

Design, synthesis, and activity evaluation of novel piperazine-thiazole cephalosporin derivatives as potential antibacterial agents

Projektowanie, synteza i ocena aktywności nowych piperazyno-tiazolowych pochodnych cefalosporyny jako potencjalnych środków przeciwbakteryjnych

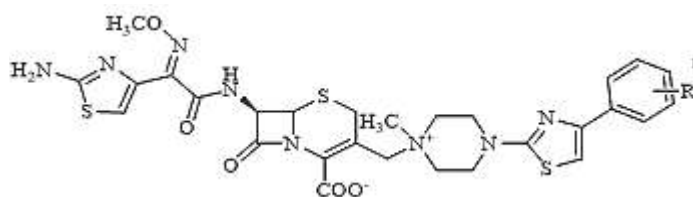


DOI: 10.15199/62.2025.6.6

Dwanaście nowych struktur piperazyno-tiazolowych zawierających pochodne cefalosporyny zostało racjonalnie zaprojektowanych poprzez optymalizację zależności struktura-aktywność z wykorzystaniem podwójnych cech strukturalnych białka wiążącego penicylinę 2a (PBP2a) (miejsca aktywne/allosteryczne) szczepu *S. aureus*. Największą aktywność *in vitro* przeciwko szczepom *S. aureus* wykazała pochodna dwukrotnie podstawiona chlorem w pozycjach 3 i 4 w końcowej grupie fenylovej (MIC = 1,56 µg/mL) w porównaniu z cefpiromem (MIC = 3,13 µg/mL). Dokowanie molekularne ujawniło mechanizm hamowania podwójnego celu, tworząc stabilne wiązania wodorowe z resztami katalitycznymi (Ser403, Ser462) oraz oddziaływania halogenowo- π -kationowe w miejscu allosterycznym (Lys148, Arg241), zakłócając w ten sposób dynamikę konformacyjną PBP2a. Profilowanie obliczeniowe ADMET wykazało korzystne powinowactwo do leku przy obliczonym $\log P < 3$ i 2 donorach wiązania wodorowego, a także minimalne ryzyko toksyczności na podstawie prognoz toksyczności *in silico*.

Słowa kluczowe: białko wiążące penicylinę, szkielety piperazyno-tiazolowe, cefalosporyna, aktywność przeciwbakteryjna, dokowanie molekularne

Twelve novel piperazine-thiazole scaffolds-incorporating cephalosporin derivatives were rationally designed by structure-activity relationship optimization guided by the dual structural features of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) (active/allosteric sites) of *S. aureus*. The R substituents in the derivatives (formula below) were: H, 4-Me, 4-F, 4-Cl, 4-MeO, 4-MeSO₂, 3-MeO, 3-Cl, 2-Me, 2-Cl, 3,4-diMeO and 3,4-Cl₂.



The highest potent activity *in vitro* against *S. aureus* exhibited the derivative, where R was 3,4-Cl₂ (MIC = 1.56 µg/mL) compared to cefpirome (MIC = 3.13 µg/mL). Mol. docking revealed its dual-target inhibition mechanism, forming stable H bonds with catalytic residues (Ser403, Ser462) and halogen/ π -cation interactions at the allosteric site (Lys148, Arg241), thereby disrupting PBP2a conformational dynamics. The computational ADMET profiling demonstrated favorable drug-likeness with a calculated $\log P < 3$ and 2 H bond donors, along with min. toxicity risks based on *in silico* toxicity predictions.

Keywords: penicillin-binding protein, piperazine-thiazole scaffolds, cephalosporin, antibacterial activity, molecular docking

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), Gram-dodatni patogen oportunistyczny, jest odpowiedzialny za różnorodne infekcje kliniczne, od zmian skórnych po zagrażającą życiu bakteremię¹⁾. Rosnąca oporność *S. aureus* na środki przeciwdrobnoustrojowe stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia na całym świecie, spowodowane ewolucyjną adaptacją

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), a Gram-positive opportunistic pathogen, is responsible for diverse clinical infections ranging from cutaneous lesions to life-threatening bacteremia¹⁾. The escalating antimicrobial resistance in *S. aureus* poses a critical global health threat, driven by microbial evolutionary adaptation and indiscriminate antibiotic use in clinical and agricultural settings²⁾. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), designated by WHO as a priority antibiotic-resistant pathogen, rapidly acquires resistance determinants

* Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Liushi Road No. 257, Yufeng District, Liuzhou City 545005, Guangxi, China, e-mail: luxiaoling0903@163.com

mikroorganizmów oraz niekontrolowanym stosowaniem antybiotyków w medycynie i rolnictwie²⁾. *S. aureus* oporny na metycylinę (MRSA), uznany przez WHO za priorytetowy patogen oporny na antybiotyki, szybko nabywa determinanty oporności poprzez horyzontalny transfer genów za pośrednictwem plastyczności genomowej, osłabiając działanie antybiotyków β -laktamowych i leków pierwszego rzutu³⁾. Z klinicznego punktu widzenia zakażenia MRSA wymagają długotrwałej hospitalizacji i intensywnej terapii, co zwiększa obciążenie systemu opieki zdrowotnej poprzez wzrost kosztów leczenia i śmiertelności. Szczególnie niepokojąca jest dwukierunkowa transmisja między szczepami MRSA występującymi w społecznościach i w placówkach opieki zdrowotnej, która powoduje powstanie samonapędzającego się cyklu oporności. Obecny kryzys podkreśla pilną potrzebę opracowania nowych środków przeciwdrobnoustrojowych w celu zmniejszenia śmiertelności.

β -Laktamowe cefalosporyny pozostają antybiotykami pierwszego rzutu, ale wykazują malejącą skuteczność przeciwko MRSA z powodu oporności wywołanej przez białko wiążące penicylinę 2a (PBP2a), kodowane przez gen *mecA*⁴⁾. Badania strukturalne wykazują, że sterycznie ograniczone miejsce aktywne PBP2a utrudnia dostęp β -laktamu do katalitycznego Ser403, zapobiegając tworzeniu się kompleksu acylowo-enzymowego⁵⁾. Istnieje podwójna regulacja konformacyjna: domeny katalityczne utrzymują stan zamknięty, podczas gdy domeny allosteryczne przyjmują konfigurację otwartą⁶⁾. Wiązanie ligandów wywołuje przemiany allosteryczne, które otwierają centra katalityczne, umożliwiając wiązanie β -laktamu i hamowanie transpeptydazy peptydoglikanowej⁷⁾. Te ustalenia stanowią podstawę strategii optymalizacji opartej na strukturze ukierunkowanej na obie dziedziny. Obecne podejścia łączą modelowanie obliczeniowe dynamiki PBP2a z racjonalnym projektowaniem szkieletu optymalizującym wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe w celu stabilizacji konformacji miejsc aktywnych. To podwójne ukierunkowanie zwiększa skuteczność antybiotyków, zachowując jednocześnie profil bezpieczeństwa β -laktamów wobec rozwijającej się oporności.

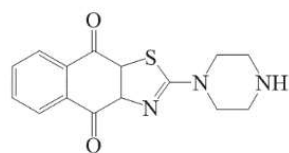
Cefalosporyny piątej generacji są przykładem racjonalnego projektowania leków dzięki modyfikacjom molekularnym w pozycji 7 i 3, które zwiększają odporność na β -laktamazy i powinowactwo do PBP2a. Substytucja w pozycji 7 pochodnymi oksyiminotiadiazolu łączy wiązanie wodorowe w miejscu aktywnym β -laktamazy (poprzez 1,2,4-tiadiazol) z przeszkodą steryczną przeciwko hydrolizie, podczas gdy sztywne układy bicykliczne w pozycji 3 przenikają wąską szczelinę MRSA PBP2a poprzez płaskie oddziaływania hydrofobowe. Przestrzenne rozmieszczenie podstawników umożliwia tworzenie wiązań π - π i kontaktów van der Waalsa, stabilizujących kompleksy lek-cel, nadając ceftobiprolowi lepszą aktywność przeciwko MRSA w porównaniu z poprzednikami⁸⁾. Charakterystyczna struktura ceftaroliny, zawierająca 7-imino-2-aminotiadiazol (podwójne wiązanie N-H) i C-3 tiazolilosiarczek (układ π), ułatwia indukowane

through horizontal gene transfer via genomic plasticity, undermining β -lactam antibiotics and first-line agents³⁾. Clinically, MRSA infections require prolonged hospitalization and intensive therapies, exacerbating healthcare burdens through rising treatment costs and mortality. Of particular concern is the bidirectional transmission between community- and healthcare-associated MRSA strains, establishing a self-reinforcing resistance cycle. This crisis underscores the urgent need for novel antimicrobial agents to reduce mortality.

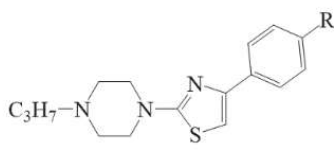
*β -Lactam cephalosporins remain first-line antibacterials but show declining efficacy against MRSA due to resistance mediated by *mecA*-encoded penicillin-binding protein 2a (PBP2a)⁴⁾. Structural studies demonstrate PBP2a's sterically constrained active site impedes β -lactam access to catalytic Ser403, preventing acyl-enzyme complex formation⁵⁾. Dual conformational regulation exists: catalytic domains maintain closed states while allosteric domains adopt open configurations⁶⁾. Ligand binding induces allosteric transitions that open catalytic sites, enabling β -lactam engagement and peptidoglycan transpeptidase inhibition⁷⁾. These findings drive structure-guided optimization strategies targeting both domains. Current approaches combine computational modeling of PBP2a dynamics with rational scaffold design optimizing hydrogen-bonding and hydrophobic interactions to stabilize active site conformations. This dual-domain targeting enhances antibiotic efficacy while maintaining β -lactam safety profiles against evolving resistance.*

Fifth-generation cephalosporins exemplify rational drug design through 7- and 3-position molecular modifications enhancing β -lactamase resistance and PBP2a affinity. 7-Substitution with oxymino-thiadiazole derivatives combines β -lactamase active-site hydrogen bonding (via 1,2,4-thiadiazole) with steric hindrance against hydrolysis, while 3-position rigid bicyclic systems penetrate MRSA PBP2a's narrow cleft through planar hydrophobic interactions. Spatial substituent arrangements enable π - π stacking and van der Waals contacts stabilizing drug-target complexes, conferring ceftobiprole's superior anti-MRSA activity versus predecessors⁸⁾. Ceftaroline's distinct 7-imino-2-aminotiadiazole (dual N-H bonding) and C-3 thiazolylsulfur (π -system positioning) facilitate allosteric-induced PBP2a conformational changes exposing catalytic residues for acylation⁹⁾. These topology- and electronics-driven adaptations overcome resistance while preserving β -lactam core integrity.

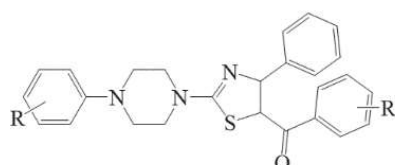
Thiazole, a widely studied aromatic heterocycle in drug discovery, demonstrates therapeutic potential through derivatives exhibiting antibacterial, antitumor, antimalarial, and anti-inflammatory activities. Aminothiazole derivatives notably enhance antibacterial efficacy while improving lipophilicity and pharmacoki-



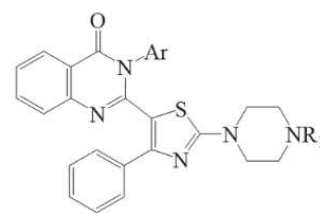
I



II



III



IV

allosterycznie zmiany konformacyjne PBP2a, odsłaniając reszty katalityczne dla acylacji⁽⁹⁾. Te dostosowania oparte na topologii i elektronice pokonują opór, zachowując jednocześnie integralność rdzenia β -laktamu.

Tiazol, szeroko badany heterocykliczny związek aromatyczny wykorzystywany w tworzeniu leków, wykazuje potencjał terapeutyczny dzięki pochodnym o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwnowotworowym, przeciwmalarycznym i przeciwzapalnym. Pochodne aminotiazolu znacznie zwiększają skuteczność przeciwbakteryjną, poprawiając jednocześnie lipofilność i profil farmakokinetyczny. Część piperazynowa, kluczowy motyw strukturalny w chemii medycznej, zapewnia stabilność konformacyjną dzięki swojej strukturze krzesłkowej i ułatwia interakcje między lekiem a receptorem poprzez zdolność do akceptacji protonów. Ten 6-członowy heterocykl azotowy skutecznie optymalizuje geometrię molekularną i właściwości farmakologiczne. W ramach racjonalnych strategii hybrydyzacji molekularnej opracowano ostatnio hybrydy piperazyny i tiazolu, które wykazują lepsze właściwości terapeutyczne w modelach przeciwdrobnoustrojowych i przeciwnowotworowych, co podkreśla ich potencjał aplikacyjny⁽¹⁰⁻¹³⁾. Struktury piperazyny-tiazolu i jego pochodnych przedstawiono jako wzory I-IV.

Aby zwalczyć oporność wywołaną przez β -laktamazy, opracowano strategię podwójnego działania mającą na celu optymalizację cefalosporyny poprzez modyfikacje strukturalne oparte na ADMET, w celu poprawy stabilności farmakokinetycznej, oraz zmodyfikowane szkielety piperazyno-tiazolowe, ukierunkowane zarówno na kieszeń allosteryczną, jak i domenę katalityczną PBP2a. Systematyczne modyfikacje podstawników arylowych ujawniły zależności między strukturą a aktywnością, które pomogły w zaprojektowaniu farmakoforów o podwójnym wiązaniu.

Część doświadczalna

Materiały

Wszystkie odczynniki chemiczne zostały zakupione od firm Adamas-beta (Shanghai Titan Technology Co., Ltd., Chiny) oraz Macklin (Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd., Chiny). O ile nie zaznaczono inaczej, materiały zostały użyte bez dodatkowego oczyszczania.

Metody analityczne i separacyjne

Przebieg reakcji monitorowano za pomocą analitycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z użyciem płytek

netic profiles. The piperazine moiety, a key structural motif in medicinal chemistry, offers conformational stability through its chair structure and facilitates drug-receptor interactions via proton-accepting capacity. This six-membered N-heterocycle effectively optimizes molecular geometry and pharmacological properties. Rational molecular hybridization strategies have recently developed piperazine-thiazole hybrids showing enhanced therapeutic performance in antimicrobial and anticancer models, underscoring their translational potential⁽¹⁰⁻¹³⁾. The structures of piperazine-thiazole and its derivatives were shown as formulas I-IV.

To address β -lactamase-mediated resistance, we developed a dual-target strategy for cephalosporin optimization through ADMET-guided structural modifications to improve pharmacokinetic stability and engineered piperazine-thiazole scaffolds targeting both the allosteric pocket and catalytic domain of PBP2a. Systematic aryl substituent modifications revealed structure-activity relationships that informed the design of dual-binding pharmacophores.

Experimental

Materials

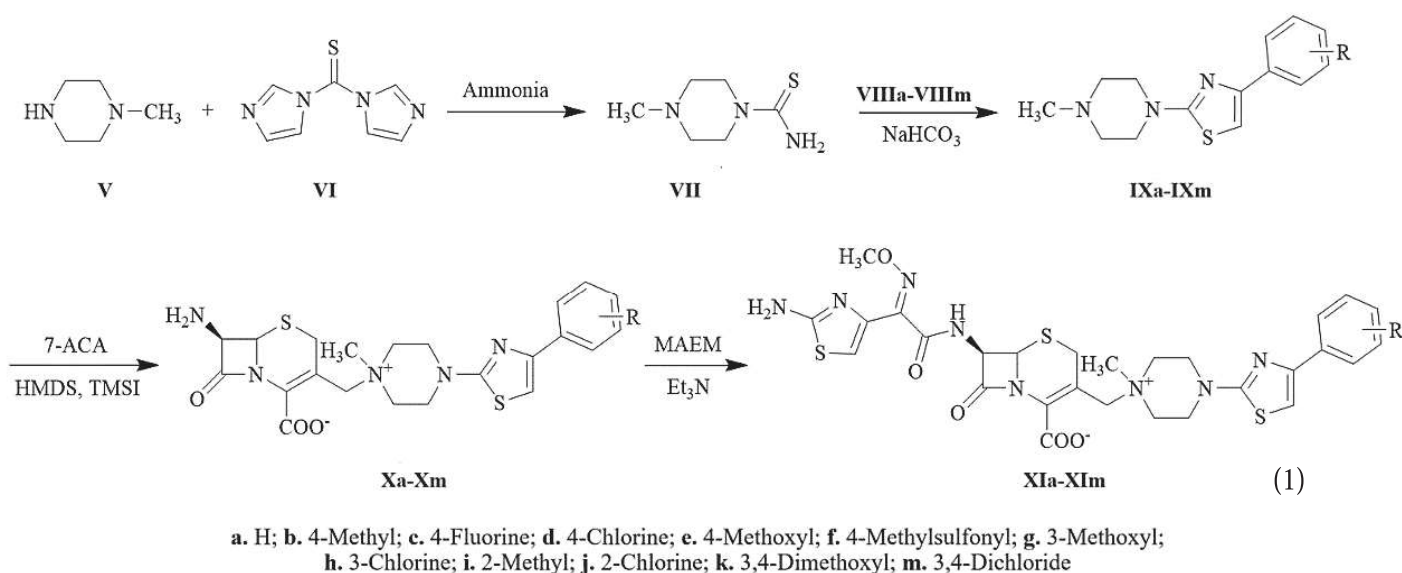
All chemical reagents were commercially sourced from Adamas-beta (Shanghai Titan Technology Co., Ltd., China) and Macklin (Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd., China). Unless specifically noted, materials were employed without further purification.

Analytical and separation methods

Reaction progress was monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) using pre-coated silica gel HSGF254 plates. Intermediate compounds were purified by flash column chromatography with 300-400 mesh silica gel (Yantai Jiangyou Silica Gel Development Co., Ltd., China). Final target compounds were isolated through macroporous adsorption resin chromatography (XAD-16, Macklin), followed by lyophilization to achieve the target compound.

Chemistry

The target compound synthesis was developed according to literature data and preliminary experiments, followed by iterative optimization of reaction pathways



HSFG254 pokrytych wcześniej żelem krzemionkowym. Związki pośrednie oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej, używając żelu krzemionkowego o uziarnieniu 300–400 (Yantai Jiangyou Silica Gel Development Co., Ltd., Chiny). Ostateczne związki docelowe wyizolowano poprzez chromatografię na makroporowatej żywicy adsorpcyjnej (XAD-16, Macklin), a następnie poddano liofilizacji w celu uzyskania związku docelowego.

Chemia

Syntezę związku docelowego opracowano na podstawie danych z literatury i wstępnych eksperymentów, a następnie przeprowadzono iteracyjną optymalizację ścieżek reakcji i parametrów w celu ustalenia wydajnej procedury w łagodnych warunkach. Syntezę nowych pochodnych piperazyny-tiazolu cefalosporyny (**XIa–XIIm**) przeprowadzono zgodnie z reakcją (1).

Synteza związku VII

Mieszanie związków **V** (56,0 g, 0,56 mol) i **VI** (100,0 g, 0,56 mol) w bezwodnym THF mieszano w temperaturze otoczenia przez 2 h, a następnie ogrzewano w temp. 50°C przez 1 h. Po schłodzeniu do temp. 0–5°C dodawano kroplami roztwór metanolowy NH_3 (1 L, 7 N). Mieszanie reakcyjne ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temp. 60°C przez 20 h, a następnie zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem do ok. 200 mL. Schłodzenie do temp. 0°C spowodowało krystalizację, a filtracja próżniowa pozwoliła uzyskać związek **VII** w postaci jasnożółtej substancji stałej (68,2 g, 78%).

Ogólna procedura syntezy związków IXa–IXm

Mieszanie związków **VII** (25 mmol), **VIII** (25 mmol) i NaHCO_3 (4,2 g, 50 mmol) w bezwodnym EtOH mieszało w temp. 80°C przez 4 h (monitorując za pomocą TLC). Mieszanie reakcyjne zateżono pod obniżonym ciśnieniem i oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, uzyskując związki **IXa–IXm** w postaci jasnożółtych substancji stałych (wydajność 63–98%).

and parameters to establish an efficient protocol under mild conditions. Synthesis of novel piperazine-thiazole cephalosporin derivatives (**XIa–XIIm**) was carried out according to reaction (1).

Synthesis of compound VII

A mixture of compounds **V** (56.0 g, 0.56 mol) and **VI** (100.0 g, 0.56 mol) in anhydrous THF was stirred at ambient temperature for 2 h, followed by heating at 50°C for 1 h. After cooling to 0–5°C, methanolic NH_3 solution (1 L, 7 N) was added dropwise. The reaction mixture was refluxed at 60°C for 20 h, then concentrated under reduced pressure to about 200 mL. Cooling to 0°C induced crystallization, and vacuum filtration afforded compound **VII** as a light-yellow solid (68.2 g, 78%).

General procedure for the synthesis of compounds IXa–IXm

A mixture of compounds **VII** (25 mmol), **VIII** (25 mmol), and NaHCO_3 (4.2 g, 50 mmol) in anhydrous EtOH was stirred at 80°C for 4 h (monitored by TLC). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purified by flash silica gel column chromatography to afford compounds **IXa–IXI** as light-yellow solids (63–98% yields).

General procedure for the synthesis of compounds Xa–Xm

Under a nitrogen atmosphere, 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA, 4.4 g, 16 mmol) in anhydrous DCM was treated with hexamethyldisilazane (HMDS, 8 mL, 38 mmol). The mixture was stirred (10 min, 25°C) followed by reflux (3 h) to afford a light-yellow solution. Following ice-bath cooling (0–5°C, dark), trimethylsilyl silane (TMSI, 3 mL, 22 mmol) was added dropwise at below 10°C. Subsequent warming to 10–15°C with stirring (4 h) yielded a brown suspension, followed by

Ogólna procedura syntezy związków Xa–Xm

W atmosferze azotu kwas 7-aminocefalosporynowy (7-ACA, 4,4 g, 16 mmol) w bezwodnym DCM poddano działaniu heksametylodisilazanu (HMDS, 8 mL, 38 mmol). Mieszaninę mieszano (10 min, 25°C), a następnie ogrzewano pod chłodnicą zwrotną (3 h), uzyskując jasnożółty roztwór. Po schłodzeniu w łaźni lodowej (0–5°C, w ciemności) dodano kroplami trimetylojodosilan (TMSI, 3 mL, 22 mmol) w temperaturze poniżej 10°C. Następnie mieszaninę ogrzano do temp. 10–15°C, mieszając przez 4 h, co dało brązową zawiesinę, a następnie dodano kroplami związek **IX** (20 mmol) w DCM za pomocą lejka wyrównującego ciśnienie (10–25°C). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temp. 35°C (6 h), ochłodzono (0–5°C) i schłodzono za pomocą MeOH (10 mL, 15 min). Po obróbce wodnej (H₂O, 20 mL) i neutralizacji (50% NaOH, pH 7–8) roztwór poddano działaniu węgla aktywnego (2 h), filtracji i ekstrakcji DCM. Fazę wodną zakwaszono (stężony HCl, pH 2–3) w temp. 0–5°C w celu wytrącenia substancji stałych, które zebrano przez filtrację, przemyto wodą lodową (2×20 mL) i wysuszono próżniowo, uzyskując docelowe związki **Xa–Xm** w postaci brązowożółtych substancji stałych (21–69%).

Ogólna procedura syntezy związku docelowego XIa–XI_m

Roztwór związku **X** (3 mmol) i Et₃N (6 mmol) w DCM schłodzono do temp. 0–5°C. Dodano aktywny ester MAEM (1,6 g, 4,5 mmol) i roztwór mieszano w temp. 0–5°C przez 2 h, a następnie ogrzano do temp. 25°C i mieszano przez 2 h. Reakcję zatrzymano dodaniem H₂O (40 mL) i ekstrahowano za pomocą DCM. Warstwę organiczną przemyto H₂O (3 × 10 mL), a połączoną fazę wodną poddano działaniu węgla aktywnego (30 min), przefiltrowano i oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej z użyciem żywicy makroporowatej. Wpływ został schłodzony do temp. 0–5°C, zakwaszony do pH 2–3 za pomocą 2 M HCl i mieszany w celu krystalizacji. Osad zebrano przez filtrację, przemyto wodą lodową (10 mL) i EtOAc (10 mL), wysuszono próżniowo i otrzymano związki docelowe **XIa–XI_m** w postaci brązowożółtych ciał stałych (wydajność 40–56%).

Działanie przeciwbakteryjne

Minimalne stężenie hamujące (MIC) określono poprzez rozcieńczenie w mikrobulionie zgodnie z wytycznymi CLSI (M07-A11)¹⁴. Kultury bakterii hodowano w bulionie BHI w temp. 37°C do fazy środkowej logarytmicznej, odwirowano, 3-krotnie przemyto PBS i dostosowano do stężenia 5·10⁵ CFU/mL. W sterylnych 96-dółkowych płytkach ustalono podwójny gradient stężenia: związki badane (50–0,78 µg/mL) poprzez poziome 2-krotne rozcieńczenie seryjne, z kontrolami podłużnymi. Po 16 h inkubacji statycznej w temp. 37°C wartości MIC oceniono wizualnie jako najmniejsze stężenie całkowicie hamujące widoczny wzrost.

dropwise addition of compound IX (20 mmol) in DCM via pressure-equalized addition funnel (10–25°C). The reaction mixture was heated to 35°C (6 h), cooled (0–5°C), and quenched with MeOH (10 mL, 15 min). After aqueous workup (H₂O, 20 mL) and neutralization (50% NaOH, pH 7–8), the solution underwent activated carbon treatment (2 h), filtration, and DCM extraction. The aqueous phase was acidified (conc. HCl, pH 2–3) at 0–5°C to precipitate solids, which were collected by filtration, washed with ice-cold H₂O (2×20 mL), and vacuum-dried to yield target compounds Xa–Xm as brown-yellow solids (21–69%).

General procedure for the synthesis of target compound XIa–XI_m

A solution of compound X (3 mmol) and Et₃N (6 mmol) in DCM was cooled to 0–5°C. MAEM active ester (1.6 g, 4.5 mmol) was added, and the mixture was stirred at 0–5°C for 2 h, then warmed to 25°C and stirred for 2 h. The reaction was quenched with H₂O (40 mL) and extracted with DCM. The organic layer was washed with H₂O (3×10 mL), and the combined aqueous phase was treated with activated carbon (30 min), filtered, and purified by macroporous resin column chromatography. The effluent was cooled to 0–5°C, acidified to pH 2–3 with 2 M HCl, and stirred for crystallization. The precipitate was collected by filtration, washed with ice-cold H₂O (10 mL) and EtOAc (10 mL), vacuum-dried, and afforded target compounds XIa–XI_m as brownish-yellow solids (40–56% yields).

Antibacterial activity

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by microbroth dilution following CLSI guidelines (M07-A11)¹⁴. Bacterial cultures were grown in BHI broth at 37°C to mid-log phase, centrifuged, washed three times with PBS, and adjusted to 5·10⁵ CFU/mL. In sterile 96-well plates, a dual-concentration gradient was established: test compounds (50–0.78 µg/mL) via horizontal two-fold serial dilution, with longitudinal controls. After 16 h static incubation at 37°C, MIC values were visually assessed as the lowest concentration completely inhibiting visible growth.

Molecular docking

Molecular docking was performed using AutoDock Vina¹⁵ to evaluate interactions between synthesized derivatives and penicillin-binding protein IIa (PBP2a). The PBP2a crystal structure (PDB: 3GZ0) was obtained from RCSB PDB, prepared in PyMOL¹⁶ by removing water molecules, heteroatoms, and the native ligand, and energy-minimized with the AMBER force field. Derivative structures were generated in KingDraw and converted to PDBQT format using OpenBabel¹⁷. Two binding sites were defined: active site (grid center:

Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne przeprowadzono przy użyciu programu AutoDock Vina¹⁵⁾ w celu oceny interakcji między syntetycznymi pochodnymi a białkiem wiążącym penicylinę **IIa** (PBP2a). Strukturę krystaliczną PBP2a (PDB: 3GZ0) uzyskano z RCSB PDB, przygotowano w PyMOL¹⁶⁾ poprzez usunięcie cząsteczek wody, heteroatomów i natywnego liganda, a następnie zminimalizowano energię za pomocą pola sił AMBER. Struktury pochodne zostały wygenerowane w programie KingDraw i przekonwertowane do formatu PDBQT za pomocą programu OpenBabel¹⁷⁾. Zdefiniowano 2 miejsca wiązania: miejsce aktywne (środek siatki: -34,135; 43,587; 65,269; wymiary: 40×68×40 Å³) i miejsce allosteryczne (środek: 10,596; 50,96; 24,514; wymiary: 32×62×40 Å³), na podstawie opublikowanych analiz. Dokowanie przeprowadzono przy użyciu algorytmu genetycznego Lamarcka (wskaźnik wyczerpania 32), wybierając dla każdego związku konformację o najniższej energii wiązania (ΔG , kcal/mol).

Analiza ADMET

Reguła pięciu Lipińskiego zdefiniowała kluczowe deskryptory molekularne do oceny podobieństwa leków: masa cząsteczkowa ($MW < 500$ Da), współczynnik podziału oktanol-woda ($\log P < 5$), donory wiązań wodorowych ($HBD \leq 5$) i akceptory ($HBA \leq 10$)¹⁸⁾. Te parametry są powiązane z profilami ADMET, które pokazują właściwości fizykochemiczne związku. W celu oceny potencjału leku przeprowadzono zintegrowany proces obliczeniowy, obejmujący (i) konwersję przebadanych związków do formatu SMILES oraz (ii) wielonarzędziową prognozę za pomocą SwissADME (biodostępność)¹⁹⁾, Deep-PK (farmakokinetyka)²⁰⁾ i ProTox-3.0 (toksyczność)²¹⁾.

Wyniki badań i ich omówienie

Chemia

Zsyntetyzowano 12 piperazyno-tiazolowych pochodnych cefalosporyny (**XIa–XIIm**). Kondensacja związku **V** ze związkiem **VI** utworzyła tiokarbamianowy związek pośredni, który uległ amonolizie, dając kluczowy związek pośredni **VII**. Substytucja nukleofilowa związku **VII** pochodnymi α -bromoacetofenonu **VIIIa–VIIIIm** w warunkach alkalicznych spowodowała powstanie związków pośrednich **IXa–IXm**. 7-ACA został kolejno zmodyfikowany poprzez: silylowanie grup aminowych/karboksyłowych za pomocą HMDS, jodowanie za pomocą TMSI oraz regioselektywną substytucję związków **IXa–IXm** w celu utworzenia półproduktów cefalosporyny **Xa–Xm**. Ostateczna transestryfikacja związków **Xa–Xm** z MAEM, katalizowana przez Et₃N, dała docelowe związki **XIa–XIIm**.

Działanie przeciwbakteryjne

Związki docelowe **XI** wykazały selektywną aktywność przeciwbakteryjną wobec patogenów Gram-dodatnich (tabela 1).

-34.135, 43.587, 65.269; dimensions: 40×68×40 Å³) and allosteric site (center: 10.596, 50.96, 24.514; dimensions: 32×62×40 Å³), based on published analyses. Docking employed the Lamarckian genetic algorithm (exhaustiveness 32), with the lowest binding energy (ΔG , kcal/mol) conformation selected for each compound.

ADMET analysis

Lipinski's Rule of Five defined key molecular descriptors for drug-likeness evaluation: molecular mass ($MW < 500$ Da), octanol-water partition coefficient ($\log P < 5$), hydrogen bond donors ($HBDs \leq 5$), and acceptors ($HBA \leq 10$)¹⁸⁾. These parameters correlate with ADMET profiles, reflecting a compound's physicochemical properties. To assess drug potential, an integrated computational workflow was executed by (i) conversion of screened compounds to SMILES format and (ii) multi-tool prediction via SwissADME (bioavailability)¹⁹⁾, Deep-PK (pharmacokinetics)²⁰⁾, and ProTox-3.0 (toxicity)²¹⁾.

Results and discussion

Chemistry

Twelve piperazine-thiazole cephalosporin derivatives (**XIa–XIIm**) were synthesized. Condensation of compound **V** with compound **VI** formed a thiocarbamate intermediate, which underwent ammonolysis to yield key intermediate **VII**. Nucleophilic substitution of **VII** with α -bromoacetophenone derivatives **VIIIa–VIIIIm** under alkaline conditions generated intermediates **IXa–IXm**. 7-ACA was sequentially modified through: HMDS-mediated silylation of amino/carboxyl groups; TMSI iodination; regioselective substitution with **IXa–IXm** to form cephalosporin intermediates **Xa–Xm**. Final Et₃N-catalyzed transesterification of **Xa–Xm** with MAEM afforded target compounds **XIa–XIIm**.

Antibacterial activity

The target compounds **XI** demonstrated selective antibacterial activity against Gram-positive pathogens (Table 1). Compounds **XIc**, **XIh**, **XIi** and **XIm** exhibited potent inhibition against *S. aureus* and *S. pneumoniae* (MIC: 1.56–3.13 $\mu\text{g/mL}$), with **XIm** showing superior efficacy to cefpirome (reference drug), while **XIc**, **XIh** and **XIm** displayed activity comparable to the control. In contrast, all derivatives exhibited limited Gram-negative activity (MICs \geq control).

Structure-activity relationship analysis identified two critical determinants of antibacterial potency. First, halogen substituents on the benzene ring markedly enhanced antimicrobial activity, with fluorine showing the greatest effect. This enhancement likely stems from stable halogen bonds formed between halogens and key amino acid residues in target proteins. Compound **XIm**, bearing dual chlorines, illustrates this experimentally,

Table 1. Antibacterial activity of cephalosporin derivatives

Tabela 1. Działanie przeciwbakteryjne pochodnych cefalosporyny

Compound XI/ Związek XI	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	m	Cefpirom
<i>S. aureus</i>	12,5	6,25	3,13	6,25	12,5	6,25	6,25	3,13	3,13	6,25	12,5	1,56	3,13
<i>S. pneumonia</i>	12,5	6,25	3,13	6,25	12,5	6,25	6,25	3,13	3,13	6,25	12,5	1,56	3,13
<i>P. aeruginosa</i>	> 50	25	25	25	> 50	25	25	25	25	25	> 50	12,5	12,5
<i>K. pneumonia</i>	> 50	25	12,5	12,5	> 50	25	12,5	25	25	12,5	> 50	6,25	6,25
<i>E. coli</i>	> 50	25	12,5	25	> 50	25	25	25	25	12,5	> 50	12,5	12,5

Związki **XIc**, **XIh**, **XIi** i **XIm** wykazały silne hamowanie wzrostu *S. aureus* i *S. pneumoniae* (MIC: 1,56–3,13 µg/mL), przy czym związek **XIm** wykazał skuteczność przewyższającą cefpirom (lek referencyjny), natomiast związki **XIc**, **XIh** i **XIm** wykazały aktywność porównywalną do kontroli. Natomiast wszystkie pochodne wykazywały ograniczoną aktywność wobec bakterii Gram-ujemnych (MIC ≥ kontrola).

Analiza zależności struktury od aktywności pozwoliła zidentyfikować 2 kluczowe czynniki determinujące skuteczność przeciwbakteryjną. Po pierwsze, podstawniki halogenowe w pierścieniu benzenowym znacznie wzmacniały aktywność przeciwdrobnoustrojową, przy czym największy wpływ wykazywał fluor. To wzmocnienie prawdopodobnie wynikało ze stabilnych wiązań halogenowych utworzonych między halogenami a kluczowymi resztami aminokwasowymi w białkach docelowych. Związek **XIm**, zawierający 2 atomy chloru, wykazał eksperymentalnie lepszą aktywność przeciwko bakteriom Gram-dodatnim w porównaniu z analogami niehalogenowanymi. Po drugie, wzorce substytucji miały znaczący wpływ na bioaktywność w przestrzeni. W szczególności substytucja w pozycji 4 konsekwentnie zapewniała związkowi wzmocnione działanie przeciwbakteryjne, co sugeruje optymalne dopasowanie wiązania. Co ciekawe, chociaż grupa metylosulfonyloacetylowa zawiera 2 atomy tlenu zdolne do tworzenia wiązań wodorowych, cecha ta nie wpłynęła znacząco na zwiększenie mocy działania.

Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne wyjaśniło mechanizm przeciwbakteryjny piperazyno-tiazolowych pochodnych cefalosporyny wobec PBP2a, ujawniając powinowactwo wiązania zarówno w miejscach aktywnych ($\Delta G = -8,990$ do $-10,193$ kcal/mol), jak i allosterycznych ($\Delta G = -7,596$ do $-8,324$ kcal/mol). Kluczowe interakcje obejmowały wiązania wodorowe z SER403, ASN464 (miejsce aktywne) i ARG241, LYS148 (allosteryczne), a także interakcje hydrofobowe/ π -kationowe i mostki solne. Wszystkie związki wykazały podwójne wiązanie z obydwoma miejscami (tabela 2).

Dokowanie molekularne związku **XIm** (najwyższa aktywność przeciwbakteryjna/wynik dokowania) z PBP2a ujawniło podwójne wiązanie. W miejscu allosterycznym:

exhibiting superior Gram-positive activity versus non-halogenated analogs. Second, substitution patterns significantly influenced bioactivity spatially. Specifically, 4-position substitution consistently afforded compounds with enhanced antibacterial effects, suggesting optimal binding alignment. Interestingly, while the methylsulfonyl moiety contains two hydrogen-bond-capable oxygens, this feature did not significantly enhance potency.

Molecular docking

Molecular docking elucidated the antibacterial mechanism of piperazine-thiazole cephalosporin derivatives against PBP2a, revealing binding affinities at both active ($\Delta G = -8.990$ to -10.193 kcal/mol) and allosteric sites ($\Delta G = -7.596$ to -8.324 kcal/mol). Key interactions involved hydrogen bonds with SER403, ASN464 (active site) and ARG241, LYS148 (allosteric), alongside hydrophobic/ π -cation interactions and salt bridges. All compounds showed dual binding to both sites (Table 2).

Molecular docking of compound XIm (highest antibacterial activity/docking score) with PBP2a revealed dual binding. At the allosteric site: three H-bonds (Lys148 (3.72 Å); Glu239 (2.99 Å); Arg241 (3.11 Å)), hydrophobic contact (Asn146), π -cation interaction (Lys148 (5.67 Å)), and Cl-mediated halogen bond (Ile144 (3.20 Å)). At the active site: H-bond network with Ser403 (3.69 Å), Ser462 (3.19 Å), Ser598 (2.68 Å), Thr600 (3.22/3.90 Å), Asn464 (4.08 Å), and Tyr519 (2.96 Å), complemented by salt bridges (His583 (4.76 Å); Lys597 (5.13 Å)) and π -cation interaction (Lys647 (3.90 Å)). These multivalent interactions rationalize the superior binding affinity of XIm.

ADMET properties

ADMET profiling plays a critical role in modern drug discovery by mitigating clinical trial risks through early elimination of suboptimal candidates. Authors systematically evaluated ADMET properties of the designed cephalosporin derivatives. As indicated in Table 3, the target compounds demonstrate molecular weights above 500 Da while retaining favorable drug-like properties, with calculated logP values <5 (range 1.37–2.68), two hydrogen bond donors, and ≤10 hydrogen bond acceptors. These parameters collectively satisfy three

Table 2. Binding energies, kcal/mol, and H-bond interactions for active and allosteric sites

Tabela 2. Energia wiązania, kcal/mol, i oddziaływania wiązań wodorowych dla miejsc aktywnych i allosterycznych

Compound XI / Związek XI	ΔG	H-Bond interactions/Interakcje wiązań H	
		active site/miejsce aktywne	allosteric site/miejsce allosteryczne
a	-9,308 -8,130	SER403, LYS406, ASN464, SER598, THR600, THR600	LYS148, GLU239, ARG241
b	-9,929 -8,083	SER403, TYR446, SER461, SER462, ASN464, TYR519, SER598, HR600, THR600, THR600, SER643	LYS148, GLU239, ARG241
c	-9,911 -8,171	SER403, TYR446, SER461, SER462, ASN464, TYR519, SER598, HR600, THR600, SER643	GLU150, ARG241
d	-9,429 -8,137	SER403, LYS406, ASN464, SER598, THR600, THR600, GLU602, LU602	SER149, ARG241
e	-9,852 -7,777	ASN464, SER598, THR600, THR600, THR600, SER643, LYS647	PHE211, THR238, ARG241, HIS293
f	-9,590 -7,930	SER403, LYS406, ASN464, SER598, THR600, THR600, THR600, HR600, SER643	LYS148, LYS316
g	-9,596 -7,918	ASN464, GLU585, SER598, THR600, THR600, THR600, THR600, SER643	LYS148, GLU239, ARG241
h	-10,042 -8,274	SER403, SER403, TYR446, SER461, SER462, ASN464, SER598, HR600, THR600, THR600, SER643	LYS148, GLU239, ARG241
i	-10,114 -8,182	SER403, SER403, TYR446, SER461, SER462, ASN464, SER598, HR600, THR600, THR600, GLU602, SER643	GLU150, ARG241
j	-8,990 -8,096	SER403, LYS406, SER462, ASN464, THR600, THR600, GLU602, LU602	GLU150, ARG241
k	-9,716 -7,596	LYS406, ASN464, SER598, THR600, THR600, THR600, SER643	PHE211, THR238, ARG241, HIS293
m	-10,193 -8,324	SER403, TYR446, SER461, SER462, ASN464, TYR519, SER598, HR600, THR600, THR600, SER643	LYS148, GLU239, ARG241
Cefpirom	-8,791 -7,011	SER403, SER462, ASN464, SER598, THR600, THR600, THR600	LYS148, ARG241

3 wiązania wodorowe (Lys148 (3,72 Å); Glu239 (2,99 Å); Arg241 (3,11 Å)), kontakt hydrofobowy (Asn146), oddziaływanie π -kationowe (Lys148 (5,67 Å)) oraz wiązanie halogenowe za pośrednictwem Cl (Ile144 (3,20 Å)). W miejscu aktywnym: sieć wiązań wodorowych z Ser403 (3,69 Å), Ser462 (3,19 Å), Ser598 (2,68 Å), Thr600 (3,22/3,90 Å), Asn464 (4,08 Å) i Tyr519 (2,96 Å), uzupełniona mostkami solnymi (His583 (4,76 Å); Lys597 (5,13 Å)) oraz oddziaływanie π -kationowe (Lys647 (3,90 Å)). Te wielowartościowe interakcje wyjaśniają doskonałą zdolność wiązania związku **XIm**.

Właściwości ADMET

Profilowanie ADMET odgrywa kluczową rolę w nowoczesnym opracowywaniu leków, ograniczając ryzyko związane z badaniami klinicznymi poprzez wczesną eliminację nieoptymalnych kandydatów. W pracy dokonano systematycznej oceny właściwości ADMET zaprojektowanych pochodnych cefalosporyny. Jak pokazano w tabeli 3, związki docelowe wykazywały masę cząsteczkową powyżej 500 Da, zachowując jednocześnie korzystne właściwości farmaceutyczne, z obliczonymi wartościami $\log P < 5$ (zakres:

of the five criteria outlined in Lipinski's Rule of Five for drug-likeness. Notably, the preserved compliance with other critical parameters suggests that the designed compounds retain drug-like properties while accommodating structural requirements for antimicrobial activity.

As detailed in Table 4, critical ADMET parameters of the compounds reveal deviations from conventional oral bioavailability criteria: (i) gastrointestinal absorption (predicted: low) falls below the recommended threshold (> 50% for class I compounds), (ii) blood-brain barrier penetration (BBB; predicted: no) indicates limited CNS exposure, and (iii) CYP3A4 inhibition (predicted: yes) suggests potential drug-drug interaction risks. The observed absorption limitations likely originate from the C-3 carboxylate moiety, a structural imperative for β -lactamase resistance that concomitantly reduces intestinal permeability. This alignment with injectable β -lactam pharmacophores suggests our derivatives may bypass conventional oral bioavailability requirements while maintaining targeted antibacterial action.

Table 3. The drug-like properties of cephalosporin derivatives

Tabela 3. Właściwości lekowe pochodnych cefalosporyny

Compound XI/ Związek XI	Formula/Wzór	MW	LogP	nHA	nHA	nHD	nRot	TPSA
a	C ₂₈ H ₃₀ N ₈ O ₅ S ₃	654,78	1,42	44	8	2	10	247,95
b	C ₂₉ H ₃₂ N ₈ O ₅ S ₃	684,81	1,39	46	9	2	11	257,18
c	C ₂₈ H ₂₉ FN ₈ O ₅ S ₃	672,77	1,52	45	9	2	10	247,95
d	C ₂₈ H ₂₉ ClN ₈ O ₅ S ₃	689,22	2,05	45	8	2	10	247,95
e	C ₂₉ H ₃₂ N ₈ O ₆ S ₃	684,81	1,39	46	9	2	11	257,18
f	C ₂₉ H ₃₂ N ₈ O ₇ S ₄	732,86	1,39	48	8	2	11	256,33
g	C ₂₉ H ₃₂ N ₈ O ₆ S ₃	684,81	1,39	46	9	2	11	257,18
h	C ₂₈ H ₂₉ ClN ₈ O ₅ S ₃	689,22	2,05	45	8	2	10	247,95
i	C ₂₉ H ₃₂ N ₈ O ₅ S ₃	668,81	1,79	45	8	2	10	247,95
j	C ₂₈ H ₂₉ ClN ₈ O ₅ S ₃	689,22	1,79	45	8	2	10	247,95
k	C ₃₀ H ₃₄ N ₈ O ₇ S ₃	714,84	1,37	48	10	2	12	266,41
m	C ₂₈ H ₂₈ Cl ₂ N ₈ O ₅ S ₃	723,67	2,68	46	8	2	10	247,95

Table 4. The pharmacokinetic profile of cephalosporin derivatives

Tabela 4. Profil farmakokinetyczny pochodnych cefalosporyny

Parameters/ Parametry	Compound XI/Związek XI											
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	m
<i>Absorption/Absorpcja</i>												
<i>GI absorption/Absorpcja GI</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>	<i>low/niska</i>
<i>Bioavailability/Biodostępność</i>	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
<i>Distribution/Dystrybucja</i>												
BBB	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>
PPB	74,69	75,09	73,68	76,67	68,19	73,76	68,66	77,16	75,19	78,17	64,14	79,98
<i>Metabolism/Metabolizm</i>												
CYP2D6	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>	<i>no/nie</i>
CYP3A4	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>	<i>yes/tak</i>
<i>Excretion/Wydalenie</i>												
<i>Half-life drug/Lek o okresie półtrwania, h</i>	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
<i>Clearance/Klirens</i>	1,52	1,02	1,35	1,40	1,63	0,70	1,66	1,40	1,23	1,37	1,70	0,82

1,37–2,68), 2 donorami wiązań wodorowych i ≤ 10 akceptorami wiązań wodorowych. Te parametry łącznie spełniały 3 z 5 kryteriów określonych w regule pięciu Lipińskiego dotyczącej podobieństwa do leków. Co ważne, zachowana zgodność z innymi krytycznymi parametrami sugeruje, że zaprojektowane związki zachowują właściwości leków, spełniając jednocześnie wymagania strukturalne niezbędne do działania przeciwko drobnoustrojom.

Jak pokazano w tabeli 4, kluczowe parametry ADMET związków wykazywały odchylenia od konwencjonalnych kryteriów biodostępności doustnej: (*i*) wchłanianie z przewodu pokarmowego (przewidywane: niskie) spada poniżej

Toxicity assessment is critical in modern drug discovery pipelines. Computational toxicity profiling classified all derivatives under the Globally Harmonized System (GHS) as Toxicity Class VI ($LD_{50} > 10,000$ mg/kg)²²⁾, indicating "practical non-toxicity". This safety profile exceeds clinically established β -lactam antibiotics such as ceftriaxone (GHS Class V). Comprehensive endpoint analysis predicted negligible risks of hepatotoxicity, cytotoxicity, immunogenicity, and mutagenicity (all inactive). These findings collectively align with international safety pharmacology guidelines (ICH) and demonstrate favorable preclinical safety charac-

zalecanego progu ($> 50\%$ dla związków klasy I), (ii) przenikanie przez barierę krew-mózg BBB (przewidywane: brak) wskazuje na ograniczoną ekspozycję na ośrodkowy układ nerwowy, oraz (iii) inhibicja CYP3A4 (przewidywana: tak) sugeruje potencjalne ryzyko interakcji między lekami. Zaobserwowane ograniczenia absorpcji wynikały prawdopodobnie z obecności grupy karboksylowej C-3, strukturalnego elementu niezbędnego do uzyskania oporności na β -laktamazy, który jednocześnie zmniejsza przepuszczalność jelitową. Zgodność z farmakoforami β -laktamowymi stosowanymi w preparatach do iniekcji sugeruje, że pochodne uzyskane w badaniach mogą ominąć konwencjonalne wymagania dotyczące biodostępności po podaniu doustnym, zachowując jednocześnie ukierunkowane działanie przeciwbakteryjne.

Ocena toksyczności ma kluczowe znaczenie w nowoczesnych procesach opracowywania leków. Profilowanie toksyczności obliczeniowej sklasyfikowało wszystkie pochodne w ramach Globalnie Zharmonizowanego Systemu (GHS) jako klasę toksyczności VI ($LD_{50} > 10\,000\text{ mg/kg}$)²², co oznacza „praktyczny brak toksyczności”. Profil bezpieczeństwa tego leku przewyższa profil antybiotyków β -laktamowych o potwierdzonej skuteczności klinicznej, takich jak ceftriakson (klasa V wg GHS). Kompleksowa analiza punktów końcowych przewidywała znikome ryzyko hepatotoksyczności, cytotoksyczności, immunogenności i mutagenności (wszystkie nieaktywne). Te wyniki są zgodne z międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi bezpieczeństwa farmakologicznego (ICH) i wykazują korzystne właściwości bezpieczeństwa przedklinicznego²³. W połączeniu z profilem farmakokinetycznym te pochodne cefalosporyny zasługują na dalsze badania przedkliniczne jako potencjalne środki przeciwdrobnoustrojowe, szczególnie w przypadku zakażeń wielolekoopornych wymagających długotrwałego leczenia.

Wnioski

Opierając się na wiedzy o strukturze aktywnych i allosterycznych miejsc PBP2a szczepu *S. aureus*, zastosowano strategię racjonalnego projektowania opartą na zależnościach struktura-aktywność w celu opracowania nowych pochodnych cefalosporyny ukierunkowanych zarówno na domeny katalityczne, jak i allosteryczne. Zsyntetyzowano 12 związków zawierających szkielet piperazyno-tiazolowy i oceniono ich aktywność przeciwbakteryjną. Badania *in vitro* uwiarygodniły, że pochodne **XIc**, **XIh**, **XIi** i **XIm** wykazywały silne działanie przeciwbakteryjne przeciwko *S. aureus*, przy czym związek **I** wykazał największą skuteczność ($MIC = 1,56\text{ }\mu\text{g/mL}$), przewyższając lek referencyjny cefpirom ($MIC = 3,13\text{ }\mu\text{g/mL}$). Profilowanie ADMET przewidywało korzystne właściwości lekowe tych pochodnych, w tym akceptowalną rozpuszczalność, stabilność metaboliczną i małe ryzyko toksyczności. Badania dokowania molekularnego wyjaśniły mechanizm podwójnego działania

teristics²³). Combined with their pharmacokinetic profile, these cephalosporin derivatives warrant further preclinical development as antimicrobial candidates, particularly for multidrug-resistant infections requiring extended-duration therapy.

Conclusions

Based on structural insights into the active and allosteric sites of PBP2a of *S. aureus*, a structure-activity relationship guided rational design strategy was employed to develop novel cephalosporin derivatives targeting both catalytic and allosteric domains. Twelve compounds featuring piperazine-thiazole scaffold were synthesized and evaluated for antibacterial activity. *In vitro* assays revealed that derivatives **XIc**, **XIh**, **XIi** and **XIm** exhibited potent antibacterial effects against *S. aureus*, with compound **I** demonstrating the highest efficacy ($MIC = 1.56\text{ }\mu\text{g/mL}$), surpassing the reference drug cefpirome ($MIC = 3.13\text{ }\mu\text{g/mL}$). ADMET profiling predicted favorable drug-like properties for these derivatives, including acceptable solubility, metabolic stability, and low toxicity risks. Molecular docking studies elucidated the dual-target mechanism of compound **XIm**. At the active site, it formed eleven hydrogen bonds, including a critical interaction with SER403 and ASN464, complemented by π -cation interaction and salt bridges, yielding a strong binding affinity ($\Delta G = -10.193\text{ kcal/mol}$). At the allosteric site, three hydrogen bonds were observed, notably with LYS148 and ARG241, alongside analogous non-covalent interactions. Collectively, these findings demonstrate that compound **XIm** stabilizes PBP2a in an inactive conformation by concurrently occupying both sites, thereby disrupting cell wall synthesis. The *in vitro* activity, and computational data position compound **XIm** as a promising lead for combating β -lactam-resistant MRSA which will be further developed as novel candidates for antibacterial drugs. The toxicity analysis of cephalosporin derivatives **XIa–XIm** at $LD_{50}\ 10,000\text{ mg/kg}$ confirmed class 6 and excluded both hepatotoxicity, cytotoxicity, immunogenicity, and mutagenicity.

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: 11-06-2025

Reviewed/Zrecenzowano: 13-06-2025

Accepted/Zzaakceptowano: 16-06-2025

Published/Opublikowano: 25-06-2025

związku **XIm**. W miejscu aktywnym utworzył 11 wiązań wodorowych, w tym krytyczne oddziaływanie z SER403 i ASN464, uzupełnione oddziaływaniem π -kationowym i mostkami solnymi, co dało silne powinowactwo wiązania ($\Delta G = -10,193$ kcal/mol). W miejscu allosterycznym zaobserwowano 3 wiązania wodorowe, zwłaszcza z LYS148 i ARG241, a także analogiczne oddziaływania niekowalencyjne. Wyniki te łącznie wskazują, że związek **XIm** stabilizuje PBP2a w nieaktywnej konformacji poprzez jednoczesne zajęcie obu miejsc, zakłócając w ten sposób syntezę ściany komórkowej. Aktywność *in vitro* oraz dane obliczeniowe wskazują na związek **XIm** jako na obiecujący środek do zwalczania MRSA opornego na β -laktamy, który będzie dalej rozwijany jako nowy kandydat na lek przeciwbakteryjny. Analiza toksyczności pochodnych cefalosporyny **XIa–XIm** przy LD₅₀ 10 000 mg/kg potwierdziła klasę 6 i wykluczyła zarówno hepatotoksyczność, cytotoksyczność, immunogenność, jak i mutagenność.

Podziękowania

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).

REFERENCES/LITERATURA

- [1] S.Y.C. Tong, J.S. Davis, E. Eichenberger et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 2015, **28**, No. 3, 603.
- [2] S. Sharma, A. Chauhan, A. Ranjan et al., *Frontiers Microbiol.* 2024, **15**, 1403168.
- [3] G. Sulis, S. Sayood, S. Katukoori et al., *Clin. Microbiol. Infection* 2022, **28**, No. 9, 1193.
- [4] Z. Hou, L. Liu, J. Wei et al., *Infection Drug Resist.* 2023, 3271.
- [5] M.A.W. Shalaby, E.M.E. Dokla, R.A.T. Serya et al., *Europ. J. Med. Chem.* 2020, **199**, 112312.
- [6] M. Mora-Ochomogo, C.T. Lohans, *RSC Med. Chem.* 2021, **12**, No. 10, 1623.
- [7] J.F. Fisher, S. Mobashery, *Chem. Rev.* 2020, **121**, No. 6, 3412.
- [8] A.L. Lovering, M.C. Gretes, S.S. Safadi et al., *J. Biol. Chem.* 2012, **287**, No. 38, 32096.
- [9] G.G. Zhanel, G. Snizek, F. Schweizer et al., *Drugs* 2009, **69**, 809.
- [10] T. Haraguchi, S. Hayashi, S. Nakasaka et al., *Molecules* 2024, **29**, No. 6, 1277.
- [11] E. Pivovarova, A. Climova, M. Świątkowski et al., *Intern. J. Mol. Sci.* 2022, **23**, No. 17, 9844.
- [12] Ş. Demirayak, Z. Şahin, M. Ertaş et al., *J. Heterocyclic Chem.* 2019, **56**, No. 12, 3370.
- [13] R.N. Sharma, R. Ravani, *Med. Chem. Res.* 2013, **22**, 2788.
- [14] R.M. Humphries, J. Ambler, S.L. Mitchell et al., *J. Clin. Microbiol.* 2018, **56**, No. 4, 10.1128/jcm.01934-17.
- [15] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A.F. Tillack et al., *J. Chem. Inform. Modeling* 2021, **61**, No. 8, 3891.
- [16] S. Yuan, H.C.S. Chan, Z. Hu, *Wiley Interdisciplinary Rev. Computational Mol. Sci.* 2017, **7**, No. 2, e1298.
- [17] N.M. O'Boyle, M. Banck, C.A. James et al., *J. Cheminformatics* 2011, **3**, 1.
- [18] W.P. Walters, *Expert Opinion Drug Discovery* 2012, **7**, No. 2, 99.
- [19] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *Sci. Rep.* 2017, **7**, No. 1, 42717.
- [20] Y. Myung, A.G.C. de Sá, D.B. Ascher, *Nucleic Acids Res.* 2024, **52**(W1), W469.
- [21] P. Banerjee, E. Kemmler, M. Dunkel et al., *Nucleic Acids Res.* 2024, **52**(W1), W513.
- [22] C. Winder, R. Azzi, D. Wagner, *J. Hazardous Mater.* 2005, **125**, No. 1–3, 29.
- [23] S. Rahi, A. Rana, *Intern. J. Drug Regulatory Affairs* 2019, **7**, No. 4, 14.

KALENDARZ WYDARZEŃ W 2025 R.

Miesiąc	Data	Wydarzenie	Miejsce	Organizator
Lipiec	1–4.07.	Polska Konferencja Chemii Analitycznej PoKoCha 2025	Gdańsk	Politechnika Gdańska
Wrzesień	22–26.09.	67. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego	Wrocław	PTChem, Politechnika Wrocławska, Uniwersytet Wrocławski, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Grudzień	3–5.12.	Konferencja Przemysł Chemiczny 2025 Konkurs o tytuł „Inżynier Przemysłu Chemicznego” 2025	Warszawa	SITPChem