

Priprava, karakterizacija i interakcije 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina s ribosomom iz bakterije Escherichia coli

Gašperov, Jana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:785839>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Jana Gašperov

**PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I
INTERAKCIJE 3-AMINOPROPIL
DEKLADINOZIL DERIVATA
AZITROMICINA S RIBOSOMOM IZ
BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI***

Diplomski rad

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

Zagreb, 2020.

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

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

Zahvale

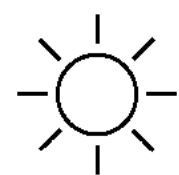
Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Predragu Novaku na pruženoj prilici, povjerenju i vjeri u ovaj rad. Hvala Vam na konstruktivnim savjetima tijekom izrade Diplomskog rada i veliko Vam hvala na strpljenju pri ispravljanju svakog našeg rada do sada. Ogroooooomno hvala mojoj neposrednoj voditeljici Ivani Mikulandri, mag. chem.! Bez tebe izrada ovog rada ne bi bila ista. Hvala ti na ugodnoj i poticajnoj radnoj atmosferi i na svim savjetima. Hvala doc. dr. sc. Tomislavu Jednačku pri pomoći prilikom snimanja spektara interakcija. Hvala i Ivi Habinovec, mag. chem. i LESi – curama s druge strane labosa – na divnoj atmosferi u našoj 106ici i van nje. Uz vas je izrada Diplomskog bila sve samo ne dosadna.

Neizmjerne hvala ekipi iz Znanstvenih čarolija! Uz projekt i Vas sam naučila puno toga što nikad ne bih. Najveće hvala mojim divnim curama: MMartini – na vjeri u mene – i Emi – uz tebe su Čarolije i više nego sigurne. HVALA mojoj Per koja je od prvih godina studiranja uz mene. Hvala ti na svim motivacijskim razgovorima, svim studentskim utorcima, srijedama i subotama, na beskonačnim glasovnim porukama i na svemu kaj si (ne)svjesno delala za mene. Smak svijeta ne postoji! (ili postoji, diplomirale smo?) Hvala najdražim Truleksićima. Niš drugo nemam za reć osim – Idemo sjest! Hvala i Hani, mom katabiolatoru. Hvala mojim curama – Viki i Luciji. Hvala i Matiji na svim popijenim kavama u pauzama od snimanja spektara, popijenim bocama uz Catan i na samoizolaciji. Hvala i Koroni što me zatvorila doma i uz čije društvo je bilo zanimljivo pisati ovaj Rad. Hvala teti Meliti bez koje vjerojatno ne bih ni dobila želju da studiram na PMF-u.

Hvala i mom Filipu. Hvala ti što si uz mene od prve pomisli o ovom studiju. Hvala na svim razgovorima ikad. Hvala ti što si pun ideja, razumijevanja i potpore kada je najpotrebnije. Nema riječi kojima ti se mogu zahvaliti. Hvala ti, hvala ti, hvala ti.

I na kraju, najveće hvala Mami i Tati. Ni sami ne znate koliko ste utjecali na svog ludog znanstvenika svih ovih godina. Hvala Vam na podršci i vjeri u mene. Hvala Vam na razumijevanju i ljubavi koju mi pružate iz dana u dan.

Samo nam ti diplomiraj, ostalo ćemo lako. ♡



Sadržaj

SAŽETAK.....	VII
ABSTRACT	IX
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Makrolidi	2
2.1.1. Podjela makrolida.....	2
2.1.2. Trodimenzijska struktura makrolida.....	6
2.2. Mehanizam djelovanja makrolida.....	8
2.3. Azitromicin	10
2.4. Bakterijska rezistencija na makrolide	12
2.5. Spektroskopija NMR	13
2.5.1. Tehnike NMR za određivanje strukture spojeva	14
2.5.1.1. Tehnika ¹ H NMR.....	14
2.5.1.2. Tehnika DEPT-Q.....	15
2.5.1.3. Tehnika COSY	15
2.5.1.4. Tehnika HSQC.....	16
2.5.1.5. Tehnika HMBC.....	16
2.5.1.6. Tehnika NOESY.....	16
2.5.1.7. Tehnika ROESY	17
2.5.2. Tehnike NMR za određivanje interakcija ligand-receptor.....	18
2.5.2.1. Tehnika tr-NOESY.....	19
2.5.2.2. Tehnika STD.....	21
2.6. Interakcije makrolida s biološkim metama	22
2.6.1. Interakcije makrolida s ribosomom	22
2.6.2. Interakcije makrolida s drugim biološkim metama.....	26
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. Kemikalije i instrumenti.....	29
3.2. Priprava 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina	30
3.3. Metode za karakterizaciju 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina.....	32
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. Priprava 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina	34
4.2. Karakterizacija 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina.....	35

4.3. Interakcije 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina s ribosomom	43
§ 5. ZAKLJUČAK	46
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	47
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	48
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I INTERAKCIJE 3-AMINOPROPIL DEKLADINOZIL DERIVATA AZITROMICINA S RIBOSOMOM IZ BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

Jana Gašperov

Makrolidni antibiotici, poput azitromicina, koriste se u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Djeluju kao inhibitori sinteze bakterijskih proteina tako što se vežu na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma u blizini centra peptidil-transferaze. Učestalo korištenje makrolidnih antibiotika dovelo je do pojave i razvoja bakterijske rezistencije. Iz tog razloga javlja se potreba za otkrićem i razvojem novih antibiotika. Za razumijevanje cjelokupnog biološkog profila novog potencijalnog lijeka važno je odrediti konformaciju molekule u slobodnom i vezanom stanju te istražiti interakcije s biološkim metama. U ovom radu uspješno je pripremljen 3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina (**S6**), prekursor u sintezi makrozona, novih bioaktivnih konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. Pripremljeni spoj okarakteriziran je spektroskopijom NMR i spektrometrijom masa. Upotrebom tehnike ROESY određena je konformacija prekursora u slobodnom stanju, a pomoću tehnika tr-NOESY i STD istražene su interakcije prekursora s ribosomom izoliranim iz bakterije *Escherichia coli* te je određena konformacija u vezanom stanju.

(50 stranica, 32 slike, 9 tablica, 43 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

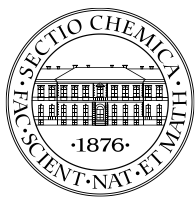
Ključne riječi: azitromicin, interakcije, makrolidi, rezistencija, spektroskopija NMR

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak
Neposredni voditelj: Ivana Mikulandra, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
 3. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
- Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 8. prosinac 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND INTERACTIONS OF 3-AMINOPROPYL DESCLADINOSYL DERIVATE OF AZITHROMYCIN WITH *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOME

Jana Gašperov

Macrolide antibiotics, such as azithromycin, are used to treat infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria. They act as inhibitors of bacterial protein synthesis by binding to the 50S subunit of the bacterial ribosome at or near the peptidyl transferase center. Frequent use of macrolide antibiotics has led to the emergence of bacterial resistance. For this reason, there is a need to discover and develop new antibiotics. To understand the overall biological profile of a new potential drug, it is important to determine the conformation of molecules in the free and bound state and to investigate interactions with biological targets. In this work, 3-aminopropyl decladinosyl derivative of azithromycin (**S6**), a precursor in the synthesis of macrozones, a new bioactive conjugate of azithromycin and thiosemicarbazone, was successfully prepared. The compound **S6** was characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry. ROESY technique was applied to estimate free conformation in solution. The interactions of **S6** with the ribosome isolated from *Escherichia coli* were investigated by using tr-NOESY and STD techniques. The analysis of the recorded spectra enabled determination of conformation in bound state.

(50 pages, 32 figures, 9 tables, 43 references, original in croatian)

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

Keywords: azithromycin, interactions, macrolides, resistance, spectroscopy NMR

Mentor: Dr. Predrag Novak, Full Professor with tenure

Assistant mentor: Ivana Mikulandra, mag. chem.

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Full Professor with tenure

2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

3. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor

Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: December 8th, 2020

§ 1. UVOD

Makrolidi pripadaju skupini spojeva koji se sastoje od makrocikličkog laktonskog prstena (aglikona) na kojem su najčešće vezane dvije saharidne podjedinice.^{1,2} Postoje četiri generacije makrolidnih antibiotika, a predstavnik prve generacije je eritromicin A, dok je predstavnik druge generacije azitromicin. Nakon druge generacije makrolida, sintetizirani su i najpoznatiji predstavnici treće i četvrte generacije – telitromicin i solitromicin. Makrolidi predstavljaju skupinu antibiotika širokog spektra djelovanja. Uspješno liječe infekcije uzrokovane Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama te unutarstaničnim organizmima.³

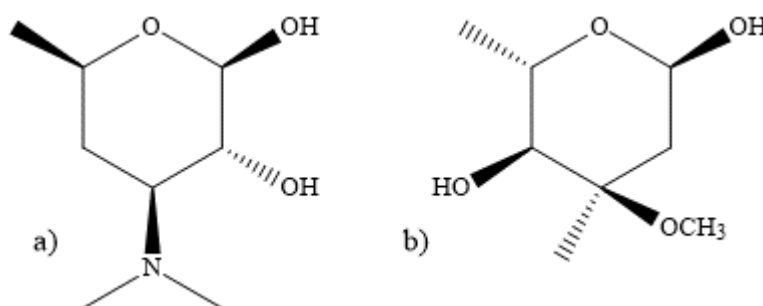
Zbog sve većeg razvoja bakterijske rezistencije na antibiotike potrebno je osmisлити i pripremiti nove spojeve s većom biološkom aktivnosti. Naglasak je na istraživanju i razvoju antibiotika za sojeve bakterija koji su otporni na već postojeće antibiotike. Tijekom dizajna novog lijeka važno je istražiti interakcije molekule s biološkim metama koje utječu na apsorpciju, bioraspoloživost i izlučivanje lijeka iz organizma, odnosno na njegovu biološku potentnost.

Cilj ovog diplomskog rada je pripremiti, strukturno okarakterizirati i istražiti interakcije 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina s ribosomom iz bakterije *Escherichia coli*. Struktura pripremljenog spoja odredit će se analizom jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR i spektra MS. U svrhu istraživanja interakcija s ribosomom izoliranim iz bakterije *Escherichia coli*, snimit će se spektri tr-NOESY i STD NMR kako bi se utvrdilo vezanje za ribosom i odredili epitopi vezanja.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Makrolidi

Pojam *makrolid* prvi put se spominje 1957. godine kada su makrolidi opisani kao prirodni antibiotici koji sadrže 12-, 14- i 16-člani makrociklički laktonski prsten (aglikon) na kojem su vezane dvije ili više saharidnih jedinica, najčešće desozamin i kladinoza (slika 1).⁴ Od tada su provedena mnoga istraživanja na makrolidima te su pripremljeni polusintetski derivati čime se proširio spektar biološkog djelovanja.⁵



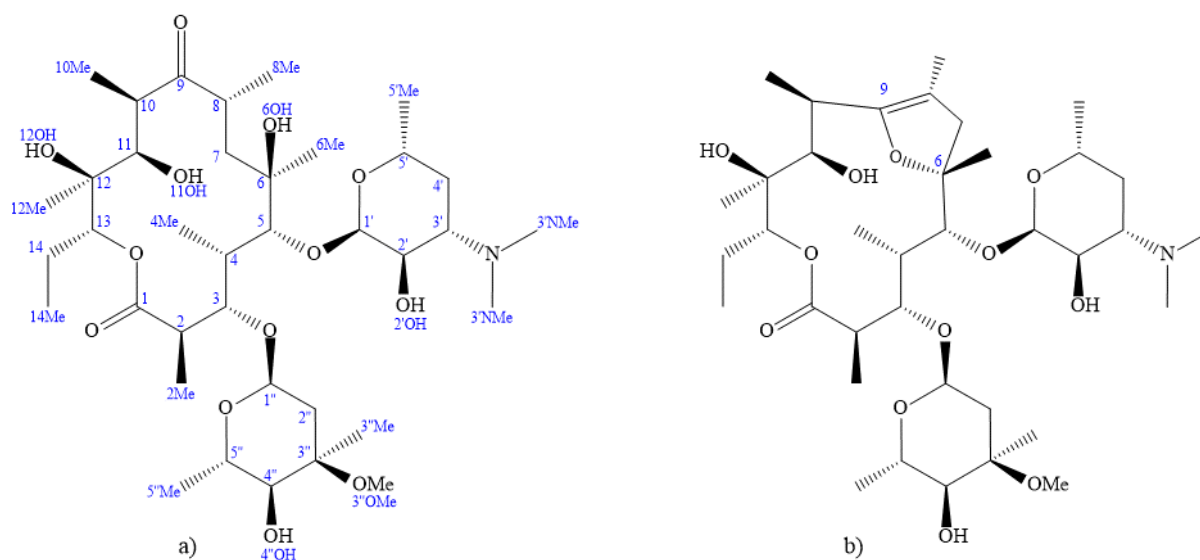
Slika 1. Struktura a) desozamina i b) kladinoze.

Makrolidni antibiotici djelotvorni su u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*), nekim Gram-negativnim bakterijama (*Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*) i unutarstaničnim organizmima (*Chlamydia pneumoniae* i *Coxiella burnetti*).³ Osim antibakterijskog djelovanja, makrolidi pokazuju i antiupalna, antikancerogena i antimalarijska djelovanja.¹ Najčešće se koriste za liječenje bakterijskih infekcija dišnih puteva, gastrointestinalnog sustava, infekcija kože i infekcija spolnog sustava.²

2.1.1. Podjela makrolida

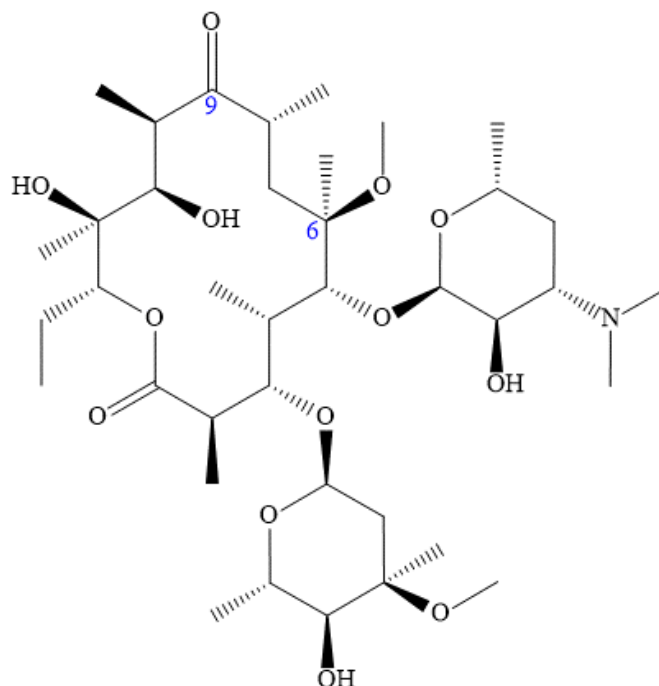
Makrolidni antibiotici mogu se podijeliti u četiri generacije. Eritromicin A (slika 2. a) predstavnik je prve generacije makrolida. Izoliran je 1952. godine iz soja mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea* koji osim eritromicina A proizvodi i druge vrste eritromicina (B, C, D i F).⁶ Eritromicin A se koristio za liječenje bakterijskih infekcija kod pacijenata alergičnih na penicilin, međutim izazvao je mnoge nuspojave (mučnina, povraćanje, probavne smetnje,

kožni osip, zujanje u ušima itd.) te je njegova bioraspodivost^{3,6} slaba zbog kemijske nestabilnosti u kiselim uvjetima (pH vrijednost u želucu varira od 1,5 do 3,5).⁷ Istraživanja² su pokazala kako pri niskim pH vrijednostima dolazi do reakcije između karbonylne skupine na položaju C9 s hidroksilnom skupinom na položaju C6 te takvom intramolekulskom ciklizacijom (slika 2. b) eritromicin A gubi svoju biološku aktivnost.



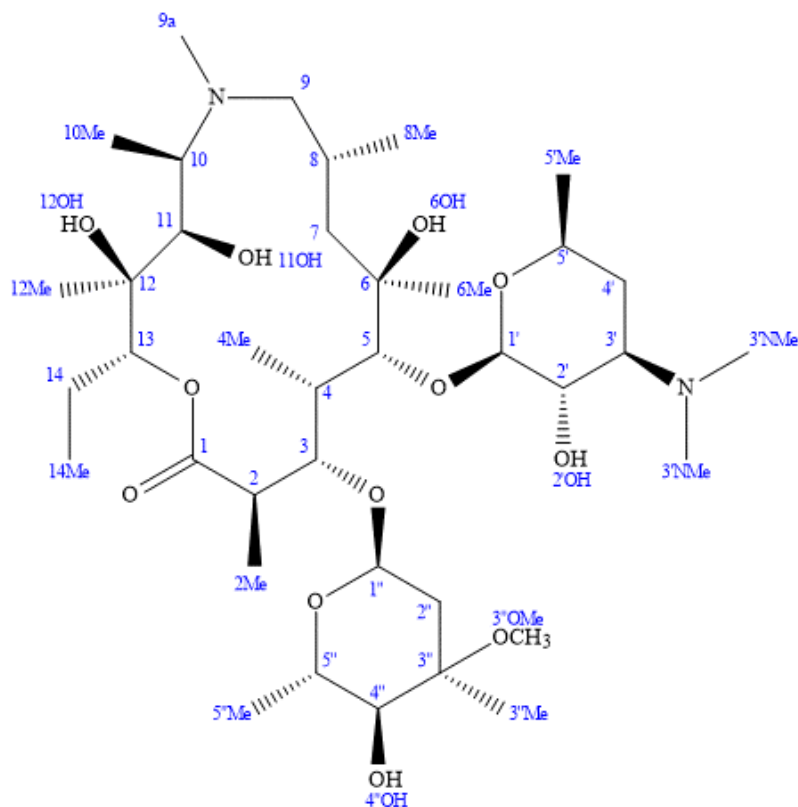
Slika 2. Struktura a) eritromicina A i b) enolni eter eritromicin A (8,9-anhidro-6,9-poluketal).

Klaritromicin (slika 3), polusintetski derivat eritromicina A, pripada također prvoj generaciji makrolidnih antibiotika. Razlikuje se od eritromicina A po uvedenoj metoksi skupini na položaju C6 čime je onemogućena intramolekulska ciklizacija i time poboljšana kemijska stabilnost spoja u uvjetima niske pH vrijednosti.²



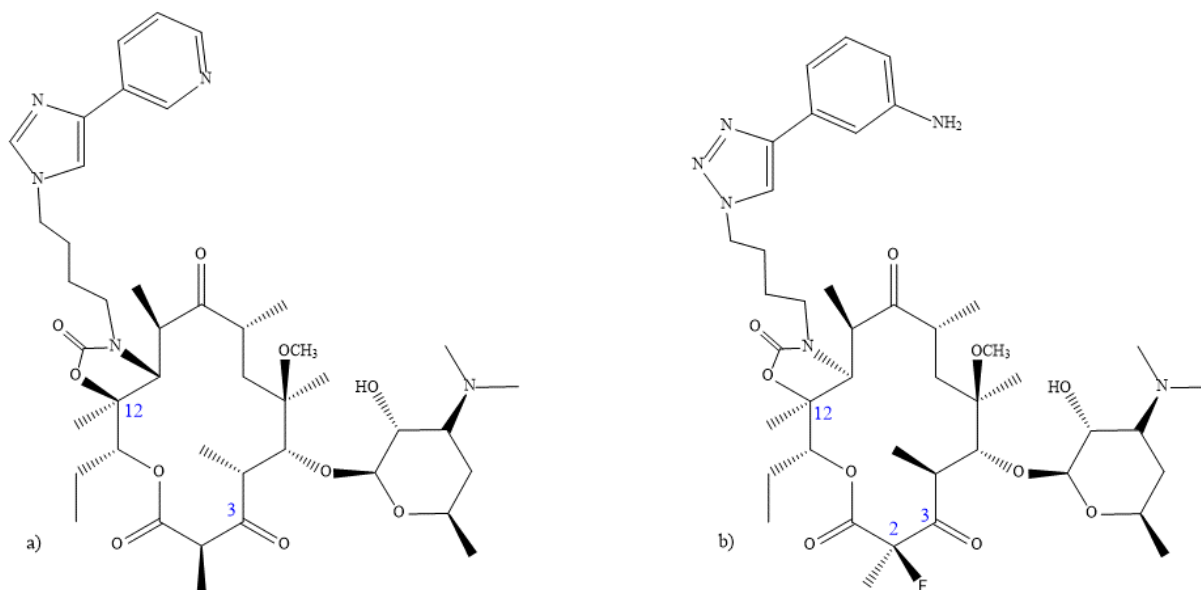
Slika 3. Struktura klaritromicina.

Budući da ni klaritromicin nije pokazao široki spektar biološke aktivnosti, istraživanja su bila usmjerena prema povećanju bioaktivnosti i poboljšanju farmakoloških svojstava novih makrolida. Daljnjim istraživanjima makrolidnih antibiotika razvijeni su azalidi – druga generacija makrolida.⁸ Azalidi su polusintetski derivati eritromicina A koje karakterizira 15-člani laktonski prsten nastao ugradnjom atoma dušika. Predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika je azitromicin (slika 4). Azitromicin posjeduje izvrsna farmakokinetička svojstva kao što su zadovoljavajuća bioraspoloživost, kemijska stabilnost u kiselim uvjetima i dugo vrijeme poluživota što omogućuje kratku primjenu terapije.



Slika 4. Struktura azitromicina s označenim lokantima.

Međutim, bakterije su razvile rezistenciju na postojeće makrolide pa se javila se potreba za novim, djelotvornijim antibioticima. Tako su razvijene treća i četvrta generacija makrolidnih antibiotika – ketolidi i fluoroketolidi. Ketolidi umjesto kladinoze imaju keto skupinu na položaju C3 te alkil-heteroaril bočni lanac na položaju C12. TELITROMICIN (slika 5. a), predstavnik ketolida, isprva se pokazao učinkovitim za liječenje bakterijskih infekcija dišnog sustava, ali je izazivao mnogo nuspojava (poremećaj vida, sinkopa, hepatotoksičnost itd.) zbog čega je povučen s tržišta. Predstavnik fluoroketolida je SOLITROMICIN (slika 5. b). Solitromicin, poput telitromicina, nema vezanu kladinozu, ali na položaju C2 sadrži atom fluora te 1,2,3-tiazol-aminofenil bočni lanac na položaju C12. Predstavnici posljednjih dviju generacija strukturno su vrlo slični zbog čega solitromicin nije odobren od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*). Smatra se kako bi mogao izazivati slične nuspojave kao i telitromicin.

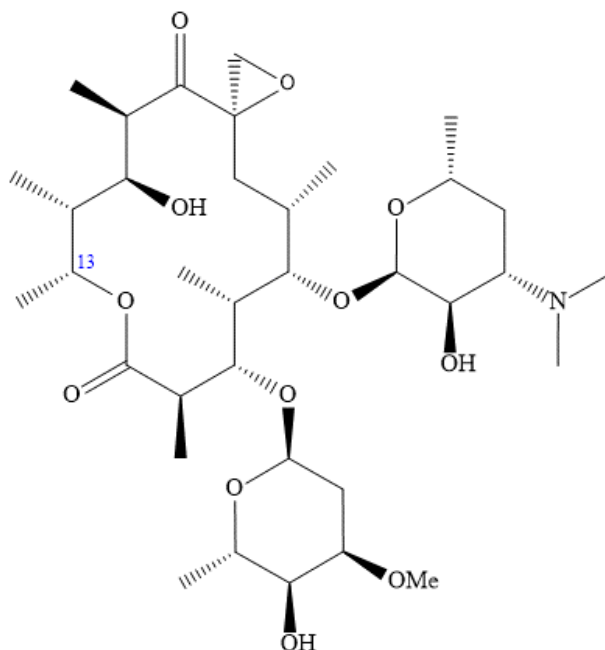


Slika 5. Struktura a) telitromicina i b) solitromicina.

2.1.2. Trodimenzijska struktura makrolida

Makrolidi su složene molekule s mnogo kiralnih centara čija promjena konfiguracije utječe na biološka i fizikalno-kemijska svojstva spoja. Konformacije makrolida u slobodnom i vezanom stanju s biološkim metama je potrebno istražiti kako bi se utvrdio odnos između strukture i aktivnosti. U tu svrhu korištene su metode rendgenske difrakcije, spektroskopije NMR i metode molekuskog modeliranja.⁹

Pomoću spektroskopije NMR Everett i suradnici¹⁰ opisali su strukturu eritromicina A u slobodnom stanju pomoću dvije osnovne konformacije, tzv. *folded-in* i *folded-out*. Karakteristični parametri koji opisuju konformacije nalaze se u tablici 1. Prilikom istraživanja konformacija 14-članih makrolida bitni su položaji skupine 2Me. Za konformaciju *folded-out* je karakteristična visoka energetska barijera rotacije skupine 2Me što rezultira kratkim longitudinalnim vremenom relaksacije. Suprotno tome, u konformaciji *folded-in* skupina 2Me slobodnija je te to rezultira dugim longitudinalnim vremenom relaksacije.⁹ Daljnjim istraživanjem⁸ otkriveno je kako 14-člani makrolidi u otopini većinom zauzimaju energetski povoljniju konformaciju *folded-out*. Na primjeru 14-članog makrolida oleandomicina (slika 6) i njegovih derivata ustanovljeno je kako udio pojedine konformacije u slobodnom stanju ovisi o polarnosti otapala i temperaturi.



Slika 6. Struktura oleandomicina.

Tablica 1. Usporedba karakterističnih parametara za konformacije *folded-out* i *folded-in* eritromicina A (slika 2 a).

	Konformacija <i>folded-out</i>	Konformacija <i>folded-in</i>
homonuklearna sprega $^3J_{H2,H3}$	≈ 10 Hz	2-3 Hz
torzijski kut između atoma H2–H3	$\approx 180^\circ$	$\approx 100^\circ$
položaj 4Me skupine	izvan molekule, aksijalni položaj	u prostoru između šećera
udaljenost desozamina i kladinoze	šećeri su bliži jedno drugome	šećeri su odmaknuti jedan od drugoga
prostorno približavanje protona	H4 i H11, H5 i H6Me, H2Me i H14Me	H3 i H7 i H11, H2Me i H4Me

15-člani makrolidi, poput azitromicina (slika 4), u slobodnom stanju poprimaju konformaciju tzv. *3-endo-folded-out*. Homonuklearna sprega $^3J_{H2,H3}$ iznosi između 4 i 5 Hz, dok je torzijski kut između atoma H2-C2-C3-H3 122° . Udaljenost protona H3 i protona H11, odnosno protona H4 i protona H11 slična je vrijednostima karakterističnim za konformaciju *folded-out*. Također, prostorni raspored šećera sličan je rasporedu šećera u konformaciji *foledded-out*.¹

Istraživanjem strukture makrolida u vezanom stanju opaženo je kako makrolidi zauzimaju konformaciju *folded-out*.⁸ U takvoj konformaciji polarne skupine makrocikličkog laktonskog prstena usmjerene su na jednu stranu molekule, dok je druga strana molekule hidrofobna. Polarna, hidrofilna strana makrolida bliža je aktivnom mjestu u ribosomu.⁸ Prvenstveno je istraživana konformacija makrolida u vezanom stanju s ribosomom jer se aktivnost makrolida očituje u vezanju za ribosom i inhibiciji sinteze proteina o čemu će više biti govora u narednim poglavljima.¹

2.2. Mehanizam djelovanja makrolida

Makrolidni antibiotici imaju bakteriostatsko djelovanje, zaustavljaju rast i razvoj bakterija inhibicijom biosinteze bakterijskih proteina.^{2,7}

Ribosomi su RNA katalizatori i jedini prirodni ribozimi koji imaju sintetsku ulogu. Oni su *molekulski strojevi* koji sintetiziraju proteine u stanicama u kojima se nalaze. Ribosomi mogu vezati dva tRNA supstrata: peptidil-tRNA na mjesto P u ribosomu i aminoacil-tRNA na mjesto A. Određene kristalne strukture kompleksa dale su informacije o aktivnom mjestu vezanja na ribosom. Pokazano je da se velika podjedinica bakterijskog ribosoma sastoji od dvije molekule RNA – 23S i 5S – i proteina. Zbog toga, podjedinica 50S ima sposobnost sinteze peptidne veze jednaku kao i cijeli bakterijski ribosom.¹¹ Podjedinica 30S zadužena je za genetsko dekodiranje.

Ovisno o mjestu vezanja, antibiotici se dijele u tri skupine: antibiotici koji se vežu na 30S podjedinicu, antibiotici koji se vežu na 50S podjedinicu i antibiotici koji se vežu na cijeli ribosom. Makrolidni antibiotici svoju aktivnost pokazuju vezujući se na veliku podjedinicu ribosoma, 50S, u blizini centra peptidil-transferaze. Centar peptidil-transferaze nalazi se u domeni V 23S rRNA. Vezanjem na to mjesto, makrolidi zaustavljaju rast bakterijske stanice jer inhibiraju sintezu bakterijskih proteina.^{1,6-9,12-20} U vezanom stanju, makrolidni antibiotik smanjuje veličinu tunela ribosoma s promjera od 18 Å na promjer od približno 10 Å.⁸

Način vezanja makrolida i mjesto prekidanja sinteze proteina ovisi o kemijskoj strukturi makrolida i bakterijskom soju. 16-člani makrolidi, poput spiramicina, kovalentno se vežu za bakterijski ribosom tvoreći reverzibilnu vezu između aldehidne skupine makrolida i amino skupine iz 23S rRNA. Iz tog razloga 16-člani makrolidi vežu se relativno blizu proteinskim jedinicama (L4 i L37E) u ribosomu što se razlikuje od načina vezanja 14- i 15-članih makrolida. Kompleks spiramicina i ribosoma pokazuje da protonirana *N,N*-dimetilamino skupina šećera forozamina stvara vodikove veze sa glicinom L4 proteinske podjedinice. S druge strane,

disaharidni ogranak spiramicina orijentiran je duž osi tunela. Takva orijentacija zaustavlja translaciju proteina već u ranim fazama sinteze, to jest nakon stvaranja druge ili treće peptidne veze. Petnaesteročlani makrolidi, poput azitromicina, vežu se na ribosom na malo drugačiji način. Orijentacija makrolidnog prstena u odnosu na tunel slična je orijentaciji 16-članih makrolida. Međutim, nedostatak aldehidne skupine kod azitromicina uzrokuje odbijanje amino skupine iz 23S rRNA i metilne skupine (6Me) azitromicina te na taj način dolazi do odmicanja makrolidnog antibiotika od L4 proteinske podjedinice ribosoma. Za bolje vezanje azitromicina na ribosom zaslužni su šećeri: dezosamin i kladinoza. Desozamin je orijentiran duž osi tunela, dok kladinoza dolazi u blizinu nukleotida (G2540) koji se nalazi u blizini mjesta P na ribosomu. Ovakva vezanja šećera makrolida omogućuju nešto dulji rast novog bakterijskog peptida (do otprilike 8 peptidnih veza). Vezanje 14-članih makrolidnih antibiotika, poput eritromicina A, potpuno se razlikuje od prethodno navedena dva načina. Aglikonski prsten 14-eročlanih makrolida orijentiran je gotovo okomito na os tunela. Takvu konformaciju stabiliziraju intermolekulske vodikove veze između amino skupine iz 23S rRNA i hidroksilne skupine (6OH) makrolida.

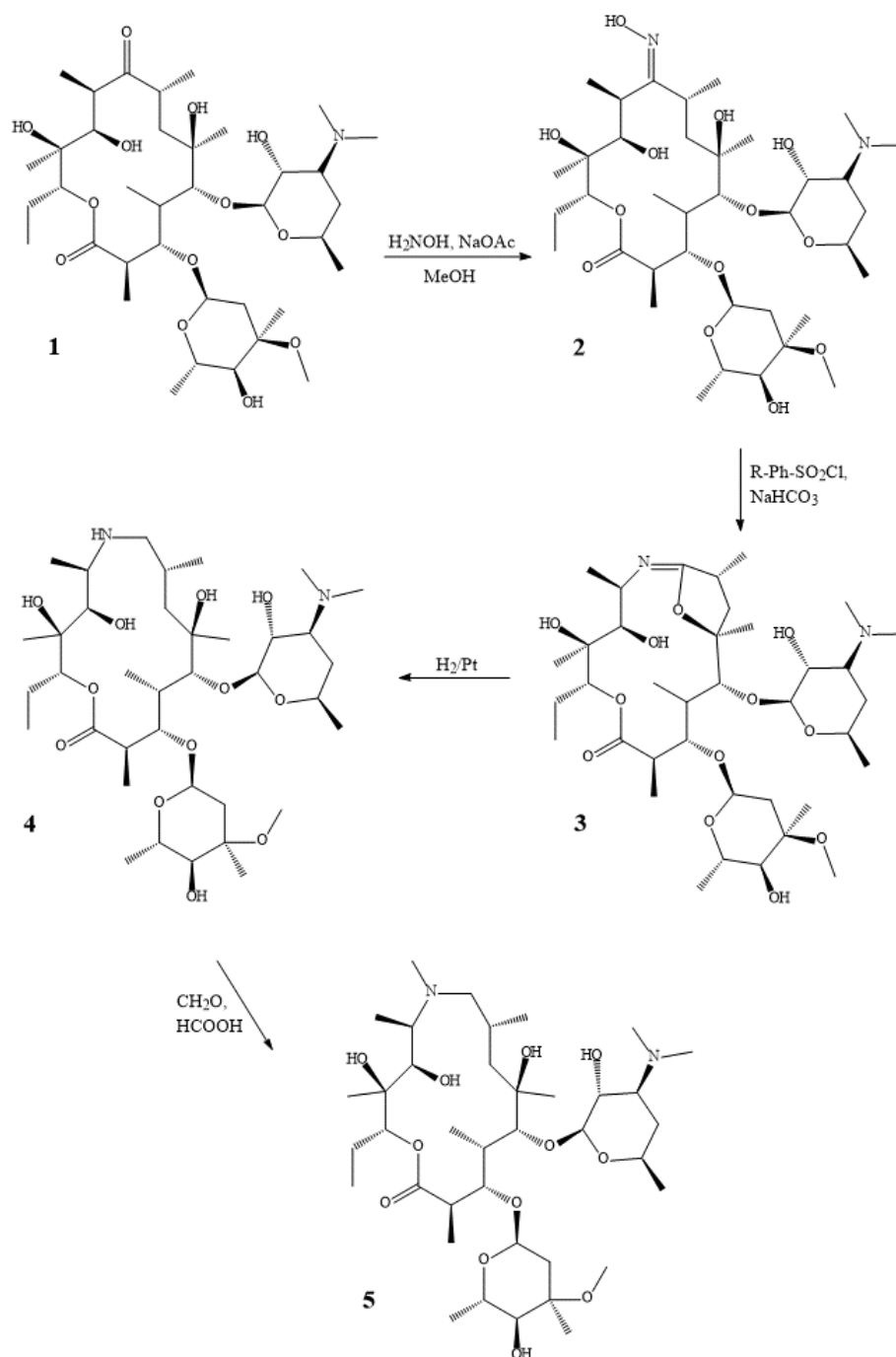
Osim interakcija s ribosomskim podjedinicama, makrolidi su i u interakciji i s citokromom P450 te s ligandima koji sudjeluju u sintezi proteina, npr. aminoacil-tRNA i peptidil-tRNA. Stoga, zaustavljanje i ometanje bakterijske sinteze ovisi o peptidnom slijedu. Ukoliko se makrolid veže 10-12 Å udaljen od mjesta P, moguća je dulja sinteza bakterijskog peptida.¹

2.3. Azitromicin

1980. godine je u PLIVI sintetiziran 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A poznatiji pod nazivom azitromicin. Azitromicin, aktivna tvar lijeka *Sumamed*, koristi se za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, a najčešće za liječenje infekcija dišnih puteva. Osim antibakterijskog djelovanja, azitromicin se može koristiti i za liječenje malarije.⁸ Važnost azitromicina dokazuje činjenica da ga je Svjetska zdravstvena organizacija klasificirala kao iznimno važan antibiotik.²¹

U odnosu na eritromicin A, nuspojave azitromicina su smanjene. Bioraspoloživost azitromicina je zadovoljavajuća što omogućava kratku primjenu terapije.⁸ Razlog kratke primjene je ta što azitromicin ima mogućnost postizanja niskih koncentracija u plazmi odnosno visokih koncentracija u tkivima.²²

Shema 1. prikazuje sintetski put dobivanja azitromicina Beckmannovom pregradnjom. Reakcijom eritromicina A (1) i hidroksilamina dobiven je oksim eritromicina A (2). Nadalje, aciliranjem oksima eritromicina A uz benzensulfonil-klorid u acetonu i vodi uz natrijev hidrogenkarbonat dolazi do Beckmannove pregradnje oksima u iminoeter eritromicina A (3). Uz vodik i platinu kao katalizator, iz iminoetera dolazi do nastajanja 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina (4). Metiliranjem dušika nastaje azitromicin (5).²³



Shema 1. Sinteza azitromicina (1 – eritromicin A, 2 – eritromicin-9(*E*)-oksim, 3 – 6,9-iminoeter, 4 – 9-dekso-9dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A, 5 – azitromicin).

2.4. Bakterijska rezistencija na makrolide

Zbog porasta bakterijske rezistencije na makrolide, istraživanja znanstvenika su već dugi niz godina usmjerena prema razvoju novih, djelotvornih antibiotika.

Bakterije dijelimo, obzirom na građu stanične stijenke, na dvije skupine: Gram-pozitivne i Gram-negativne. Gram-pozitivne bakterije sadrže 95 % peptidoglikana u staničnoj stijenci, dok Gram-negativne sadrže samo 5-12 %. Zbog manjeg udjela peptidoglikana, Gram-negativne bakterije sadrže dodatnu vanjsku membranu te su iz tog razloga otpornije na antibiotike.²⁴

Nekoliko je mehanizama kojima bakterije pokazuju otpornost na makrolidne antibiotike od kojih su najčešći preinaka 50S ribosomske podjedinice i izbacivanje antibiotika iz stanice.⁷

Neke bakterije posjeduju gen *erm* koji sadrži kodirajuću sekvencu za *N*-metil-transferazu, enzim koji može metilirati dušik nukleotidne baze (adenina) i tako izmijeniti 50S ribosomsku podjedinicu. Metiliranjem dolazi do steričkih smetnji odnosno blokiranja vezanja makrolidnog antibiotika na ribosom. Neke od bakterija koje sadrže *erm* gen jesu *S. aureus*, *S. sanguis*, *S. Pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *B. licheniformis*, *B. fragilis*, *S. epidermidis*, *C. perfringens*, *C. Difficile*.^{25,26}

Svi sojevi bakterija koji sadrže gen *erm* otporni su na MLS_BK antibiotike (makrolidi, likozamidi, streptogramin B, ketolidi). Mehanizam rezistencije MLS može biti inducibilni (iMLS) i konstitutivni (cMLS). Inducibilna rezistencija aktivira se tek u prisutnosti antibiotika, dok se konstitutivna rezistencija razvija bez prisutnosti antibiotika.⁸

Drugi najčešći način rezistencije uključuje energijski ovisne pumpe. Gen *mef* sadrži kodirajuću sekvencu za proteinsku pumpu koja izbacuje makrolidne antibiotike iz stanice prije nego što makrolidni antibiotik stigne doći do ribosoma. Ovakav način rezistencije češći je kod Gram-negativnih bakterija te je karakterističan samo za makrolidne antibiotike.²⁵

ESKAPE patogeni je naziv koji objedinjuje sve bakterije kod kojih se najčešće razvija rezistencija na antibiotike. U ESKAPE petogene pripadaju *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i sojevi *Enterobacteriaceae*.²⁷

Kako je sve više bakterijskih sojeva razvilo otpornost na makrolide, u posljednje vrijeme intenzivno se radilo na razvoju novih polusintetskih derivata makrolida. Kemijskom modifikacijom pojedinih položaja u azitromicinu cilj je razviti nove derivate koji će pokazati veću biološku aktivnost i ujedno zadržati povoljna farmakološka svojstva azitromicina.

Do sada su pripremljeni i okarakterizirani dekladinozil makrolidi,²⁸ makrolidi s kemijskim modificiranim saharidnim jedinicama^{1,28} i makrolidi sa supstituiranim hidroksilnim skupinama na određenim položajima (C6, C11, C12). Različitim modifikacijama određenih položaja azitromicina, ali i makrolida općenito, dobiveni su derivati veće i manje antimikrobne aktivnosti.^{1,29}

Dugo se smatralo kako kladinoza ima veliku ulogu u biološkoj aktivnosti makrolida, međutim razvojem bioaktivnih ketolida i proučavanjem vezanja makrolida za ribosom otkrilo se kako kladinoza ne sudjeluje u interakciji s 23SrRNA dok je druga saharidna jedinica, desozamin iznimno bitna za stvaranje kompleksa makrolid – ribosom.²⁸ Prema istraživanju¹⁸ 3-aminopropil dekladinozil derivati azitromicina pokazali su zadovoljavajuću biološku aktivnost na neke Gram-pozitivne bakterije (*S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pneumoniae* B0326, *S. aureus* B033, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212).

2.5. Spektroskopija NMR

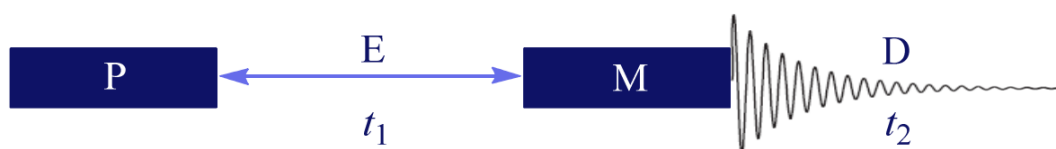
Za određivanje strukture organskih molekula i makromolekula može se koristiti spektroskopija NMR (engl. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*). Spektroskopijom NMR proučavaju se jezgre čiji su spinovi različiti od nule kao npr. ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P.³⁰ Svaka jezgra posjeduje dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina i nuklearni magnetski spinski kvantni broj. Spektri se asigniraju na temelju kemijskih pomaka i multipletnosti signala. Ovisno o položaju i intenzitetu signala mogu se otkriti fragmenti i funkcijske skupine u analiziranom spoju. Osim za određivanje strukture molekula, spektroskopija NMR koristi se i za istraživanje specifičnih interakcija u biološkim kompleksima.

Spektroskopija NMR temelji se na pobuđivanju jezgri fotonom energije koja je jednaka razlici energije dvaju spinskih stanja. Takve energije se postižu pomoću vanjskog magnetnog polja ili radiofrekvencijskim pulsevima. Radiofrekvencijski pulsevi dijele se na kratke odnosno tvrde pulseve i duge odnosno meke pulseve. Ukoliko se žele pobuditi sve jezgre koriste se tvrdi pulsevi, a ukoliko je potrebna selektivna pobuda spinova jezgri koriste se meki pulsevi. Sheme radiofrekvencijskih pulseva prikazane su na slici 7.³⁰



Slika 7. Sheme radiofrekvencijskih pulseva: a) tvrdi/kratki puls, b) meki/dugi puls.

Osim jednodimenzijskih, postoje i dvodimenzijske tehnike NMR koje pružaju više informacija o strukturi spoja. Pulsni slijedovi dvodimenzijskih tehnika NMR sastoji se od pripreme (P), evolucije (E), miješanja (M) i detekcije (D) te je prikazan slikom 8.



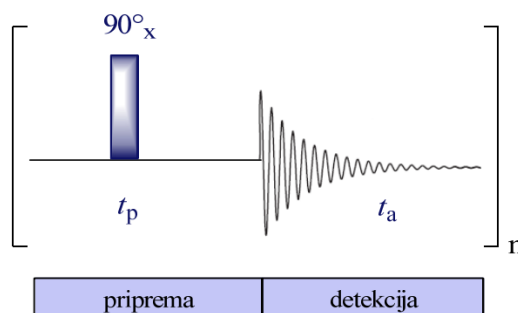
Slika 8. Opća shema dvodimenzijskog eksperimenta NMR. t_1 – vrijeme evolucije, t_2 – period detekcije.³⁰

2.5.1. Tehnike NMR za određivanje strukture spojeva

Postoji mnogo jedno- i dvodimenzijskih tehnika NMR, a u nastavku su opisane samo one tehnike korištene u ovom radu.

2.5.1.1. Tehnika ^1H NMR

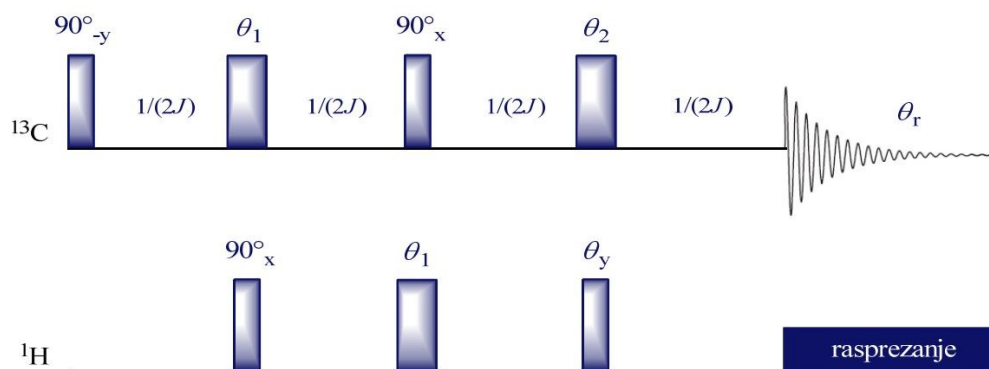
Tehnika ^1H NMR koristi se za detekciju signala kemijski neekvivalentnih protona u spoju. Površina ispod signala odgovara broju neekvivalentnih protona. Pomoću ove tehnike možemo dobiti prvi uvid u strukturu spoja.



Slika 9. Pulsni slijed tehnike ^1H NMR.

2.5.1.2. Tehnika DEPT-Q

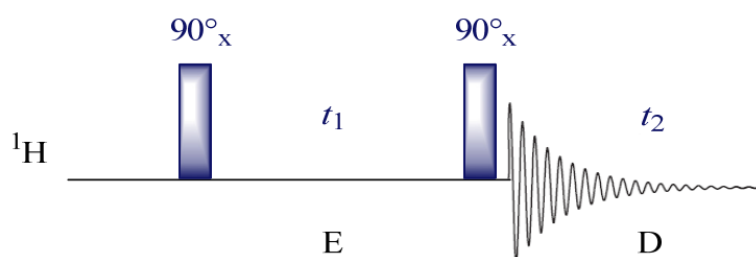
Tehnika DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*) jednodimenzijaska je tehnika te omogućava editiranje spektra heterojezgri poput ^{13}C prema multiplicitetu uz pojačavanje signala jezgri s malim magnetožirnim omjerom, γ (^{13}C) pomoću prijenosa polarizacije s jezgri s velikim γ (^1H). Pomoću tehnike DEPT-Q moguće je dobiti informacije u kvaternim ugljikovim atomima.



Slika 10. Pulsni slijed tehnike DEPT-Q.

2.5.1.3. Tehnika COSY

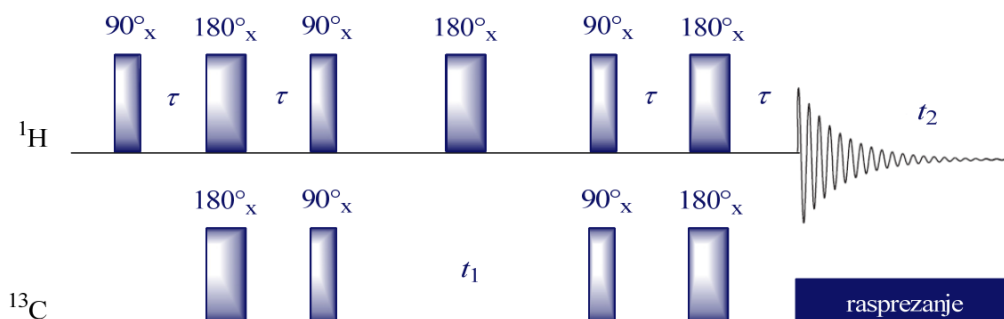
Tehnika COSY (engl. *correlation spectroscopy*) jedna je od najčešće korištenih dvodimenzijskih tehnika NMR. COSY se koristi kako bi se dobile informacije o spinskim sustavima protona, odnosno o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze.



Slika 11. Pulsni slijed tehnike COSY.

2.5.1.4. Tehnika HSQC

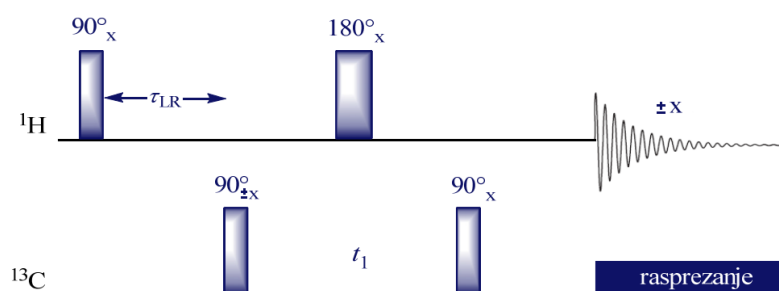
Tehnika HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) koristi se za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i neke heterojezgre.



Slika 12. Pulsni slijed tehnike HSQC.

2.5.1.5. Tehnika HMBC

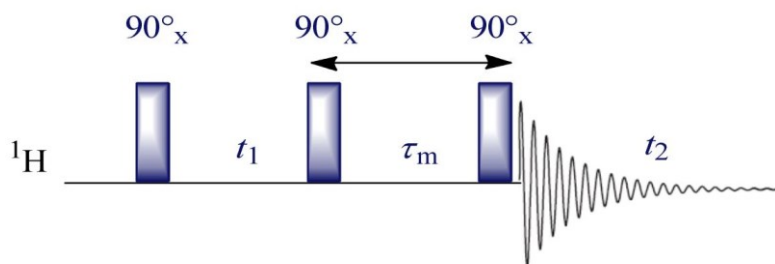
Tehnika HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) dvodimenzijaska je tehnika poput tehnike HSQC. HMBC omogućava uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili više kemijskih veza.



Slika 13. Pulsni slijed tehnike HMBC.

2.5.1.6. Tehnika NOESY

Tehnika NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) dvodimenzijaska je tehnika čijim korištenjem se dobiju informacije o međusobnoj udaljenosti spinova. Tehnika NOESY temelji se na efektu NOE (engl. *nuclear Overhauser effect*), odnosno na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi (interakcije kroz prostor). Da bi se signali vidjeli u spektru NOESY, spinovi trebaju biti prostorno blizu (udaljenost manja od 5 \AA).

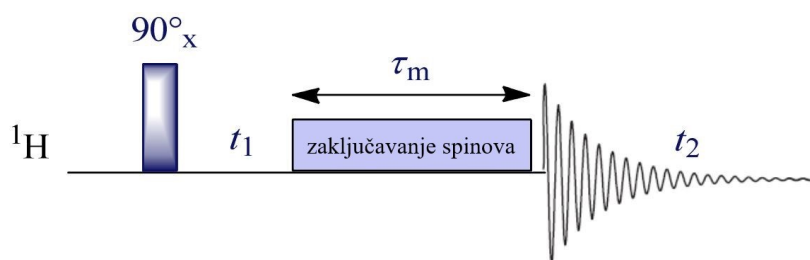


Slika 14. Pulsni slijed tehnike NOESY.

Pulsom od 90°_x magnetizacija se prebacuje u ravninu xy . Zatim slijedi evolucijsko vrijeme (t_1) nakon kojeg dolazi drugi puls od 90°_x . Prebacivanjem jedne komponente vektora magnetizacije na negativni dio osi z , postignuta je inverzija napućenosti. Inverzija napućenosti omogućuje nastanak NOE efekta tijekom vremena miješanja (τ_m). Posljednji puls je također puls od 90°_x koji vraća magnetizaciju na ravninu xy .

2.5.1.7. Tehnika ROESY

Tehnika ROESY (engl. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*) dvodimenzijaska je tehnika koja također daje informacije o prostornoj udaljenosti spinova. Glavna razlika tehnike ROESY u odnosu na tehniku NOESY je ravnina u kojoj nastaje efekt NOE. U tehnici ROESY NOE nastaje u ravnini xy . Pulsom od 90°_x prebacuje se magnetizacija u ravninu xy (jednako kao i kod tehnike NOESY). Vrijeme miješanja (τ_m) odnosno zaključavanje spinova (engl. *spin lock*) slijedi nakon evolucijskog vremena (t_1).



Slika 15. Pulsni slijed tehnike ROESY.

2.5.2. Tehnike NMR za određivanje interakcija ligand-receptor

Za razumijevanje cjelokupnog biološkog profila neke molekule važno je detaljno proučiti interakcije unutar biološkog kompleksa.⁸

Postoji mnogo metoda za proučavanje interakcija ligand-receptor poput fluorescentne spektroskopije, ravnotežne dijalize, kapilarne elektroforeze, ultrafiltracije, kalorimetrije i slično. Međutim, korištenjem navedenih tehnika može doći do promjene u strukturi i bioaktivnosti liganda. Dvije najčešće tehnike koje se koriste za proučavanje interakcija protein–ligand su: spektroskopija NMR i rendgenska difrakcija.⁸

Nedostatak spektroskopije NMR jest nemogućnost određivanja strukture bioloških molekula čija je masa veća od 70 kDA poput proteina i nukleinskih kiselina, dok kristalografija daje precizne podatke o strukturi velikih molekula. Međutim, kristalografija pruža uvid u statičnu strukturu molekule koja se može razlikovati od strukture u otopini zbog gibanja molekula i zauzimanja različitih konformacija. Korištenjem jednodimenzijskih i dvodimenzijskih tehnika NMR moguće je dobiti puno informacija o strukturi kompleksa ligand-receptor, uspostavljenim interakcijama te o mobilnosti takvog sustava.⁸

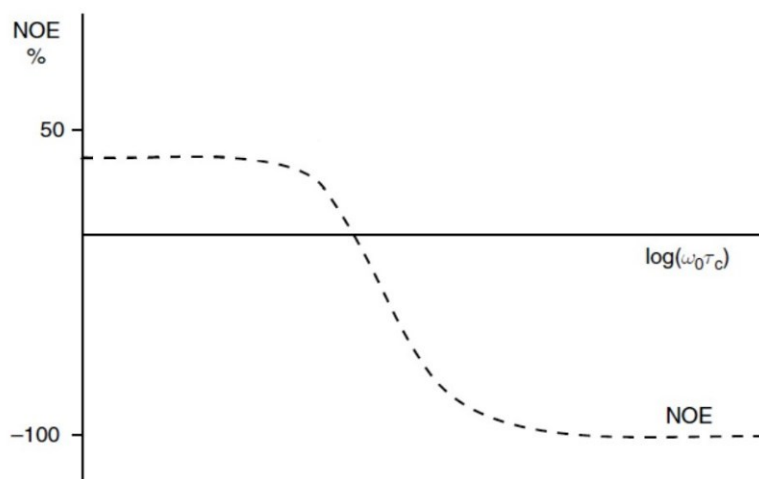
Postoje dva pristupa pri proučavanju interakcija ligand – receptor spektroskopijom NMR. Jedan pristup je da se mjeri promjena parametara NMR biomolekule (engl. *Structure-activity relationship (SAR) by NMR*) ili da se mjere promjene parametara NMR liganda. Vezanje liganda moguće je pratiti titracijskim eksperimentima (promjena kemijskog pomaka i širenje signala u spektru) relaksacijskim tehnikama, difuzijskim tehnikama i tehnikama prijenosa magnetizacije. U posljednju skupinu tehnika NMR pripadaju: tr-NOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*), STD (engl. *Saturation transfer difference*), NOE *pumping* i WaterLOGSY (engl. *Water–ligand observed gradient spectroscopy*).³¹ U daljnjem tekstu opisan je princip rada dviju tehnika (tr-NOESY i STD NMR) korištenih u ovom radu za istraživanje kompleksa makrolid-ribosom.⁸

Obje tehnike intenzivno su se koristile za proučavanje interakcija makrolida s ribosomom.⁸ Istraživanjima je pokazano kako je vezanje makrolida na ribosom proces koji obuhvaća dva koraka. Prvi korak uključuje slabo vezanje makrolida s brzom izmjenom između slobodnog i vezanog stanja, odnosno prepoznavanje aktivnog mjesta u ribosomu. Takav brzi režim izmjene liganda je pogodan za izvođenje eksperimenata tr-NOESY i STD. Drugi korak obuhvaća snažniju interakciju koja je odgovorna za inhibiciju sinteze bakterijskih proteina. Iako

je drugi korak važniji za aktivnost ribosoma, dokazano je da ukoliko nema prethodnog slabijeg vezanja, da u tom slučaju makrolid nema antibiotsko djelovanje.⁸

2.5.2.1. Tehnika *tr*-NOESY

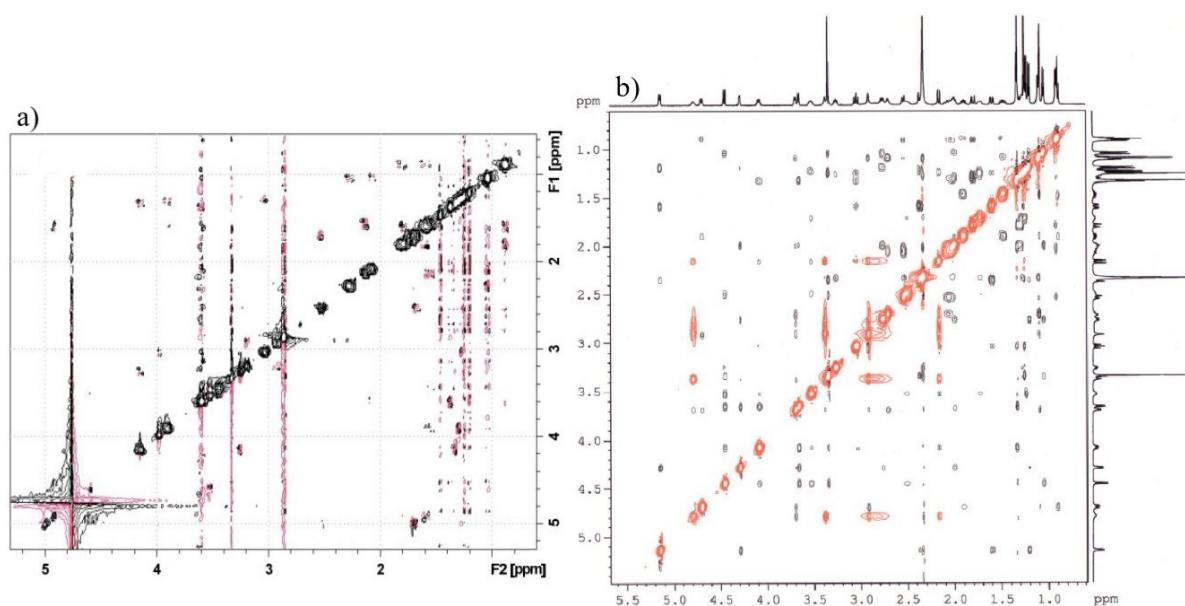
Tr-NOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*) je tehnika koja se temelji na nuklearnom Overhauserovom efektu (engl. *transferred nuclear Overhauser effect*, NOE), odnosno na križnoj relaksaciji dipolno spregnutih spinova čija je prostorna udaljenost manja od 5 Å.³⁰ Navedenom tehnikom mogu se dobiti informacije o konformaciji liganda u vezanom stanju. Na predznak i vrijednost NOE, osim udaljenosti spinova, utječe i korelacijsko vrijeme (prosječno vrijeme potrebno molekuli da se zarotira za kut od jednog radijana) koje pak ovisi o veličini molekule i viskoznosti otapala. Korelacijsko vrijeme je veće ukoliko je molekula manja, odnosno porastom veličine molekule korelacijsko vrijeme opada. Slika 16. prikazuje ovisnost intenziteta NOE o logaritmu umnoška frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena. Iz ovisnosti se vidi da je NOE pozitivan za molekule manje molekulske mase, dok je negativan za molekule veće molekulske mase.



Slika 16. Ovisnost intenziteta efekta NOE o logaritmu umnoška frekvencije vanjskog polja i korelacijskog vremena.³⁰

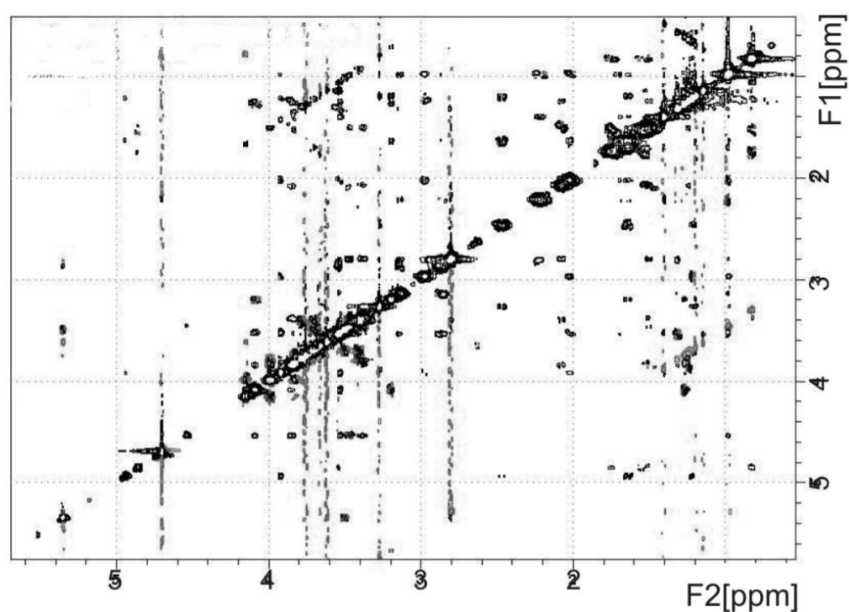
Makrolidni antibiotici su molekule srednje veličine ($M \approx 1000$ Da) te je za takve molekule vrijednost NOE vrlo mala ili jednaka nuli. Iz tog razloga će doći do javljanja slabih izvandijagonalnih signala ili pak do njihovog izostanka (slika 17. a). Međutim, upotrebom

otapala drugačije viskoznosti promijenit će se i korelacijsko vrijeme makrolida što će utjecati na povećanje intenziteta izvandijagonalnih signala (slika 17. b)



Slika 17. Spektar NOESY azitromicina snimljen u a) D₂O i b) kloroformu-d.³⁰

Dodatkom biološkog receptora (npr. ribosoma), ligandi (npr. makrolidi) poprimaju svojstva velike molekule čime se mijenja predznak i intenzitet signala u spektru tr-NOESY (slika 18). Interpretacijom spektra dobivaju se informacije o konformaciji liganda u vezanom stanju.

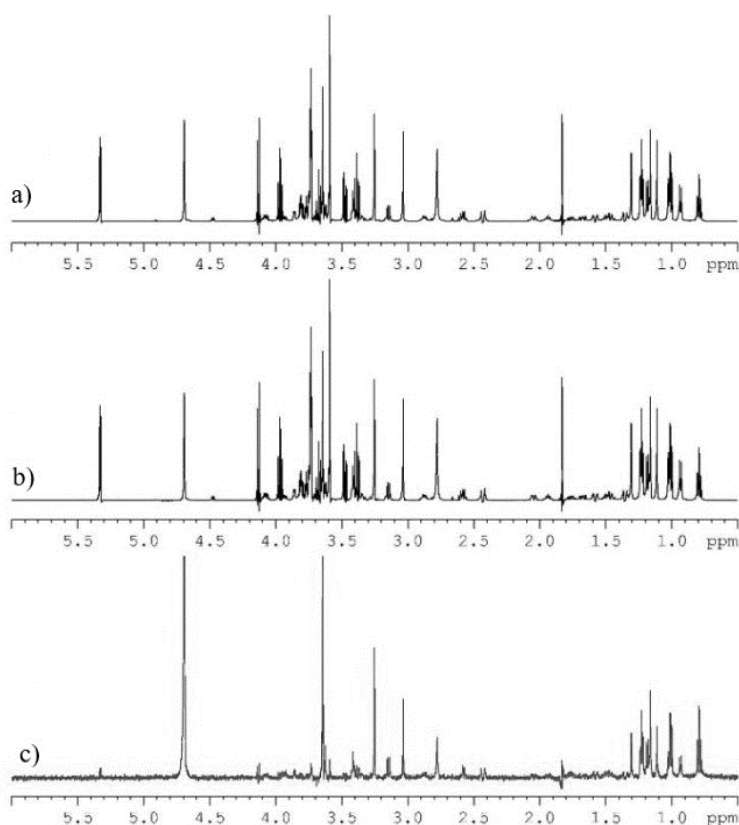


Slika 18. Spektar tr-NOESY NMR azitromicina vezanog u aktivnom mjestu ribosoma *E. coli*.³¹

Eksperimenti se provode koristeći veliki suvišak liganda u odnosu na receptor kako se signali receptora ne bi vidjeli u spektru.^{8,31}

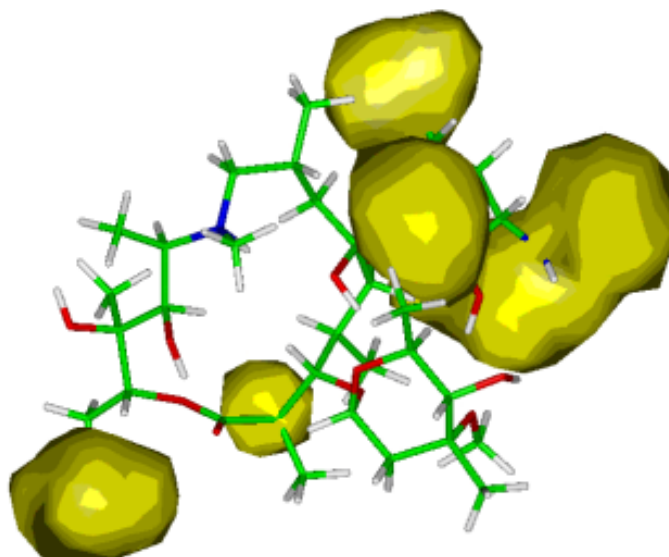
2.5.2.2. Tehnika STD

Metoda razlike prijenosa zasićenja (STD) je brza, precizna, pouzdana tehnika NMR za probir potencijalno bioaktivnih molekula liganada u smjesi i identifikaciju vezujućih liganada.³² Metoda se temelji na selektivnom zasićenju signala receptora i prijenosu magnetizacije na signale liganda mehanizmom spinske difuzije.⁸ Stupanj zasićenosti ovisi o prostornoj udaljenosti protona liganda od površine receptora. Spektar STD je razlika tzv. „*on-resonance*“ (primijenjena selektivna pobuda protona receptora) i „*off-resonance*“ (bez selektivne pobude protona receptora) spektra te sadrži samo signale skupina liganda koje se vežu na receptor.^{12,32} U spektru STD protoni liganda koji se nalaze najbliže receptoru pokazat će najintenzivniji signal za razliku od protona liganda koji su udaljeniji od receptora i koji će pokazati signal slabijeg intenziteta (slika 19).



Slika 19. a) Spektar *on-resonance* ^1H NMR b) Spektar *off-resonance* ^1H NMR oleandomicina nakon dodatka ribosoma (50 ppm) c) Spektar razlike (spektar STD) oleandomicina u tris puferu pri 298 K.⁸

Važna karakteristika tehnike STD je što se osim malih proteina, mogu analizirati i veće biomolekule poput ribosoma,³¹ odnosno nema ograničenja u veličini promatrane molekule.⁸ Stoga se tehnikom STD mogu detektirati skupine liganda koji su u bliskom kontaktu s aktivnim mjestom receptora, odnosno mogu se odrediti epitopi vezanja.³²



Slika 20. Epitopi vezanja azitromicina na ribosom.⁸

2.6. Interakcije makrolida s biološkim metama

2.6.1. Interakcije makrolida s ribosomom

Za potpuno razumijevanje mehanizma djelovanja makrolida dosadašnja istraživanja su obuhvatila detaljnu analizu interakcija makrolida i ribosoma. U tu su svrhu najčešće korištene rendgenska difrakcija, spektroskopija NMR i molekulsko modeliranje.^{9,20}

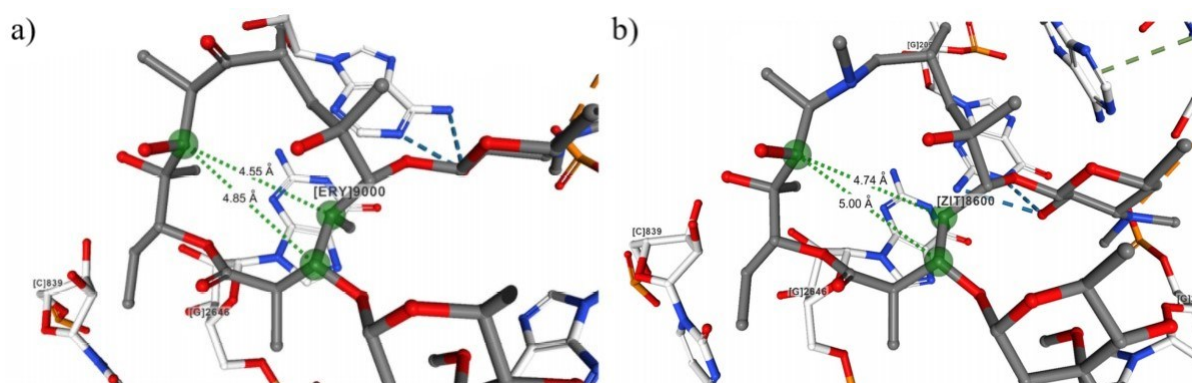
Kristalografija je tehnika za karakterizaciju vezanja na atomskoj razini. Korištenjem kristalografije u svrhu istraživanja kompleksa makrolid-ribosom moguće je dobiti informacije o duljini veza između pojedinih atoma u kompleksu. Kristalografija je kao tehnika ograničena na komplekse makrolid-ribosom u kojima je moguće kristalizirati ribosom. Neke od bakterija koje su istraživane su *Haloarcula marismortui*, *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli* i *Thermus thermophilus*.²⁰ Većina istraženih struktura kompleksa s ribosomima je iz klinički nevažnih bakterija (osim *E. coli*). Međutim, struktura ribosoma evolucijski je očuvana kroz gotovo sve poznate bakterijske vrste pa se dobivene informacije mogu primijeniti i na ostale

bakterijske ribosome.²⁰ Proučavanjem kristalnih struktura kompleksa ribosom-makrolid moguće je pretpostaviti detaljan mehanizam vezanja makrolida na ribosom te dobivene informacije mogu pripomoći pri dizajniranju novih derivata makrolida.

Yonath i suradnici³³⁻³⁵ opisali su kristalne strukture velike podjedinice ribosoma *D. radiodurans* u kompleksu s 14-članim makrolidima (eritromicinom A, telitromicinom), dok su Hansen i suradnici^{36,37} predložili kristalne strukture velike podjedinice *H. marismortui* u kompleksu s 15-članim makrolidom azitromicinom te 16-članim makrolidima, karbomicinom, spiramicinom i tilozinom.

Kristalne strukture makrolida vezanih na ribosom koje su opisali Tu i suradnici³⁸ razlikovale su se od prethodno spomenutih. Uočene su razlike u konformaciji makrolida u vezanom stanju, varijacije u orijentaciji te različite interakcije između ribosoma i makrolida. Na primjeru eritromicina A, konformacija šećera kladinoze razlikuje se ovisno o proučavanom bakterijskom soju, u slučaju bakterije *D. radiodurans* zauzima konformaciju stolice, dok u slučaju bakterije *H. marismortui* zauzima konformaciju čamca.^{1,20}

Istraživanjem kompleksa azitromicina i bakterijskog ribosoma izoliranog iz *H. marismortui* i *T. thermophilus* opisane su interakcije aglikonskog prstena azitromicina i hidrofobne površine izlaznog tunela ribosoma.²⁰



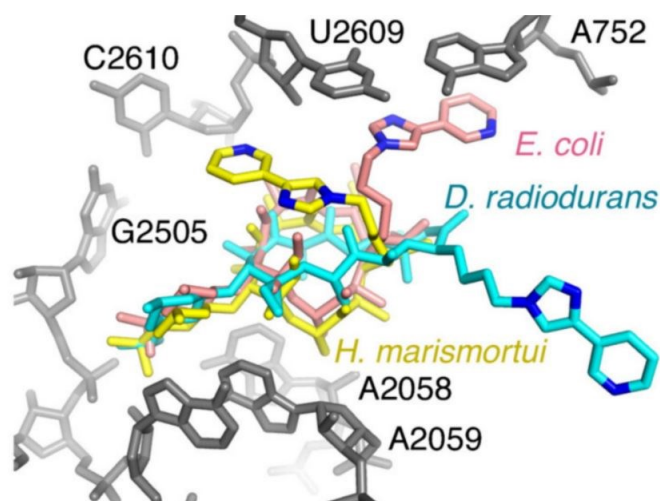
Slika 21. Kristalne strukture a) eritromicina i b) azitromicina vezanog na 50S podjedinicu ribosoma izoliranog iz bakterije *H. marismortui*.²⁰

U tablici 2. prikazane su udaljenosti atoma azitromicina i eritromicina A dobivene kristalografijom. Istraživanja kristalnih struktura kompleksa makrolid-ribosom pokazala su da se makrolid u kompleksu nalazi u *folded-out* konformaciji.

Tablica 2. Usporedba udaljenosti atoma azitromicina i eritromicina A u slobodnom i vezanom stanju s različitim bakterijskim ribosomima.²⁰

Makrolid	Ribosom izolirani iz bakterije	Udaljenost/Å					
		C3–C11	C4–C11	C4–C6Me	C5–C6Me	C3–C8	C8–C11
Azitromicin	slobodno stanje	4,86	4,60	3,92	2,50	5,74	4,80
	<i>H. marismortui</i>	5,00	4,74	3,92	2,55	5,82	4,84
	<i>T. thermophilus</i>	4,80	5,01	4,03	2,59	5,76	4,62
Eritromicin A	slobodno stanje	4,69	4,33	3,90	2,52	5,50	3,65
	<i>H. marismortui</i>	4,85	4,55	3,99	2,61	5,64	3,59
	<i>T. thermophilus</i>	4,85	4,55	3,99	2,61	5,64	3,59

Kompleks makrolida i 50S podjedinice ribosoma izoliranog iz *E. coli* prvi je opisani kompleks makrolida i ribosoma patogene bakterije.³⁹ Dunkle i suradnici otkrili su kako je način vezanja telitromicina i eritromicina na ribosom izoliran iz bakterije *E. coli* drugačiji od vezanja na već proučavane nepatogene bakterije.



Slika 22. Vezanje telitromicina na bakterijski ribosom izoliran iz bakterije *E. coli* (rozo), *H. marismortui* (žuto) i *D. radiodurans* (plavo).³⁹

Svetlov i suradnici⁴⁰ pokazali su kako su za vezanje eritromicina A na ribosom izoliran iz bakterije *T. thermophilus* zaslužne vodikove veze između nukleotidnih baza A2058 i A2059 sa šećerom desozaminom. Također, istraživanje je pokazalo kako eritromicin svojim vezanjem na ribosom utječe na promjenu adenina A2062 ribosoma bakterije *T. thermophilus*. Zanimljiva je činjenica da takva promjena nije zamijećena kod ribosoma izoliranog iz bakterije *E. coli*.

Različita kristalografska istraživanja¹⁶ koja su proučavala kinetiku stvaranja kompleksa makrolid-ribosom otkrila su kako vezanje makrolida ovisi i o proučavanom soju bakterija. Primjerice, na neke se bakterijske ribosome veže jedna molekula azitromicina (*Thermus thermophilus* i *Haloarcula marismorui*), dok se na bakteriju *Deinococcus radiodurans* vežu dvije molekule azitromicina. Jedna molekula azitromicina vezana je na domenu V 23S rRNA, dok druga molekula azitromicina ostvaruje vodikove veze s kisikom uracila (O4, U2588) što rezultira jačim vezanjem ribosoma i makrolida. Molekule azitromicina su i međusobno povezane vodikovim vezama preko desozamina i kisika na položaju C1. Zanimljivo, dušik u aglikonskom prstenu azitromicina ne sudjeluje direktno u vezanju na ribosom.⁸

Utjecaj supstituenata na aglikonskom prstenu makrolida vrlo je važan pri stvaranju veza između makrolida i bakterijskog ribosoma. Hidroksilna skupina 2'OH šećera dezosamina stvara vodikove veze s atomima dušika adenina (N6 i N1, A2058).⁸ Ukoliko atomi dušika ribosoma budu metilirani, nije moguće uspostavljanje vodikovih veza te to rezultira pojavom rezistencije na antibiotik. U interakcijama, osim 2'OH skupine, sudjeluju i hidroksilne skupine aglikonskog prstena C6, C11, C12 koje stvaraju vodikove veze sa dušikom adenina (N6, A2062) odnosno kisikom uracila (O4, U2609) bakterijske 23rRNA. Uloga kladinoze nije presudna pri vezanju makrolida na bakterijski ribosom.⁸

Bitno je napomenuti kako kristalografija daje uvid u konformacije makrolida u čvrstom stanju, a trodimenzijske strukture u otopinama i u krutinama nisu nužno jednake zbog gibanja molekula u otopini.²⁰

Spektroskopijom NMR moguće je istraživati interakcije makrolida u otopini pri fiziološkim uvjetima. Podacima dobivenim iz jedno- i dvodimenzijskih spektara NMR moguće je odrediti konformacije makrolida u slobodnom i vezanom stanju. Poznavanjem konformacija makrolida moguće je okarakterizirati interakcije makrolida i ribosoma što uvelike doprinosi razvoju novih makrolidnih antibiotika. Tehnike koje se najčešće koriste u ovakvim istraživanjima su STD NMR i tr-NOESY koje su objašnjene u poglavlju 2.5.2.

U posljednje vrijeme, često se koriste računalne simulacije u istraživanju i razvoju potencijalnih novih antibiotika. Uvid u mehanizme vezanja i dinamiku prilikom stvaranja kompleksa makrolid-receptor omogućavaju upravo računalne simulacije. Zbog toga, u svrhu boljeg razumijevanja nastanka kompleksa makrolid-receptor potrebno je kombinirati rezultate dobivene kristalografijom, spektroskopijom NMR i molekulskim modeliranjem. Takvi podaci ključ su daljnjih istraživanja i razvoja novih makrolidnih antibiotika.²⁰

2.6.2. Interakcije makrolida s drugim biološkim metama

Iako je ribosom primarna meta djelovanja makrolida, važno je istražiti interakcije makrolida i s drugim biološkim metama kao što su membrane, proteini i žučne kiseline. Interakcije s navedenim biološkim metama makrolida utječu na njegova farmakokinetička svojstva kao što su apsorpcija, distribucija i izlučivanje lijeka iz organizma. Određivanje mjesta vezanja i interakcija u kompleksu makrolid-biološka meta može pripomoći u razvoju novih derivata makrolida s poboljšanim farmakokinetičkim svojstvima.

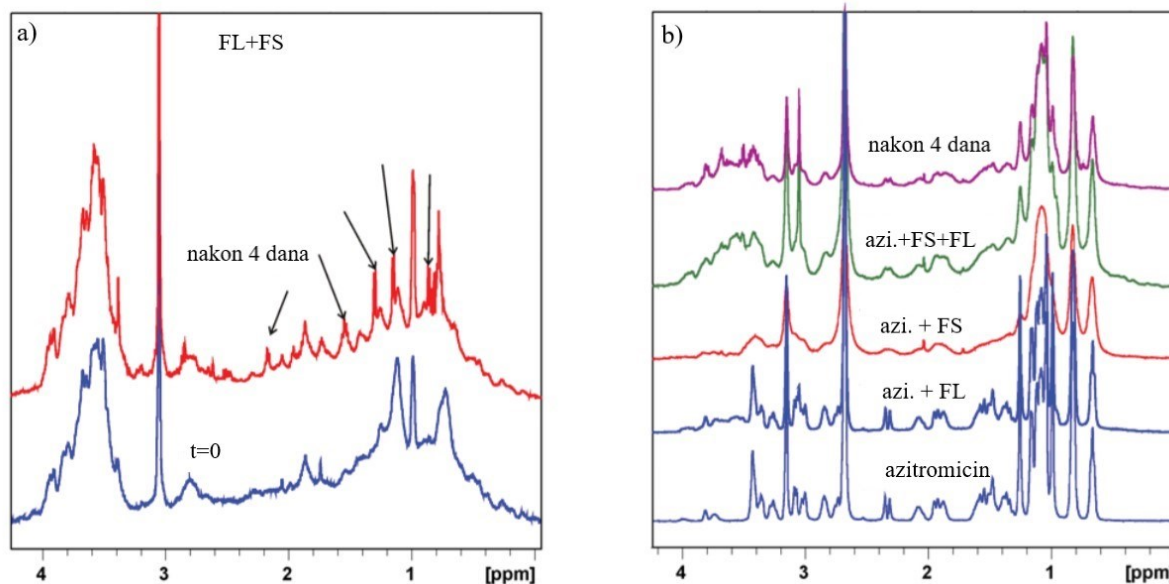
Biološke membrane dinamične su strukture koje se sastoje od fosfolipida. Interakcija makrolida i membrane može uvelike utjecati na bioraspodjelu i ukupnu aktivnost antibiotika.¹⁹

Kosol i suradnici¹⁹ istraživali su interakcije različitih makrolida (azitromicin, dekladinozil azitromicin, eritromicin A, azahomoeritromicin, klaritromicin, aglikon azitromicina, derivati klaritromicina) s modelima bioloških membrana (dodecylfosfolipin (DPC) i natrijev dodecil-fosfat (SDS)) pomoću eksperimenata NMR. Provedeni su difuzijski eksperimenti i eksperimenti temeljeni na pojačanju signala paramagnetskom relaksacijom.

Difuzijskim eksperimentima je dokazano vezanje makrolida za membranu tako što se pratio pad vrijednosti difuzijskih koeficijenata makrolida nakon dodatka micela SDS i DPC u otopinu. Relaksacijskim eksperimentima je određena orijentacija makrolida i način vezanja za micelle. Makrolidi koji ne posjeduju nabijene skupine uglavnom nisu topljivi u vodi te samim time nisu pokazali ni topljivost u otopinama DPC i SDS. Zaključeno je da su za vezanje makrolida na membrane ključni desozamin i pozitivno nabijena amino skupina.

Nadalje, titracijskim NMR eksperimentima istražen je mehanizam fosfolipidoze koju uzrokuju makrolidi. Makrolidi se akumuliraju u membranama lizosoma te induciraju prekomjerno nakupljanje fosfolipida u stanicama tako što inhibiraju aktivnost fosfolipaze A1, enzima koji katalizira razgradnju lipida.⁸ Proučavani su spektri ¹H NMR smjese fosfolipaze A1 i fosfolipida u prisutnosti i odsutnosti azitromicina. Spektar ¹H NMR (slika 22. a) fosfatidilserina s fosfolipazom A1 pokazuje široke i slabe signale. U početku dodatak fosfolipaze A1 nije pokazao nikakve promjene u spektru snimanog lipida. Međutim, nakon četiri dana dolazi do pojave oštrih i intenzivnih signala u spektru ¹H NMR što pokazuje da dolazi do razgradnje fosfolipida. Dodatkom azitromicina (slika 22. b) uočava se ponovno širenje linija u spektru što ukazuje na stvaranje kompleksa azitromicin-micelle, odnosno time je dokazano kako u prisutnosti azitromicina ne dolazi do razgradnje lipida. Iz dobivenih rezultata

se može zaključiti da makrolidi sterički sprječavaju vezanje fosfolipaze A1 za površinu membrane i tako uzrokuju fosfolipidozu.¹⁹



Slika 23. a) Spektar ¹H NMR fosfatidilserina (FS) s fosfolipazom A1, b) spektar ¹H NMR slobodnog azitromicina i smjese azitromicina s fosfatidilserinom (FS) i/ili fosfolipazom A1 (FL).

Budući da se većina makrolida iz organizma izlučuje putem žuči, Glanzer i suradnici⁴¹ istražili su interakcije makrolida (azitromicin, eritromicin, klaritromicin, azahomoeritromicin, dekladinofil azitromicin i aglikon azitromicina) s micelama žučnih kiselina pomoću spektroskopije NMR. Koristili su titracijske, relaksacijske i difuzijske eksperimente. Rezultati dobiveni titracijskim eksperimentima dokazali su vezanje makrolida na micelle. Naime, dodatkom žučne kiseline u otopinu azitromicina opažene su promjene kemijskih pomaka i širenje signala u spektru ¹H NMR.

Difuzijskim eksperimentima ustanovljeno je vezanje makrolida na micelle žučnih kiselina. Naime, vezanjem liganda na makromolekulu dolazi do značajnog povećavanja njegovog hidrodinamičkog radijusa što dovodi do smanjenja brzine difuzije i koeficijenta translacijske difuzije. Pokazano je i kako različiti makrolidi posjeduju različit afinitet vezanja na micelle žučne kiseline. Najjače vezanje primijećeno je kod hidrofobnijih makrolida poput azitromicina i klaritromicina.

Relaksacijskim eksperimentima dobivene su informacije o pozicioniranju makrolida u kompleksu makrolid-žučna kiselina. Dodatkom topljivog i inertnog paramagnetskog agensa u otapalo, okolina kompleksa postaje paramagnetska te brzina relaksacije jezgri liganda ovisi o dubini vezanja u micelu. Ukoliko je ligand u brzom izmjeni između slobodnog i vezanog stanja, PRE (engl. *paramagnetic relaxation enhancements*) se prenosi s otapala na ligand. Na taj način mogu se odrediti dijelovi liganda koji su prostorno najbliže micelama, odnosno može se odrediti orijentacija liganda. Svi makrolidi su pokazali sličnu orijentaciju u kompleksu.

Novak i suradnici⁴² su proučavali vezanje makrolida (azitromicin, oleandomicin, telitromicin) za protein albumin pomoću tehnike razlike prijenosa zasićenja (STD, engl. *saturation transfer difference*). Albumini pripadaju klasi proteina u plazmi koji se mogu reverzibilno vezati s lijekovima i tako služiti kao sustavi za dostavu lijeka. Tehnikom STD uspješno su okarakterizirani epitopi svih proučavanih makrolidnih antibiotika. Najintenzivniji signal za azitromicin (slika 4) i oleandomicin (slika 6) signal je protona H13, dok je za telitromicin najintenzivniji signal protona H14Me (slika 5. a). Protoni šećera desozamina kod azitromicina i oleandomicina sudjeluju u vezanju na BSA (engl. *bovine serum albumin*), dok kod telitromicina nisu u jednako bliskom kontaktu s ribosomom. Zaključno, spektroskopija STD NMR pokazala se kao izvrsna tehnika za detekciju i karakterizaciju interakcije između makrolidnih antibiotika i BSA.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i instrumenti

Kemikalije korištene u izradi rada, njihovi proizvođači, čistoće i molarne mase navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Popis kemikalija korištenih u izradi rada.

Kemikalija	Proizvođač	Čistoća	$M / g \text{ mol}^{-1}$
Etil acetat	Gram Mol	p.a.	88,11
Anhidrid octene kiseline	Carlo Erba Reagents	97 %	102,09
Natrijev hidrogenkarbonat	Gram Mol	p.a.	84,01
Kalijev karbonat	Fisher Chemical	99,5 %	138,205
Klorovodična kiselina	Kemika	p.a.	36,46
Diklormetan	Carlo Erba Reagents VWR Chemicals	99,9 % 100 %	84,93
Natrijev hidroksid	Kemika	p.a.	39,997
Toluen	Gram Mol	p.a.	92,14
<i>N,N</i> -dimetilformamid-dimetilacetal	Acros Organic	97 %	119,16
Metanol	Merck Chemicals		32,04
Amonijak, 25 %	Alkaloid Skopje		17,031
Kloroform-d	Eurisotop	99,8 %	120,384
Dietileter	Lach-Ner, s. r. o.		74,12
Akronitril	TCI America	99 %	53,06
<i>t</i> -Butanol	Carlo Erba Reagents	99,5 %	74,12
Tetrahidrofuran	LiChrosolv	99,8 %	72,11
Natrijev hidrid	Sigma-Aldrich		23,997
Ledena octena kiselina	Gram Mol	p.a.	60,05
Platinin(IV) oksid	Sigma-Aldrich		227,08
Sumporna kiselina, 96 %	Carlo Erba Reagents	p.a.	98,073
Etanol	Gram Mol	p.a.	46,07
Deuterirana voda	Eurisotop	99,96 %	20,03

Instrumenti koji su korišteni u radu za potrebe sinteze, analize i karakterizacije spoja navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Popis instrumenata korištenih u izradi rada.

Instrument	Proizvođač
Mettler AT261 DeltaRange	Mettler
Rotavapor R-100	Büchi
pH metar	Mettler Toledo
NMR spektrometar Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend	Bruker
NMR spektrometar Bruker Avance III HD 600 MGh/54mm Ascend	Bruker
UPLC ESI MS	Waters

3.2. Priprava 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina

Priprava 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina sastoji se od šest koraka (shema 2). Detaljan opis postupka priprave opisan je u daljnjem tekstu. Polazni reaktant azitromicin pripremljen je u tvrtci Fidelta Ltd.

Azitromicin (3,05 g) se otopi u etil-acetatu (30 mL) u tikvici okruglog dna te se reakcijska smjesa ohladi na 0 °C. Postepeno se dodaje jedan ekvivalent acetanhidrida (392 µL). Nakon 24-satnog miješanja reakcijske smjese na sobnoj temperaturi smjesa se ispire sa zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata (2 x 9 mL) te se zatim posuši na bezvodnom kalijevom karbonatu. Smjesa se profiltrira kako bi se uklonilo sredstvo za sušenje, otapalo upari te se dobije produkt **S1** (3,55 g).

Produkt **S1** otopi se u klorovodičnoj kiselini koncentracije 6 mol dm⁻³ (21 mL). Miješanjem 4 sata na magnetnoj mješalici pri 0 °C uklanja se kladinoza, jedan od dva šećera vezanih na aglikonski prsten azitromicina. Zatim se provede ekstrakcija s diklormetanom (3 x 10 mL) te gradijentna ekstrakcija pri različitim pH vrijednostima (pH ≈ 6, pH ≈ 8). Različite vrijednosti pH otopine postizale su se dodatkom natrijeve lužine koncentracije 6 mol dm⁻³. Spajanjem organskih ekstrakata dobivenih u rasponu vrijednosti pH ≈ 8 – 9 te uparavanjem diklormetana dobiven je produkt **S2** (2,95 g).

U okrugloj tikvici otopi se **S2** u toluenu (36 mL), zatim se doda pet ekvivalenata *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetala (3,1 mL). Reakcijska smjesa miješa se 24 sata pri temperaturi 60 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Pokretna faza za razvijanje TLC pločica sadrži diklormetan, metanol i amonijak (25 %) u omjeru 90:15:1,5. Reaktanti i produkti vizualizirani su prskanjem pločice s 10 %-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu. Nakon 24 sata doda se još tri ekvivalenta *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetala (1,86 mL). Nakon 5 sati miješanja reakcijske smjese pri 60 °C, uparavanjem otapala dobije se produkt **S3** (3,00 g).

Produkt **S3** prebaci se u dvogrlu tikvicu, osuši kroz 15 min pri 45 °C i zatim otopi u akrilonitrilu (24,4 mL) u inertnoj atmosferi dušika. Doda se smjesa *t*-butanola i tetrahidrofurana (1:1, 1,14 mL) te se reakcijska smjesa ohladi na 0 °C. Postepeno se dodaje natrijev hidrid (192 mg) nakon čega se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi dva sata. Akrilonitril se upari na rotacijskom uparivaču, a sirovi produkt suspendira u etil-acetatu (18 mL) te se profiltrira preko Büchnerovog lijevka u koji je stavljen celit. Filtrat se ispiri sa zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata (2 x 9 mL), suši na bezvodnom kalijevom karbonatu i otapalo se upari. Sirovom produktu doda se diklormetan (3 mL) i heksan (30 mL). Nastali talog se ukloni filtriranjem preko Büchnerova lijevka, filtrat se upari i dobije se produkt **S4** (1,78 g).

Produkt **S4** otopi se u ledenoj octenoj kiselini (5,50 mL) te se doda katalizator PtO₂ (180,5 mg). Reakcijska smjesa hidrogenira se 24 sata pri tlaku od 3,5 bara, nakon čega se profiltrira kako bi se uklonio katalizator te se filtrat upari na rotacijskom uparivaču. Sirovom produktu doda se diklormetan (5,5 mL) i voda (11 mL) i provede se gradijentna ekstrakcija pri različitim pH vrijednostima: 4,2, 6,5, 8,15. pH vrijednosti otopine postizane su dodatkom HCl i NaOH koncentracije 6 mol dm⁻³. Uparavanjem organskih ekstrakata dobivenih pri pH ≈ 8 – 9 dobiven je produkt **S5** (852,82 mg).

U zadnjem sintetskom koraku produkt **S5** miješa se 24 sata u metanolu (90 mL) uz dodatak 2 ekvivalenta K₂CO₃ (342 mg) pri temperaturi 45 °C te je dobiven produkt **S6**.

3.3. Metode za karakterizaciju 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina

Spektrometrijom masa potvrđena je prisutnost svih međuprodukata S1-S5 te konačnog produkta 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina (**S6**) u reakcijskoj smjesi. Spektri masa snimljeni su na uređaju Waters UPLC ESI MS uz ionizaciju elektroraspršenjem.

Za potvrđivanje strukture spoja S6 korištene su jednodimenzijske (^1H i DEPT NMR) i dvodimenzijske (COSY, HSQC, HMBC) tehnike NMR. Spektri su snimljeni na spektrometru NMR *Bruker Avance III HD 400 MHz/54mm Ascend*. Uzorak S6 (8 mg) je otopljen u deuteriranom kloroformu (550 μL).

Tablica 5. Broj pulseva za pojedine tehnike NMR korištene za potvrđivanje strukture spoja S6 u kloroformu i vodi.

	Tehnika NMR	Broj pulseva
CDCl_3	^1H	16
	COSY	3
	HSQC	16
	HMBC	40
	DEPT	8192
D_2O	^1H	128
	COSY	6
	HMBC	50

Za istraživanje konformacije spoja **S6** u slobodnom i vezanom stanju korištene su tehnike NOESY, ROESY i tr-NOESY, a za određivanje epitopa vezanja korištena je tehnika STD. Navedeni eksperimenti NMR provedeni su na spektrometru NMR *Bruker Avance III HD 600 MHz/54mm Ascend*. U tablici 5. prikazani su korišteni parametri navedenih tehnika. Uzorak S6 (0,9 mg) je otopljen u deuteriranoj vodi (550 μL). Snimljeni su spektri ^1H , COSY i HMBC za potpunu asignaciju atoma ugljika i vodika u vodi (tablica 8).

Neposredno prije snimanje spektara STD, u otopinu 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina dodan je nedeuterirani 70S ribosom iz bakterije *E. coli* (23 μL ; $6,31 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3}). Omjer ribosoma i prekursora bio je 1:3500. Ukupan volumen otopine u cjevčici za STD i tr-NOESY mjerenja iznosio je 573 μL . Napravljena su četiri eksperimenta STD s različitim parametrima kako bi se proučilo koja kombinacija parametara daje najbolje

rezultate. Za sva četiri eksperimenta STD korišteni su Gauss G4 kaskadni puls u trajanju od 50 ms. Vrijeme zasićenja (vrijeme odgode, D1) iznosilo je 3 s, odnosno 2 s. Nakon snimljenih spektara, zasićeni spektar (*on-resonance*) je oduzet od referentnog (*off-resonance*) spektra.

Eksperiment tr-NOESY proveden je posljednji. Snimljena su četiri spektra koristeći različite parametre (tablica 6.).

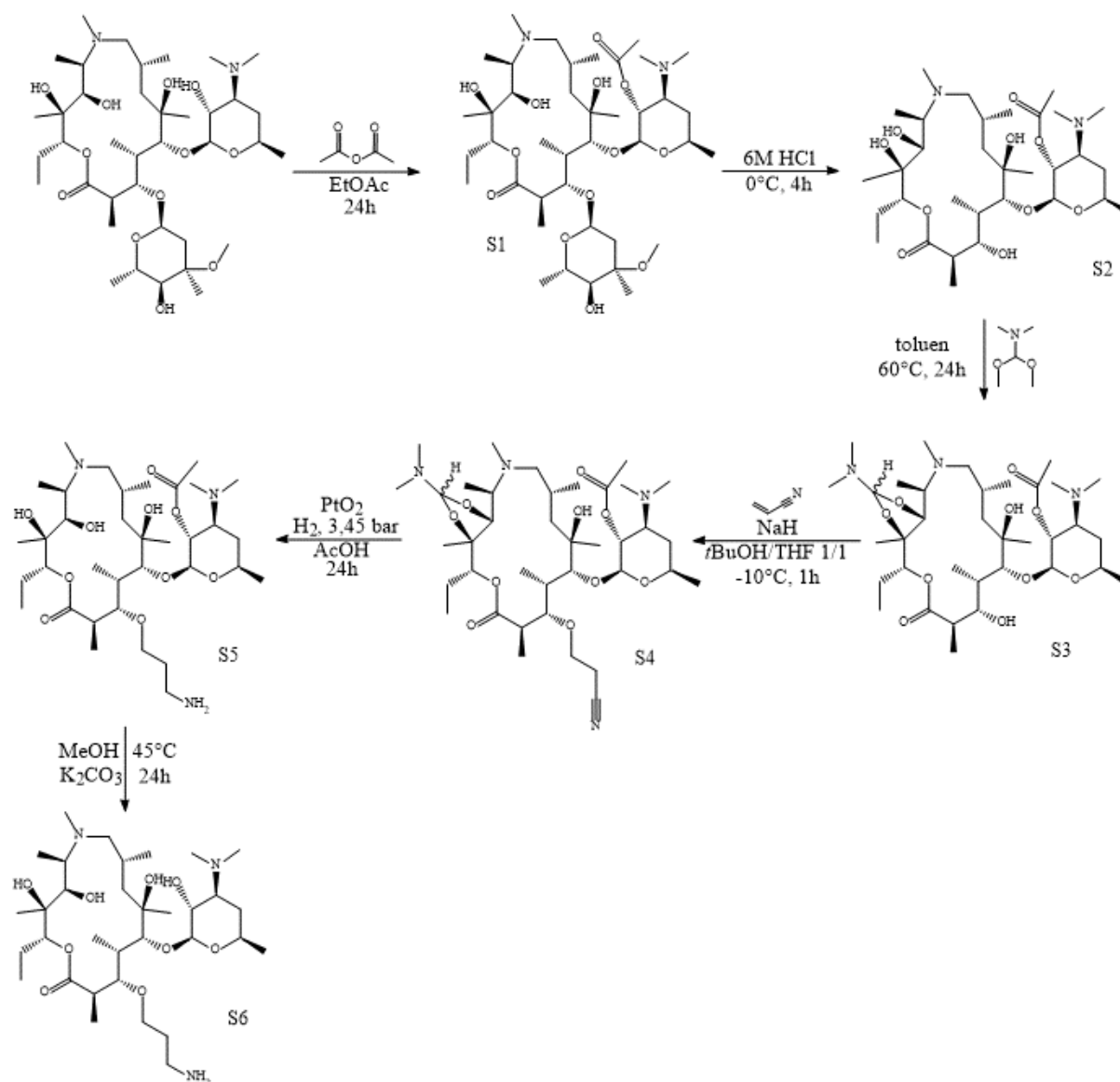
Tablica 6. Parametri tehnika NMR korištenih za istraživanje konformacije spoja S6 i epitopa vezanja. Podebljani parametri dali su najbolje rezultate za pojedine tehnike.

Otapalo: D ₂ O	Broj pulseva	<i>Off- resonance</i> /ppm	<i>On- resonance</i> /ppm	vrijeme odgode (D1)/s	vrijeme miješanja (D8)/ms
NOESY	64			1,85	400
ROESY	80			1,85	
STD	128	35	-0,5	3	
	128	35	-0,5	2	
	128	50	9	3	
	128	50	8	3	
tr- NOESY	18			2	75
	32			2	80
	32			2	100
	64			2	150

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je pripremljen 3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina (S6). Sintetski put prikazan je na shemi 2. te je detaljno pojašnjen u poglavlju 3.



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

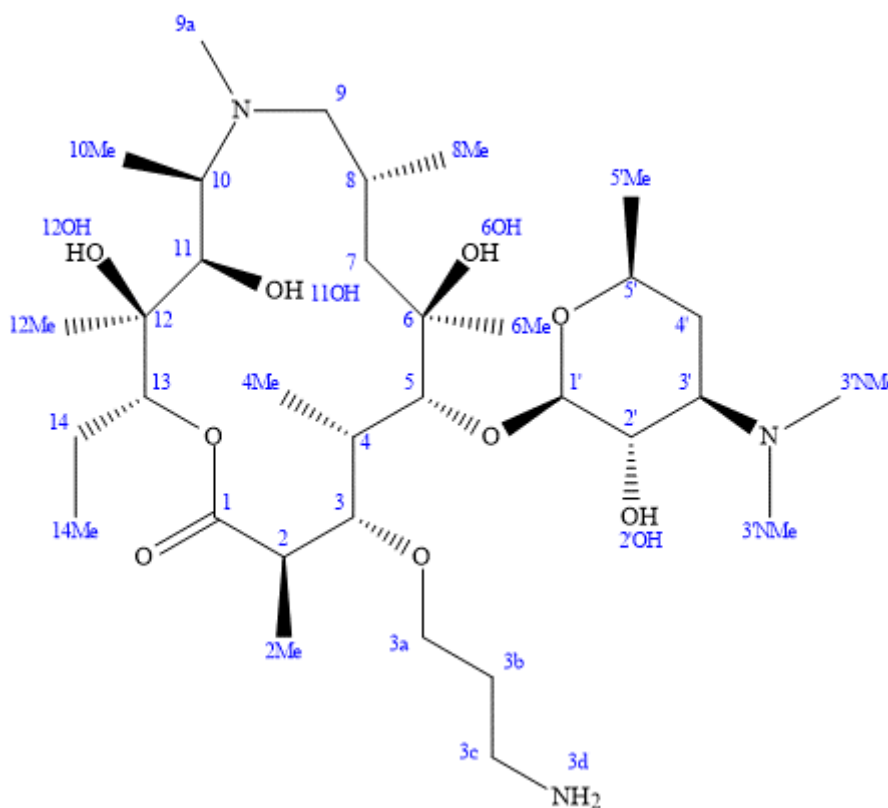
4.2. Karakterizacija 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina

Novosintetizirani spoj, 3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina (**S6**), okarakteriziran je pomoću spektrometrije masa i spektroskopije NMR.

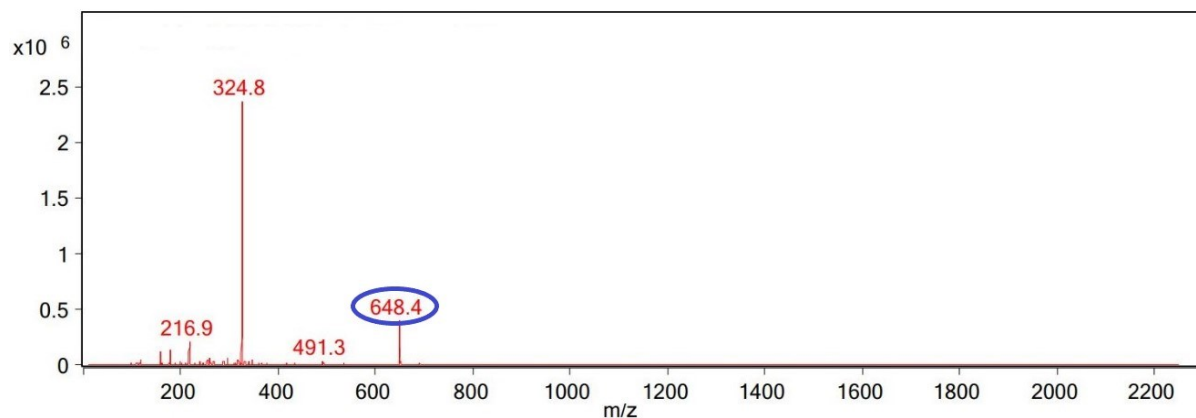
Predložena struktura spoja **S6** temeljem podataka dobivenim iz spektra mase i kombinacijom podataka dobivenih iz spektara NMR prikazana je na slici 24. Na slici 25. nalazi se spektar mase, dok su na slikama 26. – 28. prikazani neki spektri NMR (HMBC, NOESY i ROESY) 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina. Spektri mase svih međuprodukata nalaze se u dodatku (D1 – D3) kao i preostali snimljeni spektri NMR (D4 – D9).

Prekursor ion u spektru mase nalazi se pri m/z 648,4 što odgovara masi 3-aminopropil dekladinozil derivatu azitromicina. Fragmentacijom nastaju produkti ioni pri m/z 491,3, 324, 8 i 216,9.

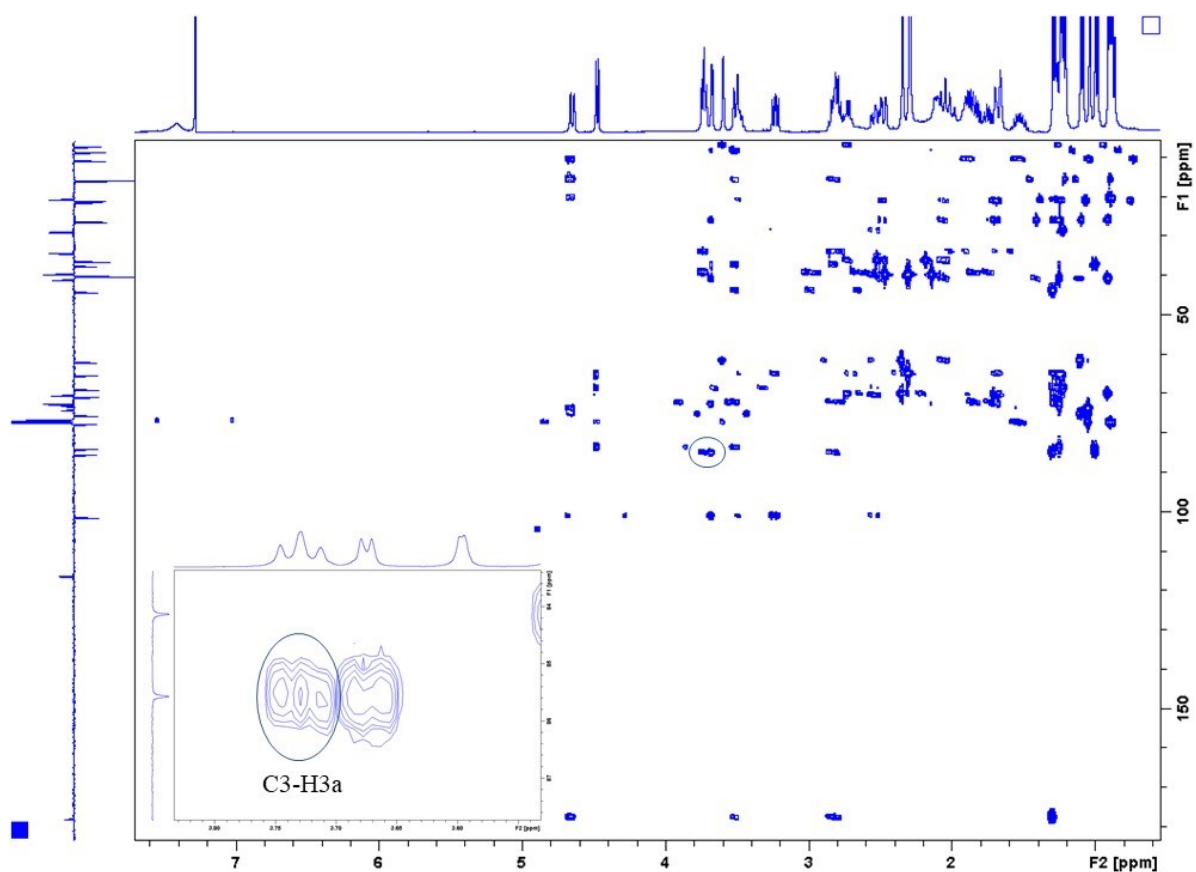
U spektru HMBC vidi se korelacija između ugljika C3 i protona H3a što potvrđuje da se supstitucija aminopropilnog ogranka dogodila upravo na položaju C3 (slika 26). Korelacijski signali između C3 i H3b i H3c nisu vidljivi u spektru HMBC jer je udaljenost C3 od navedenih protona četiri, odnosno pet kemijskih veza.



Slika 24. Struktura 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina (**S6**).



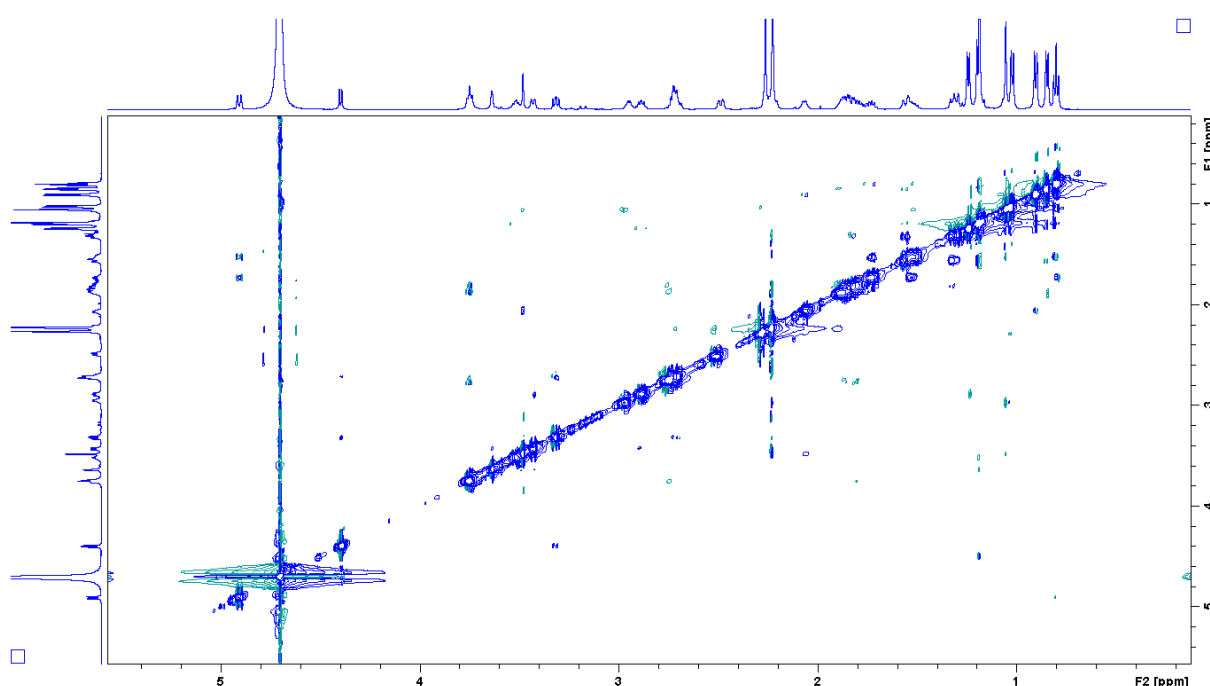
Slika 25. Spektar ESI-MS spoja **S6** snimljen u pozitivnom modu sa zaokruženim molekulskim ionom.



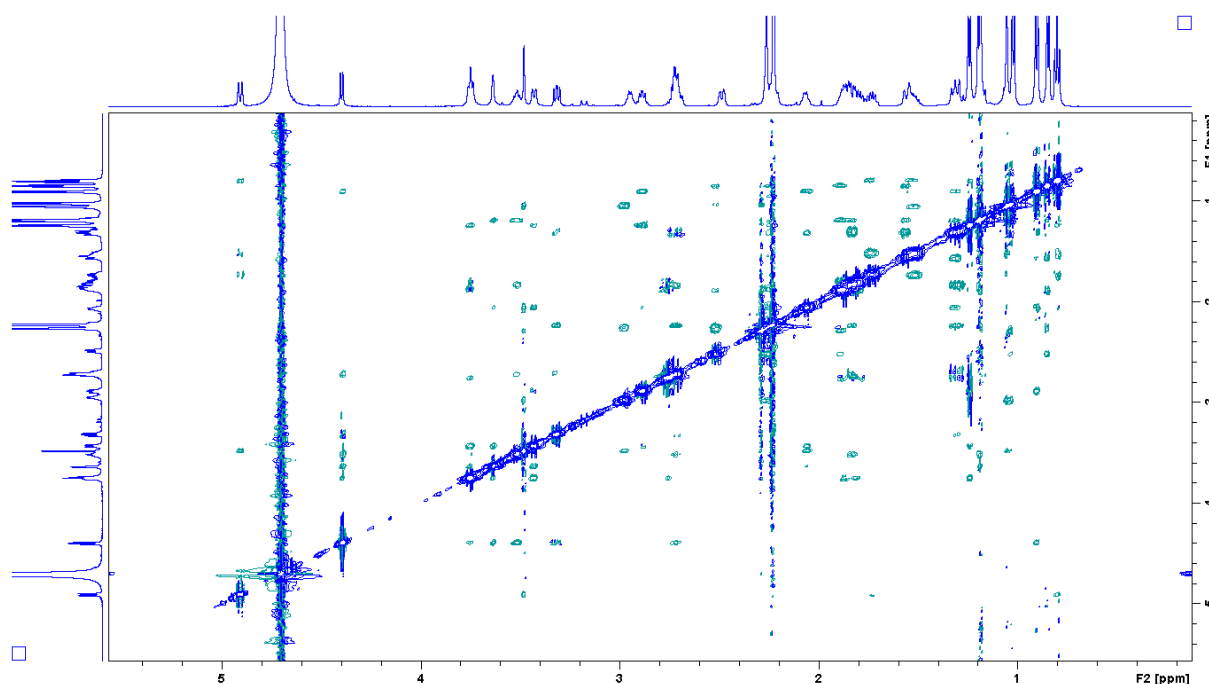
Slika 26. Spektar HMBC NMR spoja **S6** snimljen u kloroformu-d pri 298 K s označenim korelacijskim signalom ugljika C3 i protona H3a.

Signali spektra NOESY (slika 27) slabi su i jedva vidljivi. Razlog slabim signalima je masa molekule i posljedično vrijednost nuklearnog Overhauserovog efekta. Naime, za molekule

molarne mase oko 1000 Da, kao što je 3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina, vrijednost NOE je blizu nule. Zbog izostanka većine signala i pojave slabih signala u spektru NOESY, snimljen je spektar ROESY (slika 28). Kod tehnike ROESY vrijednost NOE uvijek je pozitivna. Tehnikom ROESY, kao i NOESY, moguće je potvrditi prostorne udaljenosti pojedinih atoma. U spektrima ROESY mogu biti prisutne korelacije TOCSY-ROESY i ROESY-TOCSY koji imaju isti predznak kao i signali ROE. Stoga je prilikom interpretacije ROESY spektara potrebno uzeti u obzir i ovu činjenicu. Ujedno se mogu vidjeti i korelacije COSY čiji signali su antifazni pa se lako mogu razlikovati od signala ROE.



Slika 27. Spektar NOESY NMR spoja S6 snimljen u D₂O pri 298 K.

Slika 28. Spektar ROESY NMR spoja **S6** snimljen u D₂O pri 298 K.

Na temelju analize svih spektara NMR napravljena je asignacija ugljikovih i vodikovih atoma koja je prikazana u tablicama 7. i 8., dok su u tablici 9. prikazane korelacije atoma vodika u spektru ROESY.

Tablica 7. Asignacija kemijskih pomaka ¹H i ¹³C NMR 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina u kloroformu-d.

3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina – S6					
Atom	$\delta(^1\text{H})/ \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/ \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/ \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/ \text{ppm}$
1	-	178,08	10	2,72	62,09
2	2,82	44,28	10Me	1,09	7,39
2Me	1,29	15,99	11	3,60	75,65
3	3,51	85,57	11OH	- ^a	-
3a	3,73	72,72	12	-	74,22
3b	1,74; 1,84	34,46	12OH	- ^a	-
3c	2,80	39,71	12Me	1,04	16,06
3d	7,43	-	13	4,66	77,84
4	2,11	37,74	14	1,52; 1,88	20,73
4Me	0,99	8,81	14Me	0,87	11,03
5	3,68	84,09	1'	4,48	101,56

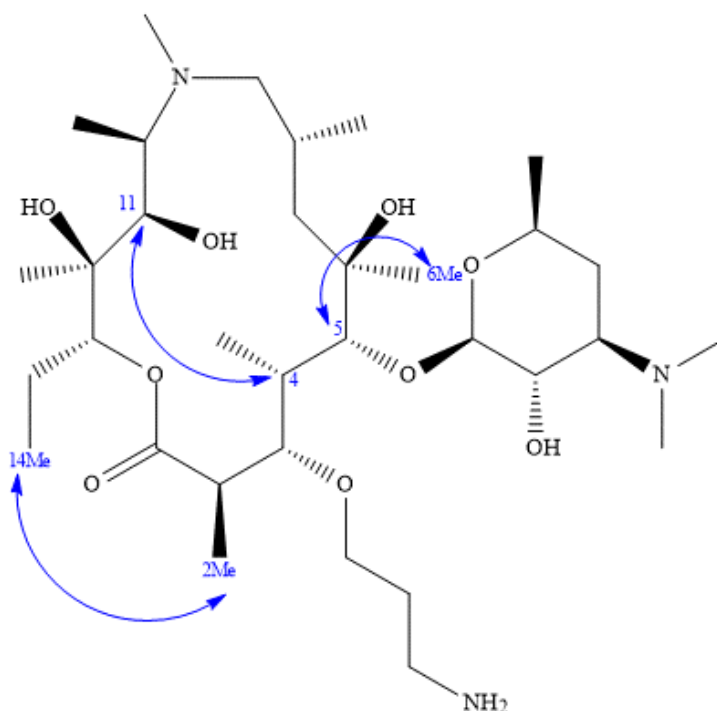
6	-	73,28	2'	3,24	70,98
6Me	1,24	26,51	2'OH	- ^a	-
7	1,27; 1,68	41,24	3'	2,53	65,46
8	1,90	26,43	3'NMe	2,30	40,39
8Me	0,90	21,58	4'	1,24; 1,67	29,07
9	2,05; 2,48	70,54	5'	3,49	69,09
9a	2,35	36,62	5'Me	1,21	21,19

Tablica 8. Asignacija kemijskih pomaka ¹H i ¹³C NMR 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina u D₂O.

3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina – S6					
Atom	$\delta(^1\text{H})/ \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/ \text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/ \text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/ \text{ppm}$
1	-	178,37	10	2,95	61,48
2	2,88	44,02	10Me	1,02	5,97
2Me	1,24	15,42	11	3,48	75,77
3	3,43	85,6	11OH	- ^a	-
3a	3,75	72,71	12	-	74,8
3b	1,78; 1,86	31,06	12OH	- ^a	-
3c	2,72	37,62	12Me	1,05	16,45
3d	- ^a	-	13	4,91	77,90
4	2,07	37,27	14	1,52; 1,73	20,54
4Me	0,90	8,34	14Me	0,80	9,95
5	3,63	84,22	1'	4,40	101,72
6	-	73,58	2'	3,32	70,71
6Me	1,19	25,73	2'OH	- ^a	-
7	1,30; 1,55	40,12	3'	2,70	63,43
8	1,88	25,93	3'NMe	2,23	39,55
8Me	0,85	20,67	4'	1,30; 1,83	30,45
9	2,21; 2,48	67,81	5'	3,52	69,52
9a	2,26	- ^a	5'Me	1,19	19,8

	1	2	2 Me	3	3a	3b	3c	3d	4	4 Me	5	6	6 Me	7	8	8 Me	9	9a	10	10 Me	11	11 OH	12	12 OH	12 Me	13	14	14 Me	1'	2'	2' OH	3'	3' NMe	4'	5'	5' Me			
10																				X	X																		
10Me																	X	X	X																				
11									X								X		X						X	X													
11OH																																							
12																																							
12OH																																							
12Me									X										X		X					X	X												
13																				X							X	X											
14																									X			X											
14Me			X																							X	X												
1'				X	X					X	X																						X					X	
2'																																					X	X	
2'OH																																							
3'																														X						X			X
3'NMe																															X			X			X		
4'																																			X			X	
5'				X																										X				X			X		X
5'Me																																						X	

Interpretacijom spektra ROESY (tablica 8) te usporedbom dobivenih informacija s literaturnim podacima^{1,8} ustanovljeno je kako spoj S6 u slobodnom stanju poprima konformaciju tzv. *folded-out* (slika 28). Konstanta homonuklerne sprege $^3J_{H_2,H_3}$ iznosi ≈ 10 Hz što uz kontakte NOE dodatno potvrđuje konformaciju *folded-out*. Kontakti NOE karakteristični za konformaciju tzv. *folded-in* nisu uočeni u spektru.



Slika 29. Struktura 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina (**S6**) s označenim ključnim kontaktima NOE za konformaciju *folded-out*.

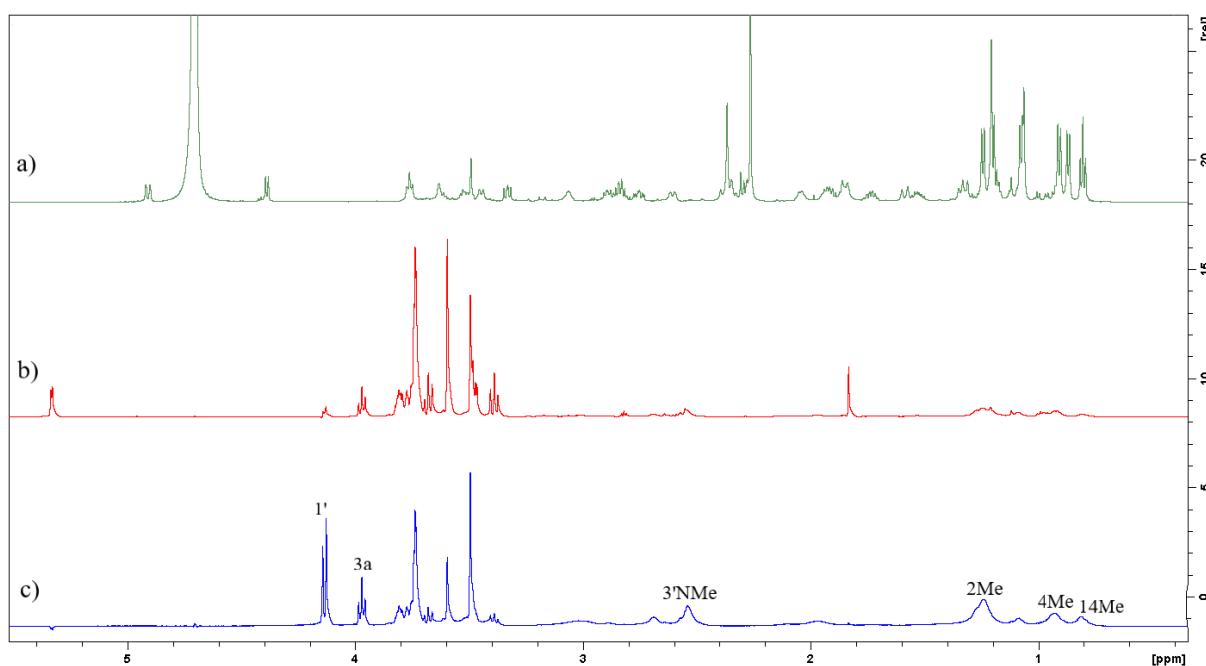
Uspoređujući spektre ROESY/NOESY pripremljenog 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina, s onima dobivenim za azitromicin,¹ oleandomicin,⁸ derivat homoeritromicina⁹ i eritromicin A¹ uočene su sličnosti, ali i neke razlike. Kao što je već spomenuto, spoj **S6** u slobodnom stanju poprima konformaciju *folded-out* čiji su karakteristični kontakti H14Me – H2Me, H4 – H11 i H5 – H6Me (slika 29). Eritromicin A i oleandomicin također pokazuju navedene karakteristične kontakte u slobodnom stanju. Azitromicin i derivati homoeritromicina poprimaju konformaciju *3-endo-folded-out* u slobodnom stanju čiji su karakteristični signali slični signalima spoja **S6**, eritromicina i oleandomicina, ali nisu u potpunosti jednaki.

4.3. Interakcije 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina s ribosomom

Interakcije 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina (**S6**) s ribosomom iz bakterije *E. coli* i konformacija **S6** u vezanom stanju okarakterizirane su pomoću spektroskopije NMR. Korištene tehnike bile su STD i tr-NOESY.

Za istraživanje epitopa vezanja spoja **S6** provedena su četiri eksperimenta STD s različitim parametrima opisanim u eksperimentalnom dijelu. Najbolji rezultati su dobiveni snimanjem referentnog spektra (*off-resonance*) pri 35 ppm i spektra zasićenja (*on-resonance*) pri $-0,5$ ppm uz vrijeme zasićenja 3 s.

Usporedbom spektra razlike STD i spektra ^1H NMR spoja **S6** snimljenog prije dodatka ribosoma (slika 30) mogu se uočiti signali protona koji sudjeluju u interakciji s ribosomom. Signali tih protona najvećeg su intenziteta u STD spektru razlike.



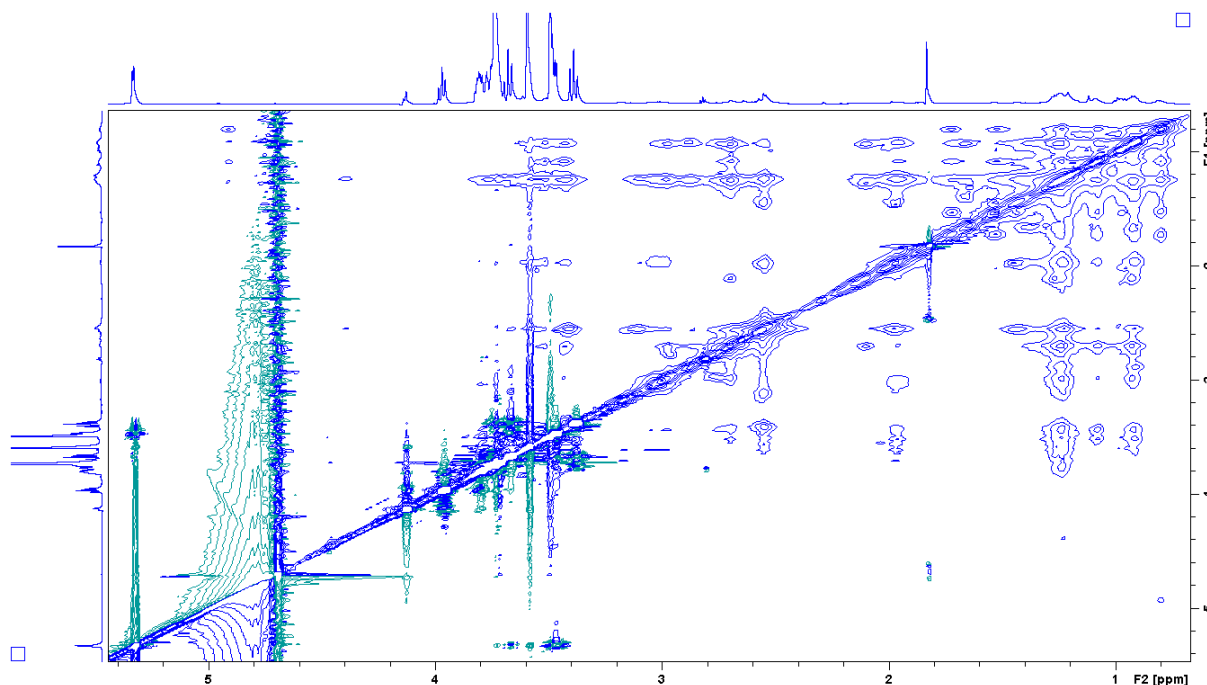
Slika 30. a) Spektar ^1H NMR spoja **S6** prije dodatka bakterijskog ribosoma izoliranog iz bakterije *E. coli* b) Spektar *off-resonance* ^1H NMR nakon dodatka ribosoma (35 ppm) c) Spektar razlike (spektar STD) spoja **S6** u D_2O pri 298 K.

Zbog širenja linija, promjene kemijskog pomaka i preklapanja signala u spektru nakon dodatka ribosoma nije moguće sa sigurnošću asignirati sve atome vodika. Na slici 30. c) naznačeni su signali atoma za koje se pretpostavlja da su u bliskom kontaktu s ribosomom.

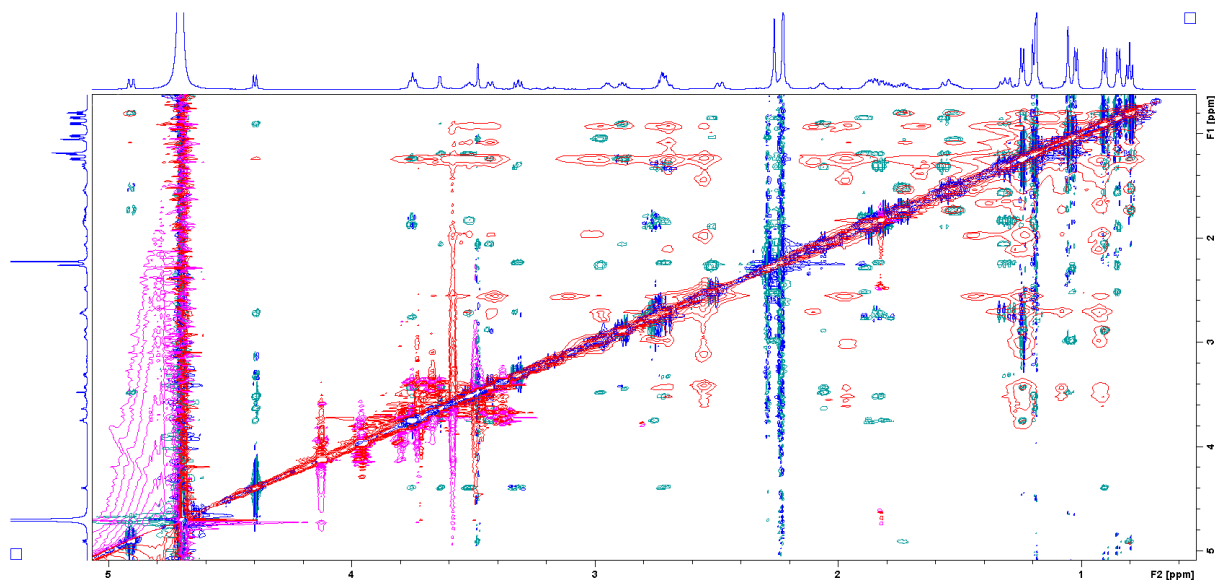
Usporedbom spektara STD NMR spoja **S6** s već prije istraživanim azitromicinom, oleandomicinom i derivatima homoeritromicina uočene su neke promjene, ali i sličnosti spoja **S6** i navedenih makrolida. Najintenzivniji signali u spektru STD NMR za spoj **S6** su oni protona na položajima 1', 3a, 3'NMe, 2Me, 4Me i 14Me. Azitromicin⁸ i derivati homoeritromicina⁹ imaju tri zajednička epitopa vezanja kao i pripravljeni 3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina (H14Me, 3'NMe, 2Me). Kod oleandomicina i njegovih derivata,⁴³ najjači signali STD opaženi su za atom H12 budući da ovaj spoj nema H14 skupinu te za skupine 3'NMe i 1'.

Za istraživanje konformacije spoja **S6** u vezanom stanju provedeno je više eksperimenata tr-NOESY (tablica 6). Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem vremena miješanja od 100 ms.

Usporedbom signala u spektru tr-NOESY i ROESY (slika 32) uočene su razlike te se može pretpostaviti da je došlo do promjene konformacije spoja **S6** u vezanom stanju. Detaljna interpretacija tr-NOESY spektra, odnosno točno određivanje konformacije bilo je otežano zbog širenja linija i promjene kemijskih pomaka signala spoja **S6** u vezanom stanju. Iz tog razloga nije moguće usporediti konformaciju spoja **S6** s konformacijama već istraživanih makrolida.



Slika 31. Spektar tr-NOESY NMR spoja **S6** nakon dodatka ribosoma izoliranog iz bakterije *E. coli* snimljen u D₂O pri 298 K.



Slika 32. Preklapljeni spektar ROESY (plavi i zeleni signali) spoja **S6** i spektar tr-NOESY (crveni i ljubičasti signali) spoja **S6** i ribosoma izoliranog iz bakterije *E. coli* snimljen u D_2O pri 298 K.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno je pripremljen 3-aminopropil dekladinozil derivat azitromicina. Sintetizirani spoj okarakteriziran je pomoću jedno- i dvodimenzijских tehnika spektroskopije NMR i spektrometrijom masa.

Konformacija spoja u slobodnom stanju opisana je pomoću tehnike ROESY te je ustanovljeno kako je ona slična konformaciji koju zauzimaju 14-člani makrolidi tzv. *folded-out* konformacija. Izmjerena konstanta sprege $^3J_{H2H3}$ u iznosu od 10 Hz je u skladu s podacima dobivenim iz spektra ROESY i potvrđuje prisutnost konformacije *folded-out*. Takvu konformaciju i karakteristične kontakte (H14Me – H2Me, H4 – H11 i H5 – H6Me) imaju i makrolidi eritromicin A i oleandomicin.

Snimljeni spektri STD NMR pokazali su da je došlo do vezanja 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina na ribosom izoliran iz bakterije *E. coli*. Međutim, dolazi do širenja linija, promjene kemijskih pomaka i preklapanja signala u spektru nakon dodatka bakterijskog ribosoma pa nije bilo moguće asignirati sve atome vodika spoja **S6**.

Isto tako, zbog širenja linija i promjena kemijskih pomaka signala spoja **S6** nije bilo moguće precizno interpretirati spektar tr-NOESY pa je i usporedba konformacija drugih makrolida u vezanom stanju s konformacijom spoja **S6** bila otežana. Međutim, razlike u snimljenim spektrima se mogu uočiti te se može zaključiti da je došlo do interakcije 3-aminopropil dekladinozil derivata azitromicina s ribosomom iz bakterije *E. coli*, odnosno da je konformacija u vezanom stanju nešto drugačija od one u slobodnom stanju.

Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao dobar temelj u razvoju i istraživanju novih derivata azitromicina te u daljnjoj sintezi nove generacije makrozona – konjugata tiosemikarbazona i derivata azitromicina.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

COSY – *correlation spectroscopy*

DEPT – *distortionless enhancement by polarisation transfer*

FDA – *Food and Drug Administration*

HMBC – *heteronuclear multiple bond correlation*

HSQC – *heteronuclear single quantum coherence*

MLS – makrolidi, linkozamidi, streptogramin

MLSBK – makrolidi, linkozamidi, streptogramin B, ketolidi

MS – spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)

NMR – nuklearna magnetna rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*)

NOE – nuklearni Overhauserov efekt

NOESY – *nuclear Overhauser effect spectroscopy*

PRE – *paramagnetic relaxation enhancements*

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

ROESY – *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

SAR – *structure-activity relationship*

STD – *saturation transfer difference*

TLC – tankoslojna kromatografija

TOCSY – *total correlation spectroscopy*

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

tr-NOESY – *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*

WaterLOGSY – *water–ligand observed gradient spectroscopy*

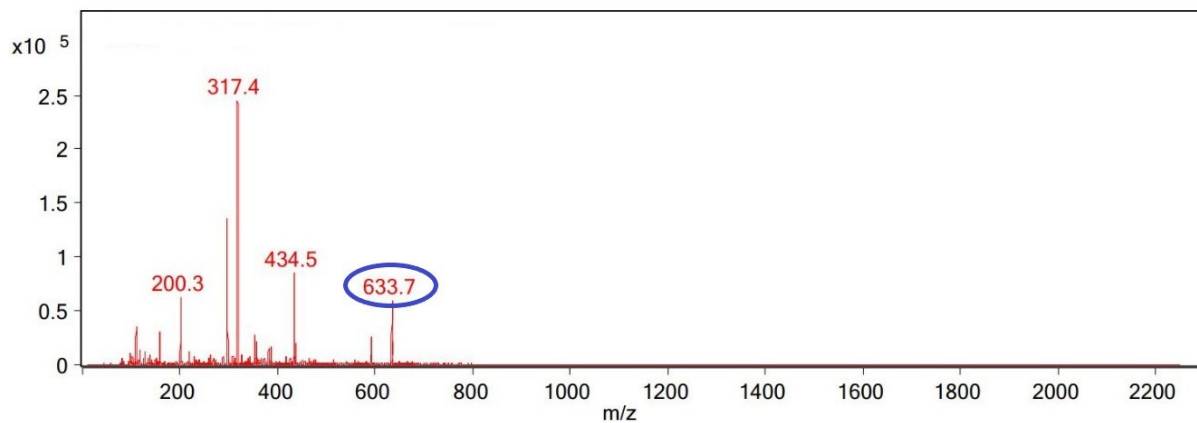
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662.
2. F. Marinelli, O. Genilloud, *Antimicrobials*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, str. 211–230.
3. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01159>
4. R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **69** (1957) 50–58.
5. J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Mol. Cell.* **10** (2002) 117–128.
6. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949–960.
7. A. E. Fohnera, A. Sparreboom, R. B. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **27** (2017) 164–167.
8. B. Arsić, J. Barber, P. Novak, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018.
9. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
10. J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1987) 1659–1667. <https://doi.org/10.1039/P29870001659>
11. M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Trends Biochem. Sci.* **32** (2007) 20–26.
12. P. Novak, T. Jednačak, u Z. Mandić (ur.), *Physico-chemical methods in drug discovery*, IACP, Zagreb, 2011, str. 189–231.
13. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
14. R. H. Drews, H. A. Gallis, *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **13** (2012) 634–639.
15. K. W. Garey, G. W. Amsden, *Ann Pharmacother.* **33** (1999) 218–228.
16. A. D. Petropoulos, E. C. Kouvela, A. L. Starosta, D. N. Wilson, G. P. Dinos, D. L. Kalpaxis, *J. Mol. Biol.* **385** (2009) 1179–1192.
17. L. Verdier, G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, J. P. Girault, *Bioorg. Med. Chem.* **8** (2000) 1225–1243.

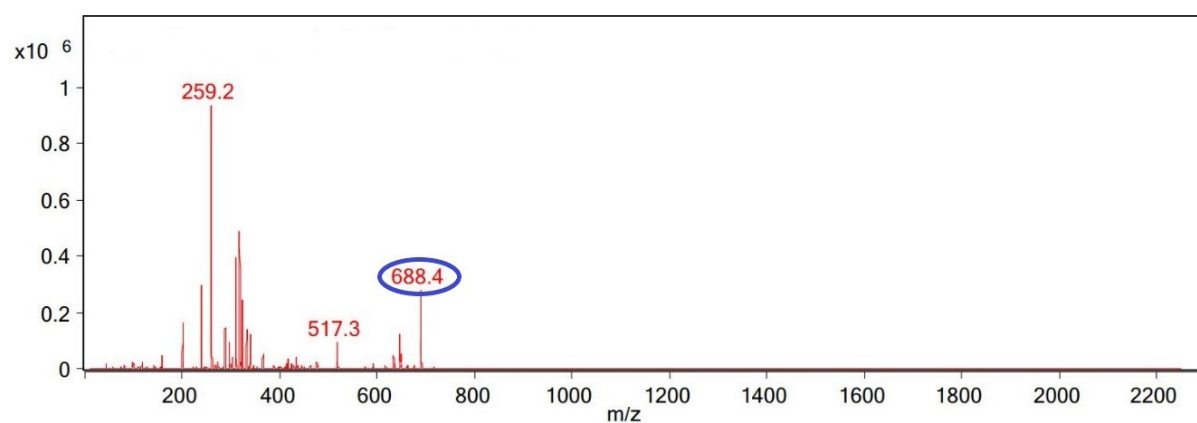
18. I. Grgičević, I. Mikulandra, M. Bukvić, M. Banjanac, V. Radovanović, I. Habinovec, B. Bertoša, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents* (2020) <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106147>
19. S. Kosol, E. Schrank, M. Bukvić, G. E. Wagner, N. H. Meyer, C. Göbl, K. Zangger, P. Novak, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 5632–5636.
20. T. Jednačak, I. Mikulandra, P. Novak, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 7799 <https://doi.org/10.3390/ijms21207799>
21. World Health Organization, *Model List of Essential Medicines, 21st List*, 2019. Geneva: World Health Organization
22. I. Francetić, *Medicus* **17** (2008) 9–14.
23. V. Godinić Mikulčić, *Studia lexicographica* **12** (2018) 33–52.
24. <https://basicbiology.net/micro/microorganisms/bacteria> (datum pristupa 1. lipnja 2020.)
25. J C. Pechere, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18** (2001) 25–28.
26. B. Weisblum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 577–585.
27. <https://www.adiva.hr/zdravlje/lijekovi-i-terapije/antimikrobna-rezistencija-jedna-od-najvecih-prijetnji-ljudskom-zdravlju/> (datum pristupa 28. ožujka. 2020.)
28. A. Fajdetic, G. Kobrehel, G. Lazarevski, V. Štimac, S. Mutak, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 301–312.
29. S. Ma, R. Ma, Z. Liu, C. Ma, X. Shen, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
30. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013.
31. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165–173.
32. M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 6108–6117.
33. R. Berisio, J. Harms, F. Schlünzen, R. Zarivach, H. A. S. Hansen, P. Fucini, A. Yonath, *J. Bacteriol.* **185** (2003) 4276–4279.
34. J. M. Harms, F. Schlünzen, P. Fucini, H. Bratels, A. Yonath, *BMC Biol.* **2** (2004) 4–13.
35. F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* **413** (2001) 814–821.
36. J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz. *Mol. Cell* **10** (2002) 117–128.
37. J. L. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* **330** (2003) 1061–1075.
38. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270.

39. J.A Dunkle, L. Xiong, A. S. Mankin, J. H. D. Cate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107** (2010) 17152–17157.
40. M. S. Svetlov, E. Plessa, C.-W. Chen, A. Bougas, M. G. Krokidis, G. P. Dinos, Y. S. Polikanov, *RNA* **25** (2019) 600–606.
41. S. Glanzer, S. A. Pulido, S. Tutz, G. E. Wagner, M. Kriechbaum, N. Gubensäk, J. Trifunović, M. Dorn, W. M. F. Fabian, P. Novak, J. Reidl, K. Zangger, *Chem. Eur. J.* (2015) <https://doi.org/10.1002/chem.201406413>
42. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta* **80** (2007) 211–216.
43. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem. A* **110** (2006) 572–579.

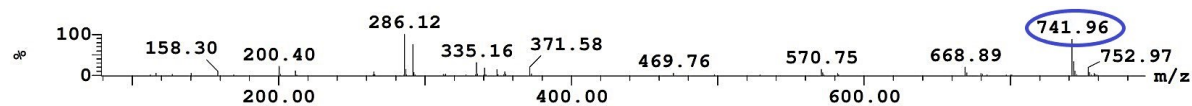
§ 8. DODATAK



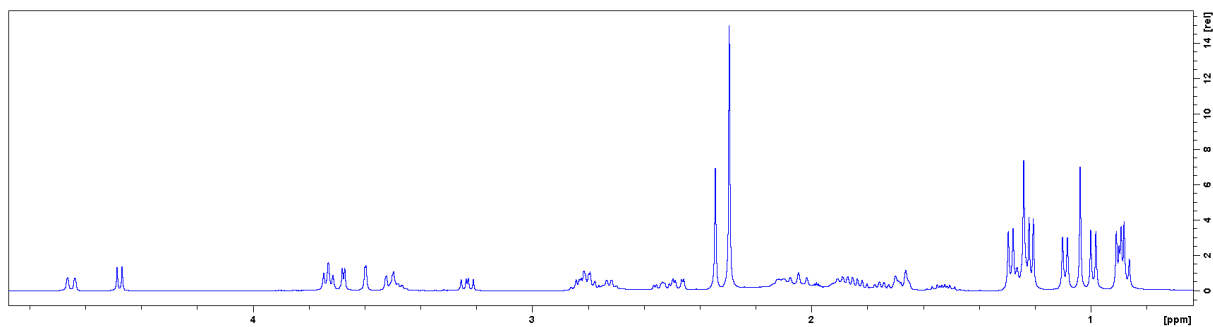
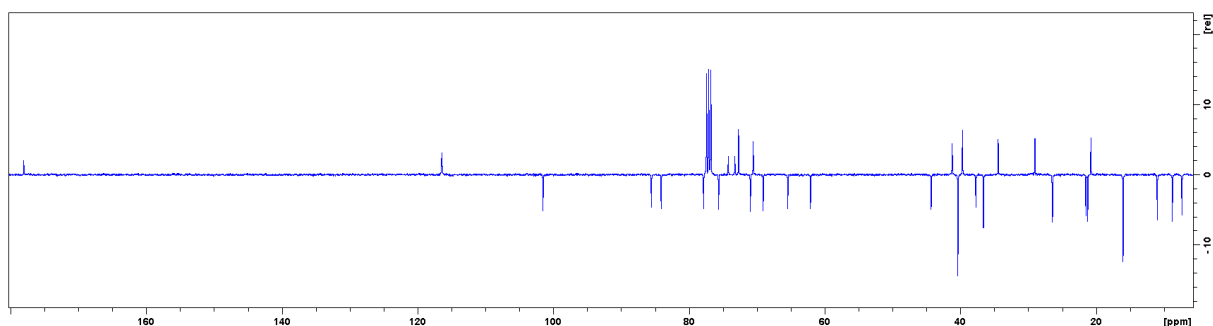
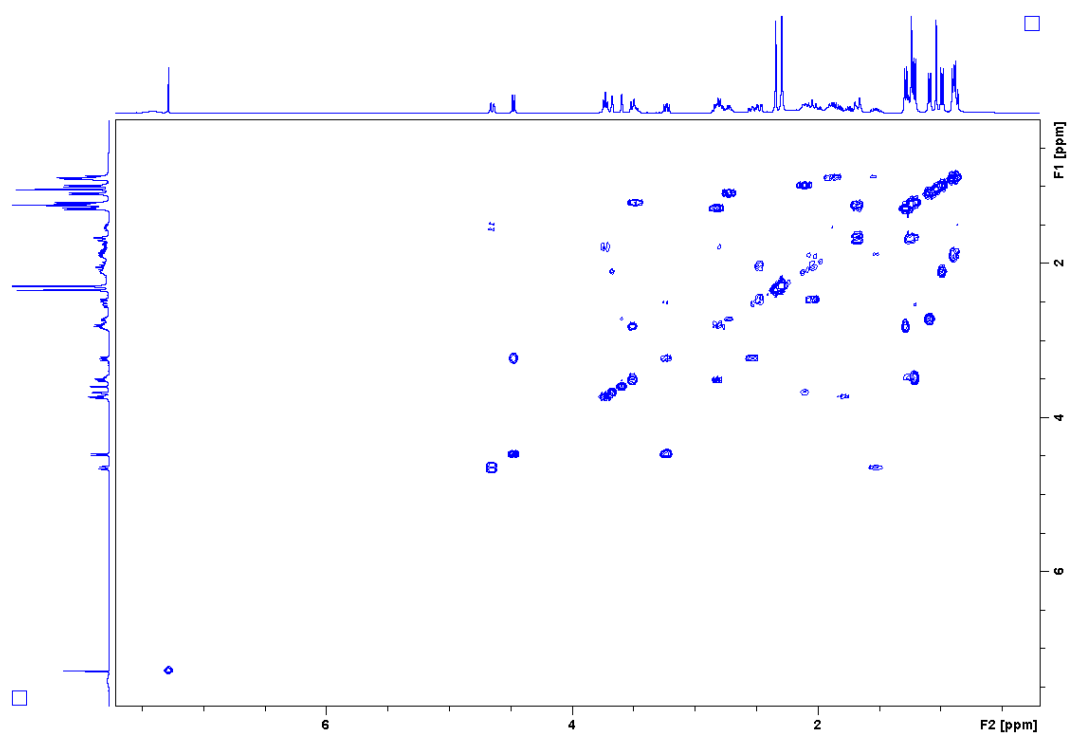
Slika D1. Spektar ESI-MS spoja S2 snimljen u pozitivnom modu sa zaokruženim molekulskim ionom.

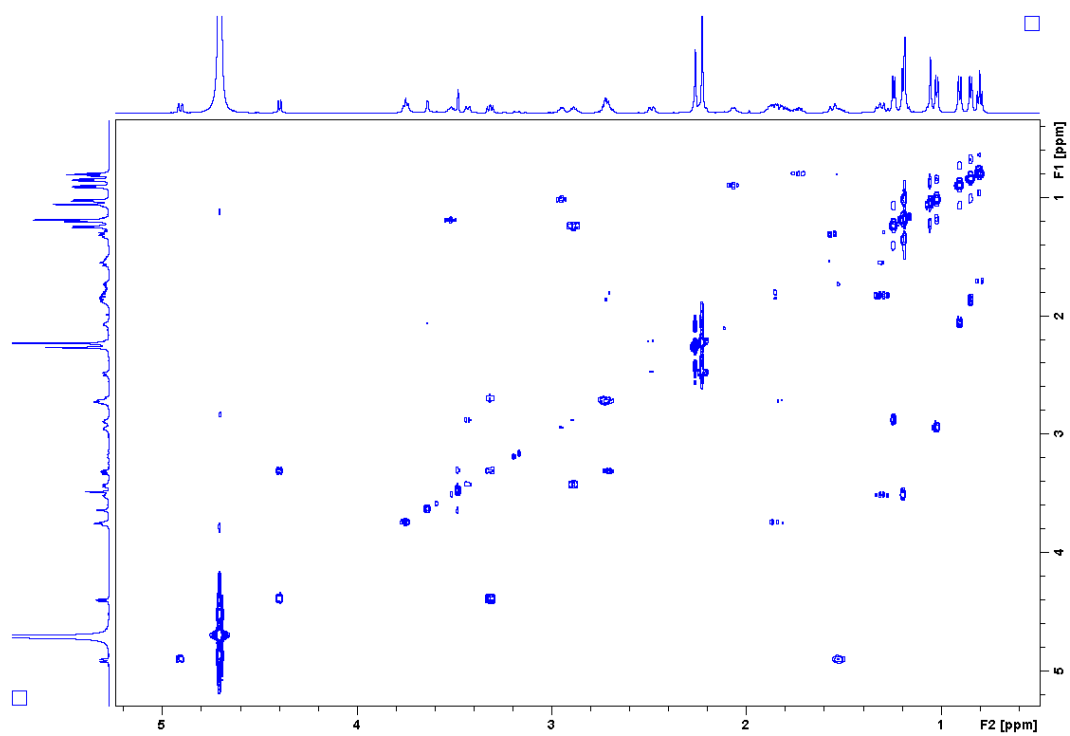
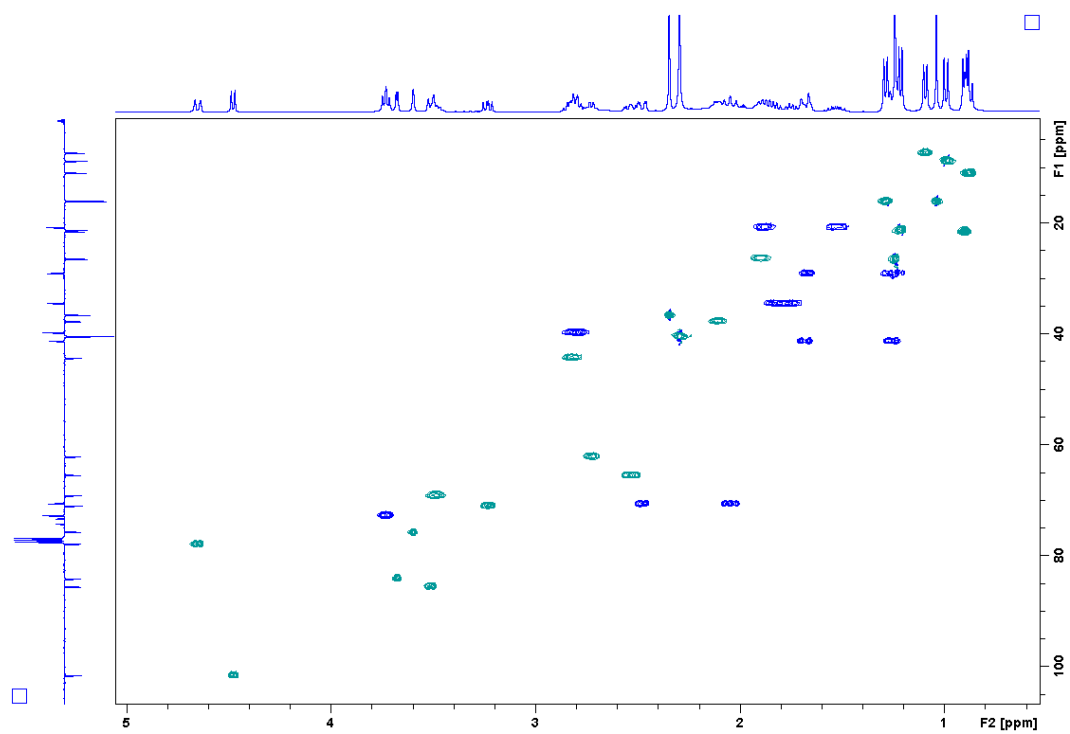


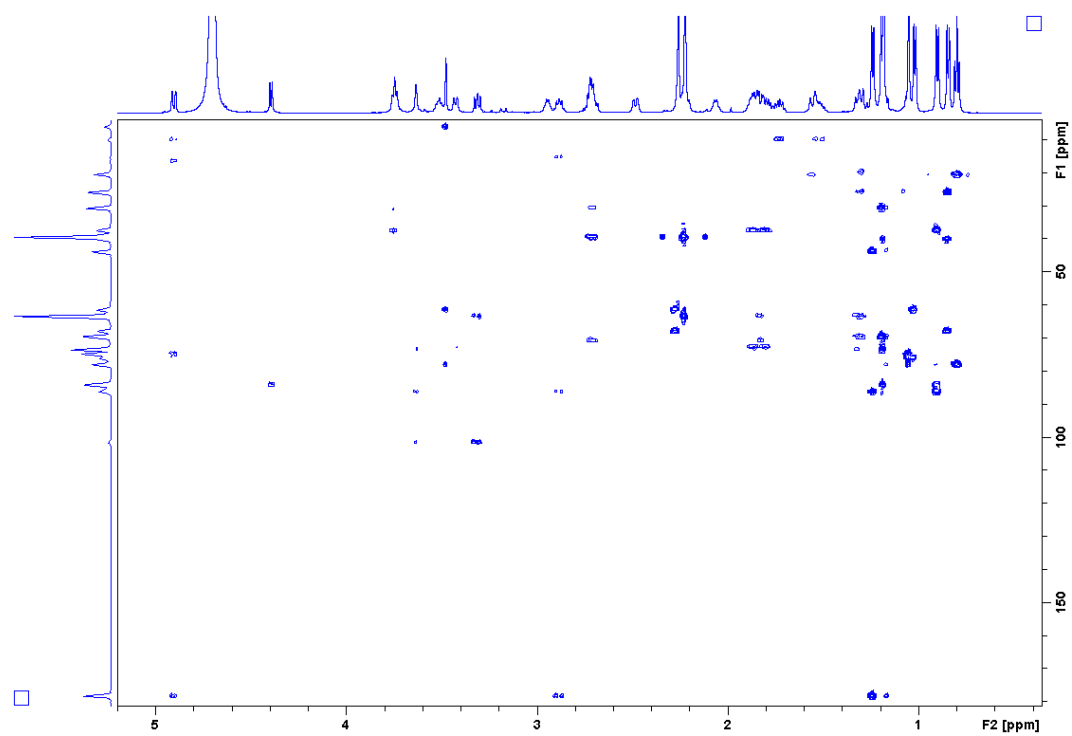
Slika D2. Spektar ESI-MS spoja S3 snimljen u pozitivnom modu sa zaokruženim molekulskim ionom.



Slika D3. Spektar ESI-MS spoja S4 snimljen u pozitivnom modu sa zaokruženim molekulskim ionom.

Slika D4. Spektar ^1H NMR spoja **S6** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.Slika D5. Spektar DEPT-Q NMR spoja **S6** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.Slika D6. Spektar COSY NMR spoja **S6** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.

Slika D7. Spektar COSY NMR spoja **S6** snimljen u D₂O pri 298 K.Slika D8. Spektar HSQC NMR spoja **S6** snimljen u kloroformu-d pri 298 K.



Slika D9. Spektar HMBC NMR spoja **S6** snimljen u D₂O pri 298 K.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Jana Gašperov

Datum rođenja: 15. listopada 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2002. – 2010. Osnovna škola Ive Andrića, Zagreb

2009. – 2013. Srednja škola suvremenog plesa Ane Maletić, Zagreb

2010. – 2014. Prva gimnazija, Zagreb

2014. – 2018. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018. – Diplomski studij kemije, smjer: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2020. Rektorova nagrada

Kategorija: Nagrada za individualni znanstveni i umjetnički rad

Podkategorija: Prirodne znanosti

Rad: *Priprava, karakterizacija i biološka aktivnost novih derivata azitromicina – makrozona*

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. – Voditeljica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

2017. – Supervizorica volonterskog projekta *BASF Kids' Lab – Malci genijalci*

2016. – Članica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

2016. – 2019. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

2015. – 2019. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. I. Mikulandra, I. Habinovec, **J. Gašperov**, A. Barišić, M. Bukvić, I. Grgičević, P. Novak, *Priprava, izolacija i strukturna karakterizacija novih bioaktivnih 4''-derivata makrozona*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, 2020. Knjiga sažetaka str. 124.
2. **J. Gašperov**, I. Mikulandra, T. Jednačak, B. Bertoša, I. Habinovec, P. Novak, *Synthesis, Structure Characterization and Interactions Of 4''-Aminopropyl Derivative of Azithromycin*; 4th Adriatic NMR Conference, Peroj, 2020., Knjiga sažetaka str. 41.
3. L. E. Sekula, I. Habinovec, I. Mikulandra, **J. Gašperov**, P. Novak, I. Grgičević, M. Bukvić, *Isolation and Structural Characterization of 9a- And 4''- Tetrahydrofurfuryl Macrozone Reaction Mixture Components Using the LC-SPE/NMR*, 4th Adriatic NMR Conference, Peroj, 2020., Knjiga sažetaka str. 38.