



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Jana Gašperov

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

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Ivane Mikulandre i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

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).

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

COSY – *correlation spectroscopy*

DCM – diklormetan

DEPT – *distortionless enhancement by polarisation transfer*

DIPEA – N,N-diizopropiletilamin

DMSO-d<sub>6</sub> – deuterirani dimetil sulfoksid

FDA – *Food and Drug Administration*

HATU – 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3-oksidi

heksafluorofosfat

HMBC – *heteronuclear multiple bond correlation*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high pressure liquid chromatography*)

HSQC – *heteronuclear single quantum coherence*

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MLS<sub>B</sub>K – makrolidi, linkozamidi, streptogramin B, ketolidi

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

nAChR – nikotin acetilkolinški receptor

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

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

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

STD – *saturation transfer difference*

THF – tetrahidrofuran

TLC – tankoslojna kromatografija

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

trNOESY – *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*

# Sadržaj

<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Makrolidi.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Struktura makrolida.....</i>	2
2.1.2. <i>Podjela makrolida.....</i>	3
2.1.3. <i>Azitromicin .....</i>	7
<b>2.2. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5. Spektroskopija NMR .....</b>	<b>17</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Kemikalije i instrumenti.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Priprava tiosemikarbazida i tiosemikarbazona .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Priprava makrozona .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5. Metode za karakterizaciju sintetiziranih spojeva .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6. Određivanje biološke aktivnost .....</b>	<b>28</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Priprava spojeva .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Karakterizacija sintetiziranih spojeva .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Biološka aktivnost .....</b>	<b>48</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>51</b>
<b>§ 6. ZAHVALE.....</b>	<b>52</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>53</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
<b>SAŽETAK .....</b>	<b>XL</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XLI</b>
<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XLII</b>

## § 1. UVOD

Makrolidi predstavljaju spojeve koji se sastoje od makrocikličkog laktonskog prstena (aglikona) na kojem su vezane dvije ili više saharidnih jedinica.<sup>1</sup> Makrolidne antibiotike možemo podijeliti u više generacija s obzirom na veličinu aglikonskog prstena, strukturne karakteristike i biološku aktivnost.

Makrolidni antibiotici najčešće se koriste u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.<sup>2</sup> Prvi prirodno izolirani makrolidni antibiotik je eritromicin A. 1980. godine u PLIVI je sintetiziran predstavnik druge generacije makrolida – azitromicin. Azitromicin se istaknuo po izvrsnim farmakokinetičkim svojstvima i širokom spektru antibakterijskog djelovanja. Kasnije su sintetizirani predstavnici treće i četvrte generacija makrolida (ketolidi).

Tiosemikarbazoni su male organske molekule koje pokazuju biološku aktivnost poput antibakterijske,<sup>3-7</sup> antifungalne,<sup>8,9</sup> antimalarijske<sup>10,11</sup> i antikancerogene.<sup>12</sup>

Zbog sve većeg razvoja bakterijske rezistencije na antibiotike potrebno je istražiti i pripremiti nove spojeve koji će imati veću biološku aktivnost. Poseban naglasak daje se razvoju antibiotika za bakterijske sojeve otporne na postojeće makrolidne antibiotike.

U posljednjih deset godina znanstvenici su intenzivno istraživali bioaktivnost kemijski modificiranih makrolida od kojih su neki pokazali veću, a neki manju antimikrobnu aktivnost od azitromicina.

Cilj ovog rada je pripremiti, strukturno okarakterizirati i istražiti biološku aktivnost makrozona – novih konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. U tu svrhu korištene su jednodimenzijske i dvodimenzijske tehnike NMR, spektrometrija masa (MS) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) te mikrobiološki testovi.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

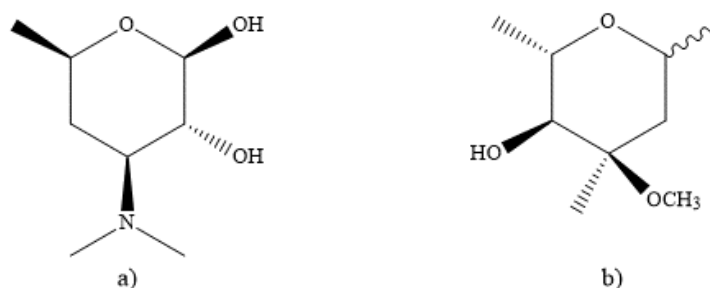
### 2.1. Makrolidi

Makrolidi su skupina prirodnih i polusintetskih antibiotika sa širokim spektrom djelovanja.<sup>13</sup> 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*).<sup>14</sup>

Osim antibakterijskog, makrolidi su pokazali antiupalno, antikancerogeno i antimalarijsko djelovanje.<sup>2</sup> Koriste se za liječenje infekcija kože, dišnih puteva i gastrointestinalnog sustava.<sup>15</sup>

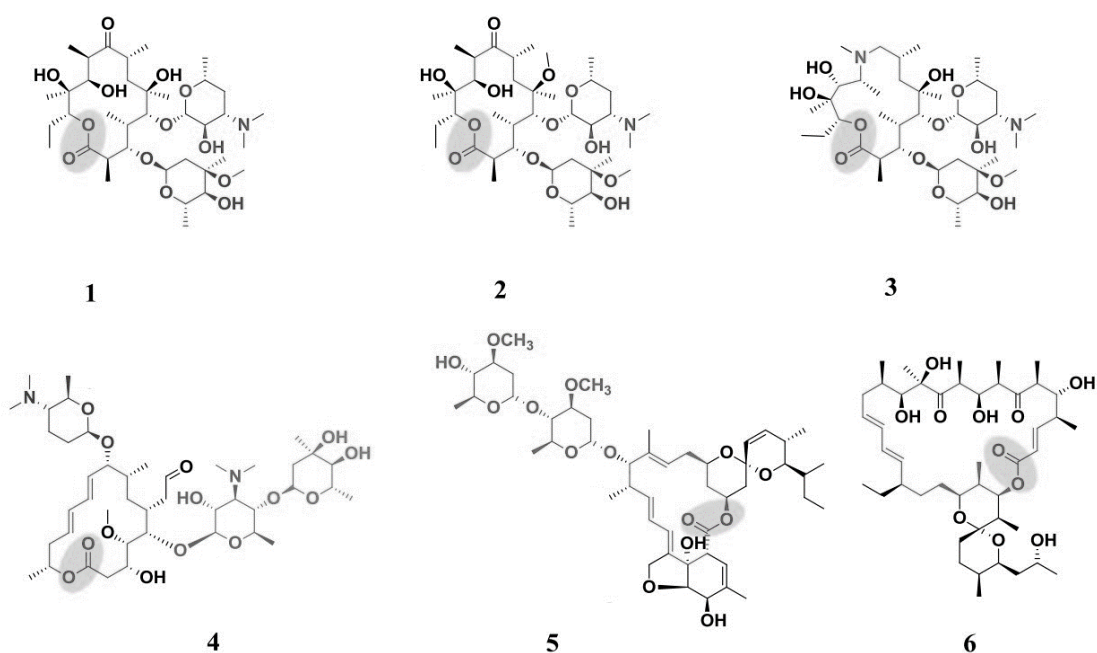
#### 2.1.1. Struktura makrolida

Za strukturu makrolida karakterističan je 12-eročlani do 16-eročlani makrociklički laktoski prsten (aglikon) na kojem su vezana dva šećera, najčešće desozamin i kladinoza (slika 1).<sup>2,15</sup>



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

Na slici 2. prikazani su neki makrolidi koji posjeduju aglikonski prsten različitih veličina.

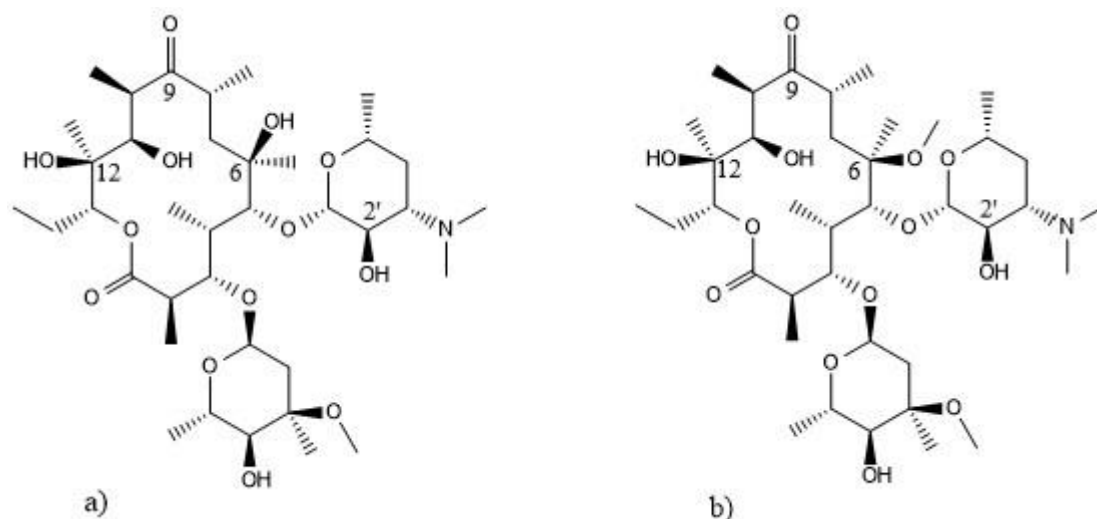
Slika 2. Strukture makrolida<sup>2</sup>:

1 – eritromicin A, 2 – klaritromicin, 3 – azitromicin, 4 – spiramicin I, 5 – avermektin B<sub>1a</sub>, 6 – oligomicin A

### 2.1.2. Podjela makrolida

Makrolidni antibiotici mogu se podijeliti na nekoliko generacija s obzirom na vrijeme njihovog otkrića, strukturne karakteristike i način djelovanja.

Predstavnik prve generacije makrolida je eritromicin A (slika 3. a)). Eritromicin A je 14-eročlani makrolid otkriven 1952. godine izolacijom iz soja mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*. *S. erythraea*, osim eritromicina A, proizvodi i druge vrste eritromicina, kao što su eritromicin B, C, D i F. Eritromicin A prvi je klinički korišten makrolid.<sup>1</sup>



Slika 3. Prva generacija makrolida: a) eritromicin A i b) klaritromicin.

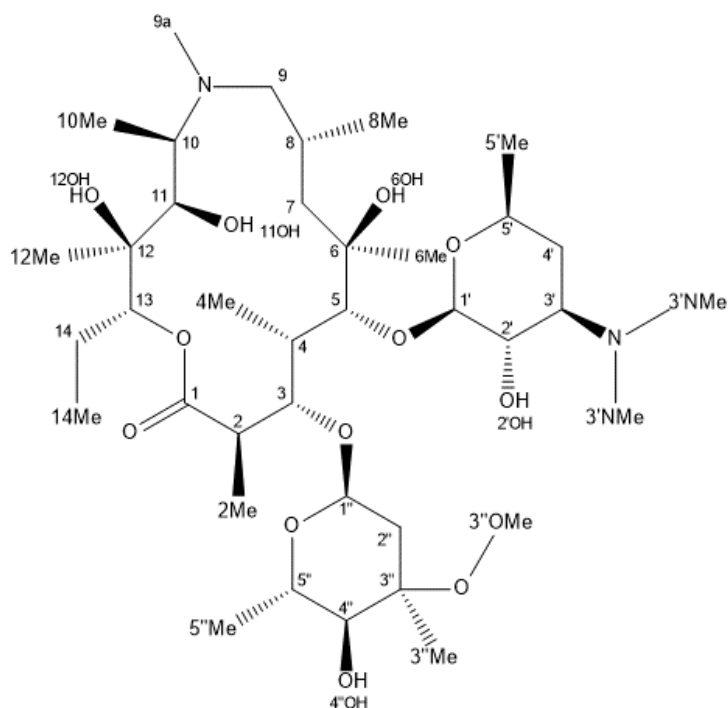
Iako se eritromicin pokazao korisnim kod liječenja bolesnika alergičnih na penicilin, izazvao je gastrointestinalne nuspojave. Osim nuspojava, nedostatak ovog antibiotika loša je bioraspoloživost<sup>14</sup> zbog kemijske nestabilnosti u kiselim želučanim uvjetima.<sup>16</sup>

Ranija istraživanja<sup>15</sup> otkrila su intramolekularnu ciklizaciju eritromicina A pri niskim vrijednostima pH. Hidroksilne skupine na položajima C6 i C12 mogu reagirati sa karbonilnom skupinom na položaju C9 čime dolazi do gubitka biološke aktivnosti eritromicina.

Osim eritromicina, prvoj generaciji makrolida pripada njegov polusintetski derivat klaritromicin (slika 3 b)). Klaritromicin se strukturno razlikuje od eritromicina samo po uvedenoj metoksi skupini na položaju C6 unutar aglikonskog prstena te je na taj način poboljšana kemijska stabilnost spoja u kiselim želučanim uvjetima.<sup>15</sup>

Kako bi se poboljšala farmakološka svojstva postojećih antibiotika i proširio spektar antibakterijskog djelovanja pripravljena je i druga generacija makrolida, tzv. azalidi.<sup>17</sup> Azalidi su 15-eročlani polusintetski derivati eritromicina A nastali ugradnjom dušikova atoma u aglikonski prsten.



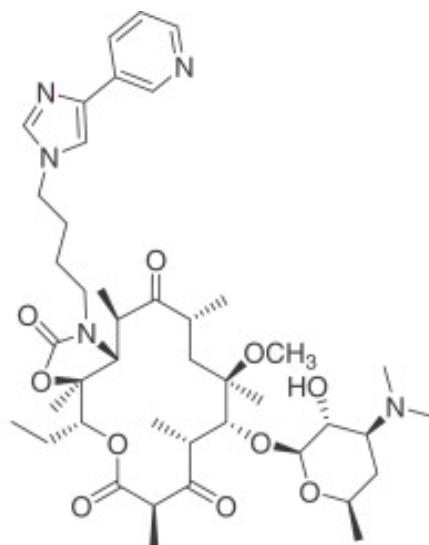


Slika 4. Predstavnik druge generacije – azitromicin.

Predstavnik druge generacije makrolida je azitromicin (slika 4.), antibiotik koji se najviše istaknuo među derivatima makrolida zbog izvrsnih farmakokinetičkih svojstava. Stabilan je pri nižim pH vrijednostima što rezultira duljim poluživotom u odnosu na eritromicin.<sup>16</sup>

Klaritromicin i azitromicin zajedno se često nazivaju i *blockbuster drugs*.<sup>18</sup> Klaritromicin ima bolju aktivnost na Gram-pozitivne bakterije u odnosu na azitromicin, dok azitromicin ima bolju aktivnost na Gram-negativne bakterije.<sup>16</sup>

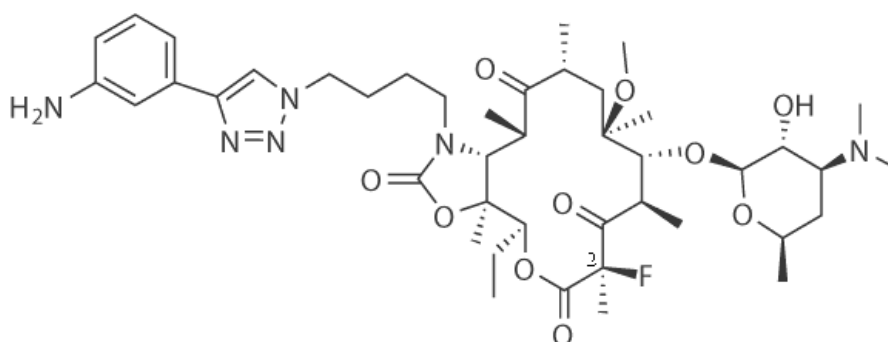
Zbog razvoja bakterijske rezistencije na makrolide stalno se javlja potreba za novim, djelotvornijim antibioticima. Stoga su daljnja istraživanja dovela do razvoja treće generacije makrolida. Treća generacija makrolida obuhvaća ketolide čiji je predstavnik telitromicin (slika 5) pod komercijalnim nazivom *Ketek*.<sup>15</sup> Ketolidi nemaju na sebe vezanu kladinozu te posjeduju heteroaril bočni lanac.



Slika 5. Struktura telitromicina.

Iako se telitromicin isprva pokazao učinkovitim za liječenje bakterijskih infekcija dišnog sustava, zbog izazivanja niza nuspojava poput poremećaja vida, sinkope, mijastenije gravis i hepatotoksičnosti povučen je s tržišta. Do navedenih poremećaja dolazi zbog inhibicije nikotinskih acetilkolinških receptora (nAChR).<sup>14</sup>

Četvrtu generaciju makrolidnih antibiotika čine fluoroketolidi. Njihov predstavnik je solitromicin (slika 6) koji sadrži 1,2,3-tiazol-aminofenil bočni lanac i atom fluora na C2 položaju. U tijeku je kliničko ispitivanje solitromicina koji nije odobren od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) zbog strukturne sličnosti s telitromicinom. Iz tog razloga FDA smatra kako bi solitromicin mogao izazvati slične nuspojave.



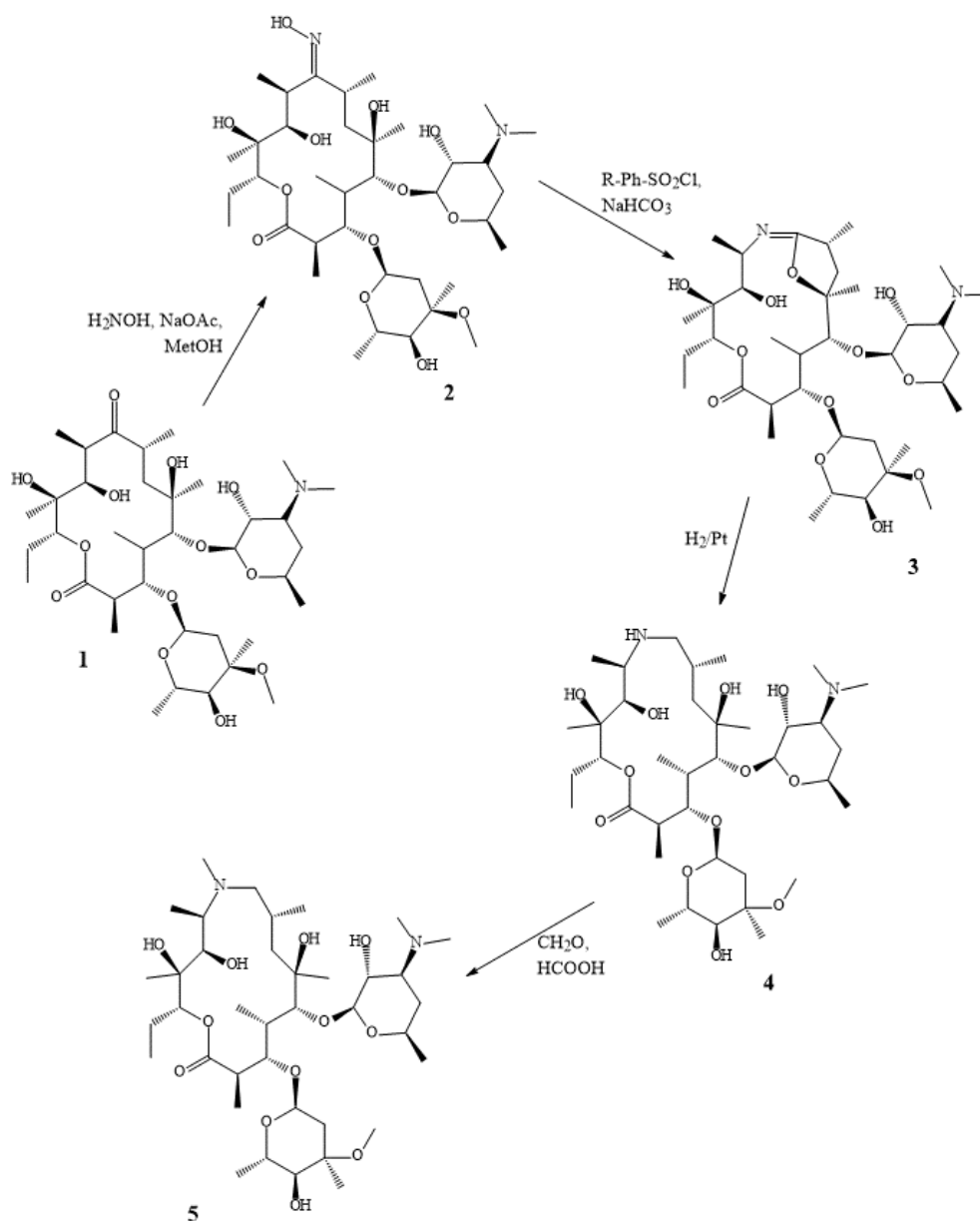
Slika 6. Struktura solitromicina.

### 2.1.3. Azitromicin

Azitromicin, 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A, predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika, sintetiziran je 1980. godine u PLIVI.

Azitromicin se koristi u liječenju niza bakterijskih infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, a najčešće su to infekcije gornjih i donjih dišnih puteva te neke crijevne infekcije. Također, u kombinaciji s drugim lijekovima može se koristiti za liječenje malarije.<sup>17</sup> Farmakokinetika azitromicina iznimno je povoljna zbog postizanja niskih koncentracija azitromicina u plazmi i visokih koncentracija u tkivima.<sup>19</sup> Rezultat toga i kemijske stabilnosti azitromicina jest dugo vrijeme poluživota i zadovoljavajuća bioraspodjelivost što omogućuje kratku primjenu terapije (oko 3 dana).<sup>17</sup> Nuspojave lijeka potpuno su smanjene u odnosu na nuspojave eritromicina A. Svjetska zdravstvena organizacija klasificirala je azitromicin kao iznimno važan antibiotik široke primjene.<sup>20</sup>

Azitromicin se dobiva Beckmannovom pregradnjom 9(E)-eritromicin oksima (shema 1). Oksim je dobiven reakcijom eritromicina i hidroksiamin hidroklorida te njegovom pregradnjom nastaje 6,9-iminoeter eritromicina A. Daljnjom sintezom uz vodik i platinu nastaje 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin. Njegovom redukcijom i N-metilacijom nastaje azitromicin.<sup>21</sup>



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

Osim što navedena svojstva azitromicina dovode do njegove široke primjene u medicini, dosadašnja su istraživanja usmjerena na dizajn novih derivata azitromicina zbog brze prilagodbe bakterija na postojeće antibiotike. U posljednjih deset godina intenzivno se radilo na kemijskoj modifikaciji pojedinih položaja u azitromicinu kako bi se proširio spektar antibakterijskog djelovanja, ali i pritom zadržala povoljna farmakološka svojstva. Dosadašnjim istraživanjima pripremljeni su i okarakterizirani dekladinofilni makrolidi, makrolidi s kemijski modificiranim saharidnim jedinicama<sup>2,22</sup> te sa supstituiranim hidroksilnim skupinama na

položajima C6, C11 i C12. Također, pripremljeni su i derivati makrolida s izmijenjenim položajima C9 i C10<sup>23-25</sup> Modifikacijama različitih položaja dobiveni su derivati 14-eročlanih i 15-eročlanih makrolida od kojih su neki pokazivali veću, a neki manju antimikrobnu aktivnost.<sup>2,23</sup> Ističu se derivati azitromicina s modificiranim položajem 4" čime se povećala biološka aktivnost na neke susceptibilne i rezistentne sojeve bakterija: *S. aureus*,<sup>26-34</sup> *S. pneumoniae*,<sup>25-32</sup> *S. pyogenes*,<sup>26-30, 32-34</sup> *H. influenzae*,<sup>26,27</sup> *M. catarrhalis*,<sup>26,27</sup> *S. typhimurium*,<sup>29</sup> *E. coli*,<sup>31-34</sup> *P. aeruginosa*,<sup>31,32</sup> *A. baumannii*,<sup>31</sup> *K. pneumoniae*,<sup>31</sup> *N. gonorrhoeae*,<sup>31</sup> *E. faecium*,<sup>33</sup> *P. multocida*,<sup>33</sup> *M. haemolytica*<sup>33</sup> i *H. somni*.<sup>33</sup>

## 2.2. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika

Makrolidi su klinički važni antibiotici koji imaju bakteriostatsko djelovanje, inhibiraju biosintezu bakterijskih proteina i tako zaustavljaju rast i razvoj bakterija.<sup>15,16</sup> Kako bi se saznao mehanizam otpornosti pojedinih bakterija na makrolidne antibiotike, bitno je poznavati mehanizam vezanja makrolida na ribosom.<sup>35</sup>

Ribosomi su „molekulski strojevi“ koji sintetiziraju proteine u stanicama. Biokemijske analize pokazale su da je aktivno mjesto za formiranje peptidnih veza, to jest centar peptidil-transferaze, sastavljeno isključivo od rRNA. Stoga je ribosom najveći poznati RNA katalizator i jedini prirodni ribozim koji ima sintetsku ulogu. Ribozimi koriste više različitih mehanizama u sintezi, npr. kiselo-lužnatu katalizu, katalizu potpomognutu metalnim ionima ili pak poravnavanje supstrata uslijed sparivanja baza. Ribosom veže dva tRNA supstrata: peptidil-tRNA na mjesto P u ribosomu i aminoacil-tRNA na mjesto A.

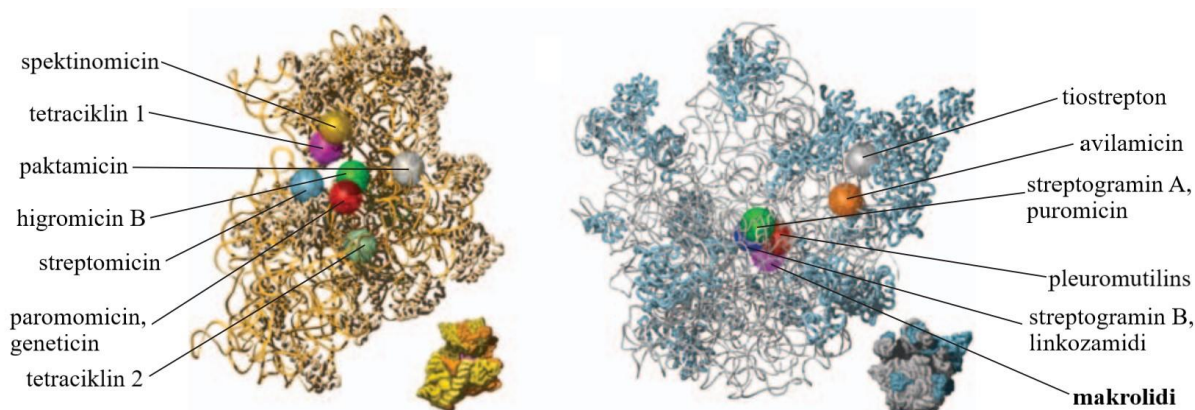
Tek je unazad petnaestak godina postignut napredak u razumijevanju funkcioniranja ribosoma. Kristalne strukture osigurale su dosta informacija o aktivnom mjestu. Velika podjedinica bakterijskog ribosoma, 50S sastoji se od dvije molekule RNA, 23S i 5S te od proteina. Podjedinica 50S sposobna je sintetizirati peptidne veze jednako kao i 70S ribosom (cijeli bakterijski ribosom).<sup>36</sup> Podjedinica 30S odgovorna je za genetsko dekodiranje i na taj način ugrađuje nove odgovarajuće aminokiseline u rastući peptidni lanac.

Antibiotike možemo podijeliti u tri razreda:

- antibiotici koji se vežu na 30S podjedinicu ribosoma
- antibiotici koji se vežu na 50S podjedinicu ribosoma
- antibiotici koji se vežu na cijeli ribosom (70S)

Nekoliko klasa antibiotika poput tetraciklina vežu se na 30S podjedinicu kako bi omeli njegovu funkciju. Podjedinica 50S sadrži glavnu enzimatsku aktivnost ribosoma, odnosno stvaranje peptidnih veza. Neki od antibiotika koji se vežu upravo na 50S podjedinicu jesu makrolidi, linkozamidi, streptogramini, fenil-propanoidi i oksazolidinoni.<sup>37</sup>

Na slici 7 naznačena su vezna mjesta različitih antibiotika, lijevo je prikazana mala podjedinica bakterijskog ribosoma 30S, dok je desno prikazana velika podjedinica 50S.



Slika 7. Vezna mjesta različitih antibiotika.<sup>38</sup>

Makrolidi se reverzibilno vežu na 50S podjedinicu ribosoma, u blizini centra peptidil-transferaze. Na taj način inhibiraju sintezu bakterijskog proteina, odnosno zaustavljaju rast bakterijske stanice.<sup>1, 16, 35, 39-41</sup> Četiri su načina inhibicije sinteze bakterijskih proteina<sup>1</sup>

1. inhibicija elongacije novog peptidnog lanca
2. indukcija disocijacije peptidil tRNA s ribosoma
3. inhibicija stvaranja peptidnih veza
4. interakcija s 50S podjedinicom

Makrolidi (primjerice karbomicin A, spiramicin, azitromicin) se vežu na ribosom u izlaznom tunelu za polipeptidni lanac.

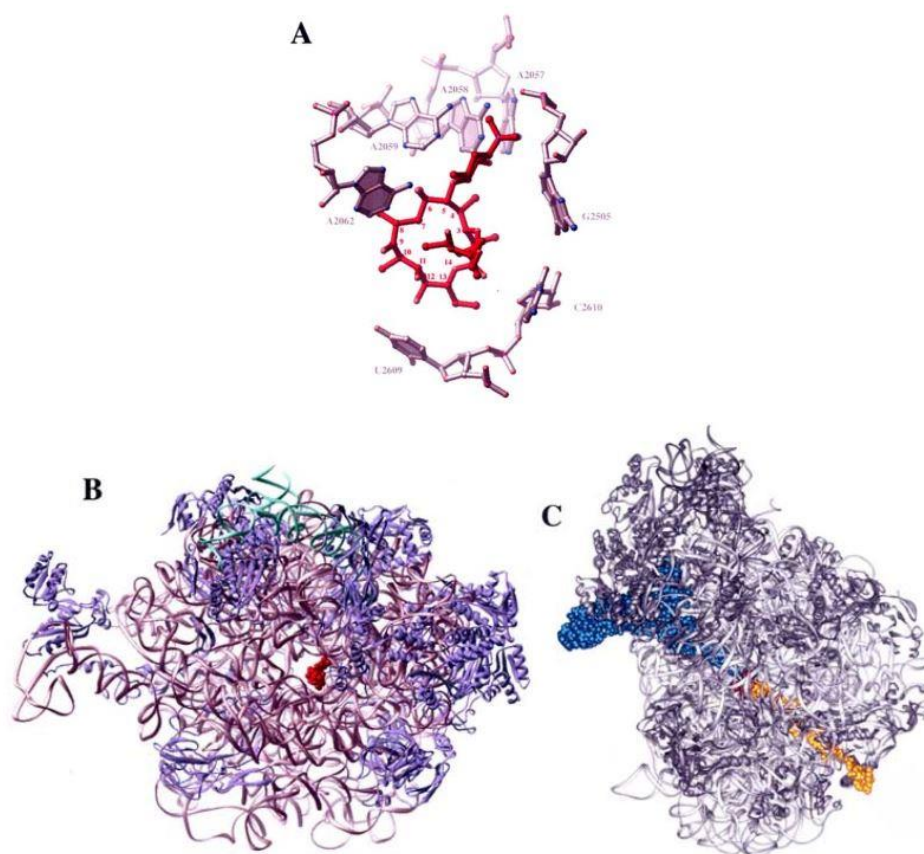
Inhibicija sinteze proteina makrolidima ima dvije karakteristike:

- makrolidi se ne vežu niti inhibiraju stvaranje peptidnih veza na ribosomima koji su već uključeni u sintezu proteina, tj. koji imaju vezane polipeptide na sebi
- ribosom koji nema vezani peptid može sintetizirati peptide u prisutnosti nekih makrolida, ali sinteza najčešće prestaje kada peptid dostigne duljinu od 5 aminokiselina<sup>13</sup>.

Interakcija makrolida s ribosomom kao i način inhibicijskog djelovanja ovisi o kemijskoj strukturi makrolida i o bakterijskom soju.

Utjecaj supstituenata na laktonskom prstenu i desozaminu od iznimne je važnosti pri stvaranju veza između makrolida i bakterijskog ribosoma. Hidroksilna skupina 2' OH šećera desozamina stvara vodikove veze s atomima dušika nukleobaza ribosoma. Nemogućnost stvaranja te vodikove veze objašnjava mehanizam rezistencije bakterija. Ukoliko se atomi dušika metiliraju neće moći doći do uspostavljanja vodikovih veza, odnosno smanjit će se afinitet vezanja makrolida za ribosom. Osim 2' OH skupine, u interakcijama sudjeluju još i hidroksilne skupine laktonskog prstena na položajima: C6, C11 i C12. 6-OH skupina stvara vodikove veze s dušikom adenina, dok 11-OH i 12-OH stvaraju vodikove veze s kisikom uracila. Za razliku od desozamina i aglikona, kladinoza ne sudjeluje u vezanju makrolida na ribosom.

Eritromicin, makrolidni antibiotik, veže se na bakterijsku 23S rRNA tako da reagira s motivom ukosnice 35 u domeni II rRNA i s peptidil-transferaznom petljom u domeni V. Te dvije regije u terciarnoj strukturi formiraju džep u koji se mogu vezati makrolidi i ostali lijekovi.<sup>43</sup> Na slici 8 prikazano je mjesto vezanja eritromicina na ribosom *Deinococcus radiodurans*. Eritromicin je prikazan crvenom bojom na svim slikama. Na slici B 23S rRNA prikazana je svijetloljubičastom bojom, 5S rRNA prikazana je plavo-zelenom dok su ribosomski proteini obojani tamnoljubičastom bojom. Na slici C rRNA i ribosomski proteini prikazani su nijansama sive boje, P mjesto vezanja tRNA prikazano je plavom bojom, dok je početni peptid prikazan žutom bojom.



Slika 8. Molekularne interakcije i mjesto vezanja eritromicina na veliku podjedinicu bakterijskog (*Deinococcus radiodurans*) ribosoma.<sup>1</sup>

Prema nekim istraživanjima<sup>41</sup> opaženo je različito vezanje makrolida ovisno o proučavanom soju bakterija. Primjerice, u slučaju bakterije *Thermus thermophilus* i *Haloarcula marismorui*, jedna molekula azitromicina veže se na bakterijski ribosom, dok se u slučaju bakterije *Deinococcus radiodurans* na jedan ribosom vežu dvije molekule azitromicina.<sup>17</sup> *D. radiodurans* jedna molekula azitromicina se veže na domenu V 23S rRNA slične orijentacije kao i eritromicin. Druga molekula azitromicina stvara vodikove veze između kisika uracila što dovodi do jačeg vezanja ribosoma i makrolida, odnosno drugi se azitromicin veže na ribosomske proteine L4 i L22. Dušik laktorskog prstena ne doprinosi izravno vezanju azitromicina, ali utječe na konformaciju prilikom vezanja azitromicina na ribosom.<sup>44</sup> Molekule azitromicina međusobno su povezane vodikovim vezama između šećera desozamina i kisika na položaju C1 laktorskog prstena.<sup>17</sup>



### 2.3. Mehanizmi rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike

S obzirom na građu stanične stijenke, bakterije dijelimo na Gram-pozitivne i Gram-negativne. Glavna razlika između navedena dva tipa bakterija je udio peptidoglikana u staničnoj stijenci (Gram pozitivne bakterije, 95 %; Gram-negativne bakterije, 5-12 %). Gram-negativne bakterije još dodatno sadrže vanjsku membranu koja okružuje staničnu stijenku, stoga su otpornije na antibiotike.<sup>45</sup>

Učestalo korištenje makrolidnih antibiotika dovelo je do pojave više rezistentnih sojeva bakterija. ESKAPE patogeni je naziv koji povezuje sve bakterije kod kojih se najčešće razvija otpornost, a to su: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i sojevi *Enterobacteriaceae*.<sup>46</sup>

U SAD-u od bakterijskih infekcija godišnje umire oko 90 tisuća ljudi. U više od 70 % bakterijskih infekcija javlja se rezistencija na barem jedan antibiotik. Iz navedenih razloga bitno je istraživanje usmjeriti prema otkriću novih antibiotika.<sup>37</sup> Svjetska zdravstvena organizacija objavila je listu patogena za koje je potrebno razviti novi antibiotik. Patogeni su podijeljeni u tri prioritetne skupine: prioritet 1 – kritični (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*), prioritet 2 – visoki (*E. faecium*, *S. aureus*, *H. pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae*, *N. gonorrhoeae*) i prioritet 3 – srednji (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Shigella spp.*).<sup>47</sup>

Postoji nekoliko mehanizama rezistencije bakterija na makrolide. Dva najčešća mehanizma su: kemijske i strukturne promjene mete djelovanja antibiotika i izbacivanje antibiotika iz stanice (efluks). Kod nekih sojeva bakterija opažena je modifikacija antibiotika proizvodnjom enzima koji inaktiviraju lijekove te promjena konformacije ribosoma čime se sprječava vezanje antibiotika.<sup>16</sup>

Aktivno mjesto u ribosomu modificira se mono- ili dimetiliranjem dušika nukleotidne baze (adenina) koja je ključna za vezanje makrolida na ribosom. Gen *erm* sadrži kodirajuću sekvencu za enzim *N*-metil-transferazu koji uzrokuje metiliranje na 50S ribosomskoj podjedinici. Na taj način dolazi do steričkog blokiranja vezanja makrolida na ribosom. Ovakav mehanizam rezistencije bakterija karakterističan je i za antibiotike linkozamide i streptogramine B. Naime, uz makrolide, i linkozamidi i streptogramini imaju bakteriostatsko djelovanje i vežu se na 23S rRNA u 50S podjedinici ribosoma.<sup>48</sup> Neke od bakterija koje sadrže gen *erm* navedene su u tablici 1.<sup>48,49</sup>

Tablica 1. Organizmi i njihovi geni *erm*.<sup>48,49</sup>

Organizam	<i>erm</i> gen
<i>S. aureus</i>	<i>ermA, ermB, ermC</i>
<i>S. sanguis, S. Pneumoniae, S. pyogenes</i>	<i>ermAM</i>
<i>E. coli</i>	<i>ermBC</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>ermD</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>ermF, ermFS, ermFU</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>ermM</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>ermP, ermQ</i>
<i>C. difficile</i>	<i>ermZ</i>

Svi sojevi bakterija koji su otporni na makrolide (M), linkozamide (L), streptogramin B (S<sub>B</sub>) i ketolide (K), odnosno koji su otporni na MLS<sub>BK</sub> antibiotike posjeduju gen *erm*. Metilacija rRNA vodi do fenotipa koji se naziva fenotip MLS<sub>BK</sub>. Mehanizam rezistencije MLS može biti inducibilni (iMLS) i konstitutivni (cMLS). Inducibilna rezistencija aktivira se u prisutnosti antibiotika, a konstitutivna rezistencija razvija se bez prisutnosti antibiotika.<sup>17.</sup>

Drugi način rezistencije, češći kod Gram-negativnih bakterija,<sup>48</sup> uključuje energijski ovisne pumpe koje nazivamo „efluks“ pumpe. Gen *mef* sadrži kodirajuću sekvencu za protein odnosno pumpu koja izbacuje makrolide iz bakterijske stanice prije nego što makrolid uspije doći do ribosoma. Ovakav mehanizam rezistencije karakterističan je samo za makrolide.<sup>48</sup>

Promjenu konformacije ribosoma bakterije postižu mutacijom 23S rRNA<sup>50</sup>. Najčešća točkasta mutacija je mutacija adenina u gvanin prisutna kod bakterija *H.marismotui*,<sup>37</sup> *Brachyspira hyodysenteriae* i *Brachyspira pilosicoli*.<sup>51</sup>

Još jedan način razvoja rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike je mogućnost strukturne promjene proteina. L22 je ribosomski protein, jedan od najvažnijih proteina velike podjedinice ribosoma koji interagira sa svim domenama 23S rRNA. Delecija tripleta Met82-Lys83-Arg84 u proteinu L22 u *E. coli* dovodi do rezistencije bakterije na eritromicin A.<sup>52</sup> *In vitro* aktivnost antibiotika izražava se pomoću minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) koja se definira kao najniža koncentracija antibiotika kojom se inhibira rast mikroorganizama nakon inkubacije tijekom noći.<sup>53</sup> Neke od vrijednosti MIK poznatih makrolidnih antibiotika prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. *In vitro* aktivnosti eritromicina, azitromicina, klaritromicina i telitromicina.  $MIK_{90}$  = minimalna inhibitorna koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) za 90% izolata.<sup>55</sup>

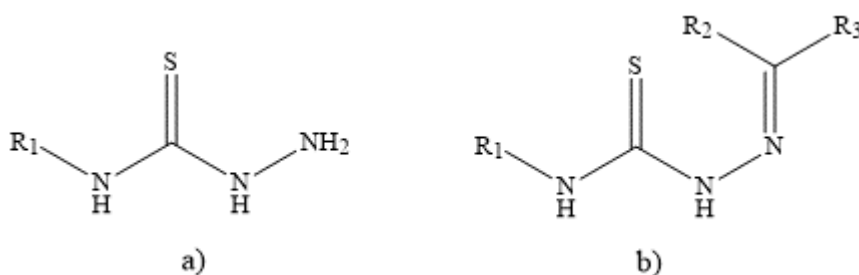
Organizam	Eritromicin	Azitromicin	Klaritromicin	Telitromicin
	MIK ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
<i>S. pneumoniae</i>				
Osjetljiv na penicilin	1,0	1,0	0,25	0,03
Umjereno rezistentan	>64,0	>64	>64	0,06
Visoko rezistentan	>64,0	>64	>64	0,25
<i>S. pyogenes</i>	0,06	0,25	0,06	0,015
<i>S. auerus</i>				
Osjetljiv na meticilin	>128	-	>128	0,25
Rezistentan na meticilin	>128	>128	>128	0,5
<i>H. influenzae</i>	8	2	16	2
<i>M. catarrhalis</i>	<0,25	<0,06	<0,25	0,12
<i>C. pneumoniae</i>	0,25	0,25	0,03	0,25
<i>L. pneumophila</i>	0,5	0,5	0,046	0,125

## 2.4. Tiosemikarbazidi i tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazidi (slika 9 a)) i tiosemikarbazoni (slika 9 b)) vrste su spojeva koji se često koriste kao kompleksi s nekim metalima poput nikla, kobalta i bakra.<sup>56</sup> Kompleksi tiosemikarbazona i prijelaznih metala koriste se za određivanje i odvajanje metala u tragovima u smjesama (biološke ili sintetske)<sup>57</sup> Također, kompleksi tiosemikarbazona s metalima koriste se i u spektrofotometrijskim,<sup>58-63</sup> spektrofluorimetrijskim,<sup>64,65</sup> potencijometrijskim<sup>66,67</sup> i gravimetrijskim<sup>58</sup> analizama metala.

1946. godine otkrivena je *in vitro* antituberkulozna aktivnost tiosemikarbazona. Nakon tog otkrića, uslijedila su mnoga nova istraživanja čiji su rezultati pokazali kako tiosemikarbazoni ujedno posjeduju antitumorsku,<sup>68</sup> antimikrobnu<sup>69</sup> i antivirusnu<sup>70</sup> aktivnost te pokazuju djelovanje na središnji živčani sustav.<sup>71</sup>

Dosadašnja istraživanja<sup>72</sup> *in vitro* antibakterijske aktivnosti tiosemikarbazona pokazala su dobre rezultate za neke Gram-pozitivne (*S. aureus*) i Gram-negativne bakterije (*E. coli*).



Slika 9. Opće strukturne formule a) tiosemikarbazida i b) tiosemikarbazona.

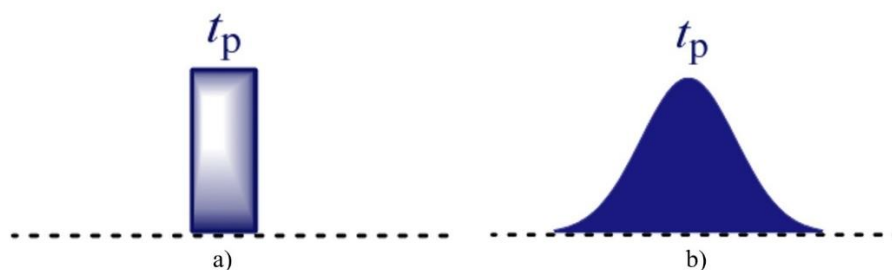
Postoji nekoliko mogućih mehanizama djelovanja tiosemikarbazona kao što su inhibicija ribonukleotid reduktaze,<sup>73</sup> generiranje reaktivnih kisikovih radikala,<sup>74</sup> inhibicija topoizomerase II<sup>75</sup> i inhibicija MDR1 proteina. Ribonukleaza reduktaza je enzim zaslužan za sintezu deoksiribonukleotid difosfata u procesu sinteze DNA, a inhibicija tog enzima uzrokovana je vezanjem intracelularnog atoma željeza koji je esencijalan za enzimsku funkciju.<sup>76</sup>

Zbog navedene biološke aktivnosti, tiosemikarbazoni zauzimaju sve veći interes u području istraživanja novih lijekova.

## 2.5. Spektroskopija NMR

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) analitička je metoda za određivanje strukture anorganskih i organskih molekula te biomolekula. Spektroskopijom NMR proučavaju se jezgre čiji su spinovi različiti od nule kao npr.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Svaka jezgra ima dva kvantna broja – kvantni broj nuklearnog spina ( $I$ ) i nuklearni magnetni spinski kvantni broj  $m_I$ . Kvantni broj nuklearnog spina može biti cijeli ili polucijeli broj dok nuklearni magnetni spinski kvantni broj govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetnom polju. Broj mogućih orijentacija moguće je izračunati pomoću formule  $2I + 1$ . Spektri se asigniraju na temelju kemijskih pomaka i multiplernosti signala te iznosa konstanti sprege između spinova.<sup>78</sup> Danas je gotovo nemoguće zaobići spektroskopiju NMR kao metodu za istraživanje interakcija u biološkim sustavima.

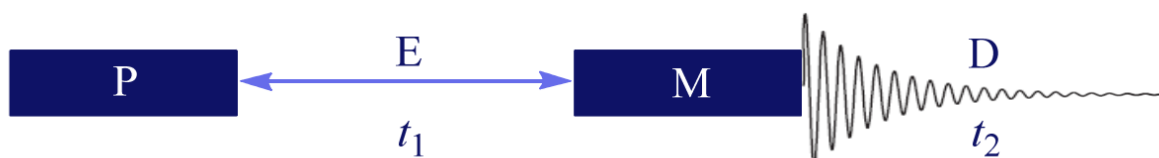
Da bi se spinovi jezgri pobudili, potrebna je energija fotona koja treba biti ista kao razlika energije dva spinska stanja. Takvu energiju može se postići pomoću vanjskog magnetnog polja ili pulseva. Spinovi se mogu pobuditi dvjema različitim vrstama pulseva. Jedan tip pulseva naziva se radiofrekvencijski pulsevi te se oni dijele na kratke tj. tvrde i duge tj. meke pulseve. Tvrđi pulsevi koriste se ukoliko se žele pobuditi sve jezgre, dok se meki pulsevi koriste za selektivnu pobudu spinova u jezgri. Meki pulsevi se zbog njihove selektivnosti nazivaju još i selektivni pulsevi. Drugi tip pulseva naziva se gradijentni pulsevi. Ova vrsta pulseva koristi dodatno defazirajuće magnetno polje koje se mijenja duž z osi.



Slika 10. Sheme radiofrekvencijskih pulseva: a) tvrđi/kratki puls, b) meki/dugi puls.<sup>78</sup>

Ovisnost intenziteta signala o kemijskom pomaku koji je proporcionalan Larmorovoj frekvenciji prikazuju jednodimenzijnski spektri NMR. Dobiveni signal je u vremenskoj domeni

te ga je potrebno pomoću Fourierove transformacije prevesti u frekvencijsku domenu. Ovisno o položaju i intenzitetu signala mogu se otkriti fragmenti i funkcijske skupine u analiziranom spoju. Potreba za naprednijim tehnikama dovela je do razvoja dvodimenzijskih tehnika NMR. Pulsni slijed dvodimenzijske tehnike NMR sastoji se od pripreme (P), evolucije (E), miješanja (M) i detekcije (D) te je prikazan slikom 11.



Slika 11. Opća shema dvodimenzijskog eksperimenta NMR.  $t_1$  – vrijeme evolucije,  $t_2$  – period detekcije.<sup>78</sup>

Vrijeme evolucije povećava se za isti odnos u svakom ponavljanju pulsno slijeda tijekom evolucijskog perioda čime dolazi do stvaranja druge frekvencijske domene.<sup>78</sup>

### 2.5.1. Tehnike NMR

Tehnikom  $^1\text{H}$  NMR detektiraju se signali kemijski neekvivalentnih protona u spoju. Površina ispod pojedinog signala odgovara broju neekvivalentnih protona. Ova tehnika daje prvi uvid u strukturu spoja.

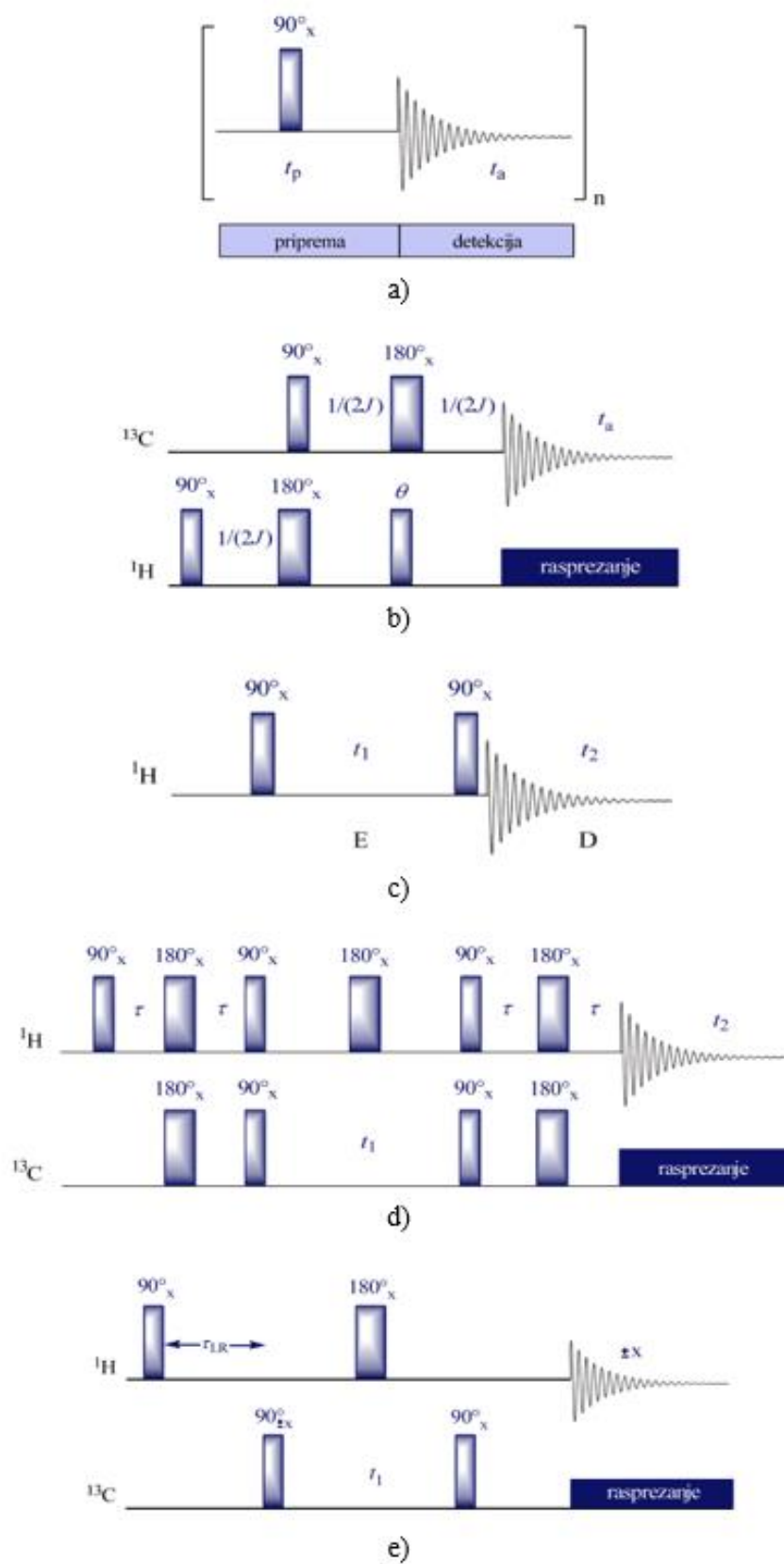
Tehnika DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*) jednodimenzijska je tehnika koja omogućava editiranje spektara heterojezgri ( $^{13}\text{C}$ ) prema multiplicitetu uz pojačavanje signala s malim  $\gamma$  ( $^{13}\text{C}$ ) pomoću prijenosa polarizacije s jezgri s velikim  $\gamma$  ( $^1\text{H}$ ). Editiranje se izvodi odabirom različitog pulsno kuta  $\theta$ .

Tehnika COSY (engl. *correlation spectroscopy*) najčešća je dvodimenzijska NMR tehnika. COSY je homonuklearna tehnika koja se koristi kako bi se dobile informacije o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. Spektar dobiven tehnikom COSY sadrži samo dijagonalne signale ukoliko nema sprege između spinova, tj. izvandijagonalne signale ukoliko ima sprege među spinovima.

Tehnika HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) dvodimenzijska je tehnika koja se koristi za detekciju heteronuklearne sprege kroz jednu vezu između protona i heterojezgre, npr  $^{13}\text{C}$ .

Tehnika HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) dvodimenzijska je tehnika koja omogućava uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze. Također, iz NMR spektra snimljenog HMBC tehnikom moguće je vidjeti povezivanje spinskih sustava.

Pulsni slijedovi korištenih tehnika u radu prikazani su na slici 12.



Slika 12. Pulsni slijedovi tehnika korištenih u radu:  
 a)  $^1\text{H}$  NMR, b) DEPT, c) COSY, d) HSQC, e) HMQC.<sup>78</sup>



Osim za određivanje strukture makrolida, spektroskopija NMR pokazala se uspješnom za detaljnije istraživanje interakcija makrolidnih antibiotika i bioloških meta.

Korištenjem jednodimenzijskih i dvodimenzijskih NMR tehnika moguće je karakterizirati uspostavljene interakcije u biološkim kompleksima. Dvije tehnike koje se najčešće koriste u proučavanja načina vezanja makrolida su prijenosni nuklearni Overhauserov efekt – trNOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i razlika prijenosa zasićenja – STD (engl. *saturation transfer difference*).<sup>17</sup> Razvojem ovih tehnika mogu se odrediti konformacije vezanog liganda tj. mogu se odrediti skupine atoma koje su odgovorne za vezanje liganda na aktivno mjesto biomolekula.<sup>17</sup>

## § 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	$M / g \text{ mol}^{-1}$
<b>N,N-dimetilformamid-dimetilacetal</b>	Acros Organic	97%	119,16
<b>Toluen</b>	Gram Mol	p.a.	92,14
<b>Diklormetan</b>	Carlo Erba Reagents VWR Chemicals	99,9% 100%	84,93
<b>Metanol</b>	Merck Chemicals		32,04
<b>Amonijak, 25%</b>	Alkaloid Skopje		17,031
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Eurisotop	99,9%	84,17
<b>Kloroform-d</b>	Eurisotop	99,8%	120,384
<b>Kloroform</b>	VWR Chemicals	99,2%	
<b>Etil acetat</b>	Gram Mol	p.a.	88,11
<b>Anhidrid octene kiseline</b>	Carlo Erba Reagents	97%	102,09
<b>Natrijev hidrogenkarbonat</b>	Gram Mol	p.a.	84,01
<b>Kalijev karbonat</b>	Fisher Chemical	99,5%	138,205
<b>Dietileter</b>	Lach-Ner, s. r. o.		74,12
<b>Akilonitril</b>	TCI America	99%	53,06
<b>t-Butanol</b>	Carlo Erba Reagents	99,5%	74,12
<b>Tetrahidrofuran</b>	LiChrosolv	99,8%	72,11
<b>Natrijev hidrid</b>	Sigma-Aldrich		23,997
<b>Ledena octena kiselina</b>	Gram Mol	p.a.	60,05
<b>Platina(IV) oksid</b>	Sigma-Aldrich		227,08
<b>Klorovodična kiselina</b>	Kemika	p.a.	36,46
<b>Natrijev hidroksid</b>	Kemika	p.a.	39,997
<b>Sumporna kiselina, 96%</b>	Carlo Erba Reagents	p.a.	98,073

<b>Etanol</b>	Gram Mol	p.a.	46,07
<b>1-naftil izotiocijanat</b>	Acros Organics	98%	185,245
<b>Benzil izotiocijanat</b>	Acros Organics	98%	149,21
<b>4-(trifluorometoksi)fenil izotiocijanat</b>	Alfa Aesar	97%	219,18
<b>Tetrahidrofurfuril izotiocijanat</b>	Alfa Aesar	98%	143,21
<b>Hidrazin monohidrat</b>	Sigma-Aldrich	98%	50,06
<b>2-propanol</b>	J. T. Baker	99,7%	60,10
<b>4-formilbenzojeva kiselina</b>	Sigma-Aldrich	97%	150,13
<b>1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinijev-3- oksid heksafluorofosfat (HATU)</b>	Acros Organic	97%	380,23
<b>N,N-diizopropiletilamin (DIPEA)</b>	Acros Organic	99,5%	129,24

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

Tablica 4. Popis instrumenata korištenih u izradi rada.

<b>Instrument</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Mettler AT261 DeltaRange</b>	Mettler
<b>Rotavapor R-100</b>	Buchi
<b>pH metar</b>	Mettler Toledo
<b>CombiFlash NextGen 300+</b>	Teledyne Isco
<b>NMR spektrometar Bruker Avance III HD 400 MGh/54mm Ascend</b>	Bruker
<b>UPLC ESI MS</b>	Waters
<b>UV lampa</b>	Analytikjena

### 3.2. Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina

Priprava 4''-aminopropil derivata azitromicina sastoji se od pet koraka. Detaljan postupak pripreme opisan je u daljnjem tekstu. Polazni reaktant azitromicin pripremljen je u tvrtci Fidelta Ltd

U okrugloj tikvici otopi se azitromicin (5,00 g) u toluenu (60 mL), zatim se doda pet ekvivalenata N,N-dimetilformamid-dimetilacetala (4,43 mL). Reakcijska smjesa miješa se na magnetnoj mješalici 24 sata pri temperaturi 60 °C. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom (TLC). Mobilna faza korištena za razvijanje TLC pločica sastoji se od diklormetana, metanola i amonijaka (25 %) u omjeru 90:15:1,5. Reaktanti i produkti vizualizirani su prskanjem pločice s 10 %-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu. Nakon 24 h doda se tri ekvivalenta N,N-dimetilformamid-dimetilacetala (2,66 mL) te se reakcijska smjesa dodatno miješa 5 sati. Uparavanjem otapala dobije se produkt **P1** (4,67 g).

Produkt **P1** otopi se u etil-acetatu (46 mL) te se reakcijska smjesa ohladi na 0° C. Postepeno se dodaje jedan ekvivalent acetanhidrida (560 µL). Nakon dodatka acetanhidrida smjesa se miješa 5 sati na sobnoj temperaturi, zatim se ispiri sa zasićenom otopinom natrijeva hirogenkarbonata (2 x 14 mL) i posuši na bezvodnom kalijevom karbonatu. Dobiveni produkt **P2** (5,02 g) suspendira se u dietil-eteru pri 0 °C te se profiltrira preko Büchnerova lijevka, a zatim osuši kroz 15 minuta na 45 °C.

Produkt **P2** prebaci se u dvogrlu tikvicu i otopi u akrilonitrilu (33,3 mL) u inertnoj atmosferi dušika. Zatim se doda smjesa t-butanola i tetrahidrofurana (1:1, 1,90 mL) te se reakcijska smjesa ohladi na 0 °C. Postepeno se dodaje natrijev hidrid (260,79 mg) nakon čega se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi dva sata.

Akrilonitril se upari na rotacijskom uparivaču, sirovi produkt suspendira u etil acetatu (30 mL) i profiltrira preko Büchnerovog lijevka u koji je stavljen celit. Filtrat se ispiri sa zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata, suši na bezvodnom kalijevom karbonatu i upari. Dobiveni sirovi produkt otopi se u diklormetanu (5 mL), doda se n-heksan (50 mL) prilikom čega dolazi do nastanka taloga. Smjesa se profiltrira preko Büchnerova lijevka, a produkt **P3** (2,24 g) se dobije uparavanjem filtrata.

U otopinu **P3** u ledenoj octenoj kiselini (6,5 mL) doda se katalizator PtO<sub>2</sub> (215,87 mg). Provede se hidrogeniranje 24 sata pri tlaku od 3,5 bara. Dobivena reakcijska smjesa profiltrira se kako bi se uklonio katalizator. Nakon što se filtrat upari na rotacijskom uparivaču, sirovom produktu doda se diklormetan (7 mL) i voda (13 mL) te se provede gradijentna ekstrakcija pri

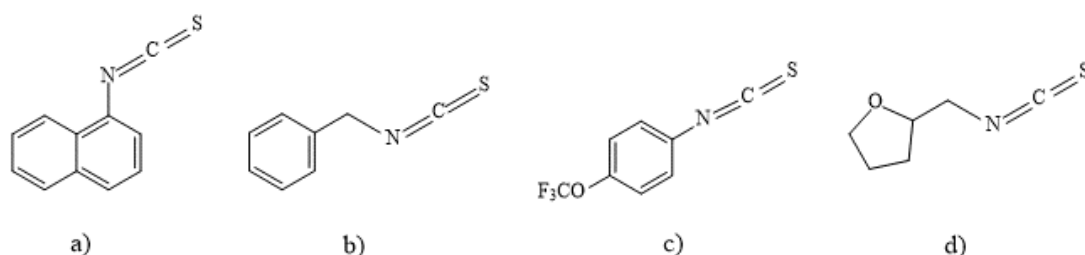
tri različite pH vrijednosti: 4,2, 6,5 i 8,15. Željena pH vrijednost otopine postizala se dodatkom 0,1 M HCl, odnosno dodatkom 0,1 M NaOH. Uparavanjem organskih ekstrakata pri pH ~ 8 i pH ~ 9 dobiven je produkt **P4**. Navedeni produkt je suspendiran u dietil-eteru (2 mL) i profiltriran preko Büchnerova lijevka.

Posljednji sintetski korak obuhvaća 24-satno miješanje **P4** (1,08 g) u metanolu (108 mL) pri temperaturi 45 °C dajući produkt **P5**.

### 3.3. Priprava tiosemikarbazida i tiosemikarbazona

Priprava makrozona, konjugata azitromicina i tiosemikarbazona, sastoji se od tri koraka. U prvom koraku nastaje tiosemikarbazid, u drugom tiosemikarbazon, a treći korak obuhvaća konjugaciju 4"-aminopropil derivata azitromicina **P5** i tiosemikarbazona pri čemu nastaje makrozon.

Izotiocijanati korišteni u prvom sintetskom koraku su: 1-naftil izotiocijanat, benzil izotiocijanat, 4-(trifluorometoksi)fenil izotiocijanat i tetrahidrofurfuril izotiocijanat. Njihove strukture prikazane su na slici 13.



Slika 13. Strukture izotiocijanata: a) 1-naftil izotiocijanat, b) benzil izotiocijanat, c) 4-(trifluorometoksi)fenil izotiocijanat i d) tetrahidrofurfuril izotiocijanat.

Tiosemikarbazidi nastaju reakcijom izotiocijanata (tablica 5.) i hidrazin monohidrata (90,95  $\mu\text{L}$ ) u izopropanolu (10 mL). Reakcijska smjesa miješa se na magnetnoj mješalici jedan sat pri 0 °C pri čemu dolazi do nastanka taloga. Smjesa se profiltrira preko Büchnerovog lijevka sa sinteriranom pločicom.

Tablica 5. Mase i volumeni polaznih reaktanata (izotiocijanata) u sintezi tiosemikarbazida.

Izotiocijanat	V / $\mu\text{L}$	m / mg
<b>1-naftil izotiocijanat</b>	/	189,0255
<b>Benzil izotiocijanat</b>	135,34	/
<b>4-(trifluorometoksi)fenil izotiocijanat</b>	167,3	/
<b>Tetrahidrofurfuril izotiocijanat</b>	130,48	/

Tiosemikarbazoni nastaju reakcijom tiosemikarbazida i 4-formilbenzojeve kiseline uz ledenu octenu kiselinu u izopropanolu (11 mL). Reakcijska smjesa miješa se 24 sata na sobnoj temperaturi. Nastali talog profiltrira se preko Büchnerovog lijevka.

Volumeni i mase polaznih reaktanata drugog sintetskog koraka prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Mase i volumeni polaznih reaktanata u sintezi tiosemikarbazona.

Ime tiosemikarbazida	m (tiosemikarbazid) / mg	V (ledena octena kiselina) / $\mu\text{L}$	m (formilbenzojeva kiselina) / mg
<b>N-(naftalen-1-il)hidrazin- karbotioamid</b>	155,985	4,146	107,76
<b>N-benzilhidrazin-karbotioamid</b>	103,73	3,31	85,92
<b>N-4- (trifluorometoksi)fenilhidrazin- karbotioamid</b>	107,96	2,48	64,51
<b>N-(tetrahidrofuran-2- il)metilhidrazin-karbotioamid</b>	114,86	3,79	98,40

### 3.4. Priprava makrozona

Makrozoni nastaju reakcijom 4"-aminopropil derivata azitromicina **P5** (60 mg) i tiosemikarbazona (1 ekvivalent). U tikvici se otopi odgovarajući tiosemikarbazon (tablica 7.) i HATU (1,1 ekvivalent, 31,13 mg) u diklormetanu (5 mL), doda se DIPEA (3 ekvivalenta, 38,89  $\mu\text{L}$ ) te se smjesa miješa uz pomoć magnetne mješalice 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon

30 minuta doda se **P5** i reakcijska smjesa se nastavlja miješati 24 sata. Završetkom reakcije otapalo se upari na rotacijskom uparivaču.

Tablica 7. Prikaz masa polaznih reaktanata (tiosemikarbazona) u sintezi makrozona.

Ime tiosemikarbazona	<i>m</i> (tiosemikarbazona) / mg
4-((2-(naftalen-1-ilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeva kiselina	26,01
4-((2-(benzilkarbamotioil)hidrazono)metil)benzojeva kiselina	23,32
4-((2-((4-(trifluorometoksi)fenil)karbamotioil)hidrazono)metil)benzojeva kiselina	28,53
4-((2-(((tetrahidrofuran-2-il)metil)karbamotioil)hidrazono)metil)benzojeva kiselina	33,87

Tijek svih navedenih reakcija, priprava 4"-aminopropil derivata azitromicina **P5**, tiosemikarbazida, tiosemikarbazona i makrozona, praćene su tankoslojnom kromatografijom. Mobilna faza korištena za razvijanje TLC pločice sastojala se od diklormetana, metanola i amonijaka (25 %) u omjeru 90:15:1,5. Reaktanti i produkti vizualizirani su prskanjem pločice 10 %-tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu (priprava **P5**) i korištenjem UV lampe pri  $\lambda = 256$  i  $\lambda = 366$  nm (priprava tiosemikarbazida, tiosemikarbazona i makrozona).

Pripravljeni makrozoni pročišćeni su pomoću *flash* kromatografije uz gradijentno eluiranje. Kao pokretna faza korišten je sustav otapala DCM:MeOH:NH<sub>3</sub> u omjeru 90:9:0,5, a kao nepokretna faza silikagel. Eluiranje je započeto s diklormetanom, nakon čega se postupno mijenjao sastav mobilne faze povećavanjem sustava otapala za 10%. Protok mobilne faze iznosio je 8 mL/min te su skupljane frakcije od 4 mL koje su se potom analizirale tankoslojnom kromatografijom.

### 3.5. Metode za karakterizaciju sintetiziranih spojeva

Prisutnost dobivenih makrozona u reakcijskim smjesama potvrđena je spektrometrijom masa. Spektri masa snimljeni su na uređaju Waters UPLC ESI MS uz ionizaciju elektroraspršenjem.

Udio makrozona u reakcijskoj smjesi određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Kao nepokretna faza korištena je kromatografska kolona Waters XBridge Phenyl, a kao pokretna faza smjesa acetonitrila i amonijačnog pufera ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) koncentracije soli  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pri vrijednosti  $\text{pH} = 10$ . Uzorci koncentracije  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljeni su otapanjem reakcijske smjese u acetonitrilu. Provedeno je gradijentno eluiranje te je podešena valna duljina detekcije na  $210 \text{ nm}$ .

Strukture dobivenih produkata (tiosemikarbazida, tiosemikarbazona i makrozona) potvrđene su spektroskopijom NMR. Jednodimenzijski ( $^1\text{H}$  NMR i DEPT) i dvodimenzijski (COSY, HSQC i HMBC) spektri NMR snimljeni su na spektrometru NMR *Bruker Avance III HD 400 MHz/54mm Ascend*. Uzorci (5 mg) su otopljeni u  $550 \mu\text{L}$  deuteriranog otapala. Deuterirana otapala korištena u ovom radu su kloroform-d, dimetilsulfoksid-d<sub>6</sub> i acetonitril-d<sub>3</sub>. Kao referentni siglan korišten je tetrametilsilan.

### 3.6. Određivanje biološke aktivnost

Biološka aktivnost *In vitro* nosintetiziranih derivata azitromicina napravljena je u Fidelti Ltd. Aktivnost četiri različita makrozona, 4"-A, 4"-B, 4"-C, 4"-D, određena je na osam Gram-pozitivnih bakterija: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* B0330 (cMLS), *S. aureus* B0331 (M), *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pneumoniae* B0326 (M), *S. pneumoniae* B0633 (cMLS), *S. pyogenes* B0542 i *E. faecalis* ATCC 29212, četiri Gram-negativne bakterije: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoanie* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853 i na organizam koji pripada carstvu gljiva *S. cerevisiae*.

Dobivene vrijednosti MIK novopripremljenih makrozona uspoređene su s onima za azitromicin za navedene sojeve bakterija.

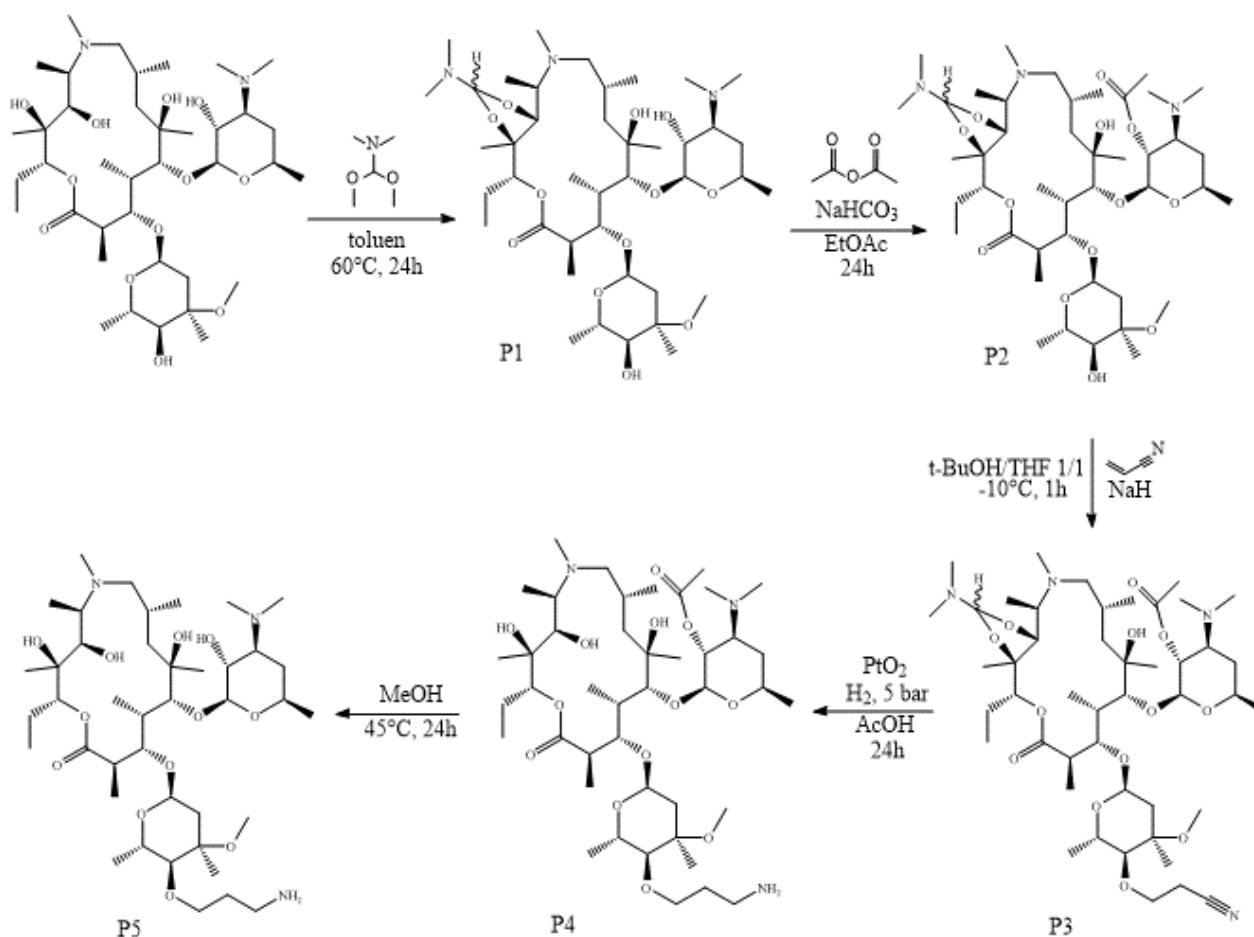


## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprava spojeva

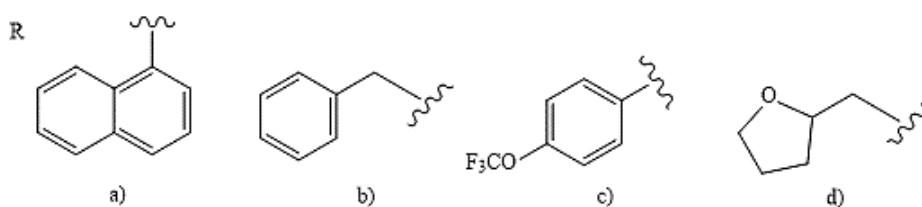
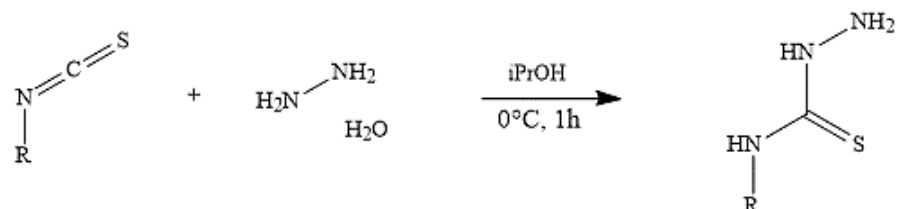
U sklopu ovog rada uspješno su pripravljena četiri makrozona reakcijom 4"-aminopropil derivata azitromicina i tiosemikarbazona. Pripravi makrozona prethodila je sinteza četiri tiosemikarbazida, četiri tiosemikarbazona i sinteza derivata azitromicina. Svi sintetski putevi i postupci pojašnjeni su u eksperimentalnom dijelu ovoga rada.

Prema literaturnim podacima<sup>79</sup> modifikacijom položaja C4" u azitromicinu (slika 4) dobiveni su spojevi zadovoljavajuće antimikrobne aktivnosti. Iz tog razloga pribjegli se kemijskoj modifikaciji upravo tog položaja u azitromicinu. Sintetski put 4"-aminopropilnog derivata azitromicina **P5** prikazan je na Shemi 2.

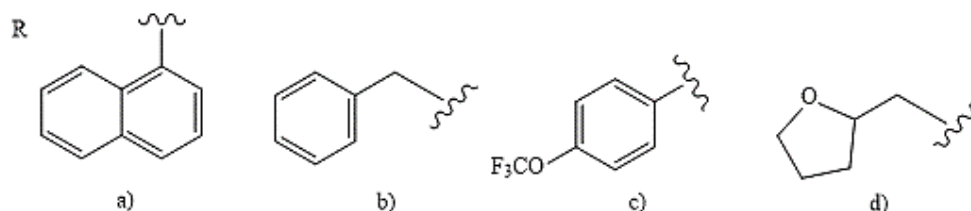
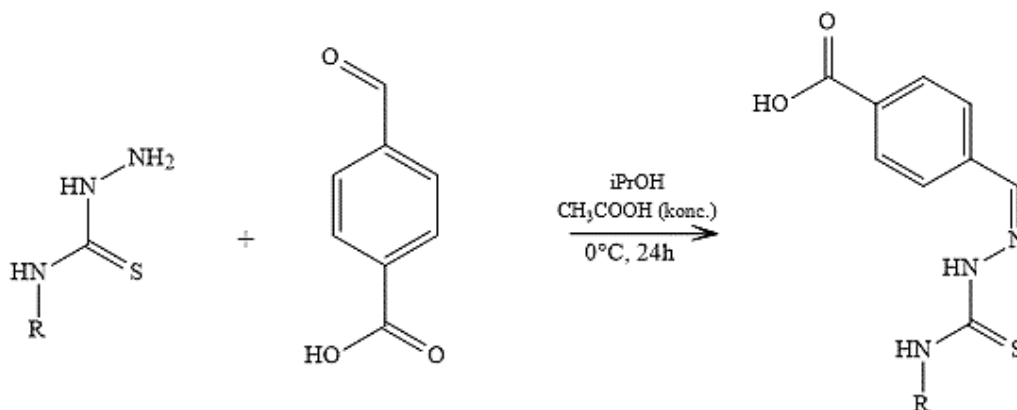


Shema 2. Sinteza 4"-aminopropil derivata azitromicina.

Pripravi tiosemikarbazona prethodila je priprava tiosemikarbazida. Tiosemikarbazidi su sintetizirani reakcijom izotiocijanata i hidrazin monohidrata (Shema 3.) Reakcijom dobivenih tiosemikarbazida i 4-formilbenzojeve kiseline uz dodatak ledene octene u propan-2-olu sintetizirani su tiosemikarbazoni (Shema 4.).

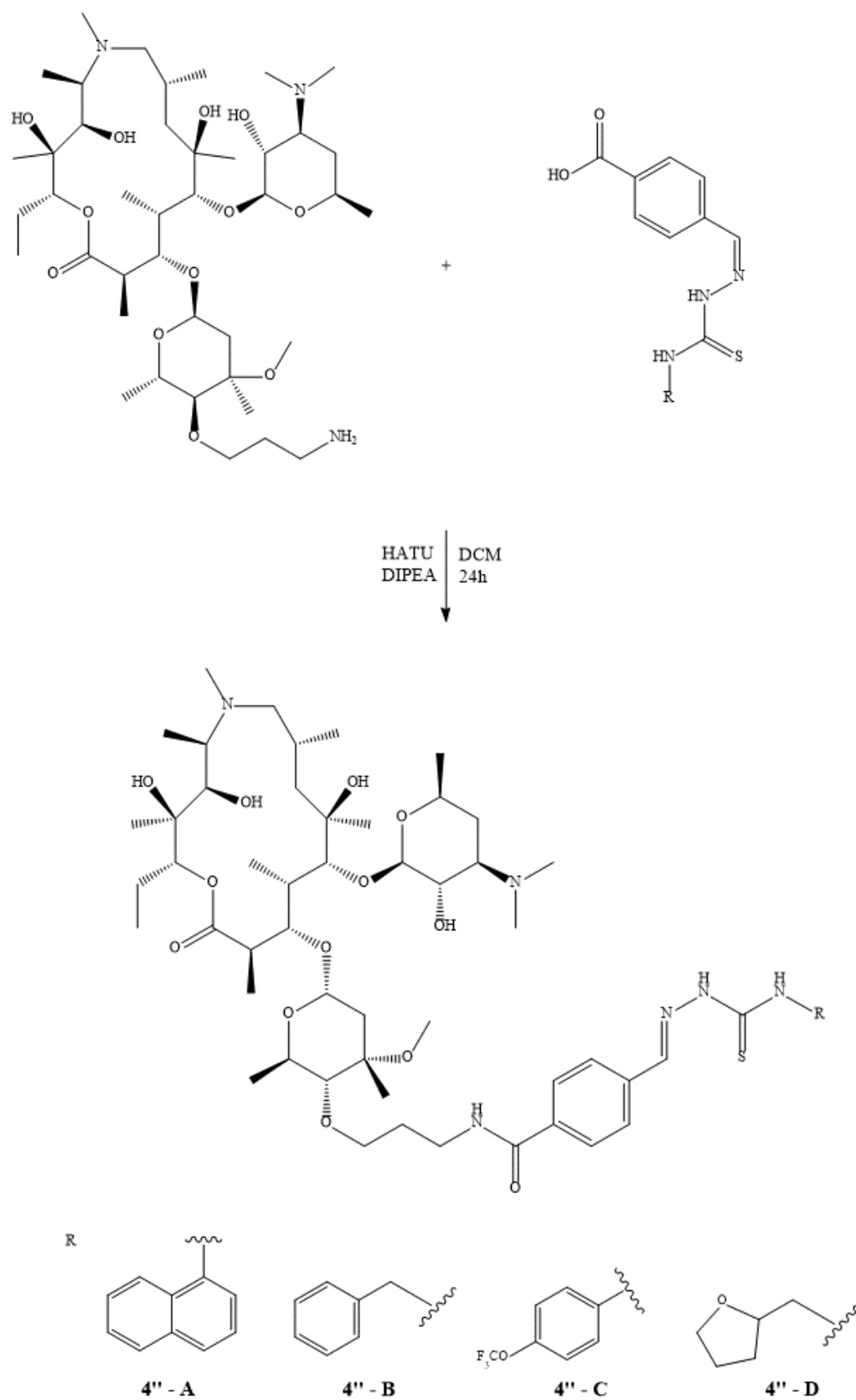


Shema 3. Priprava tiosemikarbazida.



Shema 4. Priprava tiosemikarbazona.

Za pripravu makrozona kao polazni spojevi korišteni su prethodno pripremljeni tiosemikarbazoni i 4"-aminopropil derivat azitromicina uz dodatak HATU i DIPEA-e. Deprotonacijom karboksilne skupine tiosemikarbazona pomoću DIPEA-e nastaje karboksilatni anion. Reakcijom karboksilatnog aniona i HATU dolazi do nastanka aktiviranog estera. Makrozon nastaje nukleofilnim napadom amino skupine 4"-aminopropil derivata azitromicina na ugljikov atom karboksilne skupine aktiviranog estera. Sintetski put makrozona prikazan je na Shemi 5.



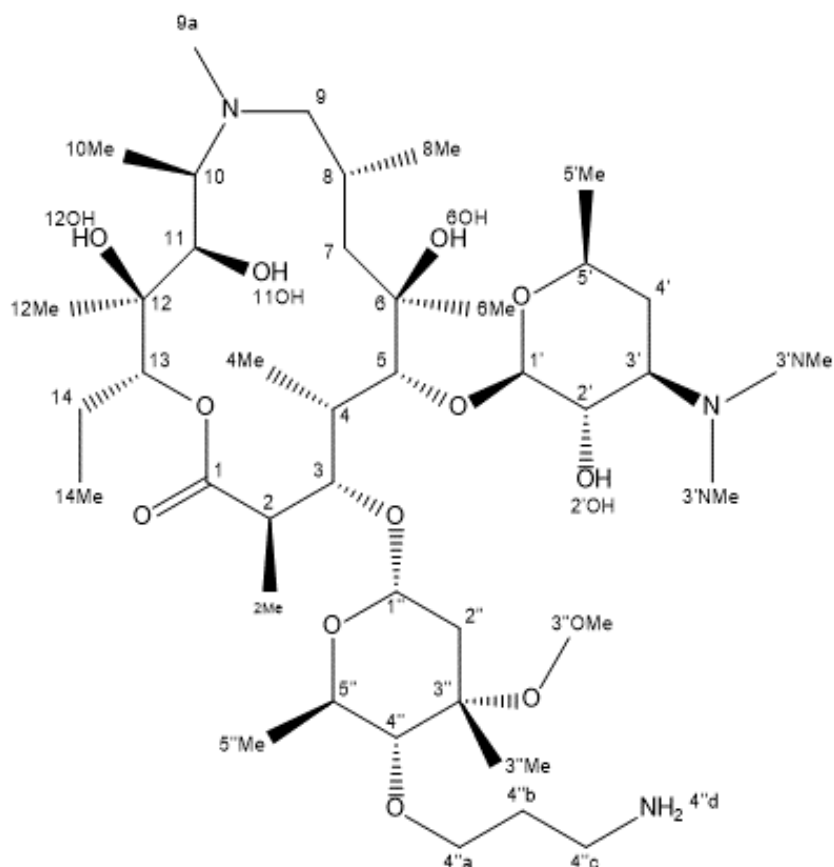
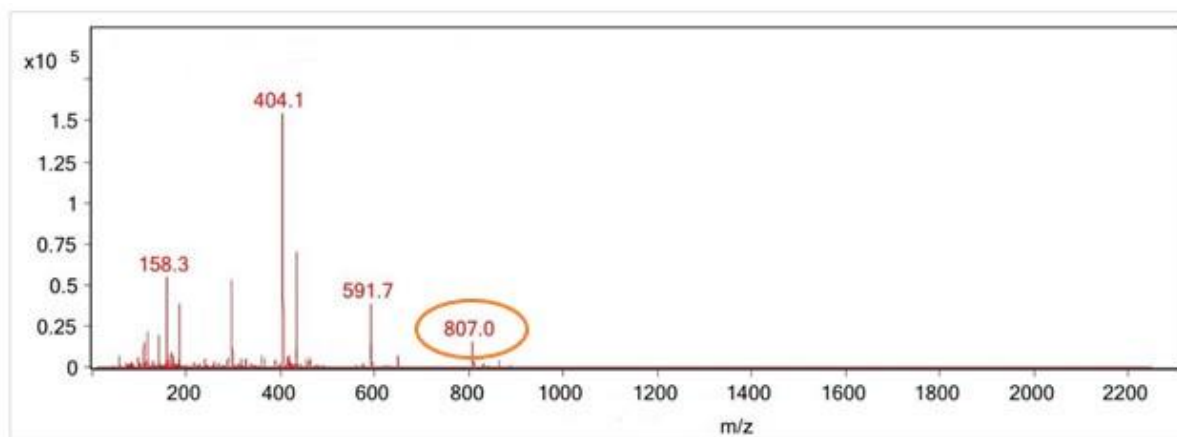
Shema 5. Priprava markozona.

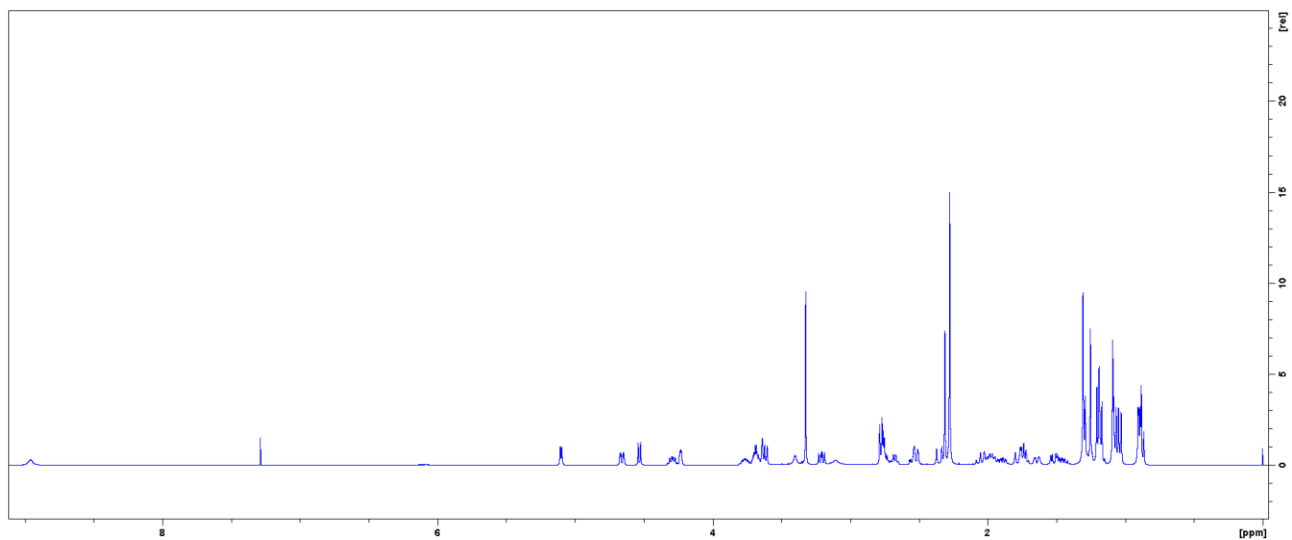
## 4.2. Karakterizacija sintetiziranih spojeva

Za karakterizaciju novosintetiziranih spojeva – 4"-aminopropilni derivat azitromicina, tiosemikarbazoni i makrozoni – korištene su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, spektrometrija masa i spektroskopija NMR.

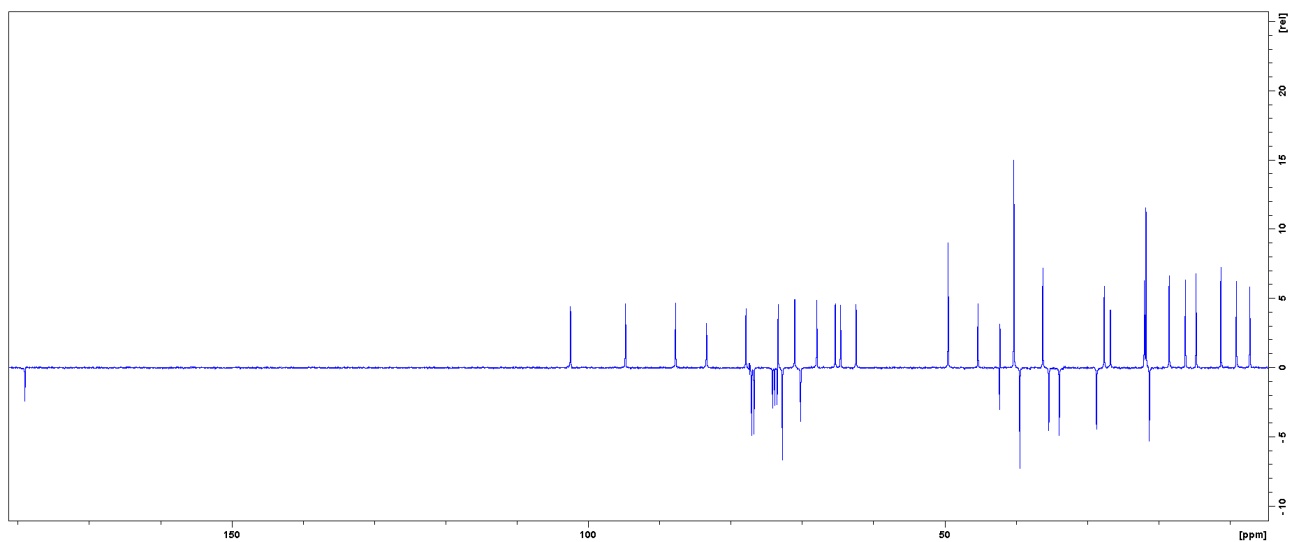
Iz reakcijske smjese 4"-aminopropilni derivat azitromicina, spoj **P<sub>5</sub>** prvo je pročišćen i izoliran kolonskom kromatografijom. Struktura spoja **P<sub>5</sub>** predložena je na temelju podataka dobivenih iz spektra mase te kombinacijom podataka dobivenih iz spektara NMR. Predložena struktura spoja prikazana je na slici 14. Na slici 15. prikazan je spektar mase spoja P<sub>5</sub>, dok se na slikama 16. – 20 nalaze jedno- i dvo-dimenzijski spektri NMR. Prekursor ion u spektru mase nalazi se pri m/z od 807 što odgovara masi spoja P<sub>5</sub>. Fragmentacijom nastaju produkti ioni pri m/z 591, 404 i 158.

U spektru COSY mogu se opaziti korelacijski signali 4"-aminopropilnog lanca koji čine jedan spinski sustav i označeni su na slici 18., a pripadaju protonima 4"a, 4"b i 4"c. HMBC korelacijski signali ogranka C4"a – C4"c (slika 20 a)) u suglasju su s onima opaženim u spektru COSY. Iz spektra HMBC se vidi korelacija između atoma C4" s protonima 2", 4" i 5" što je i očekivano budući da pripadaju šećeru kladinozi. Međutim, najvažniji je opaženi korelacijski signal C4"-H4"a koji potvrđuje da se supstitucija 4"-aminopropilnog ogranka dogodila upravo na položaju C4" u kladinozi (slika 20 b)). Nadalje, u spektru HMBC nisu opaženi korelacijski signali atoma C4" s protonima 4"b i 4"c zbog udaljenosti ovih protona od četiri odnosno pet kemijskih veza.

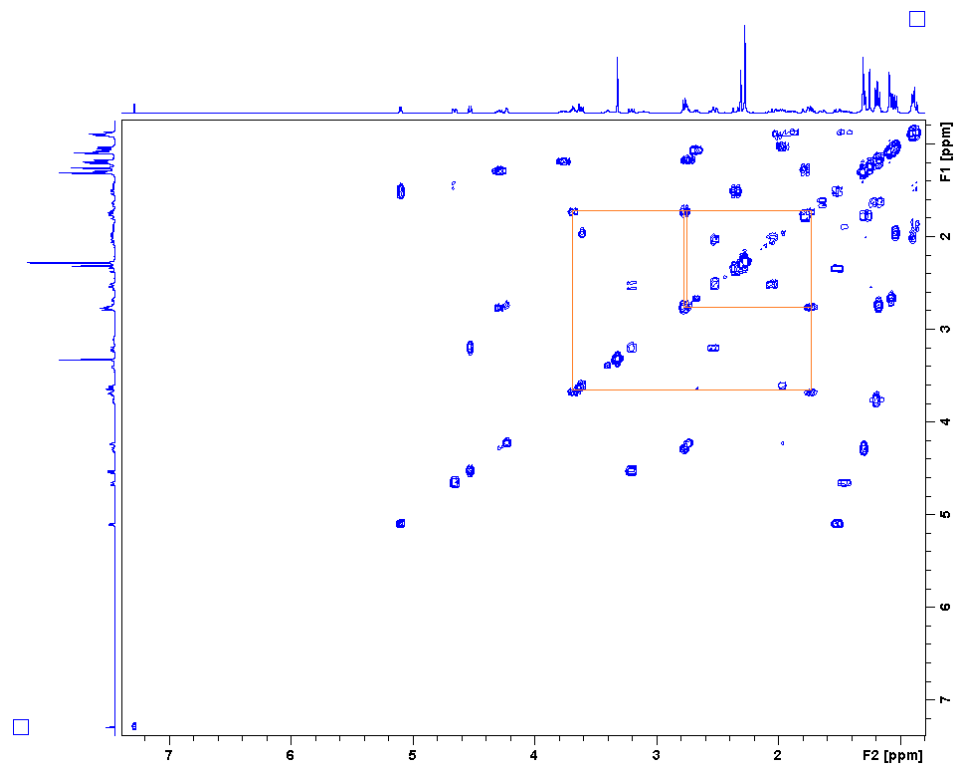
Slika 14. Struktura 4''-aminopropil derivata azitromicina (P<sub>5</sub>).Slika 15. Spektar ESI-MS spoja P<sub>5</sub>, snimljen u pozitivnom modu sa zaokruženim molekulskim ionom.



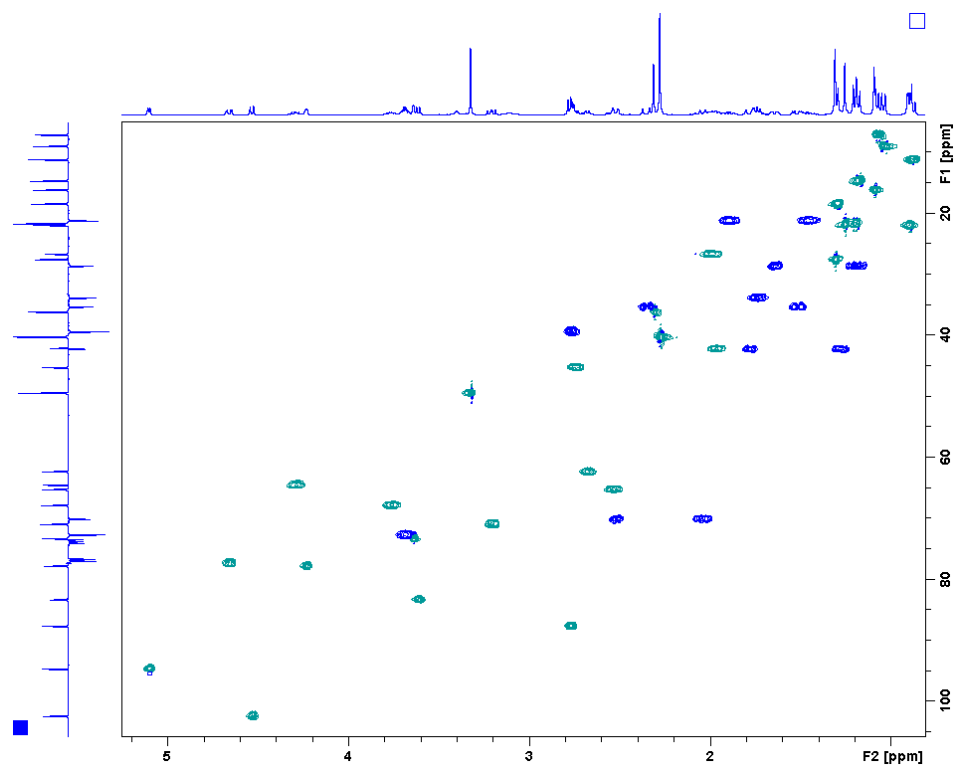
Slika 16. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja  $\text{P}_5$  snimljen u kloroformu-d pri 298K.



Slika 17. Spektar DEPT-Q NMR spoja  $\text{P}_5$  snimljen u kloroformu-d pri 298K.

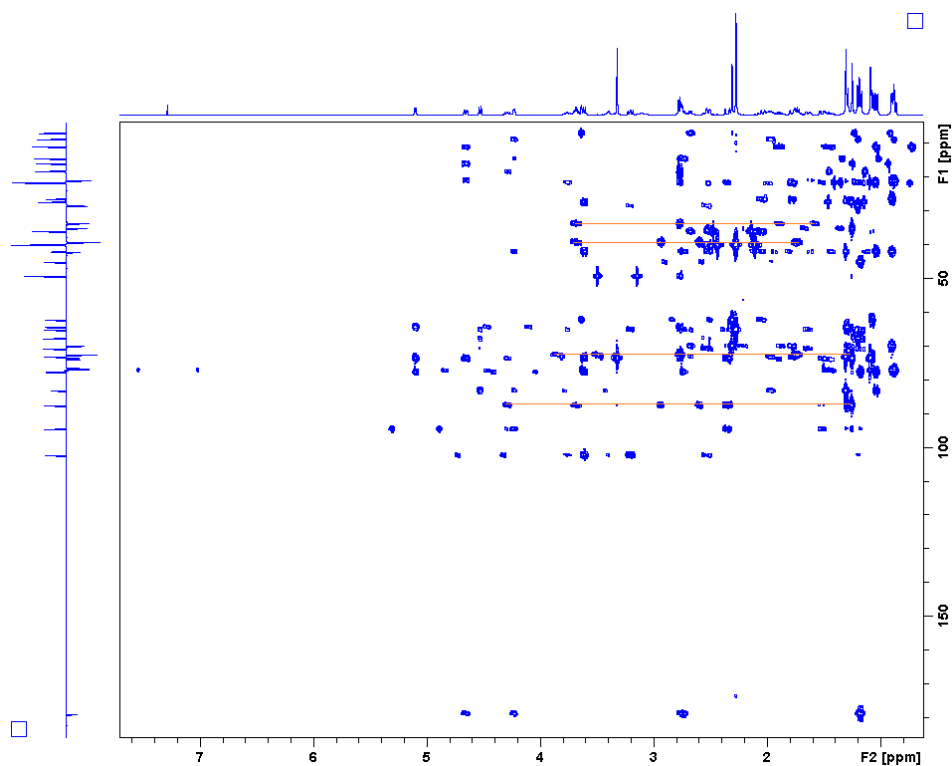


Slika 18. Spektar COSY NMR spoja  $P_5$  snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima protona 4“a, 4“b i 4“c.

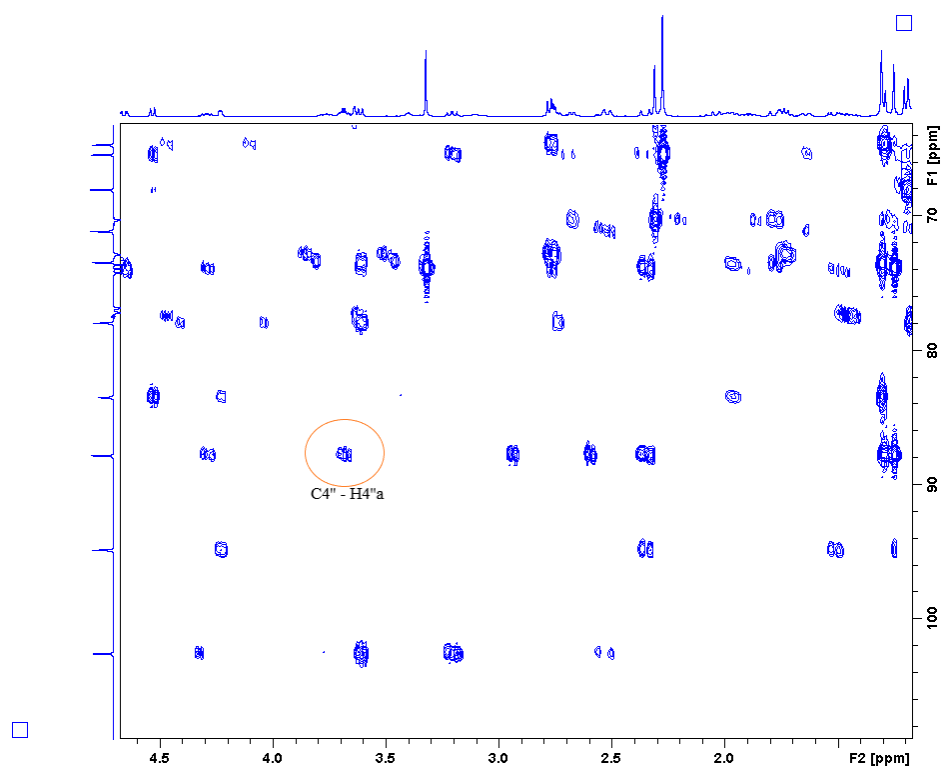


Slika 19. Spektar HSQC NMR spoja  $P_5$  snimljen u kloroformu-d pri 298K.





Slika 20. a) Cijeli spektar HMBC NMR spoja  $P_5$  snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima ugljika i protona 4''a, 4''b i 4''c.



Slika 20. b) Uvećani dio spektra HMBC NMR spoja  $P_5$  snimljen u kloroformu-d pri 298K s označenim korelacijskim signalima ugljika C4 i protona H4''a.

Na temelju analize svih spektara NMR napravljena je asignacija ugljikovih i vodikovih atoma koja je prikazana u Tablici 8.

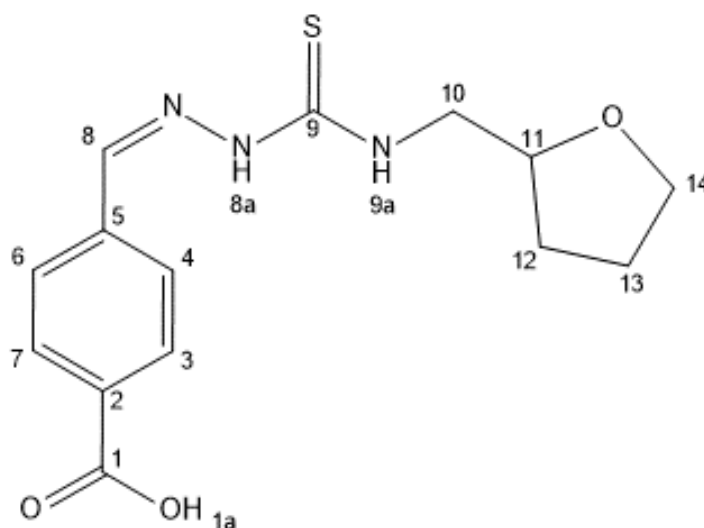
Tablica 8. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR 4''-aminopropil derivata azitromicina.

4''-aminopropil derivat azitromicina – P <sub>5</sub>					
Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$	Atom	$\delta(^1\text{H})/\text{ppm}$	$\delta(^{13}\text{C})/\text{ppm}$
<b>1</b>	-	179,02	<b>14</b>	1,48; 1,89	21,29
<b>2</b>	2,74	45,32	<b>14Me</b>	0,89	11,27
<b>2Me</b>	1,19	14,76	<b>1'</b>	4,52	102,57
<b>3</b>	4,23	77,88	<b>2'</b>	3,20	71,03
<b>4</b>	1,96	42,21	<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>4Me</b>	1,03	9,09	<b>3'</b>	2,53	65,36
<b>5</b>	3,61	83,38	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,27	40,29
<b>6</b>	-	73,51	<b>4'</b>	1,19; 1,64	28,70
<b>6Me</b>	1,31	27,62	<b>5'</b>	3,76	67,95
<b>6OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>5'Me</b>	1,19	21,76
<b>7</b>	1,28; 1,76	42,29	<b>1''</b>	5,10	94,90
<b>8</b>	1,98	26,76	<b>2''</b>	1,48; 2,36	35,39
<b>8Me</b>	0,89	21,99	<b>3''</b>	-	73,83
<b>9</b>	1,98; 2,53	70,22	<b>3''Me</b>	1,25	21,76
<b>9aN</b>	2,31	36,22	<b>3''OMe</b>	3,32	49,54
<b>10</b>	2,67	62,41	<b>4''</b>	2,78	87,77
<b>10Me</b>	1,06	7,21	<b>4''a</b>	3,69	72,76
<b>11</b>	3,64	73,38	<b>4''b</b>	1,76	33,93
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>4''c</b>	2,76	39,46
<b>12</b>	-	74,16	<b>4''d</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>5''</b>	4,29	64,62
<b>12Me</b>	1,06	16,23	<b>5''Me</b>	1,28	18,52
<b>13</b>	4,66	77,27			

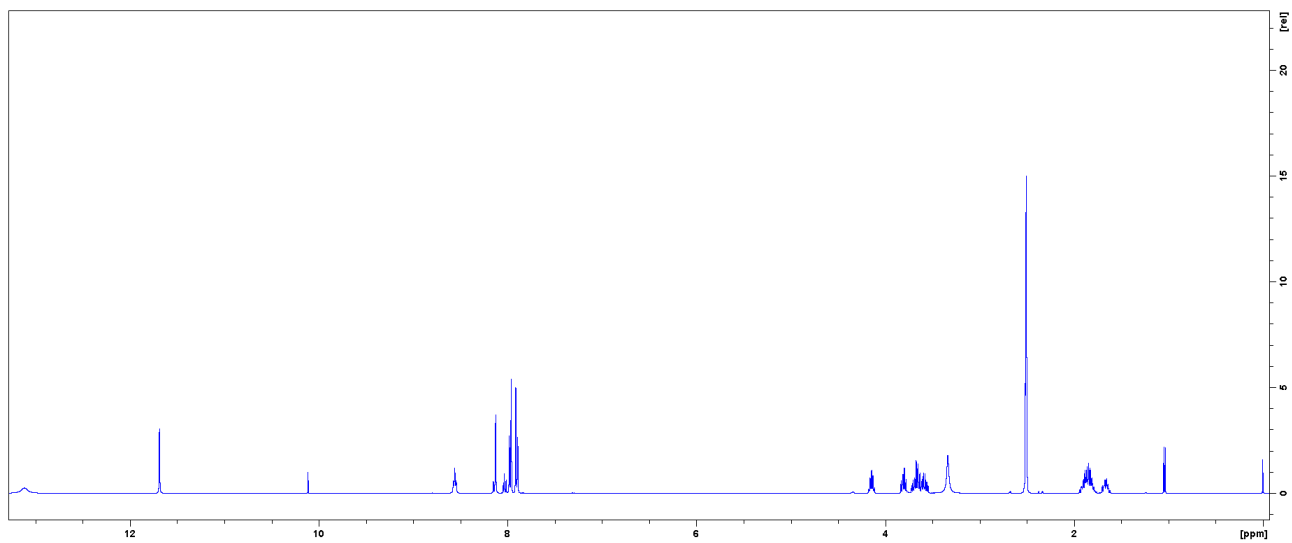
Strukture pripremljenih tiosemikarbazida potvrđene su spektroskopijom NMR te su spektri NMR i asignacije prikazane u dodatku, D1–D8.

Za potrebe karakterizacije tiosemikarbazona snimani su spektri  $^1\text{H}$ , DEPT-Q, COSY, HSQC i HMBC. U nastavku rada prikazani su spektri i asignacije tiosemikarbazona D, dok se spektri i asignacije preostala tri pripremljena tiosemikarbazona nalaze u dodatku (D9–D26).

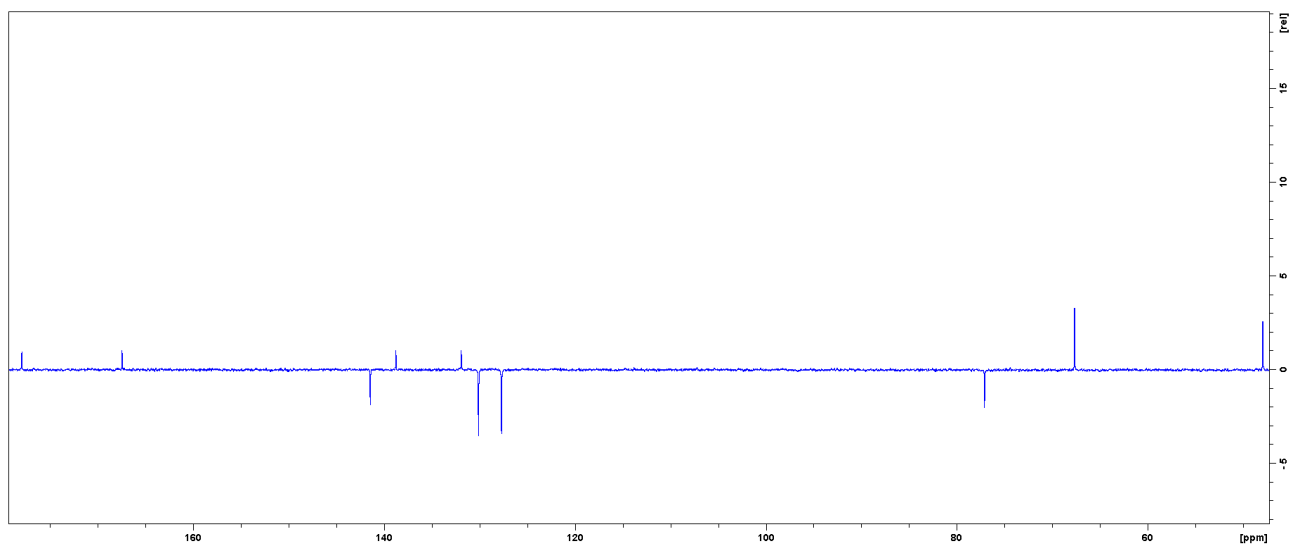
Struktura spoja tiosemikarbazona D predložena je na temelju kombinacije podataka dobivenih iz spektara NMR te je prikazana na slici 21. U spektru COSY (slika 24.) može se opaziti signal H8 pri kemijskom pomaku od 8,13 ppm i njegova slaba korelacija s protonima atomatskog prstena. U spektru COSY mogu se opaziti korelacijski signali između protona H8 i H8a te korecijski signali između protona H9 i H10. Također, u spektru COSY postoje korelacije protona unutar aromatskog i tetrahidrofuranskog dijela molekule, čineći odvojene spinske sustave. U spektru HMBC (slika 26.) nalaze se korelacijski signali između atoma C4 i C6 s atomima H3, H7 i H8, dok atomi C3 i C7 koreliraju samo s atomima H4 i H6. Također, očekivani korelacijski signali atoma C5 s aromatskim protonima i protonom H8 te atoma C2 samo s atomima H3 i H7 opaženi su i u spektru HMBC. Korelacijski signali HMBC unutar aromatskog i tetrahidrofuranskog dijela molekule potvrđuju zaključke dobivene iz spektra COSY.



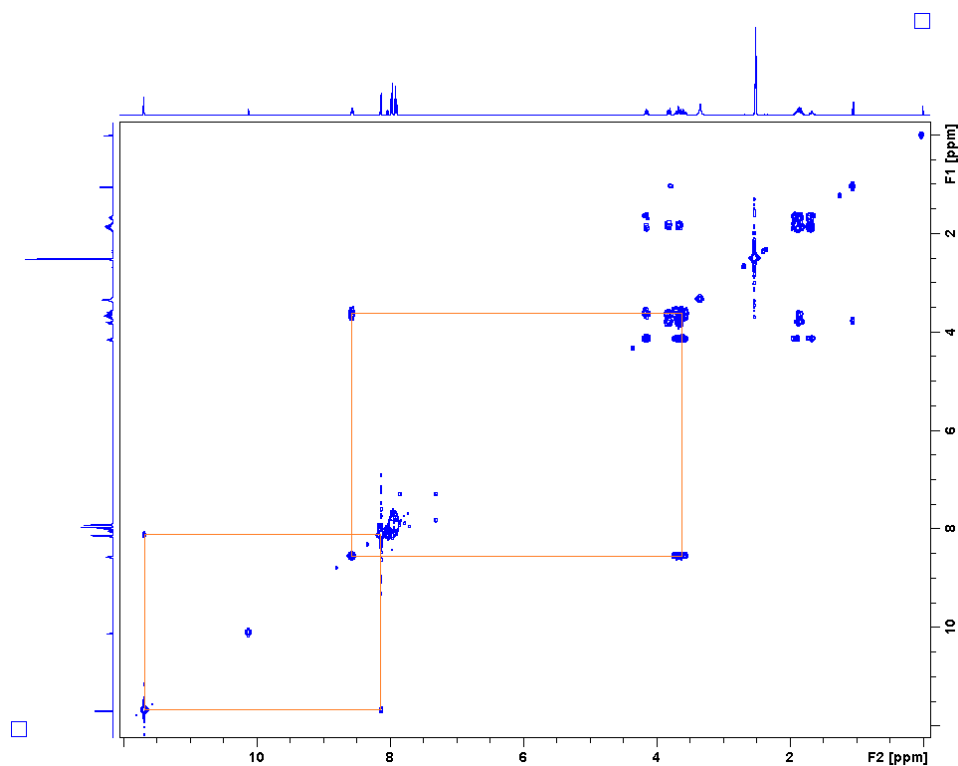
Slika 21. Struktura tiosemikarbazona D uz označene lokante.



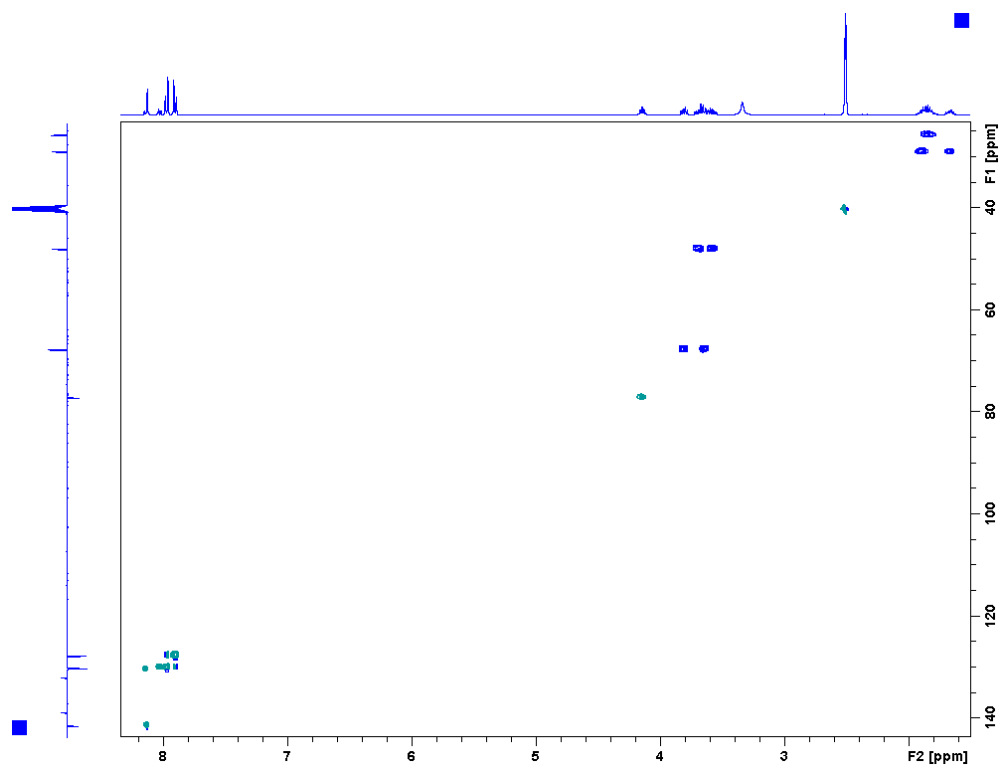
Slika 22. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona D snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.



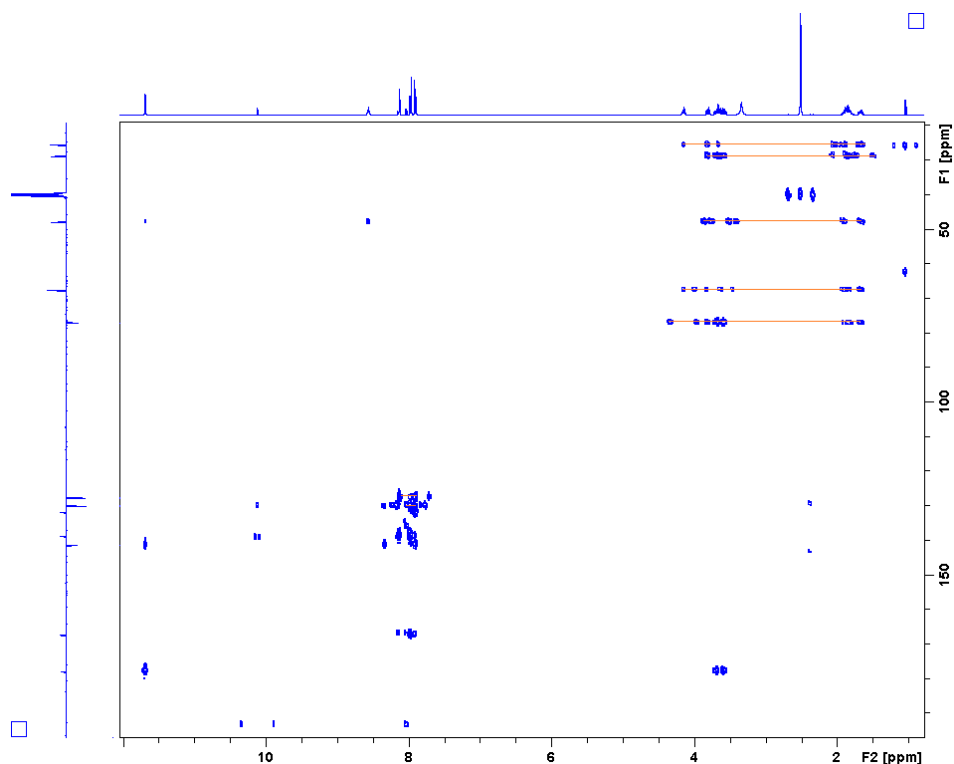
Slika 23. Spektar DEPT-Q tiosemikarbazona D snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.



Slika 24. Spektar COSY tiosemikarbazona D snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K s označenim korelacijama protona H8 (8,13 ppm) i H8a (11,69 ppm), odnosno H9a (8,55 ppm) i H10 (3,58; 3,68).



Slika 25. Spektar HSQC tiosemikarbazona D snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K.



Slika 26. Spektar HMBC tiosemikarbazona D snimljen u DMSO- $d_6$  pri 298K s označenim korelacijskim signalima unutar tetrahidrofurnaskog prstena (od 1,66 ppm do 4,14 ppm) i aromatskog prstena (od 7,91 ppm do 7,97 ppm).

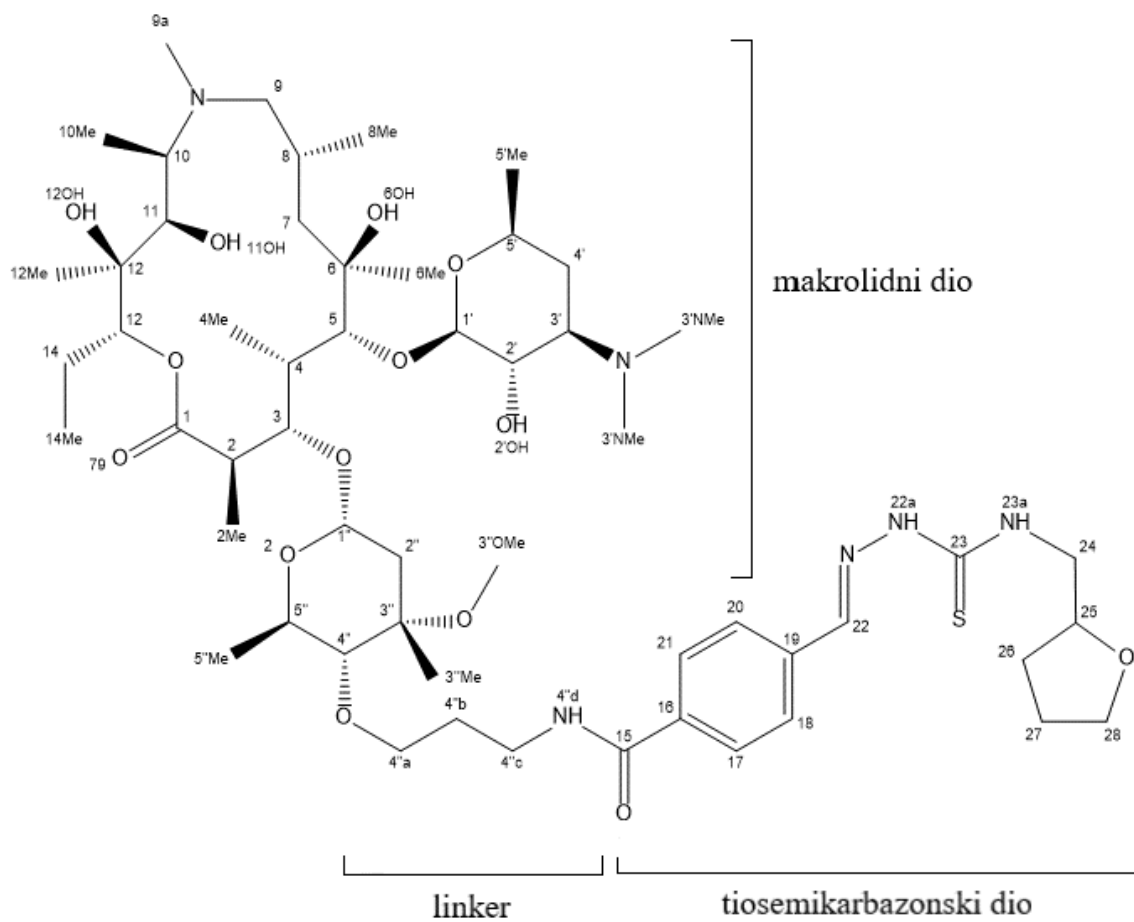
Asignacija atoma napravljena je na temelju analize jedno- i dvo-dimnzijskih spektara NMR i nalazi se u Tablici 9.

Tablica 9. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR tiosemikarbazona D.

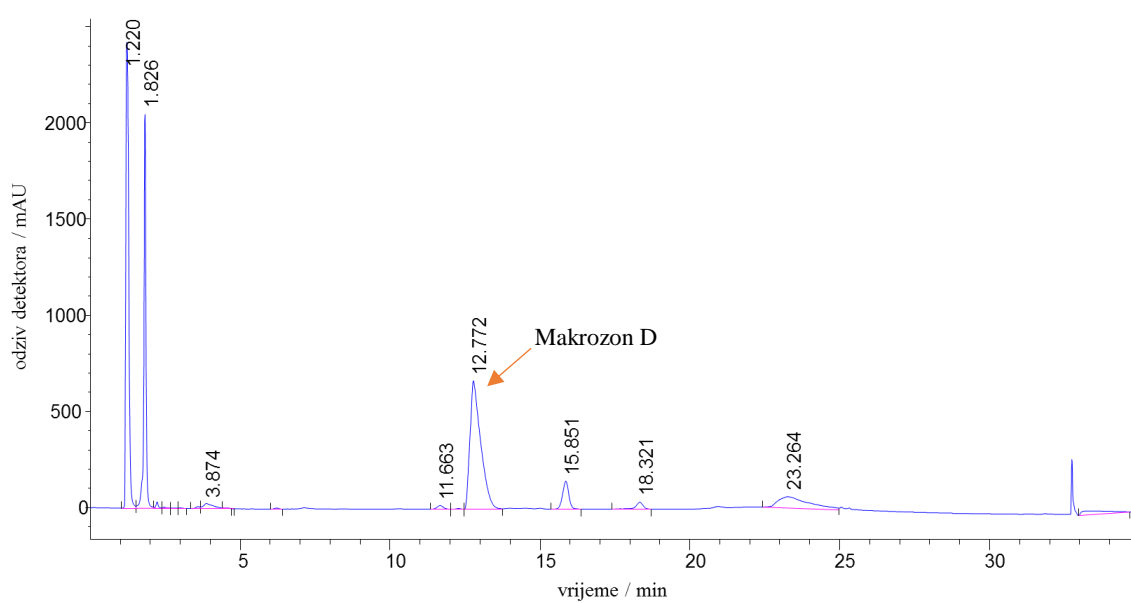
Tiosemikarbazon D					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	-	167,35	<b>9</b>	-	177,84
<b>1a</b>	13,13	-	<b>9a</b>	8,55	-
<b>2</b>	-	132,0	<b>10</b>	3,58; 3,68	47,9
<b>3, 7</b>	7,97	130,19	<b>11</b>	4,14	77,13
<b>4, 6</b>	7,91	127,61	<b>12</b>	1,82; 1,86	25,70
<b>5</b>	-	138,8	<b>13</b>	1,66; 1,92	28,87
<b>8</b>	8,13	141,53	<b>14</b>	3,65; 3,81	67,6
<b>8a</b>	11,69	-			

Karakterizacija novih makrozona (A–D) provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, spektrometrije masa i spektroskopije NMR. Udjeli makrozona u reakcijskim smjesama dobiveni su metodom normalizacije pikova u kromatogramima. Nakon pročišćavanja spojeva pomoću *flash* kromatografije, struktura svakog makrozona potvrđena je spektroskopijom NMR. Spektri i asignacije makrozona D – tetrahidro-2-furfuril-makrozona – prikazane su u nastavku, dok se spektri i asignacije preostala tri pripremljena makrozona nalaze u dodatku (D27–D46).

Struktura makrozona D predložena je na temelju podataka dobivenih iz spektra mase te kombinacijom podataka dobivenih iz spektara NMR. Predložena struktura spoja prikazana je na slici 27. Analizom kromatograma prikazanog na slici 28., izračunat je udio makrozona u smjesi koji iznosi 31,3%. Na slici 29. nalazi se spektar mase makrozona D. U spektru je opažen signal molekulskog iona pri  $m/z$  1095,81 koji odgovara masi spoja D. Fragmentacijom spoja D nastaje produkti ion pri  $m/z$  548,68. Na slikama 30. – 33. prikazani su spektri NMR za potvrdu strukture pripremljenog makrozona. U spektru COSY (slika 31.) vide se dva spinska sustava koji pripadaju makrolidnom i tiosemikarbazonskom dijelu molekule makrozona. Budući da OH skupina tiosemikarbazona sudjeluje u reakciji s 4"-aminopropilnim prekursorom, ne vidi se signal OH skupine vezane na C15 (pri 13,13 ppm) što upućuje da je došlo do kemijske reakcije i povezivanja tih dvaju fragmenata. U molekuli makrozona protoni 4", 4"a, 4"b, 4"c odsjenjeniji su u usporedbi s prekursorom zbog elektronskog utjecaja atoma kisika na atomu C15. Isto tako, atom C16 je odsjenjeniji u molekuli makrozona u usporedbi s molekulom tiosemikarbazona što se pripisuje utjecaju atoma dušika na položaju 4"d. Kemijski pomaci  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  navedeni su u tablici 10. Spektar HMBC (slika 33.) prikazuje korelacije unutar pojedinih spinskih sustava. U spektru je opažena i korelacija atoma C15 s aromatskim protonima te protonima 4"c što je dodatna potvrda da je došlo do vezanja prekursora i tiosemikarbazona na položaju 4".



Slika 27. Stuktura makrozona D uz označene lokante.

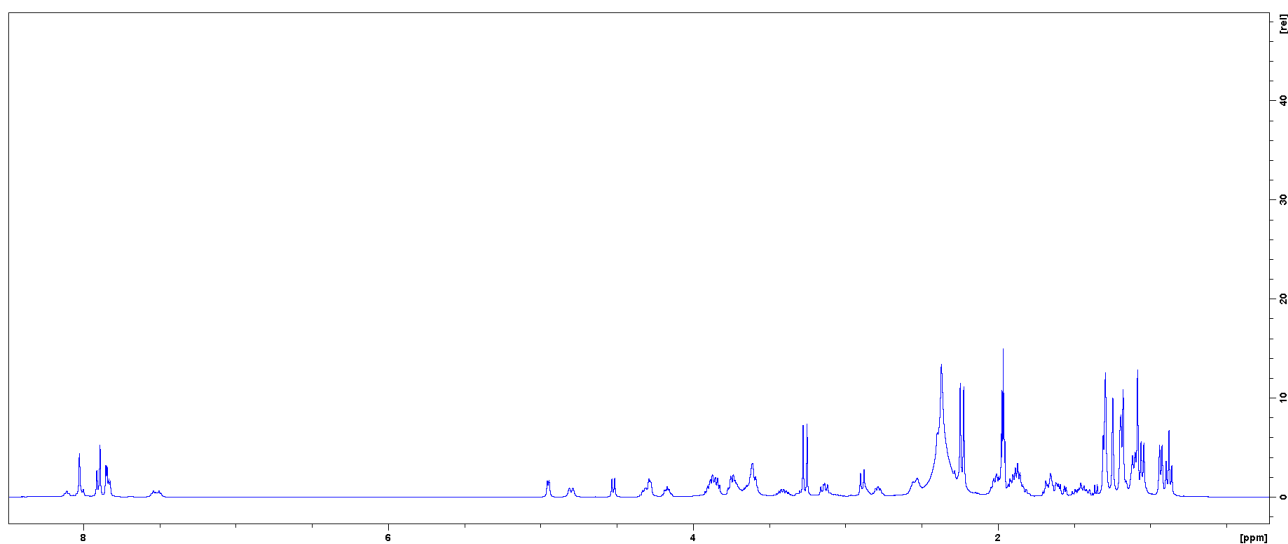


Slika 28. Kromatogram reakcijske smjese makrozona D

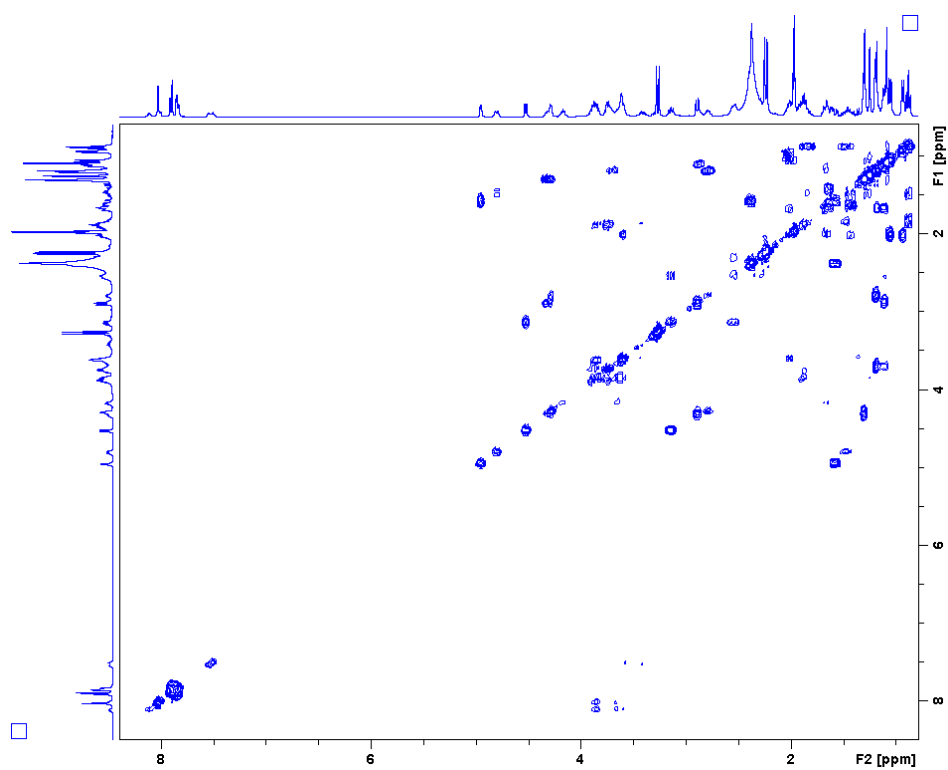




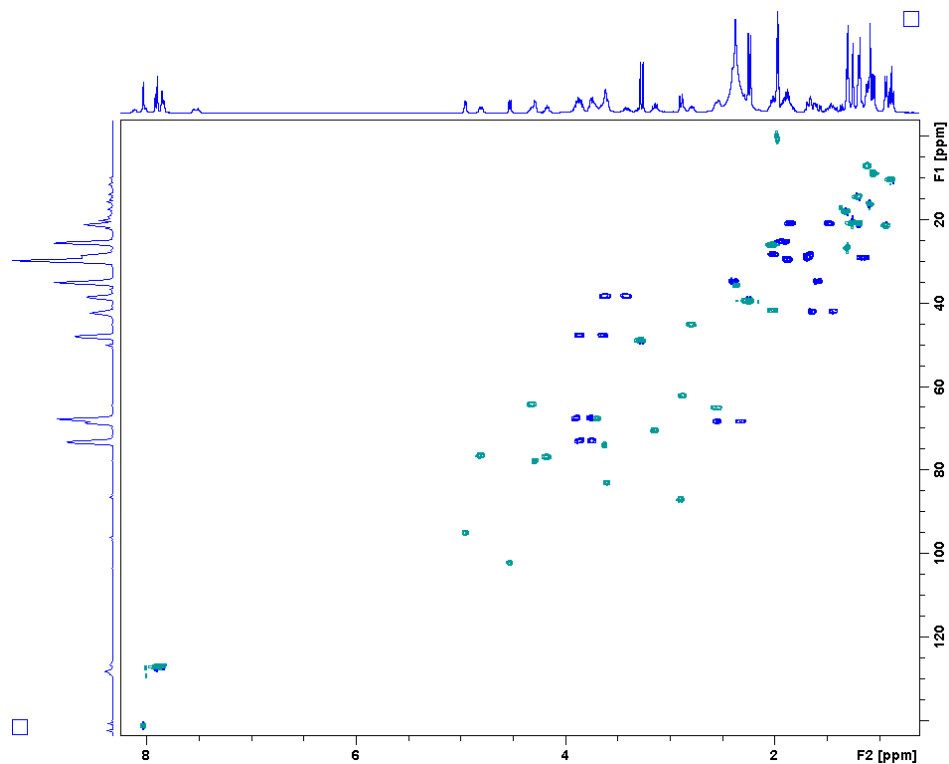
Slika 29. Spektar ESI-MS makrozona D snimljen u pozitivnom modu sa zaokruženim molekulskim ionom.



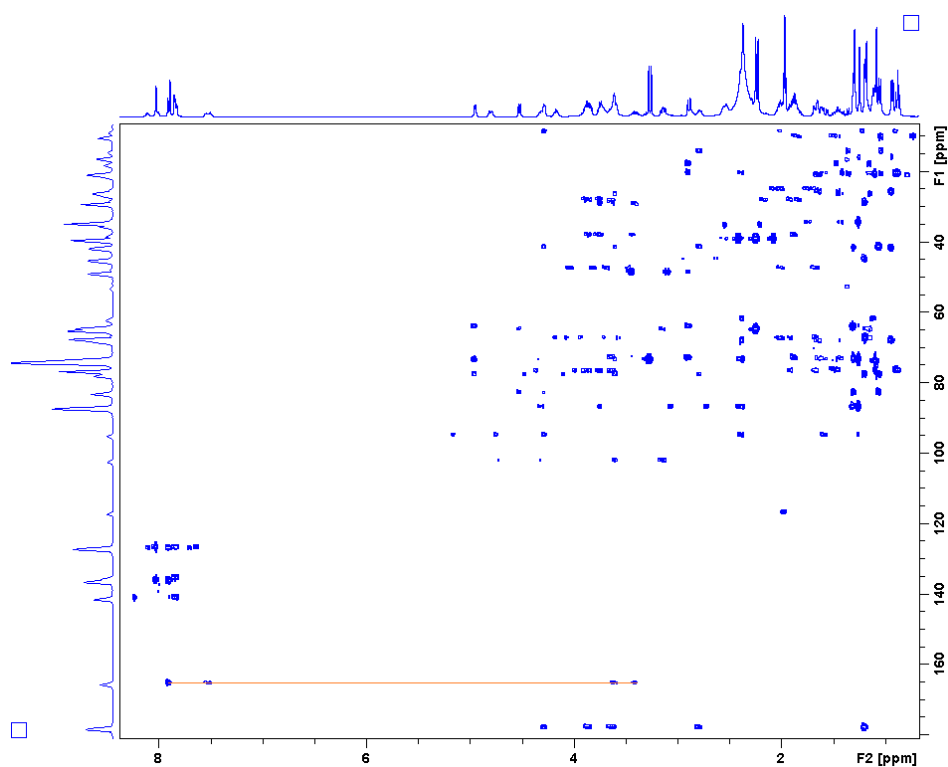
Slika 30. Spektar  $^1\text{H}$  makrozona D snimljen u acetonitrilu- $\text{d}_3$  pri 298K.



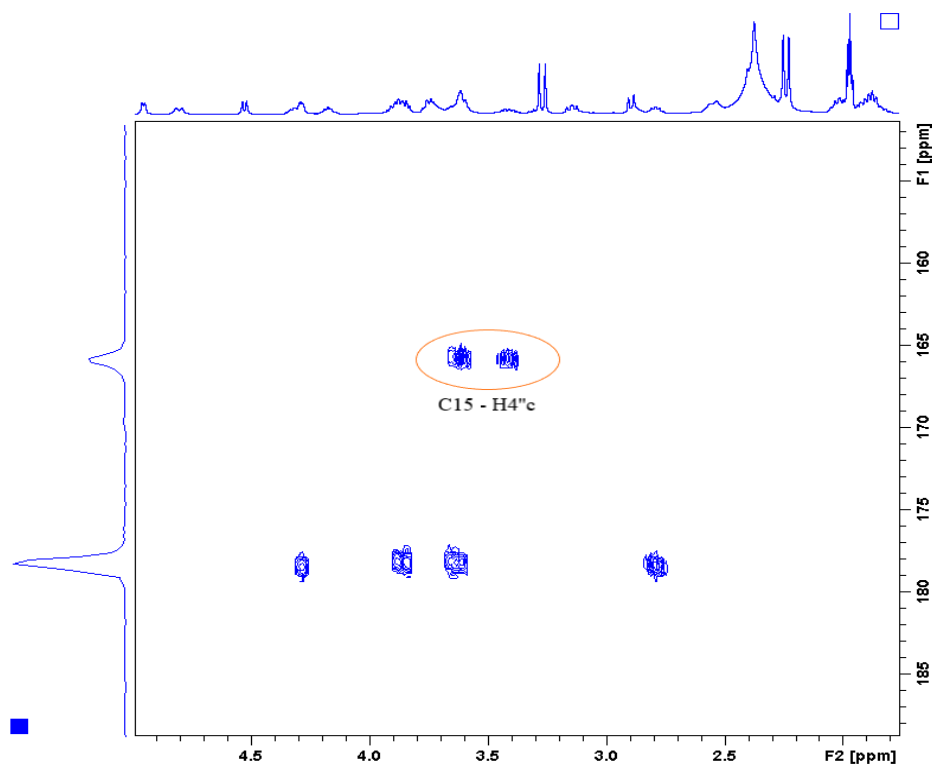
Slika 31. Spektar COSY makrozona D snimljen u acetonitrilu- $\text{d}_3$  pri 298K.



Slika 32. Spektar HSQC makrozona D snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K.



Slika 33. a) Cijeli spektar HMBC makrozona D snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K s označenim korelacijskim signalima C15 i H4''c, H17, H21.



Slika 33. b) Uvećani dio spektra HMBC NMR makrozona D snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K s označenim korelacijskim signalima ugljika C15 i protona H4''c.

Na temelju podataka dobivenih iz spektra mase i jedno- i dvo-dimenzijskih spekara NMR napravljena je asignacija atoma  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  čiji su kemijski pomaci navedeni u tablici 10.

Tablica 10. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  makrozona D.

Makrozon D					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	-	178,4	<b>4'</b>	1,14; 1,67	29,36
<b>2</b>	2,79	45,32	<b>5'</b>	3,69	67,80
<b>2Me</b>	1,19	14,50	<b>5'Me</b>	1,19	21,12
<b>3</b>	4,29	78,16	<b>1''</b>	4,95	95,28
<b>4</b>	2,01	41,95	<b>2''</b>	1,58; 2,36	34,93
<b>4Me</b>	1,07	8,68	<b>3''</b>	-	73,79
<b>5</b>	3,59	83,31	<b>3''OMe</b>	3,28	49,07
<b>6</b>	-	73,54	<b>3''Me</b>	1,25	20,82
<b>6OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>4''</b>	2,89	87,47
<b>6Me</b>	1,30	27,08	<b>4''a</b>	3,74; 3,86	73,11
<b>7</b>	1,43; 1,63	42,0	<b>4''b</b>	1,87	29,68

<b>8</b>	2,03	26,27	<b>4''c</b>	3,41; 3,61	38,35
<b>8Me</b>	0,93	21,49	<b>4''d</b>	7,53	-
<b>9</b>	2,32; 2,54	68,43	<b>5''</b>	4,32	64,58
<b>9a</b>	2,37	35,75	<b>5''Me</b>	1,31	18,40
<b>10</b>	2,87	62,39	<b>15</b>	-	165,8
<b>10Me</b>	1,11	7,28	<b>16</b>	-	135,96
<b>11</b>	3,61	74,36	<b>17, 21</b>	7,97	127,58
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>18, 20</b>	7,90	127,24
<b>12</b>	-	74,35	<b>19</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>22</b>	8,03	141,51
<b>12Me</b>	1,08	16,41	<b>22a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>13</b>	4,81	76,86	<b>23</b>	-	178,18
<b>14</b>	1,47; 1,86	20,97	<b>23a</b>	8,09	-
<b>14Me</b>	0,88	10,54	<b>24</b>	3,62; 3,86	48,04
<b>1'</b>	4,53	102,46	<b>25</b>	4,15	77,06
<b>2'</b>	3,14	70,82	<b>26</b>	1,65; 2,00	28,39
<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>27</b>	1,91	25,37
<b>3'</b>	2,55	65,41	<b>28</b>	3,75; 3,88	67,68
<b>3'NMe</b>	2,23	39,55			

### 4.3. Biološka aktivnost

Napravljena je antibakterijska aktivnost *in vitro* za novopripravljene makrozone 4''A, 4''B, 4''C i 4''D određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) prema standardnim protokolima (CLSI, engl. *Clinical Laboratory Standards Institute*). Spojevi su testirani u rasponu koncentracija od 0,125 µg mL<sup>-1</sup> do 64 µg mL<sup>-1</sup>.

Istražena je bioaktivnost makrozona na neke susceptibilne i rezistentne sojeve koji uzrokuju infekcije dišnih putova (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *K. pneumoaniae*) i druge razne infekcije poput infekcije mokraćnog i probavnog sustava (*S. aureus*, *E. faecalis*,<sup>81</sup> *E. coli*,<sup>82</sup> *K. Pneumoaniae*.<sup>83</sup>) Jedna od najpoznatijih rezistentnih bakterija je zlatni stafilocok, meticilin-rezistentni *S. aureus* (engl. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) koji je razvio otpornost na širok spektar antibiotika.

U tablici 11. prikazane su i uspoređene vrijednosti MIK za makrozone i azitromicin. Za rezistentne sojeve naznačen je mehanizam kojim pokazuju otpornost na antibiotike (cMLS – konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; M – efluks rezistencija na makrolide).

Tablica 11. Minimalna inhibitorna koncentracija, MIK ( $\mu\text{g/mL}$ ) makrozona i azitromicina na neke sojeve bakterija.

		Gram-pozitivne bakterije							Gram-negativne bakterije				Gljive	
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> B0330 (cMLS)	<i>S. aureus</i> B0331 (M)	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i> B0326 (M)	<i>S. pneumoniae</i> B0633 (cMLS)	<i>S. pyogenes</i> B0542	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7752
		MIK ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )												
Azitromicin		2	>64	>64	<0.125	8	>64	<0.125	8	4	32	8	64	>64
Makrozon	4'' - A	8	64	<b>16</b>	1	8	64	4	<b>2</b>	>64	>64	>64	>64	>64
	4'' - B	4	>64	<b>8</b>	< <b>0.125</b>	<b>2</b>	<b>32</b>	1	<b>2</b>	>64	>64	>64	>64	>64
	4'' - C	8	<b>16</b>	<b>16</b>	1	64	>64	4	<b>4</b>	64	>64	>64	>64	>64
	4'' - D	8	>64	<b>32</b>	< <b>0.125</b>	<b>2</b>	>64	0,5	<b>2</b>	>64	>64	>64	>64	>64

Prema tablici 11. može se uočiti kako neki makrozoni pokazuju bolju, a neki slabiju antibakterijsku aktivnost u odnosu na azitromicin.

Makrozon 4''-A ima izrazito bolju aktivnost od azitromicina na rezistentni soj *S. aureus* B0331 (M). i soj *E. faecalis* ATCC 29212. Međutim, makrozon 4''-A, kao i azitromicin, nije pokazao značajniju aktivnost na sojeve bakterija koje posjeduju konstitutivnu rezistenciju (*S. aureus* B0330, *S. pneumoniae* B0633). Nadalje, vrlo dobra biološka aktivnost ( $1-8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dobivena je za sojeve *S. aureus* ATCC 29213, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pneumoniae* B0326 (M), *S. pyogenes* B0542 i *E. faecalis* ATCC 29212, ali nešto slabija za sojeve *S. aureus* B0330 (cMLS), *S. pneumoniae* B0633 (cMLS), *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 17978, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. cerevisiae* ATCC 7752 ( $> 64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Makrozon 4''-B pokazuje daleko najbolju aktivnost od svih testiranih spojeva na rezistentni soj *S. aureus* B0331 (M). Za taj zlatni stafilokok bioaktivnost je čak osam puta veća od bioaktivnosti azitromicina. Ujedno je povećana antibakterijska aktivnost opažena za rezistentne sojeve *S. pneumoniae* B0326 (M) i *S. pneumoniae* B0633 (cMLS) te za susceptibilni soj *E.*

*faecalis* ATCC 29212. Visoka antimikrobna aktivnost ( $<0,125\text{--}4\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) slična aktivnosti azitromicina dobivena je za *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. pneumoniae* B0326 (M), *S. pyogenes* B0542 i *E. faecalis* ATCC 29212. Makrozon 4''-B nije se pokazao djelotvornim u borbi protiv Gram-negativnih bakterija i Gram-pozitivne rezistentne bakterije *S. aureus* B0330 (cMLS) ( $> 64\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Makrozon 4''-C ima niže vrijednosti MIK od azitromicina na tri bakterije, od toga su dva rezistentna soja (*S. aureus* B0330 (cMLS), *S. aureus* B0331 (M)) i jedan susceptibilni (*E. faecalis* ATCC 29212). Vrlo dobra bioaktivnost ( $1\text{--}8\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) zabilježena je za *S. aureus* ATCC 29213, *S. pyogenes* B0542, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619. Navedeni makrozon ne pokazuje bioaktivnost na rezistentne sojeve *S. pneumoniae* i Gram-negativne bakterije.

Makrozon 4''-D se pokazao najaktivnijim na rezistentni soj *S. pneumoniae* B0326 (M). Njegova aktivnost je četiri puta veća od aktivnosti azitromicina za navedeni soj. Usporediva ili veća bioaktivnost ( $<0,125\text{--}4\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) od aktivnosti azitromicina dobivena je za rezistentni soj *S. aureus* B0331 (M) i osjetljive sojeve *S. pneumoniae* ATCC 49619, *S. aureus* ATCC 29213, *S. pyogenes* B0542 i *E. faecalis* ATCC 29212. Na Gram-negativne bakterije i konstitutivno rezistentne Gram-pozitivne bakterije nije dobivena značajna aktivnost.

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog rada uspješno su pripravljena četiri nova makrozona, odnosno konjugata azitromicina i tiosemikarbazona. S obzirom na dobru biološku aktivnost tiosemikarbazona i izvrstan farmakokinetički profil azitromicina pripremom makrozona pokušao se proširiti spektar antimikrobne aktivnosti s posebnim naglaskom na rezistentne bakterijske sojeve.

Svi pripremljeni spojevi pročišćeni su tekućinskom kromatografijom, a njihove strukture potvrđene su pomoću jednodimenzijskih i dvodimenzijskih tehnika NMR te spektrometrijom masa.

Nakon pročišćavanja spojeva određena je biološka aktivnost na panelu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Najveći doprinos ovih istraživanja leži u činjenici da su neki od pripremljenih spojeva pokazali odličnu aktivnost na sojeve bakterija koji su razvili rezistenciju na azitromicin. Spojevi 1-naftil-, benzil-, 4-(fluorometoksi)fenil- i tetrahidro-2-furfuril – makrozon (makrozoni A-D) imaju izvrsnu ukupnu biološku aktivnost na Gram-pozitivne bakterije. Posebno treba istaknuti aktivnost makrozona B i D na rezistentni soj *S. pneumoniae* B0326 (M) koja je četiri puta veća od azitromicina, zatim aktivnost makrozona B na rezistentni soj *S. aureus* B0331 (M) koja je osam puta veća od azitromicina. Ističe se i aktivnost makrozona A, B i D na susceptibilni soj *E. faecalis* ATCC 29212 (četiri puta veća od azitromicina). Nadalje, makrozon C (4-(fluorometoksi)fenil-makrozon) je pokazao četiri puta veću aktivnost na rezistentni soj *S. aureus* B0330 (cMLS).

Dobiveni rezultati služe kao dobar temelj za daljnja istraživanja i dizajn novih antibiotika s poboljšanom biološkom aktivnosti.

## § 6. ZAHVALE

Hvala prof. dr. sc. Predragu Novaku na ukazanom povjerenju i vjeri u ovaj rad. Hvala Vam na pruženoj prilici i strpljenju.

Veliko hvala *mojoj* neposrednoj voditeljici mag. chem. Ivani Mikulandri. Hvala na ugodnoj atmosferi, velikom povjerenju i *guštanju* pri izradi ovog rada.

Hvala mag. chem. Ivi Habinovec na ugodnoj atmosferi u 106ici i pomoći kad god je zapelo.

Hvala dr. sc. Mirjani Bukvić i Ivanu Grgičeviću na pomoći pri pročišćavanju spojeva.

Hvala Filipu na satima slušanja o makrolidima, tiosemikarbazonima, makrozonima ili kako bi rekao *onim tvojim stvarima*. Hvala Petri, Emi, Martini i ostalim prijateljima na podršci, razumijevanju i kavama kad je bilo najpotrebnije.

Na kraju, najveće hvala Mami i Tati. Hvala vam na podršci i ljubavi svih ovih godina.



## § 7. LITERATURNI IZVORI

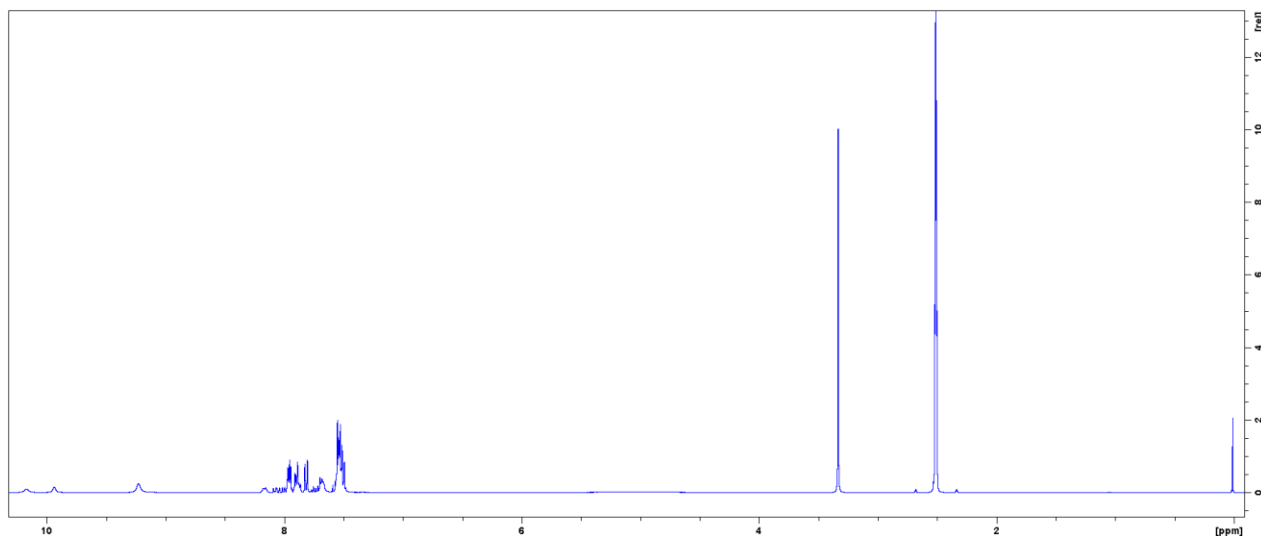
1. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949–960.
2. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662
3. M. Gopalakrishnan et al, *Chem. J.* **42** (2008) 271–276.
4. N. Siddiqui, O. Singh, *Indian J. Pharm. Sci.* **65** (2003) 423–425.
5. T. Plech et al, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 241–248.
6. M. Sheikhy et al, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
7. P. Umadevi et al, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4** (2012) 379–383.
8. A. R. Jalilian et al, *Il Farmaco.* **58** (2003) 63–68.
9. S. J. Siwek et al, *J. Mol. Model.* **18** (2012) 4159–4170.
10. C. Biot et al, *Bioorn. Med. Chem. Lett.* **17** (2007) 6434–6438.
11. D. L. Klayman, J. P. Scovill, J. F. Bratosevich, J. Bruce, *J. Med. Chem.* **26** (1983) 35–39
12. H. J. Zhang et al, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 4702–4708.
13. J. L. Hansen et al, *Mol. Cell.* **10** (2002) 117–128.
14. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *J. Med. Chem.* (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01159>
15. F. Marinelli, O. Genilloud, *Antimicrobials*, Springer–Verlag Berlin Heidelberg, 2014, str. 211–230.
16. A. E. Fohnera, A. Sparreboom, R. B. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **27** (2017) 164–167.
17. B. Arsić, J. Barber, P. Novak, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018.
18. K. Ajito, T. Miura, T. Furuuchi, A. Tamura, *Heterocycles* **89** (2014) 281–352
19. I. Francetić, *Medicus* **17** (2008) 9–14.
20. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, 2019. Geneva: World Health Organization
21. V. Godinić Mikulčić, *Studia lexicographica*, **12** (2018) 33–52.
22. A. Fajdetić et al, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 301–312.
23. S. Ma et al, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
24. S. T. Waddell et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8** (1998) 1321–1326.
25. S. Ma et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 1698–1701.
26. I. P. Jakopović et al, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6578–6588.

27. S. Kapic et al, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 7270–7280.
28. C. Ma et al, *J. Antibiot.* **63** (2010) 3–8.
29. X. Li et al. *Eur. J. Med. Chem.* **59** (2013) 209–217.
30. M. Yan et al, *Eur. J. Med. Chem.* **103** (2015) 506–515.
31. L. Zhang et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **23** (2013) 5057–5060.
32. Y. Wang et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **27** (2017) 3872–3877.
33. A.N. Tevyashova et al, *J. Antibiot.* **72** (2019) 22.
34. A.N. Tevyashova et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **29** (2019) 276–280.
35. P. Novak, T. Jednačak, *NMR Spectroscopy for studying interactions of bioactive molecules*, str. 217–220.
36. M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Trends Biochem. Sci.* **32** (2007) 20–26.
37. F. Franceschi, E. M. Duffy, *Biochem. Pharmacol.* **71** (2006) 1016–1025.
38. J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nature reviews. Microbiology.* **3** (2005) 870–881.
39. R. H. Drews, H. A. Gallis, *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **13** (2012) 634–639.
40. K. W. Garey, G. W. Amsden, *Ann Pharmacother.* **33** (1999) 218–228.
41. A. D. Petropoulos et al, *J. Mol. Biol.* **385** (2009) 1179–1192.
42. [https://bib.irb.hr/datoteka/393529.F15\\_poglavlje.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/393529.F15_poglavlje.pdf) (datum pristupa 5. ožujka 2020.)
43. L. H. Hansen, P. Mauvais, S. Douthwaite, *Mol. Microbiol.* **31** (1999) 623–631.
44. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics* **5** (2016) 29.
45. <https://basicbiology.net/micro/microorganisms/bacteria> (datum pristupa 1. lipnja 2020.)
46. <https://www.adiva.hr/zdravlje/lijekovi-i-terapije/antimikrobna-rezistencija-jedna-od-najvecih-prijetnji-ljudskom-zdravlju/> (datum pristupa 28. ožujka 2020.)
47. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (datum pristupa 28. ožujka 2020.)
48. J. C. Pechere, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18** (2001) 25–28.
49. B. Weisblum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **39** (1995) 577–585.
50. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270.
51. M. Karlsson, C. Fellström, K. E. Johansson, A. Franklin, *Microb. Drug. Resist.* **10** (2004) 204–208.
52. N. Davydova, V. Streltsov, M. Wilce, A. Liljas, M. Garber, *J. Mol. Biol.* **322** (2002) 635–644.

53. J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemother.* **48** (2001) 5–16.
54. B. Bedenić, *Antibakterijski lijekovi*, Štamparija Fojnica d.o.o., str. 221–251.
55. I. Kuzman, *Infektološki glasnik* **25** (2005) 29–40.
56. S. A. Khan, A. M. Asiri, K. Al-Amry, M. A. Malik, *Sci. World J.* (2014) <https://doi.org/10.1155/2014/592375>
57. N. Suvarapu, A. R. Somala, J. R. Koduru, S. O. Baek, V. R. Ammireddy, *Asian J. Chem.* **24** (2012) 1889–1898.
58. R. B. Singh, B. S. Garg, R. P. Singh, *Talanta* **253** (1978) 619–632.
59. D. P. Bendito, F. Pino, *Mikrochim. Acta* **1** (1976) 613–622.
60. E. Vareda, A. Rios, M. Valcarcel, *Analyst* **122** (1997) 85–88.
61. A. Balaban, M. Sekerci, B. Erk, *Synth. React. Inorg. Met.–Org. Chem.* **33** (2003) 1775–1786.
62. K. J. Reddy, J. R. Kumar, C. Ramachandraiah, T. Trivieni, A. V. Reddy, *Food. Chem.* **101** (2007) 585–591.
63. A. P. Kumar, P. R. Reddy, V. K. Reddy, Y. I. Lee, *Anal. Lett.* **42** (2009) 84–93.
64. H. Kato, N. Ban, S. Kawai, T. Ohno, *Bunseki Kagaku* **20** (1971) 1315–1318.
65. M. Deguchi, A. Odachi, K. Morishige, I. Okumura, K. Yamaguchi, *Bunseki Kagaku* **31** (1982) 212–214
66. Y. N. Bhatt, K. K. Patel, K. J. Shah, R. S. Patel, *J. Indian Chem. Soc.* **52** (1975) 1035–1040.
67. Y. N. Bhatt, K. K. Patel, K. J. Shah, R. S. Patel, *J. Indian Chem. Soc.* **52** (1975) 1214–1220.
68. R. A. Finch, M. C. Liu, S. P. Grill, W. C. Rose, R. Loomis, K. M. Vasquez, Y. C. Cheng, A. C. Sartorelli, *Biochem. Pharmacol.* **59** (2000) 983–991.
69. P. Bindu, M. R. Prathapachandra Kurup, T. R. Satyakeerty, *Polyhedron* **18** (1999) 321–331.
70. A. Altun, M. Kumru, A. Dimoglo, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **535** (2001) 235–246
71. L. Tripathi, R. Singh, *Asian J. Chem.* **23** (2011) 447–450.
72. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
73. R. W. Brockman, R. W. Sidwell, G. Arnett, S. Shaddix, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133** (1970) 609–614.
74. J. Shao, B. Zhou, A. J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, *Mol. Cancer Ther.* **5** (2006) 586–592.

75. I. H. Hall, C. B. Lackey, T. D. Kistler, R. W. Jr. Durham, E. M. Jouad, M. Khan, X. D. Thanh, S. Djebbar–Sid, O. Benali–Baitich, G.M. Bouet, *Pharmazie* **55** (2000) 937–941.
76. J. A. Ludwig, G. Szakács, S. E. Martin, B. F. Chu, C. Cardarelli, Z. E. Sauna, N. J. Caplen, H. M. Fales, S. V. Ambudkar, J. N. Weinstein, M. M. Gottesman, *Cancer Res.* **66** (2006) 4808–4815.
77. C. Wu, S. Shukla, A. M. Calcagno, M. D. Hall, M. M. Gottesman, S. V. Ambudkar, *Mol. Cancer Ther.* **6** (2007) 3287–3296.
78. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013
79. S. Ma et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 1698–1701.
80. S. Ma et al, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
81. <https://www.healthline.com/health/enterococcus-faecalis#symptoms> (datum pristupa 2. lipnja 2020.)
82. <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html> (datum pristupa 2. lipnja 2020)
83. <https://www.kb-merkur.hr/userfiles/pdfs/Djelatnost/Jedinica%20za%20kvalitetu/informativni%20letci/KP%20Klebsiella%20pneumoniae%20letak.pdf> (datum pristupa 2. lipnja 2020.)

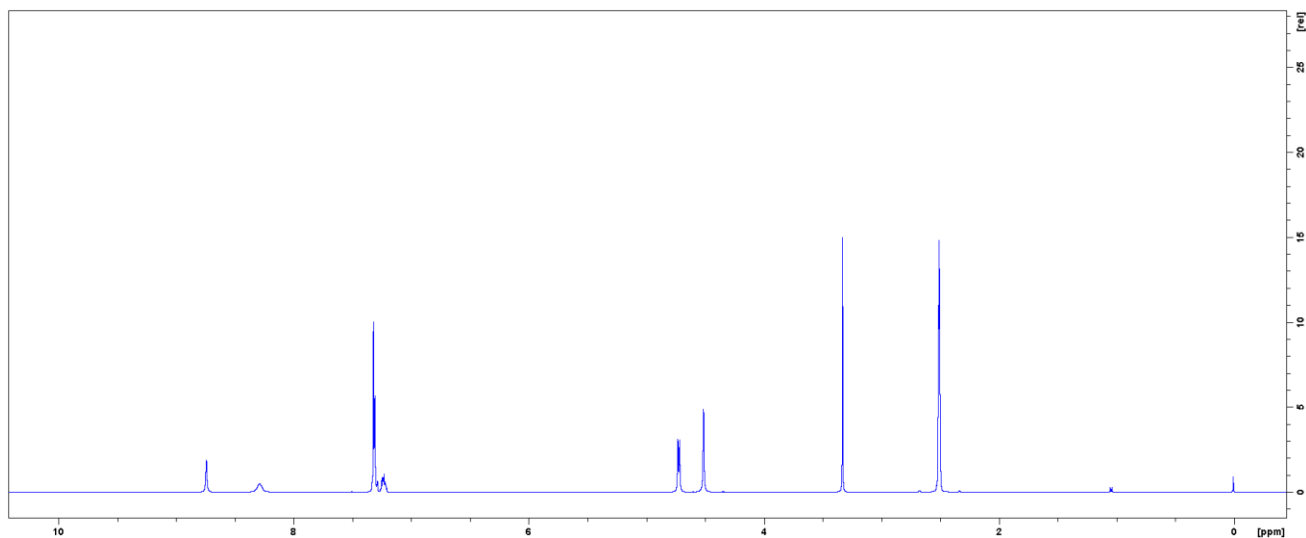
## § 8. DODATAK



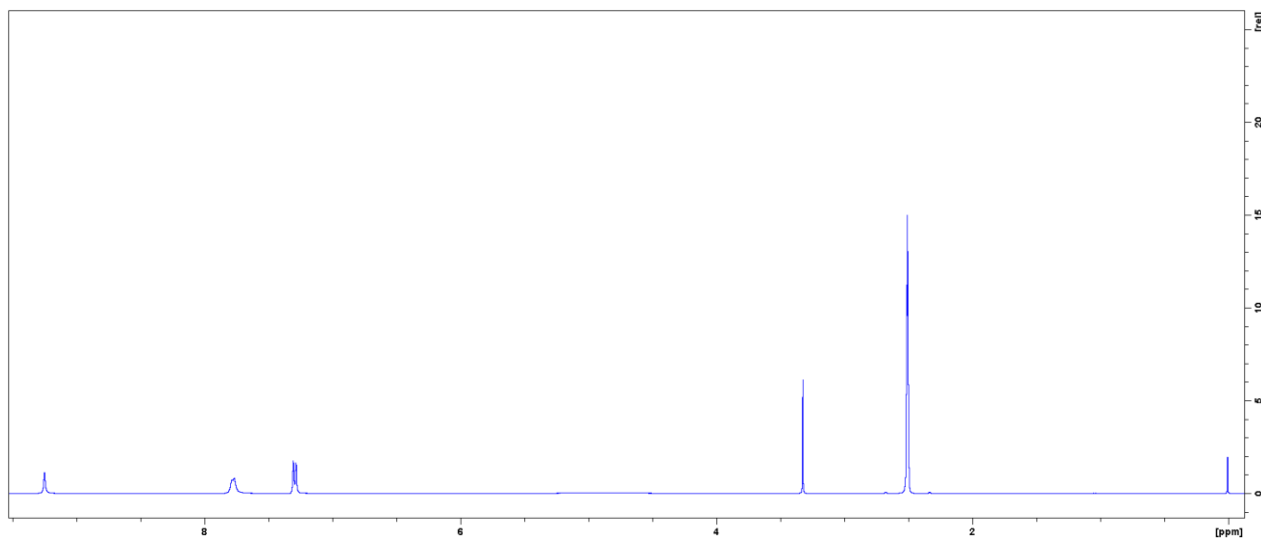
D1. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazida A snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.

D2. Assignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  tiosemikarbazida A.

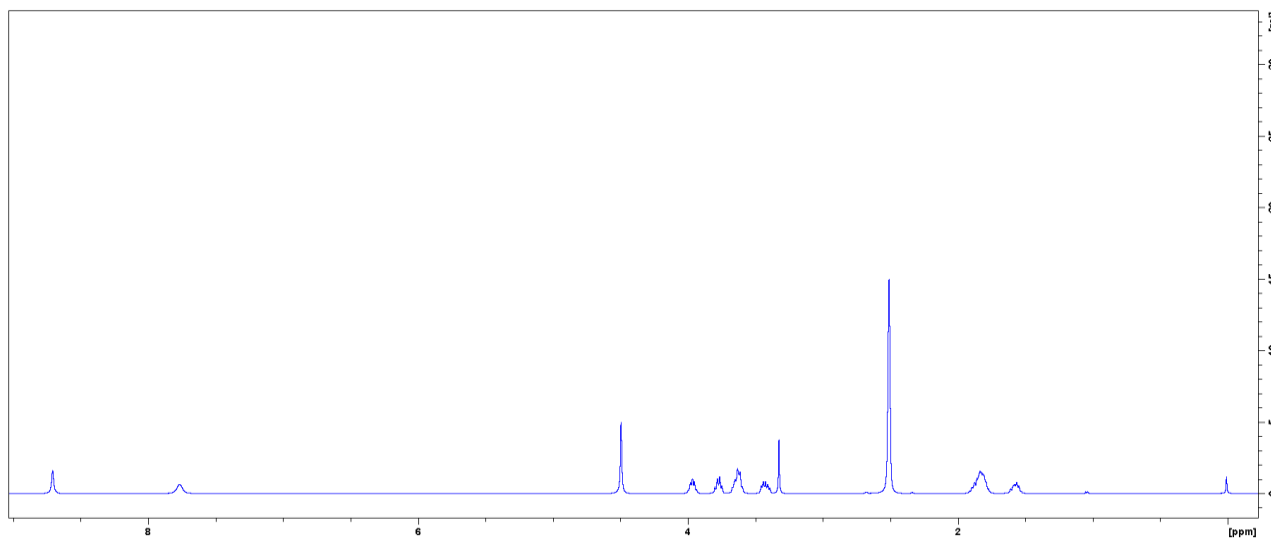
Tiosemikarbazid A	
Atom	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) / ppm
1	9,23
2	10,18
3	9,34
4	7,96
5	7,90
6	7,81
7, 8, 9, 10	7,54

D3. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazida B snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.D4. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  tiosemikarbazida B.

Tiosemikarbazid C	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	_a
2	8,74
3	8,30
4	4,73
5, 9	7,31
6, 8	7,30
7	7,24

D5. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazida C snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.D6. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  tiosemikarbazida C.

Tiosemikarbazid C	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	_a
2	_a
3	9,26
4, 7	7,78
5, 6	7,30

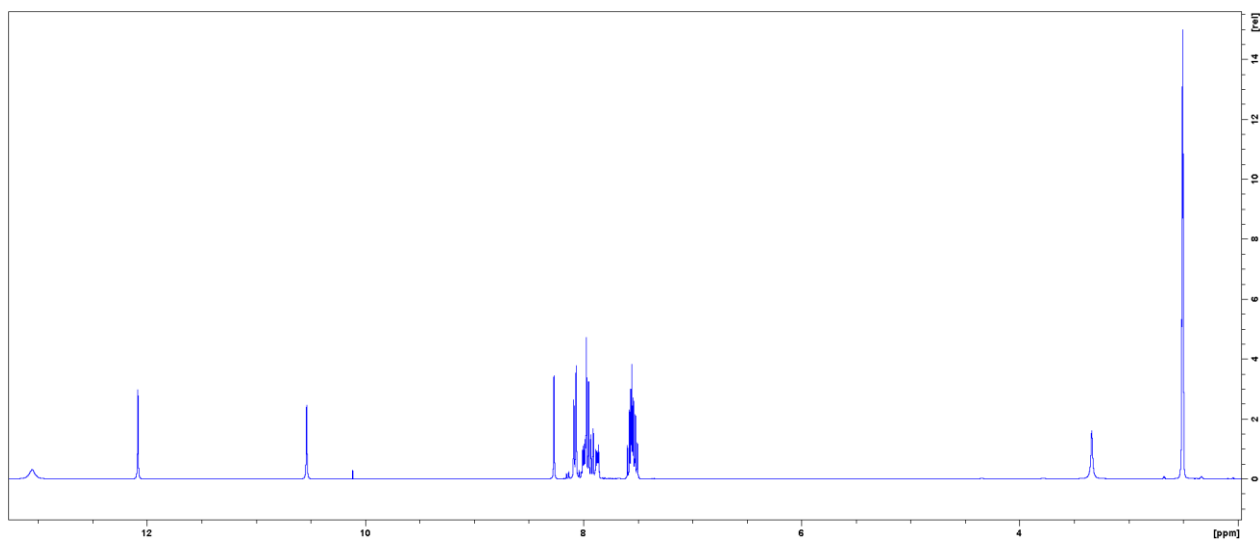


D7. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazida D snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.

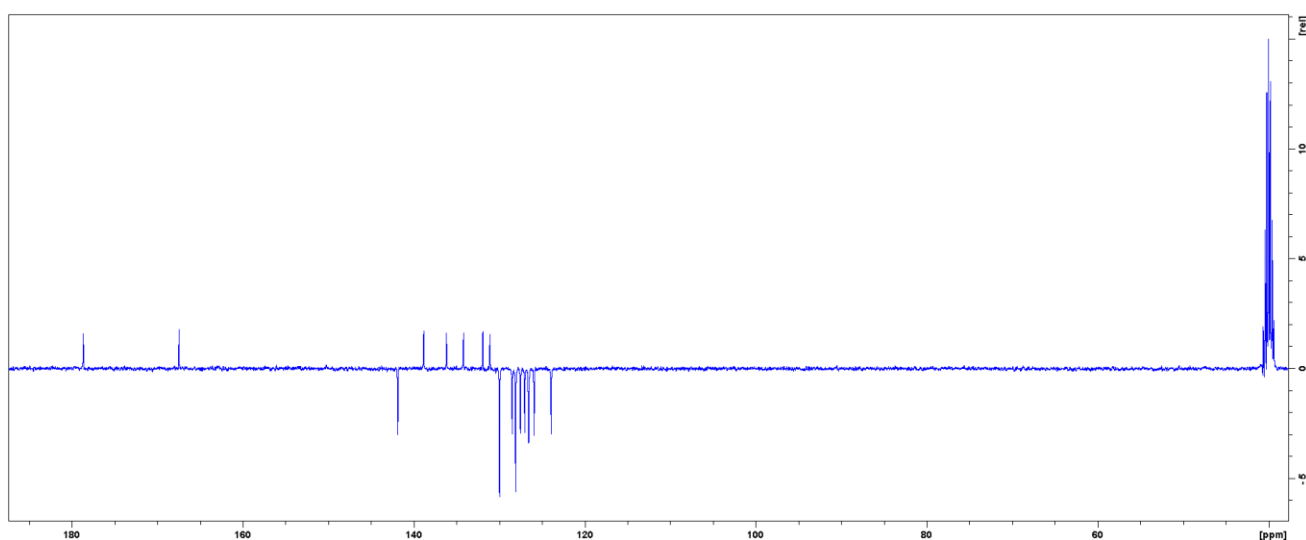
D8. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  tiosemikarbazida D.

Tiosemikarbazid D	
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$
1	4,50
2	8,70
3	7,77
4	3,43; 3,63
5	3,97
6	1,57; 1,83
7	1,83
8	3,61; 3,76

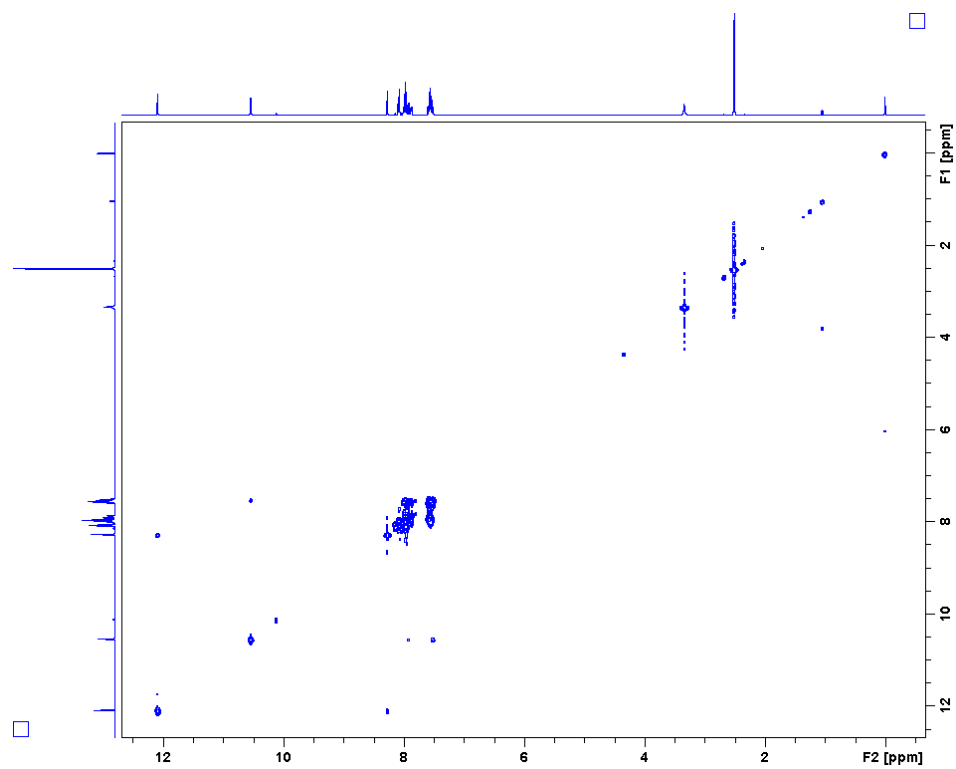
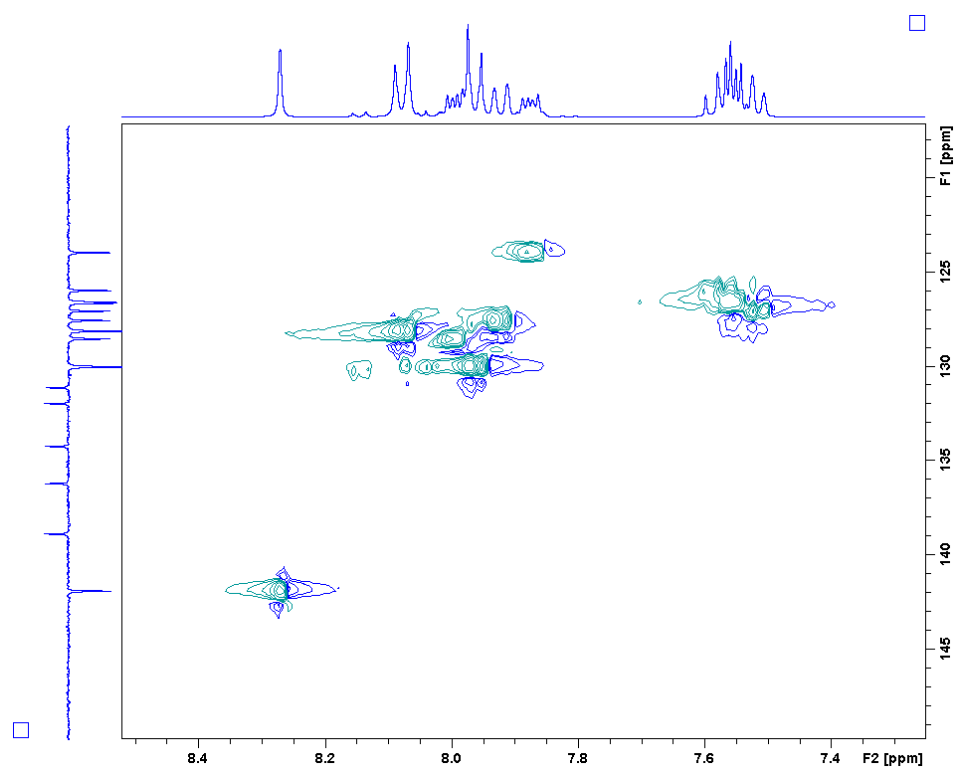


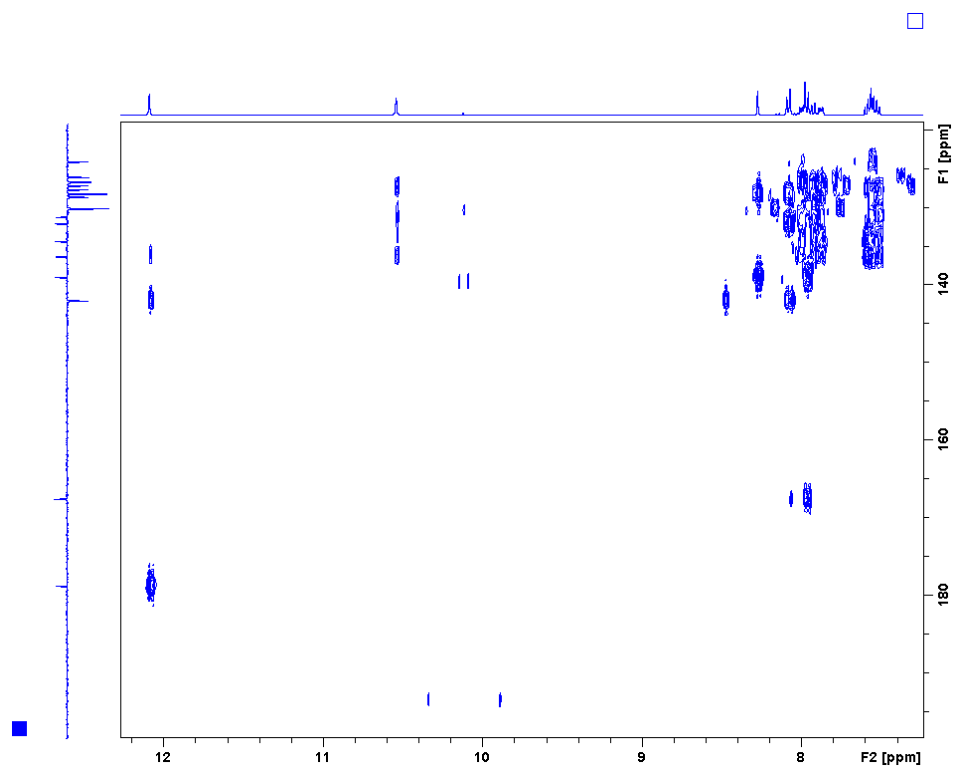


D9. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona A snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.

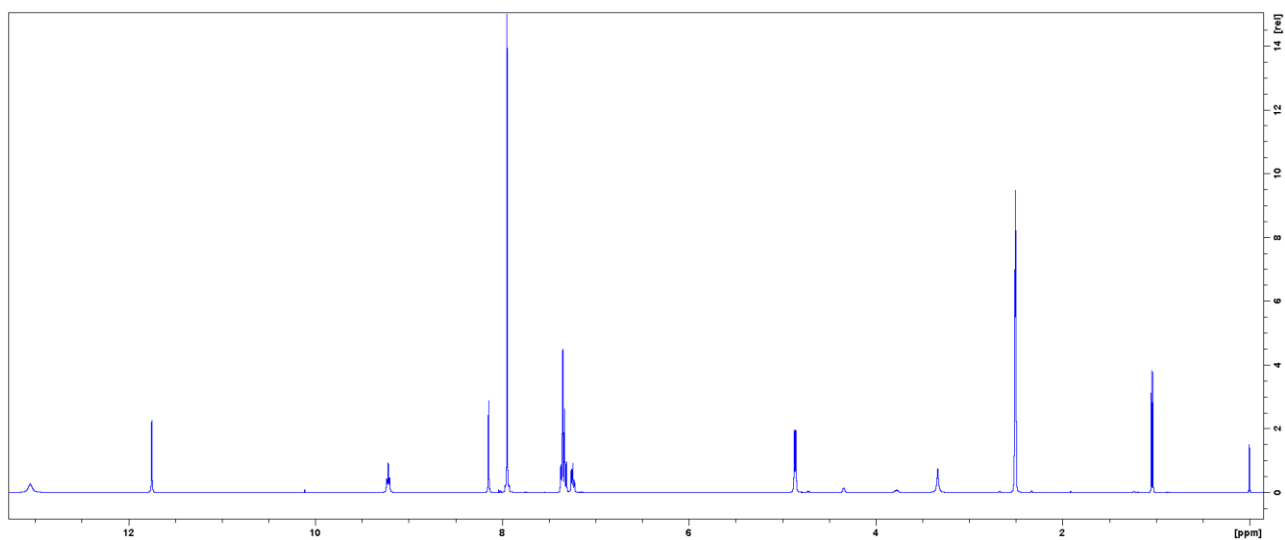
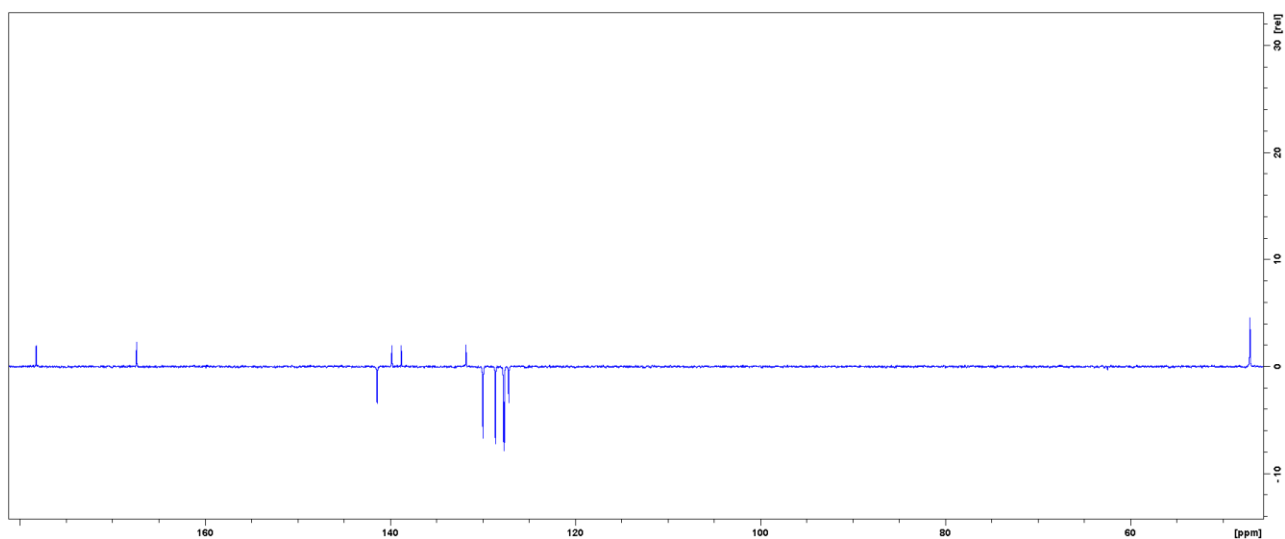


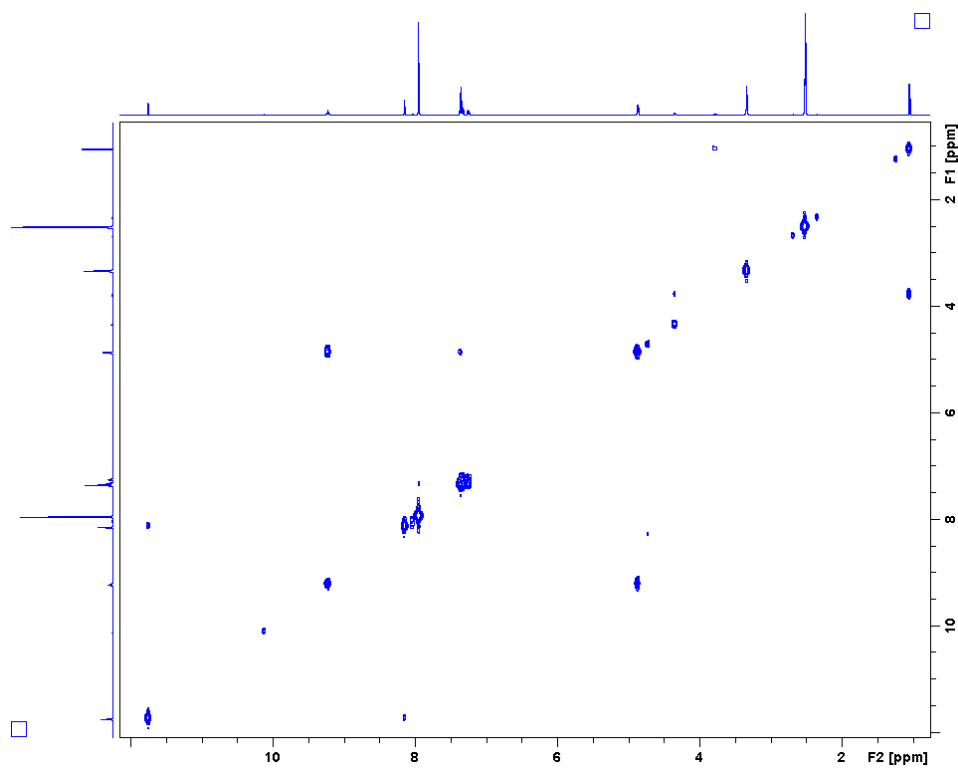
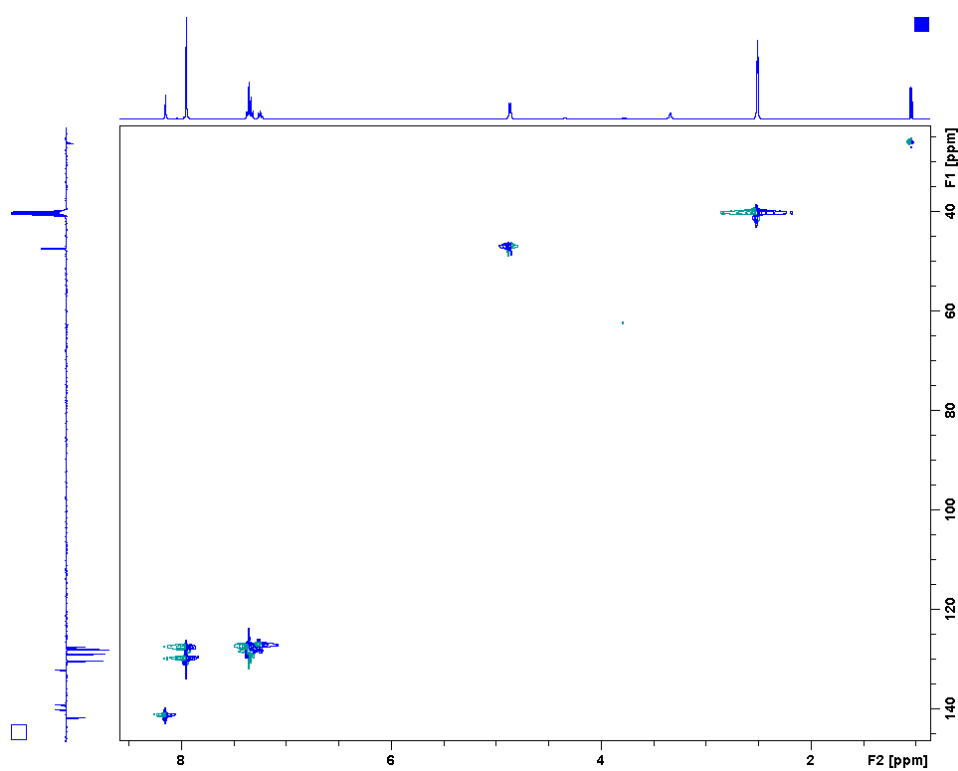
D10. Spektar DEPT-Q tiosemikarbazona A snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.

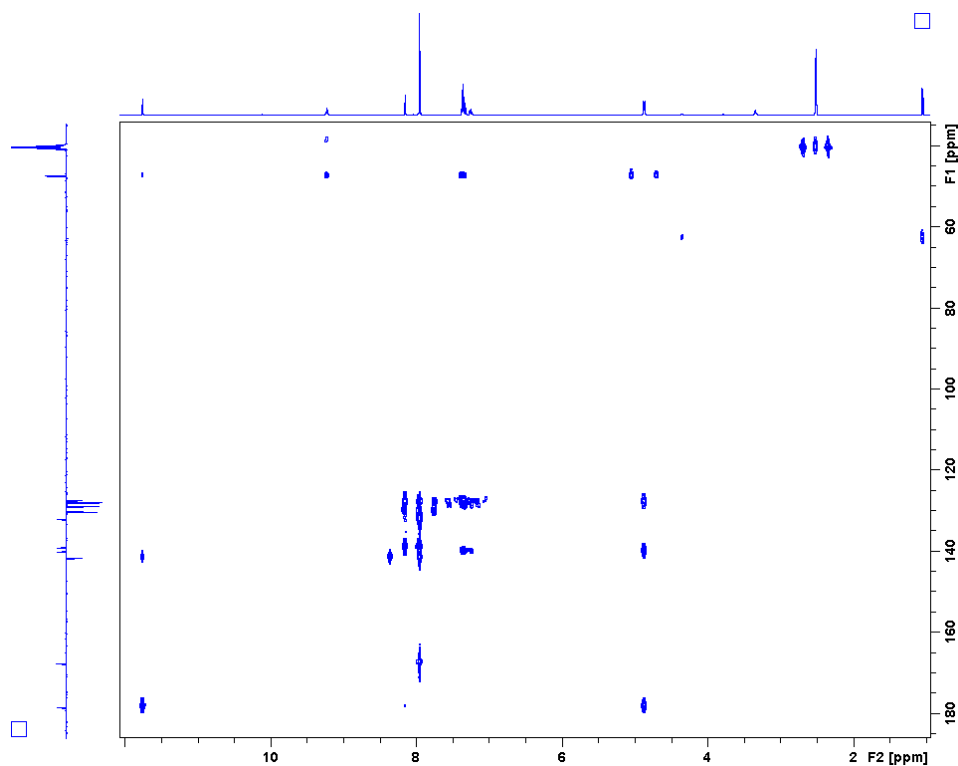
D11. Spektar COSY tiosemikarbazona A snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.D12. Spektar HSQC tiosemikarbazona A snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.

D13. Spektar HMBC tiosemikarbazona A snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.D14. Asignacija kemijskih pomaka <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR tiosemikarbazona A.

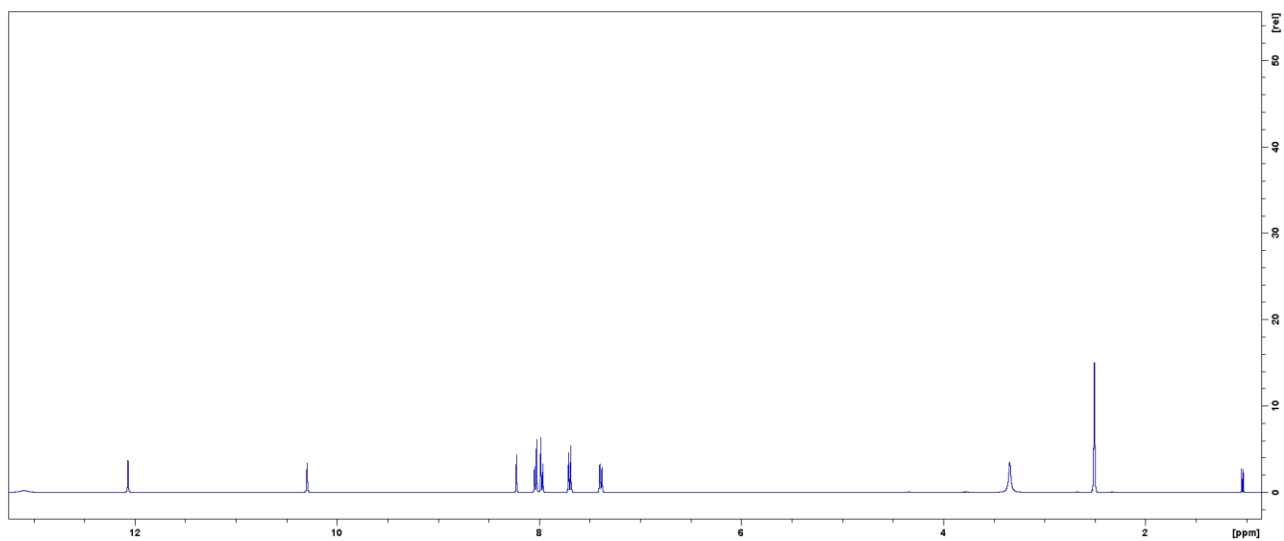
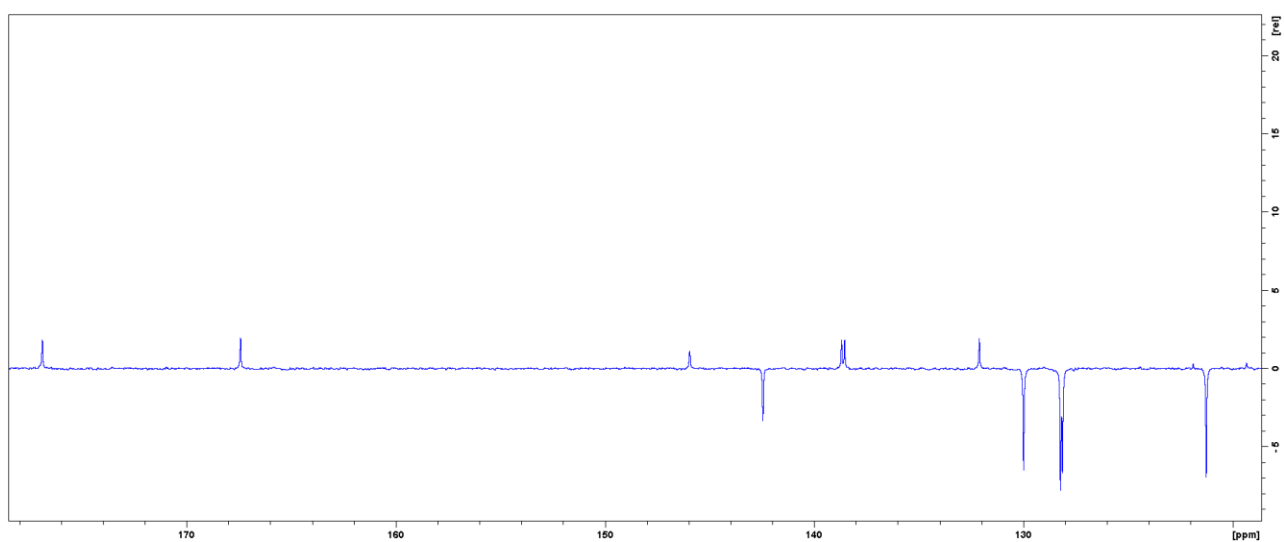
Tiosemikarbazon A					
Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm	Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm
<b>1</b>	-	167,45	<b>10</b>	-	136,1
<b>1a</b>	13,04	-	<b>11</b>	7,51	127,51
<b>2</b>	-	132,1	<b>12</b>	7,84	123,92
<b>3, 7</b>	8,08	128,07	<b>13</b>	7,92	127,52
<b>4, 6</b>	7,92	129,97	<b>14</b>	-	131,07
<b>5</b>	-	138,8	<b>15</b>	7,52	127,01
<b>8</b>	8,27	141,87	<b>16, 17</b>	7,55	126,56
<b>8a</b>	12,07	-	<b>18</b>	7,59	125,93
<b>9</b>	-	178,66	<b>19</b>	-	136,17
<b>9a</b>	10,53	-			

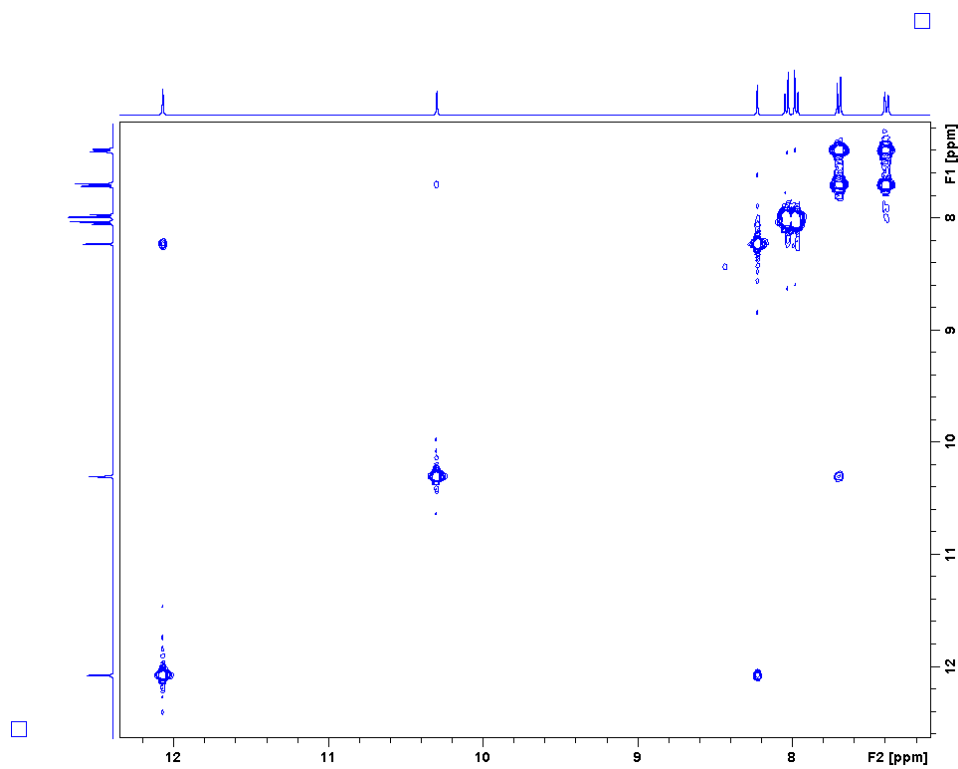
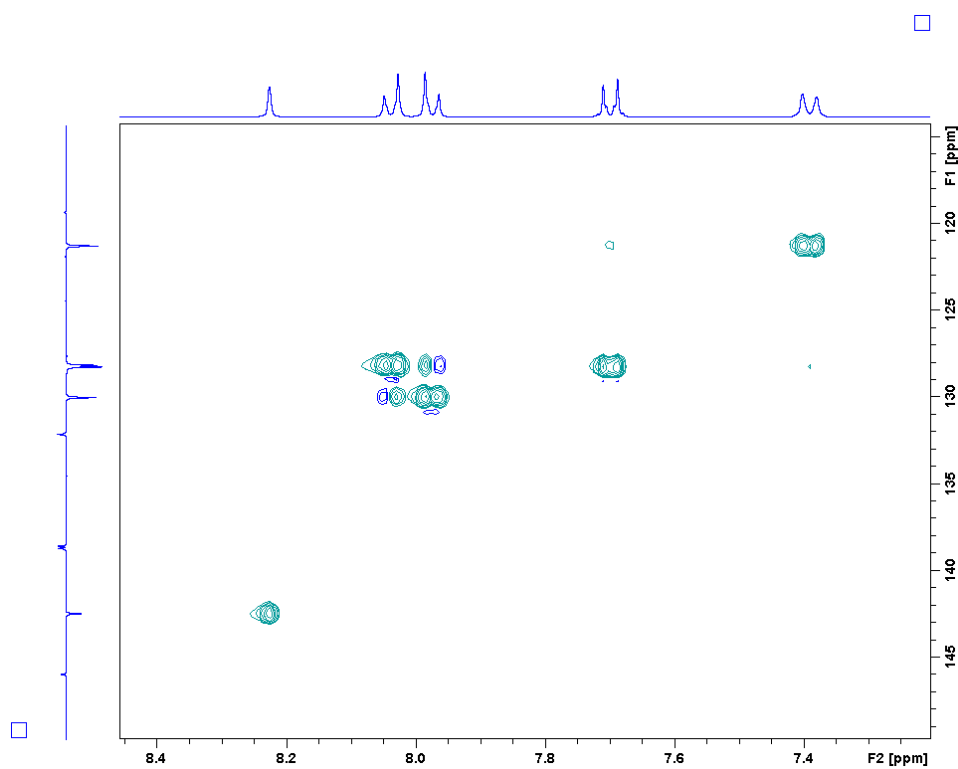
D15. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona B snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.D16. Spektar DEPT-Q tiosemikarbazona B snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.

D17. Spektar COSY tiosemikarbazona B snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.D18. Spektar HSQC tiosemikarbazona B snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.

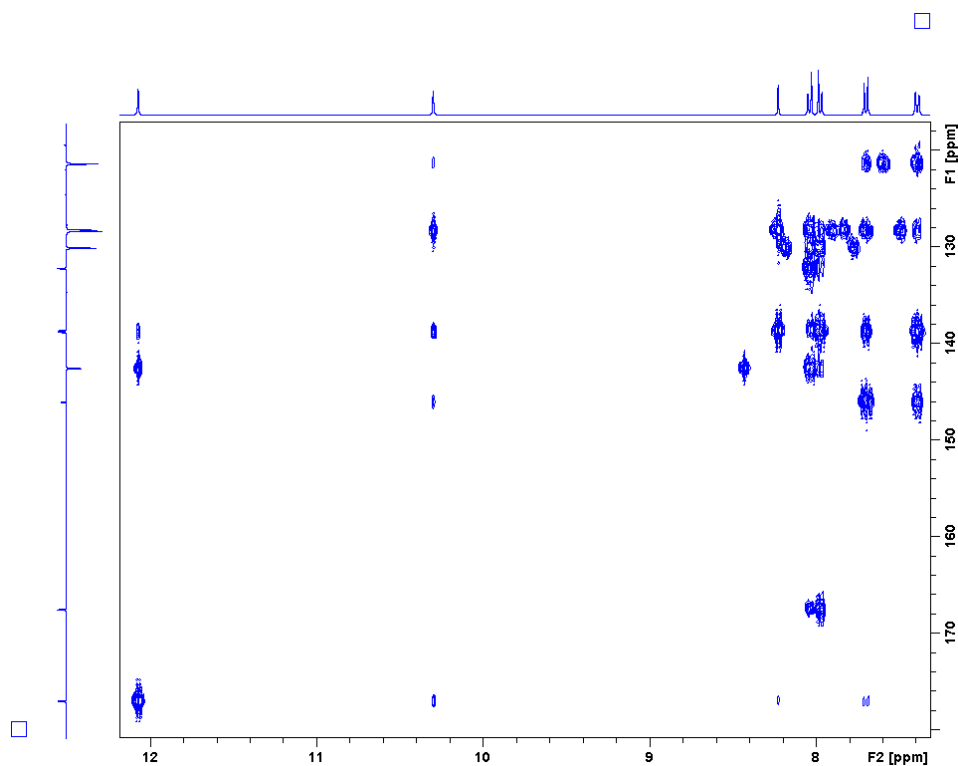
D19. Spektar HMBC tiosemikarbazona B snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.D20. Asignacija kemijskih pomaka <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR tiosemikarbazona B

Tiosemikarbazon B					
Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm	Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm
<b>1</b>	-	167,44	<b>9</b>	-	178,27
<b>1a</b>	13,05	-	<b>9a</b>	9,21	-
<b>2</b>	-	131,79	<b>10</b>	4,87	47,11
<b>3, 7</b>	7,94	129,96	<b>11</b>	-	139,85
<b>4, 6</b>	7,94	127,72	<b>12, 16</b>	7,36	127,73
<b>5</b>	-	138,76	<b>13, 15</b>	7,34	128,65
<b>8</b>	8,14	141,43	<b>14</b>	7,25	127,23
8a	11,75	-			

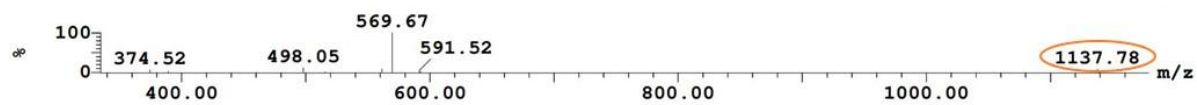
D21. Spektar  $^1\text{H}$  NMR tiosemikarbazona C snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.D22. Spektar DEPT-Q tiosemikarbazona C snimljen u  $\text{DMSO-d}_6$  pri 298K.

D23. Spektar COSY tiosemikarbazona C snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.D24. Spektar HSQC tiosemikarbazona C snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.

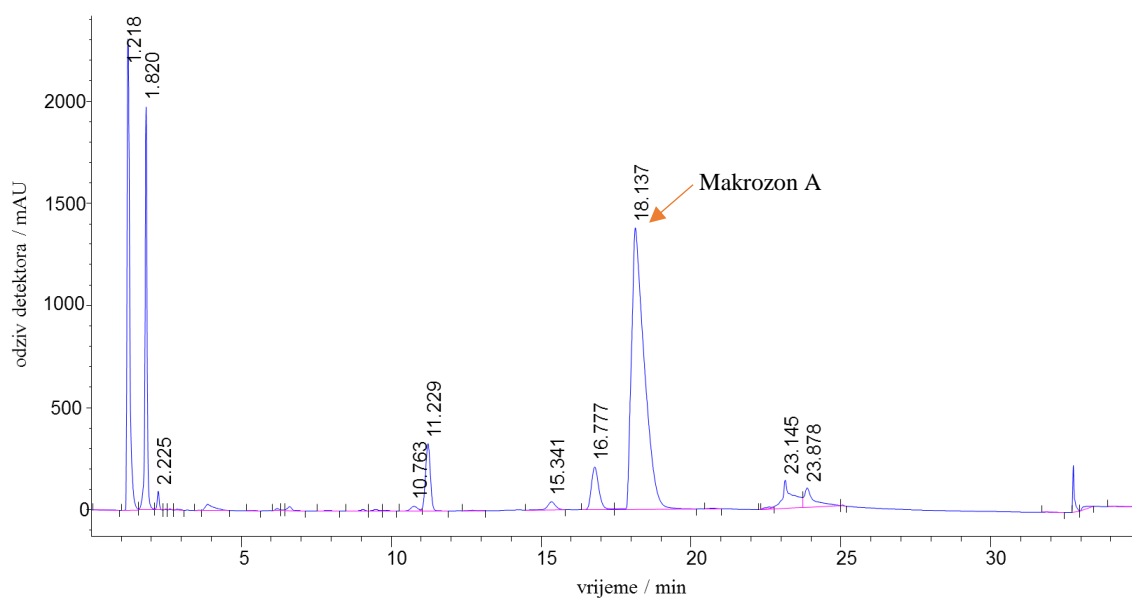


D25. Spektar HMBC tiosemikarbazona C snimljen u DMSO-d<sub>6</sub> pri 298K.D26. Asignacija kemijskih pomaka <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR tiosemikarbazona C.

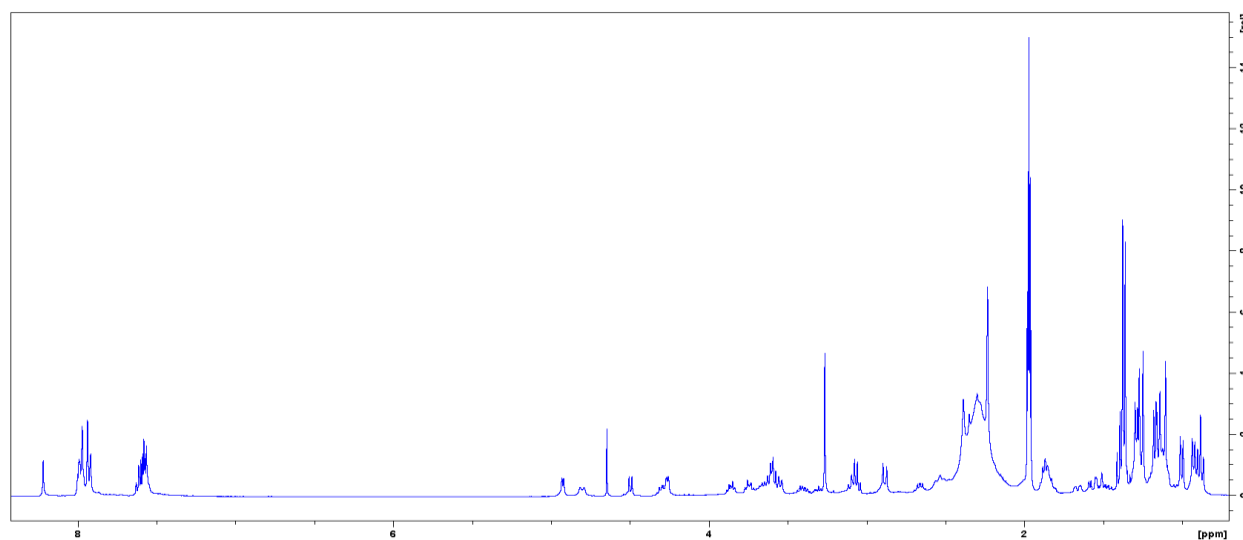
Tiosemikarbazon C					
Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm	Atom	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) / ppm	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) / ppm
<b>1</b>	-	167,30	<b>9</b>	-	177,02
<b>1a</b>	13,10	-	<b>9a</b>	10,30	-
<b>2</b>	-	132,13	<b>10</b>	-	138,74
<b>3, 7</b>	7,98	130,15	<b>11, 15</b>	7,70	128,23
<b>4, 6</b>	8,04	128,23	<b>12, 14</b>	7,39	121,24
<b>5</b>	-	138,56	<b>13</b>	-	146,10
<b>8</b>	8,23	142,65	<b>16</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>8a</b>	12,09	-			

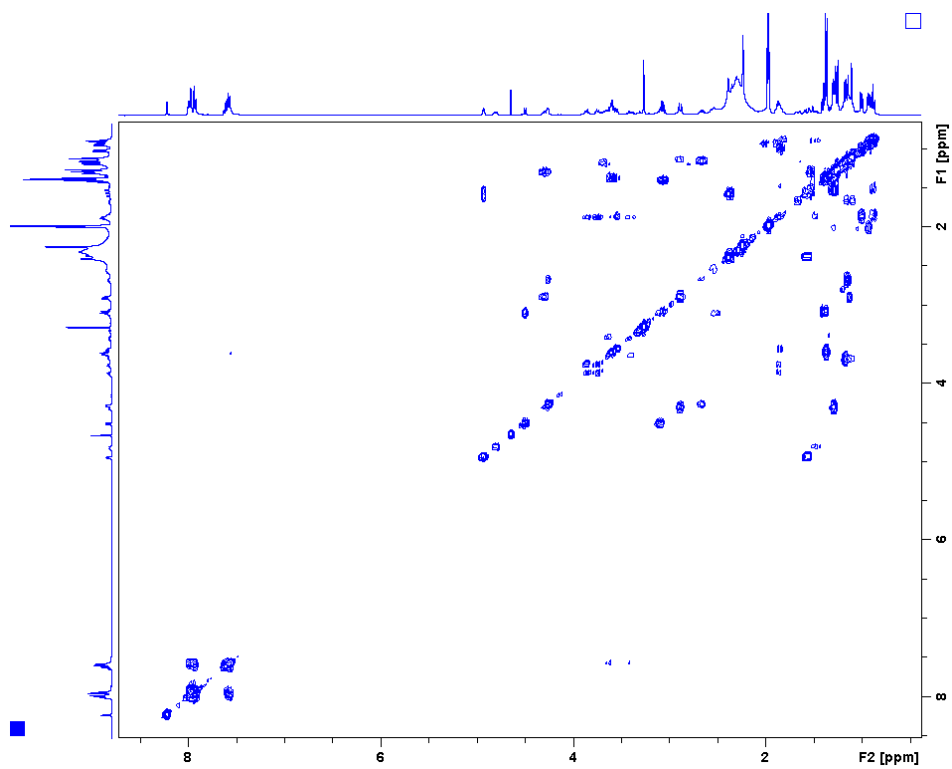
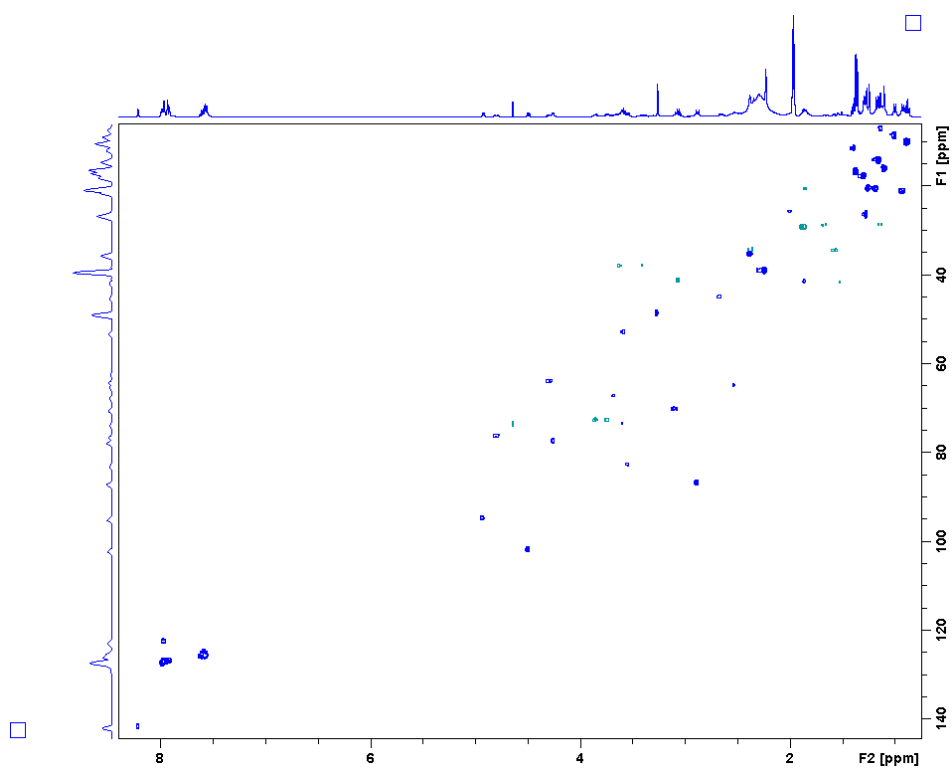


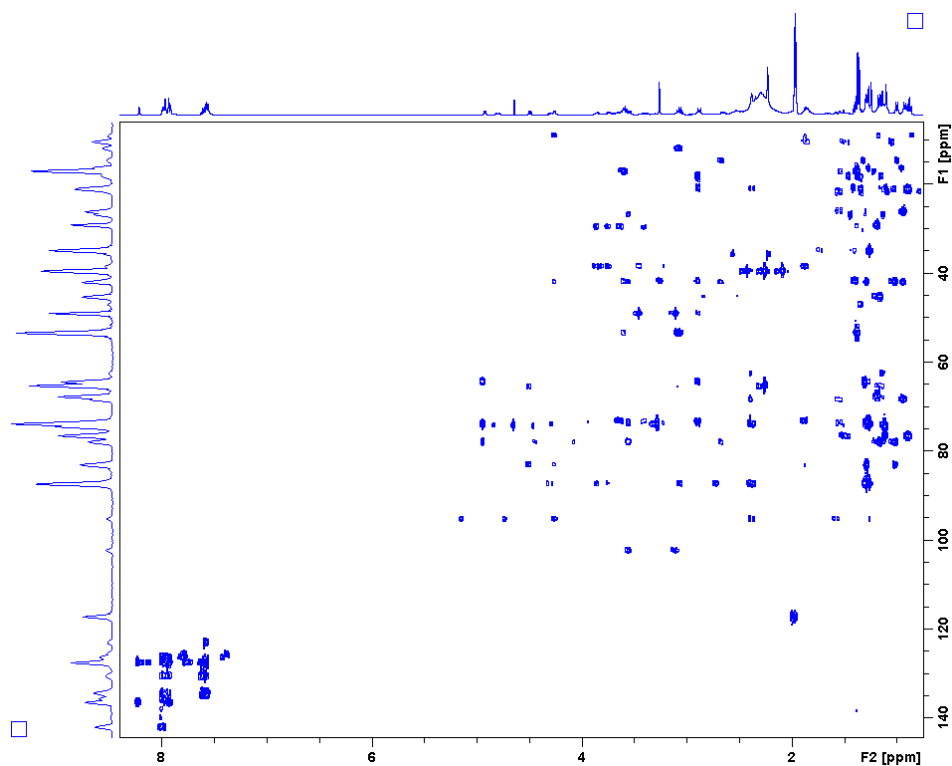
D27. Spektar ESI-MS makrozona A snimljen u pozitivnom modu.



D28. Kromatogram reakcijske smjese makrozona A.

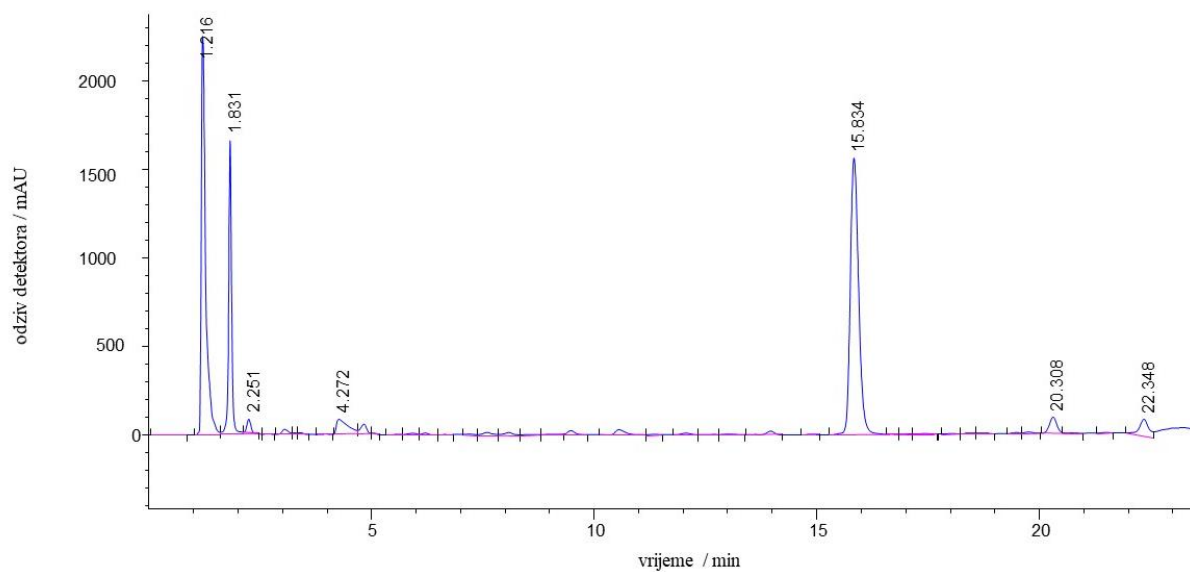
D29. Spektar  $^1\text{H}$  makrozona A snimljen u acetonitrilu- $\text{d}_3$  pri 298K.

D30. Spektar COSY makrozona A snimljen u acetonitrilu-d<sub>3</sub> pri 298K.D31. Spektar HSQC makrozona A snimljen u acetonitrilu-d<sub>3</sub> pri 298K.

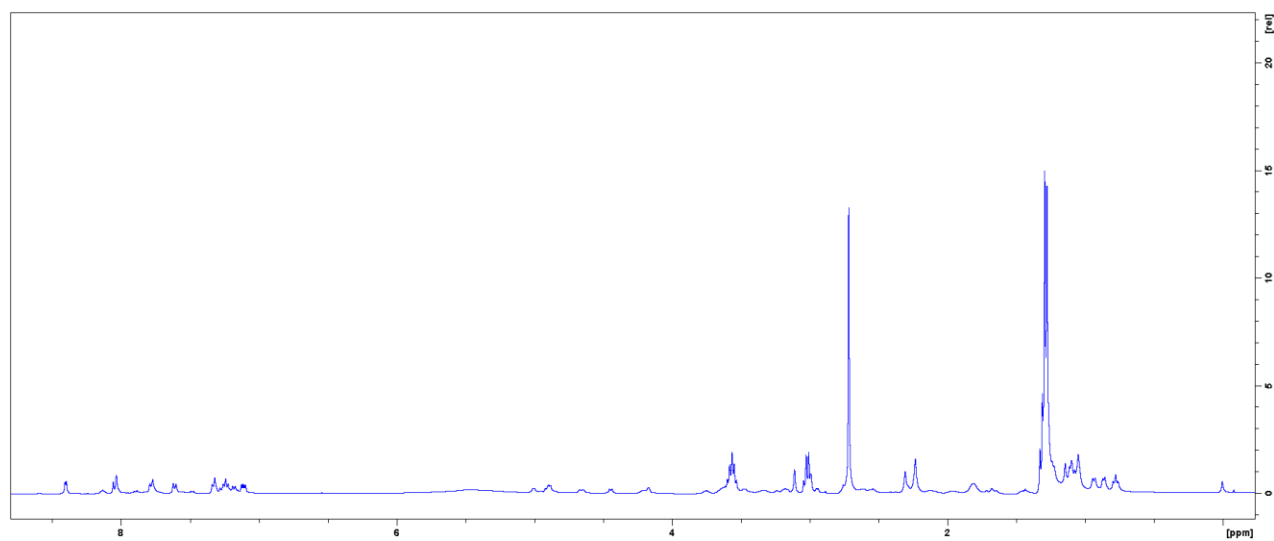
D32. Spektar HMBC makrozona A snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K.D33. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  makrozona A.

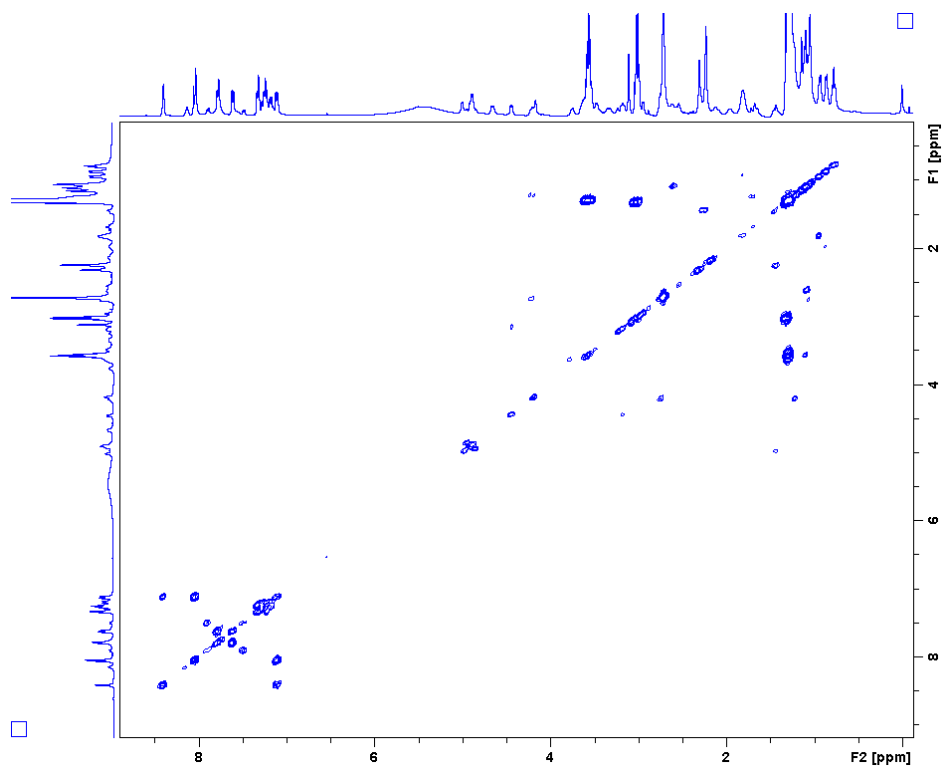
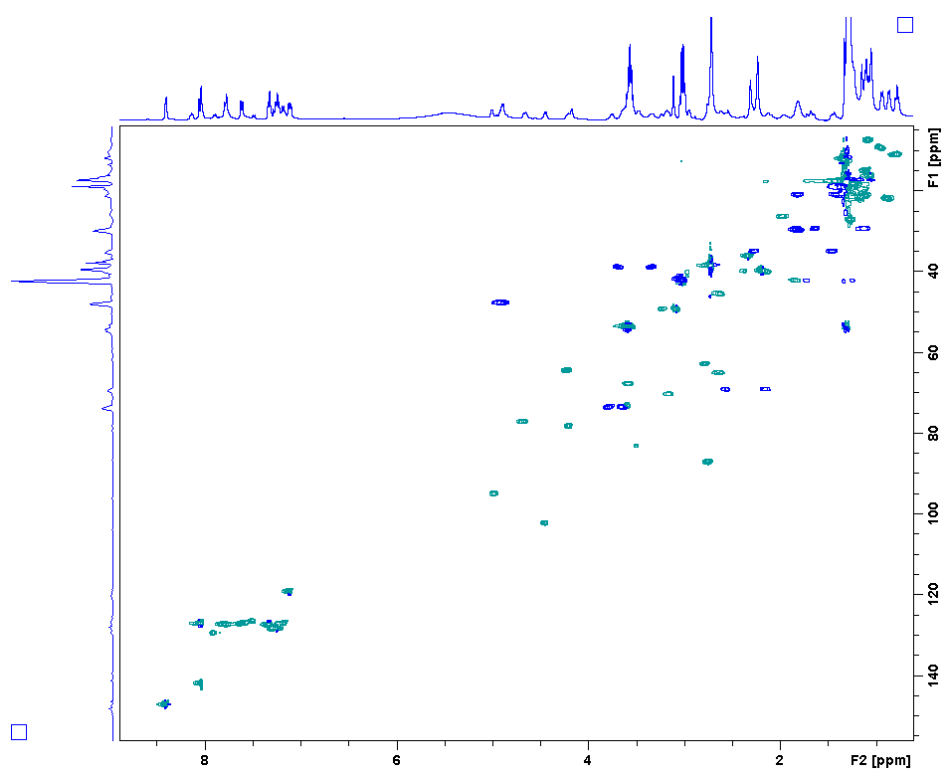
Makrozon A					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	-	178,4	<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,24	39,82
<b>2</b>	2,68	45,36	<b>4'</b>	1,14; 1,67	29,14
<b>2Me</b>	1,15	12,00	<b>5'</b>	3,68	67,78
<b>3</b>	4,26	78,23	<b>5'Me</b>	1,17	21,07
<b>4</b>	1,87	41,89	<b>1''</b>	4,93	95,27
<b>4Me</b>	1,01	9,00	<b>2''</b>	2,38; 1,56	34,74
<b>5</b>	3,55	83,26	<b>3''</b>	-	73,79
<b>6</b>	-	73,73	<b>3''OMe</b>	3,28	49,08
<b>6OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>3''Me</b>	1,24	21,02
<b>6Me</b>	1,28	26,82	<b>4''</b>	2,89	87,19
<b>7</b>	1,29	42,04	<b>4''a</b>	3,86; 3,74	73,21
<b>8</b>	2,00	26,38	<b>4''b</b>	1,87	29,8
<b>8Me</b>	0,93	21,47	<b>4''c</b>	3,65; 3,43	38,32
<b>9</b>	2,55; 2,33	68,45	<b>4''d</b>	7,58	-

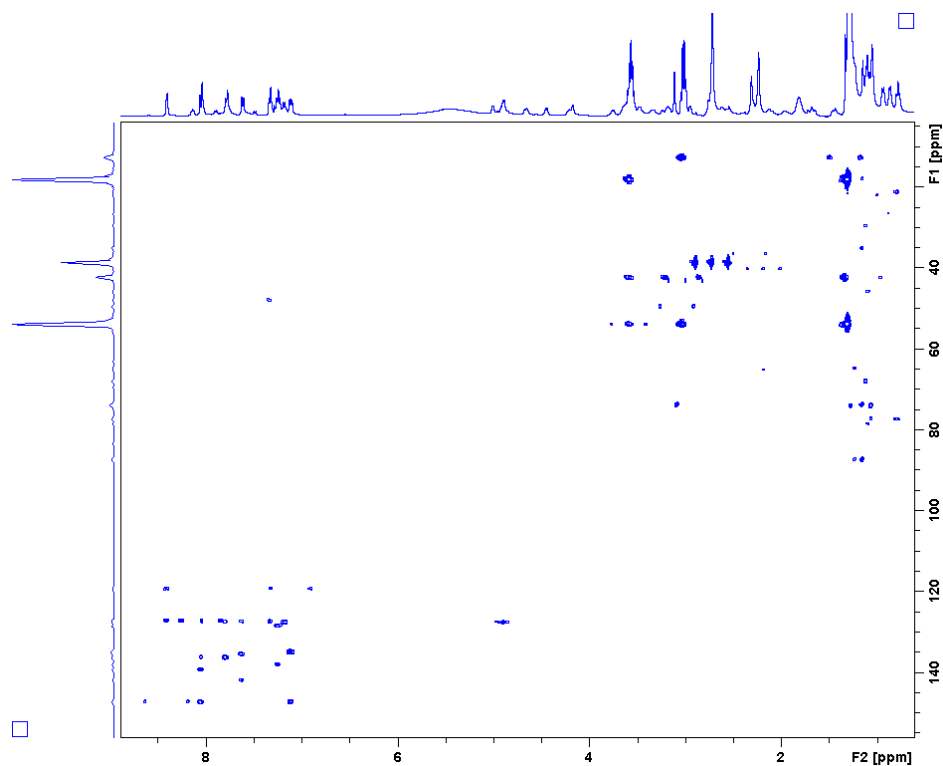
<b>9a</b>	2,38	35,73	<b>5''</b>	4,29	64,46
<b>10</b>	2,90	62,6	<b>5''Me</b>	1,29	18,04
<b>10Me</b>	1,13	7,4	<b>15</b>	-	165,5
<b>11</b>	3,61	73,94	<b>16</b>	-	135,98
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>17, 21</b>	7,93	127,31
			<b>18,20</b>	7,97	127,77
<b>12</b>	-	- <sup>a</sup>	<b>19</b>	-	136,7
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>22</b>	8,23	142,18
<b>12Me</b>	1,10	16,28	<b>22a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>13</b>	4,80	76,73	<b>23</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>14</b>	1,51; 1,87	21,49	<b>23a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>14Me</b>	0,90	10,57	<b>24</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>1'</b>	4,49	102,57	<b>25, 26, 27</b>	7,98	123,06
<b>2'</b>	3,11	70,73	<b>28</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>29, 30, 31, 32</b>	7,58	126,19
<b>3'</b>	2,52	65,50			



D34. Kromatogram reakcijske smjese makrozona B.

D35. Spektar  $^1\text{H}$  makrozona B snimljen u acetonitrilu- $\text{d}_3$  pri 298K

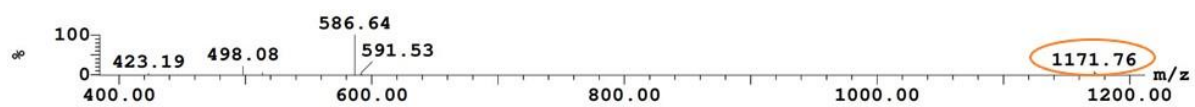
D36. Spektar COSY makrozona B snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K.D37. Spektar HSQC makrozona A snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K.

Slika 38. HMBC spektar makrozona B snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K.D39. Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  makrozona B.

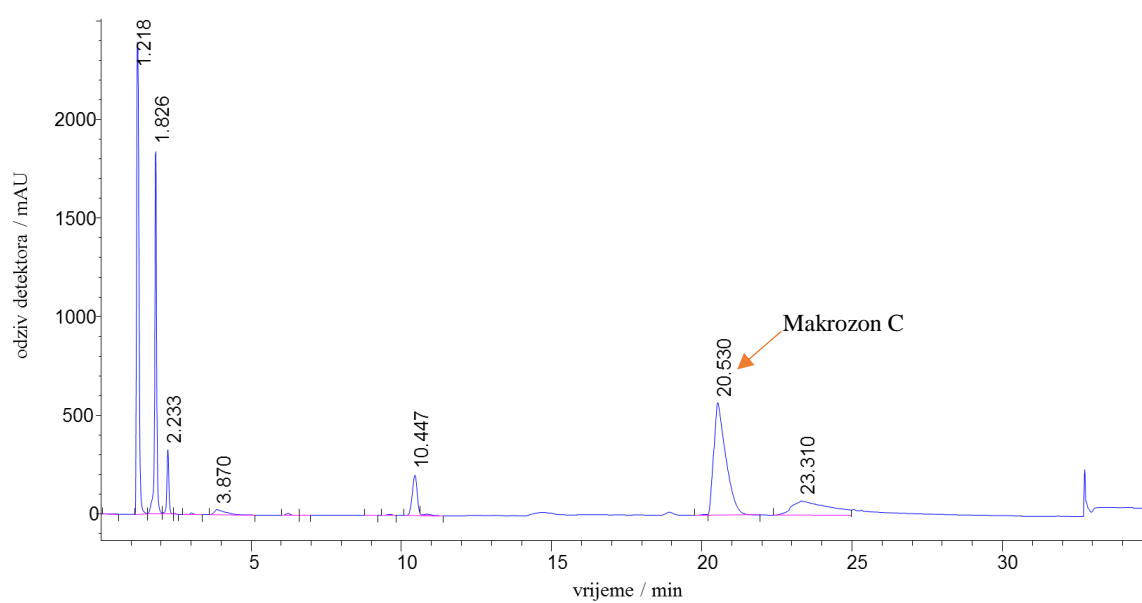
Makrozon B					
Atom	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) / ppm	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) / ppm	Atom	$\delta$ ( $^1\text{H}$ ) / ppm	$\delta$ ( $^{13}\text{C}$ ) / ppm
<b>1</b>	-	178,9	<b>4'</b>	1,61; 1,12	29,55
<b>2</b>	2,63	45,76	<b>5'</b>	3,57	68,03
<b>2Me</b>	1,09	14,83	<b>5'Me</b>	1,13	21,28
<b>3</b>	4,18	78,64	<b>1''</b>	4,99	95,15
<b>4</b>	1,82	42,21	<b>2''</b>	1,44; 2,28	35,15
<b>4Me</b>	0,95	9,31	<b>3''</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>5</b>	3,49	83,41	<b>3''OMe</b>	3,10	39,06
<b>6</b>	-	- <sup>a</sup>	<b>3''Me</b>	1,23	18,22
<b>6OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>4''</b>	2,75	87,29
<b>6Me</b>	1,29	27,26	<b>4''a</b>	3,65; 3,79	73,64
<b>7</b>	1,71; 1,18	42,20	<b>4''b</b>	1,81	29,47
<b>8</b>	1,96	26,51	<b>4''c</b>	3,33; 3,68	38,99
<b>8Me</b>	0,87	21,99	<b>4''d</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>9</b>	2,14; 2,56	69,34	<b>5''</b>	4,23	64,55
<b>9a</b>	2,34	36,66	<b>5''Me</b>	1,29	17,72
<b>10</b>	2,78	62,87	<b>15</b>	-	- <sup>a</sup>



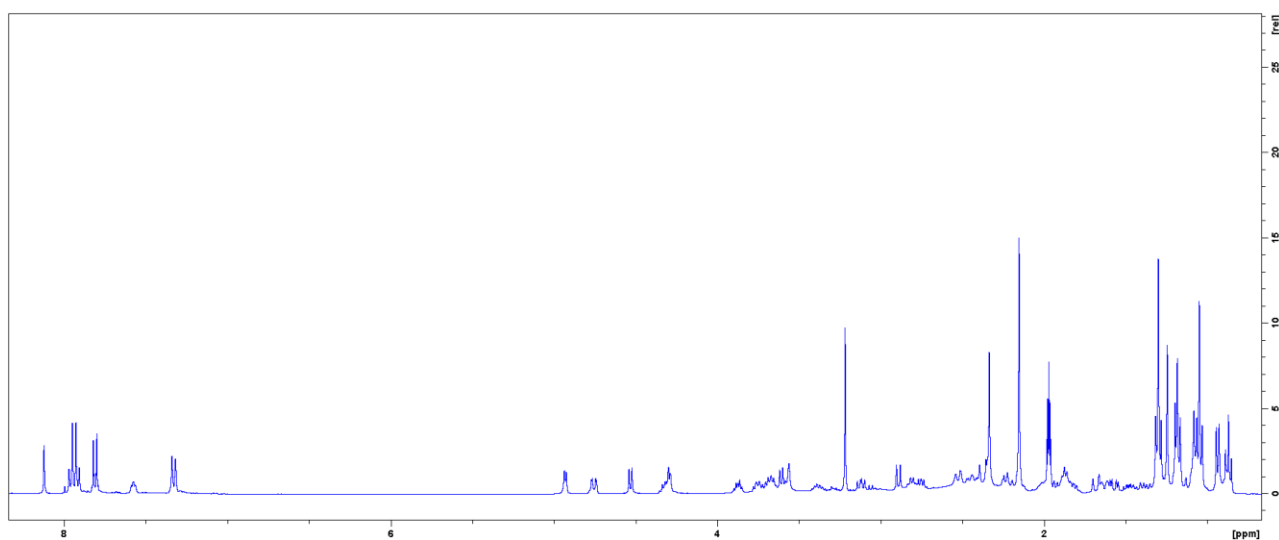
<b>10Me</b>	1,07	7,46	<b>16</b>	-	135,6
<b>11</b>	3,58	73,31	<b>17, 21</b>	8,05	127,22
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>18, 20</b>	7,80	127,61
<b>12</b>	-	- <sup>a</sup>	<b>19</b>	-	136
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>22</b>	8,41	147,32
<b>12Me</b>	1,04	16,39	<b>22a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>13</b>	4,67	77,19	<b>23</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>14</b>	1,41; 1,81	21,07	<b>23a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>14Me</b>	0,78	11,05	<b>24</b>	4,89	47,85
<b>1'</b>	4,44	102,49	<b>25</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>2'</b>	3,17	70,37	<b>26, 30</b>	7,33	127,64
<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>27, 29</b>	7,25	128,48
<b>3'</b>	2,64	65,22	<b>28</b>	7,18	127,31
<b>3'NMe<sub>2</sub></b>	2,71	38,85			

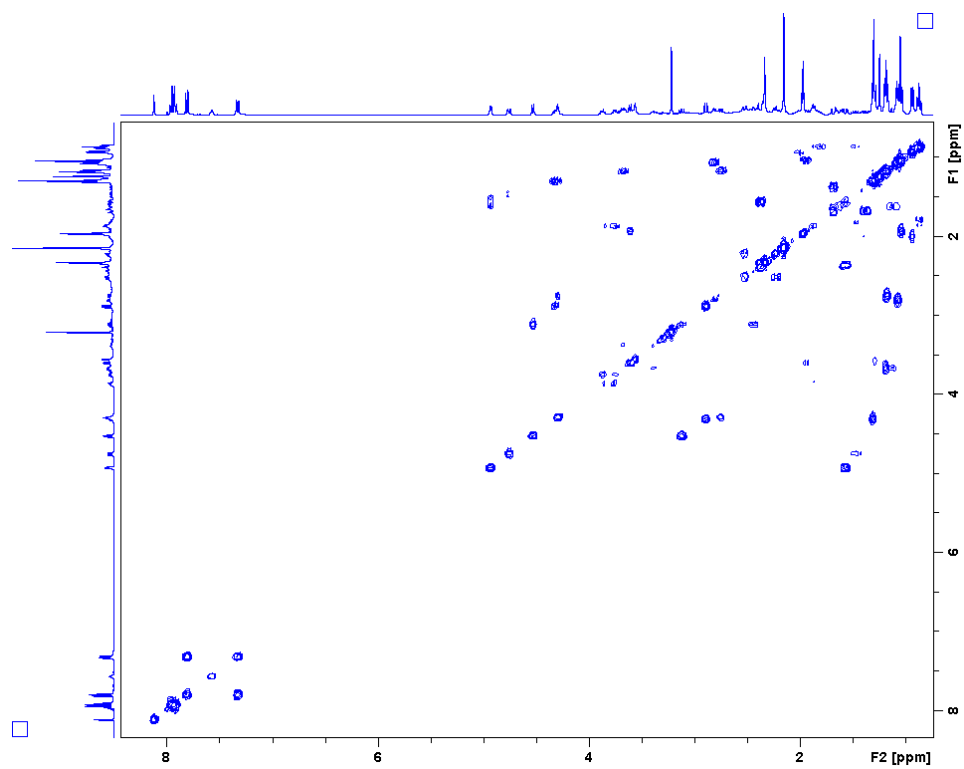
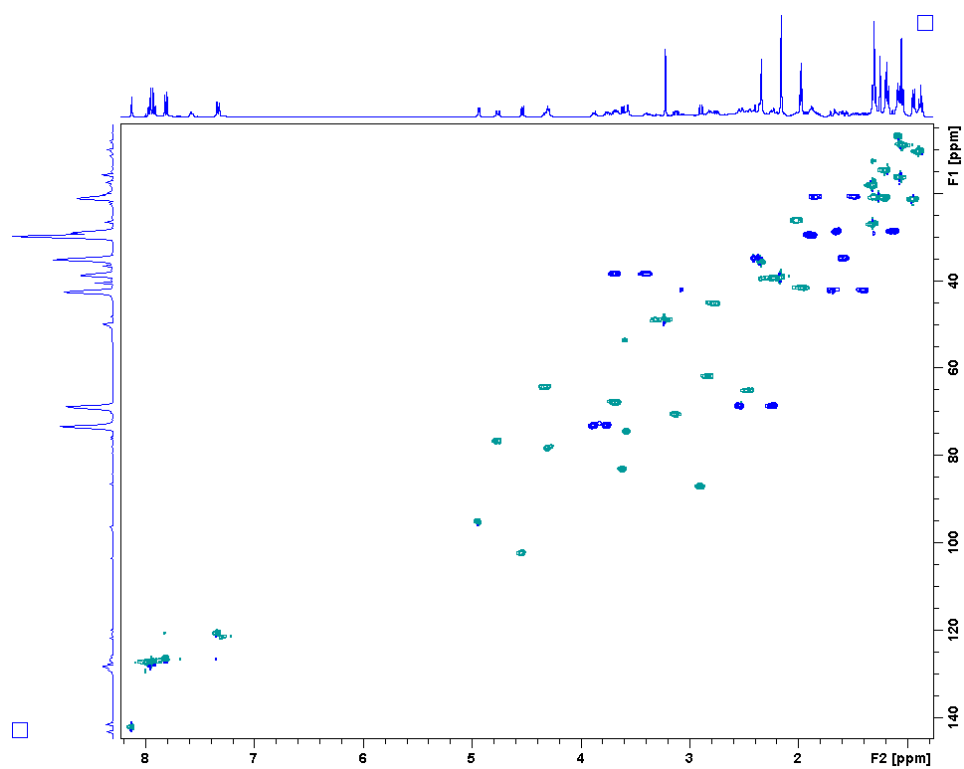


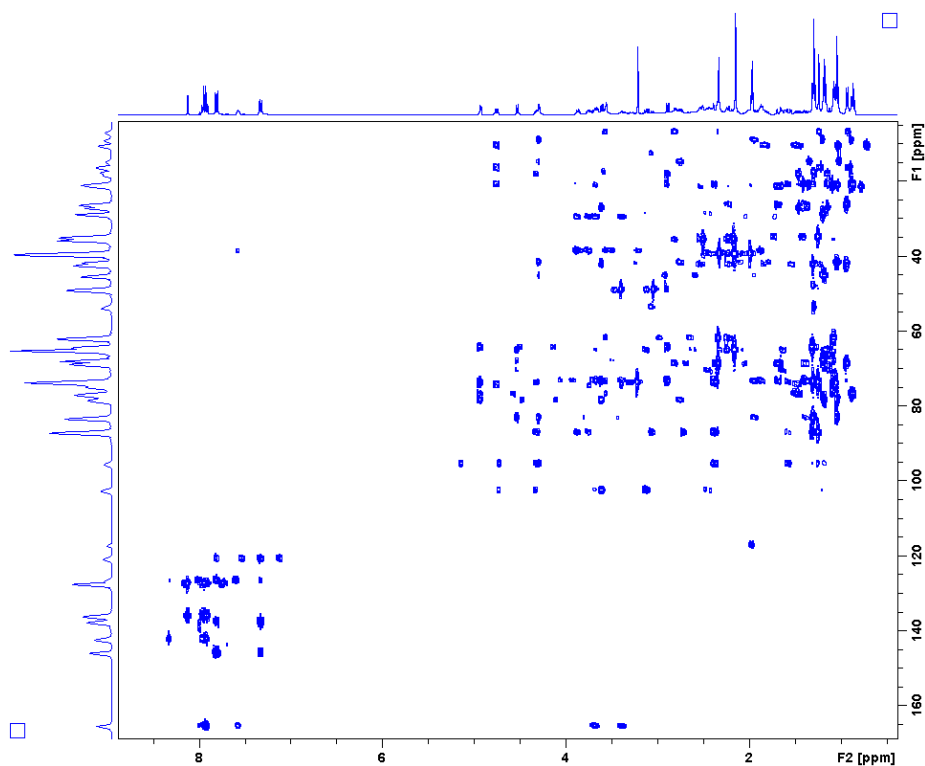
D40. Spektar ESI-MS makrozona C snimljen u pozitivnom modu.



D41. Kromatogram reakcijske smjese makrozona C.

D42. Spektar  $^1\text{H}$  makrozona C snimljen u acetonitrilu- $\text{d}_3$  pri 298K

D43. Spektar COSY makrozona C snimljen u acetonitrilu-d<sub>3</sub> pri 298K.D44 Spektar HSQC makrozona C snimljen u acetonitrilu-d<sub>3</sub> pri 298K.

D45. Spektar HMBC makrozona C snimljen u acetonitrilu- $d_3$  pri 298K.D46 Asignacija kemijskih pomaka  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  makrozona C.

Makrozon C					
Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$	Atom	$\delta (^1\text{H}) / \text{ppm}$	$\delta (^{13}\text{C}) / \text{ppm}$
<b>1</b>	-	178,7	<b>4'</b>	1,11; 1,63	28,84
<b>2</b>	2,74	45,36	<b>5'</b>	3,67	67,97
<b>2Me</b>	1,18	14,79	<b>5'Me</b>	1,19	21,20
<b>3</b>	4,28	78,55	<b>1''</b>	4,93	95,51
<b>4</b>	1,97	41,74	<b>2''</b>	1,57; 2,37	34,86
<b>4Me</b>	1,04	9,04	<b>3''</b>	-	73,73
<b>5</b>	3,61	83,41	<b>3''OMe</b>	3,22	49,13
<b>6</b>	-	73,48	<b>3''Me</b>	1,24	20,94
<b>6OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>4''</b>	2,89	87,32
<b>6Me</b>	1,30	27,29	<b>4''a</b>	3,74; 3,86	73,41
<b>7</b>	1,38; 1,67	42,33	<b>4''b</b>	1,87	29,7
<b>8</b>	1,99	26,27	<b>4''c</b>	3,37; 3,68	38,41
<b>8Me</b>	0,94	21,45	<b>4''d</b>	7,57	-

<b>9</b>	2,22; 2,52	68,84	<b>5''</b>	4,31	64,35
<b>9a</b>	2,33	35,65	<b>5''Me</b>	1,31	18,08
<b>10</b>	2,80	62,10	<b>15</b>	-	165,64
<b>10Me</b>	1,06	6,99	<b>16</b>	-	136,04
<b>11</b>	3,56	74,4	<b>17, 21</b>	7,92	127,45
<b>11OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>18, 20</b>	7,95	127,73
<b>12</b>	-	74,05	<b>19</b>	-	136,33
<b>12OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>22</b>	8,12	142,5
<b>12Me</b>	1,06	16,21	<b>22a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>13</b>	4,75	77,17	<b>23</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>14</b>	1,47; 1,82	20,98	<b>23a</b>	- <sup>a</sup>	-
<b>14Me</b>	0,87	10,49	<b>24</b>	-	137,61
<b>1'</b>	4,53	102,61	<b>25, 29</b>	7,81	120,07
<b>2'</b>	3,12	70,87	<b>26, 28</b>	7,33	127,84
<b>2'OH</b>	- <sup>a</sup>	-	<b>27</b>	-	145,97
<b>3'</b>	2,44	65,44	<b>30</b>	-	- <sup>a</sup>
<b>3'NMe</b>	2,15	39,42			

## SAŽETAK

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

Jana Gašperov

Makrolidni antibiotici su vrlo učinkoviti u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, a najčešće se primjenjuju u liječenju infekcija dišnih puteva. Međutim, široka i nepravilna upotreba antibiotika dovela je do pojave bakterijske rezistencije koja je postala svjetski zdravstveni problem. Zbog toga je danas istraživanje i razvoj novih lijekova sa širim spektrom antimikrobne aktivnosti izazov 21. stoljeća. Problematika ovog rada temelji se na otkriću novih bioaktivnih derivata makrolida s poboljšanom biološkom aktivnosti s posebnim naglaskom na aktivnost prema rezistentnim bakterijskim sojevima. U radu je opisana priprava, karakterizacija i biološka aktivnost novih derivata azitromicina, makrozona. Konjugacijom 4"-aminopropil derivata azitromicina i tiosemikarbazona pripremljena su četiri nova makrozona. Pripravljene spojevi su okarakterizirani pomoću spektroskopije NMR, spektrometrije masa i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Provedena su i biološka testiranja makrozona na odabrane rezistentne i susceptibilne Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Makrozoni su pokazali vrlo dobru biološku aktivnost, posebice na neke rezistentne bakterije. Dobiveni rezultati poslužit će kao dobar temelj za daljnja istraživanja i dizajn novih antibiotika.

Ključne riječi: azitromicin, biološka aktivnost, rezistencija, „makrozoni, spektroskopija NMR

## ABSTRACT

### SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW AZITHROMYCIN DERIVATES – MACROZONES

Jana Gašperov

Macrolide antibiotics are very efficient agents to treat infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and are mostly used in treating respiratory tract infections. However, wide use as well as misuse of antibiotics leads to bacterial resistance which consequently became a major world health issue. Therefore, discovery and development of new antimicrobial drugs poses a medical challenge of the 21st century. The work presented here deals with the discovery of new bioactive macrolide derivatives with enhanced biological activity against resistant bacterial strains. Hence, novel azithromycin conjugates, the macrozones, have been prepared and characterized and their biological activity evaluated. By conjugation of 4"-aminopropyl azithromycin derivative and thiosemicarbazone, four new macrozones were prepared. Newly synthesized compounds were characterized by NMR spectroscopy, mass spectrometry and high resolution liquid chromatography (HPLC). Biological evaluation of macrozones against resistant and susceptible Gram-positive and Gram-negative bacteria was made. Macrozones showed very good biological activity especially against some resistant bacterial strains. Obtained results can serve as a good platform for design and discovery of new antibiotics.

Keywords: azithromycin, biological activity, resistance, macrozones, spectroscopy NMR

## 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

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

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

2016. – 2019. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

2019. – Voditeljica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

2016. – Članica studentskog volonterskog projekta *Znanstvene čarolije*

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