

Sinteza i karakterizacija 9a-N-aminopropil i 4''-O-aminopropil derivata azitromicina

Horvat, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:157902>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marko Horvat

Sinteza i karakterizacija *9a-N*-aminopropil i *4''-O*-aminopropil derivata azitromicina

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za medicinsku kemiju Selvite d.o.o. pod mentorstvom dr. sc. Mirjane Bukvić i prof. dr. sc. Predraga Novaka

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije* (IP-2018-01-8098, voditelj projekta: prof. dr. sc. Predrag Novak)

Zahvale

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku, na pruženim prilikama, savjetima i mentorstvu pri izvedbi i izradi Završnog i Diplomskog rada.

Moje zahvale idu Selviti d.o.o na mogućnosti izrade Diplomskog rada.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mirjani Bukvić radi njenog gostoprimstva, prenesenog iskustva, strpljenja, savjeta, empatije i još mnogo toga.

Također zahvaljujem članovima stručnog povjerenstva doc. dr. sc. Daniju Škalameri i prof. dr. sc. Mirti Rubčić na uloženom trudu koji je unaprijedio ovaj rad.

Hvala svim kolegama i prijateljima koji su ovo razdoblje studiranja učinili ljepšim i zabavnijim.

Hvala Ivici na svoj zezanciji, podršci, i društvu.

I na kraju, najveće hvala ide mojoj mami, bez čije ljubavi, povjerenja i razumijevanja ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Hvala ti.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Nomenklatura, struktura i klasifikacija makrolida.....	3
2.2. Svojstva i uporaba makrolidnih antibiotika.....	5
2.3. Eritromicin A.....	8
2.4. Prva i druga generacija semisintetskih derivata eritromicina A	9
2.5. Treća i četvrta generacija semisintetskih derivata eritromicina A	15
2.6. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika.....	19
2.7. Mehanizmi rezistencije na makrolidne antibiotike.....	23
2.8. Tiosemikarbazoni.....	26
2.9. Makrozoni.....	28
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. Materijali i metode.....	32
3.1.1. Kemikalije i materijali	32
3.1.2. Instrumentne metode.....	32
3.2. Sinteza tiosemikarbazonских međuprodukata	34
3.2.1. 2-Karboksibenzaldehid tiosemikarbazon (I).....	34
3.2.2. 3-Karboksi-4-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon (II).....	35
3.3. Sinteza makrolidnih međuprodukata	36
3.3.1. Sinteza 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (III)	36
3.3.2. Sinteza 4''-O- γ -aminopropil-azitromicina (IV).....	38
3.4. Sinteza makrozona	43
3.4.1. Sinteza 9a-N- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (V).....	43
3.4.2. Sinteza 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (VI).....	44
3.4.3. Sinteza 9a-N- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (VII).....	45
3.4.4. Sinteza 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (VIII).....	46
3.5. Testiranje antimikrobnog učinka	47
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	48
4.1. Sinteza tiosemikarbazonских međuprodukata	48
4.1.1. 2-Karboksibenzaldehid tiosemikarbazon (I).....	48

4.1.2. 3-Karboksi-4-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon (II).....	49
4.2. Sinteza makrolidnih međuprodukata	50
4.2.1. Sinteza 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (III)	50
4.2.2. Sinteza 4"-O- γ -aminopropil-azitromicina (IV)	50
4.3. Sinteza makrozona	52
4.3.1. Sinteza 9a-N- i 4"-O- γ -aminopropil makrozonskih derivata (V) i (VI)	52
4.3.2. Sinteza 9a-N- i 4"-O- γ -aminopropil makrozonskih derivata (VII) i (VIII)	53
4.4. Potvrda strukture pripremljenih makrozona NMR tehnikama	55
4.5. Antibakterijska aktivnost pripremljenih makrozona.....	65
§ 5. ZAKLJUČAK	69
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	70
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	LXXII
§ 8. DODATAK	LXXVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	LXXXIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

SINTEZA I KARAKTERIZACIJA 9*A*-*N*-AMINOPROPIL I 4''-*O*-AMINOPROPIL DERIVATA AZITROMICINA

Marko Horvat

Makrolidni antibiotici, kao što je azitromicin, imaju široku primjenu u liječenju infekcija dišnih puteva uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Tiosemikarbazoni, kao i neki njihovi metalni kompleksi, također pokazuju antibiotsku, protuupalnu i antitumorsku aktivnost. Racionalnim pristupom u spajanju ovih dviju klasa spojeva moguće je dobiti novu klasu makrolidnih konjugata „makrozona“, s poboljšanom biološkom aktivnošću, ujedno aktivnim i na rezistentne bakterijske sojeve. Stoga su sintetizirani novi biološki aktivni konjugati makrolidnih antibiotika dobivenih vezanjem različitih tiosemikarbazonskih derivata na 9*a*-*N* i 4''-*O* γ -aminopropil-azitromicin uz izolaciju putem preparativnog LC-MS-a i njihovu karakterizaciju pomoću 1D i 2D NMR-a. Pripremljenim spojevima ispitano je antimikrobno djelovanje na niz osjetljivih i rezistentnih sojeva Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) i Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*) ključnim za područje djelovanja makrolidnih antibiotika.

(71 stranica, 64 slike, 6 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: antibiotici, azitromicin, ispitivanje in vitro, makrozoni, rezistencija, tiosemikarbazoni

Mentori: dr. sc. Mirjana Bukvić., zn. sur. i prof. dr. sc. Predrag Novak

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
 3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 29.9.2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF 9A-N-AMINOPROPYL AND 4"-O-AMINOPROPYL DERIVATIVES OF AZITHROMYCIN

Marko Horvat

Macrolide antibiotics, such as azithromycin, have wide application in the treatment of respiratory infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Thiosemicarbazones, as well as some of their metal complexes, also show antibiotic, anti-inflammatory and antitumor activity. With a rational approach in combining these two classes of compounds, it is possible to obtain a new class of macrolide conjugates "macrozones", with improved biological activity, while also active in resistant bacterial strains. Thus, new biologically active conjugates of macrolide antibiotics obtained by binding various thiosemicarbazone derivatives to 9a-N and 4"-O γ -aminopropyl-azithromycin were synthesized with isolation by preparative LC-MS and their characterization by 1D and 2D NMR. The prepared compounds were tested for antimicrobial activity on a number of sensitive and resistant strains of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Moraxella catarrhalis*) which are crucial for the area of application of macrolide antibiotics.

(71 pages, 64 figures, 6 tables, 47 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: antibiotics, azithromycin, in vitro evaluation, macrozone, resistance, thiosemicarbazone

Mentors: Dr. Mirjana Bukvić., Research Associate and Dr. Predrag Novak., Professor

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Professor
2. Dr. Mirta Rubčić, Professor
3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
4. Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: 29.9.2022.

§ 1. UVOD

Makrolidi, u svojoj užoj definiciji, predstavljaju klasu antimikrobnih spojeva okarakteriziranih makrolaktonskim prstenom, na kojem se nalaze vezani glikozidnom vezom, jedan ili više šećernih supstituenata. Osnovna podjela makrolida temelji se na veličini njihovog makrolaktonskog prstena, pri čemu se izdvajaju tri skupine: 12-eročlani, 14-eročlani te 16-eročlani makrolidi. 14-eročlani spojevi su izrazito korišteni, te imaju istaknutu ulogu u liječenju infekcija kože i dišnih puteva uzrokovanih Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama uz još indikacija. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika temelji se na inhibiciji sinteze proteina na bakterijskom ribosomu, pri čemu se odlikuju primarno bakteriostatskim djelovanjem. 14-eročlani makrolid eritromicin A, sekundarni metabolit bakterije *Saccharopolyspora erythraea*, je prvi makrolidni antibiotik koji je uveden u kliničku uporabu, te je poslužio kao osnova za niz semisintetskih puteva sa ciljem pronalaženja novih makrolidnih antibiotika poboljšane aktivnosti, farmakokinetike (pogotovo bolje stabilnosti u kiselom mediju želuca), šireg antibakterijskog spektra te povoljnijeg sigurnosnog profila, radi niza nedostataka eritromicina A, ali i drugih izoliranih makrolidnih antibiotika.^{1,2}

Kao rezultat sintetskih napora radi poboljšanja gornjih svojstava u takozvanoj drugoj generaciji makrolidnih antibiotika, istaknut je azitromicin, koji pripada 15-eročlanim azalidima, makrolidima nastalim ekspanzijom makrolaktonskog prstena uvođenjem dušikovog atoma. Usprkos nižoj *in vitro* aktivnosti naspram eritromicina A, prošireni spektar djelovanja, odlična farmakokinetika te bolji sigurnosni profil osigurali su nezamjenjivu ulogu azitromicina na tržištu antibiotika. Kao zadatak novijih generacija makrolidnih antibiotika, ističe se borba protiv rastuće bakterijske rezistencije, koja se odvija primarno putem izbacivanja makrolida van stanice (pomoću aktivnih transportera), te mutacija ili metilacija na bakterijskom ribosomu. Radi neuspjeha telitromicina i solitromicina, pripadnika novije skupine 14-eročlanih makrolidnih antibiotika ketolida, nastavlja se potraga za novim makrolidima efektivnim protiv rezistentnih bakterija.^{2,3}

Osim antibakterijske aktivnosti, makrolidi također pokazuju imunomodularnu i protuupalnu aktivnost, a neki od njih i niz drugih svojstava poput antiviralne, antitumorske, antimalarijske i tuberkulostatske aktivnosti. Prije istaknuta svojstva azitromicina, ali i drugih predstavnika azalidne skupine, dovela su stoga do istraživanja makrolidnih hibrida, odnosno

kombinacije dva ili više farmakofora u jednu molekulu, kao odgovor na potragu za boljim makrolidima, ali i općenito boljim lijekovima.^{4,5}

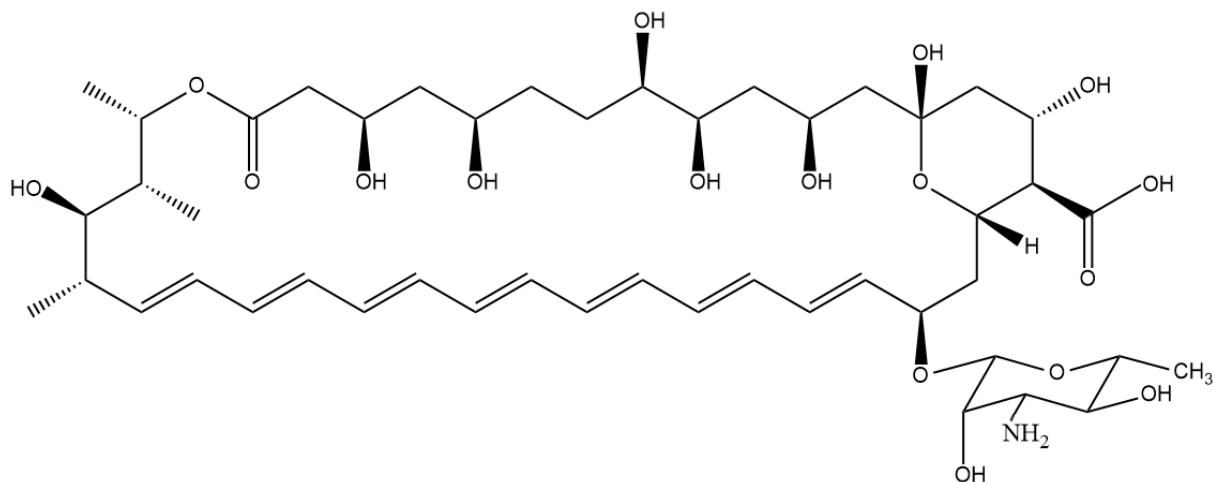
Tiosemikarbazoni i njihovi metalni kompleksi se također ističu kao spojevi sa nizom pogodnih svojstava poput antibakterijske, antituberkulozne, protuupalne i antitumorske aktivnosti. Također je zanimljiva uloga konjugata tiosemikarbazida u smanjenju mehanizma rezistencije putem aktivnih transportera. Stoga je cilj ovog rada nastavak prijašnjih sinteza nove klase makrolidnih konjugata „makrozona“, s poboljšanom biološkom aktivnošću, ujedno aktivnim i na rezistentne bakterijske sojeve.^{6,7,8}

Novi biološki aktivni konjugati makrolidnih antibiotika dobiveni su vezanjem različitih tiosemikarbazonских derivata na 9a-N i 4''-O γ -aminopropil-azitromicin uz izolaciju putem LC-MS-a i njihovu karakterizaciju pomoću 1D i 2D NMR-a. Antimikrobno djelovanje sintetiziranih spojeva ispitano je na niz osjetljivih i rezistentnih sojeva Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) i Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Moraxella catarrhalis*) ključnim za područje djelovanja makrolidnih antibiotika.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nomenklatura, struktura i klasifikacija makrolida

Naziv „makrolidi“ za skupinu spojeva prirodnog podrijetla predložio je 1957. organski kemičar R. B. Woodward kao skraćenica naziva „makrolaktonski glikozidi“, pri čemu se naziv ponajviše odnosi na antibiotske spojeve koji se sastoje od makrolaktonskog prstena aglikona varijabilne veličine, primarno 12, 14 ili 16-eročanih prstena sa jedan ili više šećera povezanih na prsten O-glikozidnom vezom, uz manji broj drugih supstituenata poput karbonilnih, alkilnih, alkoksidnih ili hidroksilnih skupina. U široj definiciji, pojam obuhvaća makrolaktonske spojeve bez šećernih supstituenata, bez antibiotskog djelovanja, uključuje molekule s raznovrsnim aktivnostima, (antiviralno, antitumorsko, tuberkulostatsko, antimalarijsko, antiparazitsko djelovanje i dr.) varijabilnijim veličinama prstena (8 do 62-očlani), što primjerice obuhvaća antifungalne poliene, skupinu spojeva sa visoko konjugiranim prstenom te amino šećernim supstituentom, poput 36-eročlanog amfotericina B. Gdje nije izričito istaknuto, nadalje pojam makrolid odnosit će se na užu definiciju tog pojma.^{1,4}

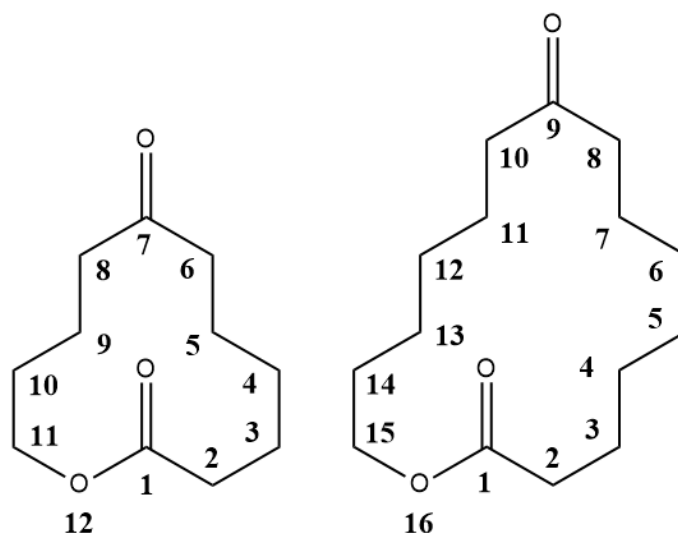


Slika 1. Prikaz antifungalnog lijeka amfotericina B (Prilagođeno prema Ref. 9)

Makrolidi nastaju primarno u redu *Actinomycelates*, skupini micelij formirajućih Gram-pozitivnih bakterija. To uglavnom obuhvaća rodove *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* i *Actinoplanes*. Također su sekundarni metaboliti, te nastaju tipično u kasnijim fazama logaritamskog rasta i tijekom stacionarne faze rasta bakterija. U široj definiciji

javlja se i niz drugih organizama koji produciraju makrolide, poput Gram-negativnog reda *Myxobacteria*, insekata, algi i biljaka.^{1,4}

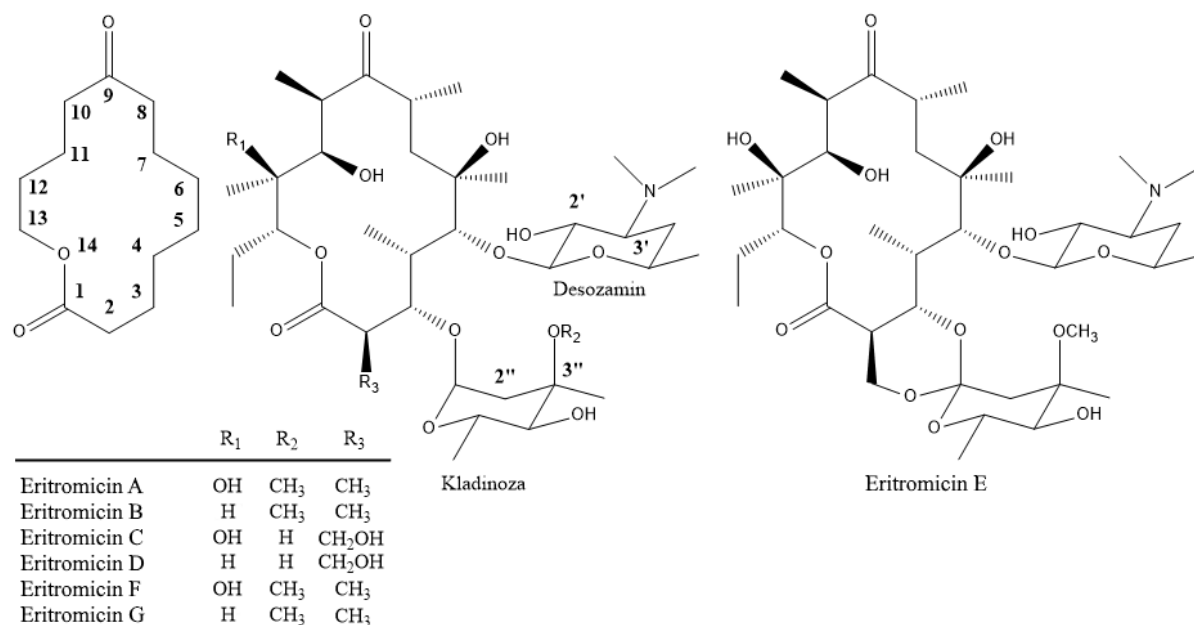
Kao što je već spomenuto, osnovna klasifikacija makrolida zasniva se na veličini makrolaktonskog prstena. 12-eročlana skupina makrolida nije pokazala dovoljan antibiotski potencijal, te stoga nije dalje razvijena. 16-eročlani makrolidi su najbrojnija skupina, te su uglavnom pronašli primjenu u veterinarstvu, uz manji broj spojeva razvijenih za uporabu na ljudima. Dijelev se u 4 podskupine na temelju strukture makrolaktonskog prstena nastalog tijekom biosinteze, a prije njegove modifikacije. To su platenolidna, tilaktonska, micinamicinska i kalkozna/neutramicinska skupina. Unutar skupine, razlikuju se u poziciji i broju šećernih supstituenata, prisutnosti acil grupa na šećerima, te dodatnim modifikacijama prstena poput hidroksilacija ili acilacija.^{1,10}



Slika 2. Opći izgled i numeracija 12 i 16-eročlanog makrolaktonskog prstena (Preuzeto i prilagođeno prema Ref 1,4)

14-eročlani makrolidi čine izrazito korištenu skupinu makrolida u kliničkoj praksi. Spoj koji se najviše istaknuo svojim antibiotskim djelovanjem je eritromicin A, te je ujedno prvi makrolid pušten u uporabu. Neki od drugih predstavnika skupine koji su prirodni spojevi su oleandomicin, megalomicin i prekursori ili nusprodukti sinteze eritromicina A, eritromicini B-G. Osim 14-eročlanog prstena, generalna karakteristika ove skupine je prisutnost šećernog supstituenta desozamina na C-5 atomu, dok varijabilnost daju različiti neutralni šećeri na C-3 atomu (kod eritromicina A to je kladinoza), te prisustvo i rasporedi drugih supstituenata na C-13 lancu, ili drugdje duž prstena. Osim prirodnih spojeva, tu se može i ubrojiti podulji niz

semisintetskih derivata eritromicina A, uključujući i 15-eročlane makrolide azalide o kojima će biti više rečeno kasnije.^{1,11}



Slika 3. Opći izgled i numeracija 14-eročlanog makrolaktonskog prstena te šećera desozamina i kladinoze, uz predstavnike 14-eročlanih makrolida, eritromicina A-G (Prilagođeno prema Ref. 1,11)

2.2. Svojstva i uporaba makrolidnih antibiotika

Makrolidi su široko primijenjena skupina spojeva, te u europskim zemljama čine drugu najveću skupinu antibiotika poslije penicilina. Imaju istaknutu ulogu u liječenju infekcija dišnih puteva uzrokovanih nizom bakterija poput *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ili *Mycoplasma pneumoniae*, te u infekcijama kože i mekih tkiva uzrokovanih stafilokokima, *Streptococcus pyogenes* i *Propionobacter acnes*. Također nalaze primjenu u liječenju određenih spolnih bolesti (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*) i čireva na želucu (*Helicobacter pylori*). 14-ero i 15-eročlani makrolidi ističu se protuupalnom i imunomodularnom aktivnošću, te se stoga koriste i za niz drugih indikacija, poput cistične fibroze, kroničnog bronhitisa, difuznog panbronhiolitisa itd. Općenito se može reći da su makrolidi efektivni protiv niza infekcija čiji su uzročnici uglavnom Gram-

pozitivne bakterije, s ograničenim rasponom efektivnosti protiv Gram-negativnih bakterija.^{1,10,12}

Distinktno farmakološko svojstvo makrolida je visoka razina penetracije u tkiva i stanice. Koncentracije u tkivima dosežu 10 do 100 puta veće vrijednosti nego one izmjerene u plazmi, a stanice inkubirane s makrolidima u trajanju od 3 sata su pokazale 500 puta veću intracelularnu koncentraciju od ekstracelularne. To svojstvo ovisi o vrsti tkiva i stanica. Stanice koje vrše fagocitozu (poput neutrofila i makrofaga) pogotovo akumuliraju makrolide. Radi uloge istih u imunološkom odgovoru, makrolidi se ukoncentriravaju na mjestima infekcije, poput raznih tkiva i fluida. Visoka razina intracelularne akumulacije ih također čini korisnima protiv intracelularnih parazita. Zahvaljujući navedenim svojstvima, makrolidi sa relativno slabim *in vitro* djelovanjem mogu biti izrazito efektivni *in vivo*.^{1,12,13}

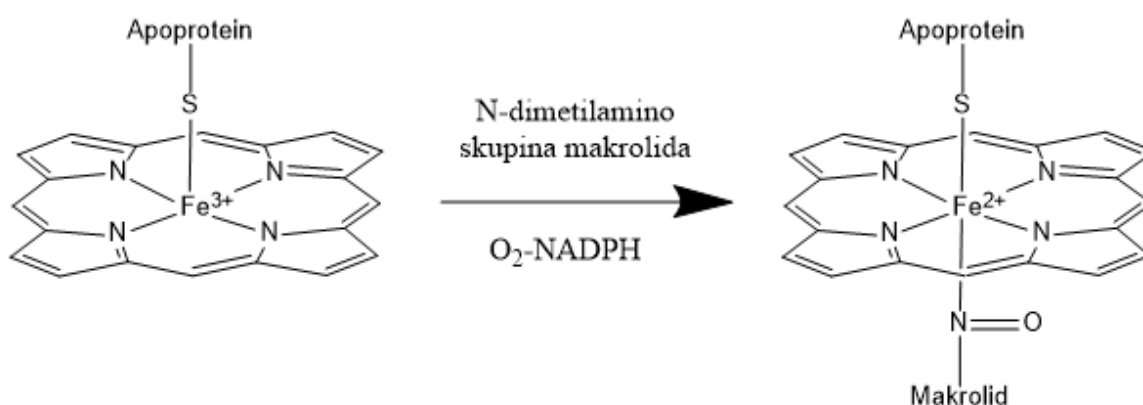
Makar nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da mehanizam akumulacije uključuje pasivni transport putem difuzije relativno lipofilnih makrolida preko stanične membrane, te zarobljavanje u kiselim staničnim organelima poput lizosoma protonacijom, što je i demonstrirano utjecajem makrolida na pojavu fosfolipidoze, ali i povećanim izbacivanjem makrolida van lizosoma nakon umjetne promjene pH u organelu. Makrolidi također mogu degradirati stanične membrane, što daje drugi način njihovog ulaska u lizosome. Prisutan je i aktivni transport, na koji upućuje ovisnost akumulacije makrolida o pH, ekstracelularnoj koncentraciji kalcija, temperaturi i staničnoj vijabilnosti, uz interakcije, bilo kao supstrati ili inhibitori određenih transportnih proteina. Penetracija u tkiva i stanice ipak uvjetuje da makrolidi nisu korisni protiv raznih sistemskih infekcija poput bakterijemija, radi posljedično niže razine akumulacije u plazmi.^{1,12,14}

Lipinski „pravilo od 5“ daje niz uvjeta koji ako su zadovoljeni, čine potencijalni lijek oralno raspoloživim u ljudima. To obuhvaća molekulsku masu manju od 500 Da, 5 ili manje donora vodikove veze, 10 ili manje akceptora vodikove veze, i oktanol-voda particijski koeficijent (*logP*) manji od 5. Makrolidi ne podliježu „pravilu od 5“ stoga njihova farmakokinetika svojstva ne mogu biti predviđena na temelju standardnih modela izgrađenih na podacima sa manjih molekula. Unatoč tome, razvijeni su modeli za opis njihove stanične akumulacije i retencije.^{13,15}

Mnogi makrolidi pokazuju gastrointestinalne smetnje, što je posljedica njihove mimikrije peptidnog hormona motilina, koji vezanjem na motilinske receptore u tankom crijevu utječe na kontrakcije mišića u probavi. Stoga se razvijaju „motilidi“, klasa makrolida bez

antibiotske aktivnosti, radi potencijalne kliničke uporabe u gastrointestinalnim poremećajima, ali i makrolidni antibiotici koji neće djelovati na motilinske receptore.^{1,12}

60–70 % apsorbirane frakcije makrolida i njihovih metabolita eliminira se putem žuči, a ostatak putem mokraće. Ovisno o samom makrolidu, dolazi do različite količine razgradnje u kiselom mediju želuca, ali i u jetri putem reakcija sa izoenzimima hepatičke CYP450 obitelji (skupine monooksigenaznih enzima sa hemom kao kofaktorom značajnih u metabolizmu lijekova). U tome se pogotovo ističe enzim CYP3A4. Makrolidi mogu djelovati kao supstrati i inhibitori iste obitelji enzima. To se odvija putem demetilacije dimetilamino skupine supstituenta na makrolaktonskom prstenu, poput desozamina, te njegove oksidacije u nitrozo skupinu koja se kovaletno veže za Fe (II) u kofaktoru enzima i dovodi do inhibicije.^{1,16,17}



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz mehanizma inhibicije CYP3A4 enzima pomoću makrolidnih antibiotika (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 17)

Uz prije spomenutu povezanost s mehanizmima aktivnog transporta i interakciju sa CYP450 enzimima, dokumentiranu interakciju sa žučnim kiselinama, prisutnosti poremećaja žuči poput kolestaze i moguće inhibicije transportera žučnih kiselina, makrolidi utječu na metabolizam drugih lijekova. Primjer nepovoljnog utjecaja takvih interakcija je antikoagulans varfarin, lijek koji se odlikuje uskim terapijskim indeksom, odnosno malenom razlikom između terapijski efektivne i opasne doze lijeka, te stoga se eritromicin A ne smije koristiti zajedno s njime.^{1,12,16}

Također je i demonstrirana inhibicija hERG ionskih kanala za kalij, koji sudjeluju u pravilnom otkucavanju srca, stoga su uočeni povećani rizici od srčanih abnormalnosti. Posljedično se u pacijentima s rizikom od ili prisutnošću istih abnormalnosti makrolidi primjenjuju s oprezom, a polifarmacija želi izbjeći. Navedene mane poslužile su kao motivacija

za pronalazak novih makrolidnih antibiotika poboljšanih svojstava. Pri tome je bitno istaknuti da su 16-eročlani makrolidi manje proučavani radi njihove ograničene uporabe, a od poznatih podataka, pokazuju manje probavnih smetnji te manji utjecaj na metabolizam drugih lijekova, što je demonstrirano generalnim nedostatkom nuspojava i nedostatkom inhibicije CYP3A4 enzima na proučavanom 16-eročlanom makrolidu josamicinu.^{1,10,12,18}

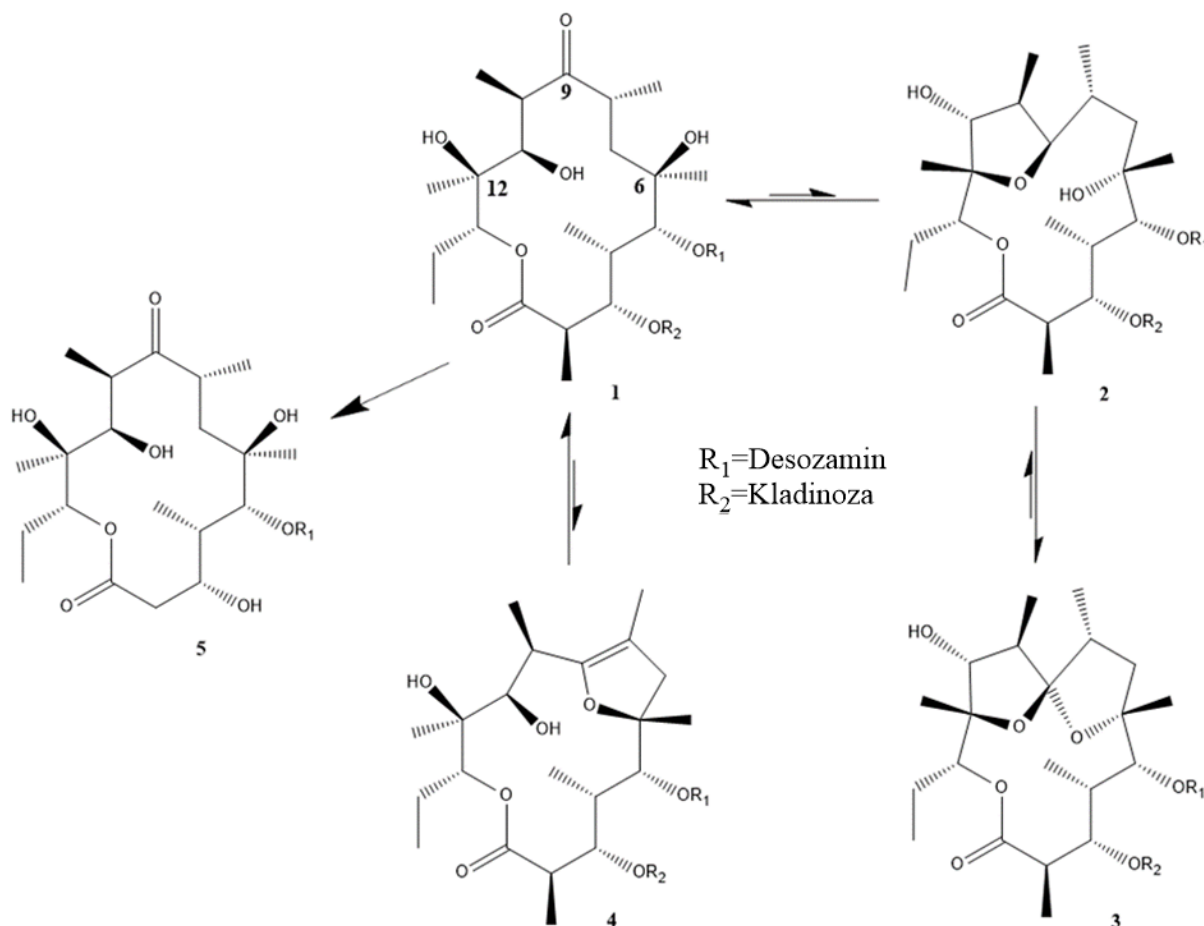
2.3. Eritromicin A

Eritromicin A, sekundarni metabolit bakterije *Saccharopolyspora erythraea*, izoliran je iz uzorka tla sa Filipina 1949., te je ujedno prvi makrolid pušten u kliničku uporabu još 1952. Otkriven je tijekom zlatnog razdoblja otkrića antibiotika, u kojem su identificirani spojevi koji sačinjavaju većinu klasa modernih antibiotika. Tada, pronalazak novih spojeva temeljio na njihovoj izolaciji iz prirodnih izvora. Uz eritromicin A, otkriveni su i drugi prirodno prisutni makrolidni antibiotici poput oleandomicina, josamicina i drugih. Usprkos tome, eritromicin A se pokazao najučinkovitijim. Proizvodnja eritromicina A započela je u 50-ima, te se i dalje temelji na organizmu *S. erythraea*. Fermentacijski postupak je od tada postigao povećanje prinosa eritromicina od otprilike 10 puta, te glavna komponenta nastale smjese (idealno preko 90 %) je eritromicin A, uz prisutnost međuprodukata, dominantno eritromicina B, C, D.^{2,19}

Usprkos svojem povoljnom antibakterijskom djelovanju te visokoj penetraciji u tkiva i stanice, eritromicin A pokazuje niz nedostataka, što je posljedica izostanka evolucijskih pritisaka koji bi spoj činili idealnim za uporabu na ljudima. Eritromicin A spada u klasu motilida, te stoga uzrokuje gastrointestinalne smetnje. Posjeduje ograničenu oralnu bioraspoloživost, gorak okus, rizik od srčanih abnormalnosti te izaziva bol pri injekciji. Utječe na metabolizam drugih lijekova putem prije navedenih mehanizama poput uključenosti u aktivni transport, djelovanjem na enzime hepatičke obitelji CYP450 kao supstrat i inhibitor, te ometanjem homeostaze žučnih kiselina.^{1,2,3,16,19}

Glavni nedostatak eritromicina A i motivacija za pronalazak novih analoga je relativno malo poluvrijeme eliminacije (što zahtijeva unos 3 do 4 puta na dan) i brza dekompozicija u kiselom mediju želuca. Kombinacijom tehnika NMR, HPLC-a i rendgenske difrakcije razjašnjen je mehanizam degradacije. Eritromicin A (**1**) posjeduje keto skupinu na C-9 atomu, te ona može stupiti u intramolekulsku reakciju sa 6 ili 12-C hidroksilnim skupinama. Spoj se u otopini nalazi u ravnoteži sa svojim 12,9-hemiacetalom koji je nastao reakcijom ciklizacije između 12-C hidroksilne i 9-C keto skupine (**2**). Iz spoja (**2**) nastaje anhidroeritromicin (**3**) sudjelovanjem druge hidroksilne skupine, dok iz početnog eritromicina može doći i do reakcije

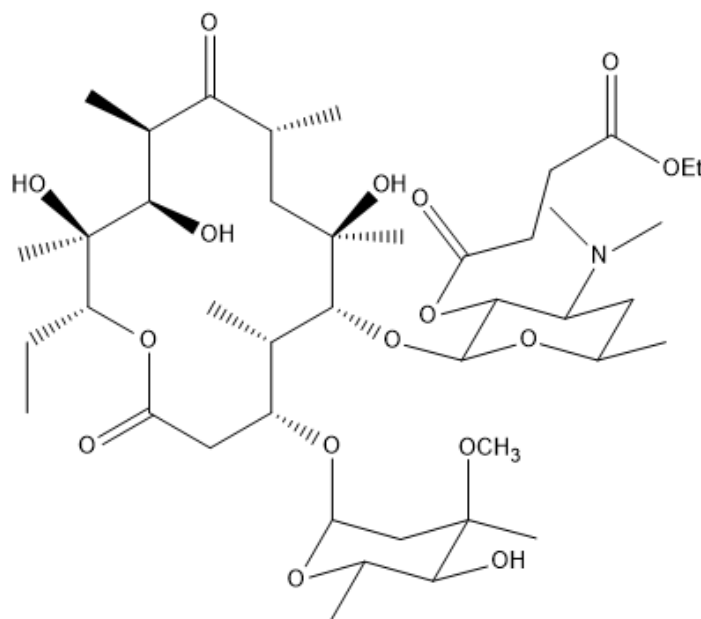
ciklizacije putem 6-C hidroksilne skupine i 9-C keto skupine koja rezultira eritromicin enol-eterom (**4**). Također može doći i do cijepanja kladinoznog šećera (**5**). Nastali spojevi nemaju antibakterijsku aktivnost.^{1,2,11}



Slika 5. Prikaz razgradnje eritromicina A u kiselim uvjetima (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 11)

2.4. Prva i druga generacija semisintetskih derivata eritromicina A

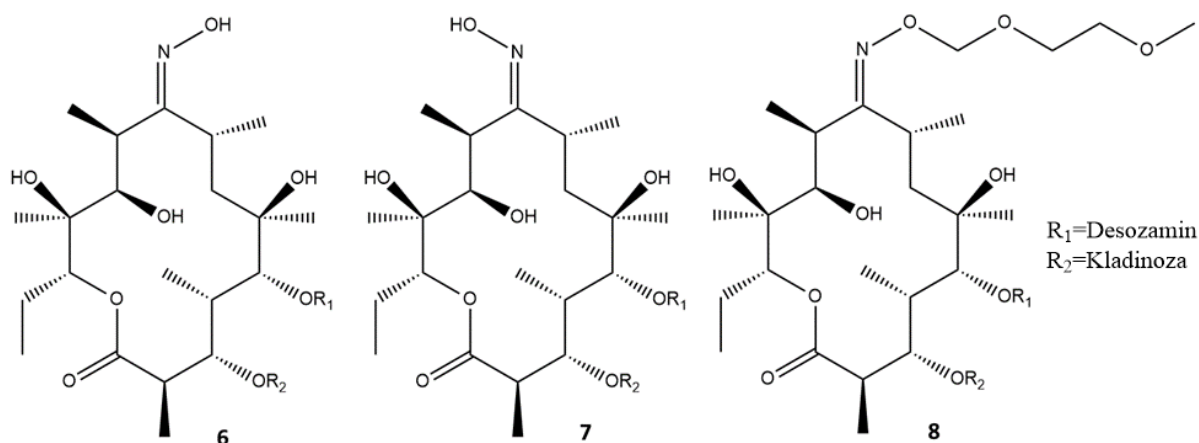
Prva generacija semisintetskih derivata eritromicina A obuhvaća jednostavnije spojeve poput 2'-estera, 11,12 cikličkih karbamata i raznih lipofilnih soli (nastalih ionizacijom eritromicina A pomoću dušikovog atoma na desozaminu). Primjer estera je prolijek eritromicin A 2'-etil sukcinat, koji radi manje topljivosti i bržeg prolaska kroz želudac izbjegava degradaciju, usprkos identičnoj kinetici reakcija njega i eritromicina A u kiselom mediju želuca, a u neutralnom/bazičnom mediju poput krvi ili tankog crijeva deesterificira u eritromicin A.^{4,11}



Slika 6. Prikaz strukture eritromicina A 2'-etil sukcinata
(Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 11)

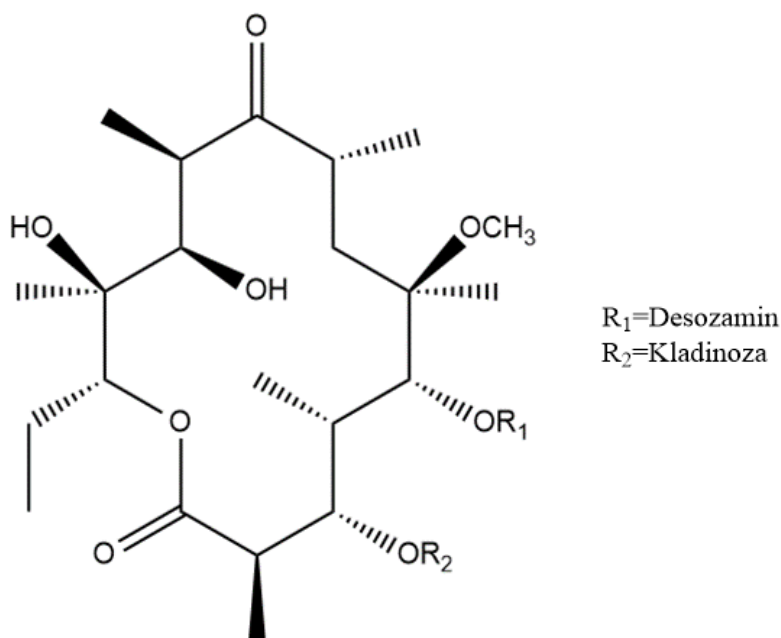
Druga generacija makrolidnih antibiotika se primarno fokusirala na promjenu funkcionalnih skupina koje sudjeluju u degradaciji eritromicina A u kiselim uvjetima, odnosno C-6/12 hidroksilnoj te C-9 keto skupini, ali i uz druge funkcionalizacije. Općenito je bila uspješna, te davala nove antibiotike sa boljim farmakološkim svojstvima i širim antibakterijskim spektrom.²⁰

Jedan od primjera promjene C-9 keto skupine je roksitromicin (**8**). Sinteza kreće iz oksimacije keto skupine eritromicina A pomoću hidroksilamina. Reakcija je stereospecifična, te preferentno nastaje eritromicin 9(*E*)-oksim (**6**) uz manje količine *Z* izomera (**7**). Hidroksilna skupina na oksimu je reaktivna, te stoga njezino alkiliranje (metoksietoksi)-metil kloridom ne zahtijeva dodatne zaštite drugih hidroksilnih skupina na makrolidu. Roksitromicin (**8**), ili 9-[*O*-(metoksietoksi)metil]oksim pokazao se najboljim u seriji spojeva nastalih oksimacijom i alkilacijom pozicije C-9. Posjeduje veću kiselinsku stabilnost uz gubitak isključivo kladinoze, poboljšano *in vivo* djelovanje naspram eritromicina A, značajno bolji Gram-negativni spektar, i manju interakciju sa CYP450 hepatičkim enzimima, no i dalje izaziva gastrointestinalne smetnje te povećava rizik od srčanih abnormalnosti uz druge nuspojave. Demonstrirana je reakcija izomerizacije spoja iz *E* u *Z* izomer, no taj izomer je bio manje aktivan.^{12,18,20,21}



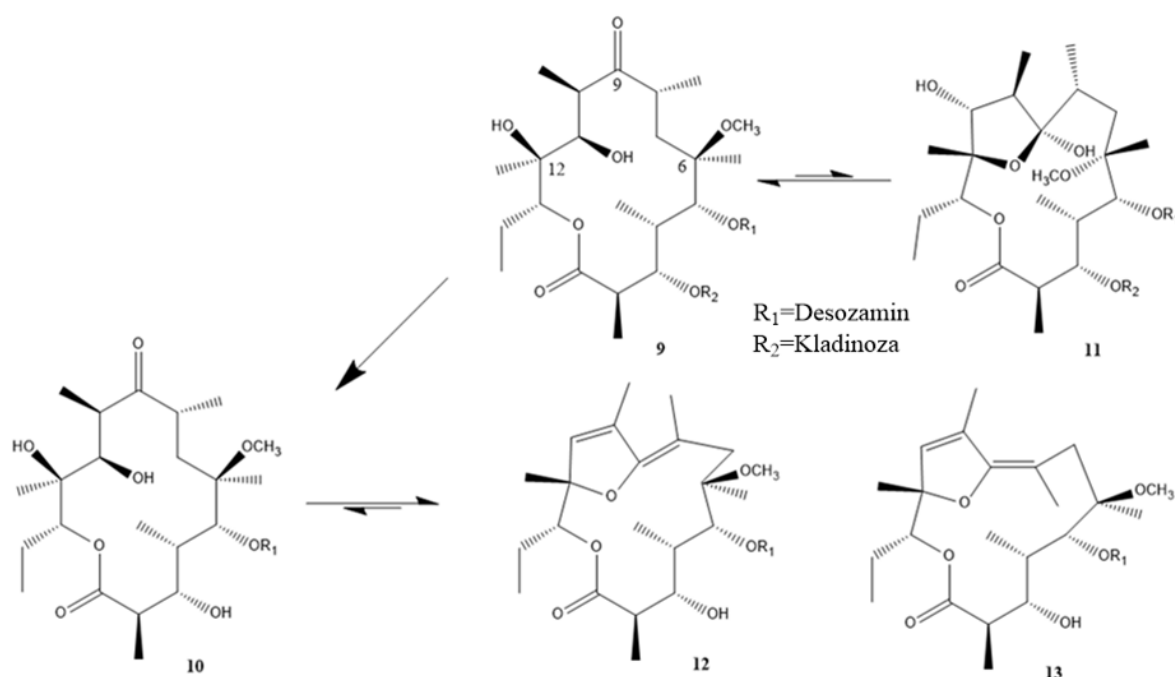
Slika 7. Prikaz strukture eritromicin A 9(*E*)-oksima (**6**), eritromicin A 9(*Z*)-oksima (**7**) i roksitromicina (**8**) (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 20)

Još jedno rješenje problema kiselinske degradacije je blokiranje C-6 hidroksilne skupine uvođenjem metilne skupine, što je i ostvareno u makrolidnom antibiotiku klaritromicinu. U ovom slučaju, potrebno je uvoditi zaštite na neke od drugih hidroksilnih skupina makrolida, poput najreaktivnije C-2' hidroksilne skupine kako bi se ostvarila zadovoljavajuća razina selektivne alkilacije. Pri tome je razvijen niz pristupa kako bi se izbjegli višestruki koraci izolacije, skidanje i stavljanje zaštita, toksični spojevi, i postupci teže izvedivi na velikoj skali poput katalitičkog hidrogeniranja, i težilo blagim uvjetima i „one-pot“ pristupu sintezi.²⁰



Slika 8. Prikaz strukture makrolidnog antibiotika klaritromicina
(Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 20)

Klaritromicin (**9**) također degradira u kiselom mediju gubitkom kladinoznog supstituenta sa znatno duljim vremenom polureakcije od 310 minuta pri 27 °C. Na fiziološki relevantnoj vremenskoj skali nema drugih pojava, no uz dulje vrijeme degradacije u kiselini NMR spektroskopija ukazuje i na ravnotežu sa 12,9-hemiacetalom klaritromicina (**11**), spoja sličnom 12,9-hemiacetalu (**2**) kod eritromicina A (**1**). Reakcijski put završava nastankom dekladinofil derivata klaritromicina (**10**) popraćenog dodatnom eliminacijom vode i formiranjem dvaju izomera (**12**) i (**13**).¹¹

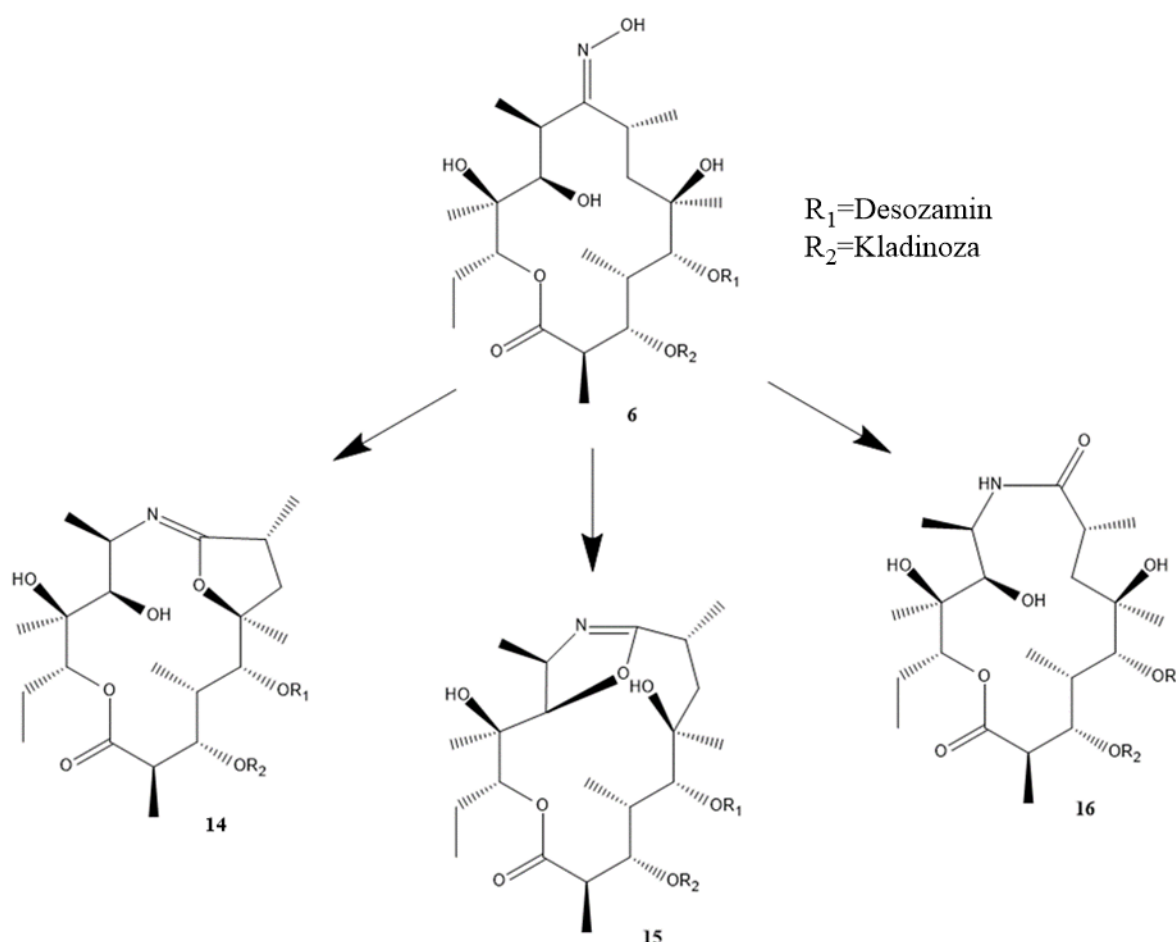


Slika 9. Prikaz strukture klaritromicina (**9**) i njegovih produkata kiselinske razgradnje (**10-13**)
(Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 11)

Klaritromicin je postigao bolju oralnu bioraspoloživost, i konzistentnije razine lijeka u plazmi. Neki od metabolita su također pokazali aktivnost, koja je čak izraženija od izvorne molekule u slučaju bakterije *H. influenzae*. Također pokazuje smanjenu interakciju sa CYP450 enzimima naspram eritromicina A i gastrointestinalne smetnje. Općenito se može reći da posjeduje povoljniji farmakološki profil i aktivnost uz prošireniji antibakterijski spektar, uz i dalje prisutne nedostatke poput roksitromicina.^{1,3,14,16,17,20}

Najuspješniji predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika je uvjerljivo azitromicin. Njegova sinteza temelji se istraživanjima odvijanim u Plivinim istraživačkim laboratorijima u okviru radova derivatizacije eritromicin A 9(*E*)-oksima (**6**) i drugih spojeva.

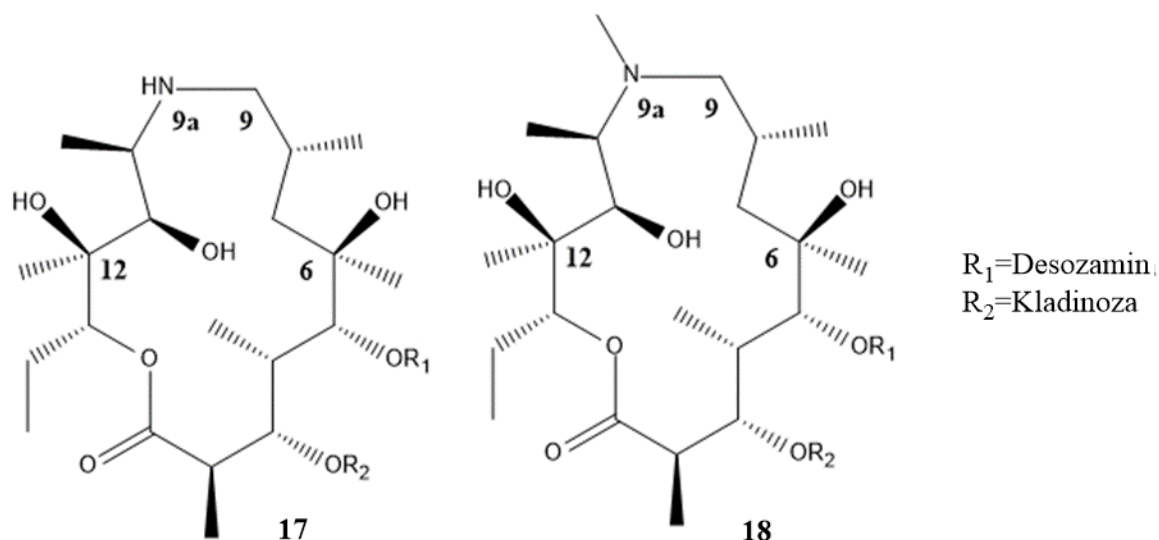
Radi istaknutog antibiotskog djelovanja sulfonamida, težilo se spajanju obiju farmakofora u zajedničku molekulu, odnosno sintezi makrolidnog hibrida. Pri sintezi O-sulfonamidnih derivata oksima (**6**) u prisutnosti benzensulfonil klorida u smjesi otapala aceton-voda ipak dolazi do Beckmannove pregradnje, s obzirom na katalitičku ulogu sulfonil-klorida u odvijanju iste. Beckmannova pregradnja iz oksima inače daje amid, no u ovom slučaju rezultirala je 6,9-iminoeterom (**14**). S obzirom da spoj ne posjeduje antibakterijsku aktivnost, podvrgnut je daljnjim reakcijama. Ovisno o reakcijskim uvjetima, inicijalna pregradnja je rezultirala sa različitim omjerima spoja (**14**), 9,11-iminoetera (**15**) i očekivanog produkta pregradnje, laktama (**16**).^{4,20,22}



Slika 10. Reakcijska shema Beckmannove pregradnje oksima (**6**) u iminoetere (**14**), (**15**) i laktam (**16**) (Prilagođeno prema Ref. 4)

Oba iminoetera su nakon njihove redukcije vodikom uz katalizator dali spoj **(17)** odnosno 9-deokso-9-dihidro-9*a*-aza-9*a*-homoeritromicin A. Spoj **(17)** se pokazao obećavajućim, te je poslužio kao prekursor za seriju spojeva od kojih se 9-deokso-9*a*-aza-9*a*-metil-9*a*-

homoeritromicin A (njegov 9*a*-metilirani derivat), odnosno azitromicin (**18**) pokazao najboljim.^{4,20,23}



Slika 11. Prikaz strukture i numeracije makrolaktonskog prstena azitromicina (**18**) i njegovog prekursora (**17**) (Prilagođeno prema Ref. 4)

Dušik uveden u makrolaktonski prsten dovodi do njegove stabilizacije, te je azitromicin praktički stabilan u kiselim uvjetima, a degradira gubitkom kladinoznog supstituenta. *In vitro* pokazuje lošiju aktivnost od eritromicina A na Gram-pozitivne bakterije, ali posjeduje prošireni Gram-negativni spektar i dobru aktivnost protiv istih. Od svih makrolida, azitromicin se najviše ističe svojom razinom akumulacije u tkiva i stanice, najvjerojatnije radi njegove dikationske prirode, naspram prije navedenih makrolida koji su monokationski. Posjeduje značajno bolju oralnu bioraspoloživost, te dugo poluvrijeme eliminacije. Stoga, *in vivo* pokazuje superiorna svojstva, te je njemu i klaritromicinu omogućen unos samo 1-2 puta na dan.^{1,3,4,11,12,20,23}

Azitromicin izrazito postiže slabu interakciju sa CYP450 enzimima, te stoga manje ometa metabolizam drugih lijekova, uz varfarin kao iznimku, a njegova biotransformacija je značajno ograničenija, uz neaktivni deskladinozni i aktivni 9*a*-demetiliran derivat kao posljedica djelomične degradacije u probavnom sustavu. Pokazuje 20 puta manju inhibiciju hERG ionskih kanala, no i dalje se polifarmacija preferentno izbjegava, a upotreba kontrolira radi naznaka o rizicima kod ljudi sa srčanim oboljenjima. Uz smanjenu inhibiciju transportera žučnih kiselina, općenito se može reći da azitromicin ima znakovito poboljšani sigurnosni profil i dobru podnošljivost, te je time stekao dominantnu poziciju na tržištu makrolidnih antibiotika

i antibiotika općenito, te se smatra glavnim predstavnikom 15-eročlanih azalida, skupine makrolidnih antibiotika sa dušikovim atomom umetnutim u makrolaktonski prsten Beckmannovom pregradnjom.^{1,3,4,12,17}

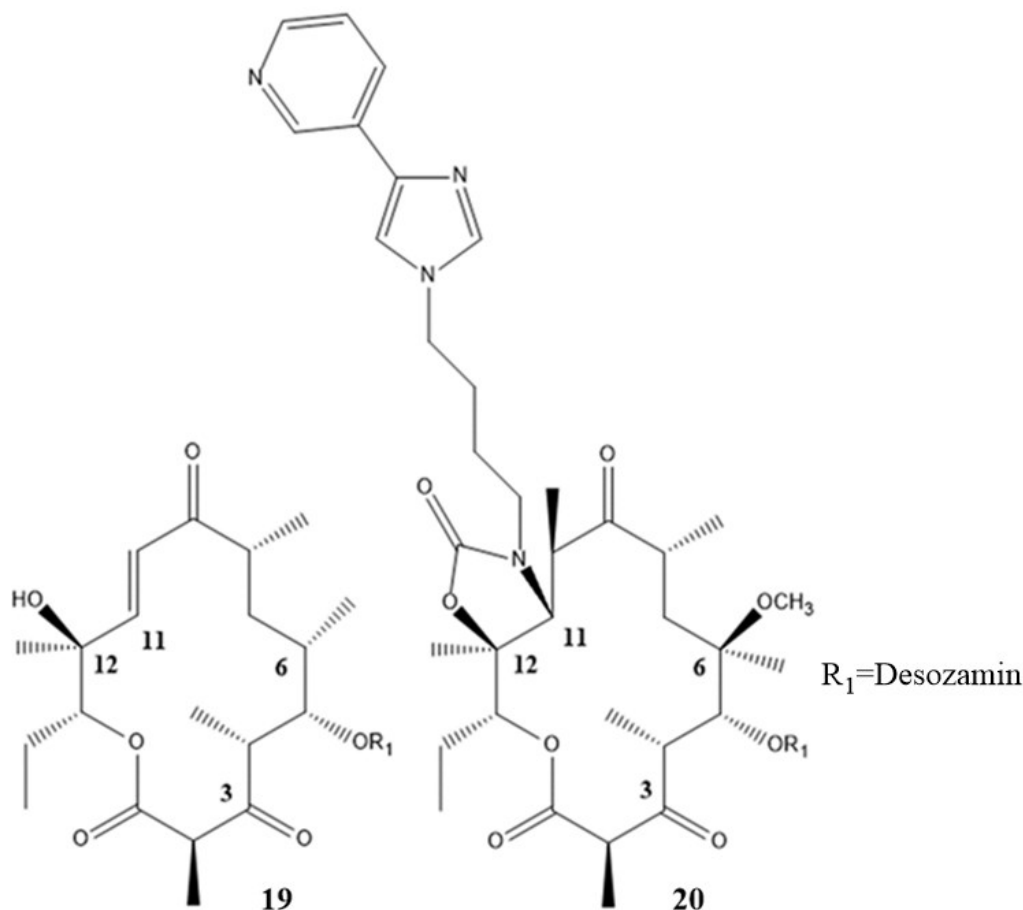
Osim Plive, u povijesnom razvoju azitromicina i azalida također se nalazio i Pfizer, te je stoga azitromicin stavljen na tržište kao Sumamed (PLIVA), odnosno Zithromax (Pfizer). Broj derivata azitromicina i općenito azalida je podulji, te uključuje strukturno raznolike spojeve poput ravnolančanih formi, multifunkcionalnih derivata i drugo, ali i obuhvaća niz potencijalnih aktivnosti, poput već istaknutog antibakterijskog, imunomodularnog i protuupalnog djelovanja, te tuberkulostatske, antimalarijske, antitumorske i antiviralne aktivnosti.^{4,20,22,23}

2.5. Treća i četvrta generacija semisintetskih derivata eritromicina A

Glavna zadaća treće i četvrte generacije makrolidnih antibiotika je proširenje spektra djelovanja, motivirano općim porastom rezistencije na antibiotike, pa tako i na široko korištene makrolide azitromicin i klaritromicin. Rezistencija na makrolide (ovisno o njenom tipu) također može obuhvatiti i druge klase antibiotika poput linkozamida, streptogramina, i kloramfenikola, radi prisutnosti zajedničkih elemenata u vezanju antibiotika na bakterijski ribosom. Navedeno, ali i mane drugih terapijskih opcija poput penicilina i fluorokinolona motivirale su daljnju potragu za novim makrolidnim antibioticima.^{3,5,8,19,24,25,26}

Kao primjer treće generacije makrolidnih antibiotika ističe se telitromicin, čijem otkriću su prethodile dvije ključne publikacije. Tijekom zlatnog razdoblja otkrića antibiotika izolirani su prirodni makrolidi poput pikromicina (**19**) i narbomicina iz organizma *Streptomyces venezuelae*. Odlika njihove strukture naspram eritromicina A je razlika u poziciji metilnih skupina, ali i nedostatak kladinoznog supstituenta na C-3 atomu, zamijenjen keto skupinom. Makrolidi takvog tipa se stoga odlikuju nazivom ketolidi. Spojevi su pokazali *in vitro* aktivnost, ali ne i *in vivo* te stoga nisu dalje razvijeni za kliničku uporabu. Druga publikacija obuhvatila je seriju C-11,12 karbamatnih makrolida, koji su pokazali obećavajuću aktivnost protiv rezistentnih sojeva, ali i dalje sveukupno manju u usporedbi s eritromicinom A, s obzirom da sterički efekti sprječavaju efektivno djelovanje u veznom mjestu na bakterijskom ribosomu. Također je otkrivena uloga kladinoze u indukciji jednog od najčešćih tipova makrolidne rezistencije putem metilacije ribosomskog veznog mjesta što sprječava interakciju.^{3,24} Navedena otkrića su dovela do razvoja serije ketolida kako bi se izbjegla indukcija rezistencije. Telitromicin (**20**) se stoga može zamisliti kao molekula koja objedinjuje gore navedene

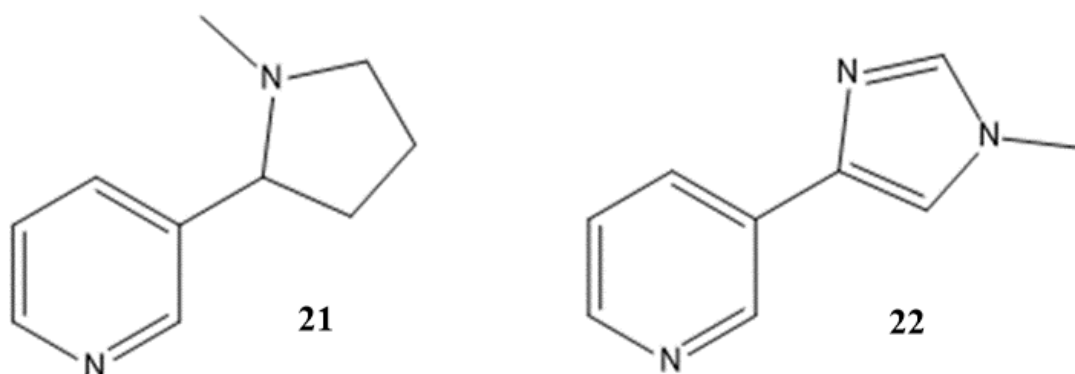
elemente. Sinteza mu započinje iz klaritromicina, pa posjeduje 6-O metilnu skupinu. Kladinoza je eliminirana, te nastala hidroksilna skupina oksidirana u keto. Na N-atomu njegovog karbamatnog supstituenta nalazi se butilni lanac koji vodi do piridil-imidazolne skupine. Time je stvoreno novo vezno mjesto, a eliminacija kladinoze smanjuje veličinu molekule i izbjegava indukciju rezistencije.^{3,24}



Slika 12. Prikaz strukture i numeracije prstena pikromicina (**19**) i telitromicina (**20**) (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 1)

Telitromicin se odlikovao povoljnom farmakokinetikom te veoma dobrom aktivnošću protiv rezistentnih sojeva, makar gubitak vezanja putem kladinoze nije potpuno nadomješten novim supstituentom. Ketolidi općenito, pa tako i telitromicin su se pokazali baktericidnima, a i pokazuju manju osjetljivost na mehanizam rezistencije putem transportera. Ipak, prijave o nizu simptoma poput hepatotoksičnosti, zatajenja jetre, sinkope, vizualnih smetnji i iznimnog pojačanja autoimune bolesti miastenije gravis (koja se očituje napadajima slabosti mišića) dovele su do povlačenja s tržišta diljem svijeta i uvođenja strožih kriterija za odobrenja lijekova

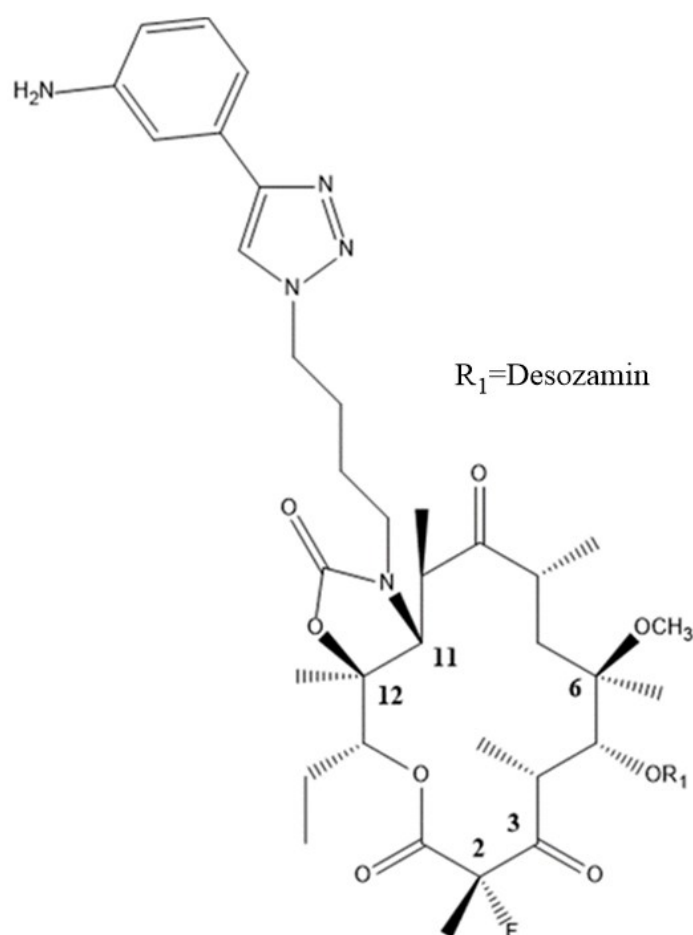
od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA). Naknadno je pokazano da su navedeni simptomi posljedica poremećaja u funkciji nikotin acetilkolinskog receptora (nAChR). Nikotin (**21**) se ponaša kao agonist istog receptora, odnosno njegovim vezanjem dolazi do konformacijske promjene i otvaranja ionskog kanala što finalno dovodi do provođenja živčanog impulsa. nAChR-ovi imaju široku distribuciju u organizmu, te između ostalog reguliraju upalni odgovor u jetri, kontrakciju mišića na neuromuskularnom spoju, te su prisutni u mozgu i oku. Demonstrirana je uloga telitromicina kao antagonista različitih izoformi nAChR receptora što sprječava vezanje acetilkolina i normalnu funkciju, te je uzrok toga smanjenje ionske permeabilnosti kanala radi interakcije s kanalom receptora, ali i kompeticije za vezno mjesto s acetilkolinom. Istaknuta je strukturna sličnost nikotina i piridil-imidazolnog supstituenta telitromicina (**22**). Također je pokazano da drugi makrolidi pokazuju značajno manju inhibiciju pri terapijskim koncentracijama.^{3,26}



Slika 13. Prikaz strukture nikotina (**21**) i piridil-imidazolnog supstituenta telitromicina (**22**)
(Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 3)

Solitromicin je pripadnik četvrte generacije makrolidnih antibiotika, te glavni predstavnik fluoroketolida. Sličan je telitromicinu, odnosno zadržava C-3 keto skupinu, C-11,12 karbamat sa butilnim lancem koji vodi do supstituenta, te 6-O metilnu skupinu. Ono što ga razlikuje je prisutnost novog supstituenta na karbamatu, tj. 1*H*-1,2,3-triazolne skupine dodatno supstituirane 3-aminofenilom, te fluor umjesto vodika na C-2 atomu. Time je izbjegnuta piridil-imidazolni supstituent odgovoran za poremećaje funkcije nikotin acetilkolinskih receptora, a zadržano svojstvo novog veznog mjesta. Fluor pak sprječava reakciju enolizacije keto skupine, te time i potencijalno narušavanje veznih interakcija, a i sam vjerojatno doprinosi vezanju. Time bi se moglo reći da je telitromicin zapravo u skupini enolida, a solitromicin prvi ketolid.^{3,24,26}

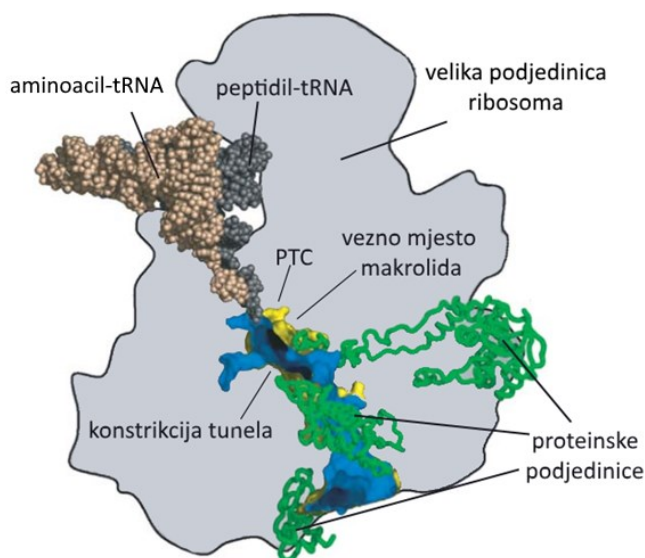
Time solitromicin izbjegava indukciju metilacije veznog mjesta, a za razliku od telitromicina pokazuje dobru aktivnost i protiv drugog konstitutivnog tipa metilacije radi veznih interakcija omogućenih fluorom. Demonstrirana je i bolja aktivnost protiv rezistencije putem aktivnih transportera naspram analoga bez fluora. Njegov 3-aminofenilni supstituent se biološki ne prepoznaje kao anilin, s obzirom da nedostatak mutagenosti i genotoksičnosti *in vitro* i *in vivo*. 1*H*-1,2,3-triazolni supstituent također pokazuje bolju metaboličku stabilnost od telitromicinovog imidazola. Solitromicin se od svih makrolida također ističe nedostatkom rizika od srčanih abnormalnosti. U sklopu njegovog razvoja, upravo radi neuspjeha telitromicina okarakteriziran mu je sigurnosni profil, te je najbliži klaritromicinu. Usprkos navedenome, stopiran je daljnji razvoj radi regulatornih zapreka. Stoga, i dalje se javlja potreba za novim efektivnim makrolidnim antibioticima. Poput azitromicina i azalida, prije spomenuti predstavnici različitih generacija semisintetskih derivata eritromicina A predstavljaju malen dio ukupnog broja derivata raznolikih strukturnih formi i bioloških funkcija.^{3,24,25}



Slika 14. Prikaz strukture solitromicina (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 19)

2.6. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika

S obzirom na iznimnu ulogu translacije u živim bićima i značajnu razliku u strukturi ribosoma između prokariota i eukariota, translacija je česta meta antibiotika, pa tako i makrolida. Tipični makrolidni antibiotici vežu se unutar 50S podjedinice bakterijskog ribosoma, konkretnije rečeno u tunelu kroz koji izlazi novonastali polipeptid van ribosoma u citoplazmu, između mjesta konstrikcije i peptidil-transferaznog centra (PTC), pa time blokiraju njegov izlazak (Slika 15.). Cijeli tunel sastoji se od 23S rRNA i proteinskih podjedinica. Većina bakterijskih ribosoma *in vitro* veže makrolide, te su inhibirani, stoga slaba aktivnost u Gram-negativnim bakterijama je odlika alternativnih interakcija makrolida. Niz eksperimentalnih metoda je u upotrebi radi karakterizacije strukture slobodnih i vezanih makrolida. To obuhvaća razne NMR tehnike, molekularno modeliranje, krioelektronsku mikroskopiju, difrakciju X-zraka te druge biokemijske i fizikalno-kemijske metode. U razmatranju makrolidnog djelovanja bitno je napomenuti da kristalne strukture velike podjedinice ribosoma sa vezanim makrolidima potječu iz 4 organizma (*Thermus thermophilus*, *Haloarcula Marismortui*, *Deinococcus radiodurans* i *Escherichia coli*) koji nisu bliskog srodstva s nizom patogenih organizama protiv kojih se makrolidi koriste, nisu klinički relevantni (osim *E. coli*), a među strukturama se povremeno javljaju značajne razlike.^{1,25,27,28}



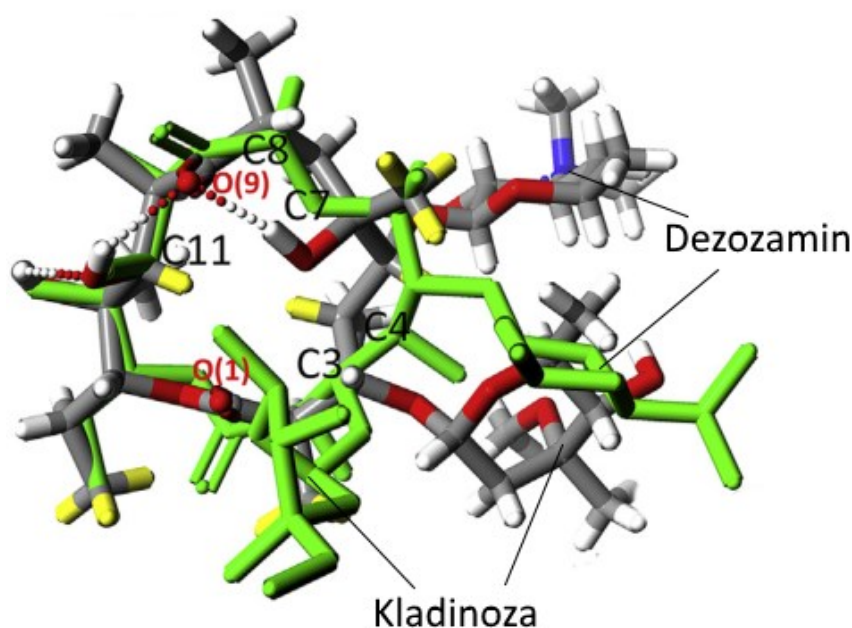
Slika 15. Shematski prikaz građe velike podjedinice ribosoma oko veznog mjesta makrolida.

Površina izlaznog tunela prikazana je plavom (iznutra) i žutom (izvana) (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 1)

Promatrajući eritromicinsku klasu makrolida, sa tunelom se ostvaruju interakcije putem desozaminskog šećera i laktonskog prstena na domenu V 23S rRNA. Desozaminova 2'-OH skupina formira 3 vodikove veze sa nukleotidima A2058 i A2059 (*E. coli*), te su zajedno s njihovim hidrofobnim interakcijama dovoljno značajne da sačinjavaju otprilike pola ukupne vezne energije makrolida. Ipak šećer je prekratak da dosegne PTC, te se stoga 14/15-eročlani makrolidi smatraju inhibitorima translokacije (inhibicija formiranja 4.-8. peptidne veze), dok u 16-eročlanim spojevima sa disaharidnom rukom pri C-5 atomu (koja može biti dodatno supstituirana) doseže dovoljno duboko do PTC-a da ih se smatra inhibitorima peptidil-transferazne aktivnosti (inhibicija formiranja 1.-3. peptidne veze). Uz ostale interakcije, valja istaknuti hidroksilne skupine pri C-6/11/12 u dodiru sa 23S rRNA. Kladinoza je izložena u izlaznom tunelu, okrenuta prema PTC-u i spremna na interakciju s nadolazećim peptidom, što se očituje u erm mehanizmu rezistencije, o kojem će biti više rečeno kasnije.^{1,25,28}

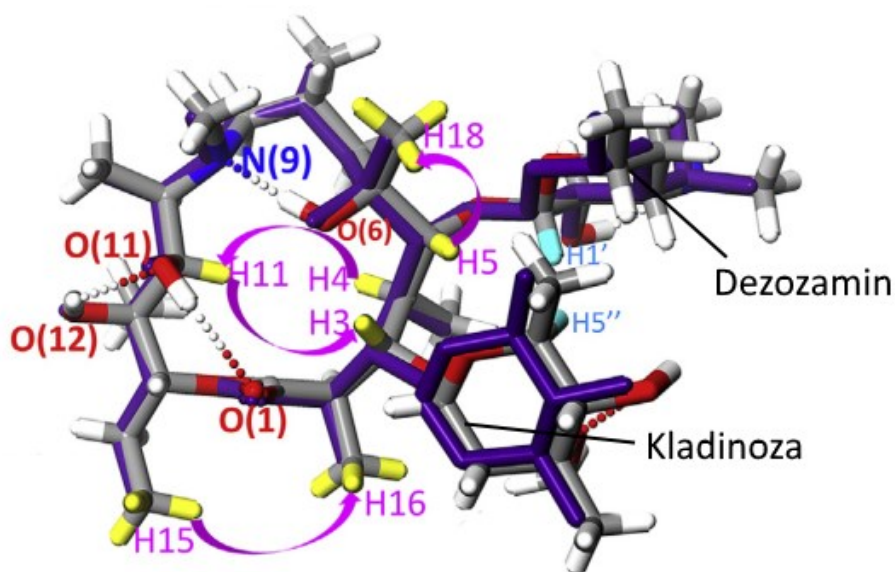
Struktura azitromicina u *D. radiodurans* se ističe prisutnošću dvije molekule vezane na ribosom (naspram jedne molekule u ostalim kristalnim strukturama, ali i drugih ispitivanja koja su isključila mogućnost vezanja druge molekule). Prva molekula ima sličnu orijentaciju poput eritromicina, (interakcije s domenom V 23S rRNA) dok druga ostvaruje interakciju sa L4 proteinskim podjedinicom, te se stvaraju dodatni kontakti sa domenom II i IV 23S rRNA. Molekule azitromicina su međusobno povezane direktno putem vodikove veze, ali i indirektno koordinacijom magnezijevog iona. Dušikov atom azitromicina pritom ne sudjeluje u vezanju.^{27,28,29}

Radi kompleksne strukture makrolida, i posljedično širokog konformacijskog prostora u kojem se mogu nalaziti, osim interakcija s ribosomom vrijedi opisati i njihovu konformaciju, s obzirom da ona značajno utječe na biološke interakcije i fizikalno-kemijska svojstva. Tu su najviše proučavani 14 i 15-eročlani makrolidi. Odlikuju se dvjema osnovnim konformacijama, preklopljena ili „folded-in“ i otklopljena ili „folded-out“ konformacija. Folded-out konformacija je okarakterizirana bliskim kontaktima između protona H4-H11, H5-H18, H15-H16, i vrijednošću diedarskog kuta $\omega_{H2-C2-C3-H3}$ od $\sim 160^\circ$. U folded-in konformaciji H3, H8 i H11 vodikovi atomi su okrenuti u unutrašnjost makrolaktonskog prstena, te su prostorno blizu. Ta promjena je posljedica konformacijske promjene u C3-C5 fragmentu prstena. To također dovodi do promjene prije navedenog diedarskog kuta na $\sim 90-100^\circ$, ali i povećava međusobnu udaljenost šećernih supstituenata desozamina i kladinoze. Folded-in i folded-out konformacije posjeduju intramolekulske vodikove veze, makar je folded-out bolje stabilizirana njima.^{25,27,28,29}



Slika 16. Usporedba folded-out (sivo) i folded-in (zeleno) konformacije eritromicina A. Strukture su poravnane preko regije C-10 do C-13 uz naznačene intramolekulske vodikove veze (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 25)

15-eročlani makrolidi poput azitromicina također mogu poprimiti 3-endo folded-out konformaciju, koja nije dostupna tipičnim 14-eročlanim makrolidima. Ona predstavlja međuprodukt između folded-in i folded out oblika. Vrijednost diedarskog kuta $\omega_{H2-C2-C3-H3}$ stoga iznosi $\sim 122^\circ$. Za azitromicin i njemu slične azalide, H3-H11 i H4-H11 udaljenosti i položaj saharidnih supstituenata je sličan folded-out strukturi tipičnih 14-eročlanih makrolida. Općenito se može reći da je folded out konformacija dominantna u čvrstom stanju i otopini, da su strukture makrolida vezanih na ribosom slične slobodnim makrolidima, te da 15-eročlani makrolidi pokazuju veći stupanj konformacijske slobode.^{25,27,28,29}



Slika 17. Usporedba 3-endo folded-out konformacija azitromicina u otopini (sivo) i na ribosomskom vezujućem mjestu (ljubičasta). Naznačene su intramolekulske vodikove veze i bitni ^1H - ^1H kontakti, korišteni pri procjeni konformacije NMR metodama (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 25)

Vezanje makrolida u izlaznom tunelu blizu PTC-a ribosoma dovodi do prestanka translacije putem steričkog blokiranja nastalog polipeptida, odnosno inhibicije translokacije, ili inhibicije peptidil-transferazne aktivnosti u 16-eročlanim makrolidima sa disaharidnom rukom. Makrolidi sužavaju izlazni tunel, ali ne dovode do potpune blokade te je vjerojatno da N-terminus nastalog polipeptida ima prostora za izlazak. Demonstrirana je sposobnost ribosoma sa vezanim makrolidom da sintetizira peptid od 7-12 aminokiselina, te erm mehanizam rezistencije na makrolide zahtijeva sintezu peptida od 9 aminokiselina. Kristalne strukture sugeriraju da nema dovoljno prostora za njihovo smještanje u međuprostor između makrolida i PTC-a. Stoga peptid prolazi pored makrolida usprkos djelomičnom blokiranju tunela, ili ima alternativni izlazni put s ribosoma.^{1,25,28}

Kao posljedica inhibicije translacije putem dva gore navedena mehanizma, najvjerojatnija posljedica je otpuštanje peptidil-tRNA, no pokazano je da dolazi do ubrzanja toga procesa, što daje dodatni mehanizam inhibicije. Ako brzina recikliranja citoplazmatske peptidil-tRNA nije dovoljna, značajne količine tRNA time mogu biti isključene iz sinteze proteina. Finalno, pretpostavlja se da makrolidi ometaju proces inicijacije vezanjem na veliku podjedinicu ribosoma, ali na drugom veznom mjestu, te su nastali ribosomski međuprodukti degradirani hidrolitičkim enzimima stanice, što može dati doprinos inhibiciji staničnog rasta.

Prilikom razumijevanja ukupnog djelovanja makrolida potrebno je kombinirati više eksperimentalnih tehnika, te uzeti u obzir mogućnost različitih interakcija na ribosomskom kompleksu ovisno o specifičnoj bakterijskoj vrsti i sekvenci polipeptida u sintezi, što je demonstrirano baktericidnim djelovanjem makrolida na rodu *Streptococcus*, naspram uobičajenog bakteriostatskog na ostale uzročnike.^{1,25,27,28,29}

2.7. Mehanizmi rezistencije na makrolidne antibiotike

Rezistencija na makrolide zabilježena je iste godine kada je eritromicin pušten u kliničku uporabu. Postoji niz različitih mehanizama, te pri tome su najčešće modifikacije bakterijskog ribosoma, te izbačaj makrolida van stanice putem aktivnih transportera (engl. efflux pump). Zabilježeni su i rezistentni sojevi koji posjeduju više od jednog mehanizma rezistencije. Mono ili dimetilacija nukleotida A2058 (*E. coli*) pri njegovom N-6 atomu putem metilaznog enzima produkta gena *erm* (engl. Erythromycin resistance methylase) onemogućuje formiranje vodikovih veza ribosoma sa odgovarajućim dijelom makrolida, Ovaj mehanizam je posebice važan jer drugi antibiotici poput linkozamida, streptogramina i kloramfenikola posjeduju zajedničke elemente pri vezanju na bakterijski ribosom te se stoga govori o Erm ili MLS_B rezistenciji. Identificirano je više od 40-tak *erm* gena, te se smatra da potječu iz bakterijskih proizvođača makrolida (poput organizma *S. erythraea*).^{1,5}

Erm mehanizam rezistencije se može dodatno podijeliti u konstitutivni tip rezistencije (c-MLS_B), gdje je metilazna aktivnost enzima prisutna u domaćinu neovisno o makrolidima, te inducibilni tip (i-MLS_B), gdje je enzimska aktivnost ovisna o aktivaciji putem makrolida. Prisutnost c-MLS_B rezistencije daje otpornost na 14-16-eročlane makrolide, s iznimkama poput solitromicina, ali i raznovrsnim kombinacijama susceptibilnosti i rezistencije na ketolide ovisno o bakterijskog vrsti. Takva pojava je najvjerojatnije povezana sa različitim razinama metilacije koju pružaju *erm* geni, te razlikama u brzini sklapanja ribosoma u bakterijskim organizmima. Inducibilna rezistencija efektivna je protiv eritromicina i pripadnika druge generacije njegovih derivata poput klaritromicina i azitromicina, ali ne i protiv ketolida te 16-eročlanih makrolida.^{1,3,26}

Na temelju proučavanja *ermC* gena predložen je molekularni mehanizam rezistencije. *ermC* gen se transkribira u obliku bicistronske mRNA, koja sadrži uputu za sintezu metilaze, ali joj prethodi otvoreni okvir čitanja (engl. open reading frame, ORF) koji kodira vodeći peptid. U odsutnosti inducirajućeg makrolida, sekundarna struktura mRNA je takva da zaklanja ribosomsko vezno mjesto *ermC* gena, te time sprječava njegovu translaciju. Kada se makrolid

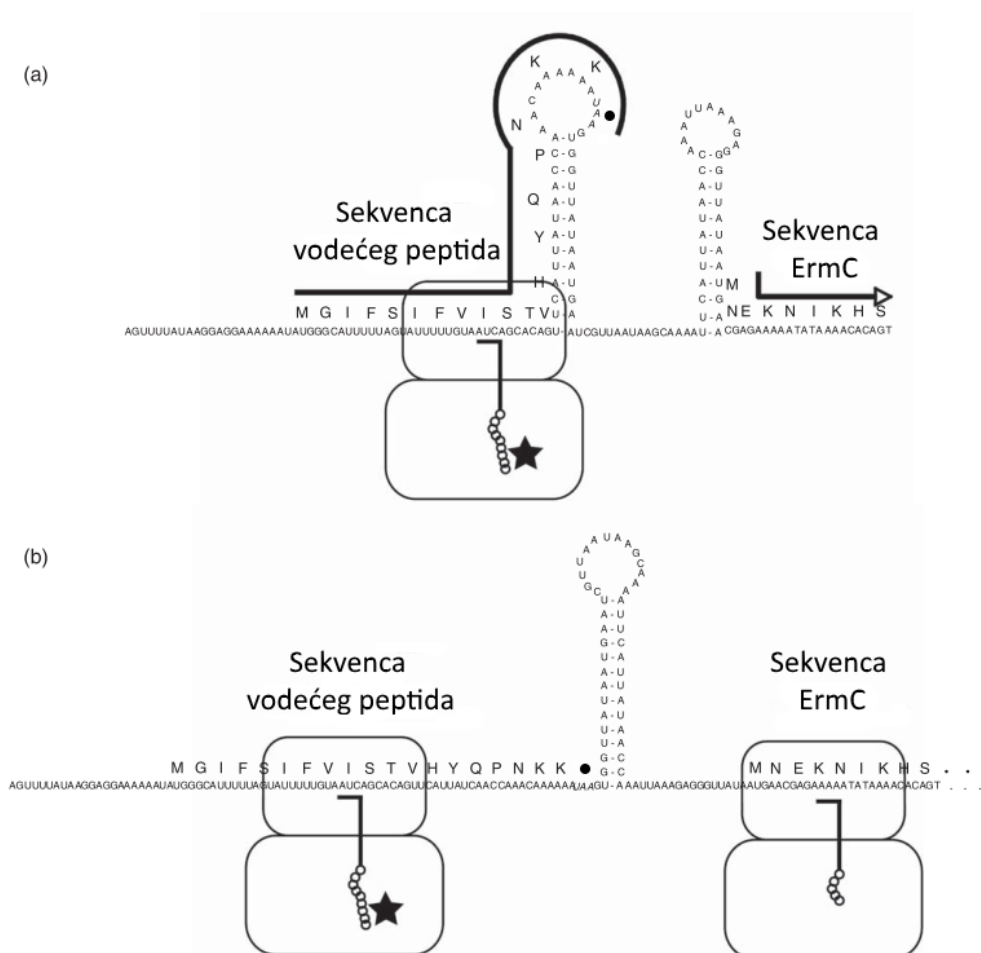
nalazi u stanici, njegovo vezanje na ribosom uvjetuje zastoj u translaciji ORF-a vodećeg peptida na 9. kodonu, pri čemu se potiče konformacijska promjena mRNA koja omogućuje translaciju *ermC* gena na novom ribosomu bez makrolida. Ukupni kompleks mora biti dovoljno stabilan kako bi došlo do spomenute promjene konformacije u mRNA, pri čemu promjene u sekvenci peptida i makrolida imaju bitan utjecaj. Kladinoza tu igra ključnu ulogu, te radi njenog nedostatka pri C-3 atomu ketolidi nisu efektivni stabilizatori kompleksa, dok 16-eročlani makrolidi zbog svoje inhibicije peptidil-transferazne aktivnosti ribosoma ne dozvoljavaju dosezanje ribosoma do 9. kodona. Također postoje verzije mehanizma rezistencije u kojima samo jedan specifičan makrolid čini stabilan kompleks, a moguće je i ostvariti konverziju između i-MLS_B i c-MLS_B rezistencije putem mutacija koje dovode do inducirane konformacije kao one stalne.¹

Alternativni način modifikacije bakterijskog ribosoma obuhvaća akumulacije mutacija. Primjer toga su nukleotidi A2058 i A2059 u domeni V 23S rRNA čime se eliminira sposobnost formiranja krucijalnih vodikovih veza i umanjuje strukturna komplementarnost sa C-5 supstituentom makrolida. Također su zabilježene mutacije u drugim dijelovima domene V i domeni II 23S rRNA, uz prisutnost mutacija u L4 i L22 proteinima koji sačinjavaju izlazni tunel za novonastali polipeptid, gdje je rezistencija uglavnom posljedica promjene konformacije ribosoma. Moguće su kombinacije raznih mutacija i metilacija, te su demonstrirani aditivni i sinergistički učinci u efektivnosti rezistencije.¹

Drugi značajan mehanizam rezistencije je putem aktivnih transportera koji miču makrolid van stanice (engl. efflux pump), od kojih su neki specifični na makrolide, a drugi općeniti. MefA skupina transportera djeluje pomoću indukcije transkripcije uvjetovane makrolidima, javlja se primarno u infekcijama uzrokovanim rezistentnim streptokokima, te ketolidi i 16-eročlani makrolidi nisu dobri aktivatori. Srodna, ali strukturno različita MsrA skupina nalazi se primjerice u rezistentnim sojevima *S. aureus*. Gram-negativne bakterije odlikuju se nizom transporterskih sustava koji nisu specifični na makrolide, te su primarni uzrok njihove intrinzične rezistencije na njih.¹

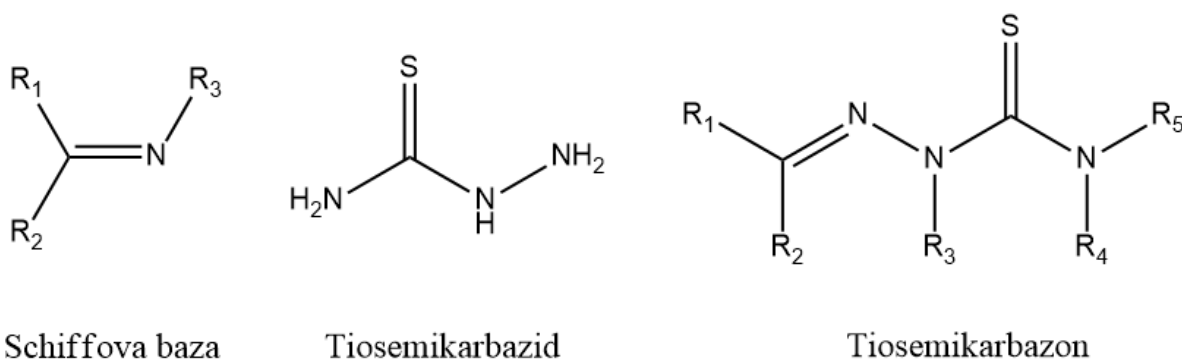
Moguća je i enzimska inaktivacija makrolida putem fosforilacije, glikozilacije ili acetilacije hidroksilnih skupina, ali i hidrolize šećernih supstituenata ili laktona. Također je uočen mehanizam rezistencije putem ekspresije kraćih peptida specifičnih sekvenci, gdje njihova translacija na ribosomu paralelno dovodi do izbacivanja makrolida van ribosoma. Pojava proteina čija sinteza se nesmetano nastavlja neovisno o prisutnosti makrolida se

najvjerojatnije može objasniti analognim mehanizmom. Prisutno je i vezanje makrolida na druge podstanične sustave, prekomjerna proizvodnja vezujućih mjesta za makrolide, ali i alternativni mehanizmi.^{1,27}



2.8. Tiosemikarbazoni

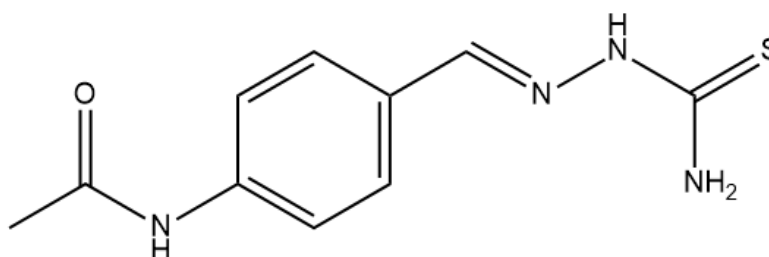
Imini su spojevi okarakterizirani prisutnošću dvostruke veze između ugljika i dušika generalne formule $R_1R_2C=NR_3$, pri čemu R skupina može predstavljati vodik ili razne alkilne i arilne skupine. Schiffove baze su podskupina imina, gdje R_3 skupina nije vodikov atom. Jednostavna sinteza imina, pa tako i Schiffovih baza uključuje reakciju nukleofilne adicije amonijaka odnosno primarnih amina na aldehide ili ketone. Semikarbazoni se stoga mogu promatrati kao podskupina Schiffovih baza u kojoj je nukleofil u reakciji adicije predstavljen semikarbazidima, te daju generalnu formulu $R_1R_2C=NNR_3C(O)NR_4R_5$. Stoga, ovisno o odabranom reakcijskom putu i polaznim spojevima, moguće je postići varijabilnu supstituciju duž molekule. Time tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni predstavljaju iste klase spojeva, uz zamjenu kisika sumporovim atomom pri karbonilnoj skupini. Dodatno, tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni pronalaze upotrebu kao polazni spojevi u sintezi raznih supstituiranih heterocikličkih spojeva.^{30,31,32,33}



Slika 19. Prikaz opće strukture Schiffove baze, tiosemikarbazida i tiosemikarbazida (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 30,31)

Svojstva tiosemikarbazona i njemu srodnih spojeva su istraživana već dulje vrijeme, te je već tijekom 1950-ih zabilježeno antibakterijsko djelovanje tiosemikarbazona protiv *Mycobacterium tuberculosis*, glavnog uzročnika tuberkuloze. Kao primjer te aktivnosti može se spomenuti tioacetazon (ili *p*-acetamidobenzaldehid). Navedeni spoj posjeduje iznimno uzak spektar aktivnosti, djelujući na *M. tuberculosis* i još dva organizma iz roda *Mycobacterium*. Dulje vrijeme je bio u uporabi, no njegova bakteriostatska aktivnost, razvitak rezistencije, pojava unakrsne rezistencije s drugim lijekovima, razvitak novih terapijskih opcija i komplikacije pri liječenju pacijenata zaraženih HIV-om su mu ograničile uporabu. Tuberkulostatska aktivnost tioacetazona ponajviše se temelji na njegovoj enzimskoj aktivaciji

u samom organizmu putem monookisgenaznog enzima EthA, odnosno spada u prolijekove, te potom sudjelovanju u inhibiciji sintaze masnih kiselina FAS II (engl. Fatty acid synthase), koja sudjeluje u sintezi mikoličnih kiselina, skupine masnih kiselina koje su sastavnice stanične stijenke uzročnika infekcije.^{6,34}



Tioacetazon

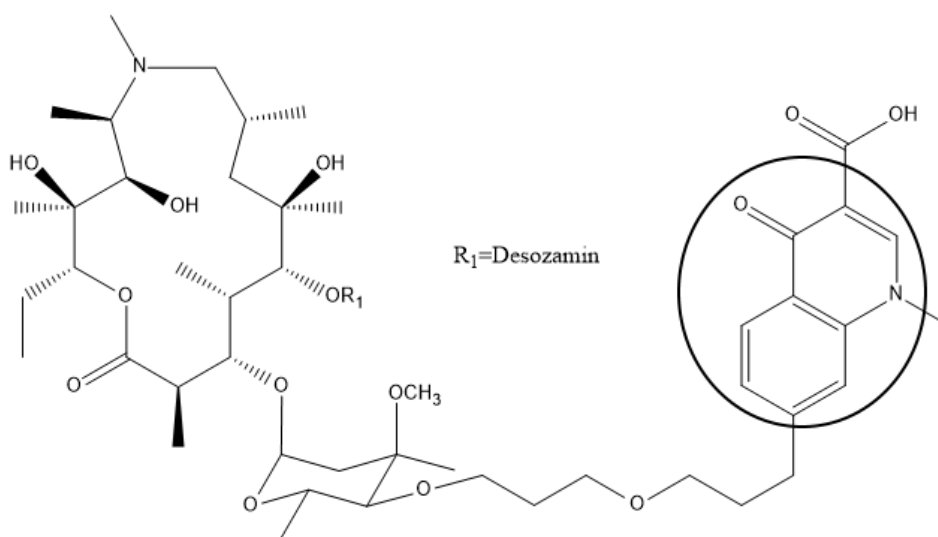
Slika 20. Struktura tuberkulostatika tioacetazona (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 34)

Otkriće antitumorskog djelovanja cisplatine u 60-ima inspiriralo je daljnje istraživanje metalnih iona i njihove koordinacijske kemije kao ključ za pronalazak novih lijekova. Tiosemikarbazoni se tu odlikuju kao dobri kelatori raznih metalnih iona poput željeza, bakra, nikla, cinka, kobalta, mangana i dr. Njihovo osnovno vezanje metala odvija se putem bidentatnog vezanja sa sumporovim atomom i azometinskim dušikom, uz dodatak da mogućnost uvođenja supstituenata na R₁₋₅ omogućava znatne modifikacije u strukturi, stehiometriji i načinu vezanja u ukupnom kompleksu. Osim antituberkulozne aktivnosti, tiosemikarbazoni i njihovi metalni kompleksi su pokazali raznolika biološka svojstva poput antiviralne, antifungalne, antibakterijske, antimalarijske, antitumorske, antiparazitske te mnoge druge aktivnosti. U mnogim slučajevima vezanje metala povećava aktivnost spoja, što se može često opravdati kao posljedica generalnog raspršenja naboja slijedom koordinacije metala, te promjene u strukturi liganda gdje se nepolarniji dijelovi više izlažu otapalu, čime dolazi do porasta u lipofilnosti kompleksa, te stoga i penetracije staničnih membrana. Također je u sojevima rezistentnog *S. aureus* demonstriran antimikrobni efekt tiosemikarbazona vezanih na nanočestice cinkova oksida, pri čemu dolazi i do smanjenja u ekspresiji gena za aktivne transportere (efflux pump mehanizam rezistencije) pri njihovom korištenju s antibiotikom. Bitno je istaknuti da tiosemikarbazoni nisu spojevi čija aktivnost u organizmima isključivo proizlazi iz oduzimanja esencijalnih metala iz cirkulacije kelacijom slobodnih metalnih iona, već kao spojevi koji interagiraju s metalima, djelujući na raznolike biološke puteve različitim načinima.^{6,7,35,36,37}

2.9. Makrozoni

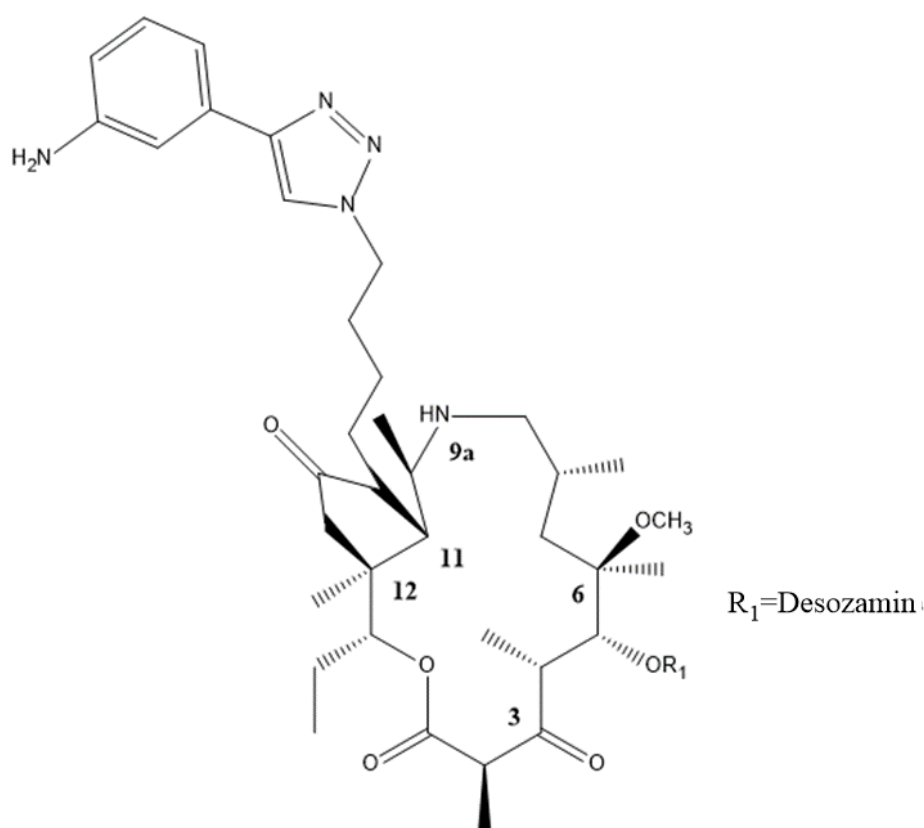
Otkriće lijekova dugotrajan je i skup proces. Stoga, u njihovom istraživanju modifikacija već postojećih skupina lijekova je često najpovoljniji i najproduktivniji pristup. Primjer obuhvaćanja takvog pristupa su hibridne molekule, definirane kao sintetski produkt spajanja dviju ili više farmakofora u jednu molekulu, sa ciljem stvaranja spoja koji će idealno dovesti do sinergističkog efekta, odnosno bioloških svojstava značajnijih u usporedbi sa oba farmakofora u izolaciji, ili pak do promjene u svojstvima. Kao što je već spomenuto, makrolidi se ističu svojom antibakterijskom, imunomodularnom i protuupalnom aktivnošću, povoljnim farmakološkim svojstvima (pogotovo azalidi), a neki su pokazali i potencijal u slučajevima poput antiviralne, antimalarijske, antitumorske i tuberkulostatske aktivnosti. Stoga, makrolidi su poslužili kao jedan od farmakofora u novim hibridnim spojevima.^{4,5,38}

Hibridne molekule mogu se podijeliti u 4 skupine. Prva skupina obuhvaća konjugate, u kojima su farmakofori povezani u jednu molekulu putem poveznice (engl. linker), kemijske skupine koja se ne nalazi u izvornim molekulama iz kojih farmakofori potječu, a najčešće je metabolički stabilna. Jednostavan primjer je skupina makrolona, konjugata makrolida i kinolona, druge skupine antibiotika koja služi kao jedna od alternativnih terapijskih opcija, primjerice u liječenju upale pluća. Dvije skupine mogu biti povezane putem 4"-OH skupine kladinoznog šećera azitromicina, korištenjem acil ili alkil poveznice, te spojevi pokazuju potencijal naspram prijašnjih makrolidnih antibiotika poput telitromicina, primjerice aktivni su protiv konstitutivno rezistentnog *S. pyogenes*.^{5,38}



Slika 21. Prikaz strukture predstavnika makrolona, konjugata makrolida i kinolona, sa zaokruženom kinolonskom skupinom (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 38)

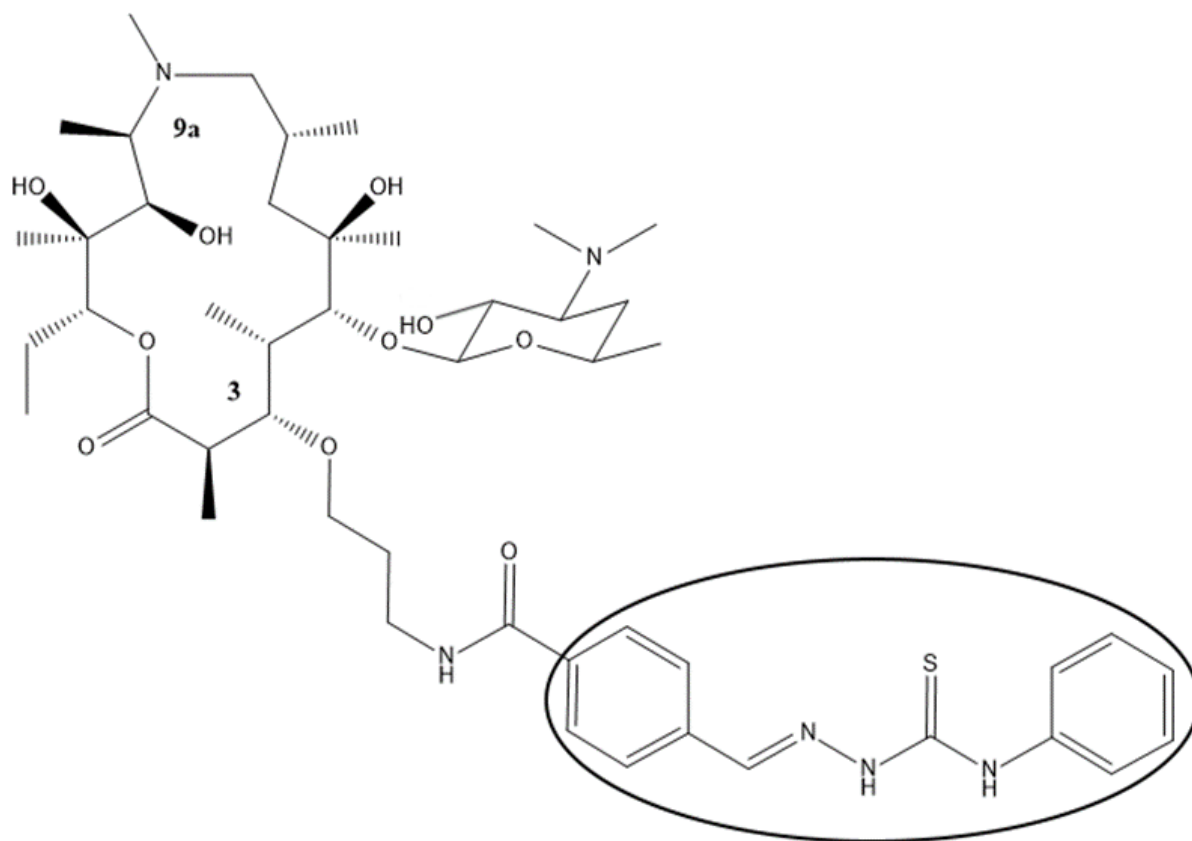
Druga skupina čini lomljive konjugate (engl. cleavage conjugates), čija je razlika u tome da se poveznica metabolički cijepa, te se u organizmu otpuštaju farmakofori koji nadalje djeluju neovisno jedan o drugome. Treća skupina (engl. fused hybrid molecules) sačinjena je na način da je poveznica dovoljno smanjena da se farmakofori međusobno dodiruju. Zadnja četvrta skupina su sjedinjeni hibridi (engl. merged hybrides), gdje se javlja značajna sličnost u polaznim strukturama farmakofora, te stoga sjedinjeni hibrid dovodi do nastanka jednostavnije molekule koja kombinira preostale različite strukturne elemente. Kao primjer može se navesti skupina makrolidnih antibiotika azaketolida, koji kombiniraju azalidnu makrolaktonsku osnovu sa uklanjanjem kladinoznog šećera i zamjenom keto skupinom, te često i upotrebu C-11,12-karbamatnog supstituenta sa vlastitim dodatno supstituiranom alkilnim lancem kao u spoju na slici 22., makar su mogući i drugi načini vezanja i supstituenata. Time se objedinjuju iznimna farmakološka svojstva azalida, stvara novo vezno mjesto i izbjegava indukcija rezistencije.^{4,5,19,38}



Slika 22. Prikaz strukture predstavnika azaketolida, skupine sjedinjenih hibrida azalidne i ketolide skupine makrolidnih antibiotika (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 19)

Pripadnici treće i četvrte generacije makrolidnih antibiotika nisu prisutni na tržištu, dijelom radi neuspjeha telitromicina i nastalih regulatornih zapreka, te se stoga i dalje poglavito koriste azitromicin i klaritromicin. Opći porast rezistencije na antibiotike, pa tako i na makrolide u uporabi predstavlja globalni javno-zdravstveni problem, te se stoga javlja potreba za novim makrolidnim antibioticima djelotvornim na rezistentne sojeve. Cilj novog makrolida je stoga posjedovati više veznih mjesta na ribosomskoj 23S rRNA kao u telitromicinu i solitromicinu kako bi se spriječila pojava rezistencije, a potrebna su i povoljna farmakološka svojstva. 15-eročlani makrolid azitromicin posebice se ističe svojom akumulacijom u tkiva i stanice, zadovoljavajućom oralnom bioraspoloživošću, dugim poluvremenom eliminacije i dobrim sigurnosnim profilom i podnošljivošću. Broj pozitivno nabijenih atoma pri fiziološkom pH, lipofilnost te distribucija i stupanj separacije između polarnog i hidrofobnog dijela molekule su neki od značajnih prediktora stanične akumulacije i retencije makrolida. Odabirom mjesta supstitucije, strukture supstituenta i duljine poveznice između dviju skupina spojeva moguće je sintetizirati nove makrolidne konjugate sa povoljnim sigurnosnim profilom i aktivnošću protiv osjetljivih i rezistentnih sojeva, što je demonstrirano u sintetskim postupcima koji su kombinirali azitromicin sa sulfonamidima i tioureama.^{3,8,13,15,39,40}

Uzevši u obzir istaknutu biološku aktivnost tiosemikarbazona, također je pripravljena nova klasa makrolidnih konjugata makrozona, pri čemu se očekivao sinergijski učinak u spajanju farmakofora. 3-O i 4"-O γ -aminopropil-azitromicin su bili polazni makrolidni prekursori, koji putem amidne veze ostvarene na γ -aminopropilnoj skupini se spajaju s tiosemikarbazonom, dodatno supstituiranim aromatima. Provedene su simulacije vezanja nastalih spojeva na ribosom pomoću kristalne strukture organizma *E. coli*, te je mjesto vezanja odgovaralo primarnom mjestu vezanja azitromicina. Makrolaktonski prsten poprima poziciju nalik eritromicinu, no ostvaruje više interakcija (uglavnom van der Waalsovih), te tiosemikarbazonski supstituent također doprinosi putem stvaranja vodikovih veza i π - π interakcija. Spojevi su testirani *in vitro* na niz osjetljivih i rezistentnih patogena poput *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus* i drugih. Dobivene aktivnosti su predstavljale u mnogim slučajevima poboljšanje naspram azitromicina, te predstavljaju platformu za pronalazak novih efektivnih makrolidnih antibiotika.⁸



Slika 23. Prikaz strukture pripadnika makrozona, konjugata makrolida i tiosemikarbazona, sa zaokruženim tiosemikarbazonским substituentom (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 8)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Kemikalije i materijali

U eksperimentima su, ukoliko je bilo moguće korištene komercijalno dostupne kemikalije, te komercijalna otapala analitičke čistoće. Tankoslojna kromatografija (engl. thin layer chromatography, TLC) rađena je na pločama silikagela DC Kieselgel 60F254 (*Merck*, Njemačka). Korišteni su sustavi otapala u navedenim omjerima:

Diklormetan : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 9 : 1,5

Diklormetan : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 15 : 1,5

Diklormetan : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 30 : 1,5

Mrlje su detektirane pomoću UV svjetla pri 254 nm i prskanjem pločica s 5 %-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu.

3.1.2. Instrumentne metode

Brza kolonska kromatografija (engl. flash column chromatography) provedena je na uređaju Interchim PuriFlash na komercijalno dostupnim kolonama (Interchim PF-15SIHC-JP/4 g) punjenim sferičnim silikagelom (veličina čestica 15 µm). Preparativna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) provedena je na uređaju Agilent 1290 Infinity II System, opremljenim s detektorom s nizom fotodioda (DAD) i SQ kvadrupolnim detektorom (*Agilent Technologies*, SAD). Upotrijebljena je Waters SunFire C18 kolona (19 mm unutarnjeg promjera, 100 mm duljine, 5 µm veličine čestica). Tijekom analize protok iznosi 30 mL/min, te kao eluensi su korišteni 0,1 %-tna otopina mravlje kiseline u vodi i 0,1 %-tna otopina mravlje kiseline u acetonitrilu. Tijekom ispiranja acetonitrilna otopina se povećavala u udjelu od 3 do 97 % kroz 3,5 min, te se održavala postignuta razina još 0,4 min. Potom je postotak iste otopine pao na 3 % kroz 0,01 min, te u uvjeti zadržani još 0,4 min. Injektirani volumen iznosio je 2 µL. Raspon DAD detektora je 210 nm – 400 nm. Kao međuspoj za masenu spektrometriju korištena je metoda elektroraspršenja u pozitivnom i negativnom modu.

Svi jednodimenzijski i dvodimenzijski NMR spektri snimljeni su u Laboratoriju za NMR spektroskopiju Selvite d.o.o. Spektri ¹H, COSY (engl. correlated spectroscopy), editirani HSQC (engl. heteronuclear single quantum coherence), HMBC (engl. heteronuclear multiple bond correlation) NMR snimani su na Bruker Avance III 600 i Bruker Avance DRX500

spektrometrima (*Bruker*, SAD) opremljenim inverznom probom i z-gradijentima, dok su DEPT-Q (engl. distortionless enhancement by polarisation transfer with retention of quaternaries) eksperimenti provedeni na Bruker Avance DPX300 spektrometru s direktnom $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DUL probom (*Bruker*, SAD). Svi eksperimenti provedeni su na 25 °C u NMR cjevčicama od 5 mm. Za snimanje svih spektara korišteni su standardni pulsni sljedovi koji se nalaze u biblioteci proizvođača (*Bruker BioSpin*). Kao otapalo je korišten kloroform-d i DMSO- d_6 uz tetrametilsilan (TMS) kao interni standard.

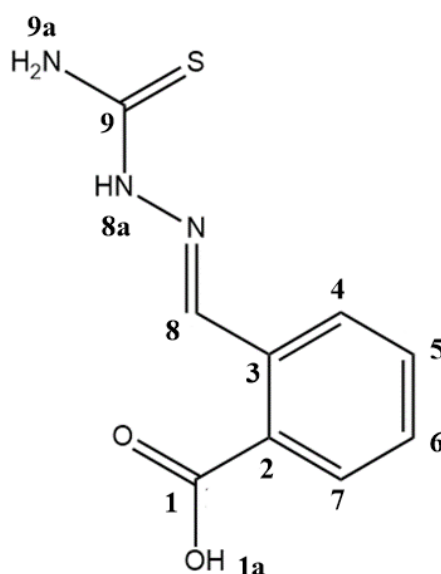
Radi inicijalne provjere reakcijskih smjesa upotrijebljena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. ultra-performance liquid chromatography, UPLC) na uređaju Waters Acquity UPLC opremljenog s DAD detektorom te SQ kvadrupolnim detektorom. Korištena je kolona sa reverznom fazom Waters Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm unutarnjeg promjera, 50 mm duljine, veličine čestica 1,7 μm) (*Waters*, SAD). Injektirani volumen iznosi 2 μL te je vrijeme ekvilibracije 1 minuta. Ovisno o slučaju, korištene su dvije metode različitog pH uz gradijentne uvjete ispiranja. Metoda višeg pH upotrebljava otapala A (voda s 0,05% amonijaka) i B (acetonitril s 0,05% amonijaka). Metoda nižeg pH upotrebljava otapala C (voda s 0,1 % mravlje kiseline) i D (acetonitril s 0,05% mravlje kiseline). Protok iznosi 0,6 mL/min. Tijekom analize otapalo A/C nalazi se pri 97 % prvih 0,5 min. Zatim dolazi do promjene istog otapala do 3 % u 6,5 min. Održava se postignuta razina još 0,5 min, te u 0,1 min dolazi do reverzne promjene iz 3 u 97 % otapala A/C. Uvjeti su zadržani još 0,4 min. Raspon DAD detektora je 210 nm – 400 nm, a kao međuspoj za masenu spektrometriju korištena je metoda elektrorasprišenja u pozitivnom i negativnom modu.

Čistoća pojedinih spojeva kontrolirana je HPLC analizom na instrumentu Waters 2690 uz Photodiode Array Waters 996 i MS micromass Quattro micro detektore te kolonu XTerra MS C18. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina formijatne kiseline u acetonitrilu odnosno vodi uz protok 0,5 mL/min.

3.2. Sinteza tiosemikarbazonskih međuprodukata

3.2.1. 2-Karboksibenzaldehid tiosemikarbazon (**I**)

U suspenziju 2-karboksibenzaldehida (**1a**) (500 mg, 3,33 mmol) u izopropanolu (50 mL) doda se tiosemikarbazid (**1b**) (304 mg, 3.34 mmol), te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi 2 sata. Smjesa se analizira putem UPLC-MS-a te je opažen očekivani molekulski ion pri m/z : 224,08. Dobiveni kristali se odsiše preko Büchnerovog lijevka i suše u vakuum sušilici pri 45°C preko noći. Dobiven je 2-karboksibenzaldehid tiosemikarbazon, odnosno tiosemikarbazon (**I**) (633,7 mg, $\eta=85\%$), koji je dalje korišten bez pročišćavanja. NMR podatci navedeni su u Tablici 1.⁸



Slika 24. Struktura tiosemikarbazonskog prekursora (**I**) s označenim lokantima

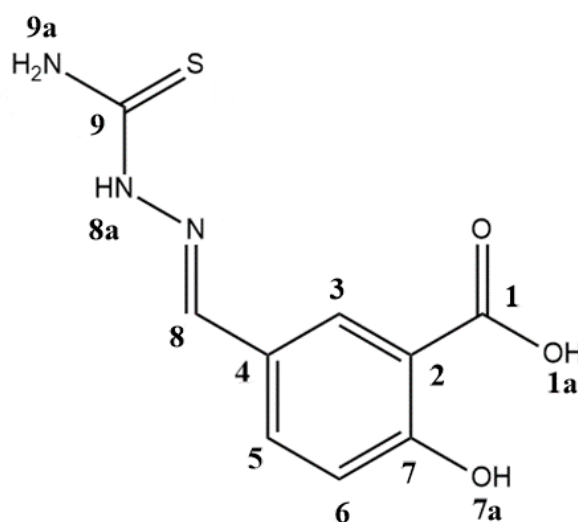
Tablica 1. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR tiosemikarbazona (**I**)

Tiosemikarbazon (I)					
Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1a	- ^a	-	6	7,47	129,31
1	-	168,20	7	7,82	129,95
2	-	130,81	8a	11,59	-
3	-	134,18	8	8,78	141,35
4	8,25	127,08	9a	8,22; 7,96	-
5	7,56	131,61	9	-	178,17

^a - nije asignirano

3.2.2. 3-Karboksi-4-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon (**II**)

U suspenziji 5-formilsalicilne kiseline (**IIa**) (500 mg, 3,01 mmol) u izopropanolu (50 mL) doda se tiosemikarbazid (**Ib**) (280 mg, 3,07 mmol), te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi 2 sata. Uspješnost reakcije potvrđuje se UPLC-MS-om, gdje se očekivani molekularni ion nalazi pri m/z : 240,07. Dobiveni kristali su odsisani preko Buchnerovog lijevka i sušeni u vakuum sušilici pri 45°C preko noći. Dobiven je 3-karboksi-4-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon, odnosno tiosemikarbazon (**II**) (667,9 mg, $\eta=93\%$), koji je dalje korišten bez pročišćavanja. NMR podatci spoja su prikazani u Tablici 2.⁸

Slika 25. Struktura tiosemikarbazonskog prekursora (**II**) s označenim lokantimaTablica 2. Asignacija kemijskih pomaka ^1H i ^{13}C NMR tiosemikarbazona (**II**)

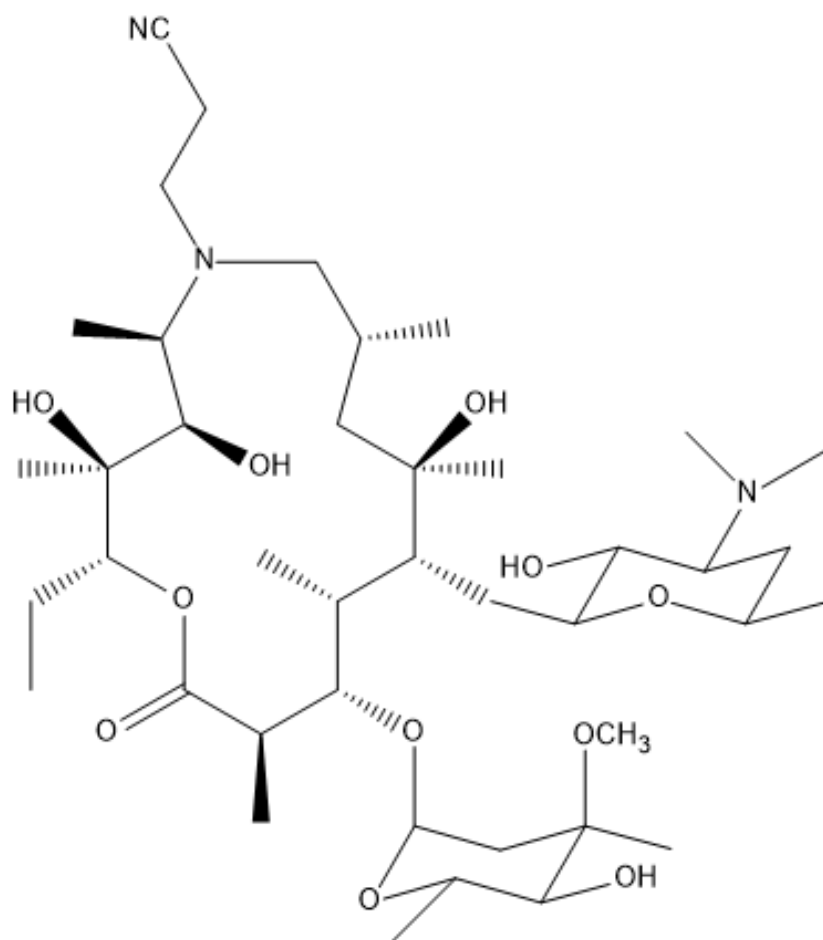
Tiosemikarbazon (II)					
Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm	Atom	$\delta(^1\text{H})$ / ppm	$\delta(^{13}\text{C})$ / ppm
1a	- ^a	-	7a	- ^a	-
1	-	171,50	7	-	162,34
2	-	113,15	8a	11,32	-
3	7,985	130,13	8	8,00	141,54
4	-	125,60	9a	8,11; 7,980	-
5	8,10	133,42	9	-	177,68
6	6,98	117,85			

^a - nije asignirano,

3.3. Sinteza makrolidnih međuprodukata

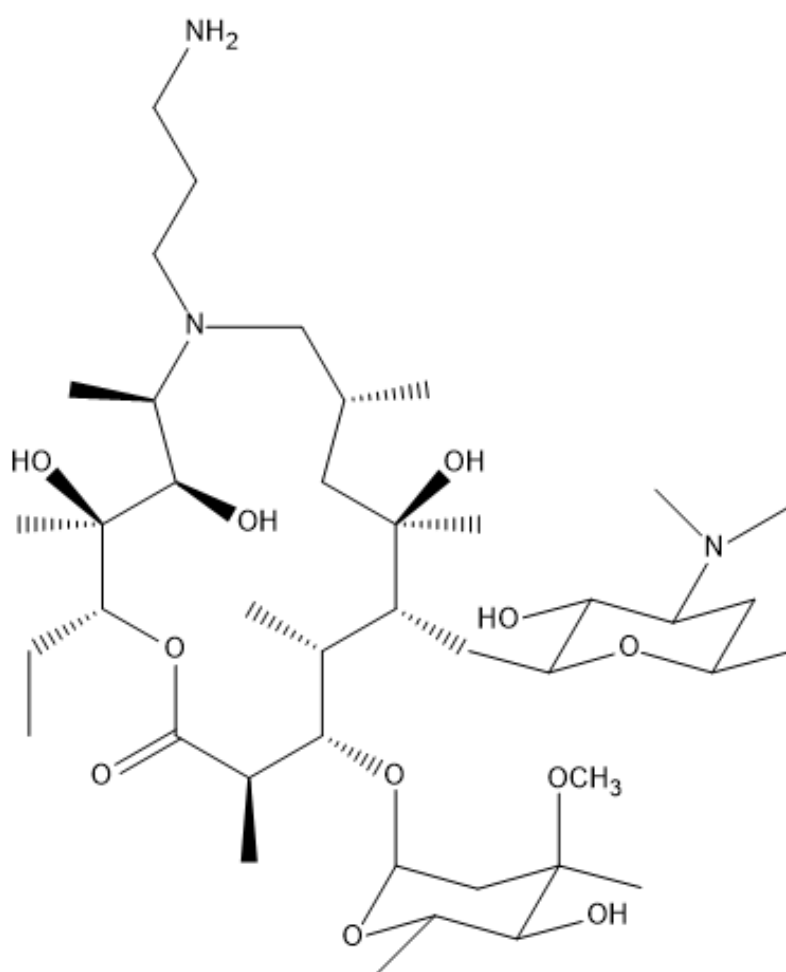
3.3.1. Sinteza 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (**III**)

Otopina 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**IIIa**) (2,0 g, 2,72 mmol) u akrilonitrilu (10 mL) zagrijava se pri temperaturi vrenja oko 10 sati. Akrilonitril se destilira pod sniženim tlakom. Nastaje čisti 9-deokso-9-dihidro-9a-(β -cijanoetil)-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**IIIb**) (2,01 g, η =94 %). Protonirani molekulski ion u spektru mase UPLC-MS-a nalazi se pri m/z: 788,68.^{40,41}



Slika 26. Struktura 9-deokso-9-dihidro-9a-(β -cijanoetil)-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**IIIb**)
(Prilagođeno prema Ref. 40)

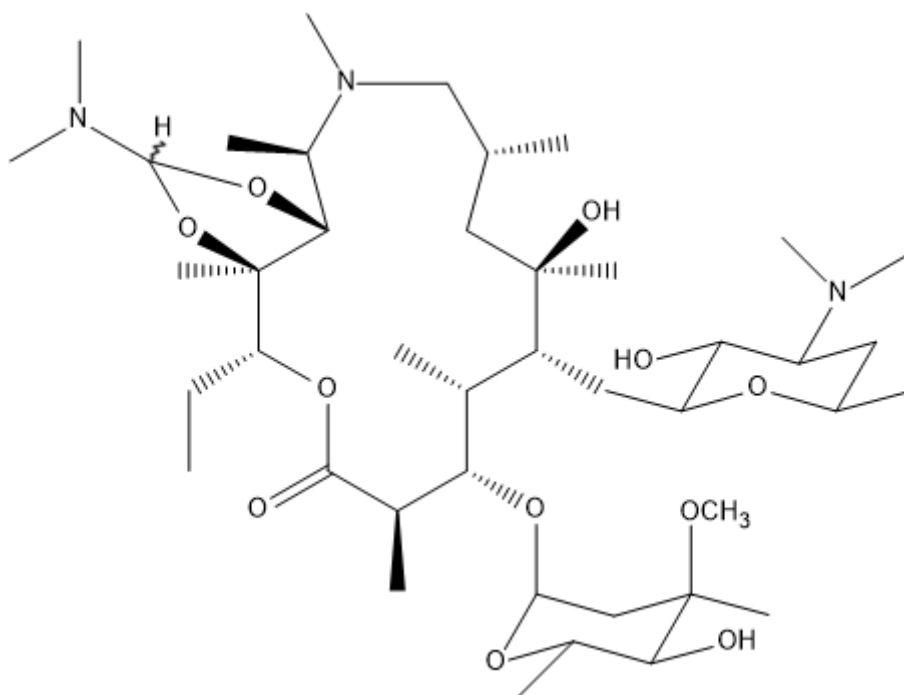
Otopina 9-deokso-9-dihidro-9a-(β -cijanoetil)-9a-aza-9a-homoeritmicina A (**IIIb**) (1,0 g, 1,27 mmol) u 96 %-tnom etanolu (10 mL) hidrira se 72 sata uz PtO₂ (0,3 g) pri tlaku vodika od 20 bara. Katalizator se odsiše i etanol upari pod sniženim tlakom. Dobiva se sirovi 9-deokso-9-dihidro-9a- γ -aminopropil-9a-aza-9a-homoeritromicin A ili 9a-N- γ -aminopropil-azitromicin (**III**) (0,87 g, η =87 %). Protonirani molekulski ion u spektru mase detektira se pri m/z: 792,44, što odgovara očekivanim vrijednostima makrolidnog prekursora (**III**). Čisti spoj (**III**) (0,51 g, η =59 %) izolira se kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala diklormetan : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 9 : 1,5.^{40,41}



Slika 27. Struktura 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (**III**) (Prilagođeno prema Ref. 40)

3.3.2. Sinteza 4''-O- γ -aminopropil-azitromicina (**IV**)

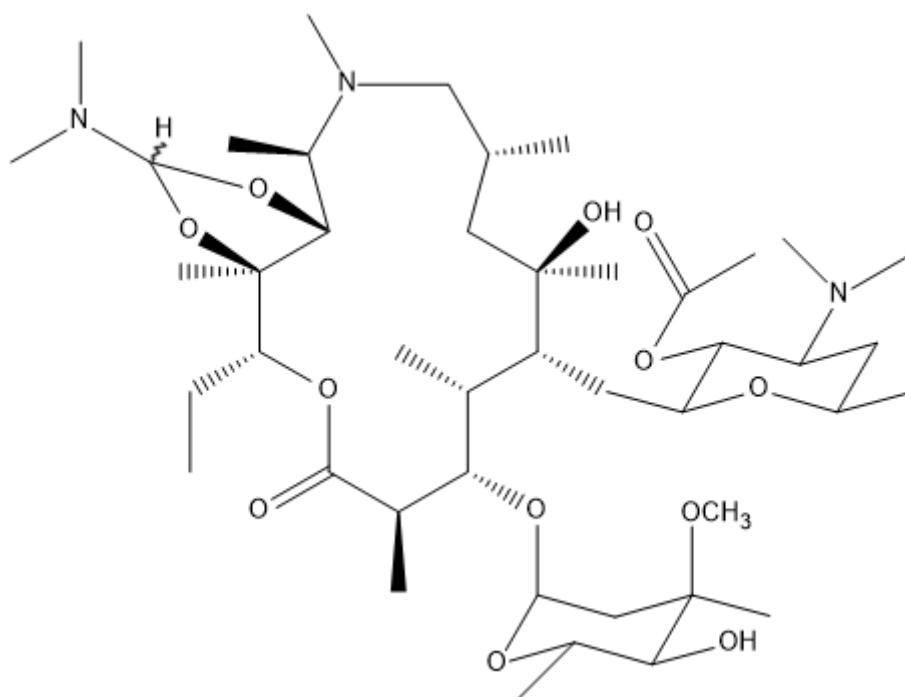
U otopinu azitromicina (**IVa**) (10 g, 13 mmol) u diklormetanu (engl. dichloromethane, DCM) (40 mL) dodan je N,N-dimetilformamid-dimetilacetal (DMF-DMA) (6,0 mL, 45 mmol) i reakcijska smjesa je miješana na 65 °C 24 sata. U smjesu unesena je dodatna količina DMF-DMA (2 mL, 15 mmol) i miješanje nastavljeno na 65 °C još 5 sati. Uparavanjem otapala pod sniženim tlakom dobiveno je 12,7 g 9-deokso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(N,N-dimetilformamid)acetal (**IVb**) u obliku ulja koji je korišten u sljedećem stupnju bez dodatnog pročišćavanja. Putem prije navedene UPLC-MS metode dobivena je očekivana m/z vrijednost protoniranog iona međuprodukta od oko 804,50.^{8,42}



Slika 28. Struktura 9-deokso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicina A-11,12-(N,N-dimetilformamid) acetala (**IVb**) (Prilagođeno prema Ref. 8)

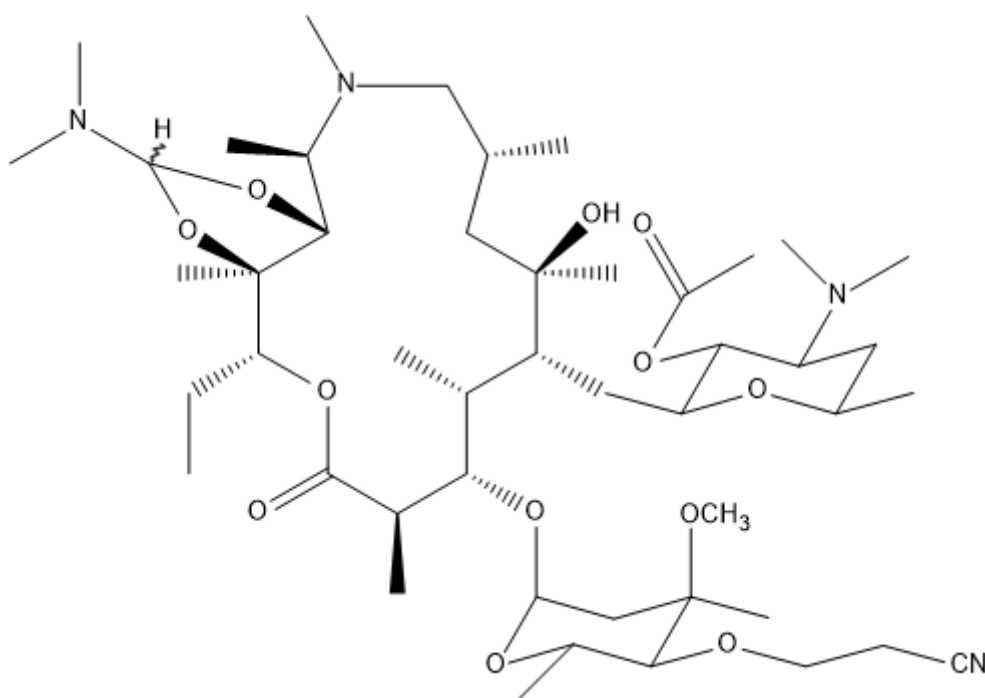
U otopinu uljastog ostatka produkta (**IVb**) iz prethodnog stupnja (12,7 g) u etil-acetatu (70 mL) ohlađenog na 0 °C tijekom 15 minuta dokapan je anhidrid octene kiseline (1,84 mL, 19,5 mmol). Temperatura reakcijske smjese je polako tijekom jednog sata povećavana do sobne temperature. Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 2 sata, a zatim oprana zas. vod. otopinom NaHCO₃ (2x15 mL). Organski sloj sušen je iznad K₂CO₃ te uparen pod sniženim tlakom. Na dobivenu pjenastu krutinu dodan je dietil-eter. Talog je profiltriran pri čemu je dobiven 2'-O-Acetil-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(N,N-

dimetilformamid) acetal (**IVc**) (10,2 g, $\eta=93\%$) u obliku bijelog taloga. Protonirani molekulski ion javlja se pri m/z : 846,70.^{8,42}



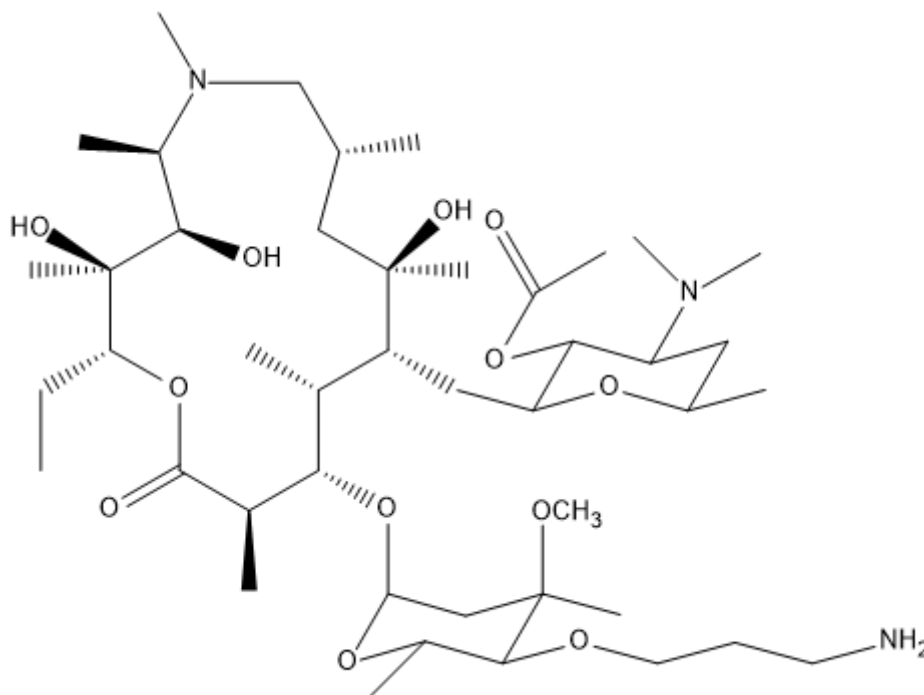
Slika 29. Struktura 2'-O-Acetil-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(*N,N*-dimetilformamid) acetala (**IVc**) (Prilagođeno prema Ref. 8)

U otopinu spoja (**IVc**) (5,2 g, 6,15 mmol) u akrilonitrilu (35 mL) pod atmosferom dušika dodan je tert-BuOH : THF = 1 : 1 (2 mL, 20 mmol). Reakcijska smjesa ohlađena je na 0 °C i tijekom 30 minuta dodavan NaH (0,2 g, oko 8 mmol). Temperatura reakcijske smjese je polako tijekom jednog sata povećavana do sobne temperature te je miješanje na sobnoj temperaturi nastavljeno još 2 sata. Akrilonitril je uparen pod sniženim tlakom, a na upareni ostatak dodan je etil-acetat (30 mL). Nastali polimerni talog uklonjen je filtracijom preko celita, a filtrat opran sa zas. vod. otopinom NaCl (20 mL). Organski sloj sušen je iznad K₂CO₃ te uparen pod sniženim tlakom. Na upareni ostatak dodani su DCM (5 mL) i n-heksan (45 mL). Nastali žuti talog uklonjen je filtracijom preko celita, a filtrat uparen pod sniženim tlakom pri čemu je dobiven 2'-O-Acetil-4''-O-(2-cijanoetil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(*N,N*-dimetilformamid) acetal (**IVd**) (5,12 g $\eta=93\%$) u obliku bijele pjenaste krutine. Protonirani molekulski ion u spektru mase UPLC-MS-a nalazi se pri m/z : 899,69.^{8,42}



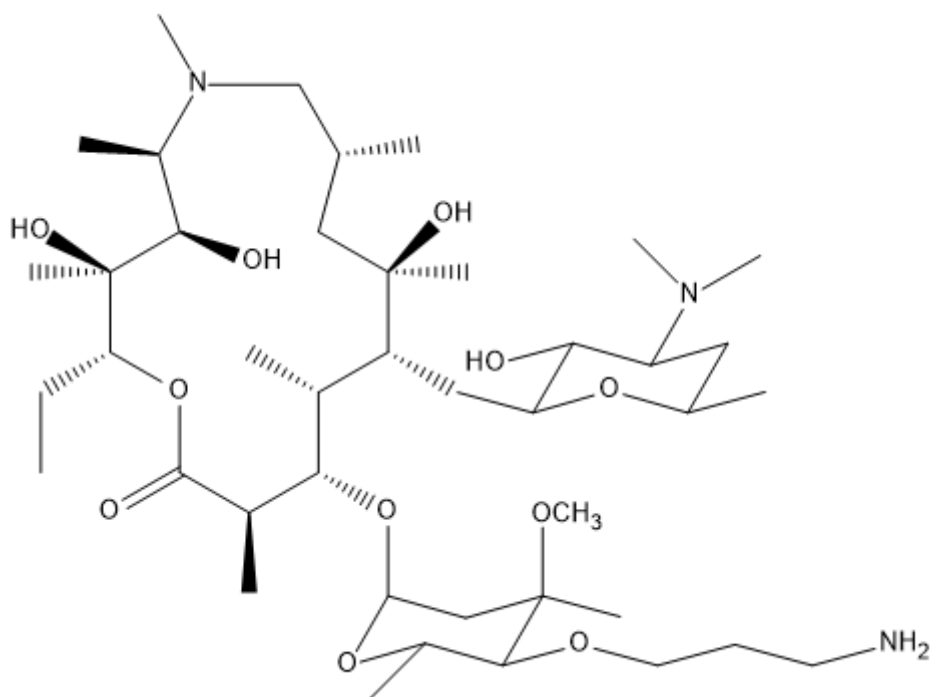
Slika 30. Struktura 2'-O-Acetil-4"-O-(2-cijanoetil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(*N,N*-dimetilformamid)acetala (**IVd**) (Prilagođeno prema Ref. 8)

U otopinu spoja (**IVd**) (5,12 g, 5,7 mmol) u ledenoj octenoj kiselini (20 mL) dodan je PtO_2 (0,4 g). Reakcijska smjesa hidrirana je pod tlakom vodika od 5 bara 17 sati. Katalizator je uklonjen filtracijom i ledena octena kiselina uparena pod sniženim tlakom. Na upareni uljasti ostatak dodan je DCM (20 mL), a nastali talog uklonjen filtracijom preko celita. Filtrat je uparen na polovicu volumena i ekstrahiran vodom (30 mL) pri čemu je produkt prešao u vodeni sloj. Vodeni sloj je ekstrahiran DCM-om (10 mL), a zatim ekstrahiran s dodatnom količinom DCM-a (30 mL) uz podešenje pH uz jako miješanje na 6,5. Sakupljeni organski ekstrakti su uklonjeni, a vodeni sloj ekstrahiran novom količinom DCM-a (20 mL) uz podešenje pH vrijednosti uz jako miješanje na 8. Produkt je prešao u organski sloj koji je sušen iznad Na_2SO_4 te uparen pod sniženim tlakom pri čemu je dobiven 2'-O-Acetil-4"-O-(3-aminopropil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**IVe**) (3,05 g, $\eta=62\%$) u obliku bijele pjenaste krutine. Vrijednost m/z protoniranog iona međuprodukta iznosi 848,45.^{8,42}



Slika 31. Struktura 2'-O-Acetil-4''-O-(3-aminopropil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**IVe**) (Prilagođeno prema Ref. 8)

U otopinu makrolidnog spoja (**IVe**) (3,13 g, 3,6 mmol) u smjesi otapala metanol : voda = 2 : 1 (40 mL) dodan je K_2CO_3 (2,1 g, 15 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na 55 °C 6 sati. Metanol je uparen pod sniženim pritiskom, a produkt otopljen u etil-acetatu (20 mL) i opran sa zas. vod. otopinom $NaHCO_3$ (20 mL). Organski sloj je sušen iznad Na_2SO_4 te uparen pod sniženim tlakom. Na pjenastu krutinu dodan je dietil-eter. Istaloženi produkt je profiltriran i pri čemu je dobiven 4''-O-(3-Aminopropil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicina A, ili 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin (**IV**) (2,29 g, η =79%) u obliku bijelog praha. Protonirani molekulski ion u spektru mase UPLC-MS-a nalazi se pri m/z od 806,34. Finalni produkt (**IV**) (1,19 g, η =52%) pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela u sistemu otapala diklormetan : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 9 : 1,5.^{8,42}

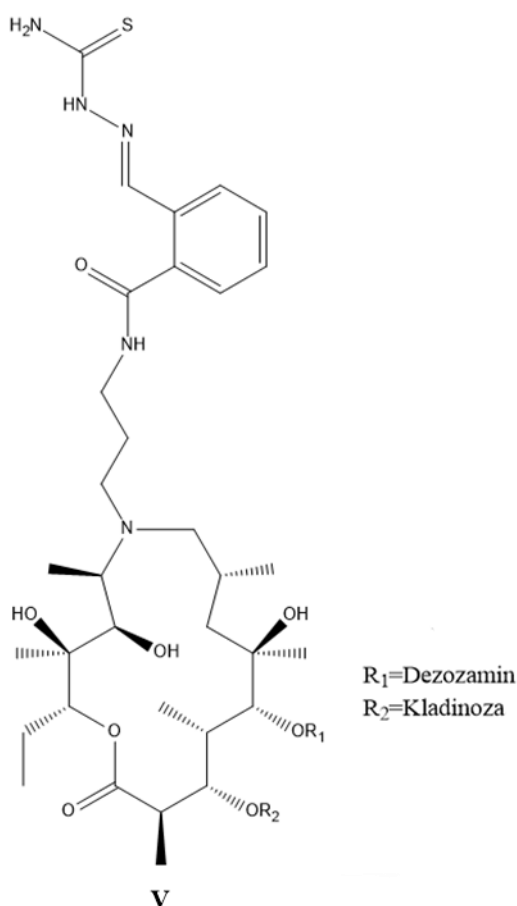


Slika 32. Struktura 4''-O- γ -aminopropil-azitromicina (**IV**) (Prilagođeno prema Ref. 8)

3.4. Sinteza makrozona

3.4.1. Sinteza 9a-N- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (V)

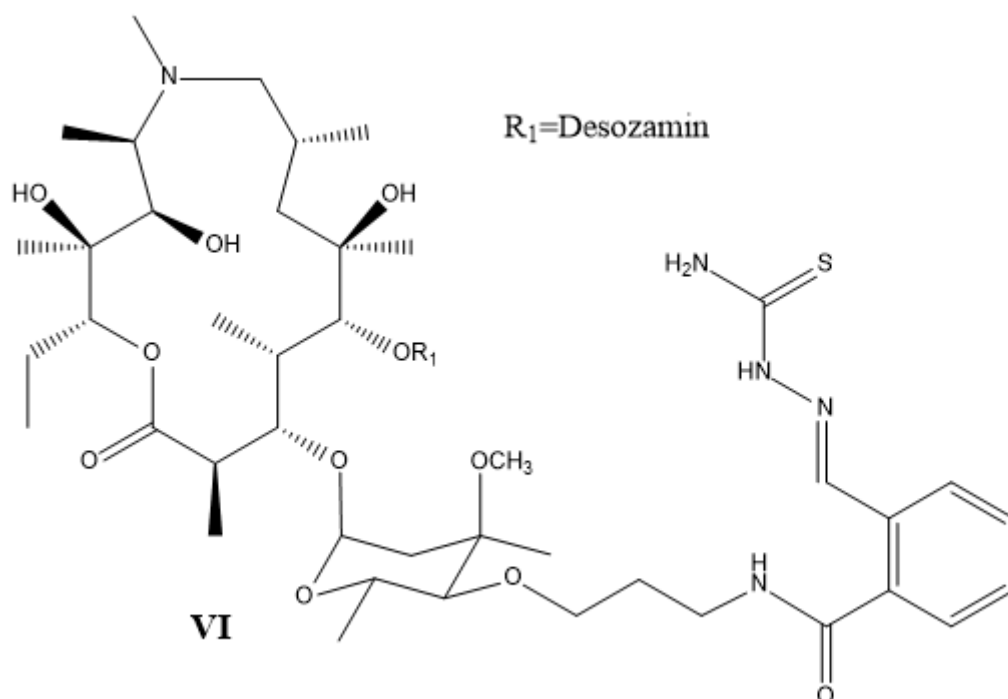
Otopini 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (III) (200 mg, 0,252 mmol) u DCM-u (4 mL) dodana je 2-tiosemikarbazonometil-benzojeva kiselina (I) (56,4 mg, 0,252 mmol), 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*] piridinijev-3-oksid heksafluorofosfat (HATU, 115,2 mg, 0,303 mmol) i N,N-diizopropiletilamin (DIPEA, 88,0 μ L, 0,505 mmol) te se potom reakcijska smjesa miješa pri sobnoj temperaturi 17 sati. Uspješnost reakcije potvrđena je UPLC-MS-om, odnosno protonirani molekulski ion u spektru mase nalazi se pri m/z : 997,48, te se uočava fragmentacija kladinoze i dvostruko nabijeni molekulski ion. Reakcijska smjesa ekstrahira se zasićenim vodenim otopinama NaHCO₃ i NH₄Cl. Organski ekstrakt osušen je na Na₂SO₄, filtriran te uparen pod sniženim tlakom. Čisti makrozon (V) (97,7 mg, η =39%) izolira se kromatografijom na stupcu silikagela u sistemu otapala DCM : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 9 : 1,5. Također su provedene prije spomenute NMR tehnike radi potvrde strukture.⁸



Slika 33. Struktura makrozona (V) nastalog reakcijom tiosemikarbazona (I) i 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (III)

3.4.2. Sinteza 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (VI)

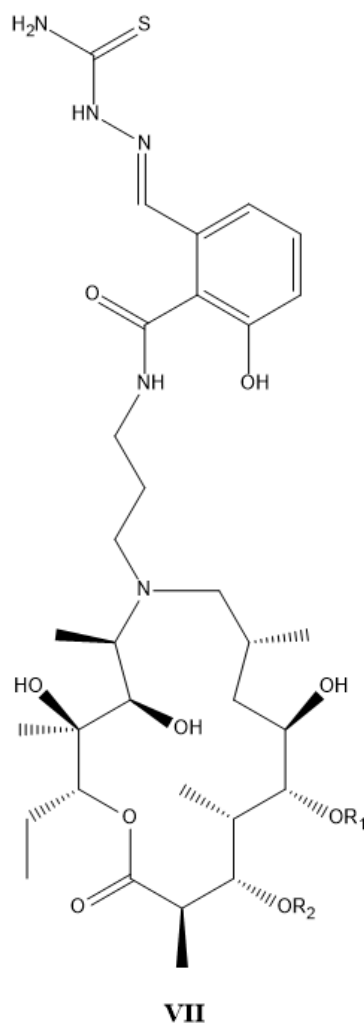
U DCM (4 mL) dodaje se tiosemikarbazon (**I**) (27,7 mg, 0,124 mmol) i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin (**IV**) (100 mg, 0,124 mmol) uz HATU (56,6 mg, 0,149 mmol) i DIPEA (43,2 μ L, 0,248 mmol). Reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi na tresilici 17 h. Uspješnost reakcije potvrđena je UPLC-MS-om, te se protonirani molekulski ion u spektru mase nalazi pri m/z : 1011,65, a vidi se i dvostruko nabijeni molekulski ion i fragmentacija kladinoze. Reakcijska smjesa ekstrahira se zasićenim vodenim otopinama NaHCO_3 i NH_4Cl . Iz organskog ekstrakta je eliminirana voda pomoću Na_2SO_4 , a ekstrakt je profiltriran te uparen pod sniženim tlakom. Spoj je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala DCM : metanol : konc. amonijeva lužina = 90 : 9 : 1,5, te dodano preparativnim HPLC-MS-om. Dobiveno je 36,4 mg, η =29% čistog produkta (**VI**). Snimljeni su 1D i 2D NMR spektri radi potvrde strukture.⁸



Slika 34. Struktura makrozona (**VI**) nastalog reakcijom tiosemikarbazona (**I**) i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicina (**IV**)

3.4.3. Sinteza 9a-N-γ-aminopropil-azitromicin makrozona (VII)

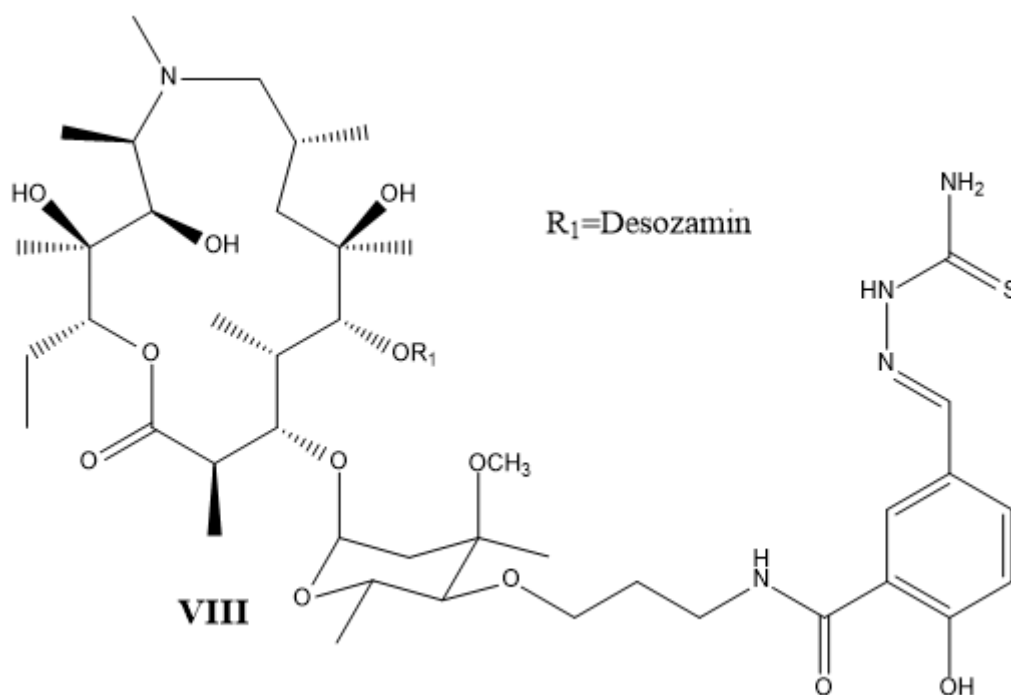
U otopini DCM-a (5 mL), dodaje se 3-tiosemikarbazonometil-4-hidroksibenzojeva kiselina (II) (30,1 mg, 0,126 mmol) i 9a-N-γ-aminopropil-azitromicin (III) (100 mg, 0,126 mmol) uz HATU (57,4 mg, 0,151 mmol) i DIPEA (43,4 μL, 0,252 mmol). Reakcija se miješa pri sobnoj temperaturi 17 h. Protonirani molekulski ion u spektru mase nalazi se pri m/z: 1013,64, što je očekivana vrijednost za makrozonski produkt (VII). Također se uočava ion produkta bez kladinoze te dvostruko nabijeni molekulski ion. Reakcijska smjesa ekstrahira se zasićenim vodenim otopinama NaHCO₃ i NH₄Cl. Organski ekstrakt osušen je na Na₂SO₄, profiltriran te uparen pod sniženim tlakom. 17,5 mg (η=14%) čistog makrozona (VII) izolirano je putem preparativnog HPLC-MS-a. Provedene su opisane NMR tehnike radi potvrde strukture.⁸



Slika 35. Struktura makrozona (VII) nastalog reakcijom tiosemikarbazona (II) i 9a-N-γ-aminopropil-azitromicina (III)

3.4.4. Sinteza 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozona (**VIII**)

U 5 mL DCM-a otopini dodaje se tiosemikarbazon (**I**) (30,1 mg, 0,126 mmol) i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin (**IV**) (101,6 mg, 0,126 mmol) uz HATU (57,4 mg, 0,151 mmol) i DIPEA (43,4 μ L, 0,252 mmol). Reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi na tresilici 17 h. Protonirani molekulski ion u spektru mase snimanog u pozitivnom modu nalazi se pri m/z : 1027,66 što daje zadovoljavajuću masu makrozonskog produkta (**VIII**). Javlja se i fragmentacija kladinoze s produkta te dvostruko nabijeni molekulski ion. Reakcijska smjesa ekstrahira se zasićenim vodenim otopinama NaHCO_3 i NH_4Cl . Iz organskog ekstrakta je eliminirana voda pomoću Na_2SO_4 , ekstrakt je profiltriran te uparen pod sniženim tlakom. Spoj je pročišćen pomoću preparativnog HPLC-MS-a te je dobiveno 6,99 mg ($\eta=5,4\%$) čistog produkta. Snimljeni su 1D i 2D NMR spektri radi potvrde strukture.⁸



Slika 36. Struktura makrozona (**VIII**) nastalog reakcijom tiosemikarbazona (**I**) i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicina (**IV**)

3.5. Testiranje antimikrobnog učinka

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK, $\mu\text{g/mL}$), kao pokazatelj antimikrobne aktivnosti spojeva *in vitro*, određena je metodom mikrodilucije u bujonu u skladu sa smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). MIK je definiran kao koncentracija pri kojoj se javlja 90% inhibicije rasta.⁴³

Spojevi su testirani na grupi gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus* (soj ATCC 29213 i B0331, M), *Streptococcus pneumoniae* (soj B0627, cMLS_b), *Streptococcus pyogenes* (soj ATCC 700274), *Enterococcus faecalis* (soj ATCC 29212)) i gram negativnih bakterija (*Escherichia coli* (soj ATCC 25922 i AcrAB-), i *Moraxella catarrhalis* (ATCC 23246)). U svim testovima azitromicin i ciprofloksacin su korišteni kao kontrola.

Testne supstance i standardi otopljeni su u dimetil sulfoksidu s koncentracijom od 10 mg/mL. Vrijednosti MIK-a su određene u kation prilagođenom BBL Mueller-Hinton II bujonu (Becton Dickinson, SAD), dopunjenim s 5% konjskim serumom (Gibco, Thermo Fisher, SAD), za streptokoke. Dvostruka razrjeđenja ispitivanih spojeva u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica pripremljena su u rasponu koncentracije 64-0,25 $\mu\text{g/mL}$. *E. coli* i *S. aureus* su uzgajani na Mueller-Hintonovim pločama agara (Becton Dickinson, SAD). *E. faecalis* i *M. catarrhalis* su uzgajani na Columbia agaru s 5% ovčje krvi pri ambijentalnom zraku, dok su *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* na Columbia agaru s 5% ovčje krvi u atmosferi s 5% CO₂. Inokulumi su pripremljeni metodom direktne suspenzije kolonije, a ploče su inokulirane s 5×10^4 CFU / jažici (gdje su CFU mjera za količinu bakterija, jedinice koje formiraju kolonije, engl. colony forming unit). Nakon 20-22 sata inkubacije pri 37°C na ambijentalnom zraku rezultati su utvrđeni vizualnom inspekcijom mikrotitarskih pločica. Sva testiranja spojeva provedena su u Odjelu za međustaničnu komunikaciju Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Potreba za novim antimikrobnim sredstvima veća je nego ikada dosad. Kao što je već navedeno, od postojećih makrolidnih antibiotika, azitromicin i klaritromicin pokazali su se najdjelotvorniji, ali porast rezistencije bakterija na postojeće antibiotike, pa tako i makrolide predstavlja globalni javno-zdravstveni problem. Primjer toga je razvoj i širenje rezistentnih sojeva najčešćih respiratornih patogena, *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus pneumoniae*. U porastu je tzv. višestruka rezistencija na lijekove (engl. multidrug resistance, MDS) u patogenim mikroorganizmima, nove se infekcije brzo šire, a za infekcije uzrokovane nekim sojevima praktički nema djelotvorne terapije.^{3,8,12,26}

Među brojnim potencijalnim kandidatima javljaju se i makrozoni. Oni su nova klasa makrolidnih konjugata vezanih na tiosemikarbazon, pri čemu se očekuje sinergijski učinak u spajanju farmakofora dvaju molekula. Niz makrozona nastalih iz 3-*O*- γ -aminopropil i 4''-*O*- γ -aminopropil-azitromicina, povezanih amidnom vezom preko odgovarajuće γ -aminopropilne poveznice na supstituirane aromatske tiosemikarbazonske derivate pokazali su dobru aktivnost protiv osjetljivih i rezistentnih bakterija relevantnih za područje djelovanja makrolida.⁸

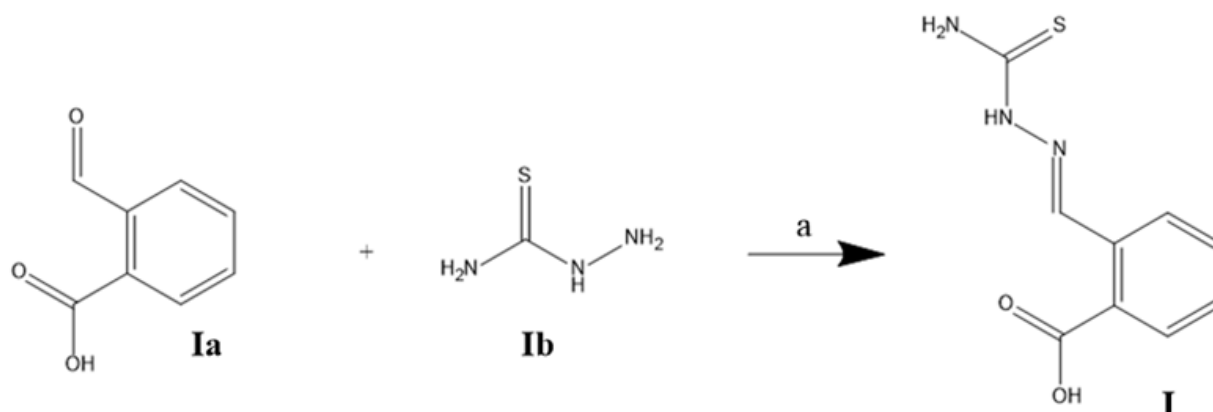
Antibakterijska aktivnost takvih supstituiranih makrozona bila je poticaj pripravi nekoliko novih tiosemikarbazon-azitromicinskih konjugata. Stoga, u diplomskom radu izabrani tiosemikarbazonski derivati su vezani amidnom vezom preko aminopropilnog linkera na 9a-N- ili 4''-O položaju azitromicina. Sa strane tiosemikarbazona amidna veza ostvarena je putem karboksilne skupine vezane na aromatski supstituent, koji se nalazi na imino ugljiku tiosemikarbazona.

4.1. Sinteza tiosemikarbazonskih međuprodukata

4.1.1. 2-Karboksibenzaldehid tiosemikarbazon (**I**)

Tiosemikarbazidi su glavni prekursori za sintezu različitih tiosemikarbazona, koji su pak prekursori za sintezu različitih heterocikličkih spojeva. Stoga prvi izabrani tiosemikarbazon (**I**) (2-karboksibenzaldehid tiosemikarbazon) pripremljen je reakcijom 2-karboksibenzaldehida (**Ia**) i tiosemikarbazida (**Ib**) u izopropanolu po postupku detaljnije opisanom u poglavlju 3. Reakcijom adicije aldehida (**Ia**) s amino skupinom tiosemikarbazida (**Ib**) uz potpunu konverziju i u visokom iskorištenju dobiven je tiosemikarbazon (**I**). Sintetski put je prikazan na

Slici 37. Pretpostavljena struktura spoja (**I**) potvrđena je NMR spektroskopskim metodama te spektrometrijom masa.

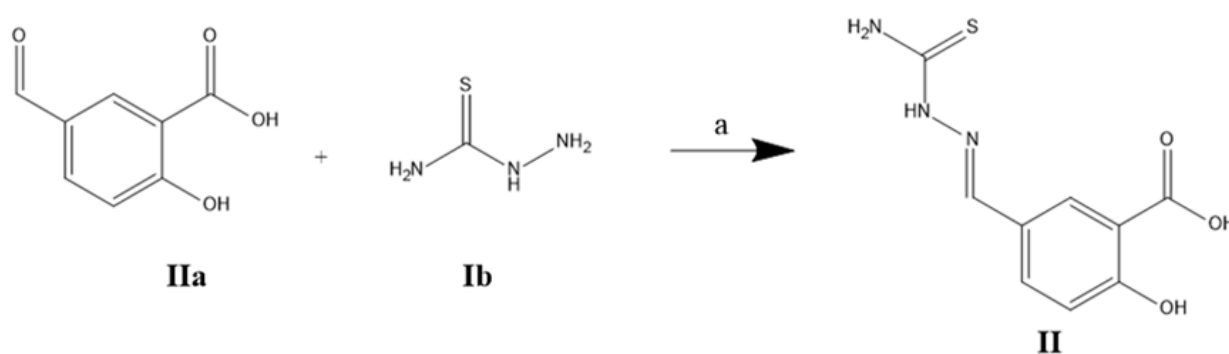


Slika 37. Prikaz sinteze tiosemikarbazona (**I**) (a) izopropanol, sobna temperatura, 2 h.

(Prilagođeno prema Ref. 8)

4.1.2. 3-Karboksi-4-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon (**II**)

Drugi izabrani tiosemikarbazon (**II**) ili 3-karboksi-4-hidroksibenzaldehid tiosemikarbazon pripravljen je reakcijom 5-formilsalicilne kiseline (**IIa**) i tiosemikarbazida (**Ib**) u izopropanolu po postupku opisanom u poglavlju 3. Reakcijski put je analogan sintezi tiosemikarbazona (**I**) te je prikazan na Slici 38. Pretpostavljena struktura spoja (**II**) potvrđena je NMR spektroskopskim metodama te spektrometrijom masa.



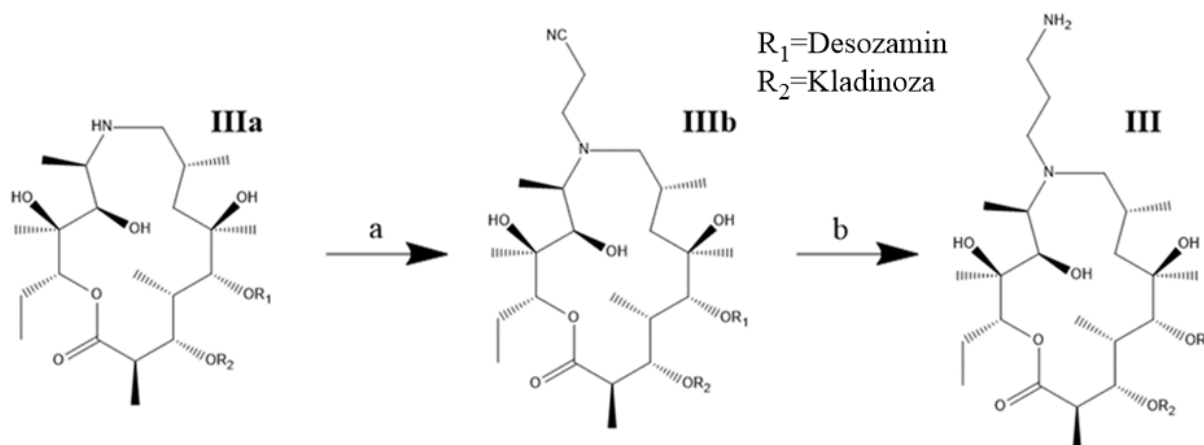
Slika 38. Prikaz sinteze tiosemikarbazona (**II**) (a) izopropanol, sobna temperatura, 2 h.

(Prilagođeno prema Ref. 8)

4.2. Sinteza makrolidnih međuprodukata

4.2.1. Sinteza 9a-N-γ-aminopropil-azitromicina (**III**)

Sinteza 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-(γ-aminopropil)-9a-homoeritromicina A (**III**) sastoji se od dva stupnja. Michaelovom adicijom akrilonitrila na 9a amino-skupinu spoja (**IIIa**) pripremljen je 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-(β-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (**IIIb**). Sinteza je provedena zagrijavanjem akrilonitrilne otopine spoja (**IIIa**) pri temperaturi ključanja kroz 10 sati pri čemu je dobiven spoj (**IIIb**) u 94 %-tnom iskorištenju. Katalitičkim hidrogeniranjem cijanoetilnog adukta (**IIIb**) pri sobnoj temperaturi i tlaku vodika od oko 20 bara uz platina(IV) oksid kao katalizator pripremljen je aminopropilni derivat (**III**) koji je poslužio kao prekursor u daljnjim kemijskim stupnjevima. Struktura spoja (**III**) i njegovog prekursora (**IIIb**) određena je NMR metodama i spektrometrijom masa te je u skladu s literaturnim podacima. Postupak je detaljnije opisan u poglavlju 3, a reakcijska shema se nalazi na slici 39.^{40,41}



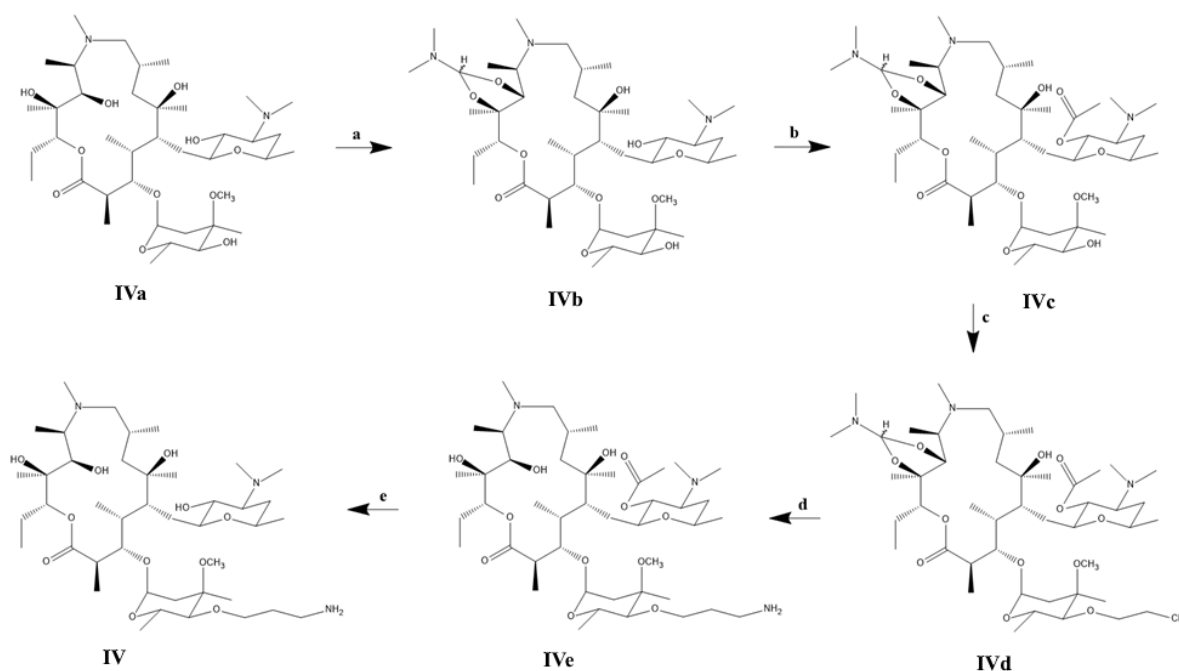
Slika 39. Prikaz sinteze 9a-N-γ-aminopropil-azitromicin (**III**) (a) akrilonitril, 10 h, refluks; (b) etanol, H₂, PtO₂, 20 bara, 72 h (Prilagođeno prema Ref. 40)

4.2.2. Sinteza 4''-O-γ-aminopropil-azitromicina (**IV**)

Priprava makrolidnog prekursora 4''-O-γ-aminopropil-azitromicina (**IV**) provedena je prema sintezi opisanoj u literaturi. Da bi se provelo regioselektivno alkiliranje 4''-OH skupine makrolida bilo je nužno zaštititi hidroksilne skupine koje bi mogle sudjelovati u kompetitivnim reakcijama. Za makrolidne molekule poznato je da reaktivnost sekundarnih hidroksilnih skupina u reakcijama esterifikacije slijedi redoslijed 2'-OH >> 4''-OH > 11-OH > 12-OH. Prisutnost vicinalne dimetilamino skupine na položaju C-3' desozamina intramolekulski katalizira aciliranje 2'-OH skupine i čini je najreaktivnijom. Azitromicin (**IVa**) reagira s N,N-dimetilformamid-dimetilacetalom (DMF-DMA), te reakcijom se uvode zaštitne skupine na

hidroksilne skupine C-11 i C-12 atoma, odnosno nastaje spoj 9-deokso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(*N,N*-dimetilformamid)acetal (**IVb**). U sljedećem koraku u (**IVb**) uvodi se dodatna 2'-*O*-acetilna zaštitna skupina reakcijom sa acetanhidridom, te nastaje 2'-*O*-acetil-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(*N,N*-dimetilformamid) acetal (**IVc**). Prekrivanje reaktivnih hidroksilnih skupina omogućava 4"-OH skupini korak nukleofilnije adicije sa akrilonitrilom, sličan prijašnjoj shemi sa spojem (**IIIa**), pri čemu je potrebna deprotonacija posredovana natrijevim hidridom, radi manje bazičnosti kisikovog atoma naspram dušikovog. Nastaje 2'-*O*-acetil-4"-*O*-(2-cijanoetil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A-11,12-(*N,N*-dimetil formamid) acetal (**IVd**).^{8,44,45,42}

Katalitičkom hidrogenacijom spoja (**IVd**) uz platina (IV) oksid u ledenoj octenoj kiselini prevodi se cijano skupinu u amino, te dolazi do skidanja zaštitne acetalne skupine na C-11 i C-12 atomima pri čemu nastaje spoj 2'-*O*-Acetil-4"-*O*-(3-aminopropil)-9-dekso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**IVe**). Posljednji korak obuhvaća skidanje 2'-*O*-acetilne zaštitne skupine s metanolom. Spektralni podatci spoja (**IV**) i njegovih prekursora (**IVb**)-(IVe) bili su u skladu s literaturnim podacima. Postupak je opisan u poglavlju 3, a reakcijska shema se nalazi na slici 40.⁸

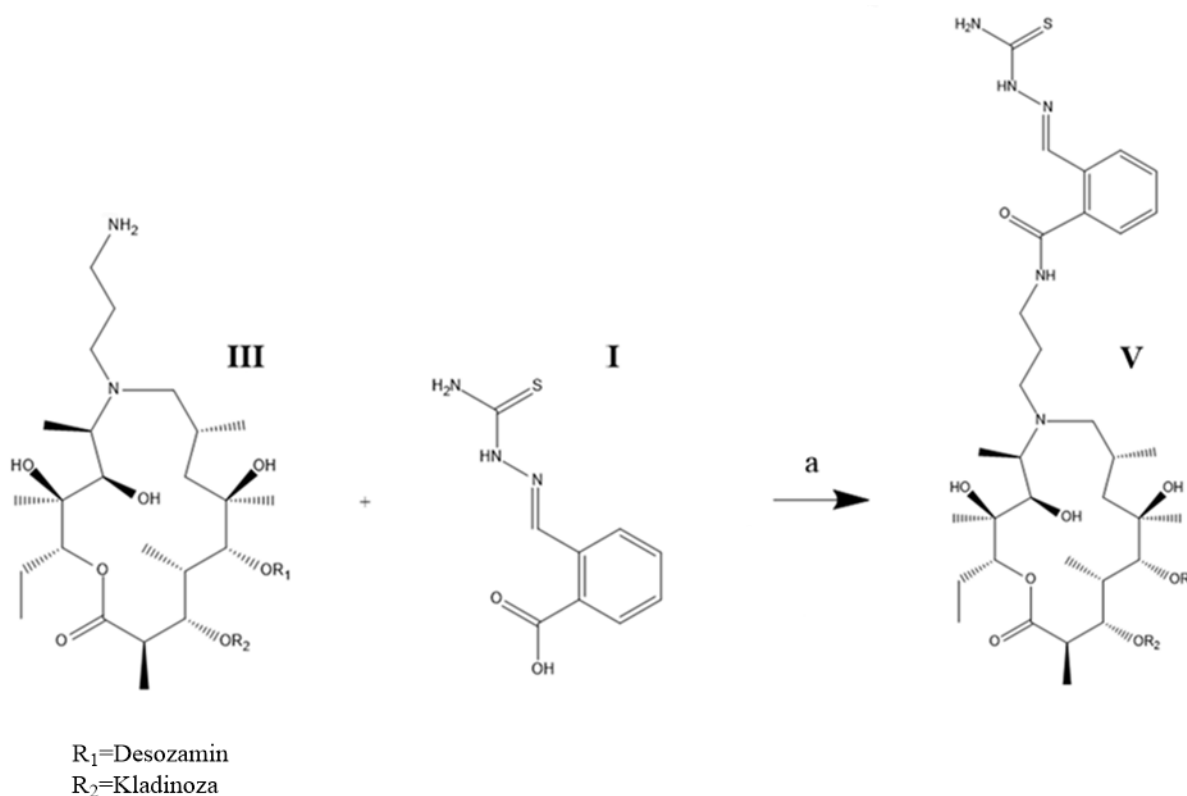


Slika 40. Prikaz sinteze 4''-*O*- γ -aminopropil-azitromicina (**IV**) (a) DMF-DMA (4 ekv.), DCM (50 ekv.), 65 °C, 24 h; (b) Ac₂O (1,5 ekv.), NaHCO₃ (2x15 mL); (c) akrilonitril (35 mL), *t*-BuOH : THF = 1 : 1 (3 ekv.), NaH (1,3 ekv.); (d) ledena octena kiselina (20 mL), H₂, PtO₂ (0,4 g). 5 bara, 17 h; (e) metanol : voda = 2 : 1 (40 mL), K₂CO₃ (4 ekv.), 55 °C, 6 h (Prilagođeno prema Ref. 8)

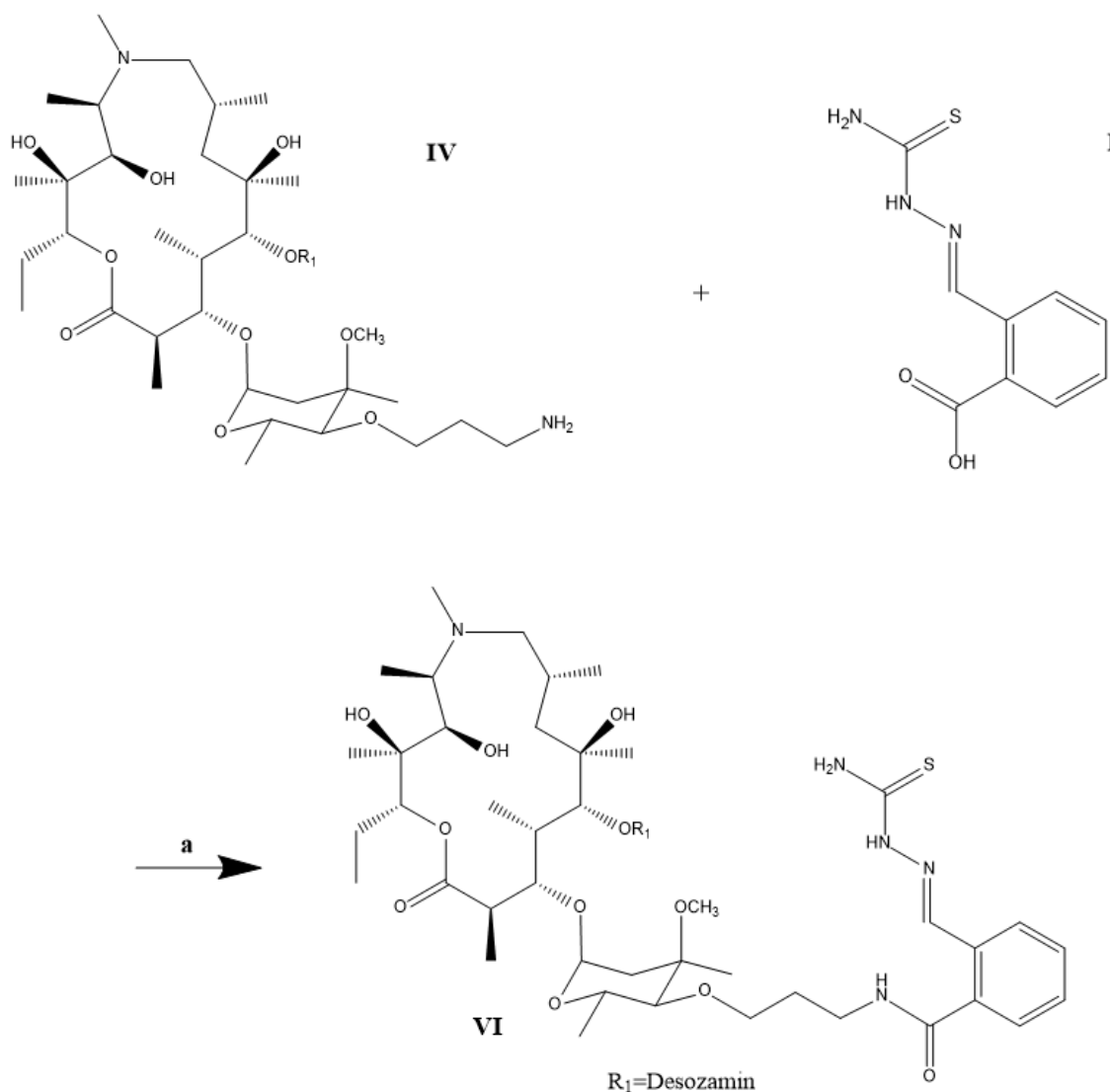
4.3. Sinteza makrozona

4.3.1. Sinteza 9a-N- i 4''-O- γ -aminopropil makrozonskih derivata (V) i (VI)

Nakon priprave tiosemikarbazona te makrolidnih međuprodukata slijedi sinteza makrozona u jednom koraku. U prvom slučaju koristi se reakcija amidacije između 2-tiosemikarbazonometilbenzojeve kiseline, odnosno tiosemikarbazona (**I**) i 9a-N- γ -aminopropil-azitromicina (**III**) ili 4''-O- γ -aminopropil-azitromicina (**IV**), pri čemu nastaju amidi (**V**) odnosno (**VI**). Dodatni sudionici reakcije DIPEA i HATU služe stvaranju aktiviranog estera tiosemikarbazona koji reagira sa makrolidnim međuproduktom stvarajući amid. Reakcijske upute opisane su u poglavlju 3. Strukture novოსintetiziranih spojeva (**V**) i (**VI**) dokazane su NMR spektroskopskim 1D (^1H , ^{13}C) i 2D tehnikama (COSY, HMBC, HSQC) i karakterističnim fragmentacijama u spektrima masa.



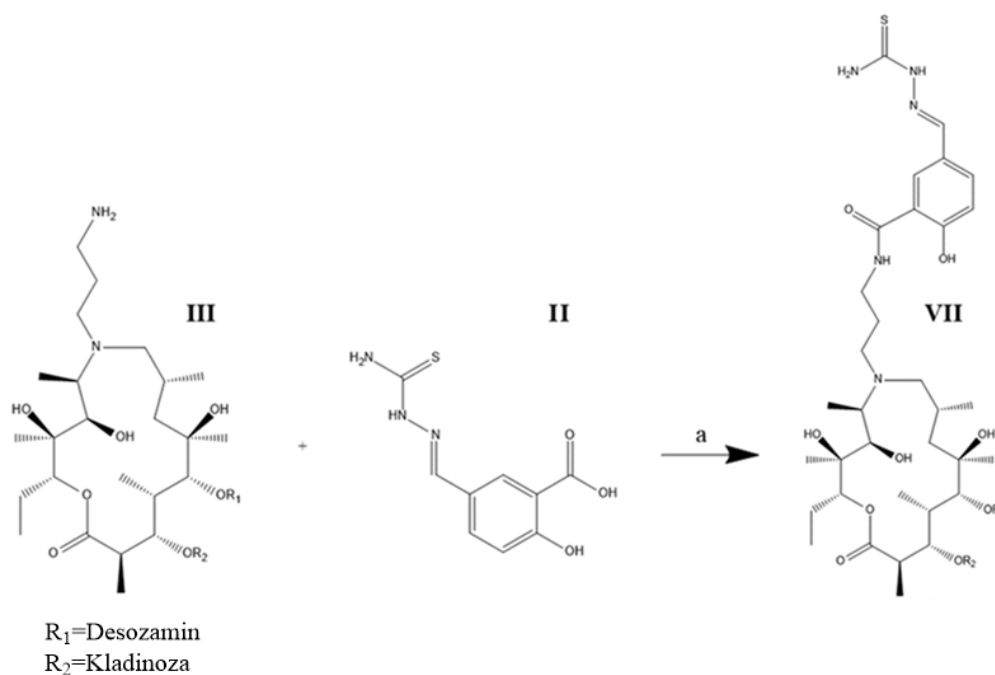
Slika 41. Prikaz sinteze makrozona (**V**) nastalog iz 9a-N- γ -aminopropil-azitromicin (**III**) i tiosemikarbazona (**I**) (a) DCM (4 mL), HATU (1,2 ekv.), DIPEA (2 ekv.), sobna temperatura (Prilagođeno prema Ref. 8)



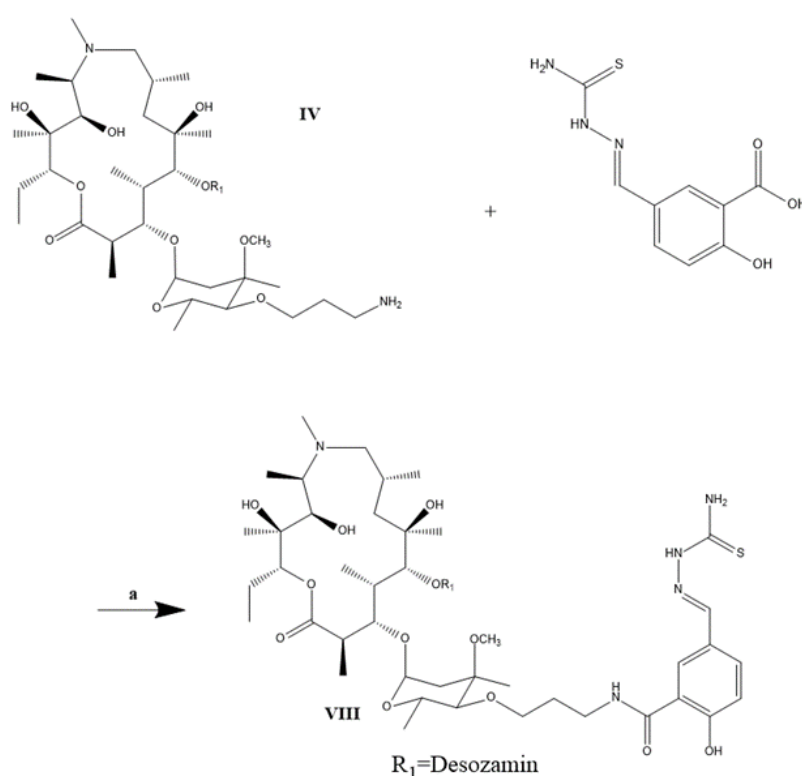
Slika 42. Prikaz sinteze makrozona (VI) nastalog iz 4''-O γ -aminopropil-azitromicin (IV) i tiosemikarbazona (I) (a) DCM (4 mL), HATU (1,2 ekv.), DIPEA (2 ekv.), sobna temperatura (Prilagođeno prema Ref. 8)

4.3.2. Sinteza 9a-N- i 4''-O- γ -aminopropil makrozonskih derivata (VII) i (VIII)

Priprava makrozona prati identičan reakcijski put kao u prije navedenoj sintezi. uz jedinu iznimku korištenja 3-tiosemikarbazonometil-4-hidroksibenzojeve kiseline, odnosno tiosemikarbazona (II) kao reaktanta umjesto (I). Postupak je također analogan onome iz prijašnjeg odjeljka, te je detaljnije opisan u poglavlju 3. Struktura novosintetiziranih spojeva (VII) i (VIII) određena je NMR 1D (^1H , ^{13}C) i 2D tehnikama (COSY, HMBC, HSQC) i karakterističnim signalima u spektrima masa.



Slika 43. Prikaz sinteze makrozona (**VII**) nastalog iz *9a-N-γ*-aminopropil-azitromicin (**III**) i tiosemikarbazona (**II**) (a) DCM (5 mL), HATU (1,2 ekv.), DIPEA (2 ekv.), sobna temperatura (Prilagođeno prema Ref. 8)



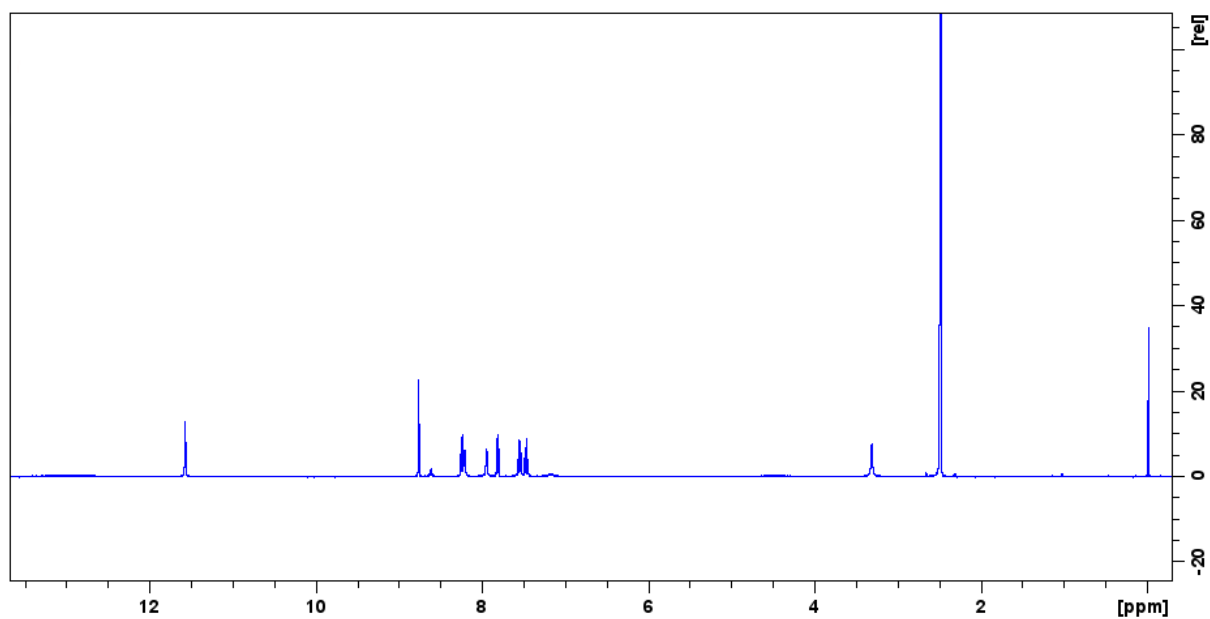
Slika 44. Prikaz sinteze makrozona (**VIII**) nastalog iz *4''-O-γ*-aminopropil-azitromicin (**IV**) i tiosemikarbazona (**II**) (a) DCM (5 mL), HATU (1,2 ekv.), DIPEA (2 ekv.), sobna temperatura (Prilagođeno prema Ref. 8)

4.4. Potvrda strukture pripremljenih makrozona NMR tehnikama

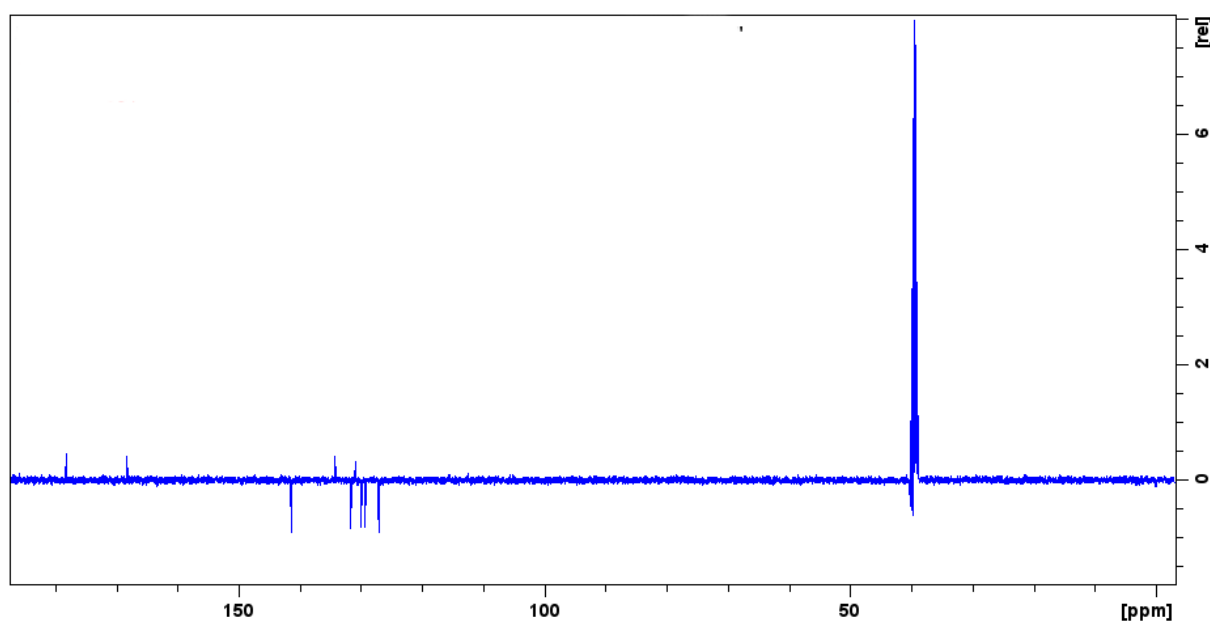
Molekulska masa svih makrozona određena masenom spektrometrijom odgovarala je pretpostavljenim strukturama. Potvrda strukture dobivena je asignacijom ^1H i ^{13}C signala u NMR spektrima. U tu svrhu osim jednodimenzijskih ^1H i ^{13}C NMR spektara bila je nužna i dvodimenzijska NMR spektroskopija (COSY, HSQC, HMBC). Konačni produkti, naime, pripadaju srednje velikim molekulama. Iako su kod njih gotovo svi ugljikovi i većina vodikovih atoma magnetski neekvivalentni, asignacija 1D spektara nije jednoznačna, posebice kod ^1H spektara, zbog velikog broja prekrivenih signala. Ovaj problem uspješno rješavaju 2D NMR tehnike, jer omogućuju njihovo razdvajanje te povezuje atome koji su u međudjelovanju preko jedne (HSQC) ili preko više veza (COSY, HMBC).

Postupak potvrde strukture obično je polazio od HMBC spektara gdje se određivala povezanost poznatih ugljikovih atoma s protonima preko dvije ili tri veze. Zatim su se u HSQC spektrima ovi protoni povezivali preko $^1J_{\text{CH}}$ skalarne sprege s odgovarajućim ugljikovim atomima. Kombinacija COSY-a i HMBC-a potom omogućuje izgradnju te spajanje različitih spinskih sustava.

U ^1H i ^{13}C NMR spektrima tiosemikarbazona (**I**) i (**II**) prikazanima na Slikama 45. i 46., svi signali aromatskih tiosemikarbazonских jezgara, prema očekivanju, rezoniraju kod nižih magnetskih polja; od 7 do 8,25 ppm, odnosno kod C atoma 113 ppm do 134 ppm i jednog signala od 162 ppm, gdje je veći pomak posljedica utjecaja odsjenjujućeg hidroksilnog supstituenta. Također, opaženi su karakteristični signali tiosemikarbazonске skupine pa tako proton CS-NH skupine je na oko δ_{CSNH} : $\sim 11,59$ ppm za spoj (**I**), odnosno na 11,32 ppm za spoj (**II**), te proton CH=N na $\delta_{\text{CH=N}}$: $\sim 8,78$ ppm, za spoj (**I**), odnosno na 8,00 ppm za spoj (**II**). Signali odgovarajućih ugljikovih atoma opaženi su na δ_{CSNH} : $\sim 178,2$ ppm za tiosemikarbazon (**I**), odnosno na 177,7 ppm za tiosemikarbazon (**II**), a kvaterni C-atom tiokarbazonске skupine CH=N na $\delta_{\text{CH=N}}$: $\sim 141,3$ ppm, za spoj (**I**), odnosno na 141,5 ppm za spoj (**II**). U ^1H NMR spektru tiosemikarbazona (**I**) se primjerice nazire i karakteristični signal karboksilne skupine pa je tako proton na oko δ_{COOH} : $\sim 12,98$ ppm, dok se signal ugljikovog atoma karboksilne skupine opaža na δ_{COOH} : $\sim 168,2$ ppm za tiosemikarbazon (**I**), a $\sim 171,50$ ppm za tiosemikarbazon (**II**).

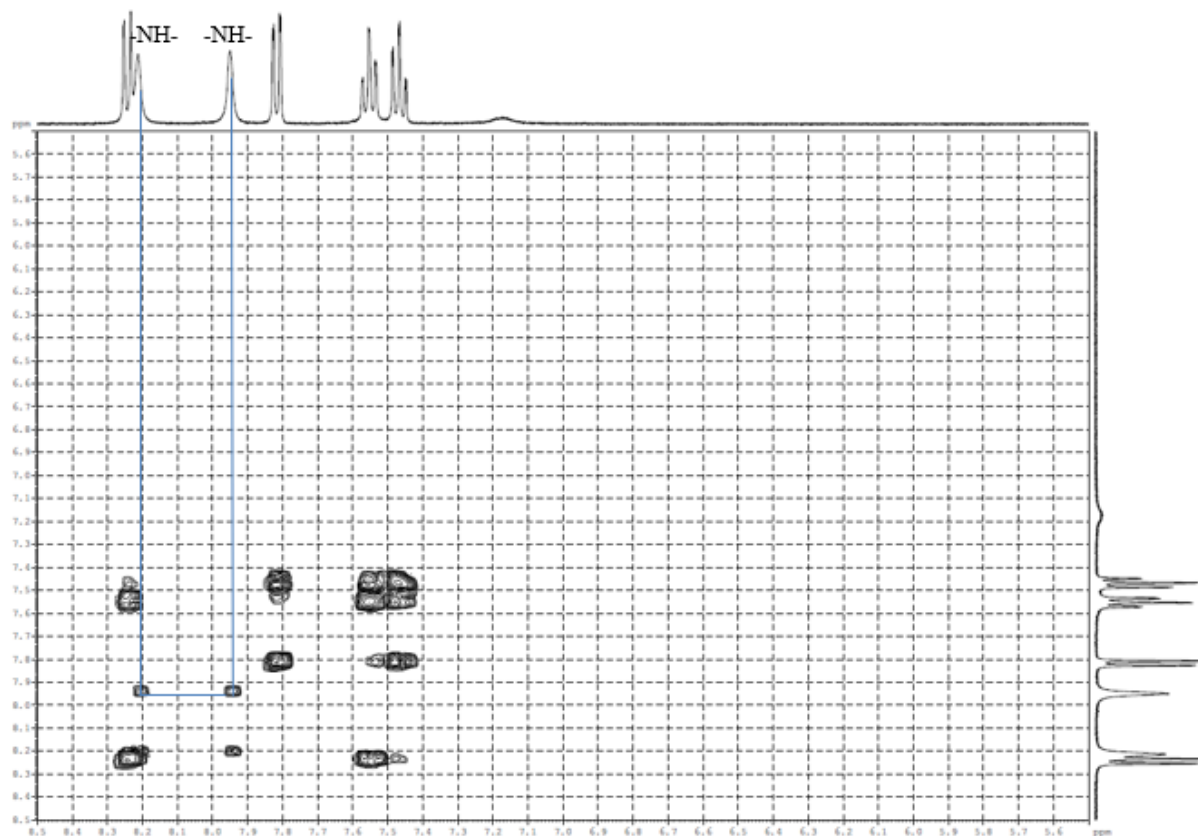


Slika 45. ^1H NMR spektar tiosemikarbazona (**I**) snimljen u DMSO-d_6 pri 298 K



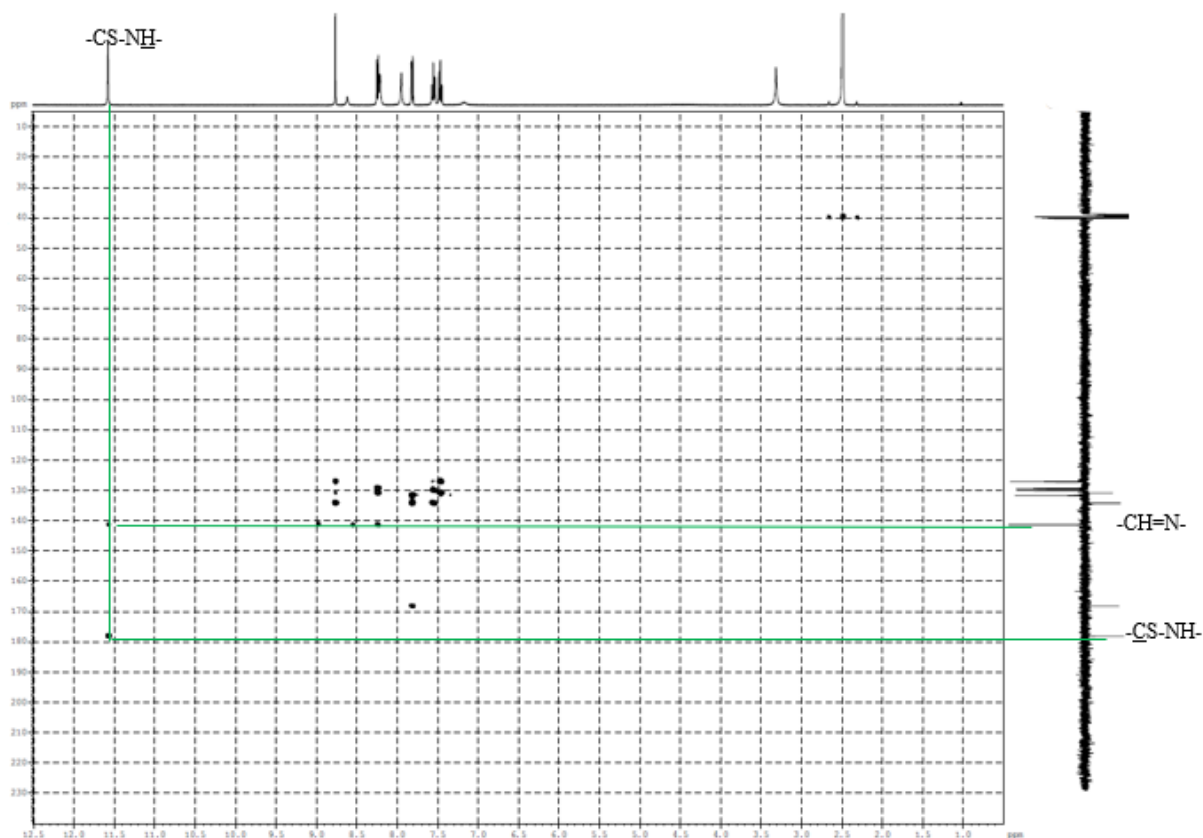
Slika 46. Spektar DEPT-Q spoja (**I**) u DMSO-d_6 pri 298 K

U COSY spektru tiosemikarbazona (**I**) opaženi su križni signali kroz veze bliskih NH_2 protona koji su rezultat spin-spin interakcija na istom dušikovom atomu (Slika 47.).



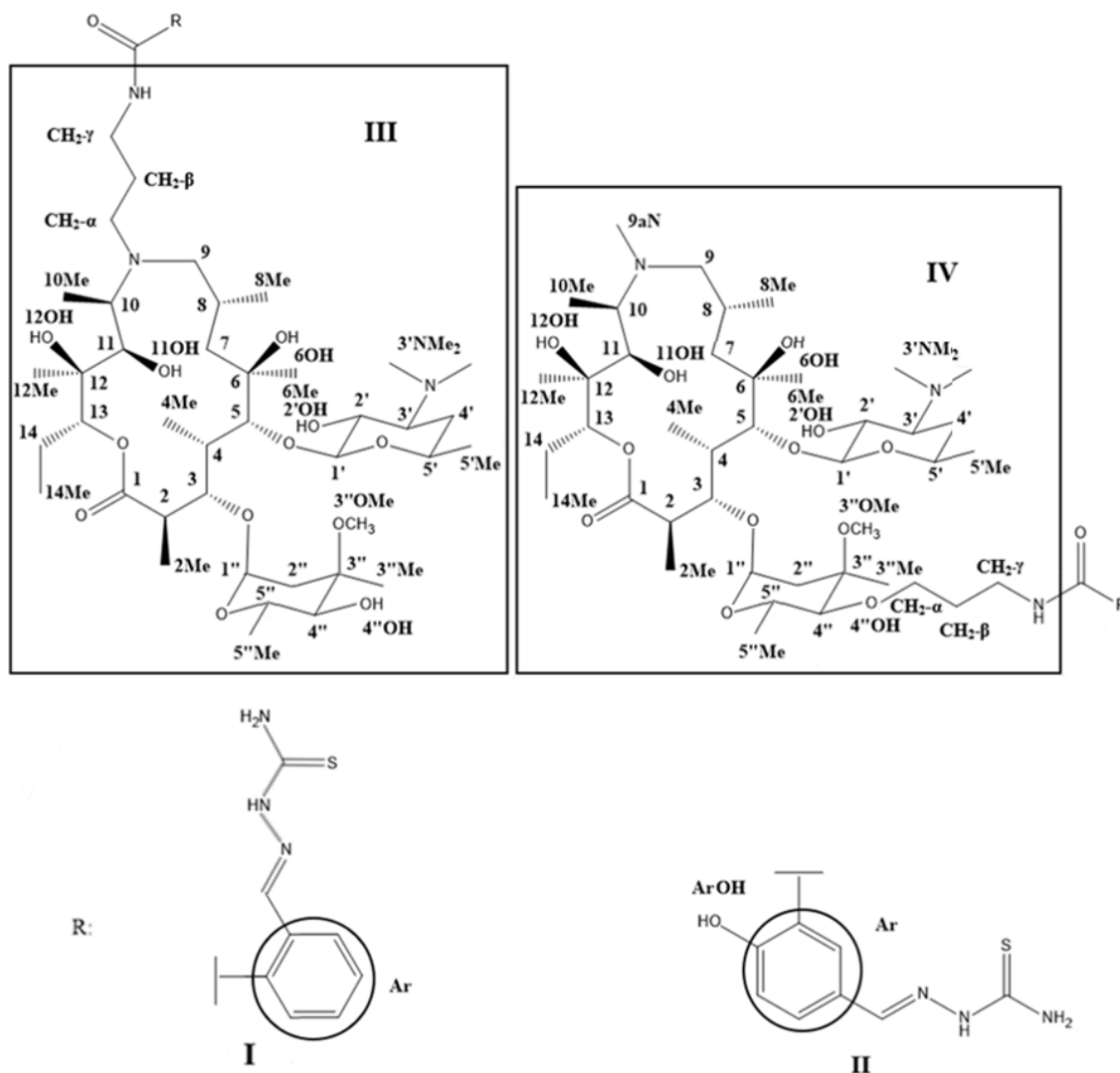
Slika 47. Prikaz regije COSY spektra spoja (**I**) sa naznačenim signalima sprege protona amino skupine

U HMBC spektru spoja **(I)** javljaju se križni signali koji odgovaraju interakciji $\underline{\text{C}}\text{S-NH}$ ugljika kroz 2 veze s proton CS-NH (Slika 48). Također je opažena i korelacija kroz više veza $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{N}$ skupine s protonima CS-NH . Slično je uočeno i za spoj **(II)**. Preostali spektri tiosemikarbazona **(I)** i **(II)** nalaze se u Dodatku (D1-D8).



Slika 48. Prikaz regije HMBC spektra tiosemikarbazona **(I)** s naznačenim signalima sprege protona -CS-NH- skupine s ugljicima -CH=N- i -CS-NH- skupina

Tako kod makrozona (**V**) i (**VII**) promjene u kemijskim pomacima signala H-9a, H-8 i H-10 protona ukazuju na strukturne promjene 9a položaja azalidnog prstena u usporedbi sa prekursorom **IIIa**. U ^1H i ^{13}C NMR spektrima spojeva (**VI**) i (**VIII**) uočen je pomak ^{13}C signala 4"-ugljika u područje nižih magnetskih polja ($\delta_{\text{C-O}}$: iz ~ 77 ppm u 87 ppm) što potvrđuje prisutnost aminopropilnog lanca s amidno vezanom tiosemikarbazonskom jedinicom u položaju 4"-OH šećera kladinoze.^{41,46}



Slika 49. Shematski prikaz i numeracija makrozona, gdje dva tiosemikarbazonska supstituenta (**I**) i (**II**) u spoju s dvije makrolidne osnovice (**III**) i (**IV**) odgovaraju prijašnjim makrozonima (**V**)-(VIII) -^a

Tablica 3. Asignacija kemijskih pomaka ^1H NMR makrozona (V)-(VIII)

^1H NMR									
$\delta(^1\text{H}) / \text{ppm}$									
Makrozon / Atom	V	VI	VII	VIII	Makrozon / Atom	V	VI	VII	VIII
1	-	-	-	-	3'NMe ₂	2,25	2,34	2,48	2,82
2	2,72	2,72	2,92	2,76	4'	1,60; 1,35	- ^a	1,82; 1,40	2,30; 1,40
3	3,98	4,29	4,01	4,15	5'	3,40	3,64	3,62	3,51
4	1,95	2,00	2,04	2,03	5'Me	1,28	1,33	1,43	1,34
5	3,56	4,27	3,74	4,15	1''	4,86	5,07	5,09	5,07
6	-	-	-	-	2''	2,29; 1,44	2,28; 1,54	2,39; 1,97	2,35; 1,57
7	1,78; 1,30	1,77; 1,32	- ^a	1,71; 1,31	3''	-	-	-	-
8	1,98	2,0	2,31	2,09	3''Me	1,14	1,25	1,31	1,29
9	2,64; 2,08	2,54; 2,06	2,59; 1,99	2,64; 2,19	3''OMe	3,23	3,10	3,35	3,33
10	2,83	2,70	2,69	- ^a	4''	2,80	2,83	3,23	2,86
11	3,68	3,71	3,94	3,72	4''OH	- ^a	-	- ^a	-
12	-	-	-	-	5''	3,97	4,27	4,11	4,21
13	4,71	4,71	4,78	4,72	5''Me	1,23	1,28	1,30	1,29
14	1,85; 1,52	2,01; 1,47	1,88; 1,49	1,91; 1,55	CH ₂ - α	- ^a	3,88; 3,72	3	3,80; 3,73
2Me	1,26	1,26	1,25	1,24	CH ₂ - β	1,90; 1,85	1,90	1,96	2,03; 1,90
4Me	1,11	1,06	1,26	1,02	CH ₂ - γ	3,45; 3,25	3,67; 3,54	2,62; 3,47	- ^a
6Me	1,18	1,34	1,53	1,35	CONH	6,88	6,94	6,95	6,98
8Me	0,82	1,08	1,10	0,97	Ar	8,05	8,31	8,51-8,66	8,4
10Me	1,11	1,22	1,36	1,19	Ar	7,88	7,89	7,40-7,46	7,92
12Me	1,18	1,12	1,12	1,12	Ar	7,7	7,49	-	-
14Me	0,90	0,93	0,92	0,91	Ar	7,5-7,37	7,30	-	-
6OH	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	Ar	7,32	6,55	-	-
11OH	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	ArOH	-	-	- ^a	- ^a
12OH	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	HC=N	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
1'	4,35	4,48	4,56	4,74	N-NH	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
2'	3,16	3,30	3,34	3,51	SC-NH ₂	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
2'OH	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	9aN	-	2,41	-	2,43
3'	2,36	- ^a	2,77	2,95					

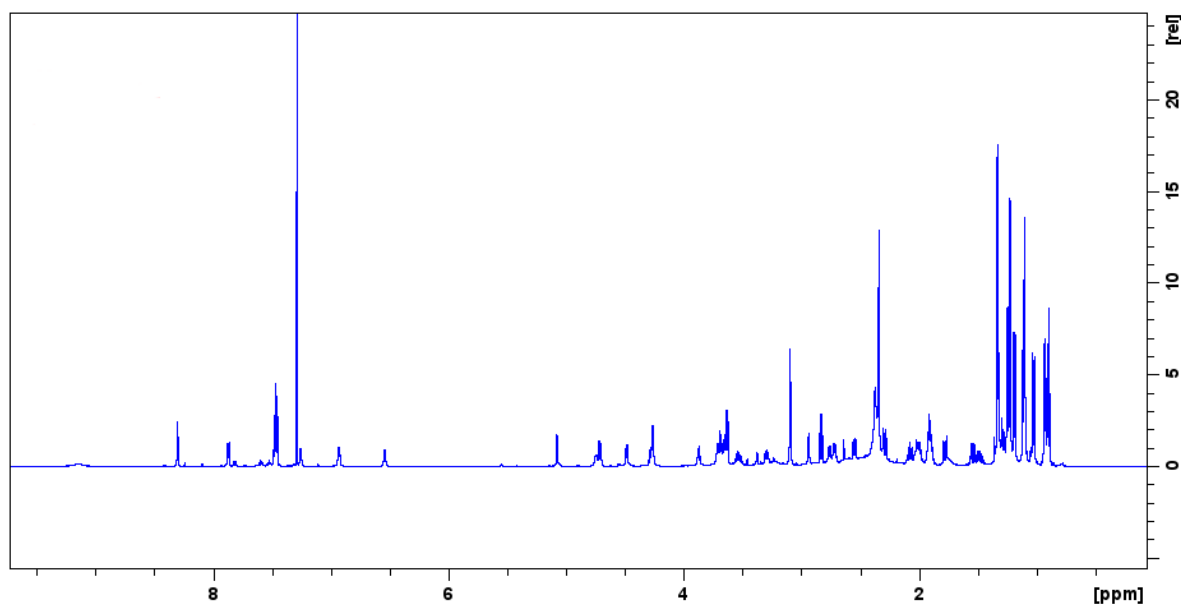
^a - nije asignirano

Tablica 4. Asignacija kemijskih pomaka ^{13}C NMR makrozona (V)-(VIII)

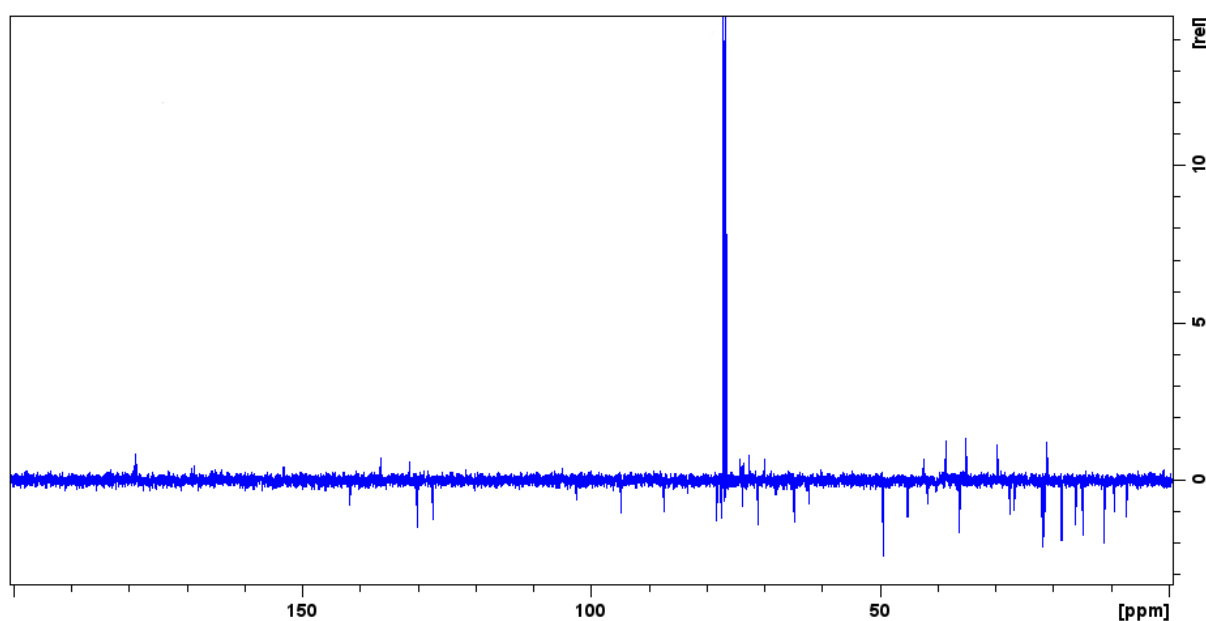
Makrozon / Atom	$\delta(^{13}\text{C}) / \text{ppm}$								
	V	VI	VII	VIII	Makrozon / Atom	V	VI	VII	VIII
1	178,3	179,1	178	179	3'	65,7	_a	65,6	68
2	44,7	45,3	45	45	3'NMe ₂	40,3	40,4	40	40
3	79	78,4	79	78	4'	29,5	_a	30	_a
4	39,8	41,8	41	42	5'	68,8	68,1	68,3	65
5	83,5	83,5	83	84	5'Me	18,4	18,6	18,3	19
6	75,6	73,6	74	_a	1"	95,8	95	95	95
7	38,5	42,5	_a	_a	2"	35	35,2	34,9	36
8	29	26,8	28	27	3"	72,3	72,7	73	73
9	60	70	_a	70	3"-Me	21,5	21,6	22	22
10	_a	62,3	_a	63	3"OMe	49,4	49,5	49,4	49
11	75,6	73,8	71	73	4"	77,9	87,5	77,7	88
12	74,6	74,2	75	_a	4"OH	-	-	-	-
13	78,2	77,5	76,8	78	5"	65,6	64,9	66,5	65
14	21,6	21,2	21,3	21	5"Me	21,5	21,9	21,4	22
2Me	15,8	14,9	16,4	15	CH ₂ - α	49	72,7	_a	72
4Me	9,6	9,5	9	10	CH ₂ - β	28	29,8	_a	30
6Me	27,3	27,6	27	28	CH ₂ - γ	38,5	38,6	37,3	38
8Me	22,6	22,0	22,2	22	CONH	169,1	168,7	169,8	168
10Me	7,9	7,4	8	7	Ar	141,8	141,8	142	143
12Me	16,3	16,2	16,4	16	Ar	131,6	136,5	133	133
14Me	11,0	11,2	10,8	12	Ar	130,8	131,6	130	130
6OH	-	-	-	-	Ar	127,6	130,1	_a	119
11OH	-	-	-	-	Ar	126,1	127,4	125	_a
12OH	-	-	-	-	Ar	123,6	_a	_a	_a
1'	103,0	102,5	103	102	HC=N	_a	_a	_a	_a
2'	70,9	71,1	70,7	71	SC-NH ₂	_a	_a	_a	_a
2'OH	-	-	-	-	9aN	-	36,3	-	36

^a - nije asignirano

U ^1H i ^{13}C NMR spektrima spojeva (V) i (VII) promjene signala propilnog lanca također potvrđuju prisutnost amidno vezane tiosemikarbazonske jedinice. Signal karakterističan za ugljikov atom u amidnoj vezi za spojeve (V), (VI), (VII) i (VIII) opažen je u ^{13}C spektrima na ~ 168 ppm.

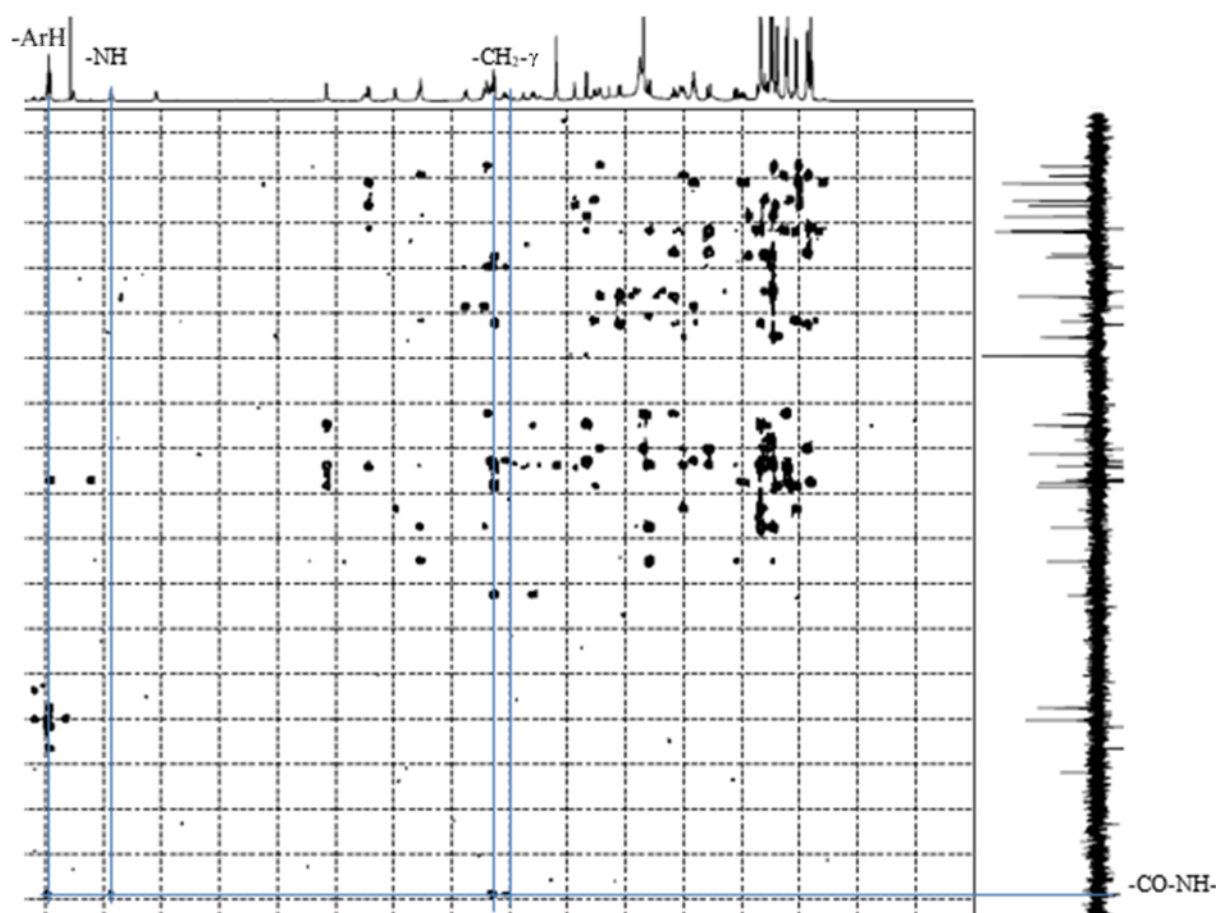


Slika 50. ^1H spektar makrozona (VI) snimljen u kloroformu-d pri 298 K



Slika 51. Spektar DEPT-Q makrozona (VI) u kloroformu-d pri 298 K

U HMBC spektru spoja (VI) javljaju se križni signali koji odgovaraju interakciji $\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ ugljika s protonom $-\text{NH}$ amidne veze na 6,94 ppm, protonom u fenilnom prstenu na 7,49 ppm, te kroz 3 veze s protonom $-\text{CH}_2-\gamma$ skupine propilnog lanca na 3,54 ppm i na 3,67 ppm (Slika 52). Time je uočena poveznica između propilnog lanca makrolida i tiosemikarbazonskog supstituenta. Dodatno je opažena i interakcija ugljika $\text{CH}_2-\gamma$ ($\delta \sim 38$ ppm) s protonima $\text{CH}_2-\alpha$ ($\delta \sim 3,88$ ppm; 3,72 ppm) i $-\text{CH}_2-\beta$ ($\delta \sim 1,9$ ppm). U COSY spektru spoja (VI) opaženi su križni signali $-\text{NH}$ protona s $-\text{CH}_2-\gamma$ protonima na 3,54 ppm i na 3,67 ppm. Također, opaženi su križni signali kroz veze bliskih CH_2 protona koji su rezultat spin-spin interakcija. Time je potvrđena struktura i povezanost aminopropilnog lanca. Preostali spektri makrozona (VI) nalaze se u Dodatku (D9-D11).



Slika. 52. Prikaz regije spektra HMBC makrozona (VI) s naznačenim spregama protona amidne skupine i dvaju protona propilnog lanca s amidnim ugljikom

Iz spektralnih podataka makrozona dobivenih prije opisanim MS i NMR metodama nije moguće govoriti o kakvoj se točno vrsti izomerije radi. Spojevi nisu bili podvrgnuti dodatnim spektroskopskim ispitivanjima prije procjene njihove antibakterijske aktivnosti. U slučaju iznimne aktivnosti na rezistentne sojeve, problem izomerije se može razriješiti na više načina. Moguće je iskoristiti ovisnost vicinalne sprege između ^1H atoma, koja ovisi o diedarskom kutu između njih prema Karplusovoj jednadžbi, te time procijeniti konformaciju.

Ipak, bolja je upotreba tehnika NOESY i ROESY, dvodimenzijskih NMR tehnika koje se temelje na efektu NOE (engl. nuclear Overhauser effect), odnosno križnoj relaksaciji spinova u dipolnoj sprezi koja se odvija preko prostora, za razliku od skalarne sprege uobičajene u drugim tehnikama NMR, koja se odvija putem kemijskih veza. Time je moguće doći do informacije o udaljenostima među atomima koja dovodi do rješavanja izomerije, pod uvjetom da su promatrani atomi prostorno blizu. Za makrozone je pogodnija tehnika ROESY, s obzirom da vrijednost NOE-a ovisi o molekulskoj masi, te za molekule oko 1000 Da, odnosno srednje velike molekule, u tehnici NOESY iznosi oko ili blizu nula, no ROESY je također podložna artefaktima radi sličnosti pulsni slijedova s drugim tehnikama.

4.5. Antibakterijska aktivnost pripremljenih makrozona

U diplomskom radu obuhvaćeno je antibakterijsko testiranje novosintetiziranih makrozona (V) – (VIII), s obzirom na mogućnost poboljšanja antibakterijske aktivnosti u odnosu na standardne makrolidne antibiotike koja je klasa makrozona i pokazala. Povezivanjem makrolidnih i tiosemikarbazonskih farmakofora želi se postići sinergijski učinak i dobiti molekule izvrsnog antibakterijskog profila. Pri tome su rezultati uspoređeni među spojevima, s azitromicinom i ciprofloksacinom (pripadnikom fluorokinolona), a dodatno sa prije istraživanim makrozonima.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK, $\mu\text{g/mL}$), kao pokazatelj antimikrobne aktivnosti spojeva *in vitro*, definirana je kao koncentracija koja pokazuje 90 %-tnu inhibiciju rasta mikroorganizama. Spojevi su testirani na grupi gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus* (soj ATCC 29213 i B0331, M), *Streptococcus pneumoniae* (soj B0627, cMLS_B), *Streptococcus pyogenes* (soj ATCC 700274), *Enterococcus faecalis* (soj ATCC 29212)) i gram negativnih bakterija (*Escherichia coli* (soj ATCC 25922 i AcrAB-), i *Moraxella catarrhalis* (ATCC 23246)) po postupku opisanom u poglavlju 3.

C-MLS_B označava podtip Erm ili MLS_B rezistencije, odnosno konstitutivni tip rezistencije na makrolide, linkozamide, streptogramine i kloramfenikol. M fenotip upućuje na prisutnost prije spomenutog *efflux pump* mehanizma rezistencije, nastalog slijedom djelovanja *msrA* gena. *Escherichia coli* soja AcrAB- je osjetljiva na antibiotike radi nedostatka *AcrAB* gena, te posljedično njegovog produkta, proteinske pumpe koja također sudjeluje u *efflux pump* mehanizmu rezistencije. Gore navedeni mehanizmi rezistencije su opisani i pojašnjeni u poglavlju 2.

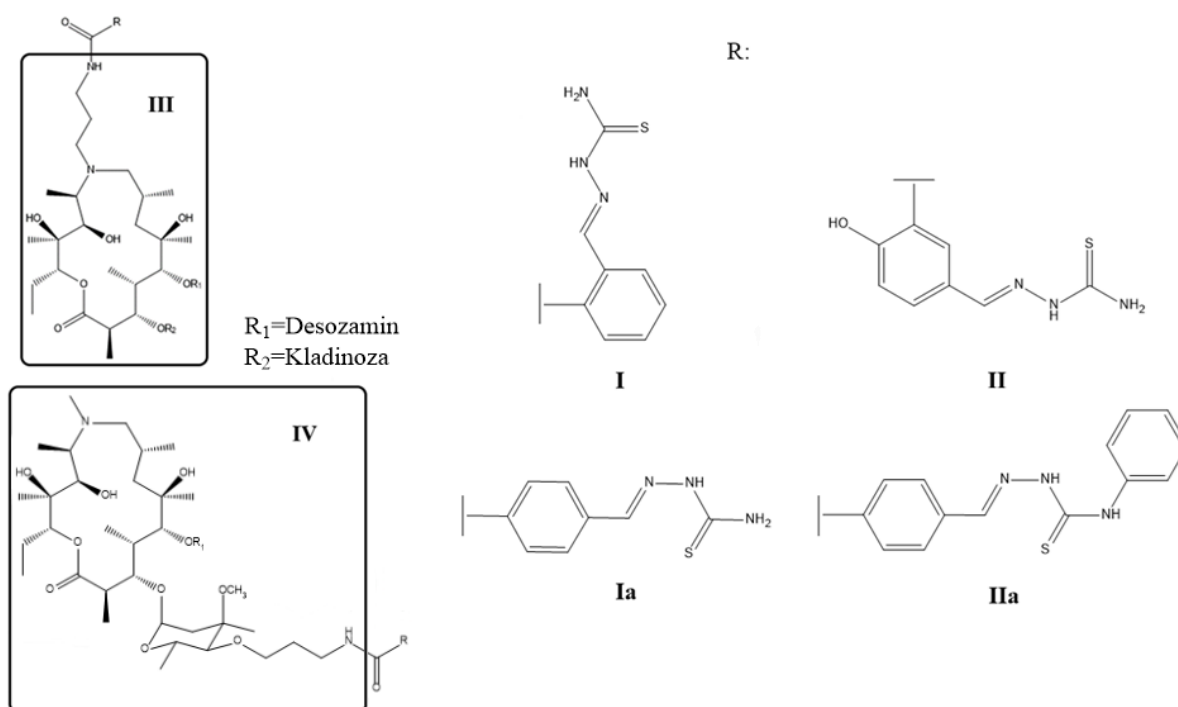
Rezultati antimikrobnih ispitivanja četiriju predstavnika makrozona, te njihovih različitih izomera prikazani su Tablici 5. u usporedbi s MIK vrijednostima azitromicina i ciprofloksacina.

Tablica 5. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) sintetiziranih makrozona uz standardne antibiotike azitromicin i ciprofloksacin za niz Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija

		G+					G-		
	Bakterijski soj / Spoj	<i>S. pyogenes</i> ATCC 700274	<i>S. pneumoniae</i> B0627 (cMLS)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> B0331 (M)	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> AcrAB-
MIK (µg/mL)	(V)	0,25	>64	32	>64	>64	8	>64	4
	(VI)	0,5	64	16	64	8	8	>64	2
	(VII)	2	>64	32	>64	>64	16	>64	16
	(VIII)	1	64	16	64	32	4	>64	4
	Azitromicin	0,125	>32	1	>32	8	≤0,125	4	0,5
	Ciprofloksacin	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	≤0,125	0,25	≤0,125

U seriji makrozona (V)-(VIII) uočeno je da sintetizirani spojevi pokazuju umjerenu antibakterijsku aktivnost na susceptibilni soj *S. pyogenes* i *E. coli* AcrAB-. Tako spoj (V) pokazuje samo dva puta slabiju aktivnost u usporedbi s azitromicinom na osjetljivi *S. pyogenes*, te čak i bolju aktivnost u usporedbi s ciprofloksacinom. Spoj (VI) pokazao je istu aktivnost kao i azitromicin na soj *E. faecalis*. Aktivnost makrozona na *E. coli* AcrAB- je ipak slabija 4 puta u usporedbi s azitromicinom. Spojevi nisu pokazali zadovoljavajuću aktivnost na konstitutivno rezistentni soj *S. pneumoniae* te efflux rezistentni *S. aureus* B0331, M. Također ni na Gram-negativne bakterije *E. coli*, ATCC 25922 i *M. catarrhalis* ovi spojevi nisu pokazali značajniju aktivnost. Osim navedenog, novosintetizirani makrozoni (V)-(VIII) pokazuju istovjetnu ili goru antibakterijsku aktivnost u usporedbi sa serijom prije sintetiziranih 3-O i 4"-O-γ-aminopropil-azitromicin makrozona (pritom uzimajući isključivo istovjetne sojeve za usporedbu).⁸

Zanimljiva je i usporedba makrozona (V)-(VIII) sa drugim nedavno sintetiziranim 9a-N i 4"-O-γ-aminopropil-azitromicin makrozonima. Isti su stoga najbliži strukturni analozi od dosad prikazanih spojeva. Preklapaju se u korištenoj makrolidnoj 9a-N i 4"-O-γ-aminopropil-azitromicin osnovi (spojevi (III) i (IV)) sve do amidne veze odgovarajuće γ-aminopropilne poveznice, gdje potom dolazi do razlike u poziciji i vrsti supstitucije na benzenskom prstenu tiosemikarbazona. Prijašnji makrozoni (V)-(VIII) te novi pripadnici su prikazani na Slici 53.⁴⁷



Slika 53. Opći prikaz strukture niza 9a-N i 4''-O-γ-aminopropil-azitromicin makrozona.

(Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 47)

Makrozoni sa novim supstituentima (**Ia**) i (**IIa**) predstavljaju prije spomenute bliske strukturne analoge. 4-karboksibenzaldehid tiosemikarbazon je polazišni spoj supstituenta (**Ia**), odnosno javlja se para umjesto orto supstitucije slučaja (**I**). Supstitent (**IIa**) polazi iz 4-karboksibenzaldehid tiosemikarbazona, dodatno supstituiranog benzenom na amino dušiku. Tu se također javlja para supstitucija na prvom benzenskom prstenu.

Prije navedeni te novi makrozoni (sveukupno 8 njih) su testirani na na sličnom antibakterijskom panelu uz azitromicin kao referencu. Prvotni makrozoni zadržavaju svoju numeraciju (**V**)-(VIII), dok novi uzimaju ovisno u makrolidu i supstituentu ((IX) je (**III**) i (**Ia**), (X) je (**IV**) i (**Ia**), (XI) je (**III**) i (**IIa**), (XII) je (**IV**) i (**IIa**)). Rezultati antibakterijskog ispitivanja prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) niza makrozona uz standardni antibiotik azitromicin za niz Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. (Preuzeto i prilagođeno prema Ref. 47)

		G+								G-	
	Bakterijski soj / Spoj	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> B0330 (cMLS)	<i>S. aureus</i> B0331 (M)	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i> B0326	<i>S. pneumoniae</i> B0633	<i>S. pyogenes</i> B0542	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246
MIK (µg/mL)	(V)	32	>64	>64	/	/	>64	/	>64	>64	0,5
	(VII)	32	>64	>64	/	/	>64	/	64	>64	0,25
	(IX)	16	>64	>64	<0,125	32	>64	<0,125	64	64	/
	(XI)	8	>64	>64	<0,125	32	>64	<0,125	32	64	/
	(VI)	16	>64	>64	/	/	>64	2	8	>64	1
	(VIII)	32	>64	64	/	/	>64	1	/	>64	2
	(X)	8	>64	64	<0,125	2	>64	0,25	8	64	2
	(XII)	4	>64	4	<0,125	<0,125	>64	0,25	1	64	/
	Azitromicin	4	>64	>64	<0,125	4	>64	<0,125	4	4	<0,125

Ova skupina makrozona generalno pokazuje odličnu antibakterijsku aktivnost u slučajevima susceptibilnih sojeva *S. pneumoniae* i *S. pyogenes*, gdje su jednaki ili se daju usporediti s azitromicinom, zadovoljavajuću protiv susceptibilne *S. aureus*, te djelomičnu kod efflux rezistentne *S. pneumoniae* B0326. Konjugati (X) i (XII) pokazuju se kao obećavajući kandidati. Oboje pokazuju iznimnu aktivnost protiv efflux rezistentne *S. pneumoniae*. (XII) također posjeduje veoma dobru aktivnost kod efflux rezistentne *S. aureus* gdje svi ostali spojevi, uključujući azitromicin podbacuju, uz četiri puta bolju aktivnost od azitromicina kod *E. faecalis*, te aktivnost jednaku azitromicinu kod susceptibilne *S. aureus*. Među dva gram negativna soja, zadovoljavajuće rezultate pokazuje samo soj *M. catarrhalis*.

Radi ograničenog broj pripravljenih 9a-N i 4"-O-γ-aminopropil-azitromicin makrozona nije moguće uspostaviti temeljitu analizu odnosa strukture i aktivnosti, te sa sigurnošću objasniti uspjeh spoja (XII) naspram ostalih makrozona. Ipak, sveukupni rezultat ukazuje na vijabilnost reakcijskog puta te potencijal spojeva za boljom aktivnošću pomoću dodatnih modifikacija.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu diplomskog rada pripremljeni su konjugati makrolidnog antibiotika azitromicina i izabranih tiosemikarbazona pod skupnim nazivom makrozoni. Upotrebom poznatih sintetskih puteva pripremljeni su potrebni makrolidni i tiosemikarbazoni prekursori. Korištena je γ -aminopropilna skupina na 9a-N i 4''-O pozicijama azitromicina, te uz pomoć karboksilne skupine supstituiranih tiosemikarbazona ostvarena stabilna amidna veza u nastalom konjugatu. Spojevi su pročišćeni te okarakterizirani LC-MS, jednodimenzijskim i dvodimenzijskim NMR-om koji su potvrdili uspješnost reakcija i identitet produkata.

Antibakterijska aktivnost nastalih makrozona ispitana je na panelu osjetljivih i rezistentnih Gram pozitivnih i negativnih bakterija relevantnih u području djelovanja makrolidnih antibiotika. Rezultati su uspoređivani sa azitromicinom i ciprofloksacinom. Pokazana je umjerena aktivnost na susceptibilne sojeve *S. pyogenes* i *E. coli* AcrAB-, uz jednaku aktivnost azitromicina i spojeva (VI) kod soja *E. faecalis*. Generalno, dobivene aktivnosti su umjerene ili nezadovoljavajuće. Uzeta je usporedba navedenih rezultata sa literaturnim podatcima o antibakterijskim aktivnostima 3-O i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozona u istovjetnim sojevima, te je dobivena istovjetna ili gora aktivnost.

Ipak, dodatna antibakterijska ispitivanja istih makrozona sa drugim nedavno sintetiziranim 9a-N i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozonima, njihovim najbližim strukturnim analogima, u sličnom antibakterijskom panelu, ukazala su na potencijal skupine. Ponajprije rezultate pokazuje spoj (XII), kod kojeg se u usporedbi s azitromicinom javlja odlična aktivnost protiv efflux rezistentnih sojeva *S. pneumoniae* i *S. aureus*, četiri puta bolja aktivnost pri soju *E. faecalis*, te aktivnost jednaka kontroli kod susceptibilnog *S. aureus*. Radi manjeg broja pripremljenih spojeva onemogućeno je donošenje zaključaka o odnosu strukture i reaktivnosti. Rezultati ukazuju na uspješnost sintetskog puta i mogućnosti makrozona, i specifično 9a-N i 4''-O- γ -aminopropil-azitromicin makrozona, za daljnjom sintetskom modifikacijom i poboljšanjem antibakterijske aktivnosti, koja je temelj za daljnja i sveobuhvatnija istraživanja u području makrozonskih antibiotika.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

c/i-MLS_B (engl. constitutive/induced) – konstitutivni/induciran (tip rezistencije na) makrolide, linkozamide, streptogramine B

COSY - (engl. correlated spectroscopy), korelacijska spektroskopija

DAD – (engl. diode array detector), detektor s nizom fotodioda

DCM - diklormetan

DEPT-Q – (engl. distortionless enhancement by polarisation transfer with retention of quaternaries)

DMF-DMA - N,N-dimetilformamid-dimetilacetal

DIPEA - N,N-diisopropiletilamin

Erm - eritromicin rezistentna metilaza

HATU - 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinijev-3-oksid
heksafluorofosfat

HMBC - (engl. heteronuclear multiple bond correlation), heteronuklearna korelacija kroz više veza

HPLC – (engl. high performance liquid chromatography), tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

HSQC - (engl. heteronuclear single quantum coherence), heteronuklearna koherencija od jednog kvanta

LC – (engl. liquid chromatography), tekućinska kromatografija

MDS – (engl. multidrug resistance), višestruka rezistencija (na lijekove)

MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

mRNA - (engl. messenger ribonucleic acid), glasnička RNK

MS – masena spektrometrija

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

PTC - peptidil-transferazni centar

RNA - (engl. ribosome ribonucleic acid), ribonukleinska kiselina, RNK

rRNA (engl. ribosome ribonucleic acid), ribosomska RNK

THF - tetrahidrofuran

TMS - tetrametilsilan

tRNA (engl. transfer ribonucleic acid), prijenosna RNK

UPLC - (engl. ultra-performance liquid chromatography), tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. L. Katz, A. S. Mankin u M. Schaechter (ur.), *Encyclopedia of Microbiology*, Third Edition, Elsevier/Academic Press, New York, 2009, str. 529.
2. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 31-34.
3. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, Differentiating the Pharmacodynamics and Toxicology of Macrolide and Ketolide Antibiotics, *J. Med. Chem.*, **63** (12) (2020) 6462–6473.
4. S. Mutak, Azalides from Azithromycin to New Azalide Derivatives, *J. Antibiot.* **60** (2) (2007) 85–122.
5. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 79-80.
6. Z. A. Kaplancıklı, M. D. Altıntop, B. Sever, Z. Cantürk, A. Özdemir, Synthesis and *In Vitro* Evaluation of New Thiosemicarbazone Derivatives as Potential Antimicrobial Agents, *Journal of Chemistry*, **2016** (2016) 1692540
7. A. Nejabatdoust, H. Zamani, A. Salehzadeh, Functionalization of ZnO Nanoparticles by Glutamic Acid and Conjugation with Thiosemicarbazide Alters Expression of Efflux Pump Genes in Multiple Drug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains *Microb. Drug Resist. (New Rochelle, NY, U. S.)*, **25** (7) (2019) 966-974.
8. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, Discovery of macrozones, new antimicrobial thiosemicarbazone-based azithromycin conjugates: design, synthesis and in vitro biological evaluation, *Int J Antimicrob Agents*, **56** (5) (2020) 106147
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amphotericin-b> (datum pristupa 1.8.2022.)
10. B. Arsić, J. Barber, A. Čikoš, M. Mladenović, N. Stanković, P. Novak, 16-membered macrolide antibiotics: a review, *Int J Antimicrob Agents*, **51** (3) (2018) 283-288.
11. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 1-9.

12. M. J. Parnham, V. Eraković Haber, E. J. Giamarellos-Bourboulis, G. Perletti, G. M. Verleden R. Vos, Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications, *Pharmacol. Ther.* **143** (2) (2014) 225-245.
13. V. Stepanić, S. Koštrun, I. Malnar, M. Hlevnjak, K. Butković, I. Čaleta, M. Dukši, G. Kragol, O. Makaruha-Stegić, L. Mikac, J. Ralić, I. Tatić, B. Tavčar, K. Valko, S. Zulfikari, V. Munić, Modeling Cellular Pharmacokinetics of 14- and 15-Membered Macrolides with Physicochemical Properties, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 719-733.
14. S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvić Krajačić, G. E. Wagner, N. H. Meyer, C. Göbl, G. N. Rechberger, K. Zangger, P. Novak, Probing the interactions of Macrolide Antibiotics with Membrane Mimetics by NMR Spectroscopy, *J. Med. Chem.* **55** (11) (2012) 5632-5366.
15. S. Koštrun, V. Munić Kos, M. Matanović Škugor, I. Palej Jakopović, I. Malnar, S. Dragojević, J. Ralić, S. Alihodžić, Around the macrolide – Impact of 3D structure of macrocycles on lipophilicity and cellular accumulation, *Eur. J. Med. Chem.* **133** (2017) 351-364.
16. S. Glanzer, S. A. Pulido, S. Tutz, G. E. Wagner, M. Kriechbaum, N. Gubensäk, J. Trifunović, M. Dorn, W. M. F. Fabian, P. Novak, J. Reidl, K. Zangger, Structural and Functional Implications of the Interaction between Macrolide Antibiotics and Bile Acids, *Chem. Eur. J.* **21** (11) (2015) 4350-4358.
17. J. F. Westphal, Macrolide – induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **50** (4) (2000) 285-295.
18. I. Depoortere, T. L. Peters, G. Matthijs, T. Cachet, J. Hoogmartens, G. Vantrappen, Structure-Activity Relation of Erythromycin-Related Macrolides in Inducing Contractions and in Displacing Bound Motilin in Rabbit Duodenum, *Neurogastroenterol. Motil.* **1** (2) (1989) 150-159.
19. I. B. Seiple, Z. Zhang, P. Jakubec, A. Langlois-Mercier, P. M. Wright, D. T. Hog, K. Yabu, S. Rao Allu, T. Fukuzaki, P. N. Carlsen, Y. Kitamura, X. Zhou, M. L. Condakes, F. T. Szczypiński, W. D. Green, A. G. Myers, A platform for the discovery of new macrolide antibiotics, *Nature*, **533** (2016) 338-345.
20. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 34-44.

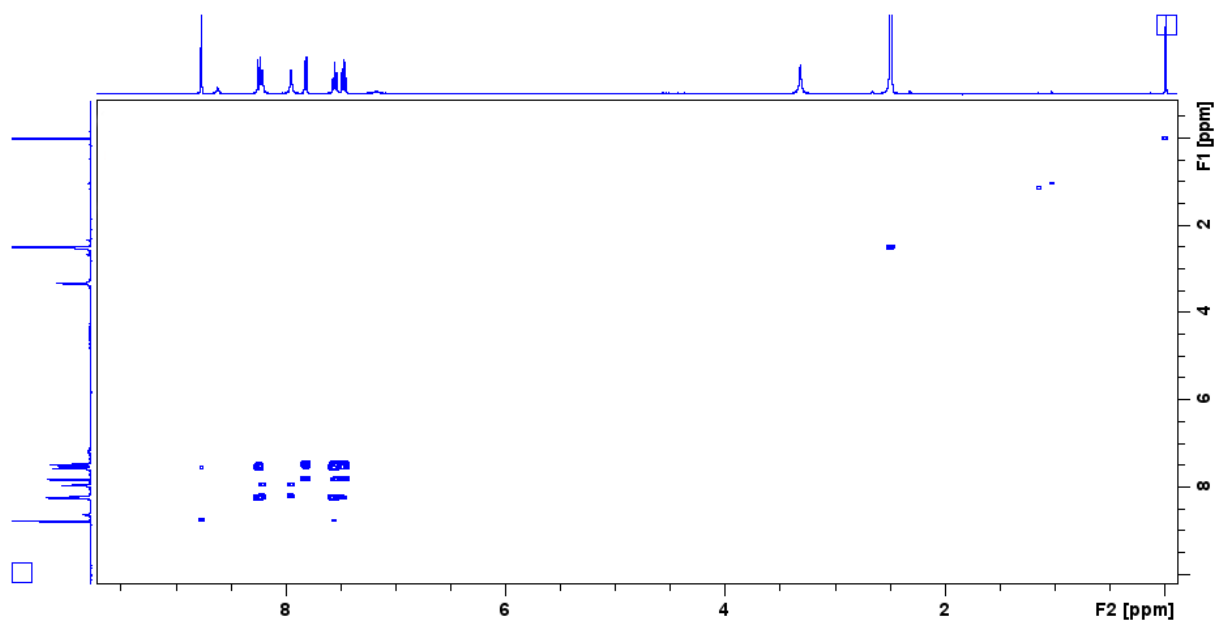
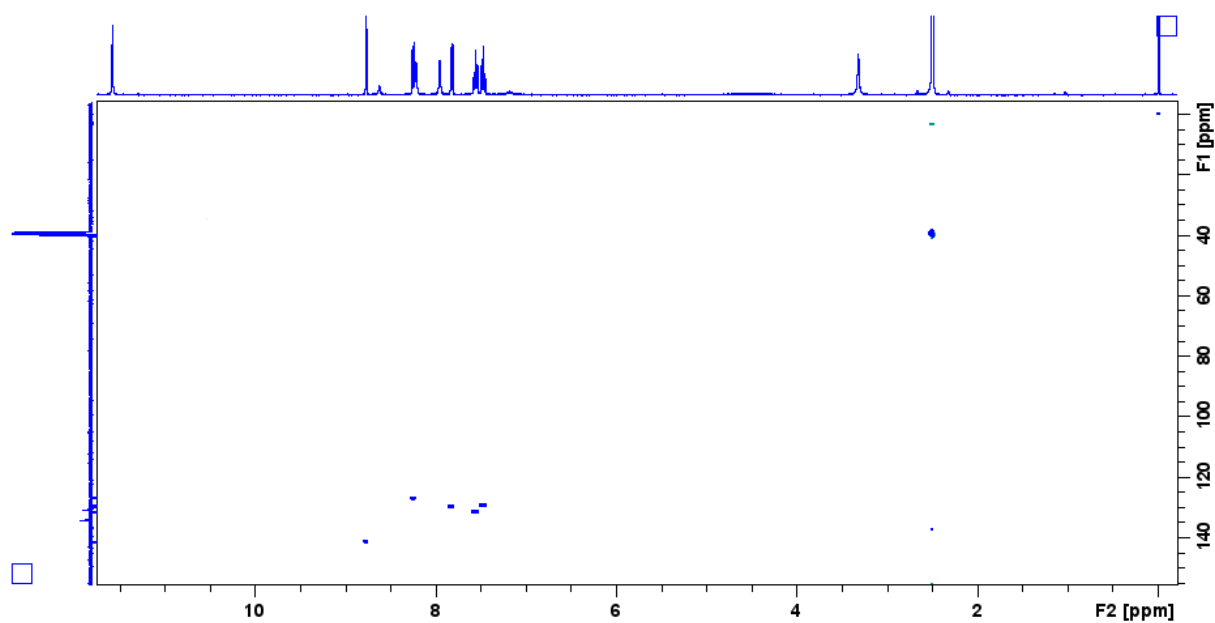
21. P. Periti, T. Mazzei, E. Mini, A. Novelli, Pharmacokinetic Drug Interactions of Molecules, *Clin. Pharmacokinet.* **23** (2) (1992) 106-131.
22. Z. Banić Tomišić, Priča o azitromicinu, *Kem. Ind.* **60** (12) (2011) 603-617.
23. G. M. Bright, A. A. Nagel, J. Bordner, K. A. Desal, J. N. Dibrino, J. Nowakowska, L. Vincent, R. M. Watrous, F. C. Sciavolino, A. R. English, J. A. Retsema, M. R. Anderson, L. A. Brennan, R. J. Borovoy, C. R. Cimochoowski, J. A. Faiella, A. E. Girard, D. Girard, C. Herbert, M. Manousos, R. Mason. Synthesis, in-vitro and in vivo activity of novel 9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A derivatives; a new class of macrolide antibiotics, the azalides, *J. Antibiot.* **41** (8) (1988) 1029-1047.
24. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 44-53.
25. A. Janas, P. Przybylski, 14- and 15-membered lactone macrolides and their analogues and hybrids: structure, molecular mechanism of action and biological activity, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662
26. B. J. Donald, S. Surani, H. S. Deol, U. J. Mbadugha, G. Udeani, Spotlight on solithromycin in the treatment of community-acquired bacterial pneumonia: design, development, and potential place in therapy, *Drug Des., Dev. Ther.* **11** (2017) 3559-3566.
27. T. Jednačak, P. Novak, I. Mikulandra, Advanced Methods for Studying Structure and Interactions of Macrolide Antibiotics, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (20) (2020) 7799
28. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 9-24.
29. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 63-73.
30. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/I02957> (datum pristupa 6.8.2022.)
31. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/S05498> (datum pristupa 6.8.2022.)
32. M. H. Shih, F. Y. Ke, Syntheses and evaluation of antioxidant activity of sydnonyl substituted thiazolidinone and thiazoline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 4633-4643.
33. M. A. Metwally, S. Bondock, H. El-Azap, E. M. Kandeel, Thiosemicarbazides: synthesis and reactions, *J. Sulfur Chem.* **32** (5) (2011) 489-519.

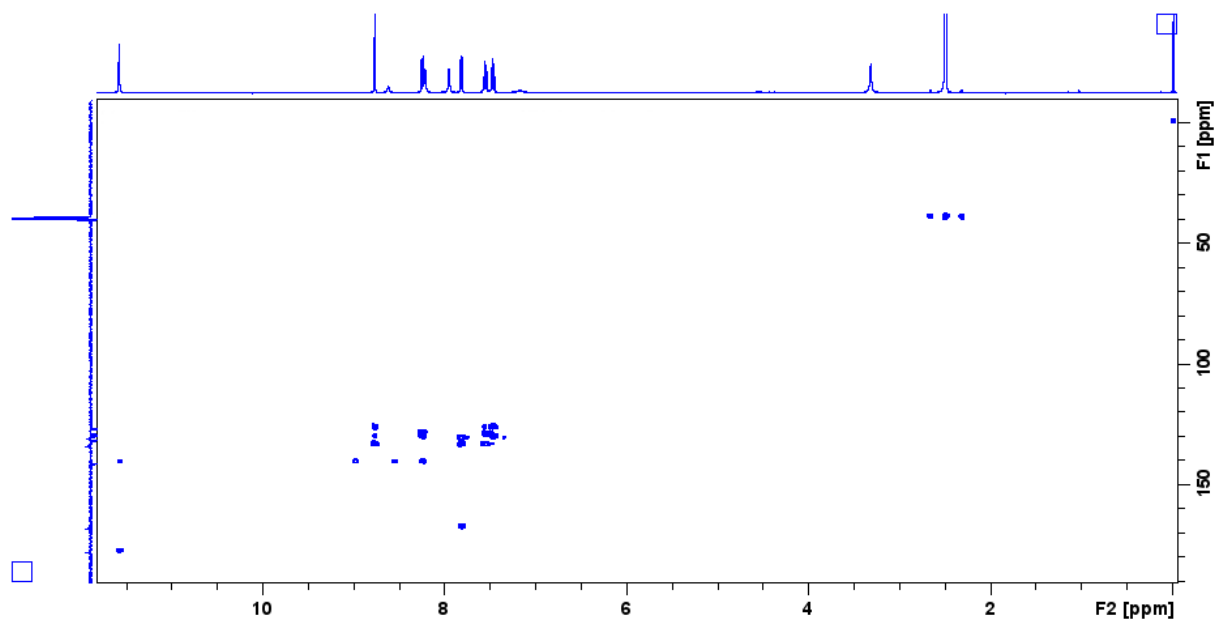
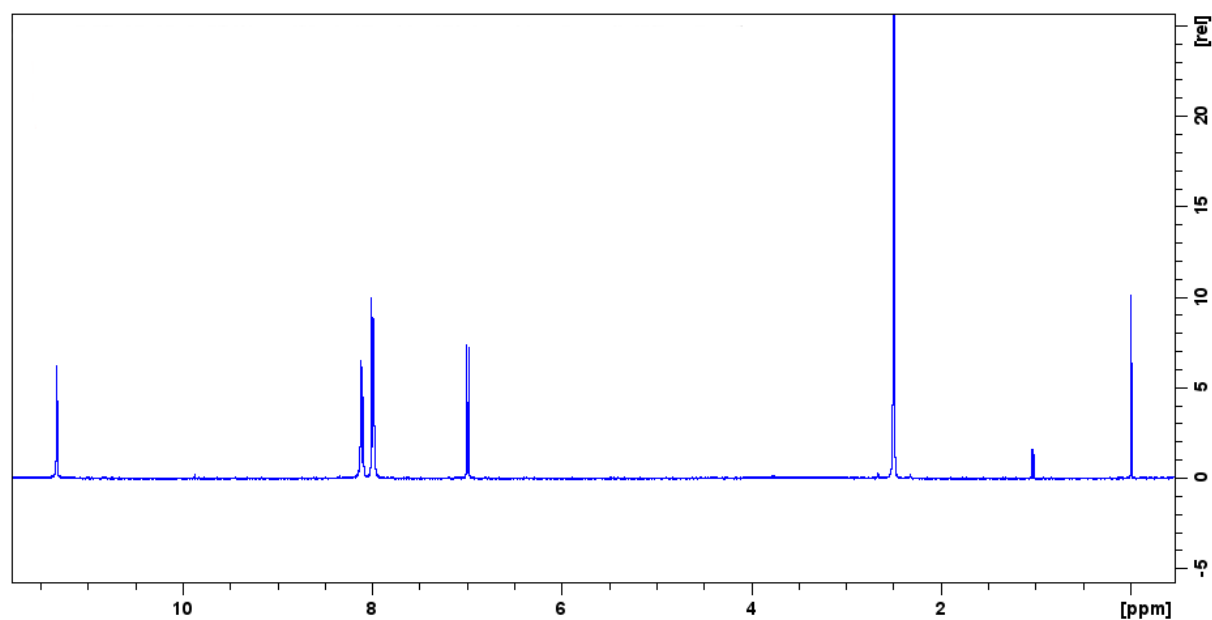
34. P. Gopal, T. Dick, The new tuberculosis drug Perchlozone[®] shows cross-resistance with thiacetazone, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **45** (4) (2015) 430-433.
35. E. J. Siddiqui, I. Azad, A. R. Khan, T. Khan, Thiosemicarbazone Complexes as Versatile Medicinal Chemistry Agents: A Review, *J. Drug Delivery Ther.* **9** (3) (2019) 689-703.
36. P. Heffeter, V. F. S. Pape, E. A. Enyedy, B. K. Keppler, G. Szakacs, C. R. Kowol, Anticancer thiosemicarbazones: chemical properties, interaction with iron metabolism, and resistance development, *Antioxid. Redox Signaling* **30** (8) (2019) 1062-1082.
37. E. Namiecińska, M. Sobiesiak, M. Małecka, P. Guga, B. Rozalska, E. Budzisz, Antimicrobial and Structural Properties of Metal Ions Complexes with Thiosemicarbazide Motif and Related Heterocyclic Compounds, *Curr. Med. Chem.* **26** (2019) 664-693.
38. B. Arsić, P. Novak, G. Kragol, J. Barber, M. G. Rimoli, F. Soldano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin/Boston, 2018, str. 56-61.
39. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak, N. Kujundžić, Novel ureas and thioureas of 15-membered azalides with antibacterial activity against key respiratory pathogens, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3459-3470.
40. M. Bukvić Krajačić, N. Kujundžić, M. Dumić, M. Cindrić, K. Brajša, B. Metelko, P. Novak, Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel sulfonylureas of 15-membered azalides, *J. Antibiot.* **58** (6) (2005) 380-389.
41. M. Bukvić, *Sinteza i biološka aktivnost novih ureido- i tioureido-derivata iz reda 15-članih azalida*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 95.
42. I. Palej Jakopović, G. Kragol, A. K. Forrest, C. S. V. Frydrych, V. Štimac, S. Kapić, M. Matanović Škugor, M. Ilijaš, H. Čipčić Paljetak, D. Jelić, D. J. Holmes, D. M. B. Hickey, D. Verbanac, V. Eraković Haber, S. Alihodžić, Synthesis and properties of macrolones characterized by two ether bonds in the linker, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6578-6588.
43. *Methods for Dilution - Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition*, siječanj 2009., *Clinical and Laboratory Standards Institute*
[https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhsykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/\\$FILE/ATTCSEG3.pdf/M07-](https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhsykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/$FILE/ATTCSEG3.pdf/M07-)

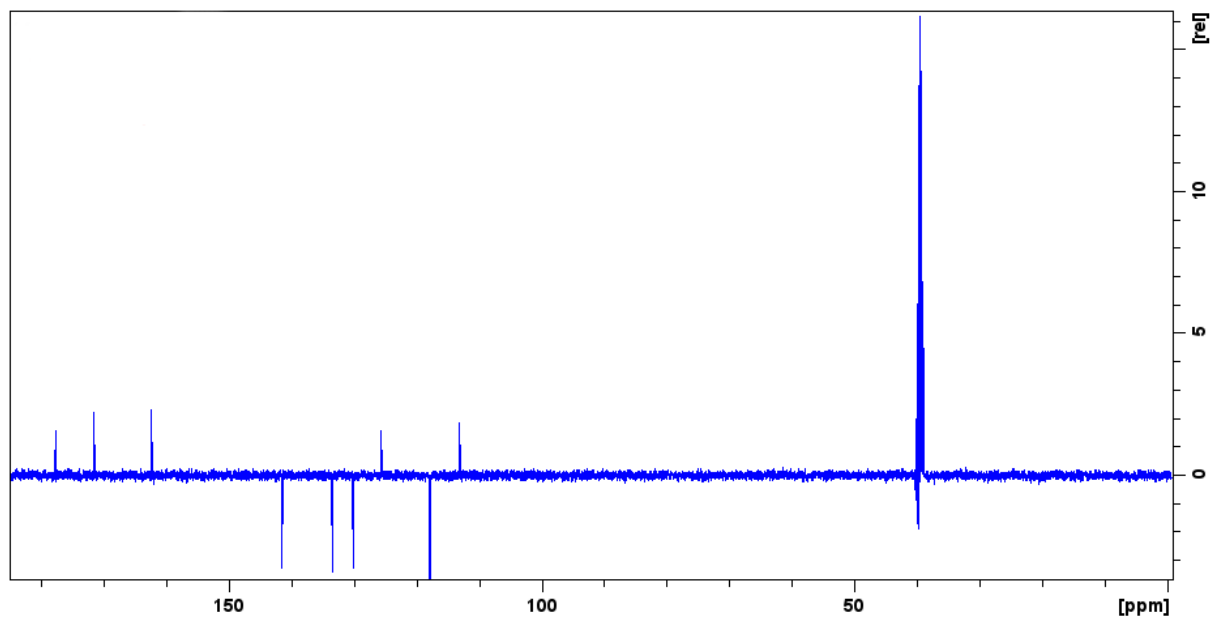
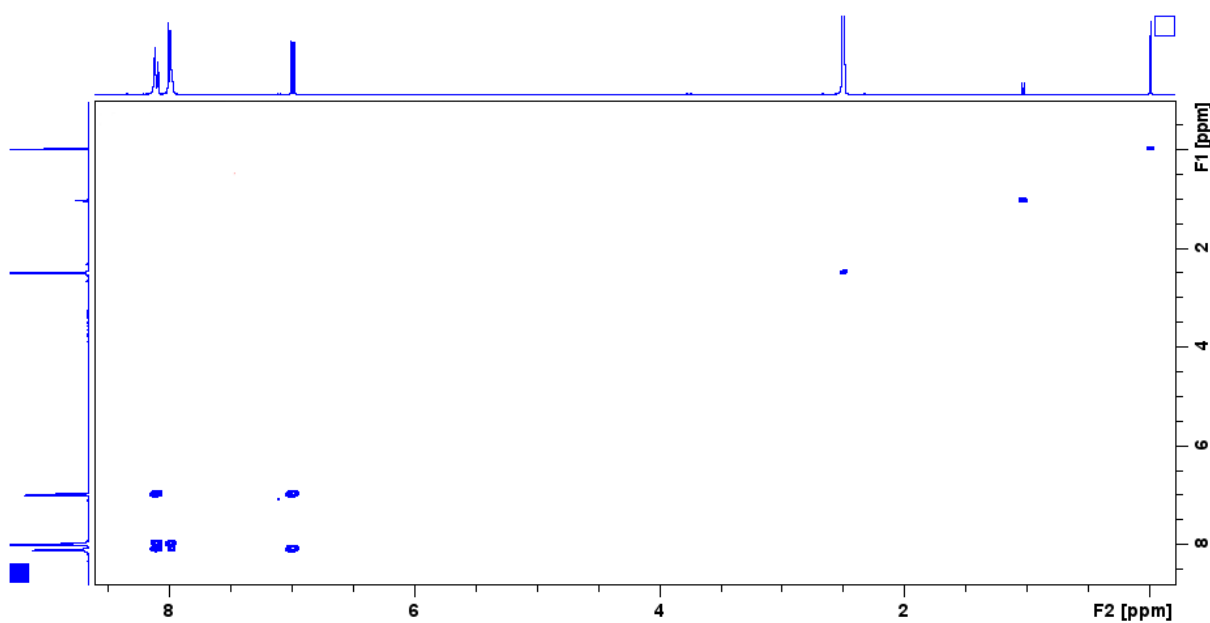
[A8%20Methods%20for%20Dilution%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Tests%20for%20Bacteria%20That%20Grow%20Aerobically.pdf](#) (datum pristupa 20.7 2022.)

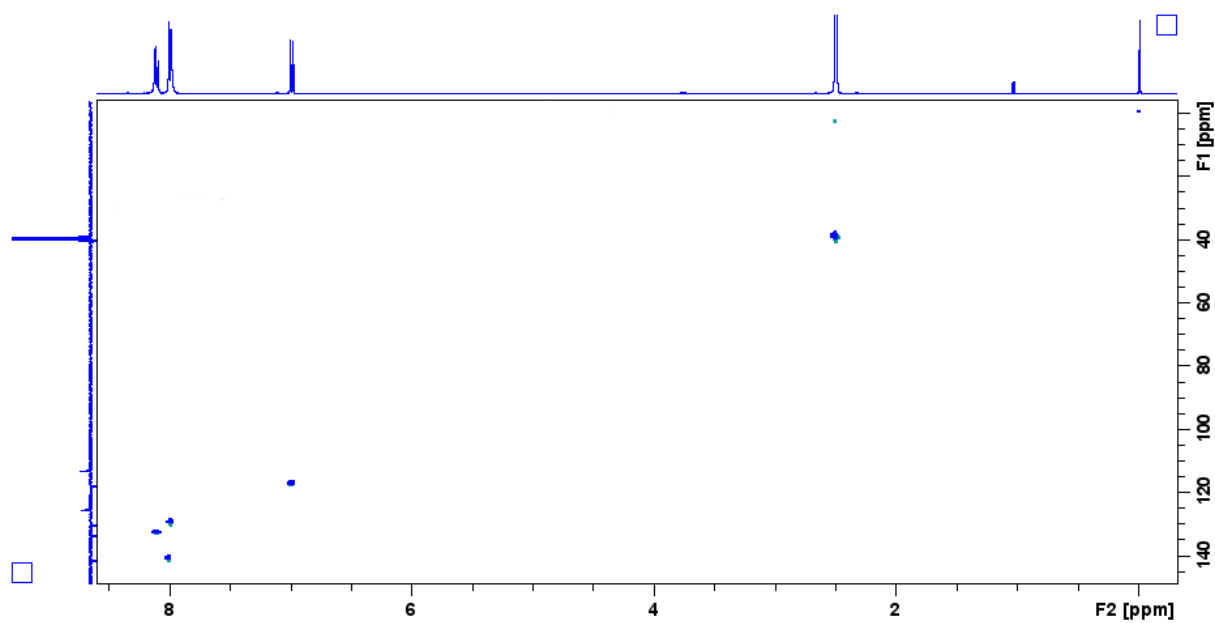
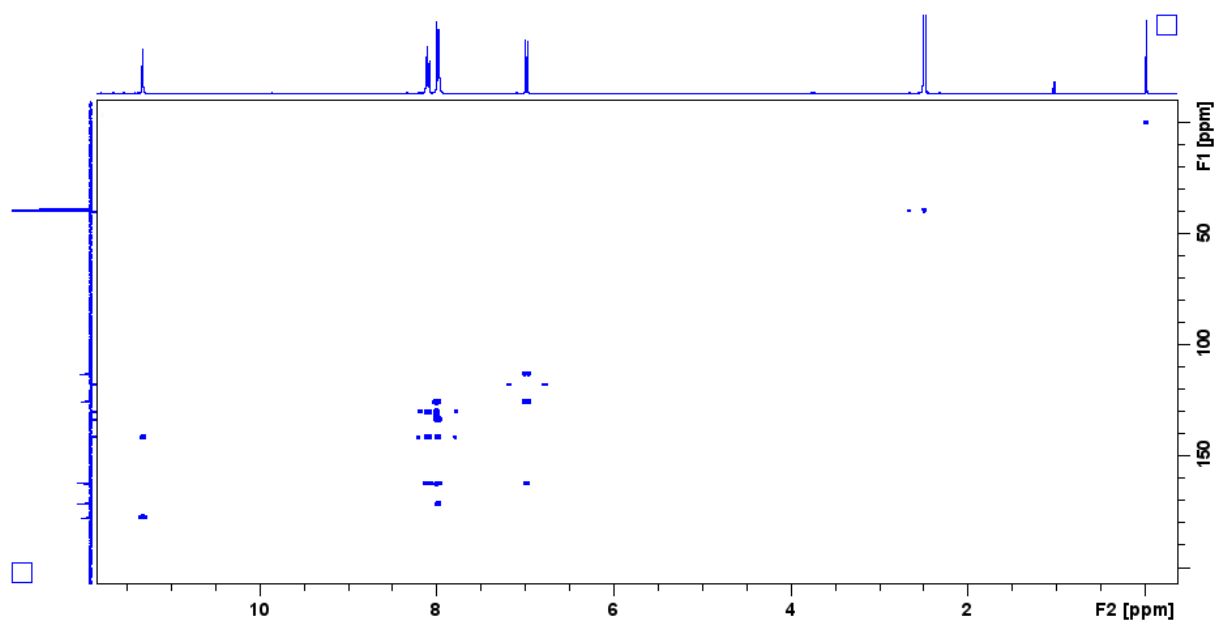
44. P. H. Jones, J. Forest, T. J. Perun, *Erythromycin derivatives*, U.S. Patent, 3,736,313, 1973.
45. P. H. Jones, T. J. Perun, E. K. Rowely, E. J. Baker, Chemical modifications of erythromycin antibiotics. 3. Synthesis of 4" and 11 esters of erythromycin A and B, *J. Med. Chem.* **15** (1972) 631-634.
46. A. Barišić, *Priprava i karakterizacija novih 4''-derivata azitromicina: 4-piperidil-sulfonilfenil-, 3-piridil-, benzo-3,4-(1,3-dioksolil)-, etoksikarbonil-, metiltiofen-2-karboksilat-3-il- i 2-furfurilmetil-makrozona*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 34-35.
47. M. Bukvić, M. Buljat, H. Čipčić Paljetak, P. Novak, Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel 9a-N and 4''-O-aminopropyl-azithromycin-thiosemicarbazone conjugates, Tetrahedron Symposium, Lisabon, 2022.

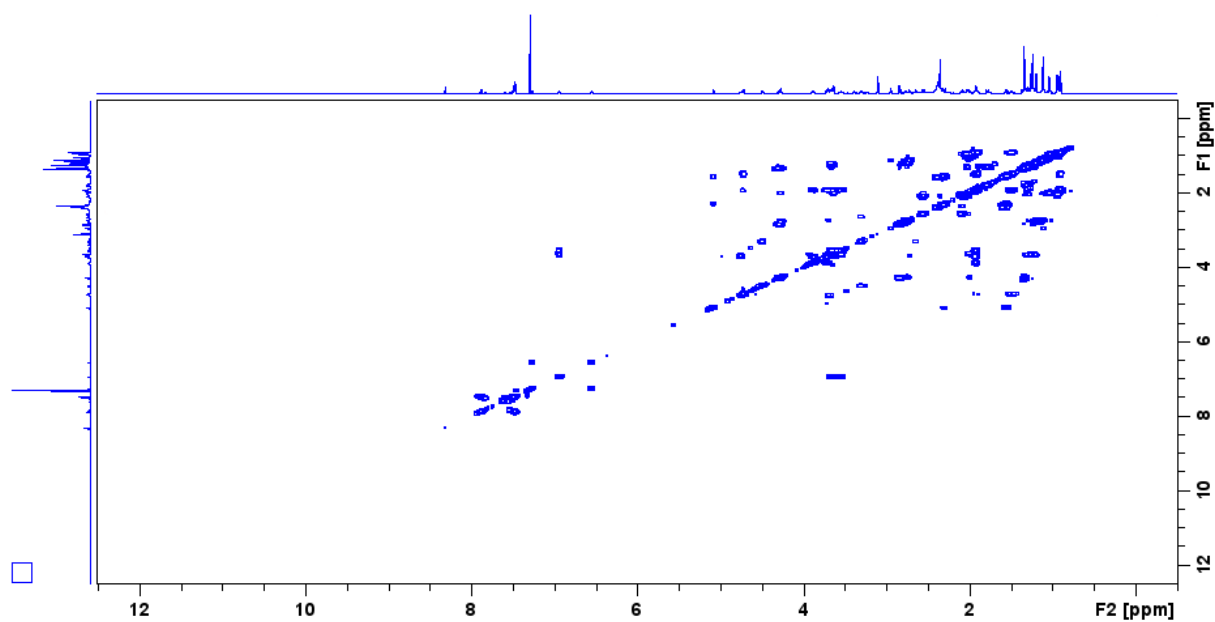
§ 8. DODATAK

D1. Spektar COSY tiosemikarbazona (**I**) snimljen u DMSO-d₆ pri 298 KD2. Spektar HSQC spoja (**I**) snimljen u DMSO-d₆ pri 298 K

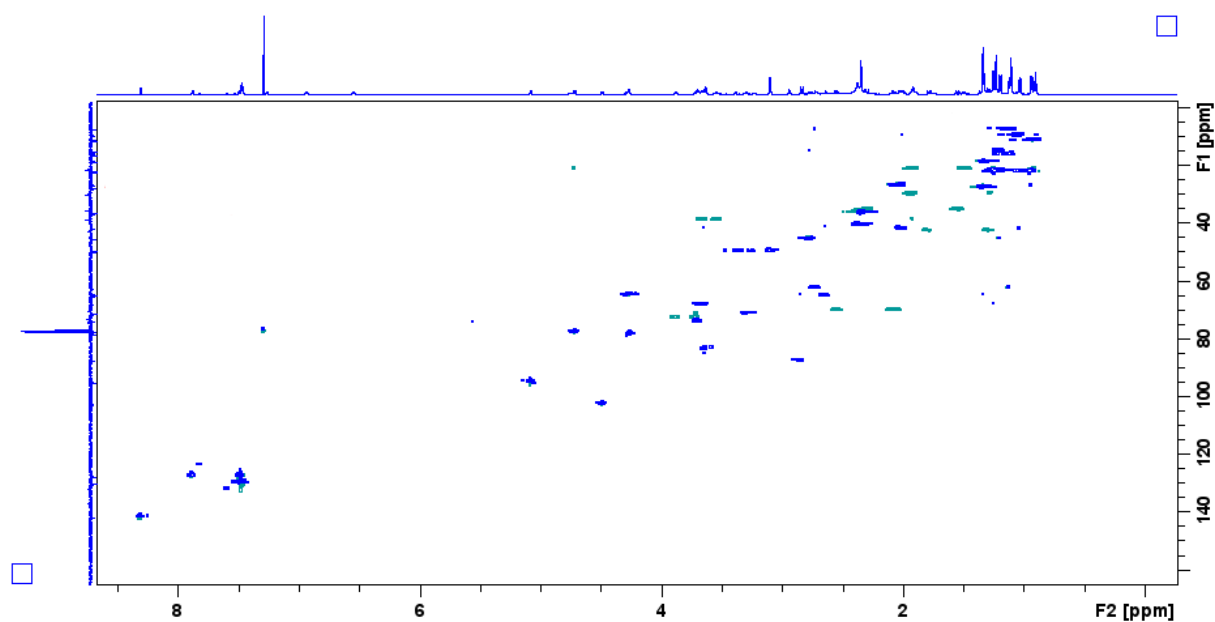
D3. HMBC spektar tiosemikarbazona (**I**) u DMSO- d_6 pri 298 KD4. ^1H NMR spektar tiosemikarbazona (**II**) snimljen u DMSO- d_6 pri 298 K

D5. Spektar DEPT-Q spoja (**II**) snimljen u DMSO-d₆ pri 298 KD6. Spektar COSY tiosemikarbazona (**II**) u DMSO-d₆ pri 298 K

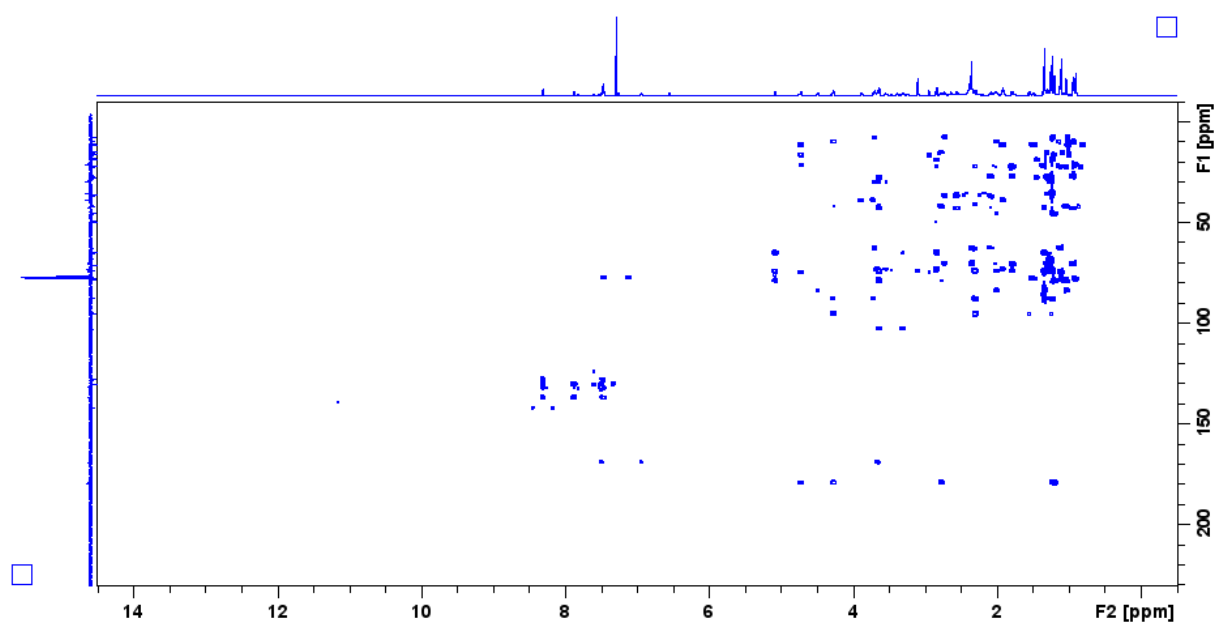
D7. HSQC spektar spoja (II) snimljen u DMSO-d₆ pri 298 KD8. Spektar HMBC tiosemikarbazona (II) u DMSO-d₆ pri 298 K



D9. Spektar COSY spoja (VI) snimljen u kloroformu-d pri 298 K



D10. Spektar HSQC spoja (VI) u kloroformu-d pri 298 K



D11. Spektar HMBC spoja (VI) snimljen u kloroformu-d pri 298 K

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marko Horvat

Datum rođenja: 16. prosinca 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Tituša Brezovačkog, Zagreb

2011.–2015. Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

2015.–2018. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu

2018.-2022. Diplomski sveučilišni studij; Analitička kemija i biokemija,
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016. 9. otvoreni dan Kemijskog odsjeka