Sinteza i svojstva protuupalnih konjugata makrolida i nesteroidnih protuupalnih lijekova

Zulfikari, Selvira

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:806085

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

SELVIRA ZULFIKARI

SINTEZA I SVOJSTVA PROTUUPALNIH KONJUGATA MAKROLIDA I NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.

University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

SELVIRA ZULFIKARI

SYNTHESIS AND ACTIVITY OF ANTI-INFLAMMATORY CONJUGATES OF MACROLIDE AND NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

SELVIRA ZULFIKARI

SINTEZA I SVOJSTVA PROTUUPALNIH KONJUGATA MAKROLIDA I NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr. sc. Linda Tomašković
prof. dr. sc. Olga Kronja

Zagreb, 2012.

University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

SELVIRA ZULFIKARI

SYNTHESIS AND ACTIVITY OF ANTI-INFLAMMATORY CONJUGATES OF MACROLIDE AND NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG

DOCTORAL THESIS

Supervisors: dr. sc. Linda Tomašković
prof. dr. sc. Olga Kronja

Zagreb, 2012

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen u PLIVA Istraživačkom institutu (nakon toga GlaxoSmithKline Istraživački centar, Zagreb), u sklopu znanstveno-istraživačkog programa „Protuupalni konjugati makrolida“ (PLR 17) te u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najiskrenije zahvaljujem voditeljici dr. sc. Lindi Tomašković koja mi je pomogla tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Hvala i Gordani Turkalj bez čije pomoći ovaj rad ne bi ugledao svijetlo dana.

Zahvaljujem Oresti, Marijani, Višnji i Gogi koje su mi svojim nesebičnim znanjem i savjetima pomogle tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem Striboru Markoviću i ostalim djelatnicima odjela Biologije (Pliva Istraživački institut) na biološkim ispitivanjima provedenim na sintetiziranim spojevima.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Olgi Kronji, prof. dr. sc. Branki Zorc, doc. dr. sc. Sandri Jurić i dr. sc. Ivici Malnaru na ukazanom trudu pri lektoriranju ovog rada.

Hvala svim prijateljima i djelatnicima Agencije za lijekove i medicinske proizvode na podršci.

Na kraju najveća hvala mojoj obitelji na podršci.

SAŽETAK

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) imaju dugu kliničku primjenu u liječenju mnogih upalnih stanja kao što su različiti oblici artritisa. NSAID-i inhibiraju sintezu prostaglandina inhibirajući enzime ciklooksigenazu-1 (COX-1) i ciklooksigenazu-2 (COX-2). COX-1 je konstitutivno prisutan enzim odgovoran za regulaciju normalnih fizioloških procesa, dok je COX-2 enzim fakultativno prisutan u stanjima upale, uključen u patološkim procesima u organizmu. Međutim, ovi lijekovi pokazuju različite gastrointestinalne i kardiovaskularne nuspojave.

Makrolidi su velika skupina različitih spojeva što se tiče njihove kemije i djelovanja, a dolaze kao prirodni bakterijski metaboliti ili kao polusintetski derivati prirodnih spojeva. Pokazalo se da se neki makrolidi, posebno azitromicin, nakupljaju u upalnim stanicama. Danas postoje dokazi da pojedini makrolidi, koji se već niz godina primjenuju u kliničkoj praksi kao antibiotici, pokazuju i protuupalno djelovanje.

Cilj ovog istraživanja bio je pripraviti nove konjugate azitromicina i azitromicinu sličnih makrolida s NSAID-ima koji pokazuju protuupalni učinak kako bi se unaprijedilo liječenje različitih upalnih bolesti. Konjugati su pripravljeni koristeći dvostruku aktivaciju u postupku priprave esterske ili amidne veze. Korišteni su neselektivni NSAID-i (klasični) poput indometacina, ibuprofena i flurbiprofena te selektivni COX-2 NSAID-i poput celekoksiba i valdekoksiba. Također su kao makrolide podjedinice korišteni azitromicin, 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A, eritromicin A, klaritromicin i telitromicin. NSAID-i su vezani na položajima 9a, 9 (oksima), 11, 3'-*N*, 4" i 4"-*O*-makrocikličkog prstena. Prva tri mjesta vezanja nalaze se na aglikonskom prstenu, a sljedeća tri na šećerima, desozaminu, odnosno kladinozi. Također su pripravljeni i konjugati s dekladinozilnim makrolidima kao i aglikonski konjugati. Sintetizirano je više od 90 konjugata NSAID-a i makrolida.

Biološka aktivnost pripravljenih spojeva proučena je na temelju *in vitro* ispitivanja inhibicije enzima COX-1 i COX-2 te inhibicije produkcije TNF-α (čimbenik nekroze tumora α). Pojedini konjugati pokazuju selektivnu inhibiciju COX-2 enzima uz dodatnu inhibiciju produkcije TNF-α. Većina sintetiziranih konjugata značajno je inhibirala produkciju TNF-α. Značajna inhibicija enzima COX-2 zabilježena je u konjugata u kojima je NSAID vezan preko 9a-dušika na makrolidnu podjedinicu koja ima oba šećera ili na odgovarajući aglikonski analog, te kod konjugata s telitromicinom gdje je NSAID vezan na položaju 11. Konjugati u kojima je NSAID-na podjedinica vezana na položaju 9a pokazuju najbolji biološki učinak.

Ključne riječi: NSAID/ makrolid/konjugati/protuupalno djelovanje/COX enzim/TNF-α

SUMMARY

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have a long clinical use for the treatment of various inflammatory diseases like different forms of arthritis. NSAIDs inhibit prostaglandin synthesis by inhibition of enzymes cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). COX-1 was described as "constutive" controlling normal homeostasis, and COX-2 as "inflammatory", involved in pathological prosses in organism. However, these drugs are not devoided of serious side effects affecting gastrointestinal and cardiovascular system.

Macrolides form a large group of divergent compounds regarding their chemistry and function, wich occur as natural bacterial metabolites, or as semisyntetic derivatives of natural compounds. Some macrolides, especially azithromycin, have been shown to accumulate within inflammatory cells. Today, there is a clear evidence that some macrolides, used for many years in clinical practice as antibiotics, also show anti-inflammatory activity.

The aim of this study was to prepare new conjugates of azithromycin and azithromycin-like macrolide scaffolds with NSAIDs that possess anti-inflammatory activity in order to improve the treatment of different inflammatory diseases. Conjugates have been prepared using double activation in the esters or amide coupling procedures. Non-selective NSAIDs (classical) like indomethacine, ibuprofen, flurbiprofen and selective COX-2 NSAIDs like celecoxib and valdecoxib are used. For macrolide subunits, azithromycin, 9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A, erythromycin A, clarithromycin and telithromycin are used. NSAIDs were linked at the positions 9a, 9 (oxime), 11, 3'-*N*, 4"- and 4"-*O*- of macrocyclic scaffold. The first three coupling sites are at the aglycon part of the molecule, the later three on the sugar moieties desosamin and cladinose, respectively. Also, conjugates of decladinosyl macrolides have been prepared, as well as macrolide aglycon conjugates. More than 90 conjugates of NSAID and macrolide have been synthesized.

Biological activity of the prepared compounds was studied on the basis of *in vitro* tests of COX-1 and COX-2 inhibition and inhibition of TNF-α (tumor necrosis factor α) production. Some conjugates show selectivity towards COX-2 enzyme and they additionally inbibit TNF-α production. Most of the synthesized conjugates significantly inhibited TNF-α production. Significant inhibition of COX-2 was observed for conjugates with NSAID linked through 9a-nitrogen of macrolide subunit having both sugars or for corresponding aglycon analogues, as well as with telithromycin conjugate where NSAID is linked through position 11. Conjugates having NSAID subunit linked at 9a position showed the highest biological activity.

Keywords: NSAID/macrolide/conjugates/anti-inflammatory activity/COX enzyme/TNF-α

SADRŽAJ

1. UVOD … 1

2. OPĆI DIO … 2

2.1. Nesteroidni protuupalni lijekovi … 2

2.1.1. Povijest nesteroidnih protuupalnih lijekova … 2

2.1.2. Svojstva i struktura nesteroidnih protuupalnih lijekova … 4

2.1.2.1. Kiralnost nesteroidnih protuupalnih lijekova … 7

2.1.2.2. Farmakokinetika nesteroidnih protuupalnih lijekova … 8

2.1.3. Prostaglandini i enzim ciklooksigenaza … 8

2.1.3.1. Prostaglandini … 8

2.1.3.2. Enzim ciklooksigenaza … 12

2.1.4. Mehanizam djelovanja nesteroidnih protuupalnih lijekova … 13

2.1.5. Upotreba nesteroidnih protuupalnih lijekova u upalnim bolestima … 14

2.1.5.1 Reumatoidni artritis … 15

2.1.6. Nuspojave nesteroidnih protuupalnih lijekova … 18

2.1.7. Neselektivni nesteroidni protuupalni lijekovi … 20

2.1.8. Selektivni nesteroidni protuupalni lijekovi … 22

2.2. Makrolidi … 26

2.2.1. Upotreba i povijest makrolida … 26

2.2.2. Strukture i podjela makrolida … 27

2.2.3. Mehanizam djelovanja makrolida … 30

2.2.4. Nuspojave makrolida … 31

2.2.5. Najpoznatiji makrolidi … 32

2.2.6 Protuupalni učinci makrolida … 41

2.2.7 Klinička primjena makrolida u neinfektivnim bolestima … 44

3. VLASTITA ISTRAŽIVANJA … 47

3.1. Uvod u vlastita istraživanja … 47

3.2. Priprava spojeva … 50

3.2.1. Priprava konjugata neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i derivata azitromicina u položajima 9a, 11, 3'-*N* dezozamina i 4" kladinoze … 51

3.2.1.1. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A vezanih esterskom vezom (u položaju 9a makrolida) … 51

3.2.1.2. Priprava konjugata NSAID-a i derivata 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A amidnom vezom (u položaju 9a makrolida) … 52

3.2.1.3. Priprava konjugata NSAID-a i dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A te konjugata NSAID-a i aglikona 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A (u

položaju 9a makrolida) … 53
3.2.1.4. Produljenje poveznice na makrolidu u položaju 9a makrolida … 54
3.2.1.5. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A vezanih u položaju 9a s modifikacijama u 3'-*N* položaju desozamina … 56
3.2.1.6. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina te konjugata NSAID-a i dekladinozil-azitromicina vezanih u položaju 3'-*N* desozamina … 58
3.2.1.7. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina vezanih u položaju 4" kladinoze … 59
3.2.1.8. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina vezanih preko hidroksilne skupine u položaju 11 azitromicina … 60
3.2.1.9. Priprava konjugata NSAID-a i aglikona 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A vezanih u položaju 11 makrolida … 61
3.2.2. Priprava konjugata COX-1/COX-2 inhibitora i derivata 14-članih makrolida … 63
3.2.2.1. Priprava konjugata NSAID-a i eritromicin A oksima te NSAID-a i klaritromicina vezanih u položaju 3'-*N* desozamina … 63
3.2.2.2. Priprava konjugata NSAID-a i eritromicin A oksima vezanih preko 9(E)-*O*-aminoalkilnog lanca … 65
3.2.2.3. Priprava konjugata NSAID-a i klaritromicina vezanih u položaju 4"-*O*- kladinoze … 65
3.2.3. Priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i derivata azitromicina u položajima 9a, 6, 11, 3'-*N* desozamina i 4" kladinoze … 67
3.2.3.2. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina … 67
3.2.3.2.1. Priprava derivata celekoksiba … 67
3.2.3.2.2. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A … 68
3.2.3.3. Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata azitromicina … 72
3.2.3.3.1. Priprava derivata valdekoksiba … 72
3.2.3.3.2. Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a homoazitromicina A … 73
3.2.4. Priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i derivata 14-članih makrolida … 73
3.2.4.1. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 14-članih makrolida (eritromicin A oksim i klaritromicin) … 73
3.2.4.2. Priprava konjugata derivata celekoksiba i ketolida … 75
3.3. Eksperimentalni dio … 76
3.4. Biološka ispitivanja i rezultati … 141
4. RASPRAVA … 151
4.1 Kemijska istraživanja … 151

4.2. Biološki profil pripravljenih konjugata nesteroidnih protuupalnih lijekova i makrolida 164

5. ZAKLJUČAK … … … … … … … … … … … 165

6. LITERATURA … … … … … … … … … … … 167

7. PRILOG … … … … … … … … … … … … 181

7.1. Popis kratica i simbola … … … … … … … … … … 181

8. ŽIVOTOPIS … … … … … … … … … … … 183

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) su jedni od najčešće korištenih lijekova u suvremenoj terapiji koji imaju izrazito protuupalno djelovanje. Oni dodatno djeluju i na smanjenje osjeta boli te snižavaju povišenu tjelesnu temperaturu. Nazivaju se i antireumaticima zbog svoje česte primjene u liječenju reumatskih bolesti. Imaju svojstvo blokiranja sinteze lipidnih medijatora upale (eikozanoida) inhibicijom enzima ciklooksigenaze (COX) i enzima lipooksigenaze (LOX).[1]

Makrolidi su također specifične molekule zbog njihove sposobnosti nakupljanja u stanicama, naročito u neutrofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, koji ih procesom kemotaksije usmjeravaju na mjesto upale. Zahvaljujući tome postižu se mnogo veće koncentracije makrolida u području upale nego u zdravom tkivu, čime se ostvaruje njihovo ciljano djelovanje.[1-3] Također, danas postoje jasni dokazi da pojedini makrolidi, koji se već niz godina primjenuju u kliničkoj praksi kao antibiotici, pokazuju i protuupalno djelovanje. Tako se na primjer eritromicin A uspješno primjenjuje u liječenju difuznog panbronhiolitisa (DPB), bolesti karakterizirane kroničnom upalom bronha i infiltracijom upalnih stanica, pogotovo neutrofila.[4,5]

Vođeni idejom da se iskoristi takvo jedinstveno farmakokinetičko ponašanje makrolida, kao i protuupalno djelovanje nesteroidnih protuupalnih lijekova i nekih makrolida sintetizirani su novi konjugati nesteroidnih protuupalnih lijekova i makrolida. Navedene podjedinice su modificirane različitim sintetskim postupcima te su međusobno povezane u konačne konjugate. Ti spojevi pokazuju različiti biološki profil djelovanja *in vitro* kao što je inhibicija enzima COX-1, COX-2 i čimbenika nekroze tumora α (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor α*).[6]

2. OPĆI DIO

2.1. NESTEROIDNI PROTUUPALNI LIJEKOVI

2.1.1. Povijest nesteroidnih protuupalnih lijekova

Nesteroidni protuupalni lijekovi (skraćeno nazvani **NSAID, NSAIL, NSAIR** ili **NAID**) se koriste u različitim oblicima od antičkih vremena (ekstrakt vrbine kore bogat salicilatima).[7] Acetilsalicilna kiselina (**1**) je proizvedena 1898. godine, indometacin (**2**) 1960. godine, a 1971. godine je otkrićem enzima ciklooksigenaze (COX) postepeno započelo rasvjetljavanje načina kako NSAID djeluju. Ciklooksigenaza sudjeluje u regulaciji mnogobrojnih fizioloških funkcija kao što su prijenos informacija u središnjem živčanom sustavu, agregacija trombocita, zaštita sluznice u gastrointestinalnom traktu, relaksacija i kontrakcija maternice, zaraštanje kosti, regulacija tjelesne temperature i boli, a sve one mogu biti promijenjene prilikom uzimanja NSAID lijekova.

Tablica 1. Tijek otkrića acetilsalicilne kiseline

- 400 godina prije nove ere - Hipokrat propisuje koru i lišće od vrbe za ublažavanje boli i groznice
- 1853. godine - francuski kemičar Charles Gergardt eksperimentira sa salicilnom kiselinom i sintetizira acetilsalicilnu kiselinu
- 1897. godine - Felix Hoffmann proučava Gerhardt-ove eksperimente i ponovo otkriva acetilsalicilnu kiselinu
- 1899. godine - Bayer distribuira liječnicima acetilsalicilnu kiselinu u obliku praška (Aspirin®) da ga propisuju svojim pacijentima
- 1900. godine - Bayer proizvodi Aspirin® u obliku vodotopljivih tableta - prvi lijek koji će se prodati u ovom farmaceutskom obliku
- 1915. godine - Aspirin® postaje dostupan bez recepta. Proizveden u obliku tableta.
- 1948. godine - kalifornijski liječnik Lawrence Craven je svojim pacijentima preporučio uzimanje acetilsalicilne kiseline svakodnevno kako bi im se smanjila opasnost od srčanog udara
- 1971. godine - John Vane dokazuje da acetilsalicilna kiselina djeluje na inhibiranje sinteze prostaglandina

Lijekovi koji sadrže derivate salicilne kiseline primjenjuju se u medicini od davnih vremena (Tablica 1).

Hipokrat, otac moderne medicine, koji je živio negdje između 460 i 377 godine prije Krista, ostavio je povijesne zapise o tretmanima za smanjivanje boli, uključujući korištenje praška izrađenog

od lišća i kore vrbe koji pomaže u liječenju glavobolje i bolova te za snižavanje tjelesne temperature. Tek su 1829. godine znanstvenici otkrili da je aktivni sastojak iz biljke vrbe salicin.

Francuski kemičar, Charles Frederic Gerhardt, je prvi 1853. godine pripravio acetilsalicilnu kiselinu (nazvanu Aspirin® 1899. god.).[8] Prilikom njegovog rada na sintezi i svojstvima raznih anhidrida kiselina, pomiješao je acetil-klorid s natrijevom soli salicilne kiseline (natrijev salicilat). Gerhardt je pripremljeni spoj nazvao anhidrid salicilne i octene kiseline ("*wasserfreie Salicylsäure-Essigsäure*").

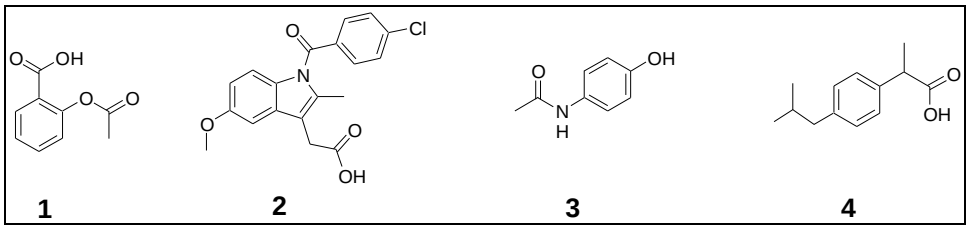
Šest godina kasnije, 1859. godine, von Gilm je priredio analitički čistu acetilsalicilnu kiselinu (koju je nazvao acetilirana salicilna kiselina / "*acetylierte Salicylsäure*") reakcijom salicilne kiseline i acetil-klorida.[9]

Schröder, Prinzhorn i Kraut su 1869. godine ponovili obje sinteze, Gerhardt-ovu i von Gilm-ovu te zaključili da obje reakcije daju isti spoj – acetilsalicilnu kiselinu.[10] Oni su prvi odredili ispravnu strukturu acetilsalicilne kiseline.

Znanstvenici tvrtke Bayer 1897. godine počinju istraživati acetilsalicilnu kiselinu kao poboljšanu zamjenu standardnih lijekova salicilata.[11,12] Acetilsalicilna kiselina je patentirana 27. veljače 1900. godine.[13] Djelatnici Bayer-a su smislili ime Aspirin® (Slika 1) koje potječe od "*a*" u acetil-kloridu, "*spir*" od *Spiraea ulmaria* (biljka iz koje je izolirana salicilna kiselina) i nastavka "*in*".[14]

Slika 1. Prva boca Aspirina® (1899. godine)

Acetilsalicilna kiselina je najprije prodavana u obliku praška, a 1915. godine je prvi put formulirana u obliku tableta. Popularnost acetilsalicilne kiseline opada nakon izlaska na tržište paracetamola (acetaminofena) (**3**) 1956. godine i ibuprofena 1969. godine (Slika 2).[15] No, nakon što su kliničke studije u 1960-tima i 1980-tima potvrdile djelotvornost acetilsalicilne kiseline protiv zgrušavanja krvi, prodaja acetilsalicilne kiseline u dvadesetprvom stoljeću ne opada.



Slika 2. Acetilsalicilna kiselina (**1**), indometacin (**2**), paracetamol (**3**) i ibuprofen (**4**)

Farmakolog John Vane dobio je Nobelovu nagradu za medicinu 1982. godine zajedno sa Sune K. Bergström i Bengt I. Samuelsson za rješavanje jednog od najvećeg misterija medicinske znanosti: kako acetilsalicilna kiselina djeluje.[16-20]

Vane je razvio sustav koji mu je dozvolio da istovremeno mjeri, gotovo trenutačno, razinu niza hormona u krvi. Koristeći ga utvrdio je da acetilsalicilna kiselina inhibira djelovanja prostaglandina - spojeva koji uzrokuju upalu, bol i povišenje tjelesne temperature. Također je otkrio da čak male doze acetilsalicilne kiseline u trombocitima zaustavljaju proizvodnju tromboksana, koji uzrokuje agregaciju trombocita i tako zatvaraju oštećenja krvnih žila. Zbog toga je acetilsalicilna kiselina učinkovita u sprečavanju nastanka krvnih ugrušaka, čestog uzroka srčanih bolesti. Njegov rad je doveo do razvoja inhibitora COX-2 enzima za smanjenje boli i upale, i inhibitora angiotensin-konvertirajućeg enzima (ACE inhibitora) za snižavanje krvnog tlaka.

2.1.2. Svojstva i struktura nesteroidnih protuupalnih lijekova

Nesteroidni protuupalni lijekovi su lijekovi s analgetskim, antipiretskim (smanjuju tjelesnu temperaturu i smanjuju bol bez utjecaja na svijest) i u većim dozama s protuupalnim djelovanjem (smanjuju upalu). Izraz *nesteroidni* se koristi da bi se razlikovali od steroida koji (pored širokog spektra ostalih djelovanja) imaju protuupalni učinak (inhibirajući sintezu eikozanoida). Kao analgetici, NSAID-i spadaju u neopijate.

- *Protuupalno djelovanje*: smanjenje vazodilatatornih prostaglandina smanjuje vazodilataciju i indirektno smanjuje edem. Akumulacija upalnih stanica nije smanjena.[21]
- *Analgetski učinak:* smanjeno stvaranje prostaglandina znači manju senzitizaciju nociceptivnih živčanih završetaka od strane medijatora upale kao što su bradikinin i 5-hidroksitriptamin. Otklanjanje boli kod glavobolje vjerojatno je rezultat smanjenja vazodilatacije izazvane prostaglandinima. [21]
- *Antipiretički učinak*: djelomično je rezultat smanjenja sinteze prostaglandina koji su odgovorni za povećanje vrijednosti na koju je podešena temperatura tijela u termoregulacijskom centru u hipotalamusu i time porast tjelesne temperature.[21,22]

Upravo su nesteroidni protuupalni lijekovi najčešće upotrebljavana skupina lijekova u terapiji različitih vrsta reumatskih bolesti.[23] To su simptomatski lijekovi koji inhibirajući biosintezu prostaglandina, važnih posrednika upalnih procesa, uspješno ublažavaju, odnosno uklanjaju tipične simptome upale (oteklina, crvenilo i bol).[24]

Nesteroidni antireumatici su skupina lijekova koji imaju jednaka farmakodinamska svojstva - jednako se ponašaju u organizmu, iako pripadaju različitim kemijskim skupinama. Većinom su derivati slabih kiselina.

Većina NSAID lijekova registriranih u Hrvatskoj su neselektivni inhibitori ciklooksigenaze, što znači da djeluju na enzime COX-1 i na COX-2.[25] Neselektivni, klasični NSAID-i uspješno otklanjaju simptome upale kod različitih vrsta reumatskih bolesti, ali istovremeno izazivaju iritaciju sluznice probavnog trakta (posebno želučane sluznice) i uzrokuju tegobe kao što su dispepsija, žgaravica, nadutost i bol u epigastriju, mučnina i povraćanje. U težim slučajevima dolazi do erozije želučane sluznice s krvarenjem, te se razvija ulkus.[21,26-29]

U skladu s najnovijim teoretskim saznanjima, posljednjih je godina na farmaceutskom tržištu dostupna nova generacija NSAID lijekova. To su tzv. selektivni inhibitori COX-2 enzima. Njihova je prednost pred klasičnim NSAID lijekovima u tome što uz jednaki antireumatski učinak izazivaju znatno manje želučanih tegoba. Međutim, ti lijekovi povećavaju rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti (npr. infarkt miokarda).[30]

Dvije su osnovne skupine NSAID-a:

1. klasični, neselektivni NSAID-i (Slike 2 i 3), koji se s obzirom na kemijsku strukturu mogu podijeliti na:

a) derivate salicilne kiseline: acetilsalicilna kiselina (**1**), diflunisal (**5**)

b) derivate pirazolona: metamizol (**6**)

c) derivate arilalanoatne kiseline: diklofenak (**7**), etodolak (**8**), indometacin (**2**), sulindak (**9**), tolmetin (**10**)

d) derivate 2-aril-propionske kiseline / profeni: ibuprofen (**4**), ketoprofen (**11**), naproksen (**12**), fenbufen (**13**), fenoprofen (**14**), flurbiprofen (**15**), indoprofen (**16**), ketorolak (**17**)

e) *N*-aril-antranilne kiseline (fenamske kiseline): mefenamska kiselina (**18**), flufenamska kiselina (**19**), meklofenamska kiselina (**29**), tolfenamska kiselina (**21**)

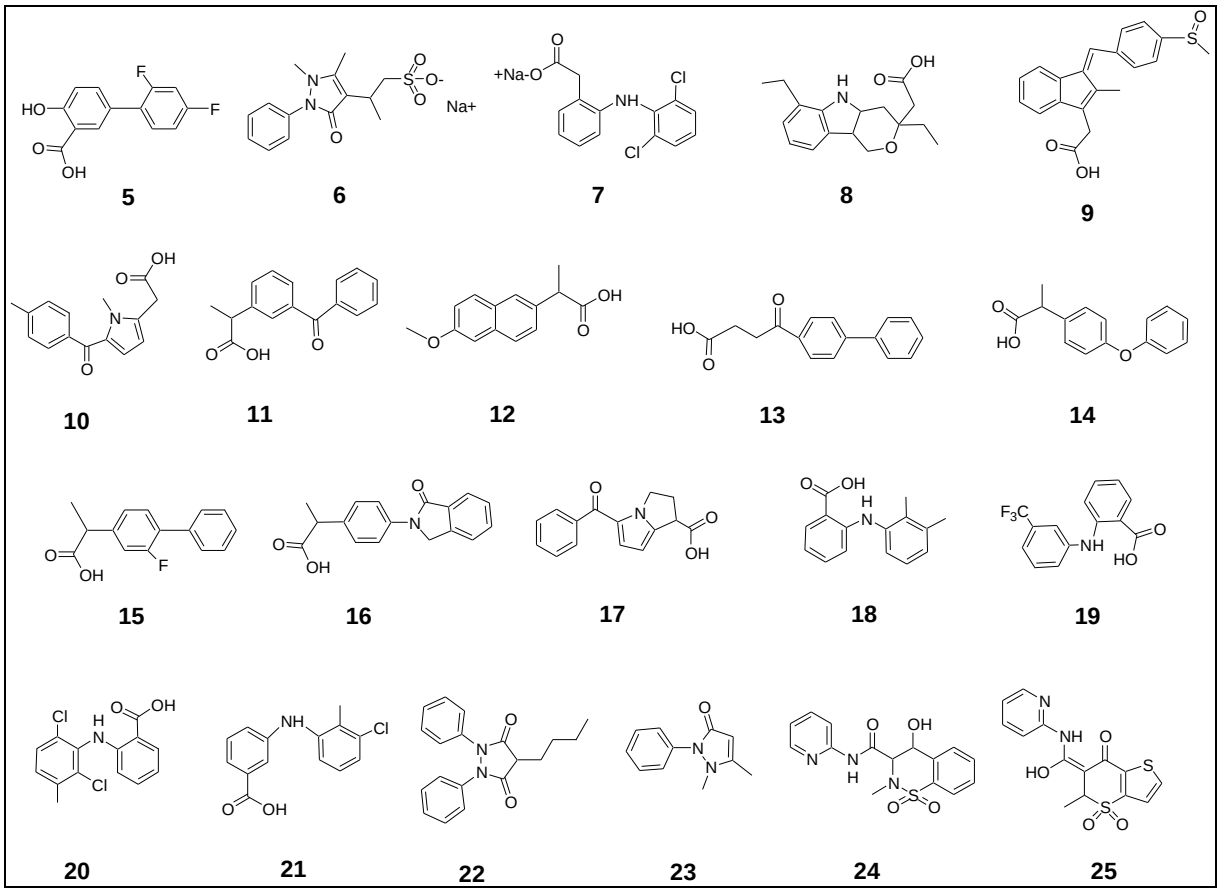
f) pirazolidinske derivate: fenilbutazon (**22**), fenazon (**23**)

e) oksikami: piroksikam (**24**), tenoksikam (**25**)

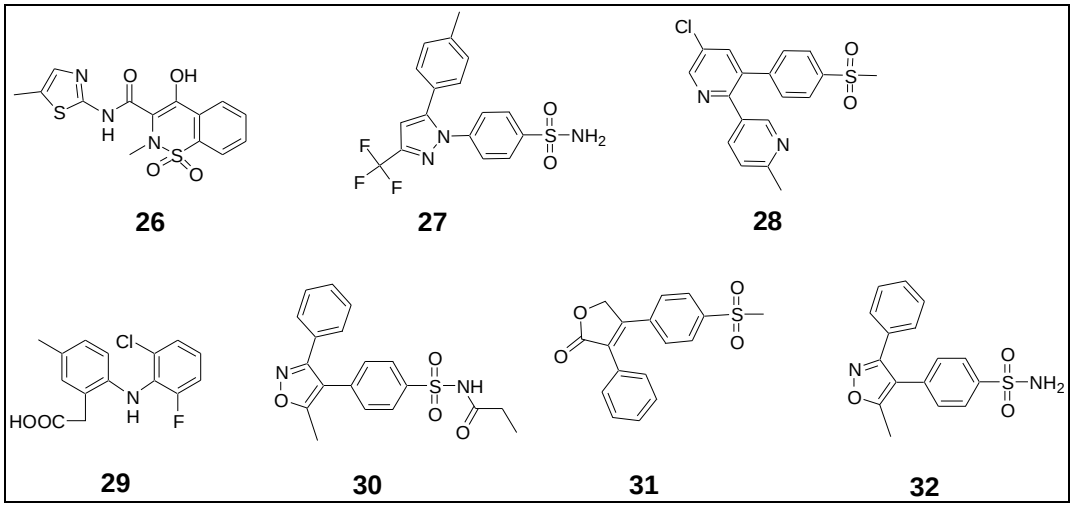
2. selektivni NSAID-i, inhibitori COX-2 su (Slika 4):

a) meloksikam (**26**)

b) koksibi: celekoksib (**27**), etorikoksib (**28**), lumirakoksib (**29**), parekoksib (**30**), rofekoksib (**31**) i valdekoksib (**32**)



Slika 3. Klasični NSAID-i: diflunisal (**5**), metamizol (**6**), diklofenak natrij (**7**), etodolak (**8**), sulindak (**9**), tolmetin (**10**), ketoprofen (**11**), naproksen (**12**), fenbufen (**13**), fenoprofen (**14**), flurbiprofen (**15**), indoprofen (**16**), ketorolak (**17**), mefenamska kiselina (**18**), flufenamska kiselina (**19**), meklofenamska kiselina (**20**), tolfenamska kiselina (**21**), fenilbutazon (**22**), fenazon (**23**), piroksikam (**24**), tenoksikam (**25**)

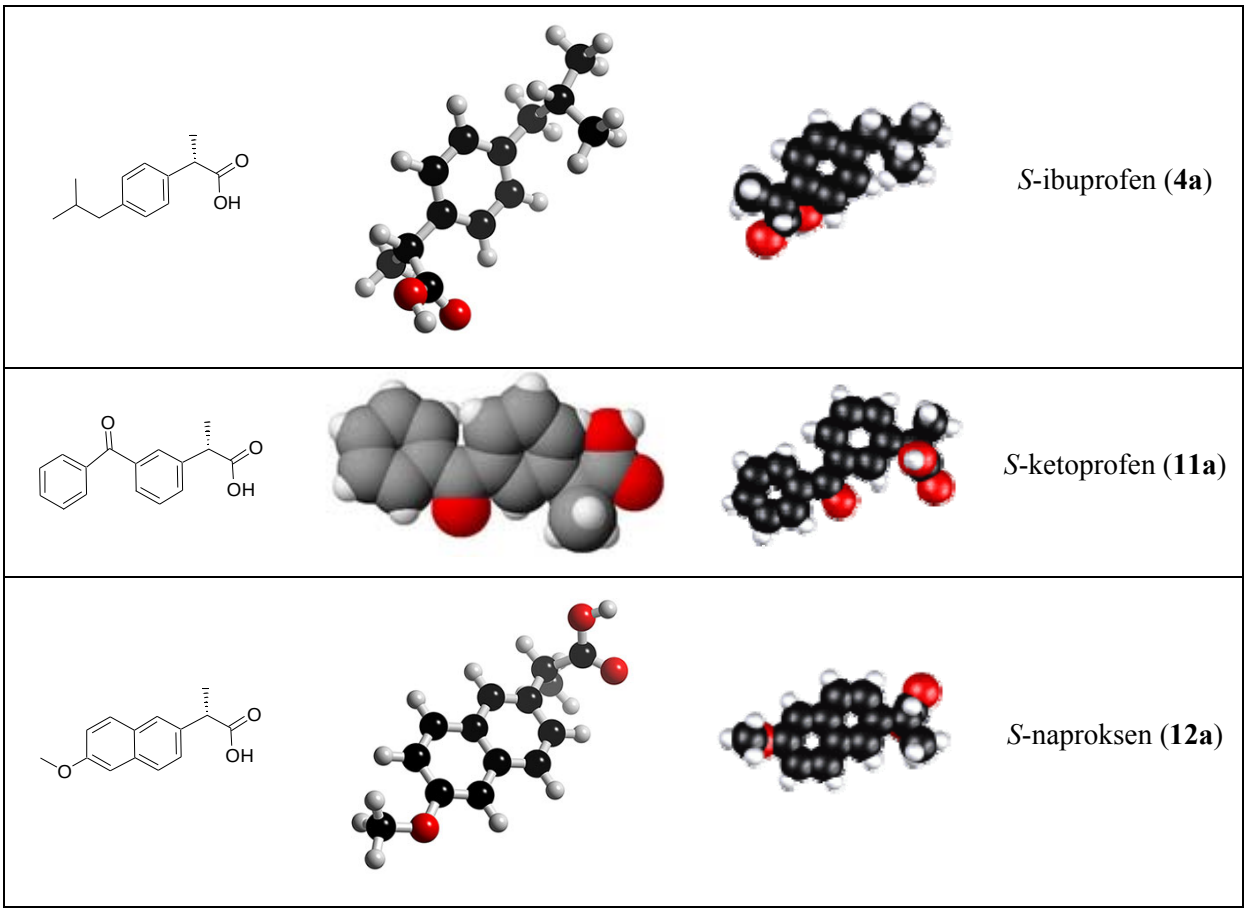


Slika 4. Selektivni COX-2 inhibitori: meloksikam (**26**), celekoksib (**27**), etorikoksib (**28**), lumirakoksib (**29**), parekoksib (**30**), rofekoksib (**31**) i valdekoksib (**32**)

2.1.2.1. Kiralnost nesteroidnih protuupalnih lijekova

Većina NSAID-a su kiralne molekule (uz pojedine iznimke / npr. diklofenak). Međutim, većina ih se proizvodi/sintetizira kao racemične smjese. U pravilu, samo je jedan enantiomer farmakološki aktivan. Za neke lijekove (u pravilu profene), u organizmu postoje enzimi izomeraze koji prevode neaktivne enantiomere u aktivne forme, iako aktivnost tih enzima jako varira od pojedinca do pojedinca. Taj je fenomen najvjerojatnije odgovoran za slabu korelaciju između djelotvornosti NSAID-a i koncentracije u plazmi uočenu u starijim studijama kada se nije provodila specifična analiza aktivnog enantiomera.

Ibuprofen i ketoprofen su sada dostupni u jednoj, aktivnoj enantiomernoj formi (*S*-ibuprofen i *S*-ketoprofen), što omogućuje brži nastup djelovanja i bolji profil nuspojava. Naproksen je uvijek bio na tržištu kao jedan aktivni enantiomer, *S*-naproksen (Slika 5).[32]



Slika 5. Kiralne strukture NSAID-a: *S*-ibuprofen (**4a**), *S*-ketoprofen (**11a**), *S*-naproksen (**12a**)

2.1.2.2. Farmakokinetika nesteroidnih protuupalnih lijekova

Većina NSAID-a su slabe kiseline, s pK_a vrijednosti od 3-5. Apsorbiraju se gotovo u potpunosti iz gastrointestinalnog (GI) trakta, metaboliziraju se u jetri i uglavnom izlučuju kroz bubrege. Dobro se vežu za proteine plazme (obično >95 %), najčešće na albumin, tako da je njihov volumen distribucije približno jednak volumenu plazme. Većina NSAID-a se metabolizira u jetri oksidacijom i konjugacijom u neaktivne metabolite koji se obično izlučuju urinom, iako se neki lijekovi djelomično izlučuju preko žuči. Metabolizam im može biti nenormalan u određenim stanjima bolesti, a nakupljanje se može primijetiti i kod normalnog doziranja lijekova. Ibuprofen i diklofenak imaju kratka vremena polueliminacije (2-3 sata), dok neki NSAID-i (obično oksikami) imaju vrlo dugo vrijeme polueliminacije (20-60 sati). [33-37]

2.1.3. Prostaglandini i enzim ciklooksigenaza

2.1.3.1. Prostaglandini

Povijest naziva

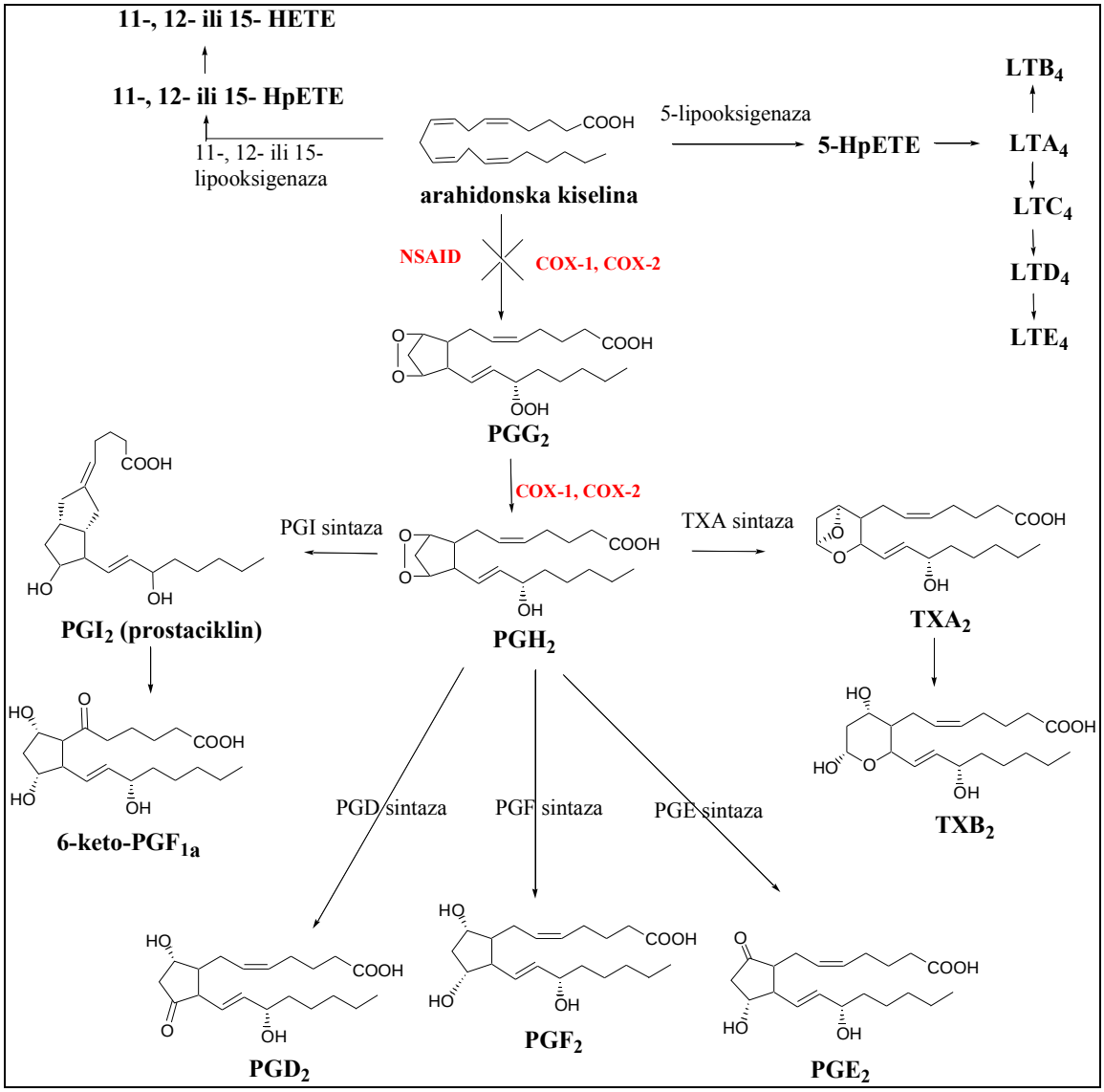
Još 1931. godine Kurzok i Lieb su otkrili da sjemena tekućina čovjeka posjeduje snažne kontraktilne i vazodilatirajuće učinke na glatku muskulaturu uterusa. Prostaglandine je prvi otkrio i izolirao iz ljudske sjemene tekućine 1935. godine Ulf von Euler iz Švedske,[38] te potom neovisno od njega M.W. Goldblatt.[39] Identificirani su kao lipofilne kisele tvari, a misleći da potječu iz žlijezda prostate, nazvani su prostaglandinima. Također je utvrđeno da su prisutni i sintetiziraju se u gotovo svakoj stanici u tijelu.[40]

Prostaglandini djeluju kao kemijski glasnici, na mjestu gdje se sintetiziraju. Oni su medijatori i imaju različita fiziološka djelovanja.

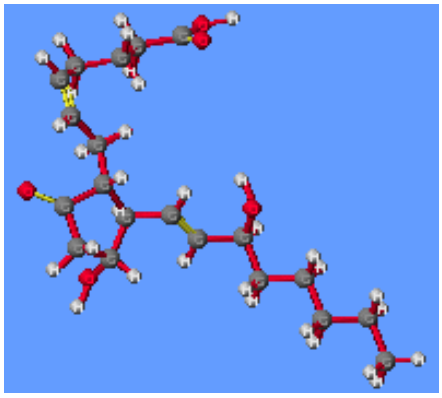
Kao što je ranije navedeno, 1971. godine otkriveno je da acetilsalicilna kiselina i slični lijekovi mogu inhibirati sintezu prostaglandina (Sune K. Bergström, Bengt I. Samuelsson i John R. Vane).

Biokemija prostaglandina /bisinteza

Prostaglandini zajedno s tromboksanima i prostaciklinima tvore prostanoidnu klasu derivata masnih kiselina (prostanoidna klasa je podklasa eikozanoida). Dakle, prostaglandini su nezasićene karboksilne kiseline, koji se sastoje od 20 ugljikovih atoma, a također sadrže i peteročlani prsten (derivati ciklopentano-masnih kiselina s 20 C atoma). Postoje različite strukture s jednom, dvije ili tri dvostruke veze. Na peteročlanom prstenu također može biti prisutna dvostruka veza, karbonilna ili alkoholna skupina.



Slika 6. Sintetski put tromboksana (TX), prostaciklina, prostaglandina (PG) i leukotriena (LT)



Slika 7. Struktura prostaglandina PGE_2

Prostaglandini nastaju iz fosfolipida vezanih na stanične membrane. Pod utjecajem enzima fosfolipaze A2 iz fosfolipida se oslobađa arahidonska kiselina. Iz arahidonske kiseline, pod utjecajem enzima ciklooksigenaze (COX) nastaju prekursori prostaglandina, nestabilni ciklički endoperoksidi iz kojih konačno, posredovanjem specifičnih enzima prostaglandin sintaza, nastaju pojedini prostaglandini. Dodatno iz arahidonske kiseline djelovanjem enzima lipooksigenaza (LOX) nastaju leukotrieni. Odnosno, arahidonska kiselina osim kroz cikooksigenazni put prolazi i kroz lipooksigenazni put. U ciklooksigenaznom putu osim prostaglandina nastaju i tromboksan i prostaciklin. Lipooksigenazni put je aktivan u leukocitima i makrofazima gdje nastaju leukotrieni (Slika 6 i 7).[41-45] NSAID-i inhibiraju ciklooksigenazu i tako sprječavaju endogenu produkciju prostaglandina.

Funkcija prostaglandina

Prostaglandini su u normalnim okolnostima prisutni u brojnim biljnim i životinjskim vrstama, te u ljudskom organizmu. Njihove su fiziološke funkcije raznovrsne, a pojedinih vrsta prostaglandina često i oprečne. Tako su neki prostaglandini bronhokonstriktori, a neki bronhodilatatori. Među prostaglandinima nadalje postoje vazokonstriktori, vazodilatatori, inhibitori i aktivatori agregacije trombocita. Neki smanjuju lučenje želučane kiseline i potiču produkciju zaštitne sluzi na sluznici probavnog trakta.

Trenutno je poznato 9 receptora prostaglandina na različitim tipovima stanica.[46] Receptori nazvani DP1-2, EP1-4, FP, IP i TP, vežu odgovarajući prostaglandin (npr. DP1-2 receptor se veže za PGD2). Ti raznovrsni receptori znače da prostaglandini djeluju na različite stanice te da imaju široku raznolikost djelovanja:

- uzrokuju konstrikciju ili dilataciju glatkih mišića krvnih žila
- uzrokuju agregaciju i deagregaciju trombocita
- senzibiliziraju spinalne neurone za bol
- smanjuju intraokularni tlak
- reguliraju upalne procese
- reguliraju kretanje kalcija
- kontroliraju regulaciju hormona
- kontroliraju stanični rast

U Tablici 2 prikazana je usporedba prostaglanina (prostaglandin I_2 (PGI_2), prostaglandin E_2 (PGE_2) i prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)) – receptori na koje se vežu te funkcija prostaglandina.

Tablica 2. Usporedba tipova prostaglandina

Tip prostaglandina	Receptor	Funkcija
PGI_2	IP	vazodilatacija inhibicija agregacije trombocita bronhodilatacija
PGE_2	EP_1	bronhokonstrikcija kontrakcija glatkih mišića GI trakta
	EP_2	bronhodilatacija relaksacija glatkih mišića GI trakta vazodilatacija
	EP_3	↓ lučenje želučane kiseline ↑ lučenje želučane mukoze kontrakcija maternice (u trudnoći) kontrakcija glatkih mišića GI trakta inhibicija lipolize ↑ autonomne neurotransmitere
	nespecifični	hiperalgezija ↑ tjelesnu temperaturu
$PGF_{2\alpha}$	FP	kontrakcija maternice bronhokonstrikcija

Inhibicija prostaglandina i klinička primjena

Antagonisti prostaglandina[19] su:

- kortikosteroidi (inhibiraju produkciju fosfolipaze A_2)
- klasični NSAID-i (inhibiraju ciklooksigenazu)
- selektivni COX-2 inhibitori ili koksibi

U Tablici 3 prikazani su učinci prostaglandina i inhibitora prostaglandina.

Tablica 3. Učinci prostaglandina i inhibitora prostaglandina

Učinak prostaglandina	Efekt inhibitora prostaglandina	Klinički učinak
povećano stvaranje vezivnog tkiva, proliferacija	smanjeno stvaranje vezivnog tkiva	antireumatski učinak
smanjeno izlučivanje želučane kiseline, zaštitno djelovanje	povećano izlučivanje želučane kiseline	mukozne lezije, čir
smanjen motilitet (pokretljivost) crijeva	povećana pokretljivost crijeva	dijareja
povećano izlučivanje Na u bubrezima	smanjeno izlučivanje Na^+ bubrezima	edemi
povećana agregacija trombocita	smanjena agregacija trombocita	profilaksa moždanog udara
smanjen tonus bronhijalne muskulature	povećani tonus bronhijalne muskulature	napadaj astme

2.1.3.2. Enzim ciklooksigenaza

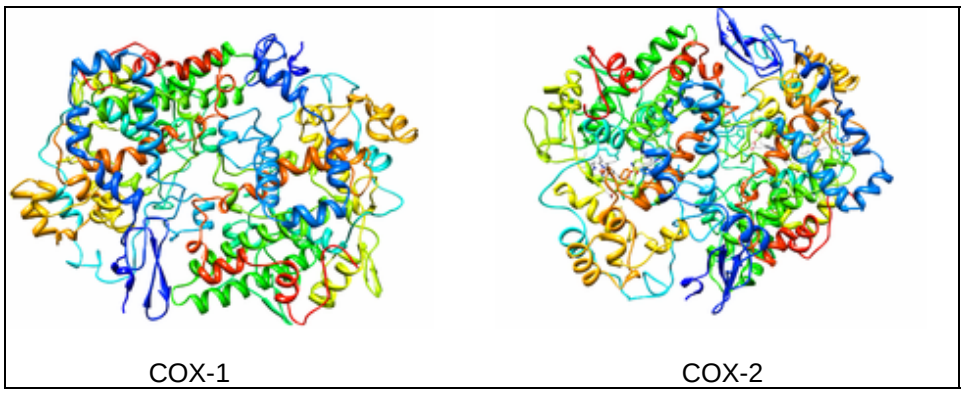
Cikooksigenaza je enzim odgovoran za tvorbu važnih bioloških medijatora prostanoida, kao što su prostaglandini, prostaciklin i tromboksan. Danas su poznate tri izoforme COX enzima: COX-1, COX-2 i COX-3.[47-53]

COX-1 je konstitutivno prisutan enzim (*house-keeping*) s važnom ulogom u regulaciji mnogih normalnih fizioloških procesa.[54-57] Jedna od uloga je održavanje normalnog stanja želuca, gdje prostaglandini imaju zaštitnu ulogu sprečavajući eroziju mukoze želuca.[28,58-59] Kada neselektivni COX-1/COX-2 inhibitori (poput acetilsalicilne kiseline, ibuprofena i naproksena) smanje razinu prostaglandina u želucu, gubi se zaštitni utjecaj prostaglandina što može rezultirati ulkusom želuca ili duodenuma i potencijalnim krvarenjem.

COX-2 je enzim koji je fakultativno prisutan u stanjima upale (induciran je citokinima, mitogenima i endotoksinima u upalnim stanicama)[56-57] i upravo inhibicijom COX-2 enzima nastaju željeni učinci NSAID-a.[60-62]

Za treću formu enzima COX-3, smatra se da se nalazi u mozgu i da je možda povezana s centralnim djelovanjem na snižavanje tjelesne temperature kod upotrebe paracetamola.

Strukture COX-1 i COX-2 enzima prikazane su na Slici 8, a funkcije COX-1, COX-2 i COX-3 enzima prikazane su u Tablici 4.



Slika 8. Strukture COX-1 i COX-2 enzima

Tablica 4. Vrste COX enzima i njihova funkcija

Vrste enzima	Odgovoran za	Lokacija
COX-1	bazalnu razinu prostaglandina	u krvnim žilama, želucu i bubrezima
COX-2	sintezu prostaglandina posrednika upale/ proizvodi prostaglandine raznim stimulacijama	u krvnim žilama, želucu i bubrezima
COX-3	u fazi otkrivanja točne uloge	u mozgu

Daniel L. Simmons je 1991. godine otkrio enzim COX-2 čime se razvila nada da će se otkriti djelotvorni NSAID-i bez gastrointestinalnih nuspojava, koje su karakteristične za ovu vrstu lijekova. Mislilo se da će se selektivnom inhibicijom COX-2 enzima dobiti protuupalno djelovanje bez ometanja gastroprotektivnih prostaglandina. Relativno selektivni COX-2 inhibirajući oksikam, meloksikam, je bio prvi korak u razvoju pravih selektivnih COX-2 inhibitora. Međutim, koksibi (celekoksib, rofekoksib, valdekoksib, parekoksib i etorikoksib), najnovija klasa NSAID-a, koji se smatraju pravim selektivnim COX-2 inhibitorima, ispoljavaju kardiovaskularne nuspojave.

Simmons je također suotkrivač COX-3 izoenzima u 2002. godini. On je analizirao vezu između novog izoenzima i paracetamola (acetaminofena).[63-64]

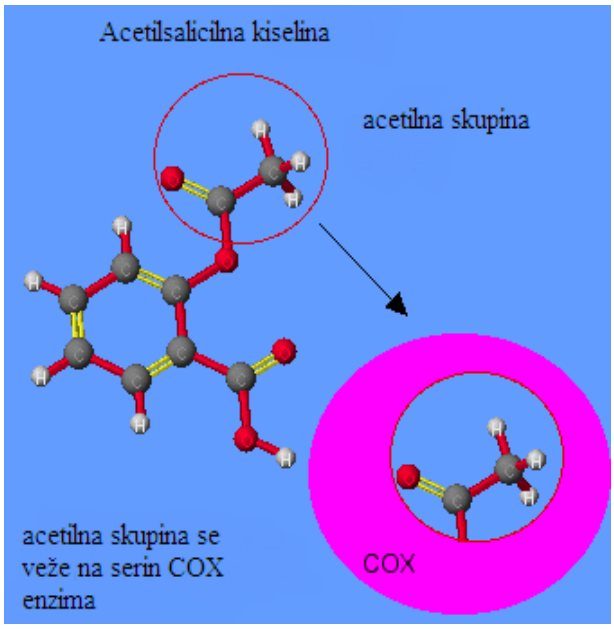
2.1.4. Mehanizam djelovanja nesteroidnih protuupalnih lijekova

Većina NSAID-a djeluju kao neselektivni inhibitori ciklooksigenaze-1 (COX-1) i ciklooksigenaze-2 (COX-2). Kao što je ranije navedeno ciklooksigenaze kataliziraju nastajanje prostaglandina i tromboksana iz arahidonske kiseline (koja nastaje iz staničnog fosfolipidnog dvosloja djelovanjem fosfolipaze A_2). Prostaglanini djeluju između ostalog kao prijenosne molekule u procesu upale.[41-45,65]

Acetilsalicilna kiselina je jedini NSAID koji ireverzibilno inhibira COX-1, dok se ostali NSAID-i reverzibilno vežu za COX enzime (selektivno ili neselektivno).

Acetilsalicilna kiselina, kao i ostali NSAID-i, inhibira enzime ciklooksigenaze, COX-1 i COX-2, koji su uključeni u zatvaranje prstena i dodavanje kisika arahidonskoj kiselini pri njezinoj pretvorbi u prostaglandine. Acetilna skupina na acetilsalicilnoj kiselini se hidrolizira i potom se veže na alkoholnu skupinu serina. Time se blokira kanal u enzimu i arahidonska kiselina ne može doprijeti do aktivnog mjesta enzima. Inhibirajući ili blokirajući enzim, sinteza prostaglandina je blokirana što ima za posljedicu smanjenje upale, bolova i povišene tjelesne temperature. Molekularna osnova inhibicije COX enzima acetilsalicilnom kiselinom prikazana je na Slici 9.

Acetilsalicilna kiselina također inhibira sintezu prostaglandina koji su uključeni u neželjeno zgrušavanje krvi pri koronarnim bolestima.



Slika 9. Molekularna osnova inhibicije COX enzima acetilsalicilnom kiselinom

2.1.5. Upotreba nesteroidnih protuupalnih lijekova u upalnim bolestima

NSAID-i se obično primjenjuju za liječenje akutne i kronične bolesti gdje su prisutni bol i upala. Istraživanja se nastavljaju prema prevenciji kolorektalnih tumora te liječenju ostalih stanja poput tumora i kardiovaskularnih bolesti.

NSAID-i su općenito indicirani za simptomatsko liječenje pri sljedećim stanjima:

- reumatoidni artritis
- osteoartritis
- protuupalne artropatije (npr. ankilozantni spondilitis, psorijazni artritis)
- akutni giht
- dismenoreja (menstrualna bol)
- bolesti kostiju (metastaze)
- glavobolje i migrene
- postoperativni bolovi
- blaga do umjerena bol za vrijeme upale i ozlijede tkiva
- vrućica
- kad ductus arteriosus nije zatvoren kod preranorođene djece (u 24 sata nakon poroda)

Acetilsalicilna kiselina inhibira agregaciju trombocita, što je korisno u liječenju arterijske tromboze i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

2.1.5.1 Reumatoidni artritis

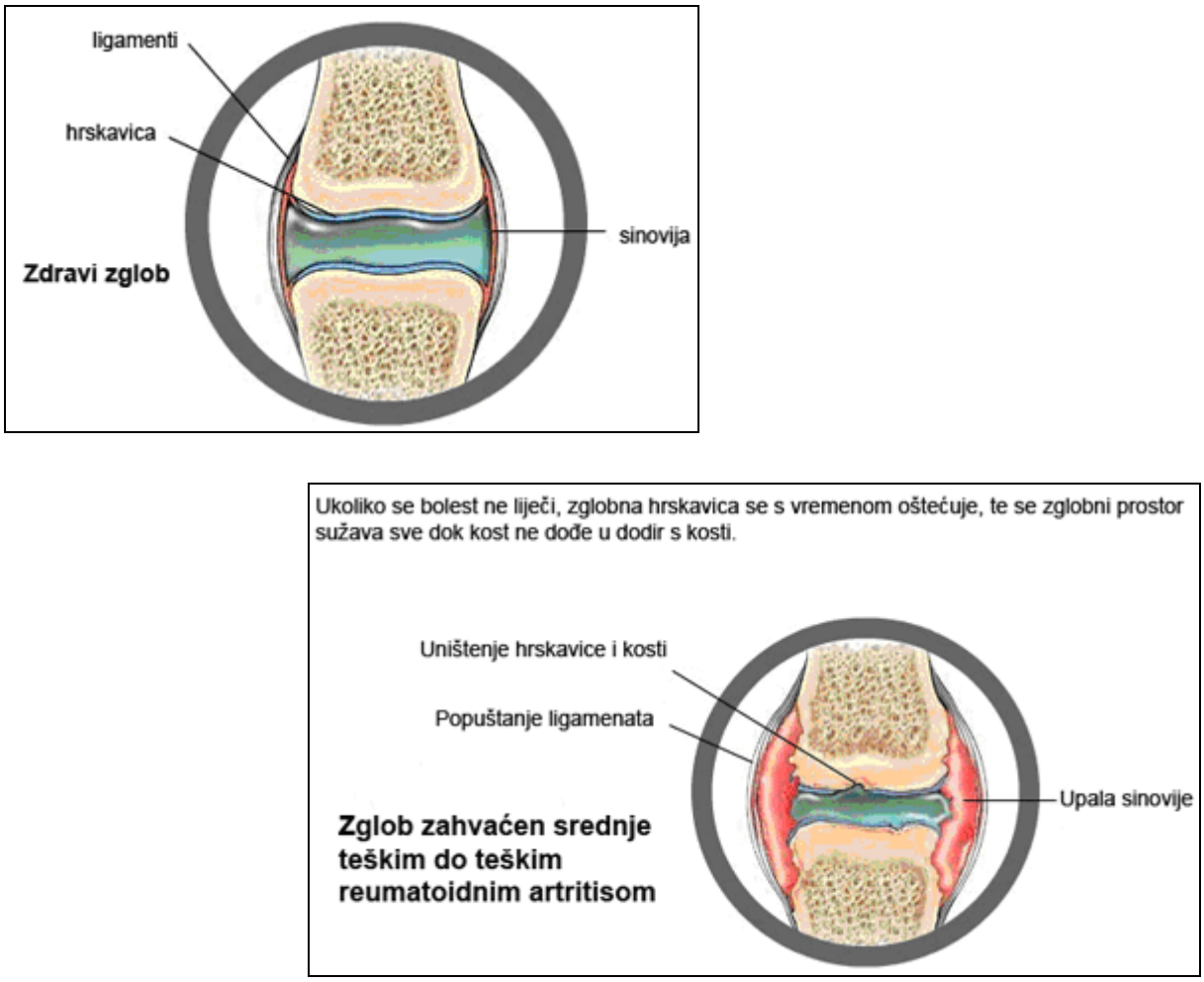
Reumatoidna oboljenja su jedna od najčešćih kroničnih inflamatornih stanja u razvijenim zemljama svijeta, a reumatoidni artritis je najčešći uzrok invalidnosti. Promjene na zglobovima, koje vjerovatno predstavljaju autoimunu reakciju, sastoje se od upale, proliferacije sinovije i erozije hrskavice i kosti. Reumatske bolesti se pojavljuju u sve većem broju. Te bolesti najteže pogađaju ljude u zreloj životnoj dobi, ali nisu rijetke i kod djece.[66-68] Vremenom prouzrokuju sve veća oštećenja organa za kretanje. Uzrok i mehanizam nastanka reumatskih bolesti uglavnom nije poznat, a ne postoji niti jedinstvena klasifikacija reumatskih bolesti.[69-76]

Najvažnije reumatske bolesti su:

- upalne reumatske bolesti - reumatska groznica, reumatoidni artritis, sistemske bolesti vezivnog tkiva (lupus, sistemska skleroza, vaskulitisi), metaboličke artropatije (giht, osteoporoza), infekcijski artritis
- degenerativne reumatske bolesti kralježnice i perifernih zglobova
- izvanzglobni (mekotkivni) reumatizam
- rijetke reumatske bolesti
- reumatski sindromi u drugim bolestima (u bolestima pluća, krvi, endokrinog, gastrointestinalnog i kardiovaskularnog sustava)

Artritis predstavlja upalu jednog ili više zglobova, a karakteriziran je bolom, oteklinama, ukočenošću, i deformacijama sa ili bez smanjene pokretljivosti zglobova. Artritis uglavnom pogađa pokretne zglobove koljena, ručne zglobove, zglobove palčeva, skočni zglob i rame. Kod artritisa razlikujemo dva najčešća oblika – osteoartritis i reumatoidni artritis.

Reumatoidni artritis je upalna bolest vezivnog tkiva koja uzrokuje bol, otekline, ukočenost i gubitak funkcije zglobova te zahvaća ponekad i druge izvanzglobne strukture. To je zapravo autoimuno oboljenje u kojemu obrambeni imunološki sustav pojedinca vlastite membrane u zglobovima ne prepoznaje kao svoje, nego kao strana tijela. Pojavljuje se upala hrskavica i tkiva oko zglobova, koji se oštećuju i propadaju (Slika 10). Često postoje oštećenja i same površine kosti. Tijelo nadomješta normalno tkivo s tkivom ožiljka, čime normalni prostor unutar zglobova postaje tijesan i ograničen te se kosti međusobno previše približavaju. Bez odgovarajuće terapije oštećenje zgloba se nastavlja, a može doći i do ireverzibilnog oštećenja.[77]



Slika 10. Zdravi zglob i zglob zahvaćen srednje teškim do teškim reumatoidnim artritisom

Liječenje reumatskih bolesti

Steroidni antireumatski lijekovi

Lijekovi koji se koriste u terapiji reumatskih bolesti, zbog svog antiinflamatornog i imunosupresivnog djelovanja su kortikosteroidi (steroidni antireumatski lijekovi).[78-79] U tu skupinu spadaju prirodni hormoni (npr. hidrokortizon) i njihovi strukturni analozi (npr. prednizon, prednizolon, metilprednizolon, deksametazon, betametazon, fluokortolon, triamcinolon). Kortikosteroidi imaju vrlo široko indikacijsko područje, te su reumatske bolesti samo jedno od brojnih bolesnih stanja gdje se ti lijekovi mogu primijeniti (npr. supstitucijsko liječenje, alergijske kožne bolesti, alergijski rinitis, alergija na lijekove, urtikarija, bronhijalna astma, imunosupresija nakon presađivanja organa, ulcerozni kolitis, neki oblici leukemije).

U terapiji reumatoidnog artritisa, kortikosteroidi u relativno kratkom vremenu suprimiraju upalu, te usporavaju i sprečavaju dodatno oštećenje zglobova i ostalih zahvaćenih tkiva. Međutim, kad se upotrebljavaju u kontinuitetu nekoliko mjeseci do nekoliko godina, učinak im postepeno slabi, te istovremeno izazivaju brojne i teške nuspojave kao što su: ovalno lice i vrat, hiperpigmentacija,

dlakavost, zadržavanje Na^+ iona i vode u organizmu, edemi (otekline), povišenje krvnog tlaka, pojava ili napredovanje šećerne bolesti, osteoporoza s povećanim rizikom loma kostiju, katarakta (zamućenje očnih leća), glaukom (povišenje intraokularnog tlaka), stanjenje i isušivanje kože, aktivacija peptičkog ulkusa i dr.[80-81] Zbog svega navedenog kortikosteroidi nisu prikladni za dugotrajno liječenje reumatskih bolesti, te se najčešće koriste samo pri akutnim pogoršanjima istih.

Ostali antireumatici – auranofin , sulfasalazin

Unutar ove skupine nalaze se lijekovi koji modificiraju, usporavaju ili u potpunosti zaustavljaju progresiju reumatoidnog artritisa te propadanje zglobova. To nisu simptomatski lijekovi. Oni nemaju sposobnost ublažavanja akutnih simptoma reumatoidnog artritisa (bol, otekline), pa se iz tog razloga kombiniraju s lijekovima koji to mogu – nesteroidnim antireumaticima, kortikosteroidima ili istovremeno s nesteroidnim antireumaticima i kortikosteroidima. Njihov puni učinak se zapaža tek nakon višemjesečnog kontinuiranog i redovitog uzimanja.[82-84]

Imunosupresivi

Reumatoidni artritis je kronična progresivna bolest autoimunog karaktera, pa se u terapiji ove bolesti osim do sada nabrojanih skupina lijekova, upotrebljavaju i imunosupresivi (lijekovi koji suprimiraju pretjerani imunološki odgovor organizma). Kao ni prethodna skupina lijekova, niti imunosupresivi nisu simptomatski lijekovi. Njihov se puni učinak također očituje tek nakon dulje uporabe. Od do sada spomenutih skupina lijekova rjeđe se koriste u terapiji reumatoidnog artritisa prije svega zbog teških nuspojava (pad imuniteta, organizam postaje skloniji infekcijama, oštećenja bubrega i jetre). Njihovo primarno indikacijsko područje je prevencija odbacivanja transplantata. Neki od tih lijekova se, u drugačijim dozama i načinima primjene, upotrebljavaju kao citostatici. Najznačajniji imunosupresivi raspoloživi kod nas koji se koriste u terapiji reumatoidnog artritisa su: metotreksat, azatioprin i ciklosporin.[83-85]

Nesteroidni protuupalni lijekovi

NSAID su najčešće primenjivani u suvremenoj reumatološkoj praksi. Njihovim se djelovanjem smanjuju bol i otok, ali se ne može značajno uticati na tijek bolesti. U primjeni je veliki broj lijekova iz ove skupine, sa sličnom efikasnošću, ali s različitim neželjenim efektima. Pri dugoj upotrebi NSAID-a, posebno kod osoba starijih od 65 godina, postoji rizik od gastrointestinalnih oštećenja.[86-87] Zbog toga se ti lijekovi obično uzimaju poslije obroka.

U posljednje se vrijeme sve više pažnje poklanja novoj klasi NSAID-a, podjednako efikasnih kao i prethodni, ali znatno sigurnijih i s manje gastrointestinalnih nupojava. To su takozvani selektivni COX-2 inhibitori.[88] Jedan od dosta korištenih, pretežno selektivnih (semiselektivnih) NSAID-a je i nimesulid, lijek sa znatno manjom učestalošću gastrointestinalnih komplikacija, a s očuvanim protuupalnim i analgetskim djelovanjem.

2.1.6. Nuspojave nesteroidnih protuupalnih lijekova

Kao što je već rečeno, najvažnije nuspojave neselektivnih NSAID-a vezane su za gastrointestinalni i bubrežni sustav. Nuspojave ovise o primijenjenoj dozi. Za selektivne NSAID-e karakteristične su kardiovaskularne nuspojave. Čak 40 % bolesnika koji uzimaju NSAID-e imaju nuspojave u gastrointestinalnom traktu, a u 20 % bolesnika javljaju se kardiovaskularne nuspojave.

Gastrointestinalne nuspojave

NSAID-i imaju dvostruki utjecaj na gastrointestinalni trakt: lijekovi kiselog karaktera izravno iritiraju mukozu želuca, a inhibicijom enzima COX-1 smanjuju razinu zaštitnih prostaglandina. U oko 50 % pacijenata, koji kronično uzimaju NSAID-e, endoskopskim su pregledom dokazane erozije želučane stijenke, a u 15–30 % pacijenata ulkus želuca.[19,26-29, 89-95]

Među najtežim nuspojavama spadaju krvarenja i perforacije gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta (oko 300 slučajeva na 100.000 bolesnika koji uzimaju NSAID-e), te akutno oštećenje jetre i akutno zatajenje bubrega (puno rjeđi od krvarenja).

Rizici za razvoj gastrointestinalnih nuspojava su mnogobrojni: postojeća ili ranija komplicirana i nekomplicirana ulkusna bolest, istodobna primjena više od jednog NSAID-a, primjena velikih doza NSAID-a, istodobna primjena antikoagulantnih lijekova (npr. varfarina), dob starija od 70 godina, istodobna primjena glukokortikoida ili antitrombocitnih lijekova (npr. tienopiridina).[96-101]

Kako bi se spriječile ili umanjile te nuspojave treba promijeniti vrijeme uzimanja i oblik lijeka, kombinirati terapiju NSAID s inhibitorima protonske pumpe (npr. omeprazol) ili misoprostolom.

Pojedini NSAID-i dolaze na tržištu kao obložene formulacije ili za rektalnu primjenu. Međutim, takve formulacije nisu pokazale smanjeni rizik od nastajanja gastrointestinalnih ulceracija.

Bubrežne nuspojave

NSAID-i su također povezani s relativno visokim postotkom bubrežnih nuspojava. Mehanizam bubrežnih nuspojava je povezan s promjenom bubrežne hemodinamike (protoku krvi). Prostaglandini uobičajeno uzrokuju vazodilataciju aferentnih arteriola u glomerulu. To pomaže održavanju normalne glomerularne perfuzije i brzine glomerularne filtracije (GFR), indikatoru renalne funkcije. Blokiranjem tih učinaka povezanih s prostaglandinima, NSAID-i mogu uzrokovati bubrežne disfunkcije (zadržavanje soli i tekućine te hipertenziju).[102,103] U rjeđim slučajevima mogu uzrokovati intersticijski nefritis, nefrotički sindrom, akutno zatajenje bubrega i akutnu tubularnu nekrozu.

Kardiovaskularne nuspojave

Noviji specifični COX-2 inhibitori (koksibi) imaju podjednak željeni učinak uz manje gastrointestinalne nuspojave. Obzirom na relativno kratko iskustvo s primjenom koksiba u usporedbi s klasičnim NSAID-ima, primjenu koksiba potrebno je vrlo pažljivo pratiti. To je pokazao i nedavni slučaj s koksibima (lumirakoksib, rofekoksib i valdekoksib), koji su povučeni iz upotrebe zbog učestalosti kardiovaskularnih incidenata pri duljoj i redovitoj primjeni.[104-106]

COX-2 inhibitori i visoke doze klasičnih protuupalnih lijekova za 80 % povećavaju rizik nastajanja infarkta miokarda u usporedbi s placebom.[30,31,107]

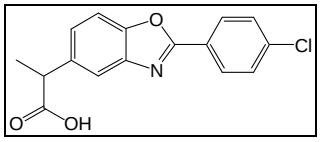
Svi NSAID-i, osim acetilsalicilne kiseline, povezani su s dvostukim rizikom simptomatskog zatajenja srca u pacijenata bez povijesti srčanih oboljenja. U pacijenata s takvom povijesti, upotreba NSAID-a (osim niske doze acetilsalicilne kiseline) je povezana s više od 10 puta povećanim rizikom srčanih zatajenja.

Jedan od prijedloga primjene NSAID-a uz postojeći kardiovaskularni rizik (prisutan infarkt, angina pektoris, cerebrovaskularna bolest, premoštenje krvnih žila) je uz NSAID uzimati acetilsalicilnu kiselinu i inhibitor protonske pumpe, što je prikladan model i uz postojeći gastrointestinalni rizik.

Fototoksičnost

Kod mnogih NSAID-a je uočena nuspojava fotoosjetljivost. Protuupalni lijekovi mogu sami prouzrokovati upalu u kombinaciji s izlaganjem svjetlu. Dokazano je da 2-aril-propionske kiseline mogu uzrokovati fotoosjetljive reakcije, ali i ostali NSAID-i uključujući piroksikam, diklofenak i benzidamin.[108]

Kod benoksaprofena (**33**) (Slika 11/ povučen zbog hepatotoksičnosti) uočena je najveća fotoaktivnost od svih NSAID-a. Fotoosjetljivost je povezana s dekarboksilacijom karboksilne skupine.



Slika 11. Struktura benoksaprofena (**33**)

2.1.7. Neselektivni nesteroidni protuupalni lijekovi

Acetilsalicilna kiselina (1)

Acetilsalicilna kiselina je derivat salicilne kiseline koja je blagi neopijatni analgetik koristan u smanjenju glavobolje i mišićnih bolova. Kao i ostali NSAID-i inhibira sintezu prostaglandina.

Indometacin (2)

Indometacin je otkriven 1963. godine,[109] a najprije je odobren u SAD-u 1965. godine.

Indometacin ima jako izraženo antiinflamatorno i antireumatsko djelovanje pa se uglavnom koristi kod reumatskih bolesti, a ne za smanjenje bolova i snižavanje povišene temperature. Izaziva brojne nuspojave – ulceracije i krvarenja u želucu, glavobolje, oštećenje bubrega, jetre, pogoršanje krvne slike, a može izazvati i zadržavanje vode i soli u bubregu što podiže krvni tlak. Može izazvati halucinacije ili pogoršati depresiju.[110]

Upotrebljava se pri upalnim reumatskim bolestima, a također se klinički koristi za produljivanje prijevremenog poroda, i za zatvaranje ductus arteriosus.[111]

Indometacin je potentni lijek s puno ozbiljnih nuspojava i ne treba se koristiti za manje bolove ili povišene tjelesne temperature. Za blagu do umjerenu bol uobičajena oralna doza indometacina (50-75 mg) je djelotvorna kao 600 mg aspirina.

Paracetamol (3)

Paracetamol (acetaminofen) se ponekad svrstava među NSAID-e, međutim, on nije NSAID i nema značajna protuupalna svojstva. S obzirom da njegov mehanizam djelovanja nije jasan, sumnja se da je neposjedovanje protuupalnog djelovanja posljedica inhibicije ciklooksigenaze u središnjem živčanom sustavu. Pretpostavlja se da paracetamol inhibira COX-3.[64]

Ibuprofen (4)

Ibuprofen je derivat propionske kiseline i bio je prvi lijek iz te skupine. Po djelovanju vrlo je sličan acetilsalicilnoj kiselini. Ibuprofen je indiciran za ublažavanje blage do umjerene boli, a koristi se i za liječenje reumatskih bolesti.[111]

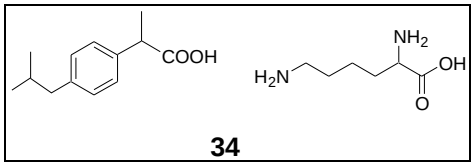
Najčešće nuspojave ibuprofena su ulceracije i krvarenje želuca, zatim glavobolja, vrtoglavica, nesanica, razdražljivost, umor, povraćanje, ukočenost vrata i pomućenje svijesti. Kod ugotrajne upotrebe moguće je oštećenje jetre ili bubrega.

Ibuprofen je razvijen od strane istraživačkog tima Boots Group tijekom 1960-tih godina.[111] Otkrio ga je Stewart Adams, a patentirao ga je zajedno sa suradnicima Johnom Nicholson i Colinom

Burrows 1961. godine. Lijek je odobren za liječenje reumatoidnog artritisa u Velikoj Britaniji 1969. godine, a u SAD-u 1974. godine.

Ibuprofen lizin (34)

U Europi, Australiji i Novom Zelandu odobrena je sol ibuprofena s lizinom (Slika 12) za liječenje istih stanja kao i ibuprofen. Ta sol je dobro topljiva u vodi čime je omogućena intravenska primjena. Ibuprofen lizin pokazuje puno brže djelovanje od ibuprofena.[112]



Slika 12. Struktura ibuprofen lizina (**34**)

Ibuprofen lizin se koristi za zatvaranje ductus arteriosus u prerano rođene djece male porođajne mase (500 do 1500 grama), koja nemaju više od 32 tjedna gestacijske starosti, kada su uobičajena medicinska sredstva nedjelotvorna.[112]

***Diklofenak* (7)**

Diklofenak se u manjim dozama koristi uglavnom za uklanjanje bolova (povrede, zubobolja, glavobolja, menstrualni bolovi i sl.) i za ublažavanje upale kod vanzglobnog reumatizma, a također može poslužiti i za snižavanje povišene tjelesne temperature. U većim dozama koristi se za ublažavanje simptoma reumatoidnog artritisa, osteoartroze, ankilozantnog spondilitisa, akutnog napada gihta i dr. Osim toga u većim je dozama pogodan za ublažavanje posttraumatskih bolova.[113-114]

Diklofenak je jedan od najpopularnijih nesteroidnih antireumatika i njegova potrošnja je izuzetno velika. Kao i svi neselektivni NSAID-i može uzrokovati krvarenje i ulceracije u želucu. Ne smije se uzimati dulje od 2 mjeseca zbog opasnosti od oštećenja jetre i bubrega.[115]

Ketoprofen (11)

Ketoprofen je po svojim svojstvima sličan ibuprofenu. Ima dobro protuupalno i analgetsko djelovanje, pogotovo kod reumatskih bolesti. Također, može se koristiti kod raznih bolnih stanja (postoperativna bol, menstruacija, bol kod koštanih metastaza, bol poslije povreda i dr.).

Naproksen (12)

Naproksen je najjači NSAID propionske strukture. Djelovanje mu je analgetsko tako da je naproksen lijek prvog izbora kod brojnih vrlo bolnih stanja (bol u mišićima, kostima i zglobovima; bol poslije operacija i vađenja zuba; bol nakon povreda, uganuća i istegnuća; pri zubobolji i glavobolji).

Pri ginekološkim bolestima smiruje bol i menstruacijske grčeve. Osim toga, koristi se i za liječenje brojnih reumatskih bolesti.[116]

Naproksen razrijeđuje krv te ga osobe koje koriste antikoagulanse trebaju izbjegavati. Naproksen, poput ostalih NSAID-a, posjeduje gastrointestinalne nuspojave.

Piroksikam (24)

Piroksikam spada u skupinu oksikama. Posjeduje vrlo izraženo protuupalno djelovanje kao i indometacin, dok je po analgo-antipiretskom djelovanju sličan acetilsalicilnoj kiselini. Zato se koristi za brojne reumatske bolesti: reumatoidni artritis, spondiloartritisi (ankilozantni spondilitis, psorijatični artritis, osteoartroza, pseudogiht, burzitis, kapsulitis, tendinitis, tendosinovitis, sinovitis i dr.) i vrlo je efikasan u lječenju istih.

Nuspojave kod piroksikama blaže su nego kod indometacina, a i sigurniji je za dugotrajno liječenje od indometacina.

2.1.8. Selektivni nesteroidni protuupalni lijekovi

Koksibi su NSAID-i nove generacije i nove kemijske strukture. To su rofekoksib, celekoksib, valdekoksib, lumirakoksib i parekoksib. Za razliku od prethodnih, neselektivnih NSAID-a koksibi su selektivni inhibitori COX-2 enzima, koji je odgovoran za produkciju medijatora upale, bolova i povišene tjelesne temperature, a ne djeluju na produkciju zaštitnih prostaglandina u želucu. Stoga, inhibitori COX-2 enzima imaju manje gastrointestinalnih nuspojava od ostalih NSAID-a. Koriste se za ublažavanje bolova kod reumatoidnog artritisa i osteoartritisa.[117-123]

Suprotno ostalim NSAID-ima, selektivni COX-2 inhibitori ne smanjuju zgrušavanje krvi, tako da se smatraju sigurnijim za pacijente koji koriste antikoagulanse (poput varfarina) te se mogu koristiti prije ili poslije operacije bez povećanja rizika od krvarenja.

Međutim, podaci iz novijih istraživanja ukazuju na potencijalno povećani rizik od kardiovaskularnih nuspojava (kao što su srčani udar) za ovu klasu spojeva. Preporučljivo je da liječnik odredi individualni faktor rizika za svakog pacijenta. Koksibi nisu preporučljivi za osobe lošijeg stanja srca i kardiovaskularnog sustava.[124-126]

Celekoksib (27)

Celekoksib je razvila trvtka G. D. Searle & Company, a kopromovirale su ga tvrtke Monsanto (osnovna tvrtka Searle) i Pfizer pod zaštićenim imenom Celebrex®. Monsanto nakon spajanja s tvrtkom Pharmacia (podružnica tvrtke Pfizer) daje Pfizeru vlasništvo nad Celebrexom.

Celekoksib (zaštićena imena Celebrex®, Celebra® i Onsenal®) je NSAID koji se koristi za liječenje osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, akutne boli, bolne menstruacije i menstrualne simptome te za smanjenje brojnih polipa (kolon i rektum).[126] Primarno je indiciran u pacijenata kojima je potrebna stalna i dugotrajna terapija smanjenja boli. Vjerojatno je da upotreba celekoksiba nema prednost za kratkotrajne i akutne boli pred klasičnim NSAID-ima (smanjenje boli celekoksibom je slično paracetamolu).[127]

Celekoksib je selektivni COX-2 inhibitor, otprilike 10-20 puta selektivniji za COX-2 nego COX-1.[128]

Kao i ostali NSAID-i, celekoksib je od FDA (*Food and Drug Administration*, Američka agencija za lijekove) dobio "*black box warning*" zbog kardiovaskularnog i gastrointestinalnog rizika, a također *American Heart Association* preporuča da se celekoksib uzima isključivo kao zadnji izbor kod pacijenata koji imaju srčanih problema ili rizik da ih razviju (preporuka uzeti paracetamol ili naproksen).[104, 129,130]

Preliminarni rezultati studije *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study* (CLASS) izdani 2000. godine (rezultati za prvih šest mjeseci) potvrdili su da selektivni COX-2 inhibitori imaju manje gastrointestinalnih nuspojava od klasičnih NSAID-a (celekoksib nasuprot ibuprofenu ili diklofenaku). Ali ti rezultati nisu potvrđeni nakon 12 mjeseci (cijela studija). Međutim, u toj studiji davao se celekoksib u dozi od 800 mg dnevno, a uobičajene doze su 400 ili 200 mg dnevno.[131]

Također različite kliničke studije pokazuju kontradiktorne podatke o kardiovaskularnim nuspojavama celekoksiba. Tako npr. *Adenoma Prevention with Celecoxib* (APC) studija pokazala je povećani kardiovaskularni rizik kod celekoksiba u odnosu na placebo, dok slična studija *Prevention of Colorectal Sporadic Adenomatous Polyps* (PreSAP) nije dokazala povećani rizik. S druge pak strane, *Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial* (ADAPT) studija, koja je prekinuta nakon preliminarnih podataka, pokazala je da je neselektivni NSAID naproksen, ali ne celekoksib, povezan s povećanjem kardiovaskularnog rizika. FDA je za sve NSAID-e zaključila da postoji '*class effect*' za povećanje kardiovaskularnog rizika.[132-134]

Rofekoksib (31)

Rofekoksib (zaštićena imena Vioxx®, Ceoxx® i Ceeoxx®) je NSAID proizvođača Merck & Co. Koristio se za liječenje osteoartritisa, u stanjima akutne boli i dismenoreje te svih ostalih stanja koje uzrokuju akutnu ili kroničnu bol.[135] Rofekoksib je odobren kao siguran i djelotvoran lijek od strane

FDA 20. svibnja 1999. godine. Širom svijeta rofekoksib se propisivao za više od 80 milijuna ljudi u isto vrijeme te je do samog povlačenja bio jedan od najšire korištenih lijekova na tržištu.[136]

Merck je dobrovoljno povukao rofekoksib s tržišta 30. rujna 2004. godine[105] nakon saznanja iz *Adenomatous Polyp PRevention On Vioxx* (APPROVe) studije,[137] provedene od stane tvrtke Merck zbog zabrinutosti od povećanog rizika od kardiovaskularnih nuspojava povezanim s dugotrajnom upotrebom i visokim dozama rofekoksiba.[124, 138] FDA je također potvrdio povećani rizik od kardiovaskularnih nuspojava te je procjenio da je Vioxx u u pet godina koliko je bio na tržištu uzrokovao 88 000 do 139 000 srčanih udara, od kojih su 30-40 % vjerojatno bili fatalni.

Zanimljivo je da je u vrijeme povlačenja s tržišta, rofekoksib bio jedini koksib s kliničkim dokazima o njegovim superiornim profilom gastrointestinalnih nuspojava nad klasičnim NSAID-ima. To je u većoj mjeri bazirano na *Vioxx GI Outcomes Research* (VIGOR) studiji, koja je uspoređivala djelotvornost i profil nuspojava rofekoksiba i naproksena.[139-141]

Etorikoksib (28)

Etorikoksib (zaštićena imena Arcoxia®, Algix® i Tauxib®) je selektivni COX-2 inhibitor (otprilike je 106 puta selektivniji za COX-2 nego za COX-1) proizvođača Merck. Trenutno je odobren u više od 60 zemalja širom svijeta, ali nije u SAD-u (FDA tražila dodatne podatke o sigurnosti i djelotvornosti etorikoksiba prije odobravanja – *non-approvable letter*, 27.04.2007. godine).[142] U RH je za etorikoksib ukinuto Rješenje odlukom proizvođača (iz marketinških razloga). Terapijske indikacije etorikoksiba su reumatioidni artitis, psorijatički artritis, osteoartritis, ankilozantni spondilitis, kronična bol u leđima, akutna bol i giht.[143,144]

Lumirakoksib (29)

Lumirakoksib (zaštićeno ime Prexige®) je selektivni COX-2 inhibitor proizvođača Novartis. Nakon što je prvotno odobren u nekim zemljama, lumirakoksib je povučen s tržišta najviše zbog hepatotoksičnosti.[145]

Lumirakoksib ima nekoliko razlikovnih obilježja. Po strukturi je različit od ostalih COX-2 inhibitora. Lumirakoksib je analog diklofenaka (klor je zamijenjen fluorom, feniloctena kiselina ima drugu metilnu skupinu u meta položaju) po čemu spada u skupinu NSAID-a arilalkanskih kiselina. Veže se na različito mjesto na COX-2 receptoru u odnosu na ostale COX-2 inhibitore. Od svih koksiba on je jedini kiselina i pokazuje najveću COX-2 selektivnost od svih NSAID-a.[146]

Parekoksib (30)

Parekoksib je prolijek valdekoksiba koji je topljiv u vodi. On je injekcijski preparat koji se koristi perioperativno kada pacijenti ne mogu uzimati lijekove oralno. Odobren je u Europi za kratkotraju kontrolu perioperativne boli na isti način kao i ketorolak u SAD-u. Međutim, nasuprot

ketorolaku parekoksib nema utjecaja na funkciju trombocita te ne potiče krvarenje za vrijeme ili nakon operacije.[147,148]

U 2005. godini FDA je poslala pismo neodobravanja za parekoksib. Samo je jedna studija zabilježila povećanje incidencije srčanih udara nakon operacije srca u usporedbi s placebom kad je parekoksib u visokim dozama korišten nakon operacije. U Europi parekoksib nije odobren za upotrebu nakon srčanih operacija.

Valdekoksib (32)

Valdekoksib je NSAID koji se koristi za liječenje osteoartritisa, reumatoidnog artritisa te kod bolnih menstruacija i menstrualnih simptoma.[148] Valdekoksib je proizveden i stavljen na tržište pod zaštićenim imenom Bextra® od strane proizvođača D.G. Searle & Company. Odobren je u SAD-u u studenom 2001. godine i bio je dostupan do 2005. godine, kada je povučen s tržišta zbog povećanog rizika od kardiovaskularnih nuspojava.

Pfizer je prva saznanja o kardiovaskularnom riziku valdekoksiba uočio u listopadu 2004. godine, a potom je *American Heart Association* objavio da je za pacijente, koji koriste valdekoksib nakon operacije srca, mogućnost od srčanog infarkta 2,19 puta veća od onih koji uzimaju placebo. U usporedbi s rofekoksibom, a prema velikoj studiji objavljenoj 2006. godine, valdekoksib ima manje renalnih nuspojava i aritmija srca.[149]

2.2. MAKROLIDI

2.2.1. Upotreba i povijest makrolida

Makrolidi predstavljaju dobro poznatu skupinu oralnih antibiotika. Njihova široka aktivnost pokriva najvažnije bakterijske vrste odgovorne za infekcije gornjih i donjih respiratornih puteva. Općenito su djelotvorni na aerobne Gram-pozitivne bakterije (*Staphyloccocus aureus*, *Streptoccocus pneumoniae* i *Streptoccocus pyogenes*), anaerobne bakterije, neke Gram-negativne bakterije (*Neisseria gonorreheae*, *Bordetella pertusis* i *Haemophilus influenzae*), te na *Mycoplasmu* i *Chlamydiu.* Prema eukariotima makrolidi pokazuju malu ili nikakvu aktivnost. Makrolidni antibiotici se upotrebljavaju u terapiji raznih bakterijskih infekcija već više od 50 godina.[150] Upotrebljavaju se u humanoj i veterinarskoj praksi (16-člani makrolidi), a zbog niske toksičnosti i visokog stupnja sigurnosti koriste se i u liječenju djece. Prvi makrolidni antibiotik na tržištu bio je eritromicin A.[151] Nestabilnost eritromicina A u kiseloj sredini želuca, loša oralna bioraspoloživost, gastrointestinalne nuspojave i još neka svojstva ograničavaju njegovu uporabu. Stoga je sintetiziran cijeli niz derivata među kojima su se naročito istaknuli klaritromicin i azitromicin. Ta dva antibiotika karakterizirana su širokim spektrom antibakterijske aktivnosti, poboljšanim farmakokinetskim svojstvima, te neznatnim nuspojavama u odnosu na eritromicin A. Međutim, na ta dva antibiotika sve se više razvija rezistencija. Pojavom bakterija rezistentnih na makrolide nastavljaju se istraživanja u smjeru razvoja novih makrolidnih antibiotika djelotvornih na rezistentne sojeve.[152]

Godine 1950. Brockmann i Henkel su izolirali prvi makrolid iz soja *Streptomyces* i nazvali ga pikromicin.[153] Prototip makrolidne klase antibiotika je eritromicin. Eritromicin je najviše istraživani spoj iz skupine 14-članih makrolida. Poznati su eritromicin A, B, C, D i F, a strukturno kompleksni sekundarni metaboliti izolirani su 1952. godine iz soja *Saccharopolyspora erythraeaus*.[151] Patentirano je dobivanje eritromicina A iz soja *Arthrobacter sp.* i on predstavlja jedini opisani makrolidni antibiotik koji se ne dobiva iz mikroorganizma vrste *Actinomycetes*. Od tog vremena do danas izolirano je stotinjak makrolidnih antibiotika iz aktinomiceta te im je određena struktura. Na tržištu se trenutno nalazi najviše derivata eritromicina A.

Nova skupina makrolida dobivena je uvođenjem dušikovog atoma u aglikonski prsten, čime su dobiveni petnaesteročlani makrolidi, nazvani azalidi. Azalidi su dobiveni reakcijom Beckmannove pregradnje 9(E)-eritromicin oksima, pri čemu nastane imino eter umjesto očekivanog laktama. Daljnjom redukcijom dobivenog iminoetera, nastaju petnaesteročlani makrolidi, azalidi. To su polusintetski derivati postojećih makrolida. Prvi 15-člani makrolid i prvi predstavnik azalida, antibiotik azitromicin, otkriven je 1980. godine u PLIVI, a nastao je iz ideje da se kombiniraju

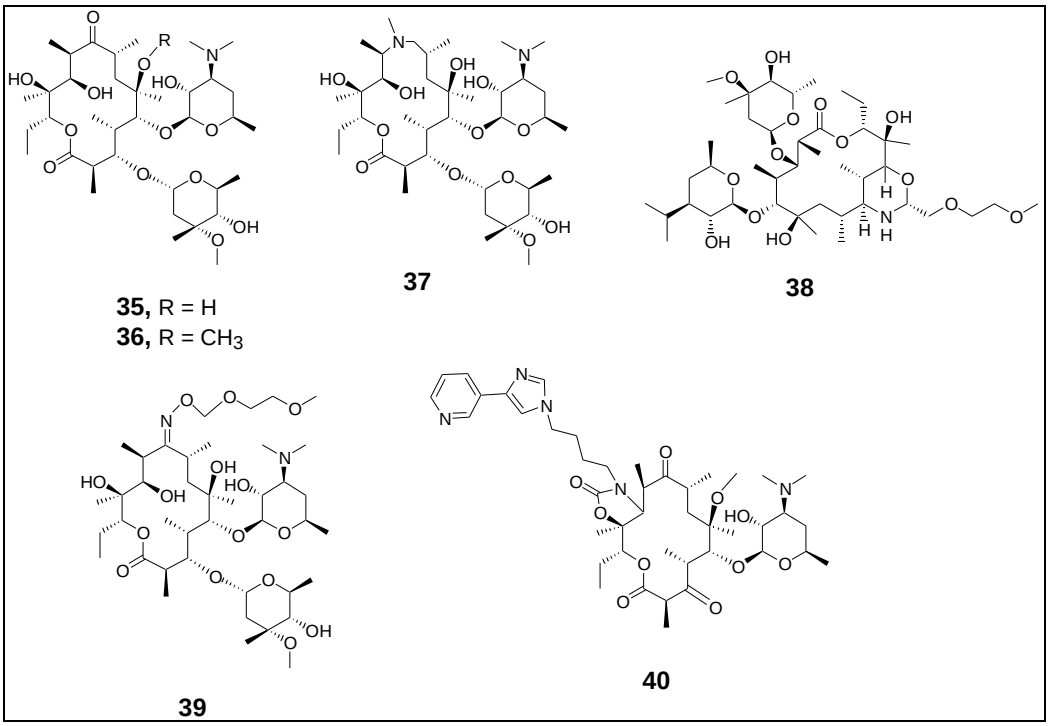
svojstva eritromicina i sulfonamida sintezom *O*-sulfonil-derivata eritromicin oksima.[154,155] Azitromicin se odlikuje širokim spektrom antibakterijske aktivnosti koji pokriva sve bakterije bitne u infekcijama respiratornog trakta uključujući i Gram-negativne bakterije *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, prema kojima su do tada poznati makrolidi pokazivali slabu aktivnost. Velika prednost azitromicina pred drugim antibioticima je njegova izvrsna farmakokinetika. Taj antibiotik karakterizira dobra oralna bioraspoloživost, dugo vrijeme poluživota u odnosu na već postojeće antibiotike, te nakupljanje u tkivima u visokoj koncentraciji. Od cijelog niza spojeva sintetiziranih u fazi polusintetskih derivata druge generacije, azitromicin (Sumamed®, Zithromax®) je uz klaritromicin (Biaxin®) doživio najveći klinički i komercijalni uspjeh.

Zbog potrebe pronalaženja antibiotika koji imaju bolje djelovanje na rezistentne sojeve istraživane su različite klase makrolida. Poboljšana svojstva pokazali su ketolidi. Ketolidi su 14-člani makrolidi koji na položaju C-3 imaju karbonilnu skupinu. Dobivaju se eliminacijom šećera L-kladinoze s položaja C-3 eritromicinskog skeleta i dalje oksidacijom nastale hidroksilne skupine u karbonilnu. Iako su već 1977. godine izolirani ketolidi pikromicin i njegov analog narbomicin, tek su 1995. godine priređeni prvi polusintetski ketolidi i objavljena su njihova antibakterijska svojstva. Prvi takav ketolid, iz skupine makrolida treće generacije, pojavio se na tržištu kao telitromicin (Ketek®).[156]

2.2.2. Strukture i podjela makrolida

Makrolidi sadrže makrociklički lakton sa 12, 14, 15 ili 16 ugljikovih atoma, a na aglikonskom prstenu glikozidno je vezan jedan ili više amino- i/ili neutralnih šećera (najčešće kladinoza i desozamin koji ima bazičnu diamino-skupinu). Iz tog razloga je Woodward predložio termin "makrolid" kojim se opisuje ova klasa spojeva. Glavni predstavnici 14-članih makrolida su eritromicin, klaritromicin i oleandomicin, 15-člani makrolid je azitromicin, dok kod 16-članih razlikujemo tilozinsku i leukomicin-spiramicinsku podvrstu. Kliničku uporabu nije doživio niti jedan 12-člani makrolid.[157]

Uobičajeni makrolidi (Slika 13) su: eritromicin A (**35**), klaritromicin (**36**), azitromicin (**37**), diritromicin (**38**), roksitromicin (**39**) i telitromicin (**40**).



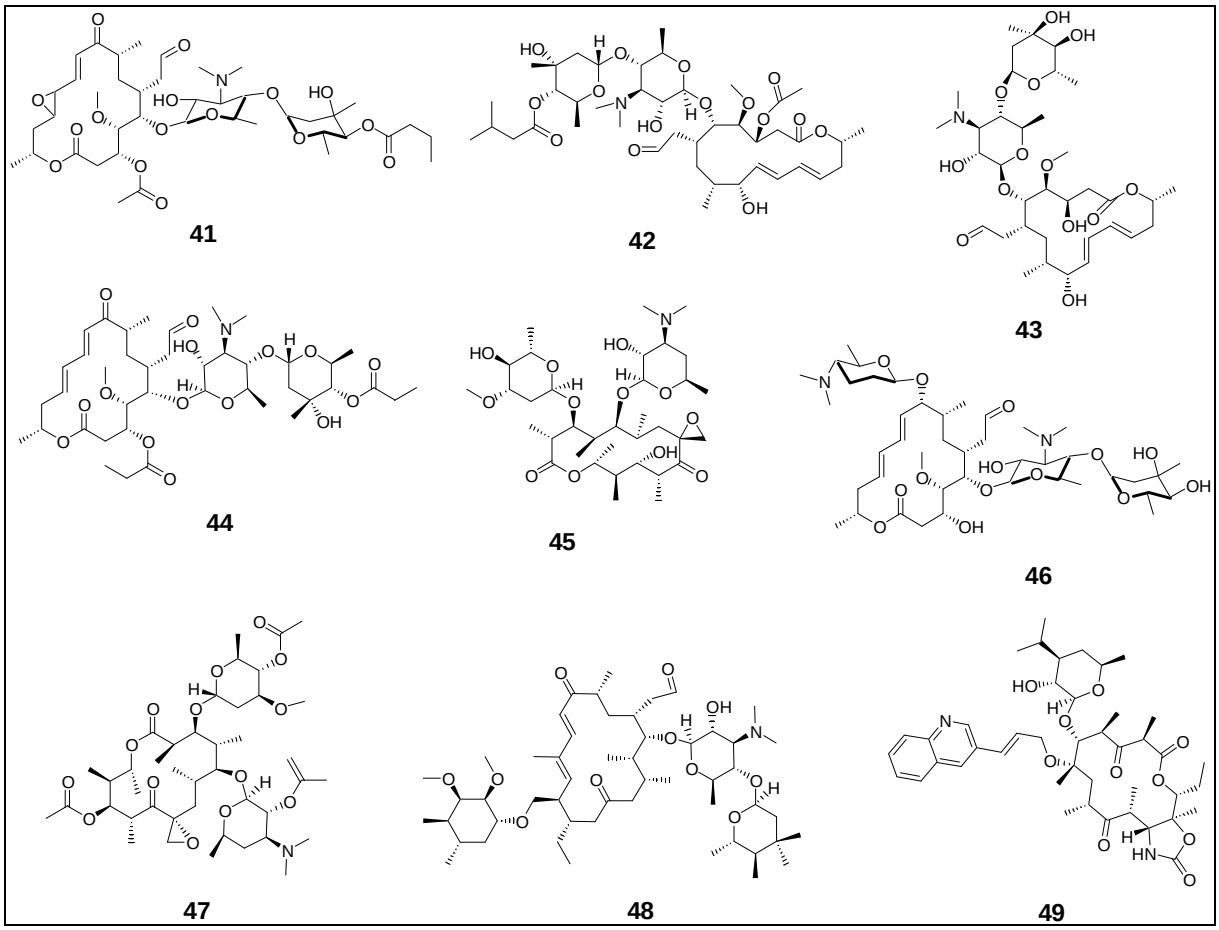
Slika 13. Uobičajeni makrolidi: eritromicin A (**35**), klaritromicin (**36**), azitromicin (**37**), diritromicin (**38**), roksitromicin (**39**) i telitromicin (**40**)

Predstavnici ostalih makrolida (Slika 14) su: karbomicin A (**41**), josamicin (**42**), kitazamicin (**43**), midekamicin (midekamicin acetat) (**44**), oleandomicin (**45**), spiramicin (**46**), troleandomicin (**47**) i tilozin (**48**).

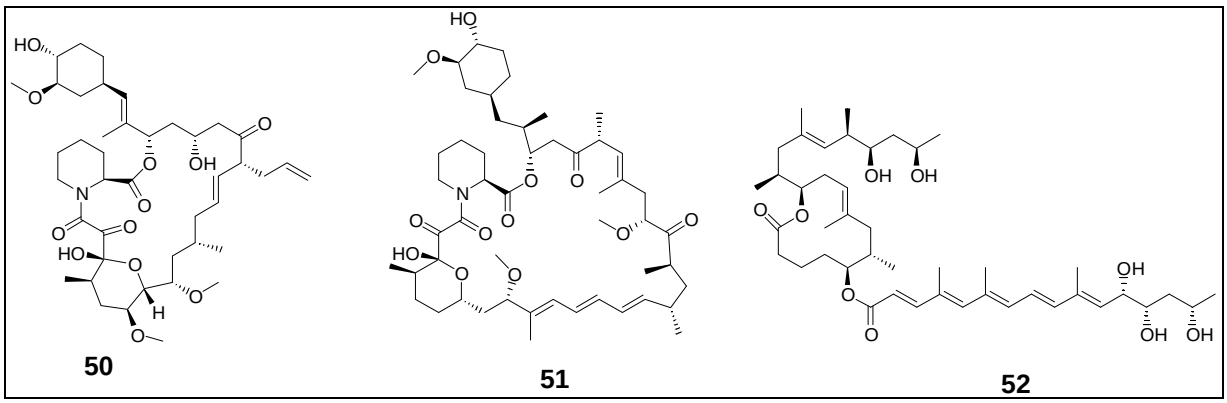
Ketolidi - nova skupina makrolida (strukturno srodni makrolidima). Upotrebljavaju se kod infekcija respiratornog trakta uzrokovane bakterijama rezistentnima na makrolide. Neki od njih su (Slika 14): telitromicin (**40** i cetromicin (**49**).

Makrolidi koji ne djeluju antibiotski su lijekovi poput takrolimusa (**50**) i sirolimusa (**51**) (Slika 15), koji se koriste kao imunosupresivi. Oni imaju slično djelovanje kao i ciklosporin.

Primjer toksičnog makrolida je mikolakton (**52**) (Slika 15).



Slika 14. Ostali makrolidi: karbomicin A (**41**), josamicin (**42**), kitazamicin (**43**), midekamicin (**44**), oleandomicin (**45**), spiramicin (**46**), troleandomicin (**47**), tilozin (**48**) i cetromicin (**49**)



Slika 15. Makrolidi koji ne djeluju antibiotski: takrolimus (**50**), sirolimus (**51**) i mikolakton (**52**)

2.2.3. Mehanizam djelovanja makrolida

Antimikrobno djelovanje

Makrolidi su lipofilne molekule koje ulaze u bakterijsku stanicu gdje sprečavaju sintezu proteina na ribosomima. Vežu se na peptidiltransferazno područje 50S ribosomske podjedinice i inhibiraju elongaciju proteina. Većina makrolida ne inhibira direktno stvaranje peptidne veze, već blokiraju ekstenziju početnog peptida na ribosomu koji je odgovoran za inicijaciju sinteze peptida. Inibicija vodi do destabilizacije i otpuštanja nepotpunih peptida u obliku peptidil-tRNA (tRNA, transportna ribonukleinska kiselina).[158-160]

Ribosom katalizira polimerizaciju aminokiselinskog slijeda kojeg diktira nukleotidni slijed sadržan u mRNA (glasnička ribonukleinska kiselina). Sastoji se od ribonukleoproteinskih dijelova, a ima sedimentacijski koeficijent 70S. Svaki bakterijski ribosom sastoji se od veće, 50S, podjedinice i manje 30S. Sinteza proteina započinje vezanjem 30S podjedinice na mRNA i inicijator aminoacil-tRNA. Kompleksu se pridružuje 50S podjedinica pri čemu nastaje kompletni inicijacijski kompleks koji na katalitičkom centru 50S podjedinice ima dva vezna mjesta (akceptorsko-A, ili aminoacilno, i donorsko-P, ili peptidilno) za aminoacil-tRNA derivate. Ova prva faza u sintezi proteina poznata je pod nazivom inicijacija. U drugoj fazi sinteze proteina, elongaciji, aminokiseline se vežu peptidnom vezom pri čemu nastaje peptidni lanac. Taj proces ponavlja se toliko puta koliko ima raspoloživih aminokiselina kodiranih slijedom nukleotidnih tripleta u mRNA, a ciklus završava otpuštanjem proteinskog lanca, terminacijom, te 70S ribosom ponovno disocira u podjedinice da bi inicirao novi ciklus.[158-160]

Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika promatra se u dva dijela, prepoznavanje veznog mjesta na ribosomu i utjecaj na elongaciju polipeptida.

Afinitet pojedinog antibiotika za vezno mjesto definiran je kinetičkom konstantom formiranja kompleksa antibiotik-ribosom. Veza između antibiotika i ribosoma nekovalentnog je karaktera i neobično jaka, što najvjerojatnije pridonosi dugom djelovanju.

Unos u stanice

Sposobnost prodiranja makrolida u stanice omogućuje mu nakupljanje u neutrofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, koji ga procesom kemotaksije usmjeravaju na mjesto upale. Zahvaljujući tome postižu se mnogo veće koncentracije makrolida u području upale nego u zdravom tkivu, čime se ostvaruje njegovo ciljno djelovanje.[1-3,161-167]

Za azitromicin, eritromicin, klaritromicin, telitromicin i cetromicin uspoređena je kinetika unosa i oslobađanja u ljudskim periferalnim krvnim polimorfonuklearnim neutrofilima (PMN) i u tri različite stanične linije (dvije fagocitne i jedna epitelna stanična linija). Azitromicin se nakuplja u svim stanicama bez naznaka zasićenja nakon 3 sata inkubacije, puno bolje se nakuplja u fagocitnim

stanicama nego u nefagocitnim, te se polagano oslobađa iz stanica. Kod eritromicina i klaritromicina vidljiv je slab unos u stanice, dolazi do zasićenja unosa u stanice te se brzo oslobađaju iz stanica. Unos telitromicina i cetromicina (ketolidi) postiže zasićenje u promonocitnoj staničnoj liniji i u makrofagima te je njihovo oslobađanje iz stanica vrlo brzo.[168]

Protuupalno djelovanje

Danas postoje jasni dokazi da neki makrolidi koji se već niz godina primjenjuju u kliničkoj praksi djeluju i protuupalno djelujući na imunološki sustav. Prvi podaci došli su iz kliničke primjene, kao što je uspješna primjena eritromicina A u liječenju difuznog panbronhiolitisa, bolesti karakterizirane kroničnom upalom bronha i infiltracijom upalnih stanica, pogotovo neutrofila.

Za makrolidne antibiotike eritromicin A, klaritromicin i roksitromicin dokazano je da su djelotvorni pri dugotrajnoj primjeni kod idiopatske, u Aziji raspostranjenje bolesti pluća difuznog panbronhiolitisa (DPB). Uspješni rezultati makrolida u DPB potiču iz kontroliranja simptoma kroz imunomodulaciju (prilagođavajući imunološki odgovor), uz dodatnu prednost upotrebe niske doze. S terapijom makrolida u DBP postignuto je veliko smanjenje upale u bronhijima kroz supresiju ne samo proliferacije neutrofilnih granulocita već i aktivnosti limfocita i obstruktivne sekrecije u dišnim putevima. Međutim, smatra se da antimikrobno djelovanje makrolida nije uključeno u njihovim korisnim djelovanjima u DPB jer je njihov protuupalni učinak očuvan i kod upotrebe niskih doza ili u terapiji bakterijskih infekcija s *Pseudomonas aeruginosa* rezistentnom na makrolide.[4-5,169-171]

2.2.4. Nuspojave makrolida

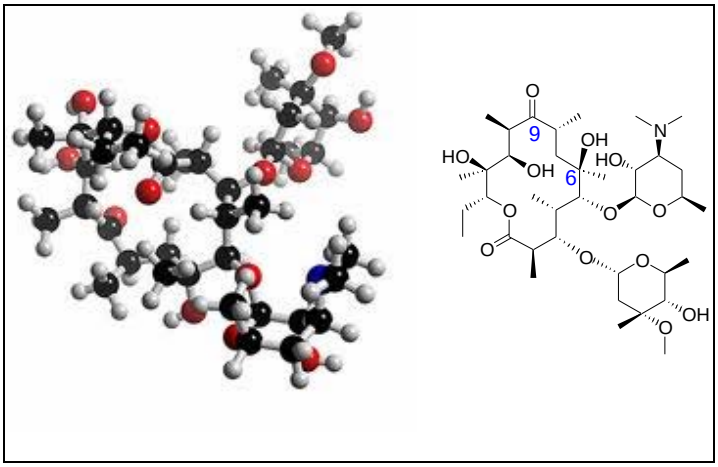
Gastrointestinalni poremećaji su uobičajene i veoma neugodne, ali ne i opasne nuspojave makrolida. Za eritromicin A, zabilježene su reakcije preosjetljivosti, kao što su kožni osip i groznica, prolazni poremećaji sluha, i rijetko, nakon tretmana duljeg od dva tjedna, kolestatska žutica. Moguća je pojava oportunističkih infekcija gastrointestinalnog trakta ili vagine.[172-173]

Eritromicin može izazvti abdominalne grčeve i dijareju i kada se primjenjuje u terapijskim dozama, jer posjeduje visoki afinitet za motilinske receptore (poznati prokinetik).

Neželjena djelovanja telitromicin su zamućenje vida (1-2%), QTc prolongacija, inhibicija CYP3A4 te moguća hepatotoksičnost, zbog čega je njegova primjena ograničena.[174]

2.2.5. Najpoznatiji makrolidi

Eritromicin A (35)



Slika 16. Eritromicin A

Eritromicin se dobiva kao smjesa triju tvari (eritromicin A, B i C) iz *Streptomyces erythreus*. Izoliran je 1950. godine,[150] a eritomicin A je u kliničkoj praksi od 1952. godine.[151] Donedavno je bio najvažniji antibiotik iz ove skupine. Sastoji se od 14-članog laktonskog prstena s deset centara asimetrije i dva šećera (L-kladinoza i D-desozamin).

Eritromicin A (Slika 16) je slaba baza (pK_a 8,7), razgrađuje se u kiselim uvjetima, apsorpcija mu je nepotpuna te je teško predvidjeti razinu u serumu i krvi. Za oralnu primjenu stabilizira se prevođenjem u soli i estere čime se povećava bioraspoloživost i apsorpcija, a smanjena su neželjena djelovanja. Primjeri soli bazičnih šećera su laktobionat (dobro topljiv u vodi), glukoheptonat i estolat (stabilan i netopljiv u vodi, brza resorpcija nakon oralne primjene / smatra se da je hepatotoksičan). Od estera poznati su stearati, propionati i etilsukcinati. Stearati su netopljivi su u vodi, daju se *p.o.* u obliku tableta i suspenzija. Eritromicin se oslobađa iz prolijeka u dvanaesniku.

<u>*Djelovanje, upotreba i metabolizam eritromicina*</u>

Ovisno o primijenjenoj dozi eritromicin može djelovati baktericidno ili bakteriostatski. Djelotvorniji je kod bazičnog pH jer je tada u neioniziranom obliku te lakše prodire kroz bakterijsku membranu. Eritromicin se uzima 4 puta dnevno. Posebno se primijenjuje kod pacijenata alergičnih na penicilin. Poznata je njegova gastrointestinalna toksičnost, a rezistencija je moguća nakon dulje primjene.[175,176]

Eritromicin je antibiotik iz skupine makrolida namijenjen za profilaksu i liječenje infekcija izazvanih Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Nakon oralne primjene eritromicin etilsukcinat se dobro resorbira iz tankog crijeva i u krvi se hidrolizira, i oslobađa se eritomicin baza

kao djelotvorni oblik lijeka. Maksimalnu koncentraciju u krvi postiže nakon 30 do 90 minuta. Izlučuje se putem jetre i žuči, a samo 5 % putem mokraće.

Većina eritromicina se metabolizira demetilacijom u jetri, a glavni je put eliminacije putem žuči, dok se samo malim dijelom eliminira urinom. Vrijeme polueliminacije eritromicina je 1,5 sat.

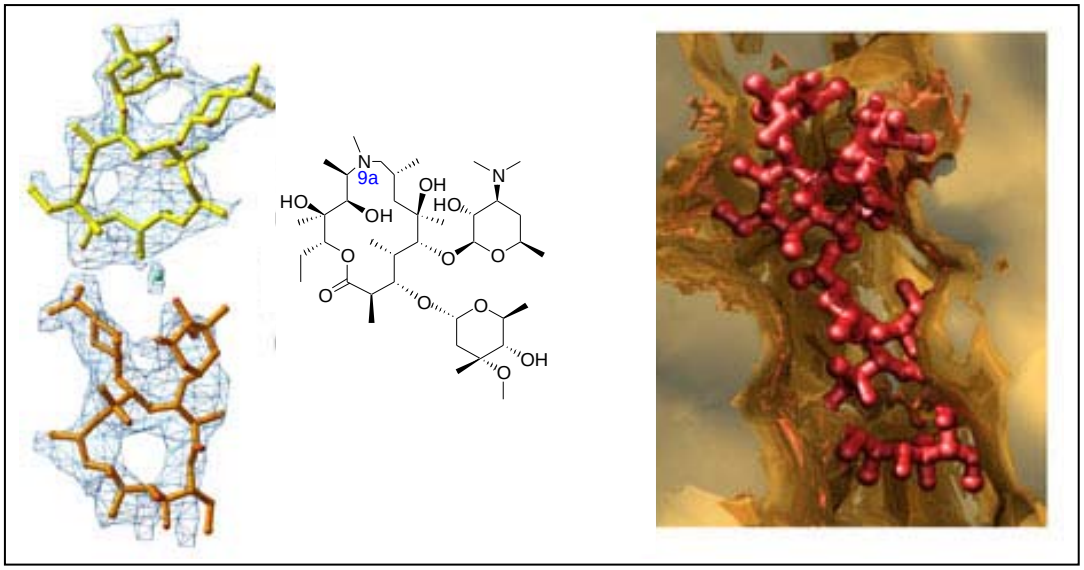
Povijest eritromicina

Nakon što je Abelardo Aguilar, filipinski znanstvenik, poslao uzorke zemlje svom poslodavcu Eli Lily-ju 1949. godine, istraživački tim Eli Lilly-ija, vođen J.M. McGuire-om, uspio je izolirati eritromicin iz metaboličkih produkata iz *Streptomyces erythreus* nađenih u uzorcima.[177]

Eli Lilly je podnio patentnu prijavu za navedeni spoj (patent odobren 1953. godine). Lijek je stavljen na tržište 1952. godine pod nazivom Ilosone® (prema filipinskoj regiji Iloilo gdje je izvorno sakupljen). Eritromicin se nekada zvao i Ilotycin®.[151]

Robert B. Woodward, dobitnik Nobelove nagrade i profesor kemije na Sveučilištu Harvard, je zajedno s članovima svojeg istraživačkog tima 1981. godine otkrio prvu stereokontroliranu asimetričnu kemijsku sintezu eritromicina A (objavljena nakon njegove smrti).[178]

Azitromcin (37)



Slika 17. Azitromicin (**37**)

Azitromicin (Slika 17) se dobiva polusintetski iz eritromicina A. Sadrži azalidni prsten, 15-člani prsten u kojem je dušik uključen u laktonski prsten na položaju 9a te nosi metilnu skupinu na položaju 9a(*N*). Za razliku od eritromicina A ima dvije bazične tercijarne amino-skupine. Azitromicin

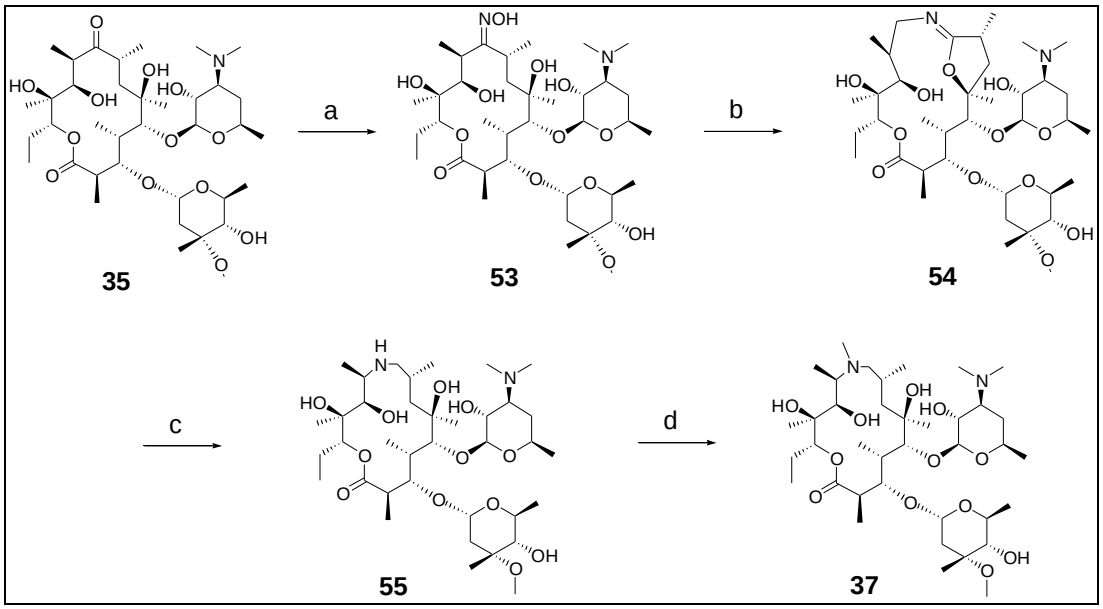
posjeduje bolje djelovanje na Gram-negativne bakterije, bolje prodire u tkiva i zadržava se u stanicama te je stabilan u kiselom i dobro se apsorbira.[1]

Otkriće azitromicina

Od 1970. godine, PLIVIN istraživački tim na čelu s dr. Slobodanom Đokićem radio je na području makrolidnih antibiotika. Godine 1981. su Slobodan Đokić, Gabrijela Kobrehel, Zrinka Tamburašev i Gorjana Radobolja-Lazarevski sintetizirali novi antibiotik pod nazivom azitromicin, prvi član nove skupine makrolidnih antibiotika, azalida. Novostvoreni spoj, azitromicin dihidrat, dobiven je iz eritromicina A pokazao je superiorna svojstva u odnosu na polazni spoj. Zbog iznimnih terapijskih svojstava azitromicin je napravio revoluciju u liječenju antibioticima, te na taj način postao jedan od najuspješnijih lijekova diljem svijeta. Od samih početnih ispitivanja azitromicin se pokazao kao iznimno učinkovit antibiotik s proširenom i povećanom antimikrobnom aktivnošću (posebice u djelovanju protiv Gram-negativnih patogena), te prolongiranom i višom tkivnom koncentracijom, kao i niskom učestalošću gastrointestinalnih nuspojava u usporedbi s ostalim antibioticima.[155]

Dugogodišnje istraživanje dovelo je PLIVU do razvoja iznimno vrijednog lijeka s ogromnim terapijskim i marketinškim potencijalom. PLIVA je 1981. godine prijavila patent za azitromicin u bivšoj Jugoslaviji, te mnogim drugim zemljama. Azitromicin je 1988. godine registriran pod zaštićenim imenom Sumamed®. Za strateškog partnera PLIVA je odabrala američku farmaceutsku kompaniju Pfizer, s kojim je 1986. godine potpisala ugovor prema kojem je Pfizer dobio ekskluzivna prava za prodaju azitromicina u Zapadnoj Europi i SAD-u, a PLIVA u Centralnoj i Istočnoj Europi.[155]

Sinteza azitromicina



Shema 1. Put sinteze azitromicina (**37**) iz eritromicina A (**35**): a) $H_2NOH{\cdot}HCl$, Na_2CO_3, b) tionil-klorid, $NaHCO_3$, c) H_2/Pt, d) HCHO/HCOOH

Na Shemi 1 prikazan je sintetski put azitromicina (**37**) iz eritromicina A (**35**). U prvom koraku sinteze provodi se oksimiranje eritromicina u prisustvu $NH_2OH{\cdot}HCl$ i Na_2CO_3 pri čemu nastaje eritromicin A oksim (**53**). Daljnjim postupkom Beckmannove pregradnje s tionil-kloridom iz spoja **53** nastaje eritromicin A imino eter **54** koji se podvrgava redukciji u prisustvu vodika i platine kao katalizatora pri čemu nastaje 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**). I konačno, u zadnjem koraku metiliranja spoja **55** uz HCHO/HCOOH nastaje azitromicin (**37**).[179]

Djelovanje i upotreba azitromicina

Azitromicin djeluje tako da interferira sa sintezom bakterijskih proteina.[158-160] Iako se navedeni mehanizam smatra bakteriostatskim, koncentracije nekoliko puta veće od minimalnih inhibitornih koncentracija doprinose baktericidnom djelovanju.

Djelovanje azitromicina je slično djelovanju eritromicina A uz širi spektar djelovanja (prednost pred ostalim makrolidima). Osobito je djelotvoran prema uzročnicima infekcija gornjih dišnih puteva te pri infekcijama mekih tkiva, infekcijama spolno prenosivih bolesti. Bolje djeluje na bakterije koje se zadržavaju u stanici (hemofilus, mikoplazme, legionele, stafilokoki).

Farmakokinetika azitromicina

Azitromicin se brzo apsorbira i distribuira po tkivima te postiže visoku i dugotrajnu koncentraciju u tkivu, koja rezultira dugotrajnom antimikrobnom aktivnošću. Kako je azitromicin slaba baza, on lako prolazi kroz staničnu membranu te ostaje unutar stanice, osobito u lizosomima. Visoke koncentracije azitromicina se mogu naći u inficiranim tkivima budući da ga fagociti, polimorfonuklearni leukociti i makrofagi, prenose do mjesta infekcije i tamo u prisutnosti bakterija, oslobađaju. Koncentracija azitromicina u tkivima može biti više od 50 puta veća nego u plazmi. Visoke koncentracije su zamijećene u tonzilima, plućima, bubrezima, prostati i urogenitalnom traktu, a niske koncentracije u mišićima i mukozi probavnog trakta.[1-3, 180]

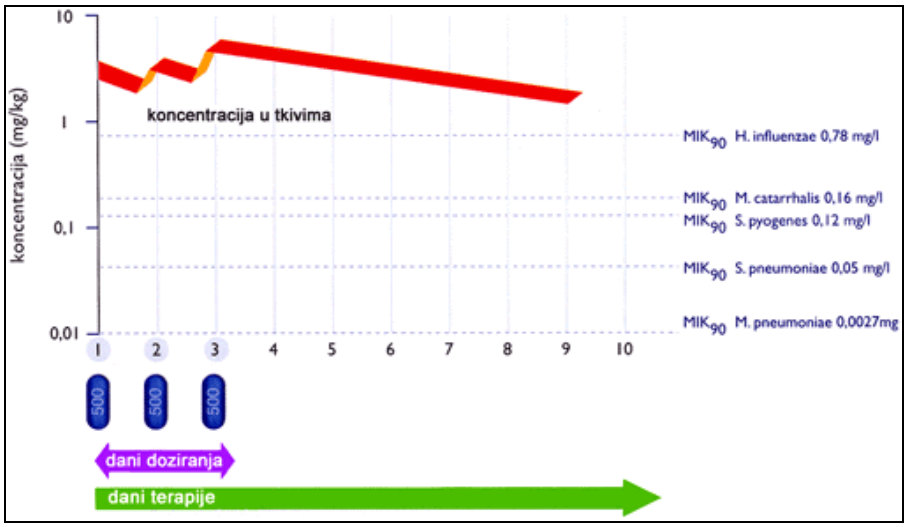
Ciljano djelovanje azitromicina obuhvaća sljedeće korake:

- fagociti preuzimaju azitromicin iz krvnog optoka i tkiva
- fagociti se potom gibaju prema zaraženom tkivu
- fagociti izlučuju azitromicin kao reakciju na bakterije.

Zahvaljujući tome što azitromicin u upalno promijenjenim tkivima postiže visoke i postojane terapijske koncentracije tijekom pet do sedam dana nakon prestanka uzimanja lijeka (Slika 18), primjena azitromicina je jednostavna i kratka.

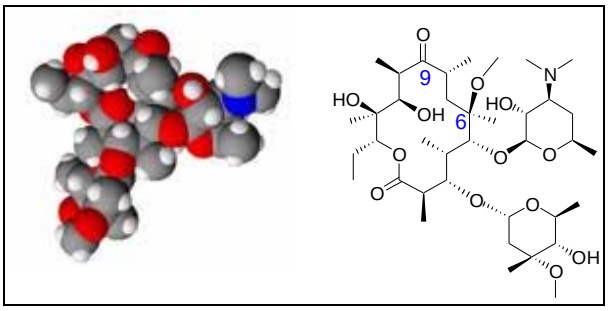
Azitromicin slabo difundira u središnji živčani sustav ukoliko moždane stanice nisu upalno promijenjene. Biotransformacija malih količina azitromicina zbiva se u jetri procesom demetilacije. Iz organizma se izlučuje putem žuči i to najvećim dijelom u nepromijenjenom obliku, a manje količine u

obliku metabolita. Oko 6 % primijenjene oralne doze izlučuje se nepromijenjeno urinom. Za razliku od većine makrolida, u jetri se ne veže na citokrom P-450, što ima za posljedicu mali broj intereakcija s drugim lijekovima. Završno vrijeme polueliminacije azitromicina iz plazme iznosi 2 do 4 dana.[180]



Slika 18. Koncentracija azitromicina u tkivima

Klaritromicin (36)



Slika 19. Klaritromicin (**36**)

Klaritromicin (Slika 19) je polusintetski antibiotik iz skupine makrolida. Sprečava sintezu bjelančevina u bakterijskoj stanici.[158-160] Djeluje primarno bakteriostatski, a sekundarno baktericidno.

Djelovanje i upotreba klaritromicina

Na klaritromicin su osjetljivi unutarstanični mikroorganizmi, Gram-pozitivni mikroorganizmi, Gram-negativni mikroorganizmi, neki anaerobi i sve mikobakterije osim *M. tuberculosis*.[181,182]

Farmakokinetika klaritromicina

Klaritromicin se dobro apsorbira. Hrana usporava apsorpciju, no ne utječe bitno na biološku raspoloživost klaritromicina. Približno 20 % lijeka odmah se metabolizira u 14-hidroksi-klaritromicin koji snažno djeluje na bakteriju *Haemophilus influenzae*. Djelotvornost metabolita je gotovo dvostruko veća od djelotvornosti klaritromicina. Vrijeme polueliminacije klaritromicina je 5 sati, a 14-hidroksi-klaritromicina oko 7 sati. Od 20 do 30 % klaritromicina izluči se mokraćom u nepromijenjenom obliku, a preostala količina u obliku metabolita. Klaritromicin i njegovi metaboliti izlučuju se mokraćnim putem i putem žuči.[166]

Klaritromicin dobro prelazi u tjelesne tekućine i tkiva gdje postiže do deset puta veće koncentracije nego u serumu. Najveće koncentracije klaritromicina su nađene u tkivima jetre i pluća.

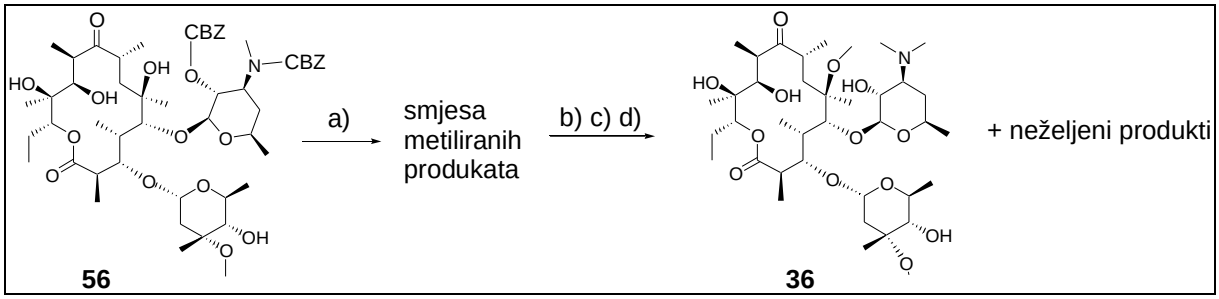
Otkriće klaritromicina

Klaritromicin su otkrili znanstvenici u japanskoj tvrtki Taisho Pharmaceuticals 1970-tih godina. Otkriven je s ciljem razvoja derivata eritromicina A koji bi bio stabilniji u kiselim uvjetima probavnog trakta i uzrokovao manje nuspojava (mučnina i bolovi u trbuhu). Tvrtka Taisho je podnijela zahtjev za patentnu prijavu 1981. godine[183] i nakon toga je klaritomicin pod zaštićenim imenom Clarith® pušten na tržište (u listopadu 1991. godine). Tvrtka Taisho je s američkom tvrtkom Abbott Laboratories 1985. godine potpisala partnerstvo za međunarodna prava te je Abbott također u listopadu 1991. godine dobio odobrenje od FDA za lijek Biaxin®. Prvi generici se pojavljuju 2004. godine u Europi, a 2005. godine u SAD-u.

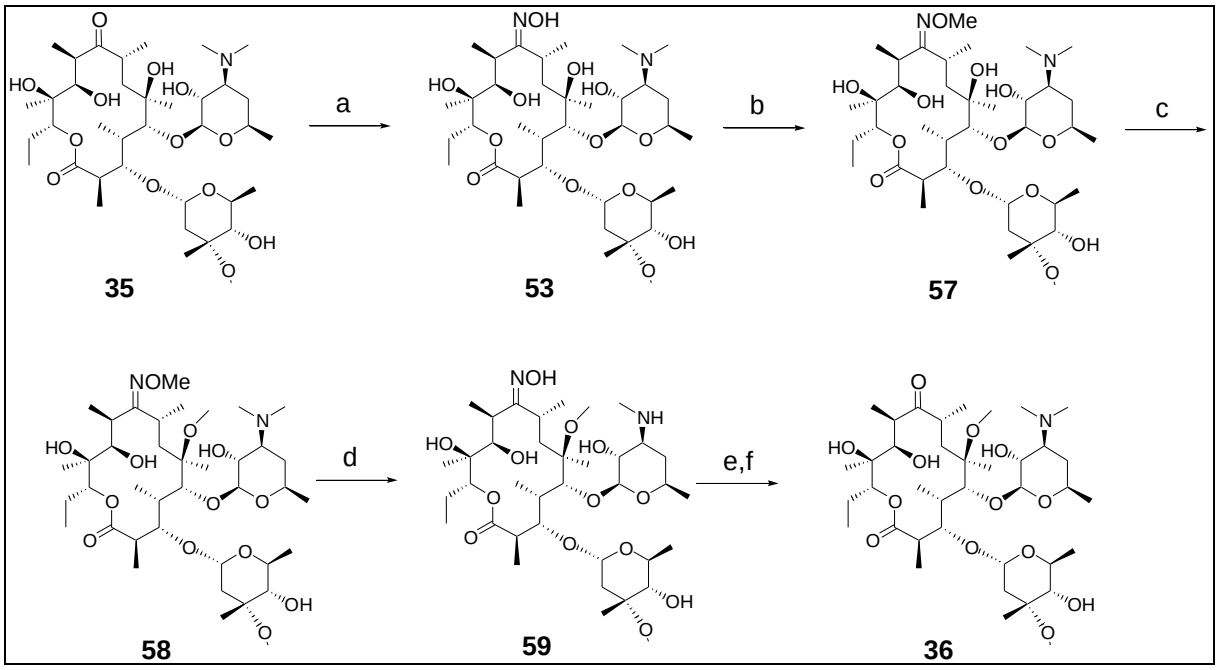
Sinteza klaritromicina

Iako je struktura klaritromicina (6-*O*-metil-eritromicin A) vrlo slična strukturi eritromicina A, njegova sinteza je dosta komplicirana. S obzirom da eritromicin A ima 5 hidroksilnih skupina, teško je selektivno alkilirati samo C-6 hidroksilnu skupinu. Prvu regioselektivnu sintezu objavili su Watanabe i suradnici preko 2'-*O*-3'-*N*-bis (benziloksikarbonil)-*N*-demetileritromicina (Shema 2a).[184] Postupak je uključivao kromatografsko odjeljivanje željenog produkta iz smjese metiliranih produkata. Glavni nedostatak ovog postupka je regioselektivna metilacija koja se prvenstveno zbiva na sekundarnom 11-OH položaju umjesto na željenom tercijarnom 6-OH položaju. Watanabe i suradnici su riješili taj problem metilirajući 2'-*O*-3'-*N*-bis (benziloksikarbonil)-*N*-demetileritromicin A 9-oksim-derivat (Shema 2b).[185a)b)] Dalje, da bi se izbjeglo korištenje iritirajućeg i toksičnog benzil-klorformijata, klaritromicin je sintetiziran i metilacijom kvaternog amonijevog derivata eritromicina A (Shema 2c).[186] Posebnost ovog postupka je taj što se sve zaštitne skupine uvode u jedom koraku djelujući na eritromicin A 9-oksim s benzil-bromidom i natrijevim hidridom, a uklanjanje zaštitnih skupina provodi se metodom transfer hidrogeniranja. Tim reakcijskim slijedom postignuta je maksimalna selektivnost. No, tom metodom je uklanjanje tri benzilne skupine u jednom koraku često nedosljedno i teško se postiže. Najimpresivniji postupak je opet od Wanatabe i suradnika, koji su priredili

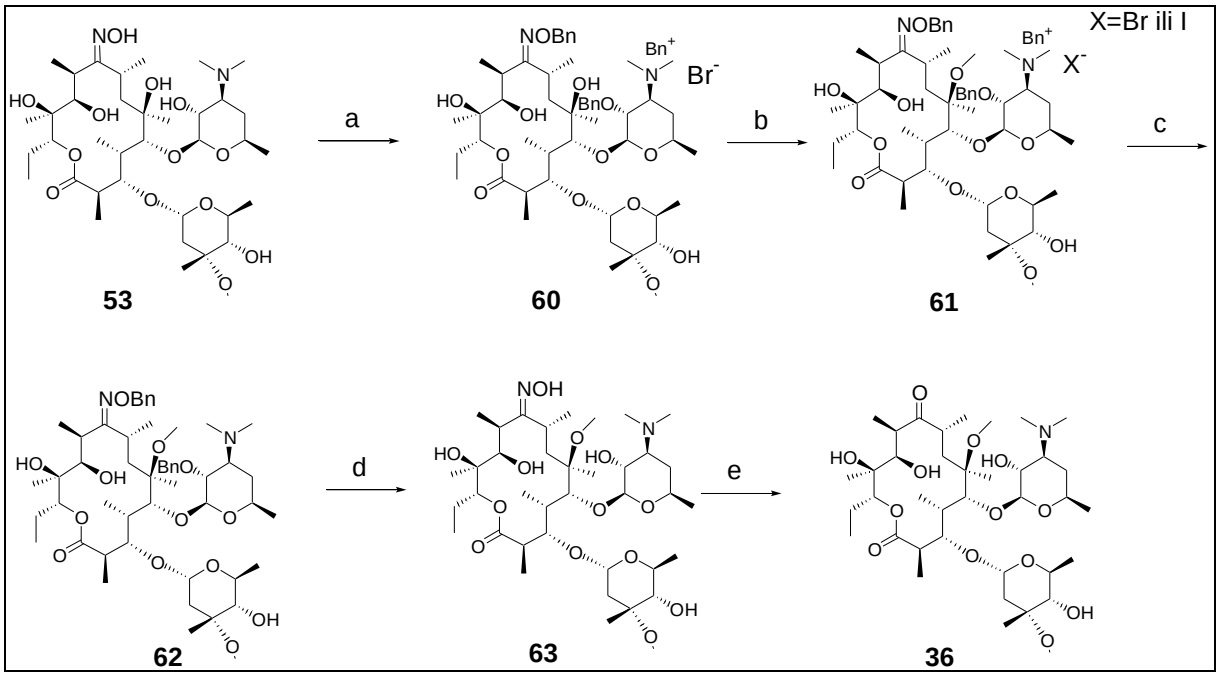
klaritromicin iz eritromicin A 9-oksima bez pročišćavanja međuprodukata (Shema 2d),[187] ali je postupak proveden s manjim prinosom nego raniji postupci.



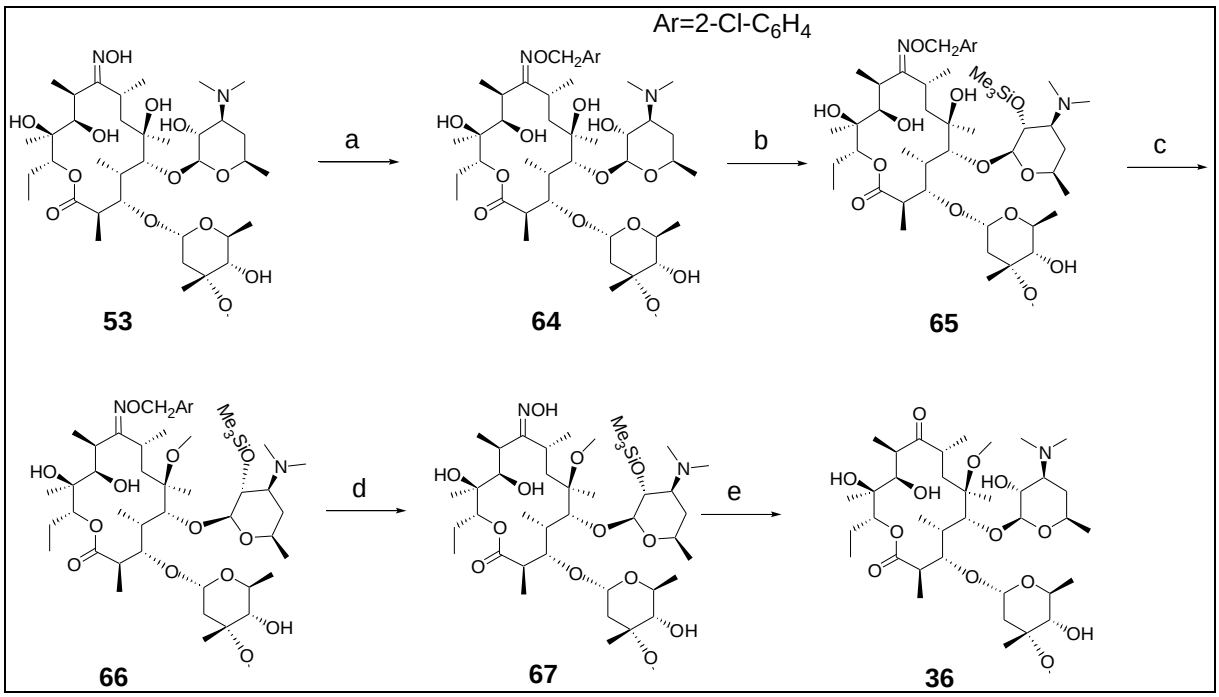
Shema 2a. Sinteza klaritromicina: a) MeI/NaH, DMSO, THF (1:1), b) odjeljivanje kromatografijom na stupcu, c) hidrogeniranje, d) reduktivna metilacija



Shema 2b. Sinteza klaritromicina s poboljšanim prinosom: a) $NH_2OH{\cdot}HCl$, NaOAc/MeOH, oksidacija, b) MeCl/NaOH, DMF, zaštita oksima, c) MeOH/KOH, DMSO:THF (1:1), metilacija, d) H_2/Pd-C, uklanjanje zaštitnih skupina, e) HCHO/HCOOH, *N*-metilacija, f) $NaHSO_3$ uklanjanje zaštite na oksimu

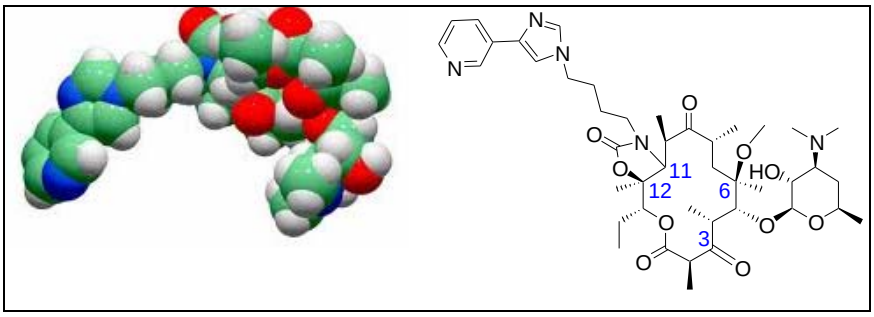


Shema 2c. Sinteza klaritromicina s najboljom selektivnošću: a) BnBr, NaH, DMSO-THF, b) MeI, NaH, DMSO:THF (1:1), c) 10 % Pd-C, $HCOONH_4$, DMF, d) 10 % Pd-C, $HCOONH_4$, HCOOH, MeOH, e) $NaHCO_3$, EtOH



Shema 2d. Sinteza klaritromicina iz eritromicin A-9-oksima: a) 2-klorbenzil-bromid, KOH, DMF, b) Me_3SiCl, 1-(trimetilsilil)imidazol, EtOAc, c) MeI, KOH, DMSO-THF, d) H_2, Pd-C, HCOONH, HCOOH, MeOH, e) $NaHCO_3$, MeOH, H_2O

Telitromicin (40)



Slika 20. Telitromicin (**40**)

Ketolidi su nova skupina makrolidnih antibiotika, posebno učinkovitih protiv uzročnika respiratornih infekcija (gornjeg i donjeg dijela dišnog sustava), uključujući i one koji su stekli rezistenciju na makrolide. Oni su polusintetski derivati eritromicina A. Telitromicin (Ketek®) prvi je antibiotik iz te skupine koji je u širokoj kliničkoj primjeni.[156, 188-191] Sinteza telitromicina prikazana je na Shemi 3.

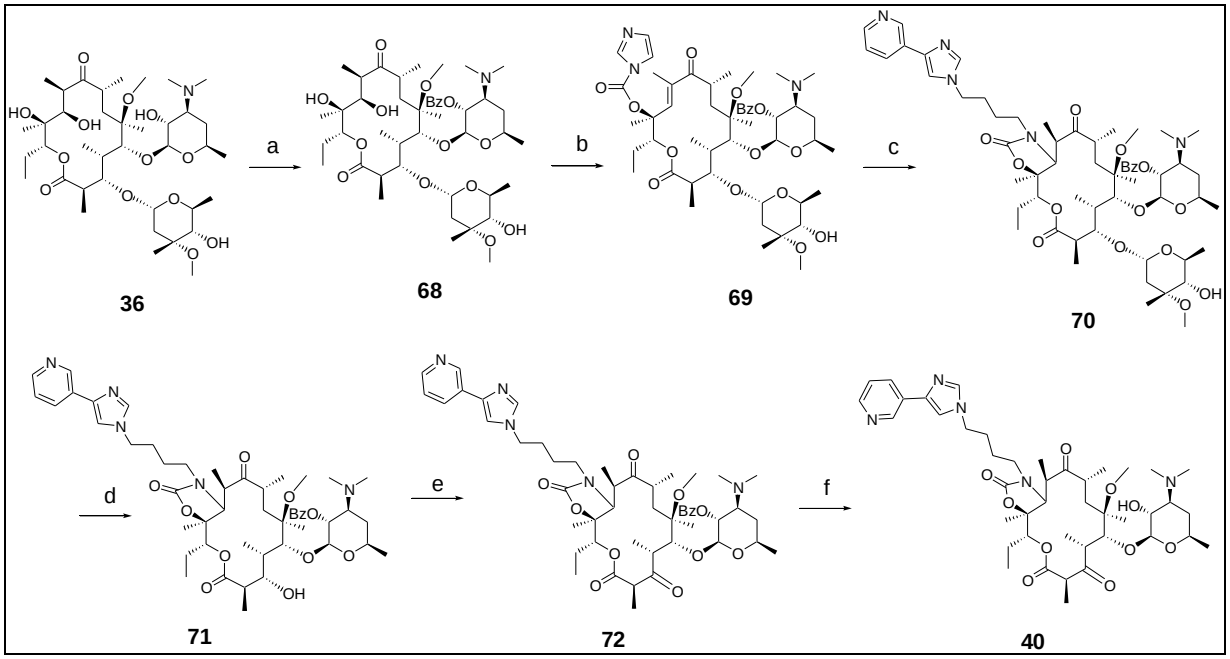
Telitromicin ima sve značajke dobrog antibiotika, osobito za empirijsko liječenje akutnih respiratornih infekcija. Spektar antimikrobne aktivnosti telitromicina obuhvaća sve važnije bakterijske uzročnike respiratornih infekcija, uključujući penicilin rezistentne sojeve te amoksicilin otporne sojeve, odnosno intracelularne uzročnike atipičnih pneumonija. Odlikuje se i povoljnom farmakokinetikom i sigurnošću primjene u jednoj dnevnoj peroralnoj dozi za sve indikacije. U brojnim randomiziranim, multicentričnim, komparativnim kliničkim istraživanjima telitromicin je pokazao jednaku ili bolju učinkovitost, bakteriološku eradikaciju i bolju podnošljivost u usporedbi s kompariranim antibioticima.[192,193]

Međutim, Europska agencija za lijekove (EMA, *European Medicines Agency*) je ograničila primjenu telitromicina. Prijave ozbiljnih oštećenja jetre potaknule su opsežnu reevaluaciju sigurnosti i efikasnosti primjene telitromicina (telitromicin za više od 80% povećava rizik od hepatotoksičnosti). Osim ograničenja primjene, proširene su kontraindikacije i dodatno upozorenje, u skladu sa novim saznanjima.[174]

<u>*Distribucija*</u>

U *in vitro* istraživanjima dokazano je da se 60–70 % telitromicina veže na proteine. Telitromicin se dobro distribuira u cijelom tijelu, a volumen distribucije iznosi 2,9±1,01 l/kg. Brza distribucija i visoke koncentracije telitromicina u tkivima i tjelesnim tekućinama rezultiraju znatno većim koncentracijama u ciljnim tkivima (na mjestu upale) nego u plazmi. Tako je maksimalna koncentracija u sluznici bronha 12,1 puta veća, u epitelnom sekretu 16,8 puta, u slini 1,6 puta, u iskašljaju 4,8 puta, u tonzilarnom tkivu 7,8 puta, u sekretu srednjeg uha 2,4 puta, u sekretu sinusa 4,0

puta, a u alveolarnim makrofagima i polinuklearnim leukocitima i 500 puta veća od koncentracije u plazmi.[194-197]



Shema 3. Sinteza telitromicina iz klaritromicina: a) etil-acetat, benzilaldehid, 4-dimetilaminopiridin, trietilamin, b) DMF, DBU, 1,1-karbonildiimidazol, c) DMF, DBU, d) aceton, HCl, e) *N*-klorsukcinimid, MDC, dimetil-sulfid, TEA i f) metanol, refluks.

2.2.6. Protuupalni učinci makrolida

Već je 20 godina poznato kako neki makrolidi imaju imunomodulatorne učinke, koji su korisni u liječenju kroničnih plućnih upalnih sindroma, poput difuznog panbronhiolitisa (DPB), cistične fibroze (CF), astme i bronhiektazija.[4,5.169-171] Pojedini makrolidi su dosljedno povezani s kraćim boravkom u bolnici i mortalitetom, kada su upotrijebljeni ili zasebno, ili u kombinaciji s beta-laktamskim antibioticima.

Iako se ne zna točan mehanizam djelovanja, čini se da protuupalno djelovanje pojedinih makrolidnih antibiotika ima veći utjecaj kod liječenja pacijenata s DPB ili CF nego njihovo antimikrobno djelovanje.

Protuupalni učinci makrolidnih antibiotika (eritromicin A, roksitromicin, klaritromicin i azitromicin) i učinci na bakterijsku virulentnost obuhvaćaju sljedeće:[198]

- reguliraju ekspresiju TNF-α, interleukina-1 (IL-1), interleukina-4 (IL-4), interleukina-8 (IL-8)
- povećavaju stvaranje β-defenzin-1 i β-defenzin-2
- smanjuju oslobađanje superoksida i elastaze iz stimuliranih polimorfonuklearnih leukocita (PMN)
- smanjuju stimulaciju oslobađanja interleukina-1 β (IL-1 β), interleukina-6 (IL-6), stimulirajućeg faktora kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF) i TNF-α
- smanjuju ekspresiju i aktivnost matriks metaloproteinaze-9
- inhibiraju interleukin-5 (IL-5) inducirano povećanje kod preživljavanja eozinofila
- povečavaju apoptozu neutrofila, limfocita, histiocita i eozinofila
- smanjuju kemotaksiju neutrofila
- smanjuju preživljavanje neutrofila
- smanjuju sekreciju mukoze
- smanjuju eliminaciju metilprednizolona
- smanjuju adherenciju / prijanjanje *P. aeruginosa* na membranu
- smanjuju stvaranje alginata / stvaranje biofilma

Utjecaji na mukozu dišnih puteva

Stvaranje mukoze i njezino oslobađanje mukocilijarnim transportom su primarni način obrane dišnih puteva. Kronična upala može uzrokovati hiperplaziju stanica i submukoznih žlijezda te hipertrofiju uzrokovanu hipersekrecijom mukoze. Razne studije i klinička ispitivanja pokazuju da eritromicin A inhibira izlučivanje glikokonjugata mukoze,[199] a klaritromicin smanjuje volumen izlučenog sputuma u pacijenata s kroničnim bronhitisom, bronhioekstazama i DPB, povećava gustoću i elastičnost sputuma bez promjene u dinamičkoj viskoznosti.[200] Klaritromicin i eritromicin mogu inhibirati izlučivanje mukoze djelujući na MUC5AC mucin mRNA ekspresiju, a azitromicin inhibira MUC5AC aktiviranu s 30-C_{12}-HSL u NCl-H292 epitelnoj staničnoj liniji.[201-203]

Upalne stanice (neutrofilne stanice – infiltracija i funkcija)

Pokazalo se da pojedini ispitani makrolidni antibiotici utječu na nekoliko funkcija neutrofilnih stanica. *In vivo* i *ex vivo* studije pokazuju da pojedini makrolidi inhibiraju nastajanje oksidansa,[204,205] potiču degranulaciju neutrofilnih stanica *in vivo* i *ex vivo,*[206,207] smanjuju fagocitozu neutrofilnih stanica *ex vivo,*[205] te dodatno povećavaju migraciju neutrofilnih stanica.[208,209]

Dugotrajna terapija ispitanim makrolidima u pacijenata s DPB dovodi do snižavanja broja neutrofilnih stanica u bronhoalveolarnoj tekućini.[210,211] Mehanizmi koji objašnjavaju utjecaj makrolida

na funkciju neutrofilnih stanica su nejasni. Pretpostavlja se da je inhibicija aktivacije protein kinaze A odgovorna za inhibiciju stvaranja oksidansa.[212] Također neki pretpostavljaju da makrolidi u kliničkoj praksi utječu na fosfolipaza D-fosfatidat fosfohidrolazni transdukcijski put, koji je esencijalan za degranulaciju neutrofilnih stanica.[213]

Citokini i kemokini

Prema literaturi ispitani su utjecaji poznatih makrolida na produkciju citokina/kemokina s različitim staničnim tipovima i različitim poticajima, uključujući proupalne citokine (interleukin-1, IL-1), bakterije (*Streptococcus pneumoniae* i *P. aeruginosa*) ili bakterijske produkte (lipopolisaharid, LPS). Pojedini makrolidi suprimiraju stvaranje IL-6 i IL-8 s IL-1-stimulacijom bronhijalnih epitelnih stanica.[214,215] Eritromicin A ovisno o dozi inhibira stvaranje TNF-α, IL-6, IL-8 i interleukin-10 (IL-10).[207,216] Slični rezultati su uočeni u studijama s LPS, u kojima ispitani makrolidni antibiotici smanjuju produkciju citokina iz bronhijalnih epitelnih stanica ili mononuklearnih stanica.[217]

U nekliničkim i kliničkim studijama uočeno je da pojedini makrolidi značajno inhibiraju produkciju TNF-α i interleukina (bez utjecaja na broj bakterija).[218-221]

Mehanizam inhibicije stvaranja citokina može ležati u interferenciji inhibicije proteina, ili može biti rezultat modulacije genske ekspresije. Klaritromicin inhibira aktivaciju čimbenika transkripcije jezgrinog čimbenika kapa B (NFkB), dok eritromicin A inhibira transkripcijsku aktivnost NFkB.[222-224]

Makrolidi i biofilmovi

Bakterije koje tvore biofilmove, poput *P. aeruginosa,* ne podliježu fagocitozi i djelovanju antimikrobnih sredstava. Oporavljena *P. aeruginosa* iz pluća pacijenta s DPB ili CF je često uvućena u mukoidno-alginatni biofilm. Biofilm veže stanice te organske i anorganske materijale jedne s drugima. Njihova čvrsto vezana struktura smanjuje antimikrobnu aktivnost, poboljšava adheziju bakterija na plućni epitel i sprječava dehidraciju bakterija. Glavna komponenta biofilma je alginat.

Kroz inhibiciju stvaranja alginata poznati makrolidni antibiotici smanjuju viskoznost medija koji sadrži *P. aeruginosa*.[225] Stvaranje alginata je inhibirano s eritromicinom A, klaritromicnom ili azitromicinom preko inhibicije enzima u sustavu alginata koji aktiviraju stvaranje alginata unutar *P. aeruginosa*. Važno je da je stvaranje alginata inhibirano s koncentracijama makrolida manjim od minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).[226]

2.2.7 Klinička primjena makrolida u neinfektivnim bolestima

Cistična fibroza

U istraživanjima vezanim za primjenu poznatih makrolidnih antibiotika u liječenju pacijenata s CF identificirano je više od 1000 genetskih mutacija kod proteina transmembranskog regulatora cistične fibroze (CFTR, *cystic fibrosis conductance* regulator), no još nije objašnjen pulmonarni fenotip bolesti. Razina upale direktno korelira s napretkom i ishodom bolesti, a disfunkcija CFTR može biti predispozicija za bakterijsku adherenciju koja rezultira upalnim odgovorom. Protuupalni učinak pojedinih makrolida u pacijenata s CF može uključivati različite mehanizme kao što su, modulacija upalnih procesa, antibakterijski učinak preko inhibicije adhezije *Pseudomonas aeruginosa* na bronhalni zid te regulacija transporta klorida preko CFTR.

U razdoblju od 1997. do 2003. godine provedeno je 10 studija s pacijentima s CF. Studije su uključile 339 pacijenata koji su liječeni makrolidima (8 studija s azitromicinom te po jedna s eritromicinom A i klaritromicinom). U tim su studijama FEV (forsirani ekspiratorni volumen) i FVC (forsirani vitalni kapacitet pluća) pacijenata porasli s 4,8 % na 11 %, no ipak ukupna se prisutnost i gustoća *P. aeruginosa* nisu promijenile što upućuje na to da je protuupalni učinak zaslužan za kliničko poboljšanje pacijenata.[227]

U drugim istraživanjima također je dokazano da je dugotrajna primjena niske doze azitromicina u odraslih pacijenata sa cističnom fibrozom (kronična endobronhijalna infekcija s *Pseudomonas aeruginosa*) sigurna i smanjuje pogoršanje funkcije pluća, povećava tjelesnu težinu te smanjuje postotak mukoidnih *P. aeruginosa* u uzorku sputuma.[228-231]

Difuzni panbronhiolitis

Difuzni panbronhiolitis krakterizira kronična sinobronhijalna infekcija s difuznim bilateralnim mikronodularnim plućnim lezijama u upalnim stanicama. Genetska predispozicija za tu bolest svojstvena je za azijate. U pacijenata s DPB povećan je broj neutrofila, visoke su koncentracije IL-8 u BAL fluidu te je povećan broj limfocita i smanjen odnos CD4/CD8 (pomagački T limfociti / citotoksični T limfociti).

Kudoh i suradnici su prvi u 1980-tim godina zamijetili da terapija eritromicinom A poboljšava ishod DPB.[210] Važno je da su povoljni utjecaji bili neovisni o prisutnosti infekcije s *P. aeruginosa* ili kronične respiratorne mane. Uz eritromicin A, povoljni utjecaji u DPB su potvrđeni i za klaritromicin, roksitromicin i azitromicin.[232-234]

Navedeni makrolidi inhibiraju produkciju ili sekreciju protuupalnih citokina putem inhibicije transkripcijskih faktora (NFκB) i aktivacijskog proteina 1 (AP-1), čime je smanjeno nakupljanje neutrofila u dišnim putevima. Osim smanjenja broja neutrofila sa smanjenjem aktivnosti kemotaksije neutrofila dokazano je i smanjenje koncentracije IL-8, leukotrien B_4 (LTB_4), limfocita i HBD-2 (humani β-defenzin 2).

Ranije spomenuti Kudoh i Keicho tvrde da je neovisno o bakterijskom klirensu kliničko poboljšanje opaženo u pacijenata koji su koristili eritromicin A.[210] Također potvrđuju da se u slučajevima bakterijske rezistencije na poznate makrolide liječenje pokazalo djelotvornim. Dodatno navode i činjenicu da preporučeno doziranje makrolidnog antibiotika proizvodi razinu u tkivu koja je niža od minimalne inhibitorne koncentracije za većinu patogenih bakterija koje koloniziraju dišne puteve. Predloženi mehanizam djelovanja uključuje inhibiciju suvišne mukoze i sekreciju vode iz epitela dišnog puta, inhibiciju akumulacije neutrofila u širim dišnim putevima, inhibiciju akumulacije limfocita i makrofaga u užim dišnim putevima te modulaciju bakterijske virulentnosti.

Astma

Postoji nekoliko različitih fenotipova astme, ali kod svih su glavni procesi opstrukcija dišnih puteva, hiperosjetljivost bronhija i upala. Korištenje makrolidnih antibiotika (troleandromicin, klaritromicin i roksitromicin) pokazuje kliničko poboljšanje u bolesnika s astmom.[235-237] Mehanizmi imunomodulatornog djelovanja poznatih makrolida korištenih u terapiji astme uključuju poboljšanje u primarnim obrambenim mehanizmima, inhibiciju interakcije između bakterije i epitelnih stanica, modulaciju signalnog puta i oslobađanja kemokina te izravni utjecaj neutrofila.

Kronična opstruktivna bolest pluća (KOPB)

KOPB je bolest karakterizirana progresivnom opstrukcijom dišnih putova koja nije potpuno reverzibilna, a uzrokovana je neprimjerenim upalnim odgovorom na dugotrajnu izloženost štetnim tvarima.[238] Ta se izloženost poglavito odnosi na pušenje duhana koje je glavni čimbenik rizika od nastanka KOPB-a, a dugotrajna izloženost dišnog sustava produktima izgaranja duhana inicijalni je pokretač kompliciranih patofizioloških mehanizama nastanka ove bolesti.

Mnoge su studije potvrdile važnost upale u dišnim putevima i plućnom parenhimu u KOPB-u. Upalni odgovor pridonosi povećanju oksidativnog stresa za vrijeme akutnih egzercebacija (AE-KOPB, akutne egzacerbacije kronične opstruktivne plućne bolesti). Opisana je neutrofilna i eosinofilna upala s mnoštvom upalnih medijatora uključujući interleukin-8 (IL-8), leukotrien B_4 (LTB_4), TNF-α i drugih.

Kako KOPB napreduje, pluća se infiltriraju aktiviranim makrofagima i limfocitima. Makrofagi su ključne stanice imunog sustava koje izlučuju citokine i kemokine.[239,240]

Iako neki ističu da se makrolidni antibiotici općenito ne smatraju optimalnim odabirom u teškim AE-KOPB-u, ipak se posebno navodi da pojedini makrolidi imaju dodatno korisno protuupalno i mukolitičko djelovanje.[241]

Upotrebom poznatih makrolidnih antibiotika (azitromicin, klaritromicin, eritromicin A) u KOPB-u uočeni su klinički znakovi poboljšanja bolesti (manje egzacerbacija i hospitalizacija te značajno poboljšanje upalnih markera u sputumu).[242-245]

3. VLASTITA ISTRAŽIVANJA

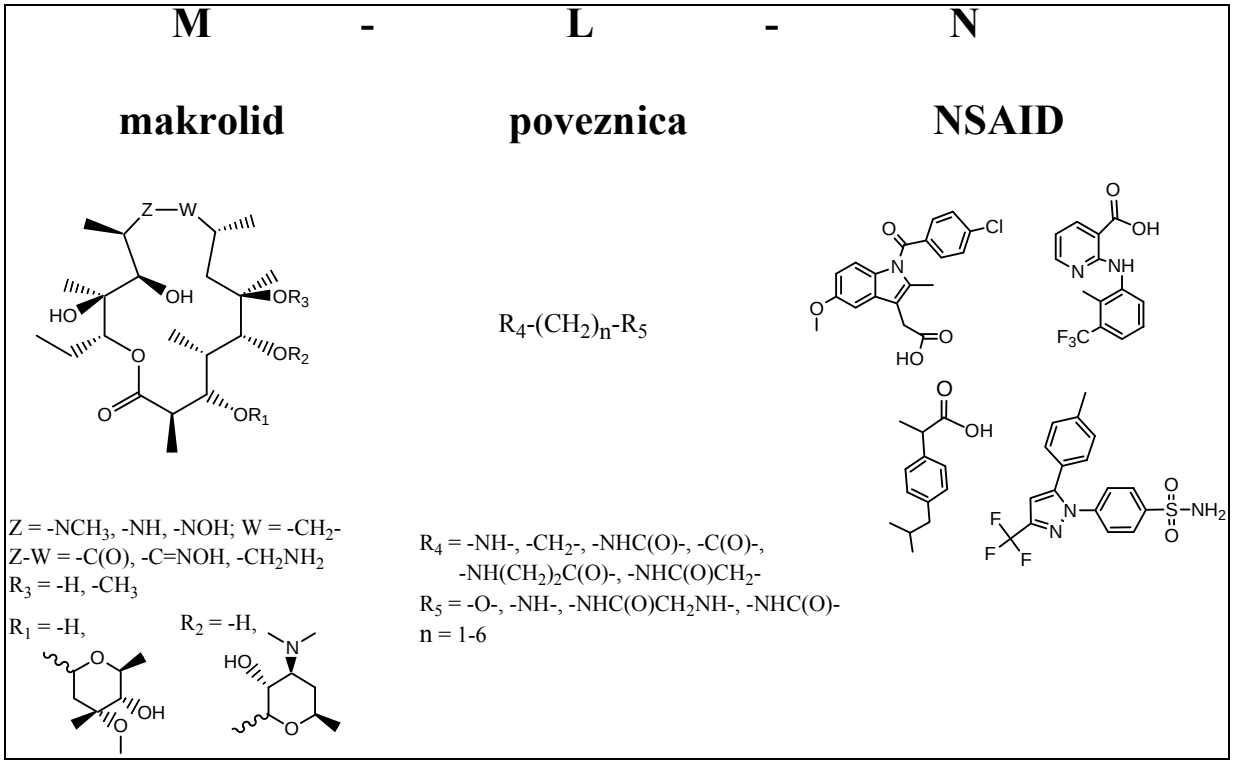
3.1. UVOD U VLASTITA ISTRAŽIVANJA

Lijekovi koji spadaju u temeljnu terapiju reumatoidnih bolesti su nesteroidni protuupalni lijekovi, soli zlata, hidroksiklorokin, kortikosteroidi, imunosupresivi, sulfasalazin, citostatici te noviji lijekovi koji djeluju direktno na upalne stanice u zglobnom prostoru. Brojni neželjeni učinci tih lijekova ograničavaju njihovu dugotrajnu primjenu, što je nužno kod liječenja kroničnih bolesti.[80,81] Upravo zbog toga se intenzivno radi na otkrivanju novih lijekova. U današnje se doba najčešće koriste nesteroidni protuupalni lijekovi. No, klasični nesteroidni protuupalni lijekovi zbog svoje neselektivne inhicije COX-1 i COX-2 imaju značajne nuspojave vezane uz gastrointestinalni trakt (inhibicijom konstitutivno prisutnog COX-1 enzima smanjuje se njegova zaštitna uloga prvenstveno u želucu, ali i u bubrezima).[86,87] Zbog toga su u novije vrijeme u terapiju uvedeni selektivni inhibitori COX-2, tzv. koksibi koji u puno manjoj mjeri izazivaju gastrointestinalne nuspojave (ne utječu na inhibiciju konstitutivno prisutnog COX-1 enzima u želucu).[88] No, upravo zbog svoje selektivne inhibicije COX-2 enzima, koksibi su pokazali nuspojave vezane za kardiovaskularni sustav te su zbog toga neki povučeni s tržišta (rofekoksib, lumirakoksib...). Neki koksibi poput celekoksiba ostali su na tržištu zahvaljujući svojoj umjerenoj selektivnosti inhibicije COX-2 enzima.

S obzirom na navedena saznanja o neselektivnim i selektivnim inhibitorima COX enzima cilj ovog istraživanja bio je sintetizirati spojeve koji će pokazivati selektivnost na COX enzime, ali ne tako izraženu selektivnost kao kod rofekoksiba i valdekoksiba.[105,106]

S druge strane makrolidi imaju izrazitu sposobnost nakupljanja u stanicama, naročito u neutrofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, koji ih procesom kemotaksije usmjeruju na mjesto upale. Zahvaljujući tome postižu se mnogo veće koncentracije makrolida u području upale nego u zdravom tkivu, čime se ostvaruje njihovo ciljno djelovanje.[1-3] Danas postoje dokazi da neki makrolidi djeluju i protuupalno djelujući na imunološki sustav. Tako se eritromicina A uspješno koristi u liječenju difuznog panbronhiolitisa, bolesti karakterizirane kroničnom upalom bronha i infiltracijom upalnih stanica, pogotovo neutrofila.[4,5]

Vođeni idejom da iskoristimo takvo jedinstveno farmakokinetičko ponašanje makrolida, kao i protuupalno djelovanje pojedinih makrolidnih antibiotika i nesteroidnih protuupalnih lijekova sintetizirani su brojni konjugati nesteroidnih protuupalnih lijekova i makrolida kao što je prikazano na Slici 21.[6]



Slika 21. Osnovni kostur konjugata makrolida i nesteroidnih protuupalnih lijekova

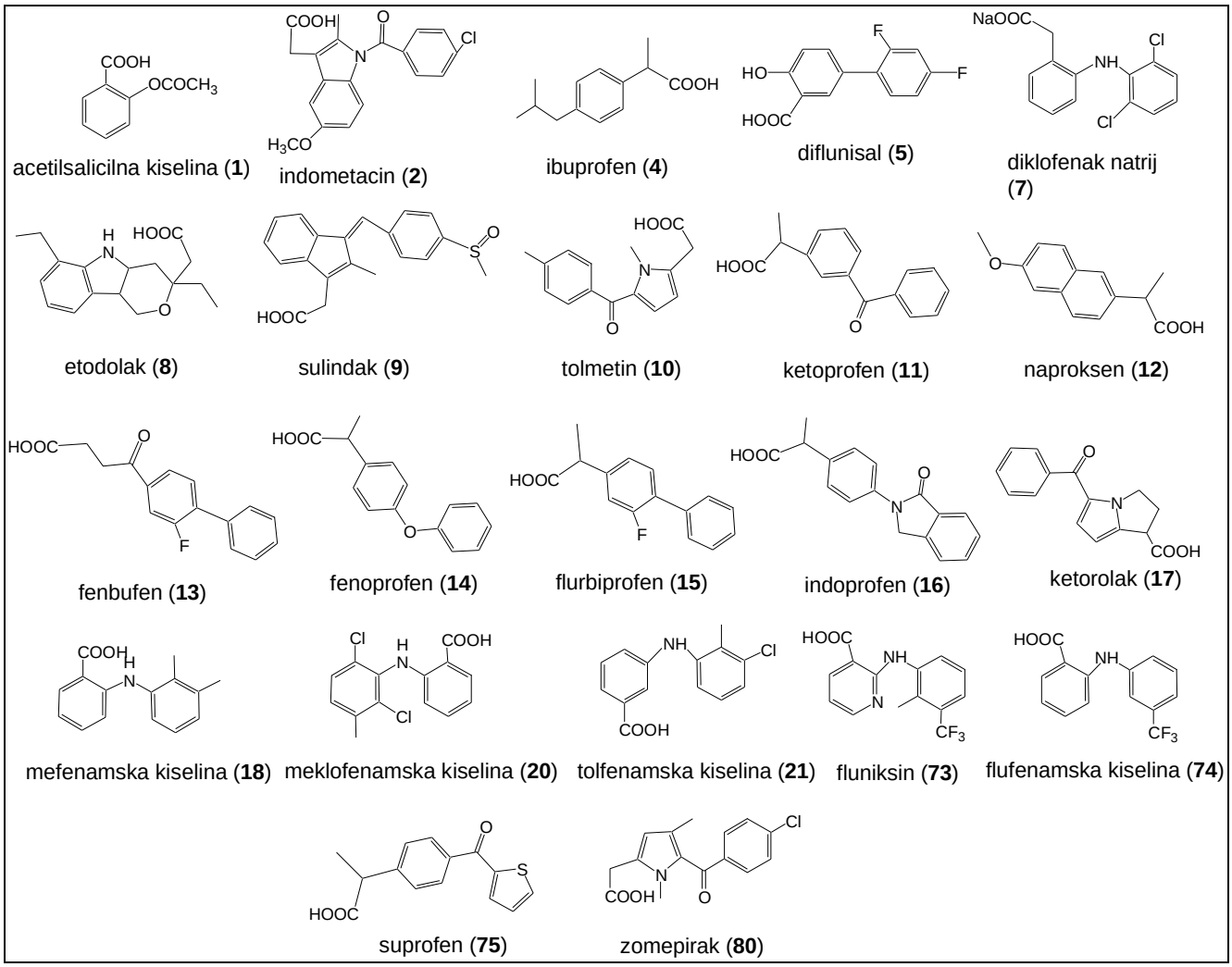
Navedene podjedinice međusobno su povezane amidnom ili esterskom vezom.

Od nesteroidnih protuupalnih spojeva korišteni su komercijalno dostupni NSAID-i (Slika 22a i 22b). Neki od NSAID-a su direktno vezani za derivate makrolida, dok su na drugima napravljene modifikacije u svrhu uvođenja vezujuće skupine pogodne za povezivanje s makrolidima.

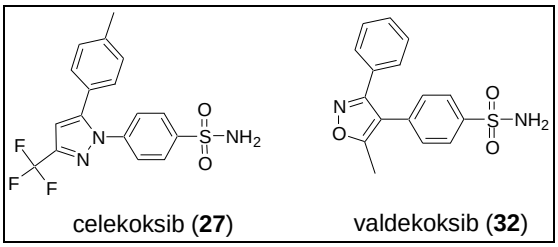
Od makrolidnih se podjedinica najčešće koristio azitromicin, ali su također korišteni i ostali makrolidi kao što su eritromicin A, klaritromicin i telitromicin (Slika 23). Na navedenim makrolidima na položajima 3, 9a, 9 (oksim), 11, 3'-*N* desozamina, te 4" i 4"-*O* kladinoze pripravljene su različite modifikacije u svrhu uvođenja različitih funkcionalnih skupina bitnih za povezivanje s nesteroidnim protuupalnim lijekovima u konačne konjugate.

Kako je cilj bio dobiti konjugate koji bi se primjenjivali kroz dulje vrijeme, prihvatljiviji su bili spojevi bez antibakterijskog djelovanja. Zbog toga je posebna pažnja posvećena derivatizaciji makrolida u svrhu dobivanja konjugata bez antibakterijskog djelovanja.

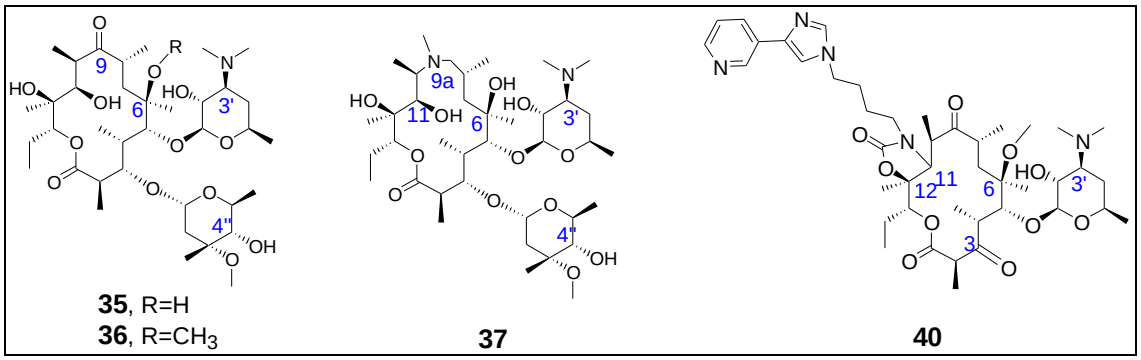
Protuupalno djelovanje pripravljenih spojeva ispitano je *in vitro* promatranjem inhibicije produkcije TNF-α te inhibicije enzima COX-1 i COX-2.



Slika 22a. Neselektivni COX-1/COX-2 inhibitori upotrebljeni za sintezu konjugata



Slika 22b. Selektivni COX-2 inhibitori upotrebljeni za sintezu konjugata



Slika 23. Makrolidi: eritromicin A (**35**), klaritromicin (**36**), azitromicin (**37**) i telitromicin (**40**), upotrebljeni za sintezu konjugata

3.2. PRIPRAVA SPOJEVA

Priprava spojeva uključenih u ovu doktorsku disertaciju može se podijeliti u 2 dijela:

1. priprava konjugata neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i makrolida te
2. priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i makrolida

Dodatno se priprava konjugata neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i makrolida može podijeliti u dva dijela:

1.1. priprava konjugata neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i derivata azitromicina te

1.2. priprava konjugata neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i derivata 14-članih makrolida

Također se priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i makrolida može opet podijeliti u dva dijela:

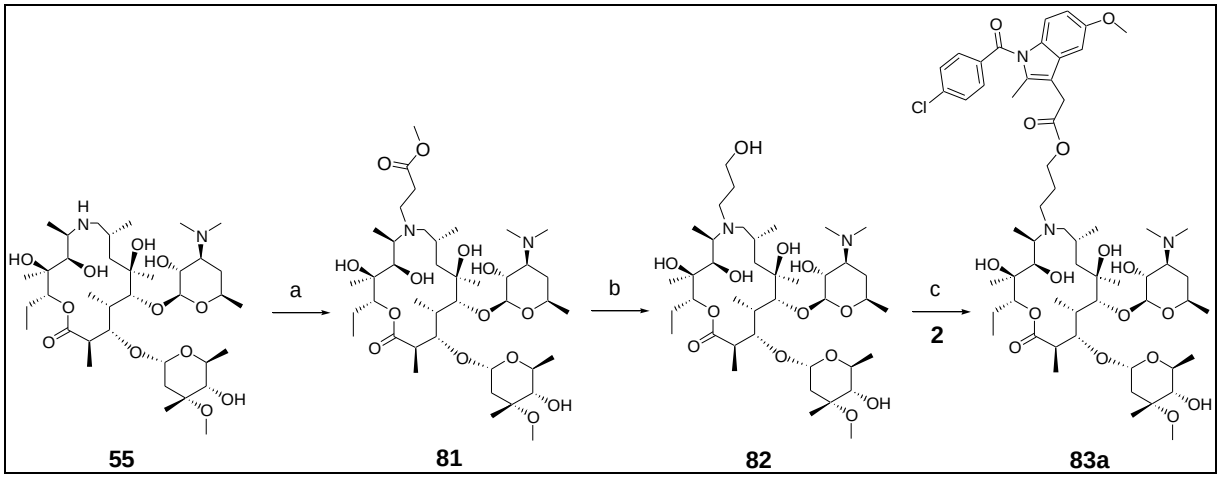
2.1. priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i derivata azitromicina te

2.2. priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i derivata 14-članih makrolida

3.2.1. Priprava konjugata neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i derivata azitromicina u položajima 9a, 11, 3'-*N* desozamina i 4'' kladinoze

3.2.1.1. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A vezanih esterskom vezom (u položaju 9a makrolida)

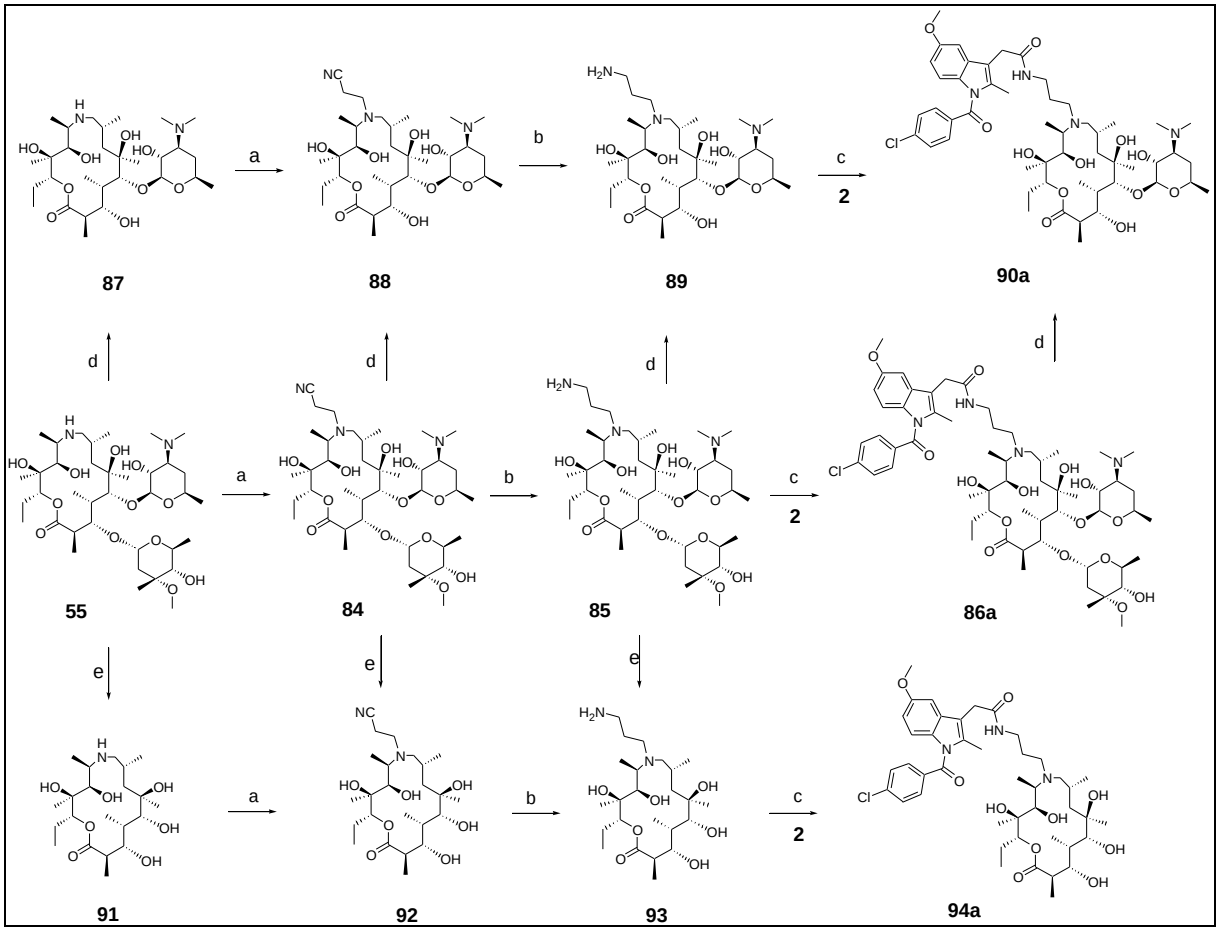
S ciljem priprave konjugata nesteroidnih protuupalnih lijekova, koji su po svojoj strukturi većinom kiseline, i derivata makrolida (prvenstveno azitromicina) kao prva ideja nametnulo se povezivanje navedenih podjedinica esterskom vezom. Tako su pripravljeni konjugati makrolida i sljedećih nesteroidnih protuupalnih kiselina: indometacin (**2**), flurbiprofen (**15**) i S-(+)-ibuprofen (**4**). No, prije povezivanja tih dviju podjedinica makrolidnu je podjedinicu bilo potrebno modificirati u spoj pogodan za povezivanje s NSAID-om (kiselinom) esterskom vezom. Tako se na derivat makrolida, 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) djelovalo metilakrilatom da bi se dobio 9a-(2-metilkarboksilat-etil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**81**).[248] U sljedećem je koraku esterska skupina spoja **81** reducirana u hidroksilnu skupinu u prisustvu $LiAlH_4$ u tetrahidrofuranu (THF) te je dobiven spoj 9a-(3-hidroksipropil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**82**).[248,249] Dobiveni derivat 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A s hidroksilnom skupinom **82** je u prisustvu 1,1-karbonildiimidazola (CDI) i dimetilformamida (DMF) povezan s ranije navedenim kiselinama (**2**, **4** i **15**) u konjugate **83a-c** (Shema 4 i Tablica 5).[250]



Shema 4. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A esterskom vezom: a) CH_2=$CHCOOCH_3$, b) $LiAlH_4$/THF, c) CDI / DMF. Na analogan način dobiveni su konjugati **83b** i **83c** s *S*-(+)-ibuprofenom (**4a**) i flurbiprofenom (**15**)

3.2.1.2. Priprava konjugata NSAID-a i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A amidnom vezom (u položaju 9a makrolida)

S obzirom da je esterska veza nestabilnija od amidne veze, kao puno bolji izbor pokazalo se povezivanje nesteroidnih protuupalnih lijekova i makrolida amidnom vezom.[246,251]



Shema 5. Priprava konjugata NSAID-a i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A vezanih u položaju 9a amidnom vezom: a) CH_2=CHCN, b) H_2, PtO_2, c) EDC·HCl, HOBT, TEA (trietilamin), CH_2Cl_2, d) razrijeđena otopina HCl, e) 6 M HCl/$CHCl_3$. Na analogan način dobiveni su konjugati **86b-o**, **90b-h** i **94b-h** s različitim NSAID-ima

Među prvim konjugatima rađeni su oni na položaju 9a (Slika 23) derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**). U tu svrhu također je bilo potrebno prethodno modificirati derivat 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) na položaju 9a, odnosno vezati poveznicu s prihvatljivom slobodnom funkcionalnom skupinom. Kao što je prikazano na Shemi 5, početak sinteze je bio pripraviti 9a-(2-cijanoetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**84**) iz 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**55**) Michaelovom adicijom u prisustvu akrilonitrila.[252] Navedena reakcija je provedena skoro kvantitativno, dok je sljedeća reakcija hidrogeniranja, pri čemu se cijano-skupina

reducira u amino-skupinu, provedena u puno manjem iskorištenju, oko 30 % (detaljno objašnjeno u dijelu Rasprava). Katalitičko hidrogeniranje spoja **84** provedena je uz katalizator PtO_2 u EtOH pri tlaku vodika od 40-50 bara, pri čemu je nastao 9a-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**85**).[249] Katalitičko hidrogeniranje je također provedeno i u ledenoj octenoj kiselini pri tlaku od 5,5 bara uz PtO_2 kao katalizator s puno boljim iskorištenjem (i do 80 %).

Spoj **85** je povezan s indometacinom (**2**) u konjugat **86a** standardnom postupkom nastajanja amidne veze s 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidrokloridom (EDC·HCl) i 1-hidroksibenzotriazolom (HOBT) kao aktivatorima karboksilne kiseline.[253] Osim s indometacinom također su pripravljeni i konjugati s brojnim NSAID-ima kao što su flufenamska kiselina, fluniksin, tolmetin, ibuprofen, acetilsalicilna kiselina i tako dalje (svi sintetizirani konjugati prikazani su u Tablici 5).

3.2.1.3. Priprava konjugata NSAID-a i dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A te konjugata NSAID-a i aglikona 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (u položaju 9a makrolida)

S ciljem sintetiziranja konjugata sa smanjenom antibakterijskom aktivnošću ili konjugata bez antibakterijske aktivnosti pristupilo se sintezi konjugata s makrolidima bez jednog ili bez oba šećerna ostatka. Hidroliza samo jednog šećera, kladinoze, provedena je u razrijeđenoj otopini HCl,[254,255] dok je hidroliza oba šećera, kladinoze i desozamina, provedena uz refluks sa 6 M $HCl/CHCl_3$ otopinom[254a),255,256] na derivatu **85** da bi se dobili dekladinozilni spoj **89** (3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A) i aglikon **93** (3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A) kao što je prikazano na Shemi 5. Također je moguća hidroliza kladinoze na derivatima **55** i **84** te na konjugatu **86a** da bi se dobili dekladinozilni produkti **87** i **88**, te dekladinozilni konjugat **90a**. Hidroliza oba šećera je također moguća i na derivatima **55** i **84** da bi se dobili aglikonski produkti **91** i **92**. Najpovoljnije je provesti hidrolizu bilo kladinoze ili oba šećera na spoju **55**, djelomice na spoju **84**, jer reakcija katalitičkog hidrogeniranja ide uz najmanje iskorištenje (oko 30 % u EtOH pri 40-50 bara). Također je čišćenje smjese nakon provedene reakcije hidrolize kromatografijom na stupcu puno jednostavnije i brže ako se hidrogeniranje provodi na spojevima **55** i **84** nego na spoju **85** (amino-derivat) jer se dobiveni amini **89** i **93** zbog svoje polarnosti dulje zadržavaju na koloni te je pročišćavanje smjese dugotrajnije i teže.

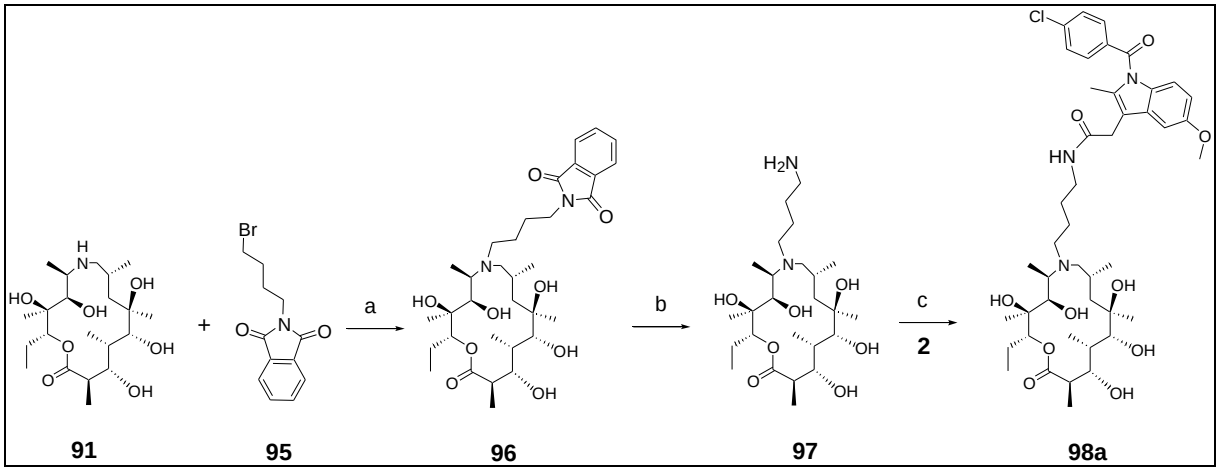
Makrolidi **89** i **93** povezani su amidnom vezom s indometacinom (**2**) uz EDC·HCl i HOBT u konačne konjugate **90a** i **94a**.[253] Konjugat **90a** dodatno je pripravljen i direktno iz konjugata **86a** kao što je ranije navedeno. Pripravljeni su i dekladinozilni i aglikonski konjugati s flufenamskom

kiselinom, fluniksinom, tolmetinom, ibuprofenom, acetilsalicilnom kiselinom i drugim NSAID-ima (svi sintetizirani konjugati prikazani su u Tablici 5).

3.2.1.4. Produljenje poveznice na makrolidu u položaju 9a makrolida

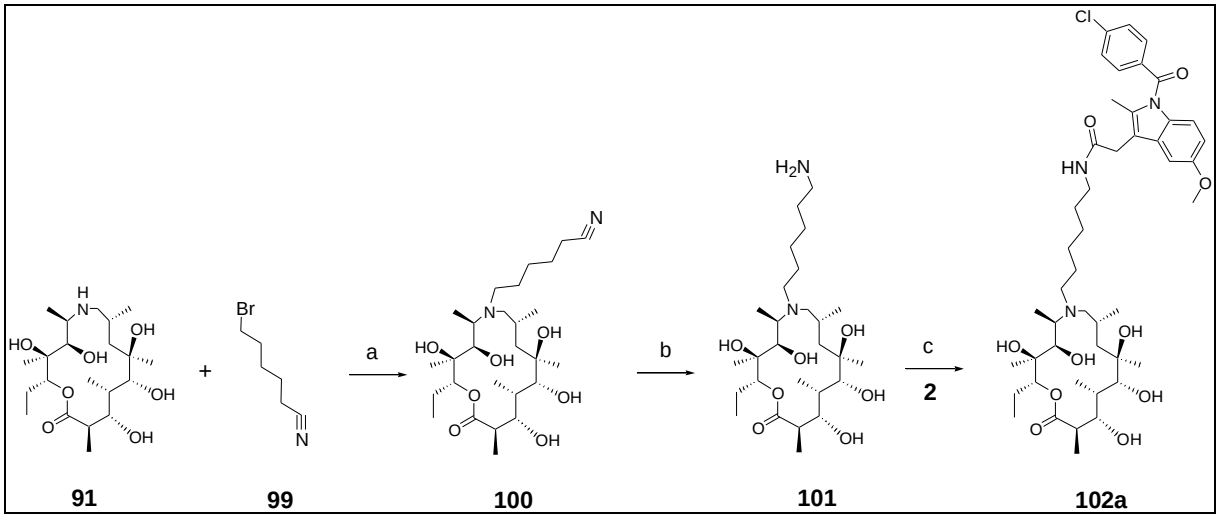
Najčešće korištena poveznica između makrolidne i nesteroidne podjedinice vezane na položaju 9a makrolida (Slika 23) bila je s 3 metilenske jedinice. Da bi se ispitao utjecaj duljine poveznice pripravljeni su konjugati u kojima je poveznica između makrolida i nesteroidnih protuupalnih lijekova produljena na 4 i 6 metilenskih jedinica. Sintetizirani su i konjugati s peptidnom vezom unutar poveznice.

Konjugati s poveznicom s 4 metilenske jedinice pripravljeni su na sljedeći način: na 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**91**) djelovalo se s 4-brom-butilftalimidom (**95**) u prisustvu *N*,*N*-diizopropiletilamina u acetonitrilu pri temperaturi od 80 ºC, pri čemu je dobiven spoj 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9a-(butilftalimid)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**96**).[257] Ftalimidna zaštitna skupina na spoju **96** hidrolizirana je u prisustvu hidrazina u metanolu te je dobiven 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9a-(4-aminobutil)- 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**97**).[258] Nakon uspješno pripravljenog derivata **97** sa slobodnom 4-alkilamino-skupinom na položaju 9a, navedeni je derivat povezan s indometacinom (**2**), fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**) u konjugate **98a-c** standardim postupkom nastajanja amidne veze uz EDC·HCl i HOBT kao aktivatorima karboksilne kiseline (Shema 6 i Tablica 5).[253]



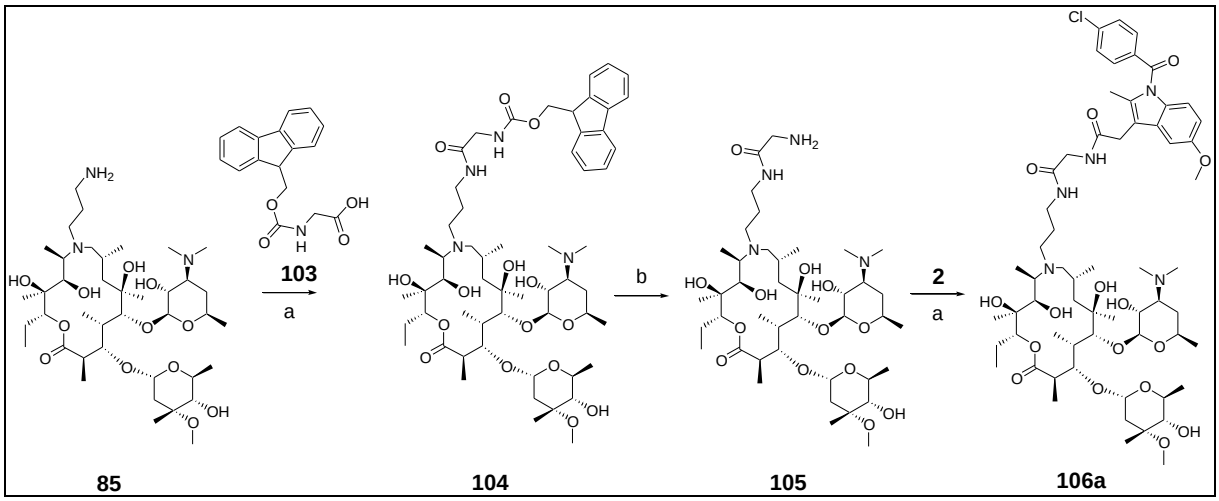
Shema 6. Produljenje poveznice na položaju 9a makrolida (I): a) *N*,*N*-diizopropilamin, MeCN, 80 ºC, b) $H_2NNH_2 \cdot H_2O$, MeOH, c) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2. Na analogan način dobiveni su konjugati **98b i 98c** s fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**)

Na drugi su način pripravljeni konjugati s poveznicom sa šest metilenskih jedinica (Shema 7). Na 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**91**) djelovalo se sa 6-brom-heksanonitrilom (**99**) u prisustvu *N*,*N*-diizopropiletilamina u acetonitrilu pri temperaturi od 80 ºC pri čemu je dobiven spoj 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(5-cijanopentil)-9a-homoeritromicin A (**100**).[257] Katalitičko hidrogeniranje spoja **100** provedeno je uz katalizator PtO_2 u EtOH pri tlaku vodika od 40-50 bara pri čemu je nastao 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(6-aminoheksil)-9a-homoeritromicin A (**101**).[249] Derivat **101** sa slobodnom 6-alkilamino-skupinom na položaju 9a potom je povezan s indometacinom (**2**), fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**) u konjugate **102a-c** standardnim postupkom nastajanja amidne veze s EDC·HCl i HOBT kao aktivatorima karboksilne kiseline (Shema 7 i Tablica 5).[253]



Shema 7. Produljenje poveznice na položaju 9a makrolida (II): a) *N*,*N*-diizopropiletilamin, MeCN, 80 ºC, b) H_2, PtO_2, EtOH, 40-50 bara, c) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2. Na analogan način dobiveni su konjugati **102b** i **102c** s fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**)

Treći je način priprave dulje poveznice između makrolida i nesteroidnih protuupalnih lijekova putem peptidne veze (Shema 8). 9-Deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**) povezan je amidnom vezom u prisustvu aktivatora karboksilne kiseline (EDC·HCl i HOBT) s *N*-Fmoc-glicinom (*N*-α-fluorenilmetiloksikarbonilglicin) (**103**) u derivat **104**.[253] Za reakciju je korišten komercijano dostupan glicin kojemu je amino-skupina zaštićena Fmoc-skupinom da bi se spiječilo nastajanje nepoželjnih amida. Fmoc-skupina na spoju **104** uklonjena je u prisustvu piperidina u EtOAc[259] te je tako dobiven spoj **105** sa slobodnom amino-skupinom, koji je povezan s indometacinom (**2**) i flufenamskom kiselinom (**74**) u konjugate **106a-b** standardnim postupkom nastajanja amidne veze s EDC·HCl i HOBT (Tablica 5).[253]

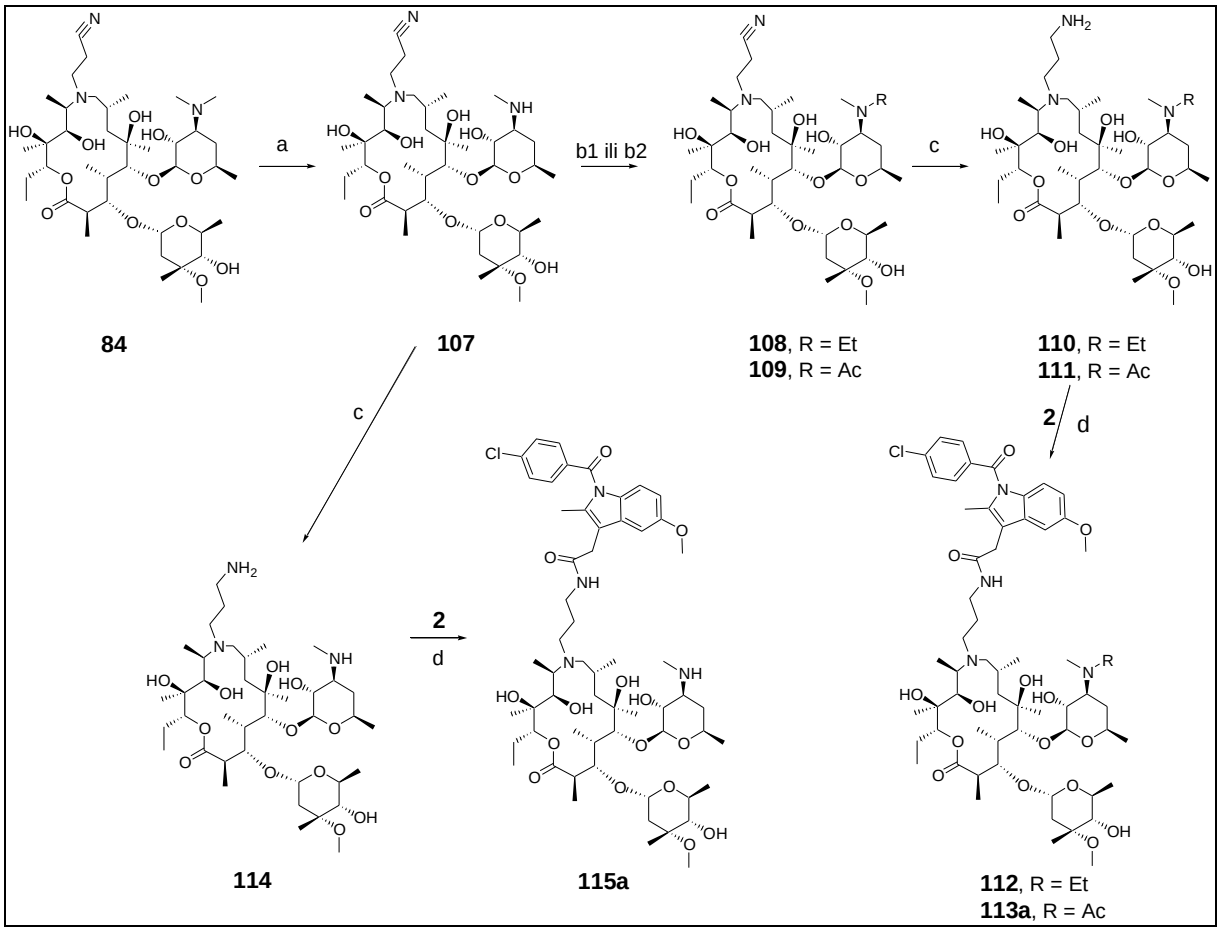


Shema 8. Produljenje poveznice na položaju 9a makrolida (III): a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, b) piperidin, EtOAc. Na analogan način dobiven je konjugat **106b** s flufenamskom kiselinom (**74**)

3.2.1.5. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A vezanih u položaju 9a s modifikacijama u 3'-*N* položaju desozamina

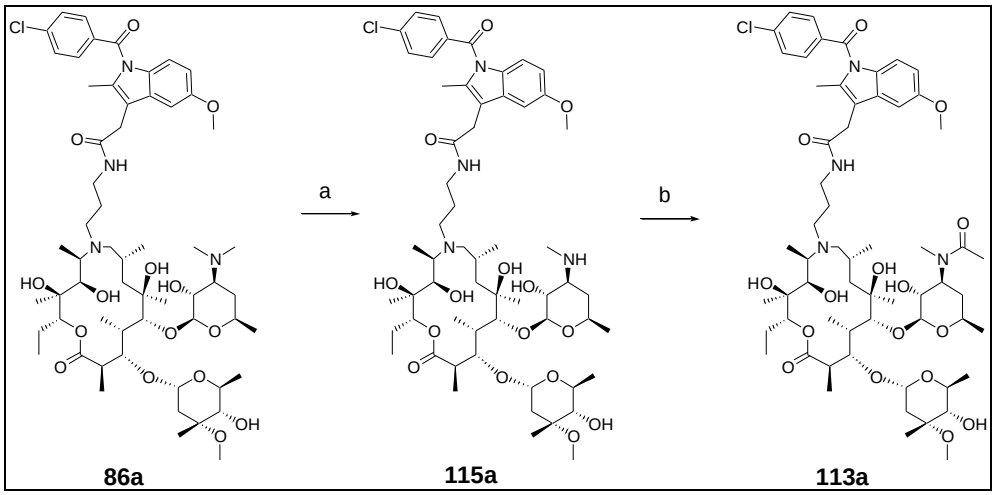
S ciljem priprave spojeva sa smanjenom antibakterijskom aktivnošću, pripravljeni su derivati između NSAID-a (indometacina, flufenamske kiseline ili fluniksina) i makrolida kojem je na položaju 3'-*N* desozamina (Slika 23) metilna skupina supstituirana etilnom ili acetilnom skupinom. Sinteza je započeta iz 9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicina A (**84**) koji je demetiliran na položaju 3'-*N* desozamina s I_2 i NaOAc u MeOH uz osvjetljavanje halogenom lampom od 500 W u 3'-*N*-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (**107**).[262,263] Nukleofilnim napadom s acetanhidridom ili etil-jodidom na spoj **107** nastaju spojevi 3'-*N*-demetil-3'-*N*-etil-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (**108**) i 3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (**109**).[257,261,263,264] Potom su cijanoetilni derivati **108** i **109** katalitički hidrogenirani s PtO_2 kao katalizatorom pod tlakom od 50 atmosfera u EtOH ili u ledenoj octenoj kiselini pri tlaku od 5,5 bara u amino-derivate **110** i **111**.[249] Konjugati **112** i **113a-c** pripravljeni su u reakciji nastajanja amidne veze s NSAID-ima indometacinom (**2**), fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**) i derivatima makrolida **110** i **111** u prisustvu EDC·HCl i HOBT (Shema 9 i Tablica 5).[253]

Spoj **107** je nadalje podvrgnut katalitičkom hidrogeniranju s PtO_2 kao katalizatorom pod tlakom od 50 atmosfera u EtOH pri čemu je nastao amino-derivat 3'-*N*-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a- homoeritromicin A (**114**).[249] Amino-derivat **114** je potom u prisustvu aktivatora karboksilne kiseline (EDC·HCl i HOBT) povezan s indometacinom (**2**) i flufenamskom kiselinom (**74**) u konjugate **115a-b** (Shema 9 i Tablica 5).[253]



Shema 9. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A vezanih u položaju 9a s modifikacijama u 3'-*N* položaju desozamina (I): a) I_2, NaOAc·$3H_2O$, 500 W, b1) EtI, $(i\text{-Pr})_2NEt$, MeOH, b2) Ac_2O, MeOH, c) H_2, PtO_2, EtOH, pri tlaku vodika od 40-50 bara ili ledena octena kiselina, 5,5 bara d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2. Na analogan način dobiveni su konjugati **113b-c** i **115b** s fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**)

Priprava konjugata indometacina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A s modifikacijom na položaju 3'-*N* desozamina (3'-*N*-acetilni derivat, spoj **113a**) moguća je i iz konjugata **86a** kao što je prikazano na Shemi 10. Na konjugatu **86a** provedena je demetilacija na 3'-*N* položaju desozamina s I_2 i NaOAc u metanolu uz osvjetljavanje halogenom lampom od 500 W, a potom je na dobivenom produktu **115a** nukleofilnim napadom s acetanhidridom dobiven konačni spoj **113a**.[261] Sličan način priprave konjugata **112** (3'-*N*-demetil-3'-*N*-etilni derivat) iz spoja **86a** nukleofilnim napadom s EtI nakon 3'-*N*-demetilacije nije bio moguć zbog degradacije indometacina u reakcijskim uvjetima potrebnim za nukleofilnu supstituciju što je dodatno objašnjeno u dijelu 4.1 u Raspravi.

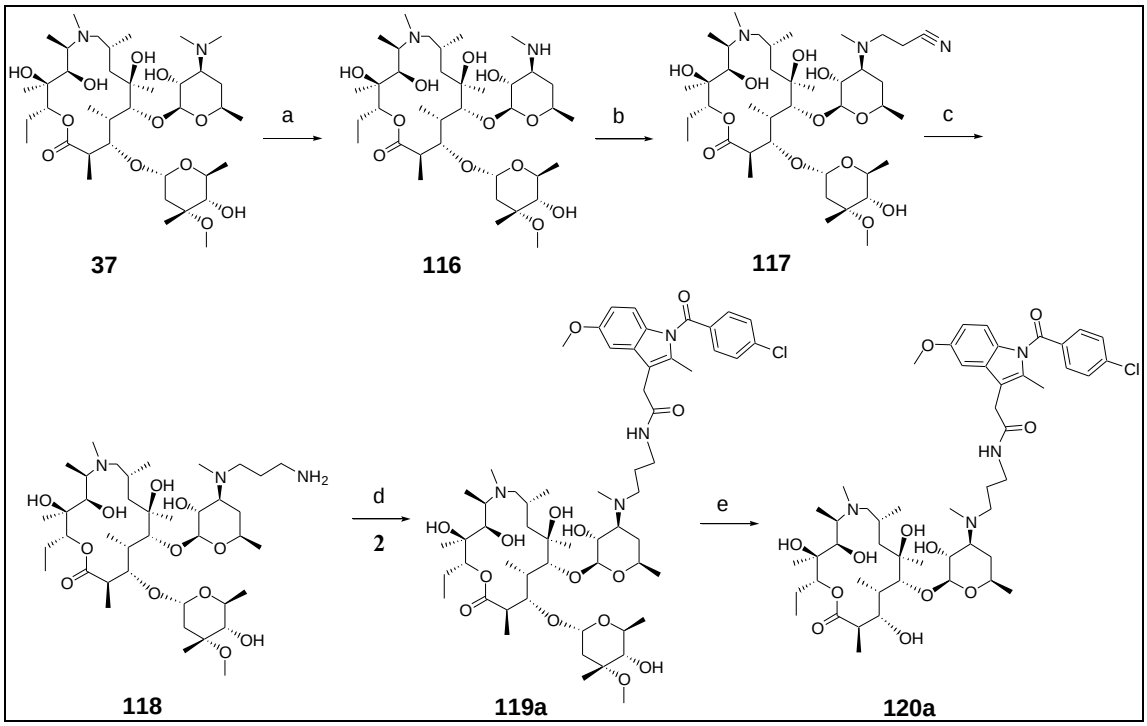


Shema 10. Priprava konjugata NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A vezanih u položaju 9a s modifikacijama u 3'-*N* položaju desozamina (II): a) I_2, NaOAc·$3H_2O$, 500 W, b) Ac_2O, MeOH

3.2.1.6. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina te konjugata NSAID-a i dekladinozil-azitromicina vezanih u položaju 3'-*N* desozamina

3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-derivat azitromicina **118** je pripremljen iz azitromicina (**37**) kao što je opisano na Shemi 11. Prvi korak je demetilacija polaznog azitromicina (**37**) na položaju 3'-*N* desozamina u reakciji s I_2 i NaOAc u metanolu uz osvjetljavanje halogenom lampom od 500 W u 3'-*N*-demetil-azitromicin (**116**).[262,263] 3'-*N*-demetil-3'-*N*-cijanoetil-azitromicin (**117**) pripravljen je iz spoja **116** s akrilonitrilom Michaelovom adicijom[251] te je potom spoj **117** katalitički hidrogeniran pod tlakom od 50 atmosfera s PtO_2 kao katalizatorom u EtOH u 3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-azitromicin (**118**).[249] Konjugati **119a-c** pripravljeni su u reakciji nastajanja amidne veze između indometacina (**2**), fluniksina (**73**) i flufenamske kiseline (**74**) i amino-derivata **118** u prisustvu EDC·HCl i HOBT (Tablica 5).[253]

Konjugati **119a-c** su pomoću razrijeđene kloridne kiseline prevedeni u dekladinozilne konjugate **120a-c**, kao što je prikazano na Shemi 11.[254,255] (Tablica 5).

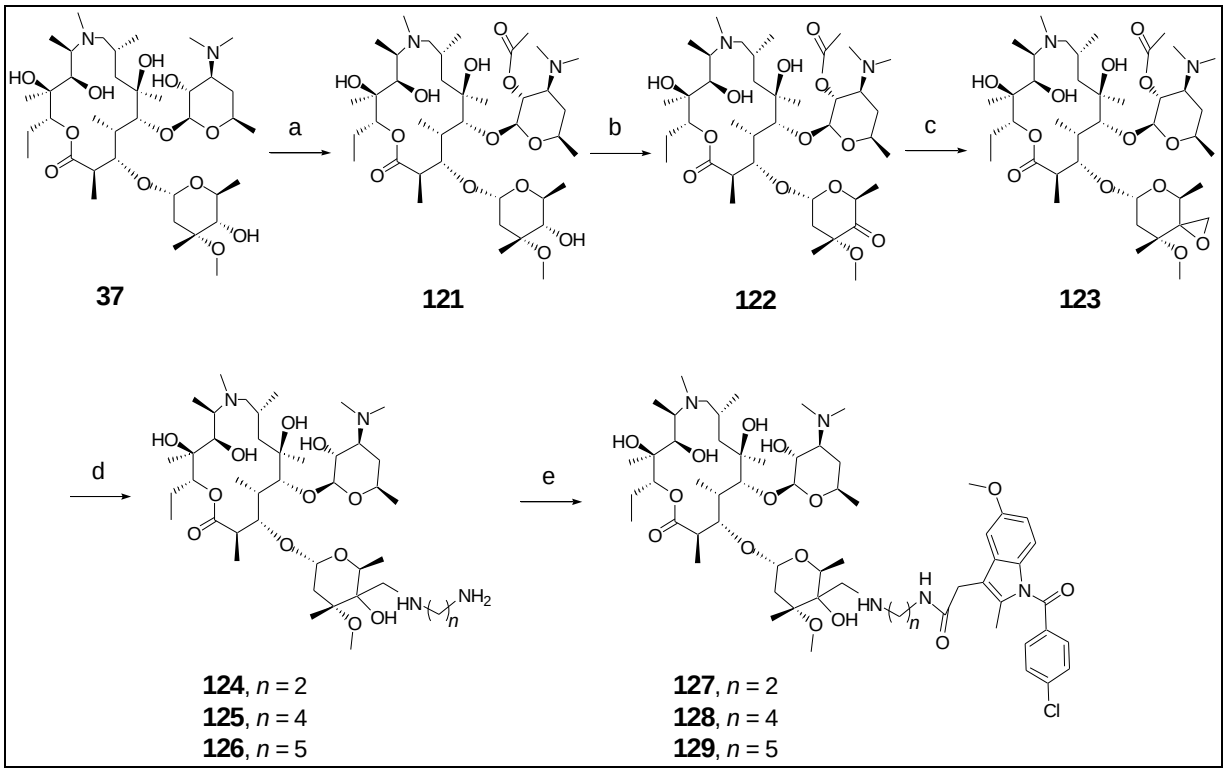


Shema 11. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina te dekladinozil-azitromicina vezanih u položaju 3'-*N* desozamina: a) I_2, $NaOAc \cdot 3H_2O$, 500 W, b) CH_2=CHCN, refluks, c) H_2, PtO_2, EtOH, 40-50 bara ili ledena octena kiselina, 5,5 bara, d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, e) HCl/H_2O. Na analogan način dobiveni su konjugati **119b-c** i **120b-c** s fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**)

3.2.1.7. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina vezanih u položaju 4" kladinoze

Kao što je prikazano na Shemi 12 prvi korak u sintezi konjugata NSAID-a i azitromicina na položaju 4" kladinoze (Slika 23) je zaštita najreaktivnije hidroksilne skupine na položaju 2' azitromicina (**37**) acetiliranjem s acetanhidridom u EtOH uz K_2CO_3 kao bazu pri čemu nataje 2'-*O*-acetil-azitromicin (**121**).[247,252] U sljedećem je koraku hidroksilna skupina na položaju 4" kladinoze na spoju **121** oksidirana u karbonilnu skupinu upotrebom piridintrifluoroacetata i EDC·HCl u prisustvu CH_3SOCH_3 te je tako pripravljen 2'-*O*-acetil-4"-dehidro-4"-okso-azitromicin (**122**).[252] Provođenjem reakcije s trimetilsulfoksonijevim jodidom i NaH na spoju **122**, pripravljen je spoj 2'-*O*-acetil-4"-epoksi-azitromicin (**123**) (na položaju 4" nasataje epoksid).[265] Nakon uklanjanja acetilne zaštite na položaju 2' na spoju **123** u MeOH[252] te nakon otvaranja epoksidne skupine na položaju 4" kladinoze s etilendiaminom, 1,4-diaminobutanom, odnosno 1,5-diaminopentanom, pripravljeni su 4"-amino-derivati azitromicina **124-126**.[265] Uklanjanje acetilne zaštite na položaju 2' kladinoze i otvaranje epoksida na položaju 4" kladinoze moguće je izvesti u jednom koraku s obzirom da se reakcija otvaranja epoksida s diaminima zbiva u metanolu u kojem ujedno dolazi i do uklanjanja acetilne zaštitne skupine. Konjugati NSAID-a i azitromicina na položaju 4" kladinoze **127-129** pripravljeni su

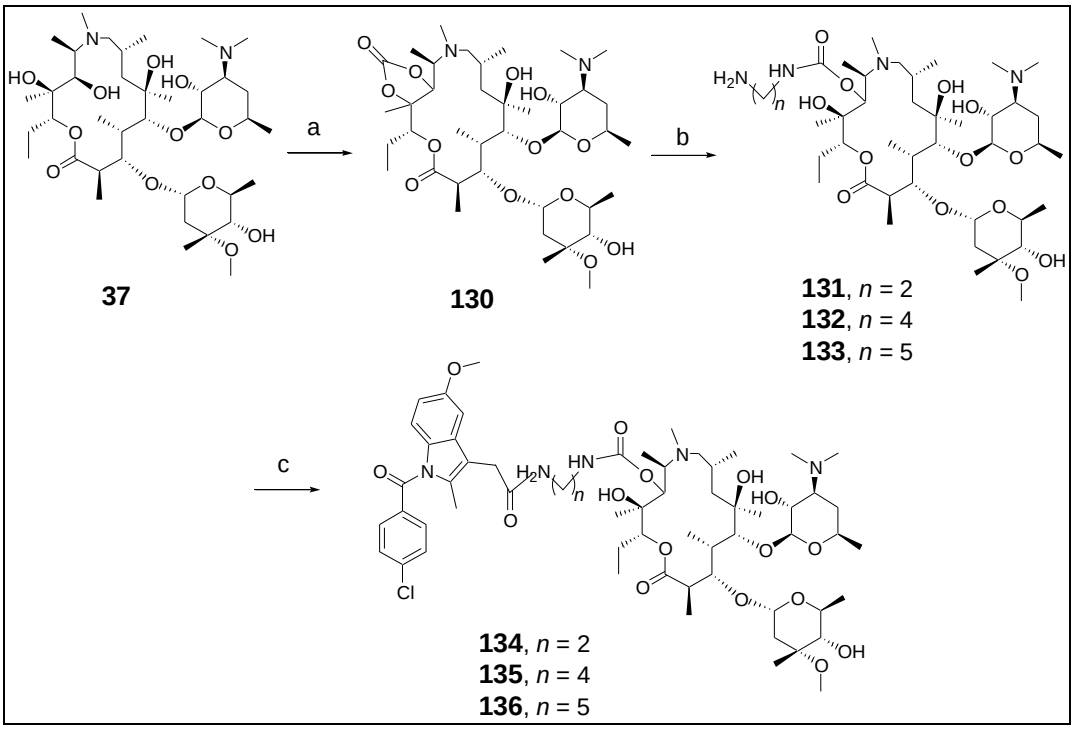
iz indometacina (**2**) i 4"-amino-derivata azitromicina **124-126** standardnim postupkom nastajanja amidne veze s EDC·HCl i HOBT (Shema 12 i Tablica 5).[253]



Shema 12. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina vezanih u položaju 4" kladinoze: a) Ac_2O, EtOAc, b) DMSO, piridintrifluoroacetat, EDC·HCl, c) trimetilsulfoksonijev jodid, NaH, d) $NH_2(CH_2)_nNH_2$, KI, MeOH, n=2, 4 ili 5, e) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

3.2.1.8. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina vezanih preko hidroksilne skupine u položaju 11 azitromicina

U svrhu pripravljanja konjugata izmedu NSAID-a i azitromicina vezanih preko položaja 11 azitromicina (Slika 23), azitromicin (**37**) je u prvom koraku modificiran u 11,12–ciklički karbonat **130** korištenjem etilen-karbonata i K_2CO_3.[256,267] Reakcijom spoja **130** s etilendiaminom, 1,4-diaminobutanom, odnosno 1,5-diaminopentanom uz piridin-klorid nastaju amino-derivati azitromicina **131-133** na položaju 11 (11-karbamati azitromicina) uz različite duljine lanca (Shema 13). Dobiveni amino-derivati **131-133** su prilično nestabilni[268,269] te ih nije moguće čistiti kromatografijom na stupcu, pa se s njima išlo dalje u rekcije bez prethodnog čišćenja. Konjugati između NSAID-a i azitromicina **134-136** pripravljeni su iz indometacina (**2**) i amino-derivata azitromicina **131-133** standardnim postupkom nastajanja amidne veze s EDC·HCl i HOBT (Tablica 5).[253]



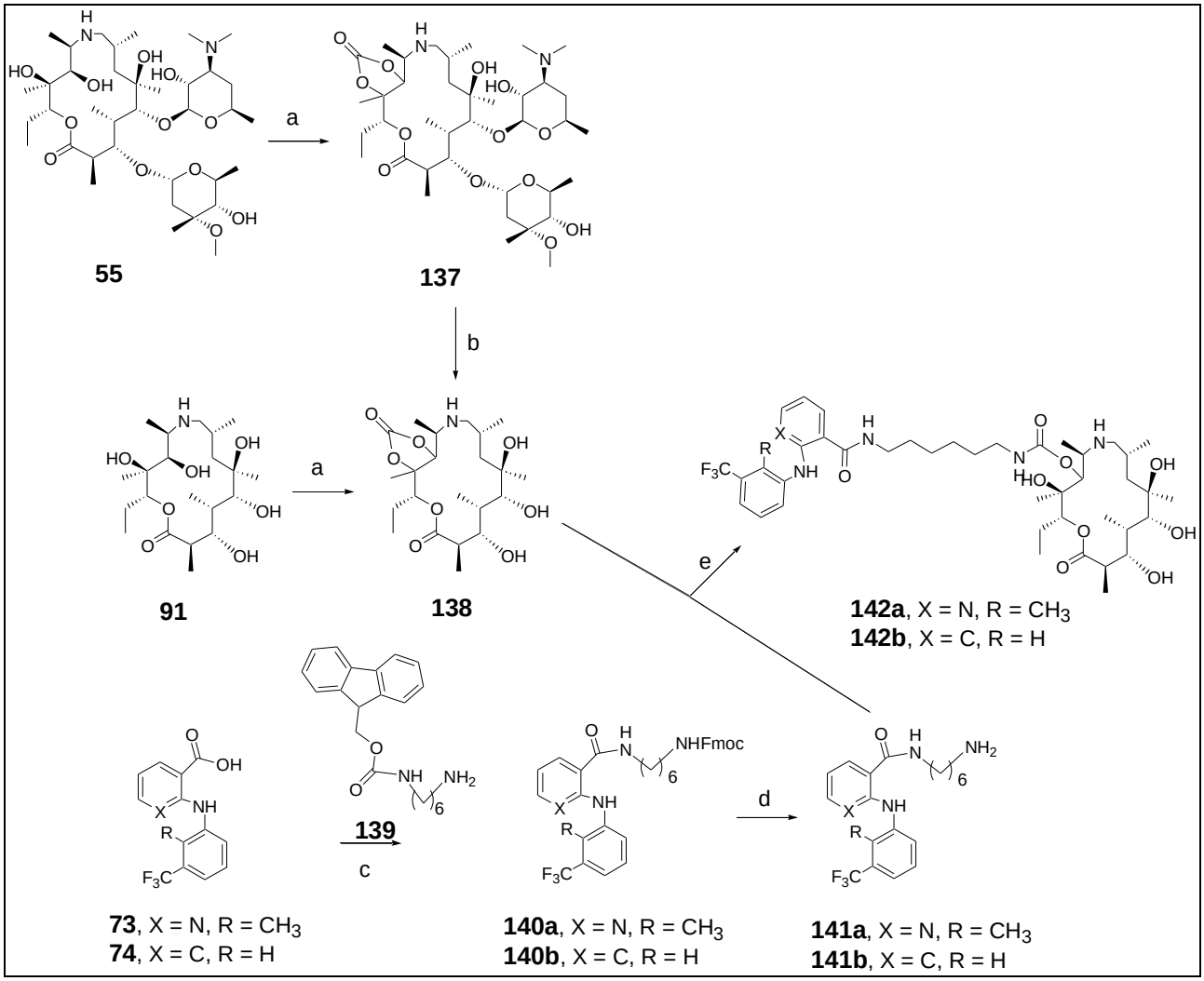
Shema 13. Priprava konjugata NSAID-a i azitromicina vezanih preko hidroksilne skupine u položaju 11 azitromicina: a) etilen-karbonat, K_2CO_3, b) $NH_2(CH_2)_nNH_2$, piridin·HCl, n = 2, 4 ili 5, c) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

3.2.1.9. Priprava konjugata NSAID-a i aglikona 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A vezanih u položaju 11 makrolida

Na primjeru pripravljenih konjugata fluniksina i flufenamske kiseline s aglikonom makrolida preko položaja 9a (spojevi **94b-c**) vidjelo se da navedeni konjugati pokazuju značajnu selektivnu inhibiciju COX-2 enzima te inhibiciju produkcije TNF-α. Upravo iz tog razloga potrebno je bilo pripraviti konjugate tih kiselina s aglikonima makrolida na ostalim položajima, te tako i na položaju 11 makrolida.

S obzirom na spoznaju o nestabilnosti derivata azitromicina **131-133** (karbamati na položaju 11 makrolida) za sintezu konačnih konjugata **142a-b** (konjugati NSAID-a i aglikonskog makrolida vezanih preko položaja 11 makrolida) izabran je alternativni put sinteze kao na Shemi 14. Stoga je najprije sintetiziran 11,12-ciklički karbonat **138** iz 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**91**) u prisutnosti K_2CO_3 i etilen-karbonata.[256, 267] Spoj **138** je također moguće pripremiti na drugi način tako što se najprije iz 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**55**) pripravi 11,12-ciklički karbonat **137** na kojem se potom hidroliziraju oba šećera u prisustvu 6 M HCl i $CHCl_3$.[254a,255,256] S druge strane trebalo je pripremiti poveznicu sa slobodnom amino-skupinom na fluniksinu (**73**) i flufenamskoj kiselini (**74**). Za taj je korak poslužio 6-*N*-Fmoc-1,6-diaminoheksan

(**139**) kojem je jedna amino-skupina zaštićena Fmoc skupinom. Fluniksin (**73**) i flufenamska kiselina (**74**) vezani su s navedenim aminom **139** amidnom vezom uz EDC·HCl, HOBT i trietilamin u inertnoj atmosferi, pri čemu su dobiveni odgovarajući spojevi **140a-b**.[253] U sljedećem koraku uklonjena je Fmoc zaštita amino-skupine na spojevima **140a-b** u piperidinu/EtOAc[259] i dobiveni su derivati navedenih kiselina **141a-b** (s poveznicama sa slobodnim amino-skupinama). Reakcijom amina **141a-b** s 11,12-cikličkim karbonatom **138** uz piridin-klorid dobiveni su konjugati **142a-b** (Tablica 5).



Shema 14. Priprava konjugata NSAID-a i aglikona 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A vezanih preko hidroksilne skupine u položaju 11: a) etilen-karbonat, K_2CO_3, b) 6 M HCl/$CHCl_3$, c) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, d) piridin, EtOAc, e) piridin·HCl, DBU, piridin

3.2.2. Priprava konjugata COX-1/COX-2 inhibitora i derivata 14-članih makrolida

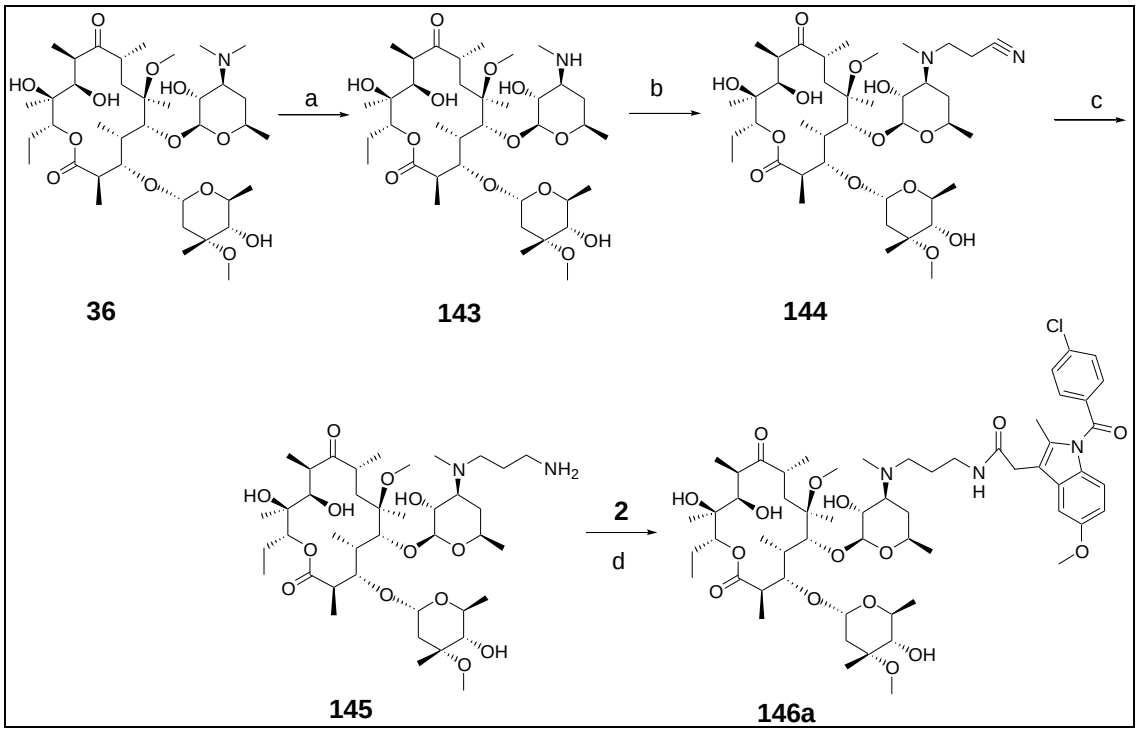
Od 14-članih makrolida za konjugaciju s neselektivnim NSAID-ima korišteni su eritromicin A oksim i klaritromicin.

3.2.2.1. Priprava konjugata NSAID-a i eritromicin A oksima te NSAID-a i klaritromicina vezanih u položaju 3'-*N* desozamina

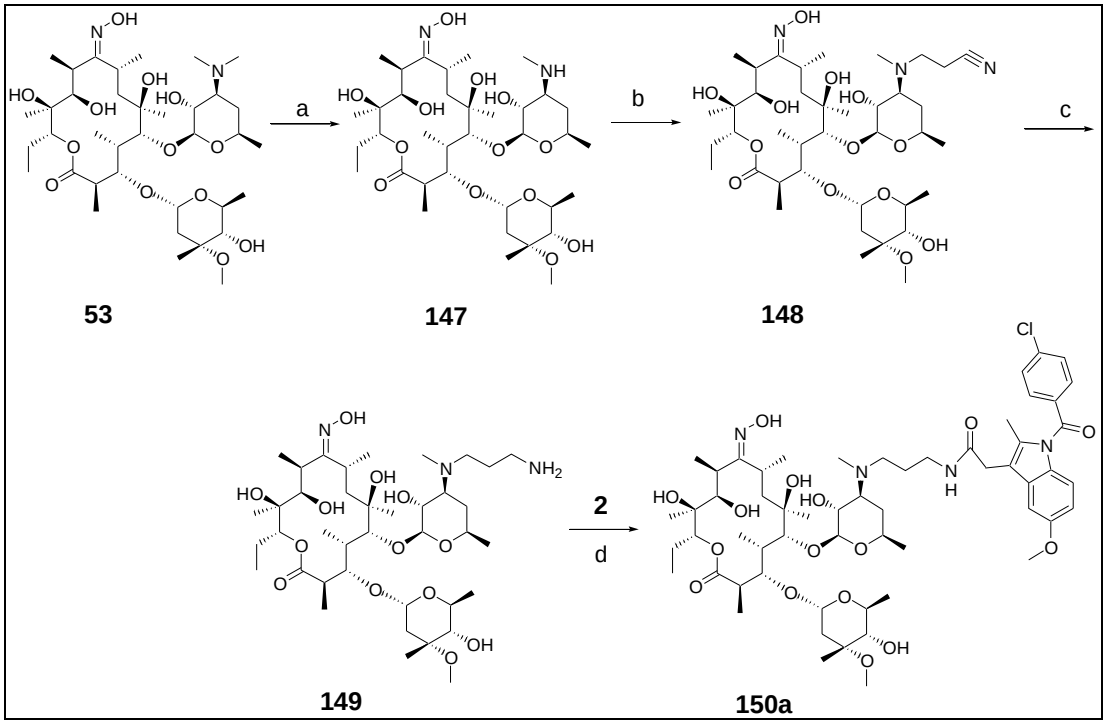
3′-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-derivati 14-članih makrolida **145** i **149** pripravljeni su iz klaritromicina (**36**) i eritromicin A oksima (**53)** (spoj **53** nastaje iz eritromicina A prevođenjem 9-karbonilne skupine u oksim / opisano pri sintezi azitromicina u Shemi 1). Prvi sintetski korak za dobivanje takvih derivata je demetilacija polaznih makrolida na položaju 3′-*N* desozamina pomoću joda ozračivanjem halogenom lampom.[262,263] Navedenim postupkom dobiveni su 3′-*N*-demetilni derivati klaritromicina **143** (Shema 15) te eritromicin A oksima **147** (Shema 16). Nadalje su spojevi **143** i **147** Michaelovom adicijom s akrilonitrilom[252] prevedeni u odgovarajuće cijanoetilne adukte **144** i **148.** Primijećeno je da, za razliku od adicije na klaritromicinskom derivatu **143** koja se zbiva uobičajenim tokom te uz dobro iskorištenje, reakcijom Michaelove adicije na eritromicin A oksimskom derivatu **147** nastajanje željenog produkta **148** nije selektivno (pretpostavka o sudjelovanju oksimske jedinice u reakciji Michaelove adicije / detaljnije opisano u dijelu 4.1 Rasprava).

Cijanoetilni adukt **144** podvrgnut je potom katalitičkom hidrogeniranju pri tlaku od 50 atmosfera te uz PtO_2 kao katalizator.[249] Pri tome je postignuto bolje iskorištenje za dobivanje amina **145** ako se umjesto etanola upotrijebi metanol (bolja topljivost spoja **144**). Sljedećom reakcijom stvaranja amidne veze s indometacinom (**2**), fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**) uz upotrebu EDC·HCl i HOBT, dobiveni su konjugati **146a-c** (Shema 15 i Tablica 5).[253]

Odgovarajući 3′-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-derivat eritromicin A oksima **149** dobiven je katalitičkim hidrogeniranjem spoja **148**[249] te je potom vezan amidnom vezom na indometacin (**2**) i fluniksin (**73**) u konjugate **150a-b** (Shema 16 i Tablica 5).[253]



Shema 15. Priprava konjugata NSAID-a i klaritromicina vezanih u položaju 3'-*N* desozamina: a) I_2, $NaOAc \cdot 3H_2O$, 500 W, b) CH_2CHCN, refluks, c) H_2, PtO_2, MeOH, 50 atm, d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2. Na analogan način dobiveni su konjugati **146b** i **146c** s fluniksinom (**73**) i flufenamskom kiselinom (**74**)

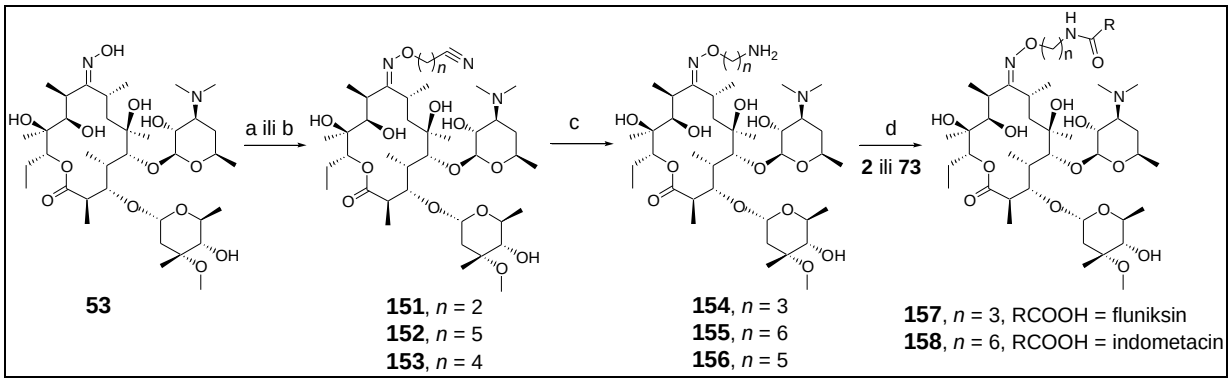


Shema 16. Priprava konjugata NSAID-a i eritromicin A oksima vezanih u položaju 3'-*N* desozamina: a) I_2, $NaOAc \cdot 3H_2O$, 500 W, b) CH_2CHCN, refluks, c) H_2, PtO_2, EtOH, 50 atm d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2. Na analogan način dobiven je konjugat **150b** s fluniksinom (**73**)

3.2.2.2. Priprava konjugata NSAID-a i eritromicin A oksima vezanih preko 9(E)-*O*-aminoalkilnog lanca

Pretpostavka postavljena o sudjelovanju oksimske jedinice u Michaelovoj adiciji potvrđena je kada je reakcijom eritromicin A oksima **53** (koji sadrži oba metila na dušiku u položaju 3′-*N* desozamina) s akrilonitrilom dobiven spoj **151** s 9(E)-*O*-(2-cijanoetilnim) lancem (Shema 17).[252] Ova reakcija odvijala se sporo i s malim iskorištenjem koje bi se vjerojatno moglo poboljšati dodatkom baze. Dobiveni cijanid **151** hidrogeniranjem je preveden u amin **154**,[249] koji je s fluniksinom (**73**) vezan u amid **157** standardnim postupkom nastajanja amidne veze.[253]

Na Shemi 17 također je prikazan sintetski slijed za dobivanje još dva spoja s 9(E)-*O*-aminoalkilnim lancem. Cijanidi potrebni za pripravu takvih derivata dobiveni su reakcijom eritromicin A oksima (**53**) i 6-bromheksannitrila (za spoj **152**), odnosno 5-bromvaleronitrila (za spoj **153**) u prisutnosti tetrabutilamonijevog jodida, natrijevog jodida i kalijevog hidroksida. Dobiveni cijanidi **152** i **153** hidrogeniranjem su prevedeni u amine **155** i **156**,[249] a potom je amino-derivat **155** vezan s indometacinom (**2**) u konjugat **158** standardnim postupkom nastajanja amidne veze.[253]



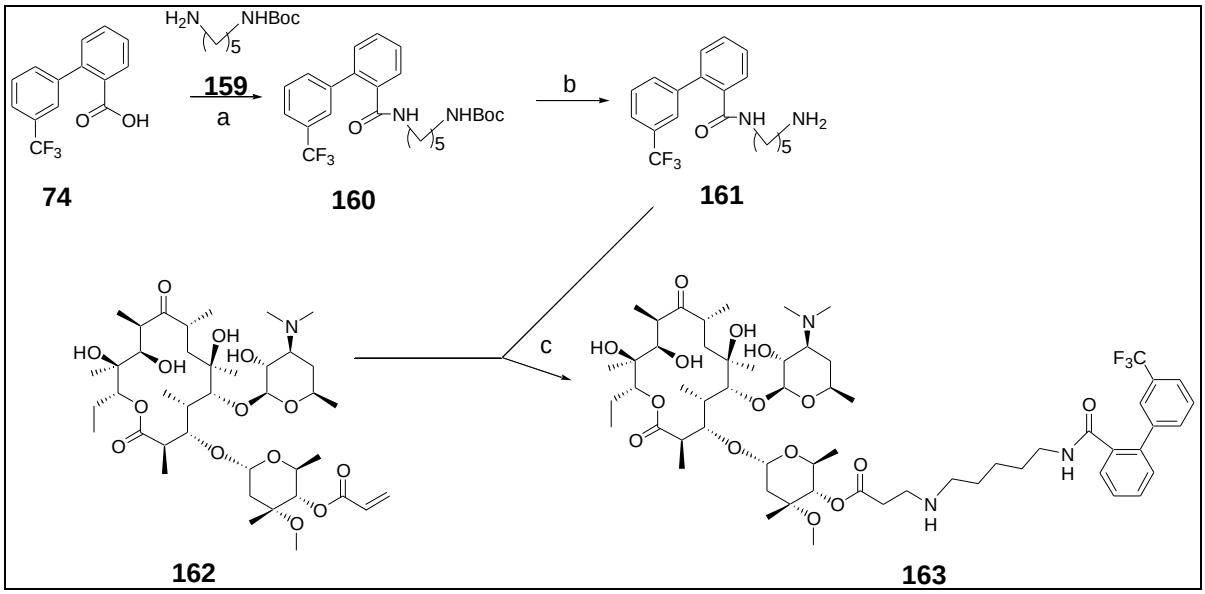
Shema 17. Priprava konjugata NSAID-a i eritromicin A oksima vezanih preko 9(E)-*O*-aminoalkilnog lanca: a) CH_2=CHCN, b) $Br(CH_2)_nCN$, $Bu_4N^+I^-$, NaI, KOH, THF, n = 4 i 5, c) H_2, PtO_2, EtOH, 50 atm, d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

3.2.2.3. Priprava konjugata NSAID-a i klaritromicina vezanih u položaju 4”-*O*-kladinoze

S obzirom da su konjugati azitromicina i flufenamske kiseline pokazali izrazita svojstva selektivne inhibicije COX-2 enzima te inhibicije produkcije TNF-α, a s ciljem da se istraži povezanost protuupalnih svojstava s tipom makrolidnih podjedinica, sintetiziran je konjugat derivata flufenamske kiseline i derivata klaritromicina **163** (Shema 18).

Prvenstveno je trebalo pripraviti lanac sa slobodnom amino-skupinom na flufenamskoj kiselini (**74**), za što je poslužio 1,5-diaminopentan kojemu je jedna amino-skupina zaštićena Boc (*N*-α-*terc*-

butiloksikarbonil)-skupinom (spoj **159**). Flufenamska kiselina (**74**) vezana je s navedenim aminom **159** amidnom vezom uz HOBT i EDC·HCl u inertnoj atmosferi, pri čemu je dobiven odgovarajući spoj **160**.[253] U sljedećem koraku skinuta je Boc zaštita amino-skupine na spoju **160** u smjesi THF i CH_2Cl_2 u volumnom omjeru 1:1 i dobiven je derivat flufenamske kiseline sa slobodnom amino-skupinom **161**.[270] Tako dobiveni derivat flufenamske kiseline **161** (amin) povezan je s 4"-*O*-akriloil-klaritromicinom **162** Michaelovom adicijom u konjugat **163** (kako je prikazano na Shemi 18).[266] Reakcija je provedena u metanolu pri 55 °C kroz 18 sati (uz iskorištenje od oko 80 %).



Shema 18. Priprava konjugata NSAID-a i klaritromicina vezanih u položaju 4”-*O*-kladinoze: a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, b) TFA:CH_2Cl_2 = 1:1, c) MeOH, 55 °C, 18 sati

3.2.3. Priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i derivata azitromicina u položajima 9a, 11, 3'-*N* desozamina i 4'' kladinoze

3.2.3.2. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina

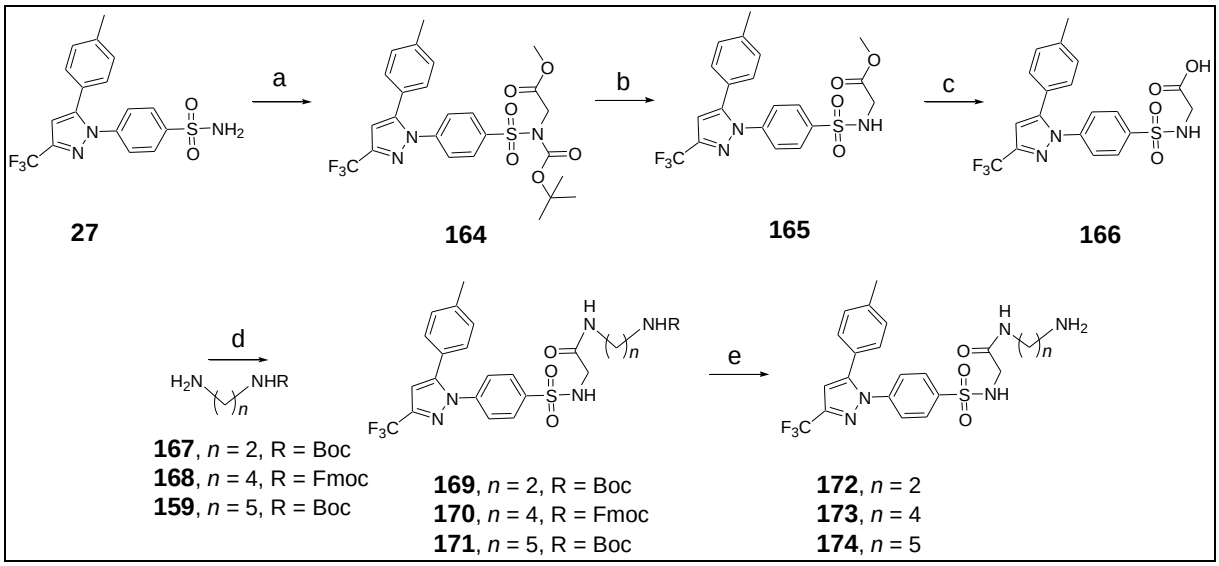
3.2.3.2.1. Priprava derivata celekoksiba

U nastojanju da se izbjegnu gastrointestinalni poremećaji uslijed neselektivnosti klasičnih NSAID lijekova u terapiji se sve više uvode selektivni COX-2 inhibitori,[1-4] iako s velikim opezom jer je poznato da selektivni COX-2 inhibitori smanjuju gastrointestinalne nuspojave, ali posjeduju kardiovaskularne nuspojave (posebno oni s velikom selektivnošću). Danas su najpoznatiji selektivni COX-2 inhibitori koksibi, među kojima je i celekoksib (**27**). U tu je svrhu bilo potrebno povezati celekoksib s makrolidom da bi se vidjelo da li će zadržati svoju selektivnost ili je možda povećati, a također da li će postići bolje nakupljanje u upalnim stanicama.

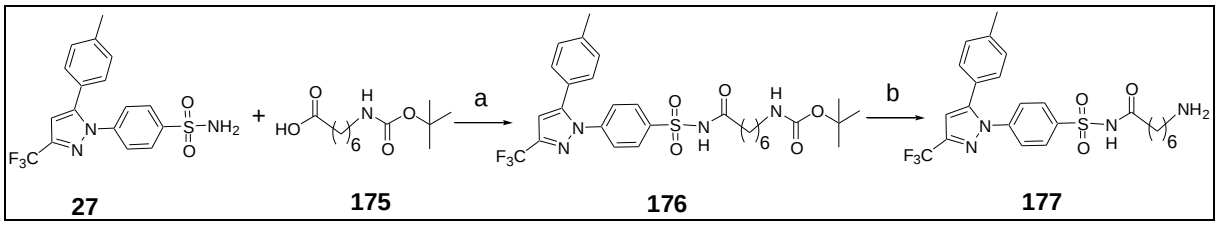
Najprije je bilo potrebno prirediti derivat celekoksiba koji sadrži slobodnu karboksilnu skupinu **164**. Iz celekoksiba (**27**) uz prisustvo 4-dimetilaminopiridina (DMAP), TEA, di-*terc*-butil-dikarbonata, metil-bromacetata i K_2CO_3 pripravljen je spoj **164**[274] iz kojeg je potom dobiven spoj **165** uklanjanjem Boc zaštite s TFA u CH_2Cl_2.[270] Hidrolizom metilnog estera **165** s LiOH[249] konačno je dobiven derivat celekoksiba sa slobodnom karboksilnom kiselinom **166** s kojim se išlo dalje u povezivanje s makrolidima (Shema 19).

Za pripremu nekih konjugata celekoksiba i makrolida bilo je potrebno prethodno pripremiti poveznicu na celekoksibu sa slobodnom amino-skupinom. Reakcijom diamina (**159**, **167** i **168**), koji imaju jednu amino-skupinu zaštićenu Fmoc-, odnosno Boc-skupinom, s derivatom celekoksiba **166** uz EDC·HCl, HOBT i TEA dobiveni su spojevi **169-171**.[253] Uklanjanjem Fmoc zaštite s piperidinom u EtOAc[259] na spoju **170**, a Boc zaštite s TFA u CH_2Cl_2[270] na spojevima **169** i **171** dobiveni su derivati celekoksiba sa slobodnom amino-skupinom **172-174** s kojima se također išlo u daljnje povezivanje s makrolidima (Shema 19).

Derivat celekoksiba sa slobodnom amino-skupinom **177** pripravljen je na još jedan način direktno iz celekoksiba (**27**), kao što je prikazano na Shemi 20. Celekoksib (**27**) je povezan s *N*-Boc-7-amino-heptanskom kiselinom **175** u derivat **176**,[253] iz kojeg je uklanjanjem Boc zaštitne skupine u TFA/ CH_2Cl_2 dobiven derivat celekoksiba sa slobodnom amino-skupinom **177**.[270]



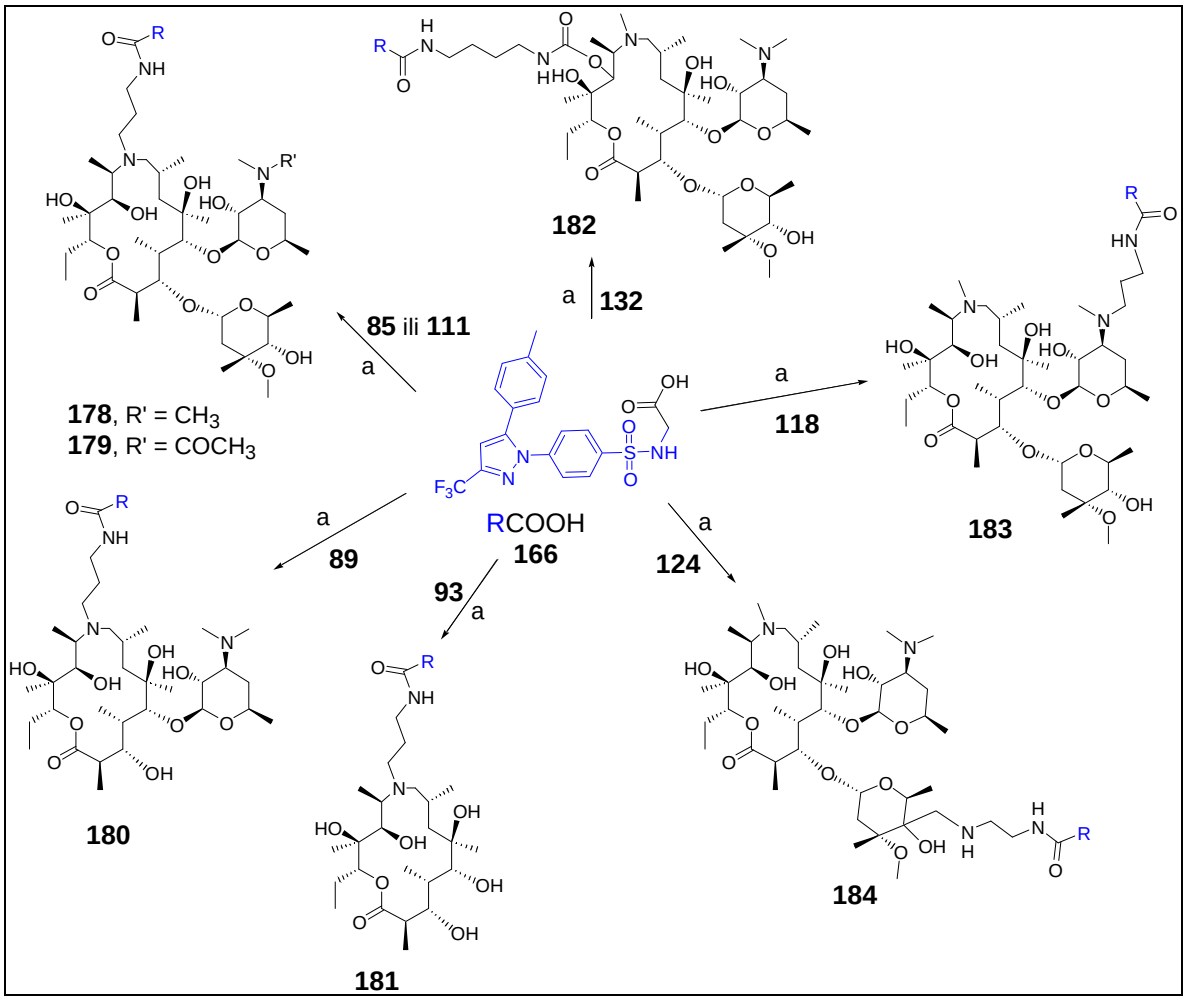
Shema 19. Priprava derivata celekoksiba (I): a) DMAP, TEA, di-*terc*-butil-dikarbonat, metil-bromacetat i K_2CO_3, b) TFA, CH_2Cl_2, c) LiOH, d) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, e) piperidin, EtOAc ili TFA, CH_2Cl_2



Shema 20. Priprava derivata celekoksiba (II): a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, b) TFA, CH_2Cl_2

3.2.3.2.2. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A

Nakon pripremanja derivata celekoksiba sa slobodnom karboksilnom skupinom **166** i sa slobodnom amino-skupinom **172-174** i **177** navedeni su derivati povezani s pojedinim derivatima azitromicina u konjugate u položajima 6, 9a (bez i s modifikacijama na 3'-*N* položaju desozamina), 11, 3'-*N* desozamina i 4" kladinoze (Sheme 21-25). Navedeni konjugati su sintetizirani s ciljem ispitivanja da li položaj na makrolidu preko kojeg je vezan derivat celekoksiba utječe na djelovanje konjugata.

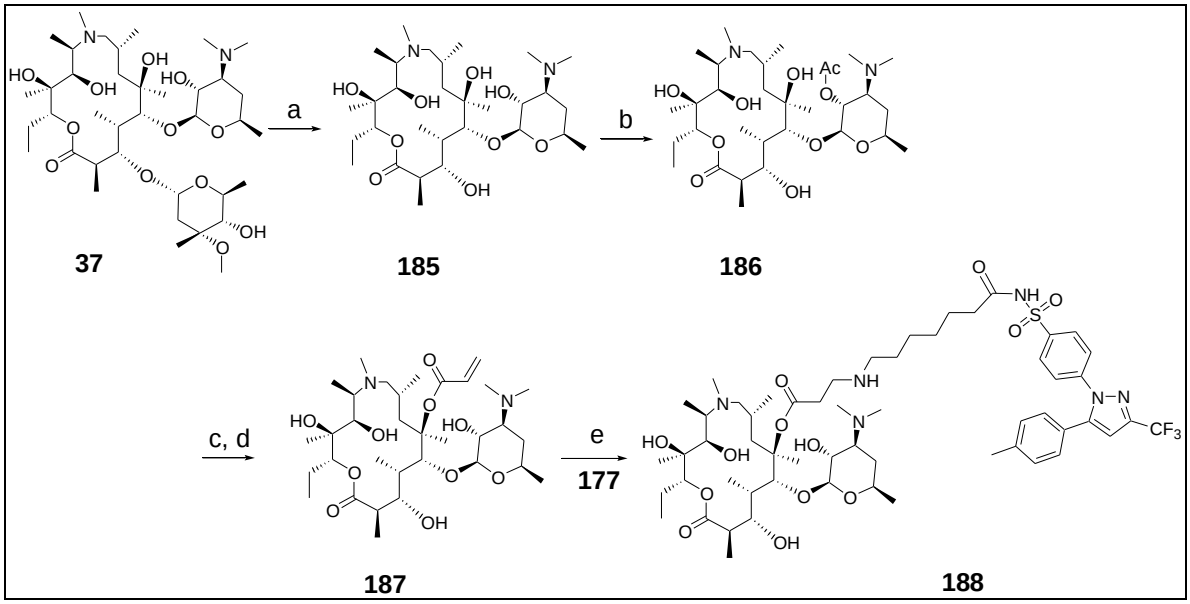


Shema 21. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina (I): a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

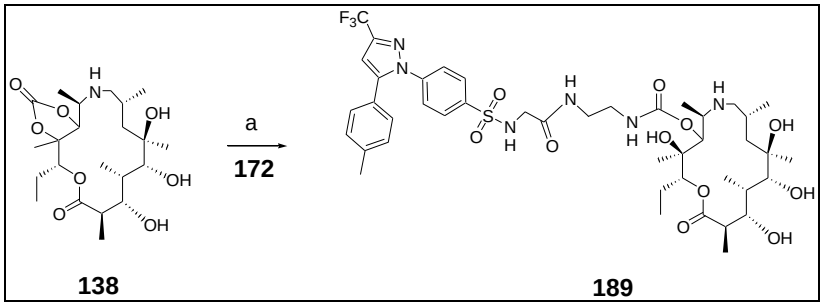
Kao što je prikazano na Shemi 21 iz derivata celekoksiba **166** i odgovarajućih derivata azitromicina sa slobodnom amino-skupinom (**85**, **89**, **93**, **111**, **118**, **124** i **132**) uz EDC·HCl, HOBT i TEA pripravljeni su konjugati **178-184**.[253] Dobivanje derivata azitromicina sa slobodnom amino-skupinom **85**, **89**, **93**, **111**, **118**, **124** i **132** prikazano je ranije (Sheme 5, 9, 11, 12 i 13).

Za pripravu konačnog konjugata **188**, upotrebljeni su derivat celekoksiba sa slobodnom amino-skupinom **177** i derivat azitromicina **187** (Shema 22). S ciljem dobivanja derivata azitromicina **187** kladinoza je na položaju 3 makrolida hidrolizirana na azitromicinu (**37**) reakcijom u otopini razrijeđene kloridne kiseline.[247] Tako pripravljen 3-*O*-dekladinozil-azitromicin (**185**) je acetiliran s anhidridom ocetne kiseline u prisutnosti natrijevog hidrogenkarbonata kao baze, pri čemu se selektivno zaštićuje najreaktivnija 2'-hidroksilna skupina te na taj način nastaje 3-*O*-dekladinozil-2'-*O*-acetil-azitromicin (**186**).[252] Sljedećom reakcijom esterifikacije s 3-klorpropionil-kloridom u prisutnosti trietilamina kao baze dobiven je produkt **187** koji ima vezanu akriloilnu skupinu na položaju 6 makrolida (umjesto očekivanog na položaju 3 makrolida).[275] Radi daljnje identifikacije nastalog

produkta, acetatna zaštitna skupina s 2'-hidroksilne skupine u prisutnosti metanola je uklonjena već na spoju **187**, iako se navedena zaštitna skupina može skinuti u sljedećem koraku povezivanja s derivatom celekoksiba **177** Michaelovom adicijom u metanolu pri čemu nastaje konjugat **188**.[266] Povezivanje akriloilnog lanca na položaju 6 makrolida potvrđeno je jedno- i dvo- dimenzionalnim ^{1}H NMR (nuklearna magnetska rezonancija) i ^{13}C NMR spektrima (detaljno obrazloženo u dijelu 4.1 Rasprava).



Shema 22. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina (II): a) HCl/H_2O, b) Ac_2O, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, c) 3-klorpropionil-klorid, Et_3N, toluen, d) MeOH, e) MeOH

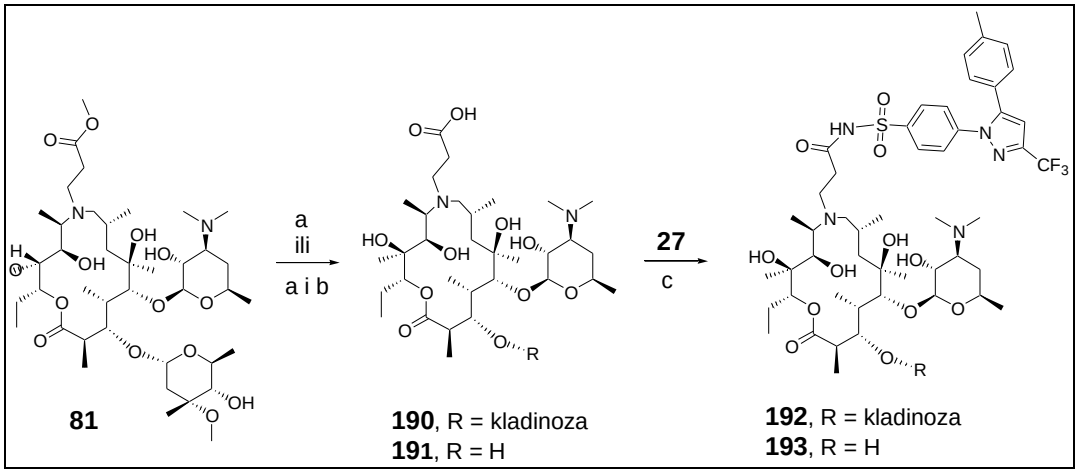


Shema 23. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A na položaju 11 makrolida (III): a) piridin·HCl, DBU, piridin

Također je pripremljen konjugat derivata celekoksiba i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A na položaju 11 makrolida (**189**). Za pripremu navedenog konjugata bilo je potrebno prethodno pripraviti derivat celekoksiba sa slobodnom amino-skupinom (spoj **172**, Shema 19). Otvaranjem cikličkog karbonata na 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicinu A **138** (dobivanje ranije prikazano na Shemi 14) s aminom **172**

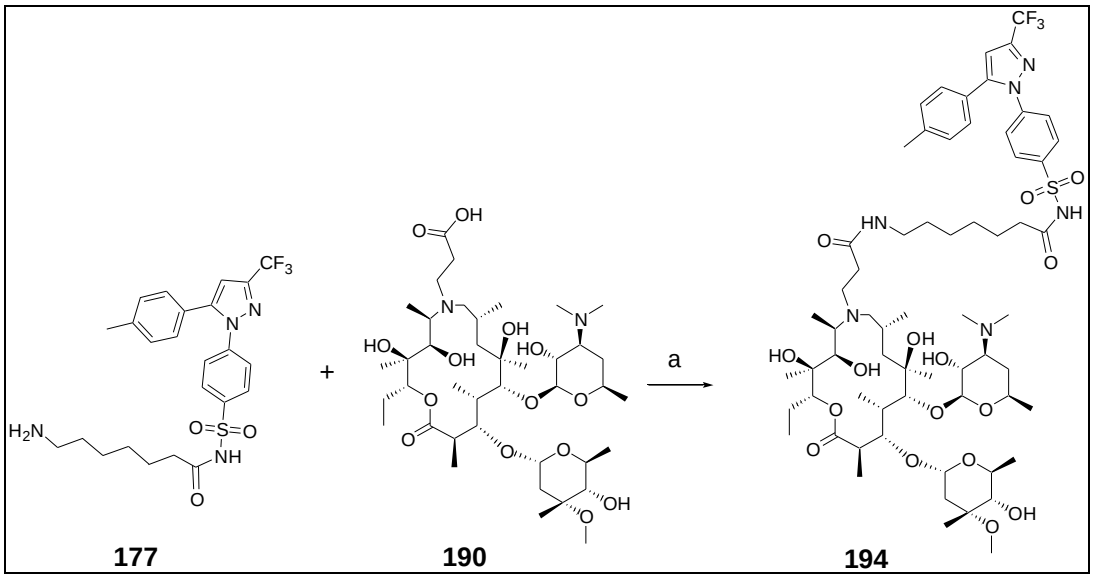
uz piridin-klorid i DBU (1,8-diazabiciklo(5.4.0)undekan-7-en) u piridinu dobiven je konjugat **189** (Shema 23).[267]

Direktnim vezanjem celekoksiba (**27**) i derivata makrolida **190,** koji ima slobodnu karboksilnu skupinu na poveznici u položaju 9a makrolida, dobiven je konjugat **192** (prikazan na Shemi 24), koji se nije mogao izolirati (uočena razgradnja konačnog konjugata u 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**)). Spoj **190** dobiven je iz spoja **81** hidrolizom estera u prisustvu LiOH.[249] Na spoju **81** je također provedena i hidroliza kladinoze (s razrijeđenom HCl)[254,255] uz hidrolizu estera (s LiOH)[249] pri čemu je dobiven derivat **191** (derivat sa slobodnom karboksilnom kiselinom). Spoj **191** je potom direktno povezan s celekoksibom (**27**) u konjugat **193** koji se također nije mogao izolirati (razgradnja na 3-*O*-dekladinolil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (**87**)).[253]



Shema 24. Pokušaj priprave konjugata celekoksiba i derivata azitromicina (IV): a) LiOH, b) razr. HCl, c) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

Isti derivat makrolida **190** povezan je s derivatom celekoksiba **177**, koji ima slobodnu amino-skupinu na dugoj poveznici. Reakcija je provedena u prisustvu aktivatora karboksilne kiseline EDC·HCl i HOBT uz prisustvo baze TEA te je dobiven konjugat **194** koji je, za razliku od prethodnih, uspješno izoliran (Shema 25).[253]

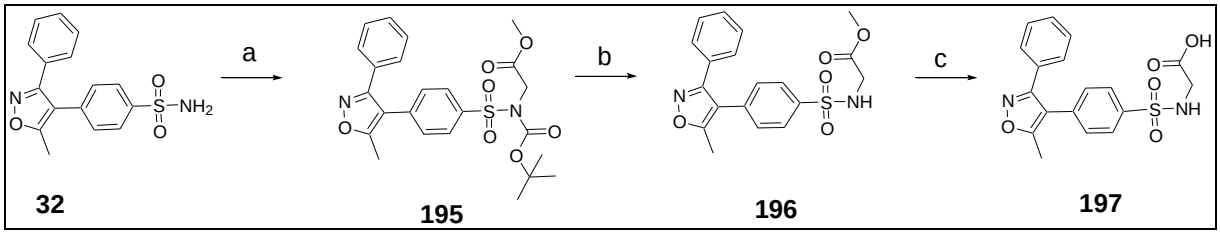


Shema 25. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina (V): a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

3.2.3.3. Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata azitromicina

3.2.3.3.1. Priprava derivata valdekoksiba

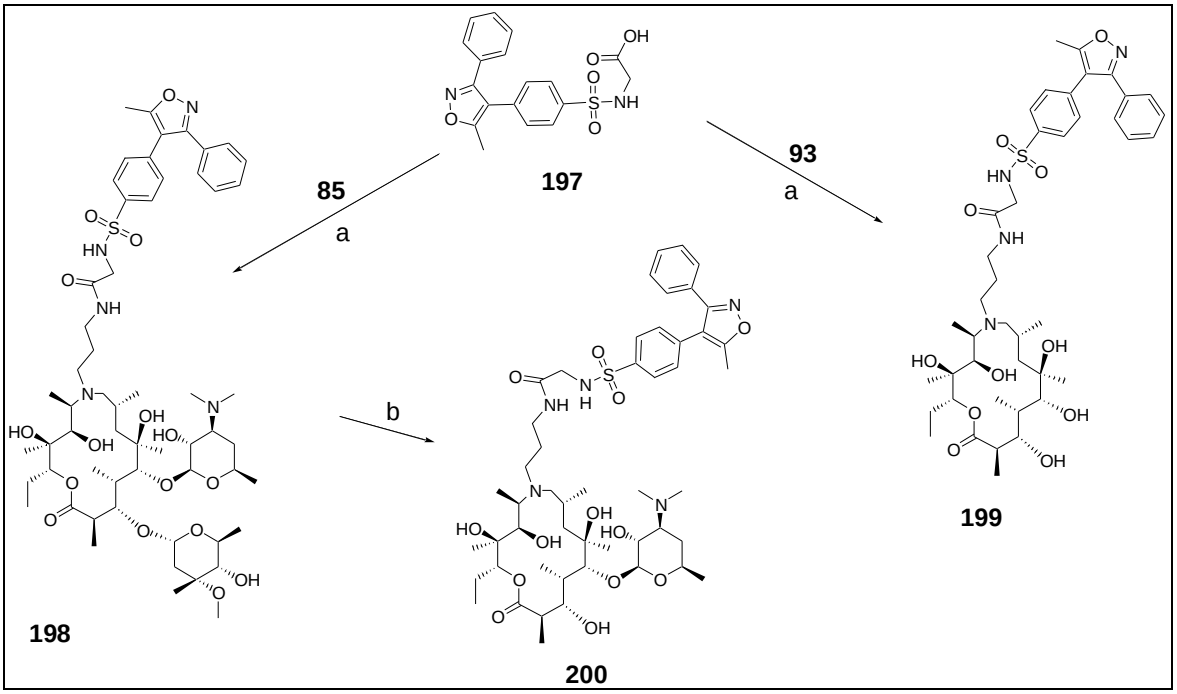
Osim celekoksiba (**27**) i valdekoksib (**32**) je poznati selektivni COX-2 inhibitor, koji je također vezan na makrolide. U tu svrhu najprije je bilo potrebno prirediti derivat valdekoksiba koji sadrži slobodnu karboksilnu skupinu **197** analogno kao i iz celekoksiba (što je prikazano ranije na Shemi 19). U skladu s prikazanim na Shemi 26, iz valdekoksiba (**32**) uz prisustvo DMAP, TEA, di-*terc*-butil-dikarbonata, metil-bromacetata i K_2CO_3 nastaje spoj **195**[274] iz kojeg se uklanjanjem Boc zaštite s TFA u CH_2Cl_2 dobiva spoj **196**.[270] Konačno hidrolizom metilnog estera na derivatu **196** s LiOH dobiven je derivat valdekoksiba koji sadrži slobodnu karboksilnu skupinu **197**.[249]



Shema 26. Priprava derivata valdekoksiba: a) DMAP, TEA, di-*terc*-butil-dikarbonat, metil-bromacetat i K_2CO_3, b) TFA, CH_2Cl_2, c) LiOH

3.2.3.3.2. Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A

Priređeni derivat valdekoksiba **197** povezan je s 9a-aminopropilnim derivatima makrolida **85** i **93** uz TEA, HOBT i EDC·HCl u konjugate **198** i **199** kao što je prikazano na Shemi 27.[253] Hidrolizom kladinoze na spoju **198** u 0,1 M HCl dobiven je i konjugat **200**.[247]



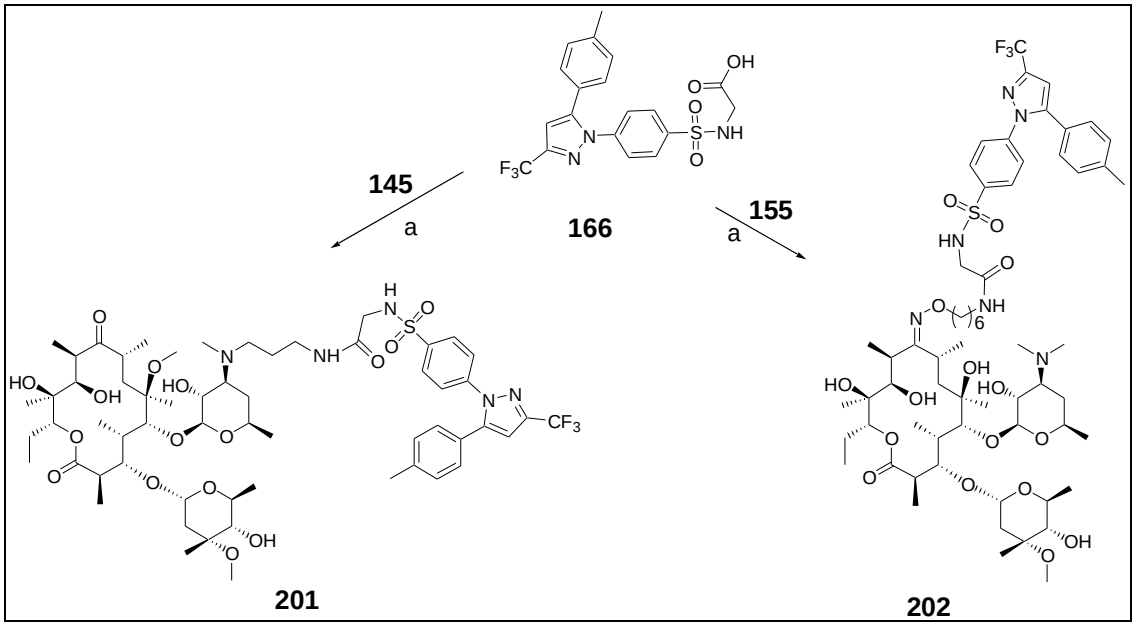
Shema 27. Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A: a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2, b) HCl/H_2O

3.2.4. Priprava konjugata selektivnih COX-2 inhibitora i derivata 14-članih makrolida

3.2.4.1. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 14-članih makrolida (eritromicin A oksim i klaritromicin)

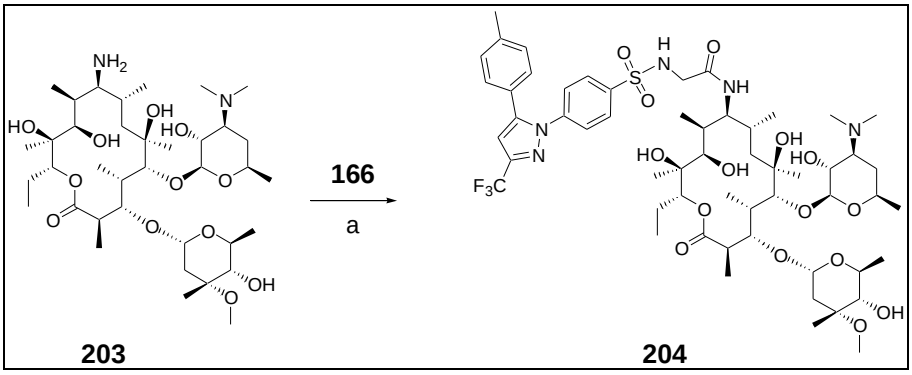
Dobivanje derivata klaritromicina sa slobodnom amino-skupinom na položaju 3'-*N* desozamina opisan je ranije na Shemi 15 (spoj **145**). Standardnim amidnim povezivanjem navedenog derivata klaritromicina **145** s derivatom celekoksiba sa slobodnom karboksilnom skupinom **166** u prisustvu EDC·HCl i HOBT dobiven je konjugat **201** (Shema 28).[253]

Derivat celekoksiba **166** je također vezan amidnom vezom i s 9(E)-*O*-(6-aminoheksil)-eritromicin A oksim-derivatom **155** u konjugat **202** (Shema 28). Sintetski put dobivanja derivata **155** opisan je ranije na Shemi 17.



Shema 28. Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 14-članih makrolida (eritromicin A oksim i klaritromicin): a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

S ciljem povezivanja derivata celekoksiba sa što više različitih makrolida povezan je i derivat celekoksiba **166** s 9(*S*)-eritromicilaminom (**203**).[182] Navedeni polazni spojevi povezani su amidnom vezom u prisustvu EDC·HCl, HOBT i TEA u konjugat **204** (Shema 29).[253] Iskorištenje reakcije je bilo nešto niže nego uobičajna iskorištenja za reakcije nastajanja amidne veze s makrolidima, a također je nastalo nekoliko nusprodukata koji se nisu mogli izolirati u zadovoljavajućoj količini i čistoći radi njihove daljnje identifikacije.



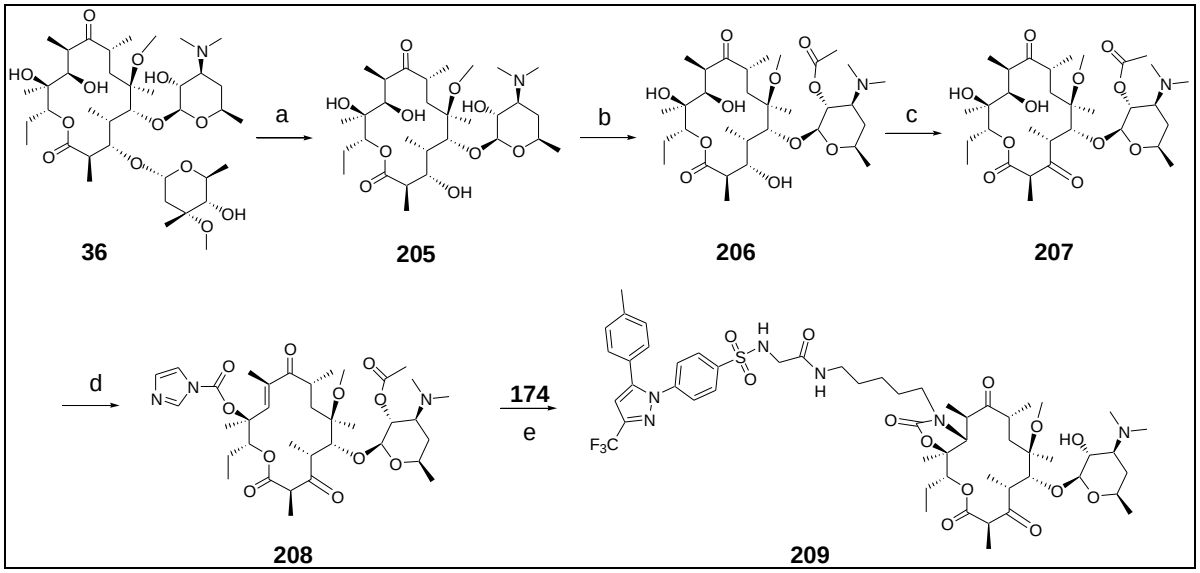
Shema 29. Priprava konjugata i derivata celekoksiba i 9(*S*)-eritromicilamina A: a) EDC·HCl, HOBT, TEA, CH_2Cl_2

3.2.4.2. Priprava konjugata derivata celekoksiba i ketolida

S obzirom da ketolidni makrolidi (telitromicin) pokazuju izrazito svojstvo nakupljanja u upalnim stanicama, bilo je potrebno usporediti aktivnost i selektivnost konjugata ketolida i NSAID-a s konjugatima azitromicina i NSAID-a. U tu je svrhu pripremljen konjugat celekoksiba i ketolida **209** (Shema 30).

Dobivanje derivata celekoksiba sa slobodnom amino-skupinom **174**, potrebnog za sintezu konačnog konjugata **209**, prikazano je ranije na Shemi 19.

Također je za sintezu konjugata između celekoksiba i ketolida, u prvom koraku na klaritromicinu (**36**) hidrolizom u razrijeđenoj kloridnoj kiselini uklonjena kladinoza pri čemu je dobiven 3-*O*-dekladinozil-klaritromicin (**205**).[254,255] Potom je na spoju **205** zaštićena najreaktivnija hidroksilna skupina na položaju 2' uz acetanhidrid te je tako dobiven 3-*O*-dekladinozil-2'-*O*-acetil-klaritromicin (**206**),[252] na kojem je hidroksilna skupina na položaju 3 oksidirana u karbonilnu skupinu uz piridintrifluoroacetat i EDC·HCl. Iz tako nastalog 3-dehidro-3-okso-2'-*O*-acetil-derivata **207** u reakciji s NaH te 1,1'-karbonilimidazolom u suhim uvjetima pripremljen je 12-acilimidazol-makrolida **208**. Zagrijavanjem reakcijske smjese spoja **208** s derivatom celekoksiba **174** u MeOH dobiven je konjugat **209** (Shema 30).



Shema 30. Priprava konjugata derivata celekoksiba i ketolida: a) HCl/H_2O, b) Ac_2O/K_2CO_3, aceton, c) EDC·HCl, DMSO, piridintrifluoroacetat, CH_2Cl_2, d) NaH, DMF, 1,1'-karbonildiimidazol, e) MeOH

3.3. EKSPERIMENTALNI DIO

Tijek kemijskih reakcija praćen je pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) – aluminijske folije Kieselgel 60 F_{254} - na kojima su mrlje detektirane pomoću UV lampe (254 nm, 365 nm) te sprejanjem pločica s 5 %-tnom otopinom H_2SO_4 u etanolu (za detekciju hidroksilnih skupina) ili otopinom ninhidrina u etanolu (za detekciju primarnih amina) uz zagrijavanje na 140 °C.

Čišćenje pojedinih spojeva vršeno je kromatografijom na stupcu silikagela uz različite sustave kao eluense, ekstrakcijom i u rijetkim slučajevima prekristalizacijom.

Identifikacija dobivenih spojeva provedena je sljedećim metodama :

- *tekućinskom kromatografijom visokog učinka* vezanom na spektrometar masa (HPLC-MS; ESI metoda). Za HPLC-MS analizu korišten je HPLC instrument Waters 2690 s UV detektorom Waters 996 Photodiode Array Detector (210-450 nm) i MS detektorom Micromass, Quattro microTM (cone voltage = 30 V) uz eksternu kalibraciju. Korištena je kolona Xterra RP18, 3,5 μm, 3,0x50 mm uz otapalo A = MeCN i otapalo B = 0.05 % mravlja kiselina/H_2O te protok 0,5 mL/min. Korišteni gradijent je od 15-98 % A. Prikazane su monoizotopne mase.

- *spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije* (NMR; jednodimenzionalni i dvodimenzionalni spektri). NMR-spektri snimljeni su na BRUKER AVANCE DPX 300 (^{1}H-NMR spektri snimljeni su pri 300 MHz, odnosno ^{13}C spektri pri 75 MHz) ili na BRUKER AVANCE DRX 500 (^{1}H-NMR spektri snimljeni su pri 500 MHz, odnosno ^{13}C spektri pri 125 MHz) u deuteriranom $CDCl_3$ ili DMSO-u pri 24 °C. Kemijski pomaci u ppm (δ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutrašnjem standardu, a konstante sprege (J) u Hz.

- *infracrvena spektroskopija* (IR). IR spektri (KBr pastila) snimljeni na MAGNA FT-IR 760, NICOLET.

Literaturno poznati intermedijeri: 81, 82, 84, 85, 87, 91, 121, 122, 130, 164 i 203. [181-183, 248, 252, 256]

Priprava 9a-(2-metilkarboksilat-etil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (81)

9-Deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) (4 g; 5,44 mmol) otopljen je u metilakrilatu (50 mL; 0,56 mol). Reakcijska je smjesa miješana na 80 °C uz refluks dva dana, nakon toga je uparena do suha, a dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 3,6 g (72 %) čistog produkta **81**.

Čistoća, HPLC/MS: 90 %

HPLC/MS: MS(ES-) *m/z*: $[M]^-$ 821,77 (teor. 821,53)

IR (KBr) cm^{-1}: 3485, 2973, 2939, 2879, 2833, 2788, 1737, 1637, 1461, 1378, 1327, 1282, 1246, 1168, 1110, 1053, 1012, 957, 900, 864, 835, 804, 774, 730, 703, 640

Priprava 9a-(3-hidroksipropil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (82)

U tikvicu propuhanu argonom dodan je $LiAlH_4$ (69,3 mg; 1,827 mmol) te je nastavljeno propuhivanje argonom. U menzuri je pod argonom odmjeren THF (20 mL). THF (10 mL) je pod argonom dodan u tikvicu s $LiAlH_4$. U drugoj je tikvici otopljen spoj **81** (500 mg; 0,609 mmol) u THF-u (5 mL) pod argonom, te je sve prebačeno u trogrlu tikvicu s $LiAlH_4$ otopljenim u THF-u pod argonom. Tikvica u kojoj je bio spoj **81** isprana je s preostalim THF-om (5 mL) te je prebačena u reakcijsku smjesu (pod argonom). Reakcijska je smjesa cijelo vrijeme miješana pri temperaturi od 0-5 ºC kroz 1 sat. Potom je u reakcijsku smjesu dodano malo vode da bi se uništio $LiAlH_4$ (dok nije pobijelio). Smjesa je profiltrirana preko Büchnerovog lijevka, te je filtrat uparen do suha (dobivena bijela pjena). Dobiveno je 421,5 mg sirovog produkta **82** koji je spojen s drugom šaržom i pročišćen.

Čistoća, HPLC/MS: 64 %

HPLC/MS: MS(ES-) *m/z*: $[M]^-$ 793,62 (teor. 793,53)

Priprava konjugata indometacina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 83a

Opći postupak A

U trogrloj tikvici od 25 mL u struji argona dodan je indometacin (**2**) (200 mg; 0,56 mmol) otopljen u suhom DMF-u (3 mL). U uređaju za hlađenje na –10 °C dodana je otopina 1,1-karbodiidazola (186,9 mg; 1,152 mmol) u suhom DMF-u (3 mL). Reakcijska je smjesa miješana na –5 °C preko noći, nakon čega je dodana otopina spoja **82** (443,82 mg; 0,56 mmol) u suhom DMF-u. Reakcijska je smjesa miješana 24 sata na sobnoj temperaturi, potom 10 sati na 100 °C i 24 sata na sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno do suha te je sirovi produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:8:1 i 15:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 15 mg čistog spoja **83a**.

Čistoća, HPLC/MS: 90 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1131,46 (teor. 1131,60)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 2972, 2936, 1731, 1686, 1622, 1564, 1546, 1512, 1478, 1460, 1374, 1323, 1263, 1225, 1168, 1089, 1057, 1013, 958, 925, 834, 804, 756, 732

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 177,43; 169,51; 167,83; 155,32; 139,41; 136,41; 134,35; 130,97; 130,54; 130,27; 128,47; 115,42; 113,17; 111,86; 103,32; 101,42; 96,37; 84,15; 78,83; 77,42; 77,15; 73,29; 72,55; 71,89; 69,05; 65,53; 64,81; 60,32; 55,32; 48,52; 45,31; 40,47; 39,36; 38,52; 35,74; 31,65; 28,64; 28,33; 26,14; 25,17; 23,83;: 21,65; 20,55; 20,12; 19,87; 17,53; 15,72; 14,32; 12,74; 10,38; 8,52; 7,48

Priprava konjugata S-(+)-ibuprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 83b

Prema općem postupku A iz S-(+)-ibuprofena (**4a**) (200 mg; 0,9703 mmol) i spoja **82** (769 mg; 0,9703 mmol) dobiveno je 277 mg čistog spoja **83b**.

Čistoća, HPLC/UV: 97,73 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 981,85 (teor. 981,65)

IR (KBr) cm^{-1}: 3483, 2971, 2937, 2873, 2787, 1733, 1655, 1638, 1561, 1511, 1459, 1421, 1379, 1332, 1248, 1167, 1109, 1055, 1013, 1000, 958, 900, 836, 803, 756, 728, 640

Priprava konjugata flurbiprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 83c

Prema općem postupku A iz flurbiprofena (**15**) (200 mg; 0,819 mmol) i spoja **82** (650 mg; 0,819 mmol) dobiveno je 234 mg čistog spoja **83b**.

Čistoća, HPLC/UV: 94,85 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1018,80 (teor. 1018,61)

IR (KBr) cm^{-1}: 3452, 2973, 2937, 2879, 2829, 2777, 1734, 1688, 1659, 1625, 1582, 1565, 1546, 1512, 1461, 1420, 1379, 1329, 1267, 1171, 1109, 1054, 1013, 999, 959, 899, 834, 801, 767, 726, 699, 640

Priprava 9a-(2-cijanoetil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (84)

Opći postupak B

9-Deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) (100 g; 136 mmol) je otopljen u akrilonitrilu (300 mL) uz zagrijavanje. Reakcijska je smjesa miješana na 80 ˚C uz refluks preko noći. Akrilonitril je uparen do suha. Dobiveno je 109 g (96 %) čistog produkta **84**.

Čistoća, HPLC/MS: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 788,52 (teor. 788,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3486, 2973, 2938, 2881, 2833, 2789, 2249, 1722, 1656, 1639, 1562, 1544, 1510, 1460, 1379, 1280, 1168, 1111, 1076, 1054, 1013, 958, 899, 861, 835, 805, 729, 639

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4,96 (1H, d); 4,67 (1H, d); 4,47 (1H, d); 4,15 (1H, q); 4,05 (1H, m); 3,93 (1H, s); 3,65 (1H, d); 3,61(1H, d); 3,54 (2H, m); 3,31 (3H, s); 3,04 (1H, t); 2,81 (5H, m); 2,65 (2H, m); 2,51 (3H, m); 2,41 (6H, s); 2,19 (2H, m); 1,92 (5H, m); 1,54 (5H, m); 1,32 (6H, d); 1,23 (10H, t); 1,13 (3H, d); 1,07 (6H, d); 0,97 (3H, d); 0,90 (3H, t)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,10; 119,10; 103,11; 96,15; 79,40; 78,18; 77,84; 74,96; 74,86; 74,51; 72,79; 70,80; 68,80; 65,96; 65,46; 49,43; 45,30; 40,74; 35,03; 28,99; 22,23; 21,55; 21,42; 21,25; 18,32; 17,35; 16,46; 15,58; 11,29; 9,74; 8,75

Priprava 9a-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (85)

Opći postupak C1

Spoj **84** (64,4 g; 81,7 mmol) je otopljen u apsolutnom EtOH (300 mL), te je dodan katalizator PtO_2 (6,5 g). Reakcijska je smjesa podvrgnuta hidrogeniranju pod tlakom od 55 bara u reaktoru kroz četiri dana. Reakcijska je smjesa profiltrirana i uparena do suha, te je sirovi produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 16,305 g čistog spoja **85** (94,29 %, čistoća) i 40,669 g spoja **85** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS: 94,29 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 792,46 (teor. 792,55)

IR (KBr) cm^{-1}: 3451, 2973, 2938, 2878, 2833, 2789, 1729, 1637, 1461, 1378, 1282, 1168, 1110, 1054, 1000, 958, 900, 865, 835, 806, 756, 727, 669, 640

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 5,07 (1H, d); 4,91 (1H, d); 4,46 (1H, d); 4,15 (1H, d); 4,09 (2H, m); 3,63 (1H, s); 3,60 (2H, d); 3,51 (2, m); 3,47 (4H, s); 3,34 (3H, s); 3,25 (3H, m); 3,03 (1H, d); 2,96 (1H, m); 2,85 (1H, t); 2,78 (2H, m); 2,67 (1H, q); 2,46 (1H, m); 2,38 (2H, d); 2,30 (6H, s); 2,02 (2H, s); 1,91 (1H, m); 1,80 (1H, m); 1,66 (2H,d); 1,59 (2H, q); 1,49 (2H, m); 1,32 (6H, d); 1,20 (10H, m); 1,09 (9H, m); 1,00 (3H, d); 0,86 (3H, t)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 177,49; 102,95; 95,67; 83,93; 79,28; 78,01; 77,79; 74,72; 74,66; 74,55; 72,84; 70,96; 68,91; 65,77; 65,53; 64,63; 50,72; 49,47; 48,43; 45,13; 40,93; 40,38; 39,78; 35,01; 29,14; 28,90; 28,68; 23,25; 21,58; 21,42; 21,15; 18,32; 16,57; 15,37; 11,00; 9,54; 7,13; 0,00

Opći postupak C2

Spoj **84** (5 g; 6,3 mmol) je otopljen u ledenoj octenoj kiselini (80 mL), te je dodan katalizator PtO_2 (1 g). Reakcijska je smjesa mučkana na Paarovom aparatu pod tlakom H_2 od 5,5 bara preko noći. Smjesa je profiltrirana, uparena do suha te je dodana voda (pH 4,5) i ekstrahirana je s CH_2Cl_2 (3x30 mL). Nakon odjeljivanja slojeva, vodeni je sloj postupno zaluživan do pH 6, 8, 10, 12 i 14, te je svaki put ekstrahiran s CH_2Cl_2 (3x30 mL). Ekstrakti pri zadnje dvije pH jedinice su spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4, profiltrirani i upareni do suha. Dobiveno je 2,9 g (58 %) spoja **85**.

Čistoća, HPLC/MS: 89 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 792,3 (teor. 792,55)

Priprava konjugata indometacina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86a

Opći postupak D

U suspenziju indometacina (**2**) (208 mg; 0,58 mmol) i diklormetana (10 mL), uz propuhivanje argonom, dodan je trietilamin (0,76 mL; 5,4528 mmol) pri čemu se suspenzija razbistri. Zatim su dodani redom: 1-hidroksibenzotriazol (160 mg; 1,18 mmol), spoj **85** (460 mg; 0,58 mmol) i EDC · HCl (470 mg; 2,4 mmol). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Otapalo je upareno na rotavaporu, te je sirovi produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 423 mg (64,4 %) čistog produkta **86a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98,54 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1131,6 (teor. 1131,62)

IR (KBr) cm^{-1} : 3424, 3087, 2972, 2937, 2878, 2832, 2787, 1720, 1681, 1569, 1535, 1478, 1459, 1400, 1373, 1324, 1289, 1260, 1226, 1178, 1167, 1109, 1090, 1053, 1013, 957, 926, 902, 834, 804, 755, 734, 690, 639

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,69 (1H, d); 7,47 (1H, d); 6,97 (1H, s); 6,92 (1H, d); 6,66 (1H,q); 4,96 (1H, d); 4,60 (1H, s); 4,44 (1H,d); 4,05 (2H, m); 3,82 (3H, s); 3,61 (4H, m); 3,52 (1H, m); 3,31 (3H, s); 3,26 (2H, m); 3,19 (2H, m); 3,03 (2H,t); 2,82 (2H, t); 2,54 (1H, s); 2,37 (6H, s); 2,36 (1H, s); 2,33

(1H, s); 2,20 (1H, d); 1,98 (2H, m); 1,88 (1H, m); 1,74 (2H, s); 1,59 (1H, q); 1,48 (1H, m); 1,30 (6H,d); 1,25 (3H,s); 1,21 (7H, m); 1,06 (6H,d); 1,03 (3H, s); 0,94 (3H, d); 0,89 (3H, t)
^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 177,13; 169,71; 167,84; 155,64; 138,65; 135,67; 133,32; 130,65; 130,41; 130,14; 128,55; 114,39; 112,69; 111,42; 102,34; 100,66; 95,21; 83,07; 78,87; 77,30; 77,14; 73,98; 72,23; 70,25; 68,15; 65,33; 65,10; 64,40;55,21; 48,84; 44,25; 39,82; 39,69; 37,12; 34,39; 31, 62; 28,64; 28,32; 26,13; 22,21; 20,94; 20,73; 20,60; 17,76; 15,78; 14,77; 12,86; 10,49; 8,88; 7,26

Priprava konjugata flufenamske kiseline i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86b
Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (2 g; 7,112 mmol) i spoja **85** (5,633 g; 7,112 mmol) dobiveno je 5,542 g (74 %) spoja **86b**.
R_f(CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,29
Čistoća HPLC/MS-UV: 96,51% (UV), 78,43 % (MS)
HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1055,57 (teor. 1055,61)

Priprava konjugata *S*-(+)-ibuprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86c
Prema općem postupku D iz *S*-(+)-ibuprofena (**4a**) (60 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 239 mg (84 %) spoja **86c**.
Čistoća HPLC/MS-UV: 94,2 %
HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 981,0 (teor. 980,67)
IR (KBr) cm^{-1}: 3433, 2971, 2936, 2872, 1720, 1686, 1655, 1561, 1545, 1511, 1460, 1378, 1264, 1167, 1109, 1054, 1013, 1000, 958, 902, 835, 642

Priprava konjugata flurbiprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86d
Prema općem postupku D iz flurbiprofena (**15**) (141 mg; 0,58 mmol) i spoja **85** (460 mg; 0,58 mmol) dobiveno je 483,1 mg (82 %) spoja **86d**.
Čistoća HPLC/MS-UV: 94 %
HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1018,61 (teor. 1018,63)

Priprava konjugata ketoprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86e
Prema općem postupku D iz ketoprofena (**11**) (74 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 114 mg (37 %) spoja **86e**.
Čistoća HPLC/MS-UV: 95,8 %
HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1065,9 (teor. 1065,61)
IR (KBr) cm^{-1}: 3450, 3062, 2972, 2937, 2876, 2834, 2788, 1722, 1658, 1598, 1580, 1544, 1458, 1378, 1319, 1284, 1168, 1109, 1081, 1053, 1013, 1000, 957, 902, 834, 755, 723, 705, 643

Priprava konjugata acetilsalicilne kiseline i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86f

Prema općem postupku D iz acetilsalicilne kiseline (**1**) (52 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 127 mg (46 %) spoja **86f**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 92,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 955,0 (teor. 954,58)

Priprava konjugata fenbufena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86g

Prema općem postupku D iz fenbufena (**13**) (74 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 215,3 mg (72 %) spoja **86g**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 95,5 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1028,5 (teor. 1028,63)

Priprava konjugata indoprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86h

Prema općem postupku D iz indoprofena (**16)** (81,5 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 93,7 mg čistog spoja **86h** i 84 mg spoja **86h** u smjesi.

Čistoća HPLC/MS-UV: 92,3 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1055,6 (teor. 1055,65)

Priprava konjugata fenoprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86i

Prema općem postupku D iz fenoprofena (**14)** (151,6 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 148,2 mg čistog spoja **86i** i 51 mg spoja **86i** u smjesi.

Čistoća HPLC/MS-UV: 97 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1016,8 (teor. 1016,63)

Priprava konjugata *S*-(+)-ketoprofena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86j

Prema općem postupku D iz S(+)-ketoprofena (**11a**) (73 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 243 mg (81,5 %) spoja **86j**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 93,5 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1028,29 (teor. 1028,63)

Priprava konjugata diflunisala i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86k

Prema općem postupku D iz diflunisala (**5**) (72,5 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 121 mg čistog spoja **86k** i 41 mg spoja **86k** u smjesi.

Čistoća HPLC/MS-UV: 90,6 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1024,37 (teor. 1024,58)

Priprava konjugata tolfenamske kiseline i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86l

Prema općem postupku D iz tolfenamske kiseline (**21)** (75,9 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 246 mg (82 %) spoja **86l**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 97 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1035,30 (teor. 1035,60)

Priprava konjugata zomepiraka i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86m

Prema općem postupku D iz zomepiraka (**80)** (90,1 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 240 mg (78 %) spoja **86m**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 92,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1065,9 (teor. 1065,61)

Priprava konjugata diklofenak natrija i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86n

Prema općem postupku D iz diklofenak natrija (**7**) (92 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 140 mg (45 %) spoja **86n**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 92,9 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1069,1 (teor. 1069,56)

IR (KBr) cm^{-1}: 3426, 3073, 2972, 2937, 2876, 2829, 2788, 1722, 1658, 1578, 1562, 1546, 1511, 1454, 1378, 1301, 1281, 1167, 1110, 1053, 1013, 999, 958, 898, 836, 750, 668

Priprava konjugata naproksena i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 86o

Prema općem postupku D iz naproksena (**12)** (67 mg; 0,29 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 162 mg (56 %) spoja **86o**.

Čistoća HPLC/MS-UV: 91,2 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1004,9 (teor. 1004,63)

IR (KBr) cm^{-1}: 3433, 2972, 2937, 2876, 2829, 2788, 1719, 1655, 1607, 1560, 1542, 1508, 1459, 1377, 1265, 1230, 1167, 1109, 1053, 1013, 1000, 958, 928, 895, 853, 809, 755, 640

Priprava 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (89)

Opći postupak E

Spoj **85** (3,166 g; 4,4 mmol) je otopljen u razrijeđenoj HCl (22,5 mL vode + 2,25 mL konc. HCl). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi, te je ekstrahirana s CH_2Cl_2. Vodeni je sloj zalužen s 20 %-tnom NaOH do pH 9,5 te je ekstrahiran 3 puta s CH_2Cl_2. Organski slojevi su spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4 te upareni. Sirovi je produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 1,838 g (59 %) čistog spoja **89**.

Čistoća, HPLC/MS: 89 %.

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 634,38 (teor. 634, 46)

IR (KBr) cm^{-1}: 3478, 3445, 3358, 3294, 2985, 2941, 2870, 2803, 2722, 1722, 1655, 1608, 1463, 1381, 1348, 1307, 1262, 1175, 1112, 1078, 1049, 1036, 1021, 1003, 976, 933, 896, 870, 831, 798, 758, 670, 633

Priprava konjugata indometacina i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (71,42 mg; 0,2 mmol) i spoja **89** (126,7 mg; 0,2 mmol) dobiveno je 138 mg (96 %) spoja **90a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 90 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 973,5 (teor. 973,52)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,10; 170,12; 169,31; 155,39; 138,56; 135,27; 134,09; 130,71; 130,42; 130,17; 129,14; 113,78; 112,57; 111,42; 103,34; 100,48; 92,14; 83,06; 78,23; 77,31; 73,98; 72,17; 70,08; 64,19; 60,32; 58,22; 55,36; 52,17; 48,84; 44,82; 43,42; 39,91; 38,14; 33,72; 32,55; 28,34; 26,14; 22,96; 22,63; 21,43; 18,39; 16,48; 16,09; 14,23; 10,42; 8,84; 7,63

Priprava konjugata fluniksina i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (142 mg; 0,29 mmol) i spoja **89** (184 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 168 mg (94 %) spoja **90b**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 912,43 (teor. 912,52)

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90c

Prema općem postupku E iz spoja **86b** (211 mg; 0,2 mmol) dobiveno je 128 mg (71 %) spoja **90c**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96,3 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 897,69 (teor. 897,51)

Priprava konjugata ibuprofena i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90d

Prema općem postupku D iz ibuprofena (**4**) (59,82 mg; 0,29 mmol) i spoja **89** (184 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 230 mg (96 %) spoja **90b**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 822,53 (teor. 822,58)

IR (KBr) cm^{-1}: 3450, 2971, 2873, 1710, 1656, 1544, 1511, 1459, 1380, 1350, 1262, 1173, 1111, 1073, 1050, 978, 957, 934, 898, 803, 755, 634

Priprava konjugata flurbiprofena i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90e

Prema općem postupku E iz spoja **86e** (254 mg; 0,25 mmol) dobiveno je 100 mg (46,5 %) spoja **90e**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 94 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 860,69 (teor. 860,10)

Priprava konjugata ketoprofena i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90f

Prema općem postupku E iz spoja **86e** (150 mg; 0,15 mmol) dobiveno je 42 mg (32 %) spoja **90f**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96,3 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 870,1 (teor. 870,54)

IR (KBr) cm^{-1}: 3439, 3067, 2972, 2936, 2876, 1721, 1657, 1598, 1580, 1544, 1458, 1378, 1349, 1319, 1283, 1173, 1136, 1111, 1074, 1050, 1000, 956, 904, 863, 723, 705, 643

Priprava konjugata diflunisala i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90g

Prema općem postupku E iz spoja **86k** (256 mg; 0,25 mmol) dobiveno je 112 mg (52 %) spoja **90g**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93,4 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 866,61 (teor. 866,49)

Priprava konjugata tolfenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 90h

Prema općem postupku D iz tolfenamske kiseline (**21**) (75,89 mg; 0,29 mmol) i spoja **89** (184 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 194 mg (76 %) spoja **90h**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95,5 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 877,53 (teor. 877,50)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (91)

Opći postupak F

9-Deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) (4,7 g; 6,4 mmol) je otopljen u 6 M HCl (40 mL) i u $CHCl_3$ (20 mL). Reakcijska je smjesa miješana na 80 °C uz refluks preko noći. Sloj $CHCl_3$ je odijeljen, a vodeni je sloj još ispran s $CHCl_3$ (30 mL). Vodeni je sloj zatim zalužen na pH 10 i ekstrahiran s CH_2Cl_2 (2x30 mL). Organski su slojevi spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4, profiltrirani i upareni do suha. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 1,23 g (43 %) čistog produkta **91**.

Čistoća, HPLC/MS: 89 %.

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 420,09 (teor. 420,29)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (93)

Prema općem postupku F iz spoja **85** (3,16 g; 4 mmol), uz čišćenje kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens, dobiveno je 667 mg čistog spoja **93** i 87 mg spoja **93** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS: 92 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 477,38 (teor. 477,35)

IR (KBr) cm^{-1}: 3429, 3389, 3311, 2976, 2938, 2876, 2830, 2725, 1720, 1637, 1608, 1560, 1459, 1402, 1378, 1356, 1310, 1263, 1174, 1086, 1054, 1038, 1010, 972, 956, 914, 848, 806, 775, 749, 707, 675

Priprava konjugata indometacina i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (1,96 g; 5,5 mmol) i spoja **93** (2,62 g; 5,5 mmol), uz dvostruko čišćenje kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens, dobiveno je 2,6 g (58 %) čistog produkta **94a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 91 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 816,52 (teor. 816,41)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 177,92; 170,62; 168,95; 156,17; 137,56; 135,42; 133,88; 130,58; 130,17; 129,44; 128,11; 112,74; 112,43; 110,43; 110,93; 105,39; 90,47; 84,23; 82,15; 76,14; 75,83; 70,42; 58,22; 55,39; 51,39; 50,19; 45,17; 44,18; 39,73; 35,21; 30,29; 28,47; 24,63; 23,22; 21,55; 20,60; 15,78; 14,18; 10,32; 8,64; 7,42

Priprava konjugata fluniksina i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (368 mg; 0,75 mmol) i spoja **93** (357 mg; 0,75 mmol) dobiveno je 247 mg (44 %) čistog produkta **94b**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98,93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 755,3 (teor. 755,41)

IR (KBr) cm^{-1}: 3418, 2973, 2931, 2878, 1712, 1634, 1610, 1593, 1520, 1483, 1463, 1377, 1320, 1278, 1256, 1169, 1123, 1088, 1053, 1024, 958, 928, 899, 849, 795, 772, 720

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94c

Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (410 mg; 1,46 mmol) i spoja **93** (690 mg; 1,45 mmol) dobiveno je 613 mg (53 %) čistog produkta **94c**.

Čistoća, HPLC/UV-MS: 94 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 740,93 (teor. 740,40)

Priprava konjugata diflunisala i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94d

Prema općem postupku D iz diflunisala (**5**) (72,6 mg; 0,29 mmol)) i spoja **93** (138 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 93,2 mg (45 %) spoja **94d**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 91,6 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 709,23 (teor. 709,38)

Priprava konjugata tolfenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94e

Prema općem postupku D iz tolfenamske kiseline (**21)** (76 mg; 0,29 mmol) i spoja **93** (138 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 84,5 mg (40,5 %) spoja **94e**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93,4 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 720,31 (teor. 720,39)

Priprava konjugata mefenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94f

Prema općem postupku D iz mefenamske kiseline (**18**) (70 mg; 0,29 mmol)) i spoja **93** (138 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 94,6 mg (46,6 %) spoja **94f**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 700,69 (teor. 700,45)

Priprava konjugata meklofenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94g

Prema općem postupku D iz meklofenamske kiseline (**20**) (86 mg; 0,29 mmol) i spoja **93** (138 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 65,8 mg (30 %) spoja **94g**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 92,8 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 754,33 (teor. 754,35)

Priprava konjugata etodolaka i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 94h

Prema općem postupku D iz etodolaka (**8**) (84 mg; 0,29 mmol) i spoja **93** (138 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 72,4 mg (33 %) spoja **94h**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 748,40 (teor. 748,50)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9a-(butilftalimid)-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (96)

Spoj **91** (2 g; 4,767 mmol) otopljen je u acetonitrilu (120 mL) i *N*,*N*-diizopropiletilaminu (8,11 mL; 47,67 mmol). Otopini je dodan *N*-(4-brombutil)-ftalimid (13,45 g; 47,67 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 38 h na 80 °C. Otapalo je pod sniženim tlakom upareno do rijetkog crvenosmeđeg ulja koje je potom otopljeno u EtOAc (100 mL) te isprano sa zasićenom otopinom $NaHCO_3$ (100 mL) i s vodom (100 mL). Organski sloj sušen je na bezvodnom Na_2SO_4 te uparen pod sniženim pritiskom. Dobiveni sirovi produkt (13,27 g) čišćen je kromatografijom na stupcu uz eluens CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:8:1. Dobiveno je 625 mg spoja **96**.

Čistoća, HPLC/UV-MS: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 621,66 (teor. 621,77)

IR(KBr) cm^{-1}: 3483, 3061, 2973, 2937, 2876, 1773, 1713, 1612, 1467, 1439, 1398, 1372, 1356, 1267, 1174, 1137, 1089, 1053, 999, 958, 933, 902, 863, 809, 721, 623

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9a-(4-aminobutil)- 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (97)

U otopinu spoja **96** (625 mg; 1,007 mmol) u MeOH (50 mL) dodan je hidrazin hidrat (107,65 µL; 2,215 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na temperaturi od 65 ^oC 3 sata. MeOH je uparen pod sniženim tlakom do bijelih kristala koji su potom otopljeni u vodi (70 mL) i ekstrahirani s EtOAc (2x70 mL). TLC (eluens CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1) je pokazao da je dio produkta prešao u vodeni sloj koji je potom zalužen dodatkom 1 M NaOH na pH 13 i ispran s EtOAc(70 mL). Pri tome je sav produkt prešao u organski sloj. Spojeni organski slojevi osušeni su nad bezvodnim Na_2SO_4 i upareni pod sniženim tlakom do bijelih kristala. Dobiveni sirovi produkt (422 mg) spojen je sa šaržom od 121 mg i čišćen kromatografijom na stupcu uz eluens CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1. Dobiveno je 313 mg spoja **97**.

Čistoća, HPLC/UV-MS: 91,6 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 491,52 (teor. 491,67)

IR(KBr) cm^{-1}: 3415, 2974, 2937, 2876, 1720, 1599, 1459, 1376, 1352, 1308, 1268, 1176, 1139, 1090, 1055, 1038, 958, 900, 850, 810, 737, 705, 671

Priprava konjugata indometacina i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 98a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (72,9 mg; 0,204 mmol) i spoja **97** (100 mg; 0,204 mmol) dobiveno je 141 mg čistog produkta **98a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 830,7 (teor. 831,45)

IR(KBr) cm^{-1}: 3417, 3087, 2972, 2935, 2876, 1709, 1681, 1658, 1596, 1529, 1478, 1457, 1400, 1372, 1357, 1322, 1289, 1261, 1226, 1179, 1150, 1090, 1054, 1037, 1015, 958, 926, 912, 833, 805, 755, 736, 702,664

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO) δ: 178,07; 170,56; 169,18; 156,26; 136,43; 135,06; 133,62; 130,42; 130,01; 129,42; 128,32; 111,84; 111,23; 110,21; 105,43; 90,37; 83,16; 82,31; 75,82; 75,31; 69,41; 58,63; 55,41; 51,39; 50,38; 50,03; 45,23; 44,72; 40,12; 36,25; 30,42; 29,17; 28,52; 23,62; 22,14; 21,93; 20,32; 15,53; 14,07; 11,42; 9,31; 8,43

Priprava konjugata fluniksina i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 98b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (90,2 mg; 0,183 mmol) i spoja **97** (51,6 mg; 0,183 mmol) dobiveno je 110 mg čistog produkta **98b**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 769,6 (teor. 769,43)

IR(KBr) cm^{-1}: 3424, 3082, 2974, 2938, 2876, 1711, 1640, 1593, 1523, 1483, 1462, 1376, 1320, 1280, 1256, 1169, 1123, 1088, 1053, 1024, 957, 927, 901, 848, 795, 757, 720, 666, 614

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A 98c

Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (90 mg; 0,183 mmol) i spoja **97** (51,6 mg; 0,183 mmol) dobiveno je 81 mg čistog produkta **98c**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 754,5 (teor. 754,42)

IR(KBr) cm^{-1}: 3398, 3081, 2973, 2937, 2876, 1719, 1638, 1596, 1523, 1459, 1376, 1336, 1282, 1236, 1165, 1126, 1094, 1070, 1053, 997, 957, 928, 895, 857, 794, 748, 699, 663

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(5-cijanopentil)-9a-homoeritromicin A (100)

Spoj **91** (500 mg; 1,1918 mmol) otopljen je u acetonitrilu (25 mL) i *N*,*N*-diizopropiletilaminu (2,026 mL; 11,918 mmol). Dodan je 6-bromheksanonitril **99** (1,58003 mL; 11,918 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na 80 ºC tijekom noći (21 sat). Reakcijska je smjesa uparena do suha, otopljena u CH_2Cl_2 te je isprana zasićenom otopinom $NaHCO_3$ i vodom. Organski je sloj posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen do suha. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 133 mg čistog produkta **100**.

Čistoća, HPLC/MS: 89,6 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 515,53 (teor. 515,36)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 2973, 2937, 2875, 2247 (C ≡ N), 1712, 1637, 1459, 1375, 1352, 1307, 1265, 1179, 1139, 1090, 1052, 1004, 958, 901, 860, 810, 773, 750, 705, 670

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(6-aminoheksil)-9a-homoeritromicin A (101)

Spoj **100** (721 mg; 1,401 mmol) otopljen je u 40 mL apsolutnom EtOH i hidrogeniran u reaktoru 3 dana uz PtO_2 (80 mg) kao katalizator pri tlaku od 50 atmosfera. Reakcijska smjesa je profiltrirana preko naboranog filter papira, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Ostatak je čišćen kromatografijom na stupcu uz eluens CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1. Dobiveno je 162 mg spoja **101**.

Čistoća, HPLC/MS: 94 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 519,57 (teor. 519,73)

IR(KBr) cm^{-1}: 3367, 3301, 2975, 2935, 2868, 2714, 1724, 1597, 1459, 1400, 1375, 1352, 1306, 1270, 1178, 1140, 1089, 1055, 1037, 999, 974, 958, 893, 850, 812, 755, 706, 667

Priprava konjugata indometacina i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 102a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (48,3 mg; 0,135 mmol) i spoja **101** (70 mg; 0,135 mmol) dobiveno je 98 mg čistog produkta **102a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 858,7 (teor. 858,46)

IR(KBr) cm^{-1}: 3422, 3087, 2935, 2875, 1681, 1655, 1595, 1535, 1478, 1458, 1400, 1371, 1357, 1322, 1261, 1225, 1179, 1150, 1090, 1055, 1036, 1014, 957, 926, 833, 806, 755, 736, 692, 669

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO) δ: 177,84; 171,55; 168,42; 155,62; 137,39; 136,42; 133,54; 130,18; 129,93; 129,07; 128,42; 111,55; 111,01; 110,32; 105,48; 92,33; 84,61; 81,48; 76,69; 75,84; 70,71; 59,33; 55,29; 52,17; 50,94; 50,38; 46,33; 45,18; 41,72; 37,52; 32,14; 30,17; 29,83; 29,15; 27,37; 24,33; 22,17; 20,89; 20,04; 16,47; 14,32; 10,33; 8,51; 7,98

Priprava konjugata fluniksina i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 102b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (71,1 mg; 0,145 mmol) i spoja **101** (75 mg; 0,145 mmol) dobiveno je 86 mg čistog produkta **102b**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 797,6 (teor. 797,46)

IR(KBr) cm^{-1}: 3433, 2973, 2936, 2875, 1710, 1638, 1593, 1518, 1483, 1460, 1376, 1320, 1280, 1256, 1168, 1124, 1088, 1054, 1024, 974, 957, 928, 795, 771, 721, 669, 615

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 102c

Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (48,8 mg; 0,145 mmol) i spoja **101** (75 mg; 0,145 mmol) dobiveno je 93 mg čistog produkta **102c**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 782,8 (teor. 782,45)

IR(KBr) cm^{-1}: 3376, 3076, 2973, 2936, 2870, 1712, 1638, 1596, 1523, 1455, 1426, 1375, 1336, 1282, 1235, 1166, 1127, 1094, 1070, 1054, 997, 973, 957, 929, 895, 853, 793, 748, 699, 663

Priprava konjugata *N*-Fmoc-glicina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 104

Prema općem postupku D iz *N*-Fmoc-glicina (**103**) i spoja **85** dobiveno je 1,474 g spoja **104** (korišten za pripravu spoja **105**, postupak I).

Ćistoća, HPC-MS: 63 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1071,49 (teor. 1071,64)

Prema općem postupku D iz Fmoc-glicina (**103**) (624,3 mg; 2,1 mol) i spoja **85** (742,4 mg; 2,1 mmol), te nakon ekstrakcije vodom (vodeni sloj sadrži konačni spoj), zaluživanja vodenog sloja do pH 12 s 1 N NaOH i ekstrakcije s CH_2Cl_2, dobiveno je 729 mg sirovog produkta **104** (korišten za pripravu spoja **105**, postupak II).

Priprava spoja **104** je ponovljena s istim količinama polaznih spojeva, te je nakon ekstrakcije s vodom pri pH 5 dobiveno 422 mg (75%) spoja **104** (korišten za pripravu spoja **105**, postupak III).

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98,9 %

Priprava konjugata glicina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 105

Postupak I

U otopini smjese spoja **104** (1,474 g, 1,378 mmol) u suhom THF-u (10 mL) dodani su oktantiol (2,39 mL; 1,378 mmol) i DBU (6,2 μL; 0,03 eq). Nakon miješanja reakcijske smjese od 24 sata dodana je dodatna količina DBU (6,2 μL) te je nastavljeno miješanje reakcijske smjese sljedeća 3 sata. Reakcijom su nastali nepoželjni produkti (došlo je hidrolize kladinoze na makrolidu).

Postupak II

Spoj **104** je otopljen u 50% piperidina u CH_2Cl_2 (20 mL) te je reakcijska smjesa miješana 4 sata. Nakon uparavanja otapala dobivene su velike količine piperidin-klorida u obliku bijelih kristala koji se nisu mogli ukloniti niti filtracijom niti ekstrakcijom.

Postupak III

Spoj **104** (422 mg; 0,394 mmol) je otopljen u 20 % piperidinu u EtOAc (10 mL) i reakcijska je smjesa miješana 5 minuta. Nakon uparavanja dobiveno je 300 mg (72 %) spoja **105**.

Čistoća, HPLC/MS: 80 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 849,58 (teor. 849,57)

Priprava konjugata indometacina, glicina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 106a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (80 mg; 0,226 mmol) i spoja **105** (192 mg; 0,226 mmol) dobiveno je 150 mg (53 %) čistog spoja **106a**.

Čistoća, HPLC/MS: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1188,55 (teor. 1188,64)

IR (KBr) cm^{-1}: 3424, 3087, 2972, 2936,2877, 2833, 2787, 1724, 1682, 1594, 1545, 1529, 1478, 1458, 1374, 1324, 1286, 1261, 1228, 1168, 1110, 1089, 1053, 1013, 958, 827, 899, 834, 804, 755, 735, 691, 640

Priprava konjugata flufenamske kiseline, glicina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 106b

Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) i spoja **105** dobiveno je 55 mg čistog spoja **106b**.

Čistoća, HPLC/MS: 94,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1112,57 (teor.1112,63)

IR (KBr) cm^{-1}: 3367, 3082, 2973, 2938, 2877, 2833, 2789, 1719, 1648, 1638, 1596, 1583, 1523, 1459, 1426, 1378, 1335, 1282, 1166, 1124, 1053, 998, 958, 929, 896, 864, 835, 974, 749, 699, 663, 640

Priprava 3'-*N*-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicina A (107)

Opći postupak G

Spoj **84** (4 g; 5 mmol) je otopljen u MeOH (30 mL), te su dodani $NaOAc \cdot 3H_2O$ (3,4 g; 25 mmol) i I_2 (1,58 g; 6,25 mmol). Reakcijska je smjesa miješana uz osvjetljavanje halogenom lampom od 500 W uz refluks kroz 3 sata. Nakon jednog sata prema TLC-u uočeno je da je polazni spoj potpuno prešao u novi polarniji spoj. Suvišak I_2 je uništen s 1 M $Na_2S_2O_3$, a MeOH je uparen. Sirovom produktu je dodana H_2O (30 mL), te je izvršena ekstrakcija s CH_2Cl_2 (2x30 mL). CH_2Cl_2 slojevi su spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4 i upareni do suha. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens. Dobiveno je 2 g (54 %) čistog produkta **107**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 83 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 774,4 (teor. 774,50)

IR (KBr) cm^{-1}: 3483, 3973, 2937, 2248, 1728, 1655, 1638, 1618, 1561, 1542, 1508, 1459, 1379, 1284, 1247, 1169, 1126, 1074, 1054, 1000, 958, 901, 862, 805, 729

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 4,90 (d,1H); 4,78 (d,1H); 4,43 (d,1H); 4,11 (m,3H); 3,67 (s,1H); 3,63 (m,2H); 3,53 (d,H); 3,29 (s,3H); 3,03 (d,1H); 2,85 (m,2H); 2,76 (t,2H); 2,58 (m,2H); 2,48 (m,2H); 2,44 (s,3H); 2,34 (d,1H); 2,15 (m,1H); 1,92 (m,4H); 1,52 (m,4H); 1,31 (s,3H); 1,30 (s,1H); 1,24 (m,9H); 1,11 (t,6H); 1,03 (d,3H); 0,99 (d,3H); 0,92 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 177,67; 119,06; 103,63; 97,01; 79,41; 77,97; 77,75; 75,28; 75,22; 74,80; 74,07; 72,74; 68,93; 66,05; 60,23; 49,42; 36,84; 34,98; 33,07; 29,02; 22,25; 21,74; 21,52; 21,09; 18,14; 17,58; 16,69; 15,97; 11,37; 10,15; 8,64

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-etil-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (108)

Opći postupak H

Spoj **107** (400 mg; 0,52 mmol) je otopljen u MeOH (10 mL). Zatim su dodani (i-*Pr*)$_2$NEt (884 µL; 5,2 mmol) i EtI (261 µL; 3,26 mmol). Reakcijska je smjesa miješana na 50 ºC tijekom 25 sati. MeOH je uparen, a dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 236 mg (57%) čistog produkta **108.**

Čistoća, HPLC/MS: 92 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 802,29 (teor. 802,54)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 2973, 1937, 2879, 2248, 1735, 1655, 1638, 1561, 1542, 1509, 1459, 1421, 1378, 1247, 1168, 1111, 1054, 1013, 957, 902, 805, 729

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 4,98 (s,1H); 4,65 (d,1H); 4,48 (s,1H); 4,15 (d,1H); 4,06 (m,1H); 3,96 (d,1H); 3,63 (q,2H); 3,55 (s,1H); 3,32 (s,3H); 3,05 (t,1H); 2,82 (m,3H); 2,65 (m,2H); 2,53 (m,3H); 2,35 (d,3H); 2,19 (d,2H); 1,90 (m,4H); 1,54 (m,3H); 1,31 (s,6H); 1,24 (s,9H); 1,13 (d,3H); 1,08 (s,6H); 0,98 (d,3H); 0,90 (t,3H)

^{13}C NMR(DMSO, 125 MHz) δ: 178,13; 119,09; 103,00; 96,03; 79,42; 78,25; 77,89; 75,04; 74,87; 74,50; 72,82; 70,49; 68,88; 65,95; 49,43; 40,70; 35,07; 29,03; 22,21; 21,56; 21,40; 21,24; 18,35; 17,36; 16,45; 15,50; 11,27; 9,71; 8,75

Spoj **107** (621 mg; 0,803 mmol) je otopljen u MeOH (25 mL). Zatim su dodani (i-*Pr*)$_2$NEt (1,22 mL; 7,18 mmol) i EtI (1,53 mL; 19,11 mmol). Reakcijska je smjesa miješana na 50 ºC 20 sati, te je potom dodan EtOAc (100 mL) i ispran je zasićenom otopinom $NaHCO_3$ (3x50 mL) i s vodom (3x50 mL). Spojeni organski ekstrakti posušeni su iznad Na_2SO_4 te je otapalo upareno do suha. Dobiveno je 421 mg (61 %) čistog produkta **108.**

Čistoća, HPLC/MS: 93,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 802,4 (teor. 802,54)

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (109)

Opći postupak I

Spoj **107** (300 mg; 0,39 mmol) je otopljen u MeOH (10 mL) i reakcijska je smjesa ohlađena na 2 ºC. Nakon toga je dodan acetanhidrid (74 µL; 0,78 mmol), te je reakcijska smjesa miješana 3 sata na istoj temperaturi. MeOH je uparen, a sirovi je produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 285 mg (90 %) čistog produkta **109.**

Čistoća, HPLC/MS: 87 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 816,25 (teor. 816,51)

IR (KBr) cm^{-1}: 3464, 2974, 2937, 2248, 1730, 1630, 1561, 1542, 1459, 1379, 1250, 1168, 1124, 1059, 1013, 996, 958, 901, 801, 734, 647

^{13}C NMR($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 177,87; 171,80; 119,06; 104,26; 96,64; 79,82; 78,14; 77,74; 75,24; 74,94; 74,60; 72,84; 71,38; 69,96; 68,73; 66,11; 60,73; 58,50; 53,66; 51,57; 49,58; 49,37; 45,70; 42,12; 41,74; 40,74; 36,40; 35,63; 35,11; 34,91; 30,30; 29,08; 27,05; 26,66; 22,46; 22,43; 22,21; 21,56; 20,95; 18,14; 16,48; 14,24; 11,27; 9,94;8,61; 6,82

Spoj **107** (500 mg; 0,6464 mmol) je otopljen u MeOH (25 mL) i reakcijska je smjesa ohlađena na 2 ºC. Nakon toga je dodan acetanhidrid (169 µL; 1,78 mmol), te je reakcijska smjesa miješana 3 sata na istoj temperaturi, nakon čega je MeOH uparen. Dobiveno je 618 (87 %) mg spoja **109.**

Čistoća, HPLC/MS: 74,6 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 816,5 (teor. 816,51)

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-etil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (110)

Prema općem postupku C1 iz spoja **108** (420 mg; 0,525 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens, dobiveno je 60 mg (7 %) spoja **110**.

Čistoća, HPLC/UV-MS: 50 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 806,5 (teor. 806,57)

Prema općem postupku C2 iz spoja **108** (376 mg; 0,47 mmol) dobiveno je 210 mg čistog spoja **110** i 75 mg spoja **110** u smjesi.

Čistoća, HPLC/UV-MS: 95,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 806,54 (teor. 806,57)

IR (KBr) cm^{-1} : 3450, 2972, 2936, 2876, 1727, 1639, 1562, 1544, 1510, 1461, 1378, 1169, 1110, 1054, 1013, 957, 901, 807, 729

^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 5,08 (d,1H); 4,93 (q,1H); 4,48 (d,1H); 4,15 (d,1H); 4,10 (m,2H); 3,62 (s,1H); 3,59 (d,2H); 3,51 (m,2H); 3,33 (s,3H); 2,99 (m,2H); 2,82 (m,3H); 2,63(m,2H); 2,52 (m,1H);

2,39 (m,2H); 2,28 (m,2H); 2,24 (s,3H); 2,02 (m,2H); 1,92 (m,1H); 1,61 (m,3H); 1,47 (m, 2H);1,32 (m,6H); 1,25 (s,3H); 1,21 (t,6H); 1,08 (m,9H); 1,00 (d,3H); 0,86 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 177,61; 102,90; 95,55; 83,73; 79,21; 78,02; 77,75; 74,75; 74,55; 72,84; 70,54; 69,04; 65,79; 64,83; 49,47; 48,37; 47,55; 45,09; 41,06; 39,73; 36,34; 34,99; 29,67; 29,10; 28,44; 23,30; 21,59; 21,43; 21,14; 18,34; 16,63; 15,31; 13,89; 11,00; 9,41; 7,15

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (111)

Prema općem postupku C1 iz spoja **109** (618 mg; 0,927 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens, dobiveno je 138 mg (17 %) spoja **111**.

Čistoća, HPLC/UV-MS: 94 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 821 (teor. 820,55)

IR (NaCl) cm^{-1}: 3417, 2971, 2934, 1727, 1615, 1455, 1379, 1268, 1168, 1122, 1060, 1012, 1000, 958, 901, 874, 735

Prema općem postupku C2 iz spoja **109** (200 mg; 0,3 mmol) dobiveno je 200 mg (81 %) spoja **111**.

Čistoća po LC/UV-MS: 90 %

HPLC-MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 820,30 (teor. 820,55)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 2973, 2936, 1727, 1686, 1637, 1630, 1561, 1508, 1459, 1379, 1248, 1169, 1122, 1060, 1000, 958, 900, 793, 733

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 5,02 (d,1H); 4,93 (d,1H); 4,68 (m,1H); 4,53 (d,1H); 4,48 (d,1H); 4,10 (m,2H); 4,05 (s,1H);3,68 (m,3H); 3,60 (m,3H); 3,46 (m,1H); 3,36 (m,3H); 3,35 (s,3H); 3,31 (s,1H); 3,17 (m,2H); 3,04 (m,2H); 2,92 (s,3H); 2,84 (s,2H); 2,79 (m,2H); 2,69 (d,2H);2,36 (m,2H); 2,22 (m,3H); 2,12 (s,3H); 1,95 (m,4H); 1,62 (m,4H); 1,48 (m,3H); 1,34 (m,6H); 1,26 (s,3H); 1,25 (s,3H); 1,21 (d,3H); 1,14 (d,3H); 1,08 (s,3H); 1,04 (t,3H); 0,99 (d,2H); 0,87 (m,3H)

^{13}C NMR(DMSO, 300 MHz) δ: 171,45; 103,31; 95,62; 79,34; 77,28; 74,25; 74,10; 70,99; 68,05; 65,60; 57,98; 53,15; 48,87; 44,84; 38,81; 35,90; 35,17; 34,54; 29,74; 28,54; 21,83; 21,32; 21,01; 20,64; 20,48; 17,76; 16,30; 15,00; 10,43; 9,28

Priprava konjugata indometacina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 112

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (22 mg; 0,062 mmol) i spoja **110** (50 mg; 0,062 mmol) dobiveno je 46 mg (58 %) čistog produkta **112**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 90 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1145,52 (teor. 1145,63)

IR (KBr) cm^{-1}: 3429, 3088, 2971, 2936, 1728, 1681, 1594, 1537, 1478, 1456, 1402, 1373, 1324, 1291, 1260, 1227, 1179, 1109, 1089, 1054, 1014, 957, 926, 902, 834, 805, 755, 736, 691

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 7,69 (d,2H); 7,48 (d,2H); 6,92 (s,1H); 6,90 (s,1H); 6,67 (q,1H); 4,97 (d,1H); 4,44 (d,1H); 4,05 (m,2H); 3,82 (s,3H); 3,62 (s,3H); 3,69 (m,1H); 3,50 (m,2H); 3,32 (s,3H); 3,22 (m,3H); 3,02 (t,2H); 2,84 (t,2H); 2,62 (m,6H); 2,36 (s,3H); 2,25 (s,3H); 2,15 (d,2H); 1,90 (m,3H); 1,59 (m,5H); 1,46 (m,2H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 177,97; 170,12; 168,43; 156,28; 139,30; 136,30; 133,90; 131,26; 131,01; 130,70; 129,17; 115,03; 113,22; 112,11; 103,00; 101,13; 95,66; 83,43; 79,43; 78,02; 77,84; 74,61; 74,46; 72,83; 70,53; 68,92; 95,79; 95,05; 64,92; 55,78; 49,45; 47,62;44,75; 40,31; 37,88; 36,35; 35,01; 32,25; 29,72; 29,06; 26,94; 22,85; 21,57; 21,39; 21,19; 18,40; 16,30; 15,34; 13,76; 13,42; 11,15; 9,40; 7,86

Priprava konjugata indometacina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 113a

Prema općem postupku I iz spoja **115a** (100 mg, 0,0896 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens, dobiveno je 39 mg (34 %) spoja **113a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 90 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1160,4 (teor. 1159,61)

IR (KBr) cm^{-1}: 3424, 3087, 2972, 2936, 2879, 2834, 1730, 1678, 1649, 1631, 1541, 1478, 1458, 1401, 1373, 1357, 1324, 1289, 1260, 1226, 1168, 1150, 1123, 1089, 1060, 1014, 998,957, 926, 902, 834, 803, 755, 690, 665, 642

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,32; 169,42; 168,39; 167,18; 155,73; 139,38; 134,75; 133,68; 130,42; 130,20; 130,07; 129,45; 115,37; 112,69; 110,44; 103,52; 100,29; 94,22; 82,07; 78,30; 77,87; 76,42; 75,29; 73,42; 70,39; 68,42; 65,31; 65,08; 63,49; 50,27; 48,62; 46,53; 39,23; 37,62; 34,93; 31,64; 28,42; 27,97; 27,32; 26,92; 22,42; 20,17; 20,05; 19,34; 18,17; 15,82; 14,52; 13,72; 10,42; 9,08; 7,92

Priprava konjugata fluniksina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 113b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (60 g, sadrži 36,14 mg of fluniksina; 0,12 mmol) i spoja **111** (100 mg; 0,12 mmol) dobiveno je 60 mg (42 %) spoja **113b**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 92 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1098,9 (teor. 1098,61)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 3085, 2973, 2937, 2880, 1728, 1633, 1594, 1524, 1483, 1462, 1380, 1320, 1256, 1168, 1122, 1058, 1022, 958, 930, 900, 867, 794, 772, 720, 665, 614

Priprava konjugata flufenamske kiseline i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 113c

Prema općem postupku I iz spoja **115c** (100 mg, 0,096 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 87 mg (83,75 %) spoja **113c**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,50

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99,95 % (UV), 94,90 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1083,56 (teor. 1083,60)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 3069, 2973, 2937, 2879, 1720,1638,1597, 1524, 1453, 1426, 1379, 1336, 1283, 1247, 1167, 1125, 1059, 1012, 998, 957, 931, 897, 793, 749, 669, 663, 641

Priprava 3'-*N*-demetil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicina A (114)

Prema općem postupku C2 iz spoja **107** (900 mg; 1,16 mmol) dobiveno je 541 mg (63 %) spoja **114**.

Čistoća po LC/MS-UV: 94 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 778,5 (teor. 778,54)

IR (KBr) cm^{-1}: 3428, 2973, 2933, 1725, 1630, 1568, 1461, 1406, 1379, 1267, 1168, 1123, 1080, 1059, 1012, 959, 902, 651

Priprava konjugata indometacina i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 115a

Prema općem postupku G iz spoja **86a** (200 mg; 0,177), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens, dobiveno je 31 mg (16 %) spoja **115a.**

Čistoća, HPLC/MS-UV: 92 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1117,58 (teor. 1117,60)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 177,42; 168,32; 167,48; 155,62; 137,56; 134,72; 133,22; 130,93; 130,42; 130,07; 127,89; 115,93; 112,97; 110,32; 101,42; 98,52; 94,21; 82,37; 77,87; 77,22; 76,74; 74,22; 71,32; 69,47; 68,15; 64,35; 64,10; 63,89; 49,32; 48,97; 44,29; 37,41; 34,52; 33,39; 30,60; 27,42; 27,15; 25,42; 23,77; 22,14; 20,79; 20,18; 20,01; 18,42; 16,38; 12,57; 13,18; 12,33; 10,84; 8,52; 6,97

Priprava konjugata flufenamske kiseline i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 115b

Prema općem postupku G iz spoja **86b** (1 g, 0,948 mmol) dobiveno je 188 mg (19 %) spoja **115b**.

R_f($CHCl_3$:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,38

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99,02 % (UV), 96,83 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1041,57 (teor. 1041,59)

IR (KBr) cm^{-1}: 3423, 2973, 2937, 1725, 1641, 1597, 1524, 1460, 1425, 1379, 1337, 1283, 1238, 1167, 1126, 1069, 1053, 998, 958, 930, 897, 862, 795, 751, 699, 663

Priprava 3'-*N*-demetil-azitromicina (116)

Prema općem postupku G iz azitromicina (**37**) (10 g; 13,4 mmol), te nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens, dobiveno je 7,17 g (34 %) spoja **116**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 89 %

HPLC-MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 735,3 (teor. 735,49)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 2972, 2936, 2637, 1720, 1655, 1638, 1561, 1459, 1421, 1380, 1346, 1325, 1257, 1168, 1123, 1080, 1053, 1015, 999, 958, 900, 866, 842, 796, 726, 641

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-cijanoetil-azitromicina (117)

Prema općem postupku B iz spoja **116** (1,06 g; 1,44 mmol) dobiveno je 1,13 g (99 %) spoja **117**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 88 %

HPLC-MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 788,3 (teor. 788,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3483, 2971, 2937, 2877, 2248, 1729, 1655, 1638, 1560, 1542, 1509, 1460, 1378, 1257, 1169, 1105, 1056, 1013, 1000, 958, 901, 796, 727, 642

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-azitromicin (118)

Prema općem postupku C2 iz spoja **117** (1 g; 1,27 mmol) dobiveno je 724 mg čistog spoja **118** i 100 mg spoja **118** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 91 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 792,3 (teor. 792,55)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 2971, 2937, 2876, 2244, 1729, 1655, 1638, 1561, 1459, 1379, 1257, 1178, 1108, 1055, 1013, 999, 958, 900, 842, 796, 727, 701, 671, 646

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 119a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (50 mg; 0,14 mmol) i spoja **118** (115 mg; 0,14 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 i CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluense, dobiveno je 50 mg (29,4 %) spoja **119a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1131,69 (teor. 1131,62)

Priprava konjugata fluniksina i derivata azitromicina 119b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (186 mg; 0,379 mmol) i spoja **118** (300 mg; 0,379 mmol) dobiveno je 333 mg (82,24 %) spoja **119b**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,72

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99,1 % (UV), 98,8 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1071, 0 (teor. 1070,62)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 2972, 2937, 2878, 1729, 1648, 1611, 1594, 1524, 1483, 1462, 1378, 1320, 1280, 1257, 1168, 1123, 1055, 1026, 958, 901, 863, 842, 794, 771, 720, 700, 667, 640, 614

Priprava konjugata flufenamske kiseline i derivata azitromicina 119c

Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (106 mg; 0,379 mmol) i spoja **118** (300 mg; 0,379 mmol) dobiveno je 371 mg (92,79 %) spoja **119c**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,67

Čistoća, HPLC/M-UV: 97,35 % (UV), 91,97 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1055,50 (teor. 1055,61)

IR (KBr) cm^{-1}: 3426, 2970, 2937, 1723, 1641, 1596, 1524, 1463, 1425, 1379, 1336, 1282, 1262, 1167, 1126, 1055, 1014, 999, 958, 899, 797, 752, 699, 663

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 177,02, 168,18, 143,04, 142,28, 131,55, 130,35, 130,05, 130,04, 128,80, 125,86, 122,25, 121,38, 119,74, 116,87, 116,58, 113,81, 102,20, 94,41, 82,79, 77,28, 76,26, 74,85, 73,53, 72,68, 72,46, 70,35, 68,63, 66,97, 64,66, 64,17, 61,37, 50,99, 48,60, 44,61, 41,76, 41,76, 37,07, 36,28, 35,68, 34,52, 30,78, 27,32, 27,21, 26,00, 22,02, 21,37, 20,90, 20,86, 18,37, 17,62, 14,69, 10,88, 9,01, 6,69

Priprava konjugata indometacina i derivata 3-*O*-dekladinozil-azitromicina 120a

Prema općem postupku E iz spoja **119a** (50 mg; 0,0442 mol) dobiveno je 43 mg spoja **120a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 973,4 (teor. 973,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3426, 2967, 2933, 2875, 2248, 1807, 1776, 1706, 1675, 1653, 1561, 1545, 1524, 1478, 1462, 1400, 1375, 1324, 1261, 1228, 1168, 1111, 1069, 1037, 957, 929, 907, 835, 800, 754

Priprava konjugata fluniksina i derivata 3-*O*-dekladinozil-azitromicina 120b

Prema općem postupku E iz spoja **119b** (120 mg; 0,112 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens, dobiveno je 96 mg (93,55 %) čistog spoja **120b**.

R_f ($CHCl_3$:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1) = 0,66

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99,0 % , 99,3 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 912,9 (teor. 912,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3429, 2973, 2937, 2876, 1712, 1644, 1611, 1593, 1520, 1483, 1463, 1379, 1320, 1277, 1257, 1170, 1116, 1077, 1043, 956, 862, 846, 795, 757, 720, 703, 666, 638

Priprava konjugata flufenamske kiseline i derivata 3-*O*-dekladinozil-azitromicina 120c

Prema općem postupku E iz spoja **119c** (120 mg; 0,114 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 33 mg čistog spoja **120c** i 47 mg spoja **120c** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,49

Čistoća, HPLC/MS-UV: 100 % (UV) i 98,83 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 897,52 (teor. 897,51)

IR (KBr) cm^{-1}: 3426, 3071, 2973, 2937, 2879, 1718, 1640,1595, 1524, 1463, 1425, 1379, 1337, 1281, 1237, 1169, 1126, 1071, 1045, 998, 956, 931, 898, 862, 794, 749, 699, 663, 639

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 176,84, 168,87, 131,52, 130,05, 129,21, 127,39, 125,29, 122,21, 121,68, 118,85, 118,48, 117,61, 115,41, 115,26, 78,99, 74,81, 73,66, 72,60, 70,41, 70,09, 69,16, 64,82, 62,24, 50,79, 43,81, 41,51, 37,27, 36,55, 36,00, 29,05, 26,43, 25,94, 25,23, 20,64, 20,51, 20,34, 15,51, 15,37, 10,28, 7,36, 7,08

Priprava 2'-*O*-acetil-azitromicina (121)

Opći postupak J

Azitromicin (**37**) (11,3 g; 15,1 mmol) je otopljen u CH_2Cl_2 (75 mL), te su dodani K_2CO_3 (2,8 g; 20,3 mmol) i acetanhidrid (2 mL; 21,16 mmol). Reakcijska je smjesa miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Sutradan je dodana jednaka količina vode, te je smjesa ekstrahirana s CH_2Cl_2. Organski je sloj posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen je do suha. Dobiveno je 12,7 g (99 %) čistog produkta **121**.

Čistoća, HPLC/MS: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 791,36 (teor. 791,52)

Priprava 2'-*O*-acetil-4''-dehidro-4''-okso-azitromicina (122)

Spoj **121** (15 g; 19 mmol) je otopljen u suhom CH_2Cl_2 (80 mL) u tikvicu propuhanu argonom. Zatim je dodan DMSO (15 mL) i EDC·HCl (12,6 g; 65,7 mmol). Nakon 10 minuta miješanja smjesa se razbistrila, nakon čega je polako iz lijevka za dokapavanje dodana otopina piridintrifluoroacetata (12,7 g; 65,8 mmol) u CH_2Cl_2 (20 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 3 sata. Nakon toga je dodana voda (100 mL) i pH je podešen na 2, te je odijeljen organski sloj. Vodenom je sloju podešen pH na 7-8 i izvršena je ekstrakcija s CH_2Cl_2 (2x50 mL). Organski su slojevi spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4 i upareni do suha. Dobiveno je 15,9 g (55 %) produkta **122** u smjesi s kojim se išlo dalje u reakcije bez prethodnog čišćenja**.**

Čistoća, HPLC/MS: 52 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 789,40 (teor. 789,50)

IR (KBr) cm^{-1}: 3464, 2975, 2939, 2877, 2834, 2646, 1736, 1637, 1460, 1378, 1319, 1275, 1258, 1175, 1114, 1075, 1052, 1024, 958, 899, 861, 835, 797, 758, 700, 640

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 211,74; 186,11; 178,23; 103,59; 96,312; 84,69; 78,60; 77,80; 77,23; 74,85; 74,37; 73,55; 72,35; 70,86; 70,19; 69,21; 65,38; 62,21; 51,30; 44,62; 42,26; 40,42; 39,95; 36,84; 36,67; 29,30; 26,85; 26,59; 21,86; 21,32; 21,05; 21,00; 16,27; 16,19; 15,31; 11,20; 9,28; 7,61

Priprava 2'-*O*-acetil-4''-epoksi-azitromicina (123)

NaH (182 mg; 7,58 mmol) je otopljen u DMF-u (11 mL), te je dodan TMSI (trimetilsulfoksonijjodid) (0,85 g; 3,86 mmol). Smjesa se otopila nakon 15 minuta miješanja na sobnoj temperaturi. Iz lijevka za dokapavanje polako je dodavana otopina spoja **122** (2,1896 g; 2,78 mmol) u suhom DMSO-u (9,5 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Smjesa je prelivena u smjesi

voda/EtOAc (50mL/50 mL), organski je sloj odijeljen i ispran vodom. Organski je sloj posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen do suha. Dobiveno je 1,5767 g (54 %) produkta **123** u smjesi s kojim se išlo dalje u reakcije bez prethodnog čišćenja**.**

Čistoća, HPLC/MS: 77 %

HPLC-MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 803,61 (teor. 803,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 3062, 2974, 2939, 2879, 2832, 2791, 2639, 1731, 1649, 1463, 1422, 1379, 1331, 1277, 1258, 1175, 1114, 1075, 1050, 1012, 972, 958, 930, 890, 862, 839, 796, 757, 685, 667, 642

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,44; 102,60; 95,61; 83,80; 83,50; 78,51; 78,41; 77,49; 174,35; 74,32; 73,84; 73,65; 73,60; 73,53; 70,98; 70,23; 68,26; 65,56; 63,69; 63,59; 62,34; 61,88; 49,90; 49,61; 46,39; 45,47; 45,15; 44,96; 42,26; 41,51; 41,12; 40,41; 37,43; 36,48; 35,13; 29,23; 28,91; 27,22; 26,73; 21,90; 21,49; 21,41; 21,20; 18,42; 17,84; 16,20; 15,04; 14,55; 13,99; 11,24; 9,30; 7,53

Priprava 4''-(*N*-(2-aminoetil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (124)

Opći postupak K

Nakon otapanja spoja **123** (5 g, smjesa) u MeOH (40 mL) u reakcijsku su smjesu dodani etilendiamin (2,6 mL; 39,5 mmol) i KI (6,5 g; 39,5 mmol). Reakcijska je smjesa miješana preko noći na temperaturi od 50 °C. MeOH je uparen, a ostatak je otopljen u smjesi CH_2Cl_2/voda (40 mL/40 mL). Organski je sloj posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen. Dobiveno je 4,86 g produkta **124** u smjesi, koja je čišćena kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens. Konačno je dobiveno 991 mg čistog produkta **124** i 437 mg spoja **124** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS: 89 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 821,58 (teor. 821,58)

IR (KBr) cm^{-1}: 3458, 2973, 2939, 2878, 2831, 2647, 1730, 1618, 1462, 1381, 1278, 1258, 1178, 1111, 1052, 1013, 994, 959, 941, 895, 862, 837, 797, 758, 726, 701, 671, 641

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,81; 103,07; 95,07; 94,73; 83,60; 79,45; 77,47; 77,40; 77,20; 76,50; 76,38; 74,24; 74,05; 73,64; 73,55; 73,16; 72,43; 71,57; 70,88; 70,26; 68,72; 68,38; 67,35; 66,63; 65,80; 62,60; 52,24; 49,73; 49,55; 49,13; 45,40; 42,51; 42,34; 41,00; 40,37; 36,26; 36,10; 31,44; 28,79; 27,78; 26,73; 22,03; 21,75; 21,48; 21,28; 19,02; 17,31; 16,39; 15,25; 15,21; 14,86; 14,79; 14,60; 11,24; 9,08; 7,30

Priprava 4''-(*N*-(4-aminobutil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (125)

Prema općem postupku K iz spoja **123** (320 mg; 0,4 mmol) i 1,4-diaminobutana (0,5 mL; 5 mmol) dobiveno je 95 mg (14 %) spoja **125**.

Čistoća, HPLC/MS: 50,84 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 849,6 (teor. 849,61)

Priprava 4''-(*N*-(5-aminopentil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (126)

Prema općem postupku K iz spoja **123** (320 mg; 0,4 mmol) i 1,5-diaminopentana (0,585 mL; 5 mmol) dobiveno je 101 mg (16 %) spoja **126**.

Čistoća, HPLC/MS: 54 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 863,65 (teor. 863,62)

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 127

Prema općem postupku D iz spoja indometacina (**2**) (71,4 mg; 0,2 mmol) i spoja **124** (164 mg; 0,2 mmol) dobiveno je 104 mg (39,7 %) spoja **127**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 88,6 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1160,42 (teor. 1160,64)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,81; 170,73; 169,14; 155,92; 138,42; 134,42; 132,93; 131,23; 131,08; 130,81; 128,59; 112,49; 112,10; 109,39; 104,32; 100,32; 93,17; 92,41; 89,32; 82,91; 78,42; 77,63; 74,98; 71,59; 70,39; 65,38; 64,29; 63,42; 61,48; 57,29; 54,31; 52,17; 50,42; 48,31; 47,74; 46,38; 43,82; 42,21; 38,52; 37,38; 35,57; 32,55; 31,72; 29,41; 26,17; 23,52; 22,73; 20,42; 20,18; 17,42; 16,48; 11,46; 10,38; 8,64; 7,72

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 128

Prema općem postupku D iz spoja indometacina (**2**) (40 mg; 0,11 mmol) i spoja **125** (95 mg; 0,11 mmol) dobiveno je 52 mg (36,2 %) čistog produkta **128**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 91 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1188,73 (teor. 1188,67)

IR (KBr) cm^{-1}: 3423, 3350, 3086, 2971, 2937, 2877, 2831, 1730, 1685, 1596, 1527, 1478, 1459, 1400, 1372, 1358, 1324, 1259, 1225, 1177, 1109, 1092, 1051, 1014, 994, 958, 926, 911, 896, 834, 797, 755, 737, 690, 663, 639

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 129

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (40 mg; 0,11 mmol) i spoja **126** (95 mg; 0,11 mmol) dobiveno je 75 mg (51 %) čistog produkta **129**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 90 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1202,78 (teor. 1202,69)

IR (KBr) cm^{-1}: 3423, 3087, 2971, 2936, 2877, 2831, 1730, 1685, 1596, 1524, 1478, 1459, 1372, 1358, 1324, 1258, 1225, 1177, 1109, 1092, 1051, 1038, 1014, 994, 959, 926, 896, 835, 797, 755, 736, 691, 640

Priprava 11,12–cikličkog karbonata azitromicina (130)

Opći postupak L

Azitromicin (**37**) (20,45 g; 27,3 mmol), etilen-karbonat (14,1 g; 160 mmol) i K_2CO_3 (4,6 g; 33,3 mmol) otopljeni su u etilacetatu (150 mL). Reakcijska je smjesa miješana na 75 °C uz refluks tri dana. Nakon što je reakcijska smjesa ohlađena isprana je vodom, organski je sloj posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen je do suha. Nakon toga je sirovi produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 20,7 g (82 %) spoja **130**.

Čistoća, HPLC/MS: 84 %

HPLC-MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 775,28 (teor. 775,49)

Priprava 9-deokso-9a-aza-11-(2-amino-etilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a-homoeritromicin A (131)

Opći postupak M

Spoj **130** (330 mg; 0,426 mmol) je otopljen u etilendiaminu (3,5 mL; 52,4 mmol) i te je dodan piridin·HCl (50 mg; 0,43 mmol). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 24 sata (do 3 dana). Nakon toga je u reakcijsku smjesu dodan CH_2Cl_2 (40 mL), te je potom reakcijska smjsa isprana vodom (30 mL) i zasićenom otopinom NaCl (30 mL). Organski je sloj posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen do suha. Nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens dobiveno je 147 mg spoja **131** u smjesi (korišten za sljedeći korak bez čišćenja).

Čistoća, HPLC/MS: 34 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 835,57 (teor. 835,56)

Priprava 9-deokso-9a-aza-11-(4-amino-butilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a-homoeritromicin A (132)

Prema općem postupku M iz spoja **130** (9 g; 11,6 mmol) i 1,4-diaminobutana (36 mL) dobiveno je 8,3 g spoja **132** u smjesi (korišten za sljedeći korak bez čišćenja).

Čistoća, HPLC/MS: 62 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 863,46 (teor. 863,59)

Priprava 9-deokso-9a-aza-11-(5-amino-pentilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a- homoeritromicin A (133)

Prema općem postupku M iz spoja **130** (330 mg; 0,426 mmol) i 1,5-diaminopentana (2,5 mL; 21,4 mmol) dobiveno je 286 mg spoja **133** u smjesi (korišten za sljedeći korak bez čišćenja).

Čistoca, HPLC/MS: 77 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 877,66 (teor. 877,60)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 3371, 3305, 2971, 2936, 2870, 1813, 1727, 1460, 1379, 1257, 1167, 1110, 1081, 1051, 1014, 959, 899, 867, 835, 805, 772, 733, 707, 671, 640

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 134

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (62,85 mg; 0,176 mmol) i spoja **131** (147 mg; 0,176 mmol) dobiveno je 54 mg (25 %) čistog spoja **134**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1174,52 (teor. 1174,62)

IR (KBr) cm^{-1}: 3424, 3063, 2972, 2937, 2877, 2831, 2128, 1722, 1703, 1675, 1659, 1545, 1526, 1477, 1460, 1375, 1325, 1259, 1231, 1166, 1123, 1088, 1054, 1014, 959, 926, 898, 834, 803, 754, 699, 637

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,32; 171,18; 169,43; 155,93; 136,42; 135,81; 133,60; 131,17; 130,39; 129,64; 128,56; 113,74; 111,79; 110,64; 104,92; 100,21; 90,39; 89,32; 85,96; 85,42; 83,17; 76,13; 75,43; 74,38; 72,29; 68,17; 67,33; 59,33; 56,17; 54,23; 52,41; 50,42; 49,62; 46,33; 44,18; 38,47; 38,40; 37,42; 35,29; 31,45; 30,67; 29,42; 25,38; 23,22; 22,17; 20,47; 20,18; 19,85; 16,18; 14,54; 13,37; 10,42; 8,83; 7,26

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 135

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (41,5 mg; 0,116 mmol) i spoja **132** (100 mg; 0,116 mmol) dobiveno je 38 mg (26 %) čistog produkta **135**.

Čistoca, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1202,67 (teor. 1202,65)

Priprava konjugata indometacina i derivata azitromicina 136

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (57 mg; 0,16 mmol) i spoja **133** (130 mg; 0,16 mmol) dobiveno je 117 mg (57 %) čistog produkta **136**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1216,6 (teor. 1216,67)

IR (KBr) cm^{-1}: 3424, 3063, 2972, 2937, 2877, 2831, 2128, 1722, 1703, 1675, 1659, 1545, 1526, 1477, 1460, 1375, 1325, 1259, 1231, 1166, 1123, 1088, 1054, 1014, 959, 926, 898, 834, 803, 754, 699, 637

Priprava 11,12-cikličkog karbonata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A (137)

Prema općem postupku L iz spoja **55** (20 g; 27,3 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens dobiveno je 19,85 mg čistog spoja **137** i 765 mg spoja **137** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS: 92,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 761,50 (teor. 761,47)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a- homoeritromicina A 11,12-ciklički karbonat (138)

Prema općem postupku F iz spoja **137** (10,118 g; 13,3 mmol) dobiveno je 1,28 g spoja **138** te 2,9 g spoja **91**.

Spoj **138**: Čistoća, HPLC/MS: 54 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 446,31 (teor. 446,27)

Spoj **91**: Čistoća, HPLC/MS: 49 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 420,34 (teor. 420,29)

Prema općem postupku L iz spoja **91** (5 g; 12,04 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1.5 kao eluens, dobiveno je 1,7 g spoja **138**.

Čistoća, HPLC/MS: 30 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 446,31 (teor. 446,27)

Priprava konjugata fluniksina i 6-*N*-Fmoc-1,6-diaminoheksana 140a

Prema postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (565 mg; 1,15 mmol) i *N*-Fmoc-1,6-diaminoheksan **139** (390 mg; 1,15 mmol) dobiveno je 548 mg spoja **140a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 27 %

HPLC-MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 617,66 (teor. 617,27)

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 6-*N*-Fmoc-1,6-diaminoheksana 140b

Prema postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (245 mg; 0,87 mmol) i *N*-Fmoc-1,6-diaminoheksan **139** (300 mg; 0,9 mmol). Dobiveno je 430 mg spoja **140b** (po TLC-u, ne otapa se te se nije mogao snimiti na HPLC-MS).

Priprava konjugata fluniksina i 1,6-diaminoheksana 141a

Opći postupak N

U otopini spoja **140a** (548 mg; smjesa) i etilacetata (5 mL) dodan je piperidin (2 mL; 0,02 mmol). Reakcijska smjesa je mijesana 1,5 sati na sobnoj temperaturi. Piperidin i etilacetat su upareni na rotavaporu. Dobiveno je 732 mg sirovog produkta **141a**, koji je korišten za sljedeći korak bez čišćenja.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 66 % (UV), 37 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 395,45 (teor. 395,20)

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 1,6-diaminoheksana 141b

Prema općem postupku N iz spoja **140b** (400 mg; smjesa) dobiveno je 570 mg sirovog produkta **141b**, koji je korišten za sljedeći korak bez čišćenja.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 68 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 380,22 (teor. 380,19)

Priprava konjugata derivata fluniksina i derivata 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 142a

Opći postupak O

Spoj **141a** (732 mg; 1,86 mmol) i spoj **138** (217 mg; 0,5 mmol) otopljeni su u piridinu (7 mL). Zatim je dodan piridin·HCl (60 mg; 0,5 mmol) i par kapi 1,8-diazabicyclo [5.4.0]-undec-7-ena (DBU). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 5 dana. Dodan je CH_2Cl_2 u reakcijsku smjesu, koja je zatim isprana vodom i zasićenom otopinom NaCl. Organski sloj je posušen iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparen do suha. Sirovi produkt pročišćen je dva puta kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 90:9:1.5 kao eluens. Dobiveno je 70 mg čistog spoja **142a**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 % (UV), 88 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 840,43, (teor. 840,47)

IR (KBr) cm^{-1}: 3369, 2971, 2935, 2878, 1645, 1593, 1462, 1380, 1320, 1254, 1186,1168, 1122, 1088, 1023, 975, 927, 795, 772, 720, 665, 614

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO) δ: 175,29; 155,64; 153,29; 152,32; 140,09; 136,29; 130,42; 129,52; 128,62; 125,52; 125,17; 123,62; 120,42; 120,32; 120,17; 88,32; 85,17; 78,42; 75,41; 70,87; 70,09; 52,46; 48,35; 44,24; 44,21; 40,13; 39,87; 27,39; 27,17; 20,43; 18,52; 14,23; 10,39; 8,69; 7,32, 6,68

Priprava konjugata derivata flufenamske kiseline i derivata 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 142b

Prema općem postupku O iz spoja **141b** (380 mg; 0,5 mmol) i spoja **138** (222 mg; 0,5 mmol), nakon čišćenja sirovog produkta kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 i CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluense, dobiveno je 18 mg čistog spoja **142b** i 15 mg spoja **142b** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 % (UV), 89 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 825,40 (teor. 825,45)

IR (KBr) cm^{-1}: 3369, 2970, 2935, 2878, 1632, 1595, 1524, 1452, 1426, 1377, 1336, 1283, 1248,1165, 1124, 1097, 1070, 975, 928, 793, 750, 699, 663

Priprava 3′-*N*-demetil-klaritromicina (143)

Prema općem postupku G iz klaritromicina (**36**) (10,0 g, 13,370 mmol) dobiveno je 10,678 g sirovog produkta **143**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 90:8:1) = 0,27

Čistoća, HPLC/MS: 90,74 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 734,61 (teor. 734,46)

IR (KBr) cm^{-1}: 3483, 2974, 2939, 2883, 2834, 1736, 1691, 1460, 1406, 1380, 1348, 1287, 1268, 1246, 1170, 1127, 1084, 1070, 1054, 1010, 983, 959, 936, 902, 892, 842, 804, 77, 733, 698, 630

Priprava 3′-*N*-demetil-3'-*N*-(2-cijanoetil)-klaritromicina (144)

Prema općem postupku B iz spoja **143** (10,675 g; 14,545 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 8,393 g (73,32 %) čistog spoja **144**. Također je izolirano i 2,239 g polaznog spoja **143**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,76

Čistoća, HPLC/MS: 86,44 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 787,5 (teor. 787,49)

IR (KBr) cm^{-1}: 3477, 2974, 2940, 2883, 2249 (C≡N), 1732, 1692, 1463, 1406, 1379, 1348, 1286, 1268, 1246, 1170, 1110, 1055, 1034, 1010, 959, 935, 903, 891, 865, 842, 802, 754, 730, 698, 638

Priprava 3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-klaritromicin (145)

Postupak I

$NaBH_4$ (38 mg, 1,018 mmol) je otopljen u 32 % NaOH (24 mL) te je dodan u otopinu spoja **144** (800 mg, 1,016 mmol) i Raney-Ni (10,6 mL ~6.37 g) u MeOH (80 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 45 minuta, pri čemu je prema TLC (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0.1) vidljivo da je sva količina polaznog spoja **144** izreagirala. Katalizator je profiltriran preko diatomejske zemlje (celit) preko Büchner-ovog lijevka. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom te je izvršena ekstrakcija s CH_2Cl_2 (3x20 mL). Organski su ekstrakti isprani vodom, posušeni iznad K_2CO_3 i upareni do suha. Ostatak je otopljen u EtOH (12 mL) i zasićenoj otopini NaCl (12 mL) te je dodan trietanolamin (8 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 2 sata, a potom je ekstrahirana s EtOAc (3x30 mL). Organski su slojevi dva puta isprani sa zasićenom otopinom NaCl, posušeni iznad K_2CO_3, upareni do suha i pročišćeni kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Prema HPLC-MS analizi vidljivo je da je nastao produkt željene molekulske mase (MH^+=791,7) u smjesi, ali se nije mogao izolirati produkt zadovoljavajuće čistoće.

Postupak II

Prema općem postupku C1 iz spoja **144** (1,807 g, 2,296 mmol), te nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens, dobiveno je samo 79 mg čistog spoja **145**. Također je dobiveno i 1,318 g polaznog spoja **144**.

Čistoća, HPLC/MS: 81,16 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 792,00 (teor. 791,52)

Postupak III

Postupak III je isti kao i postupak II uz iznimku otapala koje je korišteno za otapanje spoja **144** (MeOH umjesto EtOH). Iz spoja **144** (1,318 g; 1,674 mmol) dobiveno je 568 mg čistog spoja **145** i 447 mg spoja **145** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1) = 0,25

Čistoća, HPLC/MS: 96,44 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 791,87 (teor. 791,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3598, 3424, 3150, 2971, 2940, 2883, 2836, 2734, 2601, 2067, 1732, 1687, 1629, 1629, 1460, 1406, 1379, 1348, 1290, 1268, 1246, 1171, 1128, 1113, 1056, 991, 957, 909, 865, 832, 802, 750, 698, 641, 619

Priprava konjugata indometacina i derivata klaritromicina 146a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (90 mg; 0,253 mmol) i spoja **145** (200 mg; 0,253 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens, dobiveno je 256 mg (89,81 %) čistog spoja **146a**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 90:8:1) = 0,76

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98,52 % (UV), 91,61 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1130,86 (teor. 1130,59)

IR (KBr) cm^{-1}: 3450, 2972, 2938, 2883, 2833, 1733, 1686, 1596, 1524, 1478, 1459, 1401, 1373, 1355, 1325, 1288, 1263, 1226, 1169, 1110, 1087, 1054, 1012, 926, 903, 834, 803, 755, 735, 697, 640

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 220,82, 175,69, 168,43, 156,16, 139,44, 136,34, 133,75, 131,44, 131,31, 131,07, 130,56, 129,18, 115,16, 113,05, 111,98, 101,20, 96,13, 78,53, 78,25, 77,75, 76,73, 74,25, 72,91, 69,11, 66,08, 55,91, 50,60, 49,45, 45,14, 45,02, 39,27, 38,96, 37,31, 34,97, 32,29, 21,47, 21,18, 21,05, 19,78, 18,68, 18,00, 16,04, 15,97, 13,44, 12,31, 10,60, 9,45

Priprava konjugata fluniksina i derivata klaritromicina 146b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (124 mg; 0,253 mmol) i spoja **145** (200 mg; 0,253 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 102 mg čistog spoja **146b**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,69

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96,87 % (UV), 92,56 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1069,82 (teor. 1069,59)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 2973, 2939, 2882, 2833, 1735, 1686, 1648, 1611, 1594, 1523, 1483, 1461, 1405, 1379, 1321, 1283, 1256, 1169, 1124, 1113, 1083, 1054, 1031, 1011, 935, 902, 841, 795, 772, 720, 665, 637, 615

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 220,69, 175,53, 155,66, 151,01, 140,02, 136,43, 129,77, 129,54, 128,18, 125,73, 125,63, 123,59, 120,42, 120,38, 120,33, 96,08, 81,84, 78,58, 78,20, 77,64, 76,81,

74,26, 72,94, 72,94, 69,14, 66,11, 50,61, 49,33, 45,12, 44,97, 39,24, 38,72, 37,35, 34,92, 21,46, 21,20, 21,07, 19,72, 18,61, 18,03, 16,07, 15,96, 14,02, 12,33, 10,60, 9,61

Priprava konjugata flufenamske kiseline i derivata klaritromicina 146c

Prema općem postupku D iz flufenamske kiseline (**74**) (27 mg; 0,096 mmol) i spoja **145** (76 mg; 0,096 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 i CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:0,5 kao eluense, dobiveno je 67 mg (65,98 %) čistog spoja **146c**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 90:8:1) = 0,76

Čistoća, HPLC/MS-UV: 89,8 % (UV), 86,7 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1054,9 (teor. 1054,57)

IR (KBr) cm^{-1}: 3458, 2973, 2939, 2884, 2833, 1735, 1691, 1643, 1596, 1524, 1462, 1425, 1379, 1336, 1284, 1245, 1168, 1127, 1069, 1054, 1010, 932, 892, 795, 749, 699, 663, 636

Priprava 3′-*N*-demetil-eritromicin A oksima (147)

Prema općem postupku G iz eritromicin A oksima (**53**) (4,914 g; 6,561 mmol), uz trajanje reakcije od 30 minuta, dobiveno je 4,601 g (95,40 %) sirovog produkta **147**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,17

Čistoća, HPLC/MS: 92,95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 735,62 (teor. 735,46)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 2974, 2939, 2881, 1737, 1638, 1462, 1404, 1379, 1347, 1285, 1247, 1168, 1125, 1087, 1055, 1011, 955, 895, 865, 843, 804, 758, 731, 699

Priprava 3′-*N*-demetil-3'-*N*-(2-cijanoetil)-eritromicin A oksima (148)

Prema općem postupku B iz spoja **147** (4,402 g; 5,990 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 i EtOAc:Et_3N 96:4 kao eluens, dobiveno je 1,425 g (29,79 %) čistog spoja **148**. Dodatno je dobiveno 1,208 g manje čistog produkta, koji prema HPLC-MS analizi sadrži dva cijanoetilna lanca (MH^+: 841,70, teor. 841,51).

R_f(CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0,40

Čistoća, HPLC/MS: 94,06 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 788,62 (teor. 788,48)

IR (KBr) cm^{-1}: 3498, 2974, 2939, 2880, 2736, 2249 (CN) 1736, 1637, 1465, 1406, 1380, 1346, 1285, 1262, 1169, 1111, 1055, 1012, 953, 931, 909, 864, 802, 758, 729, 698

Priprava 3′-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-eritromicin A oksima (149)

Prema općem postupku C1 iz spoja **148** (1,350 g; 1,713 mmol) dobiveno je 312 mg (23 %) spoja 149 i 887 mg polaznog spoja **149**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0.1) = 0,15

Čistoća, HPLC/MS: 94,66 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 792,68 (teor. 792,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 2973, 2939, 2879, 1736, 1637, 1462, 1380, 1346, 1285, 1263, 1169, 1111, 1087, 1054, 1012, 955, 894, 864, 804, 755, 698, 665

Priprava konugata indometacina i derivata eritromicin A oksima 150a

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (54 mg; 0,151 mmol) i spoja **149** (120 mg; 0,151 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 29 mg čistog spoja **150a** i 94 mg spoja **150a** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1.5) = 0,51

Čistoća, HPLC/MS-UV: 89,92 % (UV), 81,96 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1131,81 (teor. 1131,58)

IR (KBr) cm^{-1}: 3428, 3072, 2973, 2937, 2879, 2834, 1736, 1678, 1524, 1478, 1460, 1401, 1372, 1324, 1288, 1226, 1168, 1111, 1088, 1054, 1013, 954, 926, 909, 833, 803, 755, 730, 697, 611

Priprava konugata fluniksina i derivata eritromicin A oksima 150b

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (74 mg; 0,152 mmol) i spoja **149** (120 mg; 0,152 mmol), nakon dvostrukog čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 27 mg čistog spoja **150b** i 58 mg manje čistog spoja **150b**

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1) = 0 0,36

Čistoća, HPLC/MS-UV: 90,48 % (UV), 87,87 %(MS) (za smjesu : 85,14 % (UV), 85,79 % (MS)).

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1070,81 (teor. 1070,58)

IR (KBr) cm^{-1}: 3433, 2974, 2939, 2879, 1736, 1594, 1524, 1483, 1461, 1401, 1379, 1320, 1281, 1256, 1168, 1122, 1085, 1055, 1013, 954, 930, 902, 864, 841, 795, 771, 720, 664

Priprava 9(E)-*O*-(2-cijanoetil)-eritromicin A oksima (151)

Prema općem postupku B iz spoja **53** (3,300 g, 4,008 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz EtOAc:Et_3N 96:4 kao eluens, dobiveno je 909 mg (28,28 %) spoja **151**. Također je izolirano 1,668 g polaznog spoja **53**.

R_f (CH_2Cl_2-CH_3OH-NH_4OH, 90:8:1) = 0,27

Čistoća, HPLC/MS: 86,80 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 802,71 (teor. 802,5)

IR (KBr) cm^{-1}: 3464, 2975, 2939, 2881, 2833, 2788, 2254 (CN), 1732, 1637, 1460, 1407, 1379, 1351, 1246, 1169, 1110, 1093, 1053, 1012, 956, 894, 864, 835, 802, 754, 730, 639

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO) δ: 175,5; 173.64; 102,68; 96,31; 83,64,;79,95; 77,86; 77,10; 75,38; 74,38; 72,76; 70,90; 70,25; 68,49; 67,83; 65,76; 65,62; 49,45; 44,76; 40,4; 39,04; 37,59; 35,04; ~30; 27,08; 26,87; 21,47; 21,23; 21,17; 18,75; 18,58; 18,44; 16,26; 16,02; 14,52; 10,68; 9,31

Priprava 9(E)-*O*-(5-cijanopentil)-eritromicin A oksima (152)

Opći postupak P

Kalijev hidroksid (225 mg; 4,010 mmol) je dodan u smjesi spoja **53** (3 g; 4,005 mmol), tetrabutilamonijevog jodida (74 mg; 0,200 mmol), natrijevog jodida (90 mg; 0,600 mmol) i 6-bromheksanitrila (0,796 mL, 6,008 mmol) u THF (39 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 16 sati, a potom je otapalo upareno do suha. Sirovom je ostatku dodan CH_2Cl_2 (30 mL) i zasićena otopina $NaHCO_3$ (30 mL) te su faze odijeljene. Vodena faza je oprana dva puta s CH_2Cl_2. Organske faze su isprane s vodom i zasićenom otopinom NaCl, posušene iznad bezvodnog Na_2SO_4 i uparene do suha. Sirovi je ostatak pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 1,265 g čistog spoja **152** i 416 mg spoja **152** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5) = 0,58

Čistoća, HPLC/MS: 85,19 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 844,72 (teor. 844,55); $[(M+2H)^{2+}]$ 423,05 (teor. 422,78)

IR (KBr) cm^{-1}: 3467, 2974, 2939, 2877, 2832, 2787, 2247 (CN), 1736, 1460, 1380, 1345, 1283, 1168, 1111, 1086, 1053, 1012, 956, 893, 864, 835, 804, 729, 698, 636

Priprava 9(E)-*O*-(4-cijanobutil)-eritromicin A oksima (153)

Prema općem postupku P iz spoja **53** (2,755 g; 3,679 mmol) i 5-bromvaleronitrila (0,644 mL; 5,518 mmol) dobiveno je 1,270 g čistog spoja **153** i 189 mg spoja **153** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 90:9:1,5) = 0,54

Čistoća, HPLC/MS: 85,86 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 830,66 (teor. 830,53); $[(M+2H)^{2+}]$ 416,15 (teor. 415,77)

IR (KBr) cm^{-1}: 3450, 2973, 2940, 2878, 2831, 2789, 2247 (CN), 1736, 1630, 1460, 1379, 1346, 1282, 1170, 1112, 1083, 1053, 1013, 1000, 957, 930, 894, 864, 834, 806, 771, 735, 698, 638

Priprava 9(E)-*O*-(3-aminopropil)-eritromicin A oksima (154)

Prema općem postupku C1 iz spoja **151** (862 mg, 1,075 mmol) dobiveno je 272 mg čistog spoja **154** i 146 mg spoja **154** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1) = 0,34

Čistoća, HPLC/MS:79,48 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 806,83 (teor. 806,53); $[(M+2H)^{2+}]$ 404,08 (teor. 403,77)

IR (KBr) cm^{-1}: 3485, 2975, 2939, 2879, 2833, 2787, 1731, 1605, 1456, 1380, 1347, 1282, 1182, 1168, 1110, 1083, 1054, 1000, 957, 900, 863, 835, 801, 730, 697, 639

Priprava 9(E)-*O*-(6-aminoheksil)-eritromicin A oksima (155)

Prema općem postupku C1 iz spoja **152** (1,207 g; 1,430 mmol) dobiveno je 463 mg čistog spoja **155** i 199 mg spoja **155** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 6:1:0,1) = 0,36

Čistoća, HPLC/MS: 95,54 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 848,77 (teor. 848,58); $[(M+2H)^{2+}]$ 425,14 (teor. 424,79)

IR (KBr) cm^{-1}: 3439, 2972, 2938, 2876, 2787, 1737, 1673, 1631, 1463, 1380, 1345, 1281, 1169, 1112, 1082, 1053, 1013, 1000, 957, 929, 893, 865, 833, 805, 772, 698, 638

Priprava 9(E)-*O*-(5-aminopentil)-eritromicin A oksima (156)

Prema općem postupku C1 iz spoja **153** (1,291 g; 1,555 mmol), uz korištenje smjese otapala EtOH:MeOH (35 mL), dobiveno je 598 mg čistog spoja **156** i 182 mg spoja **156** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1) = 0,39

Čistoća, HPLC/MS: 91,54 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 834,73 (teor. 834,56); $[(M+2H)^{2+}]$ 417,84 (teor. 417,78)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 2973, 2938, 2876, 2788, 1735, 1620, 1460, 1403, 1379, 1346, 1283, 1169, 1112, 1085, 1054, 1012, 954, 926, 893, 865, 835, 804, 769, 733, 698, 637

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 176,03, 170,62, 103,06, 96,28, 83,60, 80,00, 77,89, 77,31, 75,48, 74,95, 74,23, 74,12, 73,08, 72,73, 72,69, 71,02, 70,60, 68,78, 65,64, 65,52, 49,51, 44,87, 40,34, 40,28, 39,00, 37,26, 34,94, 32,82, 29,80, 28,88, 28,78, 26,78, 26,40, 22,64, 21,46, 21,06, 18,97, 18,54, 16,17, 14,88, 10,58, 9,15

Priprava konugata fluniksina i derivata eritromicin A oksima 157

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**73**) (79 mg; 0,161 mmol) i spoja **154** (130 mg; 0,162 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 22 mg čistog spoja **157** i 54 mg spoja **157** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5) = 0,41

Čistoća, HPLC/MS-UV: 97,25 % (UV), 85,16 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1084,69 (teor. 1084,6) ; $[(M+2H)^{2+}]$ 542,99 (teor. 542,8)

IR (KBr) cm^{-1}: 3454, 2974, 2937, 2881, 2787, 1735, 1643, 1593, 1524, 1462, 1379, 1321, 1280, 1259, 1168, 1121, 1081, 1055, 1021, 955, 899, 867, 834, 795, 773, 721, 666, 614

Priprava konugata indometacina i derivata eritromicin A oksima 158

Prema općem postupku D iz indometacina (**2**) (55mg; 0,153 mmol) i spoja **155** (130 mg; 0,153 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens, dobiveno je 168 mg (92,37 %) čistog spoja **158**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 90:9:1,5) = 0,49

Čistoća, HPLC/MS-UV: 92,68 % (UV), 83,34 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1187,90 (teor. 1187,64); $[(M+2H)^{2+}]$ 594,77 (teor. 594,32)

IR (KBr) cm^{-1}: 3426, 3085, 2972, 2937, 2876, 2832, 2786, 1736, 1681, 1594, 1531, 1478, 1456, 1401, 1372, 1325, 1287, 1261, 1226, 1168, 1110, 1088, 1053, 1013, 955, 924, 903, 834, 804, 755, 697, 665, 638

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 175,12, 171,28, 169,79, 168,35, 156,27, 139,55, 136,26, 133,65, 131,22, 130,91, 130,40, 129,22, 115,09, 113,07, 112,23, 102,55, 100,97, 96,27, 83,51, 79,96, 77,85, 75,28, 74,22, 73,80, 72,83, 70,62, 68,40, 65,74, 65,63, 55,75, 49,45, 44,68, 40,45, 39,56, 38,77, 37,72, 35,10, 32,86, 32,24, 29,47, 28,76, 27,02, 26,53, 26,37, 25,52, 21,49, 21,26, 21,10, 18,70, 18,59, 16,26, 16,19, 14,48, 13,29, 10,67, 9,38

Priprava konjugata flufenamske kiseline i *N*-Boc-1,5-diaminopentana 160

Prema općem postupku D iz fluniksin meglumina (**74**) (382 mg; 1,36 mmol) i *N*-Boc-1,5-diaminopentana **159** (283,8 μL; 1,36 mmol) dobiveno je 363 mg (60 %) spoja **160**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 89,9 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 451,12 (teor. 451,21)

Priprava konjugata flufenamske kiseline i 1,5-diaminopentana 161

Opći postupak R

Spoj **160** (350 mg; 0,78 mmol) otopljen je u TFA (2 mL) i CH_2Cl_2 (2 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 2 sata. TFA je uparena, te je u reakcijsku smjesu dodan CH_2Cl_2 koji je potom uparen. Dobiveno je 230 mg (84 %) spoja **161**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 92,3 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 351,46 (teor. 351,16)

Priprava konjugata flufenamske kiseline, 1,5-diaminopentana i derivata klaritromicina 163

U otopini spoja **162** (219 mg; 0,279 mmol) u MeOH (15 mL), dodan je spoj **161** (200 mg; 0,548 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na 55 °C preko noći. Otapalo je upareno, a sirovi je produkt pročišćen kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 125 mg čistog spoja **163**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95,82 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1137,65 (teor. 1137,63)

IR (KBr): 3448, 2976, 2938, 2833, 2791, 1736, 1686, 1638, 1596, 1583, 1524, 1499, 1459, 1426, 1379, 1336, 1282, 1235, 1168, 1126, 1070, 1050, 1033, 1012, 985, 959, 931, 904, 891, 835, 794, 754, 698, 664, 634

Priprava metil-*N*-(*terc*-butoksikarbonil)-*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicinata (164)

Opći postupak S

Otopina celekoksiba (**27**) (7 g; 18,35 mmol), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (1,12 g; 9,17 mmol), di-*terc*-butil-dikarbonata (3,76 mL; 15,75 mmol) i TEA (13,16 mL; 55 mmol) u THF-u (50 mL) miješana je na sobnoj temperaturi 1 sat. Tada je dodan metil-bromacetat (4,24 mL; 45,85 mmol) i K_2CO_3 (5,07 g; 36,68 mmol), te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi narednih 22 sata. Nakon toga je reakcijska smjesa prelivena u zasićenu otopinu $NaHCO_3$ (50 mL) i ekstrahirana je s EtOAc (2x50 mL). Organski su slojevi spojeni, isprani zasićenom otopinom NaCl (50 mL), posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4, profiltrirani i upareni do suha. Dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 9,83 g (97 %) čistog produkta **164**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 97 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 554,05 (teor. 554,15)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 3136, 3108, 2983, 1919, 1759, 1738, 1618, 1598, 1501, 1473, 1450, 1411, 1372, 1314, 1273, 1239, 1165, 1146, 1095, 1016, 995, 976, 939, 846, 808, 763, 744, 718, 653

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 8,07 (d,2H); 7,62 (d,2H); 7,22 (s,1H); 7,21 (s,4H); 4,60 (s,2H); 3,71 (s,3H); 2,31 (s,3H); 1,25 (s,9H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ : 168,77; 149,58; 145,40; 142,58; 139,06; 138,80; 129,32; 129,05; 128,76; 125,93; 125,19; 106,30; 84,87; 52,25; 46,79; 27,14; 20,69

Priprava metil-*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicinata (165)

Prema općem postupku R

Prema postupku R iz spoja **164** (2,57 g; 4,64 mmol) dobiveno je 2,26 g (98 %) čistog produkta **165**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 454,27 (teor. 454,10)

IR (KBr) cm^{-1}: 3281, 2954, 2925, 1747, 1595, 1555, 1499, 1476, 1438, 1411, 1376, 1354, 1324, 1279, 1238, 1216, 1162, 1133, 1100, 1016, 978, 949, 874, 849, 803, 762, 744, 722, 700, 633

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,86 (d,2H); 7,56 (d,2H); 7,22 (s,5H); 3,79 (d,2H); 3,54 (s,3H); 2,51 (s,2H); 2,33 (s,3H)

^{13}C NMR(DMSO, 300 MHz) δ: 169,47; 145,43; 141,74; 140,84; 139,23; 129,56; 128,88; 127,82; 126,24; 125,39; 106,28; 51,92; 43,81; 20,94

Priprava *N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicina (166)

Opći postupak T

Spoj **165** (2,26 g; 4,98 mmol) otopljen je u THF-u (5 mL), te je dodana otopina $LiOH{\cdot}H_2O$ (418 mg; 9,97 mmol) u destiliranoj vodi (5 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi pola sata.

THF je uparen do suha, a preostala vodena otopina je zakiseljena s 0,1 M HCl do pH 2 pri čemu je došlo do taloženja produkta. Talog je odsisan i posušen. Dobiveno je 1,79 g (82 %) čistog produkta **166**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 440,25 (teor. 440,08)

IR (KBr) cm^{-1}: 3396, 1606, 1574, 1501, 1472, 1415, 1373, 1326, 1274, 1238, 1169, 1156, 1129, 1098, 1022, 974, 930, 847, 813, 758, 628

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,86 (d,2H); 7,56 (d,2H); 7,22 (s,5H); 3,79 (d,2H); 3,54 (s,3H); 2,51 (s,2H); 2,33 (s,3H)

^{13}C NMR(DMSO, 300 MHz) δ: 169,47; 145,43; 141,74; 140,84; 139,23; 129,56; 128,88; 127,82; 126,24; 125,39; 106,28; 51,92; 43,81; 20,94

Priprava konjugata derivata celekoksiba i *N*-Boc-etilendiamina 169

Prema postupku D iz spoja **166** (500 mg; 1,14 mmol) i *N*-Boc-etilendiamin **167** (0,18 mL; 1,14 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0.1 kao eluens, dobiveno je 390 mg (58 %) čistog produkta **169**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 85 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 582,33 (teor. 582,19)

IR (KBr) cm^{-1}: 3378, 2979, 2933, 1686, 1598, 1528, 1499, 1473, 1450, 1409, 1369, 1341, 1273, 1238, 1163, 1135, 1097, 1006, 976, 843, 827, 808, 761, 744, 719, 694, 627

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,85 (d,2H); 7,54 (d,2H); 7,20 (m,5H); 3,45 (s,2H); 3,01 (t, 2H); 2,93 (t,2H); 2,31 (s, 3H); 1,35 (s, 9H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 167,30; 155,49; 145,19; 142,39; 141,89; 141,54; 140,20; 138,98; 129,37; 128,64; 127,78; 127,61; 125,99; 125,17; 106,04; 77,60;45,09; 40,25; 38,58; 28,11; 20,74

Priprava konjugata derivata celekoksiba i *N*-Fmoc-1,4-diaminobutana 170

Prema postupku D iz spoja **166** (300 mg; 0,68 mmol) i *N*-Fmoc-1,4-diaminobutana **168** (260 mg; 0,68 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens, dobiveno je 138 mg (28 %) čistog produkta **170**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 732,49 (teor. 732,24)

Priprava konjugata derivata celekoksiba i *N*-Boc-1,5-diaminopentana 171

Prema općem postupku D iz spoja **166** (300 mg; 0,68 mmol) i *N*-Boc-1,5-diaminopentana **159** (141,9 µl; 0,68 mmol) dobiveno je 470 mg (96,4 %) spoja **171**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 86,89 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 424, 61 (teor. 624,24)

IR (KBr) cm^{-1}: 3400, 2964, 2931, 2865, 1702, 1687, 1675, 1659, 1598, 1560, 1545, 1530, 1512, 1498, 1472, 1448, 1409, 1369, 1341, 1266, 1237, 1163, 1133, 1096 ,1039, 1019, 974, 843, 806, 761, 744, 720, 695

Priprava konjugata derivata celekoksiba i 1,2-diaminoetana 172

Prema općem postupku R iz spoja **169** (300 mg; 0,52 mmol) dobiven je sirovi produkt kojem je dodana voda (15 mL), te je otopina zalužena s 1M NaOH do pH 14 i ekstrahirana je s EtOAc (2x20 mL). Slojevi EtOAc su spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4, profiltrirani i upareni do suha. Dobiveno je 250 mg čistog spoja **172**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 84 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 482,19 (teor. 482,14)

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,85 (d,2H); 7,54 (d,2H); 7,20 (m,5H); 3,46 (s,2H); 3,01 (m, 2H); 2,51 (m,2H); 2,32 (s, 3H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 167,34; 145,18; 142,37; 141,87; 141,47; 140,34; 138,98; 129,35; 128,62; 127,75; 125,98; 125,14; 106,00; 45,21; 41,64; 40,78; 20,72; 0,01

Priprava konjugata derivata celekoksiba i 1,4-diaminobutana 173

Prema općem postupku N iz spoja **170** (135 mg, 0,18 mmol) dobiveno je 201 mg spoja **173**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 42 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 510 (teor. 510,17)

Priprava konjugata derivata celekoksiba i 1,5-diaminopentana 174

Prema općem postupku R iz spoja **171** (460 mg; 0,74 mmol) dobiven je sirovi produkt kojem je dodana voda (15 mL), te je otopina zalužena s 1 M NH_4OH do pH 8 i ekstrahirana je s CH_2Cl_2. Organski slojevi su spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4, profiltrirani i upareni do suha. Dobiveno je 354 mg spoja **174**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 90,7 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 524,6 (teor. 524,19)

IR (KBr) cm^{-1}: 3366, 3296, 3074, 2933, 2864, 1655, 1597, 1545, 1498, 1742, 1449, 1408, 1375, 1335, 1273, 1237, 1201, 1162, 1133, 1097, 1076, 1018, 976, 842, 826, 807, 760, 742, 719, 692, 627

Priprava konjugata celekoksiba i *N*-Boc-7-amino-heptanske kiseline 176

Prema općem postupku D iz *N*-Boc-7-amino-heptanske kiseline **175** (490 mg; 2 mmol) i celekoksiba (**27**) (762 mg; 2 mmol) dobiveno je 940 mg (77 %) čistog spoja **176**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95,5 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 609,56 (teor. 609,23)

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,93 (d,2H); 7,55 (d,2H); 7,20 (s,4H); 6,72 (t,1H); 2,85 (m,2H); 2,50 (s,2H); 2,32 (s,3H); 2,16 (t5,2H); 1,35 (s,9H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 185,61; 172,77; 155,68; 145,45; 142,15; 140,45; 139,25; 129,54;128,86; 128,78; 126,01; 125,39; 106,31; 77,39; 35,96; 29,39; 28,37; 28,11; 26,03; 24,31; 20,94

Priprava konjugata celekoksiba i 7-amino-heptanske kiseline 177

Prema općem postupku R iz spoja **176** (890 mg; 1,46 mmol) dobiveno je 730 mg (98 %) čistog spoja **177**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 508,94 (teor. 509,18)

^1H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,77 (d,2H); 7,33 (d,2H); 7,19 (s,4H); 7,15 (s,1H); 2,75 (t,2H); 2,50 (s,2H); 2,30 (s,3H); 1,93 (t,2H); 1,47 (m,2H); 1,39 (m,2H); 1,23 (m,2H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 185,66; 177,76; 146,53; 145,19; 141,66; 139,76; 139,05; 129,48; 128,78; 127,94; 125,60; 124,97; 105,80; 28,27; 26,89; 25,62; 25,39; 20,92

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 178

Prema općem postupku D iz spoja **166** (384 mg; 0,87 mmol) i spoja **85** (690 mg; 0,87 mmol) dobiveno je 368 mg čistog spoja **178** i 98 mg spoja **178** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 97 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1213,84 (teor. 1213,62)

IR (KBr) cm^{-1}: 3442, 2973, 2937, 2878, 2834, 2789, 1720, 1672, 1499, 1473, 1408, 1376, 1343, 1273, 1238, 1164, 1137, 1096, 1053, 1013, 1000, 976, 903, 841, 806, 760

^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,88 (d,2H); 7,44 (d,2H); 7,17 (d,2H); 7,09 (d,2H); 6,72 (s,1H); 4,98 (d,1H); 4,73 (d,1H); 4,44 (d,1H); 4,07 (m,2H); 3,66 (m,5H); 3,52 (m,2H); 3,47 (s,1H); 3,32 (s,3H); 3,20 (m,4H); 3,03 (t,2H); 2,87 (m,4H); 2,49 (m,2H); 2,37 (s,3H); 2,33 (s, 6H); 2,21 (d,1H); 2,08 (s,1H); 1,98 (s,1H); 1,88 (m,1H); 1,72 (m,3H); 1,60 (q,1H); 1,48 (m,1H); 1,37 (s,2H); 1,32 (d,4H); 1,25 (s,3H); 1,19 (m,6H); 1,07 (m,6H); 0,99 (d,2H); 0,87 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 177,35; 167,61; 144,67; 143,62; 143,11; 141,88; 139,20; 138,59; 129,21; 128,11; 127,74; 125,07; 124,87; 105,65; 102,33; 95,53; 82,54; 79,07; 77,24; 74,34; 74,06; 72,17; 70,19; 68,25; 65,46; 65,11; 63,16; 52,87; 50,13; 48,90; 45,08; 44,34; 39,98; 39,77; 36,97; 34,32; 28,29; 28,17; 26,67; 26,21; 22,39; 20,81; 20,83; 17,82; 16,01; 14,88; 10,44; 8,86; 7,04

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 179

Prema postupku D iz spoja **166** (29,5 mg; 0,067 mmol) i spoja **111** (55 mg; 0,067 mmol) dobiveno je 34 mg (41 %) čistog spoja **179**.

Čistoća, HPLC/MSUV: 90 % (UV), 77 % (MS).

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1241,8 (teor. 1241,62)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 177,15; 167,92; 165,83; 145,28; 144,29; 143,72; 142,93; 140,37; 139,59; 129,46; 128,69; 127,85; 125,08; 124,78; 105,95; 100,62; 94,53; 82,45; 80,46; 78,39; 74,78;

74,18; 71,93; 70,54; 68,52; 65,07; 64,93; 63,25; 50,13; 49,46; 45,34; 44,35; 44,08; 43,74; 39,82; 39,15; 38,24; 35,72; 29,74; 28,39; 28,17; 27,67; 26,42; 21,38; 20,84; 20,25; 17,01; 16,44; 15,18; 14,82; 1053; 8,76; 7,08

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 180

Prema postupku D iz spoja **166** (127 mg; 0,29 mmol) i spoja **89** (186 mg; 0,29 mmol) dobiveno je 41 mg (14 %) čistog spoja **180**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 98 % (MS), 97 % (UV).

HPLC/MS: MS(ES) *m/z:* $[MH]^+$ 1055,72 (teor. 1055,53)

IR (KBr) cm^{-1}: 3371, 2958, 2931, 2876, 1713, 1666, 1598, 1549, 1499, 1471, 1454, 1407, 1374, 1343, 1304, 1270, 1237, 1163, 1135, 1097, 1053, 976, 844, 807, 761, 743

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,90 (d,2H); 7,45 (d,2H); 7,17 (d,2H); 7,09 (d,2H); 6,72 (s,1H); 4,90 (s,1H); 4,53 (s,1H); 4,31 (s,1H); 3,72 (s,1H); 3,65 (m,4H); 3,29 (t,2H); 3,27 (s,2H); 2,96 (m,4H); 2,66 (m,3H); 2,38 (s,9H); 2,07 (m,2H); 1,88 (m,1H); 1,77 (d,2H); 1,60 (m,2H); 1,43 (s,3H); 1,25 (m,9H); 1,11 (s,3H); 1,05 (d,3H); 1,00 (s,3H); 0,85 (s,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 172,35; 167,61; 145,29; 143,92; 143,51; 142,53; 139,82; 139,12; 129,81; 128,70; 128,31; 125,64; 125,51; 106,25; 74,64; 70,29; 69,97; 65,60; 45,78; 44,57; 40,28; 37,13; 28,49; 21,36; 21,18; 21,14; 16,61; 15,76; 10,62; 7,98

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 181

Prema postupku D iz spoja **166** (384 mg; 0,87 mmol) i spoja **93** (414 mg; 0,87 mmol) dobiveno je 306 mg (39 %) čistog spoja **181**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99 % (UV), 92 % (MS).

HPLC/MS: MS(ES-) *m/z*: $[MH]^+$ 898,29 (teor. 898,42)

IR (KBr) cm^{-1}: 3425, 2974, 2937, 2878, 1709, 1665, 1599, 1547, 1498, 1473, 1408, 1376, 1345, 1272, 1238, 1164, 1137, 1112, 1098, 1074, 1051, 976, 898, 842, 807, 761, 744, 720, 627

^{1}H NMR (DMSO, 500 MHz) δ: 7,85 (d,2H); 7,53 (d,2H); 7,20 (m,5H); 5,05 (d,1H); 4,53 (d,1H); 4,43 (s,1H); 4,22 (s,1H); 3,91 (s,1H); 3,49 (d,1H); 3,45 (s,2H); 3,38 (m,1H); 3,32 (s,3H); 3,28 (d,1H); 2,93 (m,2H); 2,72 (s,1H); 2,50 (s,3H); 2,32 (s, 3H); 2,04 (s,1H); 1,91 (d,1H); 1,78 (m,2H); 1,63 (s,1H); 1,47 (m,1H); 1,36 (m,1H); 1,10 (s,3H); 1,08 (d,3H); 1,01 (s,3H); 0,95 (d,3H); 0,83 (t,3H); 0,75 (t,3H)

^{13}C NMR (DMSO, 500 MHz) δ: 174,85; 166,83; 145,17; 142,31; 142,01; 141,51; 140,31; 138,96; 129,35; 128,62; 127,75; 125,94; 125,16; 105,99; 81,96; 78,58; 75,59; 74,23; 73,86; 45,02; 43,26; 39,95; 38,95; 37,19; 34,55; 29,43; 27,95; 25,96; 21,64; 21,36; 20,73; 17,86; 15,39; 10,61; 7,70; 7,44

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina 182

Prema postupku D iz spoja **166** (176 mg; 0,4 mmol) i spoja **132** (350 mg; 0,4 mmol) dobiveno je 150 mg čistog spoja **182** i 58 mg spoja **182** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1284,84 (teor. 1284,65)

IR (KBr) cm^{-1}: 3426, 2973, 2939, 2878, 1720, 1686, 1598, 1500, 1473, 1408, 1376, 1343, 1272, 1238, 1164, 1137, 1096, 1051, 1014, 976, 897, 841, 806, 761, 743, 723

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,88 (d,2H); 7,45 (d,2H); 7,17 (d,2H); 7,09 (d,2H); 6,73 (s,1H); 4,99 (d,1H); 4,91 (d,1H); 4,50 (s,1H); 4,41 (d,1H); 4,09 (m,1H); 3,58 (m,3H); 3,31 (s,3H); 3,17 (m,3H); 3,02 (t,1H); 2,68 (m,2H); 2,38 (s, 6H); 2,26 (m,2H); 1,95 (s,2H); 1,80 (s,1H); 1,55 (m,6H); 1,31 (d,6H); 1,22 (m,12H); 1,08 (d,3H); 1,02 (s,3H); 0,85 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 176,98; 167,79; 145,28; 144,27; 143,75; 142,57; 139,82; 138,83; 129,81; 128,70; 128,32; 125,66; 125,48; 106,29; 103,71; 96,09; 78,55; 77,78; 75,09; 72,80; 70,55; 69,10; 67,80; 66,02; 65,58; 53,44; 49,54; 48,04; 46,67; 45,78; 45,62; 45,41; 42,34; 40,41; 39,14; 36,36; 36,26; 34,87; 31,89; 26,92; 25,86; 22,18; 17,87; 14,64; 11,32; 10,36; 9,77

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina 183

Prema postupku D iz spoja **166** (111 mg; 0,25 mmol) i spoja **118** (200 mg; 0,25 mmol) dobiveno je 42 mg čistog spoja **183** i 93 mg spoja **183** manje čistoće.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 % (MS), 97 % (UV)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1213,8 (teor. 1213,62)

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 178,12; 167,83; 146,82; 145,92; 144,56; 143,81; 141,73; 140,63; 130,67; 129,93; 128,58; 125,84; 125,17; 106,49; 101,27; 94,33; 81,45; 80,92; 78,95; 74,83; 74,26; 72,05; 70,69; 69,25; 65,73; 64,89; 63,52; 50,15; 49,46; 48,15; 45,31; 44,48; 43,13; 40,83; 39,15; 38,29; 35,64; 29,74; 27,39; 27,15; 26,14; 25,49; 20,39; 20,17; 19,48; 18,53; 16,41; 14,72; 10,53; 9,45; 7,84

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata azitromicina 184

Prema postupku D iz spoja **166** (176 mg; 0,4 mmol) i spoja **124** (328 mg; 0,4 mmol) dobiveno je 176 mg (35 %) čistog spoja **184**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1242,85 (teor. 1242,65)

IR (KBr) cm^{-1}: 3414, 2972, 2937, 2875, 1724, 1661, 1599, 1546, 1498 1464, 1378, 1345, 1273, 1238, 1165, 1133, 1109, 1052, 997, 974, 895, 840, 806, 761, 628

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,88 (d,2H); 7,46 (d,2H); 7,17 (d,2H); 7,10 (d,2H); 6,73 (s,1H); 5,07 (d,1H); 4,72 (d,1H); 4,41 (d,1H); 4,24 (s,1H); 3,62 (s,2H); 3,55 (m,4H); 3,40 (m,6H); 3,29 (s,3H); 2,96 (s,2H); 2,88 (s,2H); 2,74 (m,2H); 2,54 (m,2H); 2,40 (s,3H); 2,34 (s, 6H); 2,31 (s,2H); 1,95

(m,4H); 1,82 (m,4H); 1,34 (s,3H); 1,23 (m,15H); 1,16 (s,3H); 1,10 (m,6H); 1,02 (d,3H); 0,91 (d,3H); 0,85 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 178,25; 168,42; 144,69; 143,70; 143,19; 142,17; 142,05; 139,23; 138,12; 129,23; 128,11; 127,74; 125,06; 124,96; 106,71; 102,82; 94,71;84,46; 79,65; 77,28; 75,72; 73,73; 73,51; 73,21; 70,90; 70,30; 69,43; 68,23; 67,75; 65,82; 65,16; 64,74; 62,00; 49,03; 48,80; 47,62; 45,20; 44,80; 41,76; 41,46; 39,71; 38,06; 35,94; 35,71; 30,90; 28,74; 28,69; 26,98; 26,10; 21,38; 20,94; 20,77; 20,56; 18,35; 17,02; 15,86; 14,35; 14,06; 10,56; 8,76; 6,78

Priprava 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (185)

Prema općem postupku E iz azitromicina **37** (300 mg; 0,4 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 i CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluense, dobiveno je 177 mg spoja **185**.

Čistoća, HPLC/MS: 92 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 591,15 (teor. 591,41)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-2'-*O*-acetil-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (186)

Prema općem postupku J iz spoja **185** (500 mg; 0,847 mmol) dobiveno je 527 mg spoja **186**.

Čistoća, HPLC/MS: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 633,29 (teor. 633,42)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-6-*O*-propenoil-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicina A (187)

Spoj **186** (1 g; 1,580 mmol) je otopljen u suhom toluenu te je u reakcijsku smjesu dodan trietilamin (0,151 mL; 1,578 mmol) i 3-klorpropionil-klorid (0,29 mL; 0,3 mmol). Nakon 15 minuta miješanja dodane su dodatne količine trietilamina (0,151 mL; 1,578 mmol) i 3-klorpropionil-klorida (29 µL; 0,3 mmol) te je nastavljeno miješanje reakcijske smjese naredna 3 sata na sobnoj temperaturi. Prema TLC (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH, 90:9:1.5) vidljivo da je nastao novi produkt, ali polazni spoj **186** nije u potpunosti izreagirao, te je reakcijska smjesa podijeljena u dva dijela (po 31 mL) te je nastavljena na dva načina:

Dio A:

U reakcijsku je smjesu dodana zasićena otopina $NaHCO_3$, slojevi su odijeljeni, organski sloj je ispran s vodom, posušen iznad Na_2SO_4 i uparen do suha. Potom je sirovi produkt otopljen u MeOH (20 mL) te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi 20 sati. MeOH je uparen, a sirovi je ostatak pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens. Dobiveno je 280 mg spoja **187**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1) = 0,28

Čistoća, HPLC/MS: 92,77 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 645,65 (teor. 645,42); $[(M+2H)^{2+}]$ 323,48 (teor. 323,21)

IR (KBr) cm^{-1}: 3478, 2974, 2939, 2878, 2850, 2790, 1716, 1637, 1618, 1459, 1403, 1380, 1351, 1300, 1277, 1200, 1173, 1111, 1073, 1049, 986, 956, 936, 910, 862, 835, 810, 756, 701, 665, 638

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 176,05, 165,88, 130,64, 130,27, 102,69, 87,08,~80, 78,74, 77,30, 75,44, 74,73, 71,01, 68,64, 65,23, 61,40, 44,65, 40,99, 38,17, 37,36, 31,17, 27,52, 21,93, 21,75, 21,67, 18,40, 16,75, 11,07, 9,19, 7,98

Dio B:

U reakcijsku su smjesu dodane dodatne koičine Et_3N (0,661 mL) i 3-klorpropionil-klorida (0,151 mL), reakcijska je smjesa miješana preko noći te je provedeno čišćenje kako je objašnjeno u dijelu A. Polazni spoj **186** je u potpunosti izreagirao, ali je osim 151 mg spoja **187** (MH^+ = 645,23, čistoća, HPLC/MS 95,50 %) dobiveno i 250 g drugog produkta (čistoća, HPLC/MS 87,99 %), koji prema HPLC/MS odgovara spoju s dva akriloilna lanca (MH^+ = 699,26).

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-azitromicina 188

Prema općem postupku K iz spoja **187** (100 mg; 0,155 mmol) i spoja **177** (158 mg; 0,310 mmol), te nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz $CHCl_3$:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens, dobiveno je 40 mg (22,28 %) spoja **188**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 6:1:0,1) = 0,14

Čistoća, HPLC/MS-UV: 89,66 % (UV), 82,97 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1153,42 (teor. 1153,60); $[(M+2H)^{2+}]$ 577,52 (teor. 577,30)

IR (KBr) cm^{-1}: 3442, 2974, 2936, 2868, 1736, 1597, 1498, 1471, 1406, 1375, 1271, 1237, 1164, 1136, 1096, 1078, 1041, 976, 841, 806, 758, 719, 633

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 189

Prema općem postupku O iz spoja **138** (220 mg, 0,5 mmol) i spoja **172** (360 mg; smjesa), te nakon čišćenja sirovog produkta kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1.5 kao eluens, dobiveno je 24 mg čistog spoja **189** i 27 mg spoja **189** u smjesi.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 94 % (UV), 77 % (MS).

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 927,64 (teor. 927,41)

IR (KBr) cm^{-1}: 3416, 2973, 2934, 2880, 1660, 1599, 1546, 1498, 1471, 1376, 1339, 1272, 1238, 1163, 1134, 1097, 974, 843, 808, 761, 740, 703, 615

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO) δ: 177,42; 168,97; 151,42; 145,82; 144,72; 143,64; 142,71; 139,83; 138,39; 129,73; 128,64; 128,51; 126,43; 125,84; 105,75; 81,32; 80,16; 78,55; 73,64; 72,81; 71,94;

54,35; 46,78; 45,07; 44,62; 42,41; 40,34; 39,57; 31,83; 25,96; 22,73; 20,43; 17,88; 14,43; 10,73; 9,32; 7,44; 7,53

Priprava 9-deokso-9a-aza-9a-(3-karboksipropil)-9a-homoeritromicin A (190)

Prema općem postupku T iz spoja **81** (1,7 g; 2 mmol) dobiveno je 1,6 g (98 %) čistog spoja **190**.

Čistoća, HPLC/MS: 95 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 807,67 (teor. 807,51)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 2974, 2938, 2878, 2835, 1721, 1574, 1461, 1405, 1379, 1352, 1319, 1267, 1167, 1112, 1054, 1012, 956, 897, 865, 835, 805, 776, 729, 672

Priprava 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-karboksipropil)-9a-homoeritromicin A (191)

Spoj **81** (1 g; 1.22 mmol) je otopljen u THF-u (7 mL) te je dodana otopina $LiOH \cdot H_2O$ (100 mg; 2,4 mmol) u destiliranoj vodi (7 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 10 minuta. U reakcijsku je smjesu potom dodana 0.1 M HCl (8 mL) i voda (10 mL), te je nastavljeno miješanje reakcijske smjese na sobnoj temperaturi još 2 sata. THF je uparen, a ostatak je zalužen s NaOH na pH 12. Smjesa je ekstrahirana s CH_2Cl_2 (2 x 20 mL) uz dodatak NaCl. Organski su slojevi spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4, profiltrirani i upareni do suha. Dobiveno je 730 mg sirovog produkta koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 680 mg (88 %) čistog produkta **191**.

Čistoća, HPLC/MS: 98 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 649.56 (teor. 649.42)

IR (KBr) cm^{-1}: 3433, 2975, 2937, 2879, 1723, 1582, 1463, 1382, 1352, 1324, 1267, 1171, 1111, 1075, 1052, 1006, 958, 898, 865, 835, 754, 671

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 175,16; 173,83; 102,92; 76,31; 75,93; 75,67; 74,39; 73,53; 70,09; 68,14; 64,49; 43,61; 40,22; 40,18; 38,52; 36,21; 32,85; 30,33; 28,46; 26,26; 21,44; 21,29; 20,98; 17,82; 15,86; 10,59; 8,20

Priprava konjugata celekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 192

Prema općem postupku D iz spoja **190** (234 mg; 0,29 mmol) i celekoksiba (**27**) (110 mg; 0,29 mmol) dobiven je sirovi produkt koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 81 mg produkta **192** u kojem je prisutno oko 60 % 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**). 9-Deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) se niti ponovnim čišćenjem kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens nije mogao ukloniti. Nakon toga je pokušano čišćenjem kromatografijom na stupcu (kolona punjena sephadeksom) uz $CHCl_3$ kao eluens, ali se niti na taj način nije uspio ukloniti prisutan 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**).

Čistoća, HPLC/MS-UV: 40 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1170,68 (teor. 1170,58)

735,69 (teor. 735,49 = spoj **55**)

Priprava konjugata celekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 193

Prema općem postupku D iz spoja **191** (188 mg; 0,29 mmol) i celekoksiba (**27**) (110 mg; 0,29 mmol) dobiven je sirovi produkt koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 kao eluens. Dobiveno je 44 mg produkta **193** u kojem je prisutno oko 70 % spoja **87**. Spoj **87** se niti ponovnim čišćenjem kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens nije mogao ukloniti.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 30 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1012,58 (teor.: 1012,49)

735,69 (teor. 735,49 =spoj **87**)

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 194

Prema općem postupku D iz spoja **190** (242 mg; 0,3 mmol) i spoja **177** (153 mg; 0,3 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 6:1:0,1 i CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluense, dobiveno je 57 mg (15 %) čistog spoja **194**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 94 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1297,38 (teor. 1297,68)

IR (KBr) cm^{-1}: 3433, 2972, 2935, 1726, 1655, 1648, 1597, 1561, 1499, 1472, 1376, 1271, 1237, 1164, 1136, 1086, 1055, 1012, 977, 897, 841, 805, 758, 615

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 184,83; 178,23; 177,24; 176,42; 146,35; 145,57; 141,73; 139,67; 139,13; 129,64; 128,78; 127,34; 126,93; 124,47; 105,69; 103,21; 96,51; 80,42; 79,81; 78,29; 75,33; 74,94; 74,36; 73,09; 71,27; 69,32; 64,95; 64,37; 49,73; 45,84; 41,72; 35,54; 29,85; 29,32; 27,43; 25,16; 24,46; 23,22; 22,18; 21,55; 21,04; 20,64; 18,27; 17,45; 16,73; 15,48; 10,53; 9,84; 8,49

Priprava metil-*N*-(*terc*-butoksikarbonil)-*N*-((4-(5-metil-3-fenilizoksazol-4-il)fenil)sulfonil)glicinata (195)

Prema općem postupku S iz valdekoksiba (**32**) (800 mg; 2,54 mmol), DMAP (155 mg; 1,27 mmol), di-*terc*-butil-dikarbonata (1,82 mL; 7,63 mmol) i TEA (0,42 mL; 3,04 mmol), metil-bromacetata (0,59 mL; 6,35 mmol) i K_2CO_3 (720 mg; 5,08 mmol) dobiveno je 990 mg (80 %) čistog spoja **195**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 487,32 (teor.: 487,15)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 3096, 3072, 3004, 2985, 2933, 1759, 1746, 1624, 1593, 1561, 1499, 1466, 1448, 1424, 1397, 1353, 1319, 1288, 1223, 1176, 1143, 1087, 1029, 1015, 979, 962, 937, 907, 850, 808, 778, 763, 743, 701, 658, 646

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 8,04 (d,2H); 7,43 (m,7H); 4,60 (s,2H); 3,71 (s,3H); 2,48 (s,3H); 1,23 (s,9H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 169,07; 168,06; 160,49; 149,93; 138,53; 135,60; 130,23; 129,98; 128,37; 128,31; 114,16; 84,90; 52,46; 46,82; 27,38; 11,51

Priprava metil-*N*-((4-(5-metil-3-fenilizoksazol-4-il)fenil)sulfonil)glicinata (196)

Prema općem postupku R iz spoja **195** (930 mg; 1,9 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1.5 kao eluens, dobiveno je 712 mg (97 %) čistog spoja **196**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 387,35 (teor. 387,09)

IR (KBr) cm^{-1}: 3449, 3300, 3068, 2959, 2920, 2854, 1931, 1759, 1736, 1658, 1626, 1596, 1566, 1546, 1495, 1464, 1439, 1414, 1394, 1368, 1340, 1302, 1281, 1243, 1215, 1167, 1136, 1093, 1028, 1014, 977, 960, 914, 834, 779, 744, 725, 698, 654

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,80 (d,2H); 7,41 (m,7H); 3,77 (s,2H); 3,51 (s,3H); 2,47 (s,3H).

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ : 185,49; 169,50; 167,83; 160,74; 140,01; 134,05; 130,29; 129,93; 128,98; 128,44; 128,31; 127,03; 114,30; 51,88; 43,87; 11,50

Priprava *N*-((4-(5-metil-3-fenilizoksazol-4-il)fenil)sulfonil)glicina (197)

Prema općem postupku T iz spoja **196** (650 mg; 1,68 mmol) dobiveno je 600 mg (96 %) čistog spoja **197**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 373,30 (teor. 373,08)

IR (KBr) cm^{-1}: 3324, 2972, 2922, 2701, 2636, 2585, 2518, 1930, 1745, 1626, 1596, 1578, 1497, 1468, 1446, 1422, 1397, 1377, 1336, 1308, 1280, 1242, 1204, 1184, 1167, 1114, 1093, 1028, 1014, 1001, 968, 922, 877, 834, 783, 758, 746, 730, 714, 670

^{1}H NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 7,81 (d,2H); 7,41 (m,7H); 3,60 (s,2H); 2,49 (s,3H)

^{13}C NMR (DMSO, 300 MHz) δ: 170,37; 167,80; 160,73; 140,12; 133,95; 130,24; 129,92; 128,99; 128,43; 128,30; 127,03; 114,30; 43,97; 11,52

Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 198

Prema općem postupku D iz spoja **197** (112 mg; 0,3 mmol) i spoja **85** (230 mg; 0,3 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens, dobiveno je 266 mg (77 %) čistog spoja **198**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1147,19 (teor. 1146,62)

IR (KBr) cm^{-1}: 3423, 2972, 2937, 2878, 2833, 2789, 1720, 1671, 1619, 1597, 1545, 1459, 1421, 1377, 1336, 1282, 1244, 1165, 1109, 1094, 1075, 1053, 1013, 1000, 962, 902, 839, 806, 775, 757, 745, 728, 698, 655

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,89 (d,2H); 7,39 (m,4H); 7,30 (d,2H); 7,26 (s,1H); 5,00 (d,1H); 4,45 (d,1H); 4,15 (m,2H); 3,73 (s,3H); 3,66 (d,2H); 3,57 (m,3H); 3,32 (s,3H); 3,25 (s,3H); 3,02 (t,2H); 2,86 (s,2H); 2,49 (s,3H); 2,36 (s,6H); 2,21 (d,2H);1,90 (m,6H); 1,54 (m,3H);1,39 (s,3H); 1,34 (d,3H); 1,25 (s,3H); 1,22 (t,6H); 1,08 (m,3H); 1,01 (d,3H); 0,87 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 167,32; 161,11; 138,80; 135,20; 130,27; 129,72; 128,76; 128,47; 127,65; 114,55; 102,95; 96,21; 79,51; 77,79; 74,99; 74,69; 72,77; 70,72; 68,83; 66,14; 65,73; 49,49; 45,79; 43,46; 40,39; 34,91; 22,87; 21,48; 21,36; 21,19; 18,36; 16,71; 15,45; 11,79; 11,02

Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A spoja 199

Prema općem postupku D iz spoja **197** (75 mg; 0,2 mmol) i spoja **93** (95 mg; 0,2 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens, dobiveno je 85 mg (51 %) čistog spoja **199**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 832,30 (teor. 832,41)

IR (KBr) cm^{-1}: 3423, 2973, 2935, 2877, 1719, 1655, 1550, 1459, 1420, 1396, 1376, 1341, 1280, 1243, 1163, 1094, 1053, 1014, 962, 903, 842, 775, 745, 728, 698, 656

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,90 (d,2H); 7,39 (m,4H); 7,30 (d,2H); 7,27 (s,1H); 3,85 (s,2H); 3,69 (s,3H); 3,57 (s,2H); 3,24 (m,3H); 3,14 (s,2H); 2,93 (m,3H); 2,64 (m,2H); 2,48 (s,3H); 2,04 (m,2H); 1,88 (m,2H); 1,57 (m,3H); 1,39 (m,2H); 1,31 (s,3H); 1,23 (m,3H); 1,21 (s,2H); 1,13 (s,3H);1,01 (d,3H); 0,97 (d,3H); 0,82 (t,3H)

^{13}C NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 185,84; 176,73; 169,00; 167,38; 161,08; 138,40; 135,37; 130,33; 129,74; 128,76; 128,46; 128,41; 127,62; 114,45; 83,23; 79,85; 74,72; 74,43; 50,89; 45,75; 43,87; 37,36; 34,82; 29,63; 27,84; 27,13; 25,42; 21,67; 21,42; 16,65; 15,30; 11,80; 10,58; 7,61; 7,24

Priprava konjugata derivata valdekoksiba i derivata 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicina A 200

Spoj **198** (113 mg: 0,1 mmol) otopljen je u destiliranoj vodi (5 mL) i konc. HCl (1 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 2 sata. Dodan je CH_2Cl_2 (10 mL) te je nakon mučkanja odijeljen sloj CH_2Cl_2. Vodeni je sloj zalužen do pH 7-8 i ekstrahiran je s CH_2Cl_2 (2x10 mL). Vodeni je sloj zalužen s NaOH do pH 9 i do pH 10 i oba je puta ekstrahiran s CH_2Cl_2 (2x10 mL). Organski su slojevi pri pH 7-8, 9 i 10 spojeni, posušeni iznad bezvodnog Na_2SO_4 i upareni do suha. Dobiveno je 80 mg (81 %) čistog produkta **200**.

Čistoća, HPLC/MS-UV: 93 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 988,84 (teor. 988,52)

IR (KBr) cm^{-1}: 3448, 2971, 2938, 2878, 1708, 1597, 1545, 1459, 1420, 1378, 1342, 1262, 1165, 1109, 1096, 1074, 1050, 979, 958, 932, 902, 862, 839, 802, 776, 745, 728, 698, 654

^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 7,87 (d,2H); 7,39 (m,4H); 7,32 (d,2H); 7,27 (s,1H); 4,85 (d,1H); 4,40 (d,1H); 4,18 (m,1H); 3,69 (m,2H); 3,66 (s,2H); 3,61 (m,2H); 3,20 (m,3H); 2,83 (s,2H); 2,62 (m,2H); 2,53 (m,2H); 2,47 (s,3H); 2,26 (s,6H); 1,87 (m,3H); 1,62 (m,2H); 1,53 (m,3H); 1,35 (s,3H); 1,25 (m,9H); 1,15 (s,3H); 1,09 (s,2H); 1,03 (d,3H); 0,94 (d,3H); 0,86 (t,3H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ: 167,34; 161,12; 138,60; 135,44; 130,36; 129,76; 128,78; 128,48; 127,58; 114,48; 106,40; 74,61; 74,33; 70,19; 65,53; 45,93; 44,71; 40,24; 37,47; 28,10; 21,17; 21,14; 18,31; 16,49; 15,91; 11,80; 10,76; 7,87; 1,02

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata klaritromicina 201

Prema općem postupku D iz spoja **166** (70 mg; 0,159 mmol) i spoja **145** (126 mg; 0,159 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH 90:8:1 ko eluens, dobiveno je 92 mg čistog spoja **201** i 62 mg manje spoja **201**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5) = 0,49

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96,61 % (UV) i 87,90 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1212,80 (teor. 1212,59)

IR (KBr) cm^{-1}: 3444, 2973, 2939, 2881, 2834, 1732, 1681, 1598, 1538, 1499, 1471, 1409, 1377, 1345, 1271, 1238, 1166, 1132, 1110, 1054, 1010, 976, 935, 903, 892, 843, 806, 759, 723, 697, 666, 616

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 220,76, 175,60, 145,32, 144,27, 143,96, 139,89, 138,95, 129,83, 128,69, 128,31, 125,62, 125,47, 106,34, 96,13, 81,68, 78,63, 78,21, 77,61, 74,24, 72,96, 69,16, 66,32, 50,56, 49,39, 45,76, 45,12, 45,03, 39,20, 38,81, 35,01, 24,70, 21,45, 21,34, 21,12, 21,08, 19,78, 18,65, 17,96, 16,09, 15,93, 12,31, 10,60, 9,71

Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata eritromicin A oksima 202

Prema općem postupku D iz spoja **166** (78 mg; 0,177 mmol) i spoja **155** (150 mg, 0,178 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluens, dobiveno je 100 mg čistog spoja **202** i 35 mg spoja **202** u smjesi.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5) = 0,41

Čistoća, HPLC/MS-UV: 96,77 % (UV), 92,07 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1269,76 (teor. 1269,65); $[(M+2H)^{2+}]$ 635,77 (teor. 635,32)

IR (KBr) cm^{-1}: 3429, 2973, 2937, 2877, 2788, 1735, 1672, 1598, 1544, 1499, 1471, 1408, 1376, 1344, 1273, 1238, 1165, 1136, 1095, 1053, 1013, 976, 956, 894, 841, 806, 761, 727, 698

^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 175,91, 170,99, 167,55, 145,25, 142,69, 139,85, 138,71, 129,82, 128,71, 128,30, 125,70, 125,47, 106,35, 102,39, 96,20, 83,48, 79,71, 77,80,75,39, 74,16, 73,36, 72,87,

70,96, 70,76, 68,29, 65,81, 65,67, 49,46, 45,63, 44,79, 40,49, 39,33, 38,89, 37,65, 35,02, 32,89, 28,87, 28,41, 27,02, 26,37, 25,76, 25,12, 21,45, 21,35, 21,23, 21,07, 18,71, 18,49, 16,28, 14,54, 10,72, 9,38

Priprava konjugata derivata celekoksiba i 9(*S*)-eritromicilamina 204

Prema općem postupku D iz spoja **166** (120 mg; 0,272 mmol) i spoja **203** (200 mg; 0,272 mmol), nakon čišćenja kromatografijom na stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 i CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5 kao eluense, dobiveno je 109 mg (34,59 %) spoja **204**.

R_f (CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:9:1,5) = 0,43

Čistoća, HPLC/MS-UV: 99,21 % (UV), 94,10 % (MS)

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1156,59 (teor. 1156,56)

IR (KBr) cm^{-1}: 3477, 2975, 2938, 2881, 2834, 2788, 1735, 1676, 1618, 1599, 1529, 1500, 1472, 1457, 1408, 1376, 1342, 1273, 1238, 1164, 1136, 1110, 1095, 1054, 1015, 976, 957, 901, 841, 806, 761, 744, 722, 693

Priprava 3-*O*-dekladinozil-klaritromicin (205)

Klaritromicin **36** (3,0 g; mmol) je otopljen u 10 %-tnoj otopini HCl te je reakcijska smjesa miješana na sobnoj temperaturi 4 sata. Dodana je zasićena otopina NaCl i pH je prilgođen (podešen) na 8 s NH_4OH. Nakon ekstrakcije s EtOAc, organski su slojevi posušeni iznad K_2CO_3i upareni do suha. Dobiveno je 2,077 g spoja **205**, koji je korišten za sljedeći korak sinteze bez prethodnog čišćenja.

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 590,29 (teor. 590,38)

Priprava 3-*O*-dekladinozil-2'-*O*-acetil-klaritromicin (206)

Prema općem postupku H iz spoja **205** (2,077 g) dobiveno je 2,288 g spoja **206**.

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 632,50 (teor. 632,39)

Priprava 3-dehidro-3-okso-2'-*O*-acetil-klaritromicina (207)

Spoj **206** (2,2 g; 3, 486 mmol) je otopljen u suhom CH_2Cl_2 (25 mL) u tikvicu propuhanu argonom. Zatim je dodan DMSO (2,465 mL) i EDC·HCl (4,2 g; 2,397mmol). Potom je polako dodana otopina piridintrifluoroacetata (2,052 g; 10,458 mmol) u CH_2Cl_2 (3 mL). Reakcijska je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 4 sata. Nakon toga je dodana voda (290 mL). Nakon 10 minuta miješanja otopina je izlivena u CH_2Cl_2 (100 mL), slojevi su odijeljeni, organski je sloj ispran vodom, posušen iznad K_2CO_3 i uparen do suha. Sirovi je produkt (žuta pjena) potom pročišćen kromatografijom na stupcu uz diizopropileter:trietilamin 90:10 kao eluens. Dobiveno je 605 mg spoja **207** te 450 mg spoja kojem je skinuta acetilna zaštita na položaju 2'.

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 630,41 (teor. 630,38)

Čistoća, HPLC/MS: 85,3 %

HPLC/MS: MS(ES) *m/z:* $[MH]^+$ 588,28 (teor. 588,37) - spoj bez acetilne zaštite

Čistoća, HPLC/MS: 75,3 %

Priprava 2'-*O*-acetil-10,11-anhidro-12-(imidazol-1-karboniloksi)-3-*O*-dekladinozil-3-okso-klaritromicin (208)

Prema općem postupku R iz spoja **207** (464 mg) dobiveno je 354 mg spoja **208**.

HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 706,22 (teor. 706,38)

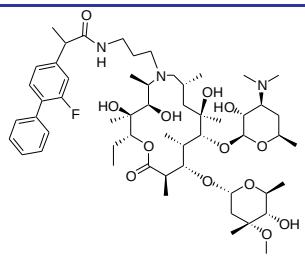
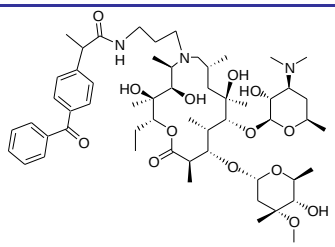
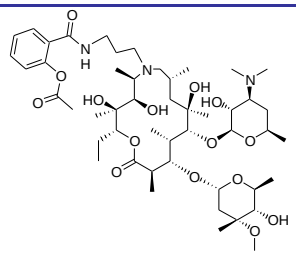
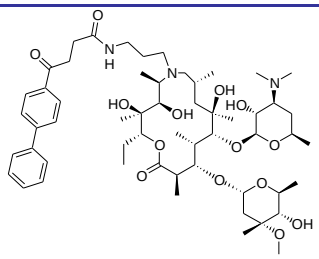
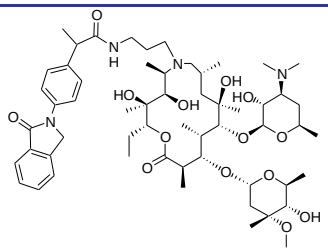
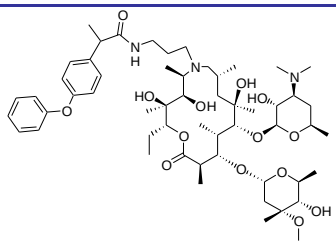
Priprava konjugata derivata celekoksiba i derivata ketolida 209

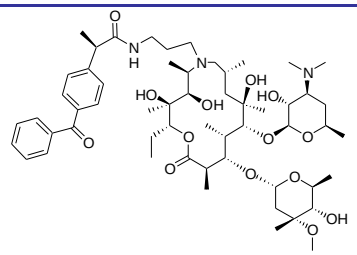
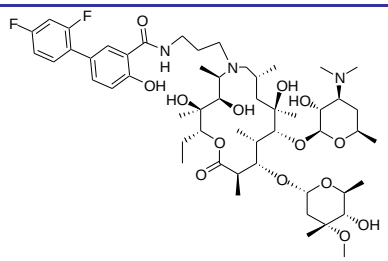
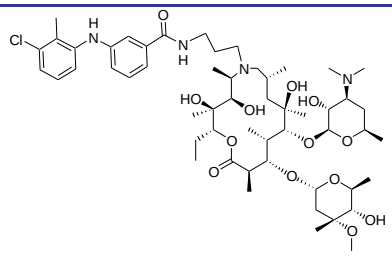
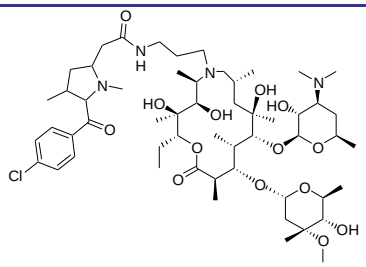
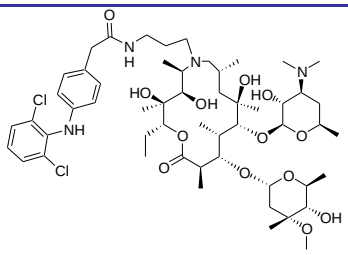
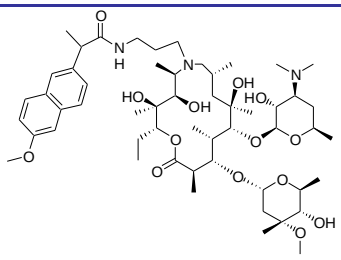
U MeOH (5 mL) otopljen je spoj **208** (116 mg; 0,164 mmol) te je u otopinu dodan spoj **174** (172 mg; 0,328 mmol). Reakcijska je smjesa miješana na 55 °C 3 dana, otapalo je upareno. Sirovi je produkt potom pročišćen kromatografijom n stupcu uz CH_2Cl_2:CH_3OH:NH_4OH 90:8:1 kao eluens. Dobiveno je 19 mg spoja **209**.

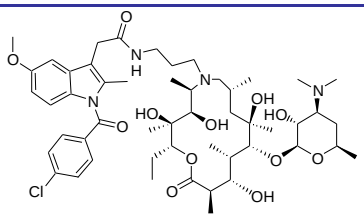
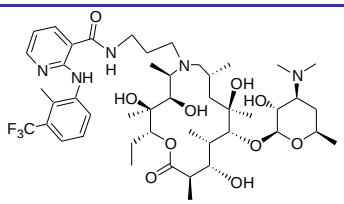
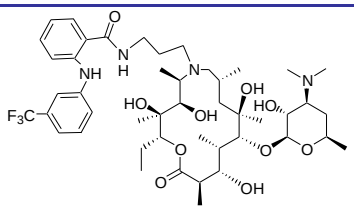
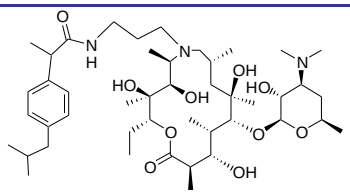
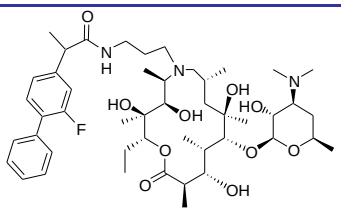
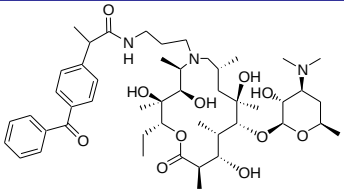
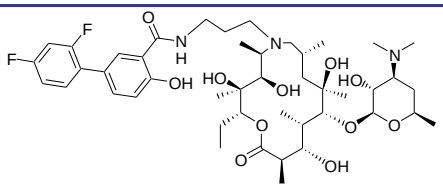
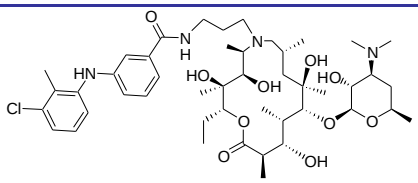
HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1119,65 (teor. 1119,52)

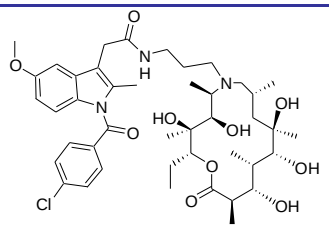
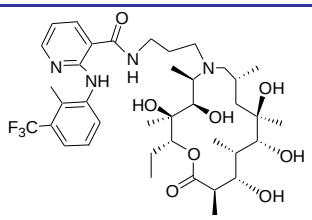
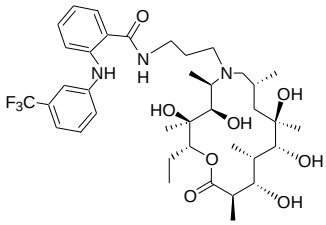
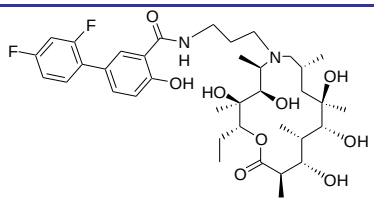
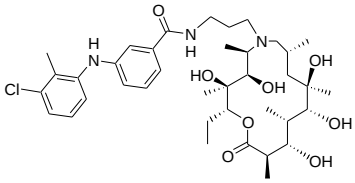
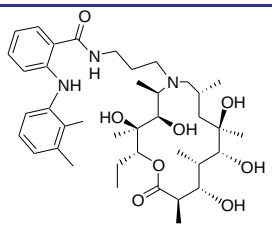
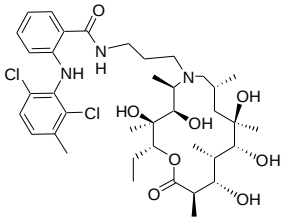
Tablica 5. Sintetizirani konjugati NSAID-a i makrolida

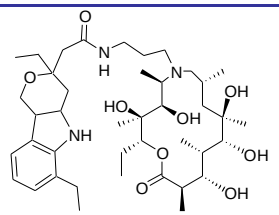
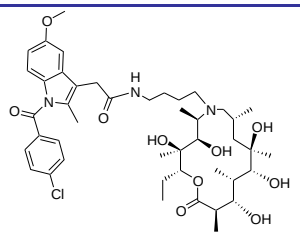
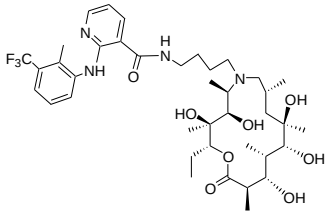
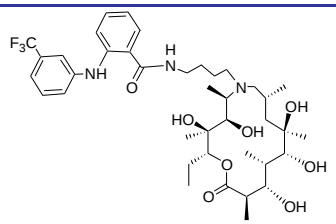
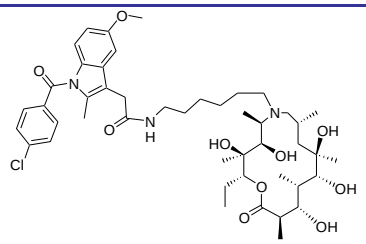
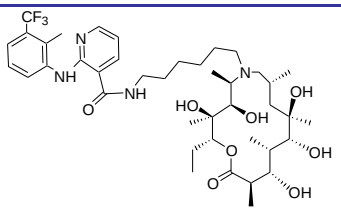
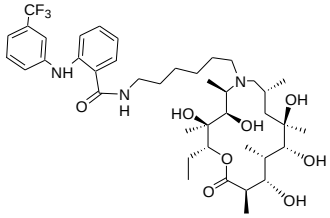
Konjugat		NSAID	Makrolid
Spoj	Struktura		
83a		indometacin (**2**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-hidroksipropil)-9a-homoeritromicin A (**82**)
83b		S-(+)-ibuprofen (**4a**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-hidroksipropil)-9a-homoeritromicin A (**82**)
83c		flurbiprofen (**15**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-hidroksipropil)-9a-homoeritromicin A (**82**)
86a		indometacin (**2**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86b		flufenamska kiselina (**74**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86c		*S*-(+)ibuprofen (**4a**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)

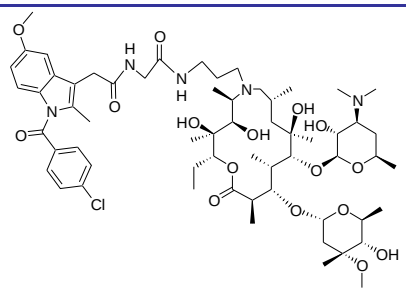
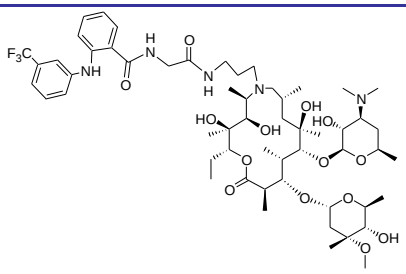
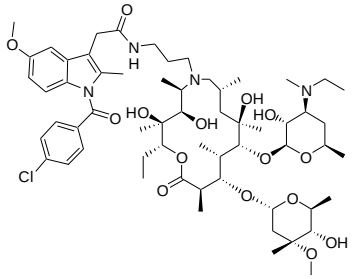
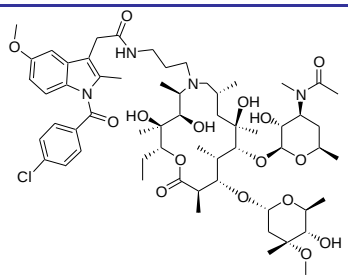
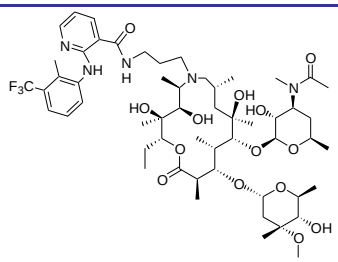
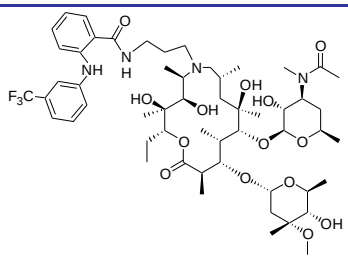
86d		flurbiprofen (**15**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86e		ketoprofen (**11**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86f		acetilsalicilna kiselina (**1**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86g		fenbufen (**13**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86h		indoprofen (**16**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86i		fenoprofen (**14**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)

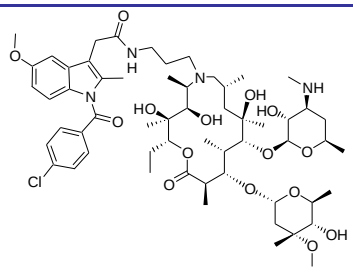
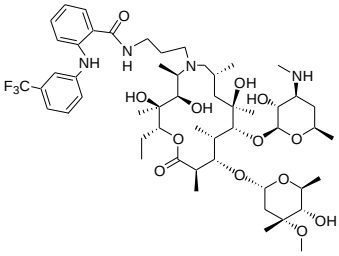
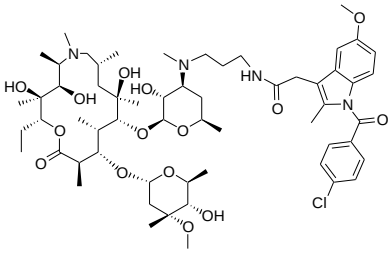
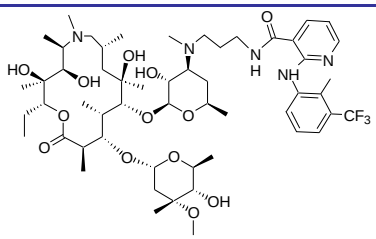
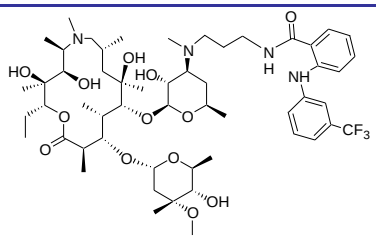
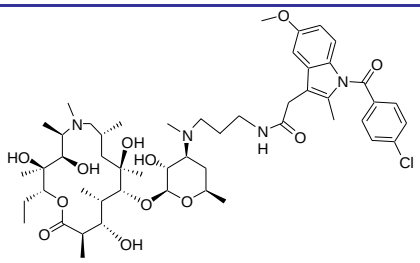
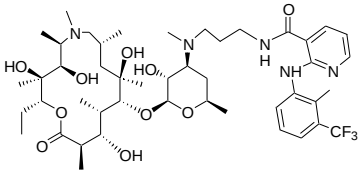
86j		S-(+)-ketoprofen (**11a**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86k		diflunisal (**5**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86l		tolfenamska kiselina (**21**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86m		zomepirak (**80**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86n		diklofenak (**7**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
86o		naproksen (**12**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)

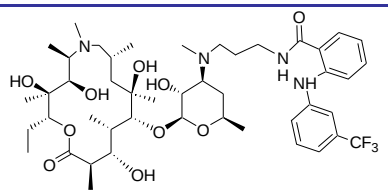
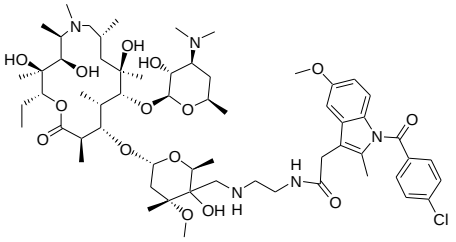
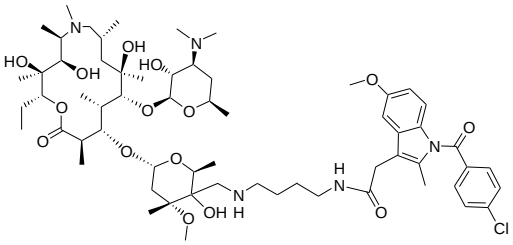
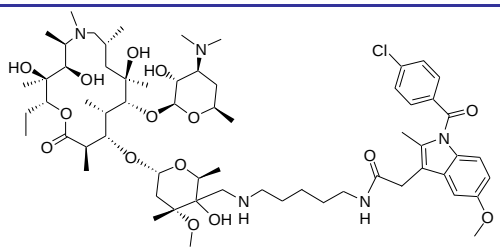
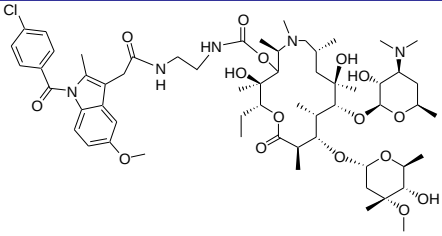
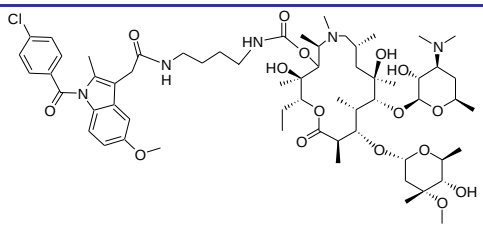
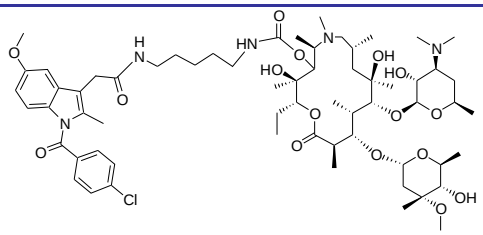
90a		indometacin (**2**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90b		fluniksin (**73**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90c		flufenamska kiselina (**74**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90d		ibuprofen (**4**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90e		flurbiprofen (**15**)	3- *O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90f		ketoprofen (**11**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90g		diflunisal (**5**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
90h		tolfenamska kiselina (**21**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)

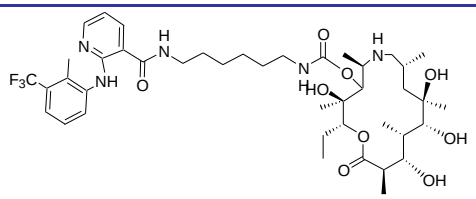
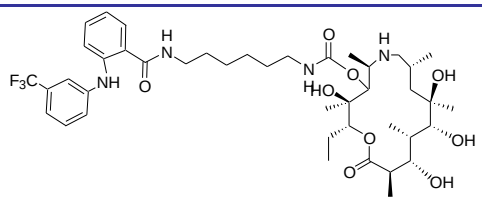
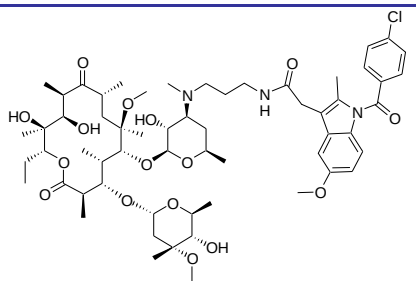
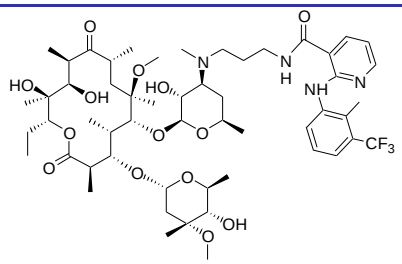
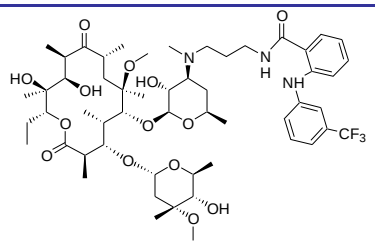
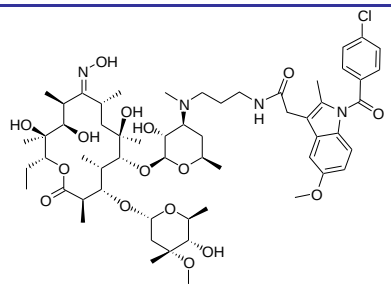
94a		indometacin (**2**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
94b		fluniksin (**73**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
94c		flufenamska kiselina (**74**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
94d		diflunisal (**5**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
94e		tolfenamska kiselina (**21**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
94f		mefenamska kiselina (**18**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
94g		meklofenamska kiselina (**20**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)

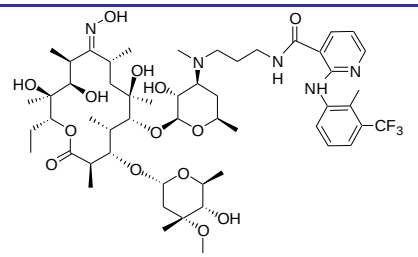
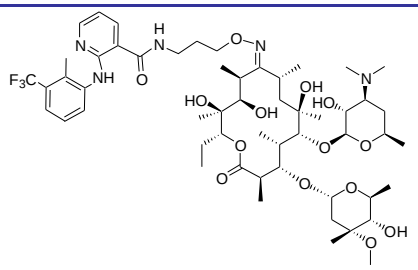
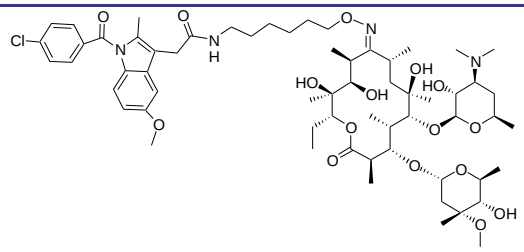
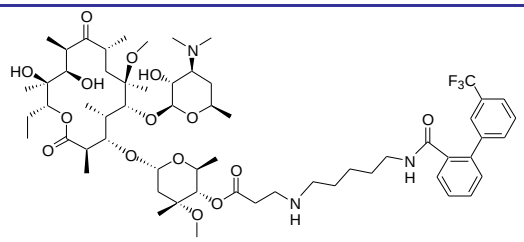
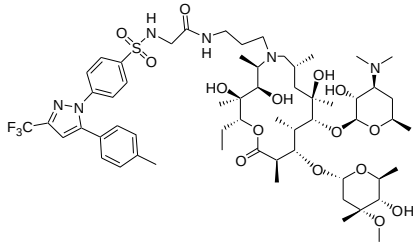
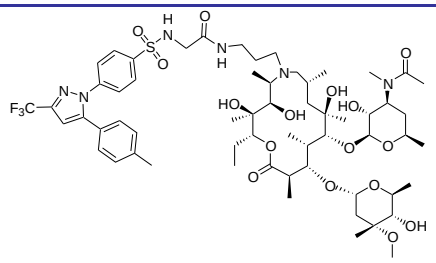
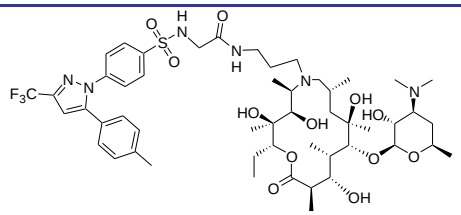
94h		etodolak (**8**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**93**)
98a		indometacin (**2**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(4-aminobutil)-9a-homoeritromicin A (**97**)
98b		fluniksin (**73**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(4-aminobutil)-9a-homoeritromicin A (**97**)
98c		flufenamska kiselina (**74**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(4-aminobutil)-9a-homoeritromicin A (**97**)
102a		indometacin (**2**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(6-aminoheksil)-9a-homoeritromicin A (**101**)
102b		fluniksin (**73**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(6-aminoheksil)-9a-homoeritromicin A (**101**)
102c		flufenamska kiselina (**74**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(6-aminoheksil)-9a-homoeritromicin A (**101**)

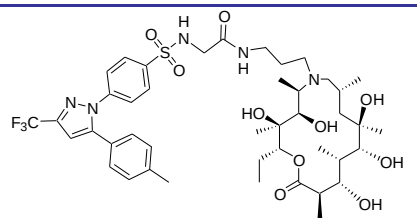
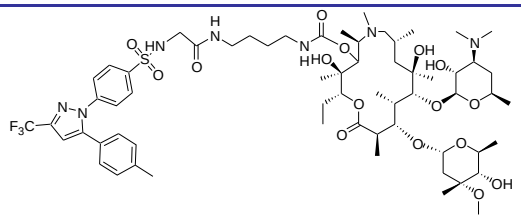
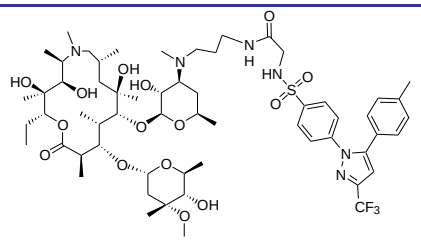
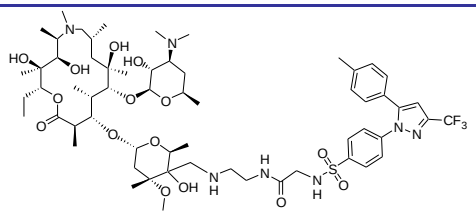
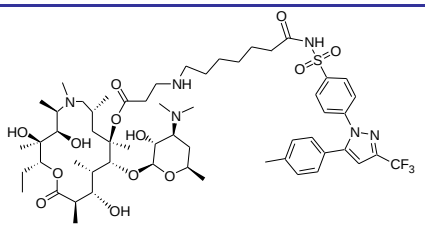
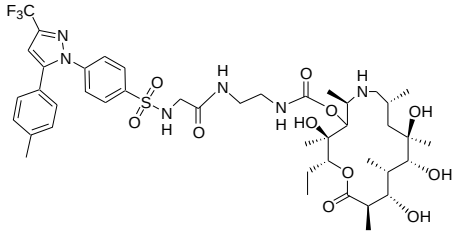
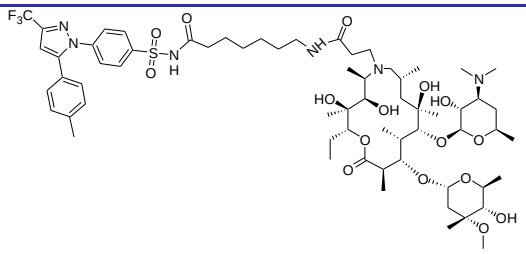
106a		indometacin (**2**)	9-deokso-9a-aza-9a-[3-(2-amino-acetilamino)-propil]-9a-homoeritromicin A (**105**)
106b		flufenamska kiselina (**74**)	9-deokso-9a-aza-9a-[3-(2-amino-acetilamino)-propil]-9a-homoeritromicin A (**105**)
112		indometacin (**2**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-etil- 9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**110**)
113a		indometacin (**2**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil – 9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**111**)
113b		fluniksin (**73**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil – 9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**111**)
113c		flufenamska kiselina (**74**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil – 9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**111**)

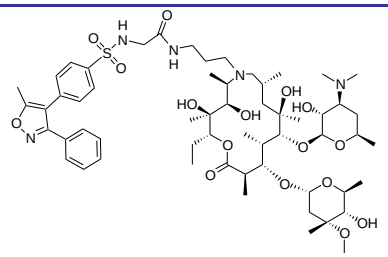
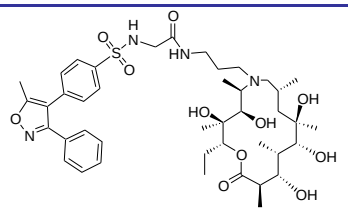
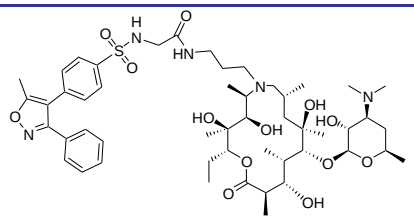
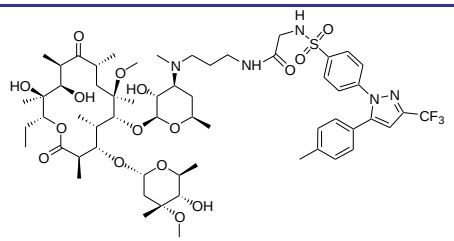
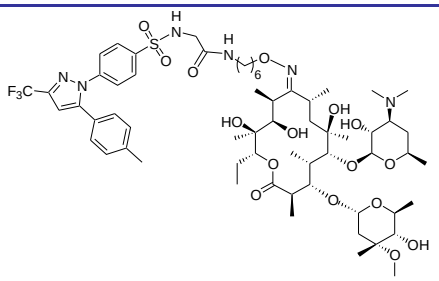
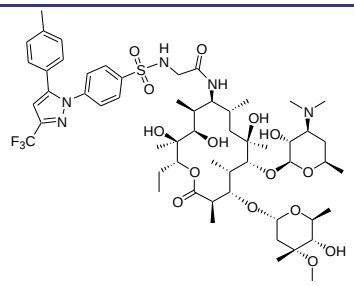
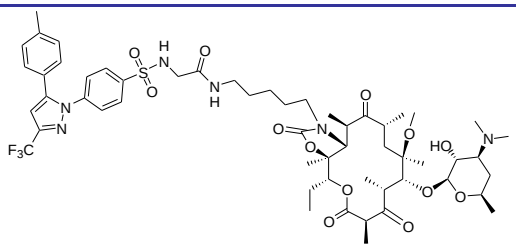
115a		indometacin (**2**)	3'-*N*-demetil – 9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**114**)
115b		flufenamska kiselina (**74**)	3'-*N*-demetil – 9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**114**)
119a		indometacin (**2**)	3'-*N*-demetil-3'-N-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**118**)
119b		fluniksin (**73**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**118**)
119c		flufenamska kiselina (**74**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**118**)
120a		indometacin (**2**)	3-*O*-dekladinozil-3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A
120b		fluniksin (**73**)	3-*O*-dekladinozil-3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A

120c		flufenamska kiselina (**74**)	3-*O*-dekladinozil-3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A
127		indometacin (**2**)	4"-(*N*-(2-aminoetil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**124**)
128		indometacin (**2**)	4"-(*N*-(4-aminobutil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**125**)
129		indometacin (**2**)	4"-(*N*-(5-aminopentil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**126**)
134		indometacin (**2**)	9-deokso-9a-aza-11-(2-amino-etilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**131**)
135		indometacin (**2**)	9-deokso-9a-aza-11-(4-amino-butilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a- homoeritromicin A (**132**)
136		indometacin (**2**)	9-deokso-9a-aza-11-(5-amino-pentilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a- homoeritromicin A (**133**)

142a		derivat fluniksina (**141a**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A 11,12 ciklički karbonat (**138**)
142b		derivat flufenamske kiseline (**141b**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A 11,12 ciklički karbonat (**138**)
146a		indometacin (**2**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-klaritromicin (**145**)
146b		fluniksin (**73**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-klaritromicin (**145**)
146c		flufenamska kiselina (**74**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-klaritromicin (**145**)
150a		indometacin (**2**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-eritromicin A oksim (**149**)

150b		fluniksin (**73**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-eritromicin A oksim (**149**)
157		fluniksin (**73**)	9(E)-*O*-(3-aminopropil)-eritromicin A oksim (**154**)
158		indometacin (**2**)	9(E)-*O*-(6-aminoheksil)-eritromicin A oksim (**155**)
163		derivat flufenamske kiseline (**161**)	4''-*O*-propenoil-klaritromicin (**162**)
178		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
179		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-acetil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**111**)
180		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)

181		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil) 9a-homoeritromicin A (**93**)
182		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	9-deokso-9a-aza-11-(4-amino-butilkarbamoiloksi)-9a-metil-9a- homoeritromicin A (**132**)
183		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)- 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**118**)
184		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	4"-(*N*-(2-aminoetil)-aminometil))-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**124**)
188		derivat celekoksiba **177**	3-*O*-dekladinozil-6-*O*-propenoil-9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A (**187**)
189		derivat celekoksiba **172**	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A 11,12 ciklički karbonat (**138**)
194		derivat celekoksiba **177**	9-deokso-9a-aza-9a-(3-karboksipropil)-9a-homoeritromicin A (**190**)

198		derivat valdekoksiba **197**	9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**85**)
199		derivat valdekoksiba **197**	3-*O*-dekladinozil-5-*O*-dedesozaminil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil) 9a-homoeritromicin A (**93**)
200		derivat valdekoksiba **197**	3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-(3-aminopropil)-9a-homoeritromicin A (**89**)
201		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	3'-*N*-demetil-3'-*N*-(3-aminopropil)-klaritromicin (**145**)
202		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	9(E)-*O*-(6-aminoheksil) eritromicin A oksim (**155**)
204		*N*-((4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-pirazol-1-il)fenil)sulfonil)glicin (**166**)	9(*S*)-eritromicilamin (**203**)
209		derivat celekoksiba **175**	2'-*O*-acetil-10,11-anhidro-12-(imidazol-1-karboniloksi)-3-*O*-dekladinozil-3-okso-klaritromicin (**208**)

3.4. Biološka ispitivanja i rezultati

Svi pripravljeni spojevi podvrgnuti su *in vitro* ispitivanjima. Ispitana je njihova djelotvornost na inhibiciju produkcije TNF-α te inhibiciju COX-1 i COX-2 enzima.

Također je većini sintetiziranih spojeva određena minimalna inhibicijska koncentracija (MIK, engl. *minimal inhibitory concentration*) na više sojeva mikroorganizama.

Djelovanje većine sintetiziranih konjugata između NSAID-a i makrolida na inhibiciju produkcije TNF-α te inhibiciju COX-1 i COX-2 enzima prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Inhibicija COX-1 i COX-2 te inhibicija produkcije TNF-α.

Spoj	**86a**	**86b**	**86c**	**86d**	**86e**	**86f**	**86n**	**90a**	**90b**	**90c**	**90e**
Inhibicija produkcije TNF-α	++	+++	+	++	–	–	+	++	+	++	–
Inhibicija COX-1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Inhibicija COX-2	++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Spoj	**90f**	**90g**	**90h**	**94a**	**94b**	**94c**	**94d**	**94e**	**94f**	**94g**	**94h**
Inhibicija produkcije TNF-α	–	+	++	+	–	++	+	++	++	–	+
Inhibicija COX-1	–	–	–	++	–	–	–	–	–	–	–
Inhibicija COX-2	–	–	–	++	+	+	–	–	–	–	–

Spoj	**96**	**106a**	**106b**	**112**	**113a**	**113b**	**113c**	**115a**	**115c**	**119a**	**119b**
Inhibicija produkcije TNF-α	–	+	+	–	–	++	+	–	++	+	+++
Inhibicija COX-1	ND	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Inhibicija COX-2	ND	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Nastavak Tablice 6. Inhibicija COX-1 i COX-2 te inhibicija produkcije TNF-α.

Spoj	**119c**	**120a**	**120b**	**120c**	**127**	**128**	**129**	**134**	**135**	**136**	**142a**
Inhibicija produkcije TNF-α	++	++	++	++	+	+++	+	+	++	+	–
Inhibicija COX-1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Inhibicija COX-2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Spoj	**142b**	**142a**	**146b**	**146c**	**150a**	**150b**	**157**	**178**	**180**	**181**	**209**
Inhibicija produkcije TNF-α	–	+++	++	++	++	++	++	++	+	–	++
Inhibicija COX-1	–	+	–	–	–	–	–	–	+	++	–
Inhibicija COX-2	–	+	–	–	–	–	–	++	+	++	+++

+ : inhibicija veća od 60 % u koncentraciji od 10 μM

++ : inhibicija veća od 60 % u koncentraciji od 10 i 3 μM

+++ : inhibicija veća od 60 % u koncentraciji od 10, 3 i 1 μM

ND : nije testirano

Za pojedine polazne spojeve (nesteroidne protuupalne kiseline) kao i za pripravljene konjugate ispitana je samo TNF-α djelotvornost što je prikazano u Tablici 7.

Tablica 7. Inhibicija produkcije TNF-α.

Spoj	**2**	**20**	**27**	**32**	**47**	**73**	**83a**	**83b**	**83c**	**86a**	**86d**	**90d**
Inhibicija produkcije TNF-α	–	–	–	–	–	–	++	+	+	++	–	+

Spoj	**106a**	**106b**	**112**	**113a**	**113c**	**119c**	**129a**	**142a**	**142b**	**146a**	**146c**
Inhibicija produkcije TNF-α	–	+	–	–	–	++	++	–	–	++	–

Nastavak Tablice 7. Inhibicija produkcije TNF-α

Spoj	**150a**	**150c**	**157**	**158**	**163**	**165**	**166**	**178**	**179**	**180**	**181**	**182**	**183**
Inhibicija produkcije TNF-α	++	+	–	++	++	+	–	+	+++	+	–	+++	+++

Spoj	**184**	**189**	**195**	**196**	**197**	**198**	**199**	**200**	**201**	**202**	**204**
Inhibicija produkcije TNF-α	+++	–	+	+	–	–	++	–	+	++	+

+ : inhibicija veća od 60 % u koncentraciji od 10 μM

++ : inhibicija veća od 60 % u koncentraciji od 10 i 3 μM

+++ : inhibicija veća od 60 % u koncentraciji od 10, 3 i 1 μM

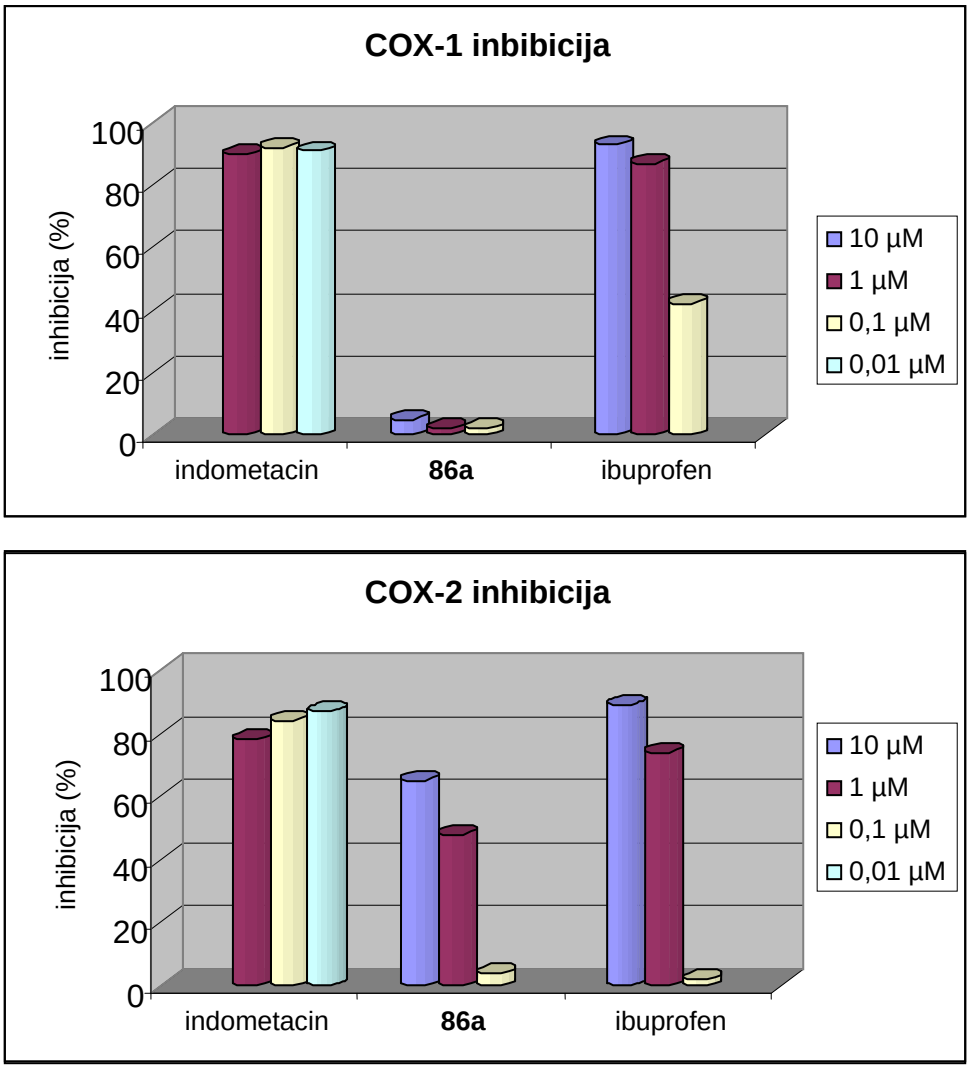
IC_{50} vrijednosti (koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibicije) na COX-2 nekih derivata celekoksiba i valdekoksiba, kao i njihovih konjugata s makrolidima prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. IC_{50} vrijednosti inhibicije COX-2 nekih derivata celekoksiba i valdekoksiba

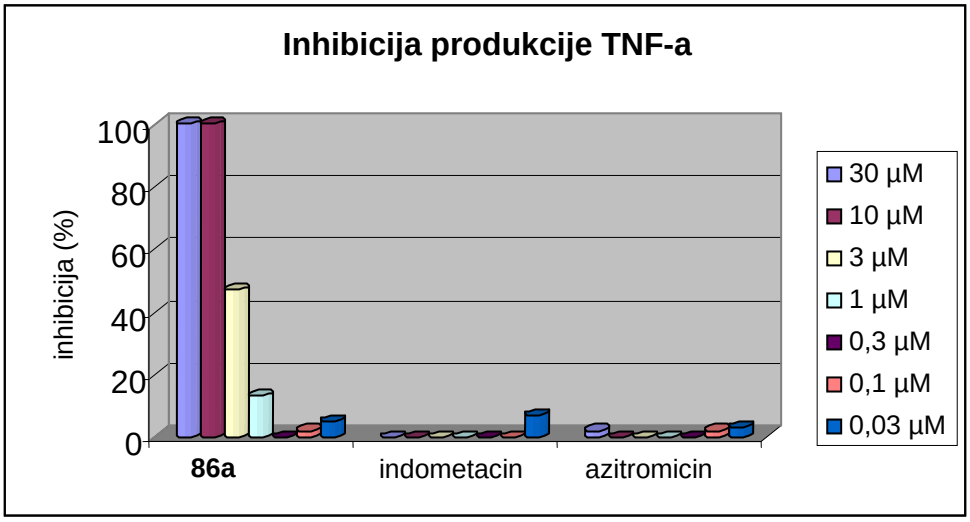
Spoj	**27**	**31**	**32**	**164**	**165**	**166**	**195**	**196**	**197**	**198**	**199**	**200**	**209**
IC_{50} (μM)	0,02	0,01	0,007	>10	7	8	>10	5	>10	>10	>10	>10	0,02

Na Slici 24 uspoređena je djelotvornost spoja **86a** na COX-1 i COX-2 izoenzime u odnosu na polazni nesteroidni protuupalni lijek, indometacin te nesteroidni protuupalni lijek, ibuprofen.

Također je za spoj **86a** i za njegove polazne podjedinice (indometacin i azitromicin) ispitana TNF-α inhibicija u LPS stimuliranim RAW 264,7 stanicama (Slika 25).



Slika 24. Inhibicija COX-1 i COX-2 izoenzima konjugata **86a** i poredbenih supstancija indometacina i ibuprofena



Slika 25. Inhibicija produkcije TNF-α u LPS stimuliranim RAW 264,7 stanicama konjugata **86a** i poredbenih supstancija indometacina i azitromicina

MIK vrijednosti za pripremljene supstance određene su na panelu osjetljivih i rezistentnih Gram-pozitivnih sojeva bakterija (*Staphyloccocus aureus*, *Streptoccocus pneumoniae* i *Streptoccocus pyogenes*). Testirana su i četiri soja Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli, E. fecalis, Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarhalis*), dok je *S. cervisiae* test za toksičnost na stanice eukariota. U svim testovima korišteni su azitromicin, tilozin i amfotericin B kao poredbeni spojevi.

Vrijednosti su određene mikrodilucijskim testom u Mueller-Hinton mediju. Test supstancije i standardi otopljeni su u DMF-u pri koncentraciji od 5 mg/mL. Otopina supstancija je priređena u Mueller-Hinton mediju, konačne koncentracije od 64 do 0,125 µg/mL. Nakon 24 sata inkubacije pri 37 ºC, optička gustoća je određena mjerenjem apsorbancije na 600 nm.

MIK je definiran kao koncentracija pri kojoj nastupa 90 % inhibicije rasta. Sva testiranja rađena su na TECAN Genesis 150 uređaju.

U Tablici 9 prikazani su rezultati mikrobiološkog testiranja na veliki broj sintetiziranih konjugata.

Tablica 9. MIK ispitivanja sintetiziranih spojeva

Konjugat				Standard			Mikroorganizam
86j	**86i**	**86h**	**86c**	Amfotericin B	Tilozin	Azitromicin	
1	1	1	2				*S. aureus* / B 0329
>64	>64	>64	32	>64	2	>64	*S. aureus* / iMLS / B 0538
>64	>64	>64	32	>64	>64	>64	*S. aureus* / cMLS / B 0330
>64	>64	>64	32	>64	0,5	64	*S. aureus* / M / B 0331
≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	>64	≤0,125	≤0,125	*S. pneumoniae* / B 0541
16	16	4	4	>64	>64	16	*H. influenzae* / B 0928
16	16	8	16	>64	≤0,125	2	*S. pneumoniae* / M / B 0326
≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	>64	≤0,125	≤0,125	*S. pyogenes* / B 0542
8	8	4	4	>64	0,25	4	*S. pyogenes* / iMLS / B 0543
>64	>64	64	16	>64	>64	>64	*S. pyogenes* / cMLS / B 0544
8	16	8	8	>64	0,25	2	*S. pyogenes* / M / B 0545
0,5	0,5	0,5	0,5				*M. catarrhalis* / B 0324
1	2	2	1				*H. influenzae* / B 0529
8	32	8	8	>64	0,5	4	*E. faecalis* / B 0004
32	8	16	>64	>64	>64	1	*E. coli* / B 0001
>64	>64	>64	64	≤0,125	>64	>64	*S. cerevisiae* / B0332
0,5	0,25	0,25	0,5				*S. pneumoniae* / B 0627
64	>64	64	32	>64	>64	>64	*S. pneumoniae* / B 0633

Konjugat										Mikroorganizam
113c	**113b**	**113a**	**112**	**106b**	**106a**	**105**	**86n**	**86m**	**86l**	
>64	>64		16	2	2	32	1	1	2	*S. aureus* / B 0329
64	>64	>64	16	32	>64	>64	>64	16	>64	*S. aureus* / iMLS / B 0538
>64	>64	>64	16	64	64	>64	>64	16	>64	*S. aureus* / cMLS / B 0330
64	>64	>64	16	32	64	>64	>64	16	>64	*S. aureus* / M / B 0331
32	16	32	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2	≤0,125	≤0,125	≤0,125	*S. pneumoniae* / B 0541
>64		>64	16	32	8	>64	8	0,5	8	*H. influenzae* / B 0928
64	64	64	8	16	8	64	8	8	16	*S. pneumoniae* / M / B 0326
32		64	0,5	≤0,125	≤0,125	2	≤0,125	≤0,125	≤0,125	*S. pyogenes* / B 0542
64	64	64	8	8	8	16	4	4	4	*S. pyogenes* / iMLS / B 0543
32	64	>64	8	16	16	>64	64	8	64	*S. pyogenes* / cMLS / B 0544
>64	64	>64	4	8	8	64	8	4	8	*S. pyogenes* / M / B 0545
32			1	1	0,25	1	0,25	1	1	*M. catarrhalis* / B 0324
>64			4	2	2	>64	1	1	2	*H. influenzae* / B 0529
16	32	64	8	8	8	>64	8	4	8	*E. faecalis* / B 0004
>64	>64	>64	>64	64	64	>64	64	64	64	*E. coli* / B 0001
>64	>64	>64	32	>64	>64	>64	>64	16	>64	*S. cerevisiae* / B0332
32			4	0,25	0,25	8	0,25	0,5	0,5	*S. pneumoniae* / B 0627
64	64	>64	16	32	32	>64	64	16	64	*S. pneumoniae* / B 0633

Konjugat										Mikroorganizam
134	**129**	**128**	**127**	**120c**	**120b**	**120a**	**119c**	**119b**	**119a**	
1	2	1	1	32	16		8	8	32	*S. aureus* / B 0329
>64	32	32	2	32	16	>64	16	8	32	*S. aureus* / iMLS / B 0538
>64	32	64	32	32	32	>64	16	8	16	*S. aureus* / cMLS / B 0330
>64	8	4	1	32	16	>64	16	8	32	*S. aureus* / M / B 0331
≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	8	32	>64	16	4	16	*S. pneumoniae* / B 0541
8	2	2	32	8	16	>64	16	8	4	*H. influenzae* / B 0928
2	≤0,125	≤0,125	≤0,125	32	32	>64	16	16	16	*S. pneumoniae* / M / B 0326
≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	8	16	64	64	8	4	*S. pyogenes* / B 0542
4	1	1	0,25	32	32	64	32	8	16	*S. pyogenes* / iMLS / B 0543
>64	16	16	4	16	16	32	16	8	8	*S. pyogenes* / cMLS / B 0544
2	1	1	0,25	32	64	64	16	16	16	*S. pyogenes* / M / B 0545
≤0,125	1	1	1	2	4		2	2	4	*M. catarrhalis* / B 0324
1	2	1	1	>64	>64		32	>64	16	*H. influenzae* / B 0529
16	0,5	0,5	0,5	32	32	>64	8	8	16	*E. faecalis* / B 0004
16	8	8	8	>64	>64	>64	>64	>64	>64	*E. coli* / B 0001
>64	64	64	32	64	64	>64	16	8	>64	*S. cerevisiae* / B0332
0,5	0,25	0,25	≤0,125	16	16		16	8	16	*S. pneumoniae* / B 0627
>64	16	16	2	32	32	>64	32	16	32	*S. pneumoniae* / B 0633

Konjugat										Mikroorganizam
178	**158**	**157**	**150b**	**150a**	**146c**	**146b**	**146a**	**136**	**135**	
2	8	8	8	>64	64	8	>64	1	1	*S. aureus* / B 0329
32	>64	64	16	>64	>64	32	64	>64	>64	*S. aureus* / iMLS / B 0538
32	>64	>64	8	>64	>64	16	>64	>64	>64	*S. aureus* / cMLS / B 0330
32	64	>64	16	>64	>64	16	>64	16	32	*S. aureus* / M / B 0331
≤0,125								≤0,125	≤0,125	*S. pneumoniae* / B 0541
32	>64	32	>64	>64	>64	>64	>64	1	0,5	*H. influenzae* / B 0928
8	>64	32	64	32	64	64	16	1	2	*S. pneumoniae* / M / B 0326
≤0,125	4	≤0,125	>64	>64	64	>64	32	≤0,125	≤0,125	*S. pyogenes* / B 0542
8	>64	32	>64	>64	>64	>64	>64	2	2	*S. pyogenes* / iMLS / B 0543
32	>64	32	>64	>64	>64	>64	>64	32	32	*S. pyogenes* / cMLS / B 0544
8	>64	16	>64	>64	>64	>64	>64	8	8	*S. pyogenes* / M / B 0545
	>64	1	32	>64	>64	>64	>64	0,5	0,5	*M. catarrhalis* / B 0324
4	>64	16	>64	>64	>64	>64	>64	2	2	*H. influenzae* / B 0529
4	32	32	8	16	16	16	64	2	2	*E. faecalis* / B 0004
>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64	32	*E. coli* / B 0001
64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	>64	*S. cerevisiae* / B0332
	64	8	>64	>64	>64	>64	>64	≤0,125	0,25	*S. pneumoniae* / B 0627
8	>64	32	>64	>64	>64	>64	>64	32	32	*S. pneumoniae* / B 0633

Konjugat			Mikroorganizam
202	**201**	**184**	
16	>64	2	*S. aureus* / B 0329
>64	>64	8	*S. aureus* / iMLS / B 0538
>64	>64	16	*S. aureus* / cMLS / B 0330
64	>64	4	*S. aureus* / M / B 0331
		≤0,125	*S. pneumoniae* / B 0541
>64	>64	8	*H. influenzae* / B 0928
64	32	≤0,125	*S. pneumoniae* / M / B 0326
16	>64	≤0,125	*S. pyogenes* / B 0542
>64	>64	2	*S. pyogenes* / iMLS / B 0543
>64	>64	16	*S. pyogenes* / cMLS / B 0544
>64	>64	4	*S. pyogenes* / M / B 0545
>64	>64		*M. catarrhalis* / B 0324
>64	>64	4	*H. influenzae* / B 0529
64	8	1	*E. faecalis* / B 0004
>64	>64	16	*E. coli* / B 0001
>64	>64	16	*S. cerevisiae* / B0332
>64	>64		*S. pneumoniae* / B 0627
>64	>64	0,25	*S. pneumoniae* / B 0633

Osvrt na biološki učinak pripravljenih spojeva bit će iznesen u poglavlju 4.2 Rasprava.

4. RASPRAVA

4.1. Kemijska istraživanja

S ciljem da se iskoristi jedinstveno farmakokinetičko ponašanje makrolida (nakupljanje u upalnim stanicama), kao i protuupalno djelovanje nesteroidnih protuupalnih lijekova i nekih makrolida sintetizirani su brojni konjugati nesteroidnih protuupalnih lijekova i makrolida.

Kao prva ideja povezivanja makrolida i NSAID-a nametnulo se povezivanje esterskom vezom preko položaja 9a makrolida. Tako su pripravljeni konjugati **83a-c** (Shema 4). Međutim, s obzirom da su reakcije provedene s vrlo slabim iskorištenjima te da je bilo potrebno koristiti vrlo osjetljive reakcijske uvjete (reduciranje esterske u hidroksilnu skupinu u suhim uvjetima, u suprotnom dolazi do hidrolize estera) odustalo se od priprave takvih konjugata. Osim toga, sintetizirani konjugati su se pokazali dobrim inhibitorima produkcije TNF-α, ali nisu pokazali djelotvornost na inhibiciju COX enzima.

Zbog toga je za povezivanje makrolida i NSAID-a korištena amidna veza (stabilnija od esterske) preko položaja 9a makrolida (Shema 5). Jedina reakcija sa slabim iskorištenjem bila je reakcija redukcije cijano-derivata u amino-derivat makrolida. Za nju se daljnjom optimizacijom (više isprobanih reakcijskih uvjeta/opisano u daljnjem dijelu Rasprave) značajno poboljšalo iskorištenje reakcije. Većina sintetiziranih amidnih konjugata su se pokazali dobrim inhibitorima produkcije TNF-α, a konjugat **86a** se pokazao i kao selektivni inhibitor COX-2 enzima.

Radi ispitivanja utjecaja položaja preko kojeg su NSAID-i vezani na makrolid, pripravljeni su i konjugati kod kojih su NSAID-i vezani na makrolide preko položaja 11, 3'-*N* desozamina i 4'' kladinoze (Shema 11-14). Sve reakcije na položaju 3'-*N* desozamina provedene su bez značajnih poteškoća (slično kao i na položaju 9a makrolida). Na azitromicinu dolazi do selektivne demetilacije tercijarne amino-skupine na položaju 3' desozamina, dok na položaju 9a azitromicina ne dolazi do demetilacije u provedenim reakcijskim uvjetima. Reakcije s makrolidima na položajima 11 i 4'' kladinoze provodile su se uz slabija iskorištenja, s obzirom da makrolidi sadrže više hidroksilnih skupina te je bilo teže selektivno provoditi reakcije na željenim položajima.

Konjugati NSAID-a i makrolida vezani na položajima 9a, 11 i 4'' kladinoze pripravljeni su i s različitim duljinama poveznice među njima (Shema 5-8, 12, 13). Uočeno je da su reakcije išle s većim iskorištenjem što je poveznica (metilenski lanac) bila dulja, vjerojatno zbog manjih steričkih smetnji među vezanim podjedinicama (NSAID i makrolidi).

S obzirom da je cilj bio dobiti konjugate bez antibakterijskog djelovanja pripravljeni su dekladinozilni konjugati (preko položaja 9a na aglikonskom prstenu i 3'-*N* desozamina) te aglikonski konjugati (preko položaja 9a i 11) kao što je prikazano na Shemi 5. Također su s istom namjerom

pripravljeni i konjugati NSAID-a i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A preko položaja 9a uz modifikacije na položaju 3'-*N* desozamina (Shema 9 i 10). Općenito su sve reakcije koje su se provodile na aglikonskim derivatima makrolida provedene s manjim iskorištenjem u odnosu na reakcije na makrolidima sa šećerima (npr. reakcija hidrogeniranja cijano-derivata, reakcija nastajanja amidne veze između makrolida i NSAID-a, ...) vjerojatno zbog slabije topljivosti aglikonskih derivata makrolida. Većina tako sintetiziranih konjugata pokazala su slabiju antibakterijsku aktivnost (hidroliza šećera i supstitucija metilne skupine na 3'-*N* desozaminu nekom većom skupinom doprinosi smanjenju antibakterijske aktivnosti), dobru inhibiciju produkcije TNF-α, a konjugati **94b-c** su se pokazali i kao selektivni inhibitori COX-2 enzima.

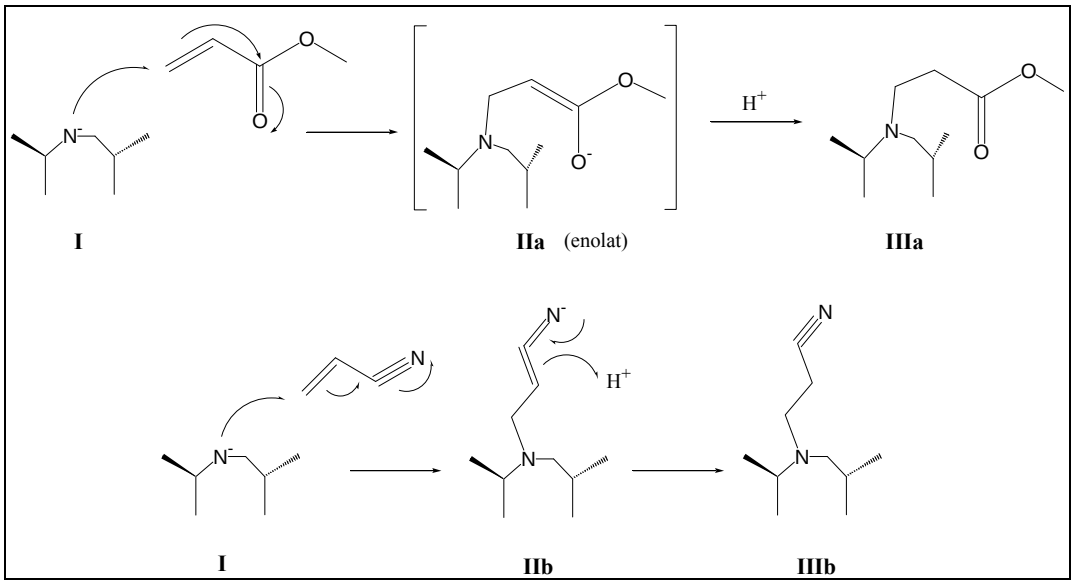
Pripravljeni su analogni konjugati NSAID-a i 14-članih makrolida (klaritromicin i eritromicin A oksim) preko položaja 9(E)-*O* i 3'-*N* desozamina (Shema 15-17). Pri sintezi derivata na položaju 3'-*N* desozamina uočeno je da reakcijom Michaelove adicije akrilonitrilom selektivno nastaje jedan produkt na klaritromicinu. No, na ertitromicin A oksimu dolazi do adicije akrilonitrila na položaju 3'-*N* desozamina te na oksimskoj podjedinici (potvrđeno pripravljanjem konjugata na položaju 9(E)-*O* eritromicin A oksima, Shema 17).

Direktno povezivanje celekoksiba (selektivni NSAID) s derivatom makrolida sa slobodnom karboksilnom skupinom (Shema 24) dobio se željeni konjugat. Međutim, pri čišćenju tako nastalog konjugata kromatografijom na stupcu dolazi do razgradnje konjugata (retro Michaelova reakcija). No, povezivanjem derivata makrolida (sa slobodnom karboksilnom ili amino-skupinom) s derivatom celekoksiba koji na duljoj poveznici također sadrži slobodnu karboksilnu ili amino-skupinu dolazi do nastajanja stabilnijih konjugata (Shema 25), koji se ne raspadaju pri čišćenju.

Nadalje, pripravljeni su derivati celekoksiba i valdekoksiba sa slobodnim karboksilnim ili amino-skupinama (Shema 19, 20 i 26), a potom su vezani na 14- i 15- člane makrolide preko istih položaja kao i neselektivni NSAID-i (9a, 9(E)-*O*, 11, 3'-*N* desozamina te 4'' i 4''-*O* kladinoze). Pripravljeni su i analogni dekladinozilni i aglikonski konjugati te su provedene i modifikacije na položaju 3'-*N* desozamina.

Mehanizam Michaelove adicije – adicija akrilonitrila ili metakrilata na položaju 9a makrolidnog prstena

Za pripravu derivata makrolida sa slobodnom hidroksilnom ili amino-skupinom na položaju 9a makrolidnog prstena (spojevi **82** i **85)** prvi korak je adicija metilakrilata ili akrilonitrila na 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**) pri čemu nastaju 9-deokso-9a-aza-9a-(2-metilkarboksilat-etil)-9a-homoeritromicin A (**81**) i 9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicin A (**84**) (Shema 4 i 5). Priprava spojeva **81** i **84** provedena je Michaelovom adicijom čiji je mehanizam prikazan na Slici 26.[252] Dvostruka veza u konjugaciji s karbonilnom skupinom (u slučaju metilakrilata), odnosno s cijano-skupinom (u slučaju akrilonitrila) podložna je nukleofilnom napadu u reakciji 1,4-adicije. Nukleofil (9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**I**)) se adira na dvostruku vezu i nastaju međuprodukti **IIa-b** (enolat u slučaju metilakrilata) iz kojih se dobivaju željeni produkti **IIIa-b** (u slučaju metilakrilata to je spoj **81**, a u slučaju akrilonitrila spoj **84**).[276]



Slika 26. Mehanizam Michaelove adicije

Kod pojedinih slučajeva uočena je i retro Michaelova reakcija, a kao primjer može se izdvojiti sinteza konjugata **192** i **193** (sintetski putevi prikazani na Shemi 24). U tim slučajevim direktnim povezivanjem derivata makrolida **190** i **191** (sa slobodnom karboksilnom skupinom) s celekoksibom **27** uočeno je da nastaju željeni konjugati **192** i **193**. Međutim, kod pokušaja čišćenja spojeva **192** i **193** kromatografijom na stupcu dolazi do njihove razgradnje na polazne makrolide, spojeve 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**55**), odnosno 3-*O*-dekladinozil-9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A (**87**), tj. dolazi do retro-Michaelove reakcije. U slučaju kad je spoj **190** vezan na derivat celekoksiba **177**, koji ima slobodnu amino-skupinu na dugoj poveznici, nastaje konjugat **194**, koji je puno stabilniji i kod kojeg ne dolazi do retro-Michaelova reakcije (Shema 25).

Redukcija cijano-skupine u amino-skupinu (za pripravu spoja 85 iz spoja 84)

Jedan od kritičnijih koraka u sintezi derivata makrolida sa slobodnom amino-skupinom na različitim položajima pokazao se korak redukcije cijano-derivata u amino-derivate. Detaljnije je ispitana redukcija cijano-derivata **84** u amino-derivat **85** što je prikazano na Shemi 5. Ispitano je nekoliko različitih načina redukcije spoja **84**. Prvotno je ispitana redukcija pomoću $NaBH_4$ uz aktivatore $CoCl_2$ i I_2 pri različitim reakcijskim uvjetima. Kao što je prikazano u Tablici 10, redukcija pomoću sustava $NaBH_4/CoCl_2$ daje bolja iskorištenja uz zagrijavanje reakcijske smjese. Jednak utjecaj ima i dvostruka količina reducensa, dok upotreba vodenih otapala umjesto metanola nije davala rezultate.

Tablica 10. Redukcija spoja **84** pomoću $NaBH_4$ uz aktivatore $CoCl_2$ i I_2 pri različitim reakcijskim uvjetima

Reagens	Otapalo	Posebni uvjeti	Prinos (%)
$NaBH_4/I_2$	THF	bezvodni uvjeti	4,07
$NaBH_4/CoCl_2$	metanol	_	_
$NaBH_4/CoCl_2$	metanol	zagrijavanje (50 ^oC)	7,09
$NaBH_4/CoCl_2$	metanol	dvostruka kol. $NaBH_4$	11,94
$NaBH_4/CoCl_2$	THF:H_2O (2:1, v/v)	_	_

Tablica 11. Redukcija spoja **84** katalitičkim hidrogeniranjem uz različite katalizatore i reakcijske uvjete

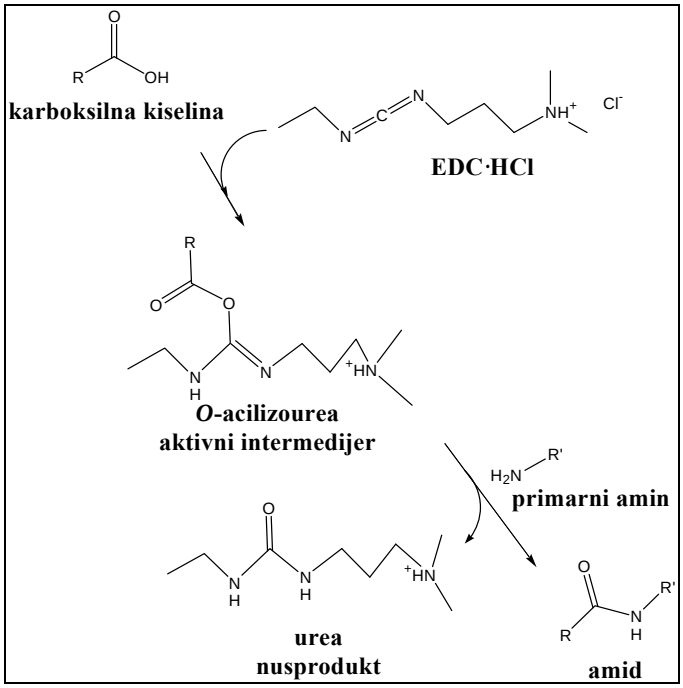
Katalizator	Otapalo	Reakcijski uvjeti	Prinos (%)
PtO_2	etanol	$5\cdot10^6$ Pa / 48 h	44,03
PtO_2	izopropanol	$5\cdot10^6$ Pa / 48 h	36,22
Pt/C	izopropanol	$5\cdot10^6$ Pa / 24 h	8,81
Pt/C	kisela vod. otopina	$4\cdot10^5$ Pa / 24 h	39
Raney Ni	izopropanol	$4\cdot10^6$ Pa / 24 h	_
PtO_2	ledena octena kiselina	$5,5\cdot10^5$ Pa / 24 h	do 80

S obzirom da u nijednom od navedenih reakcijskih uvjeta nije dobiven zadovoljavajući prinos spoja **85,** pokušana je i redukcija spoja **84** katalitičkim hidrogeniranjem uz različite katalizatore i reakcijske uvjete kao što je prikazano u Tablici 11.[249] Najbolje iskorištenje je dobiveno kad je redukcija provedena u etanolu (44%). Katalitičko hidrogeniranje spoja **84** je potom provedeno i u ledenoj

octenoj kiselini pri tlaku od 5,5 bara uz PtO_2 kao katalizator s puno boljim iskorištenjem (i do 80 %). Spoj **85** je iz smjese u ledenoj octenoj kiselini uspješno izoliran ekstrakcijom (bez čišćenja kromatografijom na stupcu, koja je neophodna nakon reakcije u EtOH).

Mehanizam nastajanja amidne veze

S obzirom da je esterska veza labilnija u odnosu na amidnu za povezivanje makrolida i NSAID-a izabrana je amidna veza. Prvi konjugat s amidnom poveznicom bio je konjugat **86a** (Shema 5), potom je i većina ostalih konjugata makrolida i NSAID-a pripravljena korištenjem amidne veze. Za stvaranje amidne veze korišten je EDC·HCl, uz HOBT i TEA, a reakcija je provođena u CH_2Cl_2 (uz propuhivanje argonom). Mehanizam nastajanja amidne veze s EDC·HCl prikazan je na Slici 27. *N*-supstituirani karbodiimid (EDC·HCl) reagira s karboksilnom kiselinom (najčešće NSAID ili derivat NSAID-a) dajući reaktivni esterski intermedijer (*O*-acilizourea) koji u prisustvu primarnog amina (najčešće derivat makrolida) kao nukleofila stvara amidnu vezu uz nastanak uree kao nusprodukta.[277]



Slika 27. Mehanizam nastajanja amidne veze

.

Sam postupak priprave amida je sljedeći: 1 eq kiseline (NSAID ili njegov derivat sa slobodnom karboksilnom skupinom) se otapa u CH_2Cl_2 (sušenom na 4A molekularnim sitima) u inertnoj atmosferi (struji argona). Potom se dodaje 8 eq TEA pri čemu se suspenzija razbistri (u većini slučajeva). Nakon toga dodaju se redom 2 eq HOBT, 1 eq amina (derivat makrolida sa slobodnom amino-skupinom) i 4 eq EDC·HCl, te se reakcijska smjesa miješa na sobnoj temperaturi u inertnoj

atmosferi dušika 24 sata (u rijetkim slučajevima i kraće). Nakon uparavanja otapala sirovi se produkt pročišćava kromatografijom na stupcu uz odgovarajuće eluense. Prinosi tih reakcija su bili najčešće od 30-70 %. Općenito je kod nastajanja aglikonskih konjugata iskorištenje reakcije bilo niže (ispod 50 %) u odnosu na konjugate sa šećerima.

Stabilnost azitromicina (37) i konjugata 86a pri različitim pH vrijednostima

Za azitromicin (**37**) i konjugat **86a** ispitana je stabilnost pri različitim pH vrijednostima (1, 3 i 5). Sadržaji ispitivanih spojeva **37** i **86a** te njihovih razgradnih spojeva **185** i **90a** (Slika 28) određeni su nakon 0, 15, 60 i 150 minuta te 24 sata HPLC/MS metodom.

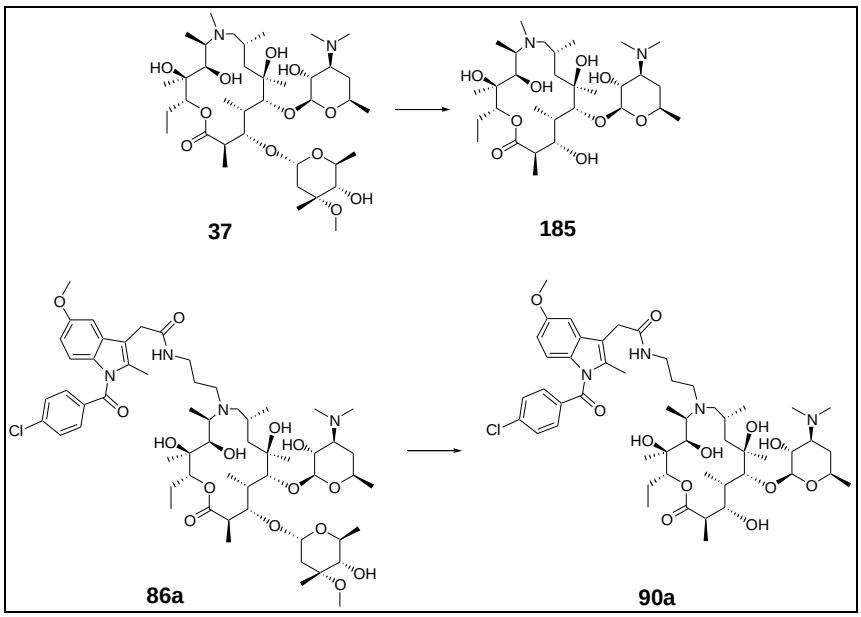
Spoj **37** : HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 749,84 (teor. 749,51)

Spoj **185** : HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 591,78 (teor. 591,41)

Spoj **86a** : HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 1131,88 (teor. 1131,62)

Spoj **90a** : HPLC/MS: MS(ES) *m/z*: $[MH]^+$ 973,80 (teor. 973,52).

Rezultati navedenih ispitivanja prikazani su u Tablici 12 i na Slici 29.



Slika 28. Strukture azitromicina (**37**) i konjugata **86a**, te njihovih razgradnih spojeva **185** i **90a**

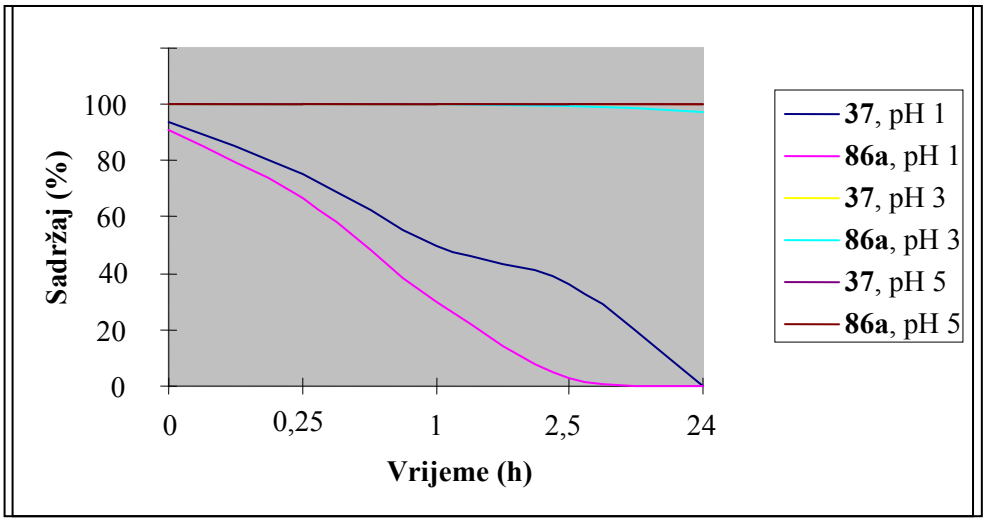
Azitromicin (**37**) i konjugat **86a** pokazali su se izrazito stabilnima pri pH 3 i pH 5, dok pri pH 1 dolazi do hidrolize kladinoze kod oba spoja. Kod konjugata **86a** dolazi do hidrolize kladinoze brže nego kod azitromicina.

Tablica 12. Stabilnost azitromicina (**37**) i konjugata **86a** pri pH 1, 3 i 5

Vrijeme (h)	Sadržaj (%)					
	37 / **185**[a]			**86a** / **90a**[b]		
	pH 1	pH 3	pH 5	pH 1	pH 3	pH 5
0	94 / 6	100 / 0	100 / 0	91 / 9	100 / 0	100 / 0
0,25	75 / 25	100 / 0	100 / 0	67 / 33	100 / 0	100 / 0
1	50 / 50	100 / 0	100 / 0	30 / 70	100 / 0	100 / 0
2,5	36 / 64	100 / 0	99,4 / 0,6	3 / 97	99,4 / 0,6	100 / 0
24	0 / 100	100 / 0	97 / 3	0 / 100	97 / 3	100 / 0

[a] Spoj **185** – razgradni produkt azitromicina (**37**)

[b] Spoj **90a** – razgradni produkt konjugata **86a**

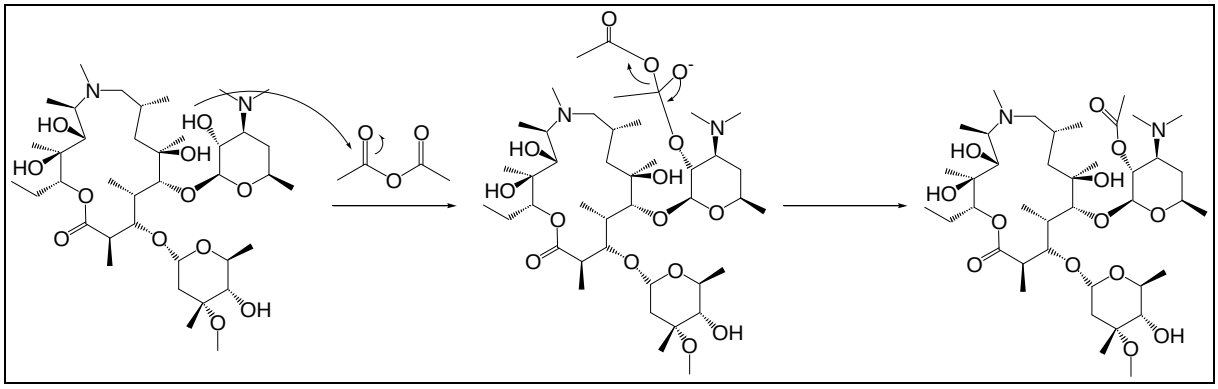


Slika 29. Stabilnost azitromicina **37** i konjugata **86a** pri pH 1, 3 i 5.

Mehanizam acetiliranja 2'- hidroksilne skupine na makrolidu

S obzirom da makrolidi imaju više slobodnih hidroksilnih skupina (najčešće 5), selektivno provođenje reakcija na određenom položaju je izrazito teško. Od svih hidroksilnih skupina na makrolidu najreaktivnija je hidroksilna skupina na položaju 2' desozamina zbog blizine diamino-skupine na položaju 3'-*N* desozamina (mogućnost nastajanja vodikovih veza). Tu hidroksilnu skupinu najčešće treba zaštititi da bi se mogle provesti reakcije na nekim drugim položajima.

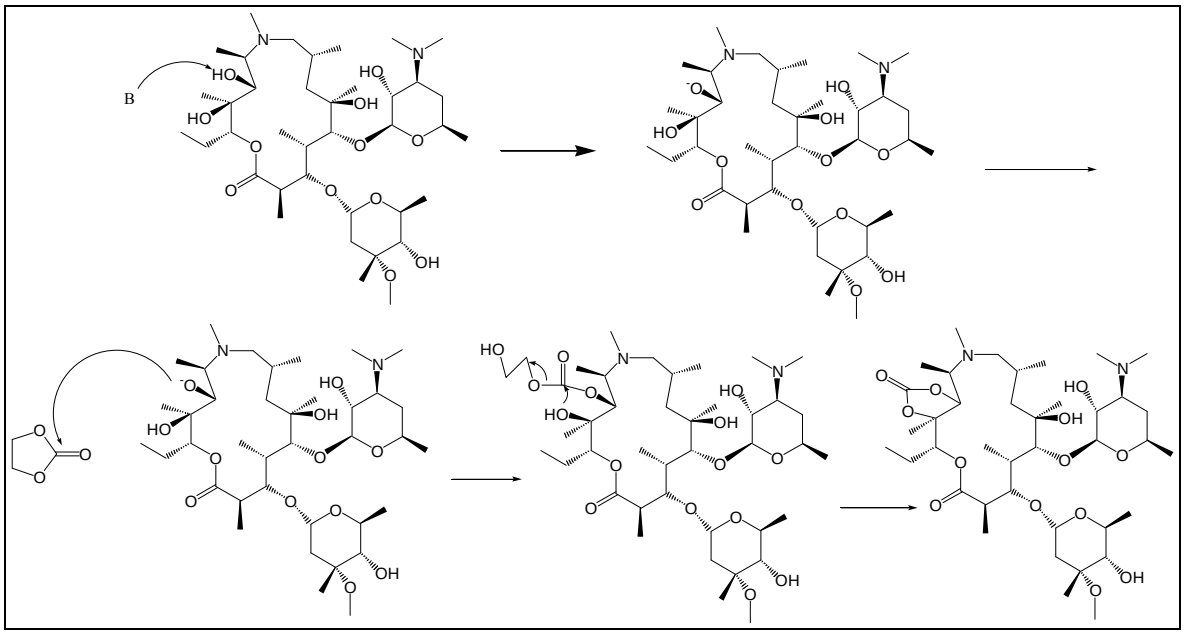
Acetilna zaštita na položaju 2' desozamina provodi se s acetanhidridom uz K_2CO_3 ili $NaHCO_3$ kao bazu pri čemu nastaje 2'-*O*-acetil-makrolid. Mehanizam acetiliranja hidroksilne skupine na položaju 2' desozamina prikazan je na Slici 30. Acetilna zaštita na ovom položaju je izuzetno povoljna jer ju je lako uvesti, stabilna je pri sljedećim reakcijama na ostalim položajima makrolida te ju je lako ukloniti metanolizom.[257] Nakon zaštite 2' hidroksilne skupine na desozaminu, sljedeća po reaktivnosti je hidroksilna skupina na položaju 4" kladinoze (prema literaturnim podacima)[252] te se za sve reakcije koje se žele selektivno provoditi na položaju 4" kladinoze upotrebljavaju 2'-*O*-acetilni derivati makrolida. Nakon provedenih željenih reakcija na položaju 4" kladinoze uklanjanje 2'-*O*-acetilne zaštite u MeOH provodi se vrlo jednostavno, a da pritom ne utječe na prethodno provedene reakcijske korake.



Slika 30. Mehanizam acetiliranja hidroksilne skupine na položaju 2' desozamina.

Mehanizam nastajanja 11,12-cikličkog karbonata i nestabilnost karbamida

Za dobivanje konjugata **134-136**, sinteza počinje pripravom 11,12-cikličkog karbonata azitromicina **130** iz azitromicina (**37**) (kao na Shemi 13). Dodatno, u nekim slučajevima nastajanje 11,12-cikličkog karbonata može služiti i kao zaštitna skupina 11 i 12 hidroksilne skupine da bi se daljnje reakcije selektivno provodile na nekim drugim položajima. Reakcija nastajanja 11,12-cikličkog karbonata se provodi uz etilen-karbonat i K_2CO_3 kao bazu, a mehanizam reakcije je prikazan na Slici 31. Iskorištenje reakcije je oko 50 %, a azitromicin i produkt **130** se mogu postupkom kiselo bazne ekstrakcije uspješno odijeliti.



Slika 31. Mehanizam nastajanja 11,12-cikličkog karbonata na azitromicinu

Daljni put sinteze je otvaranje 11,12-cikličkog karbonata azitromicina **130** s etilendiaminom, 1,4-diaminobutanom, odnosno 1,5-diaminopropanom uz piridin-klorid, pri čemu nastaju derivati azitromicina koji na položaju 11 imaju poveznicu sa slobodnom amino-skupinom **131-133** različite duljine lanca. Derivati **131-133** su karbamidi, koji su nestabilni te se ne mogu čistiti kromatografijom na stupcu (kontinuirano raspadanje spojeva). Pri reakcijama nastajanja derivata **131-133** najbolje iskorištenje dobiveno je u reakciji s 1,5-diaminopentanom, pri čemu je izoliran najčišći produkt **133** (čistoća sirovog produkta 77 %). Zbog uočene nestabilnosti, ti su derivati bez čišćenja upotrebljeni za reakciju povezivanja s indometacinom (**2**). Nastali konjugati **134-136** nisu se raspadali pri provođenju kromatografiji na stupcu.

Priprava akriloilnog lanca na položaju 6 umjesto na položaju 3 azitromicina

S ciljem priprave konjugata celekoksiba i azitromicina preko položaja 3 azitromicina prvi reakcijski slijedovi su išli očekivanim putem i s očekivanim iskorištenjem (kao što je prikazano na Shemi 22). Iznenađujući rezultat je bio korak u reakciji esterifikacije na spoju **186** s 3-klorpropionil-kloridom u prisutnosti trietilamina kao baze. Umjesto očekivanog povezivanja akriloilnog lanca na položaju 3, u reakciji je većinom nastao produkt **187** koji ima vezanu akriloilnu skupinu na položaju 6 makrolida. Radi daljnje identifikacije nastalog produkta, na spoju **187** skinuta je acetatna zaštitna skupina s 2'-hidroksilne skupine u prisutnosti metanola. Povezivanje akriloilnog lanca na položaju 6 makrolida potvrđeno je jedno- i dvo- dimenzionalnim ^{1}H i ^{13}C NMR spektrima. Prema ^{13}C NMR

spektrima vidljivo je pomicanje signala kvaternog C-6 atoma od 72,54 ppm za spoj **186** na 87,08 ppm za spoj **187**. HMBC NMR spektar pokazuje korelaciju signala kroz dvije veze sa H-5 atomom signala (4,48 ppm za spoj **187**, 3,44 ppm za spoj **186**) kao i sa signalom 6-CH_3 protona (1,55 ppm za spoj **187**, 1,05 ppm za spoj **186**).

Nadalje, ispitivana je brzina reakcije te utjecaj količine 3-klorpropionil-klorida i trietilamina na iskorištenje reakcije nastajanje produkta **187**. Kada je korišten jedan ekvivalent 3-klorpropionil-klorida i tri ekvivalenta trietilamina uz trajanje reakcije od tri sata nastaje samo produkt **187**, ali pritom ne izreagira cjelokupna količina spoja **186**. Produljenjem reakcije na dodatna tri sata uz upotrebu dodatnog ekvivalenta 3-klorpropionil-klorida i tri ekvivalenta trietilamina, dobiven je željeni produkt **187**, ali zajedno sa spojem kojemu su esterificirane dvije hidroksilne skupine (određeno prema HPLC-MS, nije izoliran spoj dovoljne čistoće za daljnu analizu).

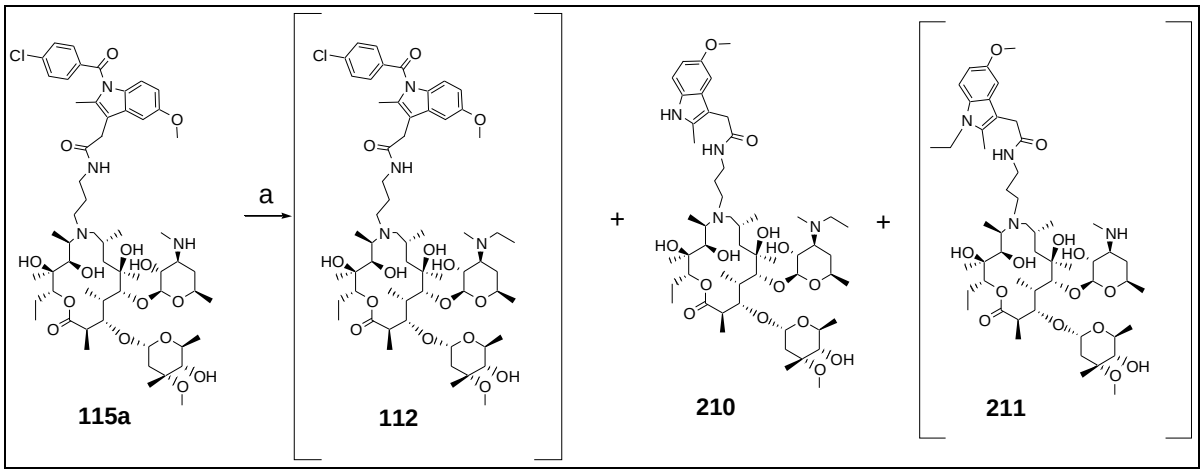
Priprava akriloilnog lanca na eritromicin A oksimu (na dva mjesta)

Kao što je prikazano na Shemi 16 odgovarajući 3′-*N*-demetil-3'-*N*-(2-cijanoetil) eritromicin A oksim (**148**) pripravljen je i iz 3′-*N*-demetil- eritromicin A oksima (**147**). Međutim, u toj reakciji Michaelove adicije uz produkt **148** nastaje još jedan produkt koji prema HPLC-MS analizi sadrži dva cijanoetilna lanca. Produkt nije izoliran u zadovoljavajućoj čistoći za daljnju analizu, ali je pretpostavljeno da u adiciji sudjeluje i oksimska jedinica. Kasnije je pri pripravi konjugata **157** i **158** dokazano da na oksimskoj jedinici eritromicin A oksima nastaju cijanoetilni derivati (spojevi **151-153** kao što je prikazano na Shemi 17).

Razgradnja indometacina:
a) pri etilaciji na položaju 3'-*N* desozamina

Prva ideja za sintezu konjugata **112** (s etilnom skupinom na položaju 3'-*N* desozamina) i **113a** (s acetatnom skupinom na položaju 3'-*N* desozamina) bila je priprava iz konjugata **86a** (kao na Shemi 10). Prema tom sintetskom putu uspješno je pripravljen konjugat **113a** (nukleofilnim napadom acetanhidridom na spoj **115a**). Međutim, kod pokušaja priprave spoja **112** na analogan način nukleofilnim napadom s etil-jodidom na spoju **115a** nije dobiven željeni produkt. HPLC-MS analiza nastale smjese pokazala je molekulski ion s masom manjom za 138. Vjerojatno je došlo do razgradnje indometacina (pucanja amidne veze). No, s obzirom da su postojala dva potencijalna produkta **210** i **211** (prikazani na Shemi 31), pomoću MS-MS analize je dokazano da nastali produkt odgovara

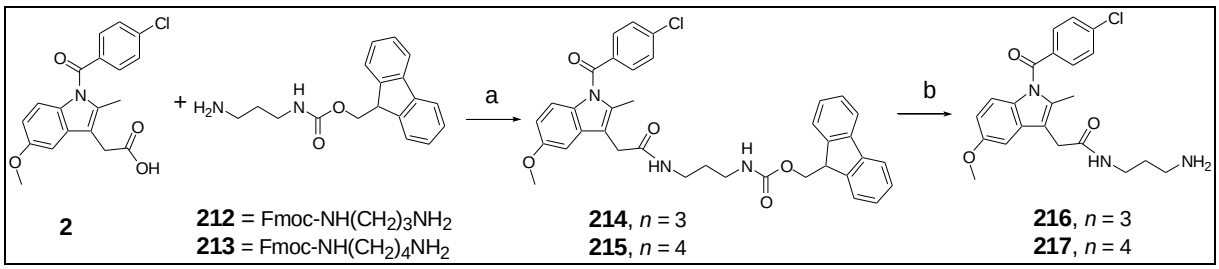
strukturi **210**. Dobiveni signal 1007,5 odgovara molekulskom ionu, signal 849,6 odgovara molekulskom ionu bez kladinoze, a signal 678,4 odgovara molekulskom ionu bez kladinoze i desozamina na koji je vezan etil, što u potpunosti potvrđuje strukturu spoja **210**.



Shema 31. Potencijalni produkti u reakciji s etil-jodidom: a) EtI, $(i\text{-Pr})_2$NEt, MeOH

S obzirom da se navedeni sintetski put nije pokazao prikladnim za sintezu spoja **112**, izabran je alternativni put sinteze (Shema 9). Prema tom postupku etilna skupina na položaju 3´-*N* desozamina uvedena je na 9-dihidro-9-deokso-9a-aza-9a-(2-cijanoetil)-9a-homoeritromicinu A (**84**), odnosno prije vezanja indometacina na makrolid. Kako se ovaj alternativni put pokazao puno boljim i jednostavnijim koristio se i za dobivanje spojeva **113a** i **179** (preko cijanoetilnog derivata **109**).

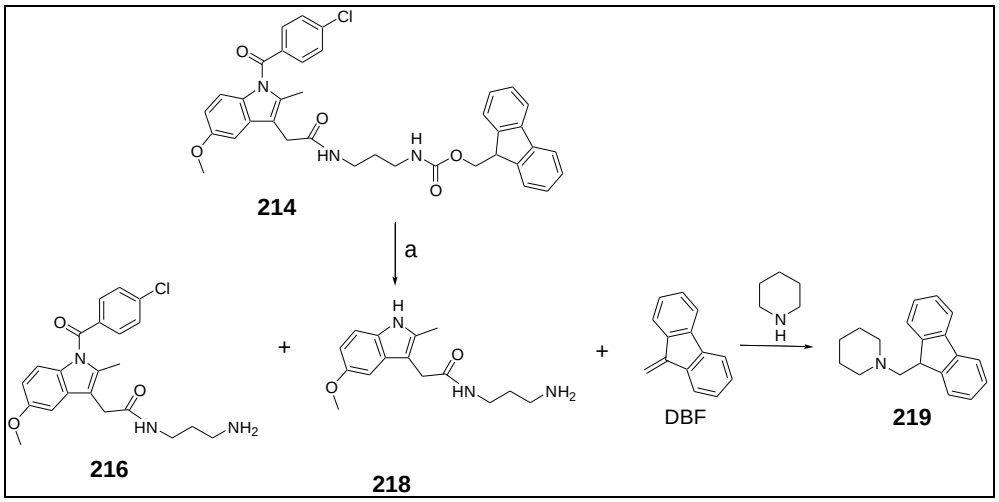
b) pri uklanjanju zaštitne skupine (Fmoc) i aminolizi indometacina



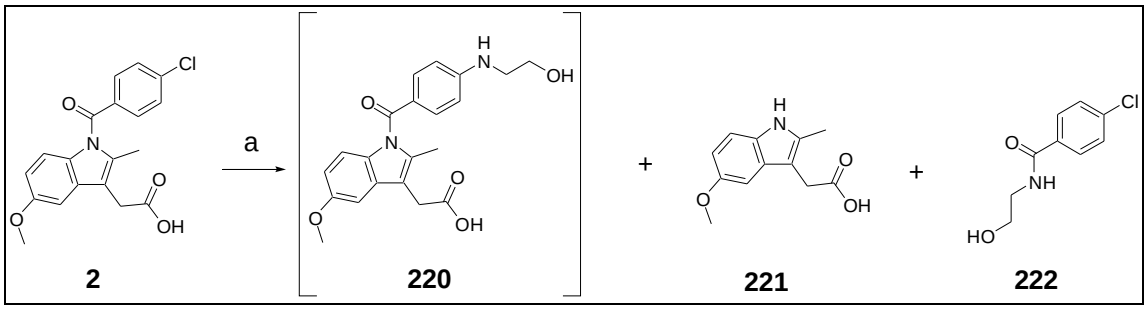
Shema 32. Pokušaj priprave derivata indometacina sa slobodnom amino-skupinom: a) EDC·HCl, HOBT, TEA, b) piperidin, CH_2Cl_2

S ciljem priprave derivata indometacina s poveznicom sa slobodnom amino-skupinom **216** i **217** najprije su iz indometacina (**2**) i diamina s Fmoc zaštitom **212** i **213** pripravljeni derivati **214** i **215** (Shema 32). Pri pokušaju uklanjanja Fmoc zaštite na derivatu **214** s piperidinom u CH_2Cl_2 uočeno je da nastaje piperidin-klorid kojeg je teško ukloniti. Također je uočeno da su nastala dva produkta koji

su prema ninhidrinskom testu amini. U HPLC-MS spektru prisutni su signali s molekulskim masama 414,5, 276,7 i 264,3. Pretpostavljene strukture su prikazane na Shemi 33 Signal 414,5 odgovara molekulskom ionu spoja **216**. Uklanjanje Fmoc zaštitne skupine sa spoja **214** također dovodi do pucanja 4-klorbenzoilne skupine pri čemu nastaje spoj **218** molekulske mase 276,7. Piperidin formira konjugat s dibenzofulvenom (DBF), spoj **219**. DBF se oslobađa tijekom uklanjanja Fmoc zaštite sa spoja **214**. Konjugat **219** daje signal s molekulskom masom 264,3.



Shema 33. Različiti produkti uočeni tijekom uklanjanja Fmoc zaštite s derivata indometacina: a) piperidin



Shema 34. Aminoliza indometacina: a) etanolamin, *N*-metil-pirolidon

Zbog ispitivanja utjecaja slobodne karboksilne skupine na aktivnost konjugata indometacina i makrolida, pokušana je sinteza spoja u kojem bi indometacin bio povezan na makrolid preko poveznice na 4-klorbenzoilnoj skupini indometacina (konjugat bi imao slobodnu karboksilnu skupinu). U tu svrhu pokušana je sinteza derivata indometacina **220** reakcijom aminolize 4-klorbenzoilne skupine indometacina (**2**) u prisustvu etanolamina i *N*-metil-pirolidona (Shema 34). Međutim, u toj reakciji dolazi do transaminacije 4-klorbenzoilne skupine, odnosno nastaju spojevi **221** i **222**, dok željeni spoj **220** uopće ne nastaje.

Uklanjanje Fmoc zaštite

Fmoc zaštitna skupina se pokazala vrlo dobrim izborom za zaštitu amino-skupine spoja **103** (*N*-Fmoc-glicin/komercijalno dostupan) da bi se spriječilo nastajanje nepoželjnih amida u reakcijskoj smjesi. Kasnije se, nakon provođenja željenih reakcija, navedena zaštitna skupina vrlo lagano i brzo uklonila. Često se ista zaštitna skupina koristila za zaštitu jedne amino-skupine kod diamina (uz Boc zaštitnu skupinu), koji su također komercijalno dostupni.

Prema dostupnoj literaturi poznato je nekoliko načina uklanjanja Fmoc zaštitne skupine:

- s 20-55 % piperidinom u DMF-u ili *N*-metil-pirolidonu (NMP),[259]
- s piperidinom u CH_2Cl_2 (nije preporučljiv jer nastaju talozi soli amina),[278]
- s 2 %-tnim 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undekan-7-enom (DBU) u DMF-u.[279]

Na primjeru spoja **104** (Shema 8) ispitano je nekoliko načina uklanjanja Fmoc zaštitne skupine:

1. U reakcijsku smjesu spoja **104** (1,474 g; 1,378 mmol) u suhom THF (10 mL) dodani su oktantiol (2,39 mL; 1,378 mmol) i DBU (6,2 μL; 0,03 eq). Nakon miješanja reakcijske smjese 24 sata dodana je dodatna količina DBU (6,2 μL) i nastavljeno je miješanje naredna 3 dana. Reakcijom su nastali neočekivani produkti, odnosno došlo je do uklanjanja kladinoze na makrolidu.
2. Spoj **104** je otopljen u 50 %-tnom piperidinu u CH_2Cl_2 (20 mL) i reakcijska je smjesa miješana 4 sata. Nakon uparavanja reakcijske smjese dobivene su velike količine kristala piperidin-klorida koji se nisu mogli ukloniti niti filtracijom niti ekstrakcijom.
3. Spoj **104** je otopljen u 20 %-tnom piperidinu u EtOAc (10 mL) i reakcijska je smjesa miješana 5 minuta. Nakon uparavanja reakcijske smjese dobiveno je 300 mg spoja **105** (80 % čistoće).

Iz navedenog primjera vidljivo je da uklanjanje Fmoc zaštitne skupine kod spoja **104** najpovoljnije kada se provodi u 20 %-tnom piperidinu u EtOAc.

4.2. Biološki profil pripravljenih konjugata nesteroidnih protuupalnih lijekova i makrolida

Kao što je ranije navedeno biološka aktivnost pripravljenih spojeva proučena je u sljedećim *in vitro* ispitivanjima: inhibicija produkcije TNF-α te inhibicija COX-1 i COX-2 izoenzima. Također je većini sintetiziranih spojeva određena minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) na više sojeva mikroorganizama.

Iz priloženih Tablica 6 i 7 vidljivo je da polazni NSAID-i ne pokazuju inhibiciju produkcije TNF-α, dok velika većina sintetiziranih konjugata pokazuje značajnu inhibiciju.

Konjugat **86a** je pokazao dobru selektivnost na COX-2 te je taj spoj najviše ispitivan. Iz Slike 24 vidljivo da je spoj **86a**, za razliku od indometacina (**2**) i ibuprofena (**4**), selektivni COX-2 inhibitor. Također za razliku od svojih polaznih molekula (indometacina i azitromicina) spoj **86a** pokazuje TNF-α inhibiciju u LPS stimuliranim RAW 264,7 stanicama (Slika 25).

Od daljnih sintetiziranih konjugata na položaju 9a makrolida konjugati **94b** i **94c** (aglikonski derivati makrolida i flufenamske kiseline i fluniksina) pokazali su se selektivnim inhibitorima COX-2 te *in vitro* inhibitorima produkcije TNF-α.

Određivanjem IC_{50} vrijednosti na COX-2 nekih derivata celekoksiba i valdekoksiba (prikazani u Tablici 8) vidljivo je da derivatizacija celekoksiba i valdekoksiba smanjuje njihovo djelovanje na COX-2 kao i njihovo povezivanje s makrolidima. Jedini su izuzetak konjugati **178** (konjugat celekoksiba i azitromicina na položaju 9a) i **209** (konjugat celekoksiba i telitromicina) koji su pokazali značajnu potentnost i selektivnost na enzim COX-2.

Iz priloženih rezultata ispitivanja minimalne inhibicijske koncentracije na više sojeva mikroorganizama (Tablica 9) utvrđeno je da se hidrolizom šećera pripravljenim konjugatima smanjuje odnosno potpuno uklanja antibakterijska aktivnost, a kod nekih i supstitucijom metilne skupine na položaju 3'-*N* desozamina nekom većom skupinom.

5. ZAKLJUČAK

1) S ciljem da se iskoristi jedinstveno farmakokinetičko ponašanje makrolida (nakupljanje u upalnim stanicama), kao i protuupalno djelovanje nesteroidnih protuupalnih lijekova i nekih makrolida sintetizirano je oko 90 konjugata koji sadrže obje podjedinice povezane esterskom, amidnom ili amino vezom preko odgovarajuće poveznice.

2) Da bi se mogli povezati s makrolidima pripravljeni su derivati celekoksiba i valdekoksiba (selektivni COX-2 inhibitori) s karboksilnom skupinom, dok su korišteni neselektivni NSAID-i po svojoj strukturi kiseline te nije bilo potrebno njihovo derivatiziranje.

3) U sintetiziranim konjugatima osim makrolidnog kostura (14- i 15- člani makrolidi) variran je položaj vezanja za poveznicu, kao i duljina poveznice.

4) Da bi se makrolidi mogli povezati s NSAID-ima pripravljeni su derivati azitromicina (15-člani makrolid) s poveznicom koja ima slobodnu hidroksilnu (na položaju 9a) ili amino-skupinu (na položajima 9a, 11, 3'-*N* i 4"). Također su pripravljeni derivati eritromicin A oksima, klaritromicina i telitromicina (14-člani makrolidi) s poveznicom koja ima slobodnu amino-skupinu (za klaritromicin na položajima 3'-*N* desozamina i 4"-*O*-kladinoze; za eritromicin A oksim na 9(E)-*O* i 3'-*N* desozamina te za telitromicin na položaju 11).

5) Najbolji prinosi u reakciji redukcije makrolida s 2-cijanoetilnim lancem (spoj **84**) u 3-aminopropilni derivat (spoj **85**) postignuti su katalitičkom hidrogenacijom uz katalizator PtO_2 u ledenoj octenoj kiselini.

6) Reakcijom dekladinozil-azitromicina (**185**) s 3-klorpropionil-kloridom u prisutnosti TEA došlo je neočekivano do esterifikacije hidroksilne skupine na položaju 6 makrolida.

7) Prilikom nukleofilnog napada s etil-jodidom na 3'-*N*-demetilni konjugat azitromicina i indometacina (spoj **115a**) nije dobiven željeni produkt, već je došlo do pucanja amidne veze u indometacinskoj podjedinici.

8) Najbolji uvjeti za uklanjanje Fmoc zaštitne skupine kod azitromicinskog derivata **104** postignuti su u 20%-tnom piperidinu u EtOAc.

9) Svi pripravljeni konjugati testirani su *in vitro* (inhibicija COX-1 i COX-2 enzima, inhibicija TNF-α te antibakterijsko djelovanje).

10) Analiza strukture i biološke aktivnosti pripravljenih konjugata pokazala je da:

a) konjugati neselektivnih COX-1/COX-2 inhibitora i makrolida **86a** (konjugat 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A i indometacina na položaju 9a makrolida), **94b** i **94c** (aglikonski derivati 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A i fluniksina, odnosno flufenamske kiseline na položaju 9a makrolida) pokazuju selektivnu inhibiciju COX-2 enzima, a također i dobru inhibiciju produkcije TNF-α,

b) konjugati selektivnih COX-2 inhibitora (celekoksib i valdekoksib) i makrolida pokazuju smanjenje inhibicije COX-2 enzima, uz izuzetak konjugata **178** (konjugat celekoksiba i 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A na položaju 9a makrolida) i konjugata **209** (konjugat celekoksiba i telitromicina), koji su se pokazali kao potentni i selektivni inhibitori COX-2 enzima,

c) polazni NSAID-i ne pokazuju inhibiciju produkcije TNF-α, dok većina testiranih konjugata NSAID-a i makrolida pokazuju značajnu inhibiciju produkcije TNF-α,

d) iz priloženih rezultata ispitivanja minimalne inhibitorne koncentracije na više sojeva mikroorganizama utvrđeno je da se sintetiziranim konjugatima smanjuje antibakterijska aktivnost hidrolizom šećera te supstitucijom metilne skupine na položaju 3'-*N* desozamina nekom većom skupinom.

6. LITERATURA

1. M. Bulat, J. Geber, i Z. Lacković, *Medicinska farmakologija*, Medicinska naklada, (2001) 433–435
2. R. P. Gladue, G. M. Bright, R. E. Isaacson, and M. F. Newborg, *Antimikrob. Agents Chemoter.* **33:3** (1989) 277–282
3. K. M. Olsen, G. S. San Pedro, L. P. Gann, P. O. Gubbins, D. Halinski, and G. D. Campbell, JR., *Antimicrob. Agents Chemother.* **40** (1996) 2582–2585
4. O. Čulić, V. Eraković, and M. J. Parnham, *Eur. J. Pharmacol.* **429** (2001) 209–229
5. M. T. Labro, *J. Antimicrob. Chemother.* **41** (1998) 37–46
6. M. Merćep, M. Mesić, L. Tomašković, and S. Marković, PCT WO 2004/005309 A2 (2004)
7. J. R. Vane, *J. Physiol. Pharmacol.* **51** (2000) 573–586
8. C. Gerhardt, *Ann. Chem. Pharm.* **87** (1853) 149–179
9. H. von Gilm, *Ann. Chem. Pharm.* **112:2** (1859) 180–185
10. P. Schröder and K. Kraut, *Ann. Chemie Pharmacie* **150:1** (1869) 1–20
11. J. Wallace, *Gastroenterology* **112** (1997) 1000–1016
12. J. R. Vane, R. J. Flower, and R. M. Botting, *Stroke* **21** (1990) Suppl:IV-12
13. http://www.history.com/this-day-in-history.do?action=VideoArticle&id=52415
14. Pflügers Archiv, *Eur. J. Physiol.* **84**:**11-12** (1901) 527–546
15. D. Jeffreys, *Bloomsbury USA*, (2005) 73
16. S. Moncada, S. H. Ferreira, and J. R. Vane, *Eur. J. Pharmacol.* **31:2** (1975) 250–260
17. S. H. Ferreira, S. Moncada, and J. R. Vane, *Br. J. Pharmacol.* **47:3** (1973) 629P–630P
18. S. H. Ferreira, S. Moncada, and J. R. Vane, *Nature: New biology* **231:25** (1971) 237–239
19. J. R. Vane, *Nature: New biology* **231:25** (1971) 232–235
20. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1982/vane-autobio.html
21. A. Koeberle and O. Werz, *Curr. Med. Chem.* **16:32** (2009) 4274–4296
22. D. M. Aronoff and E. G. Neilson, *Am. J. Med.* **111:4** (2001) 304–315
23. G. Green, *Clin. Cornerstone* **3:5** (2001) 50–60
24. S. Rossi, *Australian Medicines Handbook,* 11th edition, Australian Medicines Handbook Pty Ltd, Adelaide (2010)
25. www.halmed.hr
26. G. Traversa, A. M. Walker, F. M.. Ippolito, B. Caffari, L. Capurso, A. Dezi, M. Koch, M. Maggini, S. Alegiani, and R. Raschetti, *Epidemiology* **6:1** (1995) 49–54

27. S. H. Roth, E. A. Tindall, A. K. Jain, F. G. McMahon, P. A. April, B. I. Bockow, S. B. Cohen, and R. M. Fleischmann, *Arch. Int. Med.* **153:22** (1993) 2565–71
28. T. D. Warner, F .Giuliano, I . Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell, and J. R. Vane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96:13** (1999) 7563–8
29. G. Singh and G. Triadafilopoulus, *J. Rheumatol.* **26:26** (1999) 18–24
30. P. M. Kearney, C. Baigent, J. Godwin, H. Halls, J. R. Emberson, and C. Patrono, *BMJ (Clin. Research)* **332:7553** (2006) 1302–1308
31. J. Page and D. Henry, *Arch. Int. Med.* **160:6** (2000) 777–784
32. P. J. Hayball, *Drugs* **52:5** (1996) 47–58
33. W. J. Wallis and P. A. Simkin, *Clin. Pharm.* **8** (1983) 496–522
34. C. Rolf, B. Engstrom, C. Beauchard, L. D. Jacobs, and A. LeLiboux, *Rheumatol.* **38** (1999) 564–567
35. J. B. Whitlam, K. F. Brown, M. J. Crooks, and G. F. W. Room, *Clin. Pharmacol. Ther.* **29** (1981) 487–492
36. R. C. Glass and A. J. Swannell, *Br. J. Clin. Pharmacol*. **6** (1978) 453P–454P
37. H. W. *Emori*, G. D. Champion, R. Bluestone, and H. E. Paulus, *Ann. Rheum. Dis*. **32** (1973) 433–435
38. Von Euler US, *Wien Klin. Wochenschr.* **14:33** (1935) 1182–1183
39. M. W. Goldblatt, *J. Physiol.* **84:2** (1935) 208–18
40. K. C. Nicolaou, and E. J. Sorensen, *Classics Total Syn*. Weinheim, Germany, (1996) 65
41. J . Komoto, T. Yamada, K. Watanabe, D. Woodward, and F. Takusagawa, *Biochem.* **45:7** (2006) 1987–1996
42. J. Komoto, T. Yamada, K. Watanabe, D. Woodward, and F. Takusagawa, *Biochem.* **43:8** (2004) 2188–2198
43. R. G. Kurumbail, A. M. Stevens, J. K. Gierse, J. J. McDonald, R. A. Stegeman, J. Y. Pak, D. Gildehaus, J. M. Miyashiro, T. D. Penning, K. Seibert, P. C. Isakson, and W. C. Stallings, *Nature* **384:6610** (1996) 644–648
44. R. T. Schoen and R. J. Vender, *Am. J. Med.* **86** (1989) 449-458
45. J. Vane and R. Botting, *FASEB J.* **1:2 (**1987) 89-96
46. K. Tsuboi, Y. Sugimoto, and A. Ichikawa, *Prostag. Oth. Lipid M.* **68-69** (2002) 535–556
47. J. L. Masferrer, K. Seibert, B. Zweifel, and P. Needleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 3917–3921
48. L. J. Crofford, *J. Rheumatol.* **24: 49** (1997) 15-19
49. D. L. DeWitt and W. L. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 1412–1416
50. T. Hla and K. Neilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 7384–7388

51. R. Botting, S. Ayoub, P. Colville-Nash, and D. Willoughby, *Pharmacologist* **44:1** (2002) A54
52. R. Botting, *Thromb. Res.* **110:5-6** (2003) 269–272
53. M. E. Turini and R. N. DuBois, *Annu. Rev. Med.* **53** (2002) 35–57
54. C. Yokoyama and T. Tanabe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165:2** (1989) 888–894
55. C. D. Funk, L. B. Funk, M. E. Kennedy, A. S. Pong, and G. A. Fitzgerald, *FASEB J.* **5:9** (1991) 2304–2312
56. J. A. Mitchell, P. Akarasereenont, C. Thiemermann, R. J. Flower, and J. R. Vane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90:24** (1993) 11693–11697
57. P. Needleman and P. C. Isakson, *J. Rheumatol.* **24:49** (1997) 6–8
58. F. L. Lanza, G. L. Royer, and R. S. Nelson, *N. Engl. J. Med.* **303** (1980) 136–138
59. M. Lee, B. Cryer and M. Feldman, *Ann. Intern. Med.* **120** (1994) 184–189
60. Y. S. Bakhle, *Drugs Today* **35:4-5** (1999) 237–250
61. C. Sakamoto, *J. Gastroenterol.* **33:5** (1998) 618–624
62. J. A. Mitchell and T. D. Warner, *Br. J. Pharmacol.* **128:6** (1999) 1121–32
63. N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, and D. L. Simmons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99:21** (2002) 13926–13931
64. B. Kis, J. A. Snipes, and D. W. Busija, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315:1** (2005) 1–7
65. J. R. Vane and R. M. Botting, *Scand. J. Rheumatol.* **102** (1996) 9–21
66. Y. Alamanos, P. V. Voulgari, and A. A. Drosos, *Semin. Arthritis Rheum.* **36:3** (2006) 182–188
67. S. E. Gabriel, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **27** (2001) 269–281
68. D. P. Symmons, E. M. Barrett, C. R. Bankhead, D. G. Scott, and A. J. Silman, *Br. J. Rheumatol.* **33** (1994) 735–739
69. T. Garrood, and D.L. Scott, *Bio. Drugs* **15:8** (2001) 543–561
70. S. Fiorucci, E. Antonelli, J. L. Burgaud, and A. Morelli, *Drug Safety* **24** (2001) 801–811
71. A. Sawar and T. L. Moore, *Drugs Today* **33** (1997) 299–306
72. J. van Ryn, G. Trummlitz, and M. Pairet, *Current Med. Chem.* **7** (2000) 1145–1161
73. X. de Leval, T. Dassesse, J. M. Dogné, J. Delarge, F.Somers, P. de Tullio, Y. Henrotin, B. Pirotte, and J. M. Dogne, *Current Med. Chem.* **7** (2000) 1041–1062
74. J. M. Janusz, P. A. Young, M. W. Scherz, K. Enzweiler, L. I. Wu, L. Gan, S. Pikul, K. L. McDow-Dunham, C. R. Johnson, and C. B. Senanayake, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 1112–1123
75. B. Hinz and K. Brune, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2** (2002) 367–375
76. F. C. Arnett, S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, and L. A. Healey, *Arthritis Rheum.* **31** (1988) 315–324
77. P. C. Gøtzsche, *Controlled Clin. Trials* **10:1** (1989) 31–56

78. L. W. Moreland and J. R.O'Dell, *Arthritis Rheum.* **46** (2002) 2553–2563
79. K. G. Saag, L. A. Criswell, K. M. Sems, M. D. Nettleman, and S. Kolluri, *Arthritis Rheum.* **39** (1996) 1818–1825
80. K. G. Saag, R. Koehnke, J. R. Caldwell, R. Brasington, L. F. Burmeister, and B. Zimmerman, *Am. J. Med.* **96** (1994) 115–123
81. R. McDougall, J. Sibley, M. Haga, and A. Russell, *J. Rheumatol.* **21** (1994) 1207–1213
82. N. Svartz, *Acta Med. Scand.* **110** (1942) 577–598
83. D. T. Felson, J. J. Anderson, and R.F. Meenan, *Arthritis Rheum.* **33** (1990) 1449–1461
84. T. R. Mikuls and J. O'Dell, *Arthritis Rheum.* **43** (2000) 464–465
85. H. K. Choi, M. A. Hernan, J. D. Seeger, J. M. Robins, and F. Wolfe, *Lancet* **359** (2002) 1173–1177
86. C. Bombardier, L. Laine, A. Reicin, D. Shapiro, Burgos-Vargas, B. Davis, R. Day, M. B. Ferraz, C. J. Hawkey, and M. C. Hochberg, *N. Engl. J. Med.* **343** (2000) 1520–1528
87. F. E. Silverstein, G. Faich, J. L. Goldstein, L. S. Simon, K. M. Verburg, and G. S. Geis, *JAMA* **284** (2000) 1247–1255
88. G. A. FitzGerald and C. Patrono, *N. Engl. J. Med.* **345** (2001) 433–442
89. K. Higuchi, E.Umegaki, T. Watanabe, Y. Yoda, E. Morita, M. Murano, S. Tokioka, and T. Arakawa, *J. Gastroenterol.* **44:9** (2009) 879–888
90. D. C. Sun, S. H. Roth, C. S. Mitchell, and D. W. Englund, *Am. J. Dig. Dis.* (1974) 405-410
91. M. Levy, *N. Engl. J. Med.* **290** (1974) 1158–1162
92. G. R. Silvoso, K. J. Ivey, J. H. Butt, O. O. Lockard, S. D. Holt, C. Sisk, W. N. Baskin, P. A. Mackercher, and J. Hewett, *Ann. Intern. Med.* **91** (1979) 517–520
93. D. R. Lichtenstein, S. Syngal, and M. M. Wolfe, *Arthritis Rheum.* **38** (1995) 5–18
94. E. N. Larkai, J. L. Smith, M. D. Lidsky, and D. Y. Graham, *Am. J. Gastroenterol*. **82** (1987) 1153–1158
95. G. Singh, D. R. Ramey, D. Morfeld, H. Shi, H. T. Hatoum, and J. F. Fries, *Arch. Intern. Med.* **156** (1996) 1530–1536
96. G. Singh, *Am. J. Med.* **105** (1998) 31S–38S
97. D. J. Bjorkman, *Am. J. Med.* **101:1A** (1996) 25S–32S
98. G. F. Longstreth, *Am. J. Gastroenterol.* **90** (1995) 206–210
99. J. M. Greene and R. N. Winickoff, *Arch. Intern. Med.* **152** (1992) 1995–2002
100. S. E. Gabriel, L. Jaakkimainen, and C. Bombardier, *Ann. Intern. Med.* **115** (1991) 787–796
101. M. R. Griffin, J. M. Piper, J. R. Daugherty, M. Snowden, and W.A. Ray, *Ann. Intern. Med.* **114** (1991) 787257–787263
102. M. C. Thomas, *Med. J. Aust.* **172:4** (2000) 184–185

103. M. E. De Broe and M. M. Elseviers, *N. Engl. J. Med.* **338:7** (1997) 446–452
104. Information for Healthcare Professionals: Celecoxib (marketed as Celebrex®), http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm124655.htm
105. VIOXX® (rofecoxib) Information Center, http://www.merck.com/newsroom/vioxx/
106. Information for Healthcare Professionals: Valdecoxib (marketed as Bextra®), http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm124649.htm
107. G. Salinas and U. C. Rangasetty, *Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.* **12:2** (2007) 98–111
108. De Moore, *Drug safety: Int. J. Med. Toxicol. Drug Ex.* **25:5** (2002) 345–372
109. S. Ferreira, S. Moncada, and J. Vane, *Nat. New. Biol.* **231:25** (1971) 237–239
110. F. Hart and P. Boardman, *Br. Med. J.* **5363** (1963) 965–970
111. S. S. Adams, *J. Clin. Pharmacol.* **32:4** (1992) 317–323
112. G. Geisslinger, K. Dietzel, H. Bezler, B. Nuernberg, and K. Brune, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **27:7** (1989) 324–328
113. P. A. Todd and E. M. Sorkin, *Drugs* **35** (1988) 244-285
114. P. D. Fowler, M. F. Shadforth, P. R. Crook, and V. A. John, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **25** (1983) 389–394
115. N. M. Davies, and K. E.Anderson, *Clin. Pharmacokinet*. **33** (1997) 184–213
116. P. J. Harrington and E. Lodewijk, *Org. Process Res. Dev.* **1:1** (1997) 72–76
117. L. J. Marnett, and A. S. Kalgutkar, *Trends Pharmacol. Sci.* **20:11** (1999) 465–469
118. I. A. Mardini and G. A. FitzGerald, *Mol. Interv.* **1:1** (2001) 30–38
119. L. J. Marnett, and A. S. Kalgutkar, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2:4** (1998) 482–490
120. R. J. Flower, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2:3** (2003) 179–191
121. B. Hinz and K. Brune, *Pharmacol*. **300:2** (2002) 367–375
122. J. Delarge, X. de Leval, P. de Tullio, J. M.. Dogne, Y. Henrotin, B. Pirotte, and F. Somers, *Curr. Med. Chem.* **7:10** (2000) 1041–1063
123. A. S. Kalgutkar and Z. Zhao, *Curr. Drug Targets* **2: 1** (2001) 79–106
124. J. A. Baron, R. S. Sandler, R. S. Bresalier, A. Lanas, D. G. Morton, R. Riddell, E. R. Iverson, and D. L. DeMets, *Lancet* **372:9651** (2008) 1756–1764
125. ADAPT Research Group, *Publ. Libr. Sci. Clin. Trials* **1:7** (2006) 33
126. N. M. Davies, A. J. McLachlan, R. O. Day, and K. M. Williams, *Clin. Pharmacokinet.* **38** (2000) 225–242
127. M. J. Yelland, C. J. Nikles, N. McNairn, C. B. Del Mar, P. J. Schluter, and R. M. Brown, *Rheumatol.* **46:1** (2007) 135–140
128. B. G.Katzung, *Basic Clin. Pharmacol.*, 10th edidition. McGraw Hill, (2007) 579

129. P. Kearney, C. Baigent, J. Godwin, H. Halls, J. Emberson, and C. Patrono, *Brit. Med. J.* **332:7553** (2006) 1302–1308

130. P. McGettigan and D. Henry, *J. Amer. Med. Assoc.* **296:13** (2006) 1633–1644

131. F. E. Silverstein, G. Faich, J. L. Goldstein, L. S. Simon, T. Pincus, A. Whelton, R. Makuch, G. Eisen, N. M. Agrawal, W. F. Stenson, A. M. Burr, W. W. Zhao, J. D. Kent, J. B. Lefkowith, K. M. Verburg, and G. S. Geis, *J. Amer. Med. Assoc.* **284:10** (2000) 1247–1255

132. http://www.enotes.com/topic/Discovery_and_development_of_cyclooxygenase_2_inhibitors

133. S. E. Kimmel, J. A. Berlin, M. Reilly, J. Jaskowiak, L. Kishel, J. Chittams, and B. L. Strom, *Ann. Intern. Med.* **142** (2005) 157–164

134. D. Mukherjee, S. E. Nissen, and E. J. Topol, *J. Amer. Med. Assoc.* **286:8** (2001) 954–959

135. R. A. Halpin, A. G. Porras, L. A. Geer, M. R. Davis, D. Cui, G. A. Doss, E. Woolf, D. Musson, C. Matthews, R. Mazenko, J. I. Schwartz, K. C. Lasseter, K. P. Vyas, and T. A. Baillie, *Drug. Metab. Dispos.* **28:10** (2000) 1244–1254

136. http://www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=4054991

137. R. S. Bresalier, R. S. Sandler, H. Quan, J. A. Bolognese, B. Oxenius, K. Horgan, C. Lines, R. Riddell, D. Morton, A. Lanas, M. A. Konstam, and J. A. Baron, *N. Engl. J. Med.* **352:11** (2005) 1092–1102

138. W. Jaksch, C. Dejaco, and M. Schirmer, *Rheumatol. Internat.* **28:12** (2008) 1187–1195

139. J. Karha and E. J. Topol, *Cleveland Clin. J. Med.* **71:12** (2004) 933–939

140. D. H. Solomon, R. J. Glynn, R. Levin, and J. Avorn, *Arch. Int.. Med.* **162:10** (2002) 1099–1104

141. C. Bombardier, L. Laine, A. Reicin, D. Shapiro, R. Burgos-Vargas, B. Davis, R. Day, M. B. Ferraz, C. J. Hawkey, M. C. Hochberg, T. K. Kvien, and T. J. Schnitzer, Vigor Study Group, *New Engl. J. Med.* **343:21** (2000) 1520–1528

142. http://www.drugs.com/nda/arcoxia_070427.html

143. J. K. Takemoto, J. K. Reynolds, C. M. Remsberg, K. R.Vega-Villa, and N. M. Davies, *Clin. Pharmacokinet.* **47** (2008) 703–720

144. N. G. B. Agrawal, M. J. Rose, C. Z. Matthews, E. J. Woolf, A. G. Porras, L. A. Geer, P. J. Larson, J. Cote, S. C. Dilzer, K. C. Lasseter, I. Alam, K. J. Petty, and K. M. Gottesdiener, *J. Clin. Pharmacol.* **43:3** (2003) 268–276

145. Withdrawal of Market Authorization for Prexige®, http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/advisories-avis/_2007/2007_141-eng.php

146. J. B. Mangold, H. Gu, L. C. Rodriguez, J. Bonner, J. Dickson, and C. Rordorf, *Drug Metab. Dispos.* ***32:5*** (2004) 566–571

147. A. Karim, A. Laurent, M. E. Slater, M. E. Kuss, J. Qian, S. L. Crosby-Sessoms, and R. C. Hubbard, *J. Clin. Pharmacol.* **41:10** (2001) 1111–1119
148. J. Barden, J. E. Edwards, H. J. McQuay, and R. A. Moore, *BMC Anesthesiology* **3:1** (2003) 1–9
149. J. J. Zhang, E. L. Ding, and Y. Song, *J. Amer. Med. Assoc.* **296:13** (2006) 1619–1632
150. E. Flyn, M. Sigal, P. Wiley, and K. J. Gerzon, *Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 3121
151. J. M. McGuire, R. L. Bunch, R. C. Anderson, H. E. Boaz, E. H. Flyn, H. M. Powell, and J. W. Smith, *Antibiot. Chemother.* **2** (1952) 281
152. S. Alvarez-Elcoro and M. J. Enzler, *Mayo Clin. Proc.* **74:6** (1999) 613-634
153. N. Noriyuki, H. Tatsuo, T. Tatsuyoshi, O. Yuji, and Y. Osamu, *J. Am. Chem. Soc.* **108:15** (1986), 4645–4647
154. http://www.wipo.int/sme/en/case_studies/pliva.htm
155. S. Djokic, G. Kobrehel, N. Lopotar, B. Kamenar, A. Nagl, and D. J. Mrvos, *J. Chem. Res. Synop.* **5** (1988) 152–153
156. N. Scheinfeld, *J. Drug Dermat.* **3** (2004) 409–413
157. W. Schonfeld and S. Mutak, *Azithromycin and novel azalides*, in: W. Schonfeld and H. A. Kirst (Ed.), *Macrolide Antibiotic,* Birkhauser Verlag Basel, Switzerland (2004) 73-94
158. T. Tenson , M. Lovmar, and M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **330:5** (2003) 1005–1014
159. P. Vannuffel and C. Cocito, *Drugs* **51:1** (1996) 20–30
160. G. G. Zhanel, M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, and J. A. Karlowsky, *Drugs* **61:4** (2001) 443–498
161. M. Ishiguro, H. Koga, S. Kohno, T. Hayashi, K. Yamaguchi, and M. Hirota, *J. Antimicrob. Chemother.* **24** (1989) 719–729
162. J. R. Martin, P. Johnson, and M. F. Miller. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** (1985) 314-319
163. R. P. Gladue, G. M. Bright, R. E. Isaacson, and M. F. Newborg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **33** (1989) 277–282
164. J. Blais, D. Beauchamp, and S. Chamberland, *J. Antimicrob. Chemother*. **34** (1994) 371–382
165. W. L. Hand and D. L. Hand, *Int. J. Antimicrob. Agents* **18** (2001) 419–425
166. K. A. Rodvold, *Clin. Pharmacokinet.* **37** (2001) 385–398
167. A. Pascual, S. Ballesta, I. García, and E. J. Perea, *Clin. Microbiol. Infect.* **7** (2001) 65–69
168. M. Bosnar, Ž. Kelnerić, V. Munić, V. Eraković, and M. J. Parnham, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49:6** (2005) 2372–2377
169. N. Keicho and S. Kudoh, *Am. J. Respir. Med.* **1:2** (2002) 119–131

170. Y. S. Lopez-Boado and B. K. Rubin, *Curr. Opin. Pharmacol.* **8:3** (2008) 286–291
171. M. J. Schultz, *J. Antimicrob. Chemother.* **54:1** (2004) 21–28
172. S. C. Piscitelli, L. H. Danziger, and K. A. Rodvold, *Clin. Pharm.* **11:2** (1992) 137–152
173. F. H. Weber, R. D. Richards, and R. W. McCallum, *Amer. J. Gastroenterol.* **88:4** (1993) 485–490
174. K. D. Clay, J. S. Hanson, S. D. Pope, R. W. Rissmiller, P. P. Purdum III, and P. M. Banks, Ann. Intern. Med. **144:6** (2006) 415–420
175. J. A. Washington II and W. R.Wilson, *Mayo Clin. Proc.* **60** (1985) 189–203
176. J. A. Washington II and W. R.Wilson, *Mayo Clin. Proc.* **60** (1985) 271–278
177. http://filipinoachievers.wordpress.com/2010/06/24/abelardo-aguilar-filipino-scientist-discovered-erythromycin/
178. R. B. Woodward, E. Logusch, K. P. Nambiar, K. Sakan, D. E. Ward, B.-W. Au-Yeung, P. Balaram, L. J. Browne, P. J. Card, C. H. Chen, R. B. Chênevert, A. Fliri, K. Frobel, H.-J. Gais, D. G. Garratt, K. Hayakawa, W. Heggie, D. P. Hesson, D. Hoppe, I. Hoppe, J. A. Hyatt, D. Ikeda, P. A. Jacobi, K. S. Kim, Y. Kobuke, K. Kojima, K. Krowicki, V. J. Lee, T. Leutert, S. Malchenko, J. Martens, R. S. Matthews, B. S. Ong, J. B. Press, Rajan Babu, G. Russeau, H. M. Sauter, M. Suzuki, K. Tatsuta, L. M. Tolbert, E. A. Truesdale, I. Uchida, Y. Ueda, T. Uyehara, A. T. Vasella, W. C. Vladuchick, P. A. Wade, R. M. Williams, and N. C. Wong, *J. Amer. Chem. Soc.* **103** (1981) 3210–3212
179. G. M. Bright, A. A. Nagel, J. Bordner, K. A. Desai, J. N. Dibrino, J. Nowakowska, L. Vincent, R. M. Watrous, F. C. Sciavolino, A. R. English, J. A. Retsema, M. R. Anderson, L. A. Brennan, R. J. Borovoy, C. R. Cimochowski, J. A. Faiella, A. E. Girard, D. Girard, C. Herbert, M. Manousos, and R. Mason, *J. Antibiot.* **41** (1988) 1029–1047
180. G. Foulds, R. M. Shepard, and R. B. Johnson**,** *J. Antimicrob. Chemother.* **25:A** (1990) 73–82
181. P. Kurath, P. H. Jones, R. S. Egan, and T. J. Perun, *Experimentia* **27** (1971) 362
182. V. C. Stephens and J. W. Conine, *Antibiotic Annu.* **6 (**1950–1959) 346
183. Y. Watanabe, S. Morimoto, and S. Omura, US 4 331 803 (1982)
184. S. Morimoto, Y. Takahashi, Y. Watanabe, and S. Omura, *J. Antibiot.* **37** (1984) 187–189
185. (a) Y. Watanabe, T. Adachi, T. Asaka, M. Kashimura, and S. Morimoto, *Heterocycles* **31** (1990) 2121–2124, (b) Y. Watanabe, S. Morimoto, T. Adachi, M. Kashimura, and T. Asaka, *J. Antibiot.* **46** (1993) 647–660
186. Y. Watanabe, M. Kashimura, T. Asaka, T. Adachi, S. Morimoto, *Heterocycles* **36** (1993) 243–247

187. Y. Watanabe, T. Adachi, T. Asaka, M. Kashimura, T. Matsunaga, S. Morimoto, *J. Antibiot*. **46** (1993) 1163–1167
188. C. S. Shain and G. W. Amsden, *Ann. Pharmacother.* **36:3** (2002) 452–464
189. G. G. Zhanel, M. Walters, A. Noreddin, L. M. Vercaigne, A. Wierzbowski, J. M. Embil, A. S. Gin, S. Douthwaite, and D. J. Hoban, *Drugs* **62** (2002) 1771–1804
190. J. A. Barman Balfour and D. P. Figgitt, *Drugs* **61** (2001) 815–829
191. A. Bryskier, *Clin. Microbiol. Infect.* **6** (2000) 661–669
192. D. J. Hoban, G. G. Zhanel, and J. A. Karlowsky, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **35** (1999) 37–44
193. D. J. Hoban, K. Waites, and D. Felmingham, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45** (2003) 251–259
194. F. Namour, D. H. Wessels, M. H. Pascual, D. Reynolds, E. Sultan, and B. Lenfart, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45** (2001) 170–175
195. C. Perret and D. H. Wessels, *Clin. Microbiol. Infect.* **1** (2000) 203–204
196. A. A. Pascual, S. Ballesta, I. Garcia, and E. J. Perea, *Clinic. Microbiol. Infect.* **7** (2001) 65–69
197. A. Bryskier, *Clin. Microbiol. Infect.* **6** (2000) 661–669
198. F. J. Martinez, J. L. Curtis, and R. Albert, *Int. J. COPD* **3:3** (2008) 331–350
199. S. K. Goswami, S. Kivity, and Z. Marom, *Am. Rev. Respir. Dis.* **141** (1990) 72–78
200. J. Tamaoki, K. Takeyama, E. Tagaya, and K. Konno, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39** (1995) 1688–1690
201. T. Shimizu, S. Shimizu, R. Hattori, E. C. Gabazza, and Y. Majima, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168** (2003) 581–587
202. Y. Imamura, K. Yanagihara, Y. Mizuta, M. Seki, H. Ohno, Y. Higashiyama, Y. Miyazaki, K. Tsukamoto, Y. Hirakata, K. Tomono, J. Kadota, and S. Kohno**,** *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (2004) 3457–3461
203. Y. Shibuya, P. J. Wills, and P. J. Cole, *Respiration* **68** (2001) 615–619
204. R. Anderson, *J. Infect. Dis.* **159** (1989) 966–973
205. C. Wenisch, B. Parschalk, K. Zedtwitz-Liebenstein, A. Weihs, I. el Menyawi, and W. Graninger, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40** (1996) 2039–2042
206. H. Abdelghaffar, D. Vazifeh, and M. T. Labro, *J. Antimicrob. Chemother.* **38** (1996) 81–93
207. M. J. Schultz, P. Speelman, C. E. Hack, W. A. Buurman, S. J. H. van Deventer, and T. van der Poll, *J. Antimicrob. Chemother.* **46** (2000) 235–240
208. R. Anderson, A. C. Fernandes, and H. E. Eftychis, *J. Antimicrob. Chemother.* **14** (1984) 41–50
209. G. J. Ras and R. Anderson, *J. Antimicrob. Chemother.* **17** (1986) 185–193

210. S. Kudoh, T. Uetake, K. Hagiwara, M. Hirayama, L. H. Hus, H. Kimura, and Y. Sugiyama, *Jpn. J. Thorac. Dis.* **25** (1987) 632–642
211. H. Takeda, H. Miura, M. Kawahira, H. Kobayashi, S. Otomo, and S. Nakaike, *Kansenshogaku Zasshi* **63** (1989) 71–78
212. T. Mitsuyama, T. Tanaka, K. Hidaka, M. Abe, and N. Hara, *Respiration* **62** (1995) 269–273
213. H. Abdelghaffar, D. Vazifeh, and M. T.Labro, *J. Immunol.* **159** (1997) 3995–4005
214. H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi, T. Kikutani, H. Okazaki, M. Sato, N. Akiyama, S. Shoji, K. Hiramatsu, and K. Ito, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **210** (1995) 781–786
215. H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi, S. Kawasaki, T. Kohyama, M. Sato, M. Tanaka, T. Kasama, K. Kobayashi, J. Nakajima, and K. Ito, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **156** (1997) 266–271
216. M. J. Schultz, P. Speelman, S. Zaat, S. J. H. van Deventer, and T. van der Poll, *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** (1998) 1605–1609
217. K. Morikawa, H. Watabe, M. Araake, and S. Morikawa, *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**(1996) 1366–1370
218. K. Yanagihara, K. Tomono, M. Kuroki, Y. Kaneko, T. Sawai, H. Ohno, Y. Miyazaki, Y. Higashiyama, S. Maesaki, J. I. Kadota, and S. Kohno, *Clin. Exp. Immunol.* **122** (2000) 67–71
219. J. Kadota, Y. Matsubara, Y. Ishimatsu, M. Ashida, K. Abe, R. Shirai, K**.** Iida, K**.** Kawakami, H. Taniguchi, T. Fujii, M. Kaseda, **S.** Kawamoto, and S. Kohno, *Clin. Exp. Immunol.* **103** (1996) 461–466
220. O. Sakito, J. Kadota, S. Kohno, K. Abe, R. Shirai, and K. Kara, *Respiration* **63** (1996) 42–48
221. R. Shirai, K. Abe, M. Yoshinaga, Y. Ishimatsu, Y. Matsubara, K. Kawakami, K. Iida, T. Fujii, S. Kawamoto, M. Kaseda , J. Kadota, and S. Kohno, *Kansenshogaku Zasshi* **71** (1997) 1155–1161
222. S. Abe, H. Nakamura, S. Inoue, H. Takeda, H. Saito, S. Kato, N. Mukaida, K. Matsushima, and H. Tomoike, *Am. J. Resp. Cell Mol.* **22** (2000) 51–60
223. T. Ichiyama, M. Nishikawa, T. Yoshitomi, S. Hasegawa, T. Matsubara, T. Hayashi, and S. Furukawa, *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (2001) 44–47
224. Y. Aoki and P. N. Kao, *Antimicrob. Agents Chemother.* **43** (1999) 2678–2684
225. K. Takeoka, T. Ichimiya, and T. Yamasaki, *Chemotherapy* **44** (1998) 190–197
226. K. Kawamura-Sato, Y. Iinuma, T. Hasegawa, T. Horii, T. Yamashino, and M. Ohta, *Antimicrob. Agents Chemother.* **44** (2000) 2869–2872
227. C. R. Hansen, T. Pressler, C. Koch, and N. Høiby, *J. Cyst. Fibros.* **4:1** (2005) 35–40
228. A. Jaffe, J. Francis, M. Rosenthal, and A. Bush, *Lancet* **351** (1998) 420–421

229. J. Wolter, S. Seeney, S. Bell, S. Bowler, P. Masel, and J. McCormack, *Thorax.* **57** (2002) 212–216

230. A. Equi, I. M. Balfour-Lynn, A. Bush, and M. Rosenthal, *Lancet* **360** (2002) 978–984

231. L. Saiman, B. C. Marshall, N. Mayer-Hamblett, J. L. Burns, A. L. Quittner, D. A. Cibene, S. Coquillette, A. Y. Fieberg, F. J. Accurso, and P. W. Campbell, *J. Am. Med. Assoc.* **290** (2003) 1749–1756

232. H. Takeda, H. Miura, M. Kawahira, and H. Koyabashi, *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **63** (1989) 71–78

233. H. Nakamura, S. Fujishima, T. Inoue, Y. Ohkubo, K. Soejima, Y. Waki, M. Mori, *T.* Urano, F. Sakamaki, S. Tasaka, A. Ishizaka, M. Kanazawa, and K. Yamaguchi, *Eur. Respir. J.* **13** (1999) 1371–1379

234. H.Kobayashi, H. Takeda, S. Sakayori, Y. Kawakami, Y. Otsuka, M. Tamura, K. Konishi, S. Tanimoto, M. Fukakusa, K. Shimada, Y. Sano, Y. Arai, H. Shihido, H. Watanabe, E. Sakamoto, K. Nagata, T. Nakatani, N. Tsuboi, S. Odagiri, K. Suzuki, Y. Yoshiike, Y. Hirai, T. Okubo, H. Ikeda, M. Arakawa, K. Wada, H. Tsukada, A. Sato, K. Chida, N. Narita, M. Sawaki, K. Mikasa, R. Soejima, Y. Niki, N. Okimoto, T. Sasaki, Y. Matsumoto, Y. Sugimoto, M. Kido, Y. Nikaido, K. Arakawa, K. Kohno, T. Ishibashi, M. Takamoto, Y. Kitahara, K. Hara, S. Kohno, J. Kadora, M. Nasu, Y. Goto, T. Yamasaki, A. Saito, H. Fukuhara, and J. Inadome, *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis*. **69** (1995) 711–722

235. A. S. Niven and G. Argyros, *Chest* **123** (2003) 1254–1265

236. M. Kraft, G. H. Cassell, J. Pak, and R. J. Martin, *Chest* **121** (2002) 1782–1788

237. P. N. Black, F. Blasi, C. R. Jenkins, R. Scicchitano, G. D. Mills, A. R. Rubinfeld, R. E. Ruffin, P. R. Mullins, J. Dangain, B. C. Cooper, D. Bem David, and L. Allegra, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164** (2001) 536–541

238. R. A. Pauwels, S. Buist, P. M. A. Calverley, C. R. Jenkins, and S. S.Hurd, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163** (2001) 1256–1276

239. A. T. Hill, E. J. Campbell, D. L. Bayley, S. L. Hill, and R. A. Stockley, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160** (1999) 1968–1975

240. A. White, S. Gompertz, D. Bayley, S. Hill, C. O'Brien, I. Unsal, and R. Stockley, *Thorax*. **58** (2003) 680–685

241. M. Miravitlles, *Eur. Respir. J.* **20:36** (2002) 9–19

242. J. Gómez, V. Baños, E. Simarro, M. Lorenzo Cruz, J. Ruiz Gómez, J. Latour, E. Garcia Martin, M. Canteras, and M. Valdes, *Rev. Esp. Quimioterap.* **13** (2000) 379–383

243. I. Basyigit, F. Yildiz, S. K. Ozkara, E. Yildirim, H. Boyaci, and A. Ilgazli, *Ann. Pharmacother.* **38** (2004) 1400–1405

244. D. Banerjee, O. A. Khair, and D. Honeybourne, *Eur. Respir. J.* **23** (2004) 685–691

245. T. Suzuki, M. Yanai, M. Yamaya, T. Satoh-Nakagawa, K. Sekizawa, S. Ishida, and H. Sasaki, *Chest*. **120** (2001) 730–733
246. M. Mercep, M. Mesic, L. Tomaskovic, M. Komac, B. Hrvačić, and S. Markovic, WO 02/055531 A1 (2002)
247. C. Agouridas, A. Denis, J.-M. Auger, Y. Benedetti, A. Bonnefoy, F. Bretin, J. F. Chantot, A. Dussarat, C. Fromentin, S. G. D'Ambrières, S. Lachaud, P. Laurin, O. Le Martret, V. Loyau, and N. Tessot, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 4080–4100
248. A. M. Costa and J. Vilarresa, *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 3371–3375
249. D. G. Batt, J. J. Petraitis, G. C. Houghton, D. P. Modi, G. A. Cain, M. H. Corjay, S. A. Mousa, P. J. Bouchard, M. S. Forsythe, P. P. Harlow, F. A. Barbera, S. M. Spitz, R. R. Wexler, and P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 41–58
250. D. J. Kertesz and M. Marx, *J. Org. Chem.* **51:12** (1986) 2315–232
251. a) J. H. Park, J. S. Chang, M. I. El-Gamal, W. K. Choi, W. S. Lee, H. J. Chung, H. I. Kim, Y. J. Cho, B. S. Lee, H. R. Jeon, Y. S. Lee, Y. W. Choi, J. Lee, and C. H. Oh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20:19** (2010) 5895–5899, b) M. Stjerndahl, and K.Holmberg, *J. Colloid Interf. Sci.* **291** (2005) 570–576, c) M. F. Simőesa, E. Valentea, M. J. Rodríguez Gómeza, E. Anesb, and L. Constantino, *Eur. J. Pharm. Sci.* **37** (2009) 257–263
252. G. M. Bright, A. A. Nagel, J. Bordner, K. A. Desai, J. N. Dibrino, J. Nowakowska, L. Vincent, R. M. Watrous, and F. C. Sciavolino, *J. Antibiot.* **41:8** (1988) 1029–1047
253. D. Romo, R. M. Rzasa, H. A. Shea, K. Park, J. M. Langenhan, L. Sun, A. Akhiezer, J. O. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 12237–12254
254. a) S. Djokić, G. Kobrehel, G. Lazarevski, N. Lopotar, Z. Tamburašev, B. Kamenar, A. Nagl, and I. Vicković, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **I** (1986) 1881–1890, b) M. V. Sigal Jr., P. F. Wiley, K. Gerzon, E. H. Flynn, U. C. Quarck, and O. Weaver, *J. Am. Chem. Soc.* **78** (1956**)** 388–395
255. M. Mercep, M. Mesic, L. Tomaskovic, S. Markovic, B. Hrvačić, O. Makaruha, and V. Poljak, PCT/IB2004/001235 (2004)
256. O. Carević, S. Djokić, H. Krnjević, N. Lopotar, and G. Kobrehel, EP 0 283 055 A2 (1988)
257. K. Tsuzuki, T. Sunazuka, S. Marni, H. Toyoda, S. Omura, N. Inatomi, and Z. Itok, *Chem. Pharm. Bull*. **37:10** (1989) 2687–2700
258. M. Niyaz Khan, *J. Org. Chem.* **60:14** (1995) 4536–4541
259. J. E. Sheppeck, H. Kar, and H. Hong, *Tetrah. Letters.* **41** (2000) 5329–5333
260. M. Mercep, M. Mesic, L. Tomaskovic, S. Markovic, O. Makaruha, and V. Poljak, WO 04/005310 A2 (2004)

261. a) E. H. Flynn, H. W. Murphy, and R. E. McMahon, *J. Med. Chem.* **77** (1954) 3104–3016, b) K. Tsuzuki, T. Sunazuka, S. Marui, H. Toyoda, S. Omura, N. Inatomi, and Z. Itoh, *Chem. Pharm. Bull.* **37** (1989) 2687–2700
262. M. Bruncko, H. Fortuna, J. Randolph, R. S. Daryl, L. M. Frey, J. Greer, A. N. Mort, W. B. Crawford, R. C. Dalton, and A. M. Kaminski, WO 99/50275 (1999)
263. J. T. Randolph, P. Waid, C. Nichols, D. Sauer, F. Haviv, G. Diaz, G. Bammert, L. M. Besecke, J. A. Segreti, K. M. Mohning, E. N. Bush, C. D. Wegner, and J. Greer, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 1085–1097
264. D. R. Sauer, F. Haviv, J. Randolph, N. Mort, C. Dalton, M. Bruncko, M. A. Kaminski, B. Crawford, L. M. Frey, and J. Greer, *Macrolide LHRH Antagonists* (1999)
265. B. S. Bronk, M. A. Letavic, B. V. Yang, H. Cheng, T. Kaneko, and E. A. Glazer, WO 98/56801 (1998)
266. K. Biggadike, S. J. Coote, A. Craig, D. M. Crowe, V. W. Jacewicz, M. J. Millan, R. K. Nice, B. Noga, J. F. Seager, and A. L. Theophilus, PCT/GB2003/000478 (2003)
267. H Cheng, M.A. Letavic, C. B. Ziegler, J. K. Dutra, P. Bertinato, and B. S. Bronk, EP0984019 A1 (2000)
268. W. R. Baker, J. D. Clark, R. L. Stephens, and K. H. Kim, *J. Org. Chem.* **53:10** (1988) 2340–2345
269. Y. Sun Or, R. F. Clark, S. Wang, D. T. W. Chu, A. M. Nilius, R. K. Flamm, M. Mitten, P. Ewing, J. Alder, and Z. Ma, *J. Med. Chem.* **43:6** (2000) 1045–1049
270. G. Barany and R. B. Merrifield, *Solid-phase peptide synthesis,* In E. Goss and J. Meienhofer (Ed), *The Peptides*, Vol. 2. Academic press, New York, (1979) 1-284
271. A. S. Kalgutkar, S. W. Rowlinson, B.C. Crews, and L. J. Marnett, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **12** (2002) 521–524
272. A. S. Kalgutkar, A. B. Marnett, B. C. Crews, R. P. Remmel, and L. J. Marnett, *J. Med. Chem*. **43** (2000) 2860–2870
273. W. C. Black, C. Bayly, M. Belley, C. C. Chan, S. Charleson, D. Denis, J. Y. Gauthier, R. Gordon, D. Guay, and S. Kargman, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **6** (1996) 725–730
274. J. S. Carter, Patent Application Publication US 2003/0055012 A1 (2003)
275. W. R. Draper, B. Hu, A. T. McPhail, M.S. Puar, E.J. Vater, and L. Weber, *Tetrahedron* **55** (1999) 3355–3364
276. B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, and T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.* **31** (2006) 487–531
277. G.T. Hermanson, 'Bioconjugate Techniques', Academic Press, San Diego (1996**)** 170-173

278. a) G. B. Fields and C. G. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 4202–4207, b) F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R. I. Masada, D. Hudson, and G. Baran, *J. Org. Chem.* **55** (1990) 3730–3743

279. J. G. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, and G. W. Tregear, *Peptide res.* **4** (1991) 194–199

280. A. Fajdetić, H. Čipčić Paljetak, G. Lazarevski, A. Hutinec, S. Alihodžić, M. Đerek, V. Štimac, D. Andreotti, V. Šunjić, J.M. Berge, S. Mutak, M. Dumić, S. Lociuro, D.J. Holmes, N. Maršić, V. Eraković Haber, R. Spaventi, *Bioorg. Med. Chem.* **18:17** (2010) 6559–6568

281. J. P. Leeds and H.A. Kirst, *Synt. Commun.* **18** (1988) 777–782

282. G. Kobrehel and S. Djokić, US 4 517 359 (1985)

7. PRILOG

7.1 Popis kratica i simbola

NSAID, NSAIL, NSAIR ili NAID - Nesteroidni protuupalni lijekovi

COX – enzim ciklooksigenaza

COX-1– enzim ciklooksigenaza-1

COX-2 – enzim ciklooksigenaza-2

COX-3 – enzim ciklooksigenaza-3

LOX – enzim lipooksigenaza

TNF-α – čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α*)

ACE – angiotensin-konvertirajući enzim

PGI_2 – prostaglandin I_2

PGE_2 – prostaglandin E_2

$PGF_{2\alpha}$ – prostaglandin $F_{2\alpha}$

GI trakt – gastrointestinalni trakt

GFR – brzine glomerularne filtracije

CLASS – "Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study"

APC – "Adenoma Prevention with Celecoxib"

PreSAP – "Prevention of Colorectal Sporadic Adenomatous Polyps"

ADAPT – "Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial"

APPROVe – "Adenomatous Polyp PRevention On Vioxx" studija

VIGOR – "Vioxx GI Outcomes Research" studija

tRNA – transportna ribonukleinska kiselina

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

PMN – polimorfonuklearni neutrofili

DPB – difuzni panbronhiolitis

CF – cistična fibroza

IL-1 – interleukin-1

IL-1 β – interleukin-1 β

IL-4 – interleukin-4

IL-5 – interleukin-5

IL-6 – interleukin-6

IL-8 – interleukin-8

GM-CSF – stimulirajući faktor kolonija granulocita i makrofaga

MUC5AC – mucin 5AC

LPS – lipopolisaharid

NFkB – čimbenik transkripcije jezgrinog čimbenika kapa B

CFTR – transmembranski regulator provodljivosti cistične fibroze (za ione klora)

FEV – forsirani ekspiratorni volumen

FVC – forsirani vitalni kapacitet pluća

CRP – C-reaktivni protein

CD4/CD8 – pomagački T limfociti / citotoksični T limfociti

AP-1– aktivacijski protein 1

LTB_4 – leukotrien B_4

HBD-2 – humani β-defenzin 2

KOPB – kronična opstruktivna bolest pluća

AE-KOPB – akutne egzacerbacije kronične opstruktivne plućne bolesti

THF – tetrahidrofuran

CDI – 1,1'-karbonildiimidazol

DMF – dimetilformamid

EDC·HCl – 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid

HOBT – 1-hidroksibenzotriazol

TEA – trietilamin

Fmoc – *N*-α-fluorenilmetiloksikarbonil

Boc – *N*-α-*terc*-butiloksikarbonil

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

DMSO – dimetilsulfoksid

DBU – 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undekan-7-en

TLC – tankoslojna kromatografija

HPLC-MS – tekućinska kromatografija visokog učinka vezana na spektrometar masa

TMS – tetrametilsilan

IR – infracrvena spektroskopija

MIK – minimalna inhibicijska koncentracija

IC_{50} – koncentracija koja uzrokuje 50 % inhibicije

DBF – dibenzofulven

NMP – *N*-metilpirolidon

8. ŽIVOTOPIS

Selvira Zulfikari (rođ. Selmani) rođena je 11. svibnja 1979. godine u Dragašu, Kosovo. Osnovnu i srednju školu (XV. Prirodoslovno matematička gimnazija) završila je u Zagrebu. Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1998. godine, a diplomirala je u veljači 2003. godine. Tijekom studija primala je stipendiju Grada Zagreba (akademske godine 2000/2001. i 2001/2002.). Poslijediplomski studij upisala je 2005. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer farmaceutske znanosti.

Nakon završetka dodiplomskog studija počela je raditi u PLIVA-Istraživačkom institutu d.o.o. kao istraživač-kemijski sintetičar, na programu "Protuupalni konjugati makrolida" pod vodstvom dr. sc. Stribora Markovića i dr. sc. Linde Tomašković gdje je izradila eksperimentalni dio svog doktorskog rada. Od svibnja 2006. godine radi u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske gdje je danas zaposlena kao viši stručni suradnik u Odsjeku za ocjenu kakvoće, sigurnosti i djelotvornosti lijekova.

Koautor je dva znanstvena rada, dvije patentne prijave, a sudjelovala je na sedam znanstvenih skupova kao koautor postera ili predavač.

Znanstveni radovi

1. V. Stepanić, S. Koštrun, I. Malnar, M. Hlevnjak, K. Butković, I. Ćaleta, M. Dukši, G. Kragol, O. Makaruha-Stegić, L. Mikac, J. Ralić, I. Tatić, B. Tavčar, K. Valko, S. Zulfikari, and V. Munić, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 719-733
2. S. Zulfikari, A. Filipović-Sučić, K. Meštrović, M. Perić-Barbarić, V. Mandarić, N. Zorić, and S. Tomić, *Coll. Antropol.*

Patentne prijave

1. M. Merćep, M. Mesić, L. Tomašković, S. Marković, V. Poljak, G. Šijan, S. Selmani, Conjugates with anti-inflammatory activity, PCT Int. Appl. WO 2006/046123 A2
2. M. Merćep, M. Mesić, L. Tomašković, S. Marković, D. Pešić, I. Ozimec Landek, M. Komac, O. Makaruha Stegić, S. Selmani, M. Banjanac, Anti-inflammatory macrolide conjugates. Substituted furochromenes, preparation thereof and their antiinflammatory activity, PCT Int. Appl. WO 2006/075255 A2

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima (posteri/predavanja):

1. M. Merćep, L. Tomašković, B. Hrvačić, S. Marković, O. Makaruha Stegić, V. Poljak, M. Komac, G. Šijan, S. Selmani, B. Ragač, A. Pešut, M. Horvatinčić, B. Bošnjak, M. Matijašić, M. Vrančić, K. Gjuračić, B. Stanić, S. Stipaničić, D. Marković, Ž. Ferenčić and M. Mesić. Sterolides - a new class of potent anti-inflammatory compounds, 12th Biennial International Conference, Bolton Landing, NY, USA, 3–7 October, 2004
2. L. Tomašković, M. Komac, O. Makaruha Stegić, V. Poljak, S. Selmani, G. Šijan, B. Hrvačić, S. Marković, M. Merćep and M. Mesić, Sterolides: Design, Synthesis and Biological Evaluation, XIXth Croatian meeting of chemists and chemical engineers, 24–27 April 2005, Opatija, Croatia
3. S. Marković, M. Mesić, L. Tomašković, M. Komac, O. Makaruha Stegić, V. Poljak, S. Selmani, G. Šijan, B. Hrvačić and M. Merćep, Macrolide-non-steroidal antiinflammatory drug conjugates, XIXth Croatian meeting of chemists and chemical engineers, 24–27 April 2005, Opatija, Croatia
4. V. Poljak, M. Komac, L. Tomašković, O. Makaruha Stegić, S. Selmani, G. Šijan, B. Hrvačić, S. Marković, M. Merćep and M. Mesić, Design of a new class of potent anti-inflammatory compounds-Sterolides, 15th Noordwijkerhout-Camerino Symp. Trends in Drug Research, Noordwijkerhout, The Netherlands, 8–13 May, 2005
5. S. Selmani, M. Komac, O. Makaruha Stegić, V. Poljak, G. Šijan, S. Marković, M. Mesić, L. Tomašković, B. Hrvačić and M. Merćep, Macrolide Non-Steroidal Anti-inflammatory drug conjugates, XXth International Congress of Heterocyclic Chemistry, Palermo, 31 July – 5 August, 2005
6. S. Tomić, A. Borić, M. Pihir, and S. Zulfikari, Agency for Medicinal Products and Medical Devices: Five Years Experience in Evaluation of Medicinal Products, 2nd PharmSciFair, Nice, France, 8–12 June, 2009
7. S. Zulfikari, Workshop on disolution testing, Bioequivalence and Biowaiver, Zagreb, 3–4 October, 2011

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Doktorska disertacija

SINTEZA I SVOJSTVA PROTUUPALNIH KONJUGATA MAKROLIDA I NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA

Selvira Zulfikari

SAŽETAK

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) imaju dugu kliničku primjenu u liječenju mnogih upalnih stanja kao što su različiti oblici artritisa. NSAID-i inhibiraju sintezu prostaglandina inhibirajući enzime ciklooksigenazu-1 (COX-1) i ciklooksigenazu-2 (COX-2). COX-1 je konstitutivno prisutan enzim odgovoran za regulaciju normalnih fizioloških procesa, dok je COX-2 enzim fakultativno prisutan u stanjima upale, uključen u patološkim procesima u organizmu. Međutim, ovi lijekovi pokazuju različite gastrointestinalne i kardiovaskularne nuspojave.

Makrolidi su velika skupina različitih spojeva što se tiče njihove kemije i djelovanja, a dolaze kao prirodni bakterijski metaboliti ili kao polusintetski derivati prirodnih spojeva. Pokazalo se da se neki makrolidi, posebno azitromicin, nakupljaju u upalnim stanicama. Danas postoje dokazi da pojedini makrolidi, koji se već niz godina primjenuju u kliničkoj praksi kao antibiotici, pokazuju i protuupalno djelovanje.

Cilj ovog istraživanja bio je pripraviti nove konjugate azitromicina i azitromicinu sličnih makrolida s NSAID-ima koji pokazuju protuupalni učinak kako bi se unaprijedilo liječenje različitih upalnih bolesti. Konjugati su pripravljeni koristeći dvostruku aktivaciju u postupku priprave esterske ili amidne veze. Korišteni su neselektivni NSAID-i (klasični) poput indometacina, ibuprofena i flurbiprofena te selektivni COX-2 NSAID-i poput celekoksiba i valdekoksiba. Također su kao makrolide podjedinice korišteni azitromicin, 9-deokso-9a-aza-9a-homoeritromicin A, eritromicin A, klaritromicin i telitromicin. NSAID-i su vezani na položajima 9a, 9 (oksima), 11, 3'-*N*, 4" i 4"-*O*- makrocikličkog prstena. Prva tri mjesta vezanja nalaze se na aglikonskom prstenu, a sljedeća tri na šećerima, desozaminu, odnosno kladinozi. Također su pripravljeni i konjugati s dekladinozilnim makrolidima kao i aglikonski konjugati. Sintetizirano je više od 90 konjugata NSAID-a i makrolida.

Biološka aktivnost pripravljenih spojeva proučena je na temelju *in vitro* ispitivanja inhibicije enzima COX-1 i COX-2 te inhibicije produkcije TNF-α (čimbenik nekroze tumora α). Pojedini konjugati pokazuju selektivnu inhibiciju COX-2 enzima uz dodatnu inhibiciju produkcije TNF-α. Većina sintetiziranih konjugata značajno je inhibirala produkciju TNF-α. Značajna inhibicija enzima COX-2 zabilježena je u konjugata u kojima je NSAID vezan preko 9a-dušika na makrolidnu podjedinicu koja ima oba šećera ili na odgovarajući aglikonski analog, te kod konjugata s telitromicinom gdje je NSAID vezan na položaju 11. Konjugati u kojima je NSAID-na podjedinica vezana na položaju 9a pokazuju najbolji biološki učinak.

Rad pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 184 stranice, 31 slika, 34 shema, 12 tablica i 282 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: NSAID/ makrolid/konjugati/protuupalno djelovanje/COX enzim/TNF-α

Mentori: **Dr. sc. Linda Tomašković**, *znanstveni suradnik, Galapagos Istraživački Centar d.o.o., Zagrebu*
Dr. sc. Olga Kronja, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Branka Zorc**, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*
Dr. sc. Linda Tomašković, *znananstveni suradnik, Galapagos Istraživački Centar d.o.o., Zagreb*
Dr. sc. Olga Kronja, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*
Dr. sc. Sandra Jurić, *docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*
Dr. sc. Ivica Malnar, *znanstveni suradnik, Galapagos Istraživački Centar d.o.o., Zagreb*

Rad prihvaćen dne: 22. veljače 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

SYNTHESIS AND ACTIVITY OF ANTI-INFLAMMATORY CONJUGATES OF MACROLIDE AND NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMTORY DRUG

Selvira Zulfikari

SUMMARY

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have a long clinical use for the treatment of various inflammatory diseases like different forms of arthritis. NSAIDs inhibit prostaglandin synthesis by inhibition of enzymes cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). COX-1 was described as "constutive" controlling normal homeostasis, and COX-2 as "inflammatory", involved in pathological prosses in organism. However, these drugs are not devoided of serious side effects affecting gastrointestinal and cardiovascular system.

Macrolides form a large group of divergent compounds regarding their chemistry and function, wich occur as natural bacterial metabolites, or as semisyntetic derivatives of natural compounds. Some macrolides, especially azithromycin, have been shown to accumulate within inflammatory cells. Today, there is a clear evidence that some macrolides, used for many years in clinical practice as antibiotics, also show anti-inflammatory activity.

The aim of this study was to prepare new conjugates of azithromycin and azithromycin-like macrolide scaffolds with NSAIDs that possess anti-inflammatory activity in order to improve the treatment of different inflammatory diseases. Conjugates have been prepared using double activation in the esters or amide coupling procedures. Non-selective NSAIDs (classical) like indomethacine, ibuprofen, flurbiprofen and selective COX-2 NSAIDs like celecoxib and valdecoxib are used. For macrolide subunits, azithromycin, 9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A, erythromycin A, clarithromycin and telithromycin are used. NSAIDs were linked at the positions 9a, 9 (oxime), 11, 3'-*N*, 4"- and 4"-*O*- of macrocyclic scaffold. The first three coupling sites are at the aglycon part of the molecule, the later three on the sugar moieties desosamin and cladinose, respectively. Also, conjugates of decladinosyl macrolides have been prepared, as well as macrolide aglycon conjugates. More than 90 conjugates of NSAID and macrolide have been synthesized.

Biological activity of the prepared compounds was studied on the basis of *in vitro* tests of COX-1 and COX-2 inhibition and inhibition of TNF-α (tumor necrosis factor α) production. Some conjugates show selectivity towards COX-2 enzyme and they additionally inbibit TNF-α production. Most of the synthesized conjugates significantly inhibited TNF-α production. Significant inhibition of COX-2 was observed for conjugates with NSAID linked through 9a-nitrogen of macrolide subunit having both sugars or for corresponding aglycon analogues, as well as with telithromycin conjugate where NSAID is linked through position 11. Conjugates having NSAID subunit linked at 9a position showed the highest biological activity.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 184 pages, 31 figures, 34 schemes, 12 tables and 282 references. Original is in Croatian language.

Keywords: NSAID/macrolide/conjugates/ anti-inflammatory activity/COX enzyme/TNF-α

Menthors: **Linda Tomašković, Ph.D.** *Senior Scientist, Galapagos Research Centre Ltd, Zagreb*
Olga Kronja, Ph.D. *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*

Reviewers: **Branka Zorc, Ph.D.** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*
Linda Tomašković, Ph.D. *Senior Scientist, Galapagos Research Centre Ltd, Zagreb*
Olga Kronja, Ph.D. *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*
Sandra Jurić, Ph.D. *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*
Ivica Malnar, Ph.D. *Senior Scientist, Galapagos Research Centre Ltd, Zagreb*

The thesis accepted: February 22, 2012