



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek
Poslijediplomski sveučilišni studij
Smjer: Analitička kemija

Ivana Mikulandra

STRUKTURA, MEHANIZAM DJELOVANJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST ODABRANIH MAKROLIDA

Kemijski seminar I

prema radu: A. Janas, P. Przybylski *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662

Zagreb, 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA MAKROLIDA	2
2.1. Struktura makrolida.....	2
2.1. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika.....	5
2.2. Mehanizam rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike	9
3. RAZVOJ NOVIH MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA	11
3.1. Kemijska modifikacija saharidnih jedinica na četrnaesteročlanim i petnaesteročlanim makrolidima	11
3.1.1. Kemijska modifikacija kladionze.....	12
3.1.2. Kemijska modifikacija aminosaharida.....	25
3.2. Kemijska modifikacija aglikonskog prstena četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida.....	29
4. ZAKLJUČAK	39
5. LITERATURNI IZVORI	40

1. UVOD

Pojam „makrolid”, prvi put upotrijebljen 50-ih godina prošloga stoljeća, odnosi se na prirodne i polusintetske antibiotike čiju strukturu karakterizira 12 do 16 atoma (N, C, O) u makrocikličkom laktonskom prstenu (aglikonu) koji na sebe ima vezane različite saharide i aminosaharide. Prirodni laktonski antibiotici izolirani su iz soja bakterija *Streptomyces*.

Najznačajniju biološku aktivnost pokazali su makrolidi koji sadrže četrnaesteročlani, petnaesteročlani i šesnaesteročlani aglikonski prsten. Djelotvorni su u liječenju infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim i nekim Gram-negativnim bakterijama. Osim širokog spektra antibakterijske aktivnosti, posjeduju i antiupalnu, antimalarijsku i antikancerogenu aktivnost. Primjena nekih makrolida može izazvati neželjene nuspojave kao što su gastrointestinalne tegobe, hepatotoksičnost i alergijske reakcije.

Većina makrolida ima bakteriostatsko djelovanje. Vežu se za 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma u blizini centra peptidil-transferaze i na taj način sterički sprječavaju sintezu peptida bitnog za rast i razvoj bakterija.¹

Zbog sve većeg razvoja bakterijske rezistencije na dosadašnje antibiotike, nužno je dizajnirati nove spojeve koji će pokazati veću biološku aktivnost. U tu svrhu može se pribjeći kemijskoj modifikaciji postojećih makrolida ili osmišljavanju inhibitora bakterijskih enzima koji su odgovorni za razvoj rezistencije.

Budući da se četrnaesteročlani i petnaesteročlani makrolidi najviše primjenjuju u kliničkim ispitivanjima, u ovom kemijskom seminaru opisat će se struktura, mehanizam djelovanja i biološka aktivnost novih kemijski modificiranih četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida.

2. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA MAKROLIDA

2.1. Struktura makrolida

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

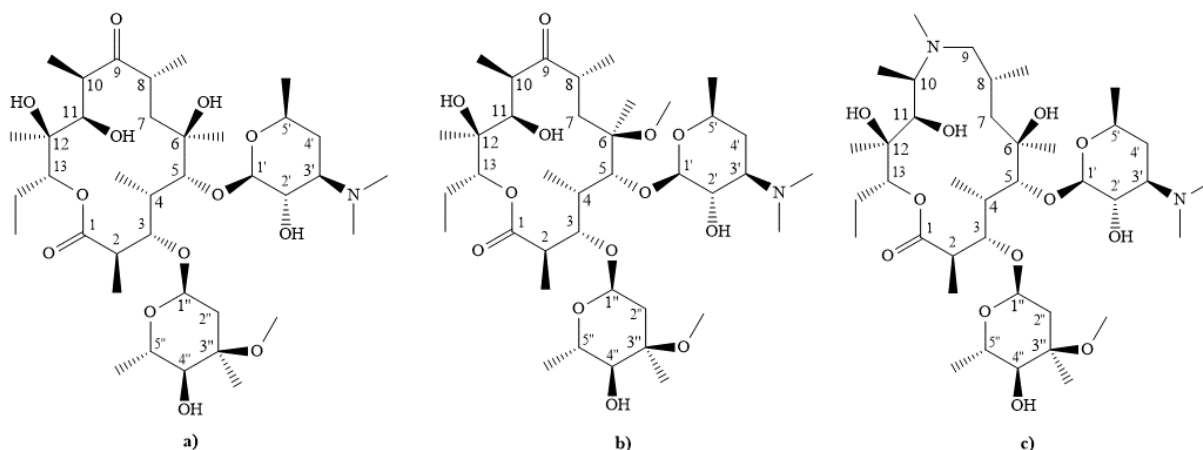
Predstavlja prvu generaciju makrolidnih antibiotika koju ne odlikuje dobra bioraspoloživost i dugo vrijeme poluživota zbog nedostatne kemijske stabilnosti u organizmu. U želučanim kiselim uvjetima dolazi do intramolekulske ciklizacije reakcijom dviju hidroksilnih skupina (6-OH i 12-OH) i karbonilne skupine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

Iz navedenih razloga alkiliranjem hidroksilne skupine na položaju C6 pripremljen je kemijski stabilniji klaritromicin (**b**, slika 1.), predstavnik prve generacije polusintetskih makrolidnih antibiotika koja je pokazala širi spektar antibakterijske aktivnosti.

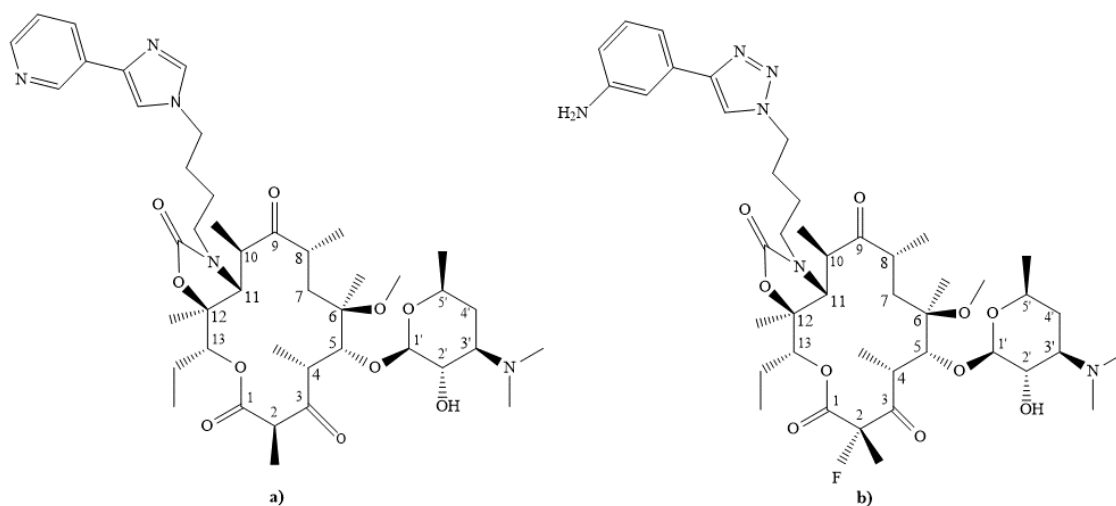
Uvođenjem dušika u aglikonski prsten pripremljeni su petnaesteročlani azalidi, druga generacija makrolidnih antibiotika, čiji je poznati predstavnik azitromicin (**c**, slika 1.).

Kako razvoj bakterijske rezistencije zahtijeva konstantno i intenzivno istraživanje antibiotika s poboljšanom biološkom aktivnosti, tako je pripremljen novi polusintetski derivat eritromicina, telitromicin (**a**, slika 2.), predstavnik ketolida - treće generacije makrolida. No, ubrzo je povučen sa tržišta zbog izazivanja niza nuspojava (gastrointestinalnih tegoba, sinkopa, hepatotoksičnost, slabljenje vida).^{1,2}

U tijeku je kliničko istraživanje solitromicina (**b**, slika 2.), ketolida koji je strukturno vrlo sličan telitromicinu. Iako se pokazao vrlo efikasnim u liječenju bakterijske upale pluća, nije odobren od strane FDA (U.S. Food and Drug Administration) zbog opreza od mogućeg razvoja nuspojava. FDA smatra kako solitromicin također može izazvati hepatotoksičnost jer je 85 % strukturno sličan telitromicinu.³



Slika 1. Strukture makrolida: **a)** eritromicin A, **b)** klaritromicin, **c)** azitromicin



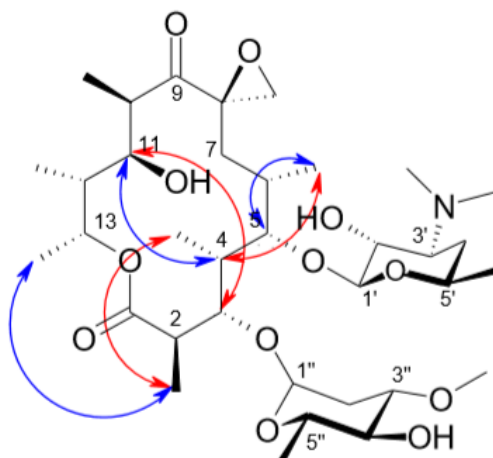
Slika 2. Strukture ketolida: **a)** telitromicin, **b)** solitromicin

Istraživanje konformacije makrolida u slobodnom i vezanom stanju bitno je za određivanje njihove biološke potentnosti. Konformacija je usko povezana s lipofilnosti koja pak utječe na transport i sposobnost akumulacije makrolida u stanicama.¹ Makrolidi su kompleksne molekule koje sadrže mnogo kiralnih centara, stoga promjena konfiguracije atoma može utjecati na promjenu bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava.² Za razumijevanje veze između strukture i aktivnosti makrolida najviše su korištene: spektroskopija NMR, rendgenska difrakcija i metode molekuskog modeliranja.

Kombinacijom spektroskopije NMR i molekuskog modeliranja predložena su dva strukturna modela četrnaesteročanih makrolida u otopini u slobodnom stanju: uvrnuta konformacija (engl. *folded-in*) i izvrnuta konformacija (engl. *folded-out*).⁴⁻⁶

Za konformaciju tzv. *folded-out* karakteristični su parametri: homonuklearna konstanta sprezanja $^3J_{H_2,H_3} \sim 10$ Hz, torzijski kut između atoma H2–H3 $\sim \pm 180^\circ$, kontakti NOE (engl. *nuclear Overhauser effect*): H4–H11 (2,7 Å), H5–H18 (2,4–3,6 Å), H15–H11 (3,2–4,2 Å), H1'–H5'' $\sim 2,4$ Å, dok su za konformaciju tzv. *folded-in* zabilježeni parametri: homonuklearna konstanta sprezanja $^3J_{H_2,H_3} \sim 2-3$ Hz, torzijski kut između atoma H2–H3 $\sim 100^\circ$, kontakt NOE H1'–H5'' $\sim 3,5$ Å.^{2,8}

Četnaesteročlani makrolidi u otopini većinom zauzimaju energetski povoljniju konformaciju *folded-out*.^{6,7} Istraživanjem četnaesteročlanog makrolida oleandomicina i njegovih derivata opaženo je kako udio pojedine konformacije ovisi o polarnosti korištenog otapala i temperaturi tijekom snimanja spektara 1H , NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i ROESY (*rotating frame Overhauser effect spectroscopy*) NMR.^{9,10} Svi bitni kontakti NOE prikazani su na slici 3.



Slika 3. Kontakti NOE konformacije *folded-in* i *folded-out* oleandomicina²

Petnaesteročlani makrolidi u slobodnom i vezanom stanju poprimaju energetski najpovoljniju konformaciju tzv. *3-endo folded-out*.^{11,12} U ovom slučaju homonuklearna konstanta sprezanja $^3J_{H_2,H_3}$ iznosi 4–5 Hz, a torzijski kut između atoma H2–H3 $\sim 122^\circ$. Udaljenost protona H4–H11 te blizina saharidnih jedinica slična je kao i kod konformacije tzv. *folded-out*.

Proučavanje trodimenzijske strukture makrolida i interakcija u kompleksima kao što su makrolid - ribosom, makrolid - bakterijska membrana i makrolid - žučna kiselina od velike je važnosti za određivanje cjelokupnog biološkog profila makrolida i za dizajn novih derivata.^{2,13}

Prilikom dizajna potencijalnog lijeka treba voditi računa o lipofilnosti i polarnosti, odnosno topljivosti molekule u fiziološkom mediju kako bi se lijek apsorbirao u organizam

odgovarajućom brzinom. Osim topljivosti i propusnosti lijeka kroz stanične membrane, bitna je i bioraspoloživost. Budući da bioraspoloživost ovisi o vezanju makrolida za plazma proteine, ona se pak može procijeniti istraživanjem interakcija u kompleksu makrolid - albumin.¹⁴

Dvije najčešće korištene komplementarne metode za proučavanje kompleksa makrolid - biološka meta su spektroskopija NMR i rendgenska difrakcija.

Glavni nedostatak tehnike NMR je nemogućnost određivanja strukture velikih bioloških molekula (> 70 kDa) kao što su proteini i nukleinske kiseline, dok se kristalografijom mogu dobiti precizne vrijednosti njihovih strukturnih parametara. Ipak, statična struktura u čvrstom stanju ne mora odgovarati konformaciji u otopini pa se ne možemo pouzdati u točnost određivanja konformacije navedenom tehnikom.² Unatoč tome, kristalografija je uvelike pripomogla analizi strukture i funkcije ribosoma. Pomoću kristalne strukture kompleksa makrolid - ribosom otkrivene su interakcije i mehanizam djelovanja makrolida.^{1,2}

2.1. Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika

Makrolidi imaju bakteriostatsko djelovanje, tj. inhibiraju rast bakterija. Vežu se na 23S rRNA u domeni V na ili u blizini centra peptidil transferaze u 50S podjedinici bakterijskog ribosoma i tako sterički blokiraju sintezu peptida u različitim fazama translacijskog procesa.²

Makrolidi se konformacijski slože na način da je jedna strana molekule hidrofobna, a druga strana hidrofilna.¹¹ Aminosaharidi igraju važnu ulogu u interakciji sa staničnim membranama i transportu makrolida do ciljanog mjesta. Između makrolida i ribosoma uspostavljaju se kovalentne i vodikove veze te hidrofobne interakcije.¹

Jakost i način vezanja razlikuje se ovisno o funkcijskim skupinama makrolida i veličini saharida na položajima C3 i C5, a neke studije su pokazale kako vezanje makrolida ovisi i o proučavanoj bakteriji.¹ Kristalografijom su dobiveni različiti strukturni modeli za različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.^{12,15,16} Kokristalne strukture su uključivale jednu molekulu makrolida i ribosomsku podjedinicu 50S. Međutim, istraživanjem vezanja azitromicina za ribosom bakterije *D. Radiodurans* opaženo je vezanje dviju molekula azitromicina.¹⁶

Bez obzira na različitost vezanja četrnaesteročlanih, petnaesteročlanih i šesnaesteročlanih makrolida zajedničko im je stvaranje vodikove veze između skupine 2'-OH aminosaharida i nukleobaze ribosoma.¹² O važnosti postojanja saharidnih jedinica i utjecaju kemijske

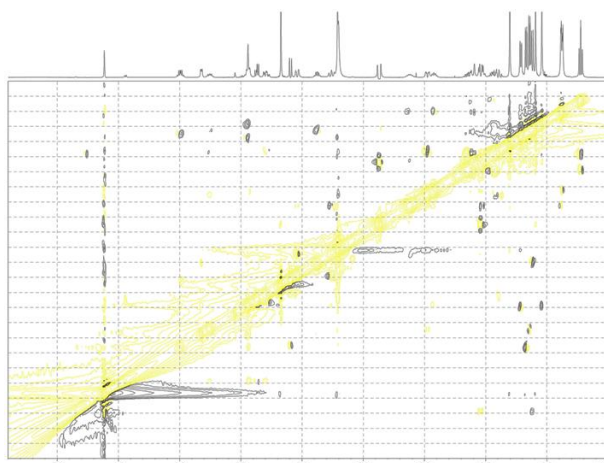
modifikacije polarnih skupina na antimikrobnu aktivnost makrolida bit će više govora u poglavlju 3.

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

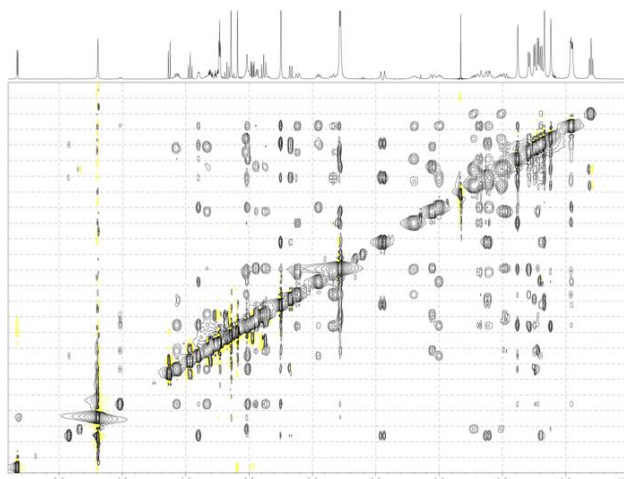
Za razumijevanje mehanizma djelovanja makrolida bitno je odrediti njihovu konformaciju u otopini i istražiti interakcije s biološkim metama. Među spektroskopskim tehnikama najveću primjenu u istraživanju konformacije vezanog stanja i interakcija makrolida s ribosomom imaju tehnike tr-NOESY (engl. *transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy*) i STD (engl. *saturation transfer difference*).²

Tehnikom tr-NOESY detektira se konformacija vezanog stanja liganda očitanjem kontakata NOE u spektru. Kako molekule srednje veličine (~ 1000 Da, M (azitromicin) = 749 g mol^{-1}) imaju kratko korelacijsko vrijeme (vrijeme potrebno da se molekula zarotira za kut od jednog radijana) tako će vrijednosti signala NOE biti vrlo male ili jednake nuli, odnosno doći će do izostanka izvandijagonalnih signala u spektru NOESY. Međutim, vezanjem za biološki receptor ligand poprima svojstva makromolekule, korelacijsko vrijeme postaje veće i u spektru se dobiju intenzivni izvandijagonalni signali, odnosno negativne vrijednosti signala NOE.^{17,18} Spektar NOESY azitromicina prije i nakon dodatka ribosoma prikazan je na slici 4.

a)



b)



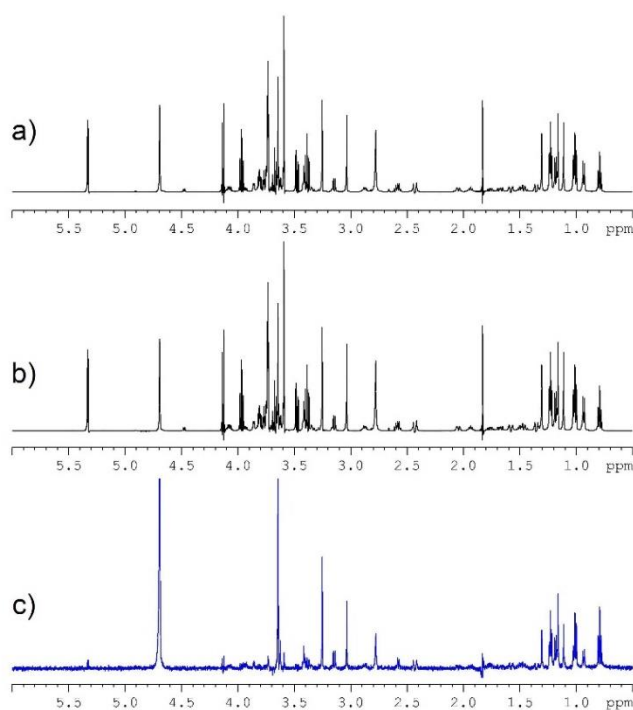
Slika 4. a) spektar NOESY azitromicina i b) spektar tr-NOESY azitromicina vezanog u aktivno mjesto ribosoma *E.coli*

Konformacije vezanog stanja eritromicina A, klaritromicina, azitromicina i njihovih dekladinozil derivata istražene su asignacijom spektara tr-NOESY i uz pomoć molekuskog modeliranja.¹⁹ Dobiveni rezultati ukazali su na zauzimanje konformacije *folded-out*. Unatoč strukturnoj sličnosti dvaju makrolida, konformacija klaritromicina u vezanom stanju se pokazala rigidnijom od konformacije azitromicina. S obzirom na činjenicu kako je azitromicin jedan od najdjelotvornijih makrolidnih antibiotika, autori smatraju kako razlike u konformacijskoj fleksibilnosti makrolida mogu biti povezane s njihovim povećanjem ili smanjenjem biološke aktivnosti.

Tehnika STD NMR temelji se na selektivnom zasićenju protona biološkog receptora uslijed čega dolazi do prijenosa magnetizacije na ligand mehanizmom spinske difuzije. Prvo se snimi

referentni, tzv. spektar *off-resonance* liganda (bez selektivne pobude receptora), a zatim tzv. *on-resonance* spektar liganda (sa selektivnom pobudom receptora). Oduzimanjem ta dva spektra dobije se spektar STD liganda. Stupanj zasićenja protona liganda, a time i pojačanje signala u spektru ovisi o prostornoj udaljenosti protona liganda od receptora. Tako će najveći intenzitet signala u spektru STD NMR imati protoni koji su najbliže receptoru i obrnuto.

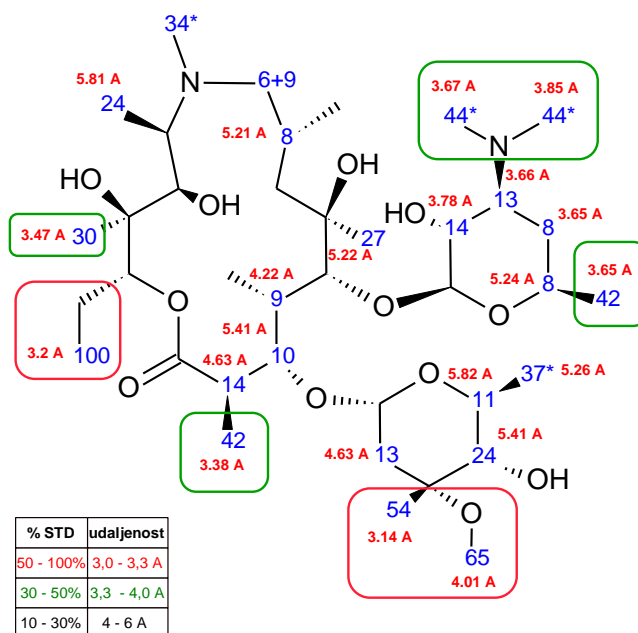
Osim što se ovom tehnikom mogu detektirati dijelovi molekule koji sudjeluju u vezanju za receptor (tzv. mapiranje epitopa), može se provesti i biološki probir liganada. U spektru STD liganada koji ne pokazuju biološku aktivnost izostat će signali.^{2,17}



Slika 5. Spektri ^1H NMR oleandomicina i ribosoma *E. coli*: **a)** *on-resonance* (8 ppm), **b)** *off-resonance* (50 ppm) i **c)** STD, snimljeni u TRIS puferu pri 25 °C²

Proučavanjem vezanja 6-O-metil homoeritormicina za ribosom pretpostavljeno je kako se u vezanom stanju prvo uspostavljaju hidrofobne interakcije u kojima sudjeluju šećer kladinoza te metilne i metilenske skupine laktonskog prstena.¹¹ Prepoznavanjem aktivnog mjesta optimalno se pozicionira šećer desozamin i dolazi do čvršćeg vezanja makrolida stvaranjem vodikovih veza između skupina 2'-OH i 3'-NMe₂ i ribosoma. Provedbom eksperimenata STD NMR dokazano je kako iste skupine sudjeluju i u vezanju azitromicina na ribosom. Usporedba

pojačanja signala u spektru STD NMR i udaljenosti atoma dobivenih kristalografijom prikazana je na slici 6.



Slika 6. Pojačanje signala STD i udaljenosti atoma azitromicina u kompleksu s ribosomom²

Opaženo je najveće pojačanje signala STD (50–100 %) za skupine azitromicina koje su najbliže ribosomu (3,0–3,3 Å), dok je pojačanje signala za udaljenije skupine postupno opadalo.

Objedinjujući rezultate dobivene kristalografijom, spektroskopijom NMR i molekulskim modeliranjem zaključeno je kako su konformacije četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida u vezanom stanju slične konformacijama u slobodnom stanju.^{6,11,12}

Smatra se kako je vezanje makrolida proces koji obuhvaća dva koraka. Prvi korak uključuje brzo vezivanje i razvezivanje makrolida, odnosno prepoznavanje ciljanog mjesta na ribosomu, a drugi korak uključuje čvrsto vezanje makrolida za aktivno mjesto.¹

2.2. Mehanizam rezistencije bakterija na makrolidne antibiotike

Zbog prisutnosti antibiotika i njihovih metabolita u okolišu te široke primjene u medicini, nastaje sve više rezistentnih sojeva bakterija.¹

Postoji više mehanizama rezistencije¹:

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

Rezistencija na više antibiotika (engl. *multidrug resistance*, MDR) koji imaju sličan mehanizam djelovanja kao i makrolidi predstavlja veliki problem u liječenju nekih bakterijskih infekcija. U tu skupinu antibiotika spadaju linkozamidi i streptogramini.¹ Navedene tri skupine antibiotika vežu se na 23S rRNA u 50S podjedinici ribosoma.²

Neki bakterijski sojevi razvili su rezistenciju metiliranjem dušika baze 23S rRNA (posredstvom *erm* gena) čime onemogućuju vezanje makrolida, linkozamida i streptogramina.³ Takva rezistencija može biti inducibilna (iMLS) ili konstitutivna (cMLS). Inducibilna rezistencija nastupa unošenjem antibiotika u stanicu pri čemu dolazi do aktivacije enzima metiltransferaze, dok je kod konstitutivne rezistencije enzim aktivan i bez prisutnosti antibiotika.

Mehanizam rezistencije efluksom (M), kodiran *mef* genima, karakterističan je samo za makrolide, ne i za linkozamide i streptogramine.^{1,3}

Antibakterijska aktivnost antibiotika *in vitro* izražena je pomoću minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), a definira se kao najniža koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija. Otopine antibiotika serijski se razrijede u rasponu koncentracija 0,125–64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te se provjeri bakteriostatska aktivnost testiranjem na uzorcima standardiziranih koncentracija bakterija.²⁰

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

3. RAZVOJ NOVIH MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

Posljednjih 10 godina značajno je opao broj novih antibiotika na tržištu. Primjerice, godine 2015. samo 1 od 45 novoodobrenih lijekova od strane FDA je bio antibiotik. Razlozi su iznimno brza prilagodljivost bakterija na antibiotike, ali i nezainteresiranost velikih farmaceutskih kompanija za razvoj novih antibiotika zbog povećanih zahtjeva kliničkih ispitivanja i neisplativosti ulaganja.¹ Zanimljiva je činjenica kako je azitromicin kao najprodavaniji antibiotik 2004. godine stekao zaradu od samo 2,1 milijarde USD čime je zauzeo 27. mjesto na listi najprodavanijih lijekova.²¹

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) ističe zabrinutost zbog sve veće pojave rezistentnih patogena i promiče važnost istraživanja novih antibiotika.

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

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

3.1. Kemijska modifikacija saharidnih jedinica na četrnaesteročlanim i petnaesteročlanim makrolidima

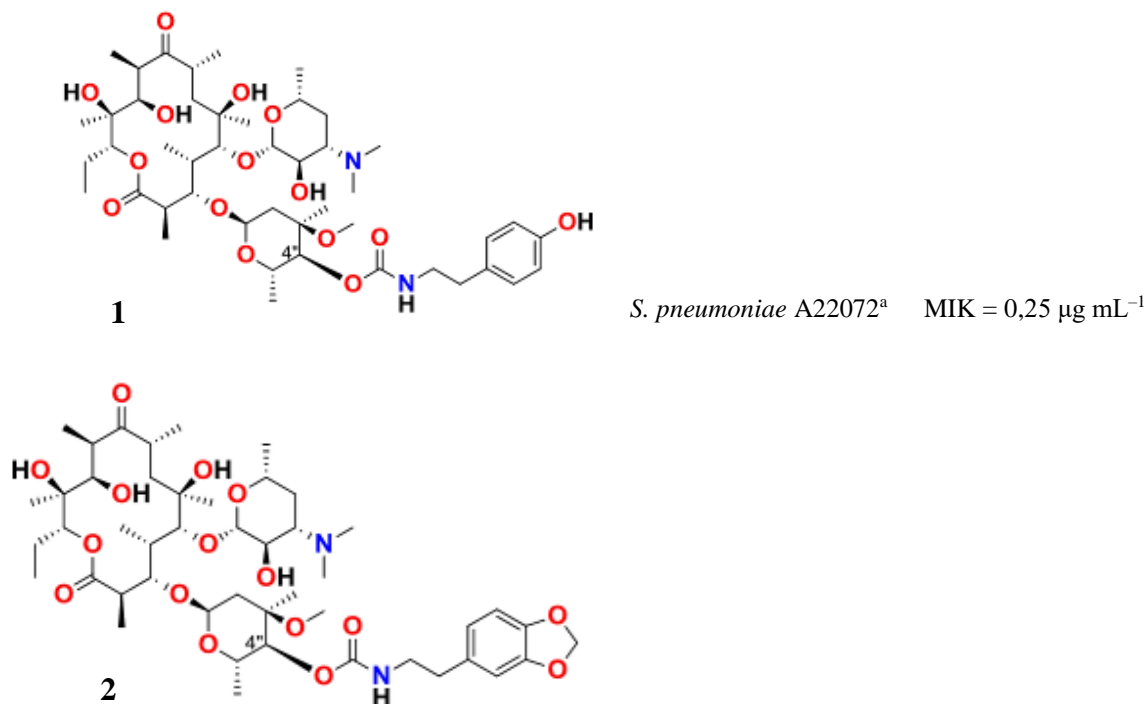
Proučavanjem kompleksa makrolid - ribosom ustanovljeno je kako je desozamin (aminosaharid) iznimno bitan za vezanja makrolida, dok šećer kladinoza ne sudjeluje u interakciji s 23S rRNA.²

U narednim potpoglavljima bit će više riječi o važnosti saharidnih jedinica za biološku aktivnost makrolida.

U nastavku su korištene sljedeće oznake za referentne makrolide: eritromicin **A-a** klaritromicin-**b**, azitromicin-**c**, telitromicin-**d**.

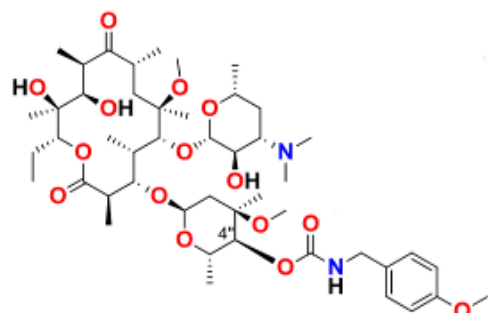
3.1.1. Kemijska modifikacija kladionze

Ma i suradnici²² pripravili su 4"-O-karbamoil derivate eritromicina A (slika 7.). Biološka aktivnost dobivenih spojeva slična je aktivnosti makrolida **a-c**. Najveća aktivnost zabilježena je za rezistentni soj *S. pneumoniae*. MIK vrijednosti eritromicina A, klaritromicina i azitromicina za navedeni soj kreće se u rasponu 128-256 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 7. Strukture spojeva **1** i **2** i određena MIK vrijednost za bakterijski soj *S. pneumoniae* (a - rezistentni soj kodiran *mef* genima)¹

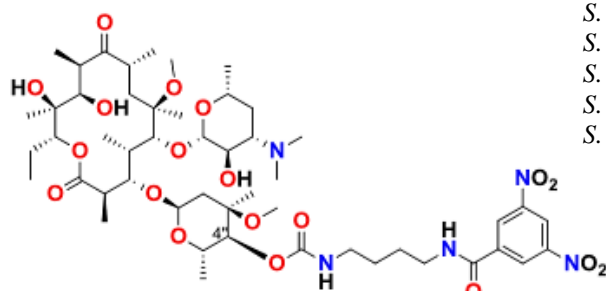
Također su pripravili i 4"-O-karbamoil derivate klaritromicina.²³ Spoj **3** (slika 8.) ima 10 puta veću aktivnost na rezistentni soj *S. pyogenes* R2 od eritromicina, no ne odlikuje ga široki spektar antibakterijske aktivnosti. Kako bi se proširila aktivnost i na druge rezistentne sojeve uspješno je pripremljen spoj **4**.²⁴



3

S. pyogenes R2^a

MIK = 0,12 µg mL⁻¹

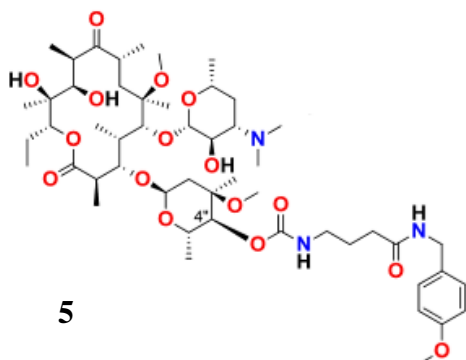


4

<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,03 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B1 ^b	MIK = 0,03 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> A22072 ^c	MIK = 0,03 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> AB11 ^d	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MIK = 0,12 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> ATCC29123	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹

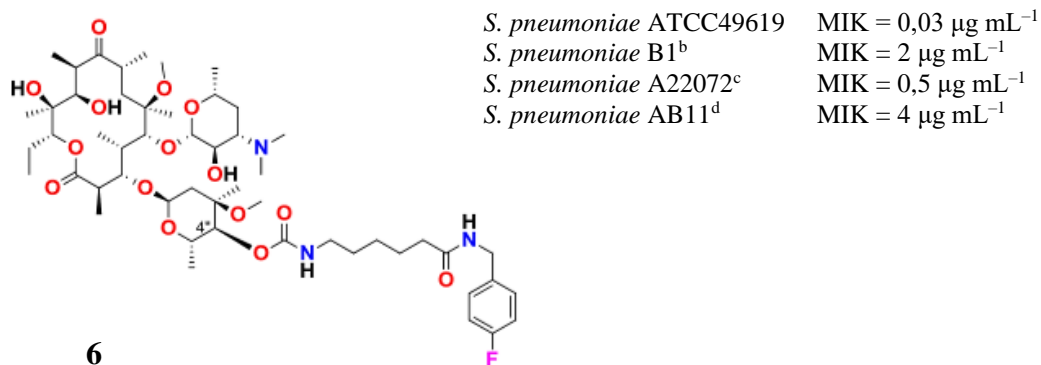
Slika 8. Strukture spojeva **3** i **4** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a- klinički izoliran rezistentni soj, b- rezistentni soj kodiran *erm* genima, c- rezistentni soj kodiran *mef* genima, d- rezistentni soj kodiran *mef* i *erm* genima)¹

Povećanjem alkilnog lanca na položaju C4" i uvođenjem 4-metoksibenzil i fluorobenzil skupina pripremljeni su spojevi **5** i **6** (slika 9.). Najznačajnija je biološka aktivnost tih spojeva na soj *S. pneumoniae* koji pokazuje rezistenciju na makrolide ekspresijom *erm* gena ili *erm* i *mef* gena.²⁵



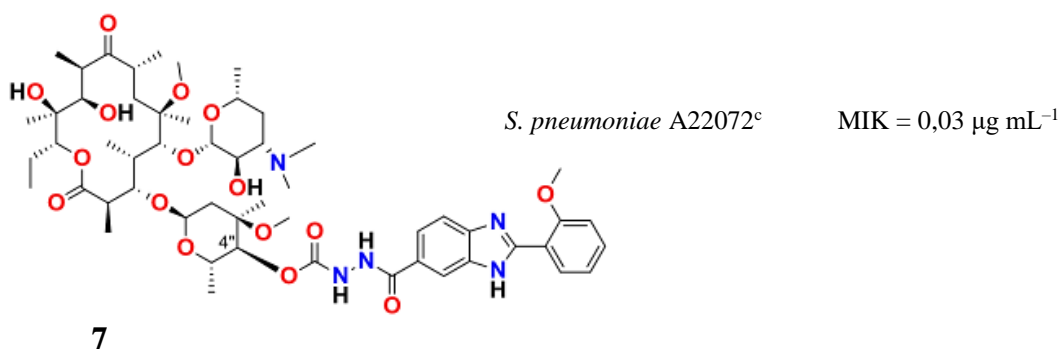
5

<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,03 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B1 ^b	MIK = 0,06 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> A22072 ^c	MIK = 0,25 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> AB11 ^d	MIK = 1 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MIK = 0,12 µg mL ⁻¹



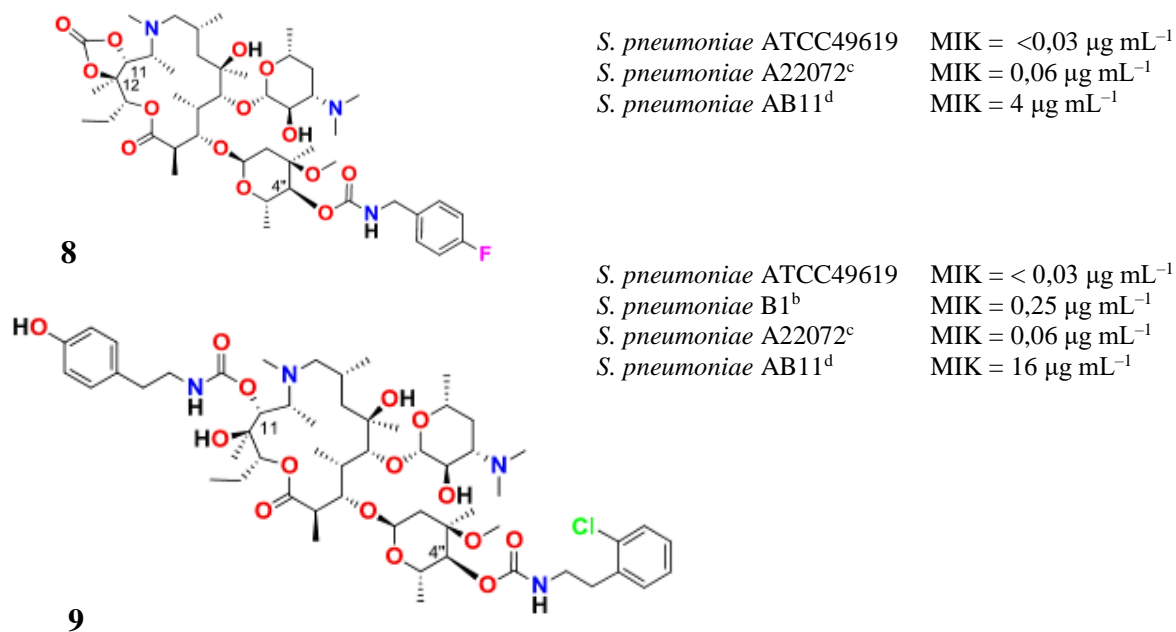
Slika 9. Strukture spojeva **5** i **6** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (b- rezistentni soj kodiran *erm* genima, c- rezistentni soj kodiran *mef* genima, d- rezistentni soj kodiran *mef* i *erm* genima)¹

4"-O-benzimidazolil derivati klaritromicina pokazali su 4 puta veću aktivnost na soj *S. pneumoniae* A22072 od **a-c**.²⁶



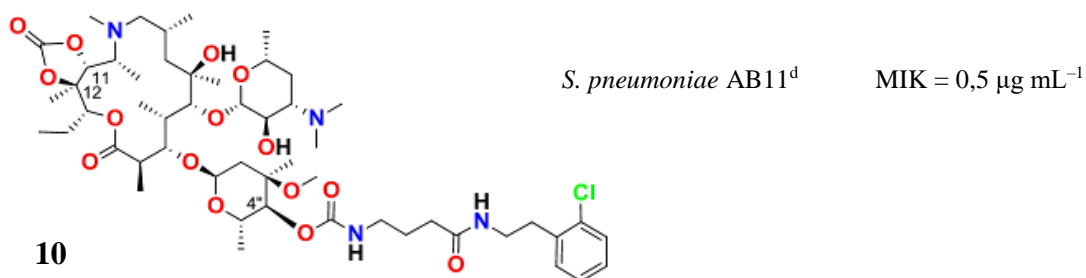
Slika 10. Struktura spoja **7** i određena MIK vrijednost za bakterijski soj *S. pneumoniae* (c- rezistentni soj kodiran *mef* genima)¹

Od 4"-O-karbamoil derivata petnaesteročlanih makrolida značajni su **8** i **9** (slika 11.). Njihova biološka aktivnost na soj *S. pneumoniae* AB11 je 4 do 16 puta veća od aktivnosti **b** i **c**. Spoj **9** pokazao je izvrsnu aktivnost na *S. pneumoniae* B1 za razliku od **b** (64 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i **c** (128 $\mu\text{g mL}^{-1}$).²⁷



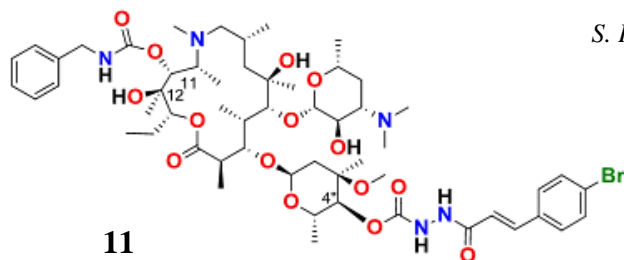
Slika 11. Strukture spojeva **8** i **9** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (b- rezistentni soj kodiran *erm* genima, c- rezistentni soj kodiran *mef* genima, d- rezistentni soj kodiran *mef* i *erm* genima)¹

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



Slika 12. Struktura spoja **10** i određena MIK vrijednost za bakterijski soj *S. pneumoniae* (d- rezistentni soj kodiran *mef* i *erm* genima)¹

Povećanjem rigidnosti lanca na položaju 4'' i uvođenjem $\pi - \pi$ konjugacije povećana je antimikrobna aktivnost na soj *S. Pneumoniae* 22072, no aktivnost se značajno smanjila za većinu Gram-pozitivnih bakterija.²⁹

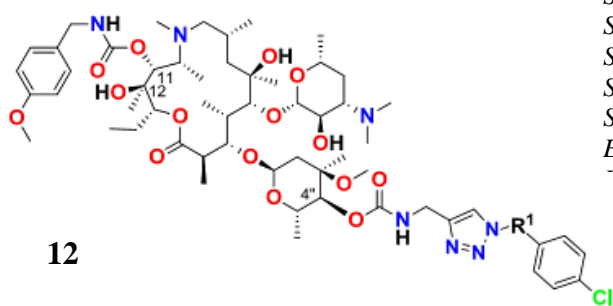


S. Pneumoniae A22072^c MIK = 0,12 µg mL⁻¹

11

Slika 13. Struktura spoja **11** i određena MIK vrijednost za bakterijski soj *S. pneumoniae* (c- rezistentni soj kodiran *mef* genima)¹

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



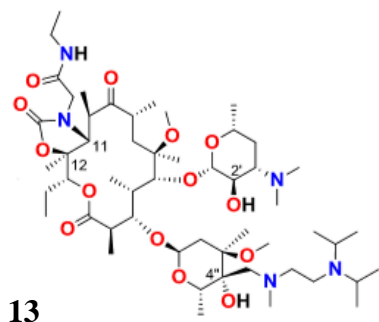
12

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

Slika 14. Struktura spoja **12** i određena MIK vrijednost za bakterijski soj *S. pneumoniae* (a- klinički izoliran rezistentni soj, b- rezistentni soj kodiran *erm* genima, c- rezistentni soj kodiran *mef* genima, d- rezistentni soj kodiran *mef* i *erm* genima)¹

Zhang i suradnici³¹ su osim već viđenih supstitucija na položajima C11, C12 te C4'' dodatno modificirali aglikonski prsten pripremom 6,9-iminoetera. Biološka aktivnost pripremljenih rigidnih bicikličkih azalida nije bila zadovoljavajuća. Time se pokazala važnost fleksibilnosti aglikonskog prstena za zauzimanje konformacije makrolida koja uspješno sterički sprječava elongaciju bakterijskog peptida.

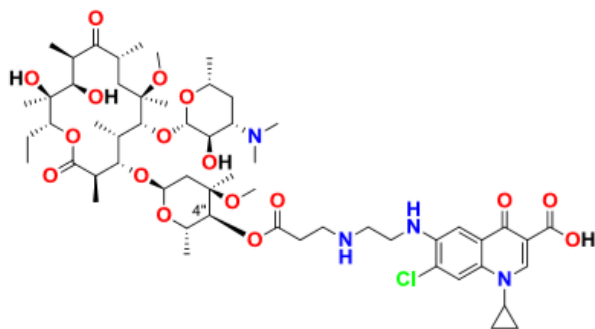
Sugimoto i suradnici³² modificirali su klaritromcin na položaju C4'' u kladinozi te položaje C11 i C12 u aglikonu. Dobiveni spojevi pokazali su dobru aktivnost na susceptibilne sojeve *S. Pneumoniae* i *S. Pyogenes* (slika 15.).



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

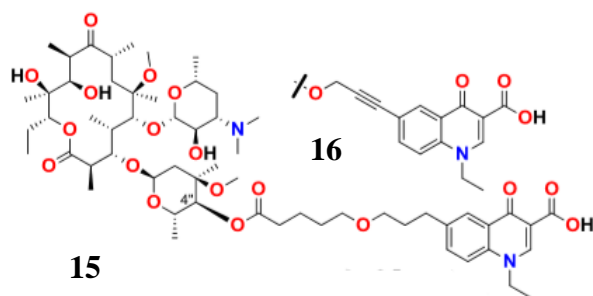
Slika 15. Struktura spoja **13** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve¹

Fajdetić i suradnici³³ pripravili su konjugate makrolida **a-c** i kinolona. Bolja antibakterijska aktivnost u odnosu na spomenute makrolide pripisana je povećanju lipofilnosti novih konjugata. Međutim, uvođenjem metinskih skupina u lanac na položaju C4" (**16**) došlo je do smanjenja biološke aktivnosti. Autori su zaključili kako je postojanje dužih fleksibilnih alkilnih lanaca nužno za optimalno smještanje makrolida u aktivno mjesto ribosoma. Posebice su istaknuli aktivnost spojeva **14** i **15** na rezistentni soj *H. Influenzae* koja je veća od aktivnosti telitromicina.



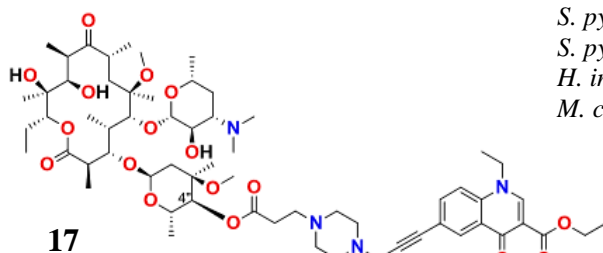
<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S.p yogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90256 (iMLS)	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> Finland 11 (iMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 166 GR-Micro (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S.p yogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90265/97 (iMLS)	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> Finland 11 (iMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 166 GR-Micro (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 16. Strukture spojeva **14** i **15** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (M - efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogramine)¹

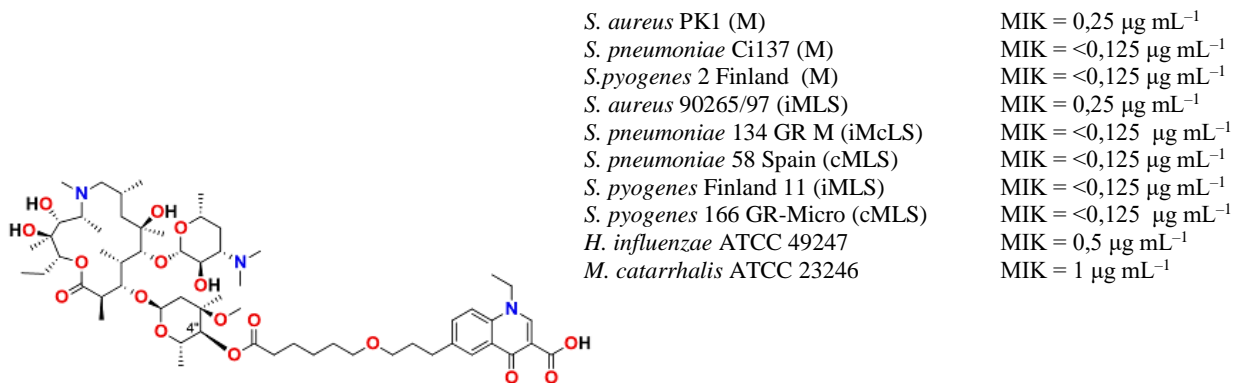
Kapić i suradnici³⁴ također su radili na sintezi konjugata makrolida i kinolona. Od pripremljenih četrnaesteročlanih derivata makrolida najviše se istaknuo spoj **17** (slika 17.) koji pokazuje izvrsnu aktivnost na *S. Pneumoniae* 134 GR-M (iMcLS) , dok azitromicin i klaritromicin ne pokazuju aktivnost na navedeni bakterijski soj. Istraživanjem djelovanja konjugata makrolida i kinolona, tzv. makrolona otkriveno je kako nemaju dualno djelovanje već pokazuju samo bakteriostatsku aktivnost. Inače, za kinolone je karakteristično baktericidno djelovanje.³⁵



<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90265/97 (iMLS)	MIK = $>64 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> Finland 11 (iMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 166 GR-Micro (cMLS)	MIK = 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$

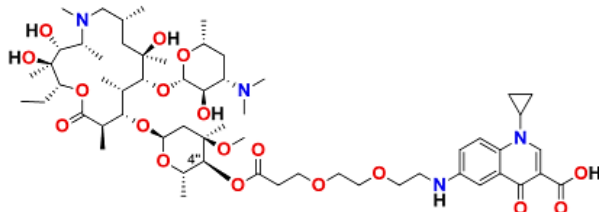
Slika 17. Struktura spoja **17** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (M - efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogramine)¹

Konjugacijom azitromicina i kinolona³⁶ dobiven je spektar spojeva od kojih su najznačajniji **18**, **19** i **20** (slika 18.). Najbolju antimikrobnu aktivnost, posebice za soj *S.aureus* i *S. pyogenes* ima spoj **20**. Spojevi **18** i **19** pokazali su dobru biorasploživost i izvrsnu aktivnost na *H. Influenzae*.



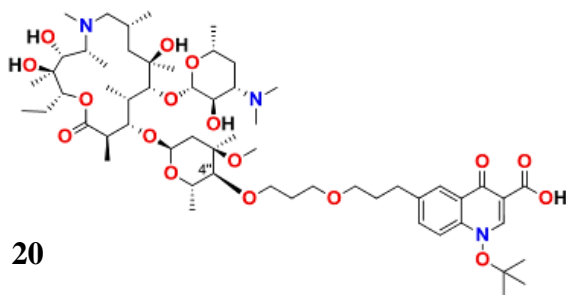
18

<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = ≤0,125 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> PK2 (cMLS)	MIK = 16 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = ≤0,125 µg mL ⁻¹
<i>S.pyogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = ≤0,125 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> 90265/97 (iMLS)	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = ≤0,125 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = ≤0,125 µg mL ⁻¹



19

<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = $\leq 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = $\leq 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90265/97 (iMLS)	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> Finland 11 (iMLS)	MIK = $\leq 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 166 GR-Micro (cMLS)	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

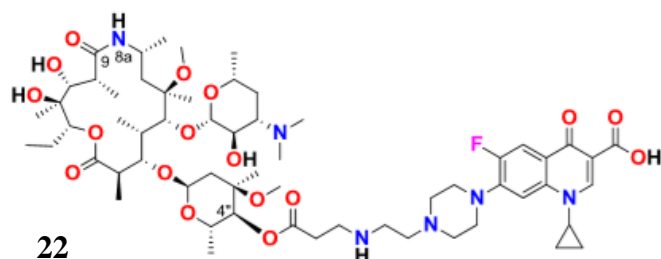
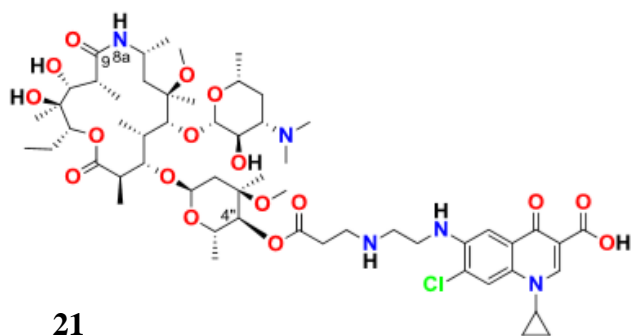


20

Slika 18. Strukture spojeva **18**, **19** i **20** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (M -efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogramine)¹

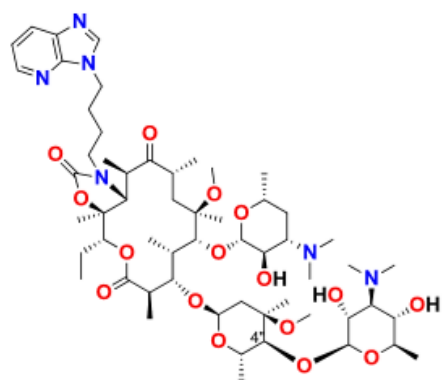
Makroloni **21** i **22** imaju visoku antimikrobnu aktivnost na eritromicin rezistentne patogene. Usporedbom MIK vrijednosti uočena je znatno bolja aktivnost spoja **21** u odnosu na spoj **22**. Autori smatraju da je bolja aktivnost **21** posljedica optimalne duljine i veće fleksibilnosti 4"-O lanca.^{33,37}

<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90256 (iMLS)	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> Finland 11 (iMLS)	MIK = $\leq 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 166 GR-Micro (cMLS)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 19. Strukture spojeva **21** i **22** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (M -efluks rezistencija na makrolide; iMLS - inducibilna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; cMLS - konstitutivna rezistencija na makrolide, linkozamide i streptogramine; iMcLS – inducibilna rezistencija na makrolide i konstitutivna rezistencija na linkozamide i streptogramine)¹

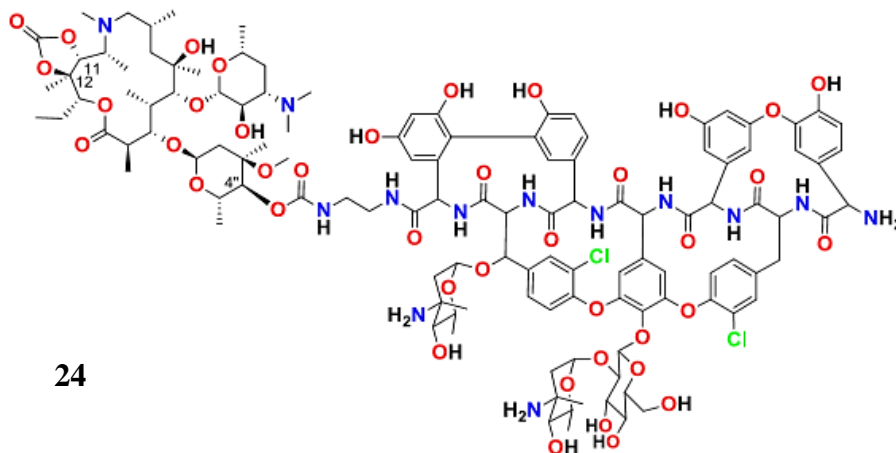
Zhao i suradnici³⁸ su istraživali biološku aktivnost derivata telitromicina. Uvođenjem još jedne saharidne jedinice na položaj C4" i zaštitom hidroksilnih skupina iste došlo je do smanjenja biološke aktivnosti. Nešto bolju aktivnost pokazao je spoj na slici 20.



<i>S. pneumoniae</i> 11J011 ERSP	MIK = 2 µg mL ⁻¹
<i>S.pyogenes</i> 11N369 ERSPy	MIK = 2 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> 11B117 MRSA	MIK = 64 µg mL ⁻¹
<i>S. epidermidis</i> 11c176 MRSE	MIK = 32 µg mL ⁻¹
<i>H. influenzae</i> 11Q373 ^a	MIK = 16 µg mL ⁻¹

Slika 20. Struktura spoja **23** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (ERSP, ERSPy-eritromicin rezistentni soj; MRSA,MRSE-meticilin rezistentni soj; a-azitromicin rezistentni soj)¹

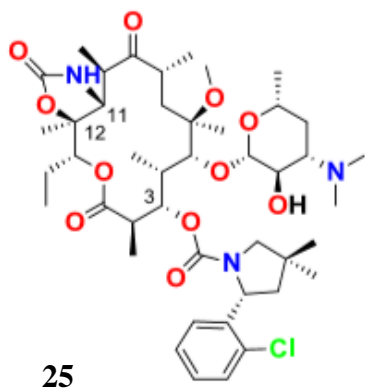
Tevyashova i suradnici³⁹ su objavili istraživanje o antibakterijskim svojstvima konjugata makrolida i peptida (slika 21.). Usporedili su antimikrobna svojstva novopripremljenih spojeva sa svojstvima azitromicina i vankomicina. Uvođenjem makrocikličkog centra smanjila se biološka aktivnost na većinu Gram-negativnih bakterija, no zabilježena je povećana aktivnost na sojeve: *E. Faecium* 568 MIK = 0,5 µg mL⁻¹, *E. Faecium* 569 MIK = 4 µg mL⁻¹, *E. Faecium* 560 MIK = 8 µg mL⁻¹ i *S. pneumoniae* ATCC49619 MIK = 1 µg mL⁻¹.



Slika 21. Struktura spoja **24**¹

Na primjeru ketolida pokazano je da kladinoza bitno ne utječe na antibakterijsku aktivnost makrolida. Ketolidi su dobiveni uklanjanjem kladinoze i oksidacijom hidroksilne skupine na položaju C3 u karbonilnu skupinu. Kako bi se dodatno istražio utjecaj kladinoze na biološku potentnost makrolida pripremljeni su spojevi opisani u nastavku.

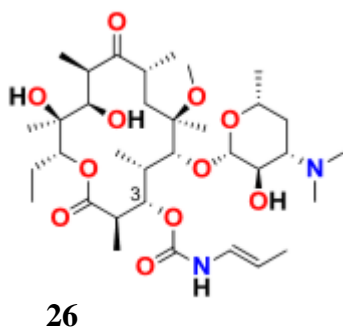
Magee i suradnici⁴⁰ su pomoću kristalografije istražili vezanje spoja **25** na ribosom bakterije *D. radiodurans*. Biološka aktivnost navedenog spoja slična je aktivnosti klaritromicina, izuzev aktivnosti na soj *S. pneumoniae* 1243-00 MLS_B koja je 4200 puta veća.



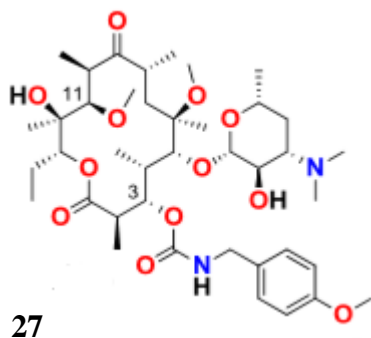
<i>S. pneumoniae</i> 1243-00 MLS _B	MIK = 0,015 µg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> 304-00 MLS _B	MIK = 0,03 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> 1279-07 MRSA	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> 2111-10 MRSA	MIK = 0,25 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> 1281-07 MRSA	MIK = 0,25 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> 1279-07 MRSA	MIK = 0,25 µg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

Slika 22. Struktura spoja **25** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (MRSA,MRSE-meticilin rezistentni soj; MLS_B-soj rezistentan na makrolide, linkozamide i streptogramine B)¹

Zhang i suradnici⁴¹ te Wu i suradnici⁴² pripremili su dekladinozil-derivate klaritromicina i provjerili njihovu biološku aktivnost. Osim što je aktivnost ovih derivata prevladala aktivnost klaritromicina, pokazali su izvrsnu aktivnost na *S. pneumoniae* (**26**) i *S. Aureus* (**27**). Pokazalo se kako se uvođenjem različitih supstituenata na položaj C3 četrnaesteročanih makrolida postiže selektivna bioaktivnost. Takav slučaj nije zabilježen uvođenjem identičnih skupina na položaj C3 petnaesteročanih makrolida.



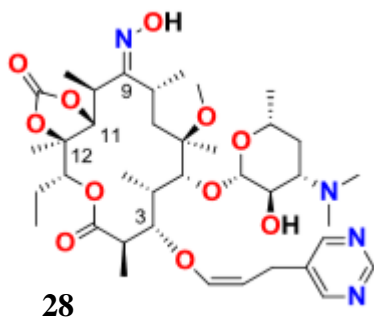
<i>S. pneumoniae</i> B1 ^a	MIK = 2 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> A22072 ^b	MIK = 0,25 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> AB11 ^c	MIK = 4 µg mL ⁻¹



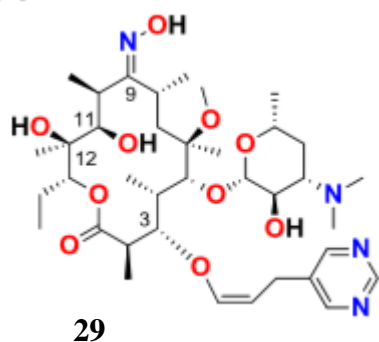
<i>S. aureus</i> A265 ^d	MIK = 0,125 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> A2333 ^e	MIK = 0,25 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> 3469 ^f	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹
<i>H. influenzae</i> 3300 ^g	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹

Slika 23. Strukture spojeva **26** i **27** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a- rezistentni soj kodiran *erm* genima, b- rezistentni soj kodiran *mef* genima, c- rezistentni soj kodiran *mef* i *erm* genima, d- eritromicin rezistentni i ampicilin susceptibilni soj, e- eritromicin rezistentni i meticilin susceptibilni soj, f- eritromicin rezistentni soj, g- ampicilin rezistentni soj)¹

Daljnjom modifikacijom dekladinozil-klaritromicina uvođenjem eterske skupine i pirimidina na položaj C3 te oksimske zaštitne skupine na položaj C9 povećana je bioaktivnost na sojeve *S. aureus* (**29**) i *S. Pneumoniae* ATCC49619 (**29**, **30**) (MIK = 0,032–0,064 µg mL⁻¹).⁴³



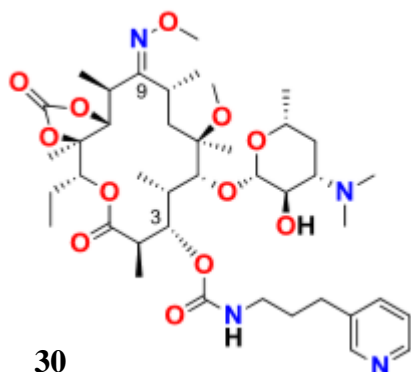
<i>S. aureus</i> ATCC29213	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> PU-32	MIK = 0,5 µg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,032 µg mL ⁻¹



<i>S. aureus</i> ATCC29213	MIK = 0,064 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> PU-32	MIK = 0,064 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,064 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Slika 24. Strukture spojeva **28** i **29** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve¹

Liang i suradnici radili su ujedno i na sintezi derivata dekladinozil-klaritromicina uvođenjem amidne skupine i heterocikličkih supstituenata na položaj C3. Najbolja antibakterijska svojstva pokazao je spoj **30**, i to posebice na rezistentne patogene (slika 25.) Doking analizom utvrđeno je kako aromatski supstituenti pogoduju vezanju makrolida za ribosom uspostavljanjem dodatnih π - π interakcija, a time i povećavaju njegovu aktivnost.⁴⁴



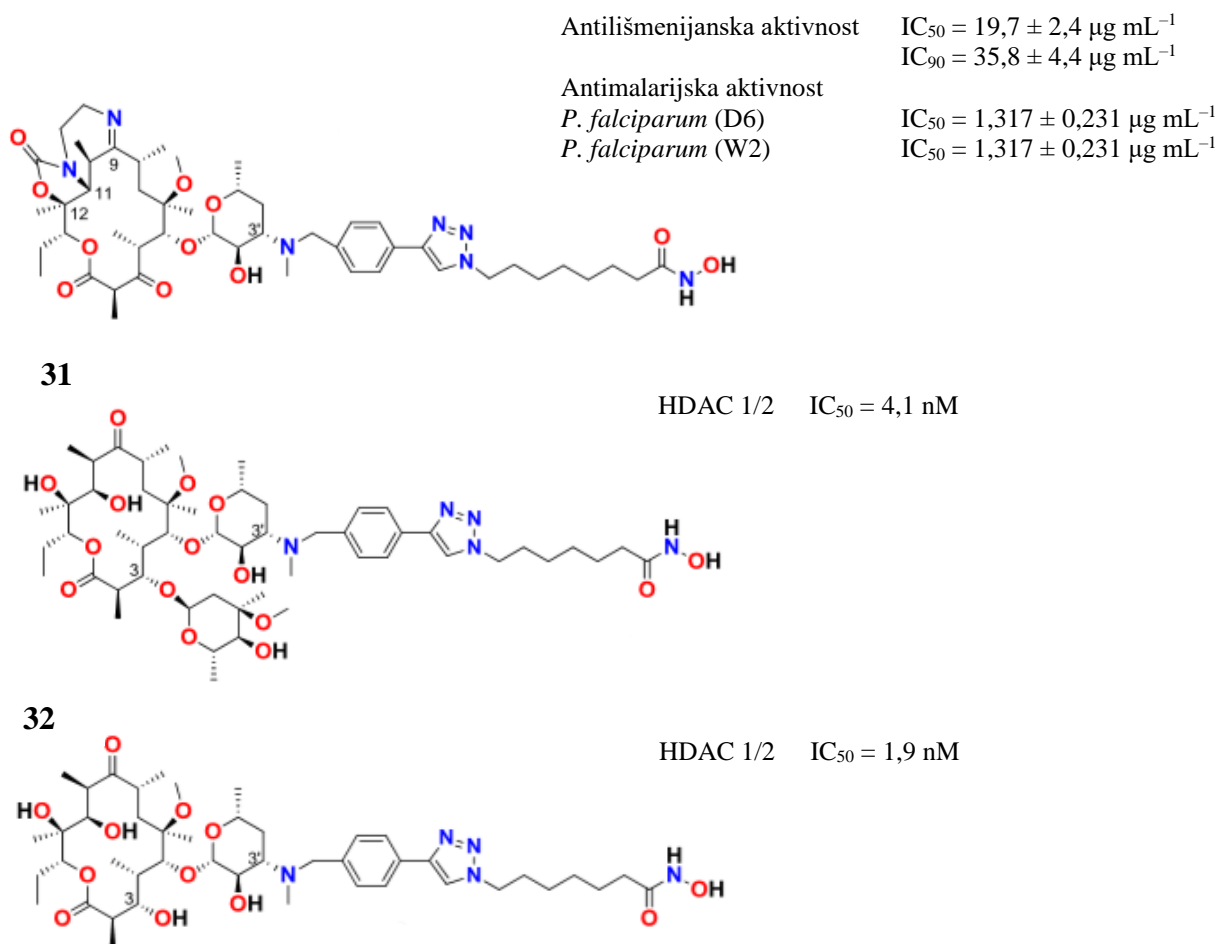
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> PU09 ^a	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 01-968 ^b	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Slika 25. Struktura spoja **30** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a- rezistentni soj kodiran *mef* genima, b- rezistentni soj kodiran *erm* genima)¹

3.1.2. Kemijska modifikacija aminosaharida

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

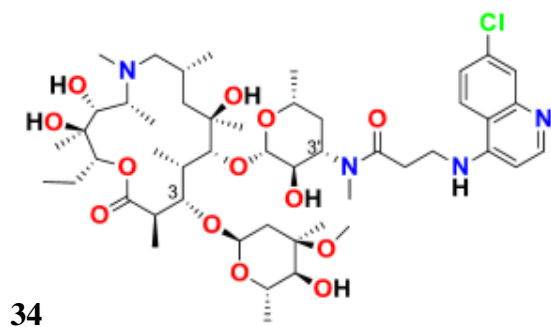
Oyelere i suradnici⁴⁵ radili su na modifikaciji položaja C3'. Provjerom biološke potentnosti i doking analizama otkriveno je inhibicijsko djelovanje makrolida na histon deacetilazu 1 (HDAC1) i histon deacetilazu 2 (HDAC2). Osim antikancerogenog djelovanja, spojevi su pokazali antimalarijsku i antilišmenijansku aktivnost (slika 26). Navedena aktivnost izražena je pomoću vrijednosti IC₅₀, to jest koncentracije koja smanjuje vijabilnost stanica za 50 %.



Slika 26. Strukture spojeva **31**, **32** i **33** i određene IC₅₀ vrijednosti¹

Također, modifikacijom položaja C3' pripremljeni su konjugati azalida i kinolona (slika 27.)⁴⁶ Spojevi su pokazali smanjenu antibakterijsku aktivnost, ali izvrsnu antimalarijsku aktivnost. Istu aktivnost imaju i azalidi s modificiranim položajem C2' (slika 28.)⁴⁷

Antimalarijska aktivnost	
<i>P. falciparum</i> 3D7A ^a	IC ₅₀ = 10 nM
<i>P. falciparum</i> W2 ^b	IC ₅₀ = 13 nM



Slika 27. Struktura spoja **34** i određene IC_{50} vrijednosti. (a - osjetljivi soj, b - soj rezistentan na klorokin i pirimetamin)¹

35

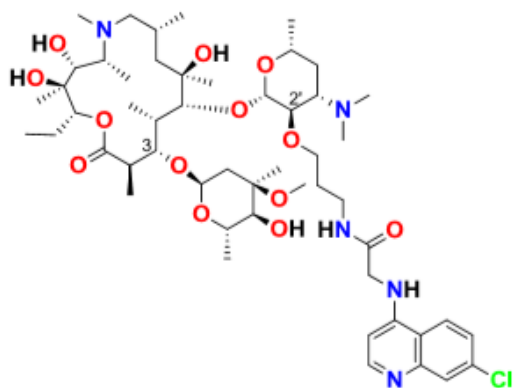
Antimalarijska aktivnost

P. falciparum 3D7A^a

$IC_{50} = 14$ nM

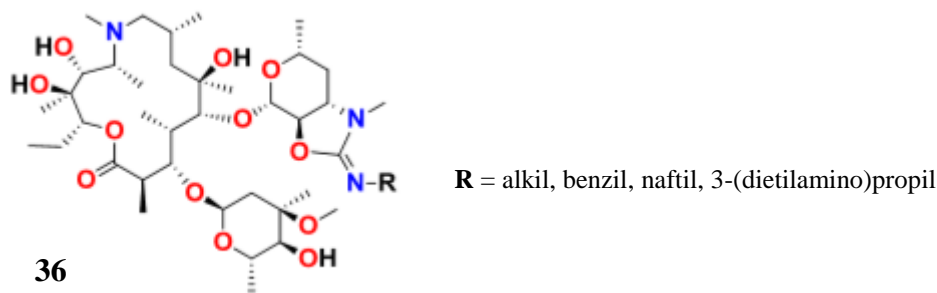
P. falciparum W2^b

$IC_{50} = 9$ nM



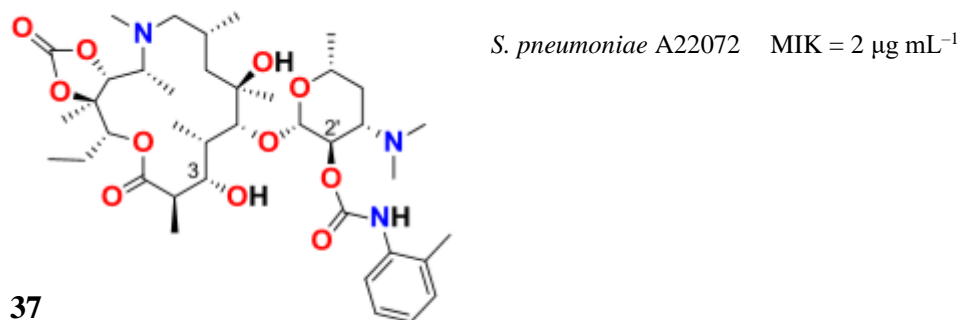
Slika 28. Struktura spoja **35** i određene IC_{50} vrijednosti. (a - osjetljivi soj, b - soj rezistentan na klorokin i pirimetamin)¹

Uvođenjem supstituenata na položaj C2' i C3' dobiveni su azalidi koji pokazuje iznimno protuupalno djelovanje (slika 29).⁴⁸



Slika 29. Struktura spoja **36**.¹

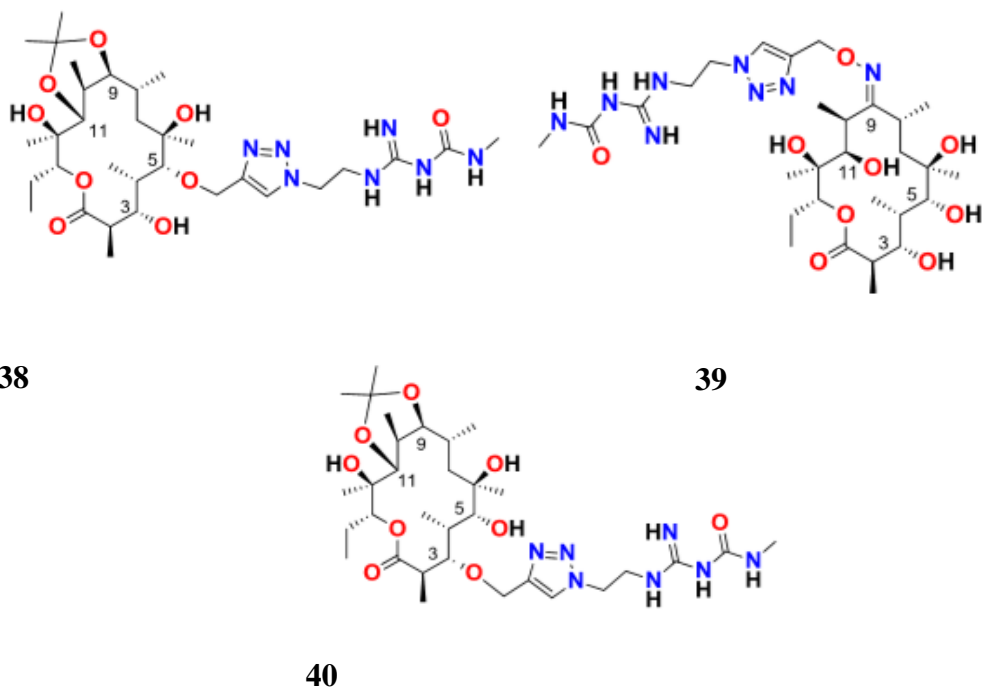
Nadalje, Yan i suradnici⁴⁹ su sintetizirali 3-O-dekladinozil-2'-O-karbamoil derivate azitromicina među kojima se istaknuo spoj **37** (slika 30.) koji pokazuje 2 puta veću aktivnost na soj *S. pneumoniae* A22072 od azitromicina. Autori smatraju kako antibakterijskoj aktivnosti tih derivata doprinosi interakcija dušika karbamoilne skupine (C2') s 23S rRNA.



Slika 30. Struktura spoja **37** i određena MIK vrijednost za bakterijski soj *S. pneumoniae*¹

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

Sunazuka i suradnici⁵² istraživali su derivate argifina i četrnaesteročlanih makrolida. Argifin je ciklički peptid izoliran iz gljive *Gliocladium sp.* FTD-0668. Pokazano je da argifin kao inhibitor enzima kitinaze ima potencijala za liječenje astme. No, novopripremljeni derivati makrolida i argifina (slika 31.) pokazali su čak 200 puta jaču inhibitornu aktivnost na enzim kitinazu.



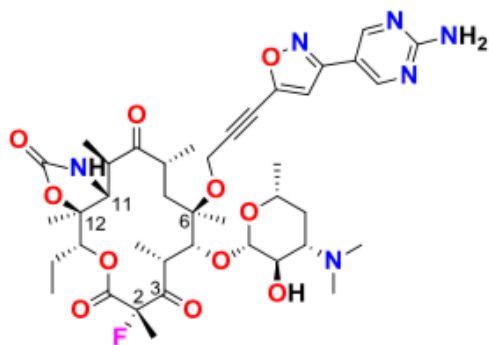
Slika 31. Strukture spojeva **38**, **39** i **40**¹

3.2. Kemijska modifikacija aglikonskog prstena četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida

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

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

Sugimoto i suradnici⁵³ radili su na sintezi fluoroketolida s modificiranim položajem C6. Dobili su spojeve s pojačanom biološkom aktivnosti na sojeve *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* i *H. influenzae* (slika 32.).

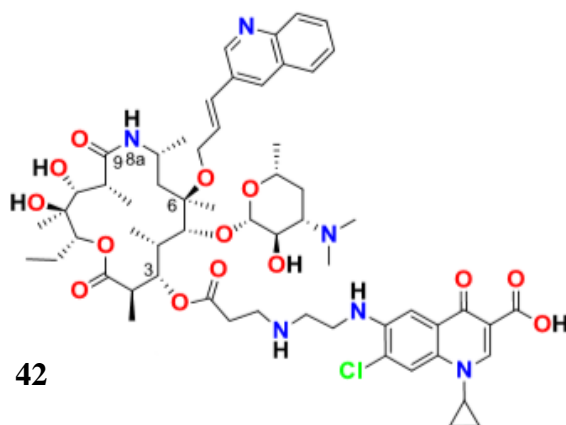


<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 210 ^a	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 205 ^b	MIK = 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 1104 ^b	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC43095	MIK = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

41

Slika 32. Struktura spoja **40** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a- rezistentni soj kodiran *mef* genima, b- rezistentni soj kodiran *erm* genima)¹

Grupa autora⁵⁴ pripremila je konjugate petnaesteročlanih makrolida i kinolona. Najaktivniji spoj **42** posjeduje biološku aktivnost sličnu telitromicinu. Istraživanja *in vivo* pokazala su sporu apsorpciju spoja **42** i dobru bioraspodjelivost.

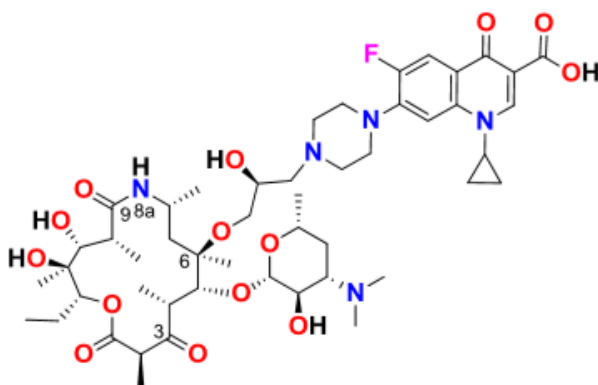


<i>S. aureus</i> ^a	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> ^b	MIK = $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> ^a	MIK = $\leq 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> ^c	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> ^d	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
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

42

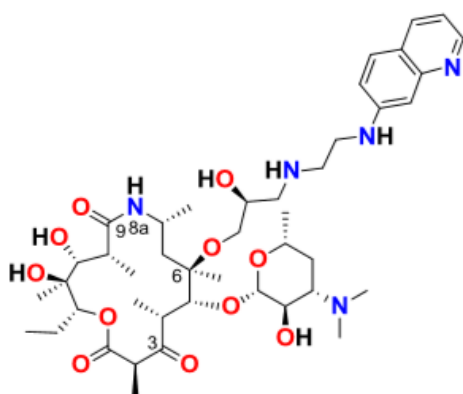
Slika 33. Struktura spoja **42** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a - eritromicin susceptibilni soj, b - inducibilno rezistentni soj (iMLS), c – konstitutivno rezistentni soj (cMLS), d – efluks rezistentni soj (M))¹

Ista grupa autora⁵⁴ istraživala je ketolidne derivate homoeritromicina A sa supstituiranim položajem C6. Na većinu rezistentnih Gram-pozitivnih bakterija aktivni su spojevi **43** i **44** te su se pokazali aktivnijima od telitromicina i cetroomicina na *H. Influenzae* i *M. Catarrhalis*.



43

<i>S. aureus</i> B0329 ^a	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> B0538 ^b	MIK = 0,25 μg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> B0330 ^c	MIK = 2 μg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> B0331 ^d	MIK = 0,25 μg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B0541 ^a	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B0627 ^c	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B0326 ^d	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0542 ^a	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0543 ^b	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0544 ^c	MIK = 2 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0545 ^d	MIK = 0,5 μg mL ⁻¹
<i>M. catarrhalis</i> B0324	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>H. influenzae</i> B0529	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹

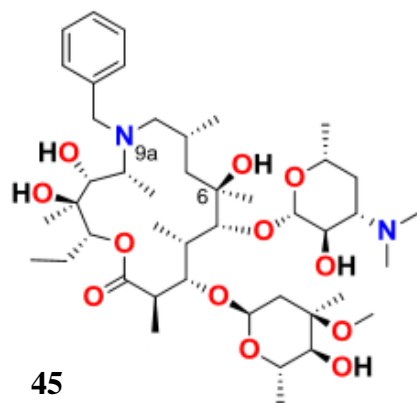


44

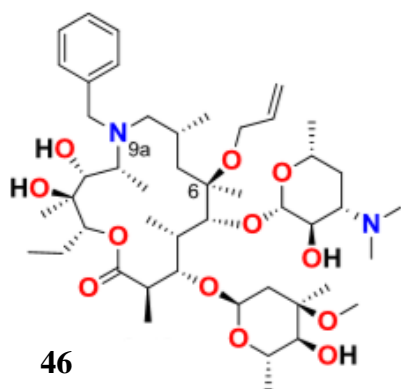
<i>S. aureus</i> B0329 ^a	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> B0538 ^b	MIK = 0,25 μg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> B0330 ^c	MIK = >64 μg mL ⁻¹
<i>S. aureus</i> B0331 ^d	MIK = 0,25 μg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B0541 ^a	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B0627 ^c	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pneumoniae</i> B0326 ^d	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0542 ^a	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0543 ^b	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0544 ^c	MIK = 1 μg mL ⁻¹
<i>S. pyogenes</i> B0545 ^d	MIK = 0,5 μg mL ⁻¹
<i>M. catarrhalis</i> B0324	MIK = ≤0,125 μg mL ⁻¹
<i>H. influenzae</i> B0529	MIK = 0,25 μg mL ⁻¹

Slika 34. Struktura spojeva **43** i **44** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a- soj osjetljiv na eritromicin, b - inducibilno rezistentni soj (iMLS), c – konstitutivno rezistentni soj (cMLS), d – efluks rezistentni soj (M))¹

Iz eritromicina pripravljeni su spojevi **45** i **46** koji su se unatoč reduciranoj antibakterijskoj aktivnosti pokazali djelotvornima na parazit *T. Gondii* koji je uzročnik toksoplazmoze.⁵⁵



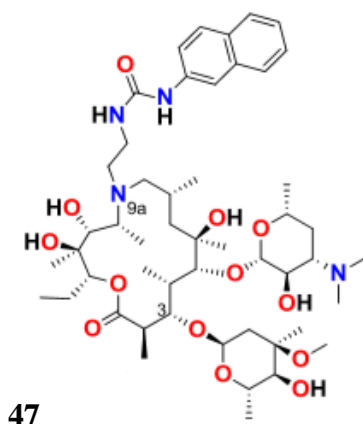
T. gondii $IC_{50} = 5 \pm 1 \mu M$



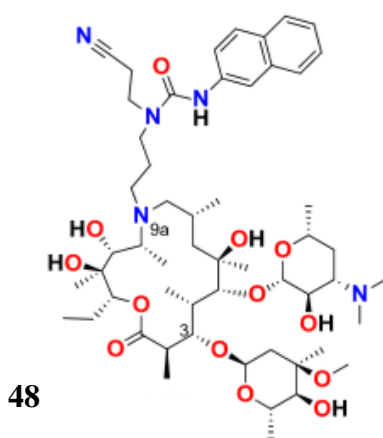
T. gondii $IC_{50} = 7 \pm 1 \mu M$

Slika 35. Strukture spojeva **45** i **46** i određene IC_{50} vrijednosti¹

Istražena je biološka aktivnost analoga makrolida sa tioureido i ureido supstituentima na položaju N(9a).⁵⁶ Na slici 36. prikazani su spojevi sa najvećom antimalarijskom aktivnosti. Spoj **47** je ujedno pokazao visoku citotoksičnost na stanice hepatocelularnoga karcinoma (Hep-G2) i staničnu liniju izoliranu iz pacijenta s akutnom monocitnom leukemijom (THP-1).



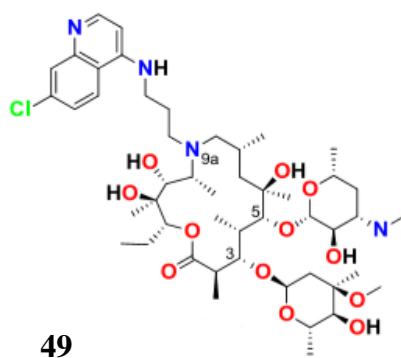
Antimalarijska aktivnost	
<i>P. falciparum</i> TM91C235	IC ₅₀ = 24 nM
<i>P. falciparum</i> D6 ^a	IC ₅₀ = 71 nM
<i>P. falciparum</i> W2 ^b	IC ₅₀ = 30 nM
Citotoksičnost THP-1	IC ₅₀ = 5 μM
Citotoksičnost Hep-G2	IC ₅₀ = 9 μM



Antimalarijska aktivnost	
<i>P. falciparum</i> TM91C235	IC ₅₀ = 116 nM
<i>P. falciparum</i> D6 ^a	IC ₅₀ = 118 nM
<i>P. falciparum</i> W2 ^b	IC ₅₀ = 178 nM

Slika 36. Strukture spojeva **47** i **48** i određene IC₅₀ vrijednosti (a - osjetljivi soj, b - soj rezistentan na klorokin).¹

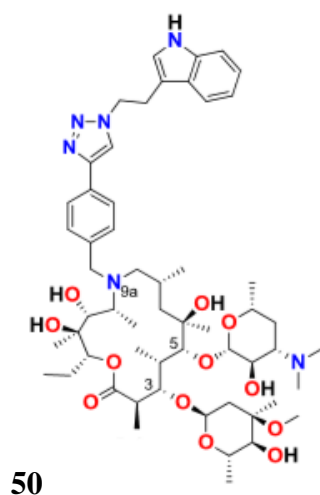
Konjugat makrolida i klorokina **49** pokazao je također antikancerogenu i visoku antimalarijsku aktivnost te dobru bioraspodjivost.⁵⁷



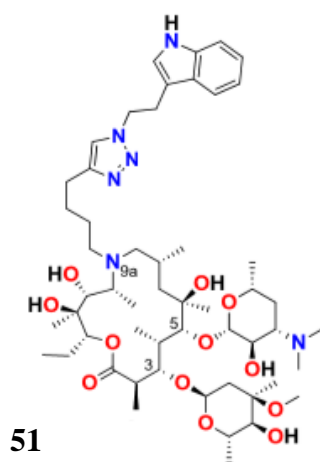
Antimalarijska aktivnost	
<i>P. falciparum</i> TM91C235	IC ₅₀ = 22 nM
Citotoksičnost Hep-G2	IC ₅₀ = 30 μM

Slika 37. Struktura spoja **49** i određena IC₅₀ vrijednost¹

Uvođenjem triazolskog i indolskog prstena na položaj N(9a) povećava se afinitet vezanja makrolida za ribosom uspostavljanjem dodatnih $\pi - \pi$ interakcija. Spoj **50** pokazao je trostruko veću aktivnost od azitromicina na „cell-free“ bakterijski soj *E. coli*. Zabilježena je i veća aktivnost spoja **51** na bakterijski soj *S. aureus* ATCC 29213.⁵⁸



<i>E. coli cell free</i>	$IC_{50} = 0,12 \pm 0,011 \mu M$
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ^a	MIK = 3,13 $\mu g mL^{-1}$
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ^b	MIK = 1,56 $\mu g mL^{-1}$

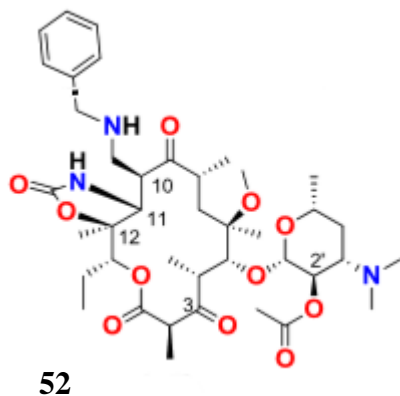


<i>E. coli cell free</i>	$IC_{50} = 0,540 \pm 0,056 \mu M$
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ^a	MIK = 0,78 $\mu g mL^{-1}$
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ^b	MIK = 0,078 $\mu g mL^{-1}$
<i>E. coli</i> ATCC 27856	MIK = 16 $\mu g mL^{-1}$

Slika 38. Strukture spojeva **50** i **51** te određene MIK i IC_{50} vrijednosti (a – bez serumskog indikatora, b – sa serumskim indikatorom)¹

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

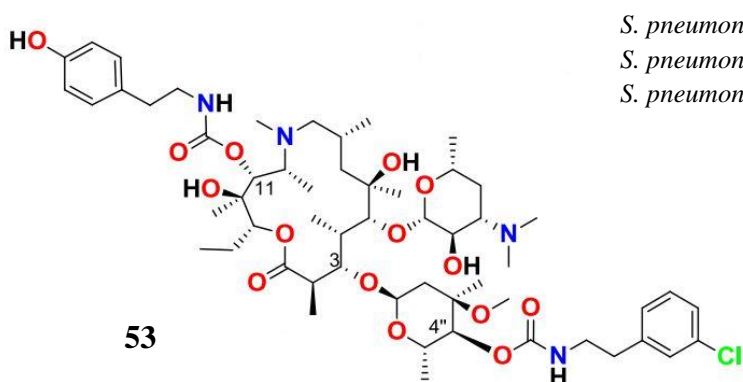
Najviše se istaknuo spoj **52** prikazan na slici 39. Aktivnost na rezistentne Gram-pozitivne patogene *S. pneumoniae* i *S. aureus* pokazala se znatno većom od bioaktivnosti koju pokazuje klaritromicin.⁵⁹



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

Slika 39. Struktura spoja **52** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a – efluks rezistentni soj (M)), b - soj rezistentan na makrolide, linkozamide i streptogramine (MLS))¹

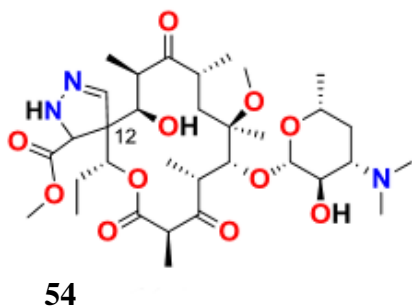
Ma i suradnici⁵⁵ radili su na supstituciji položaja C11 u petnaesteročlanim makrolidima. Dobri rezultati dobiveni su za spoj **53** (slika 40.). MIK vrijednosti za navedene sojeve su do 70 puta niže od MIK vrijednosti azitromicina i klaritromicina.



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

Slika 40. Struktura spoja **53** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve (a – rezistentni soj kodiran *erm* genima, b – rezistentni soj kodiran *mef* genima)¹

Uvođenjem prstena na položaj C12 povećala se aktivnost na soj *S. aureus* i *H. influenza* u odnosu na **a** i **b**.⁵⁶



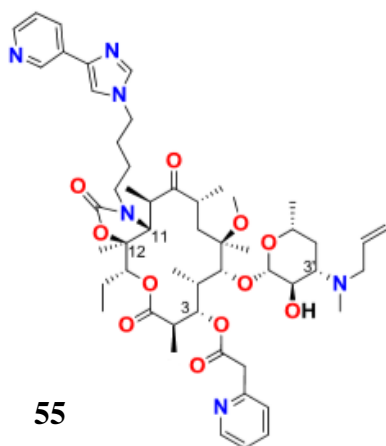
S. aureus 26001
H. influenza 5096

MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$

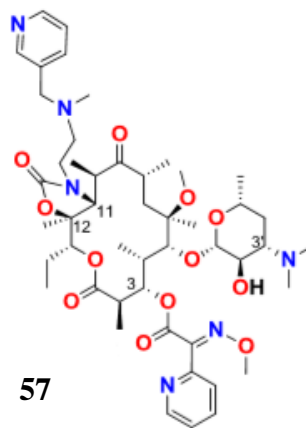
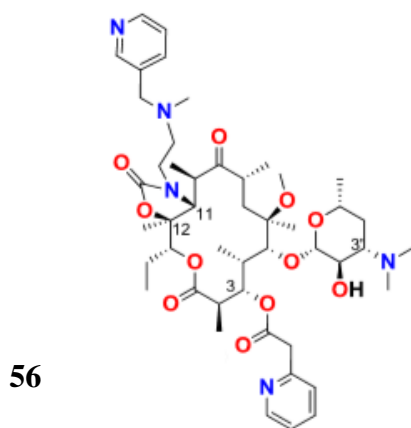
Slika 41. Struktura spoja **54** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve¹

Po uzoru na strukturu solitromicina i telitromicina pripremljen je niz derivata makrolida s transformiranim hidroksilnim skupinama na položajima C11 i C12. Jedan od njih je derivat telitromicina **55** sa izmijenjenim položajem C3 i C3' (slika 42.). Spoj **55** pokazao je 2 – 8 puta veću aktivnost na neke sojeve bakterija od telitromicina.

Za spojeve **56** i **57** zabilježena je bioaktivnost slična klaritromicinu izuzev aktivnosti na soj *S. pneumoniae* ATCC 15531 koja je prilično visoka (MIK = 0,001 – 0,002 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Također se ističe aktivnost **55** i **56** na rezistentne sojeve *M. pneumoniae* (MIK = 0,5 – 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$).⁵⁷

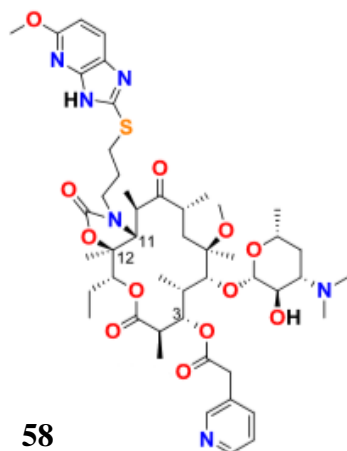


<i>S. pneumoniae</i> 6303	MIK = 0,0015 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 49619 <i>erm</i>	MIK = 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 994 <i>mef</i>	MIK = 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 19615	MIK = 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> 38	MIK = 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Moraxela</i> 8176	MIK = 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Slika 42. Strukture spojeva **56** i **57** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve¹

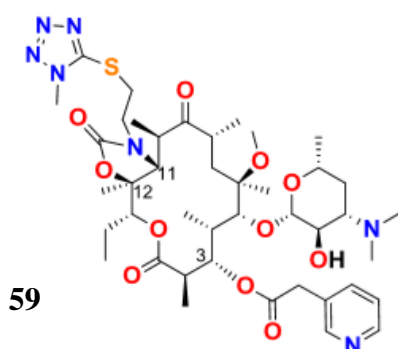
Ketolid **58** pokazao je 2 puta veću djelotvornost od telitromicina protiv sojeva navedenih na slici 43, dok je aktivnost na vankomicin rezistentni soj *E. faecalis* usporediva sa aktivnosti telitromicina.⁵⁸



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

Slika 43. Struktura spoja **58** i određena MIK vrijednost za neke bakterijske sojeve.¹

Nadalje, među pripravljenim derivatima ističe se aktivnost spojeva **59** i **60** na sojeve naznačene na slici 44.⁵⁹



S. aureus ATCC25923

MIK = <0,0625 $\mu\text{g mL}^{-1}$

E. coli ATCC25922

MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$



S. aureus ATCC6538

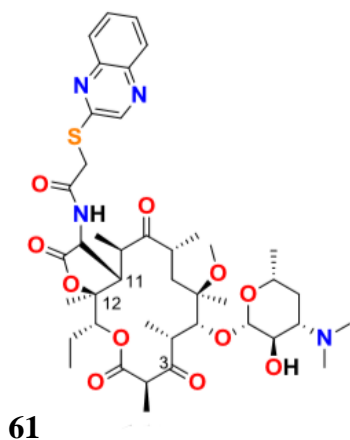
MIK = 0,063 $\mu\text{g mL}^{-1}$

S. epidermidis ATCC12228

MIK = <0,0625 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Slika 44. Strukture spojeva **59** i **60** i određene MIK vrijednosti za neke bakterijske sojeve¹

Pavlović i suradnici⁶⁰ pripravili su ketolide s atipičnom modifikacijom položaja C11 i C12. Najbolji rezultati (2 – 4 puta veća aktivnost od **c** i **d**) zabilježeni su za spoj **61** (slika 45.).



S. aureus

MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$

S. aureus iMLS

MIK = 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$

S. pyogenes iMLS_B

MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

S. pyogenes M

MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Slika 45. Struktura spoja **61** i određena MIK vrijednost za neke bakterijske sojeve¹

4. ZAKLJUČAK

U ovom kemijskom seminaru napravljen je pregled strukture i biološke aktivnosti četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolidnih antibiotika. Također, istaknuta je važnost istraživanja novih lijekova zbog sve veće učestalosti bakterijskih infekcija i pojave rezistencije na dosadašnje antibiotike.

Na temelju proučavanja interakcija kompleksa ligand-biološka meta i rezultata dobivenih molekulskim modeliranjem određena je veza između strukture i aktivnosti te su predloženi i pripremljeni novi derivati makrolida od kojih neki pokazuju veći afinitet vezanja na biološke mete, a time i bolju antimikrobnu aktivnost *in vitro*.

Iako su neki derivati pokazali veću aktivnost na susceptibilne i rezistentne sojeve u odnosu na referentne makrolide (eritromicin A, klaritromicin, azitromicin, telitromicin), većina njih nema široki spektar antibakterijske aktivnosti.

Za pojedine derivate makrolida provedena su testiranja *in vivo* te su u tijeku faze kliničkih ispitivanja.

5. LITERATURNI IZVORI

1. A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 111662.
2. B. Arsić, P. Novak, J. Barber, M. G. Rimoli, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018, str. 1–73.
3. P. Fernandes, D. Pereira, P. B. Watkins, D. Bertrand, *Eur. J. Med. Chem.* (2019) DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01159.
4. J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1987) 1659–1667.
5. J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1988) 325–337.
6. A. Awan, R. J. Brennan, A. C. Regan, J. Barber, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (2000) 1645–1652.
7. G. Bertho, P. Ladam, J. Gharbi-Benarous, M. Delaforge, J.-P. Girault, *Int. J. Biol. Macromol.* **22** (1998) 103–127.
8. G. Lazarevski, M. Vinković, G. Kobrehel, S. Đokić, *Tetrahedron* **49** (1993) 721–730.
9. P. Novak, Z. Banić Tomišić, P. Tepeš, G. Lazarevski, J. Plavec, G. Turkalj, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 39–47.
10. P. Novak, I. Tatić, P. Tepeš, S. Koštrun, J. Barber, *J. Phys. Chem. A.* **110** (2006) 572–579.
11. P. Novak, J. Barber, A. Čikoš, B. Arsić, J. Plavec, G. Lazarevski, P. Tepeš, N. Košutić-Hulita, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009) 5857–5867.
12. D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **121** (2005) 257–270.
13. S. Glanzer, S. A. Pulido, S. Tutz, G. E. Wagner, M. Kriechbaum, N. Gubensäk, J. Trifunovic, M. Dorn, W. M. F. Fabian, P. Novak, J. Reidl, K. Zangger, *Chem. Eur. J.* **21** (2015) 1–10.
14. P. Novak, P. Tepeš, V. Lazić, *Croat. Chem. Acta* **80** (2007) 211–216.
15. J. A. Dunkle, L. Xiong, A. S. Mankin, J. H. D. Cate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 17152–17157.
16. R. Berisio, J. Harms, F. Schluenzen, R. Zarivach, H. A. S. Hansen, P. Fucini, A. Yonath, *J. Bacteriol.* **185** (2003) 4276–4279.
17. P. Tepeš, P. Novak, *Kem. Ind.* **57** (2008) 165–173.
18. P. Novak, T. Jednačak, *Određivanje strukture molekula spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2014.
19. B. Arsic, A. Awan, R. J. Brennan, J. A. Aguilar, R. Ledder, A. J. McBain, A. C. Regan, J. Barber, *Med. Chem. Commun.* **5** (2014) 1347–1354.

20. S. Kalenić (ur), *Medicinska mikrobiologija*, poglavlje 15, Štamparija Fojnica d.o.o, Zenica, 2009., str. 221–252.
21. M. Bukvić Krajačić, *Sinteza i biološka aktivnost novih ureido- i tioureido- derivata iz reda 15-članih azalida*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2001, str. 33.
22. Y. Qi, B. Jiao, X. Ma, W. Cui, S. Ma, *Arch. Pharm.* **343** (2010) 458–464.
23. S. Ma, B. Jiao, Y. Ju, M. Zheng, R. Ma, L. Liu, L. Zhang, X. Shen, C. Ma, Y. Meng, H. Wang, Y. Qi, X. Ma, W. Cui, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 556–566.
24. S. Ma, P. Wei, X. Ma, C. Cong, Y. Wang, *4''-O-carbamate clarithromycin derivative with electron withdrawing group substituted terminal, preparation method for intermediate of derivative and application of derivative*, CN102584919B, 2014.
25. S. El Ashkar, M. Osman, R. Rafei, H. Mallat, M. Achkar, F. Dabboussi, M. Hamze, *J. Infect. Public Health* **10** (2017) 745–748.
26. C. Cong, H. Wang, Y. Hu, C. Liu, S. Ma, X. Li, J. Cao, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3105–3111.
27. S. Ma, B. Jiao, Z. Liu, H. Wang, R. Xian, M. Zheng, H. Lou, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **19** (2009) 1698–1701.
28. X. Li, S. Ma, M. Yan, Y. Wang, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **59** (2013) 209–217.
29. M. Yan, X. Ma, R. Dong, X. Li, C. Zhao, Z. Guo, Y. Shen, F. Liu, R. Ma, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **103** (2015) 506–515.
30. Y. Wang, C. Cong, W.C. Chai, R. Dong, L. Jia, D. Song, Z. Zhou, S. Ma, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **27** (2017) 3872–3877.
31. L. Zhang, B. Jiao, X. Yang, L. Liu, S. Ma, *J. Antibiot.* **64** (2011) 243–247.
32. T. Sugimoto, M. Hayashi, T. Kawaguchi, *C-4'' position substituted macrolide derivative*, US20170267708A1, 2017.
33. A. Fajdetić, H. Čipčić Paljetak, G. Lazarevski, A. Hutinec, S. Alihodžić, M. Đerek, V. Štimac, D. Andreotti, V. Šunjić, J.M. Berge, S. Mutak, M. Dumić, S. Lociuoro, D.J. Holmes, N. Maršić, V. Eraković Haber, R. Spaventi, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6559–6568.
34. S. Kapić, H. Čipčić Paljetak, I. Palej Jakopović, A. Fajdetić, M. Ilijaš, V. Štimac, K. Brajša, D.J. Holmes, J. Berge, S. Alihodžić, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 7281–7298.
35. J. H. Liang, X. Han, *Curr. Top. Med. Chem.* **13** (2013) 3131–3164.

36. A. Fajdetić, A. Vinter, H. Č. Paljetak, J. Padovan, I.P. Jakopović, S. Kapić, S. Alihodžić, D. Filić, M. Modrić, N. Košutić-Hulita, R. Antolović, Z. I. Schoenfeld, S. Mutak, V. E. Haber, R. Spaventi, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3388–3397.
37. A. Hutinec, M. Đerek, G. Lazarevski, V. Šunjić, H. Č. Paljetak, S. Alihodžić, V.E. Haber, M. Dumić, N. Maršić, S. Mutak, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **20** (2010) 3244–3249.
38. Z. H. Zhao, D. Zhu, X. X. Zhang, Z. G. Luo, P. S. Lei, *J. Asian Nat. Prod. Res.* **21** (2019) 610–618.
39. A. N. Tevyashova, E. N. Bychkova, A. M. Korolev, E. B. Isakova, E. P. Mirchink, I. A. Osterman, R. Erdei, Z. Szücs, G. Batta, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **29** (2019) 276–280.
40. T. V. Magee, S. Han, S. P. McCurdy, T. T. Nguyen, K. Granskog, E. S. Marr, B. A. Maguire, M. D. Huband, J. M. Chen, T. A. Subashi, V. Shanmugasundaram, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **23** (2013) 1727–1731.
41. L. Zhang, L. Song, Z. Liu, H. Li, Y. Lu, Z. Li, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 915–922.
42. Z. Wu, Y. Lu, M. Luo, X. He, Y. Xiao, J. Yang, Y. Pan, G. Qiu, H. Guo, H. Hu, D. Zhou, X. Hu, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 3636–3644.
43. J. - H. Liang, X. - L. Li, H. Wang, K. An, Y. - Y. Wang, Y. - C. Xu, G. - W. Yao, *Eur. J. Med. Chem.* **49** (2012) 289–303.
44. X. - M. Li, W. Lv, S. - Y. Guo, Y. - X. Li, B. - Z. Fan, M. Cushman, F. - S. Kong, J. Zhang, J. - H. Liang, *Eur. J. Med. Chem.* **171** (2019) 235–254.
45. S. Tapadar, S. Fathi, I. Raji, W. Omesiete, J.R. Kornacki, S.C. Mwakwari, M. Miyata, K. Mitsutake, J. - D. Li, M. Mrksich, A. K. Oyelere, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 7543–7564.
46. K. Starčević, D. Pešić, A. Toplak, G. Landek, S. Alihodžić, E. Herreros, S. Ferrer, R. Spaventi, M. Perić, *Eur. J. Med. Chem.* **49** (2012) 365–378.
47. D. Pešić, K. Starčević, A. Toplak, E. Herreros, J. Vidal, M. J. Almela, D. Jelić, S. Alihodžić, R. Spaventi, M. Perić, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 3216–3227.
48. M. Bosnar, G. Kragol, S. Koštrun, I. Vujasinović, B. Bošnjak, V. Bencetić Mihaljević, Z. Marušić Ištuk, S. Kapić, B. Hrvačić, K. Brajša, B. Tavčar, D. Jelić, I. Glojnarčić, D. Verbanac, O. Čulić, J. Padovan, S. Alihodžić, V. Eraković Haber, R. Spaventi, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 6111–6123.
49. M. Yan, R. Ma, L. Jia, H. Venter, S. Ma, *Eur. J. Med. Chem.* **127** (2017) 874–884.
50. W. Wang, F. Liu, H. Li, Y. Huang, X. Xiao, J. Li, H. Yan, *Preparation method of clarithromycin-N-oxide*, CN103172686B, 2015.

51. Y. Xu, X. Chen, D. Zhu, Y. Liu, Z. Zhao, L. Jin, C. Liu, P. Lei, *Eur. J. Med. Chem.* **69** (2013) 174–181.
52. A. Sugawara, N. Maita, H. Gouda, T. Yamamoto, T. Hirose, S. Kimura, Y. Saito, H. Nakano, T. Kasai, H. Nakano, K. Shiomi, S. Hirono, T. Watanabe, H. Taniguchi, S. Omura, T. Sunazuka, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 4984–4997.
53. T. Sugimoto, Y. Shimazaki, A. Manaka, T. Tanikawa, K. Suzuki, K. Nanaumi, Y. Kaneda, Y. Yamasaki, H. Sugiyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **22** (2012) 5739–5743.
54. D. Pavlović, S. Kimmins, S. Mutak, *Eur. J. Med. Chem.* **125** (2017) 210–224.
55. Y. Lee, J. Y. Choi, H. Fu, C. Harvey, S. Ravindran, W. R. Roush, J. C. Boothroyd, C. Khosla, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 2792–2804.
56. M. Bukvić Krajačić, M. Dumić, P. Novak, M. Cindrić, S. Koštrun, A. Fajdetić, S. Alihodžić, K. Brajša, N. Kujundžić, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **21** (2011) 853–856.
57. M. Perić, A. Fajdetić, R. Rupčić, S. Alihodžić, D. Žiher, M. Bukvić Krajačić, K. S. Smith, Z. Ivezić Schönfeld, J. Padovan, G. Landek, D. Jelić, A. Hutinec, M. Mesić, A. Ager, W. Y. Ellis, W. K. Milhous, C. Ohrt, R. Spaventi, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 1389–1401.
58. A. Z. Washington, S. Tapadar, A. George, A. K. Oyelere, *Bioorg. Med. Chem.* **23** (2015) 5198–5209.
59. H. F. Anwar, M. Andrei, K. Undheim, *Bioorg. Med. Chem.* **25** (2017) 2313–2326.
60. S. Ma, R. Ma, Z. Liu, C. Ma, X. Shen, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 4010–4020.
61. L. Hu, P. Lan, Q. L. Song, Z. J. Huang, P. H. Sun, C. Zhuo, Y. Wang, S. Xiao, W. M. Chen, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 5943–5949.
62. R. Kumar, S. Rathy, A. K. Hajare, Y. B. Surase, J. Dullu, J. S. Jadhav, R. Venkataramanan, A. Chakrabarti, M. Pandya, P. Bhateja, G. Ramkumar, B. Das, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **22** (2012) 476–481.
63. P. Xu, L. Liu, X. Chen, Y. Li, J. Liu, Z. Jin, G. Wang, P. Lei, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **19** (2009) 4079–4083.
64. L. X. Shan, P. H. Sun, B. Q. Guo, X. J. Xu, Z. Q. Li, J. Sun, S. Zhou, W. M. Chen, *Drug Des. Dev. Ther.* **8** (2014) 1515–1525.
65. D. Pavlović, S. Mutak, D. Andreotti, S. Biondi, F. Cardullo, A. Paio, E. Piga, D. Donati, S. Lociuoro, *ACS Med. Chem. Lett.* **5** (2014) 1133–1137.