

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek
Poslijediplomski sveučilišni studij
Smjer: Analitička kemija
Kolegij: Kemijski seminar I

STRUKTURA, MEHANIZAM DJELOVANJA I BIOLOŠKA AKTIVNOST ODABRANIH MAKROLIDA

Ivana Mikulandra
Lipanj, 2020.

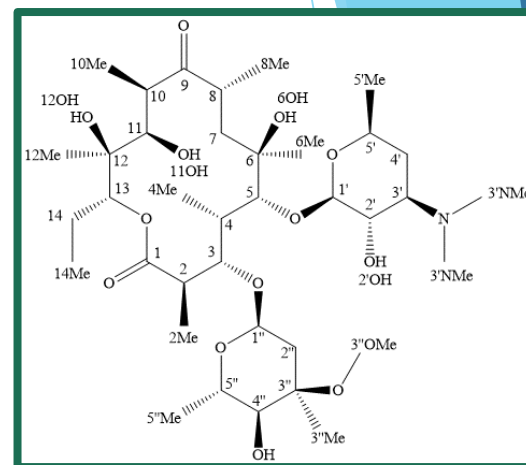
- ▶ UVOD
- ▶ STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA MAKROLIDA
- ▶ RAZVOJ NOVIH MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA
- ▶ ZAKLJUČAK

UVOD

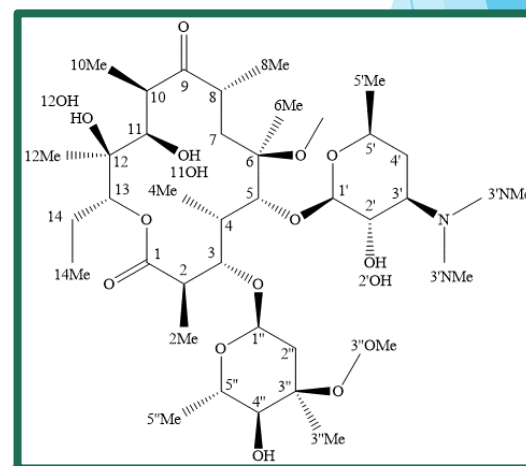
- ▶ **MAKROLIDI** : prirodni i polusintetski antibiotici čiju strukturu karakterizira 12 do 16 atoma (N, C, O) u makrocikličkom laktoskom prstenu (aglikonu) koji na sebe ima vezane različite saharide i aminosaharide.
- ▶ Prirodni makrolidi izolirani su iz soja bakterija *Streptomyces*.
- ▶ Bakteriostatsko djelovanje
- ▶ Široki spektar antibakterijske, antiupalne, antimalarijske i antikancerogene aktivnosti.
- ▶ **PROBLEM** → razvoj bakterijske rezistencije na dosadašnje antibiotike
- ▶ **RIJEŠENJE** → kemijska modifikacija postojećih makrolida
- ▶ → priprava inhibitora bakterijskih enzima koji su odgovorni za razvoj rezistencije

STRUKTURA MAKROLIDA

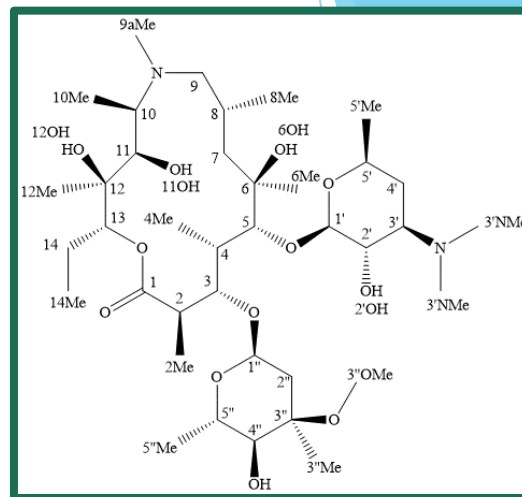
- ▶ **Eritromicin A** - prvi makrolidni antibiotik izoliran iz mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*
- ▶ nedostatna kemijska stabilnost u organizmu
- loša bioraspoloživost i kratko vrijeme poluživota



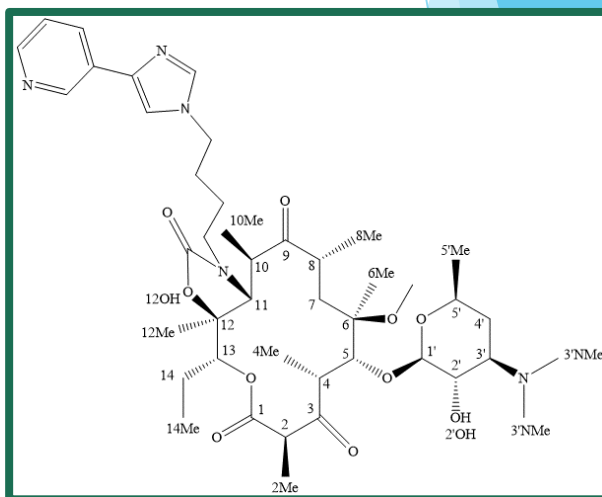
- ▶ **Klaritromicin** - predstavnik prve generacije polusintetskih makrolidnih antibiotika
- ▶ veća kemijska stabilnost
- ▶ širi spektar antibakterijske aktivnosti



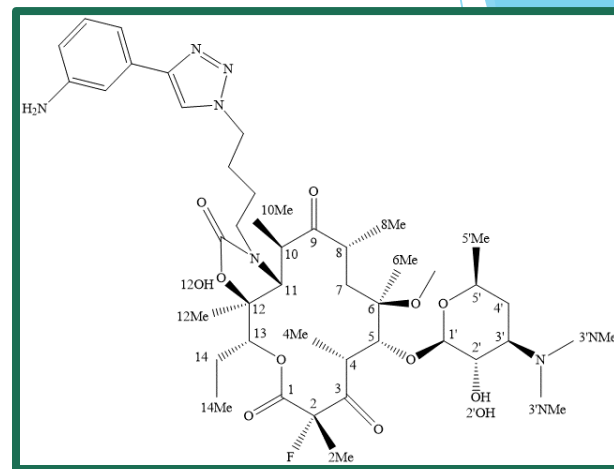
- ▶ **Azitromicin** - predstavnik druge generacije makrolidnih antibiotika (azalida)
- ▶ Izvrsna farmakokinetička svojstva



- ▶ **Telitromicin** - predstavnik treće generacije makrolidnih antibiotika (ketolidi)
- ▶ povučen sa tržišta zbog izazivanja niza nuspojave (gastrointestinalnih tegoba, sinkopa, hepatotoksičnost, slabljenje vida)

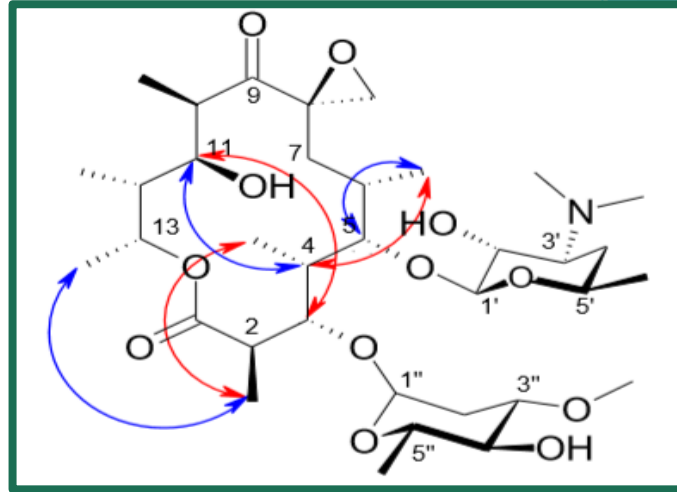


- ▶ **Solitromicin** - ketolid
- ▶ predstavnik četvrte generacije makrolidnih antibiotika
- ▶ strukturno vrlo sličan telitromicinu
- ▶ nije odobren od strane FDA (U.S. Food and Drug Administration) zbog opreza od mogućeg razvoja nuspojava



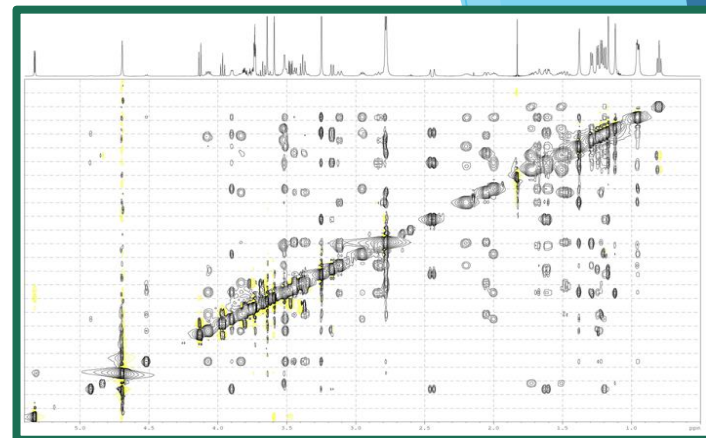
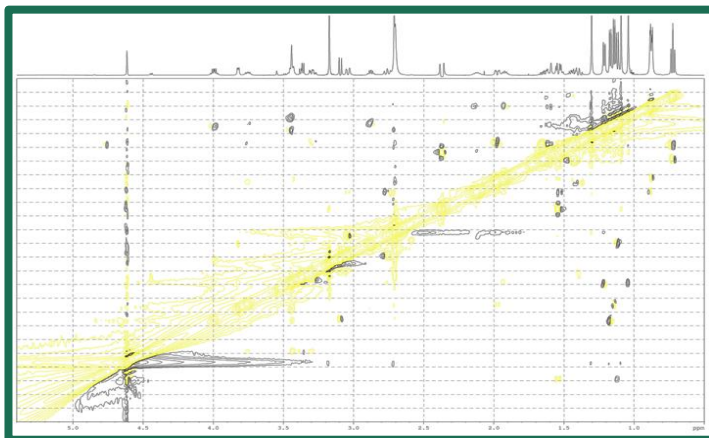
- ▶ Makrolidi su kompleksne molekule koje sadrže mnogo kiralnih centara
- ▶ Istraživanje konformacije makrolida u slobodnom i vezanom stanju (makrolid - ribosom, makrolid - bakterijska membrana, makrolid-albumin i makrolid - žučna kiselina) bitno je za određivanje njihove biološke potentnosti
- ▶ Određivanje povezanosti strukture i aktivnosti makrolida:
 - spektroskopija NMR (tehnike tr-NOESY i STD)
 - rendgenska difrakcija
 - molekulsko modeliranje

- dva strukturna modela četrnaesteročlanih makrolida u otopini u slobodnom stanju: uvrnuta konformacija (engl. *folded-in*) i izvrnuta konformacija (engl. *folded-out*)

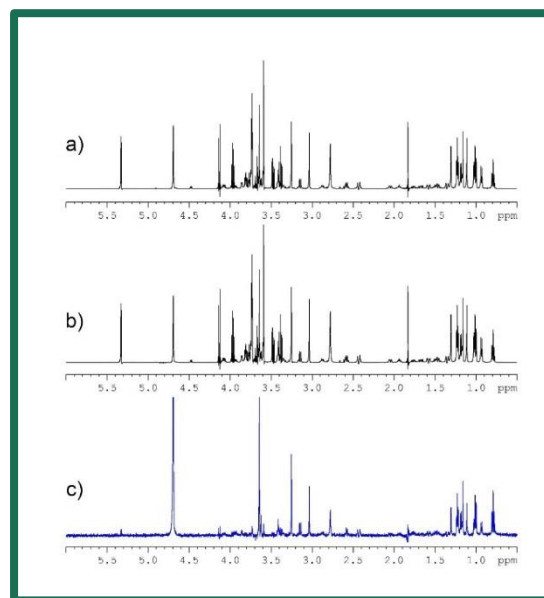


Kontakti NOE u konformacijama oleandomicina
folded-in i *folded-out*

- petnaesteročlani makrolidi u slobodnom i vezanom stanju većinom poprimaju energetski najpovoljniju konformaciju tzv. *3-endo folded-out*



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



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

MEHANIZAM DJELOVANJA MAKROLIDA

- ▶ bakteriostatsko djelovanje
- ▶ vežu se na 23S rRNA u domeni V na ili u blizini centra peptidil transferaze u 50S podjedinici bakterijskog ribosoma
- ▶ sterički blokiraju sintezu peptida u različitim fazama translacijskog procesa
- ▶ Između makrolida i ribosoma uspostavljaju se kovalentne i vodikove veze te hidrofobne interakcije
- ▶ Jakost i način vezanja ovise o
 - funkcijским skupinama makrolida
 - veličini saharida na položajima C3 i C5
 - vrsti bakteriji
- ▶ Prvi korak uključuje brzo vezanje i razvezanje makrolida (prepoznavanje ciljanog mjesta na ribosomu), a drugi korak uključuje čvrsto vezanje makrolida za aktivno mjesto

MEHANIZAM REZISTENCIJE BAKTERIJA NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE

- ▶ Zbog prisutnosti antibiotika i njihovih metabolita u okolišu te široke primjene u medicini, razvija se sve više rezistentnih sojeva bakterija
- inaktivacija antibiotika kovalentnom modifikacijom (hidroliza laktona ili saharida, regioselektivna glikolizacija, acetiliranje ili fosforilacija hidroksilnih skupina)
- kemijska modifikacija nukleobaza ribosoma
- efluks - izbacivanje antibiotika iz bakterijskih stanica
- stvaranje „lažnih“ meta za antibiotike i vezanje antibiotika na substanične strukture

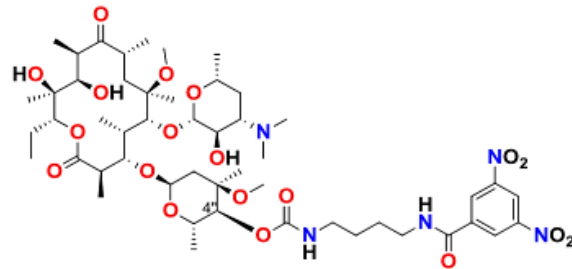
RAZVOJ NOVIH MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

- ▶ Posljednjih 10 godina značajno je opao broj novih antibiotika na tržištu
- ▶ Karakteristike koje bi novi derivati makrolidnih antibiotika trebali posjedovati su:
 - niska intrinzična toksičnost
 - kemijska stabilnost u kiselim uvjetima
 - optimalna farmakokinetička svojstva (apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje lijeka iz organizma)
 - široki spektar antibakterijske aktivnosti
 - izostanak izazivanja tegoba gastrointestinalnog sustava te alergijskih reakcija

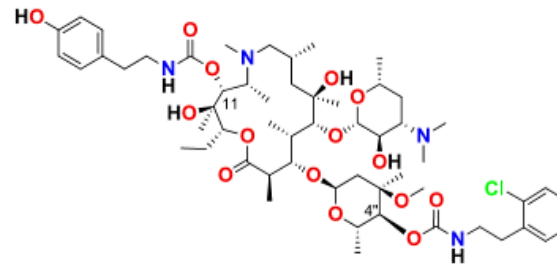
- ▶ desozamin (aminosaharid) iznimno bitan za vezanja makrolida na ribosom
- ▶ šećer kladinoza ne sudjeluje u interakciji s 23S rRNA
- ▶ hidroksilne skupine aglikona 6-OH, 11-OH i 12-OH intereagiraju s 23S rRNA
- ▶ *Kemijska modifikacija kladionze*
- ▶ *Kemijska modifikacija aminosaharida*
- ▶ *Kemijska modifikacija aglikonskog prstena četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida*

Kemijska modifikacija kladionze

- ▶ 4"-O-karbamoil derivati eritromicina, klaritromicina i azitromicina

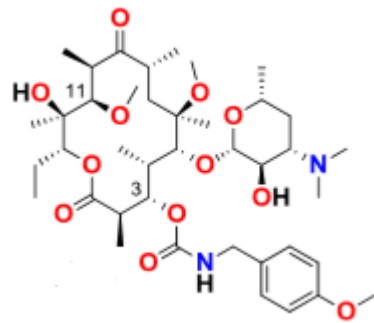


<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> B1 ^b	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> A22072 ^c	MIK = 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> AB11 ^d	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> ATCC25923	MIK = 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> ATCC29123	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$



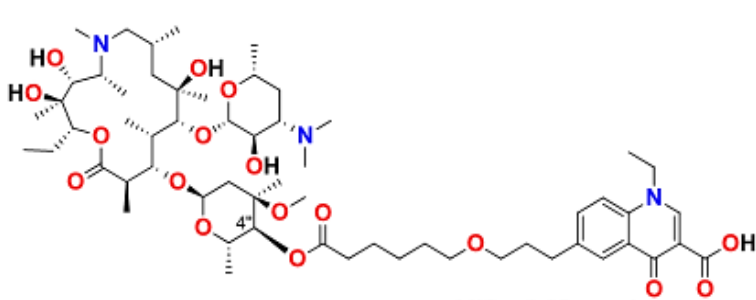
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	MIK = < 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> B1 ^b	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> A22072 ^c	MIK = 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> AB11 ^d	MIK = 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$

- ▶ dekladinozil derivati četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida

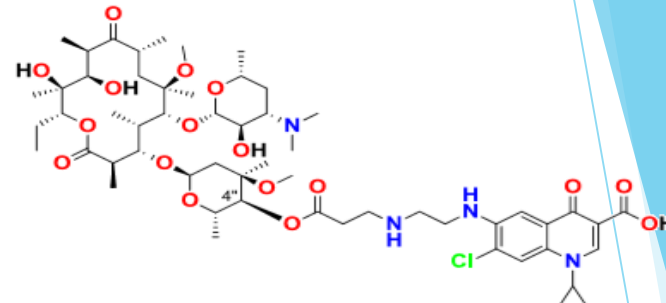


<i>S. aureus</i> A265 ^d	MIK = 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> A2333 ^e	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 3469 ^f	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> 3300 ^g	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

► konjugati eritromicina, klaritromicina, azitromicina i kinolona

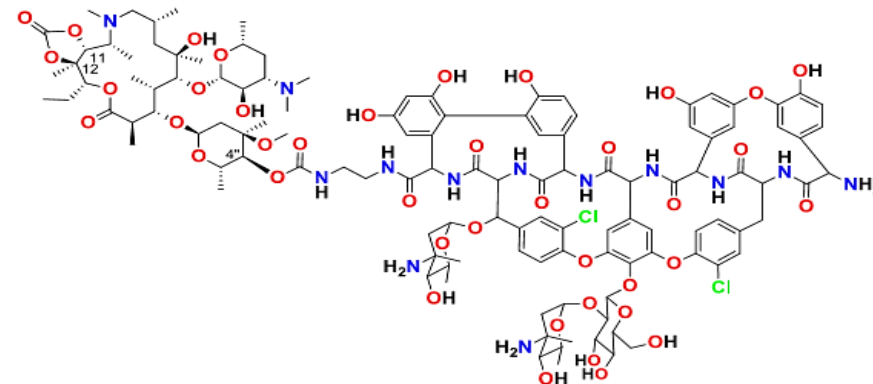


<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = <0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = <0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90265/97 (iMLS)	MIK = 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK = <0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 58 Spain (cMLS)	MIK = <0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> Finland 11 (iMLS)	MIK = <0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 166 GR-Micro (cMLS)	MIK = <0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246	MIK = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$



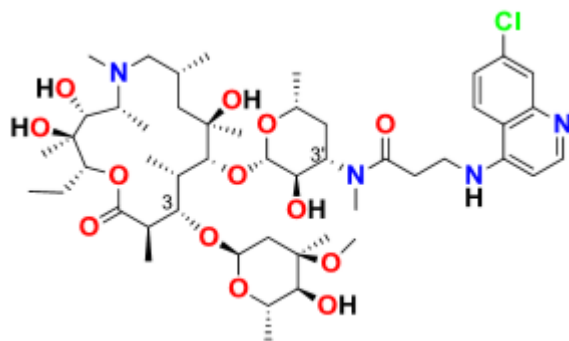
<i>S. aureus</i> PK1 (M)	MIK = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> Ci137 (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pyogenes</i> 2 Finland (M)	MIK = $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. aureus</i> 90256 (iMLS)	MIK = 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>S. pneumoniae</i> 134 GR M (iMcLS)	MIK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

► konjugati makrolida i peptida



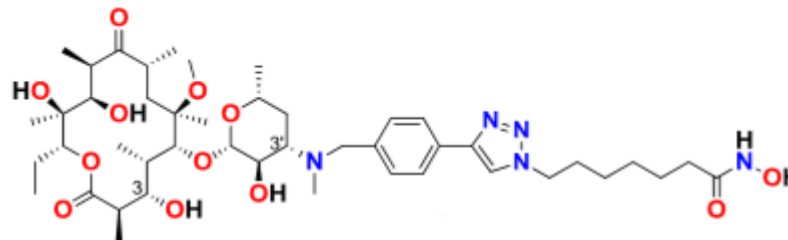
Kemijska modifikacija aminosaharida

- ▶ Konjugati azalida i kinolona
- ▶ Smanjena antibakterijska, ali povećana antimalarijska i antikancerogena aktivnost te protuupalno djelovanje



Antimalarijska aktivnost
P. falciparum 3D7A^a
P. falciparum W2^b

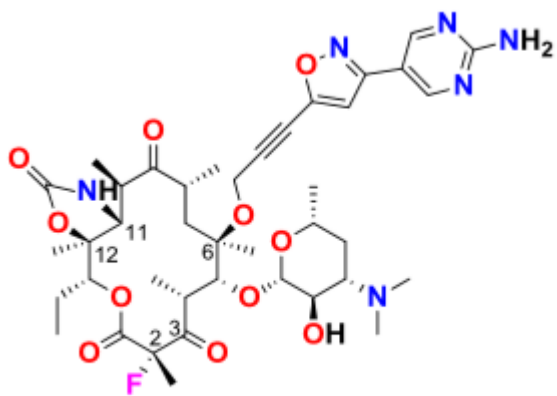
IC₅₀ = 10 nM
IC₅₀ = 13 nM



HDAC 1/2 IC₅₀ = 1,9 nM

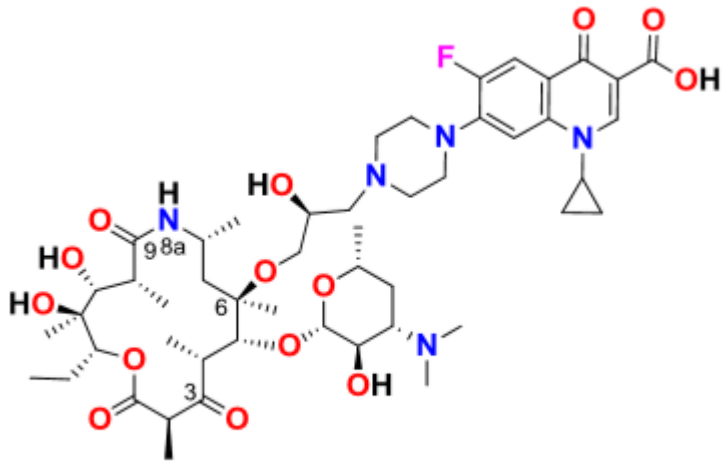
Kemijska modifikacija aglikonskog prstena četrnaesteročlanih i petnaesteročlanih makrolida

- ▶ suspcstitucije hidroksilnih skupina na položajima C6, C11 i C12
- ▶ Modifikacija položaja C9 i C10
- ▶ Konjugati makrolida i kinolona



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

► Antikancerogena i antimalarijska aktivnost

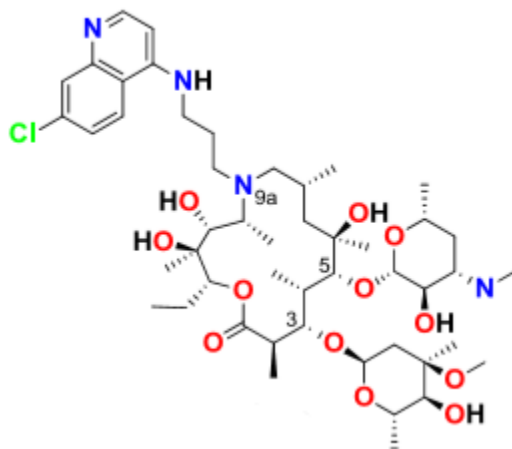


Antimalarijska aktivnost
P. falciparum TM91C235

$IC_{50} = 22 \text{ nM}$

Citotoksičnost Hep-G2

$IC_{50} = 30 \text{ }\mu\text{M}$



ZAKLJUČAK

- ▶ istaknuta je važnost istraživanja novih antibiotika zbog sve veće učestalosti bakterijskih infekcija i pojave rezistencije na dosadašnje antibiotike.
- ▶ Na temelju proučavanja interakcija kompleksa ligand-biološka meta i rezultata dobivenih molekulskim modeliranjem strukture i aktivnosti te su predloženi i pripremljeni novi derivati makrolida od kojih neki pokazuju veći afinitet vezanja na biološke mete, a time i bolju antimikrobnu aktivnost *in vitro*.
- ▶ Iako su neki derivati pokazali veću aktivnost na susceptibilne i rezistentne sojeve u odnosu na referentne makrolide (eritromicin A, klaritromicin, azitromicin, telitromicin), većina njih nema široki spektar antibakterijske aktivnosti.
- ▶ Za pojedine derivate makrolida provedena su testiranja *in vivo* te su u tijeku faze kliničkih ispitivanja.

LITERATURA

- ▶ A. Janas, P. Przybylski, *Eur. J. Med. Chem.* **182** (2019) 11166
- ▶ B. Arsić, P. Novak, J. Barber, M. G. Rimoli, G. Kragol, F. Sodano, *Macrolides: Properties, Synthesis and Applications*, De Gruyter, Berlin, 2018, str. 1-73.
- ▶ A. Awan, R. J. Brennan, A. C. Regan, J. Barber, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2000) 1645-1652.
- ▶ S. Ma, B. Jiao, Z. Liu, H. Wang, R. Xian, M. Zheng, H. Lou, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **19** (2009) 1698-1701.
- ▶ A. Fajdetić, A. Vinter, H. Č. Paljetak, J. Padovan, I.P. Jakopović, S. Kapić, S. Alihodžić, D. Filić, M. Modrić, N. Košutić-Hulita, R. Antolović, Z. I. Schoenfeld, S. Mutak, V. E. Haber, R. Spaventi, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3388-3397.
- ▶ Z. Wu, Y. Lu, M. Luo, X. He, Y. Xiao, J. Yang, Y. Pan, G. Qiu, H. Guo, H. Hu, D. Zhou, X. Hu, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 3636-3644.
- ▶ D. Pešić, K. Starčević, A. Toplak, E. Herreros, J. Vidal, M. J. Almela, D. Jelić, S. Alihodžić, R. Spaventi, M. Perić, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 3216-3227.
- ▶ M. Perić, A. Fajdetić, R. Rupčić, S. Alihodžić, D. Žiher, M. Bukvić Krajačić, K. S. Smith, Z. Ivezić Schönfeld, J. Padovan, G. Landek, D. Jelić, A. Hutinec, M. Mesić, A. Ager, W.Y. Ellis, W. K. Milhous, C. Ohrt, R. Spaventi, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 1389-1401.