

## 40 godina azitromicina – prilog valorizaciji doprinosa hrvatskih znanstvenika

Vlatka Godinić Mikulčić

Agencija za mobilnost i programe Europske unije, Zagreb  
vgodinic@yahoo.com

**SAŽETAK:** Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik koji se nakon 40-godišnjega uspjeha i dalje poima zlatnim standardom za vrstu antibiotika nazvanih azalidi. Kad se nakon 1970-ih radilo na razvijanju novoga antibiotika koji bi snažnije od eritromicina A i klaritromicina djelovao na Gram-negativne bakterije, te bio stabilan u kiseloj okolini i dobro se apsorbirao, u Hrvatskoj je 1979–81. novi makrolidni antibiotik sintetizirao istraživački tim zagrebačke farmaceutske tvrtke PLIVA na čelu s dr. sc. S. Đokićem. U članku se prikazuje cjelovit prinos PLIVINA istraživačkoga tima otkriću i proizvodnji azitromicina vlastitim tehnološkim postupkom. Za ocjenu ozračja u kojem su PLIVINI znanstvenici radili valja se prisjetiti prikaza njihovih istraživanja, oslanjajući se na doprinos svjetskoj farmaceutskoj baštini kroz povijest tijeka istraživanja makrolidnih antibiotika. Sustavnim bilješkama daje se pregled tijeka istraživanja azitromicina, ističe se doprinos prof. Nenada Bana u otkriću načina vezanja azitromicina na ribosome, a pretraživanjem najranijih i ujedno prikupljanjem novijih zapisa upućuje se na protuupalni učinak azitromicina te se provodi valorizacija novijih podataka o njegovoj upotrebi.

*Ključne riječi:* antibiotici; azitromicin; organska sinteza; ribosom; Sumamed; tehnološki postupak

### Racionalni pristup dizajniranju lijekova u PLIVI: ključni trenutci koji su prethodili otkriću azitromicina

Zdravlje je vječni prirodni preduvjet za opstanak društva i čovjeka kao pojedinca jer stvara osnove za funkcioniranje i razvoj ljudi, svih djelatnosti, procesa i aktivnosti te je pronalazak novih lijekova<sup>1</sup> iznimno važan za cjelokupnu društvenu zajednicu. Istraživanje i razvoj novih lijekova dinamičan je proces i obuhvaća čitav niz bazičnih i primijenjenih znanstvenih disciplina, a svaki projekt u tom području zahtijeva timski rad umreženih znanstvenika i struka, od molekularne biologije, biologije, medi-

<sup>1</sup> Lijek – svaka tvar ili mješavina tvari namijenjena liječenju ili sprječavanju bolesti kod ljudi te svaka tvar ili mješavina tvari koja se može primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili postavljanja medicinske dijagnoze.

cine, veterine, biokemije i kemije, do kemijske tehnologije i inženjerstva, biotehnologije i farmacije. Upravo su ljudi te njihova znanja i vještine ključni pokretači investicija u farmaceutskoj industriji. Gospodarstvo i proizvodna poduzeća su, pa tako i vodeća hrvatska farmaceutska tvrtka PLIVA iz Zagreba, izloženi globalnoj konkurenciji u vrtložnoj okolini, a u tom okruženju uspjeh mogu postizati samo tvrtke koje dolaze s inovativnim proizvodima i suvremenim organizacijskim konceptima. U farmaceutskoj je industriji inovativnost posebno izražena, a tvrtka poput PLIVE u tome desetljećima uspijeva, zahvaljujući tradiciji istraživanja i razvoja. Jedan od prvih važnijih zamaha u tom smjeru postignut je osnivanjem jedinica za istraživanje makrolidnih antibiotika,<sup>2</sup> u kojima je došlo do objedinjavanja intelektualnoga i istraživačkoga potencijala vrsnih znanstvenika. Prethodnik današnje PLIVE bilo je poduzeće Kaštel d.d., osnovano 1921. u Karlovcu (Konstantinović 1986). Kaštel je 1930-ih pokrenuo istraživački program te je već 1936., među prvima u svijetu, počeo proizvoditi sulfonamide (Konstantinović 1986). Godine 1940. osnovan je Banovinski zavod za proizvodnju lijekova biološkoga i kemijskoga sastava (PLIBAH), koji je 1941. preimenovan u Državni zavod za proizvodnju lijekova i vakcina (PLIVA), a od 1945. u njegovu je sastavu i poduzeće Kaštel. Godine 1952. utemeljen je PLIVIN Istraživački institut, a 1953. vlastitom su tehnologijom proizvedene prve količine vitamina C, koji je, uz tetraciklinske antibiotike, postao PLIVIN najvažniji proizvod (Milčec 1996). Tijekom povijesti kroz PLIVIN je Istraživački institut prošlo više od tisuću znanstvenika, od kojih su mnogi u njemu proveli cijeli svoj radni vijek. To je razdoblje obilježeno znatnim razvitkom kemijske proizvodnje i izgradnjom novih proizvodnih postrojenja, poput pogona za sintetičku proizvodnju, čime je započet razvoj novih disciplina kao što su kemijsko inženjerstvo i tehnologija. Godine 1953. i Kemijsko-tehnološki odjel bio je pripojen Istraživačkom institutu. Na osnovi vlastitih postupaka, u proizvodnju se uvode novi sintetički, polusintetički i biološki spojevi te se može ustvrditi kako su PLIVINI kemijski inženjeri bili nositelji razvoja biotehnologije, izravno pridonoseći usvajanju proizvodnje oksitetraciklina. Jedan od istraživača u novoutemeljenom PLIVINU Istraživačkom institutu bio je Slobodan Đokić,<sup>3</sup> koji je nakon stjecanja diplome iz kemije na Tehničkom fakultetu u Zagrebu

<sup>2</sup> Antibiotik – lijek koji se primjenjuje u liječenju bolesti uzrokovanih bakterijama. S obzirom na širinu djelovanja djelimo ih na antibiotike širokoga spektra djelovanja (djeluju na više vrsta bakterija) i one uskoga spektra djelovanja (djeluju na mali broj bakterijskih vrsta). Selman Waksman prvi je upotrijebio izraz antibiotik 1945. godine. Makrolidi su spojevi koje karakterizira makrolaktonski prsten (npr. 12-, 14-, 15-, 16-, 17- ili 18-eročlani) i glikozidno vezani šećeri.

<sup>3</sup> Đokić, Slobodan, kemičar (Danilovgrad, Crna Gora, 30. XI. 1926). Gimnaziju završio u Beogradu 1944., kemiju diplomirao na Tehničkom fakultetu u Zagrebu 1952. Doktorirao na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu temom *Sinteza nekih derivata piroolidina i bicikličkih amina* (1957). Kao honorarni docent i izvanredni profesor predavao kolegij Procesi organske kemijske industrije na dodiplomskom i poslijediplomskom studiju zagrebačkoga Tehnološkoga fakulteta 1964–80. Boravio na usavršavanju u Massachusetts Institute of Technology u Cambridgeu u SAD-u (1955., 1960–62) i u Im-

(1952), isprva započeo svoj radni vijek u PLIVI kao pogonski inženjer, a potom kao istraživač. U međuvremenu je doktorirao na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu (1957) te nastavio djelovati kao dugogodišnji direktor PLIVINA Istraživačkoga instituta (1971–90). Upravo je u 1970-ima cilj bio razviti novi antibiotik koji će snažnije od eritromicina A i klaritromicina djelovati na Gram-negativne bakterije te biti stabilan u kiseloj okolini i dobro se apsorbirati.

Azitromicin se dobiva polusintetski iz eritromicina A, koji je do trenutka otkrića azitromicina bio najvažniji predstavnik skupine makrolida. Nakon što je 1949. Abelardo Aguilar, filipinski liječnik i znanstvenik, pronašao aktinobakteriju *Streptomyces erythreus* u uzorcima zemlje, istraživački tim tvrtke Eli Lilly,<sup>4</sup> za koju tada radio, izolirao je eritromicin i zatražio patentnu zaštitu za navedeni spoj (patent<sup>5</sup> je odobren 1953) (Xu, Flavin, Eiznhamer 2011). Vrste aktinobakterija unutar roda *Streptomyces* najčešće su prisutne u tlu, ali i u ostalim ekološkim nišama, a proizvode oko 75% prirodnih antibiotika (Chater 2006: 761). Tijekom svojega kratka istraživanja proteina roda *Streptomyces* autorica ovoga rada postala je itekako svjesna velika biološkoga potencijala ovoga roda filamentoznih bakterija iz kojega je 1950., prije eritromicina, izoliran prvi makrolidni antibiotik pikromicin. Prvi lijek s djelatnom tvari<sup>6</sup> eritromicinom stavljen je na tržište 1952. pod nazivom<sup>7</sup> *Ilosone* (prema filipinskoj regiji Iloilo, gdje je izvorno sakupljena aktinobakterija). Robert B. Woodward, dobitnik Nobelove nagrade za kemiju (1965) i profesor kemije na Harvardskom sveučilištu, zajedno s članovima svojega istraživačkoga tima otkrio je prvu stereokontroliranu asimetričnu kemijsku sintezu eritromicina A, objavljenu 1981. nakon njego-

---

perial College u Londonu (1969). Bavi se kemijom prirodnih spojeva, napose biološki aktivnih tvari. Autor je i suautor mnogih radova publiciranih u znanstvenim časopisima (*Tetrahedron Letters*, 1967; *Croatica chemica acta*, 1969; *European Journal of Medicinal Chemistry*, Pariz 1978; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction I*, 1986; *Journal of Antibiotics*, 1987; *Journal of Chemical Research (S) and (M)*, London 1988; *Journal of Microencapsulation*, London 1991), a osobito su važni radovi o sintezi azitromicina. Autor je i suautor više od 300 patentnih prijava (1958–92) u zemlji i svijetu u kojima se štiti sinteza i struktura novih biološki aktivnih tvari, potencijalnih lijekova, osobito makrolidnih antibiotika. Također je pisao o razvoju kemijsko-farmaceutske industrije (*Dugoročni razvoj farmacije*, Zagreb 1984; *Tehnologija i razvoj*, Beograd 1989, suautor).

<sup>4</sup> Eli Lilly, globalnu farmaceutsku tvrtku koja posluje već gotovo 140 godina osnovao je 1876. u Indianapolisupukovnik Eli Lilly, tridesetosmogodišnji farmaceutski kemičar.

<sup>5</sup> Patent – isprava kojom se na određeno vrijeme zaštićuje isključivo pravo iskorištavanja nekoga izuma u zamjenu za njegovu javnu objavu. Vrijedi samo na području države za koju je izdan i predstavlja vlasništvo uporabu kojega vlasnik može dopustiti drugim osobama na određeno vrijeme davanjem licencije ili ga u potpunosti prenijeti na druge osobe.

<sup>6</sup> Djelatna tvar – tvar koja je nositelj djelovanja gotovoga lijeka, kratica API (engl. Active Pharmaceutical Ingredient).

<sup>7</sup> Naziv lijeka – ime dano lijeku, koje može biti ili novoizumljeno ili uobičajeno ili znanstveni naziv. Uz uobičajeno ime, odnosno znanstveni naziv, dodaje se zaštitni znak ili naziv proizvođača ili nositelja odobrenja. Novoizumljeno ime mora se razlikovati od uobičajenoga imena da ne dođe do zabune.

ve smrti (Woodward 1981: 3213). Eritromicin se sastoji se od 14-članoga laktonskoga prstena s deset kiralnih centara i dva monosaharida (L-kladinoza i D-desozamin). Eritromicin A je slaba baza, 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 bioraspodivnost i apsorpcija, a smanjuju neželjena djelovanja. Drugi makrolidni antibiotik, klaritromicin, pronašli su znanstvenici japanske tvrtke Taisho Pharmaceuticals 1970-ih godina. Otkriven je s ciljem razvoja derivata eritromicina A koji bi bio stabilniji u kiselim uvjetima probavnoga sustava i uzrokovao manje nuspojave<sup>8</sup>. Poduzeće Taisho Pharmaceuticals 1981. podnijelo je zahtjev za patentnu prijavu, a 1983. klaritromicin je zaštićen pod imenom *Clarith* te je dobio odobrenje za stavljanje u promet lijekovima<sup>9</sup> (1991). Tvrtka Taisho je 1985. u američkom poduzeću Abbott Laboratories pronašla partnera, te je Abbott također dobio odobrenje od FDA<sup>10</sup> za lijek *Biaxin* (1991). Prvi generički lijekovi<sup>11</sup> klaritromicina pojavljuju se 2004. u Europi, a 2005. u SAD-u.

Kao odgovor na izazov pronalaska antibiotika poboljšanih svojstava u odnosu na eritromicin A i klaritromicin, od 1970. godine PLIVIN istraživački tim, na čelu s S. Đokićem, intenzivno je radio na području sinteze makrolidnih antibiotika. Upravo je u razdoblju 1979–81. u Hrvatskoj sintetiziran novi makrolidni antibiotik, a sintetizirali su ga zaposlenici Istraživačkoga instituta zagrebačke farmaceutske tvrtke PLIVA: Slobodan Đokić, Gabrijela Kobrehel<sup>12</sup>, Zrinka Tamburašev<sup>13</sup> i Gorjana Ra-

<sup>8</sup> Nuspojava – svaka štetna i neželjena reakcija na lijek koji je primijenjen u odobrenim dozama koje se koriste za liječenje ili sprječavanje bolesti kod ljudi ili u svrhu obnavljanja, ispravljanja i prilagodbe fizioloških funkcija ili postavljanja medicinske dijagnoze. U kliničkim ispitivanjima odnosi se na svaku štetnu i neželjenu reakciju na ispitivani lijek primijenjen u bilo kojoj dozi.

<sup>9</sup> Odobrenje za stavljanje gotovoga lijeka u promet – odobrenje koje daje nadležna agencija za lijekove i medicinske proizvode (u Hrvatskoj HALMED), kojim se dovršava postupak utvrđivanja kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti gotovoga lijeka.

<sup>10</sup> FDA (engl. *Food and Drug Administration*) – Američka agencija za hranu i lijekove.

<sup>11</sup> Generički lijek (engl. *generic drug*) – kopija lijeka koja je identična izvornom lijeku s obzirom na dozu, sigurnost i način uporabe, mehanizam i jačinu djelovanja te kvalitetu i namjenu. Može doći na tržište tek nakon što istekne patentna zaštita izvornoga lijeka.

<sup>12</sup> Kobrehel, Gabrijela (rođena Vazdar), hrvatska kemičarka (Obedišće, 1. III. 1941). Diplomirala je 1964. na Tehnološkom fakultetu u Zagrebu, gdje je i magistrirala 1977. U Istraživačkom institutu PLIVE istraživala je kemijske transformacije antibiotika, napose u smjeru sinteze novih makrolidnih antibiotika. Objavila je 25 znanstvenih radova, a više od 20 izuma zaštitila je patentima (u nas i u svijetu). Dobitnica je Nagrade PLIVE (1986. i 1996.) i Nagrade HAZU (1998), Hrvatska gospodarska komora dodijelila joj je Zlatnu kunu, nagradu za životno djelo (1987), a Američko kemijsko društvo uglednu titulu »Heroj kemije 2000«.

<sup>13</sup> Tamburašev, Zrinka, hrvatska kemičarka (Sisak, 22. IX. 1921 – Zagreb, 24. IV. 2003). Diplomirala je 1948. na Kemijsko-tehnološkom odjelu Tehničkoga fakulteta u Zagrebu, a doktorirala 1965. Radila je u Istraživačkom institutu tvornice lijekova PLIVA u Zagrebu, gdje je bila voditeljica skupine za polusintetske makrolide 1972–74. i Odjela za prirodne spojeve 1974–78., te je potom vodila istraživanja

dobolja-Lazarevski<sup>14</sup> (slika 1). Sintetizirali su azitromicin, novi antibiotik željenih svojstava koji je predstavljao prvog člana nove skupine makrolidnih antibiotika, azalida<sup>15</sup>. U to je doba područje organske sinteze bilo okosnica istraživačkoga rada u PLIVINU Istraživačkom institutu. U početku je kratkoročni program rada bio usmjeren na razradu postupaka za proizvodnju već poznatih unosnih lijekova, dok je dugoročan program obuhvaćao sintezu novih, biološki aktivnih spojeva, od kojih se očekivalo povoljno ljekovito djelovanje. Radilo se na sulfonamidima te proizvodima koji djeluju na živčani sustav, posebno barbituratima. Po postupcima razrađenim u PLIVI, u proizvodnju je uveden niz farmaceutskih sirovina iz grupe spazmolitika, antihistaminika, hipertonika, diuretika te vitamin C.



**Slika 1.** Gabrijela Kobrehel, Slobodan Đokić, Gorjana Radobolja-Lazarevski i Zrinka Tamburašev  
(prilagođeno prema Banić Tomišić 2011: 603)

na području baznih sirovina. Sa Slobodanom Đokićem, Gabrijelom Kobrehel i Gorjanom Lazarevski 1974. započela je rad na sintezi pojedinih faza za pripremu azitromicina. Razvila je postupak izolacije antibiotika oksitetraciklina u njegovoj industrijskoj proizvodnji, bavila se kemijskim transformacijama antibiotika tetraciklinskoga reda i eritromicina. Dobila je Nagradu grada Zagreba 1959., Nagradu PLIVE za 1996., Nagradu HAZU 1997. i priznanje Zlatna kuna za životno djelo Hrvatske gospodarske komore 1998.

<sup>14</sup> Lazarevski, Gorjana (rođena Radobolja), hrvatska kemičarka (Omiš, 13. I. 1946). Diplomirala je 1969. na Tehnološkom fakultetu u Zagrebu, gdje je i magistrirala 1977. U Istraživačkom institutu PLIVE istraživala je kemijske transformacije antibiotika. Objavila je 16 znanstvenih radova, a više od 20 izuma zaštitila patentima (u nas i u svijetu). Dobitnica je Nagrade PLIVE (1986. i 1996) i Nagrade HAZU (1998), a Hrvatska gospodarska komora dodijelila joj je 1987., kao i drugim autorima azitromicina, nagradu Zlatna kuna za životno djelo.

<sup>15</sup> Azalidi – podskupina makrolida koju karakterizira makrolidni prsten s dušikom u prstenu.

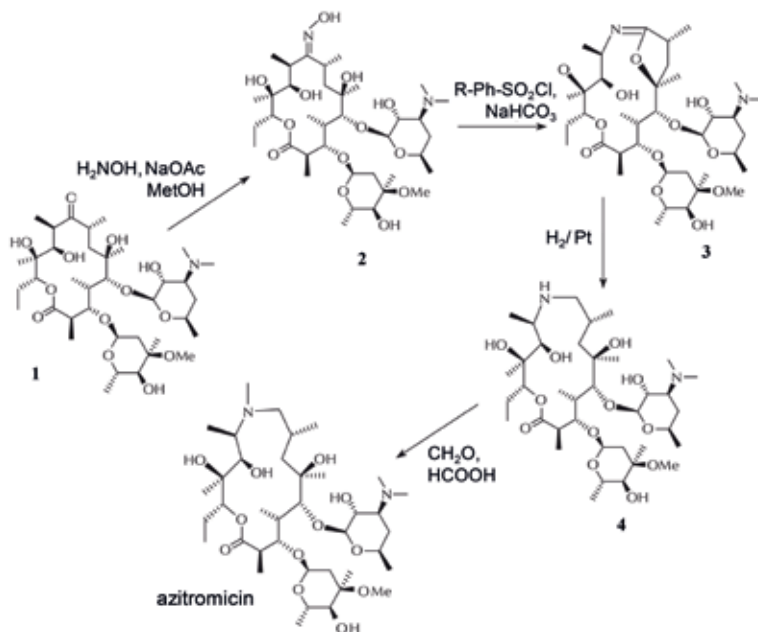
Pronalazak azitromicina započeo je još sredinom 1960-ih, kada su S. Đokić i Z. Tamburašev radili na derivatima već dobro poznatoga eritromicina A, makrolidnoga antibiotika nešto širega spektra antibakterijske aktivnosti<sup>16</sup> od spektra penicilina, te na sulfonamidnim derivatima eritromicilamina, s idejom da se kombiniraju svojstva eritromicina i sulfonamida, čime su se nadali riješiti problem pojave rezistencije<sup>17</sup>. Naime, navedeni istraživački tim isprva je radio na sintezi sulfoestera oksima eritromicina A jer je bilo predloženo da se, analogno N-(supstituiranim-benzensulfonil)-derivatima eritromicilamina, sintetiziraju odgovarajući sulfoesteri oksima eritromicina A. Međutim, pritom su nastali zanimljivi produkti. Najprije je od eritromicina A (intermedijer 1, Slika 2) i hidroksilamin hidroklorida pripremljen oksim eritromicina A (intermedijer 2, slika 2). Tijekom sljedeće reakcije aciliranja oksima eritromicina A, u prisutnosti benzensulfonil-klorida u smjesi acetona i vode s natrijevim bikarbonatom, došlo je do spontanoga Beckmannova pregrađivanja eritromicin-9(E)-oksima te, uz sudjelovanje 6-OH-skupine aglikonskog prstena, do nastajanja bicikličkoga iminoetera eritromicina A (intermedijer 3, slika 2). Katalitičkoj redukciji u prisustvu vodika i platine kao katalizatora podvrgnuo se 6,9-iminoeter (intermedijer 3, slika 2) i dobio 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A (intermedijer 4, slika 2). To još nije bio konačan produkt, azitromicin, ali i taj intermedijer je, u usporedbi s eritromicinom A, pokazao dobru antibakterijsku aktivnost na više bakterijskih sojeva, a posebice na Gram-negativne bakterije. Rezultati tih istraživanja poljuljali su dotad promicanu dogmu o makrocikličkom prstenu eritromicina kao nositelju antibakterijske aktivnosti makrolida. Z. Tamburašev je 1965. i doktorirala tezom *Studije u redu eritromicina – sinteza eritromicin oksima, 9-amino eritromicina i njihovih derivata*. Prvi PLIVINI izumi na tom području, autora S. Đokića i Z. Tamburašev, prijavljeni su još sredinom 1960-ih, štiteći pripravu oksima eritromicina A<sup>18</sup> i eritromicilamina<sup>19</sup>, važnih intermedijera u sintezi druge generacije makrolidnih antibiotika (azitromicina, klaritromicina, roksitromicina i diritromicina). U timu su neprestance nicali nove ideje vođene racionalnim pristupom u dizajnu i pripravi još djelotvornijih produkata. Ubrzo su se u istraživanje uključile G.

<sup>16</sup> Spekter antibakterijskoga djelovanja ili aktivnosti – opseg aktivnosti antimikrobnoga agensa protiv bakterija. Antibakterijski agensi širokoga spektra inhibiraju različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, antibakterijski agensi uskoga spektra aktivni su samo protiv ograničenoga broja bakterija.

<sup>17</sup> Rezistencija – prilagođavanje različitih organizama (bakterija, insekata, čovjeka) stjecanjem neosjetljivosti na djelovanje otrovnih tvari ili lijekova. Unakrsna rezistencija (engl. *cross-resistance*) – pojava otpornosti na djelatnu tvar kao posljedica izloženosti bakterije tvari sličnoga djelovanja tj. posljedična pojava rezistentnosti i na druge ili na sve lijekove iz iste klase.

<sup>18</sup> Đokić, Slobodan, Zrinka Tamburašev (PLIVA), SAD pat. prijava (prioritet) US 1967/0660895 (16. VIII. 1967); patent US 3,478,014 (11. XI. 1969)

<sup>19</sup> Đokić, Slobodan, Zrinka Tamburašev (PLIVA), jug. pat. prijava P-1046/64 (27. 7. 1964); njem. pat. prijava (prioritet) DE 1967/P042498 (29. VI. 1967); patent DE 1593961 B1 (12. VIII. 1971)



**Slika 2.** Prikaz sinteze azitromicina (prilagodeno prema Mutak 2016: 359). 1 = eritromicin A, 2 = eritromicin-9(*E*)-oksim, 3 = 6,9-iminoeter, 4 = 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicin A

Kobrehel i G. Radobolja-Lazarevski te je u narednih desetak godina istraživanja ostvareno više patenata, kojima je naposljetku ostvaren i vrhunac uspjeha, sinteza i patent azitromicina. Postupci pripreve 9-deokso-9-dihidro-9a-aza-9a-homoeritromicina A i njegovih derivata, supstancije i njihove antibakterijske aktivnosti patentno je zaštitila PLIVA: 1979. u Jugoslaviji, a 1980. u SAD-u, Sovjetskom Savezu, Japanu i još nekim europskim zemljama, navodeći kao izumitelje G. Kobrehel, G. Lazarevski, Z. Tamburašev i S. Đokić<sup>20</sup>. Taj patent, koji je štitio pronalazak prekursora u sintezi azitromicina, kasnije se pokazao iznimno važnim za dokazivanje PLIVINA autorstva te je zbog tog patenta Pfizer bio prisiljen sklopiti ugovore s PLIVOM kako bi, uz plaćanje tantijema, dobio pravo na proizvodnju i prodaju azitromicina. To je ujedno prvi patent koji je opisao uvođenje dušika u aglikonski dio molekule eritromicina i pripremu jednoga od najvažnijih intermedijera u sintezi azitromicina. Rezultati tih istraživanja objavljeni su 1986–87.<sup>21</sup> u časopisima *Journal of Chemical Society Perkin Transactions* (Đokić 1986: 1881) i *The Journal of Antibiotics* (Đokić, Kobrehel i Lazarevski 1987: 1006).

<sup>20</sup> Kobrehel, Gabrijela i dr. (PLIVA), pat. prijava (prioritet) P-768/79 (2. IV. 1979); patent YU 43116 B (30.4.1989); patent US 4,328,334 (4. V. 1982).

<sup>21</sup> Kovačević, Krunoslav (ur.), *Bibliografija znanstvenih i stručnih radova (Pliva 1921–1991)*, Zagreb: Pliva, 1991., str. 122–142.

U završnici, dvije godine nakon proširenja prstena, reduktivnim *N*-metiliranjem cikličkoga amina u prisutnosti smjese mravlje kiseline i formaldehida po Eschweiler–Clarkeovu postupku, zaključuje se proces dobivanja azitromicina (produkt 5, slika 2). Novostvoreni spoj, azitromicin dihidrat, pokazao je poželjnija svojstva u odnosu na polazni spoj, eritromicin A. Za razliku od eritromicina A, azitromicin ima dvije bazične tercijarne amino-skupine i sadržava azalidni prsten, 15-člani prsten u kojem je dušik uključen u laktonski prsten na položaju 9a te nosi metilnu skupinu na položaju 9a(N). Primjeri aktivne zaštite inovacija kroz patentne prijave te primjeri izazova pojedinih patenata svakodnevnica su svjetske farmaceutske industrije. Velika ulaganja u istraživanje i razvoj moguća su samo uz odgovarajući povrat uloženi sredstava kroz tržišni rezultat lansiranih proizvoda. Pristupilo se patentnoj zaštiti supstancije, postupka pripreme i uporabe (1981–82) u mnogim zemljama svijeta (Jugoslavija, Makedonija, SAD, Kanada, Japan, Sovjetski Savez, Belgija, DDR i GDR – kasnije ujedinjene u Saveznu Republiku Njemačku, Austrija, Poljska, Velika Britanija, Švicarska, Italija, Švedska, Mađarska, Francuska i Meksiko). Američka prijava izuma predana je 1981., a nakon mnogih izmjena u patentnoj prijavi, američki patent odobren je tek četiri godine poslije, 1985 (Banić Tomišić 2011: 603). Sintaza azitromicina objavljena je 1988. u časopisu *Journal of Chemical Research* (Đokić 1988: 152). Otkriće azitromicina nije bilo slučajno, već je dugogodišnje istraživanje temeljeno na istraživanjima odnosa strukture i djelovanja bilo vođeno racionalnim promišljanjem o dizajnu lijekova, dovevši PLIVU do razvoja iznimno vrijednoga lijeka s golemim terapijskim i marketinškim potencijalom. PLIVA je kao strateškoga partnera odabrala američku tvrtku Pfizer. Netočna je informacija u *Wikipediji* kako je nakon patentiranja spoj bi praktički bačen u ladicu da bi ga Pfizerovi znanstvenici ponovno pronašli, prelistavajući dokumentaciju patentiranih kemijskih spojeva<sup>22</sup>. Licencni je ugovor s PLIVOM dao Pfizeru ekskluzivno pravo (s pravom podlicenciranja) da pod određenim pravnim i financijskim uvjetima iskorištava PLIVINO intelektualno vlasništvo na temelju PLIVINA patenta iz 1979. Prema sklopljenim ugovorima, Pfizer je dobio pravo proizvodnje i prodaje azitromicina u obliku gotova proizvoda u gotovo svim zemljama svijeta, osim u Jugoslaviji i zemljama bivšega Istočnoga bloka, u kojima je pravo na prodaju zadržala PLIVA (Banić Tomišić 2011: 603). Dogovoreno je da Pfizer za prodaju gotova oblika PLIVI plaća tantijeme (engl. *royalty*). Pfizer je također imao obvezu otkupa PLIVINE sirovine, tj. PLIVA je snabdijevala sirovinom svojega licencijskoga partnera za proizvodnju gotova proizvoda za SAD i većinski za ostatak svijeta. PLIVA je azitromicin, kao gotov proizvod, pod tržišnim brendom *Sumamed*, stavila na tržište Jugoslavije te zatim i istočne Europe. Potom je Pfizer na tržište sa svojim tržišnim brendom *Zithromax* izašao 1991. u SAD-u, a zatim i u ostatku svijeta.

<sup>22</sup> <https://hr.wikipedia.org/wiki/Sumamed> (pristupljeno 15. III. 2019).



## Vlastiti tehnološki postupak za proizvodnju azitromicina

Prve poluindustrijske količine azitromicina kao sirovine proizvedene su u PLIVI 1986., a početkom 1989. započela je redovita proizvodnja vlastitim tehnološkim postupkom. Vlastiti tehnološki postupak za sintezu aritromicina razradili su PLIVINI kemičari, kemijski tehnolozi i biotehnolozi: Nevenka Lopotar (Đokić 1986: 1881), Miljenko Čorić, Dalmiro Grgurić, Kolja Ivanišević te Berislav Prester. Doprinos laboratorijskom postupku dala je i skupina analitičara pod vodstvom Jelene Fabijanić i Nede Ortner. Projekt za adaptaciju postrojenja načinio je Josip Kalmar, a proizvodnju je koordinirao Alojz Dumbović (Mutak 1992: 2). Kako bi zadovoljila rastuću potražnju za sirovinom, PLIVA je 1998. izgradila nov pogon za proizvodnju azitromicina (slika 3) u Savskom Marofu – Azitromicin VNS (Višenamjenska sinteza), tada kapaciteta 220 t/godišnje, u kojem se azitromicin proizvodi i danas. Pliva Hrvatska d.o.o. na lokaciji Savski Marof smještena je na području općine Brdovec, između Prudnica i Drenja Brdovečkog. Lokacija se nalazi približno 20 km sjeverozapadno od Zagreba, zapadno od Zaprješića u blizini granice sa Slovenijom, južno od željezničke pruge Zagreb–Ljubljana, sjeverno od Save. Na toj se lokaciji proizvodne aktivnosti odvijaju od 1876. godine, kada je »Tvornicu i rafineriju špirita i pjenice« utemeljio barun Dumreicher, a proizvodnja pjenice/kvasca održala se do danas u tvrtki Kvasac d.o.o.



**Slika 3.** Početak izgradnje objekta višenamjenske sinteze (VNS – azitromicin) u Savskom Marofu, (1994), završen 1998 (prilagođeno prema Mutak 1996)

Od 1948. godine tvornica posluje pod imenom »Žumberak«, s osnovnom djelatnošću proizvodnje kvasca i špirita, a početkom 1967. ulazi u sastav PLIVE, koja je na toj lokaciji proizvodila aktivne djelatne tvari (API). Na lokaciji Savski Marof 1976. izgrađeno je postrojenje za proizvodnju aktivnih farmaceutskih proizvoda kemijskim procesima, današnja Sinteza SMI. Uz PLIVU, na lokaciji u Savskom Marofu se na-

laze i tvrtke Hospira Zagreb d.o.o. za proizvodnju aktivnih farmaceutskih supstan-  
cija biološkim procesima i gotovih oblika i KVASAC d.o.o. za proizvodnju svježega i  
suhoga kvasca te pekarskih dodataka. Pogon za azitromicin izgrađen je za potrebe  
kampanjske i šaržne višenamjenske sinteze u skladu sa zahtjevima Dobre proizvo-  
đačke prakse (DPP<sup>23</sup>) i primjenjivim zakonskim zahtjevima iz područja zaštite oko-  
liša, zaštite na radu i sigurnosti. Proizvodnja azitromicina u pogonima VNS danas je  
složen tehnološki proces, sastavljen od više međusobno povezanih tehnoloških ope-  
racija i tehnika. Kod proizvodnje azitromicina reakcije su određene proizvodnim  
postupkom a sastoje se od koraka redukcije (reduktivno cijepanje<sup>24</sup>), diazotacije<sup>25</sup>,  
supstitucije<sup>26</sup>, kopulacije<sup>27</sup>, Friedel–Crafts reakcije, oksimacije, Beckmannove pre-  
gradnje, hidriranja, Eschweiler–Clark reakcije i oksidacije<sup>28</sup>. Uz kemijske reakcije,  
odvija se cijeli niz fizikalnih operacija kao što su odvajanja (odjeljivanje, dekantiranje,  
filtracija, centrifugiranje), sušenje i mljevenje. Proizvodna linija pogona za azitromi-  
cin sastoji se od reaktora, kristalizatora, centrifuge i sušnice, pumpe, mlina i uređaja  
za opremanje, te postrojenja za regeneraciju otapala i predobradu otpadnih voda,  
čime se smanjuje opterećenje okoliša otpadnim tvarima<sup>29</sup>.

## **Molekularni mehanizam vezanja i djelovanja azitromicina – doprinos hrvatskoga znanstvenika prof. Nenada Bana**

Makrolidi, pa tako i azitromicin, lipofilne su molekule koje ulaze u bakterijsku sta-  
nicu i inhibiraju biosintezu bakterijskih proteina na ribosomima (Gale 1981),  
ribonukleoproteinskim česticama čija je biološka funkcija translacija molekula  
mRNA u polipeptide, odnosno na njima se odvija biosinteza proteina. Dio svojega  
doktorata autorica ovoga rada izradila je provevši dio poslijedoktorskoga istraživač-  
koga rada u Zürichu na Tehničkoj visokoj školi (ETH) u laboratoriju prof. Nenada

---

<sup>23</sup> Dobra proizvođačka praksa (DPP, engl. *Good Manufacturing Practice*) – dio sustava osigura-  
nja kakvoće kojim se postiže da se lijekovi dosljedno i trajno proizvode i provjeravaju prema odgovaraju-  
ćim standardima kakvoće u skladu s njihovom namjenom.

<sup>24</sup> Redukcija – bilo koji proces u kojem se elektroni dodaju atomu. Oksidacijski broj se smanjuje,  
tj. postaje negativniji. Reduktivno cijepanje znači pucanje lanca ili prstena uz izdvajanje molekula.

<sup>25</sup> Diazotacija – reakcija primarnih arilamina s nitritima, po mogućnosti s natrijevim nitritom,  
u vodenokiseloj otopini.

<sup>26</sup> Supstitucija – reakcija zamjene jednoga atoma ili skupine drugim atomom ili skupinom.

<sup>27</sup> Kopulacija – povezivanje dviju molekula, na primjer preko dušikova atoma.

<sup>28</sup> Oksidacija – u kemijskom smislu, otpuštanje elektrona, što se ostvaruje prijelazom valentnih  
elektrona s atoma, iona ili molekula.

<sup>29</sup> <http://pliva.hr/press-kutak/novosti/clanak/305/PLIVA-objavila-Izvjescje-o-odrzivom-razvo-ju-za-2005-godinu.html> (pristupljeno 20. III. 2019)

Bana<sup>30</sup>, redovitoga profesora strukturne molekularne biologije na ETH i kristalografskoga stručnjaka za strukture ribosoma. Proučavanje velike ribosomske podjedinice u laboratoriju prof. Bana pružilo joj je prvi uvid u golemi volumen jedne velike stanične ribonukleoproteinske čestice i utjecalo je godinama na njezin znanstveno-istraživački rad u području međudjelovanja proteina. Prof. Ban diplomirao je u Zagrebu (1990), zatim otišao u SAD, gdje je, nakon obrane doktorskoga rada na Kalifornijskom sveučilištu u Riversideu (1994), poslijedoktorsko istraživanje nastavio na Sveučilištu Yale, koristeći se rendgensko-kristalografskom analizom u grupi budućega Nobelovca, profesora Thomasa Steitza, na temu strukture prokariotskoga ribosoma. Strukturu velike ribosomske podjedinice iz organizma *Haloarcula marismortuii* objavio je 2000 (Ban 2000: 905). Godine 2002. Steitz i Ban objavili su strukturu ribosoma u kompleksu s makrolidima karbomicinom A, spiramicinom, tilozinom i azitromicinom (Hansen 2002: 117), a Steitz je 2009. dobio Nobelovu nagradu za kemiju upravo na temelju ovih istraživanja strukture ribosoma. Strukture su razotkrile da je aktivno mjesto ribosoma građeno isključivo iz RNA, pa je ribosom zapravo ribozim (Nissen 2000: 920). Tim istraživanjima pokazano je kako je ribosom ciljno mjesto vezanja azitromicina i drugih makrolida (slika 4).



prof. Nenad Ban

Detalji u strukturi ribosoma određeni u laboratoriju prof. Nenada Bana, jednoga od najcjenjenijih hrvatskih znanstvenika s trenutačnom švicarskom adresom i dopisnoga člana HAZU, smatraju se prekretnicom u istraživanju biosinteze proteina. Proučavanjem i praćenjem njegovih istraživanja kao sustavne cjeline utvrđuje se njegov velik doprinos razumijevanju mehanizama vezanja i djelovanja antibiotika te se njegovi rezultati valoriziraju kao važan prilog hrvatskih znanstvenika otkriću azitromicina.

Iako ribosome karakterizira velika strukturna i funkcionalna evolucijska očuvanost, razlike u građi ribosoma postoje, osobito između prokariota i eukariota. Ri-

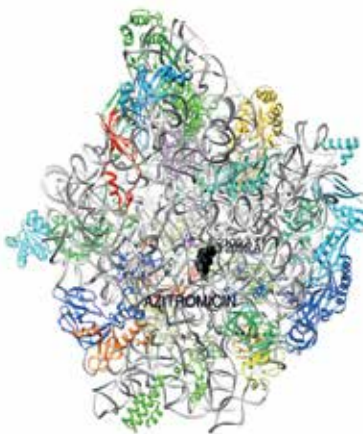
<sup>30</sup> Ban, Nenad, hrvatski molekularni biolog (Zagreb, 3. V. 1966). Diplomirao molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu (1990). Doktorirao iz biokemije na Kalifornijskom sveučilištu u Riversideu (1994). Od 1995. do 1999. djelovao na Sveučilištu Yale u New Havenu. Ondje je, kao suradnik T. A. Steitza, otkrio strukturu velike ribosomske podjedinice i pokazao da je aktivno mjesto ribosoma građeno iz RNA te da je ribosom zapravo ribozim. Od 2000. djeluje na Institutu za molekularnu biologiju i biofiziku Savezne tehničke visoke škole (Eidgenössische Technische Hochschule, ETH) u Zürichu; redoviti profesor strukturne molekularne biologije od 2007. Bavi se istraživanjem ribosoma, velikih enzima i drugih staničnih supramolekularnih struktura s pomoću biokemijskih, elektronsko-mikroskopskih i kristalografskih metoda. Otkrio strukturu sintetaze masnih kiselina u sisavaca (2008). Godine 2011. objavio je prvu detaljnu informaciju o strukturi ribosoma u viših organizama te razjasnio kako ribosom sintetizira membranske bjelančevine. Član njemačke Nacionalne akademije znanosti Leopoldina (od 2008). Dopisni je član HAZU (od 2010). Dobitnik američke nagrade »Newcomb Cleveland« (2002), njemačke nagrade »Heinrich Wieland« (2010) te drugih međunarodnih priznanja.

bosom katalizira polimerizaciju aminokiselina u proteine na temelju redoslijeda nukleotida nanizanih u mRNA (glasnička ribonukleinska kiselina) prema načelima genetskoga kôda<sup>31</sup>. Nukleotidni tripleti u mRNA (kodoni) kodiraju pojedine aminokiseline. Svaki bakterijski ribosom sastoji se od velike, podjedinice 50S, i male, podjedinice 30S. Translacija uobičajeno započinje korakom inicijacije koja u stanici prokariota uključuje vezanje Shine-Dalgarnoova slijeda molekule mRNA s dijelom 3' kraja 16S rRNA (rRNA, ribosomska RNA) male podjedinice prokariotskoga ribosoma. Nukleotidi antikodona inicijacijske tRNA (tRNA – transportna ribonukleinska kiselina) na koju je vezana početna aminokiselina metionin, tvore vodikove veze s komplementarnim slijedom nukleotida početnoga (start) kodona molekule mRNA, pri čemu nastaje cjelovit inicijacijski kompleks 30S. U sljedećem se koraku na taj kompleks veže velika podjedinica ribosoma. Na sučelju dviju podjedinica ribosoma nalazi se nekoliko karakterističnih mjesta sazdanih od dijelova ribonukleinskih kiselina koja sudjeluju u vezanju derivata molekula tRNA. Aminokiseline dolaze na ribosom povezane s molekulama tRNA (aminoacil-tRNA), pri čemu se antikodon molekule aminoacil-tRNA sparuje s kodonom u molekuli mRNA. Pravilnim smještajem supstrata u katalitički peptidil-transferazni centar (PTC, engl. *peptidyl transferase center*) velike podjedinice ribosoma, građenoga isključivo od 23S rRNA, dolazi do katalize stvaranja peptidne veze, pri čemu se aminokiselina iz molekule aminoacil-tRNA ugrađuje u polipeptidni lanac. Nakon stvaranja peptidne veze dolazi do translokacije tRNA koja je energetski potpomognuta hidrolizom molekule GTP-a. Taj ciklus ponavlja se toliko puta koliko ima kodona u mRNA, a sinteza polipeptida završava vezanjem faktora otpuštanja na stop kodon, čime dolazi do terminacije translacije, hidrolize esterske veze između tRNA i polipeptida te disocijacije velike podjedinice, male podjedinice, polipeptidnoga lanca i mRNA. Međutim, često više ribosoma uzastopce transliraju istu mRNA. Nakon sinteze i otpuštanja s ribosoma polipeptid se smata u nativni protein.

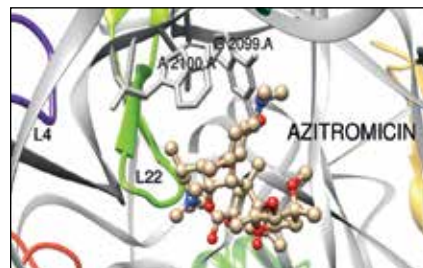
Mehanizam djelovanja makrolidnih antibiotika ostvaruje se u dvama koracima: prepoznavanjem veznoga mjesta na ribosomu i utjecajem na elongaciju polipeptida. Makrolidi se selektivno vežu na prokariotske ribosome u blizini izlaznoga tunela koji se nastavlja na peptidil-transferazni centar (Ban 2000: 905; Hansen 2002: 117). Većina makrolida ne inhibira stvaranje peptidne veze direktno, već blokiraju elongaciju polipeptida na ribosomu i onemogućavaju izlazak amino-kraja peptida kroz izlazni kanal, što dovodi do prestanka elongacije, destabilizacije i otpuštanja nepotpunih peptida kraćih od 5 aminokiselina u obliku peptidil-tRNA (Mao, Robishaw 1971: 2054), a ovisno o vrsti makrolidnoga inhibitora i do disocijacije ribosomskoga kom-

<sup>31</sup> Genetski kôd – skup pravila za prevođenje informacija sadržanih u genetskom materijalu u proteine. Degeneriran je, univerzalan i nepreklapajući, a čita se u obliku tripleta nukleotida (kodona), a tripleti kodiraju za neku od 20 osnovnih aminokiselina čiji kovalentni niz daje polipeptid.

pleksa. Mehanizam na kojem se temelji selektivnost eritromicina A stvaranje je vodikovih veza između adenzina 2058 u 23S rRNA i hidroksilne skupine dezoamidnoga šećera makrolidnoga prstena u području izlaznoga kanala koji se nastavlja na peptidil-transferazni centar (Ban 2000: 905) dok se hidrofobni dio makrolaktonskoga prstena veže na obližnje dušične baze putem van der Waalsovih interakcija (slika 4). Ukoliko se na ekvivalentnoj poziciji 2058 u 23S rRNA nalazi neka druga dušikova baza, vezanje nije povoljno te posljedično ne dolazi do terminacije translacije (Bulkeley 2010: 17158). Dok se kod prokariota na ovoj ključnoj poziciji nalazi adenzinska baza, kod eukariota ovdje nalazimo gvanozin, što smanjuje afinitet vezanja azitromicina i zbog toga su makrolidi selektivni isključivo prema bakterijskim ribosomima (Birte i Douthwaite 2001: 1). Bakterije često ostvaruju rezistenciju na antibiotike koji se vežu za bakterijski ribosom procesom metilacije specifičnih nukleotida rRNA, ključnih za interakciju s antibiotikom (Jelić, Antolović 2016: 1). Metil-transferaze Erm su skupina enzima čije djelovanje rezultira rezistencijom na terapijski važne makrolide monometiliranjem ili dimetiliranjem adenzina na poziciji A2058 u 23S rRNA, iako postoje i drugi mehanizmi rezistencije. Budući da se stijenka tunela ne sastoji samo od 23S rRNA, nego i od dijelova ribosomskih proteina L4, L22 i L23 čije petlje sužavaju tunel, strukturna različitost prokariotskih i eukariotskih varijanti proteina L4 i L22 onemogućuje vezanje azitromicina za eukariotske ribosome, ali



**Slika 4. (lijevo)** Struktura velike ribosomske podjedinice iz organizma *Haloarcula marismortui* s vezanom molekulom azitromicina (crna sfera). Proteini su obojeni različitim bojama, a rRNA (5S i 23S) prikazana je sivom bojom.



**Slika 4. (desno)** Poblži prikaz veznoga mjesta za azitromicin. Vidljiv je položaj i blizina nukleotida A2100 (numerirano prema *H. marismortui* – analog kod *E. coli* A2059) i G2099 (numerirano prema *H. marismortui* – analog kod *E. coli* A2058)

te drugih nukleotida iz domene V rRNA 23S u mjestu vezanja azitromicina u izlaznom tunelu ribosoma. Šećeri azitromicina ispruženi su prema peptidil-transferaznom centru. 23S rRNA u stijenci tunela prikazana je sivom bojom, a dijelovi ribosomskih proteina L4 i L22, čije petlje sužavaju tunel, prikazani su ljubičastom i zelenom bojom. U izradi slike korišten je program Chimera i pdb kôd 1M1K (<http://www.rcsb.org/structure/1M1K>; pristupljeno 23. III. 2019).

ne i za bakterijske (Melnikov 2012: 560). Uvođenje mutacija u proteine L4 i L22 potvrđuje njihovu ulogu u sužavanju izlaznog kanala.

## **Protuupalno djelovanje i otkriće imunomodulatornih svojstava azitromicina potaknuto spoznajama iz kliničke primjene**

Kao posljedica vezanja azitromicina za bakterijske ribosome, djelovanje azitromicina smatra se bakteriostatskim<sup>32</sup>, a koncentracije nekoliko puta veće od minimalnih inhibitornih koncentracija pridonose baktericidnom djelovanju<sup>33</sup>. Djelovanje azitromicina slično je djelovanju eritromicina A, uz širi spektar djelovanja, što predstavlja prednost pred ostalim makrolidima (Iacoviello i Zinner 2002). Osobito je djelotvoran prema uzročnicima infekcija gornjih dišnih puteva te pri infekcijama mekih tkiva i infekcijama spolno prenosivih bolesti. Međutim, uz antibakterijsko djelovanje, makrolidni antibiotici posjeduju dodatne terapijske osobine koje su došle do izražaja u kliničkoj praksi pri liječenju kroničnih upalnih i zaraznih bolesti karakteriziranih snažnom upalnom reakcijom u kojoj dominiraju neutrofilni poput difuznoga panbronhiolitisa (DPB), cistične fibroze (CF), astme i bronhiektazija (Čulić, Eraković i Parnham 2001: 209; Labro 1998: 37; Keicho, Kudoh 2002: 119, Schultz 2004: 21). Zahvaljujući iznimno dobrim farmakokinetičkim svojstvima, azitromicin u upalno promijenjenim tkivima postiže visoke i postojeće terapijske koncentracije, a završno vrijeme polueliminacije azitromicina iz plazme iznosi 2 do 4 dana. Biotransformacija malih količina azitromicina zbiva se u jetri procesom demetilacije, a iz organizma se izlučuje putem žuči. Sposobnost prodiranja makrolida u stanice omogućuje nakupljanje azitromicina u neutrofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, koji ga procesom kemotaksije usmjeravaju na mjesto upale. Zahvaljujući tome postižu mnogo veće koncentracije makrolida u području upale nego u zdravom tkivu, čime se ostvaruje njegovo ciljno djelovanje (Gladue 1989: 277, Olsen 1996: 2582, Ishiguro 1989: 719). Prvo sabiranje podataka došlo je iz kliničke primjene. Zadnjih 20-ak godina postoje jasni dokazi kako neki makrolidi, koji se već niz godina primjenjuju u kliničkoj praksi, ujedno djeluju protuupalno i imunomodulatorno. Otkriće imunomodulatornih svojstava makrolida primjećeno je uporabom lijeka u klinici izvan odobrene indikacije (engl. *off-label use*), u liječenju životno ugroženih osoba, usprkos činjenici što ih regulatorna tijela nisu registrirala za navedenu indikaciju.

<sup>32</sup> Bakteriostatska aktivnost – razina antibakterijske aktivnosti koja inhibira rast bakterije. Određuje se *in vitro* testiranjem aktivnosti standardizirane koncentracije bakterija u serijskim razrjeđivanjima antibiotika. Najniža koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK).

<sup>33</sup> Baktericidna aktivnost – razina antibakterijske aktivnosti koja uništava ispitivanu bakteriju. Određuje se *in vitro* testiranjem aktivnosti standardizirane koncentracije bakterija u serijskim razrjeđivanjima antibiotika. Najniža koncentracija antibiotika koja uništava 99,9% bakterija se naziva minimalna baktericidna koncentracija (MBK).

Kliničke opservacije učinka lijeka izvan inicijalnoga terapijskoga područja djelovanja potaknule su detaljnija bazična istraživanja uočenoga svojstva (Herak 2011: 29), međutim konačno mišljenje i preporuku o proširenju terapijskih indikacija za lijekove donosi nadležna agencija za lijekove. Protuupalni učinci makrolidnih antibiotika (Martinez, Curtis, Albert 2008: 331) očituju se u regulaciji ekspresije faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 (IL-1), interleukina-4 (IL-4), interleukina-8 (IL-8), smanjuju oslobađanje superoksida i elastaze iz stimuliranih polimorfonuklearnih leukocita (PMN), povećavaju apoptozu neutrofila, limfocita, histiocita i eozinofila, smanjuju kemotaksiju i preživljavanje neutrofila te smanjuju sekreciju mukoze i stvaranje biofilma (Anderson, Fernandes i Eftychis 1984: 966; Anderson 1989: 41; Schultz 2000: 235; Wenisch 1996: 2039). Pojedini makrolidi imaju dodatno korisno protuupalno djelovanje kod kronične opstruktivne bolesti pluća (KOPB), bolesti karakterizirane progresivnom opstrukcijom dišnih putova uzrokovane neprimjerenim upalnim odgovorom na dugotrajnu izloženost štetnim tvarima kao što su produkti izgaranja duhana (Pauwels 2001: 1256). Dugotrajnom primjenom eritromicina A i klaritromicina postignuto je znatno smanjenje upale u bronhijima kroz supresiju, ne samo proliferacije neutrofilnih granulocita, već i aktivnosti limfocita i obstruktivne sekrecije u dišnim putevima kod idiopatske bolesti DPB, raspostranjene u Aziji zbog genetskih predispozicija (Goswami, Kivity i Marom 1995: 72). Protuupalni učinak makrolida dugotrajnom terapijom pacijenata s DPB-om zabilježen je u snižavanju broja neutrofilnih stanica u bronhoalveolarnoj tekućini, inhibiciji protuupalnih citokina (Keicho, Kudoh 2002: 119) a očituje se poboljšanjem ishoda bolesti (Kudoh 1987: 632; Koyama, Geddes 1997: 915).

## Zaključak

Uz pojam hrvatske farmaceutske industrije nepobitno se povezuje organizirani istraživački rad još od 30-ih godina prošloga stoljeća koji obuhvaća djelovanje svjetski priznatih istraživača, otkriće novih lijekova, orijentiranost na izvoz proizvoda te stalno ulaganje u ljude, tehnologije i proizvode te slavnu prošlost zbog otkrića sinteze azitromicina prije 40 godina. Međutim, svega pola stoljeća nakon široke upotrebe antibiotika našli smo se u velikom javnozdravstvenom problemu i situaciji u kojoj nemamo učinkovite lijekove za neke bakterijske infekcije. U Europskoj uniji više od 25 000 pacijenata godišnje umire od infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama. Svjedoci smo, posebno u posljednje vrijeme, vrlo intenzivnih javnih rasprava o tome kako infekcije uzrokovane multirezistentnim bakterijama pokazuju višu stopu smrtnosti i produljenje bolničkoga liječenja, povećane troškove u zdravstvu, a za mnoge infekcije postoji vrlo malo preostalih terapijskih mogućnosti. Razvoj i registracija novih antibiotika, poglavito iz novih klasa, predstavljaju velik izazov. Broj odobrenja za antibiotike koje daje američka agencija za hranu i lijekove (FDA) drastično se smanjio u posljednjih 20 godina. Posljedično, u razdoblju 2015–17., FDA je

odobrila samo šest novih antibiotika od ukupno 500-tinjak odobrenih novorazvijenih lijekova (Honeyman 2001). Zbog ekonomskih, ali i drugih razloga, farmaceutske tvrtke se u svojim istraživanjima više okreću razvoju drugih vrsta lijekova. Ključni trendovi svjetske farmaceutske industrije jesu daljnja velika ulaganja u istraživanje i razvoj, uz istodobnu stagnaciju u važnim inovacijama i broju novih molekulskih entiteta koji izlaze na tržište. Takvo stanje stvara dodatan pritisak i zahtjeve na tehnološku specijalizaciju, a domaća industrija u velikoj mjeri prati navedene trendove.

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 te prolongiranom i višom tkivnom koncentracijom, kao i niskom učestalošću gastrointestinalnih nuspojava u usporedbi s ostalim antibioticima. Zahvaljujući izvrsnim rezultatima i velikoj količini akumuliranoga znanja i iskustva njezinih istraživača, tijekom sedamdesetih i osamdesetih godina XX. st. u PLIVI je uslijedilo razdoblje najvećih dometa na području kemijskih transformacija tetraciklina i eritromicina te sinteze novih azalida. PLIVA je vlasnik više od 380 patenata, ali otkriće azitromicina u PLIVINIM laboratorijima najznačajniji je događaj ne samo u povijesti PLIVE već i hrvatske farmaceutske industrije u cjelini. PLIVA se ovim otkrićem svrstala među malobrojne farmaceutske kompanije koje imaju svoj originalan lijek<sup>34</sup>, a Hrvatska među malobrojne zemlje u svijetu koje se time mogu pohvaliti. Važnost azitromicina kroz priznanja i nagrade prepoznala je Hrvatska, ali i svijet. Američko kemijsko društvo (engl. *American Chemical Society*, ACS) je 2000. godine u Washingtonu dr. sc. Slobodanu Đokiću i mr. sc. Gabrijeli Kobrehel, zajedno s njihovim kolegama koji su sudjelovali u radu na azitromicinu iz poduzeća Pfizer, dodijelilo priznanje za unaprjeđenje globalne dobrobiti čovječanstva u području zdravlja i imenovalo ih »Herojima kemije« na ceremoniji pod imenom »Heroji kemije 2000« (engl. *Heroes of Chemistry 2000*) (Vojvodić, Valentić 2000: 233). Osim toga međunarodnoga priznanja, S. Đokiću, G. Kobrehel, G. Radobolja-Lazarevski i Z. Tamburašev ujedno su dodijeljena i tuzemna priznanja – Nagrada za životno djelo (1998), Nagrada HAZU-a za otkriće novoga antibiotika azitromicina (1998), a zbog svoje iznimne kvalitete, ugleda i prepoznatljivosti, *Sumamed* je dobio atribut »izvorno hrvatsko«<sup>35</sup>.

<sup>34</sup> Izvorni lijek ili originalni lijek (engl. *proprietary drug*) – lijek koji je prvi odobren za stavljanje u promet u svijetu na temelju potpune dokumentacije o djelotvornosti, sigurnosti primjene i kakvoći prema važećim zahtjevima. Posve je nov lijek, nastao na temelju istraživanja novih kemijskih entiteta rezultati kojih se patentno zaštićuju. Prolazi dugotrajna klinička ispitivanja. Tijekom trajanja patentne zaštite (obično 20 godina) samo vlasnik patenta može proizvoditi lijek ili može to pravo licencirati nekom drugom uz odgovarajuću naknadu.

<sup>35</sup> [http://kupujmohrvatsko.hgk.hr/wp-content/uploads/2015/04/proizvodi\\_ih.pdf](http://kupujmohrvatsko.hgk.hr/wp-content/uploads/2015/04/proizvodi_ih.pdf) (pristupljeno 26. III. 2019)



## LITERATURA

- Anderson, Ronald, Fernandes, Ana Cristina i Bftychis, H. A.** (1984). »Studies on the effects of ingestion of a single 500 mg oral dose of erythromycin stearate on leucocyte motility and transformation and on release in vitro of prostaglandin E2 by stimulated leucocytes«. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, str. 41–50.
- Anderson, Ronald i dr.** (1989). »Erythromycin and roxithromycin potentiate human neutrophil locomotion in vitro by inhibition of leukoattractant-activated superoxide generation and autooxidation«. *The Journal of Infectious Diseases* 159, str. 966–973.
- Ban, Nenad i dr.** (2000). »The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution«. *Science* 289 (5481), str. 905–920.
- Banić Tomišić, Zrinka** (2011). »Priča o azitromicinu«. *Kemija u industriji*, 60 (12), str. 603–617.
- Birte, Vester, Douthwaite, Stephen** (2001). »Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA«. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1–12.
- Bulkley, David i dr.** (2010). »Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome«. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 107 (40), str. 17158–17163.
- Chater, Keith F.** (2006). »Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics«. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 361 (1469), str. 761–768.
- Čulić, Ognjen, Eraković, Vesna, Parnham, Michael J.** (2001). »Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics«. *European Journal of Pharmacology*, 429, str. 209–229.
- Đokić, Slobodan i dr.** (1986). »Erythromycin series. Part II. Ring Expansion of Erythromycin A Oxime by the Beckmann Rearrangement«. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, str. 1881–1890.
- Đokić, Slobodan, Kobrehel, Gabrijela, Lazarevski, Gorjana** (1987). »Erythromycin series XII. Antibacterial *in vitro* evaluation of 10-dihydro-10-deoxy-11-azaerythromycin A: Synthesis and structure-activity relationship of its acyl derivatives«. *Journal of Antibiotics* 40 (7), str. 1006–1015.
- Đokić, Slobodan i dr.** (1988). »Erythromycin Series. Part 13. Synthesis and Structure Elucidation of 10-Dihydro-10-deoxy-11-methyl-11-azaerythromycin A«. *Journal of Chemical Research (S)*, str. 152–153.
- Douthwaite, Stephen** (1992). »Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center«. *Journal of Bacteriology*, 174, str. 1333–1338.
- Eraković-Haber, Vesna** (2011). »Makrolidi – više od antibiotika«. *Infektološki glasnik*, 31 (1), str. 29–39.
- Gale, Ernest Frederic i dr.** (1981). »Antibiotic inhibitors of ribosome function«. U: *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, London: John Wiley & Sons, str. 402–457.
- Gladue, Ronald P. i dr.** (1989). »In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection«. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (3), str. 277–282.
- Goswami, Satindra K., Kivity, Shmuel, Marom, Zvi** (1990). »Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways in vitro«. *American Review of Respiratory Disease* 141, str. 72–78.
- Hansen, Jeffrey L. i dr.** (2002). »The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit«. *Molecular Cell*, 10 (1), str. 117–128.
- Honeyman, Allen** (2001). »Prevention of antibiotic resistance«, 120. U: »Staphylococcus aureus Infection and Disease (Infectious Agents and Pathogenesis)«. Berlin: Springer.
- Iacoviello, Vito R., Zinner, Stephen H.** (2002). »Macrolides: a clinical overview«. U: Schönfeld W, Kirst HA, U »Macrolide antibiotics«, str. 15–24. Berlin: Birkhauser-Verlag.

- Ishiguro**, Miyako i dr. (1989). »Penetration of macrolides into human polymorphonuclear leucocytes«. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 24, str. 719–729.
- Jelić**, Dubravko, **Antolović**, Roberto (2016). »From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials«. *Antibiotics (Basel)* 5 (3), str. 1–13.
- Keicho**, Naoto, **Kudoh**, Shoji (2002). »Diffuse panbronchitis: role of macrolides in therapy«. *American Journal of Respiratory Medicine: Drugs, Devices, and Other Interventions* 1 (2), str. 119–131.
- Konstantinović**, Dragoljub (1986). »Uspomene na osnutak „Kaštelova“ istraživačkog laboratorija 1936. godine«. U: *50 godina znanstvenoistraživačkog rada u Plivi: bibliografija RO Pliva Istraživački institut*, 5–7, Zagreb: Pliva.
- Koyama**, Hideaki, **Geddes**, Duncan M. (1997). »Erythromycin and diffuse panbronchitis«. *Thorax* 52(10), str. 915–918.
- Kudoh**, Shoji i dr. (1987). »Clinical effect of low-dose long-term erythromycin chemotherapy on diffuse bronchiolitis«. *Japanese Journal of Thoracic Diseases* 25, str. 632–642.
- Labro**, Marie Thérèse (1998). »Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential?«. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, str. 37–46.
- Mao**, James C.-H., **Robishaw**, Ellen E. (1971). »Effects of macrolides on peptide-bond formation and translocation«. *Biochemistry*, 10, str. 2054–2061.
- Martinez**, Fernando J., **Curtis**, Jeffrey L., **Albert**, Rick (2008). »Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease«. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 3 (3), str. 331–350.
- Melnikov**, Sergey V. i dr. (2012). »One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes«. *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6), str. 560–567.
- Milčec**, Zvonimir (1996). *Povjesnica Plive*, Zagreb: Pliva, str. 49–51.
- Mutak**, Stjepan (1992). »Što je Pliva?«, *Glasnik Društva diplomiranih inženjera i prijatelja kemijsko-tehnoloških studija* 2, str. 2–6.
- Mutak**, Stjepan (1996). »Kemičari i tehnolozi u Plivinoj projektantskoj organizaciji«, *Glasnik Društva diplomiranih inženjera i prijatelja kemijsko-tehnoloških studija* 15, str. 1–12.
- Mutak**, Stjepan (2016). »Od vitamina do antibiotika – sjećanja jednog kemičara II. dio«, *Kemija u industriji* 65 (7–8), str. 359–374.
- Nissen**, Paul i dr. (2000). »The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis«. *Science* 289 (5481), str. 920–930.
- Olsen**, Keith M. i dr. (1996). »Intrapulmonary pharmacokinetics of azithromycin in healthy volunteers given five oral doses«. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, str. 2582–2585.
- Pauwels**, Romain A. i dr. (2001). »Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) workshop summary«. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163, str. 1256–1276.
- Schultz**, Marc J. i dr. (2000). »Intravenous infusion of erythromycin inhibits CXC chemokine production, but augments neutrophil degranulation in whole blood stimulated with Streptococcus pneumoniae«. *J. Antimicrob. Chemother* 46, str. 235–240.
- Schultz**, Marcus J. (2004). Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchitis and cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (1), str. 21–28.
- Vojvodić**, Alan, **Valentić**, Renata (2000). »Plivini znanstvenici – Heroji kemije 2000«. *Medicus*, 9 (2), str. 233.
- Wenisch**, C. i dr. (1996). »Effect of single oral dose of azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin on polymorphonuclear leukocyte function assessed ex vivo by flow cytometry«. *Antimicrob. Agents. Chemother* 40, str. 2039–2042.

- Woodward, Robert Burns** i dr. (1981). »Asymmetric total synthesis of erythromycin. 2. Synthesis of an erythronolide A lactone system«, *Journal of the American Chemical Society* 103 (11), str. 3213–3215.
- Xu, Ze-Qi, Flavin, Michael T., Eiznhamer, David A.** (2011). »Macrolides and Ketolides«. U: *Antibiotic Discovery and Development*, str. 181–182, Berlin: Springer.

## 40 YEARS OF AZITHROMYCIN – A CONTRIBUTION TO THE VALORISATION OF THE ACHIEVEMENTS OF CROATIAN SCIENTISTS

Vlatka Godinić Mikulčić

Agency for Mobility and EU Programmes, Zagreb  
vgodinic@yahoo.com

**ABSTRACT:** Azithromycin is a semisynthetic macrolide antibiotic that, after 40 years of success, is still considered a golden standard for a type of antibiotic called azalides. After the 1970s, as the development of a new antibiotic that would have a more powerful effect on gram-negative bacteria than erythromycin A and clarithromycin, be stable in an acid environment, and absorb well was underway, in Croatia a research team of the Zagreb pharmaceutical company PLIVA led by Dr S. Đokić synthesised a new macrolide antibiotic in 1979–81. This article offers an overview of the full contribution of PLIVA's research team to the discovery and production of azithromycin through their own technological process. In order to better understand the climate in which PLIVA's scientists worked, one should recall the summaries of their research, based on their contribution to world pharmaceutical heritage through the history of macrolide antibiotic research. An overview of the azithromycin research process is presented through systematic notes. The contribution of Prof. Nenad Ban to the discovery of the way azithromycin binds to ribosomes is highlighted, while a study of his earliest and a collection of his newer writings are used to refer to the anti-inflammatory effect of azithromycin and valorise new data on its use.

**Keywords:** *antibiotics; azithromycin; organic synthesis; ribosome; Sumamed; technological process*



Članci su dostupni pod licencijom Creative Commons: Imenovanje-Nekomercijalno (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Sadržaj smijete umnožavati, distribuirati, priopćavati javnosti i prerađivati ga, uz obvezno navođenje autorstva, te ga koristiti samo u nekomercijalne svrhe.