

Sinteza novog azalidnog derivata na uvećanoj skali

Petanjko, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:784757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Monika Petanjko

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Monika Petanjko

Predala je izrađen diplomski rad dana: 3. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Linda Tomašković, znan. sur., Selvita d.o.o., Zagrebu
Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Sveučilište u
Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
(zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 6. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
Studij Primijenjena organska kemija

Monika Petanjko

Sinteza novog azalidnog derivata na uvećanoj skali

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Komentor rada: dr. sc. Linda Tomašković, Selvita d.o.o.

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
2. prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
3. dr. sc. Linda Tomašković, Selvita d.o.o.

Zagreb, rujan 2024.

Ovaj rad je izrađen u Selviti d.o.o. pod mentorstvom prof. dr. sc. Silvane Raić-Malić, komentorstvom dr. sc. Linde Tomašković i neposrednim voditeljstvom Maria Šmehila, dipl. kem. inž. (MSc)

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Silvani Raić-Malić na mentorstvu, susretljivosti, prenesenom znanju u sklopu odslušanih kolegija i udijeljenim savjetima.

Zahvaljujem komentorici dr. sc. Lindi Tomašković na mentorstvu, pristupačnosti, dobroti, predanosti u ispravljanju ovog rada te na svim korisnim savjetima i pomoći tijekom izrade i pisanja rada.

Zahvaljujem i Mariu Šmehilu na stručnom vodstvu i uloženom vremenu i trudu, kao i na prenesenom znanju te strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada,

Hvala djelatnicima tvrtke Selvita d.o.o. s drugog kata na pristupačnosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima, a posebno mojim roditeljima na neizmjernoj podršci, poticanju, razumijevanju, riječima utjehe, što su uvijek bili uz mene tijekom svih godina mog studiranja, a bez njih ne bih bila tu gdje jesam.

Sažetak

Azalidi predstavljaju skupinu makrolidnih antibiotika u čiji je makrociklički laktonski prsten uveden dušikov atom čime su poboljšana mnoga njihova biološka svojstva. Najpoznatiji predstavnik ove skupine je azitromicin, 9-deokso-9-dihidro-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A. Azalidi posjeduju brojne slobodne hidroksilne skupine koje su pogodne za uvođenje raznih supstituenata i sintezu novih spojeva. Uvođenjem zaštitnih skupina na pojedina reaktivna mjesta na molekuli moguće je sintetizirati željeni spoj.

U ovom radu opisana je višestupnjevita sinteza novog azalidnog derivata na uvećanoj skali. Pripravljani su prekursori koji će poslužiti za pripravu novih potencijalno aktivnih derivata azalida. U prvom stupnju sinteze, demetiliranjem 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A na položaju 3'-*N*- pripremljen je 3'-*N*-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**2**). Uvođenjem benziloksikarbonilne zaštitne skupine na dušikove atome, sintetiziran je 9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**3**). U sljedećem stupnju, reakcijom acetiliranja spoja **3** dobiven je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**4**). Zatim, reakcijom spoja **4** s etilkloroksoacetatom i uz 4-dimetilaminopiridin (DMAP) kao katalizator priređen je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**5**). U posljednjem stupnju sinteze kiselinskog derivata, hidrolizom spoja **5** pripremljen je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-oksaloksi-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**7**). Također, katalitičkim hidrogeniranjem spoja **5** sintetiziran je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-demetil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**8**). Strukturna i spektroskopska karakterizacija novopripređenih spojeva provedena je ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom.

Ključne riječi: azalidi, uvećana skala, zaštitne skupine, ester, hidroliza

Abstract

Azalides represent a group of macrolide antibiotics whose macrocyclic lactone ring has a nitrogen atom introduced, which improves many of their biological properties. The best-known representative of this group is azithromycin, 9-deoxo-9-dihydro-9a-methyl-9a-aza-9a-homoerythromycin A. Azalides possess numerous free hydroxyl groups that are suitable for the introduction of various substituents and the synthesis of new compounds. By introducing protective groups to individual reactive sites on the molecule, it is possible to synthesize the desired compound.

This paper describes a multi-step synthesis of a new azalide derivative on an enlarged scale. Precursors have been prepared and they will be used for the preparation of new potentially active azalide derivatives. In the first stage of synthesis, 3'-*N*-demethyl-9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A (**2**) was prepared by demethylating 9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A at the 3'-*N*- position. By introducing a benzyloxycarbonyl protecting group on nitrogen atoms, 9a,3'-*N,N*-dibenzoyloxycarbonyl-9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A (**3**) was synthesized. In the next step, the acetylation reaction of compound **3** gave 11,2',4''-*O*-triacetyl-9a,3'-*N,N*-dibenzoyloxycarbonyl-9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A (**4**). Then, by reaction of compound **4** with ethyl chloroacetate and with 4-dimethylaminopyridine (DMAP) as a catalyst, 11,2',4''-*O*-triacetyl-9a,3'-*N,N*-dibenzoyloxycarbonyl-12-*O*-(2-ethoxy-2-oxo-acetyl)-9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A (**5**) was prepared. In the last stage of the synthesis of the acid derivative, 11,2',4''-*O*-triacetyl-9a,3'-*N,N*-dibenzoyloxycarbonyl-12-*O*-oxalooxy-9-deoxo-9a-aza-9a (**7**) was prepared by hydrolysis of compound **5**. Also, 11,2',4''-*O*-triacetyl-9a,3'-*N,N*-demethyl-12-*O*-(2-ethoxy-2-oxo-acetyl)-9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A (**8**) was prepared by catalytic hydrogenation of compound **5**. Structural and spectroscopic characterization of the newly prepared compounds was carried out by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy.

Keywords: azalides, enlarged scale, protecting groups, ester, hydrolysis

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. MAKROLIDI.....	4
2.2. AZALIDI	7
2.2.1. 9a-Azalidi.....	7
2.2.2. Derivati azalida te njihova reaktivnost i stabilnost.....	10
2.2.3. Biološko djelovanje	21
2.2.4. Rezistentnost azalidnih antibiotika	22
2.3. REAKCIJA ESTERIFIKACIJE.....	23
2.3.1. Acetiliranje.....	25
2.3.2. Esterifikacija u sintezi makrolaktonskog prstena	26
2.4. REAKCIJA HIDROLIZE	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO	31
3.1. Opće napomene.....	32
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva	33
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	41
4.1. Cilj rada	42
4.2. Sinteza spojeva.....	43
4.3. Strukturna karakterizacija novosintetiziranih spojeva pomoću ^1H - i ^{13}C -NMR spektroskopije	50
5. ZAKLJUČAK.....	58
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA	60
7. LITERATURA.....	63
8. PRILOZI.....	72
9. ŽIVOTOPIS	80

1. UVOD

Makrolidi su dobro poznata skupina oralnih antibiotika. Sastoje se od makrocikličkog laktanskog prstena na koji su vezani šećeri. Spadaju u klinički najznačajnije lijekove, nakon β -laktama, koji se koriste za liječenje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih infekcija. Ova klasa antibiotika se često koristi za liječenje infekcija kod ljudi koji su alergični na peniciline. Najpoznatiji makrolidi su eritromicin A, klaritromicin i azitromicin.¹

Azalidi su skupina makrolidnih antibiotika koja sadrži dušikov atom u laktanskom prstenu. Najpoznatiji i jedini komercijalni predstavnik ove skupine antibiotika je azitromicin, otkriven u PLIVINOM istraživačkom institutu. Dobiven je Beckmannovom pregradnjom iz eritromicin A oksima. Nekoliko hidroksilnih skupina na strukturi azitromicina predstavljaju mete za supstituciju mnogih različitih reagensa čime je moguće sintetizirati nove spojeve različitog djelovanja. Azitromicin djeluje tako da inhibira sintezu bakterijskih proteina i sprječava rast bakterija. Najveća prednost u odnosu na ostale antibiotike iz skupine makrolida su njegova neobična farmakokinetika, koja se očituje visokom raspodjelom u tkivima, te metabolička stabilnost i visoka podnošljivost.²

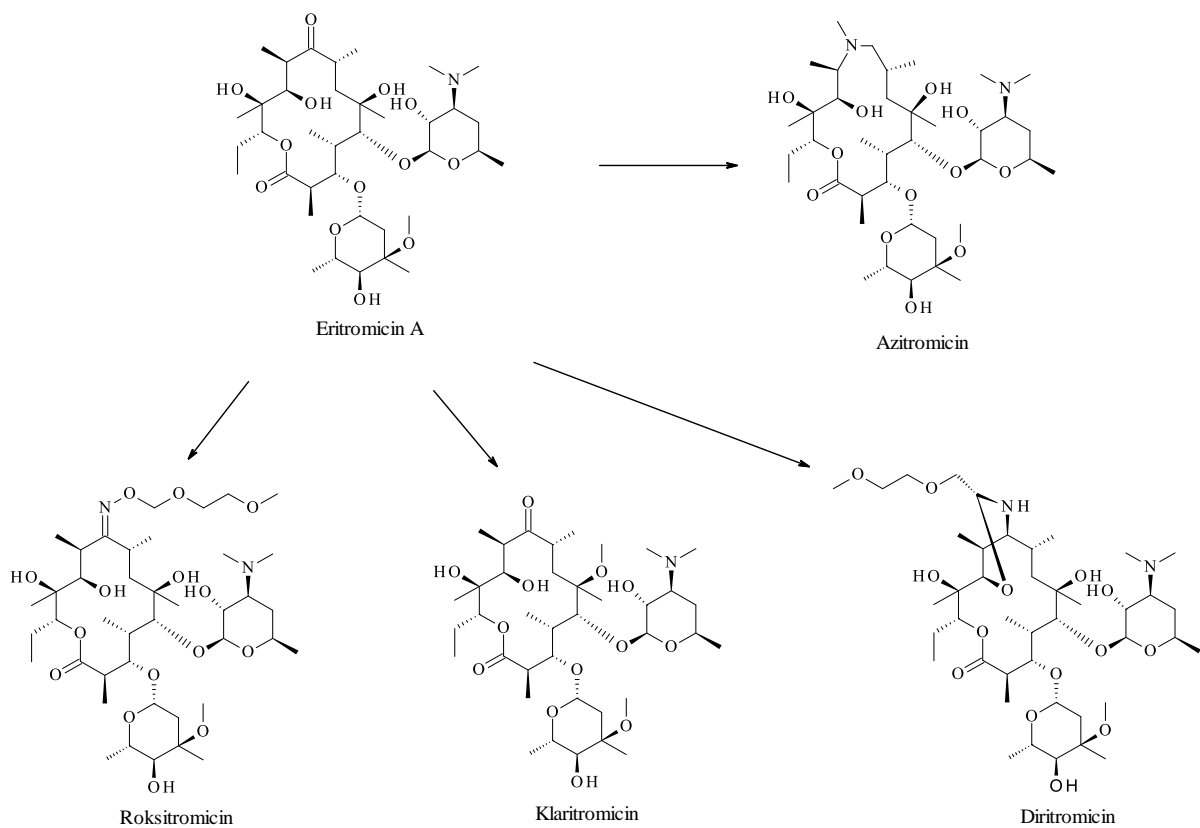
Esterifikacija je reakcija nastajanja estera kondenzacijom alkohola i karboksilne kiseline ili njezinih derivata. Esteri, dobiveni produkti, su ugodnog mirisa pa su svoju upotrebu pronašli u svakodnevnom životu. Reakcija se sporo odvija pri normalnim uvjetima, ali se ubrzava dodavanjem jako kiselih katalizatora. Predstavlja reverzibilnu reakciju, a reakcija u suprotnom smjeru naziva se hidroliza.³

Kemijska reakcija hidrolize uključuje cijepanje veze u molekuli uz dodavanje molekule vode, a hidrolizirati mogu esteri, amidi i polisaharidi. Konkretno, cijepanjem esterske veze dobivaju se početne molekule karboksilne kiseline i alkohola. Postoje dvije vrste hidrolize, a to su kiselo i bazno katalizirana.³

2. OPĆI DIO

2.1. MAKROLIDI

Makrolidi (makrolidni antibiotici) spadaju u klasu prirodnih ili polusintetskih antimikrobnih agenasa koje karakterizira prisutnost visoko supstituiranog 12 do 16-članog makrocikličkog laktonskog prstena. Najčešći supstituenti laktonskog prstena su različiti šećeri. Klinički najvažniji makrolidi podijeljeni su prema veličini laktonskog prstena na 14-člane, 15-člane i 16-člane. Neki od predstavnika 14-članih makrolida su eritromicin A i klaritromicin. U 15-člane spada azitromicin koji je ujedno i jedini komercijalni predstavnik. Kod 16-članih makrolida razlikuju se tilozinska i leukomicin-spiramicinska podvrsta.^{1,4} Prvi makrolid, uveden u kliničku primjenu, je sekundarni metabolit izoliran iz aktinomiceta *Saccharopolyspora erythraea*, a ime mu je eritromicin A. Eritromicin A spada u skupinu 14-članih makrolida, a sastoji se od aglikonskog prstena na koji su vezana dva šećera: amino šećer D-desozamin i neutralni šećer L-kladinoza.⁵ Kako bi se proširilo antibakterijsko djelovanje te poboljšale farmakokinetika i farmakodinamika eritromicina A, s vremenom su sintetizirani njegovi polusintetski derivati, kao što je klaritromicin.⁶

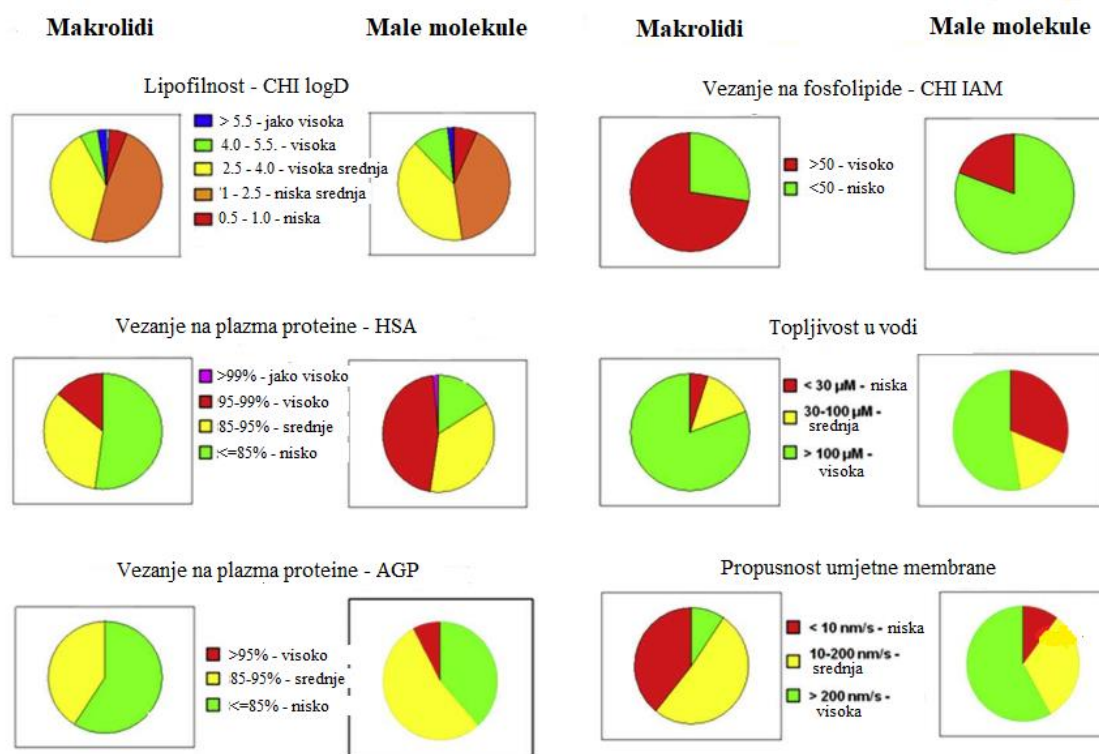


Slika 1. Prikaz polusintetskih makrolida dobivenih iz eritromicina A

Makrolidi su širokog spektra djelovanja, a svoju antibakterijsku aktivnost primarno izražavaju inhibicijom biosinteze bakterijskih proteina. Naime, reverzibilno se vežu na bakterijske 50S ribosomske podjedinice i blokiraju napredovanje nastajućih proteina kroz njihov izlazni tunel u biosintezi. Također, zaustavljaju stvaranje peptidne veze na peptidil transferazi. Na taj način je stopirana sinteza proteina, a to u konačnici dovodi do njihove smrti.^{8,9} Makrolidi se ističu dobrim *in vivo* djelovanjem i ovisno o prirodi mikroorganizma i koncentraciji lijeka mogu imati bakteriostatsko i baktericidno djelovanje. Djelotvorni su na aerobne Gram-pozitivne bakterije, kao što su npr. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes*. Također, djeluju i na anaerobne bakterije te pojedine Gram-negativne bakterije, od kojih su poznatije *Neisseria gonorrhoeae* i *Haemophilus influenzae*, a i na neke intracelularne parazite (*Legionella*, *Mycoplasma* i *Chlamydia*).⁶ Odlikuju se niskom toksičnošću, dobrom farmakokinetikom i dobrom apsorpcijom, a najčešće se primjenjuju za liječenje infekcija respiratornog trakta, mekih tkiva i kože i kod liječenja bolesti genitalnog trakta uzrokovanih Gram-pozitivnim mikroorganizmima.⁹

U usporedbi s malim molekulama, makrolidi su bolji proton donori i proton akceptori upravo zbog brojnih slobodnih OH skupina koje su dio strukture. Zbog prisutnosti dušikovog atoma na desozaminu te na makrolaktonskom prstenu azitromicina, makrolidi su pozitivno nabijeni u fiziološkom pH području. Stepanić i suradnici¹⁰ proveli su istraživanje u kojem su napravili usporedbu fizikalno-kemijskih svojstava makrolida i malih molekula. Za početak se provjeravala lipofilnost pri čemu su dobiveni slični rezultati. Što se tiče vezanja na plazma proteine, makrolidi su pokazali slabiji afinitet prema HAS (“human serum albumin”) i AGP-u (“ α -1-acid glycoprotein”). Općenito, vezanje makrolida na oba navedena plazma proteina raste s lipofilnošću te brojem aromatskih prstenova i atoma halogenih elemenata. Nadalje, makrolidi su topljiviji u vodenom puferu, ali su znatno manje propusni kroz umjetnu membranu što je posljedica njihove interakcije s fosfolipidnim dijelovima membrane. S obzirom na to, postoji rizik od fosfolipidoze, kao i loše propusnosti preko gastrointestinalne membrane te niske bioraspoloživosti. Nesupstituirani laktonski prsten pokazuje bolji fizikalno-kemijski profil od supstituiranog i od malih molekula. Dodavanjem funkcionalnih skupina laktonskom prstenu, raste složenost molekule, a opada njihova sličnost s lijekovima. Povećanje veličine i molekularne složenosti ima za posljedicu veću lipofilnost, izraženije vezanje na plazma proteine i fosfolipide. S druge strane, dolazi do smanjenja topljivosti i propusnosti. Provedena fizikalno-kemijska analiza je pokazala da se, prilikom povećavanja raznolikosti unutar makrolidnog kemijskog prostora i zadržavanja sličnih svojstava kao i lijekovi, fokus treba

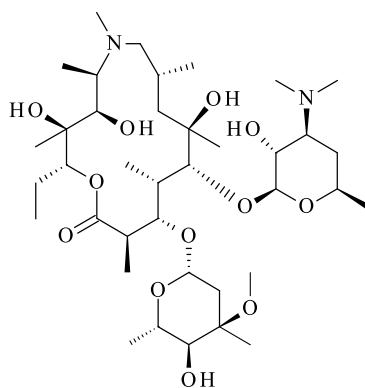
staviti na nove makrolidne jezgre s relativno malim, ali značajnim strukturnim modifikacijama koje utječu na njihove biološke značajke.



Slika 2. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava makrolida i malih molekula

2.2. AZALIDI

Azalidi su skupina polusintetskih makrolidnih antibiotika, 9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A kod kojih je, uvođenjem dušikovog atoma, proširen makrolaktonski 14-člani prsten u 15-člani prsten. To je značajno poboljšalo aktivnost i farmakološka svojstva u usporedbi s klasičnim makrolidima poput eritromicina A.⁷ Najvažniji novi antibiotik 20. stoljeća, a trenutno i jedini komercijalni predstavnik navedene skupine je azitromicin. Primjer je racionalnog medicinsko kemijskog pristupa dizajnu lijekova primjenom klasičnog odnosa struktura-aktivnost te je postao najprodavaniji brend antibiotika širom svijeta.^{9,11} Kod 15-članih azalida razlikujemo dvije podvrste: 9a-azalide, koji će biti opisani u nastavku, i 8a-azalide koji su malo manje poznati, a nastali su Beckmannovom pregradnjom¹² eritromicin A 9(*Z*)-oksima, dobivenog u malim količinama uz eritromicin A 9(*E*)-oksim.¹³



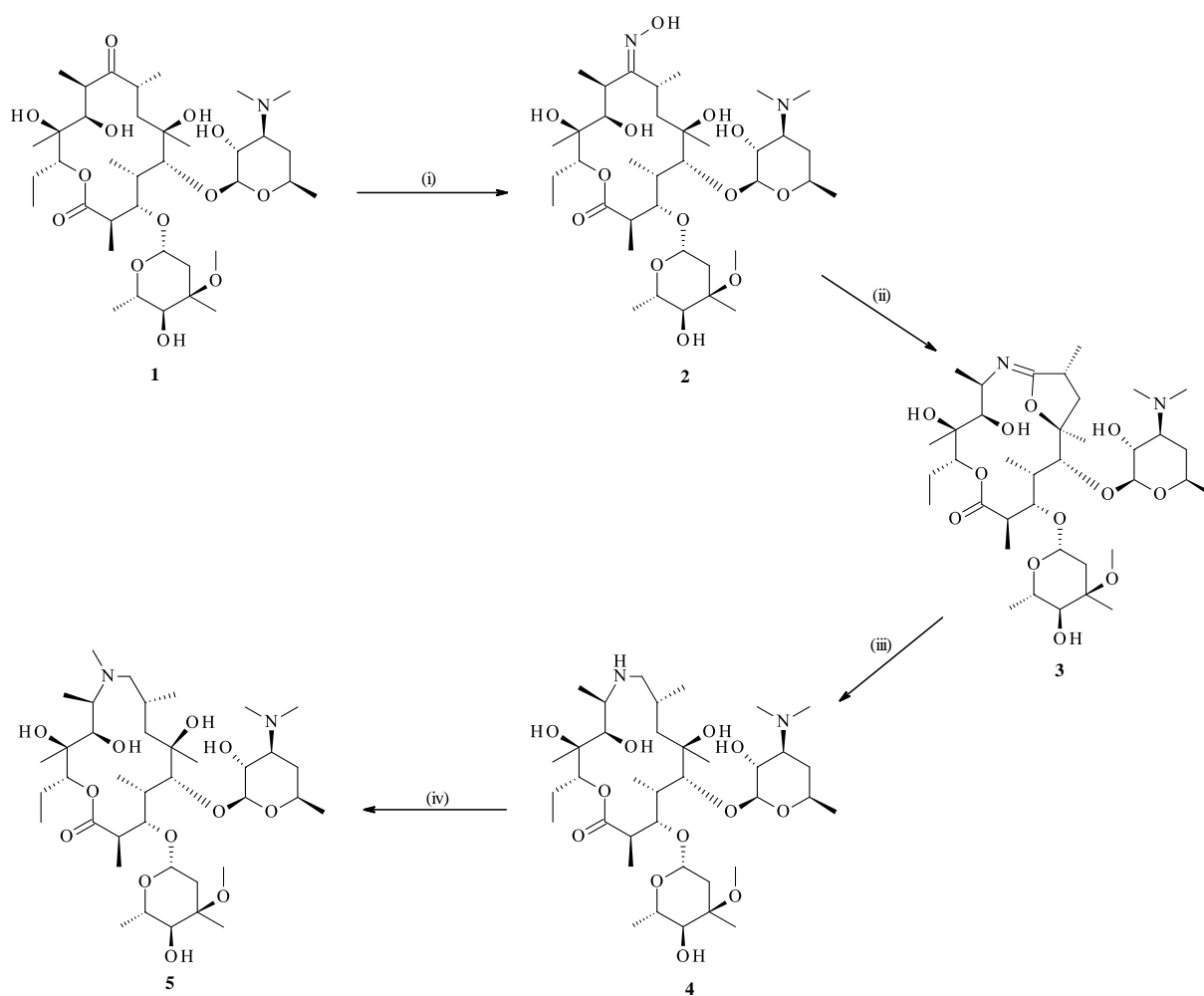
Slika 3. Azitromicin

2.2.1. 9a-Azalidi

Ključna reakcija u formiranju azalida utemeljena je tijekom sinteze *O*-sulfonil derivata eritromicin A 9(*E*)-oksima.⁷ Otprije je dobro poznato da sulfonil-kloridi predstavljaju katalizatore u reakciji Beckmannove pregradnje za prevođenje oksima u amide.⁹ Prvi pokušaji sinteze azitromicina bili su usredotočeni na karbonilnu skupinu na poziciji 9 te su tako dobiveni derivati nazvani 9a-azalidi.¹⁴

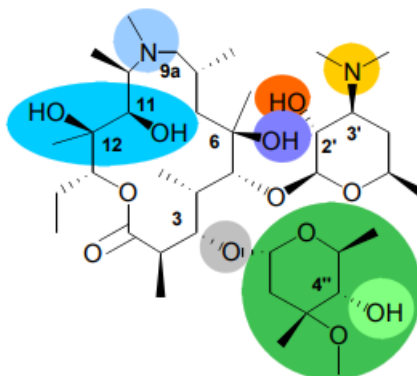
Eritromicin A (**1**) je najvažnija početna molekula za pripravu 14-članih polusintetskih makrolidnih antibiotika. Važan intermedijer u tim reakcijama je eritromicin A 9(*E*)-oksim (**2**) dobiven reakcijom spoja **1** i hidrosilamin hidroklorida uz prisutnost slabe baze ili pufera s obzirom da sterički omeđena keto- skupina nije stabilna u kiselom mediju. Reakcija oksima **2** s benzensulfonil-kloridom u smjesi otapala aceton-voda s natrijevim karbonatom dala je kao rezultat neočekivani produkt. Željeni i očekivani produkt Beckmannove pregradnje bio je amid,

no kasnije je rendgenskom strukturnom analizom potvrđeno da je nastao eritromicin-6,9-iminoeter (**3**).¹⁴ Dobiveni spoj nije pokazivao antibakterijsku aktivnost te je podvrgnut daljnjim kemijskim reakcijama. Katalitičkim hidrogeniranjem uz prisustvo Pt kao katalizatora dobiven je ciklički amino-lakton, nazvan 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**4**). Ispitivanjem je utvrđeno kako je antibakterijska aktivnost amino-laktona **4** gotovo jednaka aktivnosti eritromicina A protiv Gram-pozitivnih bakterija, a bolja protiv Gram-negativnih bakterija. Prema tome, amino-lakton **4** je postao glavni intermedijer u sintezi novih i značajno aktivnijih derivata, a posebno za 9-deokso-9-dihidro-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**5**), čije je generičko ime azitromicin. Posljednji korak u sintezi azitromicina (**5**) predstavlja reakcija reduktivnog metiliranja amino-laktona **4** uz formaldehid i mravlju kiselinu (Shema 1).¹⁵



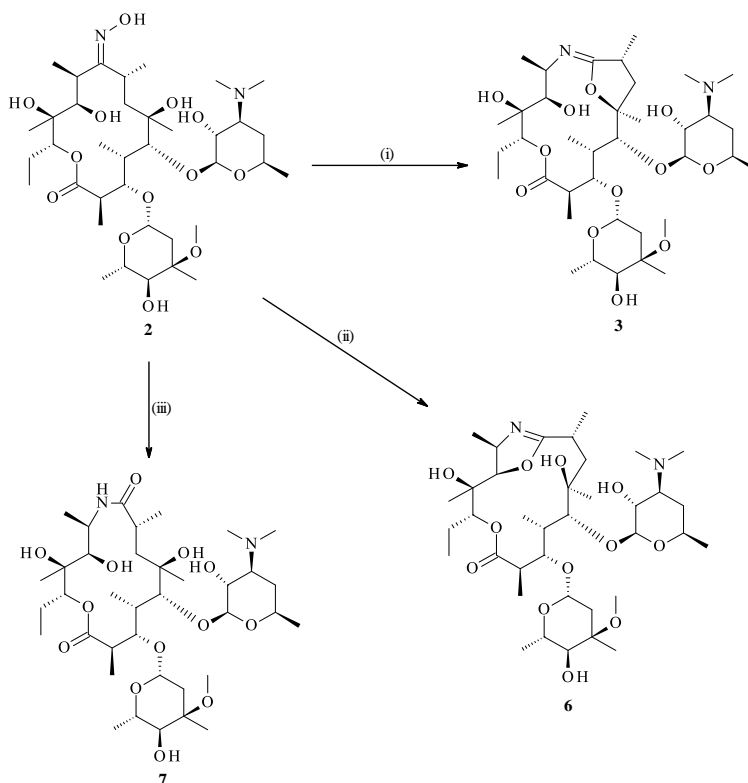
Shema 1. Sinteza azitromicina. *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) NH_2OH , (ii) $\text{R-SO}_2\text{Cl}$, baza, (iii) H_2/Pt , (iv) CH_2O , HCOOH

Azalidni spojevi imaju veliki broj funkcijskih skupina koje mogu biti supstituirane ili zamijenjene, a na slici 4 su one i naglašene.



Slika 4. Struktura azalida s označenim vezujućim skupinama⁴

S druge strane, provođenjem Beckmannove pregradnje 9(*E*)-oksima (**2**) u eteru uz prisutnost piridina na -45°C nastala je smjesa 6,9-iminoetera (**3**) i 9,11-iminoetera (**6**).¹⁶ Pri temperaturi od 0°C do 5°C i u istim reakcijskim uvjetima došlo je do nastanka 9a-laktama (**7**) koji je slabije antibakterijske aktivnosti u odnosu na ciklički amin **4**.¹⁶



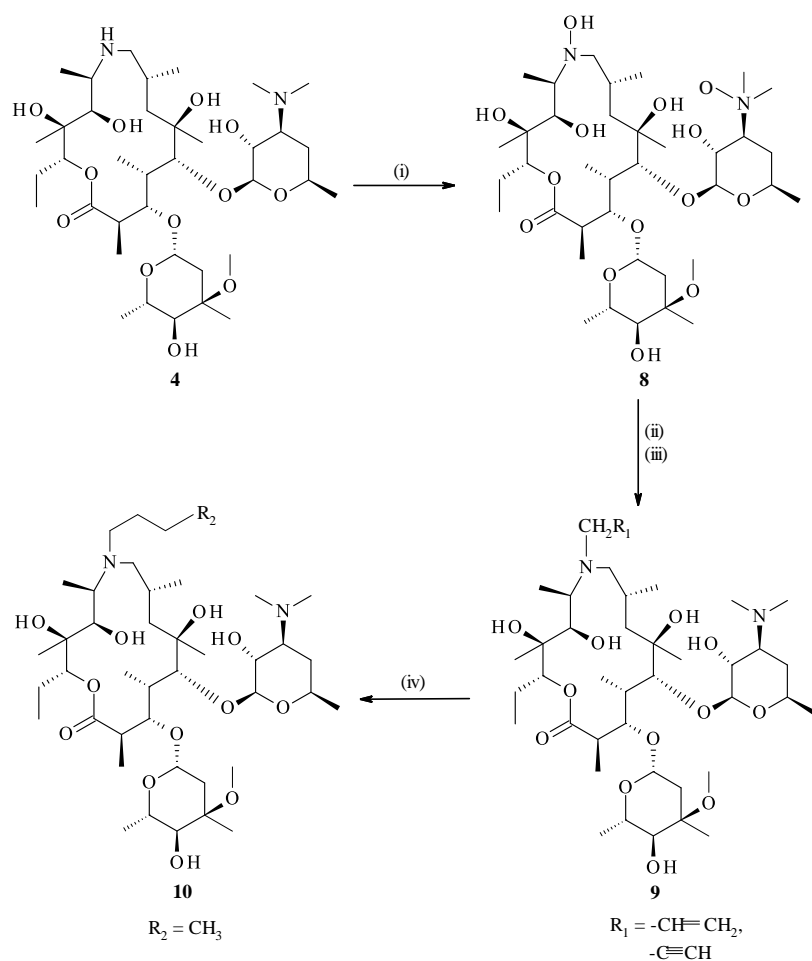
Shema 2. Produkti Beckmannove pregradnje eritromicin A 9(*E*)-oksima. *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) $\text{R-SO}_2\text{Cl}$, Na_2CO_3 , $0-5^{\circ}\text{C}$, (ii) $\text{R-SO}_2\text{Cl}$, piridin, -45°C , (iii) $\text{R-SO}_2\text{Cl}$, piridin, $0-5^{\circ}\text{C}$

2.2.2. Derivati azalida te njihova reaktivnost i stabilnost

2.2.2.1. *N*-supstituirani derivati azalida i azitromicin

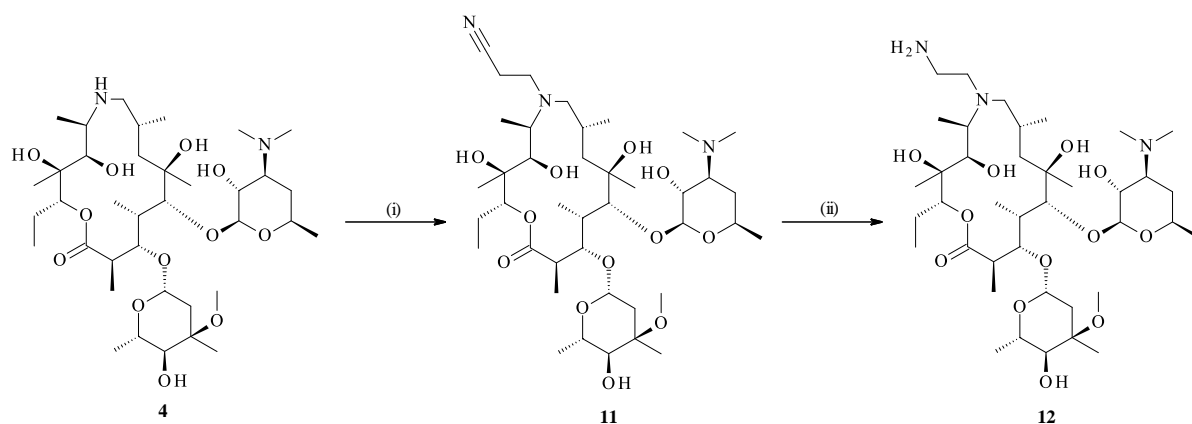
Sinteza 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**4**) (amino-lakton) predstavlja početnu točku u razvoju nove klase spojeva koja je supstituirana na položaju 9a. Od svih sintetiziranih derivata, najbolju antibakterijsku aktivnost pokazao je 9a-*N*-metil-derivat, poznatiji pod imenom azitromicin, otkriven od strane PLIVINIH znanstvenika 1980. godine.¹² Azitromicin je bio sintetiziran u obliku bezvodnog derivata, a kasnije su pripremljene različite kristalinične forme te je utvrđeno da je najstabilniji u obliku dihidrata.⁷ Spomenuti novosintetizirani azalid posjeduje poboljšanu stabilnost u kiselom mediju i malo smanjenu akutnu toksičnost u usporedbi s eritromicinom A. Njegov širok spektar aktivnosti pokriva sve bakterije koje su „krivci“ za infekcije respiratornog trakta, uključujući *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Pokazao je četiri puta bolju aktivnost od eritromicina A protiv *Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae* i dva puta bolju aktivnost od *Branhamella catarrhalis*, *Campylobacter* i *Legionella* sp.¹⁷ Uz to, zamjetno je veće oralne bioraspodjelivosti, dužeg vremena poluživota, većih koncentracija u tkivima i rjeđih nuspojava.¹⁸ Jedna od važnijih prednosti, kojom se ističe pred ostalim makrolidima, je kraće vrijeme liječenja.¹⁹

Kao što je reakcijom reduktivnog metiliranja pripremljen 9a-*N*-metil derivat **5**, na isti način, ali uz acetaldehid, moguće je prirediti 9a-*N*-etil derivat. S ciljem sprječavanja nastanka kvaterne amonijeve soli, neki *N*-alkil supstituirani derivati pripremljeni su reakcijom odgovarajućeg alkil-halogenida i *N*-hidroksi derivata, koji se prethodno dobiva reakcijom amina s vodikovim peroksidom (Shema 3).²⁰ Novi *N*-derivati prevedeni su u *N*-alil derivat, a on je katalitičkom hidrogenacijom dalje preveden u *N*-propil derivat **10a**. Provedenim istraživanjem je dokazano kako nijedan od ovih derivata nije pokazao bolju biološku aktivnost od azitromicina. Druga metoda pripreme *N*-supstituiranih laktama bazira se na primarnoj oksidaciji imino-etera do *N*-oksida šećerne dimetilamino skupine, nakon koje slijedi reakcija s alkil-halogenidima i konačna hidroliza kojom se dobiva produkt.⁷



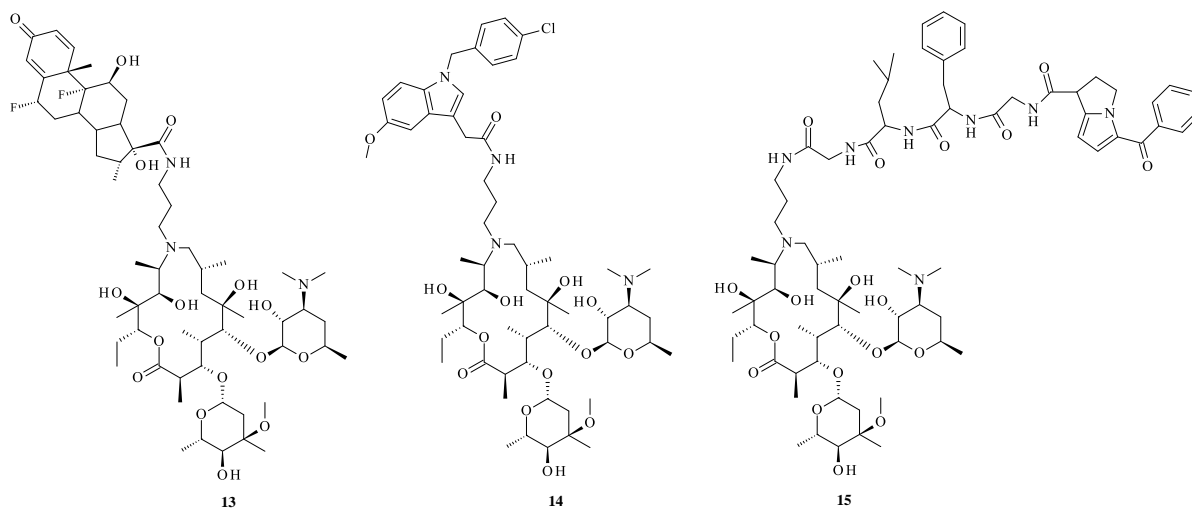
Shema 3. Sinteza 9a-(*N*)- supstituiranih derivata 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A. *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) H_2O_2 , (ii) RCH_2Br , K_2CO_3 , (iii) H_2 /katalizator, ili Ph_3P , (iv) H_2 , Pd/C

Primjenom gore opisane reakcije na akrilonitril također je moguća priprava *N*-aminoalkilnih derivata (Shema 4). Cijano-alkilni derivat **11** pripremljen je Michaelovom adicijom akrilonitrila na početnu molekulu 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**4**). Nakon toga, slijedi modificirana reakcija katalitičkog hidrogeniranja spoja **11**, uz platina(IV) oksid kao katalizator, čime je dobiven 9a-(3-aminopropil) derivat **12**.



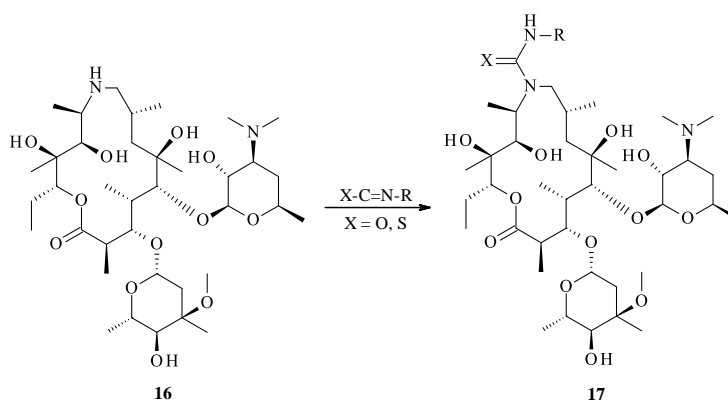
Shema 4. Sinteza *N*-aminoalkilnog derivata **12**. *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) akrilonitril, refluks, 16–19 h; (ii) PtO₂, EtOH, s. t., 4–5 atm, 48–72 h

Neki makrolidi, a među njima i azitromicin, pokazuju protuupalna svojstva. Sintetiziran je veliki broj 9a-*N*-supstituiranih derivata azalida koji su povezani sa steroidnim i nesteroidnim protuupalnim podjedinicama, a prikazani su na slici 5. Takvi derivati najčešće su pripremljeni iz amina ili aminometilenskog lanca, *N*-supstituiranog na aglikonski prsten, kako bi se poboljšalo usmjereno djelovanje na upalne stanice.²¹



Slika 5. 9a-*N*-supstituirani azalidi s protuupalnim djelovanjem

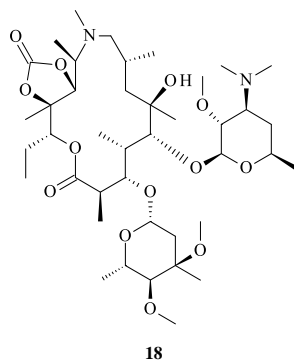
Također, različiti *N*-supstituirani spojevi dobiveni su reakcijom 9a-azalida s odgovarajućim izocijanatima i izotiocijanatima u toluenu kao otapalu te su tako dobiveni tiokarbamoil i izotio-karbamoil derivati. Neki od tako sintetiziranih spojeva pokazuju antibakterijsku aktivnost, ali lošiju od azitromicina.²²



Shema 5. Sinteza 9a-(*N*)-karbamoil i tiokarbamoil-derivata

2.2.2.2. *O*-supstituirani azalidni derivati

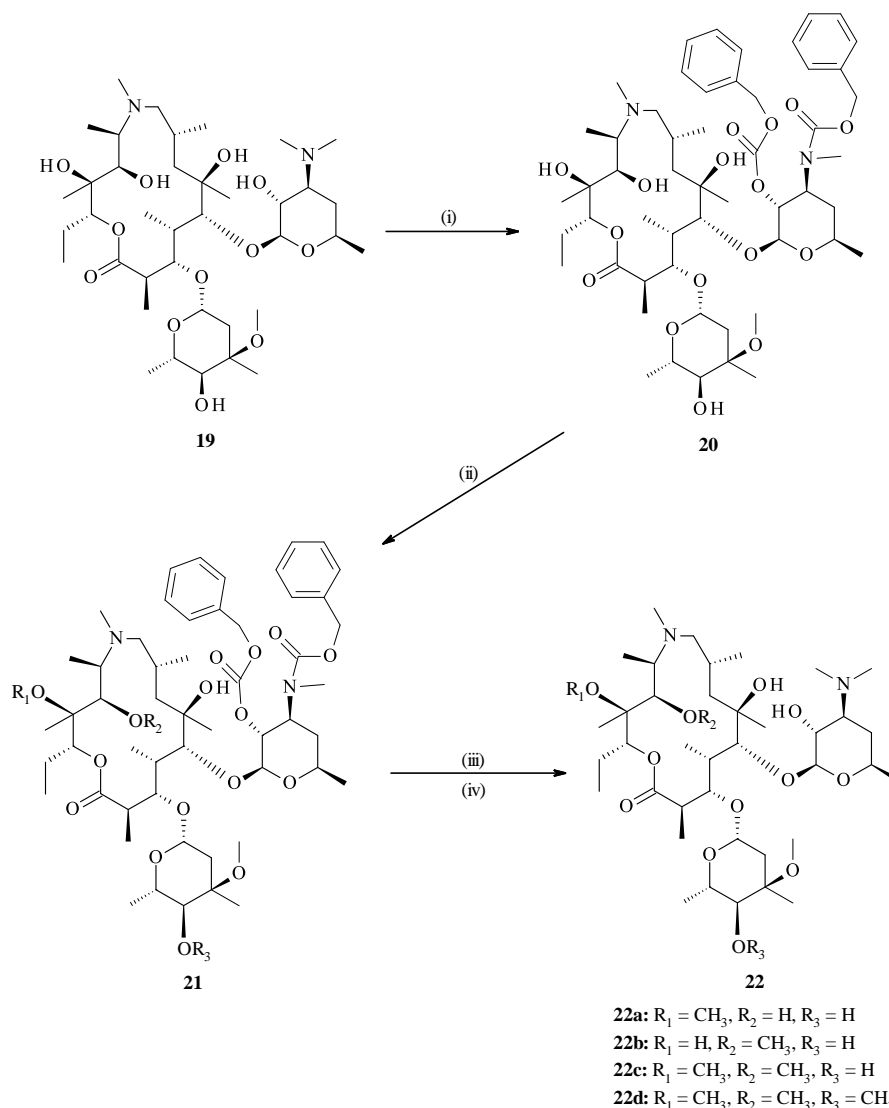
Azitromicin u svojoj strukturi posjeduje pet hidroksilnih skupina. Na aglikonskom prstenu smještene su dvije tercijarne i jedna sekundarna hidroksilna skupina dok se na šećerima nalaze dvije sekundarne skupine. Najreaktivniju hidroksilnu skupinu predstavlja ona na položaju 2' na desozaminu. Prvi pripremljeni *O*-supstituirani derivati bili su esteri pri čemu su, uz acetanhidrid i piridin, acetilne skupine uvedene na položaj 11 na aglikonskom prstenu, 2' na prije spomenutom desozaminu i 4'' na kladinozi. Također, reakcijom azitromicina ili njegovih diacetil-derivata s etilen karbonatom i kalijevim karbonatom dobiveni su 11,12-karbonati **18** prikazani na slici 6. Uvedene acetilne skupine mogu se vrlo lako hidrolizirati u metanolu. Iako na jednostavan način pripremljeni, svi sintetizirani esteri i karbonati nisu pokazivali bolje antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne bakterije od eritromicina A. Bolja aktivnost je jedino uočena kod djelovanja na Gram-negativne bakterije.^{7,23}



Slika 6. Struktura azitromicin 11,12-karbonata

Neki od 4"-arilalkil estera i karbamata sintetizirani su na početnom 8a-laktamu te su takvi derivati pokazali dobro antibakterijsko djelovanje na soj *Streptococcus pneumoniae*, rezistentan na azitromicin. S druge strane, derivati, pripremljeni na izomernom 9a-laktamu, nisu pokazivali značajnu aktivnost.²⁴

Proučavajući dobivene estere, zaključeno je kako se esterska veza cijepa u biološkim tekućinama pa se istraživanje usmjerilo na etere. Prema tome, slijedila je sinteza 6-*O*-metil derivata azitromicina uvođenjem benziloksikarbonilne zaštitne skupine na položajima 2'-*O*- i 3'-*N*-desozamina. Štoviše, benziloksikarbonilna skupina predstavlja jednu od najčešće korištenih zaštitnih skupina na dušikovim atomima, ali i na hidroksilnim skupinama. Zatim, zaštićeni derivat **20** je podvrgnut metiliranju s metil-jodidom uz natrij hidrid u kombinaciji otapala DMSO/THF ili u čistom DMF-u.²⁵ Nažalost, prema dobivenim analizama je utvrđeno kako nije nastao željeni derivat, već su, umjesto njega, nastali 11-*O*- i 12-*O*-metil derivati uz malu količinu di- ili tri-metiliranih produkata **21** (Shema 6). Ti spojevi su katalitički hidrogenirani kako bi se maknule zaštitne skupine, a nakon toga ponovo je uveden metil na 3'-*N*- uz formaldehid i mravlju kiselinu dajući spoj **22**. Nadalje, istraživanjem je dokazano da prilikom metiliranja na položaju 6-*O*- dolazi do otpadanja šećera kladinoze. Antibakterijsko djelovanje 11-*O*-metil derivata gotovo je jednako djelovanju azitromicina, dok je djelovanje 12-*O*-metil derivata slabije. Kako se povećava stupanj metiliranja, tako opada antibakterijsko djelovanje.²⁶

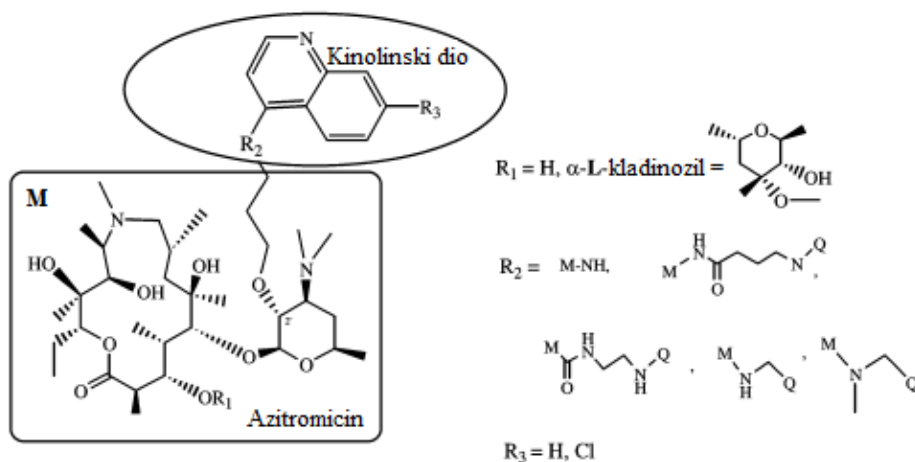


Shema 6. Sinteza *O*-metil derivata. *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) $\text{PhCH}_2\text{OCOC1}$, NaHCO_3 , (ii) CH_3I , NaH , (iii) H_2 , Pd/C , (iv) CH_2O , HCOOH

Također, provedene su sinteze mono-, di- i tri-metil derivata 9-deokso-9-dihidro-8a-metil-8a-aza-homoeritromicina A. S obzirom na poteškoće pri metiliranju 6-*O*- položaja na azitromicinu, sinteza 6-*O*-metil-9a-azalida i 6-*O*-metil-8a-azalida kreće iz klaritromicina (6-*O*-metil-eritromicin A). Dobiveni su *E* i *Z* oksimi koji su, reakcijom s tosil-kloridom u eteru i piridinu, prevedeni u odgovarajuće iminoetere. Redukcijom iminoetera i reduktivnim metiliranjem 9a- i 8a-amina pripremljeni su *N*-metilirani 6-*O*-metilni derivati. Beckmannovom pregradnjom *E*-oksima u smjesi vode i acetona dobiven je 6-*O*-metil derivat 9a-laktama. PLIVINI istraživači su također otkrili i novi postupak za selektivno metiliranje na položaju 11-*O*- korištenjem diazometana uz prisustvo katalizatora. Provedena antibakterijska ispitivanja 6-*O*-metilnih

derivata pokazala su smanjenu aktivnost u odnosu na 11- i 12-*O*-metilne derivate. Općenito, *O*-metilni derivati 8a-azalida slabije su aktivnosti od 9a-azalida.^{7,27}

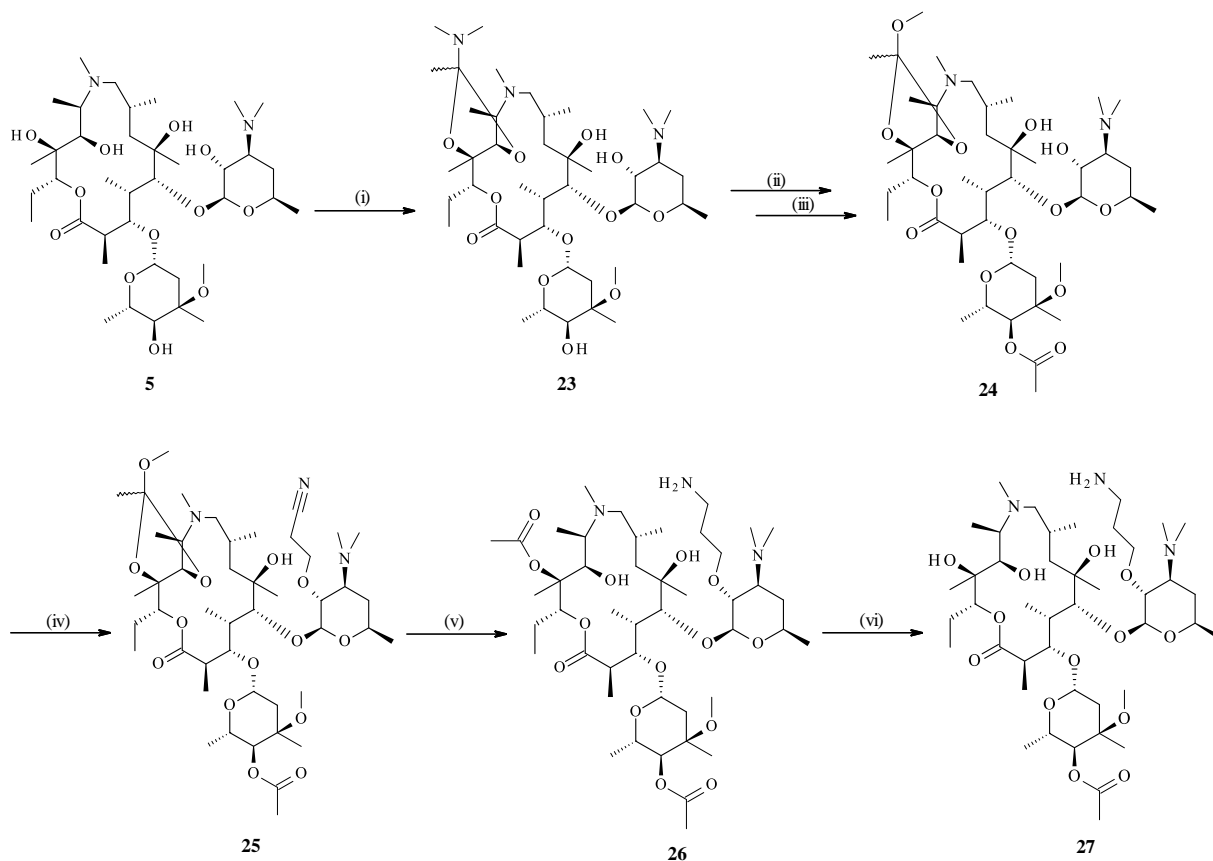
Još jedna supstitucija, koja se pojavljuje na azalidima, je ona gdje se klorokin uvodi na položaj C-2' na desozaminu. Dakle, riječ je o razvoju antimalarijskih spojeva iz skupine azalida. S ciljem nadvladavanja rezistentnih malarijskih parazita, osmišljena je i razvijena strategija hibridnih molekula. Potaknuti ozbiljnošću široko rasprostranjene parazitske bolesti kod ljudi, malarije, Pešić i suradnici²⁸ pripravili su 19 novih, stabilnih i topljivih spojeva iz reda azalida različitih kinolinskih supstituenata kovalentno vezanih na C-2' preko aminoalkilnog linkera. Kao polazne molekule, korišteni su makrolidni antibiotici, prvenstveno azitromicin, koji je pokazao *in vitro* i *in vivo* aktivnost u profilaksi malarije, a i u liječenju. U ovom dizajnu, nastojalo se kreirati makrolidne spojeve koji će biti aktivni u liječenju malarije, a pritom će zadržati dobra farmakokinetička svojstva azitromicina. Također, takvi spojevi ne bi bili antibakterijski aktivni te tako ne bi utjecali na širenje antibakterijske rezistentnosti.



Slika 7. Shematski konceptualni prikaz novog azalid-kinolin derivata²⁸

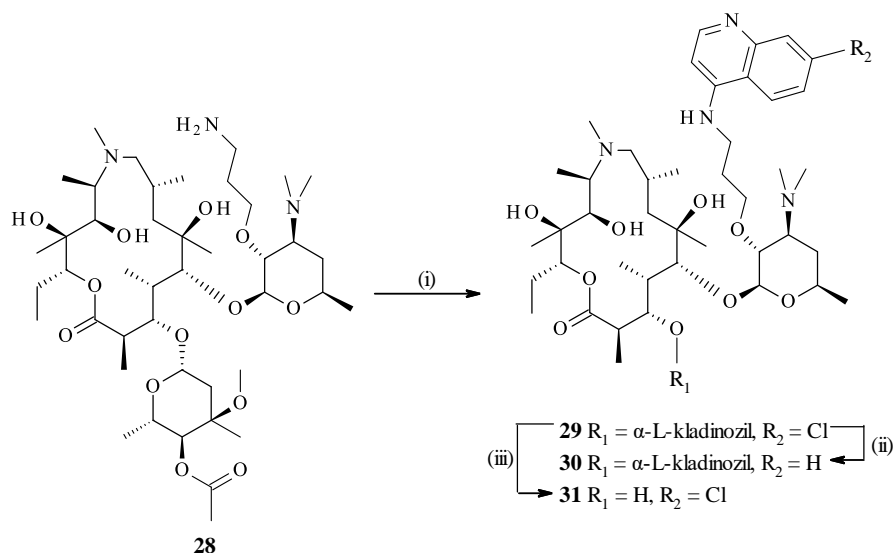
Općeniti sintetski pristup kreće od formiranja odgovarajućeg funkcionaliziranog i zaštićenog azalidnog derivata koji će dozvoliti transformacije na C-2' položaju, a takav je 2'-*O*-(3-aminopropil) derivat **27**, vrlo važan intermedijer.²⁸ Početnu molekulu na ovom sintetskom putu predstavlja 9-deokso-9a-metil-9a-aza-9a homoeritromicin A (azitromicin) **5**. S obzirom na veliku aktivnost 2'-OH skupine, potrebno je uvesti zaštitnu skupinu koja se kasnije selektivno uklanja. Također, zaštićuju se 11-OH i 12-OH skupine s DMA/DMA reagensom, koji se koristi u blagim uvjetima transacetilacije bez potrebe za kiselom katalizom, te je posljedično dobiven ciklički amino acetal **23**. Sljedeći korak je reakcija s acetanhidridom uz DMAP (4-dimetilaminopiridin) kako bi se zaštitile hidroksilne skupine na C-2' i C-4'', a nakon toga je

odmah C-2' selektivno deacetiliran u metanolu te je nastao spoj **24**. Zatim je slijedila reakcija s akrilonitrilom uz natrij hidrid te je naknadnom redukcijom cijanoetila dobiven primarni amin **26** dok se istovremeno zaštitni ciklički acetal preveo u acetilnu skupinu. Konačnom hidrolizom spoja **26** nastao je željeni intermedijer **27**.²⁹



Shema 7. Sinteza 2'-O-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**27**). *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) DMA/DMA, kloroform, refluks, (ii) Ac₂O, DMAP, TEA, DCM, s.t., (iii) MeOH, s.t., 45°C, (iv) akrilonitril, NaH, *t*-BuOH, (v) H₂, PtO₂, AcOH, (vi) LiOH, MeOH/H₂O

Nakon pripremljenog azalidnog derivata, bilo je potrebno pripremiti i kinolinske supstituente te je, komercijalno dostupan, 4,7-diklorkinolin regioselektivno preveden u 7-klor-4-(supstituirane)-aminokinoline kako bi jednostavnije došlo do njihove međusobne reakcije. Karakteristično svojstvo azalida, a i ostalih makrolida je razgradnja glikozidne veze u vodenom kiselom mediju, a rezultat toga je gubitak šećera kladinoze. Pripremljeno je i nekoliko dekladinozilnih derivata kako bi se istražilo ima li taj gubitak utjecaj na biološku aktivnost.²⁸

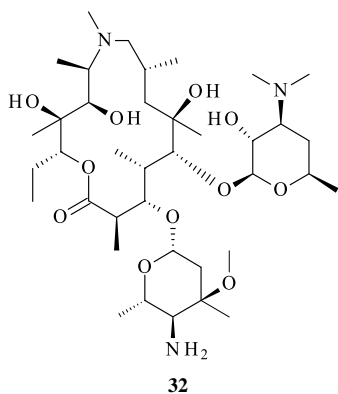


Shema 8. Sinteza novih 4-aminokinolinskih derivata 15-članih azalida. *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) DIPEA/DMSO, (ii) $\text{H}_2/\text{Pd/C}$, (iii) H^+ , H_2O

Daljnja istraživanja kemijske stabilnosti, topljivosti i stabilnosti u otopini provedena su na derivatu **29**. Tako je otkrivena visoka stabilnost u pH području 5-6 dok kod pH 1.5-3 dolazi do degradacije, odnosno do gubitka kladinoze.^{30,31} Također, dokazana je stabilnost u različitim otapalima i pri različitim temperaturama. Antimalarijsko djelovanje, provedeno za sve sintetizirane derivate, ispitivano je na dva različita soja *P. falciparum*, a rezultati, iskazani kao IC_{50} vrijednosti, pokazali su poboljšano *in vitro* djelovanje u odnosu na azitromicin. Ipak, najbolju aktivnost pokazuju derivati koji sadrže oba šećera i 4-amino-7-klorkinolinški supstituent. Aktivnost se smanjuje prilikom zamjene klorovog atoma s vodikom na kinolinu te gubitkom kladinoze. S druge strane, adicijom kinolinskih supstituenata potpuno je uklonjena antibakterijska aktivnost takvih novih derivata što ukazuje na iznimnu važnost C-2' položaja pri ciljanom vezanju na ribosome.²⁸

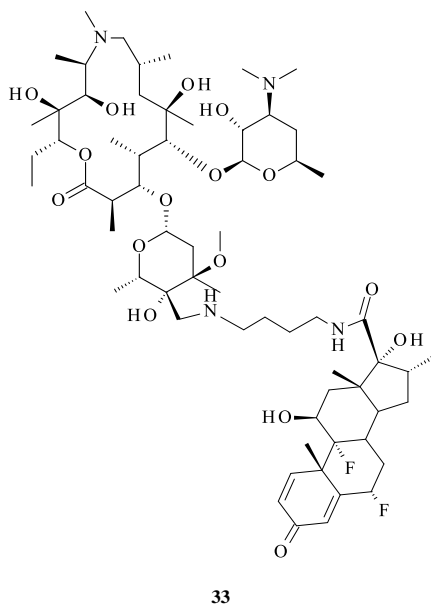
2.2.2.3. Supstitucije na C-4'' položaju

Nakon najreaktivnije hidroksilne skupine na C-2' desozamina, slijedi hidroksilna skupina na C-4'' kladinoze koja je druga po redu za moguće supstitucije. Istraživanja su provedena na način da se C-2' prethodno zaštiti uvođenjem acetilne skupine.³² Hidroksilna skupina na C-4'' oksidirana je Moffat-Pfizerovom metodom koja je rezultirala dobivanjem 4''-okso-derivata. Dobiveni derivat podvrgnut je oksimiranju, a onda reduciranju te je krajnji produkt bila smjesa epimera 4''-amino derivata azitromicina **32**. *In vivo* i *in vitro* antibakterijsko djelovanje 4''-amino derivata **32**, pogotovo protiv Gram-negativnih mikroorganizama, pokazalo se gotovo jednakim azitromicinu i boljim od eritromicina A.³³



Slika 8. 4"-amino- derivat azitromicina

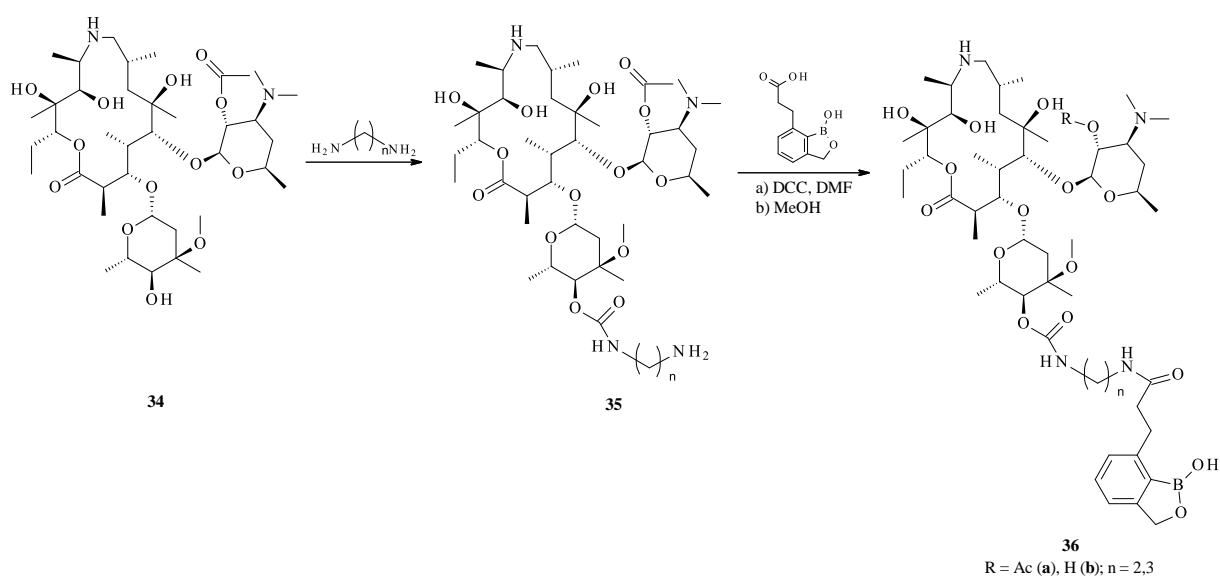
Daljnjom reakcijom derivata s Grignardovim reagensom u DMF-u uveden je dodatni ugljikov atom na položaju 4". PLIVINI znanstvenici vezali su steroidni dio na 4"-C-supstituirane epoksi-azalide s ciljem dobivanja protuupalnih spojeva **33** koji će dominantno djelovati na mjestu upale.³⁴



Slika 9. Struktura potencijalnog protuupalnog 4"-C-tetrametilendiamino-steroid-supstituiranog azalida

Nadalje, pokušalo se primijeniti metodu razvijenu za sintezu 4"-supstituiranih derivata klaritromicin-benzoksaborol na sintezu odgovarajućih derivata azitromicina.³⁵ Nakon zaštite 2'-OH acetiliranjem, slijedila je reakcija s *N,N'*-karbonildiimidazolom (CDI) uz grijanje i

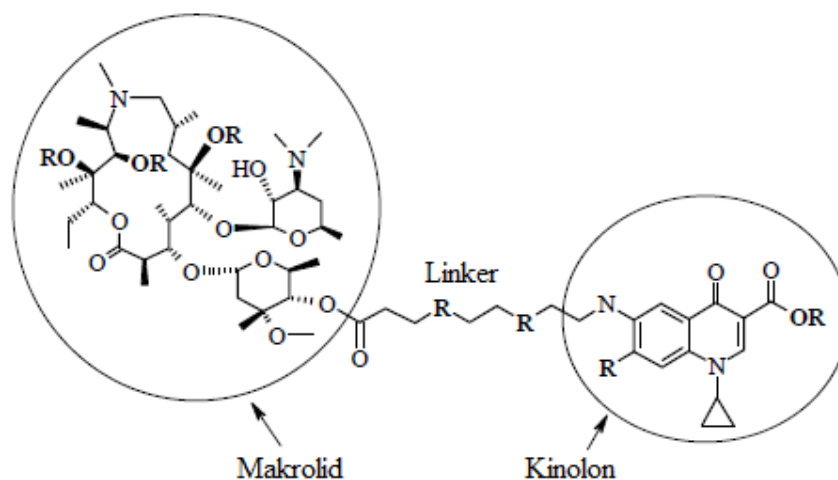
prisutnost trietilamina kojom se dobiva aktivirani imidazolni derivat azitromicina, 2'-*O*-acetil-4''-*O*-(1*H*-imidazol-1-karbonil)-9-deokso-9-dihidro-9a-metil-9a-aza-9a-homoeritromicin A. CDI se ne koristi samo kao zaštitna skupina, već i kao aktivirajuća skupina za uvođenje benzoksaborola. Dobiveni derivat tretira se s jakim bazom kao što je diaminoetan ili 1,3-diaminopropan uz DBU te je rezultat formiranje aminoalkilkarbamoilnog derivata. Naknadno aciliranje s benzoksaborolnom kiselinom i pri standardnim uvjetima (DCC, HOBt) daje seriju acilaminoalkilbenzoksaborol derivata.³⁶ U usporedbi s azitromicinom, 4''-supstituirani benzoksaborolni derivati pokazuju slabije djelovanje protiv Gram-pozitivnih bakterija nego protiv Gram-negativnih. Prisutnost acetila na položaju 2', kao i 11,12-cikličkog karbonata nema utjecaja na antibakterijsku aktivnost.³⁷



Shema 9. Sinteza benzoksaborolnog derivata azitromicina

Također, postoji još jedan koncept koji poboljšava svojstva makrolida. Radi se o vezanju kinolona kao supstituenta na položaj C-4'' kladinoze. Tako je dobivena nova klasa makrolidnih antibiotika nazvana makroloni.³⁸ Makroloni su sastavljeni od makrolaktonskog prstena i slobodne ili esterificirane kinolon 3-karboksilne skupine međusobno povezanih preko linkera. Istraživanja pokazuju kako su makroloni izvrsnog antibakterijskog djelovanja protiv ključnih eritromicin A rezistentnih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih sojeva. Uspoređujući s azitromicinom ili kinolonima, većina tako dobivenih derivata posjeduje poboljšano i superiorno *in vitro* djelovanje na rezistentne respiratorne patogene. S obzirom na njihovu fleksibilnu strukturu, vrlo su dobri kandidati za moguće višestruke interakcije s

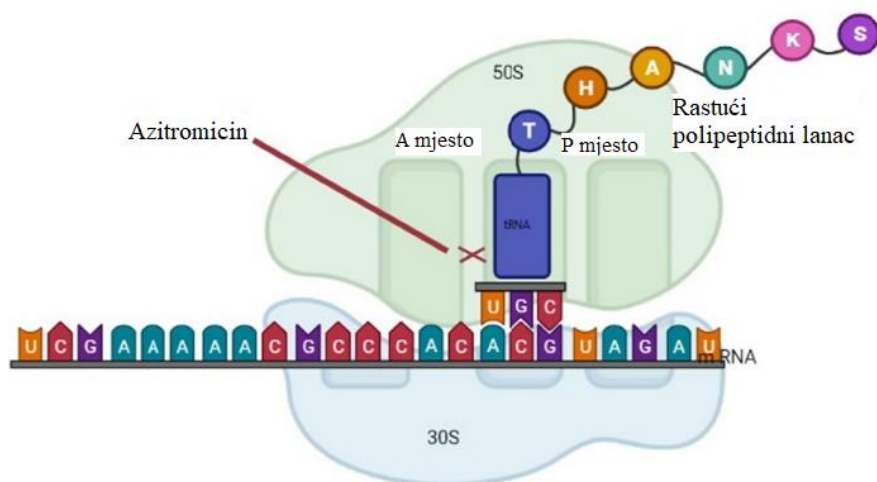
ribosomom. Na kraju, makroloni imaju veliki volumen distribucije i dugačko vrijeme poluživota, što je u skladu s propisanim doziranjem jednom dnevno. No, nije još dokazano je li ribosom njihovo ciljano mjesto djelovanja ili inhibiraju sintezu proteina. Relativno su novi derivati s velikim potencijalom te je potrebno provesti još dodatna istraživanja.³⁹



Slika 10. Shematski prikaz molekule makrolona³⁶

2.2.3. Biološko djelovanje

Slično kao i kod ostalih makrolidnih antibiotika, i kod azalida je glavni mehanizam djelovanja inhibicija sinteze bakterijskog proteina vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma.⁴⁰ Brzina prolaza azitromicina kroz neionizirani oblik membrane je velika i to može biti razlog povećanju njegove antimikrobne aktivnosti u lužnatom pH području.⁴¹ Azitromicin se veže u blizini centra peptidil transferaze na 23S rRNA na izlazni tunel rastućih proteina te ga djelomično začepljuje.⁴² Dušik, umetnut u laktonski prsten, nema izravan doprinos vezanju azitromicina na ribosom, ali ova modifikacija mijenja konformaciju laktonskog prstena dovoljno da dođe do induciranja novih kontakata. Jedna molekula azitromicina veže se na dvije domene 23S podjedinice rRNA pa se može smatrati inhibitorom ribosoma s dvojnim vezanjem.⁴² Također, moguće je istovremeno vezanje dviju molekula azitromicina na izlaz tunela, a dodatne interakcije druge molekule s dva proteina pojašnjavaju snažnu aktivnost protiv rezistencije.⁴³



Slika 11. Shematski prikaz mehanizma inhibicije translacije mRNA³⁵

Također, azitromicin pokazuje protuupalno djelovanje. Kao primjer pokazano je da reducira ekspresiju TNF- α mRNA i vezanje NF- κ B DNA u stanicama humane cistične fibroze.⁴⁴ Uz spomenut širok spektar aktivnosti, njegova minimalna inhibicijska koncentracija (MIC) za 90 % sojeva bakterija *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* i *Yersinia* iznosi ≤ 4 μ g/mL, što je znatno bolje u usporedbi s vrijednošću eritromicina A koja iznosi od 16 do 128 μ g/mL.⁴⁵ Testovi, provedeni na životinjama, pokazuju kako je azitromicinom moguće očistiti klamidiju, ali ju nije moguće potpuno eliminirati iz slijepog crijeva unutar iste životinje.⁴⁶ In vivo testovi pokazali su manju toksičnost azitromicina u odnosu na eritromicin A. Naime, vrijednost LD₅₀ za azitromicin je 825/10000 mg/kg, a za eritromicin je 360/4000 mg/kg.⁴⁷

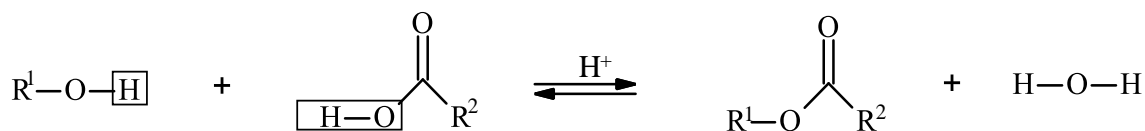
2.2.4. Rezistentnost azalidnih antibiotika

Mikroorganizmi su razvili nekoliko mehanizama kojima su stekli rezistentnost na različite vrste antibiotika, uključujući i azalidne, a to predstavlja velik problem u liječenju infektivnih bolesti.⁴⁸ Rezistentnost na azalidne antibiotike javlja se zbog modifikacije ciljanog mjesta vezivanja na ribosomu metiliranjem ili mutacijom, smanjenog unosa molekula antibiotika, biokemijske inaktivacije molekule azalida i aktivnog izbacivanja molekula antibiotika iz stanice tzv. efluks pumpom.⁴⁹ Također, pretpostavlja se da je hidrofobna priroda makrolida temeljni uzrok intrinzične otpornosti na većinu antimikrobnih sredstava. Porodica rRNA metiltransferaza, predstavljena kao Erm enzimi, odgovorna je za razvoj bakterijske rezistentnosti na antibiotike zbog metiliranja na 23S rRNA koje sprječava vezanje lijeka i bakterija tako postaje rezistentna.^{50,51} Rezistentnost, s obzirom na metiliranje, može biti

konstitutivna ili inducibilna. Inducibilnom rezistencijom bakterijska ekspresija gena počinje ulaskom antibiotika u stanicu, a rezultat toga je slaba rezistentnost na azalide, a i općenito makrolidne antibiotike. Pri konstitutivnoj rezistenciji, proizvodnja metilaze teče bez indukcije ili stimulacije antibiotika izazivajući jaku unakrsnu rezistenciju na makrolide.⁵²

2.3. REAKCIJA ESTERIFIKACIJE

Esterifikacija predstavlja reakciju nukleofilne acilne supstitucije koja karboksilnu kiselinu ili njezine derivate, kao npr. kiselinske kloride, anhidride i amide, uz alkohol, prevodi u ester, a točan naziv joj je Fischerova esterifikacija. Reakcija je reverzibilna, a u suprotnom smjeru odvija se hidroliza estera. Ester je spoj kiseline i alkohola koji nastaje uz gubitak vode. Također, moguće je sintetizirati drugi ester iz prvog nastalog estera kada on reagira s novim alkoholom, a tada je riječ o reakciji transesterifikacije. Kao zanimljivost navodi se kako se alkoholna skupina lijekova lošeg okusa često prevodi u ester da bi se poboljšao okus. U većini slučajeva ester ima bolji okus i miris od slobodnog alkohola.³

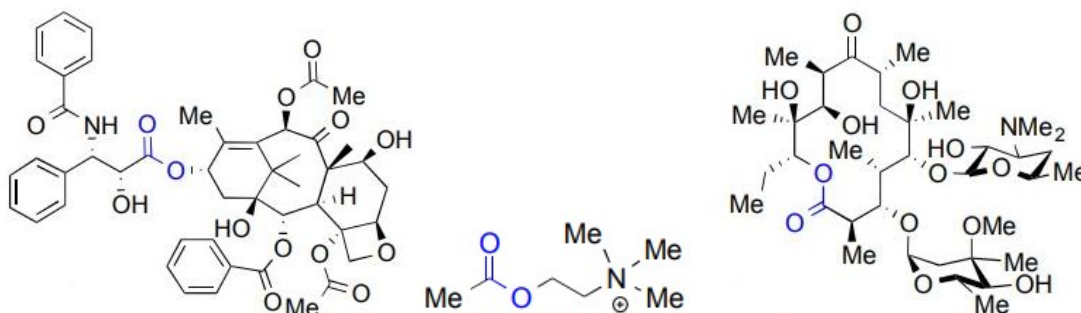


Shema 10. Općeniti mehanizam reakcije esterifikacije

Zbog svog ugodnog mirisa koriste se u proizvodnji sapuna, parfema, poliestera kao i sintetičkih aroma te kozmetike. Također, koriste se u proizvodnji lakova, boja te otapala, a prevođenjem u esencijalne polimere i poliestere, pronašli su svoju primjenu u tekstilnoj industriji, izradi folija i proizvodnji plastičnih masa. Najpoznatiji ester, kao dobro otapalo za mnoštvo spojeva, je etil-acetat čija je otrovnost, u usporedbi s drugim otapalima, jako mala.^{3,53}

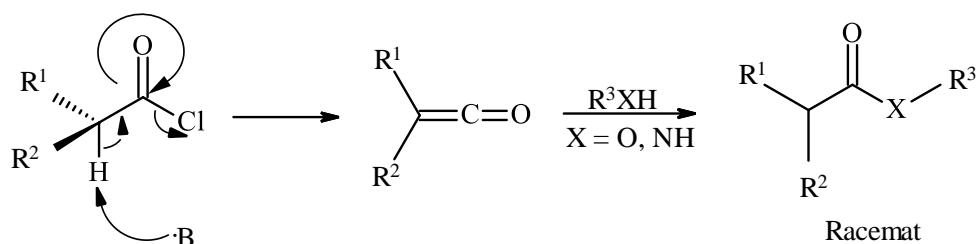
Esterske veze prisutne su u većini bioloških molekula, ali su odsutne u „skladištu“ genetskih informacija (DNA/RNA) i u funkcionalnim biopolimerima (proteinima).^{54,55} Mogući razlog je u stabilnosti navedenih biomolekula pa je eliminirana prisutnost esterske funkcionalne skupine kao posljedica njihove hidrolitičke labilnosti.⁵⁶ Općenito, esteri su ključne vezne skupine („linkeri“) u mnogim primarnim lipidnim metabolitima, ali i u nekim sekundarnim,

osobito makrocikličkim laktonima koji pripadaju klasi ciklodepsipeptida i poliketida.⁵⁷ Usprkos tome što je vrlo jednostavna reakcija, stvaranje esterske veze često čini sintetski put izazovnim kada je u pitanju priprema kompleksnih prirodnih spojeva.⁵⁸ Razni metaboliti, poput važnog neurotransmitera acetilkolina, terpenoida (Taxol) te poliketida (eritromicin A, azitromicin), sadrže estersku funkcionalnu skupinu unutar svoje strukture.⁵⁹



Slika 12. Primjeri prirodnih spojeva koji u svojim strukturama sadrže estersku vezu (Taxol (lijevo), acetilkolin (sredina), eritromicin A (desno))⁵⁴

Postoji nekoliko različitih vrsta esterifikacije, odnosno načina na koji nastaje esterska veza. Prvi način je reakcija alkohola s kiselinskim halogenidima. Tako se kiselinski kloridi, zbog svoje jake elektrofilnosti, pojavljuju kao privlačni intermedijeri kod nastajanja sterički ometanih esterskih veza.⁶⁰ No, pri ovoj strategiji se pojavljuje nekoliko ograničenja. Pri formiranju kiselinskih klorida potrebni su reagensi kao što su benzoil-klorid, tionil-klorid i oksalil-klorid koji generiraju klorovodičnu kiselinu kao nusprodukt što može naštetiti reaktantima u reakcijskoj smjesi.⁶¹ Jednom formirani kiselinski kloridi, sklone su hidrolizi, kao i racemizaciji preko ketenskog intermedijera pri bazičnim uvjetima (Shema 11). Prema tome je korištenje kiselinskih klorida ograničeno na povezivanje ili funkcionaliziranih *N*-zaštićenih aminokiselina ili malih fragmenata koji su stabilni pri kiselim uvjetima.⁶² Kao rješenje spomenutog problema spominje se aktivacija karboksilne kiseline uvođenjem fluora, odnosno formiranjem kiselinskih fluorida.⁶³ Takvi spojevi su manje osjetljivi na vlažnu atmosferu i, što je najvažnije, prikladni su za funkcionalne skupine koje su nestabilne u kiselim uvjetima.⁶⁴



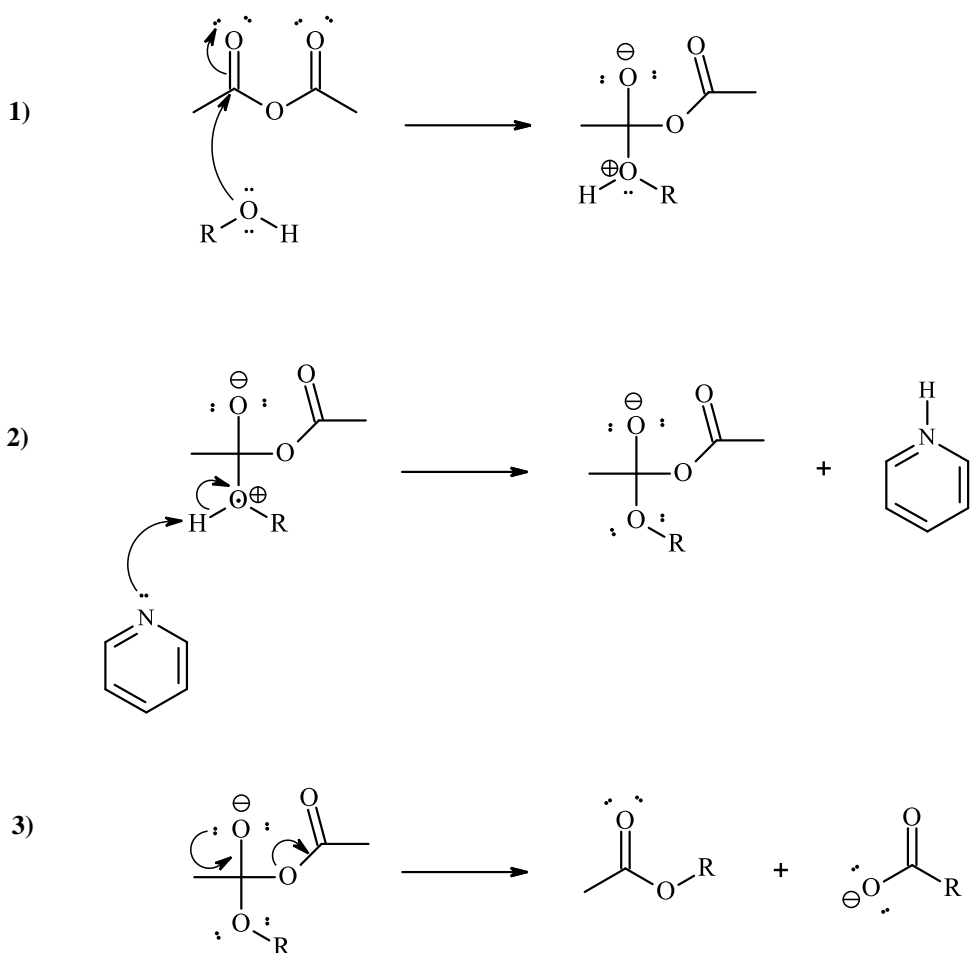
Shema 11. Racemizacija acil-klorida preko ketena kao intermedijera

Nadalje, jedni od najčešće korištenih uvjeta za formiranje esterske veze uključuju *N-N'*-cikloheksilkarbodiimid (DCC) i DMAP kao reagens.⁶⁵ Princip ove reakcije je preko *O*-acilizouree, kao intermedijera, formirati acetanhidrid koji će dalje reagirati s alkoholom i tako će nastati ester.^{66,67} Zatim, Yamaguchi esterifikacija razvijena je od strane istoimenog istraživača i njegovih suradnika, a riječ je o formiranju esterske veze reakcijom alkohola i odgovarajućih anhidrida dobivenih iz 2,4,6-triklorbenzoil-klorida i karboksilne kiseline. Trietilamin je korišten kao baza, a tetrahidrofuran kao otapalo.⁶⁶ Sljedeća vrsta esterifikacije je Mitsunobu povezivanje.⁶⁸ Mitsunobu reakcija omogućuje pretvaranje hidroksilnih skupina u različite funkcionalnosti, što uključuje i estere. Za razliku od širokog spektra korištenih reagenasa za esterifikaciju, gdje se karboksilna kiselina aktivira za nukleofilni napad alkohola, u Mitsunobu reakciji je obratno. Tu dolazi do aktiviranja alkohola za nukleofilni napad kiseline.⁶⁹ To je postignuto uz fosfin, najčešće trifenilfosfin, kao reagens i dialkilazodikarboksilat, obično diizopropilazodikarboksilat (DIAD) ili dietil azodikarboksilat (DEAD).⁷⁰ Na kraju, posljednji primjer nastajanja esterskih veza je preko ketena kao intermedijera. Keteni su visoko reaktivni intermedijeri, najčešće generirani in situ te odmah „zarobljeni“ od pogodnog sredstva kako bi se dobilo mnoštvo zanimljivih spojeva i gradivnih blokova.^{71,72} U totalnoj sintezi, najčešće korišteni ketenski intermedijeri su kiselinski keteni ili oksoketeni čime nastaju β -keto esteri ili β -keto laktoni.⁷³

2.3.1. Acetiliranje

Reakcije esterifikacije najčešće su ostvarene acetiliranjem s acetanhidridom u prisutnosti bazičnog ili kiselog katalizatora. Korištenje acetanhidrida ima prednost u tome što pri reakciji s određenim alkoholom ne dolazi do nastajanja vode koja bi dalje poslužila za hidrolizu nastalog estera.⁷⁴ Kao što je i prije navedeno, acetilne skupine predstavljaju najčešće korištene zaštitne skupine gdje, vezanjem na kisik iz OH skupine, stvaraju estersku vezu. Obično su stabilne pri kiselim i oksidacijskim uvjetima, a ukloniti se mogu pri bazičnim ili reduktivnim uvjetima.

Prednost acetilne skupine u usporedbi s drugim acilnim skupinama, kao što su benzoilne i pivaloilne skupine, je njezino jednostavno uvođenje na sterički ometene hidroksilne skupine i vrlo lako uklanjanje s obzirom na malu veličinu molekule.⁷⁵ Najčešće korišteni katalizator u spomenutoj reakciji je DMAP, no ova reakcija se može odvijati i bez katalizatora.⁷⁶



Shema 12. Mehanizam reakcije acetiliranja

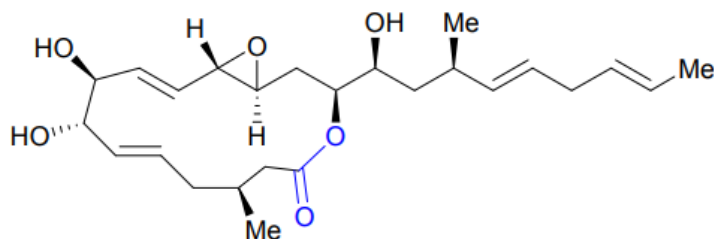
2.3.2. Esterifikacija u sintezi makrolaktonskog prstena

Makrolaktonizacija predstavlja efektivnu i popularnu metodu u sintezi makrolaktonskog prstena. Postupak je baziran na laktonizaciji odgovarajućih seko-kiselina, a odvija se spontano u kiselim uvjetima. Najčešće korištene metode pri sintezi makrolaktonskog prstena su Corey-Nicolaou, Shiina, Keck-Boden, Mukaiyama te ranije spomenute Yamaguchi i Mitsunobu metode.⁷⁷ Shiina i suradnici izvjestili su kako se 2-metil-6-nitrobenzojev anhidrid (MNBA) pokazao kao efektivan reagens za formiranje estera i makrolaktonskog prstena.⁷⁸

Dakle, željeni ester dobiva se uz suvišak MNBA i karboksilne kiseline te u kombinaciji s 10 mol % DMAP u bazičnim uvjetima.⁷⁹

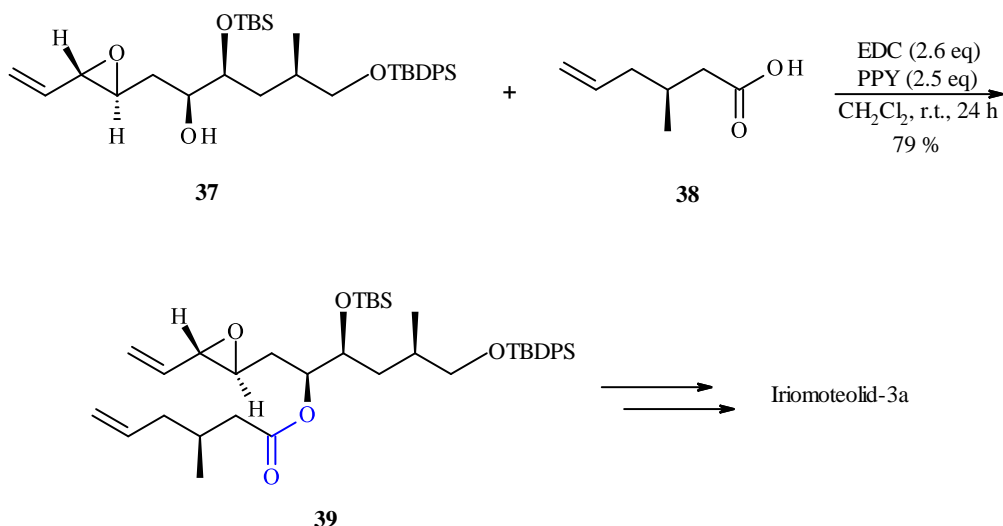
Znanstvenik Funk i suradnici uveli su novi pristup u makrolaktonizaciji posredovan ketenom preko retroenske reakcije alkil alkinil etera kao makrolaktonskog prekursora.⁸⁰ Prva primjena ovog protokola bila je u sintezi *Acutiphycin-a* od strane Jamisona i njegovih suradnika u 2006. godini.⁸¹ Dakle, termoliza alkinil etera u prisutnosti baze djeluje u retroenskoj reakciji generiranjem etilena i ketenskog intermedijera. Ketenski intermedijer je dalje podvrgnut intramolekulskom vezanju s najmanje ometenom hidroksilnom skupinom s ciljem formiranja makrolaktonskog prstena u vrlo visokom iskorištenju.⁸²

Primjer kompleksnog esterskog vezivanja u totalnoj sintezi prirodnih produkata je sinteza Iriomoteolida-3a. Iriomoteolid-3a spada u 15-člane makrolide te je ujedno i prvi član spomenute jedinstvene klase.⁸³ U svojoj strukturi posjeduje 4 stereocentra u alilnim položajima, a uključuje i alil epoksidni dio. Pokazuje izraženo citotoksično djelovanje na ljudske B limfocite DG-75.⁸⁴



Slika 13. Struktura Iriomoteolida-3a⁵³

U sintezi Iriomoteolida-3a ključna reakcija esterifikacije ostvarena je intermolekularnim povezivanjem početnih fragmenata **37** i **38** uz korištenje EDC-a kao aktivirajućeg agensa i u prisutnosti suviška 4-pirolidinopiridina (PPY). Unatoč prilično sterički ometenom sekundarnom alkoholu, reakcija esterifikacije odvila se bez ikakvih problema u visokom iskorištenju.⁸⁴



Shema 13. Formiranje esterske veze u sintezi Iriomoteolida-3a

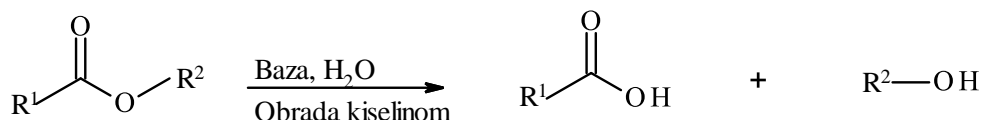
Upotreba 4-pirolidinopiridina kao nukleofilnog katalizatora umjesto DMAP u ovoj reakciji smatralo se intrigantnim te je to potaknulo daljnja istraživanja. DMAP je vrlo efikasan katalizator u reakcijama aciliranja te čak omogućuje i esterifikaciju tercijarnih alkohola. Prije otkrića DMAP, piridin je bio jedini katalizator korišten u takvim reakcijama predstavljajući pouzdan, ali ograničavajući način aciliranja alkohola.⁸⁵ Nadalje, Steglich i Höfle⁸⁶ otišli su korak dalje u istraživanju sa svojim izvješćem o učinkovitijem katalizatoru aciliranja 4-pirolidinopiridinu. Dosezanjem limita reaktivnosti, 4-pirolidinopiridin zamijenjen je novootkrivenim nukleofilnim katalizatorima koji su nazvani „super-DMAP“ analozi.⁸⁷

2.4. REAKCIJA HIDROLIZE

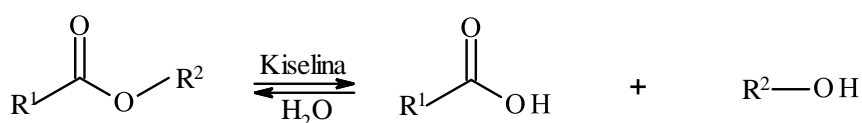
Općenito, hidroliza estera, suprotna esterifikaciji, je reakcija koja uključuje cijepanje esterske veze korištenjem vode te posljedično nastajanje alkohola i karboksilne kiseline ili karboksilatne soli, a može biti kiselo ili bazno katalizirana (Shema 14).³ Bazno katalizirana hidroliza poznata je i kao saponifikacija, reakcija priprave sapuna. Kiselo katalizirana hidroliza može se odvijati u više od jednog mehanizma, ovisno o strukturi estera. Kiselina protonira karbonilnu skupinu što ju aktivira za nukleofilni napad vode, a rezultat napada je formiranje tetraedarskog intermedijera. Transferom protona i eliminacijom alkohola dobije se karboksilna kiselina. S druge strane, tetraedarski alkoksidni intermedijer u bazno kataliziranoj hidrolizi nastaje napadom hidroksidnog iona na karbonilnu skupinu. Daljnjom eliminacijom alkoksidnog iona generira se karboksilna kiselina u obliku karboksilata s obzirom da je neposredno

deprotonirana. Za razliku od kiselo katalizirane hidrolize, u bazno kataliziranoj hidrolizi je potrebna obrada karboksilata kako bi se uspostavila željena karboksilna kiselina.⁸⁸

1) Bazno katalizirana reakcija hidrolize



2) Kiselo katalizirana reakcija hidrolize



Shema 14. Općeniti prikaz reakcija hidrolize

Hidroliza može biti značajan put razgradnje za pojedine organske spojeve, uključujući i neke antibiotike. Hidroliziranjem funkcionalnih skupina, kao što su esteri, amidi i alkil-halidi, dobivaju se manje bioakumulativne molekule jer su one polarnije i veće topljivosti u vodi. Brzina hidrolize alkil-halida varira ovisno o samoj vrsti halogenida, duljini alkilnog lanca i molekularnim steričkim efektima. Loftin i suradnici pokazali su kako su linkozamidi i sulfonamidni antibiotici stabilniji od makrolidnog antibiotika tilozina, a tilozin je bio veće stabilnosti od tri tetraciklinska antibiotika. Stopa hidrolize funkcija je okolišnih uvjeta, s temperaturom i pH vrijednošću kao ključnim parametrima. Tako se hidroliza pospješuje što je viša temperatura, a bazno katalizirana hidroliza dominantna je nad kiselo i neutralno kataliziranom za mnoge organske spojeve. Razumijevanje i poznavanje hidrolize antibiotika važno je za predviđanje njihove postojanosti u okolišu. Prema tome, napravljena su istraživanja na molekulama amfenikola i makrolidnim antibioticima koristeći tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC) u vodi u pH području 4-9. Kao reprezentativni antibiotici iz skupine amfenikola uzeti su kloramfenikol i fluorfenikol. Razlike u njihovim strukturama mogu potencijalno promijeniti gustoće elektrona unutar molekula i utjecati na stope hidrolize. Dva uobičajeno korištena i reprezentativna makrolidna antibiotika, spiramicin i tilozin, odabrana su za procjenu potencijalne hidrolize na eterskim vezama unutar molekula. Pokazalo se da su kloramfenikol, fluorfenikol, spiramicin i tilozin stabilni i nisu pokazali vidljivu hidrolizu. Bazno i kiselo katalizirana hidroliza dogodila se na povišenim temperaturama (50-

60 °C), a stope hidrolize znatno su porasle ispod pH=5 i iznad pH=8. U slučajevima kada je došlo do hidrolize, produkti razgradnje fluorfenikola i tilozina su ostali bioaktivni, no u daleko manjoj mjeri od matičnih spojeva.^{89,90}

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sve korištene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

Tijek reakcija i čistoća produkata praćeni su na vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masenog spektrometra te UV spektrofotometra (LC/MS-UV). Konkretno, korišteni su Acquity UPLC sustav s SQD masenim detektorom proizvođača Waters, kao i tankoslojna kromatografija (TLC) na staklenim pločicama uz sljedeće sustave otapala:

Diklormetan : metanol : amonijak(25%) = 90 : 9 : 1.5

Diklormetan : metanol : amonijak(25%) = 90 : 5 : 0.5

Diklormetan : etanol : amonijak(25%) = 95 : 5 : 0.5

Diklormetan : etanol : mravlja kiselina = 90 : 5 : 0.5

Diklormetan : metanol = 95 : 5

Diklormetan : metanol = 97 : 3

Diklormetan : etil-acetat = 1 : 1

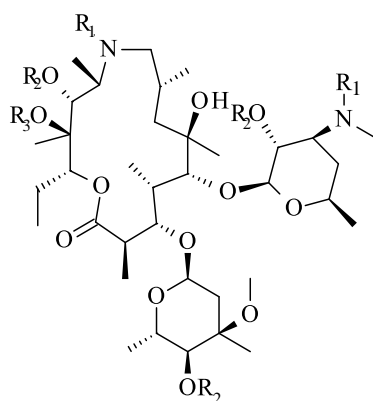
Cikloheksan : etil-acetat = 1 : 1

Prilikom detekcije izoliranih komponenata korištena je metoda prskanja pločica s 5 % - tnom otopinom sumporne kiseline u etanolu.

Dobiveni produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom na normalnoj ili reverznoj fazi pri čemu su korištene komercijalno dostupne kolone na krutom nosaču proizvođača Interchim puriFlash na automatiziranom sustavu u „flash“ načinu rada (Büchi Pure C-850 FlashPrep). Također, provedena je i preparativna kromatografija na navedenom automatiziranom sustavu.

NMR spektri snimljeni su na uređaju Bruker Avance DRX 600 (600 MHz) uz tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Svi uzorci otopljeni su u dimetil sulfoksidu (DMSO- d_6) i mjereni pri 298 K u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^1H NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, $\delta=0.0$ ppm), a konstante sprega (J) u hercima (Hz). Pojedine rezonancije asignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H.

3.2. Pregled ciljanih spojeva



2-9

SPOJ	2	3	4	5
R ₁	-H			
R ₂	-H	-H		
R ₃	-H	-H	-H	

SPOJ	6	7	8	9
R ₁			-H	
R ₂				11- H, 2'-H, 4''-
R ₃	-F			

Sinteza 3'-N-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritomicina A (2)

U dvogrllu okruglu tikvicu od 250 mL dodan je MeOH (110 mL), 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (DHL) (**1**) (2 000 mg, 2.72 mmol, 1 eq) i tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (1647.5 mg, 17.48 mmol, 5 eq). Smjesa je zagrijavana na magnetskoj miješalici do 55°C. Zatim je pažljivo dodan jod (1035.54 mg, 4.08 mmol, 1.5 eq) pri čemu temperatura reakcijske smjese ne smije prijeći 60°C. Reakcijska smjesa miješana je na 55°C tijekom 5 h. Tijek reakcije provjeren je tankoslojnom kromatografijom (TLC) u sustavu DCM:MeOH:NH₄OH = 90:9:1.5 i tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC). Nakon što je reakcija gotova, ohlađena je na sobnu temperaturu preko noći. Zasićena vodena 5%-tna otopina Na₂S₂O₃ (10 mL) dokapana je u reakcijsku smjesu u svrhu redukcije joda. Smjesa je koncentrirana uklanjanjem otprilike pola volumena MeOH. Nakon toga, koncentrat je razrijeđen s 5%-tnom vodenom otopinom Na₂CO₃ (40 mL) i DCM-om (40 mL) te je smjesa ekstrahirana. Zatim, ekstrakcija je provedena još jednom s DCM-om te je organski sloj sušen nad MgSO₄. Smjesa je profiltrirana i uparena pod sniženim tlakom te je dobiven praškasti talog bijele boje (1741 mg; 88.79 %). Dio uzorka je pročišćen kolonskom preparativnom kromatografijom na C18 koloni reverzne faze u sustavu MeOH i voda + 4 mL amonijaka. Liofilizacijom je dobiven praškasti produkt **2** bijele boje (9.2 mg; 17.75 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm 7.39 – 7.34 (m, 4H), 7.32 (ddt, *J* = 7.2, 5.7, 2.4 Hz, 1H), 5.16 – 5.08 (m, 2H), 4.85 – 4.80 (m, 2H), 4.58 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J* = 10.7, 7.6 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.21 (s, 1H), 4.07 (dd, *J* = 4.5, 2.3 Hz, 1H), 4.03 (dq, *J* = 9.4, 6.2 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.76 – 3.70 (m, 1H), 3.48 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.29 – 3.25 (m, 1H), 3.22 (s, 3H), 2.92 (dd, *J* = 9.5, 7.2 Hz, 1H), 2.85 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 2.69 – 2.57 (m, 2H), 2.30 – 2.19 (m, 2H), 2.16 (s, 6H), 1.81 – 1.74 (m, 3H), 1.72 – 1.67 (m, 1H), 1.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 1.50 (dd, *J* = 14.9, 4.9 Hz, 1H), 1.42 – 1.31 (m, 2H), 1.22 (dd, *J* = 11.5, 4.7 Hz, 1H), 1.18 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.18 – 1.11 (m, 12H), 1.11 – 1.05 (m, 8H), 1.03 – 0.93 (m, 7H), 0.91 – 0.84 (m, 4H), 0.80 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 0.69 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ/ppm 154.26, 128.27, 128.06, 127.99, 99.34, 94.48, 77.29, 77.17, 76.60, 75.81, 72.91, 72.76, 68.40, 66.96, 64.74, 62.55, 56.48, 48.79, 41.51, 40.34, 39.93, 39.79, 39.65, 39.51, 39.37, 39.23, 39.09, 34.58, 30.01, 27.41, 22.22, 21.20, 21.01, 20.82, 18.42, 14.71, 14.19, 10.98, 8.50.

UPLC/MS: MS(ESI⁺) *m/z*: 720.48

Sinteza 9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (3)

Spoj 2 (1689 mg, 2.343 mmol) je otopljen u 60 mL tetrahidrofurana i 20 mL vode. U otopinu je dodan kruti Na₂CO₃ (1415.5 mg, 13.355 mmol, 5.7 eq). Zatim je uz miješanje dodan benzil kloroformat (1.3 mL, 11.481 mmol, 4.9 eq). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon što je reakcija završena, provedena je ekstrakcija s etil-acetatom (2x80 mL), natrijevim hidrogenkarbonatom (60 mL) i malom količinom vode. Nakon toga, slijedilo je ispiranje sa zasićenom otopinom NaCl („brine”) kako bi se dodatno povukla voda iz organskog sloja. Organski sloj je osušen iznad MgSO₄ te uparen do suha. Smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom na normalnoj fazi na 220 g koloni silika gela u sustavu čisti diklormetan i metanol (5% MeOH u diklormetanu). Dobiven je bijeli praškasti produkt 3 (1243.3 mg; 53.65 %). ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ/ppm 7.34 - 7.39 (m, 8H), 7.28 - 7.33 (m, 2H), 4.99 - 5.12 (m, 5H), 4.83 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.48 (br s, 1H), 4.37 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.31 (br s, 1H), 4.05 - 4.13 (m, 2H), 3.98 - 4.04 (m, 1H), 3.89 (br s, 1H), 3.72 - 3.79 (m, 2H), 3.50 - 3.54 (m, 2H), 3.29 - 3.33 (m, 1H), 3.22 - 3.28 (m, 3H, OCH₃), 3.18 - 3.22 (m, 1H), 2.94 - 3.00 (m, 2H), 2.77 (s, 3H, NCH₃), 2.74 (quin, *J* = 7.7 Hz, 1H), 2.27 (br d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 2.10 - 2.17 (m, 1H), 1.76 - 1.86 (m, 2H), 1.54 - 1.60 (m, 2H), 1.45 - 1.52 (m, 2H), 1.37 - 1.44 (m, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.23 (d, *J* = 5.7 Hz, 3H), 1.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.16 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.12 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 1.10 - 1.11 (m, 1H), 1.09 (br s, 3H), 1.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 3H), 0.90 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 151 MHz) δ/ppm 175.1, 155.7, 155.4, 136.5, 136.3, 127.7, 127.3, 127.2, 127.0, 126.8, 101.8, 94.9, 84.4, 78.3, 77.1, 75.6, 74.9, 74.3, 73.6, 72.3, 69.9, 66.4, 66.1, 65., 64.9, 57.2, 52.1, 48.7, 48.4 (OCH₃), 44.3, 39.4, 35.7, 35.0, 34.9, 28.4 (NCH₃), 27.6, 26.8, 21.3, 20.6, 20.5, 19.8, 18.0, 17.5, 15.0, 12.7, 10.5, 8.7

UPLC/MS: MS(ESI⁺) *m/z*: 988.55

Sinteza 11,2',4''-O-triacetil-9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (4)

Spoj **3** (1243.3 mg, 1.255 mmol) otopljen je u piridinu (7.1 mL, 87.85 mmol, 70 eq) te je u smjesu dodan acetanhidrid (2.37 mL, 25.1 mmol, 25 eq). Reakcijska smjesa je miješana na 65 °C 96 h. Nakon što je reakcija završila, reakcijska smjesa je razrijeđena s 75 mL kloroforma i 100 mL vode i ekstrahirana. Po završetku ekstrakcije organski sloj ispran je s „brine-om” te osuše iznad MgSO₄, profiltriran i uparen pod sniženim tlakom. Dobivena smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom na normalnoj fazi na 80 g koloni silika gela u sustavu DCM : EtOAc = 1 : 1. Konačnim uparavanjem dobiven je praškasti produkt bijele boje (1091 mg; 77.94 %). ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ/ppm 7.29 - 7.38 (m, 10H), 5.08 - 5.14 (m, 3H), 4.98 (d, J=12.7 Hz, 1H), 4.92 (d, J=4.6 Hz, 1H), 4.90 (d, J=4.6 Hz, 1H), 4.85 (d, J=7.5 Hz, 1H), 4.70 - 4.77 (m, 2H), 4.54 - 4.59 (m, 2H), 4.31 - 4.38 (m, 2H), 4.22 - 4.29 (m, 1H), 4.12 (t, J=3.2 Hz, 1H), 3.84 - 3.90 (m, 1H), 3.63 (d, J=5.0 Hz, 1H), 3.51 (br s, 1H), 3.19 - 3.36 (m, 5H), 2.74 (s, 3H), 2.67 - 2.71 (m, 1H), 2.35 (br d, J=14.9 Hz, 1H), 2.07 - 2.13 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.85 - 1.89 (m, 1H), 1.77 - 1.81 (m, 1H), 1.66 - 1.74 (m, 3H), 1.54 - 1.60 (m, 1H), 1.50 (dd, J=14.8 Hz, J=5.2 Hz, 1H), 1.28 (br d, J=7.0 Hz, 3H), 1.18 - 1.20 (m, 1H), 1.18 (d, J=6.1 Hz, 3H), 1.15 (d, J=7.2 Hz, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.06 - 1.10 (m, 9H), 0.93 (d, J=6.8 Hz, 3H), 0.91 (d, J=7.3 Hz, 3H), 0.81 (t, J=7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm 8.8, 10.5, 12.7, 15.5, 17.1, 19.2, 19.8, 19.9, 20.1, 20.5, 21.9, 25.0, 28.2, 28.3 (NCH₃), 34.6, 35.0, 39.4, 41.5, 43.6, 48.3 (OCH₃), 51.3, 51.5, 54.5, 62.5, 65.8, 67.2, 70.3, 72.2, 73.2, 73.6, 76.6, 76.8, 77.7, 78.2, 82.3, 94.6, 98.6, 127.1, 127.2, 127.2, 127.7, 127.8, 136.6, 155.2, 155.5, 168.4, 169.5, 175.4

UPLC/MS: MS(ESI⁺) *m/z*: 1114.58

Sinteza 11,2',4''-O-triacetil-9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-12-O-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (5)

U okrugloj tikvici od 100 mL spoj **4** (2000 mg, 1.793 mmol) otopljen je u 18 mL dikloretana. Zatim je dodan trietilamin (3.45 mL, 24.743 mmol, 13.8 eq) i DMAP (21.91 mg, 0.1793 mmol, 0.1 eq) pri čemu je reakcijska smjesa intenzivno miješana. Nadalje, reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C, postupno je dodan etil kloroksoacetat (1.8 mL, 16.137 mmol, 9 eq) i reakcija je preko noći miješana na sobnoj temperaturi. Zasićeni amonijev klorid (25 mL) korišten je za „quenching” reakcije. Ekstrakcija je odrađena s dikloretanom (2x30 mL) te je organski sloj

ispran s „brine-om” i sušen iznad MgSO₄. Smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom na normalnoj fazi na 330 g koloni silika gela u sustavu cikloheksan : etil-acetat = 1 : 1 do 50 % drugog otapala. Uparavanjem otapala pod sniženim tlakom dobiven je praškasti produkt blijedožute boje (1294 mg; 59.39 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ/ppm 7.34 - 7.38 (m, 5H), 7.29 - 7.33 (m, 5H), 5.09 - 5.16 (m, 3H), 5.05 (br t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.83 - 4.90 (m, 1H), 4.71 - 4.78 (m, 1H), 4.65 - 4.71 (m, 1H), 4.54 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.50 (br d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.28 - 4.40 (m, 1H), 4.20 - 4.25 (m, 3H), 4.12 - 4.17 (m, 1H), 3.98 - 4.04 (m, 1H), 3.85 - 3.91 (m, 1H), 3.49 (br d, *J* = 3.7 Hz, 2H), 3.24 - 3.30 (m, 2H), 3.09 (br s, 3H), 2.74 - 2.79 (m, 1H), 2.68 (br s, 3H), 2.32 (br d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 2.07 (br d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (br s, 2H), 1.78 - 1.82 (m, 4H), 1.66 - 1.74 (m, 2H), 1.59 - 1.63 (m, 1H), 1.51 - 1.56 (m, 1H), 1.22 - 1.27 (m, 3H), 1.11 - 1.18 (m, 10H), 1.03 - 1.08 (m, 6H), 1.00 (br d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.88 - 0.93 (m, 6H), 0.80 (br s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ/ppm 174.9, 171.2, 171.0, 169.3, 156.8, 156.2 (NCH₃), 155.7, 138.0, 136.8, 127.6, 127.2, 99.1, 94.8, 82.2, 78.4, 78.1, 77.8, 71.9, 71.6, 70.5, 66.3, 64.8, 64.5, 62.5, 62.4, 61.5, 55.1, 50.1, 48.8 (OCH₃), 43.9, 41.3, 38.7, 35.0, 34.4, 29.2, 25.9, 20.7, 19.2, 17.4, 13.7, 13.6, 13.0, 11.2, 9.3

UPLC/MS: MS(ESI+) *m/z*: 1214.6

Sinteza 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-fluor-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (6)

U viali od 8 mL spoj **5** (20 mg, 0.0179 mmol, 1 eq) je otopljen u 1 mL DCM-a. Reakcija je ohlađena do -10°C, miješana je pod argonom te je kap po kap dodan reagens DAST (0.004 mL, 0.03 mmol, 1.7 eq). Reakcija je sljedećih 10 min miješana na -10°C i nakon toga je preko noći ostavljena da se miješa na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je UPLC-om i TLC-om te je analizom utvrđeno kako nije došlo do nastanka željenog spoja.

Sinteza 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-oksalooksi-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (7)

Metoda A: U viali od 8 mL spoj **5** (20 mg, 0.0165 mmol, 1 eq) je otopljen u smjesi THF/H₂O. Na to je dodana prethodno pripremljena 1M otopina litijeva hidroksida monohidrata (0.0495 mL, 0.0495 mmol, 3 eq). Reakcija je prvih desetak minuta miješana na sobnoj temperaturi, a

zatim je zagrijavana na 60 °C te je ostavljena preko noći. Tijek reakcije praćen je UPLC-om te je ustanovljeno da nije došlo do nastanka željenog produkta.

Metoda B: U viali od 8 mL spoj **5** (30 mg, 0.0265 mmol, 1 eq) je otopljen je u 246 µL tetrahidrofurana. U reakcijsku smjesu dodaje se kap po kap 1 M otopine cezijevog hidroksida (615 µL, 0.615 mmol, 5 eq). Reakcijska smjesa intenzivno se miješa 10 minuta. Uočen je nastanak bijelog taloga te je napravljena provjera pomoću UPLC-a i TLC-a. Reakcija je 48 h miješana na sobnoj temperaturi, no daljnjom analizom nije uočeno nastajanje željenog produkta.

Metoda C: U tikvicu od 25 mL odvagan je spoj **5** (192 mg, 0.158 mmol, 1 eq) i otopljen u 4 mL tetrahidrofurana, 1 mL vode i 1 mL metanola. Zatim je dodan NaHCO₃ (132.73 mg, 1.58 mmol, 10 eq) i reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 3 h. Tijek reakcije praćen je UPLC-om i TLC-om. Po završetku reakcije, u reakcijsku smjesu dodano je 5%-tne otopine NaHCO₃ te je smjesa razrijeđena s vodom i ekstrahirana s cikloheksanom. Vodeni sloj je ispran s diklormetanom. Organski sloj je odvojen i uparen pod sniženim tlakom te je dobivena praškasta smjesa bijele boje. Provedeno je pročišćavanje kolonskom kromatografijom na normalnoj fazi u sustavu DCM:EtOH:HCOOH=90:5:0,5. Određene frakcije su uparene te je dobiven bijeli praškasti produkt **6** (26 mg; 23.86 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ/ppm 7.29 - 7.39 (m, 10H), 5.10 - 5.18 (m, 1H), 5.08 - 5.11 (m, 2H), 5.01 - 5.07 (m, 1H), 4.84 - 4.90 (m, 1H), 4.68 (br s, 2H), 4.57 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.53 (br d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.30 - 4.39 (m, 1H), 4.17 (td, *J* = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 4.10 - 4.14 (m, 1H), 4.02 - 4.09 (m, 1H), 3.90 (ddd, *J* = 6.1, 3.5, 1.0 Hz, 1H), 3.50 (br d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.74 - 2.79 (m, 1H), 2.69 (br s, 3H), 2.36 (br d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (br d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.83 - 1.87 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.73 (br s, 2H), 1.69 (br dd, *J* = 6.7, 1.2 Hz, 2H), 1.65 (br d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 1.52 - 1.57 (m, 1H), 1.16 (br d, *J* = 6.1 Hz, 4H), 1.12 - 1.14 (m, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.03 (br d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.01 (br d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.90 (br d, *J* = 0.9 Hz, 6H), 0.80 (br s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz) δ/ppm 178.5, 171.5, 169.65, 156.0 (NCH₃), 136.8, 128.4, 127.7, 98.6, 95.1, 87.6, 77.7, 75.4, 73.7, 70.5, 67.4, 66.5, 66.1, 62.6, 52.7, 48.4 (OCH₃), 43.9, 40.7, 40.0, 35.0, 34.7, 29.6, 28.2, 24.6, 20.8, 20.7, 20.5, 20.4, 20.3, 19.8, 17.1, 15.4, 13.5, 11.3, 9.4

UPLC/MS: MS(ESI+) *m/z*: 1186.57

Čistoća, HPLC/MS-UV: 92.64 %

Sinteza 11,2',4''-O-triacetil-9a,3'-N,N-demetil-12-O-(2-etoksi-2-okso-acetil)- 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (8)

Metoda A: U okruglu trogrlu tikvicu od 25 mL stavi se spoj **5** (50 mg, 0.0412 mmol, 1 eq) te se doda 1 mL metanola. Tikvica se propuše dušikom i zatvori septom na koju se stavi igla spojena na balon koji služi za skupljanje vodika koji se generira tokom provođenja reakcije. Doda se 10 mg 5%-tnog paladija na ugljiku kao katalizatora. Nakon toga, natrij borhidrid (3.12 mg, 0.0824 mmol, 2 eq) stavi se u reakcijsku smjesu i reakcija se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Tijek reakcije praćen je UPLC-om i TLC-om te je analizama utvrđeno kako nije došlo do nastanka željenog spoja.

Metoda B: Početni spoj **5** (300 mg, 0.2468 mmol, 1 eq) otopljen je u 40 mL izopropanola. Prije dodavanja katalizatora, bocu s reakcijskom smjesom je potrebno propuhati s dušikom. Nakon toga, u smjesu je dodan 5 %-tni paladij na ugljiku te je smjesa postavljena na miješanje u atmosferi vodika u Paar-ov uređaj. Hidriranje se odvija preko noći pod tlakom od 3 bar-a. Tijek reakcije praćen je UPLC-om i TLC-om. Reakcijska smjesa profiltrirana je preko dijatomejske zemlje kako bi se uklonio Pd, a nakon toga otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Provedeno je pročišćavanje kolonskom kromatografijom na SP koloni od 5 g u sustavu DCM:EtOH:NH₄OH = 95:5:0,5. Provjerom frakcija na TLC-u, određene frakcije su uparene te je dobiven bijeli praškasti produkt. Uočavanjem prljavog profila izolirane smjese provedeno je još jedno pročišćavanje kolonskom kromatografijom na C18 koloni reverzne faze u sustavu acetonitril i voda + 4 mL amonijaka. Određene frakcije su spojene te se provodi liofilizacija kako bi se uzorak osušio. Dobiven je bijeli praškasti talog (12 mg; 5.15 %), no analizom je utvrđeno kako nije izoliran dovoljno čist željeni spoj, već smjesa spojeva.

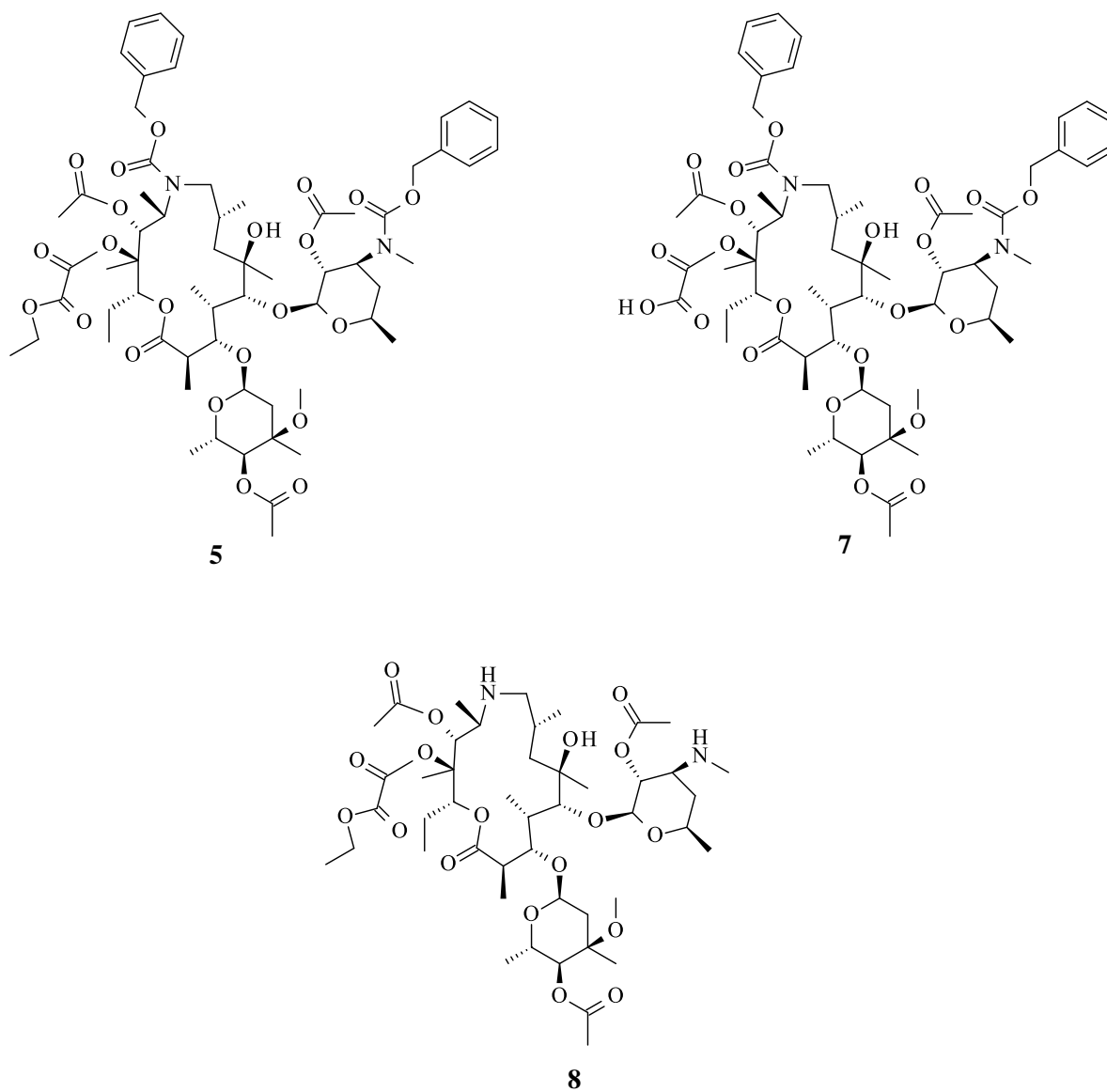
Sinteza 9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-12-O-(2-etoksi-2-okso-acetil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (9)

U okruglu tikvicu od 100 mL stavi se spoj **5** (145 mg, 0.119 mmol, 1 eq) i otopi se u 4 mL metanola. Reakcijska smjesa kuha se preko noći na temperaturi refluksa, 60 °C. Nakon određenog vremena, u reakciju je dodan 30 mL etanola te je reakcija stavljena na kuhanje na temperaturi od 90 °C. Tijek reakcije praćen je UPLC-om i TLC-om. Reakcija se, na navedenoj temperaturi, kuhala otprilike tjedan dana, no analizama je utvrđeno kako nisu postignuti željeni rezultati.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Cilj rada

Zadatak ovog rada bila je priprava novih azalidnih derivata, kiselinskog spoja **7** i esterskog derivata **5**, na uvećanoj skali koji će poslužiti kao prekursori za pripravu novih potencijalno aktivnih derivata azalida. Strukture spojeva **5**, **7** i **8** prikazane su na Slici 1. Prilikom priprave pojedinih prekursora korištene su klasične organske sintetske metode. Priređeni spojevi su okarakterizirani $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopijom.

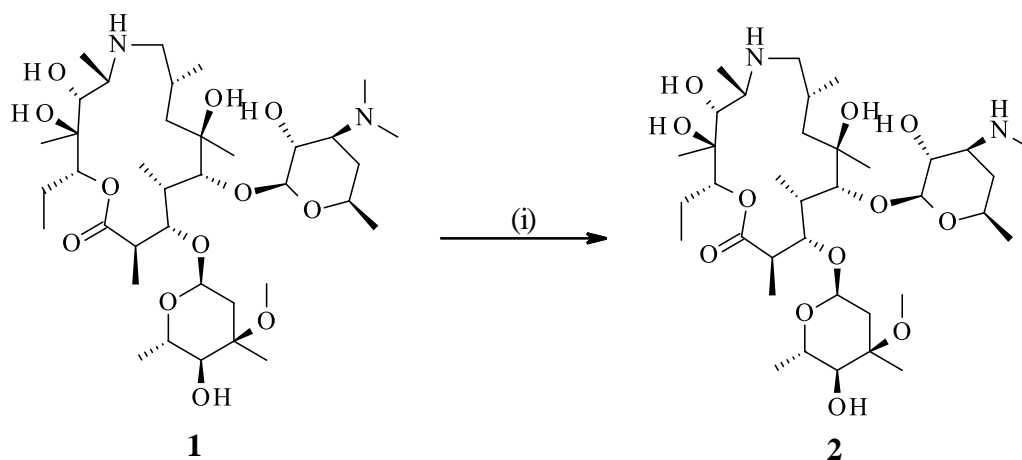


Slika 1. Prikaz struktura sintetiziranih spojeva derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A

4.2. Sinteza spojeva

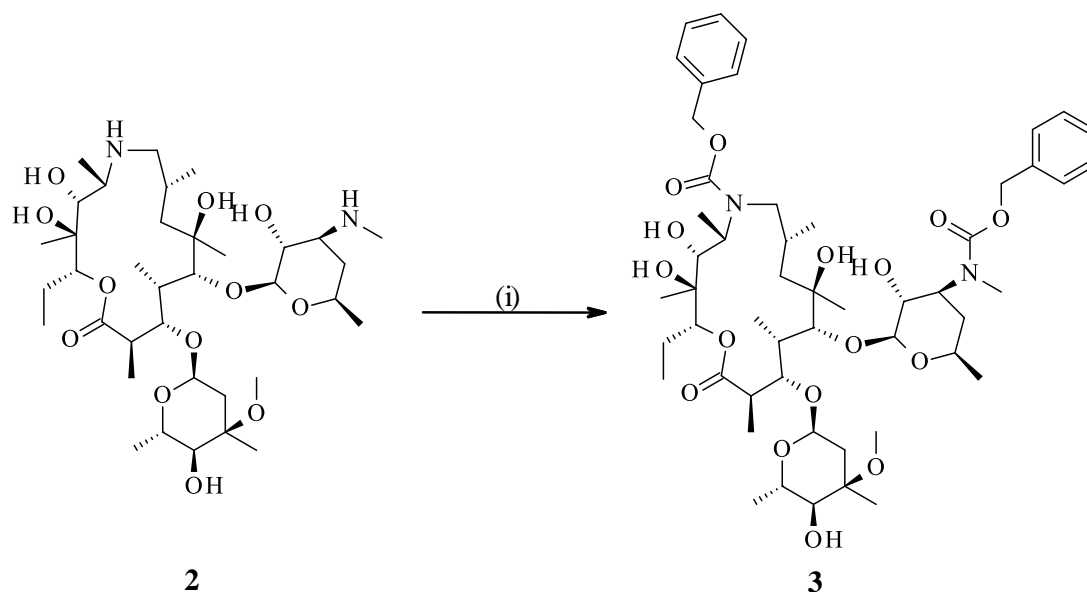
Priprava novih derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**5**, **7** i **8**), kao ciljnih molekula u okviru ovog rada, provedena je višestupnjevitom sintezom koja uključuje demetiliranje 3'- dušikovog atoma, postavljanje benziloksikarbonilnih zaštitnih skupina na 9a- i 3'- dušikove atome, acetilnih zaštitnih skupina na 11-, 2'-, i 4"- OH skupine te uvođenje 2-etoksi-2-okso-acetilnog supstituenta na položaju 12-OH, preostalom reaktivnom tercijarnom alkoholu. Uvođenje supstituenata na položaju 6 je gotovo nemoguće s obzirom na steričku ometanost tog položaja. Na kraju, nakon formiranja esterskog derivata, slijedila je njegova hidroliza te uklanjanje benziloksikarbonilnih zaštitnih skupina. Svi sintetski koraci ponavljani su više puta postupno povećavajući skalu.

U prvom stupnju sintetskog puta, reakcijom demetiliranja 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**1**) uz TRIS i jod pripremljen je spoj **2**, 3'-N-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A kao što je prikazano na Shemi 1. TRIS ima ulogu proton akceptora u reakciji te uklanja metil s molekule 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**1**), a jod je katalizator, odnosno snažno redukcijsko sredstvo. Pročišćavanje spoja provedeno je u dva pokušaja na dva različita načina. Prvi puta kolonskom kromatografijom na normalnoj fazi, a drugi puta preparativnom kolonskom kromatografijom na reverznoj fazi. U oba pokušaja, pri izoliranju željenog pika na kromatogramu, nakon pročišćavanja i sušenja uzorka analizom je utvrđeno postojanje dva pika na UPLC kromatogramu na različitim retencijama, ali iste raspodjele masa te se pretpostavlja da je djelomično došlo do epimerizacije spoja.



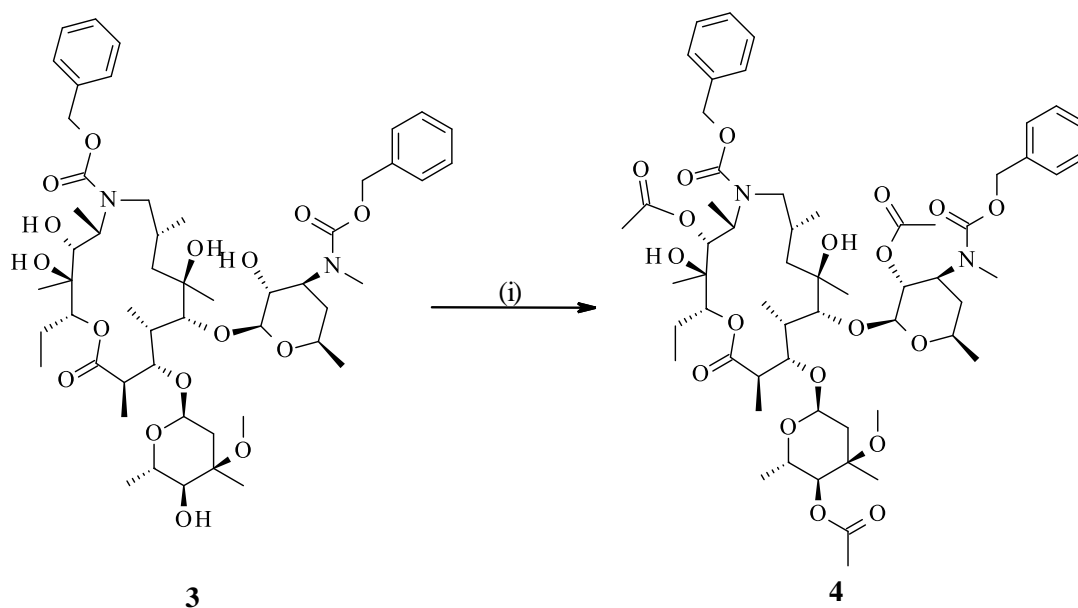
Shema 1. Sinteza 3'-N-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**2**). *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) TRIS, I₂, MeOH, refluks, 5 h

U drugom stupnju, reakcijom benzil kloroformata s prethodno demetiliranim derivatom **2** u THF-u i vodi kao otapalu, uz Na_2CO_3 kao bazu, dobiven je 9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**3**) (Shema 2). Dodatak vode u ovoj reakciji sprječava nastajanje estera. Prisutne slobodne hidroksilne skupine u tom slučaju reagiraju s vodom. Na taj način omogućeno je vezanje benzil kloroformata na slobodne dušikove atome. Natrijev karbonat koristi se za neutralizaciju generiranog HCl-a prilikom odlaska klora s molekule benzil kloroformata.



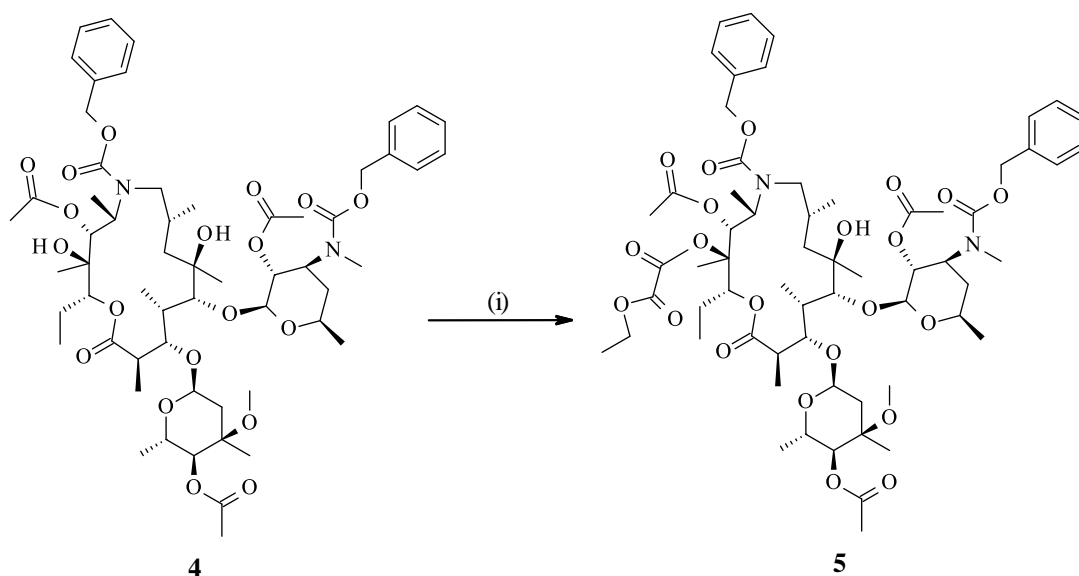
Shema 2. Sinteza 9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**3**). Reagensi i reakcijski uvjeti: (i) benzil kloroformat, Na_2CO_3 , THF/ H_2O , s. t., 24 h

U trećem stupnju, reakcijom 9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**3**) s acetanhidridom u piridinu priređen je tercijarni alkohol, spoj **4**, 11,2',4''-O-triacetil-9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (Shema 3). Riječ je o reakciji Fischerove esterifikacije jer hidroksilne skupine na položajima 11, 2' i 4'' reagiraju s acetanhidridom formirajući estersku vezu. Piridin u ovoj reakciji služi kao otapalo i kao baza koja je proton akceptor. U ovoj reakciji nema nastajanja vode prilikom kondenzacije reaktanata što je prednost jer ne postoji mogućnost istovremene reakcije hidrolize. S obzirom da je riječ o uvođenju tri acetilne skupine, kao zaštitne skupine, reakcija se odvijala postepeno uz grijanje kroz 96 sati dok analize nisu pokazale postojanje samo jednog željenog produkta.



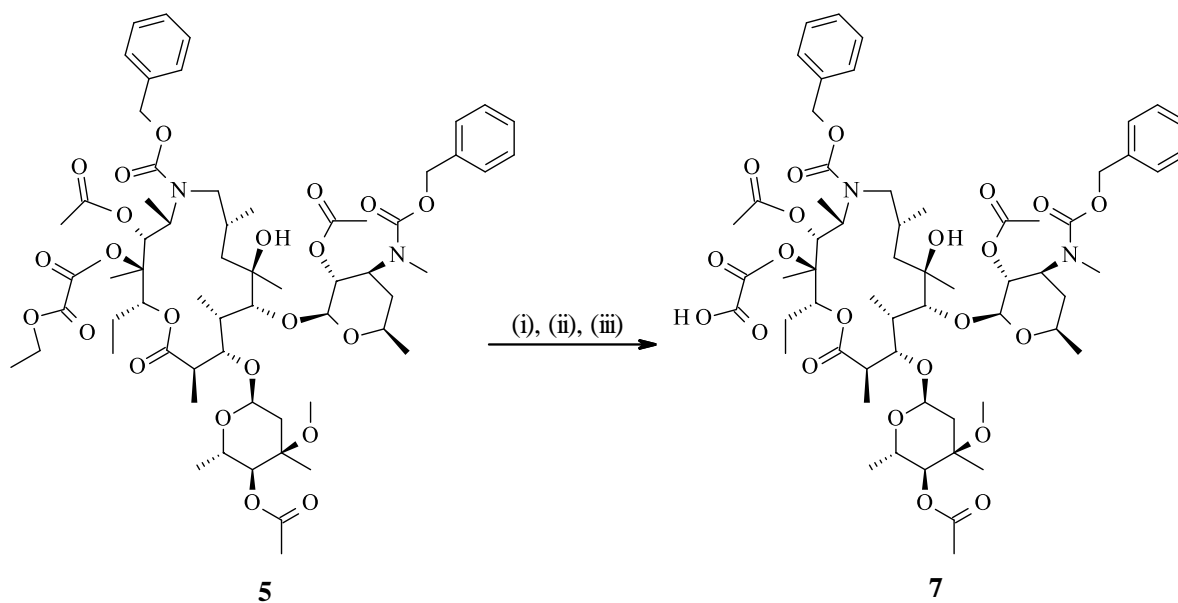
Shema 3. Sinteza 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**4**). *Reagensi i reakcijski uvjeti: (i) acetanhidrid, piridin, 60°C, 96 h*

U četvrtom stupnju, spoj **4** reagira s etil kloroksoacetatom čime je pripremljen 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**5**) (Shema 4). Provedena reakcija također predstavlja reakciju esterifikacije u kojoj reagiraju alkohol i kiselinski klorid. Trietilamin je u reakcijsku smjesu potrebno dodati prije reagensa i služi kao baza koja neutralizira nastajanje HCl-a, pri dokapavanju kiselinskog klorida, koji bi mogao naštetiti reakcijskoj smjesi. Pilikom dodavanja etil kloroksoacetata dolazi do stvaranja magle u tikvici i zbog toga je reakcijsku smjesu potrebno ohladiti na 0°C kako bi se spomenuta promjena smanjila. DMAP se koristi kao hipernukleofilni acilirajući katalizator. Reakcija je provedena bez poteškoća i kroz jedan dan što je puno brže u odnosu na reakciju u prethodnom stupnju, a odvijala se na sobnoj temperaturi.



Shema 4. Sinteza 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**5**). *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) ClCOCOOEt, DMAP, Et₃N, (CH₂)₂Cl₂, s. t., 24 h

Nadalje, slijedi hidroliza esterskog derivata **5** dobivenog u prethodnom stupnju. Prvi pokušaj hidrolize proveden je prema metodi A reakcijom s LiOH u smjesi otapala THF/H₂O. Provedbom analize utvrđeno je kako reakcija ide u neželjenom smjeru. Naime, UPLC metodom s masenim detektorom pokazalo se da dolazi do eliminacije acetilnih supstituenata, a pri tom nema nastanka kiseline. Moglo bi se zaključiti da je LiOH nepovoljna baza za hidrolizu tog estera. Zatim se kao reagens za hidroliziranje koristio CsOH kao jača baza. Reakcija je rezultirala nastankom bijelog taloga, no daljnje analize su pokazale da nije nastao željeni produkt i uočen je prljavi profil reakcije. Kao treći pokušaj, u tikvicu sa spojem **5** otopljenim u smjesi otapala THF/H₂O/MeOH, dodan je NaHCO₃ te je dobiveni profil reakcije ukazao na nastajanje željenog spoja **7**. Uz opisan postupak obrade ove reakcije u eksperimentalnom dijelu rada provodilo se još i zakiseljavanje odvojenog vodenog sloja s octenom kiselinom do pH=4. Međutim, kiselina pri tome nije orešla u vodeni sloj kao što je očekivano, već je zaostala u diklometanu. Sažeti rezultati prikazani su niže u Tablici 1.



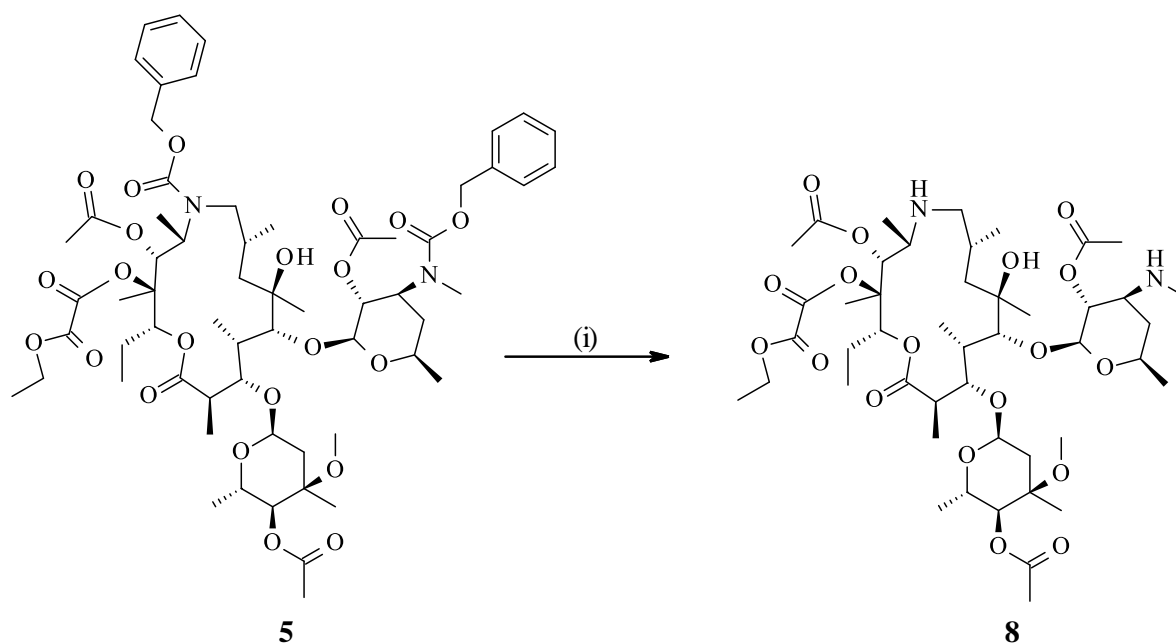
Shema 5. Sinteza 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-oksalooksio-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**7**). *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) 1 M LiOH, THF/H₂O, s. t.; (ii) 1 M CsOH, THF, s. t.; (iii) NaHCO₃, THF/H₂O/MeOH, s. t., 3 h

Tablica 1. Prikaz rezultata pojedinih metoda dobivanja kiseline **7**

Metoda	Rezultat
(i)	Nema željenog produkta, eliminacija acetilnih supstituenata
(ii)	Nema reakcije
(iii)	Dobiven je željeni produkt

Također, reakcijom katalitičkog hidrogeniranja 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**5**) u atmosferi vodika pri tlaku od 3 bara pripremljen je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-demetil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**8**) (Shema 6). Uz paladij kao katalizator, dolazi do cijepanja veza dušik–ugljik na položajima 9a- i 3'- čime se uklanjaju obje benziloksikarbonilne zaštitne skupine, a na njihovo se mjesto veže vodik. Pri odvijanju reakcije, analizom je uočen prljavi profil. Po završetku reakcije, provedeno je pročišćavanje kolonskom kromatografijom na normalnoj fazi SP kolone od 5 g silika gela u sustavu DCM:EtOH:NH₄OH = 95:5:0,5 s ciljem izoliranja željenog spoja. Etanol se u sustavu koristio umjesto metanola kako bi se spriječila transesterifikacija, odnosno da etilni ester

prijeđe u metilni. Određene frakcije, koje su pokazivale postojanje željenog spoja, su spojene i otapalo je upareno pod sniženim tlakom, ali je daljnja analiza UPLC-om i TLC-om pokazala kako pročišćavanje nije bilo uspješno. Iz tog razloga, provedeno je daljnje pročišćavanje, ali ovog puta kolonskom kromatografijom na C18 koloni reverzne faze u sustavu acetonitril i voda + 4 mL amonijaka. Prema analizama je utvrđeno postojanje željenog produkta u dobivenoj smjesi, no nije ga bilo moguće izolirati od nusprodukata i nečistoća u smjesi. Za navedeni spoj 7, sinteza se pokušala provesti i drugim načinom katalitičkog hidrogeniranja, ali uz natrij borhidrid kao reagens gdje bi u atmosferi reakcije došlo do generiranja vodika koji je potreban. No, analize tijekom reakcije pokazale su kako u reakcijskoj smjesi nije došlo do promjene te se može zaključiti da natrij borhidrid nije pogodan reagens za ovu vrstu molekula.



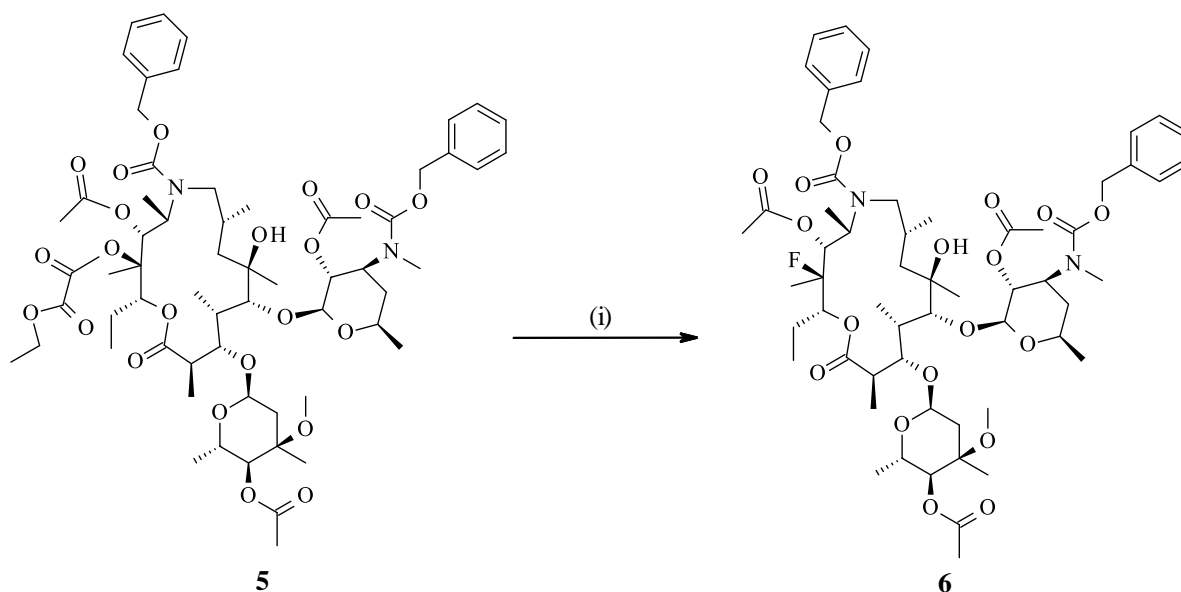
Shema 6. 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-demetil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**8**). *Reagensi i reakcijski uvjeti:* (i) Metoda A: H₂, Pd-C, izopropanol, 3 bar; Metoda B: NaBH₄, Pd-C, MeOH, s.t.

Tablica 2. Prikaz dobivenih rezultata pojedinih metoda uklanjanja benziloksikarbonilnih zaštitnih skupina

Metoda	Rezultat
(i)	Nema reakcije
(ii)	Nastaje željeni produkt, ali uz prljavi reakcijski profil

Jedna od provedenih reakcija bila je i sinteza 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-fluor-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**6**) (Shema 7). Dakle,

cilj reakcije početnog spoja **5** s DAST-om, kao reagensom, bio je uvođenje atoma fluora na položaj 12. Analize su pokazale kako nije nastao željeni produkt te kako ni nakon određenog proteklog vremena nije došlo do reakcije među reaktantima. Moglo bi se zaključiti da DAST nije pogodan reagens, ali i da supstituent 2-etoksi-2-okso-acetil na početnom spoju **5** nije dovoljno reaktivna skupina.

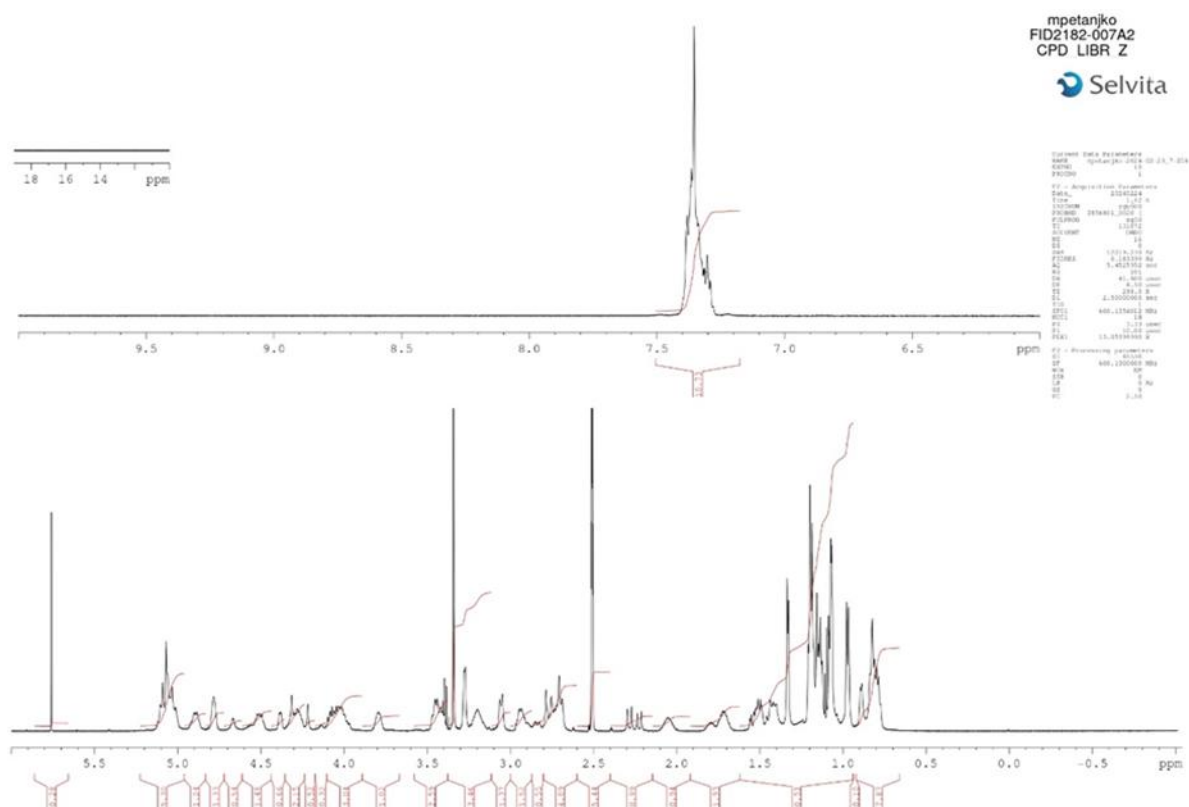


Shema 7. Sinteza fluoriranog derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**6**). *Reagensi i reakcijski uvjeti: (i) DAST, DCM, -10°C, s.t.*

4.3. Strukturna karakterizacija novosintetiziranih spojeva pomoću ^1H - i ^{13}C -NMR spektroskopije

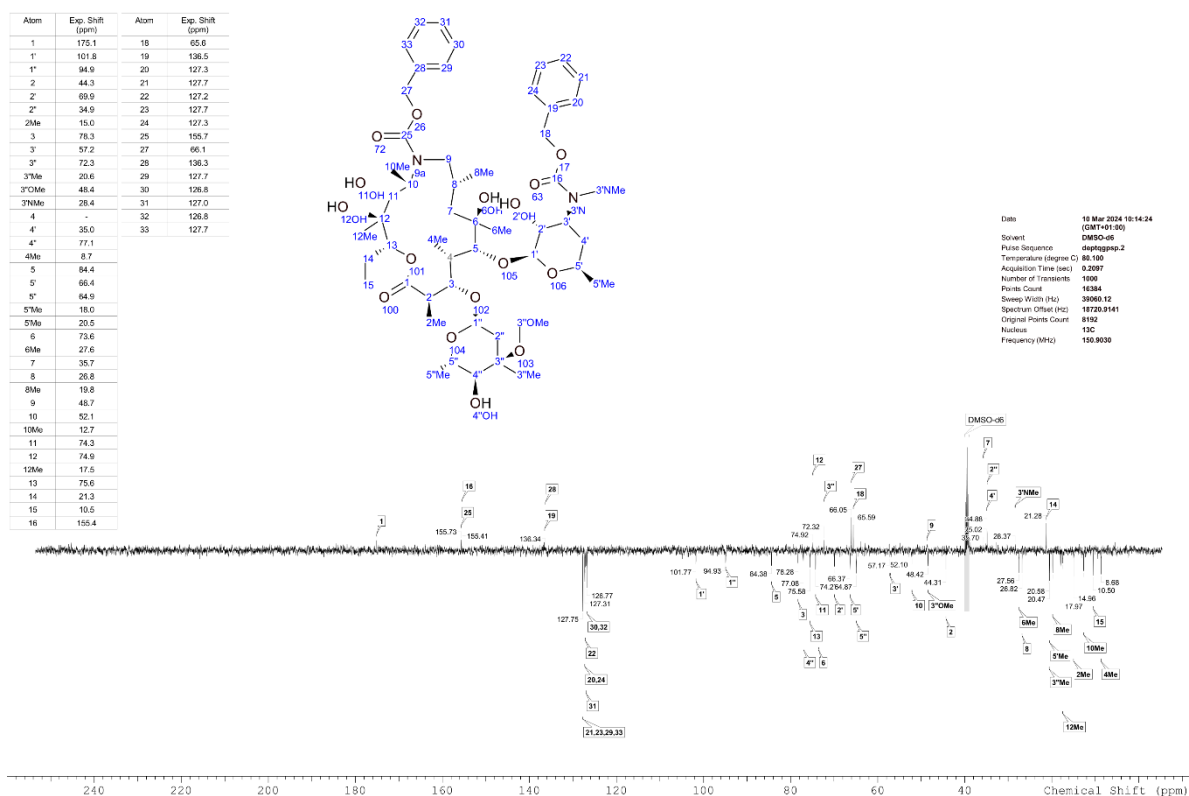
Strukture priređenih spojeva potvrđene su ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom. Asigniranje ^1H -NMR spektara izvršeno je na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala te H-H konstanti sprega.

^1H -NMR spektar spoja 9a,3'-N,N-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**3**) (Slika 1) prikazuje odgovarajući broj signala u alifatskom dijelu spektra za protone makrocikličkog laktonskog prstena i šećernih jedinica. Karakteristični signal za metilne protone vezane na dušik D-desozamina nalazi se na 2.77 ppm dok su signali metilnih protona L-kladinoze na položajima 3" i 5" prisutni redom pri kemijskim pomacima 1.17 ppm, singlet intenziteta 3H, i 1.23 ppm, dublet intenziteta 3H. Također, metilni protoni iz metoksi skupine na 3" nalaze se na 3.26 ppm u obliku singleta intenziteta 3H. U aromatskom dijelu spektra prisutni su signali za aromatske protone benziloksikarbonilne skupine, vezane na dušikove 9a- i 3'- atome, nalaze se u rasponu 7.00–7.50 ppm.



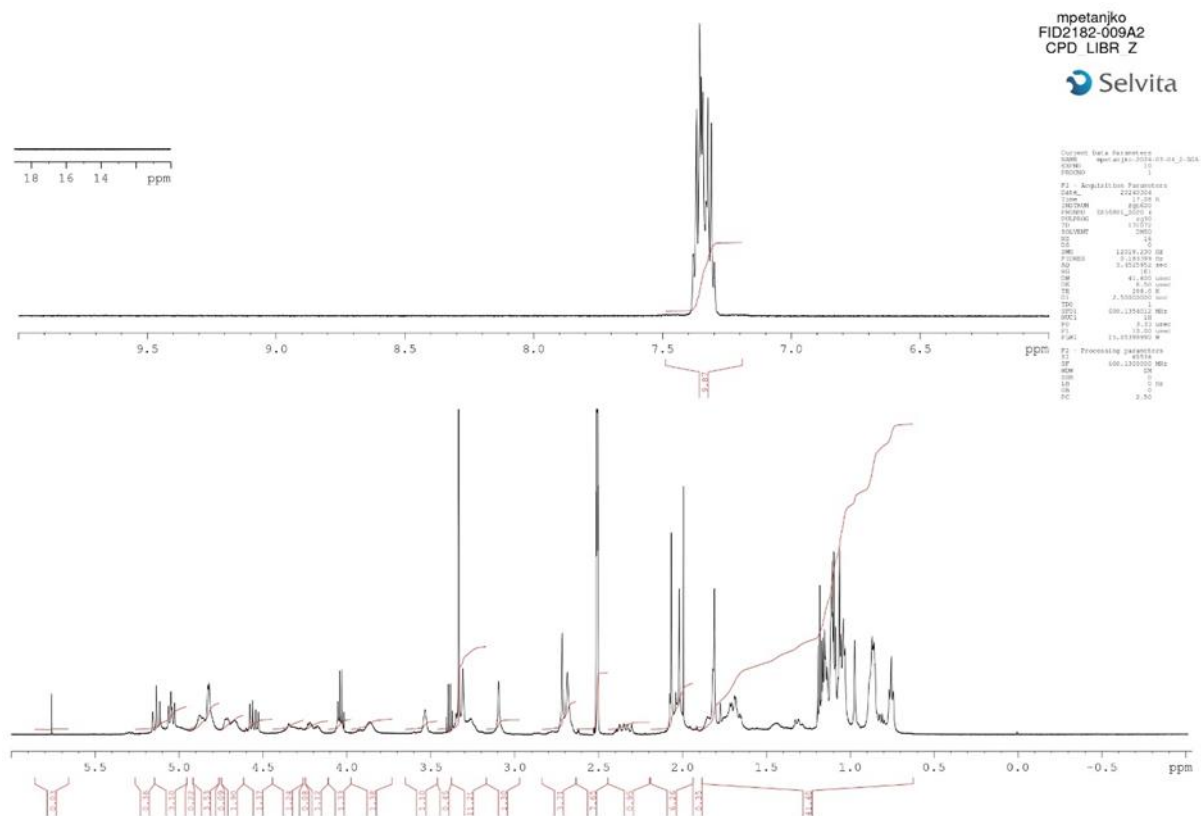
Slika 1. ^1H -NMR spektar spoja **3**

U ^{13}C -NMR spektru spoja **3** (Slika 2) prikazan je određeni broj karakterističnih signala za ugljikove atome makrocikličkog laktonskog prstena i šećernih jedinica. U području kemijskih pomaka 125–128 ppm nalaze se signali aromatskih ugljikovih atoma. Na najvećem pomaku od 175.1 ppm nalazi se signal esterskog karbonilnog (kvaternog) ugljika. Zatim, signali karbonilnih ugljika iz benziloksikarbonilnih skupina nalaze se na 155.4 i 155.7 ppm, a najmanji kemijski pomak na 8.7 ppm pripada signalu ugljikovog atoma metilne skupine vezane na C-4.



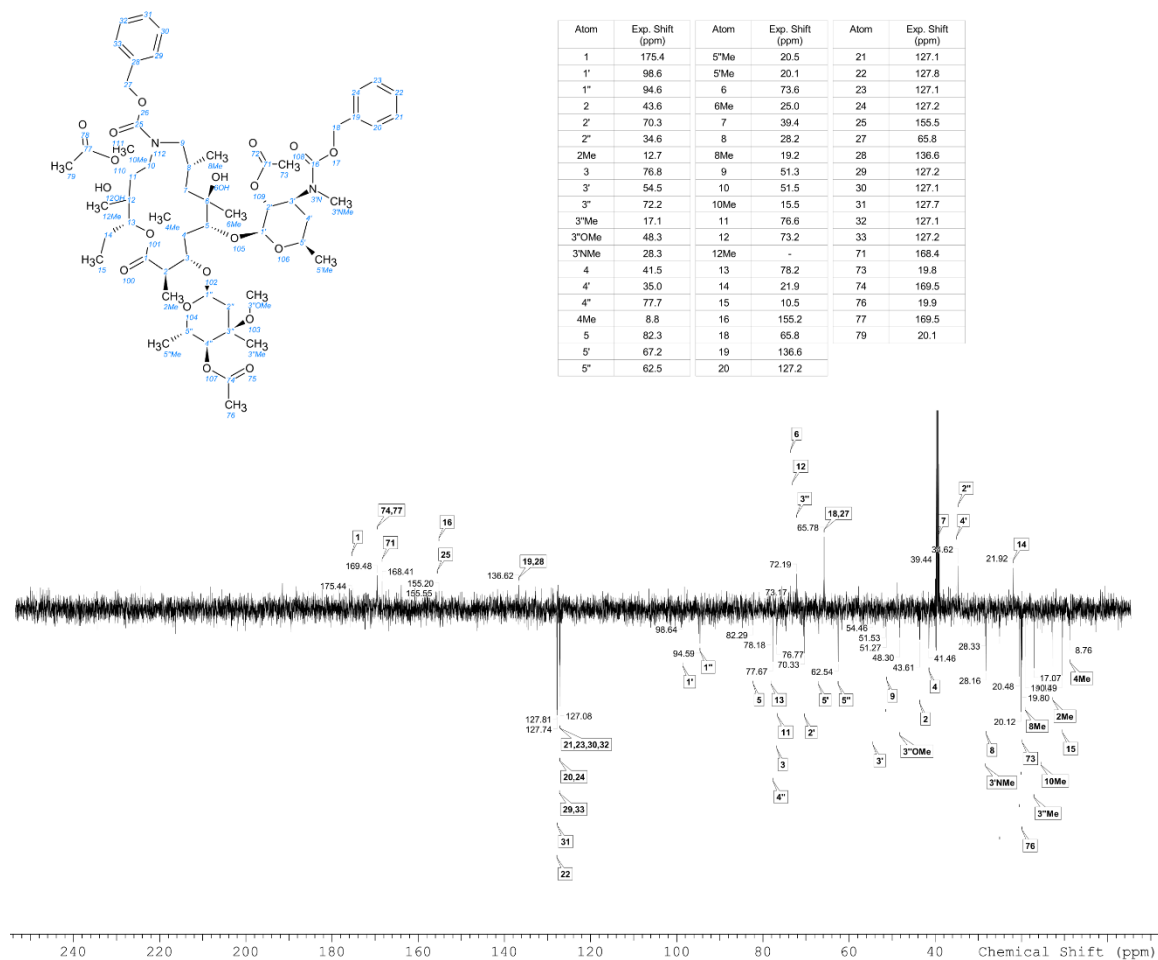
Slika 2. ^{13}C -NMR spektar i spektroskopski podaci spoja **3**

Acetiliranjem spoja **3** dobiven je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**4**) te je u $^1\text{H-NMR}$ (Slika 3) i u $^{13}\text{C-NMR}$ (Slika 4) spektrima uočen veći broj signala što je i očekivano. U $^1\text{H-NMR}$ spektru su vidljiva tri nova signala u alifatskom području za metilne protone uvedenih acetilnih skupina.



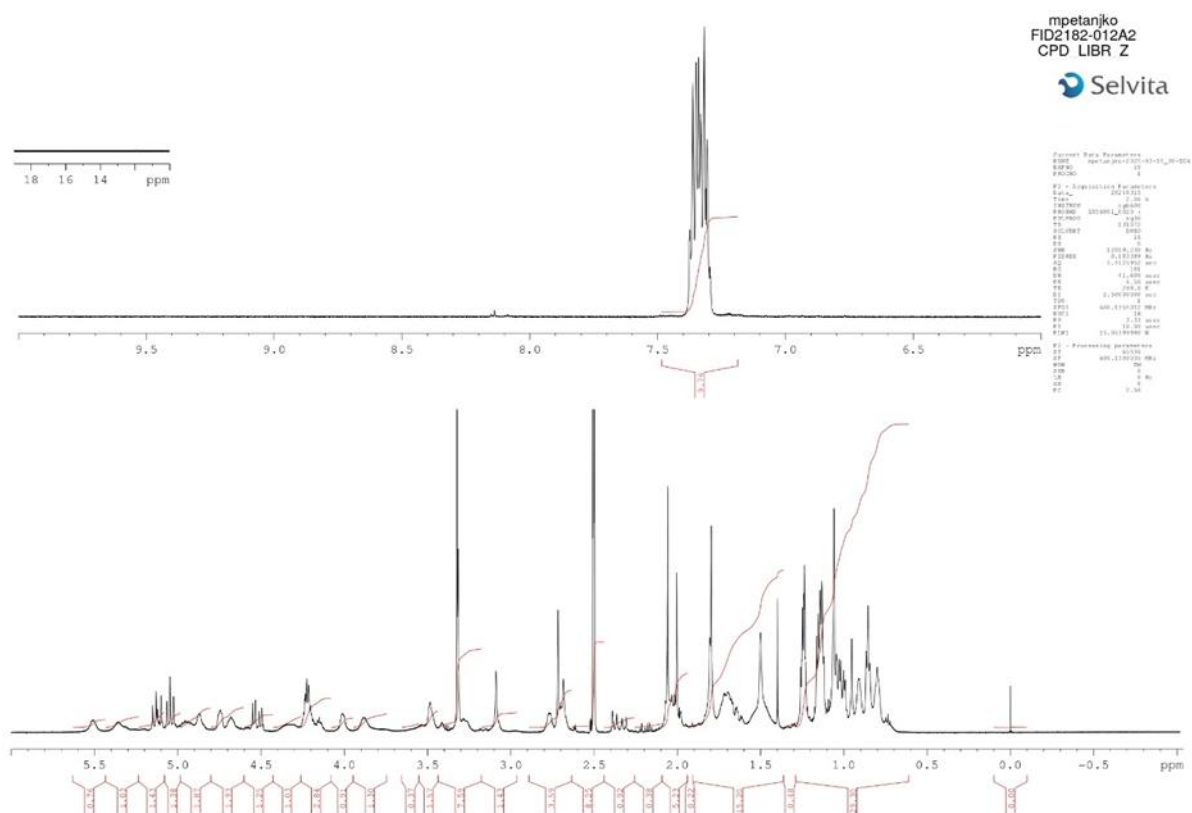
Slika 3. $^1\text{H-NMR}$ spektar spoja **4**

U ^{13}C -NMR spektru su također viđena tri nova signala u alifatskom području za ugljike metilnih skupina. S obzirom na tri novouvedene acetilne skupine, vidljivi su i signali kvaternih karbonilnih ugljika na 168.4 ppm i 169.5 ppm pod koji spadaju ugljici karbonilnih skupina vezanih na 11- i 2'-.



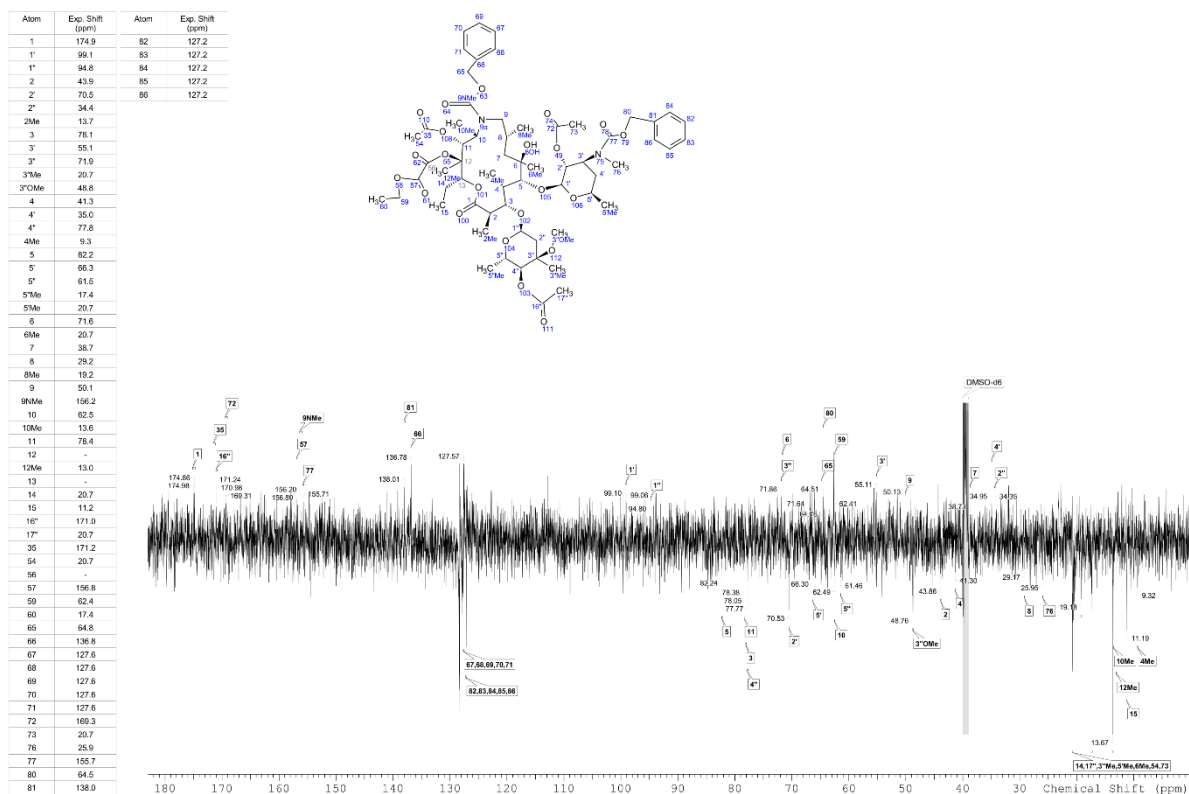
Slika 4. ^{13}C -NMR spektar i spektroskopski podaci spoja 4

Uvođenjem etil-oksoacetata na položaj 12-OH dobiven je važan intermedijer (**5**) za daljnje reakcije s obzirom da su zaštićeni svi reaktivni položaji na molekuli. ¹H-NMR spektar sličan je spektru spoja **4**, a razlika je u tome što spektar spoja **5** sadrži dodatne signale, točnije signale za etilnu skupinu vezanu na kisikov atom. Signal za CH₃ iz etila nalazi se na pomaku od 1.05 ppm dok se signal za CH₂ nalazi na 4.22 ppm, a razlog većeg pomaka je blizina kisikovog atoma.



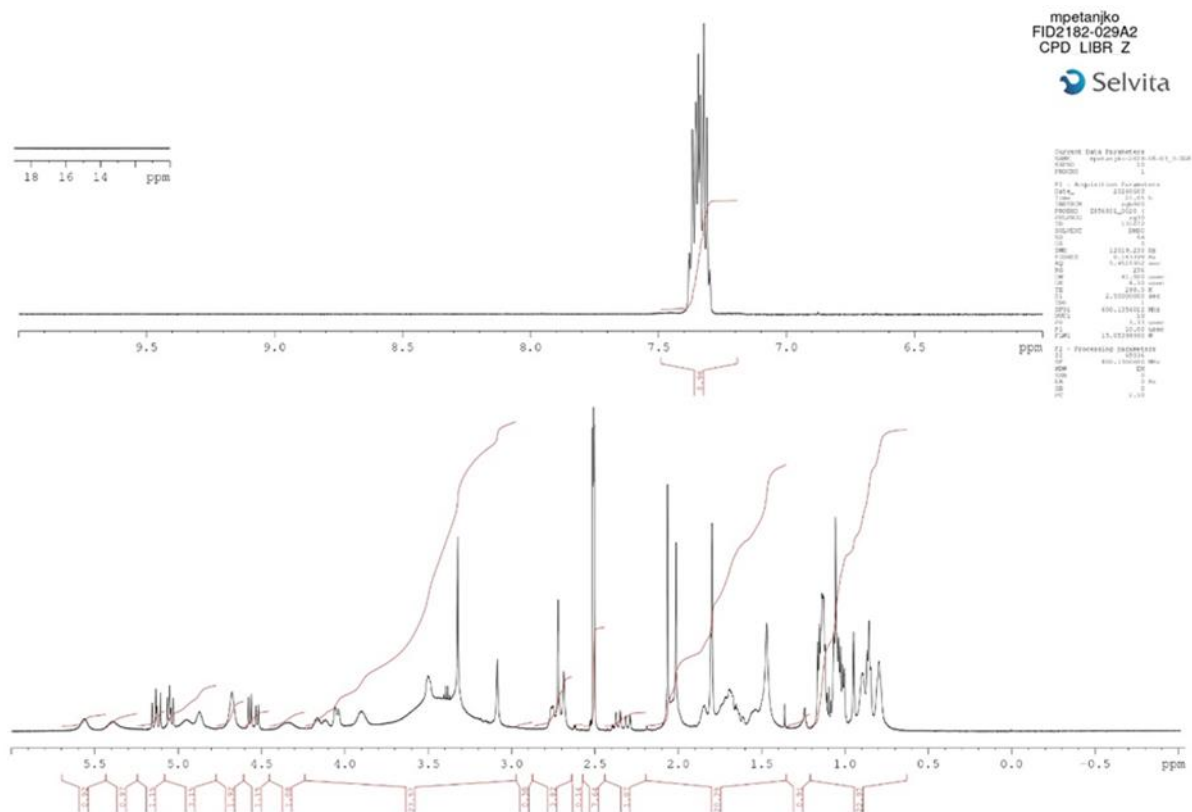
Slika 5. ¹H-NMR spektar spoja **5**

^{13}C -NMR spektar prikazuje dva nova signala za karbonilne skupine čiji je pomak otprilike na 156 ppm. Signali ugljikovih atoma iz etilne skupine smješteni su na nižim vrijednostima pomaka što je karakteristično za alifatske ugljike.



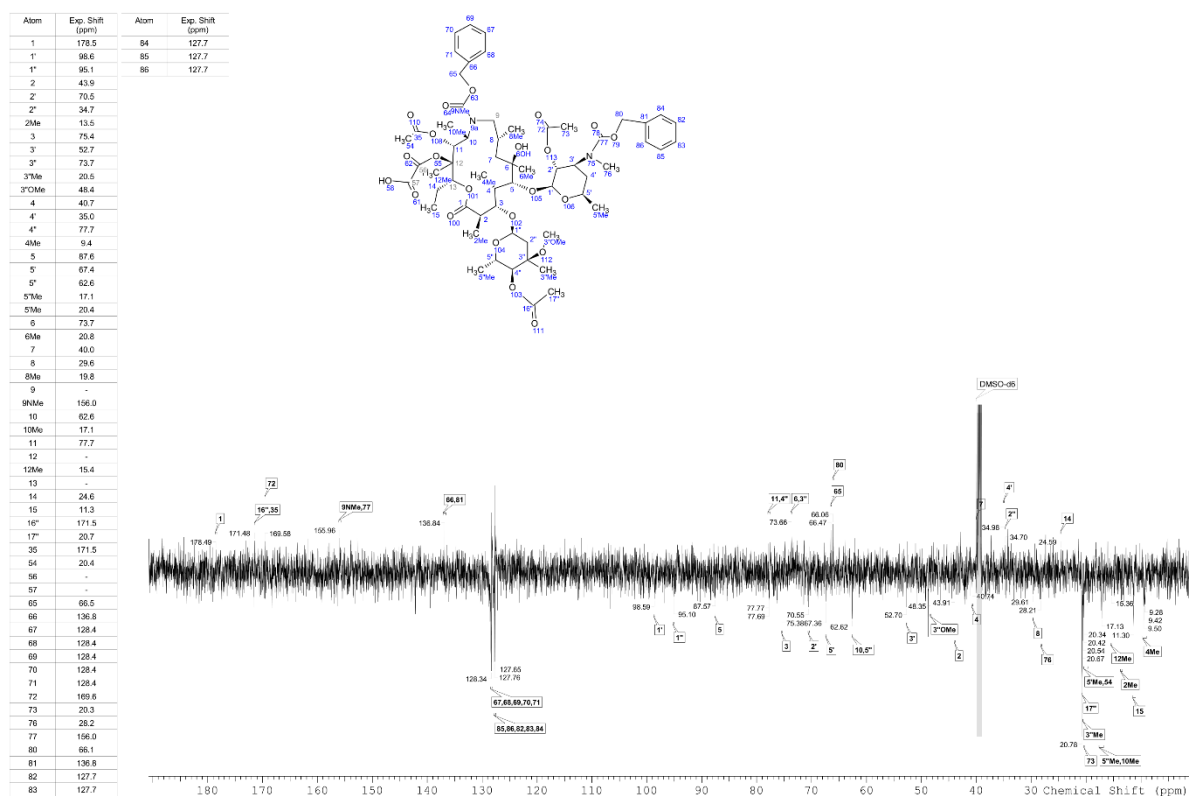
Slika 6. ^{13}C -NMR spektar spoja 5

$^1\text{H-NMR}$ spektar spoja **7** trebao bi pokazati signal za kiselinsku OH skupinu u području 10-12 ppm, no na prikazanoj slici nije vidljiv što je često slučaj za OH skupinu. Razlika u odnosu na spektar spoja **5** je izostanak protona iz etilne skupine esterskog supstituenta na položaju 12 iz čega se može zaključiti da je željeni spoj dobiven.



Slika 7. $^1\text{H-NMR}$ spektar spoja **7**

U ^{13}C -NMR spektru jedina razlika u odnosu na spektar spoja **5** je 2 signala manje za ugljikove atome iz etilne skupine koji se gube s obzirom na reakciju hidrolize. Signalu za ugljikov atom iz karboksilne skupine nije određen pomak te se pretpostavlja da nije vidljiv, no prema pravilima očekivalo bi se da je na manjem pomaku od karbonilnog esterskog ugljika.



Slika 8. ^{13}C -NMR spektar spoja **7**

5. ZAKLJUČAK

- Reakcijom uvođenja benziloksikarbonilne skupine kao zaštitne skupine na dušikove atome onemogućena je njihova reaktivnost te je dobiven 9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**3**).
- Reakcijom acetiliranja, OH skupine na položajima 11-, 2'- i 4''- 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A su zaštićene i tako je sintetiziran 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**4**).
- Fischerovom esterifikacijom 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**4**) pripremljen je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**5**).
- Reakcijom hidrolize 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-(2-etoksi-2-okso-acetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**5**) s NaHCO₃ dobiven je 11,2',4''-*O*-triacetil-9a,3'-*N,N*-dibenziloksikarbonil-12-*O*-oksalooksil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**7**), prekursor za pripremu potencijalno aktivnih bioloških derivata azalida.
- Strukturna karakterizacija priređenih spojeva potvrđena je ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektroskopijom.

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

AGP – engl. *α -1-acid glycoprotein*

CDI – *N,N*-karbonildiimidazol

DAST – dietilaminosumpor trifluorid

DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en

DCC – dicikloheksil-karbodiimid

DCM – diklormetan

DEAD – dietilazodikarboksilat

DIAD – diizopropilazodikarboksilat

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DMA – dimetilacetamid

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

EtOAc – etil-acetat

HAS – engl. *Human Serum Albumin*

HOBt – hidroksibenzotriazol

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

IC₅₀ – pola maksimalne inhibicijske koncentracije

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LD₅₀ – letalna doza koja ubija 50% ispitivane populacije

MeOH – metanol

MIC – minimalna inhibicijska koncentracija

MNBA – 2-metil-6-nitrobenzojev anhidrid

mRNA – glasnička (engl. *messenger*) ribonukleinska kiselina

MS – masena spektroskopija

NF- κ B – nuklearni factor kapa-lakih-lanaca-pojačivač aktiviranih B stanica

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

PPY – 4-pirolidinopiridin

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

TEA – trietilamin

THF – tetrahidrofuran

TLC – tankoslojna kromatografija

TMS – tetrametilsilan

TNF- α – faktor tumorske nekroze

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

UPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

UV – ultraljubičasto zračenje

7. LITERATURA

1. Bosnar, M., Kragol, G., Koštrun, S., Vujasinović, I., Bošnjak, B., Bencetić Mihaljević, V., Marušić Ištuk, Z., Kapić, S., Hrvaić, B., Brajša, K., Tavčar, B., Jelić, D., Glojnarić, I., Verbanac, D., Čulić, O., Padovan, J., Alihodžić, S., Eraković Haber, V., Spaventi, R., N'-Substituted-2'-O,3'-N-carbonimidoyl Bridged Macrolides: Novel Anti-inflammatory Macrolides without Antimicrobial Activity, *J. Med. Chem.*, **55**, 13 (2012) 6111–6123.
2. Schönfeld, W., Mutak, S., Azithromycin and novel azalides, *Macrolide Antibiotics*, 2002., str. 73.–74.
3. Wade, L. G. ml, *Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb*, 2017, str. 960.
4. Čipčić Paljetak, H., Tomašković, L., Matijašić, M., Bukvić, M., Fajdetić, A., Verbanac, D., Perić, M., Macrolide Hybrid Compounds: Drug Discovery Opportunities in Anti- Infective and Anti-inflammatory Area, *Curr. Top. Med. Chem.* **17**(8), (2017) 919–940.
5. Liang, J-H., Han, X., Structure-Activity Relationships and Mechanism of Action of Macrolides Derived from Erythromycin as Antibacterial Agents, *Curr. Top. Med. Chem.* **13** (2013) 3131–3164.
6. Zuckerman, J. M., Qamar, F., Bono, B. R., Macrolides, ketolides, and glycylicyclines: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, tigecycline, *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **23**(4) (2009) 997–1026.
7. Mutak, S., Azalides from Azithromycin to New Azalide Derivatives, *J. Antibiot.* **60**(2) (2007) 85–122.
8. Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., How Macrolide Antibiotics Work, *Trends in Biochemical Sciences*, **43**(9) (2018) 668–684.
9. Jelić, D., Antolović, R., From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials, *Antibiotics* **5**(3) (2016) 29.
10. Stepanić, V., Žiher, D., Gabelica-Marković, V., Jelić, D., Nunhuck, S., Valko, K., Koštrun, S., Physicochemical profile of macrolides and their comparison with small molecules, *Eur. J. Med. Chem.* **47** (2012) 462–472.
11. Banić Tomišić, Z., Priča o azitromicinu, *Kem. Ind.* **60** (12) (2011) 603–617.
12. Djokić, S., Kobrehel, G., Lazarevski, G., Lopotar, N., Tamburašev, Z., Kamenar, B., Nagl, A., Vicković, I., Erythromycin series. Part 11. Ring expansion of erythromycin A oxime by the Beckmann rearrangement, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** (1986) 1881–1890.

13. Alihodžić, S., Fajdetić, A., Kobrehel, G., Lazarevski, G., Mutak, S., Pavlović, D., Štimac, V., Čipčić, H., Kramarić, M.D., Eraković, V., Hasenöhr, A., Maršić, N., Schoenfeld, W., Synthesis and antibacterial activity of isomeric 15-membered azalides, *J. Antibiot.* **59**(12) (2006) 753–769.
14. Đokic, S., Kobrehel, G., Lopotar, N., Kamenar, B., Nagl, A., Mrvos, D., Erythromycin series. Part 13. Synthesis and structure elucidation of 10-dihydro-10-deoxy-11-methyl-11-azaerythromycin A, *J Chem Research (S)* (1988) 152–153.
15. Yang, B.V., Goldsmith, M., Rizzi, A., A novel product from Beckmann rearrangement of erythromycin A 9(E) oxime, *Tetrahedron Lett* **55** (1994) 3025–3028.
16. Fattori, R., Pelacini, F., Romagnano, S., Fronza, G., Rallo, R., Unusual isoxaline formation by intramolecular cyclization of (9E)-erythromycin oxime, *J Antibiot* **49** (1996) 938–940.
17. Paul, D., Chawla, M., Ahrodia, T., Narendrakumar, L., Das, B., Antibiotic Potentiation as a Promising Strategy to Combat Macrolide Resistance in Bacterial Pathogens, *Antibiotics* **12** (2023) 1715.
18. Amacher, D.E., Schomaker, S.J., Retsema, J.A., Comparison of the effects of the new azalide antibiotic, azithromycin, and erythromycin estolate on rat liver cytochrome P-450 *Antimicrob. Agents. Chemother.* **35**(6) (1991) 1186–1190.
19. Labro, M.T., Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential?, *J. Antimicrob. Chemother.* **41** (1998) 37–46.
20. Bright, G.M., Antibacterial N-methyl 11-aza-10-deoxy-10-dihydro-erythromycin A and pharmaceutically acceptable acid addition salts thereof, intermediates therefore, and processes for their preparation, USP 4 474 768, (1984)
21. Štimac, V., Alihodžić, S., Lazarevski, G., Pavlović, D., Berdik, A., Mutak, S., Maršić, N., Rušić-Pavletić, J., Dominis Kramarić, M., Eraković, V., Sinteza i antibakterijska aktivnost 6-O-alkil-4"-O-substituiranih 8a-aza-8a-homoeritromicina i 6-O-alkileritromicin 9(E)- i 9(Z)-oksima., V. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Croatia, 2004, str. 85.
22. Sheldrick, G.M., Kojić-Prodić, B., Banić, Z., Kobrehel, G., Kujundžić, N., Structure of 9-deoxy-9a-N-(N'-(4'-pyridyl)-carbamoyl)-9a-aza-9a-homoerythromycin A and conformational analysis of analogous 9a-aza 15-membered azalides in solid state, *Acta. Cryst.* **B51** (1995) 358–366.

23. Alihodžić, S., Lazarevski, G., Derek, M., Mutak, S., Štimac, V., Marušić-Ištuk, Z., Berdik, A., Maršić, N., Rušić-Pavletić, J., Eraković, V., Schoenfeld, W., Petrone, M., Synthesis and antibacterial activity of 4'-*O*-substituted 8a-aza-8a-homoerythromycins, 43rd Intersci Conf on Antimicrob Agents Chemother, ICAAC, Chicago, USA, 2003
24. Štimac, V., Alihodžić, S., Lazarevski, G., Pavlović, D., Berdik, A., Mutak, S., Maršić, N., Rušić-Pavletić, J., Dominis Kramarić, M., Eraković, V., Sinteza i antibakterijska aktivnost 6-*O*-alkil-4"-*O*-substituiranih 8a-aza-8a-homoeritromicina i 6-*O*-alkileritromicin 9(E)- i 9(Z)-oksima., V. Susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Croatia, 2004, str. 85.
25. Kobrehel, G., Lazarevski, G., Djokić, S., Kolacny-Babić, L., Kucišec-Tepeš, N., Cvrnje, M., Synthesis and antibacterial activity of *O*-methylazithromycin derivatives, *J. Antibiot.* **45** (1992) 527–534.
26. Kamenar, B., Košutić-Hulita, N., Vicković, I., Kobrehel, G., Lazarevski, G., *Acta Cryst.* C52 (1996) 2566–2568.
27. Derek, M., Kidemet, D., Leljak, M. (PLIVA), Selective alkylation of macrolide and azalide derivatives comprises reacting an macrolide or azalide derivative having a vicinal hydroxyl system with diazoalkane in the presence of transition-metal halides and of boric acid., WO 2004/106353, Sept. 12 (2004)
28. Pešić, D., Starčević, K., Toplak, A., Herreros, E., Vidal, J., Almela, M.J., Jelić, D., Alihodžić, S., Spaventi, R., Perić, M., Design, synthesis, and in vitro activity of novel 2'-*O*-substituted 15-membered azalides, *J. Med. Chem.* **55**(7) (2012) 3216–3227.
29. Jones, P. H., Perun, T. J., Rowley, E. K., Baker, E. J., Chemical modifications of erythromycin antibiotics. 3. Synthesis of 4" and 11 esters of erythromycin A and B, *J. Med. Chem.* **15** (1972) 631–634.
30. Ištuk, Z. M., Mutak, S., Kujundžić, N., Kragol, G., Novel 9a-carbamoyl- and 9a-thiocarbamoyl-3-decladinosyl-6-hydroxy and 6-methoxy derivatives of 15-membered macrolides, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 4498–4510.
31. Pestka, S., LeMahieu, R. A., Inhibition of [14C]chloramphenicol binding to *Escherichia coli* ribosomes by erythromycin derivatives, *Antimicrob. Agents Chemother.* **6** (1974) 39–45.
32. Bright, G.M., Nagel, A.A., Bordner, J., Desai, K.A., Dibrino, J.N., Nowakowska, J., Vincent, L., Watrous, R.M., Sciavolino, F.C., English, A.R., Retsema, J.A., Anderson, M.R.,

- Brennan, L.A., Borovoy, R.J., Cimochoowski, C.R., Faiella, J.A., Girard, A.E., Girard, D., Herbert, C., Manousos, M., Mason, R., Synthesis, in vitro and in vivo activity of novel 9-deoxy-9a-aza-9a-homoerythromycin A derivatives; a new class of macrolide antibiotics, the azalides, *J. Antibiot.* **41** (1988) 1029–1047
33. Bronk, B.S., Letavic, M.A., Bertsche, C.D., George, D.M., Hayashi, S.F., Kamicker, B.J., Kolosko, N.L., Norcia, L.J., Rushing, M.A., Santoro, S.L., Yang, B.V., Synthesis, stereochemical assignment and biological activity of a novel series of C-4" modified azamacrolides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 1955–1958.
34. Mercep, M., Mesic, M., Tomašković, L, Marković, S., Makaruha, O., Poljak, V. (PLIVA), New compounds, compositions and methods for treatment of inflammatory diseases and conditions. US 2004014685 (2004)
35. Olsufyeva, E.N., Yankovskaya, V.S., Main trends in the design of semi-synthetic antibiotics of a new generation, *Russ. Chem. Rev.*, **89**(3) (2020) 339–378.
36. Ma, S., Jiao, B., Liu, Z., Wang, H., Xian, R., Zheng, M., Lou, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19** (2009) 1698
37. Printsevskaya, S. S., Korolev, A. M., Luzikov, Y. N., Mirchink, E. P., Isakova, E. B., Tevyashova, A. N., *Antibiotiki i Khimioterapiia*, **63** (3) (2018) 1–2.
38. Fajdetić, A., Čipčić Paljetak, H., Lazarevski, G., Hutinec, A., Alihodžić, S., Derek, M., Štimac, V., Andreotti, D., Sunjić, V., Berge, J.M., et al., 4''-O-(omega-Quinolylamino-alkylamino)propionyl derivatives of selected macrolides with the activity against the key erythromycin resistant respiratory pathogens, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6559–6568.
39. Fajdetić, A., Vinter, A., Čipčić Paljetak, H., Padovan, J., Palej Jakopović, I., Kapić, S., Alihodžić, S., Filić, D., Modrić, M., Košutić-Hulita, N., et al., Synthesis, activity and pharmacokinetics of novel antibacterial 15-membered ring macrolones, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3388–3397.
40. Heidary, M., Ebrahimi Samangani, A., Kargari, A., Kiani Nejad, A., Yashmi, I., Motahar, M., Taki, E., Khoshnood, S., Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin, *J Clin Lab Anal.* **36**(6) (2022) 1–16.
41. Bakheit, A., Al-Hadiya, B., Abd-Elgalil, A., Azithromycin, *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* **39** (2014) 1–40.

42. Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., How macrolide antibiotics work, *Trends Biochem Sci.* **43** (2018) 668–684.
43. Schlunzen, F., Harms, J. M., Franceschi, F., Hensen, H. A. S., Bartels, H., Zarivach, R., Yonath, A., *Structure* **11** (2003) 329–338.
44. Venditto, V.J., Haydar, D., Abdel-Latif, A., et al., Immunomodulatory effects of azithromycin revisited: potential applications to COVID-19, *Front Immunol.* **12** (2021) 285.
45. Retsema, J., Girard, A., Schelkly, W., Manousos, M., Anderson, M., Bright, G., Borovoy, R., Brenan, L., Mason, R., Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms, *Antimicrob. Agents Chemother.* **31** (1987) 1939–1947.
46. Yeruva, L., Melnyk, S., Spencer, N., Bowlin, A., Rank, R.G., Differential susceptibilities to azithromycin treatment of chlamydial infection in the gastrointestinal tract and cervix, *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** (2013) 6290–6294.
47. Đokić, S., From erythromycin to azithromycin—From macrolides to azalides, *PLIVA Saopć.* **31** (1988) 1–2.
48. Paul, D., Chawla, M., Ahrodia, T., Narendrakumar, L., Das, B., Antibiotic Potentiation as a Promising Strategy to Combat Macrolide Resistance in Bacterial Pathogens, *Antibiotics* **11**;12(12) (2023) 1715.
49. Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldan, L., Pons, M.J., Ruiz, J., Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin, *Crit. Rev. Microbiol.* **43** (2017) 1–30.
50. Derby, A., Mekonnen, D., Woldeamanuel, Y., Abebe, T., Azithromycin resistant gonococci: a literature review, *Antimicrob Resist Infect Control.* **9** (2020) 1–7.
51. Belkacem, A., Jacquier, H., Goubard, A., et al., Molecular epidemiology and mechanisms of resistance of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in France during 2013–14., *J Antimicrob Chemother.* **71** (2016) 2471–2478.
52. Bryskier, A., Denis, A., Ketolides: novel antibacterial agents designed to overcome resistance to erythromycin A within gram-positive cocci, u: Schönfeld, W., Kirst, H.A. (urednici) *Macrolide Antibiotics*, Milestones in Drug Therapy MDT, Birkhäuser, Basel (2002) 73–95.

53. <https://www.geeksforgEEKS.org/ester-hydrolysis/#what-is-hydrolysis> (pristup 15.5.2024.)
54. Tsakos, M., Schaffert, E. S., Clement, L. L., Villadsen, N. L., Poulsen, T. B., Ester Coupling Reactions– an Enduring Challenge in the Chemical Synthesis of Bioactive Natural Products, *Nat. Prod. Rep.*, **32** (2015) 605–632.
55. Kuisle, O., Quiñoá, E., Riguera, R., *J. Org. Chem.*, **64** (1999) 8063–8075.
56. Mabey, W., Mill, T., *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **7** (1978) 383–415.
57. Danishefsky, S. J., Masters, J. J., Young, W. B., Link, J.T., Snyder, L.B., Magee, T. V., Jung, D. K., Isaacs, R. C. A., Bornmann, W. G., Alaimo, C. A., Coburn, C. A., Di Grandi, M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 2843–2859.
58. Leisch, H., Morley, K., Lau, P. C. K., *Chem. Rev.*, **111** (2011) 4165–4222.
59. Kamerbeek, N. M., Janssen, D. B., van Berkel, W. J. H., Fraaije, M. W., *Adv. Synth. Catal.*, **345** (2003) 667–678.
60. Han, S.-Y., Kim, Y.-A., *Tetrahedron*, **60** (2004) 2447–2467.
61. Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V., *Tetrahedron*, **61** (2005) 10827–10852.
62. Oku, A., Yamaura, Y., Harada, T., *J. Org. Chem.*, **51** (1986) 3732–3734.
63. Carpino, L. A., Beyermann, M., Wenschuh, H., Bienert, M., *Acc. Chem. Res.*, **29** (1996) 268–274.
64. Jedrzejczak, M., Motie, R. E., Satchell, D. P. N., Satchell, R. S., Wassef, W. N., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1994) 1471–1479.
65. Neises, B., Steglich, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **17** (1978) 522–524.
66. DeTar, D. F., R. Silverstein, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **88** (1966) 1020–1023.
67. Williams, A., Ibrahim, I. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 7090–7095.
68. Inanaga, J., Hirata, K., Saeki, H., Katsuki, T., Yamaguchi, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52** (1979) 1989–1993.
69. Mitsunobu, O., Yamada, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40** (1967) 2380–2382.
70. Swamy, K. C. K., Kumar, K. P., Kumar, N. N. B., *J. Org. Chem.*, **71** (2006) 1002–1008.
71. Iranpoor, N., Firouzabadi, H., Khalili, D., *Org. Biomol. Chem.*, **8** (2010) 4436–4443.

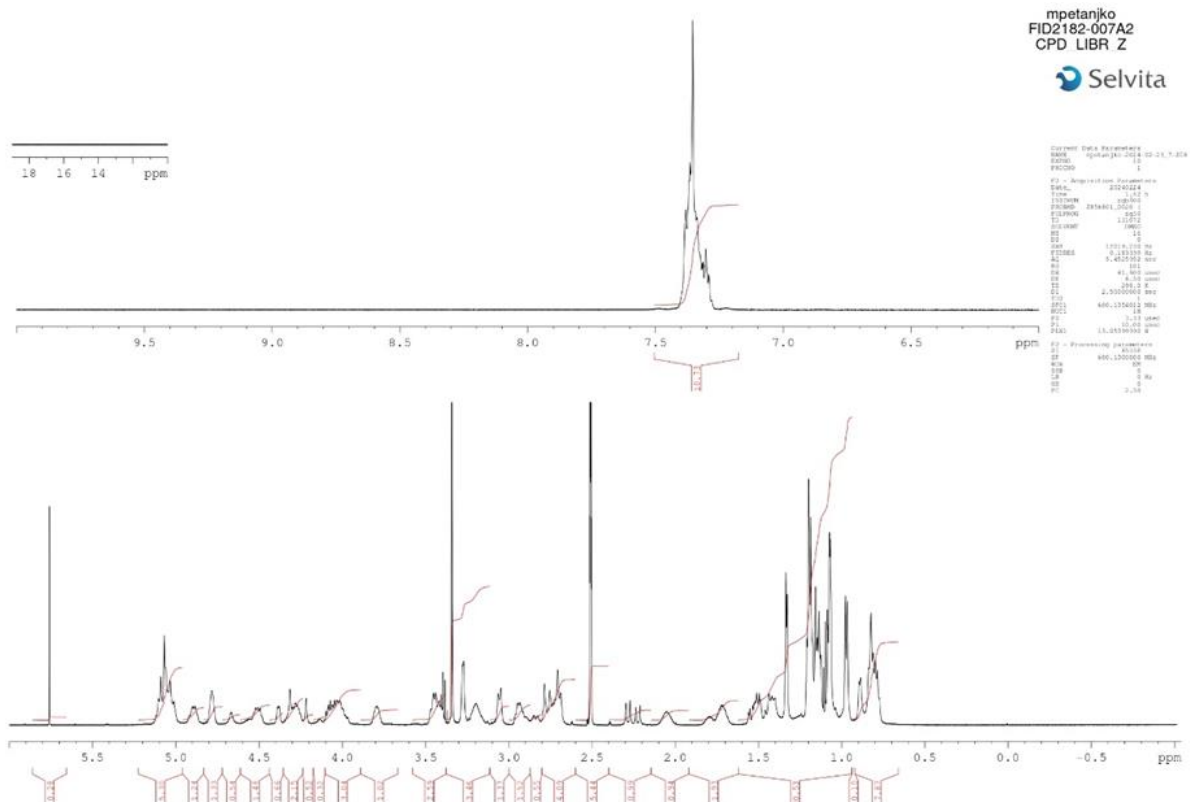
72. Reichen, W., *Chem. Rev.*, **78** (1978) 569–588.
73. Seikaly, H. R., Tidwell, T. T., *Tetrahedron*, **42** (1986) 2587–2613.
74. Reber, K. P., Tilley, S. T., Sorensen, E. J., *Chem. Soc. Rev.*, **38** (2009) 3022–3034.
75. Valentini, F., Galloni, P., Brancadoro, D., Conte, V., Sabuzi, F., A Stoichiometric Solvent-Free Protocol for Acetylation Reactions, *Front Chem.* **10** (2022) 2296–2646.
76. Conant, J. B., Bramann, G. M., The acidic and basic catalysis of acetylation reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **50** (8) (1928) 2305–2311.
77. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Anhydrides/Reactivity_of_Anhydrides/Acid_Anhydrides_react_with_alcohols_to_form_esters](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Anhydrides/Reactivity_of_Anhydrides/Acid_Anhydrides_react_with_alcohols_to_form_esters) (pristup 23.5.2024.)
78. Naga Sesha Sai Pavan Kumar, C., ‘Total Synthesis of Macrolides’, Organic Synthesis, *IntechOpen*, Guntur, 2019, str. 1–7.
79. Shiina, I., Ibuka, R., Kubota, M., *Chem. Lett.*, (2002) 286–287.
80. Shiina, I., Kubota, M., Oshiumi, H., Hashizume, M., *J. Org. Chem.*, **69** (2004) 1822–1830.
81. Funk, R. L., Abelman, M. M., Jellison, K. M., *Synlett*, (1989) 36–37.
82. Moslin, R. M., Jamison, T. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (2006) 15106–15107.
83. Liang, L., Ramaseshan, M., MaGee, D. I., *Tetrahedron*, **49** (1993) 2159–2168.
84. Oguchi, K., Tsuda, M., Iwamoto, R., Okamoto, Y., Kobayashi, J., Fukushi, E., Kawabata, J., Ozawa, T., Masuda, A., Kitaya, Y., Omasa, K., *J. Org. Chem.*, **73** (2008) 1567–1570.
85. Cribiu, R., Jäger, C., Nevado, C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48** (2009) 8780–8783.
86. Litvinenko, L. M., Kirichenko, A. I., *Dokl. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, **176** (1967) 97–100.
87. Höfle, G., Steglich, W., Vorbruggen, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **17** (1978) 569–583.
88. Hassner, A., Krepski, L. R., Alexanian, V., *Tetrahedron*, **34** (1978) 2069–2076.
89. <https://www.jk-sci.com/blogs/resource-center/ester-hydrolysis> (pristup 1.6.2024.)

90. Mitchell, S. M., Ullman, J. L., Teel, A. L., Watts, R. J., Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin, *Chemosphere*, **134** (2015) 504–511.

8. PRILOZI

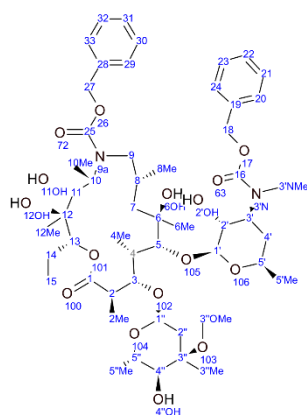
Prilog 2.

a) $^1\text{H-NMR}$ spektar spoja **3**

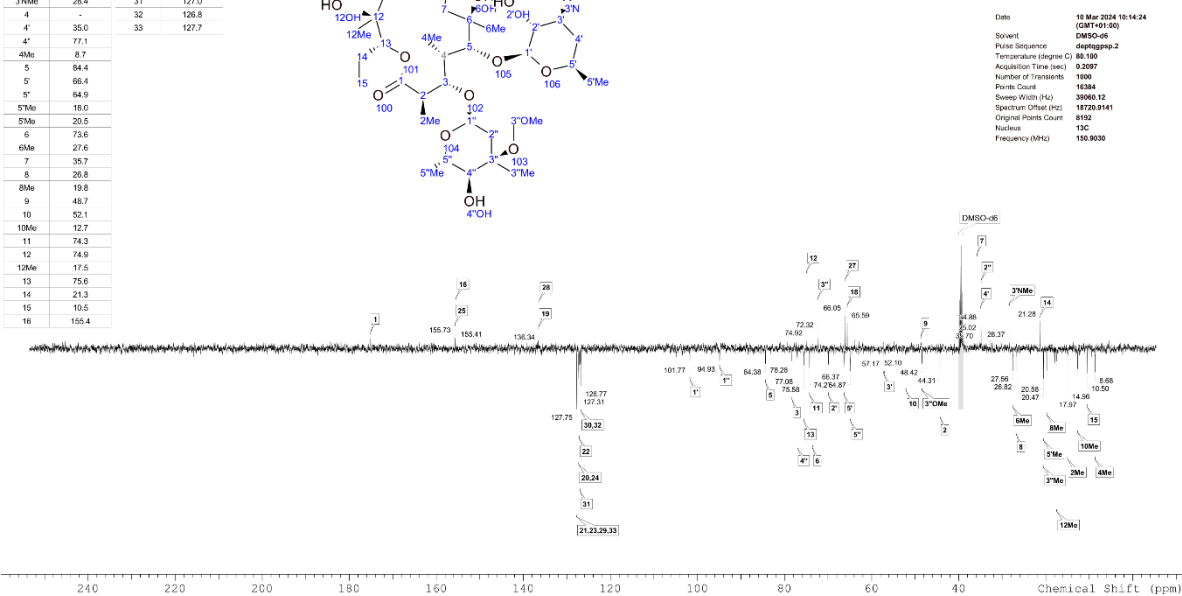


b) $^{13}\text{C-NMR}$ spektar spoja **3**

Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)
1	175.1	16	65.6
1'	101.8	19	136.5
1''	94.9	20	127.3
2	44.3	21	127.7
2'	69.9	22	127.2
2''	34.9	23	127.7
2Me	15.0	24	127.3
3	78.3	25	155.7
3'	57.2	27	66.1
3''	72.3	28	136.3
3'Me	20.6	29	127.7
3''Me	48.4	30	126.8
3NMe	28.4	31	127.0
4	-	32	126.8
4'	77.1	33	127.7
4Me	8.7		
5	64.4		
5'	66.4		
5''	64.9		
5'Me	18.0		
5''Me	20.5		
6	73.6		
6Me	27.6		
7	35.7		
8	26.8		
8Me	19.8		
9	48.7		
10	52.1		
10Me	12.7		
11	74.3		
12	74.9		
12Me	17.5		
13	75.6		
14	21.3		
15	10.5		
16	155.4		

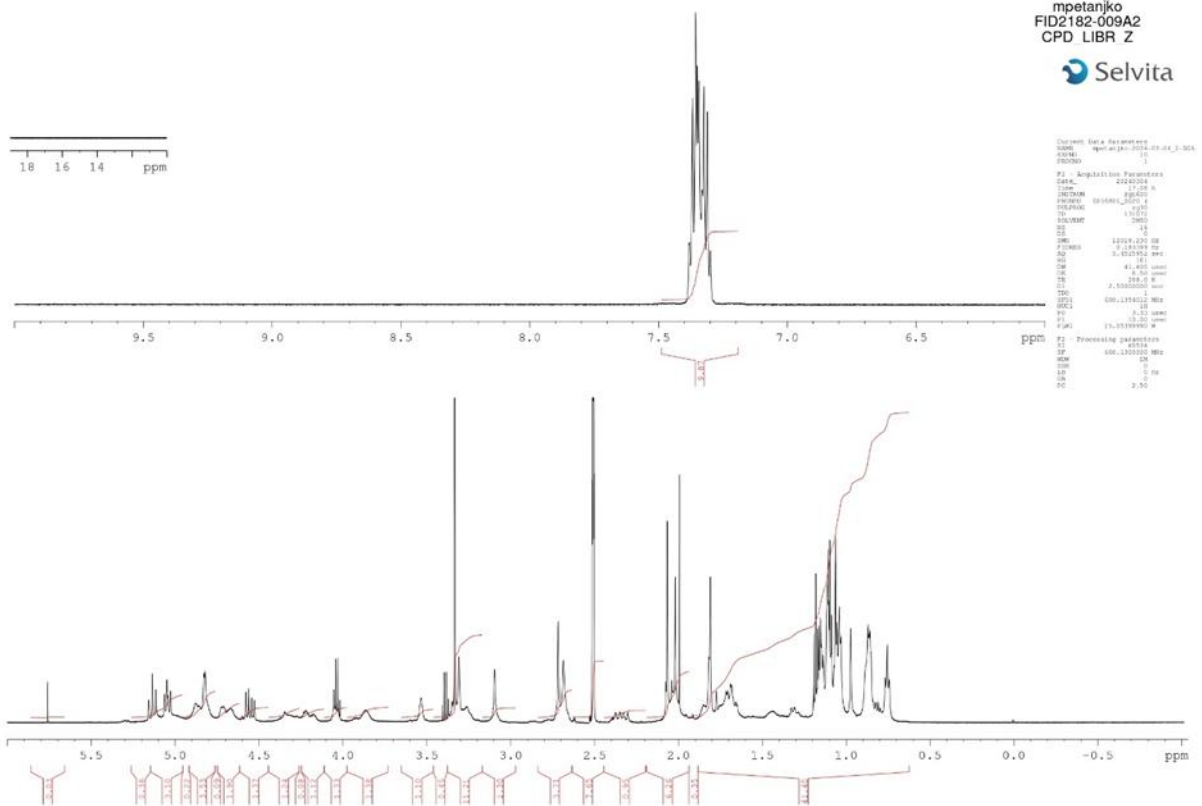


$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 175.1 (1), 155.7 (25), 155.4 (16), 136.5 (19), 136.3 (28), 127.7 (21, 23, 29, 33), 127.3 (20, 24), 127.2 (22), 127.0 (31), 126.8 (30, 32), 101.8 (1'), 94.9 (1''), 84.4 (5), 78.3 (3'), 77.1 (4'), 75.6 (13), 74.9 (12), 74.3 (11), 73.6 (6), 72.3 (3''), 69.9 (2'), 66.4 (5'), 64.9 (27), 65.6 (18), 64.9 (5''), 57.2 (3''), 52.1 (10), 48.7 (9), 48.4 (3''Me), 44.3 (2), 39.4, 35.7 (7), 35.0 (4'), 34.9 (2''), 28.4 (3''NMe), 27.6 (6Me), 26.8 (8), 21.3 (14), 20.6 (3'Me), 20.5 (5'Me), 19.8 (8Me), 18.0 (5''Me), 17.5 (12Me), 15.0 (2Me), 12.7 (10Me), 10.5 (15), 8.7 (4Me)

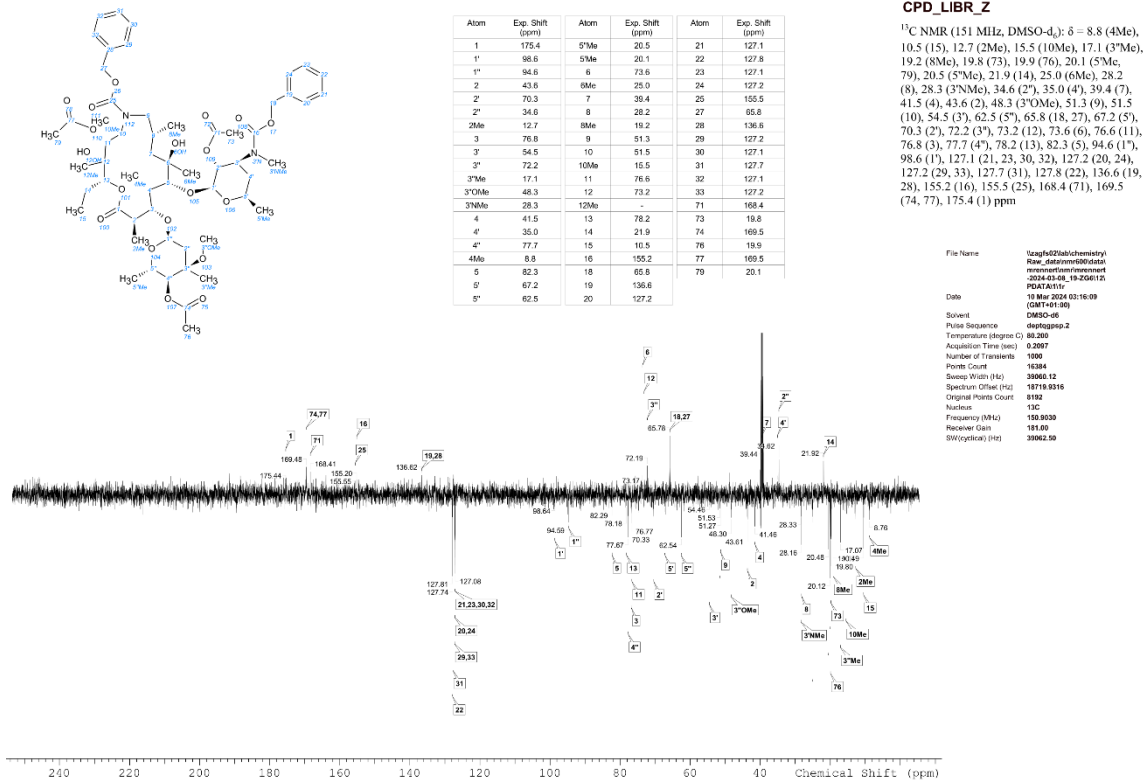


Prilog 3.

a) ¹H-NMR spektar spoja 4

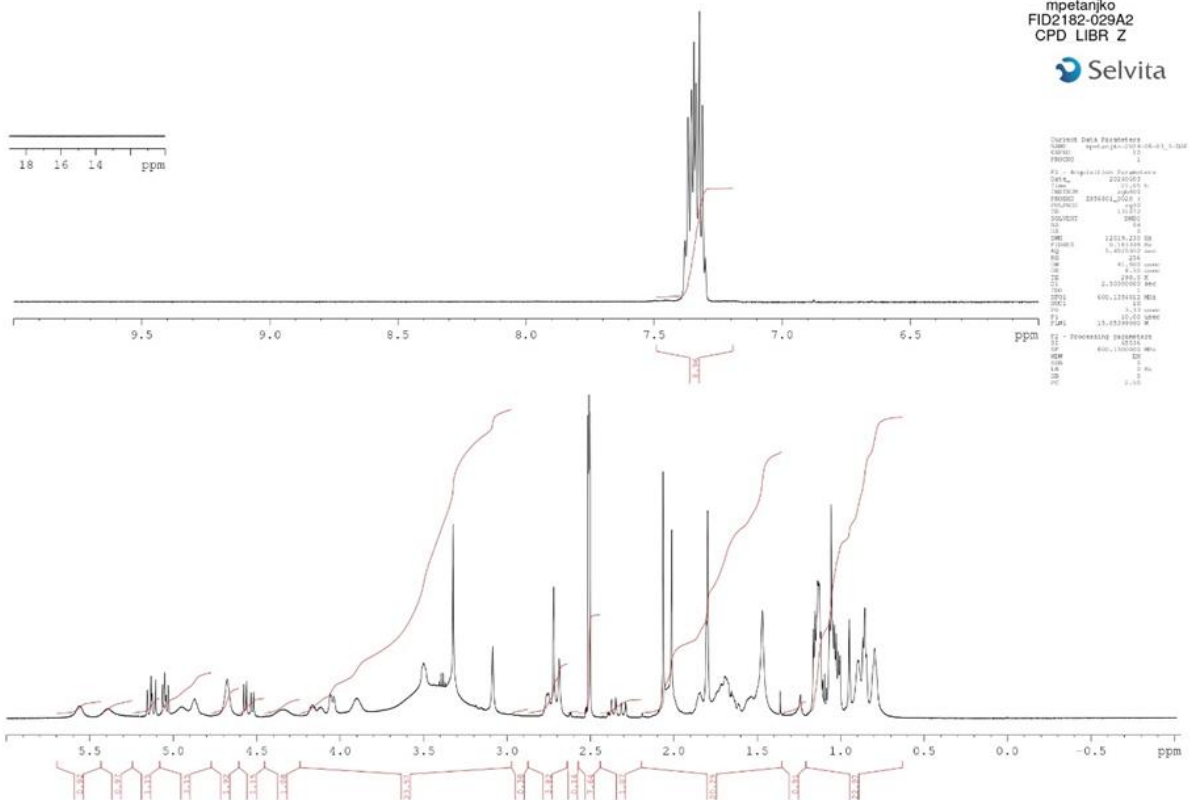


b) ¹³C-NMR spektar spoja 4



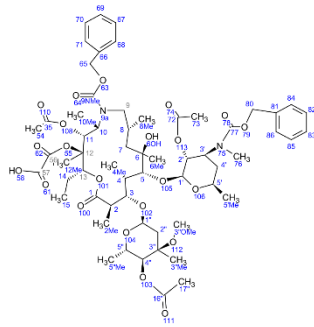
Prilog 5.

a) ¹H-NMR spektar spoja 7



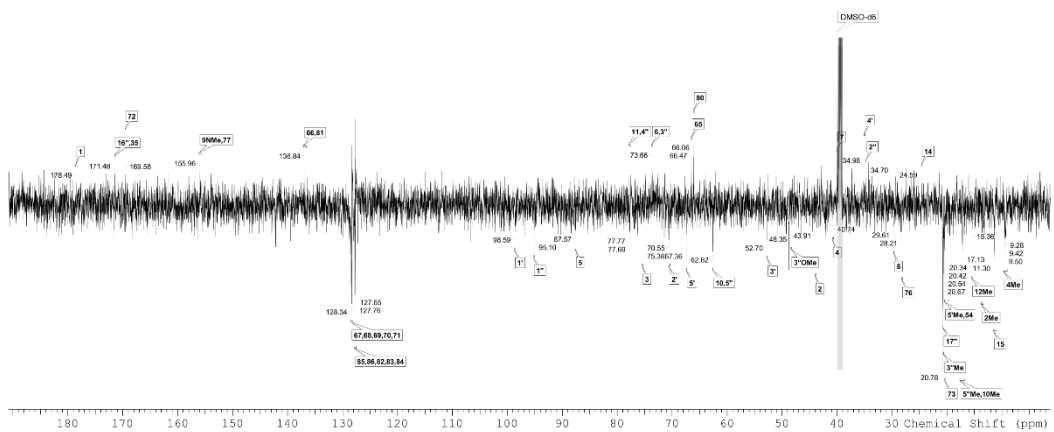
b) ¹³C-NMR spektar spoja 7

Atom	Exp. Shift (ppm)	Atom	Exp. Shift (ppm)
1	178.5	84	127.7
1'	98.6	85	127.7
1''	95.1	86	127.7
2	43.9		
2'	70.5		
2''	34.7		
2Me	13.5		
3	75.4		
3'	52.7		
3''	73.7		
3Me	20.5		
3'OMe	48.4		
4	40.7		
4'	35.0		
4''	77.7		
4Me	9.4		
5	87.6		
5'	87.4		
5''	82.6		
5'Me	17.1		
5'Me	20.4		
6	73.7		
6Me	20.8		
7	40.0		
8	28.6		
8Me	19.8		
9	-		
9NMe	156.0		
10	82.6		
10Me	17.1		
11	77.7		
12	-		
12Me	15.4		
13	-		
14	24.6		
15	11.3		
16'	171.5		
17'	20.7		
15'	171.5		
54	20.4		
56	-		
57	-		
55	86.5		
66	136.8		
67	128.4		
68	128.4		
69	128.4		
70	128.4		
71	128.4		
72	169.6		
73	20.3		
76	28.2		
77	156.0		
80	86.1		
81	136.8		
82	127.7		
83	127.7		

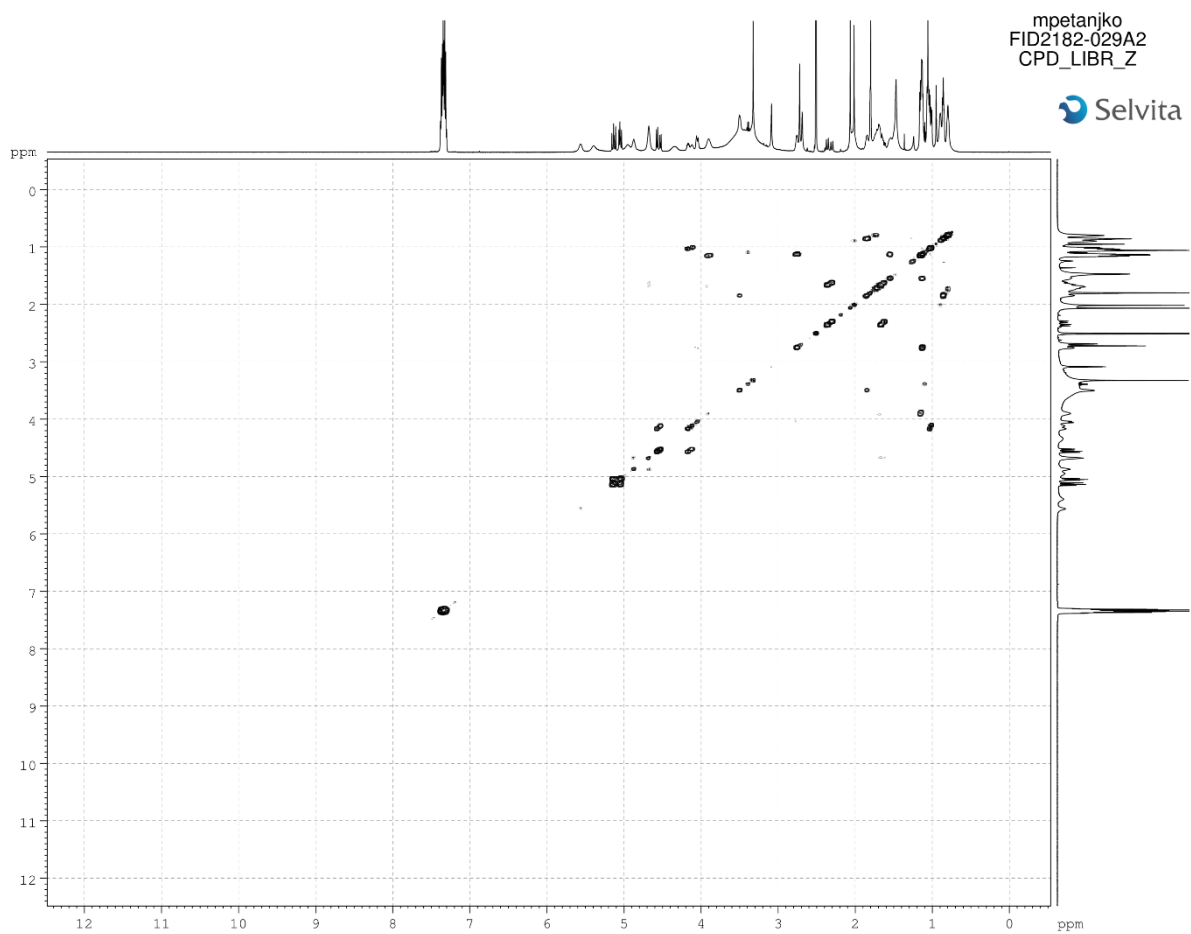


¹³C NMR (DMSO-d₆, 151 MHz): δ: 178.5 (1), 171.5 (16', 35), 169.6 (72), 156.0 (9NMe, 77), 136.8 (66, 81), 128.4 (67, 68, 69, 70, 71), 127.7 (85, 86, 82, 83, 84), 98.6 (1'), 95.1 (1''), 87.6 (5), 77.7 (11, 4''), 75.4 (3), 73.7 (6, 3''), 70.5 (2), 67.4 (5'), 66.5 (65), 66.1 (80), 62.6 (10, 5''), 52.7 (3'), 48.4 (3'OMe), 43.9 (2), 40.7 (4), 40.0 (7), 35.0 (4'), 34.7 (2''), 29.6 (8), 28.2 (76), 24.6 (14), 20.8 (6Me), 20.7 (17''), 20.5 (3'Me), 20.4 (5'Me, 54), 20.3 (73), 19.8 (8Me), 17.1 (5'Me, 10Me), 15.4 (12Me), 13.5 (2Me), 11.3 (15), 9.4 (4Me)

Date: 03 Jun 2016 22:51:19 (GMT+02:00)
Solvent: DMSO-d6
Pulse Sequence: deqzgpgp-2
Temperature (degree C): 25.000
Acquisition Time (sec): 0.2000
Number of Transients: 1000
Points Count: 16384
Sweep Width (Hz): 39060.0
Spectrum Offset (Hz): 18791.6523
Original Points Count: 8192
Nucleus: 13C
Frequency (MHz): 150.9029



c) cosy spektar spoja 8



9. ŽIVOTOPIS

Monika Petanjko ██████████ Završila je osnovnu školu Viktora Kovačića u Humu na Sutli 2014. godine. Iste godine upisala je opću gimnaziju u srednjoj školi u Pregradi gdje je maturirala 2018. godine. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala je preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Završetkom preddiplomskog studija, 2022. godine je upisala diplomski studij Primijenjena organska kemija. Stručnu praksu odradila je u tvornici stakla Vetropack Straža d.d. Hum na Sutli. Članica je Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te je tijekom studiranja pisala članke za znanstveno – popularni časopis Reaktor ideja. Također, zajedno s kolegicom s fakulteta sudjelovala je na XIV. Susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim priopćenjem rada Sinteza novih nitro i cijano supstituiranih benzotiazola primjenom zelene kemije.