

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

Syntéza a design potenciálně antimikrobiálně aktivních sloučenin

Dizertačná práca

Ján Kozic

Hradec Králové

2013

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri vypracovaní tejto práce čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.

Ján Kozic

Hradec Králové

ABSTRAKT

Táto práca sa zaoberá prípravou benzanilidov a ich analogov ako potenciálne antimykobakteriálne aktívnych zlúčenín. V rámci teoretickej časti je popísaná tuberkulóza (TBC) ako mykobakteriálne infekčné ochorenie a je podaná stručná charakteristika súčasných antituberkulotík. Dôraz je kladený na tie charakteristické vlastnosti, ktoré determinujú nedokonalosť súčasných antituberkulotík a tým podmieňujú nutnosť niekoľkomesačnej kombinovanej liečby TBC. Následne sú popísané niektoré lepšie preskúmané potenciálne cieľové štruktúry využiteľné pri vývoji nových, dokonalejších antituberkulotík. Nakoniec je podaný stručný prehľad najdôležitejších biologických vlastností benzanilidov a ich tio analogov a detailná charakteristika ich stereochemických vlastností.

V rámci praktickej časti je prezentovaných celkom 100 derivátov benzanilidu respektíve jeho analogov. Z týchto látok je 92 originálnych, v literatúre doposiaľ nepopísaných. U všetkých látok sú uvedené výsledky ich *in vitro* antimykobakteriálneho testovania proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *Mycobacterium avium*, a dvom kmeňom *Mycobacterium kansasii*. U pripravených látok je taktiež charakterizovaná ich *in vitro* schopnosť inhibovať enzým izocitrátlyázu, dôležitý perzistenčný faktor *M. tuberculosis*. V ďalšej časti sú popísané metódy a výsledky konformačnej analýzy väzieb CS-NH, Ar-CSNH a Ar-NHCS molekúl 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidov. Získané výsledky sú porovnané so súčasným stavom poznania.

Kľúčové slová:

Tuberkulóza, antituberkulotiká, perzistencia, dormantný stav, izocitrátlyáza, benzanilidy, tiobenzanilidy, konformácia tiobenzanilidov.

ABSTRACT

This work deals with the synthesis of benzanilides and their analogues as the potentially antimycobacterial active compounds. In the theoretical part of the work there is a description of tuberculosis (TBC) as a mycobacterial infectious disease and a short characteristic of recent antituberculous drugs. The most important features of both, which determine the imperfection of recent antituberculous and the long-term multidrug TBC treatment, are emphasised. Further, some of the potential targets, useful for the development of new and more effective antituberculous, are reviewed. Finally, there is a short overview of biological properties of benzanilides and thiobenzanilides and a more in depth characteristic of stereochemical properties of these compounds.

In the experimental part of the work there are presented 100 benzanilide derivatives and their analogues. Ninety-two of these compounds are original, which have not been described in literature yet. For all of the compounds there are presented the results of *in vitro* antimycobacterial evaluation against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *Mycobacterium avium*, and two strains of *Mycobacterium kansasii*. The prepared compounds are as well as characterised by their ability to act as an *in vitro* inhibitor of the enzyme isocitrate lyase, an important persistent factor of *M. tuberculosis*. The next part of the work concerns with the means and the results of conformational study of CS-NH, Ar-CSNH and Ar-NHCS bonds of 2-methoxy-2'-hydroxythiobenzanilides. The obtained results are compared with recent knowledge.

Keywords:

Tuberculosis, antituberculous, persistence, state of dormancy, isocitrate lyase, benzanilides, thiobenzanilides, conformation of thiobenzanilides.

POĎAKOVANIE

Rád by som sa poďakoval svojej školiteľke Prof. RNDr. Jarmile Vinšovej, CSc. za trpezlivosť, ktorú so mnou mala, za odborné vedenie počas môjho štúdia, ako i za pomoc, cenné rady a pripomienky pri spisovaní článkov a tejto disertačnej práce. Ďalej by som sa chcel poďakovať Mgr. et Mgr. Zdenkovi Novákovi za ochotu a obetavosť, s akou pristupoval k našej spolupráci pri riešení konformačnej problematiky niektorých pripravených látok. Moja vďaka patrí ďalej Doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc., H. Mikešovej, I. Vencovskej a V. Hronovej za realizáciu analytických meraní pripravených látok. Za stanovenie biologickej aktivity a cytotoxicity by som sa chcel poďakovať Mgr. E. Novotnej, Ph.D., RNDr. J. Stolaříkovej a Mgr. M. Volkovej. Moja vďaka prináleží taktiež ďalším pracovníkom Katedry anorganické a organické chemie, kolegom a priateľom, menovite najmä RNDr. E. Vavříkovej, Ph.D. a PharmDr. M. Krátkému, Ph.D.

Táto práca bola financovaná z nasledujúcich zdrojov: FRVŠ 665/2012, GAUK 27610/2010, GAUK 64407/2007, IGA NT 13346 (2012), IGA NS 10367-3 a SVV 267 001.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Ac-CoA - acetyl-koenzým A

ACP - acyly prenášajúci proteín

AMI - amikacín

ATP - adenzíntrifosfát

BCG - Bacillus Calmette Guérin

BK - vysokovodivostný prostredníctvom Ca^{2+} aktivovaný draslíkový kanál

CAP - kapreomycín

DMF - dimetylformamid

DMSO - dimetylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DosR - regulón prežívania v dormantnom stave

DosR (Rv3133c) - transkripčný faktor regulujúci expresiu génov z DosR

DosT (Rv2027c), DosS (Rv3132c) - senzorové kinázy riadiace DosR (Rv3133c)

dTDP - deoxytimidíndifosfát

EMB - etambutol

EmbA, EmbB, EmbC - enzýmy s arabinozyltransferázovou aktivitou

embA, *embB*, *embC* - gény kódujúce enzýmy s arabinozyltransferázovou aktivitou

EtAc - etyl-acetát

ETH - etionamid

EtOH - etanol

FAS II - syntetáza mastných kyselín II

FQ - fluorchinolóny

GDP - guanozínidifosfát

GTP - guanozíntrifosfát

HIV - vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti

IC - inhibičná koncentrácia

ICL - izocitrátlyáza

icl - gén kódujúci izocitrátlyázu

IL-12 - interleukín 12

INF- γ - interferón γ

INH - izoniazid

InhA - NADH dependentná $\Delta 2$ -*trans*-enoyl-ACP reductáza

inhA - gén kódujúci NADH dependentnú $\Delta 2$ -*trans*-enoyl-ACP reductázu

KAN - kanamycín

MDR-TBC - multiliekovo rezistentná tuberkulóza

MIC - minimálna inhibičná koncentrácia

mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

NADH - nikotínamidadeníninukleotid

ppGpp, pppGpp - polyfosforylované guanínové nukleozidy

PAS - *p*-aminosalicylová kyselina

PTH - protionamid

PZA - pyrazínamid

Rel_{Mtb} - enzým syntetizujúci a hydrolyzujúci ppGpp a pppGpp

rel_{Mtb} - gén kódujúci enzým syntetizujúci a hydrolyzujúci ppGpp a pppGpp

RIF - rifampicín (rifampín)

RNA - ribonukleová kyselina

RNAP - komplex RNA polymerázy

rRNA - ribozomálna ribonukleová kyselina

RT - rezonančná teória

SI - index selektivity

SM - streptomycín

TBC - tuberkulóza

T_C - cytotoxické T lymfocyty

TCA - trikarboxylové kyseliny

TEA - trietylamín

THF - tetrahydrofurán

TLC - tenkovrstvová chromatografia

TNF α - tumor nekrotizujúci faktor α

T_{reg} - regulačné T lymfocyty

tRNA - transférová ribonukleová kyselina

UDP - uridíndifosfát

WHO - Svetová zdravotnícka organizácia

OBSAH

1. Úvod	11
2. Cieľ práce	12
3. Súčasný stav riešenej problematiky	13
3.1. Tuberkulóza	13
3.1.1. Etiológia a charakteristika pôvodcu	13
3.1.2. Rizikové faktory	14
3.1.3. Epidemiológia	14
3.1.4. Patogenéza	14
3.1.5. Príznaky	16
3.2. Súčasná antituberkulotiká	16
3.3. Súčasná terapia TBC	21
3.4. Súčasný vývoj nových antituberkulotík	23
3.5. Biologická aktivita derivátov benzanilidu a tiobenzanilidu	27
3.6. Stereochemické vlastnosti derivátov benzanilidu a tiobenzanilidu	29
4. Experimentálna časť	37
4.1. Syntetická časť	37
4.1.1. Všeobecné metódy	37
4.1.2. Deriváty 2-metoxybenzanilidu a jeho tioxo analogu	38
4.1.3. Deriváty 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho tioxo analogu	48
4.1.4. Stereochemické vlastnosti derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu	65
4.2. Biologické hodnotenie pripravených látok	77
4.2.1. <i>In vitro</i> antimykobakteriálne hodnotenie	77

4.2.2. <i>In vitro</i> hodnotenie ICL1 inhibičnej aktivity	77
4.2.3. <i>In vitro</i> test cytotoxicity	78
5. Výsledky a diskusia	80
5.1. Deriváty 2-metoxybenzanilidu a jeho tioxo analogu	80
5.2. Deriváty 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho tioxo analogu	85
5.2.1. Biologické vlastnosti derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho tioxo analogu	85
5.2.2. Stereochemické vlastnosti derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu	92
6. Záver	102
7. Prílohy	103
8. Zoznam publikácií a prezentácií	109
9. Literatúra	111

1. ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) je jedno z najstarších ľudských ochorení. Kostrové pozostatky dokazujú, že ľudia trpeli a umierali na túto chorobu už pred niekoľkými tisícami rokov. Napriek tejto skutočnosti príčina TBC zostávala dlho nejasná, predpokladalo sa, že ide o dedičné alebo spontánne vznikajúce ochorenie. Prvá zmienka o TBC ako o infekčnej chorobe sa datuje do roku 1720 (B. Martens). Experimentálny dôkaz podal o približne 150 rokov neskôr J.A. Villemin prostredníctvom prenosu TBC na zvieratá. Nakoniec, v roku 1882 R. Koch vyhlásil, na základe svojich izolačných a kultivačných experimentov, za pôvodcu ochorenia baktériu druhu *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ¹.

Rod *Mycobacterium* je početný a na Zemi hojne rozšírený. Väčšina jeho druhov sú pôdne alebo vodné baktérie živiace sa ako saprofyty. Obligátnymi parazitmi, vyvolávajúcimi ochorenie človeka, je len niekoľko druhov. Okrem *M. tuberculosis* môžu TBC u človeka vyvolať i *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* a *Mycobacterium pinnipedii*, všetky sa súhrnne zvyknú označovať ako *M. tuberculosis* komplex. Ďalším mykobakteriálnym ochorením človeka je lepra, pôvodcom je *Mycobacterium leprae* a Buruli vred spôsobovaný *Mycobacterium ulcerans*. Fakultatívnymi parazitmi človeka sú napr. *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, baktérie *Mycobacterium avium* komplexu, atd., ktoré u imunokompromitovaných jedincov vyvolávajú tzv. atypické mykobakteriózy ¹.

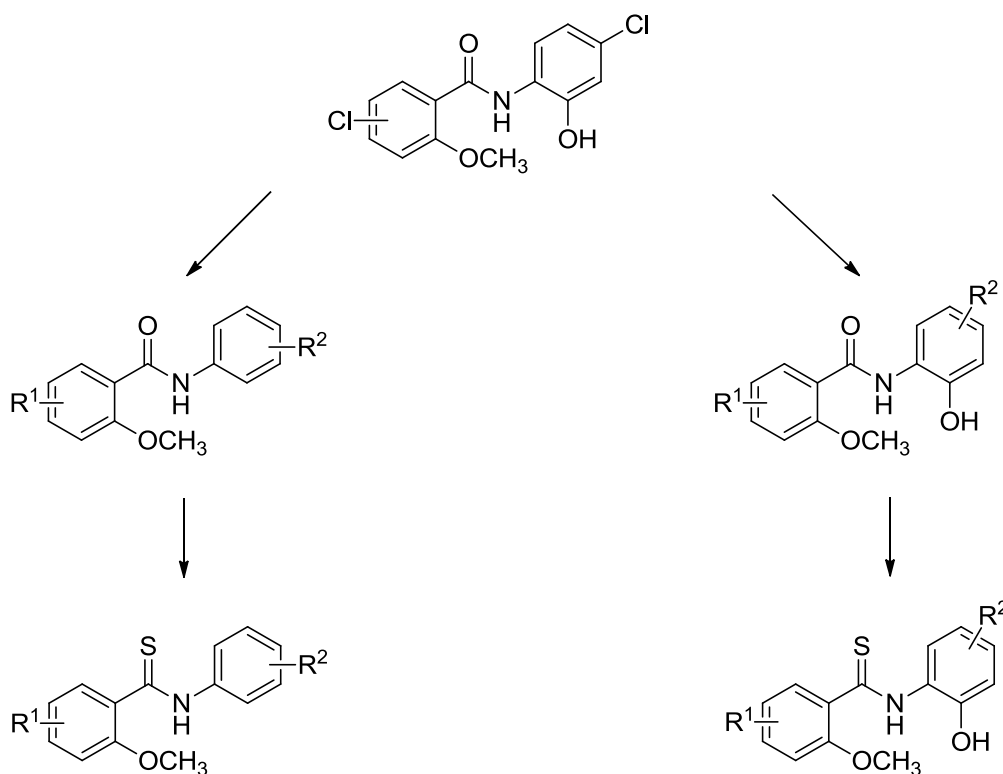
Hoci bola v dvadsiatych rokoch minulého storočia do praxe zavedená vakcinácia proti TBC pomocou oslabeného kmeňa *M. bovis* (BCG vakcína) a od štyridsiatych rokov minulého storočia sú dostupné antimykobakteriálne účinné látky, predstavuje TBC stále jedno z najrozšírenejších a najnebezpečnejších infekčných ochorení. Podľa odhadu WHO je tretina celosvetovej populácie infikovaná pôvodcom ochorenia, ročne je toto ochorenie diagnostikované asi u 9 miliónov ľudí a ďalších asi 1,5 milióna naň každý rok zomrie. Dôvodom je najmä nedokonalosť súčasných antituberkulotík, schopnosť mykobaktérií manipulovať mechanizmami hostiteľského imunitného systému vo svoj vlastný prospech, mykobakteriálna schopnosť perzistovať a prežívať v dormantnom stave, nárast rezistencie na dnes používané antituberkulotiká, rozširujúca sa HIV infekcia a migrácia obyvateľstva ^{1, 2, 3}.

I preto je dnes výskum zameraný na získanie nových antimykobakteriálne aktívnych látok, zvlášť zasahujúcich nereplikujúce sa mykobaktérie, výsostne aktuálny.

2. CIEĽ PRÁCE

Tematicky je táto dizertačná práca zameraná na deriváty benzanilidu a jeho analogy ako antimykobakteriálne aktívne látky. Táto téma je dlhodobo študovaná mojou školiteľkou Prof. RNDr. Jarmilou Vinšovou, CSc. ako i ďalšími pracovníkmi môjho školiaceho pracoviska -Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutickej fakulty UK.

Samotný cieľ dizertačnej práce je stanovený na základe výsledkov mojej diplomovej práce. V rámci nej som u dvoch pripravených látok (4/5,4'-dichlor-2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu) zistil pomerne vysokú *in vitro* antituberkulotickú aktivitu. Ich minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) voči *M. tuberculosis* je po 14/21 dňoch inkubácie na úrovni 8/8 resp. 4/4 $\mu\text{mol/l}$. Preto som sa rozhodol ďalej rozšíriť túto skupinu látok ako i pripraviť látky bez hydroxy skupiny v anilidovej časti molekuly (Obrázok 1). Od oboch skupín látok je ďalej naplánované pripraviť ich tioanalogy (Obrázok 1).



Obrázok 1: Cieľové molekuly dizertačnej práce: R¹ = Cl, R² = NO₂, Cl, di-Cl, Br, CF₃.

Pripravené látky je zamýšľané otestovať na ich *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu, *in vitro* schopnosť inhibovať enzým izocitrátlyázu (ICL), prípadne cytotoxicitu a zo získaných výsledkov vyvodit' vzťahy medzi štruktúrou a biologickou aktivitou.

3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza je infekčné ochorenie vyvolávajúce chronický granulomatózny zápal infikovaného tkaniva⁴. Hoci sa poznanie tohto ochorenia v uplynulých rokoch prehĺbilo, stále ostáva mnoho neznámeho. Nasledujúce kapitoly stručne zhŕňajú základné poznatky o TBC.

3.1.1. Etiológia a charakteristika pôvodcu

Pôvodcom TBC je najčastejšie baktéria druhu *M. tuberculosis*. Vo výnimočných prípadoch sú príčinou iné druhy z *M. tuberculosis* komplexu¹. Mtb je intracelulárna, aeróbná, nepohyblivá, nesporulujúca, toxíny a kapsulu netvoriaca baktéria tyčinkového tvaru s rozmermi 0,3-0,6 x 1-4 μm ^{5,6}. Jej hlavným hostiteľským organizmom je človek, infikovať však môže i iné živočíšne druhy. Najlepší rast dosahuje v tkanivách bohatých na kyslík, napr. v pľúcach (pľúcna TBC), zriedkavejšie infikuje i iné tkanivá (mimopľúcna TBC). Infikovanými bunkami postihnutých tkanív sú najmä makrofágy. Na základe farbenia podľa Grama nejde ani o Gram-pozitívnu ani o Gram-negatívnu baktériu, ale o tzv. acido-rezistentnú baktériu. K prieniku zásaditého farbiva (krištáľovej violeti) do bunkovej steny totiž dôjde až po jeho kombinácii s fenolom a sfarbenie sa zachováva i pri pôsobení kyslého organického rozpúšťadla (Ziehl-Nielsenovo farbenie)⁵.

Príčina tejto výnimočnosti Mtb je v stavbe jej bunkového obalu. Ten pozostáva z bunkovej membrány a bunkovej steny. Bunková stena je netypicky až z 60 % tvorená látkami lipofilnej povahy a podľa súdobých poznatkov pozostáva z dvoch častí: mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanu (mAGP) a extrahovateľnej zmesi nekovalentne viazaných glykanov, lipidov a proteínov. Mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykan je peptidoglykan (PG) obsahujúci miesto obvyklej *N*-acetylmuramovej kyseliny *N*-glykolylmuramovú kyselinu, na ktorý je kovalentne viazaný arabinogalaktan (AG), ktorého distálny koniec je esterifikovaný mykolovými kyselinami^{6,7}. Mykolové kyseliny sú β -hydroxy masné kyseliny s hlavným uhlíkovým reťazcom $\text{C}_{54} - \text{C}_{63}$, ktoré obsahujú v polohe α alkyl $\text{C}_{22} - \text{C}_{24}$ (proximálny reťazec). Podľa substitúcie v hlavnom reťazci sa mykolové kyseliny delia na α -mykolové, metoxymykolové a ketomykolové kyseliny. U Mtb sú mykolové kyseliny syntetizované špeciálnym enzýmovým systémom (FAS II)⁸. Táto stavba a zloženie bunkovej steny umožňuje Mtb odolávať vyschnutiu, pôsobeniu rôznych antimikróbnych látok a prežívať vo vnútri makrofágov^{9,10}.

3.1.2. Rizikové faktory

Medzi rizikové faktory TBC patrí HIV infekcia, maligné ochorenia, diabetes melitus (zvlášť inzulín dependentný), malnutrícia, silikóza, fajčenie, abúzus alkoholu, znečistenie ovzdušia, vek, genetická predispozícia a terapia kortikosteroidmi alebo antagonistami tumor nekrotizujúceho faktoru α (TNF α)⁵.

3.1.3. Epidemiológia

Zdrojom nákazy je najčastejšie človek s aktívnou TBC, menej často infikovaný biologický materiál. Napr. pred zavedením pasterizácie mlieka, to bolo veľmi často kravské mlieko infikované *M. bovis*. K prenosu nákazy najčastejšie dochádza pomocou infekčných častíc, ktoré sú vykašľávané človekom s aktívnou TBC. Infekčné častice si svoju infekčnosť, v dôsledku odolnosti *Mtb* voči vyschnutiu, zachovávajú i niekoľko hodín. Menej častým spôsobom prenosu je priamy kontakt alebo alimentárna cesta (nakazené mlieko). K vstupu pôvodcu ochorenia do hostiteľského organizmu dochádza najčastejšie inhaláciou infekčných častíc^{5,6}.

3.1.4. Patogenéza

Pri prvom kontakte hostiteľského organizmu s pôvodcom ochorenia dochádza k primoinfekcii. Tá začína, keď mykobaktérie dosiahnu pľúcne alveoly. Tu sú fagocytované alveolárnymi makrofágmi a dendritickými bunkami dýchacích ciest^{11, 12}. Tie predstavujú súčasť prirodzeného imunitného systému hostiteľa a ako patogén rozpoznávajú niektoré štruktúry prítomné v bunkovej stene mykobaktérií. Ide najmä o molekuly *N*-glykolylmuramyl-dipeptidu, dimykolátu trehalózy a manozylovaného lipoarabinomananu^{5, 12}. Následne sú fagocytované mykobaktérie väčšinou okamžite eliminované splynutím fagozómu s lyzozómami¹⁰. Zároveň imunitné bunky prenikajú z alveolov do pľúcneho parenchýmu, kde začínajú produkovať rôzne cytokíny, ktoré sú dôležité pre rozvoj špecifickej bunkovej imunitnej odpovedi. Napr. dendritické bunky produkujú interleukín 12 (IL-12), ktorý je dôležitý pre vyvolanie T-bunkovej odpovede typu 1 (T_H1 odpoveď, produkcia interferónu γ – INF γ , makrofágová odpoveď)^{11, 12}.

U istej časti makrofágov nedôjde, v dôsledku rôznych nie úplne známych mechanizmov, k eliminácii fagocytovaných mykobaktérií. Tie môžu vo vnútri fagozómov prežívať a deliť sa. Takto infikované makrofágy môžu zostať v pľúcnom parenchýme alebo

migrovať do spádových lymfatických uzlín¹⁰. Nakoniec sa rozpadajú a uvoľňujú mykobaktérie, ktoré sú vzápätí fagocytované ďalšími makrofágmi. Tie sú na miesto atrahované chemotakticky. Touto akumuláciou makrofágov vzniká drobný granulóm (primárne tuberkulózne ložisko) nazývaný tuberkul^{4,12}.

Za 2 až 12 týždňov sa rozvíja špecifická bunecná imunitná odpoveď sprevádzaná infiltráciou primárnych ložísk T lymfocytmi a nimi aktivovanými makrofágmi^{13, 6}. Aktivované makrofágy sú výrazne mikrobicidné a na rozdiel od neaktivovaných makrofágov už neposkytujú mykobaktériám vhodné prostredie k intracelulárnemu rastu¹¹. Pomocou CD8⁺ T lymfocytov (cytotoxické T lymfocyty, T_C) a aktivovaných makrofágov dochádza k eliminácii väčšiny mykobaktérií, čím je však súčasne zničená i veľká časť infikovaných neaktivovaných makrofágov a parenchymatických buniek. Výsledkom je vznik pevnej kaseózne nekrózy primárneho tuberkulózneho ložiska (granulómu)⁶.

Samotný granulóm predstavuje kompaktný útvar, v ktorom je nízky parciálny tlak kyslíka. V jeho strede sa nachádza amorfná hmota apoptických makrofágov a zvyšné infikované neaktivované makrofágy. Po obvode je vrstva buniek imunitného systému tvorená najmä aktivovanými makrofágmi, CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytmi¹⁴. CD4⁺ T lymfocyty sa delia na niekoľko bunkových skupín (T_{H1}, T_{H2}, T_{reg}, T_{H17}), z ktorých najdôležitejšia je skupina T_{H1} buniek. Aktivované makrofágy spracovávajú a prezentujú mykobakteriálne antigény a aktivujú tak ďalšie T_{H1} a T_C lymfocyty. T_{H1} potom produkujú INF γ a iné cytokíny, ktoré udržiavajú makrofágy v aktivovanom stave. Aktivované makrofágy produkujú TNF α , čím privádzajú do miesta infekcie ďalšie bunky a podporujú rozvoj imunitnej odpovedi. Presný stav baktérií vo vnútri granulómu nie je známy, môžu existovať ako dormantné a/alebo ako aktívne deliace sa baktérie^{10, 12}. Ak v granulómoch prevážia aktivované makrofágy nad neaktivovanými (prevaha T_{H1} odpovedi), tak progresia primárnej TBC sa v tomto štádiu zastaví. Tým, zvyčajne bez prítomnosti akýchkoľvek symptómov, primoinfekcia končí. Tých ľudí (90 % infikovaných) sú bez klinických príznakov TBC a nie sú schopní prenášať toto ochorenie (latentná TBC). V budúcnosti však môžu, po oslabení imunitného systému a reaktivácii TBC, ochorieť (postprimárna TBC). V opačnom prípade, v ich granulómoch môže postupom času dôjsť k fibrotizácii a nakoniec ku kalcifikácii^{12, 15}.

U 10 % infikovaných (vo väčšine ich granulómov prevažujú neaktivované makrofágy) postupuje ochorenie ďalej (primárna progresívna TBC). Nekróza sa rozširuje, zasiahne priedušky a vznikajú tzv. tuberkulózne dutiny (kaverny) vyplnené granulómom. Tie

predstavujú zdroj infekčných častíc, ktoré sú prostredníctvom kašľa uvoľňované z pľúc do okolitého prostredia (aktívna TBC) ^{6, 11}. Krvnou cestou môžu byť baktérie taktiež roznesené do ostatných častí hostiteľského organizmu. Mimopľúcna forma je prítomná u približne 15 % pacientov s aktívnou TBC. Postihnuté môžu byť kosti, kĺby, koža, pečeň, slezina, peritoneum, mozog, srdce a urogenitálny systém ⁶. Nakoniec môže infekcia vyústiť do stavu, keď je granulóm vyplňajúci kavernu bunkami imunitného systému skvapalnený. V skvapalnenom granulóme sa mykobaktérie môžu množiť i extracelulárne, lebo tu nachádzajú k tomu mimoriadne priaznivé aeróbne podmienky. Rast môže dosiahnuť až úroveň, keď dutina praskne, skvapalnený granulóm sa dostane do prieduškového stromu a môže byť vykašlaný. Zhojenie dutín už nie je možné *ad integrum* a deje sa ich kontrakciou a fibrotizáciou, čo vedie k trvalému poškodeniu funkcie pľúc ⁶.

U pacientov s aktívnou TBC sa vyskytujú granulómy vo všetkých vyššie zmienených vývojových štádiách, od sterilných fibrotizovaných alebo kalcifikovaných granulómov, cez granulómy typické pre latentnú TBC v strede s kaseóznou nekrózou, až po otvorené kaverny obsahujúce skvapalnený granulóm a množstvo replikujúcich sa mykobaktérií. Tieto štruktúry vytvárajú prostredie s rôznym parciálnym tlakom kyslíka a obsahom živín vyznačujúce sa rôznym pH a úrovňou oxidačného stresu. V každom type granulómu sú preto iné životné podmienky, čo vedie k vzniku rôznych mykobakteriálnych subpopulácií. Každá subpopulácia sa vyznačuje expresiou iných génov a preto inou replikačnou schopnosťou, inou metabolickou aktivitou a inou citlivosťou na pôsobenie liečiv a hostiteľského imunitného systému. Táto patologická charakteristika TBC je pravdepodobne podkladom pre pochopenie vzniku fenotypickej rezistencie voči súčasným antituberkulotikám (vis. ďalej) ^{16, 17, 18}.

3.1.5. Príznaky

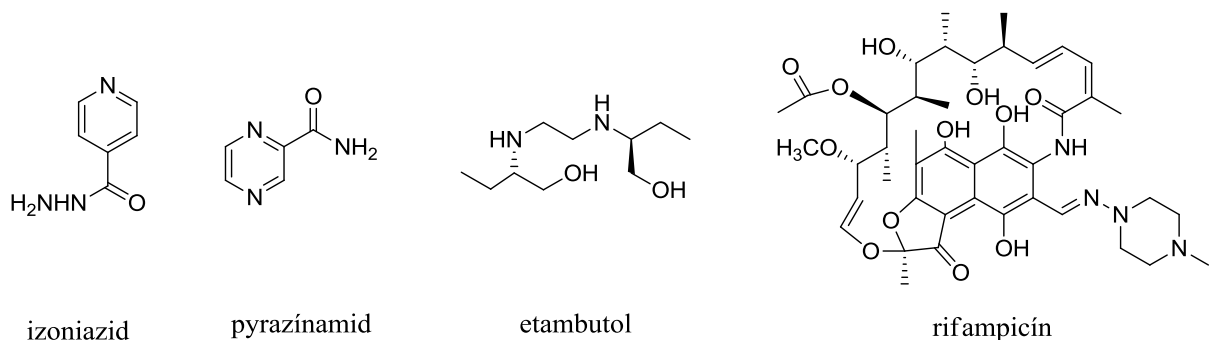
Medzi typické príznaky aktívnej pľúcnej TBC patrí bolesť na hrudi, produktívny kašeľ, respiračná nedostatočnosť, strata hmotnosti, nočné potenie, teplota, celková slabosť a vyčerpanie a v pokročilom štádiu i vykašľávanie krvi ⁶.

3.2. Súčasné antituberkulotiká

Látky s antimykobakteriálnou aktivitou, používané dnes v klinickej praxi, rozdeľuje WHO na základe antituberkulotickej aktivity, vedľajších účinkov, skríženej rezistencie a ceny do 5 skupín ¹⁹:

1. Perorálne antituberkulotiká prvej línie:

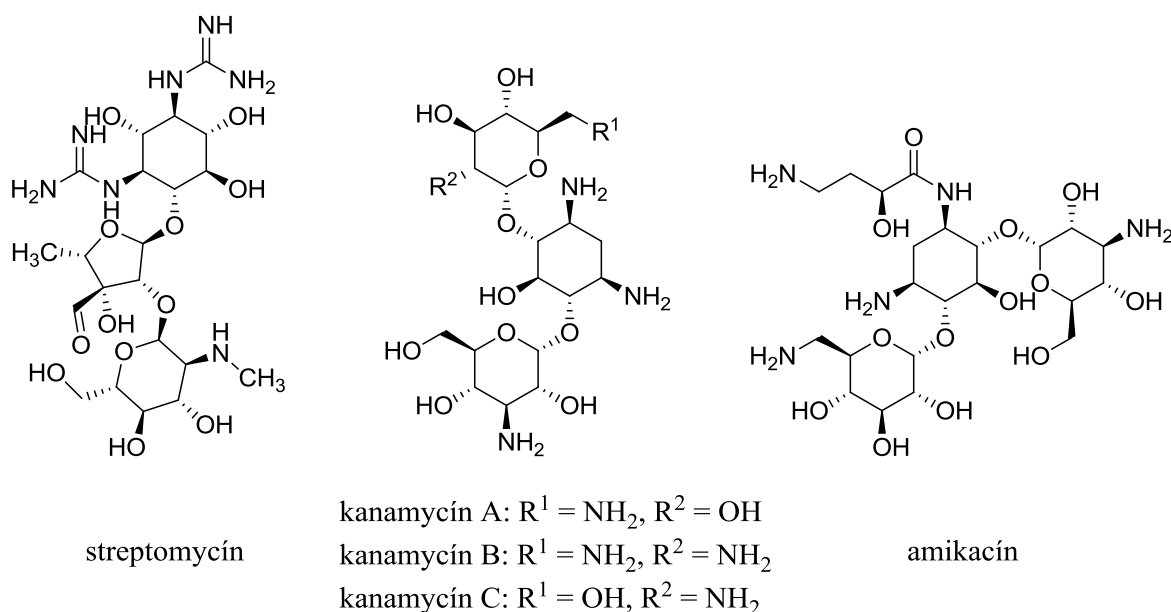
- izoniazid (INH, hydrazid izonikotínovej kyseliny, Obrázok 2) je proliečivo, ktoré musí byť najskôr aktivované pomocou endogénneho mykobakteriálneho enzýmu s katalázo/peroxidázovou aktivitou (KatG). Pomocou neho za prítomnosti kyslíka, Mn^{2+} a NADH vzniká z INH príslušný acylový radikál, ktorý sa následne stabilizuje reakciou s NAD^{\bullet} radikálom na kovalentný komplex INH-NADH^{20, 21}. Táto štruktúra predstavuje vlastný inhibítor, ktorý súťaží s NADH o väzobné miesto na InhA. InhA je NADH dependentná $\Delta 2$ -*trans*-enoyl-ACP (acyly prenášajúci proteín) reduktáza. Tento enzým preferenčne redukuje substráty obsahujúce 16 a viac uhlíkových atómov, ktoré sú využívané pri syntéze mykolových kyselín^{21, 22, 23}. INH je látka s cidným účinkom na deliace sa a metabolicky aktívne Mtb²⁴.
- pyrazinamid (PZA, amid pyrazínkarboxylovej kyseliny, Obrázok 2) narušuje transmembránový potenciálový gradient a membránové transportné funkcie patogéna. Taktiež ide o proliečivo, ktoré je na aktívnu pyrazínkarboxylovú kyselinu transformované nikotínamidázou/pyrazinamidázou mykobaktérií. PZA je aktívny len v kyslom prostredí a proti mykobaktériám v semidormantnom stave. Jeho zavedenie do terapie TBC prinieslo skrátenie liečby z pôvodných 9-12 mesiacov na 6 mesiacov²⁵.
- etambutol (EMB, Obrázok 2) je bakteriostatická látka, ktorá zasahuje do syntézy bunkovej steny (syntéza arabinogalaktanu a arabinomananu). EMB pôsobí inhibične na tri enzýmy s arabinozyltransferázovou aktivitou (EmbA, EmbB a EmbC), ktoré sú zodpovedné i za vytvorenie terminálneho hexaarabino-furanozidového reťazca arabinogalaktanu (miesto naviazania mykolových kyselín)^{26, 27, 28}. Zo stereochemického hľadiska ide o látku vyznačujúcu sa optickou izomérou, eutomérom je *S,S* izomér²⁹.
- rifampicín (rifampín, RIF, Obrázok 2) a rifabutín sú širokospektrálne, baktericidné, semisyntetické antibiotiká odvodené od rifamycínu B. Väzbou na DNA-dependentnú RNA polymerázu inhibujú syntézu RNA. Tieto látky sú aktívne proti rastúcim i metabolicky aktívnym nerastúcim mykobaktériám, čo umožnilo skrátiť dobu liečby TBC z pôvodne 12-18 mesiacov na asi 6-9 mesiacov^{30, 24}.



Obrázok 2: Perorálne antituberkulotiká prvej línie: izoniazid, pyrazínamid, etambutol, rifampicín.

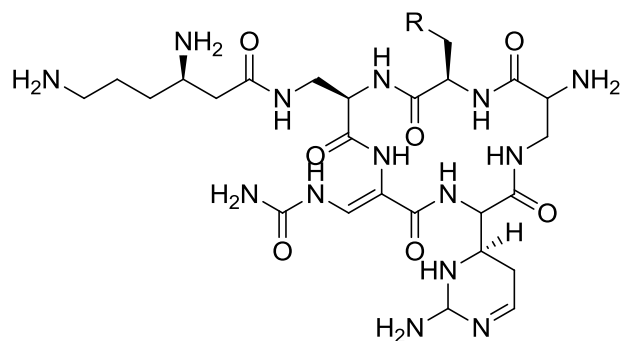
2. Injekčné antituberkulotiká

- aminoglykozidové antibiotiká (streptomycín (SM), kanamycín (KAN), amikacín (AMI), Obrázok 3) sú baktericidné látky s postantibiotickým efektom a účinkom závislým na koncentrácii. Pôsobia len na extracelulárne mykobaktérie. Primárne interferujú s proteosyntézou prostredníctvom inhibície translácie mRNA, ďalej spôsobujú nesprávne čítanie genetického kódu a poškodenie bunkovej membrány. Cieľovou štruktúrou je 30S ribozomálna podjednotka. Ide o látky potenciálne ototoxické, nefrotoxické a neurotoxické ³¹.



Obrázok 3: Aminoglykozidové antibiotiká: streptomycín, kanamycín, amikacín. Kanamycín predstavuje zmes troch látok.

- kapreomycín (CAP, Obrázok 4) je polypeptidové antibiotikum, ktoré sa však v ostatných vlastnostiach zhoduje s aminoglykozidovými antibiotikami ³¹.

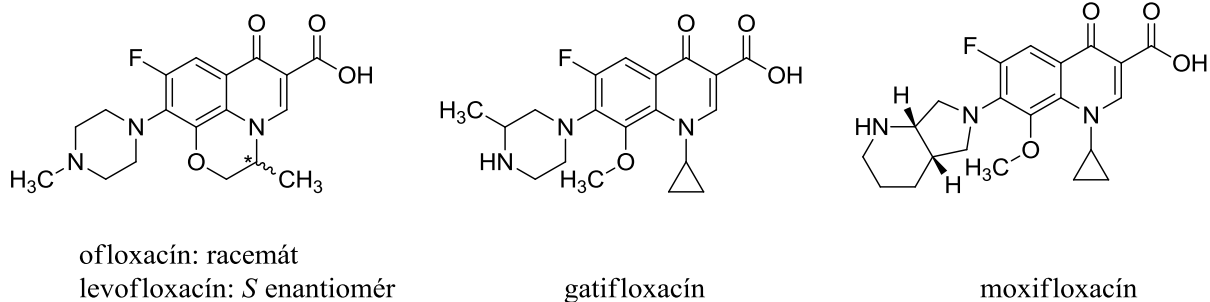


kapreomycín: R = H, OH

Obrázok 4: Injekčné polypeptidové antibiotikum kapreomycín. Kapreomycín predstavuje zmes dvoch látok.

3. Fluorochinolóny

- fluorochinolóny (FQ) sa ako záchranné liečivá používajú v liečbe TBC od roku 1985. K väčšiemu rozšíreniu ich používania však došlo až zavedením FQ tretej a štvrtej generácie³¹. Sú to syntetické látky, ktoré zasahujú do syntézy mykobakteriálnej DNA prostredníctvom interakcie s podjednotkou A a B DNA gyrázy²⁴. FQ sú schopné dosiahnuť i intracelulárne prostredie makrofágov a vykazujú preto účinok i na intracelulárne mykobaktérie. Vyznačujú sa baktericidným účinkom a používajú sa k liečbe multiliekovo rezistentnej TBC, MDR-TBC (levofloxacín, moxifloxacín, gatifloxacín, ofloxacín, Obrázok 5)³¹.



Obrázok 5: Fluorochinolóny použiteľné k liečbe TBC: ofloxacín, levofloxacín, gatifloxacín, moxifloxacín.

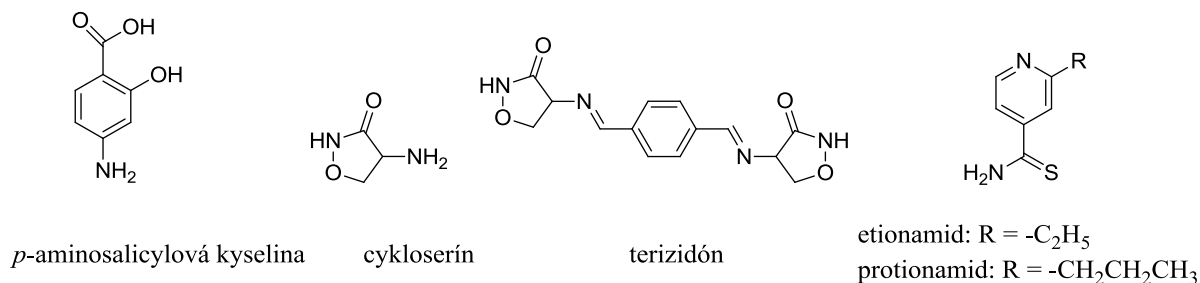
4. Perorálne bakteriostatické antituberkulotiká druhej línie

- *p*-aminosalicylová kyselina (PAS, Obrázok 6) je bakteriostatická látka preferenčne pôsobiaca na extracelulárne mykobaktérie. Mechanizmus jej pôsobenia nie je plne objasnený, predpokladá sa interakcia so syntézou listovej kyseliny a inhibícia príjmu železa. Veľkou nevýhodou je krátky biologický polčas a nutnosť podávania vysokých dávok (rádovo gramov)

³¹

- cykloserín (CS) a terizidón (Obrázok 6) sú bakteriostatické analogy D-alanínu, aminokyseliny, ktorá je dôležitou zložkou bakteriálnej bunkovej steny. Terizidón predstavuje kombináciu dvoch molekúl cykloserínu. Obe látky pôsobia ako kompetitívne inhibítory D-alanín-D-alanín syntetázy, alanín racemázy a alanín permeázy, ktoré sú nevyhnutné pre syntézu peptidoglykanu. Látky majú potenciál vyvolať závažné neurologické a psychiatrické vedľajšie účinky³¹.

- etionamid (ETH) a protionamid (PTH) (Obrázok 6) ide o proliečivá, ktoré sú aktivované pôsobením mykobakteriálneho enzýmu EtaA. Miesto zásahu je syntéza mykolových kyselín, rovnaký enzým ako v prípade INH . Ide o bakteriostatické látky pôsobiace proti intra- i extracelulárnym mykobaktériám^{24, 31}.



Obrázok 6: Perorálne bakteriostatické antituberkulotiká druhej línie: *p*-aminosalicylová kyselina, cykloserín, terizidón, etionamid, protionamid.

5. Látky s nejasnou antituberkulotickou aktivitou: klofazimín, linezolid, amoxicilín/klavulanát, tioacetazón, imipenem/cilastatín, klarithromycín

Všetky vyššie uvedené zlúčeniny (skupina 1-4) možno ďalej rozdeliť na baktericidné a bakteriostatické. Toto rozdelenie je však len orientačné, lebo niektoré statické látky môžu byť za istých podmienok (koncentrácia látky, fyziologický stav baktérií) cidné. Napr. PZA pôsobí cidne v kyslom prostredí na nerastúce mykobaktérie, na rastúce a metabolicky aktívne pôsobí však len staticky. Iné rozdelenie je na antituberkulotiká prvej línie: INH, RIF, PZA, EMB, SM a antituberkulotiká druhej línie: KAN, AMI, CAP, FQ, PAS, CS, ETH, PTH. Možné je i rozdelenie na látky špecificky pôsobiace proti mykobatériám (INH, PZA, EMB, PAS, ETH, PTH) a látky širokospektrálne, pôsobiace i na iné bakteriálne druhy (RIF, SM, KAN, AMI, CAP, FQ, CS). Podľa miesta zásahu je možno antituberkulotiká rozdeliť na:²⁴

- inhibítory syntézy bunkovej steny: INH, EMB, ETH, PTH, CS
- inhibítory syntézy nukleových kyselín: RIF, FQ,

- inhibítory proteosyntézy: SM, KAM, AMI, CAP
- látky zasahujúce do energetického metabolizmu: PZA

3.3. Súčasná terapia TBC

Terapia TBC súdobými antituberkulotikami sa vyznačuje, i v prípade, že pôvodcom je citlivý kmeň, veľkou časovou náročnosťou (typicky 6 a viac mesiacov) a nutnosťou použiť kombináciu viacerých antituberkulotík. V súčasnosti sa má za to, že dôvodom je kombinácia dvoch rozdielnych typov liekovej rezistencie. Mykobaktérie vykazujú jednak genetickú a jednak fenotypickú rezistenciu ³².

Genetická rezistencia, nakoľko je zakódovaná v DNA, je ireverzibilná a dedičná. Rozdelená môže byť na vlastnú a získanú rezistenciu. Vlastná genetická rezistencia mykobaktérií je spôsobovaná najmä nízkou permeabilitou ich bunkových povrchov, ktorá je determinovaná atypickou stavbou a zložením bunkovej steny, nízkou prítomnosťou pórov v bunkovej membráne a činnosťou efluxných mechanizmov. Ďalej sa na vlastnej genetickej rezistencii podieľa napr. expresia β -laktamáz. Táto rezistencia zužuje spektrum antibakteriálnych látok, ktoré sú schopné pôsobiť na mykobaktérie a spôsobuje, že, na druhú stranu, antimykobakteriálnu aktivitu vykazujú i látky bez všeobecnej antibakteriálnej aktivity ^{9, 32}.

Získaná genetická rezistencia vzniká v priebehu životného cyklu baktérií voči látkam, na ktoré boli tieto baktérie pôvodne citlivé. U mykobaktérií k jej vzniku dochádza hlavne prostredníctvom spontánnych mutácií génov kódujúcich cieľové štruktúry liečiv (napr. *embA*, *embB*, *embC*, *inhA*) a selekciou takýchto mutantov v podmienkach nesprávnej antimykobakteriálnej liečby (napr. monoterapie). Udáva sa, že v podmienkach typickej antimykobakteriálnej liečby dochádza k spontánnej mutácii s pravdepodobnosťou 1.10^{-9} na jedno bunčné delenie. Celková pravdepodobnosť, že u človeka s aktívnou TBC vzniknú Mtb bunky so spontánnou mutáciou je však výrazne vyššia z dôvodu prítomnosti veľkého množstva mykobaktérií a teda i veľkého počtu bunkových delení, ktoré sa navyše opakujú. Preto, hoci je pri monoterapii eliminovaná veľká väčšina mykobaktérií – všetky, ktoré sú citlivé k danému liečivu, nezostane hostiteľský organizmus úplne prostý mykobaktérií. Zostanú napr. tie, ktoré sa vďaka spontánnej mutácii stali rezistentné na dané liečivo. Na začiatku sú v malom počte, predstavujúcom len zlomok pôvodného množstva mykobaktérií, rýchlo sa však pomnožia a zaujmú priestor uvoľnený odstránením citlivých mykobaktérií. Po

krátkom odoznení príznakov tak ochorenie nastupuje znova, tento krát je však rezistentné voči pôvodne použitému liečivu. Pri súčasnom použití kombinácie dvoch alebo troch liečiv je naopak pravdepodobnosť súčasného výskytu dvoch resp. troch spontánných mutácií u jednej bakteriálnej bunky veľmi nízka ($1 \cdot 10^{-18}$ resp. $1 \cdot 10^{-27}$ na jedno bunčné delenie). Preto i pravdepodobnosť, že vzniknú mutanti, ktorí nebudú zasiahnutí ani jednou látkou je veľmi malá. Táto úvaha tvorí racionálny podklad pre nutnosť použitia kombinácie viacerých antituberkulotík^{9, 32}.

Získaná genetická rezistencia je výsledok ľudskej činnosti a je zodpovedná za vznik liekovo rezistentných kmeňov *M. tuberculosis*. Epidemiologicky najzávažnejšie sú: MDR kmene (multiliekovo rezistentné kmene), XDR kmene (extenzívne liekovo rezistentné kmene) a TDR kmene (totálne liekovo rezistentné kmene). MDR kmene sú také, ktoré sú rezistentné prinajmenšom voči INH a RIF, XDR kmene sú navyše rezistentné voči chinolónom a aspoň jednému z injekčných liečiv so skupiny AMI, KAN a CAP. TDR kmene sú také kmene, ktoré sú súčasne rezistentné voči všetkým antituberkulotikám prvej i druhej línie^{9, 33}.

Fenotypická rezistencia je naopak reverzibilná. Ide o jav, keď sa časť baktérií z voči liečivám citlivej populácie stane dočasne voči týmto liečivám necitlivá a to i napriek ich genetickej zhode so zvyškom populácie³². Príčinou tejto dočasnej necitlivosti mykobaktérií je reverzibilný prechod ich buniek do takého replikačného a metabolického stavu, v ktorom neobsahujú cieľové štruktúry daných liečiv, resp. tieto štruktúry nie sú pre ne životne dôležité. Dnes používané antimykobakteriálne liečivá majú primárne svoje miesto zásahu v biochemických pochodoch, ktoré sú prítomné a životne dôležité u metabolicky aktívnych a rastúcich mykobaktérií. Čiastočnú výnimku predstavujú len pyrazínamid a rifampicín (vis. Súčasné antituberkulotiká). Preto mykobaktérie, ktoré vykazujú vyššie uvedenú dočasnú necitlivosť voči súčasným antituberkulotikám sú tie, ktoré majú utlmený metabolizmus a schopnosť deliť sa. Konkrétne ide o perzistujúce a dormantné mykobaktérie. Dormantné mykobaktérie sú mykobaktérie v dormantnom stave, ktorý je charakterizovaný redukovanou metabolickou aktivitou a neschopnosťou pri *in vitro* kultivácii okamžite bez reaktívácie tvoriť kolónie. Perzistencia je definovaná ako jav, keď voči liečivu citlivé baktérie obmedzia alebo zastavia svoj rast a sú schopné po neurčitú dobu prežívať v hostiteľských tkanivách i v prípade riadnej liečby daným liečivom. Tieto dva termíny, hoci sa niekedy vzájomne zamieňajú, nepopisujú rovnaký metabolický a replikačný stav. Dormantný stav predstavuje oveľa hlbší útlm metabolizmu a schopnosti deliť sa³⁴.

Predpokladá sa, že perzistencia resp. prežívanie v dormantnom stave je reakciou Mtb na špecifické životné podmienky (vis. Patogenéza), prípadne, že ide o všeobecnú reakciu na stav, keď mykobakteriálna populácia dosiahne stacionárnu fázu. V prípade predčasného skončenia liečby zostanú tieto dormantné a perzistujúce mykobaktérie prítomné v hostiteľskom organizme, môžu po istom čase reaktivovať svoj metabolizmus, začať sa opäť deliť a spôsobiť opätovné vzplanutie ochorenia. Rozdiel oproti získanej genetickej rezistencii je, že mykobaktérie sú citlivé na pôvodnú liečbu. Dlhodobá liečba TBC je preto nutná k eradikácii týchto nereplikujúcich sa mykobaktérií, ktoré periodicky prechádzajú z nereplikačného stavu do aktívneho a späť a k nastoleniu dostatočnej kontroly imunitného systému nad zvyšnými dormantnými mykobaktériami³². Schopnosť fenotypickej rezistencie je primárne daná povahou Mtb, jej schopnosťou perzistovať alebo prežívať v dormantnom stave, a naopak z väčšej časti nezávisí na imunitnej odpovedi hostiteľa alebo liečbe³⁴.

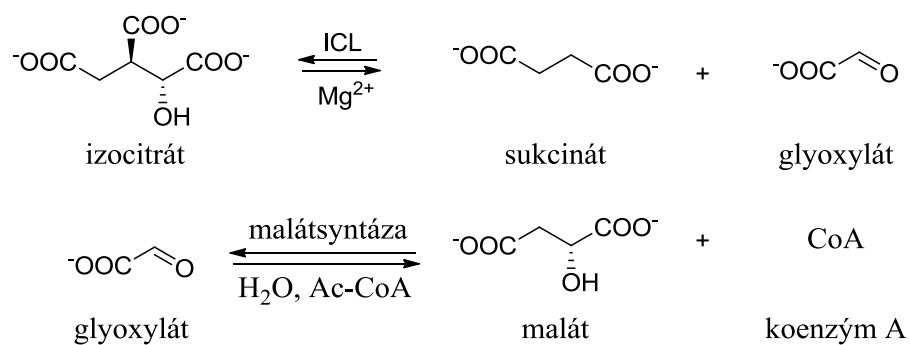
Na základe vyššie uvedeného môžeme zhrnúť, že hoci dnes máme k dispozícii látky s antimykobakteriálnou aktivitou, tie plne nereflektujú potreby therapeutickej praxe. Nedokážu totiž rovnako efektívne zasiahnuť voči všetkým mykobakteriálnym subpopuláciám, ktoré sú prítomné v hostiteľskom organizme s aktívnou TBC. To vedie k nutnosti použiť niekoľko mesačnú liečbu, ktorá kladie značné nároky na compliance pacienta a v prípade jej nedodržovania zvyšuje riziko vzniku rezistencie. Táto liečba navyše vedie len ku klinickému vyliečeniu, pričom v organizme ďalej prebieha latentná infekcia a zostáva isté množstvo dormantných mykobaktérií. Tie predstavujú zdravotné riziko do budúcnosti a bránia úplnej eradikácii pôvodcu ochorenia. V neposlednom rade súčasné liečivá zasahujú len zopár mykobakteriálnych biochemických pochodov, čo zvyšuje riziko vzniku multiliekovo rezistentných kmeňov³⁵.

3.4. Súčasné smery vývoja nových antituberkulotík

V súčasnej dobe sa za jednu z kľúčových oblastí vo vývoji nových antituberkulotík považuje výskum látok schopných zasiahnuť perzistentné a dormantné mykobaktérie. Racionálny vývoj takýchto liečiv predpokladá znalosť faktorov zodpovedných za schopnosť mykobaktérií perzistovať a prežívať v dormantnom stave. Dodnes sa podarilo, napr. pomocou štúdiá modelov perzistencie a dormancie Mtb, niekoľko takýchto faktorov nájsť. Všeobecne ide o gény, ktorých expresia je v týchto modeloch životne dôležitá/zvýšená resp. produkty týchto génov a systémy riadiace ich expresiu. Sú to napr. izocitrátlyáza (ICL), L,D-transpeptidáza (Ldt_{Mt}), DosR (dormancy survival regulon) regulátor, tzv. stringent response

system, glycinderhydrogenáza a iné. Presná funkcia väčšiny proteínov kódovaných génmi špecificky exprimovanými vo vyššie zmienených modeloch však nie je v súčasnosti objasnená. Nižšie je uvedená stručná charakteristika niektorých lepšie známych faktorov perzistencie resp. dormancie ^{34, 35}.

ICL je enzým, ktorý spolu s malátsyntázou vytvára tzv. glyoxylátový skrat v cykle trikarboxylových kyselín (TCA). Tento skrat, neprítomný v bunkách vyšších živočíchov, umožňuje obísť reakcie TCA cyklu, ktoré vedú k strate dvoch uhlíkových atómov z molekúl substrátu vo forme dvoch molekúl CO₂. Tým je umožnené využiť atómy uhlíka acetylkoenzýmu A (Ac-CoA) napr. z β-oxidácie mastných kyselín k syntéze životne dôležitých molekúl (napr. sacharidov). ICL katalyzuje štiepenie izocitrátu na sukcinát a glyoxylát, malátsyntáza katalyzuje kondenzáciu glyoxylátu s Ac-CoA na malát (Obrázok 7). Malát a sukcinát sú pre bunku prekursori využiteľné, pri nedostatku sacharidov v životnom prostredí, k syntéze životne dôležitých sacharidov cestou glukoneogenézy ³⁶.



Obrázok 7: Enzymatické reakcie tvoriace glyoxylátový skrat v TCA cykle.

Mastné kyseliny (Ac-CoA) sú v súčasnosti považované za hlavný mykobakteriálny zdroj uhlíka v priebehu infekcie hostiteľských buniek. Izocitrátlyázová aktivita je u Mtb viazaná na dva izoenzýmy: ICL1 a ICL2. Tie sú kódované génmi *icl1* a *icl2* ³⁷. ICL1 je enzým, ktorého zvýšená expresia bola zistená počas infekcie myších makrofágov a ktorý bol dôležitý pre perzistenciu mykobaktérií v myších pľúcach. Porušenie génu kódujúceho tento enzým viedlo na myšom modeli TBC k oslabeniu virulencie a perzistencie mykobaktérií bez ovplyvnenia akútnej fázy infekcie ³⁸. Naopak, Mtb infekcia u myši vyvolaná kmeňom s chýbajúcim *icl2* nevykazovala, v porovnaní s infekciou vyvolanou divokým kmeňom Mtb, žiadne zmeny. Pri poškodení alebo delécii oboch génov (*icl1* i *icl2*) bola narušená schopnosť Mtb vyvolať u myši akútnu i chronickú infekciu ³⁷. ICL1 predstavuje v súčasnosti jeden

z najlepšie charakterizovaných perzistenčných faktorov, je známa štruktúra, katalytický mechanizmus, inhibítory, štruktúra s naviazaným inhibítorom³⁹.

Taktiež bolo zistené, že mykobaktérie exprimujú atypické L,D-transpeptidázy (Ldt_{Mt1} a Ldt_{Mt2}) kódované génmi ldt_{Mt1} a ldt_{Mt2} . Strata alebo poškodenie týchto génov oslabuje u *Mtb* virulenciu a schopnosť perzistovať. Tieto transpeptidázy zosieťovávajú tvorbou 3→3 transpeptidových spojov polysacharidové reťazce peptidoglykanu, pričom 80 % polysacharidových reťazcov peptidoglykanu u mykobaktérií v stacionárnej fázy je zosieťované týmto spôsobom. Atypické sú tieto transpeptidázy preto, lebo ostatné baktérie pri zosieťovaní polysacharidových reťazcov peptidoglykanu využívajú D,D-transpeptidázy, ktoré sú inhibovateľné β -laktámovými antibiotikami a tvoria 4→3 transpeptidové spoje^{40, 41}.

DosR regulón je súbor 48 génov, ktorých expresia je pravdepodobne životne dôležitá počas perzistencie a prežívania v dormantnom stave. Do tohto regulónu patria gény kódujúce štruktúry podieľajúce sa na alternatívnom transporte elektrónov (*fdxA*), metabolizme nitrátov (*narK2*, *narX*), anaeróbnej syntéze deoxynukleozidtrifosfátov (*nrdZ*), syntéze triglyceridov (*tgsI*), a iné. Funkcia mnohých ďalších proteínov kódovaných génmi tohto regulónu nie je v súčasnosti známa, predpokladá sa však účasť na metabolizme sacharidov, mastných kyselín alebo transporte elektrónov za anaeróbných podmienok. DosR regulón je regulovaný dvojzložkovým regulačným systémom, ktorý pozostáva z dvoch sensorových kináz DosS (Rv3132c), DosT (Rv2027c) a nimi aktivovaného transkripčného faktora DosR (Rv3133c). DosT a DosS hrajú pri aktivácii DosR odlišné úlohy, čím sa vzájomne dopĺňajú. DosT je sensor hypoxie, pri poklese parciálneho tlaku kyslíku sa autofosforyluje a potom prenáša fosfát na aspartátový zvyšok DosR, čím ho aktivuje. Následne je aktivovaná i DosS. Tá predstavuje redox senzor, ktorý pri ďalšom poklese parciálneho tlaku kyslíku preberá funkciu aktivátoru DosR, fosforyluje ho na aspartátovom a treonínovom zvyšku. DosT schopnosť aktivovať DosR sa za hlbšej hypoxie stráca. Predpokladá sa, že fosforylovaný DosR sa viaže na príslušné oblasti DNA a spúšťa transkripciu príslušných génov, ktorých translačné produkty sa podieľajú na odpovedi mykobaktérií na zmenené životné podmienky^{12, 42}.

Transkripcia ďalšieho rozsiahleho súboru génov (> 80) je regulovaná systémom označovaným ako stringent response. Jeho mediátorom sú polyfosforylované guanínové nukleozidy (pppGpp, ppGpp). Tie sú u *M. tuberculosis* syntetizované pomocou enzýmu Rel_{Mtb} prenosom difosfátu z ATP do 3' polohy GTP alebo GDP. Tento enzým má vo vzťahu k (p)ppGpp okrem syntetickej i hydrolytickú aktivitu. Jeho syntetická aktivita je spúšťaná

nutričným strádaním, oxidačným a genotoxickým stresom, hydrolytická aktivita naopak prevláda po odstránení zmiených faktorov^{43, 44, 45}. (p)ppGpp nepôsobia ako transkripčné faktory viažuce sa priamo na DNA, ale destabilizujú komplex RNA polymerázy (RNAP komplex), intermediát vyskytujúci sa počas iniciácie transkripcie na regulovaných promotoroch. (p)ppGpp môžu inhibovať i ďalšie procesy, napr. replikáciu DNA⁴⁶. V roku 2009 bol u mykobaktérií identifikovaný proteín označený CarD ako ďalší faktor ovplyvňujúci stabilitu RNAP. Súčasne sa zistilo, že CarD na rozdiel od (p)ppGpp je dôležitý i pre akútnu fázu infekcie. To naznačuje, že CarD hrá i nejakú ďalšiu na (p)ppGpp nezávislú a doposiaľ neznámu úlohu v biochémií mykobaktérií. Aktivácia stringent response regulačného systému vedie k útlmu syntézy rRNA, tRNA a ďalších súčastí ribozómov, čo vedie k poklesu ich biogenézy a k celkovému útlmu proteosyntézy, metabolizmu sacharidov, aminokyselín a fosfolipidov^{45, 46}. Kmeň *M. tuberculosis* bez génu *rel_{Mtb}* nebol napr. schopný u infikovaných myší vyvolať latentnú TBC, hoci priebeh aktívnej infekcie ovplyvnený nebol⁴⁷. Obdobné výsledky boli získané na TBC modely využívajúci guinejské prasa⁴⁸.

Druhým súčasným smerom vývoja nových antituberkulotík je výskum látok proti metabolicky aktívnym mykobaktériám. Toto úsilie je motivované najmä vznikom multiliekovo rezistentných kmeňov, skutočnosťou, že súčasné antituberkulotiká zasahujú mykobaktérie len v niekoľkých biochemických pochodoch (vis. Súčasné antituberkulotiká), a potrebou látok, ktoré by sa mohli kombinovať s anti-HIV liečivami. V dnešnej dobe je pre túto oblasť výskumu dostupná široká paleta potenciálnych cieľových štruktúr. Mnohé z nich sú enzýmy metabolických dráh, z ktorých niektoré sú zasahované i súčasnými antituberkulotikami. Ide o enzýmy podieľajúce sa na syntéze zložiek mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanu: peptidoglykan [alanínracemáza (Alr), D-Ala-D-Ala ligáza], arabinogalaktan [rôzne arabinofuranozyltransferázy (EmbA-C, AftA), fosforibozyltransferáza, galaktofuranozyltransferáza, UDP-galaktopyranózamutáza, dTDP-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulozareduktáza, enzýmy (RmlA-D)], mykolové kyseliny [enzýmy systému FAS II]. Bohatý zdroj cieľových štruktúr predstavujú syntetické dráhy aminokyselín. Ide najmä o enzýmy tzv. šikimátovej dráhy, ktorá produkuje chorismát, substrát pre syntézu aromatických aminokyselín (fenylalanín, tyrozín, tryptofán) ako i ďalších aromatických látok. Enzým acetolaktátsyntáza (ALS) katalyzuje prvý krok syntézy aminokyselín s rozvetveným uhlíkovým reťazcom (valín, leucín, izoleucín). Značný význam má syntetická dráha lyzínu, kde jedným z medziproduktov je *mezo*-diaminopimelová kyselina, dôležitá zložka peptidoglykanu. Zmienené typy aminokyselín sú pre človeka esenciálne a teda vyššie uvedené

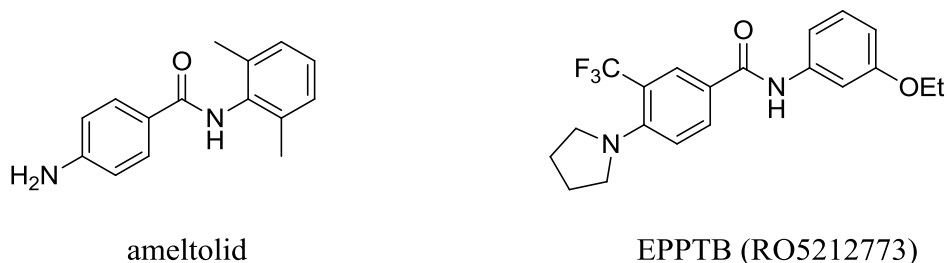
enzýmy ľudskej bunky neobsahujú. Rovnaká situácia je v prípade biosyntetických dráh rôznych enzýmových kofaktorov (foláty, pantotenát, riboflavín). Potenciálne zaujímavou je i biosyntetická dráha mykotiolu, nízkomolekulárneho tiolu chrániaceho mykobaktérie pred oxidačným stresom a antibiotikami. Maltozyltransferáza (GlgE) je enzým využívajúci maltozyl-1-fosfát k predĺžovaniu 1,4-glukanového reťazca. Maltozyl-1-fosfát je pre mykobaktérie toxický, narušuje transport elektrónov v dýchacom reťazci. Potenciálnou cieľovou štruktúrou spoločnou u všetkých prokaryotických organizmov sú enzýmy opracovávajúce proteíny (deformyláza, metionínaminopeptidáza). Konečne, bolo zistené, že pre rast *Mtb* sú dôležité i regulačné proteíny: GlnE – regulátor glutamínsyntetázy, IdeR – Fe senzitívny regulátor^{49, 50}.

3.5. Biologická aktivita derivátov benzanilidu a tiobenzanilidu

Deriváty benzanilidu (*N*-fenylbenzamid), hoci sú chemicky jednoduché zlúčeniny, môžu vyvolať na ľudský organizmus radu potenciálne terapeuticky využiteľných efektov. Zdrojom tohto ich širokého spektra farmakologických účinkov je najmä schopnosť vystupovať ako aktivátory vysokovodivostných prostredníctvom Ca^{2+} aktivovaných draslíkových kanálov (BK alebo Maxi-K kanály). Tieto iónové kanály sú prítomné takmer vo všetkých tkanivách, či už ide o bunčné membrány excitabilných alebo neexcitabilných buniek a podieľajú sa na regulácii rady bunkových funkcií. Okrem zmien intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} sú riadené i zmenou napätia naprieč membránou. Ich aktivácia vedie k toku K^+ z bunky a k hyperpolarizácii bunčnej membrány^{51, 52, 53}.

Z množstva bunčných funkcií, na ktorých riadení sa BK podieľajú, bolo doposiaľ najviac pozornosti venované ich vplyvu na neuronálnu excitabilitu, uvoľňovanie neurotransmiterov a hormónov alebo moduláciu tonu hladkej svaloviny ciev, maternice, gastro-intestinálneho traktu, dýchacích a močových ciest. Látky s aktivačným účinkom na BK kanály, medzi ktoré patria i deriváty (tio)benzanilidu, môžu byť preto využité u patologických stavov vyznačujúcich sa neuronálnou alebo svalovou hyperexcitabilitou a hypersenzitivitou voči alergénom. Ide najmä o astmu bronchiálnu a chronickú obštrukčnú pľúcnu chorobu⁵⁴, močovú inkontinenciu a spazmy močového mechúra^{53, 52, 53}, hypermotilitu gastro-intestinálneho traktu^{55, 56}, arteriálnu hypertenziu a koronárne vazospazmy^{53, 52, 53} a iné.

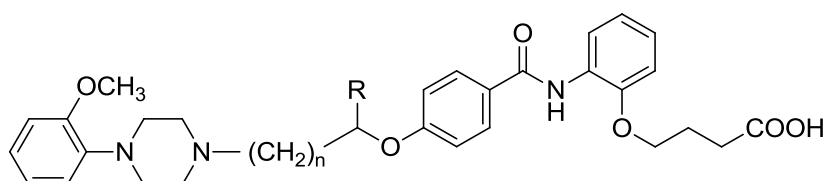
Iný derivát benzanilidu – ameltolid vykazuje prostredníctvom interakcie s napäťovo riadeným sodíkovým kanálom antiepileptickú aktivitu. Molekula ameltolidu (Obrázok 8) sa viaže na rovnaké miesto iónového kanálu ako fenytoín⁵⁷.



Obrázok 8: Ameltolid a EPPTB (RO5212773).

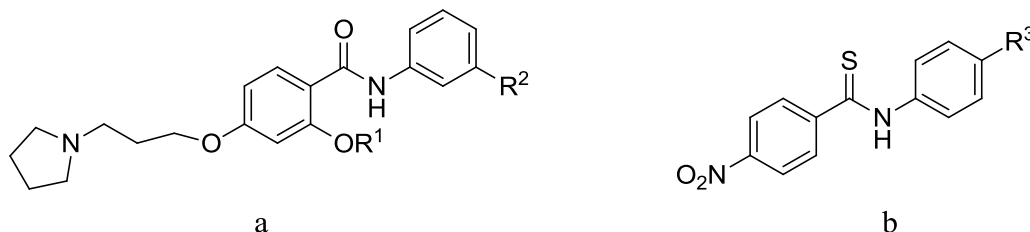
Benzanilid s označením EPPTB (RO5212773, Obrázok 8) bol identifikovaný ako prvý známy selektívny antagonistu receptoru pre stopové biogénne amíny 1 (TAAR 1). Tento receptor patrí do veľkej skupiny receptorov spojených s G-proteínom (GPCR) a jeho fyziologickými ligandmi sú stopové biogénne amíny (TA) *p*-tyramín, β -fenylethylamín, tryptamín a oktopamín. TA sa nachádzajú v mozgu a na rozdiel od klasických biogénnych amínov (serotonín, histamín dopamín, epinefrín a norepinefrín) sa vyskytujú v podstatne nižších koncentráciách. Bolo dokázané, že disregulácia koncentrácie TA môže prispievať k etiológii celej rady ochorení centrálnej nervovej sústavy. TAAR ligandy by preto mohli byť prospešné látky pri liečbe depresí, psychotických porúch, schizofrénie, bipolárnych porúch, epilepsie, migrény, porúch spánku, Parkinsonovej alebo Alzheimerovej choroby^{58, 59}.

Popísané boli i deriváty benzanilidu (Obrázok 9) so schopnosťou pôsobiť ako α_1 -antagonisti a súčasne i nesteroidné inhibítory 5α -reduktázy, enzýmu konvertujúceho testosterón na účinnejší dihydrotestosterón. Obe cieľové štruktúry sú zasahované súčasnými liečivami využívanými k liečbe benignej hyperplázie prostaty (BPH), každá však molekulou inej látky^{60, 61}.



Obrázok 9: Deriváty benzanilidu pôsobiace ako α_1 -antagonisti a súčasne ako inhibítory 5α -reduktázy, n = 1-5, R = H, fenyl, substituovaný fenyl.

U benzanilidových derivátov bola ďalej preukázaná antimalarická ⁶² a antibakteriálna aktivita ⁶³. Zvlášť deriváty *N*-(2-hydroxyfenyl)benzamidú sú už niekoľko rokov študované ako možné metabolity antibakteriálne účinných benzo[*d*]oxazolových derivátov ^{64, 65, 66}. Nedávno boli niektoré deriváty benzanilidu popísané ako inhibítory *c*-Met tyrozín kinázového receptoru, ktorý by mohol byť potenciálne dôležitým cieľom pre liečbu rakoviny (Obrázok 10 a) ⁶⁷. Protirakovinový účinok bol popísaný taktiež u derivátov tiobenzanilidu (Obrázok 10 b) ⁶⁸.



Obrázok 10: Benzanilidy s inhibičnou aktivitou na *c*-Met tyrozín kinázový receptor (a), benzanilidy s protirakovinovým účinkom (b). R^1 = alkyly a rôzne substituované benzyly, R^2 = H, halogény, hydroxy skupina, atd., R^3 = Br, CF_3 , NO_2 .

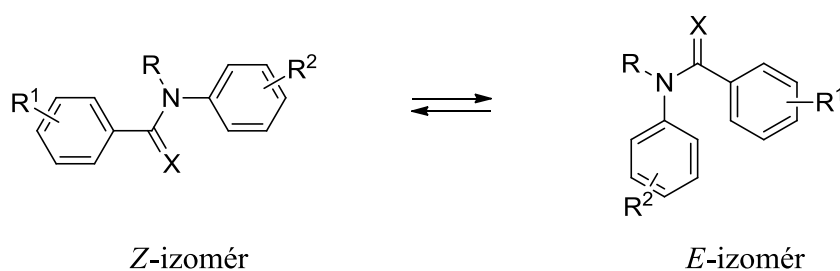
Zvláštnu skupinu derivátov benzanilidu predstavujú salicylanilidové (2-hydroxybenzanilidové) deriváty. Tie sa vyznačujú širokým spektrom biologických účinkov. Sú napr. známe ich antifungálne ^{69, 70}, antibakteriálne ^{71, 72}, antimykobakteriálne ^{69, 70}, anthelmintické ⁷³, antineoplastické ^{74, 75} a moluskocídne ⁷⁶ účinky. Taktiež majú schopnosť pôsobiť ako aktivátory draslíkového kanálu (BK kanál) ⁵¹. Ďalej bola zistená ich schopnosť inhibovať fotosyntézu a teda herbicídny a antialgálny účinok. ^{77, 78} Iné dokážu selektívne inhibovať produkciu interleukínu 12p40 (IL-12p40), čo môže mať význam u ochorení ako reumatoidná artritída, psoriáza, asthma bronchiale alebo Cronova choroba ⁷⁹. Posledne menovaná biologická vlastnosť salicylanilidov má potenciál negatívne ovplyvniť využiteľnosť ich vyššie zmienenej *in vitro* antimykobakteriálnej aktivity. Dôvodom je skutočnosť, že IL-12p40 je podjednotkou IL-12, ktorý hrá kľúčovú úlohu v rozvoji špecifickej imunitnej odpovedi voči *Mtb* infekcii (vis. kapitola 3.1.4., Patogenéza). Dopad schopnosti salicylanilidov inhibovať produkciu IL-12p40 na využiteľnosť ich antimykobakteriálnych vlastností nebol dodnes objasnený. Známa je však skutočnosť, že alkylácia salicylanilidového hydroxyly spôsobuje stratu ich schopnosti inhibovať produkciu IL-12p40 ⁷⁹.

3.6. Stereochemické vlastnosti derivátov benzanilidu a tiobenzanilidu

Molekuly derivátov benzanilidu a tiobenzanilidu môžu vykázať dva stereochemicky významné javy: *E*, *Z* izomériu na (tio)amidickej väzbe [CO(S)-NR] a/alebo axiálnu chiralitu

na osi aromatické jadro-CO(S)NR [Ar-CO(S)NR], a/alebo aromatické jadro-NRCO(S) [Ar-NRCO(S)]^{80, 81, 82, 83}. **R** na (tio)amidickom atóme dusíka bude v ďalšom texte predstavovať uhl'ovodíkový zvyšok alebo atóm vodíka.

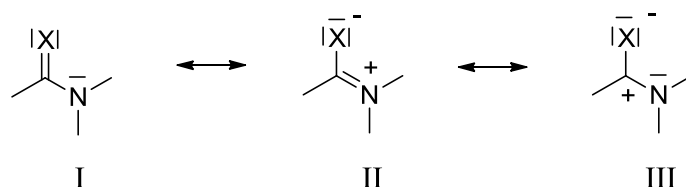
E, *Z* izoméria derivátov (tio)benzanilidu (Obrázok 11) je spôsobená existenciou dostatočne veľkej rotačnej bariéry na väzbe CO(S)-NR a schopnosťou molekúl týchto látok zaujať na tejto väzbe dve rozdielne základné priestorové usporiadania. V závislosti od miery spomalenia voľnej rotácie môžu byť *E*, *Z* izoméry stabilné buď len na NMR časovej ose (pozorovateľné v NMR spektrách) alebo i na laboratórnej časovej ose (izolovateľné ako chemické indivíduá). Až v druhom prípade ide o pravú izomériu. O tom, ktorý izomér a v akej miere bude prevládať, rozhoduje rozdiel ich potenciálnych energií. Potenciálna energia je v prvom rade určovaná substitúciou na (tio)amidickom atóme dusíka a potom, v menšej miere, i substitúciou v *orto* polohách aromatických jadier. Je všeobecne známe, že(tio)benzanilidy so substitúciou na (tio)amidickom dusíku (terciárne (tio)benzanilidy) preferujú priestorové usporiadanie *E* kým sekundárne (tio)benzanilidy naopak priestorové usporiadanie *Z*^{81,84}.



Obrázok 11: Izoméria (tio)benzanilidových derivátov na väzbe CX-NR: X = O/S, R = H, uhl'ovodíkový zvyšok, R¹, R² = substituenty.

Objasnenie pôvodu rotačnej bariéry (tio)amidickej väzby je problém, ktorý zamestnáva teoretických i experimentálnych chemikov už dlhé roky. Historicky prvou teóriou snažiacou sa podať vysvetlenie je tzv. rezonančná teória (RT) L. Paulinga. Podľa nej je rotačná bariéra CO-NR väzby spôsobená jej čiastočne dvojitém charakterom. Tento charakter CO-NR väzby vyplýva zo štruktúry CONR skupiny, ktorú RT považuje za výsledok kombinácie dvoch hraničných rezonančných štruktúr (Obrázok 12, štruktúra I a II). Okrem hraničnej rezonančnej štruktúry **I** reprezentovanej tradičnou štruktúrou s dvojitou väzbou C=O a jednoduchou väzbou C-N do výslednej štruktúry výrazne prispieva i hraničná rezonančná štruktúra **II**. U nej, v dôsledku značnej elektronegativity atómu kyslíka, je π elektrónový pár väzby C=O lokalizovaný na atóme kyslíka a voľný elektrónový pár atómu

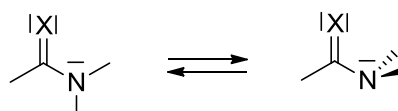
dusíka je delokalizovaný cez C,N π systém. Táto teória je schopná okrem rotačnej bariéry vysvetliť i ďalšie experimentálne zistené vlastnosti CONR skupiny: koplanaritu skupín pripojených na atóm dusíka, kinetickú stabilitu voči ataku nukleofila, napr. pri hydrolýze, zníženú bazicitu atómu dusíka, skrátenie dĺžky C-N väzby a predĺženie C=O väzby ⁸⁵.



Obrázok 12: Hraničné rezonančné štruktúry (tio)amidickej funkčnej skupiny, X = O/S.

RT však nedokáže uspokojivo vysvetliť existenciu rotačnej bariéry tioamidickej väzby. Podľa RT by rotačná bariéra tioamidickej väzby mala byť nižšia než rotačná bariéra amidickej väzby. Dôvodom je nižšia elektronegativita atómu síry v porovnaní s atómom kyslíka, z toho plynúci menší elektrónový deficit na atóme uhlíka, menšia delokalizácia voľného elektrónového páru atómu dusíka a v konečnom dôsledku v menšej miere dvojitý charakter väzby CS-NR než väzby CO-NR. Experimentálne získané výsledky (väčšia rotačná bariéra a menšia dĺžka CS-NR väzby než CO-NR väzby, väčší dipólový moment molekuly tioamidov než molekuly amidov a väčšie odtienenie ¹³C a ¹⁵N rezonančných signálov tioamidov než amidov) sú však v príkrom rozpore s týmito predstavami ⁸⁶.

Ďalšie spochybnenie platnosti RT priniesol na konci 80-tých rokov minulého storočia rozvoj výpočtovej techniky a s ním spojená možnosť modelovania molekúl. V tejto oblasti dospeli k zaujímavým výsledkom najmä K.B. Wiberg a C.L. Breneman, ktorí využili model atómy v molekulách (AIM) k analýze rozloženia elektrónov v molekule formamidu. Zistili pritom, že elektrónová hustota na atóme dusíka je väčšia v rovinnej konformácii než v twist forme (Obrázok 13), čo je v priamom rozpore s RT. Neskôr K.B. Wiberg a P.R. Rablen použili diagramy rozdielu nábojovej hustoty a zistili, že počas rotácie okolo C-N väzby sa hodnota náboja na atóme kyslíka nemení, ale naopak k výrazným zmenám náboja dochádza na atómoch uhlíka a dusíka ⁸⁵.



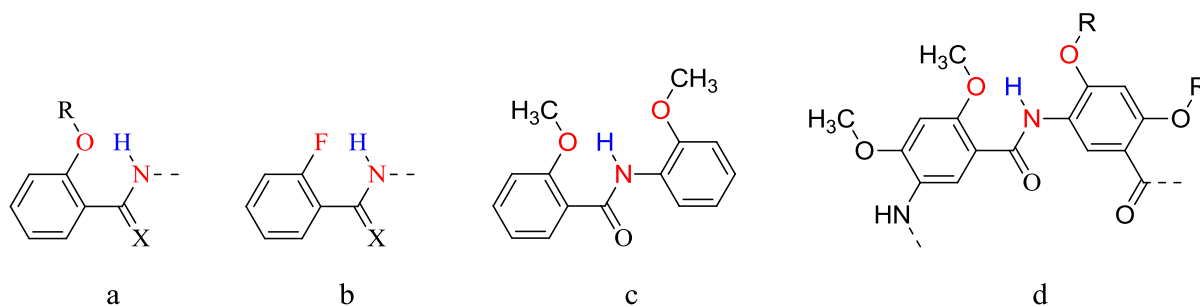
Obrázok 13: Planárna konformácia a twist konformácia na (tio)amidickej väzbe.

Tieto výsledky viedli k pridaniu tretej hraničnej rezonančnej štruktúry **III** do rezonančnej schémy (Obrázok 12) a k záveru, že za rotačnú bariéru je zodpovedná elektrostatická interakcia medzi atómami uhlíka a dusíka. Tá je väčšia v planárnej konformácii a rezultuje v kratšiu a silnejšiu väzbu a v stabilizáciu v porovnaní s twist formou. V období po Wibergovom spochybnení RT vzniklo viacero teoretických prác potvrdzujúcich alebo spochybňujúcich jeho tvrdenia. Pre všetky tieto teoretické výpočty však bolo charakteristické, že vychádzali zo zmien distribúcie náboja alebo zmien väzobných dĺžok počas rotácie okolo väzby C-N. Kvantitatívnou charakteristikou prvoradého významu u modelov (tio)amidickej funkčnej skupiny je však delokalizačná energia ⁸⁵.

D. Lauvergnat a P.C. Hiberty preto preverili platnosť RT na modely formamidu a tioformamidu pomocou *ab initio* výpočtu valenčných väzieb (VB), ktorý umožňoval podľa potreby vypínanie a zapínanie delokalizácie voľného elektrónového páru atómu dusíka a rotáciu okolo väzby C-N. Výpočtom a zrovnaním energií rôznych konformácií CO(S)NH funkčnej skupiny so zapnutou alebo vypnutou delokalizáciou voľného elektrónového páru atómu dusíka stanovili energetický príspevok delokalizácie k rotačnej bariére väzby CO(S)-NH. U molekuly formamidu bol tento príspevok približne 1/2 a v prípade molekuly tioformamidu asi 2/3 energie rotačnej bariéry. To znamená, že i v prípade, že väzba C-N má kompletne jednoduchý charakter, rotácia okolo nej je obmedzená istou rotačnou bariérou. Autori ako možné vysvetlenie zvyškovej rotačnej bariéry navrhli elektrostatickú stabilizáciu voľného elektrónového páru atómu dusíka susedným elektróndeficitným (tio)karbonylovým atómom uhlíka. Atóm dusíka má preto snahu zaujať také geometrické usporiadania väzieb (sp^2 hybridizácia) a takú konformáciu, aby orientácia jeho voľného elektrónového páru korešpondovala s miestom najmenšej elektrónovej hustoty na atóme uhlíka (tio)karbonylovej skupiny ⁸⁵.

Na základe vyššie zmienených teoretických a experimentálnych štúdií sa má dnes za to, že príčinou existencie rotačnej bariéry na väzbe CO(S)-NR je súčasne preferencia atómu dusíka k sp^2 hybridizácii s voľným elektrónovým párom orientovaným kolmo na rovinu (tio)amidickej väzby a konjugácia voľného elektrónového páru atómu dusíka s (tio)karbonylovou skupinou. Pre príspevok konjugácie do rotačnej bariéry sa miesto polarizácie väzby C=X (X = O, S) ako rozhodujúca ukázala jej polarizovateľnosť. Tá narastá s atómovým polomerom atómu X ⁸⁶.

Okrem samotných vlastností (tio)amidickej skupiny môže byť veľkosť rotačnej bariéry na väzbe CO(S)-NR ovplyvnená i blízkym okolím tejto skupiny. V prípade derivátov (tio)benzanilidu je toto okolie tvorené najmä skupinami nachádzajúcimi sa v *orto* polohách aromatických jadier. Spôsob ako môžu tieto skupiny prispievať do rotačnej bariéry spočíva buď v ich stérických vlastnostiach alebo ich schopnosti nevázobnej interakcie s (tio)amidickou skupinou. Najčastejším prípadom nevázobnej interakcie je tvorba intramolekulárnych vodíkových väzieb. Veľmi často sa s nimi stretávame v chémii foldamérov založených na benzanilidovom fragmente, kde sa tieto väzby využívajú k obmedzeniu rotácie okolo väzby Ar-NHCO, Ar-CONH. Tohto cieľa je dosahované tvorbou 5/6-členných kruhov obsahujúcich vodíkovú väzbu, ktoré v niektorých prípadoch zahŕňajú i väzbu CO-NH, čím je súčasne obmedzovaná i rotácia okolo nej (Obrázok 14 a, b) ^{87, 88}. Špeciálny prípad intramolekulárnej vodíkovej väzby predstavuje trojstredová vodíková väzba, ktorá bola popísaná u *Z*-konforméru 2,2'-dimetoxybenzanilidu (Obrázok 14 c). V molekule tohto amidu je vodík CONH skupiny zapojený súčasne do vodíkovej väzby tvoreného 5-členného i 6-členného kruhu. Táto skutočnosť rezultuje v rigidné a planárne usporiadanie celej molekuly. Navyše bolo dokázané, že trojstredová väzba pôsobí kooperačne, 5-členný a 6-členný systém sa navzájom posilňujú ⁸⁹. Nezvyčajná stabilita trojstredovej vodíkovej väzby bola demonštrovaná na tvorbe oligomérnych šróbovicových štruktúr so štruktúrnou jednotkou **d** (Obrázok 14 d) ⁹⁰.

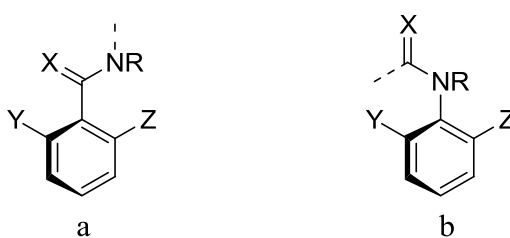


Obrázok 14: Príspevok intramolekulárnych vodíkových väzieb do rotačnej bariéry väzby CX-NH, X = O/S, R = alkyl/H: a, b – dvojstredové vodíkové väzby, c – trojstredová vodíková väzba, d – štruktúrna jednotka oligomérnych šróbovicových štruktúr využívajúca ku konformačnej stabilizácii trojstredovú vodíkovú väzbu. Donory voľného elektrónového páru sú zvýraznené červene.

S *ortho* substitúciou úzko súvisí i problematika konformácie na väzbách Ar-CO(S)NR a Ar-NRCO(S). U väčšiny derivátov (tio)benzanilidu je na týchto väzbách možná voľná rotácia a preferované sú konformácie, v ktorých obe aromatické jadrá ležia v jednej rovine s (tio)amidickou funkčnou skupinou. Dôvodom energetickej výhodnosti týchto konformácií je

možnosť konjugácie aromatického jadra s (tio)karbonylovým atómom uhlíka a s voľným elektrónovým párom atómu dusíka. Ďalší pokles potenciálnej energie týchto konformácií môže spôsobiť tvorba vyššie zmienených intramolekulárnych vodíkových väzieb. Takéto konformácie majú rovinu symetrie a preto sú molekuly týchto látok achirálné ⁹¹.

Zavedenie substituentu do *orto* polohy môže za istých okolností spôsobiť výrazné zmeny v stereochemii (tio)benzanilidových derivátov ^{80, 81, 82, 83}. Molekuly snažiac sa prejsť do konformácie s najnižšou potenciálnou energiou, musia v tomto prípade urobiť za dosť dvom protichodným požiadavkám. Snaha molekuly vytvoriť čo najrozsiahljší konjugovaný systém vedie k tendencii zaujať planárnu konformáciu a vytvoriť tak štruktúrne predpoklady pre maximálny prekryv π orbitalov. Súčasne však existuje snaha minimalizovať stérickú interakciu *orto* substituentu s (tio)amidickou skupinou. Pokiaľ je nárast potenciálnej energie spôsobovaný touto interakciou nedostatočne kompenzovaný jej úbytkom v dôsledku konjugácie, prestane byť planárna konformácia energeticky najvýhodnejšou. Priestorovým usporiadaním molekuly s najmenšou potenciálnou energiou sa stane konformácia, v ktorej aromatické jadro a rovina (tio)amidickej skupiny zvierajú istý nenulový uhol. Zväčšovaním stérických nárokov *orto* substituentu sa tento uhol zväčšuje až sa nakoniec energeticky najvýhodnejšou konformáciou stane tá, v ktorej leží *orto* substituované aromatické jadro v rovine kolmej na (tio)amidickú väzbu. Rovnaký efekt ako zväčšovanie objemu substituentu má zavedenie substituentu i do druhej *orto* polohy (Obrázok 15). S nárastom stérických požiadaviek *orto* substituentu dochádza súčasne k nárastu rotačnej bariéry na väzbe Ar-CO(S)NR resp. Ar-NRCO(S) (Obrázok 15). Príčinou je skutočnosť, že v priebehu rotácie okolo tejto väzby musí molekula zaujať i energeticky veľmi nevýhodnú planárnu konformáciu ^{82, 83, 91}.



Obrázok 15: Konformácie základného stavu na väzbe Ar-CXNR (a) a Ar-NRCX (b), X = O/S, Y, Z = stéricky objemné substituenty neschopné podieľať sa na tvorbe vodíkovej väzby, R = H, uhl'ovodíkový zvyšok.

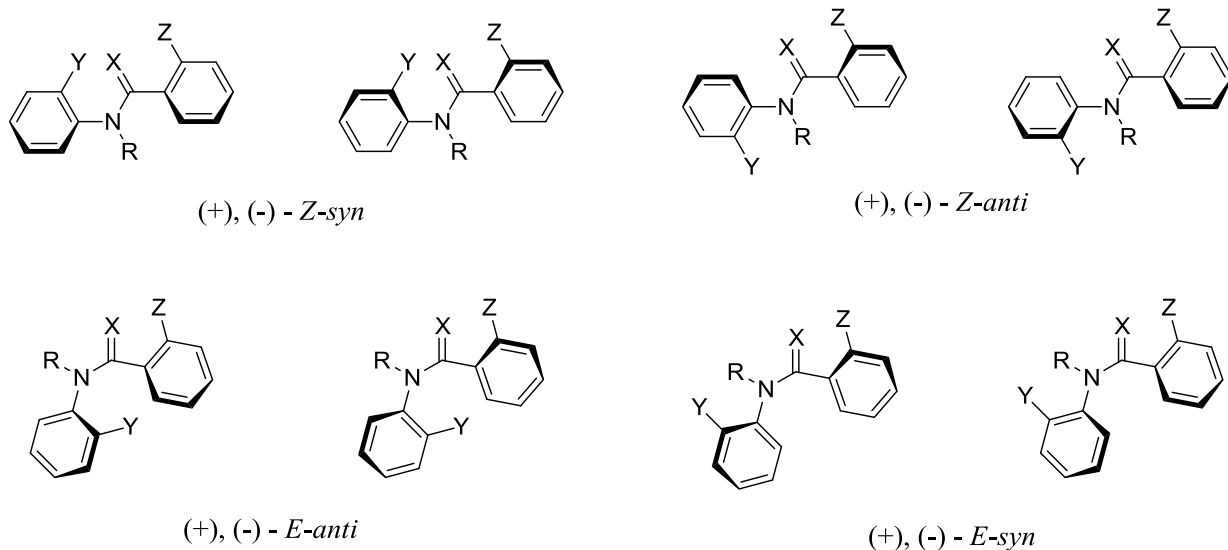
Zmena konformačnej preferencie má dôležité stereochemické následky. Za predpokladu *orto* monosubstitúcie (Obrázok 15, Y = H) alebo *orto* asymetrickej disubstitúcie

(Obrázok 15, $Y \neq Z$), energeticky preferovaná konformácia nemá žiadny prvok symetrie a preto sa stáva chirálnou. V dôsledku zvýšenej rotačnej bariéry na väzbe Ar-CO(S)NR resp. Ar-NRCO(S) sa môže rotácia okolo tejto väzby spomaliť natoľko, že sa bude chiralita manifestovať. V prípade, že rotačná bariéra je dostatočná, aby sa chiralita manifestovala spektrálne (napr. v NMR spektrách diastereotopicitou skupín pripojených na aromatické jadro a/alebo (tio)amidický atóm dusíka), ale nedostatočná k izolácii čistých enantiomérov, hovoríme o tranzientnej chiralite. Pokiaľ sa rotácia spomalí až do takej miery, že je možné jednotlivé konforméry izolovať, tie sa stávajú pravými izoméry, tento jav sa nazýva atropoizoméria a izoméry atropoizoméry⁹¹. Hranica medzi atropoizomérmi a konformérmi je arbitrárne stanovená Okioho pravidlom, podľa ktorého sú pri danej teplote atropoizoméry konforméry s polčasom interkonverzie väčším než 1000 sekúnd⁹².

Problematika axiálnej chiralita benzanilidov bola doposiaľ intenzívne študovaná najmä na prípade amidov s terciárnou amino skupinou^{80, 84, 91, 92, 93}. Na druhú stranu existuje len zopár prác venujúcich sa problému axiálnej chiralita u tiobenzanilidových derivátov^{82, 83} a zvlášť u sekundárnych tiobenzanilidových derivátov⁸¹.

Nárast objemu *orto* substituentov a s ním spojená zmena v konformácii základného stavu vedie u derivátov (tio)benzanilidu i k zväčšeniu rotačnej bariéry na (tio)amidickej väzbe. Príčina spočíva v skutočnosti, že počas rotácie okolo tejto väzby musí molekula prejsť cez konformáciu, v ktorej obe časti (tio)amidickej skupiny ležia vzájomne kolmo na seba. To v kombinácii so skutočnosťou, že v základnom stave je u týchto molekúl aromatické jadro kolmé na rovinu (tio)amidickej väzby vedie k nárastu potenciálnej energie tejto tranzitnej konformácie a k zväčšeniu rotačnej bariéry⁹⁴.

Na záver tejto kapitoly je uvedený prehľad (Obrázok 16), ktorý obsahuje všetky teoreticky možné izoméry (tio)benzanilidových derivátov, za predpokladu nekoplanarity aromatických jadier a (tio)amidickej skupiny a dostatočnej bariéry na väzbách CO(S)-NR, Ar-CO(S)NR a Ar-NRCO(S)⁸⁰:



Obrázok 16: Možné izoméry derivátov (tio)benzanilidu za predpokladu nekoplanarity aromatických jadier a (tio)amidickej skupiny a dostatočnej bariéry na väzbách CX-NR, Ar-CXNR a Ar-NRCX: X = O/S, Y, Z = stéricky objemné substituenty neschopné podieľať sa na tvorbe vodíkovej väzby, R = H, uhl'ovodíkový zvyšok.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Všetky chemikálie a rozpúšťadlá použité pri vypracovaní tejto dizertačnej práce boli zakúpené u firmy Sigma Aldrich, Praha, Česká republika alebo Penta, Praha, Česká republika a boli použité bez ďalšieho čistenia.

4.1. Syntetická časť

4.1.1. Všeobecné metódy

K monitorovaniu reakcií a ku kontrole čistoty produktov bola použitá tenkovrstvová chromatografia (TLC) na TLC doskách s 0,2mm vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ (Merck, KGaA, Darmstadt, Nemecko). K vizualizácii TLC škvrn látok bolo použité UV žiarenie o vlnovej dĺžke 254 a 366 nm. Pre kolónovú chromatografiu bol použitý silikagel 60 s veľkosťou častíc 0,063-0,2 mm (Fluka, Praha, Česká republika).

Body topenia boli stanovené v otvorených kapilárach pomocou prístroja pre stanovenie bodu topenia B-540 alebo M-560 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švajčiarsko) a sú nekorigované. IR spektrá boli zmerané v rozmedzí 400-4000 cm⁻¹ pomocou spektrometra Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s použitím ATR techniky. Pokiaľ nebude uvedené inak, NMR spektrá boli merané v DMSO-*d*₆ alebo CDCl₃ roztoku pri laboratórnej teplote NMR spektrometrom Varian Mercury Vxhb 300 (300 MHz pre ¹H a 75,5 MHz pre ¹³C, Varian Co., Palo Alto, CA, USA) a Varian Mercury (500 MHz pre ¹H a 125 MHz pre ¹³C, Varian Co., Palo Alto, CA, USA). Chemické posuny (δ) sú udávané v ppm a sú nepriamo vzťahnuté k tetrametylsilánu ako vnútornému štandardu. MS spektrá boli zmerané na hmotnostnom spektrometre s chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku (APCI) a analyzátorom na princípe iónovej pasce (IT) Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). K príprave vzoriek bol použitý metanol pre MS analýzu. Elementárna analýza (C, H, N, S) bola uskutočnená na automatickom mikroanalyzátore CHNS-O CE instrument, FISIONS EA 1110 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.1.2. Deriváty 2-metoxybenzanilidu a jeho tioxo analogu

Tieto zlúčeniny boli publikované v práci s originálnym názvom: Synthesis and *in vitro* antimycobacterial activity of 2-methoxybenzanilides and their thioxo analogues.

J. Kozic, E. Novotna, M. Volkova, J. Stolarikova, F. Trejtnar, J. Vinsova, Eur. J. Med. Chem. 56 (2012) 387-395, (kapitola 8, Zoznam publikácií a prezentácií, článok 1).

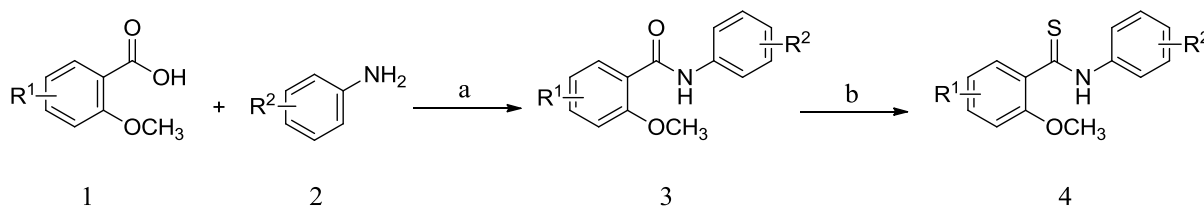


Schéma 1: Príprava 2-metoxybenzanilidov (**3**) a ich tioxo analogov (**4**): $R^1 = 4\text{-Cl}, 5\text{-Cl}$, $R^2 = 3\text{-NO}_2, 4\text{-NO}_2, 3\text{-Cl}, 4\text{-Cl}, 3,4\text{-di-Cl}, 3\text{-Br}, 4\text{-Br}, 3\text{-CF}_3, 4\text{-CF}_3$. Činidlá: (a) PCl_3 , (b) P_4S_{10} .

Postup prípravy derivátov 2-metoxybenzanilidu **3** (postup A ⁹⁵)

Ekvimolárne množstvo 4/5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny **1** (5,0 mmol), substituovaného anilínu **2** (5,0 mmol) a PCl_3 (5,0 mmol) bolo rozpustené v 20 ml chlorbenzénu a bolo zahrievané za miešania pri teplote varu po dobu 3 hodín. Následne bola reakčná zmes za tepla sfiltrovaná, zbavená rozpúšťadla a kryštalizovaná zo zmesi $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$.

Pripravené deriváty 2-metoxybenzanilidu **3**

4-chlor-2-metoxy-*N*-(3-nitrofenyl)benzamid (**3a**)

Výťažok: 64,5 %, žltá pevná látka; t. t. 185–186 °C; IR (ATR): 3331 (ν NH), 3071 (ν CH aromatická), 1670 (amid I), 1590 (ν CC aromatická), 1544 (amid II), 1520 (ν_{as} NO_2), 1477 (ν CC aromatická), 1354 (ν_{s} NO_2) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 10,57 (1H, s, NH), 8,76 (1H, m, H2'), 8,04 (1H, m, H4'), 7,95 (1H, m, H6'), 7,64 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, H5'), 7,63 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 7,29 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H3), 7,14 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H5), 3,91 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): δ 164,60; 157,55; 148,16; 140,18; 136,80; 131,19; 130,33; 125,96; 123,77; 120,68; 118,39; 113,99; 112,71; 56,68; LRMS-APCI⁺: m/z 307 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_4$ (306,70) vypočítané: C 54,83; H 3,62; N 9,13; nájdené: C 54,74; H 3,93; N 9,11.

4-chlor-2-metoxy-*N*-(4-nitrofenyl)benzamid (**3b**)

Výťažok: 60,3 %, žltá pevná látka; t. t. 223–226 °C; IR (ATR): 3327 (ν NH), 3115 (ν CH aromatická), 1677 (amid I), 1593 (ν CC aromatická), 1551 (amid II), 1506 (ν_{as} NO_2), 1479 (ν CC aromatická), 1328 (ν_{s} NO_2) cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 10,70 (1H, s, NH), 8,29-8,21 (2H, m, H3', H5'), 8,00-7,91 (2H, m, H2', H6'), 7,62 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 7,29

(1H, d, $J = 1,8$ Hz, H3), 7,14 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,82; 157,55; 145,21; 142,66; 136,88; 131,16; 125,14; 123,83; 120,69; 119,56; 112,73; 56,69; LRMS-APCI⁺: m/z 307 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₄ (306,70) vypočítané: C 54,83; H 3,62; N 9,13; nájdené: C 54,90; H 3,81; N 9,21.

4-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-metoxybenzamid (3c)

Výtťažok: 71,3 %, biela pevná látka; t. t. 116–118 °C; IR (ATR): 3355 (v NH), 1668 (amid I), 1587 (v CC aromatická), 1534 (amid II), 1482, 1460 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,28 (1H, s, NH), 7,91 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H2'), 7,65-7,57 (2H, m, H6, H4'), 7,36 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, H5'), 7,27 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 7,15 (1H, m, H6'), 7,13 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,22; 157,50; 140,52; 136,61; 133,27; 131,18; 130,63; 123,96; 123,55; 120,66; 119,31; 118,32; 112,68; 56,67; LRMS-APCI⁺: m/z 296 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ (296,15) vypočítané: C 56,78; H 3,74; N 4,73; nájdené: C 56,90; H 3,61; N 4,85.

4-chlor-*N*-(4-chlorfenyl)-2-metoxybenzamid (3d)

Výtťažok: 61,7 %, biela pevná látka; t. t. 127–128 °C; IR (ATR): 3378 (v NH), 3073 (v CH aromatická), 1667 (amid I), 1596 (v CC aromatická), 1540 (amid II), 1492, 1463 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,23 (1H, s, NH), 7,79-7,70 (2H, m, H3', H5'), 7,61 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 7,42-7,34 (2H, m, H2', H6'), 7,27 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 7,12 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,00; 157,48; 138,05; 136,49; 131,16; 128,82; 127,39; 124,10; 121,44; 120,64; 112,65; 56,64; LRMS-APCI⁺: m/z 296 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ (296,15) vypočítané: C 56,78; H 3,74; N 4,73; nájdené: C 56,98; H 4,01; N 4,76.

4-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-metoxybenzamid (3e)

Výtťažok: 51,5 %, biela pevná látka; t. t. 165–167 °C; IR (ATR): 3343 (v NH), 3106 (v CH aromatická), 1665 (amid I), 1584 (v CC aromatická), 1525 (amid II), 1476, 1464, 1456 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,37 (1H, s, NH), 8,09 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H2'), 7,66 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,4$ Hz, H6'), 7,64-7,56 (2H, m, H6, H5'), 7,28 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H3), 7,13 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,30; 157,51; 139,15; 136,77; 131,21; 131,19; 130,86; 125,27; 123,71; 121,07; 120,69; 119,97; 112,70; 56,69; LRMS-APCI⁺: m/z 330 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₀Cl₃NO₂ (330,59) vypočítané: C 50,86; H 3,05; N 4,24; nájdené: C 50,95; H 3,37; N 4,23.

***N*-(3-bromfenyl)-4-chlor-2-metoxybenzamid (3f)**

Výtťažok: 73,9 %, biela pevná látka; t. t. 136–137 °C; IR (ATR): 3355 (v NH), 3081 (v CH aromatická), 1670 (amid I), 1588 (v CC aromatická), 1536 (amid II), 1484, 1461 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10,25 (1H, s, NH), 8,05 (1H, m, H2'),

7,65 (1H, m, H4'), 7,61 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 7,32-7,25 (3H, m, H3, H5', H6'), 7,12 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 164,16; 157,50; 140,64; 136,61; 131,18; 130,90; 126,44; 123,92; 122,17; 121,73; 120,65; 118,70; 112,67; 56,66; LRMS-APCI⁺: m/z 340 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₂ (340,60) vypočítané: C 49,37; H 3,26; N 4,11; nájdené: C 49,33; H 3,60; N 4,17.

***N*-(4-bromfenyl)-4-chlor-2-metoxybenzamid (3g)**

Výtťažok: 66,8 %, biela pevná látka; t. t. 124–126 °C; IR (ATR): 3350 (ν NH), 3104 (ν CH aromatická), 1668 (amid I), 1589 (ν CC aromatická), 1539 (amid II), 1488, 1460 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,23 (1H, s, NH), 7,74-7,65 (2H, m, H3', H5'), 7,60 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 7,56-7,48 (2H, m, H2', H6'), 7,27 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 7,12 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,02; 157,48; 138,47; 136,50; 131,74; 131,16; 124,11; 121,81; 120,64; 115,44; 112,66; 56,65; LRMS-APCI⁺: m/z 340 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₂ (340,60) vypočítané: C 49,37; H 3,26; N 4,11; nájdené: C 49,61; H 3,58; N 4,15.

4-chlor-2-metoxy-*N*-(3-(trifluormetyl)fenyl)benzamid (3h)

Výtťažok: 73,2 %, biela pevná látka; t. t. 117–119 °C; IR (ATR): 3355 (ν NH), 1670 (amid I), 1592 (ν CC aromatická), 1558 (amid II), 1493 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,43 (1H, s, NH), 8,22 (1H, m, H2'), 7,91 (1H, m, H4'), 7,63 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H6), 7,56 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, H5'), 7,44 (1H, m, H6'), 7,28 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H3), 7,13 (1H, dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H5), 3,91 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,44; 157,53; 139,84; 136,67; 131,17; 130,16; 129,87 (1C, q, $J = 31,2$ Hz, C3'); 124,51 (1C, q, $J = 270,6$ Hz, CF₃); 123,91; 123,51; 120,65; 120,19 (1C, q, $J = 4,0$ Hz, C2'); 115,91 (1C, q, $J = 4,1$ Hz, C4'); 112,69; 56,67; LRMS-APCI⁺: m/z 330 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂ (329,70) vypočítané: C 54,64; H 3,36; N 4,25; nájdené: C 54,30; H 3,48; N 4,47.

4-chlor-2-metoxy-*N*-(4-(trifluormetyl)fenyl)benzamid (3i)⁹⁶

Výtťažok: 67,8 %, biela pevná látka; t. t. 141–142 °C; IR (ATR): 3368 (ν NH), 1673 (amid I), 1594 (ν CC aromatická), 1541 (amid II), 1483, 1464 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,46 (1H, s, NH), 7,97-7,88 (2H, m, H3', H5'), 7,75-7,66 (2H, m, H2', H6'), 7,62 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 7,28 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 7,13 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,51; 157,53; 142,66; 136,67; 131,16; 126,26 (2C, q, $J = 3,9$ Hz, C3', C5'); 125,25 (1C, q, $J = 269,5$ Hz, CF₃); 124,02; 123,80 (1C, q, $J = 31,8$ Hz, C4'); 120,66; 119,77; 112,70; 56,67; LRMS-APCI⁺: m/z 330 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂ (329,70) vypočítané: C 54,64; H 3,36; N 4,25; nájdené: C 54,43; H 3,25; N 4,44.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(3-nitrofenyl)benzamid (3j)

Výtťažok: 47,5 %, biela pevná látka; t. t. 190–192 °C; IR (ATR): 3318 (ν NH), 1670 (amid I),

1596 (v CC aromatická), 1552 (amid II), 1530 ($\nu_{\text{as}} \text{NO}_2$), 1474, 1458, 1433 (v CC aromatická), 1338 ($\nu_{\text{s}} \text{NO}_2$) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,66 (1H, s, NH), 8,76 (1H, t, $J = 2,2$ Hz, H2'), 8,03 (1H, m, H4'), 7,96 (1H, m, H6'), 7,63 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H5'), 7,62 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,56 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,22 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 3,87 (3H, s, OCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 164,17; 155,51; 148,15; 140,14; 131,81; 130,38; 128,97; 126,65; 125,94; 124,42; 118,48; 114,24; 113,99; 56,53; LRMS-APCI⁺: m/z 307 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₄ (306,70) vypočítané: C 54,83; H 3,62; N 9,13; nájdené: C 54,56; H 3,91; N 8,88.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(4-nitrofenyl)benzamid (3k)

Výtťažok: 49,3 %, žltá pevná látka; t. t. 209–211 °C; IR (ATR): 3318 (v NH), 1677 (amid I), 1596 (v CC aromatická), 1553 (amid II), 1513 ($\nu_{\text{as}} \text{NO}_2$), 1478, 1454 (v CC aromatická), 1330 ($\nu_{\text{s}} \text{NO}_2$) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,79 (1H, s, NH), 8,29–8,21 (2H, m, H3', H5'), 8,00–7,92 (2H, m, H2', H6'), 7,61 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,57 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,22 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 3,87 (3H, s, OCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 164,38; 155,50; 145,16; 142,72; 131,89; 128,94; 126,69; 125,17; 124,43; 119,59; 114,25; 56,54; LRMS-APCI⁺: m/z 307 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₄ (306,70) vypočítané: C 54,83; H 3,62; N 9,13; nájdené: C 54,38; H 3,21; N 8,95.

5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-metoxybenzamid (3l)

Výtťažok: 71,7 %, biela pevná látka; t. t. 133–135 °C; IR (ATR): 3326 (v NH), 3080 (v CH aromatická), 1667 (amid I), 1588 (v CC aromatická), 1525 (amid II), 1483, 1463 (v CC aromatická) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,35 (1H, s, NH), 7,91 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H2'), 7,65–7,58 (2H, m, H6, H4'), 7,54 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,36 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, H5'), 7,20 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 7,15 (1H, m, H6'), 3,87 (3H, s, OCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 163,71; 155,47; 140,44; 133,26; 131,66; 130,61; 128,97; 126,76; 124,42; 123,62; 119,33; 118,32; 114,21; 56,50; LRMS-APCI⁺: m/z 296 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ (296,15) vypočítané: C 56,78; H 3,74; N 4,73; nájdené: C 56,41; H 3,64; N 4,66.

5-chlor-*N*-(4-chlorfenyl)-2-metoxybenzamid (3m)

Výtťažok: 70,0 %, biela pevná látka; t. t. 135–137 °C; IR (ATR): 3335 (v NH), 3085 (v CH aromatická), 1665 (amid I), 1591 (v CC aromatická), 1535 (amid II), 1491, 1477 (v CC aromatická) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,32 (1H, s, NH), 7,79–7,70 (2H, m, H3', H5'), 7,59 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,54 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,43–7,35 (2H, m, H2', H6'), 7,19 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 3,86 (3H, s, OCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 163,55; 155,45; 138,02; 131,57; 128,97; 128,85; 127,48; 126,95; 124,42; 121,45; 114,19; 56,50; LRMS-APCI⁺: m/z 296 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ (296,15) vypočítané: C 56,78; H 3,74; N 4,73; nájdené: C 56,40; H 4,16; N 4,66.

5-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-metoxybenzamid (3n)

Výtěžok: 50,2 %, biela pevná látka; t. t. 175–177 °C; IR (ATR): 3343 (ν NH), 3099 (ν CH aromatická), 1674 (amid I), 1587 (ν CC aromatická), 1529 (amid II), 1476, 1469 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,45 (1H, s, NH), 8,09 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H2'), 7,65 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz, *J* = 2,3 Hz, H6'), 7,62–7,57 (2H, m, H6, H5'), 7,54 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4), 7,20 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 3,87 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 163,83; 155,48; 139,09; 131,80; 131,19; 130,87; 128,99; 126,55; 125,36; 124,43; 121,07; 119,96; 114,23; 56,52; LRMS-APCI⁺: *m/z* 330 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₀Cl₃NO₂ (330,59) vypočítané: C 50,86; H 3,05; N 4,24; nájdené: C 50,38; H 3,26; N 4,17.

N-(3-bromfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (3o)

Výtěžok: 68,3 %, biela pevná látka; t. t. 133–134 °C; IR (ATR): 3350 (ν NH), 1661 (amid I), 1592 (ν CC aromatická), 1534 (amid II), 1479, 1459 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 9,72 (1H, s, NH), 8,20 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6), 7,88 (1H, t, *J* = 1,9 Hz, H2'), 7,55 (1H, m, H4'), 7,42 (1H, dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,8 Hz, H4), 7,25 (1H, m, H6'), 7,21 (1H, t, *J* = 7,9 Hz, H5'), 6,96 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3), 4,05 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 161,86; 155,63; 139,29; 133,03; 132,13; 130,25; 127,28; 127,15; 123,19; 122,67; 122,57; 118,85; 113,05; 56,68; LRMS-APCI⁺: *m/z* 340 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₂ (340,60) vypočítané: C 49,37; H 3,26; N 4,11; nájdené: C 49,04; H 3,56; N 4,04.

N-(4-bromfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (3p)

Výtěžok: 40,7 %, biela pevná látka; t. t. 139–141 °C; IR (ATR): 3337 (ν NH), 3084 (ν CH aromatická), 1666 (amid I), 1594, 1586 (ν CC aromatická), 1535 (amid II), 1488, 1477 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,31 (1H, s, NH), 7,74–7,66 (2H, m, H3', H5'), 7,59 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6), 7,57–7,48 (3H, m, H4, H2', H6'), 7,19 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 3,86 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 163,54; 155,44; 138,42; 131,74; 131,56; 128,95; 126,94; 124,41; 121,81; 115,53; 114,18; 56,49; LRMS-APCI⁺: *m/z* 340 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₂ (340,60) vypočítané: C 49,37; H 3,26; N 4,11; nájdené: C 49,12; H 3,59; N 4,00.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(3-(trifluormetyl)fenyl)benzamid (3q)⁹⁷

Výtěžok: 53,2 %, biela pevná látka; t. t. 107–108 °C; IR (ATR): 3342 (ν NH), 1665 (amid I), 1597 (ν CC aromatická), 1559 (amid II), 1479 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,51 (1H, s, NH), 8,21 (1H, m, H2'), 7,90 (1H, m, H4'), 7,68–7,50 (3H, m, H4, H6, H5'), 7,44 (1H, m, H6'), 7,21 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 3,87 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,01; 155,50; 139,80; 131,71; 130,19; 129,83 (1C, q, *J* = 31,4 Hz, C3'); 128,96; 126,78; 124,80 (1C, q, *J* = 270,6 Hz, CF₃); 124,41; 123,50; 120,27 (1C, q, *J* = 4,0 Hz, C2'); 115,95 (1C, q, *J* = 4,3 Hz, C4'); 114,23; 56,52; LRMS-APCI⁺: *m/z* 330 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂ (329,70) vypočítané: C 54,64; H 3,36; N 4,25; nájdené: C 54,81; H 2,98; N 4,16.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(4-(trifluormetyl)fenyl)benzamid (3r)⁹⁸

Výtěžok: 75,3 %, biela pevná látka; t. t. 131–133 °C; IR (ATR): 3336 (ν NH), 1675 (amid I), 1605 (ν CC aromatická), 1545 (amid II), 1481 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,54 (1H, s, NH), 7,97-7,89 (2H, m, H3', H5'), 7,75-7,66 (2H, m, H2', H6'), 7,60 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H6), 7,55 (1H, dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4), 7,21 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3), 3,87 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,05; 155,48; 142,59; 131,71; 128,94; 126,86; 126,25 (2C, q, *J* = 3,9 Hz, C3', C5'); 125,17 (1C, q, *J* = 268,9 Hz, CF₃); 124,42; 124,06 (1C, q, *J* = 31,8 Hz, C4'); 119,77; 114,22; 56,51; LRMS-APCI⁺: *m/z* 330 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂ (329,70) vypočítané: C 54,64; H 3,36; N 4,25; nájdené: C 54,26; H 3,11; N 4,21.

Postup prípravy derivátov 2-metoxytiobenzanilidu 4 (postup B⁹⁹)

Suspenzia príslušného benzanilidu (3a–3r) (2,0 mmol) a ekvimolárneho množstva P₄S₁₀ (2,0 mmol) v 25 ml pyridínu bola za intenzívneho miešania zahrievaná pri teplote varu do doby pokiaľ bol podľa TLC prítomný v reakčnej zmesi benzanilid (3-8 hodín). V prípade potreby bol pridaný ďalší P₄S₁₀. Následne bola opatrne pridaná ľadová voda, zmes bola extrahovaná trikrát 50 ml CHCl₃, organické fáze boli spojené, vysušené Na₂SO₄ a oddestilované dosucha. Olejovitý zvyšok bol čistený chromatograficky.

Pripravené deriváty 2-metoxytiobenzanilidu 4

4-chlor-2-metoxy-*N*-(3-nitrofenyl)benztioamid (4a)

Výtěžok: 23,0 %, žltá pevná látka; t. t. 160–162 °C; IR (ATR): 3304 (ν NH), 1589, 1561 (ν CC aromatická), 1524 (ν_{as} NO₂), 1477, 1462 (ν CC aromatická), 1345 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 12,16 (1H, s, NH), 9,13 (1H, t, *J* = 2,2 Hz, H2'), 8,30 (1H, m, H4'), 8,11 (1H, m, H6'), 7,72 (1H, t, *J* = 8,2 Hz, H5'), 7,51 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H6), 7,23 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 7,09 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,9 Hz, H5), 3,85 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 195,25; 154,98; 147,70; 140,69; 135,34; 132,30; 131,26; 130,33; 128,94; 120,83; 120,34; 116,84; 112,38; 56,58; LRMS-APCI⁺: *m/z* 323 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₃S (322,77) vypočítané: C 52,10; H 3,44; N 8,68; S 9,93; nájdené: C 52,31; H 3,53; N 8,94; S 10,07.

4-chlor-2-metoxy-*N*-(4-nitrofenyl)benztioamid (4b)

Výtěžok: 20,0 %, žltá pevná látka; t. t. 153–154 °C; IR (ATR): 3364 (ν NH), 1589, 1561 (ν CC aromatická), 1510 (ν_{as} NO₂), 1491, 1473 (ν CC aromatická), 1318 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 12,20 (1H, s, NH), 8,39-8,26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 7,49 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H6), 7,23 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 7,09 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,9 Hz, H5), 3,84 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 195,83; 154,96; 145,41; 144,17; 135,43; 132,58; 131,31; 124,71; 122,47; 120,36; 112,38; 56,57; LRMS-APCI⁺: *m/z*

323 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₃S (322,77) vypočítané: C 52,10; H 3,44; N 8,68; S 9,93; nájdené: C 52,38; H 3,62; N 8,51; S 9,79.

4-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-metoxybenztioamid (4c)

Výtťažok: 50,2 %, žltá pevná látka; t. t. 124–125 °C; IR (ATR): 3290 (ν NH), 1588, 1565, 1479, 1460 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,53 (1H, s, NH), 8,41 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H₆), 7,85 (1H, t, *J* = 2,0 Hz, H₂'), 7,62 (1H, m, H₄'), 7,35 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, H₅'), 7,26 (1H, m, H₆'), 7,06 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 1,9 Hz, H₅), 6,98 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H₃), 4,00 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,78; 154,99; 140,16; 138,57; 136,34; 134,36; 129,81; 126,88; 126,84; 124,19; 122,38; 121,77; 112,09; 56,70; LRMS-APCI⁺: *m/z* 312 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NOS (312,21) vypočítané: C 53,86; H 3,55; N 4,49; S 10,27; nájdené: C 54,11; H 3,71; N 4,72; S 10,02.

4-chlor-*N*-(4-chlorfenyl)-2-metoxybenztioamid (4d)

Výtťažok: 54,0 %, žltá pevná látka; t. t. 128–129 °C; IR (ATR): 1590, 1565, 1527, 1488, 1460 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,52 (1H, s, NH), 8,42 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H₆), 7,75–7,66 (2H, m, H₃', H₅'), 7,43–7,34 (2H, m, H₂', H₆'), 7,07 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 1,9 Hz, H₅), 6,98 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H₃), 4,00 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,64; 155,02; 138,53; 137,61; 136,35; 132,01; 128,96; 126,79; 125,52; 121,76; 112,07; 56,68; LRMS-APCI⁺: *m/z* 312 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NOS (312,21) vypočítané: C 53,86; H 3,55; N 4,49; S 10,27; nájdené: C 53,65; H 3,45; N 4,56; S 10,15.

4-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-metoxybenztioamid (4e)

Výtťažok: 39,0 %, žltá pevná látka; t. t. 122–123 °C; IR (ATR): 3300 (ν NH), 1583, 1542, 1477, 1459 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,56 (1H, s, NH), 8,40 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H₆), 7,97 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H₂'), 7,59 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,5 Hz, H₆'), 7,46 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H₅'), 7,06 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 1,9 Hz, H₅), 6,98 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H₃), 4,01 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,87; 155,00; 138,80; 138,36; 136,42; 132,58; 130,33; 130,15; 126,52; 125,77; 123,56; 121,84; 112,09; 56,75; LRMS-APCI⁺: *m/z* 346 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₀Cl₃NOS (346,66) vypočítané: C 48,51; H 2,91; N 4,04; S 9,25; nájdené: C 48,27; H 3,05; N 4,15; S 9,02.

***N*-(3-bromfenyl)-4-chlor-2-metoxybenztioamid (4f)**

Výtťažok: 53,4 %, žltá pevná látka; t. t. 129–130 °C; IR (ATR): 3303 (ν NH), 1588, 1560, 1547, 1477 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,52 (1H, s, NH), 8,41 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H₆), 7,97 (1H, m, H₂'), 7,69 (1H, m, H₄'), 7,41 (1H, m, H₆'), 7,28 (1H, t, *J* = 8,1 Hz, H₅'), 7,06 (1H, m, H₅), 6,98 (1H, m, H₃), 4,00 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 193,81; 155,00; 140,29; 138,59; 136,35; 130,07; 129,79; 127,04; 126,82; 122,91; 122,21; 121,78; 112,09; 56,72; LRMS-APCI⁺: *m/z* 356 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNOS (356,67) vypočítané: C 47,14; H 3,11; N 3,93; S 8,99; nájdené: C 46,96; H 3,34; N 3,79; S 8,94.

***N*-(4-bromfenyl)-4-chlor-2-metoxybenztioamid (4g)**

Výtěžok: 29,0 %, žltá pevná látka; t. t. 123–124 °C; IR (ATR): 1592, 1566, 1486, 1462 (v CC aromatická) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10,52 (1H, s, NH), 8,42 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6), 7,69–7,62 (2H, m, H3', H5'), 7,58–7,54 (2H, m, H2', H6'), 7,07 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H5), 6,98 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3), 4,00 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 193,57; 155,00; 138,55; 138,10; 136,36; 131,93; 126,81; 125,77; 121,78; 119,88; 112,08; 56,70; LRMS-APCI⁺: m/z 356 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrClNOS}$ (356,67) vypočítané: C 47,14; H 3,11; N 3,93; S 8,99; nájdené: C 47,20; H 3,31; N 3,96; S 9,37.

4-chlor-2-metoxy-*N*-(3-(trifluormetyl)fenyl)benztioamid (4h)

Výtěžok: 37,0 %, žltá pevná látka; t. t. 109–110 °C; IR (ATR): 3289 (v NH), 1591, 1566, 1483, 1450 (v CC aromatická) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10,64 (1H, s, NH), 8,44 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6), 8,05–7,95 (2H, m, H2', H4'), 7,60–7,50 (2H, m, H5', H6'), 7,08 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 7,00 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 4,03 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 194,17; 155,07; 139,56; 138,75; 136,46; 131,28 (1C, q, $J = 32,5$ Hz, C3'); 129,38; 127,67; 126,67; 123,66 (1C, q, $J = 270,8$ Hz, CF_3); 123,41 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C2'); 121,86; 121,09 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C4'); 112,12; 56,75; LRMS-APCI⁺: m/z 346 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{NOS}$ (345,77) vypočítané: C 52,10; H 3,21; N 4,05; S 9,27; nájdené: C 52,31; H 3,02; N 4,37; S 9,16.

4-chlor-2-metoxy-*N*-(4-(trifluormetyl)fenyl)benztioamid (4i)

Výtěžok: 22,0 %, žltá pevná látka; t. t. 95–96 °C; IR (ATR): 1589, 1565, 1482, 1464 (v CC aromatická) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10,66 (1H, s, NH), 8,43 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6), 8,00–7,89 (2H, m, H3', H5'), 7,73–7,64 (2H, m, H2', H6'), 7,08 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 7,00 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 4,02 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 193,95; 154,97; 142,03; 138,76; 136,40; 126,91; 126,06 (2C, q, $J = 3,8$ Hz, C3', C5'); 123,93; 121,89; 112,15; 56,75; LRMS-APCI⁺: m/z 346 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{NOS}$ (345,77) vypočítané: C 52,10; H 3,21; N 4,05; S 9,27; nájdené: C 52,33; H 3,39; N 4,26; S 9,39.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(3-nitrofenyl)benztioamid (4j)

Výtěžok: 17,4 %, žltá pevná látka; t. t. 158–159 °C; IR (ATR): 3291 (v NH), 1560 (v CC aromatická), 1531 ($\nu_{\text{as}} \text{NO}_2$), 1479, 1459 (v CC aromatická), 1344 ($\nu_{\text{s}} \text{NO}_2$) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ 12,23 (1H, s, NH), 9,13 (1H, t, $J = 2,2$ Hz, H2'), 8,29 (1H, m, H4'), 8,12 (1H, m, H6'), 7,73 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H5'), 7,51–7,45 (2H, m, H4, H6), 7,17 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H3), 3,82 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz): δ 194,55; 153,04; 147,70; 140,56; 134,78; 130,36; 128,98; 128,94; 127,85; 124,10; 120,93; 116,90; 113,98; 56,47; LRMS-APCI⁺: m/z 323 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ (322,77) vypočítané: C 52,10; H 3,44; N 8,68; S 9,93; nájdené: C 51,92; H 3,28; N 8,37; S 9,78.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(4-nitrofenyl)benztioamid (4k)

Výtěžok: 17,0 %, žltá pevná látka; t. t. 171–172 °C; IR (ATR): 3276 (ν NH), 1594 (ν CC aromatická), 1565 (ν_{as} NO₂), 1493, 1477 (ν CC aromatická), 1322 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 12,28 (1H, s, NH), 8,38–8,27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 7,52–7,44 (2H, m, H4, H6), 7,16 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3), 3,81 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 195,09; 153,02; 145,32; 144,25; 135,06; 130,42; 128,98; 124,72; 124,12; 122,53; 113,98; 56,46; LRMS-APCI⁺: *m/z* 323 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₃S (322,77) vypočítané: C 52,10; H 3,44; N 8,68; S 9,93; nájdené: C 52,37; H 3,35; N 8,85; S 10,05.

5-chlor-*N*-(3-chlorfenyl)-2-metoxybenztioamid (4l)

Výtěžok: 11,2 %, žltá pevná látka; t. t. 103–104 °C; IR (ATR): 3243 (ν NH), 1592, 1480, 1463 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,55 (1H, s, NH), 8,42 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H6), 7,86 (1H, t, *J* = 2,0 Hz, H2'), 7,64 (1H, m, H4'), 7,38 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4), 7,36 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, H5'), 7,27 (1H, m, H6'), 6,93 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 4,00 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,31; 153,19; 140,10; 134,51; 134,41; 132,13; 129,86; 129,60; 126,95; 126,84; 124,06; 122,27; 113,08; 56,77; LRMS-APCI⁺: *m/z* 312 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NOS (312,21) vypočítané: C 53,86; H 3,55; N 4,49; S 10,27; nájdené: C 53,54; H 3,27; N 4,65; S 10,35.

5-chlor-*N*-(4-chlorfenyl)-2-metoxybenztioamid (4m)

Výtěžok: 44,0 %, žltá pevná látka; t. t. 106–107 °C; IR (ATR): 3292 (ν NH), 1592, 1552, 1477, 1460 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,54 (1H, s, NH), 8,43 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H6), 7,77–7,66 (2H, m, H3', H5'), 7,44–7,33 (3H, m, H4, H2', H6'), 6,93 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3), 3,99 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,17; 153,22; 137,56; 134,51; 132,08; 129,62; 129,01; 126,84; 125,41; 113,08; 56,76; LRMS-APCI⁺: *m/z* 312 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NOS (312,21) vypočítané: C 53,86; H 3,55; N 4,49; S 10,27; nájdené: C 53,74; H 3,65; N 4,52; S 10,39.

5-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-metoxybenztioamid (4n)

Výtěžok: 15,9 %, žltá pevná látka; t. t. 122–123 °C; IR (ATR): 3301 (ν NH), 1584, 1536, 1475, 1463 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,57 (1H, s, NH), 8,44 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H6), 7,98 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H2'), 7,63 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,5 Hz, H6'), 7,49 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H5'), 7,40 (1H, dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4), 6,94 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3), 4,00 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,47; 153,23; 138,35; 134,66; 132,70; 132,33; 130,43; 130,28; 129,35; 127,00; 125,71; 123,50; 113,11; 56,84; LRMS-APCI⁺: *m/z* 346 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₀Cl₃NOS (346,66) vypočítané: C 48,51; H 2,91; N 4,04; S 9,25; nájdené: C 48,41; H 2,75; N 4,25; S 9,02.

***N*-(3-bromfenyl)-5-chlor-2-metoxybenztioamid (4o)**

Výtěžok: 50,2 %, žltá pevná látka; t. t. 103–105 °C; IR (ATR): 3238 (ν NH), 1590, 1532, 1478, 1463 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,54 (1H, s, NH), 8,41

(1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,98 (1H, t, $J = 1,9$ Hz, H2'), 7,69 (1H, m, H4'), 7,45-7,35 (2H, m, H4, H6'), 7,29 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, H5'), 6,93 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 3,96 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO – *d*₆, 75 MHz): δ 193,33; 153,20; 140,23; 134,48; 132,12; 130,11; 129,85; 129,61; 126,88; 126,83; 122,77; 122,24; 113,09; 56,78; LRMS-APCI⁺: m/z 356 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNOS (356,67) vypočítané: C 47,14; H 3,11; N 3,93; S 8,99; nájdené: C 47,38; H 3,34; N 3,96; S 9,36.

***N*-(4-bromfenyl)-5-chlor-2-metoxybenztioamid (4p)**

Výtťažok: 50,3 %, žltá pevná látka; t. t. 116–117 °C; IR (ATR): 3299 (ν NH), 1594, 1551, 1479, 1458 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,53 (1H, s, NH), 8,43 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,72-7,62 (2H, m, H3', H5'), 7,58-7,50 (2H, m, H2', H6'), 7,38 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 6,93 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 3,99 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,09; 153,20; 138,06; 134,50; 132,09; 131,96; 129,63; 129,00; 126,84; 125,63; 113,08; 56,77; LRMS-APCI⁺: m/z 356 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNOS (356,67) vypočítané: C 47,14; H 3,11; N 3,93; S 8,99; nájdené: C 47,19; H 3,38; N 4,15; S 9,21.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(3-(trifluormetyl)fenyl)benztioamid (4q)

Výtťažok: 31,3 %, žltá pevná látka; t. t. 93–94 °C; IR (ATR): 3303 (ν NH), 1573, 1540, 1484, 1453 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,66 (1H, s, NH), 8,43 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 8,01-7,55 (4H, m, H2', H4', H5', H6'), 7,39 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 6,94 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 4,01 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,66; 153,25; 139,49; 134,52; 132,24; 131,28 (1C, q, $J = 32,5$ Hz, C3'); 129,41; 128,18; 127,48; 126,85; 124,79 (1C, q, $J = 270,9$ Hz, CF₃); 123,43 (1C, q, $J = 3,7$ Hz, C2'); 120,90 (1C, q, $J = 3,9$ Hz, C4'); 113,10; 56,78; LRMS-APCI⁺: m/z 346 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NOS (345,77) vypočítané: C 52,10; H 3,21; N 4,05; S 9,27; nájdené: C 52,02; H 3,37; N 3,89; S 8,98.

5-chlor-2-metoxy-*N*-(4-(trifluormetyl)fenyl)benztioamid (4r)

Výtťažok: 19,2 %, žltá pevná látka; t. t. 102–103 °C; IR (ATR): 3260 (ν NH), 1593, 1550, 1476, 1463 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,68 (1H, s, NH), 8,42 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 8,00-7,90 (2H, m, H3', H5'), 7,74-7,64 (2H, m, H2', H6'), 7,40 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4), 6,94 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 4,01 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 193,50; 153,18; 141,97; 134,54; 132,27; 129,69; 128,43 (1C, q, $J = 32,9$ Hz, C4'); 126,94; 126,08 (2C, q, $J = 3,7$ Hz, C3', C5'); 123,80; 123,78 (1C, q, $J = 270,2$ Hz, CF₃); 113,13; 56,81; LRMS-APCI⁺: m/z 346 [M+H]⁺; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NOS (345,77) vypočítané: C 52,10; H 3,21; N 4,05; S 9,27; nájdené: C 51,85; H 2,98; N 3,79; S 9,17.

4.1.3. Deriváty 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho tioxo analogu

Tieto zlúčeniny boli publikované v práci s originálnym názvom: Synthesis and *in vitro* antimycobacterial and isocitrate lyase inhibition properties of novel 2-methoxy-2'-hydroxybenzanilides, their thioxo analogues and benzoxazoles.

J. Kozic, E. Novotna, M. Volkova, J. Stolarikova, F. Trejtnar, V. Wsol, J. Vinsova, Eur. J. Med. Chem. 56 (2012) 108-119, (kapitola 8, Zoznam publikácií a prezentácií, článok 2).

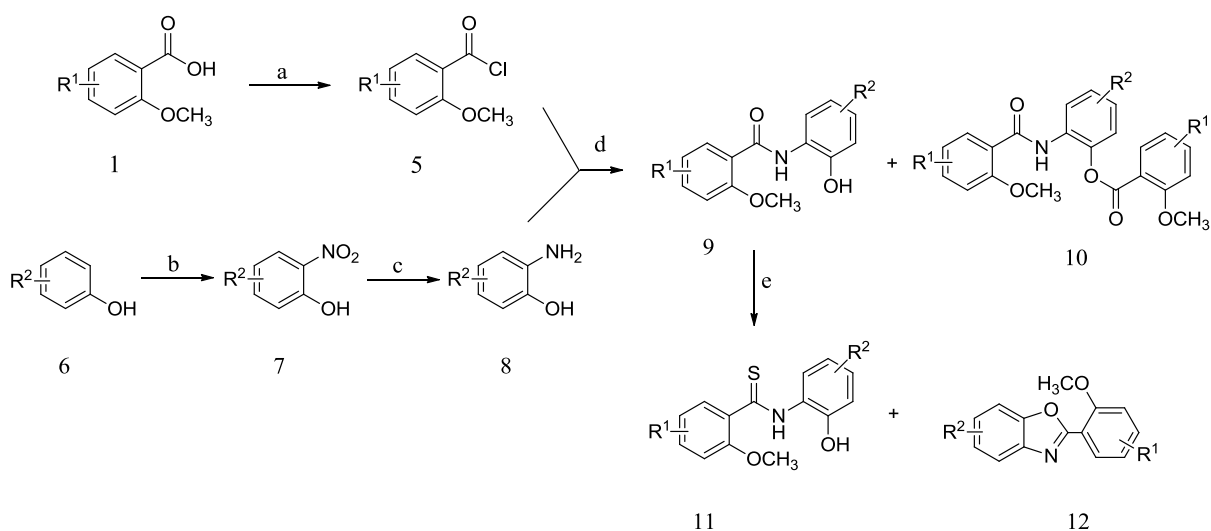


Schéma 2: Príprava 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidov (**9**) a ich tioxo analogov (**11**): R¹ = 4-Cl, 5-Cl, R² = 3,4-di-Cl, 3-Br, 4-Br, 3-CF₃, 4-CF₃ (2-amino-4/5-chlor/nitrofenol sú komerčne dostupné). Činidlá: (a) SOCl₂, (b) 65 % HNO₃, 99 % CH₃COOH, (c) Fe, H₂O, CH₃COOH, (d) TEA, (e) 1. P₄S₁₀, 2. HCl.

Postup prípravy chloridu 4/5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny **5**

0,5 g (2,7 mmol) 4/5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny **1** bolo rozpustené v 10 ml SOCl₂. Roztok bol následne za miešania zahrievaný pri teplote varu pod spätným chladičom s CaCl₂ uzáverom po dobu 3 hodín. Potom bol pomocou destilácie za zníženého tlaku odstránený prebytok SOCl₂ a tekutý zvyšok bez ďalšej izolácie použitý v nasledujúcej reakcii.

Postup prípravy derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu **9** (postup C)

K chloridu 4/5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny **5** (2,7 mmol), rozpustenom v 100 ml éteru, bolo pridané ekvimolárne množstvo (2,7 mmol) trietylamínu (TEA). Vzniklá zmes bola následne v priebehu 90 minút po kvapkách pridaná k 40 ml miešaného éterového roztoku substituovaného 2-aminofenolu **8** (2,7 mmol). Po pridaní chloridu kyseliny bola reakčná zmes

ešte 1 hodinu miešaná pod CaCl_2 uzáverom za laboratórnej teploty a potom extrahovaná postupne 50 ml 5% roztoku HCl , 50 ml 5% roztoku NaHCO_3 a 50 ml H_2O . Nakoniec bola organická fáza vysušená pomocou Na_2SO_4 a oddestilovaná. Produkt bol izolovaný kolónovou chromatografiou a kryštalizáciou.

Pripravené deriváty 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu 9

4-chlor-N-(2-hydroxy-4-nitrofenyl)-2-metoxybenzamid (9a)

Výtťažok: 55,8 %, žltá pevná látka; t. t. 270-273 °C, rozklad; IR (ATR): 3282 (b, v OH), 1641 (amid I), 1621, 1585 (v CC aromatická), 1542 ($\nu_{\text{as}} \text{NO}_2$), 1509, 1481, 1460 (v CC aromatická), 1336 ($\nu_{\text{s}} \text{NO}_2$) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 11,43 (1H, s, OH), 10,79 (1H, s, NH), 8,59 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H6'), 8,08 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H6), 7,79 (1H, dd, $J = 9,1$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H5'), 7,71 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H3'), 7,41 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H3), 7,23 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,6$ Hz, H5), 4,08 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 162,06; 158,09; 146,47; 142,54; 138,70; 133,78; 133,20; 121,72; 119,68; 118,64; 115,98; 113,52; 108,84; 57,47; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5$ (322,70) vypočítané: C 52,11; H 3,44; N 8,68; nájdené: C 51,95; H 3,38; N 8,44.

4-chlor-N-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)-2-metoxybenzamid (9b)

Výtťažok: 49,3 %, žltá pevná látka; t. t. 275-277 °C, rozklad; IR (ATR): 3346 (v NH), 1643 (amid I), 1593 (v CC aromatická), 1534 ($\nu_{\text{as}} \text{NO}_2$), 1499, 1479, 1459 (v CC aromatická), 1336 ($\nu_{\text{s}} \text{NO}_2$) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 12,03 (1H, bs, OH), 10,59 (1H, s, NH), 9,28 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, H6'), 8,07 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6), 7,91 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4'), 7,38 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3), 7,21 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H5), 7,05 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3'), 4,07 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 161,93; 158,01; 152,92; 139,57; 138,47; 133,07; 127,26; 121,64; 120,64; 119,76; 114,70; 114,21; 113,40; 57,39; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5$ (322,70) vypočítané: C 52,11; H 3,44; N 8,68; nájdené: C 52,43; H 3,78; N 8,56.

4-chlor-N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (9c) ¹⁰⁰

Výtťažok: 59,0 %, šedá pevná látka; t. t. 223-225 °C; IR (ATR): 3315 (v NH), 3185 (b, v OH), 1638 (amid I), 1608, 1592 (v CC aromatická), 1548 (amid II), 1508, 1482, 1460 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,82 (1H, bs, OH), 10,43 (1H, s, NH), 8,35 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H6'), 8,05 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H6), 7,37 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 7,20 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 6,92 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H3'), 6,87 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H5'), 4,06 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 161,41; 157,92; 147,60; 138,03; 132,99; 127,17; 126,33; 121,50; 120,81; 120,27; 119,09; 114,47; 113,32; 57,29; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (312,15) vypočítané: C 53,87; H 3,55; N 4,49; nájdené: C 53,45; H 3,94; N 4,23.

4-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (9d)

Výtěžok: 62,3 %, oranžová pevná látka; t. t. 240-242 °C; IR (ATR): 3294 (ν NH), 3142 (b, ν OH), 1642 (amid I), 1610, 1593 (ν CC aromatická), 1546 (amid II), 1506, 1496, 1480, 1458 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,61 (1H, bs, OH), 10,50 (1H, s, NH), 8,42 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H6'), 8,05 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6), 7,37 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H3), 7,21 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, H5), 6,97 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,6 Hz, H4'), 6,90 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H3'), 4,06 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 161,62; 157,96; 145,37; 138,23; 133,05; 128,29; 123,35; 122,73; 121,57; 120,07; 119,21; 115,71; 113,37; 57,34; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₃ (312,15) vypočítané: C 53,87; H 3,55; N 4,49; nájdené: C 53,82; H 3,86; N 4,32.

4-chlor-*N*-(4,5-dichlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (9e)

Výtěžok: 54,4 %, biela pevná látka; t. t. 250-252 °C; IR (ATR): 3302 (ν NH), 3153 (b, ν OH), 1633 (amid I), 1589 (ν CC aromatická), 1544 (amid II), 1497, 1487, 1467 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 11,09 (1H, s, OH), 10,48 (1H, s, NH), 8,56 (1H, s, H6'), 8,03 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,35 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H3), 7,19 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,0 Hz, H5), 7,03 (1H, s, H3'), 4,05 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 161,64; 157,95; 146,34; 138,36; 133,00; 127,47; 124,71; 121,56; 120,59; 120,28; 119,76; 115,60; 113,33; 57,33; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₀Cl₃NO₃ (346,59) vypočítané: C 48,52; H 2,91; N 4,04; nájdené: C 48,65; H 2,97; N 4,00.

***N*-(4-brom-2-hydroxyfenyl)-4-chlor-2-metoxybenzamid (9f)**

Výtěžok: 51,5 %, šedá pevná látka; t. t. 233-235 °C; IR (ATR): 3316 (ν NH), 3178 (b, ν OH), 1635 (amid I), 1608, 1589 (ν CC aromatická), 1541 (amid II), 1503, 1482, 1458 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,78 (1H, s, OH), 10,42 (1H, s, NH), 8,30 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H6'), 8,04 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6), 7,35 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 7,19 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,9 Hz, H5), 7,05 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H3'), 6,99 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,2 Hz, H5'), 4,05 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 161,40; 157,90; 147,72; 138,04; 132,99; 126,73; 122,04; 121,48; 121,20; 120,26; 117,24; 115,07; 113,28; 57,27; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₃ (356,60) vypočítané: C 47,15; H 3,11; N 3,93; nájdené: C 47,26; H 3,46; N 3,93.

***N*-(5-brom-2-hydroxyfenyl)-4-chlor-2-metoxybenzamid (9g)**

Výtěžok: 55,8 %, šedá pevná látka; t. t. 226-228 °C; IR (ATR): 3295 (ν NH), 3150 (b, ν OH), 1644 (amid I), 1608, 1592 (ν CC aromatická), 1548 (amid II), 1503, 1482, 1457 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10,63 (1H, s, OH), 10,49 (1H, s, NH), 8,55 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H6'), 8,05 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,37 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H3), 7,20 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,0 Hz, H5), 7,09 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,5 Hz, H4'), 6,86 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H3'), 4,06 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 161,58; 157,94; 145,78; 138,20; 133,01; 128,67; 128,38; 126,26; 121,95; 121,54; 120,06; 116,27; 113,34; 57,31; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₃ (356,60) vypočítané: C 47,15; H 3,11; N 3,93; nájdené: C 47,35; H 3,40; N 3,70.

4-chlor-*N*-(2-hydroxy-4-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzamid (9h)

Výtěžok: 51,1 %, biela pevná látka; t. t. 219-221 °C; IR (ATR): 3228 (b, v OH), 1646 (amid I), 1605, 1592 (v CC aromatická), 1549 (amid II), 1483, 1466 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 11,01 (1H, s, OH), 10,62 (1H, s, NH), 8,55 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H6'), 8,06 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,38 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 7,20 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,9 Hz, H5), 7,19-7,12 (2H, m, H3', H5'), 4,07 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 161,79; 157,97; 146,58; 138,32; 133,08; 130,75; 123,80 (1C, q, *J* = 31,6 Hz, C4'); 123,05 (1C, q, *J* = 269,8 Hz, CF₃); 121,55; 120,01; 119,59; 116,55 (1C, q, *J* = 3,7 Hz, C3'); 113,37; 110,65 (1C, m, C5'); 57,34; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₃ (345,70) vypočítané: C 52,11; H 3,21; N 4,05; nájdené: C 52,17; H 3,30; N 4,25.

4-chlor-*N*-(2-hydroxy-5-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzamid (9i)

Výtěžok: 56,5 %, biela pevná látka; t. t. 238-240 °C; IR (ATR): 3153 (b, v OH), 1646 (amid I), 1620, 1605, 1596 (v CC aromatická), 1567 (amid II), 1513, 1484, 1463, 1449 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 11,25 (1H, s, OH), 10,58 (1H, s, NH), 8,74 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H6'), 8,06 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,37 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H3), 7,30 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,2 Hz, H4'), 7,21 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,0 Hz, H5), 7,06 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H3'), 4,07 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 161,82; 157,97; 149,65; 138,27; 133,01; 127,53; 125,74 (1C, q, *J* = 269,7 Hz, CF₃); 121,57; 121,18 (1C, q, *J* = 4,0 Hz, C6'); 120,00; 119,86 (1C, q, *J* = 31,6 Hz, C5'); 116,22 (1C, q, *J* = 4,0 Hz, C4'); 114,67; 113,36; 57,34; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₃ (345,70) vypočítané: C 52,11; H 3,21; N 4,05; nájdené: C 52,31; H 3,37; N 4,04.

5-chlor-*N*-(2-hydroxy-4-nitrofenyl)-2-metoxybenzamid (9j)

Výtěžok: 55,2 %, žltá pevná látka; t. t. 287-290 °C, rozklad; IR (ATR): 3301 (v NH), 3080 (b, v OH), 1642 (amid I), 1623 (v CC aromatická), 1553 (v_{as} NO₂), 1508, 1475, 1456 (v CC aromatická), 1337 (v_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 11,40 (1H, bs, OH), 10,80 (1H, s, NH), 8,59 (1H, d, *J* = 9,1 Hz, H6'), 7,98 (1H, d, *J* = 2,9 Hz, H6), 7,79 (1H, dd, *J* = 9,1 Hz, *J* = 2,6 Hz, H5'), 7,71 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H3'), 7,62 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,9 Hz, H4), 7,29 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 4,08 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 161,57; 156,32; 146,62; 142,63; 133,77; 133,64; 130,67; 125,51; 122,22; 118,68; 115,85; 115,27; 108,83; 57,31; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁ClN₂O₅ (322,70) vypočítané: C 52,11; H 3,44; N 8,68; nájdené: C 52,37; H 3,88; N 8,75.

5-chlor-*N*-(2-hydroxy-5-nitrofenyl)-2-metoxybenzamid (9k)

Výtěžok: 45,2 %, žltá pevná látka; t. t. 273-275 °C, rozklad; IR (ATR): 3273 (b, v OH), 1641 (amid I), 1618, 1603, 1593 (v CC aromatická), 1550 (v_{as} NO₂), 1529 (amid II), 1508, 1498, 1475, 1459 (v CC aromatická), 1340 (v_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,69 (1H, s, NH), 9,24 (1H, d, *J* = 3,0 Hz, H6'), 7,98 (1H, d, *J* = 2,9 Hz, H6), 7,89 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz, *J* = 3,0 Hz, H4'), 7,62 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,9 Hz, H4), 7,29 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 7,00 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H3'), 4,03 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 161,39; 156,24; 154,06; 138,91; 133,47; 130,61; 127,27; 125,44; 122,40; 120,94; 115,14; 114,69;

114,24; 57,22; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}ClN_2O_5$ (322,70) vypočítané: C 52,11; H 3,44; N 8,68; nájdené: C 52,15; H 3,57; N 8,79.

5-chlor-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (9l) ¹⁰⁰

Výtťažok: 69,0 %, šedá pevná látka; t. t. 228-230 °C; IR (ATR): 3600-2849 (b, v OH), 1651 (amid I), 1614, 1593 (v CC aromatická), 1558 (amid II), 1508, 1479 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,83 (1H, bs, OH), 10,52 (1H, s, NH), 8,34 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6'), 7,98 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,62 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,30 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,92 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H3'), 6,87 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H5'), 4,03 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 160,96; 156,16; 147,69; 133,19; 130,56; 127,35; 126,21; 125,38; 122,88; 120,89; 119,10; 115,11; 114,50; 57,18; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}Cl_2NO_3$ (312,15) vypočítané: C 53,87; H 3,55; N 4,49; nájdené: C 53,46; H 3,74; N 4,40.

5-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (9m) ⁵¹

Výtťažok: 71,8 %, šedá pevná látka; t. t. 232-234 °C; IR (ATR): 3296 (b, v OH), 1648 (amid I), 1612, 1595 (v CC aromatická), 1551 (amid II), 1498, 1483 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 10,60 (1H, s, NH), 10,58 (1H, s, OH), 8,40 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6'), 7,98 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,62 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,30 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,98 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4'), 6,90 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H3'), 4,03 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 161,15; 156,19; 145,42; 133,31; 130,57; 128,13; 125,40; 123,50; 122,71; 122,66; 119,27; 115,73; 115,14; 57,19; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}Cl_2NO_3$ (312,15) vypočítané: C 53,87; H 3,55; N 4,49; nájdené: C 54,31; H 3,91; N 4,31. 1H NMR je zhodné s literatúrou ⁵¹.

5-chlor-*N*-(4,5-dichlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (9n)

Výtťažok: 68,4 %, biela pevná látka; t. t. 248-250 °C; IR (ATR): 3294 (b, v OH), 1649 (amid I), 1593 (v CC aromatická), 1541 (amid II), 1498, 1479 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 11,07 (1H, s, OH), 10,55 (1H, s, NH), 8,53 (1H, s, H6'), 7,95 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,60 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,27 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 7,02 (1H, s, H3'), 4,01 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 161,14; 156,17; 146,38; 133,39; 130,55; 127,32; 125,42; 124,85; 122,32; 120,58; 120,33; 115,60; 115,04; 57,16; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{10}Cl_3NO_3$ (346,59) vypočítané: C 48,52; H 2,91; N 4,04; nájdené: C 48,58; H 3,21; N 4,13.

***N*-(4-brom-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (9o)**

Výtťažok: 55,4 %, biela pevná látka; t. t. 239-241 °C; IR (ATR): 3320 (v NH), 3254 (b, v OH), 1645 (amid I), 1613, 1595 (v CC aromatická), 1541 (amid II), 1502, 1481, 1462 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,80 (1H, s, OH), 10,52 (1H, s, NH), 8,29 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6'), 7,98 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,62 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,30 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,05 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H3'), 7,00 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H5'), 4,03 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 160,96; 156,15; 147,79; 133,18; 130,55; 126,59; 125,37; 122,86; 122,06; 121,28; 117,27; 115,25; 115,10;

57,17; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}BrClNO_3$ (356,60) vypočítané: C 47,15; H 3,11; N 3,93; nájdené: C 46,92; H 3,31; N 4,02.

***N*-(5-brom-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (9p)**

Výtťažok: 64,7 %, šedá pevná látka; t. t. 223-224 °C; IR (ATR): 3301 (b, v OH), 1652 (amid I), 1610, 1595 (v CC aromatická), 1542 (amid II), 1481, 1458 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,64 (1H, s, OH), 10,57 (1H, s, NH), 8,52 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H6'), 7,97 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,62 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,29 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,09 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H4'), 6,85 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H3'), 4,02 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 161,15; 156,20; 145,88; 133,35; 130,58; 128,54; 126,45; 125,41; 122,66; 122,04; 116,33; 115,16; 110,30; 57,21; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}BrClNO_3$ (356,60) vypočítané: C 47,15; H 3,11; N 3,93; nájdené: C 47,03; H 3,43; N 4,04.

5-chlor-*N*-(2-hydroxy-4-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzamid (9q)

Výtťažok: 60,5 %, biela pevná látka; t. t. 207-209 °C; IR (ATR): 3253 (b, v OH), 1651 (amid I), 1610, 1598 (v CC aromatická), 1545 (amid II), 1482 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 11,00 (1H, s, OH), 10,70 (1H, s, NH), 8,53 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6'), 7,99 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, H6), 7,61 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4), 7,30 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,17 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H5'), 7,15 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H3'), 4,04 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 161,32; 156,21; 146,65; 133,39; 130,62; 125,42; 124,27 (1C, q, $J = 270,0$ Hz, CF₃); 123,95 (1C, q, $J = 31,6$ Hz, C4'); 122,58; 119,66; 116,52 (1C, q, $J = 4,0$ Hz, C3'); 115,11; 110,69 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C5'); 57,19; Elementárna analýza (%) pre $C_{15}H_{11}ClF_3NO_3$ (345,70) vypočítané: C 52,11; H 3,21; N 4,05; nájdené: C 52,35; H 3,38; N 4,23.

5-chlor-*N*-(2-hydroxy-5-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzamid (9r)

Výtťažok: 57,9 %, biela pevná látka; t. t. 190-192 °C; IR (ATR): 3182 (b, v OH), 1648 (amid I), 1620, 1605 (v CC aromatická), 1565 (amid II), 1513, 1484, 1449 (v CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 11,26 (1H, s, OH), 10,66 (1H, s, NH), 8,72 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H6'), 7,99 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, H6), 7,63 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4), 7,31 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,31 (1H, m, H4'), 7,07 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H3'), 4,04 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 161,38; 156,21; 149,73; 133,37; 130,59; 127,39; 125,42; 125,33 (1C, q, $J = 269,4$ Hz, CF₃); 122,61; 121,35 (1C, q, $J = 4,0$ Hz, C6'); 119,78 (1C, q, $J = 31,7$ Hz, C5'); 116,31 (1C, q, $J = 4,0$ Hz, C4'); 115,15; 114,72; 57,22; Elementárna analýza (%) pre $C_{15}H_{11}ClF_3NO_3$ (345,70) vypočítané: C 52,11; H 3,21; N 4,05; nájdené: C 52,28; H 2,83; N 4,13.

Vedľajšie produkty syntézy derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu 10

5-chlor-2-(4-chlor-2-metoxybenzamido)fenyl 4-chlor-2-metoxybenzoát (10a)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 153-155 °C; IR (ATR): 3341 (v NH), 1754 (v CO, ester), 1665 (amid I), 1594, 1565 (v CC aromatická), 1534 (amid II), 1485, 1462, 1455 (v CC

aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9,74 (1H, s, NH), 8,48 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H_3'), 8,17 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 8,01 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,31-7,23 (2H, m), 7,12-7,03 (3H, m), 6,88 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 3,86 (3H, s, OCH_3), 3,52 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 162,47; 162,34; 160,66; 157,50; 141,36; 140,83; 139,15; 133,67; 133,55; 129,60; 128,89; 126,63; 123,45; 122,45; 121,92; 120,81; 120,09; 116,30; 113,03; 112,11; 56,34; 55,95; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{NO}_5$ (480,73) vypočítané: C 54,97; H 3,35; N 2,91; nájdené: C 55,26; H 3,68; N 2,85.

2-(4-chlor-2-metoxybenzamido)-5-(trifluormetyl)fenyl 4-chlor-2-metoxybenzoát (10b)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 162-164 °C; IR (ATR): 3334 (v NH), 1758 (v CO, ester), 1670 (amid I), 1621, 1592, 1569 (v CC aromatická), 1537 (amid II), 1506, 1488, 1479, 1463 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9,94 (1H, s, NH), 8,75 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H_3'), 8,18 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), 8,05 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,60-7,51 (2H, m), 7,16-7,04 (3H, m), 6,90 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 3,88 (3H, s, OCH_3), 3,51 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 162,57; 162,42; 160,75; 157,52; 141,57; 139,80; 139,46; 134,08; 133,75; 133,62; 125,94 (1C, q, $J = 33,3$ Hz, C_5'); 123,68 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C_6'); 122,32 (1C, q, $J = 270,3$ Hz, CF_3); 122,21; 122,03; 120,87; 119,95; 119,50 (1C, q, $J = 3,9$ Hz, C_4'); 116,10; 113,07; 112,19; 56,38; 56,01; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{NO}_5$ (514,28) vypočítané: C 53,72; H 3,14; N 2,72; nájdené: C 53,81; H 3,22; N 2,83.

4,5-dichlor-2-(5-chlor-2-metoxybenzamido)fenyl 5-chlor-2-metoxybenzoát (10c)

Vedľajší produkt, oranžová pevná látka; t. t. 184-185 °C; IR (ATR): 3324 (v NH), 1766 (v CO, ester), 1668 (amid I), 1592, 1572 (v CC aromatická), 1523 (amid II), 1488, 1462 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9,88 (1H, s, NH), 8,78 (1H, s, H_6'), 8,18 (1H, d, $J = 2,8$ Hz), 8,02 (1H, d, $J = 2,8$ Hz), 7,57 (1H, dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 2,8$ Hz), 7,40 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz), 7,41 (1H, s, H_3'), 7,02 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,85 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 3,86 (3H, s, OCH_3), 3,54 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 161,97; 161,79; 158,70; 155,71; 138,80; 134,97; 133,25; 132,15; 131,86; 130,27; 129,01; 128,20; 127,13; 126,94; 125,55; 123,62; 123,34; 122,53; 113,79; 112,99; 56,40; 56,09; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{Cl}_4\text{NO}_5$ (515,17) vypočítané: C 51,29; H 2,93; N 2,72; nájdené: C 51,66; H 3,32; N 2,63.

2-(5-chlor-2-metoxybenzamido)-5-(trifluormetyl)fenyl 5-chlor-2-metoxybenzoát (10d)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 142-143 °C; IR (ATR): 3333 (v NH), 1760 (v CO, ester), 1681 (amid I), 1619, 1599 (v CC aromatická), 1541 (amid II), 1489, 1482, 1463 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10,02 (1H, s, NH), 8,76 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H_3'), 8,21 (1H, d, $J = 2,8$ Hz), 8,06 (1H, d, $J = 2,7$ Hz), 7,59 (1H, d, $J = 2,5$ Hz), 7,58-7,53 (2H, m), 7,42 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz), 7,03 (1H, d, $J = 8,9$ Hz), 6,86 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 3,87 (3H, s, OCH_3), 3,55 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 162,21; 161,96; 158,71; 155,73; 139,73; 134,91; 133,91; 133,26; 132,23; 131,91; 127,15; 125,73 (1C, q, $J = 33,4$ Hz, C_5'); 125,55; 123,77 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C_6'); 123,26 (1C, q, $J = 270,1$ Hz, CF_3); 122,74; 122,25; 119,50 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C_4'); 118,95; 113,77; 113,00; 56,41; 56,10; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{NO}_5$ (514,28) vypočítané: C 53,72; H 3,14; N 2,72;

nájdené: C 53,90; H 3,29; N 2,95.

Postup prípravy derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu 11 (postup D⁹⁹)

Do roztoku substituovaného 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu 9 (1,3 mmol) v 10 ml pyridínu bolo pridané 2,8 mmol P₄S₁₀ a vzniknutá zmes bola za miešania zahrievaná pri teplote varu po dobu 4 hodín. Následne bolo pridané 40 ml CHCl₃, 40 ml 5% roztoku HCl a 10 ml koncentrovanej HCl (do pH = 1) a reakčná zmes bola za intenzívneho miešania refluxovaná po dobu 1 hodiny. Potom bola organická fáza oddelená a vodná fáza bola extrahovaná trikrát 50 ml CHCl₃. Organické podiely boli spojené, vysušené Na₂SO₄ a odparené dosucha. Olejovitý zvyšok bol čistený kolónovou chromatografiou a kryštalizáciou.

Pripravené deriváty 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu 11

4-chlor-N-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzotioamid (11a)

Výtťažok: 35,9 %, žltá pevná látka; t. t. 168-169 °C, rozklad; IR (ATR): 3132 (b, ν OH), 1620, 1590, 1557, 1499, 1476, 1456 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,34 (1H, s, NH), 10,52 (1H, s, OH), 8,09 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6'), 7,78 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6), 7,22 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 7,09 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,9 Hz, H5), 6,96 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H3'), 6,91 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,3 Hz, H5'), 3,90 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,49 (1H, s, NH), 10,28 (1H, s, OH), 7,33 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H6), 6,94 (1H, zakryté hlavným konformérom, H5), 6,82 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 6,75 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H3'), 6,71 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6'), 6,61 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,3 Hz, H5'), 3,48 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,49; 155,28; 151,71; 135,70; 132,96; 130,88; 130,05; 126,88; 126,43; 120,40; 118,51; 115,66; 112,49; 56,68; minoritný konformér: δ 198,92; 153,35; 152,64; 134,34; 131,61; 130,91; 128,01; 120,07; 118,17; 115,70; 111,37; 99,66; 55,62; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂S (328,21) vypočítané: C 51,23; H 3,38; N 4,27; S 9,77; nájdené: C 51,14; H 3,36; N 4,24; S 10,02.

4-chlor-N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzotioamid (11b)

Výtťažok: 27,8 %, žltá pevná látka; t. t. rozklad; IR (ATR): 3198 (b, ν OH), 1613, 1589, 1555, 1493, 1475, 1457 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,45 (1H, s, NH), 10,40 (1H, s, OH), 8,32 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H6'), 7,83 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,23 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H3), 7,17 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,6 Hz, H4'), 7,10 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,9 Hz, H5), 6,96 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H3'), 3,92 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,53 (1H, s, NH), 10,05 (1H, s, OH), 7,33 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H6), 7,02 (1H, zakryté hlavným konformérom, H4'), 6,92 (1H, zakryté hlavným konformérom, H5), 6,83 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, H3), 6,76 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6'), 6,72 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3'), 3,50 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 89 %, minoritný konformér: 11 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,33; 155,32;

149,40; 135,98; 133,25; 129,78; 128,30; 127,08; 124,42; 121,61; 120,51; 117,15; 112,57; 56,76; minoritný konformér: δ 55,64; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2S$ (328,21) vypočítané: C 51,23; H 3,38; N 4,27; S 9,77; nájdené: C 51,16; H 3,22; N 4,21; S 9,82.

4-chlor-N-(4,5-dichlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzťioamid (11c)

Výťažok: 28,9 %, žltá pevná látka; t. t. 176-177 °C, rozklad; IR (ATR): 3130 (b, ν OH), 1589, 1558, 1541, 1491, 1477, 1458 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,48 (1H, s, NH), 10,88 (1H, s, OH), 8,45 (1H, s, H6'), 7,81 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H6), 7,22 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3), 7,12 (1H, s, H3'), 7,09 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H5), 3,90 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,58 (1H, s, NH), 10,54 (1H, s, OH), 7,36 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6), 6,97 (1H, s), 6,95 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 6,89 (1H, s), 6,84 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 3,51 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 90 %, minoritný konformér: 10 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,86; 155,37; 150,49; 136,12; 133,26; 129,62; 128,62; 127,55; 126,16; 120,54; 119,72; 117,03; 112,59; 56,78; minoritný konformér: δ 199,49; 153,22; 151,55; 134,65; 131,36; 129,98; 129,08; 128,09; 127,50; 119,37; 111,39; 55,64; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{10}Cl_3NO_2S$ (362,66) vypočítané: C 46,37; H 2,78; N 3,86; S 8,84; nájdené: C 46,20; H 2,58; N 3,83; S 8,86.

N-(4-brom-2-hydroxyfenyl)-4-chlor-2-metoxybenzťioamid (11d)

Výťažok: 25,2 %, žltá pevná látka; t. t. 167-169 °C, rozklad; IR (ATR): 3197 (b, ν OH), 1613, 1591, 1557, 1497, 1476, 1461, 1454 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,34 (1H, s, NH), 10,52 (1H, s, OH), 8,05 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6'), 7,78 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6), 7,22 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 7,13-7,06 (2H, m, H5, H3'), 7,04 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H5'), 3,90 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,47 (1H, s, NH), 10,28 (1H, s, OH), 7,33 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6), 6,93 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5), 6,90 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H3'), 6,82 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 6,74 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,1$ Hz, H5'), 6,65 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H6'), 3,48 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,45; 155,31; 151,85; 135,75; 133,02; 130,07; 127,18; 126,85; 121,46; 120,43; 119,08; 118,55; 112,53; 56,71; minoritný konformér: δ 152,67; 145,80; 134,39; 131,10; 128,33; 121,11; 109,78; 55,66; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}BrClNO_2S$ (372,66) vypočítané: C 45,12; H 2,98; N 3,76; S 8,60; nájdené: C 45,42; H 3,24; N 3,88; S 8,72.

N-(5-brom-2-hydroxyfenyl)-4-chlor-2-metoxybenzťioamid (11e)

Výťažok: 28,2 %, žltá pevná látka; t. t. 155-158 °C, rozklad; IR (ATR): 3189 (b, ν OH), 1614, 1587, 1556, 1489, 1475, 1455 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,43 (1H, s, NH), 10,41 (1H, s, OH), 8,39 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H6'), 7,81 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H6), 7,28 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H4'), 7,23 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H3), 7,10 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H5), 6,91 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H3'), 3,91 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,54 (1H, s, NH), 10,07 (1H, s, OH), 7,33 (1H, d, $J = 8,2$

Hz, H6), 6,83 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H3), 6,67 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H3'), 3,50 (3H, s, OCH₃); zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu ich prekryvania so signálmi hlavného konforméru; zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 90 %, minoritný konformér: 10 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,42; 155,32; 149,93; 135,94; 133,19; 130,00; 129,83; 128,71; 127,33; 120,50; 117,73; 112,57; 108,95; 56,75; minoritný konformér: δ 55,62; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁BrClNO₂S (372,66) vypočítané: C 45,12; H 2,98; N 3,76; S 8,60; nájdené: C 45,38; H 2,90; N 3,69; S 8,79.

4-chlor-*N*-(2-hydroxy-4-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzťioamid (11f)

Výťažok: 36,0 %, žltá pevná látka; t. t. 132-134 °C, rozklad; IR (ATR): 3246 (b, ν OH), 1618, 1592, 1559, 1477, 1462 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,51 (1H, s, NH), 10,79 (1H, bs, OH), 8,38 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H6'), 7,82 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H6), 7,24 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3), 7,23-7,18 (2H, m, H3', H5'), 7,11 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H5), 3,92 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,64 (1H, s, NH), 10,52 (1H, bs, OH), 7,41 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6), 7,03 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3'), 6,96 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 1,9$ Hz), 6,90 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 1,9$ Hz), 6,86 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6'), 6,82 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H3), 3,41 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 194,03; 155,32; 150,87; 136,00; 133,19; 130,83; 129,91; 127,32 (1C, q, $J = 31,5$ Hz, C4'); 125,98; 124,11 (1C, q, $J = 270,5$ Hz, CF₃); 120,51; 115,47 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C3'); 112,58; 112,18 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C5'); 56,76; minoritný konformér: δ 151,72; 131,55; 111,48; 55,59; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂S (361,77) vypočítané: C 49,80; H 3,06; N 3,87; S 8,86; nájdené: C 49,95; H 3,15; N 3,99; S 8,75.

4-chlor-*N*-(2-hydroxy-5-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzťioamid (11g)

Výťažok: 22,2 %, žltá pevná látka; t. t. 153-155 °C, rozklad; IR (ATR): 3174 (b, ν OH), 1626, 1591, 1573, 1557, 1476, 1461, 1449 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,50 (1H, s, NH), 11,04 (1H, s, OH), 8,55 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H6'), 7,82 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H6), 7,49 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H4'), 7,24 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3), 7,12 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H3'), 7,11 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H5), 3,92 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,62 (1H, s, NH), 10,72 (1H, s, OH), 7,35 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6), 7,33 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H4'), 7,03 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H6'), 6,94 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H5), 6,88 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H3'), 6,79 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3), 3,45 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,92; 155,36; 153,92; 135,98; 133,16; 129,86; 127,48; 124,76 (1C, q, $J = 4,2$ Hz, C6'); 124,70 (1C, q, $J = 269,3$ Hz, CF₃); 122,41 (1C, q, $J = 4,2$ Hz, C4'); 120,51; 119,00 (1C, q, $J = 32,2$ Hz, C5'); 116,39; 112,58; 56,77; minoritný konformér: δ 134,56; 131,12; 127,36; 111,19; 55,47; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂S (361,77) vypočítané: C 49,80; H 3,06; N 3,87; S 8,86; nájdené: C 49,62; H 2,93; N 3,67; S 8,64.

5-chlor-*N*-(4-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenztioamid (11h)

Výtěžok: 26,4 %, žltá pevná látka; t. t. 144-145 °C, rozklad; IR (ATR): 3197 (b, ν OH), 1611, 1591, 1556, 1502, 1475, 1450 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,42 (1H, s, NH), 10,50 (1H, s, OH), 8,03 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H6'), 7,71 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,47 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,16 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 6,97 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H3'), 6,91 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H5'), 3,87 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,56 (1H, s, NH), 10,33 (1H, s, OH), 7,31 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,22 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 6,78 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H6'), 6,76-6,72 (2H, m, H3, H3'), 6,62 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H5'), 3,46 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 84 %, minoritný konformér: 16 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): hlavný konformér: δ 193,10; 153,46; 151,88; 132,71; 131,36; 129,99; 126,48; 124,20; 119,29; 117,93; 115,28; 114,91; 113,62; 56,04; minoritný konformér: δ 55,52; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂S (328,21) vypočítané: C 51,23; H 3,38; N 4,27; S 9,77; nájdené: C 50,82; H 3,13; N 4,23; S 9,81.

5-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenztioamid (11i)

Výtěžok: 48,3 %, žltá pevná látka; t. t. 147-149 °C, rozklad; IR (ATR): 3315 (b, ν OH), 1618, 1594, 1562, 1497, 1477, 1454 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,52 (1H, s, NH), 10,36 (1H, s, OH), 8,23 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H6'), 7,76 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,48 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,18 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H4'), 7,16 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 6,96 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H3'), 3,88 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,61 (1H, s, NH), 10,10 (1H, s, OH), 7,30 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,23 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,01 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4'), 6,83 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6'), 6,76 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,72 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H3'), 3,49 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): hlavný konformér: δ 192,95; 153,49; 149,62; 132,46; 130,85; 130,67; 128,15; 127,30; 124,73; 124,22; 121,64; 117,29; 114,31; 56,66; minoritný konformér: δ 198,58; 151,41; 150,70; 132,81; 129,72; 129,04; 128,01; 128,04; 126,51; 123,62; 121,20; 117,24; 112,81; 55,50; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁Cl₂NO₂S (328,21) vypočítané: C 51,23; H 3,38; N 4,27; S 9,77; nájdené: C 51,47; H 3,35; N 4,04; S 9,31.

5-chlor-*N*-(4,5-dichlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenztioamid (11j)

Výtěžok: 33,4 %, žltá pevná látka; t. t. rozklad; IR (ATR): 3240 (b, ν OH), 1611, 1591, 1555, 1489, 1477, 1456 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,55 (1H, bs, NH), 10,85 (1H, bs, OH), 8,39 (1H, s, H6'), 7,75 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,48 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,17 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,13 (1H, s, H3'), 3,88 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,64 (1H, bs, NH), 10,59 (1H, bs, OH), 7,34 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, H6), 7,25 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4), 7,05 (1H, s), 6,90 (1H, s), 6,77 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 3,50 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 86 %, minoritný konformér: 14 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): hlavný konformér: δ 193,43; 153,51; 150,64; 132,26; 130,94; 130,66; 128,81; 127,39; 126,39; 124,24; 119,74; 117,13; 114,31; 56,66; minoritný konformér: δ 198,81; 151,53; 151,21;

132,51; 129,91; 129,68; 129,26; 128,20; 127,32; 123,65; 119,36; 117,00; 112,81; 55,50; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{10}Cl_3NO_2S$ (362,66) vypočítané: C 46,37; H 2,78; N 3,86; S 8,84; nájdené: C 46,25; H 2,99; N 3,96; S 8,92.

***N*-(4-brom-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenztioamid (11k)**

Výťažok: 38,9 %, žltá pevná látka; t. t. 148-149 °C, rozklad; IR (ATR): 3233 (b, ν OH), 1613, 1594, 1556, 1497, 1476, 1451 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,42 (1H, s, NH), 10,49 (1H, s, OH), 7,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H6'), 7,72 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,47 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,16 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,11 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H3'), 7,04 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H5'), 3,87 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,54 (1H, s, NH), 10,33 (1H, s, OH), 7,31 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,22 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4), 6,89 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H3'), 6,78-6,69 (3H, m, H3, H5', H6'), 3,46 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 86 %, minoritný konformér: 14 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,01; 153,45; 151,99; 132,70; 130,68; 130,51; 127,37; 126,71; 124,15; 121,50; 119,28; 118,65; 114,26; 56,62; minoritný konformér: δ 198,19; 152,74; 151,36; 132,73; 129,08; 128,49; 123,57; 118,50; 112,84; 55,57; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}BrClNO_2S$ (372,66) vypočítané: C 45,12; H 2,98; N 3,76; S 8,60; nájdené: C 45,34; H 3,20; N 3,97; S 8,76.

***N*-(5-brom-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenztioamid (11l)**

Výťažok: 38,7 %, žltá pevná látka; t. t. 148-149 °C, rozklad; IR (ATR): 3299 (b, ν OH), 1616, 1593, 1562, 1493, 1477, 1453 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,51 (1H, s, NH), 10,38 (1H, s, OH), 8,32 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H6'), 7,75 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,48 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,29 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H4'), 7,16 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 6,92 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H3'), 3,88 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,61 (1H, s, NH), 10,12 (1H, s, OH), 7,29 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,22 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,11 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H4'), 6,95 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H6'), 6,76 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 6,67 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H3'), 3,50 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 86 %, minoritný konformér: 14 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,03; 153,48; 150,13; 132,50; 130,83; 130,62; 130,20; 128,56; 127,61; 124,21; 117,85; 114,30; 108,97; 56,65; minoritný konformér: δ 198,61; 151,38; 151,18; 112,78; 55,53; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre $C_{14}H_{11}BrClNO_2S$ (372,66) vypočítané: C 45,12; H 2,98; N 3,76; S 8,60; nájdené: C 45,12; H 2,89; N 3,77; S 8,54.

5-chlor-*N*-(2-hydroxy-4-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenztioamid (11m)

Výťažok: 49,0 %, žltá pevná látka; t. t. 127-129 °C, rozklad; IR (ATR): 3204 (b, ν OH), 1622, 1595, 1568, 1476, 1458 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,58 (1H, bs, NH), 10,77 (1H, bs, OH), 8,31 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H6'), 7,75 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,49 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4), 7,25-7,19 (2H, m, H3', H5'), 7,17 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 3,89 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,72 (1H, bs, NH), 10,57 (1H, bs, OH), 7,39 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,02 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H3'), 6,95-

6,90 (2H, m, H5', H6'), 6,74 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), H4 zakryté hlavným konformérom, 3,39 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,61; 153,49; 151,06; 132,57; 130,90; 130,69; 130,62; 127,66 (1C, q, $J = 31,7$ Hz, C4'); 126,28; 125,37 (1C, q, $J = 270,4$ Hz, CF₃); 124,25; 115,53 (1C, q, $J = 3,9$ Hz, C3'); 114,34; 112,34 (1C, q, $J = 3,7$ Hz, C5'); 56,68; minoritný konformér: δ 198,33; 151,84; 151,32; 130,07; 129,57; 123,76; 112,93; 55,49; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂S (361,77) vypočítané: C 49,80; H 3,06; N 3,87; S 8,86; nájdené: C 49,71; H 2,85; N 3,69; S 8,92.

5-chlor-*N*-(2-hydroxy-5-(trifluormetyl)fenyl)-2-metoxybenzotioamid (11n)

Výťažok: 26,3 %, žltá pevná látka; t. t. 132-133 °C, rozklad; IR (ATR): 3252 (b, ν OH), 1624, 1574, 1478, 1460, 1447 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): hlavný konformér: δ 11,57 (1H, s, NH), 11,00 (1H, s, OH), 8,48 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H6'), 7,75 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,55-7,45 (2H, m, H4, H4'), 7,17 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 7,12 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H3'), 3,89 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,69 (1H, s, NH), 10,76 (1H, s, OH), 7,36-7,30 (2H, m), 6,88 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H3'), 6,72 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 2H zakryté hlavným konformérom, 3,44 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 86 %, minoritný konformér: 14 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): hlavný konformér: δ 193,52; 154,10; 153,50; 132,53; 130,85; 130,58; 127,32; 124,93 (1C, q, $J = 3,9$ Hz, C6'); 124,21; 124,19 (1C, q, $J = 269,4$ Hz, CF₃); 122,70 (1C, q, $J = 3,8$ Hz, C4'); 119,05 (1C, q, $J = 32,2$ Hz, C5'); 116,50; 114,30; 56,66; minoritný konformér: δ 198,93; 155,14; 151,23; 132,64; 129,75; 128,96; 127,21; 125,48; 123,64; 118,71 (1C, q, $J = 32,4$ Hz, C5'); 112,62; 55,34; zvyšné rezonančné signály nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₁ClF₃NO₂S (361,77) vypočítané: C 49,80; H 3,06; N 3,87; S 8,86; nájdené: C 49,66; H 3,15; N 4,02; S 9,05.

Vedľajšie produkty syntézy derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu 12

6-chlor-2-(4-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazol (12a)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 146-147 °C; IR (ATR): 1614, 1592, 1566, 1550, 1487, 1471, 1458, 1446 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,01 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H6'), 7,97 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 7,82 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,45 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,8$ Hz), 7,38 (1H, d, $J = 1,8$ Hz), 7,21 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,8$ Hz), 3,95 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 161,41; 158,97; 150,50; 140,46; 138,17; 132,45; 129,83; 125,38; 121,05; 120,96; 114,05; 113,53; 111,60; 56,81; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₉Cl₂NO₂ (294,13) vypočítané: C 57,17; H 3,08; N 4,76; nájdené: C 56,95; H 3,26; N 4,97.

5,6-dichlor-2-(4-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazol (12b)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 184-185 °C; IR (ATR): 1605, 1592, 1573, 1536, 1479, 1465 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,03 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H6'), 7,86 (1H, s), 7,68 (1H, s), 7,09 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H5'), 7,07 (1H, d, $J =$

1,9 Hz, H3'), 4,01 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 162,45; 159,03; 148,84; 141,69; 139,33; 132,10; 129,01; 128,65; 121,16; 121,08; 113,82; 112,88; 112,19; 56,49; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₈Cl₃NO₂ (328,58) vypočítané: C 51,18; H 2,45; N 4,26; nájdené: C 51,55; H 2,63; N 4,56.

5-brom-2-(4-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[d]oxazol (12c)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 138-139 °C; IR (ATR): 1612, 1597, 1572, 1536, 1492, 1479, 1467, 1445 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,05 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H6'), 7,93 (1H, s), 7,51-7,40 (2H, s), 7,14-7,02 (2H, m', H3', H5'), 4,02 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 161,85; 158,97; 149,23; 143,55; 139,00; 132,10; 128,08; 123,10; 121,09; 117,13; 114,20; 112,85; 111,67; 56,50; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₉BrClNO₂ (338,58) vypočítané: C 49,66; H 2,68; N 4,14; nájdené: C 49,45; H 2,90; N 4,18.

6-brom-2-(4-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[d]oxazol (12d)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 157-158 °C; IR (ATR): 1608, 1596, 1576, 1538, 1481, 1471, 1458 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,04 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H6'), 7,74 (1H, d, *J* = 1,8 Hz, H7), 7,66 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H4), 7,46 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,8 Hz, H5), 7,11-7,05 (2H, m, H3', H5'), 4,02 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 161,16; 158,95; 150,67; 141,21; 138,90; 132,01; 127,86; 121,15; 121,10; 118,02; 114,23; 113,96; 112,84; 56,49; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₉BrClNO₂ (338,58) vypočítané: C 49,66; H 2,68; N 4,14; nájdené: C 49,68; H 2,83; N 4,23.

2-(4-chlor-2-metoxyfenyl)-6-(trifluormetyl)benzo[d]oxazol (12e)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 103-105 °C; IR (ATR): 1617, 1595, 1569, 1555, 1491, 1466 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,09 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H6'), 7,88 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H4), 7,86 (1H, d, *J* = 1,6 Hz, H7), 7,62 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,6 Hz, H5), 7,11 (1H, dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,0 Hz, H5'), 7,09 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H3'), 4,03 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 163,12; 159,16; 149,67; 144,69; 139,40; 132,25; 127,31 (1C, q, *J* = 32,9 Hz, C6); 124,14 (1C, q, *J* = 270,3 Hz, CF₃); 121,70; 121,18; 120,50; 114,03; 112,93; 108,28; 56,50; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₉ClF₃NO₂ (327,69) vypočítané: C 54,98; H 2,77; N 4,27; nájdené: C 55,15; H 2,98; N 4,35.

5-chlor-2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[d]oxazol (12f)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 136-137 °C; IR (ATR): 1613, 1599, 1578, 1532, 1478, 1464, 1449, 1434 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,10 (1H, s, H6'), 7,78 (1H, s), 7,55-7,39 (2H, m), 7,33 (1H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,01 (1H, d, *J* = 9,1 Hz, H3'), 4,00 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 161,51; 157,09; 148,87; 143,01; 132,69; 130,78; 129,94; 125,84; 125,59; 120,22; 116,90; 113,49; 111,26; 56,55; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₉Cl₂NO₂ (294,13) vypočítané: C 57,17; H 3,08; N 4,76; nájdené: C 57,39; H 3,26; N 5,06.

5,6-dichlor-2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[d]oxazol (12g)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 201-202 °C; IR (ATR): 1597, 1575, 1558, 1529, 1481, 1437 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 7,86 (1H, s), 7,66 (1H, s), 7,54 (1H, s), 7,27 (1H, m), 6,86 (1H, m), 3,80 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ 161,55; 156,70; 148,45; 141,07; 132,57; 130,15; 128,54; 128,07; 125,18; 120,56; 115,86; 113,27; 111,89; 56,07; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₈Cl₃NO₂ (328,58) vypočítané: C 51,18; H 2,45; N 4,26; nájdené: C 51,31; H 2,64; N 4,52.

5-brom-2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[d]oxazol (12h)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 121-122 °C; IR (ATR): 1598, 1577, 1531, 1481, 1460, 1444 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,10 (1H, s, H6'), 7,94 (1H, s), 7,53-7,37 (3H, m), 7,02 (1H, d, $J = 9,1$ Hz), 4,00 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 161,33; 157,10; 149,29; 143,48; 132,71; 130,80; 128,31; 125,84; 123,24; 117,23; 116,85; 113,49; 111,76; 56,56; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₉BrClNO₂ (338,58) vypočítané: C 49,66; H 2,68; N 4,14; nájdené: C 49,34; H 2,82; N 4,28.

6-brom-2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[d]oxazol (12i)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 113-115 °C; IR (ATR): 1608, 1598, 1578, 1534, 1482, 1455, 1435 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,09 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6'), 7,75 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H7), 7,67 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H4), 7,47 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H5), 7,45 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4'), 7,01 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3'), 4,00 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 160,66; 157,07; 150,73; 141,12; 132,62; 130,70; 127,96; 125,85; 121,27; 118,25; 116,86; 114,04; 113,48; 56,53; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₉BrClNO₂ (338,58) vypočítané: C 49,66; H 2,68; N 4,14; nájdené: C 49,63; H 2,91; N 4,16.

2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)-6-(trifluormetyl)benzo[d]oxazol (12j)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 82-84 °C; IR (ATR): 1618, 1599, 1578, 1551, 1533, 1497, 1479, 1464 (v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,14 (1H, m, H6'), 7,94-7,85 (2H, m), 7,63 (1H, dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,6$ Hz), 7,48 (1H, m), 7,04 (1H, d, $J = 8,9$ Hz), 4,02 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 162,63; 157,29; 149,74; 144,58; 133,05; 130,94; 127,51 (1C, q, $J = 32,7$ Hz, C6); 125,93; 123,39 (1C, q, $J = 270,7$ Hz, CF₃); 121,76 (1C, q, $J = 3,7$ Hz, C7); 120,65; 116,66; 113,57; 108,37 (1C, q, $J = 4,2$ Hz, C5); 56,54; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₉ClF₃NO₂ (327,69) vypočítané: C 54,98; H 2,77; N 4,27; nájdené: C 55,21; H 2,94; N 4,41.

Postup prípravy substituovaných 2-nitrofenolov 7¹⁰¹

Príslušne substituovaný fenol **6** (150 mmol) bol rozpustený v ľadovej kyseline octovej (50 mL) a roztok bol miešaný a zahrievaný na 40 °C. Následne bol po kvapkách v priebehu 15 minút pridaný roztok 11 ml 65% HNO₃ v 30 ml ľadovej kyseline octovej. Zmes bola ďalších 45 minút miešaná pri laboratórnej teplote. Reakcia bola ukončená prídavkom

400 ml ľadovej vody, vzniknutá zmes bola extrahovaná štyrikrát 100 ml CHCl₃, organické fáze boli spojené, vysušené Na₂SO₄ a odparené dosucha. 2-nitrofenoly boli izolované chromatograficky (**7a**, **7c**, **7e**), kryštalizáciou z etanolu (**7b**) alebo boli použité v surovom stave (**7d**).

Pripravené substituované 2-nitrofenoly **7**

4,5-dichlor-2-nitrofenol (**7a**)¹⁰¹

Výtťažok: 38,0 %, žltá pevná látka; t. t. 66-68 °C; IR (ATR): 3275 (b, ν OH), 1614, 1564 (ν CC aromatická), 1513 (ν_{as} NO₂), 1457 (ν CC aromatická), 1344 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,47 (1H, s, OH), 8,23 (1H, s, H3), 7,33 (1H, s, H6); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 153,44; 142,26; 132,28; 125,83; 124,34; 121,48. ¹H NMR zhodné s literatúrou¹⁰¹.

4-brom-2-nitrofenol (**7b**)¹⁰²

Výtťažok: 54,0 %, žltá pevná látka; t. t. 90-92 °C; IR (ATR): 3274 (b, ν OH), 1612, 1601, 1571 (ν CC aromatická), 1530 (ν_{as} NO₂), 1470, 1450 (ν CC aromatická), 1323 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,49 (1H, s, OH), 8,25 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H3), 7,66 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz, *J* = 2,4 Hz, H5), 7,08 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H6); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 154,09; 140,35; 127,30; 126,72; 121,72; 111,69. ¹H NMR zhodné s literatúrou¹⁰².

5-brom-2-nitrofenol (**7c**)¹⁰³

Výtťažok: 26,0 %, žltý olej; IR (ATR): 3182 (b, ν OH), 1608, 1573 (ν CC aromatická), 1530 (ν_{as} NO₂), 1466, 1448 (ν CC aromatická), 1325 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 10,62 (1H, s, OH), 7,97 (1H, d, *J* = 9,1 Hz, H3), 7,37 (1H, d, *J* = 2,1 Hz, H6), 7,13 (1H, dd, *J* = 9,1 Hz, *J* = 2,1 Hz, H4); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 155,26; 132,69; 132,34; 126,05; 123,88; 122,98. IR a NMR zhodné s literatúrou¹⁰³.

2-nitro-5-(trifluormetyl)fenol (**7e**)¹⁰⁴

Výtťažok: 26,1 %, žltý olej; IR (ATR): 3273 (b, ν OH), 1635, 1594 (ν CC aromatická), 1542 (ν_{as} NO₂), 1487, 1448 (ν CC aromatická), 1335 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 10,57 (1H, s, OH), 8,23 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H3), 7,44 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H6), 7,23 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 1,9 Hz, H4); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 154,81; 138,47 (1C, q, *J* = 33,4 Hz, C5); 135,22; 126,08; 121,50 (1C, q, *J* = 271,7 Hz, CF₃); 117,87 (1C, q, *J* = 3,9 Hz, C6); 116,64 (1C, q, *J* = 3,5 Hz, C4). ¹H NMR zhodné s literatúrou¹⁰⁴.

Postup prípravy substituovaných 2-aminofenolov **8**¹⁰¹

Príslušný 2-nitrofenol **7** (40 mmol) bol rozpustený v zmesi 100 ml ľadovej kyseliny octovej a 30 ml vody. Roztok bol za miešania zahriaty k teplote varu a následne bolo v priebehu 15 minút pridané 0,8 mol Fe prachu. Po pridaní železného prachu bola reakčná zmes ešte 30 minút zahrievaná pri teplote varu a potom zriedená prídavkom 400 ml ľadovej

vody. Zmes bola extrahovaná štyrikrát 200 ml etyl-acetátu (EtAc). Následne boli organické podiely spojené, sfiltrované, extrahované desaťkrát 150 ml 5% roztoku NaHCO₃, raz nasýteným roztokom NaCl a vysušené Na₂SO₄. 2-Aminofenoly **8** boli izolované chromatograficky.

Pripravené substituované 2-aminofenoly **8**

2-amino-4,5-dichlorfenol (**8a**)¹⁰¹

Výtťažok: 66,3 %, tmavo červená pevná látka; t. t. rozklad; IR (ATR): 3467, 3376 (ν NH₂), 3298 (b, ν OH), 1610, 1581, 1502 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 9,73 (1H, bs, OH), 6,74 (1H, s, H6), 6,71 (1H, s, H3), 4,95 (2H, bs, NH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 143,96; 137,98; 120,68; 115,88; 115,14; 114,09.

2-amino-4-bromfenol (**8b**)¹⁰²

Výtťažok: 41,7 %, tmavo červená pevná látka; t. t. rozklad; IR (ATR): 3457, 3386 (ν NH₂), 3278 (b, ν OH), 1601, 1582, 1505 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 9,26 (1H, bs, OH), 6,70 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H3), 6,54 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H6), 6,48 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 2,5 Hz, H5), 4,79 (2H, bs, NH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 143,46; 139,08; 118,25; 116,17; 115,82; 110,84. ¹H NMR zhodné s literatúrou¹⁰².

2-amino-5-bromfenol (**8c**)¹⁰³

Výtťažok: 60,5 %, tmavo červená pevná látka; t. t. rozklad; IR (ATR): 3370, 3296 (ν NH₂), 3100-2300 (b, ν OH), 1600, 1501 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 9,46 (1H, bs, OH), 6,75 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H6), 6,67 (1H, dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 2,5 Hz, H4), 6,51 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H3), 4,66 (2H, bs, NH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 145,33; 136,52; 122,04; 116,84; 115,53; 106,24.

2-amino-4-(trifluormetyl)fenol (**8d**)¹⁰⁵

Výtťažok: 65,6 %, oranžová pevná látka; t. t. 115-118 °C; IR (ATR): 3391, 3318 (ν NH₂), 3061-2342 (b, ν OH), 1618, 1528, 1460 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 9,85 (1H, bs, OH), 6,85 (1H, m), 6,80-6,64 (2H, m), 4,92 (2H, bs, NH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 147,28; 137,57; 125,28 (1C, q, *J* = 269,3 Hz, CF₃); 120,23 (1C, q, *J* = 31,0 Hz, C4); 113,91; 113,32 (1C, q, *J* = 4,3 Hz, C5); 110,11 (1C, q, *J* = 3,7 Hz, C3).

2-amino-5-(trifluormetyl)fenol (**8e**)¹⁰⁶

Výtťažok: 50,5 %, oranžová pevná látka; t. t. 112-115 °C; IR (ATR): 3397, 3316 (ν NH₂), 3500-2300 (b, ν OH), 1611, 1527, 1444 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 9,60 (1H, bs, OH), 6,92-6,82 (2H, m, H4, H6), 6,67 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H3), 5,18 (2H, bs, NH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 143,63; 141,03; 125,54 (1C, q, *J* = 268,3 Hz, CF₃); 117,16 (1C, q, *J* = 4,2 Hz, C6); 115,87 (1C, q, *J* = 31,4 Hz, C5); 113,10; 110,42 (1C, q, *J* = 3,7 Hz, C4).

4.1.4. Stereochemické vlastnosti derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu

Na látky uvedené v tejto kapitole sa treba pozerať ako na obmeny molekuly 5-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzotioamidu (vis. kapitola 4.1.3. látka **11i**) respektíve ako na medziprodukty prípadne vedľajšie produkty syntézy týchto obmien. Syntetické schéma bolo rovnaké ako v predošlom prípade (vis. kapitola 4.1.3.), príslušná kyselina alebo anilín, pokiaľ neboli komerčne dostupné, boli pripravené z dostupných derivátov (fenoly, étery, nitrily, ...) a následne z nich boli pripravené príslušné benzanilidy, ktoré boli nakoniec premenené na tiobenzanilidy (vis. Schéma 3). Výnimku predstavuje len látka **32**, ktorá bola pripravená podľa Schémy 4. Prehľad všetkých pripravených obmien látky **11i** prináša Obrázok 17. Pokiaľ nebude uvedené inak všetky zlúčeniny v tejto kapitole boli pripravené podľa postupov z kapitoly 4.1.3..

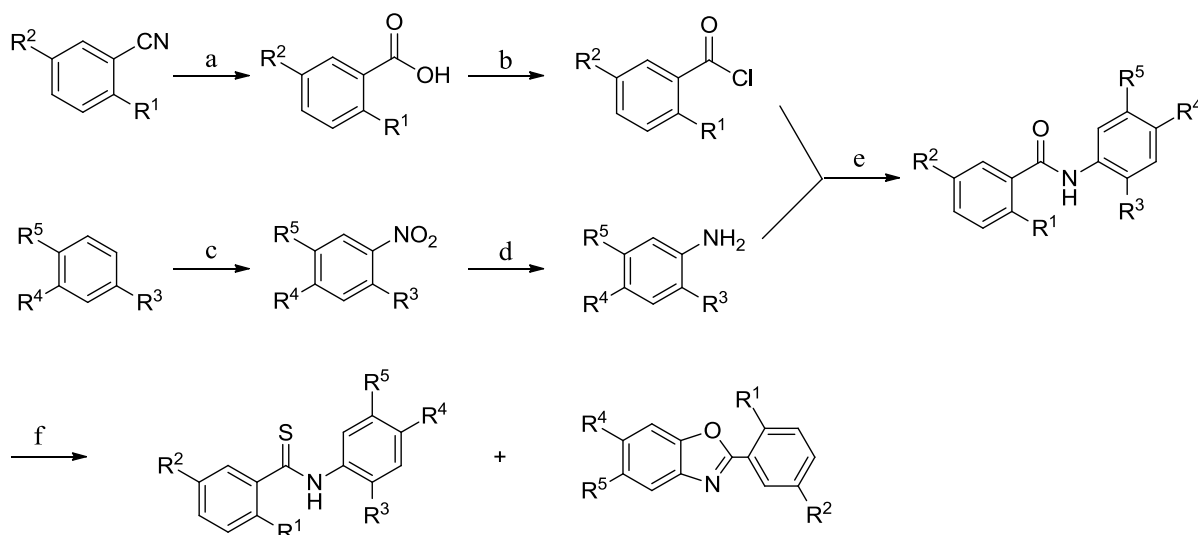


Schéma 3: Všeobecný postup prípravy modifikácií molekuly **11i**: $R^1 = \text{H, OMe, Cl, Et}$; $R^2 = \text{H, Cl}$; $R^3 = \text{H, OH, OMe, Me, Et}$; $R^4 = \text{H, Et, NO}_2$; $R^5 = \text{H, Cl}$. Činidlá: (a) 1. KOH, 2. HCl, (b) SOCl_2 , (c) HNO_3 , (d) Fe, AcOH, (e) TEA, (f) 1. P_4S_{10} , 2. HCl.

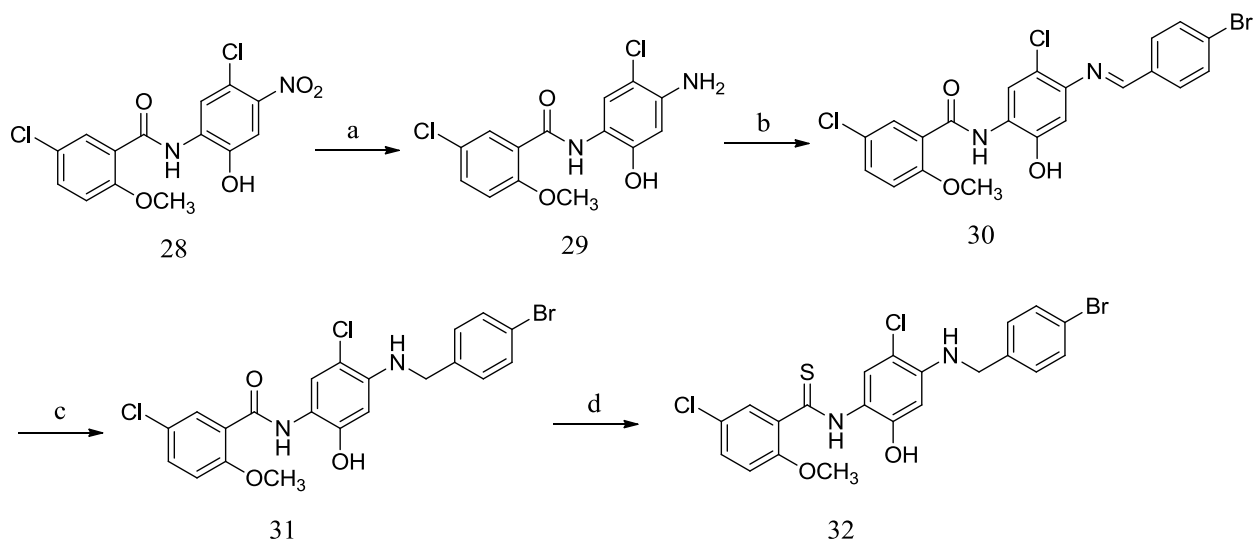
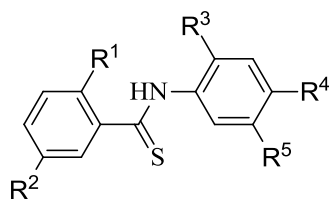


Schéma 4: Postup prípravy zlúčeniny **32**. Činidlá: (a) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (b) *p*-brombenzaldehyd, (c) NaBH_4 , (d) 1. P_4S_{10} , 2. HCl , 3. NaHCO_3 .

	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵
11i	OCH ₃	Cl	OH	H	Cl
14	H	Cl	OH	H	Cl
16	OCH ₃	H	OH	H	H
19	Cl	Cl	OH	H	Cl
23	OCH ₃	Cl	OCH ₃	H	Cl
27	OCH ₃	Cl	CH ₃	H	Cl
32	OCH ₃	Cl	OH	^a	Cl
37	OCH ₃	Cl	OH	Et	Cl
41	Et	H	OH	H	Cl
43	OCH ₃	Cl	Et	H	H

^a – *p*-brombenzylamino skupina



Obrázok 17: Prehľad pripravených modifikácií 5-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-metoxibenztioamidu (**11i**).

3-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)benzamid (**13**)⁵²

Výtťažok: 61,8 %, biela pevná látka; t. t. 223-224 °C; IR (ATR): 3419 (ν NH), 3108 (b, ν OH), 1647 (amid I), 1608, 1591, 1566 (ν CC aromatická), 1537 (amid II), 1498 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,08 (1H, s, NH), 9,68 (1H, s, OH), 8,00 (1H, t, *J* = 1,9 Hz, H2), 7,90 (1H, m, H6), 7,74 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H6'), 7,66 (1H, ddd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 2,1 Hz, *J* = 1,1 Hz, H4), 7,55 (1H, t, *J* = 7,8 Hz, H5), 7,08 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,6 Hz, H4'), 6,92 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H3'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 164,21; 148,88; 136,41; 133,47; 131,76; 130,65; 127,70; 126,85; 126,55; 125,63; 124,26; 122,19; 117,17; Elementárna analýza (%) pre C₁₃H₉Cl₂NO₂ (282,12) vypočítané: C 55,34; H 3,22; N 4,96; nájdené: C 55,24; H 3,42; N 4,85. Analytické dáta zhodné s literatúrou⁵².

3-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)benztioamid (14)

Výtěžok: 30,3 %, žltá pevná látka; t. t. 124-125 °C, rozklad; IR (ATR): 3257 (ν NH), 3026 (b, ν OH), 1581, 1567, 1525, 1485, 1471 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 11,37 (1H, s, NH), 10,05 (1H, s, OH), 7,91 (1H, t, *J* = 1,9 Hz, H2), 7,84 (1H, m, H6), 7,60 (1H, m, H4), 7,53 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H6'), 7,50 (1H, t, *J* = 7,9 Hz, H5), 7,22 (1H, dd, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4'), 6,97 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H3'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 196,88; 151,26; 143,21; 132,82; 130,72; 130,10; 128,26; 128,19; 127,76; 127,43; 126,55; 121,78; 117,92; Elementárna analýza (%) pre C₁₃H₉Cl₂NOS (298,19) vypočítané: C 52,36; H 3,04; N 4,70; S 10,75; nájdené: C 52,41; H 3,14; N 4,83; S 10, 84.

N-(2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (15) ¹⁰⁷

Výtěžok: 73,2 %, biela pevná látka; t. t. 200-202 °C (lit. 203-206 °C ¹⁰⁷); IR (ATR): 3294 (ν NH), 3201 (b, ν OH), 1638 (amid I), 1614, 1598 (ν CC aromatická), 1555 (amid II), 1510, 1484, 1455 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,57 (1H, s), 10,20 (1H, s), 8,37 (1H, d, *J* = 7,9 Hz), 8,08 (1H, dd, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,8 Hz), 7,56 (1H, m), 7,25 (1H, d, *J* = 8,3 Hz), 7,13 (1H, t, *J* = 7,5 Hz), 6,95-6,89 (2H, m), 6,81 (1H, m), 4,03 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 162,27; 157,35; 146,46; 133,66; 131,54; 127,43; 123,86; 121,58; 121,36; 119,92; 119,45; 114,76; 112,79; 56,63; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₃NO₃ (243,26) vypočítané: C 69,12; H 5,39; N 5,76; nájdené: C 69,38; H 5,56; N 5,93.

N-(2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenztioamid (16)

Výtěžok: 46,7 %, žltá olejovitá látka; IR (ATR): 3289 (ν NH), 3046 (b, ν OH), 1585, 1537, 1515, 1489 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,39 (1H, s, NH), 9,97 (1H, s, OH), 8,28 (1H, dd, *J* = 8,1 Hz, *J* = 1,6 Hz, H6'), 7,88 (1H, dd, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,8 Hz, H6), 7,44 (1H, m, H4), 7,18-7,08 (2H, m, H3, H4'), 7,03 (1H, td, *J* = 7,5 Hz, *J* = 1,0 Hz, H5), 6,95 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,4 Hz, H3'), 6,85 (1H, td, *J* = 7,7 Hz, *J* = 1,4 Hz, H5'), 3,89 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,32 (1H, s, NH), 9,73 (1H, s, OH), 7,30 (1H, dd, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,8 Hz, H6), 7,16 (1H, zakryté hlavným konformérom, H4), 6,91 (1H, m, H4'), 6,84 (1H, zakryté hlavným konformérom, H5), 6,74 (1H, dd, *J* = 8,1 Hz, *J* = 1,3 Hz, H3'), 6,69 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H3), 6,62 (1H, dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,6 Hz, H6'), 6,46 (1H, td, *J* = 7,6 Hz, *J* = 1,3 Hz, H5'), 3,43 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 88 %, minoritný konformér: 12 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 193,98; 154,81; 150,42; 132,41; 131,87; 131,19; 127,83; 127,63; 125,11; 120,81; 118,91; 116,14; 112,47; 56,46; minoritný konformér: δ 199,89; 152,78; 151,30; 131,38; 130,09; 129,47; 127,85; 127,42; 126,26; 120,02; 118,19; 115,86; 111,00; 55,08; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₃NO₂S (259,32) vypočítané: C 64,84; H 5,05; N 5,40; S 12,36; nájdené: C 64,68; H 5,36; N 5,73; S 12,49.

2-(2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazol (17) ¹⁰⁸

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 63-65 °C; IR (ATR): 1617, 1599, 1583, 1549, 1496, 1458 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,14 (1H, dd, *J* = 7,7 Hz, *J* = 1,7 Hz), 7,84 (1H, m), 7,59 (1H, m), 7,51 (1H, td, *J* = 7,9 Hz, *J* = 1,7 Hz), 7,38-7,31 (2H, m),

7,15-7,05 (2H, m), 4,03 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 161,43; 158,47; 150,17; 141,73; 132,89; 131,21; 124,99; 124,33; 120,67; 120,12; 115,84; 112,01; 110,41; 56,15; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₁NO₂ (225,24) vypočítané: C 74,65; H 4,92; N 6,22; nájdené: C 74,47; H 4,59; N 6,25. IR a NMR zhodné s literatúrou ¹⁰⁸.

2,5-dichlor-N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)benzamid (18) ¹⁰⁹

Výťažok: 56,2 %, biela pevná látka; t. t. 212-213 °C; IR (ATR): 3381 (ν NH), 3159 (b, ν OH), 1655 (amid I), 1613, 1595 (ν CC aromatická), 1531 (amid II), 1464, (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10,12 (1H, s, OH), 9,89 (1H, s, NH), 7,96 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H6'), 7,69 (1H, m), 7,60-7,52 (2H, m), 7,05 (1H, dd, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4'), 6,90 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, H3'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 164,05; 147,74; 138,06; 131,80; 131,48; 131,01; 129,09; 129,05; 126,92; 125,08; 122,59; 122,21; 116,89; Elementárna analýza (%) pre C₁₃H₈Cl₃NO₂ (316,57) vypočítané: C 49,32; H 2,55; N 4,42; nájdené: C 49,53; H 2,78; N 4,56.

2,5-dichlor-N-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)benztioamid (19)

Výťažok: 61,5 %, žltá pevná látka; t. t. 152-153 °C, rozklad; IR (ATR): 3304 (ν NH), 3092 (b, ν OH), 1599, 1525, 1495, 1456 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,70 (1H, s, NH), 10,13 (1H, s, OH), 7,71 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6'), 7,62-7,40 (3H, m, H3, H4, H6), 7,21 (1H, dd, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,8 Hz, H4'), 6,97 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H3'); minoritný konformér: δ 11,93 (1H, s, NH), 10,33 (1H, s, OH), 6,76 (1H, d, *J* = 8,7 Hz), zvyšné rezonančné signály (5H) zakryté hlavným konformérom, zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 90 %, minoritný konformér: 10 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 194,79; 150,87; 144,20; 131,57; 131,47; 129,72; 128,36; 128,17; 127,49; 127,18; 126,77; 121,71; 117,97; minoritný konformér: δ 197,50; 131,33; 131,10; 131,00; 130,75; 129,61; 128,79; 128,58; 127,24; 126,70; 126,33; 121,55; 117,58; Elementárna analýza (%) pre C₁₃H₈Cl₃NOS (332,63) vypočítané: C 46,94; H 2,42; N 4,21; S 9,64; nájdené: C 46,73; H 2,75; N 4,53; S 9,78.

4-chlor-1-metoxy-2-nitrobenzen (20) ¹¹⁰

4-Chloranisol (5,0 g, 4,3 ml, 35,0 mmol) bol rozpustený v acetanhydride (16,5 ml, 175,0 mmol). Tento roztok bol za laboratórnej teploty v priebehu 15 minút po kvapkách pridaný k miešanému roztoku 7,4 ml 65% HNO₃ (106,0 mmol HNO₃) v 16,5 ml (175,0 mmol) acetanhydridu. Následne bola reakčná zmes miešaná za laboratórnej teploty ďalších 45 minút. Reakcia bola ukončená pridaním 150 ml vody, vylúčená pevná látka bola odfiltrovaná a vysušená. Získaná bola čistá zlúčenina ¹¹⁰.

Výťažok: 89,1 %, žlto-biela pevná látka; t. t. 97-98 °C; IR (ATR): 1615, 1573 (ν CC aromatická), 1514 (ν_{as} NO₂), 1484, 1467, 1454, 1446 (ν CC aromatická), 1349 (ν_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,83 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H3), 7,50 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz, *J* = 2,6 Hz, H5), 7,04 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H6), 3,95 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ

151,64; 139,67; 133,98; 125,51; 125,22; 114,76; 56,78.

5-chlor-2-metoxyanilin (21) ¹¹¹

Výtěžok: 86,6 %, biela pevná látka; t. t. 82-83 °C; IR (ATR): 3467, 3377 (ν NH₂), 1616, 1586, 1501, 1462 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6,74-6,65 (3H, m, H3, H4, H6), 3,94 (2H, bs, NH₂), 3,83 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 145,93; 136,94; 125,79; 117,82; 114,68; 111,08; 55,65.

5-chlor-N-(5-chlor-2-metoxyfenyl)-2-metoxybenzamid (22)

Chlorid 5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny bol pripravený vyššie uvedeným spôsobom (vis. kapitola 4.1.3.). 919,2 mg (5,8 mmol) 5-chlor-2-metoxyanilinu **9** bolo rozpustené v 50,0 ml éteru, do tohto roztoku bolo pridané 4,1 ml (29,2 mmol) trietylamínu a následne roztok 5,8 mmol chloridu 5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny v 100,0 ml éteru. Reakčná zmes bola za laboratórnej teploty miešaná pod CaCl₂ uzáverom po dobu 18 hodín. Potom bola zmes extrahovaná 50 ml 5% HCl. Nerozpustný podiel bol odfiltrovaný a vysušený. Získaná bola čistá látka.

Výtěžok: 78,0 %, biela pevná látka; t. t. 208-209 °C; IR (ATR): 3315 (ν NH), 1669 (amid I), 1598 (ν CC aromatická), 1544 (amid II), 1479 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10,67 (1H, s, NH), 8,48 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H6'), 7,99 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6), 7,66 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,8 Hz, H4), 7,34 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 7,17-7,10 (2H, m, H3', H4'), 4,08 (3H, s, OCH₃), 3,96 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 161,27; 156,24; 147,18; 133,52; 130,57; 128,83; 125,46; 124,50; 123,47; 122,42; 118,94; 115,26; 112,42; 57,31; 56,81; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₃Cl₂NO₃ (326,17) vypočítané: C 55,23; H 4,02; N 4,29; nájdené: C 55,35; H 4,22; N 4,45.

5-chlor-N-(5-chlor-2-metoxyfenyl)-2-metoxybenzotioamid (23)

Táto zlúčenina bola pripravená podľa postupu B (vis. kapitola 4.1.2.).

Výtěžok: 38,4 %, žltá pevná látka; t. t. 148-150 °C; IR (ATR): 3270 (ν NH), 1609, 1591, 1545, 1477, 1460, 1451 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,52 (1H, s, NH), 8,19 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H6'), 7,71 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6), 7,48 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,8 Hz, H4), 7,34 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,7 Hz, H4'), 7,18 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3'), 7,17 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 3,89 (3H, s, OCH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,73 (1H, s, NH), 7,32 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6), 7,22 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,8 Hz, H4), 7,17 (1H, zakryté hlavným konformérom, H4'), 6,93 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H6'), 6,90 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3'), 6,73 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H3), 3,66 (3H, s, OCH₃), 3,44 (3H, s, OCH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 85 %, minoritný konformér: 15 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 193,70; 153,45; 151,54; 132,57; 130,88; 130,56; 129,19; 127,48; 125,23; 124,23; 123,43; 114,32; 113,75; 56,67; 56,61; minoritný konformér: δ 198,86; 152,17; 151,25; 132,58; 129,77; 129,21; 129,20; 128,15;

126,54; 123,60; 122,98; 113,26; 112,75; 55,81; 55,46; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₃Cl₂NO₂S (342,24) vypočítané: C 52,64; H 3,83; N 4,09; S 9,37; nájdené: C 52,80; H 4,12; N 4,35; S 9,51.

4-chlor-1-metyl-2-nitrobenzen (24)¹¹²

5,0 g (4,7 ml, 39,5 mmol) 4-Chlortoluénu bolo zmiešané s 3,3 ml H₂O. K miešanej emulzii bola pomaly pridaná zmes 3,0 ml 65% HNO₃ a 13,2 ml 96% H₂SO₄, tak aby sa teplota reakčnej zmesi pohybovala v rozmedzí 50-55 °C. Následne bola reakčná zmes miešaná pri teplote 55 °C po dobu 2 hodín. Potom bolo pridané 50 ml H₂O a zmes bola extrahovaná trikrát 50 ml CHCl₃. Organické fázy boli spojené, vysušené Na₂SO₄ a odparené dosucha. Látka bola izolovaná pomocou kolónovej chromatografie¹¹².

Výtťažok: 49,2 %, žlto-biela pevná látka; t. t. 37-38 °C; IR (ATR): 1556 (v CC aromatická), 1521 (v_{as} NO₂), 1481, 1451 (v CC aromatická), 1347 (v_s NO₂) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,96 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H3), 7,47 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, *J* = 2,2 Hz, H5), 7,29 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H6), 2,57 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 149,35; 133,81; 133,01; 132,39; 132,02; 124,67; 19,95.

5-chlor-2-metylanilin (25)¹¹³

Výtťažok: 89,6 %, biela pevná látka; t. t. 24-25 °C; IR (ATR): 3385 (b, v NH₂), 1622, 1576, 1494, 1448 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6,88 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H3), 6,61 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H6), 6,43 (1H, dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 2,3 Hz, H4), 5,11 (2H, bs, NH₂), 2,00 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 148,39; 131,32; 130,77; 120,03; 115,30; 113,02; 17,07.

5-chlor-*N*-(5-chlor-2-metylfenyl)-2-metoxybenzamid (26)

Táto zlúčenina bol pripravený rovnakým postupom ako látka **22**.

Výtťažok: 60,1 %, biela pevná látka; t. t. 198-200 °C; IR (ATR): 3341 (v NH), 1663 (amid I), 1613, 1587 (v CC aromatická), 1541 (amid II), 1480 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 9,92 (1H, s, NH), 8,02 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H6'), 7,84 (1H, d, *J* = 2,9 Hz, H6), 7,61 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz, *J* = 2,9 Hz, H4), 7,32-7,24 (2H, m, H3, H3'), 7,15 (1H, dd, *J* = 8,1 Hz, *J* = 2,3 Hz, H4'), 3,99 (3H, s, OCH₃), 2,28 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 162,33; 155,99; 137,78; 132,65; 131,92; 130,37; 130,07; 128,50; 124,97; 124,47; 124,34; 122,31; 114,74; 56,98; 17,26; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₃Cl₂NO₂ (310,18) vypočítané: C 58,08; H 4,22; N 4,52; nájdené: C 58,25; H 4,39; N 4,38.

5-chlor-*N*-(5-chlor-2-metylfenyl)-2-metoxybenzotioamid (27)

Táto zlúčenina bola pripravená podľa postupu B (vis. kapitola 4.1.2.).

Výtťažok: 25,0 %, žltá pevná látka; t. t. 142-144 °C; IR (ATR): 1597, 1577, 1530, 1486, 1463

(v CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,58 (1H, s, NH), 7,54 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,46 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4), 7,41 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H6'), 7,35 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H3'), 7,32 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H4'), 7,15 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 3,85 (3H, s, OCH₃), 2,25 (3H, s, CH₃); minoritný konformér: δ 12,04 (1H, s, NH), 7,49 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,27 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4), 7,19 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H3'), 7,10 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H4'), 6,79 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H6'), 6,75 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 3,39 (3H, s, OCH₃), 2,27 (3H, s, CH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 88 %, minoritný konformér: 12 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): hlavný konformér: δ 195,34; 153,10; 139,47; 133,83; 132,34; 130,23; 130,07; 129,28; 127,53; 127,15; 124,03; 113,91; 56,40; 17,18; minoritný konformér: δ 198,26; 151,24; 139,60; 132,33; 132,22; 131,68; 129,56; 129,43; 126,92; 126,11; 123,99; 112,98; 55,44; 17,28; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₃Cl₂NOS (326,24) vypočítané: C 55,22; H 4,02; N 4,29; S 9,83; nájdené: C 55,41; H 4,36; N 4,53; S 9,59.

5-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxy-4-nitrofenyl)-2-metoxybenzamid (28)

Výtťažok: 53,1 %, žltá pevná látka; t. t. 259-260 °C, rozklad; IR (ATR): 3258 (b, v OH), 1673 (amid I), 1615, 1584 (v CC aromatická), 1541 (amid II), 1522 (ν_{as} NO₂), 1503, 1480, 1460 (v CC aromatická), 1340 (ν_{s} NO₂) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 11,60 (1H, s, NH), 10,78 (1H, s, OH), 8,58 (1H, s, H3'), 7,92 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, H6), 7,61 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4), 7,53 (1H, s, H6'), 7,28 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 4,02 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 161,65; 156,28; 145,42; 141,02; 133,88; 132,47; 130,61; 125,51; 121,73; 120,40; 116,85; 115,15; 111,27; 57,26; Elementárna analýza (%) pre C₁₄H₁₀Cl₂N₂O₅ (357,15) vypočítané: C 47,08; H 2,82; N 7,84; nájdené: C 47,25; H 3,12; N 7,95.

N-(4-amino-5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (29)

1,2 g, (3,4 mmol) Zlúčeniny **28** bolo rozpustené v zmesi 80 ml DMF a 30 ml EtAc. Následne bolo pridané 7,6 g (34,0 mmol) SnCl₂·2H₂O a zmes bola nechaná miešať za laboratórnej teploty 24 hodín. Potom bolo pH reakčnej zmesi upravené pomocou prídavku 100 ml nasýteného vodného roztoku NaHCO₃ na zásaditú reakciu a reakčná zmes bola extrahovaná päťkrát 100 ml EtAc. Organické podiely boli spojené, extrahované trikrát 150 ml H₂O, vysušené Na₂SO₄ a odparené dosucha. Získaná bola čistá látka ⁸⁰.

Výtťažok: 90,1 %, žltá pevná látka; t. t. rozklad; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,27 (1H, s, NH), 10,13 (1H, s, OH), 8,16 (1H, s, H6'), 7,96 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, H6), 7,59 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4), 7,27 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,42 (1H, s, H3'), 5,14 (2H, bs, NH₂), 4,00 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 160,03; 156,00; 146,71; 141,44; 132,69; 130,38; 125,29; 123,28; 120,54; 117,55; 114,96; 106,84; 101,74; 57,09.

N-(4-((4-brombenzyliden)amino)-5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (30)

728,0 mg, (2,2 mmol) Zlúčeniny **29** bolo rozsuspendované v 15,0 ml 99% etanolu.

Zmes bola za miešania zahrievaná do doby než vznikol roztok. Následne bolo pridané 452,8 mg (2,4 mmol) *p*-brombenzaldehydu a zmes bola za miešania zahrievaná pri teplote 60 °C po dobu pokiaľ bola podľa TLC prítomná škvrna vychádzajúcej látky (1 hodina). Potom bola reakčná zmes umiestnená do mrazničky a nechaná kryštalizovať. Vylúčená látka bola odfiltrovaná, vysušená a použitá v ďalšej reakcii.

Výťažok: 66,8 %, žltá pevná látka; t. t. rozklad; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,77 (1H, bs, OH), 10,59 (1H, s, NH), 8,51 (1H, s), 8,50 (1H, s), 7,99 (1H, d, *J* = 2,9 Hz, H₆), 7,93-7,84 (2H, m), 7,78-7,69 (2H, m), 7,61 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,9 Hz, H₄), 7,29 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H₃), 6,79 (1H, s), 4,04 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 160,94; 160,20; 156,17; 146,26; 143,35; 135,14; 133,26; 132,14; 130,80; 130,57; 126,22; 125,59; 125,42; 122,67; 120,19; 117,83; 115,08; 105,90; 57,20.

***N*-(4-((4-brombenzyl)amino)-5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenzamid (31)**

734,8 mg, (1,5 mmol) Zlúčeniny **30** bolo rozpustené v zmesi 10,0 ml DMF a 5,0 ml metanolu. Následne bolo po častiach v priebehu 10 minút pridané 283,7 mg (7,5 mmol) NaBH₄ a reakčná zmes bola miešaná za laboratórnej teploty 19 hodín. Potom bolo pridané 100 ml H₂O, zmes bola extrahovaná trikrát 50 ml EtAc, organické podiely boli spojené a vysušené Na₂SO₄. Produkt bol izolovaný pomocou kolónovej chromatografie.

Výťažok: 56,3 %, žltá pevná látka; t. t. rozklad; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10,21 (1H, s, NH), 10,07 (1H, s, OH), 8,22 (1H, s, H₆'), 7,95 (1H, d, *J* = 2,9 Hz, H₆), 7,57 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,9 Hz, H₄), 7,54-7,49 (2H, m), 7,30-7,26 (2H, m), 7,25 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H₃), 6,10 (1H, s, H₃'), 6,01 (1H, bs, NH), 4,31 (2H, s, CH₂), 3,97 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 160,17; 155,97; 146,87; 140,70; 139,43; 132,66; 131,39; 130,33; 129,12; 125,26; 123,26; 120,97; 119,76; 117,01; 114,91; 107,31; 98,84; 57,03; 45,88.

***N*-(4-((4-brombenzyl)amino)-5-chlor-2-hydroxyfenyl)-5-chlor-2-metoxybenztioamid (32)**

Produkt bol získaný rovnakým postupom ako predošlé deriváty 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu (postup D, vis. kapitola 4.1.3.), len po hydrolýze bola reakčná zmes zneutralizovaná pomocou prídavku 15,0 g NaHCO₃.

Výťažok: 48,4 %, žltá pevná látka; t. t. 145-147 °C, rozklad; IR (ATR): 3399 (ν NH), 3350-2900 (b, ν OH), 1613, 1536, 1481, 1454 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,30 (1H, s, NH), 9,88 (1H, s, OH), 8,23 (1H, s, H₆'), 7,79 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H₆), 7,56-7,50 (2H, m), 7,44 (1H, dd, *J* = 8,9 Hz, *J* = 2,8 Hz, H₄), 7,31-7,25 (2H, m), 7,13 (1H, d, *J* = 8,9 Hz, H₃), 6,30 (1H, t, *J* = 6,1 Hz, NH), 6,07 (1H, s, H₃'), 4,34 (2H, d, *J* = 6,1 Hz, CH₂), 3,85 (3H, s, OCH₃); minoritný konformér: δ 11,27 (1H, s, NH), 9,56 (1H, s, OH), 8,56 (1H, m), 7,76 (1H, m), 7,48 (1H, m), 7,39-7,35 (2H, m), 7,21-7,15 (2H, m), 6,78 (1H, m), 6,69 (1H, s, H₆'), 5,81 (1H, s, H₃'), 4,21 (2H, m, CH₂), 3,53 (3H, s, OCH₃);

zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 88 %, minoritný konformér: 12 %; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): hlavný konformér: δ 189,89; 153,47; 150,31; 149,79; 143,11; 139,19; 132,28; 131,45; 130,84; 129,09; 124,96; 124,22; 119,84; 116,94; 114,25; 106,64; 98,68; 56,61; 45,73; minoritný konformér: δ 198,28; 151,61; 151,53; 143,68; 139,00; 136,29; 133,19; 131,34; 129,04; 128,27; 127,05; 123,43; 119,78; 116,46; 112,76; 106,57; 98,51; 55,55; 45,64; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{BrCl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (512,25) vypočítané: C 49,24; H 3,35; N 5,47; S 6,26; nájdené: C 49,41; H 3,59; N 5,65; S 6,32.

***N*-(4-brombenzyl)-5-chlor-2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazol-6-amin (33)**

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 171-173 °C; IR (ATR): 3432 (ν NH), 1608, 1575, 1548, 1493, 1466, 1466 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 7,87 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6'), 7,75 (1H, s, H4), 7,54 (1H, dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4'), 7,53-7,45 (2H, m), 7,37-7,28 (2H, m), 7,23 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H3'), 6,78 (1H, s, H7), 6,55 (1H, t, $J = 6,1$ Hz, NH), 4,46 (2H, d, $J = 6,1$ Hz, CH_2), 3,87 (3H, s, OCH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 158,05; 156,66; 150,74; 142,78; 138,98; 132,21; 131,78; 131,51; 129,60; 129,38; 124,48; 120,00; 117,11; 116,26; 114,91; 92,86; 56,58; 45,74; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{BrCl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ (478,17) vypočítané: C 52,75; H 3,16; N 5,86; nájdené: C 52,41; H 2,97; N 5,65.

4-chlor-5-etyl-2-nitrofenol (34) ¹¹⁴

Výtťažok: 46,3 %, žltá pevná látka; t. t. 39-41 °C; IR (ATR): 3286 (b, ν OH), 2971 (ν_{as} CH_3), 1624, 1571 (ν CC aromatická), 1522 (ν_{as} NO_2), 1463 (ν CC aromatická), 1336 (ν_{s} NO_2) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 10,45 (1H, s, OH), 8,08 (1H, s, H3), 7,04 (1H, s, H6), 2,76 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 1,26 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 153,64; 152,84; 131,70; 125,26; 124,77; 119,88; 27,14; 13,08.

2-amino-4-chlor-5-etylfenol (35) ¹¹⁵

Výtťažok: 71,8 %, biela pevná látka; t. t. 138-140 °C (lit. 139 °C ¹¹⁵); IR (ATR): 3372, 3304 (ν NH_2), 3100-2500 (b, ν OH), 2968 (ν_{as} CH_3), 1601, 1506 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 9,12 (1H, bs, OH), 6,57 (1H, s), 6,55 (1H, s), 4,58 (2H, bs, NH_2), 2,45 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 1,06 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 143,36; 136,34; 127,87; 122,15; 115,30; 114,27; 25,57; 14,94.

5-chlor-*N*-(5-chlor-4-etyl-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzamid (36)

Výtťažok: 78,4 %, biela pevná látka; t. t. 185-187 °C; IR (ATR): 3318 (ν NH), 3089 (b, ν OH), 2966 (ν_{as} CH_3), 2943 (ν_{as} CH_2), 1636 (amid I), 1605 (ν CC aromatická), 1548 (amid II), 1508, 1482, 1459 (ν CC aromatická) cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 10,50 (1H, s), 10,47 (1H, s), 8,37 (1H, s, H6'), 7,97 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,61 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,28 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,84 (1H, s, H3'), 4,02 (3H, s, OCH_3), 2,58 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH_2), 1,12 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 160,93; 156,15; 145,67; 136,22; 133,18; 130,56; 126,01; 125,39; 122,76; 122,06; 119,97; 115,31; 115,07; 57,16; 26,06; 14,32; Elementárna analýza (%) pre $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (340,20) vypočítané: C

56,49; H 4,44; N 4,12; nájdené: C 56,28; H 4,19; N 4,25.

5-chlor-*N*-(5-chlor-4-etyl-2-hydroxyfenyl)-2-metoxybenzotioamid (37)

Výtťažok: 28,5 %, žltá pevná látka; t. t. 151-152 °C, rozklad; IR (ATR): 3300 (b, v NH), 2958 (ν_{as} CH₃), 2929 (ν_{as} CH₂), 2866 (ν_{s} CH₃), 1615, 1592, 1566, 1556, 1500, 1477, 1455 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,47 (1H, s, NH), 10,21 (1H, s, OH), 8,23 (1H, s, H6'), 7,77 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,47 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 7,16 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,90 (1H, s, H3'), 3,88 (3H, s, OCH₃), 2,63 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 1,16 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃); minoritný konformér: δ 11,54 (1H, s, NH), 9,96 (1H, s, OH), 7,29 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,22 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,8$ Hz, H4), 6,81 (1H, s, H6'), 6,76 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H3), 6,66 (1H, s, H3'), 3,49 (3H, s, OCH₃), 2,47 (2H, zakryté reziduálnym signálom rozpúšťadla, CH₂), 1,04 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 87 %, minoritný konformér: 13 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 192,50; 153,47; 149,60; 140,12; 132,41; 130,78; 130,72; 126,07; 125,12; 124,23; 121,20; 116,60; 114,28; 56,64; 26,20; 14,12; minoritný konformér: δ 198,44; 151,43; 150,66; 140,84; 132,83; 129,63; 128,85; 126,96; 125,85; 123,56; 120,78; 116,48; 112,82; 55,53; 25,98; 13,99; Elementárna analýza (%) pre C₁₆H₁₅Cl₂NO₂S (356,27) vypočítané: C 53,94; H 4,24; N 3,93; S 9,00; nájdené: C 54,11; H 4,39; N 4,25; S 9,12.

5-chlor-2-(5-chlor-2-metoxyfenyl)-6-etylbenzo[*d*]oxazol (38)

Vedľajší produkt, biela pevná látka; t. t. 120-121 °C; IR (ATR): 2968 (ν_{as} CH₃), 2840 (ν_{s} CH₂), 1596, 1577, 1529, 1480, 1456 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8,09 (1H, bs), 7,81 (1H, bs), 7,56-7,34 (2H, bm), 7,01 (1H, bd, $J = 8,6$ Hz), 4,01 (3H, bs, OCH₃), 2,88 (2H, bq, $J = 7,3$ Hz, CH₂), 1,30 (3H, bt, $J = 7,3$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 160,79; 156,98; 149,32; 140,68; 139,26; 132,47; 130,63; 129,87; 125,76; 120,64; 117,03; 113,49; 110,47; 56,87; 27,31; 14,10; Elementárna analýza (%) pre C₁₆H₁₃Cl₂NO₂ (322,19) vypočítané: C 59,65; H 4,07; N 4,35; nájdené: C 59,47; H 4,29; N 4,25.

2-etylbenzoová kyselina (39) ¹¹⁶

1,0 g (1,0 ml, 7,6 mmol) 2-Etylbenzonitrilu a 1,4 g (24,8 mmol) KOH bolo rozsuspendované v 10,0 ml etylénglykolu. Zmes bola za miešania zahrievaná pri teplote 170 °C po dobu 7 hodín. Následne bola reakčná zmes schladená a bolo pridané 50 ml H₂O. Vodná fáza bola extrahovaná trikrát 30 ml éteru, za chladenia okyslená na pH = 1 a extrahovaná trikrát 40 ml éteru. Éterová fáza bola extrahovaná trikrát 40 ml H₂O, vysušená Na₂SO₄ a zbavená rozpúšťadla. Získaná bola čistá látka zhodná t. t. a IR s literatúrou¹¹⁶.

Výtťažok: 89,0 %, biela pevná látka; t. t. 64-65 °C; IR (ATR): 3400-2300 (b, v OH), 2977 (ν_{as} CH₃), 2955 (ν_{as} CH₂), 2869 (ν_{s} CH₃), 1681 (v CO), 1601, 1575, 1488, 1447 (v CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 12,79 (1H, bs, COOH), 7,76 (1H, d, $J = 7,0$ Hz), 7,43 (1H, t, $J = 7,5$ Hz), 7,33-7,21 (2H, m), 2,90 (2H, q, $J = 7,4$ Hz, CH₂), 1,14 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 169,14; 145,12; 131,96; 130,54;

130,35; 130,34; 126,04; 27,03; 16,32.

***N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-etylbenzamid (40)**

Výtťažok: 74,4 %, biela pevná látka; t. t. 151-152 °C; IR (ATR): 3379 (ν NH), 3155 (b, ν OH), 2972 (ν_{as} CH₃), 1650 (amid I), 1593 (ν CC aromatická), 1525 (amid II), 1493 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 10,12 (1H, bs, OH), 9,36 (1H, s, NH), 7,89 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6'), 7,53-7,37 (2H, m), 7,37-7,24 (2H, m), 7,05 (1H, dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4'), 6,90 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H3'), 2,76 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 1,18 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 168,32; 147,79; 141,99; 136,27; 130,24; 129,44; 127,45; 127,44; 125,93; 124,91; 122,62; 122,35; 117,05; 26,06; 16,09; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₄ClNO₂ (275,73) vypočítané: C 65,34; H 5,12; N 5,08; nájdené: C 65,57; H 4,92; N 5,38.

***N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)-2-etylbenztioamid (41)**

Výtťažok: 39,9 %, zeleno-žltá pevná látka; t. t. 140-141 °C, rozklad; IR (ATR): 3351 (ν NH), 3144 (b, ν OH), 2962 (ν_{as} CH₃), 2930 (ν_{as} CH₂), 2870 (ν_{s} CH₃), 1603, 1530, 1499, 1487, 1453 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,32 (1H, s, NH), 10,12 (1H, s, OH), 7,56 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6'), 7,44-7,10 (5H, m, H3, H4, H5, H6, H4'), 6,95 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H3'), 2,81 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 1,21 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃); minoritný konformér: δ 11,56 (1H, s, NH), 10,28 (1H, s, OH), 7,17-7,05 (5H, zakryté hlavným konformérom, H3, H4, H5, H6, H4'), 6,75 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H3'), 6,64 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H6'), 2,49 (2H, zakryté reziduálnym signálom rozpúšťadla, CH₂), 1,07 (3H, t, $J = 7,4$ Hz, CH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 95 %, minoritný konformér: 5 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 201,03; 151,24; 144,05; 139,09; 128,73; 128,67; 128,04; 127,78; 127,49; 126,90; 125,55; 121,69; 117,83; 25,41; 15,68; minoritný konformér: nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity rezonančných signálov; Elementárna analýza (%) pre C₁₅H₁₄ClNOS (291,80) vypočítané: C 61,74; H 4,84; N 4,80; S 10,99; nájdené: C 61,57; H 4,95; N 4,58; S 11,21.

5-chlor-*N*-(2-etylfenyl)-2-metoxybenzamid (42)

Táto zlúčenina bol pripravený rovnakým postupom ako látka **22**.

Výtťažok: 89,3 %, biela pevná látka; t. t. 114-116 °C; IR (ATR): 3341 (ν NH), 1663 (amid I), 1614, 1593 (ν CC aromatická), 1550 (amid II), 1485, 1474, 1456 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 9,83 (1H, bs, NH), 7,90-7,79 (2H, m), 7,58 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, $J = 2,9$ Hz, H4), 7,33-7,22 (2H, m), 7,21 (1H, dd, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,8$ Hz), 7,15 (1H, dd, $J = 7,3$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 3,98 (3H, s, OCH₃), 2,65 (2H, q, $J = 7,6$ Hz, CH₂), 1,18 (3H, t, $J = 7,6$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 162,37; 155,93; 136,11; 135,76; 132,34; 130,07; 128,83; 126,36; 125,48; 124,94; 124,76; 124,26; 114,62; 56,87; 24,22; 14,29; Elementárna analýza (%) pre C₁₆H₁₆ClNO₂ (289,76) vypočítané: C 66,32; H 5,57; N 4,83; nájdené: C 66,59; H 5,75; N 4,68.

5-chlor-*N*-(2-etylfenyl)-2-metoxybenzotioamid (43)

Táto zlúčenina bola pripravená podľa postupu B (vis. kapitola 4.1.2.).

Výťažok: 37,3 %, žltá pevná látka; t. t. 101-103 °C; IR (ATR): 3336 (ν NH), 2958 (ν_{as} CH₃), 2930 (ν_{as} CH₂), 2870 (ν_{s} CH₃), 1595, 1569, 1508, 1481, 1464, 1445 (ν CC aromatická) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): hlavný konformér: δ 11,50 (1H, s, NH), 7,51 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H6), 7,45 (1H, dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,7$ Hz, H4), 7,37-7,25 (4H, m, H3', H4', H5', H6'), 7,15 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H3), 3,86 (3H, s, OCH₃), 2,64 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 1,17 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₃); minoritný konformér: δ 11,98 (1H, s, NH), 7,38 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H6), 7,22 (1H, m, H4), 7,19 (1H, m), 7,09 (1H, dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,4$ Hz), 6,91 (1H, td, $J = 7,7$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 6,76 (1H, dd, $J = 7,3$ Hz, $J = 1,3$ Hz), 6,72 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H3), 3,39 (3H, s, OCH₃), 2,49 (2H, zakryté reziduálnym signálom rozpúšťadla, CH₂) 1,23 (3H, zakryté hlavným konformérom, CH₃); zastúpenie konformérov: hlavný konformér: 95 %, minoritný konformér: 5 %; ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): hlavný konformér: δ 195,44; 153,07; 140,54; 137,87; 134,15; 130,01; 129,23; 129,17; 128,01; 127,96; 126,45; 123,97; 113,88; 56,35; 24,27; 15,05; minoritný konformér: nemožno odčítať z dôvodu nízkej intenzity rezonančných signálov; Elementárna analýza (%) pre C₁₆H₁₆ClNOS (305,82) vypočítané: C 62,84; H 5,27; N 4,58; S 10,48; nájdené: C 62,89; H 5,45; N 4,77; S 10,59.

4.2. Biologické hodnotenie pripravených látok

4.2.1. *In vitro* antimykobakteriálne hodnotenie

In vitro antimykobakteriálne hodnotenie pripravených zlúčenín bolo použité k charakterizácii ich schopnosti pôsobiť proti mykobaktériám v rastovej a replikačnej fáze (pri dostatku kyslíka a živín). Testovanie bolo uskutočnené v Zdravotnímskom ústave se sídlom v Ostravě na nasledujúcich kmeňoch: *M. tuberculosis* My 331/88 (riedenie kmeňa 10^{-3}), *M. avium* My 330/88 (riedenie kmeňa 10^{-5}), *M. kansasii* My 235/80 (riedenie kmeňa 10^{-4}) a *M. kansasii* My 6509/96 (riedenie kmeňa 10^{-4}). Všetky kmene, s výnimkou *M. kansasii* 6509/96, boli získané z Českej národnej zbierky typových kultúr (CNCTC). Kmeň *M. kansasii* 6509/96 bol klinicky izolovaný. Antimykobakteriálna aktivita pripravených zlúčenín bola stanovená v Šulovej pôde (SEVAC, Praha, Česká republika) pomocou mikrometódy pre stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) pri 37 °C¹¹⁷. Výsledky boli odčítané po 14 a 21 dňoch respektíve po 7, 14 a 21 dňoch u *M. kansasii*. Testované látky boli pridávané do kultivačnej pôdy v DMSO roztoku, INH bol použitý ako štandard a bol pridaný ako vodný roztok. Pre testované zlúčeniny boli použité nasledujúce koncentrácie: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2, 1 a 0,5 μmol/l. Rovnaké koncentrácie v rozmedzí 0,5-250 μmol/l boli použité pre INH. Výsledky testovania sú prezentované ako MIC hodnota, ta reprezentuje najnižšiu koncentráciu testovanej látky, pri ktorej je pozorovaná inhibícia mykobakteriálneho rastu.

4.2.2. *In vitro* hodnotenie ICL1 inhibičnej aktivity

Toto testovanie bolo použité k posúdeniu schopnosti pripravených látok pôsobiť ako inhibítory ICL1 a teda potenciálne proti perzistujúcim a dormantným mykobaktériám. Výsledky sú prezentované ako percento inhibície ICL1. Testovanie bolo uskutočnené na Katedre biochemických vied Farmaceutickej fakulty UK v Hradci Králové.

Potrebné množstvo ICL1 bolo získané expresiou príslušného génu. *Icl1* (Rv0467) o veľkosti 1,28 kb bol najskôr zmnožený použitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Pre tento účel bola ako templát použitá genómová DNA z *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Zmnožená DNA bola následne vpravená do pET-28b(+) plazmidu Novagen (Merck, KGaA, Darmstadt, Nemecko) použitím *NdeI* a *HindIII* restriktčných miest. Rekombinantný plazmid bol prenesený do *Escherichia coli* HB101. K potvrdeniu, že vložená sekvencia nemá žiadnu mutáciu bolo použité DNA sekvenovanie. Pre účel expisie *icl1* boli bunky obsahujúce tento

gén nechané rásť až dosiahli optickú hustotu $OD_{595} = 0,6$. Bakteriálna kultúra bola následne indukovaná pomocou isopropyl- β -D-tiogalaktopyranozidu (1 mmol/l) a inkubovaná pri 30 °C po dobu ďalších 4 hodín. Bunky boli oddelené centrifugáciou pri 6000 g po dobu 10 minút a rozsuspendované v BugBuster Protein Extraction Reagent Novagen (Merck, KGaA, Darmstadt, Nemecko). Bunkové zvyšky boli odstránené centrifugáciou a histidínom-značený proteín bol čistený pomocou Äkta purifikačného systému (Amersham Biosciences, Valley Stream, NY, USA). Čistota získaného enzýmu bola potvrdená pomocou elektroforézy na polyakrylamidovom gély v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a farbením gélu (Coomassie staining). Koncentrácia proteínu bola stanovená pomocou Bradfordovej metódy¹¹⁸.

Aktivita ICL1 v prítomnosti testovaných látok bola stanovená podľa protokolu vypracovaného Dixonom a Kornbergom¹¹⁹. Vlastné stanovenie bolo optimalizované pre konečný objem 100 μ l (stanovenie na doštičke, 96-jamková doštička, NUNC, Schoeller, Praha, Česká republika). Konečná koncentrácia testovanej látky v reakčnej zmesi bola 10 μ mol/l. Reakčný pufer obsahoval 50 mmol/l KH_2PO_4 , 4 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 4 mmol/l fenylylhydrazinium chloridu, 12 mmol/l cysteínu, vodu a KOH do pH 7. Rozklad izocitrátu bol kvantifikovaný prostredníctvom zmeny absorbancie pri vlnovej dĺžke 324 nm, ktorá je spôsobovaná tvorbou fenylylhydrazónu glyoxalátu. Každá testovaná zlúčenina bola rozpustená v DMSO a bol pripravený 1mmol/l roztok, 1 μ l tohto roztoku bol pridaný k 93,9 μ l reakčného pufru. Potom bolo pridané 0,1 μ l roztoku enzýmu v fosfátovom pufre a glycerole o koncentrácii 0,58 mg/ml (Bradford). Nakoniec bola enzymatická reakcia naštartovaná pridaním 0,2 μ mol draselnej soli (+)-*Ds-treo*-izocitrátu v roztoku. Etionamid a izoniazid boli použité ako negatívna kontrola (inhibícia 0 %) a 3-nitropropionová kyselina slúžila ako pozitívna kontrola. Všetky kontrolné zlúčeniny boli do reakčnej zmesi pridané rovnakým spôsobom ako testované látky a taktiež ich konečná koncentrácia v reakčnej zmesi bola 10 μ mol/l. Inhibičná aktivita samotného DMSO (1 μ l) bola odčítaná od aktivity testovaných látok.

4.2.3. *In vitro* test cytotoxicity

Cytotoxicita najaktívnejších zlúčenín bola stanovená na ľudských hepatocytoch (Hep G2, pasáž 12, ECACC, Salisbury, UK) s použitím metódy CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay¹²⁰ (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Táto metóda je založená na stanovení redukčnej metabolickej aktivity použitých buniek. Výsledky sú

prezentované ako inhibičná koncentrácia (IC_{50}), čo je koncentrácia testovaných látok, ktorá je potrebná k redukcii viability buniek na 50 % hodnoty maximálnej (kontrolnej) viability. Pre posúdenie vzťahu medzi cytotoxicitou a antituberkulotickou aktivitou bol u každej testovanej látky vypočítaný index selektivity (SI, $SI = IC_{50}/MIC_{M. tuberculosis 331/88, 14dni}$). Stanovenie bolo uskutočnené na Katedre biologických a lekánských vied Farmaceutickej fakulty UK v Hradci Králové.

Na začiatku stanovenia bolo do každej jamky 96-jamkovej doštičky (NUNC, Schoeller, Praha, Česká republika) umiestnených 10 000 buniek. Inkubačné médium bolo zložené z Minimum Essentials Eagle Medium (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), 1 % glutamínu, 10 % fetálneho bovinného séra (PAA, Biotech, Praha, Česká republika) and 1 % neesenciálnych aminokyselín. Inkubácia trvala 24 hodín a prebiehala v inkubačnom zariadení (Shel Lab, Cornelius, OR, USA) pri teplote 37 °C a v atmosfére s 5 % CO_2 . Pred vlastným stanovením cytotoxicity pripravených látok boli bunky mikroskopicky skontrolované. Každá testovaná zlúčenina bola rozpustená v DMSO a hodnotená v kvadrupletoch pre každú z ôsmich skúšaných koncentrácií. Pripravené boli taktiež vzorky na kontrolu 100% viability, kontrolu pôsobenia 1 % DMSO, kontrolu nulovej viability (pôsobenie 10 % DMSO), kontrolu nožnej interakcie testovanej látky s reagentom kitu a kontrolu pozadia inkubačného média. Vzorky testovaných látok a kontrolné vzorky boli inkubované 24 hodín pri 37 °C. Následne bolo do jamiek pridané činidlo príslušného kitu a zmes bola nechaná pri 37 °C po dobu 90 minút. Potom bola zmeraná absorbanca pri 490 nm pomocou doštičkového analyzátoru Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švajčiarsko). Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a hodnota IC_{50} pre každú testovanú zlúčeninu bola stanovená pomocou GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ¹²⁰.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1. Deriváty 2-metoxybenzanilidu a jeho toxo analogu

Motiváciou k výskumu tejto skupiny látok boli okrem výsledkov mojej diplomovej práce¹⁰⁰ i publikácie popisujúce antimykobakteriálnu aktivitu salicylanilidov⁹⁵, ich esterov^{121, 122, 123, 124} a karbamátov¹²⁵. U esterov a karbamátov salicylanilidov nie je dodnes na 100 % jasné, či ide o proliečivá, za ktorých aktivitu zodpovedá príslušný salicylanilid alebo o nové antimykobakteriálne účinné štruktúry. Príprava metyl éterov preto predstavovala logickú obmenu salicylanilidového fragmentu s potenciálom získania menej toxických látok¹²⁶. Pozitívne ovplyvnenie antimykobakteriálnej aktivity salicylamidových derivátov výmenou atómu kyslíka amidickej skupiny za atóm síry je taktiež zdokumentované⁹⁹.

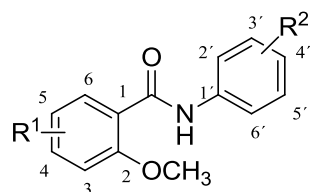
V rámci tejto časti dizertačnej práce bolo pripravených 36 látok, z toho 18 derivátov 2-metoxybenzanilidu **3** a 18 derivátov 2-metoxytiobenzanilidu **4** (Tabuľka 1 a 2). Substituenty na oboch aromatických jadrách boli zvolené na základe výsledkov štúdia antimykobakteriálnych vlastností derivátov salicylanilidu⁹⁵. Prehľad pripravených látok s ich *in vitro* antimykobakteriálnou aktivitou prináša Tabuľka 1 a 2.

Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že všetky pripravené zlúčeniny vykázali aktivitu voči všetkým testovaným kmeňom. Látky boli aktívne i proti *M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 235/80, ktoré sú voči INH rezistentné. Vo všeobecnosti deriváty 2-metoxytiobenzanilidu **4** boli aktívnejšie než deriváty 2-metoxybenzanilidu **3**. Aktivita amidov sa pohybovala v rozmedzí 4-500 $\mu\text{mol/l}$ (Tabuľka 1), aktivita tioamidov v rozmedzí 2-250 $\mu\text{mol/l}$ (Tabuľka 2). Schopnosť pripravených látok inhibovať enzým ICL1 prináša Tabuľka 3. U piatich najaktívnejších látok bola stanovená taktiež ich cytotoxicita (Tabuľka 4).

Všeobecne možno uzavrieť, že táto séria látok výrazne zaostala za antimykobakteriálnou aktivitou predlohových salicylanilidov a ich modifikácií. Tento nález môže byť interpretovaný i tak, že v minulosti pripravené estery salicylanilidov s octovou kyselinou¹²¹, benzénsulfónovou kyselinou¹²⁷, alifatickými karbámovými kyselinami¹²⁵, aminokyselinami s rôzne chránenou amino skupinou^{123, 124, 124}, či rôznymi aromatickými kyselinami¹²⁸ sú proliečivá salicylanilidov a nepredstavujú nové antimykobakteriálne aktívne molekuly. Za antimykobakteriálnu aktivitu týchto látok by mohol byť zodpovedný príslušný salicylanilid, ktorý by sa uvoľnil pomocou enzymatickej hydrolýzy. V prospech tejto teórie hovorí práve skutočnosť, že metoxy analogy salicylanilidov (zlúčeniny **3**) mali výrazne nižšiu

antimykobakteriálnu aktivitu než odpovedajúce salicylanilidy ⁹⁵. Takmer u všetkých bola aktivita horšia o 5 prípadne viac riedení. Naopak, vyššie spomínané estery, karbamáty a benzénsulfonáty salicylanilidov majú antimykobakteriálnu aktivitu vo väčšine prípadov zhodnú ako odpovedajúce salicylanilidy ^{95, 122, 123, 124, 125, 125, 128, 128}. Len v niektorých prípadoch je ich aktivita o 2-3 riedenia lepšia resp. horšia. Ďalším argumentom v prospech tejto teórie je skutočnosť, že estery salicylanilidov s príslušnou *R* i *S* aminokyselinou majú rovnakú antimykobakteriálnu aktivitu ¹²³. To by sa v prípade, že by bol aktívnou molekulou príslušný ester, za predpokladu špecifického pôsobenia, s najväčšou pravdepodobnosťou nestalo. Esterifikácia salicylového hydroxyly preto pravdepodobne len zlepšujú prestup salicylanilidov cez lipofilné mykobakteriálne bunkové povrchy a znižuje cytotoxicitu pre ľudské bunky. Na záver treba dodať, že aktivity líšiace sa o jedno riedenie je treba, s ohľadom na presnosť stanovenia ± 1 riedenie, považovať za totožné.

Tabuľka 1: Prehľad pripravených derivátov 2-metoxybenzanilidu **3** a ich *in vitro* antimykobakteriálne vlastnosti.

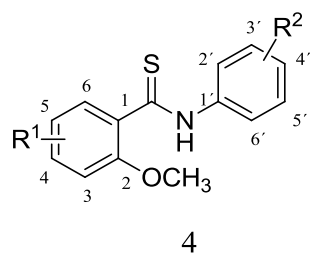


3

R ¹	R ²	MIC [μmol/l]										
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96			
		dni										
		14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
3a	4-Cl	3'-NO ₂	125	125	125	125	125	250	250	125	125	125
3b	4-Cl	4'-NO ₂	250	250	250	250	125	250	250	125	125	125
3c	4-Cl	3'-Cl	125	125	8	32	8	32	32	62,5	62,5	125
3d	4-Cl	4'-Cl	125	125	8	32	8	16	62,5	8	16	62,5
3e	4-Cl	3',4'-di-Cl	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
3f	4-Cl	3'-Br	250	250	125	125	125	125	125	125	125	125
3g	4-Cl	4'-Br	62,5	125	8	32	4	8	32	4	8	32
3h	4-Cl	3'-CF ₃	250	250	125	125	125	250	250	125	125	125
3i	4-Cl	4'-CF ₃	125	125	62,5	125	125	125	125	32	125	125
3j	5-Cl	3'-NO ₂	125	125	250	250	125	125	125	125	125	125
3k	5-Cl	4'-NO ₂	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
3l	5-Cl	3'-Cl	250	250	250	250	62,5	250	250	125	250	250
3m	5-Cl	4'-Cl	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	250	250	62,5	125	125
3n	5-Cl	3',4'-di-Cl	125	125	250	250	62,5	250	250	62,5	125	125
3o	5-Cl	3'-Br	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
3p	5-Cl	4'-Br	16	16	16	32	62,5	62,5	62,5	32	62,5	62,5
3q	5-Cl	3'-CF ₃	4	16	125	125	4	4	16	4	4	16
3r	5-Cl	4'-CF ₃	250	250	250	250	125	500	500	62,5	250	250
	INH		0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid.

Tabuľka 2: Prehľad pripravených derivátov 2-metoxytiobenzanilidu **4** a ich *in vitro* antimykobakteriálne vlastnosti.



R ¹	R ²	MIC [μmol/l]										
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96			
		dni										
		14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
4a	4-Cl	3'-NO ₂	8	16	16	16	32	32	62,5	8	16	32
4b	4-Cl	4'-NO ₂	8	32	16	16	16	32	32	16	16	32
4c	4-Cl	3'-Cl	4	16	16	16	16	32	32	16	32	32
4d	4-Cl	4'-Cl	4	16	32	32	32	62,5	62,5	16	32	62,5
4e	4-Cl	3',4'-di-Cl	2	8	32	32	16	32	62,5	16	32	32
4f	4-Cl	3'-Br	32	32	125	125	125	125	125	125	125	125
4g	4-Cl	4'-Br	4	16	16	62,5	32	62,5	62,5	16	32	62,5
4h	4-Cl	3'-CF ₃	4	8	32	32	16	32	32	16	32	32
4i	4-Cl	4'-CF ₃	8	16	32	32	16	32	62,5	8	32	32
4j	5-Cl	3'-NO ₂	250	250	250	250	62,5	250	250	62,5	250	250
4k	5-Cl	4'-NO ₂	32	32	250	250	125	250	250	125	250	250
4l	5-Cl	3'-Cl	16	16	32	32	8	16	16	16	16	32
4m	5-Cl	4'-Cl	16	16	32	32	8	32	62,5	16	16	32
4n	5-Cl	3',4'-di-Cl	8	8	32	62,5	32	62,5	62,5	62,5	125	125
4o	5-Cl	3'-Br	32	32	32	32	16	32	32	32	32	32
4p	5-Cl	4'-Br	16	16	16	16	62,5	250	250	16	32	32
4q	5-Cl	3'-CF ₃	16	16	32	32	8	16	16	8	16	16
4r	5-Cl	4'-CF ₃	16	16	16	16	8	16	32	8	16	16
	INH		0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid.

Tabuľka 3: Schopnosť 2-metoxybenzanilidov **3** a ich tio analogov **4** inhibovať enzým ICL1. Koncentrácia všetkých testovaných a kontrolných zlúčenín bola 10 µmol/l.

	% inhibície	štandardná odchýlka		% inhibície	štandardná odchýlka
3a	20	± 2,08	4a	14	± 2,08
3b	14	± 1,40	4b	15	± 1,90
3c	17	± 0,81	4c	22	± 2,09
3d	17	± 1,54	4d	18	± 2,20
3e	17	± 1,70	4e	22	± 1,07
3f	17	± 3,03	4f	15	± 0,79
3g	17	± 2,35	4g	22	± 1,12
3h	9	± 2,73	4h	22	± 1,66
3i	16	± 1,86	4i	31	± 2,08
3j	9	± 3,09	4j	12	± 2,83
3k	17	± 1,29	4k	11	± 1,42
3l	11	± 3,78	4l	22	± 2,51
3m	9	± 5,99	4m	21	± 4,53
3n	9	± 3,93	4n	23	± 3,49
3o	13	± 4,87	4o	24	± 1,81
3p	21	± 2,45	4p	19	± 2,51
3q	11	± 3,71	4q	18	± 1,59
3r	10	± 3,08	4r	21	± 4,98
3-NPA	25	± 4,13	3-NPA	25	± 4,13
ETA	0	0	ETA	0	0
INH	0	0	INH	0	0

3-NPA – 3-nitropropiónová kyselina, ETA – etionamid, INH – izoniazid

Tabuľka 4: Cytotoxicita a index selektivity najaktívnejších 2-metoxytiobenzanilidov **4**.

	IC ₅₀ [µmol/l]	SI, My 331/88, 14 dní
4c	11,68	2,92
4d	2,93	0,73
4e	6,50	3,25
4g	3,55	0,89
4i	1,81	0,45

SI (index selektivity) = IC₅₀/MIC *M. tuberculosis* 331/88, 14dni.

5.2. Deriváty 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho tioxo analogu

5.2.1. Biologické vlastnosti derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho tioxo analogu

Tieto látky predstavujú rozšírenie skupiny antimykobakteriálne účinných derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu pripravenej v rámci vypracovania mojej diplomovej práce¹⁰⁰. Na tieto zlúčeniny sa dá pozerat' ako na acyklické analogy 2-(2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazolových derivátov. V rámci tejto dizertačnej práce bolo pripravených ďalších 16 derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu **9** a 14 derivátov jeho tio analogu **11** (Tabuľka 5 a 6). Substituenty na oboch aromatických jadrách boli rovnaké ako u predošlej skupiny látok (vis. kapitola 5.1.).

Pre prípravu amidov **9** bol najskôr použitý kondenzačný postup s *in situ* prípravou chloridu kyseliny (vis. Experimentálna časť, kapitola 4.1.2., postup prípravy benzanilidov A). Ten však vyžadoval zvýšenú reakčnú teplotu, čo vytváralo podmienky pre množstvo vedľajších reakcií a viedol k zložitým reakčným zmesiam s nízkym výťažkom cieľových látok **9**. Ako oveľa efektívnejšia metóda prípravy benzanilidov **9** sa preto ukázala dvojstupňová syntéza cez chlorid príslušnej kyseliny **5** ako medziprodukt (vis. Experimentálna časť, kapitola 4.1.3., Schéma 2). Vedľajšou reakciou tohto postupu bola esterifikácia hydroxy skupiny benzanilidu **9**. Z tohto dôvodu boli optimalizované podmienky kondenzácie (reakčná teplota, množstvo a spôsob pridania TEA, spôsob pridania chloridu kyseliny **5**), optimalizácia bola zrealizovaná na príprave 5,5'-dichlor-2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu (**9m**). Výťažky benzanilidov **9**, získaných touto zoptimalizovanou metódou (vis. Experimentálna časť, postup prípravy benzanilidov B), boli v rozmedzí 51-72 %. I napriek tomu boli štyri esterifikované benzanilidy (**10a-10d**) získané v množstve a čistote dostatočnej k stanoveniu ich biologickej aktivity. Potrebné 2-aminofenoly **8**, pokiaľ neboli komerčne dostupné, boli získané z príslušných fenolov **6** nitráciou a následnou redukciou nitro skupiny (vis. Experimentálna časť, Schéma 2).

Syntéza tio analogov **11** benzanilidov **9** bola v porovnaní s prípravou predošlej série tioamidov komplikovaná dvoma skutočnosťami. Po prvé, pri tionácii derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu **9** dochádzalo k tvorbe cyklickej soli s P₄S₁₀. Vzniknutý tio analog **11** bolo preto potrebné z tejto soli uvoľniť pomocou kyslej hydrolýzy (vis. Experimentálna časť, Schéma 2). Táto skutočnosť je reflektovaná odlišným postupom prípravy týchto tio analogov (vis. Experimentálna časť, postup prípravy tiobenzanilidov B). Po druhé

tiokarbonylový atóm uhlíka je elektrofilnejší než karbonylový, čo viedlo k uľahčeniu cyklizácie na deriváty 2-(2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazolu **12** (vis. Experimentálna časť, Schéma 2). Prítomnosť rôznych fosforečných zlúčenín vytvorených v reakčnej zmesi z P₄S₁₀ počas tiónácie mohla tento pochod ďalej urýchľovať. Rýchlosť cyklizačných reakcií taktiež vzrastala pri zahrievaní tioamidov **11** (v tuhom stave pri meraní teploty topenia, v roztoku počas kryštalizácie) ako i na silikagely, čo komplikovalo chromatografickú izoláciu a kryštalizáciu týchto látok. Výťažky pripravených tiobenzanilidov **11** sa pohybovali v rozmedzí (22-49 %), v ekvimolárnom množstve vznikali príslušné deriváty 2-(2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazolu **12**. Tie sa podarilo vo väčšine prípadov vyizolovať v dostatočnom množstve a otestovať ich biologickú aktivitu. Na tieto deriváty sa dá pozeráť ako na cyklické analogy 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidov **9**. Množstvo vznikajúcich benzoxazolových derivátov **12** sa za podmienky zachovania 100% konverzie amidu **9** na tioamid **11** nepodarilo zredukovať použitím 1 ekvivalentu P₄S₁₀ ani skrátením reakčnej doby. Tio analogy nitro derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu (**9a**, **9b**, **9j**, **9k**) sa nepodarilo získať v čistom stave z dôvodu nízkeho rozlíšenia chromatografických zón týchto látok a nemožnosti dosiahnuť 100% konverziu amidov na tioamidy.

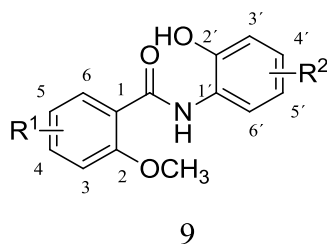
Všetky pripravené benzanilidy **9**, tiobenzanilidy **11** ako i vedľajšie produkty ich syntézy (esterifikované amidy **10**, benzoxazoly **12**) boli otestované na *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu, výsledky prináša Tabuľka 5, 6, 7. V skupine benzanilidov **9** bola väčšia aktivita zistená u derivátov 5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny než u derivátov 4-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny. Výnimku predstavovali deriváty s nitro skupinou v anilinovej časti, tu bola situácia opačná, aktívnejšie boli deriváty 4-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny. V rámci skupiny derivátov 5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny bola ako najlepšia substitúcia anilidovej časti identifikovaná substitúcia 4'/5'-Cl/Br. U týchto derivátov sa taktiež pozitívne prejavilo zavedenie 2'-OH, u ostatných derivátov mala táto obmena nejasný resp. skôr negatívny vplyv. Substitúcia 4'/5'-CF₃/NO₂ alebo 4',5'-di-Cl v anilidovej časti sa ukázala menej vhodná. U tiobenzanilidových derivátov **11** boli zistené podobné aktivity voči všetkým testovaným kmeňom, taktiež aktivity jednotlivých látok sa vzájomne líšili len minimálne. Zaujímavé bolo zistenie, že v prípade derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu **9** mala substitúcia atómu kyslíka amidickej skupiny atómom síry negatívny vplyv na antituberkulotickú aktivitu najaktívnejších derivátov (**9l**, **9m**, **9o**, **9p**). Naopak pozitívny vplyv na antituberkulotickú aktivitu mala táto

izostérna náhrada u derivátov s 4'/5'-CF₃ alebo 4',5'-di-Cl substitúciou anilidovej časti. Porovnaním aktivity 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidových derivátov **11** s aktivitou predošlých 2-metoxytiobenzanilidov **4** (vis. kapitola 5.1.) sa zistilo, že zavedenie 2'-OH skupiny nemá na antimykobakteriálnu aktivitu žiaden vplyv, resp. má negatívny vplyv. Negatívny efekt na antimykobakteriálnu aktivitu mala taktiež cyklizácia benzanilidových derivátov **9** na deriváty 2-(2-metoxyfenyl)benzo[*d*]oxazolu **12**. Naopak čiastočne pozitívny efekt bol pozorovaný u derivátov benzanilidu s esterifikovanou 2'-OH skupinou **10** (u derivátov 5-chlor-2-metoxybenzoovej kyseliny). Všetky pripravené látky s výnimkou **9e** vykázali aktivitu i voči *M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 235/80, ktoré sú INH rezistentné.

Všetky pripravené látky boli otestované i na ich schopnosť pôsobiť ako *in vitro* inhibítory ICL1, výsledky prináša Tabuľka 8. Tiobenzanilidy **11** boli identifikované ako lepšie ICL1 inhibítory než benzanilidy **9**, pričom dva z nich (**11f** a **11m**) dosiahli aktivitu zrovnateľnú s aktivitou štandardnej zlúčeniny, 3-nitropropiónovej kyseliny. Inhibičnú aktivitu voči ICL1 vykázali i esterifikované benzanilidy **10**, ich cyklické analogy **12** však aktívne neboli. Je preto možné vysloviť predpoklad, že pre aktivitu je dôležitá prítomnosť C=O/S skupiny.

Ako veľká nevýhoda väčšiny (tio)benzanilidových derivátov sa ukázala ich značná cytotoxicita (vis. Tabuľka 9). Len dve zlúčeniny (**9l** a **9o**) boli viac toxické pre *M. tuberculosis* než pre ľudské hepatocyty, **9l** s SI po 14 dňoch inkubácie 12,8 a **9o** s SI po 14 dňoch inkubácie 2,0. Taktiež najlepšia inhibícia ICL1 (zlúčeniny **11f** a **11m**) bola pozorovaná pri koncentrácii väčšej než je hodnota IC₅₀ týchto látok.

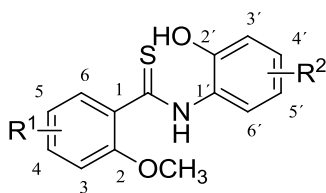
Tabuľka 5: Prehľad pripravených derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu **9** a ich *in vitro* antimykobakteriálne vlastnosti.



R ¹	R ²	MIC [μmol/l]										
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88			<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96		
		dni										
		14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
9a	4-Cl	4'-NO ₂	4	8	32	125	8	8	16	8	16	16
9b	4-Cl	5'-NO ₂	16	32	62,5	125	8	32	32	16	62,5	125
9c	4-Cl	4'-Cl	8	8	62,5	125	62,5	62,5	125	16	62,5	62,5
9d	4-Cl	5'-Cl	125	125	125	125	125	125	125	16	62,5	62,5
9e	4-Cl	4',5'-di-Cl	500	500	>1000	>1000	500	500	500	250	250	250
9f	4-Cl	4'-Br	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
9g	4-Cl	5'-Br	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
9h	4-Cl	4'-CF ₃	250	250	62,5	62,5	^a	250	250	250	250	250
9i	4-Cl	5'-CF ₃	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
9j	5-Cl	4'-NO ₂	500	500	250	250	125	250	250	250	250	250
9k	5-Cl	5'-NO ₂	32	62,5	250	250	8	32	62,5	125	125	125
9l	5-Cl	4'-Cl	4	4	62,5	250	16	32	62,5	8	16	16
9m	5-Cl	5'-Cl	16	32	125	125	4	16	16	8	16	16
9n	5-Cl	4',5'-di-Cl	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
9o	5-Cl	4'-Br	4	8	500	500	500	500	500	250	250	250
9p	5-Cl	5'-Br	8	8	62,5	62,5	4	8	8	4	8	8
9q	5-Cl	4'-CF ₃	500	500	62,5	62,5	^a	250	250	250	250	250
9r	5-Cl	5'-CF ₃	250	250	62,5	125	32	62,5	62,5	62,5	125	125
	INH		0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid, ^a – hodnotu MIC nebolo možné stanoviť.

Tabuľka 6: Prehľad pripravených derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu **11** a ich *in vitro* antimykobakteriálne vlastnosti.

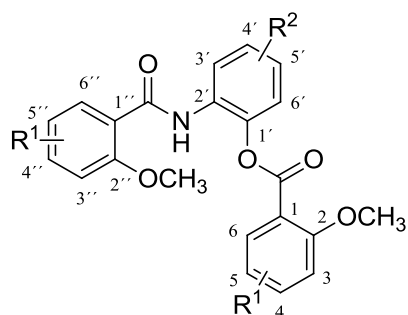


11

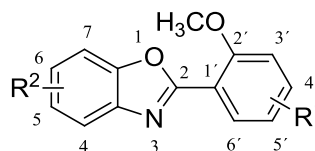
R ¹	R ²	MIC [μmol/l]										
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96			
		dni										
		14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
11a	4-Cl	4'-Cl	16	32	32	32	16	32	62,5	16	32	32
11b	4-Cl	5'-Cl	62,5	62,5	32	32	16	62,5	125	32	62,5	125
11c	4-Cl	4',5'-di-Cl	32	32	62,5	62,5	16	32	62,5	16	32	62,5
11d	4-Cl	4'-Br	16	32	32	32	16	32	62,5	16	32	32
11e	4-Cl	5'-Br	32	32	32	62,5	16	32	62,5	32	32	62,5
11f	4-Cl	4'-CF ₃	32	62,5	62,5	62,5	^a	62,5	62,5	32	62,5	62,5
11g	4-Cl	5'-CF ₃	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
11h	5-Cl	4'-Cl	16	32	32	62,5	16	32	62,5	32	32	32
11i	5-Cl	5'-Cl	16	32	32	32	8	8	16	16	32	32
11j	5-Cl	4',5'-di-Cl	16	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5	16	32	62,5
11k	5-Cl	4'-Br	32	32	62,5	125	16	32	62,5	16	32	32
11l	5-Cl	5'-Br	16	32	32	32	8	16	16	16	16	32
11m	5-Cl	4'-CF ₃	62,5	62,5	32	62,5	^a	62,5	62,5	32	62,5	62,5
11n	5-Cl	5'-CF ₃	32	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5	16	32	32
INH			0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid, ^a – hodnotu MIC nebolo možné stanoviť.

Tabuľka 7: *In vitro* antimykobakteriálne vlastnosti izolovaných esterifikovaných amidov **10** a benzoxazolových vedľajších produktov **12**.



10



12

R ¹	R ²	MIC [μmol/l]										
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96			
		dni										
		14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
10a	4,4''-di-Cl	5'-Cl	4	8	62,5	62,5	16	32	125	8	16	62,5
10b	4,4''-di-Cl	5'-CF ₃	250	250	62,5	62,5	- ^a	250	250	250	250	250
10c	5,5''-di-Cl	4',5'-di-Cl	8	8	62,5	62,5	4	8	8	4	8	8
10d	5,5''-di-Cl	5'-CF ₃	250	250	62,5	62,5	- ^a	8	16	8	8	8
12a	4-Cl	6-Cl	125	125	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
12b	4-Cl	5,6-di-Cl	250	250	250	500	250	250	250	250	250	250
12c	4-Cl	5-Br	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
12d	4-Cl	6-Br	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
12e	4-Cl	6-CF ₃	250	250	125	125	- ^a	250	250	250	250	250
12f	5-Cl	5-Cl	125	125	250	250	250	250	250	250	250	250
12g	5-Cl	5,6-di-Cl	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
12h	5-Cl	5-Br	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
12i	5-Cl	6-Br	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
12j	5-Cl	6-CF ₃	62,5	62,5	250	250	250	250	250	62,5	62,5	62,5
INH			0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid, ^a – hodnotu MIC nebolo možné stanoviť.

Tabuľka 8: Schopnosť pripravených zlúčenín **6-9** inhibovať enzým ICL1. Koncentrácia všetkých testovaných a kontrolných zlúčenín bola 10 $\mu\text{mol/l}$.

	% inhibície	štandardná odchýlka		% inhibície	štandardná odchýlka
9a	0	0	9j	0	0
9b	0	0	9k	0	0
9c	4	$\pm 3,01$	9l	10	$\pm 0,17$
9d	0	0	9m	0	0
9e	0	0	9n	7	$\pm 0,50$
9f	0	0	9o	0	0
9g	0	0	9p	0	0
9h	7	$\pm 2,33$	9q	2	$\pm 0,66$
9i	0	0	9r	0	0
10a	0	0	10c	3	$\pm 1,44$
10b	8	$\pm 2,41$	10d	9	$\pm 2,22$
11a	10	$\pm 2,74$	11h	0	0
11b	9	$\pm 2,28$	11i	0	0
11c	0	0	11j	9	$\pm 3,30$
11d	10	$\pm 1,51$	11k	7	$\pm 1,94$
11e	0	0	11l	8	$\pm 1,37$
11f	23	$\pm 1,36$	11m	21	$\pm 2,14$
11g	0	0	11n	8	$\pm 4,80$
12a	0	0	12f	0	0
12b	0	0	12g	4	$\pm 3,27$
12c	0	0	12h	0	0
12d	0	0	12i	0	0
12e	0	0	12j	0	0
3-NPA	25	$\pm 4,13$	3-NPA	25	$\pm 4,13$
ETA	0	0	ETA	0	0
INH	0	0	INH	0	0

3-NPA – 3-nitropropiónová kyselina, ETA – etionamid, INH – izoniazid

Tabuľka 9: Cytotoxicita vybraných derivátov 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidu **9** a 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidových derivátov **11**.

	IC ₅₀ [$\mu\text{mol/l}$]	SI pre My 331/88, 14 d		IC ₅₀ [$\mu\text{mol/l}$]	SI pre My 331/88, 14 d
9c	7,34	0,92	9l	51,30	12,83
9d	87,02	0,70	9m	- ^a	-
9e	11,52	0,02	9n	2,98	0,02
9f	46,62	0,37	9o	7,98	2,00
9g	5,63	0,05	9p	4,09	0,51
9h	3,90	0,02	9q	4,91	0,01
9i	25,37	0,10	9r	15,43	0,06
11a	5,11	0,32	11h	4,45	0,28
11b	8,49	0,14	11i	8,60	0,54
11c	3,16	0,10	11j	3,72	0,23
11d	3,88	0,24	11k	7,60	0,24
11e	6,53	0,20	11l	8,74	0,55
11f	3,14	0,10	11m	3,69	0,06
11g	5,74	0,18	11n	5,86	0,18

SI (index selektivity) = IC₅₀/MIC *M. tuberculosis* 331/88, 14dni.

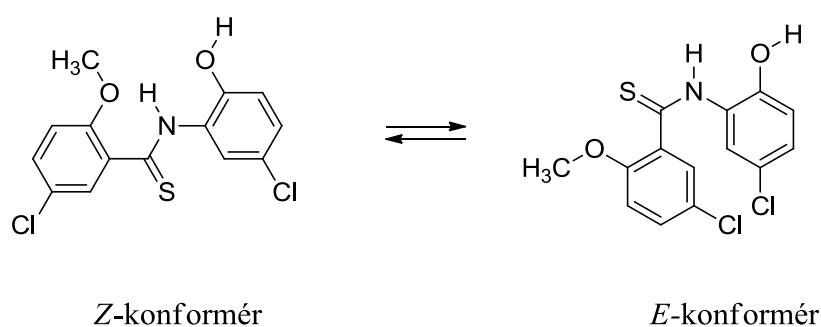
^a – hodnotu IC₅₀ nebolo možné stanoviť.

5.2.2. Stereochemické vlastnosti derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu

V ^1H a ^{13}C NMR spektrách všetkých derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu (látky **11a-11n**) boli prítomné dve série rezonančných signálov (Experimentálna časť, kapitola 4.1.3., Prílohy, Príloha 1-3). Tieto spektrá ako i všetky ostatné spektrá v rámci tejto kapitoly, pokiaľ nebude uvedené inak, boli zmerané pri laboratórnej teplote v roztoku $\text{DMSO-}d_6$. Pomer integrálnych intenzít rezonančných signálov týchto sérií bol približne 1:0,15. V ^{13}C NMR spektrách neboli v niektorých prípadoch pozorované dve kompletne série z dôvodu malej intenzity signálov menej zastúpenej série a z dôvodu vzájomného prekryvania signálov (Experimentálna časť, kapitola 4.1.3.). Prípadné znečistenie tiobenzanilidov **11** východiskovým benzanilidom **9** alebo inou nečistotou bolo vylúčené pomocou vzájomného zrovnania posunov ^1H a ^{13}C NMR rezonančných signálov, IR spektier a elementárnej analýzy. Na základe hodnôt interakčných konštánt, štiepenia rezonančných signálov a hodnôt chemických posunov bolo zistené, že každému protónu látky **11** prináležia dva rezonančné signály: jeden intenzívnejší a jeden menej intenzívny (Experimentálna časť, kapitola 4.1.3., Prílohy, Príloha 1 a 2). V ^1H NMR spektre látky **11i** boli teda dva OH singlety, dva NH singlety, štyri aromatické dublety dubletov, osem aromatických dubletov a dva OCH_3 singlety (Prílohy, Príloha 1 a 2).

S ohľadom na čo najmenšie prekryvanie rezonančných signálov a iné výhodné vlastnosti bola pre ďalšie štúdium vytipovaná látka **11i**. Meraním jej ^1H NMR spektra v $\text{DMSO-}d_6$ roztoku pri rôznych teplotách v rozmedzí 30-100 °C (VT-NMR) bolo zistené postupné vzájomné splývanie oboch sérií rezonančných signálov (Prílohy, Príloha 4-10). K úplnému vzájomnému splynutiu (koalescencii) oboch sérií rezonančných signálov došlo pri teplote 90-100 °C, následným ochladením sa dve série rezonančných signálov opäť obnovili. Z toho možno usudzovať, že dve série NMR rezonančných signálov látky **11i** patria dvom rozdielnym konformáciám molekuly tejto látky. Vzájomná premena oboch konformérov je za laboratórnej teploty dostatočne pomalá, aby jednotlivé konforméry mohli byť pozorované v NMR spektre, súčasne však dostatočne rýchla, aby mohli byť izolované ako chemické indivíduá. Rezonančné signály boli pri koalescenčnej teplote rozšírené a mali zmenenú hodnotu chemického posunu (Prílohy, Príloha 9 a 10), čo je ďalším dôkazom, že existencia dvoch sérií rezonančných signálov má svoj pôvod v obmedzenej rotácii. Naopak, zmena koncentrácie látky **11i** nemala na vzhľad NMR spektra žiaden vplyv. Posuny jednotlivých rezonančných signálov i pomery integrálnych intenzít signálov oboch sérií zostali zachované.

Na základe teoretickej úvahy bol vyslovený predpoklad, že ide o *E* a *Z* konforméry látky **11i** na väzbe CS-NH (Obrázok 18). Tento predpoklad bol potvrdený využitím 2D NMR spektrometrie. Pomocou NOESY NMR spektra bolo zistené, že u hlavného konforméru (*Z* konformér) je prítomná korelácia atómu vodíka CSNH skupiny súčasne na dva aromatické vodíky (H6, H6'), kým u minoritného konforméru (*E* konformér) len na jeden z nich (H6') (Prílohy, Príloha 11). U *E* konforméru je vodík H6 tienený aromatickým jadrom nesúcim vodík H6', resp. tiokarbonylovou skupinou. Prevažnosť *Z* konforméru nad *E* konformérom ako i väčšie odtienenie atómov tvoriacich aromatické jadrá *Z* konforméru je v súlade s teoretickými poznatkami.



Obrázok 18: *E*, *Z* konforméry látky **11i** na väzbe CS-NH.

S pomocou vzťahu pre odhad rýchlostnej konštanty k vzájomnej premeny konformérov (Rovnica 1) bola získaná približná hodnota k pre látku **11i**. Táto bola spolu s koalescenčnou teplotou T_c tejto látky ($T_c = 368$ K, hodnota získaná pomocou VT-NMR) dosadená do Eyringovej rovnice (Rovnica 2). Následným výpočtom bolo zistené, že približná hodnota $\Delta G^\ddagger_{CS-NH}$, energia rotačnej bariéry na väzbe CS-NH, látky **11i** pri koalescenčnej teplote T_c je 75 kJ/mol. Keďže pre rotáciu okolo väzby sa predpokladá, že ΔS^\ddagger je veľmi malé ($|\Delta S^\ddagger| < 40$ J/mol) a teda, že $\Delta G^\ddagger_{CS-NH}$ len veľmi málo závisí na teplote, hodnota $\Delta G^\ddagger_{CS-NH}$ látky **11i** pri laboratórnej teplote je taktiež približne 75 kJ/mol. Hodnota $\Delta G^\ddagger_{CS-NH}$ látky **11i** znamená, že polčas existencie $t_{1/2}$ *E*, *Z* konformérov tejto látky je za laboratórnej teploty rádovo sekundy. Δf v Rovnici 1 je absolútna hodnota rozdielu chemických posunov príslušných rezonančných signálov (rezonančných signálov istého atómu vodíka, napr. H6) oboch konformérov vyjadrená v Hz^{93, 129}.

$$k = 2^{-1/2} \pi \Delta f \quad (\text{Rovnica 1})$$

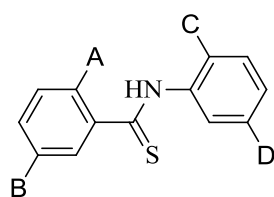
$$\Delta G^\ddagger_{CS-NH} = 0,01914 T_c [10,319 + \log_{10} (T_c k^{-1})] \quad (\text{Rovnica 2})$$

Preskúšaná bola i závislosť pomeru konformérov látky **11i** na druhu rozpúšťadla použitého pri meraní NMR spektra. Prehľad použitých rozpúšťadiel a pomer konformérov látky **11i** v jednotlivých rozpúšťadlách prináša tabuľka 10. Medzi obsahom konformérov a vlastnosťami rozpúšťadla (teplota varu, hustota, viskozita a relatívna permitivita) nebol nájdený lineárny vzťah.

Tabuľka 10: Zastúpenie *Z*, *E* konformérov látky **11i** v rôznych rozpúšťadlách za laboratórnej teploty. Určené na základe integrácie plochy rezonančných signálov ¹H NMR spektra.

Rozpúšťadlo	<i>Z/E</i> v absolútnych %
CDCl ₃	90/10
Acetón- <i>d</i> ₆	97/3
CD ₃ OD	93/7
DMSO- <i>d</i> ₆	87/13
DMF- <i>d</i> ₇	94/6
Pyridín- <i>d</i> ₅	92/8
THF- <i>d</i> ₈	95/5

Zaujímavou skutočnosťou bolo, že súčasný výskyt rezonančných signálov *E* a *Z* konforméru nebol pozorovaný v NMR spektrách 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilidov **9** a 2-metoxytiobenzanilidov **4**. Na základe tohto bol vyslovený predpoklad, že pokiaľ má byť pomocou NMR za vyššie uvedených podmienok súčasne pozorovaný *E* i *Z* konformér látok **11**, je v molekulách týchto látok potrebná prítomnosť tioamidickej funkčnej skupiny a súčasne substitúcia atómu vodíka aspoň jednej *orto* polohy oboch aromatických jadier. Tento predpoklad bol dokázaný pomocou NMR spektier derivátov **11i**. Tieto deriváty boli získané náhradou 2-OCH₃ resp. 2'-OH skupiny atómom vodíka (Obrázok 19: látky **14** a **4I**). V oboch prípadoch bola v NMR spektre prítomná len jedna séria rezonančných signálov. Náhrada oboch atómov chlóru v látke **11i** atómom vodíka (Obrázok 19: látka **16**) nemala naopak na súčasnú pozorovateľnosť oboch konformérov žiaden vplyv. Z toho možno usudzovať, že na ňu nemajú žiaden vplyv substituenty látok **11** nachádzajúce sa v ďalších polohách aromatických jadier (*meta* a *para* poloha). *Orto* substituenty sa môžu na súčasnej pozorovateľnosti oboch konformérov podieľať buď svojou schopnosťou tvoriť intramolekulárne vodíkové väzby alebo svojimi stérickými vlastnosťami (vis. Teoretická časť, kapitola 3.6.). Aby bolo možné rozlíšiť medzi týmito dvoma možnosťami, boli pripravené nasledujúce deriváty **11i** (Obrázok 19: látky **19**, **23** a **27**).



	A	B	C	D
11i	OCH ₃	Cl	OH	Cl
4l	OCH ₃	Cl	H	Cl
14	H	Cl	OH	Cl
16	OCH ₃	H	OH	H
19	Cl	Cl	OH	Cl
23	OCH ₃	Cl	OCH ₃	Cl
27	OCH ₃	Cl	CH ₃	Cl

Obrázok 19: Obmeny látky **11i** (**4l**, **14**, **16**, **19**, **23**, **27**).

V prípade derivátu **19** bola 2-OCH₃ skupina nahradená substituentom 2-Cl. Stérické vlastnosti oboch substituentov sú približne rovnaké (vyjadrené pomocou van der Waalsových polomerov/efektívnych polomerov r_x , $r_{Cl} = 1,80 \text{ \AA}$, $r_{OCH_3} = 1,52 \text{ \AA}^{130}$), atóm chlóru však na rozdiel od metoxy skupiny nie je schopný tvoriť vodíkové väzby. U látky **19** boli v jej NMR spektre pozorované dva konforméry (*E*, *Z*) so zastúpením 90 % *Z* konformér, 10 % *E* konformér a koalescenčnou teplotou medzi 90-100 °C. Obdobná situácia bola pozorovaná i pri náhrade 2'-OH skupiny skupinou 2'-OCH₃ resp. izostérnou 2'-CH₃ (Obrázok 19: látky **23** a **27**, Experimentálna časť, kapitola 4.1.4.). Z predošlého vyplýva, že *ortho* substituent acylovej i anilinovej časti molekuly **11i** prispieva k pozorovanému javu svojimi stérickými vlastnosťami a nie schopnosťou tvoriť intramolekulárne vodíkové väzby. Z NOESY NMR spektra látky **11i** taktiež vyplýva, že u konforméru *Z* sa neuplatňujú silné intramolekulárne vodíkové väzby, prípadne trojstredová vodíková väzba (vis. Teoretická časť, kapitola 3.6.). Tieto interakcie by totiž vyžadovali rovinné usporiadanie aromatického jadra/aromatických jadier a tioamidickej skupiny. Proti takémuto usporiadaniu svedčia korelácie atómu vodíka CSNH skupiny na aromatické vodíky H₃, H₆, H_{3'}, H_{6'} (Prílohy, Príloha 11).

Ďalej bol učený pokus odhaliť mechanizmus, ktorým atóm síry a stérické vlastnosti *ortho* substituentov týchto látok spôsobujú súčasnú pozorovateľnosť *E* i *Z* konforméru. Principiálnym problémom však bola skutočnosť, že atóm síry a *ortho* substituenty súčasne ovplyvňujú veľkosť rotačnej bariéry na väzbe CS-NH i polohu termodynamickej rovnováhy medzi *E* a *Z* konformérom (vis. Teoretická časť, kapitola 3.6.). Z tohto dôvodu prítomnosť len jednej série rezonančných signálov u vyššie zmienených látok (látky **9**, **4l** a **14**) nie je možné interpretovať jednoznačne. Neprítomnosť druhej série rezonančných signálov môže byť primárne spôsobená buď dostatočne nízkou rotačnou bariérou väzby CS-NH a teda rýchlou vzájomnou premenou oboch konformérov alebo termodynamickou rovnováhou, ktorá je jednoznačne posunutá na stranu jedného z konformérov. Rozlíšenie medzi týmito

možnosťami bolo zamýšľané na základe stanovenia hodnoty $\Delta G^\ddagger_{CS-NH}$ látok **9m**, **4l** a **14**. Avšak ani pri teplote $-80\text{ }^\circ\text{C}$ nebola v NMR spektrách týchto látok, zmeraných v roztoku THF- d_6 , pozorovaná druhá séria rezonančných signálov. Nakoľko hlbšie ochladenie nebolo s dostupnou NMR sondou možné, tento problém zostal nevyriešený.

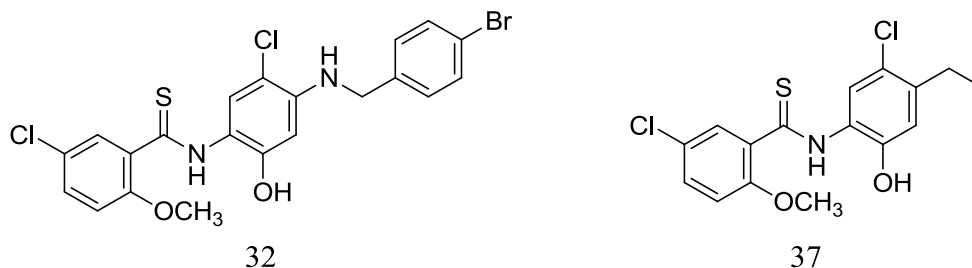
Skutočnosť, že *orto* substituenty molekuly **11i** podmieňujú súčasnú pozorovateľnosť *E* a *Z* konforméru na väzbe CS-NH nastolila otázku do akej miery tieto substituenty bránia voľnej rotácii na väzbe Ar-CSNH resp. Ar-NHCS alebo lepšie povedané aké sú konformačné pomery na týchto väzbách u *E* a *Z* konforméru **11i**. Teoreticky vzaté, u molekuly **11i** pripadali z tohto pohľadu do úvahy celkom tri stereochemicky významné možnosti konformačného chovania:

- a) obe aromatické jadrá a tioamidická skupina ležia v jednej rovine, pričom rotačná bariéra na oboch vyššie zmienených väzbách je dostatočná na obmedzenie voľnej rotácie. Táto situácia je možná pokiaľ sú *orto* substituenty dostatočne malé a schopné tvoriť dostatočne pevné intramolekulárne vodíkové väzby. Takéto planárne usporiadanie má rovinu symetrie a táto konformácia je preto achirálna (vis. Teoretická časť, kapitola 3.6.). U látky **11i** je toto priestorové usporiadanie možné u *Z* konforméru.
- b) aromatické jadro/á a tioamidická skupina zvierajú nenulový torzný uhol, pričom rotácia okolo väzby/väzieb tioamidickej skupiny k aromatickému jadrú/aromatickým jadrám je obmedzená. Táto situácia môže nastať, pokiaľ sú *orto* substituenty v molekule **11i** dostatočne veľké. Takáto konformácia základného stavu nemá žiadny prvok symetrie a je preto chirálna. Pokiaľ je rotácia na väzbe k aromatickému jadrú dostatočne pomalá môže sa chiralita i manifestovať, s najväčšou pravdepodobnosťou by v tomto prípade išlo o tranzientnú chiralitu (vis. Teoretická časť, kapitola 3.6.). Takéto priestorové usporiadanie je možné u *E* i *Z* konforméru látky **11i**.
- c) na oboch väzbách Ar-CSNH a Ar-NHCS je možná v podstate voľná rotácia.

Situácia podľa bodu a) bola vylúčená na základe NOESY NMR spektra látky **11i**, keď bola pozorovaná korelácia atómu vodíka CSNH skupiny na aromatické atómy vodíka H3, H6, H3' a H6' (Prílohy, Príloha 11). Tento nález sa dá vysvetliť buď tak, že nastal prípad b) alebo c).

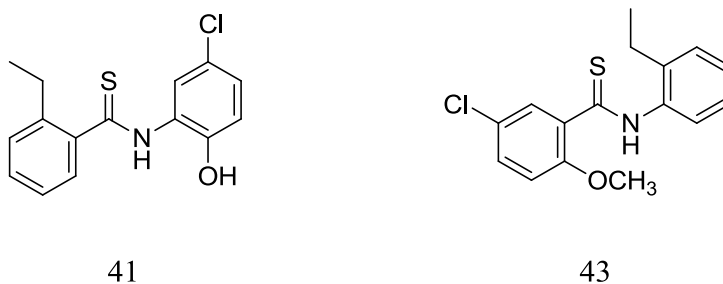
Rozlíšenie medzi situáciou b) a c) bolo dosiahnuté na základe dôkazu prítomnosti resp. neprítomnosti axiálnej chiralít (vlastnosti vyplývajúcej z priestorového usporiadania b)). Existencia axiálnej chiralít dokazuje usporiadanie b), neprítomnosť axiálnej chiralít naopak usporiadanie c). Molekula **11i** bola modifikovaná zavedením etyl resp. *p*-brombenzylamino skupiny (obe obsahujú prochirálny atóm uhlíka). Tieto skupiny boli zavedené na také miesto molekuly, aby boli pokiaľ možno čo najbližšie študovaným väzbám (Ar-CSNH, Ar-NHCS, potenciálne osi chiralít) a súčasne, aby čo najmenej ovplyvňovali študované konformačné pomery. Následne boli pomocou NMR spektrometrie sledované geminálne metylénové vodíky etyl resp. *p*-brombenzylamino skupiny. Princíp tejto metódy, využívajúcej metylénovú skupinu ako sondu chiralít, spočíval v nasledujúcej úvahe. Pokiaľ nastane situácia b) a metylénová skupina je dostatočne blízko k ose chiralít (väzba Ar-CSNH alebo Ar-NHCS) bude každý atóm vodíku CH₂ skupiny vystavený inému priemernému chemickému okoliu. V dôsledku toho sa uvedené vodíkové atómy stanú čo do chemického posunu magneticky neekvivalentné (anizochronné), konkrétne diastereotopické a každý z nich bude mať v NMR spektre svoj vlastný rezonančný signál. Naopak, pokiaľ bude rotácia na vyššie zmienených väzbách v dostatočnej miere voľná, situácia c), bude súčasne s rotáciou dochádzať i k vzájomnej premene oboch "enantiomérov" a oba atómy vodíka metylénovej skupiny budú mať identické priemerné chemické okolie. V dôsledku toho budú oba atómy vodíka čo do chemického posunu magneticky ekvivalentné (izochronné) a oba budú mať v NMR spektre jeden spoločný rezonančný signál ¹³¹.

Prvé pokusy o implementáciu tejto metódy boli uskutočnené na látkach **32** a **37** (Obrázok 20). Umiestnenie etyl resp. *p*-brombenzylamino skupiny do polohy *para* voči väzbe Ar-NHCS bolo zvolené z dôvodu minimálneho stérického ovplyvnenia pomerov v študovanej oblasti (Ar₁-CS-NH-Ar₂). Ani v jednom prípade však nebola u *E* ani u *Z* konforméru pozorovaná magnetická neekvivalencia chemických posunov geminálnych vodíkov. Za možnú príčinu tohto neúspechu bola považovaná veľká vzdialenosť medzi potenciálnou osou chiralít a geminálnymi vodíkmi a teda málo rozdielne priemerné chemické okolie.



Obrázok 20: Obmeny látky **11i**: látky **32** a **37**.

Pri ďalšom pokuse bola modifikovaná acylová časť molekuly tiobenzanilidu **11i**. Tento krát bola 2-OCH₃ skupina nahradená izostérnou etyl skupinou, látka **41** (Obrázok 21). Taktiež bola vyskúšaná náhrada 2'-OH skupiny za 2'-etyl skupinu, látka **43** (Obrázok 21). Ani u jednej z týchto obmien, i napriek najväčšej možnej blízkosti prochirálnnej skupiny, nebola v NMR spektre zmeranom v DMSO-*d*₆ roztoku za laboratórnej teploty prítomná diastereotopicitá geminálnych atómov vodíka. Zaujímavé však bolo zistenie, že u látky **41** i **43** došlo k výraznému poklesu v zastúpení *E*-konforméru, v oboch prípadoch pokles na 5 % (vis. Experimentálna časť, kapitola 4.1.4.). Táto skutočnosť, ktorá je v súlade s publikovanými štúdiami ⁸¹, znemožnila prípadné posúdenie konformácie na väzbe Ar-CSNH resp. Ar-NHCS tohto konforméru. Súčasne táto skutočnosť dokazuje, že vyššie uvedené modifikácie molekuly **11i** predstavujú obmenu priestorovo objemnejším substituentom, čo bolo pre štúdium konformačného správania látok **11** neželané.



Obrázok 21: Obmeny látky **11i**: látky **41** a **43**.

V snahe dosiahnuť diastereotopicitu vodíkov metylénovej skupiny bola vyskúšaná zmena rozpúšťadla pre NMR meranie. Z literatúry je totiž dobre známe, že značný vplyv na rozdiel chemických posunov medzi jednotlivými diastereotopickými skupinami ($\Delta\delta_{AB}$) má i rozpúšťadlo ¹³¹. Miesto DMSO-*d*₆ bol použitý THF-*d*₈. Ani v tomto prípade, však nebol dosiahnutý želaný cieľ. Následne boli zmerané NMR spektrá látky **41** v THF-*d*₈ roztoku pri rôznych teplotách v rozmedzí -80-20 °C, avšak ani pri teplote -80 °C nebola pozorovaná diastereotopicitá vodíkov CH₂ skupiny. Túto skutočnosť možno interpretovať tak, že ani pri teplote -80 °C nedôjde k dostatočnému spomaleniu rotácie okolo väzby Ar-CSNH, v dôsledku čoho sú oba atómy vodíka CH₂ skupiny vystavené rovnakému priemernému chemickému okoliu.

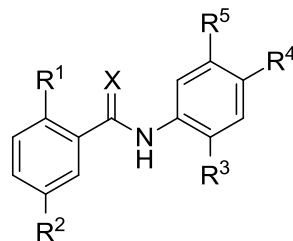
Na základe vyššie uvedených experimentálnych výsledkov možno vyvodit' záver, že príčinou pozorovania *E*, *Z* konformérov látok **11** v NMR spektrách sú okrem vlastností tioamidickej skupiny i stérické efekty *ortho* substituentov. Ďalej, rotácia okolo väzieb Ar-

CSNH a Ar-NHCS je u *E*, *Z* konformérov látok **11** možná bez výraznejšieho obmedzenia (prípád c) vis. vyššie). Ani pri náhrade 2-OCH₃ skupiny stéricky objemnejšou 2-Et skupinou (efektívne polomery sú 1,52 resp. 2,15 Å¹³⁰) alebo 2'-OH skupiny objemnejšou 2'-Et skupinou nebola totiž pozorovaná žiadna diastereotopicita atómov vodíka CH₂ skupiny. Táto skutočnosť je v súlade s niekoľko málo článkami, ktoré boli publikované o probléme axiálnej chiraloty tiobenzanilidových derivátov. Na základe poznatkov o amidových analogoch sa dá uzavrieť, že *orto* substituenty resp. atóm vodíka NH skupiny látok **11** sú príliš malé, aby bola rotácia okolo väzieb Ar-CSNH a Ar-NHCS významne obmedzená. Výsledky tým potvrdzujú doposiaľ známy fakt, že axiálna chiralita je u (thio)benzanilidov možná len v prípade terciárnych (tio)benzanilidov.

Pripravené obmeny látky **11i** ako i medziprodukty prípadne vedľajšie produkty ich syntézy boli otestované na antimykobakteriálnu aktivitu a schopnosť inhibovať ICL1. Výsledky sú prezentované v Tabuľkách 11-13.

Táto séria látok je príliš nesúrodá, aby bolo možné vyvodit' nejaké vzťahy medzi štruktúrou a biologickou aktivitou. Za zmienku však stojí antimykobakteriálna aktivita látok **15** a **18**. Látka **15** je 2-metoxy-2'-hydroxybenzanilid a všetky testované kmene vykazujú voči tejto látke rezistenciu. To dakazuje význam substitúcie aromatických jadier v predošlých sériách benzanilidov. Látka **18** naopak vykazuje pomerne dobrú aktivitu voči obom kmeňom *M. kansasii* (MIC = 1 μmol/l). Látky **28** a **37** sú látkami s najlepšou schopnosťou inhibovať enzým ICL1 pripravené v tejto práci. Látka **28** dosahuje 220 % a látka **37** 132 % inhibičného potenciálu štandardnej látky, 3-nitropropiónovej kyseliny. S ohľadom na ďalšie výsledky získané v tejto práci sa dá vyvodit' záver, že na zvýšenie *in vitro* ICL1 inhibičnej aktivity (tio)benzanilidových derivátov má pozitívny vplyv substitúcia anilínovej časti v polohe *para*.

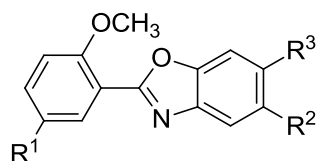
Tabuľka 11: *In vitro* antimykobakteriálna aktivita obmien látky **11i** a medziproduktov ich syntézy.



X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	MIC [μmol/l]										
						<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96			
						dni										
						14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
14	S	H	Cl	OH	H	Cl	62,5	62,5	62,5	125	62,5	125	125	62,5	125	125
19	S	Cl	Cl	OH	H	Cl	32	62,5	32	62,5	4	8	16	4	8	8
23	S	OMe	Cl	OMe	H	Cl	250	250	500	500	250	250	250	250	250	250
27	S	OMe	Cl	Me	H	Cl	32	62,5	250	250	250	250	250	250	250	250
32	S	OMe	Cl	OH	^a	Cl	250	250	250	500	125	250	500	250	250	500
37	S	OMe	Cl	OH	Et	Cl	32	62,5	62,5	62,5	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
41	S	Et	H	OH	H	Cl	62,5	62,5	62,5	62,5	32	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
43	S	OMe	Cl	Et	H	H	32	62,5	62,5	62,5	32	62,5	125	62,5	62,5	125
13	O	H	Cl	OH	H	Cl	62,5	62,5	250	250	16	32	62,5	8	16	32
15	O	OMe	H	OH	H	H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
18	O	Cl	Cl	OH	H	Cl	32	62,5	32	32	1	1	2	1	1	1
22	O	OMe	Cl	OMe	H	Cl	>1000	>1000	500	500	250	250	250	250	250	250
26	O	OMe	Cl	Me	H	Cl	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
28	O	OMe	Cl	OH	NO ₂	Cl	16	16	125	125	8	16	16	16	16	32
36	O	OMe	Cl	OH	Et	Cl	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
40	O	Et	H	OH	H	Cl	62,5	62,5	125	125	62,5	62,5	125	62,5	125	125
42	O	OMe	Cl	Et	H	H	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
			INH				0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid, ^a – *p*-brombenzylamino skupina.

Tabuľka 12: *In vitro* antimykobakteriálna aktivita vedľajších produktov syntézy obmien látky **11i**.



R ¹	R ²	R ³	MIC [$\mu\text{mol/l}$]										
			<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> My 6509/96			
			dni										
			14	21	14	21	7	14	21	7	14	21	
17	H	H	H	250	250	125	250	125	125	250	125	125	250
33	Cl	Cl	^a	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
38	Cl	Cl	Et	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	INH			0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	4	4	4

INH – izoniazid, ^a – *p*-brombenzylamino skupina.

Tabuľka 13: Schopnosť obmien látky **11i** a medziproduktov /vedľajších produktov ich syntézy inhibovať enzým ICL1. Koncentrácia všetkých testovaných a kontrolných zlúčenín bola 10 $\mu\text{mol/l}$.

	% inhibície	štandardná odchýlka		% inhibície	štandardná odchýlka
13	14	$\pm 1,38$	28	55	$\pm 1,80$
14	16	$\pm 0,49$	32	20	$\pm 0,52$
15	14	$\pm 1,93$	33	15	$\pm 2,33$
17	11	$\pm 2,42$	36	11	$\pm 1,33$
18	13	$\pm 2,08$	37	33	$\pm 1,63$
19	20	$\pm 1,02$	38	13	$\pm 0,49$
22	16	$\pm 1,78$	40	9	$\pm 4,20$
23	14	$\pm 4,40$	41	11	$\pm 3,53$
26	10	$\pm 3,67$	42	17	$\pm 3,00$
27	18	$\pm 1,75$	43	13	$\pm 0,95$
3-NPA	25	$\pm 4,13$	3-NPA	25	$\pm 4,13$
ETA	0	0	ETA	0	0
INH	0	0	INH	0	0

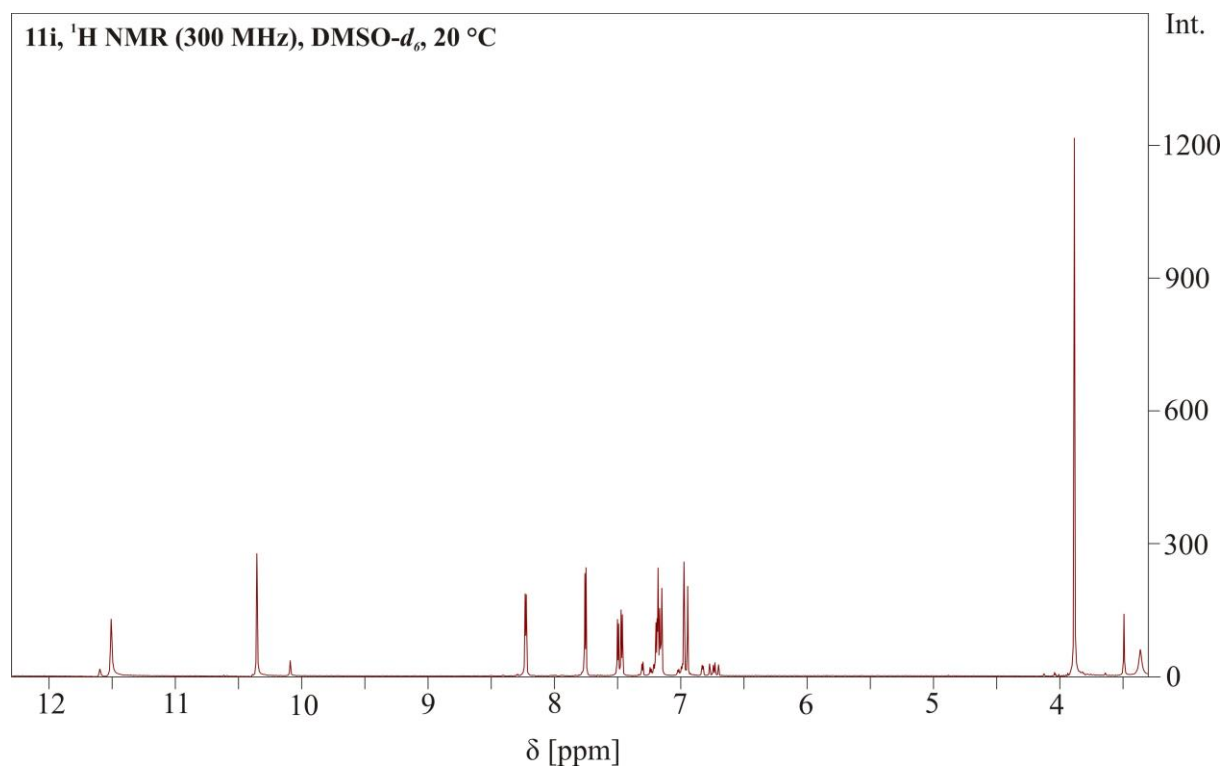
3-NPA – 3-nitropropiónová kyselina, ETA – etionamid, INH – izoniazid.

6. ZÁVER

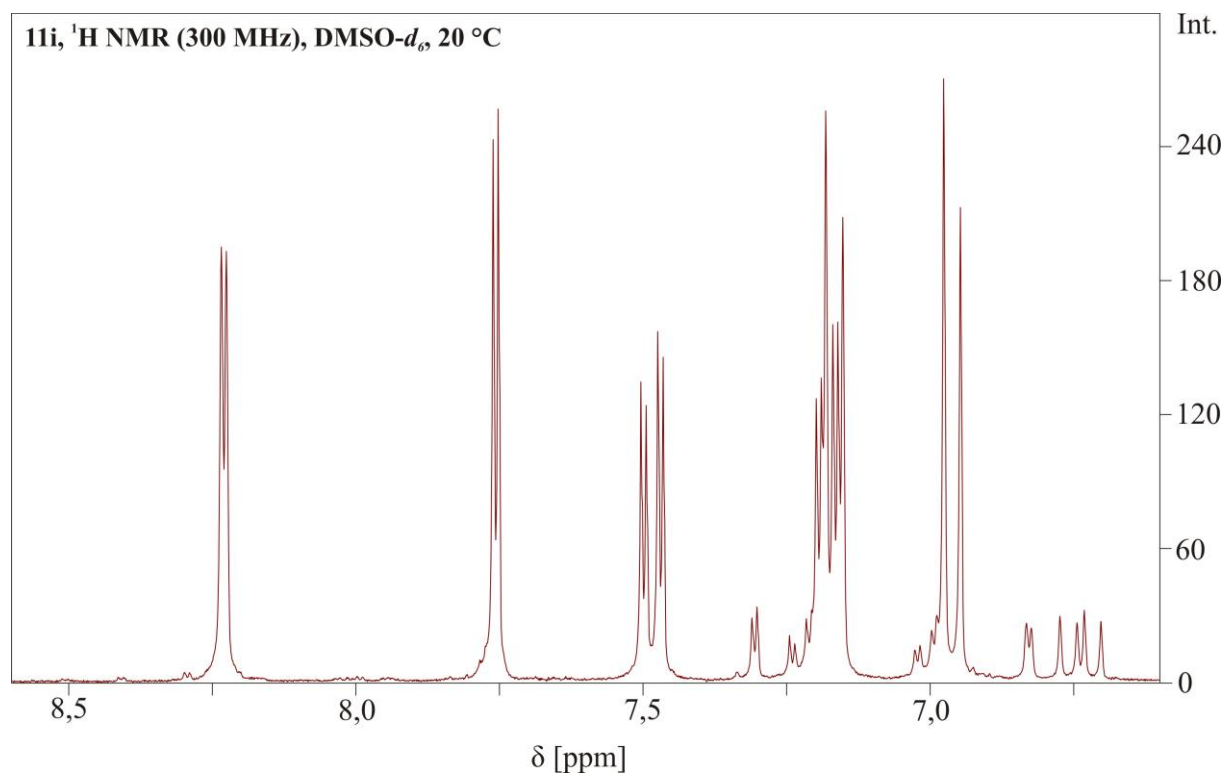
V rámci tejto dizertačnej práce bolo pripravených a otestovaných 100 derivátov benzanilidu respektíve jeho analogov. Z týchto látok bolo 92 originálnych, doposiaľ nepopísaných v literatúre (údaj podľa databázy SciFinder, stav k 31. 1. 2013). U všetkých zlúčenín bola stanovená ich *in vitro* antimykobakteriálna aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *Mycobacterium avium*, a dvom kmeňom *Mycobacterium kansasii*. Všetky testované látky s výnimkou **9e**, **15** a **22** vykázali antimykobakteriálnu aktivitu voči všetkým testovaným kmeňom, táto aktivita však vo všeobecnosti nedosiahla úroveň salicylanilidových derivátov. Pripravené látky boli taktiež otestované ako potenciálne *in vitro* inhibítory ICL1 enzýmu. Niekoľko látok dosiahlo približne inhibičný potenciál štandardnej látky, 3-nitropropiónovej kyseliny a tri látky (**4i**, **28** a **37**) ho prekonal. Na tieto výsledky sa treba pozeráť ako na príspevok k štúdiu antimykobakteriálnych vlastností benzanilidov a ich analogov, ktorý je rozvíjaný na Katedre anorganické a organické chemie Farmaceutickej fakulty UK už niekoľko rokov.

V ďalšej časti práce bolo dokázané, že u derivátov 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidu je možné pozorovať za laboratórnej teploty na tioamidickej väzbe *Z*, *E* konforméry. Pomocou VT NMR bola určená rotačná bariéra tejto väzby na približne 75 kJ/mol, čo znamená, že *E*, *Z* konforméry majú za laboratórnej teploty polčas existencie rádovo sekundy. Táto skutočnosť dokazuje, že tieto konforméry sú za laboratórnej teploty dostatočne stabilné, aby mohli byť pozorované v NMR spektre, súčasne však príliš nestabilné, aby mohli byť izolované ako chemické individuá alebo aby mali podstatný vplyv na biologické vlastnosti pripravených látok. Za možnosť pozorovať v NMR spektre týchto látok súčasne ich *E* i *Z* konformér je zodpovedná tioxo skupina a stérické vlastnosti *orto* substituentov týchto látok. Otázka presného mechanizmu, ktorým sterické vlastnosti *orto* substituentov podmieňujú súčasnú pozorovateľnosť *E* i *Z* priestorového usporiadania týchto tioamidov však, i napriek experimentálnemu úsiliu, nebola zodpovedaná. Preskúmaná bola ďalej rotačná bariéra na zvyšných dvoch stereochemicky významných väzbách molekúl 2-metoxy-2'-hydroxytiobenzanilidov (Ar-CSNH, Ar-NHCS). Získané výsledky dokazujú, že rotácia okolo týchto väzieb je za laboratórnej teploty v podstate bez výraznejšieho obmedzenia, čo vylučuje existenciu tranzientnej axiálnej chiralítity.

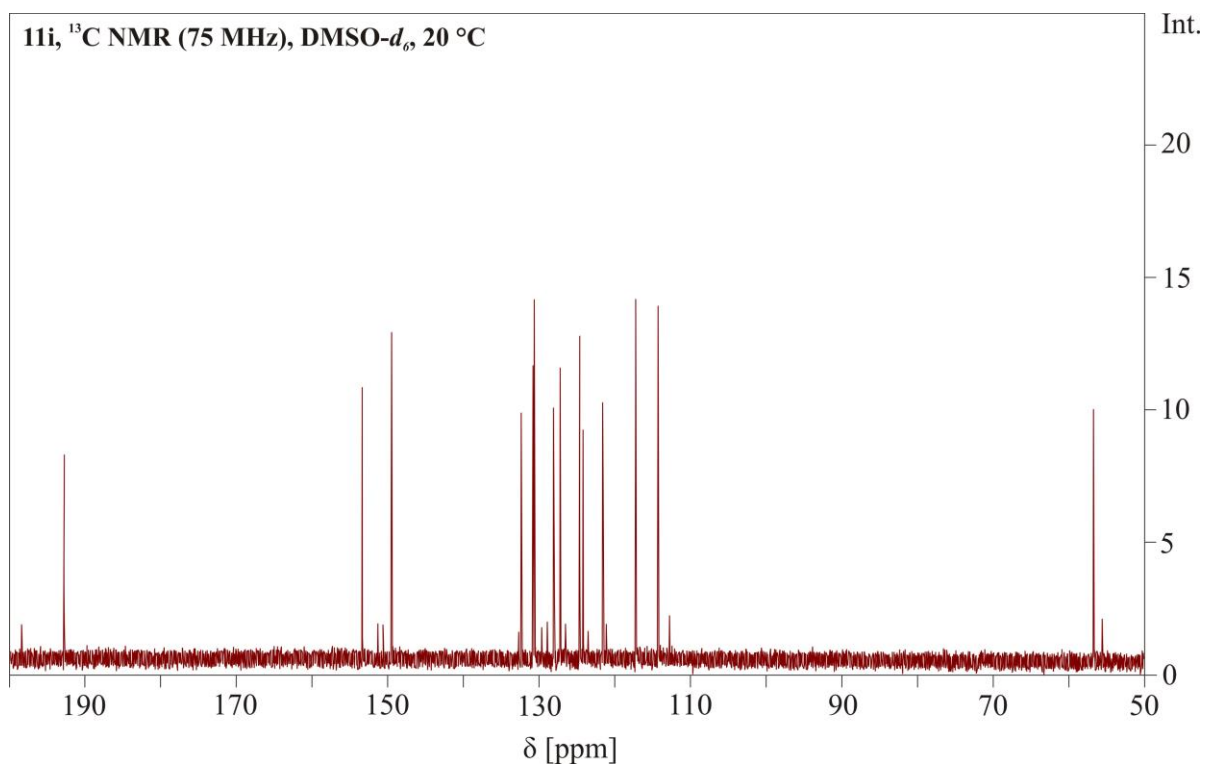
7. PRÍLOHY



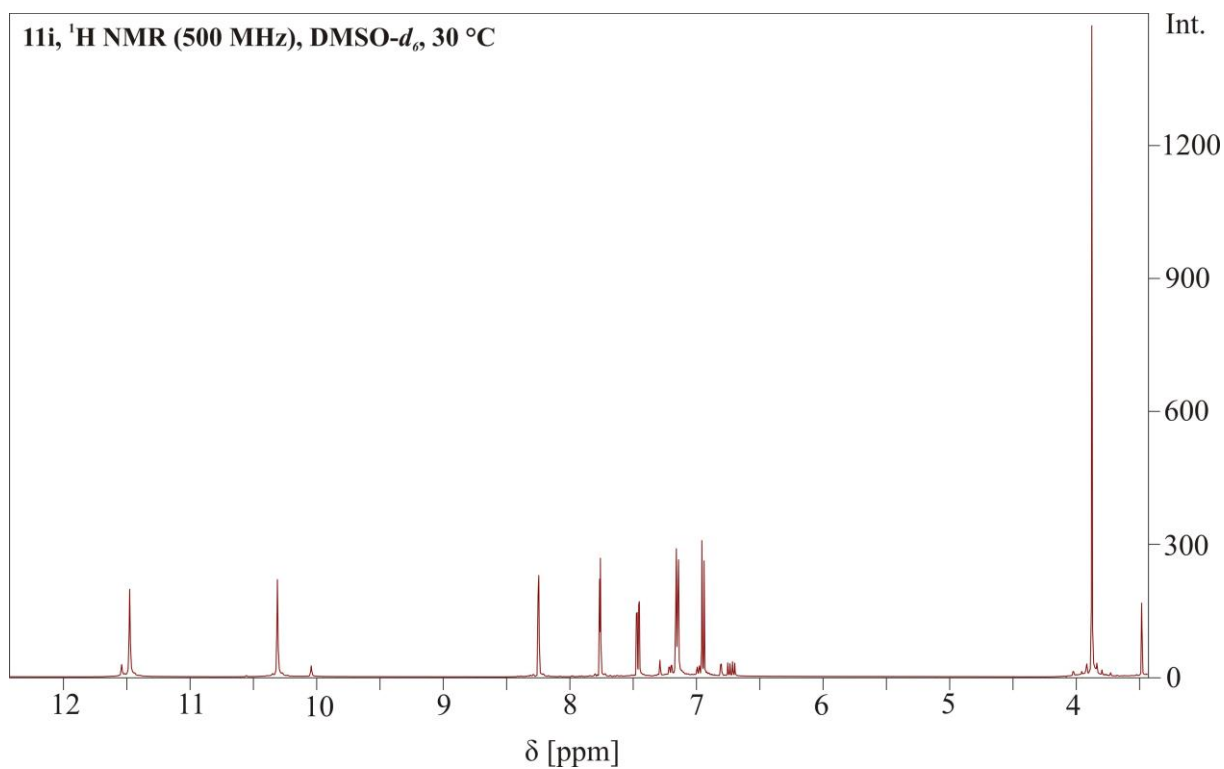
Príloha 1: Ukážkové NMR spektrum látok **11**. ^1H NMR (300 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku $\text{DMSO-}d_6$ pri teplote 20 °C (celkový pohľad).



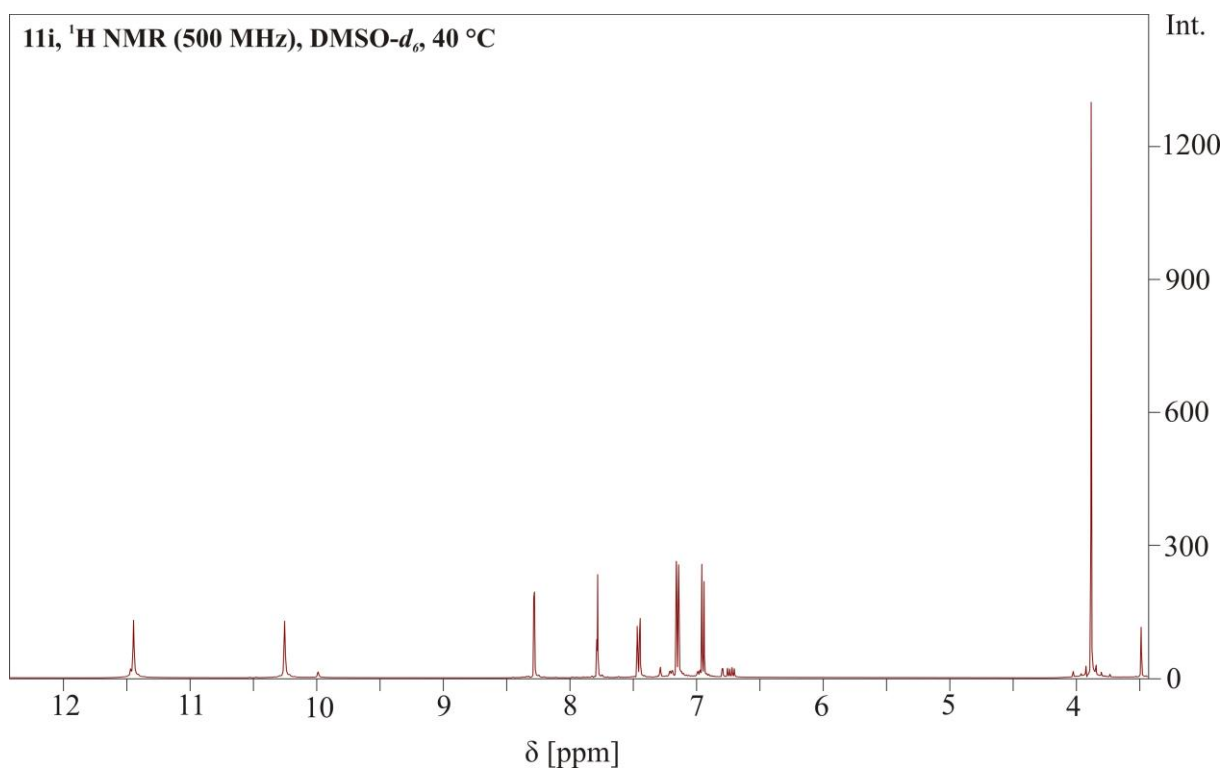
Príloha 2: Ukážkové NMR spektrum látok **11**. ^1H NMR (300 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku $\text{DMSO-}d_6$ pri teplote 20 °C (detail aromatickej oblasti).



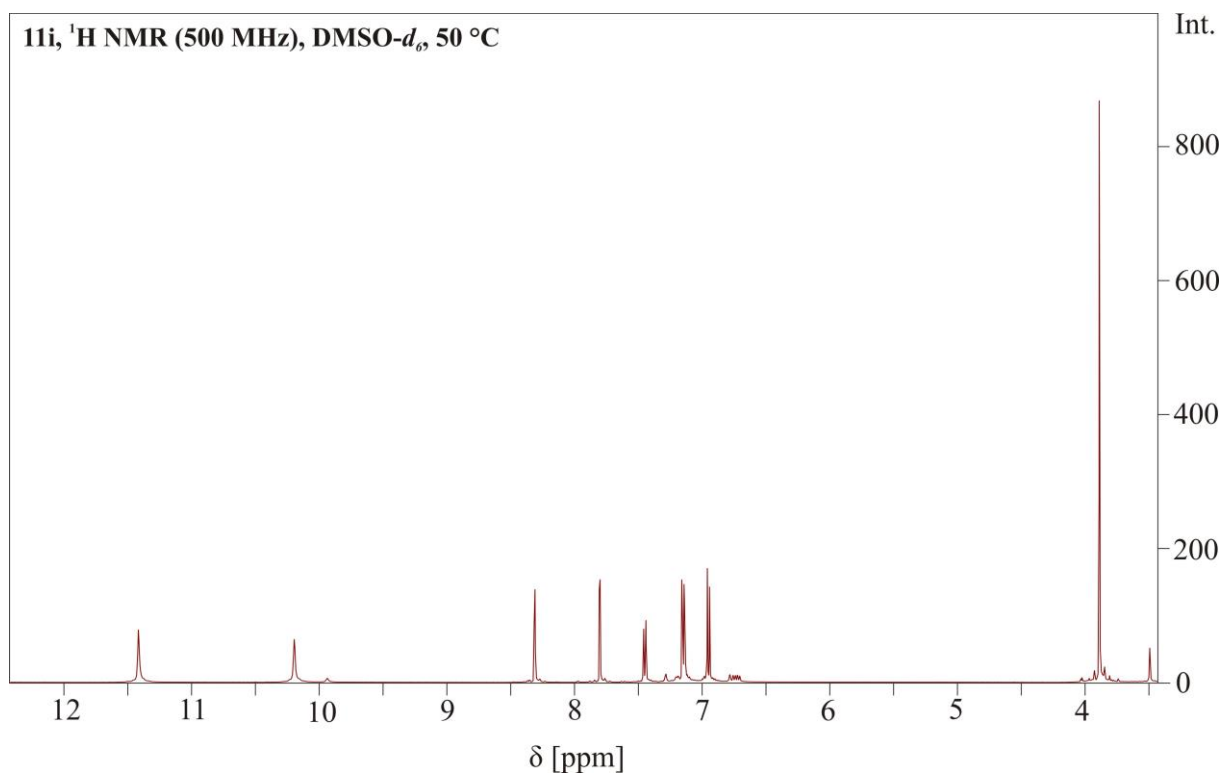
Príloha 3: Ukážkové NMR spektrum látok **11**. ^{13}C NMR (75 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 20 °C (celkový pohľad).



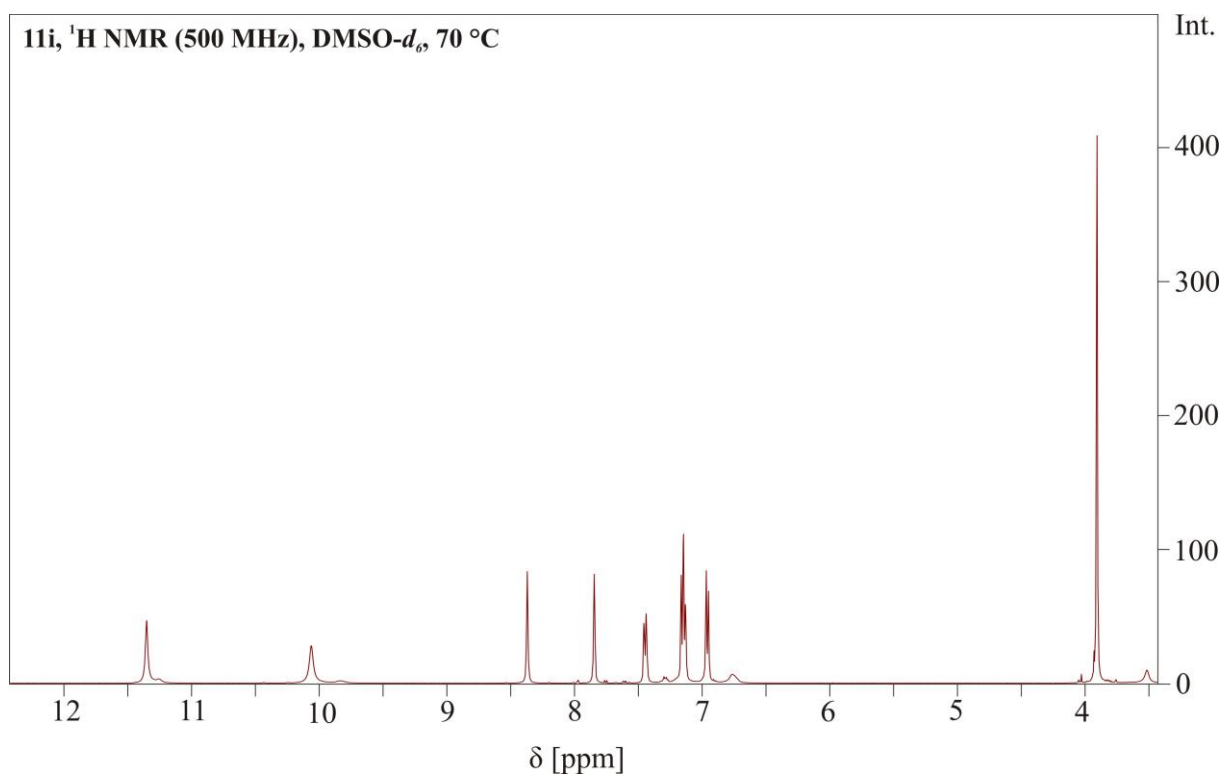
Príloha 4: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 30 °C (celkový pohľad).



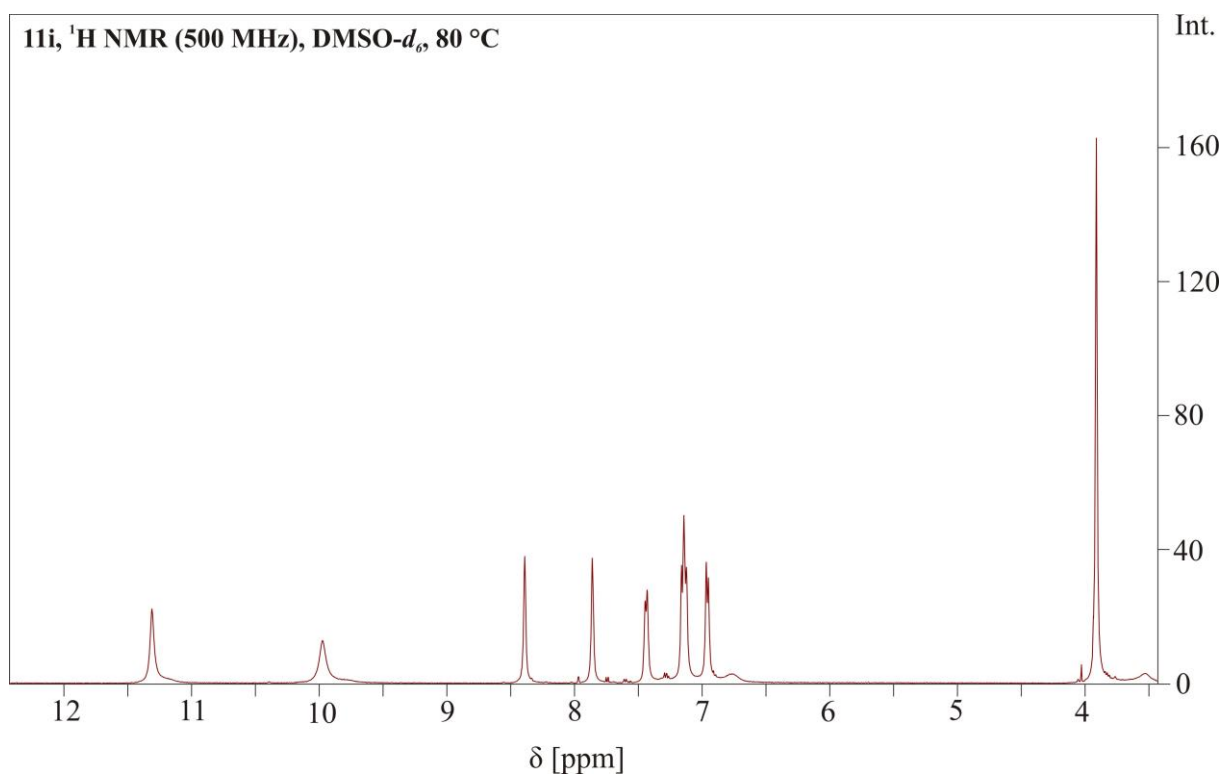
Príloha 5: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 40 °C (celkový pohľad).



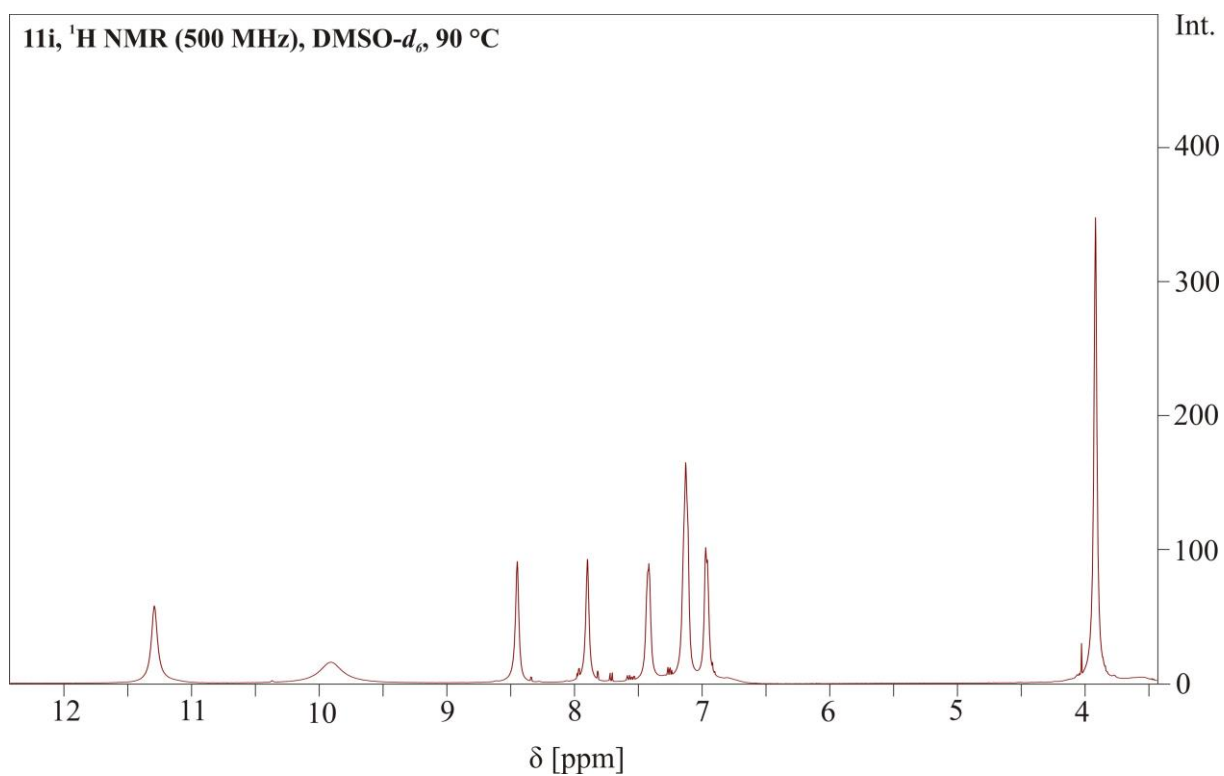
Príloha 6: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 50 °C (celkový pohľad).



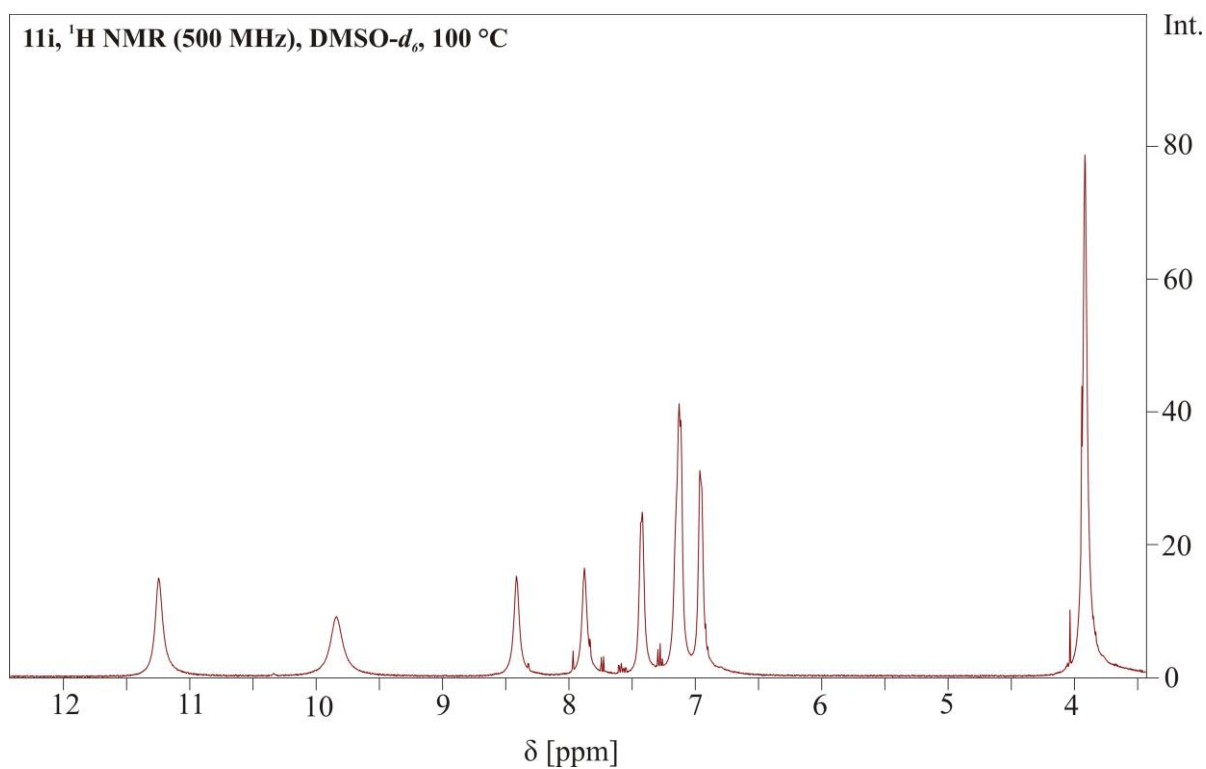
Príloha 7: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 70 °C (celkový pohľad).



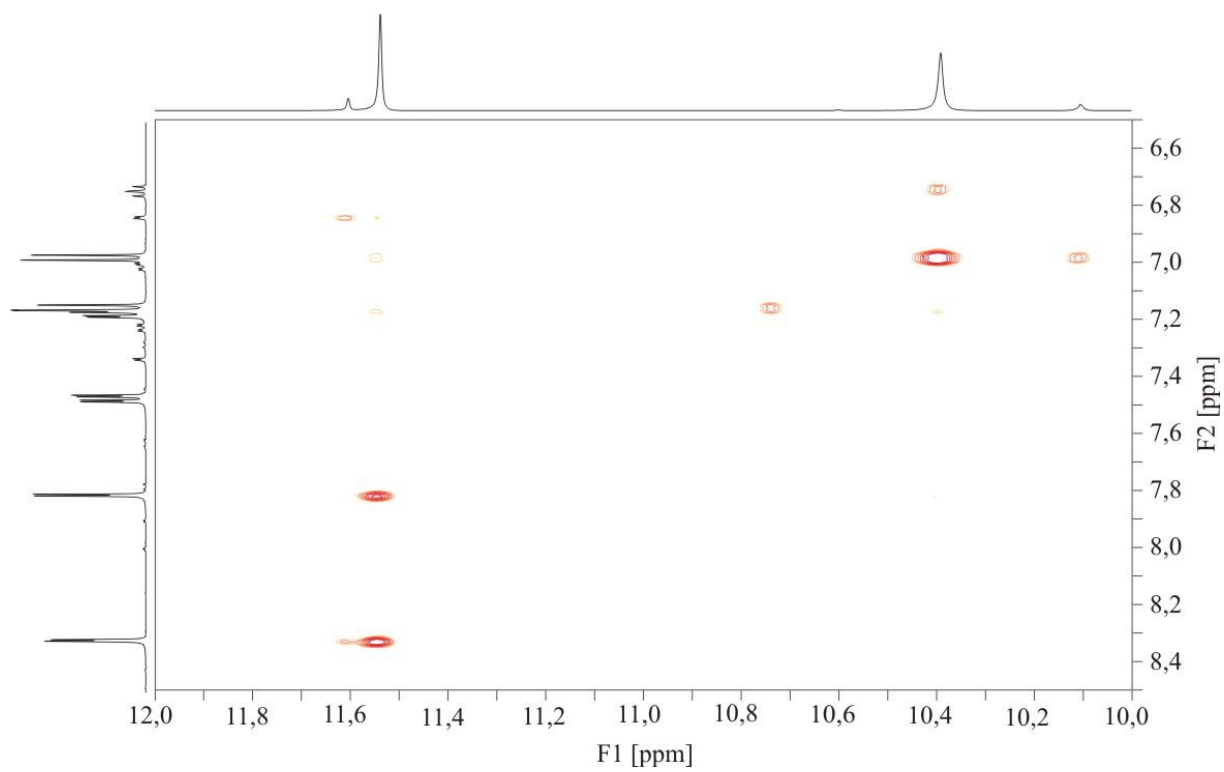
Príloha 8: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 80 °C (celkový pohľad).



Príloha 9: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 90 °C (celkový pohľad).



Príloha 10: ^1H NMR (500 MHz) spektrum látky **11i** zmerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 100 °C (celkový pohľad).



Príloha 11: Časť NOESY NMR (500 MHz) spektra látky **11i** zmeraného v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 20 °C

8. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A PREZENTÁCIÍ

Články v recenzovaných časopisoch:

1. J. Kozic, E. Novotna, M. Volkova, J. Stolarikova, F. Trejtnar, J. Vinsova, Synthesis and *in vitro* antimycobacterial activity of 2-methoxybenzanilides and their thioxo analogues, Eur. J. Med. Chem. 56 (2012) 387-395, DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.07.044 [ISSN 0223-5234, IF₂₀₁₁ = 3.346].

2. J. Kozic, E. Novotna, M. Volkova, J. Stolarikova, F. Trejtnar, V. Wsol, J. Vinsova, Synthesis and *in vitro* antimycobacterial and isocitrate lyase inhibition properties of novel 2-methoxy-2'-hydroxybenzanilides, their thioxo analogues and benzoxazoles, Eur. J. Med. Chem. 56 (2012) 108-119, DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.08.016 [ISSN 0223-5234, IF₂₀₁₁ = 3.346].

Prednášky:

1. J. Kozic, Z. Novák, J. Vinšová, Conformational study of 2-methoxy-2'-hydroxythiobenzanilide derivatives, 3. Postgraduální a 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové 2013.

2. J. Kozic, E. Novotná, J. Stolaříková, J. Vinšová, Derivatives of 2-methoxy-2'-hydroxybenzanilide and its thioxo analogue as antimycobacterial agents, 2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové 2012.

3. J. Kozic, J. Stolaříková, J. Vinšová, Deriváty 2-methoxybenzanilidu a jeho thioxoanalogu ako antimykobakteriálne látky, 1. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové 2011.

Posterové prezentácie:

1. J. Kozic, M. Krátký, J. Stolaříková, J. Vinšová, Synthesis and *in-vitro* antimycobacterial activity of novel benzanilides, thiobenzanilides and side products benzoxazoles, II International Conference on Antimicrobial Research, 21.-23. 11. 2012, Lisabon, Portugal, strana 529.

2. J. Kozic, Z. Rychtarčíková, M. Krátký, J. Stolaříková, J. Vinšová, *In vitro* antimycobacterial activity of selected benzanilides, salicylanilides and thiobenzanilides,

Tuberculosis 2012: Biology, pathogenesis, intervention strategies, 11.-15. 9. 2012, Institut Pasteur, Paris, France, P208.

3. J. Kozic, E. Novotná, J. Stolaříková, J. Vinšová, *In vitro* antimykobakteriálne účinné deriváty 2-methoxy-2'-hydroxybenzanilidu a jeho thioxoanalogu, 41. konferencia Syntéza a analýza liečiv, 10.-12. 9. 2012, Bratislava, Slovensko, Farmaceutický obzor LXXXI(5-6) 111 (2012).

4. J. Kozic, E. Novotná, J. Stolaříková, J. Vinšová, *In vitro* antimykobakteriálne aktívne benzanilidy, 64. Chemický sjezd asociací českých a slovenských spoločností, 25.-27. 6. 2012, Olomouc, Chem. Listy 106 555 (2012), ISSN 0009-2770.

5. J. Kozic, J. Vinšová, J. Stolaříková, Deriváty 2-methoxybenzanilidu a jeho thioxoanalogu ako antimykobakteriálne látky, 63. Zjazd Chemikov, 5.-9. 9. 2011, Tatranské Matliare, Slovensko, ChemZi 7/11 201, ISSN 1336-7242, strana 223-224.

6. J. Kozic, J. Stolaříková, J. Vinšová, *In vitro* antimycobacterial activity of benzanilides and their thioxoanalogues with 2-methoxy group in the acyl moiety, Italian, Austrian, Czech, Greek, Hungarian, Polish, Slovak, Slovenian VII Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 30. 6.-2. 7. 2011, Catania, Italy, zborník strana 177.

7. J. Kozic, J. Vinšová, J. Stolaříková, Salicylanilidy a ich thioxo-analógy s metylovaným salicylovým hydroxylom, 39. Konferencia Syntéza a analýza liečiv, 2.-4. 9. 2010, Modra-Harmónia, Slovensko, Librix eu, ISBN 978-80-7399-986-5, strana 85.

8. J. Kozic, Z. Oktábec, J. Stolaříková, J. Vinšová, Benzamidy – otevřené formy antimykobakteriálně aktivních benzoxazolů, 44. Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, 27.-29. 11. 2009, Nymburk, Chem. Listy 103 999 (2009), ISSN 0009-2770.

9. J. Kozic, J. Vinšová, J. Stolaříková, Benzamidy obsahující hydroxyskupinu v bazické části molekuly jako potenciální antituberkulotika, 38. Konference Syntéza a analýza léčiv, 14.-16. 9. 2009, Hradec Králové, ISBN 978-80-7305-0778-8, strana 103.

9. LITERATÚRA

Zoznam použitej literatúry je spracovaný podľa požiadaviek European Journal of Medicinal Chemistry platných v roku 2012.

-
- ¹ S.V. Gordon, D. Bottai, R. Simeone, T.P. Stinear, R. Brosch, Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants, *BioEssays* 31 (2009) 378-388.
 - ² WHO report 2011, Global tuberculosis control 2011,
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44728/1/9789241564380_eng.pdf
 - ³ WHO report 2012, Global tuberculosis report 2012,
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
 - ⁴ E.J. Rubin, The granuloma in tuberculosis-friend or foe?, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 2471-2473.
 - ⁵ S.D. Lawn, A.I. Zumla, Tuberculosis, *Lancet* 378 (2011) 57-72.
 - ⁶ R.G. Ducati, A. Ruffino-Netto, L.A. Basso, D.S. Santos, The resumption of consumption-A review on tuberculosis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (2006) 697-714.
 - ⁷ D. Alsteens, C. Verbelen, E. Dague, D. Raze, A.R. Baulard, Y.F. Dufrene, Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view, *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 456 (2008) 117-125.
 - ⁸ K. Takayama, C. Wang, G.S. Besra, Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 81-101.
 - ⁹ P.E.A. Da Silva, J.C. Palomino, Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs, *J. Antimicrob. Chemoth.* 66 (2011) 1417-1430.
 - ¹⁰ J. Pieters, *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance, *Cell Host Microbe* 3 (2008) 399-407.
 - ¹¹ J.L. Flynn, J. Chan, What's good for the host is good for the bug, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 98-102.
 - ¹² M.Y. Lin, T.H.M. Ottenhoff, Host-pathogen interactions in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: identification of new targets for tuberculosis intervention, *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders – Drug Targets* 8 (2008) 15-29.
 - ¹³ T. Ulrichs, S.H.E. Kaufmann, Mycobacterial persistence and immunity, *Front. Biosci.-Landmrk.* 7 (2002) 458-469.
 - ¹⁴ D.G. Russell, Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 39-47.
 - ¹⁵ T. Ulrichs, S.H.E. Kaufmann, New insights into the function of granulomas in human tuberculosis, *J. Pathol.* 208 (2006) 261-269.
 - ¹⁶ C.E. Barry 3rd, H.I. Boshoff, V. Dartois, T. Dick, S. Ehrt, J. Flynn, D. Schnappinger, R.J. Wilkinson, D. Young, The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 845-855.
 - ¹⁷ H.I.M. Boshoff, C.E. Barry 3rd, Tuberculosis-metabolism and respiration in the absence of growth, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 70-80.
 - ¹⁸ Y. Zhang, W.W. Yew, M.R. Barer, Targeting persisters for tuberculosis control, *Antimicrob. Agents Ch.* 56 (2012) 2223-2230.
 - ¹⁹ WHO report 2008, Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Emergency update 2008,
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547581_eng.pdf

-
- ²⁰ R.I.J. Amos, B.S. Gourlay, B.F. Yates, C.H. Schiesser, T.W. Lewis, J.A. Smith, Mechanistic investigation of the oxidation of hydrazides isoniazid: implications for the activation of the TB drug isoniazid, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 170-176.
- ²¹ D.A. Rozwarski, G.A. Grant, D.H.R. Barton, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* 279 (1998) 98-102.
- ²² A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, W.R. Jacobs Jr., *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* 263 (1994) 227-230.
- ²³ A. Quemard, J.C. Sacchettini, A. Dessen, C. Vilcheze, R. Bittman, W.R. Jacobs Jr., J.S. Blanchard, Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochemistry-US* 34 (1995) 8235-8241.
- ²⁴ Z. Ying, The magic bullets and tuberculosis drug targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 529-564.
- ²⁵ Y. Zhang, M.M. Wade, A. Scorpio, H. Zhang, Z.H. Sun, Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid, *J. Antimicrob. Chemoth.* 52 (2003) 790-795.
- ²⁶ K. Takayama, J.O. Kilburn, Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*, *Antimicrob. Agents Ch.* 33 (1989) 1493-1499.
- ²⁷ B.A. Wolucka, M.R. McNeil, E. de Hoffmann, T. Chojnacki, P.J. Brennan, Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on Mycobacteria, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23328-23335.
- ²⁸ L.J. Alderwick, M. Seidel, H. Sahm, G.S. Besra, L. Eggeling, Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 15653-15661.
- ²⁹ Q.Q. Huang, R. He, A.P. Kozikowski, Stereochemistry at the forefront in the design and discovery of novel anti-tuberculosis agents, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 810-818.
- ³⁰ H.G. Floss, T.W. Yu, Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis, *Chem. Rev.* 105 (2005) 621-632.
- ³¹ M.A. Arbex, M.D.L. Varella, H.R. de Siqueira, F.A.F. de Mello, Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second-line drugs, *J. Bras. Pneumol.* 36 (2010) 641-656.
- ³² L.E. Connolly, P.H. Edelstein, L. Ramakrishnan, Why is long-term therapy required to cure tuberculosis? *Plos Med.* 4 (2007) 435-442.
- ³³ A.A. Velayati, M.R. Masjedi, P. Farnia, P. Tabarsi, J. Ghanavi, A.H. ZiaZarifi, S.E. Hoffner, Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran, *Chest* 136 (2009) 420-425.
- ³⁴ Y. Zhang, Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis, *Front. Biosci-Landmrk.* 9 (2004) 1136-1156.
- ³⁵ D.J. Murphy, J.R. Brown, Novel drug target strategies against *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Opin. Microbiol.* 11 (2008) 422-427.
- ³⁶ K.H. zu Bentrup, A. Miczak, D.L. Swenson, D.G. Russell, Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 7161-7167.
- ³⁷ E.J. Munoz-Elias, J.D. McKinney, *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence, *Nat. Med.* 11 (2005) 638-644.
- ³⁸ J.D. McKinney, K.H. zu Bentrup, E.J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W.T. Chan, D. Swenson, J.C. Sacchettini, W.R. Jacobs, D.G. Russell, Persistence of *Mycobacterium*

tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase, Nature 406 (2000) 735-738.

³⁹ V. Sharma, S. Sharma, K.H. zu Bentrup, J.D. McKinney, D.G. Russell, W.R. Jacobs, J.C. Sacchettini, Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*, Nat. Struct. Biol. 7 (2000) 663-668.

⁴⁰ M. Lavollay, M. Arthur, M. Fourgeaud, L. Dubost, A. Marie, N. Veziris, D. Blanot, L. Gutmann, J.L. Mainardi, The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by *L,D*-transpeptidation, J. Bacteriol. 190 (2008) 4360-4366.

⁴¹ R. Gupta, M. Lavollay, J.L. Mainardi, M. Arthur, W.R. Bishai, G. Lamichhane, The *Mycobacterium tuberculosis* protein Ldt_{Mt2} is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin, Nat. Med. 16 (2010) 466-470.

⁴² T. Chen, L.M. He, W.Y. Deng, J.P. Xie, The mycobacterium DosR regulon structure and diversity revealed by comparative genomic analysis, J. Cell. Biochem. 114 (2013) 1-6.

⁴³ T.P. Primm, S.J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, C.E. Barry 3rd, The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival, J. Bacteriol. 182 (2000) 4889-4898.

⁴⁴ A. Avarbock, D. Avarbock, J.S. Teh, M. Buckstein, Z.M. Wang, H. Rubin, Functional regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase/hydrolase activities of Rel_{Mtb} from *Mycobacterium tuberculosis*, Biochemistry-US 44 (2005) 9913-9923.

⁴⁵ C.L. Stallings, N.C. Stephanou, L. Chu, A. Hochschild, B.E. Nickels, M.S. Glickman, CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence, Cell 138 (2009) 146-159.

⁴⁶ L.E. Connolly, J.S. Cox, CarD tricks and magic spots: mechanisms of stringent control in Mycobacteria, Cell Host Microbe 6 (2009) 1-2.

⁴⁷ J.L. Dahl, C.N. Kraus, H.I.M. Boshoff, B. Doan, K. Foley, D. Avarbock, G. Kaplan, V. Mizrahi, H. Rubin, C.E. Barry 3rd, The role of Rel_{Mtb}-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice, P. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 10026-10031.

⁴⁸ L.G. Klinkenberg, J.H. Lee, W.R. Bishai, P.C. Karakousis, The stringent response is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs, J. Infect. Dis. 202 (2010) 1397-1404.

⁴⁹ K. Mdluli, M. Spigelman, Novel targets for tuberculosis drug discovery, Curr. Opin. Pharmacol. 6 (2006) 459-467.

⁵⁰ G. Lamichhane, Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs, Trends Mol. Med. 17 (2011) 25-33.

⁵¹ G. Biagi, I. Giorgi, O. Livi, A. Nardi, V. Calderone, A. Martelli, E. Martinotti, O.L. Salerni, Synthesis and biological activity of novel substituted benzanilides as potassium channel activators. V, Eur. J. Med. Chem. 39 (2004) 491-498.

⁵² V. Calderone, A. Coi, F.L. Fiamingo, I. Giorgi, M. Leonardi, O. Livi, A. Martelli, E. Martinotti, Structural modifications of benzanilide derivatives, effective potassium channel openers. X, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 1421-1429.

⁵³ V. Calderone, F.L. Fiamingo, G. Amato, I. Giorgi, O. Livi, A. Martelli, E. Martinotti, New amido derivatives as potential BKCa potassium channel activators. XI, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 792-799.

⁵⁴ L.C. Rovati, A. Giordani, G. Caselli, *N*-phenylbenzamide derivatives as drugs for the treatment of COPD, CA 2514373, 29.7. 2005.

- ⁵⁵ G. Brunhofer, N. Handler, K. Leisser, C.R. Studenik, T. Erker, Benzanilides with spasmolytic activity: chemistry, pharmacology, and SAR, *Bioorgan. Med. Chem.* 16 (2008) 5974-5981.
- ⁵⁶ G. Brunhofer, W.H. Granig, C.R. Studenik, T. Erker, A journey from benzanilides to dithiobenzanilides: synthesis of selective spasmolytic compounds, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 994-1001.
- ⁵⁷ A.E. Philip, J.H. Poupaert, G. Cheve, G. Muccioli, D. Lambert, C.R. McCurdy, Structure-activity relationship of phenytoinergic antiepileptic drugs related to ameltolide, *Med. Chem. Res.* 16 (2007) 130-135.
- ⁵⁸ G. Galley, K. Groebke Zbinden, R. Norcross, H. Stalder, Benzamide derivatives and their use for treating CNS disorders, US 2009/0036420 A1, 5.2. 2009.
- ⁵⁹ H. Stalder, M.C. Hoener, R.D. Norcross, Selective antagonists of mouse trace amine-associated receptor 1 (mTAAR1): discovery of EPPTB (RO5212773), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 1227-1231.
- ⁶⁰ K. Yoshida, Y. Horikoshi, M. Eta, J. Chikazawa, M. Ogishima, Y. Fukuda, H. Sato, Synthesis of benzanilide derivatives as dual acting agents with α_1 -adrenoceptor antagonistic action and steroid 5- α reductase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 2967-2972.
- ⁶¹ H. Sato, O. Kitagawa, Y. Aida, J. Chikazawa, T. Kurimoto, M. Takei, Y. Fukuta, K. Yoshida, Dual acting agents with α_1 -adrenoceptor antagonistic and steroid 5 α -reductase inhibitory activities. Synthesis and evaluation of arylpiperazine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 1553-1558.
- ⁶² K.R. Desai, M.S. Shaikh, E.C. Coutinho, Molecular modeling studies, synthesis and biological evaluation of derivatives of *N*-phenylbenzamide as *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase (*Pf*DHODH) inhibitors, *Med. Chem. Res.* 20 (2011) 321-332.
- ⁶³ T. Ertan, I. Yildiz, S. Ozkan, O. Temiz-Arpaci, F. Kaynak, I. Yalcin, E. Aki-Sener, U. Abbasoglu, Synthesis and biological evaluation of new *N*-(2-hydroxy-4(or 5)-nitro/aminophenyl)benzamides and phenylacetamides as antimicrobial agents, *Bioorgan. Med. Chem.* 15 (2007) 2032-2044.
- ⁶⁴ I.Y. Oren, E. Aki-Sener, C. Ertas, O.T. Arpaci, I. Yalcin, N. Altanlar, Synthesis and microbiological activity of some substituted *N*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)benzamides and phenylacetamides as possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles, *Turk. J. Chem.* 28 (2004) 441-449.
- ⁶⁵ E. Aki-Sener, K.K. Bingol, O. Temiz-Arpaci, I. Yalcin, N. Altanlar, Synthesis and microbiological activity of some *N*-(2-hydroxy-4-substitutedphenyl)benzamides, phenylacetamides and furamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles, *Il Farmaco* 57 (2002) 451-456.
- ⁶⁶ E.A. Sener, K.K. Bingol, I. Oren, O.T. Arpaci, I. Yalcin, N. Altanlar, Synthesis and microbiological activity of some *N*-(*o*-hydroxyphenyl)benzamides and phenylacetamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles: part II, *Il Farmaco* 55 (2000) 469-476.
- ⁶⁷ J.V. Allen, C. Bardelle, K. Blades, D. Buttar, L. Chapman, N. Colclough, A.G. Dossetter, A.P. Garner, A. Girdwood, C. Lambert, A.G. Leach, B. Law, J. Major, H. Plant, A.M. Slater, The discovery of benzanilides as c-Met receptor tyrosine kinase inhibitors by a directed screening approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 5224-5229.
- ⁶⁸ W.P. Hu, H.S. Yu, Y.R. Chen, Y.M. Tsai, Y.K. Chen, C.C. Liao, L.S. Chang, J.J. Wang, Synthesis and biological evaluation of thiobenzanilides as anticancer agents, *Bioorgan. Med. Chem.* 16 (2008) 5295-5302.

- ⁶⁹ A. Imramovsky, J. Vinsova, M.J. Ferriz, V. Buchta, J. Jampilek, Salicylanilide esters of *N*-protected amino acids as novel antimicrobial agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 348-351.
- ⁷⁰ K. Waisser, M. Perina, P. Holy, M. Pour, O Bures, J. Kunes, V. Klimesova, V. Buchta, P. Kubanova, J. Kaustova, Antimycobacterial and antifungal isosters of salicylamides, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 336 (2003) 322-335.
- ⁷¹ D.J. Hlasta, J.P. Demers, B.D. Foleno, S.A. Fraga-Spano, J.H. Guan, J.J. Hilliard, M.J. Macielag, K.A. Ohemeng, C.M. Sheppard, Z.H. Sui, G.C. Webb, M.A. Weidner-Wells, H. Werblood, J.F. Barrett, Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 1923-1928.
- ⁷² M.J. Macielag, J.P. Demers, S.A. Fraga-Spano, D.J. Hlasta, S.G. Johnson, R.M. Kanojia, R.K. Russel, Z.H. Sui, M.A. Weidner-Wells, H. Werblood, B.D. Foleno, R.M. Goldschmidt, M.J. Loeloff, G.C. Webb, J.F. Barrett, Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2939-2945.
- ⁷³ R.J. Martin, Modes of action of anthelmintic drugs, *Vet. J.* 154 (1997) 11-34.
- ⁷⁴ C. Liechti, U. Sequin, G. Bold, P. Furet, T. Meyer, P. Traxler, Salicylanilides as inhibitors of the protein tyrosine kinase epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 11-26.
- ⁷⁵ L. Guo, Q.L. Wang, Q.Q. Jiang, Q.J. Jiang, Y.B. Jiang, Anion-triggered substituent-dependent conformational switching of salicylanilides. New hints for understanding the inhibitory mechanism of salicylanilides, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 9947-9953.
- ⁷⁶ G.S. Hassan, G.H. Hegazy, H.M. Safwat, Synthesis of furo-salicylanilides and their heterocyclic derivatives with anticipated molluscicidal activity, *Arch. Pharm.* 339 (2006) 448-455.
- ⁷⁷ L. Kubicova, K. Kissova, K. Waisser, Inhibition of the chlorophyll production in *Chlorella vulgaris* by substituted salicylanilides, *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* 25 (2000) 67-72.
- ⁷⁸ L. Kubicova, K. Kralova, F. Sersen, J. Gregor, K. Waisser, Effects of substituted salicylanilides on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts, *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* 25 (2000) 89-96.
- ⁷⁹ M.E. Brown, J.N. Fitzner, T. Stevens, W. Chin, C.D. Wright, J.P. Boyce, Salicylanilides: selective inhibitors of interleukin-12p40 production, *Bioorgan. Med. Chem.* 16 (2008) 8760-8764.
- ⁸⁰ J. Clayden, L. Vallverdu, M. Helliwell, Conformational communication between the Ar-CO and Ar-N axes in 2,2'-disubstituted benzanilides and their derivatives, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 2106-2118.
- ⁸¹ D. Ach, V. Reboul, P. Metzner, Benzylic metallation of thiobenzamides and thionaphthamides, *Eur. J. Org. Chem.* (2002) 2573-2586.
- ⁸² S. Dantale, V. Reboul, P. Metzner, C. Philouze, First use of axially chiral thioamides for the stereocontrol of C-C bond formation, *Chem.-Eur. J.* 8 (2002) 632-640.
- ⁸³ D. Ach, V. Reboul, P. Metzner, Atroposelectivity of reactions of benzylic metalated thiobenzamides and thionaphthamides, *Eur. J. Org. Chem.* (2003) 3398-3406.
- ⁸⁴ L. Chabaud, J. Clayden, M. Helliwell, A. Page, J. Raftery, L. Vallverdu, Conformational studies of tertiary oligo-*m*-benzanilides and oligo-*p*-benzanilides in solution, *Tetrahedron* 66 (2010) 6936-6957.
- ⁸⁵ D. Lauvergnat, P.C. Hiberty, Role of conjugation in the stabilities and rotational barriers of formamide and thioformamide. An ab initio valence-bond study, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 9478-9482.

-
- ⁸⁶ Y. Huang, G. Jahreis, G. Fischer, C. Lucke, Atomic polarizability dominates the electronic properties of peptide bonds upon thioxo or selenoxo substitution, *Chem.-Eur. J.* 18 (2012) 9841-9848.
- ⁸⁷ Z.T. Li, J.L. Hou, C. Li, H.P. Yi, Shape-persistent aromatic amide oligomers: new tools for supramolecular chemistry, *Chem.-Asian J.* 1 (2006) 766-778.
- ⁸⁸ I. Huc, Aromatic oligoamide foldamers, *Eur. J. Org. Chem.* (2004) 17-29.
- ⁸⁹ R.D. Parra, H.Q. Zeng, J. Zhu, C. Zheng, X.C. Zeng, B. Gong, Stable three-center hydrogen bonding in a partially rigidified structure, *Chem.-Eur. J.* 7 (2001) 4352-4357.
- ⁹⁰ B. Gong, Hollow crescents, helices, and macrocycles from enforced folding and folding-assisted macrocyclization, *Accounts Chem. Res.* 41 (2008) 1376-1386.
- ⁹¹ P. Bowles, J. Clayden, M. Helliwell, C. McCarthy, M. Tomkinson, N. Westlund, Atroposelectivity in the reactions of ortholithiated aromatic tertiary amides with aldehydes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1997) 2607-2616.
- ⁹² J. Clayden, Atropisomers and near-atropisomers: achieving stereoselectivity by exploiting the conformational preferences of aromatic amides, *Chem. Commun.* (2004) 127-135.
- ⁹³ J. Clayden, Stereocontrol with rotationally restricted amides, *Synlett* (1998) 810-816.
- ⁹⁴ V.M. Potapov, *Stereochemie*, SNTL, Praha, 1986, strana 583.
- ⁹⁵ K. Waissner, O. Bures, P. Holy, J. Kunes, R. Oswald, L. Jiraskova, M. Pour, V. Klimesova, L. Kubickova, J. Kaustova, Relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 336 (2003), 53-71.
- ⁹⁶ N. Isami, M. Yoshihiro, H. Hiroto, G. Makoto, T. Masanori, S. Akira, M. Masayuki, F. Nobusuke, Benzamide derivatives and agricultural chemicals as well as use thereof, JP 2003034671 (A), 7.2. 2003.
- ⁹⁷ S.C. Chaffee, B.K. Albrecht, B.L. Hodous, M.W. Martin, D.C. McGowan, E.F. DiMauro, G. Reddy, V.J. Cee, P.R. Olivieri, A. Reed, K. Romero, Heteroaryl-substituted alkyne compounds and method of use, US 7,776,869 B2, 17.8. 2010.
- ⁹⁸ J.L. Romine, P. Hewawasam, V.K. Gribkoff, S.W. Martin, N.A. Meanwell, J.E. Starrett, Jr., Diphenyl heterocycles as potassium channel modulators, 976554, 25.1. 1999.
- ⁹⁹ R. Dolezal, K. Waissner, E. Petrlikova, J. Kunes, L. Kubickova, M. Machacek, J. Kaustova, H.M. Dahse, *N*-benzylsalicylthioamides: highly active potential antituberculotics, *Arch. Pharm.* 342 (2009) 113-119.
- ¹⁰⁰ J. Kozic, Syntéza antimykrobiálne aktívnych anilidov, diplomová práca, Hradec Králové Farmaceutická fakulta UK 2009 53 strán.
- ¹⁰¹ R. Lok, R.E. Leone, A.J. Williams, Facile rearrangements of alkynylamino heterocycles with noble metal cations, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 3289-3297.
- ¹⁰² D.A. Nugiel, K. Jacobs, L. Cornelius, C.H. Chang, P.K. Jadhav, E.R. Holler, R.M. Klabe, L.T. Bacheler, B. Cordova, S. Garber, C. Reid, K.A. Logue, L.J. Gorey-Feret, G.N. Lam, S. Erickson-Viitanen, S.P. Seitz, Improved P1/P1' substituents for cyclic urea based HIV-1 protease inhibitors: synthesis, structure-activity relationship, and X-ray crystal structure analysis, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1465-1474.
- ¹⁰³ Y.H. Shen, Q. Xie, M. Norberg, E. Sausville, G.V. Woude, D. Wenkert, Geldanamycin derivative inhibition of HGF/SF-mediated Met tyrosine kinase receptor-dependent urokinase-plasminogen activation, *Bioorgan. Med. Chem.* 13 (2005) 4960-4971.
- ¹⁰⁴ A. Naganawa, T. Matsui, T. Saito, M. Ima, T. Tatsumi, S. Yamamoto, M. Murota, H. Yamamoto, T. Maruyama, S. Ohuchida, H. Nakai, K. Kondo, M. Toda, Discovery of heteroaryl sulfonamides as new EP1 receptor selective antagonistse, *Bioorgan. Med. Chem.* 14 (2006) 6628-6639.

- ¹⁰⁵ Y. Sato, M. Yamada, S. Yoshida, T. Soneda, M. Ishikawa, T. Nizato, K. Suzuki, F. Konno, Benzoxazole derivatives as novel 5-HT₃ receptor partial agonists in the gut, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 3015-3021.
- ¹⁰⁶ I. Ott, B. Kircher, G. Heinisch, B. Matuszczak, Substituted pyridazino[3,4-*b*][1,5]benzoxazepin-5(6*H*)ones as multidrug resistance modulating agents, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4627-4630.
- ¹⁰⁷ Y. Shibasaki, F. Toyokawa, S. Ando, M. Ueda, Highly transparent photosensitive polybenzoxazole: poly(*o*-hydroxy amide) derived from 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)bis(*o*-aminophenol) and *o*-substituted dikarboxylic acid chlorides, *Polym. J.* 39 (2007) 81-89.
- ¹⁰⁸ J.S. Peng, C.J. Zong, M. Ye, T.H. Chen, D.W. Gao, Y.F. Wang, C.X. Chen, Direct transition-metal-free intramolecular C-O bond formation: synthesis of benzoxazole derivatives, *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 1225-1230.
- ¹⁰⁹ B. Kohler, R.V. Meyer, Neue 2-aryl-benzoxazole und neue 2'-hydroxybenzanilide, EP 0 332 988 A2, 20.9. 1989.
- ¹¹⁰ R.G. Clewley, A. Fischer, G.N. Henderson, *ipso* Nitration in *para*-halophenyl ethers, *Can. J. Chem.* 67 (1989) 1472-1479.
- ¹¹¹ V. Pandarus, R. Ciriminna, F. Beland, M. Pagliaro, Selective hydrogenation of functionalized nitroarenes under mild conditions, *Catal. Sci. Technol.* 1 (2011) 1616-1623.
- ¹¹² G. Tomokazu, Preparation of 4-halomononitrotoluenes, Japanese Pat. JP 04046140, 17.2. 1992.
- ¹¹³ N. Ryu, T. Norihiko, A. Nobuyuki, Tricyclic indole-2-carboxylic acid derivatives being selective antagonists of the NMDA receptor, EP 0 657 427 B1, 14.6. 1995.
- ¹¹⁴ F. Diaz, F.S. Farouz, R. Coatsworth Holcomb, E.A. Kesicki, H. Chee Ooi, A. Rudolph, F. Stappenbeck, E.D. Thorsett, J. Joseph Gaudino, K. Lee Fischer, A. Wade Cook, Heteroaryl urea derivatives useful for inhibiting ChK1, US 2009/0143357 A1, 4.6. 2009.
- ¹¹⁵ E. Jung, V. Vossius, J. Schirdewahn, Verfahren zur Herstellung farbenphotographischer Bilder durch Farbentwicklung und farbenphotographisches Mehrschichtenmaterial, DE2028601 A1, 17.12. 1970.
- ¹¹⁶ E. Reimann, W. Erdle, C. Weigl, K. Polborn, Protoberberine aus *Reissert*-Verbindungen, 6. Mitt. [1]: Diastereoselektive Synthese und relative Konfiguration von 2-Benzoyl-1-cyano-1-(1-phenylalkyl)-1,2-dihydroisochinolinen, *Monatshefte für Chemie* 130 (1999) 313-326.
- ¹¹⁷ J. Kaustova, Quantitative micromethod for drug susceptibility testing of mycobacteria in Sula's medium, *Klin. Microbiol. Inf. Lek.* 3 (1997) 115-124.
- ¹¹⁸ M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- ¹¹⁹ G.H. Dixon, H.L. Kornberg, Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle, *Proceedings of the Biochemical Society*, *Biochem. J.* 72 (1959) 3P.
- ¹²⁰ CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582, <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf>
- ¹²¹ J. Vinsova, A. Imramovsky, V. Buchta, M. Ceckova, M. Dolezal, F. Staud, J. Jampilek, J. Kaustova, Salicylanilide acetates: synthesis and antibacterial evaluation, *Molecules* 12 (2007) 1-12.
- ¹²² A. Imramovsky, J. Vinsova, J.M. Ferriz, V. Buchta, J. Jampilek, Salicylanilide esters of *N*-protected amino acids as novel antimicrobial agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 348-351.

-
- ¹²³ A. Imramovsky, J. Vinsova, J.M. Ferriz, R. Dolezal, J. Jampilek, J. Kaustova, F. Kunc, New antituberculotics originated from salicylanilides with promising in vitro activity against atypical mycobacterial strains, *Bioorgan. Med. Chem.* 17 (2009) 3572-3579.
- ¹²⁴ M. Kratky, J. Vinsova, V. Buchta, K. Horvati, S. Bosze, J. Stolarikova, New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 6106-6113.
- ¹²⁵ J.M. Ferriz, K. Vavrova, F. Kunc, A. Imramovsky, J. Stolarikova, E. Vavrikova, J. Vinsova, Salicylanilide carbamates: antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, *Bioorgan. Med. Chem.* 18 (2010) 1054-1061.
- ¹²⁶ M. Kratky, J. Vinsova, Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents – A Review, *Curr. Pharm. Design* 17 (2011) 3494-3505.
- ¹²⁷ M. Kratky, J. Vinsova, N. Guisado Rodriguez, J. Stolarikova, Antimycobacterial activity of salicylanilide benzensulfonates, *Molecules*, 17 (2012) 492-503.
- ¹²⁸ M. Kratky, Design and synthesis of new compounds active especially against multidrug-resistant mycobacterial strains, Ph.D. thesis, Hradec Králové Farmaceutická fakulta UK 2011 115 strán a přílohy.
- ¹²⁹ A. Ahmed, R.A. Bragg, J. Clayden, L.W. Lai, C. McCarthy, J.H. Pink, N. Westlund, S.A. Yasin, Barriers to rotation about the chiral axis of tertiary aromatic amides, *Tetrahedron* 54 (1998) 13277-13294.
- ¹³⁰ B. Staskun, Empirical quantitative correlation of substituent size with proton nuclear magnetic resonance chemical shift difference between nonequivalent geminal methylene protons of hindered *N*-substituted acetanilides and difluorooxyboranes, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 1643-1646.
- ¹³¹ W.B. Jennings, Chemical shift nonequivalence in prochiral groups, *Chem. Rev.* 75 (1975) 307-322.