



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Korina Palić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Proces razvoja lijeka

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Željka Car

Zagreb, 2023.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

4. srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujan 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Željka Car

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Faze istraživanja lijeka.....	2
1.1.1. Otkriće i razvoj lijeka.....	2
1.1.2. Pretklinička faza lijeka.....	3
1.1.3. Kliničke faze I-III.....	3
1.1.4. Odobravanje lijeka.....	4
1.1.5. Faza IV.....	4
§ 2. CEFALOSPORINI.....	5
2.1. Otkriće.....	5
2.1.1. Primjeri cefalosporina I-IV. generacije.....	5
2.2. Struktura i svojstva cefalosporina C.....	7
2.2.1. Odnos strukture i aktivnosti.....	8
2.3. Sinteza analoga modifikacijom pozicije 7.....	9
2.4. Sinteza 3-metiliranog cefalosporina.....	9
§ 3. PENICILIN.....	11
3.1. Struktura, biosinteza i mehanizam inhibicije.....	11
3.1.1. Odnos strukture i aktivnosti penicilina.....	12
3.1.2. Osjetljivost penicilinskih derivata na kisele uvjete.....	13
3.1.3. Utjecaj enzima β -laktamaze na penicilin.....	14
3.2. Benzilpenicilin, fenoksimetilpenicilin i sinteza penicilina V.....	15
3.3. 6-aminopenicilinska kiselina (6-APA) i njezini derivati.....	17
3.3.1. Priprava ostalih derivata penicilina.....	20
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XXIV

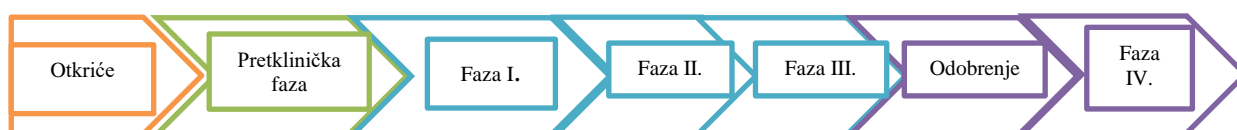
§ Sažetak

Proces razvoja lijeka dugotrajan je i skup. Sastoji se od otkrića djelatne tvari, pretkliničke i nekoliko kliničkih faza te odobrenja od strane nadležnih tijela. Tijekom istraživanja u pojedinim fazama ispituje se sigurnost, djelotvornost, farmakodinamika i farmakokinetika lijeka, prati se njegova toksičnost te nuspojave. U prvom dijelu ovoga rada pojasnit će se ukratko faze istraživanja lijeka od njegova otkrića do faze odobrenja dok će naglasak u drugom dijelu biti na nekim konkretnim primjerima. Kao primjeri su odabrani β -laktamski antibiotici cefalosporini i penicilini. Derivate cefalosporina je moguće sintetizirati promjenama na ugljiku na položaju 7, 7-acilamino i 3-acetoksimetilnom bočnom lancu dok se derivati penicilina dobivaju modifikacijama samo na acilnom bočnom lancu. Benzilpenicilin (penicilin G) i fenoksimetilpenicilin (penicilin V) se smatraju prirodnim penicilinima.

§ 1. UVOD

Prvi korak u sintezi lijeka je odabir bolesti na koju bi lijek trebao imati utjecaja. Tako se u farmaceutskim tvrtkama, institutima, fakultetima, kliničkim zavodima odabire ciljana bolest. S obzirom da je razvoj lijeka skup proces farmaceutske tvrtke odabiru bolesti koje su zastupljenije među populacijom čiji se trošak razvoja lijeka uklapa u budžet te ona istraživanja u kojima je konkurencija manja, kako bi ostvarili povrat uloženi sredstava. U prijašnjim desetljećima farmaceutske tvrtke orijentirane su na bolesti Zapadnog svijeta, kao što su depresija, migrene, bolesti krvožilnog sustava, pretilost i slično. Globalizacijom se pridaje pozornost bolestima karakterističnim za tropske krajeve i Afriku, poput malarije, kolere, žute groznice. Unatoč tome, brojne bolesti kao što su Afrička bolest spavanja, denga groznica, gvinejska glista te ostale, su neistražene i bez adekvatnog lijeka za njihovo liječenje.^{1,2}

Razvoj lijeka je iznimno izazovan proces. Osim što mora biti siguran i efikasan u liječenju bolesti, također mora proći sigurnosna testiranja te mora pokazati djelotvornost u raznim subpopulacijama. Unatoč brzom razvoju farmacije unazad nekoliko desetljeća u procesu razvoja lijeka još je uvijek puno problema: dugotrajnost i složenost istraživanja, skupoća, nepoznata patofiziologija bolesti, ograničenja bioloških testiranja. Od početka razvoja do ulaska lijeka u kliničku fazu (slika 1) prođe oko 10 i više godina, a samo 20% lijekova koji dopiju do testiranja na ljudima bude odobreno. Također svaka osoba je drugačija i bolesti se ovisno o pojedincu razvijaju drugačije zbog čega određeni lijekovi mogu imati željeno djelovanje samo za određene pacijente.³

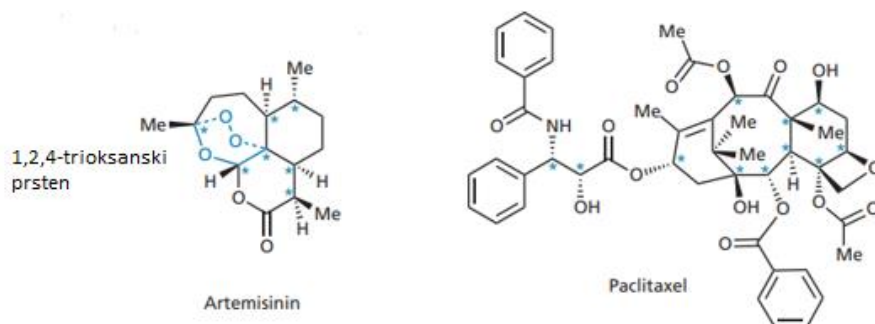


Slika 1. Faze istraživanja lijeka. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.⁴

1.1. Faze istraživanja lijeka

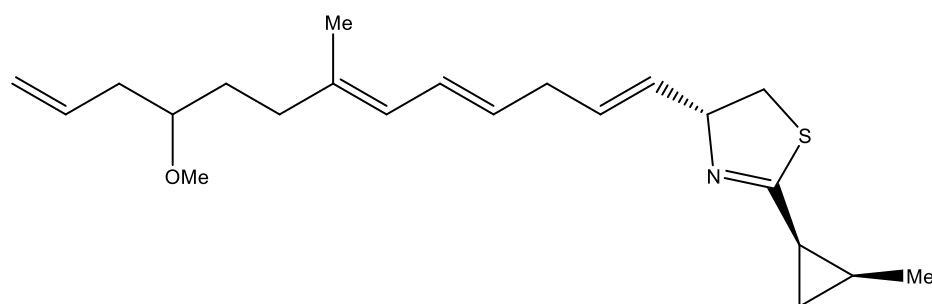
1.1.1. Otkriće i razvoj lijeka

Početak svakog istraživanja lijeka započinje odabirom bolesti te pronalaskom kemijskog spoja koji pokazuje željeno farmakološko djelovanje (biološku aktivnost). Kemijski spojevi se biraju većinom iz prirodnih izvora: biljaka, životinja i ljudi ili su ciljano sintetizirani. Spojevi iz prirodnih izvora posjeduju različite biološke aktivnosti te takve strukture služe kao polazni spojevi u sintezama lijeka. Obično se radi o jako kompleksnim strukturama koje često imaju više kiralnih središta zbog čega je njihova sinteza otežana te se moraju iz prirodnih izvora ekstrahirati što je skup, spor i neefikasan proces. Morfij, kokain, kinin, nikotin, paclitaxel (lijek protiv raka), galantamin (lijek za liječenje Alzheimerove bolesti), artemisinin (antimalarijski lijek) samo su neki od spojeva izolirani iz biljaka (slika 2).



Slika 2. Kemijski spojevi iz biljaka kao prirodnih izvora biološki aktivnih tvari. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

Osim biljaka, mikroorganizmi (bakterije, gljivice) također mogu poslužiti kao izvor biološki aktivnih tvari. Penicilin, cefalosporini, kloramfenikol, aminoglikozidi neki su od takvih primjera. Spojevi iz morskih izvora, koralja, spužvi, ribe su pokazali antivirusna, antikancerogena i protuupalna djelovanja. Tako su curacin A (slika 3), briostatini, halihondrin B samo neki od brojnih antitumorskih sredstava podrijetlom iz morskog svijeta.



Slika 3. Curacin A izoliran iz morske cijanobakterije¹

Kao polazni spojevi mogu poslužiti i već postojeći lijekovi. Ponekad je lakše i isplativije razviti lijek iz već poznatog spoja s potrebnim farmakokinetičkim svojstvima nego započeti novo istraživanje.

Nakon odabira polaznih spojeva sintetiziraju se ciljane molekule koje bi mogle imati odgovarajuća farmakodinamička i farmakokinetička svojstva. Obično je sintetiziran veliki broj spojeva, no samo rijetki na kraju ulaze u pretkliničku i kliničku fazu istraživanja. Sintetizirani ciljni spojevi postepeno se eliminiraju proučavanjem njihovog mehanizma djelovanja, njihove citotoksičnosti i ostalih učinaka na organizam.^{1,4}

1.1.2. Pretklinička faza lijeka

Nakon odabira ciljne molekule koja zadovoljava gore spomenute uvjete da bi postala lijek, ona se testira *in vitro* na izoliranim stanicama te *in vivo* na životinjama. Promatra se kako lijek djeluje na živi organizam, ali i koje bi bile njegove moguće nuspojave te kakva su mu farmakokinetička svojstva. Prije testiranja lijeka *in vivo* lijek se ispituje *in vitro* metodama koje pružaju uvid u to kako stanica reagira na lijek. Ako se potencijalni lijek dokaže učinkovitim *in vivo* na životinjskim modelima to ne znači da će biti pogodan za ljude. Potrebno je provesti i kliničko istraživanje na raznim subpopulacijama kako bi se osigurala sigurnost lijeka prije njegovog plasmana na tržište.

Ovisno o vrsti lijeka *in vitro* i *in vivo* metode mogu biti jednostavne, ali i komplicirane za provesti. Primjerice, antibakterijski lijek je lagano ispitati u *in vitro* modelu na način da se izmjeri koliko efikasno taj lijek ubija bakterijske stanice. Međutim, potencijalni antipsihotik je nemoguće jednostavno testirati *in vivo* metodom. U tom slučaju provodi se *in vitro* ispitivanje lijeka na određenom receptoru koji je uključen u takvo zdravstveno stanje te prati njegova aktivnost. Nakon uspješno provedene pretkliničke faze traži se dopuštenje za nastavak kliničkih faza istraživanja preko prijave za novi istražni lijek (engl. *Investigational New Drug*, IND) u SAD-u ili prijave za kliničko ispitivanje (engl. *Clinical Trial Application*, CTA) u Europi^{1,4-6}

1.1.3. Kliničke faze I-III

Nakon pretkliničke faze istraživanja lijeka na životinjama slijedi kliničko istraživanje na ljudima. Kliničko istraživanje je podijeljeno na tri faze. Faza I. proučava sigurnost, toleranciju, farmakodinamiku te farmakokinetiku na zdravim ljudima, osim kod onkoloških bolesnika gdje je testiranje odmah provedeno na oboljelima. Kod farmakokinetike se prati utjecaj tijela na

lijek, metabolizam, adsorpciju, distribuciju i izlučivanje dok se kod farmakodinamike prati utjecaj lijeka na tijelo i tjelesne funkcije, primjerice, prate se otkucaji srca, krvni tlak i slično. Ispitivanja lijeka vezana uz doziranje lijeka započinje u minimalnim dozama koje se postepeno povećavaju. Ukoliko se utvrdi da je životni vijek lijeka predugačak ili prekratak te ako nije razvijena dobra tolerancija lijek se prestaje istraživati. Nakon što je utvrđena učinkovitost i sigurnost lijeka u fazi I. u fazi II. se on ispituje na ciljanoj skupini ljudi za koje je lijek namijenjen. Na manjoj se skupini ljudi testira minimalna i maksimalna doza lijeka, a na većoj niz doza kako bi se odredila minimalna učinkovita te minimalna neučinkovita doza. Time se određuje optimalna doza lijeka. U zadnjoj se fazi uspoređuju učinci novog lijeka s već postojećim terapijama.⁴

1.1.4. *Odobranje lijeka*

Nakon završene kliničke faze istraživanja potrebno je odobrenje od strane Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europske Agencije za lijekove (engl. *European Medicine Agency*, EMA). Ukoliko je lijek odobren, određuje mu se cijena te se lansira na tržište.^{4,5}

1.1.5. *Faza IV*

Jednom dok se lijek odobri i lansira na tržište i dalje je potrebno provjeravati njegovu sigurnost. Time se bavi područje poznato pod nazivom farmakovigilancija. Ukoliko se tijekom ispitivanja u fazi IV. otkriju nove nuspojave može doći do povlačenja lijeka. U ovoj fazi istraživanja uključene su subpopulacije koje su u prijašnjim fazama bile izuzete, kao što su djeca, trudnice i starije osobe.^{4,5}

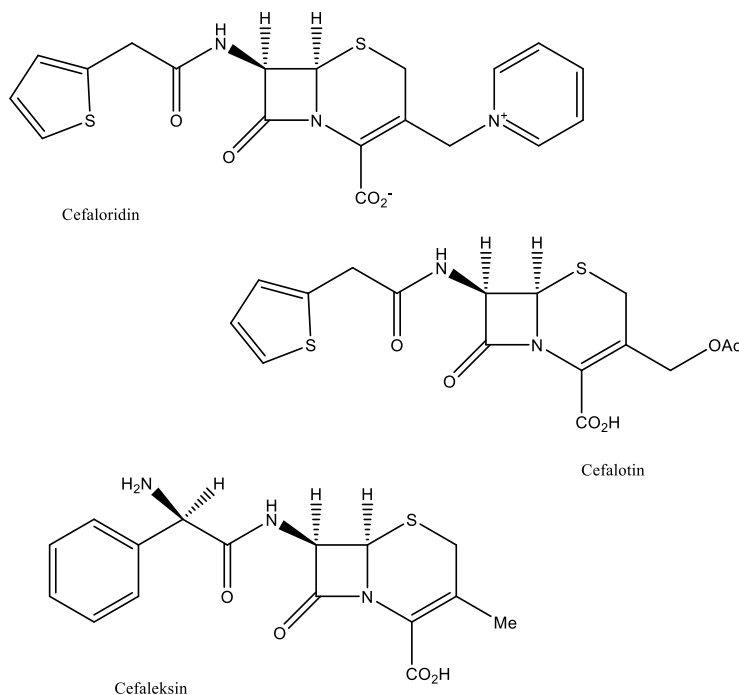
§ 2. CEFALOSPORINI

2.1. Otkriće

1940. godine na Siciliji u kanalizacijskim vodama otkrivena je gljivica *Cephalosporium acremonium* kod koje je uočeno antibakterijsko svojstvo te je iz nje izoliran cefalosporin C, no struktura mu je otkrivena tek kasnije pomoću rendgenske kristalografije. Nakon cefalosporina C otkriveni su cefalosporini N i P te je utvrđeno da napadaju veliki raspon bakterija među kojima su bile i bakterije otporne na penicilin.¹

2.1.1. Primjeri cefalosporina I-IV. generacije

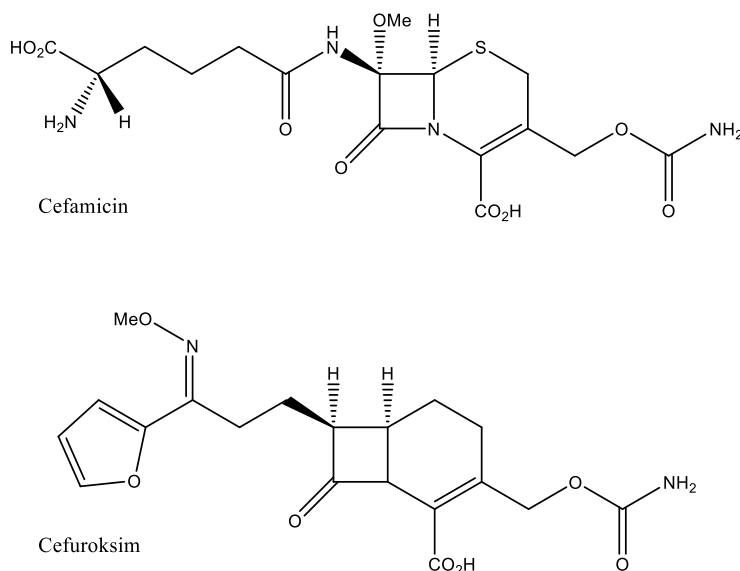
Cefalosporini I. generacije (slika 4) imaju nižu antibakterijsku aktivnost od penicilina no imaju veći raspon djelovanja. Djeluju na gram-pozitivne bakterije kao i penicilin no za razliku od njega cefalosporini su manje osjetljiviji na enzime β -laktamaze što uzrokuje spomeniti širi spektar djelovanja. Slabo se apsorbiraju kroz stijenku crijeva zbog čega se moraju unositi intravenozno. Cefalotin ima acetiloksi skupinu koja se hidrolizira te kao produkt hidrolize izlazi manje aktivan alkohol, dok cefaloridin ima piridinski prsten umjesto esterske skupine zbog čega je stabilniji. Cefaleksin je jedini iz prve generacije koji se može unositi oralnim putem, a to je zahvaljujući metilnom supstituentu na položaju 3.



Slika 4. Strukturne formule cefalosporina I. generacije¹

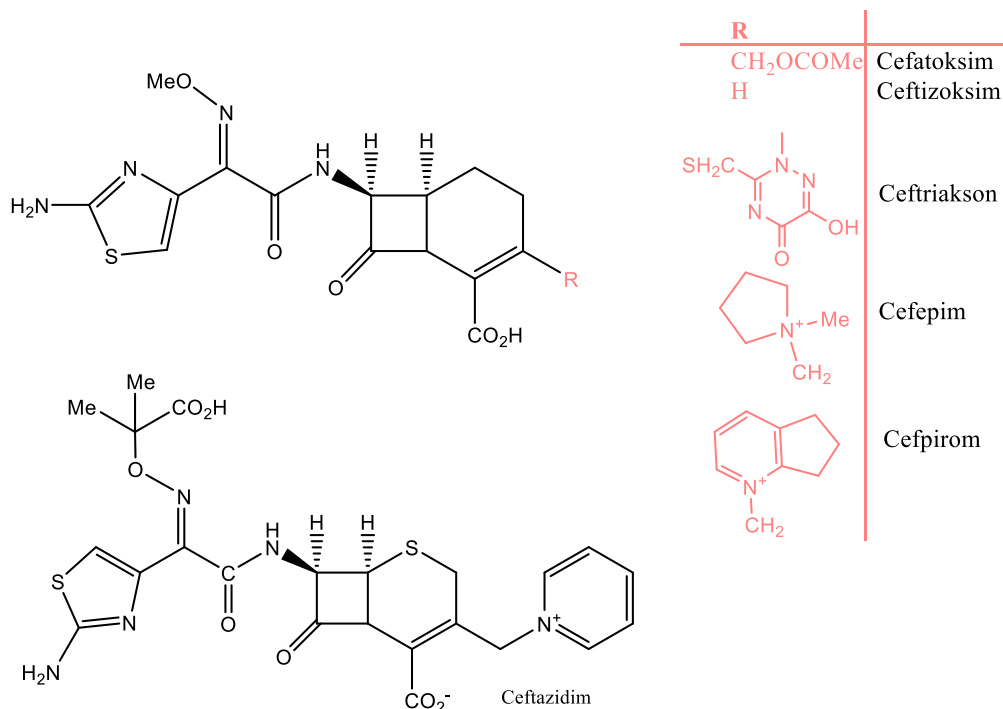
Cefalosporinima II. generacije (slika 5) poboljšana je učinkovitost kemijskim modifikacijama na oba bočna lanca, no oni se i dalje ne mogu apsorbirati kroz stijenku crijeva zbog čega se također unose intravenozno. Cefamicin ima metoksi skupinu na položaju 7. Oksiminocefalosporin, kojem pripada i cefuroksim, zbog iminometoksi skupine na bočnom lancu ima povećanu stabilnost protiv β -laktamaza.

Cefalosporini III. generacije (slika 6) napadaju bakterije sa i bez zaštitne membrane. Umjesto furanskog prstena oksiminocefalosporina imaju aminotiazolni prsten zbog kojeg mogu proći kroz membrane gram-negativnih bakterija. Ceftazidim, cefotaksim, ceftizoksim i ceftriakson su samo neki od njih.



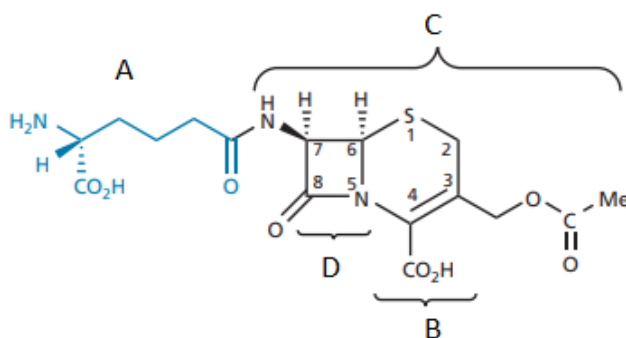
Slika 5. Strukturne formule cefalosporina II. generacije¹

Cefalosporini IV. generacije su cefepim i cefpirom. Djeluju i na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije te su jako otporni na β -laktamazu.^{1,7-10}

Slika 6. Strukturne formule cefalosporina III. i IV. generacije¹

2.2. Struktura i svojstva cefalosporina C

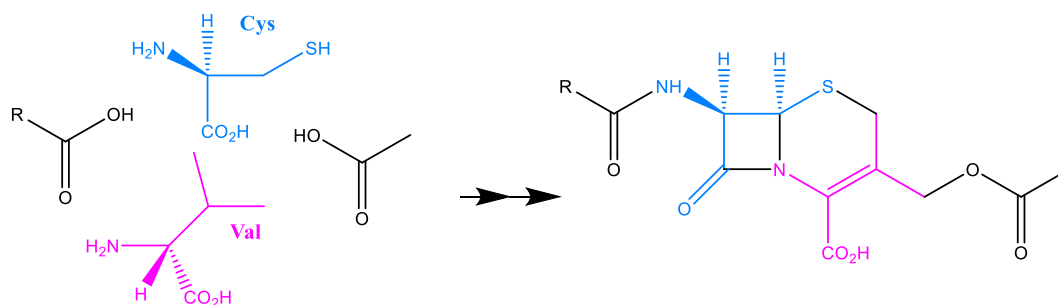
Cefalosporin C karakterizira njegova niska toksičnost i široki spektar aktivnosti zahvaljujući bočnom acilnom lancu (slika 7A). Ima veću otpornost protiv kiselinske hidrolize i utjecaja β-laktamaze te djeluje i protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija.



Slika 7. Strukturna formula cefalosporina C: A) 7-aminoadipinski bočni lanac, B) dihidrotiazinski prsten, C) 7-aminocefalosporinska kiselina (7-ACA), D) β-laktamski prsten.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

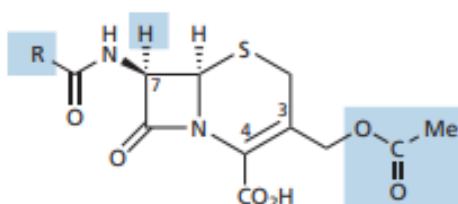
Njegova biosinteza kreće iz octene kiseline, cisteina i valina te karboksilne kiseline o čijoj strukturi ovisi kakav će biti bočni lanac na β-laktamskom prstenu (slika 8)¹

Slika 8. Polazni spojevi u biosintezi cefalosporina C.¹

Djeluje tako da inhibira sintezu peptidoglikana koji je dio bakterijske stijenke zbog čega se bakterijske stijenke ne mogu dalje sintetizirati. Inhibicija se događa na način da cefalosporin imitira vezno mjesto transpeptidaze PBP (engl. *penicillin binding protein*, PBP). Vežu se na PBP čime se inhibira njegova aktivnost prekidom unakrsnog povezivanja peptidoglikana.^{1,9,11}

2.2.1. Odnos strukture i aktivnosti

Modifikacijama na cefalosporinu C utvrđeno je da su β -laktamski prsten, acilamino bočni lanac na položaju 7 te ionizirana karboksilatna skupina na položaju 4 važni za aktivnost. β -laktamski prsten ključan je za antibakterijsko djelovanje jer se veže za PBP kojem je onda inhibirana aktivnost. Cefalosporin C je moguće kemijski modificirati na 7-acilamino bočnom lancu, 3-acetoksimetil bočnom lancu te na ugljikovom atomu na položaju 7 (slika 9).^{1,11}

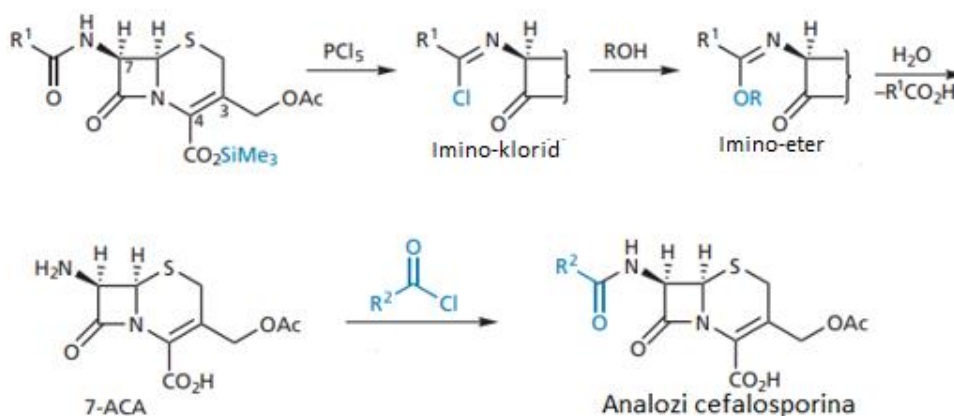
Slika 9. Mjesta na strukturi cefalosporina C koja je moguće modificirati u svrhu poboljšanja aktivnosti.¹

Važnost položaja supstituenata kao i prisutnost heterocikličkog prstena može se predočiti promatranjem epileptogene aktivnosti. Spojevi s heterocikličkim prstenima i na položaju 3 i na položaju 7 (cefazolin, cefotiam, ceftazol) imaju jaku epileptogenu aktivnost. Oni sa samo jednim heterocikličkim prstenom ili na položaju 3 ili na 7 (cefapirin, cefmetazol, cefalotin) imaju slabu takvu aktivnost dok oni koji uopće nemaju heterociklične

supstituente(cefradin, cefaleksin) ne pokazuju nikakvu epileptogenu aktivnost. Također, supstituenti na položaju 3 uzrokuju veće povećanje aktivnosti nego oni na položaju 7.¹²

2.3. Sinteza analoga modifikacijom pozicije 7

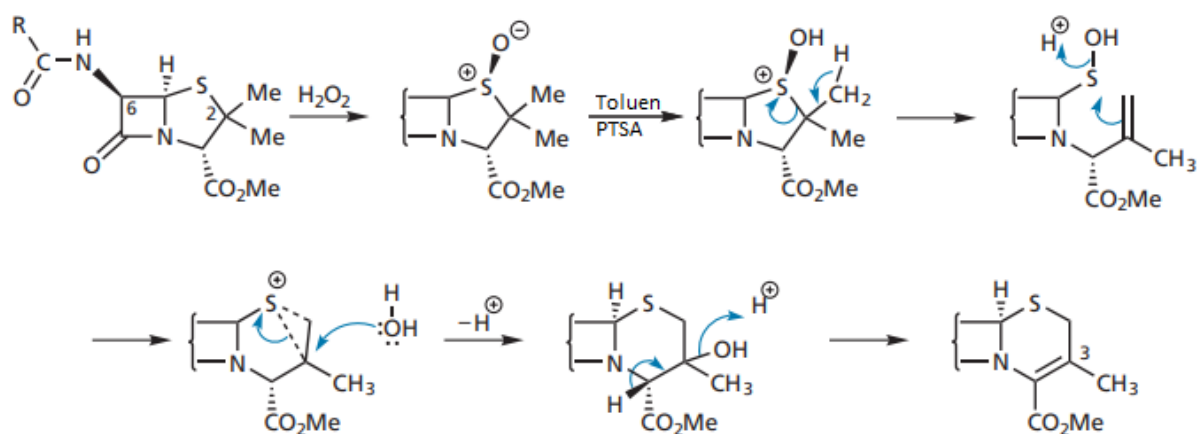
Kako bi se dobio analog cefalosporina na poziciji 7 potrebno je dobiti 7-ACA (7-aminocefalosporinsku kiselinu) kemijskom hidrolizom. Prvi korak je sinteza imino-klorida. Zatim se imino-klorid uz alkohol pretvara u imino-eter koji se lakše hidrolizira nego β -laktamski prsten. Kao produkt te hidrolize izlazi 7-ACA koja aciliranjem daje razne analoge cefalosporina (slika 10)¹



Slika 10. Sinteza 7-ACA i analoga cefalosporina modifikacijom pozicije 7. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

2.4. Sinteza 3-metiliranog cefalosporina

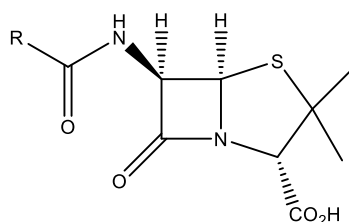
3-metilirani cefalosporini kao polaznu molekulu u pripravi koriste penicilin. Sinteza se sastoji od dva dijela, oksidacije atoma sumpora te kiselinski kataliziranog proširenja peteročlanog tiazolidinskog prstena u šesteročlani dihidrotiazinski prsten (slika 11).¹

Slika 11. Sinteza 3-metiliranog cefalosporina.¹

§ 3. PENICILIN

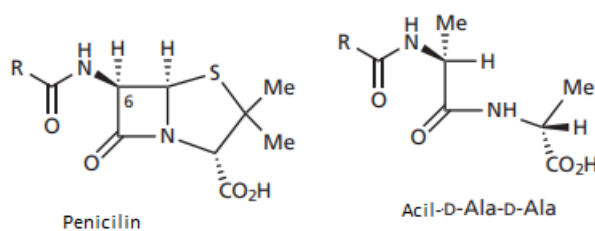
3.1. Struktura, biosinteza i mehanizam inhibicije

Struktura penicilina (slika 12) se sastoji od β -laktamskog prstena, tiazolidinskog prstena i bočnog lanca, 6-aminopenicilinske kiseline (6-APA).

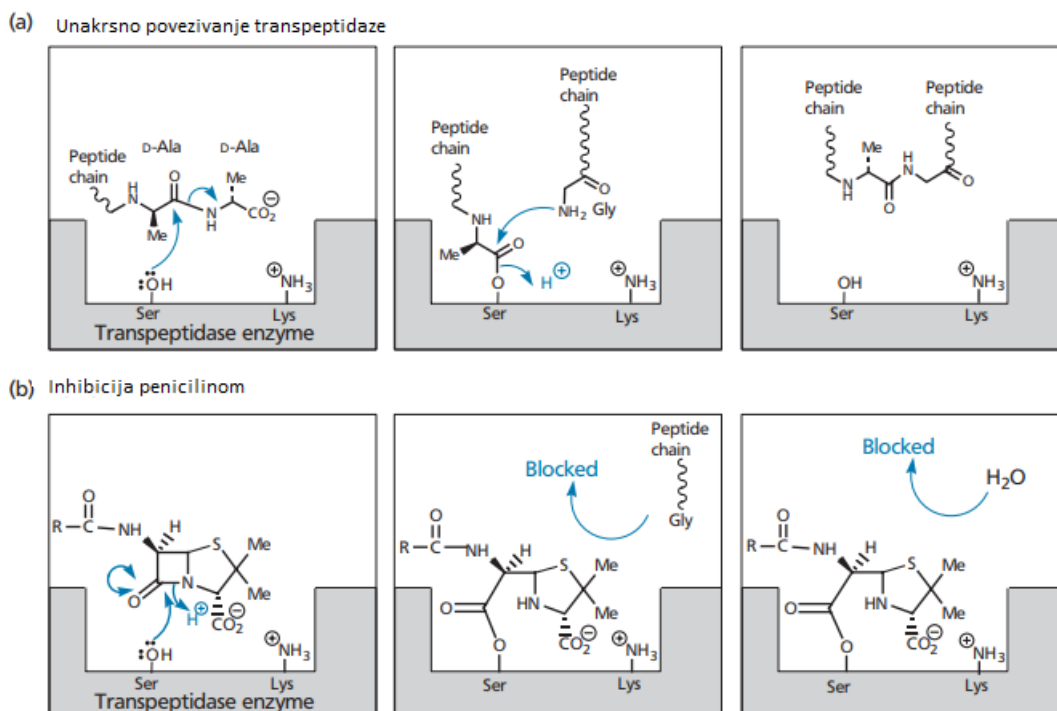


Slika 12. Strukturna formula penicilina¹

Prirodni penicilini djeluju protiv gram-pozitivnih bakterija, aminopenicilini djeluju protiv gram-pozitivnih te nekih gram-negativnih bakterija, dok karboksi- i ureidopenicilini djeluju i protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Njihov mehanizam djelovanja zasniva se na inhibiranju sinteze bakterijske stijenke tako što se vežu na proteine koji vežu penicilin (karboksipeptidaze, endopeptidaze, transpeptidaze) u bakterijskoj citoplazmatskoj membrani. Inhibiraju sintezu peptidoglikana u staničnim stijenkama. Penicilin ima strukturu sličnu konformaciji D-Ala-D-Ala dijela polipeptidnog lanca (slike 13, 14A) u unakrsnom povezivanju enzima transpeptidaze. Enzim prepoznaje penicilin (slika 14B), veže ga za aktivno mjesto i potiče inhibiciju.^{1,13,14}

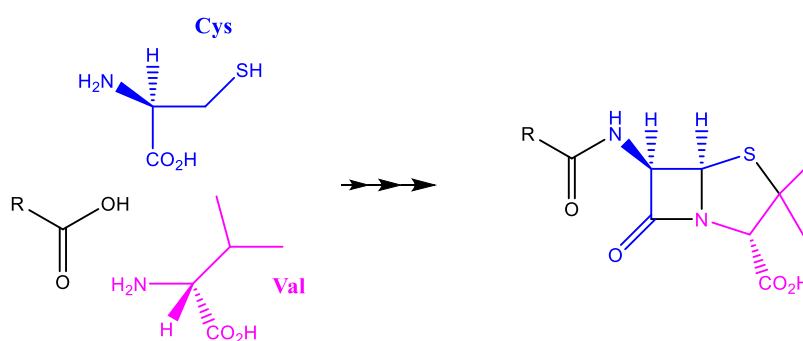


Slika 13. Usporedba strukture penicilina i acil-D-Ala-D-Ala.¹



Slika 14. A) Mehanizmi unakrsnog povezivanja transpeptidaze te B) inhibicije penicilinom¹

U biosintetskom putu penicilin se pripravlja iz aminokiselina valina i cisteina te još jedne određene aminokiseline o kojoj ovisi kakav će derivat penicilina biti pripravljen (slika 15).¹



Slika 15. Biokomponente sinteze penicilina¹

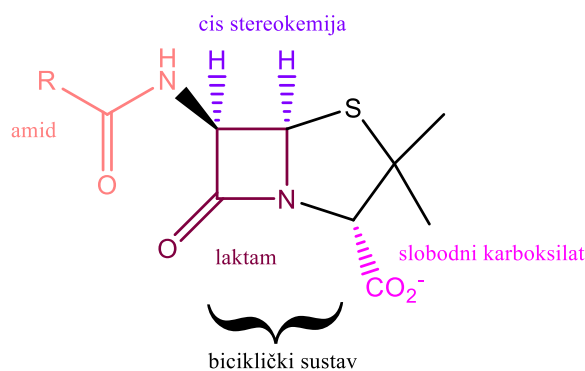
3.1.1. Odnos strukture i aktivnosti penicilina

β -laktamski prsten odgovoran je za antibakterijsko djelovanje penicilinskih derivata, te svaka promjena napravljena na njemu rezultira stvaranjem peniciloiinske kiseline zbog čega se to

djelovanje onda gubi. Spektar aktivnosti i farmakokinetička svojstva ovise o strukturi bočnog lanca, čiji sastav ovisi o komponentama medija za fermentaciju.

Razmatranjem ovisnosti strukture i aktivnosti utvrđeno je da su za aktivnost penicilinskih derivata potrebni slijedeći strukturni fragmenti (slika 16):

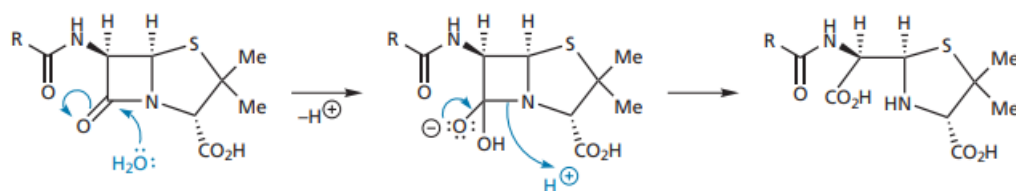
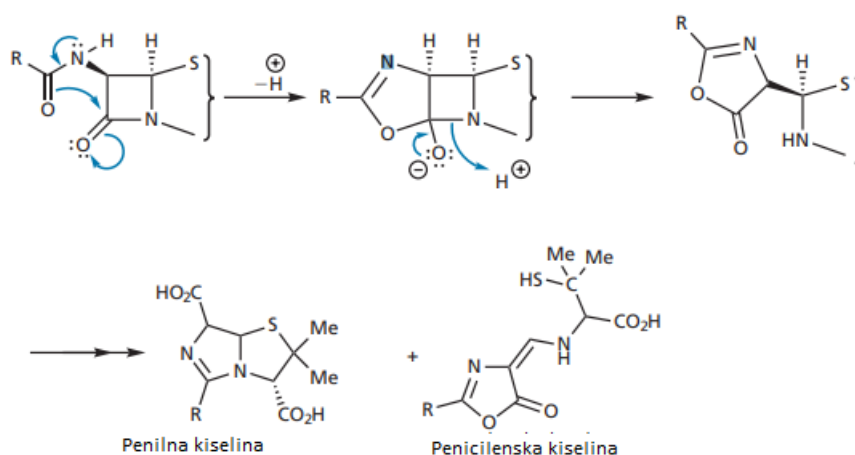
- napeti β -laktamski prsten
- nezaštićena karboksilna kiselina
- biciklički sustav
- acilamidni bočni lanac
- atom sumpora
- odgovarajuća stereokemija bicikličkog prstena obzirom na acilamidni lanac.^{1,13}



Slika 16. Nužni strukturni dijelovi penicilina potrebni za njegovu aktivnost¹

3.1.2. Osjetljivost penicilinskih derivata na kisele uvjete

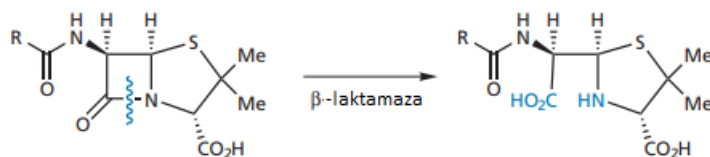
Biciklički sustav kakav ima penicilin posjeduje velike vezne kuteve i torzijsku napetost zbog čega se djelovanjem kiseline prsten lako otvara kao što je prikazano na slici 17. Također karbonilna skupina acilamidnog fragmenta je otporna na nukleofilni napad jer je stabilizirana slobodnim elektronskim parom atoma dušika zbog čega je karbonilna skupina β -laktamskog prstena elektrofilnija nego što bi se očekivalo.¹ Posljedično, acilamidni bočni lanac također može uzrokovati otvaranje manjeg prstena pri čemu kao krajnji produkti tim otvaranjem nastaju penilna i penicilenska kiselina (slika 18).

Slika 17. Kiselinom katalizirano otvaranje β -laktamskog prstena penicilina¹Slika 18. Utjecaj acilamidnog bočnog lanca na otvaranje β -laktamskog prstena.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

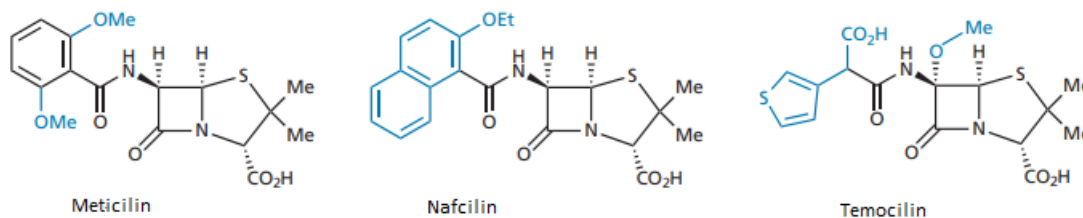
3.1.3. Utjecaj enzima β -laktamaze na penicilin

Određene skupine bakterija proizvode enzim β -laktamazu zbog čega se nativni penicilini ne mogu koristiti u liječenju infekcija uzrokovanih takvim bakterijama. β -laktamaze inaktiviraju djelovanje penicilina cijepanjem β -laktamskog prstena (slika 19)^{1,15}

Slika 19. Učinak β -laktamaze na nativne derivate penicilina. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

Kako bi se spriječio utjecaj β -laktamaze primjenjuje se princip steričkog štita, odnosno na acilamidni lanac uvodi se glomazna, sterički zahtjevnja skupina (slika 20) koja je dovoljno velika da spriječi vezanje penicilina u β -laktamazno aktivno mjesto no opet dovoljno mala da

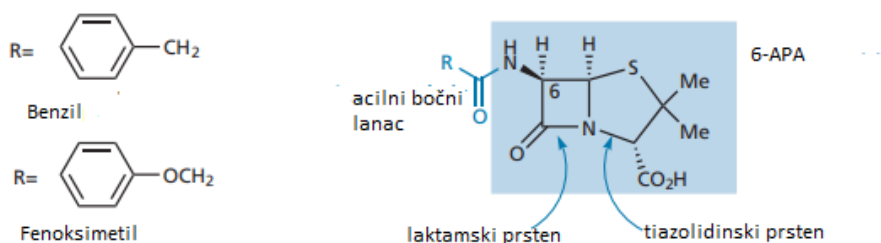
se penicilin može vezati na željeni enzim. Time se osigurava da penicilin može djelovati i na one organizme koje proizvode β -laktamazu.¹



Slika 20. Analози penicilina sa glomaznim skupinama koje blokiraju dolazak do β -laktamaznog aktivnog mjesta. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

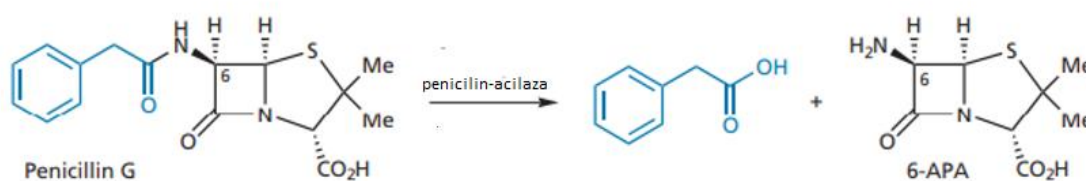
3.2. Benzilpenicilin, fenoksimetilpenicilin i sinteza penicilina V

Benzilpenicilin se još naziva i penicilin G te se proizvodi fermentacijom direktno iz *Penicillium crysogenum* mikroorganizama dodatkom feniloctene kiseline (slika 21).



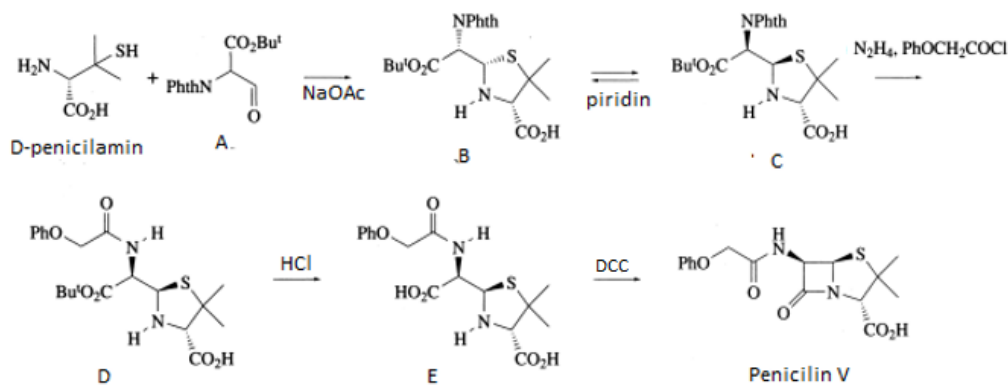
Slika 21. Strukturne formule benzilpenicilin i fenoksimetilpenicilin. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

Deacilira se hidrolitičkim enzimom amidazom koji uzrokuje cijepanje bočnog acilnog lanca zbog čega zaostaje 6-aminopenicilinska kiselina (6-APA) kao produkt (slika 22). Djeluje na gram-pozitivne koki bakterije te ne uzrokuje jake nuspojave. Međutim, u kiselim uvjetima se raspada zbog čega se mora uzimati intravenozno, a ne oralno. Neaktivan je protiv mnogih drugih bakterija, točnije svih onih koje proizvode β -laktamazu.^{1,14-17}



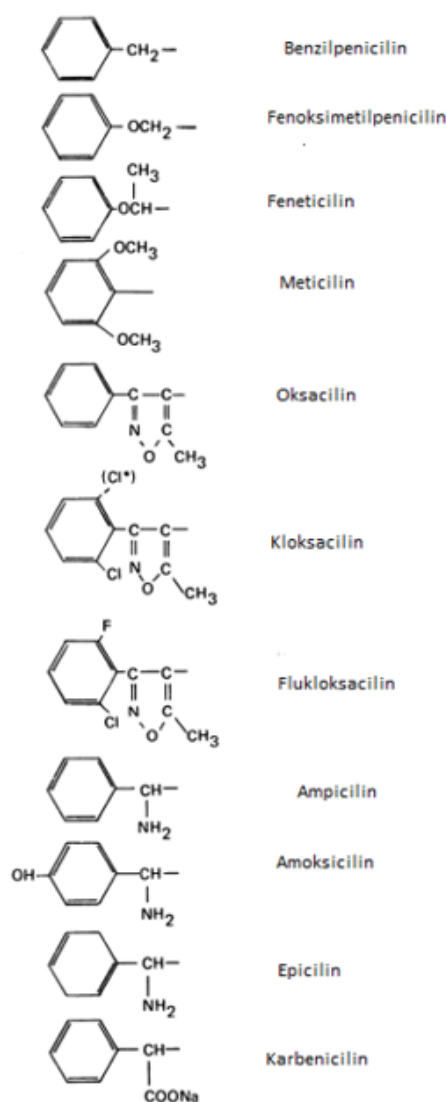
Slika 22. Deacilacija penicilina G amidazom penicilin-aci lazom. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹

Fenoksimetilpenicilin ili penicilin V proizvodi se fermentacijom uz dodatak fenoksiotene kiseline. Za razliku od penicilina G on se može unijeti oralno jer je stabilniji u kiselim uvjetima zbog elektronegativnog kisika na acilnom bočnom lancu koji ima elektron-odvlačeća svojstva zbog koje je stabilniji i otporniji na hidrolizu. Na slici 23 prikazana je sinteza penicilina V. U sintezi nastaje smjesa dva diastereoizomera tiazolidina, B i C. U prirodnom penicilinu je pronađen samo C stereoisomer zbog čega se B u sintezi mora epimerizirati u C. Dalje dolazi do zamjene ftalimidne skupine C s fenoksiacetilnom skupinom u derivatu D, hidrolize esterske skupine u kiselim uvjetima te na kraju zatvaranja prstena uz pomoć karbodiimidnog reagensa.¹⁸



Slika 23. Sinteza penicilina V. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

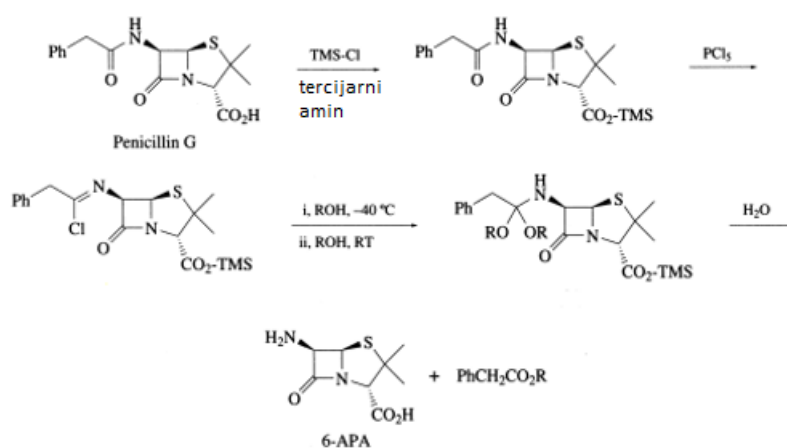
Kao što je prethodno rečeno mijenjanjem acilnih lanaca pripravlja se različiti analozi penicilina. Tako su pripremljeni analozi penicilina s acilnim lancima poput onih prikazanih na slici 24.



Slika 24. Bočni lanci raznih analoga penicilina. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

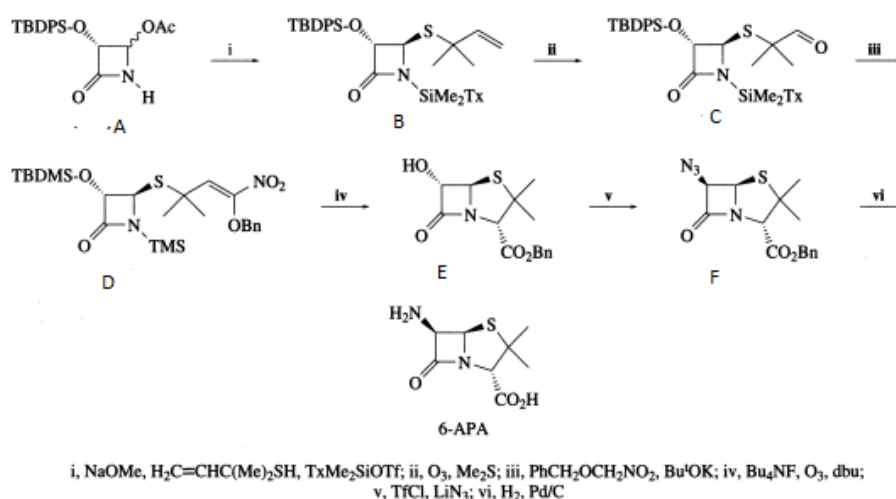
3.3. 6-aminopenicilinska kiselina (6-APA) i njezini derivati

6-APA je moguće prirediti iz uzgojenog *Penicillium chrysogenum* mikroorganizma u fermentacijskom mediju bez karboksilne kiseline ili se može dobiti hidrolizom iz penicilina G (slika 22). Obzirom da je bočni lanac sekundarni amid, a u β -laktamskom prstenu je tercijarni amid, bočni lanac je taj koji se selektivno cijepa te kao produkt tog cijepanja izlazi 6-APA (slika 25).^{1,18,19}



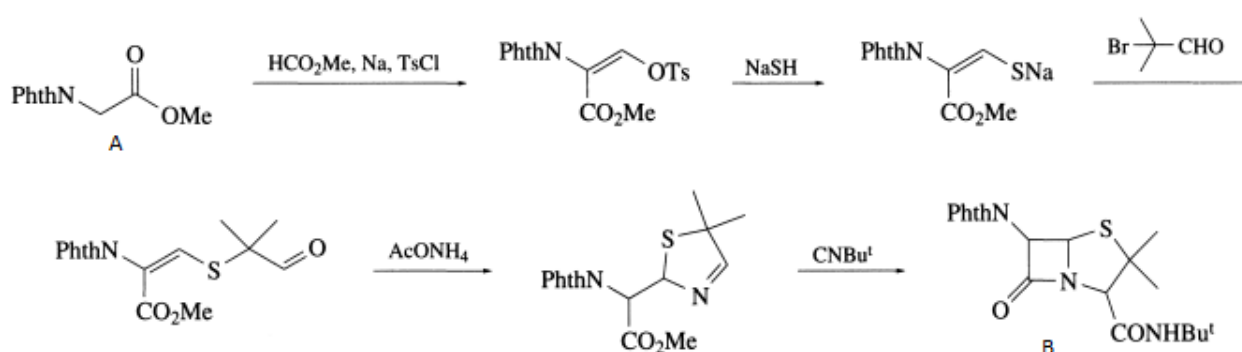
Slika 25. Priprava 6-APA iz penicilina G. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

6-aminopenicilinska kiselina može se sintetizirati i iz monocikličkog β -laktama A kao polaznog spoja (slika 26). Spoj B se dobiva na diastereoselektivan način iz A s 1-metil-3-butentiolom u bazičnim uvjetima. Spoj D je dobiven zamjenom alkenске skupine s aldehydom pri čemu nastaje spoj C te kondenzacijom s benziloksnitrometanom. Reakcija D sa prikazanim reagensima daje smjesu bicikličkog β -laktama s njezinim 3-epimerom. Baza DBU u koraku iv. uzrokuje potpunu epimerizaciju 3-epimera u spoj E. U spoju F uvođenjem azida također dolazi i do inverzije konfiguracije na tom položaju (slika 26).¹⁸



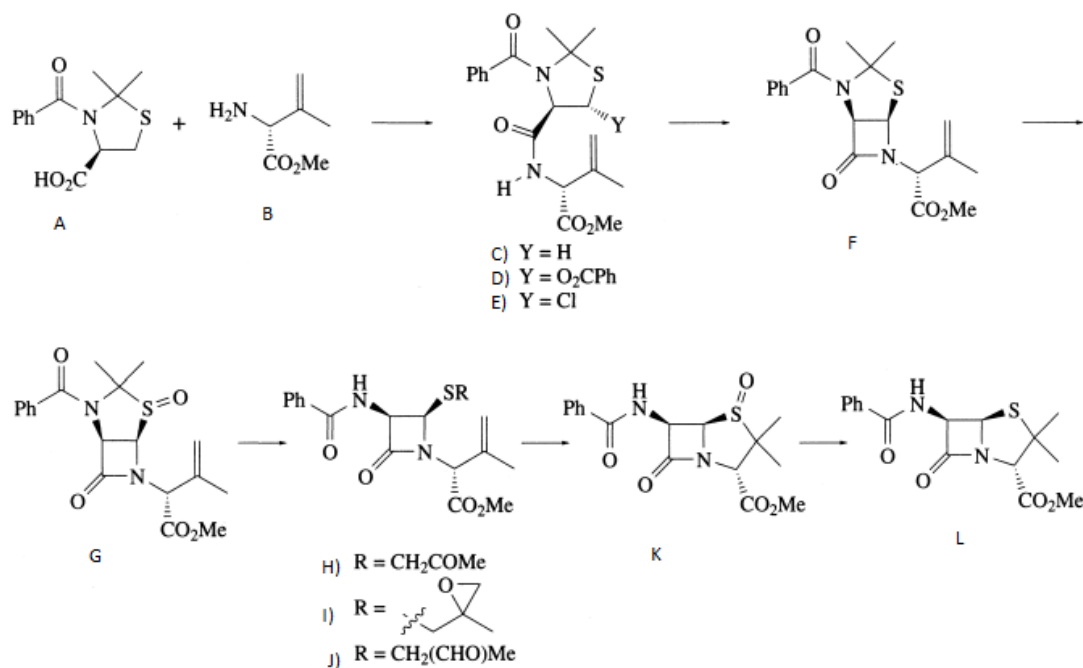
Slika 26. Sinteza 6-APA iz monocikličkog polaznog β -laktamskog derivata. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

Određeni derivati penicilina zahtjevni su za dobiti modifikacijama prirodnih penicilina zbog čega su osmišljene njihove sintetske rute. Imidni derivat 6-APA (B, slika 27), dobiven je u sintezi kao smjesa diastereoizomera, a pripravljen je iz ftalilnog derivata metilnog estera glicina A. Ftalilni derivat metilnog estera glicina se prevede u međuprodukt s tosilnom skupinom koja se supstituira s natrijevim hidrosulfidom. Nakon tog koraka slijedi supstitucijska reakcija dobivenog derivata i 2-brom-2-metilpropanala. Dolazi do adicije dušika na dvostruku vezu te zatvaranja tiazolnog prstena. U konačnici nastaje manji, β -laktamski prsten čime se sintetizira derivat 6-APA.¹⁸



Slika 27. Sinteza imidnog derivata 6-APA¹⁸

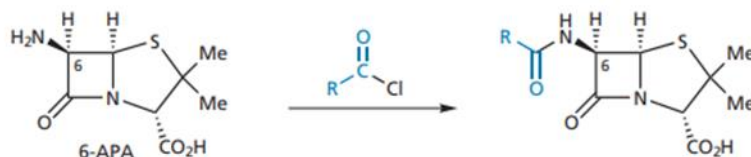
Spoj C (slika 28) je dobiven kondenzacijom zaštićenog L-cisteina A i D-izodehidrovalina B. *N*-benzoilom zaštićeni metini ester 6-APA L ima stereokemiju identičnu prirodnom produktu zbog čega je ta sinteza i prva stereokontrolirana sinteza prirodnog penicilina.¹⁸



Slika 28. Sinteza *N*-benzoiлом zaštićenog metilnog estera 6-APA. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

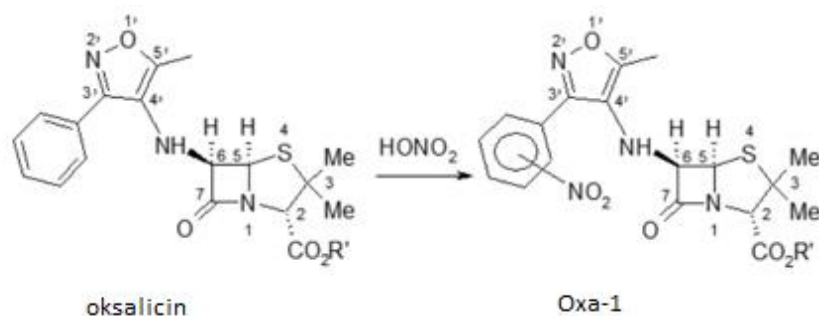
3.3.1. Priprava ostalih derivata penicilina

Analozi penicilina mogu se prirediti fermentacijom tako što se fermentacijski medij mijenja, tj. mijenja se derivat karboksilne kiseline koji se dodaje u njega o čemu ovisi koji će se penicilinski derivat pripremiti. Međutim, fermentacijom se mogu sintetizirati samo određeni broj penicilinskih analoga pošto je moguće koristiti samo one kiseline koje imaju opću formulu RCH₂CO₂H. Osim fermentacijom moguće ih je prirediti i polusintetskim postupkom koji kao polazni spoj koristi 6-APA koji se onda tretira acil-kloridom (slika 29).^{1,18}



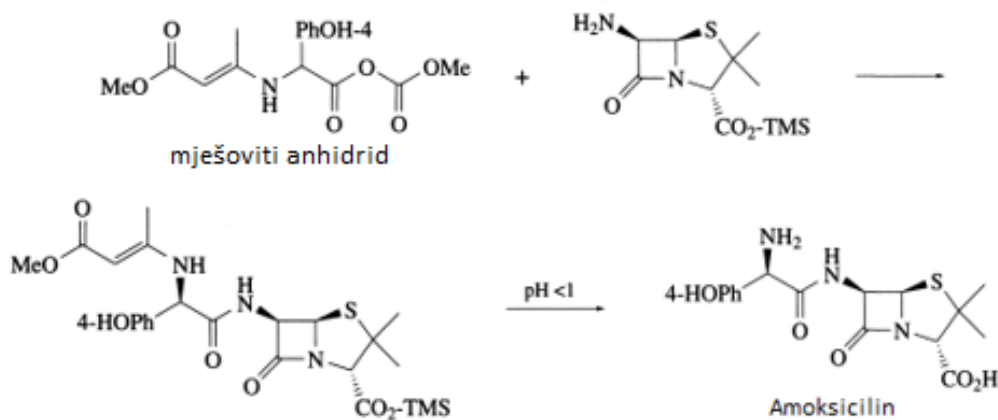
Slika 29. Sinteza analoga penicilina aciliranjem 6-APA.¹

Derivat Oxa-1 dobiven je nitriranjem oksalicina (slika 30) no pokazalo se da NO₂ skupina ne doprinosi boljoj aktivnosti.²⁰



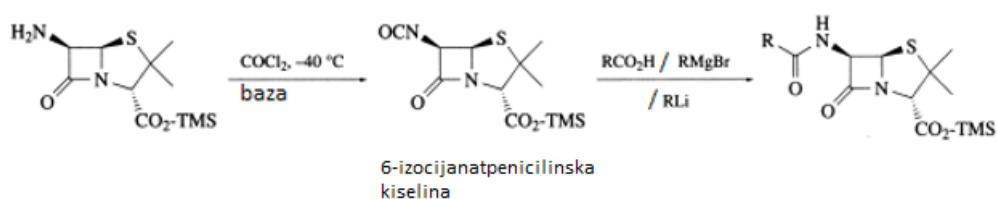
Slika 30. Sinteza Oxa-1. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.²⁰

Amoksicilin (slika 31) se dobiva sintezom temeljenom na ruti mješovitog anhidrida karboksilne i ugljične kiseline. Općenito se takav mješoviti anhidrid priprema iz karboksilnih kiselina, trietilamina i alkil-klorokarbonata u inertnom otapalu te oni aciliraju dietil-malonatne i dietil-etilmalonatne derivate. Također sudjeluju u sintezi amidnih veza. U sintezi amoksicilina mješoviti anhidrid je dobiven iz kalij (*R*)-((3-etoksi-1-metil-3-oksopropiliden)amino)fenilacetata, dobivenog reakcijom metil-acetoacetata i 4-hidroksifenilglicina, s metil-kloroformatom u bazičnim uvjetima (slika 30).^{18,21}



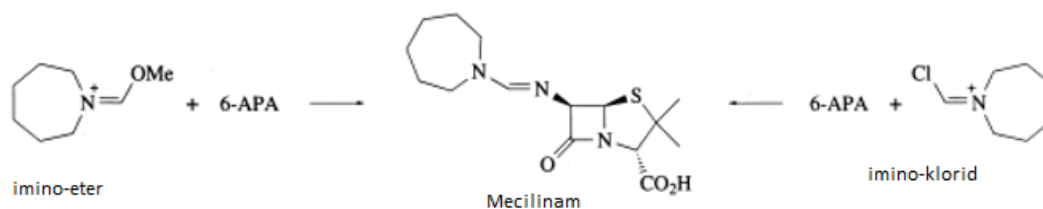
Slika 31. Sinteza amoksicilina iz mješovitog anhidrida. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

Polusintetski penicilini se mogu prirediti i reakcijom 6-izocijanatpenicilinske kiseline s karboksilnom kiselinom ili organometalnim reagensom (slika 32)¹⁸



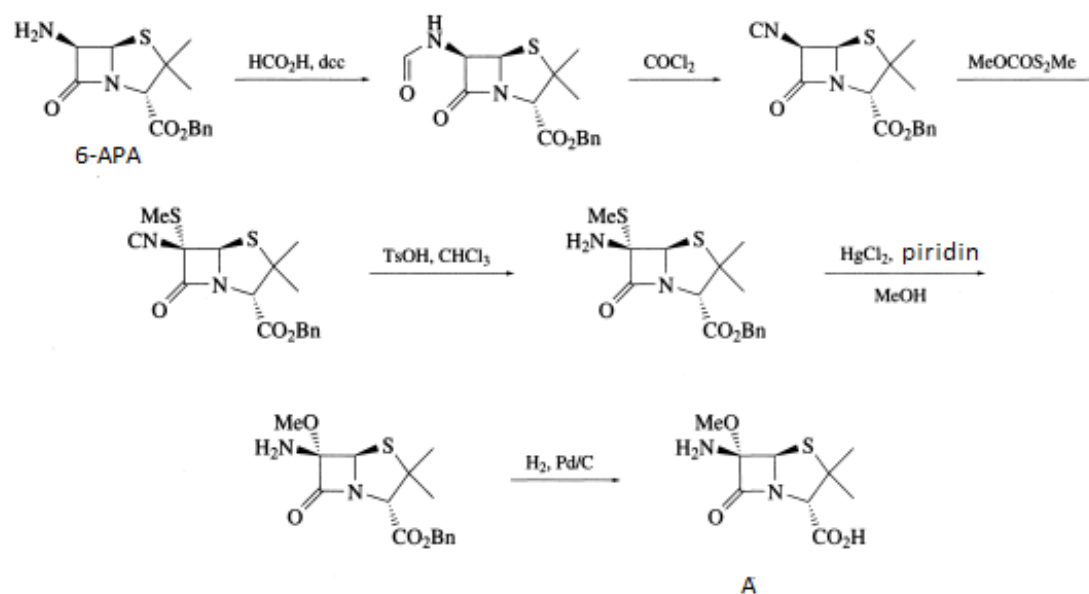
Slika 32. Sinteza penicilinskih derivata uporabom organometalnih reagensa. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

Kondenzacijom 6-APA s imino-kloridom ili imino-eterom sintetizira se mecilinam (slika 33). U svojoj strukturi ima 6- β -formiminoilnu skupinu te djeluje na gram-negativne bakterije tako da se veže na vezni protein penicilina 2 (PBP2) te uzrokuje promjenu štapičastog oblika stanice u ovalni oblik.^{18,22}



Slika 33. Sinteza mecilinama. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

U sintezi temocilina potrebno je za početak sintetizirati njegov prekursor, 6- α -metoksi-6- β -aminopenicilansku kiselinu (A, slika 34). 6-APA se najprije acilira te nastaje međuprodukt koji u reakciji s fozgenom supstituira amino-aldehidnu skupinu cijano-skupinom. Nadalje dolazi do uvođenja sulfidne i cijano-skupine nakon čega slijedi nukleofilna supstitucija kojom se uvodi metoksi-skupina. Na kraju se hidrogenolizom uklanja benzilna zaštita.¹⁸



Slika 34. Sinteza 6- α -metoksi-6- β -aminopenicilanske kiseline (A). ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.¹⁸

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. G. L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 5. Ed., Oxford University Press, Oxford, 2013, str. 299-306, 446-467.
2. <https://www.britannica.com/science/tropical-disease> (datum pristupa 18.5.2023)
3. <https://www.azolifesciences.com/article/Modern-Challenges-of-Drug-Discovery.aspx> (datum pristupa 18.5.2023)
4. P. Ellis, Nihad A. M. Tamimi, *Nephron Clin. Pract.* **113** (2009) 125-131.
5. <https://www.biostock.se/en/2023/01/drug-development-the-four-phases/> (datum pristupa 25.5.2023)
6. <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/in-vivo-vs-in-vitro-definition-pros-and-cons-350415> (datum pristupa 24.5.2023)
7. A. Bhide, S. Datar, K. Stebbins, *Cephalosporins: Case Histories of Significant Medical Advances*, Harvard Business School, 2020, str. 5-10.
8. C. Garcia-Estrada, J.-F. Martin, *Compr. Biotechnol.* **3** (2011) 255-268.
9. N. T. Khan, *Enz. Eng.* **6** (2017) str. 159.
10. A. Mikulić, *Istraživanje odnosa između strukture i djelovanja β-laktama*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2016, str 5-10.
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/> (datum pristupa 16.6.2023)
12. C. Kamei, A. Sunami, K. Tasaka, *Epilepsia* **24** (1983) str. 431-439.
13. <http://www.antimicrobe.org/d24.asp> (datum pristupa 22.6.2023)
14. S. S. Castle, *Penicillins, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007, str. 1-6.
15. P. Kumar, *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, Elsevier, 2017, str. 457-487.
16. M. Farrington, *Clinical Pharmacology* (2012) str. 173-190
17. A. P. Bell, J. A. Gray, J. M. Murdoch, *Antibacterial Drugs Today* (1978) str. 6-18.
18. Johann T. B. H. Jastrzebski, G. VanKoten, *Penicillins, Comprehensive Heterocyclic Chemistry II.* **1B** (1996) str. 623-658.
19. S. Kundu, I. Chakravarty, S. Ojha, K. Kundu, *Applied Microbiology and Bioengineering* Elsevier, 2019, str. 163-183.

20. L. Sekhri, M. L. Kadri, C. Samira, M. Sengira, *Biomed. Pharmacol. J.* **1** (2008) str. 257-264
21. R. H. W. Bender, *Dane salt and process for preparing aminopenicillins therefrom*, U. S. Patent 4231954A, 1980.
22. D. G. Allison, P. A. Lambert, *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, **1**, 2015, str. 583-598.