

Priprava i karakterizacija 2-feniletil-, 3-piridil-, dimetil-izoksazol-4-il, 4-piperidilsulfonilfenil-i tetrahidro-3-furfuril-makrozona, novih konjugata makrolidnih antibiotika

Lulić, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:954724>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana-Marija Lulić

**Priprava i karakterizacija 2-feniletil-,
3-piridil-, 3,5-dimetilizoksazol-4-il-,
4-piperidilsulfonilfenil- i tetrahidro-3-furfuril-
makrozona, novih konjugata makrolidnih
antibiotika**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Ive Habinovec.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom "Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije" (šifra projekta: IP-2018-01.8098).

Zahvale

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku što mi je pružio priliku da radim na ovako zanimljivoj temi i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

Također, zahvaljujem neposrednoj voditeljici mag. chem. Ivi Habinovec na pomoći i ugodnoj atmosferi tijekom izrade eksperimentalnog rada, strpljenju i korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene i učinili mi ovaj period života najljepšim.

I naravno, hvala mojoj obitelji na neizmjernoj podršci i razumijevanju.

Sadržaj

SAŽETAK	V
ABSTRACT	VI
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Biosinteza proteina.....	3
2.2. Makrolidi.....	8
2.3. Sinteza novih derivata makrolida.....	14
2.4. Metode pročišćavanja i strukturne karakterizacije spojeva.....	25
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	29
3.1. Sinteza makrozona.....	29
3.2. Pročišćavanje makrozona	31
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1. Sinteza makrozona.....	33
4.2. Pročišćavanje makrozona tekućinskom kromatografijom	41
§ 5. ZAKLJUČAK.....	54
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	55
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	56
§ 8. DODATAK	VII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Priprava i karakterizacija 2-feniletil-, 3-piridil-, 3,5-dimetilizoksazol-4-il-, 4-piperidilsulfonilfenil- i tetrahidro-3-furfuril-makrozon, novih konjugata makrolidnih antibiotika

Ana-Marija Lulić

Makrolidi su velika klasa antibiotika koje karakterizira širok spektar antibakterijskog djelovanja i slična kemijska struktura. Građeni su od makrolaktonskog prstena na koji mogu biti vezane šećerne jedinice, najčešće desozamin i kladinoza. Zbog pretjerane upotrebe antibiotika u medicini, veterinarstvu i uzgoju biljaka, bakterije su razvile mehanizme otpornosti, a potencijalno rješenje ovog problema je sinteza i dizajn novih makrolida kemijskom modifikacijom već postojećih. Makrozoni su nova klasa derivata makrolidnih antibiotika u kojima je na poziciju 9a makrolaktonskog prstena vezana molekula tiosemikarbazona preko molekule poveznice. Sintetizirani su 2-feniletil-, 3-piridil-, 3,5-dimetilizoksazol-4-il-, 4-piperidilsulfonilfenil- i tetrahidro-3-furfuril-makrozon u tri reakcijska koraka. Dobiveni makrozoni pročišćeni su kromatografijom na koloni, a zatim su strukturno karakterizirani jednod- i dvodimenzijom spektroskopijom NMR.

(77 stranica, 53 slika, 5 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

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

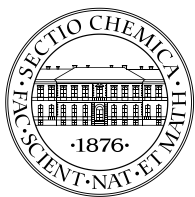
Ključne riječi: azitromicin, kromatografija, makrolidi, spektroskopija NMR, tiosemikarbazoni

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak
Neposredni voditelj: mag. chem. Iva Habinovec

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 27. 2. 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Preparation and characterization of a 2-phenylethyl-, 3-pyridyl-, 3,5-dimethylisoxazol-4-yl, 4-piperidylsulfonylphenyl- and tetrahydro-3-furfuryl-macrozone, new conjugates of macrolide antibiotics

Ana-Marija Lulić

Macrolides are a large class of antibiotics known for a wide range of antibacterial activity and similar chemical structure. Their structure is made up of a macrolactone ring to which sugar units may be attached, most commonly desosaminosis and cladinosis. Due to the overuse of antibiotics in medicine, veterinary medicine and cultivation of plants, bacteria have developed resistance mechanisms. Potential solution to this problem is the synthesis and design of new macrolides by chemical modification of existing ones. Macrozones are a new class of macrolide antibiotic derivatives in which a thiosemicarbazone molecule is attached to the position 9a of the macrolactone ring via linkage molecule. 2-phenylethyl-, 3-pyridyl-, 3,5-dimethylisoxazol-4-yl-, 4-piperidylsulfonylphenyl- and tetrahydro-3-furfuryl-macrozone were synthesized in three reaction steps. The resulting macrozones were purified by column chromatography and structurally characterized by one and two-dimensional NMR spectroscopy.

(77 pages, 53 figures, 5 tables, 53 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: Azithromycin, chromatography, macrozones, NMR, thiosemicarbazones

Mentor: Dr. Predrag Novak, Professor
Assistant mentor: mag. chem. Iva Habinovec

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Professor
2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Date of exam: February 27th, 2020

§ 1. UVOD

Prema definiciji antibiotici su kemijski spojevi koje proizvode različiti mikroorganizmi poput bakterija i gljivica. Otkriće penicilina 1928. godine pokrenulo je veliku revoluciju u liječenju različitih infektivnih bolesti, a do danas je otkriven velik broj antibiotika koji su pronašli široku primjenu ne samo u medicini, nego i u veterinarstvu i uzgoju biljaka. Antibiotici se najčešće koriste za liječenje bakterijskih infekcija uzrokovanih bakterijama *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* i brojnih drugih, no neki od njih pokazuju čak i antimalarijsko, antitumorsko i antiparazitsko djelovanje. Ovaj široki spektar spojeva može međudjelovati s pojedinim staničnim komponentama na različite načine i tako uzrokovati smrt bakterijske stanice. Antibiotici inhibiraju različite enzime koji kataliziraju reakcije neophodne za život i sudjeluju u reakcijama sinteze nukleinskih kiselina, proteina ili stanične stijenke.^{1,2}

MLS_B je skraćeni naziv za veliku skupinu antibiotika u koju pripadaju makrolidi, linkozamidi i streptogramin B. Ove skupine spojeva razlikuju se po kemijskoj strukturi, ali imaju sličnu antibakterijsku aktivnost i mehanizam djelovanja, a to je inhibicija biosinteze proteina. Jedna od najznačajnijih skupina antibiotika su makrolidi čiju strukturnu srž čini makrolaktonski prsten na koji mogu biti vezane različite funkcionalne skupine što uvelike definira njihovu biološku aktivnost. Makrolidi inhibiraju sintezu proteina na način da se vežu između peptidil-transferaznog centra, u kojem se odvija sinteza peptidne veze, i tunela kroz koji izlazi novorastući polipeptidni lanac. Jedan od najznačajnijih predstavnika ove skupine spojeva je azitromicin kojeg karakterizira povoljna farmakokinetika, široki spektar antibakterijskog djelovanja i vrlo dobra distribucija u tkivima u usporedbi s ostalim pripadnicima ove skupine spojeva.

Zbog prekomjerne upotrebe antibiotika bakterije su razvile nekoliko mehanizama otpornosti poput kemijske modifikacije veznog mjesta ili antibiotika i sinteze efflux pumpi koje smanjuju unos antibiotika u stanicu, stoga su dizajn i sinteza novih antibiotika postali veliki izazov.

Jedan od pristupa ovom problemu je kemijska modifikacija već postojećih antibiotika vezanjem određene funkcijske skupine na odabranu poziciju u makrolidnim antibioticima što potencijalno može rezultirati sintezom kemijskog spoja koji će pokazivati veću biološku aktivnost u odnosu na polaznu molekulu.³

Tema ovog diplomskog rada je sinteza, karakterizacija i pročišćavanje makrozona, nove klase spojeva dobivene konjugacijom makrolida i tiosemikarbazona. Opisana je sinteza tiosemikarbazona koristeći izotiocijanate kao polazne reaktante koji se vežu na 9a-(γ -aminopropil) derivat azitromicina preko molekule poveznice. Sintetizirani spojevi su pročišćeni kromatografijom na koloni, a potom su identificirani spektrometrijom masa i strukturno karakterizirani spektroskopijom NMR.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

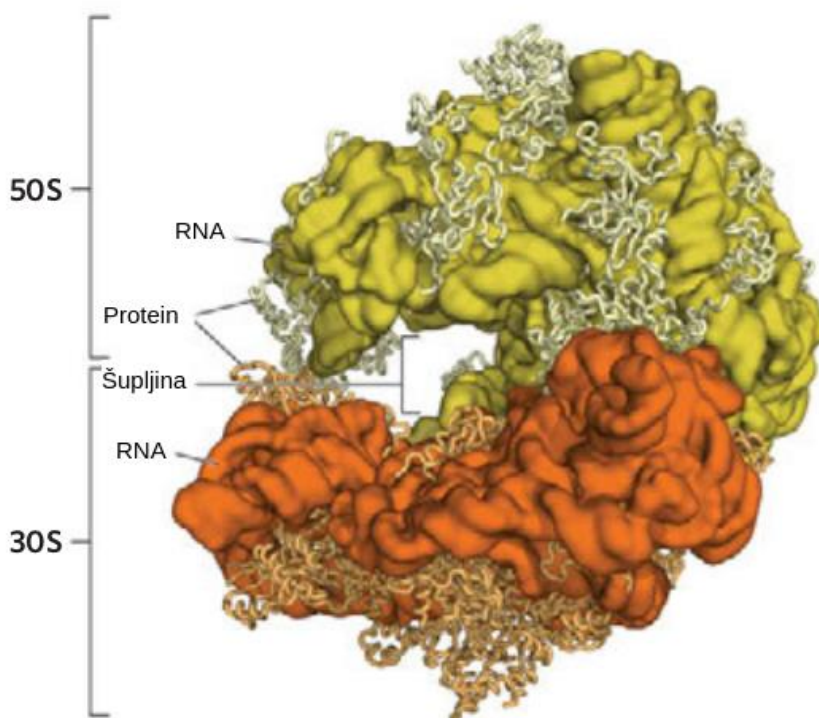
2.1. Biosinteza proteina

Sinteza proteina je iznimno važan i vrlo precizno reguliran biosintetski proces u kojem sudjeluje velik broj različitih makromolekula. Tipičnoj stanici potrebno je na tisuće proteina u svakom trenutku zbog čega je potrebno sintetizirati točno određenu količinu proteina koju stanica zahtjeva u određenom trenutku, transportirati ih na odgovarajuće ciljno mjesto i razgraditi ih kada više nisu potrebni. Na važnost sinteze proteina upućuju i činjenice da se 90 % kemijske energije utrošene u biosintetskim reakcijama troši upravo na biosintezu proteina i da 35 % suhe tvari stanice otpada na biosintetski sustav pri čemu ribosomi sačinjavaju 1/4 ukupne suhe tvari u stanici. Biosinteza proteina zahtjeva simultanu interakciju nekoliko stotina makromolekula uključujući ribosom, jedan od najkompleksnijih enzima, molekulu mRNA koja prenosi genetičku informaciju iz jezgre do ribosoma u citosolu, tRNA koja ima ulogu adaptera u dekodiranju genetičke informacije zapisane u mRNA, brojne kofaktore koji potpomažu sintezu proteina, itd.^{3,4}

2.1.1. Ribosom

Ribosom je veliki ribonukleoproteinski supramolekulski enzim koji katalizira biosintezu polipeptida, točnije reakciju sinteze peptidne veze. U molekuli mRNA genetička informacija zapisana je u obliku kodona, tj. tripleta nukleotida koju ribosom mora dekodirati kako bi sintetizirao polipeptid od pravilnog slijeda aminokiselina. Iznimno je važan odabir pravilnog okvira čitanja mRNA kako bi se osigurala točnost translacije. Bakterijski ribosom građen je od dvije različite podjedinice, velike 50S i male 30S podjedinice koje su sastavljene od ribosomske RNA (rRNA) i nekoliko ribosomskih proteina, a njegova struktura prikazana je na **slici 1**. Strukturnu srž ribosoma sačinjava molekula rRNA na koju otpada 2/3 mase ribosoma. Velika podjedinica građena je od 23S i 5S rRNA i sadržava aktivno mjesto, tj. peptidil-transferazni centar. U maloj podjedinici, koja se sastoji od 16S rRNA, nalazi se vezno mjesto za mRNA. Uočeno je da je u radijusu od 18 Å strukturne srži ribosoma, u kojoj se nalazi peptidil-transferazni centar, prisutna samo molekula rRNA što znači da je ribosom zapravo ribozim, tj. enzim čije aktivno mjesto sačinjava molekula RNA.⁵

Katalitički aktivan ribosom formira se u 2 koraka. Prvi korak uključuje formiranje predinicijacijskog kompleksa male podjedinice, mRNA i tRNA na koju je vezana aminokiselina metionin kodirana start-kodonom. U drugom koraku dolazi do interakcije male i velike podjedinice uz posredovanje inicijacijskih faktora IF1, IF2 i IF3.⁶



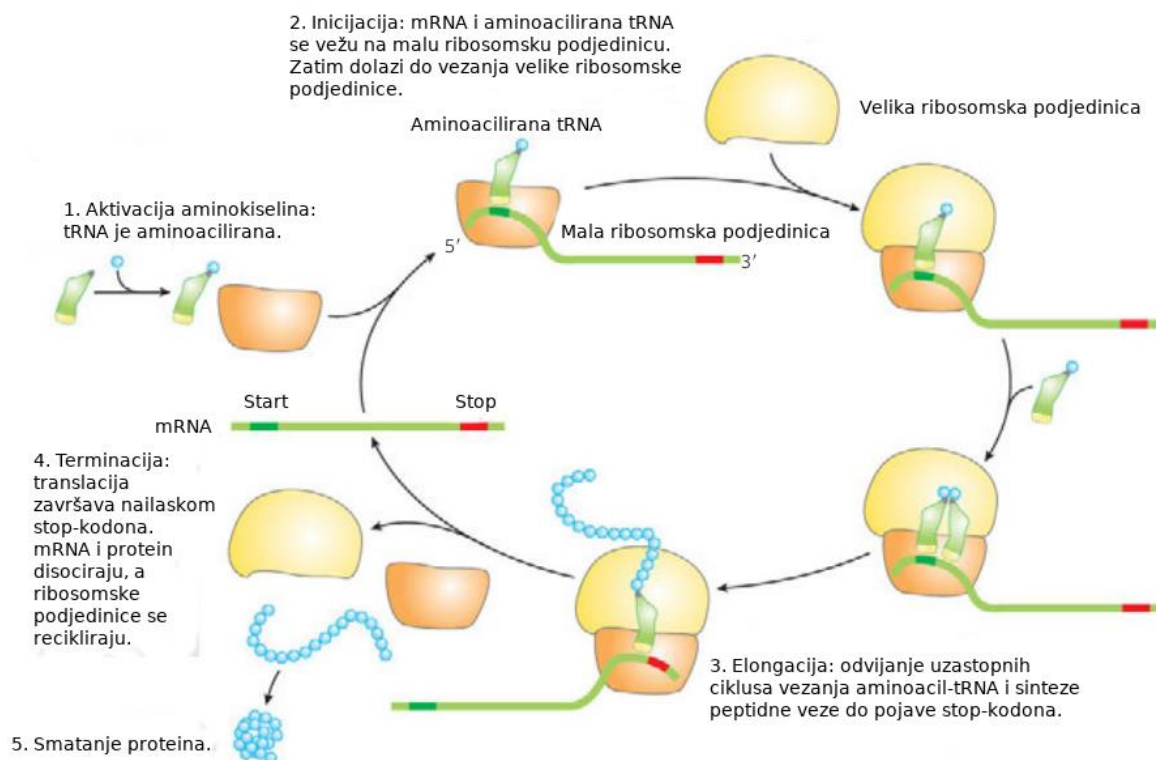
Slika 1. Struktura bakterijskog ribosoma.³

2.1.2. Translacija

Translacija, tj. biosinteza proteina, sastoji se od 5 koraka, a to su: aktivacija aminokiselina, inicijacija, elongacija, terminacija i recikliranje ribosoma, te posttranslacijska dorada polipeptida prikazanih na **slici 2**.

Prvi korak biosinteze proteina uključuje aktivaciju aminokiselina. Za biosintezu polipeptida prvo je potrebno dekodirati slijed mRNA, tj. kodone koji kodiraju jednu od 20 različitih aminokiselina. Aminokiseline ne stupaju izravno u interakciju s mRNA nego se enzimatski vežu na molekulu tRNA koja ima ulogu adaptera. Molekula tRNA sadrži antikodonsku sekvencu koja stupa u interakciju s kodom mRNA i veznim mjestom za odgovarajuću aminokiselinu. U stanici postoji tRNA specifična za svaku aminokiselinu. Reakcija

kovalentnog vezanja aminokiselina na tRNA odvija se u citosolu, a katalizirana je enzimima koji se nazivaju aminoacil-tRNA-sintetaze. U ovoj reakciji je od iznimne važnosti vezanje pravilne aminokiseline na odgovarajuću molekulu tRNA, a aminoacil-tRNA-sintetaze posjeduju nekoliko mehanizama kojima će to osigurati.

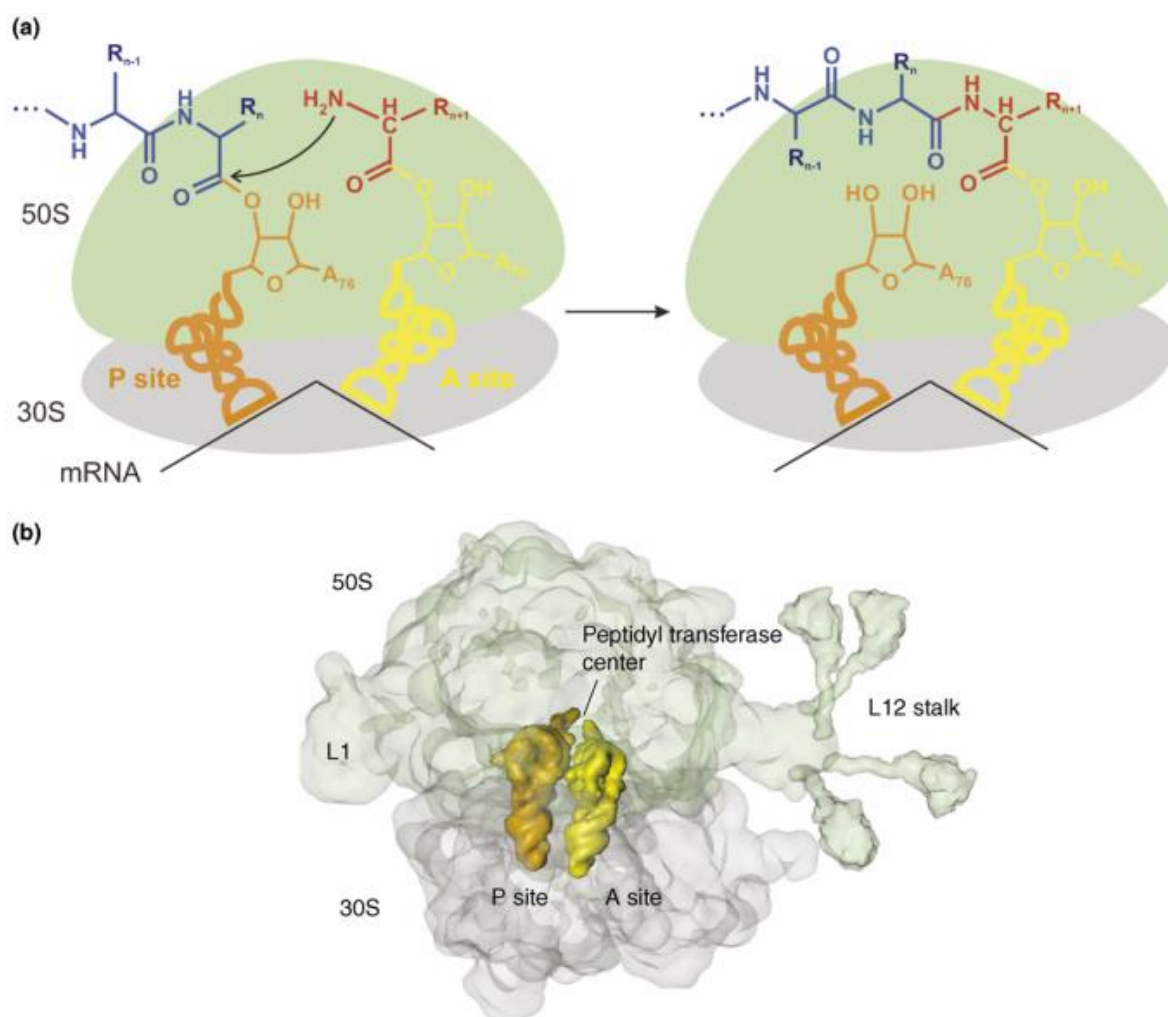


Slika 2. Proces biosinteze proteina: 1. Aktivacija aminokiselina, 2. Inicijacija, 3. Elongacija, 4. Terminacija, 5. Smatanje proteina i posttranslacijska dorada.³

U inicijaciji dolazi do vezanja molekule mRNA i inicijacijske tRNA na malu ribosomsku podjedinicu. Na inicijacijsku tRNA je vezan metionin kodiran start-kodonom AUG. Uz posredovanje inicijacijskih faktora (engl. *initiation factor*, IF) dolazi do vezanja velike ribosomske podjedinice i nastajanja ribosomskog kompleksa.⁶

Na sučelju velike i male podjedinice nalazi se aminoacilno mjesto (A mjesto) u kojem dolazi do interakcije kodona mRNA i antikodona aminoacilirane tRNA. Ukoliko je u A mjestu vezana ispravno aminoacilirana tRNA, ona odlazi u peptidilno (P mjesto) koje se nalazi u velikoj ribosomskoj podjedinici nakon čega dolazi do sinteze peptidne veze. U peptidilnom mjestu

vezana je peptidil-tRNA, tj. novorastući polipeptidni lanac. Struktura ribosoma i reakcija nastajanja peptidne veze prikazana je na **slici 3**.



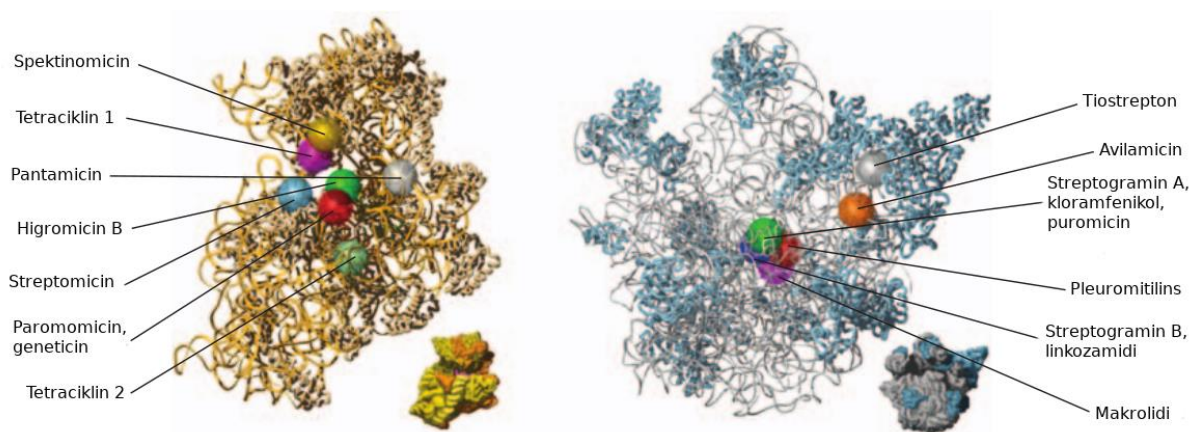
Slika 3. a) Reakcija sinteze peptidne veze. Zelenom bojom označena je velika 50S podjedinica, a sivom bojom označena je mala 30S podjedinica. b) Struktura ribosoma na kojoj je prikazan peptidil-transferazni centar, A mjesto i P mjesto.⁵

α -amino skupina aminokiseline vezane na tRNA u A mjestu nukleofilno napada karbonilni atom polipeptidnog lanca koji se nalazi u P mjestu. Budući da peptidna veza nastaje u A mjestu velike podjedinice, potrebno je translocirati peptidil-tRNA u P mjesto uz zakretanje male i velike podjedinice. Rastući polipeptidni lanac izlazi kroz tunel koji se proteže kroz veliku ribosomsku podjedinicu od peptidil-transferaznog centra do površine i zatim se strukturira u citosolu.

Korak terminacije započinje kada se u A mjesto peptidil-transferaznog centra smjesti stop-kodon za koji ne postoji molekula tRNA. Stop-kodone prepoznaju faktori otpuštanja koji potiču hidrolizu esterske veze peptidil-tRNA u P mjestu 50S podjedinice i otpuštanje polipeptida.

U zadnjem koraku translacije dolazi do smatanja proteina u odgovarajuću trodimenzionalnu strukturu, tj. u svoj biološki aktivni oblik. Također, prije ili nakon smatanja polipeptidnog lanca u aktivni oblik, protein može biti podvrgnut enzimatskom uklanjanju ili dodavanju određenih aminokiselinskih ogranaka, proteolitičkom cijepanju, dodavanju oligosaharidnih ili drugih prostetičkih skupina.³⁻⁷

Zbog velike važnosti biosinteze proteina za održavanje stanice, ovaj proces je primarna meta različitih antibiotika i toksina. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina mogu se podijeliti u 3 skupine ovisno o tome vežu li se na 30S podjedinicu, 50S podjedinicu ili na sveukupni 70S ribosom. Na **slici 4** prikazani su primjeri antibiotika i njihova vezna mjesta na ribosomskim podjedinicama. Tetraciklini blokiraju A mjesto u peptidil-transferaznom centru i na taj način sprječavaju vezanje aminoacil-tRNA. U veliku skupinu antibiotika pod nazivom MLS_B pripadaju makrolidi, linkosamidi i streptogramin B koji, iako su strukturno različiti, sličnim mehanizmom djelovanja inhibiraju sintezu proteina. Vežu se na 23S rRNA u velikoj 50S ribosomskoj podjedinici u blizini peptidil-transferaznog centra i blokiraju tunel kroz koji izlazi novorastući polipeptidni lanac. Mehanizam djelovanja makrolida opisan je u nadolazećim poglavljima.^{3,8}



Slika 4. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina i njihova vezna mjesta. Prikazane su 30S podjedinica (lijevo) i 50 S podjedinica (desno) ribosoma iz bakterije *Thermophilus*.⁴

2.2. Makrolidi

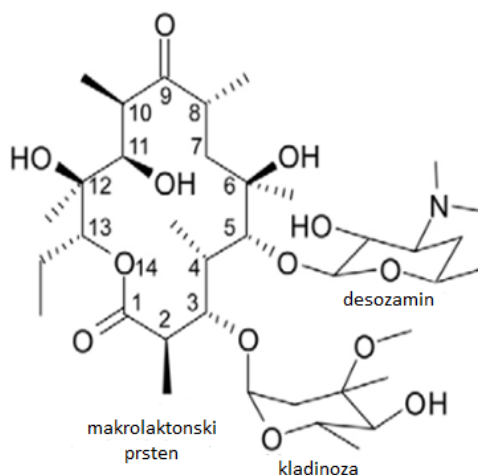
Makrolidi obuhvaćaju veliku skupinu antibiotika koje karakterizira slična kemijska struktura, sličan spektar antibakterijskog djelovanja i mehanizam djelovanja, ali različita farmakokinetička svojstva. Srž makrolidne strukture je makrolaktonski prsten čija veličina može varirati ovisno o broju ugljikovih atoma (od 8 do 64), a funkcijske skupine vezane na makrolaktonski prsten definiraju biološka svojstva makrolida. Klinički najvažniji makrolidi sastoje se od 14-, 15- i 16-eročlanog makrolaktonskog prstena. Najznačajniji 14-eročlani makrolidi su eritromicin A, B, C, D, E i F, oleandomicin, roksitromicin, diritromicin, klaritromicin i fluoritromicin. Azitromicin je najznačajniji 15-eročlani makrolid, a najvažniji 16-eročlani makrolidi su josamicin, rosamarcin, rokitamicin, mirosamicin, te spiramicin i tilozin koji se najčešće koriste u veterinarskoj praksi. Prema Woodwardovoj definiciji iz 1957. godine makrolidi su spojevi koji sadrže makrolaktonski prsten na koji je vezana jedna ili više deoksišećernih jedinica. U današnju definiciju makrolida također pripadaju i spojevi u kojima nisu vezane šećerne jedinice, koji nemaju nužno antibakterijsko djelovanje i koji ne potječu od mikroorganizama iz tla poput semisintetskih makrolida azitromicina, klaritromicina, oksitromicina, diritromicina i fluoritromicina.

Organizmi koji sintetiziraju makrolide su mikobakterije, alge, gljive, pa čak i neke biljke i insekti. Međutim, najčešće se dobivaju iz bakterija roda *Saccharopolyspora*, osim rosamarcina i mirosamicina koji se dobivaju iz bakterija roda *Micromonispora*.

Makrolidni antibiotici, uključujući i semisintetske derivate poput azitromicina, klaritromicina, telitromicina i roksitromicina, pokazuju snažnu antibakterijsku aktivnost. Obilježava ih širok spektar djelovanja protiv Gram-pozitivnih bakterija roda *Streptococcus* spp. i *Staphylococcus* spp. te aktivnosti protiv Gram-negativnih bakterija roda *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Chlamydia*, *Neisseria*, *Legionela* i *Mycoplasma* spp. Makrolidi su pronašli primjenu u liječenju infektivnih bolesti uzrokovanih bakterijama uključujući bolesti dišnog sustava, kože, mekog tkiva i spolno prenosivih bolesti. Međutim, ova klasa spojeva pokazuje i antiparazitska, antivirusna, antigljivična, tuberkulostatska i antimalarijska svojstva. Također, makrolidni antibiotici su pogodno alternativno rješenje u liječenju oboljelih osoba koje su alergične na penicilin.^{4, 11-18}

2.2.1. Eritromicin

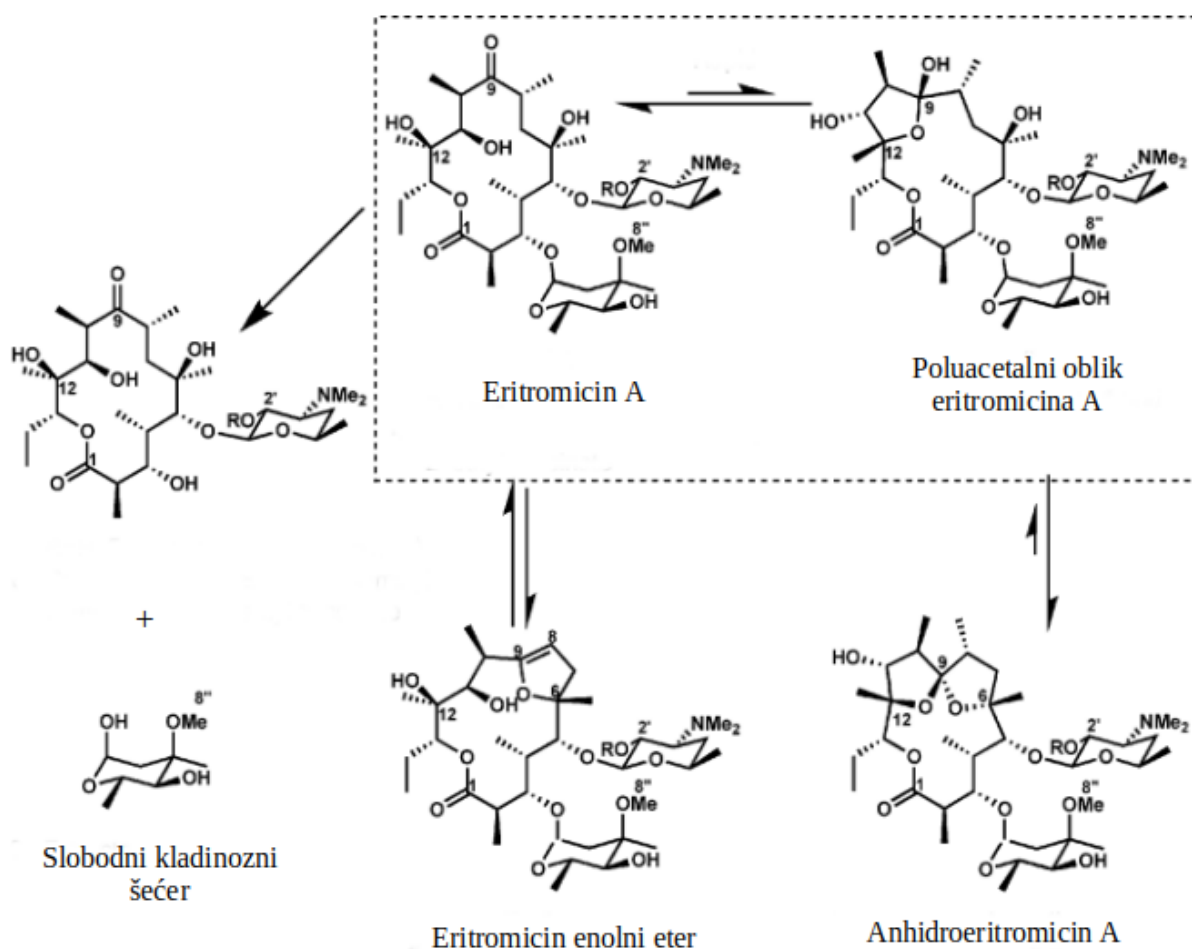
Eritromicin A, prvi makrolidni antibiotik, otkriven je 1952. godine i izoliran kao sekundarni metabolit iz bakterije roda *Saccharopolyspora erythraea* prisutne u tlu. Na **slici 5** prikazana je struktura eritromicina A koja se sastoji od 14-eročlanog makrolaktonskog prstena u kojem je na poziciji C3 vezana kladinoza, a na poziciji C5 desozamin.



Slika 5. Struktura eritromicina.⁴

U kiselim uvjetima, poput onih u želucu, eritromicin ima kratko vrijeme poluživota i nestabilan je. Hidroksilne skupine na poziciji 6 i 12 makrolaktonskog prstena mogu nukleofilno napasti keto skupinu na poziciji 9 što rezultira nastajanjem 5-eročlanog prstena. Stoga u kiselim uvjetima prelazi u inaktivni eritromicin enolni eter (8,9-anhidro-6,9-poluketal) koji se naposljetku razgrađuje u anhidroeritromicin A (6,9,9,12-spiroketalni oblik) kao rezultat reakcije intramolekulske pregradnje. Na **slici 6** prikazane su reakcije razgradnje eritromicina A. Nastajanje ovakvih neželjenih produkata onemogućava određivanje točne koncentracije eritromicina A u serumu i tkivima. Ustanovljeno je da je anhidroeritromicin A uzročnik negativnih gastrointestinalnih nuspojava.

Unatoč nedostatku eritromicina A, ovaj antibiotik danas se još uvijek koristi za liječenje infekcija dišnih puteva, kože i pojedinih tkiva te ima izrazitu važnost u farmaceutskoj industriji jer je prekursor za ostale važne antibiotike poput azitromicina, klaritromicina, roksitromicina i telitromicina.^{12,16,17,19-21}



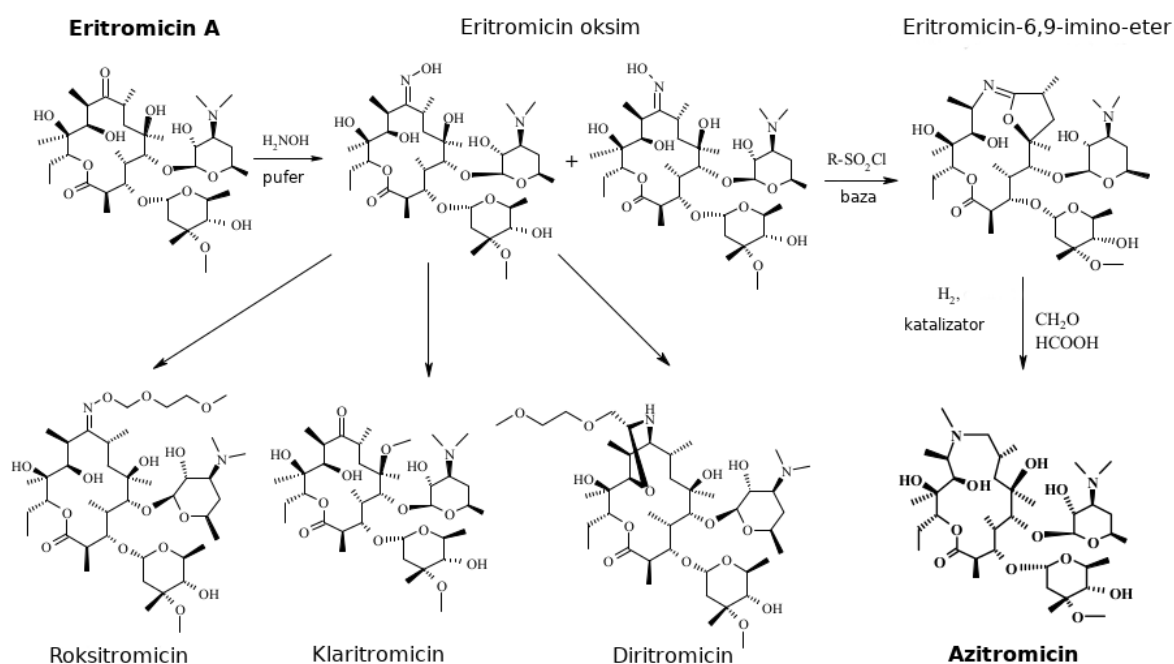
Slika 6. Shema razgradnje eritromicina A u kiselim uvjetima pri čemu nastaje inaktivni anhidroeritromicin A.¹⁹

2.2.2. Azitromicin

Nakon što su identificirani razgradni produkti eritromicina A, uloženo je jako puno truda u poboljšanje bioloških svojstava makrolida, odnosno, njihove biološke aktivnosti, biodostupnosti i stabilnosti. Glavni cilj je bio izbjegavanje nastajanja inaktivnog spiroketalnog oblika anhidroeritromicina A modificirajući keto i hidroksilnu skupinu. Stoga je sintetizirano nekoliko novih antibiotika mijenjajući strukturu eritromicina A što je rezultiralo otkrićem nove skupine makrolida nazvanih 9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicini koji su danas poznatiji pod nazivom azalidi. Prvi azalid, poznat pod nazivom azitromicin, sintetiziran je 1980. godine u farmaceutskoj kompaniji PLIVA, a 1992. godine američka agencija za konzumiranje hrane i lijekova (engl. U.S. Food and Drug Agency, FDA) odobrila je korištenje azitromicina u

kliničkoj praksi. Azitromicin je semisintetski makrolidni antibiotik koji se sastoji od 15-eročlanog makrolaktonskog prstena u kojemu je na poziciji 3 vezana kladinoza, a na poziciji 5 desozamin, kao i u molekuli eritromicina. Međutim, na poziciji 9a makrolaktonskog prstena prisutan je metilirani atom dušika umjesto ugljika.

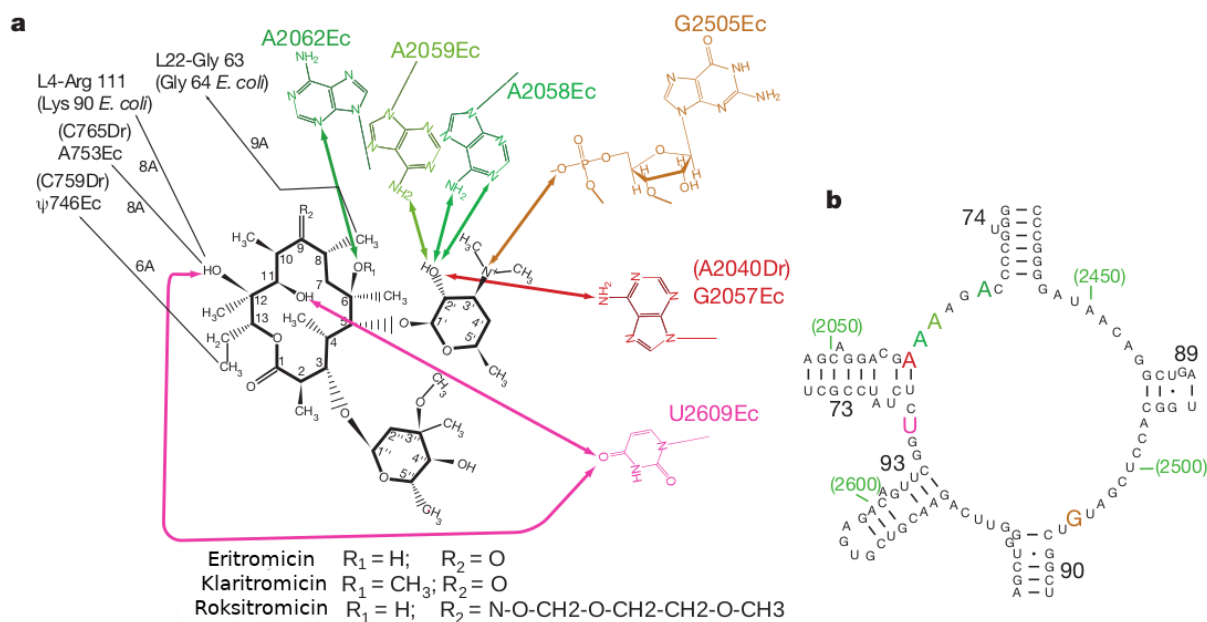
Reakcijska shema dobivanja azitromicina prikazana je na **slici 7**. Kada se oksim eritromicina A tretira benzensulfonil kloridom u smjesi acetona i vode uz natrijev bikarbonat, kao produkt reakcije Beckmannove pregradnje dobiva se eritromicin-6,9-iminoeter. U idućem koraku se dobiveni iminoeter podvrgne reakciji reduktivne metilacije uz formaldehid i mravlju kiselinu uz prisutnost katalizatora, a produkt ove reakcije je azitromicin. Ova strukturna promjena čini azitromicin stabilnim u kiselim uvjetima jer, za razliku od eritromicina, ne posjeduje keto skupinu na položaju 9 makrolaktonskog prstena. Zbog veće stabilnosti azitromicina povećano mu je i vrijeme poluživota u serumu, oralna biodostupnost, distribucija i koncentracija u tkivima te antibakterijska aktivnost protiv pojedinih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Također, azitromicin se učinkovnije nakuplja u fagocitima u odnosu na ostale antibiotike iz ove skupine spojeva zbog čega dolazi u većoj koncentraciji do mjesta infekcije.^{3,10-12,22-25}



Slika 7. Reakcijska shema dobivanja azitromicina.²⁴

2.2.3. Mehanizam djelovanja makrolida i interakcija s ribosomom

Svi makrolidni antibiotici imaju sličan mehanizam djelovanja. Ova skupina spojeva reverzibilno se veže na bakterijsku 50S ribosomsku podjedinicu u prisutnosti Mg^{2+} i K^+ iona u peptidil-transferaznu šupljinu, točnije, između peptidil-transferaznog centra i tunela kroz koji izlazi novorastući polipeptidni lanac. Na taj način makrolidi inhibiraju RNA-ovisnu sintezu proteina, ali se ne vežu na eukariotski 80S ribosom. Tunnel kroz koji izlazi novorastući polipeptidni lanac dugačak je 100 Å, širok 20-30 Å, započinje u blizini peptidil-transferaznog centra, a završava na vanjskoj strani ribosoma u citosolu. Makrolidi inhibiraju sintezu proteina blokirajući najuži dio tunela u kojem dolazi do spajanja β -uvojnice ribosomskih proteina L4 i L22 s molekulom RNA. Na **slici 8** prikazane su interakcije koje makrolidi ostvaruju s ribosomom.



Slika 8. a) Prikaz strukture makrolida i interakcija koje ostvaruju s nukleotidima peptidil-transferazne šupljine, b) Sekundarna struktura peptidil-transferaznog prstena *D. radiodurans*, nukleotidi koji ostvaruju interakciju s klindamicinom prikazani su različitim bojama.³⁰

Makrolaktonski prsten i dezaminozni šećer ostvaruju interakciju u peptidil-transferaznoj šupljini pri čemu hidroksilna skupina na poziciji 2 dezaminoznog šećera sudjeluje u vodikovoj vezi na 3 pozicije: s dušikovim atomima na poziciji N1 i N6 u A2041 (*D. radiodurans*) i A2058 (*E. coli*), i s dušikovim atomom na poziciji N6 u A2042 (*D. radiodurans*) i A2059 (*E. coli*). Nekoliko hidroksilnih skupina makrolaktonskog prstena ostvaruje interakciju s 23S rRNA podjedinicom: hidroksilna skupina na poziciji 2 makrolaktonskog prstena ostvaruje vodikovu vezu s dušikovim atomom N6 u A2045 (*D. radiodurans*) i A2062 (*E. coli*), a hidroksilne skupine na poziciji 11 i 12 ostvaruju vodikovu vezu s kisikom na poziciji O4 u U2588 (*D. radiodurans*) i U2609 (*E. coli*), dok kladinozna šećerna jedinica ne ostvaruje interakciju s 23S rRNA. Kada je makrolidni antibiotik vezan na bakterijski ribosom, promjer tunela kroz koji izlazi novorastući polipeptidni lanac smanjuje se na 10-18 Å. Također, potrebno je uzeti u obzir i da hidratizirani Mg^{2+} ioni blokiraju ulaz tunela.

Azitromicin se, za razliku od ostalih makrolidnih antibiotika, veže na ribosom malo drugačije zbog postojanja sekundarnog veznog mjesta. Riješene su tri kristalne strukture kompleksa azitromicina i ribosoma iz bakterija *Termus termophilus*, *Haloarcula marismorui* i *Deinococcus radiodurans*. U kristalnim strukturama kompleksa azitromicina i ribosoma iz prve dvije navedene bakterije ostvaruju se klasične hidrofobne interakcije hidroksilnih skupina dezaminoznog šećera i makrolaktonskog prstena s tunelom preko A2058, A2059 i U2611.

Također, iz kristalne strukture kompleksa azitromicina i ribosoma iz bakterije *D. radiodurans* uočeno je da se primarno vezno mjesto za azitromicin nalazi u domeni V 23S rRNA, a ostvarivanje interakcija odvija se na sličan način kao i u ostalim makrolidima, tj. interakcije se ostvaruju s bazama A2045 i U2609. Međutim, druga molekula azitromicina ostvaruje vodikovu vezu s kisikom na poziciji 4 u U2588 uz dodatne interakcije s domenom II i IV 23 rRNA, što navedene interakcije čini jačima. Također, hidratizirani magnezijev ion ostvaruje interakciju s makrolaktonskim prstenom i kladinoznom šećerom, dok dušikov atom makrolaktonskog prstena ne sudjeluje u izravnoj interakciji s ribosomom. Naposljetku, sekundarna molekula azitromicina ostvaruje izravnu interakciju s primarnom molekulom azitromicina formirajući vodikovu vezu između dezaminoznog šećera i kisika na poziciji O1 u makrolaktonskom prstenu prve molekule azitromicina.^{3,5,14,15,18,22,26-30.}

2.2.4. Mehanizam otpornosti bakterija na makrolidne antibiotike

Posljednjih godina makrolidi privlače veliku pozornost zbog svoje potencijalne primjene u liječenju kroničnih bolesti poput astme, cistične fibroze, pa čak i u liječenju malarije i tumora. No jedan od glavnih razloga je i razvoj rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike zbog njihove prekomjerne upotrebe u kliničkom liječenju, veterinarstvu i uzgoju biljaka zbog čega više nisu toliko efikasni. Bakterije su razvile nekoliko mehanizama otpornosti, a to su: (1) promjena veznog mjesta makrolida kemijskom modifikacijom jedne ili više nukleotidnih baza na ribosomu s kojima makrolid ostvaruje interakcije prilikom vezanja, (2) mutacija gena koji kodiraju određene dijelove ribosoma, (3) kemijska modifikacija same molekule makrolida što dovodi do njegove inaktivacije i smanjenja unosa makrolida u stanicu pomoću transportera koji se nalaze na membrani. Bakterija može kemijski modificirati vezno mjesto ribosoma dimetilacijom adenina na poziciji 2058 male ribosomske podjedinice 23S rRNA u N6, N6-dimetiladenin pomoću metilaze čija je ekspresija regulirana genom *erm*. Membranski protein koji ima ulogu eritromicin efflux-pumpe kodiran je genom *msr* u bakterijama soja *Staphylococcus* i genom *mef* u bakterijama soja *Streptococcus*. Makrolidi mogu biti kemijski modificirani različitim enzimima poput esteraze, što naposljetku rezultira njihovom inaktivacijom.^{5, 15-18, 22, 30, 32-34}

2.3. Sinteza novih derivata makrolida

Unatoč postojanju velikog broja makrolidnih antibiotika i njihovog širokog spektra djelovanja, sve veća otpornost bakterija predstavlja veliki izazov u liječenju oboljelih. Kao potencijalno rješenje ovog problema je dizajn i sinteza novih makrolidnih antibiotika kemijskom modifikacijom već postojećih, tj. sinteza derivata makrolida čija je struktura promijenjena dodatkom određene funkcijske skupine. Makrolidi su strukturno kompleksne molekule s nekoliko stereogenih središta koja definiraju njihova biološka i fizikalno-kemijska svojstva. Također, antibakterijska svojstva makrolida ne ovise samo o vezanju antibiotika na ribosom, nego i o interakciji makrolida s bakterijskom stanicom i npr. žučnom kiselinom što može izravno utjecati na unos u bakterijsku stanicu i otpornost. Navedeni faktori uvelike utječu na biološki profil makrolida.

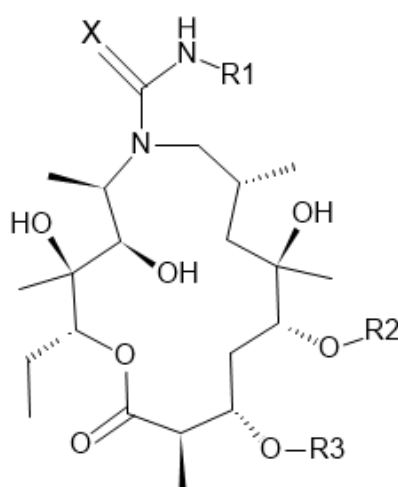
2.3.1. Sinteza novih derivata azitromicina

Kako bi se poboljšala biološka aktivnost azalida, ova skupina spojeva može se konjugirati s drugim skupinama spojeva pri čemu nastaju hibridne molekule koje mogu imati bolja biološka svojstva i biodostupnost. Azitromicin se može derivatizirati pojedinim funkcijskim skupinama na nekoliko pozicija u strukturi. Jedna od pozicija je kladinozna šećerna jedinica koja je vezana na poziciji 3 na makrolaktonskom prstenu, a druga pozicija je atom dušika koji je vezan na poziciji 9a makrolaktonskog prstena.^{12,18}

U nekoliko istraživanja pokazano je kako je vrlo lako vezati karbamoilnu ili tiokarbamoilnu skupinu na dušik makrolaktonskog prstena formirajući ureje ili tioureje. Vezanjem karbamoilne ili tiokarbamoilne skupine dolazi do elektronske i steričke promjene molekule, a ta skupina ujedno ima i ulogu poveznice, tzv. linkera, na koju je moguće vezati različite funkcijske skupine. Zbog velikog broja komercijalno dostupnih izocijanata i izotocijanata moguće je vrlo lako derivatizirati azitromicin različitim funkcijskim skupinama. Sintetizirani su derivati azitromicina koji je supstituiran različitim funkcijskim skupinama na poziciji 9a preko molekule poveznice i ispitivana je njihova biološka aktivnost, a pojedini derivati su i patentirani. U nastavku teksta bit će opisano nekoliko provedenih istraživanja.^{24,35-37,40}

Nedjeljko Kujundžić i suradnici sintetizirali su i strukturno okarakterizirali seriju 9a-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A supstituiranih na poziciji 9a karbamoilnim i tiokarbamoilnim funkcijskim skupinama te provjerili pokazuju li dobiveni derivati antibakterijska svojstva. Budući da se adicija primarnih i sekundarnih amina pokazala kao odlična metoda za pripremu supstituiranih ureja i tioureja, sintetizirana je skupina derivata azitromicina koji je derivatiziran na položaju 9a makrolaktonskog prstena i dobiveni spojevi su okarakterizirani spektroskopskim metodama i rentgenskom kristalografijom. Na **slici 9** prikazane su strukture sintetiziranih derivata, a u **tablici 1** su navedeni supstituenti 9a-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A. Reakcija u trajanju od 1 h provedena je na sobnoj temperaturi dodatkom izopropilizocijanata u otopinu azitromicina otopljenog u toluenu pri čemu je nastao manje topljivi produkt označen brojem 4 u prinosu od 86,2 %. Čistoća dobivene reakcijske smjese provjeravana je tankoslojnom kromatografijom koristeći pločice silikagela kao nepokretnu fazu, a kao pokretna faza koristila su se 2 sustava otapala (A i B). Sustav A sastojao se od smjese otapala ψ (etil-acetat, n-heksan, dietilamin) = 100:100:20, a sustav B sastojao se od ψ (kloroform, metanol, amonijev hidroksid) = 6:1:0,1. Zatim, koristeći azitromicin u kojem je na dušik na poziciji 9a makrolaktonskog prstena vezan vodik, a ne metilna skupina, su adirane 4-

metil-5-oksazolilna, 2-furilna, 4-piridilna i fenilna skupina. Spojevi su dobiveni reakcijom Curtisove pregradnje odgovarajućih azida nakon čega je provedena reakcija adicije navedenih izocijanata na amino skupinu koja se nalazi na poziciji 9a. Na isti način dobiveni su i spojevi 11-13. Dobiveni spojevi strukturno su karakterizirani tehnikama molekulske spektroskopije uključujući IR, NMR i tehnikom rentgenske kristalografske analize. Također, provjereno je pokazuju li sintetizirani spojevi biološku aktivnost protiv različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Derivati *N*-izopropilkarbamoil (4) i *N*-benziltiokarbamoil (12) pokazali su povećanu biološku aktivnost u odnosu na azitromicin, dok su ostali spojevi pokazali smanjenu antibakterijsku aktivnost u odnosu na azitromicin.²³

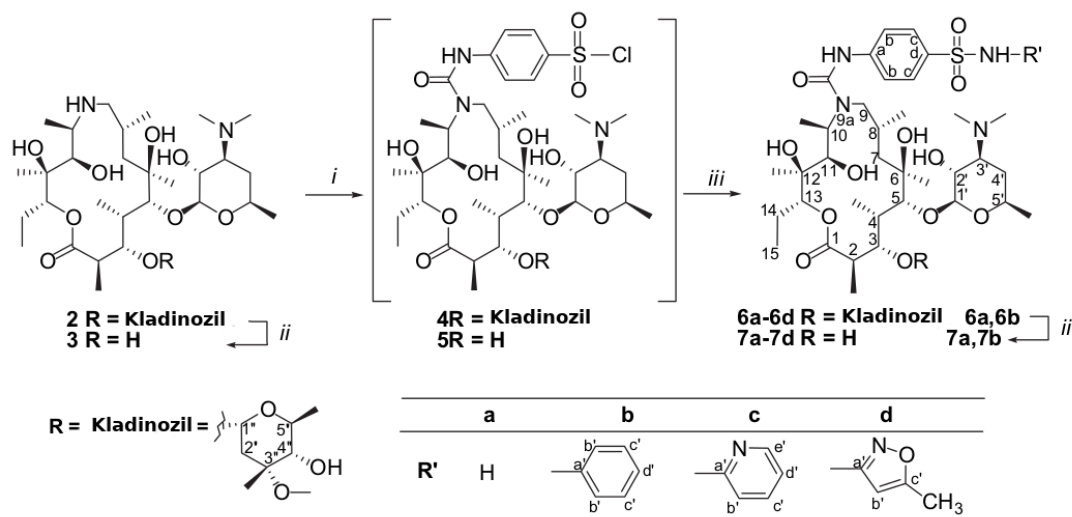


Slika 9. Strukture 9-deokso-9a-*N*-(*N'*-supstituiranih karbamoil i tiokarbamoil)-9a-aza-9a-homoeritromicina A 4-13.²²

Tablica 1. Supstituenti sintetiziranih derivata 9a-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A.²²

	X	R ¹	R ²	R ³
4	O	CH(CH ₃) ₂	D-desozamin	L-kladinoza
6	O	CH(CH ₃) ₂	H	H
7	O	4-metil-5-oksazolil	D-desozamin	L-kladinoza
8	O	2-furil	D-desozamin	L-kladinoza
9	O	4-piridil	D-desozamin	L-kladinoza
10	O	fenil	D-desozamin	L-kladinoza
11	O	benzil	D-desozamin	L-kladinoza
12	S	benzil	D-desozamin	L-kladinoza
13	O	1-naftil	D-desozamin	L-kladinoza

Mirjana Bukvić Krajačić i suradnici proveli su nekoliko istraživanja u kojima su sintetizirali derivate azitromicina modificirajući poziciju 9a makrolaktonskog prstena. Dobivene spojeve su strukturno karakterizirali, a na kraju su provjeravali njihovu biološku aktivnost. U prvom istraživanju derivatizirali su azitromicin različitim sulfonamidima, a reakcijska shema prikazana je na **slici 10**.

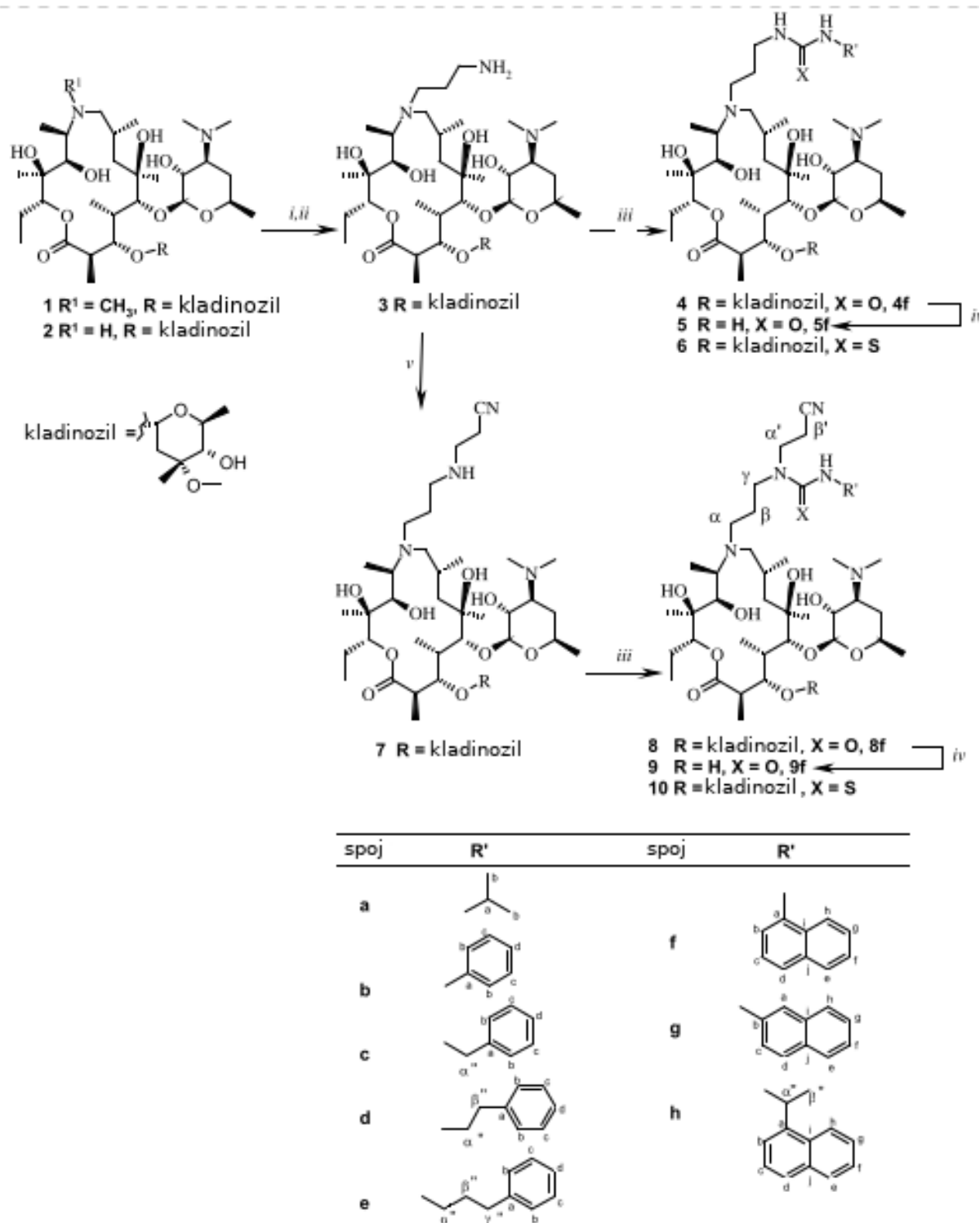


Slika 10. Reakcijska shema sinteze konjugata azitromicina i sulfonamida.³⁸

Sinteza konjugata azitromicina i sulfonamida sastojala se od nekoliko koraka. Kao polazni spoj koristio se 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A (spoj 2), zadnji međuprodukt reakcije sinteze azitromicina kojemu je dodan 4-(klorosulfonyl)fenilizocijanat, a reakcija se provodila u toluenu pri 0-5 °C pri čemu je dobiven spoj 4, 9a-[[4-(klorosulfonyl)sulfonylphenyl]karbamoyl]-derivat. U dobivenu reakcijsku smjesu dodana su 2 ekvivalenta različitih amina; amonijaka, anilina, 2-aminopiridina i 3-metil-3-aminoizoksazola. Strukture svih spojeva određene su tehnikama IR, NMR i spektrometrijom masa. U spektrima IR i NMR uočeni su novi signali uspoređujući sa spektrom azitromicina. U spektru IR u području od 1660-1634 cm⁻¹ uočena je vrpca velikog intenziteta koja odgovara karbamoilnoj skupini C=O. U protonskom spektru NMR snimljenom u deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-d₆) signali u području od 6,8 ppm do 8,0 ppm, odnosno, u području od 6,1 ppm do 8,3 ppm snimljeni u deuteriranom kloroformu (CDCl₃), odgovaraju protonima supstituiranog benzena, piridina i izoksazolnog prstena. Također, spojevi su potvrđeni spektrometrijom masa uz MALDI-TOF i MS/MS, a dobiveni spektri detaljno su analizirani u izvornom radu. Osim

toga, spojevi su pročišćavani kolonskom kromatografijom koristeći silikagel kao nepokretnu fazu uz pokretnu fazu E1 koja se sastoji od ψ (diklormetan, metanol, amonijak) =90:9:1,5, a čistoća frakcija provjeravana je tankoslojnom kromatografijom. Čistoća izoliranih spojeva je potvrđena spektrometrijom masa i ona iznosi više od 90 %. Nakon pročišćavanja dobivenih spojeva provjereno je pokazuju li biološku aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* te Gram-negativnih bakterija poput *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Iz dobivenih rezultata uočeno je da spojevi 6a - 6d, čija je struktura prikazana na **slici 10**, pokazuju slabu biološku aktivnost protiv bakterija sa efflux genom *mef*, bakterija roda *S. Pyogenes* i Gram negativnih bakterija poput *Escherichia coli* i *Haemophilus influenzae*. Međutim, spojevi 6a i 6b pokazuju veću aktivnost protiv *S. Pyogenes* u odnosu na spoj 2 i azitromicin, te veću aktivnost u odnosu na spojeve 6c i 6d protiv bakterija *S. aureus* i *M. catarrhalis*.³⁸

Dvije godine kasnije provedeno je istraživanje u kojem je sintetizirano nekoliko derivata azitromicina adirajući različite izocijanate i izotiocijanate na 9a-(γ -aminopropil) derivat azitromicina. Navedeni derivat 9a-(γ -aminopropil) pripremljen je reakcijom Michaelove adicije akrilonitrila i katalitičkog hidrogeniranja uz platina (IV) oksid kao katalizator, a zatim je otopljen u diklormetanu. Nakon toga dodani su različiti alkilni ili arilni izocijanati i izotiocijanati, a reakcija se odvijala 1 h na sobnoj temperaturi. Na **slici 11** prikazana je ukupna reakcijska shema dobivanja 9a-derivatiziranog azitromicina. Dobiveni spojevi strukturno su karakterizirani tehnikama IR i NMR te spektrometrijom masa. U spektrima IR za spojeve 4 i 6 pojavile su se vrpce u području od 1681 cm^{-1} do 1645 cm^{-1} i od 1549 cm^{-1} do 1557 cm^{-1} koje odgovaraju karbonilnoj skupini C=O u ureama, odnosno vrpca u području od 1537 cm^{-1} do 1552 cm^{-1} kod tiourea što odgovara C=S skupini. U protonskim spektrima NMR signali u području od 7,2 ppm do 8,0 ppm su odgovarali alkilnim i arilnim supstituentima. U spektrima ^{13}C NMR signali supstituenata pojavljuju se kao singleti u području od 118 ppm do 142 ppm. Dobivene spojeve bilo je potrebno pročistiti kako bi se mogli provesti *in vitro* eksperimenti kojima se provjerava pokazuju li sintetizirani spojevi antibakterijsku aktivnost. Sintetizirani derivati pročišćeni su na isti način kao i u prethodno opisanom istraživanju u kojem su sintetizirani konjugati azitromicina i sulfonamida.

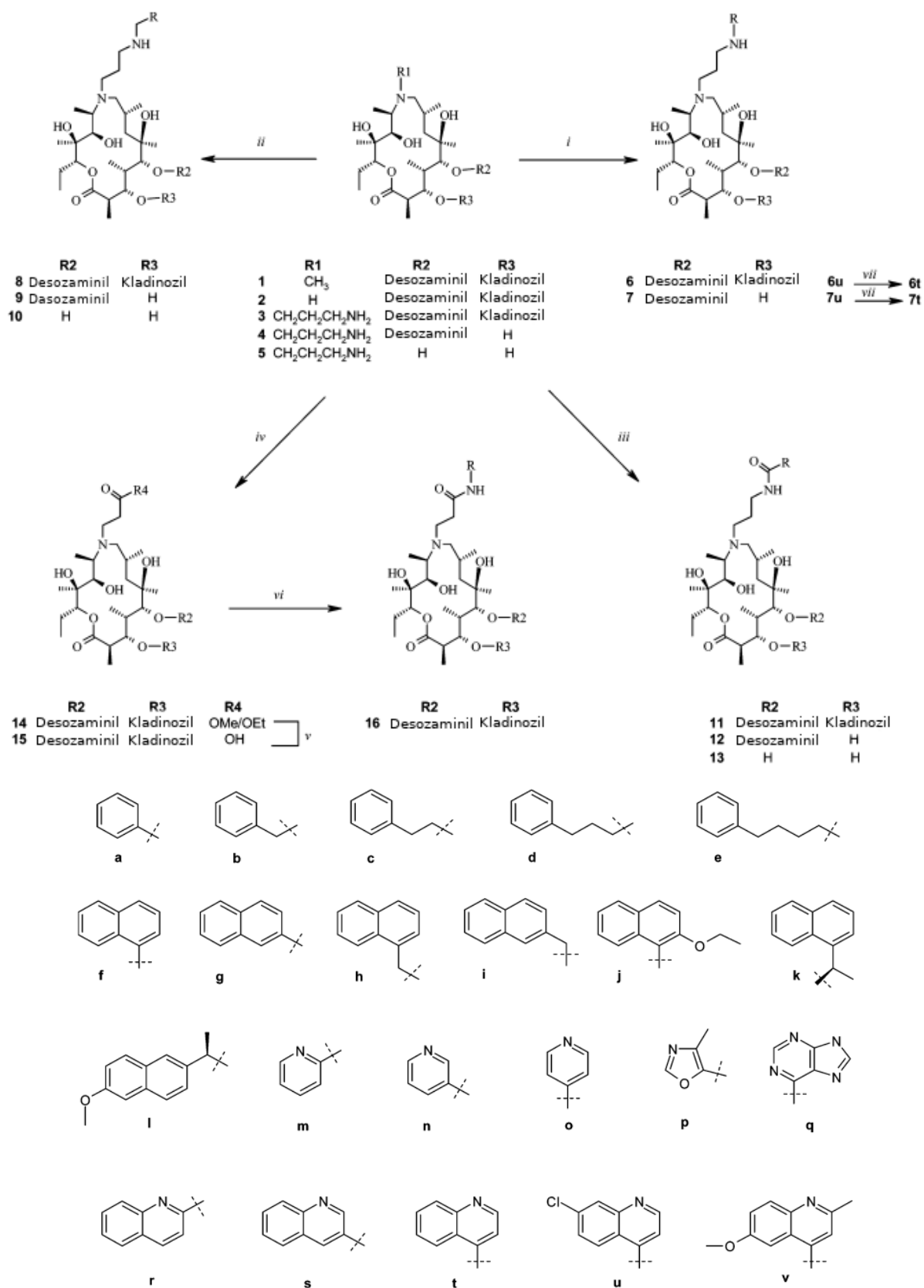


Slika 11. Ukupna reakcijska shema dobivanja derivata azitromicina supstituiranog na poziciji 9a. U donjem dijelu slike prikazani su supstituenti. ³⁶

Ispitana je biološka aktivnost dobivenih spojeva protiv bakterije *S. Pyogenes* i rezultati pokazuju veću biološku aktivnost od karbamoil/tiokarbamoil, sulfonilkarbamoil derivata i konjugata azitromicina i sulfonilamida. Uree supstituirane naftilnom skupinom 4f, 4g i 4h, čija je struktura prikazana na **slici 11**, pokazale su bolju antibakterijsku aktivnost u odnosu na azitromicin prema bakterijama soja *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* i *Haemophilus influenzae*.³⁶

Azitromicin je prvi makrolidni antibiotik istraživani u svrhu liječenja malarije, ali nije pokazao značajnu antimalarijsku aktivnost. Međutim, Mihaela Perić i suradnici proveli su istraživanje u kojem su sintetizirali velik broj ureja i tioureja derivata azitromicina i ispitali njihovu antimalarijsku aktivnost eksperimentima *in vitro* i *in vivo*. Proučavana je povezanost kemijske strukture i biološke aktivnosti mijenjajući strukturu azitromicina, tj. supstituirajući položaj 9a na makrolaktonskom prstenu i uklanjanjem šećernih jedinica kladinoze i dezaminoze. Na **slici 12** prikazana je ukupna reakcijska shema dobivanja novih derivata azitromicina. Kao polazni spoj korišteni su 9a-(γ -aminopropil) derivati azitromicina 3 i 4 koji su supstituirani arilnim i heteroarilnim halogenidima u dimetilsulfoksidu pri povišenoj temperaturi. Spojevi 8-10 dobiveni su reakcijom reduktivne alkilacije prekursora 3-5 s odgovarajućim aldehidima uz natrijev tetrahidroborat i trietilamin u metanolu.

Derivati 11-13 pripremljeni su acilacijom polaznih amina 3-5 s odgovarajućim karboksilnim kiselinama u prisutnosti reagensa 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid (EDC) i 1-hidroksibenzotriazola (HOBT) u diklormetanu pri sobnoj temperaturi. Naposljetku, spoj 14 pripremljen je iz polaznog amina 2 Michaelovom adicijom uz metil ili etil-akrilat u kloroformu nakon čega je podvrgnut esterskoj hidrolizi uz vodu, tetrahidrofuran i litijev hidroksid kako bi se osigurali bazični uvjeti. Na kraju, amid 16 dobiven je esterifikacijom karboksilne kiseline 15 koristeći različite amine uz reagense korištene u dobivanju amida 11 - 13. Ispitana je biološka aktivnost dobivenih derivata protiv mikroorganizma *Plasmodium falciparum*. Pokazano je da uklanjanje kladinoznog i dezaminoznog šećera uvelike umanjuje biološku aktivnost dobivenih derivata u odnosu na azitromicin. Također, derivati azitromicina supstituiranog fenilnom skupinom pokazali su veću biološku aktivnost u odnosu na heterocikličke izoksazolne i heteroaromatske piridinske derivate, ali supstitucija naftilne skupine pokazuje veću biološku aktivnost u odnosu na fenilnu skupinu. No, uočeno je da derivati s povećanom antimalarijskom aktivnošću pokazuju i povećanu citotoksičnost.⁴⁰



Slika 12. Reakcijska shema dobivanja 9a supstituiranih derivata azitromicina. Na donjem dijelu slike prikazani su supstituenti R.⁴⁰

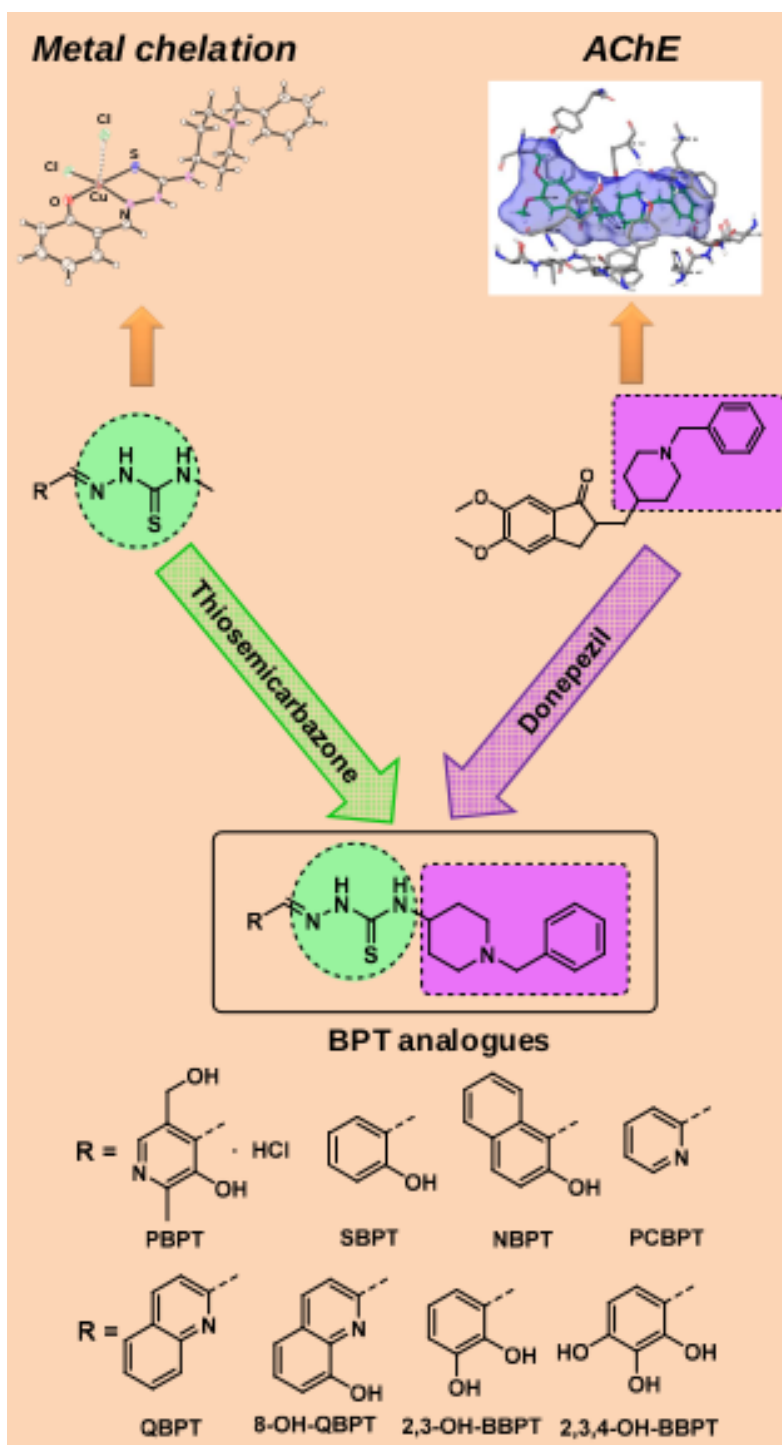
2.3.2. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni su derivati imina, a dobivaju se reakcijom kondenzacije različito supstituiranih aldehida ili ketona i semikarbazida preko terminalne amino skupine (-NH₂). Ova skupina spojeva analogna je semikarbazonima, ali umjesto kisika u karbonilnoj skupini nalazi se sumpor. Tiosemikarbazoni i njihovi derivati su spojevi koji pokazuju široki spektar biološke aktivnosti poput antibakterijske, antifungalne, antivirusne, antimalarijske i antitumorske aktivnosti. Njihova biološka aktivnost očituje se u mogućnosti kompleksiranja različitih prijelaznih metala koji se mogu nalaziti u aktivnom mjestu enzima ili biti dio strukture enzima. Interakcija molekule tiosemikarbazona i prijelaznog metala ostvaruje se zbog prisutnosti elektron-donirajućih skupina, odnosno, atoma sumpora u tioketonskoj skupini i dušika u imino skupini. Istraživanja su pokazala da tiosemikarbazoni mogu inhibirati enzime poput ribonukleotid-reduktaze, cistein-proteaze, katepsin L, itd.

Strukturalna karakterizacija tiosemikarbazona moguća je klasičnim metodama molekulske spektroskopije poput nuklearne magnetske rezonancije, spektrometrije masa i infracrvene spektroskopije. Budući da ovu skupinu spojeva karakterizira imino veza, signal protona iz imino veze u spektrima NMR bit će prisutan u području od 8,5 ppm do 9,0 ppm, a proton iz amino skupine vezane između tioketonske i iminske skupine će pokazivati signal u području od 10,05 ppm do 12,50 ppm.^{42,43}

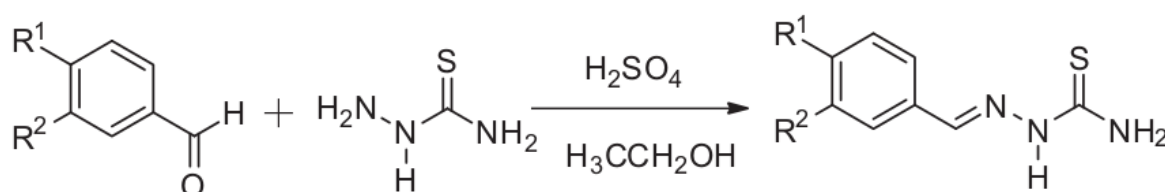
Provedena su različita istraživanja u kojima su tiosemikarbazoni proučavani kao potencijalni lijekovi protiv Alzheimerove bolesti. Donezil je reverzibilni inhibitor kolinesteraze što uzrokuje inhibiciju hidrolize acetilkolina pa se koristi u liječenju Alzheimerove bolesti. Budući da su tiosemikarbazoni spojevi koji mogu kompleksirati različite prijelazne metale, njihova konjugacija s donezilom mogla bi dovesti do povećanja aktivnosti samog donezila. Ovakav konjugat mogao bi kompleksirati metale poput bakra, željeza i cinka čijom akumulacijom se potiče agregacija peptida A β . Na **slici 13** prikazan je dizajn 4-(1-benzilpiperidin-4-il)tiosemikarbazon (BPT) derivata koji su sintetizirani reakcijom tiosemikarbazida s različito supstituiranim aldehydima u istraživanju znanstvenika D. Palanimuthu i njegovih suradnika. Dobiveni derivati BPT pokazali su nisku antiproliferativnu aktivnost i bolju sposobnost keliranja željeza uspoređujući s deferoksaminom koji se često koristi u kliničkoj medicini kao kelator iona željeza. Osim toga, derivati BPT pokazali su

umjerenu inhibiciju acetilkolin-esteraze, inhibiciju agregacije peptida A β uz prisustvo bakrovih iona i povećanu inicijaciju autofagije. Od svih dobivenih derivata BPT, konjugat PBPT, čija struktura je prikazana na **slici 13**, pokazao se kao potencijalni lijek u liječenju Alzheimerove bolesti jer posjeduje najveću multifunkcionalnu aktivnost u odnosu na druge derivate.⁴⁴



Slika 13. Dizajn i sinteza konjugata donezila i tiosemikarbazona. Na donjoj slici prikazane su funkcionalne skupine korištenih aldehida.⁴⁴

Mariana A. Soares i njezina istraživačka skupina proučavali su potencijalnu primjenu tiosemikarbazona u liječenju melanoma koji nastaje povećanom aktivnošću melanocita u koži, tj. prekomjernom sintezom melanina. Enzimi koji reguliraju aktivnost melanocita su tirozin kinaze u čijem aktivnom mjestu se nalaze dva atoma bakra, a tiosemikarbazoni su odabrani kao potencijalni lijekovi zbog njihove sposobnosti kompleksiranja prijelaznih metala. Sintetizirano je osam tiosemikarbazona reakcijom tiosemikarbazida i različito supstituiranih benzaldehida te piridinkarboksaldehida. Reakcijska shema prikazana je na **slici 14**, a u **tablici 2** su prikazani supstituenti..



Slika 14. Reakcijska shema dobivanja tiosemikarbazona iz tiosemikarbazida i različito supstituiranih aldehida.

Tablica 2. Supstituenti R¹ i R² korišteni u sintezi tiosemikarbazona.

Kemijski spojevi	Supstituenti	
	R ¹	R ²
Tio-1	HO	H
Tio-2	HO	OCH ₃
Tio-3	OC ₂ H ₅	H
Tio-4	OCH ₃	H
Tio-5	HO	H
Tio-6	Cl	H
Tio-7	Br	H
Tio-8	2-formilpiridin	H

Dobiveni tiosemikarbazoni Tio-1 i Tio-4 pokazali su se boljim inhibitorima u odnosu na Tio-5 i Tio-8 zbog prisutnosti atoma kisika u para-položaju aromatskog prstena. Atom kisika pokazao se ključnim u inhibiciji tirozin-kinaze zbog njegove mogućnosti interakcije s bakrovim ionima. Derivat Tio-2 pokazao se boljim inhibitorom u odnosu na Tio-1, 3 i 4 zato što može ostvariti interakciju s aminokiselinama His-155, Gly-170 i Val-172 koje se nalaze u aktivnom mjestu tirozin-kinaze. ⁴⁵

2.4. Metode pročišćavanja i strukturne karakterizacije spojeva

2.4.1. Kromatografske tehnike

Kromatografija je analitička metoda koja se koristi za odjeljivanje i pročišćavanje spojeva iz smjese. Postoji velik broj različitih kromatografskih tehnika, a svaka od njih se temelji na odjeljivanju sastojaka smjese između dviju različitih faza od kojih je jedna faza nepokretna, a druga pokretna. Uzorak mora biti topljiv u pokretnoj fazi. S obzirom na agregatno stanje pokretne faze kromatografske tehnike mogu se podijeliti na: (1) tekućinsku kromatografiju u kojoj je pokretna faza tekućina, (2) plinsku kromatografiju u kojoj je pokretna faza plin i (3) fluidnu kromatografiju u kojoj je pokretna faza fluid pri superkričnim uvjetima. Kromatografske tehnike mogu se također podijeliti na: (1) kolonsku kromatografiju u kojoj je nepokretna faza smještena u koloni i (2) plošnu kromatografiju u kojoj je nepokretna faza nanosena na čvrstu podlogu. Sastojci smjese nošeni su pokretnom fazom i kreću se kroz ili preko nepokretne faze pri čemu dolazi do njihove ravnotežne raspodjele između dviju faza. Što je veći broj prelazaka analita iz jedne faze u drugu, veća je učinkovitost odjeljivanja sastojaka. Sastojci koji ostvaruju jaču interakciju s nepokretnom fazom sporije će se kretati kroz kromatografski sustav nošeni pokretnom fazom. Na taj način će doći do odjeljivanja sastojaka različitih svojstava kao što su polarnost, veličina molekule, itd. Zbog različite pokretljivosti sastojaka u kromatografskom sustavu, oni će se odvajati u zasebne zone pa će se moći selektivno i osjetljivo detektirati, a nakon toga kvalitativno i kvantitativno analizirati.

2.4.2. Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid chromatography, LC*)

Za analizu biološki aktivnih spojeva, u današnje vrijeme najčešće se koristi tekućinska kromatografija kojom se mogu analizirati različiti proteini, lijekovi poput antibiotika, aminokiseline, lipidi, nukleinske kiseline i brojne druge klase spojeva.

Analiza klasičnom tekućinskom kromatografijom najčešće podrazumijeva korištenje staklenih kolona duljine od 50 cm do 500 cm, unutarnjeg promjera od 1 cm do 5 cm, a promjer čestica punila iznosi od 150 μm do 200 μm uz protok pokretne od 1 mL min⁻¹. Ova tehnika u današnje vrijeme koristi se samo u preparativne svrhe, a zamijenila ju je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography, HPLC*).

Tehnike tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti mogu se podijeliti s obzirom na princip kromatografskog razdvajanja, a to su adsorpcija, razdjeljivanje, ionska izmjena, isključenje i afinitetna kromatografija. Odabir tehnike ovisi o svojstvima sastojaka smjese kao što su polarnost, topljivosti u vodi, molarna masa itd. ⁴⁸

Za analizu makrolidnih antibiotika koristi se tekućinska kromatografija koja se temelji na različitoj topljivosti sastojaka u pokretnoj i nepokretnoj fazi, tj. razdjeljivanju sastojaka između dvije faze. Ova tehnika može se podijeliti na kromatografiju normalnih faza u kojoj je nepokretna faza polarnija od pokretne faze i kromatografiju obrnutih faza u kojoj je pokretna faza polarnija od nepokretne. Za analizu azitromicina u tabletama, krutim materijalima, ljudskim tkivima i uzlučevinama, te njegovo pročišćavanje od razgradnih produkata i onečišćenja koristi se kromatografija obrnutih faza. Ovisno o vrsti uzorka koriste se različite pokretne faze, tj. pokretne faze različitog sastava i različitog pH. Također, vrlo često se koristi i gradijentno eluiranje u kojem dolazi do promjene sastava pokretne faze tijekom kromatografskog odjeljivanja. Kao pokretna faza često se koristi smjesa acetonitrila i vode ili fosfatnog pufera te smjesa metanola i vode ili pufera pri točno određenoj vrijednosti pH ovisno o svojstvima analita. Vrijednost pH može se podesiti korištenjem kalijevog hidroksida ili fosforne kiseline. Za analizu azitromicina u ljudskom serumu i suzama kao pokretna faza koristi se smjesa fosfatnog pufera, natrijeva perklorata, acetonitrila i metanola pri pH vrijednosti 7,0 koja se podesi dodavanjem fosforne kiseline. Npr. za analizu azitromicina u serumu štakora može se koristiti smjesa fosfatnog pufera i acetonitrila pri pH 7,2 koji se podesi dodavanjem kalijeva hidroksida. ^{46,47}

2.4.3. Tankoslojna kromatografija (*engl. thin layer chromatography, TLC*)

Tankoslojna kromatografija je tehnika tekućinske kromatografije koja se provodi na plohi na koju se nanese sloj sorbensa poput celuloze ili silikagela debljine 200-250 μm ili 100 μm . Kao ploha najčešće se koristi aluminijska pločica na koju je nanesen sloj silikagela, a otopljeni uzorak nanosi se pomoću kapilare u točku. Nakon nanošenja uzorka, pločica se postavi u staklenu kadu s poklopcem u kojoj se nalazi mala količina pokretne faze. Budući da je atmosfera u kadi zasićena parama otapala, zbog djelovanja kapilarne sile otapalo će se kretati po kromatografskoj pločici. Kada otapalo prijeđe minimalno 2/3 pločice, potrebno ju je izvaditi iz komore i posušiti. Položaj analita na pločici može se detektirati na nekoliko načina, a to su: (1) prskanje pločice reagensom poput sumporne kiseline, (2) fluorescencija pod UV-svjetlom i (3)

ninhidrin. Ninhidrin (2,2-dihidroksiindan-1,3-dion) se pripravlja kao 0,2 %-tna otopina u etanolu ili butan-1-olu, a koristi se za detekciju amina, karbamata i amida. Kada se nanese nekoliko kapljica ninhidrina na pločicu silikagela doći će do pojave ljubičaste boje jakog intenziteta ako se u smjesi nalazi jedna od navedenih kemijskih vrsta. Prednosti korištenja tankoslojne kromatografije su jednostavnost, brza izvedba i moguća istovremena analiza više uzoraka.⁴⁸

2.4.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. nuclear magnetic resonance, NMR)

Uz infracrvenu spektroskopiju i spektrometriju masa, tehnika nuklearne magnetske rezonancije je neizostavna spektroskopska tehnika u strukturnoj karakterizaciji organskih i bioloških spojeva. Tehnika NMR je nedestruktivna metoda kojom je moguće analizirati uzorke u čvrstom, tekućem i plinovitom agregatnom stanju, a primjenjiva je u analitičkoj i organskoj kemiji, biokemiji, fizici i medicini. Svaku jezgru moguće je karakterizirati sa 2 kvantna broja, a to su: (1) kvantni broj nuklearnog spina I koji može biti cijeli ili polucijeli broj, npr. 0, 1/2, 1, 3/2, itd. i (2) nuklearni magnetski spinski kvantni broj m_I koji govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetskom polju pri čemu mogućih orijentacija može iznositi $2I+1$. Spektroskopijom NMR mogu se proučavati jezgre čiji je kvantni broj različit od nule, a to su jezgre poput ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , itd. Kvantni broj nuklearnog spina ovisi o protonskom i masenom broju jezgre pa, ako je atomski i maseni broj neparan, kvantni broj nuklearnog spina bit će 0 i ove jezgre nisu aktivne u spektroskopiji NMR, a primjer takve jezgre je deuterij ^2H . Ako je atomski i maseni broj neparan, kvantni broj I bit će polucijeli broj ($n/2$), a ako je maseni broj neparan, kvantni broj I bit će cijeli broj (n). Primjenom magnetskog polja ili radiofrekvencijskih pulseva spinovi jezgri mogu se pobuditi samo ako je energija fotona jednaka razlici energije između 2 kvantna stanja, pri čemu je frekvencija fotona jednaka frekvenciji precesije spinova oko vanjskog magnetskog polja, tj. Larmorovoj frekvenciji.

Spinovi mogu međudjelovati ovisno o njihovom položaju u prostoru, a te interakcije mogu biti magnetske i električne. Magnetske interakcije bit će prisutne kod svih jezgara, a one uključuju kemijski pomak i spin-spin sprezanje. Spin-spin sprezanje je interakcija između 2 spina kroz prostor ili kemijske veze. Električne interakcije uključuju kvadrupolno sprezanje koje će biti prisutno samo kod jezgri s kvantnim brojem I većim od 1/2.

Jedan od najvažnijih parametara u spektroskopiji NMR je kemijski pomak koji predstavlja pomak pojedinog signala u NMR spektru u odnosu na referentni signal. Kemijski pomak definira se kao razlika frekvencije proučavanog i referentnog signala podijeljena s frekvencijom vanjskog magnetskog polja. Dobivenu veličinu je potrebno pomnožiti sa 10^6 zbog praktičnih razloga pa se kemijski pomak na kraju izražava bezdimenzijskom jedinicom ppm (engl. *parts per million*). Kao referentni uzorak u ^1H i ^{13}C spektroskopiji NMR koristi se tetrametil-silan (TMS). Jezgre pri većem kemijskom pomaku nalazit će se pri većoj frekvenciji, ali pri manjem magnetskom polju pa se za njih može reći da su odsjenjenije od onih jezgri koje se nalaze pri manjem kemijskom pomaku. Lokalna elektronska struktura uzrokovat će različite kemijske pomake različitih jezgara pa će tako npr. prisutnost atoma poput kisika ili halogenih elemenata uzrokovati odsjenjenje jezgara koje se nalaze u blizini ovih atoma zbog čega će njihov kemijski pomak biti pri višim vrijednostima.

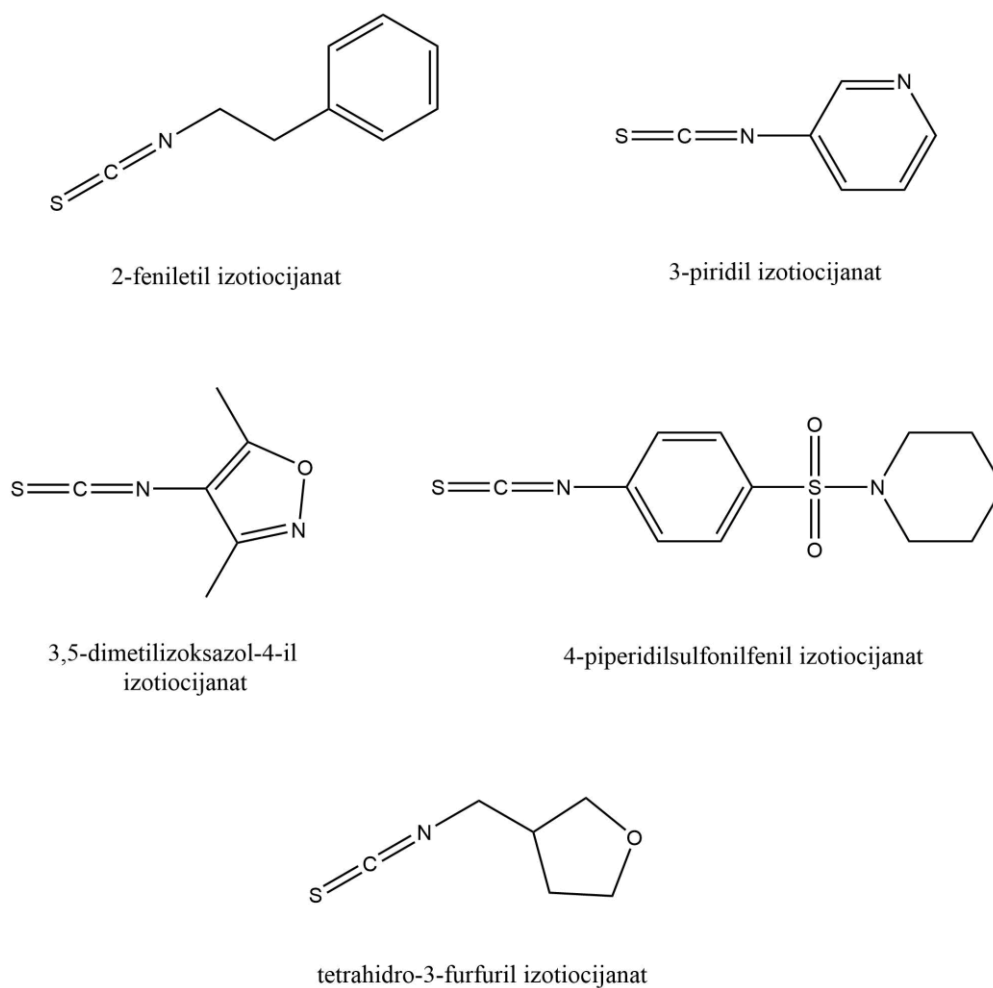
Struktura spojeva određuje se analizom spektara NMR. Eksperimentom NMR dobivaju se spektri u vremenskoj domeni koje je potrebno Fourierovom transformacijom prevesti u frekvencijsku domenu. Jednodimenzijски spektri NMR prikazuju ovisnost intenziteta signala koji je proporcionalan Larmorovoj frekvenciji o kemijskom pomaku. Jedna od osnovnih jednodimenzijских tehnika NMR je tehnika ^1H NMR u kojoj se na temelju dobivenog spektra mogu odrediti kemijski pomaci neekvivalentnih protona i konstante sprege spin-spin što omogućava određivanje raspodjele protona po funkcionalnim skupinama u molekuli. Također, često se koriste različite tehnike ^{13}C NMR poput tehnike APT (engl. *attached proton test*) i DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*) pomoću kojih se može odrediti broj ugljikovih atoma te njihov multiplicitet, tj. odgovara li signal metilnoj, metilenskoj, metinskoj skupini ili kvaternom ugljikovom atomu.

Dvodimenzijски spektri se opisuju s dvije domene: evolucijskom domenom F1 i detekcijskom domenom F2. Dvodimenzijске tehnike koje se najčešće koriste u spektroskopskoj analizi su homonuklearna tehnika COSY (engl. *correlation spectroscopy*) na temelju koje se mogu dobiti informacije o povezanosti protona kroz 2-4 kemijske veze. Vrlo često se koriste heteronuklearne tehnike HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) i HMQC (engl. *heteronuclear multiple quantum coherence*) na temelju kojih se mogu dobiti informacije o izravnoj povezanosti protona i odgovarajućeg ugljikovog atoma. Informacije o korelaciji protona s ugljikovim atomima preko 2-4 kemijske veze moguće je dobiti analizom spektara HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*).^{49, 51-53}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Sinteza makrozona

Sinteza makrozona, nove klase makrolidnih antibiotika, sastoji se od 3 koraka. Prvi korak uključuje sintezu tiosemikarbazida koristeći 5 polaznih izotiocijanata i hidrazin. Drugi korak je sinteza tiosemikarbazona iz dobivenih tiosemikarbazida i odgovarajuće karboksilne kiseline. U zadnjem koraku nastaju makrozoni vezanjem tiosemikarbazona na 9a-(γ -aminopropil) derivat azitromicina. Polazni reaktanti su bili sljedeći: 2-feniletil-izotiocijanat, 3-piridil-izotiocijanat, 3,5-dimetilizoksazol-4-il-izotiocijanat, 4-piperidilsulfonilfenil-izotiocijanat i tetrahidro-3-furfuril-izotiocijanat. Na **slici 15** prikazane su strukture navedenih izotiocijanata.



Slika 15. Strukture izotiocijanata korištenih u sintezi.

3.1.1. Sinteza tiosemikarbazida

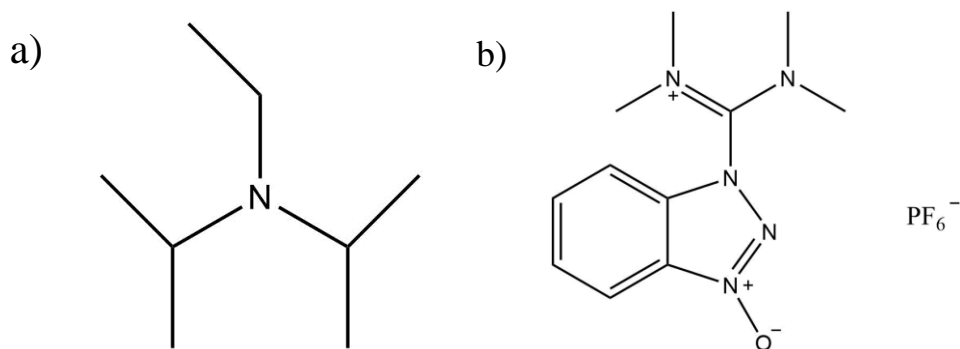
U tikvicu je dodano 234 μL hidrazina, 20 mL izopropanola i magneti \acute{c} te je reakcijska smjesa postavljena na magnetsku mješalicu u ledenu kupelj. U pripremljenu otopinu dodano je 2 mmol pojedinog izotiocijanata, a količina izotiocijanata koju je bilo potrebno dodati izračunata je na temelju poznate množine, molarne mase i gustoće pojedinog polaznog spoja. Reakcijska smjesa je ostavljena 1 h pri čemu je došlo do nastajanja tiosemikarbazida. Dobiveni tiosemikarbazid je profiltriran preko Büchnerovog lijevka uz sniženi tlak i posušen, a zatim je izvagan. Nakon provedene sinteze snimljen je spektar NMR dobivenog spoja na način da je izvagano 3-5 mg tiosemikarbazida i otopljeno u 600 μL deuteriranog dimetilsulfoksida ($\text{DMSO-}d_6$). Snimanje svih spektara NMR provedeno je na spektrometru NMR Bruker Avance III HD, 400 MHz.

3.1.2. Sinteza tiosemikarbazona

U okrugloj tikvici pripravljena je smjesa tiosemikarbazida dobivenog u prethodnom koraku i 0,10 ekvivalenata ledene octene kiseline te 22 mL izopropanola. U smjesu je na kraju dodano 1,20 ekvivalenata 4-formilbenzojeve kiseline nakon čega je postavljena na magnetsku mješalicu preko noći na sobnoj temperaturi. Dobiveni tiosemikarbazon profiltriran je preko Büchnerovog lijevka uz sniženi tlak, a nakon toga izvagan. Također, snimljen je spektar NMR dobivenog tiosemikarbazona na način koji je opisan u poglavlju 3.1.1.

3.1.3. Sinteza makrozona

U okruglu tikvicu dodano je 25 mg tiosemikarbazona, zatim 1,1 ekvivalent aktivatora HATU (heksafluorofosfat azabenzotriazol tetrametil uronij), 3 ekvivalenta DIPEA-e (*N*-diizopropiletilamin) i 5 mL diklormetana. Na **sluci 16** prikazana je struktura DIPEA-e i aktivatora HATU. Pripravljena reakcijska smjesa postavljena je na magnetsku mješalicu pri sobnoj temperaturi, a nakon 30 min miješanja u reakcijsku smjesu dodan je 1 ekvivalent prekursora, 9a-(γ -aminopropil) derivata azitromicina. Reakcijska smjesa je ostavljena preko noći. Nakon što je provedena sinteza makrozona, reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču. Zatim je snimljen spektar NMR na način da je izdvojeno 10 mg reakcijske smjese u Eppendorf epruvetu i otopljeno u 600 μL deuteriranog acetonitrila (CD_3CN).



Slika 16. Struktura: a) DIPEA-e, b) aktivatora HATU.

3.2. Pročišćavanje makrozona

3.2.1. Kolonska kromatografija

Nakon sinteze, makrozoni su pročišćeni i izolirani od neizreagiranih sastojaka reakcijske smjese tekućinskom kromatografijom na stupcu. Kao nepokretna faza korišten je silikagel na način da je za pročišćavanje 1 g sintetiziranog makrozona bilo potrebno 100 g silikagela. Kao pokretna faza korištena je smjesa otapala ψ (diklormetan, metanol, amonijak) =90:15:1,5 skraćenog naziva E+.

Kolona je pripravljena na način da je na dno postavljen mali komad vate, a nakon toga je nanosena odgovarajuća količina silikagela prethodno otopljenog u maloj količini diklormetana. Otopina silikagela dodavana je polako i jednoliko kako ne bi došlo do pojave mjehurića i zona zraka što bi znatno otežalo uspješno odjeljivanje i pročišćavanje. Nakon što se sav silikagel slegnuo kolona je isprana 2 puta sa 40 mL diklormetana nakon čega je uzorak reakcijske smjese jednoliko nanosen na kolonu. Pri pročišćavanju je korišteno gradijentno eluiranje pokretnom fazom E+ i diklormetanom. Pokretna faza je dodavana u obrocima od 10 mL na način da se prva frakcija sastojala od 100 % diklormetana i 0 % pokretne faze E+, a u svakom idućem obroku udio E+ povećavan je za 5 % sve dok određeni makrozon nije počeo izlaziti s kolone.

3.2.2. Tankoslojna kromatografija

Svaka frakcija eluirana s kromatografske kolone analizirana je tankoslojnom kromatografijom. Komora za razvijanje pločice pripravljena je na način da je u staklenu posudu dodano 20 mL pokretne faze E+. Kao nepokretna faza korištena je metalna pločica čija površina je prekrivena

tankim slojem silikagela na kojem je bilo potrebno označiti početnu točku. Na početnu točku nanosena je mala količina uzorka iz frakcije tankom staklenom kapilarom (oko 10 kapljica) i takva pločica je postavljena u komoru za razvijanje. Kada je pokretna faza dosegula frontu, pločica je izvađena i posušena. Uzorak na pločici detektiran je na dva načina. Prvi način detekcije bio je postavljanje pločice pod lampu UV, a drugi način je prskanje pločice smjesom otapala ψ (etanol, sumporna kiselina)=9:1. Ukoliko je detektirana mrlja na pločici odgovarala makrozonu, frakcija je uparena, a suhi ostatak je otopljen u 600 μ L deuteriranog acetonitrila (CD_3CN) te su snimljeni spektri NMR.

3.2.3. *Analiza pročišćenih spojeva tehnikom HPLC (engl. high performance liquid chromatography)*

Reakcijske smjese pripremljenih makrozona, kao i spojevi pročišćeni kromatografijom na stupcu, analizirani su na tekućinskom kromatografu Agilent 1260 Infinity opremljenom kvaternom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatiranim prostorom za kolonu te detektorom s nizom fotodioda. Korištena je kromatografska kolona Waters XBridge Phenyl, (dimenzija 150 mm x 4,6 mm) s promjerom čestica punila 3,5 μ m. Spojevi su eluirani gradijentno smjesom acetonitrila i pufera (10 mM NH_4HCO_3 pH=10 podešen otopinom amonijaka). Protok pokretne faze bio je 1 ml min^{-1} . Volumen injektiranja bio je 15 μ l. Valna duljina detekcija bila je 210 nm. Uzorci makrozona za analizu tehnikom HPLC pripremljeni su otapanjem reakcijske smjese do konačne masene koncentracije 5 mg ml^{-1} , odnosno 0,7 mg ml^{-1} za pročišćene spojeve.

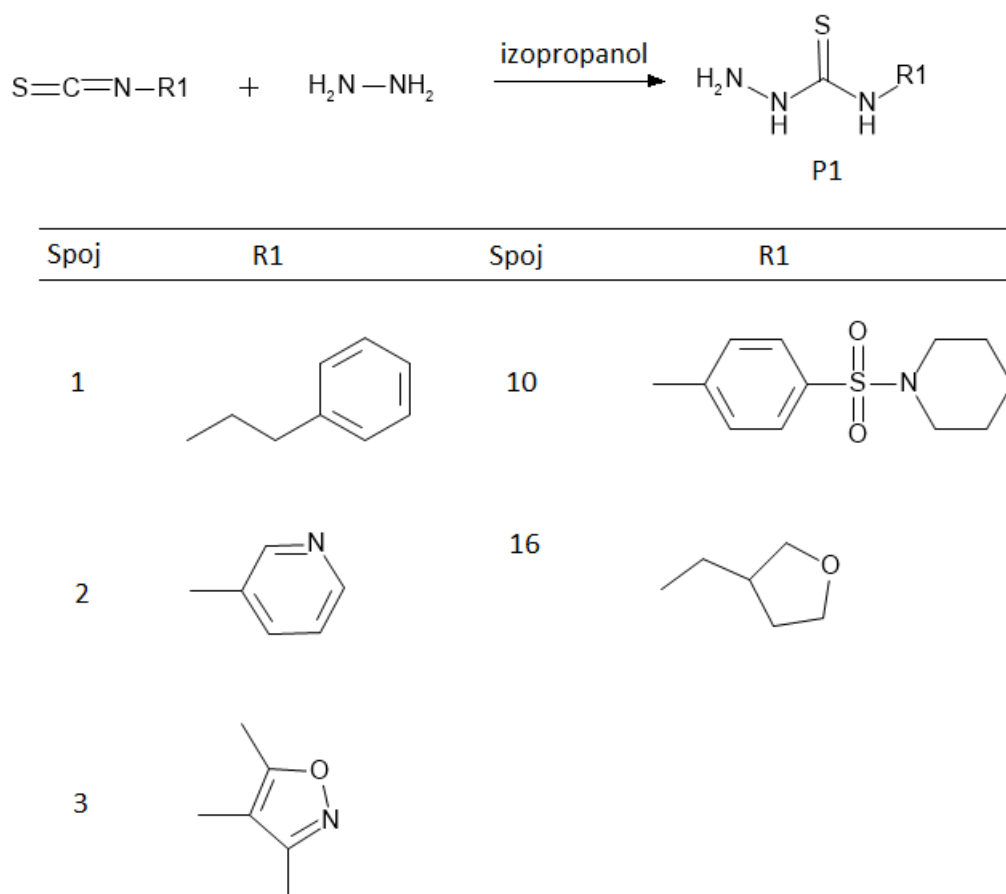
3.2.4. *Priprava uzoraka za analizu vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, (engl. liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)*

U Eppendorf epruvetu odvagano je 1 mg pripravljene reakcijske smjese i otopljeno u 1 ml acetonitrila kako bi masena koncentracija otopine iznosila 1 mg mL^{-1} . Zatim je u novu Eppendorf epruvetu dodano 200 μ L otopine makrozona koncentracije 1 mg ml^{-1} i nadopunjeno do volumena od 1 mL acetonitrirom kako bi konačna masena koncentracija otopine iznosila 0,2 mg mL^{-1} . Analiza reakcijske smjese tehnikom LC-MS provedena je u tvrtci Fidelta na instrumentu UPLC-ESI-MS proizvođača Waters koristeći elektroraspršenje kao ionizacijski izvor.

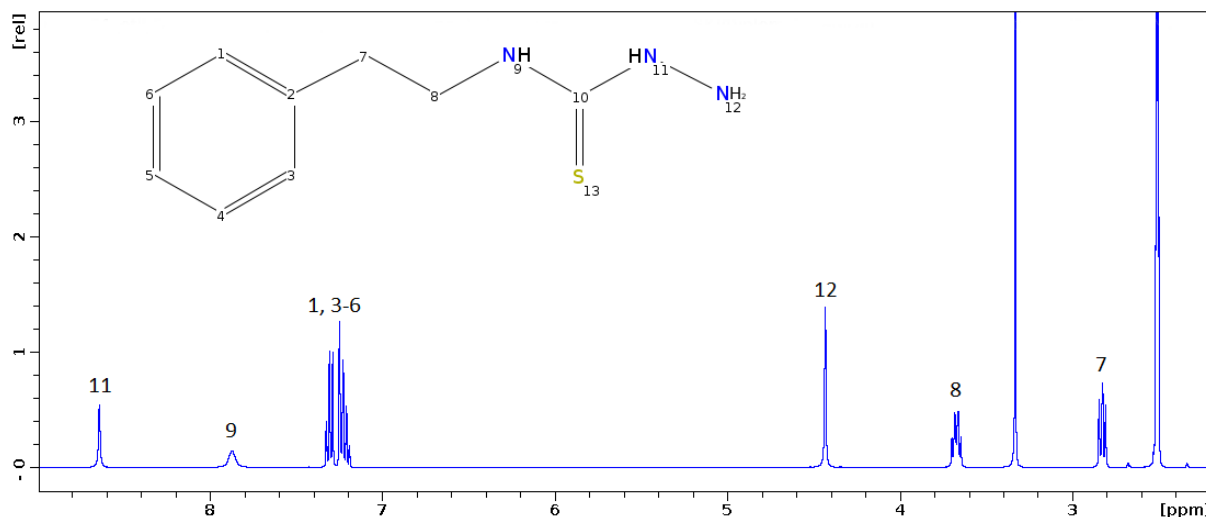
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza makrozona

Sinteza makrozona započela je pripremom tiosemikarbazida. Na **slici 17** prikazana je reakcijska shema dobivanja tiosemikarbazida (P1), a u donjem dijelu slike prikazani su supstituenti R1. Reakcijom 5 različitih izotiocijanata i hidrazina u izopropanolu nastali su bijeli talozi tiosemikarbazida. Strukture produkata potvrđene su analizom spektara ^1H NMR. Na **slici 18** prikazan je spektar ^1H NMR dobivenog tiosemikarbazida-1, a spektri ^1H NMR ostalih tiosemikarbazida, količine izotiocijanata korištenih u sintezi, kao i mase dobivenih produkata, nalaze se u Dodatku (**Tablica 3** te **slike 45** i **47**).

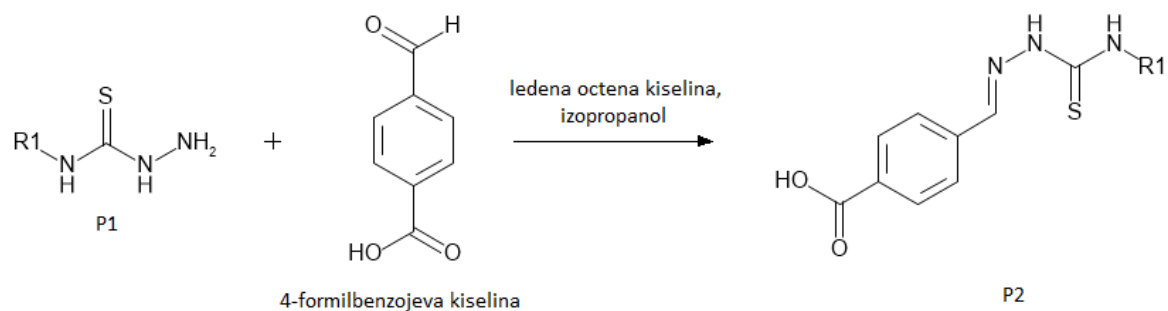


Slika 17. Reakcija dobivanja tiosemikarbazida (P1). Na donjem dijelu slike prikazane su strukture supstituenata R1.

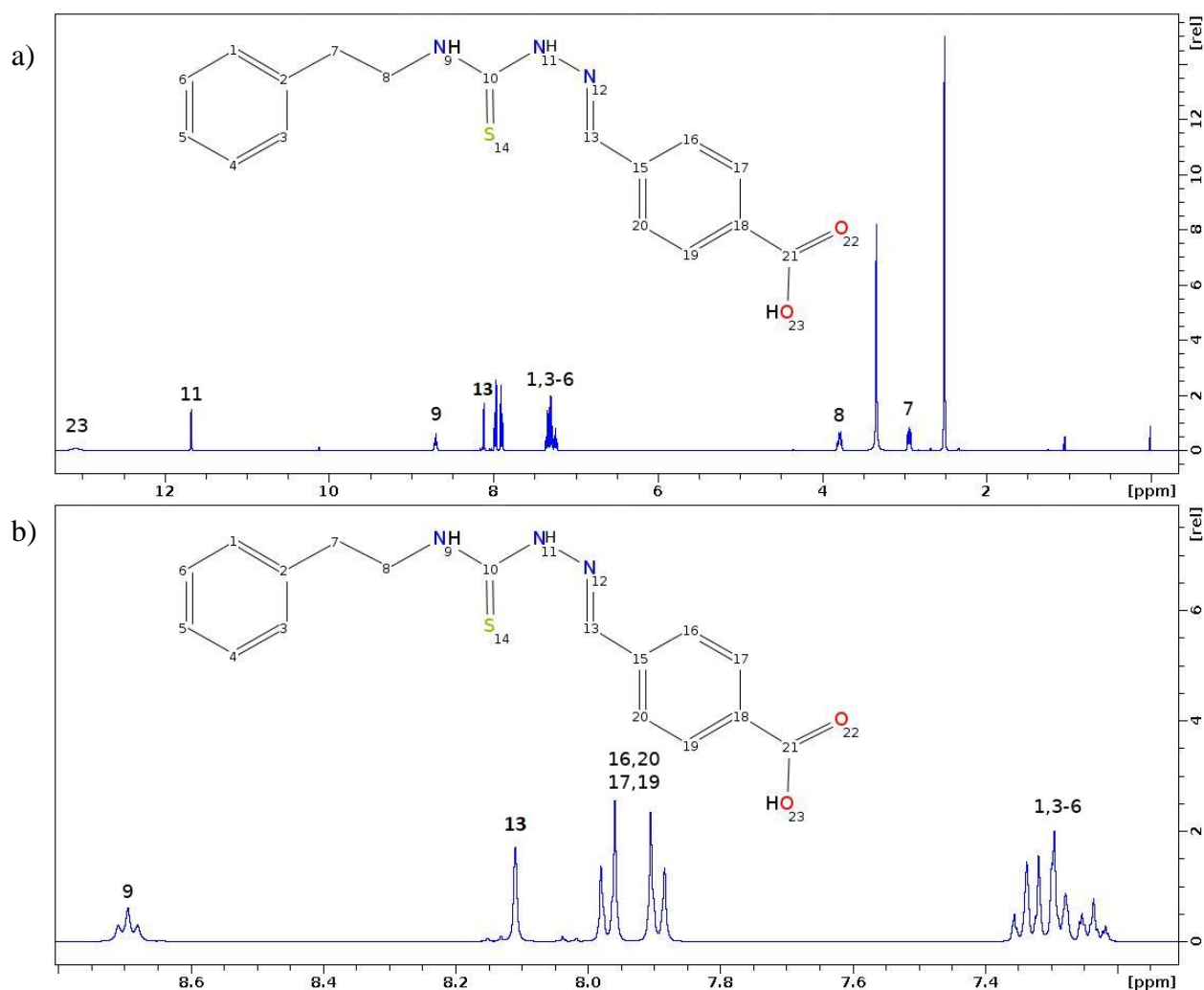


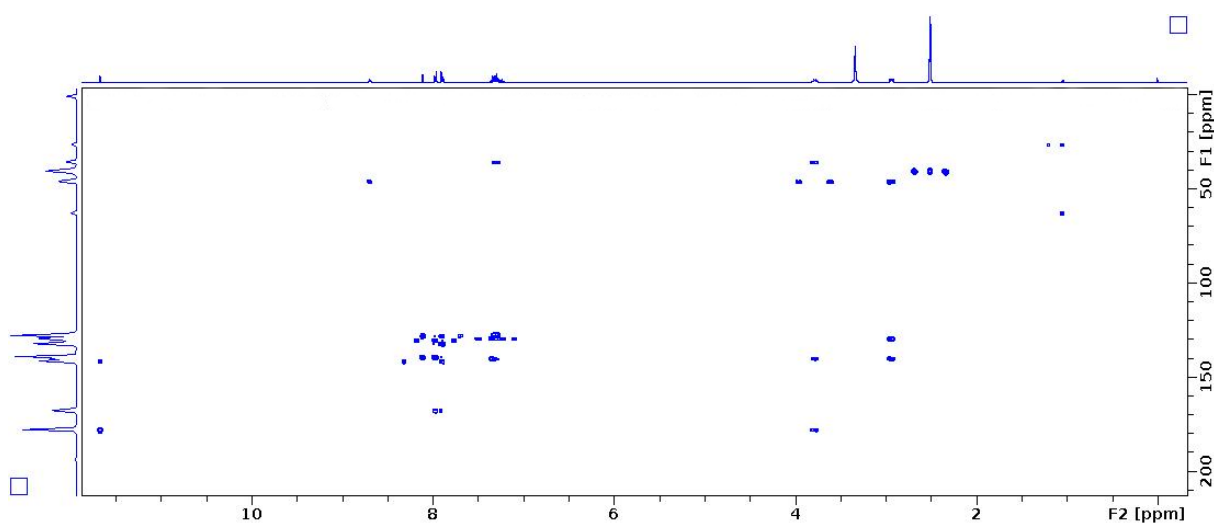
Slika 18. Spektar ^1H NMR tiosemikarbazida-1 snimljen u DMSO-d_6 .

U spektru ^1H NMR pikovi pri kemijskom pomaku 8,64 ppm i 7,88 ppm odgovaraju protonima iz $-\text{NH}-$ skupina (H11 i H9), a pik koji odgovara kemijskom pomaku protona iz terminalne amino skupine nalazi se pri 4,43 ppm (H12). Kemijski pomaci aromatskih protona (H1, H3-H6) nalaze se u očekivanom području od 7,18 ppm do 7,34 ppm. Pikovi koji odgovaraju kemijskim pomacima metilnih skupina nalaze se pri 2,82 ppm (H7) i 3,67 ppm (H8) zbog prisutnosti dušika iz amino-skupine i benzenskog prstena koji imaju odsjenjujući efekt. U spektrima NMR preostala 4 sintetizirana tiosemikarbazida kemijski pomaci primarne i sekundarnih amino skupina nalaze se pri vrlo sličnim vrijednostima kemijskih pomaka, što je potvrda da je prvi korak sinteze bio uspješan. Dobiveni tiosemikarbazidi su zatim otopljeni u izopropanolu i podvrgnuti reakciji s ledenom octenom kiselinom i 4-formilbenzojevom kiselinom kako bi došlo do nastajanja tiosemikarbazona.(P2).4-formilbenzojeva kiselina ima ulogu poveznice (tzv. linkera) preko koje će se molekula tiosemikarbazona vezati na γ -aminopropilni lanac na poziciju 9a- u makrolaktonskom prstenu azitromicina. Nakon što se reakcijsku smjesu ostavi preko noći dolazi do pojave blijedožutog taloga. Mase reaktanata korištenih u drugom reakcijskom koraku i mase dobivenih tiosemikarbazona nalaze se u Dodatku (**Tablica 4**). Na **slici 19** prikazana je reakcijska shema dobivanja tiosemikarbazona. Analizirani su spektri ^1H , HSQC, COSY i HMBC sintetiziranih tiosemikarbazona. Na **slici 20** prikazan je spektar ^1H NMR tiosemikarbazona-1, a na **slici 21** spektar HMBC, dok se u Dodatku nalaze spektri COSY i HSQC (Dodatak, **slika 40**).



Slika 19. Reakcijska shema dobivanja tiosemikarbazona.

Slika 20. Spektar ^1H NMR tiosemikarbazona-1: a) cijeli spektar, b) uvećani prikaz aromatskog područja od 7 ppm do 9 ppm.

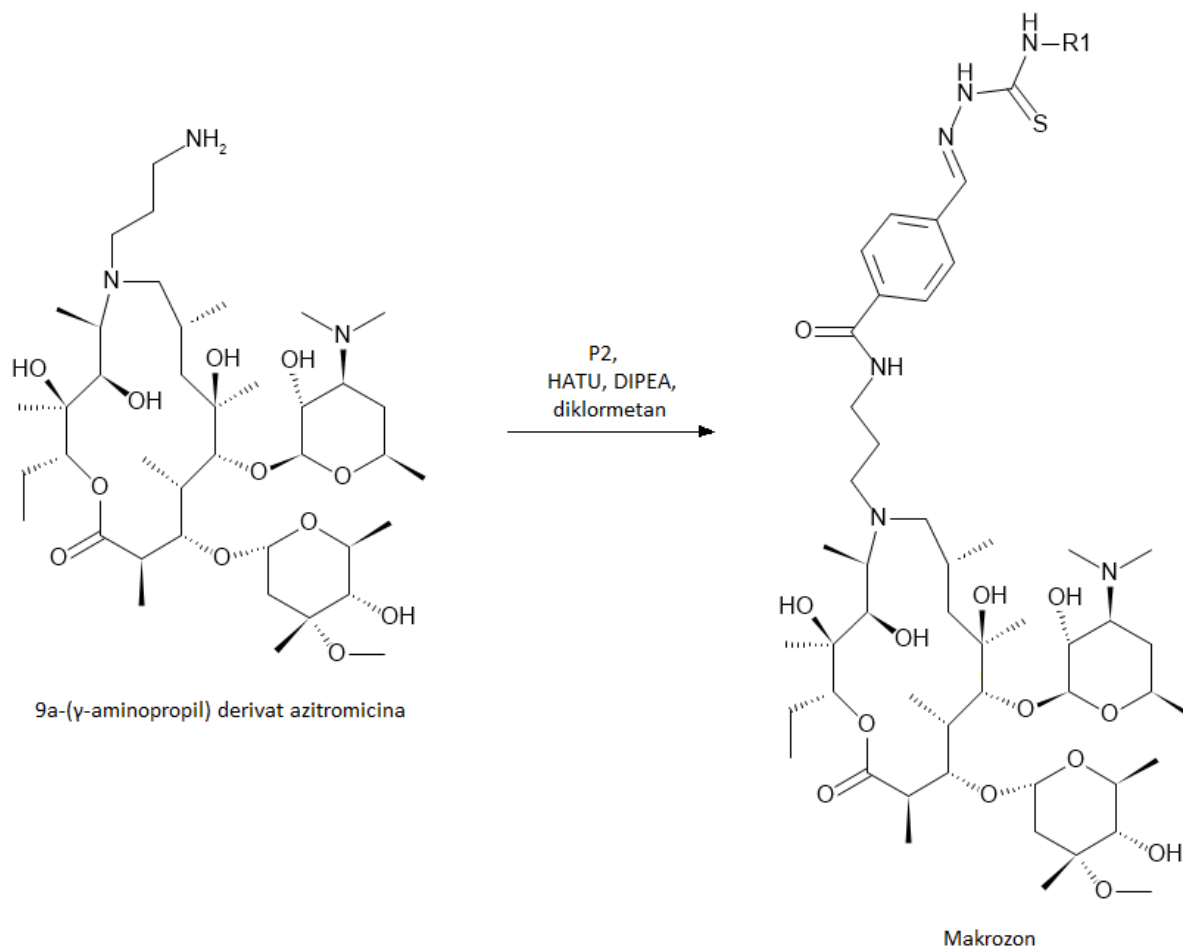


Slika 21. Spektar HMBC tiosemikarbazona-1.

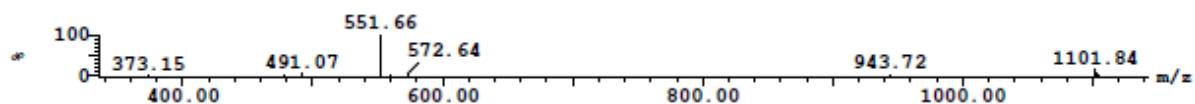
U spektru ^1H NMR tiosemikarbazona-1 (**slika 20.a**) može se opaziti singlet pri 13,07 ppm koji odgovara protonu iz karboksilne skupine (H23). Ova pretpostavka potvrđena je analizom spektra HSQC (Dodatak, **slika 40**) u kojem je uočeno da taj proton nije u korelaciji niti s jednim ugljikovim atomom. Signal protona H23 prisutan je i u spektrima ^1H NMR preostalih tiosemikarbazona u rasponu od 12,15 ppm do 13,11 ppm (Dodatak, **slike 41-44, slike 46, 47.b**) i **48**). Signali protona sekundarnih amino-skupina, H11 i H9, nalaze se pri 11,67 ppm (H11) i 8,69 ppm (H9) u spektru tiosemikarbazona-1 (**slika 20**), odnosno 8,64 ppm (H11) i 7,88 ppm (H9) u spektru tiosemikarbazida-1 (**slika 18**). Promjena kemijskog pomaka navedenih protona prema višim vrijednostima u spektru tiosemikarbazona-1 može se objasniti nastajanjem dvostruke veze između dušikovog i ugljikova atoma u Schiffovoj bazi. Nadalje, u spektru ^1H NMR tiosemikarbazona-1 nedostaje singlet u rasponu od 4,43 ppm do 4,45 ppm koji je prisutan u spektru ^1H NMR tiosemikarbazida-1, a odgovara protonu H12, što dodatno potvrđuje nastajanje Schiffove baze. Ovaj singlet prisutan je jedino u spektru ^1H NMR tiosemikarbazona-3 (Dodatak, **slika 43**) što upućuje na to da izotiocijanat nije u potpunosti izreagirao u drugom koraku sinteze ovog produkta P2. Nadalje, ovu pretpostavku potvrđuje i činjenica da je prinos reakcije drugog koraka sinteze veoma mali i iznosi 11,4 % (Dodatak, **Tablica 4**). U spektrima ^1H NMR svih pripremljenih tiosemikarbazona dolazi do pojave singleta u rasponu od 8,05 ppm do 8,2 ppm što odgovara protonu vezanom na ugljikov atom iz dvostruke veze s dušikom (H13, **slika 20**). Iz spektra COSY tiosemikarbazona-1 (Dodatak, **slika 40.a**) može se uočiti da je

proton H13 u korelaciji s aromatskim protonima H16, H17, H19 i H20 koji su odsjenjeniji u odnosu na aromatske protone H1, H3-H6 zbog blizine karboksilne skupine i dvostruke veze. Protoni tiosemikarbazonskog dijela molekule (H1, H3-H6) su u korelaciji s metilnom skupinom H7 koja se nalazi pri 2,93 ppm. Druga metilna skupina, H8, pri kemijskom pomaku od 3,78 ppm, je odsjenjenija zbog prisutnosti sekundarne amino skupine H9 s kojom je i u korelaciji prema spektru COSY.

Na **slici 22** prikazana je reakcijska shema dobivanja makrozona iz prethodno pripremljenih tiosemikarbazona uz DIPEA-u i aktivator HATU. DIPEA se u organskoj kemiji koristi kao baza, ali je vrlo loš nukleofil. Na dušikovom atomu prisutan je slobodni elektronski par koji može reagirati s elektrofilima, no, zbog prisutnosti etilne i 2 izopropilne skupine, reagirat će samo s protonima. U ovoj reakciji slobodni elektronski par iz dušika deprotonirat će karboksilnu skupinu iz molekule tiosemikarbazona. HATU u ovoj reakciji ima ulogu aktivatora, a u organskoj sintezi koristi se za dobivanje amida i to vrlo često u kombinaciji s DIPEA-om. Nastajanje amidne veze uz aktivator HATU odvija se uz formiranje 7-eročlanog prstena u prijelaznom stanju koji je stabiliziran dušikovim atomom iz piridinskog prstena. Mase reaktanata korištenih u trećem koraku sinteze i mase dobivenih reakcijskih smjesa makrozona prikazane su u Dodatku u **Tablici 5**. Reakcijom je dobivena žuta bistra otopina koja nakon uparavanja prelazi u gustu uljastu tekućinu. Reakcijske smjese analizirane su tehnikom LC-MS te je potvrđena prisutnost sintetiziranih makrozona u svim reakcijskim smjesama. Na **slici 23** prikazan je spektar MS makrozona-1 u pozitivnom modu, a spektri MS preostalih makrozona nalaze se u Dodatku (**Slika 50**).



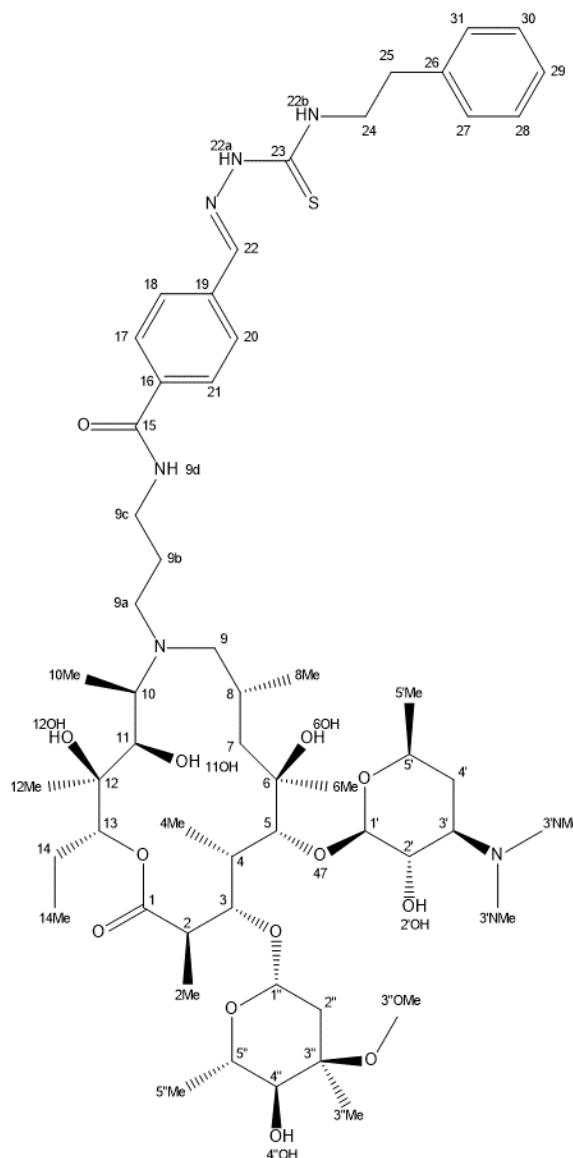
Slika 22. Reakcija shema dobivanja makrozona.



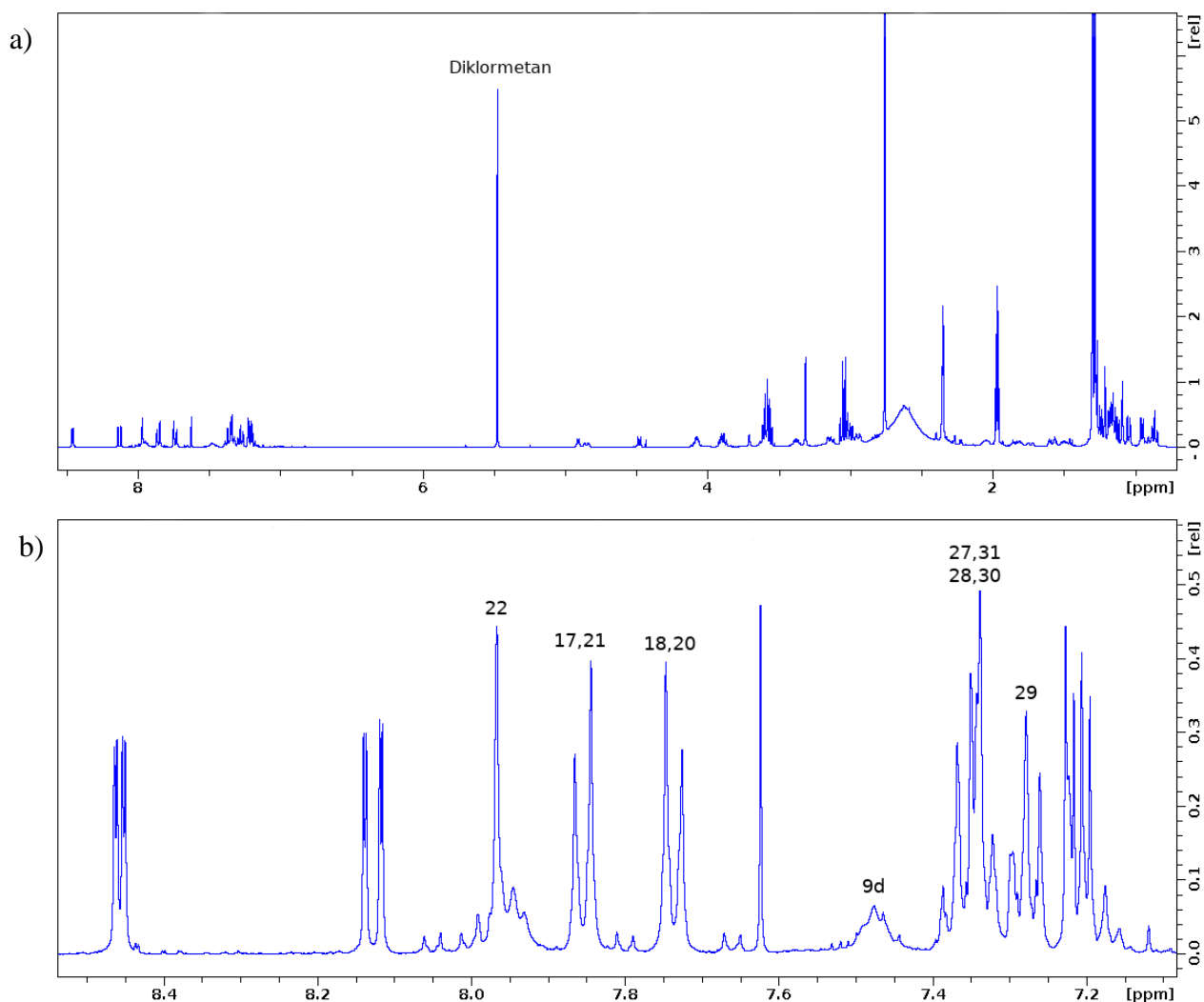
Slika 23. Spektar MS makrozona-1.

Na **slici 24** prikazana je je struktura makrozona-1, a na **slici 25** spektar ^1H NMR reakcijske smjese makrozona-1 dobivenog u trećem koraku sinteze. U uvećanom dijelu spektra ^1H NMR makrozona-1 (**slika 25 b**) može se uočiti triplet pri 7,47 ppm (H9d) koji odgovara protonu vezanom na dušikov atom iz amidne veze, što potvrđuje da je treći korak sinteze bio uspješan, tj. da je došlo do nastajanja makrozona. Protoni iz hidroksilnih skupina vezanih na makrolaktonski prsten, te kladinozu i desozamin, kao i protoni sekundarnih amino skupina tiosemikarbazonskog dijela, izmijenili su se s deuterijem iz acetonitrila korištenog kao otapalo, stoga u spektru nema njihovih signala. Signali u području od 7,26 do 7,36 ppm (H27-H31)

odgovaraju signalima protona iz benzenskog prstena tiosemikarbazonskog dijela molekule. Signali u području od 7,74 ppm do 7,85 ppm (H17,H18,H20,H21) odgovaraju protonima benzenskog prstena iz kiselinskog dijela molekule. Dakle, signali ovih protona su odsjenjeniji u odnosu na signale protona iz tiosemikarbazonskog dijela molekule zbog prisutnosti amidne i imino skupine. Singlet pri 7,94 ppm odgovara protonu iz imino veze (H22).

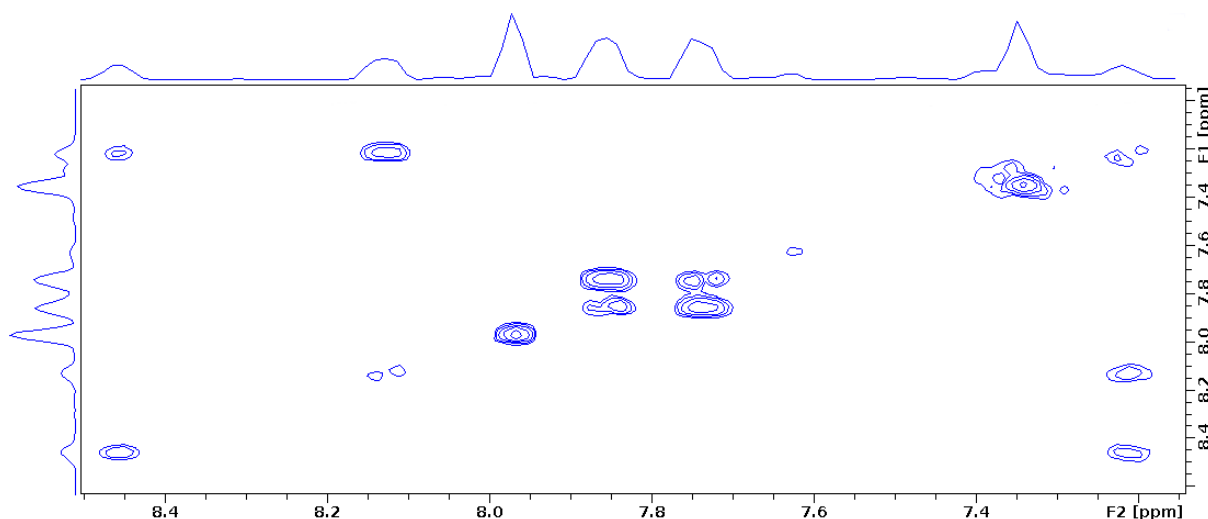


Slika 24. Struktura makrozona-1.



Slika 25. Spektar ¹H NMR makrozona-1: a) cijeli spektar, b) uvećani dio od 7 ppm do 8,6 ppm.

Signali pri kemijskom pomaku od 7,2 ppm i dva dublet dubleta u području iznad 8 ppm ne odgovaraju kemijskom pomaku niti jednog protona iz molekule makrozona. Također, analizom COSY spektra (**slika 26**) može se uočiti da su navedeni signali u međusobnoj sprezi što upućuje na to da su u reakcijskoj smjesi prisutna onečišćenja poput neizreagirano aktivatora HATU i drugi nepoznatih nusprodukata, zbog čega je bilo potrebno pročistiti ovu smjesu kolonskom kromatografijom.

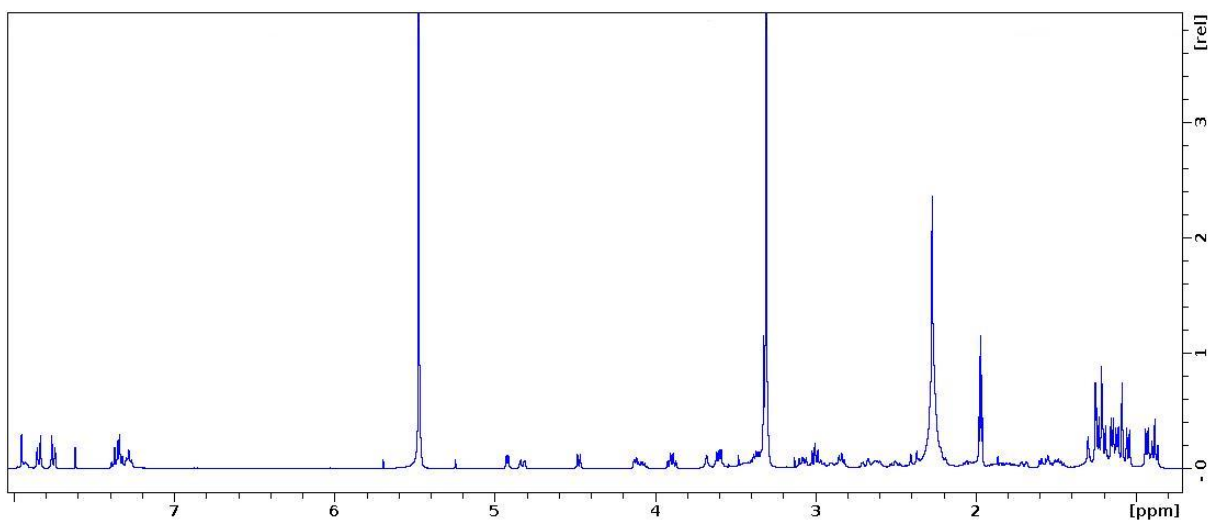


Slika 26. Uvećani dio spektra COSY makrozona-1.

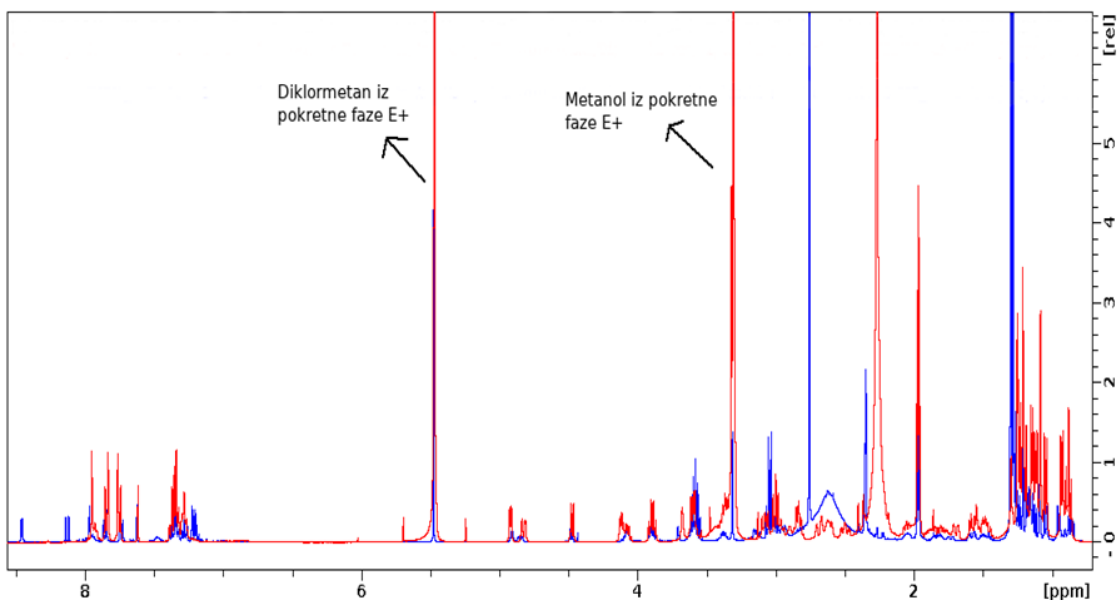
4.2. Pročišćavanje makrozona tekućinskom kromatografijom

Makrozoni su pročišćeni kromatografijom na stupcu koristeći silikagel kao nepokretnu fazu i pokretnu fazu E+. Pretpostavka je bila da će makrozoni eluirati s kolone u frakciji u kojoj udio pokretne faze E+ iznosi 45 %-50 %. Tijekom pročišćavanja makrozona-1 u frakciji u kojoj je udio pokretne faze E+ iznosio 15 % detektirana je mrlja na pločici TLC. Nakon snimanja i analize spektra NMR signali u spektru nisu odgovarali makrozonu-1. Nadalje, prilikom pročišćavanja makrozona-3 došlo je do pojave mrlje na pločici TLC u frakciji u kojoj je udio pokretne faze E+ iznosio 25 %. Analizom spektra NMR također je utvrđeno da se ne radi o makrozonu. Makrozon-1 te makrozon-3 eluirani su s kolone uz udio pokretne faze E+ 45 % i 50 %. Na **slici 27** prikazan je spektar ^1H NMR makrozona-1 nakon pročišćavanja. **Slika 28** prikazuje spektar ^1H NMR makrozona-1 prije pročišćavanja (plavo) i nakon pročišćavanja (crveno). U spektru prikazanom plavom bojom mogu se uočiti signali koji odgovaraju protonima benzenskog prstena iz tiosemikarbazonskog (H27-H31) i kiselinskog dijela molekule (H17,18,20,21), zatim protonu iz amidne veze (H9d) i protonu iz imino veze (H22). Također, izostaju signali protona sekundarnih amino skupina i hidroksilnih skupina zbog izmjene protona s deuterijem iz acetonitrila korištenog kao otapalo za snimanje spektara NMR. Pri kemijskom pomaku od 7,2 ppm prisutan je kvartet koji odgovara signalu aktivatora HATU. U spektru COSY (**slika 26**) može se uočiti da je navedeni signal u korelaciji s dva dublet dubleta koji se nalaze pri kemijskom pomaku većem od 8 ppm. U spektru označenom crvenom

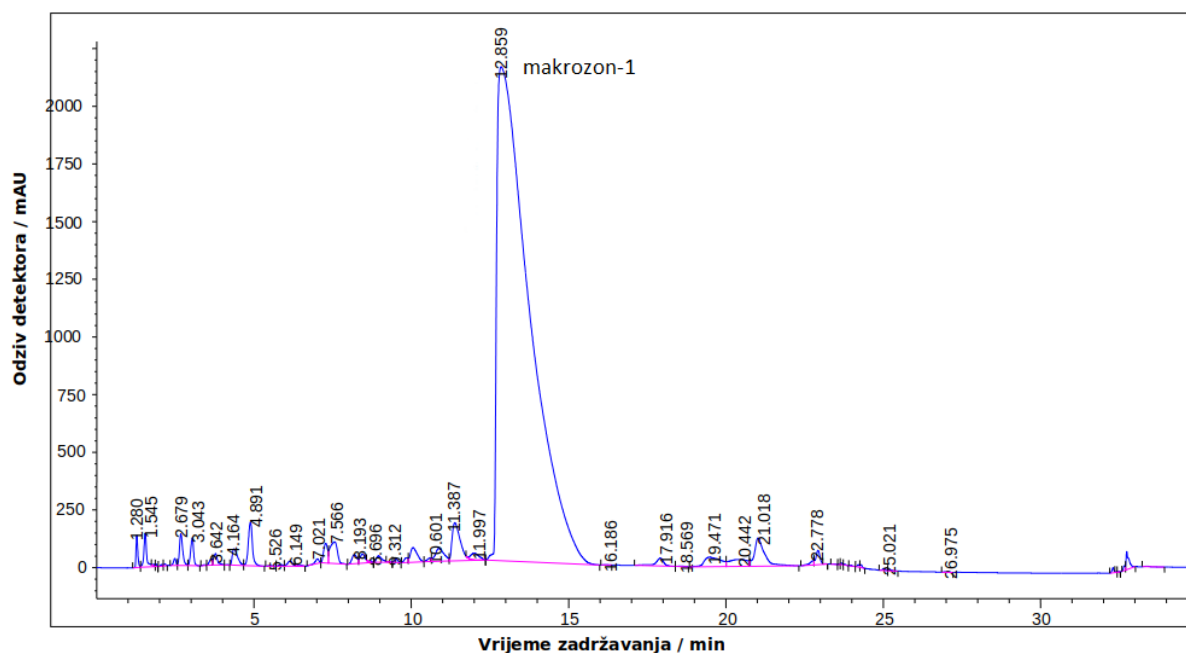
bojom može se uočiti kako su dva dublet dubleta pri kemijskom pomaku većem od 8 ppm i kvartet pri 7,2 ppm odsutni pa se može zaključiti da je aktivator HATU uspješno odijeljen od makrozona. Na **slici 29** prikazan je kromatogram frakcije makrozona-1 pročišćenog na koloni. Na kromatogramu se može uočiti kako su u frakciji, uz glavnu komponentu makrozon-1, prisutna još neka nepoznata onečišćenja. Određena je čistoća izoliranog makrozona metodom normalizacije pikova i ona iznosi 87 % što dodatno potvrđuje da pročišćavanje kromatografijom na koloni nije bilo dovoljno uspješno.



Slika 27. Spektar ^1H NMR makrozona-1 nakon pročišćavanja.

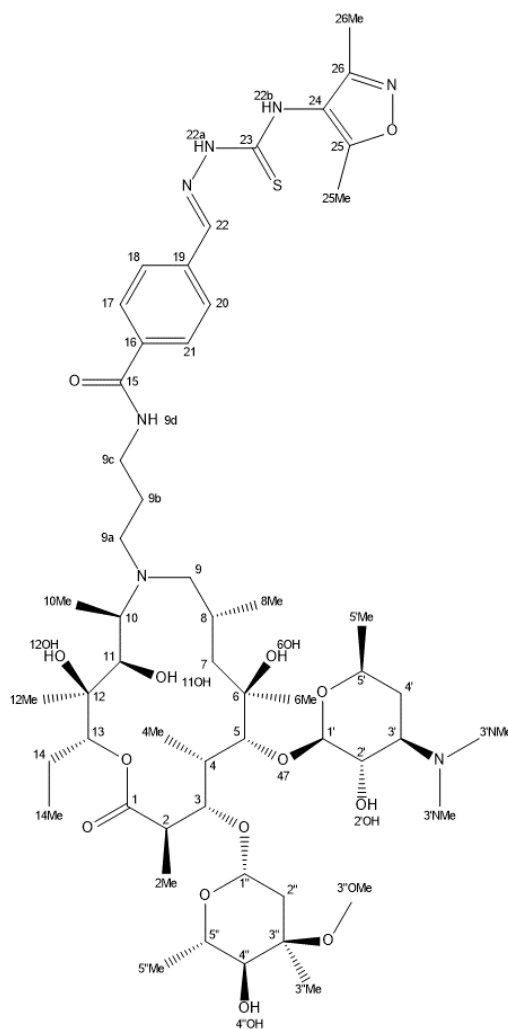


Slika 28. Spektar ^1H NMR makrozona-1 prije i nakon pročišćavanja. Plavom bojom prikazan je spektar makrozona prije pročišćavanja, a crvenom bojom nakon pročišćavanja..

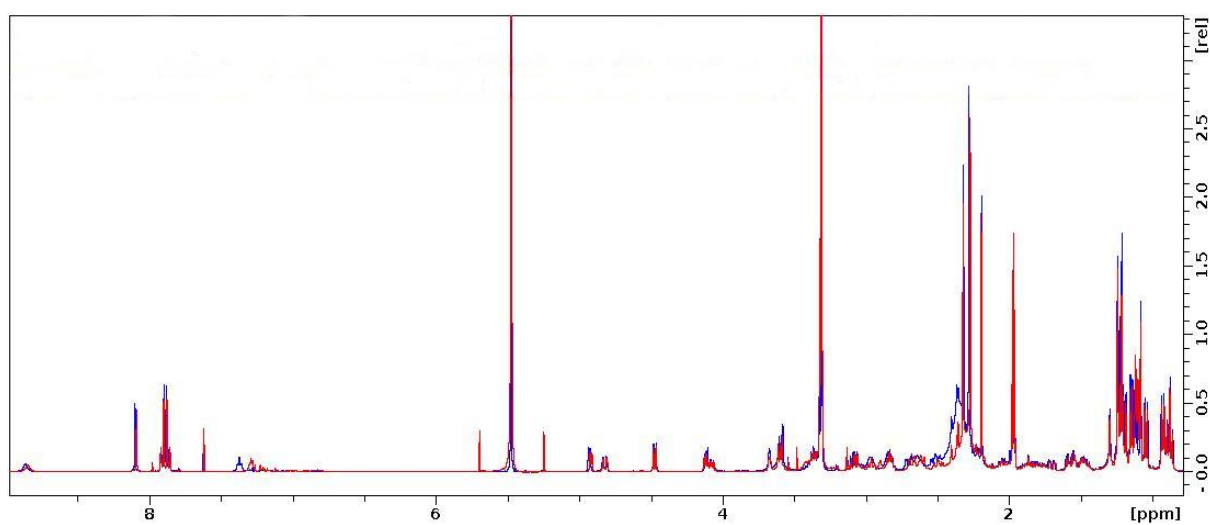


Slika 29. Kromatogram frakcije makrozona-1 pročišćenog na koloni.

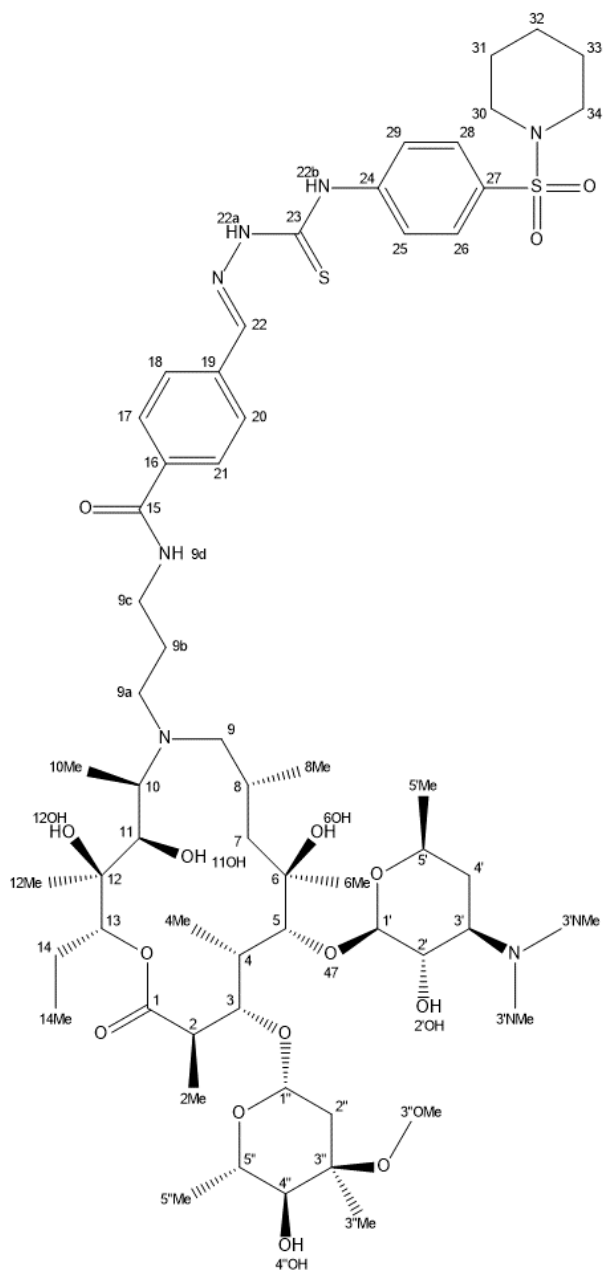
Na **slici 30** prikazana je struktura makrozona-3, a na **slici 31** spektar ^1H NMR navedenog makrozona. Makrozon-3 je također izoliran iz smjese u frakciji u kojoj je udio pokretne faze E+ iznosio 45 % - 50 %. Međutim, u spektru ^1H NMR ovog makrozona u područjima od 7,1 ppm do 7,3 ppm te u području od 5 ppm do 5,8 ppm prisutni su signali koji ne odgovaraju kemijskom pomaku niti jednog protona u molekuli makrozona, a prisutni su i u spektru ^1H NMR prije pročišćavanja što znači da pročišćavanje nije bilo u potpunosti uspješno.



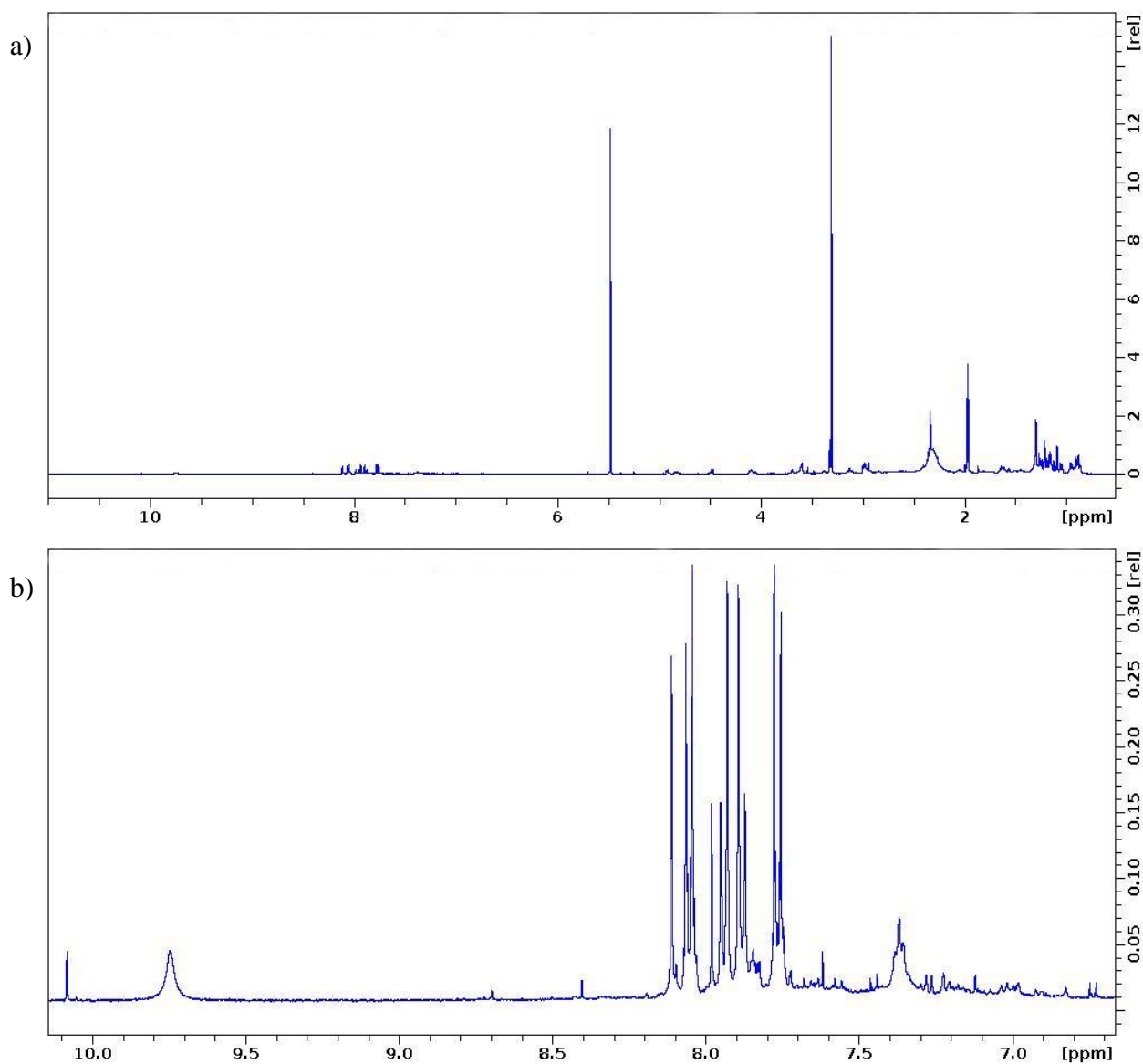
Slika 30. Struktura makrozona-3.

Slika 31. Spektar ^1H NMR makrozona-3. Plavom bojom označen je spektar makrozona prije pročišćavanja, a crvenom bojom spektar makrozona nakon pročišćavanja.

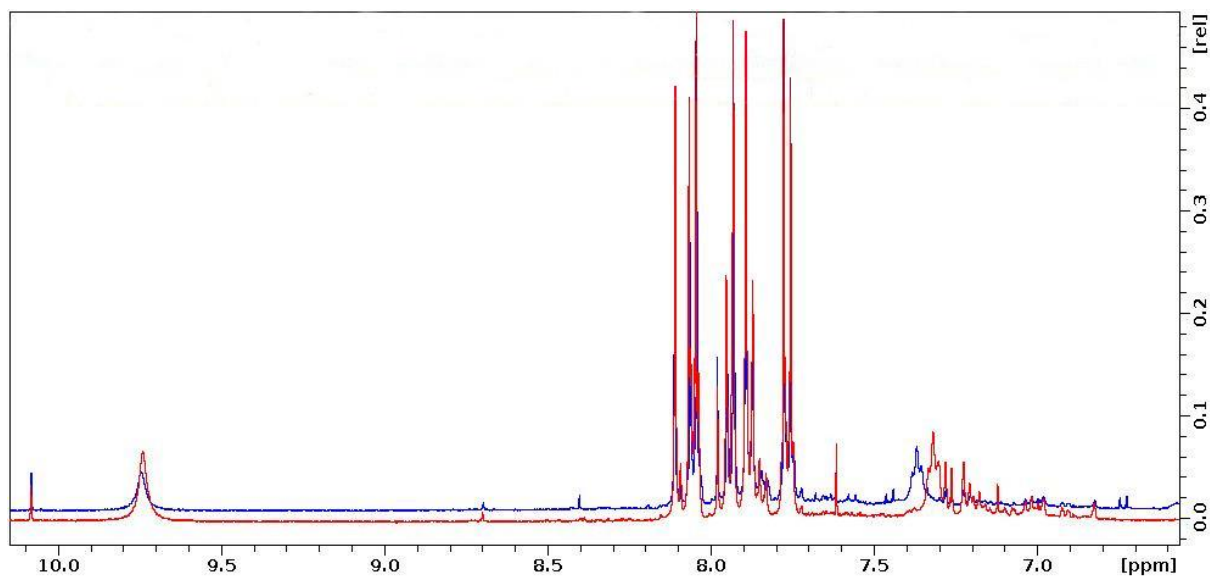
Struktura makrozona-10 prikazana je na **slici 32**. Na **slici 33.a)** prikazan je spektar ^1H NMR makrozona-10 prije pročišćavanja, a na **slici 33.b)** uvećani dio spektra ^1H NMR makrozona prije pročišćavanja u području od 6,6 ppm do 10,05 ppm. U spektru se može uočiti triplet koji odgovara protonu iz amidne veze na 7,37 ppm (H9d), signali koji odgovaraju benzenskim protonima iz kiselinskog dijela molekule pri 7,85 (H17 i H21) i 7,90 ppm (H18 i H20) i signali protona iz imino veze pri 8,08 ppm (H22) koji su prisutni i u spektrima ostalih makrozona. Signali pri 7,73 ppm (H26 i H28) i 8,08 ppm (H25 i H29) odgovaraju aromatskim protonima iz tiosemikarbazonskog dijela molekule. Također, na **slici 33.b)** mogu se uočiti signali iznad 8,3 ppm niskog intenziteta koji ne odgovaraju signalima protona iz makrozona što znači da reakcijska smjesa nakon trećeg koraka sinteze, također, ne sadrži samo molekulu makrozona nego i onečišćenja zbog čega je dobivenu smjesu potrebno pročistiti. Makrozon-10 izašao je s kolone pri udjelu pokretne faze E+ od 45 % do 50 %. Na **slici 34** prikazan je uvećani dio spektra ^1H NMR makrozona-10 na kojem je prikazana usporedba čistoće smjese prije i nakon pročišćavanja na koloni. Iz spektra prikazanog na **slici 34** može se zaključiti kako pročišćavanje nije bilo uspješno jer, iako su malog intenziteta, signali u području iznad 8,3 ppm, koji ne odgovaraju signalima protona iz molekule makrozona, su prisutni. Također, snimljen je kromatogram frakcija u kojima je makrozon-10 izoliran s kolone, a prikazan je na **slici 35** i određena je čistoća izoliranog spoja metodom normalizacije pikova koja iznosi 66 % što dodatno potvrđuje da pročišćavanje nije bilo uspješno.



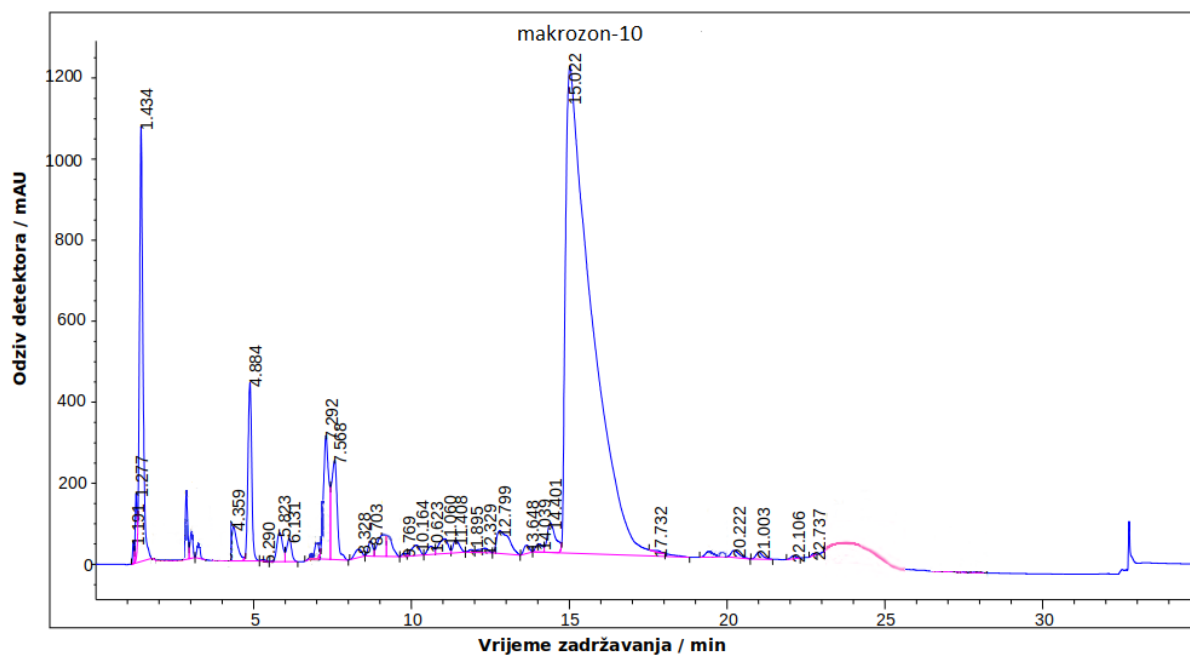
Slika 33. Struktura makrozona-10.



Slika 33. Spektar ^1H NMR makrozona-10 nakon pročišćavanja: a) cijeli spektar, b) uvećani dio od u području od 6,6 ppm do 10,05 ppm.



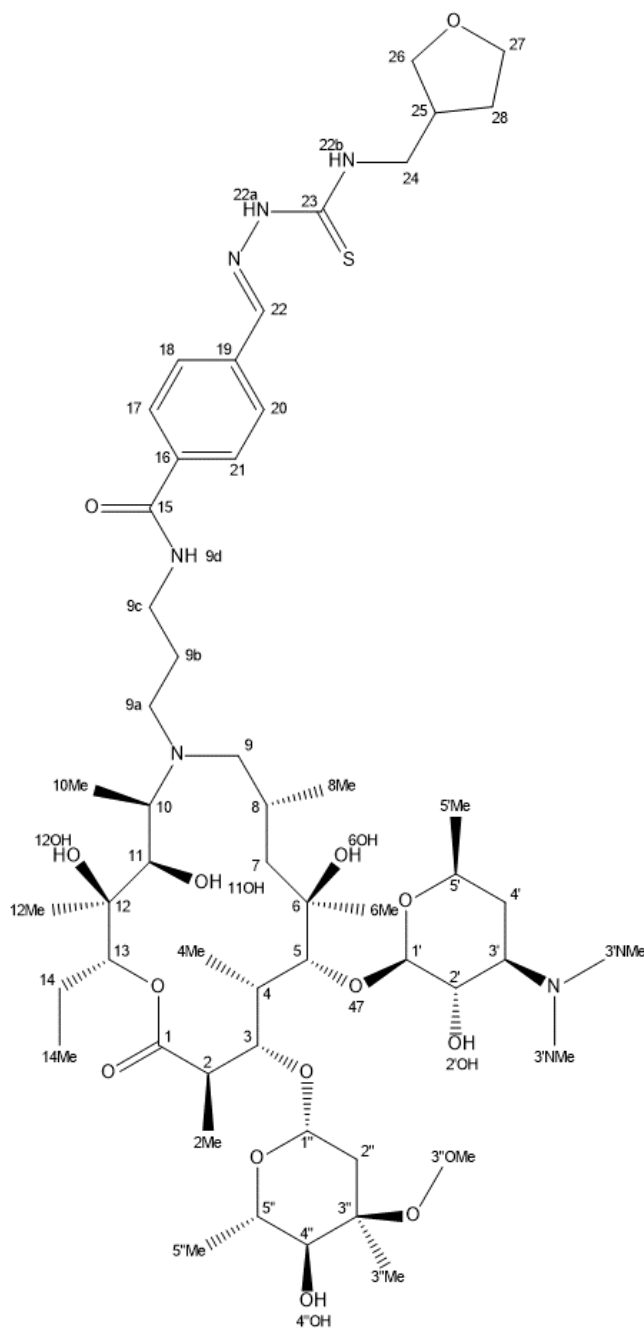
Slika 34. Uvećani prikaz spektra ^1H NMR makrozon-10 prije i nakon pročišćavanja u rasponu od 6,5 ppm do 10,2 ppm. Plavom bojom prikazan je spektar makrozona prije pročišćavanja, a crvenom bojom nakon pročišćavanja.



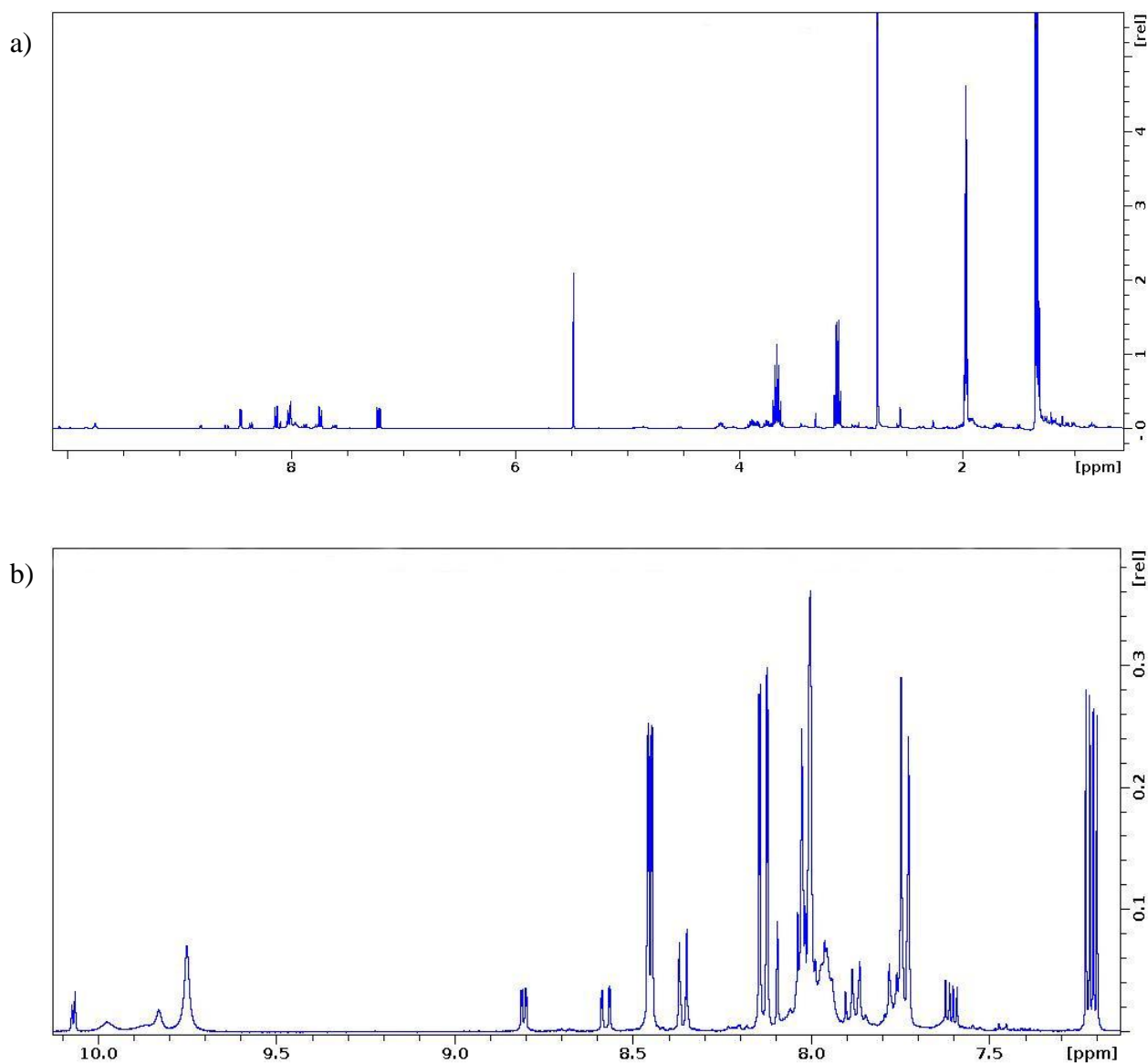
Slika 35. Kromatogram frakcije makrozon-10 izoliranog s kolone.

Makrozon-2 je također bilo potrebno pročišćavati zbog prisutnih onečišćenja u reakcijskoj smjesi. Navedeni makrozon je izoliran s kolone pri udjelu pokretne faze E+ od 45 % do 50 %, a signali onečišćenja su unatoč pročišćavanju bili prisutni u spektru (Dodatak, **slike 51 i 52**). Također, u Dodatku se nalazi kromatogram frakcija u kojima je makrozon-2 izoliran s kolone (**slika 53**), a čistoća 3-piridil-makrozona izoliranog s kolone iznosi 80 %.

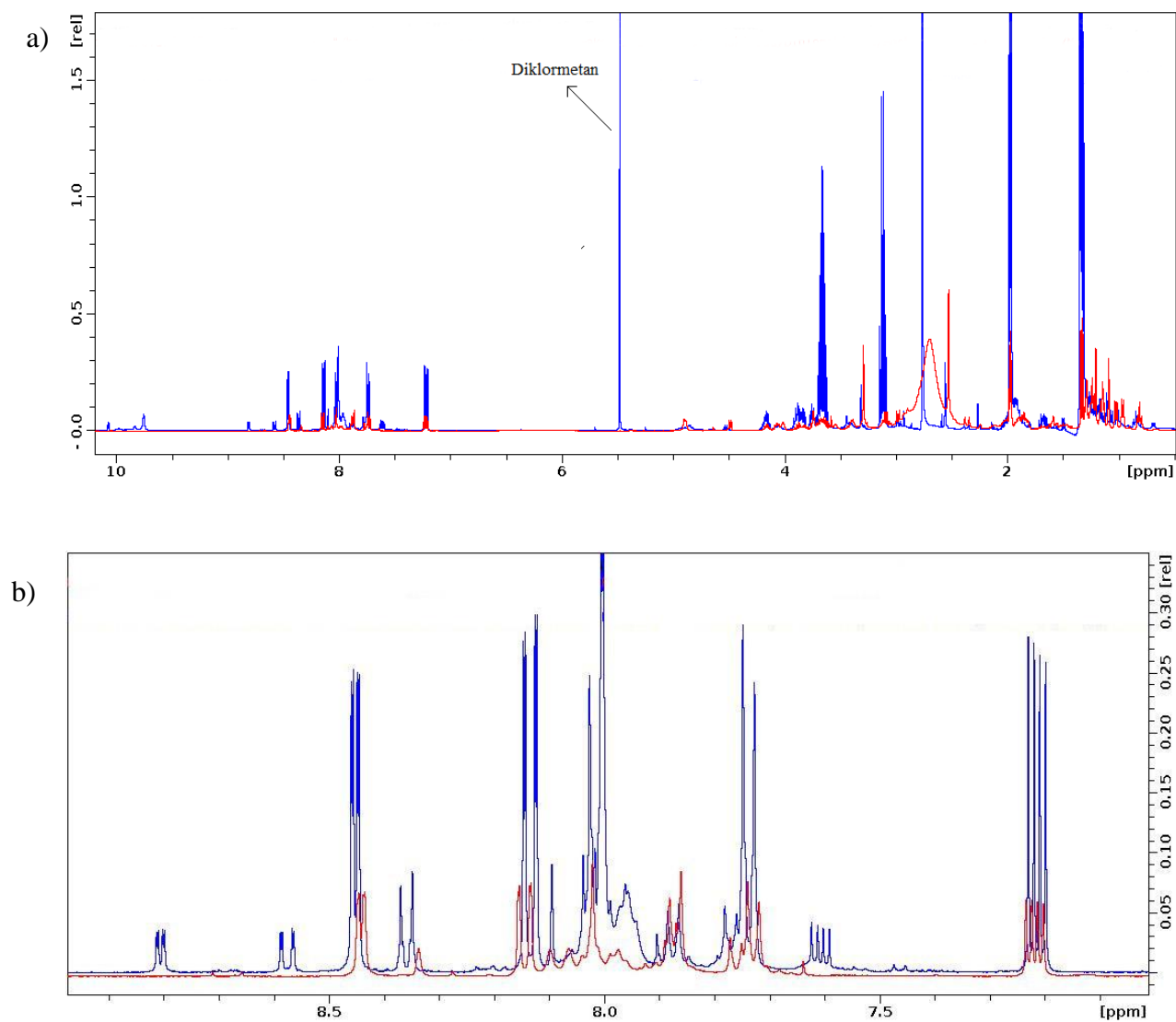
Na **slici 36** prikazana je struktura makrozona-16, a na **slici 37** prikazan je spektar makrozona-16 prije pročišćavanja. Iz spektra se mogu uočiti signali u području od 7,70 ppm do 8,05 ppm koji odgovaraju protonu iz amidne veze (H9d), aromatskim protonima iz kiselinskog dijela molekule (H17, H18, H20 i H21) i protonu iz imino veze (H22). Međutim, u području od 7,0 ppm do 10,05 ppm prisutno je još nekoliko signala niskog intenziteta koji ne odgovaraju signalima protona makrozona zbog čega je i ovaj makrozon bilo potrebno pročistiti. Pročišćavanje makrozona-16 bilo je problematično zato što je spoj izoliran s kolone tek kada je udio pokretne faze E+ iznosio 100 % i to nakon dodavanja 140 mL pokretne faze. Na **slici 38** prikazan je spektar ^1H NMR navedenog makrozona nakon pročišćavanja. Analizom spektra ^1H NMR makrozona-16 može se uočiti kako su dva dublet dubleta pri kemijskom pomaku većem od 8,5 ppm odsutni, no još uvijek je prisutan kvartet pri kemijskom pomaku od 7,2 ppm koji ne odgovara signalu protona makrozona-16 što znači da pročišćavanje nije bilo u potpunosti uspješno. Neučinkovitost pročišćavanja makrozona-16 dodatno je potvrđeno analizom kromatograma frakcije navedenog makrozona prikazanog na **slici 39**. Čistoća spoja iznosila je 53 %.



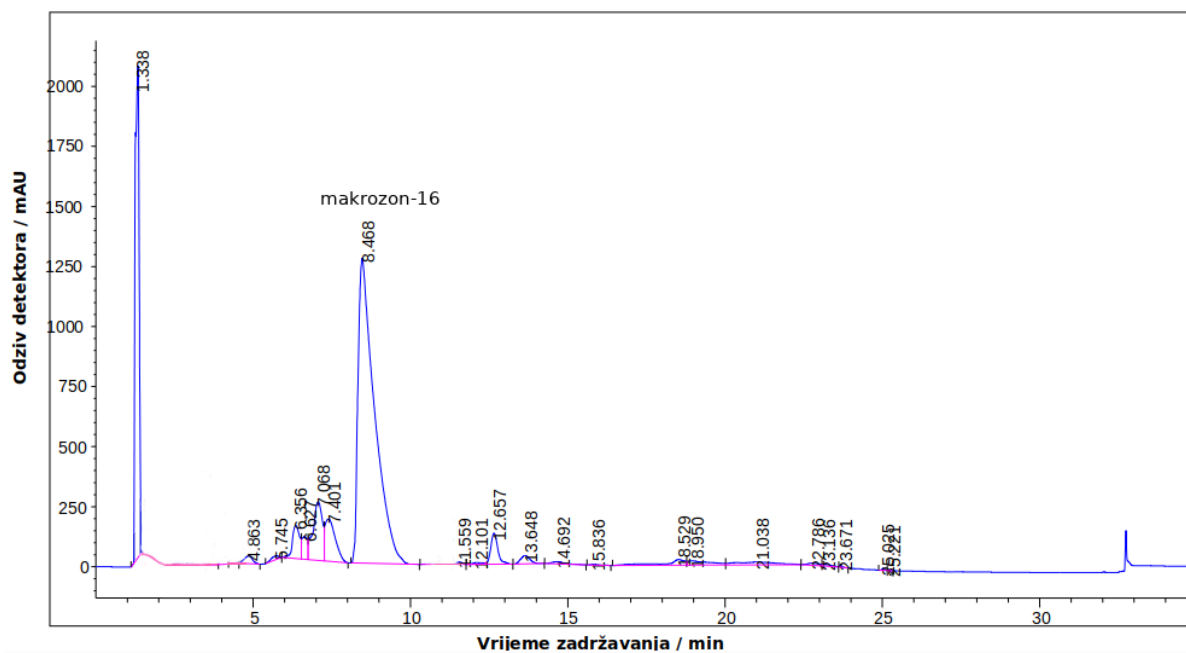
Slika 36. Struktura makrozona-16.



Slika 37. Spektar ^1H NMR makrozona-16 prije pročišćavanja: a) cijeli spektar, b) uvećani dio spektra od 7,2 ppm do 10,1 ppm.



Slika 38. Usporedba spektra ^1H NMR makrozona-16 prije i poslije pročišćavanja: a) cijeli spektar, b) uvećani dio od 7,1 ppm do 10,1 ppm. Plavom bojom prikazan je spektar makrozona prije pročišćavanja, a crvenom bojom spektar makrozona poslije pročišćavanja.



Slika 39. Kromatogram frakcija u kojima je makrozon-16 izoliran s kolone.

§ 5. ZAKLJUČAK

Opisana je metoda sinteze makrozona, novih derivata makrolidnih antibiotika, koja se sastoji od tri koraka. Prvi korak uključuje pripremu tiosemikarbazida iz 5 različitih izotiocijanata, a drugi korak pripremu tiosemikarbazona reakcijom 4-formilbenzojeve kiseline i dobivenog tiosemikarbazida. U zadnjem koraku dolazi do nastajanja makrozona uz formiranje amidne veze između karboksilne skupine tiosemikarbazona i amino-skupine 9a-(γ -aminopropil) derivata azitromicina. Dobiveni spojevi potvrđeni su spektrometrijom masa i spektroskopijom NMR. Analizom spektara NMR ustanovljeno je da u smjesi nije prisutan samo makrozon nego i onečišćenja poput neizreagirano aktivatora HATU i nusprodukata koje je potrebno dodatno identificirati.

Dobiveni makrozoni pročišćeni su tekućinskom kromatografijom na stupcu, no pročišćavanje nije bilo dovoljno učinkovito jer neka onečišćenja prisutna u reakcijskoj smjesi nakon trećeg koraka sinteze koeluiraju s makrozonom. Postupak pročišćavanja novosintetiziranih makrozona kromatografijom na stupcu treba dodatno optimirati. Također, trebalo bi istražiti učinkovitost pročišćavanja makrozona tehnikom ekstrakcije na čvrstoj fazi, SPE (engl. *solid phase extraction*), tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) te vezanim sustavom tekućinske kromatografije i ekstrakcije na čvrstoj fazi, LC-SPE.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APT – engl. *attached proton test*

$CDCl_3$ – deuterirani klororm

$CHCl_3$ – kloroform

CH_2Cl_2 – diklormetan

DEPT – engl. *distortionless enhancement proton test*

DIPEA – *N,N*-diizopropietilamin

Dr – bakterija *Deinococcus radiodurans*

Ec – bakterija *Escherichia Coli*

HATU – Heksafluorofosfat azabenzotriazole tetrametil uronij

IF – inicijacijski faktor

IR – infracrvena spektroskopija, engl. *infrared spectroscopy*

LiOH - litijev hidroksid

MALDI-TOF – matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem uz analizator koji mjeri vrijeme leta, engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*

MeOH – metanol

MLS_B – skupina antibiotika u koju pripadaju makrolidi, linkozamid, Streptogramin B

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina, engl. *messenger ribonucleic acid*

NMR – nuklearna magnetska rezonancija, engl. *nuclear magnetic resonance*

P1 – produkt prvog koraka reakcije sinteze(tiosemikarbazid)

P2 – produkt drugog koraka reakcije sinteze(tiosemikarbazon)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina, engl. *ribosomal ribonucleic acid*

S – sedimentacijski koeficijent

TLC – tankoslojna kromatografija, engl. *thin-layer chromatography*

tRNA – prijenosna ribonukleinska kiselina, engl. *transfer ribonucleic Acid*

UV – spektroskopija u ultraljubičastom području, engl. *ultraviolet spectroscopy*

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. J. Cheesman, A. Ilanko, B. Blonk, I. E. Cock, *Pharmacogn. Rev.* **11** (2017) 57-72.
2. L. Katz, A. S. Mankin, *Encycl. Microbiol.*, **3rd Edition**, (2009), 529-558.
3. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, **6th Edition**, W. H. Freeman and Company, New York, 2013, str. 1103-1139.
4. J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nat Rev Microbiol.* **3** (2005) 870-881.
5. M. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Trends in Biochem. Sci.* **32** (2006) 20-25.
6. A. Antoun, M. Y. Pavlov, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *The EMBO Journal* **25** (2006) 2539-2550.
7. V. Ramakrishnan, *Cell* **108** (2002) 557-572.
8. F. Franceschi, E. M. Duffy, *Biochem. Pharmacol.* **7** (2001) 1016-1025.
9. Y. Nakajima, *Chemistry, Biology and Practice*, **2nd Edition** (2002), 453-500
10. T. Tenson, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **330** (2003) 1005-1014.
11. S. Mutak, *J. Antibiot.* **60** (2007) 85-122.
12. I. Kanfer, M. F. Skinner, R. B. Walker, *J. Chromat. A* **812** (1998) 225-286.
13. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics* **5** (2016) 1-13.
14. Y. Nakajima, *J. Infect. Chemother.* **5** (1999) 61-74.
15. J. M. Zuckermann, *Infect Dis Clin N Am.* **18** (2004) 621-649.
16. J. M. Zuckermann, F. Qamar, B. R. Bono, *Med Clin N Am* **95** (2011) 761-791.
17. B. Arsić, P. Novak, J. Barber, M. G. Rimoli, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides*, **1st Edition**, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, 2018, str. 1-35.
18. Y. Kohno, *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice*, **2nd Edition**, Tokyo, 2002., 327-361.
19. A. Hassanzadeh, J. Barber, C. A. Morris, P. A. Gorry, *J. Phys. Chem.* **111** (2007) 10098-10114.
20. A. E. Fohner, A. Sparreboom, R. A. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **27** (2017) 164-167.

21. M. J. Parnham, V. Eraković Haber, E. J. Gaimarellos-Bourboulis, G. Perletti, G. M. Verleden, R. Vos, *Pharmacol. Ther.* **143** (2014) 225-245.
22. N. Kujundžić, G. Kobrehel, Z. Banić, Ž. Kelnerić, B. Koić Prodić, *Eur. J. Med. Chem.* **30** (1995), 455-462.
23. B. W. Yang, M. Goldsmith, J. P. Rizzi, *TetraHedron Lett.* **35** (1994), 3025-3028.
24. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics* **5** (2016) 1-13.
25. F. Schlünzen, J. M. Harms, F. Francheschi, H. A. S. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath, *Structure* **11** (2003) 329-338.
26. J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Molecular Cell* **10** (2002) 117-128.
27. A. D. Petropoulos, E. C. Kouvela, A. L. Starosta, D. N. Wilson, G. P. Dinos, D. L. Kalpaxis, *J. Mol. Biol.* **385** (2009) 1179-1192.
28. F. Schlünzen, J. M. Harms, F. Franceschi, H.A.S. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath, *Structure* **11** (2003) 329-338.
29. N. Vasquez Mankin, A. S. Mankin, *Trends Biochem. Sci.* **43** (2018) 668-684.
30. F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Francheschi, *Nature* **413** (2001) 814-821.
31. J. M. Munita, C. A. Arias, *Microbiol. Spectr.* **4** (2016) 1-37.
32. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257-270.
33. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949-960.
34. W. S. Champney, R. Burdine, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 2141-2144.
35. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Dumić, M. Cindrić, H. Čipčić Paljetak, N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3459-3470.
36. Z. Matušić Ištuk, S. Mutak, N. Kujundžić, G. Kragol, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 4498-4510.
37. M. Bukvić Krajačić, P. Novak, M. Cindrić, K. Brajša, M. Dumić, N. Kujundžić, *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 138-145.
38. Barton *et.al.*, *Chemokine Receptor 4 Antagonists*, *Pat. Int. Appl.* 2012025473, 2012.
39. Alihodžić *et al.*, *9a-substituted Azalides*, *Pat. Int. Appl.* 2007125414, 2007.
40. M. Perić, A. Fajdetić, R. Rupčić, S. Alihodžić, D. Žiher, M. Bukvić Krajačić, K. S. Smith, Z. Ivezić Schönfeld, J. Padovan, G. Landek, D. Jelić, A. Hutinec, M. Mesić, A. Ager, W. Y. Ellis, W. K. Milhous, C. Ohrt, R. Spaventi, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 1389-1401.

41. M. Bukvić Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša, N. Kujundžić, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21** (2011) 853-856.
42. R. Matsa, P. Makam, M. Kaushik, S.L. Hoti, T. Kannan, *Eur. J. Pharm. Sci.* **137** (2019) 1-43.
43. L. R. P. de Siqueira, P. A. T. de Moraes Gomes, L. P. de Lima Ferreira, M. J. B. de Melo Rego, A. Cristina, L. Leite, *Eur. J. Med. Chem.* **170** (2019) 237-260.
44. D. Palanimuthu, R. Poon, S. Sahni, R. Anjum, D. Hibbs, H.-Y. Lin, P. V. Bernhardt, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Eur. J. Med. Chem.* **139** (2017) 612-632.
45. M. A. Soares, M. A. Almeida, C. Marins-Goulart, O. A. Chaves, A. Echevarria, M. C.C. de Oliveira, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27** (2017) 3546-3550.
46. J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, Wiley, Cambridge, 2002, str. 4-30.
47. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Zagreb, 2006, str. 1-110.
48. I. Kanfer, M. F. Skinner, R. B. Walker, *J. Chromatogr. A* **812** (1998) 255-286.
49. T. Mitchell, B. Costisella, *NMR – From Spectra to Structures, 2nd Edition*, Springer-Verlag, Berlin, 2007, str. 1-50.
50. E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, *Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectral Data, 3rd Edition*, Springer-Verlag, Berlin, 2000., str. 161-304.
51. M. Balci, *Basic 1H and 13C-NMR spectroscopy, 1st Edition*, Elsevier, Ankara, 2005., 3-139.
52. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, str. 1-45.
53. A. H.H. Bakheit, B. M.H. Al-Hadiya, A. A. Abd-Elgalil, *Profiles Drug Subst., Excipients, Relat. Methodol.* **39** (2014) 2-34.

§ 8. DODATAK

Tablica 3. Mase reaktanata korištenih u prvom koraku sinteze i mase dobivenih tiosemikarbazida (P1).

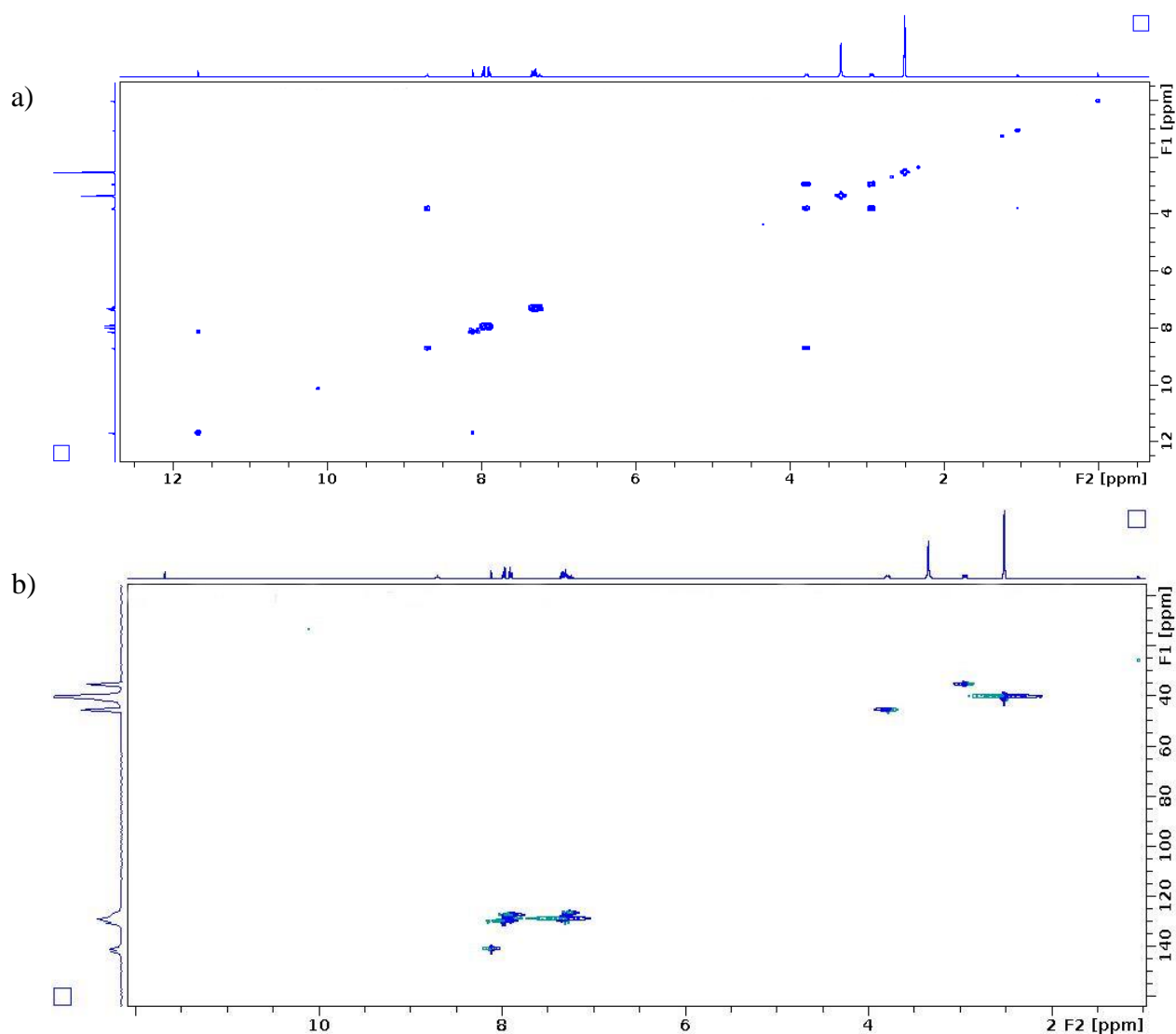
	V (izotiocijanat)/ μL	m (izotiocijanat)/mg	m (P1)/mg
1-feniletil-izotiocijanat	298,00		203,00
3-piridil-izotiocijanat	223,23		284,31
3,5-dimetilizoksazol-4-il-izotiocijanat	200,00		65,59
4-piperidilsulfonilfenil-izotiocijanat		564,75	554,14
Tetrahidro-3-furfuril-izotiocijanat	255,73		128,71

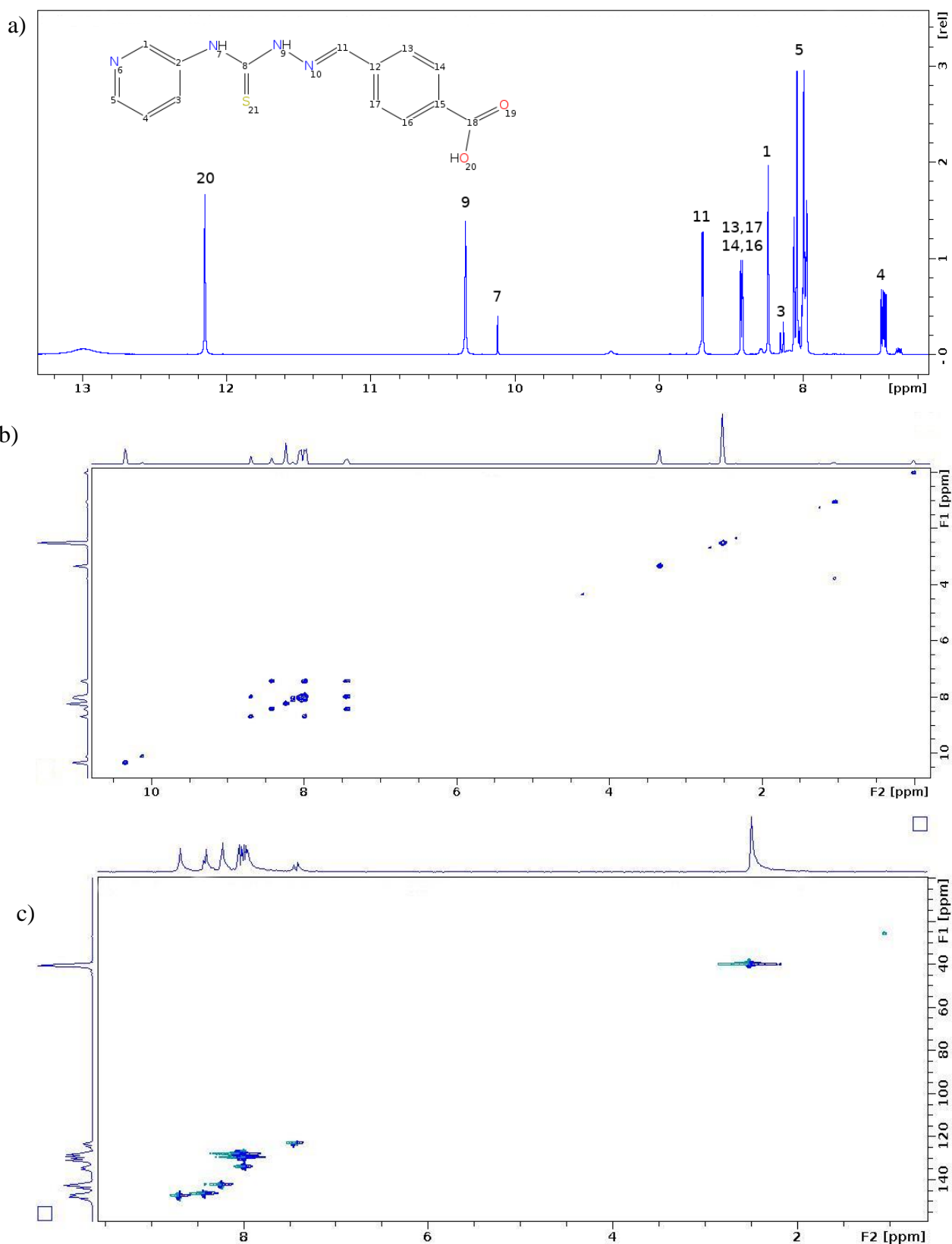
Tablica 4. Mase reaktanata korištenih u drugom koraku sinteze, mase dobivenih tiosemikarbazona (P2) i prinosi reakcija.

	m(P1)/mg	m(4-formilbenzojeva kis.)/ mg	V($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$)/ μL	m(P2)/mg	$\eta/\%$
1-feniletil-izotiocijanat	199,89	184,41	6	222,50	66,4
3-piridil-izotiocijanat	281,28	301,24	10	440,63	87,7
3,5-dimetilizoksazol-4-il-izotiocijanat	64,09	62,00	2	12,46	11,4
4-piperidilsulfonilfenil-izotiocijanat	542,15	310,59	9,85	661,24	85,9
Tetrahidro-3-furfuril-izotiocijanat	123,58	127,05	4	215,24	99,6

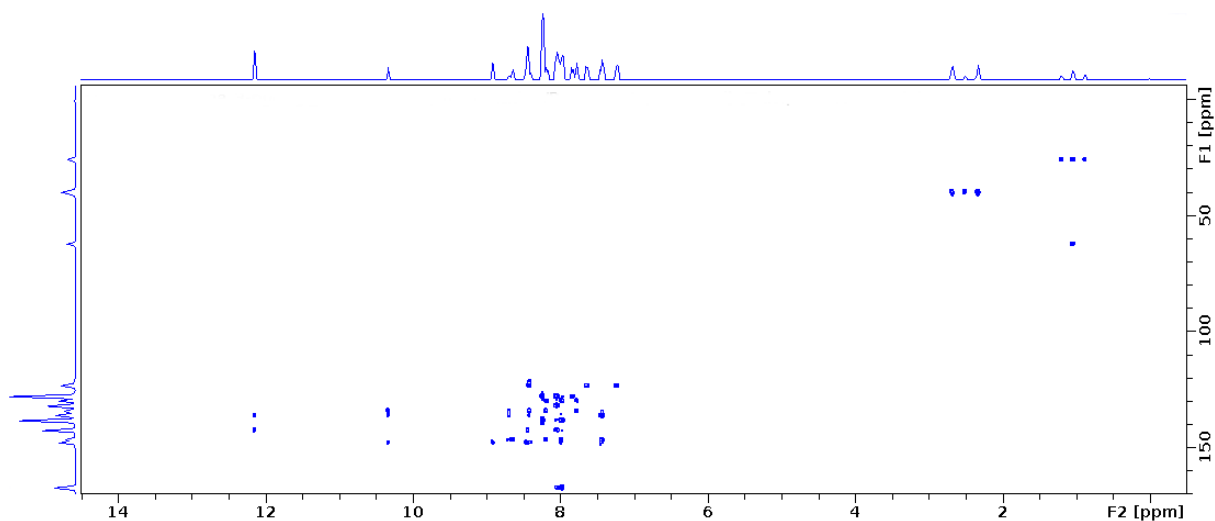
Tablica 5. Mase reaktanata korištenih u trećem koraku reakcije sinteze i mase dobivenih reakcijskih smjesa makrozona.

	m(P2)/mg	m(HATU)/mg	V(DIPEA)/ μ L	m(amin)/mg	m(reak. smjesa)/mg
1-feniletil-izotiocijanat	219,05	31,97	39,94	59,46	184,38
3-piridil-izotiocijanat	436,71	34,82	43,49	64,76	7,66
3,5-dimetilizoksazol-4-il-izotiocijanat	10,81	13,12	16,40	24,43	26,23
4-piperidilsulfonilfenil-izotiocijanat	652,74	23,41	29,25	43,55	49,10
Tetrahidro-3-furfuril-izotiocijanat	208,32	34,13	42,64	63,49	216,00

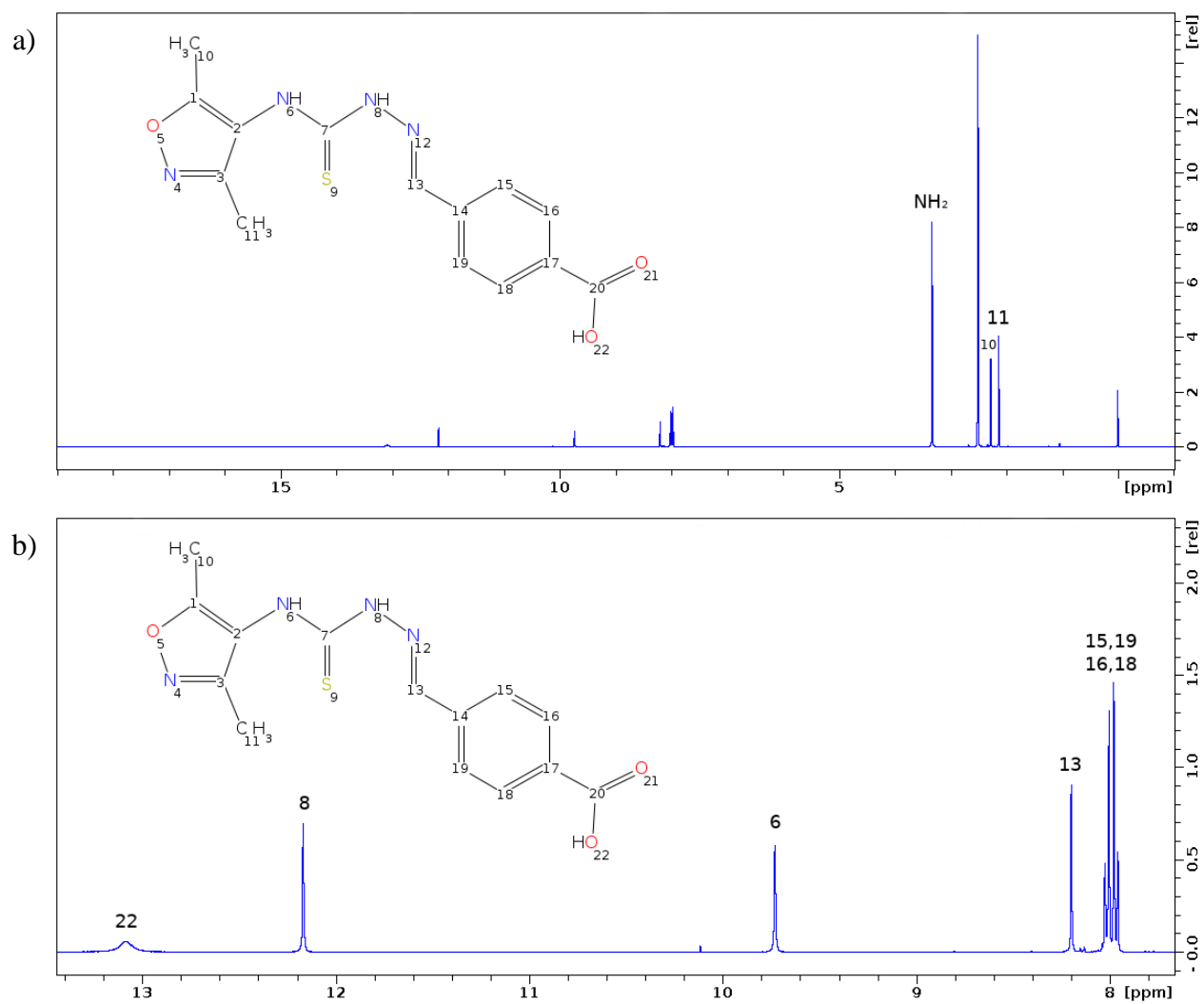
**Slika 40.** Spektri NMR tiosemikarbazona-1: a) COSY, b) HSQC spektar.

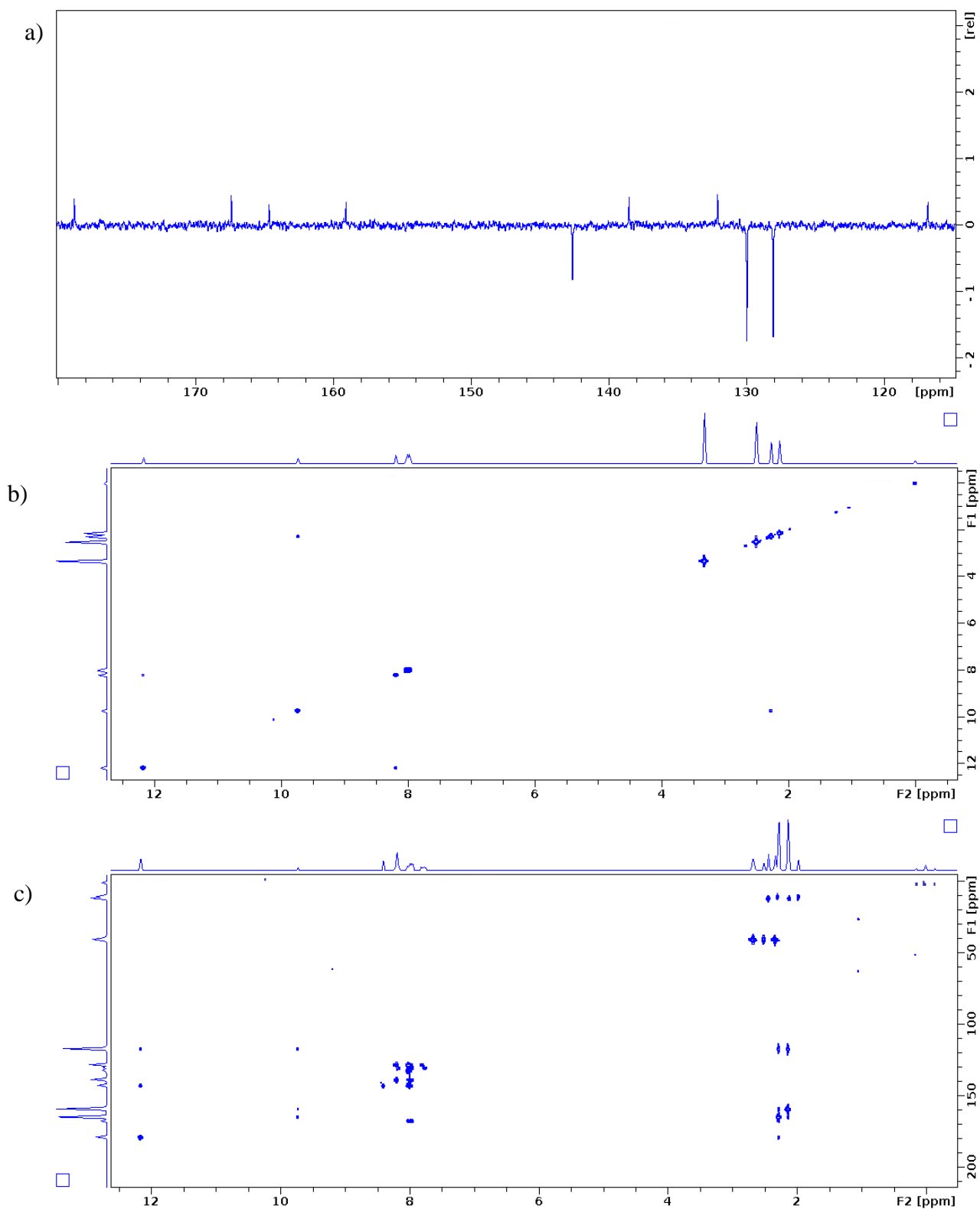


Slika 41. Spektri NMR tiosemikarbazona-2: a) uvećani dio spektra ^1H NMR u području od 7 ppm do 13.05 ppm, b) COSY i c) HSQC spektar.

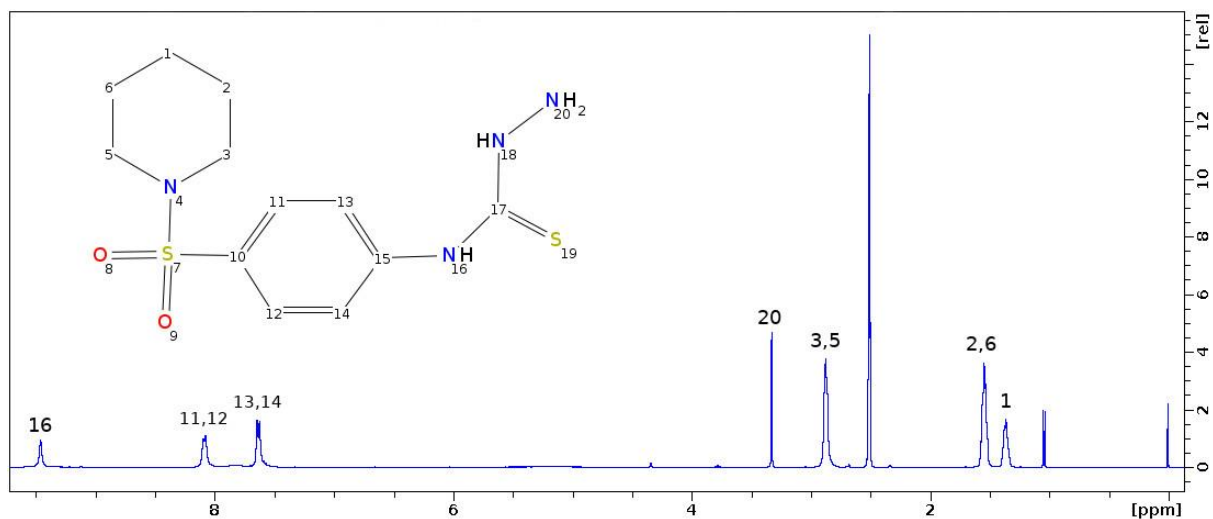
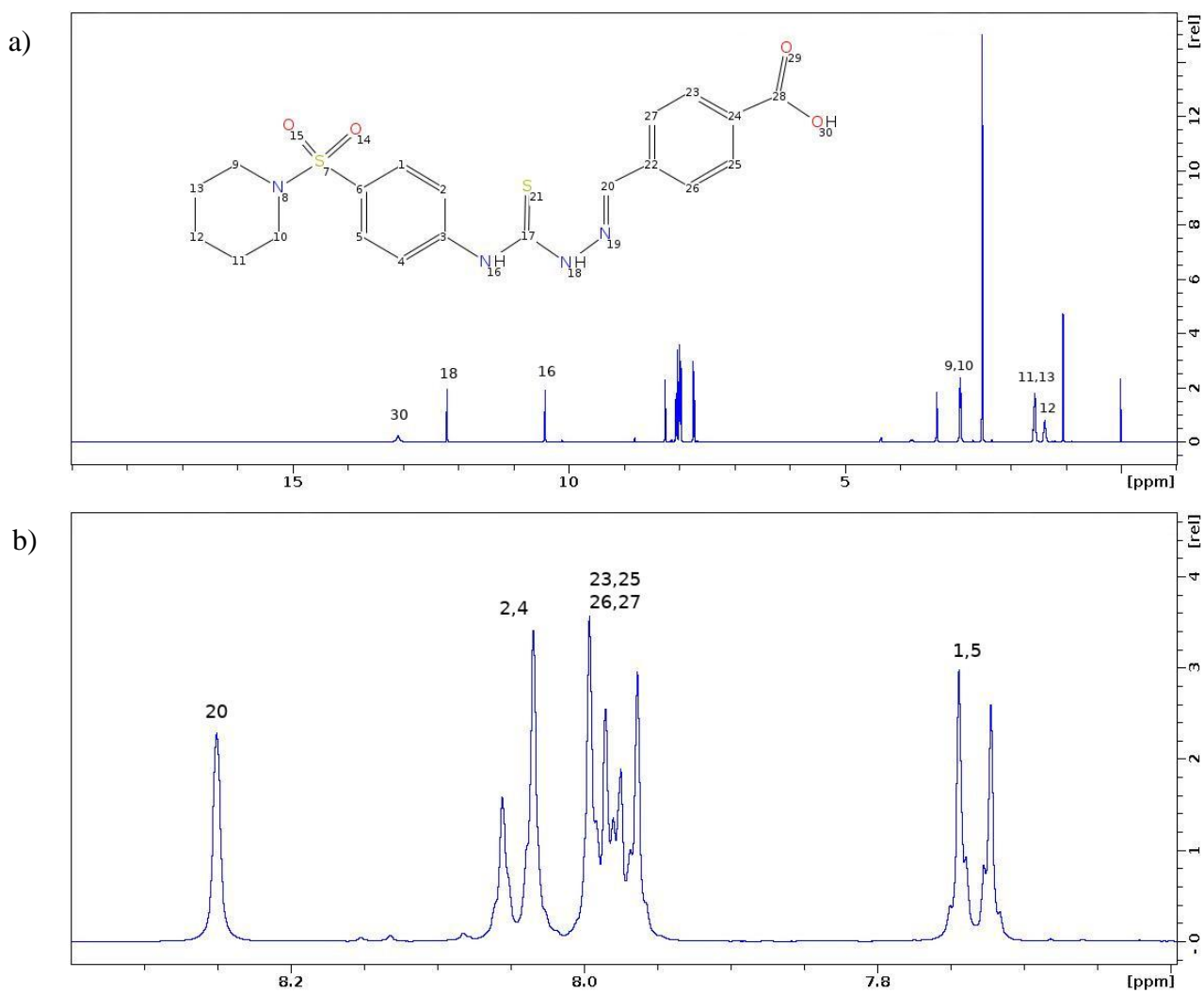


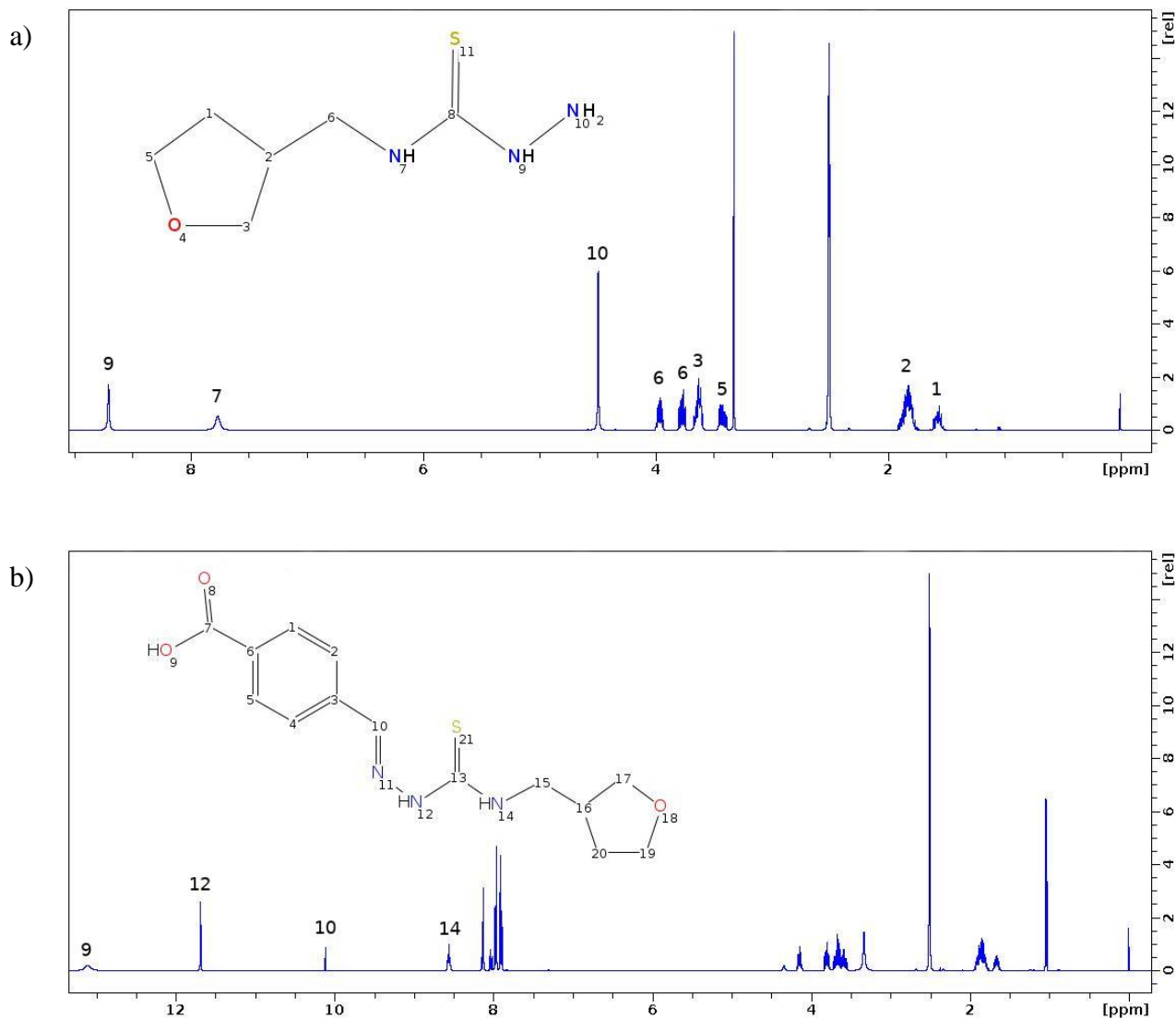
Slika 42. Spektar HMBC tiosemikarbazona-2.

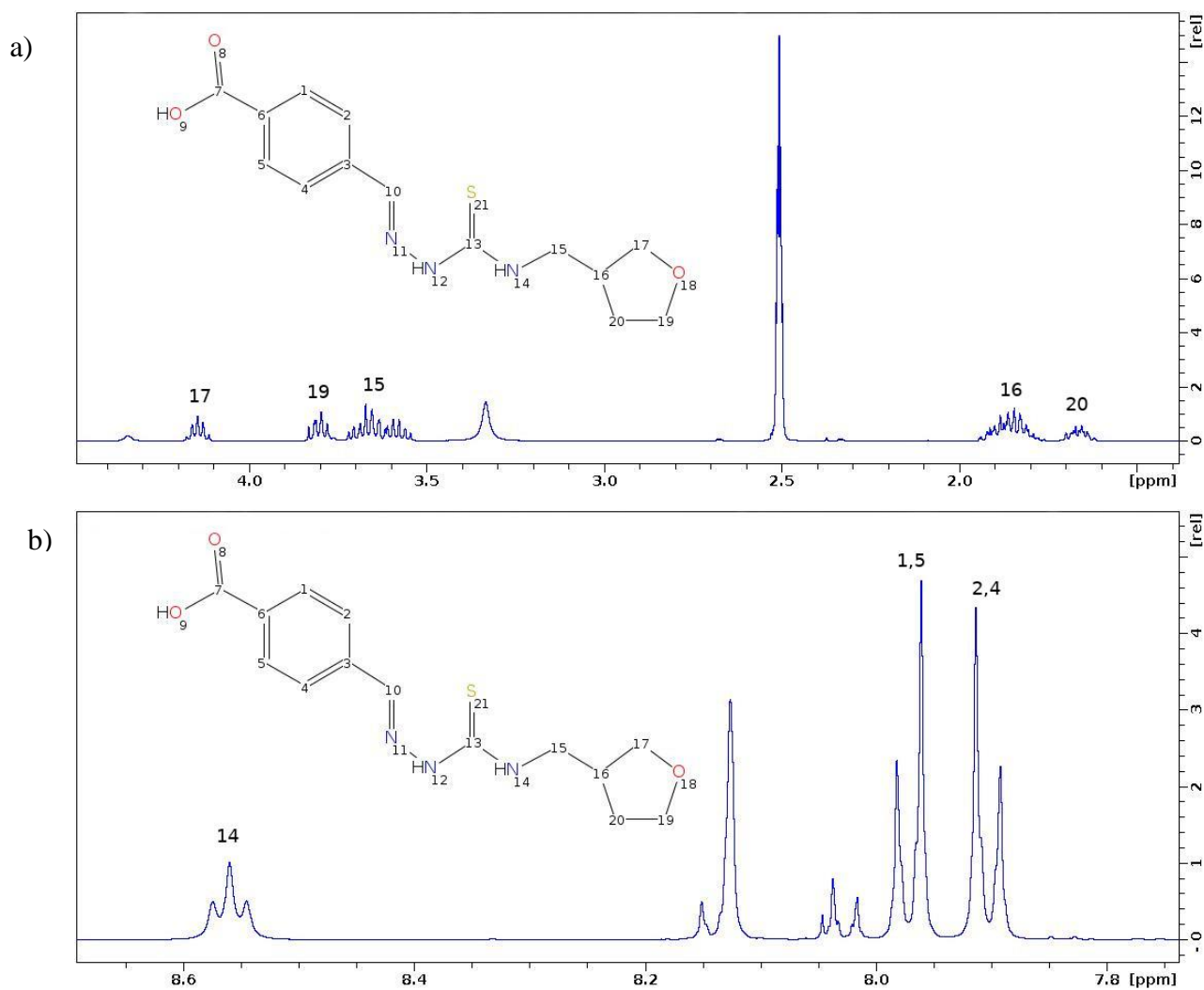
Slika 43. Spektar ^1H NMR tiosemikarbazona-3: a) cijeli spektar, b) uvećani dio spektra u području od 7,8 ppm do 13,4 ppm.



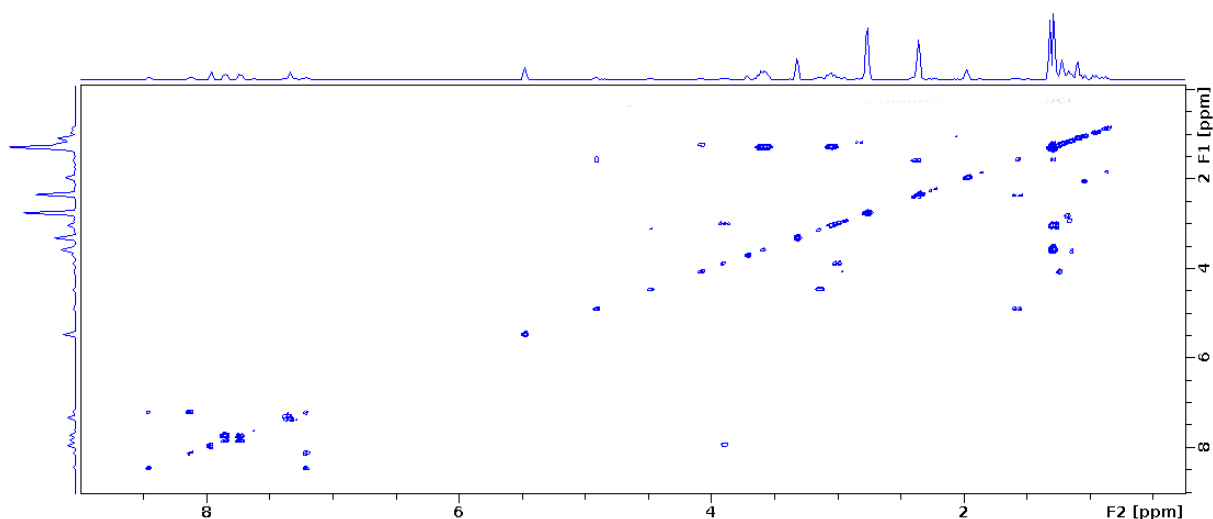
Slika 44. Spektri tiosemikarbazona-3: a) DEPT, b) COSY i c) HMBC spektar.

Slika 45. Spektar ^1H NMR tiosemikarbazida-10.Slika 46. Spektar ^1H NMR tiosemikarbazona-10: a) cijeli spektar, b) uvećani dio spektra u području od 7,6 ppm do 8,4 ppm.

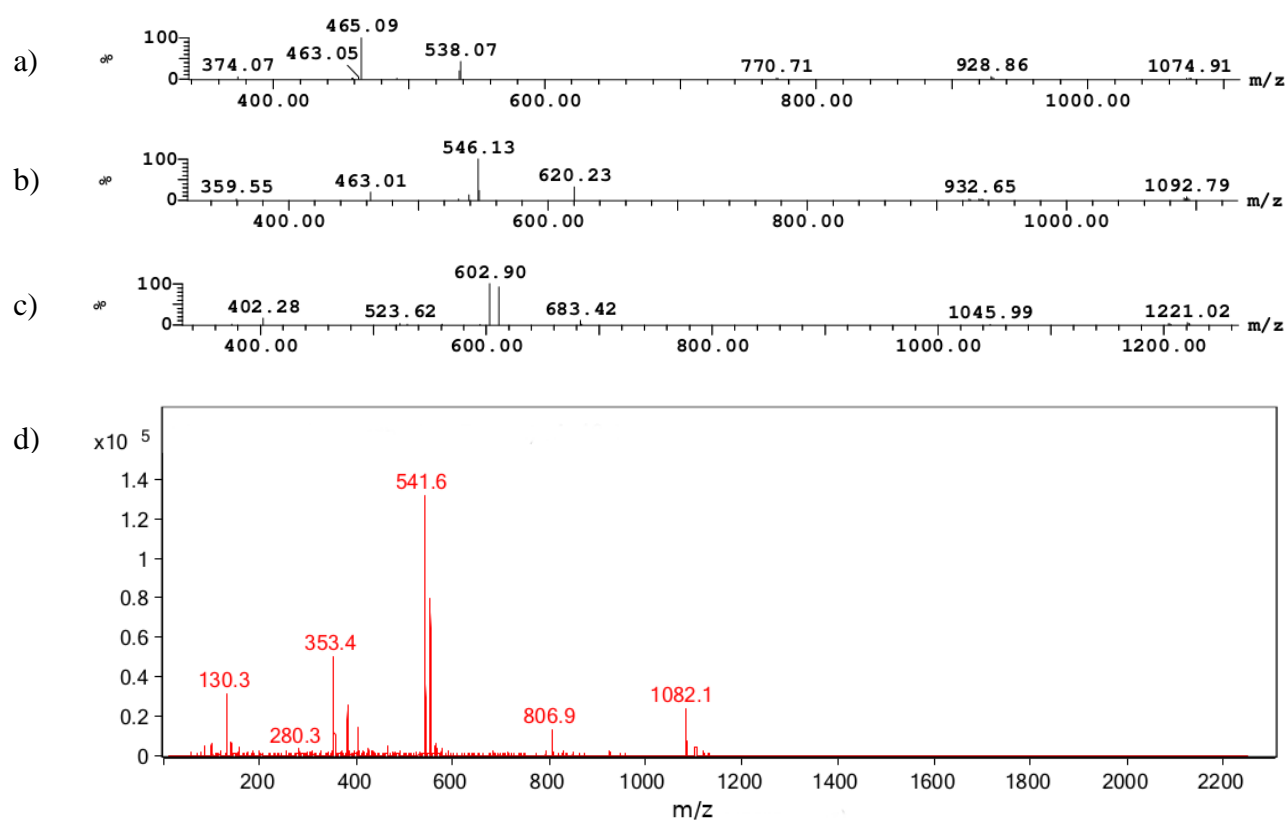




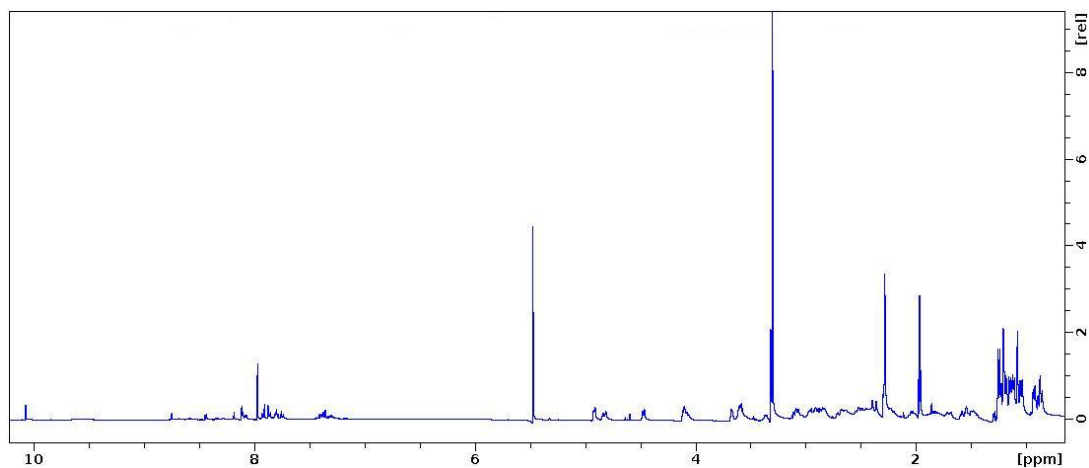
Slika 48. Uvećani prikaz spektra ^1H NMR tiosemikarbazona-16:
a) u području od 1,5 ppm do 4,5 ppm, b) u području od 7,75 ppm do 8,7 ppm.



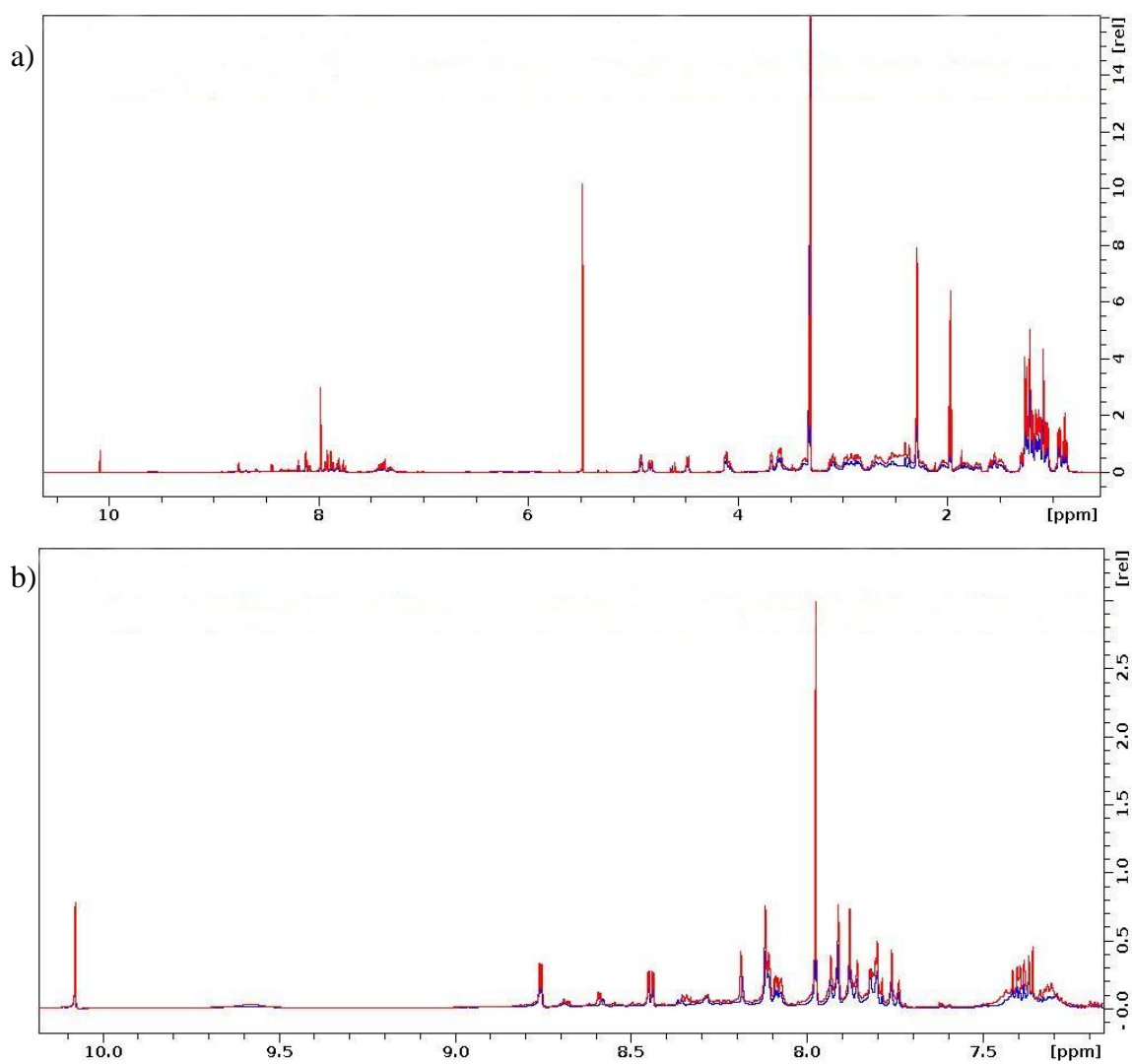
Slika 49. COSY spektar makrozona-1.



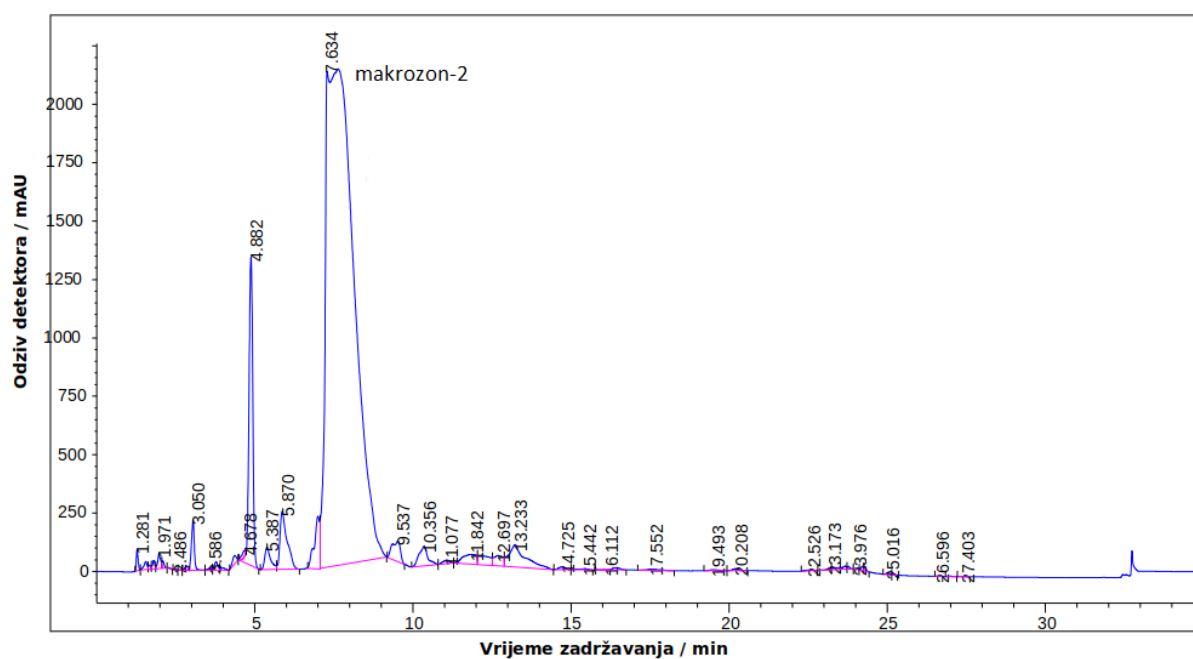
Slika 50. Spektri MS snimljeni uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom modu:
a) makrozona-2, b) makrozona-3, c) makrozona-10 i d) makrozona-16.



Slika 51. Spektar ^1H NMR makrozona-2 prije pročišćavanja.



Slika 52. Spektar ^1H NMR makrozona-2 prije i nakon pročišćavanja: a) cijeli spektar, b) uvećani dio u rasponu od 7,2 ppm do 10,2 ppm. Plavom bojom označen je NMR spektar makrozona prije pročišćavanja, a crvenom bojom spektar NMR spektar makrozona nakon pročišćavanja.



Slika 53. Kromatogram frakcija makrozona-2 izoliranog s kromatografske kolone.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ana-Marija Lulić

Datum rođenja: 7. Ožujka 1995.

Mjesto rođenja: Sankt Peterburg, Ruska Federacija

Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Eugena Kumičića, Velika Gorica

2009.–2013. Opća Gimnazija Velika Gorica

2013.–2017. Preddiplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2017.-2019- Diplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014.-2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

Publikacije

1. I. Mikulandra, M. Facković, A. Lulić, I. Habinovec, N. Benčić, M. Bukvić, I. Grgičević, T. Jednačak, M. Cindrić, P. Novak, *Synthesis and characterization of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates*, HSKIKI 2019, Šibenik, Hrvatska, 2019.,

2. I. Mikulandra, S. Škevin, A. Lulić, I. Habinovec, T. Jednačak, B. Bertoša, P. Novak, *Epitope mapping of a macrozone interaction with Ribosome by nmr spectroscopy and Molecular modeling*, Adriatic NMR Conference, Mali Ston, Hrvatska, 2019.,

3. I. Habinovec, P. Novak, N. Benčić, I. Mikulandra, A. M. Lulić, I. Grgičević, M. Bukvić, K. Zangger, *Determination of ethyl-phenyl macrozone reaction mixture components by LC-SPE/NMR methodology*, Adriatic NMR Conference, Mali Ston, Hrvatska, 2019.

Radno iskustvo

6/2019–7/2019 IAESTE Stručna praksa na Zavodu za molekularnu dijagnostiku i farmakogenomiku, Medicinsko Sveučilište, Łódź, Poljska,

10/2019–11/2019 Rad u laboratoriju na Zavodu za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.