

# Priprava, karakterizacija i biološka aktivnost makrozona, novih derivata azitromicina

---

Mikulandra, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:942141>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Mikulandra

**PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA  
AKTIVNOST MAKROZONA,  
NOVIH DERIVATA AZITROMICINA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2022.





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Mikulandra

**PREPARATION, CHARACTERIZATION AND  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF MACROZONES,  
NEW AZITHROMYCIN DERIVATIVES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Dr. Predrag Novak, Professor

Zagreb, 2022.



Ova doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka.

Doktorska disertacija izrađena je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije* (IP-2018-01-8098).



*Zahvaljujem prof. dr. sc. Predragu Novaku na motivaciji, savjetima i podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem dr. sc. Mirjani Bukvić na korisnim savjetima i pomoći tijekom priprave spojeva.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na provedenim računalnim istraživanjima.*

*Hvala mojim zavodskim kolegama doc. dr. sc. Tomislavu Jednačaku i Ivi Habinovec, mag. chem. na pomoći.*

*Hvala ostalim dragim kolegama i prijateljima na podršci i ohrabrivanju! 😊*





# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Makrolidi .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Struktura makrolida .....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Mehanizam djelovanja makrolida.....</i>	<i>6</i>
2.1.3. <i>Mehanizam rezistencije bakterija na makrolide .....</i>	<i>7</i>
<b>2.2. Razvoj novih derivata makrolida .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. <i>Kemijska modifikacija šećernih jedinica četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida.....</i>	<i>11</i>
2.2.1.1. <i>Kemijska modifikacija kladinoze.....</i>	<i>11</i>
2.2.1.2. <i>Kemijska modifikacija aminošećera.....</i>	<i>26</i>
2.2.2. <i>Kemijska modifikacija aglikonskog prstena četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida.....</i>	<i>30</i>
<b>2.3. Dosadašnja istraživanja interakcija makrolida i bioloških meta .....</b>	<b>42</b>
2.3.1. <i>Interakcije makrolid-ribosom.....</i>	<i>43</i>
2.3.2. <i>Interakcije makrolid-biološka membrana .....</i>	<i>50</i>
2.3.3. <i>Interakcije makrolid-žučna kiselina.....</i>	<i>54</i>
2.3.4. <i>Interakcije makrolid-albumin.....</i>	<i>57</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Materijali i metode.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2. Priprava tiosemikarbazida.....</b>	<b>65</b>
<b>3.3. Priprava tiosemikarbazona .....</b>	<b>69</b>
<b>3.4. Priprava 4''-O-(3-aminopropil)azitromicina (P5).....</b>	<b>74</b>
<b>3.5. Priprava 3-dekladinozil-O-(3-aminopropil)azitromicina (S6) .....</b>	<b>76</b>
<b>3.6. Priprava makrozona .....</b>	<b>79</b>
3.6.1. <i>Priprava 4''-makrozona (klasa I).....</i>	<i>81</i>
3.6.2. <i>Priprava 3-makrozona (klasa II).....</i>	<i>91</i>
3.6.3. <i>Priprava 9a-makrozona (klasa III) .....</i>	<i>100</i>
<b>3.7. Biološka aktivnost makrozona .....</b>	<b>112</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>113</b>
<b>4.1. Priprava spojeva .....</b>	<b>113</b>
<b>4.2. Biološka aktivnost makrozona .....</b>	<b>120</b>

<b>4.3. Proučavanje konformacije molekule spojeva i interakcija s biološkim metama .....</b>	<b>126</b>
4.3.1. <i>Spektroskopija NMR .....</i>	<i>126</i>
4.3.2. <i>Molekulsko modeliranje.....</i>	<i>138</i>
4.3.3. <i>UV-VIS i fluorescencijska spektroskopija.....</i>	<i>140</i>
4.3.4. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>147</i>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>150</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....</b>	<b>153</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>155</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST MAKROZONA, NOVIH DERIVATA AZITROMICINA

Ivana Mikulandra

Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,  
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Značajan porast bakterijske rezistencije utječe na sve veću potrebu za istraživanjem i razvojem novih antibiotika. U sklopu ovog rada pripravljene su tri nove klase makrozona, konjugata makrolidnog antibiotika azitromicina i tiosemikarbazona. Tiosemikarbazoni su korišteni za kemijsku modifikaciju azitromicina na tri različita položaja. Cilj rada je priprava novih derivata makrolida sa širim spektrom biološke aktivnosti.

Pripremljenim spojevima određena je biološka aktivnost *in vitro* na susceptibilne i rezistentne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te su istražene interakcije s biološkim receptorima. Za proučavanje interakcija primijenjena je spektroskopija NMR, cirkularni dikroizam, fluorescencijska spektroskopija i molekulsko modeliranje.

Makrozoni su pokazali zadovoljavajuću biološku aktivnost, posebice na neke rezistentne bakterijske sojeve na koje azitromicin nije aktivan. Rezultati dobiveni spektroskopskim metodama i molekulskim modeliranjem ukazuju na odnos strukture i aktivnosti novih derivata azitromicina, što može poslužiti za dizajn i otkriće biaktivnijih derivata makrolida.

(160 stranica, 80 slika, 15 tablica, 114 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: azitromicin / biološka aktivnost / interakcije s biološkim metama / makrolidi / tiosemikarbazoni

Mentor: Prof. dr. sc. Predrag Novak

Rad prihvaćen: 4. svibnja 2022.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
2. prof. dr. sc. Dražen Vikić Topić
3. dr. sc. Ivo Piantanida, zn. savj.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### PREPARATION, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MACROZONES, NEW AZITHROMYCIN DERIVATIVES

Ivana Mikulandra

Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb,  
Croatia

Owing to a significant increase in bacterial resistance, a high need for discovery and development of new antibiotics has emerged. As part of this work, three novel classes of macrozones, conjugates of macrolide antibiotic azithromycin and thiosemicarbazones, were prepared. Thiosemicarbazones were used to chemically modify azithromycin at three different positions. The aim of this thesis was to prepare compounds with a wider range of biological activity including resistant bacterial strains. *In vitro* biological activity of the prepared compounds was determined against susceptible and resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria, and interactions with biological receptors were investigated. Macrozones showed satisfactory biological activity, especially against some resistant bacterial strains to which azithromycin is inactive. NMR spectroscopy, circular dichroism, fluorescence spectroscopy, and molecular modeling were further used to study interactions of selected compounds with biological targets. The results obtained by spectroscopic methods and molecular modeling indicate a relationship between structure and activity of new azithromycin derivatives, which can be used for design and discovery of more active macrolide derivatives.

(160 pages, 80 figures, 15 tables, 114 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: azithromycin / biological activity / interactions with biological targets / macrolides / thiosemicarbazones

Supervisor: Dr. Predrag Novak, Professor

Thesis accepted: 4th May 2022.

Reviewers:

Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor  
Dr. Dražen Vikić Topić, Professor  
Dr. Ivo Piantanida, Professor



## § 1. UVOD

Makrolidni antibiotici predstavljaju skupinu prirodnih i polusintetskih antibiotika čiju strukturu karakterizira -dvanaestero- do šesnaesteročlani makrociklički laktonski prsten na kojem su vezane dvije šećerne jedinice, najčešće desozamin i kladinoza. Od otkrića pa sve do danas makrolidi se koriste za liječenje infekcija koje uzrokuju Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.<sup>1,2</sup> Posljednjih godina otkriveno je kako makrolidi osim antibakterijskog djelovanja pokazuju i protuupalnu, antikancerogenu i antimalarijsku aktivnost. Makrolidi djeluju bakteriostatski, vezanjem za 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma i sprječavaju sintezu peptida, odnosno rast i razvoj bakterija. Azitromicin je poznati petnaesteročlani makrolid koji posjeduje široki spektar antibakterijske aktivnosti. Među makrolidima, azitromicin se ističe po povoljnim fizikalno-kemijskim svojstvima, postizanju visoke akumulacije u stanicama i tkivima te smanjenim nuspojavama.<sup>1,3</sup>

Zbog široke i nekontrolirane upotrebe antibiotika, te brze prilagodljivosti patogenih mikroorganizama dolazi do sve veće rezistencije bakterija na antibiotike.<sup>1</sup> Iz tog razloga znanstvena istraživanja stalno su usmjerena prema razvoju i dizajnu novih antibiotika sa širim spektrom antimikrobne aktivnosti. U procesu otkrića novog antibiotika važan korak je određivanje njegovog mehanizma djelovanja. Istraživanjem interakcija potencijalnog antibiotika s biološkim metama i proučavanjem vezne konformacije molekule antibiotika dolazi se do novih spoznaja koje mogu poslužiti za poboljšanje farmakokinetičkih svojstava i bioaktivnosti nove klase antibiotika.

Cilj istraživanja provedenih u okviru ove doktorske disertacije je dizajn i priprava novih derivata makrolida sa širim spektrom biološke aktivnosti te određivanje mehanizma vezanja na ribosom i druge biološke receptore. Pripravit će se nove klase makrozona, konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. Prema posljednjim istraživanjima<sup>4-6</sup>, derivati tiosemikarbazona pokazali su antitumorsku, antibakterijsku i protuupalnu aktivnost te su korišteni za kemijsku modifikaciju azitromicina. Svrha priprave makrozona je povezivanje bioaktivnosti i izvrsnih farmakokinetičkih svojstava azitromicina s biološkom aktivnosti tiosemikarbazona.

U svrhu potvrde uspješnosti sinteze i strukturne karakterizacije pripremljenih spojeva koristit će se spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR), kromatografske metode i



spektrometrija masa (MS). Provest će se biološka testiranja pripremljenih spojeva na panelu bakterija karakterističnom za makrolide. Odredit će se aktivnost *in vitro* na susceptibilne i rezistentne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

Budući da je primarna meta djelovanja makrolida ribosom, odredit će se konformacija molekula novopripremljenih spojeva u slobodnom stanju te vezanih na 70S ribosom *E. coli* pomoću spektroskopije NMR. Za proučavanje konformacije primijenit će se tehnike NMR NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) i ROESY (engl. *Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy*), a za detekciju vezanja molekula na ribosom i određivanja dijelova molekule koji sudjeluju u vezanju na ribosom tehnike trNOESY (engl. *Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), tehnika razlike prijenosa zasićenja (engl. *Saturation Transfer Difference, STD*) i waterLOGSY (engl. *Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*). Dodatno će se okarakterizirati interakcije makrozona s RNA, DNA, goveđim serumskim albuminom (engl. *bovine serum albumin, BSA*) i 70S ribosomom *E. coli* pomoću cirkularnog dikroizma i fluorescencijske spektroskopije. Očekuje se da će objedinjeni rezultati dobiveni biološkim testiranjem, spektroskopskim metodama i molekulskim modeliranjem pomoći u određivanju odnosa strukture i aktivnosti te da će poslužiti kao temelj za dizajn novih bioaktivnijih makrolida.

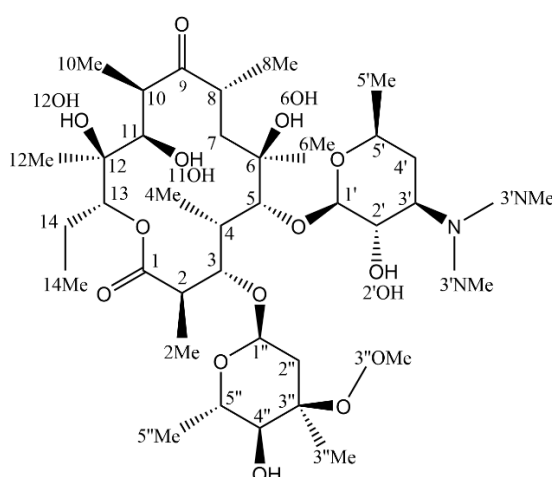
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Makrolidi

#### 2.1.1. Struktura makrolida

Makrolidni antibiotici obuhvaćaju skupinu spojeva čija se struktura sastoji od dvanaestero- do šesnaesteročlanog makrocikličkog laktonskog prstena (aglikona) na kojem su vezane dvije monosaharidne jedinice, najčešće desozamin i kladinoza.<sup>1</sup>

Pojam „makrolid“ prvi puta se spominje 1952. godine kad je izoliran eritromicin A iz mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*.<sup>2</sup> Tijekom narednih godina uslijedilo je intenzivno istraživanje makrolida i priprava polusintetskih analoga.<sup>1</sup>

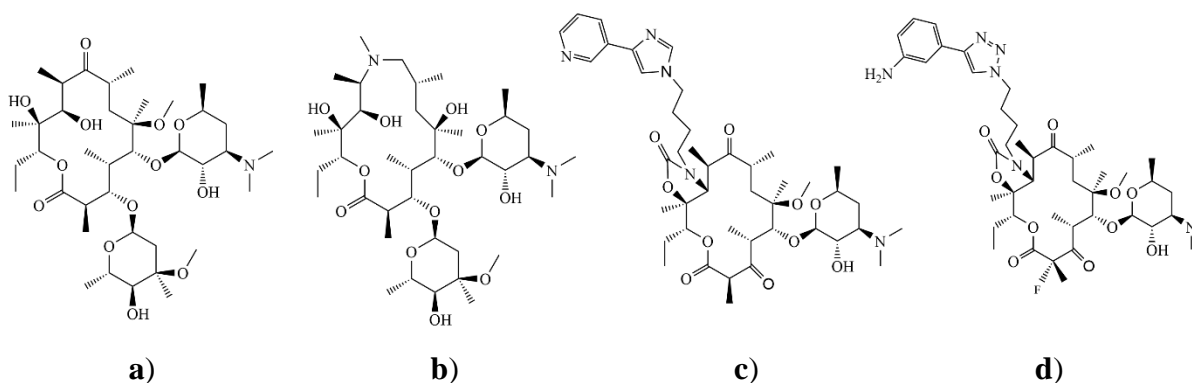


**Slika 1.** Strukturna formula molekule eritromicina A s pobrojanim atomima ugljika

Eritromicin A (slika 1.) prvi je makrolidni antibiotik, izoliran iz mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*. Sastoji se od četrnaesteročlanog laktonskog prstena koji na položaju C3 ima vezanu kladinozu, a na položaju C5 desozamin.<sup>1,3</sup>

Predstavlja prvu generaciju makrolidnih antibiotika koju ne odlikuje dobra bioraspodivnost i dugo vrijeme poluzivota zbog nedostatne kemijske stabilnosti u organizmu. U želučanim kiselim uvjetima dolazi do intramolekulske ciklizacije reakcijom dviju hidroksilnih skupina (6-OH i 12-OH) i karbonilne skupine (C9). Promjenom konformacije smanjuje se afinitet vezanja eritromicina na ribosom što dovodi do smanjenja ili izostanka biološke aktivnosti.<sup>3</sup>

Iz navedenih razloga alkiliranjem hidroksilne skupine na položaju C6 pripremljen je kemijski stabilniji klaritromicin (slika 2.a), predstavnik prve generacije polusintetskih makrolidnih antibiotika koji su pokazali širi spektar antibakterijske aktivnosti.<sup>3</sup>



**Slika 2.** Strukturne formule predstavnika generacija polusintetskih makrolidnih antibiotika: **a)** klaritromicin, **b)** azitromicin, **c)** telitromicin i **d)** solitromicin

Uvođenjem atoma dušika u aglikonski prsten pripremljeni su petnaesteročlani azalidi, druga generacija makrolidnih antibiotika, čiji je najpoznatiji predstavnik azitromicin (slika 2.b).<sup>1,3</sup>

Treću generaciju čine ketolidi čiji je predstavnik telitromicin (slika 2.c). Telitromicin je povučen s tržišta zbog izazivanja niza nuspojava, stoga se pribjegli razvoju četvrte generacije makrolidnih antibiotika čiji je predstavnik solitromicin (slika 2.d).<sup>7</sup>

U tijeku je kliničko istraživanje solitromicina, ketolida koji je strukturno vrlo sličan telitromicinu. Iako se pokazao vrlo učinkovitim u liječenju bakterijske upale pluća, nije odobren od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) zbog opreza od mogućeg razvoja nuspojava. FDA smatra kako solitromicin zbog 85 % strukturne sličnosti telitromicinu također može izazvati hepatotoksičnost.<sup>7</sup>

Zbog sve većeg razvoja bakterijske rezistencije na postojeće antibiotike nameće se potreba za dizajnom novih lijekova sa širim spektrom antimikrobne aktivnosti. Posljednjih desetak godina intenzivno se radilo na pripravi i istraživanju biološke aktivnosti kemijskih modificiranih 14- i 15-članih derivata makrolida.<sup>1</sup>

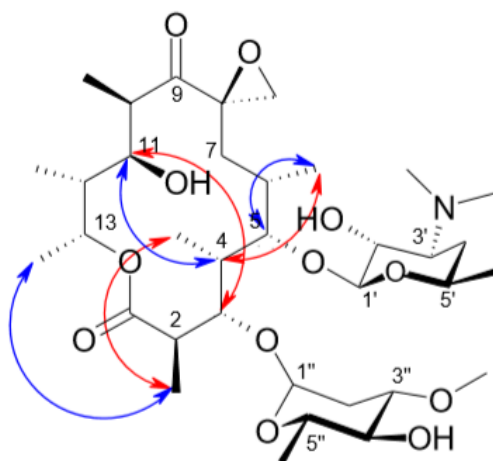
Istraživanje konformacije makrolida u slobodnom i vezanom stanju bitno je za određivanje njihove biološke potentnosti. Konformacija je usko povezana s lipofilnosti koja pak utječe na transport i sposobnost akumulacije makrolida u stanicama.<sup>1</sup> Makrolidi su kompleksne molekule koje sadrže više kiralnih centara, stoga promjena konfiguracije atoma može utjecati na

promjenu bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava. Za razumijevanje veze između strukture i aktivnosti makrolida najviše su korištene: spektroskopija NMR, difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu i metode molekuskog modeliranja.<sup>3</sup>

Kombinacijom spektroskopije NMR i molekuskog modeliranja predložene su dvije konformacije četrnaesteročlanih makrolida u otopini u slobodnom stanju: uvrnuta konformacija (engl. *folded-in*) i izvrnuta konformacija (engl. *folded-out*).<sup>8-10</sup>

Za izvrnutu konformaciju karakteristični su parametri: homonuklearna konstanta sprežanja  $^3J_{H2,H3} \approx 10$  Hz, torzijski kut između atoma H2-H3  $\approx \pm 180^\circ$ , kontakti NOE (engl. *nuclear Overhauser effect*): H4-H11, H2-H4, H5-H6Me, dok su za uvrnutu konformaciju zabilježeni parametri: homonuklearna konstanta sprežanja  $^3J_{H2,H3} \approx 2-3$  Hz, torzijski kut između atoma H2-H3  $\approx 100^\circ$ , te kontakti NOE H3-H11, H4-H6Me i H3-H8.<sup>3,12</sup>

Četrnaesteročlani makrolidi su u otopini većinom zastupljeni u obliku energijski povoljnije izvrnute konformacije.<sup>10,11</sup> Istraživanjem četrnaesteročlanog makrolida oleandomicina i njegovih derivata opaženo je kako udio pojedine konformacije ovisi o polarnosti korištenog otapala i temperaturi tijekom snimanja spektara  $^1H$ , NOESY i ROESY NMR.<sup>12,13</sup> Svi bitni kontakti NOE za određivanje konformacije prikazani su na slici 3.



**Slika 3.** Kontakti NOE uvrnute (engl. *folded-in*) i izvrnute (engl. *folded-out*) konformacije oleandomicina<sup>3</sup>

Petnaesteročlani makrolidi u slobodnom stanju zastupljeni su u obliku energijski najpovoljnije konformacije tzv. *3-endo-folded-out*.<sup>15,16</sup> U ovom slučaju homonuklearna konstanta sprežanja  $^3J_{H2,H3}$  iznosi 4-5 Hz, a torzijski kut između atoma H2-H3  $\approx 122^\circ$ .

Udaljenost protona H4-H11 te blizina monosaharidnih jedinica slična je kao i kod izvrnute konformacije.

Proučavanjem makrolida u vezanom stanju ustanovljeno je da zauzimaju slične konformacije kao i u slobodnom stanju.<sup>1,3</sup>

### 2.1.2. Mehanizam djelovanja makrolida

Makrolidi pokazuju široki spektar biološke aktivnosti. Djelotvorni su u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i nekim Gram-negativnim bakterijama. Često se koriste za liječenje infekcija dišnog sustava izazvanih bakterijskim sojevima: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i dr. Osim antibakterijske, posjeduju antikancerogenu i antimalarijsku aktivnost te protuupalna svojstva.<sup>1</sup>

Makrolidi imaju bakteriostatsko djelovanje, tj. inhibiraju rast bakterija. Vežu se na 23S rRNA u domeni V na ili u blizini centra peptidil-transferaze u 50S podjedinici bakterijskog ribosoma i tako sterički blokiraju sintezu peptida u ranim fazama translacijskog procesa.<sup>1,3</sup>

Aminošećeri igraju važnu ulogu u interakciji sa staničnim membranama i transportu makrolida do ciljanog mjesta djelovanja. Između makrolida i ribosoma uspostavljaju se kovalentne i vodikove veze te hidrofobne interakcije.<sup>1,15</sup> Smatra se kako je vezanje makrolida proces koji obuhvaća dva koraka. Prvi korak uključuje brzo vezivanje i razvezivanje makrolida, odnosno prepoznavanje ciljanog mjesta na ribosomu, a drugi korak uključuje čvrsto vezanje makrolida za aktivno mjesto.<sup>3</sup>

Jakost i način vezanja razlikuju se ovisno o funkcijskim skupinama makrolida i veličini šećera na položajima C3 i C5, a neke studije su pokazale kako vezanje makrolida ovisi i o vrsti bakterije.<sup>1</sup> Difrakcijom rendgenskog zračenja na monokristalu dobiveni su različiti strukturni modeli za različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.<sup>16-18</sup> Kokristalne strukture uključivale su jednu molekulu makrolida i ribosomsku podjedinicu 50S. Međutim, istraživanjem vezanja azitromicina za ribosom bakterije *D. radiodurans* opaženo je vezanje dviju molekula azitromicina.<sup>17</sup>

Bez obzira na različitost vezanja četrnaesteročlanih, petnaesteročlanih i šesnaesteročlanih makrolida zajedničko im je stvaranje vodikove veze između skupine 2'-OH aminošećera i nukleobaze ribosoma.<sup>1</sup> O važnosti šećernih jedinica u strukturi makrolida i utjecaju kemijske modifikacije polarnih skupina na antimikrobnu aktivnost makrolida bit će više govora u poglavlju 2.2.

Osim o strukturi makrolida, inhibicija sinteze proteina ovisi i o sekvenci biosintetiziranog peptida. Makrolidi mogu intereagirati i s enzimom citokrom P450 3A4 te ligandima uključenim u sintezu proteina kao što su aminoacil-tRNA i peptidil-tRNA.<sup>1</sup>

### 2.1.3. Mehanizam rezistencije bakterija na makrolide

Zbog prisutnosti antibiotika i njihovih metabolita u okolišu te široke i nepravilne primjene u medicini, sve više sojeva bakterija postaju rezistentni.<sup>1</sup>

Postoji više mehanizama rezistencije<sup>1</sup>:

- inaktivacija antibiotika kovalentnom modifikacijom (hidroliza laktona ili šećera, regioselektivna glikolizacija, acetiliranje ili fosforilacija hidroksilnih skupina)
- kemijska modifikacija nukleobaza ribosoma
- efluks - izbacivanje antibiotika iz bakterijskih stanica
- modifikacija mete djelovanja antibiotika
- stvaranje „lažnih“ meta za antibiotike i vezanje antibiotika na substanične strukture

Rezistencija na više antibiotika (engl. *multidrug resistance*, MDR) koji imaju mehanizam djelovanja sličan makrolidima predstavlja veliki problem u liječenju nekih bakterijskih infekcija. U tu skupinu antibiotika spadaju linkozamidi i streptogramini.<sup>1</sup> Navedene tri skupine antibiotika vežu se na 23S rRNA u 50S podjedinici ribosoma.<sup>3</sup>

Neki bakterijski sojevi razvili su rezistenciju metiliranjem dušika baze 23S rRNA (posredstvom gena *erm*) čime onemogućuju vezanje makrolida, linkozamida i streptogramina.<sup>7</sup> Takva rezistencija može biti inducibilna (iMLS) ili konstitutivna (cMLS). Inducibilna rezistencija nastupa unošenjem antibiotika u stanicu pri čemu dolazi do aktivacije enzima metiltransferaze, dok je kod konstitutivne rezistencije enzim aktivan i bez prisutnosti antibiotika.

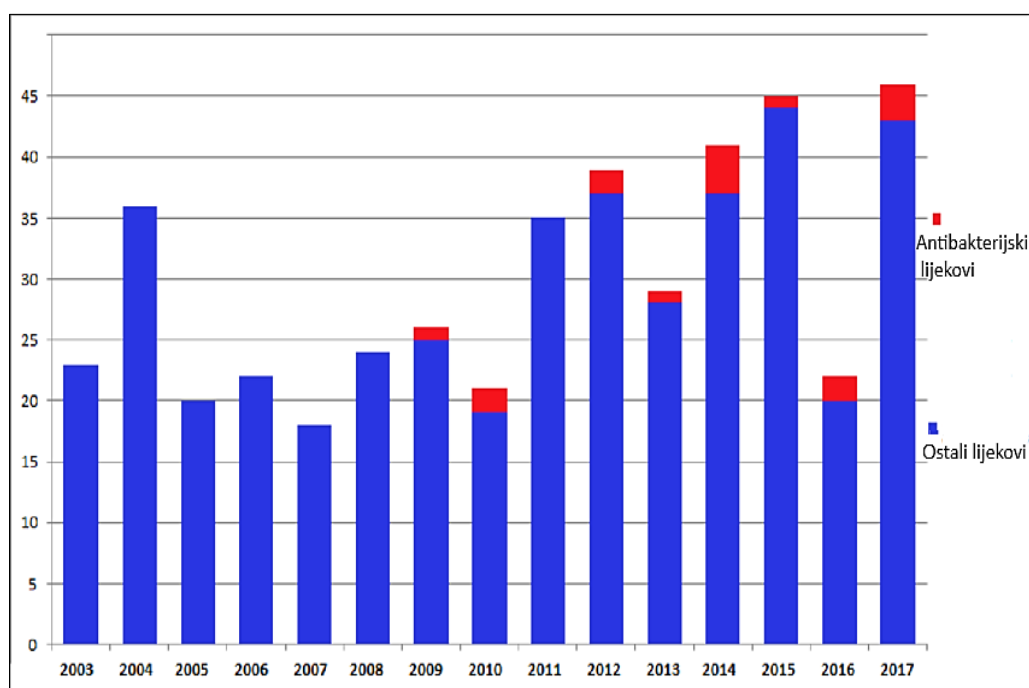
Mehanizam rezistencije efluksom (M), kodiran genima *mef*, karakterističan je samo za makrolide, ne i za linkozamide i streptogramine.<sup>1,7</sup>

Antibakterijska aktivnost antibiotika *in vitro* kvantitativno se izražava pomoću minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), a definira se kao najniža masena koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija. Otopine antibiotika serijski se razrijede najčešće u rasponu koncentracija 0,125–64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  te se provjeri bakteriostatska aktivnost testiranjem na uzorcima standardiziranih koncentracija bakterija.<sup>19</sup>

Neki od učestalih rezistentnih sojeva su Gram-pozitivne bakterije: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* i Gram-negativne bakterije: *H. influenzae*, *E. coli*. Navedeni sojevi bakterija uzrokuju kožne infekcije, infekcije dišnih puteva te infekcije gastrointestinalnog i mokraćnog sustava.<sup>1</sup>

## 2.2. Razvoj novih derivata makrolida

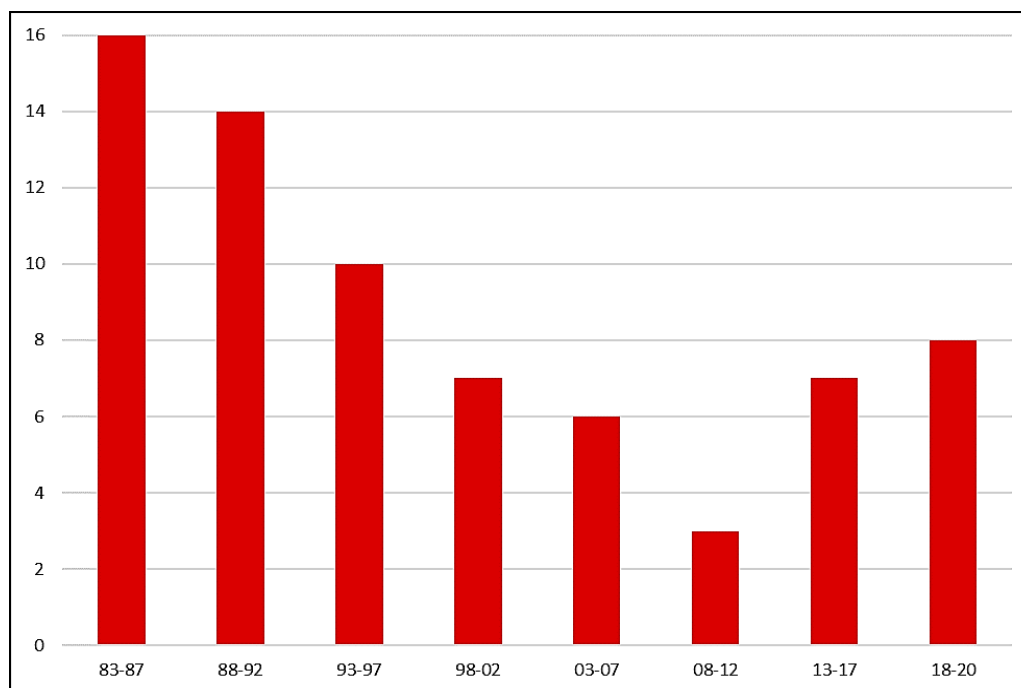
Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) izražava zabrinutost zbog sve veće pojave rezistentnih patogena i promiče važnost istraživanja novih antibiotika.<sup>3</sup> Na slici 4. prikazan je broj antibakterijskih lijekova (označeni crvenom bojom) u odnosu na ukupni broj odobrenih lijekova (označeni plavom bojom) u razdoblju od 2003. do 2017. godine.<sup>20</sup> Može se zamijetiti kako je udio antibakterijskih lijekova vrlo mali. Razlog je iznimno brza prilagodljivost bakterija na lijekove što dovodi do povećanih zahtjeva kliničkih ispitivanja, a time i do male isplativosti ulaganja farmaceutske industrije.<sup>1</sup>



**Slika 4.** Odobreni lijekovi od strane FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) u razdoblju 2003.-2017.<sup>20</sup>

Zanimljiva je činjenica kako je azitromicin kao najprodavaniji antibiotik 2004. godine stekao zaradu od samo 2,1 milijarde USD čime je zauzeo 27. mjesto na listi najprodavanijih lijekova.<sup>21</sup> Na slici 5. dan je uvid u kretanje broja odobrenih antibiotika od 1983 do danas. Bilježi se povećanje broja registriranih antibiotika u odnosu na posljednjih 20 godina.





**Slika 5.** Odobreni antibiotici od strane FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) u razdoblju 1983.-2020.<sup>20</sup>

Kako bi se riješio problem rezistencije bakterija na antibiotike, nužno je dizajnirati nove spojeve koji će pokazati veću biološku aktivnost. Može se pribjeći pripremi inhibitora bakterijskih enzima odgovornih za otpornost ili kemijskoj modifikaciji postojećih antibiotika. Posljednjih 10 godina intenzivno su se istraživali derivati četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida.<sup>1</sup>

Karakteristike koje bi novi derivati makrolidnih antibiotika trebali posjedovati su: niska intrinzična toksičnost, dobra kemijska stabilnost u kiselim uvjetima, veliki afinitet vezanja za bakterijski ribosom, optimalna farmakokinetička svojstva (apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje lijeka iz organizma), široki spektar antibakterijske aktivnosti i izostanak izazivanja tegoba gastrointestinalnog sustava te alergijskih reakcija.<sup>1</sup>

U ovome poglavlju dan je pregled ovisnosti strukture i antimikrobne aktivnosti *in vitro* novih derivata makrolida. Opisani su samo oni derivati čija je biološka aktivnost usporediva ili veća od aktivnosti makrolidnih antibiotika dostupnih na tržištu.

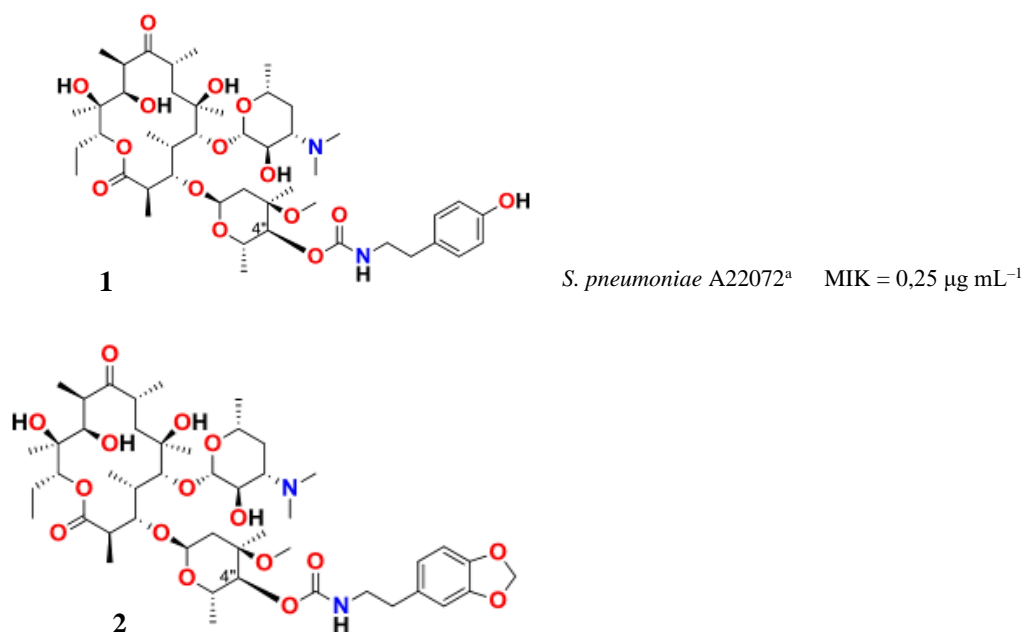
### 2.2.1. Kemijska modifikacija šećernih jedinica četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida

Proučavanjem kompleksa makrolid-ribosom ustanovljeno je kako je desozamin (aminošećer) iznimno bitan za vezanja makrolida, dok kladinoza nije ključna za ukupnu antibakterijsku aktivnost.<sup>3</sup>

U nastavku će biti više riječi o važnosti šećernih jedinica za biološku aktivnost makrolida. Za referentne makrolide koristit će se sljedeće oznake: eritromicin **A-a** klaritromicin-**b**, azitromicin-**c**, telitromicin-**d**.

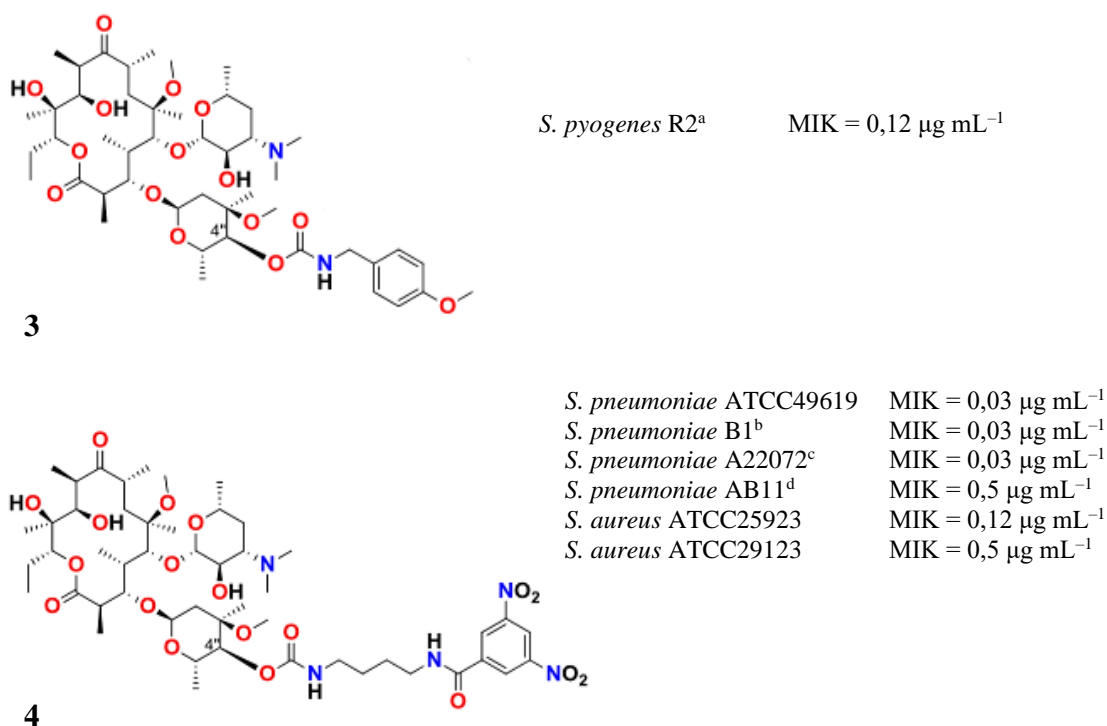
#### 2.2.1.1. Kemijska modifikacija kladinoze

Ma i suradnici<sup>22</sup> pripravili su 4"-*O*-karbamoilne derivate eritromicina A, spojeve **1** i **2** (slika 6.). Biološka aktivnost dobivenih spojeva za neke sojeve donekle je slična aktivnosti makrolida **a-c**. Najveća aktivnost zabilježena je za rezistentni soj *S. pneumoniae*. Vrijednosti MIK makrolida **a, b** i **c** za navedeni soj kreću se u rasponu 128-256 µg mL<sup>-1</sup>.



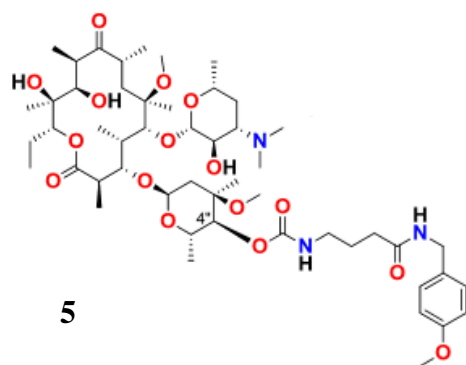
**Slika 6.** Strukturne formule molekula spojeva **1** i **2** i određena vrijednost MIK za bakterijski soj *S. pneumoniae* (a - rezistentni soj kodiran genima *mef*)<sup>1</sup>

Isti su autori također pripravili i 4"-*O*-karbamoilne derivate klaritromicina.<sup>23</sup> Spoj **3** (slika 7.) ima 10 puta veću aktivnost na rezistentni soj *S. pyogenes* R2 od eritromicina, no ne odlikuje ga široki spektar antibakterijske aktivnosti. Kako bi se proširila aktivnost i na druge rezistentne sojeve uspješno je pripremljen spoj **4**.<sup>24</sup>

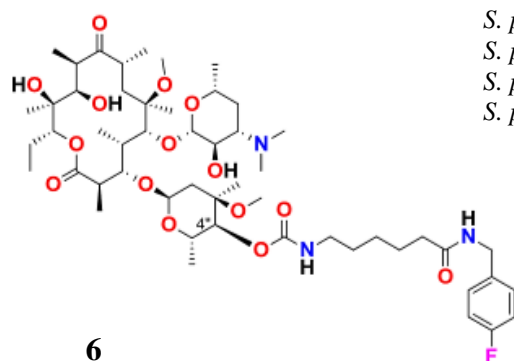


**Slika 7.** Strukturne formule molekula spojeva **3** i **4** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a- klinički izoliran rezistentni soj, b- rezistentni soj kodiran genima *erm*, c- rezistentni soj kodiran genima *mef*, d- rezistentni soj kodiran genima *mef* i *erm*)<sup>1</sup>

Povećanjem duljine alkilnog lanca vezanog na položaj C4'' molekule eritromicina i uvođenjem 4-metoksibenzilne i 4-fluorobenzilne skupine pripremljeni su spojevi **5** i **6** (slika 8.). Najznačajnija je biološka aktivnost tih spojeva na soj *S. pneumoniae* koji pokazuje rezistenciju na makrolide ekspresijom gena *erm* ili gena *erm* i *mef*.<sup>25</sup>



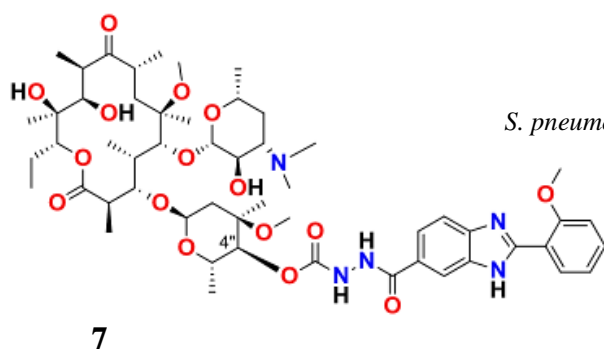
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> B1 <sup>b</sup>	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> A22072 <sup>c</sup>	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> AB11 <sup>d</sup>	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MIK = 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$



<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> B1 <sup>b</sup>	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> A22072 <sup>c</sup>	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> AB11 <sup>d</sup>	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 8.** Strukturne formule molekula spojeva **5** i **6** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (b- rezistentni soj kodiran *erm* genima, c- rezistentni soj kodiran genima *mef*, d- rezistentni soj kodiran genima *mef* i *erm*)<sup>1</sup>

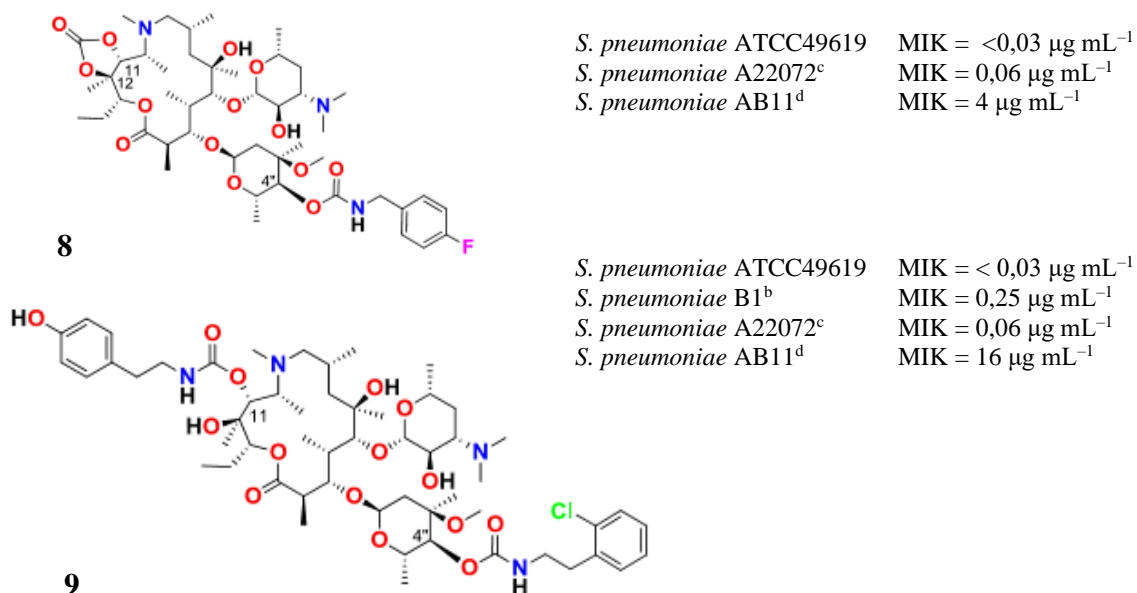
Općenito, 4''-O-benzimidazolilni derivati klaritromicina pokazali su 4 puta veću aktivnost na soj *S. pneumoniae* A22072 od **a-c**. Na slici 9. dan je primjer jednog takvog derivata.<sup>26</sup>



<i>S. pneumoniae</i> A22072 <sup>c</sup>	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
--	----------------------------------

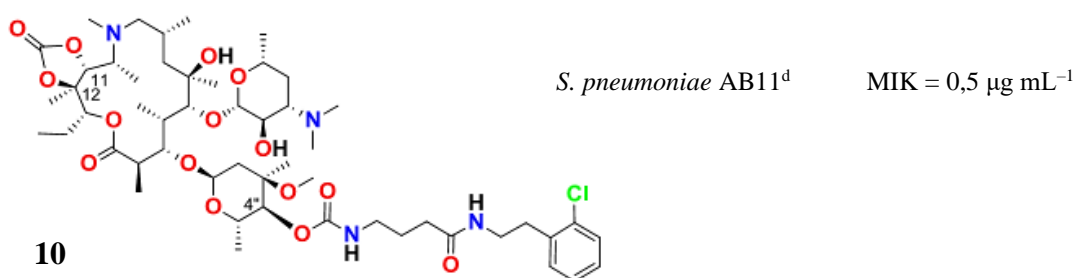
**Slika 9.** Strukturna formula molekule spoja **7** i određena vrijednost MIK za bakterijski soj *S. pneumoniae* (c- rezistentni soj kodiran genima *mef*)<sup>1</sup>

Od 4"-*O*-karbamoilnih derivata petnaesteročlanih makrolida značajni su spojevi **8** i **9** (slika 10.). Njihova biološka aktivnost na soj *S. pneumoniae* AB11 je 4 do 16 puta veća od aktivnosti **b** i **c**. Spoj **9** pokazao je izvrsnu aktivnost na *S. pneumoniae* B1 za razliku od **b** ( $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i **c** ( $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).<sup>27</sup>



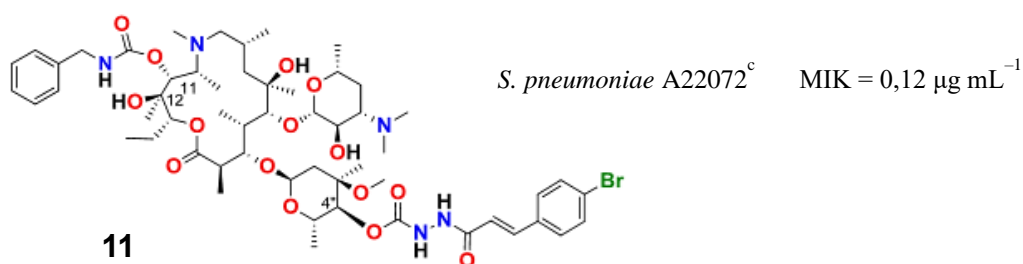
**Slika 10.** Strukturne formule molekula spojeva **8** i **9** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (b- rezistentni soj kodiran genima *erm*, c- rezistentni soj kodiran genima *mef*, d- rezistentni soj kodiran genima *mef* i *erm*)<sup>1</sup>

Dodatnim uvođenjem zaštite hidroksilnih skupina na položajima C11 i C12 (slika 11.) povećana je aktivnost 4"-*O*-karbamoilnih derivata samo na soj *S. pneumoniae* AB11 (MIK (**a-c**) =  $128\text{--}256 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), a smanjena na ostale bakterijske sojeve u usporedbi s aktivnosti referentnih makrolida.<sup>28</sup>



**Slika 11.** Strukturna formula molekule spoja **10** i određena vrijednost MIK za bakterijski soj *S. pneumoniae* (d- rezistentni soj kodiran genima *mef* i *erm*)<sup>1</sup>

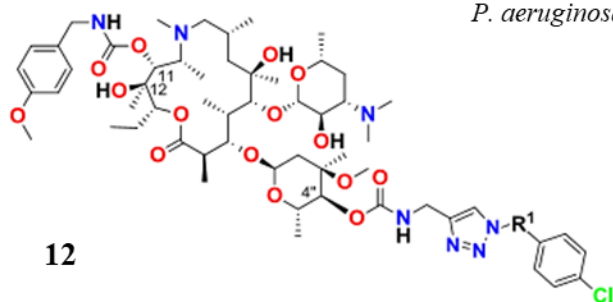
Povećanjem rigidnosti lanca vezanog na položaju 4" (slika 12.) povećana je antimikrobna aktivnost na soj *S. pneumoniae* 22072, no aktivnost se značajno smanjila za većinu Gram-pozitivnih bakterija.<sup>29</sup>



**Slika 12.** Strukturna formula molekule spoja **11** i određena vrijednost MIK za bakterijski soj *S. pneumoniae* (c- rezistentni soj kodiran *mef* genima)<sup>1</sup>

Izvršnu biološku aktivnost na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve pokazao je spoj **12** (slika 13.). Posebno se ističe aktivnost na sojeve *S. pneumoniae* koja je 133 do 2133 puta veća od aktivnosti azitromicina.<sup>30</sup>

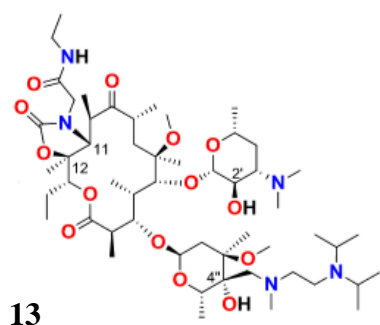
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> B1 <sup>b</sup>	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> A22072 <sup>c</sup>	MIK = 0,06 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> AB11 <sup>d</sup>	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MIK = 0,008 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pyogenes</i> S2 <sup>a</sup>	MIK = 0,002 µg mL <sup>-1</sup>
<i>E. coli</i> ATCC25922	MIK = 16 µg mL <sup>-1</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	MIK = 8 µg mL <sup>-1</sup>



**Slika 13.** Strukturna formula molekule spoja **12** i određena vrijednost MIK za bakterijski soj *S. pneumoniae* (a- klinički izoliran rezistentni soj, b- rezistentni soj kodiran genima *erm*, c- rezistentni soj kodiran genima *mef*, d- rezistentni soj kodiran genima *mef* i *erm*)<sup>1</sup>

Zhang i suradnici<sup>31</sup> su osim već viđenih supstitucija na položajima C11, C12 te C4'' dodatno modificirali aglikonski prsten pripravom 6,9-iminoetera. Biološka aktivnost pripremljenih rigidnih bicikličkih azalida nije bila zadovoljavajuća. Time je potvrđena važnost fleksibilnosti aglikonskog prstena čime molekula makrolida može postići konformaciju koja uspješno sterički sprječava elongaciju bakterijskog peptida.

Sugimoto i suradnici<sup>32</sup> modificirali su klaritromcin na položaju C4'' kladinoze te položaje C11 i C12 u aglikonu. Dobiveni spojevi pokazali su dobru aktivnost na susceptibilne sojeve *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* (slika 14.).

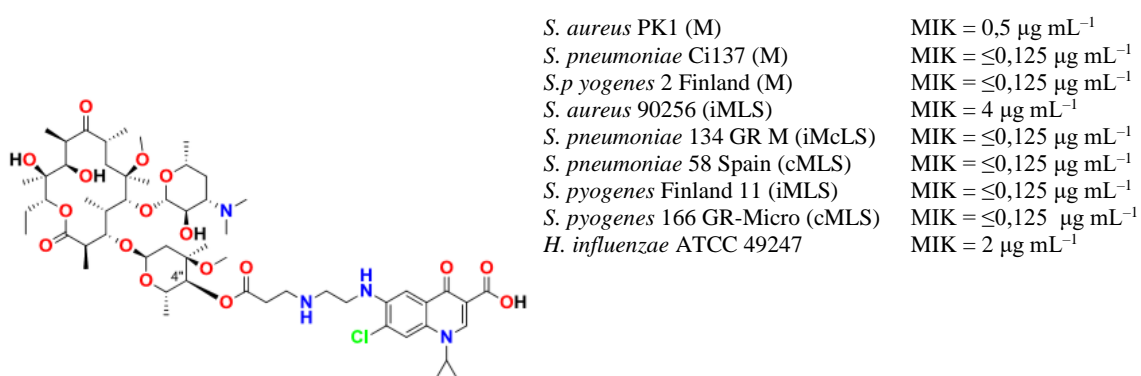


<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> MSC07465	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> MSC08607	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> ATCC700904	MIK = 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> MSC 07365	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> ATCC12344	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> MSC07812	MIK = 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> MSC07811	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

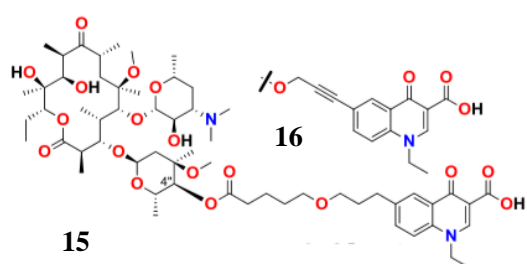
**Slika 14.** Strukturna formula molekule spoja **13** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve<sup>1</sup>

Fajdetić i suradnici<sup>33</sup> pripravili su konjugate makrolida **a-c** i kinolona. Bolja antibakterijska aktivnost u odnosu na spomenute makrolide pripisana je povećanju lipofilnosti novih konjugata. Međutim, uvođenjem metinskih skupina u lanac na položaju C4'' (**16**, slika 15.) došlo je do smanjenja biološke aktivnosti. Autori su zaključili kako je postojanje dužih fleksibilnih alkilnih lanaca nužno za optimalno smještanje makrolida u aktivno mjesto ribosoma. Posebice su istaknuli aktivnost spojeva **14** i **15** na rezistentni soj *H. influenzae* koja je veća od aktivnosti telitromicina.





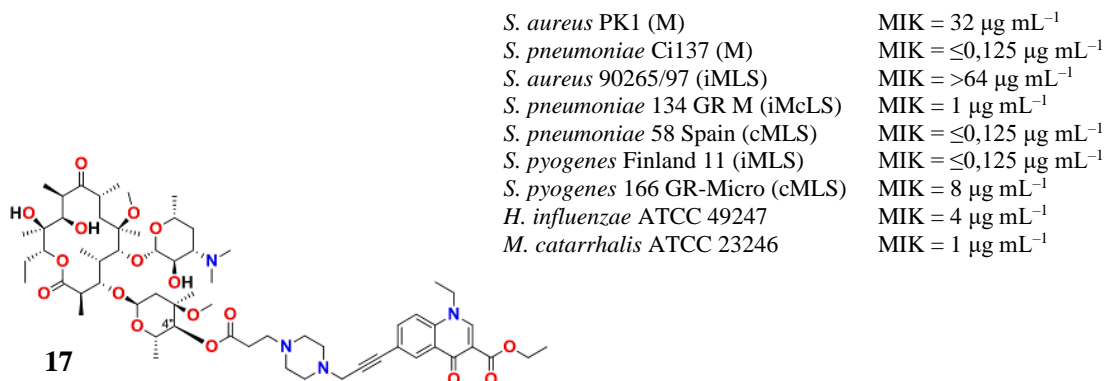
14



15

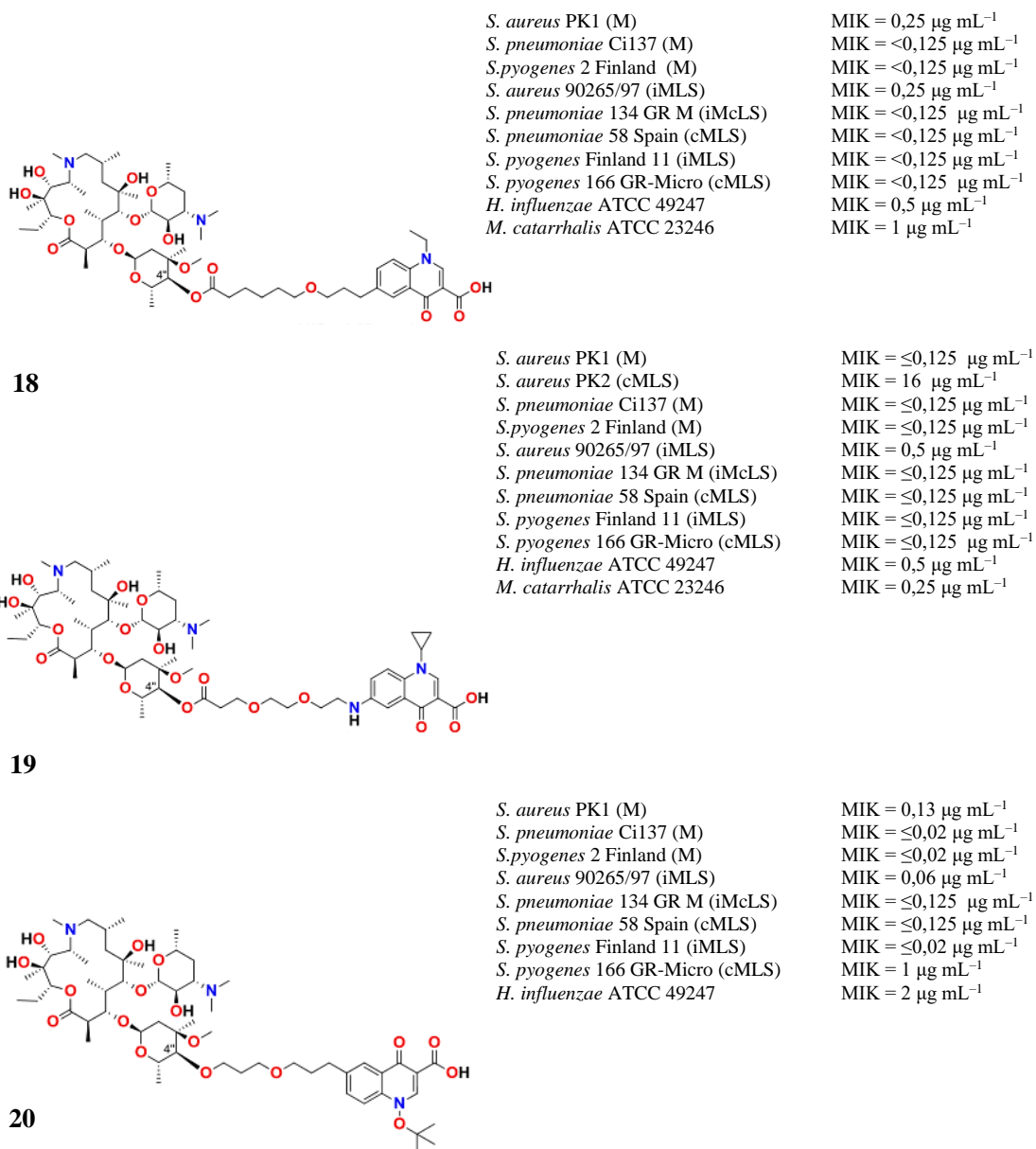
**Slika 15.** Strukturne formule molekula spojeva **14** i **15** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (M -efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogramine)<sup>1</sup>

Kapić i suradnici<sup>34</sup> također su radili na sintezi konjugata makrolida i kinolona. Od pripremljenih četrnaesteročlanih derivata makrolida najviše se istaknuo spoj **17** (slika 16.) koji pokazuje izvrsnu aktivnost na *S. pneumoniae* 134 GR-M (iMcLS), dok azitromicin i klaritromicin ne pokazuju aktivnost na navedeni bakterijski soj. Istraživanjem djelovanja konjugata makrolida i kinolona, tzv. makrolona otkriveno je kako nemaju dualno djelovanje već pokazuju samo bakteriostatsku aktivnost. Inače, za kinolone je karakteristično baktericidno djelovanje.<sup>35</sup>



**Slika 16.** Strukturna formula molekule spoja **17** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (M -efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogamine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogamine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogamine)<sup>1</sup>

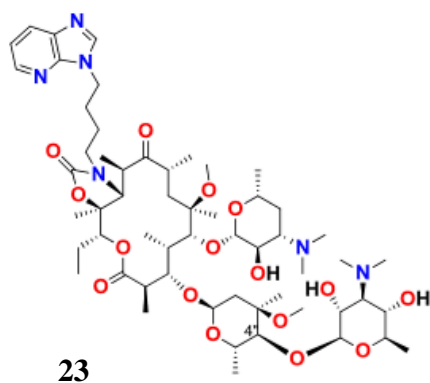
Konjugacijom azitromicina i kinolona<sup>36</sup> dobiven je spektar spojeva od kojih su najznačajniji spojevi **18**, **19** i **20** (slika 17.). Najbolju antimikrobnu aktivnost, posebice za soj *S.aureus* i *S. pyogenes* ima spoj **20**. Spojevi **18** i **19** pokazali su dobru bioraspoloživost i izvrsnu aktivnost na *H. influenzae*.



**Slika 17.** Strukturne formule molekula spojeva **18**, **19** i **20** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (M -efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogramine)<sup>1</sup>

Makroloni **21** i **22** (slika 18.) imaju visoku antimikrobnu aktivnost na patogene rezistentne na eritromicin. Usporedbom vrijednosti MIK uočena je znatno bolja aktivnost spoja **21** u



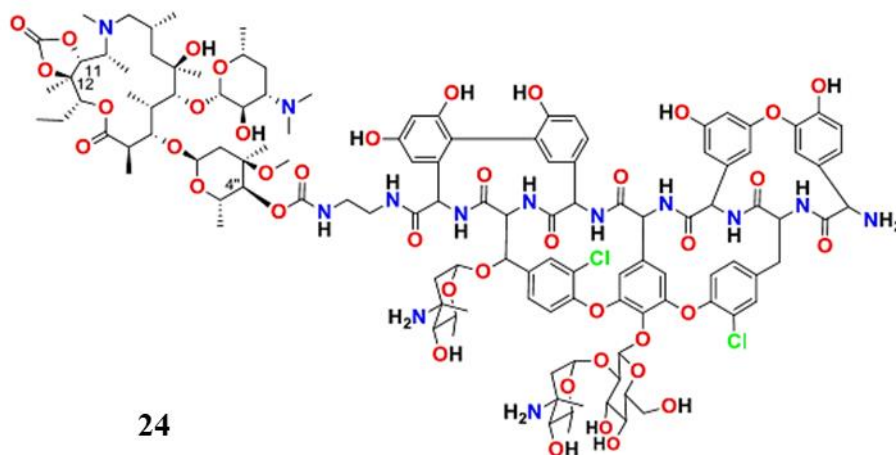


23

<i>S. pneumoniae</i> 11J011 ERSP	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 11N369 ERSPy	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 11B117 MRSA	MIK = 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. epidermidis</i> 11c176 MRSE	MIK = 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> 11Q373 <sup>a</sup>	MIK = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 19.** Strukturne formule molekula spoja **23** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (ERSP, ERSPy-eritromicin rezistentni soj; MRSA,MRSE-meticilin rezistentni soj; a-azitromicin rezistentni soj)<sup>1</sup>

Tevyashova i suradnici<sup>39</sup> objavili su istraživanje o antibakterijskim svojstvima konjugata makrolida i peptida (slika 20.). Usporedili su antimikrobna svojstva novopripremljenih spojeva sa svojstvima azitromicina i vankomicina. Uvođenjem makrocikličkog centra smanjila se biološka aktivnost na većinu Gram-negativnih bakterija, no zabilježena je povećana aktivnost na sojeve: *E. faecium* 568 (MIK = 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *E. faecium* 569 (MIK = 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *E. faecium* 560 (MIK = 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i *S. pneumoniae* ATCC49619 (MIK = 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



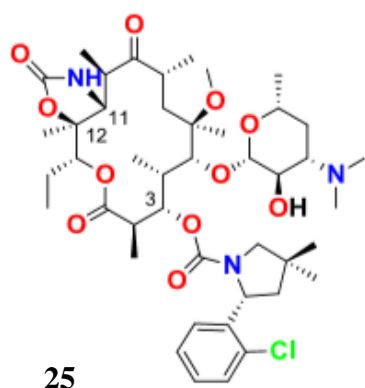
24

**Slika 20.** Strukturna formula molekule spoja **24**<sup>1</sup>

Na primjeru ketolida pokazano je da kladinoza ne utječe bitno na antibakterijsku aktivnost makrolida. Ketolidi su dobiveni uklanjanjem kladinoze i oksidacijom hidroksilne skupine na

položaju C3 u karbonilnu skupinu. Kako bi se dodatno istražio utjecaj kladinoze na biološku potentnost makrolida pripravljeni su spojevi opisani u nastavku.

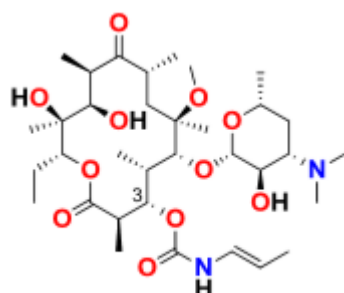
Magee i suradnici<sup>40</sup> su kristalografskim postupcima istražili vezanje spoja **25** (slika 21.) na ribosom bakterije *D. radiodurans*. Biološka aktivnost navedenog spoja slična je aktivnosti klaritromicina, izuzev aktivnosti na soj *S. pneumoniae* 1243-00 MLS<sub>B</sub> koja je 4200 puta veća.



<i>S. pneumoniae</i> 1243-00 MLS <sub>B</sub>	MIK = 0,015 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pyogenes</i> 304-00 MLS <sub>B</sub>	MIK = 0,03 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. aureus</i> 1279-07 MRSA	MIK = 0,5 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. aureus</i> 2111-10 MRSA	MIK = 0,25 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. aureus</i> 1281-07 MRSA	MIK = 0,25 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. aureus</i> 1279-07 MRSA	MIK = 0,25 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. epidermidis</i> 1105-00 MRSE, MLS <sub>B</sub>	MIK = 8 µg mL <sup>-1</sup>

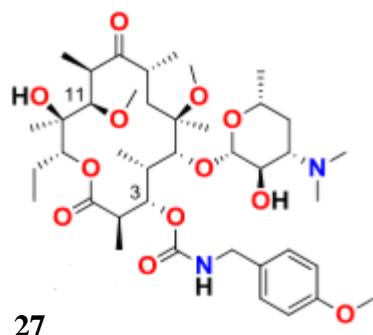
**Slika 21.** Strukturna formula molekule spoja **25** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (MRSA,MRSE-meticilin rezistentni soj; MLS<sub>B</sub>-soj rezistentan na makrolide, linkozamide i streptogramine B)<sup>1</sup>

Zhang i suradnici<sup>41</sup> te Wu i suradnici<sup>42</sup> pripremili su dekladinozil-derivate klaritromicina **26** i **27** te provjerili njihovu biološku aktivnost. Spojevi su pokazali veću aktivnost od klaritromicina. Treba naglasiti izvrsnu aktivnost na *S. pneumoniae* (**26**) i *S. aureus* (**27**) (slika 22.). Pokazalo se kako se uvođenjem različitih supstituenata na položaj C3 četrnaesteročlanih makrolida postiže selektivna bioaktivnost. Takav slučaj nije zabilježen uvođenjem identičnih skupina na položaj C3 petnaesteročlanih makrolida.



26

<i>S. pneumoniae</i> B1 <sup>a</sup>	MIK = 2 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> A22072 <sup>b</sup>	MIK = 0,25 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> AB11 <sup>c</sup>	MIK = 4 µg mL <sup>-1</sup>

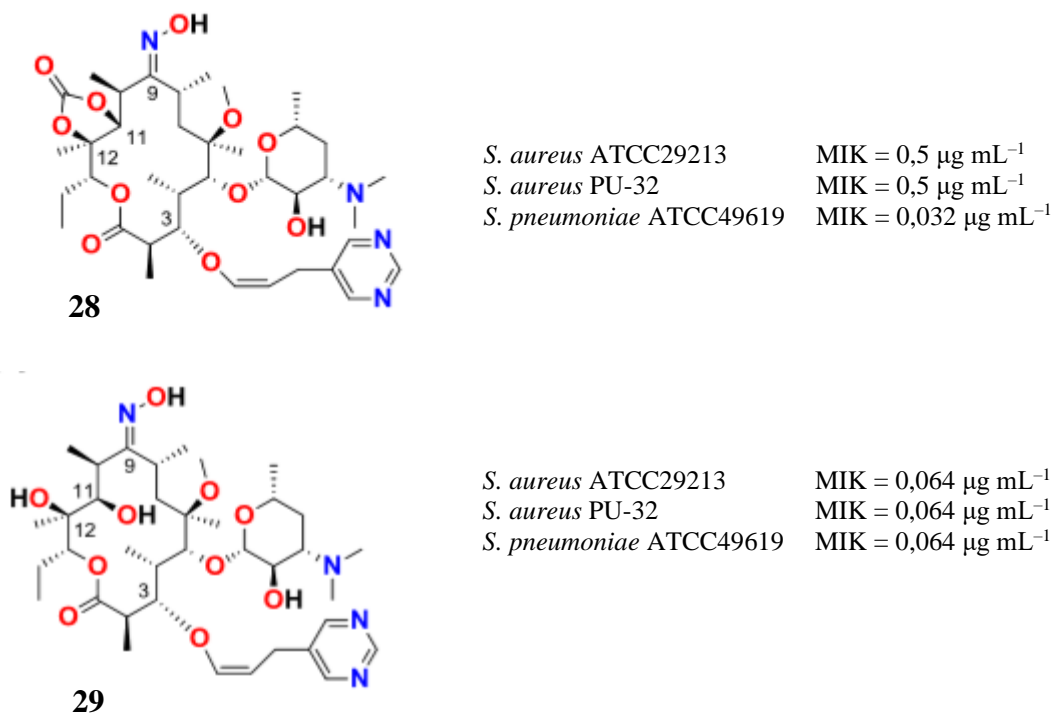


27

<i>S. aureus</i> A265 <sup>d</sup>	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. aureus</i> A2333 <sup>e</sup>	MIK = 0,25 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> 3469 <sup>f</sup>	MIK = 0,5 µg mL <sup>-1</sup>
<i>H. influenzae</i> 3300 <sup>g</sup>	MIK = 0,5 µg mL <sup>-1</sup>

**Slika 22.** Strukturne formule molekula spojeva **26** i **27** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a- rezistentni soj kodiran genima *erm*, b- rezistentni soj kodiran genima *mef*, c- rezistentni soj kodiran genima *mef* i *erm*, d- eritromicin rezistentni i ampicilin susceptibilni soj, e- eritromicin rezistentni i meticilin susceptibilni soj, f- eritromicin rezistentni soj, g- ampicilin rezistentni soj)<sup>1</sup>

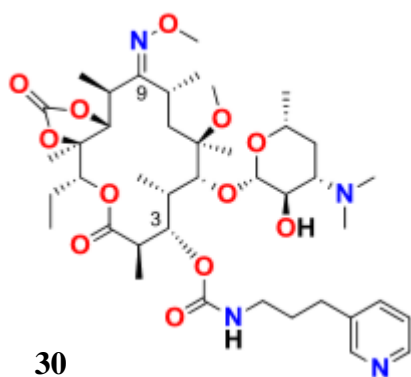
Daljnjom modifikacijom dekladinozil-klaritromicina uvođenjem eterske skupine i pirimidina na položaj C3 te oksimske zaštitne skupine na položaj C9 pripremljeni su spojevi **28** i **29** (slika 23.) s povećanom bioaktivnošću na sojeve *S. aureus* (**29**) i *S. pneumoniae* ATCC49619 (**28, 29**) (MIK = 0,032–0,064 µg mL<sup>-1</sup>).<sup>43</sup>



**Slika 23.** Strukturne formule molekula spojeva **28** i **29** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve<sup>1</sup>

Isti su autori radili i na sintezi derivata dekladinozil-klaritromicina uvođenjem amidne skupine i heterocikličkih supstituenata na položaj C3. Najbolja antibakterijska svojstva pokazao je spoj **30**, i to posebice na rezistentne patogene (slika 24.) Analizom rezultata molekuskog uklapanja (engl. *docking*) utvrđeno je kako aromatski supstituenti pogoduju vezanju makrolida za ribosom uspostavljanjem dodatnih interakcija  $\pi - \pi$ , a time i povećavaju njegovu aktivnost.<sup>44</sup>





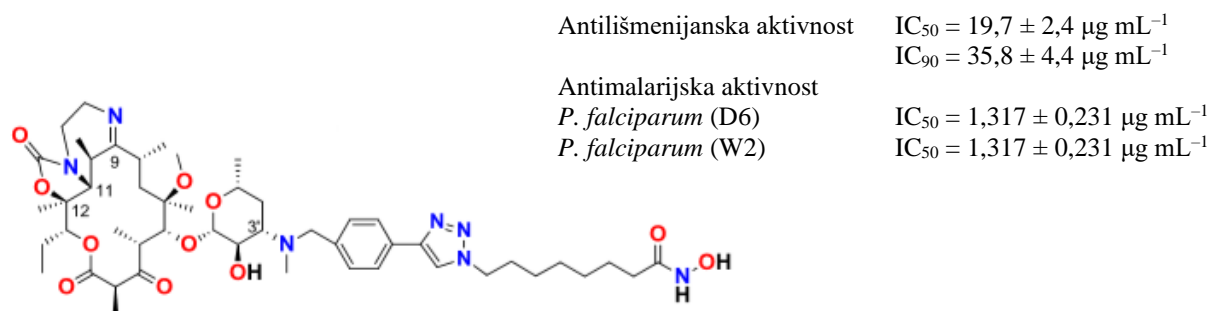
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> PU09 <sup>a</sup>	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 01-968 <sup>b</sup>	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 24.** Strukturna formula molekule spoja **30** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a- rezistentni soj kodiran genima *mef*, b- rezistentni soj kodiran genima *erm*)<sup>1</sup>

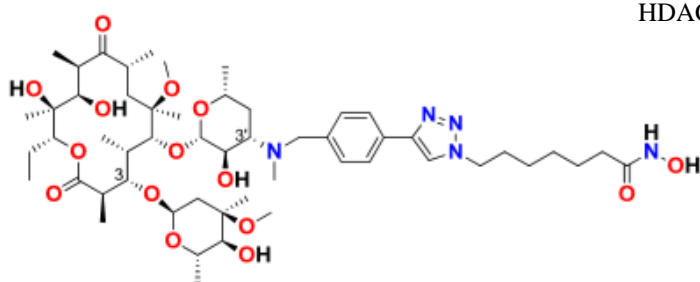
#### 2.2.1.2. Kemijska modifikacija aminošećera

Proučavanjem mehanizma djelovanja makrolida ustanovljeno je kako je desozamin od ključne važnosti za vezanje četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida na ribosomsku podjedinicu. Između desozamina i ribosoma uspostavljaju se hidrofobne interakcije i vodikove veze neovisno o veličini i orijentaciji aglikonskog prstena u aktivnom mjestu.<sup>1</sup>

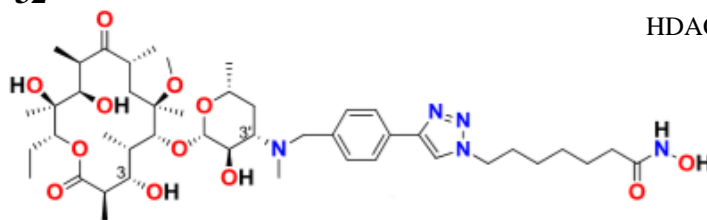
Tapadar i suradnici<sup>45</sup> radili su na modifikaciji položaja C3'. Provjerom biološke potentnosti i analizama molekulskog umetanja otkriveno je inhibicijsko djelovanje makrolida na histon deacetilazu 1 (HDAC1) i histon deacetilazu 2 (HDAC2). Osim antikancerogenog djelovanja, spojevi su pokazali antimalarijsku i antilišmenijansku aktivnost (slika 25). Navedena aktivnost izražena je pomoću vrijednosti  $IC_{50}$ , to jest koncentracije koja smanjuje vijabilnost stanica za 50 %.



31

HDAC 1/2  $IC_{50} = 4,1 \text{ nM}$ 

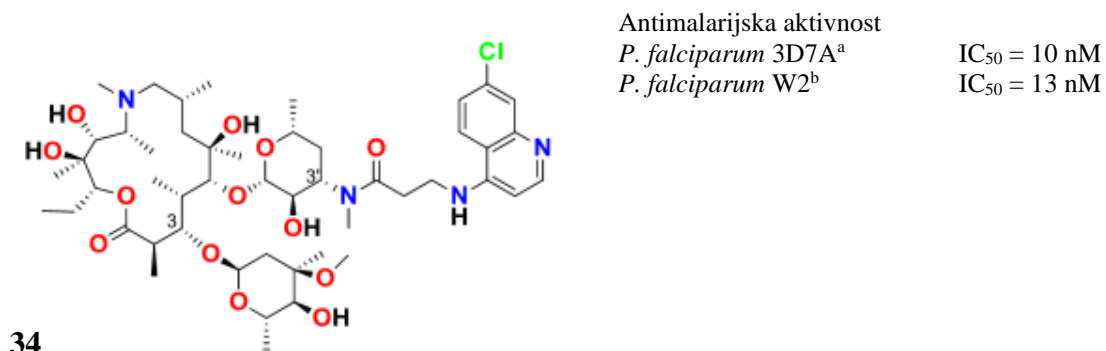
32

HDAC 1/2  $IC_{50} = 1,9 \text{ nM}$ 

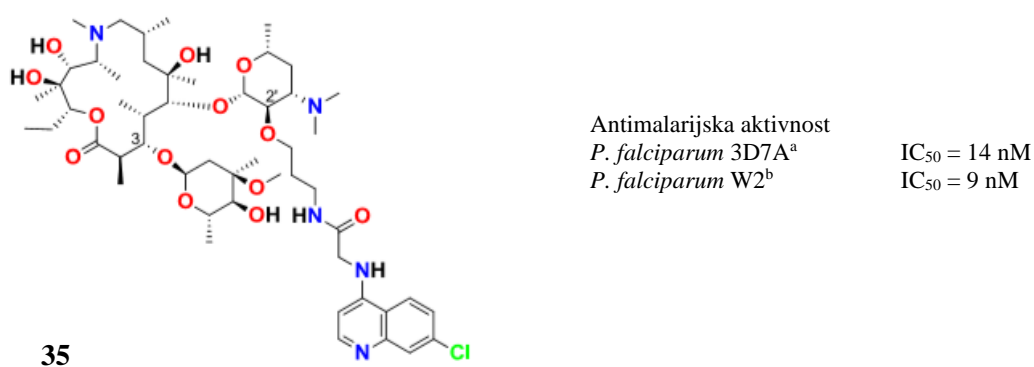
33

Slika 25. Strukturne formule molekula spojeva **31**, **32** i **33** i određene vrijednosti  $IC_{50}$ <sup>1</sup>

Isto tako, modifikacijom položaja C3' pripremljeni su konjugati azalida i kinolona (slika 26.).<sup>46</sup> Spojevi su pokazali smanjenu antibakterijsku aktivnost, ali izvrsnu antimalarijsku aktivnost. Istu aktivnost imaju i azalidi s modificiranim položajem C2' (slika 27.).<sup>47</sup>

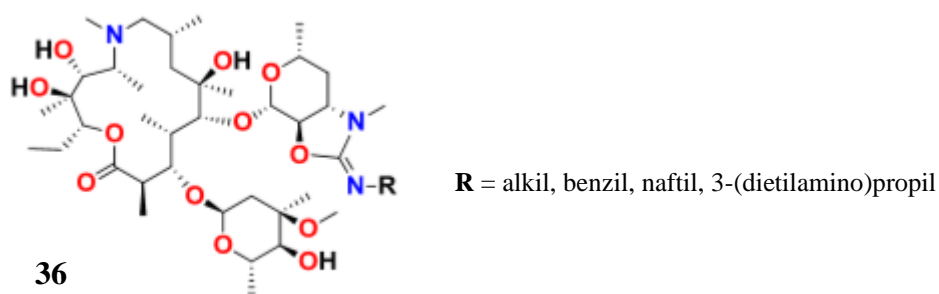


**Slika 26.** Strukturna formula molekule spoja **34** i određene vrijednosti IC<sub>50</sub>. (a - osjetljivi soj, b - soj rezistentan na klorokin i pirimetamin)<sup>1</sup>



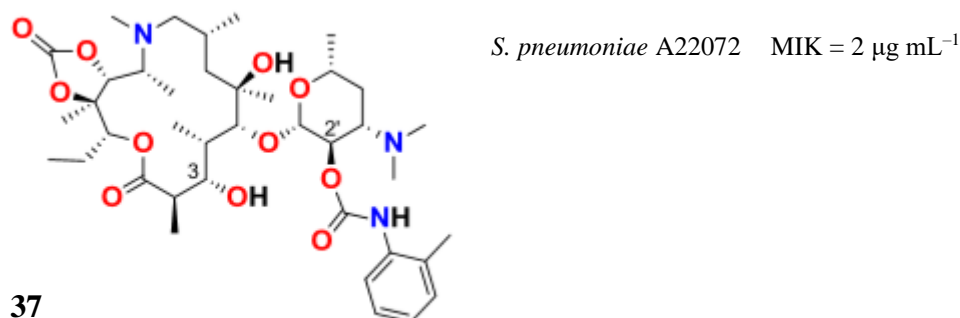
**Slika 27.** Strukturna formula molekule spoja **35** i određene vrijednosti IC<sub>50</sub>. (a - osjetljivi soj, b - soj rezistentan na klorokin i pirimetamin)<sup>1</sup>

Uvođenjem supstituenata na položaj C2' i C3' dobiveni su azalidi koji pokazuje iznimno protuupalno djelovanje (slika 28.).<sup>48</sup>



**Slika 28.** Strukturna formula molekule spoja **36**<sup>1</sup>

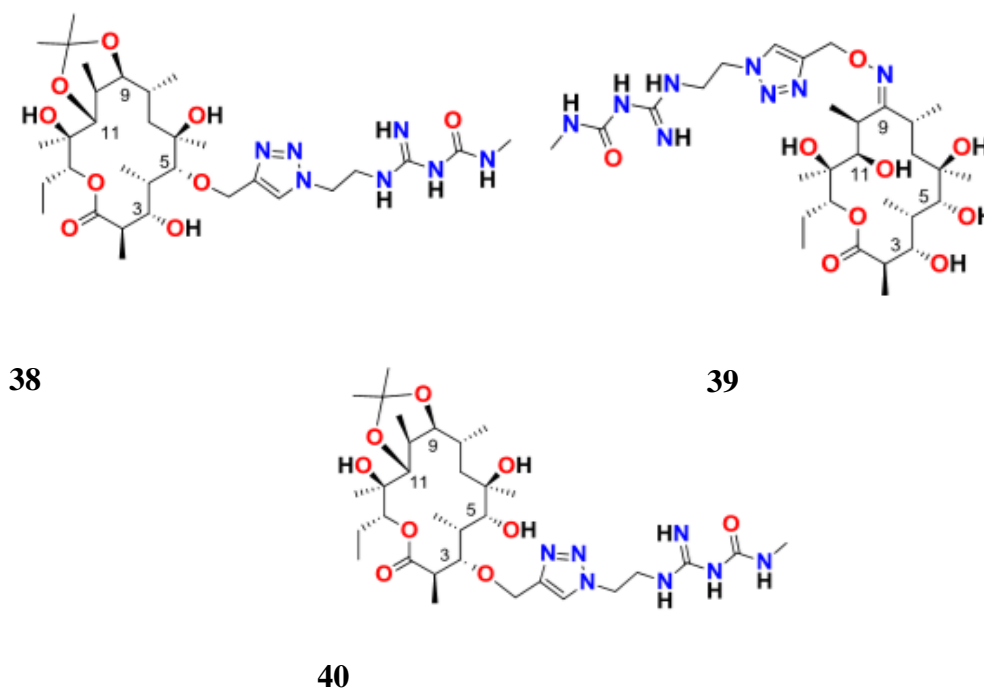
Nadalje, Yan i suradnici<sup>49</sup> sintetizirali su 3-O-dekladinozil-2'-O-karbamoil derivate azitromicina među kojima se istaknuo spoj **37** (slika 29.) koji pokazuje 2 puta veću aktivnost na soj *S. pneumoniae* A22072 od azitromicina. Autori smatraju kako antibakterijskoj aktivnosti tih derivata doprinosi interakcija dušika karbamoilne skupine (C2') s 23S rRNA ribosoma.



**Slika 29.** Strukturna formula molekule spoja **37** i određena vrijednost MIK za bakterijski soj *S. pneumoniae*<sup>1</sup>

Neki spojevi dobiveni zaštitom hidroksilne skupine i modifikacijom dušika na desozaminu pokazali su znatno smanjenu antibakterijsku aktivnost ili pak izostanak bilo kakve biološke aktivnosti.<sup>50</sup> Isti rezultati dobiveni su i uklanjanjem desozamina, dok se zamjenom modificiranog desozamina s mikaminozom povratila biološka aktivnost makrolida. Stoga je zaključeno da su OH-skupine aminošećera važne za interakciju makrolida s nukleotidima ribosoma te da će bilo kakva modifikacija tih skupina dovesti do izostanka antimikrobne aktivnosti.<sup>51</sup>

Sugawara i suradnici<sup>52</sup> istraživali su derivate argifina i četrnaesteročlanih makrolida. Argifin je ciklički peptid izoliran iz gljive *Gliocladium sp.* FTD-0668. Pokazano je da argifin kao inhibitor enzima kitinaze ima potencijala za liječenje astme. No, novopripremljeni derivati makrolida i argifina (slika 30.) pokazali su čak 200 puta jaču inhibitornu aktivnost na enzim kitinazu.



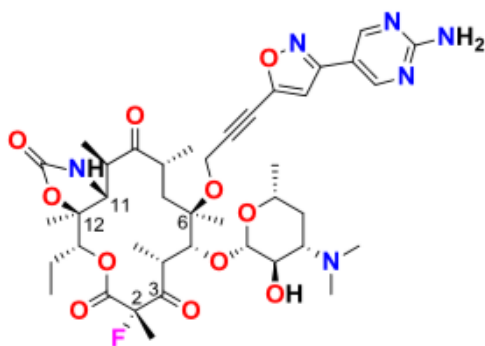
Slika 30. Strukturna formula molekule spojeva 38, 39 i 40<sup>1</sup>

### 2.2.2. Kemijska modifikacija aglikonskog prstena četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida

Proučavanjem konformacije vezanog stanja eritromicina otkrivene su skupine aglikona koje interagiraju s 23S rRNA, a to su 6-OH, 11-OH i 12-OH. Tijekom godina istraživala se antimikrobna aktivnost derivata makrolida s transformiranim položajima u aglikonskom prstenu.<sup>1</sup>

Pretpostavlja se kako ketolidi posjeduju zadovoljavajuću biološku aktivnost zbog supstitucije hidroksilnih skupina na položajima C6, C9, C11 i C12. Smatra se kako karbamatni, eterski i oksimski mostovi omogućuju efektivnu penetraciju makrolida kroz stanične membrane bakterija, dobru bioraspoloživost i čvrsto vezanje u aktivnom mjestu ribosoma.<sup>1</sup>

Sugimoto i suradnici<sup>53</sup> radili su na sintezi fluoroketolida s modificiranim položajem C6. Dobili su spojeve s pojačanom biološkom aktivnosti na sojeve *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* i *H. influenzae* (slika 31.).

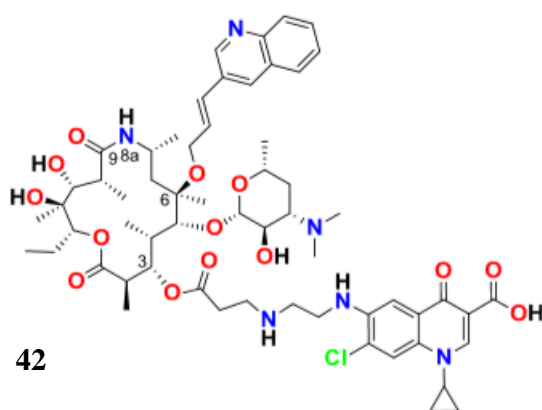


<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 210 <sup>a</sup>	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 205 <sup>b</sup>	MIK = 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 1104 <sup>b</sup>	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC43095	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

41

**Slika 31.** Strukturna formula molekule spoja **40** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a- rezistentni soj kodiran genima *mef*, b- rezistentni soj kodiran genima *erm*)<sup>1</sup>

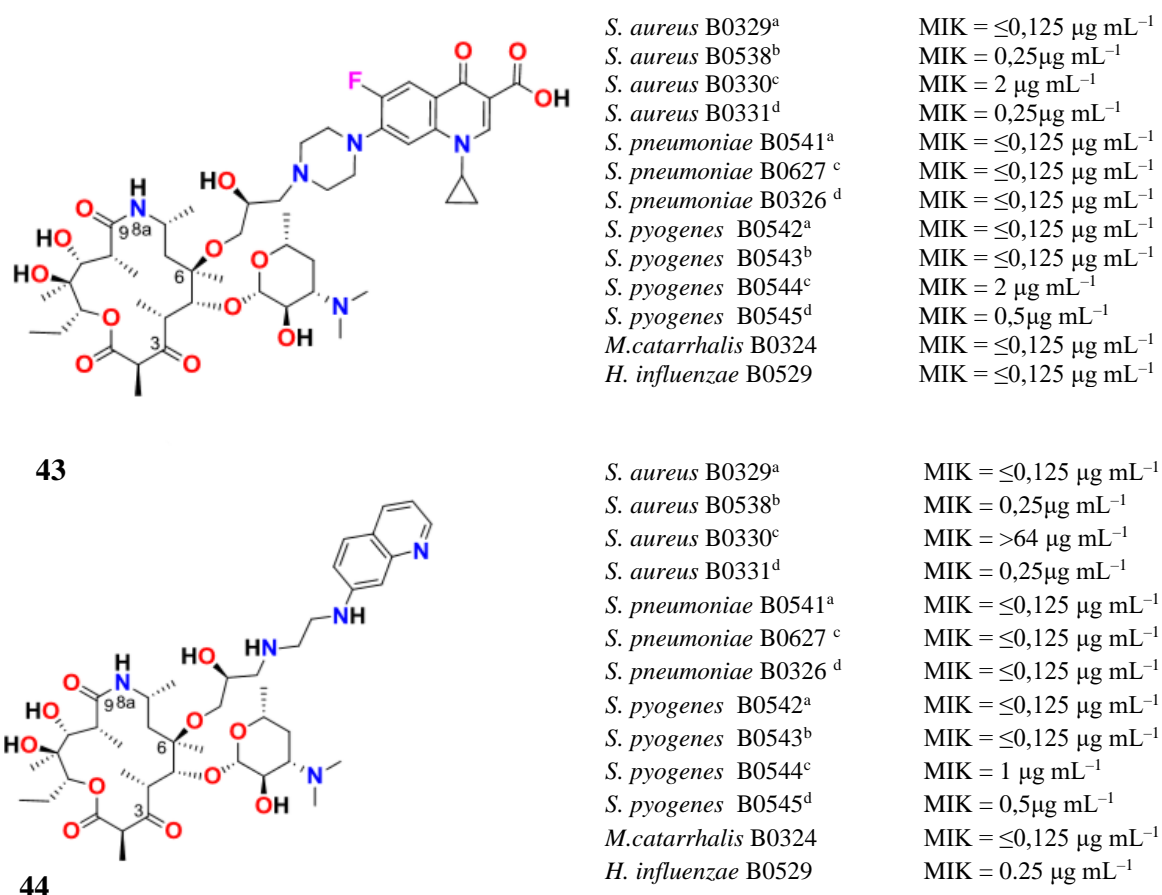
Skupina autora<sup>54</sup> pripremila je konjugate petnaesteročlanih makrolida i kinolona. Najaktivniji spoj **42** posjeduje biološku aktivnost sličnu telitromicinu. Istraživanja *in vivo* pokazala su sporu apsorpciju spoja **42** i dobru bioraspodjivost (slika 32.).



<i>S. aureus</i> <sup>a</sup>	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> <sup>a</sup>	MIK = $\leq 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> <sup>c</sup>	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> <sup>d</sup>	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> <sup>a</sup>	MIK = $\leq 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> <sup>c</sup>	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> <sup>d</sup>	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC43095	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

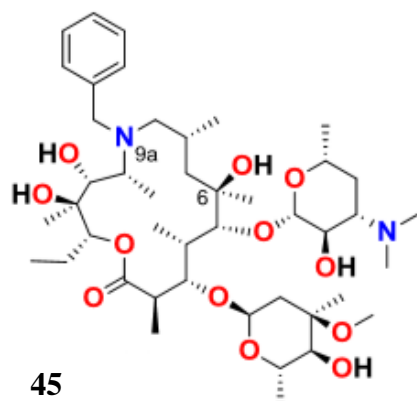
**Slika 32.** Strukturna formula molekule spoja **42** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a - eritromicin susceptibilni soj, b - inducibilno rezistentni soj (iMLS), c – konstitutivno rezistentni soj (cMLS), d – efluks rezistentni soj (M))<sup>1</sup>

Ista skupina autora<sup>54</sup> istraživala je ketolidne derivate homoeritromicina A sa supstituiranim položajem C6 (slika 33). Na većinu rezistentnih Gram-pozitivnih bakterija aktivni su spojevi **43** i **44** te su se pokazali aktivnijima od telitromicina i cetromicina na *H. influenzae* i *M. catarrhalis*.

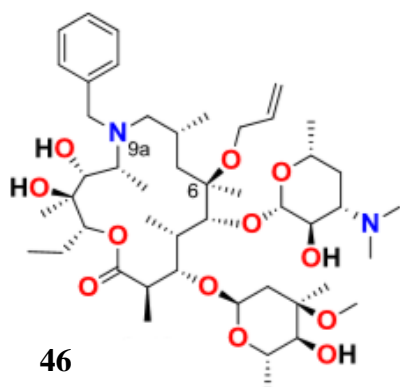


**Slika 33.** Strukturne formule molekula spojeva **43** i **44** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a- soj osjetljiv na eritromicin, b - inducibilno rezistentni soj (iMLS), c – konstitutivno rezistentni soj (cMLS), d – efluks rezistentni soj (M))<sup>1</sup>

Iz eritromicina pripravljeni su spojevi **45** i **46** (slika 34.) koji su se unatoč reduciranoj antibakterijskoj aktivnosti pokazali djelotvornima na parazit *T. gondii* koji je uzročnik toksoplazmoze.<sup>55</sup>



*T. gondii* IC<sub>50</sub> = 5 ± 1 μM

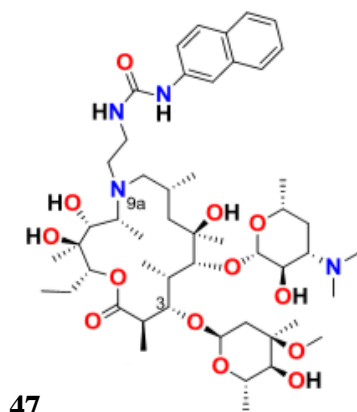


*T. gondii* IC<sub>50</sub> = 7 ± 1 μM

Slika 34. Strukturne formule molekula spojeva **45** i **46** i određene vrijednosti IC<sub>50</sub><sup>1</sup>

Istražena je biološka aktivnost analoga makrolida s tioureido i ureido supstituentima na položaju N(9a).<sup>56</sup> Na slici 35. prikazani su spojevi s najvećom antimalarijskom aktivnosti. Spoj **47** ujedno je pokazao visoku citotoksičnost na stanice hepatocelularnoga karcinoma (Hep-G2) i staničnu liniju izoliranu iz pacijenta s akutnom monocitnom leukemijom (THP-1).

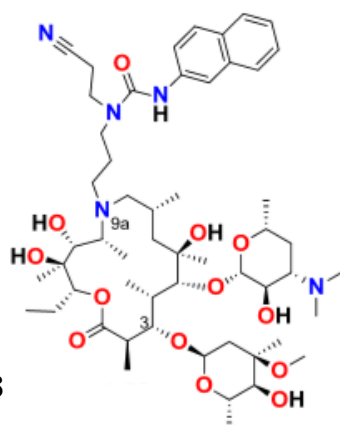




47

Antimalarijska aktivnost  
*P. falciparum* TM91C235  $IC_{50} = 24 \text{ nM}$   
*P. falciparum* D6<sup>a</sup>  $IC_{50} = 71 \text{ nM}$   
*P. falciparum* W2<sup>b</sup>  $IC_{50} = 30 \text{ nM}$

Citotoksičnost THP-1  $IC_{50} = 5 \mu\text{M}$   
 Citotoksičnost Hep-G2  $IC_{50} = 9 \mu\text{M}$

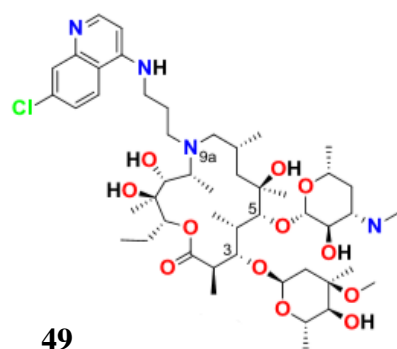


48

Antimalarijska aktivnost  
*P. falciparum* TM91C235  $IC_{50} = 116 \text{ nM}$   
*P. falciparum* D6<sup>a</sup>  $IC_{50} = 118 \text{ nM}$   
*P. falciparum* W2<sup>b</sup>  $IC_{50} = 178 \text{ nM}$

**Slika 35.** Strukturne formule molekula spojeva **47** i **48** i određene vrijednosti  $IC_{50}$  (a - osjetljivi soj, b - soj rezistentan na klorokin).<sup>1</sup>

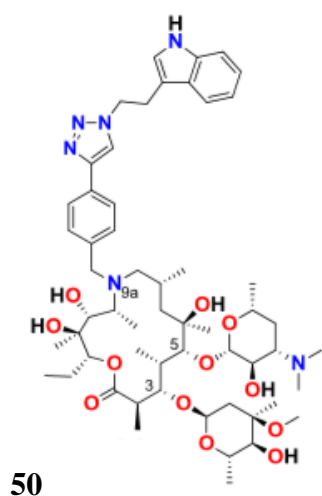
Konjugat makrolida i klorokina **49** (slika 36.) pokazao je također antikancerogenu i visoku antimalarijsku aktivnost te dobru biorasploživost.<sup>57</sup>



Antimalarijska aktivnost  
*P. falciparum* TM91C235  $IC_{50} = 22 \text{ nM}$   
Citotoksičnost Hep-G2  $IC_{50} = 30 \text{ } \mu\text{M}$

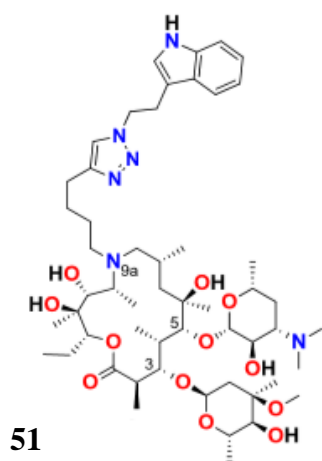
**Slika 36.** Strukturna formula molekule spoja **49** i određena vrijednost  $IC_{50}$ <sup>1</sup>

Uvođenjem triazolnog i indolnog prstena na položaj N(9a) povećava se afinitet vezanja makrolida za ribosom uspostavljanjem dodatnih interakcija  $\pi - \pi$ . Spoj **50** (slika 37.) pokazao je trostruko veću aktivnost od azitromicina na „cell-free“ bakterijski soj *E. coli*. Zabilježena je i veća aktivnost spoja **51** na bakterijski soj *S. aureus* ATCC 29213.<sup>58</sup>



*E. coli cell free*  
*S. aureus* ATCC 29213<sup>a</sup>  
*S. aureus* ATCC 29213<sup>b</sup>

IC<sub>50</sub> = 0,12 ± 0,011 μM  
 MIK = 3,13 μg mL<sup>-1</sup>  
 MIK = 1,56 μg mL<sup>-1</sup>



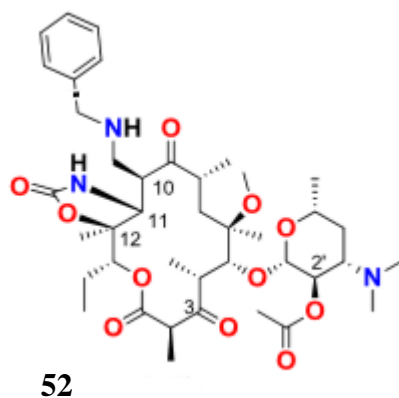
*E. coli cell free*  
*S. aureus* ATCC 29213<sup>a</sup>  
*S. aureus* ATCC 29213<sup>b</sup>  
*E. coli* ATCC 27856

IC<sub>50</sub> = 0,540 ± 0,056 μM  
 MIK = 0,78 μg mL<sup>-1</sup>  
 MIK = 0,078 μg mL<sup>-1</sup>  
 MIK = 16 μg mL<sup>-1</sup>

**Slika 37.** Strukturne formule molekula spojeva **50** i **51** te određene vrijednosti MIK i IC<sub>50</sub> (a – bez serumskog indikatora, b – sa serumskim indikatorom)<sup>1</sup>

Za razliku od iscrpnog istraživanja derivata makrolida s modificiranim položajem C6 i C9, svega nekoliko skupina autora radilo je na modifikaciji položaja C10.

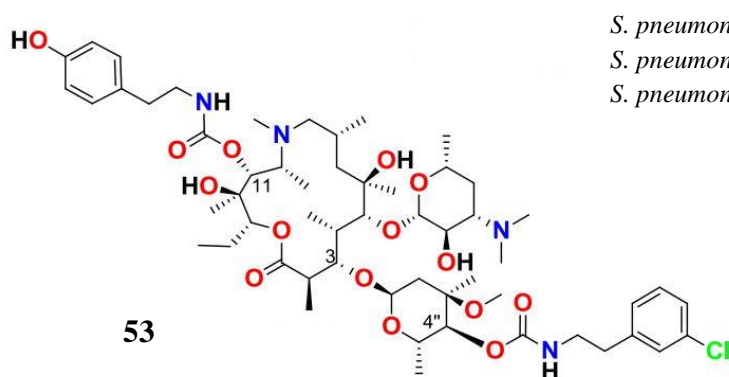
Najviše se istaknuo spoj **52** (slika 38.) čija je aktivnost na rezistentne Gram-pozitivne patogene *S. pneumoniae* i *S. aureus* bila znatno veća od bioaktivnosti koju pokazuje klaritromicin.<sup>59</sup>



<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = <0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> BAA1402 <sup>a</sup>	MIK = <0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 3914 <sup>b</sup>	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> ATCC29213	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> BAA976 <sup>a</sup>	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> BAA977 <sup>b</sup>	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 38.** Strukturna formula molekule spoja **52** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a – efluks rezistentni soj (M)), b - soj rezistentan na makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS))<sup>1</sup>

Ma i suradnici<sup>60</sup> radili su na supstituciji položaja C11 u petnaesteročlanim makrolidima. Dobri rezultati dobiveni su za spoj **53** (slika 39.) čije su vrijednosti MIK za navedene sojeve su do 70 puta niže od vrijednosti MIK azitromicina i klaritromicina.

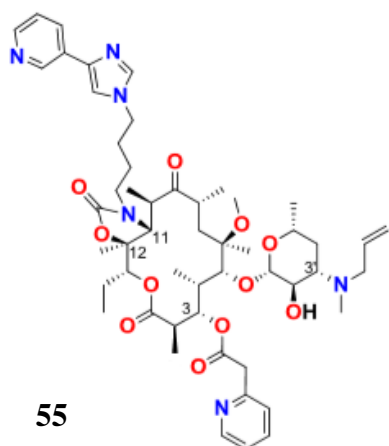


<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = <0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> B1 <sup>a</sup>	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> A22072 <sup>b</sup>	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$

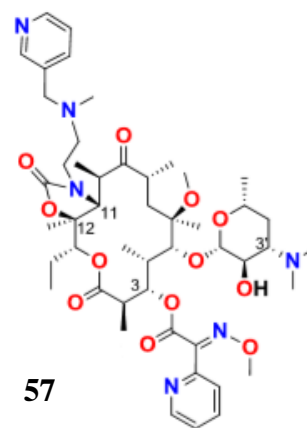
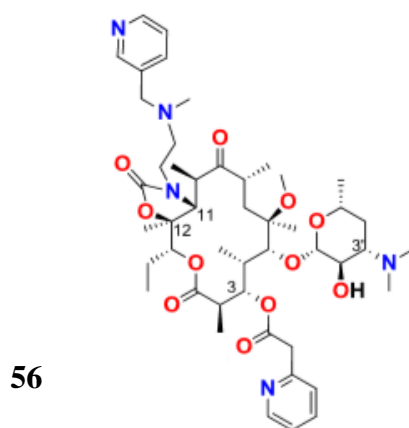
**Slika 39.** Strukturna formula molekule spoja **53** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve (a – rezistentni soj kodiran *erm* genima, b – rezistentni soj kodiran *mef* genima)<sup>1</sup>

Uvođenjem prstena na položaj C12 (slika 40.) povećala se aktivnost na soj *S. aureus* i *H. influenza* u odnosu na eritromicin i klaritromicin.<sup>61</sup>



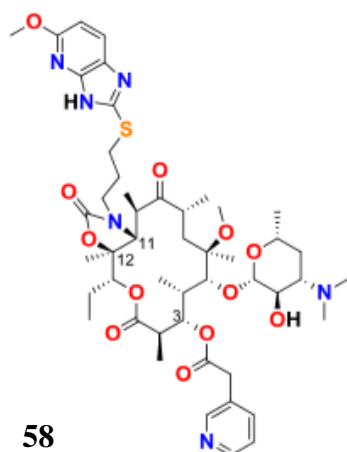


<i>S. pneumoniae</i> 6303	MIK = 0,0015 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> 49619 <i>erm</i>	MIK = 0,008 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pneumoniae</i> 994 <i>mef</i>	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>
<i>S. pyogenes</i> 19615	MIK = 0,008 µg mL <sup>-1</sup>
<i>H. influenzae</i> 38	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>
<i>Moraxela</i> 8176	MIK = 0,125 µg mL <sup>-1</sup>



**Slika 41.** Strukturne formule molekula spojeva **56** i **57** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve<sup>1</sup>

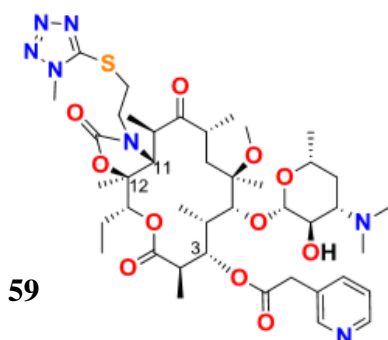
Ketolid **58** (slika 42.) pokazao je dva puta veću djelotvornost od telitromicina protiv sojeva navedenih na slici 43, dok je aktivnost na vankomicin rezistentni soj *E. faecalis* usporediva sa aktivnosti telitromicina.<sup>63</sup>



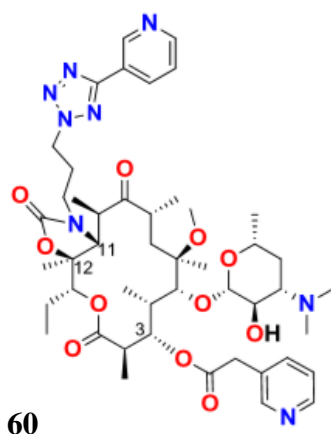
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,062 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 07U084	MIK = 0,031 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 07Z014	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. epidermidis</i> 07R066	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 42.** Strukturna formula molekule spoja **58** i određena vrijednost MIK za neke bakterijske sojeve.<sup>1</sup>

Nadalje, među pripravljenim derivatima ističe se aktivnost spojeva **59** i **60** (slika 43.) na sojeve naznačene na slici 44.<sup>64</sup>



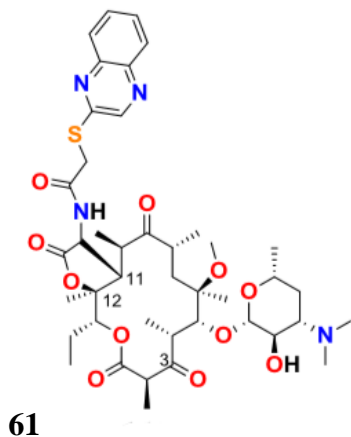
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MIK = <0,0625 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>E. coli</i> ATCC25922	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$



<i>S. aureus</i> ATCC6538	MIK = 0,063 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	MIK = <0,0625 $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 43.** Strukturne formule molekula spojeva **59** i **60** i određene vrijednosti MIK za neke bakterijske sojeve<sup>1</sup>

Pavlović i suradnici<sup>65</sup> pripravili su ketolide s atipičnom modifikacijom položaja C11 i C12. Najbolji rezultati biološkog testiranja, dva do četiri puta veća aktivnost od aktivnosti azitromicina i telitromicina zabilježena je za spoj **61** (slika 44.).



<i>S. aureus</i>	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> iMLS	MIK = $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> iMLS <sub>B</sub>	MIK = $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> M	MIK = $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$

**Slika 44.** Strukturna formula molekule spoja **61** i određena vrijednost MIK za neke bakterijske sojeve<sup>1</sup>



### 2.3. Dosadašnja istraživanja interakcija makrolida i bioloških meta

Za razumijevanje cjelokupnog biološkog profila i dizajn novih derivata makrolida potrebno je istražiti interakcije makrolida s biološkim metama.<sup>3</sup> Osim ribosoma, makrolidi intereagiraju s bakterijskim membranama, žučnim kiselinama i nekim proteinima. Prilikom dizajna potencijalnog lijeka treba voditi računa o lipofilnosti i polarnosti spoja. Cilj je pripremiti lijek zadovoljavajućih farmakokinetičkih svojstava kao što su apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje lijeka iz organizma. Stoga se točnim određivanjem mjesta vezanja i interakcija u biološkim kompleksima mogu poboljšati fizikalno – kemijska svojstva novog potencijalnog lijeka.<sup>1,3</sup>

Spektroskopija NMR brza je i pouzdana metoda za proučavanje interakcija makromolekula i liganada.<sup>3</sup> Dosadašnja istraživanja obuhvatila su intenzivno proučavanje interakcija i sklonosti vezanja makrolida na ribosom<sup>1,3,66</sup>, žučne kiseline<sup>67</sup>, albumin<sup>68</sup> te biološke membrane<sup>69</sup>. U tu svrhu korišteno je više tehnika NMR kako za kvalitativnu (metoda razlike prijenosa zasićenja, engl. *Saturation transfer difference*, STD) tako i za kvantitativnu analizu (titracijski, relaksacijski, difuzijski eksperimenti itd.).<sup>66-69</sup>

Osim spektroskopije NMR, za proučavanje bioloških kompleksa često je primijenjena i rendgenska strukturalna analiza te molekularno modeliranje. Za razliku od rendgenske strukturalne analize koja daje statičnu sliku, NMR pruža uvid u dinamiku kompleksa biološka molekula-ligand. Eksperimentima NMR moguće je dobiti više informacija kao što su mjesto i sklonost vezanja liganda, konformacija kompleksa te lokalna pokretljivost kompleksa i slobodnih liganada.<sup>3,70,71,72</sup>

Glavni nedostatak tehnike NMR je nemogućnost određivanja strukture velikih bioloških molekula (> 70 kDa) kao što su proteini i nukleinske kiseline, dok se kristalografijom mogu dobiti precizne vrijednosti njihovih strukturalnih parametara. Ipak, statična struktura u čvrstom stanju ne mora odgovarati konformaciji u otopini.<sup>3</sup> Unatoč tome, difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu je uvelike pripomogla analizi strukture i funkcije ribosoma. Pomoću kristalne strukture kompleksa makrolid - ribosom otkrivene su ključne interakcije i mehanizmi djelovanja makrolida<sup>1,3</sup> o čemu je više govora u poglavljima 2.1.2. i 2.3.1.

Općenito, za karakterizaciju sustava receptor-ligand dodatno se koriste sljedeće tehnike: titracijska kalorimetrija, fluorescencijska spektroskopija, infracrvena spektroskopija, cirkularni dikroizam, otisak stopa (engl. *footprinting*), otisak prsta (engl. *toeprinting*) itd.<sup>66</sup>

### 2.3.1. Interakcije makrolid-ribosom

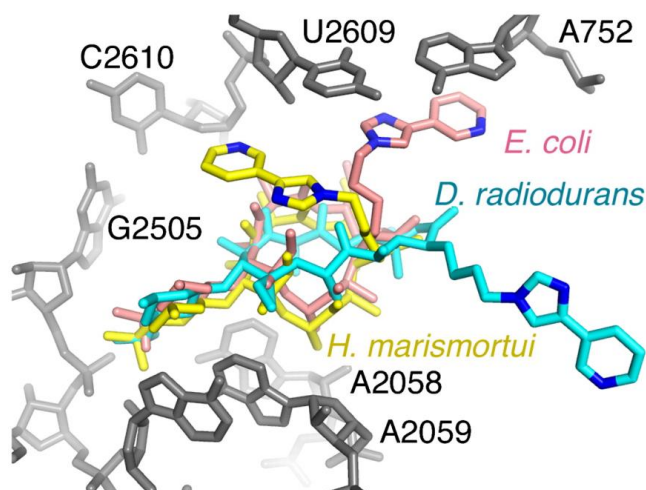
Primarna meta djelovanja makrolida jest ribosom. Makrolidi se vežu na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma u blizini ili na centar peptidil-transferaze. Na taj način blokiraju izlazni tunel za novosintetizirane bakterijske peptide i sterički ometaju njihovu sintezu. Svi makrolidi sprječavaju sintezu peptida u ranoj fazi translacije, odnosno ometaju stvaranje prve, druge ili treće peptidne veze. Između makrolida i ribosoma uspostavljaju se hidrofobne interakcije te vodikove i kovalentne veze.<sup>1,3</sup>

Prema literaturnim podacima način vezanja makrolida za ribosom varira ovisno o strukturi makrolida i proučavanom soju bakterije.<sup>1</sup> Primjerice, ovisno o proučavanom soju bakterije (*H. marismortui*, *D. radiodurans*, *E. coli*) opažene su razlike u orijentaciji aglikonskog prstena i uspostavljanju interakcija  $\pi$ - $\pi$  između telitromicina i nukleobaza ribosoma. Nadalje, male razlike uočene su kod vezanja četrnaesteročlanih, petnaesteročlanih i šesnaesteročlanih makrolida ovisno o prisutnim kemijskim skupinama, veličini aglikonskog prstena i duljini saharidnih jedinica. Primjerice, spiramicin se veže na način da se uspostavlja kovalentna veza između aldehidne skupine antibiotika i amino-skupine nukleobaze ribosoma, dok nepostojanje aldehidne skupine kod azitromicina utječe na nešto drugačije pozicioniranje unutar ribosomskog tunela. Ipak, svim makrolidima zajednički je način vezanja aminošećerne jedinice koja igra ključnu ulogu u vezanju makrolida na ribosom.<sup>1,3,66</sup>

Tijekom godina istraživanja kompleksa makrolid-ribosom dvije najčešće korištene komplementarne metode su spektroskopija NMR i difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu.<sup>3</sup>

Pomoću difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu određena je konformacija i epitopi vezanja nekoliko makrolida (eritromicin, azitromicin, telitromicin, metimicin, pikromicin) za različite sojeve bakterija (*H. marismortui*, *D. radiodurans*, *T. thermophilus*, *E. coli*).<sup>73-76</sup> Proces kristalizacije kompleksa makrolid-ribosom nije jednostavan, stoga difrakcijom rendgenskog zračenja na monokristalu nije bilo moguće istražiti komplekse makrolida i klinički relevantnih bakterija.<sup>66</sup>

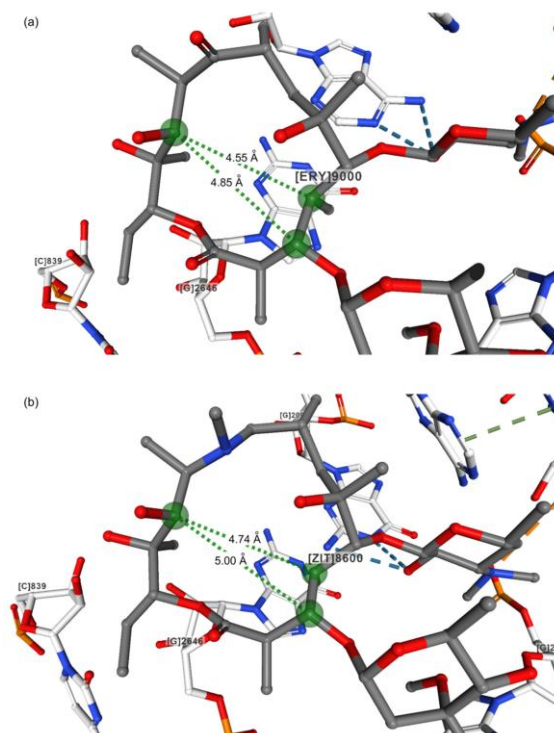
Kao što je već spomenuto na primjeru telitromicina, uočene su razlike u vezanju makrolida ovisno o proučavanom soju (slika 45.).<sup>77</sup>



**Slika 45.** Interakcije telitromicina i 23 rRNA iz ribosoma *E. coli* (sivo obojeno) te konformacije telitromicina u veznom mjestu: *E. coli* (rozo obojeno), *D. radiodurans* (tirkizno obojeno) i *H. marismortui* (žuto obojeno)<sup>77</sup>

Pretpostavlja se da se razlike mogu prije pripisati različitim postupcima kristalizacije sustava i interpretaciji rezultata, nego specifičnosti bakterijskog soja.<sup>77</sup>

Proučavanjem strukturnih modela okarakterizirane su različite konformacije makrolida. Pokazano je da 14-člani makrolidi u vezanom stanju zauzimaju izvrnutu konformaciju, dok 15-člani makrolidi zauzimaju konformaciju *3-endo-folded-out*. Polarne skupine makrolaktonskog prstena usmjerene su prema lumenu ribosomskog tunela, dok je hidrofobni dio makrolaktonskog prstena usmjeren prema zidu tunela. Na slici 46. prikazane su kristalne strukture molekula eritromicina i azitromicina u vezanom stanju. Naznačene su udaljenosti C4-C11 i C3-C11. Udaljenost između atoma C4-C11 je kraća što upućuje na izvrnutu konformaciju.<sup>74,76</sup>



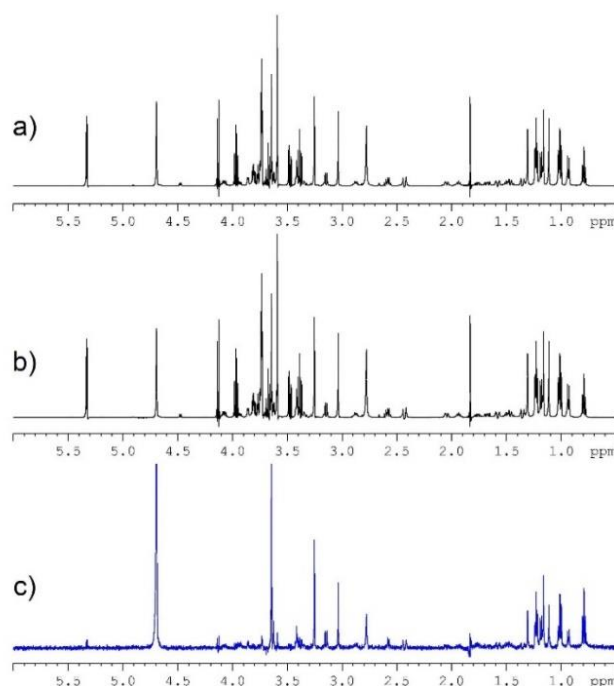
**Slika 46.** Kristalne strukture (a) eritromicina<sup>71</sup> i (b) azitromicina<sup>73</sup> u veznom mjestu 50S podjedinice ribosoma izoliranog iz bakterije *H. marismortui*<sup>66</sup>

Iako je difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu pripomogla analizi sustava makrolid-ribosom, istraživanja su pokazala da je važno koristiti i druge metode prilikom određivanja odnosa strukture i aktivnosti makrolida. Prvi razlog je nemogućnost kokristalizacije kliničkih relevantnih bakterija, a drugi razlog je provjeravanje vjerodostojnosti rezultata. Treba istražiti zašto su dobiveni različiti modeli vezanja za različite bakterije.

Metode NMR temeljene na prijenosu magnetizacije kao što su STD i trNOESY intenzivno su se koristile za proučavanje sustava makrolid-ribosom.<sup>3,66</sup> Važno je napomenuti da je navedene eksperimente NMR moguće uspješno provesti samo u slučaju brze izmjene liganda između slobodnog i vezanog stanja,<sup>71</sup> odnosno, metoda je ograničena na sustave sa slabim i umjerenim vezanjem ( $K_d > 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Kao što je već opisano u poglavlju 2.1.2., prvi korak vezanja makrolida uključuje slabo vezanje, a drugi korak jako vezanje.<sup>3</sup>

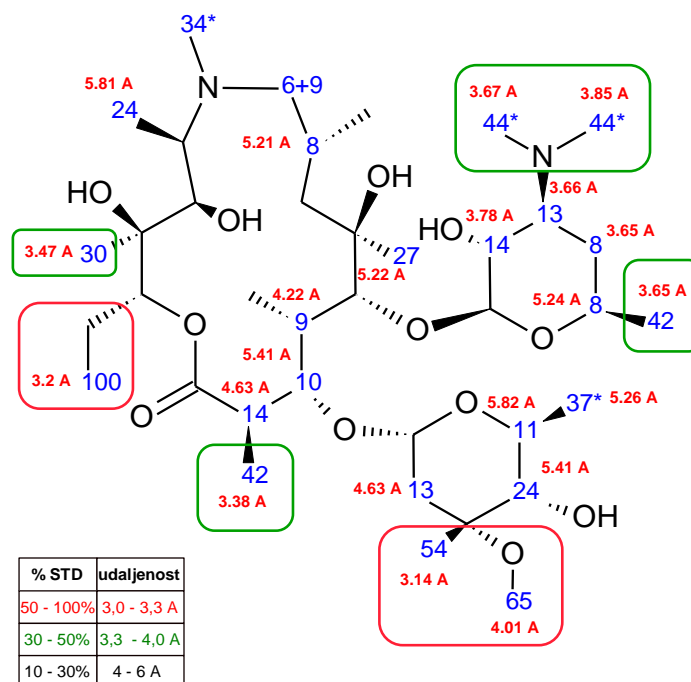
Tehnika razlike prijenosa zasićenja (STD) korisna je tehnika za detekciju kemijskih skupina liganda koje sudjeluju u vezanju za receptor, to jest za mapiranje epitopa. Tehnika se temelji na snimanju referentnog spektra (engl. *off resonance*) tijekom kojeg ne dolazi do pobude receptora, i spektra zasićenja (engl. *on resonance*) tijekom kojeg dolazi do selektivne pobude receptora i

prijenosa magnetizacije na ligand. Spektar razlike STD nastaje oduzimanjem referentnog spektra i spektra zasićenja te sadrži samo signale protona liganda koji su primili magnetizaciju s receptora (slika 47.). Mjerenjem intenziteta signala može se otkriti koji protoni su najbliži receptoru, a koji su najudaljeniji. Najintenzivniji signal imat će protoni koji su u bliskom kontaktu s receptorom.<sup>71,78</sup>



**Slika 47.** Spektri  $^1\text{H}$  NMR oleandomicina i ribosoma *E. coli*: **a)** spektar zasićenja (8 ppm), **b)** referentni spektar (50 ppm) i **c)** spektar razlike STD, snimljeni u tris- $d_{11}$  puferu pri 298 K<sup>1</sup>

Proučavanjem vezanja 6-*O*-metil homoeritormicina za ribosom pretpostavljeno je kako se u vezanom stanju prvo uspostavljaju hidrofobne interakcije u kojima sudjeluju šećer kladinoza te metilne i metilenske skupine laktoskog prstena.<sup>15</sup> Prepoznavanjem aktivnog mjesta optimalno se pozicionira šećer desozamin i dolazi do čvršćeg vezanja makrolida stvaranjem vodikovih veza između skupina 2'-OH i 3'-NMe<sub>2</sub> i ribosoma. Provedbom eksperimenata STD NMR dokazano je kako iste skupine sudjeluju i u vezanju azitromicina na ribosom. Usporedba pojačanja signala u spektru STD NMR i udaljenosti atoma dobivenih difrakcijom rendgenskog zračenja na monokristalu prikazana je na slici 48.



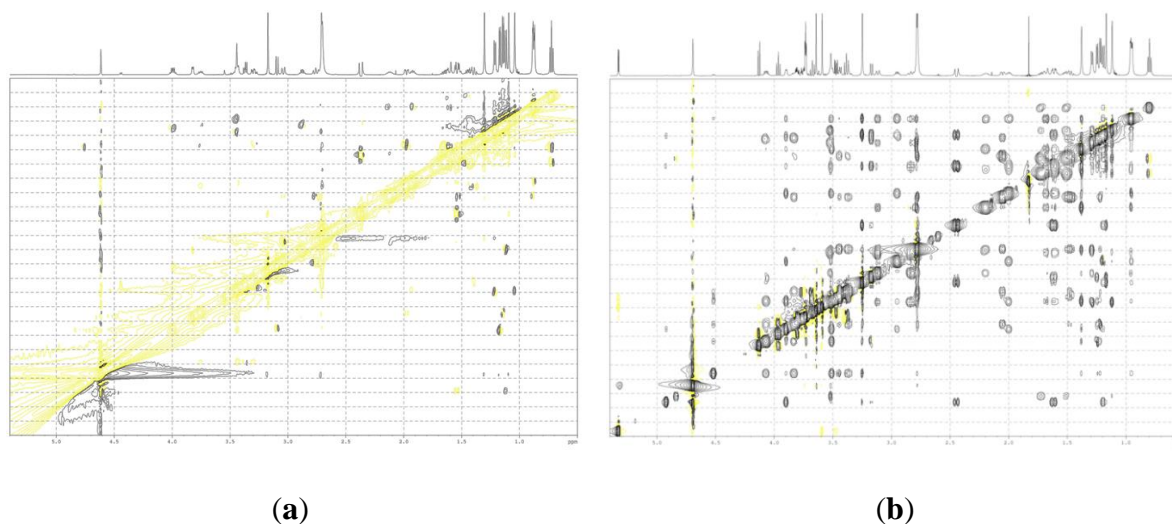
**Slika 48.** Pojaćanje signala STD i udaljenosti atoma azitromicina u kompleksu s ribosomom<sup>3</sup>

Opaženo je najveće pojaćanje signala STD (50–100 %) za atome molekule azitromicina koji su najbliže ribosomu (3,0–3,3 Å), dok je pojaćanje signala za udaljenije atome postupno opadalo.<sup>3</sup>

Tehnika water-LOGSY (engl. *Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*) zasniva se na sličnom principu kao i STD. Temelji se na pobudi protona vode i prijenosu magnetizacije između molekula vode, proteina i liganda putem efekta NOE i kemijske izmjene. Metoda je primjenjiva na sustave velike molekulske mase i omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu vezanja. Najčešće se koristi za probir vežućih liganada čija je konstanta vezanja  $K_D$  reda veličine  $\mu\text{M}$ - $\text{mM}$ . Ovom tehnikom mogu se odrediti vrijednosti  $K_D$  pomoću eksperimenta titracije liganada. Nadalje, tehnika se može primijeniti za mapiranje epitopa odnosno određivanje orijentacije liganada tijekom vezanja.<sup>79,80</sup>

Tehnikom trNOESY može se saznati dolazi li do vezanja makrolida na ribosom te se može proučiti konformacija molekule makrolida u vezanom stanju. Tehnika se temelji na efektu NOE, križnoj relaksaciji dipolno spregnutih spinova. Dipolno sprežanje spinova uključuje spregu preko prostora te se interpretacijom spektra dobiva informacija o sprezi spinova čija je udaljenost manja od 5 Å. Osim o udaljenosti spinova, jačina efekta NOE ovisi o korelacijskom vremenu molekule koje pak ovisi o veličini molekule i viskoznosti otapala. Ukoliko imamo male molekule ( $M < 500$  Da) vrijednost NOE bit će pozitivna, dok u slučaju molekula srednje

veličine ( $M \sim 500\text{-}1000$  Da) vrijednost NOE bit će mala ili jednaka nuli. Za velike molekule NOE poprima negativnu vrijednost.<sup>81</sup> Spektar NOESY azitromicina prije i nakon dodatka ribosoma prikazan je na slici 49.



**Slika 49.** Spektari **a)** NOESY azitromicina prije i **b)** tr-NOESY azitromicina nakon dodatka ribosoma *E. coli*<sup>81</sup>

Prije dodatka ribosoma većina izvandijagonalnih signala azitromicina ( $M_w = 748.996$   $\text{g mol}^{-1}$ ) izostaje, dok nakon dodatka ribosoma azitromicin poprima svojstvo velike molekule i time dolazi do pojave signala u spektru.

Konformacije molekula eritromicina A, klaritromicina, azitromicina i njihovih dekladinofil-derivata u vezanom stanju istražene su asignacijom spektara tr-NOESY i uz pomoć molekuskog modeliranja.<sup>82</sup> Dobiveni rezultati ukazali su da ovi spojevi zauzimaju izvornu konformaciju. Unatoč strukturnoj sličnosti dvaju makrolida, konformacija molekule klaritromicina u vezanom stanju pokazala se rigidnijom od konformacije molekule azitromicina. S obzirom na činjenicu kako je azitromicin jedan od najdjelotvornijih makrolidnih antibiotika, autori smatraju kako razlike u konformacijskoj fleksibilnosti makrolida mogu biti povezane s njihovim povećanjem ili smanjenjem biološke aktivnosti.

Objedinjujući rezultate dobivene difrakcijom rendgenskog zračenja na monokristalu, spektroskopijom NMR i molekuskim modeliranjem zaključeno je kako su konformacije molekula četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida u vezanom stanju slične konformacijama u slobodnom stanju.<sup>10,15,16</sup>

Krioelektronska mikroskopija također je korištena za karakterizaciju sustava makrolid-ribosom. Navedenom metodom pokušao se odrediti odnos strukture i aktivnosti diritromicina budući da taj antibiotik pokazuje veću aktivnost od svog prekursora, eritromicina. Proučene su specifične interakcije diritromicina u kompleksu s ribosomom *E. coli*.<sup>83</sup> Ujedno se pokušavao objasniti mehanizam resistencije soja *S. aureus* na eritromicin. Pokazano je da unosom eritromicina u bakteriju dolazi do strukturne promjene ribosoma, međutim ta promjena značajno ne utječe na vezanje eritromicina. Ustanovljeno je da eritromicin u kompleksu s ribosomom *S. aureus* zauzima izvornu konformaciju, što je u skladu s rezultatima dobivenim difrakcijom rendgenskog zračenja na monokristalu. Ipak, uočene su male razlike uspoređivanjem vezanja eritromicina na podjedinicu 50S i na cijeli ribosom. Razlike u vezanju ukazuju da konformacijska fleksibilnost eritromicina ovisi o ostvarenim specifičnim interakcijama s okolinom.<sup>84</sup>

Iako prethodno opisane metode (difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu, spektroskopija NMR, krioelektronska mikroskopija) pružaju pregršt informacija o vezanju makrolida, mana njihove primjene je što interpretacija rezultata zahtijeva dosta vremena. Potrebno je potpuno strukturno okarakterizirati ligande, receptore te kompleks.

Metode koje pružaju brži uvid u vezanje makrolida su: otisak stopa (engl. *footprinting*), otisak prsta (engl. *toeprinting*) i fluorescencijska spektroskopija.<sup>66</sup> Prednost ovih metoda je što se na brz način može potvrditi vezanje makrolida, identificirati aktivno mjesto makrolida te procijeniti kako formiranje kompleksa utječe na strukturu i funkciju biomolekule. Nedostatak navedenih metoda je zahtjevna priprema uzorka. Primjerice, priprema uzorka za fluorescencijsku spektroskopiju uključuje selektivno označavanje ribosoma<sup>85</sup> ili antibiotika s fluoroforom. Važno je napomenuti da derivatizacija analita može promijeniti njegovu aktivnost i kinetiku vezanja. Za izvođenje eksperimenta najpogodniji su manji i neutralni fluorescirajući supstituenti (npr. BODIPY, NBD) jer veliki (npr. rodamin, fluorescein) i negativno nabijeni (npr. Alexa fluor 488) supstituenti smanjuju afinitet vezanja.<sup>86</sup>

Tereshchenkov i suradnici<sup>86</sup> pripravili su seriju fluorescirajućih derivata makrolida te su istražili nastajanje kompleksa makrolid-ribosom praćenjem intenziteta signala fluorescentne polarizacije. Odredili su konstantu disocijacije kompleksa i procijenili afinitet vezanja novih derivata makrolida. Prednost fluorescentne polarizacije je visoka osjetljivost. Intenzitet signala ovisi o masi fluorescirajuće molekule, odnosno o brzini rotacije molekule. Za razliku od male molekule, kompleks ribosoma i fluorescirajućeg liganda posjeduju malu brzinu rotacije što



rezultira promjenom intenziteta emitirane polarizirane svjetlosti. Nedostatci metode su interferencijski faktori poput raspršenja svjetlosti, gašenje fluorescencije, autofluorescencija itd. Nadalje, istraživanje vezanja antibiotika na ribosom moguće je provođenjem kompeticijskih eksperimenata s fluorescirajućim ligandom. Prati se promjena intenziteta fluorescencije kompleksa zamjenom fluorescirajućeg liganda s antibiotikom.<sup>87</sup>

Pomoću spektroskopske metode cirkularnog dikroizma istraživani su utjecaji zagrijavanja i metalnih iona na strukturu ribosoma i RNA te su proučavane interakcije s nekim antibioticima. Cirkularni dikroizam se pokazao kao prikladna metoda za proučavanje konformacijskih promjena RNA uslijed vezanja antibiotika te za određivanje konstante disocijacije.<sup>88-91</sup>

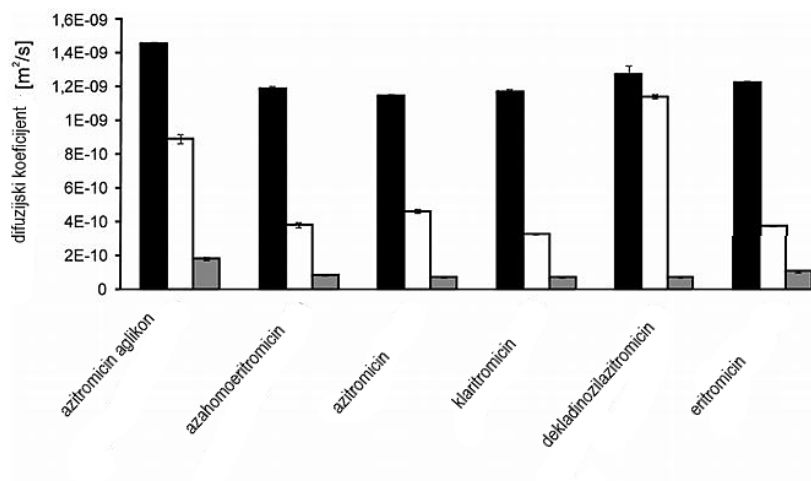
Računalne simulacije igraju važnu ulogu u procesu dizajna lijeka, stoga se koriste u kombinaciji s eksperimentalnim tehnikama. Molekulskim modeliranjem moguće je procijeniti mehanizme i dinamiku vezanja makrolida, te interakcije u sustavu makrolid-ribosom. Također je moguće procijeniti fizikalno-kemijska svojstva odgovorna za bioaktivnost makrolida.<sup>92-94</sup>

### 2.3.2. Interakcije makrolid-biološka membrana

Kosol i suradnici<sup>69</sup> istražili su vezanje makrolidnih antibiotika na biološke membrane pomoću difuzijskih eksperimenata NMR i tehnikom pojačanja signala paramagnetskom relaksacijom (engl. *Paramagnetic relaxation enhancements*, PRE). Za proučavanje interakcija koristili su micelle deuteriranog dodecilsulfokolina (engl. *dodecylphosphocholine*, DPC) i deuteriranog natrijeva dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecylsulphate*, SDS) kao mimetike biološke membrane.

Difuzijskim eksperimentima NMR moguće je pratiti vezanje liganda za makromolekulu, što se očituje u smanjenju vrijednosti difuzijskih koeficijenata ( $D$ ). Difuzijski koeficijent opisuje translacijsku difuziju molekule i ovisi o hidrodinamičkom radijusu molekule. Što je molekula veća, vrijednost  $D$  bit će manja i obrnuto.<sup>71</sup>

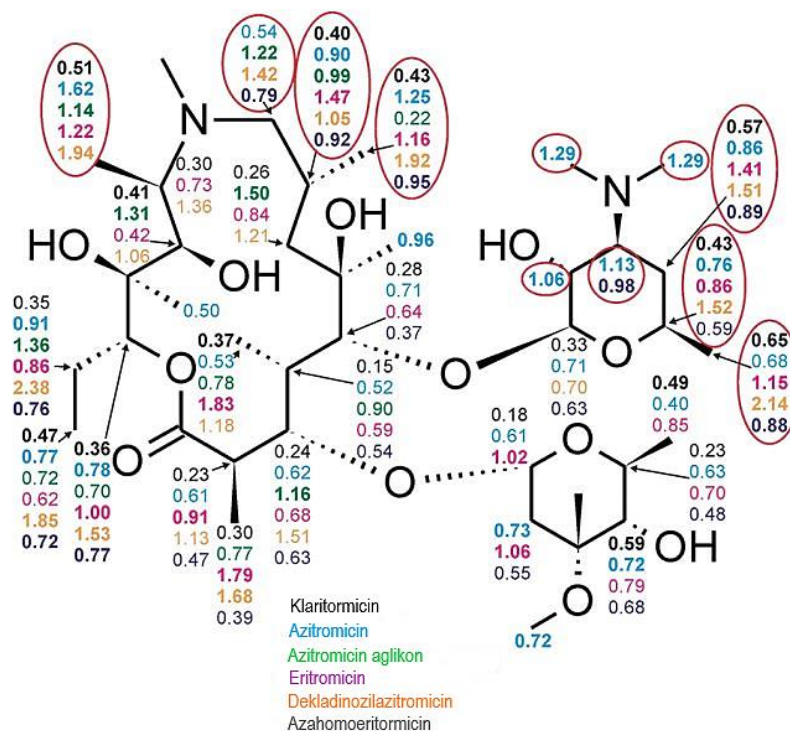
Mjerenjem difuzijskih koeficijenata slobodnih makrolida i makrolida u prisutnosti micela ustanovljeno je kako se makrolidi vežu na mimetike membrane (slika 50.). Istraženo je vezanje biološki aktivnih (azitromicin, klaritromicin, eritromicin) i neaktivnih (aglikon azitromicina, azahomoeritromicin, dekladinozilazitromicin) makrolida sličnih strukturnih karakteristika.<sup>69</sup>



**Slika 50.** Difuzijski koeficijenti slobodnih makrolida (crno) i makrolida u prisutnosti DPC (bijelo) i SDS (sivo)<sup>69</sup>

Usporedbom vrijednosti  $D$  kompleksa makrolida-DPC i kompleksa makrolida-SDS opaženo je kako se makrolid jače veže za negativno nabijeni SDS. Taj podatak ukazuje na ključnu ulogu pozitivno nabijene amino skupine desozamina za stvaranje kompleksa makrolid-micela.

Pomoću tehnike pojačanja signala paramagnetskom relaksacijom autori su odredili orijentaciju makrolida u kompleksu, to jest način vezanja makrolida za micela. Eksperiment je proveden titriranjem otopine kompleksa makrolid-DPC s inertnim paramagnetskim reagensom Gd(DTPA-BMA). Dodatkom paramagnetskog reagensa dobiva se tzv. „paramagnetsko otapalo“. Brzina relaksacije za pojedine jezgre makrolida ovisit će o udaljenosti atoma od otapala. Iz ovisnosti brzine longitudinalne relaksacije o koncentraciji paramagnetskog reagensa dobiju se vrijednosti PRE pomoću kojih se mogu odrediti lokanti makrolida koji su prostorno najbliži i najudaljeniji od micela (slika 51.).<sup>69</sup>

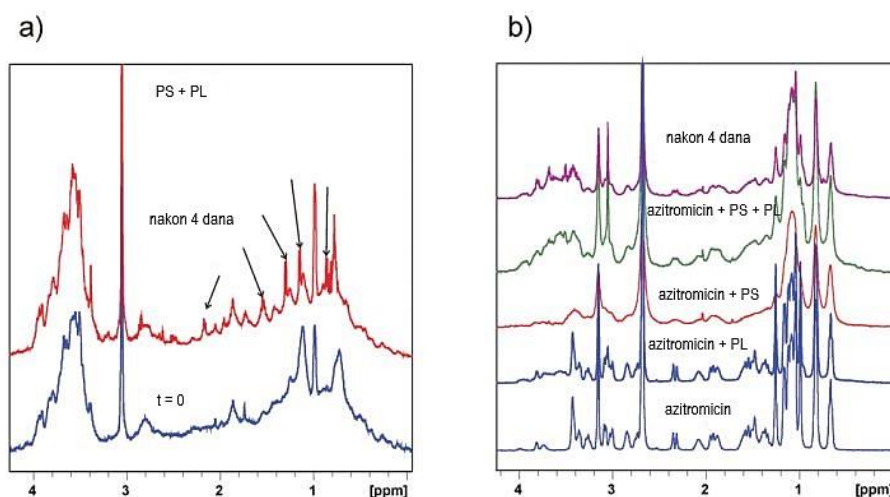


Slika 51. Vrijednosti PRE nekih makrolida<sup>69</sup>

Visoke vrijednosti PRE ukazuju na lokante koji su najbliži površini micela, dok niže vrijednosti ukazuju na lokante makrolida najudaljenije od površine micela. Dobiveni rezultati upućuju na ostvarivanje elektrostatskih interakcija amino-skupine desozamina i negativno nabijene fosfatne skupine micela. Na slici 51. crvenom su bojom označeni dijelovi makrolida za koje se pretpostavlja da ostvaruju nablizi kontakt s micelama.

Osim sklonosti i načina vezanja makrolida za membrane, Kosol i suradnici istražili su mehanizam fosfolipidoze, nuspojave koju induciraju makrolidi. Naime, unosom veće količine makrolida u organizam blokira se djelovanje fosfolipaze A1, enzima odgovornog za razgradnju lipida što dovodi do nekontroliranog nakupljanja fosfolipida u stanicama.

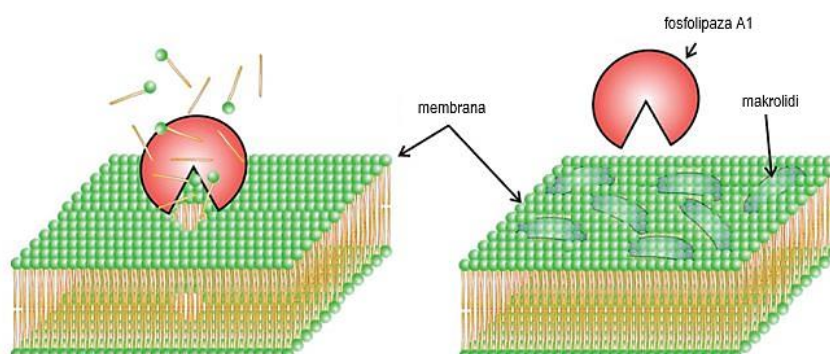
Kako bi se istražila uloga makrolida u procesu fosfolipidoze, snimljeni su i uspoređeni spektri <sup>1</sup>H NMR smjese fosfolipaze A1 i fosfatidilserina, prije i nakon dodatka azitromicina (slika 52.).



**Slika 52.** Jednodimenzijski spektri  $^1\text{H}$  NMR: a) fosfatidilserina (PS) i fosfolipaze (PL), b) azitromicina bez i u prisutnosti fosfatidilserina (PS) i fosfolipaze (PL)<sup>69</sup>

Na slici 52. a) vidljivo je kako enzim fosfolipaza A1 razgrađuje lipide tek nakon nekog vremena što se očituje u promjeni izgleda signala u spektru (uži, oštriji signali). Na slici 52. b) usporedbom spektara  $^1\text{H}$  azitromicina prije i nakon dodatka micela uočava se širenje linija u spektru što ukazuje na nastanak kompleksa azitromicin-micela, dok se dodatkom enzima u otopinu azitromicina i lipida ne uočavaju promjene u spektru. Kao što je i očekivano, iz spektara je vidljivo kako u prisutnosti azitromicina u otopini enzima i lipida ne dolazi do razgradnje lipida čak niti nakon nekog vremena.

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da fosfolipidoza nije uzrok izravne inhibicije enzima fosfolipaze A1 već makrolidi vezanjem na površinu membrana sterički sprječavaju vezanje enzima, a time i razgradnju lipida (slika 53.).<sup>69</sup>



**Slika 53.** Pretpostavljeni mehanizam zaštitne uloge makrolida na lipidne membrane, tj. uzroka fosfolipidoze<sup>69</sup>

Yuan i suradnici<sup>95</sup> proučavali su interakcije makrolida azalomicina s membranama pomoću spektroskopije <sup>31</sup>P NMR. Snimali su spektre modela membrana te su promatrali kemijske pomake fosfora prije i nakon dodatka makrolida.

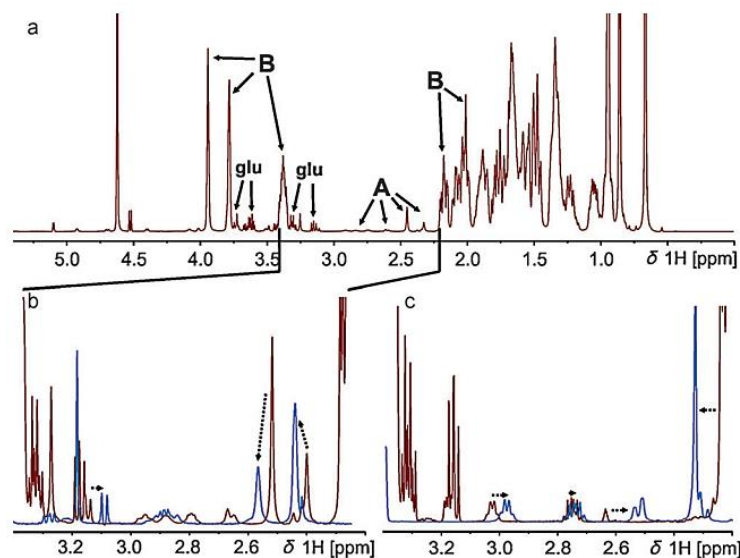
Ciesielski i suradnici<sup>96</sup> opisali su primjenu spektroskopije NMR u čvrstom stanju <sup>13</sup>C MAS (engl. *magic angle spinning*) za proučavanje interakcija makrolida amfotericina B i natamicina s modelima membrana.

### 2.3.3. Interakcije makrolid-žučna kiselina

Oko 60 – 70 % makrolidnih antibiotika izlučuje se iz organizma putem žuči.<sup>97</sup> Neka istraživanja su pokazala povezanost česte upotrebe makrolidnih antibiotika sa pojavom nekoliko bolesti žučnog sustava.<sup>98</sup> Nadalje, dokazan je utjecaj makrolida na izlučivanje drugih lijekova putem žuči.<sup>99</sup>

Kako bi se objasnio mehanizam utjecaja makrolida na žučni sustav, Glanzer i suradnici<sup>67</sup> istražili su interakcije unutar kompleksa makrolid-žučna kiselina pomoću spektroskopije NMR. U tu svrhu koristili su relaksacijske, titracijske i difuzijske eksperimente NMR.

Titracijskim eksperimentima NMR dokazano je vezanje makrolidnih antibiotika na micide žučnih kiselina. Vezanje se očituje u promjenama kemijskih pomaka i širenju signala u spektru <sup>1</sup>H NMR makrolida (slika 54.).

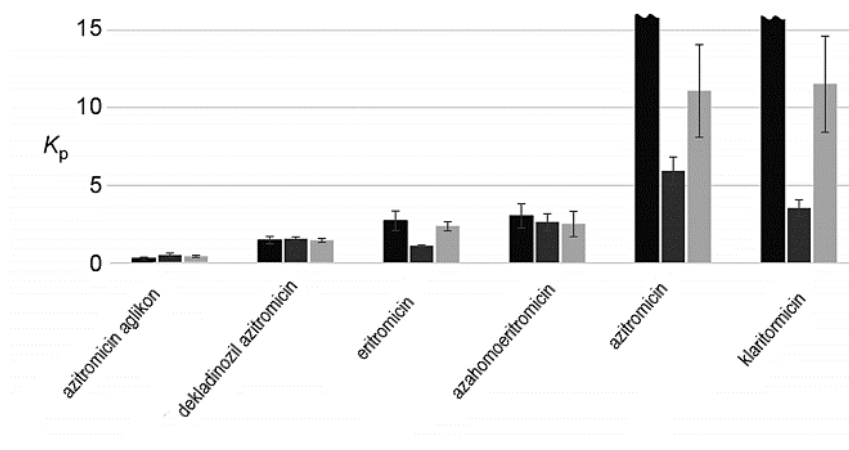


**Slika 54.** Jednodimenzijski spektar  $^1\text{H}$  NMR: a) otopine azitromicina i žučne kiseline (A – signali azitromicina, B – signali žučne kiseline, Glu – signali glukoze), b) uvećani dio spektra otopine azitromicina i žučne kiseline (crveno) i slobodnog azitromicina (plavo), c) uvećani dio spektra aglikona azitromicina u odsutnosti (plavo) i u prisutnosti žučne kiseline (crveno)<sup>67</sup>

Difuzijskim eksperimentima NMR dobivene su informacije o jakosti vezanja različitih makrolida na micelle žučnih kiselina. Usporedbom vrijednosti difuzijskih koeficijenata slobodnih makrolida i makrolida u prisutnosti micela potvrđeno je stvaranje kompleksa makrolid-žučna kiselina. Kvantitativna informacija o jakosti vezanja makrolida i micela izražena je particijskim koeficijentom ( $K_P$ ), to jest omjerom vezanih liganada ( $A_b$ ) i slobodnih liganada u otopini ( $A_f$ ). Za izračun  $K_P$ , jednadžba (1), potrebno je izmjeriti vrijednosti difuzijskih koeficijenata: slobodnih makrolida ( $D_f$ ), micela žučne kiseline ( $D_{mic}$ ) i kompleksa makrolid-micela ( $D_e$ ).

$$K_P = \frac{D_e - D_f}{D_{mic} - D_e} = \frac{A_b}{A_f} \quad (1)$$

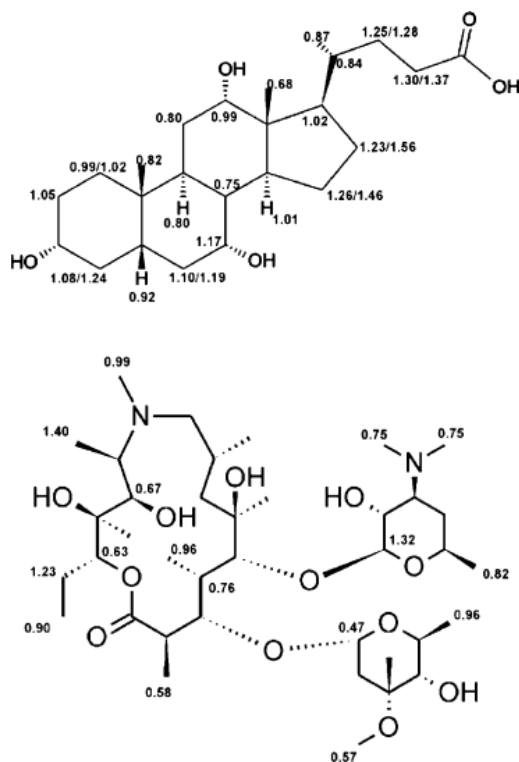
Na slici 55. prikazana je vrijednost  $K_P$  za biološki aktivne (azitromicin, klaritromicin, eritromicin) i neaktivne (aglikon azitromicina, azahomoeritromicin, dekladinofilazitromicin) makrolide. Slične vrijednosti  $K_P$  dobivene su za sve istražene žučne kiseline (natrijev kolat, natrijev deoksikolat i natrijev taurokolat).<sup>67</sup>



**Slika 55.** Particijski koeficijent ( $K_p$ ) makrolida u prisutnosti žučnih kiselina: natrijev kolat (crno), natrijev deoksikolat (tamno sivo) i natrijev taurokolat (svijetlo sivo)<sup>67</sup>

Najveća vrijednost  $K_p$  izračunata je za azitromicin i klaritromicin, najhidrofobnije proučavane makrolide.

Pomoću eksperimenata temeljenih na paramagnetskoj relaksaciji (PRE) istražen je način vezanja i pozicioniranje makrolida u kompleksu makrolid-žučna kiselina. Dobivene su slične vrijednosti PRE za sve atome makrolidnih antibiotika i žučnih kiselina što upućuje na nepostojanje preferirane orijentacije makrolida u kompleksu (slika 56).<sup>67</sup>



Slika 56. Vrijednosti PRE [  $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$  ] kolata i azitromicina<sup>67</sup>

#### 2.3.4. Interakcije makrolid-albumin

Visoka biorasploživost je bitno fizikalno-kemijsko svojstvo lijeka. Budući da biorasploživost ovisi o vezanju makrolida za plazma proteine, ona se može procijeniti istraživanjem interakcija u kompleksu makrolid-albumin. Albumini spadaju u skupinu plazma proteina koji reverzibilno intereagiraju s lijekovima i tako utječu na biorasploživost.<sup>68</sup>

Autori su proučavali interakcije makrolida s albuminom iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) pomoću tehnike STD NMR. Odredili su epitope vezanja azitromicina, oleandomicina i telitromicina. Ustanovljeno je kako azitromicin i oleandomicin imaju slične epitope. Protoni desozamina u bliskom su kontaktu s albuminom. Za telitromicin uočen je drugačiji način vezanja. Za razliku od azitromicina i oleandomicina, desozaminski protoni telitromicina nešto su udaljniji od albumina. Drugačiji način vezanja pripisuje se strukturnoj razlici makrolida.<sup>68</sup>



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Sve korištene kemikalije i otapala su analitičke čistoće.

Tijek reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela Macherey-Nagel (SIL G-25 / UV<sub>254</sub> + UV<sub>366</sub>) uz sustave otapala:

diklormetan : metanol : amonijak (25 %) = 90 : 9 : 1,5

diklormetan : metanol : amonijak (25 %) = 90 : 9 : 0,5

heksan : etil-acetat: dietil-amin = 50 : 50 : 20

Reaktanti i produkti na TLC pločicama vizualizirani su pomoću UV svjetla i prskanjem pločica s 10 % -tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu.

Prisutnost spojeva u reakcijskoj smjesi potvrđena je spektrometrijom masa, a udio spojeva u reakcijskoj smjesi određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC).

Spojevi su pročišćeni pomoću kromatografije na stupcu, *flash* kromatografije, semipreparativne i preparativne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te spregnutog sustava tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-ekstrakcija na čvrstoj fazi (HPLC-SPE). Za svaku klasu spojeva odabrani su optimalni uvjeti kromatografskog razdvajanja. Variran je sastav pokretne faze, duljina i sastav punila kolone, način eluiranja te protok pokretne faze.

Kao nepokretna faza u kromatografiji na stupcu korišten je silikagel, a kao pokretna faza diklormetan i smjesa otapala diklormetan : metanol : amonijak, 25 % = 90 : 15 : 1,5. Provedeno je gradijentno eluiranje koje je započeto s čistim diklormetanom. Zatim se postupno smanjivao volumni udio diklormetana za 10 %, a povećao se udio smjese otapala za 10 %. Sakupljane su frakcije volumena 15 mL. Eluat se analizirao tankoslojnom kromatografijom.

*Flash* kromatografija provedena je na instrumentu *Combi Flash Nextgen 300+*. Kao nepokretna faza korišten je silikagel (kolona Silica 12 g), a kao pokretna faza:

diklormetan i smjesa otapala diklormetan : metanol : amonijak, 25 % = 90 : 9 : 0,5

diklormetan i smjesa otapala diklormetan : metanol : amonijak, 25 % = 90 : 18 : 0,5

Gradijentno eluiranje započeto je sa sastavom pokretne faze od 100 % diklormetana, nakon čega se volumni udio diklormetana postupno smanjivao za 10 %, a udio smjese otapala DCM : MeOH : NH<sub>3</sub> povećavao za 10 %. Protok pokretne faze iznosio je 20 mL min<sup>-1</sup> te su sakupljane frakcije od 5 mL koje su se potom analizirale tankoslojnom kromatografijom.

Semipreparativna i preparativna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti provedena je na instrumentu *Agilent 1260 Infinity II* opremljenim s UV detektorom s nizom fotodioda (DAD). Za analizu su pripremljeni uzorci makrozona u dimetil-sulfoksidu masene koncentracije 30 mg mL<sup>-1</sup>. Kao pokretna faza korištena je smjesa otapala acetonitril i 0,1 %-tna mravlja kiselina, a kao nepokretna faza korištene su kolone C18 *Zorbax* dimenzija 250 mm × 9,6 mm i 150 mm × 21,2 mm, promjera čestica punila 5 μm. Volumen injektiranja iznosio je 600 μL. Provedeno je gradijentno eluiranje (tablica 1.) uz protok od 30 mL min<sup>-1</sup>. Valna duljina detekcije bila je u rasponu od 210 do 360 nm.

**Tablica 1.** Sastav pokretne faze za pročišćavanje makrozona semipreparativnom i preparativnom HPLC kromatografijom

<i>Mobilna faza</i>		
<i>t / min</i>	<b>acetonitril</b>	<b>mravlja kiselina (0,1 %)</b>
0,80	15	85
5,00	40	60
5,90	100	0
5,95	100	0
5,96	15	85

Pročišćavanje spojeva spregnutim sustavom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-ekstrakcija na čvrstoj fazi (HPLC-SPE) provedena je na tekućinskom kromatografu *Agilent 1260 Infinity* opremljenim s detektorom DAD i instrumentu *Prospekt 2 (Spark Holland)*. Korištena je kromatografska kolona *Waters XBridge Phenyl* dimenzija 150 mm × 4,6 mm i promjera čestica punila 3,5 μm, te pokretna faza acetonitril i amonijačni pufer (NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) vrijednosti pH 10. Za analizu pripremljeni su uzorci makrozona u acetonitrilu masene koncentracije 5 mg mL<sup>-1</sup>. Volumen injektiranja bio je 15 μL. Protok pokretne faze iznosio je 1 mL min<sup>-1</sup> uz gradijentno eluiranje (tablica 2.). Dodatni protok pufera (tzv. *make-up* protok) iznosio je 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Nakon izolacije spojeva na kolonama C18 SPE dimenzija 10 mm × 2

mm, provedeno je njihovo sušenje u struji dušika te su spojevi eluirani deuteriranim acetonitrilom u cjevčice NMR.

**Tablica 2.** Sastav pokretne faze za pročišćavanje makrozona sustavom HPLC-SPE

<i>Mobilna faza</i>		
<i>t / min</i>	<b>acetonitril</b>	<b>pufer pH 10 (NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)</b>
0	50	50
20	68	32
21	100	0
30	100	0
30,1	50	50

Čistoća spojeva također je određena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Pripravljene pročišćene spojevi okarakterizirani su spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa.

Spektri NMR u otopini snimani su na spektrometrima NMR *Bruker Neo* 600 MHz i *Bruker Avance III HD* 400 MHz opremljenima s 5 mm inverznom probom BBI sa z-gradijentnom zavojnicom i 5 mm direktnom BBO krio-probom Prodigy sa z-gradijentnom zavojnicom. Mjerenja su izvedena pri sobnoj temperaturi u cjevčicama promjera 5 mm i 3 mm. Kao otapala korišteni su deuterirani kloroform-*d*<sub>1</sub>, dimetil sulfoksid-*d*<sub>6</sub>, acetonitril-*d*<sub>3</sub>, voda-*d*<sub>2</sub> i tris-*d*<sub>11</sub> pufer ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,4) uz tetrametil silan kao unutarnji standard. Za svaki spoj optimirani su parametri bitni za uspješno izvođenje eksperimenta.

Za određivanje strukture korištene su jedno- i dvodimenzijske tehnike NMR: <sup>1</sup>H, DEPTQ (engl. *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*), COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*), HSQC (engl. *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) i HMBC (engl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Spektri <sup>1</sup>H NMR snimani su uz spektralnu širinu od 9kHz, broj pulseva od 16 do 128 i digitalno razlučivanje od 0,18 Hz do 0,36 Hz po točki. Za DEPTQ spektre korištena je spektralna širina 35 kHz, digitalno razlučivanje 0,67 Hz po točki te je broj pulseva iznosio 3072.

Eksperimenti COSY snimani su uz sljedeće uvjete: spektralna širina 5,6 kHz, broj pulseva 3-5, digitalno razlučivanje 5,46 Hz po točki u dimenziji  $f_2$ , odnosno 43,7 Hz po točki u dimenziji

$f_1$ . Za snimanje spektara COSY su primijenjene 2048 točke u dimenziji  $f_2$  te 512 inkremenata u dimenziji  $f_1$ .

Za spektre HSQC i HMBC korištena je spektralna širina od 6 kHz do 9,6 kHz u dimenziji  $f_2$  i 27,1 kHz u dimenziji  $f_1$ . Digitalno razlučivanje iznosilo je od 2,93 do 4,69 Hz po točki u dimenziji  $f_2$ , odnosno od 172,94 do 212,3 Hz po točki u dimenziji  $f_1$ . Primijenjeno je 4096 točaka u dimenziji  $f_2$  te 256 inkremenata u dimenziji  $f_1$ . Broj pulseva za spektre HSQC bio je u rasponu od 40 do 64, odnosno za spektre HMBC od 70 do 160.

Konformacija molekule spojeva u slobodnom stanju određena je pomoću tehnika NOESY i ROESY. Spektri NOESY snimani su s 50 pulseva i spektralnom širinom 6 kHz, relaksacijskim vremenom odgode 2 s i vremenom miješanja 400 ms. Korišteno je 2048 točaka u dimenziji  $f_2$ , odnosno 1024 inkremenata u  $f_1$  te digitalno razlučivanje 9,39 Hz po točki u dimenziji  $f_2$ , odnosno 18,7 Hz po točki u dimenziji  $f_1$ .

Spektri ROESY snimljeni su primjenom 80 pulseva, spektralne širine od 3,2 kHz i digitalnog razlučivanja od 3,1 Hz po točki u dimenziji  $f_2$ , odnosno 25,5 Hz po točki u dimenziji  $f_1$ . Sirovi podaci (engl. *Free Induction Decay*, FID) su sakupljeni u matricu podataka veličine 2048 x 256.

Za proučavanje vezanja novopripremljenih spojeva na ribosom izoliran iz bakterije *E. coli* primijenjena je tehnika razlike prijenosa zasićenja STD NMR, tehnika prijenosnog nuklearnog Overhauserovog efekta trNOESY i tehnika waterLOGSY. Za eksperimente STD i trNOESY pripremljeni su uzorci masene koncentracije 2-4 mg mL<sup>-1</sup> u D<sub>2</sub>O i tris-*d*<sub>11</sub> puferu. Korišten je deuterirani 70S ribosom iz bakterije *E. coli* množinske koncentracije 14,8 μmol mL<sup>-1</sup>. Prilikom izvođenja eksperimenata omjer spojeva i ribosoma iznosio je 3500:1.

Spektri waterLOGSY snimani su s 256 pulseva. Uzorci masene koncentracije 2 mg mL<sup>-1</sup> otopljeni su u 95 % protoniranog fosfatnog pufera i 5 % D<sub>2</sub>O. Za svaki uzorak snimljena su tri eksperimenta prije i nakon dodatka ribosoma *E. coli*. Omjer spojeva i ribosoma bio je 3500:1. Tijekom svakog eksperimenta varirano je vrijeme miješanja te je iznosilo 1,5 s, 0,75 s i 0,25 s.

Za snimanje spektara trNOESY korišteni su isti uvjeti kao i za spektre NOESY osim što je vrijeme miješanja podešeno na 75 ms te je povećan broj pulseva na 80. Broj točaka u dimenziji  $f_2$  iznosio je 2048, a u dimenziji  $f_1$  512. Digitalno razlučivanje u dimenziji  $f_1$  bilo je 37,5 Hz po točki.

Eksperimenti STD NMR snimani su s 256 pulseva, i spektralnom širinom od 9 kHz te 32 768 točaka u vremenskoj domeni. Vrijeme zasićenja iznosilo je 3 s. Za različite spojeve varirana

je vrijednost frekvencije zasićenja. U zasićenom spektru (tzv. *on resonance*) frekvencija zasićenja mijenjala se u rasponu od 8 do 11 ppm, a u referentnom spektru (tzv. *off resonance*) postavljena je na 50 ppm. Selektivno zasićenje ribosoma postignuto je uporabom pulsa Gauss u trajanju od 50 ms. Snimljeno je ukupno deset STD eksperimenata. Svaki je zasebno obrađen, odnosno dobiven je spektar razlike oduzimanjem zasićenog spektra od referentnog spektra. Konačan spektar STD dobiven je zbrajanjem 10 spektara razlike.

Spektri NMR u čvrstom stanju snimani su na instrumentima *Bruker Avance Neo* 300 MHz i 400 MHz opremljenih s BB MAS probom. Mjerenja su izvedena u rotorima promjera 4 mm pri sobnoj temperaturi. Snimljeni su spektari  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  CP-MAS (engl. *Cross-Polarization Magic Angle Spinning*) uz vrtnju pri magičnom kutu od 10 kHz. Za snimanje spektara  $^{13}\text{C}$  CP-MAS broj pulseva bio je u rasponu od 16 do 1024, dok su spektari  $^{15}\text{N}$  CP-MAS snimljeni s 16 384 pulsa. Vrijeme odgode iznosilo je 7 s za  $^{13}\text{C}$  CP-MAS i 3,5 s za  $^{15}\text{N}$  CP-MAS.

Spektri masa snimani su na uređajima LC-MS/MS proizvođača *Waters* i *Agilent Technologies* uz ionizaciju elektroraspršenjem. Pripravljene su otopine uzoraka u metanolu masene koncentracije  $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$  i injektirane u sustav uz eluiranje s 50 %-tnim metanolom.

Za potrebe provođenja eksperimenata UV-VIS te mjerenja fluorescencije i cirkularnog dikroizma pripravljene su *stock* otopine makrozona **4''-3b** ( $c = 4,96 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$ ), **4''-3g** ( $c = 5,38 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$ ) i **9a-3e** ( $c = 1,49 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$ ) u DMSO. Korišteni su receptori *ctDNA* (*calf thymus* DNA,  $c_0 = 2,21 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$ ), *pApU* (*poly A-poly U* RNA,  $c_0 = 2,93 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$ ), *BSA* ( $c_0 = 1 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$ ) i 70S ribosom *E. coli* ( $c_0 = 7,4\ \mu\text{mol mL}^{-1}$ ). Svi dobiveni podaci obrađeni su u programu *Origin 9*.

Eksperimenti UV-VIS provedeni su na spektrofotometru *Varian Cary 100 Bio* u kvarcnoj kivetu s optičkim putem od 1,00 cm. Najprije je snimljena slijepa proba, 1 mL kakodilatnog pufera ( $I = 0,05\ \text{mol dm}^{-3}$ , pH = 7). Razrjeđivanjem *stock* otopine s kakodilatnim puferom pripremljeni su uzorci makrozona **4''-3g** množinskih koncentracija:  $5,38 \times 10^{-6}\ \text{mol dm}^{-3}$ ,  $1,08 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$ ,  $1,61 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$  i  $2,15 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$ ; uzorci makrozona **4''-3b** množinskih koncentracija:  $4,96 \times 10^{-6}\ \text{mol dm}^{-3}$ ,  $9,92 \times 10^{-6}\ \text{mol dm}^{-3}$ ,  $1,48 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$  i  $1,98 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$  te uzorci makrozona **9a-3e** množinskih koncentracija:  $4,97 \times 10^{-6}\ \text{mol dm}^{-3}$ ,  $1,00 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$ ,  $1,50 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$  i  $2,00 \times 10^{-5}\ \text{mol dm}^{-3}$ . Zatim su snimani njihovi spektari u rasponu valnih duljina od 220 nm do 400 nm. Mjerenja su izvedena pri 25 °C i 90 °C.

Fluorescencijski spektari naprije su snimani na instrumentu *Agilent Eclipse* u kvarcnoj kivetu s optičkim putem od 1,00 cm. Nakon snimanja bazne linije, 2 mL kakodilatnog pufera ( $I = 0,05$

mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7) uslijedilo je snimanje uzoraka makrozona **4''-3g** množinskih koncentracija:  $5,38 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $1,08 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $1,61 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> i  $2,15 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Uzorci su pripremljeni dodavanjem alikvota *stock* otopine makrozona u kivetu s kakodilatnim puferom. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 340 nm do 600 nm. Valna duljina pobude prilikom snimanja emisijskog spektra odgovarala je valnoj duljini maksimalne apsorpcije te je iznosila  $\lambda_{\text{eksc}} = 325$  nm. Širina pobudne i emisijske pukotine bila je 20 nm. Mjerenja su provedena pri 25 °C i 90 °C. Preeliminarna mjerenja također su uključila titracijske eksperimente spoja **4''-3g** množinske koncentracije  $2,15 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> s DNA i BSA.

Zatim su provedeni titracijski eksperimenti pri 25 °C na osjetljivijem fluorimetru *Edinburgh Instruments* FS5. Snimljen je spektar kakodilatnog pufera (slijepe probe) te spektri spojeva **4''-3b** ( $c = 9,92 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>) i **4''-3g** ( $c = 9,95 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>). Potom je uslijedila titracija spojeva **4''-3b** i **4''-3g** s proteinom BSA, te titracija spoja **4''-3b** s RNA. Nakon svakog dodatka alikvota BSA i RNA vrijeme inkubacije iznosilo je 1 min kako bi se postigla ravnoteža u reakcijskoj smjesi. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 340 do 550 nm pri valnoj duljini pobude  $\lambda_{\text{eksc}} = 325$  nm. Širina pobudne i emisijske pukotine iznosila je 4 nm. Nakon provedenih preeliminarnih istraživanja s DNA, RNA i BSA provedeni su titracijski eksperimenti s ribosomom uz identične uvjete snimanja osim početne množinske koncentracije spojeva ( $c = 5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>).

Kompeticijski eksperimenti izvedeni su s fluorescentno obilježenim makrolidom 9a-NBD-azitromicinom. Pripravljena je njegova *stock* otopina u DMSO množinske koncentracije  $5,31 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>. Razrjeđenjem s kakodilatnim puferom pripravljen je uzorak 9a-NBD-azitromicina množinske koncentracije  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Najprije je snimljena bazna linija. Zatim je provedena titracija s ribosomom do zasićenja, tako da je početna množinska koncentracija ribosoma iznosila  $5 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>. Nakon što je došlo do znatne promjene intenziteta fluorescencije (> 10 %) u istu otopinu se dodavao makrozon i pratila se promjena fluorescencije. Početna množinska koncentracija makrozona iznosila je  $5 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 485 do 700 nm pri valnoj duljini maksimalne pobude 475 nm. Na instrumentu *Perkin Elmer* LS55 širina pobudne pukotine iznosila je 5 nm i 10 nm, a širina emisijske pukotine iznosila je 10 nm. Prilikom snimanja na osjetljivijem fluorimetru *Edinburgh Instruments* FS5 podešena je širina pobudne i emisijske pukotine na 5 nm.

Ekperimenti cirkularnog dikrozma (CD) izvedeni su na spektrometru JASCO J-815 CD u kivetu duljine optičkog puta od 1,00 cm pri 25 °C. Spektri su snimani u rasponu od 220 nm do 400 nm, brzinom snimanja 200 nm min<sup>-1</sup> te je osjetljivost podešena na 5 mdeg. Konačan CD spektar prosjek je tri snimanja. Najprije je snimljen spektar kakodilatnog pufera (slijepa proba) pa spektri spojeva **4''-3b** ( $c = 1,97 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i **4''-3g** ( $c = 1,98 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $3,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), nakon čega su uslijedili titracijski ekperimenti s DNA, RNA, BSA i ribosomom.

### 3.2. Priprava tiosemikarbazida

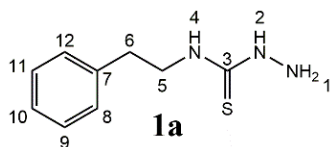
U otopinu odgovarajućeg izotiocijanata u izopropanolu (10 mL) doda se hidrazin monohidrat (1,2 ekv.). Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj miješalici 1 h pri 0 °C pri čemu dolazi do nastanka taloga. Smjesa se profiltrira preko Büchnerovog lijevka.

Svi tiosemikarbazidi pripremljeni su prema opisanom općem postupku. U tablici 3. prikazane su količine polaznih reaktanata korištenih u sintezi tiosemikarbazida.

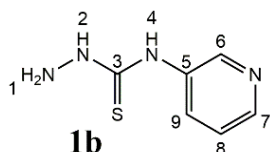
**Tablica 3.** Količine polaznih reaktanata korištenih u sintezi tiosemikarbazida

Oznaka	Izotiocijanati		Hidrazin monohidrat	
	Naziv	<i>m</i> / mg	<i>V</i> / $\mu$ L	<i>V</i> / $\mu$ L
a	2-fenilet-il-izotiocijanat	-	298	234
b	piridin-3-il-izotiocijanat	-	117,5	90,95
c	3,5-dimetilizoksazol-4-il-izotiocijanat	-	180	85
d	naftalen-1-il-izotiocijanat	189	-	90,95
e	benzil-izotiocijanat	-	135	90,95
f	metil-3- izotiocijanatotiofen-2-karboksilat	199	-	90,95
g	4-trifluormetoksifenil-izotiocijanat	-	167,37	90,95
h	3-fenilpropan-1-il-izotiocijanat	-	169	90,95
i	4-(piperidin-1-ilsulfonil)fenil-izotiocijanat	291,1	-	90,95
j	3,4-metilendioksifenil-izotiocijanat	179,2	-	90,95
k	tetrahidrofuran-2-ilmetil-izotiocijanat	-	130,48	90,95

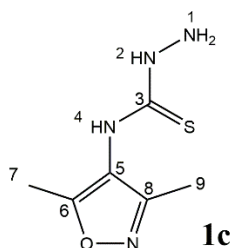


N-(2-feniletil)hidrazinkarbotioamid (**1a**) $\eta = 46,4 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO [ $\delta$  / ppm]:**

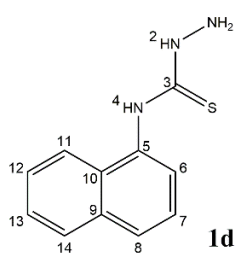
4,4 (2H, H-1), 7,8 (1H, H-2), 8,7 (1H, H-3),  
3,61 (2H, H-5), 2,81 (2H, H-6), 7,36 (2H, H-  
8,12), 7,35 (2H, H-9,11), 7,38 (1H, H-10)

N-(piridin-3-il)hidrazinkarbotioamid (**1b**) $\eta = 91,6 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

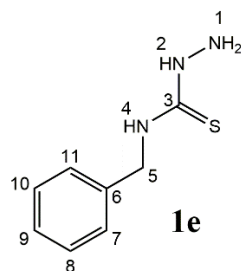
9,33 (1H, H-4), 8,71 (1H, H-6), 8,29 (1H, H-  
7), 7,33 (1H, H-8), 8,10 (1H, H-9)

N-(3,5-dimetilizoksazol-4-il)hidrazinkarbotioamid (**1c**) $\eta = 62,4 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

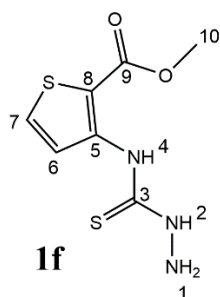
2,2 (3H, H-7), 2,1 (3H, H-9)

N-(naftalen-1-il)hidrazinkarbotioamid (**1d**) $\eta = 71,7 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

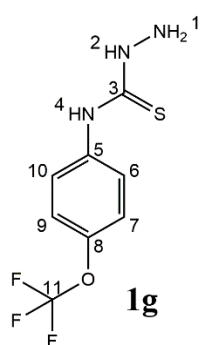
9,23 (1H, H-2), 9,34 (1H, H-4), 7,54-7,96  
(7H, H-6,7,8,11,12,13,14)

N-benzilhidrazinkarbotioamid (**1e**) $\eta = 60 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

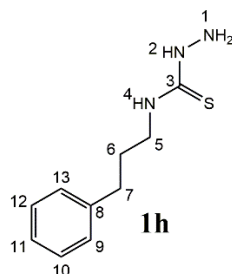
4,5 (2H, H-1), 8,74 (1H, H-2), 8,30 (1H, H-  
4), 4,73 (2H, H-5), 7,31 (2H, H-7,11), 7,3  
(2H, H-8,10), 7,24 (1H, H-9)

Metil-3-(hidrazinkarbotioamido)tiofen-2- karboksilat (**1f**) $\eta = 79,2 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

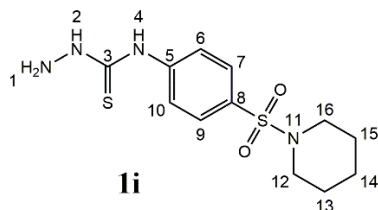
7,83 (1H, H-6), 8,95 (1H, H-7), 3,82 (1H, H-10)

N-(4-trifluorometoksifenil)hidrazinkarbotioamid (**1g**) $\eta = 45,7 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

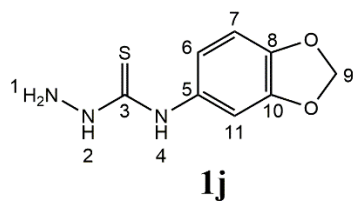
9,26 (1H, H-4), 7,78 (2H, H-6,10), 7,30 (2H, H-7,9)

N-(3-fenilpropan-1-il)hidrazinkarbotioamid (**1h**) $\eta = 65 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

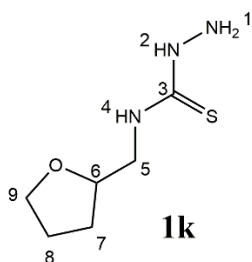
7,86 (1H, H-4), 3,48 (2H, H-5), 1,82 (2H, H-6), 2,58 (2H, H-7), 7,22 (2H, H-9,13), 7,28 (2H, H-10,12), 7,17 (1H, H-11)

N-[4-(piperidin-1-ilsulfonyl)fenil]hidrazinkarbotioamid (**1i**) $\eta = 81,1 \%$ **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**

8,10 (1H, H-2), 7,9 (1H, H-4), 7,8 (2H, H-6,10), 7,6 (2H, H-7,9), 2,9 (2H, H-12,16), 1,5 (2H, H-13,15), 1,3 (2H, H-14)

N-(3,4-metilendioksifenil)hidrazinkarbotioamid (**1j**) $\eta = 40 \%$ 

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**  
4,7 (2H, H-1), 9,1 (1H, H-4), 6,81 (1H, H-6),  
6,86 (1H, H-7), 6,01 (2H, H-9), 7,26(1H, H-  
11)

N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)hidrazinkarbotioamid (**1k**) $\eta = 69 \%$ 

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:**  
4,5 (2H, H-1), 8,70 (1H, H-2), 7,77 (1H, H-  
4), 3,43;3,63 (2H, H-5), 3,97 (1H, H-6),  
1,57;1,83 (2H, H-7), 1,83 (2H, H-8),  
3,61;3,76 (2H, H-9)

### 3.3. Priprava tiosemikarbazona

Dobiveni tiosemikarbazidi otope se u izopropanolu (10 mL) uz dodatak 4-formil-benzojeve kiseline (1 ekv.) i ledene octene kiseline (0,1 ekv.). Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi 24 h i zatim se nastali talog profiltrira preko Bücherovog lijevka.

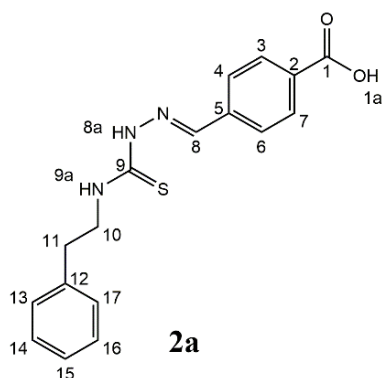
Svi tiosemikarbazoni pripremljeni su prema opisanom općem postupku. U tablici 4. prikazane su količine polaznih reaktanata korištenih u sintezi tiosemikarbazona.

**Tablica 4.** Količine polaznih reaktanata korištenih u sintezi tiosemikarbazona

<i>Tiosemikarbazidi</i>		<i>4-formil-benzojeva kiselina</i>	<i>Ledena octena kiselina</i>
<b>Oznaka</b>	<i>m / mg</i>	<i>m / mg</i>	<i>V / μL</i>
<b>1a</b>	181,37	139,32	5,1
<b>1b</b>	147,59	132,6	5
<b>1c</b>	111,44	71,8	4,1
<b>1d</b>	155,98	107,7	4,1
<b>1e</b>	100,50	82,8	3,2
<b>1f</b>	173,15	112,4	4,3
<b>1g</b>	107,96	64,51	2,5
<b>1h</b>	130,20	93,38	3,6
<b>1i</b>	247,92	118,3	4,5
<b>1j</b>	74,8	53,3	2
<b>1k</b>	114,86	58,4	3,7

4-[[2-(feniletilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2a**)

$$\eta = 82,3 \%$$

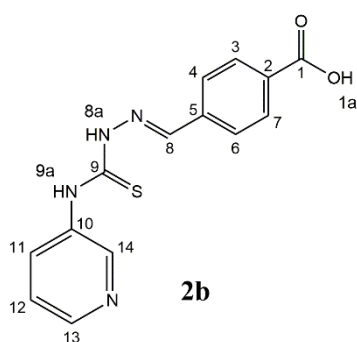


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 12,5 (1H-1a), 7,89 (2H, H-3, 7), 7,96 (2H, H-4, 6), 8,11 (1H, H-8), 11,6 (1H, H-8a), 8,7 (1H, H-9a), 3,79 (2H, H-10), 2,94 (1H, H-11), 7,32 (4H, H-13, 17, 14, 16), 7,24 (1H, H-15)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 167,5 (C-1), 132,05 (C-2), 130,3 (C-3,7), 127,2 (C-4,6), 138,86 (C-5), 141,5 (C-8), 177,6 (C-9), 45,6 (C-10), 35,7 (C-11), 139,65 (C-12), 129,04 (C-13, 17, 14, 16), 136,49 (C-15)

4-[[2-(piridin-3-ilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2b**)

$$\eta = 54 \%$$

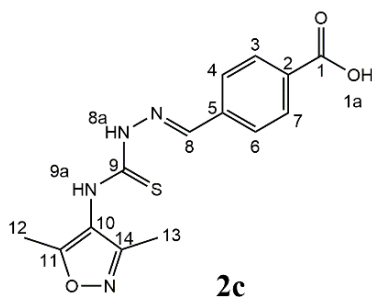


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 7,98 (2H, H-3, 7), 8,05 (2H, H-4, 6), 8,23 (1H, H-8), 12,15 (1H, H-8a), 10,34 (1H, H-9a), 7,98 (1H, H-11), 7,43 (1H, H-12), 8,42 (1H, H-13), 8,69 (1H, H-14)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 167,42 (C-1), 132,13 (C-2), 129,99 (C-3,7), 128,15 (C-4,6), 138,50 (C-5), 142,67 (C-8), 172,39 (C-9), 136,41 (C-10), 134,23 (C-11), 123,47 (C-12), 146,73 (C-13), 147,93 (C-14)

4-[[2-(3,5-dimetilizoksazol-4-ilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2c**)

$$\eta = 52 \%$$

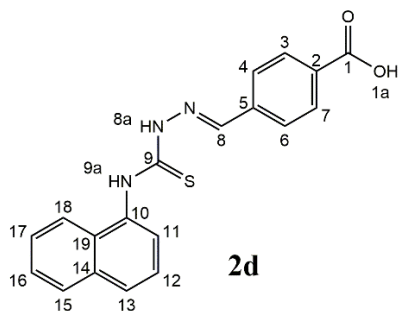


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) [ $\delta$  / ppm]:** 13,1 (1H, H-1a), 8,01 (2H, H-3, 7), 7,95 (2H, H-4, 6), 8,19 (1H, H-8), 12,15 (1H, H-8a), 9,72 (1H, H-9a), 2,27 (3H, H-12), 2,13 (3H, H-13)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO) [ $\delta$  / ppm]:** 167,42 (C-1), 132,13 (C-2), 129,99 (C-3,7), 128,15 (C-4,6), 138,50 (C-5), 142,67 (C-8), 172,39 (C-9), 116,91 (C-10), 164,5 (C-11), 11,38 (C-12), 10,27 (C-13), 159,2 (C-14)

4-[[2-(naftalen-1-ilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2d**)

$$\eta = 76,5 \%$$

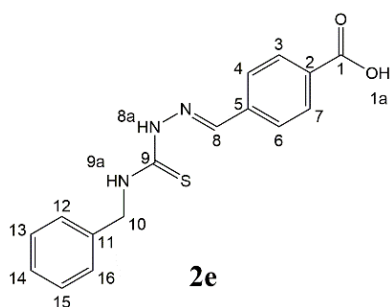


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [δ / ppm]:** 13,04 (1H, H-1a), 8,08 (2H, H-3, 7), 7,92 (2H, H-4, 6), 8,27(1H, H-8), 12,08 (1H, H-8a), 10,53 (1H, H-9a), 7,51 (1H, H-11), 7,84 (1H, H-12), 7,92 (1H, H-13), 7,52 (1H, H-15), 7,55 (2H, H-16, 17), 7,59 (1H, H-18)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [δ / ppm]:** 167,45 (C-1), 132,1 (C-2), 128,07 (C-3,7), 129,97 (C-4,6), 138,8 (C-5), 141,87 (C-8), 178,6 (C-9), 136, 1 (C-10), 127,51 (C-11), 123,92 (C-12), 127,52 (C-13), 131,07 (C-14), 127,01 (C-15), 126,56 (C-16,17), 125,93 (C-18), 136,17 (C-19)

4-[[2-(benzilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2e**)

$$\eta = 83 \%$$

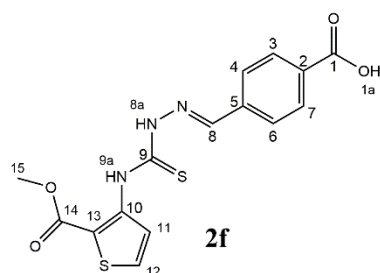


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [δ / ppm]:** 13,05 (1H, H-1a), 7,94 (2H, H-3, 7), 7,94 (2H, H-4, 6), 8,14 (1H, H-8), 11,75 (1H, H-8a), 9,21 (1H, H-9a), 4,87 (2H, H-10), 7,36 (1H, H-12,16), 7,34 (2H, H-13,15), 7,25 (1H, H-14)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [δ / ppm]:** 167,44 (C-1), 137,79 (C-2), 129,96 (C-3,7), 127,72 (C-4,6), 138,76 (C-5), 141,43 (C-8), 178,27 (C-9), 47,11 (C-10), 139,85 (C-11), 127,73 (C-12,16), 128,65 (C-13,15), 127,23 (C-14)

4-[[2-(3-(metoksikarbonil)tiofen-2-ilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2f**)

$$\eta = 79 \%$$



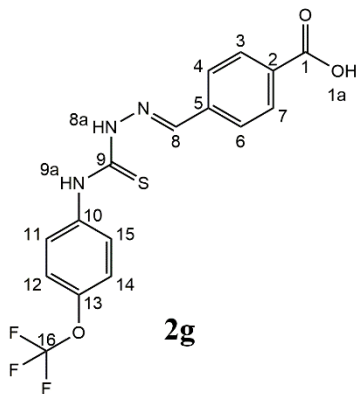
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [δ / ppm]:** 8,06 (2H, H-3, 7), 8,01 (2H, H-4, 6), 8,26 (1H, H-8), 12,46 (1H, H-8a), 12,18 (1H, H-9a), 7,93 (1H, H-11), 8,88 (1H, H-12), 3,96 (3H, H-15)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [δ / ppm]:** 167,35 (C-1), 132,43 (C-2), 130,22 (C-3,7), 128,03 (C-4,6), 138,26 (C-5),

141,89 (C-8), 174,3 (C-9), 145,41 (C-10), 132,68 (C-11),  
122,29 (C-12), 111,80 (C-13), 164,35 (C-14), 52,61 (C-15)

4-[[2-(4-trifluormetoksifenilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2g**)

$\eta = 53 \%$

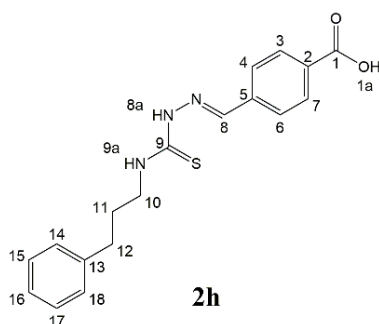


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 13,10 (1H, H-1a), 7,98 (2H, H-3, 7), 8,04 (2H, H-4, 6), 8,23 (1H, H-8), 12,09 (1H, H-8a), 10,3 (1H, H-9a), 7,70 (2H, H-11,15), 7,39 (2H, H-12,14)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 167,3 (C-1), 132,13 (C-2), 130,15 (C-3,7), 128,23 (C-4,6), 138,56 (C-5), 142,65 (C-8), 177,02 (C-9), 138,74 (C-10), 128,23 (C-11,15), 121,24 (C-12,14), 146,1 (C-13)

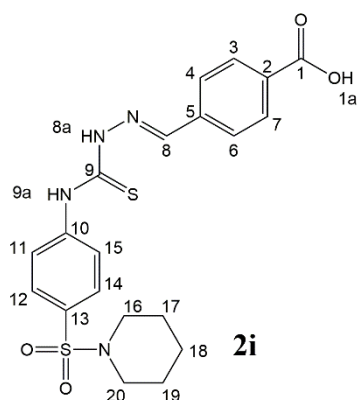
4-[[2-(3-fenilpropan-1-ilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2h**)

$\eta = 65 \%$



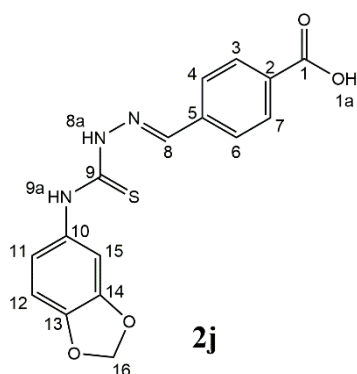
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 13,10 (1H, H-1a), 7,95 (2H, H-3, 7), 7,92 (2H, H-4, 6), 8,10 (1H, H-8), 8,68 (1H, H-9a), 3,59 (2H, H-10), 1,92 (2H, H-11), 2,64 (2H, H-12), 7,24 (2H, H-14,18), 7,27 (2H, H-15,17), 7,18 (1H, H-16),

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 167,5 (C-1), 131,85 (C-2), 130,0 (C-3,7), 127,61 (C-4,6), 138,93 (C-5), 141,30 (C-8), 177,60 (C-9), 43,94 (C-10), 30,83 (C-11), 32,98 (C-12), 142,3 (C-13), 128,83 (C-14,18), 128,78 (C-15,17), 126,28 (C-16)

4-[[2-(4-(piperidin-1-ilsulfonil)fenilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2i**) $\eta = 66,8 \%$ 

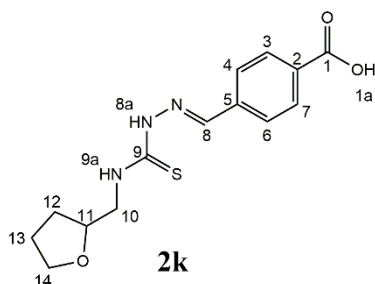
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 7,99 (2H, H-3, 7), 7,74 (2H, H-4, 6), 8,25 (1H, H-8), 12,2 (1H, H-8a), 10,43 (1H, H-9a), 7,96 (2H, H-11, 15), 8,04 (2H, H-12, 14), 2,90 (2H, H-16, 20), 1,56 (2H, H-17, 19), 1,37 (1H, H-18)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 167,39 (C-1), 132,22 (C-2), 130,01 (C-3,7), 128,05 (C-4,6), 138,39 (C-5), 140,93 (C-8), 176,3 (C-9), 143,61 (C-10), 125,69 (C-11,15), 128,22 (C-12,14), 47,14 (C-16,20), 25,18 (C-17,19), 23,41 (C-18)

4-[[3,4-metilendioksifenilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2j**) $\eta = 88,6 \%$ 

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 7,96 (2H, H-3, 7), 8,03 (2H, H-4, 6), 8,19 (1H, H-8), 11,9 (1H, H-8a), 10,11 (1H, H-9a), 6,91 (1H, H-11), 6,91 (1H, H-12), 7,14 (1H, H-15), 6,05 (1H, H-16)

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 167,43 (C-1), 131,95 (C-2), 129,97 (C-3,7), 128,05 (C-4,6), 138,68 (C-5), 141,92 (C-8), 177,12 (C-9), 133,49 (C-10), 120,04 (C-11), 107,85 (C-12), 145,43 (C-13), 147,03 (C-14), 108,55 (C-15), 101,77 (C-16)

4-[[2-((tetrahidrofuran-2-ilmetil)karbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeva kiselina (**2k**) $\eta = 88,6 \%$ 

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) [ $\delta$  / ppm]:** 13,13 (1H, H-1a), 7,97 (2H, H-3, 7), 7,91 (2H, H-4, 6), 8,13 (1H, H-8), 11,69 (1H, H-8a), 8,55 (1H, H-9a), 3,58;3,68 (2H, H-10), 4,14 (1H, H-11), 1,82; 1,86 (2H, H-12), 1,66; 1,92 (2H, H-13), 3,65; 3,81 (2H, H-14)



$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) [ $\delta$  / ppm]: 167,35 (C-1), 132,0 (C-2), 130,19 (C-3,7), 127,61 (C-4,6), 138,8 (C-5), 141,53 (C-8), 177,84 (C-9), 47,9 (C-10), 77,13 (C-11), 25,7 (C-12), 28,87 (C-13), 67,6 (C-14)

### 3.4. Priprava 4''-O-(3-aminopropil)azitromicina (P5)

Spoj 4''-O-(3-aminopropil)azitromicin (**P5**) je prekursor u sintezi prve klase makrozona. Priprava 4''-O-(3-aminopropil)azitromicina sastoji se od pet koraka (shema 1.).<sup>100</sup>

Azitromicin (3 g) se otopi u toluenu (30 mL) te se doda *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetal (5 ekv., 2,66 mL). Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj miješalici 24 h pri temperaturi od 60 °C. Zatim se doda još *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetala (3 ekv., 1,59 mL) i smjesa se nastavi miješati 5 h pri istoj temperaturi. Završetkom reakcije toluen se upari na rotacijskom uparivaču i dobije se produkt **P1** (3 g).

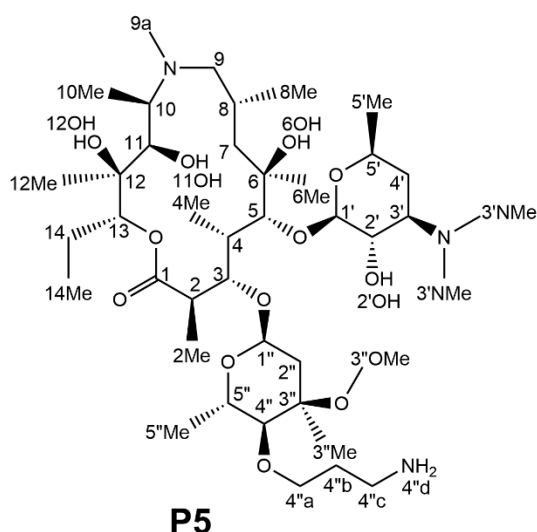
Spoj **P1** (3 g) otopi se u etil-acetatu (30 mL) te se reakcijska smjesa ohladi na 0 °C. Postepeno se dokapava acetanhidrid (1 ekv., 360  $\mu\text{L}$ ). Nakon dodatka acetanhidrida reakcijska smjesa miješa se 5 h pri sobnoj temperaturi. Potom se smjesa ispire sa zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (2  $\times$  9 mL). Organski sloj osuši se na bezvodnom  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , profiltrira te upari do suha. Sirovi produkt suspendira se u dietil eteru pri 0 °C i profiltrira. Talog se potom dodatno ispire s dietil eterom te osuši na 45 °C. Dobije se produkt **P2** (2,51 g).

U dvogrloj tikvici otopi se spoj **P2** (2,51 g) u acetonitrilu (17 mL) pod atmosferom dušika. Dokapa se kroz septum smjesa *t*BuOH i THF (1:1, 1,9 mL) te se reakcijska smjesa ohladi na -10 °C smjesom leda i soli. Postepeno se doda NaH (1,1 ekv., 130 mg, 60 %-tna disperzija u mineralnom ulju) i smjesa se nastavi miješati 2 h pri sobnoj temperaturi. Zatim se smjesa upari do suha i doda se etil acetat (16 mL). Nastala suspenzija profiltrira se preko Büchnerovog lijevka u koji je stavljen celit. Filtrat se ispire sa zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (2  $\times$  8 mL), osuši na bezvodnom  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i upari do suha. Zatim se sirovi produkt otopi u diklormetanu (3 mL). Dodatkom *n*-heksana (20 mL) dolazi do nastanka suspenzije. Nastala suspenzija se profiltrira te se filtrat upari do suha. Dobije se produkt **P3** (2,1 g).

Otopini spoja **P3** (2,1 g) u ledenoj octenoj kiselini (7 mL) doda se  $\text{PtO}_2$  (200 mg) te se provede hidrogeniranje 24 h pri tlaku od 3,5 bara. Uspješnost reakcije se provjerava prskanjem pločice s otopinom ninhidrina. Nakon hidrogeniranja doda se diklormetan (7 mL), reakcijska

smjesa se profiltrira i filtrat se upari do suha. Sirovi produkt se otopi u diklormetanu (7 mL), doda se voda (14 mL) te se provede gradijentna ekstrakcija pri tri pH vrijednosti (4,2, 6,5 i 8,15). pH vrijednosti se podešavaju dodatkom 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH. Uparavanjem organskih ekstrakata pri pH  $\approx$  8 dobije se sirovi produkt. Sirovi produkt se suspendira u dietil eteru pri 0 °C i profiltrira. Dobije se produkt **P4** (1,2 g).

Spoj **P4** (1,2 g) otopi se u metanolu (100 mL). Smjesa se miješa 24 h na magnetskoj miješalici pri temperaturi od 45 °C. Otapalo se upari pod sniženim tlakom i dobije se produkt **P5**. Dobiveni produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz sustav otapala dimetil klorid : metanol : amonijak, 25 % = 90 : 9 : 1,5 nakon čega se dobije čisti 4''-O-(3-aminopropil)azitromicin **P5** (1,05 g).



$\eta = 35 \%$

**MS (ESI+)**  $m/z$  807.0

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, kloroform-*d*) [ $\delta$ /ppm]:**

2,73 (1H, H-2), 1,17 (3H, H-2 Me), 4,23 (1H, H-3), 1,96 (1H, H-4), 1,03 (3H, H-4 Me), 3,60 (1H, H-5), 1,30 (3H, H-6 Me), 1,78; 1,27 (2H, H-7), 1,98 (1H, H-8), 0,88 (3H, H-8Me), 2,52; 2,02 (2H, H-9), 2,31 (3H, H-9a), 2,66 (1H, H-10), 1,06 (3H, H-10 Me), 3,63 (1H, H-11), 1,08 (3H, H-12 Me), 4,66 (1H, H-13), 1,89; 1,44 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 4,52 (1H, H-1'), 3,19 (1H, H-2'), 2,52 (1H, H-3'), 2,27 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,62; 1,18 (2H, H-4'), 3,75 (1H, H-5'), 1,19 (3H, H-5' Me), 5,09 (1H, H-1''), 2,34; 1,51 (2H, H-2''), 1,25 (3H, H-3'' Me), 3,31 (3H, H-3'' OMe), 2,76 (1H, H-4''), 3,68 (2H, H-4'' a), 1,75; 1,72 (2H, H-4'' b), 2,77; 2,75 (2H, H-4'' c), 4,29 (1H, H-5''), 1,28 (3H, H-5'' Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, kloroform-*d*) [ $\delta$ /ppm]:**

179,3 (C-1), 45,2 (C-2), 14,4 (C-2Me), 77,8 (C-3), 42,3 (C-4), 8,9 (C-4 Me), 83,3 (C-5), 73,4 (C-6), 27,7 (C-6 Me), 42,4 (C-7), 26,6 (C-8), 21,9 (C-8 Me), 70,1 (C-9), 36,3 (C-9a), 62,4 (C-10), 7,1 (C-10 Me), 73,4 (C-11), 73,9 (C-12), 16,2 (C-12 Me), 77,4 (C-13), 21,2 (C-14), 11,2 (C-14 Me), 102,4 (C-1'), 71,1 (C-2'), 65,1 (C-3'), 40,3 (C-3' NMe), 28,6 (C-4'), 67,8 (C-5'), 21,7 (C-5' Me), 94,8 (C-1''), 35,4 (C-2''), 73,8 (C-3''), 21,6 (C-3'' Me), 49,5 (C-3''OMe), 87,7 (C-4''), 72,6 (C-4'' a), 33,8 (C-4'' b), 39,5 (C-4'' c), 64,4 (C-5''), 18,6 (C-5'' Me).

**3.5. Priprava 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (S6)**

Spoj 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicin (**S6**) je prekursor u sintezi druge klase makrozona. Priprava navedenog spoja se sastoji od šest koraka i prikazana je na shemi 2.<sup>100</sup>

Otopina azitromicina (3 g) u etil-acetatu (30 mL) ohladi se na 0 °C. Ohlađenoj otopini postepeno se dodaje acetanhidrid (1 ekv., 392  $\mu$ L). Nakon što je sav acetanhidrid dodan smjesa se miješa 5 h na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa se zatim ispere sa zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (2  $\times$  9 mL) nakon čega se organski sloj suši na bezvodnom K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Otapalo se upari uz sniženi tlak i dobije se produkt **S1** (3,5 g).

Spoj **S1** otopi se u klorovodičnoj kiselini ( $c = 6 \text{ mol dm}^{-3}$ , 20 mL). Smjesa se miješa 4 h pri 0 °C nakon čega se ekstrahira s diklormetanom (3  $\times$  10 mL). Zatim se podesi pH vrijednost na pH  $\approx$  8-9 dodatkom 6 M NaOH te se smjesa ponovno ekstrahira s diklormetanom. Organski ekstrakti se osuše na bezvodnom K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i upare do suha čime se dobije produkt **S2** (2,95 g).

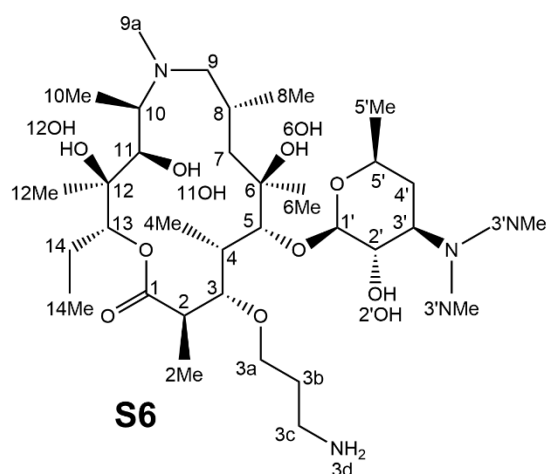
U otopinu spoja **S2** (2,95 g) u toluenu (30 mL) doda se *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetal (5 ekv., 3,10 mL). Nakon 24 h miješanja na 60 °C doda se još *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetala (3 ekv., 1, 85 mL) i smjesa se nastavi miješati 5 h pri istim uvjetima. Otapalo se upari pod sniženim tlakom i dobije se produkt **S3** (3 g).

U dvogrloj tikvici otopi se spoj **S3** (3 g) u akrilonitrilu (25 mL) pod atmosferom dušika. Potom se kroz septum dokapa smjesa tBuOH:THF (1:1, 2,8 mL) i reakcijska smjesa se ohladi na -10 °C smjesom soli i leda. U smjesu se postepeno dodaje NaH (1,1 ekv., 192 mg, 60 %-tna disperzija u mineralnom ulju). Nakon dodatka NaH smjesa se miješa 2 h pri sobnoj temperaturi. Akrilonitril se upari na rotacijskom uparivaču te se dobiveni sirovi produkt otopi u etil acetatu (18 mL). Nastala suspenzija se profiltrira preko Büchnerovog lijevka u koji je stavljen celit. Filtrat se ispere sa zasićenom otopinom NaHCO<sub>3</sub> (2  $\times$  9 mL) i osuši na bezvodnom K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Organski sloj se upari do suha. Dobivena smjesa se otopi u diklormetanu (3 mL), doda se n-heksan (20 mL) i nastala suspenzija se profiltrira. Filtrat se upari do suha čime se dobije produkt **S4** (1,78 g).

Otopini spoja **S4** (1,78 g) u ledenoj octenoj kiselini (6 mL) doda se katalizator PtO<sub>2</sub> (180 mg) te se provede hidrogeniranje 24 h pri tlaku od 3,5 bara. Uspješnost reakcije provjerava se prskanjem TLC pločice s ninhidrinom. Nakon hidrogeniranja doda se diklormetan (6 mL) i reakcijska smjesa se profiltrira te se filtrat upari do suha. Sirovi produkt se zatim otopi u diklormetanu (6 mL), doda se voda (12 mL) i smjesa se ekstrahira pri tri različite pH vrijednosti (4,2, 6,5 i 8,15). pH vrijednosti se podešavaju dodatkom 0,1 M HCl i 0,1 M NaOH. Organski ekstrakti pri pH ≈ 8 se upare do suha i zatim suspendiraju u dietil eteru pri 0 °C. Smjesa se profiltrira te se dobije produkt **S5** (853 mg).

Spoj **S5** (853 mg) otopi se u metanolu uz dodatak K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Smjesa se miješa na magnetskoj miješalici 24 h pri temperaturi od 45 °C. Otapalo se upari pod sniženim tlakom te se dobije produkt **S6**.



$$\eta = 28 \%$$

**MS (ESI+)** *m/z* 648,4

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, kloroform-*d*)** [ $\delta$ /ppm]:

2,82 (1H, H-2), 1,29 (3H, H-2 Me), 3,51 (1H, H-3), 2,11 (1H, H-4), 0,99 (3H, H-4 Me), 3,68 (1H, H-5), 1,24 (3H, H-6 Me), 1,68; 1,26 (2H, H-7), 1,90 (1H, H-8), 0,90 (3H, H-8Me), 2,48; 2,05 (2H, H-9), 2,34 (3H, H-9a), 2,73 (1H, H-10), 1,09 (3H, H-10 Me), 3,60 (1H, H-11), 1,04 (3H, H-12 Me), 4,65 (1H, H-13), 1,88; 1,53 (2H, H-14), 0,88 (3H, H-14 Me), 4,48 (1H, H-1'), 3,23 (1H, H-2'), 2,54 (1H, H-3'), 2,29 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,67; 1,25 (2H, H-4'), 3,49 (1H, H-5'),

1,21 (3H, H-5' Me), 3,73 (2H, H-3 a), 1,84; 1,74 (2H, H-3 b), 2,81 (2H, H-3 c), 7,43 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, kloroform-*d*) [ $\delta$ /ppm]:**

178,1 (C-1), 44,3 (C-2), 16,1 (C-2Me), 85,6 (C-3), 37,7 (C-4), 8,82 (C-4 Me), 84,1 (C-5), 73,3 (C-6), 26,5 (C-6 Me), 41,3 (C-7), 26,4 (C-8), 21,5 (C-8 Me), 70,6 (C-9), 36,6 (C-9a), 62,1 (C-10), 7,38 (C-10 Me), 75,7 (C-11), 74,2 (C-12), 16,1 (C-12 Me), 77,8 (C-13), 20,8 (C-14), 11,0 (C-14 Me), 101,5 (C-1'), 71,0 (C-2'), 65,5 (C-3'), 40,4 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,1 (C-4'), 69,1 (C-5'), 21,3 (C-5' Me), 72,7 (C-3 a), 34,5 (C-3 b), 39,7 (C-3 c).

### 3.6. Priprava makrozona

Pripravljene su tri klase makrozona: **klasa I** (4''-makrozoni), **klasa II** (3-makrozoni) i **klasa III** (9a makrozoni). Priprava prekursora za makrozone klase I i klase II opisana je u poglavljima 3.4 i 3.5. Prekursor za pripravu makrozona klase III pripremljen je u tvrtki Fidelta d.o.o.

Makrozoni su pripremljeni reakcijom amidacije derivata aminopropil-azitromicina i tiosemikarbazona. Otopini tiosemikarbazona u diklormetanu (5 mL) doda se HATU (1,1 ekv.) i DIPEA (3 ekv.) pri sobnoj temperaturi. Nakon 30 min miješanja na magnetskoj miješalici reakcijskoj smjesi se doda prekursor (1 ekv.) te se smjesa nastavlja miješati 24 h. Zatim se otapalo upari na rotacijskom uparivaču.

Svi makrozoni su pripremljeni prema opisanom općem postupku. U tablicama 5., 6. i 7. navedene su količine reaktanata korištenih u sintezi. Iskorištenja reakcija kreću se u rasponu od 30 do 70 %.

**Tablica 5.** Količina korištenih reaktanata u sintezi makrozona **klase I**

<i>Tiosemikarbazoni</i>		<i>HATU</i>	<i>DIPEA</i>	<i>4''-O-(3-aminopropil)azitromicin</i>
<b>Oznaka</b>	<b><i>m / mg</i></b>	<b><i>m / mg</i></b>	<b><i>V / μL</i></b>	<b><i>m / mg</i></b>
<b>2a</b>	40,61	51,88	64,8	100
<b>2b</b>	22,34	31,13	38,8	60
<b>2c</b>	-	-	-	-
<b>2d</b>	26,01	31,13	38,8	60
<b>2e</b>	23,31	31,13	38,8	60
<b>2f</b>	27,03	31,13	38,8	60
<b>2g</b>	28,58	31,13	38,8	60
<b>2h</b>	56,88	69,68	87	134,31
<b>2i</b>	33,22	31,13	38,8	60
<b>2j</b>	25,56	31,13	38,8	60
<b>2k</b>	22,87	31,13	38,8	60

**Tablica 6.** Količina korištenih reaktanata u sintezi makrozona **klase II**

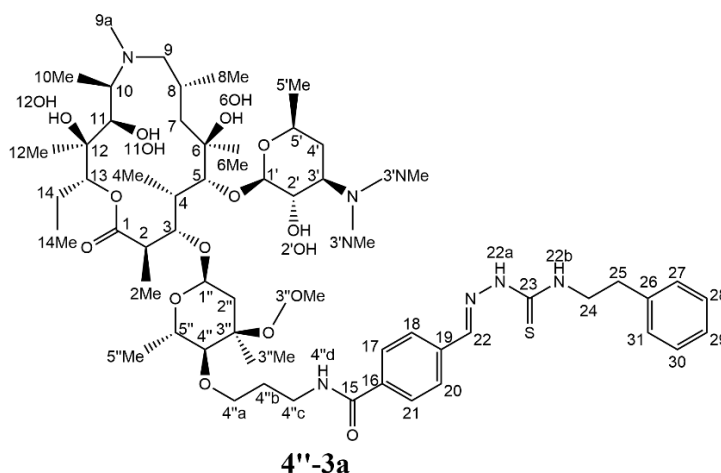
<i>Tiosemikarbazoni</i>		<i>HATU</i>	<i>DIPEA</i>	<i>3-dekladinozil-O-(3-aminopropil)azitromicin</i>
<b>Oznaka</b>	<b><i>m / mg</i></b>	<b><i>m / mg</i></b>	<b><i>V / μL</i></b>	<b><i>m / mg</i></b>
<b>2a</b>	30,34	38,56	48,4	60
<b>2b</b>	-	-	-	-
<b>2c</b>	-	-	-	-
<b>2d</b>	32,37	38,56	48,4	60
<b>2e</b>	29,03	38,56	48,4	60
<b>2f</b>	33,65	38,56	48,4	60
<b>2g</b>	16,56	18,07	22,5	28
<b>2h</b>	31,6	38,56	48,4	60
<b>2i</b>	31,01	29,04	36,29	45
<b>2j</b>	31,81	38,56	48,4	60
<b>2k</b>	36,11	49,15	61,4	76,15

**Tablica 7.** Količina korištenih reaktanata u sintezi makrozona **klase III**

<i>Tiosemikarbazoni</i>		<i>HATU</i>	<i>DIPEA</i>	<i>9a-aminopropil-azitromicin</i>
<b>Oznaka</b>	<b><i>m / mg</i></b>	<b><i>m / mg</i></b>	<b><i>V / μL</i></b>	<b><i>m / mg</i></b>
<b>2a</b>	25,2	32,2	40,3	60
<b>2b</b>	-	-	-	-
<b>2c</b>	24,54	32,2	40,3	60
<b>2d</b>	26,93	32,2	40,3	60
<b>2e</b>	24,16	32,2	40,3	60
<b>2f</b>	28	32,2	40,3	60
<b>2g</b>	29,55	32,2	40,3	60
<b>2h</b>	26,3	32,2	40,3	60
<b>2i</b>	34,4	32,2	40,3	60
<b>2j</b>	26,47	32,2	40,3	60
<b>2k</b>	23,7	32,2	40,3	60

## 3.6.1. Priprava 4''-makrozona (klasa I)

## 2-feniletil-4''-makrozon (4''-3a)



**MS (ESI+)  $m/z$**  1115,66

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,70 (1H, H-2), 1,17 (3H, H-2 Me), 4,27 (1H, H-3), 1,95 (1H, H-4), 1,04 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,34 (3H, H-6 Me), 1,72; 1,30 (2H, H-7), 2,05 (1H, H-8), 0,94 (3H, H-8Me), 2,65; 2,26 (2H, H-9), 2,48 (3H, H-9a), 2,85 (1H, H-10), 1,17 (3H, H-10 Me), 3,60 (1H, H-11), 1,09 (3H, H-12 Me), 4,72 (1H, H-13), 1,84; 1,46 (2H, H-14), 0,88 (3H, H-14 Me), 7,88 (2H, H-17,21), 7,79 (2H, H-18,20), 7,98 (1H, H-22), 3,91 (2H, H-24), 3,01 (2H, H-25), 7,37 (2H, H-27,31), 7,34 (2H, H-28,30), 7,28 (1H, H-29), 4,53 (1H, H-1'), 3,14 (1H, H-2'), 2,50 (1H, H-3'), 2,62 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,67; 1,15 (2H, H-4'), 3,77 (1H, H-5'), 1,23 (3H, H-5' Me), 4,95 (1H, H-1''), 2,36; 1,53 (2H, H-2''), 1,26 (3H, H-3'' Me), 3,38 (3H, H-3'' OMe), 2,83 (1H, H-4''), 3,71; 3,85 (2H, H-4'' a), 1,91 (2H, H-4'' b), 3,56 (2H, H-4''c), 7,76 (1H, H-4''d), 4,26 (1H, H-5''), 1,33 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

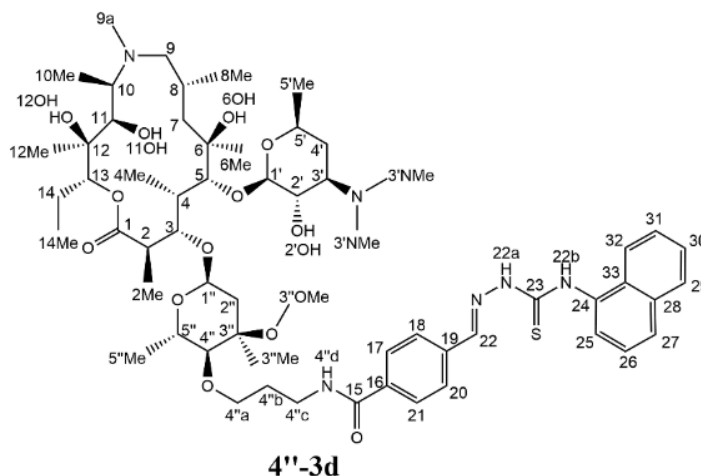
178,1 (C-1), 45,28 (C-2), 14,9 (C-2Me), 78,3 (C-3), 42,25 (C-4), 9,3 (C-4 Me), 83,5 (C-5), 73,7 (C-6), 26,68 (C-6 Me), 42,17 (C-7), 26,28 (C-8), 21,79 (C-8 Me), 69,2 (C-9), 36,52 (C-9a), 62,31 (C-10), 7,83 (C-10 Me), 74,63 (C-11), 74,0 (C-12), 16,44 (C-12 Me), 77,27 (C-13), 21,24 (C-14), 11,24 (C-14 Me), 165,9 (C-15), 135,75 (C-16), 136,72 (C-19), 127,38 (C-17, 21), 127,07 (C-18, 20), 141,07 (C-22), 177,81 (C-23), 45,1 (C-24), 34,78 (C-25), 139,32 (C-26), 128,93 (C-27,31), 126,45 (C-28,30), 126,47 (C-29), 102,49 (C-1'), 70,7 (C-2'), 65,41 (C-3'), 38,85 (C-3' NMe), 29,03 (C-4'), 68,03 (C-5'), 21,28 (C-5' Me), 95,39 (C-1''), 35,15 (C-2''),





(C-3"OMe), 87,19 (C-4"), 73,21 (C-4" a), 29,8 (C-4" b), 38,32 (C-4" c), 64,46 (C-5"), 18,04 (C-5" Me).

*Naftalen-1-il-4''-makrozon (4''-3d)*



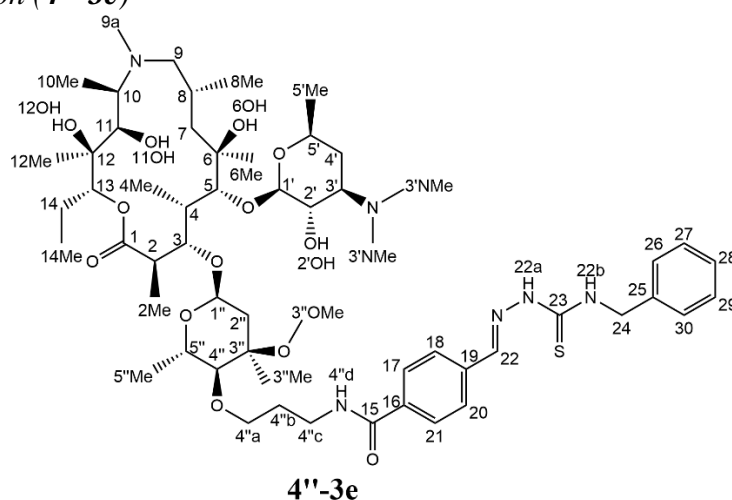
**MS (ESI+)  $m/z$  1137,78**

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,68 (1H, H-2), 1,15 (3H, H-2 Me), 4,26 (1H, H-3), 1,87 (1H, H-4), 1,01 (3H, H-4 Me), 3,55 (1H, H-5), 1,28 (3H, H-6 Me), 1,29 (2H, H-7), 2,0 (1H, H-8), 0,93 (3H, H-8Me), 2,55; 2,33 (2H, H-9), 2,38 (3H, H-9a), 2,90 (1H, H-10), 1,13 (3H, H-10 Me), 3,61 (1H, H-11), 1,10 (3H, H-12 Me), 4,80 (1H, H-13), 1,88; 1,51 (2H, H-14), 0,90 (3H, H-14 Me), 7,93 (2H, H-17,21), 7,97 (2H, H-18,20), 8,23 (1H, H-22), 7,98 (3H, H-25, 26, 27), 7,58 (4H, H-29, 30, 31, 32), 4,49 (1H, H-1'), 3,11 (1H, H-2'), 2,52 (1H, H-3'), 2,24 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,67; 1,14 (2H, H-4'), 3,68 (1H, H-5'), 1,17 (3H, H-5' Me), 4,93 (1H, H-1''), 2,38; 1,56 (2H, H-2''), 1,25 (3H, H-3'' Me), 3,28 (3H, H-3'' OMe), 2,89 (1H, H-4''), 3,86; 3,74 (2H, H-4'' a), 1,87 (2H, H-4'' b), 3,43; 3,65 (2H, H-4''c), 7,58 (1H, H-4'' d), 4,29 (1H, H-5''), 1,29 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,4 (C-1), 45,36 (C-2), 12,0 (C-2Me), 78,23 (C-3), 41,89 (C-4), 9,0 (C-4 Me), 83,26 (C-5), 73,73 (C-6), 26,82 (C-6 Me), 42,04 (C-7), 26,38 (C-8), 21,47 (C-8 Me), 68,45 (C-9), 35,73 (C-9a), 62,6 (C-10), 7,4 (C-10 Me), 73,94 (C-11), 74,5 (C-12), 16,28 (C-12 Me), 76,73 (C-13), 21,49 (C-14), 10,57 (C-14 Me), 165,5 (C-15), 135,98 (C-16), 136,7 (C-19), 127,31 (C-17, 21), 127,77 (C-18, 20), 142,18 (C-22), 123,06 (C-25, 26, 27), 126,19 (C-29, 30, 31, 32), 102,57 (C-1'), 70,73 (C-2'), 65,50 (C-3'), 39,82 (C-3' NMe), 29,14 (C-4'), 67,78 (C-5'), 21,07 (C-5' Me), 95,27 (C-1''), 34,74 (C-2''), 73,79 (C-3''), 21,02 (C-3'' Me), 49,08 (C-3''OMe), 87,19 (C-4''), 73,21 (C-4'' a), 29,8 (C-4'' b), 38,32 (C-4'' c), 64,46 (C-5''), 18,04 (C-5'' Me).

*Benzil-4''-makrozon (4''-3e)*

**MS (ESI+)  $m/z$**  1101,64

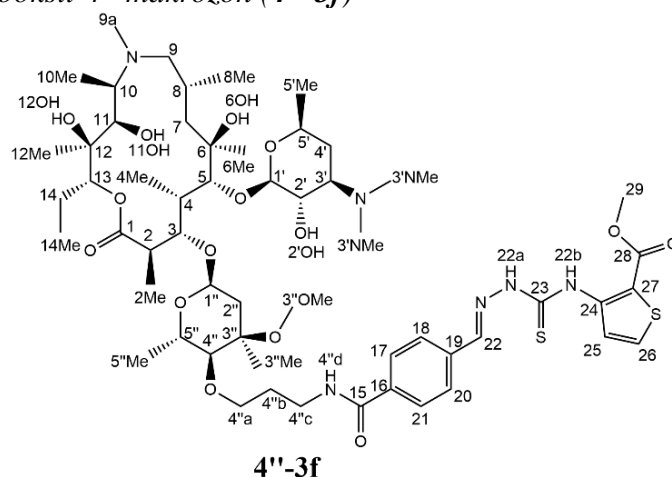
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,63 (1H, H-2), 1,09 (3H, H-2 Me), 4,18 (1H, H-3), 1,82 (1H, H-4), 0,95 (3H, H-4 Me), 3,39 (1H, H-5), 1,29 (3H, H-6 Me), 1,71; 1,19 (2H, H-7), 1,96 (1H, H-8), 0,87 (3H, H-8Me), 2,56; 2,14 (2H, H-9), 2,34 (3H, H-9a), 2,78 (1H, H-10), 1,07 (3H, H-10 Me), 3,58 (1H, H-11), 1,04 (3H, H-12 Me), 4,67 (1H, H-13), 1,81; 1,41 (2H, H-14), 0,78 (3H, H-14 Me), 8,05 (2H, H-17,21), 7,80 (2H, H-18,20), 8,41 (1H, H-22), 4,89 (2H, H-24), 7,33 (2H, H-26, 30), 7,25 (2H, H-27,29), 7,18 (1H, H-28), 4,44 (1H, H-1'), 3,17 (1H, H-2'), 2,64 (1H, H-3'), 2,71 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,61; 1,12 (2H, H-4'), 3,57 (1H, H-5'), 1,13 (3H, H-5' Me), 4,99 (1H, H-1''), 2,28; 1,44 (2H, H-2''), 1,23 (3H, H-3'' Me), 3,20 (3H, H-3'' OMe), 2,75 (1H, H-4''), 3,79; 3,65 (2H, H-4'' a), 1,81 (2H, H-4'' b), 3,33; 3,68 (2H, H-4'' c), 4,23 (1H, H-5''), 1,29 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,9 (C-1), 45,76 (C-2), 14,83 (C-2Me), 78,64 (C-3), 42,21 (C-4), 9,31 (C-4 Me), 83,41 (C-5), 73,74 (C-6), 27,26 (C-6 Me), 42,20 (C-7), 26,51 (C-8), 21,99 (C-8 Me), 69,34 (C-9), 36,66 (C-9a), 62,87 (C-10), 7,46 (C-10 Me), 73,31 (C-11), 74,56 (C-12), 16,39 (C-12 Me), 77,19 (C-13), 21,07 (C-14), 11,05 (C-14 Me), 135,6 (C-16), 136,0 (C-19), 127,22 (C-17, 21), 127,61 (C-18, 20), 147,32 (C-22), 47,85 (C-24), 127,64 (C-26, 30), 128,48 (C-27, 29), 127,31 (C-28), 102,49 (C-1'), 70,37 (C-2'), 65,22 (C-3'), 38,85 (C-3' NMe), 29,55 (C-4'), 68,03 (C-5'), 21,28 (C-5' Me), 95,15 (C-1''), 35,15 (C-2''), 73,89 (C-3''), 18,22 (C-3'' Me), 39,06 (C-3'' OMe), 87,29 (C-4''), 73,64 (C-4'' a), 29,47 (C-4'' b), 38,99 (C-4'' c), 64,55 (C-5''), 17,72 (C-5'' Me).

## Metil-3-tiofen-2-karboksil-4''-makrozon (4''-3f)



**MS (ESI+)  $m/z$  1151,89**

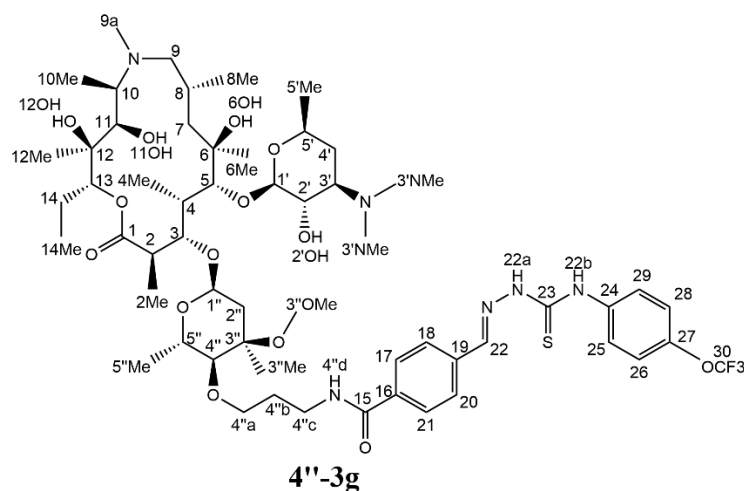
**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,70 (1H, H-2), 1,17 (3H, H-2 Me), 4,19 (1H, H-3), 1,95 (1H, H-4), 1,04 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,34 (3H, H-6 Me), 1,72; 1,30 (2H, H-7), 2,05 (1H, H-8), 0,94 (3H, H-8Me), 2,65; 2,26 (2H, H-9), 2,48 (3H, H-9a), 2,87 (1H, H-10), 1,17 (3H, H-10 Me), 3,75 (1H, H-11), 1,09 (3H, H-12 Me), 4,72 (1H, H-13), 1,84; 1,46 (2H, H-14), 0,88 (3H, H-14 Me), 7,95 (2H, H-17,21), 7,99 (2H, H-18,20), 8,06 (1H, H-22), 12,29 (1H, H-23a), 7,45 (1H, H-25), 8,97 (1H, H-26), 3,93 (3H, H-29), 4,61 (1H, H-1'), 3,42 (1H, H-2'), 3,12 (1H, H-3'), 2,62 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,84; 1,26 (2H, H-4'), 3,77 (1H, H-5'), 1,23 (3H, H-5' Me), 5,09 (1H, H-1''), 2,36; 1,53 (2H, H-2''), 1,26 (3H, H-3'' Me), 3,38 (3H, H-3'' OMe), 2,83 (1H, H-4''), 3,71; 3,85 (2H, H-4'' a), 1,91 (2H, H-4'' b), 3,53; 3,61 (2H, H-4''c), 7,76 (1H, H-4''d), 4,26 (1H, H-5''), 1,33 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,1 (C-1), 45,28 (C-2), 14,9 (C-2Me), 78,3 (C-3), 42,25 (C-4), 9,3 (C-4 Me), 83,5 (C-5), 73,7 (C-6), 26,68 (C-6 Me), 42,17 (C-7), 26,28 (C-8), 21,79 (C-8 Me), 69,2 (C-9), 36,52 (C-9a), 63,5 (C-10), 7,83 (C-10 Me), 72,4 (C-11), 74,0 (C-12), 16,44 (C-12 Me), 77,27 (C-13), 21,24 (C-14), 11,24 (C-14 Me), 166,9 (C-15), 135,7 (C-16), 136,8 (C-19), 127,71 (C-17, 21), 127,88 (C-18, 20), 141,8 (C-22), 174,2 (C-23), 145,1 (C-24), 130,4 (C-25), 122,3 (C-26), 112,3 (C-27), 164,4 (C-28), 51,83 (C-29), 102,49 (C-1'), 70,37 (C-2'), 65,22 (C-3'), 38,85 (C-3' NMe), 29,55 (C-4'), 68,03 (C-5'), 21,28 (C-5' Me), 95,15 (C-1''), 35,15 (C-2''), 73,89 (C-3''), 18,22 (C-3'' Me), 39,06 (C-3''OMe), 87,29 (C-4''), 73,64 (C-4'' a), 29,47 (C-4'' b), 38,99 (C-4'' c), 64,55 (C-5''), 17,72 (C-5'' Me).

## 4-trifluorometoksifenil-4''-makrozon (4''-3g)



**MS (ESI+)  $m/z$  1171,76**

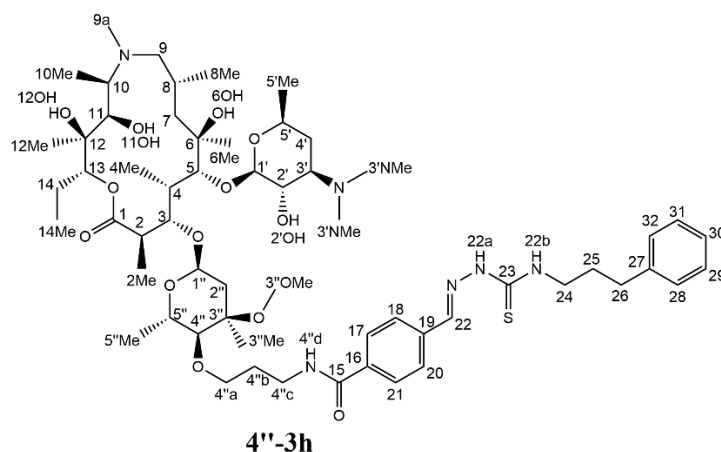
**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,74 (1H, H-2), 1,18 (3H, H-2 Me), 4,28 (1H, H-3), 1,97 (1H, H-4), 1,04 (3H, H-4 Me), 3,61 (1H, H-5), 1,30 (3H, H-6 Me), 1,67; 1,38 (2H, H-7), 1,99 (1H, H-8), 0,94 (3H, H-8Me), 2,52; 2,22 (2H, H-9), 2,33 (3H, H-9a), 2,80 (1H, H-10), 1,06 (3H, H-10 Me), 3,56 (1H, H-11), 1,06 (3H, H-12 Me), 4,75 (1H, H-13), 1,82; 1,47 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,92 (2H, H-17,21), 7,95 (2H, H-18,20), 8,12 (1H, H-22), 7,81 (2H, H-25, 29), 7,33 (2H, H-26, 28), 4,53 (1H, H-1'), 3,12 (1H, H-2'), 2,44 (1H, H-3'), 2,15 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,63; 1,11 (2H, H-4'), 3,67 (1H, H-5'), 1,19 (3H, H-5' Me), 4,93 (1H, H-1''), 2,37; 1,57 (2H, H-2''), 1,24 (3H, H-3'' Me), 3,22 (3H, H-3'' OMe), 2,89 (1H, H-4''), 3,86; 3,74 (2H, H-4'' a), 1,87 (2H, H-4'' b), 3,37; 3,68 (2H, H-4''c), 4,31 (1H, H-5''), 1,31 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,7 (C-1), 45,36 (C-2), 14,79 (C-2Me), 78,55 (C-3), 41,74 (C-4), 9,04 (C-4 Me), 83,41 (C-5), 73,48 (C-6), 27,29 (C-6 Me), 42,33 (C-7), 26,27 (C-8), 21,45 (C-8 Me), 68,84 (C-9), 35,65 (C-9a), 62,10 (C-10), 6,99 (C-10 Me), 74,4 (C-11), 74,05 (C-12), 16,21 (C-12 Me), 77,17 (C-13), 20,98 (C-14), 10,49 (C-14 Me), 165,64 (C-15), 136,04 (C-16), 136,33 (C-19), 127,45 (C-17, 21), 127,73 (C-18, 20), 142,5 (C-22), 137,61 (C-24), 127,07 (C-25, 29), 120,84 (C-26, 28), 145,97 (C-27), 102,61 (C-1'), 70,87 (C-2'), 65,44 (C-3'), 39,42 (C-3' NMe), 28,84 (C-4'), 67,97 (C-5'), 21,20 (C-5' Me), 95,51 (C-1''), 34,86 (C-2''), 73,73 (C-3''), 20,94 (C-3'' Me), 49,13 (C-3'' OMe), 87,32 (C-4''), 73,41 (C-4'' a), 29,7 (C-4'' b), 38,41 (C-4'' c), 64,35 (C-5''), 18,08 (C-5'' Me).

## 3-fenilpropan-1-il-4''-makrozon (4''-3h)



**MS (ESI+)  $m/z$  1129,68**

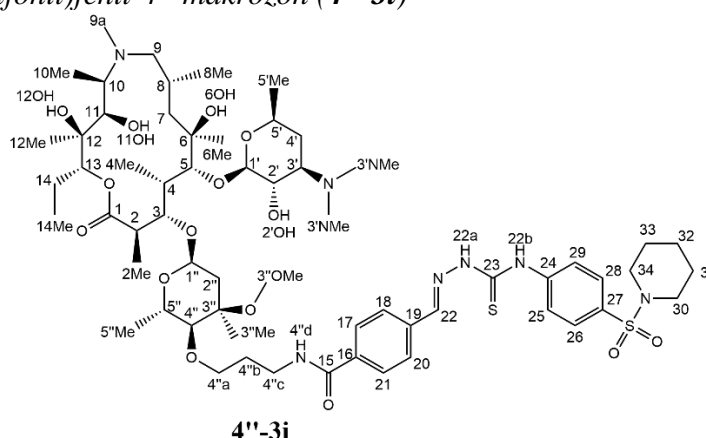
**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,81 (1H, H-2), 1,20 (3H, H-2 Me), 4,28 (1H, H-3), 2,00 (1H, H-4), 1,07 (3H, H-4 Me), 3,61 (1H, H-5), 1,30 (3H, H-6 Me), 1,43; 1,67 (2H, H-7), 2,01 (1H, H-8), 0,92 (3H, H-8Me), 2,25; 2,56 (2H, H-9), 2,38 (3H, H-9a), 3,00 (1H, H-10), 1,10 (3H, H-10 Me), 3,56 (1H, H-11), 1,10 (3H, H-12 Me), 4,78 (1H, H-13), 1,84; 1,49 (2H, H-14), 0,88 (3H, H-14 Me), 7,88 (2H, H-17,21), 7,86 (2H, H-18,20), 7,96 (1H, H-22), 3,71 (2H, 24), 2,01 (1H, H-25), 2,72 (1H, H-26), 7,28 (2H, H-28,32), 7,31 (2H, H-29,31), 7,21 (1H, H-30), 4,53 (1H, H-1'), 3,20 (1H, H-2''), 2,77 (1H, H-3'), 2,20 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,66; 1,13 (2H, H-4'), 3,75 (1H, H-5'), 1,19 (3H, H-5' Me), 4,92 (1H, H-1''), 2,37; 1,57 (2H, H-2''), 1,25 (3H, H-3'' Me), 3,25 (3H, H-3'' OMe), 2,89 (1H, H-4''), 3,85; 3,74 (2H, H-4'' a), 1,87 (2H, H-4'' b), 3,39; 3,62 (2H, H-4''c), 7,44 (1H, H-4''d), 4,31 (1H, H-5''), 1,31 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,4 (C-1), 45,08 (C-2), 14,61 (C-2Me), 78,33 (C-3), 41,68 (C-4), 8,91 (C-4 Me), 83,33 (C-5), 73,72 (C-6), 26,98 (C-6 Me), 42,2 (C-7), 26,11 (C-8), 21,44 (C-8 Me), 68,68 (C-9), 35,80 (C-9a), 63,06 (C-10), 7,0 (C-10 Me), 74,81 (C-11), 73,1 (C-12), 16,6 (C-12 Me), 76,83 (C-13), 20,93 (C-14), 10,72 (C-14 Me), 165,68 (C-15), 135,85 (C-16), 136,31 (C-19), 127,38 (C-17, 21), 127,42 (C-18, 20), 141,1 (C-22), 178,0 (C-23), 43,7 (C-24), 30,86 (C-25), 32,86 (C-26), 142,0 (C-27), 128,42 (C-28,32), 128,42 (C-29,31), 125,89 (C-30), 102,55 (C-1'), 70,73 (C-2''), 65,50 (C-3'), 39,34 (C-3' NMe), 28,88 (C-4'), 67,78 (C-5'), 21,1 (C-5' Me), 95,46 (C-1''), 35,02 (C-2''), 73,79 (C-3''), 21,01 (C-3'' Me), 49,0 (C-3'' OMe), 87,35 (C-4''), 72,96 (C-4'' a), 29,74 (C-4'' b), 38,39 (C-4'' c), 64,48 (C-5''), 18,16 (C-5'' Me).

## 4-(piperidin-1-ilsulfonil)fenil-4''-makrozon (4''-3i)



**MS (ESI+)  $m/z$  1234,83**

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,74 (1H, H-2), 1,16 (3H, H-2 Me), 4,30 (1H, H-3), 1,95 (1H, H-4), 1,06 (3H, H-4 Me), 3,62 (1H, H-5), 1,31 (3H, H-6 Me), 1,71; 1,49 (2H, H-7), 2,01 (1H, H-8), 0,95 (3H, H-8Me), 2,33; 2,52 (2H, H-9), 2,34 (3H, H-9a), 2,83 (1H, H-10), 1,07 (3H, H-10 Me), 3,59 (1H, H-11), 1,02 (3H, H-12 Me), 4,75 (1H, H-13), 1,82; 1,46 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,92 (2H, H-17,21), 7,75 (2H, H-18,20), 8,14 (1H, H-22), 7,93 (2H, H-25,29), 8,12 (2H, H-26,28), 3,0 (2H, H-30,34), 1,63 (2H, H-31,33), 1,44 (1H, H-32), 4,55 (1H, H-1'), 3,13 (1H, H-2'), 2,46 (1H, H-3'), 2,14 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,64; 1,13 (2H, H-4'), 3,67 (1H, H-5'), 1,24 (3H, H-5' Me), 4,93 (1H, H-1''), 2,34; 1,57 (2H, H-2''), 1,2 (3H, H-3'' Me), 3,19 (3H, H-3'' OMe), 2,9 (1H, H-4''), 3,89; 3,76 (2H, H-4'' a), 1,88 (2H, H-4'' b), 3,36; 3,71 (2H, H-4''c), 7,67 (1H, H-4''d), 4,32 (1H, H-5''), 1,31 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,32 (C-1), 45,35 (C-2), 14,85 (C-2Me), 78,75 (C-3), 41,82 (C-4), 9,09 (C-4 Me), 83,54 (C-5), 73,81 (C-6), 27,22 (C-6 Me), 42,67 (C-7), 26,3 (C-8), 21,53 (C-8 Me), 68,63 (C-9), 35,76 (C-9a), 62,06 (C-10), 7,05 (C-10 Me), 73,66 (C-11), 74,49 (C-12), 16,17 (C-12 Me), 77,01 (C-13), 20,99 (C-14), 10,54 (C-14 Me), 165,75 (C-15), 136,3 (C-16), 136,03 (C-19), 127,59 (C-17, 21), 127,91 (C-18, 20), 142,95 (C-22), 142,7 (C-24), 127,53 (C-25,29), 123,92 (C-26,28), 132,03 (C-27), 47,01 (C-30,34), 25,06 (C-31,33), 23,23 (C-32), 102,81 (C-1'), 70,83 (C-2'), 65,34 (C-3'), 39,53 (C-3' NMe), 28,96 (C-4'), 68,08 (C-5'), 21,02 (C-5' Me), 95,66 (C-1''), 35,02 (C-2''), 74,3 (C-3''), 21,12 (C-3'' Me), 49,05 (C-3''OMe), 87,15 (C-4''), 73,5 (C-4'' a), 29,62 (C-4'' b), 38,79 (C-4'' c), 64,41 (C-5''), 17,96 (C-5'' Me).

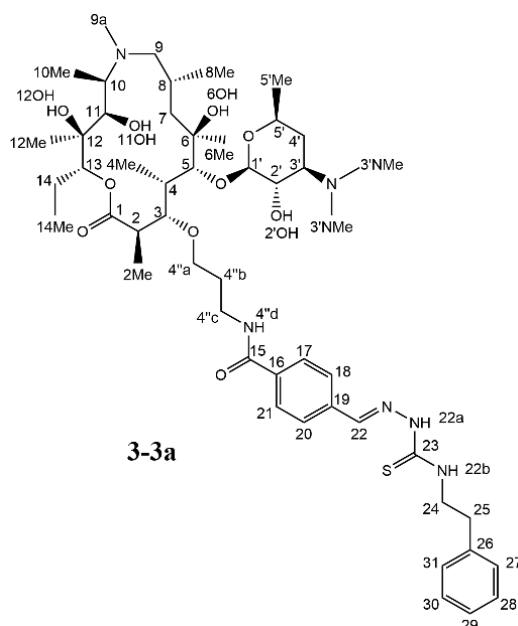






## 3.6.2. Priprava 3-makrozona (klasa II)

## 2-feniletil-3-makrozon (3-3a)



MS (ESI+)  $m/z$  957,57

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:

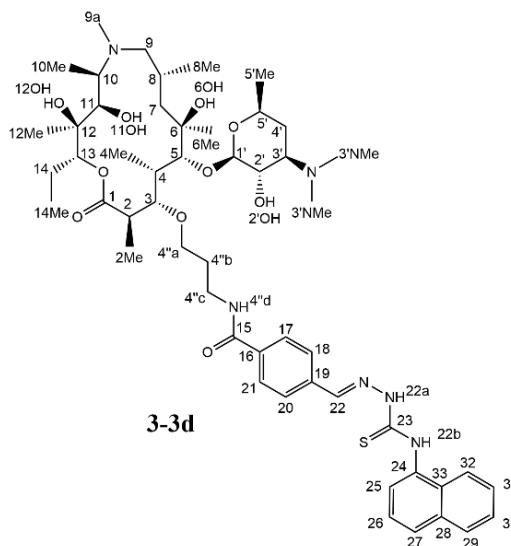
2,83 (1H, H-2), 1,30 (3H, H-2 Me), 3,46 (1H, H-3), 2,10 (1H, H-4), 0,94 (3H, H-4 Me), 3,64 (1H, H-5), 1,23 (3H, H-6 Me), 1,57; 1,38 (2H, H-7), 1,94 (1H, H-8), 0,91 (3H, H-8Me), 2,50; 2,17 (2H, H-9), 2,43 (3H, H-9a), 2,85 (1H, H-10), 1,08 (3H, H-10 Me), 3,56 (1H, H-11), 1,05 (3H, H-12 Me), 4,79 (1H, H-13), 1,85; 1,52 (2H, H-14), 0,89 (3H, H-14 Me), 7,85 (2H, H-17,21), 7,77 (2H, H-18,20), 7,96 (1H, H-22), 3,91 (2H, H-24), 3,01 (2H, H-25), 7,37 (2H, H-27,31), 7,34 (2H, H-28,30), 7,28 (1H, H-29), 4,48 (1H, H-1'), 3,17 (1H, H-2'), 2,76 (1H, H-3'), 2,39 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,78; 1,26 (2H, H-4'), 3,57 (1H, H-5'), 1,18 (3H, H-5' Me), 3,80 (2H, H-3 a), 1,98 (2H, H-3 b), 3,48 (2H, H-3 c), 7,43 (2H, H-3 d).

$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:

178,2 (C-1), 44,3 (C-2), 15,73 (C-2Me), 85,8(C-3), 37,44 (C-4), 8,2 (C-4 Me), 84,4 (C-5), 73,3 (C-6), 25,67 (C-6 Me), 40,91 (C-7), 25,86 (C-8), 21,52 (C-8 Me), 69,5(C-9), 36,18 (C-9a), 62,4 (C-10), 7,43 (C-10 Me), 75,6 (C-11), 74,2 (C-12), 16,5 (C-12 Me), 77,5 (C-13), 20,84 (C-14), 10,32 (C-14 Me), 165,9 (C-15), 135,75 (C-16), 136,72 (C-19), 127,38 (C-17, 21), 127,07 (C-18, 20), 141,07 (C-22), 177,81 (C-23), 45,1 (C-24), 34,78 (C-25), 139,32 (C-26), 128,93 (C-

27,31), 126,45 (C-28,30), 126,47 (C-29), 101,7 (C-1'), 70,3 (C-2'), 65,2 (C-3'), 39,46 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 28,95 (C-4'), 68,7 (C-5'), 20,46 (C-5' Me), 72,8 (C-3 a), 30,08 (C-3 b), 37,47 (C-3 c).

### Naftalen-1-il-3-makrozon (3-3d)



**MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*** 979,56

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

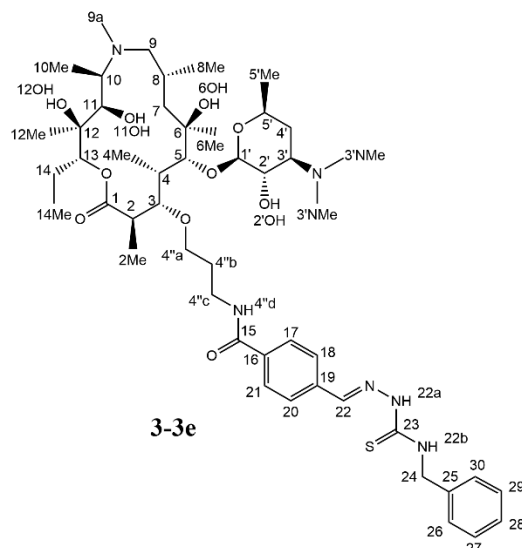
2,81 (1H, H-2), 1,28 (3H, H-2 Me), 3,41 (1H, H-3), 2,15 (1H, H-4), 0,97 (3H, H-4 Me), 3,64 (1H, H-5), 1,18 (3H, H-6 Me), 1,51; 1,32 (2H, H-7), 1,9 (1H, H-8), 0,9 (3H, H-8Me), 2,42; 2,14 (2H, H-9), 2,3 (3H, H-9a), 2,81 (1H, H-10), 1,05 (3H, H-10 Me), 3,55 (1H, H-11), 1,02 (3H, H-12 Me), 4,76 (1H, H-13), 1,83; 1,51 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,86 (2H, H-17,21), 7,94 (2H, H-18,20), 8,15 (1H, H-22), 7,98 (3H, H-25, 26, 27), 7,58 (4H, H-29, 30, 31, 32), 4,48 (1H, H-1'), 3,07 (1H, H-2'), 2,53 (1H, H-3'), 2,24 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,65; 1,15 (2H, H-4'), 3,49 (1H, H-5'), 1,13 (3H, H-5' Me), 3,81 (2H, H-3 a), 1,96 (2H, H-3 b), 3,47 (2H, H-3 c), 7,43 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

178,2 (C-1), 44,1 (C-2), 15,5 (C-2Me), 86,02 (C-3), 37,40 (C-4), 8,5 (C-4 Me), 84,03 (C-5), 73,3 (C-6), 26,1 (C-6 Me), 41,29 (C-7), 26,4 (C-8), 20,7 (C-8 Me), 69,54(C-9), 35,7 (C-9a), 61,57 (C-10), 6,4 (C-10 Me), 76,53 (C-11), 74,2 (C-12), 16,1 (C-12 Me), 77,5 (C-13), 20,8 (C-14), 9,9 (C-14 Me), 166,0 (C-15), 136,13 (C-16), 136,6 (C-19), 127,34 (C-17, 21), 127,34 (C-18, 20), 142,13 (C-22), 122,88 (C-25, 26, 27), 126,30 (C-29, 30, 31, 32), 101,7 (C-1'), 70,72

(C-2'), 65,29 (C-3'), 39,84 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 28,6 (C-4'), 68,91 (C-5'), 20,7 (C-5' Me), 72,98 (C-3 a), 30,24 (C-3 b), 37,58 (C-3 c).

### Benzil-3-makrozon (3-3e)



**MS (ESI+)**  $m/z$  943,56

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

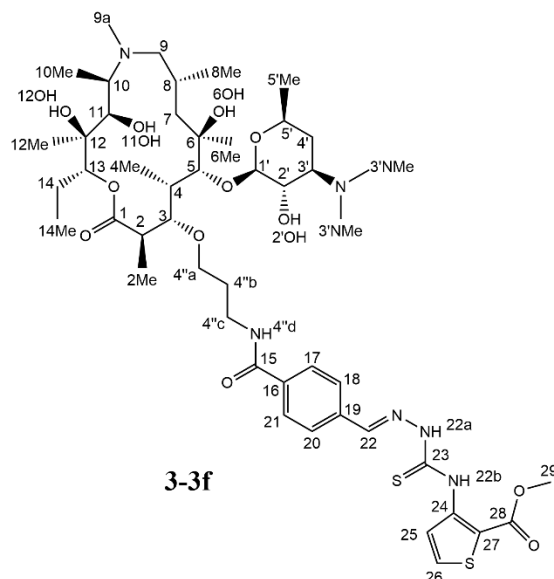
2,83 (1H, H-2), 1,30 (3H, H-2 Me), 3,46 (1H, H-3), 2,10 (1H, H-4), 0,94 (3H, H-4 Me), 3,64 (1H, H-5), 1,23 (3H, H-6 Me), 1,57; 1,38 (2H, H-7), 1,94 (1H, H-8), 0,91 (3H, H-8Me), 2,50; 2,17 (2H, H-9), 2,30 (3H, H-9a), 2,80 (1H, H-10), 1,05 (3H, H-10 Me), 3,56 (1H, H-11), 1,05 (3H, H-12 Me), 4,79 (1H, H-13), 1,85; 1,52 (2H, H-14), 0,89 (3H, H-14 Me), 7,85 (2H, H-17,21), 7,77 (2H, H-18,20), 7,96 (1H, H-22), 4,93 (2H, H-24), 3,01 (2H, H-25), 7,37 (2H, H-27,31), 7,34 (2H, H-28,30), 7,28 (1H, H-29), 4,48 (1H, H-1'), 3,17 (1H, H-2'), 2,51 (1H, H-3'), 2,24 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,66; 1,14 (2H, H-4'), 3,57 (1H, H-5'), 1,18 (3H, H-5' Me), 3,80 (2H, H-3 a), 1,98 (2H, H-3 b), 3,48 (2H, H-3 c), 7,43 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

178,2 (C-1), 44,3 (C-2), 15,73 (C-2Me), 85,8(C-3), 37,44 (C-4), 8,2 (C-4 Me), 84,4 (C-5), 73,3 (C-6), 25,67 (C-6 Me), 40,91 (C-7), 25,86 (C-8), 21,52 (C-8 Me), 69,5(C-9), 39,70 (C-9a), 61,2 (C-10), 6,38 (C-10 Me), 75,6 (C-11), 74,2 (C-12), 16,5 (C-12 Me), 77,5 (C-13), 20,84 (C-14), 10,32 (C-14 Me), 165,9 (C-15), 135,75 (C-16), 136,72 (C-19), 127,38 (C-17, 21), 127,07 (C-18, 20), 141,07 (C-22), 177,81 (C-23), 46,93 (C-24), 34,78 (C-25), 139,32 (C-26), 128,93 (C-

27,31), 126,45 (C-28,30), 126,47 (C-29), 101,7 (C-1'), 70,3 (C-2'), 65,5 (C-3'), 39,46 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 28,77 (C-4'), 68,7 (C-5'), 20,46 (C-5' Me), 72,8 (C-3 a), 30,08 (C-3 b), 37,47 (C-3 c).

### Metil-3-tiofen-2-karboksil-3-makrozon (3-3f)



**MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  993,5**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

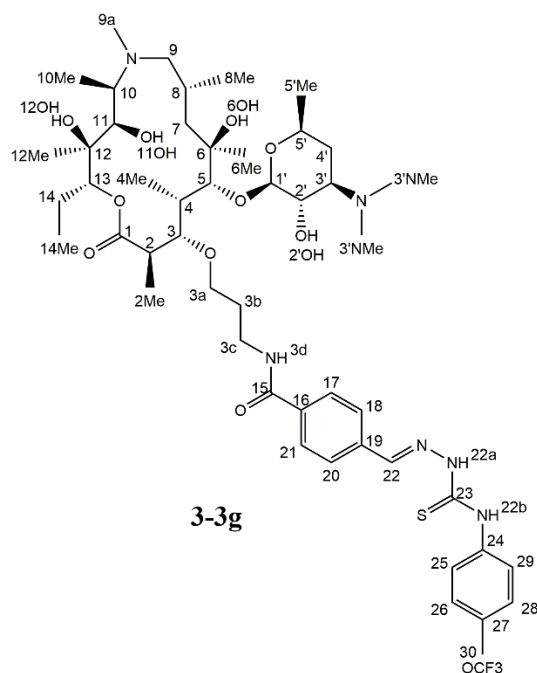
2,77 (1H, H-2), 1,25 (3H, H-2 Me), 3,41 (1H, H-3), 2,13 (1H, H-4), 0,98 (3H, H-4 Me), 3,63 (1H, H-5), 1,18 (3H, H-6 Me), 1,53; 1,34 (2H, H-7), 1,84 (1H, H-8), 0,90 (3H, H-8Me), 2,42; 2,16 (2H, H-9), 2,31 (3H, H-9a), 2,80 (1H, H-10), 1,05 (3H, H-10 Me), 3,56 (1H, H-11), 0,99 (3H, H-12 Me), 4,79 (1H, H-13), 1,82; 1,47 (2H, H-14), 0,86 (3H, H-14 Me), 7,90 (2H, H-17,21), 8,05 (2H, H-18,20), 8,11 (1H, H-22), 12,29 (1H, H-23a), 8,98 (1H, H-25), 7,70 (1H, H-26), 3,93 (3H, H-29), 4,44 (1H, H-1'), 3,08 (1H, H-2'), 2,47 (1H, H-3'), 2,25 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,63; 1,14 (2H, H-4'), 3,47 (1H, H-5'), 1,14 (3H, H-5' Me), 3,81 (2H, H-3 a), 1,98 (2H, H-3 b), 3,50 (2H, H-3 c), 7,24 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

177,3 (C-1), 44,46 (C-2), 15,54 (C-2Me), 86,1 (C-3), 37,38 (C-4), 8,6 (C-4 Me), 84,2 (C-5), 73,22 (C-6), 26,06 (C-6 Me), 40,98 (C-7), 26,19 (C-8), 20,8 (C-8 Me), 69,33 (C-9), 35,75 (C-9a), 61,79 (C-10), 6,23 (C-10 Me), 76,1 (C-11), 74,4 (C-12), 16,31 (C-12 Me), 77,3 (C-13), 20,78 (C-14), 10,27 (C-14 Me), 166,9 (C-15), 136,3 (C-16), 136,6 (C-19), 127,67 (C-17, 21), 127,67 (C-18, 20), 142,26 (C-22), 174,2 (C-23), 145,1 (C-24), 122,1 (C-25), 131,3 (C-26),

112,3 (C-27), 164,4 (C-28), 51,83 (C-29), 101,39 (C-1'), 70,06 (C-2'), 64,87 (C-3'), 39,68 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,48 (C-4'), 68,85 (C-5'), 20,71 (C-5' Me), 73, 2 (C-3 a), 30,19 (C-3 b), 37,6 (C-3 c).

*4-trifluorometoksifenil-3-makrozon (3-3g)*



**MS (ESI+)**  $m/z$  1015,6

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>)** [ $\delta$ /ppm]:

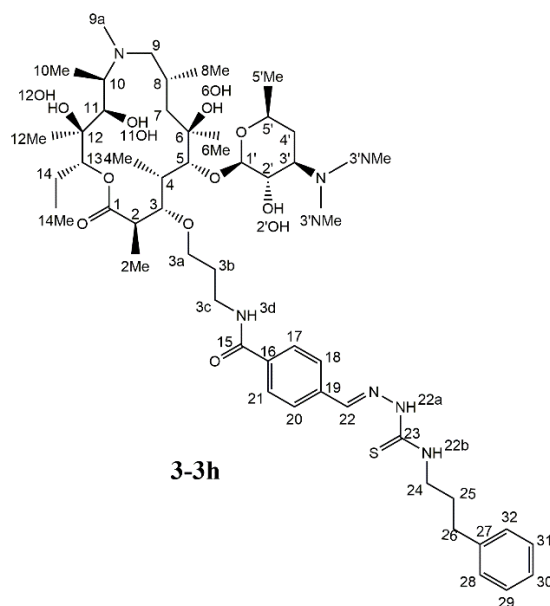
2,77 (1H, H-2), 1,24 (3H, H-2 Me), 3,39 (1H, H-3), 2,07 (1H, H-4), 0,92 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,16 (3H, H-6 Me), 1,53; 1,29 (2H, H-7), 1,84 (1H, H-8), 0,85 (3H, H-8Me), 2,40; 2,12 (2H, H-9), 2,26 (3H, H-9a), 2,76 (1H, H-10), 1,01 (3H, H-10 Me), 3,51 (1H, H-11), 0,99 (3H, H-12 Me), 4,79 (1H, H-13), 1,82; 1,46 (2H, H-14), 0,81 (3H, H-14 Me), 7,90 (2H, H-17,21), 7,83 (2H, H-18,20), 8,08 (1H, H-22), 7,69 (2H, H-25, 29), 7,30 (2H, H-26, 28), 4,42 (1H, H-1'), 3,09 (1H, H-2'), 2,52 (1H, H-3'), 2,22 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,62; 1,12 (2H, H-4'), 3,46 (1H, H-5'), 1,18 (3H, H-5' Me), 3,76 (2H, H-3 a), 1,94 (2H, H-3 b), 3,44 (2H, H-3 c), 7,57 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>)** [ $\delta$ /ppm]:

177,3 (C-1), 44,46 (C-2), 15,54 (C-2Me), 85,93 (C-3), 37,38 (C-4), 8,58 (C-4 Me), 84,28 (C-5), 73,22 (C-6), 26,04 (C-6 Me), 40,98 (C-7), 26,19 (C-8), 20,73 (C-8 Me), 69,33 (C-9), 35,75 (C-9a), 61,82 (C-10), 6,19 (C-10 Me), 75,73 (C-11), 74,4 (C-12), 16,31 (C-12 Me), 77,46 (C-

13), 20,78 (C-14), 10,09 (C-14 Me), 166,9 (C-15), 136,0 (C-16), 136,58 (C-19), 127,58 (C-17, 21), 127,58 (C-18, 20), 142,71 (C-22), 137,82 (C-24), 127,26 (C-25, 29), 121,04 (C-26, 28), 146,54 (C-27), 121,09 (C-30), 101,39 (C-1'), 71,01 (C-2'), 64,87 (C-3'), 39,68 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,48 (C-4'), 68,85 (C-5'), 20,47 (C-5' Me), 72,72 (C-3 a), 30,06 (C-3 b), 37,39 (C-3 c).

### 3-fenilpropan-1-il-3-makrozon (3-3h)



**MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*** 971,6

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

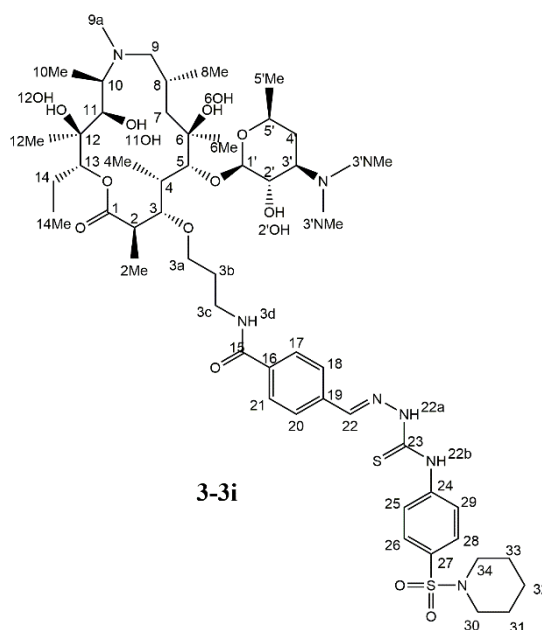
2,77 (1H, H-2), 1,25 (3H, H-2 Me), 3,38 (1H, H-3), 2,11 (1H, H-4), 0,94 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,15 (3H, H-6 Me), 1,50; 1,30 (2H, H-7), 1,84 (1H, H-8), 0,87 (3H, H-8Me), 2,40; 2,12 (2H, H-9), 2,27 (3H, H-9a), 2,77 (1H, H-10), 1,02 (3H, H-10 Me), 3,53 (1H, H-11), 0,99 (3H, H-12 Me), 4,74 (1H, H-13), 1,82; 1,47 (2H, H-14), 0,83 (3H, H-14 Me), 7,88 (2H, H-17,21), 7,86 (2H, H-18,20), 7,96 (1H, H-22), 3,67 (2H, 24), 1,98 (1H, H-25), 2,67 (1H, H-26), 7,28 (2H, H-28,32), 7,31 (2H, H-29,31), 7,21 (1H, H-30), 4,56 (1H, H-1'), 3,05 (1H, H-2'), 2,47 (1H, H-3'), 2,22 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,63; 1,11 (2H, H-4'), 3,47 (1H, H-5'), 1,10 (3H, H-5' Me), 3,77 (2H, H-3 a), 1,94 (2H, H-3 b), 3,44 (2H, H-3 c), 7,24 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

177,3 (C-1), 44,46 (C-2), 15,54 (C-2Me), 85,93 (C-3), 37,38 (C-4), 8,58 (C-4 Me), 84,28 (C-5), 73,22 (C-6), 26,04 (C-6 Me), 40,98 (C-7), 26,19 (C-8), 20,73 (C-8 Me), 69,33 (C-9), 35,75 (C-9a), 61,82 (C-10), 6,19 (C-10 Me), 75,73 (C-11), 74,4 (C-12), 16,31 (C-12 Me), 77,46 (C-

13), 20,78 (C-14), 10,09 (C-14 Me), 166,3 (C-15), 136,35 (C-16), 136,81 (C-19), 127,34 (C-17, 21), 127,34 (C-18, 20), 141,3 (C-22), 178,0 (C-23), 43,76 (C-24), 30,51 (C-25), 32,75 (C-26), 142,16 (C-27), 128,41 (C-28,32), 128,41 (C-29,31), 125,82 (C-30), 101,0 (C-1'), 71,01 (C-2'), 64,87 (C-3'), 39,68 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,48 (C-4'), 68,85 (C-5'), 20,47 (C-5' Me), 72,72 (C-3 a), 30,06 (C-3 b), 37,39 (C-3 c).

#### 4-(piperidin-1-ilsulfonyl)fenil-3-makrozon (3-3i)



**MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*** 1076,5

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

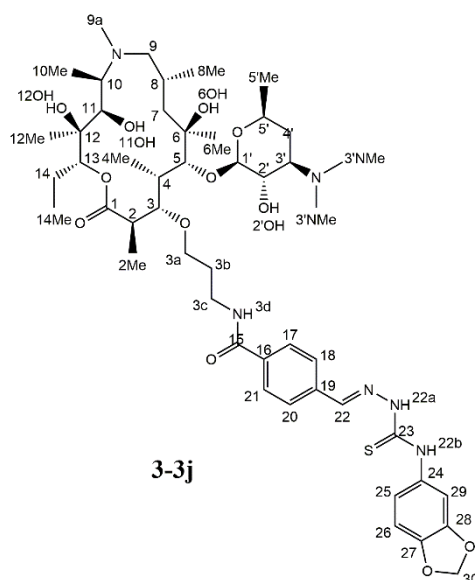
2,77 (1H, H-2), 1,25 (3H, H-2 Me), 3,41 (1H, H-3), 2,13 (1H, H-4), 0,95 (3H, H-4 Me), 3,63 (1H, H-5), 1,18 (3H, H-6 Me), 1,53; 1,34 (2H, H-7), 1,84 (1H, H-8), 0,89 (3H, H-8Me), 2,42; 2,16 (2H, H-9), 2,31 (3H, H-9a), 2,80 (1H, H-10), 1,05 (3H, H-10 Me), 3,56 (1H, H-11), 0,99 (3H, H-12 Me), 4,81 (1H, H-13), 1,82; 1,47 (2H, H-14), 0,86 (3H, H-14 Me), 7,87 (2H, H-17,21), 7,94 (2H, H-18,20), 8,11 (1H, H-22), 7,95 (2H, H-25,29), 8,13 (2H, H-26,28), 3,01 (2H, H-30,34), 1,60 (2H, H-31,33), 1,42 (1H, H-32), 4,42 (1H, H-1'), 3,08 (1H, H-2'), 2,47 (1H, H-3'), 2,25 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,63; 1,14 (2H, H-4'), 3,47 (1H, H-5'), 1,14 (3H, H-5' Me), 3,81 (2H, H-3 a), 1,98 (2H, H-3 b), 3,50 (2H, H-3 c).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**



177,3 (C-1), 44,46 (C-2), 15,54 (C-2Me), 86,1 (C-3), 37,38 (C-4), 8,6 (C-4 Me), 84,2 (C-5), 73,22 (C-6), 26,06 (C-6 Me), 40,98 (C-7), 26,19 (C-8), 20,8 (C-8 Me), 69,33 (C-9), 35,75 (C-9a), 61,79 (C-10), 6,23 (C-10 Me), 76,1 (C-11), 74,4 (C-12), 16,31 (C-12 Me), 77,3 (C-13), 20,78 (C-14), 10,27 (C-14 Me), 166,9 (C-15), 136,3 (C-16), 136,6 (C-19), 127,67 (C-17, 21), 127,67 (C-18, 20), 142,26 (C-22), 142,7 (C-24), 127,53 (C-25,29), 123,92 (C-26,28), 132,03 (C-27), 47,01 (C-30,34), 25,06 (C-31,33), 23,23 (C-32), 101,39 (C-1'), 70,06 (C-2'), 64,87 (C-3'), 39,68 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,48 (C-4'), 68,85 (C-5'), 20,71 (C-5' Me), 73, 2 (C-3 a), 30,19 (C-3 b), 37,6 (C-3 c).

### 3,4-metilendioksifenil-3-makrozon (3-3j)



**MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  973,5**

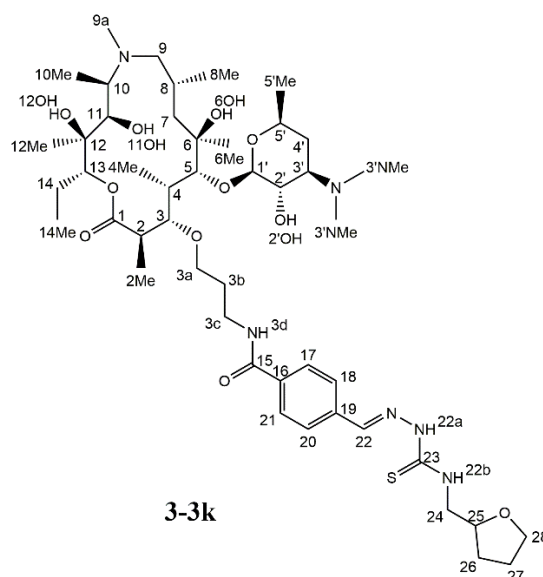
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

2,77 (1H, H-2), 1,25 (3H, H-2 Me), 3,38 (1H, H-3), 2,11 (1H, H-4), 0,94 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,19 (3H, H-6 Me), 1,54; 1,33 (2H, H-7), 1,84 (1H, H-8), 0,87 (3H, H-8Me), 2,44; 2,16 (2H, H-9), 2,31 (3H, H-9a), 2,80 (1H, H-10), 1,05 (3H, H-10 Me), 3,57 (1H, H-11), 0,99 (3H, H-12 Me), 4,74 (1H, H-13), 1,82; 1,47 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,86 (2H, H-17,21), 7,90 (2H, H-18,20), 8,07 (1H, H-22), 7,22 (1H, H-25), 6,85 (1H, H-28), 6,98 (1H, H-29), 6,02 (2H, H-30), 4,44 (1H, H-1'), 3,08 (1H, H-2'), 2,47 (1H, H-3'), 2,25 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,63; 1,14 (2H, H-4'), 3,47 (1H, H-5'), 1,13 (3H, H-5' Me), 3,80 (2H, H-3 a), 1,94 (2H, H-3 b), 3,47 (2H, H-3 c), 7,24 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

177,3 (C-1), 44,46 (C-2), 15,54 (C-2Me), 85,93 (C-3), 37,38 (C-4), 8,58 (C-4 Me), 84,28 (C-5), 73,22 (C-6), 26,04 (C-6 Me), 40,98 (C-7), 26,19 (C-8), 20,73 (C-8 Me), 69,5 (C-9), 35,9 (C-9a), 61,7 (C-10), 6,3 (C-10 Me), 76,29 (C-11), 74,4 (C-12), 16,31 (C-12 Me), 77,46 (C-13), 20,78 (C-14), 10,2 (C-14 Me), 165,83 (C-15), 135,04 (C-16), 136,47 (C-19), 127,39 (C-17, 21), 127,70 (C-18, 20), 142,06 (C-22), 132,82 (C-24), 107,59 (C-25), 145,97 (C-26), 146,99 (C-27), 107,46 (C-28), 119,22 (C-29), 101,73 (C-30), 101,39 (C-1'), 71,01 (C-2'), 64,87 (C-3'), 39,8 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,48 (C-4'), 68,85 (C-5'), 20,47 (C-5' Me), 72,72 (C-3 a), 30,06 (C-3 b), 37,5 (C-3 c).

### Tetrahidrofuran-2-ilmetil-3-makrozon (3-3k)



**MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  936,5**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

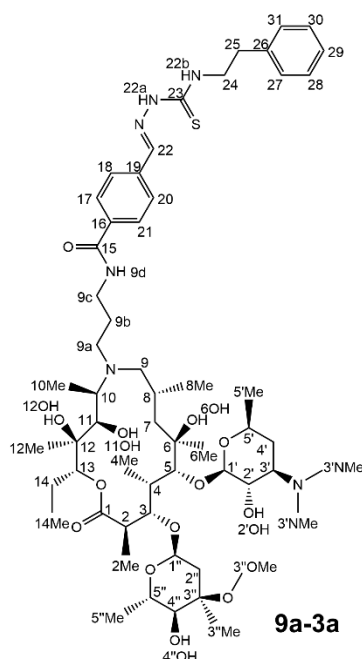
2,78 (1H, H-2), 1,25 (3H, H-2 Me), 3,39 (1H, H-3), 2,10 (1H, H-4), 0,94 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,15 (3H, H-6 Me), 1,51; 1,30 (2H, H-7), 1,84 (1H, H-8), 0,86 (3H, H-8Me), 2,40; 2,12 (2H, H-9), 2,28 (3H, H-9a), 2,76 (1H, H-10), 1,02 (3H, H-10 Me), 3,53 (1H, H-11), 1,00 (3H, H-12 Me), 4,75 (1H, H-13), 1,81; 1,47 (2H, H-14), 0,83 (3H, H-14 Me), 7,82 (2H, H-17,21), 7,78 (2H, H-18,20), 7,96 (1H, H-22), 7,97 (1H, H-22b), 3,63; 3,81 (2H, H-24), 4,13 (1H, H-25), 1,97; 1,63 (2H, H-26), 1,88 (2H, H-27), 3,85; 3,71 (2H, H-28), 4,43 (1H, H-1'), 3,05 (1H, H-2'), 2,48 (1H, H-3'), 2,22 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,62; 1,11 (2H, H-4'), 3,47 (1H, H-5'), 1,09 (3H, H-5' Me), 3,77 (2H, H-3 a), 1,94 (2H, H-3 b), 3,44 (2H, H-3 c), 7,29 (2H, H-3 d).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

177,3 (C-1), 44,3 (C-2), 15,64 (C-2Me), 86,0 (C-3), 37,5 (C-4), 8,64 (C-4 Me), 84,20 (C-5), 73,04 (C-6), 26,20 (C-6 Me), 41,08 (C-7), 26,07 (C-8), 20,83 (C-8 Me), 69,46 (C-9), 35,82 (C-9a), 61,72 (C-10), 6,39 (C-10 Me), 76,05 (C-11), 74,12 (C-12), 16,22 (C-12 Me), 77,44 (C-13), 20,72 (C-14), 10,36 (C-14 Me), 166,3 (C-15), 135,92 (C-16), 136,67 (C-19), 127,55 (C-17, 21), 127,11 (C-18, 20), 141,55 (C-22), 178,2 (C-23), 47,78 (C-24), 77,01 (C-25), 28,40 (C-26), 25,41 (C-27), 67,7 (C-28), 101,39 (C-1'), 71,01 (C-2'), 64,87 (C-3'), 39,68 (C-3' NMe<sub>2</sub>), 29,48 (C-4'), 68,85 (C-5'), 20,47 (C-5' Me), 72,72 (C-3 a), 30,06 (C-3 b), 37,39 (C-3 c).

### 3.6.3. Priprava 9a-makrozona (klasa III)

#### 2-feniletil-9a-makrozon (9a-3a)



MS (ESI+)  $m/z$  1101,84

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:

2,84 (1H, H-2), 1,19 (3H, H-2 Me), 4,10 (1H, H-3), 2,05 (1H, H-4), 1,03 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,25 (3H, H-6 Me), 1,58; 1,47 (2H, H-7), 1,99 (1H, H-8), 0,92 (3H, H-8Me), 2,22; 2,73 (2H, H-9), 3,05; 2,65 (2H, H-9a), 1,90; 1,77 (2H, H-9 b), 3,36 (2H, H-9 c), 7,50 (1H, 9 d) 2,85 (1H, H-10), 1,11 (3H, H-10 Me), 3,67 (1H, H-11), 1,07 (3H, H-12 Me), 4,80 (1H, H-13), 1,84; 1,47 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,85 (2H, H-17,21), 7,74 (2H, H-18,20), 7,96 (1H, H-22), 3,89 (2H, H-24), 2,99 (2H, H-25), 7,36 (2H, H-27,31), 7,35 (2H, H-28,30), 7,28 (1H, H-29), 4,46 (1H, H-1'), 3,07 (1H, H-2'), 2,52 (1H, H-3'), 2,27 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,70; 1,11 (2H,

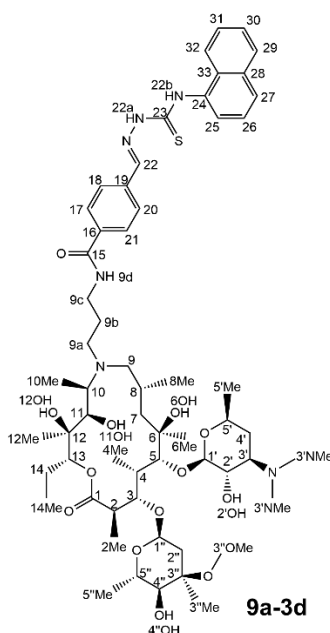


H-22), 2,31 (3H, H-25Me), 2,19 (3H, H-26Me), 4,46 (1H, H-1'), 3,09 (1H, H-2'), 2,51 (1H, H-3'), 2,27 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,70; 1,13 (2H, H-4'), 3,59 (1H, H-5'), 1,14 (3H, H-5' Me), 4,92 (1H, H-1''), 2,38; 1,58 (2H, H-2''), 1,21 (3H, H-3'' Me), 3,31 (3H, H-3'' OMe), 2,96 (1H, H-4''), 4,07 (1H, H-5''), 1,23 (3H, H-5'' Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

177,83 (C-1), 44,84 (C-2), 14,58 (C-2Me), 78,46 (C-3), 40,89 (C-4), 9,04 (C-4 Me), 83,24 (C-5), 74,07 (C-6), 26,81 (C-6 Me), 41,40 (C-7), 28,21 (C-8), 21,97 (C-8 Me), 63,81 (C-9), 47,77 (C-9a), 27,19 (C-9 b), 37,96 (C-9 c), 60,82 (C-10), 8,53 (C-10 Me), 74,71 (C-11), 74,83 (C-12), 16,88 (C-12 Me), 77,19 (C-13), 21,14 (C-14), 10,51 (C-14 Me), 166,34 (C-15), 136,49 (C-16), 136,30 (C-19), 127,58 (C-17, 21), 127,58 (C-18, 20), 142,40 (C-22), 115,90 (C-24), 165,23 (C-25), 10,39 (C-25Me), 159,07 (C-26), 9,16 (C-26Me), 102,54 (C-1'), 71,01 (C-2'), 65,28 (C-3'), 39,74 (C-3' NMe), 28,91 (C-4'), 68,21 (C-5'), 20,83 (C-5' Me), 95,34 (C-1''), 34,65 (C-2''), 72,79 (C-3''), 20,70 (C-3'' Me), 48,91 (C-3''OMe), 77,89 (C-4''), 65,34 (C-5''), 18,02 (C-5'' Me).

*Naftalen-1-il-9a-makrozon (9a-3d)*



**MS (ESI+) *m/z*** 1124,0

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

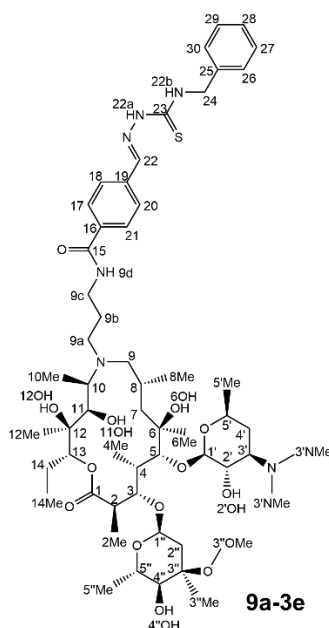
2,80 (1H, H-2), 1,19 (3H, H-2 Me), 4,10 (1H, H-3), 2,02 (1H, H-4), 1,04 (3H, H-4 Me), 3,58 (1H, H-5), 1,24 (3H, H-6 Me), 1,53; 1,46 (2H, H-7), 1,97 (1H, H-8), 0,90 (3H, H-8Me), 2,18; 2,65 (2H, H-9), 3,03; 2,61 (2H, H-9a), 1,85; 1,73 (2H, H-9 b), 3,35 (2H, H-9 c), 7,46 (1H, 9 d) 2,80 (1H, H-10), 1,10 (3H, H-10 Me), 3,66 (1H, H-11), 1,07 (3H, H-12 Me), 4,82 (1H, H-13),

1,81; 1,47 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,64 (2H, H-17,21), 7,99 (2H, H-18,20), 8,15 (1H, H-22), 8,38 (1H, H-22b), 7,56 (4H, H-25, 26, 30, 31), 7,95 (3H, H-27, 29, 32), 4,45 (1H, H-1'), 3,09 (1H, H-2'), 2,50 (1H, H-3'), 2,28 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,68; 1,10 (2H, H-4'), 3,58 (1H, H-5'), 1,12 (3H, H-5' Me), 4,92 (1H, H-1''), 2,34; 1,54 (2H, H-2''), 1,20 (3H, H-3'' Me), 3,30 (3H, H-3'' OMe), 2,95 (1H, H-4''), 4,07 (1H, H-5''), 1,22 (3H, H-5'' Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

178,56 (C-1), 44,0 (C-2), 14,55 (C-2Me), 78,40 (C-3), 40,87 (C-4), 9,10 (C-4 Me), 82,9 (C-5), 73,87 (C-6), 26,8 (C-6 Me), 39,9 (C-7), 27,8 (C-8), 20,07 (C-8 Me), 65,7 (C-9), 47,5 (C-9a), 26,8 (C-9 b), 38,9 (C-9 c), 61,2 (C-10), 8,6 (C-10 Me), 74,3 (C-11), 77,8 (C-12), 16,7 (C-12 Me), 77,9 (C-13), 21, 7 (C-14), 10,6 (C-14 Me), 166,4 (C-15), 136,4 (C-16), 137,1 (C-19), 127,5 (C-17, 21), 128,1 (C-18, 20), 142,1 (C-22), 126,29 (C-25, 26, 30, 31), 122,87 (C-27), 129,38 (C-29), 127,97 (C-32), 102,55 (C-1'), 70,82 (C-2'), 65,32 (C-3'), 37,79 (C-3' NMe), 28,86 (C-4'), 68,11 (C-5'), 20,89 (C-5' Me), 95,27 (C-1''), 34,71 (C-2''), 73,0 (C-3''), 20,64 (C-3'' Me), 48,90 (C-3''OMe), 78,09 (C-4''), 65,32 (C-5''), 18,10 (C-5'' Me).

*Benzil-9a-makrozon (9a-3e)*



**MS (ESI+) *m/z* 1087,98**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

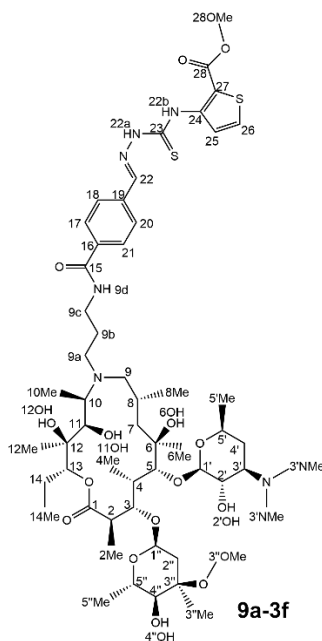
2,81 (1H, H-2), 1,19 (3H, H-2 Me), 4,10 (1H, H-3), 2,03 (1H, H-4), 1,04 (3H, H-4 Me), 3,58 (1H, H-5), 1,24 (3H, H-6 Me), 1,53; 1,46 (2H, H-7), 1,97 (1H, H-8), 0,90 (3H, H-8Me), 2,16; 2,64 (2H, H-9), 3,03; 2,60 (2H, H-9a), 1,85; 1,73 (2H, H-9 b), 3,34 (2H, H-9 c), 7,36 (1H, 9 d)

2,81 (1H, H-10), 1,09 (3H, H-10 Me), 3,66 (1H, H-11), 1,07 (3H, H-12 Me), 4,83 (1H, H-13), 1,81; 1,47 (2H, H-14), 0,87 (3H, H-14 Me), 7,83 (2H, H-17,21), 7,81 (2H, H-18,20), 8,01 (1H, H-22), 8,44 (1H, H-22b), 4,92 (1H, H-24), 7,39 (2H, H-26,30), 7,35 (2H, H-27,29), 7,26 (1H, H-28), 4,46 (1H, H-1'), 3,09 (1H, H-2'), 2,51 (1H, H-3'), 2,27 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,70; 1,13 (2H, H-4'), 3,59 (1H, H-5'), 1,14 (3H, H-5' Me), 4,92 (1H, H-1''), 2,38; 1,58 (2H, H-2''), 1,21 (3H, H-3'' Me), 3,31 (3H, H-3'' OMe), 2,96 (1H, H-4''), 4,07 (1H, H-5''), 1,23 (3H, H-5'' Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

177,56 (C-1), 44,84 (C-2), 14,55 (C-2Me), 78,43 (C-3), 40,87 (C-4), 9,12 (C-4 Me), 83,09 (C-5), 73,87 (C-6), 27,05 (C-6 Me), 41,32 (C-7), 28,16 (C-8), 22,07 (C-8 Me), 63,71 (C-9), 47,72 (C-9a), 27,21 (C-9 b), 37,95 (C-9 c), 60,67 (C-10), 8,73 (C-10 Me), 74,71 (C-11), 74,66 (C-12), 16,92 (C-12 Me), 77,33 (C-13), 21,17 (C-14), 10,59 (C-14 Me), 166,50 (C-15), 136,60 (C-16), 136,63 (C-19), 127,63 (C-17, 21), 127,63 (C-18, 20), 141,72 (C-22), 178,90 (C-23), 47,07 (C-24), 138,80 (C-25), 127,33 (C-26,30), 128,39 (C-27,29), 127,05 (C-28), 102,55 (C-1'), 70,82 (C-2'), 65,32 (C-3'), 37,79 (C-3' NMe), 28,86 (C-4'), 68,11 (C-5'), 20,89 (C-5' Me), 95,27 (C-1''), 34,71 (C-2''), 73,0 (C-3''), 20,64 (C-3'' Me), 48,90 (C-3''OMe), 78,09 (C-4''), 65,32 (C-5''), 18,10 (C-5'' Me).

*Metil-3-tiofen-2-karboksil-9a-makrozon (9a-3f)*



**MS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*** 1137,9

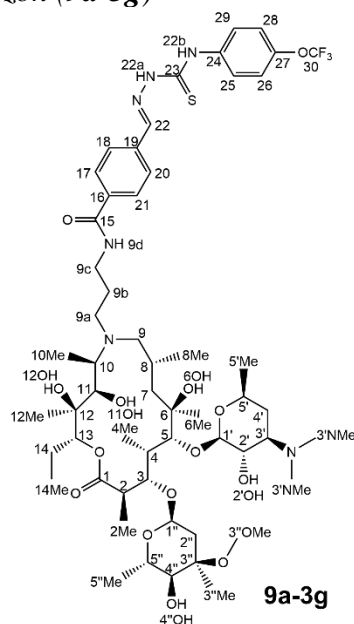
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

2,83 (1H, H-2), 1,19 (3H, H-2 Me), 4,11 (1H, H-3), 2,05 (1H, H-4), 1,03 (3H, H-4 Me), 3,59 (1H, H-5), 1,24 (3H, H-6 Me), 1,55; 1,48 (2H, H-7), 2,01 (1H, H-8), 0,92 (3H, H-8Me), 2,23; 2,74 (2H, H-9), 3,07; 2,68 (2H, H-9a), 1,91;1,78 (2H, H-9 b), 3,37 (2H, H-9 c), 2,86 (1H, H-10), 1,12 (3H, H-10 Me), 3,67 (1H, H-11), 1,07 (3H, H-12 Me), 4,81 (1H, H-13), 1,83; 1,47 (2H, H-14), 0,86 (3H, H-14 Me), 7,90 (2H, H-17,21), 8,03 (2H, H-18,20), 8,10 (1H, H-22), 8,96 (1H, H-25), 7,69 (1H, H-26), 3,97 (3H, H-28OMe), 4,46 (1H, H-1'), 3,09 (1H, H-2'), 2,53 (1H, H-3'), 2,28 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,69; 1,10 (2H, H-4'), 3,58 (1H, H-5'), 1,14 (3H, H-5' Me), 4,95 (1H, H-1''), 2,39; 1,58 (2H, H-2''), 1,20 (3H, H-3'' Me), 3,30 (3H, H-3'' OMe), 2,97 (1H, H-4''), 4,09 (1H, H-5''), 1,24 (3H, H-5'' Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

178,02 (C-1), 44,83 (C-2), 14,58 (C-2Me), 78,54 (C-3), 40,93 (C-4), 8,96 (C-4 Me), 83,16 (C-5), 74,21 (C-6), 26,79 (C-6 Me), 41,39 (C-7), 27,95 (C-8), 21,90 (C-8 Me), 64,01 (C-9), 47,73 (C-9a), 27,03 (C-9 b), 37,95 (C-9 c), 61,02 (C-10), 8,58 (C-10 Me), 74,54 (C-11), 74,92 (C-12), 16,66 (C-12 Me), 77,07 (C-13), 21,33 (C-14), 10,48 (C-14 Me), 166,48 (C-15), 136,30 (C-16), 136,62 (C-19), 127,68 (C-17, 21), 127,59 (C-18, 20), 142,31 (C-22), 145,60 (C-24), 122,21 (C-25), 131,21 (C-26), 112,31 (C-27), 164,47 (C-28), 51,75 (C-28OMe), 102,66 (C-1'), 71,02 (C-2'), 65,33 (C-3'), 39,71 (C-3' NMe), 28,87 (C-4'), 68,11 (C-5'), 20,86 (C-5' Me), 95,35 (C-1''), 34,44 (C-2''), 72,91 (C-3''), 20,64 (C-3'' Me), 48,80 (C-3''OMe), 77,88 (C-4''), 65,47 (C-5''), 17,92 (C-5'' Me).

**4-trifluorometoksifenil-9a-makrozon (9a-3g)**



**MS (ESI+) *m/z* 1157,92**



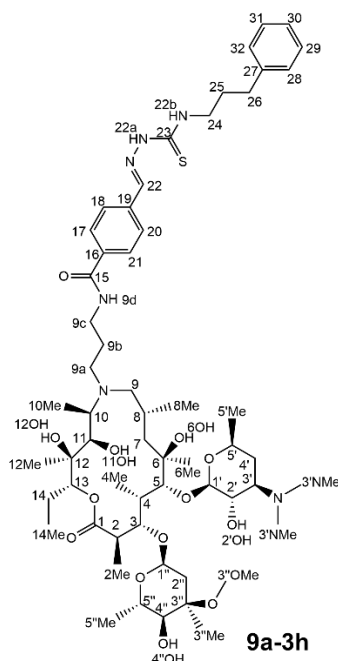
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

2,84 (1H, H-2), 1,18 (3H, H-2 Me), 4,09 (1H, H-3), 2,05 (1H, H-4), 1,02 (3H, H-4 Me), 3,58 (1H, H-5), 1,26 (3H, H-6 Me), 1,58; 1,45 (2H, H-7), 1,99 (1H, H-8), 0,92 (3H, H-8Me), 2,20; 2,73 (2H, H-9), 3,05; 2,65 (2H, H-9a), 1,76;1,89 (2H, H-9 b), 3,35 (2H, H-9 c), 7,61 (1H, H-9 d), 2,84 (1H, H-10), 1,11 (3H, H-10 Me), 3,65 (1H, H-11), 1,07 (3H, H-12 Me), 4,80 (1H, H-13), 1,83; 1,46 (2H, H-14), 0,86 (3H, H-14 Me), 7,91 (2H, H-17,21), 7,87 (2H, H-18,20), 8,09 (1H, H-22), 7,44 (2H, H-25, 29), 7,33 (2H, H-26,28), 4,45 (1H, H-1'), 3,10 (1H, H-2'), 2,54 (1H, H-3'), 2,27 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,71; 1,14 (2H, H-4'), 3,59 (1H, H-5'), 1,14 (3H, H-5' Me), 4,96 (1H, H-1"), 2,38; 1,59 (2H, H-2"), 1,21 (3H, H-3" Me), 3,31 (3H, H-3" OMe), 2,98 (1H, H-4"), 4,09 (1H, H-5"), 1,24 (3H, H-5" Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-*d*<sub>3</sub>) [δ/ppm]:**

178,10 (C-1), 44,87 (C-2), 14,52 (C-2Me), 78,80 (C-3), 41,0 (C-4), 8,99 (C-4 Me), 83,2 (C-5), 74,06 (C-6), 26,81 (C-6 Me), 41,19 (C-7), 27,95 (C-8), 21,86 (C-8 Me), 64,0 (C-9), 47,61 (C-9a), 27,12 (C-9 b), 37,99 (C-9 c), 61,24 (C-10), 8,42 (C-10 Me), 74,42 (C-11), 74,67 (C-12), 16,93 (C-12 Me), 77,20 (C-13), 21,27 (C-14), 10,64 (C-14 Me), 166,73 (C-15), 136,14 (C-16), 136,43 (C-19), 127,56 (C-17, 21), 127,48 (C-18, 20), 142,50 (C-22), 137,87 (C-24), 127,17 (C-25,29), 120,76 (C-26,28), 146,27 (C-27), 102,70 (C-1'), 71,04 (C-2'), 65,28 (C-3'), 39,40 (C-3' NMe), 29,08 (C-4'), 68,11 (C-5'), 20,85 (C-5' Me), 95,30 (C-1"), 34,62 (C-2"), 72,89 (C-3"), 20,65 (C-3" Me), 48,85 (C-3"OMe), 77,92 (C-4"), 65,47 (C-5"), 18,06 (C-5" Me).

## 3-fenilpropan-1-il-9a-makrozon (9a-3h)



**MS (ESI+)  $m/z$**  1115,85

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

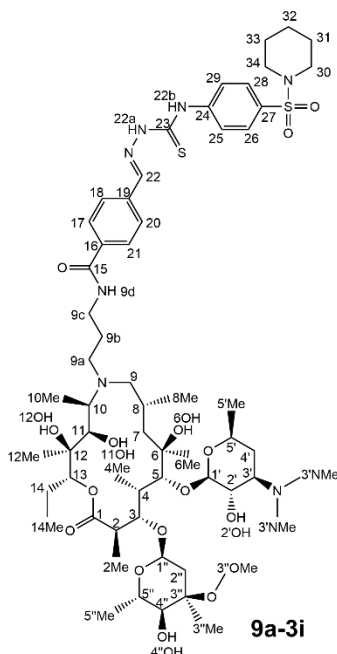
2,79 (1H, H-2), 1,15 (3H, H-2 Me), 4,06 (1H, H-3), 2,01 (1H, H-4), 1,00 (3H, H-4 Me), 3,55 (1H, H-5), 1,22 (3H, H-6 Me), 1,52; 1,43 (2H, H-7), 1,97 (1H, H-8), 0,89 (3H, H-8Me), 2,21; 2,70 (2H, H-9), 3,03; 2,62 (2H, H-9a), 1,87; 1,93 (2H, H-9 b), 3,32 (2H, H-9 c), 7,52 (1H, H-9 d), 2,83 (1H, H-10), 1,09 (3H, H-10 Me), 3,64 (1H, H-11), 1,04 (3H, H-12 Me), 4,78 (1H, H-13), 1,79; 1,43 (2H, H-14), 0,83 (3H, H-14 Me), 7,82 (2H, H-17,21), 7,78 (2H, H-18,20), 7,95 (1H, H-22), 8,65 (1H, H-22b), 3,66 (2H, H-24), 1,95 (2H, H-25), 2,67 (2H, H-26), 7,22 (2H, H-28,32), 7,27 (2H, H-29,31), 7,16 (1H, H-30), 4,43 (1H, H-1'), 3,06 (1H, H-2'), 2,50 (1H, H-3'), 2,26 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,67; 1,10 (2H, H-4'), 3,56 (1H, H-5'), 1,11 (3H, H-5' Me), 4,92 (1H, H-1''), 2,34; 1,54 (2H, H-2''), 1,18 (3H, H-3'' Me), 3,27 (3H, H-3'' OMe), 2,94 (1H, H-4''), 4,05 (1H, H-5''), 1,21 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

178,0 (C-1), 45,0 (C-2), 14,63 (C-2Me), 78,54 (C-3), 41,06 (C-4), 8,98 (C-4 Me), 83,05 (C-5), 74,10 (C-6), 26,78 (C-6 Me), 41,22 (C-7), 27,91 (C-8), 21,89 (C-8 Me), 64,0 (C-9), 47,71 (C-9a), 27,02 (C-9 b), 38,09 (C-9 c), 60,94 (C-10), 8,42 (C-10 Me), 74,26 (C-11), 74,65 (C-12), 16,71 (C-12 Me), 77,16 (C-13), 21,33 (C-14), 10,50 (C-14 Me), 166,60 (C-15), 135,86 (C-16), 136,81 (C-19), 127,48 (C-17, 21), 127,26 (C-18, 20), 141,30 (C-22), 178,02 (C-23), 43,79 (C-24), 30,4 (C-25), 32,84 (C-26), 142,14 (C-27), 128,33 (C-28, 32), 128,33 (C-29, 31), 125,69

(C-30), 102,4 (C-1'), 70,89 (C-2'), 65,35 (C-3'), 39,53 (C-3' NMe), 29,03 (C-4'), 68,16 (C-5'), 20,83 (C-5' Me), 95,38 (C-1''), 34,56 (C-2''), 72,71 (C-3''), 20,71 (C-3'' Me), 48,84 (C-3''OMe), 77,70 (C-4''), 65,35 (C-5''), 17,86 (C-5'' Me).

4-(piperidin-1-ilsulfonil)fenil-9a-makrozon (**9a-3i**)



MS (ESI+)  $m/z$  1221,02

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

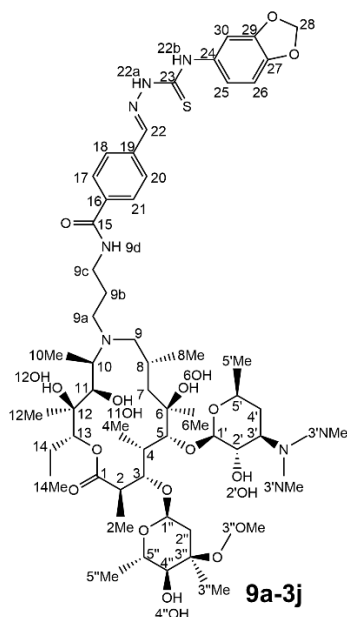
2,80 (1H, H-2), 1,16 (3H, H-2 Me), 4,05 (1H, H-3), 2,01 (1H, H-4), 1,01 (3H, H-4 Me), 3,56 (1H, H-5), 1,23 (3H, H-6 Me), 1,54; 1,46 (2H, H-7), 2,00 (1H, H-8), 0,91 (3H, H-8Me), 2,25; 2,71 (2H, H-9), 1,88;1,74 (2H, H-9 b), 3,34 (2H, H-9 c), 7,37 (1H, H-9 d), 2,90 (1H, H-10), 1,12 (3H, H-10 Me), 3,65 (1H, H-11), 1,06 (3H, H-12 Me), 4,79 (1H, H-13), 1,79; 1,44 (2H, H-14), 0,84 (3H, H-14 Me), 7,85 (2H, H-17,21), 7,90 (2H, H-18,20), 8,08 (1H, H-22), 8,01 (2H, H-25,29), 7,73 (2H, H-26,28), 2,96 (2H, H-30,34), 1,60 (2H, H-31,33), 1,40 (2H, H-32), 4,44 (1H, H-1'), 3,09 (1H, H-2'), 2,57 (1H, H-3'), 2,30 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,70; 1,13 (2H, H-4'), 3,57 (1H, H-5'), 1,13 (3H, H-5' Me), 4,89 (1H, H-1''), 2,35; 1,55 (2H, H-2''), 1,18 (3H, H-3'' Me), 3,28 (3H, H-3'' OMe), 2,94 (1H, H-4''), 4,04 (1H, H-5''), 1,21 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

177, 83 (C-1), 44,89 (C-2), 14,67 (C-2Me), 78,57 (C-3), 40,74 (C-4), 9,07 (C-4 Me), 83,31 (C-5), 74,27 (C-6), 26,65 (C-6 Me), 41,16 (C-7), 27,83 (C-8), 21,81 (C-8 Me), 63,87 (C-9), 26,92 (C-9 b), 37,87 (C-9 c), 61,31 (C-10), 8,55 (C-10 Me), 74,27 (C-11), 75,08 (C-12), 16,56 (C-12

Me), 77,11 (C-13), 21,16 (C-14), 10,47 (C-14 Me), 166,51 (C-15), 136,13 (C-16), 136,14 (C-19), 127,45 (C-17, 21), 127,58 (C-18, 20), 142,69 (C-22), 142,73 (C-24), 124,01 (C-25,29), 127,97 (C-26,28), 132,25 (C-27), 46,97 (C-30, 34), 25,02 (C-31, 33), 23,2 (C-32), 102,49 (C-1'), 70,52 (C-2'), 65,27 (C-3'), 39,48 (C-3' NMe), 28,97 (C-4'), 68,15 (C-5'), 20,83 (C-5' Me), 95,53 (C-1''), 34,68 (C-2''), 72,73 (C-3''), 20,66 (C-3'' Me), 48,73 (C-3''OMe), 77,86 (C-4''), 65,39 (C-5''), 18,10 (C-5'' Me).

### 3,4-metilendioksifenil-9a-makrozon (9a-3j)



**MS (ESI+)  $m/z$  1117,9**

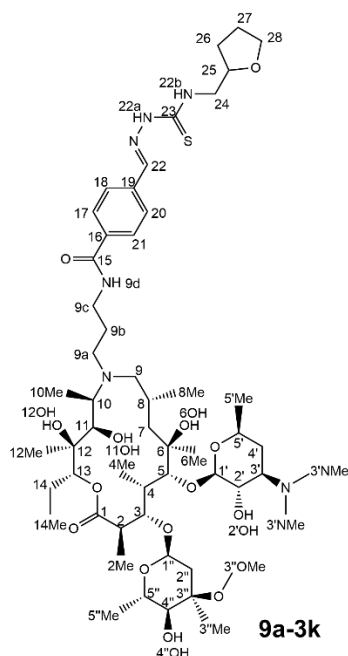
**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,80 (1H, H-2), 1,17 (3H, H-2 Me), 4,06 (1H, H-3), 2,01 (1H, H-4), 1,01 (3H, H-4 Me), 3,55 (1H, H-5), 1,23 (3H, H-6 Me), 1,53; 1,45 (2H, H-7), 1,98 (1H, H-8), 0,91 (3H, H-8Me), 2,22; 2,71 (2H, H-9), 3,06; 2,64 (2H, H-9 a), 1,87; 1,74 (2H, H-9 b), 3,34 (2H, H-9 c), 7,36 (1H, H-9 d), 2,86 (1H, H-10), 1,10 (3H, H-10 Me), 3,64 (1H, H-11), 1,05 (3H, H-12 Me), 4,78 (1H, H-13), 1,79; 1,43 (2H, H-14), 0,84 (3H, H-14 Me), 7,82 (2H, H-17,21), 7,86 (2H, H-18,20), 8,03 (1H, H-22), 9,35 (1H, H-22b), 6,92 (1H, H-25), 6,83 (2H, H-26), 5,99 (1H, H-28), 7,15 (2H, H-30), 4,43 (1H, H-1'), 3,07 (1H, H-2'), 2,54 (1H, H-3'), 2,28 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,69; 1,11 (2H, H-4'), 3,57 (1H, H-5'), 1,12 (3H, H-5' Me), 4,89 (1H, H-1''), 2,34; 1,54 (2H, H-2''), 1,18 (3H, H-3'' Me), 3,28 (3H, H-3'' OMe), 2,94 (1H, H-4''), 4,04 (1H, H-5''), 1,21 (3H, H-5'' Me).

**$^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

177, 79 (C-1), 44,80 (C-2), 14,64 (C-2Me), 78,73 (C-3), 40,82 (C-4), 9,04 (C-4 Me), 83,25 (C-5), 74,09 (C-6), 26,65 (C-6 Me), 41,02 (C-7), 27,89 (C-8), 21,93 (C-8 Me), 63,69 (C-9), 47,93 (C-9 a), 27,0 (C-9 b), 37,94 (C-9 c), 61,15 (C-10), 8,59 (C-10 Me), 74,54 (C-11), 74,83 (C-12), 16,89 (C-12 Me), 77,09 (C-13), 21,27 (C-14), 10,39 (C-14 Me), 166,47 (C-15), 136,15 (C-16), 136,45 (C-19), 127,46 (C-17, 21), 127,46 (C-18, 20), 142,02 (C-22), 132,77 (C-24), 119,29 (C-25), 107,26 (C-26), 147,22 (C-27), 101,68 (C-28), 145,74 (C-29), 107,6 (C-30), 102,65 (C-1'), 70,76 (C-2'), 63,54 (C-3'), 39,63 (C-3' NMe), 28,89 (C-4'), 68,21 (C-5'), 20,81 (C-5' Me), 95,42 (C-1''), 34,61 (C-2''), 72,76 (C-3''), 20,70 (C-3'' Me), 48,88 (C-3''OMe), 77,83 (C-4''), 65,34 (C-5''), 18,01 (C-5'' Me).

#### *Tetrahidrofuran-2-ilmetil-9a-makrozon (9a-3k)*



**MS (ESI+)  $m/z$  1082,1**

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, acetonitril- $d_3$ ) [ $\delta$ /ppm]:**

2,79 (1H, H-2), 1,16 (3H, H-2 Me), 4,01 (1H, H-3), 2,01 (1H, H-4), 1,02 (3H, H-4 Me), 3,54 (1H, H-5), 1,28 (3H, H-6 Me), 2,11 (1H, H-8), 0,96 (3H, H-8Me), 2,49; 2,90 (2H, H-9), 2,87 (2H, H-9 a), 2,03 (2H, H-9 b), 3,40 (2H, H-9 c), 7,96 (1H, H-9 d), 2,94 (1H, H-10), 1,24 (3H, H-10 Me), 3,73 (1H, H-11), 1,08 (3H, H-12 Me), 4,89 (1H, H-13), 1,83; 1,45 (2H, H-14), 0,81 (3H, H-14 Me), 7,86 (2H, H-17,21), 7,72 (2H, H-18,20), 8,02 (1H, H-22), 3,82; 3,66 (2H, H-24), 4,13 (1H, H-25), 1,85; 1,73 (2H, H-26), 1,89 (2H, H-27), 3,67; 3,60 (2H, H-28), 4,49 (1H, H-1'), 3,29 (1H, H-2'), 2,92 (1H, H-3'), 2,52 (6H, H-3' NMe<sub>2</sub>), 1,82; 1,24 (2H, H-4'), 3,57 (1H,

H-5'), 1,13 (3H, H-5' Me), 4,88 (1H, H-1"), 2,35; 1,57 (2H, H-2"), 1,20 (3H, H-3" Me), 3,29 (3H, H-3" OMe), 2,98 (1H, H-4"), 4,05 (1H, H-5"), 1,22 (3H, H-5" Me).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, acetonitril-d<sub>3</sub>) [ $\delta$ /ppm]:**

177,53 (C-1), 45,17 (C-2), 14,64 (C-2Me), 78,64 (C-3), 40,96 (C-4), 9,25 (C-4 Me), 83,88 (C-5), 74,30 (C-6), 26,15 (C-6 Me), 27,34 (C-8), 21,59 (C-8 Me), 64,06 (C-9), 48,27 (C-9 a), 26,06 (C-9 b), 37,53 (C-9 c), 63,2 (C-10), 8,84 (C-10 Me), 73,12 (C-11), 74,90 (C-12), 16,64 (C-12 Me), 76,90 (C-13), 21,42 (C-14), 10,31 (C-14 Me), 166,70 (C-15), 135,95 (C-16), 136,66 (C-19), 127,52 (C-17, 21), 127,13 (C-18, 20), 141,68 (C-22), 178,2 (C-23), 47,79 (C-24), 77,7 (C-25), 28,1 (C-26), 25,4 (C-27), 68,4 (C-28), 102,80 (C-1'), 67,90 (C-2'), 65,34 (C-3'), 39,57 (C-3' NMe), 29,78 (C-4'), 20,54 (C-5' Me), 95,96 (C-1"), 34,65 (C-2"), 72,90 (C-3"), 20,57 (C-3" Me), 48,96 (C-3"OMe), 77,77 (C-4"), 65,56 (C-5"), 17,96 (C-5" Me).

### 3.7. Biološka aktivnost makrozona

Testovi biološke aktivnosti *in vitro* provedeni su u tvrtki Fidelta d.o.o. i na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Spojevi su testirani na panel susceptibilnih i rezistentnih Gram pozitivnih (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*) i Gram negativnih bakterija (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis*) te na eukariotski organizam *S. cerevisiae*.

Određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) mikrodilucijskom metodom prema standardnim protokolima (CLSI, engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*). MIK je definirana kao vrijednost koncentracije pri kojoj dolazi do inhibicije rasta bakterija. Novopripravljeni spojevi i standard azitromicin otopljeni su u dimetilsulfoksidu pri masenoj koncentraciji od 5 i 10 mg mL<sup>-1</sup>. Zatim su otopine razrijeđene u Mueller-Hinton mediju do konačnih koncentracija u rasponu 64-0,125 µg mL<sup>-1</sup>. Rezultati su određeni nakon 20-22 h inkubacije pri 37 °C.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

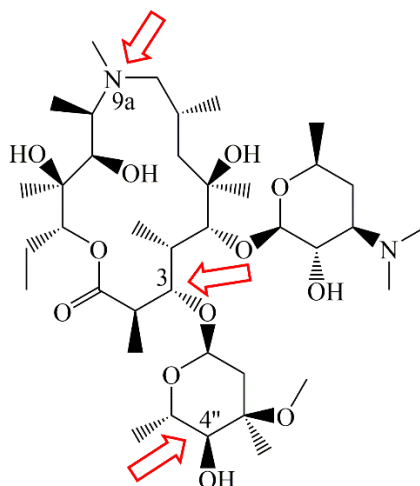
### 4.1. Priprava spojeva

Zbog sve većeg porasta broja rezistentnih patogena svjetska zdravstvena organizacija (WHO) promiče važnost istraživanja novih antibiotika. U tu svrhu posljednjih deset godina intenzivno su se istraživali derivati četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida. Provedene su strukturne modifikacije hidroksilnih skupina na aglikonskom prstenu te na šećerima kladinozi i desozaminu. Testovi biološke aktivnosti modificiranih makrolida pokazali su da supstitucija bilo kojeg položaja na desozaminu smanjuje biološku aktivnost, dok se modifikacijom položaja aglikonskog prstena i kladinoze većinom zadržava ili povećava antibakterijska aktivnost. Desozamin je ključan za proces vezanja makrolida za ribosom, stoga se derivatizacijom desozamina dobiju spojevi općenito lošije bioaktivnosti.<sup>1</sup>

Cilj ovog istraživanja je pripremiti nove derivate makrolida, konkretno makrozone, koji će pokazati širi spektar biološke aktivnosti s naglaskom na rezistentne bakterijske sojeve.

Makrozoni<sup>100</sup> predstavljaju konjugate azitromicina i tiosemikarbazona. Azitromicin pripada skupini azalida. Azalidi su kemijski stabilni petnaesteročlani makrolidi koji posjeduju izvrsna farmakokinetička svojstva i antibakterijsku aktivnost na Gram-pozitivne i neke Gram-negativne bakterije. Za azitromicin je karakteristično svojstvo visoke akumulacije u stanicama, dugo vrijeme poluživota te smanjen broj nuspojava u odnosu na ostale antibiotike.<sup>1,3</sup> Budući da su tiosemikarbazoni prema dosadašnjim istraživanjima pokazali biološku aktivnost<sup>4-6</sup>, korišteni su za kemijsku modifikaciju azitromicina na tri različita položaja (slika 57).

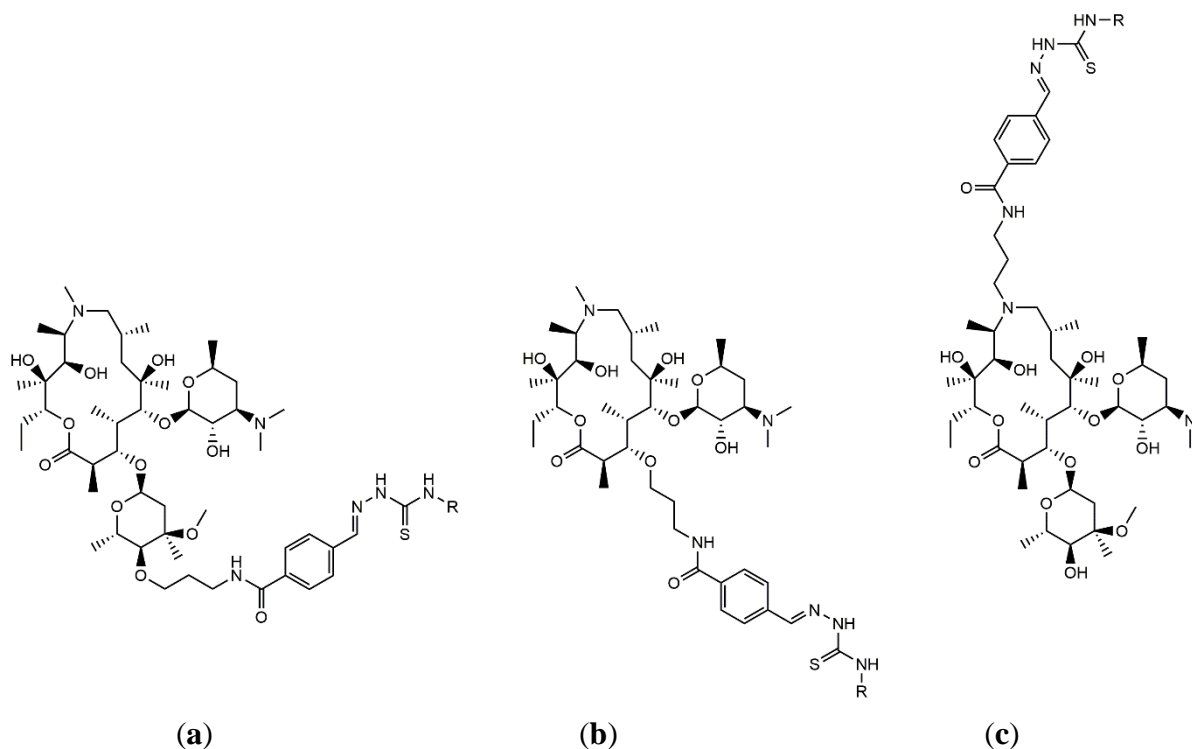




**Slika 57.** Strukturna formula molekule azitromicina s naznačenim položajima za strukturnu modifikaciju

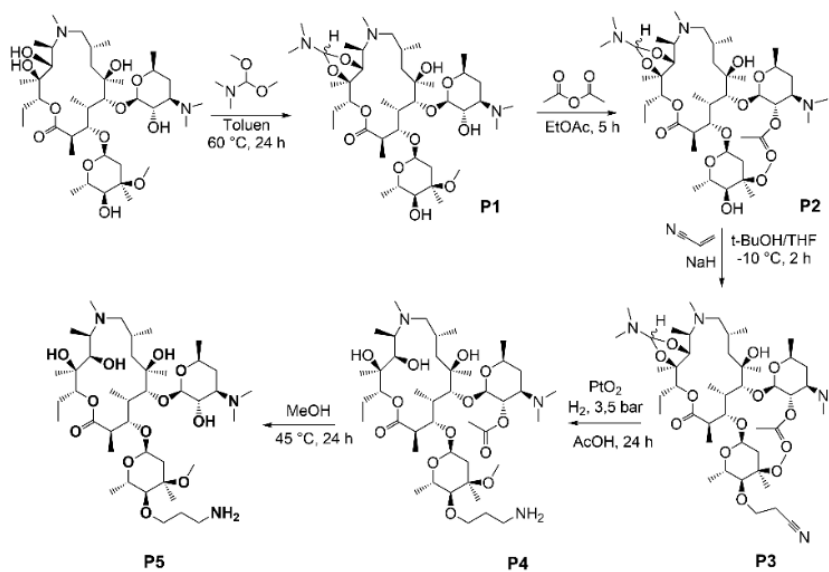
Osim što su pokazali širok spektar biološke aktivnosti, dokazano je kako neki derivati tiosemikarbazona mogu promijeniti mehanizam rezistencije bakterijskog soja *Staphylococcus aureus*.<sup>101</sup> Stoga će se konjugacijom tiosemikarbazona i azitromicina pokušati ujediniti izvrsna farmakokinetička svojstva i bioaktivnost azitromicina s bioaktivnosti tiosemikarbazona.

Pripravljene su tri klase makrozona kemijskom modifikacijom hidroksilne skupine na položaju 4'' i supstituenta na atomu kisika koji je vezan na položaju 3 azitromicina te položaja 9a demetiliranog azitromicina (slika 58.).

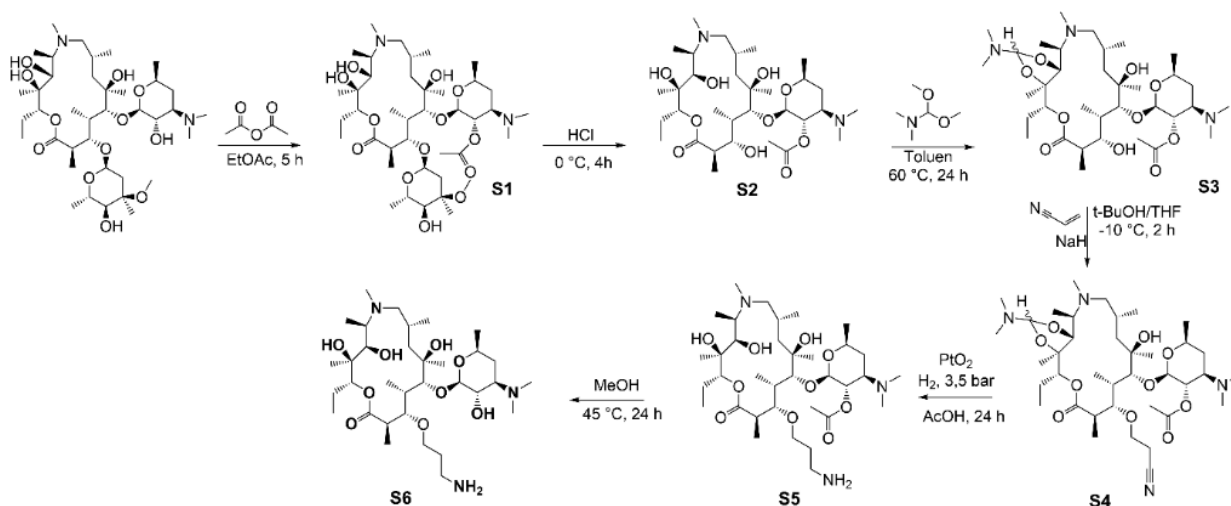


**Slika 58.** Općenite strukturne formule (a) 4''-makrozona, (b) 3-makrozona i (c) 9a-makrozona

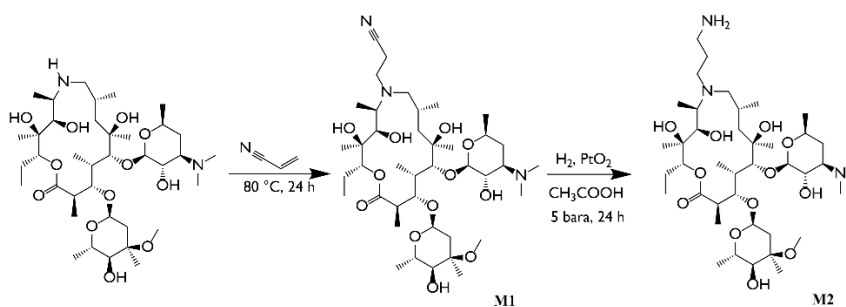
Pripravi makrozona iz **klase I** (4''-makrozoni) i **klase II** (3-makrozoni) prethodila je priprava prekursora. Priprava prekursora, 4''-*O*-(3-aminopropil)azitromicina **P5** (shema 1.) i 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina **S6** (shema 2.) sastoji se od više koraka koji obuhvaćaju zaštitu reaktivnijih hidroksilnih skupina, adiciju akrilonitrila popraćenu katalitičkim hidrogeniranjem te uklanjanje zaštitnih skupina. Priprava 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina sastoji se od dodatnog koraka, uklanjanja kladinoze. Prekursor za pripravu **klase III** (9a-makrozoni), 9a-aminopropil-azitromicin **M2** pripremljen je u tvrtki Fidelta d.o.o. (shema 3.).



Shema 1. Priprava 4''-O-(3-aminopropil)azitromicina (P5)

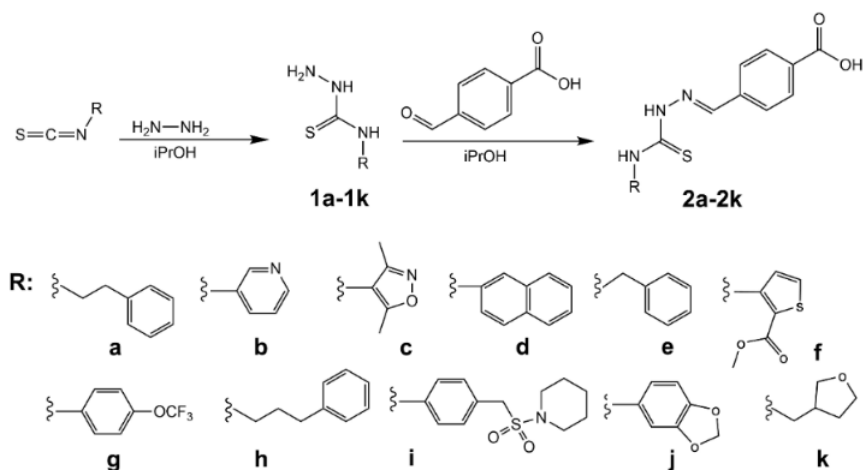


Shema 2. Priprava 3-dekladinozil-O-(3-aminopropil)azitromicina (S6)

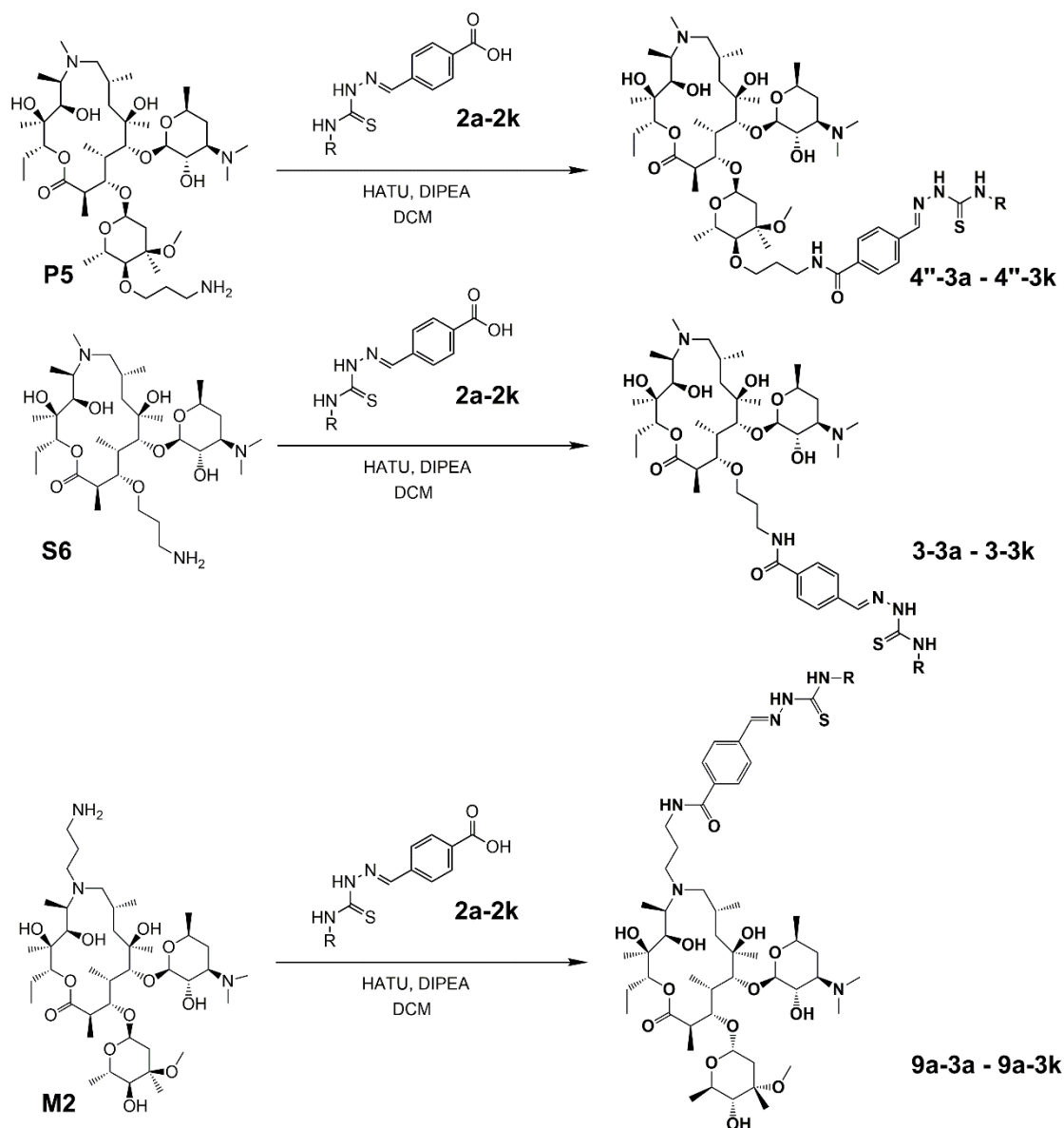


Shema 3. Priprava 9a-aminopropil-azitromicina (M2)

Priprava makrozona iz prekursora sastoji se od tri koraka. Prvi korak uključuje reakciju između izotiocijanata i hidrazin monohidrata pri čemu nastaje tiosemikarbazid. Drugi korak uključuje reakciju tiosemikarbazida i 4-formilbenzojeve kiseline te nastajanje tiosemikarbazona (shema 4). Treći korak obuhvaća reakciju amidacije i nastajanje makrozona (shema 5.).



**Shema 4.** Priprava tiosemikarbazona



**Shema 5.** Priprava makrozona – ciljnih molekula doktorske disertacije

Spojevi su pročišćeni kromatografskim metodama prema uvjetima opisanim u eksperimentalnom dijelu. Za potvrdu uspješnosti sinteze i za strukturnu karakterizaciju novopripremljenih spojeva korištena je spektroskopija NMR i spektrometrija masa. Pripadajući reprezentativni spektri NMR i MS nalaze se u dodatku.

Kao što je već opisano u poglavlju 2.2, prijašnja istraživanja<sup>1</sup> su pokazala kako neki makrolidi s izmijenjenim položajem 4'', 9a i 3 posjeduju jednak ili bolji biološki profil u odnosu na standardne antibiotike (azitromicin, telitromicin, klaritoromicin, eritromicin). Sinergistički efekt antimikrobnog djelovanja pokušavao se postići konjugacijom azitromicina i drugih bioaktivnih komponenti. Neki od primjera su makroloni<sup>33,37</sup>, konjugati makrolida i kinolona te

konjugati makrolida i peptida<sup>39,52</sup>. Varirana je duljina i fleksibilnost lanca na različitim položajima azitromicina te su pripremljeni biciklički derivati azitromicina.<sup>1,31</sup> Nadalje, pripremom dekladinozilnih derivata makrolida, primjerice ketolida, pokazano je da kladinoza ne igra ključnu ulogu u biološkoj aktivnosti makrolida.<sup>1,3,7</sup>

U sklopu ovog istraživanja tiosemikarbazoni su povezani amidnom vezom preko poveznice na 4", 9a i 3 položaj azitromicina. Za poveznicu je odabran lanac  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$  jer su dosadašnja istraživanja<sup>1,33,37</sup> pokazala da takvi duži fleksibilni alkilni lanci pogoduju smještanju makrolida u aktivno mjesto ribosoma. Nadalje, uvođenjem dušika povećava se broj pozitivno nabijenih centara te bi se dodatnim uvođenjem aromatskih supstituenata trebala poboljšati lipofilna svojstva makrozona u odnosu na svojstva azitromicina.

Poznato je da se između makrolida i ribosoma uspostavljaju vodikove veze te hidrofobne interakcije.<sup>1,3</sup> Prema rezultatima molekuskog modeliranja, utvrđeno je da se uvođenjem odabranih susptituenata R (shema 4.) u makrolidni skelet povećava broj  $\pi$ - $\pi$  interakcija i vodikovih veza. Uspostavljanje dodatnih interakcija dovodi do jačeg vezanja što bi trebalo rezultirati povećanjem biološke aktivnosti.

Prilikom dizajna makrozona vodilo se računa o pažljivom odabiru strukture i duljine bočnog lanca te mjesta supstitucije. Naime, pokazano je da neki strukturni motivi izazivaju teže nuspojave, kao što je to slučaj kod telitromicina. Smatra se da je velika sličnost strukture nikotina i bočnog ogranka telitromicina na položaju C11 i C12 (slika 2.) odgovorna za razvoj neželjenih simptoma. Telitromicin uzorkuje inhibiciju nikotinskih acetilkolinških receptora što dovodi do nuspojava, tzv. Ketek simptoma (gastrointestinalne tegobe, sinkopa, hepatotoksičnost, slabljenje vida).<sup>4,102</sup>

Razvoj novog lijeka dugotrajan je i zahtjevan proces koji započinje dizajnom i otkrićem novih spojeva nakon čega slijede preklinička i klinička istraživanja (4 faze). Proces može potrajati više od deset godina te iziskuje velika financijska sredstva. Istraživanje u sklopu ove disertacije usmjereno je na dizajn novih derivata makrolida i preeliminarna istraživanja *in vitro*. U obzir treba uzeti činjenicu da aktivnost *in vivo* može bitno odstupati od aktivnosti *in vitro*. Prije testiranja *in vivo* potrebno je prikupiti podatke o toksičnosti, farmakokinetici i farmakodinamici novog potencijalnog lijeka.<sup>103</sup>

## 4.2. Biološka aktivnost makrozona

Svi novopripremljeni derivati azitromicina testirani su na panelu bakterija karakterističnim za makrolide. Istražena je i uspoređena aktivnost *in vitro* na susceptibilne i rezistentne Gram-pozitivne (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*) i Gram-negativne bakterije (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis*) te na eukariotski organizam *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* koristi se kao potencijalna indikacija citotoksičnosti. Određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) pomoću standardnog mikrodilucijskog testa. Dobivene vrijednosti MIK uspoređene su s vrijednostima MIK antibiotika azitromicina (tablice 8.-10.). Spojevi su testirani u rasponu masenih koncentracija od 0,125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

U tablicama 8., 9. i 10. za svaki je rezistentni soj naznačen mehanizam rezistencije: efluks rezistencija na makrolide (M), inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine (iMLS), konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine (cMLS). Bakterijski sojevi osjetljivi na eritromicin naznačeni su kraticom eryS.

Prekursori makrozona i makrozoni pokazali su dobru aktivnost na Gram-pozitivne bakterije te slabiju aktivnost na Gram-negativne bakterije. Među Gram-negativnim bakterijama značajnija aktivnost postignuta je jedino na sojeve *M. catarrhalis* (MIK = 2-4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i *E. coli* (MIK = 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Usporedbom aktivnosti različitih klasa makrozona opažene su znatne razlike, što ukazuje na činjenicu da mjesto supstitucije uvelike utječe na biološku aktivnost. Općenito, 4"-makrozoni pokazali su veću antibakterijsku aktivnost u odnosu na 9a-makrozone i 3-makrozone.

Za pripravljene spojeve iz **klase I** (4"-makrozoni) uočava se dobra aktivnost na neke susceptibilne i rezistentne sojeve *S. aureus* i *S. pneumoniae* te na soj *E. faecalis*. Kao što je prikazano u tablici, pojedini 4"-makrozoni pokazali su najmanje osam puta veću aktivnost (MIK = 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) u usporedbi s azitromicinom (MIK > 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) na konstitutivno rezistentni i efluks rezistentni soj *S. aureus*. Nadalje, u odnosu na azitromicin ističe se četiri do osam puta veća aktivnost na *E. faecalis* (MIK = 2-4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i efluks rezistentni soj *S. pneumoniae* (MIK = 1-2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), te najmanje dva puta veća aktivnost na konstitutivno rezistentni soj *S. pneumoniae* (MIK = 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Isto tako je zabilježena najmanje dva puta veća aktivnost prekursora 4" makrozona na soj *E. coli* (MIK = 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Slične aktivnosti kao i kod azitromicina postignute su na susceptibilne sojeve *S. pyogenes*, *S. aureus* i *S. pneumoniae*. Ustanovljeno je da variranjem supstituenata R unutar klase 4"-makrozona ne dolazi do

značajnije promjene cjelokupne aktivnosti. Primjerice, derivat **4''-3e** aktivan je na efluks rezistentni soj *S. aureus* (MIK = 8 µg mL<sup>-1</sup>), ali nije aktivan na konstitutivno rezistentan *S. aureus* (MIK > 64 µg mL<sup>-1</sup>).

Makrozoni **klase II** (3-makrozoni) posjeduju jednaku ili slabiju aktivnost od azitromicina na ispitani panel bakterija. Bolja aktivnost postignuta je jedino na efluks rezistentne sojeve *S. aureus* i *S. pyogenes*, te na inducibilno rezistentni soj *S. aureus*.

Spojevi iz **klase III** (9a-makrozoni) pokazali su gotovo istu antibakterijsku aktivnost na susceptibilne sojeve *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* kao i azitromicin. Međutim, općenito su pokazali slabu ili nikakvu aktivnost na rezistentne sojeve *S. pneumoniae* i *S. aureus*. Jednaka ili slabija aktivnost opažena je za sojeve *E. faecalis* i susceptibilni *S. aureus*. Ipak, može se istaknuti bolja aktivnost nekih 9a-makrozona (MIK = 32 µg mL<sup>-1</sup>) na *E. coli* u odnosu na aktivnost azitromicina (MIK > 64 µg mL<sup>-1</sup>).

Pretpostavlja se da tiosemikarbazoni dio makrozona stvara dodatne interakcije s ribosomom i time pogoduje vezanju makrozona u aktivno mjesto. Jače vezanje dovodi do poboljšanja biološke aktivnosti. Ipak, dolazi do razlike u aktivnosti između različitih sojeva bakterija što bi se moglo objasniti varijacijama u strukturnoj građi ribosoma. Primjerice, proučavanjem različitih kompleksa makrolid-ribosom pomoću difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu uočene su male razlike u vezanju makrolida ovisno o proučavanoj bakteriji. Međutim, još nije u potpunosti razjašnjeno mogu li se te razlike pripisati različitim postupcima kristalizacije sustava i interpretaciji rezultata ili specifičnosti bakterijskog soja.<sup>3, 66, 104, 105</sup>

Usporedbom rezultata biološkog testiranja makrozona s bioaktivnosti dosadašnjih derivata makrolida<sup>1</sup> ustanovljeno je da općenito 4''-derivati posjeduju najbolji biološki profil. U literaturi<sup>1</sup> se ističe aktivnost 4''-derivata makrolida na sojeve *S. aureus*, *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* koja je slična ili bolja od aktivnosti istraživanih 4''-makrozona. Međutim, za razliku od njih, makrozoni su pokazali dosta slabiju aktivnost na Gram-negativne bakterije. 3- i 9a-makrozoni posjeduju umjerenu antibakterijsku aktivnost te posebno ne konkuriraju do sada istraženim derivatima makrolida. Prema literaturi<sup>1</sup>, 9a-derivati makrolida se više ističu po antimalarijskoj aktivnosti i citotoksičnosti, nego po antibakterijskoj aktivnosti.

Zbog česte i nekontrolirane uporabe antibiotika dolazi do smanjenja njihove djelotvornosti i do pojave sve većeg broja rezistentnih patogena. Kao antibiotici mogu poslužiti prirodni spojevi izolirani iz mikroorganizama, njihovi polusintetski derivati ili potpuno nove sintetske molekule.<sup>106</sup> Postavlja se pitanje u kojem smjeru je najbolje ići prilikom istraživanja novih



potencijalnih antibiotika. Prednost prirodnih spojeva je to što posjeduju izvrsna farmakokinetička svojstva. Njihova strukturalna svojstva i interakcije s biološkim metaama optimirani su evolucijskim procesom. No, mikroorganizmi koji proizvode antibiotike žive u istom okolišu kao i organizmi koji razvijaju rezistenciju na te spojeve. Stoga postoji velika vjerojatnost da će doći do razvoja rezistencije na svaki prirodni antibiotik u kliničkoj primjeni. U nekim slučajevima pokazano je da bakterije mogu relativno brzo razviti otpornost na srodne spojeve, odnosno polusintetske derivate prirodnih antibiotika.<sup>107</sup> S druge strane, razvojem potpuno novih sintetskih spojeva raste mogućnost za prevladavanje bakterijske otpornosti. Međutim, nedostatak je nemogućnost predviđanja bioloških svojstava i mehanizma djelovanja takvih spojeva.<sup>1</sup>

**Tablica 8.** Antibakterijska aktivnost *in vitro* za 4''-makrozone i prekursor P5

Makrozon	MIK (µg/mL)										P5	Azitromicin
	4''-3a	4''-3b	4''-3d	4''-3e	4''-3f	4''-3g	4''-3h	4''-3i	4''-3j	4''-3k		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 eryS	4	8	8	4	4	8	4	32	4	8	16	2
<i>S. aureus</i> B0330 (cMLS)	16	>64	64	>64	32	16	16	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S. aureus</i> B0331 (M)	>64	16	16	8	16	16	64	64	8	32	>64	>64
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	-	<0,125	1	<0,125	0,5	1	-	1	<0,125	<0,125	-	<0,125
<i>S. pneumoniae</i> B0326 (M)	8	1	8	2	32	64	8	64	2	2	16	8
<i>S. pneumoniae</i> B0633 (cMLS)	64	>64	64	32	32	>64	32	>64	64	>64	>64	>64
<i>S. pneumoniae</i> B0652 eryS	<0,125	-	-	-	-	-	<0,125	-	-	-	0,5	<0,125
<i>S. pyogenes</i> B0542 eryS	2	0,5	4	1	4	4	2	2	0,5	0,5	2	<0,125
<i>S. pyogenes</i> B0545 (M)	16	-	-	-	-	-	32	-	-	-	32	8
<i>S. pyogenes</i> B0544 (cMLS)	64	-	-	-	-	-	64	-	-	-	>64	>64
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2	4	2	2	4	4	2	16	1	2	64	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	64	>64	>64	>64	64	64	>64	64	>64	32	>64
<i>K. pneumoanie</i> ATCC 700603	-	>64	>64	>64	>64	>64	-	>64	>64	>64	-	32
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	-	>64	>64	>64	>64	>64	-	>64	>64	>64	-	8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	64	>64	>64	>64	>64	-	>64	>64	>64	-	64
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	4	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	<0,125
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64

**Tablica 9.** Antibakterijska aktivnost *in vitro* za 3-makrozone i prekursor S6

Makrozon	MIK (µg/mL)										Azitromicin
	3-3a	3-3d	3-3e	3-3f	3-3g	3-3h	3-3i	3-3j	3-3k	S6	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 eryS	8	>64	32	16	8	32	>64	16	64	>64	2
<i>S. aureus</i> B0330 (cMLS)	>64	>64	>64	32	32	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S. aureus</i> B0331 (M)	64	>64	64	32	16	64	>64	64	>64	>64	>64
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,125
<i>S. pneumoniae</i> B0326 (M)	16	64	32	8	8	32	>64	16	32	64	8
<i>S. pneumoniae</i> B0633 (cMLS)	>64	>64	>64	64	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S. pneumoniae</i> B0652 eryS	1	8	2	1	8	4	16	2	2	16	<0,125
<i>S. pyogenes</i> B0542 eryS	4	32	8	1	2	16	32	4	8	32	<0,125
<i>S. pyogenes</i> B0545 (M)	16	>64	16	≤4	8	32	64	16	32	64	8
<i>S. pyogenes</i> B0544 (cMLS)	>64	>64	>64	32	32	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	16	>64	32	16	8	16	>64	32	>64	>64	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64
<i>K. pneumoanie</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	4	32	8	2	4	16	64	8	8	2	<0,125
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

**Tablica 10.** Antibakterijska aktivnost *in vitro* za 9a-makrozone i prekursor M2

Makrozon	MIK (µg/mL)										M2	Azitromicin
	9a-3a	9a -3c	9a-3d	9a -3e	9a -3f	9a-3g	9a-3h	9a -3i	9a -3j	9a -3k		
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 eryS	8	64	16	8	4	64	8	16	>64	16	8	2
<i>S. aureus</i> B0330 (cMLS)	>64	>64	>64	>64	>64	32	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S. aureus</i> B0331 (M)	>64	>64	>64	>64	>64	32	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	0,25	0,5	0,25	<0,125	<0,125	<0,125	-	<0,125
<i>S. pneumoniae</i> B0326 (M)	64	>64	>64	>64	>64	>64	64	>64	64	64	64	8
<i>S. pneumoniae</i> B0633 (cMLS)	64	>64	>64	>64	>64	64	64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>S. pneumoniae</i> B0652 eryS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	<0,125
<i>S. pyogenes</i> B0542 eryS	0,5	0,5	0,5	<0,125	2	4	0,5	1	0,25	<0,125	0,5	<0,125
<i>S. pyogenes</i> B0545 (M)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	8
<i>S. pyogenes</i> B0544 (cMLS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>64	>64
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	16	>64	32	32	16	8	16	32	64	>64	64	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	64	>64	>64	32	64	64	64	64	>64	64	32	>64
<i>K. pneumoanie</i> ATCC 700603	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	-	32
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	-	8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	-	64
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	<0,125
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64

### 4.3. Proučavanje konformacije molekule spojeva i interakcija s biološkim metama

Prilikom dizajna novog potencijalnog lijeka važno je istražiti konformaciju molekule te specifične interakcije male organske molekule i proteina. Rezultati istraživanja mogu poslužiti za poboljšavanje farmakokinetičkih svojstava i bioaktivnosti novog lijeka. Isto tako, poznato je da konformacija molekule spojeva utječe na transport i sposobnost akumulacije u stanicama.<sup>1</sup> Stoga je za razumijevanje cjelokupnog biološkog profila važno istražiti sklonost vezanja molekule, njenu konformaciju te interakcije s biološkim metama.

U sklopu ove disertacije, nakon pripreve i karakterizacije spojeva provedeno je istraživanje vezanja na biološke mete. Budući da je ribosom primarna meta djelovanja antibiotika, istraživanje je prije svega usmjereno na proučavanje vezanja spojeva na ribosom izoliran iz bakterije *E. coli*. U tu svrhu korištena je spektroskopija NMR, fluorescencijska spektroskopija te cirkularni dikroizam. Kao dio preeliminarnog istraživanja, pomoću fluorescencijske spektroskopije i cirkularnog dikroizma dodatno je proučeno vezanje spojeva na DNA, RNA te protein BSA.

#### 4.3.1. Spektroskopija NMR

Konformacija molekule spojeva u slobodnom i vezanom stanju određena je pomoću tehnika NMR NOESY i ROESY. Za detekciju vezanja molekula na ribosom i određivanja dijelova molekule koji sudjeluju u vezanju na ribosom korištene su tehnike trNOESY, STD i WaterLOGSY. Spektroskopijom NMR proučeno je vezanje prekursora makrozona (**P5**, **S6** i **M2**), dok proučavanje vezanja makrozona navedenom tehnikom nije bilo moguće zbog nedovoljne topljivosti u vodenom mediju i male osjetljivosti navedene tehnike. Za izvedbu eksperimenata NMR korišten je deuterirani 70S ribosom bakterije *E. coli*. Eksperimenti su provedeni u velikom suvišku liganda kako signali receptora ne bi bili vidljivi u spektru. Međutim, u prisutnosti velikog suviška liganda može doći do pojačanja zasićenja slobodnih liganada zbog toga što je proces relaksacije malih molekula sporiji od prijenosa zasićenja.<sup>3,71,72</sup> U sklopu ove disertacije omjer makrolid : ribosom iznosio je 3500 : 1 budući da se prema prijašnjim istraživanjima<sup>15</sup> takav omjer pokazao optimalnim.

Svi eksperimenti NMR izvedeni su pri sobnoj temperaturi. Najprije su assignirani svi atomi ugljika i vodika u tris-*d*<sub>11</sub> puferu (*c* = 1 mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,4) i D<sub>2</sub>O (Dodatak, tablica D1.). Potom

su provedeni eksperimenti NOESY u vodenom i organskom otapalu te je procijenjena konformacija molekule prekursora makrozona (**P5**, **S6** i **M2**) u slobodnom stanju.

Prema dosadašnjim istraživanjima<sup>3,12,13,15,16</sup> pokazano je da molekule petnaesteročlanih makrolida zauzimaju tri osnovne konformacije u otopini, a to su uvrnuta (engl. *folded-in*), izvrnuta (engl. *folded-out*) i tzv. *3-endo-folded-out*. Određivanjem vrijednosti vicinalne konstante sprege  ${}^3J_{H_2,H_3}$  te očitanjem kontakata NOE može se utvrditi o kojoj je konformaciji riječ. Za izvrnutu konformaciju karakteristični su parametri: homonuklearna konstanta sprežanja  ${}^3J_{H_2,H_3} \approx 10$  Hz i kontakti NOE H4-H11, H2-H4, H5-H6Me. Na uvrnutu konformaciju upućuju vrijednosti  ${}^3J_{H_2,H_3} \approx 2-3$  Hz te kontakti NOE H3-H11, H4-H6Me i H3-H8. Konformacija *3-endo-folded-out* razlikuje se od izvrnute konformacije samo po manjoj vrijednosti konstante sprege  ${}^3J_{H_2,H_3} \approx 4-5$  Hz, dok su kontakti NOE identični. Treba napomenuti kako udio određenog konformera u otopini ovisi o temperaturi i polarnosti otapala.

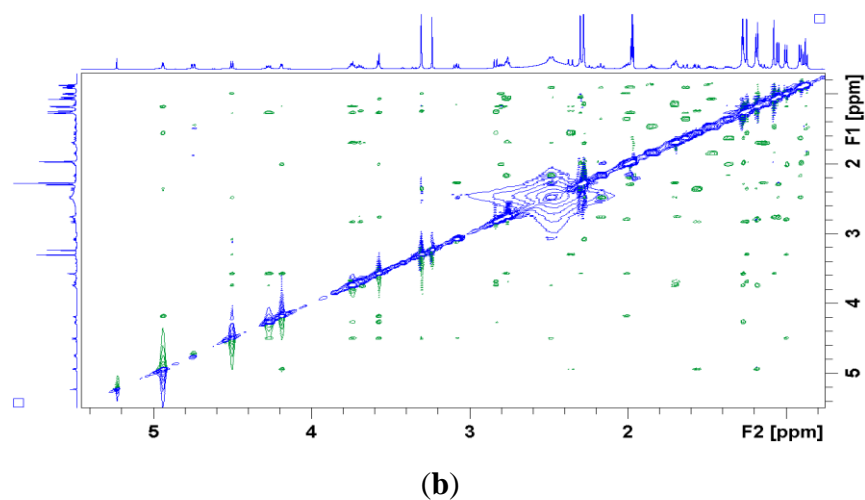
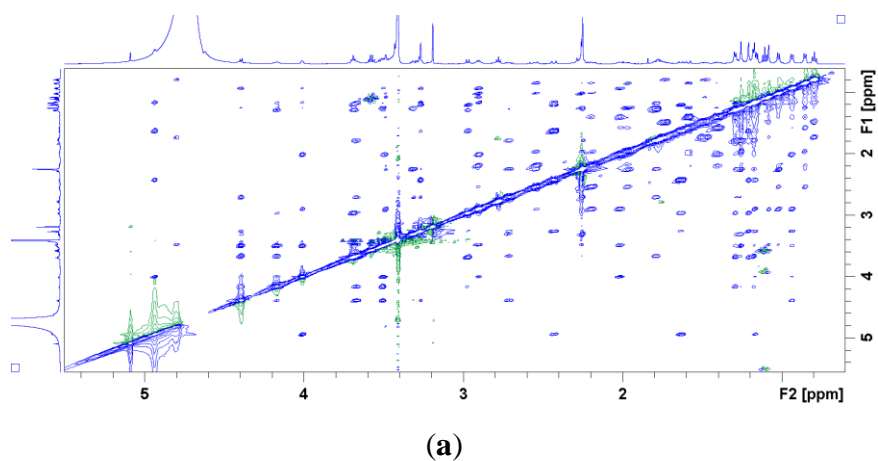
Efekt NOE na kojem se temelji tehnika NOESY ovisi o korelacijskom vremenu, a na korelacijsko vrijeme utječe masa molekule i viskoznost otapala.<sup>81</sup> Za prekursor klase 3-makrozona (**S6**) vrijednost efekta NOE u vodenom otapalu je blizu nule, stoga je dobiven spektar NOESY u kojem većina izvandijagonalnih signala izostaje. Iz tog razloga snimljen je i interpretiran spektar ROESY. Prema izmjerenim vrijednostima vicinalne konstante sprege  ${}^3J_{H_2,H_3}$  (tablica 11.) i očitanjem kontakata NOE, odnosno ROE (tablica 12.) utvrđeno je da u slobodnom stanju prekursor 3-dekladinofil-O-(3-aminopropil)azitromicin (**S6**) zauzima izvrnutu konformaciju, dok 4"-O-(3-aminopropil)azitromicin (**P5**) i 9a-aminopropil-azitromicin (**M2**) zauzimaju konformaciju *3-endo-folded-out*.<sup>108</sup> Konformacije molekule spojeva se u organskom i vodenom otapalu ne razlikuju. Na slici 59. prikazani su reprezentativni spektri NOESY za spoj **P5** u tris puferu i acetonitrilu, dok se spektri NOESY za preostale spojeve nalaze u Dodatku (slike D9 i D10.).

**Tablica 11.** Vrijednosti vicinalne konstante sprege  ${}^3J_{H_2,H_3}$  za prekursore makrozona **M2**, **S6** i **P5** u slobodnom stanju

Spoj	${}^3J_{H_2,H_3}$ / Hz	
	Acetonitril	Tris pufer
<b>M2</b>	6,60	6,43
<b>S6</b>	10,14	9,88
<b>P5</b>	5,39	5,11

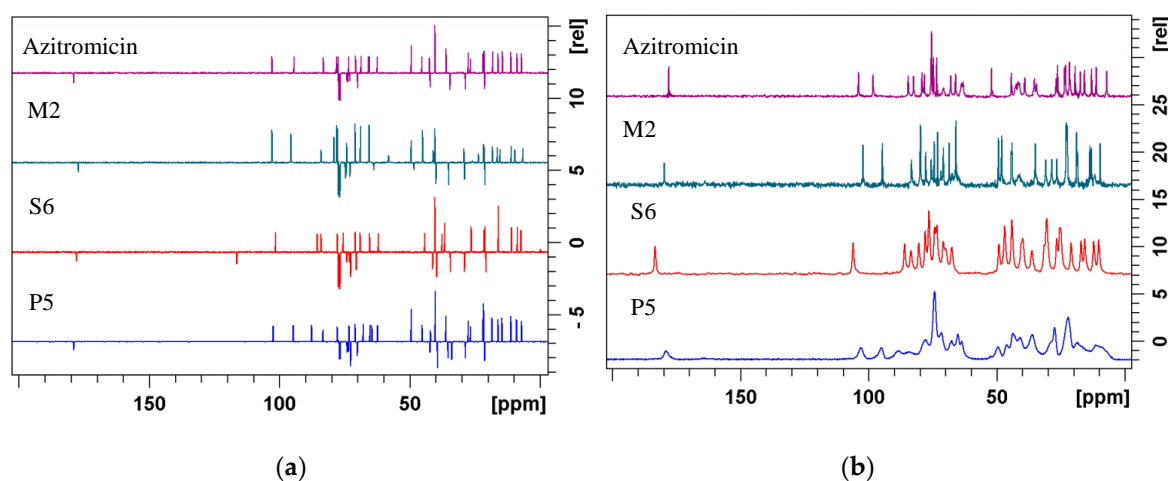
**Tablica 12.** Kontakti NOE / ROE prekursora makrozona **M2**, **S6** i **P5** u slobodnom stanju u vodenom i organskom otapalu

NOE / ROE kontakt	Spoj					
	M2		S6		P5	
	Acetonitril	Tris pufer	Acetonitril	Tris pufer	Acetonitril	Tris pufer
H3-H11	–	–	–	–	–	–
H4-H11	+	+	+	+	+	+
H2-H4	+	+	+	+	+	+
H4-H6Me	–	–	–	–	–	–
H3-H8	–	–	–	–	–	–
H5-H6Me	+	+	+	+	+	+
H8-H11	–	–	–	–	–	–



**Slika 59.** Spektri NOESY NMR 4''-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**P5**) u (a) tris puferu- $d_{11}$  i (b) acetonitrilu- $d_3$  pri 600 MHz i 25 °C

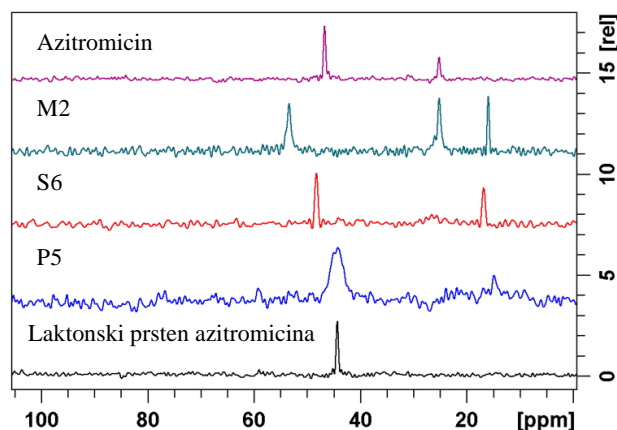
Konformacija molekule spojeva u čvrstom stanju procijenjena je analizom spektara  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  CPMAS. Usporedbom spektara  $^{13}\text{C}$  u otopini i čvrstom stanju (slika 60.) utvrđeno je da se kemijski pomaci ugljika preklapaju, odnosno može se zaključiti da molekule prekursora makrozona (**M2**, **S6** i **P5**) zauzimaju sličnu konformaciju u čvrstom i otopinskom stanju. Širenje linija signala u spektru  $^{13}\text{C}$  CPMAS spoja **P5** ukazuje na njegovu amorfnost, dok su ostali prekursori prisutni u kristaliničnoj formi.



**Slika 60.** Spektri  $^{13}\text{C}$  (a) DEPTQ NMR u otopini i (b) CPMAS NMR u čvrstom stanju azitromicina, 9a-aminopropil-azitromicina (**M2**), 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**S6**) i 4''-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**P5**) pri 400 MHz<sup>108</sup>

Kemijski pomaci  $^{15}\text{N}$  (slika 61.) azitromicina, prekursora i laktonskog prstena azitromicina također upućuju na isti zaključak. Signali u području od 45 do 50 ppm odgovaraju jezgri  $^{15}\text{N}$  u desozaminu, signali pri 25 ppm odgovaraju  $^{15}\text{N}$  na položaju 9a, a signali pri 15 ppm mogu se pripisati  $^{15}\text{N}$  u aminopropilnom lancu.

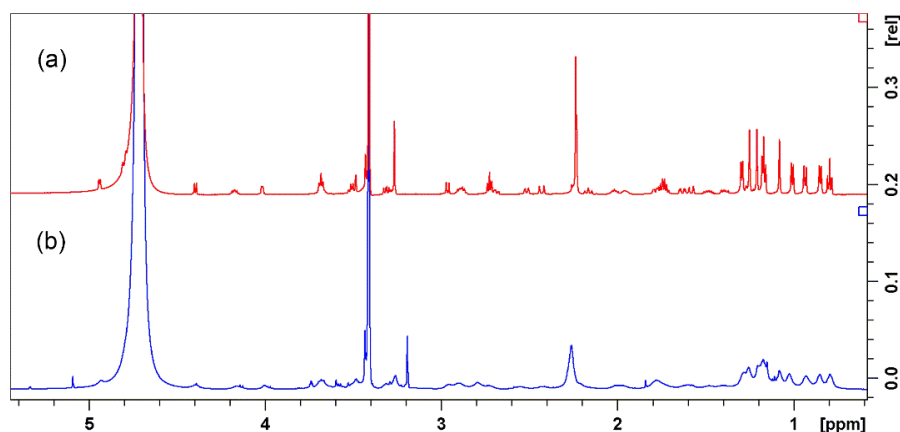




**Slika 61.** Spektri  $^{15}\text{N}$  CPMAS NMR u čvrstom stanju azitromicina, 9a-aminopropil-azitromicina (**M2**), 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**S6**) i 4''-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**P5**) i laktonskog prstena azitromicina pri 400 MHz<sup>108</sup>

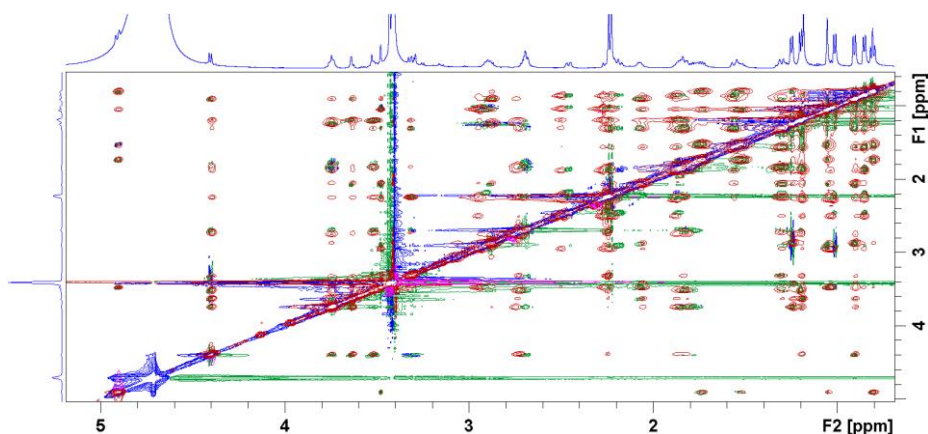
Zatim su snimljeni i analizirani spektri  $^1\text{H}$  i trNOESY svih triju prekursora makrozona u svrhu određivanja konformacije u vezanom stanju. Analizom spektara dobile su se informacije o vezanju prekursora na 70S ribosom izoliran iz bakterije *E. coli*. Signali ribosoma nisu vidljivi u spektrima zbog njegove niske koncentracije. Za snimanje spektra trNOESY odabrano je vrijeme miješanja od 75 ms po uzoru na prethodna istraživanja<sup>82</sup> sustava makrolid-ribosom. Vrijeme miješanja tijekom kojeg dolazi do stvaranja efekta NOE ne smije biti prekratko kako bi došlo do učinkovitog prijenosa magnetizacije s proteina na ligand. Ukoliko je vrijeme miješanja predugo može doći do pojave spinske difuzije, odnosno do prijenosa magnetizacije kroz veze i pojave viška signala, što dovodi do netočne procijene konformacije. Kod velikih sustava dolazi do brzog stvaranja efekta NOE, stoga je vrijeme miješanja kraće.<sup>72</sup>

Usporedbom spektara  $^1\text{H}$  prekursora **P5** (slika 62.) prije i nakon dodatka ribosoma opaža se širenje linija signala što ukazuje na nastanak kompleksa prekursor-ribosom. Do navedenih promjena dolazi zbog toga što kompleks ligand-receptor posjeduje znatno kraće relaksacijsko vrijeme od samog liganda. Širenje signala u spektru  $^1\text{H}$  uočeno je i za preostala dva prekursora.

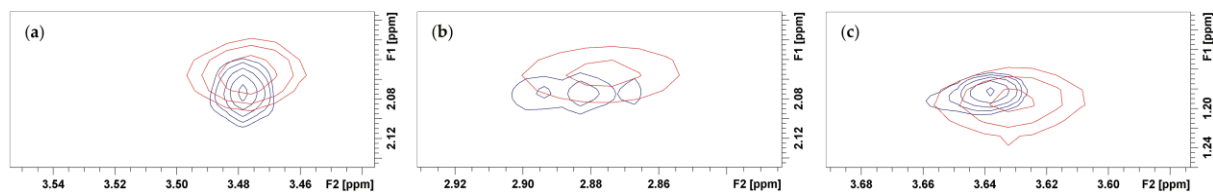


**Slika 62.** Spektri  $^1\text{H}$  NMR 4''-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**P5**) (a) prije i (b) nakon dodatka 70S ribosoma *E. coli* u tris puferu- $d_{11}$  pri 600 MHz i 25 °C

Daljnjom usporedbom rezultata eksperimenata trNOESY, NOESY i ROESY pokazano je da vezanjem na ribosom ne dolazi do značajnih strukturnih promjena prekursora (**M2**, **S6**, **P5**). Preklapanjem spektara (slika 63.) ustanovljeno je da su ključni izvandijagonalni signali (H4-H11, H2-H4, H5-H6Me) prisutni u slobodnom i vezanom stanju (slika 64.). Može se zaključiti da u vezanom stanju 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**S6**) zauzima izvrnutu konformaciju.



**Slika 63.** Preklapljeni spektri ROESY (plavi i zeleni signali) i trNOESY (crveni i ružičasti signali) 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**S6**) u tris puferu- $d_{11}$  pri 600 MHz i 25 °C



**Slika 64.** Bitni kontakti NOE za određivanje konformacije molekula spoja **S6** u slobodnom (plavi signali) i vezanom (crveni signali) stanju: (a) H4-H11; (b) H2-H4; (c) H5-H6Me<sup>108</sup>

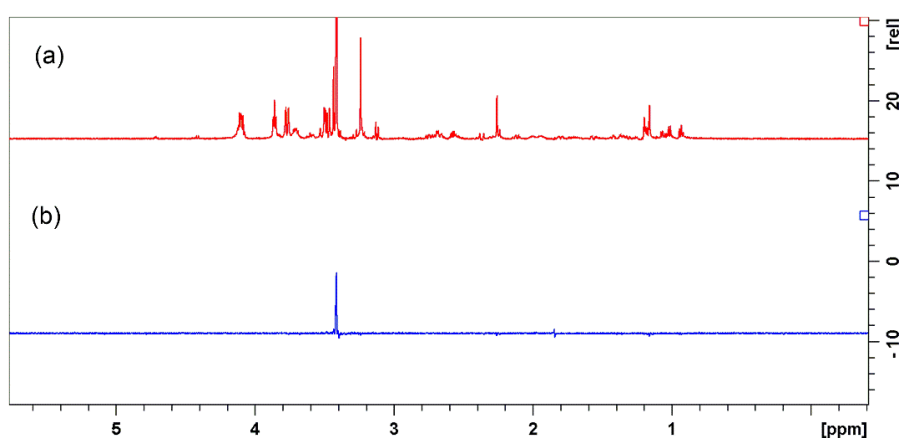
Karakteristični NOE kontakti prema kojima su određene konformacije molekula prekursora prikazani se u tablici 13. Prekursori **P5** i **M2** zauzimaju konformaciju *3-endo-folded-out*. Njihovi trNOESY spektri nalaze se u Dodatku (slike D11 i D12.). Očitanje vrijednosti homonuklearnih sprega nije bilo moguće zbog širenja linija signala, što je posljedica vezanja spojeva na ribosom.

**Tablica 13.** Kontakti NOE / ROE prekursora makrozona **M2**, **S6** i **P5** u vezanom stanju u tris puferu-*d*<sub>11</sub>

NOE / ROE kontakt	Spoj		
	M2	S6	P5
	<i>Tris pufer</i>		
H3-H11	–	–	–
H4-H11	+	+	+
H2-H4	+	+	+
H4-H6Me	–	–	–
H3-H8	–	–	–
H5-H6Me	+	+	+
H8-H11	–	–	–

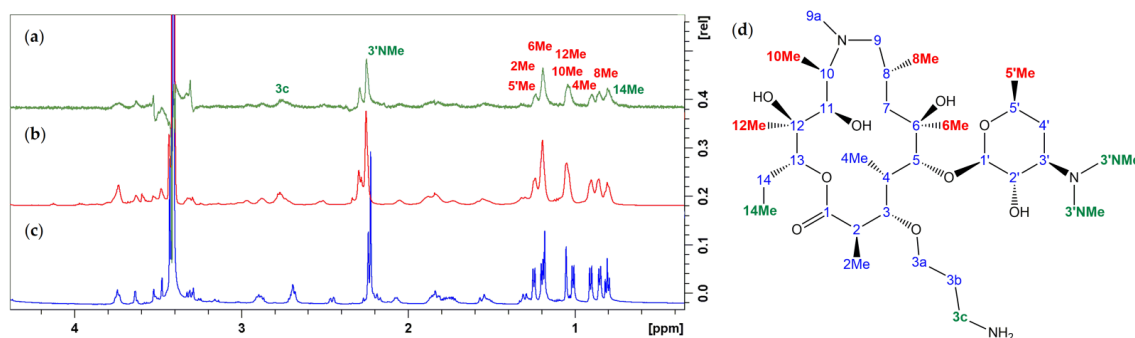
Epitopi vezanja, odnosno atomi prekursora makrozona koji su u bliskom kontaktu s ribosomom identificirani su pomoću tehnike STD NMR. Za odabir najprikladnijih uvjeta eksperimenta STD varirana je vrsta pulsnoeg slijeda, vrijednost vremena zasićenja, frekvencija snimanja referentnog spektra (engl. *off resonance*) te frekvencija snimanja spektra zasićenja (engl. *on resonance*). Za sve spojeve primijenjena je frekvencija izvan zasićenja pri 50 ppm. Prilikom snimanja spektra zasićenja selektivno se pobuđuje isključivo receptor. Optimalna

vrijednost frekvencije zasićenja odabrana je na način da se za svaki spoj proveo eksperiment STD bez dodatka ribosoma. Ukoliko je vrijednost frekvencije optimalna, tijekom snimanjem spektra zasićenja ne bi smjelo doći do pobude signala liganda. Odnosno u spektru razlike STD bi trebali izostati svi signali. Na slici 65. prikazan je primjer eksperimenata STD prije dodatka ribosoma. Odabrane su sljedeće vrijednosti frekvencije zasićenja: 8 ppm (za spojeve **M2** i **S6**) i 11 ppm (za spoj **P5**). Preostali parametri su podešeni po uzoru na prijašnja istraživanja<sup>15</sup> i opisani su u eksperimentalnom dijelu.



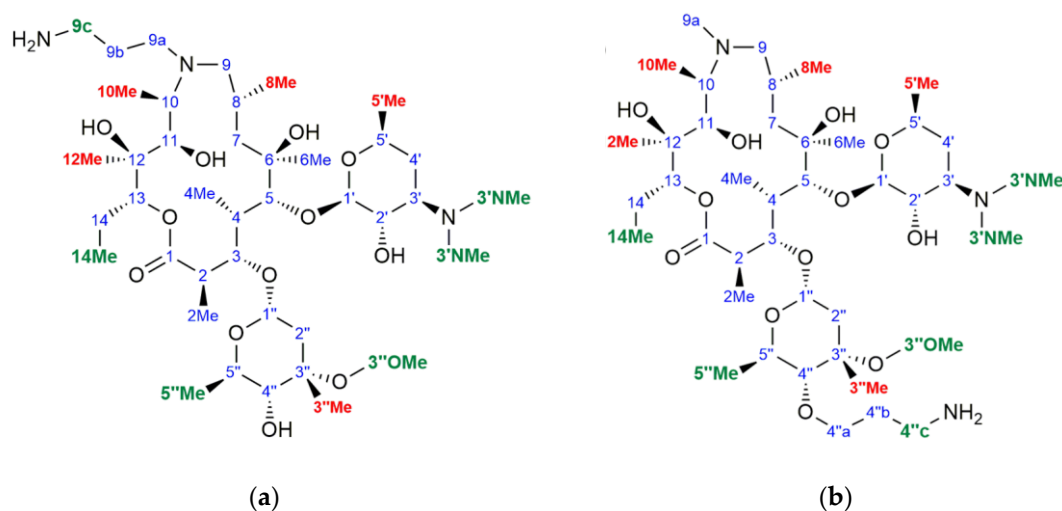
**Slika 65.** Spektar STD spoja **M2** prije dodatka 70S ribosoma *E. coli* pri (a)  $-0,5$  ppm i (b) 8 ppm pri 600 MHz i 25 °C

Najveći prijenos magnetizacije, odnosno najjače pojačanje intenziteta u spektru STD dožive atomi liganda koji su prostorno najbliže ribosomu. Analizom spektra STD za spoj **S6** ustanovljeno je da metilne skupine desozamina (3'NMe, 5'Me) i aglikonskog prstena (6Me, 8Me, 10Me, 12Me, 14Me) sudjeluju u vezanju na ribosom. Ujedno je pojačanje opaženo za metilensku skupinu (3c) aminopropilnog lanca. Procijenjeni epitopi vezanja za spoj **S6** prikazani su na slici 66. zelenom (bliske skupine) i crvenom bojom (udaljenije skupine).<sup>108</sup> Zbog preklapanja signala i širenja linija nije bilo moguće pouzdano odrediti postotak STD pojačanja metilnih i metilenskih skupina.



**Slika 66.** (a) Spektar razlike STD za spoj **S6** nakon dodatka ribosoma; (b) referentni spektar STD nakon dodatka ribosoma; (c) spektar  $^1\text{H}$  prije dodatka ribosoma; (d) strukturna formula molekule spoja **S6**, brojanje atoma i epitopi vezanja (zeleno i crveno obojeni)<sup>108</sup>

Slični rezultati eksperimenta STD dobiveni su i za prekursore 4''-O-(3-aminopropil)azitromicin (**P5**) te 9a-aminopropil-azitromicin (**M2**). Dodatno je opaženo pojačanje signala metilnih skupina kladinoze (3''Me, 5''Me). Na slici 67. prikazani su njihovi epitopi vezanja. Zelenom bojom su označene skupine koje su ostvarile najbliži kontakt, a crvenom bojom skupine koje su nešto udaljenije od ribosoma. Pripadajući spektri STD nalaze se u Dodatku (slike D13. i D14.).



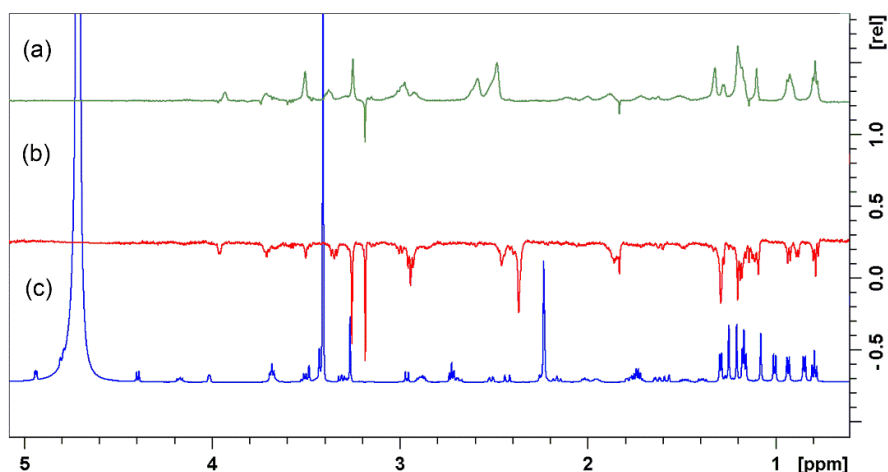
**Slika 67.** Strukturne formule molekula 9a-aminopropil-azitromicina **M2** (a) i 4''-O-(3-aminopropil)azitromicina **P5** (b), brojanje atoma i epitopi vezanja

Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima<sup>3</sup> pokazano je da su epitopi vezanja makrolida i njihovih derivata poprilično slični. Ključnu ulogu u vezanju makrolida na ribosom ima šećer desozamin. Najprije se uspostavljaju hidrofobne interakcije u kojima sudjeluju metilne i metilenske skupine aglikonskog prstena i kladinoze, a potom se stvaraju vodikove veze između skupina 2'-OH i 3'NMe<sub>2</sub> i ribosoma. U sklopu ovog istraživanja nije bilo moguće detektirati pojačanje signala 2'-OH u spektru STD zbog izmjene protona s deuterijem.

Pretpostavlja se kako bi jačem vezanju prekursora trebale doprinijeti dodatne interakcije metilenskih skupina aminopropilnog lanca s ribosomom. Indikativno je i da amino-skupina aminopropilnog lanca sudjeluje u vezanju, međutim signal protona izostaje u spektru STD zbog izmjene s deuterijem iz otapala. Smatra se da jače vezanje derivata makrolida pozitivno utječe na biološki profil<sup>1</sup>, što je i vidljivo iz rezultata biološkog testiranja. Naime, prekursori makrozona pokazali su najmanje dva puta veću aktivnost *in vitro* na soj *E. coli* u odnosu na azitromicin.

Osim tehnike STD, za dodatnu potvrdu vezanja i mape epitopa preporučljivo je primijeniti tehniku WaterLOGSY.<sup>79</sup> U eksperimentu waterLOGSY selektivno se pobuđuje voda te se magnetizacija prenosi putem efekta NOE na sve molekule prisutne u otopini. Isto tako, magnetizacija se može prenositi mehanizmom spinske difuzije s proteina na vezani ligand te putem kemijske izmjene između vode i izmjenjivih protona. Praćenjem promjene predznaka i intenziteta signala liganda nakon dodatka receptora može se zaključiti koji atomi liganda sudjeluju u vezanju, odnosno koji su atomi liganda najizloženiji otapalu (vodi). Isto tako, može se razlikovati specifično vezanje od nespecifičnog.<sup>79,80</sup>

Snimljeni su spektri prekursora makrozona (**M2**, **S6**, **P5**) prije i nakon dodatka 70S ribosoma *E. coli*. Na slici 68. prikazan je waterLOGSY spektar spoja **P5**, dok se spektri za preostale prekursore makrozona nalaze u Dodatku (slike 15-16.).



**Slika 68.** (a) Spektar waterLOGSY za spoj **P5** nakon dodatka ribosoma; (b) spektar waterLOGSY prije dodatka ribosoma (referentni spektar); (c) spektar  $^1\text{H}$  prije dodatka ribosoma

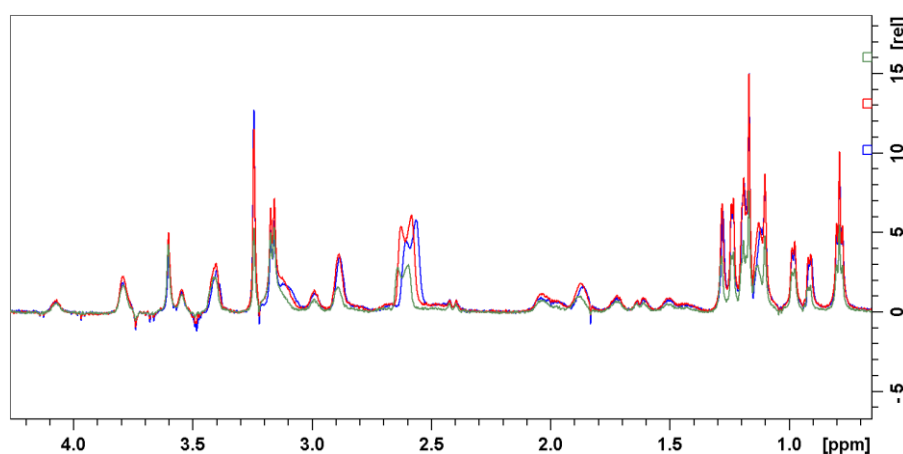
Opaženo je da se dodatkom receptora mijenja intenzitet i predznak signala liganda čime je potvrđeno vezanje na ribosom. Do navedenih promjene dolazi zbog razlike u predznaku efekta NOE malih i velikih molekula. Efekt NOE je pozitivan za molekule male molekulske mase, a negativan za molekule velike molekulske mase. Stoga će u spektru waterLOGSY nevezujući ligandi imati pozitivne NOE signale (fazirani kao negativni signali), dok će vezujući ligandi poprimiti svojstvo velike molekule i pokazati negativne signale NOE (fazirani kao pozitivni signali).<sup>80</sup>

Intenziteti signala u spektru  $^1\text{H}$  liganda razlikuju se od intenziteta signala u spektru waterLOGSY zbog prijenosa magnetizacije s vode na ligand.<sup>79</sup> Iz tog razloga uspoređeni su intenziteti signala liganda u eksperimentu waterLOGSY prije i nakon dodatka receptora. Interpretacijom spektara waterLOGSY potvrđeno je specifično vezanje prekursora makrozona na ribosom. Na specifično vezanje ukazuje promjena intenziteta signala nakon dodatka receptora. Budući da predznak efekta NOE ovisi o veličini molekule, intenzitet signala je prosjek populacije vezanih i nevezanih molekula. Intenzitet signala atoma koji su „uronjeni“ u protein trebao bi biti jednak ili veći. S druge strane, očekuje se smanjenje intenziteta signala za atome koji su izloženiji otapalu.<sup>79</sup>

Na temelju usporedbe intenziteta signala prije i nakon dodatka receptora uočen je veći ili manji porast intenziteta signala istih metilnih i metilenskih skupina kao što je opaženo i u

eksperimentima STD. Isto tako, nije zabilježeno značajno smanjenje drugih signala što upućuje na slabu izloženost molekule otapalu, odnosno na dobro uranjanje u ribosom.

Kao što je već spomenuto, na intenzitet signala u spektru waterLOGSY u većoj ili manjoj mjeri utječu i izmjenjivi protoni. Utjecaj izmjenjivog protona (npr. OH i NH) ovisi o udaljenosti, te će biti najveći za prostorno najbliže protone ( $< 5 \text{ \AA}$ ) jer jačina efekta NOE opada sa šestom potencijom udaljenosti. Poznato je da osjetljivost eksperimenta waterLOGSY ovisi o učinkovitosti prijenosa magnetizacije preko protona kompleksa pomoću mehanizma spinske difuzije. Međutim, pri manjim vremenima miješanja ( $< 1 \text{ s}$ ) dominantan je prijenos magnetizacije preko izmjenjivih protona pomoću efekta NOE. Predugo vrijeme miješanja može dovesti do smanjenja intenziteta signala zbog relaksacijskih procesa. Stoga se preporučuje koristiti vrijeme miješanja u rasponu od 1 do 2 s.<sup>79</sup> Kako bi provjerili utjecaj izmjenjivih protona na intenzitet signala u spektru, provedeni su eksperimenti waterLOGSY pri tri različita vremena miješanja (1,5 s, 0,75 s i 0,25 s; slika 69.).



**Slika 69.** Spektri waterLOGSY za spoj **M5** pri različitim vremenima miješanja (**1,7 s**, **0,75 s** i **0,25 s**)

Opaženo je da smanjenje vremena miješanja dovodi do smanjenja omjera signala prema šumu zbog nedovoljnog vremena za prijenos magnetizacije. Isto tako, uočava se povećanje intenziteta signala nekih protona koji su u blizini ( $< 5 \text{ \AA}$ ) izmjenjivih protona.

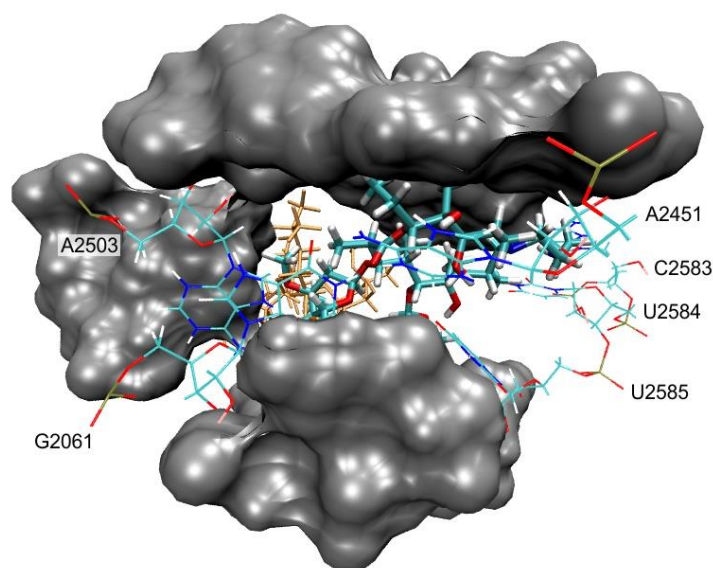


#### 4.3.2. Molekulsko modeliranje

Računalno istraživanje provedeno je na Zavodu za fizikalnu kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

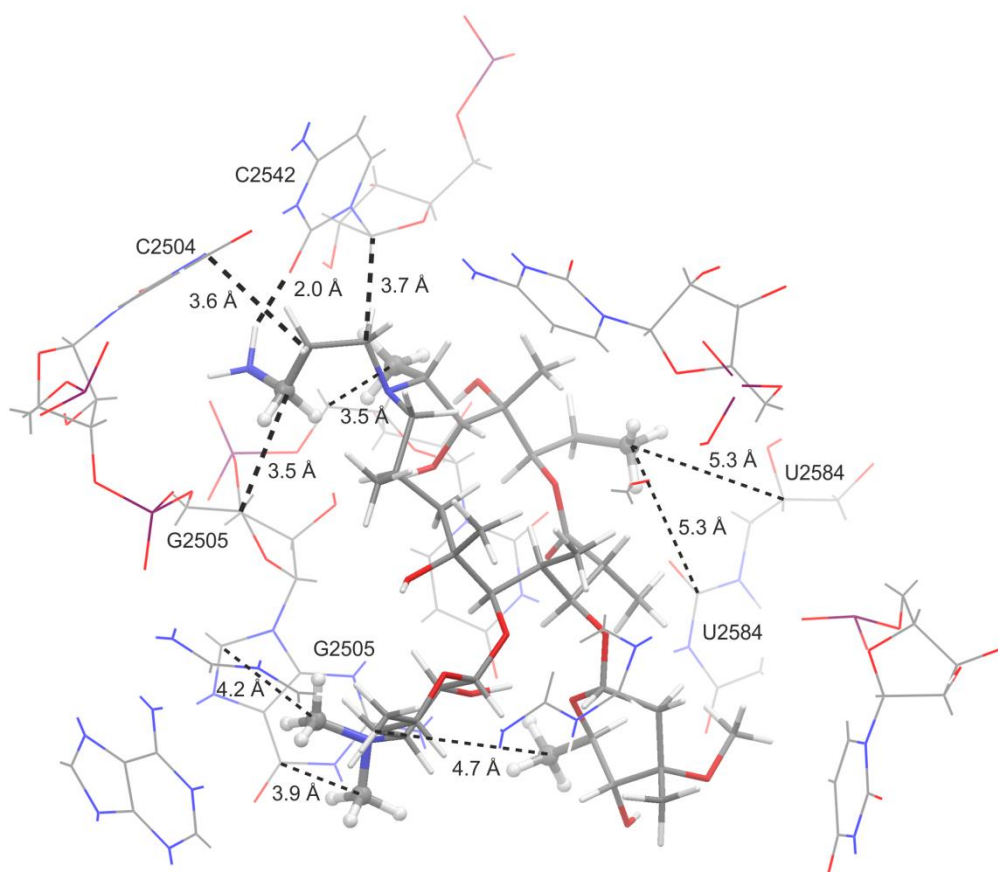
Eksperimentalni podaci dobiveni spektroskopijom NMR uspoređeni su s rezultatima molekulskog uklapanja (engl. *docking*). Budući da su eksperimenti NMR provedeni s velikim suviškom liganda u odnosu na makromolekulu, važno je proučiti pratimo li vezanje makrolida u aktivno mjesto (specifično vezanje) ili na nasumično odabrani dio ribosoma (nespecifično vezanje). Prema dosadašnjim istraživanjima dokazano je da eksperimenti STD pružaju uvid u pravo specifično vezanje makrolida.<sup>15</sup>

Provedene studije molekulskog uklapanja ukazale su na postojanje više mjesta na koje se vežu prekursori makrozona. Jedno od njih se poklapa s veznim mjestom eritromicina u kristalnoj strukturi kompleksa eritromicina i ribosoma *E. coli*. Druga detektirana vezna mjesta su se pokazala manje učestala te su okarakterizirana kao nespecifična. Stoga je proučeno vezanje prekursora na isto aktivno mjesto za eritromicin koje je ujedno i mjesto vezanja za azitromicin (slika 70.).<sup>109</sup>



**Slika 70.** Mjesto vezanja eritromicina (narančasti štapićasti prikaz) i 9a-aminopropil-azitromicina (**M2**) (tirkizni štapićasti prikaz) u ribosomu *E. coli*. Sivom bojom prikazani su nukleotidi (A2058, A2059, A2503, U2504, G2505, U2506, A2062, C2063, C2452, U2584, U2585 i U2586) s kojima 9a-aminopropil-azitromicin uspostavlja van der Waalsove interakcije. Nukleotidi s kojima 9a-aminopropil-azitromicin uspostavljava vodikove veze su naznačeni i prikazani kao linije<sup>108</sup>

Utvrđen je sličan način vezanja svih triju prekursora makrozona (**M2**, **S6**, **P5**). Makrolaktonski prsten zauzima sličnu poziciju kao i kod eritromicina<sup>66</sup>, to jest poprima izvrnutu konformaciju. Aminopropilni lanac omogućava uspostavljanje dodatnih interakcija s ribosomom. Ipak, usporedbom računskih podataka pokazano je da se afiniteti vezanja za sva tri spoja razlikuju. Najveći afinitet vezanja imaju spojevi **P5** ( $-10,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) i **M2** ( $-9,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Spoj **S6** ima nešto manji afinitet vezanja ( $-8,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), što je i u skladu s rezultatima biološke aktivnosti. Naime, spojevi **P5** i **M2** su pokazali dva puta bolju aktivnost *in vitro* na soj *E.coli* od spoja **S6**. Na slici 71. prikazane su interakcije između 9a-aminopropil-azitromicina (**M2**) i ribosoma *E. coli*. Naznačeni su nukleotidi te udaljenosti između bliskih atoma ( $< 5,3 \text{ \AA}$ ). Rezultati dobiveni molekulskim modeliranjem u skladu su s rezultatima NMR eksperimenata.<sup>108</sup>

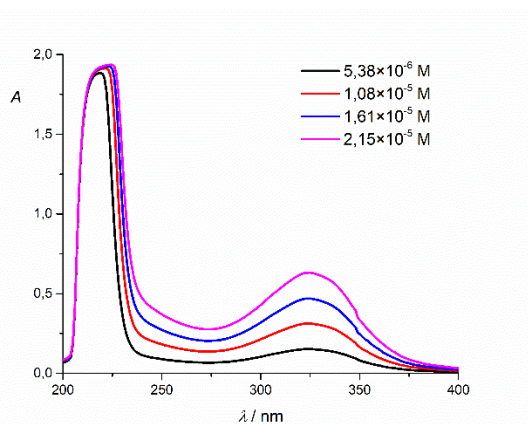


**Slika 71.** Uspostavljene interakcije i udaljenosti između 9a-aminopropil-azitromicina (**M2**) i nukleotida iz 70S ribosoma *E. coli*<sup>108</sup>

#### 4.3.3. UV-VIS i fluorescencijska spektroskopija

Za određivanje konstante vezanja makrozona na ribosom primijenjena je fluorescencijska spektroskopija. Preeliminarna istraživanja interakcija obuhvatila su proučavanje vezanja makrozona i na druge biološke mete, a to su *ctDNA*, RNA (pApU) i protein BSA. Za istraživanje su odabrani makrozoni (**4''-3b**, **4''-3g** i **9a-3e**) koji sadrže više aromatskih prstenova čija se apsorbancija može mijenjati po interakciji s drugom molekulom. Dodatno, mnogi aromatski sustavi emitiraju fluorescenciju koja je vrlo osjetljiva na nekovalentne interakcije i promjenu solvatacije kromofora. Prilikom odabira makrozona vodilo se računa i o aktivnosti makrozona na soj *E. coli* (tablica 8 i 9.). Makrozoni nisu dobro topljivi u vodi pa su se za istraživanja koristile *stock* otopine makrozona u DMSO-u koje su potom razrijeđene s kakodilatnim puferom ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

Najprije su snimljeni spektri UV-VIS (slika 72. i D17.) zbog određivanja valne duljine maksimalne apsorpcije i vrijednosti molarnog apsorpcijskog koeficijenta. Na temelju rezultata eksperimenata UV-VIS podešeni su parametri za fluorescencijska mjerenja.



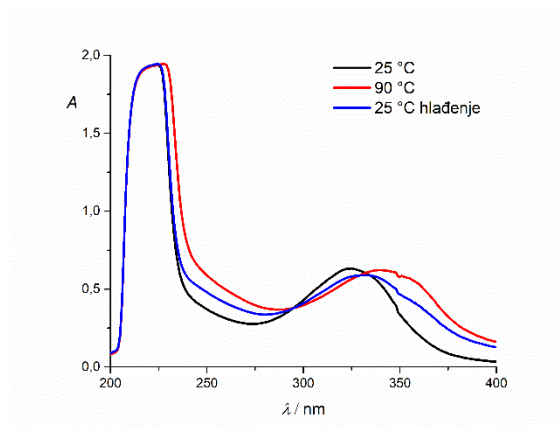
**Slika 72.** Ovisnost UV-VIS spektra makrozona **4''-3g** o koncentraciji u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Apsorbancija otopina makrozona proporcionalna je njihovim koncentracijama pri  $\lambda_{\text{maks}} = 325 \text{ nm}$  u istraživanom koncentracijskom području (do  $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Određene vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata prikazane su u tablici 14.

**Tablica 14.** Vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata makrozona pri  $\lambda = 325$  nm.

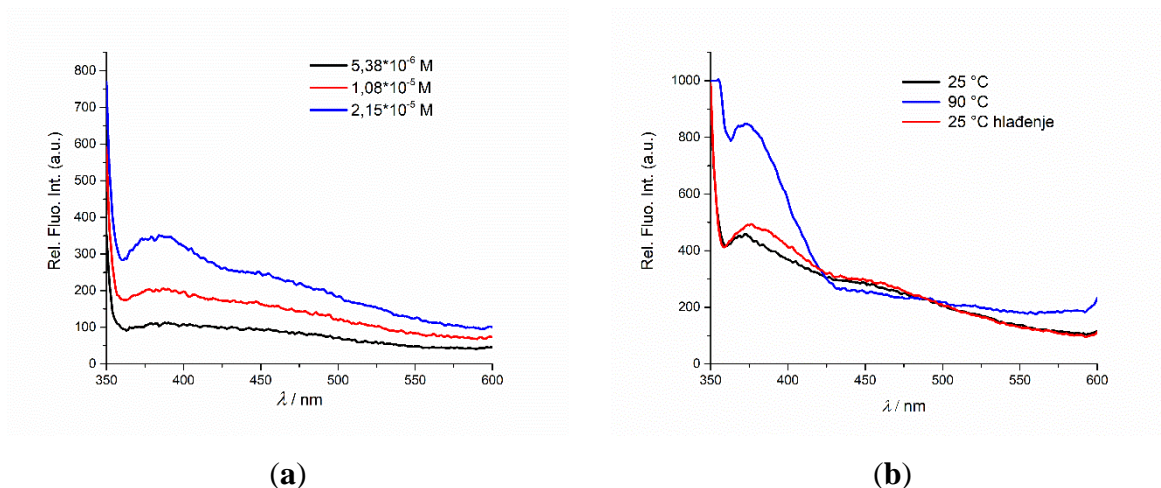
Spoj	$\varepsilon / M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
<b>4''-3b</b>	29 496,05
<b>4''-3g</b>	29 711,55
<b>9a-3e</b>	38 854,73

Termička stabilnost otopina makrozona istražena je zagrijavanjem na 90 °C i hlađenjem na 25 °C (slika 73.). Zagrijavanjem otopine dolazi do batokromnog pomaka što ukazuje na mogućnost agregacije. Hlađenjem se sustav djelomično vraća u početno stanje.



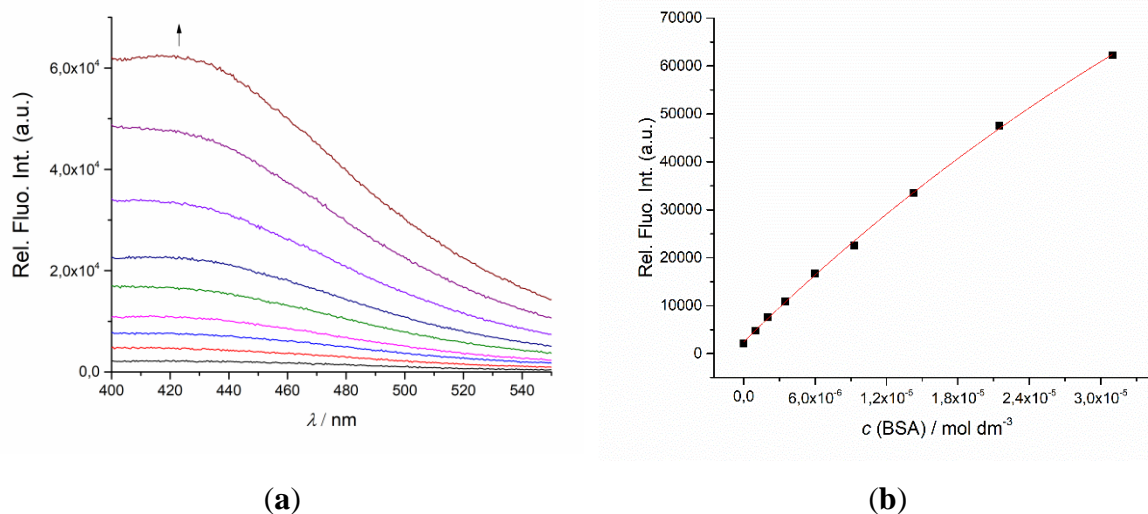
**Slika 73.** UV-VIS spektar makrozona **4''-3g** ( $c = 2,15 \times 10^{-5}$  M) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7) pri 25 °C i 90 °C

Vodene otopine makrozona pokazuju slabu fluorescenciju nakon pobude na njihovim maksimalnim valnim duljinama apsorpcije (slika 74.), uz vidljivo podizanje bazne linije koje ukazuje na moguć nastanak agregata ili slabo topljivih aglomerata. Iz tog razloga istražen je utjecaj zagrijavanja otopine makrozona na spektar fluorescencije. Zagrijavanjem sustava na 90 °C dolazi do porasta intenziteta fluorescencije, dok se hlađenjem sustav postepeno vraća u početno stanje, što dodatno podupire agregiranje.



**Slika 74.** Spektri fluorescencije makrozona 4''-3g ( $\lambda_{\text{eksc}} = 325$  nm) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7) (a) pri 25 °C; (b) pri 25 °C i 90 °C ( $c = 2,15 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>)

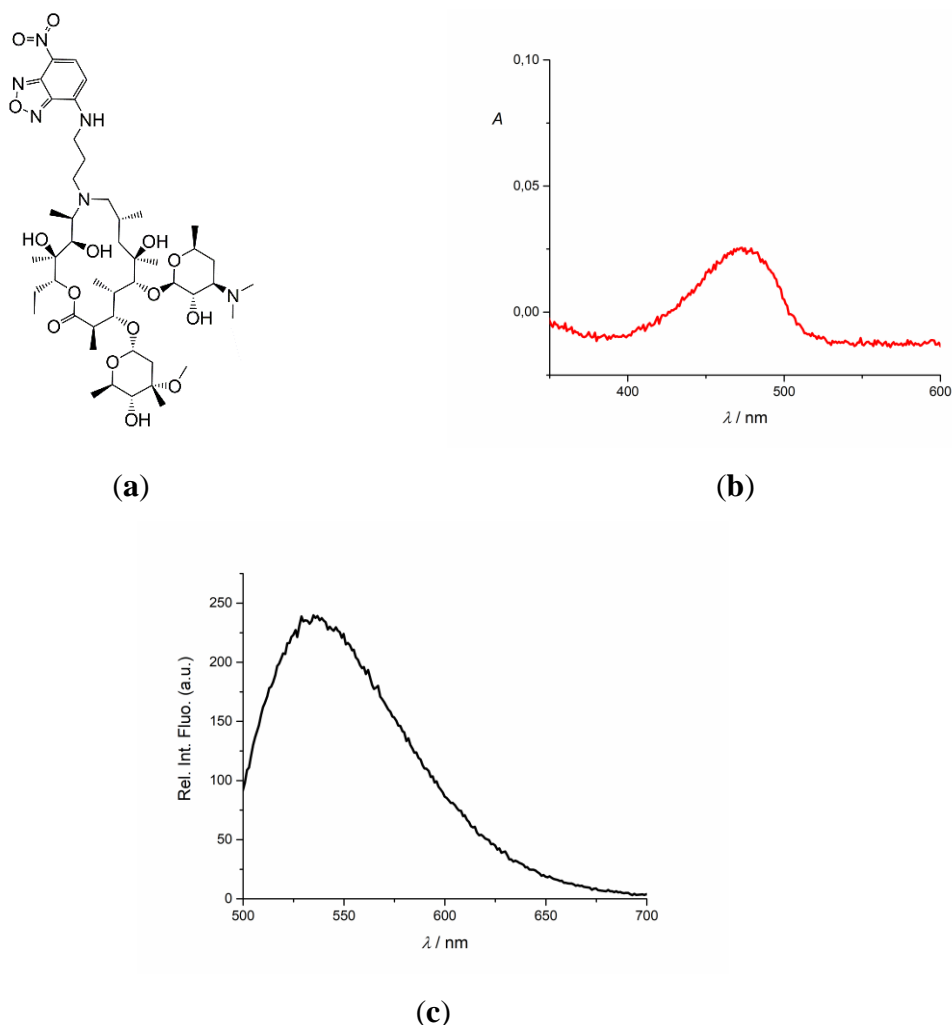
Zatim je istražen utjecaj dodatka BSA i RNA na fluorescencijske spektre makrozona, s tim da je valna duljina pobude  $\lambda_{\text{eksc}} = 325$  nm dovoljno odmaknuta od područja absorpcije BSA, kako bi se izbjegla emisija BSA. Titracija s BSA (slika 75. i D18., Dodatak) uzrokovala je značajan porast emisije makrozona 4''-3b i 4''-3g, te je iz dobivenih podataka nelinearnom regresijom za 1:1 stehiometriju kompleksa makrozon : BSA (slika 75.b) izračunata konstanta vezanja (tablica 15.).



**Slika 75.** (a) Spektri fluorescencije prilikom titracije spoja **4''-3b** ( $c = 9,92 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{eksc}} = 325 \text{ nm}$ ) s BSA; (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 419,5 \text{ nm}$  o množinskoj koncentraciji BSA u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; crvena linija predstavlja nelinearnu regresiju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1

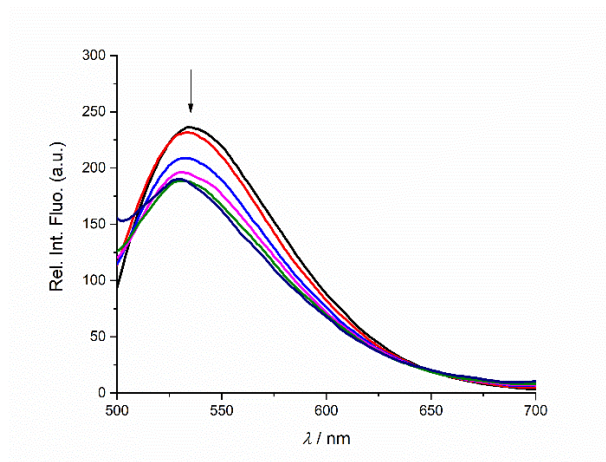
Nadalje, istražene su interakcije spoja **4''-3g** s DNA i RNA pomoću metoda temperature denaturacije DNA/RNA i fluorimetrijske titracije makorozona s DNA/RNA. Budući da nisu dobivene vidljive promjene koje bi ukazivale na mjerljivu interakciju, daljnja istraživanja s DNA i RNA više nisu provođena.

Prema literaturnim podacima<sup>86,87</sup>, proučavanje vezanja nefluorescirajućih antibiotika na ribosom pomoću fluorescencijske spektroskopije istraživalo se kovalentnim vezanjem fluorofora na antibiotik ili kompeticijskim eksperimentima s fluorescirajućim ligandom. Za izvođenje kompeticijskih eksperimenata odabire se ligand koji cilja isto vezno mjesto na biološkoj meti. Budući da se afinitet vezanja fluorescirajućeg derivata može bitno razlikovati od afiniteta vezanja makrolida, za potrebe ovog istraživanja odabrani su kompeticijski eksperimenti umjesto kemijske modifikacije makrozona. Kao kompetitor poslužio je 9a-NBD azitromicin (slika 76.a). Istraživanja su pokazala da ovaj fluorescirajući derivat ima slična farmakokinetička svojstva kao i azitromicin.<sup>110</sup> Prema njegovom spektru UV-VIS (slika 76.b) maksimalna valna duljina apsorpcije u području  $> 300 \text{ nm}$  iznosi  $475 \text{ nm}$ .

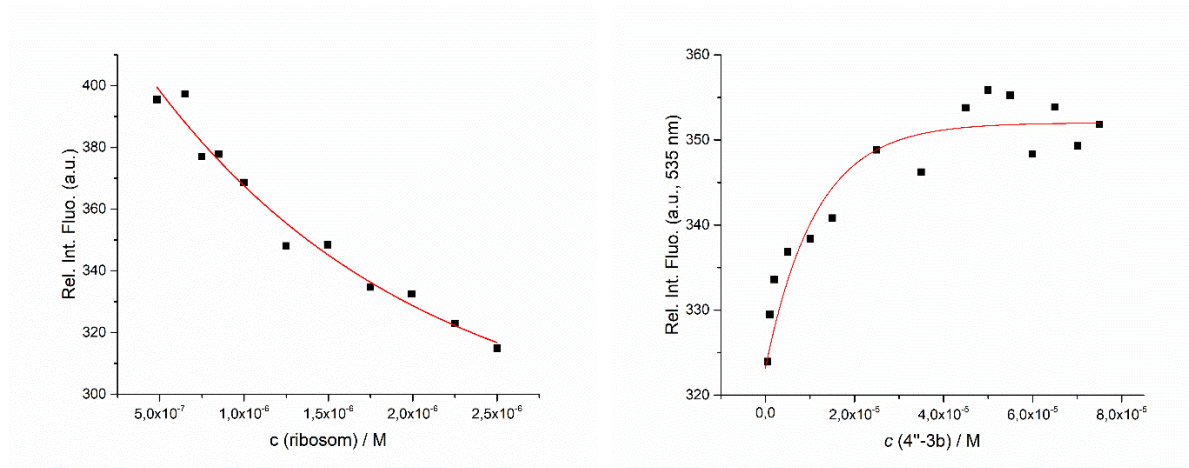


**Slika 76.** (a) Strukturna formula molekule 9a-NBD-azitromicina; (b) UV-VIS spektar 9a-NBD-azitromicina ( $c = 1,00 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (c) spektar fluorescencije 9a-NBD-azitromicina ( $c = 1,00 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\lambda_{\text{eksc}} = 475 \text{ nm}$ ) u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Najprije je snimljen fluorescencijski spektar 9a-NBD-azitromicina pri  $\lambda_{\text{eksc}} = 475 \text{ nm}$  (slika 76.c). Dodatak ribosoma u otopinu rezultirao je smanjenjem intenziteta fluorescencije (slika 77.a i 77.b). Titracija ribosomom provedena je do prestanka gašenja fluorescencije, odnosno do zasićenja veznih mjesta ribosoma. Potom su uslijedili kompeticijski eksperimenti. Dodatkom alikvota makrozona **4''-3b** u otopinu ribosoma i 9a-NBD-azitromicina dolazilo je do postupnog porasta intenziteta emisije (slika 77.c). Ipak, nije postignut povratak na početnu vrijednost intenziteta emisije slobodnog kompetitora (Rel. Int. Fluo. = 397 a.u.), što upućuje na mogućnost postojanja sekundarnog veznog mjesta za 9a-NBD-azitromicin.



(a)



(b)

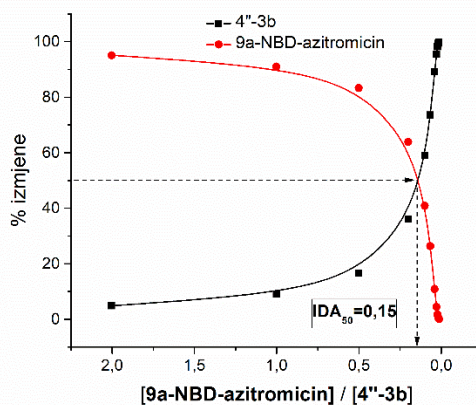
(c)

**Slika 77.** (a) Spektri fluorescencije prilikom titracije 9a-NBD-azitromicina ( $c_0 = 1 \times 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{eksc}} = 475$  nm) s ribosomom; (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 535$  nm o množinskoj koncentraciji ribosoma u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pH = 7,  $c_0$  (9a-NBD-azitromicin) =  $1 \times 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) pri 25 °C ( $\log K_d = 5,8$  M $^{-1}$ ); (c) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 535$  nm o množinskoj koncentraciji 4''-3b u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pH = 7) pri 25 °C; crvena linija predstavlja nelinearnu regresiju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1

Afinitet vezanja makrozona s obzirom na afinitet vezanja kompetitora određen je pomoću metode IDA<sub>50</sub> (engl. *Indicator displacement assay*).<sup>111</sup> Na slici 78. prikazana je ovisnost postotka izmjene o omjeru koncentracija makrozona 4''-3b i kompetitora 9a-NBD-



azitromicina. Crvena linija prikazuje istiskivanje 9a-NBD-azitromicina, dok crna linija prikazuje istovremeno vezanje makrozona **4''-3b**.



**Slika 78.** Ovisnost postotka izmjene o omjeru koncentracija makrozona **4''-3b** i 9a-NBD-azitromicina u kompeticijskom eksperimentu

Obradom emisijskih spektara kompleksa 9a-NBD azitromicin-ribosom i kompleksa **4''-3b**-ribosom dobivena je vrijednost  $IDA_{50} = 0,15$ , što prema gruboj procjeni ukazuje na tri do četiri puta manji afinitet vezanja spoja **4''-3b**. Kao završna točka kompeticijskog eksperimenta uzeta je vrijednost Rel. Int. Fluo. = 351 a.u. (slika 77.c) s pretpostavkom da je pri toj vrijednosti kompetitor u potpunosti istisnut iz aktivnog mjesta ribosoma (postotak izmjene = 100 %). Za izračun vrijednosti  $IDA_{50}$  korišteni su podaci iz grafova 77.b i 77.c dobiveni eksponencijalnom funkcijom. Ta funkcija predstavlja krivulju s uprosječenim pogreškama.

Za makrozon **4''-3g** dobiveni su slični rezultati (slika D19., dodatak), dok se makrozon **9a-3e** pokazao kao loš kompetitor (slika D20., dodatak).

Podaci dobiveni fluorimetrijskim mjerenjem analizirani su pomoću programa *Hyperyuad*. Korišteno je nekoliko modela (AB, AB<sub>2</sub>) s različitim stehiometrijama vezanja liganda (B) na BSA (A), ribosom (A) te model (ABC) kompetitivnog sustava s fluoroforom (C). Za sustav makrozon-BSA i fluorofor-ribosom najbolje slaganje dobiveno je za model AB s konstantom vezanja  $\beta$ . Međutim, ustanovljeno je da program *Hyperyuad* ne omogućava obradu kompeticijskih eksperimenata jer vjerodostojni rezultati nisu dobiveni za tu vrstu eksperimenata. U tablici 15. prikazane su izračunate konstante disocijacije multivarijantnom analizom.

**Tablica 15.** Rezultati analize fluorimetrijskih podataka pomoću programa *Hyperquad*

Sustav	log $\beta$	$\beta$	$s_d$	$K_d = 1/\beta$
<b>4''-3b</b> + BSA	5,94	$8,75 \cdot 10^5$	0,0222	$1,14 \cdot 10^{-6}$
<b>4''-3g</b> + BSA	6,21	$1,63 \cdot 10^6$	0,0163	$6,14 \cdot 10^{-7}$
9a-NBD-azitromicin + ribosom	6,36	$2,29 \cdot 10^6$	0,3517	$4,37 \cdot 10^{-7}$

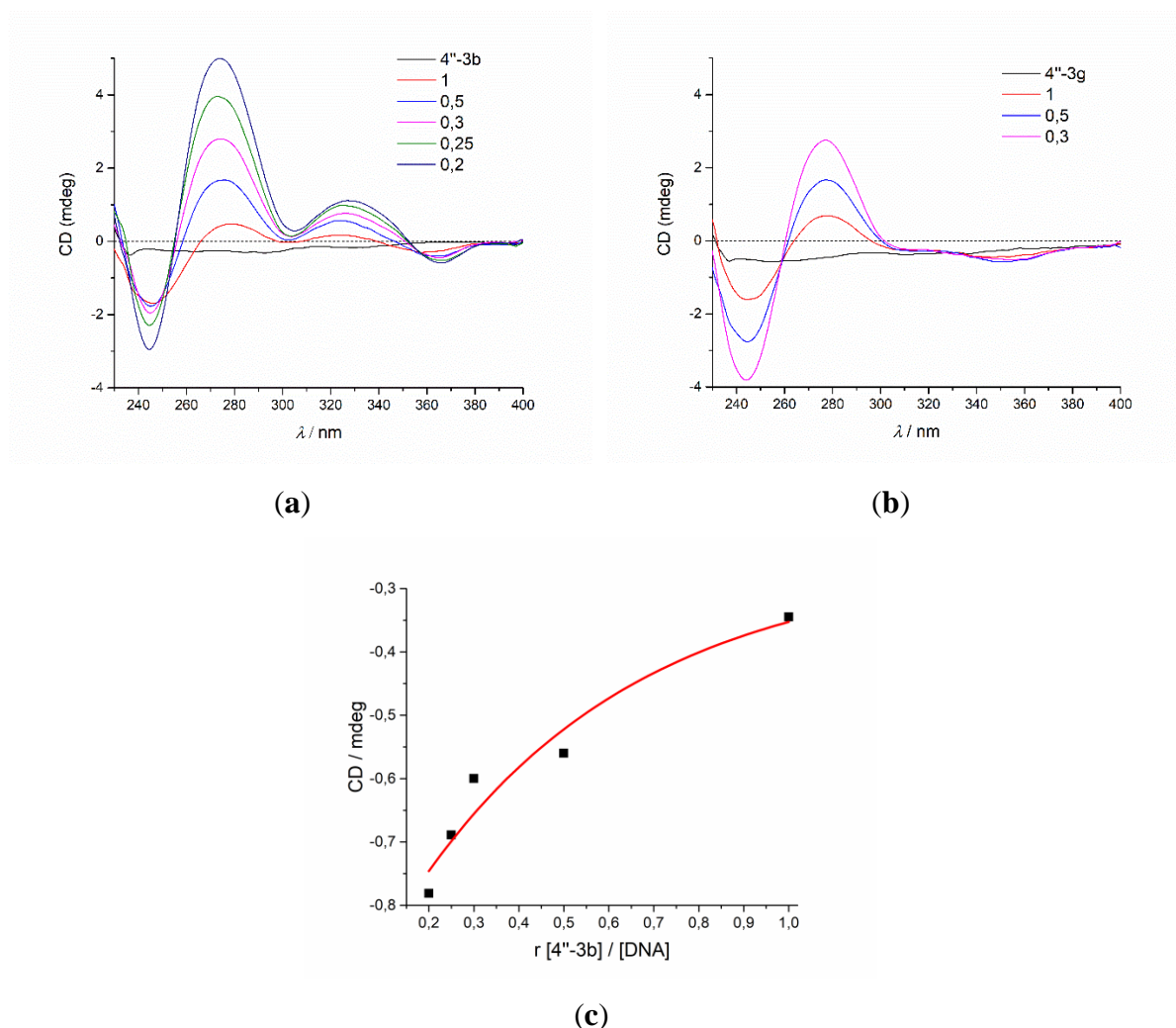
Prema dobivenim rezultatima 9a-NBD-azitromicin najjače se veže na ribosom, a makrozon **4''-3g** je bolji kompetitor od makrozona **4''-3b**.

Bitno je napomenuti da vrijednost  $K_D$  može varirati ovisno o korištenoj metodi, eksperimentalnim uvjetima i bakterijskom soju. Primjerice, prema literaturnim podacima vrijednost  $K_D$  za kompleks eritromicin-ribosom *E. coli* varira u rasponu od 2 do 36 nM, dok je dobivena vrijednost  $K_D$  za kompleks eritromicin-ribosom *H. pylori* za red veličine manja. Isti slučaj je zabilježen i za klaritromicin.<sup>86</sup>

#### 4.3.4. Cirkularni dikroizam

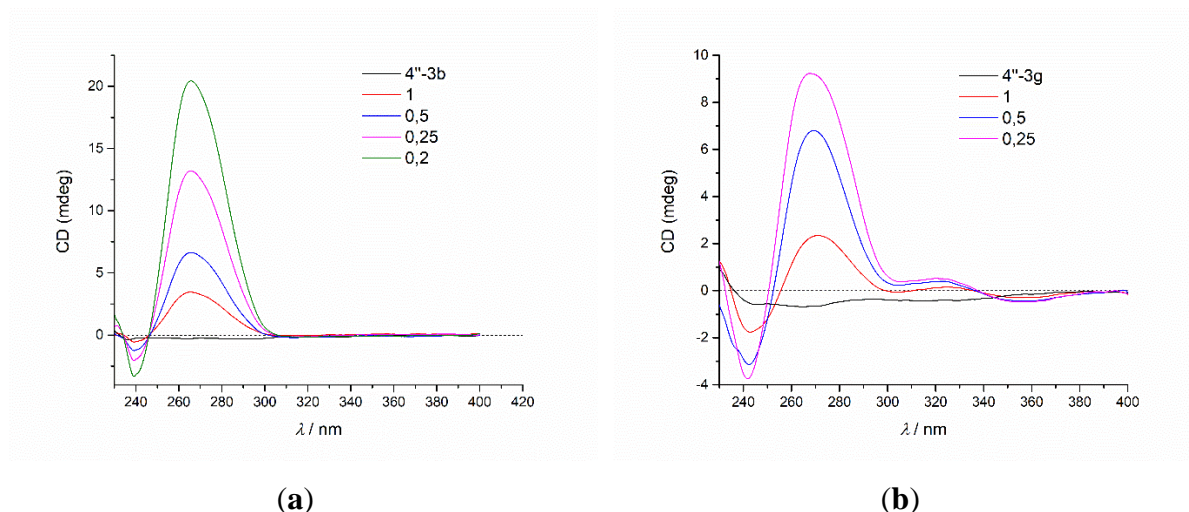
Cirkularni dikroizam primjenjuje se za proučavanje sekundarne strukture proteina i polinukleotida (DNA, RNA) te omogućava praćenje strukturnih promjena prilikom vezanja liganda i procesa denaturacije.<sup>112</sup> U sklopu ovog rada cirkularni dikroizam je primijenjen za analizu interakcija makrozona s DNA, RNA, BSA i ribosomom.

Istraživani makrozoni su akiralne molekule, stoga ne pokazuju signal u CD spektrima. Međutim, uočeno je kako u interakciji s DNA i RNA pokazuju inducirani cirkularni dikroizam (ICD), što ukazuje na uniformnu orijentaciju kromofora makrozona s obzirom na kiralnu os DNA/RNA.<sup>113</sup> Predznak i veličina ICD signala pružaju informacije o načinu vezanja.<sup>114</sup> Poznato je da polinukleotidi DNA i RNA posjeduju CD signale u ultraljubičastom području do 300 nm, dok se dodatkom makrozona inducirani CD signal javlja u području od 300 nm do 375 nm koje odgovara apsorpcijskoj vrpci spojeva. Signal ICD je izraženiji za spoj **4''-3b** u interakciji s DNA, nego za spoj **4''-3g** i DNA (slika 80.). Nelinearna ovisnost signala ICD o omjeru  $r_{[spoj]}/[DNA]$  (slika 80.c) ukazuje na nastanak nekovalentnog kompleksa.



**Slika 79.** CD titracije (a) **4''-3b** ( $c = 1,97 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); (b) **4''-3g** ( $c = 1,98 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ctDNA pri molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]} / [\text{polinukleotid}] = 0,2-1$  u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; (c) ovisnost signala ICD pri  $363 \text{ nm}$  o omjeru  $r_{[4''-3b]} / [\text{DNA}]$ ; crvena linija predstavlja nelinearnu regresiju podataka titracije za nastanak kompleksa stehiometrije 1:1

Titracijom otopine makrozona **4''-3g** s RNA opažene su male promjene u CD spektru RNA, dok za spoj **4''-3b** nije opažena pojava novih ICD vrpci (slika 81.).



**Slika 80.** CD titracije (a) **4''-3b** ( $c = 1,97 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i (b) **4''-3g** ( $c = 3,95 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s RNA pri molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]} / [\text{polinukleotid}] = 0,2-1$  u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Titracijom makrozona s ribosomom i BSA ne uočava se promjena u intenzitetu CD vrpci koja bi se mogla pripisati promjeni strukture receptora.

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ove disertacije uspješno su pripravljene tri klase makrozona (**klasa I, II i III**), amidnih konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. Pripravi makrozona prethodila je priprava deset tiosemikarbazida (**1a-1k**), deset tiosemikarbazona (**2a-2k**) i priprava tri prekursora makrozona, odgovarajućih aminopropilnih derivata azitromicina (**P5, S6 i M2**). Karboksilna skupina tiosemikarbazona **2a-2k** povezana je amidnom vezom s amino-skupinom aminopropilne poveznice  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$  vezane na tri različita položaja molekule azitromicina. **Klasa I** (4"-makrozoni, **4''-3a – 4''-3k**) dobivena je modifikacijom hidroksilne skupine na položaju 4" kladinoze. **Klasa II** (3-makrozoni, **3-3a – 3-3k**) pripravljena je uklanjanjem kladinoze i susptitucijom položaja 3 na aglikonskom prstenu. **Klasa III** (9a makrozoni, **9a-3a – 9a-3k**) dobivena je modifikacijom položaja 9a aglikonskog dijela molekule azitromicina. Ukupno je pripravljeno i strukturno okarakterizirano tridesetak makrozona.

Prekursori makrozona **P5, S6 i M2** i pripravljene makrozoni pokazali su dobru biološku aktivnost *in vitro* na Gram-pozitivne te slabu aktivnost na Gram-negativne bakterije. Usporedbom vrijednosti MIK različitih klasa makrozona ustanovljeno je da mjesto supstitucije uvelike utječe na biološku aktivnost. Najbolji rezultati biološke aktivnosti dobiveni su za **klasu I**. 4"-makrozoni pokazali su veću ili jednaku aktivnost kao i azitromcin na susceptibilne i rezistentne sojeve *S. aureus*, *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* te dva do osam puta veću aktivnost na soj *E. faecalis*. U odnosu na azitromicin, spoj piridil-3-il-4"-makrozon (**4''-3b**) posjeduje osam puta veću aktivnost na efluks rezistentni soj *S. pneumoniae* te najmanje četiri puta veću aktivnost na efluks rezistentni soj *S. aureus*. Spojevi benzil-4"-makrozon (**4''-3e**) i 3,4-metilendioksifenil-4"-makrozon (**4''-3j**) ističu se po četiri puta većoj aktivnosti u usporedbi s azitromicinom na efluks rezistentni soj *S. pneumoniae* i najmanje osam puta većoj aktivnosti na efluks rezistentni soj *S. aureus*. Na konstitutivno rezistentni soj *S. aureus* najbolju aktivnost iz **klase I** pokazali su 2-feniletil-4"-makrozon (**4''-3a**), 4-trifluormetoksifenil-4"-makrozon (**4''-3g**) i 3-fenilpropan-1-il-4"-makrozon (**4''-3h**). Njihova aktivnost na spomenuti soj najmanje je četiri puta veća od azitromicina. Pretpostavlja se da je poboljšana biološka aktivnost rezultat stvaranja dodatnih interakcija tiosemikarbazonoskog dijela makrozona s ribosomom. Ustanovljeno je da variranjem supstituenata unutar klase 4"-makrozona ne dolazi do značajnije

promjene cjelokupne aktivnosti, već do porasta selektivne bioaktivnosti. Za razliku od **klase I**, makrozoni iz **klase II i III** općenito su pokazali jednaku ili slabiju antibakterijsku aktivnost na testirane sojeve u odnosu na azitromicin. Ipak, može se istaknuti bolja aktivnost 4-trifluormetoksifenil-9a-makrozon (**9a-3g**) na rezistentne sojeve *S. aureus* (cMLS), *S. aureus* (M) i *S. pneumoniae* (cMLS). Isto tako, metil-3-tiofen-2-karboksil-3-makrozon (**3-3f**) i 4-trifluormetoksifenil-3-makrozon (**3-3g**) postigli su najmanje dva do četiri puta veću aktivnost od azitromicina na rezistentne sojeve *S. aureus* (cMLS), *S. aureus* (M) i *S. pyogenes* (M). Značajniju aktivnost na Gram-negativne bakterije (*M. catarrhalis* i *E. coli*) postignuli su jedino spojevi **P5** i **M2**.

Pomoću spektroskopije NMR i molekuskog modeliranja određena je konformacija molekula prekursora makrozona u slobodnom i vezanom stanju te su istražene interakcije s ribosomom *E. coli*. Na temelju analize spektara NOESY i ROESY ustanovljeno je da se nevezne konformacije molekula spojeva u vodenom i organskom otapalu ne razlikuju značajno. Isto tako, usporedbom spektara trNOESY, ROESY i NOESY utvrđeno je da vezanjem na ribosom ne dolazi do bitnih strukturnih promjena prekursora makrozona. Konformacija molekule prekursora 4"-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**P5**) i 9a-aminopropil-azitromicina (**M2**) slična je konformaciji molekule petnaesteročlanog makrolida azitromicina (tzv. *3-endo-folded-out*), dok 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicin (**S6**) zauzima izvrnutu konformaciju kao i većina četrnaesteročlanih makrolida. Tehnike <sup>1</sup>H, STD i waterLOGSY NMR poslužile su za potvrdu nastanka kompleksa makrolid-ribosom. Epitopi vezanja identificirani su praćenjem pojačanja intenziteta signala u spektru STD. Za spoj 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicin (**S6**) pokazano je da metilenska skupina aminopropilnog lanca (3c) te metilne skupine desozamina (3'NMe, 5'Me) i aglikonskog prstena (6Me, 8Me, 10Me, 12Me, 14Me) sudjeluju u vezanju na ribosom. Interpretacijom spektara STD za spojeve **P5** i **M2** dolazi se do istog zaključka, osim što se dodatno opaža sudjelovanje metilnih skupina kladinoze u vezanju na ribosom. Jačem vezanju prekursora makrozona u odnosu na azitromicin pridonose metilenske skupine te amino-skupina aminopropilnog lanca, što pozitivno utječe na biološki profil. Naime, aktivnost prekursora makrozona na soj *E. coli* najmanje je dva puta veća od aktivnosti azitromicina. Kombinacijom tehnika NMR i molekuskog modeliranja uspješno je rasvijetljen mehanizam vezanja pripremljenih derivata azitromicina. Međutim, spektroskopijom NMR nije bilo moguće proučiti kompleks makrozon-ribosom zbog slabe topljivosti makrozona u vodenom mediju i nedovoljne osjetljivosti navedene tehnike. Vezanje

makrozona na ribosom, BSA, RNA i DNA istraženo je fluorescencijskom spektroskopijom i cirkularnim dikroizmom. Preliminarna istraživanja vezanja makrozona na DNA i RNA nisu pokazala da dolazi do značajnih promjena u emisijskim spektrima makrozona, stoga su se istraživanja usmjerila na interakcije s proteinom BSA i ribosomom. Budući da makrozoni slabo fluoresciraju, provedeni su kompeticijski eksperimenti s fluorescirajućim derivatom azitromicina. Obradom fluorimetrijskih podataka dobivene su konstante stabilnosti za komplekse makrozon-BSA ( $0,6 \mu\text{M} - 1 \mu\text{M}$ ) i makrolid-ribosom ( $0,43 \mu\text{M}$ ). S druge strane, cirkularni dikroizam je pokazao inducirane CD vrpce za proučavane makrozone po dodatku dvolančane DNA, no ne i po dodatku ribosoma stoga ova metoda nije prikladna za proučavanje interakcija makrozona s biološkim metama.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjima pokazali su da makrozoni posjeduju vrlo dobru biološku aktivnost na susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija te predstavljaju obećavajuću klasu bioaktivnih spojeva za daljnja istraživanja i služe kao dobar temelj za dizajn novih antibiotika.

## § 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CD	cirkularni dikroizam
cMLS	konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine
COSY	engl. <i>Correlation Spectroscopy</i>
CP-MAS	engl. <i>Cross-Polarization Magic Angle Spinning</i>
ctDNA	DNA iz telećeg timusa (engl. <i>calf thymus DNA</i> )
DEPTQ	engl. <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMSO	dimetil-sulfoksid
eryS	sojevi osjetljivi na eritromicin
HATU	1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3-oksidi heksafluorofosfat
HMBC	engl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC <sub>50</sub>	koncentracija koja smanjuje vijabilnost stanica za 50 %
iMLS	inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine
M	efluks rezistencija na makrolide
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NOE	engl. <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	engl. <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
pApU	dvolančani polinukleotid sastavljen od lanca baze A i njemu komplementarnog lanca sastavljenog od baze U
PRE	engl. <i>Paramagnetic Relaxation Enhancements</i>
ROE	engl. <i>Rotating-frame Overhauser Effect</i>
ROESY	engl. <i>Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy</i>
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>Solid-Phase Extraction</i> )



---

STD	engl. <i>Saturation Transfer Difference</i>
trNOESY	engl. <i>Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UV-Vis	ultraljubičasto-vidljivo zračenje
waterLOGSY	engl. <i>Ligand Observed via Gradient Spectroscopy</i>

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662.
2. R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **69** (1957) 50–58.
3. B. Arsić, P. Novak, J. Barber, M. G. Rimoli, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018, str. 1–73.
4. P. Gopal, T. Dick, *Int. J. Antimicrob. Agents* **45** (2015) 430–3.
5. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
6. T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 977–1055.
7. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* **63** (2020) 6462–6473
8. J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1987) 1659–1667.
9. J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1988) 325–337.
10. A. Awan, R. J. Brennan, A. C. Regan, J. Barber, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2000) 1645–1652.
11. G. Bertho, P. Ladam, J. Gharbi-Benarous, M. Delaforge, J.-P. Girault, *Int. J. Biol. Macromol.* **22** (1998) 103–127.
12. G. Lazarevski, M. Vinković, G. Kobrehel, S. Đokić, *Tetrahedron* **49** (1993) 721–730.
13. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 39–47.
14. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem. A.* **110** (2006) 572–579.
15. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
16. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270.
17. J. A. Dunkle, L. Xiong, A. S. Mankin, J. H. D. Cate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 17152–17157.
18. R. Berisio, J. Harms, F. Schluenzen, R. Zarivach, H. A. S. Hansen, P. Fucini, A. Yonath, *J. Bacteriol.* **185** (2003) 4276–4279.
19. S. Kalenić (ur), *Medicinska mikrobiologija*, poglavlje 15, Štamparija Fojnica d.o.o, Zenica, 2009., str. 221–252.
20. D. G. Brown, H. J. Wobst, *J. Med. Chem.* **64** (2021) 2312–2338.
21. M. Bukvić Krajačić, *Sinteza i biološka aktivnost novih ureido- i tioureido- derivata iz reda 15-članih azalida*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2001, str. 33.

22. Y. Qi, B. Jiao, X. Ma, W. Cui, S. Ma, *Arch. Pharm.* **343** (2010) 458–464.
23. S. Ma, B. Jiao, Y. Ju, M. Zheng, R. Ma, L. Liu, L. Zhang, X. Shen, C. Ma, Y. Meng, H. Wang, Y. Qi, X. Ma, W. Cui, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 556–566.
24. S. Ma, P. Wei, X. Ma, C. Cong, Y. Wang, *4''-O-carbamate clarithromycin derivative with electron withdrawing group substituted terminal, preparation method for intermediate of derivative and application of derivative*, CN102584919B, 2014.
25. S. El Ashkar, M. Osman, R. Rafei, H. Mallat, M. Achkar, F. Dabboussi, M. Hamze, *J. Infect. Public Health* **10** (2017) 745–748.
26. C. Cong, H. Wang, Y. Hu, C. Liu, S. Ma, X. Li, J. Cao, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3105–3111.
27. S. Ma, B. Jiao, Z. Liu, H. Wang, R. Xian, M. Zheng, H. Lou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 1698–1701.
28. X. Li, S. Ma, M. Yan, Y. Wang, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **59** (2013) 209–217.
29. M. Yan, X. Ma, R. Dong, X. Li, C. Zhao, Z. Guo, Y. Shen, F. Liu, R. Ma, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **103** (2015) 506–515.
30. Y. Wang, C. Cong, W.C. Chai, R. Dong, L. Jia, D. Song, Z. Zhou, S. Ma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27** (2017) 3872–3877.
31. L. Zhang, B. Jiao, X. Yang, L. Liu, S. Ma, *J. Antibiot.* **64** (2011) 243–247.
32. T. Sugimoto, M. Hayashi, T. Kawaguchi, *C-4'' position substituted macrolide derivative*, US20170267708A1, 2017.
33. A. Fajdetić, H. Čipčić Paljetak, G. Lazarevski, A. Hutinec, S. Alihodžić, M. Đerek, V. Štimac, D. Andreotti, V. Šunjić, J.M. Berge, S. Mutak, M. Dumić, S. Lociuero, D.J. Holmes, N. Maršić, V. Eraković Haber, R. Spaventi, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6559–6568.
34. S. Kapić, H. Čipčić Paljetak, I. Palej Jakopović, A. Fajdetić, M. Ilijaš, V. Štimac, K. Brajša, D.J. Holmes, J. Berge, S. Alihodžić, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 7281–7298.
35. J. H. Liang, X. Han, *Curr. Top. Med. Chem.* **13** (2013) 3131–3164.
36. A. Fajdetić, A. Vinter, H. Č. Paljetak, J. Padovan, I.P. Jakopović, S. Kapić, S. Alihodžić, D. Filić, M. Modrić, N. Košutić-Hulita, R. Antolović, Z. I. Schoenfeld, S. Mutak, V. E. Haber, R. Spaventi, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3388–3397.
37. A. Hutinec, M. Đerek, G. Lazarevski, V. Šunjić, H. Č. Paljetak, S. Alihodžić, V.E. Haber, M. Dumić, N. Maršić, S. Mutak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 3244–3249.
38. Z. H. Zhao, D. Zhu, X. X. Zhang, Z. G. Luo, P. S. Lei, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **21** (2019) 610–618.
39. A. N. Tevyashova, E. N. Bychkova, A. M. Korolev, E. B. Isakova, E. P. Mirchink, I. A. Osterman, R. Erdei, Z. Szücs, G. Batta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29** (2019) 276–280.

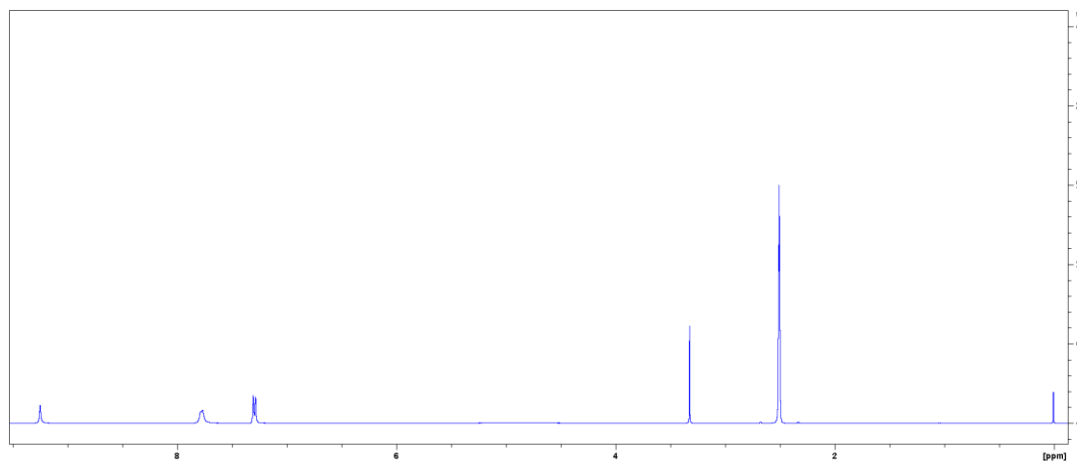
40. T. V. Magee, S. Han, S. P. McCurdy, T. T. Nguyen, K. Granskog, E. S. Marr, B. A. Maguire, M. D. Huband, J. M. Chen, T. A. Subashi, V. Shanmugasundaram, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23** (2013) 1727–1731.
41. L. Zhang, L. Song, Z. Liu, H. Li, Y. Lu, Z. Li, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 915–922.
42. Z. Wu, Y. Lu, M. Luo, X. He, Y. Xiao, J. Yang, Y. Pan, G. Qiu, H. Guo, H. Hu, D. Zhou, X. Hu, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 3636–3644.
43. J. - H. Liang, X. - L. Li, H. Wang, K. An, Y. - Y. Wang, Y. -C. Xu, G. - W. Yao, *Eur. J. Med. Chem.* **49** (2012) 289–303.
44. X. - M. Li, W. Lv, S. - Y. Guo, Y. - X. Li, B. - Z. Fan, M. Cushman, F. - S. Kong, J. Zhang, J. - H. Liang, *Eur. J. Med. Chem.* **171** (2019) 235–254.
45. S. Tapadar, S. Fathi, I. Raji, W. Omesiete, J.R. Kornacki, S.C. Mwakwari, M. Miyata, K. Mitsutake, J. - D. Li, M. Mrksich, A. K. Oyelere, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 7543–7564.
46. K. Starčević, D. Pešić, A. Toplak, G. Landek, S. Alihodžić, E. Herreros, S. Ferrer, R. Spaventi, M. Perić, *Eur. J. Med. Chem.* **49** (2012) 365–378.
47. D. Pešić, K. Starčević, A. Toplak, E. Herreros, J. Vidal, M. J. Almela, D. Jelić, S. Alihodžić, R. Spaventi, M. Perić, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 3216–3227.
48. M. Bosnar, G. Kragol, S. Koštrun, I. Vujasinović, B. Bošnjak, V. Bencetić Mihaljević, Z. Marušić Ištuk, S. Kapić, B. Hrvaičić, K. Brajša, B. Tavčar, D. Jelić, I. Glojnarčić, D. Verbanac, O. Čulić, J. Padovan, S. Alihodžić, V. Eraković Haber, R. Spaventi, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 6111–6123.
49. M. Yan, R. Ma, L. Jia, H. Venter, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **127** (2017) 874–884.
50. W. Wang, F. Liu, H. Li, Y. Huang, X. Xiao, J. Li, H. Yan, *Preparation method of clarithromycin-N-oxide*, CN103172686B, 2015.
51. Y. Xu, X. Chen, D. Zhu, Y. Liu, Z. Zhao, L. Jin, C. Liu, P. Lei, *Eur. J. Med. Chem.* **69** (2013) 174–181.
52. A. Sugawara, N. Maita, H. Gouda, T. Yamamoto, T. Hirose, S. Kimura, Y. Saito, H. Nakano, T. Kasai, H. Nakano, K. Shiomi, S. Hirono, T. Watanabe, H. Taniguchi, S. Omura, T. Sunazuka, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 4984–4997.
53. T. Sugimoto, Y. Shimazaki, A. Manaka, T. Tanikawa, K. Suzuki, K. Nanaumi, Y. Kaneda, Y. Yamasaki, H. Sugiyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 5739–5743.
54. D. Pavlović, S. Kimmins, S. Mutak, *Eur. J. Med. Chem.* **125** (2017) 210–224.
55. Y. Lee, J. Y. Choi, H. Fu, C. Harvey, S. Ravindran, W. R. Roush, J. C. Boothroyd, C. Khosla, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 2792–2804.
56. 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.

57. 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.
58. A. Z. Washington, S. Tapadar, A. George, A. K. Oyelere, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 5198–5209.
59. H. F. Anwar, M. Andrei, K. Undheim, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 2313–2326.
60. S. Ma, R. Ma, Z. Liu, C. Ma, X. Shen, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
61. L. Hu, P. Lan, Q. L. Song, Z. J. Huang, P. H. Sun, C. Zhuo, Y. Wang, S. Xiao, W. M. Chen, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 5943–5949.
62. R. Kumar, S. Rathy, A. K. Hajare, Y. B. Surase, J. Dullu, J. S. Jadhav, R. Venkataramanan, A. Chakrabarti, M. Pandya, P. Bhateja, G. Ramkumar, B. Das, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 476–481.
63. P. Xu, L. Liu, X. Chen, Y. Li, J. Liu, Z. Jin, G. Wang, P. Lei, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 4079–4083.
64. L. X. Shan, P. H. Sun, B. Q. Guo, X. J. Xu, Z. Q. Li, J. Sun, S. Zhou, W. M. Chen, *Drug Des. Dev. Ther.* **8** (2014) 1515–1525.
65. D. Pavlović, S. Mutak, D. Andreotti, S. Biondi, F. Cardullo, A. Paio, E. Piga, D. Donati, S. Lociuoro, *ACS Med. Chem. Lett.* **5** (2014) 1133–1137.
66. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21**(20) (2020) 7799.
67. S. Glanzer, S. A. Pulido, S. Tutz, G. E. Wagner, M. Kriechbaum, N. Gubensk, J. Trifunovic, M. Dorn, W. M. F. Fabian, P. Novak, J. Reidl, K. Zangger, *Chem. Eur. J.* **21** (2015) 1–10.
68. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta* **80** (2007) 211–216.
69. S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvić Krajačić, G.E. Wagner, N. H. Meyer, C. Göbl, G. N. Rechberger, K. Zangger, P. Novak, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 5632–5636.
70. Zoran Mandić (ur.), *Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development*, poglavlje 5, IAPC, Zagreb, 2012, str. 189–220.
71. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165–173.
72. S. Maity, R. K. Gundampati, T. K. S.Kumar, *Nat. Prod. Commun.* (2019) 1–17.
73. F. Schlünzen, J. M. Harms, F. Franceschi, H. A. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath *Structure* **11** (2003) 329–338.
74. D. Tu, G. Blaha, P.B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270.
75. F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harm, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi *Nature* **413** (2001) 814–821.
76. J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Mol. Cell* **10** (2002) 117–128.

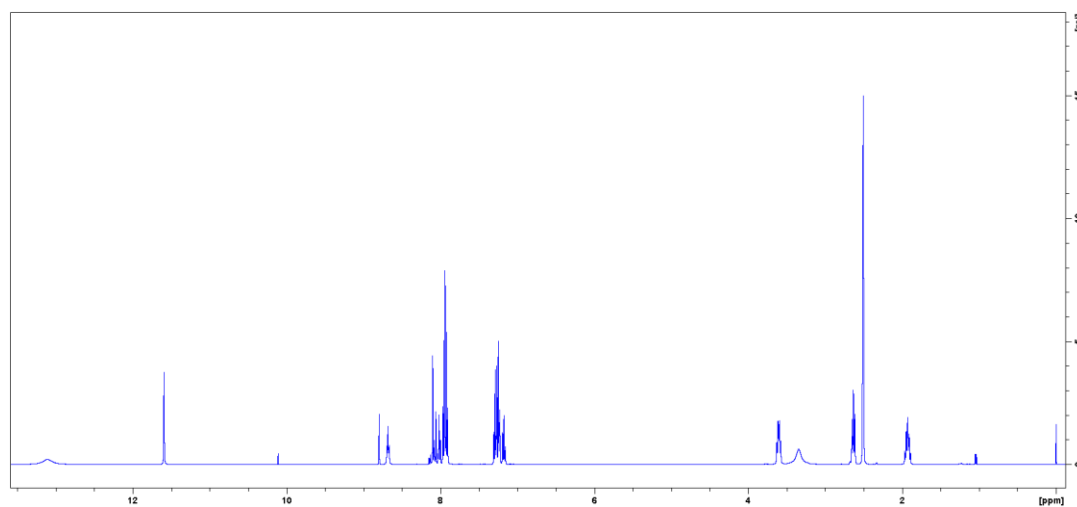
77. J. A. Dunkle, L. Xiong, A. S. Mankin, J. H. D. Cate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (2010) 17152–17157.
78. M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 6108–6617.
79. C. Raingeval, O. Cala, B. Brion, M. Le Borgne, R. E. Hubbard, I. Krimm, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34**(1) (2019) 1218–1225.
80. R. Huang, I.K. H. Leung, *Methods Enzymol.* **615** (2019) 477–500.
81. P. Novak, T. Jednačak, *Određivanje strukture molekula spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2014.
82. B. Arsic, A. Awan, R. J. Brennan, J. A. Aguilar, R. Ledder, A. J. McBain, A. C. Regan, J. Barber, *Med. Chem. Commun.* **5** (2014) 1347–1354.
83. E. B. Pichkur, A. Paleskava, A. G. Tereshchenkov, P. Kasatsky, E. S. Komarova, D. I. Shiriaev, A. A. Bogdanov, O. A. Dontsova, I. A. Osterman, P. V. Sergiev, *RNA* **26** (2020) 715–723.
84. Y. Halfon, D. Matzov, Z. Eyal, A. Bashan, E. Zimmerman, J. Kjeldgaard, H. Ingmer, A. Yonath, *Sci. Rep.* **9** (2019) 11460.
85. B. Llano Sotelo, R. P. Hickerson, L. Lancaster, H. F. Noller, A. S. Mankin *RNA* **15** (2009) 1597–1604.
86. A. G. Tereshchenkov, A. V. Shishkina, V. V. Karpenko, V. A. Chertkov, A. L. Konevega, P. S. Kasatsky, A. A. Bogdanov, N. V. Sumbatyan, *Biochemistry (Mosc.)* **81**(10) (2016) 1163–1172.
87. D. Watkins, F. A. Norris, S. Kumar, D. P. Arya, *Anal. Biochem.* **434** (2013) 300307.
88. A. E. Scheunemann, W. D. Graham, F. A. P. Vendeix, P. F. Agris, *Nucleic Acids Res.* **38**(9) (2010) 3094–3105.
89. K. GC, D. To, K. Jayalath, S. Abeysirigunawardena, *RSC Adv.* **9** (2019) 40268–40276.
90. M. Dudek, J. Romanowska, T. Wituła, J. Trylska, *Biochimie* **102** (2014) 188–202.
91. S. Hong, K. A. Harris, K. D. Fanning, K. L. Sarachan, K. M. Frohlich, P. F. Agris, *J. Biol. Chem.* **290** (31) (2015) 19273–19286.
92. J. Mortier, C. Rakers, M. Bermudez, M. S. Murgueitio, S. Riniker, G. Wolber, *Drug Discov. Today* **20** (2015) 686–702.
93. G. I. Makarov, T. M. Makarova, N. V. Sumbatyan, A. A. Bogdanov, *Biochem. Mosc.* **81** (2016) 1579–1588.
94. J. R. Perilla, B. C. Goh, C. K. Cassidy, B. Liu, R. C. Bernardi, T. Rudack, H. Yu, Z. Wu, K. Schulten, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **31** (2015) 64–74.
95. G. Yuan, L. Xu, X. Xu, P. Li, Q. Zhong, H. Xia, Y. Hu, P. Li, X. Song, J. Li, *Biomed. Pharmacother.* **109** (2019) 1940–1950.
96. F. Ciesielski, D. C. Griffin, J. Loraine, M. Rittig, J. Delves-Broughton, B. B. Bonev, *Front. Cell Dev. Biol.* **4** (2016) 1–12.

97. P. Chelvan, J. Hamilton-Miller, W. Brumfitt, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **8** (1979) 233–235.
98. D. Juricic, J. Danica, I. Hrstic, H. Irena, D. Radic, R. Davor, M. Skegro, S. Mate, M. Coric, C. Marijana, B. Vucelic, V. Boris, I. Francetic, F. Igor, Basic, *Clin. Pharmacol. Toxicol.* **106** (2010) 62–65.
99. E. M. Matsson, U. G. Eriksson, L. Knutson, K. J. Hoffmann, U. Logren, P. Fridblom, N. Petri, H. Lennerns, *J. Clin. Pharmacol.* **51** (2011) 770–783.
100. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanovic, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **56**(5) (2020) 106147.
101. A. Nejabatdoust, H. Zamani, A. Salehzadeh, *Microb. Drug Resist.* **25** (2019) 966–74.
102. P. Fernandes, E. Martens, D. Bertrand, D. Pereira, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 6420–6428.
103. S. F. Zhou, W. Z. Zhong, *Molecules* **22**(2) (2017) 279.
104. M.S. Svetlov, E. Plessa, C.-W. Chen, A. Bougas, M.G. Krokidis, G. P. Dinos, Y. S. Polikanov, *RNA* **25** (2019) 600–606.
105. K. Kannan, A. S. Mankin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1241** (2011) 33–47.
106. A. C. Pawlowski, J.W. Johnson, G. D. Wrighta, *Curr Opin Biotechnol* **42** (2016)108–117.
107. Y. K. Schneider, *Antibiotics* **10**(7) (2021) 842.
108. I. Mikulandra 1, T. Jednačak, B. Bertoša, J. Parlov Vuković, I. Kušec, P. Novak *Materials* **14** (2021) 5561.
109. F. Schlünzen, J. M. Harms, F. Franceschi, H. A.S Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath, *Structure* **11** (2003) 329–338.
110. M. Matijašić, V. Munić Kos, K. Nujić, S. Cužić, J. Padovan, G. Kragol, S. Alihodžić, B. Mildner, D. Verbanac, V. Eraković Haber, *Pharmacol Res.* **66**(4) (2012) 332–42.
111. A. C. Sedgwick, J. T. Brewster, T. H. Wu, X. Feng, S. D. Bull, X. H. Qian, J. L. Sessler, T. D. James, E. V. Anslyn, X. L. Sun, *Chem. Soc. Rev.* **50** (2021) 9–38.
112. N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody, *Circular dichroism. Principles and Applications*, WILEY-VCH, New York, 2000, str. 747–754.
113. M. Eriksson, B. Nordén, J. B. Chaires (ur.), M. J. Waring (ur.), *Methods in Enzymology*, Vol. 340, Eds. Academic Press, San Diego, 2001, str. 68–98.
114. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84–105.

## § 8. DODATAK

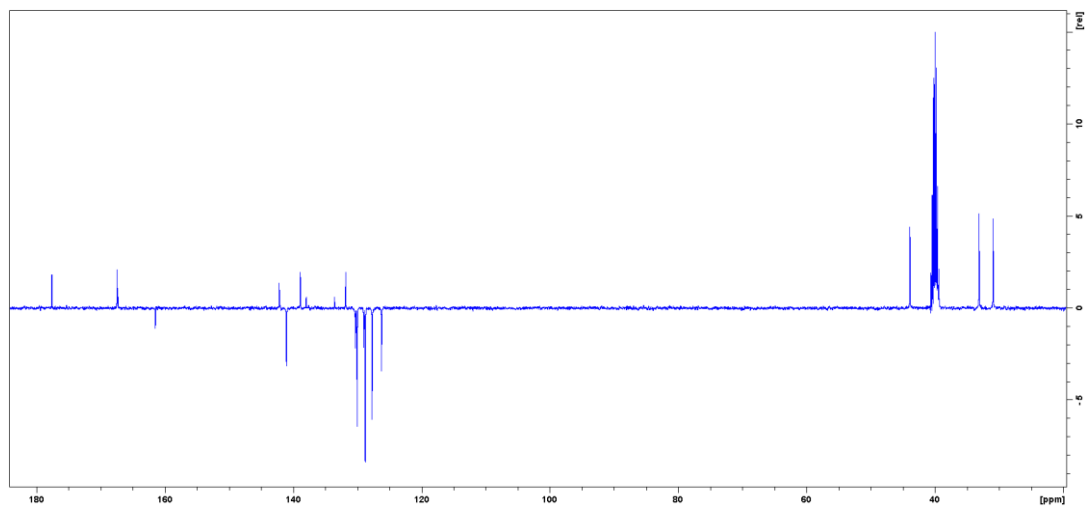


**Slika D1.** Reprezentativni spektar  $^1\text{H}$  *N*-(4-trifluormetoksifenil)hidrazinokarbotoamida u  $\text{DMSO-}d_6$  pri 298 K i 400 MHz

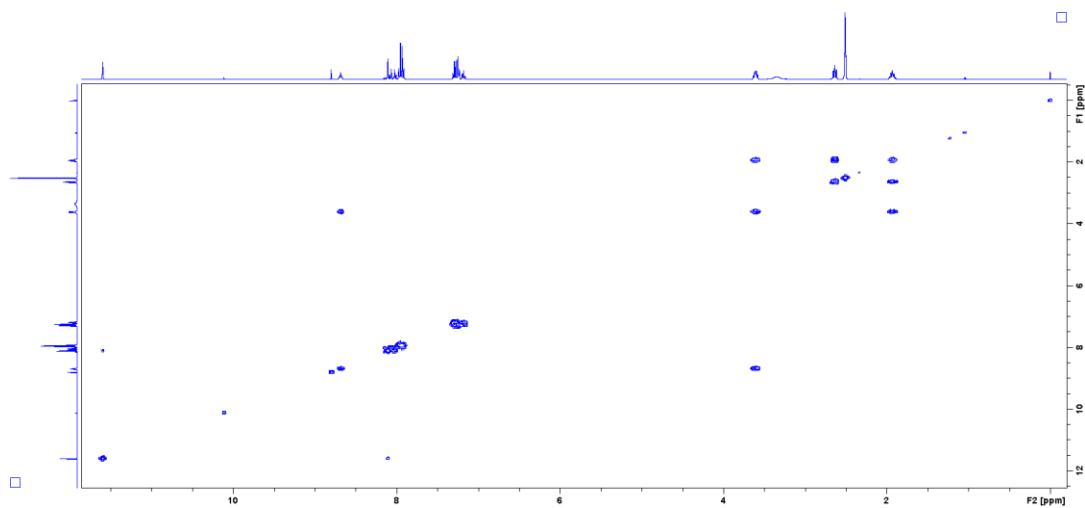


a)

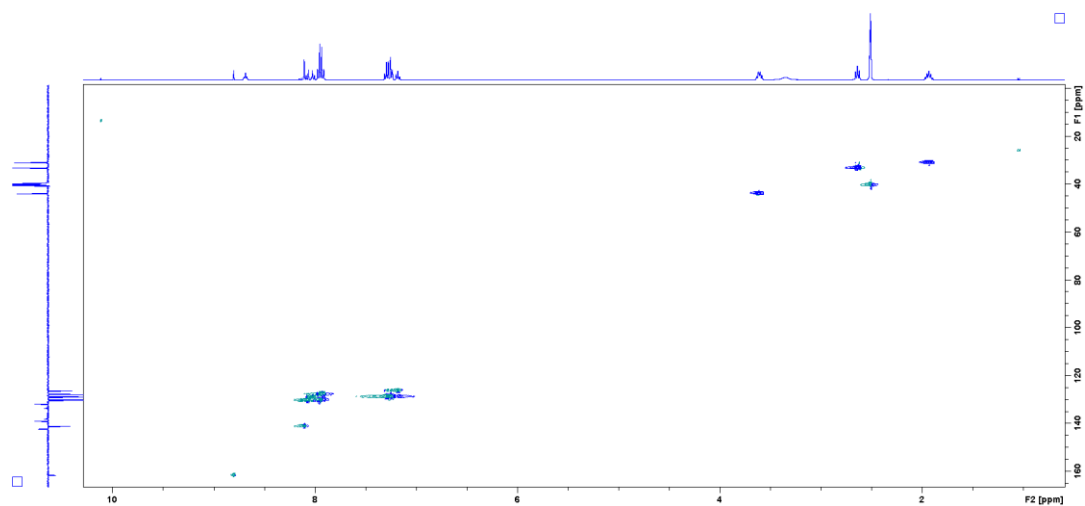




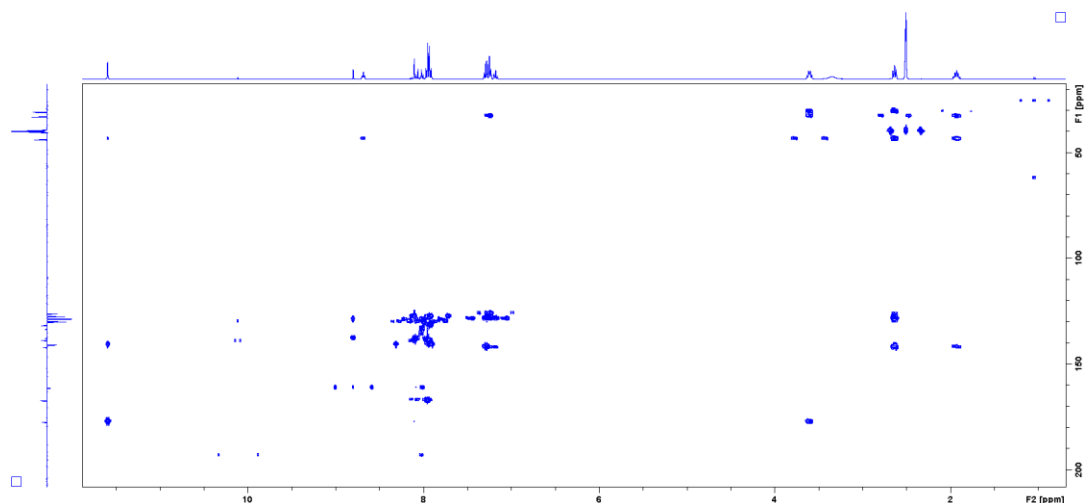
b)



c)

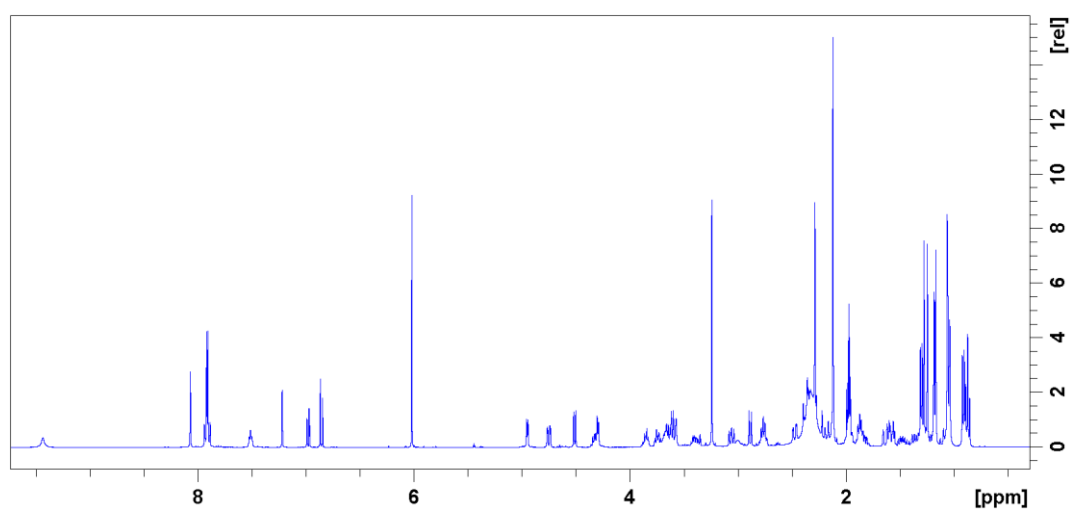


d)

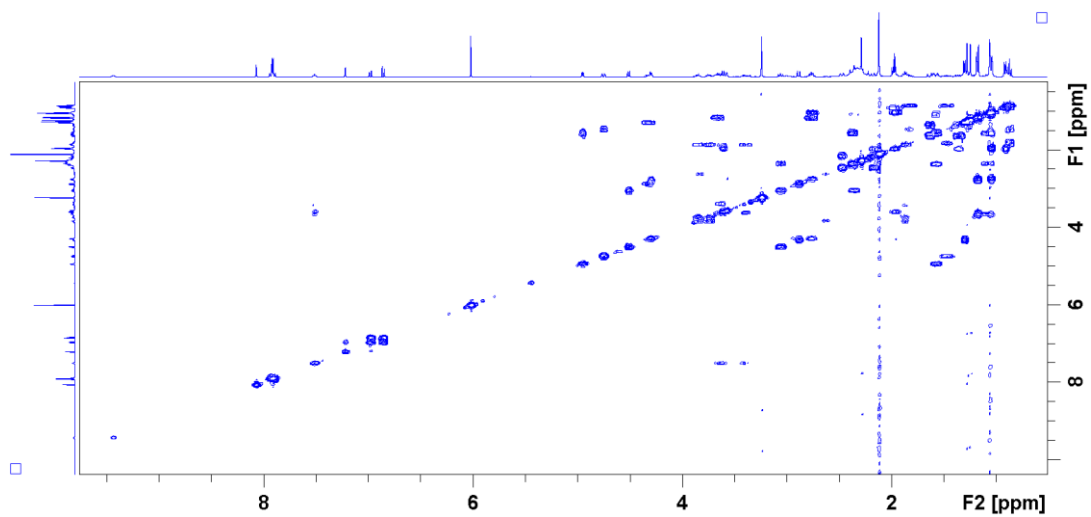


e)

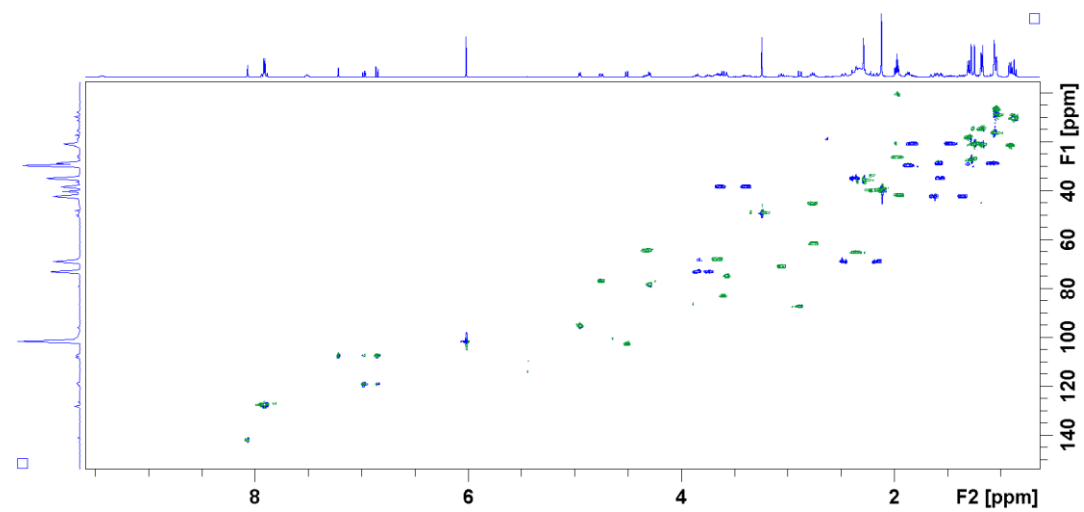
**Slika D2.** Reprezentativni spektri a)  $^1\text{H}$ , b) DEPT Q, c) COSY, d) HSQC i e) HMBC 4-[[2-(3-fenilpropan-1-ilkarbamotioil)hidraziniliden]metil]benzojeve kiseline u  $\text{DMSO-}d_6$  pri 298 K i 400 MHz



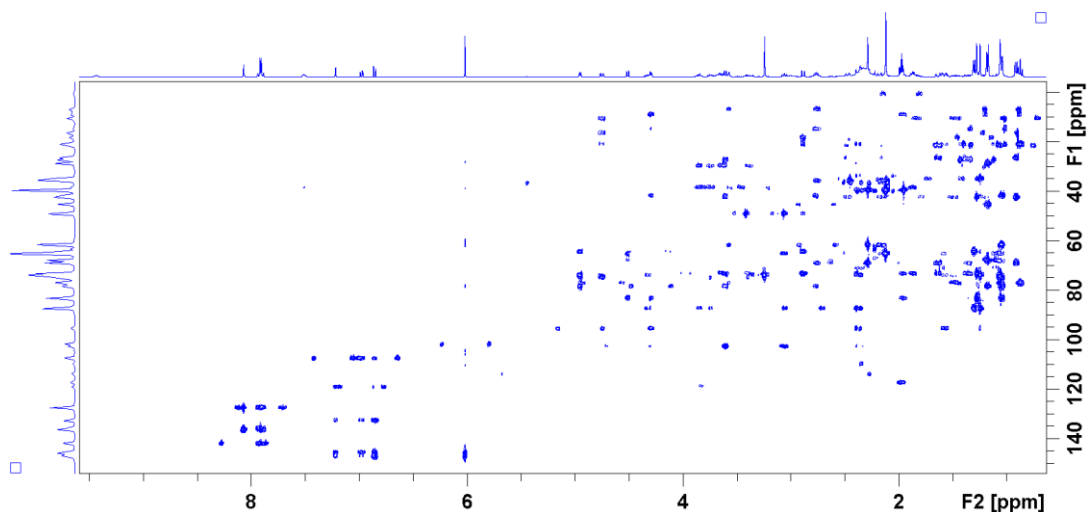
a)



b)

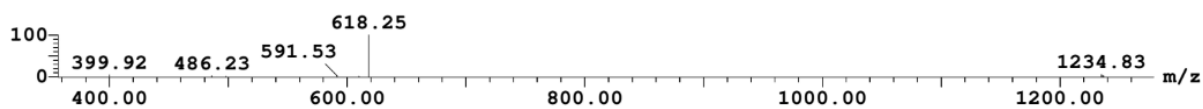


c)

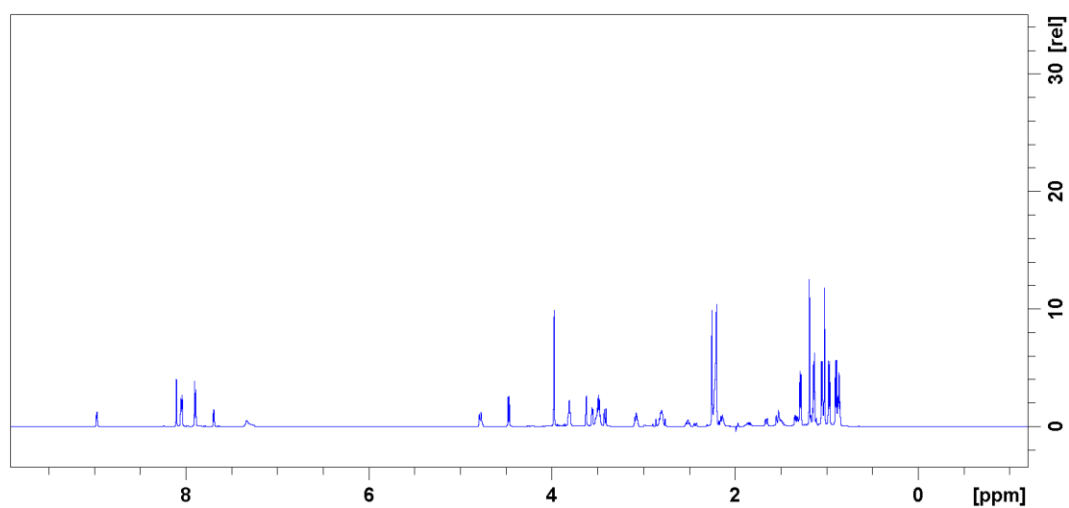


d)

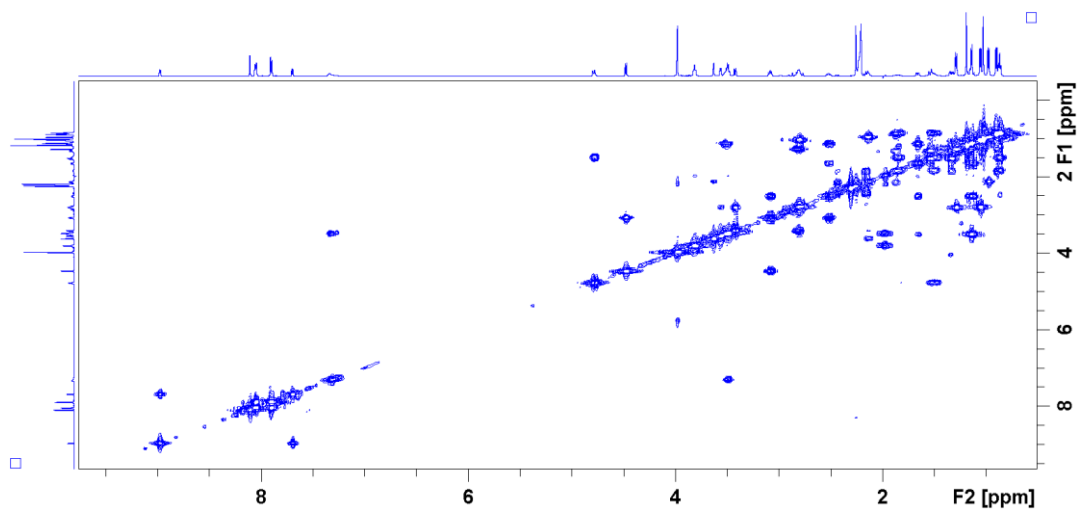
**Slika D3.** Reprezentativni spektri a)  $^1\text{H}$ , b) DEPT Q, c) COSY, d) HSQC i e) HMBC 4-(piperidin-1-ilsulfonil)fenil-4''-makrozona u acetonitrilu- $d_3$  pri 298 K i 400 MHz



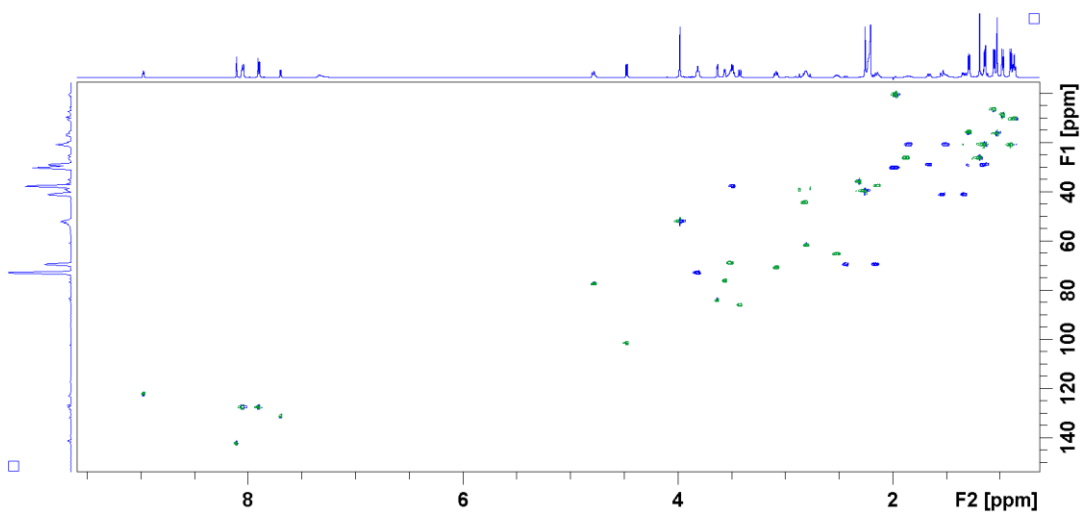
**Slika D4.** Spektar ESI-MS 4-(piperidin-1-ilsulfonil)fenil-4''-makrozona snimljen u pozitivnom modu



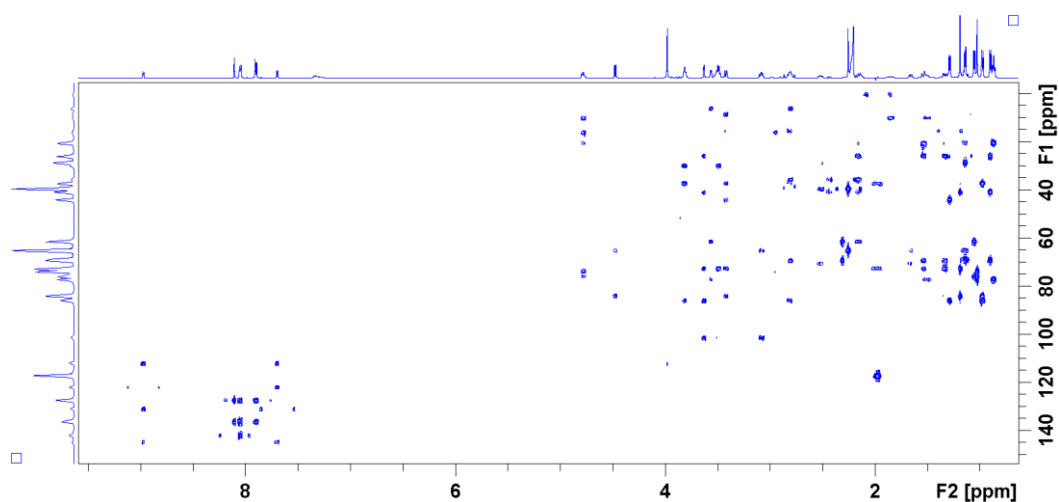
a)



b)

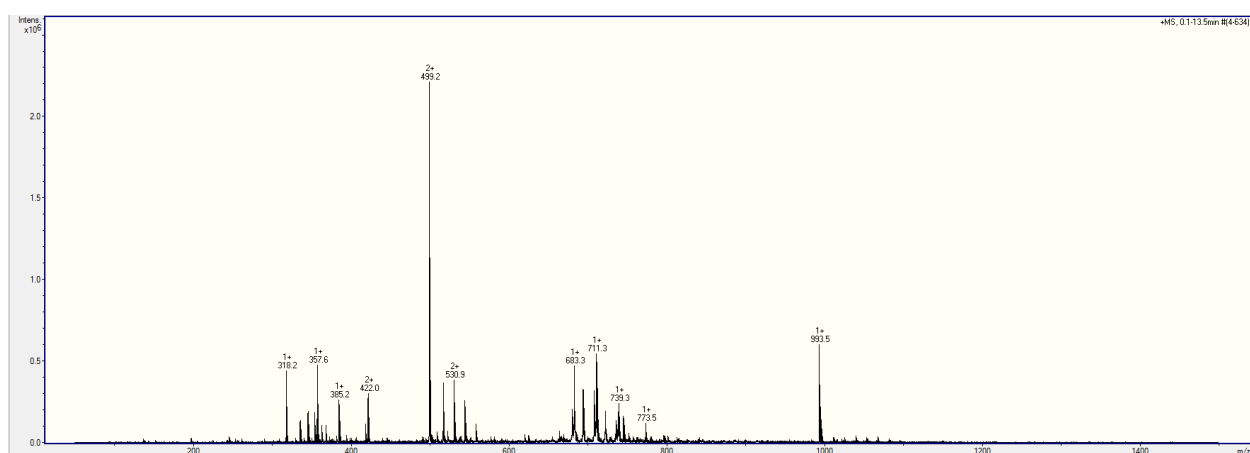


c)

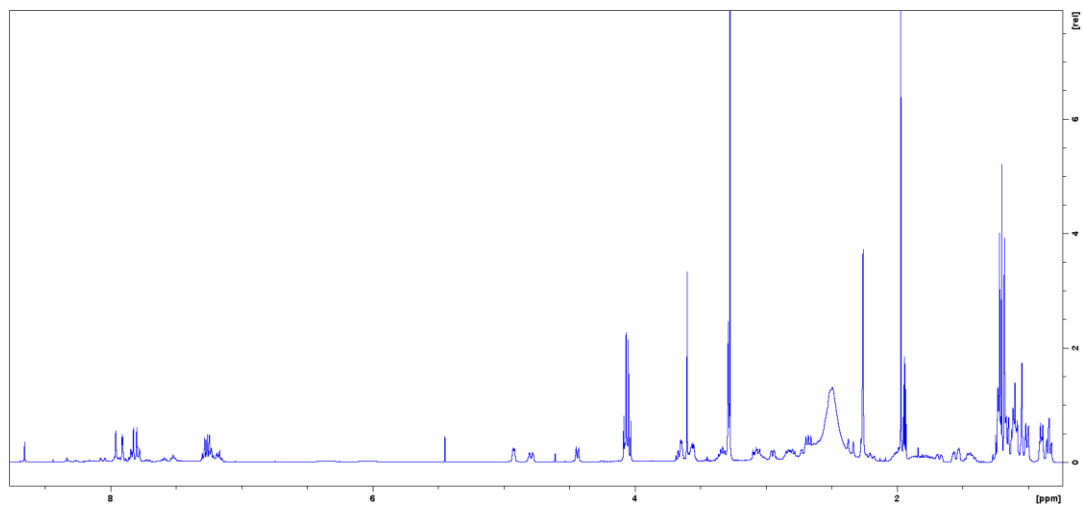


d)

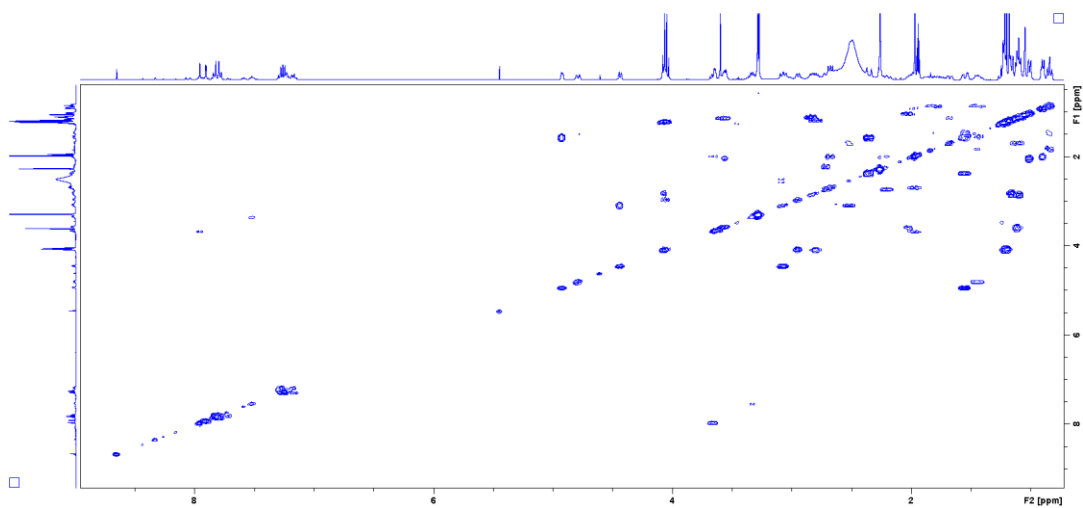
**Slika D5.** Reprezentativni spektri a)  $^1\text{H}$ , b) DEPT Q, c) COSY, d) HSQC i e) HMBC metil-3-tiofen-2-karboksil-3-makrozona u acetonitrilu- $d_3$  pri 298 K i 600 MHz



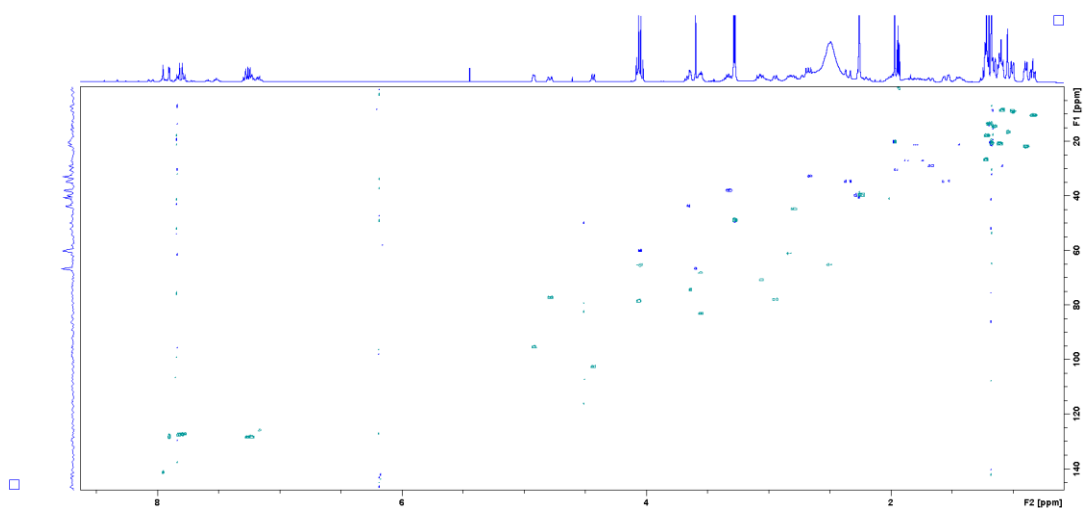
**Slika D6.** Spektar ESI-MS metil-3-tiofen-2-karboksil-3-makrozona snimljen u pozitivnom modu



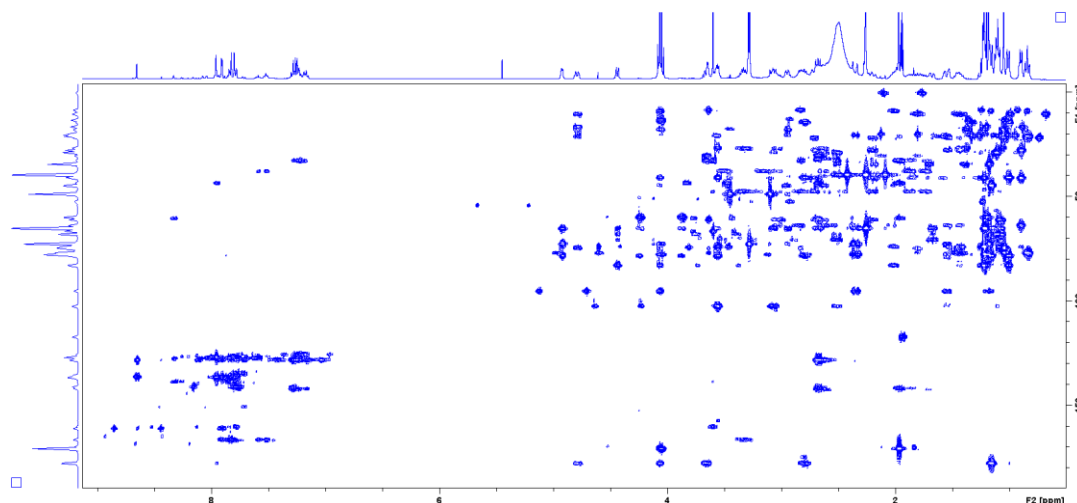
a)



b)

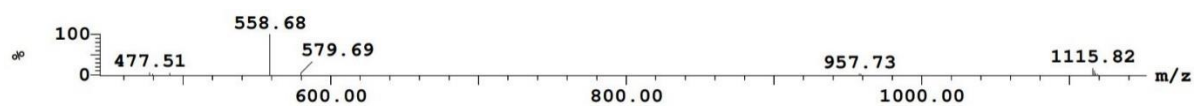


c)



d)

**Slika D7.** Reprezentativni spektri a)  $^1\text{H}$ , b) DEPT Q, c) COSY, d) HSQC i e) HMBC 2-fenilpropil-9a-makrozona u acetonitrilu- $\text{d}_3$  pri 298 K i 400 MHz



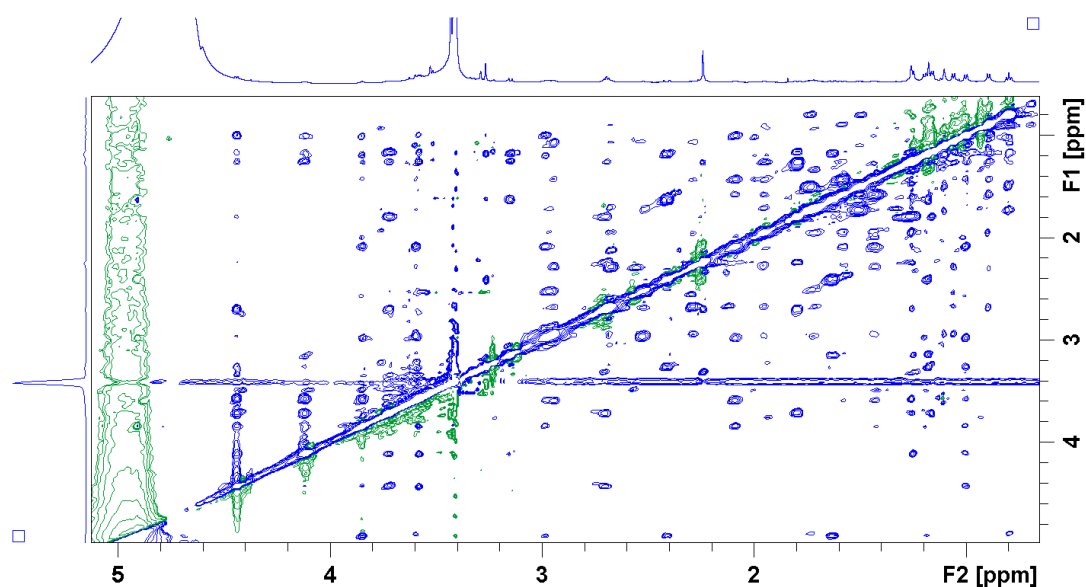
**Slika D8.** Spektar ESI-MS 2-fenilpropil-9a-makrozona snimljen u pozitivnom modu



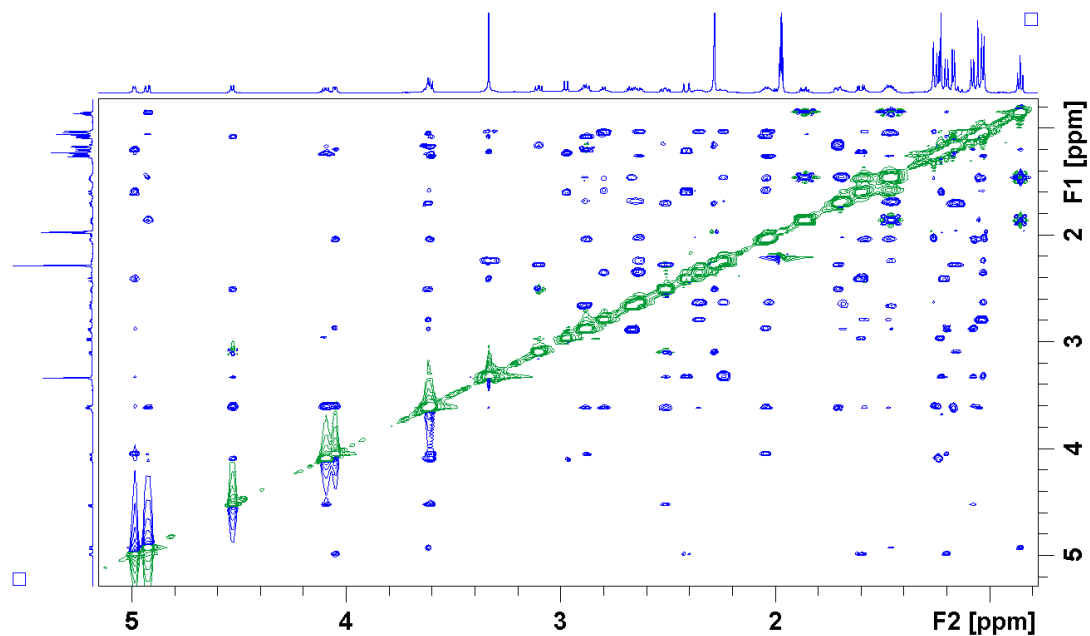
**Tablica D1.** Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR 3-dekladinozil-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**S6**), 4''-*O*-(3-aminopropil)azitromicina (**P5**) i 9a-aminopropil-derivata azitromicina (**M2**) u tris- $\text{d}_{11}$  puferu pri 600 MHz i 25 °C

Atom	S6		P5		M2	
	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
<b>1</b>	-	178,37	-	178,28	-	179,09
<b>2</b>	2,88	44,02	2,89	44,87	2,98	44,41
<b>2Me</b>	1,24	15,42	1,16	14,55	1,19	14,80
<b>3</b>	3,43	85,6	4,01	78,97	3,85	83,20
<b>3a</b>	3,75	72,71	-	-	-	-
<b>3b eq;3b ax</b>	1,78; 1,86	31,06	-	-	-	-
<b>3c</b>	2,72	37,62	-	-	-	-
<b>3d</b>	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
<b>4</b>	2,07	37,27	2,0	41,44	2,10	38,20
<b>4Me</b>	0,90	8,34	0,93	8,9	1,00	9,76
<b>5</b>	3,63	84,22	3,50	83,86	3,50	85,78
<b>6</b>	-	73,58	-	75,90	-	76,40
<b>6Me</b>	1,19	25,73	1,25	26,82	1,19	22,03
<b>7eq;7 ax</b>	1,30; 1,55	40,12	1,39; 1,57	41,31	1,43; 1,58	43,14
<b>8</b>	1,88	25,93	1,95	25,88	1,93	26,00
<b>8Me</b>	0,85	20,67	0,84	21,4	0,89	21,50
<b>9 eq;9 ax</b>	2,21; 2,48	67,81	2,21; 2,54	68,31	2,65; 2,12	58,70
<b>9aN</b>	2,26	- <sup>a</sup>	2,28	35,61	-	-
<b>9a eq;9a ax</b>	-	-	-	-	2,55;2,28	46,30
<b>9b eq;9b ax</b>	-	-	-	-	1,49;1,67	28,50
<b>9c eq;9c ax</b>	-	-	-	-	2,68	38,44
<b>10</b>	2,95	61,48	2,91	61,56	2,93	57,2
<b>10Me</b>	1,02	5,97	1,01	5,3	1,07	9,05
<b>11</b>	3,48	75,77	3,48	75,22	3,59	74,80
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-
<b>12</b>	-	74,8	-	74,29	-	74,30
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-
<b>12Me</b>	1,05	16,45	1,08	16,36	1,10	12,68
<b>13</b>	4,91	77,90	4,80	77,18	4,88	-
<b>14 eq;14 ax</b>	1,52; 1,73	20,54	1,48; 1,73	20,59	1,73;1,49	23,70

14Me	0,80	9,95	0,79	10,10	0,80	10,30
1'	4,40	101,72	4,38	102,82	4,43	102,70
2'	3,32	70,71	3,31	71,03	3,34	70,90
2'OH	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-
3'	2,70	63,43	2,70	63,13	2,68	63,30
3'NMe	2,23	39,55	2,25	39,36	2,23	39,60
4'eq; 4'ax	1,30; 1,83	30,45	1,78; 1,24	31,38	1,80; 1,26	31,29
5'	3,52	69,52	3,66	68,45	3,69	69,80
5'Me	1,19	19,8	1,17	20,45	1,16	20,40
1''	-	-	4,93	95,31	4,92	97,90
2''eq; 2''ax	-	-	2,44; 1,64	34,47	2,41; 1,56	34,90
3''	-	-	-	74,2	-	73,5
3''Me	-	-	1,20	20,65	1,19	17,46
3''OMe	-	-	3,26	49,23	3,25	48,80
4''	-	-	2,97	86,44	3,15	77,30
4''a	-	-	3,68	71,84	-	-
4''b	-	-	1,76	30,44	-	-
4''c	-	-	2,77	37,7	-	-
4''OH	-	-	- <sup>a</sup>	-	- <sup>a</sup>	-
5''	-	-	4,16	64,95	4,12	65,03
5''Me	-	-	1,29	17,9	1,25	17,70

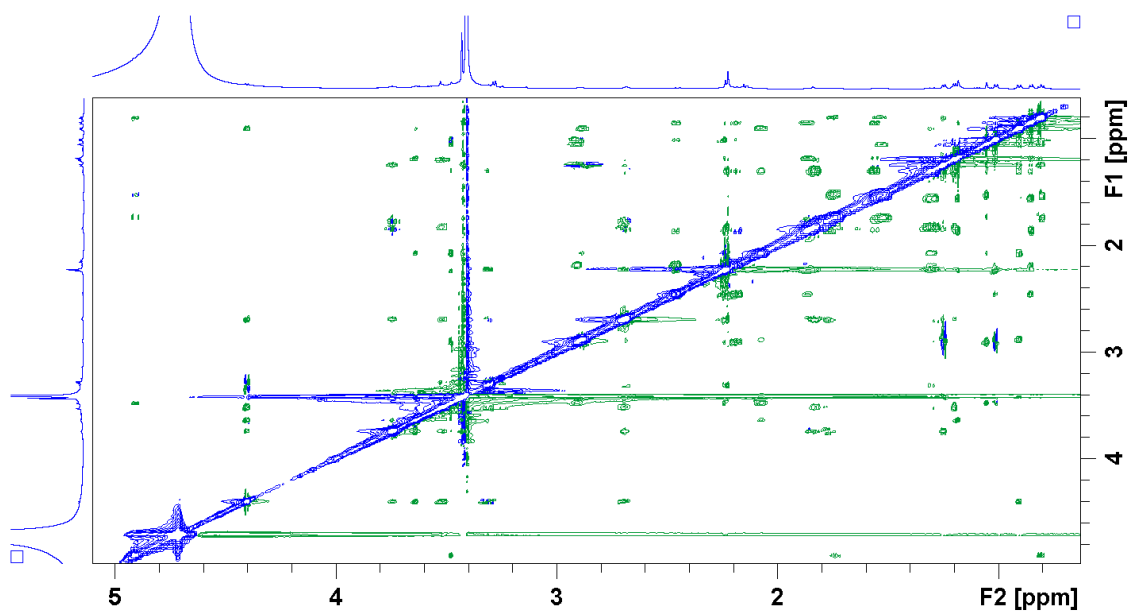


a)

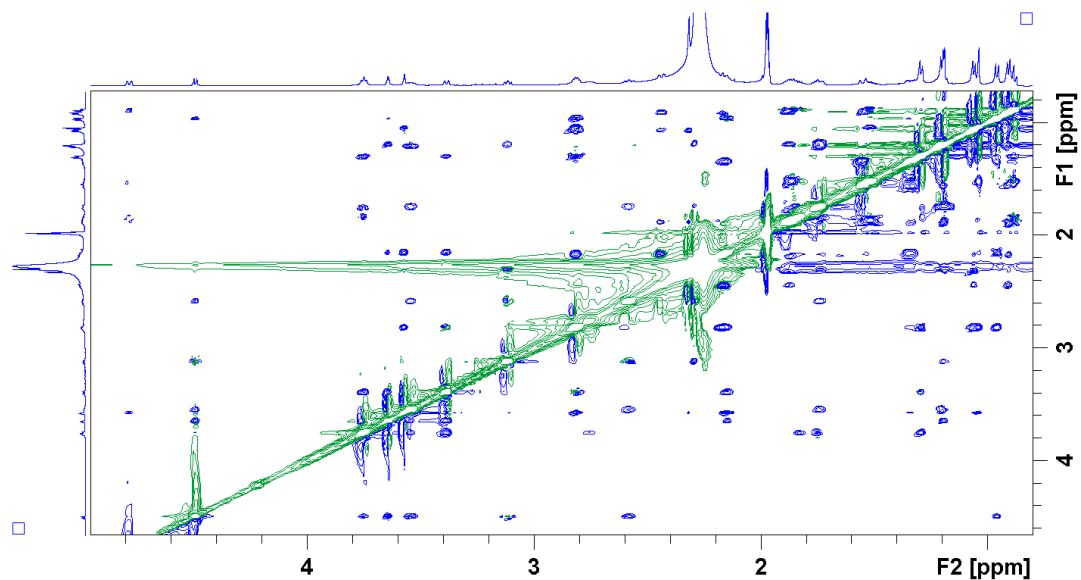


b)

**Slika D9.** Spektri NOESY spoja **M2** u a) tris puferu- $d_{11}$  i b) acetonitrilu- $d_3$  pri 298 K i 600 MHz

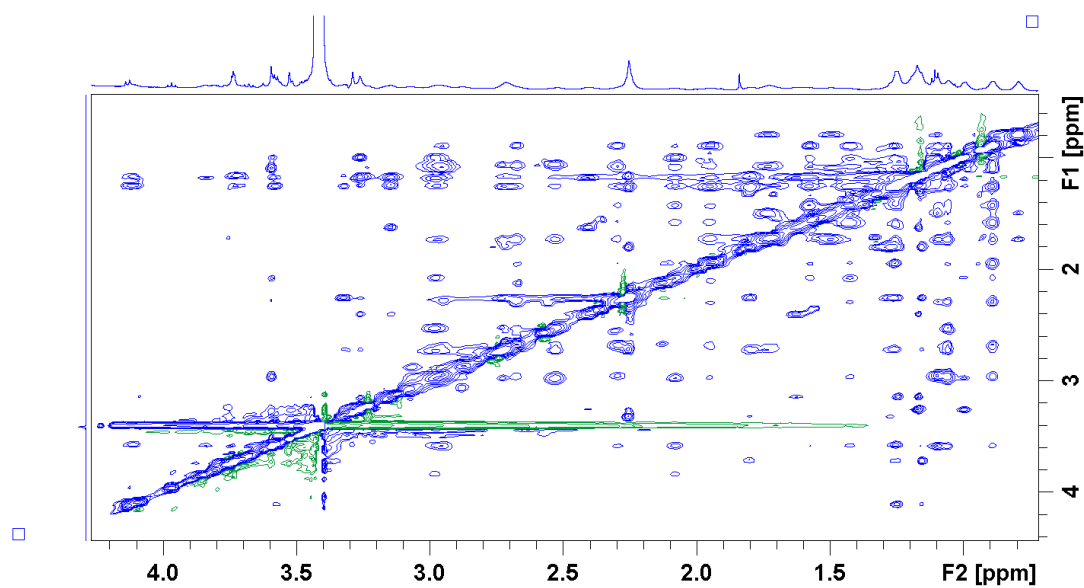


a)

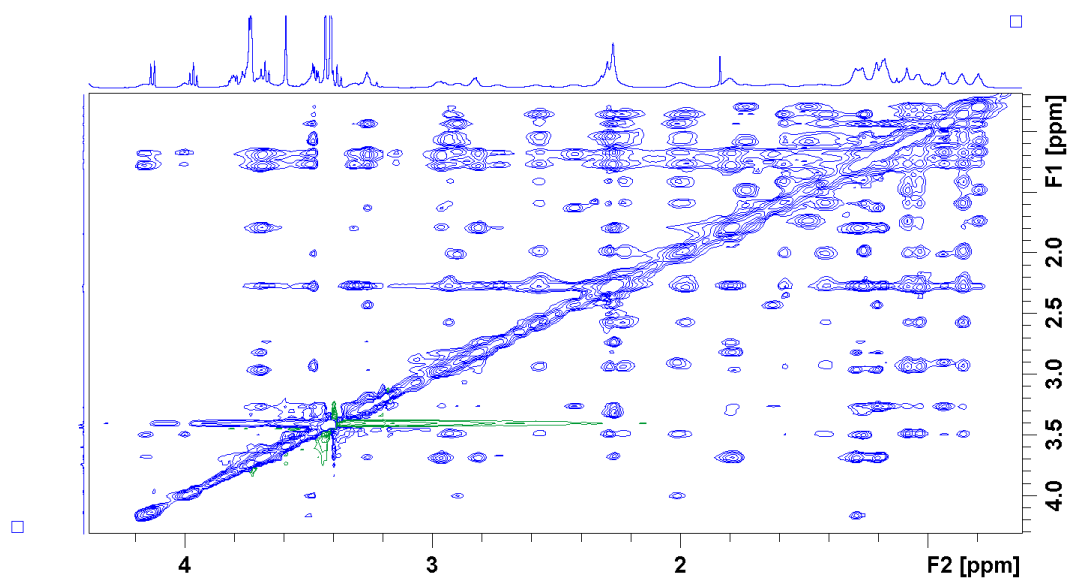


b)

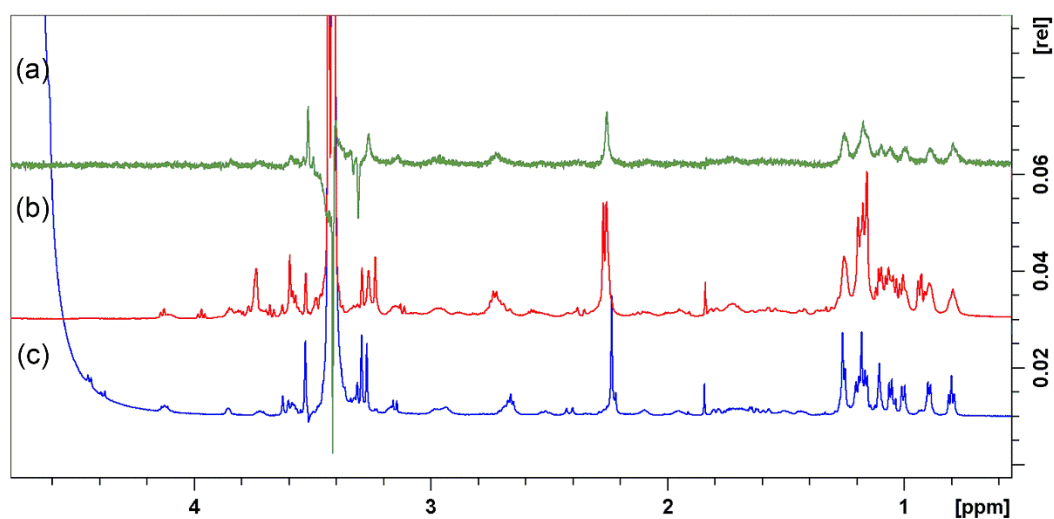
**Slika D10.** Spektri spoja **S6** a) ROESY u tris puferu- $d_{11}$  i b) NOESY u acetonitrilu- $d_3$  pri 298 K i 600 MHz



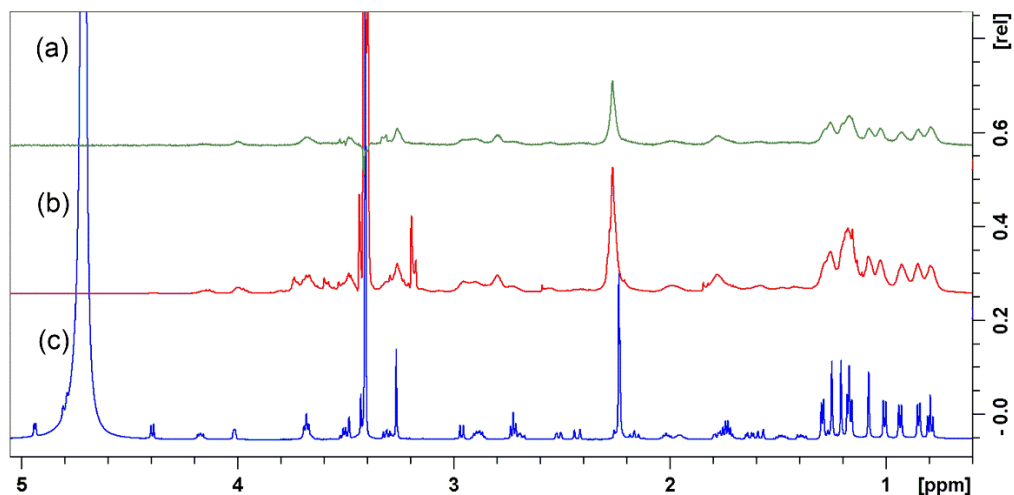
**Slika D11.** Spektar trNOESY spoja **M2** u tris puferu- $d_{11}$  pri 298 K i 600 MHz



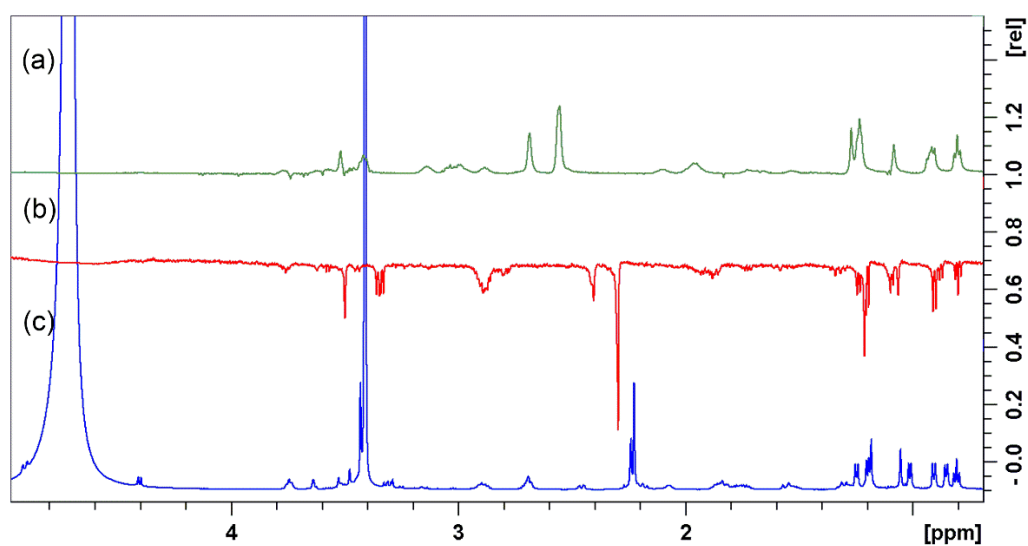
Slika D12. Spektar trNOESY spoja **P5** u tris puferu- $d_{11}$  pri 298 K i 600 MHz



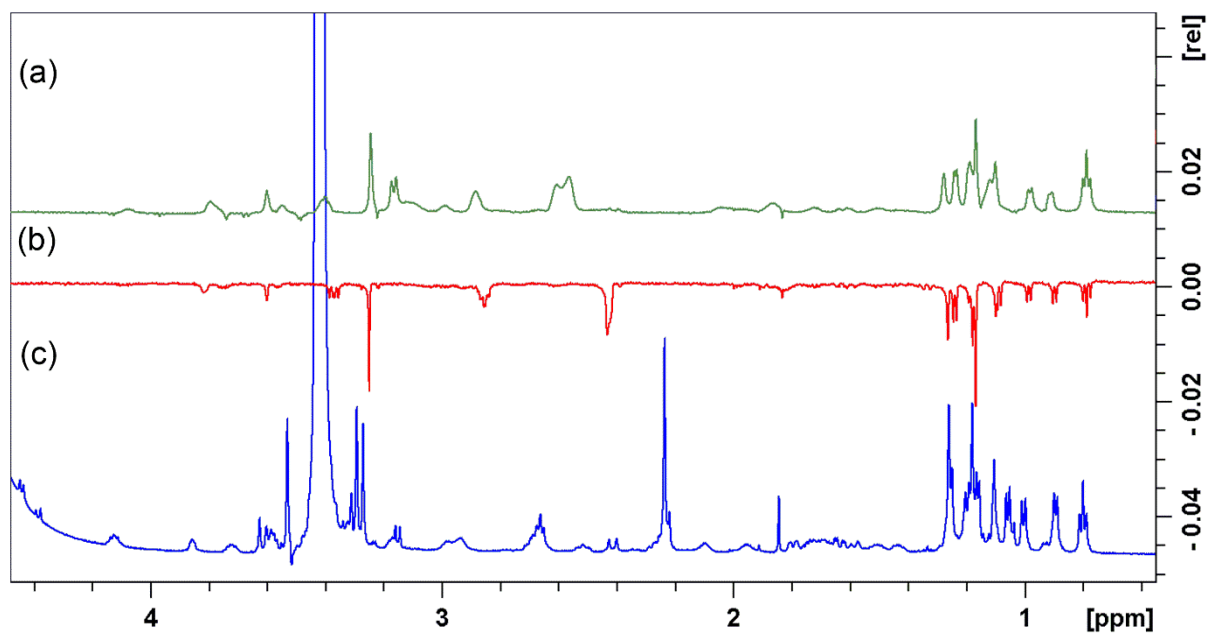
Slika D13. (a) Spektar razlike STD za spoj **M2** nakon dodatka ribosoma; (b) referentni spektar STD nakon dodatka ribosoma; (c) spektar  $^1\text{H}$  prije dodatka ribosoma



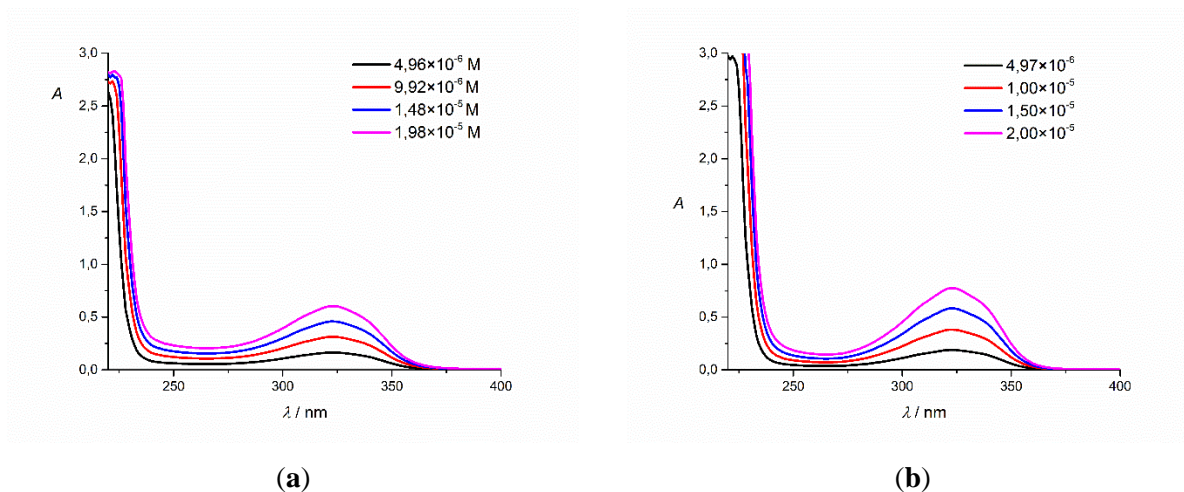
**Slika D14.** (a) Spektar razlike STD za spoj **P5** nakon dodatka ribosoma; (b) referentni spektar STD nakon dodatka ribosoma; (c) spektar  $^1\text{H}$  prije dodatka ribosoma



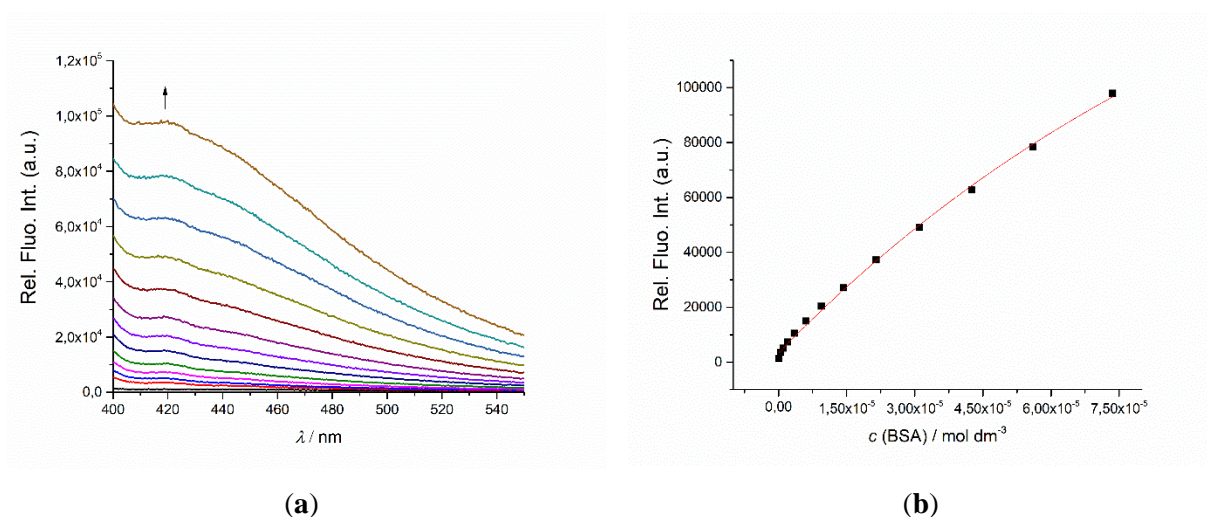
**Slika D15.** (a) Spektar waterLOGSY za spoj **S6** nakon dodatka ribosoma; (b) spektar waterLOGSY prije dodatka ribosoma; (c) spektar  $^1\text{H}$  prije dodatka ribosoma



**Slika D16.** (a) Spektar waterLOGSY za spoj **M2** nakon dodatka ribosoma; (b) spektar waterLOGSY prije dodatka ribosoma; (c) spektar  $^1\text{H}$  prije dodatka ribosoma

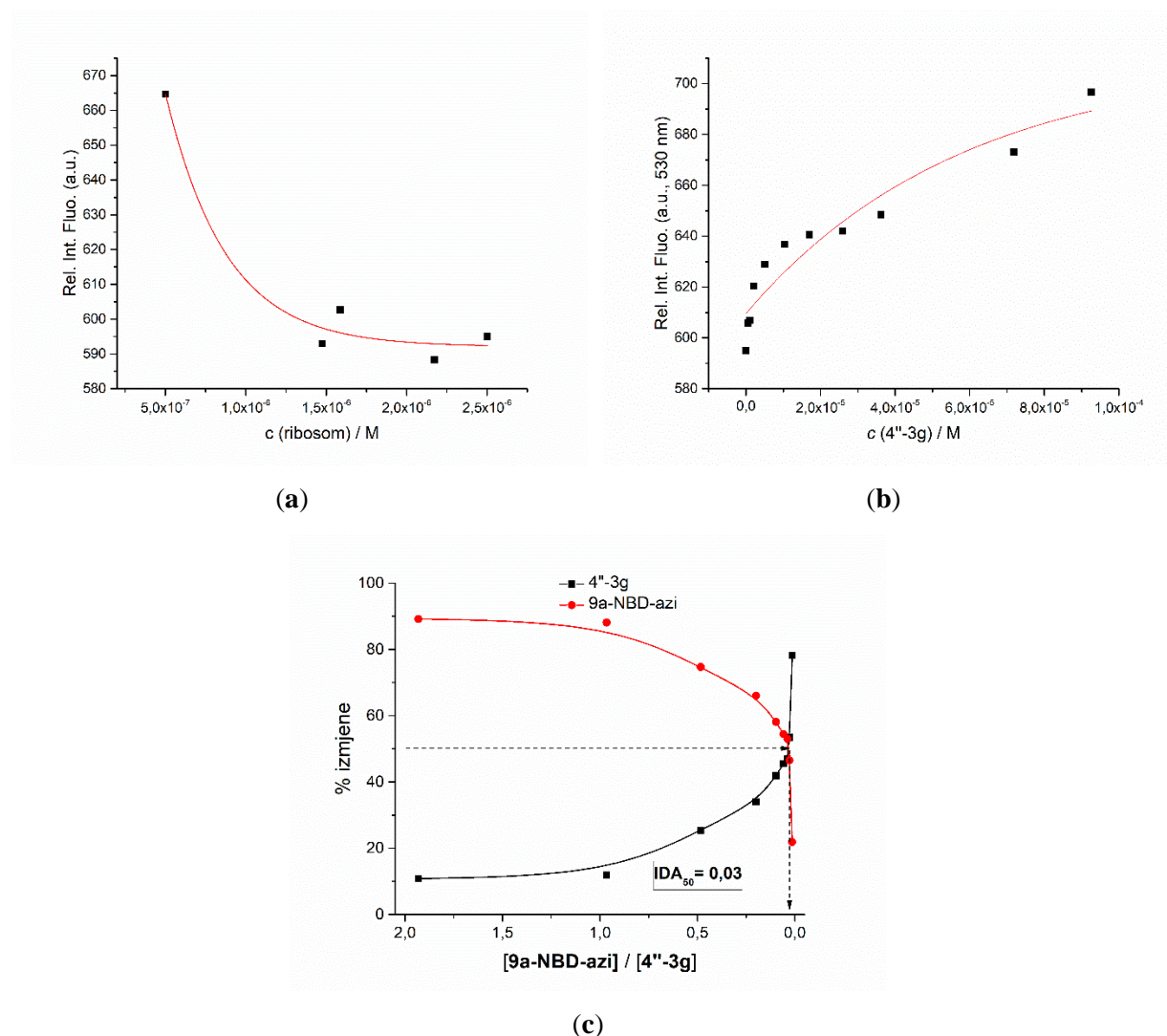


**Slika D17.** UV-VIS spektri makrozona (a) **4''-3b** i (b) **9a-3e** u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7) pri 25 °C

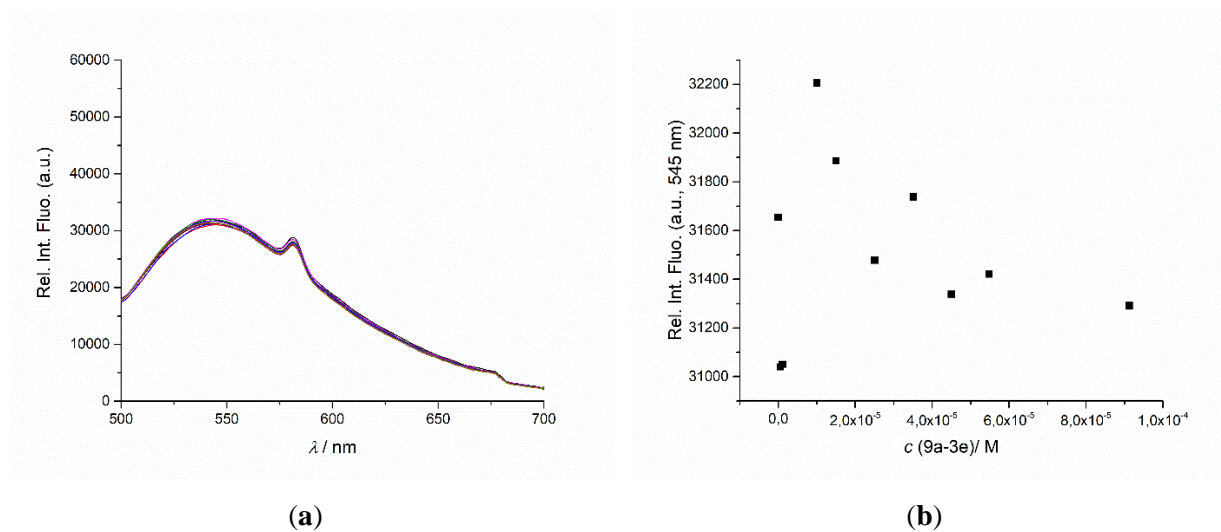


**Slika D18.** (a) spektri fluorescencije prilikom titracije spoja **4''-3g** ( $c = 9,95 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{eksc}} = 325$  nm) s BSA; (b) ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **4''-3g** pri  $\lambda_{\text{maks}} = 419,5$  nm o množinskoj koncentraciji BSA u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7) pri 25 °C





**Slika D19.** (a) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{maks} = 530$  nm o množinskoj koncentraciji ribosoma u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,  $c_0$ (9a-NBD-azitromicin) =  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C; (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{maks} = 535$  nm o množinskoj koncentraciji 4''-3g u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,  $c_0$ (9a-NBD-azitromicin) =  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C; (c) ovisnost postotka izmjene o omjeru koncentracija makrozona 4''-3g i 9a-NBD-azitromicina u kompeticijskom eksperimentu



**Slika D20.** (a) spektri fluorescencije prilikom titracije 9a-NBD-azitromicina ( $c_0 = 5 \times 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{eksc}} = 475$  nm) i ribosoma ( $c_0 = 15,26 \times 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) s makrozonom **9a-3e**; (b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri  $\lambda_{\text{maks}} = 535$  nm o množinskoj koncentraciji **9a-3e** u kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pH = 7) pri 25 °C

## § 9. ŽIVOTOPIS

### *Osobni podatci*

Ime i prezime: Ivana Mikulandra  
Datum rođenja: 07. kolovoza 1993.  
Mjesto rođenja: Šibenik

### *Obrazovanje*

2008. Osnovna škola Petra Krešimira IV., Šibenik  
2012. Gimnazija Antuna Vrančića, Šibenik  
2016. Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
*Završni rad: Priprava i reakcije nitrila*  
2018. Diplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, grane analitička i organska kemija  
*Diplomski rad: Praćenje utjecaja koncentracije i magnetnog polja na agregaciju asfaltena pomoću spektroskopije NMR*  
2022. Poslijediplomski studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, grana analitička kemija

### *Radno iskustvo*

2019. – danas asistent-doktorand, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
2017. – 2018. Analitičar, PLIVA d.o.o., Globalno TAPI Istraživanje i razvoj

### *Publikacije*

1. I. Mikulandra, T. Jednačak, B. Bertoša, J. Parlov Vuković, I. Kušec, P. Novak, *Materials*, **14** (2021), 5561.

2. I. Habinovec, I. Mikulandra, L. E. Sekula, J. Gašperov, S. Kazazić, P. Novak, *Molecules*, **26** (2021), 6316.
3. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanovic, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* **56**(5) (2020) 106147.
4. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21**(20) (2020) 7799.
5. J. P. Vuković, P. Novak, T. Jednačak, M. Kveštak, D. Kovačević, V. Smrečki, I. Mikulandra, M. D. Ibrahimpašić, S. Glanzer, K. Zangger, *J. Dispers. Sci. Technol.* **41** (2020) 179–187.

### *Sudjelovanja na znanstvenim skupovima*

2018. Adriatic NMR Conference, Mali Ston, Hrvatska
2019. 26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, Hrvatska
2019. Adriatic NMR Conference, Mali Ston, Hrvatska
2020. Adriatic NMR Conference, Peroj, Hrvatska
2020. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska
2021. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska
2021. Euromar, Portorož, Slovenija
2021. Adriatic NMR Conference, Šibenik, Hrvatska

### *Sažeci sa skupova*

1. Jednačak, Tomislav; Mikulandra, Ivana; Parlov Vuković, Jelena; Novak, Predrag; *Structure characterization of aminopropyl azithromycin derivatives in solution and solid state*, Adriatic NMR Conference 2021., Book of abstracts, str. 57-57 (poster)
2. Mikulandra, Ivana; Kušec, Iva; Jednačak, Tomislav; Novak, Predrag; *Interactions of azithromycin aminopropyl derivatives with E. coli ribosome studied by NMR spectroscopy*, Euromar 2021., Book of abstracts, str. 216-216 (poster)
3. Mikulandra, Ivana; Jednačak, Tomislav; Habinovec, Iva; Novak, Predrag; *NMR methods for studying structure and interactions of macrozones*, Adriatic NMR Conference 2021., Book of abstracts, str. 35-35 (predavanje)
4. Mikulandra, Ivana; Jednačak, Tomislav; Habinovec, Iva; Novak, Predrag; *Synthesis and characterization of macrozones, novel bioactive derivatives of azithromycin*, 5.

- Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a 2021., knjiga sažetaka str. 113-113 (predavanje)
5. Gašperov, Jana; Mikulandra, Ivana; Jednačak, Tomislav; Bertoša, Branimir; Habinovec, Iva; Novak, Predrag; *Synthesis, structure characterization and interactions of 4'-aminopropyl derivative of azithromycin*, Adriatic NMR Conference 2020., Book of Abstracts, str. 41-41 (poster)
  6. Mikulandra, Ivana; Habinovec, Iva; Gašperov, Jana; Barišić, Antonio; Bukvić-Krajačić, Mirjana; Grgičević, Ivan; Novak, Predrag; *Priprava, izolacija i strukturna karakterizacija novih bioaktivnih 4''-derivata makrozona*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a 2020., Knjiga sažetaka, str. 124-124 (poster)
  7. Sekula, Lucia Ema; Habinovec, Iva; Mikulandra, Ivana; Gašperov, Jana; Novak, Predrag; Grgičević, Ivan; Bukvić, Mirjana; *Izolacija i strukturna karakterizacija komponenata reakcijskih smjesa 9a- i 4''-tetrahidrofurfuril makrozona tehnikom LC-SPE/NMR*, Adriatic NMR conference 2020., Book of abstracts str. 38-38 (poster)
  8. Smrečki, Vilko; Novak, Predrag; Jednačak, Tomislav; Kovačević, Davor; Mikulandra, Ivana; Djetelić Ibrahimpašić, Mateja; Zangger, Klaus; Parlov Vuković, Jelena; *Magnetic Field Influence on Asphaltene Aggregation Observed by DOSY NMR 2019.*, ISMAR EUROMAR, Joint Conference str. 650-650 (poster)
  9. Rubić, Ivana; Beer Ljubić, Blanka; Novak, Predrag; Mikulandra, Ivana; Mrljak, Vladimir; *Study of serum metabolome in dogs with babesia canis infection by nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Adriatic NMR Conference 2019., Book of abstracts str. 60-60 (poster)
  10. Habinovec, Iva; Novak, Predrag; Benčić, Noelle; Mikulandra, Ivana; Lulić, Ana-Marija; Grgičević, Ivan; Bukvić, Mirjana; Zangger, Klaus; *Determination of ethyl-phenyl macrozone reaction mixture components by LC-SPE/NMR methodology*, Adriatic NMR conference 2019, Book of Abstracts, str. 61-61 (poster)
  11. Mikulandra, Ivana; Facković, Matea; Lulić, Ana-Marija; Habinovec, Iva; Benčić, Noelle; Bukvić, Mirjana; Grgičević, Ivan; Jednačak, Tomislav; Cindrić, Marina; Zangger, Klaus; Novak, Predrag; *Synthesis and characterization of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates*, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera 2019., Knjiga sažetaka str. 93-93 (poster)

12. Habinovec, Iva; Benčić, Noelle; Bukvić, Mirjana; Grgičević, Ivan; Mikulandra, Ivana; Jednačak, Tomislav; Novak, Predrag; *LC-SPE/NMR analysis of macrozones, new bioactive azithromycin conjugates*, 26. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera 2019., Knjiga sažetaka str. 88-88 (poster)
13. Djetelić Ibrahimpašić, Mateja; Jednačak, Tomislav; Mikulandra, Ivana; Zangger, Klaus; Tassoti, Sebastian; Novak, Predrag; Parlov Vuković, Jelena; *Influence of paramagnetic metals on the asphaltene aggregation behavior*, Adriatic NMR Conference 2019., Book of abstracts str. 54-54 (poster)
14. Mikulandra, Ivana; Škevin, Sonja; Lulić, Ana- Marija; Habinovec, Iva; Jednačak, Tomislav; Bertoša, Branimir; Novak, Predrag; *Epitope mapping of a macrozone interaction with ribosome by NMR spectroscopy and molecular modeling*, Adriatic NMR Conference 2019., Book of abstracts, str. 57-57 (poster)
15. Novak, Predrag; Mikulandra, Ivana; Habinovec, Iva; Jednačak, Tomislav; Bertoša, Branimir; Škevin, Sonja; Bukvić, Mirjana; Grgičević, Ivan; *NMR and Docking Studies of Novel Macrolide Conjugates*, SMASH, 2019. Book of Abstracts, str. 89-89 (poster)
16. Habinovec, Iva; Novak, Predrag; Pičuljan, Katarina; Jednačak, Tomislav; Rubić, Ivana; Mikulandra, Ivana; Grgičević, Ivan; Bukvić Krajačić, Mirjana; Gubensäk, Nina; Zangger, Klaus; *Impurity profiling of azithromycin conjugates by LC-SPE/CRYO NMR methodology*, Adriatic NMR Conference 2018., Book of abstracts, str. 58-58 (poster)
17. Mikulandra, Ivana; Jednačak, Tomislav; Parlov Vuković, Jelena; Djetelić Ibrahimpašić, Mateja; Zangger, Klaus; Smrečki, Vilko; Novak, Predrag *Concentration dependence of asphaltene aggregation monitored by DOSY NMR*, Adriatic NMR Conference 2018, Book of abstracts, str. 57-57 (poster)

### ***Istraživanja i ostali projekti***

2018. – danas istraživač na projektu Makrozoni, novi konjugati makrolidnih antibiotika: Dizajn, priprava i interakcije koji financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ-IP-2018-01-8098).
2021. stručni projekt PLIVA: identifikacija onečišćenja u lijekovima

### ***Stručno usavršavanje***

2021. Napredne NMR metode, Zürich, Švicarska

### ***Akademsko iskustvo***

Asistent na kolegijima: *Praktikum analitičke kemije 2* (laboratorijske vježbe) i *Spektroskopska strukturna analiza* (seminar)

Neposredni voditelj tri diplomska rada i rada koji je dobio Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad

### ***Sudjelovanja u popularizaciji znanosti***

2014. 7. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

2018. 11. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka PMF-a

### ***Članstvo***

Hrvatsko kemijsko društvo

### ***Strani jezici***

Engleski jezik (C1)

Talijanski jezik (A2)