

# Interakcija lijekova i bioaktivnih molekula

---

Kostelac, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:979051>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Lucija Kostelac

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJE

# **INTERAKCIJA LIJEKOVA I BIOAKTIVNIH MOLEKULA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2023.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

13.srpnja 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:



## Tablica sadržaja

§ SAŽETAK.....	7
§ 1. UVOD.....	VIII
1.1. Bioaktivne molekule.....	viii
1.2. Nuklearna magnetska rezonancija .....	viii
1.2.1 tehnike NMR .....	8
1.2.2. pronalaženje i validiranje lijeka tehnikama NMR .....	11
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....	XII
2.1. Interakcije lijekova s ljudskim serumskim albuminom .....	xii
2.1.2. Interakcije snimane tehnikom 1D <sup>1</sup> H NMR .....	12
2.1.2. Istraživanje kompetitivnog vezanja difuzijskim eksperimentima NMR .....	15
2.1.3. Interakcije proučavane eksperimentima STD NMR .....	17
2.2. Interakcije prekursora makrozona i ribosoma <i>E. coli</i> .....	xviii
2.3. Zaključak.....	xxi
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	22



## § Sažetak

Molekule poput lijekova imaju sposobnost vezanja na protein čime modificiraju aktivnost proteina. Za dizajniranje lijekova potrebno je razumijevanje molekulskih mehanizama važnih bioloških procesa i interakcija bioloških makromolekula i liganada. Jedna od pogodnih metoda za proučavanje tih interakcija je spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) zbog mogućnosti istraživanja slabih interakcija i vezanja lijekova i proteina pri vrlo visokoj rezoluciji. Spektroskopija NMR se koristi za procjenu strukturnih, termodinamičkih i kinetičkih aspekata reakcije vezanja.



## § 1. UVOD

### 1.1. Bioaktivne molekule

Bioaktivne molekule su spojevi koji se mogu dobiti iz prirodnih izvora poput biljaka, životinja, mikroorganizama ili se mogu sintetizirati. Bioaktivne molekule svoje djelovanje ostvaruju interakcijama s proteinima ili nekim drugim makromolekulama. Često mogu imati više od jedne mete na koju djeluju, a poznavanje ciljeva bioaktivnih molekula je ključno za predviđanje nepovoljnih nuspojava koje mogu nastupiti zbog interakcija s molekulama koje nisu ciljne molekule ili za promjenu korištenja lijeka za druge bolesti ukoliko su otkriveni novi ciljevi molekula.

Najvažnije biološke makromolekule su proteini jer oni upravljaju ključnim strukturnim i funkcijskim svojstvima staničnog sustava. Za razumijevanje molekuskog mehanizma u pozadini staničnih procesa potrebno je poznavati strukturalne interakcije koje tvore proteini s drugim proteinima ili s drugim biološkim molekulama poput nukleinskih kiselina, polisaharida i lipida. Kako bi se dizajnirali lijekovi potrebno je dobro poznavanje načina na koji se te interakcije ostvaruju.

Za proučavanje tih interakcija najkorisnija je spektroskopija NMR, pomoću ove tehnike dobivamo uvid u interakcije liganda i proteina na atomskoj razini. Nadalje, ova tehnika pruža informacije o konformacijskim promjenama koje mogu nastupiti uslijed vezanja proteina i liganda.

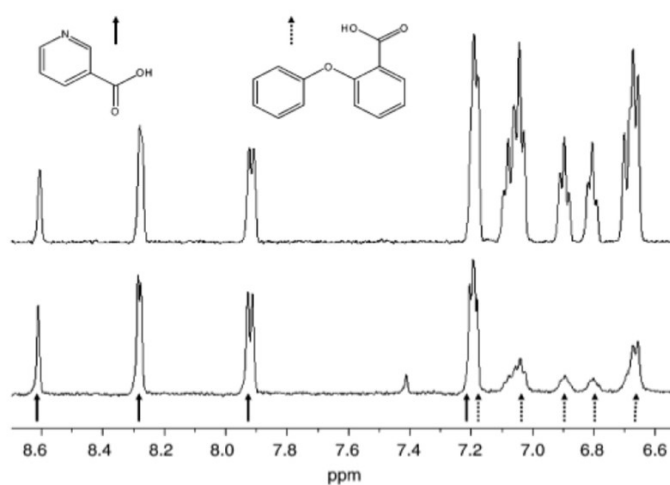
### 1.2. Nuklearna magnetska rezonancija

#### 1.2.1. Tehnike NMR

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je jedna od najpogodnijih metoda za proučavanje struktura molekula. Za snimanje spektara dovoljno je koristiti malu količinu uzorka te se tijekom provođenja mjerenja uzorak ne uništava. Kako bi jezgra bila zabilježena u spektru NMR mora imati nuklearni spin, a to su one jezgre s neparnim atomskim ili masenim brojem. Zato se proučavaju jezgre  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  i najčešće  $^1\text{H}$ . Također je ova

metoda jedna od najboljih koja se koristi u razvoju lijekova, zbog toga što direktno može zabilježiti interakcije liganda i proteina, uzorci se mogu snimati u nativnim uvjetima, vrlo je efikasna metoda te daje uvide o veznim mjestima i afinitetima vezanja. Vrsta informacija o vezanju liganda i proteina ovisit će o tome koristi li se eksperiment NMR temeljen na proučavanju liganda ili mete, najčešće proteina.

U eksperimentu u kojem se detektiraju signali liganda proučava se ligand u veznom i neveznom stanju. Razlika između ta dva stanja liganda je u masi jer će kompleks ligand-protein imati znatno veću molekulsku masu što utječe na mnoge parametre. Molekule male molekulske mase će imati sporije vrijeme relaksacije, negativne križne signale NOE i velike difuzijske koeficijente, a nakon vezanja ligand poprima svojstva proteina te će imati duže vrijeme relaksacije, pozitivne križne signale NOE i smanjen difuzijski koeficijent. Većina eksperimenata koja su temeljena na ligandu koriste jedno-dimenzijsku tehniku  $^1\text{H}$  NMR za praćenje tih promjena. Metoda je brza i potrebno su vrlo male količine proteina te nije potrebno izotopno označavanje proteina. Postoji više tehnika koje su temeljene na detekciji signala liganda poput tehnika STD NMR, WaterLOGSY, SLAPSTIC, TINS, trNOE. Odabir tehnike ovisit će o ciljnom proteinu. U spektru na slici 1. vidimo primjer eksperimenta NMR u kojem dolazi do širenja linija kada se jedna komponenta iz smjese koja se sastoji od dvije komponente veže na ciljni protein. To je spektar nikotinske kiseline ( lijevo ) i 2-fenoksibenzilne kiseline (desno) u smjesi bez proteina (gornji spektar) i u smjesi s proteinom (donji spektar). Iz spektra se uočava proširenje linija za 2-fenoksibenzilne kiselinu što upućuje na vezanje te komponente na protein.



Slika 1. Spektar  $^1\text{H}$  NOESY nikotinske kiseline (lijevo) i 2-fenoksibenzilne kiseline (desno) u otopini bez proteina (gornji spektar) i sa dodatkom proteina ( donji spektar).<sup>2</sup>

Metode koje se temelje na detekciji signala mete fokusiraju se na protein te prate kemijski pomak koji se događa u spektru proteina uslijed vezanja s ligandom. Dvodimenzijske tehnike NMR koje se koriste u tu svrhu uključuju  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, TROSY i sl.. Vrijeme eksperimenta je duže od jednodimenzijskih tehnika te protein treba biti  $^{15}\text{N}$  ili  $^{13}\text{C}$  izotopno obilježen, a potrebne su i veće količine proteina. Također daje dodatne informacije o veznom mjestu što ne možemo dobiti jednodimenzijskim tehnikama.

Tehnikom  $^1\text{H}$  NMR mogu se mjeriti konstante disocijacije za kompleks protein-ligand preko promjena u širini linija ili kemijskom pomaku signala za ligande uslijed vezanja proteina. U tom slučaju širina linije koju bi imao slobodni ligand se mijenja te on poprima širinu linije proteina, linija se proširi te se u skladu s proširenjem visina signala smanji. Na temelju tih podataka iz spektra se može izračunati konstanta disocijacije kompleksa.

Tehnika STD NMR se temelji na Overhauserovom efektu. Overhauserov efekt je fenomen zbog kojeg će se intezitet signala određenog protona promijeniti, jer će doći do križne relaksacije s drugim protonom u njegovoj blizini kod kojeg je također došlo do promjene inteziteta signala. Dok se zasićeni proton, tj. onaj kojem je u potpunosti smanjen intezitet signala pokušava opustiti, primjenom dugog radiofrekvencijskog pulsa signali protona koji su u njegovoj blizini će se pojačati ako je u pitanju mala molekula ili smanjiti ako je u pitanju velika molekula. Za STD NMR to znači da se mali skup proteina može selektivno zasititi ozračivanjem pulsom male snage. Kada je ligand prisutan u veznom mjestu proteina zasićenje se prenosi na ligand čime se smanjuje intezitet signala liganda te će ti protoni liganada koji su najbliže makromolekulama imati najveće zasićenje pa će inteziteti njihovih signala biti najreduciraniji što omogućuje mapiranje vezanja liganada.

U spektru trNOESY velike molekule će proizvesti velike negativne signale, dok će male i srednje velike molekule davati pozitivne ili vrlo male negativne signale. Spektar trNOE će davati negativne križne signale jer će u vezanom stanju, tj u kompleksu protein-ligand, molekula male molekulske mase poprimiti ponašanje velike biomolekule. Kako bi mjerenje bilo uspješno vrijeme miješanja treba biti dovoljno kratko kako bi doprinos signala NOE slobodnih liganada bio zanemariv te treba odrediti optimalan omjer molekula liganda i ciljnog proteina. U prisutnosti proteinskog receptora, vezani ligand će davati negativne signale NOE, dok će nevezni ligand pokazivati slabe pozitivne signale. Zbog tih

karakteristika ta je metoda pogodna za proučavanje konformacije koju poprima kompleks koji nastaje vezanjem malog liganda i proteina.

### 1.2.2. pronalaženje i validiranje lijeka tehnikama NMR

Jedan od glavnih ciljeva u istraživanju lijekova je pronaći i validirati ligand koji kasnije može biti razvijen u lijek. Proces pronalaženja lijeka se sastoji od nekoliko koraka, pronalaženje liganda koji ima potencijal biti razvijen u lijek, validacija te karakterizacija i optimizacija. Prvo je potrebno naći početnu potencijalnu molekulu te zatim slijedi validacija pomoću tehnika NMR što služi kao baza za daljnju karakterizaciju i optimizaciju. Validacija je potrebna jer se samo pouzdano validirani ligandi uključuju u skupa testiranja kao potencijalni lijekovi.

Zatim se provode eksperimenti vezanja liganada i proteina. Eksperimenti koji promatraju vezanje proteina otkrivaju informaciju o efektima koji se događaju vezanjem na protein, te informacije su potrebne kako bismo znali da određene interakcije dolaze od vezanja s ligandom, a ne sa nekim onečišćenjem u otopini. Eksperimenti koji promatraju vezanje liganda detektiraju efekte koji nastaju na ligandu uslijed vezanja. Također se provodi kontrola kvalitete validiranog liganda. Ligandi su devalidirani ukoliko uzrokuju agregaciju proteina ili ako ne pokazuju nikakve afinitete za vezanje na protein.

Tehnika *in-cell* NMR također je vrlo atraktivna metoda koja se koristi pri razvoju lijekova jer proučava kako će lijek reagirati u živim stanicama. Iako je vrijeme potrebno za identifikaciju općenito nekoliko mjeseci vrlo je pogodna za identifikaciju ukoliko su metode dobro proučene. Ta tehnika ima ulogu u razvoju inhibitora koji utječu na interakcije proteina i liganda te se tako mogu odrediti mjesta vezanja u smjesi koja se sastoji od više proteina, može pratiti efekt koji komponenta smjese ima na kompleks protein-protein u otopini.

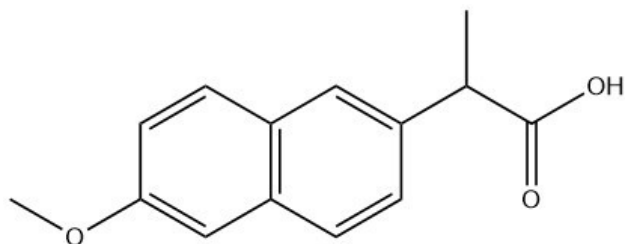
## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Interakcije lijekova s ljudskim serumskim albuminom

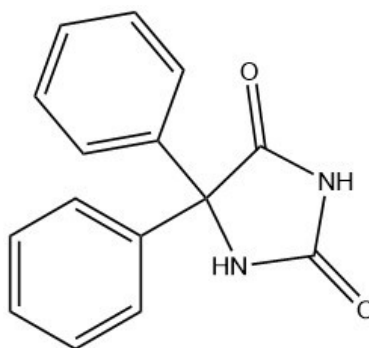
#### 2.1.1. Interakcije snimane tehnikom 1D <sup>1</sup>H NMR

Mjerenja temeljena na spektroskopiji NMR prate promjene u kemijskom pomaku ili promjeni širine linija, što služi kao sredstvo za identifikaciju određenih molekula koje se dalje koriste za razvoj lijekova. Ne mjeri se izravno afinitet vezanja, već se promatra smanjenje visine signala NMR liganda u prisutnosti proteina čime se prati nastajanje kompleksa protein- ligand. Spektri <sup>1</sup>H NMR malih molekula, molekulske mase manje od 500 Da, obično imaju izrazito oštre signale zbog spore relaksacije dipol-dipol te vezanjem na velike molekule poput proteina dolazi do širenja linija i do smanjenja visine signala liganda, jer će vezanom ligandu biti potrebno kraće vrijeme za relaksaciju.

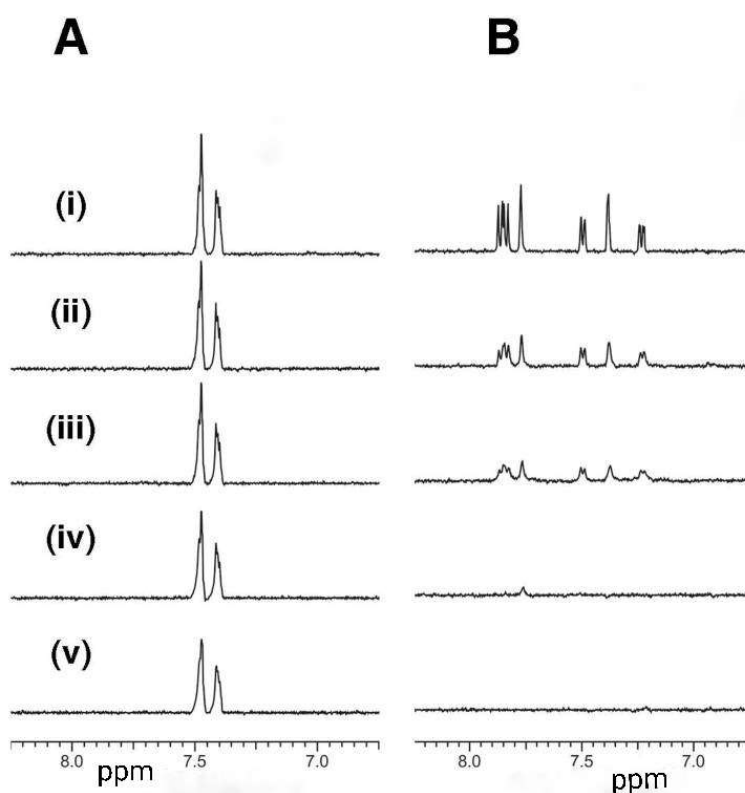
Lijekovi naproksen i fenitoin koncentracije 20  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  titrirani su otopinom ljudskog serumskog albumina različitih koncentracija. Koncentracije serumskog albumina su redom iznosile 0  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , 0,4  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , 1  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , 2  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  i 4  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Povećanjem koncentracije proteina dolazi do smanjenja signala NMR jer dolazi do vezanja liganda i proteina te vezani ligand poprima kraće vrijeme relaksacije. Smanjenje visine signala NMR proporcionalno je stupnju vezanja na način da se jače vezani ligandi brže opuštaju, u usporedbi s onima koji su slabije vezani. Iz dobivenih spektara se zatim može procijeniti konstanta disocijacije za kompleks protein-ligand (slika 4).



Slika 2. Struktura naproksena, izrađena u programu ChemDraw 19.0.



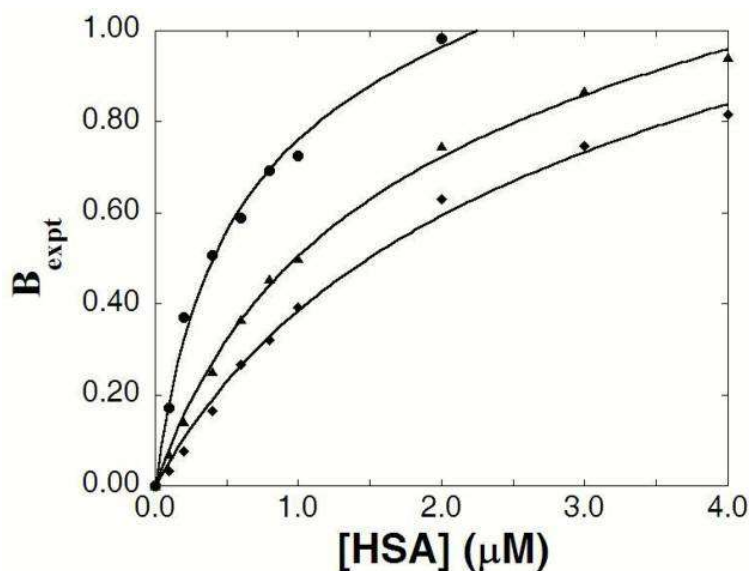
Slika 3. Struktura fenitoina, izrađena u programu ChemDraw 19.0.



Slika 4. Spektar  $^1\text{H}$  NMR titracije fenitoina (lijevo) i naproksena (desno) s ljudskim serumskim albuminom koncentracija  $0 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $0,4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  i  $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , odzgo prema dolje.<sup>4</sup>

Metoda je provjerena tako što su snimljeni spektri NMR uz korištenje liganda s ranije određenim afinitetima vezanja na ljudski serumski albumin. Ti ligandi su korišteni kako bi se istražila veza između procijenjenih vrijednosti konstante disocijacije i relativnih omjera visina signala u NMR spektru. Uzorci su sadržavali otopine liganada koncentracije  $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$  te

je koncentracija serumskog albumina postupno povećavana od 0 do 4  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  kako bi se dobila krivulja vezanja za svaki ligand (slika 5). Korištena su i dva nevezujuća liganda kao kontrola te u dobivenim spektrima nije došlo do smanjenja signala, što odgovara činjenici da se oni ne vežu na protein. Vrijednosti konstanti disocijacije koji su dobiveni iz podataka o širenju linija u spektru odgovaraju onima iz literature uz mala odstupanja zbog koji je došlo zbog varijacija u temperaturi, pH i puferkim uvjetima. Može se zaključiti da ova tehnika daje zadovoljavajuće rezultate za afinitete vezanja liganda i proteina.



Slika 5. Eksperimentalna frakcijska popunjenost za naproksen, tolbutamid i fenol crveno (s lijeva na desno) u ovisnosti o ukupnoj koncentraciji albumina.<sup>4</sup>

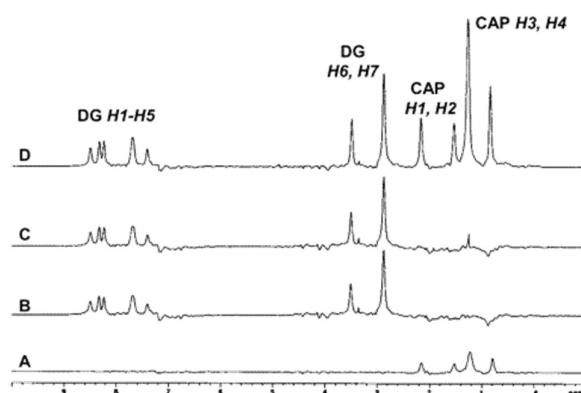
### 2.1.2. Istraživanje kompetitivnog vezanja difuzijskim eksperimentima NMR

Difuzijski eksperimenti NMR su od velike važnosti za kvalitativan opis mapiranja epitopa liganda jer daju informacije o vezanju liganda provođenjem difuzijskih eksperimenata s dugim vremenima difuzije od 500 do 1000 ms. U tom vremenu se može detektirati i *trNOE* koji je najviše izražen za funkcijske skupine liganda u neposrednoj blizini veznog mjesta proteina, što je direktan način za generiranje mape epitopa liganda.

Lijekovi se dizajniraju tako da su specifični za jedno vezno mjesto na ciljanom proteinu te je za optimalan dizajn potrebno karakterizirati i interakcije s neciljanim proteinima poput albumina. Difuzijskim NMR eksperimentima i eksperimentima NOE provodi se kvantitativna analiza vezanja liganda s ciljanim i neciljanim proteinima što pomaže u razumijevanju interakcija liganda i proteina, ali i interakcija liganda s drugim ligandima koji se mogu naći *in vivo*. Proučavanjem tih interakcija koje ligandi ostvaruju se može odrediti bioraspoloživost lijeka. Jakim vezanjem albumina i lijekova dolazi do smanjenja bioraspoloživosti i povećanja polu-života lijeka. Albumin je konformacijski fleksibilan što mu omogućuje da poprimi različite konformacije koje su približno jednakih energija što ga čini pogodnim za vezanje s više različitih liganada.

Provedene su analize vezanja albumina (HSA) s dansilglicinom (DG) i kaprilatom (CAP) što je dalo jedinstveni uvid u interakcije koje albumin istodobno ostvaruje i s dansilglicinom i kaprilatom. Pripremljene su otopine s različitim omjerima proteina i liganada. Omjeri su sljedeći 25:1 CAP:HSA, 25:1 DG:HSA, 25:1:1 DG:CAP:HSA, i 25:25:1 DG:CAP:HSA. Iz dobivenog spektra uočavamo smanjenje širina linija kada su oba liganda prisutna u uzorku što ukazuje na kompetitivno vezanje.





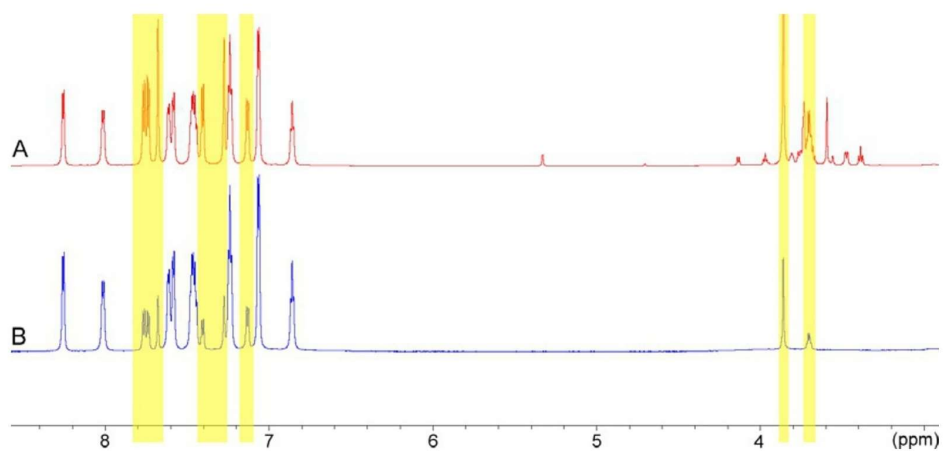
Slika 6. Spektar  $^1\text{H}$  NMR za dansilglicin i kaprilat s albuminom u sljedećim omjerima : (A) 25:1 CAP:HSA, (B) 25:1 DG:HSA, (C) 25:1:1 DG:CAP:HSA, and (D) 25:25:1 DG:CAP:HSA.<sup>6</sup>

Pri interakciji male molekule s mnogo većim proteinom dolazi do promjene difuzijskog koeficijenta te molekule. S obzirom da se spektroskopijom NMR ne mogu detektirati kiseli protoni, interakcije su proučavane preko metilenskih skupina u blizini karboksilatne skupine. Prema dobivenim podacima brzina difuzije dansilglicina se smanjuje vezanjem na albumin. Uvođenjem proteina dolazi do smanjenja koeficijenta difuzije, za dansilglicin se vrijednost smanjuje s  $4,98 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  na  $4,53 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , a za kaprilat s  $5,88 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  na  $4,12 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Opažena smanjenja ukazuju na to da se obje molekule vežu na protein. Dodatkom male količine kaprilata difuzijski koeficijent za dansilglicin iznosi  $4,44 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  te dodatkom veće količine kaprilata difuzijski koeficijent dansilglicina iznosi  $4,71 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  što ukazuje na to da kaprilat kompetitivno zamjenjuje dansilglicin. Difuzijski koeficijent kaprilata se značajnije mijenja dodatkom dansilglicina, u iznosu od 38% u odnosu na difuzijski koeficijent kada je prisutan samo protein. Povećanjem difuzijskog koeficijenta i smanjenjem širine linije (slika 6.) ukazuje na to da su ligandi kompetitivni za vezanje na albumin.

### 2.1.3. Interakcije proučavane eksperimentima STD NMR

Koristeći se eksperimentima STD NMR možemo snimati spektre komponenata smjese istovremeno, ta smjesa se sastoji od proteina i smjese liganda čije spektre želimo snimiti i čije vezanje želimo proučavati. Vezane i nevezane ligande zatim možemo razlikovati usporedbom spektra dobivenog eksperimentom STD NMR i referentnog spektra. Komponente smjese čiji se signali pojavljuju u oba spektra su oni koji se vežu na određeni protein dok oni čiji je signali vidljiv samo u referentnom spektru su oni koji se ne vežu na određen protein. Komponente se biraju tako da imaju dovoljan broj različitih signala  $^1\text{H}$  kako bi se mogli razlikovati u dobivenim spektrima.

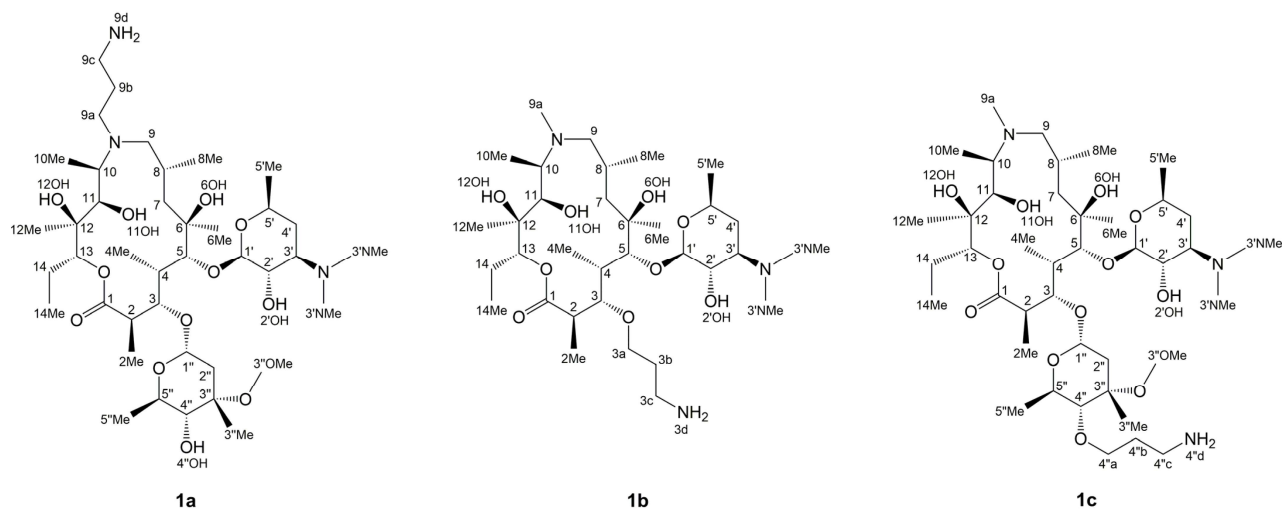
Provedeni su eksperimenti STD NMR koristeći uzorak koji je sadržavao  $22 \mu\text{mol dm}^{-3}$  albumina (HAS) i  $6 \text{ nmol dm}^{-3}$  naproksena,  $6 \text{ nmol dm}^{-3}$  8-anilinaftalen-1-sulfonske kiseline i  $6 \text{ nmol dm}^{-3}$  saharoze. Snimljeni su i spektri za svaki sastojak uzorka pojednično kako bismo mogli identificirati komponentne uzorka. Iz referentnog spektra (slika 7, gornji spektar) možemo jasno razlikovati pojedine komponentne smjese te usporedbom referentnog spektra i spektra STD NMR (slika 7, donji spektar) na kojem su vidljivi signali naproksena i 8-anilinaftalen-1-sulfonske kiseline možemo zaključiti da se naproksen i 8-anilinaftalen-1-sulfonska kiselina vežu na HSA dok se saharoza ne veže.



Slika 7. Referentni spektar otopine koja sadrži albumin, naprosken i saharozu (spektar A) i spektar STD NMR otopine koja sadrži albumin, naprosken i saharozu (spektar B), žuto označeni signali odgovaraju naproksenu.<sup>8</sup>

## 2.2. Interakcije prekursora makrozona i ribosoma *E. coli*

Makrozoni pripadaju novoj klasi konjugata azitromicina i tiosemikarbazona koji pokazuju vrlo dobro antibakterijsko djelovanje protiv rezistentnih bakterijskih sojeva, kao što su *S. aureus* i *S. pneumoniae*. Neki od prekursora su prikazani na slici 8. Jedan od ključnih faktora u dizajniranju molekula aktivnih na rezistentne sojeve je poznavanje načina na koji se lijekovi vežu za bakterije te konformacije koje poprimaju. Makrolidni antibiotici, poput azitromicina, u kliničkoj su uporabi više od 50 godina zbog visoke učinkovitosti, sigurnosti i povoljne farmakokinetike. Makrolidi se vežu za 23S rRNA 50S podjedinice, u blizini centra peptidil transferaze (PTC), blokiraju izlazni tunel peptida i tako inhibiraju sintezu bakterijskih proteina. Neki od mehanizama rezistencije na makrolide su modifikacije u meti ribosoma, inaktivacija spoja i mutacije u 23S rRNA.

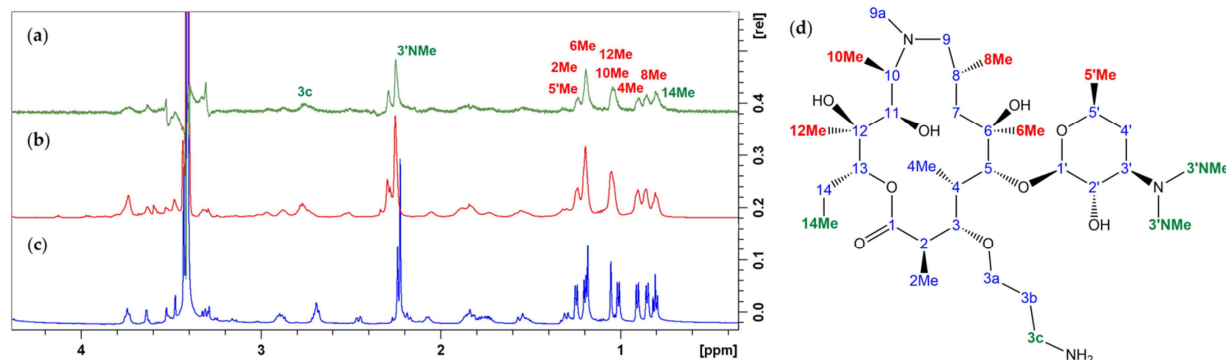


Slika 8. Strukture derivata aminopropil-azitromicina.<sup>11</sup>

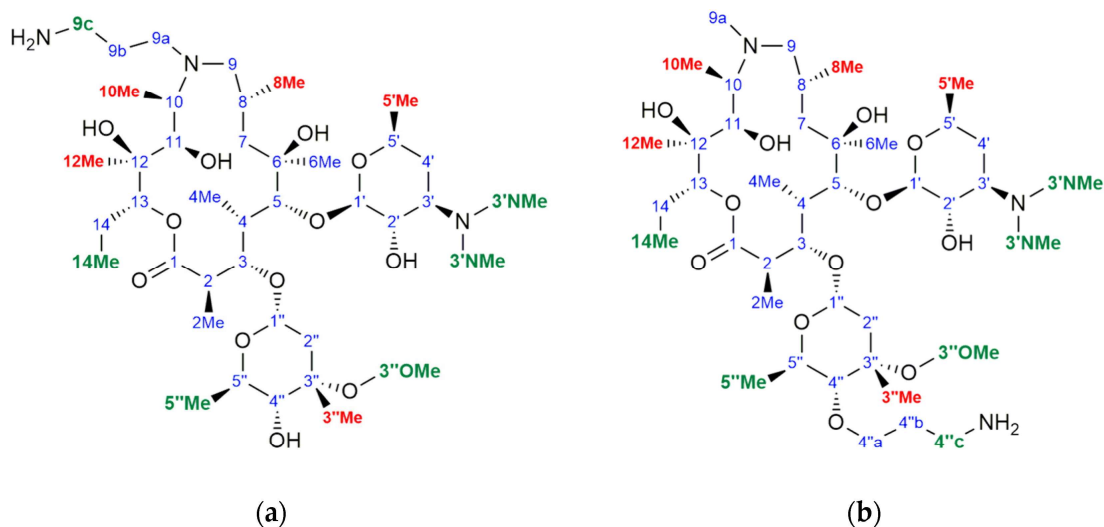
U otopini su molekule 1 (slika 8, krajnje lijeva molekula) i 3 (slika 8, krajnje desna molekula) u 3-*endo*-izvijenoj konformaciji dok je molekula 2 (slika 8, druga molekula s lijeva) u klasičnoj izvijenoj konformaciji, dok u u čvrstom stanju poprimaju slične strukture. Eksperimentom trNOESY NMR je potvrđeno vezanje na ribosom iz *E. coli* i dobiveni podaci upućuju na činjenicu da dominantne konformacije u vezanom stanju nalikuju onima u

nevezanom stanju. Pomoću spektara STD identificirane su reaktivne skupine molekula 1a, 1b i 1c u bliskom kontaktu s ribosomima koji nalikuju veznim epitopima promatranim za srodne makrolide, te su također uočene dodatne interakcije koje doprinose ukupnoj energiji vezanja promatranjem metilenskih protona u aminopropilnom bočnom lancu.

Za određivanje strukture prekursora makrozona u otopini korištene su jednodimenzijske tehnike  $^1\text{H}$  i DEPTQ i dvodimenzijske tehnike COSY i HMBC. Spektralnom analizom je potvrđena struktura koja je prikazana na slici 8. Provjerena je 3-*endo*-izvijena konformacija makrolida. Konstante sprežanja između protona H2 i H3 i kontakti NOE za protone H3-H11 i H4-H11 mogu poslužiti kao dobri pokazatelji savijanja aglikonskog prstena prema van jer će ti konformeru imati veće vrijednosti konstante sprežanja za H2 i H3 protone, oko 10 Hz i imat će veće torzijske kutove između atoma H2 i H3, oko  $\pm 180^\circ$ . Niže vrijednosti konstante sprežanja, oko 2–3 Hz te niži torzijski kutovi vrijednosti od oko  $100^\circ$  su specifični za konformere koji se savijaju prema unutra. Kako bi se ustanovilo dolazi li do promjena konformacije pri vezanju na ribosom snimljen je spektar NOESY u otopini za slobodne molekule i izmjerena je vrijednost konstante sprežanja između H2 i H3 protona. Molekula 1b je imala veliku vrijednost konstante sprežanja, približno 10 Hz i torzijski kut od  $180^\circ$  te su križni signali NOE bili karakteristični za konformaciju koja je savijena prema van. Molekule 1a i 1c u imale manje vrijednosti konstante sprežanja od oko 5–6 Hz i manje vrijednosti torzijskih kutova što potvrđuje strukturu 3-*endo*. Nadalje se spektroskopija NMR koristila kako bi se odredilo reagiraju li derivati aminopropilazitromicina s ribosomom *E. coli* te koje se strukturne promjene događaju pri vezanju. Većina signala NOE dobivenih iz otopine koja sadrži molekule 1a, 1b i 1c vezane na ribosom ukazuju na to da su im konformacije slične. spektar ROESY pokazuje da je većina signala identična. Spektar TrNOESY molekula 1a i 1c je vrlo sličan spektru NOESY te pokazuje da su dominantne konformacije 3-*endo*. Zatim su molekule podvrgnute eksperimentu STD u prisutnosti ribosoma *E. coli* kako bi se detektirali dijelovi strukture koji su u kontaktu s ribosomom i odredili vezni epitopi. Za molekulu 2 je uočen najveći prijenos zasićenja za metilneskupine na položajima 3' i 14' i za metilensku skupinu na 3c (slika 9). Značajan učinak STD također je primijećen za metilne skupine na položajima 5', 6', 8', 10' i 12'. Slično tome najjača pojačanja STD u molekulama 1a i 1c u za iste skupine te je uočen prijenos zasićenja za protone na položajima 3'' i 5'' (slika 10).



Slika 9. Spektar STD nakon dodatka ribosoma (gornji spektar), spektar STD izvan rezonancije (off-resonance) nakon dodatka ribosoma, protonski spektar prije dodatka ribosoma (odozgo prema dolje) za molekulu 2; kemijska struktura i oznake atoma za molekulu 2.<sup>11</sup>



Slika 10. Kemijska struktura i oznake atoma za molekule 1a i 1c.<sup>11</sup>

Na temelju eksperimenata trNOESY i STD pokazano je da se sva tri derivata aminopropilazitromicina vežu na ribosom i da su konformacije u veznom stanju slične onima u slobodnom stanju. Dodatni učinci STD primijećeni su za metilenske protone aminopropilnih skupina, što također ukazuje na interakciju protona NH<sub>2</sub> s ribosomom, ali se ne mogu uočiti u

spektrima zbog izmjene s deuterijem iz otapala. Te interakcije dodatno doprinose ukupnoj energiji vezanja.

### **2.3. Zaključak**

Lijekovi su neizbježan dodatak naših života, a kako bi oni bili učinkoviti potrebno je poznavanje točno na koji način takve molekule ostvaruju interakcije s bioaktivnim molekulama. U te svrhe se koristi spektroskopija NMR zbog svoje učinkovitosti, pouzdanosti i uvidima koje daje u interakcije koje bioaktivne molekule ostvaruju. Spektroskopija NMR ima mnoge prednosti naspram drugih metoda te je najkorištenija metoda u složenom i financijski zahtjevnom procesu otkrivanja molekula koje bi se koristile kao razni lijekovi.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. S.B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science*, **274** (1996) 1531-1534.
2. Jaime L Stark, Robert Powers, *Top Curr Chem* **326** (2012) 1-34.
3. A.L Skinner, J. S. Laurence, *J Pharm Sci* **97** (2008) 4670-4695.
4. M. D. Shortridge, D. S. Hage, G. S. Harbison, and R. Powers, *J Comb Chem.* **10** (2008) 948–958.
5. W. Becker 1, K. Chaitanya Bhattiprolu 1, N. Gubensäk 1, K. Zangger 1, *Chemphyschem* **19** (2018) 895-906.
6. S. Maity, R. K. Gundampati, T. K. S. Kumar, *ProteinSci* **14** (2018) 1-17.
7. T. Sugiki,1 K. Furuita,1 T. Fujiwara,1, C. Kojima, *Molecules* **23** (2018) 148.
8. S. Walpole, S. Monaco, R. Nepravishta, J. Angulo, *LWT--Food Science and Technology* **615** (2019) 423-451.
9. S. Kim, S. Lim, J. Choi, *Anim Cells Syst* **26** (2022) 254–265.
10. D. Gfeller, O. Michielin, V. Zoete, *Bioinformatics* **29** (2013) 3073–3079.
11. I.Mikulandra, T.Jednačak, B. Bertoša, J. Parlov Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Materials (Basel)* **14** (2021) 5561.
12. U. Brath 1, S.I Swamy 1, A.X Veiga 1, C. Tung 2, F.Van Petegem 2, M. Erdélyi 1, *J Am Chem Soc* **137** (2019) 1391-1408.
13. A. D. Gossert , W. Jahnke, *ScienceDirect* **97** (2016) 82–125.
14. G. Bai, B. Feng, J.B. Wang, E. Pozharski, M. Shapiro, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6756-6762.