



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Valentin Dakić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# MAKROLIDNI ANTIBIOTICI - STRUKTURNE ZNAČAJKE

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Zagreb, 2018. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

28. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Makrolidni antibiotici .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Ribosom.....	3
1.1.2. Vrste interakcija s ribosomom.....	4
1.1.3. Mehanizam djelovanja.....	7
1.1.4. Bakterijska rezistencija.....	8
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. 14-eročlani makrolidni antibiotici.....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Eritromicin.....	9
2.1.2. 14-eročlani polusintetski makrolidni antibiotici.....	11
<b>2.2. Azalidi.....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Azitromicin.....	14
2.2.2. O-metil derivati azitromicina.....	16
2.2.3. Sinteza azitromicina.....	17
2.2.4. Rendgenska strukturna analiza azitromicina.....	18
2.2.5. Metalni kompleksi azitromicina.....	19
<b>2.3. Konformacijska analiza eritromicina A, klaritromicina i azitromicina.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Ketolidi.....</b>	<b>24</b>
2.4.1. Telitromicin.....	24
2.4.2. Cetromicin (ABT-773).....	25
2.4.3. Solitromicin - prvi fluoroketolid.....	27
2.4.4. Sinteza solitromicina.....	28
<b>2.5. 16-eročlani makrolidni antibiotici.....</b>	<b>30</b>
2.5.1. Josamicin.....	30
2.5.2. Tilozin.....	31
2.5.3. Spiramicin.....	32
<b>2.6. Strukturne sličnosti i razlike u vezanju nekih 14, 15 i 16-eročlanih makrolidnih antibiotika na ribosom.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7. Budućnost i putevi sinteze novih makrolida.....</b>	<b>38</b>
2.7.1. Metoda kemijskih blokova.....	38
2.7.2. Protuupalno djelovanje - budućnost makrolida.....	39
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XL</b>



## § Sažetak

Antibiotici koji sadrže makrociklički laktonski prsten na koji su najčešće  $\alpha$ -L i  $\beta$ -D glikozidnim vezama vezane jedna do tri molekule šećera, među kojima se obično susreću aminošećeri i neutralni šećeri, nazivaju se makrolidni antibiotici. Razlikuju se prirodni i polusintetski makrolidi. U principu, radi se o 12, 14 ili 16-eročlanim laktonskim prstenovima. Makrolidi selektivno djeluju na bakterijske ribosome reverzibilnim vezanjem za podjedinice 50S. U bakterijskom protoplastu kože sintezu proteina inhibirajući aktivnost peptidil-transferaznog centra koji stvara peptidne veze između aminokiselina. Visoka učinkovitost i sigurnost makrolida, kao i njihova upotreba kao alternativna terapija za pacijente intolerantne na penicilin, učinila ih je često korištenim lijekovima. Široka upotreba tih antibiotika neizbježno je dovela do širenja otpornih sojeva. Eritromicin A je glavni predstavnik makrolida i prvi klinički korišteni makrolidni antibiotik. Pojava rezistencije i osjetljivosti same eritromicinske baze u kiselom mediju doveli su do istraživanja i sinteze novih derivata eritromicina A s povećanom stabilnošću u kiselom mediju, produljenom biološkom poluzivotu i zadržanom antimikrobnom aktivnošću. Takvi spojevi su 14-eročlani polusintetski makrolidni antibiotici (roksitromicin, klaritromicin, diritromicin i ostali), azitromicin i ketolidi. Azitromicin je 15-eročlani makrolidni antibiotik, glavni predstavnik klase azalida, kojeg je razvio tim hrvatskih znanstvenika iz tvornice lijekova PLIVA. Karakterizira ga metil-supstituirani atom dušika umetnut u aglikon eritromicina A i širok spektar djelovanja. Ketolidi su nova klasa makrolidnih antibiotika izvedena iz eritromicina A zamjenom šećera kladinoze s karbonilnom skupinom i vezanjem cikličkog karbamata u laktonski prsten. Ove modifikacije daju ketolidima mnogo širi spektar djelovanja od ostalih makrolida i veću učinkovitost protiv rezistentnih bakterija. Prvi klinički korišteni ketolid je telitromicin. Danas su u kliničkoj upotrebi i 16-eročlani makrolidni antibiotici poput josamicina i spiramicina. Iako imaju sličan antibakterijski profil, 16-eročlani makrolidi pokazuju neke prednosti u odnosu na ostale makrolide, uključujući bolju aktivnost protiv određenih rezistentnih bakterija i agresivniju inhibiciju sinteze proteina zbog dodatnih interakcija s ribosomom. Danas se intenzivno istražuju novi, jednostavniji i jeftiniji načini sinteze makrolidnih antibiotika kako bi se održao korak s bakterijskom rezistencijom. Nedavno je otkriveno da makrolidi posjeduju protuupalno djelovanje. To je polje još neistraženo i predstavlja budućnost ove klase lijekova.

## § 1. UVOD

### 1.1. Makrolidni antibiotici

Makrolidi su poliketidna klasa prirodnih spojeva koje proizvode razni sojevi bakterija *Streptomyces*. Naziv 'makrolidi' dodijelio im je Woodward 1957. godine. Sastoje se od makrocikličkog laktanskog prstena na koji se mogu vezati jedna do tri molekule šećera (najčešće  $\alpha$ -L i  $\beta$ -D glikozidnim vezama), obično kladinoza i dezozamin. Za ugljikohidratni dio makrolida koristi se još naziv glikon, a neugljikohidratni dio glikozida naziva se aglikonom ili laktanskim prstenom. S obzirom na broj atoma u laktanskom prstenu, makrolidi se dijele na parne i neparne. Laktanski prstenovi su najčešće 12, 14 ili 16-eročlani. Laktanski prsten je, osim molekulama šećera, uvijek supstituiran hidroksilnim i alkilnim skupinama, a rjeđe alkoksidnom, karbonilnom, fluoridnom ili nekom drugom skupinom.<sup>1</sup>

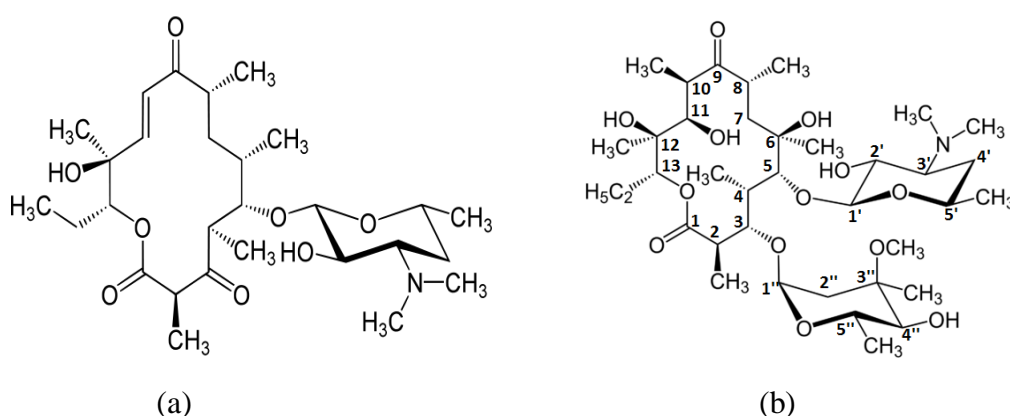
Neki makrolidi imaju antibiotsko ili antifungalno djelovanje i koriste se kao lijekovi. Oni selektivno djeluju tako što se reverzibilno vežu na bakterijske ribosome. U bakterijskom protoplastu sprječavaju sintezu proteina inhibirajući aktivnost peptidil-transferaznog centra, odnosno mjesta gdje se odvija kataliza stvaranja peptidnih veza. Mogu djelovati bakteriostatski i baktericidno. Djeluju na većinu aerobnih i anaerobnih gram-pozitivnih bakterija, a puno slabije na gram-negativne bakterije. Većina gram-negativnih bakterija prirodno je otporna na makrolide jer teško prodiru kroz njihovu staničnu stijenku. Učinkoviti su i protiv atipičnih mikobakterija, ali ne i protiv gljivica i protozoa. Rezistencija se razvija relativno sporo.<sup>2</sup>

Makrolidi su hidrofobne molekule, a laktanski prsten posjeduje blagi električni dipolni moment. Hidrofilno područje aglikona je ono oko esterske skupine, a suprotna strana je hidrofobnija. Prisutnost molekula šećera, hidroksilnih i karbonilnih skupina omogućuje makrolidnim antibioticima stvaranje intermolekulskih vodikovih veza s ribosomom. Osim vodikovih veza, za makrolidne antibiotike karakteristične su hidrofobne i van der Waalsove interakcije, koje pospješuju njihovo vezanje za ribosom.<sup>1</sup>

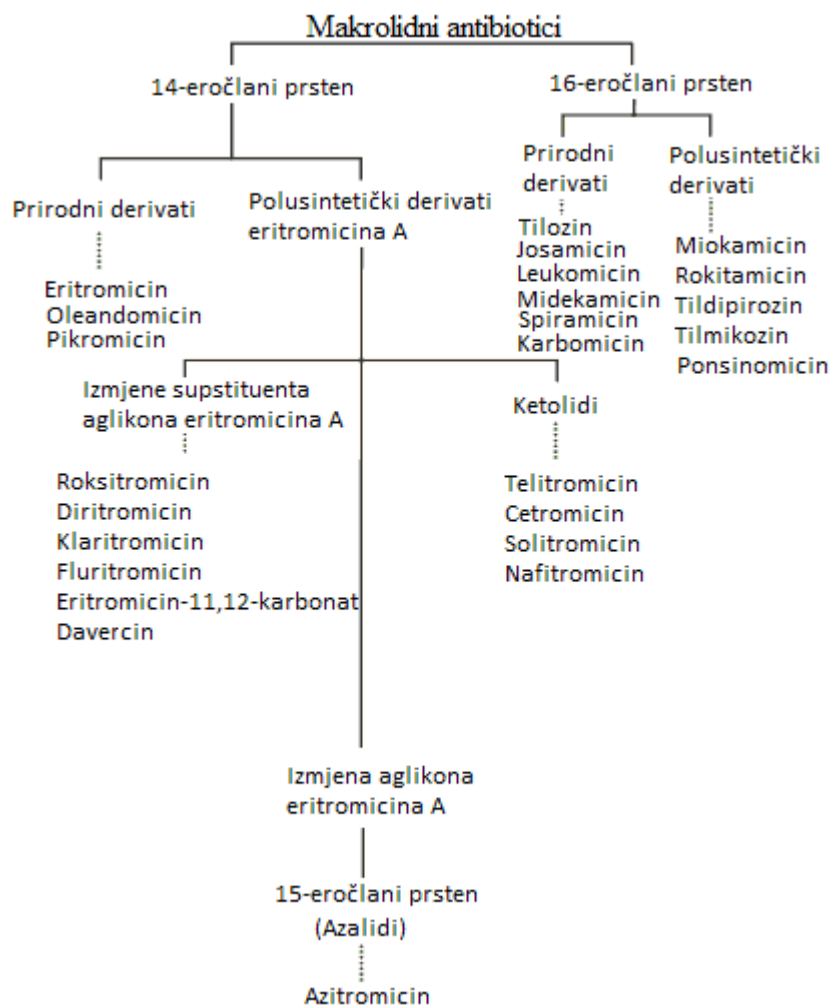
Pikromicin je prvi izolirani makrolidni antibiotik, a sastoji se od 14-eročlanog laktanskog prstena (slika 1a).<sup>3</sup> Nakon otkrića eritromicina A, prvog klinički korištenog makrolida (slika 1b), i drugih prirodnih spojeva, uključujući oleandomicin, spiramicin I, josamicin i



midekamicin, mnogo istraživanja je posvećeno pripremi analoga s poboljšanom otpornošću na kemikalije, te boljim biološkim i farmakokinetičkim svojstvima. Takvi spojevi su: klaritromicin, roksitromicin, diritromicin i fluritromicin. 14-eročlani laktonski prsten u eritromicinu A proširen je polusintetski uvođenjem atoma dušika kako bi se pripravio 15-eročlani makrolid, azitromicin. Velika obitelj 16-eročlanih makrolidnih antibiotika, predvođena tilozinom A, uglavnom se koristi u veterinarstvu, a još su česti spiramicin I i karbomicin A.<sup>4</sup> Pojava rezistencije na lijek u mnogim patogenim bakterijama pojačala je potragu za novim antimikrobnim agensima, što je dovelo do razvoja ketolida, kemijski modificiranih makrolida na bazi eritromicina A. Najpoznatiji takvi spojevi su telitromicin, cetromicin i solitromicin.<sup>5</sup> Podjela makrolidnih antibiotika prikazana je na slici 2. 12-eročlani makrolidi uglavnom nemaju antibiotski učinak, ali neki mogu djelovati protuupalno. Glavni predstavnik je metimicin.<sup>4</sup>



Slika 1. (a) Strukturna formula molekule pikromicina, prvog otkrivenog makrolida<sup>6</sup>; (b) Strukturna formula molekule glavnog predstavnika makrolida, eritromicina A, s označenim ugljikovim atomima. Takav način numeriranja ugljikovih atoma vrijedi za sve makrolide. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7)

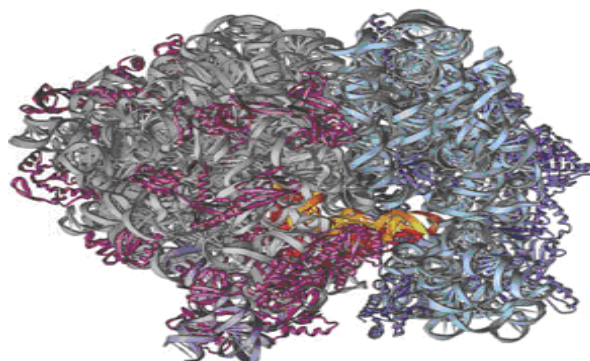


Slika 2. Klasifikacija makrolidnih antibiotika. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8)

### 1.1.1. Ribosom

Ribosom je ribonukleoproteinski supramolekulski kompleks koji katalizira biosintezu proteina. Protein je linearni polimer aminokiselina koje na ribosom dovode transportne RNK (tRNK) u obliku aminoacil-tRNK. Pravilna interakcija makrolidnih antibiotika s ribosomom neophodna je za njihovo uspješno djelovanje. Ribosom je građen od proteina i ribosomske RNK (rRNK), a služi prevođenju genetske upute koja dolazi u obliku glasničke RNK (mRNK) u polipeptidni lanac. Prokarioti imaju 70S ribosome građene od male (30S) i velike (50S) podjedinice (slika 3), a eukarioti 80S ribosome koji se sastoje od male (40S) i velike (60S) podjedinice. Osim razlike u sedimentacijskom koeficijentu (veličini), ribosomi prokariota i eukariota razlikuju se i u broju proteina te broju rRNK. Velika podjedinica prokariotskog ribosoma sadrži 34 proteina i dvije molekule rRNK, a mala podjedinica 21

protein i jednu molekulu rRNK. Kod eukariota velika podjedinica sadrži 48 proteina i tri molekule rRNK, a mala podjedinica 33 proteina i jednu molekulu rRNK. Upravo navedene razlike između prokariotskog i eukariotskog ribosoma omogućuju selektivno vezanje makrolidnog antibiotika samo na prokariotski ribosom. U prostoru koji zatvaraju mala i velika podjedinica događa se biosinteza proteina. Aktivno mjesto na većoj podjedinici izgrađeno je isključivo od rRNK. rRNK katalizira nastanak peptidne veze između aminokiselina, zbog čega je ribosom zapravo ribozim.<sup>9,10</sup>



Slika 3. Kristalna struktura 70S ribosoma bakterije *Thermus thermophilus*. Na slici su podjedinice naznačene zelenom i sivom bojom. Ljubičasti dijelovi odgovaraju proteinskim dijelovima ribosoma, a zeleni i sivi rRNK.<sup>11</sup>

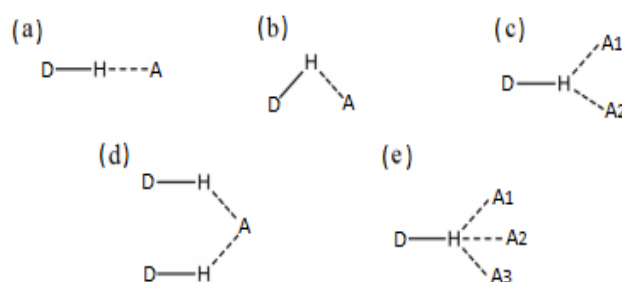
23S rRNK je 2904 nukleotida duga (u bakteriji *Escherichia coli*) komponenta velike podjedinice bakterijskog ribosoma. Sastoji se od pet domena. Ribosomska aktivnost peptidil-transferaze nalazi se u domeni V ove rRNK, a ta domena je najčešće vezno mjesto za antibiotike koji inhibiraju translaciju, pa tako i makrolida.<sup>12</sup>

### 1.1.2. Vrste interakcija s ribosomom

Prilikom vezanja makrolida za ribosome najveći utjecaj imaju nekovalentne interakcije, iako i kovalentna veza nije isključena (slika 6 i poglavlje 2.6.).<sup>13</sup>

*Vodikova veza*, općeg izraza D-H...A, privlačna je interakcija (većinom elektrostatske prirode) koja se ostvaruje između vodikovog atoma kovalentno vezanog na donorni atom D i atoma akceptora A, pri čemu su atomi D i A elektronegativniji od atoma vodika. U slučaju da se atom akceptor nalazi u istoj molekuli s atomom donora vodikove veze radi se o unutarmolekularnoj (intramolekularnoj), a ako je dio druge molekule, o međumolekularnoj (intermolekularnoj) vodikovoj vezi. Akceptor može biti atom, anion ili pak dio neutralne molekule, odnosno molekularnog iona. Riječ je o međumolekularnoj interakciji slabijoj od

kovalentne veze, a jačoj od van der Waalsovih interakcija. Zbog svoje učestalosti (biološki sustavi, materijali) i važne uloge u ostvarivanju kristalne strukture, vodikova veza je najvažnija i do sada najviše istražena međumolekulska interakcija. Vodikova veza najčešće povezuje dva atoma te može biti linearna i nelinearna. U nekim slučajevima postoji mogućnost povezivanja i tri atoma u bifurkiranim vodikovim vezama, gdje mogu sudjelovati dva donora ili akceptora. Isto tako može postojati i trifurkirana vodikova veza, no nastajanje takve interakcije ograničeno je steričkim faktorima. Spomenuti slučajevi povezivanja vodikovom vezom shematski su prikazani na slici 4.<sup>14,15</sup>



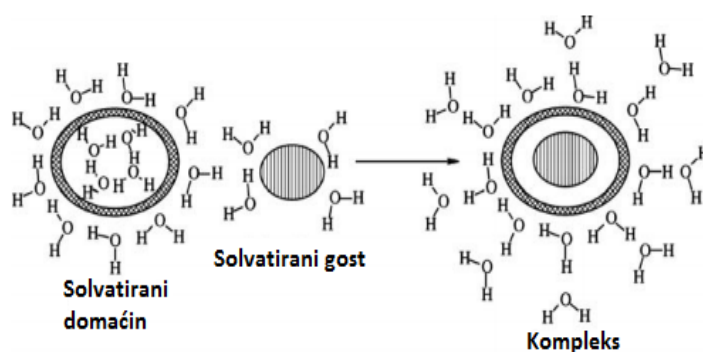
Slika 4. Shematski prikaz (a) linearne, (b) nelinearne, (c), (d) bifurkirane i (e) trifurkirane vodikove veze. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 14)

Prema duljini i jakosti, vodikove veze mogu se podijeliti na slabe, srednje jake i vrlo jake. Vrlo jake vodikove veze po jakosti su slične kovalentnim vezama te je vodikov atom gotovo u središtu između atoma donora i akceptora. Nadalje, vrlo jake vodikove veze nastaju između jakih kiselina i dobrih akceptora vodikove veze. Srednje jake vodikove veze ostvaruju se između neutralnih skupina donora i akceptora, a karakteristične su kao interakcije koje se ostvaruju kod spojeva s karboksilnom i amidnom funkcijskom skupinom. Za razliku od vrlo jakih vodikovih veza, srednje jake vodikove veze odstupaju od linearnosti te su blago savinute geometrije (vrijednost kuta D-H···A približno iznosi od 130 do 180°). Slabe vodikove veze imaju veliku ulogu u samoj stabilizaciji strukture te su od velikog značaja u kristalnom pakiranju zbog svoje brojnosti. One uključuju netradicionalne donore i akceptore (sustave aromatskih prstena, C-H skupine), a karakteriziraju ih i kutovi D-H···A u području od 90 do 150°.<sup>14,15</sup>

Pod terminom *van der Waalsovih sila* podrazumijeva se nekoliko sila, odnosno međumolekulskih interakcija kao što su dipol-dipol, dipol-inducirani dipol i inducirani dipol-inducirani dipol interakcije (Londonove sile). Dipol-dipol interakcije su posljedica privlačnih sila između molekula sa stalnim dipolnim momentom (polarnih molekula). Kod polarnih molekula elektroni su neravnomjerno raspoređeni u molekuli te se stoga unutar molekule

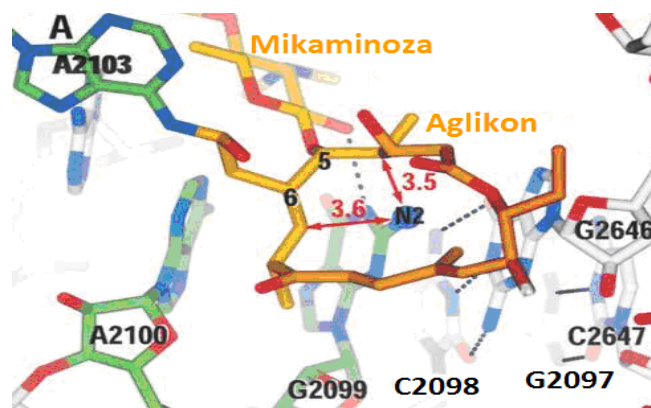
javljaju pozitivniji i negativniji dijelovi, odnosno dolazi do stvaranja permanentnog dipola. Dipolne molekule mogu u susjednim nepolarnim molekulama, kod kojih je raspodjela elektronske gustoće jednaka u cijeloj molekuli, uzrokovati stvaranje induciranog dipolnog momenta. Takve interakcije se onda nazivaju dipol-inducirani dipol. Objašnjenje interakcija inducirani dipol-inducirani dipol dao je London te je ono u korelaciji s raspodjelom elektrona susjednih atoma. Kada se približe atomi s popunjenim orbitalama, njihovi elektroni izbjegavaju susret i nastoje se što više udaljiti jedan od drugoga. Pritom se usklađuje elektronska gustoća u atomima tako što je u jednome velika, a u drugome mala u blizini dodira. U jednom je atomu jezgra uvijek manje zasjenjena negativnim nabojem nego u drugome, zbog čega se jezgra i susjedni elektronski oblak stalno privlače. Izgleda kao da inducirani dipoli stalno mijenjaju smjer, ali se uvijek privlače.<sup>16</sup>

*Hidrofobne interakcije* se očituju kao privlačne sile između nepolarnih molekula koje su odvojene vodom. Međutim, one nastaju zbog sposobnosti molekula vode da tvore relativno snažne vodikove veze s drugim molekulama vode, pa nepolarne molekule mogu tvoriti samo relativno slabe van der Waalsove veze sa svojim susjedima. Kada se nepolarne molekule uvede u vodu, ona uzrokuje da se molekule vode u njoj izravnoj blizini preurede, što mijenja entropiju i entalpiju sustava. Te promjene su termodinamički nepovoljne, pa sustav nastoji smanjiti područje kontakta između vode i nepolarnih grupa, što proizvodi privlačne sile između nepolarnih grupa. Posljedično, ovakva uređenost smanjuje ukupnu energiju i povećava entropiju (slika 5).<sup>17</sup>



Slika 5. Hidrofobno vezanje organskih molekula u vodenoj otopini. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 15)

*Kovalentna veza* je vrsta kemijske veze koja nastaje povezivanjem atoma preko zajedničkog/zajedničkih parova elektrona. Kovalentnom vezom najčešće se povezuju atomi nemetala. Atomi nemetala imaju velike energije ionizacije i elektronske afinitete pa stoga veze ostvaruju preko zajedničkih elektronskih parova (slika 6).<sup>18</sup>



Slika 6. Vodikove veze (isprekidane crte) prisutne su između parova baza (G2646 i C2098, G2097 i C2647) te makrolidnog antibiotika (mikaminoza) i ribosoma (G2099). Osim pomoću vodikovih veza, makrolidni antibiotik i ribosom povezani su kovalentnom vezom (A2103). (preuzeto i prilagođeno prema ref. 13)

### 1.1.3. Mehanizam djelovanja

Precizan mehanizam inhibicije sinteze proteina putem makrolida ovisi o specifičnoj kemijskoj strukturi molekule lijeka. To utječe na njegovu interakciju s ribosomom, kao i na način inhibicijskog djelovanja. Makrolidima se pripisuju četiri načina inhibicije sinteze proteina:

1. inhibicija napredovanja stvaranja peptidnog lanca u ranoj fazi,
2. promocija disocijacije peptidil-tRNK s ribosoma,
3. inhibicija stvaranja peptidnih veza,
4. interferencija sa skupinom 50S podjedinica.

Svi ovi mehanizmi imaju neku korelaciju s mjestom vezanja makrolida na ribosomu. Makrolidno vezno mjesto nalazi se na velikoj ribosomskoj podjedinici između izlaznog peptidnog tunela i peptidil-transferaznog centra (poglavlje 2.6; slika 28). Glavni mehanizam inhibicije sinteze proteina makrolidima povezan je s njihovim vezanjem u izlaznom peptidnom tunelu. Izlazni tunel prvenstveno je građen od 23S rRNK. Polazi od peptidil-transferaznog centra, obuhvaća cijelo tijelo podjedinice i otvara se na stražnjem dijelu. Nekoliko je studija pokazalo da interakcije između ribosoma i nascentnog peptida, koje se odvijaju unutar izlaznog tunela, utječu na napredovanje sinteze proteina. Tunel je relativno širok (prosječno od 15 Å), ali sadrži suženje (širine oko 10 Å) koje tvore ribosomski proteini L4 i L22, koji se nalaze blizu peptidil-transferaznog centra. Makrolidi se vežu blizu ovog suženja i predstavljaju blok za rastući polipeptidni lanac.<sup>19</sup> U prisutnosti vezanih 14 i 15-eročlanih makrolida, polimerizacija prvih nekoliko aminokiselina nastavlja se neprestano i inhibicija

rasta polipeptida javlja se tek nakon što nastali peptid postane dovoljno velik da dostigne vezani makrolid u blizini suženja tunela. 16-eročlani makrolidi uzrokuju agresivniju inhibiciju sinteze proteina što je povezano s njihovom strukturom. Inhibicija napredovanja peptida konačno rezultira disocijacijom peptidil-tRNK s ribosoma.<sup>19,20</sup>

#### 1.1.4. Bakterijska rezistencija

Visoka učinkovitost i sigurnost makrolidnih antibiotika, kao i njihova upotreba kao alternativna terapija za pacijente intolerantne na penicilin, učinila ih je često korištenim lijekovima. Široka upotreba tih antibiotika neizbježno je dovela do širenja otpornih sojeva. Dva najčešća mehanizma rezistencije su modifikacija ciljnog mjesta lijeka i ekspresija specifičnih kratkih peptida u stanici.<sup>19</sup>

Otpornost na antibiotike koji se vežu za bakterijski ribosom često se dobiva metilacijom specifičnih nukleotida rRNK. Nukleotidi koji postanu metilirani uvijek su ključna mjesta interakcije s antibiotikom. Dodavanje metilnih skupina na svaki od tih nukleotida katalizirano je specifičnim enzimom zvanim metiltransferaza. Erm metiltransferaze su skupina enzima čije djelovanje rezultira rezistencijom na terapijski važne antibiotike makrolide, linkozamide i streptogramine B (MLS<sub>B</sub> rezistencija). Pod utjecajem su *erm* (eritromicin rezistentna metilaza) gena. Cilj Erm metiltransferaza je nukleotid A2058 u 23S rRNK, a metiliranje nastaje prije nego što se rRNK ugradi u 50S ribosomsku podjedinicu. Međutim, detaljan mehanizam djelovanja ovih enzima nije poznat. Erm metiltransferaze javljaju se u širokom rasponu bakterija i razlikuju se po tome dodaju li jednu ili dvije metilne skupine na nukleotid A2058. Dimetilirana rRNK uzrokuje jaču otpornost prema antibioticima.<sup>19,21</sup>

Nedavno je opisan novi mehanizam rezistencije na makrolidne antibiotike koji je posredovan ekspresijom specifičnih kratkih peptida u stanici. Iako nije sasvim jasno kako ekspresija kratkih peptida može učiniti stanice otpornima, temeljni principi vjerojatno se odnose na inhibiciju translacije izazvanu samim makrolidom. Sadašnji model predlaže da novosintetizirani peptid reagira s molekulom makrolida vezanom na ribosomu i izbacuje molekulu lijeka iz njezinog veznog mjesta, dopuštajući da se ribosom ponovno uključi u sintezu staničnih proteina.<sup>19</sup>

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. 14-eročlani makrolidni antibiotici

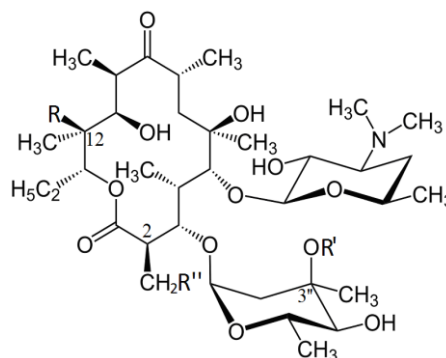
#### 2.1.1. Eritromicin

Eritromicin A je prirodni makrolidni antibiotik čiju strukturu karakterizira 14-eročlani makrolaktonski prsten s karbonilnom skupinom na položaju C-9, aminošećer dezozamin na atomu C-3 i neutralni šećer kladinoza na atomu C-5 (slika 1b).<sup>1</sup> Već 60 godina smatra se sigurnim i djelotvornim antimikrobnim sredstvom, ali preučestalo korištenje dovelo je posljednjih desetljeća do pojave rezistencije na lijek. Fermentacijski je proizvod bakterija *Streptomyces erythreus*. Izoliran je 1952. godine iz uzorka tla prikupljenog na Filipinima koji je bio dio intenzivnog programa za otkrivanje novih antibiotika. Iako je oralno dostupan za primjenu, makrociklički prsten nije stabilan u kiselini. Kod želučane pH-vrijednosti dolazi do pretvorbe u anhidroeritromicin A, slijedi gubitak antibakterijskog djelovanja, mučnina i povraćanje. Nestabilnost eritromicinskog prstena u kiseloj sredini prednost je za mikrobe iz tla koji ga sintetiziraju jer antibiotik štiti neposrednu okolinu oko organizma koji ga proizvodi. Dakle, sa stajališta prirode, to je savršena molekula. Međutim, s farmaceutске točke gledišta, poboljšanja stabilnosti spoja u kiselim uvjetima bila su nužna.<sup>22</sup>

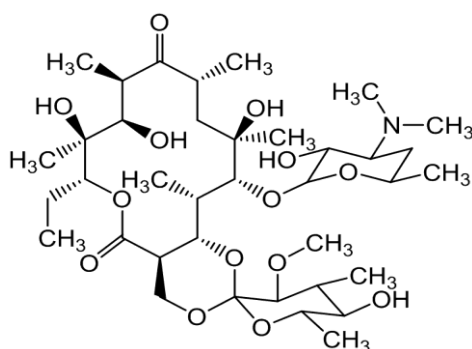
Uz eritromicin A, izolirani su i neki manje značajni produkti biosinteze iz kultura *Streptomyces erythreus*, nazvani eritromicin B, C, D, E i F. Molekuli eritromicina B nedostaje jedna hidroksilna skupina na položaju C-12 u odnosu na molekulu eritromicina A (slika 7a). Molekula eritromicina C sadrži kao neutralni šećer mikarozu umjesto kladinoze, dok molekula eritromicina D objedinjuje dva prethodna molekulska oblika, pa joj nedostaje hidroksilna skupina, a kladinozu zamjenjuje mikarozom. Eritromicin F čija molekula sadrži 2-hidroksimetilnu skupinu, vjerojatni je biosintetski prekursor eritromicina E, koji posjeduje orto-estersku vezu (slika 7b).<sup>1</sup>



Makrolid	R	R'	R''
Eritromicin A	OH	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicin B	H	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicin C	OH	H	H
Eritromicin D	H	H	H
Eritromicin F	OH	CH <sub>3</sub>	OH



(a)



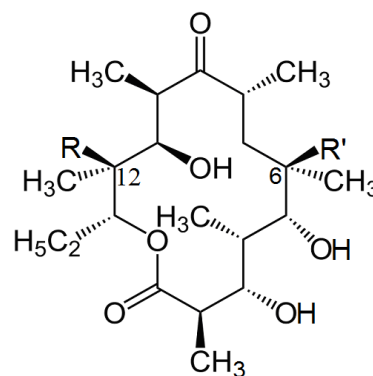
(b)

Slika 7. (a) Strukturne formule molekula eritromicina A, B, C, D i F (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7); (b) Strukturna formula molekule eritromicina E.<sup>23</sup>

Kemijskom razgradnjom eritromicina A i to hidrolizom glikozidnih veza dobiva se aglikon, eritronolid A, dok se eritronolid B dobiva fermentacijom. Biosinteza eritromicina upravo se nastavlja na 6-deoksieritronolid B, pa zatim na eritronolid B. Prvi u grupi eritromicinskih spojeva potpuno je sintetiziran eritronolid B (1978.), a uskoro zatim slijede sinteze eritronolida A i 6-deoksieritronolida B (slika 8).

Potpuna sinteza eritromicina A jedinstven je fenomen ljudske i znanstvene ustrajnosti. Iako ga je lako dobiti u velikim količinama izolacijom produkata fermentacije mikroorganizama, njegova potpuna sinteza jedan je od najzahtjevnijih postupaka u organskoj sintezi. Woodwardu i njegovim suradnicima uspjelo je okruniti napore tek 1981. godine, a nastojanja sežu još od 1956. U novijem periodu organske sinteze susreću se elegantniji putevi i metode potpune sinteze eritromicina A, koje su ujedno i potencijalne metode sinteze drugih kompleksnih prirodnih produkata.<sup>1</sup>

Makrolid	R	R'
Eritronolid A	OH	OH
Eritronolid B	H	OH
6-deoksieritronolid B	H	H

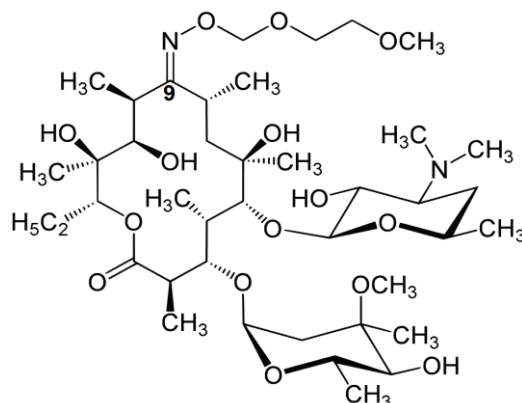


Slika 8. Strukturne formule molekula eritronolida A, eritronolida B i 6-deoksieritronolida B. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 7)

### 2.1.2. 14-eročlani polusintetski makrolidni antibiotici

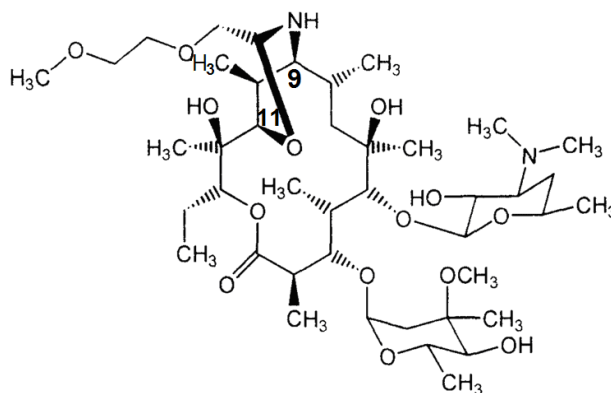
Zbog osjetljivosti same eritromicinske baze na kiselu sredinu želuca, gdje zbog intramolekulske ciklizacije lako prelazi u anhidroeritromicin A, inaktivni C-6/C-12 metabolit spiroketalne strukture, pripremljeni su brojni derivati eritromicina A s povećanom stabilnošću u kiselom mediju, produljenom biološkom poluživotu i izvrsnom prodiranju u tkiva s postizanjem visokih koncentracija u makrofazima i neutrofilima.<sup>1</sup> Značajan uspjeh u zaštiti eritromicina A od raspadanja u želucu postignut je upotrebom visoko netopljivih soli u vodi (lauril sulfat ili stearat) ili kiselinski stabilnih enteričkih prevlaka. Pripremljene su i dvije novije soli propionil eritromicina A (N-acetilcistein i merkaptosukcinat) koje kombiniraju antibiotske i mukolitičke aktivnosti u jednom agensu.<sup>24</sup>

Modificiranje složene strukture molekule eritromicina A kemijskom transformacijom C-9 karbonilne skupine i supstitucijom hidroksilnih skupina na položaju C-6, C-11, odnosno C-12 pokazalo se najuspješnije. Dobar rezultat su dale i zamjena atoma vodika na C-8 položaju te 11,12-ciklizacija aglikona. Kao rezultat tih kemijskih promjena na aglikonskom prstenu pojavljuje se nekoliko novih polusintetskih makrolida, derivata eritromicina A. Strukturne modifikacije na C-9 karbonilnoj skupini dale su oksime i hidrazone, manje podložne intramolekularnoj ciklizaciji, no često i slabije antibiotske aktivnosti od eritromicina A, ali priređeno je i nekoliko uspješnih izuzetaka. Najranija modifikacija dala je roksitromicin, 9-[O-(2-metoksietoksi)-metil]oksimski derivat eritromicina A (slika 9), a u serumu postiže znatno više koncentracije od eritromicina A.<sup>1</sup>



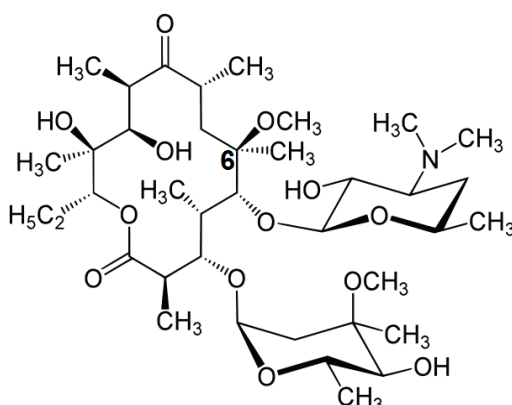
Slika 9. Strukturna formula molekule roksitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 25)

Eritromicilamin je jedan od najstarijih derivata eritromicina A. Formalno je rezultat reduktivne aminacije C-9 karbonilne skupine. Međutim, i on i njegov N-benzilidenski derivat postižu izuzetno nisku razinu u krvi kada se daju oralno. Diritromicin je oksazin pripravljen iz eritromicilamina i (2-metoksietoksi)acetaldehida, a zapravo je 9-deokso-11-deoksi-9,11-{imino-2-[2-(2-metoksietoksi)etilen]-oksi}-(9*S*)-eritromicin A (slika 10). Upravo to nastajanje eritromicilamina kao aktivnog metabolita produžava biološki poluživot diritromicina.<sup>1,24</sup>



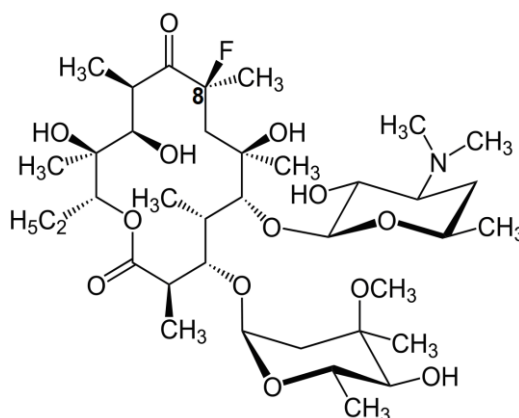
Slika 10. Strukturna formula molekule diritromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 26)

Inhibiranju intramolekulske ciklizacije uspješno se doskočilo i serijom O-alkil derivata eritromicina A, u čemu prednjači klaritromicin, 6-O-metileritromicin A (slika 11). Karbonilni kisikov atom na položaju C-9 ostvaruje intramolekulsku vodikovu vezu s hidroksilnim atomom kisika na položaju C-11.<sup>1</sup> Kiralni centri aglikona imaju apsolutne konfiguracije jednake onima u molekuli eritromicina A.<sup>27</sup> Njegova antimikrobna aktivnost nadmašuje sam eritromicin A, kao i azitromicin.<sup>1</sup>



Slika 11. Strukturna formula molekule klaritromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 28)

Zanimljiv se pokazao i produkt zamjene C-8 atoma vodika aglikona eritromicina A s atomom fluora, fluritromicin (slika 12). Tom susptitucijom je blokiran dehidratacijski korak u stvaranju anhidrohemiketala. Anaerobne bakterije očitovale su najveću osjetljivost upravo prema njemu.<sup>1</sup>



Slika 12. Strukturna formula molekule fluritromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 29)

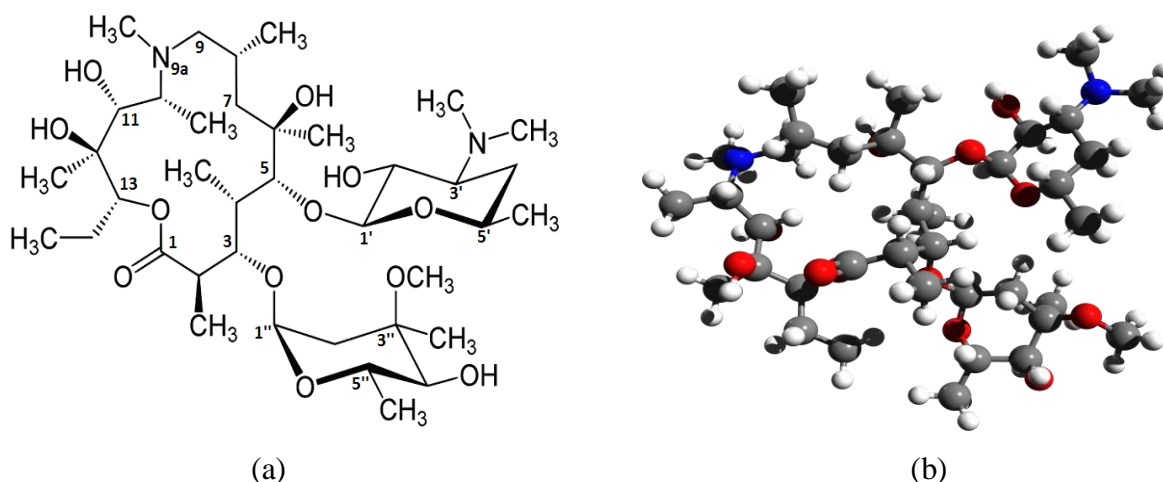
Treba spomenuti i 11,12-karbonat eritromicina A, ciklički ester koji zadržava antibakterijska svojstva i onemogućuje stvaranje intramolekulskog enolnog etera te sprječava spiroketalizaciju.<sup>1</sup>

## 2.2. Azalidi

Azalidi su klasa makrolidnih antibiotika koji sadrže atom dušika u laktonskom prstenu. Prvi i glavni predstavnik azalida je antibiotik azitromicin.<sup>30</sup> Karakterizira ga 15-eročlani laktonski prsten s metil-supstituiranim atomom dušika na položaju 9a unutar makrocikličkog prstena (slika 13).<sup>31</sup> Dušikov atom u laktonskom prstenu utječe na farmakokinetička svojstva i povezan je s većom stabilnošću molekule.<sup>30</sup>

### 2.2.1. Azitromicin

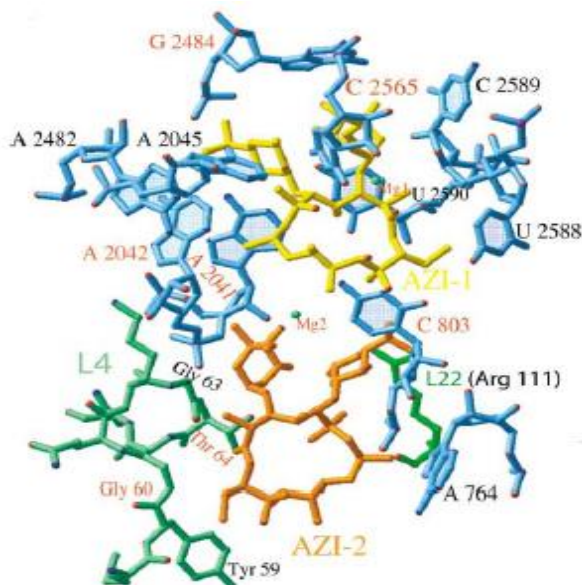
Izum azitromicina, djelatne tvari makrolidnog antibiotika *Sumamed* (tržišna marka u Hrvatskoj), spada među značajnija dostignuća u novijoj znanstvenoj povijesti. S aspekta komercijalizacije znanstvenih istraživanja vjerojatno je najveće. Ovaj izum ujedno je i velik doprinos znanosti, medicini i poboljšanju kvalitete života na globalnoj razini. Iznimno terapijsko djelovanje učinilo je azitromicin jednim od najuspješnijih antibiotika na svjetskoj razini. Karakterizira ga jednostavan način upotrebe, specifičan mehanizam prodiranja u tkiva i prijenosa do mjesta infekcije, te visoka koncentracija u tkivima što rezultira kontinuiranim baktericidnim djelovanjem na većinu patogenih mikroorganizama. Današnji uobičajeni kemijski naziv za azitromicin je 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A.<sup>32</sup>



Slika 13. (a) Strukturna formula molekule azitromicina; (b) Prostorni model molekule azitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 33)

Azitromicin se danas upotrebljava kao vrlo učinkovit lijek za liječenje raznih bakterijskih infekcija gornjih i donjih dišnih puteva, infekcija kože i potkožnog tkiva, spolno prenosivih bolesti, infekcija želuca i dvanaesnika, upale zdjelice te sve više i za prevenciju bakterijskih infekcija u djece i onih sa slabim imunitetom. Spektar antibakterijskog djelovanja azitromicina sličan je eritromicinu A, no učinkovitiji je u borbi protiv anaerobnih i gram-negativnih bakterija, posebice protiv bakterije *Haemophilus influenzae*. Azitromicin djeluje ciljano prenoseći se do mjesta infekcije putem bijelih krvnih stanica. U upaljenim tkivima postiže visoku koncentraciju te se u njima zadržava i nakon prestanka uzimanja lijeka. Azitromicin je stabilniji od eritromicina A u kiselim uvjetima, pa mu ne treba zaštita od želučane kiseline. U sirovini za proizvodnju lijeka dolazi kao bijeli kristalinični prah u obliku azitromicina dihidrata. Naravno, otapanjem u tijelu, djelatna tvar je opet samo azitromicin te kristalni oblik nije važan za aktivnost azitromicina.<sup>32</sup>

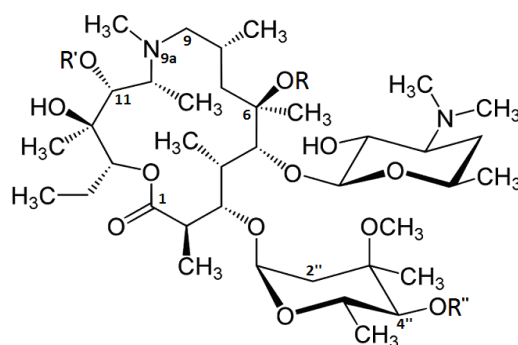
Azitromicin se veže, kao i ostali makrolidni antibiotici, na podjedinicu 50S bakterijskog ribosoma sprječavajući sintezu bakterijskih proteina, čime onemogućava rast i razmnožavanje bakterije. Pronađena su dva mjesta vezanja azitromicina u tunelu 50S podjedinice, što je dovelo do produljene konformacijske promjene u 23S rRNK (slika 14). Laktonski prsten azitromicina nalazi se u istoj ravnini kao laktonski prstenovi eritromicina A, roksitromicina i klaritromicina. Azitromicin dijeli najveći broj interakcija promatranih za eritromicin A. Baze 23S rRNK doprinose vezanju AZI-1 za primarno vezno mjesto azitromicina kroz hidrofobne interakcije. Pretpostavljeni magnezijev ion, koji je vjerojatno koordiniran molekulama vode, može doprinijeti interakciji putem vodikovih veza sa šećerom kladinozom i laktonskim prstenom. Iznenadujuće, atom dušika umetnut u laktonski prsten ne doprinosi izravno vezanju azitromicina. Međutim, ova modifikacija mijenja konformaciju laktonskog prstena dovoljno da dovede nove kontakte na ovaj magnezijev ion i 23S rRNK. Suprotno AZI-1, koji ostvaruje interakcije isključivo s domenama IV i V 23S rRNK, AZI-2 (vezan za sekundarno vezno mjesto azitromicina) također djeluje u interakciji s ribosomskim proteinima L4, L22 i domenom II 23S rRNK. Glavni izvor interakcija potječe od vodikovih veza između AZI-2 i proteina L4, kao i drugog pretpostavljenog magnezijevog iona. AZI-2 izravno kontaktira AZI-1 preko vodikove veze između atoma dušika dezozaminskog šećera AZI-1 i hidroksilnog atoma kisika AZI-2 na položaju C-12, što dovodi pojačanog vezanja azitromicina. Ovakav kontakt nije moguć u 14-eročlanim makrolidima, ograničavajući selektivnost sekundarnog veznog mjesta na 15 ili 16-eročlane makrolide.<sup>30</sup>

Slika 14. Lokalno okruženje oko dvije molekule azitromicina.<sup>30</sup>

### 2.2.2. O-metil derivati azitromicina

Budući da antimikrobna aktivnost klaritromicina (6-O-metil derivata eritromicina A) nadmašuje onu eritromicina A, kao i azitromicina, bilo je logično da i znanstvenici PLIVE intenzivno potraže vlastiti sintetski put do O-metil derivata azitromicina (slika 15).<sup>1</sup> O-metilacija azitromicina napredovala je korak po korak s dva glavna puta, počevši pojedinačno od C-6 i C-11 hidrosilnih skupina. Nakon sinteze serije O-metil derivata azitromicina, njihove antibakterijske aktivnosti uspoređene su s onima azitromicina.<sup>34</sup> Za cijelu seriju O-metil derivata eritromicina A i azitromicina vrijedi da njihova antimikrobna aktivnost *in vitro* opada porastom broja metilnih skupina.<sup>1</sup> 6-O-metilazitromicin bio je nešto manje biološki aktivan od azitromicina. Iznenadujuće, metilacija sekundarne hidroksilne skupine na položaju C-11 rezultirala je povećanjem njegove *in vitro* aktivnosti.<sup>34</sup>

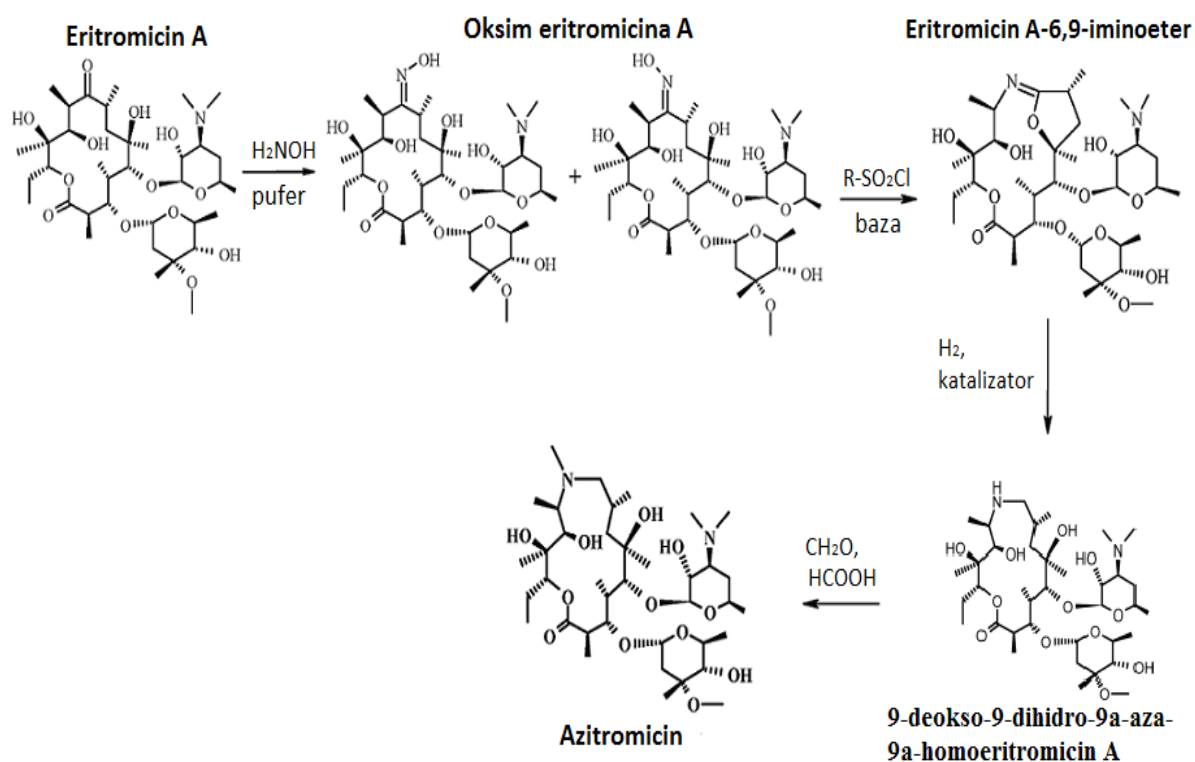
Makrolid	R	R'	R''
6-O-metilazitromicin	CH <sub>3</sub>	H	H
6,11-di-O-metilazitromicin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
11-O-metilazitromicin	H	CH <sub>3</sub>	H
6,11,4''-tri-O-metilazitromicin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



Slika 15. Strukturne formule molekula O-metil derivata azitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 1 i 33)

2.2.3. *Sinteza azitromicina*

Azitromicin je dobiven u nekoliko sintetskih koraka: oksimacijom eritromicina A, Beckmannovom pregradnjom dobivena oksima eritromicina A s aromatskim sulfokloridima, zatim redukcijom iminoetera eritromicina A te konačno metiliranjem u eritromicinski prsten uvedenoga atoma dušika.<sup>32</sup>



Slika 16. Shematski prikaz sinteze molekule azitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 35 i 36)

Prvotna je ideja bila spojiti sulfonamide s makrolidima i tako riješiti problem unakrsne rezistencije. Tako je predloženo da se analogno N-(supstituiranim-benzensulfonil)-derivatima eritromicilamina sintetiziraju odgovarajući sulfoesteri oksima eritromicina A. Međutim, tijekom reakcije aciliranja oksima došlo je do spontanog Beckmannovog pregrađivanja oksima te, uz sudjelovanje 6-OH skupine aglikonskog prstena, do nastajanja bicikličkog iminoetera eritromicina A. Katalitičkom redukcijom iminoetera dobiven je 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A. On je, u usporedbi s eritromicinom A, pokazao dobru antibakterijsku aktivnost na više bakterijskih sojeva, a posebice na gram-negativne bakterije. To je ujedno bio prvi patent koji je opisao uvođenje atoma dušika u aglikonski dio molekule eritromicina A i pripremu jednog od najvažnijih intermedijera u



sintezi azitromicina. Reakcijska shema prikazana na slici 16 danas izgleda jednostavno, no u laboratorijskoj praksi, prije 40 godina, uz tada vrlo ograničene analitičke metode, bilo je posve drugačije. Naime, očekivalo se da će Beckmannovo pregrađivanje oksima jednoznačno dati 9a-laktam, koji bi bio uobičajen produkt ove reakcije. Međutim, TLC-analiza pokazala je prisutnost dviju supstanci, glavne - nazvane LG, i nusprodukta - nazvanog LD. U spektru masa LD je pokazivao molekulski ion za koji je  $m/z = 748$ , što je odgovaralo molekulskoj masi laktama, dok je LG imao molekulsku masu nižu za jednu molekulu vode. Na osnovi fizikalno-kemijskih konstanti i sklonosti intramolekulskoj ciklizaciji 6-OH skupine poznatoj iz literature, pretpostavljena je 6,9-biciklička iminoeterska struktura spoja. Katalitičkom redukcijom spoja dobiven je produkt čija je struktura cikličkog amina potvrđena fizikalno-kemijskim konstantama i sintezom odgovarajućih O- i N-supstituiranih derivata. 6,9-iminoeter patentno je zaštićen postupkom pripreme i fizikalno-kemijskim konstantama, a bez definirane strukture, kao ključni međuprodukt u sintezi do tada neopisanog 15-eročlanog makrolida. Struktura 6,9-iminoetera potvrđena je poslije rendgenskom strukturnom analizom njegova aglikona dobivenog kiselokataliziranom hidrolizom obaju šećera. Za razliku od LG-a, LD je bio otporan čak i na žestoke uvjete katalitičke redukcije. Njegova je struktura riješena tek 1990-ih godina zahvaljujući modernim NMR-tehnikama, koje su pokazale da je došlo do otvaranja prstena i nastanka lančaste strukture *seco*-makrolida.<sup>32</sup>

#### 2.2.4. Rendgenska strukturna analiza azitromicina

Molekula azitromicina kristalizira kao dihidrat, a valjanost strukture potvrđena je termogravimetrijskom analizom, a zatim jednoznačno i rendgenskom strukturnom analizom monokristalnog uzorka azitromicina dihidrata dobivenog taloženjem sirovog produkta iz smjese aceton/voda i rekristalizacijom iz etera.<sup>32,32b</sup>

Opće značajke 15-eročlanog laktonskog prstena molekule azitromicina, kao i međuatomske udaljenosti i kutovi, u skladu su s očekivanjima i slažu se s vrijednostima iz sličnih 14-eročlanih makrolida. Usporedba vrijednosti kutova i duljina veza unutar aglikona i šećernih jedinica s onima iz 14-eročlanih makrolida pokazuje da oni u suštini slijede sličan trend, osim naravno, u području metiliranog dušikovog atoma. Udaljenosti oko atoma dušika C9-N9a i N9a-C10 iznose 1,48(8) i 1,49(8) Å, a kut C9-N9a-C10 iznosi 109,2(5)°. Laktonski

prsten molekule azitromicina povezan je  $\alpha$  i  $\beta$ -glikozidnom vezom s molekulama L-kladinoze i D-dezozamina, a oba su šećera u konformaciji stolice s orijentacijom 'up-up' (poglavlje 2.3.).

U molekuli azitromicina prisutne su dvije intramolekulske vodikove veze N9a...O6 i O3"...O4" duljina 2,81 i 2,69 Å (slika 13a). Nezavisne formulske jedinice u elementarnoj ćeliji međusobno su direktno povezane vodikovim vezama O2'...O4" i O12...O6" duljina 2,83 i 2,79 Å, dok u drugim intermolekulskim vodikovim vezama sudjeluju molekule vode. Molekule vode su od presudne važnosti za stabilnost kristalne strukture. Međusobno su povezane vodikovom vezom O(W1)...O(W2) duljine 2,80 Å. Osim ove vodikove veze, one čine još četiri intermolekulske vodikove veze. Na ovaj način se kroz cijeli prostor kristalne strukture proteže mreža vodikovih veza s bazom na hidroksilnoj skupini na položaju C-12. To je razlog zašto je tvrdoća kristala neuobičajeno velika za ovu vrstu spojeva.

Za razliku od azitromicina, eritronolid azitromicina ne gradi hidrat, a nepostojanje šećernih jedinica vezanih za 15-eročlani laktoski prsten umanjuje broj intra- i intermolekulskih vodikovih veza, što se očituje u manjoj postojanosti kristala. Usporedba vrijednosti kutova i duljina veza s onima iz molekule azitromicina pokazuje potpuno slaganje, što ukazuje da se vezanjem šećera konformacija aglikona ne mijenja značajno. Eritronolid azitromicina nema gotovo nikakvu biološku aktivnost, a to upućuje na ključnu ulogu šećera u vezanju na ribosome.<sup>37</sup>

#### 2.2.5. Metalni kompleksi azitromicina

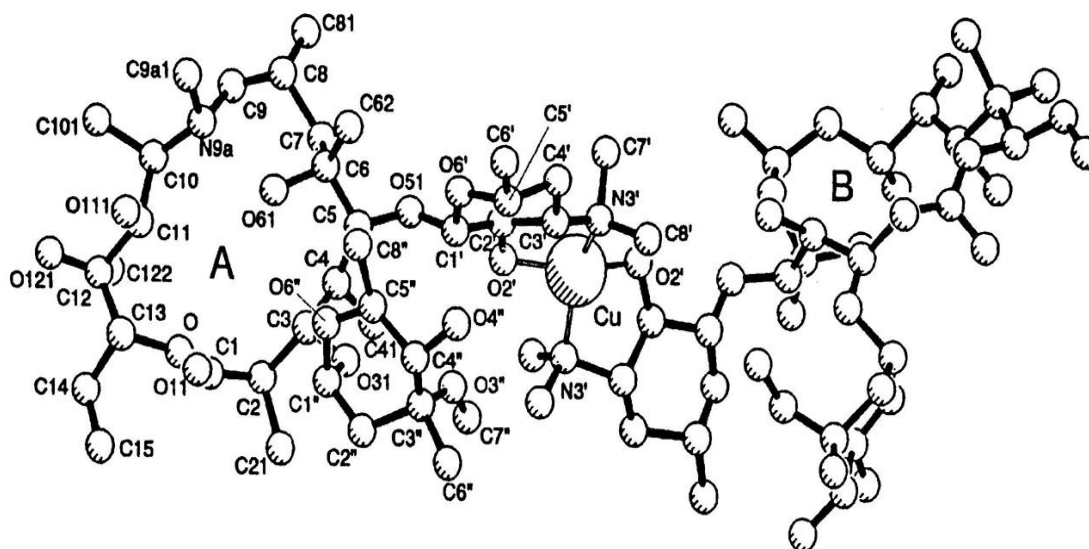
Prisutnost metala i stvaranje metalnih kompleksa mogu znatno utjecati na stabilnost, raspodjelu, biotransformaciju, eliminaciju i druge karakteristike antibiotika. Proučavano je nastajanje 2:1 kompleksa azitromicina s ionima bakra(II), cinka(II), kobalta(II), nikla(II), magnezija(II) i kalcija(II). Ti spojevi pokazuju jednaku biološku *in vitro* aktivnost kao azitromicin. Stoga uvođenje metalnih atoma i stvaranje odgovarajućih kompleksa s azitromicinskom molekulom ne mijenja njegovu antibakterijsku aktivnost. Navedeni kompleksi su izostrukturalni, ali različiti u usporedbi s kompleksom bakra(II). Kompleks bakra(II) je najstabilniji i odabran je za određivanje kristalne i molekulske strukture metodom difrakcije rendgenskih zraka na monokristalu.

Neobična značajka kristalne strukture ovog kompleksa je velika šupljina koja se stvara između stupova izgrađenih od kompleksnih molekula duž kristalografske osi *b*. Šupljina je popunjena molekulama otapalima (voda i/ili metanol) koje već na sobnoj temperaturi

napuštaju kristal, a to uzrokuje raspadanje kristala.<sup>38</sup> Kristalnu strukturu stabiliziraju vodikove veze između molekula otapala i kompleksne molekule.<sup>1</sup>

U molekuli kompleksa bakrov(II) ion povezuje dvije molekule azitromicina preko dva tercijarna atoma dušika i dva atoma hidroksilnog kisika iz dva dezozaminska šećera. Ostvarena je nepravilna kvadratna koordinacija oko atoma bakra s vrijednostima kutova u rasponu od 88 do 97°. Duljine veza Cu-O od 1,88(2) i 1,85(2) Å te Cu-N od 2,00(3) i 2,03(3) Å su uobičajene. Duljine veza i kutovi u 15-eročlanim prstenovima i šećernim komponentama slični su onima opaženima u samom dihidratu azitromicina (slika 17).

Analogno vezanje na dio dezozamina pronađeno je u eritromicinskom kompleksu s cinkom(II). Taj kompleks je strukturno karakteriziran u krutom stanju, a cinkov atom je u toj strukturi koordiniran samo s jednom molekulom eritromicina A, dok su drugi ligandi jedan monodentatno i jedan bidentatno vezani acetatni ion, te jedna molekula vode. Kristalne strukture drugih metalnih kompleksa iz reda eritromicina nisu poznate.<sup>38</sup>

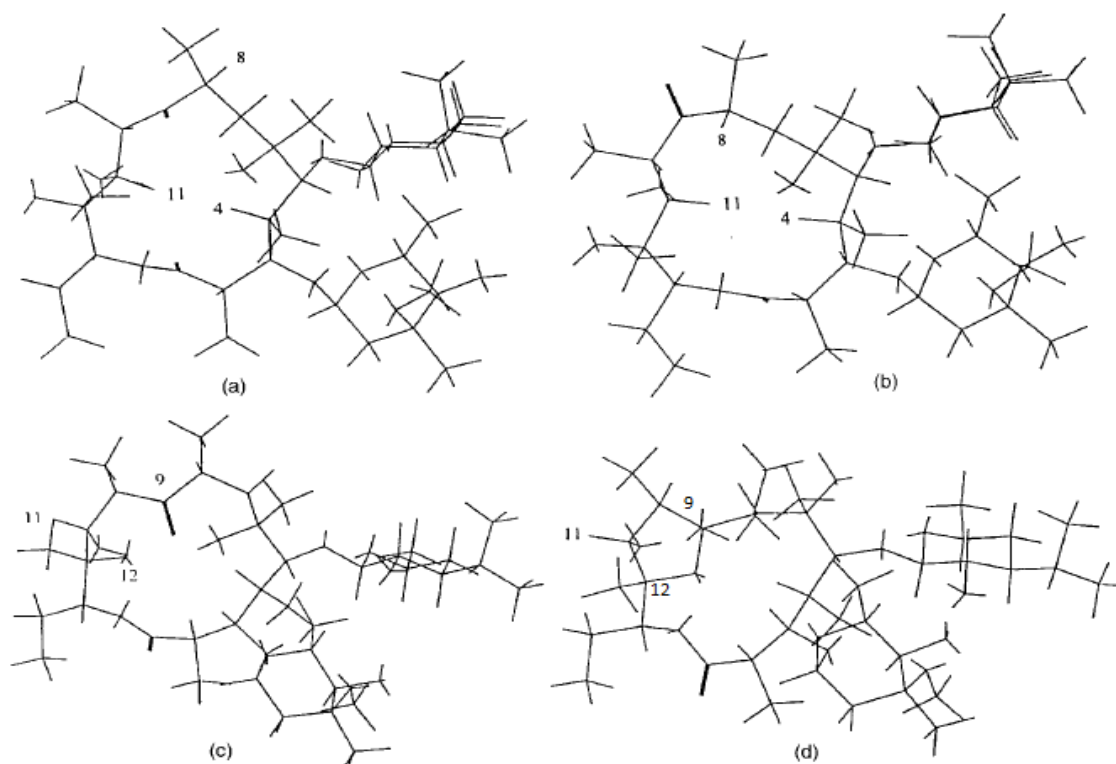


Slika 17. Molekulska struktura kompleksa Cu(II)-azitromicina. Bakrov atom je koordiniran s dvije molekule azitromicina (A i B). Oba imaju analognu shemu označavanja atoma. Atomi vodika su izostavljeni radi preglednosti.<sup>38</sup>

### 2.3. Konformacijska analiza eritromicina A, klaritromicina i azitromicina

Važna značajka organskih spojeva je da nisu statični, već imaju konformacijsku slobodu rotacije, istezanja i savijanja. Svaki različiti raspored atoma neke molekule u prostoru naziva se konformacija, a ako je određena konformacija minimum na plohi potencijalne energije, radi se o konformeru. Različiti konformeri mogu imati znatno različite energije i relativni udio svakog od njih povezan je s razlikom energije između njih. Stoga sve gore navedeno vrijedi i za makrolide jer se radi o organskim molekulama.<sup>39</sup>

Eritromicin A u vodenoj otopini postoji kao smjesa tri konformera. Glavni konformer (preko 90 %) je u "folded-out" konformaciji (slika 18a) i ima vrlo sličnu konformaciju kao i u kristalnom stanju, osim orijentacije obaju šećera koja je donekle različita. Manje zastupljeni konformer je različit u usporedbi s klaritromicinom i azitromicinom te nema antibakterijsku aktivnost. Radi se o prijelazu između "folded-out" i "folded-in" konformacije, a naziva se 8-*endo*-folded-out konformacija (slika 18b). Ovaj konformer je u brznoj izmjeni s glavnim konformerom. Dokazi za "folded-in" konformaciju molekule eritromicina A u ravnoteži s dominantnom "folded-out" konformacijom su rijetki. "Folded-out" konformaciju karakterizira unutarnji "poprečni prsten" kao posljedica približavanja vodikovih atoma H-4 i H-11 i veliki torzijski kut između vodikovih atoma H-2 i H-3. Obrnuto, "folded-in" konformaciju karakterizira međusobno približavanje vodikovih atoma H-3 i H-11 i torzijski kut između vodikovih atoma H-2 i H-3 blizu 90°. Molekula eritromicina A posjeduje fleksibilnost aglikonskog prstena u području C6-C12. Detaljna istraživanja u vodenoj otopini otkrila su postojanje trećeg konformera nazvanog ciklizabilni, koji ne mora nužno biti prisutan u mjerljivim količinama (slika 18c). U ovoj konformaciji je povoljna ciklizacija i nastanak 9,12-poluacetal eritromicina A. U vodenoj otopini pri sobnoj temperaturi 9,12-poluacetal eritromicina A predstavlja manje od 30 % eritromicina A, a pri 50 °C oko 10 % (slika 18d).<sup>1,40</sup>

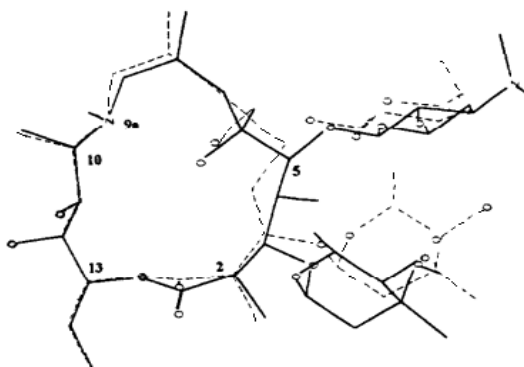


Slika 18. (a) "Folded-out" konformacija molekule eritromicina A u vodenoj otopini; (b) 8-*endo*-folded-out konformacija molekule eritromicina A u vodenoj otopini; (c) Ciklizabilna konformacija molekule eritromicina A u vodenoj otopini; (d) Konformacija molekule 9,12-poluaceta eritromicina A u vodenoj otopini. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 40)

Analiza klaritromicina u vodenoj otopini pokazala je da molekule klaritromicina u vodenoj otopini postoje uglavnom (gotovo 100 %) u "folded-out" konformaciji, slično eritromicinu A i azitromicinu. Dominantna konformacija je vrlo slična kristalnoj strukturi.

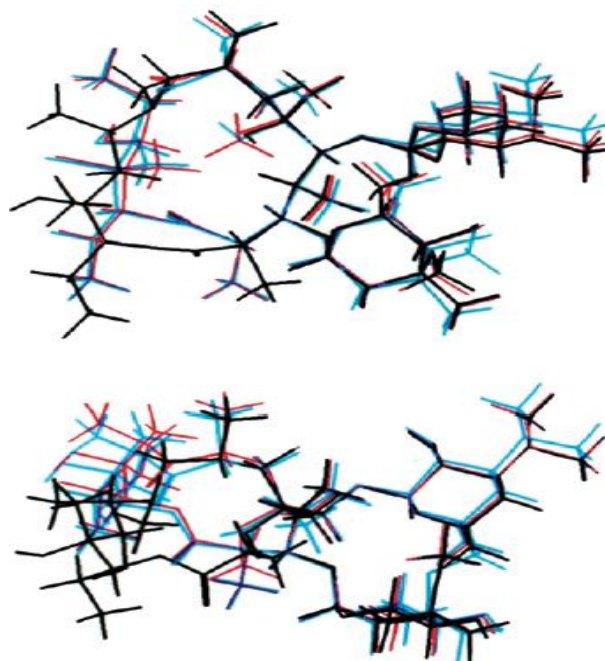
Kombinacijom NMR-spektroskopije i tehnike molekulskog modeliranja pokazano je da se konformacija molekule azitromicina u deuteriranom kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) razlikuje od one u kristalnom stanju.<sup>1</sup> U otopini je dominantna "folded-in" konformacija u C2-C5 području aglikonskog prstena, dok je u kristalnom stanju to područje "folded-out" konformacije s H2-H3 torzijskim kutom od samo  $108^\circ$ , što pokazuje da ovaj konformer ima određenu fleksibilnost u C2-C4 području (slika 19). Konformaciju u otopini karakterizira usmjerenost atoma H-3 prema atomu H-11 (slično kao i kod diritromicina), dok je u kristalnom stanju atom H-4 usmjeren prema atomu H-11 na međusobnoj udaljenosti od  $2,8 \text{ \AA}$ . Sudjelovanje "folded-out" konformera u otopini je malo, za razliku od kristalnog stanja, ali raste zamjenom  $\text{CDCl}_3$  polarnijim otapalom i porastom temperature. Područje N9a-C13 je praktički nepromijenjeno. Šećeri u molekuli azitromicina imaju istu konformaciju i orijentaciju kao i u

drugim derivatima eritromicina A, ali s većim razmakom među sobom u otopini nego u kristalnom stanju.<sup>1,40</sup>



Slika 19. Superpozicija konformacija molekule azitromicina u deuteriranom kloroforu (puna crta) i u kristalnom stanju (isprekidana crta).<sup>41</sup>

Šećeri (kladinoza i dezozamin) u sva tri promatrana makrolidna antibiotika nalaze se pretežno u konformaciji stolice s orijentacijom 'up-up', tj. s H-1 atomom dezozamina približenim H-5 atomu kladinoze. 'Up-up' orijentacija šećera je neovisna o otapalu i modifikaciji makrolidnog prstena. Preklapanje dominantnih konformera tih triju lijekova upućuje na ključnu ulogu šećera u vezanju na ribosome. Šećeri pokazuju konformacijsku homologiju (slika 20).<sup>40</sup>



Slika 20. Superpozicija dominantnih konformacija molekula eritromicina A (plavo), klaritromicina (crveno) i azitromicina (crno) u vodenoj otopini prikazana u dvije različite orijentacije.<sup>40</sup>

## 2.4. Ketolidi

Nova klasa makrolidnih antibiotika, ketolidi, izvedeni su iz 14-eročlanog makrolida eritromicina A zamjenom šećera kladinoze s karbonilnom skupinom na položaju C-3 laktonskog prstena. Hidroksilne skupine ketolida na položajima C-11 i C-12 zamijenjene su cikličkim karbamatom (slika 21).<sup>42,43</sup> Izvorno se smatralo da je šećer kladinoza važan za vezanje makrolida, ali navedene studije interakcija makrolid-ribosom pokazale su da je relativno nizak doprinos tog šećera vezanju makrolida za 50S podjedinicu.<sup>30</sup> Ove modifikacije daju ketolidima mnogo širi spektar djelovanja od ostalih makrolida i veću učinkovitost protiv rezistentnih bakterija (nisu uključeni u MLS<sub>B</sub> rezistenciju). Ketolidi imaju sličan mehanizam djelovanja kao eritromicin A i drugi makrolidi. Primjeri su telitromicin, cetromicin i solitromicin (slika 2).<sup>44</sup>

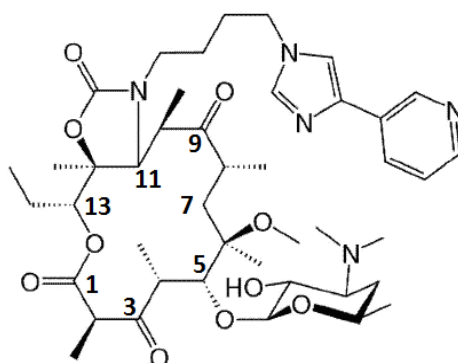
### 2.4.1. Telitromicin

Telitromicin je prvi ketolidni antibiotik koji je ušao u kliničku primjenu. Prodaje se pod komercijalnim nazivom *Ketek*.<sup>44</sup> Telitromicin ima alkil-arilni produžetak (alkilni dio: butil, arilni dio: imidazolil-piridin) koji je vezan za njegov ciklički karbamat (slika 21).<sup>45</sup> Taj produžetak znatno pojačava vezanje telitromicina na bakterijski ribosom. Afinitet telitromicina za 50S podjedinicu ribosoma bakterijskih sojeva osjetljivih na eritromicin A je 10 puta veći od afiniteta eritromicina A, a prema sojevima rezistentnima na eritromicin A telitromicin pokazuje 20 puta veći afinitet.<sup>44</sup> Makrolaktonski prsten telitromicina veže se za domenu V 23S rRNK pomoću vodikove veze koja uključuje njegovu 3-keto skupinu i preko hidrofobnih interakcija. Dodatne interakcije s tom domenom formira telitromicinski šećer dezoamin, slično načinu vezanja većine makrolida na velike ribosomske podjedinice bakterije. Ovaj šećer je uključen u elektrostatske i hidrofobne interakcije s domenom V. Hidroksilna skupina dezoamina na položaju C-2 također ostvaruje vodikovu vezu. Telitromicin ostvaruje interakcije i s domenom II 23S rRNK.<sup>46</sup> Atom ugljika na položaju C-6 je metiliran, kao što je slučaj kod klaritromicina, kako bi se postigla bolja stabilnost u kiselom mediju i izbjegla hemiketalizacija s 3-keto skupinom.<sup>45</sup>

Usporedba oblika vezanja telitromicina i makrolida iz eritromicinske obitelji za domenu V 23S rRNK pokazala je da je vezanje telitromicina manje ometeno modifikacijama nukleotida. Farmakološka istraživanja su pokazala da dodatne interakcije s domenom II

dovode do čvršćeg vezanja, ali i da vjerojatno nadoknađuju promjene na mjestu vezanja zbog bakterijske rezistencije. Daljnja stabilizacija vezanja telitromicina postiže se jedinstvenim slaganjem njegovog alkil-arilnog produžetka. Stoga je vjerojatno da interakcije s domenom II omogućuju vezanje na ribosome rezistentnih patogena, čak i kada je mjesto vezanja makrolida u domeni V modificirano. Ovaj nalaz je konzistentan s prethodnim opažanjima koja pokazuju da se troleandomicin, makrolid s dezozaminskim šećerom bez hidroksilne skupine, ipak veže na veliku ribosomsku podjedinicu, uslijed interakcija s domenom II. Studije vezanja telitromicina i cetromicina pružaju strukturnu osnovu za učinkovitost ketolida protiv patogena rezistentnih na makrolide.<sup>46</sup>

Brojna klinička istraživanja nedvojbeno su dokazala kliničku učinkovitost telitromicina u liječenju infekcija gornjeg i donjeg dijela dišnog sustava koje su uzrokovane tipičnim i atipičnim bakterijama, uključujući sojeve koji su rezistentni na beta-laktamske antibiotike i neke makrolide. Telitromicin ima dobru aktivnost i protiv gram-negativnih bakterija.<sup>44</sup>



Slika 21. Strukturna formula molekule telitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 47)

#### 2.4.2. Cetromicin (ABT-773)

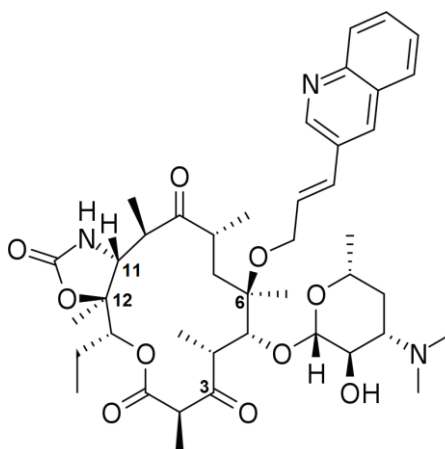
Cetromicin je ketolid sličan telitromicinu, trenutno jedinom farmakološki odobrenom ketolidu. Posjeduje kinolilalilni bočni lanac na O-6 položaju laktonskog prstena (slika 22), dok telitromicin ima alkil-arilni produžetak koji se grana iz C-11,12 karbamatne skupine.

Telitromicin je izvorno odobren za liječenje pneumonije, akutnog sinusitisa i akutnog kroničnog bronhitisa. Međutim, zbog hepatotoksičnosti i ostalih teških nuspojava danas se koristi samo iznimno. Zaključni pokusi su pokazali da telitromicin blokira aktivnost nikotinskih acetilkolinskih receptora u oku, jetri i mozgu. Cetromicin je podvrgnut istraživanjima te je dokazano da on ne dijeli profil toksičnosti telitromicina. Još uvijek nije



dokazana dovoljna djelotvornost cetromicina u liječenju antraksa i pneumonije, stoga on nije dobio odobrenje za puštanje lijeka u promet.<sup>48</sup>

Rezultati istraživanja pokazuju da je kinolilalilna skupina povezana s laktonskim prstenom kroz vrlo fleksibilnu vezu, koja omogućuje da ostatak zauzima različite prostorne položaje. Prirodnu fleksibilnost odražava elektronska gustoća kinolilalilne skupine koja se čini slabije riješena. Položaj kinolilalila koji najbolje odgovara elektronskoj gustoći omogućuje da atom dušika kinolilalila tvori vodikovu vezu s hidroksilnim atomom kisika iz domene II 23S rRNK. Domena V 23S rRNK pokazuje konformacijske promjene kroz interakciju s cetromicinom. Baze domene V 23S rRNK tvore mrežu hidrofobnih interakcija s karbamatnom skupinom cetromicina. Zajedno s vodikovom vezom između hidroksilnog atoma kisika iz 23S rRNK i atoma dušika iz karbamatne skupine tvori interakcije koje daju glavni doprinos poboljšanom vezanju cetromicina na ribosom u usporedbi s ostalim 14-eročlanim makrolidima kojima je šećer kladinoza neophodan. Iako je položaj cetromicina pomaknut u usporedbi s roksitromicinom ili eritromicinom A, on ostvaruje najveći broj interakcija koje su zapažene kod ovih makrolida. Položaj cetromicina unutar peptidnog tunela pomaknut je za oko 3 Å u usporedbi s položajem ovih makrolida, ali ipak dovodi do istog mehanizma inhibiranja, tj. blokiranja na putu nastajanja polipeptidnog lanca preko 50S podjedinice. Ovaj pomak remeti određene hidrofobne interakcije, ali dovodi do dodatnih hidrofobnih interakcija dezozamina s 23S rRNK. Strukturna usporedba cetromicina s roksitromicinom pokazuje da je kinolilalilna skupina u aktivnom mjestu u sličnom položaju i orijentaciji s oksimskim dijelom roksitromicina. Oba položaja ukazuju na interakciju s domenom IV 23S rRNK. Domena IV, za koju se prethodno nije smatralo da sudjeluje u vezanju ketolida, pridonosi pozicioniranju kinolilalilne skupine kroz hidrofobne interakcije.<sup>30</sup>

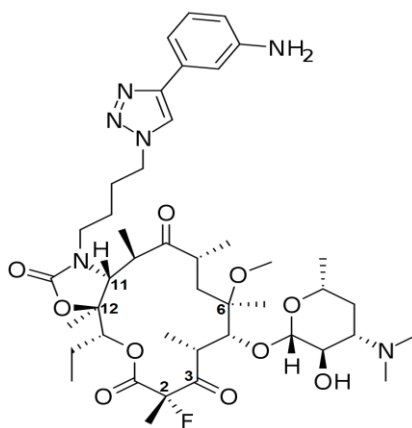


Slika 22. Strukturna formula molekule cetromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 49)

### 2.4.3. Solitromicin - prvi fluoroketolid

Solitromicin je makrolid najnovije generacije koji ima atom fluora na položaju C-2 laktonskog prstena i alkil-arilni bočni lanac (alkilni dio: butil, arilni dio: aminofenil-1,2,3-triazol) koji se razlikuje od onoga u telitromicinu.<sup>22</sup> Aminofenil-1,2,3-triazolski produžetak solitromicina, koji je kao i kod telitromicina ugrađen u bočni lanac C-11,12 karbamata, metabolički je puno stabilniji od imidazolil-piridinskog produžetka telitromicina (slika 23).<sup>50</sup> Sličan je starijim makrolidima po tome što ne inhibira nikotinske acetilkolinske receptore. Zato solitromicin ne uzrokuje nuspojave povezane s telitromicinom. Djeluje na tri mjesta na bakterijskom ribosomu, ima aktivnost protiv sojeva otpornih na starije makrolide i uglavnom djeluje baktericidno.<sup>22</sup>

Aminofenil-1,2,3-triazolski produžetak osigurava višestruke interakcije solitromicina s ribosomom koje nisu uočene u kompleksu telitromicin-ribosom. Deozaminski šećer solitromicina reagira s ribosomom na isti način kao i kod ostalih makrolida. Osim jedinstvenog bočnog lanca, solitromicin je jedinstven po tome što posjeduje atom fluora u svojoj strukturi. Testiranje mnogih analoga sa i bez atoma fluora otkrilo je da postoji komplementarnost u ribosomskim interakcijama između atoma fluora i aminofenila u bočnom lancu. Atom fluora sprječava karbonilnu skupinu da se enolizira kao što je vidljivo kod telitromicina, reagira s bakterijskim ribosomom u peptidnom tunelu i daje aktivnost solitromicina protiv sojeva rezistentnih na makrolide (uključujući sojeve otporne na telitromicin). Dakle, solitromicin ima tri mjesta interakcije s 23S rRNK bakterijskih ribosoma, što ga čini četvrtom generacijom makrolida. Solitromicin se nalazi u završnoj fazi kliničkog testiranja i uskoro se može očekivati da će biti pušten u promet.<sup>22</sup>

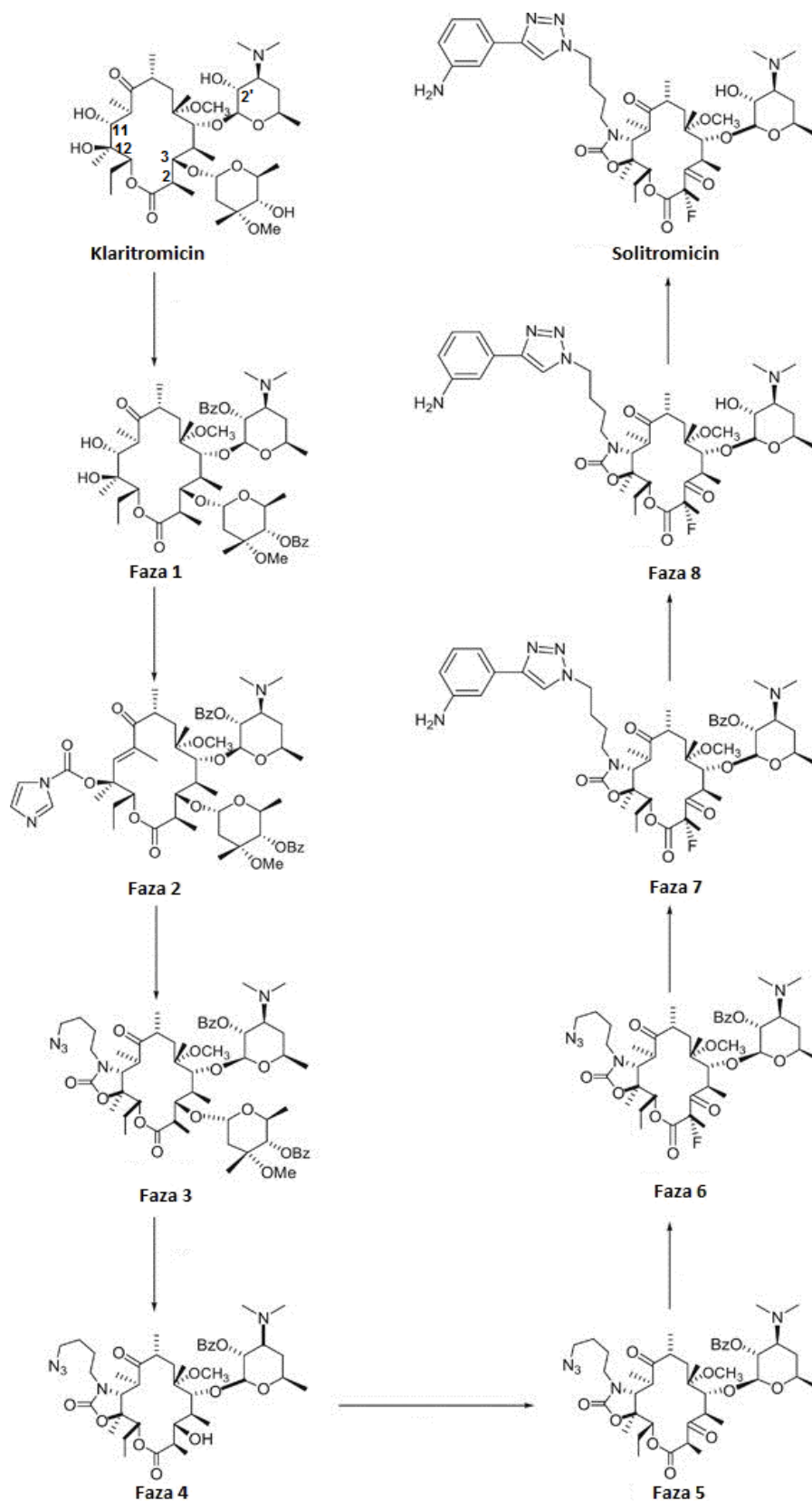


Slika 23. Strukturna formula molekule solitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 51)

#### 2.4.4. *Sinteza solitromicina*

Solitromicin je složena molekula koja ima 13 kiralnih centara. Proizvodnja solitromicina provodi se u devet sljedećih koraka: zaštita / uklanjanje zaštite s hidroksilne skupine na položaju C-2 dezozamina, aktivacija C-11 i C-12 atoma laktorskog prstena, ugradnja karbamata na položaju C-11 i C-12, uklanjanje kladinoze, oksidacija na položaju C-3, fluoriranje na položaju C-2, formiranje aminofenil-1,2,3-triazolskog dijela i stvaranje željenog polimorfa.

Shema za polusintetski put prikazana je na slici 24. Proizvodnja solitromicina započinje s komercijalno dostupnim klaritromicinom. Klaritromicin je izabran kao polazna supstanca jer predstavlja prikladan način za uspostavljanje većine kiralnih centara. Međutim, u sintezi solitromicina nastaju dva nova kiralna centra. Karbamat nastaje s visokim stupnjem stereokemijske kontrole i ta transformacija je dobro poznata u literaturi. Stvaranje drugog kiralnog centra događa se tijekom fluoriranja C-2 ketolidnog međuprodukta. Fluoriranje s N-fluorobenzensulfonimidom uz prikladnu bazu daje međuprodukt S-izomer. R-izomer nije opažen kao značajan nusprodukt, što ukazuje na to da se fluoriranje dešava s jedne strane makrolidnog prstena. Pokušaji da se R-izomer dokaže bili su neuspješni, što dodatno pokazuje da je fluoriranje stereospecifično. Aminofenil-1,2,3-triazolski ostatak je još jedna jedinstvena karakteristika solitromicina. Regio-stereoizomerska kontrola supstitucije postiže se primjenom metodologije cikloadicije azid-alkina katalizirane bakrom. Pod utjecajem bakra kao katalizatora, 1,4-regioizomer selektivno se proizvodi iz azidnog međuprodukta i 3-etinilanilina. Proizvodnja solitromicina izazovan je sintetski postupak, a ukupno iskorištenje prema opisanom postupku kreće se u rasponu od 35 do 40 %.<sup>22</sup>



Slika 24. Shematski prikaz sinteze molekule solitromicina. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 22)

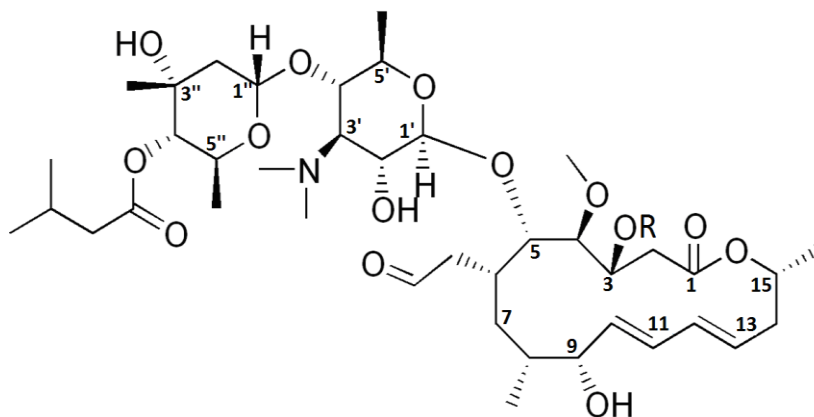
## 2.5. 16-eročlani makrolidni antibiotici

16-eročlani makrolidi predstavljaju značajnu klasu antibiotika, ali su ih zasjenili njihovi 14-eročlani analozi. Uglavnom se koriste u veterinarskoj medicini. 16-eročlani makrolidi u kliničkoj upotrebi danas su prirodno prisutni josamicin, spiramicin, karbomicin, tilozin i midekamicin, te polusintetski miokamicin, rokitamicin, tilmikozin i tildipirozin (slika 2). Iako imaju sličan antibakterijski profil (prvenstveno su aktivni protiv gram-pozitivnih i ograničenog djelovanja protiv gram-negativnih organizama), 16-eročlani makrolidi pokazuju neke prednosti u odnosu na 14-eročlane makrolide zasnovane na eritromicinu A, uključujući bolju gastrointestinalnu toleranciju, manjak interakcija lijek-lijek, te aktivnost protiv određenih rezistentnih bakterijskih sojeva zbog produljenog dometa u peptidnom tunelu, dopuštajući dodatne interakcije.<sup>52</sup> Dodatna šećerna jedinica ostvaruje interakcije s ribosomom čime se prevladava rezistencija. Ipak, manje su *in vivo* potentni od 14 i 15-eročlanih makrolida.<sup>22</sup>

### 2.5.1. Josamicin

Josamicin je prvenstveno pronađen u kulturama dvaju organizama: *Streptomyces narbonensis* i *Streptomyces kitasatoensis*. Dok *S. narbonensis* selektivno proizvodi samo josamicin, *S. kitasatoensis* proizvodi ukupno 14 16-eročlanih makrolida, zajednički nazvanih 'leukomicin'. Oni se strukturno razlikuju ovisno o njihovim supstituentima na položajima C-3 laktorskog prstena i C-4 mikaroze. Članovi s istim supstituentima obično se uzimaju u obzir zajedno, a većina biološki aktivnih parova je A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>. Ovaj par karakterizira izovalerilna skupina na C-4 položaju mikaroze, koja prvenstveno služi kao pomoć pri ulasku u ciljne stanice. Glavna strukturna razlika para je supstituent na položaju C-3 laktorskog prstena. 3-O-acetilirana polovica para (leukomicin A<sub>3</sub>) obično je manje aktivna od 3-hidroksilirane polovice (leukomicin A<sub>1</sub>). Josamicin je zapravo strukturno identičan leukomicinu A<sub>3</sub>. Razgradnja josamicina otkriva makrociklički prsten s acetilnim bočnim ogrankom na položaju O-3 i disaharid mikaminoza-mikaroza na položaju C-5 s izovalerilnom skupinom na C-4 položaju mikaroze (slika 25). Glukoza je identificirana kao biosintetsko podrijetlo obje šećerne jedinice. Usporedba strukturnih značajki molekula josamicina i eritromicina A pokazala je sličnosti ne samo u položaju mikaminoze, čija je orijentacija analogna dezozaminu, već i u izgledu laktorskog prstena. Mikarozno produljenje, koje u 16-eročlanim makrolidima

omogućuje dodatne interakcije s ribosomom, glavna je razlika između dviju klasa. Stoga su predloženi različiti mehanizmi djelovanja za dvije makrolidne skupine: 16-eročlani makrolidi su inhibitori stvaranja peptidnih veza, dok 14-eročlani makrolidi blokiraju izlazni tunel i uzrokuju prerano otpuštanje peptidnog lanca.<sup>52</sup>



R = H Leukomicin A<sub>1</sub>

R = acetil Leukomicin A<sub>3</sub>

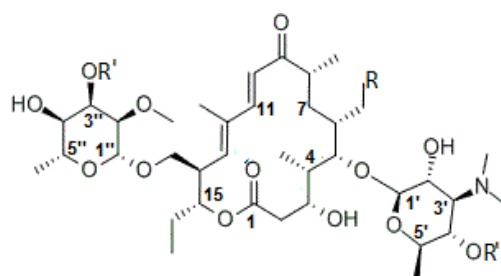
Slika 25. Strukturne formule molekula leukomicina A<sub>1</sub> i leukomicina A<sub>3</sub> (josamicina).  
(preuzeto i prilagođeno prema ref. 53)

### 2.5.2. Tilozin

Smjesa od četiri strukturno slične komponente (tilozin A, B, C i D), komercijalno poznata kao tilozin, uvedena je 1961. godine i od tada se upotrebljava kao dodatak hrani za stimulaciju rasta i antibiotik u veterinarskoj medicini. Biološka aktivnost smjese pripisuje se uglavnom tilozinu A, glavnoj komponenti s masenim udjelom većim od 80 %, iako sve četiri komponente pridonose djelovanju. Tilozin je prvotno izoliran i još se komercijalno proizvodi fermentacijom iz bakterija *Streptomyces fradiae*.

Jezgra tilozina A je 16-eročlani poliketidni makrociklički prsten nazvan tilakton. Tri šećera su pričvršćena na tilakton:  $\beta$ -D-mikaminoza i  $\alpha$ -L-mikaroza u disaharidnom obliku na položaju C-5 i neutralni šećer  $\beta$ -D-micinoza na položaju C-14. Kada se tretira kiselinom, tilozin A gubi šećer mikarozu i pretvara se u tilozin B. Tilozin C je veoma sličan tilozinu A, ali ima hidroksilnu skupinu na položaju C-3 micinoznog šećera umjesto metoksi skupine. Tilozin D se razlikuje od tilozina A po tome što je hidroksietilna skupina vezana na položaju C-6 tilaktona umjesto acetaldehidne skupine (slika 26).<sup>52</sup>

Makrolid	R	R'	R''
Tilozin A	CHO	CH <sub>3</sub>	Mikarozna
Tilozin B	CHO	CH <sub>3</sub>	H
Tilozin C	CHO	H	Mikarozna
Tilozin D	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	Mikarozna

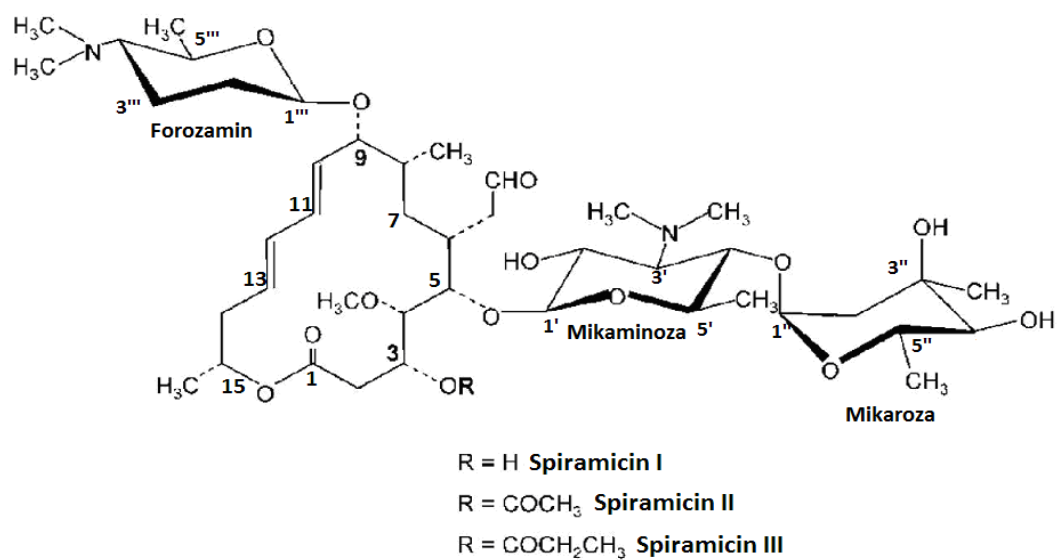


Slika 26. Strukturne formule molekula tilozina A, B, C i D. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 54)

### 2.5.3. Spiramicin

Spiramicin je kompleks makrolida kojeg čine tri komponente (I-III), koje se razlikuju u supstituentu na atomu kisika vezanom za C-3 položaj laktonskog prstena. Spiramicin I na tom položaju posjeduje atom vodika, spiramicin II acetilnu skupinu, a spiramicin III propionilnu skupinu (slika 27). Spiramicini su stabilniji od eritromicina A u kiselom mediju.<sup>55,56</sup>

Spiramicin I je makrolidni antibiotik i antiparazitik, a koristi se za liječenje toksoplazmoze i raznih drugih infekcija mekih tkiva.<sup>56</sup> Otkriven je 1952. godine kao proizvod bakterija *Streptomyces ambofaciens*.<sup>57</sup> Spiramicin I se razlikuje od leukomicina prisutnošću drugog aminošećernog supstituenta D-forozamina vezanog za O-9 atom aglikona preko  $\beta$ -glikozidne veze. Karakteriziran je pomoću <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara u organskim i vodenim otopinama. Spiramicin I može smanjiti težinu fetalne infekcije (toksoplazmoze) usporavanjem pojave fetalne bolesti i omogućavanjem većeg sazrijevanja fetalnog imunološkog sustava, a preporučuju ga mnogi istraživači u Europi i Sjevernoj Americi. Iako se koristi u Europi, Kanadi i Meksiku, spiramicin I se još uvijek smatra eksperimentalnim lijekom u SAD-u, ali se može dobiti posebnim dopuštenjem za toksoplazmozu u prvom tromjesečju trudnoće. U Europi se od 2000. godine koristi pod komercionalnim nazivom *Rovamicin*. Njegovo je djelovanje uglavnom bakteriostatsko, a kod vrlo osjetljivih sojeva djeluje baktericidno.<sup>52</sup>

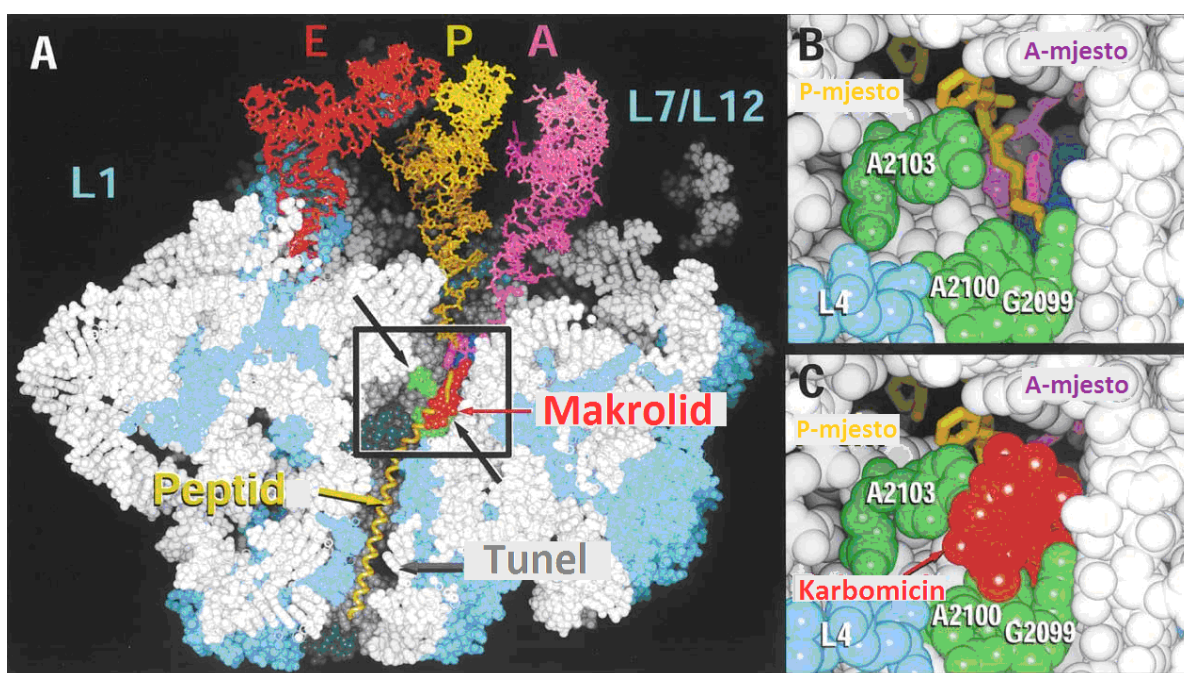


Slika 27. Strukturne formule molekula spiramicina I, II i III. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 58)



## 2.6. Strukturne sličnosti i razlike u vezanju nekih 14, 15 i 16-eročlanih makrolidnih antibiotika na ribosom

Inhibicija sinteze proteina makrolidnim antibioticima ima dvije osobitosti. Prvo, makrolidi se ne vežu za ribosome, niti inhibiraju aktivnost stvaranja peptidnih veza na ribosomima koji su već uključeni u sintezu proteina. Drugo, ribosomi koji nemaju vezane peptide mogu sintetizirati peptide u prisutnosti nekih makrolida, ali se sinteza zaustavlja prije nego što duljina produkta dosegne pet aminokiselina. Ribosomi su sposobni stvoriti kratke peptide u prisutnosti 14 i 15-eročlanih makrolida, ali njihova sposobnost stvaranja čak i jedne peptidne veze inhibirana je u prisutnosti 16-eročlanog makrolida, karbomicina A. Kristalne strukture pokazuju da se makrolidi vežu u uskom dijelu izlaznog peptidnog tunela na mjestu koje leži između peptidil-transferaznog centra i suženja u tunelu blizu proteina L4 i L22, čime se tunel blokira (slika 28).<sup>13</sup>



Slika 28. (A) Prikaz mjesta vezanja makrolidnih antibiotika na ribosomu. rRNK je prikazana bijelom, a ribosomski proteini plavom bojom. Crne strelice upućuju na otvor između peptidil-transferaznog centra i izlaznog peptidnog tunela gdje se vežu makrolidni antibiotici. Baze koje ostvaruju interakciju s makrolidnim antibioticima obojane su zeleno; (B) Detaljan pogled na izlazni peptidni tunel kroz suženje; (C) Blokirani izlazni peptidni tunel u prisutnosti makrolidnog antibiotika. Sinteza proteina nije moguća. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 13)

Šećerna grana vezana na C-5 položaju makrolida proteže se prema peptidil-transferaznom centru. To može objasniti zašto makrolidi s dugim granama koje polaze iz C-5 položaja laktorskog prstena direktnije utječu na aktivnost tog centra od makrolida s kratkim granama. Zanimljivo je da acetaldehidna skupina na C-6 položaju svakog od 16-eročlanih makrolida tvori kovalentnu vezu s atomom dušika iz 23S rRNK. Aldehidi reagiraju reverzibilno s primarnim aminima, i ako nastali karbinolamini dehidriraju, nastaju Schiffove baze. Međutim, istraživanja povezuju nastali produkt s karbinolaminom, a ne Schiffovom bazom. Karbinolaminske veze u tim strukturama mogu se otkriti rendgenskom strukturnom analizom. Atom dušika i acetaldehidna skupina sa svakog od 16-eročlanih makrolida nisu samo suprotstavljeni, nego se pridružuju i kontinuiranom elektronskom gustoćom. Nasuprot tome, takva svojstva elektronske gustoće ne opažaju se za eritromicin A i azitromicin, koji nemaju acetaldehidnu skupinu. Bilo koja modifikacija ove aldehydne skupine, čak i jednostavna redukcija hidroksilne skupine, konzistentno rezultira povećanim MIC (minimalna inhibitoriska koncentracija) vrijednostima, često više od 100 puta. Najjednostavnije objašnjenje ovih zapažanja je da karbinolaminska veza ne nastaje samo u kristalnim strukturama, nego i u živim organizmima pogođenima tim makrolidima.

Kada se strukture makrolidnih molekula usporede superponiranjem, odgovarajući atomi laktorskih prstenova i šećernih jedinica 16-eročlanih makrolida preklapaju se gotovo savršeno, a s ribosomom ostvaruju interakcije na vrlo slične načine. Zajednički supstituenti poput mikaminoze 16-eročlanih makrolida i odgovarajućeg dezozamina eritromicina A i azitromicina poklapaju se gotovo potpuno. Makrolidi se vežu na ribosom u istim niskoenergetskim dominantnim konformacijama promatranim pomoću rendgenskih zraka i NMR-a. Prema tome, svaki laktorski prsten je u "folded-out" konformaciji, a svaki šećer u konformaciji stolice s mikaminozom (ili dezozaminom) koja se okreće oko glikozidne veze približno okomito na laktorski prsten. Svaki od tih makrolida potpuno okružuje prostor tunela tako da ga izduženi polipeptidni lanac ne može proći.

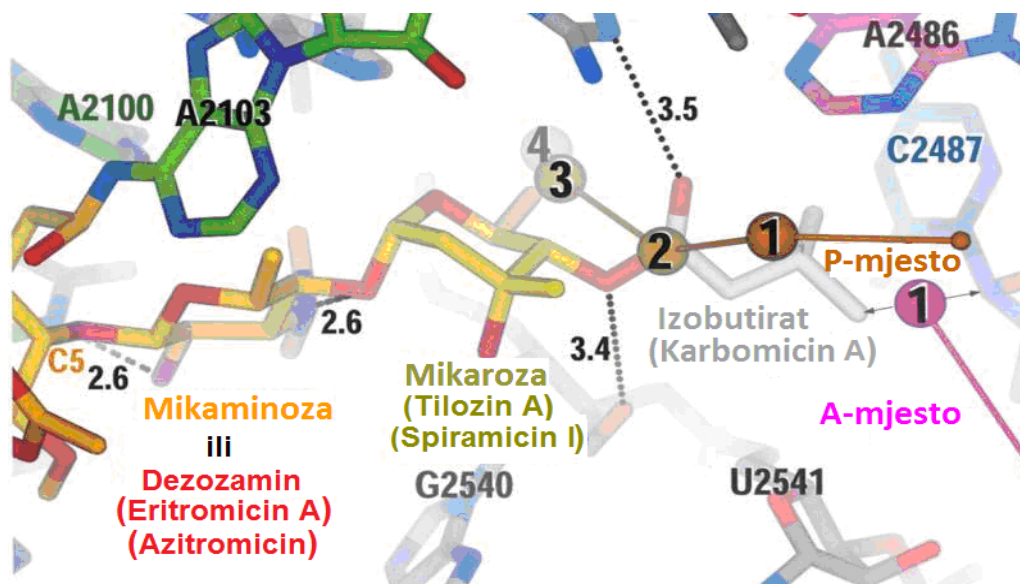
Osim doprinosa koji se može pripisati kovalentnoj vezi, jačina interakcije između makrolida i ribosoma otprilike je proporcionalna površini zauzetoj nakon vezanja. Najveći dio slobodne energije vezanja može se pripisati šećernim supstituentima. Svi makrolidi imaju glikozidno vezan šećer na C-5 položaju. Na 16-eročlanim makrolidima vezan je disaharid mikaminoza-mikaroz (slika 25, 26 i 27), a na eritromicinu A i azitromicinu monosaharid dezozamin (slika 1b i 13). U svakom od ovih kompleksa makrolida i ribosoma šećerna

skupina se prostire kroz tunel prema peptidil-transferazom centru. Hidrofobne interakcije su opsežne i imaju važnu ulogu u promicanju vezanja makrolida. Jedno lice laktonskih prstenova tih antibiotika je vrlo hidrofobno, dok je suprotno lice hidrofilnije. Svi makrolidi se vežu na ribosom s hidrofobnim licima njihovih laktonskih prstenova okrenutima prema zidu izlaznog tunela i stvaranjem mnogih specifičnih van der Waalsovih interakcija, dok su hidrofilna lica njihovih laktonskih prstenova izložena otopini. Interakcije grane na položaju C-5 s ribosomima su prvenstveno hidrofobne i olakšane su komplementarnošću oblika s mjestom vezanja. Dodatno, svaki šećer formira jednu vodikovu vezu s ribosomom. Disaharidni supstituent karbomicina A dodatno se proširuje izobutiratnom skupinom koja dopire do peptidil-transferaznog centra gdje ostvaruje interakciju s hidrofobnim pukotinama enzima. Sposobnost karbomicina A da ometa vezanje supstrata objašnjena je opažanjem da je pukotina u koju se veže izobutirat također mjesto vezanja aminokiselinskog bočnog lanca aminoacil-tRNK.

Većina makrolida u svojoj molekularnoj građi ima i drugi supstituent šećera osim onog na C-5 položaju laktonskog prstena. Tilozin A ima mikinozu povezanu s C-14 atomom (slika 26) koja produžuje duljinu osi molekule niz izlazni tunel, daleko od peptidil-transferaznog centra. Taj šećer je u interakciji sa zidom tunela kontaktirajući i protein L22 i nukleotide koji pripadaju 23S rRNK, gdje ona ostvaruje i hidrofobne i vodikove veze. Spiramicin I također ima dodatni supstituent šećera, forozamin, koji je glikozidno vezan na C-9 položaju aglikona (slika 27). Iako je elektronska gustoća koja odgovara ovom šećeru previše slaba da bi točno odredila njegovu orijentaciju i konformaciju, jasno je da on kontaktira protein L4. Azitromicin ima kladinozu vezanu na C-3 položaju laktonskog prstena (slika 13) koja djeluje u interakciji s 23S rRNK. Kao i mikinoza, ovaj šećer podrazumijeva opuštenu proširenu konformaciju koja se obično nalazi u strukturama izolirane molekule.

Duljina oligopeptida sintetiziranog u prisutnosti makrolidnih antibiotika određena je mjerom u kojoj supstituenti na položaju C-5 laktonskog prstena prodiru u peptidil-transferazni centar. Eritromicin A, koji poput azitromicina ima samo monosaharid na ovom položaju (slika 1b i 13), omogućuje sintezu duljih peptida (tetrapeptida) nego tilozin A ili spiramicin I, koji imaju disaharid, a karbomicin A je najrestriktivniji od svih zbog produljenja u obliku izobutirata na njegovom disaharidu. Tilozin A i spiramicin I, koji imaju disaharid na C-5 položaju (slika 26 i 27), omogućuju stvaranje samo dipeptida, dok karbomicin A, koji ima još duže produljenje na C-5 položaju, jako inhibira stvaranje čak i prve peptidne veze. Utjecaj

supstituenata na C-5 položaju aglikona spomenutih makrolidnih antibiotika na sintezu proteina prikazan je na slici 29.<sup>13</sup>



Slika 29. Korelacija struktura molekula makrolidnih antibiotika i njihov utjecaj na sintezu proteina. Molekula karbomicina A s tri skupine (mikaminoza, mikarozna i izobutirat) vezane za C-5 atom aglikona ne dopušta stvaranje čak ni dipeptida (kuglice s brojevima 1 i 2), jer izobutirat dopire do peptidil-transferaznog centra (A-mjesto). Molekule tilozina A i spiramicina I posjeduju disaharid (mikaminoza-mikarozna) vezan za C-5 atom i dopuštaju stvaranje samo dipeptida. Molekule azitromicina i eritromicina A, koje imaju samo monosaharidno produljenje (dezoamin) na C-5 položaju, omogućuju stvaranje tetrapeptida. (preuzeto i prilagođeno prema ref. 13)

## 2.7. Budućnost i putevi sinteze novih makrolida

### 2.7.1. Metoda kemijskih blokova

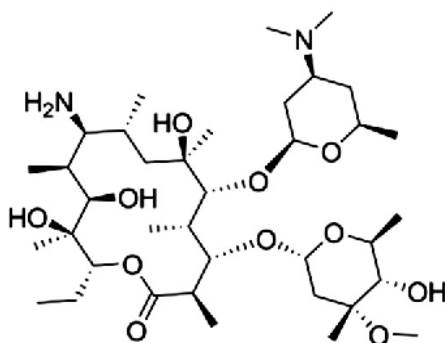
Nedavno je pronađen novi način stvaranja makrolida, klase lijekova koja se koristi u borbi protiv bakterijskih infekcija. Ovaj pristup, uslijed potrage za bržim odgovorom na bakterijske prilagodbe, pokazao se korisnim u borbi protiv rezistencije. Dugi niz godina lijekovi za liječenje raznih bakterijskih infekcija bili su makrolidi. Oni su stvoreni mijenjanjem prirodnog oblika eritromicina A, ali posljednjih godina bakterije su postale otporne na mnoge tako razvijene antibiotike. Noviji su dolazili sporo zbog poteškoća u pronalaženju novih načina uspješnog modificiranja molekule, što znači da su troškovi istraživanja i razvoja u porastu. Ovaj razvoj je doveo do zabrinutosti u zdravstvenoj zajednici jer se čini da ako se nešto ne promijeni, 'arsenal oružja' koji se koristi u borbi protiv mnogih infekcija bit će jako iscrpljen. To je potaklo mnoge znanstvenike da se više pozabave ovim problemom, te su izvjestili da su pronašli novi način stvaranja novih varijacija makrolida koji ne zahtijeva eritromicin A kao bazu - umjesto toga stvaraju ih od nule. Ovaj razvoj znači da se mnogo više varijanti može stvoriti po daleko nižoj cijeni, čime se održava korak s bakterijskom rezistencijom. Da bi se stvorili novi makrolidi, koristi se metoda koja omogućuje modularnu sintezu.

Metoda počinje sintezom malih kemijskih blokova izrađenih od industrijskih kemikalija od kojih se svaka može mijenjati pojedinačno, a zatim se oni spajaju koristeći proces koji zahtijeva vrlo malo koraka. Budući da je svaka komponenta odvojena, puno je lakše napraviti izmjene na svakoj od njih. Na taj način, metoda se može upotrijebiti za sintetiziranje velikog broja antibiotika. Tehnika se može primijeniti na multigramskoj skali, što znači da se može relativno brzo i dovoljno makrolida stvoriti za upotrebu u pokusima usmjerenima na testiranje rezultata uništavanja bakterija. Do danas je pomoću ove tehnike sintetizirano preko 300 makrolida, kao i odobreni lijek telitromicin i klinički kandidat solitromicin (poglavlje 2.4.). Kako bi pokazali učinkovitost tehnike, istraživači su proizveli replike postojećih antibiotika. Također su proizvedena dva nova makrolida koja su bila umjereno aktivna protiv bakterije MRSA (metocilin rezistentni *Staphylococcus aureus*), koja je otporna na četiri postojeća antibiotika u toj klasi. Ova metoda daje ogromnu priliku da se pronađe makrolidni antibiotik za buduće generacije. Otkrivanje novih antibiotika i načina kako napraviti promjene na postojećim lijekovima bitan je dio zaustavljanja rezistentnih sojeva.<sup>59,60</sup>

### 2.7.2. Protuupalno djelovanje - budućnost makrolida

Osim antimikrobnog djelovanja, za makrolide je dokazano da posjeduju i protuupalno djelovanje. Nedavna istraživanja eritromicina A i njegovih derivata pokazala su obećavajuće rezultate u liječenju upala povezanih s različitim bolestima: aterosklerozom, ishemičnim moždanim udarom, astmom, difuznim panbronhilitisom, sindromom Bohring-Opitz, cističnom fibrozom i drugima. Crohnova bolest, psorijaza, kronični osteomijelitis i rak pluća novi su kandidati za makrolidnu terapiju.<sup>61,62</sup> Makrolidi djeluju na kemotaksiju upalnih stanica, sintezu citokina, ekspresiju adhezijskih molekula i produkciju reaktivnih metabolita kisika i dušikovog oksida. Sposobni su akumulirati se u neutrofilima i makrofazima u znatno višim koncentracijama nego u izvanstaničnoj tekućini.<sup>63</sup>

Mnoge nedoumice i dalje postoje o mehanizmima uključenima u protuupalni potencijal makrolida. Mnogi istraživači smatraju da antibakterijsko djelovanje makrolida ostaje ključ njihovog uspjeha, ali sve veći broj liječnika priznaje jedinstvenu prirodu tih antibiotika i spremni su razmotriti upalni proces kao primarnu metu. Mnogo vrijednih informacija dobiveno je posljednjih godina o protuupalnom djelovanju makrolida, ali precizni molekularni i biokemijski mehanizmi još se moraju odgonetnuti.<sup>61</sup> Literatura koja opisuje nove klase protuupalnih makrolida (slika 30) još je uvijek oskudna zbog složenih struktura makrolida i njihovih mukotrpnih kemijskih transformacija.<sup>62</sup>



Slika 30. Strukturna formula molekule GS-459755, primjera novijeg protuupalnog makrolida dobivenog iz eritromicina A.<sup>64</sup>

Važno je znati da makrolidni antibiotici koji pokazuju protuupalna svojstva klinički nikada nisu bili aktivno optimizirani za ovu vrstu aktivnosti. Stoga optimalni klinički potencijal makrolida za terapiju neutrofilnih kroničnih upalnih bolesti nije u potpunosti istražen i iskorišten te predstavlja budućnost ove klase lijekova.<sup>62</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. Mrvoš-Sermek, *Kristalna i molekulska struktura makrolidnih antibiotika i njihovih kompleksa s metalima*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1994, str. 3–41.
2. D. Sakar, *Makrolidi i linkozamidi*, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu,  
<http://www.jelena-suran.com/predavanja/Makrolidi.pdf>  
(datum pristupa 21. srpnja 2018.)
3. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.* **174** (2017) 2967–2983.
4. T. Mazzei, E. Mini, A. Novelli, P. Periti, *J. Antimicrob. Chemother.* **31** (1993) 1–9.
5. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/ketolide>  
(datum pristupa 21. srpnja 2018.)
6. <https://en.wikipedia.org/wiki/Pikromycin>  
(datum pristupa 21. srpnja 2018.)
7. <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/eritromicina.html>  
(datum pristupa 21. srpnja 2018.)
8. A. Bryskier, *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*, ASM Press, Washington, D.C., 2005, str. 476.
9. <https://www.microscopemaster.com/ribosomes.html>  
(datum pristupa 19. srpnja 2018.)
10. K. H. Nierhaus, *BioSystems.* **12** (1980) 273–282.
11. <https://www.the-scientist.com/hot-paper/the-ribosomal-function-comes-into-view-54023>  
(datum pristupa 19. srpnja 2018.)
12. J. Brosius, T. J. Dull, H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77** (1980) 201–204.
13. J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Mol. Cell.* **10** (2002) 117–128.
14. Nikola Bedeković, *Binarne krutine N-(2-karboksifenil)glicina i derivata piridina - vodikove veze i prijenos protona*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 2–4.
15. J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry (Second Edition)*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2009, str. 28–39.

16. A. Posavec, *Polarizabilnost atoma i njezina uloga u izgradnji nekovalentnih interakcija*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 5–12.
17. Z. Herceg, A. Režek, S. Rimac Brnčić, *Mljekarstvo*. **58** (2008) 181–193.
18. <https://www.britannica.com/science/covalent-bond>  
(datum pristupa 31. kolovoza 2018.)
19. M. Gaynor, A. S. Mankin, *Curr. Top. Med. Chem.* **3** (2003) 949–960.
20. T. Tenson, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **330** (2003) 1005–1014.
21. R. Leclercq, *Clin. Inf. Dis.* **34** (2002) 482–492.
22. P. Fernandes, E. Martens, D. Pereira, *J. Antibiot.* **70** (2017) 527–533.
23. <https://pharmaffiliates.com/erythromycin/59808/erythromycin-e-impurity>  
(datum pristupa 22. srpnja 2018.)
24. H. A. Kirst, G. D. Sides, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **33** (1989) 1413–1418.
25. <http://www.antibiotics-info.org/roxithromycin.html>  
(datum pristupa 22. srpnja 2018.)
26. <https://alchetron.com/Dirithromycin>  
(datum pristupa 6. rujna 2018.)
27. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/clarithromycin#section=Computed-Descriptors>  
(datum pristupa 23. srpnja 2018.)
28. <https://en.wikipedia.org/wiki/Clarithromycin>  
(datum pristupa 23. srpnja 2018.)
29. <https://en.wikipedia.org/wiki/Flurithromycin>  
(datum pristupa 23. srpnja 2018.)
30. F. Schlünzen, J. M. Harms, F. Franceschi, H. A. Hansen, H. Bartels, R. Zarivach, A. Yonath, *Structure*. **11** (2003) 329–338.
31. D. E. Amacher, S. J. Schomaker, J. A. Retsema, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **35** (1991) 1186–1190.
32. Z. Banić Tomišić, *Kem. Ind.* **60** (2011) 603–617.
- 32b. S. Đokić, G. Kobrehel, N. Lopotar, B. Kamenar, A. Nagl, D. Mrvoš, *J. Chem. Research (S)* (1988) 152–153, *(M)* (1988) 1239–1261.
33. <https://en.wikipedia.org/wiki/Azithromycin>  
(datum pristupa 1. rujna 2018.)



34. G. Kobrehel, G. Lazarevski, S. Đokić, L. Kolačny-Babić, *J. Antibiot.* **45** (1992) 527–534.
35. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics.* **5** (2016) 29.
36. S. Mutak, *J. Antibiot.* **60** (2007) 85–122.
37. D. Mrvoš, *Strukturno istraživanje farmakološki aktivnih spojeva iz reda eritromicina A i lorazepama*, Magistarski rad, Postdiplomski studij prirodnih znanosti - Kemija, Sveučilište u Zagrebu, 1987, str. 46–61.
38. S. Đokić, Z. Vajtner, N. Lopotar, D. Mrvoš-Sermek, B. Kamenar, A. Nagl, *Croat. Chem. Acta.* **68** (1995) 375–381.
39. <http://www.utdallas.edu/~biewerm/8-conformational.pdf>  
(datum pristupa 4. rujna 2018.)
40. A. Awan, R. J. Brennan, A. C. Regan, J. Barber, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (2000) 1645–1652.
41. G. Lazarevski, M. Vinković, G. Kobrehel, S. Đokić, *Tetrahedron.* **49** (1993) 721–730.
42. T. J. Dougherty, J. F. Barrett, *Expert Opin. Investig. Drugs.* **10** (2001) 343–351.
43. S. Douthwaite, *Clin. Microbiol. Infect.* **7** (2001) 11–17.
44. I. Kuzman, *Infektološki glasnik.* **25** (2005) 29–40.
45. G. Ackermann, A. C. Rodloff, *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2003) 497–511.
46. R. Berisio, J. Harms, F. Schlünzen, R. Zarivach, H. A. Hansen, P. Fucini, A. Yonath, *J. Bacteriol.* **185** (2003) 4276–4279.
47. M. M. Hefnawy, M. S. Mohammed, G. A. Mostafa, *Life Sci. J.* **10** (2013) 199–203.
48. H. Mansour, E. B. Chahine, L. R. Karaoui, R. M. El-Lababidi, *Ann. Pharmacother.* **47** (2013) 368–379.
49. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_DE\\_CB1726437.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB1726437.htm)  
(datum pristupa 24. srpnja 2018.)
50. P. Fernandes, E. Martens, D. Bertrand, D. Pereira, *Bioorg. Med. Chem.* **24** (2016) 6420–6428.
51. <https://en.wikipedia.org/wiki/Solithromycin>  
(datum pristupa 30. kolovoza 2018.)
52. B. Arsić, J. Barber, A. Čikoš, M. Mladenović, N. Stanković, P. Novak, *Int. J. Antimicrob. Agents,* **51** (2018) 283–298.

53. <https://www.medchemexpress.com/Josamycin.html>  
(datum pristupa 25. srpnja 2018.)
54. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7708088.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7708088.htm)  
(datum pristupa 25. srpnja 2018.)
55. V. P. Marshall, J. I. Cialdella, L. Baczynskyj, W. F. Liggett, R. A. Johnson, *J. Antibiot.* **42** (1989) 132–134.
56. P. Vergani, A. Ghidini, P. Ceruti, N. Strobelt, A. Spelta, B. Zapparoli, R. Rescalda, *Am. J. Reprod. Immunol.* **39** (1998) 335–340.
57. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6602308#section=Top>  
(datum pristupa 25. srpnja 2018.)
58. <https://www.caymanchem.com/product/20267>  
(datum pristupa 25. srpnja 2018.)
59. I. B. Seiple, Z. Zhang, P. Jakubec, A. Langlois-Mercier, P. M. Wright, D. T. Hog, K. Yabu, S. Rao Allu, T. Fukuzaki, P. N. Carlsen, Y. Kitamura, X. Zhou, M. L. Condakes, F. T. Szczypinski, W. D. Green, A. G. Myers, *Nature.* **533** (2016) 338–345.
60. <https://www.theverge.com/2016/5/18/11686268/new-antibiotic-drug-candidates-resistance-harvard-macrolide>  
(datum pristupa 2. rujna 2018.)
61. M. T. Labro, *Expert Opin. Pharmacother.* **5** (2004) 541–550.
62. V. Eraković Haber, M. Bosnar, G. Kragol, *Future Med. Chem.* **6** (2014) 657–674.
63. A. Markotić, L. Cvetko Krajinović, *Infektološki glasnik.* **31** (2011) 41–48.
64. R. Tarran, J. R. Sabater, T. C. Clarke, C. D. Tan, C. M. Davies, J. Liu, A. Yeung, A. L. Garland, M. Jackson Stutts, W. M. Abraham, G. Phillips, W. R. Baker, C. D. Wright, S. Wilbert, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **304** (2013) 746–756.