63–6.59 (m, 2H, H3, H5), 3.83 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, δ) 166.5, 166.0, 163.2, 153.3, 132.6, 127.1 (q, *J* = 3.7 Hz), 126.9 (q, *J* = 32.3 Hz), 124.2 (q, *J* = 272.0 Hz), 123.4, 107.9, 105.2, 101.4, 55.9.

4.1.2. Synthesis of *N*-heteroarylsalicylamides. General procedure

A mixture of an amine (1 g) and phenyl-salicylate (1.2 equivalents) was melted at 190–210 °C for 90 min under an air condenser. The reaction mixture was then heated at reflux with ethanol for 10 min, filtered off and the product was recrystallised from the same solvent (yields 22–89%). For the preparation of compounds **1i** 4-trifluorophenyl-salicylate was used instead of phenyl-salicylate. Similar for preparation of compounds **3i**, 4-trifluorophenyl-4-methoxysalicylate was used and the reaction mixture was melted at 132 °C for 24 h.

4.1.2.1. *2-Hydroxy-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzamide (1a)*. Yellow crystals. Yield 52%, m.p. 211–213 °C, IR: ν(C=O) 1648 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, δ) 11.74 (bs, 1H, NH), 10.93 (bs, 1H, OH), 7.99 (dd, 1H, *J* = 7.69 Hz, *J* = 1.65 Hz, H6), 7.47–7.39 (m, 1H, H4), 7.03–6.91 (m, 3H,

Table 1
In vitro antimycobacterial activity of *N*-heteroarylsalicylamides

Com.	R ₁	R ₂	Minimum inhibitory concentrations (MICs) mol l ⁻¹			
			<i>M. tuberculosis</i> My 331/88 14 days	<i>M. avium</i> My 330/88 14 days	<i>M. kansas ii</i> My 235/80 14 days	<i>M. kansasii</i> My 6509/96 14 days
1a	H	<i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)	1000	1000	1000	1000
1b	H	<i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
1c	H	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	125	125	500	500
1d	H	<i>N</i> -(thiazol-2-yl)	62.5	250	500	250
1e	H	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
1f	H	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	500	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
1g	H	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
1h	H	<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	500
1k	H	<i>N</i> -(4-methylthiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
2a	4-CH ₃	<i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)	62.5	1000	<i>n</i>	<i>n</i>
2c	4-CH ₃	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	16	62.5	32	62.5
2d	4-CH ₃	<i>N</i> -(thiazol-2-yl)	16	125	<i>n</i>	125
2e	4-CH ₃	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	1000	1000	1000
2f	4-CH ₃	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	125	<i>n</i>	500	<i>n</i>
2g	4-CH ₃	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
2h	4-CH ₃	<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	8	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
2i	4-CH ₃	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)	16	62.5	125	125
3b	4-OCH ₃	<i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)	32	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3c	4-OCH ₃	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	16	250	250	250
3d	4-OCH ₃	<i>N</i> -(thiazol-2-yl)	250	500	500	500
3e	4-OCH ₃	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	1000	1000	1000
3f	4-OCH ₃	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	500	1000	1000	1000
3g	4-OCH ₃	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3h	4-OCH ₃	<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
3i	4-OCH ₃	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)	125	250	250	250
3k	4-OCH ₃	<i>N</i> -(4-methylthiazol-2-yl)	125	250	250	250
4a	4-Cl	<i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4b	4-Cl	<i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)	62.5	500	1000	1000
4c	4-Cl	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	16	250	125	125
4d	4-Cl	<i>N</i> -(thiazol-2-yl)	16	250	250	250
4e	4-Cl	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	1000	1000	1000
4f	4-Cl	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4g	4-Cl	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4h	4-Cl	<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
4i	4-Cl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)	8	125	<i>n</i>	125
4k	4-Cl	<i>N</i> -(4-methylthiazol-2-yl)	16	250	125	125
5a	5-F	<i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5b	5-F	<i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5c	5-F	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	125	125	125	125
5d	5-F	<i>N</i> -(thiazol-2-yl)	250	1000	62.5	62.5
5e	5-F	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	<i>n</i>	1000	1000
5f	5-F	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	500	250	500	<i>n</i>
5g	5-F	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5h	5-F	<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5i	5-F	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)	250	250	250	62.5
6b	5-Br	<i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6c	5-Br	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	125	250	<i>n</i>	125
6d	5-Br	<i>N</i> -(thiazol-2-yl)	62.5	125	250	250
6e	5-Br	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	1000	1000	1000
6f	5-Br	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	500	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6g	5-Br	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6h	5-Br	<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
6i	5-Br	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)	125	250	500	500
6k	5-Br	<i>N</i> -(4-methylthiazol-2-yl)	125	250	250	125

(continued on next page)

Table 1
(continued)

Com.	R ₁	R ₂	Minimum inhibitory concentrations (MICs) mol l ⁻¹			
			<i>M. tuberculosis</i> My 331/88 14 days	<i>M. avium</i> My 330/88 14 days	<i>M. kansas ii</i> My 235/80 14 days	<i>M. kansasii</i> My 6509/96 14 days
7b	5-Cl	<i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-yl)	250	250	125	62.5
7c	5-Cl	<i>N</i> -(pyrazin-2-yl)	62.5	250	62.5	62.5
7e	5-Cl	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-4-yl)	1000	1000	1000	1000
7f	5-Cl	<i>N</i> -(1,2,4-triazol-3-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7g	5-Cl	<i>N</i> -(benzimidazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7h		<i>N</i> -(benzothiazol-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
5-Cl						
7i	5-Cl	<i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)	125	62.5	62.5	32
7j	5-Cl	<i>N</i> -(pyrimidin-2-yl)	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
7k	5-Cl	<i>N</i> -(4-methylthiazol-2-yl)	62.5	250	62.5	32
INH		(i.g. isoniazide)	2	250	250	4

n—MIC values could not be determined due to the low solubility.

H3, H5, H5'), 2.37 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 168.0, 164.5, 157.6, 157.2, 134.2, 130.6, 119.7, 118.2, 117.4, 116.2, 23.6.

4.1.2.2. 2-Hydroxy *N*-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzamide (*1b*). Brown crystals. Yield 76%, m.p. 261–264 °C. IR: ν(C=O) 1686 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 11.74 (bs, 1H, NH), 11.01 (bs, 1H, OH), 8.54 (d, 1H, *J* = 4.94 Hz, H6'), 7.98 (dd, 1H, *J* = 7.97 Hz, *J* = 1.65 Hz, H6), 7.48–7.39 (m, 1H, H4), 7.12 (d, 1H, *J* = 4.95 Hz, H5'), 7.03–6.93 (m, 2H, H3, H5), 2.43 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 168.6, 164.4, 158.2, 157.5, 157.4, 134.2, 130.7, 119.8, 118.3, 117.4, 117.0, 23.8.

4.1.2.3. 2-Hydroxy *N*-(pyrazin-2-yl)benzamide (*1c*). Brown crystals. Yield 74%, m.p. 213–216 °C, Ref. [9] 216–218 °C. IR: ν(C=O) 1671 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 11.78 (bs, 1H, NH), 11.02 (bs, 1H, OH), 9.50 (d, 1H, *J* = 1.38 Hz, H3'), 8.43–8.39 (m, 2H, H5', H6'), 8.02 (dd, 1H, *J* = 7.97 Hz, *J* = 1.79 Hz, H6), 7.49–7.42 (m, 1H, H4), 7.08–6.95 (m, 2H, H3, H5). ¹³C NMR (75 MHz): δ 164.5, 157.0, 148.6, 143.0, 140.4, 136.8, 134.5, 131.0, 120.1, 117.9, 117.4.

4.1.2.4. 2-Hydroxy-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (*1d*). Brown crystals. Yield 56%, m.p. 251–252 °C, Ref. [10] 252 °C. IR: ν(C=O) 1671 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.22 (bs, 1H, NH), d 7.99 (dd, 1H, *J* = 7.83 Hz, *J* = 1.37 Hz, H6), 7.54 (d,

Table 2
Activity contribution of the combination of Free-Wilson and Hansch analysis

Fragment	Δlog MIC (μmol/l, incubation 14 days)			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/80	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> My 6509/96
R ₁ : H	0	0	0	0
4-Cl	-0.7144 (±0.2196)	-0.2980 (±0.2117)	-0.8811 (±0.2871)	-1.1168 (±0.2654)
4-CH ₃	-0.7159 (±0.1974)	-0.2945 (±0.2098)	-1.0103 (±0.3358)	-0.8459 (±0.3076)
4-OCH ₃	-0.7570 (±0.1991)	-0.1105 (±0.2189)	-0.4726 (±0.3199)	-0.5030 (±0.3360)
5-F	-0.4518 (±0.2144)	-0.5055 (±0.2042)	-1.0504 (±0.2892)	-0.8196 (±0.2864)
5-Br	-0.4324 (±0.2215)	-0.1850 (±0.2109)	-0.9109 (±0.2998)	-1.1828 (±0.2954)
5-Cl	-0.6772 (±0.2270)	-0.2537 (±0.2176)	-1.0060 (±0.2889)	-1.1547 (±0.2885)
R ₂ : benzimidazolyl	0	0	0	0
Pyrimidyl	0.8571 (±0.2523)	1.2541 (±0.3590)	0.8547 (±0.4552)	0.7174 (±0.4323)
Pyrazinyl	0.4576 (±0.1671)	0.4797 (±0.1481)	0.5578 (±0.2189)	0.5720 (±0.2114)
Thiazolyl	0.3834 (±0.2390)	0.5962 (±0.2159)	1.0135 (±0.2982)	0.6154 (±0.2574)
Triazolyl	1.6472 (±0.2015)	1.2661 (±0.1762)	1.55521 (±0.2370)	1.6457 (±0.2271)
Benzothiazolyl	0.0174 (±0.4377)	0.2803 (±0.1214)	0.1264 (±0.0573)	0.2344 (±0.1102)
Isoxazolyl	-0.0923 (±0.4370)	0.3356 (±0.1485)	0.3267 (±0.4549)	-0.0459 (±0.3543)
Δ(NH)	-0.5305 (±0.2051)	-0.4772 (±0.1671)	-0.5760 (±0.2261)	-0.0001 (±0.0003)
log P ²	0.2198 (±0.0831)	0.1627 (±0.0672)	0.2039 (±0.0888)	0.3054 (±0.0859)
μ ₀	8.0314	7.6572	-0.0045	2.3799
<i>R</i>	0.853	0.808	0.877	0.839
<i>s</i>	0.404	0.324	0.428	0.462
<i>F</i>	10.55	6.58	9.17	7.96
<i>n</i>	65	46	46	53

1H, $J = 3.85$ Hz, H4'), 7.48–7.40 (m 1H, H4), 7.25 (d, 1H, $J = 3.85$ Hz, H5'), 7.04–6.91 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 160.4, 158.2, 134.4, 130.5, 119.6, 117.4, 113.8.

4.1.2.5. 3-Hydroxy-*N*-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (Ie). White crystals. Yield 62%, m.p. 290–293 °C, IR: ν (C=O) 1662 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.53 (bs, 1H, NH), d 8.75 (s, 2H, H3', H5'), 7.85 (dd, 1H, $J = 7.97$ Hz, $J = 1.65$ Hz, H6), 7.52–7.43 (m, 1H, H4), 7.06–6.94 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (DMSO): δ 166.4, 158.0, 144.2, 134.7, 130.2, 119.6, 117.3, 115.7.

4.1.2.6. 2-Hydroxy-*N*-(4H-[1,2,4]triazol-3-yl)benzamide (If). White crystals. Yield 80%, m.p. 276–279 °C, IR: ν (C=O) 1667 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.41 (bs, 1H, NH), d 8.02–7.96 (m, 2H, H6, H5'), 7.50–7.41 (m, 1H, H4), 7.05–6.92 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 165.9, 158.3, 147.3, 134.6, 130.2, 119.7, 117.5, 116.8.

4.1.2.7. *N*-(Benzimidazol-2-yl)-2-hydroxybenzamide (Ig). White crystals. Yield 90%, m.p. 355–357 °C, Ref. [11] 250 °C IR: ν (C=O) 1667 cm^{-1} . For $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ (253.3) calculated: 66.40% C, 16.59% N, 4.38% H; found: 66.23% C, 16.43% N, 4.31% H. ^1H NMR (300 MHz): δ 8.02–7.97 (m, 1H, H6), 7.49–7.42 (m, 2H, H4', H7'), 7.38–7.31 (m, 1H, H4), 7.27–7.20 (m, 2H, H5', H6'), 6.88–6.82 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 172.6, 160.7, 151.3, 133.6, 130.1, 129.5, 123.2, 119.8, 118.2, 117.3, 112.1.

4.1.2.8. *N*-(Benzothiazol-2-yl)-2-hydroxybenzamide (Ih). White crystals. Yield 86%, m.p. 322–324 °C, IR: ν (C=O) 1676 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.26 (bs, 1H, NH), d 8.03–7.97 (m, 2H, H6, H7'), 7.72 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H4'), 7.52–7.42 (m, 2H, H4, H6'), 7.37–7.29 (m, 1H, H5'), 7.07–6.95 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 166.7, 158.2, 146.5, 134.9, 130.7, 126.8, 124.0, 122.3, 119.8, 119.2, 117.5, 117.3.

4.1.2.9. 2-Hydroxy-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)benzamide (Ii). White crystals. Yield 22%, m.p. 183–185 °C, IR: ν (C=O) 1653 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz) δ 11.73 (bs, 1H, NH), 11.05 (bs, 1H, OH), 7.97 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H6), 7.50–7.41 (m, 1H, H4), 7.05–6.93 (m, 2H, H3, H5), 6.76 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz, H4'), 2.40 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 170.1, 165.4, 158.1, 157.9, 134.5, 130.3, 119.7, 117.4, 117.2, 97.1, 12.4.

4.1.2.10. 2-Hydroxy-*N*-(4-methylthiazol-2-yl)benzamide (Ik). Yellow crystals. Yield 85%, m.p. 254–255 °C, IR: ν (C=O) 1672 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 7.97 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.9$ Hz, H6), 7.47–7.37 (1H, m, H4), 7.02–6.88 (2H, m, H3, H5), 6.78 (1H, s, H5'), 2.77 (3H, s, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 167.7, 158.6, 134.3, 130.4, 119.4, 117.6, 117.4, 107.8, 15.7.

4.1.2.11. 2-Hydroxy-4-methyl-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzamide (2a). Yellow crystals. Yield 53%, m.p. 248–251 °C, IR: ν (C=O) 1662 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.77 (bs, 1H, NH), d 10.93 (bs, 1H, OH), 7.88 (d, 1H, $J = 7.96$ Hz, H6), 7.00 (s, 1H, H5'), 6.82–6.74 (m, 2H, H3, H5), 2.37 (s, 6H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 168.0, 164.8, 158.0, 157.2, 144.8, 130.4, 120.7, 117.6, 116.1, 115.3, 23.6, 21.3.

4.1.2.12. 2-Hydroxy-4-methyl-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamide (2c). Brown crystals. Yield 65%, m.p. 213–215 °C, IR: ν (C=O) 1676 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.74 (bs, 1H, NH), 10.96 (bs, 1H, OH), 9.49 (d, 1H, $J = 1.37$ Hz, H3'), 8.43–8.39 (m, 2H, H5', H6'), 7.93 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H6), 6.86–6.79 (m, 2H, H3, H5), 2.29 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 164.6, 157.0, 148.6, 145.2, 143.0, 140.3, 136.8, 130.9, 121.2, 117.5, 115.0, 21.3.

4.1.2.13. 2-Hydroxy-4-methyl-*N*-(thiazol-2-yl)benzamide (2d). Brown crystals. Yield 54%, m.p. 254–257 °C, IR: ν (C=O) 1666 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.10 (bs, 1H, NH), 7.89 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H6), 7.53 (d, 1H, $J = 3.85$ Hz, H4'), 7.24 (d, 1H, $J = 3.84$ Hz, H5'), 6.83–6.76 (m, 2H, H3, H5), 2.29 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 179.3, 166.9, 158.2, 145.2, 130.4, 120.8, 117.6, 114.5, 113.8, 21.4.

4.1.2.14. 2-Hydroxy-4-methyl-*N*-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (2e). White crystals. Yield 65%, m.p. 304–306 °C, IR: ν (C=O) 1661 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.51 (bs, 1H, NH), 8.74 (bs, 2H, H3', H5'), 7.75 (d, 1H, $J = 8.24$ Hz, H6), 6.85–6.77 (m, 2H, H3, H5), 2.29 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 166.6, 158.3, 145.5, 144.2, 129.9, 120.7, 117.5, 112.6, 21.4.

4.1.2.15. 2-Hydroxy-4-methyl-*N*-(4H-[1,2,4]triazol-3-yl)benzamide (2f). White crystals. Yield 82%, m.p. 315–317 °C, IR: ν (C=O) 1681 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.80 (bs, 1H, NH), 7.91 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H6), 7.90 (bs, 1H, H5'), 6.84–6.76 (m, 2H, H3, H5), 2.29 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 166.0, 158.4, 148.6, 145.4, 130.0, 129.8, 120.8, 117.6, 113.7, 21.4.

4.1.2.16. *N*-(Benzimidazol-2-yl)-2-hydroxy-4-methylbenzamide (2g). White crystals. Yield 82%, m.p. 318–320 °C, IR: ν (C=O) 1664 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 7.87 (d, 1H, $J = 7.69$ Hz, H6), 7.49–7.41 (m, 2H, H4', H7'), 7.26–7.18 (m, 2H, H5', H6'), 6.68 (s, 1H, H3), 6.67–6.64 (m, 1H, H5), 2.27 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 172.7, 160.6, 151.3, 143.9, 130.1, 129.6, 123.1, 119.5, 117.5, 117.3, 112.0, 21.4.

4.1.2.17. *N*-(Benzothiazol-2-yl)-2-hydroxy-4-methylbenzamide (2h). White crystals. Yield 78%, m.p. 294–296 °C, IR: ν (C=O) 1677 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.12 (bs, 1H, NH), 7.99 (d, 1H, $J = 7.96$ Hz, H6), 7.92 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H7'), 7.72 (d, 1H, $J = 7.96$ Hz, H4'), 7.50–7.42 (m, 1H, H5'), 7.36–7.29 (m, 1H, H6'), 6.87–6.78 (m, 2H, H3, H5), 2.30 (s,

3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 158.1, 145.7, 130.6, 126.7, 124.0, 122.3, 121.0, 117.6, 114.4, 114.3, 21.4.

4.1.2.18. *2-Hydroxy-4-methyl-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzamide (2i)*. Brown crystals. Yield 59%, m.p. 245–247 °C, IR: ν(C=O) 1653 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 11.76 (bs, 1H, NH), 11.02 (bs, 1H, OH), 7.90 (d, 1H, H6), 6.82–6.75 (m, 2H, H3, H5), 6.74 (d, 1H, J = 0.82 Hz, H4'), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 170.0, 165.6, 158.3, 158.1, 145.3, 130.1, 120.8, 117.6, 114.1, 97.2, 21.3, 12.4.

4.1.2.19. *3-Hydroxy-4-methoxy-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzamide (3b)*. White crystals. Yield 52%, m.p. 215–218 °C, IR: ν(C=O) 1671 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.10 (bs, 1H, NH), 10.79 (bs, 1H, OH), 8.54 (d, 1H, J = 5.22 Hz, H6'), 7.97 (d, 1H, J = 8.79 Hz, H6), 7.12 (d, 1H, J = 5.22 Hz, H5'), 6.55 (dd, 1H, J = 8.80 Hz, J = 2.48 Hz, H5), 6.50 (d, 1H, J = 2.48 Hz, H3), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 168.5, 165.2, 164.1, 160.4, 158.1, 157.5, 131.9, 116.9, 110.3, 106.8, 101.5, 55.6, 23.8.

4.1.2.20. *2-Hydroxy-4-methoxy-N-(pyrazin-2-yl)benzamide (3c)*. White crystals. Yield 62%, m.p. 220–222 °C, IR: ν(C=O) 1628 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.00 (bs, 1H, NH), 10.87 (bs, 1H, OH), 9.47 (d, 1H, J = 1.38 Hz, H3'), 8.43–8.38 (m, 2H, H5', H6'), 8.00 (d, 1H, J = 9.06 Hz, H6), 6.59 (dd, 1H, J = 9.06 Hz, J = 2.47 Hz, H5), 6.54 (d, 1H, J = 2.47 Hz, H3), 3.79 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 164.7, 164.2, 159.2, 148.7, 143.0, 140.2, 136.9, 132.5, 110.3, 107.1, 101.6, 55.7.

4.1.2.21. *2-Hydroxy-4-methoxy-N-(thiazol-2-yl)benzamide (3d)*. Yellow crystals. Yield 20%, m.p. 264–265 °C, IR: ν(C=O) 1669 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.28 (bs, 1H, NH), 7.98 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H6), 7.53 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H4'), 7.23 (d, 1H, J = 3.4 Hz, H5'), 6.56 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H5), 6.51 (bs, 1H, H3), 3.78 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 167.2, 164.3, 160.6, 131.9, 131.8, 128.9, 113.6, 109.7, 107.0, 101.5, 55.6.

4.1.2.22. *2-Hydroxy-4-methoxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (3e)*. Brown crystals. Yield 53%, m.p. 264–265 °C, IR: ν(C=O) 1643 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 11.65 (bs, 1H, NH), 8.74 (s, 2H, H3', H5'), 7.81 (d, 1H, J = 9.06 Hz, H6), 6.58 (dd, 1H, J = 9.07 Hz, J = 2.47 Hz, H5), 6.53 (d, 1H, J = 2.47 Hz, H3), 3.79 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 166.9, 164.5, 160.8, 144.2, 131.1, 107.6, 107.0, 101.4, 55.7.

4.1.2.23. *2-Hydroxy-4-methoxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-3-yl)benzamide (3f)*. Brown crystals. Yield 88%, m.p. 309–312 °C, IR: ν(C=O) 1648 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.27 (bs, 1H, NH), d 8.00 (d, 1H, J = 8.79 Hz, H6), 7.84 (bs, 1H, H5'), 6.56 (dd, 1H, J = 8.79 Hz, J = 2.47 Hz, H5), 6.51 (d, 1H, J = 2.47 Hz, H3). ¹³C NMR (75 MHz): δ 166.2, 164.5, 160.8, 148.5, 148.4, 131.5, 108.8, 107.0, 101.5, 55.7.

4.2.1.24. *N-(Benzimidazol-2-yl)-2-hydroxy-4-methoxybenzamide (3g)*. White crystals. Yield 59%, m.p. 304–306 °C, IR: ν(C=O) 1665 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 7.90 (d, 1H, J = 8.79 Hz, H6), 7.47–7.40 (m, 2H, H4', H7'), 7.25–7.18 (m, 2H, H5', H6'), 6.44 (dd, 1H, J = 8.79 Hz, J = 2.47 Hz, H5), 6.39 (d, 1H, J = 2.47 Hz, H3), 3.77 (3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 172.4, 163.8, 162.5, 151.2, 131.5, 129.6, 123.0, 112.9, 111.9, 106.0, 100.9, 55.4.

4.1.2.25. *N-(Benzothiazol-2-yl)-2-hydroxy-4-methoxybenzamide (3h)*. White crystals. Yield 62%, m.p. 297–299 °C, IR: ν(C=O) 1676 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.27 (bs, 1H, NH), d 8.00 (d overlapped, 1H, J = 8.79 Hz, H6), 7.97 (d overlapped, 1H, J = 7.96 Hz, H4'), 7.70 (d, 1H, J = 7.96 Hz, H7'), 7.49–7.42 (m, 1H, H6'), 7.36–7.28 (m, 1H, H5'), 6.59 (dd, 1H, J = 7.89 Hz, J = 2.34 Hz, H5), 6.54 (d, 1H, J = 2.34 Hz, H3), 3.80 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 164.7, 160.6, 132.1, 126.7, 123.9, 122.3, 119.8, 118.8, 109.7, 107.2, 101.5, 55.7.

4.1.2.26. *2-Hydroxy-4-methoxy-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzamide (3i)*. Yellow crystals. Yield 26%, m.p. 194–196 °C, IR: ν(C=O) 1649 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.12 (bs, 1H, NH), 10.98 (bs, 1H, OH), 7.99 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H6), 6.73 (bs 1H, H4'), 6.59–6.47 (m, 2H, H3, H5), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 169.9, 166.0, 164.4, 161.0, 158.2, 131.4, 109.0, 106.9, 101.5, 97.3, 55.7, 12.4.

4.1.2.27. *2-Hydroxy-4-methoxy-N-(5-methylthiazol-2-yl)benzamide (3k)*. Yellow crystals. Yield 85%, m.p. 245–246 °C, IR: ν(C=O) 1667 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.39 (bs, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H6), 6.73 (s, 1H, H5'), 6.52 (dd, 1H, J = 8.8 Hz, J = 2.2 Hz, H5), 6.48 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H3), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 166.9, 164.3, 161.0, 131.7, 110.1, 107.6, 106.9, 101.4, 55.6, 15.8.

4.1.2.28. *4-Chloro-2-hydroxy-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzamide (4a)*. Yellow crystals. Yield 45%, m.p. 264–266 °C, IR: ν(C=O) 1662 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.09 (bs, 1H, NH), 10.86 (bs, 1H, OH), 7.96 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H6), 7.04–6.96 (m, 3H, H3, H5, H5'), 2.36 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 169.0, 163.8, 158.3, 157.1, 137.9, 132.3, 119.9, 117.8, 116.9, 116.2, 23.6.

4.1.2.29. *4-Chloro-2-hydroxy-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzamide (4b)*. Yellow crystals. Yield 52%, 276 °C, IR: ν(C=O) 1683 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz): δ 12.07 (bs, 1H, NH), 10.94 (bs, 1H, OH), 8.53 (d, 1H, J = 4.9 Hz, H6'), 7.95 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H6), 7.11 (d, 1H, J = 4.9 Hz, H5'), 7.05–6.98 (m, 2H, H3, H5), 2.41 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz): δ 168.7, 163.6, 158.1, 157.3, 137.9, 132.4, 119.9, 117.9, 117.0, 116.9, 23.8.

4.1.2.30. 4-Chloro-2-hydroxy-N-(pyrazin-2-yl)benzamide (4c). Brown crystals. Yield 72%, m.p. 239–240 °C, IR: ν (C=O) 1676 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz) δ 12.13 (bs, 1H, NH), d 10.89 (bs, 1H, OH), 9.46 (d, 1H, $J = 1.37$ Hz, H3'), 8.43–8.40 (m, 2H, H5', H6'), 7.98 (d, 1H, $J = 8.24$ Hz, H6), 7.07–7.01 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 163.6, 157.7, 148.4, 143.0, 140.5, 138.2, 136.8, 132.6, 120.1, 117.3, 116.9.

4.1.2.31. 4-Chloro-2-hydroxy-N-(thiazol-2-yl) benzamide (4d). Brown crystals. Yield 54%, m.p. 283–285 °C, IR: ν (C=O) 1672 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.24 (bs, 1H, NH), d 7.94 (d, 1H, $J = 8.51$ Hz, H6), 7.55 (d, 1H, $J = 3.85$ Hz, H4'), 7.23 (d, 1H, $J = 3.84$ Hz, H5'), 7.01 (d, 1H, $J = 1.92$ Hz, H3), 6.98 (dd, 1H, $J = 8.51$ Hz, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 166.6, 162.3, 159.5, 138.1, 132.4, 132.0, 119.5, 117.2, 117.0, 113.4.

4.1.2.32. 4-Chloro-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl) benzamide (4e). White crystals. Yield 53%, m.p. 278–280 °C, IR: ν (C=O) 1655 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.72 (bs, 1H, NH), d 8.76 (s, 2H, H2', H5'), 7.85 (d, 1H, $J = 8.24$ Hz, H6), 7.07–7.01 (m, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (75 MHz) δ 165.3, 158.5, 143.9, 138.3, 132.1, 119.7, 116.8, 115.7.

4.1.2.33. 4-Chloro-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-3-yl)benzamide (4f). White crystals. Yield 80%, m.p. 310–312 °C, IR: ν (C=O) 1667 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.54 (bs, 1H, NH), d 8.03 (bs, 1H, H5'), 7.95 (d, 1H, $J = 8.24$ Hz, H6), 7.05–6.98 (m, 2H, H3, H5), ^{13}C NMR: (75 MHz): δ 165.5, 159.2, 150.1, 146.3, 138.2, 131.8, 119.6, 117.0, 116.7.

4.1.2.34. N-(Benzimidazol-2-yl)-4-chloro-2-hydroxybenzamide (4g). White crystals. Yield 82%, m.p. 329–331 °C, IR: ν (C=O) 1664 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 7.97 (d, 1H, $J = 8.24$ Hz, H6), 7.51–7.43 (m, 2H, H4', H7'), 7.28–7.21 (m, 2H, H5', H6'), 6.93 (d, 1H, $J = 2.20$ Hz, H3), 6.90 (dd, 1H, $J = 8.24$ Hz, $J = 2.20$ Hz, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 171.6, 161.6, 151.0, 137.4, 131.6, 129.3, 123.3, 118.9, 118.4, 116.9, 112.1.

4.1.2.35. N-(Benzothiazol-2-yl)-4-chloro-2-hydroxybenzamide (4h). White crystals. Yield 79%, m.p. 318–320 °C, IR: ν (C=O) 1679 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.12 (bs, 1H, NH), d 8.01–7.95 (m, 1H, H7'), 7.96 (d overlapped $J = 8.24$ Hz, H6), 7.69 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H4'), 7.51–7.43 (m, 1H, H5'), 7.37–7.30 (m, 1H, H6'), 7.04 (d, 1H, $J = 1.92$ Hz, H3), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.24$ Hz, $J = 1.92$ Hz, H5). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 167.0, 161.6, 159.5, 144.0, 138.6, 132.2, 130.1, 126.9, 124.1, 122.5, 119.7, 118.3, 117.1, 117.0.

4.1.2.36. 4-Chloro-2-hydroxy-N-(5-methylisoxazol-3-yl) benzamide (4i). Brown crystals. Yield 59%, m.p. 267–268 °C, IR: ν (C=O) 1620 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.85 (bs, 1H, NH), 11.05 (bs, 1H, OH), 7.91 (d, 1H, $J = 2.61$ Hz,

H6), 7.41 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.61$ Hz, H4), 7.02 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 6.74 (d, 1H, $J = 0.82$ Hz, H4'), 2.40 (d, 3H, $J = 0.83$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 170.2, 164.0, 157.9, 156.4, 133.9, 129.4, 123.3, 119.3, 119.2, 97.1, 12.4.

4.1.2.37. 4-Chloro-2-hydroxy-N-(4-methylthiazol-2-yl)benzamide (4k). Yellow crystals. Yield 73%, m.p. 294–296 °C, IR: ν (C=O) 1664 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.65 (bs, 1H, NH), d 7.93 (d, 1H, $J = 8.24$ Hz, H6), 6.99 (d, 1H, $J = 1.93$ Hz, H3), 6.96 (dd, 1H, $J = 8.24$ Hz, $J = 1.92$ Hz, H5), 6.77 (d, 1H, $J = 1.09$ Hz, H5'), 2.26 (d, 3H, $J = 1.10$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 167.6, 160.0, 137.9, 131.8, 119.3, 117.4, 117.0, 107.5, 14.9.

• 4.1.2.38. 5-Fluoro-2-hydroxy-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzamide (5a). Yellow crystals. Yield 46%, m.p. 275–276 °C, IR: ν (C=O) 1668 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz) δ 11.65 (bs, 1H, NH), 10.91 (bs, 1H, OH), 7.70 (dd, 1H, $J = 9.5$ Hz, $J = 3.3$ Hz, H6), 7.36–7.24 (m, 1H, H4), 7.00 (dd overlapped, 1H, $J = 9.5$ Hz, $J = 4.7$ Hz, H3) 6.98 (s 1H, H5'), 2.35 (s, 6H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz) δ 168.0, 163.0, 155.4 (d, $J = 237.4$ Hz), 153.6, 121.0 (d, $J = 23.2$ Hz), 119.4 (d, $J = 6.6$ Hz), 118.9 (d, $J = 7.4$ Hz), 116.3, 115.9 ($J = 24.7$ Hz), 23.6.

• 4.1.2.39. 5-Fluoro-2-hydroxy-N-(4-methylpyrimidin-2-yl) benzamide (5b). Yellow crystals. Yield 40%, m.p. 286–287 °C, IR: ν (C=O) 1682 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz) δ 11.66 (bs, 1H, NH), 11.01 (bs, 1H, OH), 8.65 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, H6'), 7.70 (dd, 1H, $J = 9.5$ Hz, $J = 3.3$ Hz, H6), 7.36–7.25 (m, 1H, H4), 7.12 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, H5'), 7.02 (dd, 1H, $J = 9.5$ Hz, $J = 4.7$ Hz, H3), 2.42 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz) δ 168.7, 163.0, 158.2, 157.2, 155.4 (d, $J = 235.4$ Hz), 153.5, 121.1 (d, $J = 23.5$ Hz), 119.5 (d, $J = 6.6$ Hz), 118.9 (d, $J = 7.4$ Hz), 117.1, 116.0 (d, $J = 24.6$ Hz), 23.8.

4.1.2.40. 5-Fluoro-2-hydroxy-N-(pyrazin-2-yl)benzamide (5c). Brown crystals. Yield 55%, m.p. 255–258 °C, IR: ν (C=O) 1674 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.76 (bs, 1H, NH), 11.05 (bs, 1H, OH), 9.48 (d, 1H, $J = 0.82$ Hz, H3'), 8.45–8.41 (m, 2H, H5', H6'), 7.72 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 3.29$ Hz, H6), 7.38–7.29 (m, 1H, H4), 7.06 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 4.67$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 163.3 and 163.3 ($J = 2.3$ Hz), 157.1 and 154.0 ($J = 235.7$ Hz), 153.3 and 153.3 ($J = 1.4$ Hz), 148.3, 143.1, 140.6, 136.8, 121.6 and 121.2 ($J = 23.5$ Hz), 119.0 and 118.9 ($J = 7.8$ Hz), 118.9 and 118.8 ($J = 7.1$ Hz), 116.3 and 116.0 ($J = 24.3$ Hz).

4.1.2.41. 5-Fluoro-2-hydroxy-N-(thiazol-2-yl)benzamide (5d). Brown crystals. Yield 65%, m.p. 273–275 °C, IR: ν (C=O) 1671 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 7.67 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 3.29$ Hz, H6), 7.55 (d, 1H $J = 3.84$ Hz, H4'), 7.34–7.22 (m, 1H, H4), 7.24 (d overlapped, $J = 3.85$ Hz, H5'), 6.99 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 4.40$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 166.0, 161.8, 156.7 and 153.6 ($J = 234.8$ Hz),

155.1, 133.2, 121.4 and 121.1 ($J = 23.2$ Hz), 119.0 and 118.9 ($J = 7.8$ Hz), 118.4 and 118.4 ($J = 6.9$ Hz), 115.6 and 115.3 ($J = 24.0$ Hz), 113.6.

4.1.2.42. *5-Fluoro-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (5e)*. White crystals. Yield 88%, m.p. 328–330 °C, IR: ν (C=O) 1672 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 11.34 (bs, 1H, NH), d 8.77 (s, 2H, H2', H5'), 7.58 (dd, 1H, $J = 9.21$ Hz, $J = 3.29$ Hz, H6), 7.39–7.30 (m, 1H, H4), 7.04 (dd, 1H, $J = 9.21$ Hz, $J = 4.67$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 165.1 and 165.1 ($J = 2.0$ Hz), 156.8 and 153.7 ($J = 235.7$ Hz), 154.1 and 154.1 ($J = 1.4$ Hz), 144.1, 121.8 and 121.5 ($J = 23.2$ Hz), 118.9 and 118.8 ($J = 7.7$ Hz), 117.0 and 116.9 ($J = 7.2$ Hz), 115.9 and 115.6 ($J = 24.4$ Hz).

4.1.2.43. *5-Fluoro-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-3-yl)benzamide (5f)*. White crystals. Yield 89%, m.p. 357–360 °C, IR: ν (C=O) 1673 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 8.03 (bs, 1H, H5'), 7.71 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 3.30$ Hz, H6), 7.38–7.27 (m, 1H, H4), 7.01 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 4.67$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 165.1, 156.7 and 153.6 ($J = 233.0$ Hz), 155.0, 146.5, 121.6 and 121.3 ($J = 23.5$ Hz), 119.1 and 119.0 ($J = 7.7$ Hz), 118.0 and 117.9 ($J = 6.9$ Hz), 115.6 and 115.3 ($J = 25.7$ Hz).

4.1.2.44. *N-(Benzimidazol-2-yl)-5-fluoro-2-hydroxybenzamide (5g)*. White crystals. Yield 80%, m.p. 336–338 °C, IR: ν (C=O) 1643 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 7.66 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 3.29$ Hz, H6), 7.52–7.42 (m, 2H, H4', H7'), 7.29–7.16 (m, 3H, H4, H5', H6'), 6.88 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 4.67$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 171.6, 157.0, 156.3 and 153.2 ($J = 233.4$ Hz), 151.2, 129.3, 123.3, 120.7 and 120.4 ($J = 23.5$ Hz), 120.4 and 120.3 ($J = 6.6$ Hz), 118.7 and 118.6 ($J = 7.5$ Hz), 115.0 and 114.7 ($J = 23.5$ Hz), 112.1.

4.1.2.45. *N-(Benzo[thiazol-2-yl]-5-fluoro-2-hydroxybenzamide (5h)*. White crystals. Yield 85%, m.p. 349–351 °C, IR: ν (C=O) 1679 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 11.88 (bs, 1H, NH), d 7.98 (d, 1H, $J = 7.69$ Hz, H7'), 7.74–7.67 (m, 2H, H6, H4'), 7.51–7.43 (m, 1H, H5'), 7.39–7.29 (m, 2H, H4, H6'), 7.03 (dd, 1H, $J = 9.07$ Hz, $J = 4.67$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 166.6, 161.1, 156.8 and 153.7 ($J = 235.4$ Hz), 154.9, 144.6, 130.3, 126.9, 124.2, 122.5, 121.9 and 121.6 ($J = 23.5$ Hz), 119.1 and 119.0 ($J = 7.5$ Hz), 118.6, 118.3 and 118.2 ($J = 6.9$ Hz), 115.8 and 115.5 ($J = 24.3$ Hz).

4.1.2.46. *5-Fluoro-2-hydroxy N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzamide (5i)*. Brown crystals. Yield 53%, m.p. 258–261 °C, IR: ν (C=O) 1660 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 11.67 (bs, 1H, NH), 11.07 (bs, 1H, OH), 7.71 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 3.29$ Hz, H6), 7.37–7.27 (m, 1H, H4), 7.02 (dd, 1H, $J = 9.34$ Hz, $J = 4.67$ Hz, H3), 6.74 (d, 1H, $J = 0.83$, H4'), 2.40 (s, 3H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 170.2, 164.1 and 164.1 ($J = 2.3$ Hz), 157.9, 156.9 and 153.7 ($J = 235.7$ Hz), 154.0 and 154.0 ($J = 1.4$ Hz), 121.6 and 121.3 ($J = 23.5$ Hz), 119.0 and 118.9 ($J = 7.7$ Hz), 118.2 and 118.1 ($J = 7.2$ Hz), 115.8 and 115.5 ($J = 24.9$ Hz), 97.0, 12.4.

4.1.2.47. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzamide (6b)*. Yellow crystals. Yield 59%, m.p. 292–294 °C, IR: ν (C=O) 1684 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 11.91 (bs, 1H, NH), 10.98 (bs, 1H, OH), 8.54 (d, 1H, $J = 4.95$ Hz, H6'), 8.04 (d, 1H, $J = 2.41$ Hz, H6), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.41$ Hz, H4), 7.13 (d, 1H, $J = 4.95$ Hz, H5'), 6.97 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 2.42 (s, 3H, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 168.7, 169.1, 158.1, 157.2, 156.5, 136.4, 132.7, 120.9, 119.7, 117.1, 110.8, 23.8.

4.1.2.48. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(pyrazin-2-yl)benzamide (6c)*. Brown crystals. Yield 57%, m.p. 254–256 °C, IR: ν (C=O) 1677 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 12.03 (bs, 1H, NH), 10.96 (bs, 1H, OH), 9.46 (d, 1H, $J = 1.38$ Hz, H3'), 8.43–8.41 (m, 2H, H5', H6'), 8.05 (d, 1H, $J = 2.47$ Hz, H6), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.47$ Hz, H4), 7.00 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 163.2, 156.2, 148.3, 143.1, 140.6, 136.8, 136.7, 132.9, 120.1, 119.7, 111.1.

4.1.2.49. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(thiazol-2-yl)benzamide (6d)*. White crystals. Yield 53%, m.p. 272–273 °C, IR: ν (C=O) 1668 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 12.59 (bs, 1H, NH), 8.03 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, H6), 7.59–7.53 (m, 2H, H4, H4'), 7–25 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, H5'), 6.94 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 165.6, 157.9, 136.5, 132.3, 120.0, 119.8, 113.6, 110.3.

4.1.2.50. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (6e)*. White crystals. Yield 88%, m.p. 304–306 °C, IR: ν (C=O) 1670 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 11.68 (bs, 1H, NH), 8.78 (s, 2H, H3', H5'), 7.93 (d, 1H, $J = 2.60$ Hz, H6), 7.61 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.60$ Hz, H4), 6.99 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz): δ 164.9, 156.9, 143.9, 136.7, 132.3, 119.6, 118.6, 110.4.

4.1.2.51. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (6f)*. White crystals. Yield 72%, m.p. 335–338 °C, IR: ν (C=O) 1676 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 12.10 (bs, 1H, NH), d 8.07–8.02 (m, 2H, H6, H5'), 7.57 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.47$ Hz, H4), 6.95 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz) δ 165.0, 157.6, 146.0, 136.6, 132.1, 119.8, 119.6, 110.4.

4.1.2.52. *N-(Benzimidazol-2-yl)-5-bromo-2-hydroxybenzamide (6g)*. White crystals. Yield 87%, m.p. 319–321 °C, Ref. [11] 323–324 °C. IR: ν (C=O) 1634 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 8.05 (d, 1H, $J = 2.48$ Hz, H6), 7.50–7.44 (m, 3H, H4, H4', H7'), 7.28–7.21 (m, 2H, H5', H6'), 6.85 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz) δ 171.2, 160.1, 151.1, 135.8, 131.9, 129.3, 123.4, 121.7, 119.9, 112.1, 109.2.

4.1.2.53. *N-(Benzo[thiazol-2-yl]-5-bromo-2-hydroxybenzamide (6h)*. White crystals. Yield 75%, m.p. 317–321 °C, IR: ν (C=O) 1678 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz): δ 12.38 (bs, 1H, NH), 8.04 (d, 1H, $J = 2.61$ Hz, H6), 8.00–7.96 (m, 1H, H7'), 7.69 (d, 1H, $J = 7.97$ Hz, H4'), 7.58 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, J

= 2.61 Hz, H4), 7.51–7.43 (m, 1H, H5'), 7.37–7.30 (m, 1H, H6'), 6.97 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 161.5, 158.0, 143.9, 143.7, 136.9, 132.5, 130.1, 127.0, 124.2, 122.5, 119.9, 119.8, 118.3, 110.4.

4.1.2.54. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzamide (6i)*. White crystals. Yield 54%, m.p. 248–250 °C, IR: ν (C=O) 1655 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.86 (bs, 1H, NH), 11.04 (bs, 1H, OH), 8.04 (d, 1H, $J = 2.48$ Hz, H6), 7.59 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.48$ Hz, H4), 6.97 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 6.74 (d, 1H, $J = 0.82$ Hz, H4'), 2.40 (d, 3H, $J = 0.82$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 170.2, 163.9, 157.9, 156.8, 136.7, 132.3, 119.8, 119.7, 110.7, 97.0, 12.4.

4.1.2.55. *5-Bromo-2-hydroxy-N-(4-methylthiazol-2-yl)benzamide (6k)*. White crystals. Yield 82%, m.p. 287–289 °C, IR: ν (C=O) 1670 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 8.02 (d, 1H, $J = 2.75$ Hz, H6), 7.54 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.75$ Hz, H4), 6.91 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 6.79 (d, 1H, $J = 0.97$ Hz, H5'), 2.27 (d, 3H, $J = 0.97$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 159.0, 136.8, 132.6, 120.8, 120.3, 110.6, 108.0.

4.1.2.56. *5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzamide (7b)*. Yellow crystals. Yield 59%, m.p. 295–297 °C, IR: ν (C=O) 1684 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.89 (bs, 1H, NH), 10.96 (bs, 1H, OH), 8.55–8.52 (m, 1H, H6'), 7.91 (d, 1H, $J = 2.75$ Hz, H6), 7.47 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, 2.75 Hz, H4), 7.13 (d, 1H, $J = 4.94$ Hz, H5'), 7.02 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 2.42 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 168.7, 162.9, 158.1, 157.2, 156.0, 133.5, 129.8, 123.4, 120.4, 119.3, 117.1, 23.8.

4.1.2.57. *5-Chloro-2-hydroxy-N-(pyrazin-2-yl)benzamide (7c)*. Brown crystals. Yield 66%, m.p. 244–246 °C, IR: ν (C=O) 1675 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 12.02 (bs, 1H, NH), 10.95 (bs, 1H, OH), 9.47–9.45 (m, 1H, H3'), 8.44–8.41 (m, 2H, H5', H6'), 7.93 (d, 1H, $J = 3.03$ Hz, H6), 7.48 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 3.03$ Hz, H4), 7.05 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 160.2, 155.7, 148.3, 143.1, 140.6, 136.8, 133.9, 129.9, 123.7, 119.6, 119.3.

4.1.2.58. *5-Chloro-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-4-yl)benzamide (7e)*. White crystals. Yield 88%, m.p. 321–322 °C, IR: ν (C=O) 1671 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.67 (bs, 1H, NH), 8.78 (s, 2H, H2', H5'), 7.81 (d, 1H, $J = 2.75$ Hz, H6), 7.50 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.75$ Hz, H4), 7.05 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 165.0, 156.5, 144.0, 134.0, 129.5, 123.1, 119.2, 118.0.

4.1.2.59. *5-Chloro-2-hydroxy-N-(4H-[1,2,4]triazol-3-yl)benzamide (7f)*. White crystals. Yield 84%, m.p. 326–327 °C, IR: ν (C=O) 1677 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.49 (bs, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H5'), 7.93 (d, 1H, $J = 2.74$ Hz, H6), 7.47 (dd, 1H, $J = 8.80$ Hz, $J = 2.75$ Hz, H4), 7.01 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 165.1, 157.1, 150.4, 146.2, 133.9, 129.2, 123.1, 119.4, 119.1.

4.1.2.60. *N-(Benzimidazol-2-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamide (7g)*. White crystals. Yield 72%, m.p. 328–329 °C, Ref. [12] m.p. 329–330 °C. IR: ν (C=O) 1631 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 7.92 (d, 1H, $J = 2.89$ Hz, H6), 7.51–7.44 (m, 2H, H4', H7'), 7.37 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.89$ Hz, H4), 7.29–7.21 (m, 2H, H5', H6'), 6.90 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 171.3, 159.6, 151.1, 133.1, 129.3, 128.9, 123.4, 121.8, 121.2, 119.4, 112.1.

4.1.2.61. *N-(Benzothiazol-2-yl)-5-chloro-2-hydroxybenzamide (7h)*. White crystals. Yield 81%, m.p. 335–336 °C, IR: ν (C=O) 1678 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.85 (bs, 1H, NH), 11.05 (bs, 1H, OH), d 8.00–7.95 (m, 1H, H7'), 7.93–7.90 (m, 1H, H6), 7.72–7.66 (m, 1H, H4'), 7.51–7.42 (m, 2H, H4, H5'), 7.38–7.29 (m, 1H, H6'), 7.06–6.98 (m, 1H, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 166.8, 161.6, 157.7, 144.0, 134.1, 130.2, 129.5, 126.9, 124.1, 123.0, 122.5, 119.5, 119.3, 118.3.

4.1.2.62. *5-Chloro-2-hydroxy-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzamide (7i)*. White crystals. Yield 64%, m.p. 259–261 °C, IR: ν (C=O) 1652 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 11.85 (bs, 1H, NH), 11.05 (bs, 1H, OH), 7.91 (d, 1H, $J = 2.61$ Hz, H6), 7.41 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.61$ Hz, H4), 7.02 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 6.74 (d, 1H, $J = 0.82$ Hz, H4'), 2.40 (d, 3H, $J = 0.83$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 170.2, 164.0, 157.9, 156.4, 133.9, 129.4, 123.3, 119.3, 119.2, 97.1, 12.4.

4.1.2.63. *5-Chloro-5-hydroxy-N-(pyrimidin-2-yl)benzamide (7j)*. Yellow crystals. Yield 65%, m.p. 99–101 °C, IR: ν (C=O) 1697 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 8.67 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz, H4', H6'), 7.80 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H6), 7.23 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H4), 7.17 (t, 1H, $J = 4.4$ Hz, H5'), 6.81 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H3). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 163.8, 163.5, 158.7, 158.1, 133.2, 129.4, 121.6, 119.6, 118.3, 116.7.

4.1.2.64. *5-Chloro-2-hydroxy-N-(4-methylthiazol-2-yl)benzamide (7k)*. White crystals. Yield 90%, m.p. 306–308 °C, IR: ν (C=O) 1671 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz): δ 7.89 (d, 1H, $J = 2.88$ Hz, H6), 7.42 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, $J = 2.88$ Hz, H4), 6.96 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H3), 6.78 (d, 1H, $J = 1.10$ Hz, H5'), 2.26 (d, 3H, $J = 1.10$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz): δ 167.9, 164.1, 158.1, 133.5, 129.2, 122.7, 119.7, 119.4, 107.6, 14.9.

4.2. Microbiology

The following strains, obtained from the Czech national collection of type cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague, were used for the evaluation of in vitro antimycobacterial activity: *M. tuberculosis* CNCTC My 331/8, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, and *M. avium* CNCTC My 330/88. Activity against the clinical isolate of *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 was tested as well. The antimycobacterial activity of the compounds was determined in the Šula semisynthetic medium (SEVAC, Prague). This medium (with bovine serum) is routinely used in the Czech Republic. Each strain was simultaneously inoculated into a

Table 3
The calculated values of logarithm of partition coefficients (log P)

1a	2.43	1k	2.87	3b	1.60	4a	2.99	4k	3.43	6b	2.56	7b	2.29
1b	1.73	2a	2.92	3c	0.37	4b	2.29	5a	2.59	6c	1.32	7c	1.05
1c	0.19	2c	0.98	3d	2.17	4c	1.05	5c	0.65	6d	3.00	7e	0.62
1d	2.17	2d	2.66	3e	-0.06	4d	2.73	5d	2.33	6e	0.89	7f	2.82
1e	0.06	2e	0.55	3f	2.14	4e	0.62	5e	0.22	6f	3.10	7g	2.77
1f	2.27	2f	2.75	3g	2.08	4f	2.82	5f	2.42	6g	3.04	7h	4.20
1g	2.21	2g	2.70	3h	3.52	4g	2.77	5g	2.37	6h	4.48	7i	2.23
1h	3.65	2h	4.13	3i	1.55	4h	4.20	5h	3.80	6i	2.50	7j	1.58
1i	1.68	2i	2.16	3k	2.75	4i	2.23	5i	1.83	6k	3.70	7k	3.43

petri dish containing the Löwenstein–Jensen medium for the control of the sterility of the inoculum and its growth. The compounds were added to the medium in DMSO solutions. The final concentrations were 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 16, 8, 4, 2 mol/l. The MICs were determined after incubation at 37 °C for 14 days (see Table 1). MIC was the lowest concentration of an antimycobacterially effective substance (on the above concentration scale), at which inhibition of the growth of the Mycobacteria occurred. The results were summarised in Table 1.

4.3. Calculations

All regression calculations were set up using the Multireg H programme (Klemera) for Microsoft Excel. Results are summarised in Table 2. Logarithms of the partition coefficients were calculated using ChemOffice 5 software (Table 3).

Acknowledgements

The work is a part of the research project no. MSM 0021650822 of the Ministry of Education of the Czech Republic and by Grant No. 42/G6/2005 of the Higher Education Development Fund.

References

- [1] K. Waisser, J. Hladůvková, J. Kuneš, L. Kubicová, V. Klimešová, P. Karajannis, et al., Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in position 5, *Chem. Pap.* 55 (2001) 121–129.
- [2] K. Waisser, O. Bureš, P. Holý, J. Kuneš, R. Oswald, L. Jirásková, et al., Relationships between structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 336 (2003) 53–71.
- [3] D.J. Hlasta, J.P. Demers, B.D. Foletto, S. Fraga-Spano, J. Guan, J.J. Hilligard, et al., Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening HIT clobantel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 1923–1928.
- [4] M.J. Macielag, J.P. Demers, S.A. Fraga-Spano, D.J. Hlasta, S.G. Johnson, I.M. Kanojia, et al., Substituted salicylanilides as inhibitors of two component regulatory systems in bacteria, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2939–2945.
- [5] K. Waisser, M. Peřina, V. Klimešová, J. Kaustová, On the relationship between the structure and antimycobacterial activity substituted *N*-benzylsalicylamides, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 68 (2003) 1275–1294.
- [6] K. Waisser, M. Peřina, I. Boudová, J. Kuneš, J. Kaustová, A new group of potential antituberculous agents. Antimycobacterial *N*-benzylsalicylamides, *Česk. Slov. Farm.* 52 (2003) 291–294.
- [7] K. Waisser, M. Peřina, P. Holý, M. Pour, O. Bureš, J. Kuneš, et al., Antimycobacterial and antifungal isosters of salicylamides, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 336 (2003) 322–335.
- [8] K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, Antimycobacterial *N*-pyridinylsalicylamides, isosters of salicylanilides, *Farmaco* 59 (2004) 615–625.
- [9] K. Kakemi, et al., Synthesis of pyrazinoic acid derivatives, *I. J. Pharm. Soc. Jap.* 82 (1962) 338–342 *Chem. Abstr.* 56 (1962) 10141.
- [10] K. Takatori, Benzoylation by phenylbenzoate IV, *Yakugaku Zasshi* 73 (1954) 810–817 *Chem. Abstr.* 48 (1954) 8749.
- [11] A.V. Gordeeva, S.A. Khasanov, Acylation of 2-aminobenzimidazole with chlorides. *Regulatory Rosta Rast, Chem. Abstr.* 90 (1979) 203963 i *Gerbetsidy* 1978. 135.
- [12] J. Sluka, J. Daněk, P. Bedrník, Z. Buděšínský, 2-Phenyl- and 2-benzamido-benzimidazoles, *Coll. Czech. Chem. Commun.* 46 (1981) 2703–2708.

Full Paper

The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides*

Karel Waisser¹, Josef Matyk¹, Hana Divišová¹, Petra Husáková¹, Jirí Kuneš¹, Vera Klimešová¹, Jarmila Kaustová², Ute Möllmann³, Hans-Martin Dahse³, and Milan Miko⁴¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic² Regional Institute of Public Health, Ostrava, Czech Republic³ Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena, Germany⁴ Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic

On the basis of our previous results 22 salicylanilides were synthesized. The compounds were tested for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium avium*. The Free-Wilson method was used to evaluate structure-antimycobacterial activity relationships. 4-Chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide were selected for preclinical studies.

Keywords: Antimycobacterial activity / Antituberculosis activity / QSAR / Salicylanilides

Received: June 12, 2006; accepted: July 12, 2006

DOI 10.1002/ardp.200600093

Introduction

The return of tuberculosis to Europe and North America is one feature of the period dating from 1985. And new mycobacterial diseases have occurred which have been recently considered intransferable to humans (mycobacterioses produced by potentially pathogenic strains). The development of new antituberculous agents is the principal goal of our group. We have recently studied a number of structurally different compounds, such as the derivatives of pyridine [1, 2], alkoxyphenylcarbamic acids [3], tetrazoles [4, 5], dihydroindolethiones [6] and other heterocycles [7, 8].

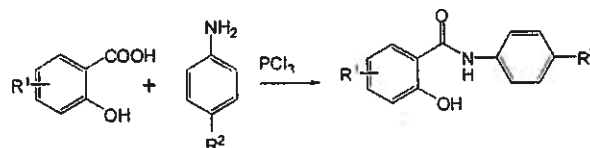
We published QSAR study of substituted salicylanilides [9] as potential antituberculous agents with the new mechanism of action in one of our previous papers. According to our study, we suppose that the substitution of *N*-phenyl-

salicylanilides in position 5 by chlorine or bromine and the substitution in position 4 in *N*-phenyl by alkyl increases the antimycobacterial activity. The goal of this paper is the synthesis and antimycobacterial evaluation of *in acyl moiety* halogenated *N*-(4-phenyl)salicylamides.

Results and discussion

Chemistry

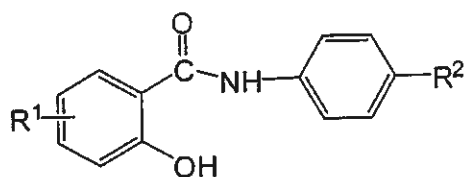
The synthesis of the title compounds is illustrated in Scheme 1 (see also Fig. 1). Various alkyl anilines were reacted in toluene with substituted salicylic acid in the presence of phosphorus trichloride. In the set of the starting compounds were 4-chloro-, 5-chloro-, 5-bromo-, and 3,5-dibromosalicylic acid. The anilides were substituted in position 4 by propyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, or *tert*-butyl. Yields, melting points, and the frequency of



Scheme 1. Preparation of *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides.

Correspondence: Karel Waisser, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, CZ 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.
E-mail: waisser@faf.cuni.cz
Fax: +420 495 514-330

* Dedicated to Prof. Roland Mayer, Dresden, on the occasion of his 80th birthday.



	R ₁	a	R ₂	e	R ₂
1	4-Cl	a	propyl	e	hexyl
2	5-Cl	b	butyl	f	heptyl
3	5-Br	c	tert-butyl	g	octyl
4	3,5-Br ₂	d	pentyl		

Figure 1. Overviews of the structures of *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides.

carbonyl of the compounds 1–4 are described in Table 1. Elemental analysis and NMR spectra are described in the Supplemental Material.

Biology

In vitro antimycobacterial activity of the compounds was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88, and *Mycobacterium kansasii* 6509/96 using the micromethod for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC). All strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague with the exception of *M. kansasii* 6509/96. The minimum inhibitory concentrations are illustrated in Table 2. For the sake of comparison, we

also included the values of MICs of the standard isoniazide (INH). The Free-Wilson method was applied for evaluating the structure-antimycobacterial activity relationship. Results of the analysis are summarized in Table 3, and 4-Chlor-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 1a and 5-chlor-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 2a were selected for preclinical study; other biological evaluation is described only with these compounds. Compounds 1a and 2a were assayed against cell lines K-562 and L-929 for their antiproliferative effects (GI_{50} : concentration which inhibited cell growth by 50%) and against HeLa for their cytotoxic effects (CC_{50} : cytotoxic concentration which causes a specific destructive action on certain cells by 50%; used particularly in referring to the lysis of cells). The cells were incubated with ten concentrations of the target compounds. Values of antiproliferative and cytotoxic activity are illustrated in Table 4. The actions of compounds 1a and 2a on endogenous respiration of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells are summarized in Table 5.

Calculation

All calculations were carried out with the use of the Multireg H program (Klemera) for Microsoft Excel. The results of Free-Wilson method are summarized in Table 3.

Discussion

The structures of the compounds were confirmed by ¹H- and ¹³C-NMR, IR spectral data and their purity by elemental analysis. All salicylanilides showed a band at 1615–1650 cm^{-1} in their IR spectra. The absorption maxima of C=O groups in this region are a characteristic feature for salicylanilides. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra and also elemental analyses (for both Supplemental Material) of all compounds are in agreement with the proposed structures.

Table 1. Yield, melting point, and carbonyl frequency of halogenated *N*-(4-alkylphenyl)-salicylamides.

Compounds	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{C=O}$ (cm^{-1})	Compounds	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{C=O}$ (cm^{-1})
1a	71	187–189	1615	2g	77	170–172	1628
1b	77	167–168	1618	3a	72	196–197	1628
1c	76	232–233	1623	3b	66	189–190	1630
1f	65	166–167	1620	3d	67	186–187	1627
1g	68	163–164	1625	3e	69	183–184	1628
2a	71	186–187	1628	3f	65	184	1629
2b	79	162–163	1628	3g	63	179–180	1628
2c	73	221–222	1627	4b	59	119	1648
2d	79	185–186	1627	4d	52	121	1650
2e	71	172–173	1621	4e	64	120	1649
2f	64	170–172	1628	4f	61	115–116	1650

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides.

	Compounds		MIC (mmol/L) Incubation time 14 d/21 d			
	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
1a	4-Cl	Propyl	2/2	8/8	8/32	8/8
1b	4-Cl	Butyl	4/4	8/8	8/8	8/8
1c	4-Cl	tert-butyl	16/16	32/62,5	–	32/62,5
1f	4-Cl	Heptyl	4/8	8/16	4/8	8/16
1g	4-Cl	Octyl	16/16	16/16	8/16	16/16
2a	5-Cl	Propyl	2/2	16/16	8/8	16/16
2b	5-Cl	Butyl	4/4	8/8	8/8	4/8
2c	5-Cl	tert-butyl	8/16	16/16	16/32	16/16
2d	5-Cl	Pentyl	16/16	16/16	16/16	16/16
2e	5-Cl	Hexyl	16/16	16/16	8/16	16/16
2f	5-Cl	Heptyl	4/4	8/8	4/8	8/8
2g	5-Cl	Octyl	2/4	4/4	8/32	4/4
3a	5-Br	Propyl	2/2	4/8	16/16	4/8
3b	5-Br	Butyl	8/8	8/8	8/16	8/8
3d	5-Br	Pentyl	8/8	32/32	–	16/16
3e	5-Br	Hexyl	8/16	32/32	8/16	16/16
3f	5-Br	Heptyl	8/8	8/8	8/8	8/8
3g	5-Br	Octyl	2/4	4/4	8/8	4/4
4b	3,5-Br ₂	Butyl	16/32	32/32	62.5/62.5	32/32
4d	3,5-Br ₂	Pentyl	32/32	32/32	62.5/62.5	32/32
4e	3,5-Br ₂	Hexyl	16/32	32/32	32/62.5	32/32
4f	3,5-Br ₂	Heptyl	16/16	32/32	32/32	32/32
Isoniazid			2/1	>250/>250	>250/>250	4/8

Table 3. Activity contribution of Free-Wilson analyses of salicylanilides and statistically significant correlations.

Parameter	$\Delta \log \text{MIC}$ (mmol/L) Incubation time 14 d/21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
4-Cl	0.0405/0.0131	0.0303/0.0928	-0.2556/0.0819	0.0426/0.0912
5-Cl	-0.1193/0.1357	-0.1121/0.1584	-0.1936/0.1439	-0.1161/0.1294
5-Br	-0.1077/0.096	-0.099/0.0793	-0.037/0.1505	-0.1154/0.1478
3,5-Br ₂	0.3196/0.3966	0.3067/0.2802	0.6405/0.5219	0.3815/0.3343
4'-propyl	-0.4697/0.546	-0.1579/0.1108	0.127/0.0805	-0.1013/0.0698
4'-butyl	-0.0401/0.0655	-0.0997/0.1429	-0.098/0.0814	-0.1407/0.1189
4'-tert-butyl	0.2577/0.3466	0.3478/0.3589	0.3586/0.8818	0.3032/0.3874
4'-pentyl	0.3373/0.2178	0.2499/0.2267	0.2415/0.066	0.1857/0.1492
4'-hexyl	0.2373/0.3178	0.2499/0.2267	-0.0716/0.0791	0.1857/0.1492
4'-heptyl	-0.0401/0.0655	-0.0997/0.0679	-0.1736/0.231	-0.0657/0.0439
4'-octyl	-0.1697/0.046	-0.2579/0.3107	0.027/0.0804	-0.2013/0.2698
μ_0	0.832/0.927	1.118/1.159	1.035/1.245	1.0772/1.1318
r	0.864/0.925	0.842/0.860	0.965/0.887	0.868/0.888
s	0.254/0.197	0.230/0.219	0.134/0.207	0.2064/0.1865
F	3.91/7.89	3.26/3.81	15.10/4.13	4.14/4.95
n	22/22	22/22	20/20	22/22

The values of antimycobacterial activity of the halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides are shown in Table 2. For the sake of comparison, we also included the values of MICs of the standard isoniazide (INH). The results revealed that the compounds exhibited *in vitro* activity against all mycobacterial strains tested. The MIC

values are generally within the range of 2 to 62.5 $\mu\text{mol/L}$, most often between 4 and 16 $\mu\text{mol/L}$. The compounds were less active than INH against *M. tuberculosis* 331/88, on the other hand the compounds possessed a better activity against *M. kansasii* 235/80 and *M. avium* 330/88 than INH. The activities of newly prepared compounds

Table 4. Antiproliferative (GI₅₀) and cytotoxic (CC₅₀) activity.

Compound	L-929GI ₅₀ ^{a)} (mg/mL)	K-562 GI ₅₀ (mg/mL)	HeLa CC ₅₀ ^{b)} /CC ₁₀
1a	2.5	1.0	4.2/0.4
2a	2.3	0.5	2.9/0.4
S.E.M.	0.7	10.3	

^{a)} GI₅₀ (mg/mL): growth inhibition or antiproliferative activity.

^{b)} CC₅₀ (mg/mL): cytotoxic concentration.

against *M. kansasii* 6509/96 (clinical isolate) are comparable with that of INH. It is worthy to note that the mono-halogenated compounds are more active than the dihalogenated.

According to Free-Wilson analysis the presence 4-propyl and 4-octyl group resulted in the increase in antimycobacterial activity, i.e. the alkyls have two optima of the antimycobacterial activity. With regard to the substituents in the acyl moiety, the substitution in position 5 by chlorine or by bromine leads to a rise of the activity. The highest activity exhibited compound 3g. Substitution with an octyl group strongly increases the lipophilicity (log P: 8.5) of the compounds and it is not favorable for use *in vivo* [10].

4-Chloro-N-(4-propylphenyl)salicylamide 1a and 5-chloro-N-(4-propylphenyl)salicylamide 2a were chosen for preclinical testing. Both compounds displayed a promising activity *in vitro* against all mycobacterial strains tested, their activities reach that of INH against *M. tuberculosis* My 331/88 and *M. kansasii* 6509/96 and exceeded the potency of INH against *M. kansasii* My 235/80 and *M. avium* 330/88. These selected compounds were subjected to an antiproliferative effect assay and cytotoxic effect assay. According to the values of GI and CC, compounds can be considered as moderately cytotoxic. Both substances are able to release previously inhibited respiration by oligomycin similarly to carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone (data not shown) in tests on effect on endogenous respiration and mode of action. We can conclude that both substances are similar to other uncouplers (such as dinitrophenole and carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone). The compounds decrease the level of ATP that decreases or inhibits growth of bacteria. This effect can be connected to the mechanism of the antimycobacterial action.

Results shown in Table 5 are the arithmetic means of the three separate experiments (for each concentration). The precision of these measurements is ±%. Stimulation of endogenous respiration of Ehrlich ascites cells is significantly dependent on tested concentration, however, is similar as in the case of the most effective uncoupler of

Table 5. Effects of compounds 1a and 2a on endogenous respiration of Ehrlich ascites carcinoma cells.

Compound	Concentrations of compounds (mmol/L)	Consumption of oxygen (nmol O ₂ /min)	Percent of control (%)
1a	0	120.15	-
	22.73	184.68	+153.7
	45.45	160.2	+133.3
	68.18	151.3	+125.9
	90.91	135.73	+112.9
	113.64	115.7	+96.3
2a	0	115.7	-
	22.73	244.75	+211.5
	45.45	244.75	+211.5
	68.18	202.48	+175.0
	90.91	202.48	+175.0
	113.64	180.23	+155.8

Cell suspension (0.2 mL) containing 17 mg dry weight, was added to 2.0 mL of medium [11], pH 7.4. Oxygen uptake was measured at 30 °C.

carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP).

This work is a part of the research project No. MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

Experimental

Melting points were determined on a Kofler block (C. Reichert, Vienna, Austria) and are uncorrected. The IR spectra were measured in KBr pellets or in CHCl₃ solutions on a Nicolet Impact 400 apparatus (Nicolet, Madison, WI, USA); the wave numbers are given in cm⁻¹. The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H- and 75 MHz for ¹³C-NMR in d₆-DMSO (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts were recorded as δ values in ppm, and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (7.26 for ¹H- and 77.0 for ¹³C-NMR). The coupling constants *J* are given in Hz. Elemental analyses were done on a CHNS-O CE elemental analyzer (FISONS EA1110, Milano). Analyses of the C, H, N, S content were within ±0.4% of the theoretical values. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator, Silufol UV 254 + 366 (Kavalier, Votice, The Czech Republic), in cyclohexane/acetone 3:1, to check the purity of the products.

General procedure for the preparation of N-(4-Alkylphenyl)salicylamides

A suspension of a substituted salicylic acid (0.02 mol) and a substituted aniline (0.02 mol) in toluene (100 mL) was heated under reflux in the presence of PCl₃ (0.01 mol) for three hours. The reaction mixture was filtered while hot, and the solvents evaporated. The product was crystallized from ethanol-water (yields in the range 52–79%).

Antimycobacterial susceptibility testing

The methods of experiments are described in our previous paper [3, 9]. The MICs were determined after incubation at 37°C for 14 and 21 days.

Antiproliferative and cytotoxic activity evaluation

The methods of experiments are described in our previous paper [11]. The 4-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 1a and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 2a were chosen for the testing.

Endogenous respiration evaluation

The 4-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 1a and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 2a were chosen for the testing. EAC cells were maintained and propagated in a strain of H Swiss albino mice from the Institute of Virology of Slovak Academy of Sciences, Bratislava, about 10 weeks old and 20–25 g body weight, as described previously [12].

The effect of compounds tested on the endogenous respiration of EAC cells was measured with a Clark-type oxygen electrode as described previously [13] in 154 mM NaCl, 6.2 mM KCl, 11 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 [14]. Compounds dissolved in DMSO were mixed with 2.0 mL of this medium, and 200 mL of the cell suspension in the same buffer solution were added. Incubation temperature was 30°C.

References

- [1] L. Zahajská, V. Klimešová, J. Kocí, K. Waisser, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 2004, 337, 549–555.
- [2] K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, *Farmaco* 2004, 59, 615–625.
- [3] K. Waisser, R. Doležal, J. Čižmárik, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* 2006, 51, 21–24.
- [4] K. Waisser, J. Adamec, R. Doležal, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* 2005, 50, 195–197.
- [5] J. Adamec, K. Waisser, J. Kuneš, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2005, 338, 385–389.
- [6] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* 2006, 51, 25–26.
- [7] J. Matyk, K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, *et al.*, *Farmaco* 2005, 60, 399–408.
- [8] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* 2005, 50, 479–482.
- [9] K. Waisser, O. Bureš, P. Holý, J. Kuneš, *et al.*, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 2003, 336, 53–71.
- [10] K. Waisser, Ž. Odlerová, *Folia Pharmaceutica Univ. Carol.* 1995, 18, 35–39.
- [11] H. M. Dahse, U. Möllmann, K. Waisser, K. Palát, *et al.*, *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2002, 26–33.
- [12] M. Miko, M. Poturnajova, R. Soucek, *Neoplasma* 2002, 49, 167–171.
- [13] M. Miko, B. Chance, *Biochim. Biophys. Acta* 1965, 105, 410–423.
- [14] B. Chance, B. Hess, *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 2404–2412.

Full Paper

**The Oriented Development of Antituberculotics (Part II):
Halogenated 3-(4-Alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-
diones***Karel Waisser¹, Josef Matyk¹, Hana Divišová¹, Petra Husáková¹, Jirí Kuneš¹, Vera Klimešová¹, Karel Palát¹, and Jarmila Kaustová²¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského, Czech Republic² Regional Institute of Public Health, Department for Diagnostic of Mycobacteria, Ostrava, Czech Republic

Based on our previous studies, 21 new halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones were synthesized by the reaction of salicylanilides and methyl-chloroformate. All compounds were screened *in vitro* against three different strains of mycobacterium, and Free-Wilson method was used to establish structure-activity relationship. 6-Bromo-3-(4-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione **3b** proved to be the most active compound of the series.

Keywords: Antimycobacterial activity / Antituberculotic activity / Benzoxazine / Tuberculostatics

Received: October 18, 2006; accepted: January 19, 2007

DOI 10.1002/ardp.200600002

Introduction

The return of tuberculosis to Europe and North America is one truly unpleasant development of the period dating from 1985. New mycobacterial diseases, which recently have been considered to be transferable to humans, occurred during the last years (mycobacterioses produced by potentially pathogenic strains). The development of new antituberculotic agents is the principal goal of our group. Lately, we have studied a number of structurally different compounds, such as the derivatives of salicylamides [1], pyridine [2, 3], alkoxyphenylcarbamic acids [4], tetrazoles [5, 6], dihydroindolethiones [7], and other heterocycles [8, 9]. Our research was strongly oriented to collaborate with German institutes like Technical University Dresden, Friedrich Schiller University Jena, Hans Knöll Institute Jena, and Maxmilian University in Munich). Approximately ten years ago, we studied antimycobacterial derivatives with the new pharmacophore together with Hans-Dietrich Stachel [10, 11] and

for several years now, we are investigating the antimycobacterial arylbenzoxazine-2,4(3H)-diones [12]. Now, we dedicate this paper to Hans-Dietrich Stachel.

The goal of this paper is the synthesis and antimycobacterial evaluation of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones, substituted in the ring B by chlorine or bromine, and to complete with this study our previous work [1]. 3-Phenyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones are the cyclic carbamic derivatives of salicylanilides and the mechanism of the antimycobacterial activity of 3-phenyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones is similar to that of salicylanilides. [13].

Results and discussion**Chemistry**

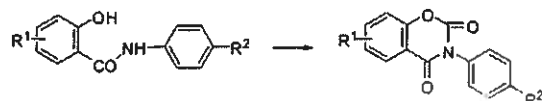
The synthesis of the title compounds is illustrated in Scheme 1. The synthesis of the starting material, halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides, were described in the previous paper [1]. Various *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides, being halogen substituted in ring A, were reacted with methyl-chloroformate in dry pyridine. The

Correspondence: Karel Waisser, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, CZ 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: waisser@faf.cuni.cz
Fax: +420 495 514-330

* Dedicated to Prof. Hans-Dietrich Stachel (Munich) on the occasion of his 80th birthday.

Table 1. Yield, melting point, and carbonyl frequency of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones.

Compound	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm ⁻¹)	Compound	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm ⁻¹)
1a	60	188–190	1773, 1703	2f	56	134–135	1777, 1708
1b	58	189–190	1771, 1705	2g	67	141–142	1777, 1708
1c	61	214–215	1770, 1709	3a	58	193–194	1774, 1700
1d	52	181–182	1773, 1701	3b	63	194–195	1770, 1702
1e	52	162–165	1776, 1699	3d	64	179–180	1777, 1709
1g	50	181–182	1773, 1702	3e	58	168–169	1774, 1701
2a	63	158–160	1777, 1696	3f	62	158–160	1774, 1701
2b	66	161–162	1776, 1708	4b	47	168–169	1774, 1701
2c	66	214–215	1767, 1716	4d	58	197–198	1780, 1701
2d	56	136–137	1777, 1708	4e	48	196–199	1781, 1703
2e	51	146–148	1776, 1708				



	R ¹	R ²
1	6-Cl	a propyl
2	7-Cl	b butyl
3	6-Br	c <i>tert</i> -butyl
4	6,8-Br ₂	d pentyl
		e hexyl
		f heptyl
		g octyl

Scheme 1. Synthesis of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones.

halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones were purified by crystallization from ethanol. Yield, melting point, and carbonyl frequency of the products are summarized in Table 1. Data from elemental analysis and NMR spectra are described in the Supporting Information.

Biology

In vitro antimycobacterial activity of the compounds was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88 and *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 using the micromethod for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC). All strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague with the exception of *M. kansasii* 6 509/96. The minimum inhibitory concentrations are illustrated in Table 2. For the sake of comparison, we also include the MIC values of the standard isoniazide (INH).

Calculation

All calculations were carried out with the use of the Multireg H program (Klemra) for Microsoft Excel. The results of Free-Wilson method are summarized in Table 3.

Table 2. Minimum antimycobacterial inhibitory activity.

Compound		MIC (μmol/L) Incubation time 14 d/21 d			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
1a	6-Cl propyl	16/16	8/8	16/16	8/16
1b	6-Cl butyl	8/8	8/8	8/8	8/16
1c	6-Cl <i>tert</i> -butyl	8/16	8/16	16/32	8/8
1d	6-Cl pentyl	8/4	8/16	8/16	8/16
1e	6-Cl hexyl	8/8	8/16	8/8	8/16
1g	6-Cl octyl	8/8	4/8	8/8	4/4
2a	7-Cl propyl	8/8	8/16	16/16	8/16
2b	7-Cl butyl	8/8	8/16	16/16	8/16
2c	7-Cl <i>tert</i> -butyl	4/4	8/16	4/8	8/8
2d	7-Cl pentyl	8/8	8/8	4/8	8/16
2e	7-Cl hexyl	4/8	8/8	4/8	8/8
2f	7-Cl heptyl	16/32	8/8	16/32	8/16
2g	7-Cl octyl	8/16	8/16	8/16	8/16
3a	6-Br propyl	16/16	8/16	16/16	8/16
3b	6-Br butyl	4/4	8/8	8/8	8/8
3d	6-Br pentyl	4/4	8/16	8/8	8/8
3e	6-Br hexyl	4/8	8/16	4/8	8/8
3f	6-Br heptyl	4/8	8/16	4/4	4/8
4b	6,8-Br ₂ butyl	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
4d	6,8-Br ₂ pentyl	16/32	16/16	62.5	32/32
4e	6,8-Br ₂ hexyl	62.5/62.5	32/32	62.5	62.5/62.5
INH		1/2	250/250	250/250	8/8

Discussion

The study was incited by the previous synthesis of antimycobacterial salicylanilides. For the synthesis of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones salicylanilides are reacted with chloroformate. The 1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones are cyclic carbamates of salicylanilides. The structures of products were confirmed by elemental analyses and by IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectral methods. All halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones showed characteristic absorption maxima of two C=O groups at 1767–1777 cm⁻¹ and 1696–1716 cm⁻¹ with the exception of compound 3d. Two absorption maxima of the C=O groups in this region are a characteristic feature for 1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones. The other confirmation of the structure was by NMR

Table 3. Activity contribution of Free-Wilson analyzes of benzoxazinediones and statistical significant of correlations.

Parameter	$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/L}$) For incubation time 14 d/21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
R ¹ : 6-Cl	0.0209/-0.207	-0.1121 ²¹	-0.0435/-0.0646	-0.1383/-0.062
7-Cl	-0.0935/-0.0842	-0.0638 ²¹	-0.1504/-0.0569	-0.0696/-0.006
6-Br	-0.2664/-0.2469	0.0023 ²¹	-0.2318/-0.2654	-0.1459/-0.235
6,8-Br ₂	0.6204/0.6494	0.5133 ²¹	0.8247/0.7043	0.7451/0.5321
R ² : propyl	0.2701/0.1744	0.0152 ²¹	0.2991/0.1718	0.0322/0.1585
butyl	-0.0444/-0.1423	0.0901 ²¹	0.0575/-0.0365	0.0572/0.679
tert-butyl	-0.1566/-0.0904	-0.0165 ²¹	-0.0458/0.1037	0.0182/-0.208
pentyl	-0.1132/-0.1423	-0.0597 ²¹	-0.0926/-0.0365	-0.0178/0.0002
hexyl	-0.0382/0.0078	0.0153 ²¹	-0.0962/-0.115	0.0572/0.0002
heptyl	0.1371/0.3227	0.0025 ²¹	0.0483/0.054	-0.128/0.028
octyl	-0.0066/0.0596	-0.1335 ²¹	-0.0458/-0.0464	-0.1318/-0.207
μ_0	0.943/1.043	0.9714 ²¹	1.043/1.157	0.1015/0.1724
r	0.881/0.878	0.928 ²¹	0.915/0.860	0.971/0.901
s	0.2033/0.2087	0.1253 ²¹	0.211/0.238	0.1015/0.1724
F	4.24/4.12	7.57 ²¹	6.25/3.48	20.42/5.25
n	21/21	21/21	21/21	21/21

²¹ Correlation is not statistically significant.

methods: The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of all compounds (see Table 1) are in the good agreement with the proposed structures. In addition, elemental analyses of all compounds correspond to the calculated values.

The values of antimycobacterial activity of the halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones are shown in Table 2. For the sake of comparison, we also included the MIC values of the standard isoniazide (INH). The results revealed that the compounds exhibited *in vitro* activity against all tested mycobacterial strains. The values of MICs are generally within the range 4–62.5 $\mu\text{mol/L}$, most often between 4–8 $\mu\text{mol/L}$. The compounds were less active than INH against *M. tuberculosis* 331/88, on the other hand, the compounds possessed a better activity against *M. kansasii* 235/80 and *M. avium* 330/88 than INH. The activities of newly prepared compounds against *M. kansasii* 6509/96 (clinical isolate) are comparable with that of INH. The newly synthesized compounds form the new promising group of antimycobacterials with the broad spectrum of activity. It is worth to note, that the monohalogenated compounds are more active than the dihalogenated ones. The antimycobacterial activity increases if 1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones are substituted in position 6 with bromine. Bromo derivatives were more active than chloro derivatives. Contrary to the starting salicylanilides, the antimycobacterial activity mostly increases when the phenyl ring is substituted by butyl. (In case of salicylanilides it was propyl). The most active in the group of halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione was 6-bromo-3-(4-

butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione 3b. According to Free-Wilson calculations, we can assume that 6-bromo-3-(4-*tert*-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione will be more active than the compounds under study.

This work is a part of the research project No. MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

Experimental

Melting points were determined on a Kofler block (C. Reichert, Vienna, Austria) and are uncorrected. The IR spectra were measured in KBr pellets or in CHCl_3 solutions on a Nicolet Impact 400 apparatus (Nicolet, Madison, WI, USA); the wave numbers are given in cm^{-1} . The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C in d_6 -DMSO (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts were recorded as δ values in ppm and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (7.26 for ¹H and 77.0 for ¹³C). The coupling constants *J* are given in Hz. Elemental analyses were done on a CHNS-O CE elemental analyzer (FISONS EA1110, Milano, Italy). Analyses of the C, H, N, S content were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator, Silufol UV 254 + 366 (Kavalier, Votice, The Czech Republic), in cyclohexane/acetone 3 : 1, to check the purity of the products.

General procedure for the preparation 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones

Methyl-chloroformate (5.2 g, 48 mmol) was added dropwise to a stirred solution of the corresponding salicylanilide (40 mmol) in

dry pyridine (20 mL) under ice cooling. The mixture was heated on a steam bath for 1 h and then poured into 5% hydrochloric acid (140 mL). After 24 h the product was filtered off, suspended in 5% potassium hydroxide solution, and the solid was filtered off. The crude products were purified by the crystallization from EtOH-water (yields 55–65%).

Antimycobacterial susceptibility testing

The methods of the experiments are described in our previous paper [12]. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined after incubation at 37°C for 14 and 21 days.

References

- [1] K. Waisser, J. Matyk, H. Divišová, P. Husáková, *et al.*, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, *339*, 616–620.
- [2] L. Zahajská, V. Klimešová, J. Kocí, K. Waisser, J. Kaustová, *Archiv Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2004**, *337*, 549–555.
- [3] K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, *Farmaco* **2004**, *59*, 615–625.
- [4] K. Waisser, R. Doležal, J. Čizmarík, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2006**, *51*, 21–24.
- [5] K. Waisser, J. Adamec, R. Doležal, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2005**, *50*, 195–197.
- [6] J. Adamec, K. Waisser, J. Kuneš, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, *338*, 385–389.
- [7] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2006**, *51*, 25–26.
- [8] J. Matyk, K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, *et al.*, *Farmaco* **2005**, *60*, 399–408.
- [9] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2005**, *50*, 479–481.
- [10] H.-D. Stachel, Ž. Odlerová, K. Waisser, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *62*, 510–515.
- [11] J. E. Schachtner, J. Hienaber, H. D. Stachel, K. Waisser, *Pharmazie* **1999**, *54*, 335–339.
- [12] K. Waisser, O. Bureš, P. Holý, J. Kuneš, *et al.*, *Pharmazie* **2003**, *58*, 83–94.
- [13] K. Waisser, K. Dražková, P. Holý, K. Palát, J. Kaustová, *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2003**, *29/30*, 17–20.