

Novel 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives as potential antibacterial agents. Chemical synthesis, biological evaluation, and computational study

Nowe 1,3,4-tiadiazolowe pochodne cefalosporyn jako potencjalne środki przeciwbakteryjne. Synteza chemiczna, ocena biologiczna i badania obliczeniowe



DOI: 10.15199/62.2025.3.10

1,3,4-Tiadiazolowe pochodne cefalosporyn zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane jako potencjalne środki przeciwbakteryjne. Związki te oceniano *in vitro* pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej wobec patogenów Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) i Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*). Testy biologiczne wykazały, że wszystkie pochodne wykazywały skuteczność przeciwbakteryjną o szerokim spektrum działania, porównywalną lub przewyższającą skuteczność leków referencyjnych w analizach porównawczych. Warto zauważyć, że związek **17i** wykazywał najsilniejszą aktywność wśród testowanych szczepów. Badania dokowania molekularnego wykazały, że związek **17i** tworzy stabilne interakcje zarówno w miejscu aktywnym, jak i w kieszeni allosterycznej białka wiążącego penicylinę 2a (PBP2a) z opornego na metycylinę *S. aureus* (MRSA, PDB: 3ZG0), sugerując mechanizm podwójnego wiązania. Ponadto, przewidywania *in silico* właściwości farmakokinetycznych ADMET (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie i toksyczność) oraz właściwości molekularnych wykazały korzystne profile podobne do profili leków dla wybranych pochodnych, podkreślając ich potencjał jako kandydatów do dalszego rozwoju przeciwko infekcjom wielolekoopornym.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, 1,3,4-tiadiazol, cefalosporyna, aktywność przeciwbakteryjna, dokowanie molekularne

1,3,4-Thiadiazole cephalosporin derivs. were designed and synthesized as potential cephalosporin-based antibacterial agents. The synthesized compds. were evaluated *in vitro* for antibacterial activity against Gram-positive (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) and Gram-negative (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*) pathogens. Biol. assays demonstrated that all derivs. exhibited broad-spectrum antibacterial efficacy, comparable or outperforming reference drugs in comparative analyses. Notably, the compd. **17i** displayed the most potent activity across tested strains. Mol. docking studies revealed that **17i** formed stable interactions at both the active site and allosteric pocket of penicillin-binding protein **2a** (PBP2a) from methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA, PDB: 3ZG0), suggesting a dual-binding mechanism. Addnl., *in silico* predictions of pharmacokinetic properties ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) and mol. characteristics indicated favorable drug-like profiles for selected derivs., highlighting their potential as candidates for further development against multi-drug-resistant infections.

Keywords: antibiotic resistance, 1,3,4-thiadiazole, cephalosporin, antibacterial activity, molecular docking

Globalne zagrożenie dla zdrowia związane z infekcjami bakteryjnymi nasiliło się z powodu malejącej innowacyjności antybiotyków i rosnącej oporności mikroorganizmów. *Staphylococcus aureus* jest tu dobrym przykładem dzięki różnorodnym mechanizmom wirulencji umożliwiającym zróżnicowane infekcje. Dziesięciolecia ewolucji drobnoustrojów i nadużywania antybiotyków w opiece zdrowotnej i rolnictwie doprowadziły do powstania coraz bardziej opornych szczepów¹. W szczególności, oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus* (MRSA) stał się wielolekoopornym

The global health threat from bacterial infections has intensified due to declining antibiotic innovation and rising resistance. *Staphylococcus aureus* exemplifies this challenge through its diverse virulence mechanisms enabling varied infections. Decades of microbial evolution and antibiotic overuse in healthcare and agriculture have spawned increasingly resistant strains¹. Notably, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a multidrug-resistant paradigm, causing over 150,000 annual infections and 7,000 deaths in the EU alone, as a leading healthcare-associated pathogen². MRSA's rapid spread and complex resistance mechanisms correlate with elevated clinical mortality rates. This crisis has spurred global efforts to develop structurally novel antibiotics with distinct action

* Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Liushi Road No.257, Yufeng District, Liuzhou City 545005, Guangxi, P.R. China, e-mail: xudong@gxust.edu.cn

paradygmatem, powodując ponad 150 tys. infekcji rocznie i 7 tys. zgonów w samej UE, jako wiodący patogen związany z opieką zdrowotną²). Szybkie rozprzestrzenianie się MRSA i złożone mechanizmy oporności korelują z podwyższonymi wskaźnikami śmiertelności klinicznej. Ten kryzys pobudził globalne wysiłki na rzecz opracowania strukturalnie nowych antybiotyków o różnych mechanizmach działania. Innowacje terapeutyczne pozostają jednak ograniczone przez stagnację w opracowywaniu leków i brak przełomów koncepcyjnych w zarządzaniu opornością. Identyfikacja alternatywnych strategii, które minimalizują ryzyko oporności przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa, pozostaje zatem pilnym priorytetem w badaniach nad środkami przeciwdrobnoustrojowymi.

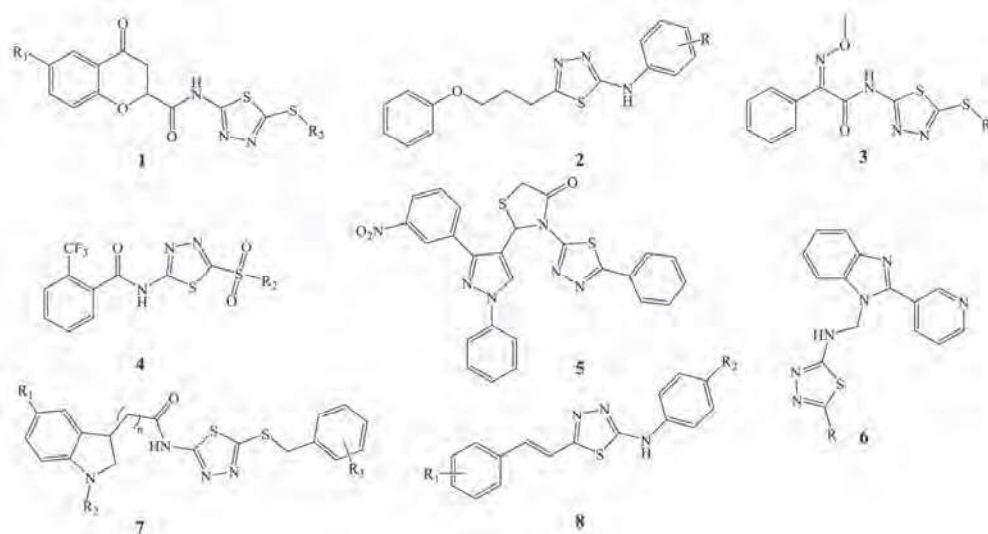
Chociaż cefalosporyny pozostają antybiotykami pierwszego wyboru, ich skuteczność maleje z powodu oporności bakterii, co wymaga opracowania środków nowej generacji. Kluczowe ograniczenie wynika ze słabego powinowactwa wiązania do białka wiążącego penicylinę **2a** (PBP2a) MRSA, które umożliwia oporność poprzez utrzymywanie zamkniętego miejsca katalitycznego, które blokuje dostęp β -laktamów³). Analizy strukturalne ujawniają podwójną konformację PBP2a: zamknięte miejsca katalityczne współistnieją z otwartymi domenami allosterycznymi. Co najważniejsze, tylko wówczas, gdy aktywatory allosteryczne wiążą otwartą domenę, dochodzi do rearanżacji strukturalnej i odsłonięcia miejsca katalitycznego dla interakcji β -laktamu i późniejszego powstrzymania syntezy ściany komórkowej. Ten mechanizm napędza obecne wysiłki w zakresie projektowania leków, skoncentrowane na optymalizacji wiązania ligand-PBP2a poprzez racjonalne modyfikacje strukturalne^{4, 5}). Cefalosporyny piątej generacji są przykładem tego ukierunkowanego podejścia. Modyfikacja C-7 metylotioipirolidynonu Ceftobiprolu ustanawia wielowartościowe interakcje PBP2a, tworząc stabilne kompleksy enzymatyczne, które zakłócają sieciowanie peptydoglikanu w opornych szczepach MRSA⁶). Podobnie, C-3 tiazolowa grupa siarczkowa ceftaroliny umożliwia jednoczesne zaangażowanie 4 błonowych PBP MRSA. Optymalizacje strukturalne zwiększają powinowactwo PBP2a poprzez podwójny mechanizm: początkowe wiązanie indukuje aktywację domeny transketolazy, podczas gdy kolejne cząsteczki tworzą stabilne kompleksy acyl-enzym, które nieodwracalnie hamują aktywność transketolazy i skutecznie przeciwdziałają oporności na β -laktamy^{7, 8}).

Środki przeciwbakteryjne na bazie 1,3,4-tiadiazolu stały się obiecującymi kandydatami terapeutycznymi w leczeniu

mechanisms. However, therapeutic innovation remains constrained by stagnant drug pipelines and limited conceptual breakthroughs in resistance management. Identifying alternative strategies that minimize resistance risk while maintaining safety thus remains an urgent priority in antimicrobial research.

*While cephalosporins remain frontline antibiotics, their efficacy is diminishing due to bacterial resistance, urging next-generation agent development. A key limitation stems from poor binding affinity to MRSA's penicillin-binding protein **2a** (PBP2a), which enables resistance by maintaining a closed catalytic site that blocks β -lactam access³. Structural analyses reveal PBP2a's dual conformation: closed catalytic sites coexist with open allosteric domains. Crucially, only when allosteric activators bind the open domain does structural rearrangement occur, exposing the catalytic site for β -lactam interaction and subsequent cell wall synthesis inhibition. This mechanism drives current drug design efforts focused on optimizing ligand-PBP2a binding through rational structural modifications^{4, 5}). Fifth-generation cephalosporins exemplify this targeted approach. Ceftobiprole's C-7 pyrrolidinone-methylthio modification establishes multivalent PBP2a interactions, forming stable enzyme complexes that disrupt peptidoglycan cross-linking in resistant MRSA strains⁶). Similarly, ceftaroline's C-3 thiazole sulfide moiety enables simultaneous engagement of 4 MRSA membrane PBPs. Structural optimizations enhance PBP2a affinity through dual mechanisms: initial binding induces transketolase domain activation, while subsequent molecules form stable acyl-enzyme complexes that irreversibly inhibit transketolase activity and effectively counter β -lactam resistance^{7, 8}).*

*1,3,4-Thiadiazole-based antibacterial agents have emerged as promising therapeutic candidates for infectious disease management due to their structural selectivity, favorable toxicity profiles, and optimized pharmacokinetic properties. The structures of the derivatives have formulas **1–8**.*



chorób zakaźnych ze względu na ich selektywność strukturalną, korzystne profile toksyczności i zoptymalizowane właściwości farmakokinetyczne. Są one przedstawione wzorami 1–8.

Nasilający się kryzys oporności na leki przeciwbakteryjne, zaostrzony przez niewłaściwe stosowanie kliniczne i ewolucyjną adaptację bakterii, spowodował konieczność opracowania środków nowej generacji zdolnych do pokonania istniejących mechanizmów oporności przy jednoczesnym zminimalizowaniu toksyczności ogólnoustrojowej. W tym badaniu zastosowano strategię racjonalnego projektowania leków poprzez integrację farmakoforu 1,3,4-tiadiazolu ze strukturą rdzenia β -laktamowego cefalosporyn. Poprzez systematyczną optymalizację strukturalną z wykorzystaniem technik *N*-alkilacji i chemii kliknięć, zaprojektowano i zsyntetyzowano nową serię pochodnych cefalosporyny zawierających podstawniki 1,3,4-tiadiazolowe, wykazujące silne powinowactwo do PBP2a. Ich aktywność przeciwbakteryjną systematycznie oceniano, a ich właściwości ADMET (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie i toksyczność) były kompleksowo przewidywane przy użyciu modeli *in silico*. Ta praca ustanawia teoretyczne podstawy dla rozwoju nowych leków przeciwbakteryjnych o zwiększonej skuteczności i profilach bezpieczeństwa.

Część doświadczalna

Materiały

Wszystkie chemikalia i odczynniki zostały uzyskane z firmy Adamas-Beta Reagent Co., Ltd. (Chiny) w jakości analitycznej i wykorzystane bez dodatkowego oczyszczania.

Metodyka badań

Synteza związków chemicznych

Wieloetapowa synteza 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych cefalosporyn **17a–o** o aktywności przeciwbakteryjnej^{9–16} została przedstawiona na schemacie (1).

Na wstępie związki **9a–o** i kwas (2*S*,4*S*)-1-((alliloksy)karbonylo)-4-(tritylotio)pirolidyno-2-karboksylowy (**10**) poddano kondensacji z udziałem 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt) i 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDCI), aby otrzymać półprodukty **11a–o**, a następnie przeprowadzono deprotekcję grupy tritylowej (Trt) przy użyciu kwasu trifluorooctowego (TFA) i trietylosilanu (TES), aby otrzymać związki **12a–o**. Jednocześnie 3-hydroksycephem poddano reakcji z chlorkiem metanosulfonylu

However, the escalating crisis of antibacterial resistance, exacerbated by clinical misuse and evolutionary bacterial adaptation, has necessitated the development of next-generation agents capable of overcoming existing resistance mechanisms while minimizing systemic toxicity. In this study, we employed a rational drug design strategy by integrating the 1,3,4-thiadiazole pharmacophore with the β -lactam core structure of cephalosporins. Through systematic structural optimization using *N*-alkylation and click chemistry techniques, a novel series of cephalosporin derivatives bearing 1,3,4-thiadiazole substituents was designed and synthesized, exhibiting strong affinity for PBP2a. Their antibacterial activities were systematically evaluated, and their ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties were comprehensively predicted using *in silico* models. This work establishes a theoretical foundation for the development of new antibacterial drugs with enhanced efficacy and safety profiles.

Experimental

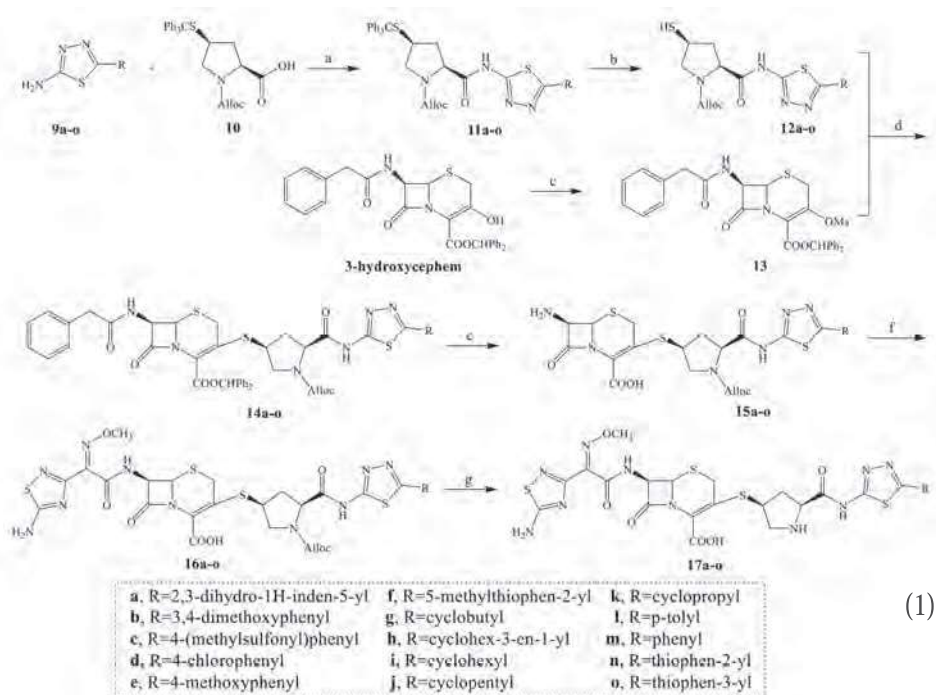
Materials

All chemicals and reagents were obtained from Adamas-Beta Reagent Co., Ltd. (China) in analytical grade and utilized without additional purification.

Methods

Synthesis of compounds

The multistep synthesis of 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives **17a–o** with antibacterial activity^{9–16} was shown on the reaction scheme (1).



Reaction conditions/Warunki reakcji: (a) HOBt/EDCI, rt; (b) TFA/TES, 0–5°C; (c) MsCl/K₂CO₃, -5–0°C; (d) DIPEA, -5–0°C; (e) Et₃N, rt; (f) (1) PCl₅, -5–0°C (2) TFA, -5–0°C; (g) NDMBA, PPh₃, Pd[P(C₆H₅)₃]₄

(MsCl) (kataliza K_2CO_3) w celu wygenerowania związku **13**, który został sprzężony z **12a-o** poprzez katalizę *N,N*-diizopropyletyloaminą (DIPEA) w celu utworzenia **14a-o**. Sekwencyjne usuwanie aminowych i karboksylowych grup ochronnych z **14a-o** przy użyciu pentachloru fosforu (PCl_5) i TFA dało **15a-o**, które zostały skondensowane z aktywnym estrem cefozopranu (kataliza trietyloaminą) w celu otrzymania **16a-o**. Wreszcie, selektywne rozszczepienie grupy alliloksykarbonylowej (Alloc) w **16a-o** przy użyciu *N*-metylo-*N,N*-dibenzylaminy (NDMBA), tryfenylofosfiny (PPh_3) i tetrakis-(tryfenylofosfina) palladu(0) [$Pd(PPh_3)_4$] dostarczyło docelowych związków **17a-o**.

Dokowanie molekularne

Struktury 2D 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych cefalosporyn zostały zaprojektowane przy użyciu oprogramowania KingDraw i przekonwertowane do formatu PDBQT za pośrednictwem oprogramowania Open Babel w celu przygotowania ligandów. Struktura krystaliczna PBP2a (PDB ID: 3ZG0) została uzyskana z Bazy Danych Białek RCSB (<https://www.rcsb.org>). Po usunięciu wody i ligandu za pomocą PyMOL 1.8¹⁷⁾, struktura receptora została przekonwertowana do formatu PDBQT. Symulacje dokowania molekularnego przeprowadzono przy użyciu AutoDock Vina 1.2.3¹⁸⁾ z dwoma zdefiniowanymi miejscami wiązania: kieszenią allosteryczną (współrzędne $x = 18,7$, $y = 29,7$, $z = 25,1$; rozmiar siatki $22 \times 58 \times 21$ Å) i kieszenią miejsca aktywnego ($x = 20,8$, $y = 26,7$, $z = 90,1$; rozmiar siatki $36 \times 34 \times 22$ Å). Wartość wyczerpująca 20 została ustawiona przy zachowaniu innych domyślnych parametrów, chyba że określono inaczej.

Najwyżej punktowana konformacja wiązania została przeanalizowana przy użyciu PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/>)¹⁹⁾ do profilowania interakcji i PyMOL do wizualizacji strukturalnej.

Profilowanie ADMET

Profile ADMET zsyntetyzowanych pochodnych 1,3,4-tiadiazolowych cefalosporyny zostały obliczone przy użyciu zintegrowanych platform. Właściwości ADME przewidziano za pomocą SwissADME (<http://www.swissadme.ch>)²⁰⁾, analizując masę cząsteczkową, logP, rozpuszczalność i zachowania farmakokinetyczne, w tym wchłanianie z przewodu pokarmowego i stabilność metaboliczną. W uzupełnieniu, Deep-PK (<https://biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>)²¹⁾ wykorzystał grafowe sieci neuronowe do optymalizacji profili farmakokinetyczno-toksikologicznych poprzez modelowanie oparte na strukturze. Do oceny toksyczności ProTox-3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>)²²⁾ przewidywał toksyczność ostrą/narządową przy użyciu modeli uczenia maszynowego przeszkolonych na ponad 300 000 związków. To wieloplatformowe podejście umożliwiło systematyczną ocenę podobieństwa leku poprzez analizę sygnatur molekularnych, przewidywanie biodostępności i stratyfikację ryzyka toksyczności bez walidacji eksperymentalnej.

*Initially, compounds 9a-o and (2S,4S)-1-((allyloxy)carbonyl)-4-(tritylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (10) underwent condensation mediated by 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) to afford intermediates 11a-o, followed by trityl (Trt) group deprotection using trifluoroacetic acid (TFA) and triethylsilane (TES) to yield 12a-o. Concurrently, 3-hydroxycephem reacted with methanesulfonyl chloride (MsCl) (K_2CO_3 catalysis) to generate 13, which was coupled with 12a-o via *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) catalysis to form 14a-o. Sequential removal of amino and carboxylic acid protecting groups from 14a-o using phosphorus pentachloride (PCl_5) and TFA produced 15a-o, which were condensed with cefozopran active ester (triethylamine catalysis) to obtain 16a-o. Finally, selective allyloxycarbonyl (Alloc) group cleavage in 16a-o using *N*-methyl-*N,N*-dibenzylamine (NDMBA), triphenylphosphine (PPh_3), and tetrakis-(triphenylphosphine)palladium(0) [$Pd(PPh_3)_4$] delivered the target compounds 17a-o.*

Molecular docking

The 2D structures of 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives were designed using KingDraw software and converted to PDBQT format via Open Babel for ligand preparation. The PBP2a crystal structure (PDB ID: 3ZG0) was obtained from the RCSB Protein Database (<https://www.rcsb.org>). After water and ligand removal using PyMOL 1.8¹⁷⁾, the receptor structure was converted to PDBQT format. Molecular docking simulations were performed using AutoDock Vina 1.2.3¹⁸⁾ with 2 defined binding sites: the allosteric pocket (coordinates $x = 18,7$, $y = 29,7$, $z = 25,1$; grid size $22 \times 58 \times 21$ Å) and active site pocket ($x = 20,8$, $y = 26,7$, $z = 90,1$; grid size $36 \times 34 \times 22$ Å). An exhaustiveness value of 20 was set while maintaining other default parameters unless specified.

The top-scoring binding conformation was analyzed using PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/>)¹⁹⁾ for interaction profiling and PyMOL for structural visualization.

ADMET Profiling

The ADMET profiles of synthesized 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives were computationally evaluated by using integrated platforms. ADME properties were predicted through SwissADME (<http://www.swissadme.ch>)²⁰⁾ by analyzing molecular mass, logP, solubility, and pharmacokinetic behaviors including gastrointestinal absorption and metabolic stability. Complementarily, Deep-PK (<https://biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>)²¹⁾ employed graph neural networks to optimize pharmacokinetic-toxicological profiles through structure-based modeling. For toxicity assessment, ProTox-3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>)²²⁾ predicted acute/organ-specific toxicity using machine learning models trained on >300,000 compounds. This multi-platform approach enabled systematic drug-likeness

Aktywność przeciwbakteryjna

Działanie przeciwbakteryjne związków docelowych oceniano wobec 5 szczepów bakteryjnych (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) przy użyciu protokołu mikrorozcieńczeń bulionowych CLSI M07-A11²³) z cefpiromem jako kontrolą. Związki rozpuszczono i seryjnie rozcieńczono w sterylnej wodzie do stężenia początkowego 50 µg/mL. Zawiesiny bakterii ($5 \cdot 10^5$ CFU/plamkę) inokulowano na płytki agarowe przy użyciu inokulatora wielopunktowego, a następnie poddawano 18-godzinnej inkubacji w temp. 37°C. Wartości MIC określono jako najniższe stężenie powstrzymujące widoczny wzrost po znormalizowanej inkubacji. Wszystkie warunki eksperymentalne zapewniały ścisłą kontrolę sterylności podczas całej procedury.

Wyniki badań i ich omówienie

Syntezy chemiczne

1,3,4-Tiadiazolowe pochodne cefalosporyn zsyntetyzowano w 4-etapowym procesie. Począwszy od związku **10**, kondensacja z pochodnymi 1,3,4-tiadiazolu **9a–o** przy użyciu HOBt/EDCI w THF dała półprodukty **11a–o** w ciągu 5 h. Selektowna triftalilometylowa deprotekcja **11a–o** za pomocą TFA/DCM w temp. 0–5°C wygenerowała surowe półprodukty merkapto **12a–o**, które zostały bezpośrednio wykorzystane w kolejnych etapach. Równoległą syntezę związku **13** przeprowadzono poprzez metanosulfonylowanie 3-hydroksycepanu za pomocą MsCl/K₂CO₃ w DMF w temp. -5–0°C. Sprzężenie **13** z **12a–o** przy użyciu DIPEA/DCM dało półprodukty **14a–o**, które poddano sekwencyjnej deprotekcji za pomocą PCl₅ i TFA w temp. -5–0°C w celu usunięcia aminowych/karboksylowych grup ochronnych, tworząc **15a–o**. Końcowa koniugacja z aktywnym estrem cefoperazonu w DCM/TEA wytworzyła zabezpieczone alliloksykarbonylem pochodne **16a–o**, a następnie katalizowana Pd deprotekcja z użyciem NDMBA/PPh₃ w THF pod osłoną azotu dała docelowe związki **17a–o**. Wszystkie produkty pośrednie i końcowe otrzymano w postaci jasno-żółtych ciał stałych bez oczyszczania chromatograficznego.

Ocena dokowania molekularnego

Dobrze scharakteryzowany mechanizm oporności na metycylinę wywołanej przez PBP2A u *Staphylococcus aureus* (MRSA) doprowadził do opracowania strategii obliczeniowych ukierunkowanych na domenę transpeptydazy w celu zaprojektowania cefalosporyn o wysokim powinowactwie. Modele dokowania zakotwiczone w białkach zostały opracowane przy użyciu oprogramowania Autodock Vina. Zintegrowały one nowe pochodne cefalosporyny z regionami transglikozylazy i transpeptydazy PBP2A. Osiągnięto precyzyjną identyfikację interakcji reszt serynowych w domenach katalitycznych enzymu. Obliczenia energii wiązania i analizy dokowania molekularnego wykazały istnienie zarówno miejsc aktywnych, jak i allosterycznych

assessment through molecular signature analysis, bioavailability prediction, and toxicity risk stratification without experimental validation.

Antibacterial activity

The antibacterial activities of target compounds were assessed against five bacterial strains (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) using CLSI M07-A11 broth microdilution protocol²³) with cefpirome as control. Compounds were dissolved and serially diluted in sterile water to 50 µg/mL initial concentration. Bacterial suspensions ($5 \cdot 10^5$ CFU/spot) were inoculated onto agar plates using a multipoint inoculator, followed by 18-hour incubation at 37°C. MIC values were determined as the lowest concentration inhibiting visible growth after standardized incubation. All experimental conditions maintained strict sterility controls throughout the procedure.

Results and discussion

Chemistry

1,3,4-Thiadiazole cephalosporin derivatives were synthesized through a 4-stage process. Starting from compound **10**, condensation with 1,3,4-thiadiazole derivatives **9a–o** using HOBt/EDCI in THF produced intermediates **11a–o** within 5 h. Selective triphthalylmethyldeprotection of **11a–o** with TFA/DCM at 0–5°C generated crude mercapto intermediates **12a–o**, which were directly used in subsequent steps. Parallel synthesis of compound **13** was achieved via methanesulfonylation of 3-hydroxycephem with MsCl/K₂CO₃ in DMF at -5–0°C. Coupling **13** with **12a–o** using DIPEA/DCM yielded intermediates **14a–o**, which underwent sequential deprotection with PCl₅ and TFA at -5–0°C to remove amino/carboxylic acid protecting groups, forming **15a–o**. Final conjugation with cefoperazone active ester in DCM/TEA produced allyloxycarbonyl-protected derivatives **16a–o**, followed by Pd-catalyzed deprotection using NDMBA/PPh₃ in THF under N₂ to afford target compounds **17a–o**. All intermediates and final products were obtained as light-yellow solids without chromatographic purification.

Molecular docking evaluation

The well-characterized mechanism of PBP2A-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) has driven computational strategies targeting its transpeptidase domain to design high-affinity cephalosporins. The protein-anchored docking models were developed by using AutodockVina. They integrated novel cephalosporin derivatives with PBP2A's transglycosylase and transpeptidase regions. The modeling prioritized precise identification of serine residue interactions within the enzyme's catalytic domains was achieved. Binding energy calculations and molecular docking analyses evaluated synthetic 1,3,4-thiadiazole cephalosporin analogs (**17a–o**) against both active and allosteric sites of PBP2A. Key amino acid residues

PBP2A w syntetycznych 1,3,4-tiadiazolowych analogach cefalosporyn (**17a–o**). Kluczowe reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie ligandów i odpowiadające im energie interakcji zostały przedstawione w tabeli 1.

Analiza dokowania molekularnego pochodnych 3ZG0 (**17a–o**) ujawniła różne profile wiązania w miejscach aktywnych i allosterycznych. W miejscu aktywnym wszyst-

involved in ligand binding and corresponding interaction energies are summarized in Table 1.

*Molecular docking analysis of 3ZG0-bound derivatives (17a–o) revealed distinct binding profiles at active and allosteric sites. At the active site, all compounds demonstrated strong binding affinities with ΔG values ranging from -9.5 to -10.7 kcal/mol. Notably, derivatives **17i** (cyclohexyl), **17a***

Table 1. Binding energies, kcal/mol, of derivatives 17a–o retrieved for both the active and allosteric sites together with their main molecular interactions

Tabela 1. Energie wiązania, kcal/mol, pochodnych 17a–o uzyskane dla miejsc aktywnych i allosterycznych wraz z ich głównymi oddziaływaniami molekularnymi

Ligand	ΔG (active and allosteric sites)/ ΔG (miejsca aktywne i allosteryczne)	H-bond interactions/Interakcje wiązań H		Hydrophobic interactions/Interakcje hydrofobowe	
		Active site/miejsce aktywne	Allosteric site/miejsce allosteryczne	Active site/miejsce aktywne	Allosteric site/miejsce allosteryczne
15a	-10.6,-7.7	SER403, GLU447, SER462, -SER462, ASN464, ASN464, GLN521, THR582, -SER598, THR600, THR600	ASN146, LYS148, ASP275, ASP295, ASP295, TYR297, TYR297, LYS316	–	–
15b	-9.9,-6.5	SER462, ASN464, GLY520, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN104, TYR105, TYR105, ASN146, ASP295	TYR446, LYS581	ILE144, ILE144
15c	-9.5,-6.9	SER403, LYS406, LYS430, THR444, THR444, ASN464, THR600, THR600, THR600, GLU602, GLN613	ASN104, TYR105, TYR105, ASN146, ASP295	TYR446	ILE144, ILE144
15d	-10.4,-7.4	SER462, SER462, SNA464, GLY520, THR600, THR600, GLU602, GLU602	SER72, ASN146, LYS148, GLY296	–	LYS148, ASP295
15e	-9.9,-6.7	SER462, ASN464, GLN521, -SER598, THR600, -THR600, GLU602, GLU602	SER72, ASN104A, TYR105, ASN146, GLY296	–	ILE144, ILE144, ILE144
15f	-10.2,-7.3	SER462, ASN464, GLY520, THR600, THR600, GLU602, GLU602	SER72, ASN104, ASN146, LYS148	–	ASP295
15g	-10.3,-7.4	SER462, ASN464, GLY520, THR600, THR600, THR600, GLU602, GLU602	TYR105, ASN146, LYS148	LYS581	LYS148, ASP295
15h	-10.3,-6.5	SER462, ASN464, GLY520, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN104, TYR105, ASN146, ASP295	LYS581	ILE144, ILE144, ILE144
15i	-10.7,-7.6	SER462, SER462, ASN464, GLY520, THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN104, TYR105, ASN146, LYS148, GLY296	LYS581, LYS581	LYS148, ASP295
15j	-10.6,-7.4	SER461, SER462, ASN464, GLN521, SER598, -THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN71, ASN104, ASN146, LYS148, ASP295	TYR446, LYS581, LYS581	ASP295
15k	-10.2,-7.6	SER462, ASN464, GLY520, THR582, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN146, LYS273, ASP275, ASP295, LYS316	TYR446, LYS581	LYS273, GLU294
15l	-10.4,-7.0	SER462, ASN464, GLY520, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN104, TYR105, TYR105, ASN146	LYS581	–
15m	-10.2,-6.3	SER462, ASN464, GLY520, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602		LYS581	ILE144, ILE144
15n	-10.1,-6.8	SER462, ASN464, GLY520, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602	ASN104, TYR105, ASN146, LYS273, ASP275, LYS316	LYS581	ASN146
15o	-9.9,-7.0	GLU447, SER462, ASN464, GLY520, SER598, THR600, THR600, GLU602, GLU602	SER72, ASN146, LYS148	LYS581	LYS148, ASP295

kie związki wykazywały silne powinowactwo wiązania z wartościami ΔG w zakresie od -9,5 do -10,7 kcal/mol. W szczególności pochodne **17i** (cykloheksyl), **17a** (2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl) i **17j** (cyklopentyl) wykazywały wyższe energie wiązania, odpowiednio -10,7, -10,6 i -10,6 kcal/mol. W przeciwieństwie do tego, bardziej masywny podstawnik 4-(metylosulfonylo)fenylowy (**17c**) wykazywał zmniejszone powinowactwo (-9,5 kcal/mol), co sugeruje efekt przeszkody sterycznej. Wiązania pośrednie (-9,9 do -10,4 kcal/mol) stanowiło 7–12 wiązań wodorowych z resztami w miejscu aktywnym,

ustanawiając te interakcje jako krytyczne stabilizatory kompleksów PBP2a-ligand. Wiązanie w miejscu allosterycznym wykazywało umiarkowane powinowactwo (-6,3 do -7,7 kcal/mol), przy czym **17a**, **17i** i **17k** (cyklopropyl) wykazywały optymalne wiązanie (-7,7 do -7,6 kcal/mol). Planarny podstawnik fenylowy (**17m**) wykazywał szczególnie słabe wiązanie (-6,3 kcal/mol), prawdopodobnie z powodu ograniczonej zdolności adaptacji konformacyjnej sztywnego pierścienia benzenowego. Inne analogi wykazywały pośrednie wartości wiązania (-6,5 do -7,4 kcal/mol) poprzez 3–8 wiązań wodorowych. Pomiedzy miejscami wiązania pojawiły się różne mechanizmy stabilizacji: w miejscu aktywnym **17i** tworzył mostek solny między swoją grupą karboksylową a LYS597-NH₃⁺, podczas gdy w miejscu allosterycznym **17a** stabilizował się poprzez π -kationowe interakcje między swoją indenylową częścią a LYS76. Choć energie dokowania wykazały słabą korelację z bioaktywnością *in vitro*, zidentyfikowane interakcje farmakoforowe z kluczowymi resztami (LYS597, LYS76) zapewniają krytyczny wgląd w strukturę dla racjonalnego projektowania leków ukierunkowanych na obie kieszenie wiążące.

Analiza strukturalna ujawniła podwójne wiązanie związku **17i** z PBP2a poprzez różne sieci interakcji (rysunek A). Zaangażowanie miejsca aktywnego (rysunek B) wykazało 3 mechanizmy stabilizacji: (i) przez wiązanie jonowe między grupą karboksylanową a grupą ϵ -aminową Lys597 (4,65 Å), (ii) 11 wiązań wodorowych (2,89–3,90 Å) oraz (iii) podwójne kontakty hydrofobowe (3,84/3,77 Å) między Lys581 a pierścieniem cykloheksanowym. Podobnie, analiza wiązania allosterycznego (rysunek C) wykazała

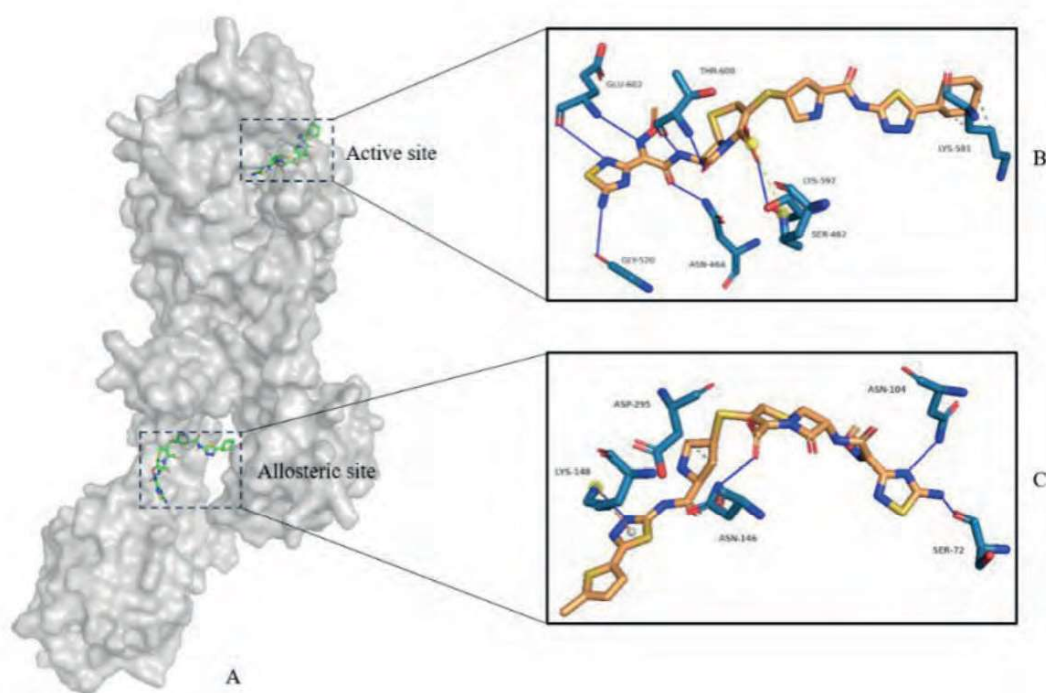


Figure. Binding mode of **17i** inside PBP2a's interactions (A): active site (B) and allosteric (C)

Rysunek. Sposób wiązania **17i** przez różne sieci interakcji (A): w miejscu aktywnym PBP2a (B) i allosterycznym (C)

(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl), and **17j** (cyclopentyl) exhibited superior binding energies of -10.7, -10.6, and -10.6 kcal/mol, respectively. In contrast, the bulkier 4-(methylsulfonyl)phenyl substituent (**17c**) showed reduced affinity (-9.5 kcal/mol), suggesting steric hindrance effects. Intermediate binders (-9.9 to -10.4 kcal/mol) formed 7–12 hydrogen bonds with active site residues, establishing these interactions as critical stabilizers of PBP2a-ligand complexes. Allosteric site binding displayed moderate affinities (-6.3 to -7.7 kcal/mol), with **17a**, **17i**, and **17k** (cyclopropyl) demonstrating optimal binding (-7.7 to -7.6 kcal/mol). The planar phenyl substituent (**17m**) exhibited notably weak binding (-6.3 kcal/mol), likely due to restricted conformational adaptability of its rigid benzene ring. Other analogs showed intermediate binding (-6.5 to -7.4 kcal/mol) through 3–8 hydrogen bonds. Distinct stabilization mechanisms emerged between binding sites: At the active site, **17i** formed a salt bridge between its carboxyl group and LYS597-NH₃⁺, while at the allosteric site, **17a** stabilized through π -cation interactions between its indenyl moiety and LYS76. Although docking energies showed weak correlation with *in vitro* bioactivity, the identified pharmacophore interactions with key residues (LYS597, LYS76) provide critical structural insights for rational drug design targeting both binding pockets.

Structural analysis revealed dual-site binding of compound **17i** to PBP2a through distinct interaction networks (Figure A). The active site engagement (Figure B) demonstrates 3 stabilization mechanisms: (i) ionic bonding between the carboxylate group and Lys597's ϵ -amino group (4.65 Å), (ii) eleven hydrogen bonds (2.89–3.90 Å) and (iii) dual hydrophobic contacts (3.84/3.77 Å) between

Table 2. Physicochemical parameters of novel 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives

Tabela 2. Parametry fizykochemiczne nowych 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych cefalosporyn

Parameter/ Parametr	17a	17b	17c	17d	17e	17f	17g	17h	17i	17j	17k	17l	17m	17n	17o
M_w	746.82	762.86	780.9	737.25	732.83	722.86	680.8	706.84	708.86	694.83	666.78	702.81	716.83	708.84	708.84
LogP	1.81	2.12	1.35	1.96	2.11	2.07	1.36	2.31	1.97	1.74	1.58	1.71	1.94	1.67	1.62
nHA	49	50	50	47	48	46	44	46	46	45	43	46	47	45	45
nHBAcc	14	14	14	12	13	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
nHBDon	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
nRotB	13	15	14	13	14	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
M_R	187.01	193.94	194.05	185.96	187.44	183.79	172.79	181.93	182.4	177.6	167.98	180.95	185.92	178.83	178.83

analogiczne strategie stabilizacji: 5 wiązań wodorowych (2,80–4,08 Å) i 2 oddziaływania hydrofobowe (3,70/3,53 Å) obejmujące Lys148, Asp295 i cząsteczkę cykloheksanu. Ta uzupełniająca się synergia sił jonowych, wiązań wodorowych i hydrofobowych wspólnie stabilizowała kompleks **17i**-PBP2a w obu miejscach regulacyjnych.

Farmakokinetyka

Zsyntetyzowane pochodne (**17a–o**) zostały obliczeniowo sprofilowane przy użyciu wielu platform predykcyjnych za pomocą oprogramowania SwissADME analizującego kluczowe parametry fizykochemiczne: masę cząsteczkową (M_w), współczynnik podziału oktanol-woda (LogP), ciężkie atomy (nHA), akceptory wiązań wodorowych (nHBAcc), donory (nHBDon), wiązania rotacyjne (nRotB), refrakcję molową (M_R) i topologiczną powierzchnię polarną (TPSA) (tabela 2). Wszystkie związki wykazały właściwości podobne do właściwości leków, wykazując wartości LogP (-0,4–5,6) i całkowitą liczbę atomów (20–70) zgodną z regułą AK Ghose²⁴, wskazującą na korzystne wchłanianie i przepuszczalność. Te systematyczne oceny identyfikują otrzymane pochodne jako obiecujących kandydatów.

Profilowanie farmakokinetyczne i toksykologiczne zsyntetyzowanych 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych cefalosporyny przeprowadzono przy użyciu 3 zweryfikowanych narzędzi obliczeniowych: SwissADME, Deep-PK i ProTox-3.0, z danymi predykcyjnymi ADMET systematycznie zestawionymi w tabeli 3. Analiza wykazała korzystną rozpuszczalność w wodzie w całej serii (logS: -4,0 do 0,5 log mol/L), zgodną z normami farmakopealnymi dla preparatów do wstrzykiwań²⁵. Późniejsze symulacje wchłaniania wykazały jednak nieoczekiwane słabe wskaźniki wchłaniania z przewodu pokarmowego (<30% biodostępności), co sugeruje, że pochodne te mogą wymagać innych dróg podawania niż doustna, co jest cechą wspólną z wieloma klinicznie stosowanymi cefalosporynami pozajelitowymi. Profilowanie toksykologiczne wykazało minimalne ryzyko hepatotoksyczności dla wszystkich związków z wyjątkiem pochodnej **17a**, która wykazała umiarkowane ryzyko hepatotoksyczności, zatem wymaga ona dopracowania struktury

Lys581 and the cyclohexane ring. Similarly, allosteric binding analysis (Figure 2C) showed analogous stabilization strategies: 5 hydrogen bonds (2.80–4.08 Å) and 2 hydrophobic interactions (3.70/3.53 Å) involving Lys148, Asp295, and the cyclohexane moiety. This complementary synergy of ionic, hydrogen-bonding, and hydrophobic forces collectively stabilized the 17i-PBP2a complex across both regulatory sites.

Pharmacokinetics

The synthesized derivatives (17a–o) were computationally profiled using multiple prediction platforms with SwissADME software analyzing key physicochemical parameters: molecular mass (M_w), octanol-water partition coefficient (LogP), heavy atoms (nHA), hydrogen bond acceptors (nHBAcc), donors (nHBDon), rotatable bonds (nRotB), molar refractivity (M_R), and topological polar surface area (TPSA) (Table 2). All compounds demonstrated drug-like properties, showing LogP values (-0.4–5.6) and total atom counts (20–70) consistent with the AK Ghose rule²⁴, indicative of favorable absorption and permeability. These systematic evaluations identify the derivatives as promising candidates.

Pharmacokinetic and toxicological profiling of the synthesized 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives was conducted using 3 validated computational tools: SwissADME, Deep-PK, and ProTox-3.0, with predictive ADMET data systematically compiled in Table 3. The analysis revealed favorable aqueous solubility across the series (log S: -4.0 to 0.5 log mol/L), consistent with pharmacopeial standards for injectable formulations²⁵. However, subsequent absorption simulations demonstrated unexpectedly low gastrointestinal absorption rates (<30% bioavailability), suggesting these derivatives may require non-oral administration routes, a characteristic shared with many clinically used parenteral cephalosporins. Toxicological profiling indicated minimal hepatotoxicity risks for all compounds except derivative 17a, which showed moderate hepatic liability requiring structural refinement. Notably, the entire series exhibited excep-

Table 3. Pharmacokinetic profile of novel 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives

Tabela 3. Profil farmakokinetyczny nowych pochodnych 1,3,4-tiadiazolowych cefalosporyn

Parameter/ Parametr	17a	17b	17c	17d	17e	17f	17g	17h	17i	17j	17k	17l	17m	17n	17o
Absorption/ Absorpcja															
Log S	-3.44	-3.47	-2.89	-3.26	-3.34	-3.25	-3.20	-3.48	-3.37	-3.29	-3.15	-3.18	-3.27	-3.15	-3.20
GI absorption/ Absorpcja GI	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska	low/ niska
Distribution/ Dystrybucja															
BBB permeation/ Przenikanie BBB	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak
Plasma protein binding/Wiązanie białek osocza	70.05	64.39	75.04	73.71	68.03	63.32	57.85	54.97	61.71	59.69	56.00	73.03	72.72	62.47	61.35
Metabolism/ Metabolizm															
CYP2D6 inhibitor	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak
CYP3A4 inhibitor	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak	yes/ tak
Excretion/ Wydalenie															
Half-Life drug/ Okres półtrwania	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs	<3hs
Clearance/Klirens	2.89	2.79	1.68	2.72	2.83	1.59	1.85	2.17	2.10	1.99	1.73	3.25	3.22	1.59	2.05
Toxicity/ Toksyczność															
LD50, mg/kg	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Hepatotoxicity/ Hepatotoksyczność	yes/ tak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak	no/ brak

Table 4. Antibacterial activity of novel 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives

Tabela 4. Aktywność przeciwbakteryjna nowych 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych cefalosporyn

Bacterial Bakterie	17a	17b	17c	17d	17e	17f	17g	17h	17i	17j	17k	17l	17m	17n	17o	Cefpirome
<i>S. aureus</i>	0.78	1.56	1.56	0.78	1.56	3.13	1.56	3.13	0.78	1.56	1.56	0.78	1.56	0.78	3.13	1.56
<i>S. pneumonia</i>	0.78	3.13	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	3.13	0.78	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56	3.13	0.78
<i>P. aeruginosa</i>	1.56	12.5	12.5	3.13	12.5	3.13	3.13	6.25	1.56	3.13	1.56	3.13	6.25	6.25	12.5	3.13
<i>K. pneumonia</i>	0.78	1.56	0.78	0.78	1.56	0.78	0.39	1.56	0.39	0.39	0.78	0.78	0.39	0.78	0.39	0.39
<i>E. coli</i>	1.56	6.25	6.25	3.13	6.25	6.25	1.56	3.13	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	1.56	6.25	3.13

ralnego. Warto zauważyć, że cała seria wykazała wyjątkowo ostre profile bezpieczeństwa, z LD₅₀ wynoszącym 8000 mg/kg, przekraczającym ustalone progi bezpieczeństwa dla kandydatów przedklinicznych. Łącznie, te wyniki obliczeń pozycjonowały 1,3,4-tiadiazolowe cefalosporyny jako obiecujących kandydatów na antybiotyki, szczególnie do podawania dożylnego lub domięśniowego.

Aktywność przeciwbakteryjna

Wyniki aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* przedstawiono w tabeli 4. Wszystkie pochodne cefalosporyny

tional acute safety profiles, with an LD₅₀ of 8000 mg/kg exceeding established safety thresholds for preclinical candidates. Collectively, these computational findings position the 1,3,4-thiadiazole cephalosporins as promising antibiotic candidates, particularly for intravenous or intramuscular delivery.

Antibacterial activity

In vitro antibacterial activity results were summarized in Table 4. All cephalosporin derivatives and the positive control (cefpirome) demonstrated potent antibacterial

i kontrola pozytywna (cefpirom) wykazały silne działanie przeciwbakteryjne. Związki **17a**, **17d**, **17i**, **17l** i **17n** przewyższyły cefpirom w stosunku do *S. aureus*, utrzymując lub zwiększając aktywność wobec innych szczepów. Pochodne **17b**, **17c**, **17e**, **17g**, **17j**, **17k** i **17m** wykazywały porównywalne lub lepsze hamowanie *S. aureus*, ale umiarkowanie zmniejszoną skuteczność wobec innych patogenów. Najsilniejszą aktywność przeciwko *S. pneumoniae* zaobserwowano w przypadku **17a**, **17i**, **17j**, **17k** i **17m**, podczas gdy **17a**, **17i** i **17k** wykazywały maksymalną siłę działania przeciwko *P. aeruginosa*. W przypadku *K. pneumoniae*, **17g**, **17i**, **17j** i **17m** były najbardziej skuteczne, podczas gdy **17a**, **17g**, **17i**, **17j** i **17n** wykazywały optymalne hamowanie *E. coli*. W szczególności **17a** i **17i** wykazywały najszersze spektra, silnie hamując wszystkie testowane szczepy. To ustalenie było zgodne z wynikami dokowania molekularnego. Jednak profilowanie toksyczności obliczeniowej przewidywało hepatotoksyczność dla **17a**, podczas gdy dla **17i** nie przewidywano takiego działania, co wskazywało, że będzie on bezpieczniejszym tropem do dalszego rozwoju.

Badania sugerują, że aktywność przeciwbakteryjna cefalosporyn zależy od lipofilowości i zasadowości grupy łańcucha bocznego^{26, 27}. Zwiększona lipofilowość zwiększa pokrycie bakterii Gram-dodatnich, podczas gdy wyższa zasadowość poprawia skuteczność bakterii Gram-ujemnych. Włączono nowe pochodne 1,3,4-tiadiazolu: (i) atom siarki C-3 jako centrum lipofilowe oraz (ii) cząsteczki pirolidyny i tiadiazolu zwiększające zasadowość. Ta podwójna konstrukcja wyjaśnia ich skuteczność o szerokim spektrum działania. W **17i** podstawienie cykloheksylem zwiększyło lipofilowość przy jednoczesnym zachowaniu krytycznych grup zasadowych, co skutkowało znacznie lepszą aktywnością Gram-ujemną w porównaniu z innymi pochodnymi.

Wnioski

Zaprojektowano serię nowych 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych cefalosporyn celujących w PBP2a *S. aureus*. Dokowanie molekularne oparte na programie AutoDock Vina ujawniło silne powinowactwo wiązania zarówno dla miejsc aktywnych, jak i allosterycznych we wszystkich pochodnych, przy czym **17a** i **17i** wykazały lepsze interakcje wskazujące na zwiększone możliwości osiągnięcia celu. Obliczeniowe profilowanie ADMET (SwissADME/DeepPK/ProTox-3.0) przewidywało korzystne podobieństwo do leku dla wszystkich związków z wyjątkiem **17a**, który oznaczał ryzyko hepatotoksyczności. Synteza obejmowała 7-etapową sekwencję: kondensację, substytucję i deprotekcję z kwasu (2*S*,4*S*)-1-((alliloksy)karbonylo)-4-(tritylotio)pirolidyno-2-karboksyloвого. Testy antybakteryjne wykazały szerokie spektrum działania przeciwko patogenom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym. **17a** i **17i** wykazywały wyjątkową siłę działania, prawdopodobnie ze względu na ich łańcuchy boczne C-3 łączące lipofilowe centra siarkowe z podstawowymi cząsteczkami pirolidyny/tiadiazolu. Te

effects. Compounds 17a, 17d, 17i, 17l, and 17n outperformed cefpirome against S. aureus while maintaining or enhancing activity against other strains. 17b, 17c, 17e, 17g, 17j, 17k, and 17m showed comparable or superior S. aureus inhibition but moderately reduced efficacy against other pathogens. The strongest anti-S. pneumoniae activity was observed in 17a, 17i, 17j, 17k, and 17m, while 17a, 17i, and 17k exhibited maximal potency against P. aeruginosa. For K. pneumoniae, 17g, 17i, 17j, and 17m were most effective, whereas 17a, 17g, 17i, 17j, and 17n showed optimal E. coli inhibition. Notably, 17a and 17i displayed the broadest spectra, strongly inhibiting all tested strains. The finding was consistent with molecular docking results. However, computational toxicity profiling predicted hepatotoxicity for 17a, whereas 17i showed no such liability, marking it as a safer lead for further development.

Studies suggest cephalosporin antibacterial activity depended on lipophilicity and side-chain group basicity^{26, 27}. Increased lipophilicity enhances Gram-positive coverage, while higher basicity improved Gram-negative efficacy. The novel 1,3,4-thiadiazole derivatives incorporated: (i) a C-3 sulfur atom as a lipophilic center and (ii) pyrrolidine and thiadiazole moieties to augment basicity. This dual design explained their broad-spectrum efficacy. In 17i, cyclohexyl substitution enhanced lipophilicity while retaining critical basic groups, resulting in significantly improved Gram-negative activity compared to other derivatives.

Conclusions

*A series of novel 1,3,4-thiadiazole cephalosporin derivatives targeting PBP2a of S. aureus was designed. AutoDockVina-based molecular docking revealed strong binding affinities for both active and allosteric sites across all derivatives, with 17a and 17i showing superior interactions indicative of enhanced target engagement. Computational ADMET profiling (SwissADME/DeepPK/ProTox-3.0) predicted favorable drug-likeness for all compounds except for 17a, which flagged hepatotoxicity. Synthesis involved a seven-step sequence: condensation, substitution and deprotection from (2*S*,4*S*)-1-((allyloxy)carbonyl)-4-(tritylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid. Antibacterial assays demonstrated broad-spectrum activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens. The 17a and 17i exhibited exceptional potency, likely due to their C-3 side chains combining lipophilic sulfur centers with basic pyrrolidine/thiadiazole moieties. These structural features facilitate critical interactions with PBP2a residues Tyr446 and Ser598. While 17a showed promising antibacterial efficacy, its hepatotoxic prediction warrants caution. In contrast, 17i maintained comparable activity without*

cechy strukturalne ułatwiają krytyczne interakcje z resztami PBP2a Tyr446 i Ser598. Związek **17a** wykazał obiecującą skuteczność przeciwbakteryjną, lecz jego hepatotoksyczność wymaga ostrożności. **17i** zaś utrzymał porównywalną aktywność bez ostrzeżeń o toksyczności, co wskazuje go jako głównego kandydata do opracowania przedklinicznego. W pracy tej opracowano strategię podwójnej optymalizacji (równowaga lipofilowości/zasadowości) dla cefalosporyn nowej generacji o zwiększonym powinowactwie do PBP2a i swoistości mikrobiologicznej.

Podziękowania

Niniejsze badania były wspierane przez granty z Guangxi Natural Science Foundation Program (nr 2022GXNSFAA035650) oraz Doctoral Foundation of Guangxi University of Science and Technology (nr 20z25).

toxicity alerts, positioning it as the lead candidate for preclinical development. This work established a dual-optimization strategy (lipophilicity/basicity balance) for next-generation cephalosporins with enhanced PBP2a affinity and microbial specificity.

Acknowledgement

This research was supported by grants from Guangxi Natural Science Foundation Program (No. 2022GXNSFAA035650) and the Doctoral Foundation of Guangxi University of Science and Technology (No. 20z25).

Received/Otrzymano: 24-02-2025

Reviewed/Zrecenzowano: 28-02-2025

Accepted/Zaakceptowano: 11-03-2025

Published/Opublikowano: 20-03-2025

REFERENCES/LITERATURA

- [1] J.A. Alara, O.R. Alara, *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* 2024, **24**, No. 3, 26.
- [2] M.A. Borg, L. Camilleri, *Microbial Drug Resistance* 2021, **27**, No. 7, 889.
- [3] L.H. Otero, A. Rojas-Altuve, L.I. Llarrull et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2013, **110**, No. 42, 16808.
- [4] A.A. Abebe, A.G. Birhanu, *Infection Drug Resistance* 2023, 7662.
- [5] G.P.L. Ynion, C.J. Rosal, A. Zulueta et al., *J. Bacteriol. Virol.* 2024, **54**, No. 1, 12.
- [6] T. Bogdanovich, L.M. Ednie, S. Shapiro et al., *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 2005, **49**, No. 10, 4210.
- [7] G.G. Zhanel, G. Sniezek, F. Schweizer et al., *Drugs* 2009, **69**, 809.
- [8] Y.C. Chiang, M.T.Y. Wong, J.W. Essex, *Israel J. Chem.* 2020, **60**, No. 7, 754.
- [9] J. Li, L. Yu, L.L. Xiaoe et al., *Phosphorus, Sulfur, Silicon Related Elements* 2023, **198**, No. 9, 770.
- [10] N. Sener, H.A.M. Emsaed et al., *J. Mol. Struct.* 2018, **1174**, 151.
- [11] Z. Wu, J. Shi, J. Chen et al., *J. Agricult. Food Chem.* 2021, **69**, No. 31, 8660.
- [12] J. Chen, C. Yi, S. Wang et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019, **29**, No. 10, 1203.
- [13] N. Kerru, L. Gummid, S.V.H.S. Bhaskaruni et al., *Monatshefte Chem. Chem. Monthly* 2020, **151**, 981.
- [14] S. Bhati, *J. Mol. Struct.* 2024, 138793.
- [15] C. Tang, J. Shao, C. Si et al., *Chem. Heterocyclic Comp.* 2024, **1**.
- [16] H.S. Sayiner, M.I. Yilmazer, A.T. Abdelsalam et al., *RSC Adv.* 2022, **12**, No. 46, 29627.
- [17] W.L. DeLano, W.L. Pymol, *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* 2002, **40**, No. 1, 82.
- [18] O. Trott, A.J. Olson, *J. Comput. Chem.* 2010, **31**, No. 2, 455.
- [19] S. Salentin, S. Schreiber, V.J. Haupt et al., *Nucleic Acids Res.* 2015, **43**(W1), W443.
- [20] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.* 2017, **7**, No. 1, 42717.
- [21] Y. Myung, A.G.C. de Sá, D.B. Ascher, *Nucleic Acids Res.* 2024, **52**(W1), W469.
- [22] P. Banerjee, E. Kemmler, M. Dunkel et al., *Nucleic Acids Res.* 2024, **52**(W1), W513.
- [23] R.M. Humphries, J. Ambler, S.L. Mitchell et al., *J. Clinical Microbiol.* 2018, **56**, No. 4, e01934.
- [24] A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski, *J. Combinatorial Chem.* 1999, **1**, No. 1, 55.
- [25] A. Dokoumetzidis, P. Macheras, *Int. J. Pharm.* 2006, **321**, No. 1-2, 1.
- [26] G.L. Biagi, M.C. Guerra, A.M. Barbaro et al., *J. Med. Chem.* 1970, **13**, No. 3, 511.
- [27] R.M. Sweet, L.F. Dahl, *J. Am. Chem. Soc.* 1970, **92**, No. 18, 5489.

chemik-czasopismo.pl

Odkrywaj publikuj inspiruj

czasopismo naukowo-techniczne science technical journal

CHEMIK

nauka • technika • rynek science • technique • market

CZASOPISMO PEŁNE CHEMII

Chemia stosowana: badania stosowane, technika, technologia przemysłowa, kontrola procesów, zarządzanie: jakością, środowiskiem i bezpieczeństwem oraz zagadnienia organizacyjno-prawne.

nauka → technika → rynek

Decyzją Zarządu Głównego SITPChem, publikacja prac naukowych do końca 2024 r. jest dla autorów bezpłatna. Warunkiem przyjęcia pracy jest pozytywna ocena recenzentów (obowiązuje dwustopniowy proces recenzji).

"CHEMIK" Czasopismo Naukowo-Techniczne założone w 1948 roku. Wydawane od 2022 r. przez Stowarzyszenie Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego i Politechnikę Wrocławską

SITP Chem Politechnika Wrocławska