

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ORGANICKEJ A BIOORGANICKEJ CHÉMIE



Syntéza substituovaných arylguanidínov ako potenciálnych liečiv XVI.

Synthesis of substituted arylguanidines as potential drugs XVI.

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Hradec Králové 2021

Eszter Gyurkovicsová

Čestné vyhlásenie

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Táto práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 2.9.2021

Eszter Gyurkovicsová

Podakovanie

Týmto krátkym textom by som sa rada poďakovala vedúcemu diplomovej práce PharmDr. Karlovi Palátovi, CSc. za trpezlivosť, vedenie, odbornú pomoc, ochotu so mnou všetko konzultovať a rady, ktoré mi pomohli pri vypracovávaní svojej diplomovej práce. Ďalej rada by som sa poďakovala doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za meranie NMR spektier látok a Ive Vencovskej za meranie IČ spektier. V neposlednom rade ďakujem Ing. Anite Sárköziovej za odbornú pomoc a korekciu práce.

Rada by som sa poďakovala aj RNDr. Kláre Konečnej, Ph.D., PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D. a Ide Dufkovej za prevedenie mikrobiologických testov.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	8
1. Úvod a ciele diplomovej práce	10
2. Najnovšie deriváty guanidínov s antifungálnou aktivitou	13
2.1. Guanidínové soli a ich vplyv na enzýmy	16
2.2. Molekulové modelovanie	19
2.3. Guanidíny ako selektívne inhibítory aktivátora plazminogénu urokinázového typu.....	22
3. Metodická časť	24
3.1. Chemická časť	24
3.1.1 Príprava sulfidov	24
3.1.2. Redukcia nitrozlučenín	25
3.1.3. Príprava 3-metyl-4-(alkylsulfanyl)anilínium-chloridu	26
3.1.4. Príprava arylguanidínov	27
3.1.5 Celková schéma syntézy	28
3.2. Mikrobiologická časť	29
4. Experimentálna časť	30
4.1. Molekulárne dokovanie na aktivátor plazminogénu urokinázového typu programom Molecular Operating Environment (MOE).....	30
4.2. Syntéza	34
4.2.1. Príprava aktívnej medi	35
4.2.2. Príprava 2-metyl-4-nitrofenyl(oktyl)sulfanu	36
4.2.3. Príprava 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínu.....	38
4.2.4. Príprava 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chloridu	40
4.2.5. Príprava 2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrátu.....	41
4.2.6. Príprava 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínu	43

4.2.7. Príprava 2-metyl-4-nitrofenyl(tetradecyl)sulfanu	45
4.2.8. Príprava 3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínu	47
4.2.9. Príprava 3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínium-chloridu	49
4.2.10. Príprava 2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrátu	51
4.2.11. Príprava 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínu	53
4.3. Mikrobiologická časť	55
4.3.1. Antibakteriálna aktivita	56
4.3.2. Antifungálna aktivita.....	57
5. Diskusia.....	58
6. Záver	60
7. Použitá literatúra:	61

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organickej a bioorganickej chémie

Študentka: Eszter Gyurkovicsová

Školiteľ: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Názov diplomovej práce: Syntéza substituovaných arylguanidínov ako potenciálnych liečiv XVI.

Neustále sa zvyšujúci počet výskytov systémových mykóz a vznik nových ochorení vyvolaných plesňami rezistentnými na už existujúce antifungálne liečiva, je obrovským problémom ochrany zdravia ľudí. Na celom svete trpí približne 1,2 miliardy jednotlivcov plesňovými infekciami. V prvom rade sú ohrozené pacienti s nedostatočnou funkciou imunitného systému [1], ich počet rastie ako výsledok rozšírenia infekcie HIV alebo intenzívnej terapie rakoviny, v stavoch po orgánových transplantáciách alebo trpiace autoimunitnými ochoreniami, ktoré vyžadujú imunosupresívnu terapiu.

Celosvetovo prebieha výskum v oblasti látok odvođených od guanidínu s potenciálnou aktivitou proti mnohým kmeňom plesní aj baktérii. Skúmaním týchto látok sa už niekoľko rokov zaoberá aj Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Cieľom je získať čo najaktívnejšie zlúčeniny substituovaných arylguanidínov so snahou nájsť závislosť medzi štruktúrou a účinkom u týchto látok.

V rámci mojej diplomovej práce boli syntetizované dva rady derivátov arylguanidínu. Produkty boli syntetizované v štvorkrokovej syntéze. V prvom kroku bol vytvorený sulfid reakciou substituovaného 2-chlór-5-nitrotoluénu a tiolov. V nasledujúcom kroku bola nitroskupina redukovaná na aminoskupinu.

Anilín bol prevedený na anilínium-chlorid pomocou plynného chlorovodíka. V poslednom kroku anilínium-chlorid reagoval s kyanamidom za vzniku arylguanidínu.

U syntetizovaných látok boli zmerané infračervené a NMR spektrá. Na Katedre biologických a lekárskech vied Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej boli prevedené testy na antifungálnu a antibakteriálnu aktivitu u syntetizovaných látok.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic chemistry

Student: Eszter Gyurkovicsová

Supervisor: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Title of diploma thesis: Synthesis of substituted arylguanidines as potential drugs XVI.

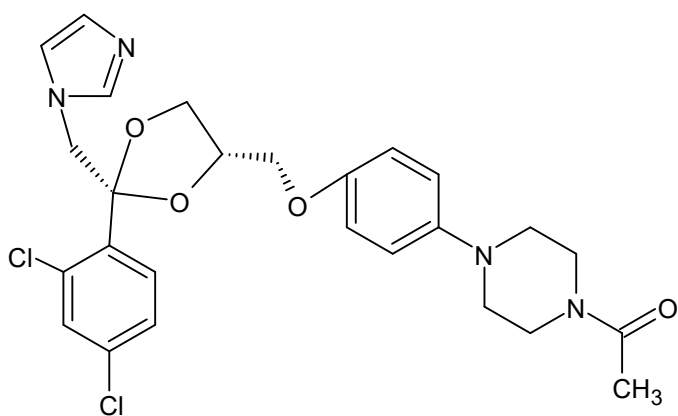
Continually increasing number of systemic mycosis and the genesis of new diseases caused by fungi resistant to existing antifungal drugs is a huge problem in protecting human health. Around 1,2 billion individuals worldwide suffer from fungal infections. Primarily patients with insufficient immune function [1] are at risk, their number is growing as a result of the spread of HIV infection or intensive cancer therapy, in conditions after organ transplants or suffering from autoimmune diseases that require immunosuppressive therapy.

Research is in progress worldwide on guanidine-derived substances with potential activity against many strains of fungi and bacteria. The Faculty of Pharmacy in Hradec Králové has also been researching these substances for several years. The aim is to obtain the most active compounds of substituted arylguanidines in an effort to find the structure-activity relationship for these substances.

In my thesis, two series of arylguanidine derivatives were synthesized. The products were synthesized in a four-step synthesis. In the first step, a sulfide was formed by the reaction of substituted chloronitrobenzene and thiols. In the next step, the nitro group was reduced to the amino group. The aniline was converted

to aniline chloride using hydrogen chloride gas. In the last step, aniline chloride reacted with cyanamide to form arylguanidine.

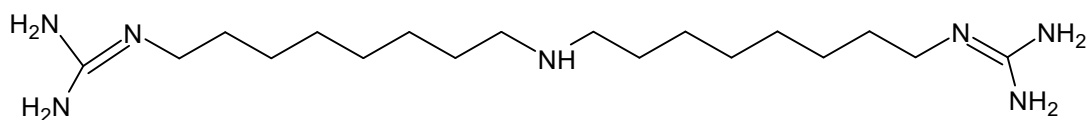
Infrared and NMR spectra were measured on the synthesized substances. Antifungal and antibacterial tests on the synthesized substances were performed at the Department of Biological and Medical Sciences of the Faculty of Pharmacy of Charles University.



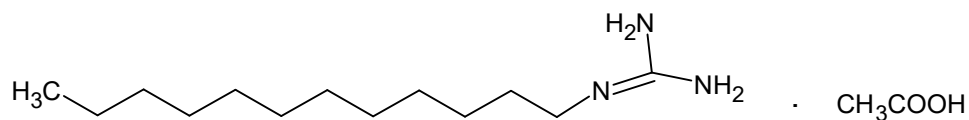
III

Pri liečbe mykotických infekcií sa ako podporné prostriedky používajú keratolytické prípravky. Majú len obmedzený antimykotický efekt, pomáhajú skôr antimykotikám dostať sa k miestnym infekciám. Prielom v liečbe kožných mykóz nastal vznikom azolových derivátov. Sú širokospektrálne, všetky sa vyznačujú podobným farmakologickým profilom. Mnoho z nich tvoria základ štandardnej liečby [3] mykotických infekcií v dermatológii. Odolnosť voči azolu medzi druhmi *Candida* a *Aspergillus* je jednou z najväčších výziev klinického úspechu, po ktorej nasleduje problematická rezistencia na echinokandín. Veľkým problémom je tiež šírenie poľnohospodársky odvodeného *Aspergillus fumigatus* odolného voči azolu a vznikajúce hrozby ako je *Candida auris* odolná voči viacerým liekom. Mechanizmy rezistencie [2] na liečivá zahŕňajú zmenené interakcie liečivo-cieľ, znížené koncentrácie bunkových liečiv sprostredkované transportérmi effluxu liečiva a bariéry priepustnosti súvisiace s biofilmami. Expozícia drog tiež ovplyvňuje vznik rezistencie. Rozvoj lepších diagnostických nástrojov a stratégií, ktoré umožňujú ciele použítie antimykotík, je zásadný pre zachovanie účinnosti liekov.

Guanidínové deriváty vykazujú rôznu biologickú aktivitu. Medzi staršie popísané látky, poskytujúce efektívnu a širokú kontrolu mikroorganizmov patria guazatín IV (bis(8-guanidino-oktyl)amín) [4] a dodín V (1-dodecylguanidíniumacetát) [5].



IV



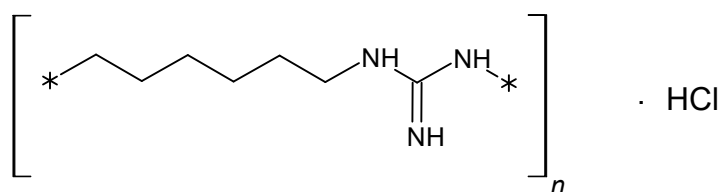
V

V rámci diplomovej práce bola prevedená rešerž v databáze SciFinder v časovom rozmedzí 2015-2021. Cieľom bolo zistiť informácie v oblasti guanidínov a jeho derivátov použiteľných ako potencialné antifungálne účinné látky a ich účinok na enzýmy. Používali sa kľúčové slová ako „antifungal guanidine“, a „antifungal“, „arylguanidine“, „guanidine enzyme“ a „molecular docking guanidine“.

2. Najnovšie deriváty guanidínov s antifungálnou aktivitou

Vzhľadom na rastúcu úmrtnosť spôsobenú invazívnou mykózou a obmedzeným množstvom účinných antimykotík, plesňové infekcie sa stávajú globálnou zdravotnou hrozbou. Medzi hubové patogény patria *Candida spp.*, ktoré predstavujú jednu z najčastejších príčin nozokomiálnych infekcií.

Študovala sa antifungálna aktivita polyhexametylénguanidín hydrochloridu (PHMGH) VI proti rôznym mikroorganizmom. PHMGH v porovnaní s najpoužívanejším liekom Amfotericínom B mal silnejšiu antifungálnu aktivitu. Nevykazoval ani hemolytické účinky a aktivity uvoľňovania laktátdehydrogenázy. PHMGH je kationový polymér [6].



VI

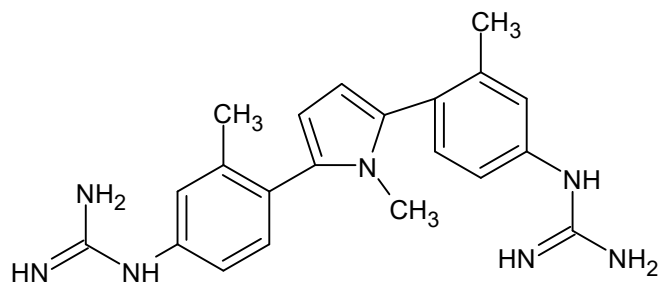
Antifungálny mechanizmus PHMGH bol skúšaný na modelovom organizme *Candida albicans*. Ďalej má rýchlu [6] a širokospektrálnu aktivitu proti grampozitívnym aj gramnegatívnym baktériám.

Medzi antimikrobiálne makromolekuly patria mikrobicídne kationové polyméry [7], ktoré obsahujú funkčné skupiny ako biguanid, kvartérne amónne soli a kvartérne pyridínové soli.

Najnovšie štúdie uvádzajú optimalizované bis-guanidínové analógy, ako nové antifungálne látky. Optimalizácia je zameraná na zmeny centrálného arylového jadra a jeho pripojenie ku koncovým guanidínom. Vznikli vysoko účinné, široko aktívne zlúčeniny s nízkou cytotoxicitou a s lepšou antifungálnou aktivitou ako štandardne používané lieky.

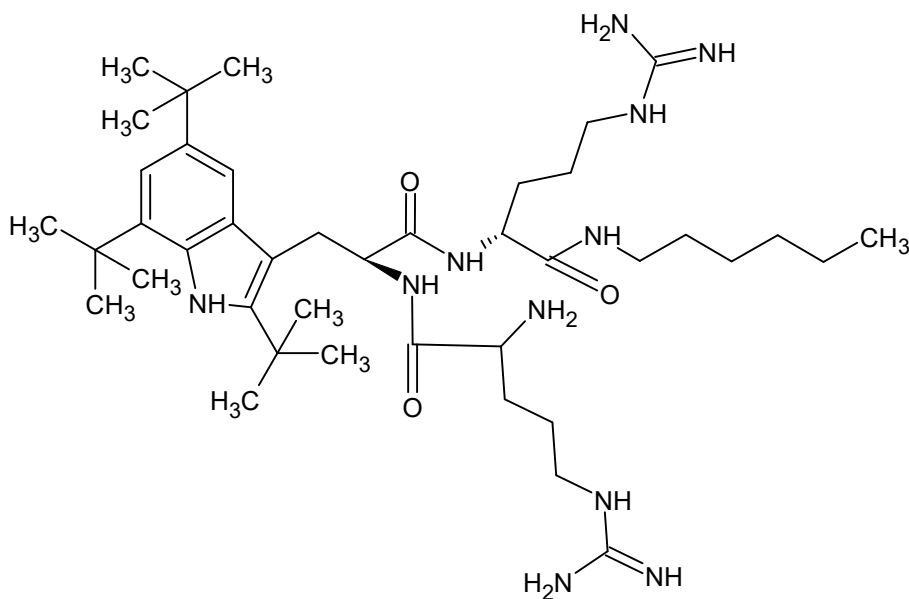
Popísané sú deriváty na báze pyrolu, ktoré obsahujú bis-guanidíny. Derivát VII je účinný proti všetkým v štúdiu [6] testovaným *Candidám* a kmeňom

Aspergillus s hodnotami minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) v rozmedzí 1 a 16 $\mu\text{g/ml}$.



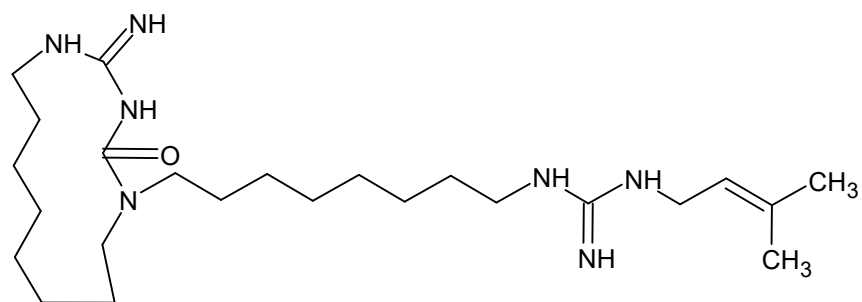
VII

Ďalšia zlúčenina VIII je jednou zo širšie aktívnych zlúčenín s MIC 4-16 $\mu\text{g/ml}$ proti *Candida spp.* a 8 $\mu\text{g/ml}$ oproti *Trichophyton spp.* Je to prírodná látka odvodená od guazatínu, ktorá slúži ako vzor pre ďalšie antimikrobiálne látky.



VIII

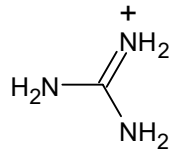
Abafungín [6] IX vykazuje širokú antifungálnu aktivitu a je najúčinnjší proti dermatofytom s rozsahmi MIC $\leq 0,06$ -2 $\mu\text{g/ml}$. MIC proti *Candida* a niektoré kmene *Aspergillus* sa pohybujú medzi 0,5-16 $\mu\text{g/ml}$ a 0,5-4 $\mu\text{g/ml}$.



IX

2.1. Guanidínové soli a ich vplyv na enzýmy

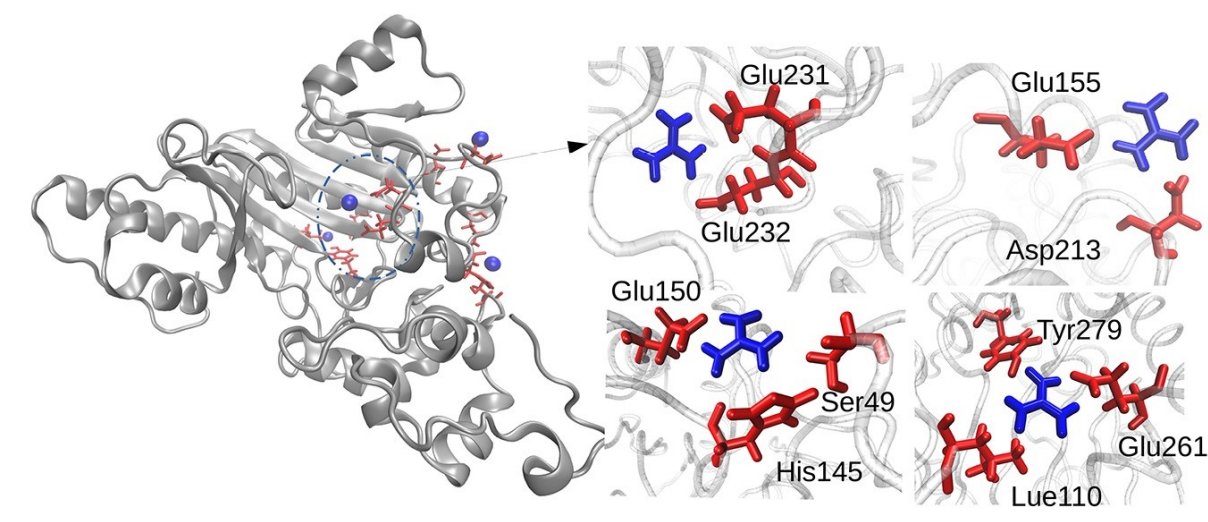
Guanidínové soli sa široko používajú v štúdiách skladania bielkovín, pretože modulujú stabilitu proteínových konformácií. Guanidíniový kation (Gdm⁺) X je geometricky planárny, a obsahuje významnú časť bočného reťazca arginínu, ktorý je obsadený v proteínoch.



X

Hodnota pK_a Gdm⁺ je 13,6, vďaka tomu je za fyziologických podmienok úplne protonizovaný. Úloha Gdm⁺ v denaturácií proteínov je stále nejasná. Ukazuje sa, že Gdm⁺ interaguje prednostne so špecifickým aminokyselinovým zbytkom, a práve to hrá kľúčovú úlohu pri denaturácií bielkovín. Vďaka konjugovanej kvázi-aromatickej štruktúre, Gdm⁺ interaguje aj s planárnym aromatickým tryptofánom. Ako kation, ukazuje aj silnú elektrostatickú interakciu so záporne nabitou časťou kyseliny asparágovej a glutámovej.

Niektoré štúdie [8] ukazujú, že u enzýmov obsahujúce dva zvyšky Asp/Glu v aktívnom mieste, sa enzymatická aktivita drasticky klesá aj pri nízkych koncentráciách guanidínium chloridu (GdmCl), hoci sa proteín nerozvinul. Pri porovnaní konformačných a aktivných zmien kreatínkinázy v prítomnosti GdmCl (Obrázok 1) sa ukázalo, že enzým sa stáva neaktívnym pri nízkych koncentráciách GdmCl. Predpokladá sa inaktivácia enzýmov v dôsledku malých konformačných zmien v blízkosti aktívneho miesta.

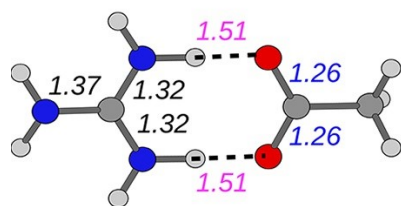


Obrázok 1. Mapa priestorovej hustoty [9] Gdm⁺ v blízkosti kreatínkinázy. Proteín je zobrazený sivou farbou. Modrá farba predstavuje priestorovú hustotu Gdm⁺ okolo proteínu, keď je obsadenosť vyššia ako 0,8. Červenou farbou sú zobrazené zvyšky, ktoré interagujú s Gdm⁺. Aktívne miesto proteínu je zakružkované modrou prerušovanou čiarou.

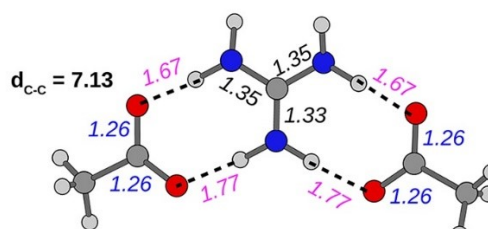
Študovala sa interakcia Gdm⁺ s karboxylátovými iónmi [9], ktoré napodobňujú interakcie s kyslými aminokyselinami pomocou simulácie molekulárnej dynamiky.

Molekulárna dynamika sa definuje [10] ako technika počítačovej simulácie, ktorá umožňuje predikciu časového vývoja interagujúceho konkrétneho systému. Používal sa program NAMD (nanoscale molecular dynamics) [11], ktorý je navrhnutý pre vysokovýkonné simulácie veľmi veľkých biologických objektov.

Interakcia prebiehala pri nízkej koncentrácii, Gdm⁺ stabilizuje diméry karboxylátových iónov a funguje ako most medzi nimi, čím sa znižuje elektrostatické odpudzovanie. Interakcia karboxylát-Gdm⁺-karboxylát môže mať vplyv na vzťah štruktúry a aktivity v enzýmoch s aktívnymi miestami obsahujúce dva kyslé zvyšky. Bolo ukázané, že Gdm⁺ sa v nízkych koncentráciách silne viaže na aktívne miesto enzýmu, a tým potenciálne inhibuje jeho aktivitu bez toho, aby sa rozvinul. Interakcia spájajúca karboxylát-Gdm⁺-karboxylát so štyrmi vodíkovými väzbami je cca 2-krát silnejšia ako konfigurácia Gdm⁺ acetátu, ktorý má iba dve vodíkové väzby (Obrázok 2).



$$E^{\text{int}} = -18.7 \text{ kcal mol}^{-1}$$



$$E^{\text{int}} = -36.1 \text{ kcal mol}^{-1}$$

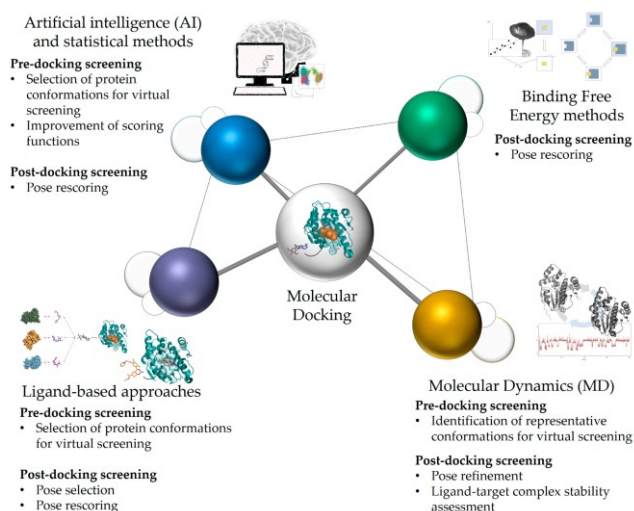
Obrázok 2. Interakcia karboxylát-Gdm⁺-karboxylát: Jednotlivé čísla ukazujú vzdialenosť medzi atómami označené farbami (biela-vodík, šedá-uhlík, modrá-dusík a červená-kyslík) v angströmoch. Porovnaná [9] je interakčná energia týchto dvoch molekúl a znázornená vzdialenosť medzi dvoma karboxylátovými iónmi (d_{c-c}).

2.2. Molekulové modelovanie

Metódy počítačovej molekulárnej simulácie [12] sa stali štandardným nástrojom na uľahčenie interpretácie experimentálnych údajov na atómovej alebo molekulárnej úrovni.

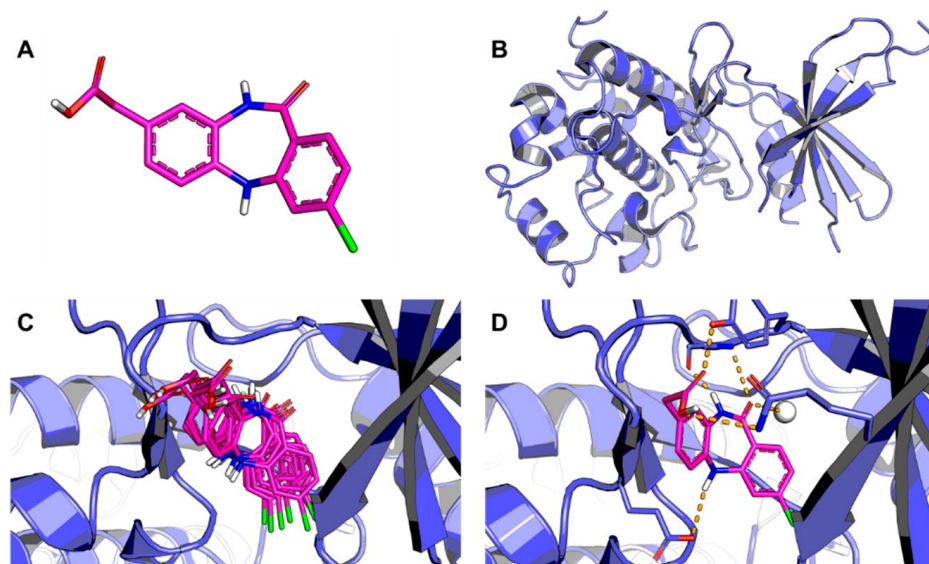
Experimentálny skrining veľkých knižníc zlúčenín [13] proti molekulárnym cieľom predstavuje zlatý štandard pre objavovanie biologicky aktívnych molekúl. Metódy založené [14] na štruktúre sa spoliehajú na informácie odvodené zo znalosti 3D štruktúry cieľa. Databázy molekúl sú zoradené podľa štruktúrnych a elektronických komplementarít ligandov k danému cieľu. Jeden z najobľúbenejších a najúspešnejších metód založených na štruktúre *in silico* je molekulárne dokovanie. Pomáha predpovedať interakcie medzi molekulami a biologickými cieľmi. Tento proces predpovedá najprv molekulárnu orientáciu ligandu v receptore, a potom pomocou vyhodnocovania odhaduje ich komplementaritu.

Od prvého uvedenia programu molekulárneho dokovania [15] na trh v polovici sedemdesiatych rokov minulého storočia sa ukázalo ako dôležitý je na porozumenie toho, ako chemické zlúčeniny interagujú s ich molekulárnymi cieľmi, a pre objavovanie liekov. Štúdie v osemdesiatich rokoch prvýkrát nahlásili výrazy „hard sphere repulsions“ a „vodíkové väzby“ na opis interakcií proteín-ligand, ktoré sa výrazne líšia od predchádzajúcich. Títo autori boli tiež prví, ktorí považovali receptor za pevné tuhé telo, ktorého väzobné miesta sú tvorené „vreckami“. Podarilo sa im predpovedať štruktúry blízke už röntgenovo hláseným štruktúram, a tiež nájsť proteínové konformácie, ktoré by bolo možné použiť na návrh nových ligandov. Začalo sa používať aj na návrh a optimalizáciu zlúčenín s terapeutickým záujmom (Obrázok 3). Aplikácia dokovania je obmedzená pri navrhovaní liečiv na biologické ciele, pre ktoré sú kryštálové štruktúry známe.



Obrázok 3. Integrácia dokovania [14] s molekulárnou dynamikou, na báze ligandu, binding free energy, s umelou inteligenciou a štatistickými metódami. Podľa dostupných informácií, rôzne prístupy *in silico* je možné kombinovať s dokovaním, aby sa vylepšili predikcie.

Molekulové dokovanie (Obrázok 4), virtuálny skrínig, založený na štruktúre (SBVS) a molekulárna dynamika (MD) patria medzi najčastejšie používané stratégie SBDD (structure-based drug design) [16] kvôli svojmu širokému spektru aplikácií v analýze, ako sú väzbová energetika, molekulárne interakcie vyvolané konformačnými zmenami.



Obrázok 4. Ukážka molekulového dokovania na látke [17] 2-(3-chloro-11-oxo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin-8-yl)octová kyselina.

(A) Trojrozmerná štruktúra ligandu; (B) Trojrozmerná štruktúra receptora; (C) Ligand je dokovaný do receptora a ukazujú sa predpokladané konformácie; (D) Identifikuje sa najviac pravdepodobná konformácia a zodpovedajúce medzimolekulárne interakcie.

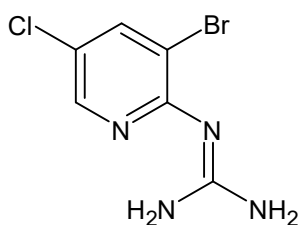
Vyššie zmienená špecifická interakcia [9] medzi karboxylát-Gdm⁺-karboxylát môže byť využívaná pri objavovaní liekov, pretože lieky na báze derivátov guanidínia sa už používajú na liečbu rôznych chorôb spojených so svalovou bolesťou, rakovinou atď. Deriváty guanidínia môžu byť navrhnuté ako potenciálne molekuly liečiva, pretože aj Gdm⁺ je podľa najnovších štúdií silný ligand na inhibíciu aktivity v enzýmoch, ako napr. lyzozýmy a asparágové/glutámové proteázy, ktoré obsahujú dve kyslé aminokyseliny v ich aktívnom mieste.

2.3. Guanidíny ako selektívne inhibítory aktivátora plazminogénu urokinázového typu

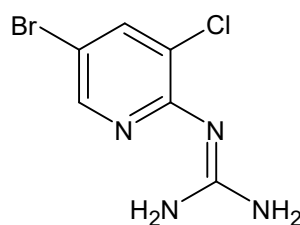
Systém urokinázového aktivátora plazminogénu (uPA) obsahujúci serínovú proteázu uPA [18], jej príbuzný receptor uPAR a dva endogénne inhibítory, inhibítor aktivátora plazminogénu-1 (PAI-1) a inhibítor aktivátora plazminogénu-2 (PAI-2), je kľúčový hráč v rozpade extracelulárnej matrice a bazálnej membrány. Zvýšená expresia uPA a uPAR je pozorovaná u mnohých typov rakoviny a je spojená so zlou prognózou.

Veľkým zázrakom [19] bola identifikácia derivátov 2-pyridinylguanidínu ako selektívne inhibítory aktivátora plazminogénu urokinázového typu (uPA). Tieto zlúčeniny sú potenciálne použiteľné pri indikáciách chorôb, kde môže dôjsť k degradácii extracelulárnej matrice pomocou uPA (rast nádoru a metastázy, angiogenéza a remodelácia tkaniva). uPA pôsobí prostredníctvom aktivácie zymogénu plazminogénu na plazmín.

Dihalogénované deriváty XI, XII sú najsilnejšie inhibítory [20] podľa predchádzajúcich štúdií s jednoduchou substitúciou pyridínového kruhu.



XI

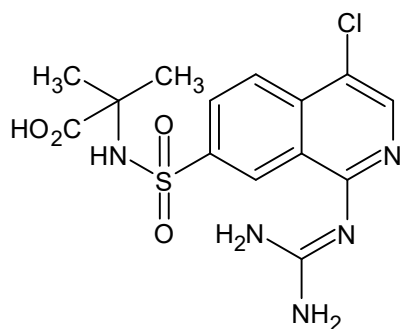


XII

Požadované guanidíny boli pripravované z 3-substituovaného 2-amino-5-chlórpyridínového derivátu.

Ďalšou popísanou zlúčeninou boli 1-izochinolinylguanidíny ako silné a selektívne inhibítory [21] aktivátoru urokinázového typu plazminogénu (uPA). Skúmanie týchto látok ukázalo, že začlenenie 7-sulfonamidu poskytuje novú sériu silných a vysoko selektívnych inhibítorov uPA. Silu a selektivitu je možné dosiahnuť pomocou sulfónamidov odvodených od rôznych amínov alebo od

aminokyselín. Spôsob väzby týchto 1-izochinolinylguanidínov bol skúmaný aj röntgenovými kokryštalizačnými štúdiami. Bol vybraný inhibítor uPA XIII pre hodnotenie jeho vynikajúcej účinnosti enzýmov a profilu selektivity.



XIII

3. Metodická časť

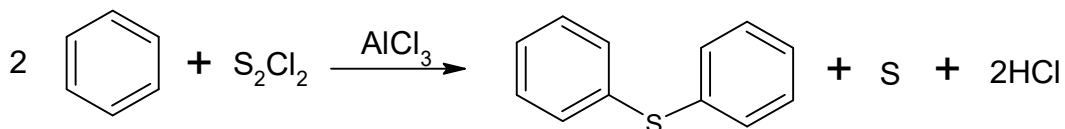
3.1. Chemická časť

Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce bolo pripraviť 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4(oktylsulfanyl)fenyl]guanidín, 2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínum-nitrát, 2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínum-nitrát, 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidín a následne stanoviť ich antifungálnu a antimikrobiálnu aktivitu.

3.1.1 Príprava sulfidov

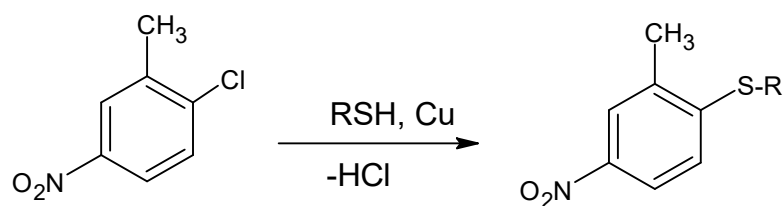
V prvom kroku syntézy boli pripravené príslušné molekuly 4-alkylsulfanyl-3-nitrotoluénu. Sulfidy [22] sú vlastne sírnou obdobou éterov, kde je nahradený atóm kyslíka sírou. Charakterizujú sa obecným vzorcom $R^1 - S - R^2$. Síra má dva voľné elektrónové páry a vďaka tomu sú to látky slabo zásaditého charakteru.

Na prípravu sulfidov existuje niekoľko spôsobov. Najčastejšie sa používa alkylácia a arylácia tiolov, ktoré sa v zásaditom prostredí stávajú nukleofilným činidlom, za čo odpovedá silne nukleofilný atóm síry. Ďalej silnými nukleofilnými činidlami [23] sú aj tioláty alkalických kovov. Pripravujú sa aj aromatické diarylsulfidy pomocou Friedel-Craftsovej [22] arylácie dichlór disulfánu aromatickými uhľovodíkmi. Chlorid hlinitý alebo železo sa používa ako katalyzátor.



V tejto diplomovej práci, sulfidy [24] [25] boli pripravené reakciou alkántiolu s 2-chlór-5-nitrotoluénom v suchom dimetylformamide, za prítomnosti uhličitanu draselného a čerstvej medi, ktorá splnila funkciu katalyzátora.

Schéma reakcie:



3.1.2. Redukcia nitrozlúčenín

Pri redukcii nitrozlúčenín [26] sú oba atómy kyslíka nahradené vodíkom. Reakcia je závislá na pH prostredia a môže prebiehať rôznym spôsobom. Redukcia nitrozlúčeniny je katalytická redukcia vodíkom za prítomnosti katalyzátora. Ako katalyzátor [27] sa dá použiť platina. Redukcia môže byť prevedená pomocou železa [28] alebo zinku. Vtedy sa nitroskupina redukuje na nitrózoskupinu, ktorá ďalej reaguje cez hydroxylamínovú skupinu na amín (schéma A). V alkalickom prostredí [29] dôjde skôr ku tvorbe bimolekulárnych látok ako medziproduktov. Reakcia prebieha za prítomnosti zinku a hydroxidu sodného (schéma B).

Schéma A:

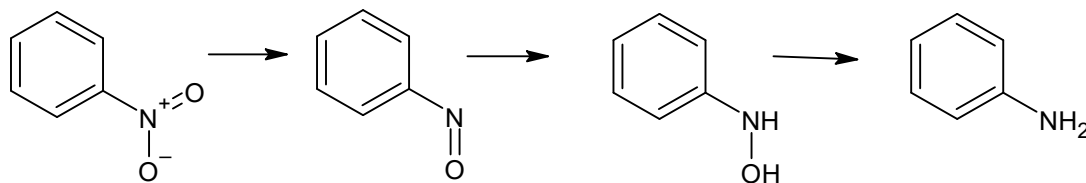
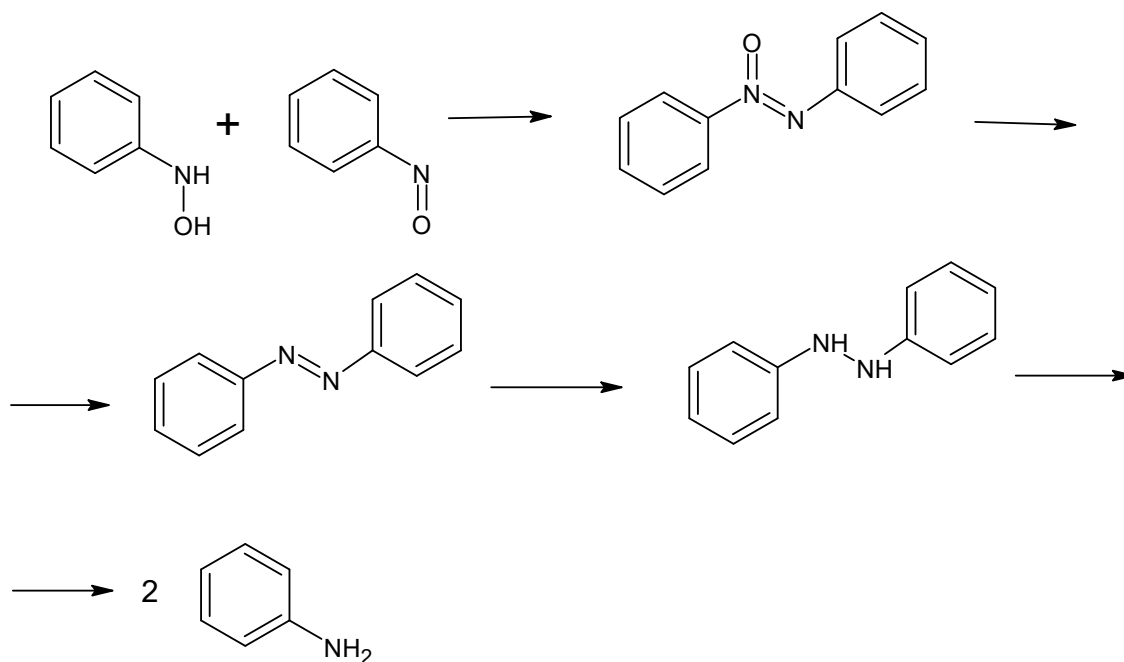
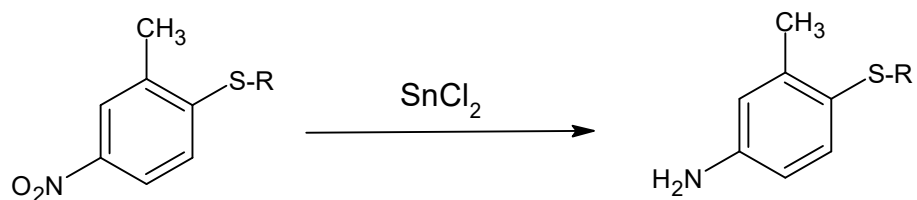


Schéma B:



Príprava 3-metyl-4(alkylsulfanyl)anilínu prebiehala redukciou 2-metyl-4-nitrofenyl(alkyl)sulfanu z predchádzajúceho kroku pôsobením chloridu cínatého.

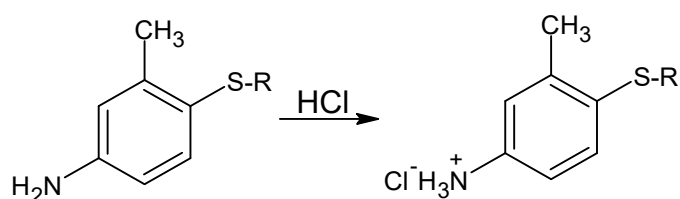
Schéma reakcie:



3.1.3. Príprava 3-metyl-4-(alkylsulfanyl)anilínium-chloridu

Príprava 3-metyl-4-(alkylsulfanyl)anilínium-chloridu prebiehala podľa reakcie [30] pomocou 3-metyl-4-(alkylsulfanyl)anilínu so suchým plynným chlorovodíkom. Vzniknuté produkty boli použité do nasledujúcich reakcií bez ďalšieho čistenia.

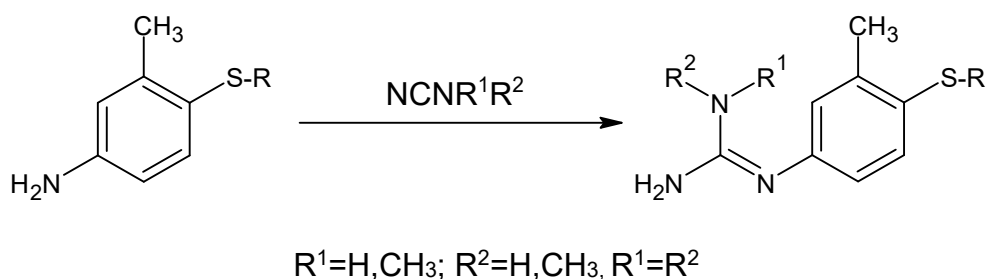
Schéma reakcie:



3.1.4. Príprava arylguanidínov

Príprava arylguanidínov prebiehala reakciou [31] 3-metyl-4-(alkylsulfanyl)anilínium-chloridov s komerčne vyrobenými kyanamidmi. Táto reakcia prebiehala za normálneho tlaku. Môže sa uskutočniť v roztoku (najčastejšie bezvodý etanol) alebo v tavenine. Reakciu je možné previesť aj so substituovaným kyanamidom [32]. V reakčnej zmesi musí byť kyslé prostredie, pretože uľahčuje vznik guanidínov. Kyanamid [33] pri výrazne väčšom pH ako 5 má tendenciu dimerizovať a pH menší ako 4 vedie k hydrolyze.

Schéma reakcie:



Najnovšie publikovaná syntéza (schéma 1) [34] prípravy arylguanidínov sa mierne líši od schémy 4, ktoré znázorňuje našu syntézu v experimentálnej časti diplomovej práce. Prvým rozdielom je, že v experimentálnej časti bola redukovaná nitrolátka pomocou chloridu cínatého namiesto ditioničitanu sodného. Ďalej, reakcia anilínium chloridu a kyanamidu prebiehala v tavenine a guanidínium nitrát bol v experimentálnej časti diplomovej práce vytvorený pomocou kyseliny dusičnej namiesto dusičnanu amonného.

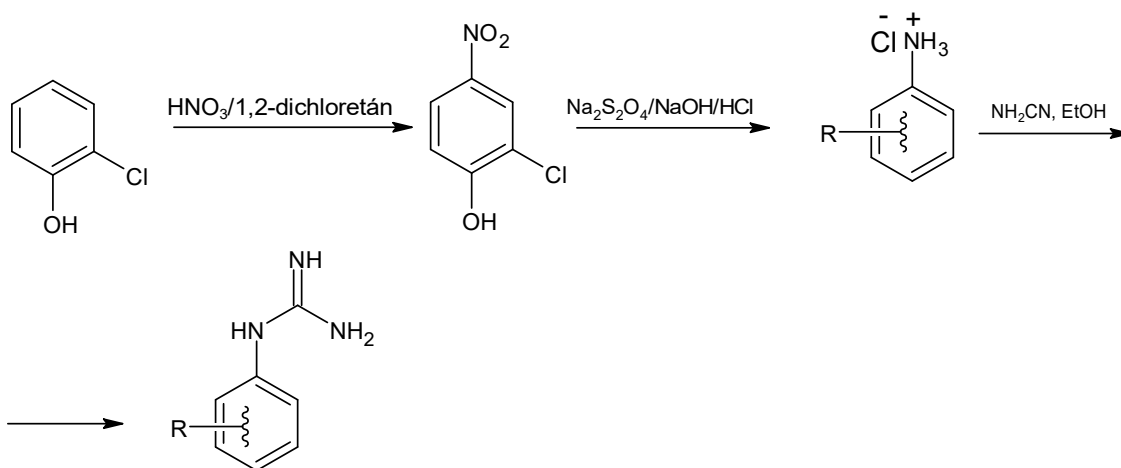


Schéma 1. Príprava arylguanidínov

Arylguanidíny v experimentálnej časti diplomovej práce boli pripravené podľa publikácií [35] a [36]. V mojej práci bol použitý spôsob prípravy v tavenine za normálneho tlaku a mierne kyslého pH 4-5, ktorý je optimálny pre vznik guanidínov.

3.1.5 Celková schéma syntézy

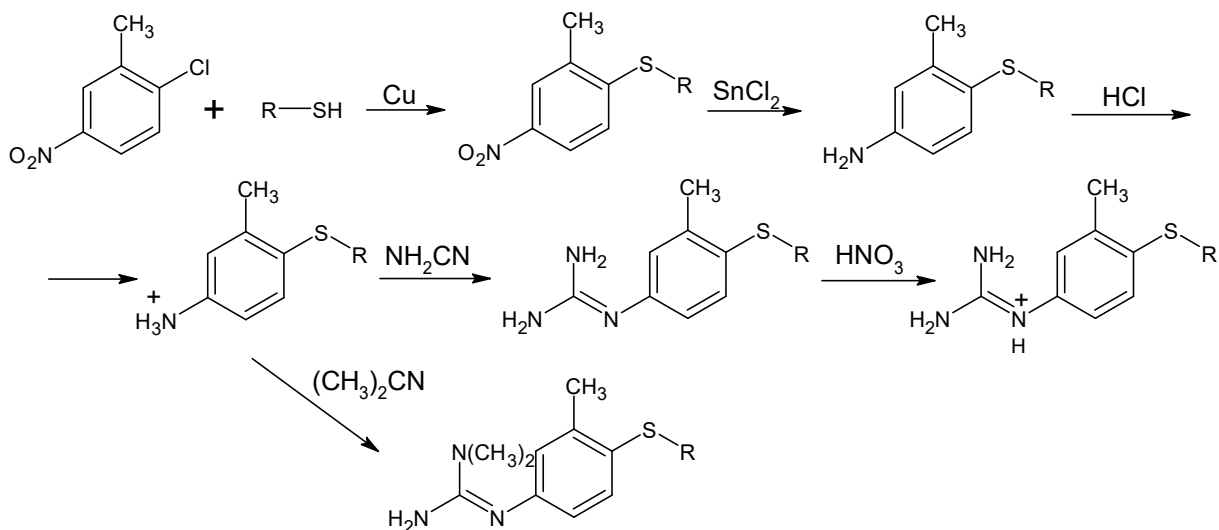


Schéma 2

3.2. Mikrobiologická časť

Mikrobiologické hodnotenie syntetizovaných látok bolo prevedené na sérii patogénnych a nepatogénnych plesní na Katedre biologických a lekárskeho vied Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové.

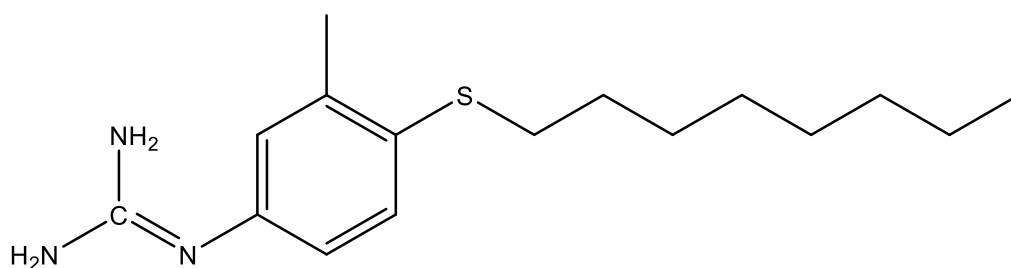
K stanoveniu antifungálnej aktivity boli využité metódy mikrodilučného bujónového testu *in vitro*. Tkaninovým médiom bol RPMI 1640 s glutamánom a 2% glukózou (SEVAPHARMA), ktorý bol pufovaný 0,165 M morfolín propánsulfónovou kyselinou (MOPS, Sigma) na pH 7,0. Objem média bol 200 μ l s 10 μ l suspenzie inokula. Dĺžka inkubácie bola 24-48 h, len u kultivácie *Trichophyton interdigitale* bola 48-72 h pri teplote 35 °C s odchýlkou 2 °C. Inkubácia prebiehala staticky, v tme, s humídnu atmosférou. Použitý bol Inkubátor AlamarBlue. Výsledky boli odčítané vizuálne – MIC v μ mol.l⁻¹. Látky boli testované na ôsmich kmeňoch potenciálne patogénnych hub: *Candida albicans* (CA), *Candida krusei* (CK), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CT), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Aspergillus flavus* (AFIa), *Absidia Corymbifera* (AC) a *Trichophyton interdigitale* (TI).

Pre stanovenie antimikrobiálnej účinnosti bol použitý ako médium Mueller Hintonov bujón č. 2 (CAMHB) pH 7,0. Objem média bol opäť 200 μ l s 10 μ l suspenzie inokula. Inkubácia opäť prebiehala staticky, v tme s humídnu atmosférou. Inkubačná doba bola u všetkých kmeňoch 24-48 h a teplota 35 °C s odchýlkou 2 °C. Použitý inkubátor bol tiež AlamarBlue a odčítanie prebiehalo vizuálne – MIC = IC₉₅ (95% inhibície kontroly). Testy prebiehali na ôsmich kmeňoch baktérií: *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (SA), *Meticilín rezistentný Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus faecalis* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Acinetobacter baumannii* (ACI) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

4. Experimentálna časť

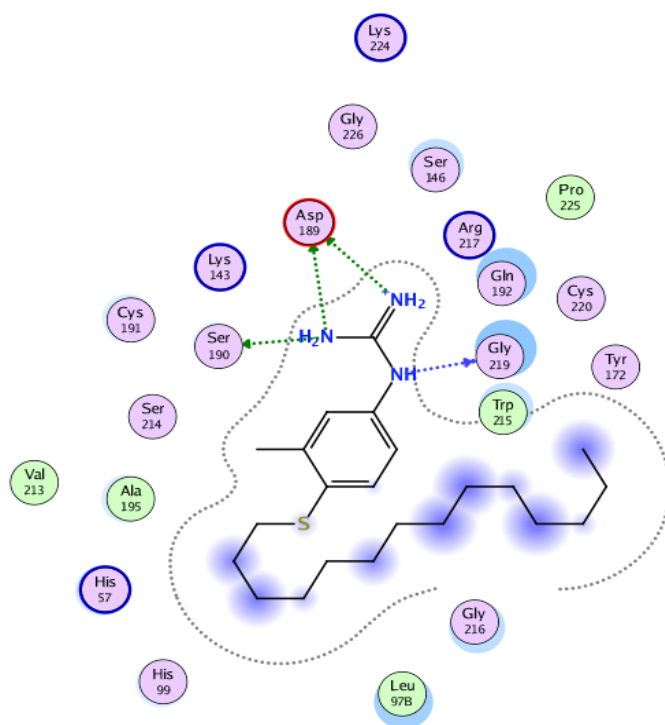
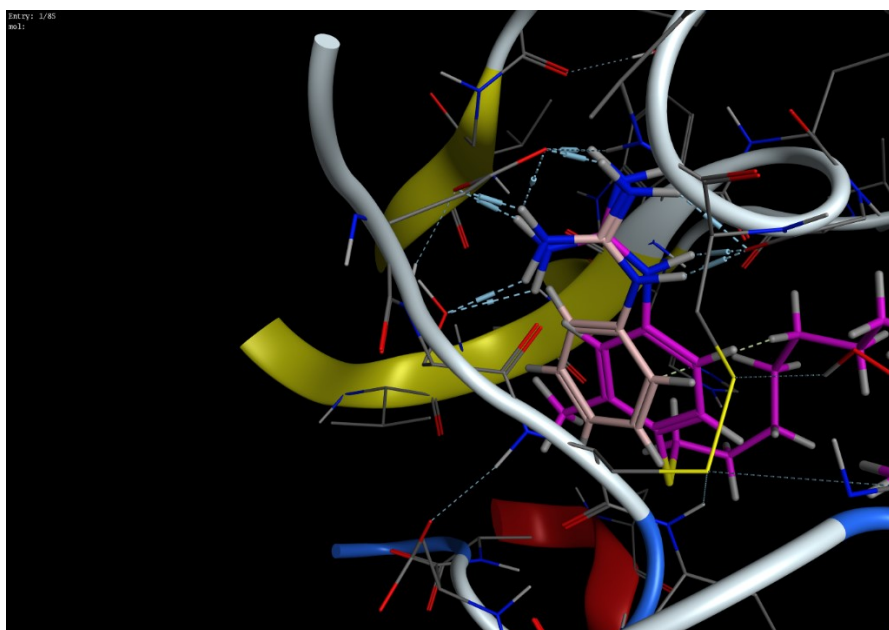
4.1. Molekulárne dokovanie na aktivátor plazminogénu urokinázového typu programom Molecular Operating Environment (MOE)

V rámci svojich štúdií som mala možnosť vyskúšať nadokovať svoje už pripravené oktylsulfanylfenyl deriváty XIV a ďalšie rôzne substituované deriváty s rôzne dlhým bočným reťazcom na vybraný enzým pomocou programu MOE. Tento program sa zaoberá hlavne flexibilitou [37] bočného reťazca. Podľa predchádzajúcich hľadání som si vybrala aktivátor plazminogénu urokinázového typu, pretože potencionálne zastavujú [20] rast, metastázy, angiogénu a prestavbu tkaniva.

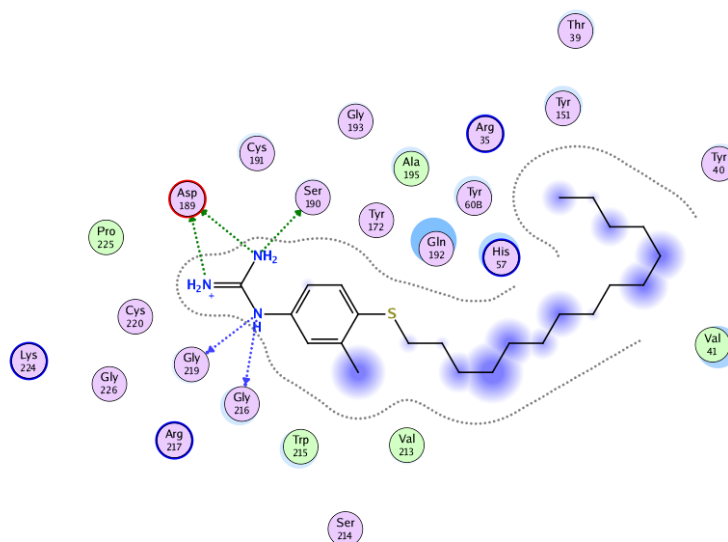
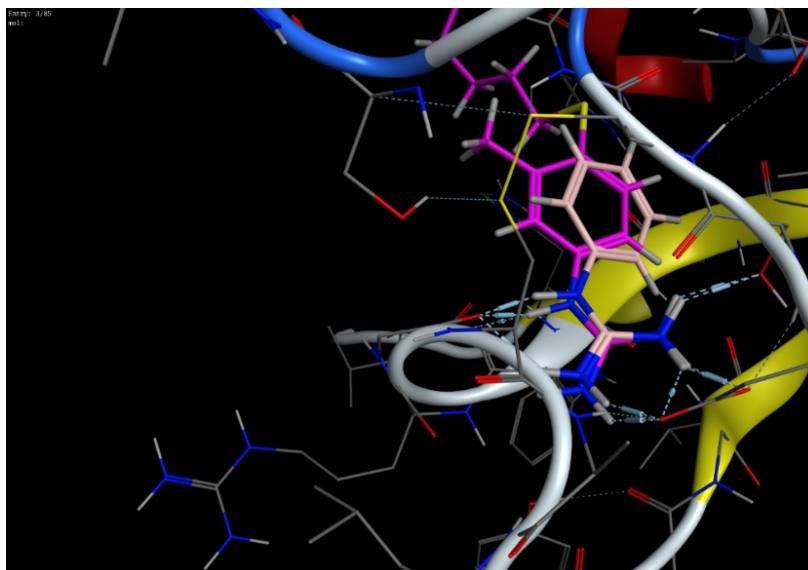


XIV

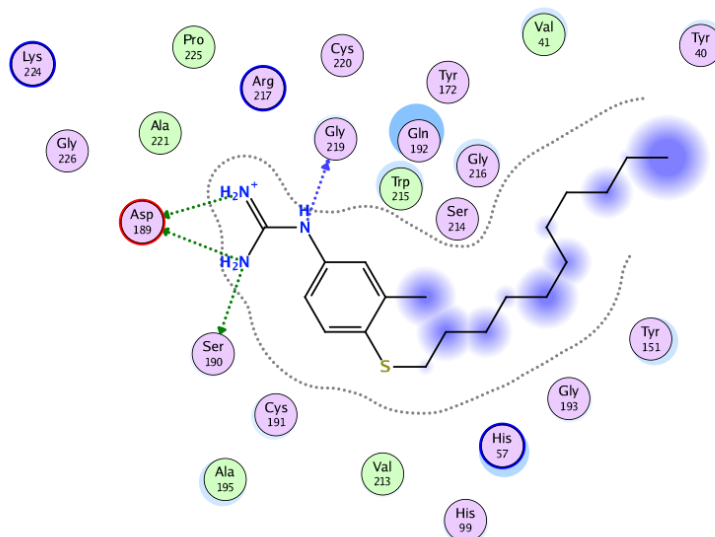
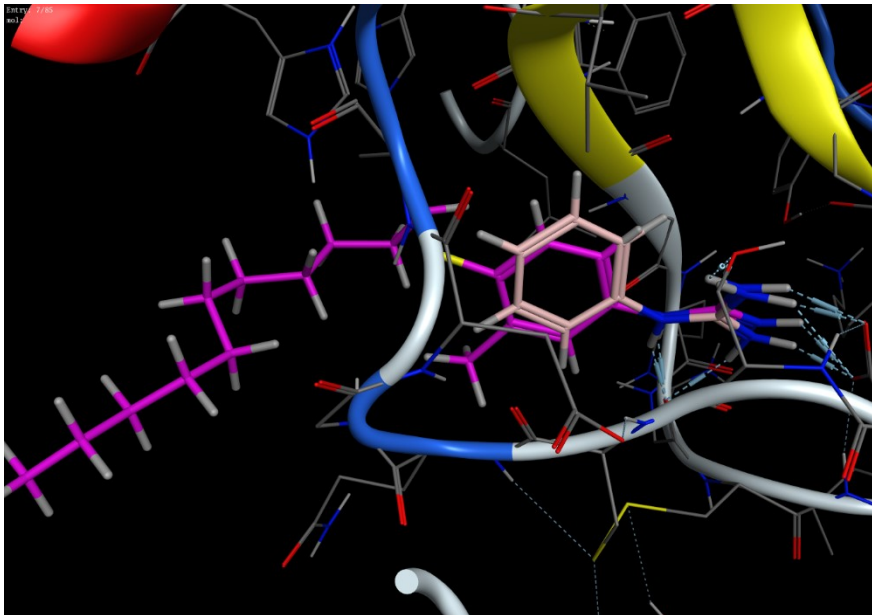
Vybrali sme si tri adukty (Obrázok 5-7).



Obrázok 5. Interakcie u tetradecylsulfanyl derivátov: Interakcia medzi vodíkom guanidínovej skupiny s aminokyselinou Asp189; NH₂ skupiny sú donorom vodíkov pre aminokyseliny; druhý vodík z guanidínovej skupiny interaguje so Ser190; ďalší vodík z guanidínovej skupiny interaguje s Gly219.



Obrázok 6. Interakcia u pentadecylsulfanyl derivátov. Plus jedna interakcia navyše s Gly219, predpokladaná kvôli energiám (u molekuly na obrázku 5 sme namerali energiu $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ a u druhej molekuly, na obrázku 6, $0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Rozdiel je malý, ale interakcia môže byť prítomná kvôli tomu.



Obrázok 7. Interakcia u undecylsulfanyl derivátov: Interakcia medzi vodíkom guanidínovej skupiny s aminokyselinou Asp189; NH₂ skupiny sú donorom vodíkov pre aminokyseliny; druhý vodík z guanidínovej skupiny interaguje so Ser190; tretí vodík s guanidínovej skupiny interaguje s Gly219; Interakcia medzi NH₂ skupinou a Ser290.

Na záver sme zistili, že fenyguanidínové deriváty s osemuhlíkatým alifatickým reťazcom nie sú najlepšou voľbou na tento enzým. Najlepšie by boli molekuly s jedenásťuhlíkatým reťazcom podľa hodnôt S/E_score2. Čím sú tieto hodnoty nižšie, tým je väzbová afinita medzi molekulou a receptorom vyššia.

4.2. Syntéza

V experimentálnej časti diplomovej práce boli použité nasledujúce chemikálie od firmy Aldrich: 2-chlór-5-nitrotoluén, oktántiol, dimetylkyanamid. Od firmy Sigma-Aldrich boli použité chemikálie: bezvodý *N,N*-dimetylformamid a bezvodý éter. Použitý kyanamid bol vyrobený firmou Fluka. Od firmy Lach-ner bol použitý etylacetát a chlorid cínatý. Použitá kyselina chlorovodíková, hexán, etanol, bezvodý síran sodný, síran sodný a kyselina dusičná boli dodané spoločnosťou Penta. Suroviny od firmy Lachema boli: pentahydrát síranu meďnatého a práškový zinok.

Infračervené spektrá boli merané na jendoodrázovom ATR (attenuated total reflectance) nástavci pomocou spektrofotometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmedzí vlnočtu 650-4000 cm^{-1} . Bol použitý germániový kryštál a spektrum bolo merané v rozlíšení 2 cm^{-1} za použitia 128 skenov. Pre meranie teploty topenia bol použitý mikrovýhrevný stolík Nagema Boetius PHMK 05.

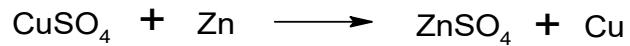
Spektrá nukleárnej magnetickej rezonancie boli namerané pri laboratórnej teplote na prístrojoch Varian VNMR S500 (500 MHz pre ^1H a 126 MHz pre ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pre ^1H a 150 MHz pre ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Pri meraniach sa ako rozpúšťadlo bol použili deuterovaný dimetylsulfoxid ($\text{DMSO-}D_6$) a chloroform (CDCl_3).

Chemické posuny sú uvedené ako hodnoty δ v parts per million (ppm) a boli nepriamo vzťahnuté k tetrametylsilánu ako štandardu pomocou zvyškového signálu rozpúšťadla. Interakčná konštanta (J) je uvedená v Hz. NMR spektrá boli vyhodnotené pomocou programu MestReNova, v. 14.2.1 (Mestrelab Research S. L., Santiago de Compostela, Španielsko).

Pre tenkovrstvovú chromatografiu boli využité ako stacionárne fázy dosky SILUFOL UV 254/366. Ako detekcia škvŕn bola použitá UV lampa s vlnovou dĺžkou 254 nm. Meranie IČ, NMR boli prevedené na katedre organickej a bioorganickej chémie rovnako ako TLC a meranie teploty topenia.

4.2.1. Príprava aktívnej medi

Molárna hmotnosť: 63,55 g.mol⁻¹

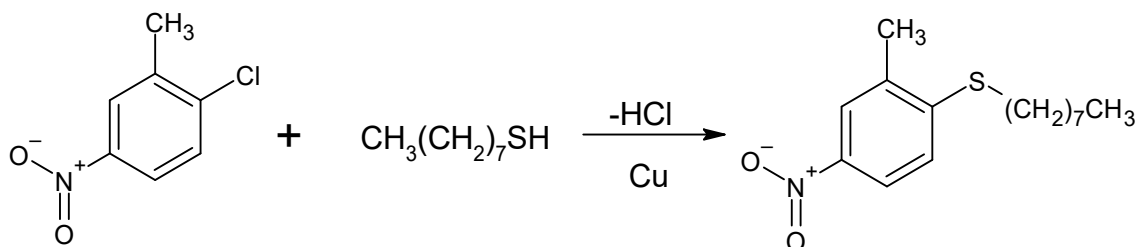


V 140 ml horúcej vody som rozpustila 40,00 g (0,1602 mol) pentahydrátu síranu meďnatého. Po ochladení som postupne pridala 12,00 g (0,1835 mol) práškového zinku.

Ďalší deň bola zmes trikrát zmiešaná s 5% roztokom kyseliny chlorovodíkovej, dokedy sa neprestal vyvíjať vodík. Získaná meď bola následne trikrát dekantovaná vodou a dvakrát 99% etanolom. Po následnom odfiltrovaní a vysušení bola meď použitá do reakcie.

4.2.2. Príprava 2-metyl-4-nitrofenyl(oktyl)sulfanu

Molárna hmotnosť: 281,23 g.mol⁻¹



V 132 ml bezvodého *N,N*-dimetylformamidu bolo rozpustených 16,40 g (0,112098 mol) oktántiolu a následne bolo pridaných 15,00 g (0,0874 mol) 2-chlór-5-nitrotoluénu, 3,34 g (0,05256 mol) aktívnej medi a 24,40 g (0,1765 mol) bezvodého uhličitanu draselného. Zmes bola zahrievaná za stáleho miešania pri teplote 155-165 °C v olejovom kúpeli pod ochrannou atmosférou dusíka po dobu desiatich hodín.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamín v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza. Po ochladení bola zmes filtrovaná a k filtrátu bola pridaná voda do zákalu. Následne bola zmes ponechaná kryštalizovať 72 hodín pri -20°C.

Produkt bol odfiltrovaný a trikrát prečistený pomocou rekryštalizácie z etanolu a pridaním aktívneho uhlia. U prečisteného produktu boli merané infračervené a NMR spektrá.

Výťažok reakcie: 9,98 g (41,0 %)

Teplota topenia produktu: 33,2-36,5 °C

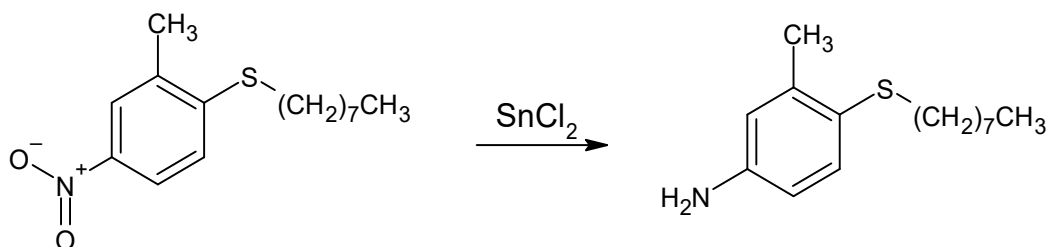
IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 2954, 2925, 2869, 1594, 1577, 1502, 1471, 1385, 1336, 1285, 1268, 768, 754

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 147.26, 143.76, 135.65, 124.19, 123.82, 121.42, 31.19, 30.52, 28.56, 28.48, 28.25, 27.84, 22.05, 19.36, 13.90

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 8.07 – 7.99 (m, 2H, Ar), 7.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar), 3.09 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.31 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.65 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.42 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.33 – 1.22 (m, 8H, CH_2), 0.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3)

4.2.3. Príprava 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínu

Molárna hmotnosť: 251,231 g.mol⁻¹



Do 104 ml bezvodého etanolu bolo pridaných 8,00 g (0,028446 mol) 2-metyl-4-nitrofenyl(oktyl)sulfanu a 32,06 g (0,1421 mol) chloridu cínateho. Zmes bola za stáleho miešania zahrievaná na teplotu 70°C po dobu šiestich hodín pod dusíkovou atmosférou.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamin v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po ukončení reakcie a po následnom vychladnutí bola zmes alkalizovaná 20% roztokom hydroxidu sodného. Zmes bola štyrikrát vytrepaná do etylacetátu. Etylacetátová fáza bola spojená a vysušená bezvodým síranom sodným. Po dni bol síran sodný odfiltrovaný a organické rozpúšťadlá oddestilované. Produkt reakcie bol prečistený rekryštalizáciou z etanolu. U prečisteného produktu boli merané infračervené a NMR spektrum.

Výťažok reakcie: 1,72 g (24,0 %)

Teplota topenia produktu: 24,1-26,9 °C

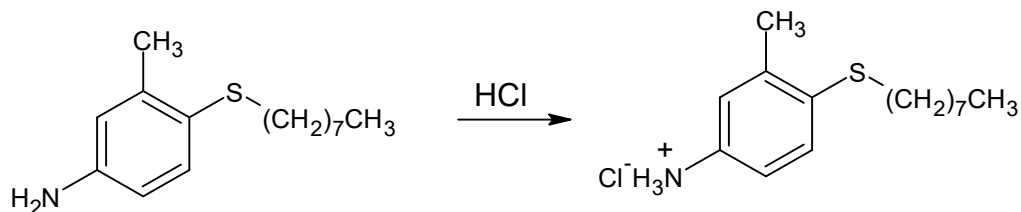
IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 3398, 3311, 2943, 2918, 2848, 1627, 1596, 1523, 1506, 1275, 1252, 1236, 853, 817

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 145.08, 139.99, 133.42, 121.49, 117.06, 113.77, 34.37, 31.19, 28.65, 28.57, 28.54, 28.04, 22.05, 20.40, 13.91

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 7.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 6.57 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, Ar), 6.50 (dd, $J = 8.3, 2.5$ Hz, 1H, Ar), 6.32 (s, 2H, NH_2), 2.66 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.24 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.45 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.33 (dd, $J = 9.1, 5.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.32 – 1.22 (m, 8H, CH_2), 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3)

4.2.4. Príprava 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chloridu

Molárna hmotnosť: 287,68 g.mol⁻¹



V 20 ml bezvodého éteru bolo rozpustené 1,50 g (0,005971 mol) 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínu. Roztok bol umiestnený vo vodnom ľadovom kúpeli a bol sýtený plynným chlorovodíkom. Zmes bola ponechaná kryštalizovať pri teplote -20°C. Vzniknutý produkt bol odfiltrovaný a bol použitý do nasledujúcej reakcie. U produktu bolo merané infračervené spektrum.

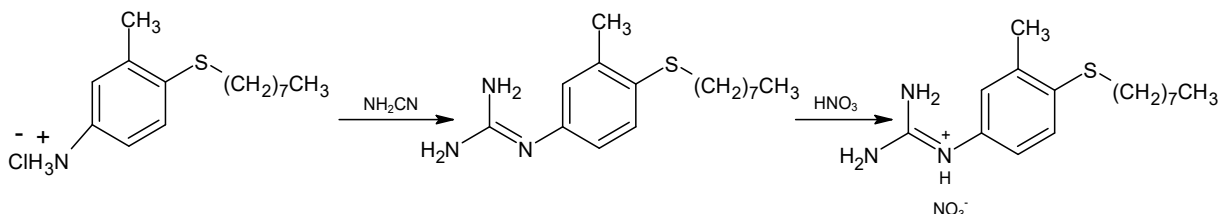
Výťažok reakcie: 1,62 g (94,2 %)

Teplota topenia produktu: 143,2-145,5 °C

IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 2956, 2922, 2872, 2855, 2611, 1606, 1566, 1531, 1488, 1233, 1181, 1171, 897, 868

4.2.5. Príprava 2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrátu

Molárna hmotnosť: 356,242 g.mol⁻¹



1,20 g (0,0041713 mol) 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chloridu bolo zmiešaných s 0,25 g (0,005947 mol) kyanamidu. Zmes bola zahrievaná na 130°C po dobu 120 minút.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamin v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po vychladnutí bola zmes rozpustená vo vode a časť okyslená kyselinou dusičnou a ponechaná kryštalizovať v chlade po dobu 24h. Zmes sme zahustili, vodu oddestilovali a nechali pri -20°C. Druhú časť zmesi sme rozpustili v horúcom etanole, pridali trošku vody a nechali kryštalizovať pri -20°C. Produkt bol dvakrát prečistený pomocou rekryštalizácie v zmesi voda, etanol v pomere 1:1.

Získané, prečistené kryštály z okyslenej časti boli analyzované pomocou infračerveného a NMR spektra.

Výťažok reakcie: 0,08 g (6,7 %)

Teplota topenia produktu: 85,6-87,2 °C

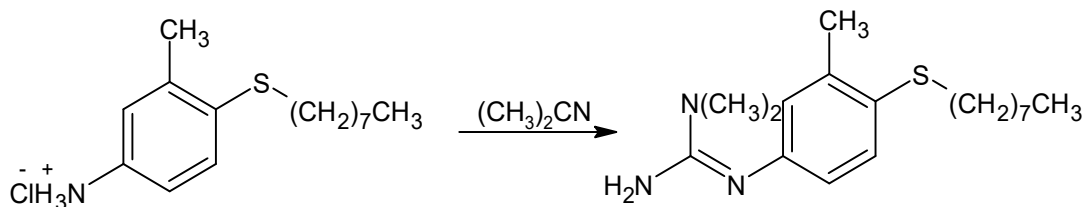
IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 3415, 3331, 3189, 2925, 2855, 1687, 1638, 1622, 1580, 1388, 13144

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 155.87, 139.19, 138.38, 130.80, 126.07, 119.31, 116.05, 33.35, 31.29, 29.00, 28.71, 28.56, 28.08, 22.09, 20.37, 13.91.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 8.48 (s, 1H, NH), 7.28 – 7.14 (m, 3H, Ar), 5.82 (s, 4H, NH_2), 2.76 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.27 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.49 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.35 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.49 – 1.19 (m, 8H, CH_2), 0.88 – 0.82 (m, 3H, CH_3).

4.2.6. Príprava 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínu

Molárna hmotnosť: 321,264 g. mol⁻¹



0,5 g (0,0014035 mol) 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chloridu bolo miešané s 0,15 g (0,002140 mol) dimetylkyanamidu. Zmes bola zahrievaná po dobu 90 minút na 110°C (zmes očividne začala reagovať už pri 98°C).

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamin v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po vychladnutí bola zmes nariedená horúcou vodou a bola alkalizovaná 20% roztokom hydroxidu sodného. Zmes bola trikrát vytrepaná do etylacetátu. Organické fázy (400ml) sme spojili a vysušili bezvodým síranom sodným. Po hodine bol síran sodný odfiltrovaný a etylacetát vákuovo oddestilovaný. Produkt bol dvakrát prečistený pomocou rekryštalizácie z etanolu. U prečisteného produktu boli merané infračervené a NMR spektrá.

Výťažok reakcie: 0,05 (11,1 %)

Teplota topenia: 51,2-53,1 °C

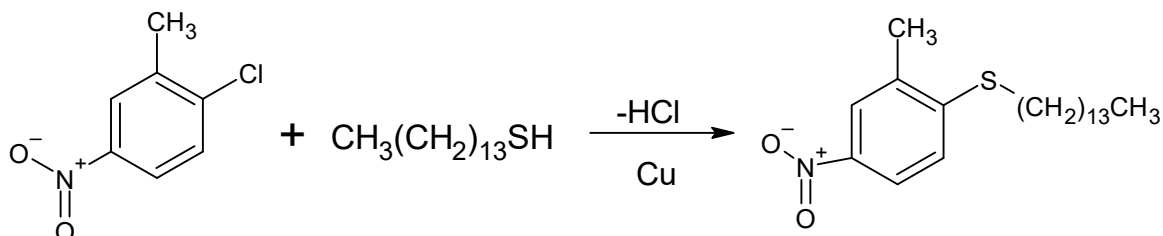
IČ (Ge-ATR, cm⁻¹): 3298, 2923, 2852, 1646, 1592, 1552, 1477, 1467, 1406, 1377, 1292, 1239, 1230, 1056, 873, 815, 786

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 155.87, 139.19, 138.38, 130.80, 126.07, 119.31, 116.05, 33.35, 31.29, 29.00, 28.71, 28.56, 28.08, 22.09, 20.37, 13.91

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 8.48 (s, 1H, NH), 7.28 – 7.14 (m, 3H, Ar), 5.82 (s, 2H, NH_2), 2.76 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.27 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.49 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.35 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.49 – 1.19 (m, 8H, CH_2), 0.88 – 0.82 (m, 3H, CH_3)

4.2.7. Príprava 2-metyl-4-nitrofenyl(tetradecyl)sulfanu

Molárna hmotnosť: 365,297 g.mol⁻¹



V 132 ml bezvodého *N,N*-dimetylformamidu bolo rozpustených 21,67 g (0,094068 mol) tetradekántiolu a následne bolo pridaných 15,00 g (0,0874 mol) 2-chlór-5-nitrotoluénu, 3,34 g (0,05256 mol) aktívnej medi a 24,40 g (0,1765 mol) bezvodého uhličitanu draselného. Zmes bola zahrievaná za stáleho miešania pri teplote 155-160 °C na olejovom kúpeli pod ochrannou atmosférou dusíka po dobu siedmych hodín.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamín v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po ukončení reakcie bola zmes ochladená, prefiltrovaná a k filtrátu bola pridaná voda do zákalu. Následne bola zmes ponechaná kryštalizovať 72 hodín pri -20°C.

Produkt bol odfiltrovaný a trikrát prečistený pomocou rekryštalizácie z etanolu a pridaním aktívneho uhlia. U prečisteného produktu boli merané infračervené a NMR spektrá.

Výťažok reakcie: 22,3 g (67,3 %)

Teplota topenia produktu: 54,1-55,4 °C

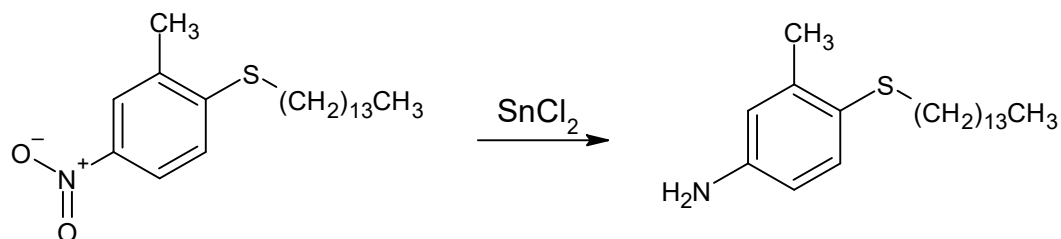
IČ spektrum (Ge-ATR, cm^{-1}): 2956, 2917, 2852, 1597, 1577, 1506, 1346, 1305, 1270, 766, 740

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 146.74, 143.85, 135.78, 124.54, 123.51, 120.99, 30.88, 30.68, 28.61, 28.57, 28.49, 28.43, 28.26, 28.08, 27.80, 27.67, 21.64, 19.06, 13.42

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 8.01 – 7.95 (m, 2H, Ar), 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 3.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.31 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.64 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.41 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.27-1.21 (m, 20H, CH_2), 0.82 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3).

4.2.8. Príprava 3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínu

Molárna hmotnosť: 335,297 g.mol⁻¹



Do 130 ml bezvodého etanolu bolo pridaných 10,00 g (0,027375 mol) 2-metyl-4-nitrofenyl(tetradecyl)sulfanu a 33,6 g (0,1489 mol) chloridu cínatého. Zmes bola za stáleho miešania zahrievaná na teplotu 70°C po dobu piatich hodín pod dusíkovou atmosférou.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamin v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po ukončení reakcie a po následnom vychladnutí bola zmes alkalizovaná 10% roztokom hydroxidu sodného. Zmes bola štyrikrát vytrepaná do etylacetátu. Etylacetátová fáza bola spojená a vysušená bezvodým síranom sodným. Po dni bol síran sodný odfiltrovaný a etylacetát vákuovo oddestilovaný. Produkt reakcie bol prečistený rekryštalizáciou z etanolu. U prečisteného produktu boli merané infračervené a NMR spektrá.

Výťažok reakcie: 8,5 g (92,4 %)

Teplota topenia produktu: 52,2-53,5 °C

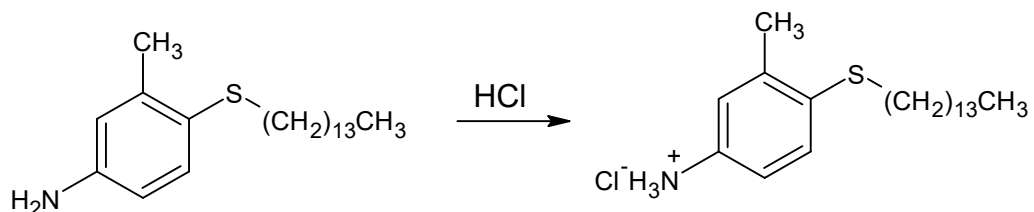
IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 3400, 3305, 2945, 2914, 2849, 1630, 1598, 1571, 1482, 1473, 1278, 1253, 743, 723

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 145.88, 141.59, 134.41, 123.53, 117.09, 113.36, 35.71, 32.07, 29.84, 29.82, 29.80, 29.75, 29.68, 29.51, 29.38, 28.99, 22.84, 20.98, 14.26

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 6.56 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, Ar), 6.48 (dd, $J = 8.2, 2.7$ Hz, 1H, Ar), 3.60 (s, 2H, NH_2), 2.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.37 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.56 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.38 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.31 – 1.24 (m, 20H), 0.89 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3)

4.2.9. Príprava 3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínium-chloridu

Molárna hmotnosť: 371,75 g.mol⁻¹



V 70 ml bezvodého éteru bolo rozpustených 10,0 g (0,029824 mol) 3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínu. Roztok bol umiestený vo vodnom ľadovom kúpeli a bol nasýtený plynným chlorovodíkom. Zmes bola ponechaná kryštalizovať pri teplote -20°C. Vzniknutý produkt bol odfiltrovaný a bol použitý do nasledujúcej reakcie. U produktu bolo merané infračervené a NMR spektrum.

Výťažok reakcie: 7,5 g (65,5 %)

Teplota topenia produktu: 118,8-120,1 °C

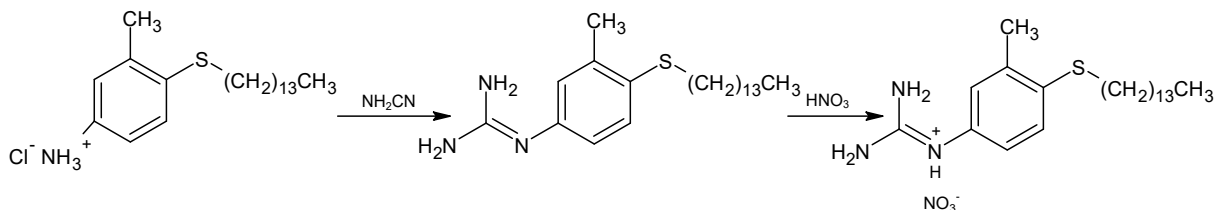
IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 2919, 2852, 2607, 1530, 1481, 1473, 1463, 1234, 1175, 1153, 743, 731

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 137.67, 134.37, 130.44, 128.37, 123.43, 120.32, 32.06, 30.96, 28.69, 28.66, 28.61, 28.57, 28.33, 28.23, 28.17, 27.87, 21.72, 19.52, 13.49

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 7.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar), 7.17 (dq, $J = 4.2$, 2.5 Hz, 2H Ar + 3H NH_3^+), 2.90 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.30 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.58 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.40 (p, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 1.31 – 1.25 (m, 20H), 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3)

4.2.10. Príprava 2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrátu

Molárna hmotnosť: 440,308 g.mol⁻¹



3,00 g (0,00807 mol) 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chloridu bolo zmiešaných s 0,37 g (0,00880114 mol) kyanamidu. Zmes bola zahrievaná na 120°C po dobu 120 minút.

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamin v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po vychladnutí bola k zmesi pridaná voda a časť okyslená kyselinou dusičnou a ponechaná kryštalizovať v chlade. Vzniknuté kryštály sme nevedeli získať z roztoku, zmes sme odparili do sucha a nechali pri -20°C po dobu 72 h. Produkt bol dvakrát prečistený pomocou rekryštalizácie v zmesi voda, etanol v pomere 1:1.

Získané kryštály boli analyzované pomocou infračerveného a NMR spektra.

Výťažok reakcie: 0,2 g (6,7 %)

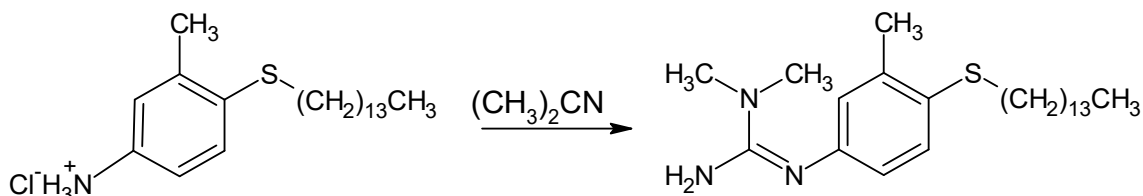
Teplota topenia produktu: 91,5-92,6 °C

IČ spektrum (Ge-ATR, cm^{-1}): 3433, 3338, 2955, 2920, 2851, 1658, 1616, 1578, 1535, 1471, 1406, 1379, 1351, 1298, 1245, 1178, 1057, 1027, 938, 881, 822, 772, 720

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 9.49 (s, 4H, NH_2), 8.49 (s, 1H, NH), 7.37 – 7.01 (m, 3H, Ar), 2.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.57 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.39 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.30 – 1.20 (m, 20H, CH_2), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3)

4.2.11. Príprava 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínu

Molárna hmotnosť: 405,33 g. mol⁻¹



3,00 g (0,0068134 mol) 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chloridu bolo miešaných s 0,51 g (0,00727636 mol) dimetylkyanamidu. Zmes bola zahrievaná po dobu 90 minút na 110°C (zmes očividne začala reagovať už pri 98°C).

Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie so stacionárnou fázou SILUFOL UV 254/366 a zmesi hexán, etanol a trietylamín v pomere 8:1:0,5 ako mobilná fáza.

Po vychladnutí bola zmes nariedená horúcou vodou a bola alkalizovaná 20% roztokom hydroxidu sodného. Zmes bola trikrát vytrepaná do etylacetátu. Organické fázy (400ml) sme spojili a vysušili bezvodým síranom sodným. Po hodine bol síran sodný odfiltrovaný a etylacetát vákuovo oddestilovaný. Produkt reakcie bol prečistený rekryštalizáciou z etanolu. U prečisteného produktu boli zmerané infračervené a NMR spektrá.

Výťažok reakcie: 0,6 g (21,7 %)

Teplota topenia produktu: 66,5-68,9 °C

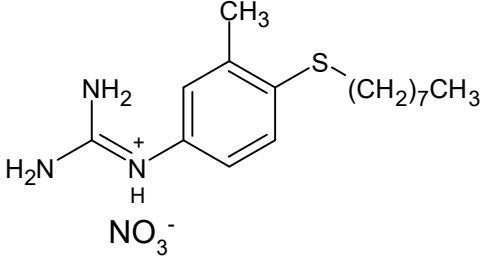
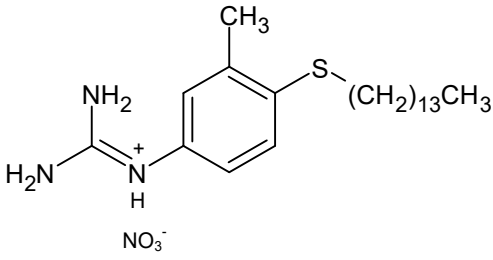
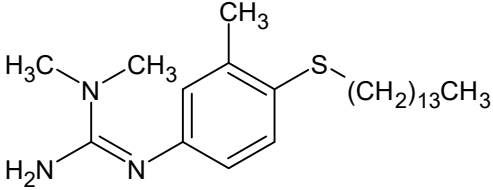
IČ spektrum (Ge-ATR, cm⁻¹): 3433, 3339, 2955, 2919, 2851, 1658, 1615, 1578, 1535, 1469, 1405, 1350, 1297, 1057, 1026, 879, 821, 774, 720

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 155.82, 137.26, 134.49, 132.08, 127.50, 126.35, 123.09, 40.05, 31.48, 31.20, 28.62, 28.59, 28.56, 28.52, 28.35, 28.31, 28.22, 28.15, 28.08, 22.06, 19.82, 13.93

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 9.49 (s, 2H, NH_2), 7.31 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, Ar), 7.09 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, Ar), 2.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.28 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 2.27 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 1.59 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2), 1.40 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.31 – 1.20 (m, 20H, CH_2), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz 3H, CH_3)

4.3. Mikrobiologická časť

Nižšie uvedené tri nasyntetizované látky (tabuľka 1) boli testované na vybraných kmeňoch potencionálne patogénnych húb a na ôsmich kmeňoch baktérií.

A	2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát	
B	2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát	
C	1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidín	

Tabuľka 1

4.3.1. Antibakteriálna aktivita

Prebiehali antibakteriálne testy na ôsmich kmeňoch baktérií: *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (SA), *Meticilín rezistentný Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus faecalis* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Acinetobacter baumannii* (ACI) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Aktivita bola testovaná v porovnaní s antibiotikami neomycinom (NEOM) a bacitracinom (BAC).

Kmeň (kód)		Testovaná látka (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				
		A	B	C	NEOM	BAC
SA	24h	125	> 500	> 250	3,9	15,62
	48h	500	> 500	> 250	3,9	31,25
MRSA	24h	250	> 500	> 250	0,98	15,62
	48h	500	> 500	> 250	0,98	31,25
SE	24h	125	> 500	> 250	3,9	15,62
	48h	500	> 500	> 250	7,81	31,25
EF	24h	500	> 500	> 250	250	31,25
	48h	> 500	> 500	> 250	250	31,25
EC	24h	250	> 500	> 250	0,98	> 500
	48h	500	> 500	> 250	0,98	> 500
KP	24h	250	> 500	> 250	0,98	> 500
	48h	500	> 500	> 250	0,98	> 500
ACI	24h	500	> 500	> 250	-	-
	48h	> 500	> 500	> 250	-	-
PA	24h	500	> 500	> 250	7,81	> 500
	48h	> 500	> 500	> 250	15,6	> 500

4.3.2. Antifungálna aktivita

U syntetizovaných látok bola skúšaná aj antifungálna aktivita na kmeňoch: *Candida albicans* (CA), *Candida krusei* (CK), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CT), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Aspergillus flavus* (AFla), *Absidia Corymbifera* (AC) a *Trichophyton interdigitale* (TI). Pri testoch ako referenčné látky boli použité dodoín (DOD) a ketokonazol (KET).

Kmeň (kód)		Testovaná látka (kód) - MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)				
		A	B	C	DOD	KET
CA	24h	7,81	> 500	> 250	7,81	< 0,24
	48h	7,81	> 500	> 250	7,81	< 0,24
CK	24h	3,9	> 500	> 250	3,91	0,98
	48h	7,81	> 500	> 250	3,91	0,98
CP	24h	7,81	> 500	> 250	-	-
	48h	7,81	> 500	> 250	-	-
CT	24h	3,9	> 500	> 250	3,91	1,95
	48h	7,81	> 500	> 250	3,91	3,91
AF	24h	15,62	> 500	> 250	7,81	7,81
	48h	31,25	> 500	> 250	15,63	7,81
AFla	24h	31,25	> 500	> 250	-	-
	48h	31,25	> 500	> 250	-	-
AC	24h	31,25	> 500	> 250	62,5	31,25
	48h	62,5	> 500	> 250	62,5	31,25
TI	24h	7,81	> 500	> 250	15,63	0,98
	48h	15,62	> 500	> 250	15,63	0,98

5. Diskusia

Experimentálna časť mojej diplomovej práce sa skladá zo štyroch syntetických krokov. V prvom kroku boli reakciou alkántiolov (oktántiol, tetradekántiol) s 2-chlór-5-nitrotoluénom syntetizované produkty 2-metyl-4-nitrofenyl(oktyl)sulfan a 2-metyl-4-nitrofenyl(tetradecyl)sulfan. Produkty tejto reakcie bol trikrát prečistený opakovanou rekryštalizáciou z horúceho etanolu a kontrolovaný pomocou TLC a teplotou topenia. Reakcie prebiehali pri 155-165°C, pod ochrannou atmosférou dusíka z dôvodu zabránenia nežiadúcich reakcií. Výťažky sa pohybovali v rozmedzí 41-67 %.

Nasledovala redukcia nitroskupiny za použitia chloridu cínateho na amín, ktorá u látky s vyšším alifatickým reťazcom prebiehala bez problémov s vysokou výťažnosťou až 92,4%. Tento produkt mal teplotu topenia okolo laboratórnej teploty, takže čistenie a následná izolácia bola problémová. Pred prípravou 3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínu sme už vedeli, že nitrolátku treba úplne prečistiť, aby redukcia prebiehala bezproblémovo. Čistota hrala dôležitú úlohu, pretože po prevedení produktu na anilínium-chlorid je čistenie látky ešte viac komplikované. Výťažok 3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínu bol 24 %.

Prevedenie derivátov anilínu na odpovedajúci anilínium-chlorid prebiehalo bezproblémovo, teplota topenia sa zvýšila vďaka prevedeniu na soľ. Výťažky sa pohybovali v rozmedzí 66-94 %.

Posledné reakcie prebiehali s kyanamidom alebo dimetylkyanamidom. Podľa predchádzajúcich diplomových prác [38], [39] sme vedeli, že množstvo kyanamidu by malo byť 120% látkového množstva anilínium-chloridu. Reaktanty začali reagovať už aj pri nižšej teplote ako bolo stanovené, a to okolo 98°C. Reakcia po celú dobu bola sledovaná pomocou TLC, teplota a čas zahrievania sa menili individuálne. Po ukončení reakcie boli nemetylované deriváty guanidínu prevedené na nitráty pomocou kyseliny dusičnej, pretože by sa neochotne kryštalizovali. Dimetylované deriváty boli ponechané v bázičkej forme po alkalizácií hydroxidom sodným. Čistenie produktu prebiehalo vytrepaním do etylacetátu a následnou rekryštalizáciou z etanolu. U výsledných nemetylovaných derivátov sa výťažky pohybovali v rozmedzí 6-7 % a v prípade

1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínu a 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínu v rozmedzí 11-22 %.

Všetky látky, ich charakterizácia, overenie štruktúry boli prevedené pomocou TLC, IČ, NMR a teplotou topenia.

Látky boli testované na antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu. Z tabuľky na antibakteriálnu aktivitu vyplýva, že ani jedna z testovaných látok nebola výrazne účinná. Látka 2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát je podľa výsledkov najúčinnější proti plesňovým patogénom. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) sa pohybovala medzi 3,9-62,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Jej účinnosť je porovnateľná s účinnosťou dodínu, v prípade *Absidie corymbifery* (AC) a *Trichophyton interdigitale* (TI) po 24h je aj vyššia. V prípade ketokonazolu jej účinnosť je porovnateľná v prípade *Absidia Corymbifera* (AC) po 24h.

6. Záver

V rámci mojej diplomovej práce bolo syntetizovaných desať zatiaľ nepopísaných látok:

2-metyl-4-nitrofenyl(oktyl)sulfan

2-metyl-4-nitrofenyl(tetradecyl)sulfan

3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilín

3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilín

3-metyl-4-(oktylsulfanyl)anilínium-chlorid

3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)anilínium-chlorid

2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát

2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát

1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidín

1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidín

Látky 2-[3-metyl-4-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát, 2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidínium-nitrát a 1,1-dimetyl-2-[3-metyl-4-(tetradecylsulfanyl)fenyl]guanidín boli testované na antifungálnu a antibakteriálnu aktivitu na katedre biologických a lekárskeho vied.

Na túto prácu by mohli naviazať ďalšie štúdie, ktoré by hľadali optimálnu dĺžku alkylového reťazca pri rovnakom substitúcií jadra pre lepšiu biologickú aktivitu.

7. Použitá literatura:

- [1] Y. L. Chang, S. J. Yu, J. Heitman, M. Wellington, and Y. L. Chen, "New facets of antifungal therapy," *Virulence*, vol. 8, no. 2, pp. 222–236, 2017, doi: 10.1080/21505594.2016.1257457.
- [2] D. S. Perlin, R. Rautemaa-Richardson, and A. Alastruey-Izquierdo, "The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 17, no. 12, pp. e383–e392, Dec. 2017, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.
- [3] V. Buchta *et al.*, "Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz," *Dermatologie pro praxi*, vol. 3, p. 118, 2009.
- [4] A. J. Papa, "Guanidine derivatives," *Chemical Abstr.* 65, vol. 15242b, no. Evans Medical Ltd, Dutch Patent 6511047, 1966.
- [5] G. Lamb, "Dodecylguanidine salts as fruit-tree fungicides," *Chemical Abstr.* 53, no. United States Patent 2867562, 1959.
- [6] S. D. P. Baugh *et al.*, "Highly potent, broadly active antifungal agents for the treatment of invasive fungal infections," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 33, no. 127727, p. 6, 2021.
- [7] H. Choi, K. J. Kim, and D. G. Lee, "Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action," *Fungal Biol.*, vol. 121, no. 1, pp. 53–60, 2017, doi: 10.1016/j.funbio.2016.09.001.
- [8] J. F. Miller and D. W. Bolen, "A guanidine hydrochloride induced change in ribonuclease without gross unfolding," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 81, no. 2, pp. 610–615, 1978.
- [9] A. N. Muttathukattil, S. Srinivasan, A. Halder, and G. Reddy, "Role of Guanidinium-Carboxylate Ion Interaction in Enzyme Inhibition with Implications for Drug Design," *J. Phys. Chem. B*, vol. 123, no. 44, pp. 9302–9311, 2019, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b06130.

- [10] M. Karplus and J. Kuriyan, "Molecular dynamics and protein function," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 19, pp. 6679–6685, 2005, doi: 10.1073/pnas.0408930102.
- [11] J. C. Phillips *et al.*, "Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures withNAMD," *J. Chem. Phys.*, vol. 153, no. 4, p. 44130, Jul. 2020, doi: 10.1063/5.0014475.
- [12] W. F. van Gunsteren, J. Dolenc, and A. E. Mark, "Molecular simulation as an aid to experimentalists," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 149–153, 2008, doi: 10.1016/j.sbi.2007.12.007.
- [13] P. Ungerer, J. Collell, and M. Yiannourakou, "Molecular modeling of the volumetric and thermodynamic properties of kerogen: Influence of organic type and maturity," *Energy and Fuels*, vol. 29, no. 1, pp. 91–105, 2015, doi: 10.1021/ef502154k.
- [14] L. Pinzi and G. Rastelli, "Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, 2019, doi: 10.3390/ijms20184331.
- [15] V. Salmaso and S. Moro, "Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, pp. 1–16, 2018.
- [16] S. Kalyanamoorthy and Y. P. Chen, "Structure-based drug design to augment hit discovery," *Drug Discov. Today*, vol. 16, no. 17–18, pp. 831–839, 2011, doi: 10.1016/j.drudis.2011.07.006.
- [17] L. G. Ferreira, R. N. Santos, G. Oliva, and A. D. Andricopulo, "Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies," *Molecules*, vol. 20, p. 38, 2015.
- [18] S.-C. Su, C.-W. Lin, W.-E. Yang, W.-L. Fan, and S.-F. Yang, "The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies," *Expert Opin.*, vol. 20, no. 5, pp. 551–566, May 2015.

- [19] C. M. Hekman and D. J. Loskutoff, "Kinetic analysis of the interactions between plasminogen activator inhibitor 1 and both urokinase and tissue plasminogen activator," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 262, no. 1, pp. 199–210, 1988, doi: 10.1016/0003-9861(88)90182-8.
- [20] C. G. Barber, R. P. Dickinson, and V. A. Horne, "Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 1: 2-pyridinylguanidines," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 12, no. 2, pp. 181–184, 2002, doi: 10.1016/S0960-894X(01)00701-6.
- [21] P. V Fish *et al.*, *Selective Urokinase-Type Plasminogen Activator Inhibitors. 4. 1-(7-Sulfonamidoisoquinoliny)guanidines*. 2007.
- [22] J. McMurry, "Organická Chémia," Nakladatelství VUTIUM, Brno, 2015, p. 586.
- [23] J. Pacák, "Úvod do stúdia organické chémie," SNTL, Praha, 1982, p. s. 138.
- [24] L. D. M. Uher, K. Antos, P. Kristian, *Isothiocyanates, XVIII, The synthesis and infrared spectra of (p-isothiocyanatophenyl) alkyl sulfides and (p-isothiocyanatophenyl) alkyl sulfones*. Chem. Zvesti., 1967.
- [25] M. P. M. Rajsner, J. Metysova, E. Svatek, F. Miksik, *Neurotropic and Psychotropic agents LCCVIII. The 2- and 3-fluoro derivative of chlorprothixene*. Collect Czech. Chem. Commun. 40, 1975.
- [26] F. M. Červinka O., Dědek V., "Organická chémie," SNTL, Praha, 1980, p. s. 419.
- [27] D. R. Levering, F. L. Morritz, and E. Lieber, "The Promoter Effect of Platinic Chloride on Raney Nickel. I. General Effects on Type W-6 Catalyst," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 3, pp. 1190–1194, 1950, doi: 10.1021/ja01159a032.
- [28] A. T. Fuller, I. M. Tonkin, and J. Walker, "Chemotherapeutic agents of the sulphone type. Part II. Sulphones related to benzamidine and benzylamine," *J. Chem. Soc.*, no. 0, pp. 633–640, Jan. 1945, doi: 10.1039/JR9450000633.

- [29] Y. O. Toshio Satoh, Naoki Mitsuo, Mayumi Nishiki, Yasuyuki Inoue, "Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Sodium Borohydride-Stannous Chloride," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 29, no. 5, pp. 1443–1445, 1981.
- [30] P. Adams and F. A. Baron, "ESTERS OF CARBAMIC ACID V . Methods of Analysis. Thermal Decomposition. Hydrolysis.," in *Berkely Chemical Reviews 1965*, 1965, pp. 567–597.
- [31] C.-J. Zeng *et al.*, "Copper(i) Iodide-Catalyzed Synthesis of *N,N*-Disubstituted Guanidines from *N*-Substituted Cyanamides*," *Aust. J. Chem.*, vol. 67, no. 7, pp. 1134–1137, Jun. 2014, doi: 10.1071/CH14197.
- [32] C. C. Lin *et al.*, "Practical synthesis of *N*-substituted cyanamides via tiemann rearrangement of amidoximes," *Org. Lett.*, vol. 16, no. 3, pp. 892–895, 2014, doi: 10.1021/ol403645y.
- [33] R. Lihotzky, "Cyanamide," in *Ullmann's Encyklopedie der technischen Chemie, 4. Auflage Band 9*, Verlag Chemie, Weinheim, 1975, pp. 642–645.
- [34] K. Alix *et al.*, "Superagonist, Full Agonist, Partial Agonist, and Antagonist Actions of Arylguanidines at 5-Hydroxytryptamine-3 (5-HT₃) Subunit A Receptors," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 7, no. 11, pp. 1565–1574, 2016, doi: 10.1021/acschemneuro.6b00196.
- [35] R.H. McKee, "On the oxygen ethers of the ureas methyl and ethylisourea," *Am. Chem.*, vol. 26, pp. 209–264, 1901.
- [36] R. Waditschatka, "Process for the production of guanidine derivatives," no. Patent US5276186, pp. 2–5, 1994.
- [37] N. S. Pagadala, K. Syed, and J. Tuszynski, "Software for molecular docking: a review," *Biophys. Rev.*, vol. 9, no. 2, p. 91, Apr. 2017, doi: 10.1007/S12551-016-0247-1.

- [38] O. Straka, "Syntéza substituovaných arylguanidinů jako potencionálních léčiv XIII.," Diplomova práce, *Katedra organické a bioorganické chemie*, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2018, pp. 33-35.
- [39] O. Vidrna, "Syntéza substituovaných arylguanidinů jako potenciálních léčiv IX.," in *Katedra anorganické a organické chemie*, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové 2013, pp. 21–61.