

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Dejan M. Opsenica

STEROIDNI TETRAOKSANI:
SINTEZA I BIOLOŠKA AKTIVNOST

-doktorska disertacija-

Beograd, 2002.

HEMIJSKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

Mentor:

dr Bogdan A Šolaja, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

akademik dr Miroslav J. Gašić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Ivan Juranić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Radomir Saičić, vanredni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Zorica Juranić, viši naučni saradnik
Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Temu disertacije predložio je dr Bogdan A. Šolaja, redovni profesor Hemijskog fakulteta koji je i rukovodio radom. Koristim i ovu priliku da mu se najiskrenije zahvalim na izuzetnoj podršci koju mi je pružio, na prenetom znanju i iskustvu i na ukazanom poverenju. Korisnim savetima i brojnim diskusijama pružio mi je neprocenjivu pomoć.

Posebno se zahvaljujem akademiku dr Miroslavu Gašiću i dr Radomiru Saičiću, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, na stalnom interesovanju, korisnim savetima i sugestijama kojima su mi pružali dragocenu pomoć tokom izrade i pisanja ovog rada.

Naročito se zahvaljujem dr Zorici Juranić višem naučnom saradniku Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, na izuzetnoj pomoći koju mi je pružila pri određivanju antiproliferativne aktivnosti ispitivanih jedinjenja i tumačenju dobijenih rezultata.

Zahvaljujem se dr Ivanu Juraniću redovnom profesoru Hemijskog fakulteta na korisnim sugestijama tokom pisanja ovog rada.

Svojim angažovanjem na ispitivanju antimalarijske aktivnosti, stereoelektronskim proračunima i snimanju mnogobrojnih masenih spektara, dr Wilbur K. Milhous, dr Apurba K. Bhattacharjee iz Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Washington, USA, i dr Gabriella Pocsfalvi iz Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Avellino, Italy, značajno su unapredili ovaj rad, na čemu im se naročito zahvaljujem.

Zahvaljujem se koleginicama i kolegama iz odeljenja za instrumentalnu analizu na urađenim analizama i snimljenim spektrima, kao i kolegi dr Milovanu Ivanoviću iz Centra za hemiju, IHTM, na pomoći u izvođenju eksperimenata iz kvantitativne IR spektroskopije.

Zahvaljujem se koleginicama i kolegama iz Centra za hemiju, IHTM, na pomoći i podršci koju su mi pružili tokom izrade ovog rada.

Naročito želim da se zahvalim koleginicama dr Ivani Aljančić, dr Dragani Milić, Nataši Terzić i kolegi Goranu Angelovskom na prijatnoj saradnji i ugodnoj atmosferi u laboratoriji 432.

Zahvaljujem se mojoj porodici koja mi je pružila nesebičnu podršku u toku rada i bila neiscrpni izvor nadahnuća.

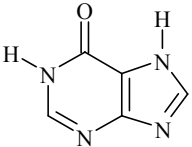
Dejan M. Opsenica

*Ovaj rad je posvećen mojoj Duški
i našim sinovima Marku i Dušanu*

SADRŽAJ

LISTA SKRAĆENICA	i
1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. Malarija	2
2.2. Artemizinin i derivati	12
2.2.1. <i>Hemijske transformacije artemizininina</i>	14
2.2.2. <i>Derivati artemizininina</i>	15
2.2.3. <i>Mehanizam delovanja</i>	23
2.3. Tetraoksani	32
2.3.1. <i>Sinteza i karakterizacija</i>	32
2.3.2. <i>Antimalarijska aktivnost</i>	36
2.3.3. <i>Mehanizam dejstva</i>	43
2.4. Citotoksičnost i antimalarijski peroksidi	44
3. NAŠI RADOVI	48
3.1. <i>bis</i> -Steroidni tetraoksani	49
3.1.1. <i>Sinteza</i>	49
3.1.2. <i>Struktura</i>	52
3.1.3. <i>Antimalarijska aktivnost</i>	55
3.1.4. <i>Antiproliferativna i citotoksična aktivnost</i>	58
3.2. Mešoviti tetraoksani	63
3.2.1. <i>Sinteza</i>	63
3.2.2. <i>Struktura</i>	68
3.2.3. <i>Antimalarijska aktivnost</i>	73
3.2.4. <i>Antiproliferativna i citotoksična aktivnost</i>	78
3.3. QSAR analiza	83
4. EKSPERIMENTALNI DEO	96
5. ZAKLJUČAK	153
5. SUMMARY	157
LITERATURA	161

Lista skraćenica i termina

apoptoza	programirana smrt ćelije izazvana spoljašnjim signalom koji aktivira metabolički put uništavanja ćelije. Karakteriše je fragmentacija i kondenzacija jedra, pojava apoptotskih tela i fragmentacija DNK.
Brazil IEC-306	soj <i>P. falciparum</i> rezistentan prema hlorokinu
BSA	<i>N,O</i> - bis(trimetilsilil)acetamid
CNS	centralni nervni sistem
CQ	hlorokin
DBNBS	natrijum-3,5-dibromo-4-nitrozobenzensulfonat
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
DIBAL	diizobutilaluminijumhidrid
DMAP	4-dimetilaminopiridin
EC ₅₀	srednja efektivna koncentracija. Koncentracija pri kojoj se u 50% slučajeva postiže maksimalni efekat.
FBS	fetalni serum govečeta
FCR3	soj <i>P. falciparum</i> rezistentan prema hlorokinu
Fem-X	ćelijska linija melanoma čoveka
FM3A	ćelijska linija raka mlečnih žlezda miševa
FP-IX	feroprotoporfirin IX
GI ₅₀	koncentracija kojom se postiže inhibicija rasta za 50%
GSH	redukovani oblik glutationa
HeLa	ćelijska linija karcinoma grlića materice
hematokriti	deo uzorka krvi koji sadrži crvena krvna zrnca, meren nakon centrifugiranja krvi
hemin	kompleks jona Fe(III) i PP-IX
Hemoglobin S	javlja se u crvenim krvnim zrnima obolelih od anemije srpastih ćelija. Oboleli od anemije srpastih ćelija su manje podložni malariji.
hipoksantin	
IC ₅₀	<i>malarija</i> : vrednost IC ₅₀ je definisana kao koncentracija supstance koja izaziva 50% inhibicije ugradnje hipoksantina. Ugradnja hipoksantina predstavlja meru sinteze DNA parazita i inhibicija ugradnje hipoksantina je direktna mera rasta parazita; <i>citotoksičnost</i> : IC ₅₀ vrednosti su definisane kao koncentracije pri kojima je inhibirano preživljavanje 50% ispitivanih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak
Indochina W2	soj <i>P. falciparum</i> rezistentan prema hlorokinu, pirimetaminu,

	sulfadoksinu i kininu, a osetljiv prema meflokinu
izozimi	strukturno i katalitički slični, ali ne i identični, enzimi koje proizvodi isti organizam
K1	soj <i>P. falciparum</i> rezistentan prema hlorokinu
K562	linija mijeloidnih ćelija leukemije; mijeloidne ćelije su maligne ćelije od kojih diferencijacijom, sazrevanjem mogu da nastanu crvena krvna zrnaca ili granulociti, makrofagi odnosno krvne pločice
kalcitriol	hormonski aktivan oblik vitamina D koji se klinički koristi kao najefikasniji lek u tretmanu psorijaze
kalmodulin	Ca ²⁺ -zavisni regulacioni protein; vrši kontrolu različitih enzima i funkcionalnih proteina
karcinom	rak koji se razvija na unutrašnjoj ili spoljašnjoj površini tela, kao što je koža, obloga gastrointestinalnog trakta, unutrašnjost krvnih sudova i pluća. Ovom tipu raka pripadaju rak dojke, rak prostate, rak pluća, rak jetre, rak kože, rak vrata i rak debelog creva. Širi se preko krvi ili limfnog sistema. Karcinom je jedan od četiri vrste raka. Drugi tipovi su: rak mišićnog i vezivnog tkiva i kostiju – sarkom; rak uobličjenih krvnih elemenata i vaskularnog tkiva – <i>limfom</i> , <i>leukemija</i> i <i>milom</i> ; rak nervnog tkiva – <i>neurom</i> , <i>gliom</i> i <i>neuroblastom</i> .
keratinociti	ćelije epiderma
LC ₅₀	koncentracija pri kojoj je 50% ispitivanih ćelija ubijeno
<i>m</i> -CPBA	<i>m</i> -hlorperbenzoeva kiselina
melanom	jedan od oblika raka kože, nastaje malignom transformacijom <i>melanocita</i> , ćelija u kojima se sintetiše pigment melanin
MQ	meflokin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
nekroza	ireverzibilna degeneracija ćelije i ćelijskih komponenti. Karakteristično je prisustvo mrtvih ćelija i neselektivna propustljivost ćelijske membrane
neoplastične ćelije	ćelije koje pripadaju tkivu koje ima abnormalno veliki rast
neuroblastom	kancer nervnog tkiva
NF54	soj <i>P. falciparum</i> osetljiv prema hlorokinu
PABA	<i>p</i> -aminobenzoeva kiselina
PBMC	skraćenica od – p eripheral b lood m ononuclear c ells. Ćelije limfocita.
PBMC + PHA	PBMC ćelije koje su stimulisane fitohemaglutinom (PHA) (phytohemaglutinine)
<i>per os</i>	oralno unošenje leka; unošenje ishranom
PP-IX	protoporfirin IX
PP-IX-DME	protoporfirin IX dimetil-estar
Py	piridin
QHS	ginghaosu, artemizinin

SD ₉₀	skraćenica od “suppression dose”. Doza potrebna za suzbijanje parazitemije za 90%
Sierra Leone D6	soj <i>P. falciparum</i> koji ima smanjenu osetljivost prema meflokinu i halofatrinu, a osetljiv prema hlorokinu i pirimetaminu
spektrin	glavna proteinska komponenta membranskog citoskeleta eritroidnih ćelija sisara i ptica; odgovoran je za održavanje normalnog oblika, jačine i stabilnosti eritrocita
subkutano	podkožno unošenje leka
TCTP	skraćenica od – t ranslationaly c ontrolled t umor p rotein
TGI	koncentracija pri kojoj je potpuno inhibiran rast ćelije
TMSCN	trimetilsilil-cijanid (Me ₃ SiCN)
TMSOTf	trimetilsilil-trifluorometansulfonat
TPP	mezo-tetrafenilporfirinil dianjon
višestruka rezistencija	neosetljivost na dejstvo više strukturno različitih lekova koja nastaje kao posledica korišćenja nekog određenog leka. U terapiji protiv raka višestruka rezistencija manifestuje se tako što neoplastične ćelije postaju rezistentne ne samo prema leku koji se koristi u terapiji, već i prema nekim drugim lekovima.
VPO	skraćenica od - v apor p ressure o smolysis

1. U V O D

Ovaj rad se sastoji iz tri dela:

- U Opštem delu dati su opšti podaci o malariji i pregled literature koja se odnosi na artemizinin i njegove derivate kao i na tetraoksanske antimalarike.
- U Našim radovima detaljno su prikazani rezultati našeg istraživanja: sinteze steroidnih tetraoksana, analiza strukture sintetisanih jedinjenja, ispitivanja njihove biološke aktivnosti (antimalarijske, antiproliferativne i citotoksične) kao i QSAR analiza.
- U Eksperimentalnom delu detaljno su opisani propisi za sintezu svih dobijenih jedinjenja, a ukratko su dati i opšti postupci za izvođenje relevantnih testiranja biološke aktivnosti.

Kao prilog ove disertacije dat je CD na kome se nalaze spektri jedinjenja sintetisanih u toku izrade disertacije kao i rezultati analiza monokristala X-zracima.

Cilj ovog rada bila je sinteza steroidnih tetraoksana izvedenih iz holne kiseline, kao i ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Poznato je da steroidi imaju veliku ulogu u najrazličitijim biološkim procesima. Smatrali smo da bi dobijanje tetraoksana holne kiseline bilo zanimljivo sa sintetske strane kao i sa stanovišta njihove potencijalne ciljane antimalarijske i antiproliferativne aktivnosti.

OPŠTI DEO

2. OPŠTI DEO

2.1. MALARIJA

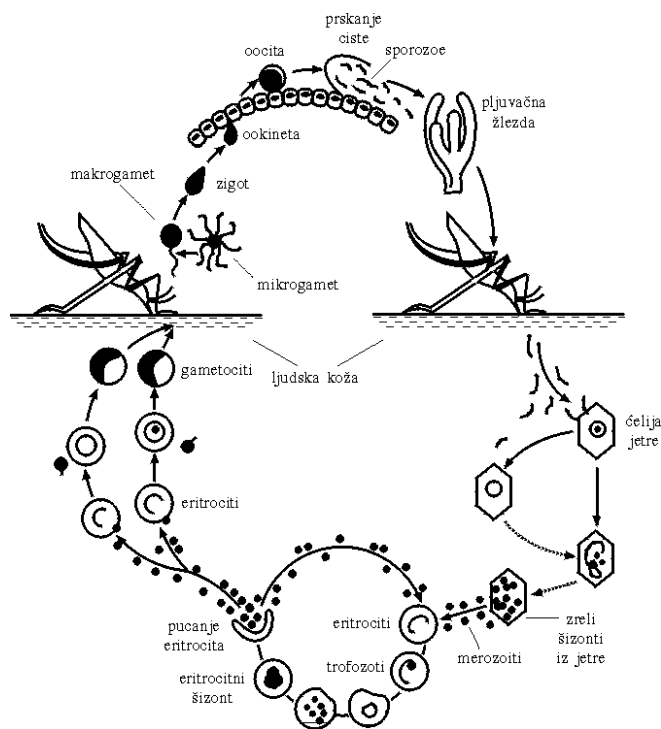
Malarija je i danas jedna od najrasprostranjenijih parazitskih bolesti na svetu. Od nje godišnje oboli 400 - 500 miliona ljudi, od kojih gotovo 2 miliona umre.¹ U 80 % slučajeva umrli pacijenti bili su zaraženi parazitom *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Nagli porast rezistencije parazita, posebno *P. falciparum*, prema lekovima, kao i porast višestruke rezistencije (multidrug resistance), problem kontrole malarije čini još izraženijim. Posebnu opasnost predstavljaju sojevi *P. falciparum* koji su rezistentni prema većini lekova, među kojima se posebno izdvajaju hlorokin-rezistentni sojevi (CQ-rezistentni sojevi) Indochina W2, Brazil IEC-306, FCR3 i K1. Zbog toga je borba protiv ove bolesti na vrhu prioriteta Svetske zdravstvene organizacije (WHO).²

Kod ljudi, malariju izazivaju 4 vrste plazmodijuma: *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium malarie* (*P. malarie*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) i *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*).³ U toku svog razvoja sva četiri parazita prolaze kroz dva ciklusa (Slika 1): **aseksualni** ciklus koji se odvija samo u pacijentu i naziva se **šizogonija** i **seksualni** ciklus koji se odvija delom u pacijentu, a delom u komarcu i naziva se **sporogonija**.³

Šizogonija: Ovaj ciklus se odvija u jetri i krvi pacijenta i karakterišu ga tri faze:

- a) **Primarna tkivna faza:** ova faza se još naziva i pre-eritrocitna ili prva egzoeritrocitna faza. Komarac u pacijenta unosi parazite, u formi *sporozoita*, koji u krvotoku ostaju oko 30 minuta, nakon čega se fiksiraju i razmnožavaju u ćelijama jetre. U jetri se paraziti preobraze u *kriptozoite*, koji se zatim izdele u mnogobrojne *merozoite* a ovi potom ulaze u krvotok.
- b) **Eritrocitna faza:** nakon ulaska u krvotok merozoiti ulaze u eritrocite i jedan broj započinje ciklus razmnožavanja. U toku eritrocitnog ciklusa parazit prolazi nekoliko stupnjeva razvoja: *mladi prstenovi* (12 sati nakon inficiranja), *zreli prstenovi* (18 sati nakon inficiranja), *rani trofozoiti* (24 sata nakon inficiranja), *zreli trofozoiti* (30 sati nakon inficiranja), *rani šizonti* (36 sati nakon inficiranja) i *zreli šizonti* (42 sata nakon inficiranja). Nakon ovih stupnjeva razvoja parazit ponovo dolazi u formu merozoita. Ali, njihov broj je jako uvećan što dovodi do prskanja eritrocita. Oslobođeni merozoiti napadaju nove eritrocite i započinju sledeću eritrocitnu fazu. Ova faza odgovara početku bolesti, a smene ciklusa u eritrocitnoj fazi su uzrok periodičnih ponavljanja malaričnih napada. Malarija započinje naglim porastom telesne temperature koji se poklapa sa prskanjem velikog broja eritrocita i oslobađanjem merozoita

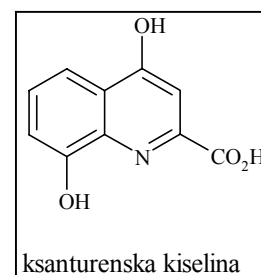
- c) *Sekundarna tkivna faza*: ova faza se još naziva i egzoeritrocitna faza i obuhvata merozoite koji su se iz krvi vratili u jetru gde se razmnožavaju prolazeći kroz fazu *metakriptozoita*, pa ponovo merozoita. Ova faza razvoja malarijskog parazita karakteristična je za vrste *P. vivax* i *P. ovale*.



Slika 1. Ciklus malarijskog parazita.

Sporogonija: Za ovaj ciklus karakteristične su dve faze:

- Prva faza se odvija u eritrocitima pacijenta. Jedan broj merozoita ne sledi opisani put šizogonije, već se transformiše u muške i ženske *gametocite*. Oni ne mogu biti oplodeni dok ne pređu u digestivni trakt komarca.
- Druga faza se odvija u komarcu. Ubodom pacijenta komarac usisa i sve forme parazita. Šizonti odmah budu svareni u želudcu. Međutim, gametociti se oslobađaju iz eritrocita i razvijaju u *gamete*, koji nakon oplodavanja stvaraju formu *zigota*. Za indukciju ovog procesa neophodna su dva stimulansa: prvi je pad temperature za 5 °C u odnosu na temperaturu pacijenta i drugi je povećanje pH sa 7,4 na 8,0 – 8,2 pomoću *ksanturenske kiseline*.⁴ Zigot se probija kroz zidove želudca sve do *supseroze* gde se pretvara u *cistu*. U cisti se razmnožavaju sporozoiti, dok ona ne prsne. Oslobođeni sporozoiti dospevaju u *hemolimfatičke* puteve i najviše se koncentrišu u pljuvačnim žlezdama. Za vreme uboda komarac inkulise sporozoite, čime započinje novi malarijski ciklus.



Da bi ušao u eritrocit parazit mora da izvrši kontrolisano i lokalizovano remećenje membrane eritrocita. Otvaranje membrane se postiže lipidima i proteazama koje parazit izbacuje na površinu membrane. Nakon ulaska u eritrocit, parazit mora da “popravi” mesto kroz koje je izvršio invaziju i da se na taj način osigura da ne bude primećen od strane “domaćina”. U toku prvih 24 sata nije primećeno da dolazi do značajnijih poremećaja membrane eritrocita. Pretpostavlja se da parazit vrši jačanje eritrocita da bi obezbedio nesmetani rast.^{5a} U toku eritrocitnog ciklusa parazit se nalazi u parazitoformnoj vakuoli (*parasitophorous vacuole*) koja se formira za vreme invazije parazita.^{5b} Membrana parazitoformne vakuole formira barijeru između plazma mebrane parazita i citoplazme eritrocita. U toku eritrocitne faze parazit luči različite proteine i transportuje ih u eritrocit.⁵ Neki od njih se zadržavaju u parazitoformnoj vakuoli a drugi nastavljaju transport do citoplazme eritrocita. Lučenje proteina je najintenzivnije u fazi trofozoita eritrocitnog ciklusa parazita. Sazrevanje intraeritrocitnog parazita praćeno je značajnim promenama u propustljivosti i vezivnim sposobnostima membrane eritrocita. Jednim delom to je posledica promene organizacije i sastava membranskih lipida. Značajne promene fizičkih karakteristika membrane eritrocita su povezane sa povećanim transportom proteina parazita prema membrani eritrocita.

Malarijski parazit razara hemoglobin u digestivnim vakuolama da bi iz proteina obezbedio slobodne aminokiseline neophodne za ishranu.⁶ Kao sporedni proizvod u tom procesu oslobađa se hem. Na pH digestivnih vakuola (pH = 5,2) gvožđe u oksidovanom hemoglobinu prelazi iz Fe(II) u Fe(III) uz istovremeno oslobađanje 0,5 ekvivalenta vodonik-peroksida.⁷ Zreli eritrociti čoveka sadrže 310-350 mg/ml hemoglobina što odgovara koncentraciji slobodnog hema od 20 mM. *P.falciparum* razgradi najmanje 75 % eritrocitnog hemoglobina za vreme intraeritrocitnog rasta. Slobodni hem se oslobađa unutar hranljivih vakuola parazita. Ukoliko bi parazit dozvolio da se slobodni hem akumulira intravakuolarni nivo hema bi dosegao koncentraciju od 300-500 mM.⁷ Toliko visoka koncentracija dovela bi do razaranja membrana parazita. Iz tog razloga parazit jedan deo hema transformiše oksidativnom polimerizacijom u *hemozoin* ili *malarijski pigment*, a jednim delom vrši neenzimatsku degradaciju hema. Procenjuje se da je na ovaj način koncentracija slobodnog hema u inficiranim eritrocitima snižena na 0,1-0,4 mM.⁷ Hemozoin je nerastvoran i nakon razaranja crvenih krvnih ćelija on se deponuje u limfoidnom tkivu, slezini, jetri, koštanoj srži i mozgu. Taramelli i saradnici utvrdili su da Fe(II)PPIX ne podleže polimerizaciji do hemozoina.⁸ Takođe, utvrdili su da Fe(II)PPIX efikasno inhibira polimerizaciju Fe(III)PPIX, čak efikasnije i od CQ. Ovi rezultati ukazuju da bi svako redukciono sredstvo sa redoks potencijalom koji je usaglašen sa redoks potencijalom Fe(II) / Fe(III) moglo izvršiti redukciju Fe(III)PPIX u Fe(II)PPIX i na taj način inhibirati sintezu hemozoina. Pogodne supstance za taj proces su različiti tioli (L-cistein, GSH) koji se već nalaze u hranljivim vakuolama parazita. U *in vitro* eksperimentima je potvrđeno da upravo te

supstance mogu učestvovati u ovim procesima. Međutim, pod *in vivo* uslovima do toga ne dolazi iz nekoliko razloga:

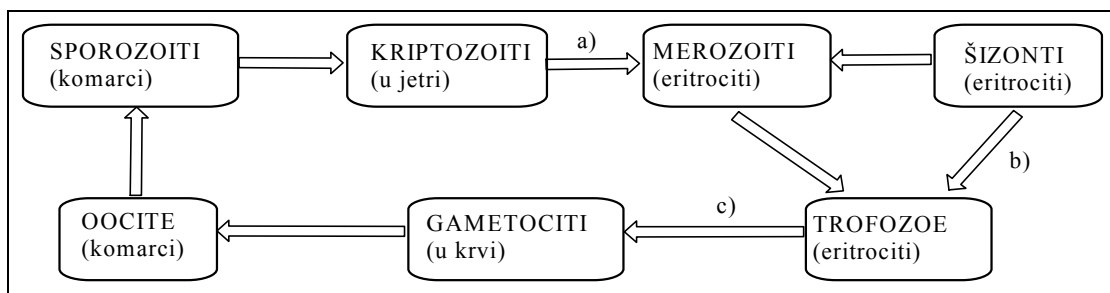
1. nedovoljna količina tiola u hranljivim vakuolama
2. opseg pH hranljivih vakuola direktno određuje stepen redukcije Fe(III) u Fe(II). Kako je redoks potencijal tiola pH zavisian, jasno je koliko pH hranljivih vakuola utiče na redukcionu sposobnost tiola
3. L-cistein i GSH u hranljivim vakuolama troše se na redukciju vodonik-peroksida i kiseoničnih radikala koji nastaju u toku katabolizma hemoglobina.

Količina L-cisteina i GSH u hranljivim vakuolama predstavlja dvosekli mač za parazit malarije. On mora da održava dovoljno visoku koncentraciju ovih supstanci da bi obezbedio redukciju vodonik-peroksida i kiseoničnih radikala. Sa druge strane ukoliko ih ima previše oni mogu izvršiti redukciju Fe(III)PPIX u Fe(II)PPIX i time inhibirati sintezu hemozoina što bi dovelo do smrti parazita.

Malariju prenose komarci roda *Anopheles*. Poznato je preko 150 vrsta ovih komaraca, od kojih samo 50 imaju značaj za epidemiologiju malarije.³

Između različitih oblika malarije, posebno je opasna **cerebralna malarija** koju izaziva *P. falciparum*. Glavne manifestacije su promene u mentalnom stanju pacijenta i koma. Bolest je akutna, zahvata značajan deo mozga, praćena je visokom telesnom temperaturom i nastupa kada je zahvaćeno više od 5% eritrocita. Ukoliko pacijent nije pod terapijom, bolest je fatalna u periodu 24-72 sata. Smrtnost se kreće u granicama 25-50%. Veliki problem u lečenju cerebralne malarije je izuzetna sposobnost plazmodijuma da razvije ukrštenu rezistentnost (cross-resistance). Pojam "ukrštena rezistentnost" definiše pojavu da neki mikroorganizam (u ovom slučaju plazmodijum) koji pokazuje rezistentnost prema određenom leku, takođe može biti rezistentan i prema drugim lekovima koji imaju zajednički mehanizam delovanja ili se vezuju za isti receptor.⁹ Takav odnos, uglavnom, postoji između lekova koji imaju sličnu hemijsku strukturu, ali su poznati drugi primeri. Kada je u pitanju malarija, to bi značilo da CQ-rezistentan soj *P. falciparum* koji već pokazuje rezistentnost prema CQ pokazuje rezistentnost i prema pirimetaminu i kininu.

Na Slici 2 prikazan je pojednostavljen ciklus malarijskog parazita i mesta dejstva nekih lekova koji se koriste u lečenju i kontrolisanju malarije.¹⁰

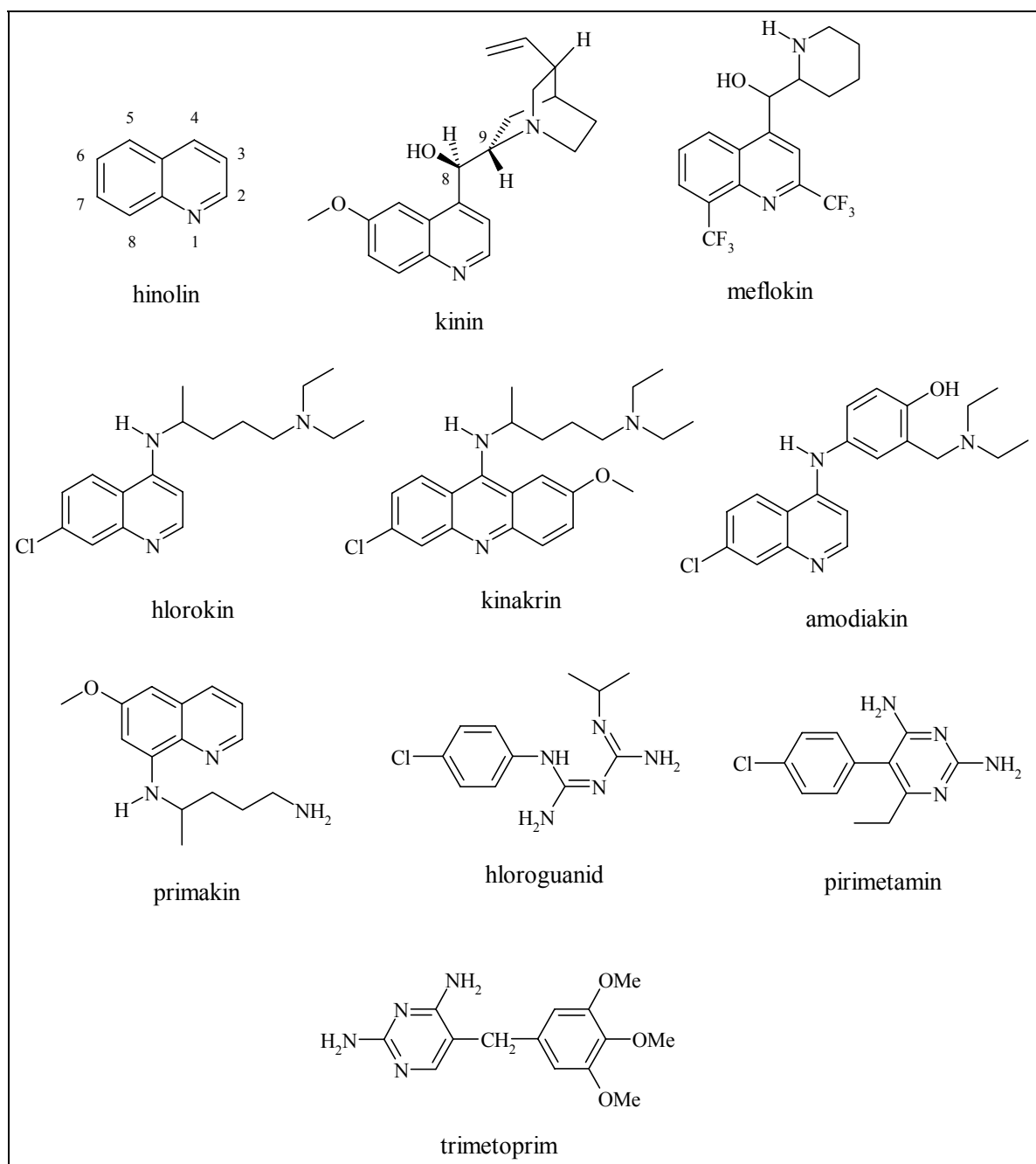


Slika 2: Mesto delovanja: a) hloroguanida, hlorokina, primakina i pirametamina, b) hlorokina, meflokina i kinina, c) hlorokina, primakina i kinina.

Antimalarici se mogu podeliti, prema mestu delovanja na

1. **primarne tkivne šizonticide:** ovi lekovi deluju na forme parazita koje se nalaze u jetri neposredno posle infekcije. Predstavnik ove grupe lekova je primakin
2. **krvne šizonticide:** ovi lekovi deluju na forme parazita koje se nalaze u eritrocitima. Ovoj grupi pripadaju kinin, meflokin, hlorokin i amodiakin
3. **gametocide:** ovi lekovi sprečavaju infekciju komaraca, a time i dalje širenje bolesti, uništavanjem gameta u krvi. Predstavnik ove grupe je primakin
4. **sekundarne tkivne šizonticide:** ovi lekovi koriste se u lečenju hronične povratne groznice koja se javlja usled infekcije parazitima *P. vivax* i *P. ovale*. Predstavnik ove grupe je primakin
5. **sporonticide:** ovi lekovi sprečavaju sporogoniju i razmnožavanje parazita u komarcima. Ovoj grupi pripadaju hloroguanid i pirimetamin.

Na Slici 3 prikazani su lekovi koji se koriste u lečenju od malarije.



Slika 3

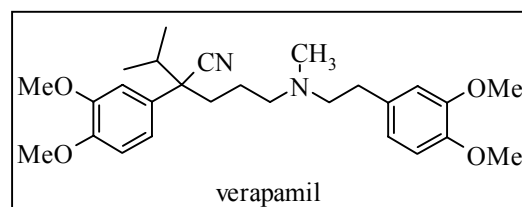
Kao što se na slici može videti većina preparata su supstituisani derivati hinolina i prema strukturnim karakteristikama mogu se podeliti u 3 grupe:

A. Prvu grupu čine 4-aminoalkoholi i glavni predstavnici su *kinin* i *meflokin (MQ)*. Kinin (8*S*, 9*R*) je najstariji preparat koji se koristi za lečenje od malarije i u upotrebi je preko 300 godina. U skorije vreme je utvrđeno da je njegov diastereomer *kinidin* (8*R*, 9*S*) 2,3 i 2,8 puta *in vitro* aktivniji od kinina prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2, kao i da je aktivniji prema još nekim CQ-osetljivim i CQ rezistentnim *P. falciparum* sojevima u *in vitro*, *in vivo* i kliničkim ispitivanjima.^{11a} Meflokin je *eritro*-izomer i utvrđeno je da je njegov (+)-izomer aktivniji prema D6 soju (oko 2 puta) i W2 soju (oko 1,5 put) od (-)-izomera. Međutim, interesantno je da je njihova racemska smesa aktivnija od

oba izomera pojedinačno prema W2 soju. Enantiomeri meflokina ne pokazuju različitu antimalarijsku aktivnost prema nekim drugim *P. falciparum* sojevima. Takođe, pokazano je da je *treo*-izomer meflokina, WR 177602, aktivniji od meflokina, i to pojedinačni izomeri, kao i racemska smeša prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2.^{11a} Pretpostavljeno je da kinin i kinidin pokazuju takvu razliku u aktivnosti zbog njihove karakteristične hinolinske strukture i prisustva rigidnog bicikličnog sistema u bočnom nizu. Dalje, pretpostavljeno je da razlika u aktivnosti prema D6 i W2 koju pokazuju enantiomeri meflokin i WR 177602 takođe posledica njihove hinolinske strukture, a da je odsustvo razlike u aktivnosti prema drugim *P. falciparum* sojevima posledica toga što, u odnosu na kinin i kinidin, poseduju fleksibilniji bočni niz. Ostali sintetički derivati iz ove grupe ne pokazuju različitu aktivnost njihovih enantiomera – odnosno oba enantiomera su jednako aktivni. Smatra se da kinin i meflokin svoje antimalarijsko dejstvo iskazuju dominantno preko interakcije sa hemom ili hemozoinom u digestivnim vakuolama parazita. Oni grade vrlo stabilne π -komplekse sa hemom (hemozoinom) koji inhibiraju dalji rast parazita. Oba leka imaju i veliki afinitet prema ćelijskim membranama. Uočeno je da kinin smanjuje aktivnost mnogih enzimskih sistema, tako da je u prošlosti bio opisivao kao “opšti protoplazmatični otrov”. Za razliku od MQ, kinin može da gradi vodonične veze sa DNK i da na taj način inhibira replikaciju DNK i transkripciju RNK. Novija istraživanja ukazuju da MQ ima 3 moguća mehanizma delovanja: 1) građenje toksičnog kompleksa sa hemom, 2) Podizanje pH i 3) interakcija sa membranskim fosfolipidima.^{11b} Kinin ne može da spreči infekciju, ali intravenoznom administracijom može da ublaži simptome i uspostavi kontrolu akutnih napada CQ-rezistentnih *P. falciparum* sojeva. Meflokin je prilikom oralne administracije aktivan prema mnogim CQ-rezistentnim *P. falciparum* sojevima, ali ne i prema svima. Oba leka su krvni šizonticidi i nemaju efekat na cikluse parazita koji se odvijaju u jetri. Zbog toga i nisu efikasni protiv *P. vivax* i *P. ovale*. Ne pokazuje gametocidni i sporonticidni efekat prema *P. falciparum*.

B. Drugu grupu čine 4-diaminoalkil- supstituisani hinolini i u njoj se nalaze *hlorokin (CQ)*, *kinakrin*, *amodiakin* i *primakin*. U slučaju hlorokina, D- i L- izomeri pokazuju jednaku aktivnost, ali je D-izomer nešto manje toksičan. Najnovija istraživanja ukazuju da CQ ima nekoliko načina delovanja i da je mehanizam delovanja mnogo složeniji nego što se to ranije mislilo. Prvi način manifestuje se u sprečavanju replikacije DNA ili njene transkripcije u RNA formiranjem kompleksa sa DNA. Hinolinski prsten se umeće između parova baza, tako da se Cl-atom u položaju 7 nađe blizu 2-amino grupe guanina u guanin-citozin paru. Aminoalkil bočni niz orijentiše se tako da formira jonsku interakciju sa fosfatnim grupama koje se nalaze u sklopu DNA heliksa. Drugi način delovanja manifestuje se inhibicijom sinteze hemozoina i inhibicijom degradacije FP-IX.^{7, 12, 13} CQ gradi kompleks sa slobodnim FP-IX i tako blokira dalju transformaciju hema u hemozin. Treći

način delovanja zasniva se na sposobnosti da izvrši puferizaciju unutrašnjeg prostora lizozoma i endozoma. Za infekciju ćelija sisara neophodno je da se prethodno snizi pH unutar ovih organela od strane nekog mikroorganizma. Puferizacija tih sredina onemogućava infekciju. Svi 4-amino derivati hinolina su krvni šizonticidi. Nemaju efekat na sekundarnu tkivnu šizogoniju, pa nisu efikasni prema *P. vivax* i *P. ovale*. Takođe, ne pokazuju dejstvo prema gametocitima i sporozoitima *P. falciparum-a*. Efikasno sprečavaju sve oblike malarije, osim onih koje izazivaju neki sojevi *P. falciparum-a*. Verapamil ima jako izražen sinergični efekat sa hlorokinom i u njegovom prisustvu značajno raste aktivnost CQ prema W2 i Brazil IEC-306.¹⁴ Sinergički efekat je toliko izražen da je IC₅₀ CQ prema ova dva soja spuštена na nivo aktivnosti prema D6. Istovremeno, korišćenjem istih koncentracija verapamila, aktivnost CQ prema D6 ostaje nepromenjena.



Aktivnost hlorokina zavisi od toga da li se u dovoljnoj količini akumulira u parazitu. Sva istraživanja koja ispituju mehanizam rezistencije nekih sojeva parazita zasnivaju se na ispitivanju mehanizma kojim se parazit oslobađa CQ ili kojim se CQ transportuje u parazit.¹⁵ Mehanizam rezistencije još uvek nije potpuno utvrđen, ali postoji nekoliko pretpostavki. Utvrđeno je da CQ-rezistentni *P. berghei* sojevi sadrže veću količinu GSH i povećanu aktivnost glutation-transferaze, u odnosu na osetljive sojeve.^{15a} Pretpostavlja se da je to povezano sa rezistencijom ovih sojeva prema CQ i procesom detoksifikacije parazita. Reakcija GSH sa halogenovanim aromatičnim jedinjenjima je uobičajeni mehanizam detoksifikacije i nastali polarni proizvodi se znatno lakše transportuju iz ćelije. Prema drugoj pretpostavci, mehanizam rezistencije je zasnovan na diferencijalnoj stimulaciji Na⁺ / H⁺ izmenjivača (NHE) kod parazita.^{15b} Utvrđeno je da je prodiranje CQ unutar parazita kompetitivno inhibirano specifičnim inhibitorima NHE, što praktično znači da se lek transportuje kroz NHE. Utvrđeno je da CQ vrši stimulaciju NHE CQ-osetljivih parazita. Suprotno, NHE CQ-rezistentnih parazita ne transportuje CQ i on je neosetljiv prema CQ. Pretpostavlja se da se smanjivanje rezistencije prema CQ u prisustvu verapamila odvija modifikacijom aktivnosti NHE parazita preko Ca²⁺ / kalmodulin zavisnog mehanizma. Velika specifičnost CQ prema malarijskom parazitu obrazložena je činjenicom da NHE sisara nije sposoban za transport CQ. Stvaranje kompleksa CQ sa slobodnim FP-IX, odnosno hemom, dodatno pojačava specifičnost CQ prema parazitu i izaziva njegovu smrt. Sa druge strane Bray iznosi pretpostavku da se glavni uzrok rezistencije krije na mestima stvaranja FP-IX i da se tu istovremeno remeti mehanizam stvaranja kompleksa CQ / FP-IX.^{15b} Odnosno, da je smanjena mogućnost građenja kompleksa CQ / FP-IX glavni uzrok rezistencije prema CQ. I na kraju, pretpostavlja se da razlog rezistencije prema CQ leži u smanjenoj sposobnosti hranljivih vakuola CQ-rezistentnih sojeva da izvrše protonovanje

hlorokina. Zbog toga hlorokin ostaje u baznom obliku koga se parazit lakše oslobađa zbog olakšanog transporta kroz ćelijsku membranu.^{15a}

Primakin pripada grupi 8-amino hinolinskih derivata i za razliku od 4-amino derivata, ne inhibira replikaciju i transkripciju DNK. Hinolin-hinon intermedijeri koji nastaju iz primakina mogu se ponašati kao oksidaciona sredstva. 8-aminohinolini deluju u egzoeritrocitnoj fazi i praktično nemaju nikakav efekat na eritrocitnu fazu. Primakin deluje kao “tkivni šizonticid”.

C. Treću grupu čine antifoli i u njoj su *hloroguanid*, *pirimetamin* i *trimetoprim*. Sva tri preparata su efikasni šizonticidi. Sam hloroguanid nije lek, već njegov triazinski derivat *cikloguanil*. Selektivna toksičnost ova tri leka zasniva se na činjenici da plazmodijum, za razliku od sisara i mnogih drugih životinja, nije izgubio enzim koji je neophodan za sintezu folne kiseline iz *p*-aminobenzoeve kiseline, glutaminske kiseline i pteridina. Svojim dejstvom ovi preparati stvaraju deficit tetrahidrofolata, što uzrokuje inhibiciju deobe ćelija parazita. Kada se svaki od ova tri leka kombinuje sa sulfonamidima ili sulfonima dolazi do sekvencijalne blokade sinteze folne kiseline na dva mesta metaboličkog puta.¹⁰ Različite kombinacije kao što su pirimetamin i kinin, ili pirimetamin i sulfadoksin pokazale su efikasnost, ali rezistentnost plazmodijuma se razvija izuzetno brzo. Zato se preporučuje njihovo korišćenje samo protiv CQ-rezistentnih sojeva. Međutim, sojevi koju pokazuju rezistentnost prema pirimetaminu obično su rezistentni i prema CQ.

Već je rečeno da je u toku intraeritrocitne faze parazit prinuđen da izvrši izvesne rekonstrukcije strukture eritrocita, pa i izvesna oštećenja, radi uspešnog razmnožavanja. Sa druge strane, ukoliko bi oštećenja eritrocita prešla neku granicu došlo bi do preranog uništavanja eritrocita što bi bilo fatalno po sam parazit, jer nedovoljno zreo parazit ne može da opstane. Tako, može se reći, da parazit sve vreme održava osetljivu ravnotežu između oštećenja eritrocita i njegovog održavanja u životu. Postoje brojni dokazi koji govore o tome da u tim procesima parazit vrši oksidativna oštećenja eritrocita. Utvrđeno je da mnogi lekovi koji imaju karakteristike oksidoredukcionih agenasa imaju značajno antimalarijsko dejstvo.¹⁶ Osetljivost inficiranog eritrocita prema ovakvim lekovima posledica je i prisutnih oštećenja koja su izazvana oksidansima koje proizvodi parazit i usled razaranja odbrambenog mehanizma od oksidanasa. Eritrociti miševa zaraženih sa *P. berghei* imaju povišenu količinu methemoglobina što je povezano sa povećanom količinom slobodnog H₂O₂. U krvi obolelih od *P. falciparum* zabeleženo je 7 puta više kiseoničnih radikala nego kod zdravih. Povećana oksidacija koju izaziva prisustvo parazita nije ograničeno samo na hemoglobin. Kod eritrocita zaraženih sa *P. falciparum* i *P. berghei* utvrđena je povećana peroksidacija lipida. Parazit *P. vinckei* ima povećanu količinu polinezasićenih masnih kiselina, koje mogu lako da se oksiduju, i plazma membrana parazita je podložnija oksidacionim procesima od

membrana eritrocita. Dijeta bogata polinezasićenim masnim kiselinama sprečava infekciju od *P. berghei*, dok vitamin E poništava njihov efekat. Miševi koji imaju deficit vitamina E otporniji su prema malariji. Inače, deficit vitamina E ima za posledicu da je ćelija mnogo osetljivija prema peroksidaciji lipida membrana i peroksidnoj hemolizi. Rezistentnost prema malariji direktno se povezuje sa ranom hemolizom eritrocita izazvanom oksidansima koji potiču od parazita, što ima za posledicu smrt parazita. Neki od oksidanasa se proizvode u toku katabolizma hemoglobina od strane parazita. Metabolizam parazita malarije proizvodi aktivirani kiseonik i sam plazmodijum poseduje enzime koji ovakav kiseonik redukuju do vodonik-peroksida. Osim oksidativnih oštećenja eritrocita, parazit uzrokuje i remećenje odbrambenog mehanizma eritrocita prema oksido-redukcionim agensima. Kod nekih miševa koji su zaraženi sa *P. berghei* postoji potpuni nedostatak superoksid dismutaze (SOD), enzima koji je odgovoran za redukciju "superoksida" do vodonik-peroksida. Napredak parazitemije je direktno praćen opadanjem aktivnosti katalaze, glutation-peroksidaze, NADPH: citohrom c reduktaze. Enzim glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PD) je najvažniji deo odbrambenog mehanizma eritrocita protiv oksidacionih agenasa. Ovaj enzim je neophodan za redukciju NADP do NADPH, koji je sa druge strane odgovoran za zadržavanje glutationa u redukovanom obliku – GSH. Kod mnogih vrsta plazmodijuma nije zabeležena aktivnost ovog enzima. Bez obzira što je kod inficiranih eritrocita zabeleženo da je enzim odgovoran za sintezu G-6-PD 25 puta aktivniji, nego kod zdravog eritrocita, sama G-6-PD nije u toj meri aktivna. Razlog leži u činjenici da plazmodijumi koriste G-6-PD za redukciju NADP u NADPH za svoje potrebe, ostavljajući eritrocite bez adekvatne zaštite. To je posledica toga što glutation reduktaza plazmodijuma ima veći afinitet prema NADPH nego glutation reduktaza eritrocita.

Mnoge nasledne nepravilnosti, koje su česte kod ljudi, mogu izazvati delimičnu zaštitu od razvoja malarije, tako što su uzrok neobično velikoj osetljivosti eritrocita prema oksidacionim agensima. Upečatljiv primer je manjak G-6-PD u eritrocitima. Gen za G-6-PD je X-vezan tako da je manjak vezan za muškarce. Posledica toga je da eritrocit postaje ekstremno osetljiv na dejstvo spoljnih oksidanasa. Ima i drugih primera naslednih nepravilnosti koje deluju zaštitno protiv malarije, delimično i kroz povećanje osetljivosti eritrocita prema oksidansima, kao što su:

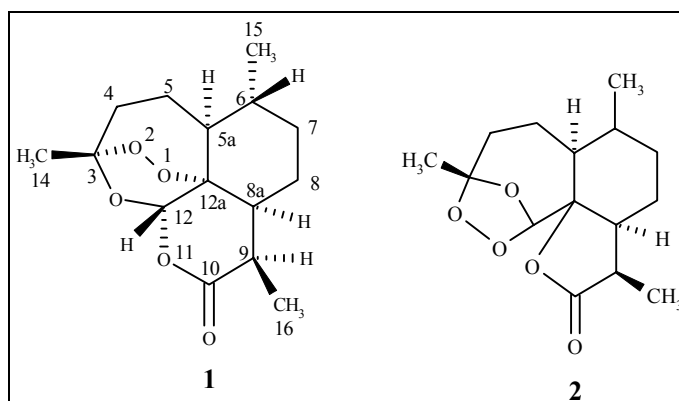
1. heterozigotnost hemoglobina S;
2. talasemija. Talasemija je uzrokovana neuravnoteženim stvaranjem α - i β - lanaca kao posledice mutacija gena. Mutacija α -gena smanjuje proizvodnju α -lanaca i kao posledica nastaje α -talasemija. Mutacijom β -gena opada proizvodnja β -lanaca i kao posledica nastaje β -talasemija koja je opasnija i često smrtonosna. Oboleli od talasemije su posebno rezistentni prema malariji;
3. nasledna otpornost fetalnog hemoglobina;
4. hemoglobin E.

Praktično u svim ovim slučajevima membrane eritrocita su neuobičajeno osjetljive prema spontanoj ili indukovanoj oksidaciji. Eritrociti sa hemoglobinom S imaju smanjenu aktivnost GSH peroksidaze i katalaze. Eritrociti sa hemoglobinom S i oboleli od talasemije imaju povećanu oksidaciju tiola membranskih proteina, i snižen nivo GSH i α -tokoferola. Takođe, ekstracelularne supstance koje se mogu ponašati kao oksidansi mogu imati važnu ulogu u zaštiti od malarije preko eritrocita koji više nemaju tako efikasnu zaštitu od oksidanasa (videti u poglavljima 2.2 i 2.3.).

Plazmodium se najbolje razvija u atmosferi siromašnoj kiseonikom. Povećanje količine kiseonika je otrovno po parazit i deluje sinergično sa nekim antimalarijskim lekovima kao što su ketokonazol ili antibiotici oksitetraciklin, hlortetraciklin, minociklin ili 8-hidroksi-5-metil-hinolin. Postoji dosta dokaza da mnogi oksidacioni antimalarici stupaju u interakciju sa aktivnim gvožđem. Razni helatni agensi, sposobni da se koordinuju sa gvožđem imaju vrlo jako antagonističko dejstvo.

2.2. ARTEMIZININ I DERIVATI

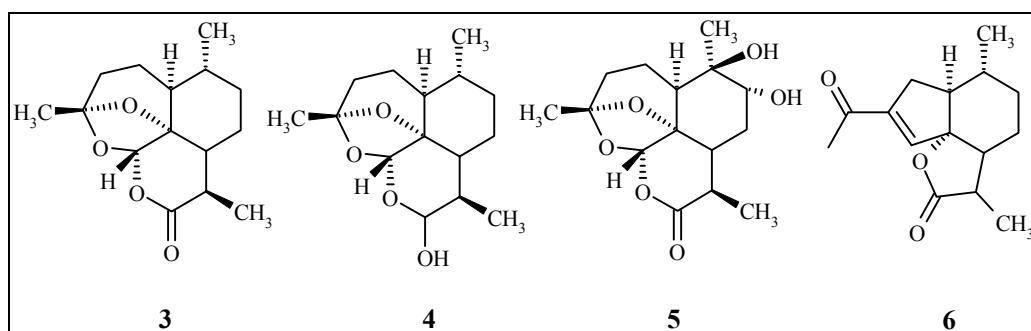
Biljka *Artemisia annua L.* se već vekovima koristi u kineskoj tradicionalnoj medicini. Prvi zapisi u kojima se pominje potiču iz 168. g. p.n.e. U zapisu iz 340 g. n.e., u delu pod nazivom “Priručnik recepata za hitnu pomoć” prvi put se pominje ekstrakt ove biljke kao lek protiv groznice. Autor Ben Cao Gang Mu, prvi put, 1596. godine pominje upotrebu ekstrakta ove biljke u lečenju malarije.¹⁷ Sistematskim ispitivanjem, izolovana je aktivna supstanca **1**, seskviterpenski lakton sa endoperoksidnom funkcijom i nazvana je **artemizinin** (*QHS*, *ginghaosu*). Stefanović je sa saradnicima prvi izolovao artemizinin, ali na žalost pripisana mu je pogrešna struktura **2**.¹⁸ Artemizinin je slabo rastvoran u vodi i ulju, a dobro je rastvoran u većini aprotičnih rastvarača. Pokazuje visoku termičku stabilnost, ali se raspada u protičnim rastvaračima.



Testiranja artemizinina na različite vrste plazmodijuma pokazala su da je on veoma efikasan i da istovremeno veoma brzo deluje. Kod miševa koji su zaraženi sa *P.berghei* nestanak parazita je postignut oralnom administracijom, dozom od 50 mg / kg telesne težine dnevno, u roku od 3 dana.¹⁷

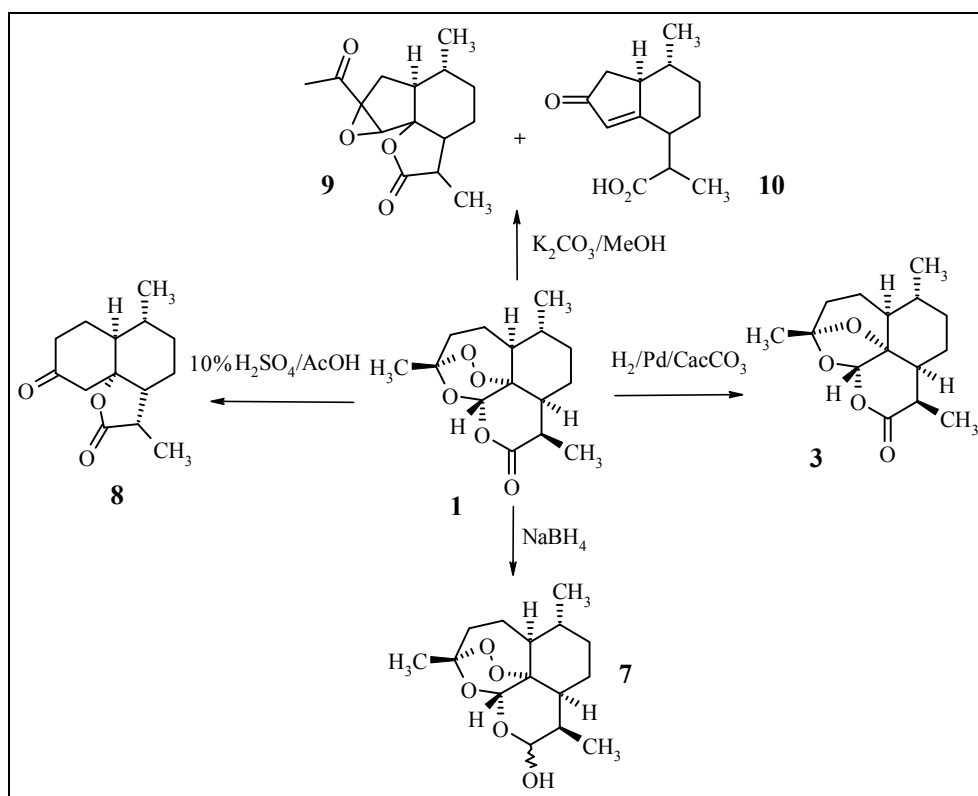
Međutim, kasnije se pokazalo da se bolji efekat postiže ukoliko se daje intramuskularno kao uljana suspenzija, i da su tada rezultati uporedivi sa rezultatima koje pokazuje CQ. Utvrđeno je da **1** praktično nema nikakvo dejstvo na egzoeritrocitne faze ciklusa parazita, već da je najaktivniji prema intraeritrocitnim formama parazita. Prilikom testiranja **1** u kliničkim uslovima pokazani su vrlo dobri rezultati. Pod tim se podrazumeva da je kod gotovo svih pacijenata postignuto vraćanje normalne telesne temperature u toku 72 sata i eliminacija aseksualnih formi parazita u krvi 120 sati nakon početka lečenja.¹⁷ U toku ispitivanja optimalnih načina administracije leka utvrđeno je da su za različite vrste parazita optimalni različiti načini administracije leka. Ispitivane su 4 vrste formulacija: tablete, uljani rastvor, uljana suspenzija i vodena suspenzija. Osim tableta, ostale formulacije su davane intramuskularno injekcijama. Redosled kojim je postignuto normalizovanje telesne temperature i nestanak parazita *P. vivax* je: tablete > uljani rastvor > uljana suspenzija > vodena suspenzija. Procenat povraćaja bolesti, u prvom mesecu je 31%, 19%, 13% i 9% redom. Kod pacijenata zaraženih *P. falciparum*-om uljani rastvor je pokazao najbrže dejstvo. Povraćaj bolesti u toku prvog meseca je bio 25%, u slučaju uljane suspenzije 10% dok je u slučaju tableta povraćaj bio 85%. Najupečatljiviji rezultati su dobijeni prilikom lečenja cerebralne malarije. Izlečenje je postignuto kod 90% pacijenata. Povratak iz kome je postignut nakon 21 sata uzimanja uljane suspenzije. Na žalost, bolest se u toku mesec dana vraća u izuzetno visokom procentu. Miševima zaraženim sa *P. berghei*, artemizinin je davan oralno i vršene su analize uzoraka krvi. Nakon 8 časova trofozoiti počinju da pokazuju morfološke promene kao što su oticanje i spiralne deformacije membrane hranljive vakuole. Nakon 12-14 časova većina trofozoita ima uvrnute hranljive vakuole i uvrtnanje spoljnih membrana mitohondrija i jedra. Nakon 20-24 časa trofozoiti pokazuju opštu degeneraciju unutrašnje strukture. Kada se CQ-osetljivi sojevi *P. falciparum* tretiraju *in vitro* pomoću **1**, uočene su slične morfološke promene. Utvrđeno je da **1** nema efekat na metabolizam folne kiseline parazita.

Ekstrakcijom etil-acetatom urina pacijenata kojima je **1** davan oralno, izolovana su 4 metabolita: dezoksiartemizinin **3**, dihidrodezoksiartemizinin **4**, 6,7-dihidroksidezoksiartemizinin **5** i tzv. *Kristal-7* **6**.^{17, 19} Zajedničko za sva tri metabolita je da ne poseduju peroksidnu funkciju i da istovremeno ne pokazuju antimalarijsku aktivnost. Na osnovu toga, zaključeno je da je za antimalarijsku aktivnost **1** presudno prisustvo peroksidne grupe.



2.2.1. Hemijske transformacije artemizina

Katalitičkom hidrogenizacijom **1** na Pd/CaCO₃ dobija se dezoksiartemizinin **3** (Shema 1). Kada se redukcija vrši natrijum-borhidridom, peroksidna grupa ostaje nedirnuta već se lakton transformiše u laktol, odnosno hemiacetal **7** – dihidroartemizinin. Artemizinin je osetljiv na dejstvo kiselina i baza. Tako, izlaganjem **1** na sobnoj temperaturi 10% rastvoru sumporne kiseline u sirćetnoj kiselini dolazi do razaranja peroksidne grupe, gubitka molekula formaldehida, i nastaje proizvod **8**.¹⁹ Jedinjenje **1** na sobnoj temperaturi u metanolu u prisustvu kalijum-karbonata stupa u složenije kondenzacione reakcije. Iz smeše su izolovana samo dva proizvoda, **9** i **10**, oba u malom prinosu.



Shema 1

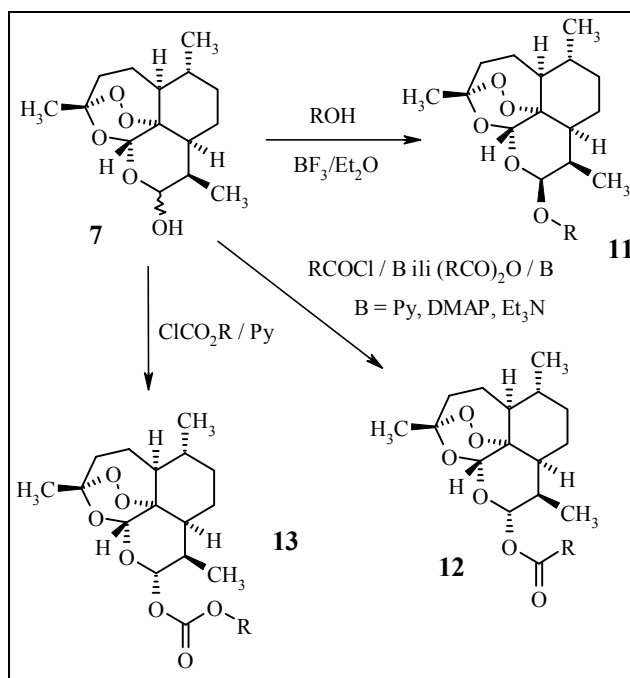
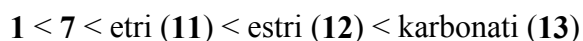
Prisustvo peroksidne funkcije je neophodno za ispoljavanje antimalarijske aktivnosti. Svi ne-peroksidni metaboliti, kao i neki drugi seskviterpeni izolovani iz *A. Annua*, koji ne poseduju peroksidnu funkciju, ne pokazuju antimalarijsku aktivnost.¹⁹ Dihidroartemizinin **7** kod koga je zadržana peroksidna funkcija, a lakton transformisan u hemiacetal, pokazuje veću aktivnost od **1** (Tabela 1), što ukazuje da δ -lakton nije sastavni deo farmakofore. Sistematična istraživanja veze između strukture i aktivnosti pokazala su da je za biološku aktivnost neophodno prisustvo karakterističnog trioksanskog sistema. Analizom modela može se uočiti amfifilna struktura **1**. Sa jedne strane molekula nalazi se 5 kiseonikovih atoma što obezbeđuje polarnost te strane, dok se sa

druge strane nalazi nepolarni ugljovodonični skelet. Smatra se da je ovakva struktura artemizinina ključni faktor koji obezbeđuje njegov lak prolazak kroz različite biomembrane.¹⁹

2.2.2. Derivati artemizinina

U ovom delu rada biće prikazani specifični derivati artemizinina i njihove antimalarijske aktivnosti.

Tri klase jedinjenja su dobijene derivatizacijom jedinjenja **7**. To su etri tipa **11**, estri karboksilnih kiselina tipa **12** i karbonati tipa **13** (Shema 2).^{17, 19} Antimalarijske aktivnosti najvažnijih derivata date su u Tabelama 1 i 2. Antimalarijska aktivnost ovih derivata menja se prema sledećem redosledu:

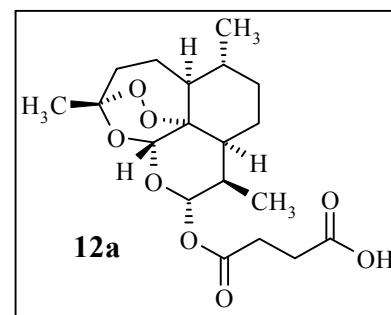


Shema 2

Etri se dobijaju reakcijom **7** i odgovarajućeg alkohola u prisustvu BF₃ / Et₂O. Dominantno se dobijaju proizvodi β-konfiguracije.¹⁹ Etri su više rastvorni u ulju od artemizinina i pokazuju bolje farmakokinetičke osobine. Od 32 sintetisana etra, među kojima se nalazi i 13 epimernih parova, dva su pokazala najbolje karakteristike – artemetar **11a** i arteetar **11b**, od kojih je **11a** odabran za klinička ispitivanja i danas je već našao primenu kao jedan od najefikasnijih lekova protiv cerebralne malarije. Kao što se iz Tabela 1 i 2 može videti, oba proizvoda su aktivnija od **1**, a pokazuju aktivnost vrlo blisku jedinjenju **7**.

Estri **12** se dobijaju na dva načina: preko acil-hlorida ili preko anhidrida karboksilnih kiselina u prisustvu pogodne baze, najčešće piridina ili DMAP-a. U oba slučaja dobijaju se proizvodi α-konfiguracije. Većina estara pokazuje bolju aktivnost od **7** (Tabela 1).¹⁹ Proizvod **12a**,

monoestar ćilibarne kiseline, odnosno odgovarajuća natrijumova so Na-artesunat, pokazuje najbolje karakteristike, i dobio je preporuke za kliničku primenu.^{17, 19} Kada se administrira intravenozno miševima zaraženim sa *P. berghei*, Na-artesunat pokazuje 5,2 puta veću aktivnost od **1**, prema CQ-rezistentnim i CQ-osetljivim sojevima *P. berghei* i uzrokuje brže nestajanje parazitemije. Posebno je aktivan prema cerebralnoj malariji. Nažalost, ovako dobre karakteristike Na-artesunata u senci su njegove niske stabilnosti u fiziološkim uslovima, jer brzo hidrolizuje do **7**.^{17, 20}



Posebnu grupu estara predstavljaju karbonati. Dobijaju se reakcijom jedinjenja **7** sa alkil-hlorformijatima u prisustvu pogodne baze, najčešće TEA ili DMAP-a. Kao i u slučaju estara karboksilnih kiselina dominantno nastaje α -proizvod.¹⁹ Bez obzira što karbonatni derivati tipa **13** pokazuju bolju *in vivo* aktivnost u odnosu na derivate **11** i **12** (Tabela 1), oni nisu klinički ispitivani, što je objašnjeno problemima u njihovoj sintezi.¹⁹

Tabela 1: Vrednosti *in vivo* antimalarijske aktivnosti nekih derivata **11**, **12** i **13** prema CQ rezistentnim sojevima *P. berghei*

Jedinjenje	R	SD ₉₀ (mg/kg) ^a
		<i>P. berghei</i>
11a	CH ₃	1,02
11b	CH ₃ CH ₂	1,95
12b	CH ₃	1,20
12c	CH ₃ CH ₂	0,66
12d	Ph	0,48
13a	CH ₃	0,78
13b	CH ₃ CH ₂	0,63
13c	CH ₃ CH ₂ CH ₂	0,50
1	-	6,20
7	-	3,65

^a Podaci iz ref. 19. Jedinjenja su administrirana intramuskularno miševima kao rastvor u biljnom ulju.

Tabela 2: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti derivata **11a**, **1** i **7**.

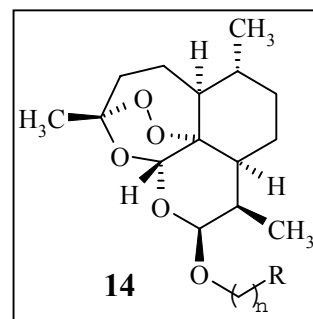
Jedinjenje	IC ₅₀ (ng / ml) ^a	
	D6	W2
11a	0,87 ^b	0,30 ^b
1	2,93	0,66
7	0,41	0,69

^a Podaci iz ref. 20; ^b Podaci iz ref. 22.

Uprkos visokoj efikasnosti artemizinina u lečenju malarije on pokazuje nekoliko ozbiljnih nedostataka kao što su: a) slaba rastvorljivost u vodi i uljima; b) visok stepen povraćaja bolesti,

verovatno, kao posledica vrlo kratkog poluživota u plazmi; c) slaba oralna aktivnost, osim u visokim dozama. Problemi rastvorljivosti su prevaziđeni derivatima **11a** i **12a**, ali i oni imaju kratak poluživot u plazmi. Značaj veoma dobre aktivnosti etara **11a** i **11b** umanjen je njihovom toksičnošću prema ćelijama CNS-a. Derivat **12a** je manje toksičan prema CNS-a, ali njegova laka hidroliza pod fiziološkim uslovima predstavlja značajan nedostatak.

U cilju prevazilaženja problema hidrolitičkog razlaganja kao u slučaju **12a**, A. J. Lin i saradnici su sintetisali grupu derivata tipa **14** kod kojih su supstituenti etarskom vezom vezani za skelet dihidroartemizinina, a na kraju supstituenta nalazi se karboksilna grupa.²⁰ Na taj način su istovremeno postignuta dva efekta. Prvi je da zahvaljujući etarskoj vezi ne dolazi do hidrolitičkog razlaganja

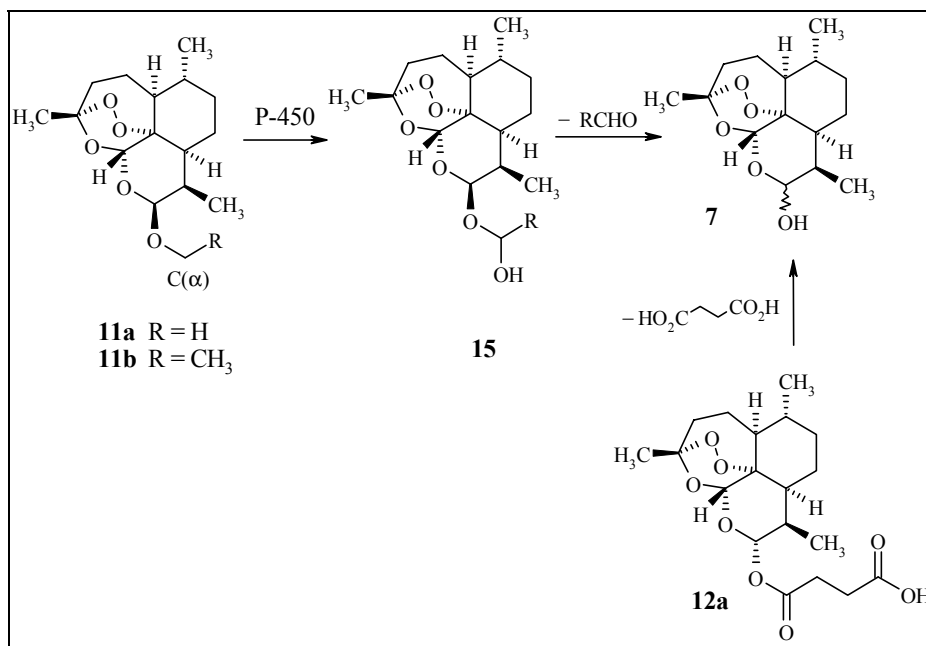


molekula, a drugi je da prisustvo karboksilne grupe povećava rastvorljivost preparata. Estri **14a** - **14d** su dobijeni istim postupkom kao i derivati **11**. Glavni kondenzacioni proizvodi imaju β -konfiguraciju, a alkalnom hidrolizom pomoću 2,5% rastvora kalijum-hidroksida u metanolu, estri su transformisani u odgovarajuće kalijumove soli **14e-14h**, koje su prevedene u odgovarajuće kiseline, **14i-14k**. Međutim, ¹H NMR spektroskopijom je utvrđeno da su kiseline nestabilne i da stajanjem dolazi do njihovog razlaganja. Verovatno dolazi do hidrolize acetalne grupe, što ukazuje da je, u ovom slučaju, prisustvo slobodne karboksilne grupe destruktivno po sam molekul. Kod svih dobijenih proizvoda ispitivane su antimalarijske aktivnosti prema D6 i W2 sojevima i odgovarajući podaci dati su u Tabeli 3. Svi derivati su aktivniji prema W2 nego prema D6. Estri **14a-14d** pokazuju aktivnost koja je gotovo jednaka aktivnosti koju imaju **1** i **7**. Aktivnost opada produženjem alkil-niza, dakle povišenjem hidrofobnosti, osim u slučaju **14d**. Kiseline i njihove kalijumove soli su приметно manje aktivne od estara. Izuzetak čine kiseline **14h** i **14k** (artelinska kiselina) koje zadržavaju visoku aktivnost. *In vivo* ispitivanja prema *P.berghei* pokazala su da je artelinska kiselina - **14k** - efikasnija u odnosu na **1** i **12a**.²⁰ Osim toga, utvrđeno je da **14k** ima duži poluživot u plazmi, u odnosu na **1** i **11a**, kao i da je manje toksična prema CNS-u. Zbog toga je artelinska kiselina **14k**, nakon svih ispitivanja, ušla u završnu fazu potpunog kliničkog ispitivanja.

Tabela 3: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti derivata **14** prema *P. falciparum*.

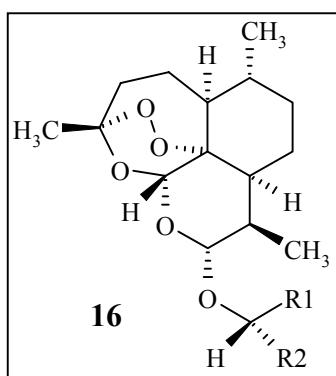
	n	R	IC ₅₀ (ng/ml)	
			D6	W2
1	-	-	2,93	0,66
7	-	-	0,41	0,69
14a	1	CO ₂ Et	0,60	0,26
14b	2	CO ₂ Me	1,84	0,64
14c	3	CO ₂ Me	3,06	0,95
14d	1	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ -CO ₂ Me	0,77	0,37
14e	1	CO ₂ K	53,79	26,23
14f	2	CO ₂ K	8,02	23,28
14g	3	CO ₂ K	75,52	10,52
14h	1	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ -CO ₂ K	1,74	0,92
14i	2	CO ₂ H	51,74	35,64
14j	3	CO ₂ H	17,90	8,04
14k	1	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ -CO ₂ H	4,07	1,38

In vivo i *in vitro* ispitivanjima je utvrđeno da dolazi do brze konverzije **11a**, **11b** i **12a** u dihidroartemizinin **7**.²² *In vivo* dealkilovanje **11a** i **11b** je verovatno rezultat delovanja citohroma P-450 (Shema 3) koji vrši hidroksilaciju C(α) atoma. Nastaje intermedijer **15**, koji se potom, eliminacijom aldehida transformiše u **7**. U slučaju jedinjenja **12a** radi se o jednostavnoj reakciji hidrolize pod fiziološkim uslovima.



Shema 3

Pretpostavlja se da su navedene transformacije uzrok kratkog poluživota ovih derivata u plazmi. Isto tako, na ovaj način je objašnjena sličnost u biohemijском ponašanju derivata **7**, **11a**, **11b** i **12a**, posebno u kontekstu njihove neurotoksičnosti. Niska neurotoksičnost i duži poluživot u plazmi derivata **14k** verovatno su posledica sporijeg dealkiranja. Iz ovih podataka sledi da bi derivati sa boljom sterom zaštitom C(α) atoma pokazivali još bolje farmakokinetičke osobine a time i višu antimalarijsku aktivnost. Radi provere ove pretpostavke sintetisani su α -alkilbenzil-etri zajedničke formule **16**.²¹ Cilj je bio da se zadrže dobre karakteristike koje pokazuje **14k** (rastvorljivost u vodi, slaba citotoksičnost, stabilnost pod fiziološkim uslovima, niska CNS-toksičnost) a da se još više



onemogućiti proces hidrosilovanja opisan u Shemi 3. Derivati **16a-16k** dobijeni su reakcijom **7** sa odgovarajućim alkoholom, a kiseline **16l-16m** hidrolizom estara pomoću 2,5% rastvora kalijum-hidroksida u metanolu. Sva jedinjenja su ispitivana prema W2 i D6 sojevima i dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4. Sva jedinjenja pokazuju veću aktivnost prema W2 nego prema D6. (*S*)-Izomeri (konfiguracija C(α) atoma alkilaril-ostatka) aktivniji su od (*R*)-izomera. Kiseline **16l-16m** su manje aktivne od odgovarajućih

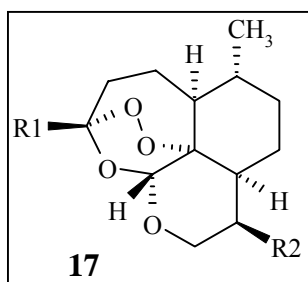
estara, što ukazuje da je lipofilni karakter ovih jedinjenja pogodniji za antimalarijsku aktivnost. Najaktivniji derivat u ovoj seriji **16i** (0,05 ng / ml prema W2 i 0,26 ng / ml prema D6) je 10, 20 i 40 puta aktivniji od **11b**, **1** i **14k** redom.

Tabela 4: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti derivata **16** prema *P. falciparum* [#]

	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (ng / ml)	
			W2	D6
1	-	-	1,02	2,30
14k	-	-	2,08	4,86
11b	-	-	0,30	0,87
16a (R)	Pr	Bz	1,92	3,05
16b (S)	Bz	Pr	0,70	0,97
16c (R)	Ph	-CO ₂ Et	0,09	0,29
16d (S)	CO ₂ Et	Ph	0,23	0,51
16e (R)	CH ₃	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ CF ₃	1,15	1,46
16f (R)	CH ₂ CO ₂ Et	Ph	0,21	0,50
16g (S)	Ph	CH ₂ CO ₂ Et	0,14	0,46
16h (R)	CH ₂ CO ₂ Et	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ NO ₂	0,23	0,56
16i (S)	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ NO ₂	CH ₂ CO ₂ Et	0,05	0,25
16j (R)	CH ₃	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ CO ₂ Me	0,34	0,92
16k (S)	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ CO ₂ Me	CH ₃	0,34	0,69
16l (R)	CH ₃	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ CO ₂ H	2,54	5,77
16l (S)	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ CO ₂ H	CH ₃	1,23	2,94
16m (R)	CH ₂ CO ₂ H	- <i>p</i> -C ₆ H ₄ NO ₂	1,35	2,86

[#] Oznake (R) i (S) odnose se na konfiguraciju C(α) atoma alkilaril-ostatka.

Avery i saradnici su objavili sintezu i ispitali antimalarijsku aktivnost 10-deoksi-derivata artemizina, zajedničke formule **17**.²² U želji da se izbegnu razlike između ispitivanih jedinjenja



kao posledica razlike u njihovoj molekularnoj masi kao i zbog toga što su jedinjenja ispitivana pod različitim uslovima, njihove aktivnosti su izražene kao *relativne aktivnosti*. Vrednosti aktivnosti dobijaju se prema obrascu koji je prikazan na dnu Tabele 5 i veća vrednost znači i višu aktivnost. U seriji gde je R₁ = CH₃, aktivnost kontinualno raste sa porastom hidrofobnosti R₂ niza. Maksimalnu aktivnost pokazuje **17h**. U seriji gde je R₂ = H, sa porastom dužine niza, aktivnost raste i dostiže maksimum u slučaju kada je R₁ = *n*-Pr (**17j**). Daljim rastom niza i hidrofobnosti aktivnost pada. Utvrđeno je da su derivati sa normalnim nizom aktivniji od onih sa račvastim (**17j** prema **17l**). Najaktivnije je jedinjenje **17h**, koji je prema D6 soju skoro 70 puta aktivniji nego artemizinin, a prema W2 soju oko 30 puta. Najnižu aktivnost pokazuje derivat **17o** koji je istovremeno i najpolarnije jedinjenje u ovoj seriji. Ovako visoke aktivnosti pokazuju da ni laktonski ni

hemiacetalni delovi strukture nisu bitni za antimalarijsku aktivnost. Naprotiv, sa povećanjem lipofilnosti strukture raste i antimalarijska aktivnost. Takođe, ovi rezultati ukazuju da je trioksanska struktura najvažnija za antimalarijsku aktivnost. Uprkos vrlo dobrim *in vitro* rezultatima nekih derivata, nema podataka o njihovim daljim ispitivanjima.

Tabela 5: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti derivata **17** prema *P. falciparum*

	R ₁	R ₂	Relativna aktivnost [#]	
			D6	W2
1	CH ₃	CH ₃	100	100
17a	CH ₃	CH ₃	659	567
17b	CH ₃	H	237	190
17c	CH ₃	Et	914	466
17d	CH ₃	Pr	473	550
17e	CH ₃	Bu	5826	2090
17f	CH ₃	C ₅ H ₁₁	170	145
17g	CH ₃	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂	5073	2506
17h	CH ₃	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ (CH ₂) ₃	6991	3317
17i	Et	H	10	10
17j	Pr	H	722	685
17k	Bu	H	653	556
17l	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	H	183	250
17lj	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₄	H	336	380
17m	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂	H	6	2
17n	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ (CH ₂) ₃	H	13	28
17nj	(CH ₂) ₂ CO ₂ Et	H	422	506
17o	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	H	0,09	0,09

[#] Relativna aktivnost = 100x[IC₅₀(**1**)/IC₅₀(**17**)]Mt(**1**)/Mt(**17**)

U toku ispitivanja uticaja strukture na aktivnost sintetisana je grupa *N*-supstituisanih 11-aza artemizina **18** kod kojih je laktonski prsten zamenjen laktamskim.²³ Poznato je da su laktami stabilniji od laktona u kiseloj sredini što bi moglo značajno da doprinese stabilnosti ovih jedinjenja pod fiziološkim uslovima.^{23a} Sa druge strane, promene supstituenata na atomu azota pružaju velike mogućnosti za promenu njihove biološke aktivnosti. U daljem tekstu biće predstavljen samo deo sintetisanih jedinjenja, i to ona najaktivnija. Dobijeni 11-azaartemizinini tipa **18** su testirani prema različitim sojevima *P. falciparuma* i vrednosti njihovih antimalarijskih aktivnosti sumirane su u Tabeli 5. Bez obzira što su ovde prikazani samo najaktivniji predstavnici ove grupe antimalarika,

opšti zaključak je da prevođenjem laktona u laktam ne dolazi do značajnijeg gubitka aktivnosti.²³ Šta više, ima primera jedinjenja koji su značajno aktivniji od **1**, kao što su **18c**, **18d** i **18e**.

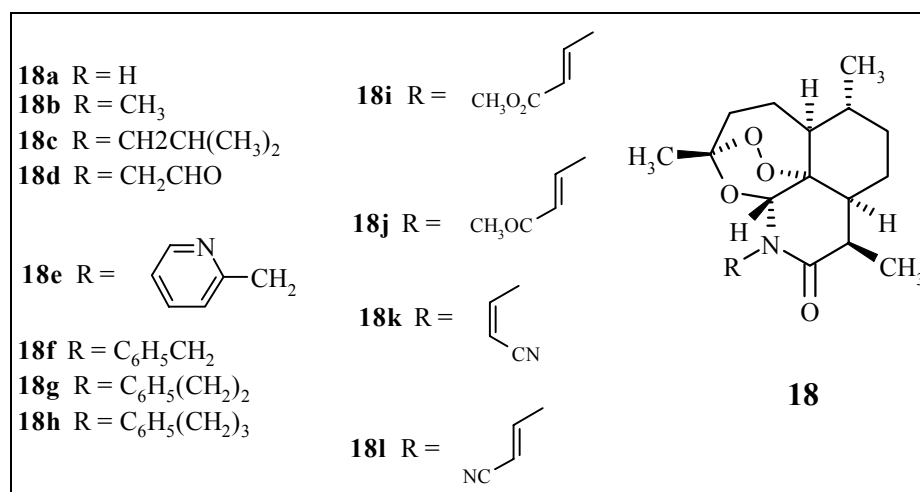


Tabela 6: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti derivata **18** prema *P.falciparum*.

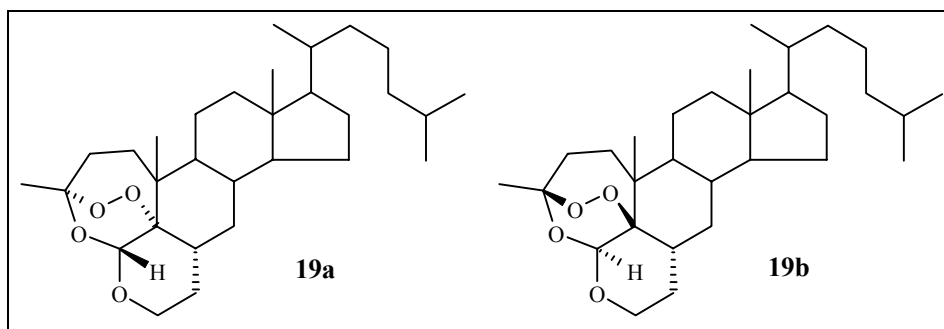
Jedinjenje	Relativna aktivnost	
	FCR3 [#]	
18a	1,0	
18b	2,6	
18c	9,0	
18d	26,0	
18e	22,0	
	W2	D6
18f	217 [◊]	189 [◊]
18g	143 [◊]	197 [◊]
18h	105 [◊]	205 [◊]
18i	1,2 [*]	2,0 [*]
18j	1,25 [*]	2,54 [*]
18k	1,7 [*]	2,7 [*]

[#] Aktivnosti izražene kao IC₅₀ (**1**)/IC₅₀ (**18a-e**). Podaci iz ref. 23a;

[◊] Aktivnosti izražene kao [IC₅₀ (**1**)/IC₅₀ (**18f-h**) x (Mt (**18f-h**) / Mt (**1**)] x 100. Podaci iz ref. 23c.

^{*} Aktivnosti izražene kao IC₅₀ (**1**)/IC₅₀ (**18i-k**). Podaci iz ref. 23b;

Interesantan primer predstavljaju steroidni analozi artemizina. Yu-Lin Wu je opisao sintezu jedinjenja **19a** i **19b**, izvedenih iz holestana.²⁴ Na žalost, autori u radu ne daju nikakve detalje o ispitivanju antimalarijske aktivnosti, već samo nagoveštavaju da je na osnovu preliminarnih ispitivanja pokazano da su **19a** i **19b** aktivniji od **1**.



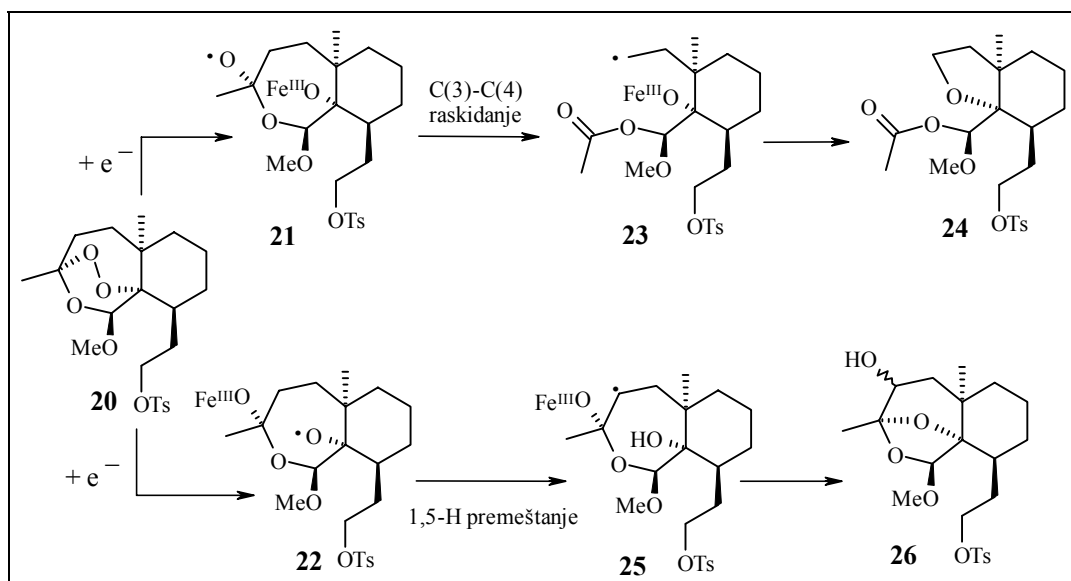
Do sada opisani derivati artemizina su samo deo jedinjenja koja su opisana u literaturi. Od velikog broja ostalih derivata artemizina treba istaći glukuronide hidrosilovanih metabolita arteetra,²⁵ fluoro derivate artemizina i **7**,²⁶ benzilamino i alkilamino etre izvedene iz **7**,²⁷ fenoksi derivate **7**,²⁸ heterociklične aromatične C(10)-supstituisane derivate **17a**²⁹ i 13-karba analoge artemizina.³⁰ Aktivnosti ovih derivata su ili približne vrednostima koje pokazuje sam artemizinin ili značajno manje.

2.2.3. *Mehanizam delovanja*

Struktura artemizina je potpuno drugačija od strukture svih dotadašnjih lekova protiv malarije i može se pretpostaviti i da je mehanizam njegovog delovanja drugačiji. Sva istraživanja koja se bave proučavanjem mehanizma kojim bi artemizinin (**1**) mogao da deluje zasnivaju se na sledećim činjenicama: a) izolovani metaboliti artemizina ne sadrže peroksidnu grupu; b) artemizinin je eritrocitni šizonticid; c) u eritrocitima obolelih od malarije nalazi se povećana koncentracija gvožđa slobodnog ili vezanog u hem, i d) artemizinin ne pokazuje aktivnost prema nekim CQ rezistentnim sojevima *P. berghei*, koji ne stvaraju hemozoin. Istraživanja ukazuju da smrt parazita uzrokovana prisustvom artemizina nije posledica nespecifičnog i nasumičnog oštećenja usled oksidativnog stresa ili prisustva nekontrolisanih kiseoničnih radikala. Istraživanja više ukazuju na postojanje specifičnog receptora koji stupa u interakciju sa artemizininom. Na osnovu toga pretpostavljeno je da artemizinin antimalarijsku aktivnost ispoljava preko peroksidne grupe, da u tom procesu učestvuju jonomi gvožđa i da tom prilikom nastaje jedan ili više proizvoda toksičnih prema parazitu. Zato se skoro sva istraživanja mehanizma zasnivaju na reakciji **1** sa jonovima gvožđa pod različitim uslovima i poređenjem izolovanih proizvoda sa izolovanim metabolitima.

Posner i saradnici su među prvima započeli sistematska ispitivanja kojima su pokušali da objasne mehanizam delovanja artemizina. Istraživanja su zasnovali na reakcijama **1**, ili jednostavnijih trioksana (**20**), sa FeBr₂ u THF-u. Oni su prvi postavili koncept po kome proces započinje jedno-elektronskom redukcijom trioksana nakon čega nastaju dva radikal-anjona **21** i **22**

(Shema 4).^{31, 32} Radikal-anjon **21** dalje podleže homolitičkom raskidanju C(3)-C(4) veze, pri čemu nastaje primarni radikal **23**, koji potom ciklizuje u tetrahidrofuranski derivat **24**. Kod intermedijera **22** prvo nastaje sekundarni radikal **25** intramolekulskom apstrakcijom C4(α) vodonika i nakon hidroksilovanja nastaje proizvod **26**.



Shema 4

Indirektni dokaz o postojanju sekundarnog radikala **25** i značajnoj ulozi C4(α) vodonika predstavljaju rezultati ispitivanja aktivnosti proizvoda **27**.³² Jasno je da kod proizvoda **27b** i **27c** ne može doći do apstrakcije C4(α) vodonika kako bi nastao odgovarajući sekundarni radikal. Upravo time se objašnjava njihova niska aktivnost (Tabela 7). Izvođenjem reakcije jedinjenja **28** sa FeSO₄ u smeši acetonitril / voda, u prisustvu spin-trap reagensa DBNBS izolovani su adukti **29** i **30**, što predstavlja direktni dokaz postojanja primarnog i sekundarnog radikala.³³

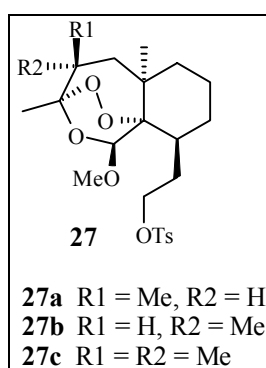
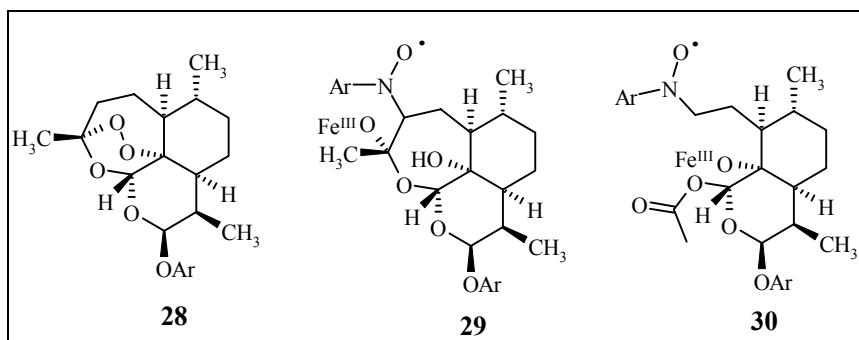
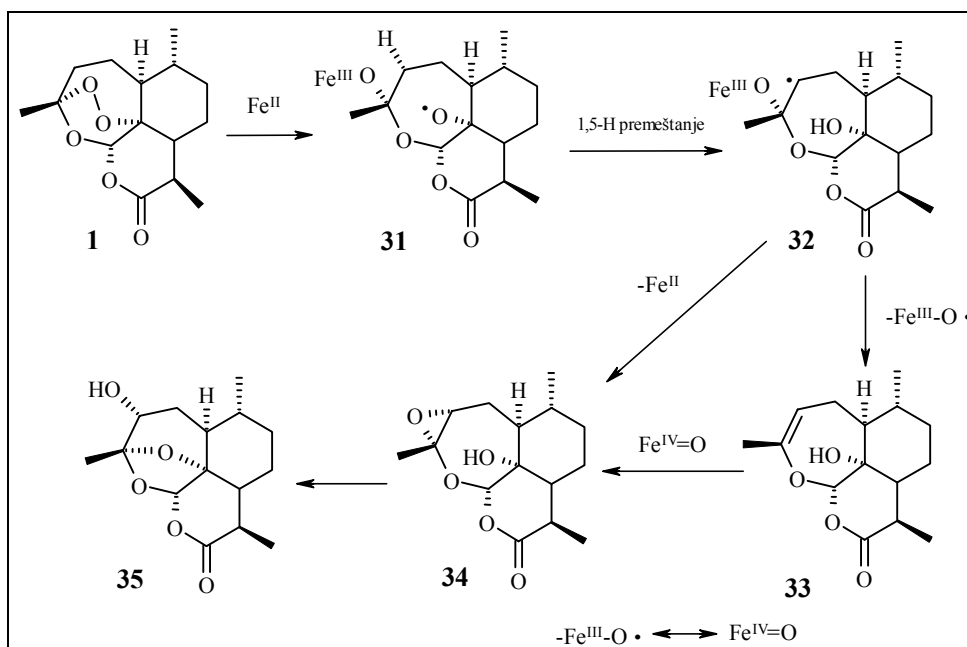


Tabela 7: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti derivata **27** prema *P. falciparum*.

	IC ₅₀ (ng/ml)	
	W2	D6
27a	4.5	3.5
27b	> 500	> 500
27c	> 500	> 500



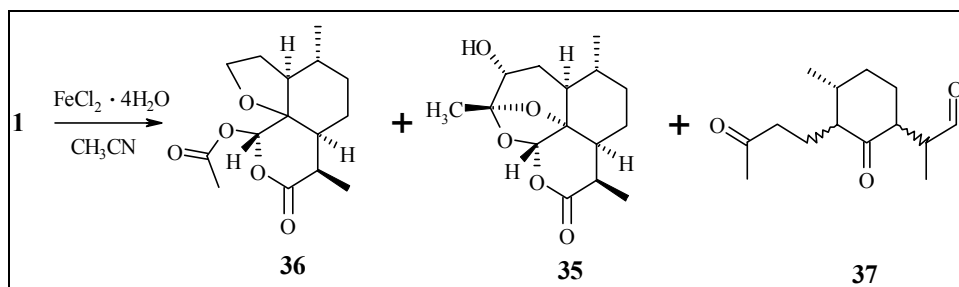
Posner i saradnici su izneli pretpostavku o važnoj ulozi visoko valentnog gvožđe-oksida, Fe(IV)=O u biološkoj aktivnosti **1** i njegovih analoga.³⁴ Oni smatraju da Fe(IV)=O nastaje u toku niza transformacija koje započinju reakcijom **1** sa Fe(II) jonom (Shema 5) i da Fe(IV)=O kasnije učestvuje u nastajanju nekih proizvoda koji mogu, direktno ili posredno, biti odgovorni za toksičnost jedinjenja **1** i analoga prema parazitu.



Shema 5

Jefford i saradnici su druga značajna grupa koja se bavi ispitivanjem mogućeg mehanizma delovanja artemizina. Njihova istraživanja se zasnivaju na ispitivanju reakcija **1** i jednostavnih trioksana sa FeCl_2 u acetonitrilu.³⁵ Reakcije su izvođene sa $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ u acetonitrilu, u inertoj atmosferi, i kao glavni proizvodi izolovani su derivati **35**, **36** i **37** (Shema 6). Može se uočiti sličnost sa proizvodima koje je izolovao Posner (Sheme 4 i 5). Jefford je predložio mehanizam procesa koji se odvijaju nakon reakcije **1** sa Fe(II) . On takođe podržava jedno-elektronsku redukciju **1** kao početak procesa kao i opštu shemu koju je predložio Posner. Međutim, Jefford smatra da ne postoje uslovi za 1,5-H premeštanje (**31** \rightarrow **32**, Shema 5), već da sekundarni radikal **40** (sa nesparenim

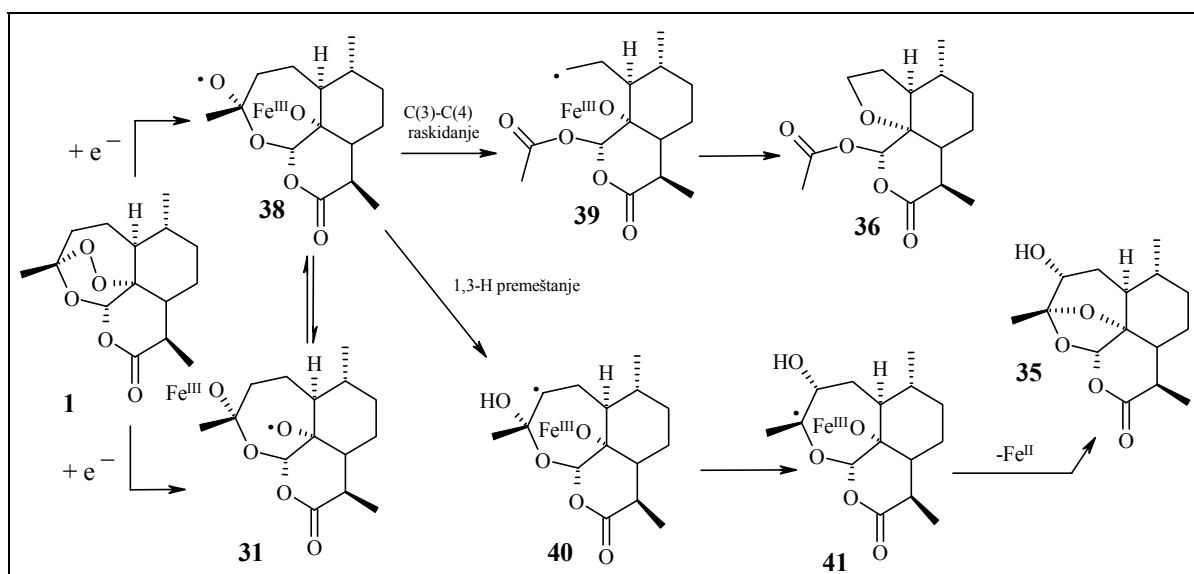
elektronom na istom C-atomu) nastaje 1,3-H premeštanjem, kako je to prikazano Shemom 7.^{35c} Kao glavni razlog navodi se veliko rastojanje izmedju C(4 α) vodonika i O(1) atoma.



Shema 6

Ovaj predlog je neobičan jer je poznato da su 1,3-H premeštanja veoma retka i da zapravo ne postoje pouzdani dokazi da se takva premeštanja u opšte odigravaju.³⁶ Takođe, u predloženom mehanizmu je sporan i korak **40** → **41** kada se uzme u obzir da su 1,2-slobodno radikalska premeštanja znatno ređa u poređenju sa odgovarajućim karbokationskim procesom i da su važna jedino prilikom premeštanja aril-, vinil- i acetoksi- grupa i halogena.³⁶

Jefford iznosi pretpostavku da je primarni radikal **39** onaj intermedijer koji je neposredno toksičan prema parazitu, odnosno da je smrt parazita posledica alkilovanja nekog vitalnog proteina ili enzima u parazitu radikalom **39**.^{35c}

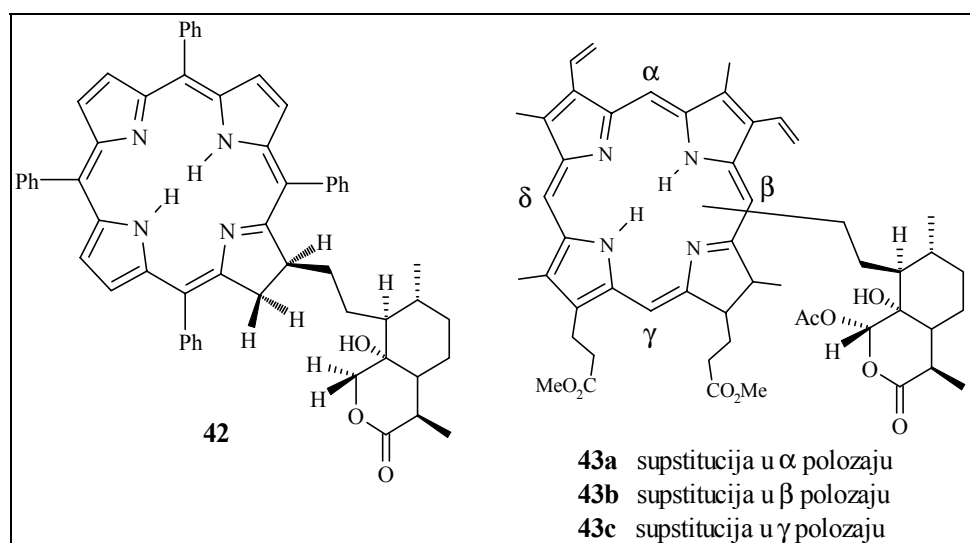


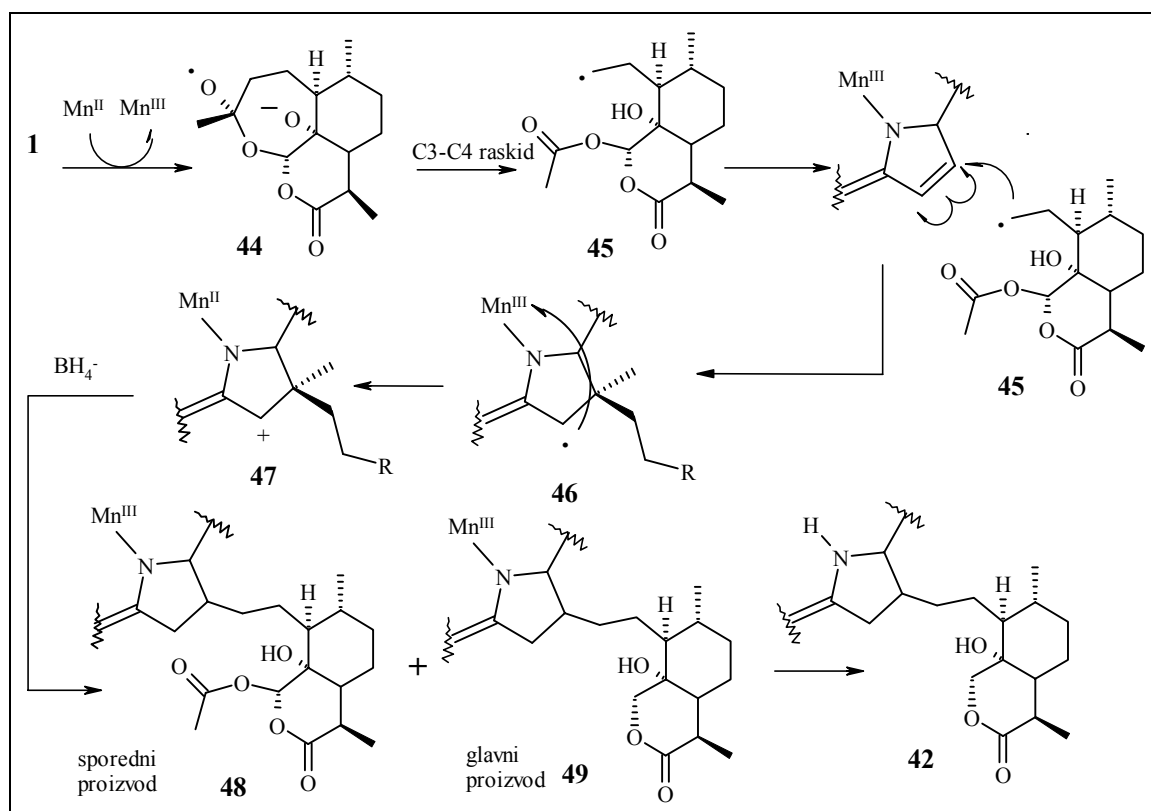
Shema 7

Haynes i Vonwiller su ispitivali ponašanje **1** u prisustvu Fe(II) i Fe(III) jona kada su vezani za PP-IX^{37a} i kada su slobodni.^{37b} Utvrdili su da **1** reaguje sporo [10 dana; vodeni acetonitril, pH = 7,8 (fosfatni pufer)] sa heminom, ali da se reakcija drastično ubrzava (10 min.) ukoliko se doda 1 ekv. cisteina u odnosu na hemin.^{37a} Pošto **1** ne reaguje sa cisteinom, jasno je da je ubrzanje reakcije

posledica redukovanja hemina u hem. Oni su prvi utvrdili da ovim reakcijama nastaje kovalentni adukt hema i jednog intermedijera koji nastaje iz **1**.^{37a} Reakcijama **1** sa slobodnim Fe(II) i Fe(III) jonima pokazano je nekoliko stvari: prvo, da su za kompletnu reakciju **1** dovoljne i katalitičke količine Fe(II) jona, drugo da odgovarajuće transformacije mogu da se odvijaju i u prisustvu Fe(III) jona, i treće, da odnos izolovanih proizvoda i njihov sastav veoma zavise od uslova koji su korišćeni u reakcijama.^{37b}

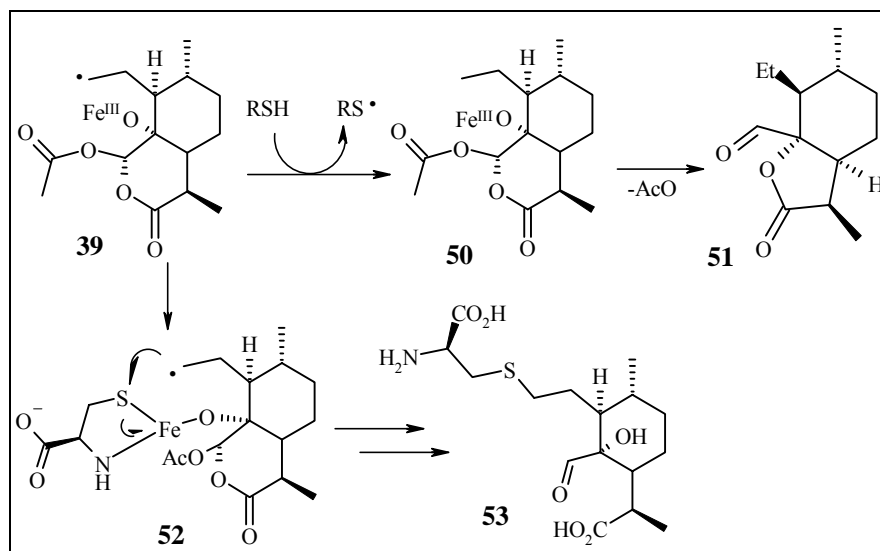
Meunier je prvi objavio strukture kovalentnih porfirinskih adukata koji su nastali iz intermedijera nastalog iz **1** i odgovarajućeg porfirinskog sistema – **42** i **43**.³⁸ Adukt **42** je izolovan kao glavni proizvod reakcije **1** sa Mn^{II}TPP. Predloženo je da nakon jedno-elektronske redukcije artemizinina (**1**) pomoću Mn(II), nastaje primarni radikal **45** koji vrši alkilovanje Mn^{III}TPP-a (Shema 8). Nastali radikal **46** podleže intramolekulskom prenosu jednog elektrona pri čemu nastaje katjon **47**. Posle redukcije nastaju proizvodi **48** i **49**. Nakon uklanjanja jona metala iz **49** dobija se finalni proizvod **42**.^{38a} Struktura adukta **42** je detaljno analizirana, a istovremeno su ispitivane reakcije derivata **1** i drugih trioksana sa Mn^{II}TPP.^{38b, 38c} Adukti **43** su nastali kao proizvodi reakcije Fe(II)PP-IX-DME i artemizinina. Nakon uklanjanja jona metala izolovana su tri proizvoda **43**.^{38c,d} Izolovanjem proizvoda **42** i **43** na indirektan način je dokazano postojanje primarnog radikala **39**, ali i sposobnost derivata artemizinina da deluju kao alkilujući reagensi.





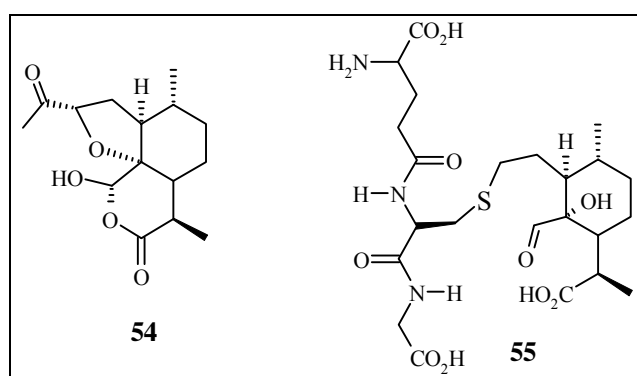
Shema 8

Yu-Lin Wu je ispitivao reakcije **1** u prisustvu $Fe(II)$ jona i cisteina.^{39a} Reakcije su izvođene u vodenom acetonitrilu na 38 °C, u struji azota sa 2 ekv. cisteina u odnosu na **1** i u prisustvu različitih količina $FeSO_4$. Utvrđeno je da su i katalitičke količine $Fe(II)$ jona dovoljne za potpunu reakciju **1** kao i da povećanje količine $FeSO_4$ ubrzava reakciju. Dodavanjem cisteina reakcija se ubrzava. Cistein redukuje nastalo $Fe(III)$ do $Fe(II)$, a $Fe(II)$ reaguje brže sa preostalim količinama artemizina. Osim ranije opisanih proizvoda reakcije **1** sa $Fe(II)$ jonima **3**, **35** i **36** izolovan je i proizvod **51**. Autori smatraju da nakon jedno-elektronske redukcije **39** cisteinom i nastanka intermedijera **50**, dolazi do intramolekulske transformacije, izdvajanja acetata čime nastaje **51**. Iz vodene faze izolovan je i proizvod u količini koja je gotovo jednaka polovini unetog **1**. Autori prepostavljaju da struktura ovog proizvoda odgovara strukturi **53** (Shema 9).^{39a} Nakon privremenog stvaranja adukta cisteina i **39** dolazi do istovremenog dvostrukog jednoelektronskog transfera: sa C(4) radikala prema S-atomu cisteina i sa S-atoma cisteina na $Fe(III)$ jon. Dolazi do oslobađanja $Fe(II)$ i nakon nekoliko intramolekulskih transformacija nastaje proizvod **53**.



Shema 9

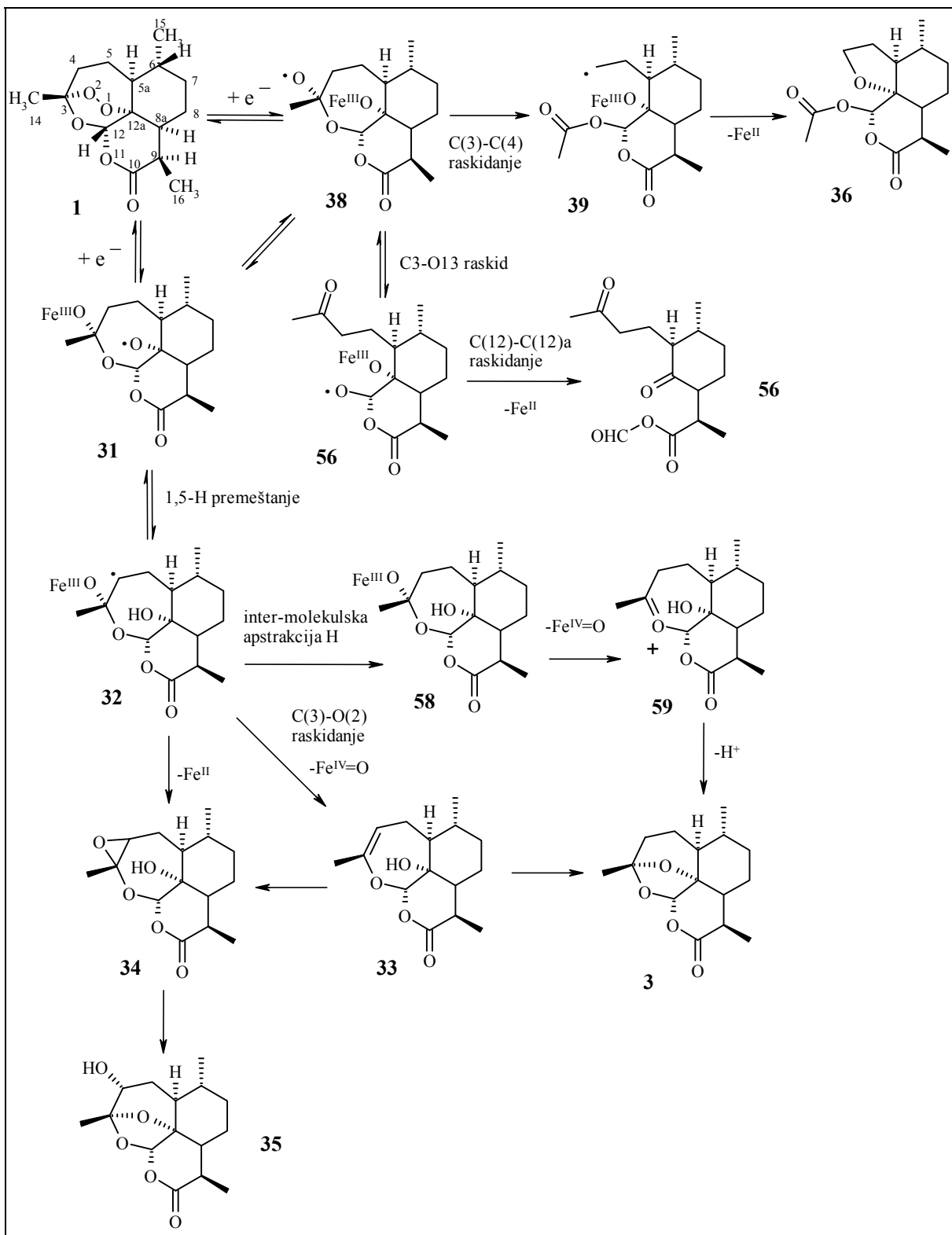
Ranije je rečeno da unutar hranljivih vakuola parazita postoje povećane količine L-cisteina i GSH koji čuvaju parazit od oksidativnog stresa. Zbog toga je Yu-Lin Wu ispitivao ponašanje **1** u prisustvu FeSO₄ i GSH.^{39b} U tipičnom eksperimentu artemizinin reaguje sa 2 ekvivalenta GSH i katalitičkom količinom FeSO₄ u vodenom acetonitrilu, u struji argona. Osim već opisanih proizvoda reakcije **1** sa jonima Fe(II) - jedinjenja **35**, **36** i **51** - iz organske faze izolovan je i proizvod **54**. Iz vodene faze izolovan je adukt primarnog radikala **39** i GSH - **55**. Pretpostavlja se da adukt **55** nastaje sličnim mehanizmom koji je prikazan Shemom 9. Ukoliko prilikom tretmana artemizininom ili njegovim derivatima, u eritrocitima nastaje adukt **55**, onda bi to vodilo snižavanju koncentracije GSH. Ta promena bi dovela do uspostavljenja čitavog niza novih ravnoteža koje bi za posledicu mogle imati i smrt parazita. Treba pomenuti i da je isti autor sa saradnicima objavio da prilikom reakcije **1** i **17** sa Fe(II) jonima u prisustvu DNA dolazi do oštećenja DNA.^{39c}



Iako još uvek nije sasvim jasno na koji način **1** izaziva smrt parazita malarije, postoji saglasnost autora koji se bave ovim problemom oko nekoliko stvari. Veruje se da aktivna vrsta koja je odgovorna za antiparazitnu ulogu nastaje nakon raskidanja peroksidne veze u **1** i da

intraeritocitno gvožđe u hemu ima ulogu okidača u tom procesu.^{39a} Različite vrste koje nastaju u toku tog procesa, radikal-joni, primarni i sekundarni C-radikali, visoko valentno gvožđe (Fe(IV)=O), adukti sa hemom ili nekom drugom intracelularnom komponentom, mogu biti odgovorne za smrt parazita. Takođe, među autorima postoji saglasnost oko mehanizma kojim nastaju glavni proizvodi transformacije **1** u reakciji sa Fe(II). Razlike između autora u interpretaciji rezultata do kojih su došli, uglavnom su posledica različitih reakcionih uslova koji su primenjeni u toku ovih istraživanja: upotreba soli Fe(II) sa različitim anjonima i drugi reakcioni uslovi (rastvarač, temperatura i atmosfera) pod kojima su reakcije vršene.⁴⁰ Wu je objedinio rezultate najznačajnijih autora i dao pregled dosadašnjih saznanja o mehanizmu transformacije **1** nakon reakcije sa Fe(II).⁴⁰ Na Shemi 10 dat je zbirni mehanizam transformacija. U istom radu autor, prvi put, pruža dokaze o postojanju sekundarnog ugljenikovog radikala u ovim procesima.

Nakon 6 sati inkubiranja eritrocita zaraženih trofozoitima sojeva D6 ili FCR3 sa izotopski označenim [10-³H]-dihidroartemizininom **7** ili [15-³H]-arteetrom **11b** izolovani su proteini parazita kod kojih je registrovana radioaktivnost.⁴¹ Nakon inkubacije rastvorima fiziološke koncentracije (33 nM) [10-³H]dihidroartemizina izolovane su 4 glavne grupe proteina – 25, 50, 65 i >200 kDa - i dve sporedne grupe – 32 i 42 kDa - u kojima je registrovana radioaktivnost. Intenzitet zračenja se ne menja nakon tretmana proteina sa EtSH ili 8 M ureom, što ukazuje da je veza između supstrata i proteina kovalentna. U ovim eksperimentima, za razliku od nekih drugih, nije zabeležena radioaktivnost kod izolovanog hemozoina, što znači da je u ovom slučaju reakcija vezana za proteine membrane parazita. Nikakva radioaktivnost nije zabeležena kada se nezaraženi eritrociti podvrgnu istom eksperimentu. Utvrđeno je da izotopski obeleženi **7** i **11b** podjednako interaguju i sa D6 i sa FCR3 sojevima, kao i sa različitim stadijumima parazita dok je on u eritrocitnoj fazi. Kada se zaraženi eritrociti inkubiraju sa [15-³H]-deoksiarteetrom nije registrovana interakcija sa proteinima parazita čak ni posle višestruko dužeg izlaganja. Iako još nije utvrđen identitet alkilovanih proteina parazita koji su prikazani u ovom radu, do sada su identifikovani neki membranski proteini *P. falciparum* koji su alkilovani endoperoksidnim antimalaricima: MSA-1 (180 – 220 kDa), MSA-2 (45 – 55 kDa), CRA.5.1 (23 kDa) i histidin – obogaćeni protein (42 kDa). Jedan od izolovanih i definisanih proteina je translatorno kontrolisani homolog tumor proteina TCTP.⁴² *In vitro*, dihidroartemizinin reaguje sa rekombinovanim TCTP u prisustvu *in situ* redukovanog hemina i gradi kovalentni adukt u odnosu 1:1 (supstrat:protein). Kada se jedan cistein u proteinu hemijski blokira, količina vezanog supstrata padne za 2/3.

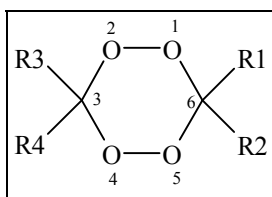


Shema 10

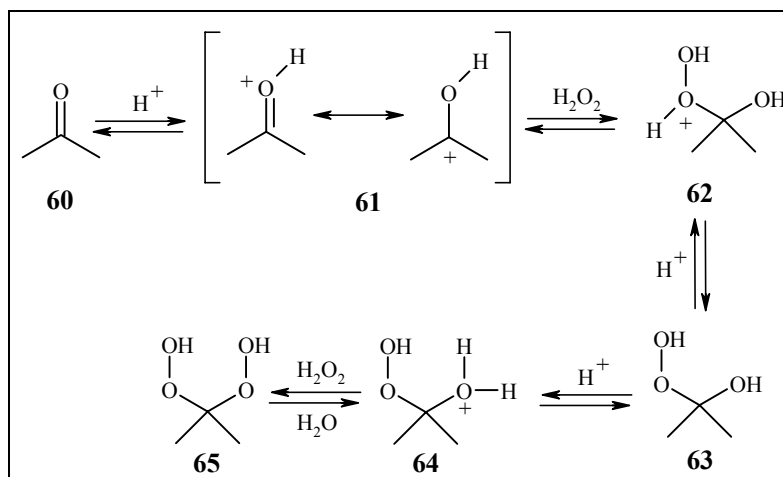
2.3. 1,2,4,5 – TETRAOKSACIKLOHEKSANI (TETRAOKSANI)

2.3.1. Sinteza i karakterizacija

Tetraoksani su supstituisani derivati 1,2,4,5-tetraoksacikloheksana. Supstituenti R_1 , R_2 , R_3 i R_4 mogu biti atomi vodonika, različiti alkil- i aril-nizovi ili delovi prstena. U literaturi nije opisan tetraoksan kod koga su sva četiri susptituenta atomi vodonika. Tetraoksani mogu biti identično i neidentično supstituisani. Prvi nastaju iz jednog karbonilnog jedinjenja, a neidentično supstituisani tetraoksani, u daljem tekstu mešoviti tetraoksani, koji imaju različite supstituente vezane za položaje 3 i 6 mogu nastati iz dva karbonilna jedinjenja.

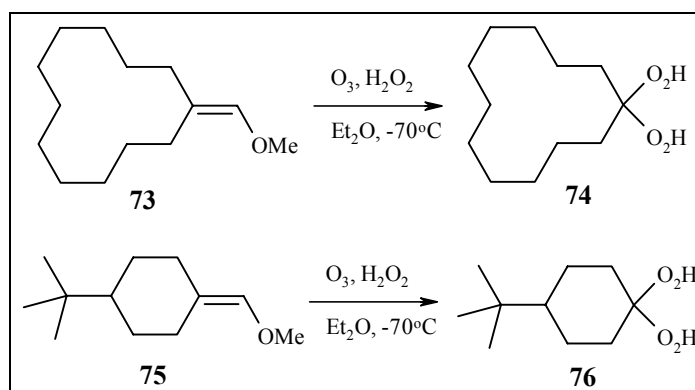
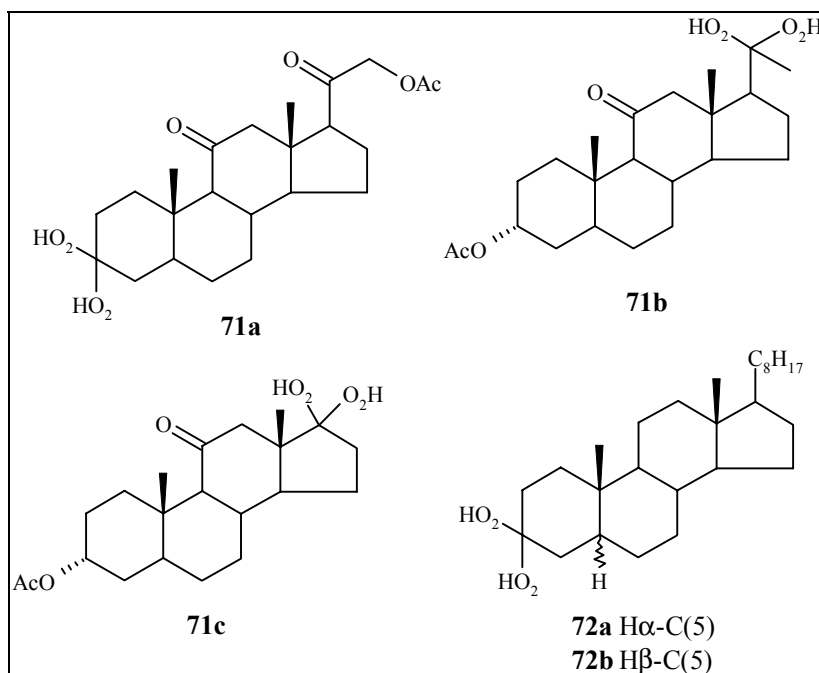


Različiti peroksidni proizvodi reakcije peroksiacetalizacije karbonilnih jedinjenja poznati su dugo vremena.⁴³ U ovim radovima kao proizvodi, opisivani su različiti hidroperoksi-peroksidi izolovani ili u smešama. Reakcija karbonilnih jedinjenja i vodonik-peroksida je analogna reakciji građenja hemiacetala i acetala. Reakcija je katalizovana kiselinama i započinje protonovanjem karbonilnog kiseonika i građenjem oksonijum jona **61** (Shema 11). Nukleofilnim napadom vodonik-peroksida, nastaje intermedijer **62** i nakon preuzimanja protona bazom nastaje hidroksi-hidroperoksid **63**. Ovaj proizvod je izolovan samo u slučajevima kada se na C(α)-atomu nalazi supstituent sa $-I$ efektom.⁴⁴



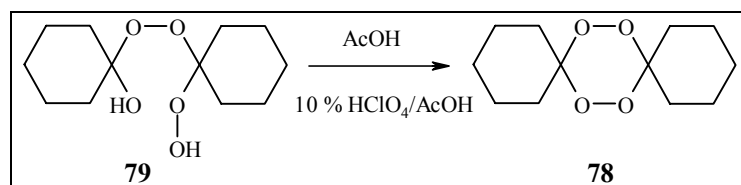
Shema 11

Hemiperoksiacetal **63** u kiseljoj sredini gradi intermedijer **64**, koji sa sledećim molekulom vodonik-peroksida daje geminalni dihidroperoksid **65**. Reakcija karbonilnih jedinjenja i vodonik-peroksida je zapravo niz ravnotežnih reakcija kako je to prikazano na Shemi 12. Naredni koraci u reakciji predstavljaju ponavljanje koraka prikazanih u Shemi 11. Hidroksi-hidroperoksid **63** sa dodatnim



Shema 13

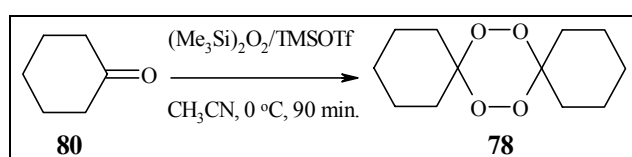
Tetraoksani se mogu dobiti na dva načina. Prvi je intramolekulskom supstitucijom, iz 1-hidroperoksi-1'-hidroksi-peroksida, rastvaranjem u sirćetnoj ili propionskoj kiselini uz dodavanje 10% rastvora perhlorne kiseline u sirćetnoj kiselini (Shema 14).^{49, 50}



Shema 14

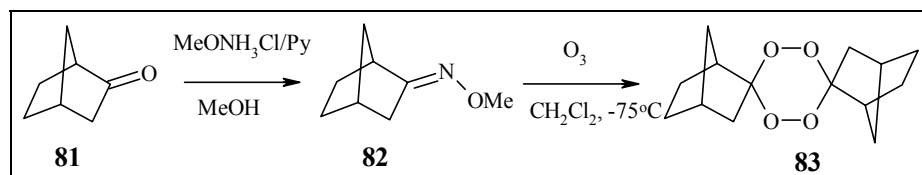
Drugi način je direktnom reakcijom iz ketona i vodonik-peroksida. U literaturi su opisani različiti postupci u kojima su menjane koncentracije rastvora vodonik-peroksida, rastvarači i katalizatori. Korišćeni su 30% vodonik-peroksid u smeši etanol / benzen / voda uz koncentrovanu sumpornu kiselinu,⁴⁶ 30% vodonik-peroksid u tetrahidrofuranu uz koncentrovanu HCl,⁴⁶ 30% vodonik-peroksid u rastvoru sirćetne kiseline uz 10% rastvor perhlorne kiseline u sirćetnoj kiselini,^{48, 49} 30% vodonik-peroksid u vodenom etanolu uz koncentrovanu sumpornu kiselinu,⁵¹

50% vodonik-peroksid u acetonitrilu u prisustvu koncentrovane sumporne kiseline,⁵² 90% rastvor vodonik-peroksid, u dihlormetanu u prisustvu jono-izmenjivačkih smola Amberlit-a i Amberlist-a^{53a} ili u smeši dihlormetan / acetonitril u prisustvu metan-sulfonske kiseline,^{53b, 53c} 85% vodonik-peroksid u prisustvu smeše koncentrovane sumporne i sirćetne kiseline.⁵⁴ Osim metoda u kojima je peroksiacetalizacija ketona katalizovana kiselinama, opisane su i druge metode dobijanja tetraoksana. Reakcijom karbonilnih jedinjenja i ekvivalentne količine trimetilsilil-peroksida i TMSOTf u anhidrovanoj sredini (Shema 15) dobijeni su odgovarajući tetraoksani u odličnom prinosu (45-95%).⁵⁵ Iz aldehida, se uvek dobijaju *trans*-proizvodi. Sporedni proizvodi u reakciji su laktoni, koji nastaju Baeyer-Villiger-ovom reakcijom. U prisustvu ekvivalentne količine TMSOTf kao glavni proizvod dobija se tetraoksan, ali se u prisustvu katalitičkih količina TMSOTf kao glavni proizvodi dobijaju laktoni.⁵⁶



Shema 15

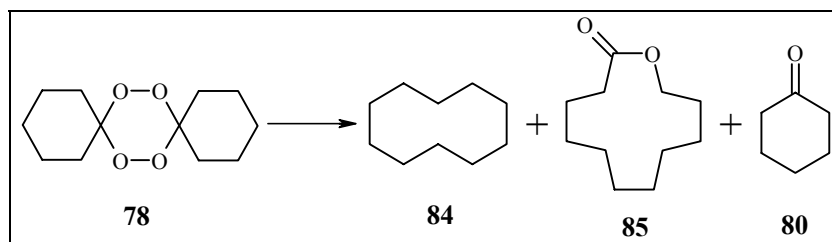
U slučajevima kada nije moguća peroksiacetalizacija katalizovana kiselinama zbog konkurentnih reakcija, pre svega Baeyer-Villiger-ove reakcije, vrlo korisna metoda za dobijanje tetraoksana je ozonoliza metoksiimina (Shema 16).⁵⁷



Shema 16

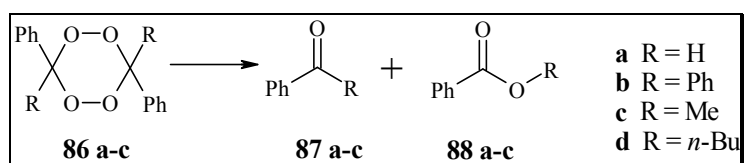
Tetraoksane je moguće dobiti još i dimerizacijom ozonida u prisustvu katalitičkih količina kiseline⁵⁸ i ozonolizom alkena⁵⁹.

Tetraoksani su dugo vremena korišćeni kao polazna jedinjenja za sintezu makrocikličnih molekula (Shema 17). Fotolizom u metanolu ili benzenu, korišćenjem lampe od 450 W, tetraoksan **78** je transformisan u ciklodekan **84** (14%), undekalakton **85** (10%) i cikloheksanon **80** (20%). Termolizom u vakumiranoj ampuli na 150 °C nastaju isti proizvodi ali u većem prinosu: **84** (44%), **85** (23%) i **80** (21%).⁶⁰ Korišćenjem tetraoksana dobijenih iz supstituisanih cikličnih ketona moguće je dobiti veliki broj vrlo različitih makrocikličnih jedinjenja.^{49b, 61}



Shema 17

Termičkim razlaganjem tetraoksana **86a-d**, u difenil-etru u atmosferi azota, kao glavni proizvodi dobijaju se karbonilna jedinjenja **87a-d** i estri **88b-d**, odnosno kiselina **88a** (Shema 18).⁶² Dodavanje metaloporfirinskih jedinjenja ZnTPP i CoTPP deluje katalitički, reakcija se odvija na nižim temperaturama, jako je ubrzana i raste prinos proizvoda.



Shema 18

- a** R = H
- b** R = Ph
- c** R = Me
- d** R = *n*-Bu

U vibracionim spektrima (IR i Raman) od posebne važnosti su apsorpcione trake valencionih vibracija O-O i C-O veza iz C-O-O grupe. Ove trake nalaze se u opsegu 1000 - 800 cm^{-1} za O-O, koja je srednjeg ili slabog intenziteta i često se javlja kao dublet. Traka u opsegu 1200-1000 cm^{-1} za C-O je jačeg intenziteta nego prethodna. Ove trake su inače slabog intenziteta u odnosu na većinu drugih karakterističnih traka u IR spektrima, ali su vrlo intenzivne u Ramanovim spektrima.⁶³

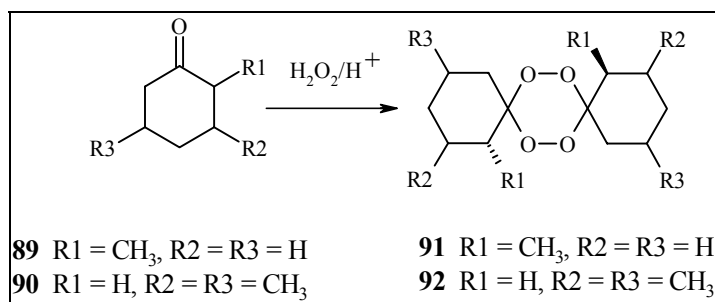
U ^{13}C NMR spektrima karakterističan je signal koji potiče od peroksiacetalnog C-atoma. Signal se nalazi, u zavisnosti od supstituenata na položajima 3 i 6, u opsegu 115 - 104 ppm.

Malo je radova u kojima se opisuje masena spektrometrija tetraoksana. Molekulska masa je u velikom broju slučajeva određivana VPO analizom, osim u jednom primeru, u slučaju **109** kod kojih je u DCI-MS uočen molekularni jom.⁴⁶ U samo dva rada je ispitivano ponašanje tetraoksana pod uslovima klasičnih MS eksperimenata (jonizacija elektronima energije 70 eV).⁶⁴

2.3.2. Antimalarijska aktivnost

Vennerstrom i saradnici prvi su pokazali da dispiro-1,2,4,5-tetraoksani pokazuju značajno antimalarijsko dejstvo.⁵¹ Proizvodi **91** i **92** (Shema 19) dobijeni su peroksiacetalizacijom, ali pod različitim reakcionim uslovima. Jedinjenje **91** je dobijeno reakcijom ketona **89** sa 30% vodonik-peroksidom u sirćetnoj kiselini uz katalitičku količinu perhlorne kiseline, na sobnoj temperaturi. Izolovan je samo jedan stereoizomer. Centrosimetrična struktura (*mezo*) **91** je posledica sternog

uticaja metil-grupe koja se nalazi u α -položaju u odnosu na peroksi-acetalni ugljenikov atom. Reakcijom ketona **90** i 30% vodonik-peroksida u vodenom etanolu u prisustvu sumporne kiseline, na 0 °C, dobijeno je jedinjenje **92** kao smeša stereoizomera.



Shema 19

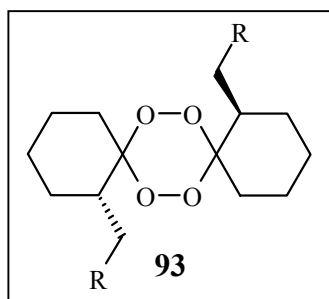
U Tabeli 8 date su vrednosti *in vitro* aktivnosti jedinjenja **91** i **92** prema D6 i W2 sojevima. Tetraoksan **91** pokazuje veću aktivnost prema W2 nego prema D6 soju. Mada **91** pokazuje manju aktivnost u odnosu na **1**, ukupni rezultati ukazuju da dispiro-1,2,4,5-tetraoksani mogu biti dobri antimalarici. *In vivo* ispitivanja pokazala su da **91** pokazuje bolju aktivnost u odnosu na **92** nakon oralne administracije.⁵¹

Tabela 8: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti **91** i **92** prema *P. falciparum*

	IC ₅₀ (nM)		indeks rezistencije ^a
	D6	W2	
91	55	32	0,58
92	175,81	45,71	0,26
artemizinin 1	8,6	7,3	0,85

^a indeks rezistencije = IC₅₀(W2) / IC₅₀(D6)

Opisano je i 11 dispiro-1,2,4,5-tetraokasna zajedničke formule **93**.⁵² Devet tetraoksana je dobijeno diastereoselektivnom peroksiacetalizacijom odgovarajućeg ketona 50% vodonik-



peroksidom u smeši H₂SO₄:CH₃CN (1:4, v/v). Reakcijom nastaje jedan stereoizomer, kao i u slučaju **91**. Dva tetraoksana, **93g** i **93h** dobijeni su hidrolizom tetraoksana **93e** odnosno **93i**. Šest tetraoksana pokazuje aktivnost koja je bliska aktivnosti **91**. Tetraoksan **93e** je najaktivnije jedinjenje u seriji (K1 IC₅₀ = 6,2 nM; NF54 IC₅₀ = 6,5 nM). Prisustvo polarnih grupa, -CH₂CO₂H, -CO₂H i -OH (**93g**, **93h**,

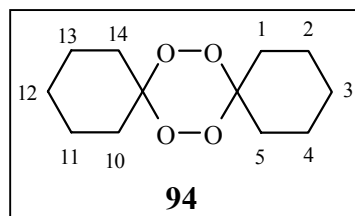
93i redom), značajno smanjuje aktivnost. Isti efekat imaju i aromatične grupe u **93c** i **93i**. Najaktivnija jedinjenja testirana su *in vivo* i sva pokazuju značajno slabiju aktivnost prilikom oralne administracije od **91** i **1**, verovatno zbog enzimatske hidrolize estara **93d** i **93e** u odgovarajuće kiseline, koje već pokazuju slabu *in vitro* aktivnost. Metil-etar **93j** pokazuje dobru *in vivo* aktivnost

prilikom subkutane administracije, ali prilikom oralne administracije aktivnost je značajno manja. U drugom slučaju verovatno dolazi do izražaja mehanizam oksidativnog dealkiranja, kojim se etar prevodi u alkohol **93h** koji već pokazuje slabu *in vitro* aktivnost.

Tabela 9: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti tetraoksana **93** prema *P. falciparum*.

Jedinjenje	R	IC ₅₀ (nM)	
		K1	NF54
93a	CH=CH ₂	19	23
93b	C≡CH	13	13
93c	C ₆ H ₅	> 200	> 200
93d	CH ₂ CO ₂ Et	14	16
93e	CO ₂ Et	6,2	6,5
93f	CH ₂ CO ₂ H	> 200	> 200
93g	CO ₂ H	> 200	> 200
93h	OH	> 200	> 200
93i	OCOC ₆ H ₅	> 200	> 200
93j	OMe	15	16
93k	OCH ₂ C ₆ H ₅	18	26
91	H	28	39
artemizinin 1		10	12

U nastojanjima da dobiju preparate koji će biti manje podložni razgradnji pod fiziološkim uslovima, Vennerstrom i saradnici su sintetisali grupu alkil-supstituisanih derivata tetraoksana **78**. Koristeći tetraoksan **91** kao prototip sintetisali su 16 derivata, **94a-94nj**, kod kojih se kao supstituent nalazi jedna ili više alkil-grupa.⁶⁵ Tetraoksani **94a-94c** predstavljaju direktne analoge **91**, kod kojih se u položajima 1 i 10 nalaze etil-, propil-, ili *terc*-butil-grupe. Tetraoksani **94c**, **94e** i **94f** su dobijeni ozonolizom odgovarajućih metoksi-imina.⁵⁷ Ostali su dobijeni peroksi-



acetalizacijom odgovarajućeg ketona 50% vodonik-peroksidom u acetonitrilu u prisustvu sumporne kiseline. Tetraoksani **94a-94c** kao i **94g-94i**, **94m** i **94n** dobijeni su kao jedan centrosimetričan stereoisomer, strukture analogne **91**. Vrednost optičke rotacije **94lj**

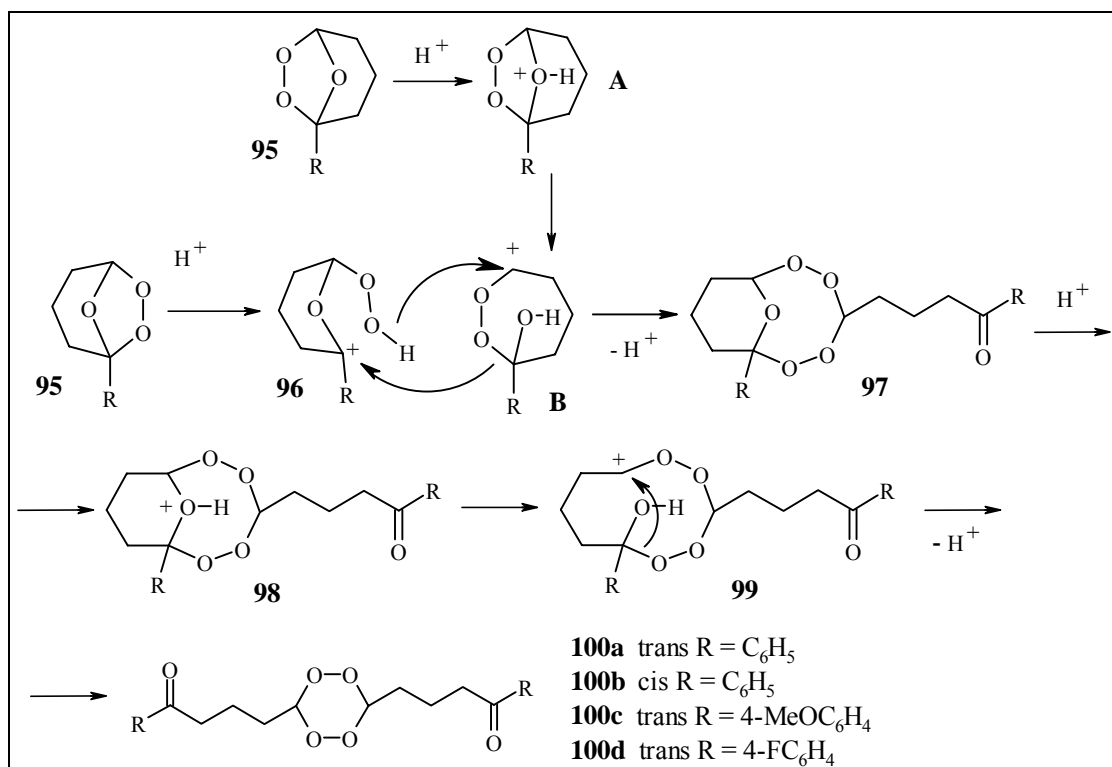
ukazuje da on nije centrosimetričan. Tetraoksani **94d-94f**, **94j** i **94k**, koji nemaju metil-grupe u položajima 1 i 10 izolovani su kao smeše diastereomera. Tetraoksani **94l** i **94nj** nemaju izomere. U Tabeli 10 su date vrednosti ispitivanja *in vitro* aktivnosti **94** i podaci za **1**, i **91** radi poređenja. Ispitivanja antimalarijske aktivnosti prema *P. falciparum* D6 i W2 sojevima pokazala su da svi derivati **94**, osim **94i**, pokazuju veću aktivnost prema W2 nego prema D6. Većina derivata pokazuje aktivnosti koje su bliske aktivnostima **91**. Uočeno je da povećavanjem zapremine supstituenata

(**94c**) i povećanjem broja supstituenata (**94l**, **94i** i **94j**) značajno opada antimalarijska aktivnost. Najveću aktivnost pokazuje **94j** (D6, IC₅₀ = 12 nM; W2, IC₅₀ = 10 nM).

Tabela 10: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti tetraoksana **94** prema *P. falciparum*.

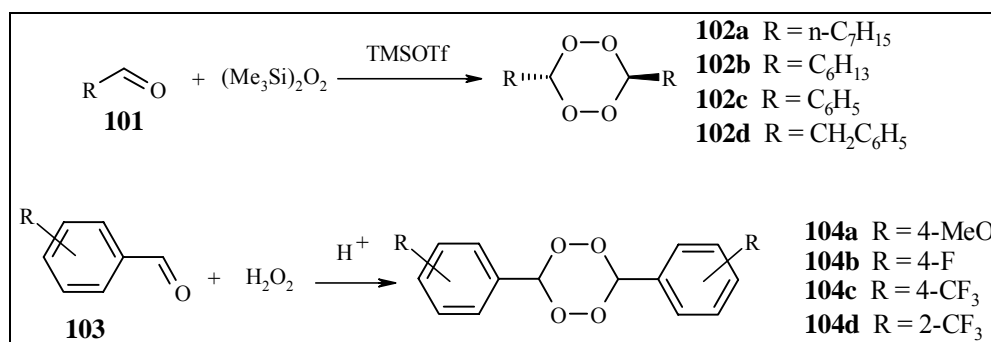
	R	IC ₅₀ (nM)	
		D6	W2
91	1, 10-dimetil	55	32
94a	1, 10-dietil	23	19
94b	1, 10-dipropil	84	39
94c	1, 10-di- <i>t</i> -butil	> 300	160
94d	2, 11-dimetil	76	51
94e	3, 12-dimetil	23	21
94f	3, 12-di- <i>t</i> -butil	200	100
94g	1, 2, 10, 11-tetrametil	50	43
94h	1, 3, 10, 12-tetrametil	110	49
94i	1, 4, 10, 13-tetrametil	15	19
94j	2, 3, 11, 12-tetrametil	12	19
94k	2, 4, 11, 13-tetrametil	30	15
94l	3, 3, 12, 12-tetrametil	> 1000	> 1000
94lj	1, 10-diizopropil-4, 13-dimetil	47	37
94m	4, 13-diizopropil-1, 10-dimetil	140	94
94n	1, 3, 3, 10, 12, 12-heksametil	> 1000	> 1000
94nj	2, 2, 4, 4, 11, 11, 13, 13-oktametil	> 1000	> 1000
artemizinin 1		8,4	7,3

Wataya i saradnici opisali su grupu tetraoksana **100**, **102** i **104** i ispitali njihovu antimalarijsku aktivnost.⁶⁶ Ozonid **95** u dihlormetanu, na sobnoj temperaturi, u prisustvu katalitičke količine hlorsulfonske kiseline dimerizuje pri čemu kao jedan od proizvoda nastaje tetraoksan **100** (Shema 20). Reakcija započinje otvaranjem ozonida protonovanjem peroksidnog atoma kiseonika i nastaje stabilniji karbokatjon **96** koji sa intermedijerom **B** gradi pentaoksan **97**. Pentaoksan u prisustvu kiseline podleže premeštanju, verovatno preko intermedijera **98** i **99**, pri čemu nastaje tetraoksan **100** u prinosu od oko 30%.



Shema 20

Reakcijom aldehida **101** i trimetilsilil-peroksida u prisustvu TMSOTf dobijeni su tetraoksani **102** (Shema 21). U svim slučajevima proizvodi su izolovani kao 3,6-*trans* izomeri. I treća grupa tetraoksana, **104**, dobijena je reakcijom aldehida **103** sa 30% vodonik-peroksidom, u vodenom etanolu u prisustvu razblažene sumporne kiseline (Shema 21).



Shema 21

Tetraoksani **100**, **102** i **104** su ispitivani prema *P. falciparum* FCR3 soju, a istovremeno je ispitivana njihova citotoksičnost prema FM3A ćelijskim linijama raka. Podaci su dati u Tabeli 11. Na osnovu tih podataka može se uočiti da su sve tri grupe tetraoksana značajno manje aktivne prema FCR3 u odnosu na artemizinin (**1**). Takođe, može se uočiti da ova jedinjenja pokazuju vrlo slabu toksičnost, sa izuzetkom **102b** i **104d**. Nađeno je da je, kod derivata **100**, *trans*-izomer 30 puta aktivniji od *cis*-izomera (**100b** prema **100a**). Zamenom MeO-grupe atomom fluora (**100c** → **100d**) dolazi do značajnog porasta aktivnosti i to gotovo 40 puta. Međutim, kada se slična promena

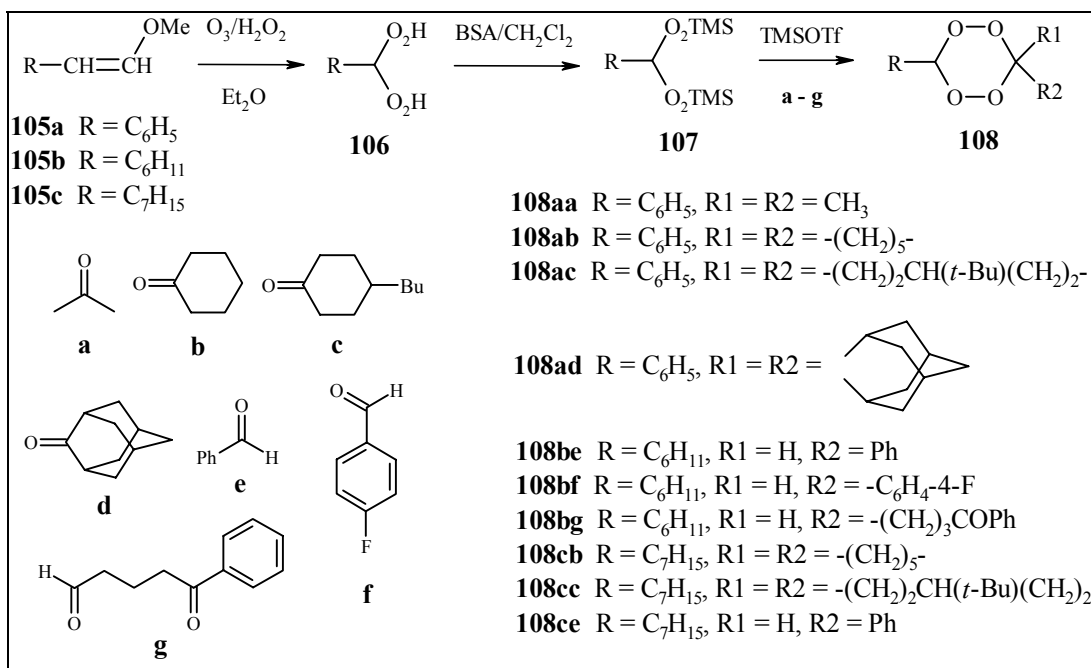
izvrši na aromatičnom jezgru koje je mnogo bliže tetraoksanskom prstenu (**104a** → **104b**) praktično nema promene aktivnosti.

Tabela 11: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnost tetraoksana **100**, **102** i **104** prema *P. falciparum* i FM3A ćelijama raka

	EC ₅₀ (nM)	
	FCR3	FM3A
100a	400	NT ^a
100b	12000	NT ^a
100c	2000	NT ^a
100d	510	NT ^a
102a	1500	NT ^a
102b	200	11000
102c	1100	NT ^a
102d	14000	NT ^a
104a	790	NT ^a
104b	500	NT ^a
104c	600	3000
104d	NT ^a	NT ^a
artemizinin 1	IC ₅₀ = 7,8 nM	10000

^a NT – nije toksičan pri koncentraciji $1 \cdot 10^{-4}$ M

Wataya i saradnici su prvi opisali dobijanje mešovutih tetraoksana (Shema 22).⁶⁷ Ozonolizom metil-enol etara **105** u dietil-etru u prisustvu suvog vodonik-peroksida dobijeni su geminalni dihidroperoksidi **106**, koji su pomoću BSA prevedeni u trimetilsilil-peroksi-etre **107**. Oni u reakciji sa različim karbonilnim jedinjenjima (**a-g**) u prisustvu jednog ekvivalenta TMSOTf daju mešovite tetraoksane **108** u dobrom prinosu (14 - 53%).



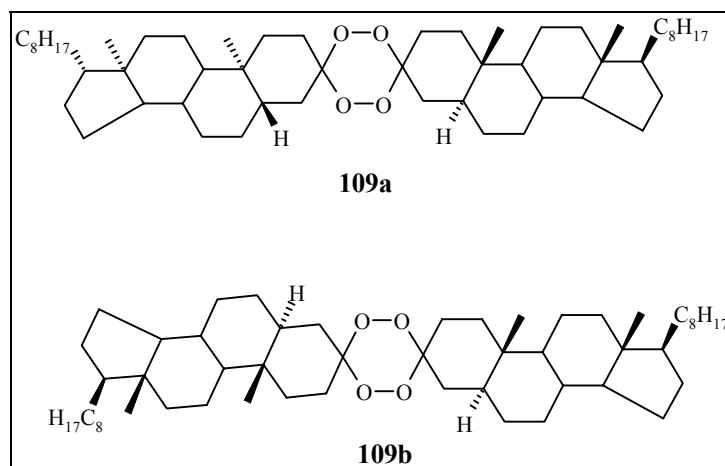
Shema 22

Tabela 12: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti tetraoksana **108** prema *P. falciparum*.

	FCR3 EC ₅₀ (nM)
108ab	2800
108be	180
108bf	720
108bg	100
108cb	1800
108cc	620
artemizinin 1	IC ₅₀ = 7,8 nM

Neki od tetraoksana **108** su ispitivani prema *P. falciparum* FCR3 soju i podaci o njihovim aktivnostima dati su u Tabeli 12. Može se uočiti da su svi ispitivani tetraoksani **108** značajno manje aktivni od artemizina (**1**). Najaktivniji **108bg** (EC₅₀ = 100 nM) gotovo je 13 puta manje aktivan od **1**.

Šolaja i saradnici prvi su opisali *bis*-steroidne tetraoksane.⁴⁶ Peroksi-acetalizacijom 5- α -holestan-3-ona, koja je katalizovana kiselinama, dobijena su oba moguća diastereoizomera *bis*(3-dioksi-5 α -holestana), **109a** i **109b**. Jedan je dobijen reakcijom sa 30% vodonik-peroksidom u tetrahidrofuranu u prisustvu katalitičke količine koncentrovane HCl, na sobnoj temperaturi. Drugi je dobijen u smeši benzen / etanol / voda u prisustvu koncentrovane sumporne kiseline na 0 °C. Pokušaji da se odgovarajući proizvodi dobiju iz 5 β -holestan-3-ona (3-koprostanon) nisu dali uspeh, već je izolovan proizvod čija struktura odgovara 1,1'-dihidroperoksidu tipa **68**. Diastereomer **109a** koji ima nižu tačku topljenja i manju vrednost $[\alpha]_D$, pokazuje umerenu antimalarijsku aktivnost (D6 IC₅₀ = 155 nM).



2.3.3. *Mehanizam dejstva*

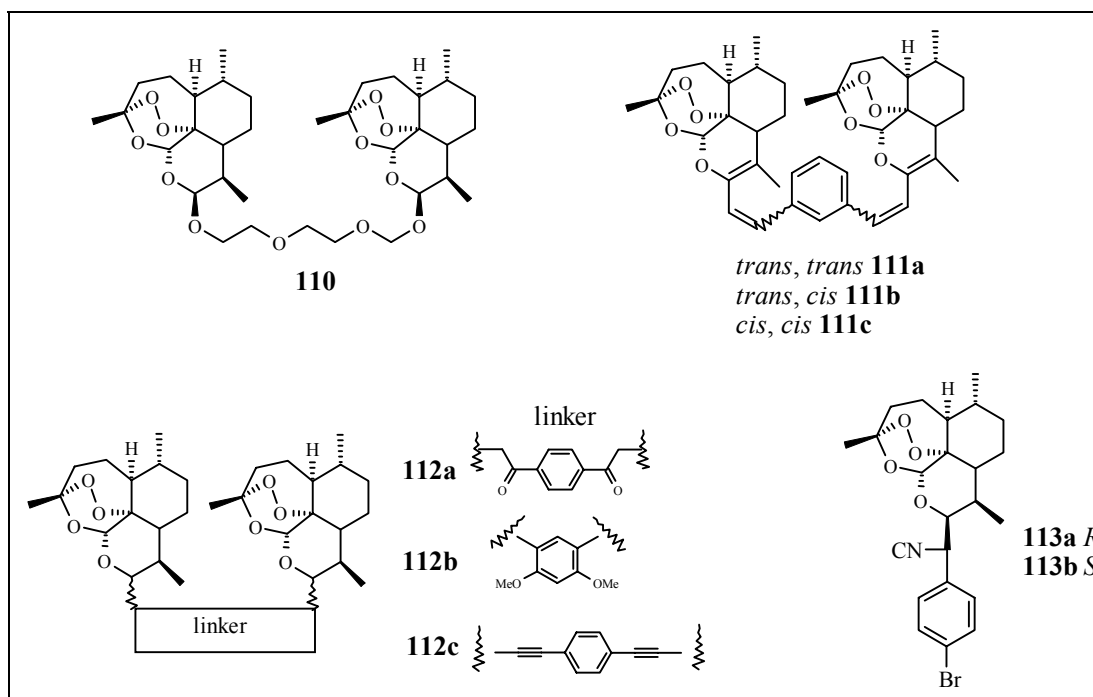
O mogućem mehanizmu delovanja tetraoksana prema parazitu malarije postoji znatno manje literaturnih podataka nego što je to slučaj sa derivatima artemizinina. Ne postoje podaci o sistematskom ispitivanju hemijskog ponašanja tetraoksana u prisustvu različitih soli gvožđa ili hema. Takođe nije poznato da li su vršena ispitivanja mogućih interakcija tetraoksana sa proteinima ili enzimima koji potiču iz parazita. Ipak, vršena su neka istraživanja koje posredno upućuju na moguće načine delovanja tetraoksana.

Tetraoksani su takođe eritrocitni antimalarici. To ukazuje na mogućnost da je njihov mehanizam dejstva vrlo sličan načinu na koji deluju artemizinin i njegovi derivati. Proizvodi kod kojih se u blizini tetraoksanskog prstena nalaze velike grupe (**94c**) kao i proizvodi sa većim brojem metil-grupa (**94i**, **94n**, **94nj**) pokazuju značajno manju aktivnost u odnosu na **91** (Tabela 10).^{65, 68} Razlog ovako velikog pada aktivnosti mogu biti jedino sterne prirode. Zbog prisutnih supstituenata peroksidne grupe su sterno zaštićene i manje dostupne reakciji sa hemom. Nakon detaljnijih farmako-kinetičkih ispitivanja, Vennerstrom ukazuje da tetraoksan **91** i artemizinin nemaju sasvim isti mehanizam delovanja.⁶⁹ Kao i artemizinin, i **91** pokazuje sinergični efekat sa meflokinom, ali za razliku od artemizinina, **91** pokazuje sinergični efekat i sa hlorokinom. U *in vivo* eksperimentima pokazano je da **91** pokazuje sinergičan efekat i sa samim artemizininom, za razliku od derivata artemizinina koji sa njim pokazuju samo kumulativni efekat. Sinergični efekti se pokazuju prema D6 i, što je bitnije, prema W2. Tetraoksan **91** pokazuje znatno duže vreme dejstva. Subkutanom administriranjem 3 dana pre infekcije miševa sa *P. berghei*, više od 50% miševa biva izlečeno. Suprotno tome, pod istim uslovima subkutanom administracijom artemizinina nije zabeležen ni jedan slučaj ozdravljenja. To bi trebalo da znači da se tetraoksani znatno sporije metabolički razlažu od artemizinina. Inkubacijom **91** i artemizinina sa rekombinovanim humanim citohrom P450 (CYP) mikrozmima utvrđeno je da se **91** i artemizinin metabolički razlažu različitim CYP izozimima

(izozomi su strukturno i katalitički slični, ali ne i identični, enzimi koje proizvodi isti organizam). Utvrđeno je da izozim CYP1A2 dominantno metabolizuje **91**, dok izozim CYP2B6 dominantno metabolizuje artemizinin. Može se zaključiti da artemizinin i tetraoksani imaju različite puteve dejstva, a da im je jedino zajednička inicijalna reakcija sa hemom.

2.4. CITOTOKSIČNOST I ANTIMALARIJSKI PEROKSIDI

Ranije je rečeno da artemizinin i njegovi derivati pokazuju neurotoksični efekat. Sa porastom interesovanja prema artemizininu kao antimalariku rasla je i potreba za ispitivanjem citotoksičnosti artemizininina i derivata. Primeri koji slede samo su ilustracija tih ispitivanja. Ispitivana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost dimera artemizininina **110-112** prema keratinocitima pacova.⁷⁰ Prikazani dimeri su aktivniji od kalcitriola pri μM koncentracijama, međutim, pri nM koncentracijama njihova aktivnost značajno opada. Ispitivana je i njihova antitumorna aktivnost prema panelu od 60 ćelijskih linija raka. Svi prikazani dimeri pokazuju značajnu aktivnost prema ćelijama leukemije i prema COLO 205 ćelijskoj liniji raka debelog creva. Pored toga treba istaći značajnu aktivnost dimera **110** prema HS 578T ćelijskoj liniji raka dojke, dimera **111c** prema ćelijskim linijama melanoma i dimera **112a** i **112c** i prema CAKI-1 ćelijskoj liniji raka bubrega.

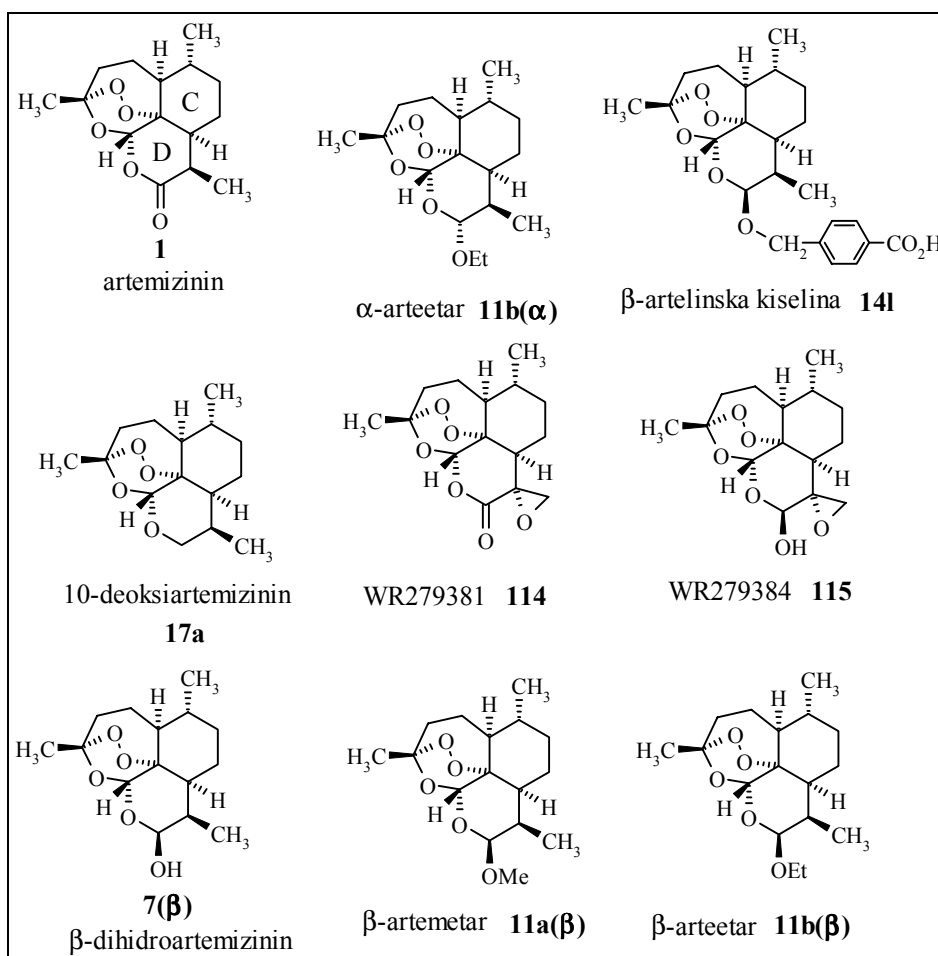


Derivati artemizininina **113** pokazali su visoku antiproliferativnu aktivnost prema A549 ćelijskoj liniji raka pluća i P388 ćelijskoj liniji leukemije.⁷¹ Osim toga, ova dva derivata indukuju

akumulaciju P388 ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa i istovremeno indukuju apoptozu kod 50% ćelija.

Interakcije između molekula ostvaruju se na osnovu njihovih stereoelektronskih osobina. Smatra se da su elektrostatičke karakteristike, koje se ispoljavaju preko Van der Waals-ovih površina, ključni faktor na osnovu koga ligand prepoznaje receptor. Interakcijom preko komplementarnih površina liganda i receptora ostvaruje se biološka aktivnost. Osim toga, stereoelektronske osobine molekula definisane su i prostornim rasporedom atoma u molekulu, tako da konformacija i konfiguracija molekula direktno utiču na njegovu biološku aktivnost. Bhattacharjee i Karle su vršili intenzivne proračune stereoelektronskih parametara artemizinin i derivata (Slika 4) i tražili korelaciju sa njihovom neurotoksičnošću.⁷² Parametri koje su izračunavali su:

1. dipolni momenat;
2. pozitivni i negativni molekularni elektrostatički potencijal (MEP+ i MEP-);
3. energija najviše popunjene (HOMO) i najniže nepopunjene (LUMO) orbitale;
4. energija hidratacije;



Slika 4

Kod derivata koji pokazuju najveću neurotoksičnost negativan kraj dipolnog momenta je usmeren prema peroksidnoj grupi. Utvrđeno je da neurotoksičnost ovih derivata opada sa porastom vrednosti dipolnog momenta. Tri derivata koja pokazuju najveću neurotoksičnost, **7(β)**, **11a(β)** i **11b(β)** imaju vrednosti dipolnih momenata $< 2,4$ D, dok je kod ostalih derivata ona u opsegu $3,5 - 7,8$ D. Niska polarnost je povezana sa njihovom većom lipofilnošću što im olakšava prolazak kroz barijeru CNS-a.

Manje toksična jedinjenja imaju veće vrednosti MEP+ koji se prostire preko prstena C. Manje toksična jedinjenja imaju samo jedan veliki region negativnog potencijala, koji se širi od trioksanskog prstena prema slobodnom elektronskom paru na O-C(10). Toksičnija jedinjenja (**7(β)**, **11a(β)** i **11b(β)**) imaju dve dobro definisane zone MEP- koje se prostiru od trioksanskog prstena prema O-C(10) i prema prstenu C. Na osnovu toga proizilazi da neurotoksičnija jedinjenja ostvaruju dve odvojene interakcije sa receptorom.

Utvrđeno je da su vrednosti energije HOMO i LUMO orbitala niske. Za HOMO kreću se u opsegu $-0,412$ do $-0,377$, a za LUMO u opsegu $0,088$ do $0,229$ eV. Ovo ukazuje da su ovi derivati u stanju da lako vrše razmenu elektrona u toku interakcije sa receptorom. Takođe, mala razlika u energijama HOMO i LUMO orbitala ukazuje da se kod ovih molekula promena distribucije naelektrisanja odvija lakim prelaskom elektrona između HOMO i LUMO orbitala.

Jedinjenja koja pokazuju veću neurotoksičnost imaju niže energije hidratacije, odnosno veću lipofilnost. To je u skladu sa već pomenutom činjenicom da upravo ti derivati imaju niže vrednosti dipolnih momenata,.

Derivati **7**, **11a**, **91** i **94** ispitivani su prema NB2a ćelijskoj liniji neuroblastoma.⁶⁵ Artemetar (**11a**) pokazuje slabu neurotoksičnost, dok dihidroartemizinin **7**, koji je pretpostavljeni neposredni metabolit većine derivata artemizina, pokazuje veliku neurotoksičnost. Derivati **94** su 5-10 puta manje neurotoksični od **7**. Međutim, oni i dalje pokazuju veliku citotoksičnost u poređenju sa **11a**. Najmanju neurotoksičnost pokazuju tetraoksani dobiveni iz (-)-mentona, **94lj** ($IC_{50} = 37 \mu M$) i **94m** ($IC_{50} = 40 \mu M$). Najtoksičniji je tetraoksan **94h** ($IC_{50} > 1 \mu M$). Nije uočena povezanost ovih rezultata sa odgovarajućim vrednostima antimalarijske aktivnosti.

Tabela 13: Vrednosti *in vitro* anti-proliferativne aktivnosti **108** prema FM3A

	EC ₅₀ (μM) FM3A
108ab	15
108be	6,5
108bf	4,8
108bg	11
108cb	17
108cc	19
artemizinin 1	10

Tetraoksani **108** ispitivani su i prema FM3A ćelijskoj liniji raka mlečnih žlezda, a podaci su dati u Tabeli 13.⁶⁷ Vrednosti njihove antiproliferativne aktivnosti istog su reda veličine kao i za **1**. Najveću aktivnost pokazuju **108be** (EC₅₀ = 6,5 μM) i **108bf** (EC₅₀ = 4,8 μM).

NAŠI RADOVI

3. NAŠI RADOVI

Prema procenama WHO, zbog novog širenja malarije usled pojave rezistentnih sojeva plazmodiuma, do 2010. godine broj obolelih od malarije bi mogao da se udvostruči. Zbog toga postoji preka potreba za razvojem novih lekova koji bi bili jeftini i lako dostupni, posebno u veoma siromašnim deolovima sveta (Afrika, Azija), efikasni prilikom oralne administracije i pokazivali dobru toleranciju.

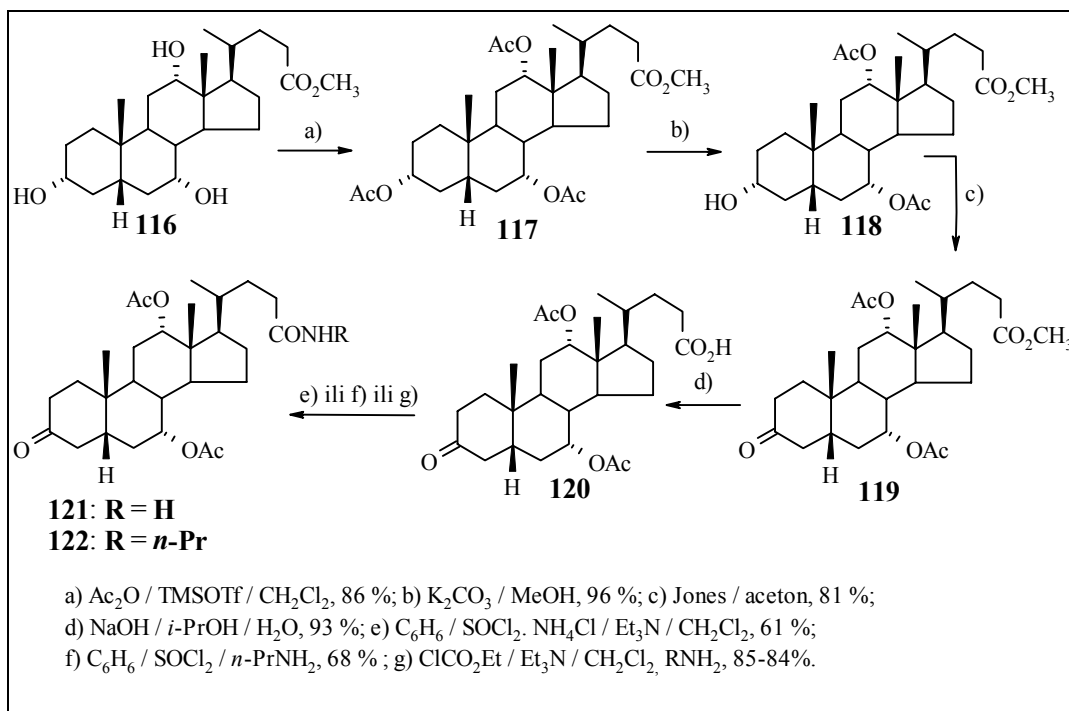
Peroksidni antimalarici predstavljaju vrlo perspektivnu grupu jedinjenja koja je značajna iz nekoliko razloga. Prvo, ova grupa pokazuje veoma dobru *in vitro* i *in vivo* aktivnost prema CQ rezistentnim sojevima *P. falciparum*. Drugo, ova jedinjenja aktivnost ostvaruju nakon interakcije sa hemom, što bar jednim delom smanjuje mogućnost razvoja rezistencije plazmodiuma. I treće, peroksidni antimalarici su lako dostupni i potencijalno jeftini lekovi.

Na osnovu podataka iz literature, može se videti da tetraoksani pokazuju vrlo dobru *in vitro* i *in vivo* antimalarijsku aktivnost. Pokazano je i da upotrebom steroida kao nosioca tetraoksanske grupe (**109a**) ne dolazi do bitnijeg opadanja aktivnosti. Holna kiselina je dobro poznato jedinjenje koje pokazuje niz bioloških aktivnosti. Takođe, kao i artemizinin, ona ima amfifilnu strukturu koja joj olakšava prolazak kroz ćelijske membrane. Zbog toga smo smatrali da bi tetraoksani izvedeni iz holne kiseline mogli pokazati zapaženu antimalarijsku aktivnost. Osim toga, holna kiselina je veoma rasprostranjen prirodni proizvod što omogućava razvoj jeftinih proizvoda.

U toku ovog rada postavljena su dva osnovna cilja. Prvi cilj je bio sinteza *bis*-steroidnih i mešovityh tetraoksana izvedenih iz holne kiseline. Drugi cilj je bio ispitivanje biološke aktivnosti dobijenih tetraoksana i to pre svega njihove antimalarijske, a zatim i antiproliferativne i citotoksične aktivnosti.

Glavni intermedijeri u sintezi obe postavljene grupe tetraoksana su pogodni 3-keto derivati holne kiseline. Sintaza tih derivata je prikazana u Shemi 23. Acetilovanje metil-holata **116** do triacetil-derivata **117** izvedeno pomoću Ac_2O / TMSOTf u dihlormetanskom rastvoru, prema postupku koji je opisan u literaturi.⁷³ Selektivna hidroliza acetil-grupe u položaju C(3) izvedena je anhidrovanim K_2CO_3 u suvom metanolu, a dobijeni alkohol **118** oksidovan uobičajenim postupkom do ketona **119**. Hidroliza metil-estarske grupe do odgovarajuće kiseline **120** izvršena je pomoću NaOH u smeši *i*-PrOH / H_2O na temperaturi ključanja. Keto-kiselina **120** je prevedena u keto-amide **121** i **122** na dva načina. Prema prvom postupku, kiselina **120** je prevedena u odgovarajući acil-

hlorid pomoću SOCl_2 zagrevanjem do ključanja u rastvoru benzena. Rastvarač i višak SOCl_2 su uklonjeni pod sniženim pritiskom, balon napunjen Ar, a sirovi kiselinski hlorid je rastvoren u suvom dihlormetanu. U takav rastvor dodavana je suspenzija 10 ekv. NH_4Cl / Et_3N u dihlormetanu u slučaju **121**, odnosno 2 ekv. $n\text{-PrNH}_2$ u slučaju **122**. Ovako dobijeni amidi su prečišćavani višestrukom hromatografijom na stubu SiO_2 . Prema drugom postupku, kiselina **120** je prvo prevedena u mešoviti anhidrid pomoću ClCO_2Et u prisustvu Et_3N na temperaturi ledenog kupatilu. Tako dobijen mešoviti anhidrid je *in situ* preveden u odgovarajuće amide dodavanjem suspenzije 10 ekv. NH_4Cl / Et_3N u dihlormetanu u slučaju **121**, odnosno 2 ekv. $n\text{-PrNH}_2$ u slučaju **122**.



Shema 23

3.1. bis-STEROIDNI TETRAOKSANI

Prvi cilj ovog dela rada bio je ispitivanje mogućnosti sinteze *bis*-steroidnih tetraoksana izvedenih iz holne kiseline. Drugi cilj bio je ispitivanje njihove biološke aktivnosti – pre svega antimalarijske, a zatim i antiproliferativne i citotoksične aktivnosti, kao i uticaj supstitucije na C(24) ($\text{CO}_2\text{Me} \rightarrow \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CONR}_1\text{R}_2$) na biološku aktivnost.

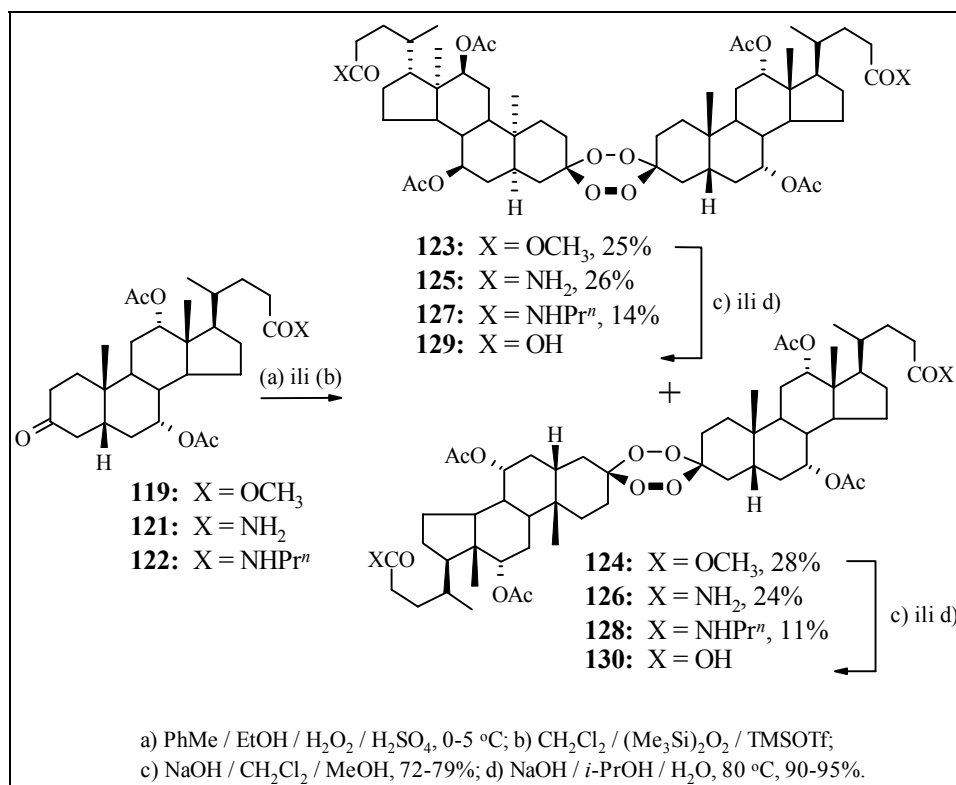
3.1.1. Sinteza

bis-Steroidni tetraoksani koji su prikazani u ovoj disertaciji dobijeni su na dva načina. Prvi je peroksiacetalizacijom 3-keto-derivata holne kiseline. Tako su sintetisani tetraoksani **123-128**. Drugi način je derivatizacija *bis*-steroidnih tetraoksana, transformacijom metil-estarskih grupa prvo

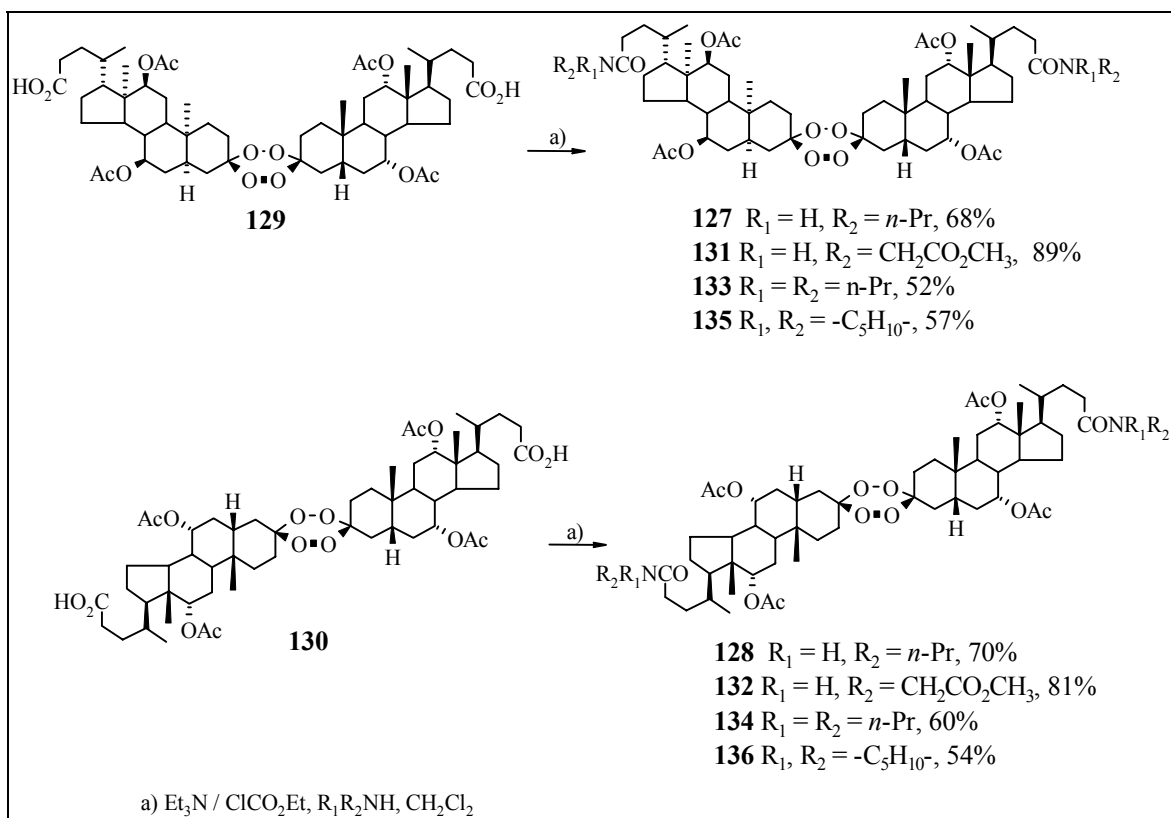
u karboksilne kiseline, a potom do odgovarajućih amida. Tako su sintetisane kiseline **129** i **130**, a njihovom derivatizacijom dobijeni su amidi **131-136** i već opisani amidi **127** i **128**.

Tetraoksani **123** i **124** dobijeni su iz ketona **119** reakcijom peroksiacetalizacije koja je katalizovana kiselinom (Shema 24). Mehanizam prema kom se odvija reakcija detaljno je prikazan u Shemama 10 i 11, pa ovde neće biti ponovo razmatran. Rastvor ketona **119** u toluolu ukapan je u prethodno ohlađenu smešu EtOH / H₂O / konc. H₂SO₄ i nakon intenzivnog mešanja, kada je rastvor bio ohlađen na temperaturu ledenog kupatila, u smešu je dodat 30% vodonik-peroksid. Mešanje je nastavljeno naredna 2 sata u ledenom kupatilu, tokom kojih polazni keton potpuno izreaguje. Reakcija je prekinuta dodavanjem vode i nakon uobičajene obrade i višestruke hromatografije na stubu SiO₂ izolovana su oba predviđena diastereomerna tetraoksana - **123** i **124**. Utvrđeno je da brzina reakcije i njen tok značajno zavise od upotrebljenog organskog rastvarača. Ukoliko se umesto toluola koristi benzen, dobijaju se isti reakcioni proizvodi, ali reakcija traje nešto duže (3 sata), verovatno zbog otežanog mešanja. Reakcija najkraće traje ukoliko se kao rastvarač koristi heptan (1 sat), ali on nije pogodan zbog vrlo slabe rastvorljivosti polaznog ketona. Upotrebom dihlormetana dobija se veoma složena reakciona smeša u kojoj dominiraju različiti hidroperoksi-derivati (Shema 11). Sličan rezultat dobijen je upotrebom drugih polarnih rastvarača kao što su Et₂O, dioksan, CH₃CN ili njihove smeše. Utvrđeno je i da pod primenjenim reakcionim uslovima jedino sa konc. H₂SO₄ nastaju željeni proizvodi u dobrom prinosu. Korišćenjem drugih kiselina kao što su HClO₄, HCl, AcOH, ili ne dolazi do reakcije, ili se dobijaju vrlo složene smeše. Promenom reakcione temperature u intervalu od -50 °C do sobne temperature nisu postignuti bolji rezultati. Nije uspeo pokušaj da se gore opisanim postupkom iz ketona **121** i **122** dobiju odgovarajući tetraoksani u zadovoljavajućem prinosu. U njihovom slučaju kao glavni proizvodi nastajali su proizvodi Baeyer-Villiger-ove reakcije. Tetraoksani **125-128** dobijeni su primenom Jefford-ovog postupka.⁵⁵ U ohlađenu smešu (Me₃Si)₂O₂ i TMSOTf u CH₃CN, u atmosferi Ar, ukapan je rastvor ketona **121** odnosno **122** i smeša je intenzivno mešana na ledenom kupatilu 15 min. Reakcija je prekidana izlivanjem u intenzivno mešanu smešu C₆H₆ / vodeni rastvor NaHCO₃ / led. Nakon obrade i višestruke hromatografije na stubu SiO₂ izolovani su željeni diastereomerni parovi **125** i **126**, odnosno **127** i **128**. Produžavanjem reakcionog vremena nastali tetraoksani lagano se transformišu u proizvode Baeyer-Villiger-ove reakcije. Utvrđeno je i da je za uspešno izolovanje nastalih proizvoda izuzetno važno da se reakciona smeša brzo izlije u smešu C₆H₆ / vodeni rastvor NaHCO₃ / led. Ukoliko se obrada reakcione smeše obavlja prema propisu koji je dat u literaturi (ekstrakcija organskim rastvaračem) dolazi do razlaganja dobijenih tetraoksana u polazni keton i u odgovarajuće laktone. Takođe, utvrđeno je i da keton **119** pod ovim uslovima daje prethodno opisane proizvode **123** i **124**, ali u znatno nižem prinosu i da u reakciji nastaje značajna količina njegovih laktone.

Tetraoksani **129-136** dobijeni su derivatizacijom tetraoksana **123** i **124** (Shema 24 i 25). Kiseline **129** i **130** dobijene su hidrolizom metil-estara **123** i **124**, na dva načina. Prema prvom postupku hidroliza je izvršena pomoću NaOH na sobnoj temperaturi. Estri su rastvarani u smeši CH₂Cl₂ / MeOH na sobnoj temperaturi i u smešu dodavan je 1,25 M rastvor NaOH. Mešanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi naredna 3 dana. Reakcija je prekidana dodavanjem glac. AcOH i nakon obrade reakcione smeše izolovane su kiseline **129** odnosno **130**. Ispitani su i neki drugi postupci za hidrolizu metil-estarske grupe u cilju skraćivanja reakcionog vremena: hidroliza pomoću LiOH i K₂CO₃ u MeOH na sobnoj i povišenoj temperaturi nije dala željene proizvode; na kraju, ispitana je hidroliza po postupku koji je opisan prilikom dobijanja kiseline **120**. Hidroliza je vršena pomoću NaOH, na temperaturi ključanja reakcione smeše. Estri su rastvarani u smeši *i*-PrOH / H₂O, dodavano je 3 ekv. NaOH (1,5 ekv. po metil-estarskoj grupi). Smeša je zagrevana na temperaturi ključanja i nakon 15 min. reakcija je prekinuta izlivanjem u smešu CH₂Cl₂ / H₂O. Nakon pažljivog zakišeljavanja vodenog sloja na pH = 2 i obrade izolovane su kiseline **129** i **130** u nešto boljem prinosu nego prema prvom postupku (90-95% prema 72-79%). U toku rada tetraoksanske kiseline su uspešno prevedene u odgovarajuće amide. Takva transformacija nam je omogućila da sintetišemo različite amide, a da ne moramo da vršimo sintezu svih neophodnih 3-keto derivata. Sinteza amida **131-136**, kao i već opisanih amida **127** i **128**, (Shema 25), izvršena je prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** i **122** pomoću mešovitog anhidrida.



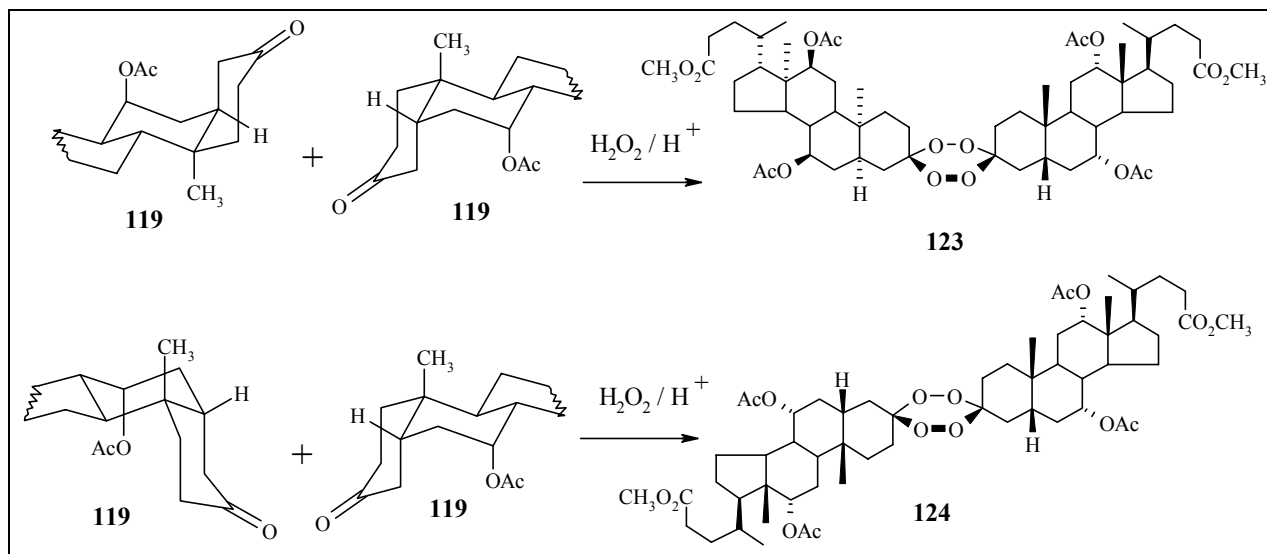
Shema 24



Shema 25

3.1.2. Struktura

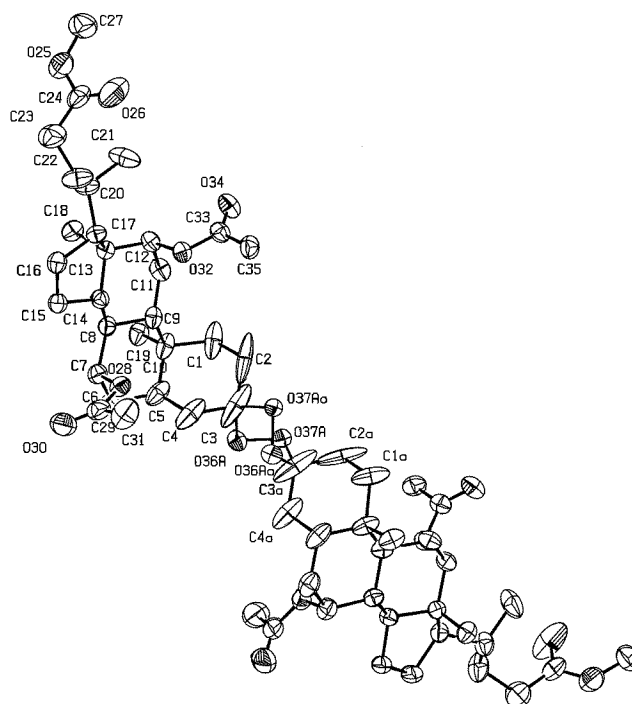
Kada se za sintezu tetraoksana koriste hiralni ketoni mogu se očekivati dva diastereoizomerna proizvoda. Oni nastaju kao posledica dva moguća načina na koji molekuli ketona mogu međusobno da se orijentišu (Shema 26).



Shema 26

U svim slučajevima kada su tetraoksani dobijani peroksiacetalizacijom odgovarajućih ketona (**123-128**) dobijena su oba predviđena diastereomera. Izomeri su uspešno razdvojeni

hromatografijom na stubu SiO₂ (za detalje videti Eksperimentalni deo) i potom okarakterisani. Takođe, transformacijama diastereomernih kiselina **129** i **130** dobijeni su odgovarajući parovi amida (**131-136**). U Tabeli 14 date su vrednosti odabranih fizičkih i spektralnih podataka tetraoksana **123-136**. Kao što se može očekivati diastereomeri se međusobno razlikuju po tačkama topljenja i vrednosti specifične rotacije. Analizom podataka koji su dati u Tabeli 14 uočavaju se izvesne pravilnosti. Tako, diastereomeri koji imaju višu tačku topljenja istovremeno imaju i veće vrednosti specifične rotacije [**123, 125, 127, 129, 131, 133, 135**, $t_t = 252-211$ °C, $[\alpha]_D^{20} = (+74,60) - (+63,60)$] u odnosu na svoj par [**124, 126, 128, 130, 132, 134, 136**, $t_t = 202-167$ °C, $[\alpha]_D^{20} = (+50,75) - (+32,50)$]. NMR Spekttri diastereomera su gotovo identični. Ipak, uočene su razlike u ¹H NMR spektrima u oblastima u kojima se javljaju signali acetatnih CH₃-grupa. Kod članova prve serije koji imaju višu tačku topljenja i veću vrednost specifične rotacije, signali koji potiču od acetatnih CH₃-grupa javljaju se u obliku *jednog* proširenog singleta. Kod članova druge serije koji imaju nižu tačku topljenja i manju vrednost specifične rotacije odgovarajući signali se javljaju kao *dva* proširena singleta različite veličine, od kojih je singlet na nižem polju većeg intenziteta. Ovakav izgled signala acetatnih CH₃-grupa upućivao nas je na zaključak da su tetraoksani u prvoj seriji C₂ simetrični. Odstupanje od ove pravilnosti javlja se u spektru kiseline **129** prilikom snimanja spektra u DMSO-d₆. Kod svih *bis*-steroidnih tetraoksana u ¹³C spektru nalazi se karakterističan signal za peroksiacetalni ugljenikov atom oko 108 ppm. U masenim spektrima svih *bis*-steroidnih tetraoksana javljaju se signali koji potiču od molekuskog jona i to kao [M]⁺, [M+H]⁺ i / ili [M+Na]⁺ joni, tako da je na osnovu njih potvrđena pretpostavka o *bis*-steroidnoj strukturi jedinjenja. Međutim, navedeni podaci, kao ni ostali spektralni podaci ovih tetraoksana nisu dovoljni da bi se pripisala struktura jednoj i drugoj seriji. To je učinjeno kristalografskom analizom tetraoksana **123**, čiji je ORTEP prikaz dat na Slici 5, čime je potvrđena pretpostavka o C₂ simetriji tetraoksana **123**. Šestočlani tetraoksanski prsten zauzima uvrnutu konformaciju, što predstavlja razliku u odnosu na jednostavnije tetraoksane.⁷⁴ Prvo što se uočava je da su acetoksi-grupe na C(7) i C(12) jednog steroida usmerene suprotno od acetatnih grupa drugog steroida i da se nalaze na suprotnim stranama zamišljene ravni koju formiraju steroidni skeleti. Takođe može se uočiti *cis*-orijentacija C(2) i C(2a) atoma oko tetraoksanskog prstena i može se reći da ovaj molekul ima *cis*-C(2)C(2a) konformaciju. Utvrđene su dve pozicije (A i B) za O(36)-O(37) (kristalografske oznake) atome. Endociklični torzioni uglovi su 82°, -44°, -40°, 82°, -44°, -40°, $\Delta C_2 = 4^\circ$ za poziciju A (počev sa C(3)-O(36)-O(37)-C(C3*)) i -77°, 40°, 43°, -77°, 40°, 43°, $\Delta C_2 = 3^\circ$ ⁷⁵ za poziciju B.



Slika 5: ORTEP prikaz tetraoksana **123**.

Na osnovu podataka dobijenih kristalografskom analizom tetraoksana **123**, i poređenjem ostalih fizičkih i spektralnih podataka, predloženo je da tetraoksani prve serije **123**, **125**, **127**, **129**, **131**, **133**, **135** pripadaju *cis*-seriji (*cis*-**C(2)**,**C(2a)**), u odnosu na tetraoksanski prsten, (Slika 5). Na osnovu toga, razumno je pretpostaviti da tetraoksani druge serije **124**, **126**, **128**, **130**, **132**, **134**, **136** pripadaju *trans*-seriji (*trans*-**C(2)**,**C(2a)**) u odnosu na tetraoksanski prsten (vidi Sliku 5).

Tabela 14. Vrednosti odabranih fizičkih i spektralnih podataka tetraoksana **123-136**.

Jedinjenje	tt (°C)	$[\alpha]_D^{20}$	NMR (CDCl ₃)		m/z; (metoda) ^a
			¹ H CH ₃ COO	¹³ C C(OO) ₂	
123	251-252	+ 74,60	2,10	108,59	1041,7 [M+H] ⁺ ; (ESI-MS)
124	167-170	+ 50,75	2,12 2,07	108,62	1041,6 [M+H] ⁺ ; (ESI-MS)
125	211-217	+72,06	2,10	108,62	1011,6 [M+H] ⁺ ; (LSI-MS)
126	196-199	+ 44,80	2,12 2,07	108,66	1011,6 [M+H] ⁺ ; (LSI-MS)
127	240-243	+ 73,90	2,10	108,62	1095,7 [M+H] ⁺ ; (LSI-MS)
128	171-174	+ 41,66	2,12 2,07	108,66	1095,8 [M+H] ⁺ ; (LSI-MS)
129	228-232	+71,04	2,00 ^a 2,04 ^a	108,24 ^a	1035,6 [M+Na] ⁺ ; (LSI-MS)
130	199-202	+49,07	2,12 2,08	108,68	1013,5 [M+H] ⁺ ; (LSI-MS)
131	249-251	+ 63,60	2,10	108,64	1177,61 [M+Na] ⁺ ; (ESI-MS)
132	170-172	+ 37,80	2,12 2,08	108,64	1177,70 [M+Na] ⁺ ; (ESI-MS)
133	222-227	+ 64,60	2,10	108,66	1179,87 [M] ⁺ ; (ESI-MS)
134	173-175	+ 49,10	2,12 2,07	108,66	1201,90 [M+Na] ⁺ ; (ESI-MS)
135	229-234	+ 68,60	2,10	108,64	1147,70 [M+H] ⁺ ; (LSI-MS)
136	182-183	+ 32,50	2,12 2,08	108,66	1147,83 ([M+H] ⁺); (LSI-MS)

^a Spektri snimani u DMSO-*d*₆.

3.1.3. Antimalarijska aktivnost

Svim *bis*-steroidnim tetraoksanima ispitana je *in vitro* antimalarijska aktivnost prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2. Ispitivanja aktivnosti vršena su u Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Washington, DC. Dobijene vrednosti navedene su u Tabeli 15.

Ispitivanje aktivnosti zasniva se na određivanju potrošnje ³H-hipoksantina od strane parazita i inhibicija ugradnje izotopa se pripisuje aktivnosti kontrolne ili ispitivane supstance. Ugradnja hipoksantina je mera sinteze DNK parazita tako da inhibicija njegove ugradnje predstavlja

inhibiciju rasta parazita. Kao kontrolne supstance uzimani su provereni antimalarici. Za kvantitativno *in vitro* određivanje efikasnosti lekova korišćeni su dobro okarakterisani sojevi *P. falciparum* D6 i W2. Prebrojavanje uzoraka vršeno je scintilatornim brojačem, a rezultati su automatizovano prikupljeni softverom razvijenim u WRAIR-u. Za svaku supstancu je određivan koncentracioni profil odgovora i njihove antimalarijske aktivnosti su prikazane kao 50% inhibitorne koncentracije (IC₅₀).

Ukoliko se prati promena aktivnosti sa promenom supsticuje na C(24) može se reći da u poređenju sa metil-estrima, koji pokazuju umerenu aktivnost, aktivnost raste uvođenjem amidne grupe. Dosta visok nivo aktivnosti se zadržava uvođenjem jednog alkil susptituenta na *N*-atom amidne grupe, ali uvođenjem drugog susptituenta na *N*-atom amidne grupe - derivati **133-136** - drastično se smanjuje aktivnost. U slučaju glicil-amida **131** i **132** dolazi do smanjivanja aktivnost u odnosu na amide **125-128**.

Utvrđeno je da između diastereomera postoje razlike u antimalarijskoj aktivnosti, ali nije utvrđeno da su jedinjenja jedne serije uvek aktivnija od odgovarajućih iz druge serije. Tako, kod primarnih amida **125** i **126**, *cis*-C(2)C(2a) diastereomer pokazuje *veću* aktivnost prema oba soja, dok je u slučaju piperidinskih amida *cis*-C(2)C(2a) izomer **135** *manje* aktivan prema oba soja u odnosu na izomer **136**. U slučaju *N*-Pr^{*n*}-amida *cis*-C(2)C(2a) izomer **127** je aktivniji od *trans*-C(2)C(2a) izomera **128** prema D6 soju, ali je **128** aktivniji prema W2 soju. U slučaju glicil-amida izomeri pokazuju dosta bliske aktivnosti.

Veća aktivnost prema jednom od *P. falciparum* sojeva posledica je hemijske transformacije na C(24) a ne *cis*- i *trans*- izomerije. Tako su primarni amidi **125** i **126** i piperidinski amidi **135** i **136** aktivniji prema D6 soju, dok su *N*-Pr^{*n*}-amidi aktivniji prema W2 soju. U slučaju glicil-amida aktivnost prema sojevima nije tako jednoznačna. Prvi diastereomer, **131** nešto je aktivniji prema W2, dok je drugi, **132** malo aktivniji prema D6.

Vrednosti antimalarijske aktivnosti metil-estara **123** i **124**, kiselina **129** i **130** kao i di-*N*-Pr^{*n*}-amidi **133** i **134** nisu određene kao konačne vrednosti pa nije moguće utvrditi njihovu relativnu aktivnost. Njihove antimalarijske aktivnosti mogu biti razmatrane samo u kontekstu uticaja supstituenta na C(24) na aktivnost.

Od 14 sintetisanih *bis*-steroidnih tetraoksana tri - **125**, **127** i **128** - pokazuju aktivnost koja je veća od aktivnosti koju pokazuje *bis*-(2-metil)cikloheksilidenski tetraoksan **91**. Njihove aktivnosti su bliske aktivnostima koje pokazuje artemizinin (**1**) i artelinska kiselina (**14k**). Ovi rezultati pokazuju značajan doprinos holne kiseline kao nosioca tetraoksanske strukture antimalarijskoj aktivnosti. Smatramo da je to, barem jednim delom, posledica amfifilne strukture holne kiseline, koja olakšava prolazak ovih molekula kroz ćelijske membrane. Treba podsetiti, da se velika antimalarijska aktivnost artemizininina i derivata pripisuje i njegovoj amfifilnoj strukturi.

Najveću aktivnost pokazuje tetraoksan **127** prema D6 soju ($IC_{50} = 9,29$ nM), i po toj aktivnosti se sasvim približio artemizininu **1** ($IC_{50} = 8,6$ nM) i artelinskoj kiselini **14k** ($IC_{50} = 9,72$ nM). Međutim, **127** pokazuje dosta slabiju aktivnost prema W2 soju, i to 6,5 puta, i to je njegova slaba strana. Među *bis*-steroidnim tetraoksanima najveću aktivnost prema W2 soju pokazuje jedinjenje **125** ($IC_{50} = 18,79$), koji kao i **127** pripada *cis*-C(2)C(2a) seriji. Tetraoksani **131** i **132**, koji se mogu smatrati derivatima prirodnog konjugata holne kiseline – glikoholata – u poređenju sa ostalim *bis*-steroidnim tetraoksanima, pokazuju umerenu aktivnost.

Vrlo slaba aktivnost tetraoksana **133-136** u poređenju sa **127** i **128** jasno ukazuje na značajan doprinos amidnog vodonika na antimalarijsku aktivnost. Zamenom atoma vodonika u amidnoj grupi (**127** i **128**) drugom *n*-propil grupom (**133** i **134**) odnosno uvođenjem piperidinskog prstena (**135** i **136**) dolazi do naglog pada aktivnosti. U prvom slučaju 456 (D6) i 211 (W2) puta, a u drugom slučaju 83 (D6) i 11 (W2) puta. Razlike u aktivnosti između di-*N*-supstituisanih amida – **133** i **134** prema **135** i **136** pokazuju da je za antimalarijsku aktivnost povoljnije prisustvo konformaciono manje fleksibilnog sistema (**135** i **136**).

Navedene hemijske transformacije odvijaju se na velikoj udaljenosti od potencijalne farmakofore – tetraoksanskog prstena, i malo je verovatno da utiču na promenu njegovog biohemijskog potencijala. Ipak, očigledan je uticaj ovih transformacija na aktivnost tetraoksana **123-136**. To bi moglo da znači da navedene transformacije utiču na sposobnost molekula da prolazi kroz membranu eritrocita i / ili da utiču na sposobnost molekula da ostvari neke od interakcija koje bi uticale na njegovo biološko dejstvo, kao što je interakcija sa hemom ili nekim proteinom iz parazita.

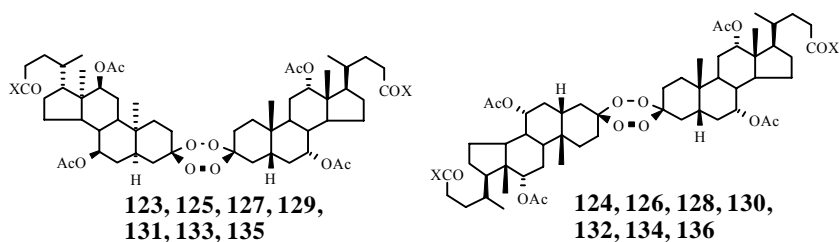

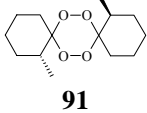


Tabela 15: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti tetraoksana **123-136**.

X	<i>cis</i> -C(2)C(2a)			<i>trans</i> -C(2)C(2a)		
	Jed.	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (nM)		Jed.	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (nM)	
		D6	W2		D6	W2
OCH ₃	123	>96	>96	124	>96	>96
NH ₂	125	23,74	18,79	126	128,58	59,35
NHPr ⁿ	127	9,29	60,43	128	20,08	30,12
OH	129	>99	>99	130	>99	>99
NHCH ₂ CO ₂ CH ₃	131	139,20	125,60	132	140,90	148,8
N(Pr ⁿ) ₂	133	>4239	>4239	134	>4239	>4239
	135	771,40	356,20	136	221,40	108,60
artemizinin 1		8,60 ^a	7,30 ^a	 91	55 ^d	32 ^d
artemetar 11a		2,92 ^b	1,00 ^b	hlorokin^e	13,76	185,38
artelinska kiselina 14k		9,72 ^c	3,30 ^c	meflokin^e	28,29	5,02

^a Podaci iz ref. 74; ^b Podaci iz ref. 21; ^c Podaci iz ref. 20; ^d Podaci iz ref. 63; ^e Kontrolni lek;

3.1.4. Antiproliferativna i citotoksična aktivnost

Ispitivana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost svih *bis*-steroidnih tetraoksana prema FemX i HeLa ćelijskim linijama, a tetraoksani **131-136** su ispitivani i prema K562 ćelijskoj liniji leukemije. Podaci se nalaze u Tabeli 16.

Humane maligne ćelije su gajene u hranljivoj podlozi RPMI-1640 sa L-glutaminom sa dodatkom 10% termički inaktivisanog FeS. Ćelije su rasle na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Testirane supstance su rastvarane u DMSO i razblaživane hranljivom podlogom do željene koncentracije i dodavane u ćelijske kulture. Vrednosti IC₅₀ određivane su spektrofotometrijski nakon 72 sata kontinualnog dejstva agensa MTT testom. Vrednosti IC₅₀ su definisane kao

koncentracije pri kojima je inhibirano preživljavanje 50% ispitivanih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak.

Ispitivani *bis*-steroidni tetraoksani ne pokazuju značajnu razliku u IC_{50} vrednostima između Fem-X i HeLa ćelija. Najveću aktivnost pokazuju amidi **125** i **126**, kiseline **129** i **130** i glicil-amid **132** i njihova aktivnost je veoma bliska aktivnosti koju pokazuje *cis*-platina, dok su amid **125** i **132** čak jednaki po aktivnosti sa *cis*-platinom. Ostali ispitivani *bis*-steroidni tetraoksani pokazuju manju aktivnost. Uočava se trend da tetraoksani *cis*-C(2)C(2a) serije pokazuju veću aktivnost od odgovarajućih iz *trans*-C(2)C(2a) serije, sa vrlo uočljivim izuzetkom glicil-amida **131** i **132** i, u nešto manje izraženom obliku metil-estara **123** i **124**. Način smrti HeLa ćelija koju izaziva **128** analiziran je pomoću fluorescentnog mikroskopa, pošto su ćelije bile obojene akridin-oranžom i etidium-bromidom.⁷⁶ Morfološka ispitivanja ćelija koje su 24 časa bile izložene dvostrukoj IC_{50} vrednosti (66 μ M) otkrivaju da visoka koncentracija **128** indukuje razgradnju jedra u mnogo malih fragmenata, što je tipično za apoptozu. Njegov diastereoizomer **127** nema direktan citotoksičan efekat na ćelije. Njegovim dejstvom dolazi do nakomilavanja ćelija u G1 fazi. Isti efekat je ispoljen i prema HeLa i prema Fem-X ćelijama. U prisustvu primarnih amida **125** i **126** ćelije se dele na svoje ćerke ćelije od kojih je jedna živa, a druga rasparčana u obliku apoptoznih tela. Ovakvo ponašanje ukazuje da se u ćerkama ćelijama, pod uticajem primarnih amida **125** i **126**, formira različit genetski materijal koji jednoj ćeliji omogućava dalji život, a druga umire. Tetraoksani **131** – **136** su slabo aktivni prema HeLa i prema K562 ćelijskim linijama, osim glicil-amida **132** koji i prema ovim ćelijama pokazuje izraženu aktivnost ($IC_{50} = 3,5 \mu$ M). Amidi **133-135** su slabo rastvorni i njihova slaba aktivnost je verovatno delom posledica male rastvorljivosti. Međutim, prilikom izlaganja ćelija ovakvim rastvorima amida **133-135** uočeno je izraženo nagomilavanje nerastvorenih čestica na površine ćelijskih membrana. To znači da nerastvorene supstance nisu homogeno ili nasumično raspoređene po ogleđnoj posudi, već se specifično grupišu i nagomilavaju na površine ćelijskih membrana.

Uopšteno govoreći, prilikom izlaganja dejstvu ispitivanih supstanci, HeLa ćelije umiru prema mehanizmu koji je karakterističan za apoptozu, a Fem-X ćelije prema mehanizmu koji je karakterističan za nekrozu.

Tabela 16. Vrednosti *in vitro* antiproliferativne aktivnosti tetraoksana **123-136**.

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM) 72 h		Jedinjenje	IC ₅₀ (μM) 72 h		
	Fem-X	HeLa		Fem-X	HeLa	K562
123	>29	>29	131	108	>100	138,0
124	19,5	20,5	132	4,67	3,67	3,5
125	3,1	3,7	133	48	105	40,0
126	6,2	6,0	134	85	>100	110,0
127	23	33	135	80	90	72,0
128	94	166	136	102	120	76,0
129	4,2	5,2	artemizinin	EC ₅₀ (FM3A) 10		
130	7,6	9,2	cis-platina		3,5	

Ispitivana je citotoksičnost odabranih jedinjenja prema nestimulisanim zdravim ćelijama limfocita (PBMC) i ćelijama PBMC stimulisanim na umnožavanje fitohemaglutininom (PHA). Za ispitivanje su odabrani *cis*-C(2)C(2a) *N*-Prⁿ-amid **127** zato što pokazuje najveću antimalarijsku aktivnost, njegov *trans*-C(2)C(2a) diastereoizomer **128** i *trans*-C(2)C(2a) gly-amid **132** zato što pokazuje najveću antiproliferativnu aktivnost. Podaci njihove aktivnosti su dati u Tabeli 17.

Najveću citotoksičnost pokazuje glicil-amid **132** i njegove IC₅₀ vrednosti su gotovo jednake IC₅₀ vrednostima njegove antiproliferativne aktivnosti. Ovakav rezultat ukazuje da je ovo jedinjenje u istoj meri toksično prema neoplastičnim i imunim ćelijama i to ga eliminiše iz daljeg ispitivanja moguće primene u ovoj oblasti. Povoljnija selektivnost je postignuta u odnosu na antimalarijsku aktivnost. Pomenuto jedinjenje je oko 20 puta manje toksično prema ćelijama imunog sistema nego prema *P. falciparum* D6 soju. *N*-Prⁿ-amidi **127** i **128** su značajno manje citotoksični od tetraoksana **132** i to oko 30 do 100 puta. Istovremeno, *trans*-C(2)C(2a) izomer **128** je oko 3 puta manje citotoksičan od *cis*-C(2)C(2a) izomera. Ovi tetraoksani pokazuju umerenu selektivnost prema neoplastičnim i imunim ćelijama. Suprotno tome, pokazuju izuzetno visoku selektivnost prema imunim ćelijama i *P. falciparum* soju D6. Podaci pokazuju da je potrebno upotrebiti značajno veću količinu tetraoksana **127** i **128** prema ćelijama imunog sistema da bi se postigao isti efekat (IC₅₀) kao prema D6 soju. Ta činjenica je veoma povoljna ukoliko se posmatra iz perspektive njihove moguće primene u lečenju malarije.

Tabela 17. Vrednosti citotoksične aktivnosti **127**, **128** i **132** prema nestimulisanim i stimulisanim ćelijama PBMC.

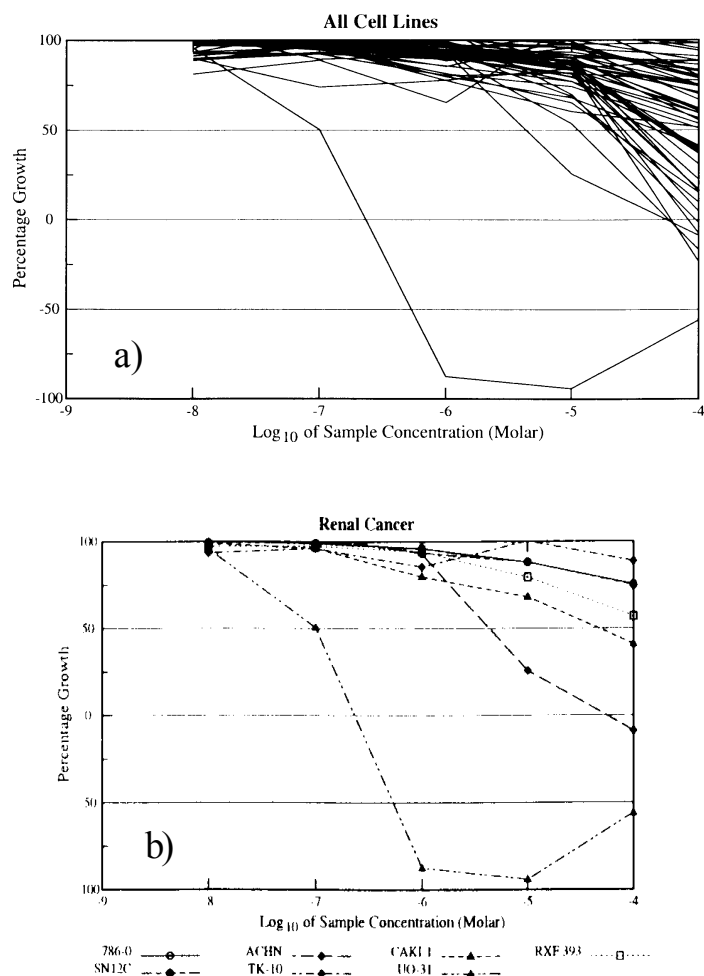
Jedinjenje	Citotoksičnost IC ₅₀ (μM) 72 ^h		Selektivnost							
	PBM C (A)	PBMC + PHA (B) ^a	A/D6	B/D6	A/Fem-X	B/Fem-X	A/HeLa	B/HeLa	A/K562	B/K562
127	>100	96	>10700	10333	>4,35	4,17	>3,03	2,91	-	-
128	>320	251	>15900	12500	>3,40	2,67	>1,93	1,51	-	-
132	2,87	3,00	20,37	21,29	0,61	0,64	0,78	0,82	0,82	0,85

^a Srednje vrednosti inhibicije merene na uzorcima tri zdrave osobe čije su PBMC stimulisane sa PHA.

Pet tetraoksana **123**, **125**, **128**, **129** i **132** je odabrano od strane National Cancer Institute (NIH-NCI), Bethesda, USA⁷⁷ u okviru DTP (Developmental Therapeutics Program), za *in vitro* ispitivanja prema panelu od 60 ćelijskih linije raka čoveka. Vrednosti kojima se izražava aktivnost ispitivanih supstanci (GI₅₀, TGI i LC₅₀) prema ćelijskim linijama kancera čoveka određivane su spektrofotometrijski SRB (sulforodamin B) testom, nakon 48 sata kontinualnog izlaganja ćelijskih linija rastvorima ispitivanih supstanci.

Ispitivani tetraoksani pokazuju relativno slabu aktivnost prema velikoj većini ćelija raka. Amid **125**, kiselina **129** i glicil-amid **132** počinju da pokazuju aktivnost prema većini ćelijskih linija pri mikromolarnim (μM) koncentracijama. Metil-estar **123** i *N*-Prⁿ-amid **128** prve znake aktivnosti pokazuju tek pri koncentraciji od 10 μM. Međutim, *N*-Prⁿ-amid **128** pokazuje veliku aktivnost specifično prema UO-31 ćelijskoj liniji raka bubrega. Odgovarajuće vrednosti koje izražavaju njegovu aktivnost su GI₅₀ = 0,10 μM, TGI = 0,23 μM i LC₅₀ = 0,54 μM (Slika 6). Istovremeno, to je i najveća aktivnost koja je zabeležena kod *bis*-steroidnih tetraoksana. Na žalost, ovakve vrednosti aktivnosti nisu dovoljne i jedinjenja nisu predložena za dalja ispitivanja.

Još 5 tetraoksana je odabrano od strane NIH-NCI za probno *in vitro* testiranje na set od 3 ćelijske linije. Za testiranje se koriste 3 ćelijske linije - NCI-H460 (rak pluća), MCF7 (rak dojke) i SF-268 (rak CNS). Jedinjenje koje prilikom probnog testa pokaže aktivnost koja dozvoljava maksimalano 32 % rasta bar jedne ćelijske linije raka, biva odabrano za dalje testiranje na panel od 60 ćelijskih linija. Za testiranje su odabrani tetraoksani **131** i **133-136**, ali na žalost nisu pokazali potreban stepen inhibicije (Tabela 18).



Slika 6: Zavisnost rasta kancerogenih ćelija od koncentracije tetraoksana 128. a) Svih ispitivanih ćelijskih linija. b) Ćelijskih linija kancera bubrega.

Tabela 18. Vrednosti procenta rasta ćelija raka nakon izlaganja rastvorima tetraoksana 131 i 133-136.

Jedinjenje	Procenat rasta ćelija		
	NCI-H460	MCF7	SF-268
131 ^a	64	52	77
133 ^a	75	67	44
134 ^a	79	67	79
135 ^a	72	85	60
136 ^b	69	78	83

^a Koncentracija 50 μM ; ^b Koncentracija 25 μM ;

3.2. MEŠOVITI TETRAOKSANI

Prvi cilj ovog dela rada bio je da se ispita mogućnost sinteze mešovitih tetraoksana, koji će sa jedne strane zadržati steroidni deo molekula, a sa druge spirocikloalkilidenski deo izveden iz jednostavnih cikličnih ketona. Drugi cilj bio je da se ispita njihova biološka aktivnost – pre svega antimalarijska, a zatim i antiproliferativna i citotoksična aktivnost, kao i faktori koji utiču na te aktivnosti, i to: zamena jednog steroidnog dela molekula *bis*-steroidnih tetraoksana jednostavnim spirocikloalkiliden delom, uticaj veličine prstena i položaja supstituenata u spirocikloalkiliden delu, kao i uticaj supstitucije na C(24) ($\text{CO}_2\text{Me} \rightarrow \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CONHR}_1$).

3.2.1. Sinteza

Mešoviti tetraoksani se mogu dobiti na dva načina: a) peroksiacetalizacijom smeše ketona vodonik-peroksidom; b) peroksiacetalizacijom jednog ketona *gem*-dihidroperoksidom drugog ketona. U oba slučaja zamišljeno je da reakcije budu katalizovane mineralnim kiselinama. Na osnovu stečenog iskustva u sintezi *bis*-steroidnih tetraoksana pretpostavili smo da bi primenom prve metode dobili još složeniju reakcionu smešu koju bi bilo teško prečistiti i izolovati željeni proizvod. Zbog toga smo odlučili da mešovite tetraoksane sintetišemo drugom metodom, a postupak sinteze prikazan je na Shemi 27.

Gem-dihidroperoksid je dobijen modifikacijom postupka koji je opisan u literaturi,⁴⁶ reakcijom ketona **119** sa 30% vodonik-peroksidom u prisustvu katalitičkih količina konc. HCl. Reakcija je izvođena na sobnoj temperaturi u toku 2 sata, a kao rastvarač je upotrebljena smeša $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ (1/3, v/v). Dihidroperoksid **137** je dobijen u visokom prinosu (97%), vrlo čist (više od 95%, ^1H NMR) i korišćen je u sledećem reakcionom koraku bez dodatnog prečišćavanja. Zamenom acetonitrila dietil-etrom ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O} = 1/3$, v/v), takođe nastaje proizvod **137**, u dobrom prinosu, ali prilikom obrade reakcione smeše proizvod se razlaže do polaznog ketona **119**. Kada se upotrebi THF, kao što je opisano u literaturi,⁴⁶ dobija se složena reakciona smeša koja je manje podesna za dalji rad. Postupak za sintezu *gem*-dihidroperoksida koji je razvijen u toku ovog rada ima nekoliko prednosti u odnosu na postupke opisane u literaturi. Ovim postupkom značajno je povećan prinos dobijenog dihidroperoksida (97% prema 40-50%),⁴⁶ izbegnuta je upotreba potencijalno opasnog suvog H_2O_2 ⁴⁵ i postupak je skraćen za jedan reakcioni korak.⁶⁵ U toku rada utvrđeno je da 10 ekvivalenata viška H_2O_2 daje nabolji rezultat i da upotrebom veće ili manje količine H_2O_2 u reakcionoj smeši ostaje veća količina neizreagovanog polaznog ketona.

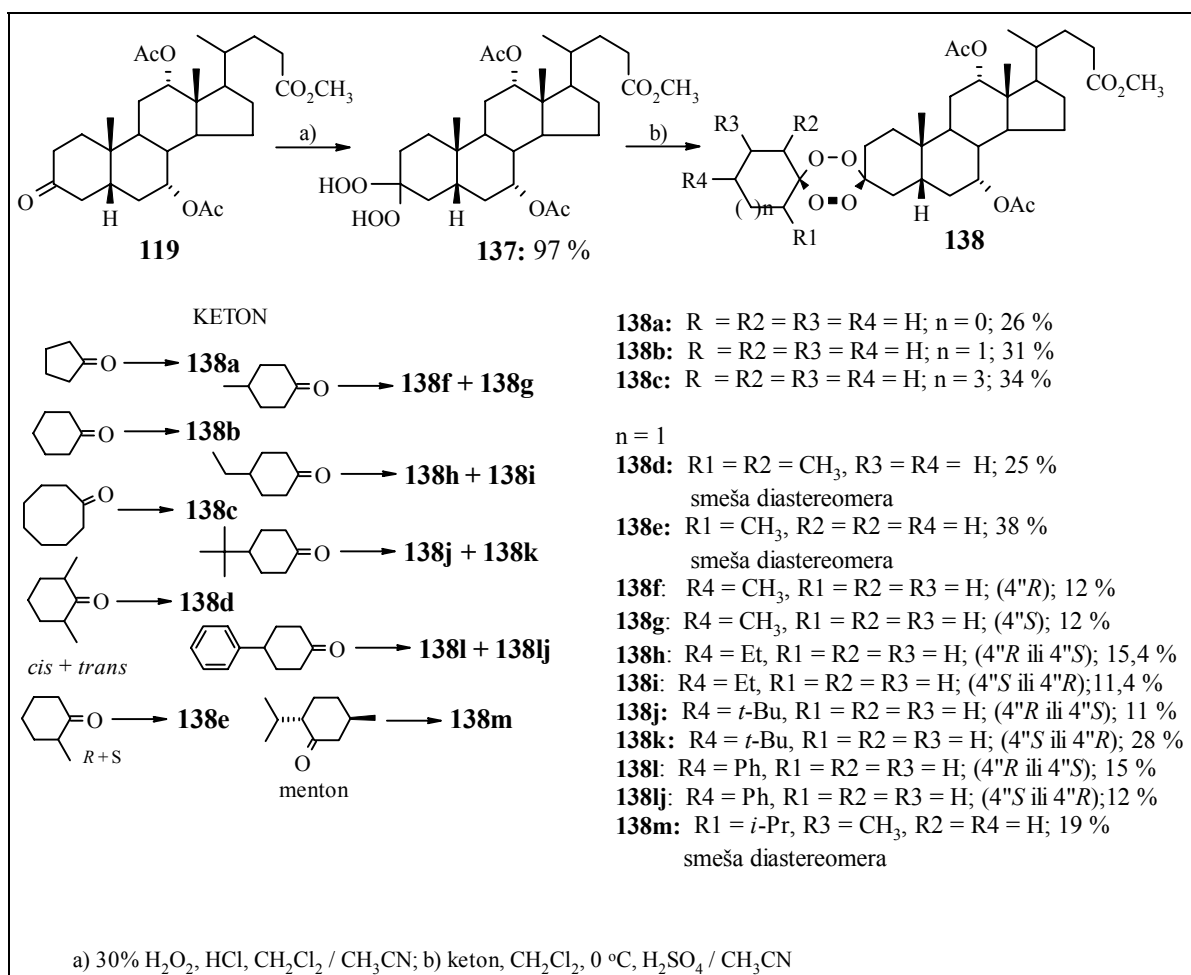
Gem-dihidroperoksid **137** je u sledećem koraku kuplovan sa odabranim cikličnim ketonima. Reakcija je izvođena na temperaturi ledenog kupatila, mešanjem **137** sa 2 ekv. odgovarajućeg ketona u CH_2Cl_2 kao rastvaraču, u prisustvu katalitičke količine H_2SO_4 . Kiselina se dodaje u obliku razblaženog rastvora u CH_3CN ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{CN} = 1/10$, v/v). Reakcija traje 15 min, i nakon

uobičajene obrade izolovana je složena reakciona smesa. Višestrukim prečišćavanjem hromatografijom na stubu SiO₂ izolovani su proizvodi **138**. Kao sporedni proizvodi, reakcijom su dobijeni keton **119** (kao proizvod razlaganja **137**) i prethodno opisani *bis*-steroidni tetraoksani **123** i **124**. Ciklopentanon, cikloheksanon i ciklooktanon daju po jedan proizvod, a reakcijom 4-metil-, 4-etil-, 4-*t*-butil- i 4-fenil-cikloheksanona dobijena su i izolovana oba očekivana diastereoizomera. Kada su korišćeni 2,6-dimetil- i 2-metil-cikloheksanon i menton odgovarajuća smesa proizvoda izolovana je kao jedna frakcija. Promenom temperature na kojoj se odvija reakcija i promenama odnosa reagenasa i vremena trajanja reakcije nije postignuto povećanje prinosa proizvoda **138**.

Opisani postupak je jednostavniji i ekonomičniji u odnosu na, do sada, jedini u literaturi opisan postupak sinteze mešovityh tetraoksana.⁶⁴ Prema postupku opisanom u ovoj tezi *gem*-dihidroperoksid dobijen je direktnom peroksiacetalizacijom ketona, a mešoviti tetraoksan direktnim kuplovanjem *gem*-dihidroperoksida i drugog ketona. Prema postupku u literaturi *gem*-dihidroperoksid je dobijen ozonolizom metil-enol etara, i nakon prevođenja u trimetilsilil-peroksi etar, kuplovan sa drugim ketonim (Shema 22).

Osim sa navedenim alifatičnim cikličnim ketonima, ispitivane su reakcije *gem*-dihidroperoksida **137** sa aromatičnim karbonilnim jedinjenjima – 2-furil-metil-keonom, 4-nitroacetofenom, 6-metoksitetralon-1-onom i *p*-metoksibenzaldehidom. Međutim, sa ovim karbonilnim jedinjenjima nisu dobijeni odgovarajući mešoviti tetraoksani. Jedini identifikovani proizvodi su keton **119** i *bis*-steroidni tetraoksani **123** i **124**. Razlog verovatno leži u sniženoj reaktivnosti karbonilne grupe usled konjugacije sa aromatičnim sistemom.

Neki tetraoksani **138** su odabrani za dalju transformaciju u kiseline, a onda i do odgovarajućih amida (Shema 28). Odabrani su oni tetraoksani **138** koji su pokazali najbolju aktivnost i kod kojih se moglo očekivati značajno povećanje aktivnosti njihovim prevođenjem u kiseline i amide. Za ove transformacije primenjeni su postupci već opisani kod *bis*-steroidnih tetraoksana. Tako su metil-estri **138** prevedeni u odgovarajuće kiseline **139** hidrolizom pomoću 1,5 ekv. NaOH u sistemu *i*-PrOH / H₂O. Dobijene kiseline su pomoću ClCO₂Et / Et₃N, prevedene u mešovite anhidride, koji su *in situ* prevedeni u amide **140** – **144** korišćenjem odgovarajućih amina.

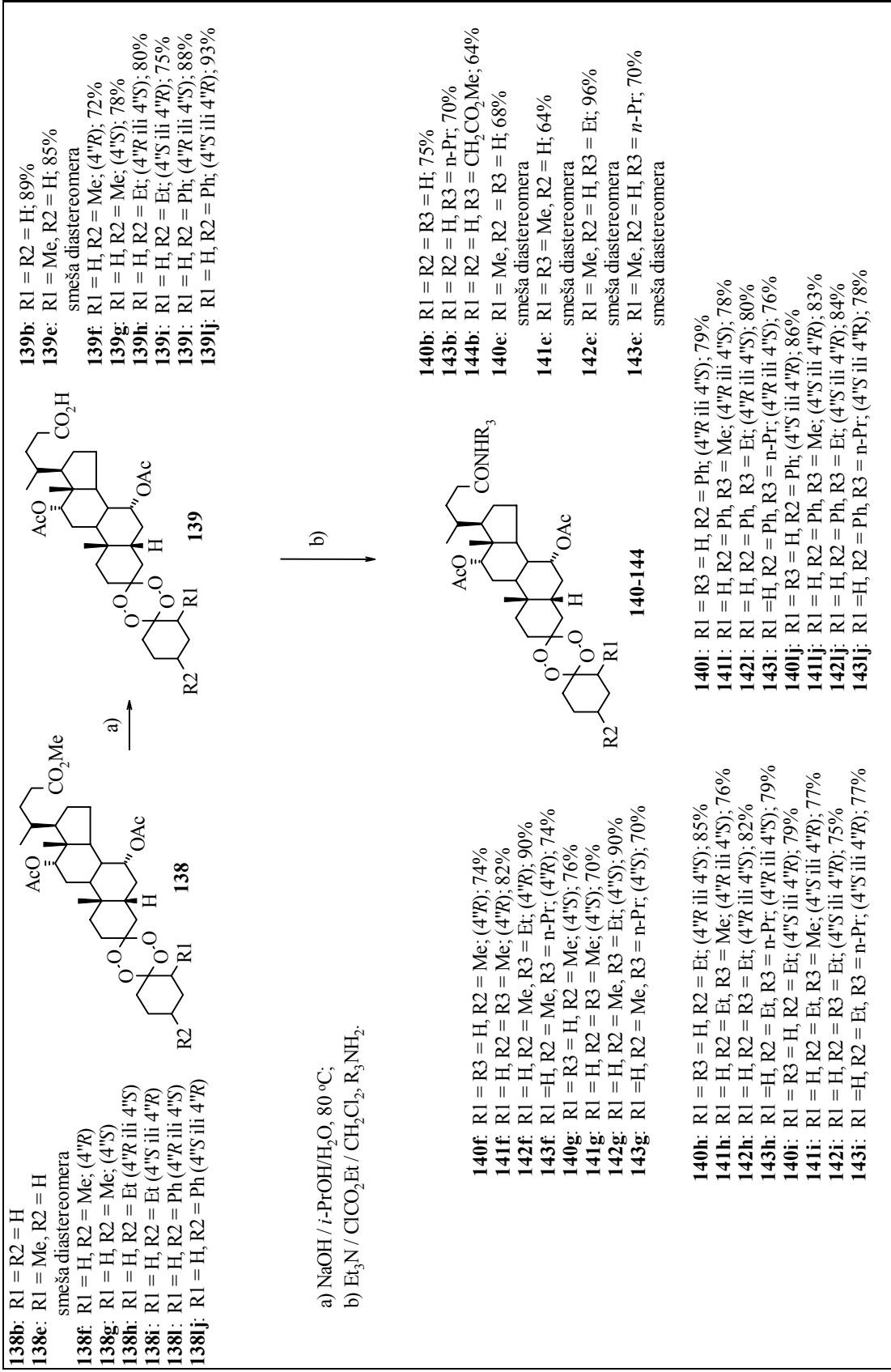


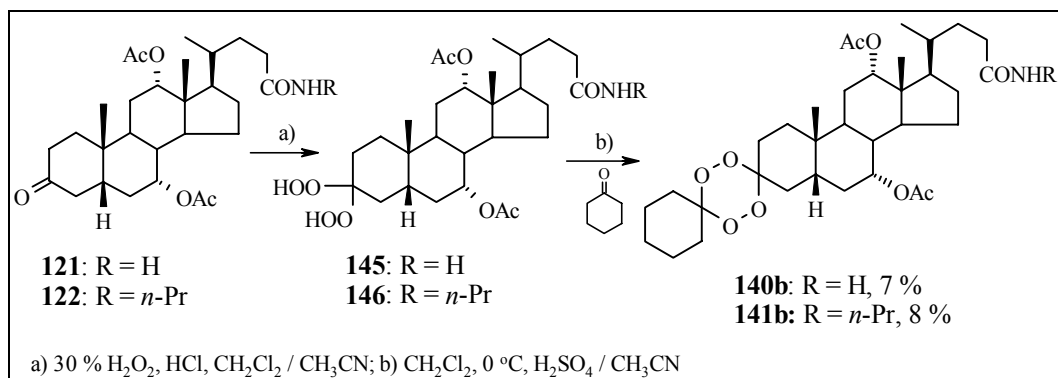
Shema 27

Osim do sada opisanih postupaka za sintezu mešovutih tetraoksana ispitani su još neki. U prvom pokušaju ispitivana je mogućnost sinteze amida mešovutih tetraoksana kuplovanjem odgovarajućeg *gem*-dihidroperoksida amida i cikloheksanona (Shema 29). Keto - amidi **121** i **122** prevedeni su u odgovarajuće *gem*-dihidroperoksidge **145** i **146** prema postupku koji je opisan za sintezu metil-estra **137**. Na osnovu ¹H NMR spektara utvrđeno je da u reakcionoj smeši ostaje veća količina neizreagovanog polaznog ketona. Sirova reakciona smeša je u sledećem koraku stavljena u reakciju sa 2 ekv. cikloheksanona pod istim reakcionim uslovima pod kojima je izvršena sinteza mešovutih tetraoksana **138**. Nakon obrade reakcione smeše i višestrukog prečišćavanja hromatografijom na stubu SiO₂ izolovani su proizvodi koji odgovaraju amidima **140b** i **141b** (NMR, IR i [α]_D). Prinos dobijenih proizvoda je oko 2 puta niži od prinosa ostvarenog prethodno opisanim postupkom (ukupno 17 % od **119** do **140b**, odnosno 15 % od **129** do **151b**). Zaključeno je da je ova metoda manje podesna za sintezu navedenih tetraoksana od prethodno opisane.

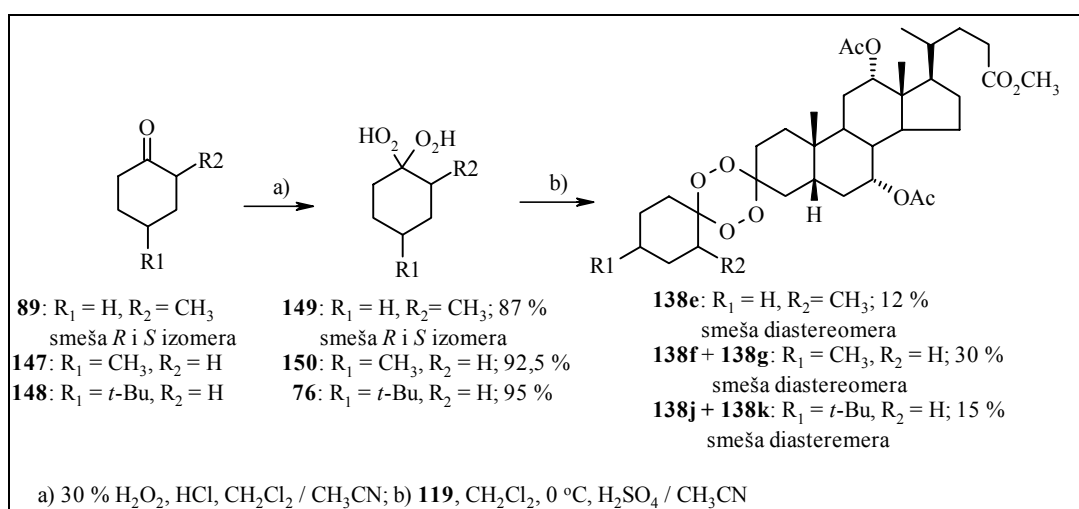
U drugom pokušaju ispitana je sinteza nekih metil-estara **138** mešovutih tetraokasana, kuplovanjem ketona **119** sa *gem*-dihidroperoksidima 2-metil-, 4-metil- i 4-*t*-butil-cikloheksanona (Shema 30). Ketoni **89**, **147** i **148** prevedeni su u odgovarajuće *gem*-dihidroperoksidge **149**, **150** i **76** redom, prema postupku koji je primenjen u sintezi *gem*-dihidroperoksidge **137**. Na osnovu ¹H NMR i

¹³C NMR spektara izolovanih proizvoda reakcija utvrđeno je da se smese sastoje samo od *gem*-dihidroperoksida i polaznog ketona. Kvantitativnom IR spektroskopijom je utvrđeno da proizvod **149** sadrži 13% polaznog ketona, proizvod **150** 7,5%, a proizvod **76** 5% polaznog ketona. Sirovi *gem*-dihidroperoksidi su u sledećem koraku kuplovani sa ketonom **119** prema već opisanom postupku za sintezu mešovutih tetraoksana. Nakon obrade reakcione smeše i višestrukog prečišćavanja hromatografijom na stubu SiO₂ izolovani su proizvodi kao smeše diastereomera i u slučajevima 4-metil- i 4-*t*-butil-cikloheksanona. Razlog je taj što je cilj bio samo da se ispituju dodatne mogućnosti za sintezu navedenih tetraoksana, a ne i njihova potpuna karakterizacija. Smeše diastereoizomera su izolovane u približno istom prinosu kao i prema već opisanom postupku. I ovim postupkom kao sporedni proizvodi nastaju *bis*-steroidni tetraoksani **123** i **124**. Kao zaključak može se reći da oba postupka sinteze metil-estara **138** mešovutih tetraoksana, preko *gem*-dihidroperoksida **137** ili **149**, **150** i **76** daju približno iste rezultate i mogu se ravnopravno primenjivati.





Shema 29

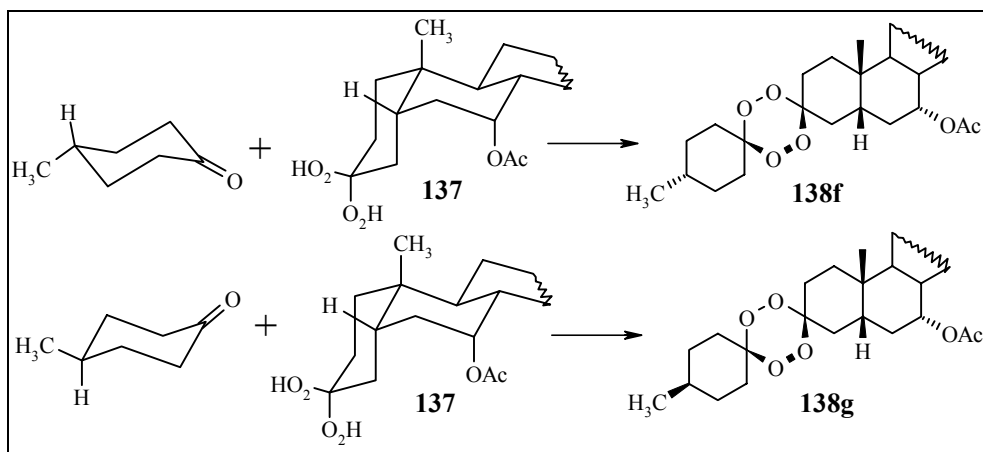


Shema 30

3.2.2. Struktura

U slučajevima kada se koriste nesupstituisani ketoni (ciklopentanon, cikloheksanon i ciklooktanon) dobija se po jedan proizvod, **138a**, **138b** i **138c**.

Kada se koriste supstituisani cikloheksanoni mogu se očekivati bar dva diastereomera, kao posledica različite orijentacije ketona prema steroidnom *gem*-dihidroperoksidu. To se dobro može videti na primeru reakcije 4-metilcikloheksanona (Shema 31).



Shema 37

Zato se u slučajevima kada se za reakciju koriste 2,6-dimetil-, 2-metil-, 4-metil-, 4-etil-, 4-*t*-butil-, 4-fenilcikloheksanon i menton može očekivati više proizvoda. Kada su upotrebljeni 4-metil-, 4-etil-, 4-*t*-butil- i 4-fenilcikloheksanon izolovana su i razdvojena oba očekivana diastereomera. U ostalim slučajevima proizvodi su izolovani kao jedna frakcija, pod datim uslovima hromatografisanja, i njihovi ^1H i ^{13}C NMR spektri potvrđuju da se u frakcijama nalaze smeše proizvoda. 2,6-Dimetilcikloheksanon je upotrebljen kao smeša *cis*- i *trans*-izomera i mogu se očekivati 3 proizvoda - **138d**. 2-Metilcikloheksanon je upotrebljen kao smeša *R*- i *S*-izomera i mogu se očekivati ukupno 4 proizvoda, označenih kao **138e**, a u slučaju mentona mogu se očekivati dva proizvoda. Nije utvrđeno da li su u ovim slučajevima nastali svi očekivani izomeri i u kojim odnosima.

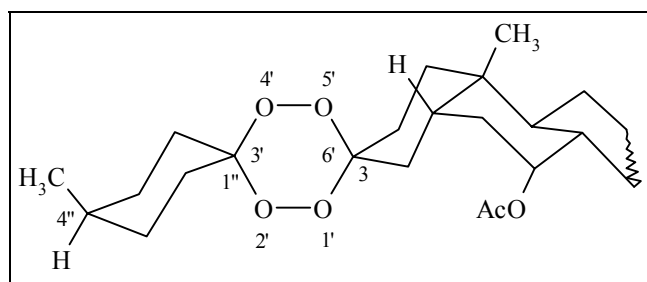
Strukture dobijenih mešovutih tetraoksana su dokazane spektralnom analizom (MS i NMR). U Tabelama 19 i 20 date su vrednosti odabranih fizičkih i spektralnih podataka tetraoksana **138-144**. U masenim spektrima svih mešovutih tetraoksana utvrđeni su signali koji potiču od molekulskog jona i to kao $[\text{M}+\text{H}]^+$ i/ili $[\text{M}+\text{Na}]^+$ joni i time je potvrđena njihova molekulska masa. Razdvojeni izomeri iz diastereomernih parova dobijenih iz supstituisanih cikloheksanona (**138f** i **138g**; **138h** i **138i**; **138j** i **138k**; **138l** i **138lj**) imaju različite tačke topljenja i to tako da izomer koji silazi prvi sa kolone ima nižu tačku topljenja. Od ove pravilnosti odstupaju samo **138j** i **138k**.

U ^1H NMR spektrima signali koji potiču od acetatnih CH_3 -grupa se javljaju kao dva proširena singleta različite veličine, od kojih je signal na nižem polju većeg intenziteta. Takođe, za ova jedinjenja je karakteristično i da u ^{13}C NMR spektrima pokazuju po dva signala u oblasti 119-108 ppm koji odgovaraju peroksiacetalnim $\text{C}(3')$ i $\text{C}(6')$ -atomima (Shema 32). NMR spektri dobijenih proizvoda su gotovo identični i na osnovu njih nije moguće izvršiti detaljniju analizu strukture ovih jedinjenja kada je u pitanju konfiguracija na $\text{C}(4'')$ -atomu (**138f** i **138g**; **138h** i **138i**; **138j** i **138k**; **138l** i **138lj**). Navedene opšte spektralne karakteristike zadržavaju i derivati koji su izvedeni iz **138**, odgovarajuće kiseline **139** kao i odgovarajući amidi **140-144**.

Na osnovu monokristala kiseline **139g** određena je konfiguracija C(4'')-atoma (Slika 7). Šestočlani 1,2,4,5-tetraoksanski i 4''-metil-cikloheksanski prstenovi zauzimaju konformacije koje su veoma bliske konformaciji stolice: parametri nabiranja su $Q = 0,646 \text{ \AA}$, $\theta = 3,5^\circ$, $\phi = 315,5^\circ$ za prvi prsten i $Q = 0,559 \text{ \AA}$, $\theta = 3,9^\circ$, $\phi = 215,1^\circ$ za drugi prsten.⁷⁸ Metil-C(4'') supstituent zauzima aksijalni položaj. Utvrđeno je da između dva molekula postoji vodonična veza koja se formira preko njihovih karboksilnih grupa: O25 ...O29 ($x, y-1, z$) = 2.700(3) \AA . Analizom date strukture utvrđeno je da kod kiseline **139g** C(4'')-atom ima *S*-konfiguraciju. Na osnovu toga, možemo pretpostaviti da kod odgovarajuće diastereomerne kiseline **139f** odgovarajući C(4'')-atom ima *R*-konfiguraciju. Takođe, sa sigurnošću možemo zaključiti i da ostali mešoviti tetraoksani 4-metilcikloheksanona imaju odgovarajuće konfiguracije, odnosno da **138f** i amidi **140f-143f** pripadaju (*4''R*) seriji, dok **138g** i amidi **140g-143g** pripadaju (*4''S*) seriji. Na Shemi 32 dat je pojednostavljen prikaz strukture jedinjenja **149g**.



Slika 7. Ortep prikaz tetraoksana **139g**



Shema 32

Na žalost, na osnovu do sada prikupljenih podataka za ostale 4''-supstituisane mešovite tetraoksane, nismo u mogućnosti da odredimo konfiguracije na C(4'')-atomu. Jedino možemo izvoditi nepouzdanе zaključke na osnovu poređenja tački topljenja, redosledu eluiranja sa kolone i bioloških aktivnosti odgovarajućih derivata.

Tabela 19. Odabrani fizički i spektralni podaci tetraoksana **138-139**

Jedinjenje	tt (°C)	[α] _D ²⁰	NMR (CDCl ₃)		m/z, (metoda) ^a	Jed.	tt (°C)	[α] _D ²⁰	NMR (CDCl ₃)		m/z, (metoda) ^a
			¹ H CH ₃ COO	¹³ C C(3'); C(6')					¹ H CH ₃ COO	¹³ C C(3'); C(6')	
138a	180-182	+49,56	2,13; 2,08;	119,71; 108,35;	643,37 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	138l	101-104	+34,27	2,12; 2,10	108,65; 107,83;	
138b	165-168	+44,93	2,12; 2,08;	108,41; 108,28;	635,4 ([M+H] ⁺) (<i>FAB-MS</i>)	138lj	186-190	+47,67	2,13; 2,08	108,66; 107,87;	
138c	181-183	+44,58	2,12; 2,08;	111,96; 107,86;	685,40 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	138m	93-95	-	2,15; 2,085; 2,080; 2,06;	111,19; 108,42; 108,35;	713,38 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)
138d	213-215	-	2,13; 2,08;	111,23; 108,17;	685,38 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	139b	213-216	+44,50	2,12; 2,09;	108,45; 108,36;	643,37 [M+Na] ⁺ (<i>LSI-MS</i>)
138e	204-207	+35,80	2,143; 2,136; 2,11; 2,10; 2,07;	109,42; 108,38; 108,34;	671,30 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	139e	199-205	+32,46	2,14; 2,11; 2,10; 2,07;	108,41; 108,36;	635,38 [M+H] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)
138f (4''R)	82-84	+38,50	2,11; 2,08;	108,35; 108,21;	671,41 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	139f (4''R)	130,5-133	+38,38	2,11; 2,09;	108,48; 108,35;	657,40 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)
138g (4''S)	204-206	+36,88	2,12; 2,08;	108,41; 108,26;	671,40 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	139g (4''S)	213,5-215	+44,38	2,12; 2,08;	108,50; 108,40;	657,36 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)
138h	72-76	+41,99	2,11; 2,08;	108,59; 108,47;	(<i>ESI-MS</i>)	139h	133-135	+41,74	2,11; 2,09;	108,60; 108,46;	
138i	110-114	+43,40	2,12; 2,08;	108,62; 108,47;	(<i>ESI-MS</i>)	139i	112-116	+67,39	2,12; 2,08;	108,64; 108,49;	
138j	111-114	+41,04	2,12; 2,08;	108,46; 108,32;	713,45 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	139l	139-143	+32,48	2,13;	108,64; 107,84;	
138k	104-107	+40,93	2,11; 2,08;	108,46; 108,32;	713,43 [M+Na] ⁺ (<i>ESI-MS</i>)	139lj	137-140	+43,87	2,14; 2,09;	108,65; 107,88;	

Tabela 20. Odabrani fizički i spektralni podaci tetraoksana **140b-143lj**

N ^o	tt (°C)	[α] _D ²⁰	NMR (CDCl ₃)		m/z	N ^o	tt (°C)	[α] _D ²⁰	NMR (CDCl ₃)		m/z
			¹ H CH ₃ COO	¹³ C C(3'); C(6')					¹ H CH ₃ COO	¹³ C C(3'); C(6')	
140b	208-210	+48,30	2,12; 2,09;	108,34	642,41 [M+Na] ⁺	141h	123-127	+46,01	2,10; 2,08;	108,48; 108,34;	
143b	208-210	+40,6	2,10; 2,07;	108,43; 108,32;	684,43 [M+Na] ⁺	142h	115-118	+46,09	2,11; 2,08;	108,48; 108,35;	
144b	114-117	+36,60	2,12; 2,09;	108,45; 108,34;	714,42 [M+Na] ⁺	143h	112-116	+45,44	2,11; 2,08;	108,55; 108,42;	
140e	131-138	+36,6	2,14; 2,13; 2,11; 2,07;	109,38; 108,31;	656,32 [M+Na] ⁺	140i	131-134	+45,43	2,12; 2,08;	108,59; 108,42;	
141e	122-127	+37,05	2,14; 2,13; 2,11; 2,10;	108,34	670,34 [M+Na] ⁺	141i	122-125	+43,78	2,12; 2,08;	108,54; 108,38;	
142e	119-125	+38,29	2,14; 2,13; 2,11; 2,10;	108,33	684,35 [M+Na] ⁺	142i	115-111	+42,72	2,12; 2,08;	108,52; 108,36;	
143e	111-116	+41,85	2,14; 2,13; 2,11; 2,10;	108,38	698,36 [M+Na] ⁺	143i	113-117	+44,32	2,12; 2,08;	108,61; 108,45;	
140f (4''R)	137-141	+44,71	2,11; 2,09;	108,46; 108,33;	656,42 [M+Na] ⁺	140l	142-146	+35,79	2,12; 2,10;	108,63; 107,83;	
141f (4''R)	129-134	+43,66	2,10; 2,08;	108,47; 108,33;	648,45 ([M+H] ⁺	141l	133-137	+28,03	2,12	108,62; 107,82;	
142f (4''R)	124-129	+43,98	2,11; 2,08;	108,47; 108,33;	684,45 [M+Na] ⁺	142l	128-131	+34,36	2,12; 2,09;	108,63; 107,82	
143f (4''R)	117-124	+43,40	2,11; 2,08;	108,47; 108,33;	676,48 [M+H] ⁺	143l	125-127	+32,25	2,12	108,64; 107,83;	
140g (4''S)	205-206	+47,23	2,12; 2,08;	108,48; 108,37;	656,42 [M+Na] ⁺	140lj	141-144	+41,37	2,16; 2,12;	108,66; 107,89;	
141g (4''S)	130-135	+46,02	2,12; 2,08;	108,49; 108,38;	670,44 [M+Na] ⁺	141lj	137-140	+47,15	2,13; 2,08;	108,67; 107,88;	
142g (4''S)	122-126	+44,13	2,12; 2,08;	108,50; 108,39;	684,45 ([M+Na] ⁺	142lj	129-132	+46,12	2,13; 2,09;	108,62; 107,84;	
143g (4''S)	208-210	+44,88	2,12; 2,08;	108,48; 108,36;	698,47 [M+Na] ⁺	143lj	127-131	+45,23	2,13; 2,08	108,65; 107,87;	
140h	133-136	+46,17	2,11; 2,09;	108,52; 108,38;							

3.2.3. Antimalarijska aktivnost

Svim dobijenim mešovitim tetraoksanima je određena *in vitro* antimalarijska aktivnost prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2, i podaci su dati u Tabelama 21 i 22. Eksperimenti su izvedeni pod istim uslovima kao i za *bis*-steroidne tetraoksane.

Poređenjem podataka za mešovite tetraoksane (Tabele 21 i 22) sa podacima za *bis*-steroidne tetraoksane (Tabela 15) vidi se da zamenom jednog steroidnog dela molekula spirocikloalkilidenskim fragmentom raste antimalarijska aktivnost. Sa druge strane, rezultati ukazuju i na značajan doprinos steroidnog dela molekula antimalarijskoj aktivnosti. Zamenom jednog spirocikloalkiliden dela iz *bis*-cikloheksilidenskih tetraoksana steroidnim molekulom kod većine derivata dolazi do povećanja aktivnosti. Poređenjem podataka za aktivnosti metil-estara **138** (Tabela 21) i *bis*-cikloheksilidenskih tetraoksana može se uočiti da je: a) tetraoksan **138b** oko 1,5 puta aktivniji od *bis*-cikloheksilidenskog tetraoksana **78** (D6 IC₅₀ = 38 nM, W2 IC₅₀ = 26 nM);⁷⁴ b) tetraoksan **138d** od 2,8 do 32 puta aktivniji od *bis*-(2,6-dimetil)cikloheksilidenskog tetraoksana (D6 IC₅₀ > 1000 nM, W2 D6 IC₅₀ > 1000 nM);⁷⁴ c) tetraoksan **138e** 2 puta aktivniji od *bis*-(2-metil)cikloheksilidenskog tetraoksana **91** (Tabela 21);⁶⁵ d) tetraoksan **138f** (4''*R*) od 2,3 do 4,2 puta aktivniji od *bis*-(3-metil)cikloheksilidenskog tetraoksana **94e** (Tabela 10);⁶⁵ e) tetraoksan **138k** oko 3,6 puta aktivniji od *bis*-(3-*t*-butil)cikloheksilidenskog tetraoksana **94f** (Tabela 10).⁶⁵

U prvom delu su ispitivane aktivnosti metil-estara **138** i gotovo svi pokazuju veću aktivnost prema W2 soju nego prema D6 (Tabela 21). Izuzetak su smeše izomera **138d** i oba 4''-Et izomera – **138h** i **138j**.

Poređenjem aktivnosti nesupstituisanih spiro-cikloalkil-derivata **138a**, **138b** i **138c** može se uočiti umeren uticaj veličine prstena (n = 0, n = 1 i n = 3, ciklopentil-, cikloheksil- i ciklooktilredom) na promenu aktivnosti. Među njima najaktivniji je spirocikloheksilidenski derivat **138b** (D6 IC₅₀ = 21,47 nM, W2 IC₅₀ = 16,96 nM), dok povećanje spirocikloalkilidenskog supstituenta, **138c** prema **138a** i **138b**, dovodi do povećanja selektivnosti prema sojevima. Kod supstituisanih spiro-cikloheksiliden derivata pokazano je da na aktivnost najpovoljnije utiče supstitucija na C(4'')-atomu. Najaktivniji su (4''*R*)-metil-derivat **138f** (D6 IC₅₀ = 9,99 nM, W2 IC₅₀ = 5,05 nM) i 4''-etil-derivat **138h** (D6 IC₅₀ = 6,73 nM, W2 IC₅₀ = 14,16 nM). Istovremeno, **138f** je i najaktivniji metil-estar čija je aktivnost veća od *bis*-(2-metil)cikloheksiliden tetraoksana **91**, od artemizinina, a po aktivnosti se izjednačio sa artelinskom kiselinom **14k** i meflokinom. Pokazano je i da promenom supstituenta na C(4'')-atomu dolazi do promene aktivnosti. Aktivnost prema W2 menja se u nizu Me > Et > Ph > *t*-Bu, a prema D6 Et > Me > Ph > *t*-Bu. Uvođenjem fenil-grupe kao supstituenta dolazi do smanjivanja selektivnosti prema sojevima D6 i W2. Razdvojeni diastereomeri C(4'')-supstituisanih cikloheksanona (**138f** i **138g**; **138h** i **138i**; **138j** i **138k**; **138l** i **138lj**) pokazuju

različite aktivnosti. Pokazano je da izomer koji ima nižu tačku topljenja i koji prvi silazi sa kolone prilikom eluiranja, po pravilu ima i veću aktivnost, *prema oba soja*, od svog diastereomera (**138f** prema **138g**, **138h** prema **138i**, **138l** prema **138lj**). Izuzetak predstavljaju 4''-*t*-Bu- proizvodi **138j** i **138k**. Ovakva razlika u aktivnosti izomera može biti posledica jedino različite konfiguracije na C(4'') atomu – (4''*R*)-metil-izomer (**138f**) je aktivniji od (4''*S*)-metil-izomera(**138g**). Odstupanje **138j** i **138k** od navedenih pravilnosti može biti posledica promene redosleda eluiranja izomera usled uticaja *t*-Bu-grupe. Najmanju aktivnost pokazuje smeša izomera **138d** (W2 IC₅₀ = 357,08 nM).

U drugom delu su ispitivane aktivnosti derivata izvedenih iz metil-estara **138** (Tabela 22). Velika većina izvedenih derivati pokazuju veću aktivnost prema W2 soju nego prema D6 soju. Veću aktivnost prema D6 pokazuju obe 4''-etil-kiseline **139h** i **139i**, 4''-etil- primarni amid **140h** i 4''-Ph *N*-Et amid **142l**. Istu aktivnost prema oba soja pokazuju (4''*S*)-metil *N*-Prⁿ-amid **143g**, 4''-Et-*N*-Me amid **141h**, 4''-Ph kiselina **139l**, 4''-Ph- primarni amid **140l** i 4''-Ph-*N*-Et amid **142lj** i oba 4''-Ph *N*-Prⁿ amida **143l** i **143lj**. Zadržan je odnos aktivnosti između diastereomera: kiseline i amidi koji su izvedeni iz aktivnijeg metil-estra zadržavaju veću aktivnost u odnosu na odgovarajući diastereomer.

Kao u slučaju *bis*-steroidnih tetraoksana, i kod mešovityh tetraoksana je pokazano da prevođenjem metil-estara u amide raste antimalarijska aktivnost. Dobijen je ukupno 31 amid od kojih su čak 9 aktivniji od artemizinina prema W2 soju (Tabela 21 i 22), čime je ponovo pokazan značajan doprinos amidne grupe antimalarijskoj aktivnosti. Većina derivata **139-144** je aktivnija od tetraoksana **91** i to prema oba ispitivana soja. Skoro jednaku aktivnost pokazuju 4''-Ph amidi **140lj** i **142lj**, a manje aktivni su 4''-Ph kiselina **139lj**, 4''-Ph *N*-Me amid **141lj** i *N*-Prⁿ-amidi (4''*S*)-Me **143g** i 4''-Et **143i**. Kiseline **139** generalno pokazuju manju aktivnost od odgovarajućih metil-estara. Međutim, pravo iznenađenje je kiselina **139f** - (4''*R*)-metil (D6 IC₅₀ = 1,49 nM, W2 IC₅₀ = 0,96 nM), koja ne samo da je aktivnija od odgovarajućeg metil-estra, već je aktivnija i od artemizinina (**1**), artelinske kiseline (**14k**) i bis-(2-metil)cikloheksiliden tetraoksana **91** i po aktivnosti se sasvim izjednačila sa artemetrom (**11a**). Veću aktivnost od odgovarajućeg metil-estra pokazuju i kiseline 4''-Et **139i** i 4''-Ph **139l**. Rezultati pokazuju da dužina *N*-alkil supstituenta malo utiče na aktivnost.

Svi 2''-Me derivati pokazuju vrlo dobru aktivnost kada se uzme u obzir da su uzorci testirani kao smeše distereomera. Za ovakvo ponašanje uzoraka postoje tri moguća objašnjenja: a) jedan od izomera je još aktivniji, ali je njegova aktivnost prigušena ostalim diastereomerima koji su manje aktivni; b) svi diastereomeri su približno jednako aktivni što ukazuje da je za aktivnost važnija supstitucija u α položaju u odnosu na peroksiacetalni C-atom nego položaj 2''-Me susptituenta u odnosu na ostatak molekula; c) smeša je aktivnija od svakog izomera pojedinačno, što bi značilo da

diastereomeri međusobno imaju sinergički efekat. Na žalost, razdvajanje ovih smeša na pojedinačne izomere nije moguće u našim uslovima, tako da ne možemo da proverimo ove pretpostavke.

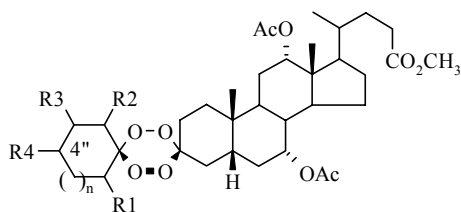


Tabela 21. Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti tetraoksana **138** prema *P. falciparum*.

Jedinjenje	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (nM)		Selektivnost W2 / D6
						D6	W2	
138a	0	H	H	H	H	39,14	27,67	0,71
138b	1	H	H	H	H	21,47	16,96	0,79
138c	3	H	H	H	H	48,44	20,00	0,41
138d	1	CH ₃	CH ₃	H	H	31,18	357,08	11,45
138e	1	CH ₃	H	H	H	27,03	15,64	0,58
138f (4''R)	1	H	H	H	CH ₃	9,99	5,05	0,50
138g (4''S)	1	H	H	H	CH ₃	24,64	13,16	0,53
138h	1	H	H	H	CH ₃ CH ₂	6,73	14,16	2,10
138i	1	H	H	H	CH ₃ CH ₃	17,70	28,30	1,60
138j	1	H	H	H	<i>t</i> -Bu	107,48	52,73	0,49
138k	1	H	H	H	<i>t</i> -Bu	51,87	27,77	0,54
138l	1	H	H	H	Ph	17,66	16,48	0,93
138lj	1	H	H	H	Ph	44,67	35,17	0,79
138m	1	<i>i</i> -Pr	H	CH ₃	H	154,36	73,24	0,47
Artemizinin 1						8,60 ^a	7,30 ^a	0,85
Artemetar 11a						2,92 ^a	1,00 ^a	0,34
artelinska kiselina 14k						9,72 ^a	3,30 ^a	0,34
Hlorokin^b						13,76	185,38	13,47
Meflokin^b						28,29	5,02	0,18
91						55 ^c	32 ^c	0,58

^a Podaci iz ref. 74; ^b Kontrolne supstance. ^c Podaci iz ref. 65;

Najaktivniji derivat je (4''R)-metil primarni amid 140f (D6 IC₅₀ = 1,49 nM, W2 IC₅₀ = 0,58 nM). Ovaj amid je 14 puta aktivniji od artemizininina (1), 6 puta aktivniji od artelinske kiseline (14k) i tetraoksana 91 i 2 puta aktivniji od artemetra (11a), do sada jedinog odobrenog derivata artemizininina za lečenje od malarije.

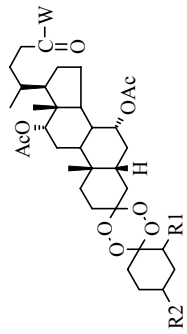


Tabela 22: Vrednosti *in vitro* antimalarijske aktivnosti tetraoksana **139-144** prema *P. falciparum*.

W	R ₁ = R ₂ = H				R ₁ = CH ₃ ; R ₂ = H				R ₁ = H; R ₂ = CH ₃				R ₁ = H; R ₂ = CH ₂ CH ₃				R ₁ = H; R ₂ = Ph						
	Jed.	IC ₅₀ (nM)		Jed.	IC ₅₀ (nM)		Jed.	IC ₅₀ (nM)		Jed.	IC ₅₀ (nM)		Jed.	IC ₅₀ (nM)		Jed.	IC ₅₀ (nM)		Jed.	IC ₅₀ (nM)			
		D6	W2		D6	W2		D6	W2		D6	W2		D6	W2		D6	W2		D6	W2		
OH	139b	30,57		139e	67,63		139f (4''R)	1,49	0,96	139g (4''S)	31,09	17,35	139h	5,76	67,26	139i	9,83	14,43	139j	77,83		8,88	8,74
			19,22			37,51																	
NH ₂	140b	11,83		140e	17,31		140f (4''R)	1,17	0,58	140g (4''S)	20,03	14,10	140h	8,40	10,70	140i	31,06	12,52	140j	58,18		10,34	10,57
			4,74			11,12																	
NHMe	-			141e	15,78		141f (4''R)	5,96	3,61	141g (4''S)	16,65	11,87	141h	7,21	7,82	141i	27,95	6,15	141j	91,02		12,43	9,80
						10,02																	
NHIEt	-			142e	12,64		142f (4''R)	5,80	3,93	142g (4''S)	15,59	9,93	142h	19,78	9,56	142i	23,14	18,08	142j	45,30		7,48	8,11
						6,97																	
NHIPr	143b	14,76		143e	13,15		143f (4''R)	3,22	3,82	143g (4''S)	84,94	83,01	143h	8,35	4,52	143i	90,15	122,68	143j	32,90		8,93	9,11
			6,80			9,29																	
NHCH ₂ CO ₂ Me	144b	22,01	10,77																				

3.2.4. Antiproliferativna i citotoksična aktivnost

Za šest metil-estara mešovutih tetraoksana tipa **138** određena je *in vitro* antiproliferativna aktivnost prema FemX, HeLa i K562 ćelijskim linijama raka i podaci se nalaze u Tabeli 23. Eksperimenti kojima su određene aktivnosti izvedeni su pod istim uslovima kao i u slučaju *bis*-steroidnih tetraoksana.

Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da su ispitivani metil-estri aktivniji 2-7 puta prema HeLa ćelijama nego prema Fem-X ćelijama, za razliku od *bis*-steroidnih tetraoksana koji nisu pokazivali veću selektivnost prema ovim ćelijama. Smatramo da je razlika u aktivnosti mešovutih tetraoksana prema ovim ćelijskim linijama posledica različitih biohemijskih procesa koji se odigravaju unutar ćelija. Pretpostavljamo da proizvodi koji nastaju nakon interakcije ispitivanih metil-estara **138** sa komponentama ćelije nisu direktno toksični prema Fem-X ćelijama, dok su direktno toksični prema HeLa ćelijama. Za dejstvo ovih jedinjenja prema Fem-X ćelijama je karakteristična pojava tamnih granula, zastoj u umnožavanju ćelija i prisustvo živih ćelija. Ovakav efekat je posebno izražen nakon izlaganja ćelija dejstvu ciklopentil-derivata **138a**, dok je znatno manje izražen u slučaju cikloheksil- i ciklooktil- derivata. Uticaj veličine prstena spirocikloalkiliden-supstituenta vidi se kroz efekat koji ovi derivati izazivaju nakon njihovog dejstva prema ćelijama, dok taj uticaj nije tako očigledan kada se posmatraju same IC₅₀ vrednosti. Efekat zastoja umnožavanja ćelija i pojava crnih granula je karakterističan i za dejstvo **138a** prema K562 ćelijama i za dejstvo **138e** prema Fem-X ćelijama. Bez obzira što je uočeno prisustvo živih Fem-X ćelija nakon izlaganja dejstvu tetraoksana sve ćelije nakon 72 sata ipak umiru. Najmanju aktivnost je pokazao (4''R)-metil metil-estar **138f** (IC₅₀ = 75,0 μM).

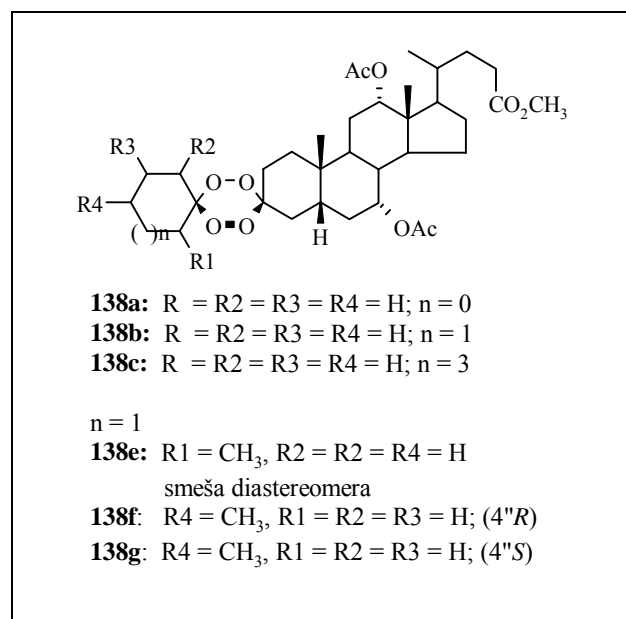
Za dejstvo ispitivanih metil-estara **138** prema HeLa ćelijama karakteristična je fragmentacija jednog dela ćelija, dok drugi deo ćelija postaje razgranat – dolazi do filopodije. Prilikom upotrebe većih koncentracija supstanci efekat fragmentacije je još izraženiji. Za razliku od efekta zastoja u razvoju Fem-X ćelija, prema HeLa ćelijama je postignut direktan toksičan efekat i smrt ćelija.

Uočeno je da je odnos antiproliferativne aktivnosti 4''-Me metil-estara obrnut u odnosu na antimalarijsku aktivnost. Prema *P. falciparum* sojevima veću aktivnost pokazao je (4''R)-metil metil-estar (**138f**), dok je njegov (4''S) izomer (**138g**) aktivniji prema ćelijama raka.

Tabela 23. Vrednosti in vitro antiproliferativne aktivnosti nekih mešovitih tetraoxana **138**.

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM) 72 h		
	Fem-X	HeLa	K562
138a	42,6	10,8	16,2
138b	52,0	18,8	10,8
138c	51,7	10,2	16,1
138e	45,5	10,0	16,0
138f	75,0	11,0	8,0
138g	25,0 ^a	5,0 ^a	8,0 ^a
artemizinin	EC ₅₀ (FM3A) 10		
cis-platina		3,5	

^a reprezentativni eksperiment. Moguće razlaganje supstance



Za pet metil-estara tipa **138** ispitana je i citotoksičnost prema stimulisanim i nestimulisanim imunim ćelijama (PBMC) i rezultati su prikazani u Tabeli 24. Jedinjenja pokazuju ujednačenu aktivnost (IC₅₀ = ~ 50μM) prema obe vrste imunih ćelija. Kao i kod *bis*-steroidnih tetraoksana, i kod ovih pet metil-estara mešovitih tetraoksana pokazana je veoma dobra selektivnost citotoksičnosti i antimalarijske aktivnosti. Podaci ukazuju da je potrebno upotrebiti značajno veću količinu tetraoksana prema ćelijama imunog sistema da bi se postigao isti efekat (IC₅₀) kao prema W2 soju. Ta činjenica je veoma povoljna ukoliko se posmatra iz perspektive njihove moguće primene u lečenju malarije. Međutim, vrednosti citotoksičnosti ovih jedinjenja prema zdravim imunim ćelijama su vrlo bliske njihovoj citotoksičnosti prema Fem-X, HeLa i K562 ćelijama. Većina ispitanih derivata pokazuje veću citotoksičnost prema zdravim imunim ćelijama. Bolja selektivnost je pokazana u odnosu na HeLa i K562 ćelije. Najpovoljniji odnos aktivnosti je pokazao derivat **138e** - oko 5. Ipak, ove vrednosti nisu dovoljne da bi se ova jedinjenja koristila za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Tabela 24. Vrednosti citotoksične aktivnosti nekih mešovitih tetraoksana **138** prema nestimulisanim i stimulisanim ćelijama PBMC.

Jedinjenje	Citotoksičnost IC ₅₀ (μM) 72 ^h		Selektivnost							
	PBMC (A)	PBMC + PHA (B) ^a	A/W2	B/W2	A/Fem-X	B/Fem-X	A/HeLa	B/HeLa	A/K562	B/K562
138a	>43	>50	>1084	>1022	>1,0	>1,17	>3,98	>4,63	>3,64	>4,24
138b	44,0	43,0	2594	2535	0,85	0,83	2,34	2,29	4,07	3,98
138c	>47	>50	>2350	>2500	>0,91	>0,97	>4,61	>4,90	>4,35	>4,63
138e	>50	>50	>3197	>3196	>1,09	>1,09	>5,00	>5,00	>3,12	>3,12
138f	>50	>50	> 9900	> 9900	>0,67	>0,67	>4,54	>4,54	>1,67	>1,67

^a Srednje vrednosti inhibicije merene na uzorcima tri zdrave osobe čije su PBMC stimulisane sa PHA.

Od ukupno 53 sintetisana mešovita tetraoksana National Cancer Institute (NIH-NCI) Bethesda, USA⁷⁹ u okviru DTP (Developmental Therapeutics Program), odabrao je 25 za *in vitro* testiranje antiproliferativne aktivnosti, i to: **138a**, **138b**, **138c**, **138f**, **138g**, **138h**, **138j**, **138k**, **138l**, **139b**, **139f**, **139g**, **139h**, **139l**, **140b**, **144b**, **140f**, **142f**, **140g**, **142g**, **143g**, **140h**, **142h**, **140i** i **141l**. Probno testiranje je izvršeno prema tri ćelijske linije raka NCI-H460 (rak dojke), MCF7 (rak grudi) i SF-268 (rak CNS-a). Jedinjenje koje prilikom probnog testa pokaže aktivnost koja dozvoljava maksimalano 32 % rasta bar jedne ćelijske linije raka, biva odabrano za dalje testiranje na panel od 60 ćelijskih linija. Ovo testiranje nije prošlo pet jedinjenja – **138h**, **138k**, **138l**, **142h** i **141l** (Tabela 25). Ostali odabrani mešoviti tetraoksani su ispitivani prema panelu od 60 ćelijskih linija.

Tabela 25. Vrednosti procenta rasta ćelija raka nakon izlaganja rastvorima, koncentracija 100 μM, tetraoksana **138h**, **138k**, **138l**, **142h** i **141l**.

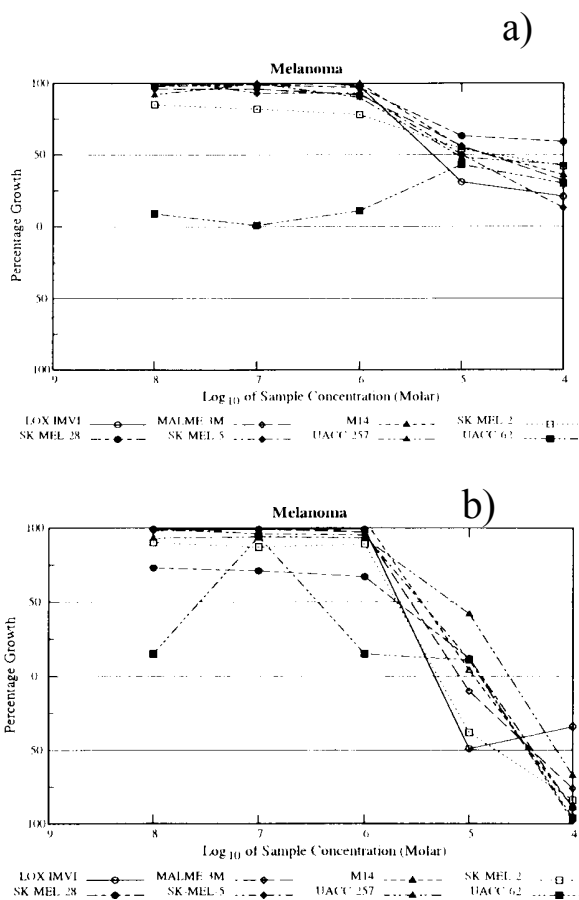
Jedinjenje	Procenat rasta ćelija		
	NCI-H460	MCF7	SF-268
138h^a	91	99	111
138k^a	47	48	60
138l^a	42	65	95
142h^a	85	63	79
141l^a	47	67	58

Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da se antiproliferativna aktivnost menja prema sledećem redosledu: amidi > karboksilne kiseline > metil-estri.

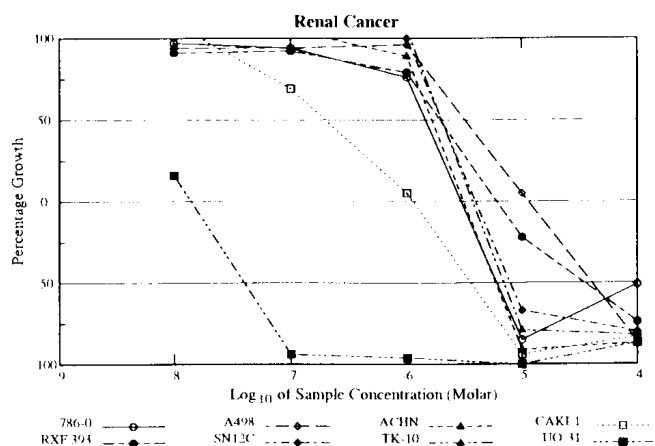
Neki od tetraoksana pokazuju karakteristično ponašanje prema pojedinim ćelijskim linijama (Tabela 26). Specifičnu inhibiciju rasta UUACC-62 ćelijske linije melanoma pokazuje 4''(*R*)-metil metil-estar **138f** ($GI_{50} = 10$ nM). Međutim, pri koncentracijama većim od 1 μ M aktivnost ovog jedinjenja se smanjuje (Slika 8a). Prema istoj ćelijskoj liniji specifičnu aktivnost pokazuje i kiselina njegovog 4'' epimera – (4''*S*)-metil-kiselina **139g**. Pri nižim koncentracijama (0,01 μ M) kiselina pokazuje dosta dobru aktivnost koja pri većim koncentracijama naglo pada (0,1 μ M). Daljim porastom koncentracije raste i aktivnost da bi pri koncentraciji 1 μ M nivo aktivnosti bio kao pri koncentraciji 10 nM (Slika 8b).

Vrlo dobru aktivnost pokazuje (4''*S*)-Me *N*-Pr''-amid **143g**. Dobre vrednosti GI_{50} pokazuje prema CCRF-CEM ćelijskoj liniji leukemije, HOP-92 ćelijskoj liniji Non-Small ćelijama raka pluća i UO-31 ćelijskoj liniji raka bubrega (Tabela 26). Ovo je vrlo dobar primer uticaja C(24) supstitucije na antiproliferativnu aktivnost. Promenom supstitucije na C(24) kod **139g** u C(24) *N*-Pr'' amidnu grupu u **143g** gubi se karakteristično ponašanje prema UUACC-62 ćelijama melanoma, raste aktivnost prema drugim ćelijama raka, a raste i broj ćelijskih linija prema kojima jedinjenje pokazuje relativno dobru aktivnost.

Najveću aktivnost pokazuje cikloheksilidenski-derivat primarni-amid **140b**. On pokazuje veoma dobru aktivnost prema više ćelijskih linija (Tabela 26). Uklanjanjem metil-grupe iz cikloheksilidenskog dela molekula povećava se aktivnost prema ćelijskim linijama, ali raste i broj ćelija prema kojima su derivati aktivni. Izrazito veliku aktivnost pokazuju prema UO-31 ćelijskoj liniji raka bubrega (Slika 9).



Slika 8: Zavisnost rasta ćelijskih linija melanoma od koncentracije tetraoksana: a) 4''(R) Me ester **138f**; b) 4''(S) kiselina **139g**.



Slika 9: Zavisnost rasta ćelijskih linija raka bubrega od koncentracije primarnog amida **140b**.

Tabela 26. Vrednosti antiproliferativne aktivnosti tetraoksana **138f**, **139g**, **143g**, **140b**, **143b** i **128**

Jedinjenje	Ćelijska linija	Aktivnosti nakon 48 h (μM)		
		GI ₅₀	TGI	LC ₅₀
138f	UACC-62 ^a	< 0,01	100	100
139g	UACC-62 ^a	-	12,6	37,1
143g	CCRF-CEM ^b	0,038	2,16	25,6
	HOP-92 ^c	0,045	1,98	15,6
	UO-31 ^d	0,96	2,42	5,98
140b	RPMI-8226 ^b	0,43	2,47	7,8
	NCI-H23 ^c	0,55	2,07	5,28
	NCI-H522 ^c	0,23	0,77	3,02
	LOX IMVI ^a	0,58	1,95	-
	IGROV1	0,032	0,12	0,43
	CAKI-1 ^d	0,2	1,12	3,59
	UO-31 ^d	< 0,01	0,014	0,04
128	UO-31 ^d	0,10	0,23	0,54

^a Ćelijska linija melanoma; ^b ćelijska linija leukemije; ^c Non-Small ćelije raka pluća; ^d ćelijska linija raka bubrega; ^e ćelijska linija raka jajnika;

*Treba istaći da tri tetraoksana - bis-steroidni **128** i mešoviti **140b** i **143g** - pokazuju veoma dobru aktivnost prema UO-31 ćelijskoj liniji raka bubrega, od kojih su dva N-Prⁿ-amidni derivati tetraoksana - **128** i **143g**.*

3.3. QSAR ANALIZA

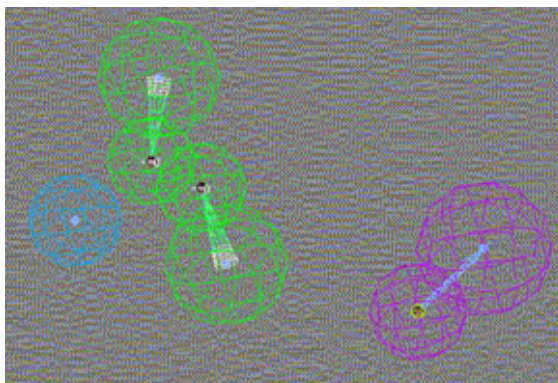
Na osnovu prikupljenih podataka o strukturama tetraoksana holne kiseline izvršeno je računarsko modelovanje njihovih struktura. Iz proračuna koji će u ovom delu teze biti prikazani isključeni su tetraoksani:

- 1) čija struktura nije potpuno utvrđena – 4''-etil, 4''-*t*-butil i 4''-fenil derivati mešovitih tetraoksana
- 2) za koje nije utvrđena definitivna vrednost antimalarijske aktivnosti – bis-steroidni tetraoksani **123**, **124**, **129**, **130**, **133** i **134** (Tabela 15)
- 3) smeše tetraoksana **138d**, **138e**, **138m**, **139e** i **140e** – **143e**.

Modelovanje je izvršeno u Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Washington, DC, na AM1 semi-empirijskom nivou, programom SPARTAN, verzija 5.0, na Silicon Graphics radnoj stanici. Optimalna konformacija svakog od ispitivanih derivata dobijena je višestrukom rotacijom oko prostih veza u molekulu. Na taj način generisano je po nekoliko konformera niske energije sa različitom distribucijom gustine i među njima su identifikovani konformeri sa najmanjim sadržajem energije. Geometrije konformera su optimizovane i na osnovu njih su izračunate stereoelektronske karakteristike ispitivanih jedinjenja.

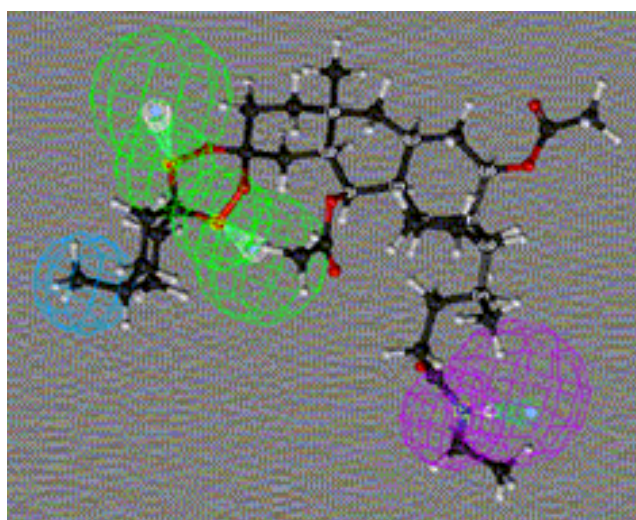
Optimizovane strukture koje su generisane programom SPARTAN, unete su u program CATALYST kojim je izvršena optimizacija do najbližeg lokalnog minimuma molekulskom mehanikom, zasnovane na CHARMM polju sila. Algoritam programa CATALYST omogućava iznalaženje najbolje konformacije generisanjem 250 konformera svakog molekula u energetskom opsegu 0 – 25 kcal / mol iznad globalnog minimuma energije konformacije. Od svih optimizovanih struktura, odabrane su strukture osam tetraoksana derivata holne kiseline koji pokazuju širok opseg aktivnosti i sa strukturama artemizinina, arteetra i četiri tetraoksana koje su sintetisali drugi autori korišćene su za generisanje hipoteze – odnosno farmakofore (Tabela 27). Cilj postavljanja hipoteze je da se utvrdi najbolji trodimenzionalni raspored funkcionalnih grupa kojim će moći da se objasne antimalarijske aktivnosti odabranih jedinjenja. Hipoteza je generisana programom CATALYST (Hypo Gen) korišćenjem optimizovanih struktura odabranog seta jedinjenja, njihovih *in vitro* antimalarijskih aktivnosti prema *P. falciparum* soju D6 i strukturno-hemijskih karakteristika – akceptor vodonične veze, donor vodonične veze, hidrofobna alifatična mesta, mesta pozitivne jonizacije i mesta sa aromatičnom strukturom. Automatsko generisanje hipoteze vršeno je na osnovu glavnih parametara - težina funkcije 0,302, koeficijent mapiranja 0, rezolucija 297 pm i nepouzdanost aktivnosti 3. Ukupno je generisano deset hipoteza od kojih je jedna statistički najrelevantnija (cost = 81,1, fixed cost = 75,1, RMS = 0,75). Statistička relevantnost generisanih hipoteza određuje se na osnovu njihovog odstupanja od nulte hipoteze kao i na osnovu korelacionih koeficijenata. Nulta hipoteza je polazna hipoteza prema kojoj, u ovom slučaju, ne postoji korelacija između strukture jedinjenja i njihove biološke aktivnosti. To znači da hipoteza koja najviše odstupa od nulte hipoteze predstavlja statistički najrelevantniju hipotezu. Utvrđeno je da su u ovu hipotezu uključene četiri strukturno-hemijske karakteristike – dva akceptora vodonične veze (zeleno), jedan donor vodonične veze (ljubičasto) i alifatični hidrofobni deo (plavo), kako je prikazano na Slici 10. Ove karakteristike predstavljene su kao tačke ili kao vektorski geometrijski objekti. Pravac vektora, posebno onih koji su povezani sa stvaranjem vodonične veze, određeni su simetrijom, brojem lokalizovanih slobodnih elektronskih parova, pojačanim efektom slobodnih elektronskih parova

usled elektrostatskog potencijala i okruženja atoma. Vrednosti RMS-a ostalih generisanih hipoteza nalaze se u opsegu 0,75 – 0,83.



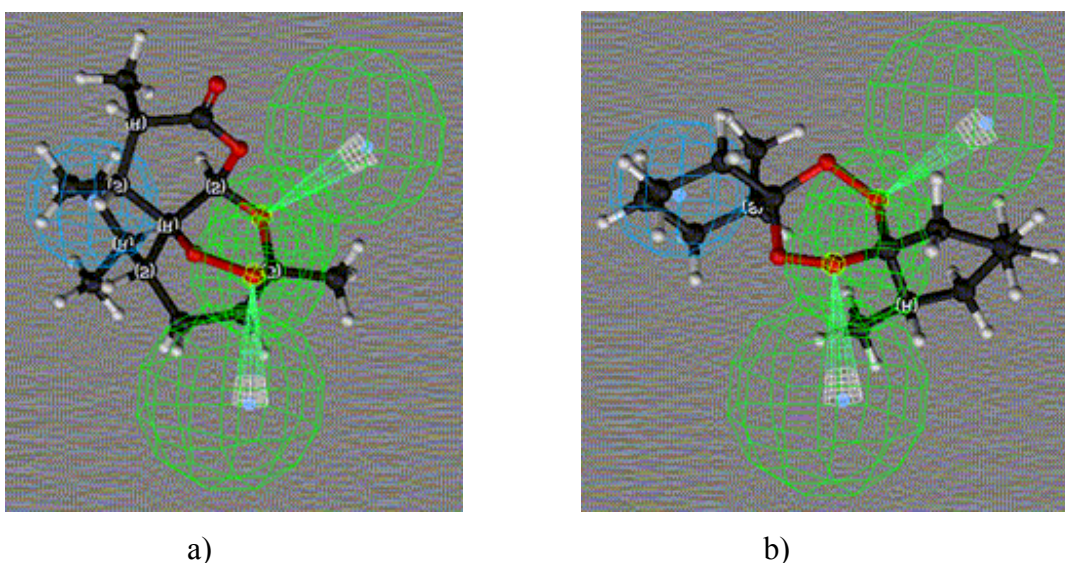
Slika 10. Hipoteza (farmakofora) steroidnih tetraoksana generisana programom CATALYST

Preklapanje statistički najrelevantnije hipoteze sa optimizovanom strukturom jednog od najaktivnijih derivata, (4''*R*)-*N*-Et-amida **142f** (Slika 11) pokazuje vrlo dobru podudarnost. Metil-grupa na C(4'') preklapa se sa hidrofobnim alifatičnim delom, kiseonikovi atomi iz peroksidnih veza preklapaju se sa akceptorom vodonične veze, a H-atom C(24) amidne grupe preklapa se sa donorom vodonične veze. Optimizovane strukture najmanje aktivnih tetraoksana **133** i **134** ne poklapaju se sa hipotezom. Rezultati ukazuju da dva akceptora vodonične veze (peroksidni atomi kiseonika), hidrofobni alifatični deo (C(4'')-alkil) na jednom kraju molekula i donor vodonične veze (C(24) karboksilna ili primarna i sekundarna amidna grupa) na drugom kraju molekula predstavljaju važne strukturne karakteristike molekula koje su povezane sa izraženom antimalarijskom aktivnošću. Treba podsetiti da su upravo 4''-metil-derivati mešovutih tetraoksana među najaktivnijim tetraoksanima koji su sintetisani (Tabele 21 i 22), kao i na važno prisustvo bar jednog vodonika u C(24) amidnoj grupi, što je pokazano slabom aktivnošću amida **133-136** (Tabela 15).



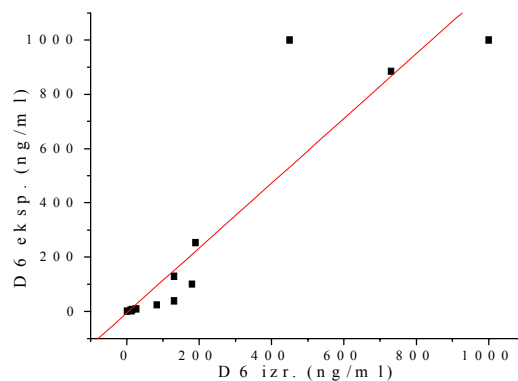
Slika 11. Prikaz farmakofore i strukture (4''*R*)-*N*-Et-amida **142f**.

Preklapanjem dobijene hipoteze sa optimizovanom strukturom artemizinina (Slika 12a) i tetraoksana **91** (Slika 12b) uočava se vrlo dobro poklapanje akceptora vodonične veze i hidrofobnog alifatičnog dela molekula. Kod artemizinina, za razliku od tetraoksana **91** jedan od dva akceptora vodonične veze nije peroksidni već etarski kiseonik. Ipak, i kod artemizinina i kod tetraoksana **91** očigledno je odsustvo donora vodonične veze. Zbog toga ova funkcionalna karakteristika ne mora biti neophodni deo farmakofore, ali na osnovu rezultata antimalarijke aktivnosti (Tabele 15, 21 i 22) očigledno je da njeno prisustvo vrlo povoljno deluje na aktivnost tetraoksana derivata holne kiseline.



Slika 12. Prikaz farmakofore i optimizovanih struktura: a) artemizinina i b) tetraoksana **91**.

Generisana hipoteza je iskorišćena za izračunavanje IC_{50} vrednosti antimalarijske aktivnosti tetraoksana derivata holne kiseline prema *P. falciparum* soju D6. Izračunate vrednosti IC_{50} i vrednosti koje su eksperimentalno dobijene date su u Tabeli 27. Za izračunavanje IC_{50} vrednosti korišćeni su oni konformeri jedinjenja koji pokazuju najmanje odstupanja prilikom projekcije na hipotezu. Greška predstavlja odnos izračunate i eksperimentalno određene aktivnosti, a negativan predznak označava da je izračunata vrednost manja od određene. Grafikon koji prikazuje odnos izračunate i određene aktivnosti daje linearnu zavisnost sa faktorom korelacije 0,92 (Slika 13).



Slika 13. Zavisnost izračunatih i određenih vrednosti IC_{50} prema D6

Tabela 27. Izračunate i eksperimentalne vrednosti antimalarijske aktivnosti odabranih tetraoksana. IC_{50} vrednosti su date u ng / ml.

Jedinjenje	IC_{50} (D6) (eksp.)	IC_{50} (D6) (izr.)	Greška *
123	99,97	180,0	1,8
126	130,0	130,0	1,0
133	5000,0	1000,0	-5,0
135	885,30	730,0	-1,2
136	254,0	190,0	-1,3
138a	24,30	83,0	3,4
139f	0,97	0,39	-2,5
143b	9,80	25,0	2,7
artemizinin	4,70	10,0	2,1
arteetar	2,70	13,0	4,8
91	6,90	15,0	2,2
Tetraoksan 3	1000,0	450,0	-2,2
Tetraoksan 4	1000,0	1000,0	1,0
Tetraoksan 5	38,0	130,0	3,4

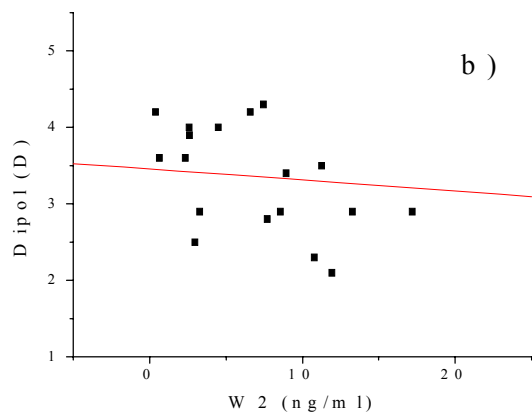
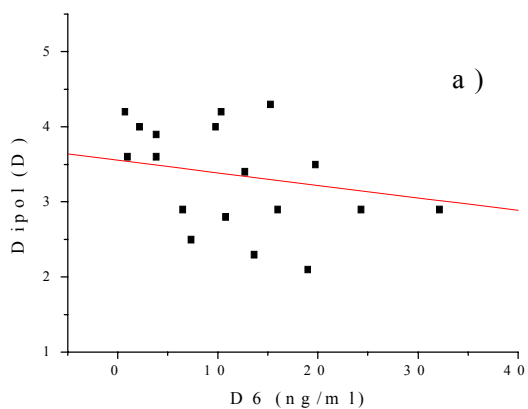
Strukture koje su dobijene AM1 semi-empirijskom optimizacijom korišćene su za izračunavanje stereoelektronskih osobina ispitivanih jedinjenja. Ovi proračuni su urađeni sa ciljem da se utvrdi kvalitativna i kvantitativna veza između strukture ovih jedinjenja i njihove

antimalarijske aktivnosti. Vršena su izračunavanja sledećih stereoelektronskih osobina: 1) dipolni moment molekula, 2) energija najviše popunjene (HOMO) i najniže nepopunjene (LUMO) molekulske orbitale i njihova razlika (GAP), 3) negativni (MEP-) i pozitivni (MEP+) elektrostatički potencijal molekula i 4) podeoni koeficijent oktanol / voda izražen kao logP. Vrednosti dobijene proračunima navedene su u Tabeli 28. Na Slikama 14 - 20 dati su grafikoni koji ilustruju zavisnosti antimalarijske aktivnosti prema D6 i W2 i izračunatih stereoelektronskih osobina.

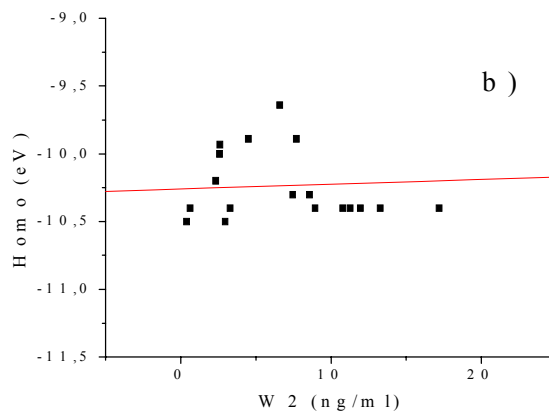
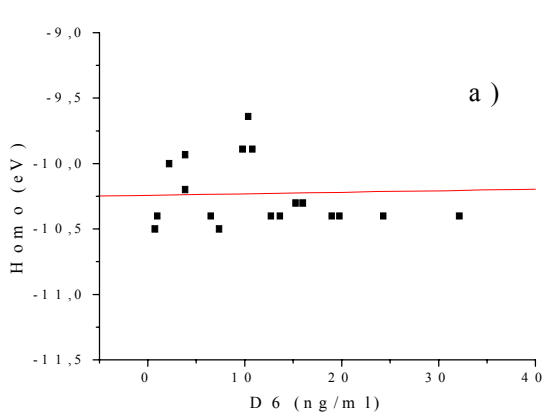
Tabela 28 . Vrednosti odabranih elektronskih karakteristika tetraoksana dobijenih proračunima AM1 metodom.

Jedinjenje	D6 ^a	W2 ^a	Dipol ^b	HOMO ^c	LUMO ^c	GAP ^d	MEP- ^e	MEP+ ^e	Log P ^f
138a	24,3	17,18	2,9	-10,40	1,02	11,44	-66,09	19,99	0,01
138b	13,63	10,77	2,3	-10,40	1,08	11,51	-66,97	19,49	0,48
138c	32,11	13,26	2,9	-10,40	1,03	11,44	-65,52	19,92	0,63
138f	6,48	3,27	2,9	-10,40	1,03	11,44	-65,62	20,42	0,59
138g	15,99	8,54	2,9	-10,30	1,10	11,40	-66,7	19,54	0,74
139b	18,98	11,93	2,1	-10,40	0,90	11,34	-69,7	34,93	-0,15
139f	0,97	0,62	3,6	-10,40	0,91	11,29	-69,46	32,62	0,21
139g	19,74	11,26	3,5	-10,40	0,92	11,31	-69,49	32,62	0,19
140b	7,33	2,94	2,5	-10,50	0,29	10,82	-72,33	38,97	0,87
140f	0,74	0,37	4,2	-10,50	0,87	11,33	-65,42	20,73	-1,32
140g	12,7	8,94	3,4	-10,40	1,06	11,39	-71,35	37,29	0,1
141f	3,86	2,34	3,6	-10,20	0,85	11,03	-65,59	21,13	-0,63
141g	10,79	7,69	2,8	-9,89	0,99	10,89	-69,82	34,16	0,18
142f	3,84	2,6	3,9	-9,93	0,85	10,79	-65,66	20,73	-0,47
142g	10,32	6,57	4,2	-9,64	0,88	10,52	-79,27	28,63	0,51
143b	9,77	4,5	4,0	-9,89	1,12	11,02	-73,96	34,93	0,44
143f	2,18	2,58	4,0	-10,0	0,85	10,86	-66,16	20,61	-0,11
143g	57,41	56,11	3,1	-9,95	1,03	10,98	-70,68	34,53	0,88
144b	15,23	7,45	4,3	-10,30	0,89	11,18	-67,95	33,35	-0,72

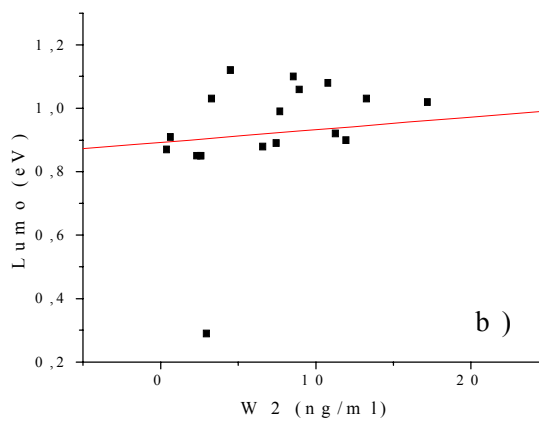
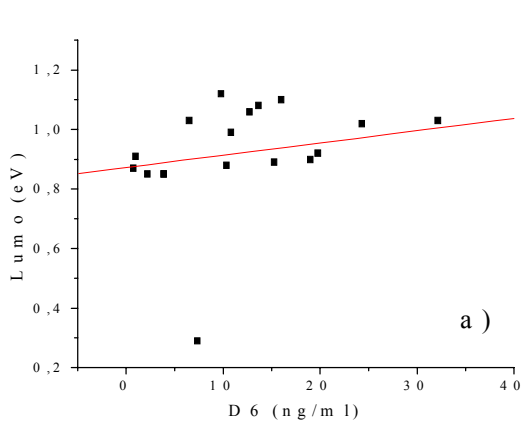
^a IC₅₀ (ng / ml); ^b Vrednosti dipolnog momenta (debajima (D)); ^c Energije HOMO i LUMO orbitala (eV); ^d GAP - razlika između HOMO i LUMO orbitala (eV); ^e MEP (-) i (+) elektrostatički potencijali (kcal / mol); ^f logP – izračunati particioni koeficijent oktanol / voda (Villar-ova skala).



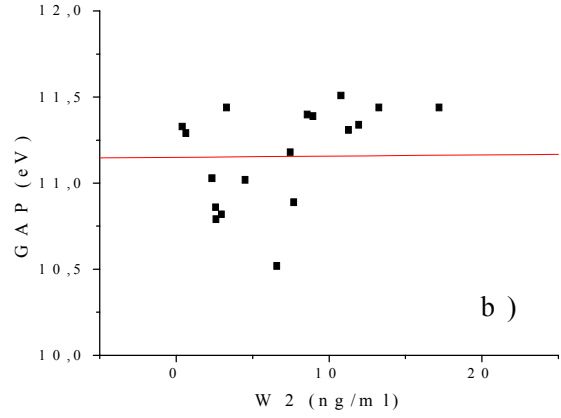
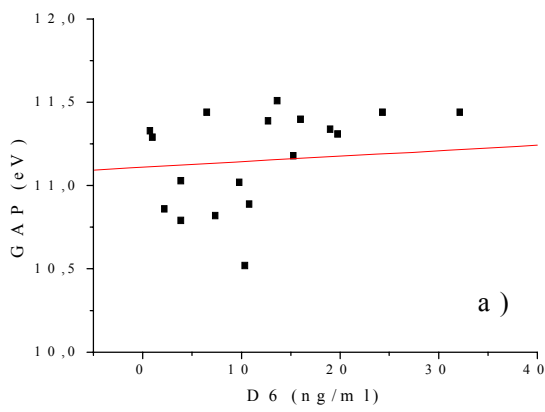
Slika 14. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od vrednosti dipolnog momenta molekula



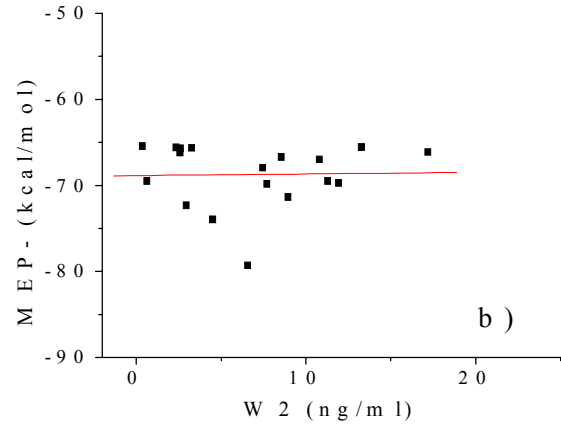
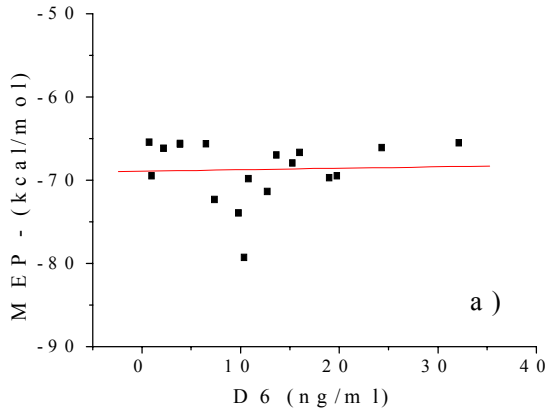
Slika 15. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od energije HOMO orbitala



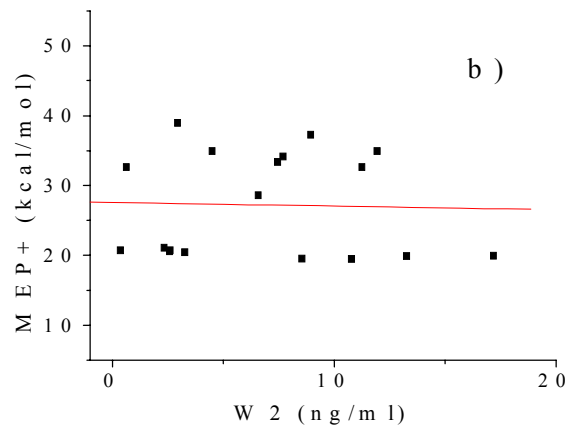
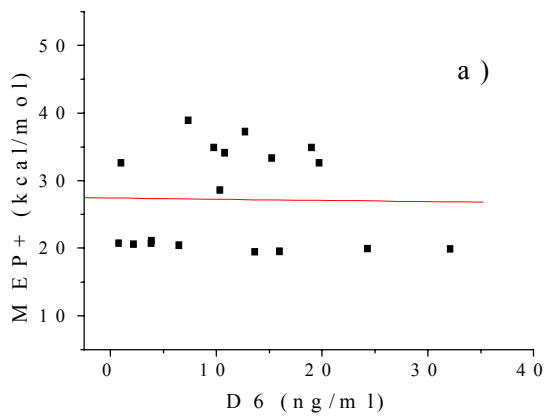
Slika 16. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od energije LUMO orbitala



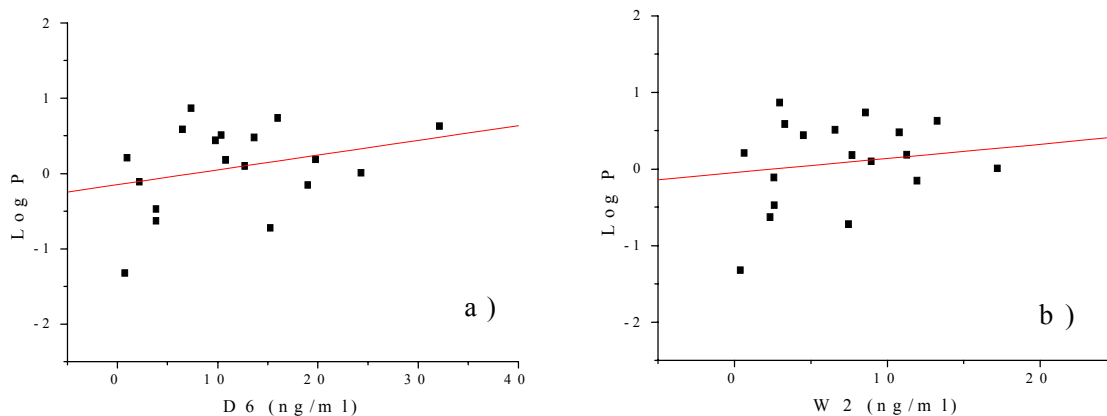
Slika 17. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od razlike energija HOMO i LUMO orbitala (GAP)



Slika 18. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od MEP-



Slika 19. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od MEP+



Slika 20. Zavisnost aktivnosti prema D6 (a) i W2 (b) od logP

Na Slici 14 prikazana je zavisnost promene aktivnosti tetraoksana derivata holne kiseline prema D6 (a) i W2 (b) od vrednosti dipolnog momenta molekula. Iz grafikona se može videti da povećanje vrednosti dipolnog momenta, odnosno povećanje polarnosti molekula, povoljno utiče na antimalarijsku aktivnost jedinjenja prema D6 i W2 sojevima. Međutim, za potpuniji zaključak o uticaju dipolnog momenta na aktivnost nedostaju podaci o pravcu prostiranja vektora dipolnog momenta. U literaturi je pokazano da osim vrednosti dipolnog momenta na biološku aktivnost istovremeno utiče i pravac prostiranja njegovog vektora.⁷²

Na Slikama 15 - 17 prikazane su zavisnosti promene aktivnosti tetraoksana derivata holne kiseline od energije najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO, Slika 15), energije najniže nepopunjene molekulske orbitale (LUMO, Slika 16) i od razlike njihovih energija (GAP, Slika 17). Iz datih grafikona može se videti da snižavanjem energija i HOMO i LUMO orbitala raste aktivnost ispitivanih tetraoksana prema oba *P. falciparum* soja. Aktivnost prema D6 raste smanjivanjem vrednosti GAP (Slika 17a). Promena vrednosti GAP ima vrlo mali uticaj na aktivnost prema W2 i njihova linearna zavisnost je gotovo paralelna sa x -osom. Ovakve zavisnosti mogu da znače da ovi derivati lako vrše razmenu elektrona prilikom interakcije sa receptorom. Smanjivanjem energije molekulske orbitale razmena elektrona bi bila lakša, što sa druge strane povoljno deluje na antimalarijsku aktivnost. To bi moglo da znači, da je razmena elektrona između ovih derivata i receptora bitan deo njihovog mehanizma biološkog delovanja.

Na slikama 18 i 19 prikazani su grafikoni promene aktivnosti tetraoksana derivata holne kiseline prema D6 (a) i W2 (b) u zavisnosti od negativnog (MEP-, Slika 18) i pozitivnog (MEP+, Slika 19) molekulskeg elektrostatickog potencijala. Izračunavanja pokazuju da MEP, i negativni i pozitivni, imaju malog uticaja na antimalarijsku aktivnost ovih jedinjenja. Za potpuniji zaključak o

uticaju MEP-a na antimalarijsku aktivnost nedostaju podaci o prostiranju elektrostatskog potencijala po Van der Walsovim površinama. U literaturi je pokazano da osim vrednosti MEP-a na biološku aktivnost istovremeno utiče i njegovo prostiranje po Van der Walsovim površinama.⁷²

Na Slici 20 prikazan je grafikon promene aktivnosti tetraoksana derivata holne kiseline prema D6 (a) i W2 (b) u zavisnosti od particionog koeficijenta oktanol / voda (logP). Vrednost logP je parametar hidrofobnosti molekula; smanjivanjem ove vrednosti smanjuje se i lipofilnost molekula. Iz grafikona se može videti da smanjivanjem vrednosti logP molekula raste njegoa antimalarijska aktivnost. Ovakva zavisnost je u skladu sa rezultatima promene antimalarijske aktivnosti u zavisnosti od vrednosti dipolnog momenta tetraoksana.

In vitro ispitivanja antimalarijske aktivnosti pokazala su da je derivat (4''R)-metil primarni amid **140f** najaktivniji od svih do sada sintetisani tetraoksana, pa i tetraoksana derivata holne kiseline holne kiseline [D6 IC₅₀ = 1,49 nM (0,74 ng / ml), **W2** IC₅₀ = **0,58 nM (0,37 ng / ml)**] (Tabele 22 i 28). Poznato je da molekuli sličnih struktura i sličnih elektronskih osobina mogu imati sličnu biološku aktivnost ili sličan mehanizma biološkog delovanja. Na osnovu toga je pretpostavljeno da bi, makar jednim delom, tetraoksani derivata holne kiseline mogli imati sličan mehanizam dejstva kao i artemizinin i njegovi derivati. Prema toj analogiji, interakcija tetraoksana holne kiseline sa hemom bi bila važan deo mehanizma njihovog biološkog dejstva. Iz tog razloga izvršene su dodatne optimizacije i proračuni strukture (4''R)-metil- primarnog amida **140f** i njegovog kompleksa sa hemom. Takođe, izvršeni su odgovarajući proračuni kompleksa njegovog (4''S)-metil- epimera **140g** sa hemom.

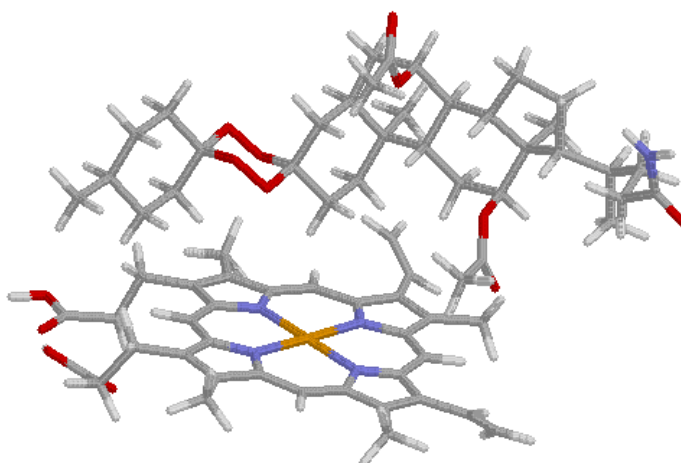
Utvrđeno je da na 3-21G* nivou RHF izračunavanja (4''R)-metil primarni amid **140f** jeste za 1,88 kcal / mol stabilniji od svog (4''S)-metil epimera **140g** (6-32G** nivo izračunavanja nije bio moguć zbog velikih dimenzija molekula). Optimizacijom strukture (4''S)-metil primarnog amida **140g**, već opisanim postupkom, utvrđeno je da je aksijalni položaj 4''-metil- grupe energetski stabilniji u vakuumu, što odgovara strukturi u kristalu odgovarajuće kiseline - **139g**.

Proračuni ukazuju na to da je u slučaju (4''S)-metil primarnog amida **140g** potrebno za 4,2 kcal / mol manje energije za homolitičko raskidanje *obe peroksidne veze* u poređenju sa (4''R)-metil- epimerom **140f**. Međutim, u slučaju **140f** potrebno je za 7,3 kcal / mol *manje* energije za homolitičko raskidanje *jedne* peroksidne veze [O(1'')-O(2''), Shema 32] u odnosu na njegov epimer **140g**, na istom nivou proračuna. Ovakva razlika u energijama homolitičkog raskidanja jedne peroksidne veze između derivata **140f** i **140g** je u skladu sa njihovom različitom antimalarijskom aktivnošću. Drugim rečima, veća aktivnost derivata **140f** u odnosu na epimer **140g** može biti posledica toga da je u slučaju **140f** potrebno uložiti manje energije za raskidanje jedne peroksidne veze.

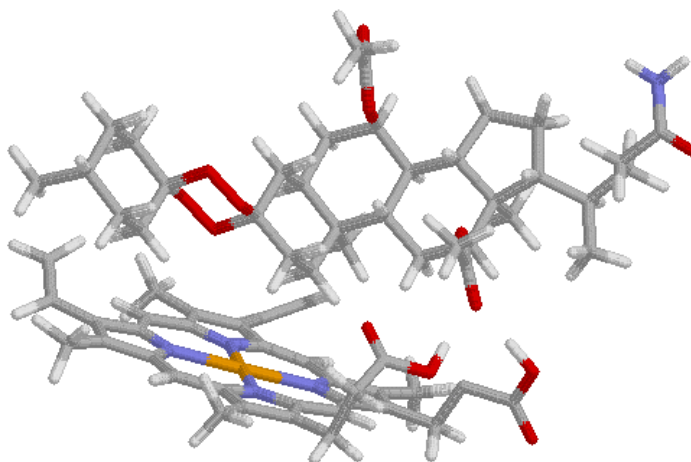
Na Slikama 21 i 22 prikazane su optimizovane strukture kompleksa tetraoksana **140f** i **140g** sa hemom. Na osnovu prikazanih struktura može se videti da se tetraoksani **140f** (Slika 19) i **140g** (Slika 20) različito orijentišu prema hemu. Tetraoksan **140f** je orijentisan tako da mu je lipofilni deo molekula okrenut prema karboksilnim grupama hema, dok je deo sa polarnim grupama (acetatne grupe u položajima C(7) i C(12) i C(24) amidna grupa) okrenut prema lipofilnom delu hema. Nasuprot njemu, tetraoksan **140g** je orijentisan tako da se njegov lipofilni deo nalazi u blizini lipofilnog dela hema, a polarni deo molekula (acetatne grupe u položajima C(7) i C(12) i C(24) amidna grupa) nalazi se u blizini karboksilnih grupa hema. Osim toga struktura ukazuje da je moguća dodatna interakcija, verovatno preko vodoničnih veza između karboksilne grupe hema i acetatne grupe u položaju C(12). Oba molekula tetraoksana su bočno okrenuta prema hemu, tako da je strana na kojoj se nalazi C(12) acetatna grupa bliža hemu, ali za razliku od derivata **140g**, kod njegovog epimera **140f** ravan tetraoksanskog prstena je paralelna sa hemom. Na prvi pogled izgleda kao da tetraoksan **140g** formira stabilniji kompleks sa hemom nego njegov epimer **140f**. Međutim, na osnovu proračuna optimizovanih struktura utvrđeno je da je ukupna energija kompleksa **140f** sa hemom ($E_u = -143,64$ kcal / mol) za 33,53 kcal / mol niža od ukupne energije kompleksa **140g** sa hemom ($E_u = -110,11$ kcal / mol); (Tabela 29). Takođe je utvrđeno da je elektrostatički potencijal kompleksa **140f** sa hemom ($EP_{140f} = -180,2$ kcal / mol) za 30,8 kcal / mol niži od elektrostatičkog potencijala kompleksa **140g** sa hemom ($EP_{140g} = -149,4$ kcal / mol); (Tabela 29). Ovakva razlika u ukupnim energijama kompleksa sa hemom i elektrostatičkog potencijala između derivata **140f** i njegovog epimera **140g** je u skladu sa njihovom različitom antimalarijskom aktivnošću. Drugim rečima, veća aktivnost derivata **140f** može biti posledica građenja stabilnijeg kompleksa sa hemom u odnosu na epimer **140g**.

Tabela 29. Vrednosti nekih fizičkih veličina optimizovanih struktura kompleksa tetraoksana **140f** i **140g** sa hemom

Fizička veličina	Tetraoksan	
	140f	140g
Ukupna energija (E_u , kcal / mol)	-143,64	-110,11
Elektrostatički potencijal (EP , kcal / mol)	-180,2	-149,4
Rastojanje Fe-O(1') (Å)	4,79	5,40
Rastojanje Fe-O(2') (Å)	5,96	6,33
Rastojanje Fe-O(4') (Å)	6,58	5,23
Rastojanje Fe-O(5') (Å)	5,54	4,06



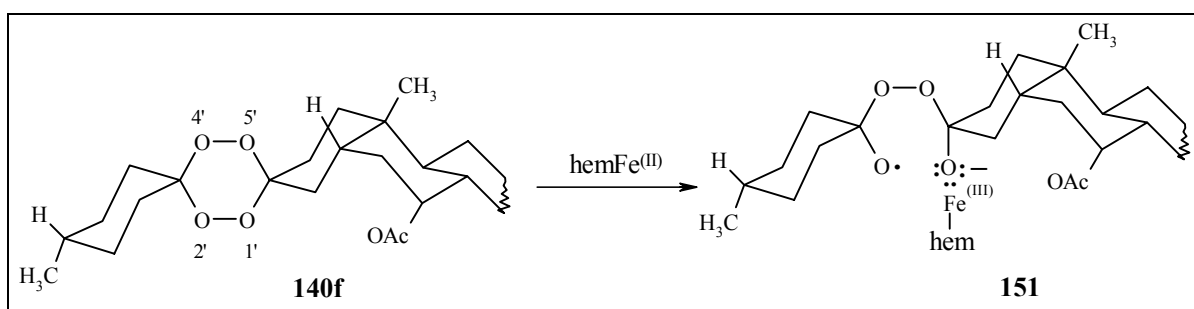
Slika 21. Optimizovana struktura kompleksa (4'*R*)-metil amida **140f** sa hemom



Slika 22. Optimizovana struktura kompleksa (4'*S*)-metil amida **140g** sa hemom

Podaci koji su dobijeni proračunima na osnovu optimizovanih struktura mogućih kompleksa tetraoksana sa hemom u skladu su sa rezultatima njihove *in vitro* antimalarijske aktivnosti. Tetraoksan **140f** pokazuje znatno bolju antimalarijsku aktivnost prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2 u poređenju sa njegovim epimerom **140g**. Istovremeno, rezultati pokazuju da bi i ova jedinjenja, kao i artemizinin ili jednostavniji tetraoksani (**91**), mogla imati sličan mehanizam biološkog delovanja. Po toj pretpostavci preduslov za dobro antimalarijsko dejstvo bio bi stvaranje dovoljno stabilnog “kompleksa” tetraoksanskog derivata holne kiseline sa hemom (Eu_{140f} prema Eu_{140g}, Tabela 29). U sledećem koraku, moglo bi doći do jednoelektronske razmene između Fe(II) jona iz hema i tetraoksana. Na to upućuje razlika u energijama homolitičkog raskidanja peroksidnih veza ovih derivata. Kako je energetski povoljnije homolitičko raskidanje O(1')-O(2') peroksidne

veze, može se pretpostaviti da proces započinje njenim homolitičkim raskidanjem koje je inicirano prelaskom jednog elektrona sa Fe(II), nakon čega nastaje radikal-anjon **151** (Shema 33). Pošto proračuni pokazuju da je u pretpostavljenom “kompleksu” **140f** sa hemom, O(1') atom bliži gvožđu iz hema (Tabela 29), verovatno bi on primio elektron i postao jednom negativan, dok bi O(2') ostao sa jednim nesparenim elektronom kao radikal. Posle ovog koraka usledile bi intramolekulske transformacije, po analogiji sa artemizininom (Shema 9), u kojima bi nastao intermedijer koji bi bio neposredno toksičan prema parazitu.



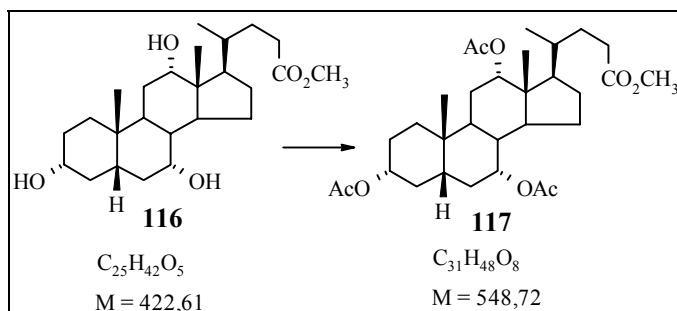
Shema 33

EKSPERIMENTALNI DEO

4. EKSPERIMENTALNI DEO

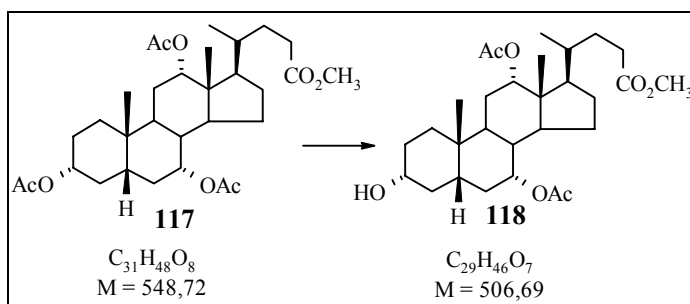
Tačke topljenja određivane su na Boetius PMHK aparatu i nisu korigovane. Vrednosti specifične rotacije određene su na aparatu Perkin-Elmer 141-MC na datoj temperaturi. IR spektri su snimani na Perkin-Elmer FT-IR 1725X spektrofotometru. $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektri su snimani na Varian Gemini-200 spektrometru na 200 i 50 MHz, u navedenim rastvaračima uz TMS kao interni standard. Hemijska pomeranja izražena su u ppm a konstante kuplovanja (J) u Hz. Maseni spektri su snimani na sledećim spektrometrima: DCI spektri su snimani na MS Finnigan-MAT 8230 spektrometru sa dvostruko fokusirajućom reverznom geometrijom koristeći izobutan. LSI (FAB) spektri su snimani na VG-ZAB-T instrumentu opremljenim sa Cs-jonskim izvorom. Napon ubrzanja je bio podešen na 8 kV, korišćena je MNBA kao matriks. Podešavanje instrumenta je vršeno PEG internim kalibrantom pri rezoluciji 5000. ESI-MS spektri su snimani na Autospec TOF instrumentu u pozitivnom jon-modu koristeći $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) sa 1% AcOH kao nosećim rastvaračem uzorka, kojim je uzorak razblaživan do koncentracije 10 pmol / μL . Temperatura izvora je bila 75 °C, a napon 40 V. QqQ-TOF spektri su snimani na QStar Pulsar (Applied Biosystems) kvadrupol-ortogonalnim “time of flight” hibridnom instrumentu. Uzorci su rastvarani u čistom CH_3CN (HPLC čistoće) do koncentracije 1,5 pmol / μL . Rastvor je direktno uvođen u izvor jonova. Spektri su snimani u pozitivnom jon modu u masenom opsegu m/z 300-1500 korišćenjem sledećih parametara izvora jona: napon ubrzanja 5500 V, napon otvora 100 V i 40 V na skimeru. Rezolucija instrumenta u TOF-MS modu je 8500. Za određivanje molekulske mase sa visokom rezolucijom (HRMS) korišćen je interni standard koji sadrži CsI sa poznatim sintetičkim peptidom i daje mase na m/z 132,90543 i 829,5398. Za tankoslojnu hromatografiju (TSH) korišćene su ploče SiO_2 (Merck) zajedno sa *N,N*-dimetil-*p*-fenil-diamonium dihloridom kao reagensom za utvrđivanje prisustva peroksida.⁸⁰ Za hromatografiju na koloni korišćene su Lobar LiChroprep Si 60 (40-63 μm) i Lobar LiChroprep RP-8 (40-63 μm) kolone i Waters RI 401 detektor. Za dry-flash hromatografiju korišćen je SiO_2 (40-63 μm).

Metil 3 α ,7 α ,12 α -triacetoksi-5 β -holanat (117).



U rastvor Ac_2O (1 mL) i $TMSOTf$ (26 μL , 0,14 mmol) u suvom dihlormetanu (10 mL) u atmosferi Ar odmeren je metil-holat **116** (1 g, 2,37 mmol, $TT = 157-158$ °C). Nakon 5 min mešanja, na sobnoj temperaturi, reakcija je prekinuta dodavanjem zasićenog vodenog rastvora $NaHCO_3$ (15 mL). Slojevi su razdvojeni, a vodeni sloj je ekstrahovan dihlormetanom (3 x 15 mL). Spojeni organski slojevi isprani su zasićenim vodenim rastvorom $NaHCO_3$ (3 x 15 mL), jednom zasićenim vodenim rastvorom $NaCl$ i sušeni iznad anh. Na_2SO_4 . Nakon ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobijeno je 1,12 g (86%) proizvoda **117** u obliku svetlo-žutog ulja. Analitički uzorak je dobijen kristalizacijom. $TT = 93-94$ °C (prizme, aceton / heksan; lit.⁸¹ $TT = 90,5-91$ °C). IR (film): 3021 sr, 2948 j, 2871 j, 1734 j, 1468 sr, 1438 j, 1378 j, 1245 j, 1063 j, 1022 j, 756 cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (d, $J = 2,6$ Hz, H-C(7)), 4,65-4,50 (m, H-C(3)), 3,66 (s, $CH_3O_2C(24)$), 2,14 (s, CH_3COO-), 2,09 (s, CH_3COO-), 2,05 (s, CH_3COO-), 0,92 (s, $H_3C-C(10)$), 0,81 (d, $J = 6,2$ Hz, $H_3C-C(20)$), 0,73 (s, $H_3C-C(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 174,6; 170,5; 170,4; 75,36; 74,05; 70,6; 51,5; 47,3; 45,0; 43,4; 40,9; 37,7; 34,6; 34,3; 31,2; 30,8; 30,7; 28,8; 27,1; 26,8; 25,5; 22,7; 22,5; 21,6; 21,5; 17,4; 12,1. MS (DCI, *i*-butan, m/z (%)): 549 ($M^+ + H$, 2), 489 ($M^+ - AcOH$, 5), 429 ($M^+ - 2 \times AcOH$, 100), 369 ($M^+ - 3 \times AcOH$, 8).

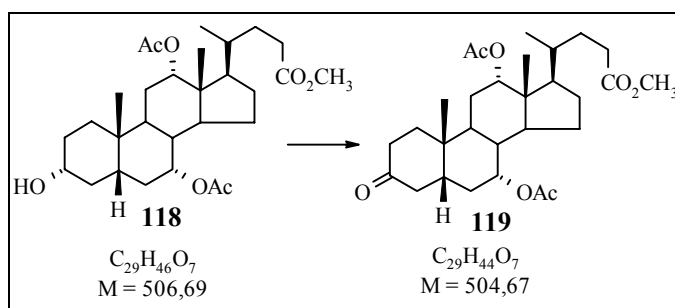
Metil 3 α -hidroksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat (118).



U rastvor triacetata **117** (5,30 g, 9,66 mmol) u suvom MeOH (80 mL), odmeren je anhidrovani K_2CO_3 (2,40 g, 17,40 mmol). Nakon 2 sata mešanja na sobnoj temperaturi, (TSH , PhMe / EtOAc = 3/7), reakcija je prekinuta dodavanjem glacijalne AcOH (3 mL) i rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Čvrst ostatak je u obliku suspenzije u EtOAc prenet u levak za odvajanje, ispran dva puta vodom i jednom zasićenim vodenim rastvorom $NaCl$ i sušen iznad anh. Na_2SO_4 .

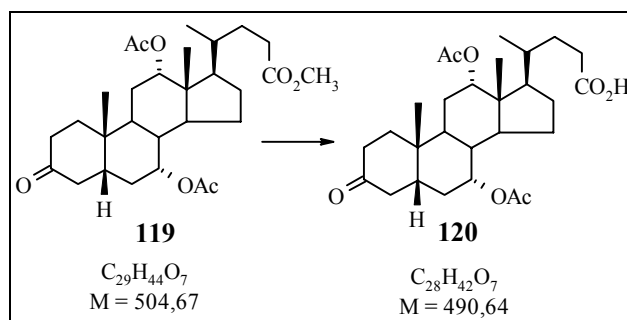
Nakon ceđenja rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Dobijeno je 4,72 g (96%) proizvoda **118** u obliku svetlo-žutog ulja. Analitički uzorak je dobijen kristalizacijom. TT = 59-62 °C (prizme, EtOAc / heksan; lit.⁸² TT = 57-59 °C). IR (KBr): 3446 sr, 2953 j, 2870 j, 1735 j, 1654 sr, 1467 sr, 1379 j, 1245 j, 1101 j, 1075 j, 1022 j cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,08 (šs, H-C(12)), 4,90 (d, *J* = 2,6 Hz, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 3,60-3,40 (m, H-C(3)), 2,13 (s, CH₃COO-), 2,09 (s, CH₃COO-), 0,91 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,2; 169,4, 73,97; 69,9; 69,4; 50,0; 47,7; 43,5; 41,8; 39,5; 36,99; 36,2; 33,4; 33,0; 32,8; 29,8; 29,3; 29,2; 28,8; 27,4; 25,6; 23,99; 21,2; 21,06; 20,12; 19,9; 15,9; 10,6. MS (DCI, *i*-butan, *m/z* (%)): 507 (M⁺+H, 2), 447 (M⁺+H - AcOH, 30), 387 (M⁺+H - 2× AcOH, 100), 369 (M⁺+H - 2× AcOH - H₂O, 50).

Metil 3-okso-7α,12α-diacetoksi-5β-holanat (119).



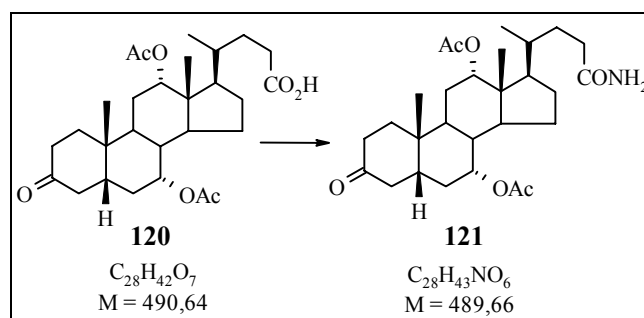
U hladan rastvor (0 °C) alkohola **118** (2,00 g, 3,95 mmol), u acetonu (55 mL), ukapavan je Jones-ov reagens (1,7 mL). Nakon završene reakcije, višak reagensa je uništen dodavanjem *i*-PrOH. Smeša je izručena u smešu led / voda, talog sušen i proizvod prečišćen kristalizacijom iz PhH / heksan. Prinos 1,61 g (81%). TT = 196-198 °C (prizme; lit.⁸² TT = 190-191 °C), $[\alpha]_D^{20} = + 57,08$ (*c* = 0,97, CHCl₃; lit.⁸² $[\alpha]_D^{20} = + 61,60$ (*c* = 2,0, CHCl₃)). IR (KBr): 3441 sr, 2965 sr, 2923 sr, 2875 sr, 1745 j, 1713 j, 1435 sr, 1382 sr, 1258 j, 1238 j, 1215 sr, 1072 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,13 (šs, H-C(12)), 5,00 (d, *J* = 2,8 Hz, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C), 2,99 (dd, *J* = 13,2, 13,2 Hz, Hα-C(4)), 2,12 (s, CH₃COO-), 2,07 (s, CH₃COO-), 1,02 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 6,2 Hz, H₃C-C(20)), 0,77 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 210,86; 173,20; 169,14; 168,86; 73,85; 69,20; 50,14; 45,97; 43,80; 43,15; 41,87; 40,75; 36,32; 35,21; 34,71; 33,17; 32,99; 29,44; 29,31; 28,38; 25,72; 24,40; 21,37; 20,22; 20,06; 19,90; 16,08; 10,82. MS (DCI, *i*-butan, *m/z* (%)): 506 (M⁺+H, 5), 445 (M⁺ - AcOH, 15), 385 (M⁺ - 2× AcOH, 100), 367 (M⁺ - 2× AcOH - H₂O, 25).

3-Okso-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanska kiselina (120).



Smeša metil-estra **119** (5,00 g, 9,9 mmol), *i*-PrOH (60 mL), H₂O (20 mL) i NaOH (600 mg, 15 mmol) intenzivno je mešana na 80 °C. Posle 30 min. (TSH, PhMe/EtOAc = 7/3) reakcija je prekinuta izlivanjem u smešu led / voda / konc. HCl. Izdvojeni talog je proceden, sušen i kristalisan iz 96% EtOH. Prinos 4,53 g (93%). TT = 200-201,5 °C (prizme; lit.^{83b} TT = 197 °C). $[\alpha]_D^{20} = +56,70$ ($c = 0,97$, CHCl₃). IR (KBr): 3500 sr, 2965 sr, 2878 sr, 1734 j, 1713 j, 1643 sl, 1437 sr, 1381 j, 1254 j, 1032 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,14 (šs, H-C(12)), 5,01 (d, $J = 2,4$ Hz, H-C(7)), 3,00 (dd, $J = 15,0, 13,8$ Hz, H α -C(4)), 2,12 (s, CH₃COO-), 2,08 (s, CH₃COO-), 1,02 (s, H₃C-C(10)), 0,84 (d, $J = 6,2$ Hz, H₃C-C(20)), 0,77 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 212,49; 179,56; 170,54; 170,27; 75,18; 70,56; 47,27; 45,03; 44,46; 43,19; 42,04; 37,64; 36,53; 36,02; 34,45; 34,31; 30,79; 30,72; 30,41; 29,70; 27,02; 25,73; 22,71; 21,56; 21,42; 21,27; 17,41; 12,18. MS (DCI, *i*-butan, m/z (%)): 491 ($M^+ + H$, 5), 431 ($M^+ - AcOH$, 15), 371 ($M^+ - 2 \times AcOH$, 100), 353 ($M^+ - 2 \times AcOH - H_2O$, 30).

3-Okso-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid (121).



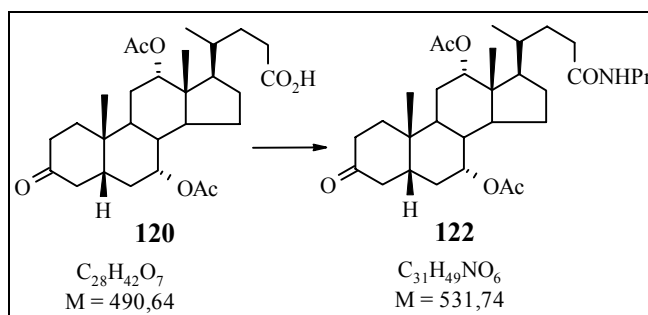
Postupak preko acil-hlorida:

U rastvor kiseline **120** (3 g, 6,11 mmol) u suvom PhH (50 mL), u atmosferi Ar, polako je dodavan SOCl₂ (534 μ L, 7,35 mmol) nakon čega je reakciona smeša grejanja do ključanja. Nakon 3 sata smeša je ohlađena, a rastvarač i višak SOCl₂ uklonjeni su pod sniženim pritiskom. Ovako dobijen sirovi kiselinski hlorid rastvoren je u suvom dihlormetanu (25 mL), rastvor je ohlađen u ledenom kupatilu i u njega je dodata suspenzija NH₄Cl (3,27 g, 61,1 mmol) i Et₃N (8,47 mL, 61,1 mmol) u suvom dihlormetanu (50 mL). Mešanje je nastavljeno još 15 min. na ledenom kupatilu a potom

preko noći na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša je izručena u smešu led / voda i ekstrahovana dihlormetanom. Spojeni organski slojevi su isprani vodom i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i sušeni iznad anh. Na₂SO₄. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, proizvod prečišćen “dry-flash” hromatografijom na SiO₂ (eluent PhMe/EA) i kristalisan iz PhH / heksan. Prinos 1,97 g (61%).

Postupak preko mešovitog anhidrida (Opšti postupak): U hladan rastvor (0 °C) kiseline **120** (3g, 6,11 mmol) u suvom dihlormetanu (25 mL) odmeren je Et₃N (0,85 mL, 6,11 mmol) i ClCO₂Et (0,58 mL, 6,11 mmol). Nakon 1 sata mešanja, u reakcionu smešu je dodata suspenzija NH₄Cl (3,27g, 61,1 mmol) i Et₃N (8,47 mL, 61,1 mmol) u suvom dihlormetanu (50 mL). Mešanje je nastavljeno u ledenom kupatilu narednih 30 min., a potom na sobnoj temperaturi dodatnih 90 min. Reakcija je prekinuta dodavanjem vode. Slojevi su razdvojeni, organski sloj je ispran dva puta zasićenim vodenim rastvorom NaCl i sušen iznad anh. Na₂SO₄. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom i proizvod kristalisan iz PhH / heksan. Prinos 2,54 g (85 %). TT = 214 °C (prizme), $[\alpha]_D^{20} = + 57,59$ (c = 1,01, CHCl₃). IR (KBr): 3426 sr, 2964 sr, 2878 sr, 1714 j, 1688 j, 1626 sr, 1380 sr, 1254 j, 1032 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,46 (s, NH₂, izmenljiv sa D₂O), 5,14 (šs, H-C(12)), 5,00 (d, *J* = 2,6 Hz, H-C(7)), 2,99 (dd, *J* = 13,4, 13,4 Hz, H-C(4)), 2,12 (s, CH₃COO-), 2,07 (s, CH₃COO-), 1,02 (s, H₃C-C(10)), 0,84 (d, *J* = 6,2 Hz, H₃C-C(20)), 0,77 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 212,18; 175,63; 170,47; 170,18; 75,22; 70,54; 47,47; 45,08; 44,52; 43,21; 42,10; 37,67; 36,58; 36,07; 34,67; 34,34; 32,65; 31,28; 30,85; 29,74; 27,13; 25,78; 22,74; 21,60; 21,45; 21,31; 17,56; 12,23. MS (DCI, *i*-butan, *m/z* (%)): 490 (M⁺+H, 50), 430 (M⁺+H – AcOH, 50), 370 (M⁺+H - 2× AcOH, 100), 352 (M⁺+H - 2× AcOH - H₂O, 10). Mikroanaliza za (C₂₈H₄₃NO₆ × 0,5 H₂O): izračunato C 67,44; H 8,89; nađeno C 67,81; H 8,50.

N-(*n*-Propil)-3-Okso-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid (**122**).



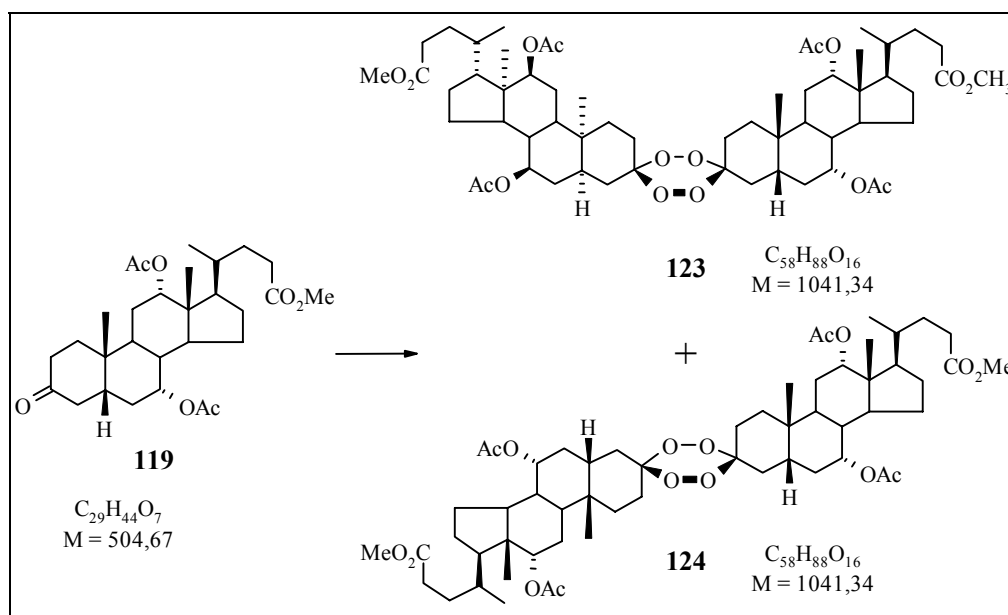
Postupak preko acil-hlorida: Prema propisu sa dobijanje amida **121**, kiselina **120** (2,95 g, 6,01 mmol) je prevedena u 2,17 g (68%) amida **122** korišćenjem 2 ekv. *n*-PrNH₂ (990 μ L, 12,02 mmol).

Postupak preko mešovitog anhidrida: Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121**, kiselina **120** (2,95 g, 6,01 mmol) je prevedena u 2,69 g (84%) amida **122** korišćenjem 2 ekv. *n*-

PrNH₂ (990 μL, 12,02 mmol). TT = 216 °C (prizme, PhH / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +50,10$ (c = 1,00, CHCl₃). IR (KBr): 3407 sr, 2954 sr, 2935 sr, 2871 sr, 1735 j, 1718 j, 1664 j, 1534 sr, 1376 sr, 1258 j, 1244 j, 1028 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,59-5,43 (m, H-N, izmenljiv sa D₂O), 5,13 (šs, H-C(12)), 5,00 (d, *J* = 2,8 Hz, H-C(7)), 3,30-3,17 (m, CH₃CH₂CH₂N), 2,99 (dd, *J* = 13,4, 13,4 Hz, H-C(4)), 2,11 (s, CH₃COO-), 2,07 (s, CH₃COO-), 1,57-1,43 (m, CH₃CH₂CH₂N), 1,02 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, CH₃CH₂CH₂N), 0,83 (d, *J* = 6,2 Hz, H₃C-C(20)), 0,77 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 212,18; 175,63; 170,47; 170,18; 75,22; 70,54; 47,47; 45,08; 44,52; 43,21; 42,10; 37,67; 36,58; 36,07; 34,67; 34,34; 32,65; 31,28; 30,85; 29,74; 27,13; 25,785; 22,74; 21,60; 21,45; 21,31; 17,56; 12,23. MS (DCI, *i*-butan, *m/z* (%)): 532 (M⁺+H, 100), 472 (M⁺+H - AcOH, 25), 412 (M⁺+H - 2× AcOH, 15). Mikroanaliza za (C₃₁H₄₉NO₆): izračunato C 70,02; H 9,29; nađeno C 70,16; H 8,96.

bis-Steroidni tetraoksani:

***bis*(Metil 3-dioksi-7α,12α-diacetoksi-5β-holanat) 123 i 124.**



U hladnu smešu (0 °C) EtOH (1,20 mL), H₂O (1,12 mL) i konc. H₂SO₄ (2,16 mL) ukapan je rastvor metil-estra **119** (400 mg, 0,79 mmol) u PhMe (8,3 mL). Nakon 15 min. intenzivnog mešanja dodat je 32% H₂O₂ (200 μL) i intenzivno mešanje je nastavljeno naredna 2 sata. Reakcija je prekinuta dodavanjem H₂O (20 mL) i PhMe (30 mL) i slojevi su razdvojeni. Organski sloj je ispran vodom (2 × 10 mL), zasićenim vodenim rastvorom NaHCO₃ (2 × 10 mL), zasićenim vodenim rastvorom NaCl i sušen iznad anh. Na₂SO₄. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, a proizvodi izolovani hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc (7/3). Prinos 104 mg (25%) **123** i 116 mg (28%) **124**.

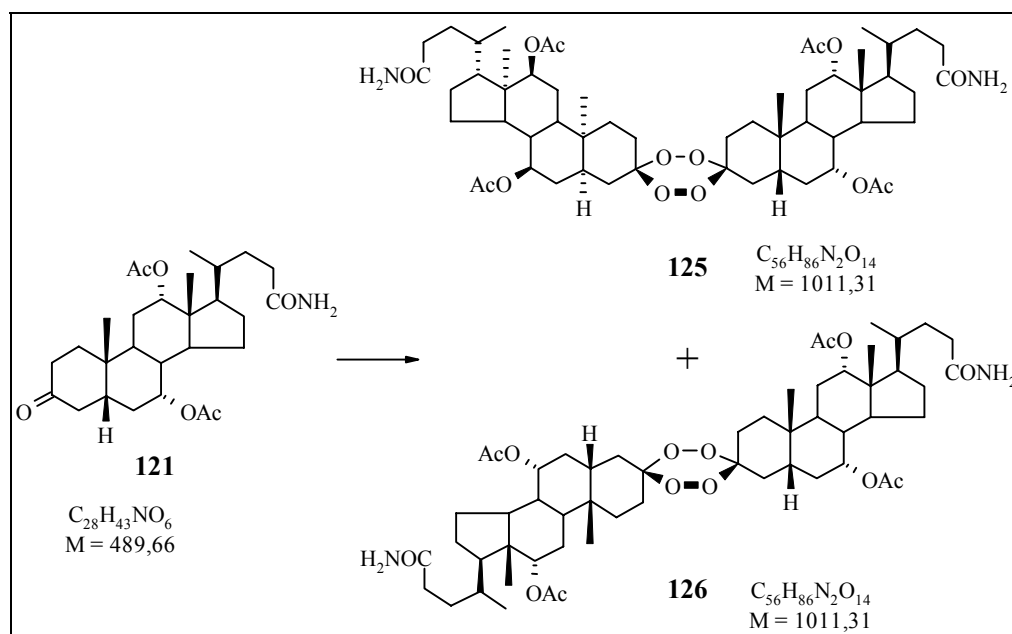
123: TT = 251-252 °C (bezbojne prizme, heksan / aceton). $[\alpha]_D^{20} = + 74,60$ ($c = 1,10$, CHCl_3). IR (KBr): 2995 sr, 1737 j, 1638 sl, 1440 sr, 1378 sr, 1250 j, 1081 sr, 1027 sr, 967 sl, 896 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,09 (šs, $2 \times \text{H-C}(12)$), 4,92 (šs, $2 \times \text{H-C}(7)$), 3,66 (s, $2 \times \text{CH}_3\text{O}_2\text{C}(24)$), 2,10 (šs, $4 \times \text{CH}_3\text{COO-}$), 0,94 (s, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,81 (d, $J = 5,8$ Hz, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 174,48; 170,45; 108,59; 75,16; 70,52; 51,42; 47,196; 44,92; 43,19; 37,55; 34,52; 34,47; 32,05; 30,72; 30,61; 28,32; 27,04; 25,57; 22,67; 22,03; 21,54; 21,23; 17,37; 12,09. ^1H -NMR (200 MHz, C_6D_6): 5,16 (šs, $2 \times \text{H-C}(12)$), 4,94 (šs, $2 \times \text{H-C}(7)$), 3,40 (s, $2 \times \text{CH}_3\text{O}_2\text{C}(24)$), 1,60 (šs, $4 \times \text{CH}_3\text{COO-}$), 0,80 (d, $J = 6,0$ Hz, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,60 (s, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,44 (s, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, C_6D_6): 173,64; 169,53; 108,91; 108,67; 75,00; 70,43; 50,93; 47,65; 45,23; 43,81; 37,71; 34,80; 34,65; 31,01; 30,80; 30,6; 28,72; 27,30; 25,99; 22,95; 22,02; 20,87; 20,56; 17,56; 12,17. MS (ESI, m/z (%)): 1063,8 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 8), 1041,7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 10), 981,6 (4), 921,7 (14), 597,0 (13), 579,0 (20), 537,4 (61), 477,3 (50), 417,3 (18), 238,0 (60), 197,0 (100), 178,2 (54), 149,0 (35). Mikroanaliza za ($\text{C}_{58}\text{H}_{88}\text{O}_{16}$ (1041,34)): izračunato C 66,90; H 8,52; nađeno C 66,66; H 8,17.

Kristalografska analiza 123. Prva grupa podataka je prikupljena na sobnoj temperaturi, ali struktura nije mogla biti korektno interpretirana zbog neuređenosti usled termalne pokretljivosti atoma u bočnom nizu holne kiseline i atoma koji su u blizini C(3) atoma. U cilju prevazilaženja ovog problema novi podaci su prikupljeni na nižoj temperaturi (100 K). Kristal ($0,3 \times 0,3 \times 0,2$ mm) je unet u inertno ulje i strujom hladnog gasa prenet u MAR345 komoru. Za prikupljanje podataka korišćeno je $\text{MoK}\alpha$ zračenje monohromatizovano grafitnim monohromatorom ($\lambda = 0,71069$ Å). Kristalni podaci za $\text{C}_{58}\text{H}_{88}\text{O}_{16} \times \text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ su : $M_r = 1097,35$, ortorombna prostorna grupa $\text{P}2_12_12$. Dimenzije jedinične ćelije su $a = 23,525(8)$ Å, $b = 8,606(3)$ Å, $c = 15,982(5)$ Å ; Zapremina $V = 3236(2)$ Å³, $Z = 2$. Ukupno je izmereno 36415 refleksija, a 3356 je bilo nezavisno [$R(\text{int}) = 0,051$]. Struktura je rešena direktnom metodom⁸⁴ i utačnjena metodom najmanjih kvadrata.⁸⁵ Konačne R vrednosti: $R_1 = 0,099$ za 3193 refleksija sa $I > 2\sigma(I)$. Za sve podatke $R_1 = 0,101$, $wR_2 = 0,295$. Atomi kiseonika tetraoksana O(36) i O(37) (Slika 5, kristalografska numeracija) zauzimaju dva položaja (A i B) sa faktorom okupacije mesta 0,52 i 0,48 redom. U završnoj sintezi Furijeovom diferencijacijom, četiri signala elektronske gustine u opsegu 1,2 do 0,8 e Å⁻³ ne mogu biti interpretirana što je verovatno uzrok visokog R indeksa. Ko-kristalni molekul acetona nalaze se na osi drugog reda.

124: TT = 167-170 °C (bezbojne prizme, heksan / aceton). $[\alpha]_D^{20} = + 50,75$ ($c = 1,10$, CHCl_3). IR (KBr): 2960 sr, 1738 j, 1439 sr, 1378 sr, 1238 j, 1081 sr, 1026 sr, 966 sl, 889 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,09 (šs, $2 \times \text{H-C}(12)$), 4,92 (šs, $2 \times \text{H-C}(7)$), 3,66 (s, $2 \times \text{CH}_3\text{O}_2\text{C}(24)$), 2,12 (šs, $2 \times \text{CH}_3\text{COO-}$), 2,07 (šs, $2 \times \text{CH}_3\text{COO-}$), 0,94 (s, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,81 (d, $J = 5,8$ Hz, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $2 \times \text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 174,51; 170,47; 108,62; 75,23; 70,59; 51,47;

47,27; 44,98; 43,24; 37,56; 34,58; 34,52; 30,78; 30,66; 28,33; 27,08; 25,62; 22,71; 22,02; 21,47; 21,31; 17,41; 12,13. ¹H-NMR (200 MHz, C₆D₆): 5,15 (šs, 2× H-C(12)), 4,95 (šs, 2× H-C(7)), 3,38 (s, 2× CH₃O₂C(24)), 1,64 (šs, 4× CH₃COO-), 0,80 (d, *J* = 5,2 Hz, 2× H₃C-C(20)), 0,66 (s, 2× H₃C-C(10)), 0,45 (s, 2× H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, C₆D₆): 173,64; 169,55; 108,77; 75,02; 70,48; 50,93; 47,67; 45,25; 43,89; 38,08; 37,71; 34,78; 34,67; 32,56; 31,03; 30,80; 30,60; 28,85; 27,28; 26,02; 25,06; 22,93; 22,06; 20,82; 20,53; 17,54; 12,19. MS (ESI, *m/z* (%)): 1063,5 ([M+Na]⁺, 1), 1041,7 ([M+H]⁺, 12), 981,6 (1), 921,5 (6), 537,3 (51), 477,3 (75), 417,3 (47), 385,3 (45), 351,2 (17), 307,0 (100). Mikroanaliza za (C₅₈H₈₈O₁₆ (1041,34)): izračunato C 66,90; H 8,52; nađeno C 66,75; H 8,22.

bis(3-Dioksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid) 125 i 126.



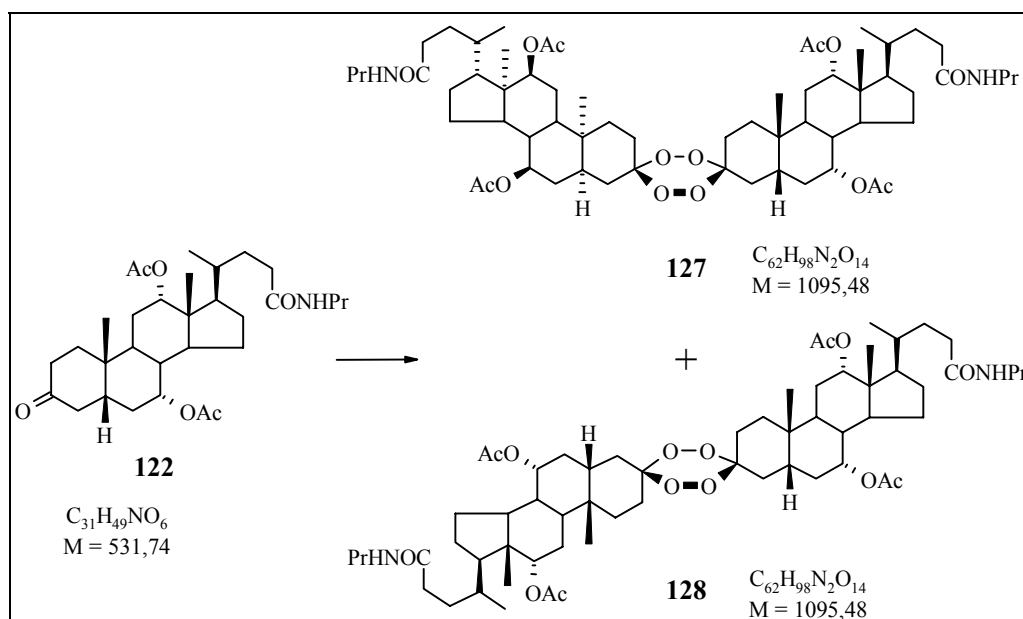
Tetraoksani **125** i **126** dobijeni su prema postupku opisanom u literaturi.⁵⁵ U hladan rastvor (0 °C) TMSOTf (276,65 μ L, 1,53 mmol) u suvom CH₃CN (7,5 mL), u atmosferi Ar, ukapan je, uz intenzivno mešanje, hladan rastvor (0 °C) (Me₃Si)₂O₂ (273,5 mg, 1,53 mmol) u suvom CH₃CN (7,5 mL). U ovako pripremljenu smešu, uz intenzivno mešanje, ukapan je rastvor **121** (500 mg, 1,02 mmol) u suvom CH₃CN (17,5 mL). Nakon 15 min. intenzivnog mešanja u ledenom kupatilu reakciona smeša je izlivena u smešu led / zas. NaHCO₃ / C₆H₆. Intenzivno mešanje nastavljeno je oko 30 min, slojevi razdvojeni, a vodeni sloj ekstrahovan benzolom. Spojeni organski slojevi isprani su jednom vodenim rastvorom NaCl i sušeni iznad anh. Na₂SO₄. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom i proizvodi izolovani hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / THF = 7 / 3). Prinos 133 mg (26%) **125** i 124 mg (24%) **126**.

125: TT = 211-217 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). $[\alpha]_D^{20} = + 72,06$ (c = 1,30, CHCl₃). IR (KBr): 3452 j, 2955 j, 2873 sr, 1718 j, 1672 j, 1443 sr, 1379 j, 1256 j, 1166 sl, 1126 sr, 1104 sr, 1080 sl, 1029 sl, 967 sl, 897 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,45 (šs, 2× NH₂), 5,09 (šs, 2× H-C(12)), 4,92 (šs, 2× H-C(7)), 2,10 (šs, 4× CH₃COO-), 0,94 (s, 2× H₃C-C(10)), 0,83 (d, *J* = 5,8 Hz, 2× H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2× H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 175,70; 170,54; 108,62; 75,23; 70,59; 47,41; 45,01; 43,24; 37,62; 34,60; 32,65; 31,30; 30,59; 28,39; 27,15; 25,64; 22,74; 22,09; 21,62; 21,32; 17,54; 12,20. MS (LSI, *m/z* (%)): 1011,6 ([M+H]⁺, 100), 967,7 (17), 909,6 (16), 891,6 (29), 851,6 (15), 793,6 (17), 766,4 (20), 735,5 (20), 677,5 (24), 647,5 (15), 613,2 (95), 577,4 (14), 561,4 (20). Mikroanaliza za (C₅₆H₈₆N₂O₁₄ × 3H₂O (1065,36)): izračunato C 63,14; H 8,70; nađeno C 63,13; H 8,99.

126: TT = 196-199 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). $[\alpha]_D^{20} = + 44,80$ (c = 1,20, CHCl₃). IR (KBr): 3452 j, 2955 j, 2877 sr, 1738 j, 1670 j, 1441 sr, 1379 j, 1255 j, 1166 sl, 1125 sr, 1081 sr, 1027 sl, 966 sl, 890 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,42 (šs, 2× NH₂), 5,10 (šs, 2× H-C(12)), 4,92 (šs, 2× H-C(7)), 2,12 (šs, 2× CH₃COO-), 2,07 (šs, 2× CH₃COO-), 0,94 (s, 2× H₃C-C(10)), 0,83 (d, *J* = 6,0 Hz, 2× H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2× H₃C-C(13)). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): 175,64; 170,51; 170,31; 108,66; 75,27; 70,63; 47,43; 45,03; 43,26; 37,60; 34,615; 34,22; 32,67; 32,03; 31,30; 30,50; 28,35; 27,15; 25,66; 22,73; 22,03; 21,51; 21,36; 17,54; 12,20. MS (LSI, *m/z* (%)): 1011,6 ([M+H]⁺, 80), 967,6 (6), 919,3 (10), 851,6 (6), 766,2 (14), 735,5 (10), 677,5 (11), 613,2 (100), 581,2 (9), 566,2 (11). Mikroanaliza za (C₅₆H₈₆N₂O₁₄ (1011,31)): izračunato C 66,51; H 8,57; nađeno C 66,21; H 8,62.

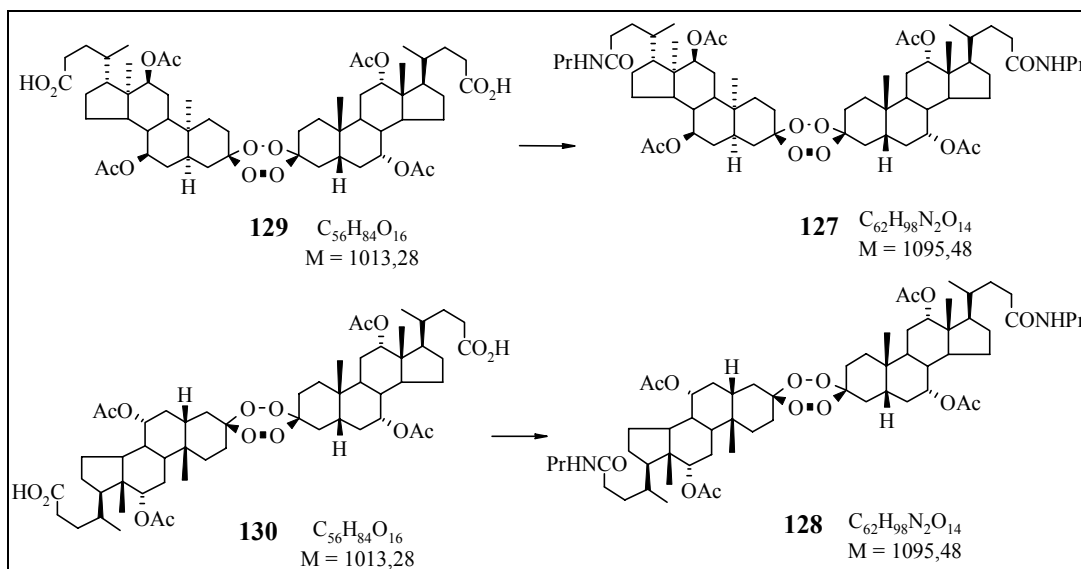
bis(*N*-(*n*-Propil)-3-dioksi-7α,12α-diacetoksi-5β-holanamid) 127 i 128.

Postupak pomoću TMSOTf/ TMS₂O₂:



Prema postupku koji je opisan za dobijanje tetraoksana **125** i **126**, keton **122** (532 mg, 1,00 mmol) preveden je u 74 mg (14%) **127** i 62 mg (11%) **128**. Proizvodi su razdvojeni hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc).

Postupak pomoću mešovitog anhidrida:



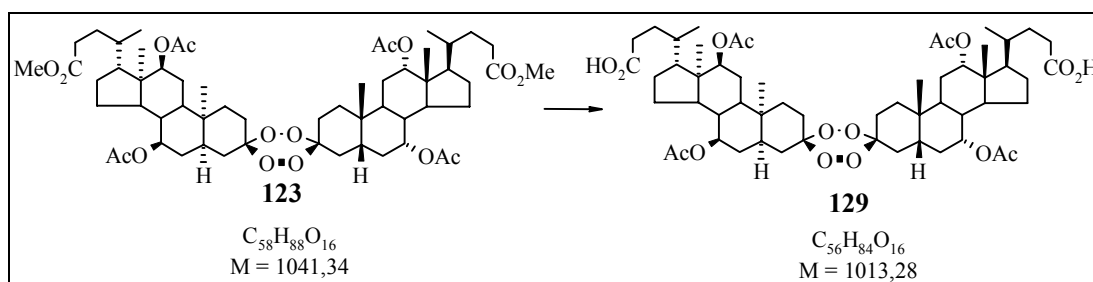
127: Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121**, kiselina **129** (100 mg, 0,1 mmol) prevedena je u 74 mg (68%) **127** pomoću suvog PrNH₂ (32,84 μL, 0,4 mmol). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar A, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc).

128: Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121**, kiselina **130** (100 mg, 0,1 mmol) prevedena je u 75,3 mg (70%) **128** pomoću suvog PrNH₂ (32,84 μL, 0,4 mmol). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar A, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc).

127: TT = 240-243 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). [α]_D²⁰ = + 73,90 (c = 1,40, CHCl₃). IR (KBr): 3422 sr, 2960 j, 2874 sr, 1738 j, 1650 j, 1551 sr, 1441 sr, 1378 j, 1250 j, 1080 sr, 1027 sr, 965 sl, 896 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,59-5,43 (m, 2× H-N), 5,09 (šs, 2× H-C(12)), 4,93 (šs, 2× H-C(7)), 3,28-3,12 (m, 2× CH₃CH₂CH₂N), 2,10 (šs, 4× CH₃COO-), 1,60-1,40 (m, 2× CH₃CH₂CH₂N), 0,96-0,87 (m, 2× H₃C-C(10), 2× CH₃CH₂CH₂N), 0,82 (d, J = 5,8 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,19; 170,51; 108,62; 75,24; 70,57; 47,44; 44,98; 43,21; 41,11; 37,59; 34,67; 34,56; 33,53; 31,52; 30,59; 28,35; 27,11; 25,60; 22,81; 22,04; 21,55; 21,28; 17,52; 12,15; 11,27. MS (LSI, m/z (%)): 1095,7 ([M+H]⁺, 28), 1035,7 (3), 613,1 (3), 532,4 (5), 504,4 (4) 460,2 (14), 412,3 (10), 307,0 (100). Mikroanaliza za (C₆₂H₉₈N₂O₁₄ (1095,48)): izračunato C 67,98; H 9,02; nađeno C 67,38; H 8,61.

128: TT = 171-174 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). $[\alpha]_D^{20} = +41,66$ (c = 1,40, CHCl₃). IR (KBr): 3951 sr, 3424 sr, 2960 sr, 2875 sr, 1738 j, 1651 sr, 1547 sr, 1441 sr, 1379 j, 1250 j, 1165 sl, 1125 sl, 1081 sr, 1026 sr, 966 sl, 890 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,38-5,49 (m, 2× H–N), 5,09 (šs, 2× H–C(12)), 4,92 (šs, 2× H–C(7)), 3,28-3,13 (m, 2 × CH₃CH₂CH₂N), 2,12 (šs, 2× CH₃COO-), 2,07 (šs, 2 × CH₃COO-), 1,60-1,40 (m, 2× CH₃CH₂CH₂N), 0,94 (s, 2× H₃C-C(10)), 0,96-0,86 (m, 2× H₃C-C(10), 2× CH₃CH₂CH₂N), 0,82 (d, *J* = 6,0 Hz, 2× H₃C-C(10)), 0,73 (s, 2× H₃C-C(13)). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,18; 170,54; 108,66; 75,29; 70,63; 47,49; 45,01; 43,26; 41,13; 37,60; 34,71; 34,60; 33,60; 31,56; 28,35; 27,15; 25,66; 22,85; 22,73; 22,03; 21,525; 21,38; 17,54; 12,18; 11,31. MS (LSI, *m/z* (%)): 1095,8 ([M+H]⁺, 100), 1035,8 (5), 967,7 (2), 909,6 (2), 851,7 (2), 793,6 (3), 766,2 (4), 677,5 (3), 613,2 (16). Mikroanaliza za (C₆₂H₉₈N₂O₁₄ × 2H₂O (1131,51)): izračunato C 65,81; H 9,09; nađeno C 66,29; H 9,66.

bis(3-Dioksi-7α,12α-diacetoksi-5β-holanska kiselina) 129.

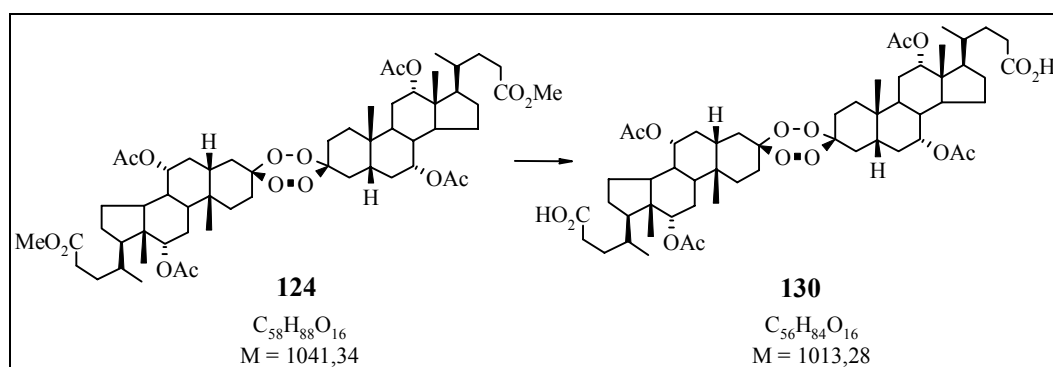


Postupak NaOH / CH₂Cl₂ / MeOH: U rastvor metil-estra **123** (250 mg, 0,24 mmol) u smeši CH₂Cl₂ / MeOH (1:1, v/v, 100 mL), dodat je rastvora NaOH (29,95 mL, 1,25 M). Nakon 3 dana mešanja na s.t., reakcija je prekinuta dodavanjem glac. AcOH (pH = 5), dodat je dihlormetan (30 mL) i voda (50 mL). Slojevi su razdvojeni, a vodeni sloj ekstrahovan dihlormetanom (5 x 30 mL). Spojeni organski slojevi isprani su vodom i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i sušeni iznad anh. Na₂SO₄ i rastvarač uklonjen pod sniženim pritiskom. Prinos 192 mg (79%) **129**. 1,25 M Rastvor NaOH pripremljen je rastvaranjem NaOH (2,50 g) u smeši MeOH / H₂O (95:5, v/v, 50 mL).

*Postupak NaOH / *i*-PrOH / H₂O. Opšti postupak za hidrolizu tetraoksanskih Me-estara:* Smeša metil-estra **123** (120,5 mg, 0,12 mmol), *i*-PrOH (3,61 mL), H₂O (1,2 mL) i NaOH (13,86 mg, 0,35 mmol) mešana je 15 min na 80 °C. Smeša je izručena u levak za odvajanje u kome se nalaze dihlormetan i voda. U vodeni sloj je, uz neizmenično mućkanje, dodavan razblaženi vodeni rastvor HCl (1:1, pH = 2). Slojevi su razdvojeni, a vodeni sloj ekstrahovan dihlormetanom. Spojeni organski slojevi su isprani dva puta vodom i jednom zasićenim vodenim rastvorom NaCl, sušeni iznad anh. Na₂SO₄ i rastvarač uklonjen pod sniženim pritiskom. Prinos 106 mg (90%) **129**. TT = 228-232 °C (bezbojni prah, aceton / *n*-heksan). $[\alpha]_D^{20} = +71,04$ (c = 1,10, DMSO). IR (KBr): 3450 j, 2953 j, 1737 j, 1441 sl, 1380 j, 1253 j, 1126 sl, 1081 sr, 1028 sl, 967 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz,

DMSO-*d*₆): 11,94 (s, 2× HO₂C(24) izmenljiv sa D₂O), 4,98 (šs, 2× H-C(12)), 4,82 (šs, 2× H-C(7)), 2,04 (šs, 2 × CH₃COO-), 2,00 (šs, 2 × CH₃COO-), 0,91 (s, 2× H₃C-C(10)), 0,74 (d, *J* = 6,0 Hz, 2× H₃C-C(20)), 0,70 (s, 2× H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 175,04; 169,97; 169,84; 108,24; 74,70; 70,28; 47,17; 44,77; 43,19; 36,88; 34,35; 30,84; 30,59; 28,00; 26,83; 25,37; 22,395; 22,12; 21,43; 21,08; 17,38; 12,09; MS (LSI, *m/z* (%)): 1035,6 ([M+Na]⁺, 43), 1012,6 (4), 993,6 (23), 969,6 (19), 951,6 (34), 891,5 (100), 849,5 (29), 794,0 (26), 780,0 (45), 766,1 (27), 749,1 (29), 735,0 (66 %), 719,0 (34), 691,0 (36), 674,0 (47), 658,0 (42), 643,0 (53), 631,0 (58). Mikroanaliza za (C₅₈H₈₄O₁₆ × 2H₂O (1049,31)): izračunato C 64,10; H 8,45; nađeno C 64,22; H 8,32.

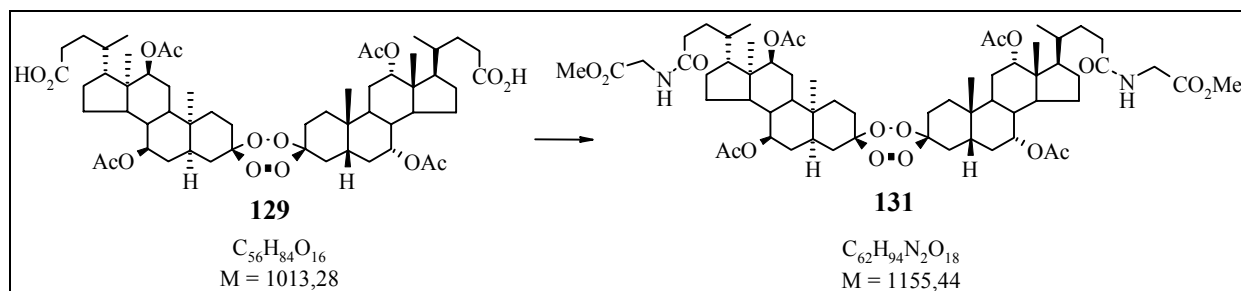
bis(3-Dioksi-7α,12α-diacetoksi-5β-holanska kiselina) 130.



Postupak NaOH / CH₂Cl₂ / MeOH: Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **124** (130 mg, 0,12 mmol) preveden je u 91 mg (72%) **130** pomoću 1,25M rastvora NaOH (15,57 mL).

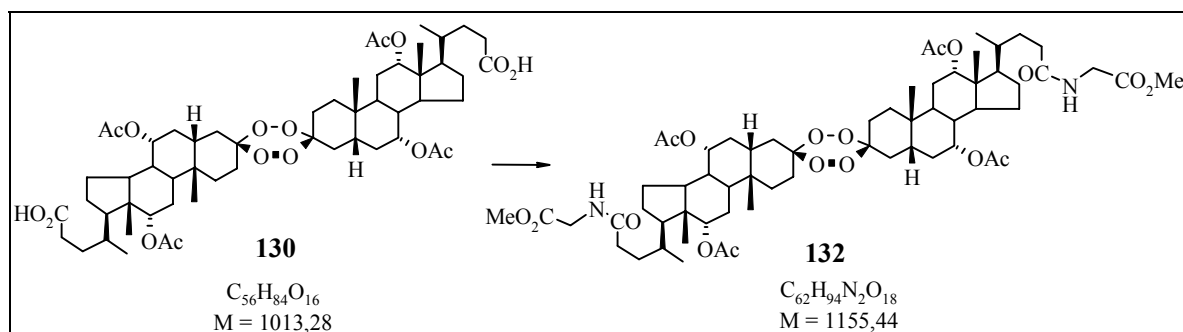
*Postupak NaOH / *i*-PrOH / H₂O.* Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **124** (147,1 mg, 0,14 mmol) preveden je u 136,0 mg (95%) **130** pomoću NaOH (16,92 mg, 0,42 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v / v, 6 mL). TT = 199-202 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). [α]_D²⁰ = +49,07 (c = 1,02, CHCl₃). IR (KBr): 3473 sr, 3456 sr, 2953 j, 1737 j, 1441 sr, 1380 j, 1250 j, 1125 sl, 1081 sl, 1027 sr, 966 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, 2× H-C(12)), 4,93 (šs, 2× H-C(7)), 2,12 (šs, 2 × CH₃COO-), 2,08 (šs, 2 × CH₃COO-), 0,94 (s, 2× H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 5,6 Hz, 2× H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2× H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,48; 170,56; 170,38; 108,68; 75,29; 70,66; 47,29; 45,03; 43,28; 37,64; 34,62; 34,51; 30,68; 30,46; 28,39; 27,11; 25,66; 22,74; 22,05; 21,52; 21,36; 17,45; 12,18. MS (LSI, *m/z* (%)): 1035,6 ([M+Na]⁺, 100), 1013,5 ([M+H]⁺, 21), 1011,4 (17), 993,5 (27), 951,4 (41), 909,4 (11), 893,4 (51), 849,5 (12), 833,4 (17), 779,9 (14), 734,9 (17), 699,5 (15), 673,9 (13), 644,9 (16), 628,9 (15). Mikroanaliza za (C₅₈H₈₄O₁₆ (1013,28)): izračunato C 66,38; H 8,36; nađeno C 66,06; H 8,17.

bis(N-(Metil etanoat-2-il)-3-dioksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holan-24-amid) 131:



Prema postuku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **129** (497,9 mg, 0,49 mmol) prevedena je u 507 mg (89%) **131**, pomoću suspenzije 6 ekv. metil glicinata hidrohlorida / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc). TT = 249-251 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). $[\alpha]_D^{20} = +63,60$ ($c = 1,00$, CHCl₃). IR (KBr): 3416 sr, 2957 sr, 1744 j, 1658 sr, 1551 sl, 1443 sl, 1386 sr, 1257 j, 1235 j, 1085 sl, 1030 sr, 970 sl, 895 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 6,05-5,95 (m, 2x *H*-N), 5,09 (šs, 2x H-C(12)), 4,92 (šs, 2x H-C(7)), 4,04 (d, $J = 5$ Hz, 2x H₂C-N), 3,77 (s, 2x CH₃O₂C(26)), 2,10 (šs, 4x CH₃COO-), 0,94 (s, 2x H₃C(10)), 0,82 (d, $J = 5,8$ Hz, 2x H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2x H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,39; 170,58; 170,53; 108,64; 75,23; 70,56; 52,39; 47,38; 44,98; 43,23; 41,12; 37,58; 34,56; 33,01; 31,23; 30,59; 28,35; 27,11; 25,60; 22,71; 22,05; 21,58; 21,31; 17,50; 12,17. MS (ESI, m/z (%)): 1193,74 ([M+K]⁺, 33), 1178,79 ([M+Na+H]⁺, 35), 1177,61 ([M+Na]⁺, 40), 1177,50 (20), 989,72 (12), 963,70 (15), 909,65 (15), 797,42 (15), 796,46 (40), 795,40 (100), 795,24 (20), 710,28 (20), 701,48 (25), 655,35 (35), 608,86 (50), 608,36(75), 600,35 (80), 523,19 (65), 463,35 (20). Mikroanaliza za (C₆₂H₉₄N₂O₁₉ × H₂O (1173,46)): izračunato C 63,46; H 8,25; nađeno C 63,76; H 8,60.

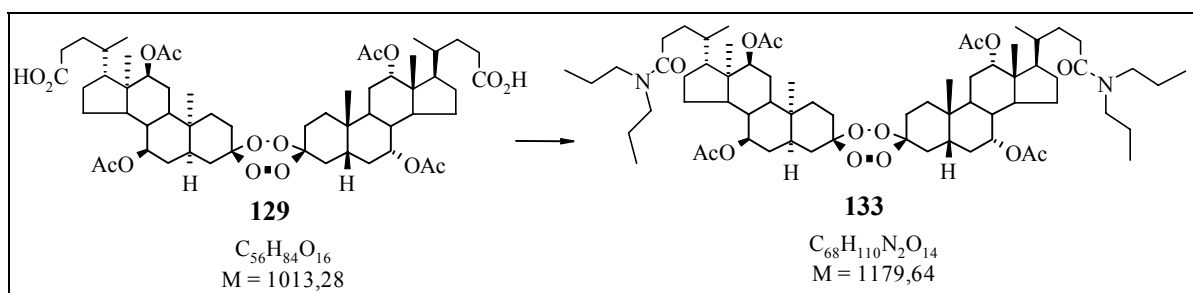
bis(N-(Metil etanoat-2-il)-3-dioksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holan-24-amid) 132:



Prema postuku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **130** (498,1 mg, 0,49 mg) prevedena je u 460 mg (81%) **132**, pomoću suspenzije 6 ekv. metil glicinata hidrohlorida / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc). TT = 170-172 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). $[\alpha]_D^{20} = +37,80$ ($c = 1,00$, CHCl₃). IR (KBr): 3415 sr, 2960 sr, 1745 j, 1660 sl, 1539 sl, 1447 sl, 1383 sr, 1248 j, 1082 sl, 1027 sr, 969 sl, 894 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 6,00-5,90 (m, 2x *H*-N), 5,09 (šs, 2x H-C(12)), 4,92 (šs, 2x H-C(7)), 4,04 (d, $J = 5,4$ Hz, 2x H₂C-N), 3,77 (s, 2x CH₃O₂C(26)), 2,12 (šs, 2x CH₃COO-), 2,08 (šs, 2x CH₃COO-), 0,94 (s, 2x

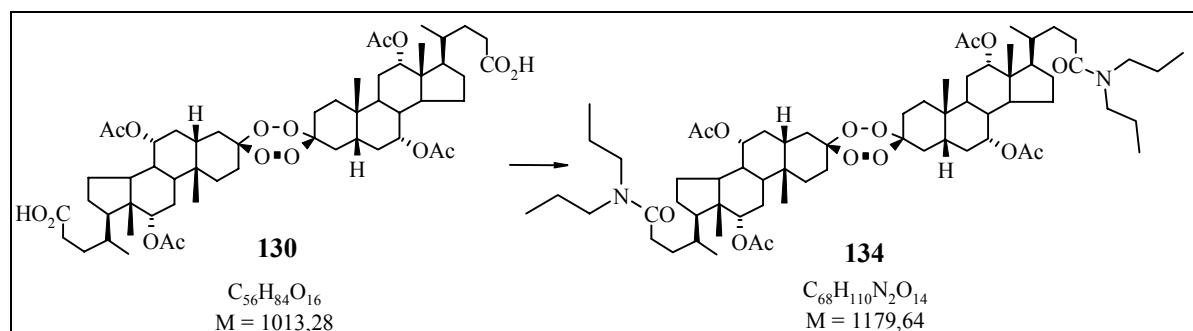
H₃C(10)), 0,82 (d, *J*=5,8 Hz, 2x H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2x H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,39; 170,60; 170,51; 170,31; 108,64; 75,27; 70,61; 68,28; 52,35; 47,41; 45,01; 43,24; 41,13; 37,60; 34,60; 33,05; 31,25; 30,52; 28,33; 27,13; 25,64; 22,80; 22,03; 21,51; 21,34; 17,52; 12,18. MS (ESI, *m/z* (%)): 1193,69 ([M+K]⁺, 15), 1177,70 ([M+Na]⁺, 20), 702,48 (5), 701,46 (10), 637,32 (5), 635,48 (5), 629,35 (5), 617,84 (5), 617,32 (15), 616,85 (22), 616,33 (30), 610,35 (5), 609,86 (12), 609,35 (30), 608,85 (70), 608,35 (100), 605,54 (5), 601,89 (10), 601,37 (25), 600,86 (65), 600,36 (90), 591,46 (5). Mikroanaliza za (C₆₂H₉₄N₂O₁₉ ((1155,44)): izračunato C 64,45; H 8,20; nađeno C 64,51; H 8,53.

bis(*N,N*-di(*n*-Propil)-3-dioksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamide) 133:



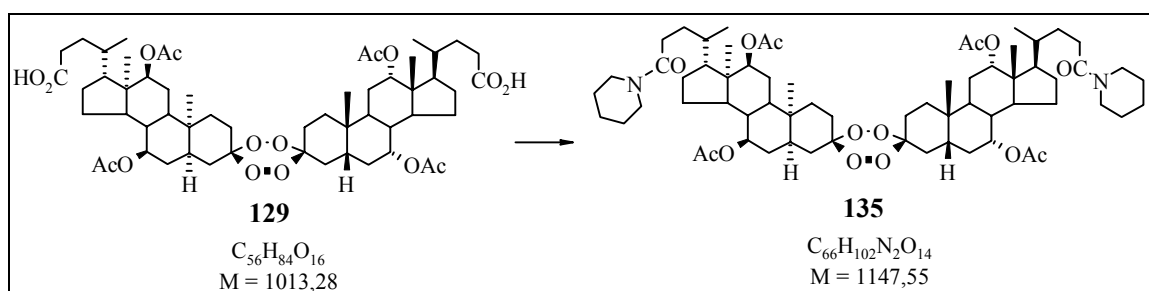
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **129** (290 mg, 0,29 mmol) prevedena je u 176 mg (52%) **133**, pomoću (*n*-Pr)₂NH (156,99 μ L, 1,14 mmol). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc (3 / 7). TT = 222-227 °C (bezbojni prah, Et₂O / *n*-heksan). [α]_D²⁰ = + 64,60 (c = 1,00, CHCl₃). IR (KBr): 3458 sr, 2968 j, 2882 sr, 1745 j, 1653 j, 1461 sr, 1383 sr, 1248 j, 1084 sr, 1034 sr, 969 sl, 899 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,10 (šs, 2x H-C(12)), 4,92 (šs, 2x H-C(7)), 3,30-3,10 (m, 4x CH₃CH₂CH₂-N), 2,10 (šs, 4x CH₃COO-), 1,80-1,40 (m, 4x CH₃CH₂CH₂-N), 1,00-0,80 (m, 2x H₃C(10), 4x CH₃CH₂CH₂-N, 2x H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2x H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 172,89; 170,56; 108,66; 75,29; 70,61; 49,62; 47,71; 47,73; 45,03; 43,23; 37,62; 34,91; 34,60; 31,34; 30,14; 28,39; 27,17; 25,66; 22,78; 22,27; 22,07; 21,58; 21,29; 20,87; 17,70; 12,19; 11,33; 11,22. MS (ESI, *m/z* (%)): 1181,88 ([M+2H]⁺, 10), 1179,87 ([M]⁺, 20), 663,48 (10), 592,44 (5), 591,95 (10), 591,43 (35), 590,93 (75), 590,43 (100), 560,42 (10), 299,31 (5), 297,29 (10), 271,28 (20), 265,27 (5). Mikroanaliza za (C₆₈H₁₁₀N₂O₁₄ × H₂O (1197,66)): izračunato C 68,20; H 9,43; nađeno C 68,20; H 8,91.

bis(*N,N*-di(*n*-Propil)-3-dioksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid) 134:



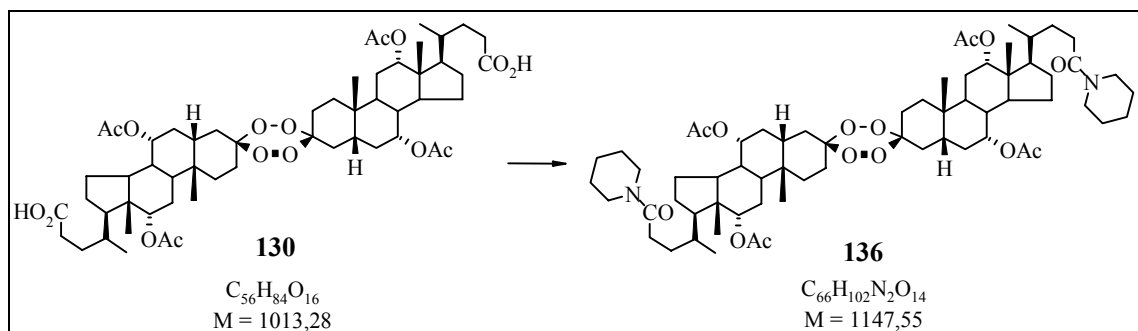
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **130** (300 mg, 0,3 mmol) prevedena je u 211 mg (60%) **134**, pomoću (*n*-Pr)₂NH (162,34 μL, 1,18 mmol). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc (3 / 7). TT = 173-175 °C (bezbojni prah, Et₂O / *n*-heksan). $[\alpha]_D^{20} = + 49,10$ (c = 1,00, CHCl₃). IR (KBr): 3472 j, 2960 j, 2939 sr, 2875 sl, 1745 j, 1653 j, 1468 sr, 1440 sr, 1383 sr, 1255 j, 1082 sl, 1027 sr, 969 sl, 940 sl, 899 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,10 (šs, 2x H-C(12)), 4,92 (šs, 2x H-C(7)), 3,40-3,10 (m, 4x CH₃CH₂CH₂-N), 2,12 (šs, 2x CH₃COO-), 2,07 (šs, 2x CH₃COO-), 1,70-1,40 (m, 4x CH₃CH₂CH₂-N), 1,00-0,80 (m, 2x H₃C(10), 4x CH₃CH₂CH₂-N, 2x H₃C-C(20)), 0,74 (s, 2x H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 172,86; 170,54; 170,33; 108,66; 75,32; 70,63; 49,60; 47,72; 47,41; 45,03; 43,24; 37,60; 34,92; 34,60; 31,32; 30,14; 28,35; 27,17; 25,64; 22,78; 22,27; 22,03; 21,51; 21,34; 20,87; 17,70; 12,19; 11,33; 11,24. MS (ESI, m/z (%)): 1201,90 ([M+Na]⁺, 30), 795,42 (5), 702,53 (10), 685,51 (20). Mikroanaliza za (C₆₈H₁₁₀N₂O₁₄ (1179,64)): izračunato C 69,24; H 9,40; nađeno C 69,45; H 9,17.

bis(3-Dioksi-7α,12α-diacetoksi-5β-holan-24-piperidin-24-on) 135:



Prema postuku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **129** (297 mg, 0,29 mmol) prevedena je u 192 mg (57%) **135** pomoću piperidina (115,76 μL, 1,17 mmol). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent: EtOAc). TT = 229-234 °C (bezbojni prah, CH₂Cl₂ / *i*-Pr₂O). $[\alpha]_D^{20} = + 68,60$ (c = 1,00, CHCl₃). IR (KBr): 3458 sl, 2946 sr, 2875 sl, 1738 j, 1653 sr, 1447 sl, 1383 sr, 1255 j, 1084 sl, 1034 sr, 969 sl, 899 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,10 (šs, 2x H-C(12)), 4,92 (šs, 2x H-C(7)), 3,60-3,45 (m, 2x CH₂-N), 3,40-3,30 (m, 2x -CH₂-N), 2,10 (šs, 4x CH₃COO-), 1,70-1,45 (m, 2x CH₂CH₂CH₂), 0,94 (s, 2x H₃C(10)), 0,83 (d, *J* = 6,00 Hz, 2x H₃C-C(20)), 0,73 (s, 2x H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 171,62; 170,56; 108,64; 75,25; 70,57; 47,58; 46,65; 44,99; 43,21; 42,54; 37,60; 34,98; 34,58; 31,28; 30,45; 28,37; 27,17; 26,50; 25,48; 24,49; 22,76; 22,07; 21,62; 21,31; 17,65; 12,17. MS (LSI, m/z (%)): 1147,70 ([M+H]⁺, 27), 906,08 (3), 574,36 (100). Mikroanaliza za (C₆₆H₁₀₂N₂O₁₄ (1147,55)): izračunato C 69,08; H 8,96; nađeno C 69,24; H 8,84.

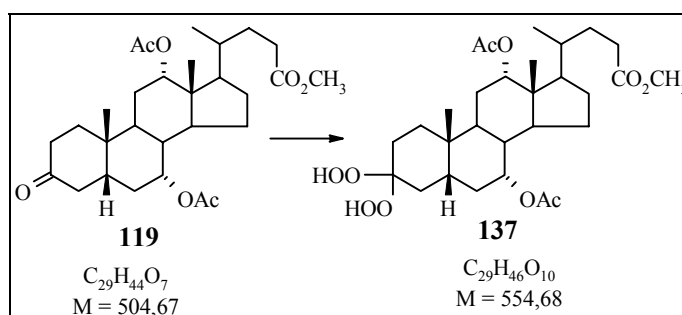
bis(3-Dioksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holan-24-piperidin-24-on) 136:



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **130** (299,3 mg, 0,3 mmol) prevedena je u 182 mg (54%) **136** pomoću piperidina (116,57 μ L, 1,18 mmol). Proizvod je prečišćen hromatografijom na SiO_2 (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc). TT = 182-183 $^{\circ}C$ (bezbojni prah, CH_2Cl_2 / *i*-Pr $_2$ O). $[\alpha]_D^{20} = +32,50$ ($c = 1,00$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3451 sl, 2939 sr, 2875 sl, 1738 j, 1646 sr, 1454 sr, 1383 sr, 1248 j, 1082 sl, 1034 sr, 964 sl, 942 sl, 899 sl cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 5,10 (šs, 2x H-C(12)), 4,92 (šs, 2x H-C(7)), 3,60-3,45 (m, 2x CH_2 -N), 3,40-3,30 (m, 2x $-CH_2$ -N), 2,12 (šs, 2x CH_3COO^-), 2,08 (šs, 2x CH_3COO^-), 1,70-1,45 (m, 2x $CH_2CH_2CH_2$), 0,94 (s, 2x $H_3C(10)$), 0,83 (d, $J = 6,00$ Hz, 2x $H_3C-C(20)$), 0,74 (s, 2x $H_3C-C(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 171,64; 170,54; 108,66; 75,29; 70,63; 47,60; 46,67; 45,03; 43,24; 42,55; 37,60; 35,00; 34,60; 31,28; 30,46; 28,35; 27,19; 26,51; 25,49; 24,51; 22,80; 22,03; 21,51; 21,34; 17,66; 12,18. MS (LSI, m/z (%)): 1185,79 ($[M+K]^+$, 18), 1169,81 ($[M+Na]^+$, 100), 1159,32 (36), 1147,83 ($[M+H]^+$, 68), 1137,34 (2). Mikroanaliza za ($C_{66}H_{102}N_2O_{14} \times 1,5 H_2O$ (1174,58)): izračunato C 67,49; H 9,01; nađeno C 67,55; H 9,04.

Mešoviti tetraoksani:

Metil 3,3-dihidroperoksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat (137).



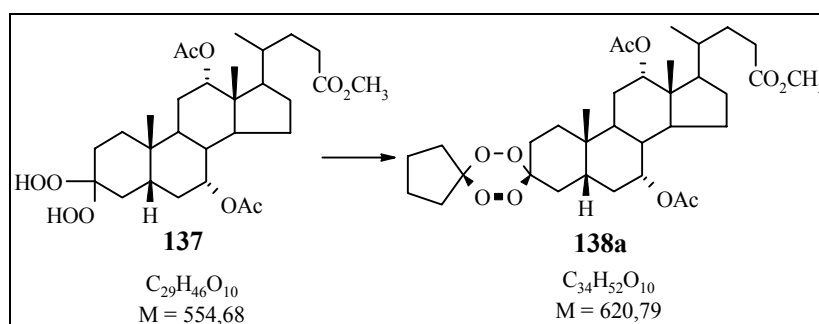
U rastvor keton **119** (3,00 g, 5,94 mmol) u smeši CH_3CN / CH_2Cl_2 (3:1, v/v, 120 mL), dodato je 5 kapi konc. HCl i 30% H_2O_2 (6,18 mL, 60,6 mmol). Nakon 2 sata mešanja na s.t. reakcija je prekinuta dodavanjem dihlormetana i vode. Vodeni sloj je ekstrahovan dihlormetanom (3 x 30 mL). Spojeni organski slojevi su isprani vodom, dva puta zasićenim vodenim rastvorom $NaHCO_3$ i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i sušeni iznad anh. Na_2SO_4 . Rastvarač je uklonjen pod

snižanim pritiskom i dobijeno je 3,20 g (97%) sirovog proizvoda **137** u obliku svetlo-žutog ulja, koji je bez dodatnog prečišćavanja korišćen u narednom reakcionom koraku. Analitički uzorak je dobijen hromatografijom na SiO₂ (Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc = 1/1). TT = 197-199 °C (bezbojne prizme, Et₂O). IR (KBr): 3429 j, 2954 sr, 1736 j, 1636 sr, 1439 j, 1382 j, 1254 j, 1124 sr, 1077 sr cm⁻¹. IR (CCl₄): 3442 j, 2952 sr, 1736 j, 1636 sl, 1559 sl, 1541 sl, 1508 sl, 1439 sr, 1381 j, 1253 j, 1127 sl, 1103 sl, 1077 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 9,06 (s, 2H, HOO-C(3), izmenljiv sa D₂O), 5,08 (šs, H-C(12)), 4,90 (šs, H-C(7)), 3,67 (s, CH₃O₂C(24)), 2,16 (šs, CH₃COO-), 2,13 (šs, CH₃COO-), 0,95 (s, H₃C-C(10)), 0,8 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 175,06; 171,22; 110,65; 75,62; 71,10; 51,66; 47,32; 45,07; 43,30; 38,29; 37,62; 34,58; 32,16; 30,90; 30,66; 28,57; 27,10; 25,69; 24,31; 22,73; 22,12; 21,63; 21,50; 17,43; 12,17. MS (ESI, *m/z* (%)): 1031,63 ([2M+Na]⁺, 15), 577,32 ([M+Na]⁺, 4), 572,36 (4), 559,29 (4), 543,28 ([M+Na-H₂O]⁺, 19), 527,30 ([M+Na-H₂O-H₂O]⁺, 100), 522,36 (33), 385,28 (75). HRMS: *m/z* 577,3077 odgovara molekulskej formuli C₂₉H₄₆O₁₀Na (greška u ppm: 15). Mikroanaliza za (C₂₉H₄₆O₁₀ (554,68)): izračunato C 62,80; H 8,36; nađeno C 63,05; H 8,04.

*Opšti postupak sinteze mešovutih tetraoksana iz gem-dihidroperoksida **137**:*

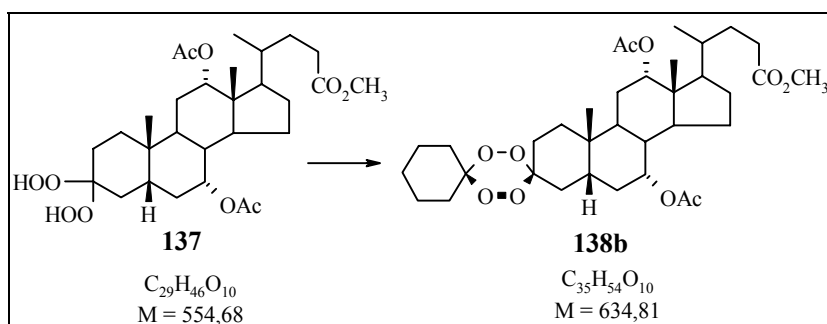
U hladan rastvor (0 °C) *gem*-dihidroperoksida **137** (500 mg, 0,90 mmol) i ketona (1,8 mmol) u dihlorometanu (14 mL) ukapan je sveže pripremljen hladan rastvor (0 °C) H₂SO₄ : CH₃CN (1/10, v/v, 650 μL). Nakon 15 min. intenzivnog mešanja u ledenom kupatilu reakcija je prekinuta dodavanjem vode. Slojevi su razdvojeni i vodeni sloj je ekstrahovan dihlorometanom (3 x 15 mL). Spojeni organski slojevi isprani su vodom, dva puta zasićenim vodenim rastvorom NaHCO₃ i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i sušeni iznad anh. Na₂SO₄. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom a proizvod izolovan hromatografijom na SiO₂.

Metil 7α,12α-diacetoksi-5β-holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spirociklopentan (138a**).**



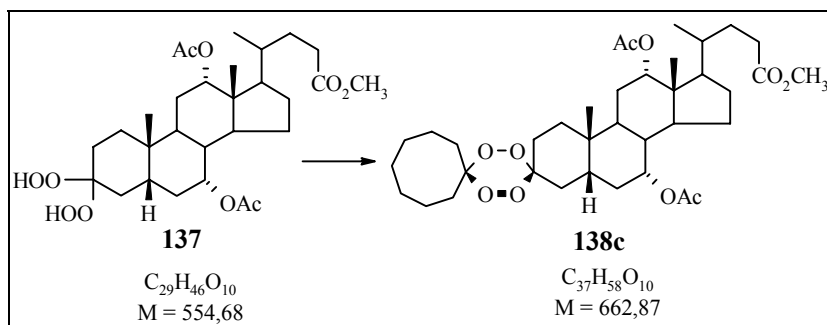
Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep si 60, eluent heptan / EtOAc = 8 / 2. Prinos 146 mg (26%). TT = 180-182 °C (bezbojne prizme, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +49,56$ (c = 1,02, CHCl₃). IR (KBr): 2954 sr, 2875 sl, 1736 j, 1440 sl, 1379 sr, 1242 j, 1076 sl, 1032 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,42; 170,49; 119,71; 108,35; 75,12; 70,52; 53,35; 51,38; 47,14; 44,88; 43,17; 37,47; 35,12; 34,52; 34,42; 34,18; 32,08; 30,66; 30,56; 28,28; 26,28; 25,57; 24,88; 24,40; 24,15; 23,75; 22,62; 21,98; 21,45; 21,29; 17,32; 12,06. MS (ESI, *m/z* (%)): 659,35 ([M+K]⁺, 18), 643,37 ([M+Na]⁺, 100), 638,41 ([M+NH₄]⁺, 41). HRMS-ESI: *m/z* 643,3467 odgovara molekulkovj formuli C₃₄H₅₂O₁₀Na (greška u ppm: 1,3). Mikroanaliza za (C₃₄H₅₂O₁₀ (620,79)): izračunato C 65,78; H 8,44; nađeno C 65,78; H 8,90.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spirocikloheksan (138b).



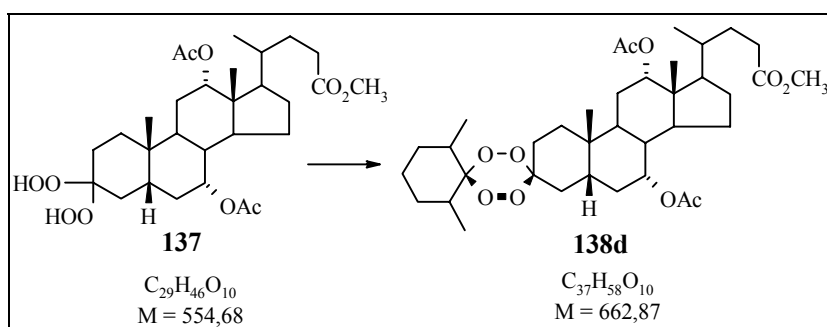
Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc = 8 / 2. Prinos 177 mg (31%). TT = 165-168 °C (bezbojne prizme, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +44,93$ (c = 1,06, CHCl₃). IR (KBr): 2947 sr, 2868 sl, 1741 j, 1451 sr, 1378 sr, 1250 j, 1238 j, 1227 j, 1181 sl, 1076 sr, 1036 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,48; 170,51; 108,41; 108,28; 75,18; 70,59; 51,42; 47,21; 44,94; 43,23; 37,56; 34,58; 34,47; 30,74; 30,63; 28,33; 27,04; 25,60; 25,24; 22,67; 22,00; 21,52; 21,31; 17,37; 12,11. FAB-MS (*m/z*): 657,4 ([M+Na]⁺, 16), 635,4 ([M+H]⁺, 100), 633,4 (30), 631 (8), 619 (10), 614 (8), 613 (17), 603 (8). Mikroanaliza za (C₃₅H₅₄O₁₀ (634,81)): izračunato C 66,22; H 8,57; nađeno C 66,17; H 8,87.

**Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spirociklooktan (138c).**



Hromatografija na SiO₂: Lobar B LichroPrep, Si 60, eluent heptan / EtOAc = 8 / 2. Prinos 203 mg (34%). TT = 181-183 °C (bezbojne prizme, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +44,58$ (c = 1,02, CHCl₃). IR (KBr): 2956 sr, 2937 sr, 2872 sr, 1736 j, 1470 sl, 1440 sl, 1377 sr, 1241 j, 1076 sr, 1031 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,35; 170,40; 111,96; 107,86; 75,11; 70,52; 53,33; 51,33; 47,14; 44,88; 43,15; 37,49; 34,51; 34,40; 31,98; 30,65; 30,57; 28,26; 26,99; 26,46; 25,53; 24,86; 24,26; 22,62; 21,94; 21,43; 21,22; 17,32; 12,04. MS (ESI, *m/z* (%)): 1347,82 ([2M+Na]⁺, 31), 701,39 ([M+K]⁺, 15), 685,40 ([M+Na]⁺, 100), 680,46 ([M+NH₄]⁺, 77). HRMS-ESI: *m/z* 685,3942 odgovara molekulkovoj formuli C₃₇H₅₈O₁₀Na (greška u ppm: 2,1). Mikroanaliza za (C₃₇H₅₈O₁₀ x 0,5 H₂O (671,88)): izračunato C 66,14; H 8,85; nađeno C 66,33; H 8,43.

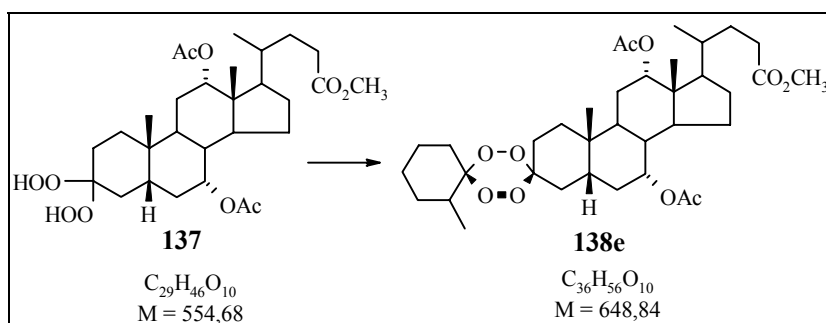
**Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-
(2'',6''-dimetil)cicloheksan (138d).**



2,6-dimetil-cikloheksanon korišćen kao smeša *cis*- i *trans*-izomera. Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc = 8 / 2. Proizvodi su izolovani kao jedna frakcija, kao smeša diastereomera. Prinos 149 mg (25%). TT = 213-215 °C (bezbojni prah, Et₂O). IR (KBr): 2940 sr, 2876 sl, 1732 j, 1452 sl, 1379 sr, 1244 sr, 1225 sr, 1095 sl, 1076 sl, 1032 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,99 (d, *J* = 6.2 Hz, H₃C-C(2''), H₃C-C(6'')), 0,95 (s, H₃C-C(10)),

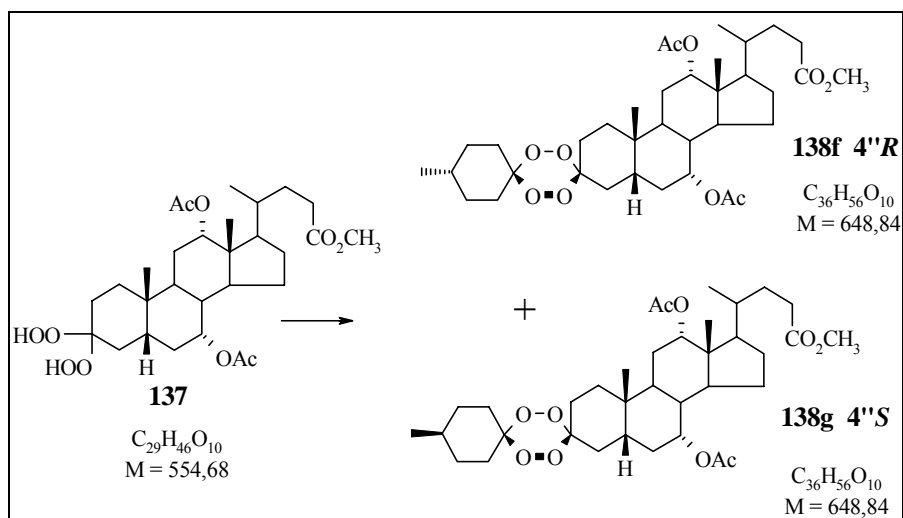
0,81 (d, $J = 6,0$ Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,40; 170,51; 111,23; 108,17; 75,18; 70,54; 51,38; 47,16; 44,90; 43,17; 37,51; 34,49; 34,43; 30,68; 30,59; 27,00; 25,55; 22,64; 21,91; 21,41; 21,42; 21,31; 19,48; 17,34; 13,60; 12,06. MS (ESI, m/z (%)): 1347,80 ([2M+Na]⁺, 32), 701,37 ([M+K]⁺, 27), 685,38 ([M+Na]⁺, 100), 680,44 ([M+NH₄]⁺, 36). Mikroanaliza za (C₃₇H₅₈O₁₀ (662,87)): izračunato C 67,04; H 8,82; nađeno C 66,88; H 9,07.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1', 2', 4', 5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(2''-metil)cikloheksan (138e).



2-metil cikloheksanon korišćen kao smeša *R* i *S* izomera. Hromatografijom na SiO₂: Lobar B, LichroPrep, eluent heptan / EtOAc = 8 / 2. Proizvodi su izolovani kao jedna frakcija, kao smeša diastereomera. Prinos 246 mg (38%). TT = 204-207 °C (bezbojni prah, Et₂O). $[\alpha]_D^{20} = +35,80$ ($c = 1,00$, CHCl₃). IR (KBr): 2937 sr, 1734 j, 1379 sr, 1251 j, 1243 j, 1225 sr, 1077 sr, 1030 sr cm⁻¹. ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,143 (šs, CH₃COO-), 2,136 (šs, CH₃COO-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,10 (šs, CH₃COO-), 2,07 (šs, CH₃COO-), 1,00 (d, $J = 6,6$ Hz, H₃C-C(2'')), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, $J = 6,0$ Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,50; 170,61; 170,53; 170,32; 109,42; 108,38; 108,34; 75,25; 70,63; 51,45; 47,26; 44,99; 43,25; 37,59; 34,52; 32,10; 30,78; 30,68; 28,34; 27,07; 25,63; 24,46; 22,71; 22,02; 21,51; 21,38; 17,41; 13,54; 12,13. ESI-MS (m/z (%)): 690,29 (4), 689,28 (13), 688,28 (24), 687,27 ([M+K]⁺, 59), 674,32 (2), 673,31 (13), 672,31 (44), 671,30 ([M+Na]⁺, 100), 666,36 (7), 655,48 (1), 583,43 (1), 543,23 (3), 527,24 (7). HRMS-ESI: m / z 671,3761 odgovara molekulknoj formuli C₃₆H₅₆O₁₀Na (greška u ppm: 1,5); m / z 687,3523 odgovara molekulknoj formuli C₃₆H₅₆O₁₀K (greška u ppm: 1,8); m / z 666,4216 odgovara molekulknoj formuli C₃₆H₅₆O₁₀NH₄ (greška u ppm: 0,18). Mikroanaliza za (C₃₆H₅₆O₁₀ (648,84)): izračunato C 66,64; H 8,70; nađeno C 66,89; H 8,99.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''R)- i (4''S)-metil)cikloheksan 138f i 138g.

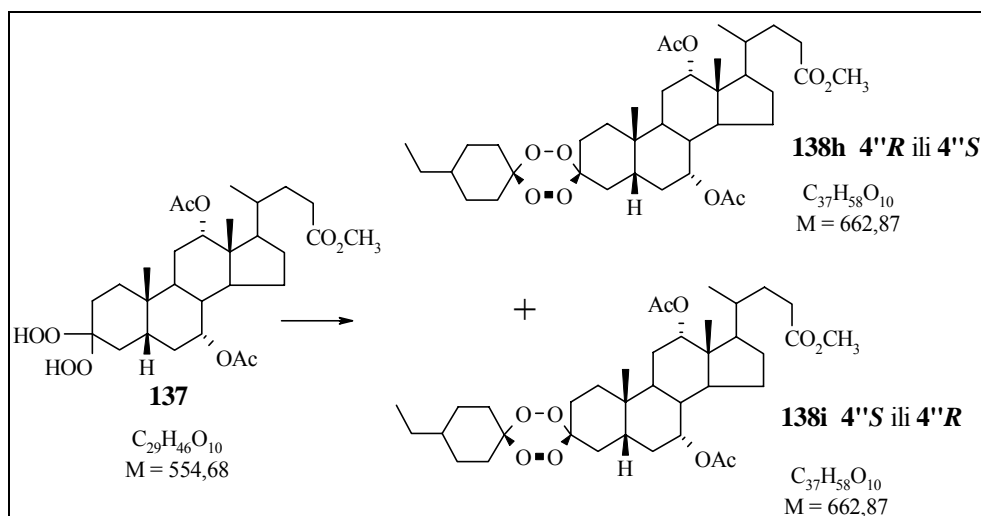


Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc = 85 / 15.

138f (4''R): Prinos 70 mg (12%). Bezbojna pena, omekšava na 82-84 °C. $[\alpha]_D^{20} = +38,50$ (c = 1,07, CHCl₃). IR (KBr): 2952 sr, 2869 sl, 1738 j, 1440 sr, 1378 sr, 1239 j, 1028 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (d, *J* = 6,4 Hz, H₃C-C(4'')), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,39; 170,40; 108,35; 108,21; 75,12; 70,54; 51,35; 47,18; 44,90; 43,17; 37,53; 34,51; 34,43; 31,46; 30,70; 30,59; 28,26; 27,00; 25,53; 22,63; 21,94; 21,45; 21,25; 17,36; 12,05. ESI-MS (*m/z* (%)): 687,39 ([M+K]⁺, 18), 671,41 [M+Na⁺, 100], 666,45 [M+NH₄]⁺, 85), 655,42 (10), 633,59 (9.5), 473,35 (14), 413,29 (11). Mikroanaliza za (C₃₆H₅₆O₁₀ (648.84)): izračunato C 66,64; H 8,70; nađeno C 67,12; H 8,23.

138g (4''S): Prinos 70 mg (12%). TT = 204-206 °C (bezbojne prizme, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +36,88$ (c = 1,06, CHCl₃). IR (KBr): 2950 j, 2871 sl, 1729 j, 1442 sr, 1378 j, 1314 sr, 1252 j, 1193 sr, 1174 sr, 1090 sr, 1049 sr, 1034 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,08 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (d, *J* = 7.2 Hz, H₃C-C(4'')), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,40; 170,45; 108,41; 108,26; 75,16; 70,56; 51,38; 47,21; 44,94; 43,23; 37,55; 34,58; 34,45; 31,58; 30,72; 30,61; 28,33; 27,02; 25,60; 22,65; 21,98; 21,47; 21,31; 17,37; 12,09. ESI-MS (*m/z* (%)): 687,38 ([M+K]⁺, 22), 671,40 ([M+Na]⁺, 100), 657,40 (1), 647,58 (2), 635,53 (1). Mikroanaliza za (C₃₆H₅₆O₁₀ (648,84)): izračunato C 66,64; H 8,70; nađeno C 66,51; H 8,97.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)- i (4''*S* ili *R*)etil)cikloheksan 138h i 138i.

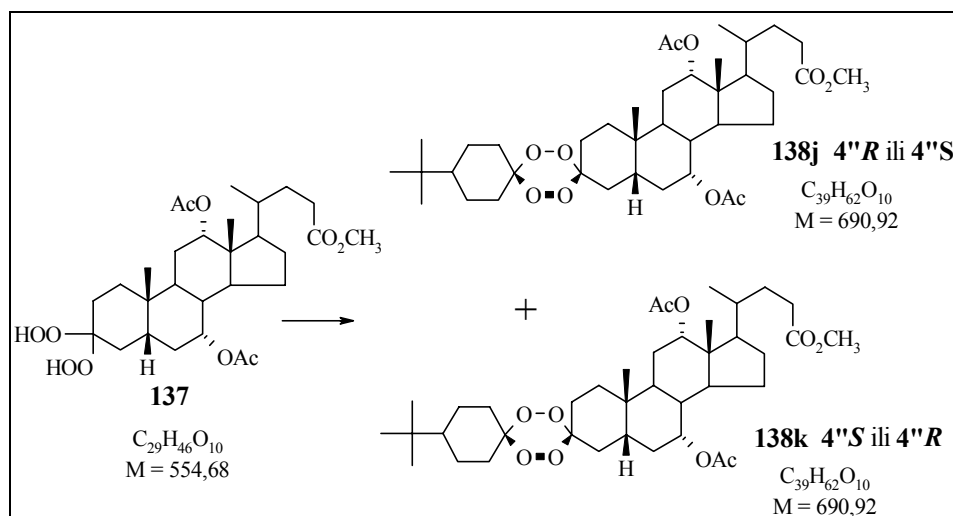


Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc = 85 / 15.

138h (4''*R* ili *S*): Prinos 92 mg (15%). Bezbojna pena, omekšava na 72-76 °C. $[\alpha]_D^{20} = +41,99$ (c = 0,86, CHCl₃). IR (KBr): 2941 j, 2876 sr, 1739 j, 1448 sr, 1378 sr, 1244 j, 1174 sl, 1082 sl, 1034 sr, 974 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94-0,79 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂-C(4''), CH₃CH₂-C(4''), H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,54; 170,54; 108,59; 108,47; 75,25; 70,67; 51,48; 47,30; 45,00; 43,26; 38,24; 37,63; 34,62; 34,54; 30,82; 30,69; 28,60; 28,37; 27,10; 25,63; 22,74; 22,04; 21,56; 21,32; 17,45; 12,15; 11,52. Mikroanaliza za (C₃₇H₅₈O₁₀ (662,87)): izračunato C 67,04; H 8,82; nađeno C 67,33; H 8,97.

138i (4''*S* ili *R*): Prinos 68 mg (11%). Bezbojna pena, omekšava na 110-114 °C. $[\alpha]_D^{20} = +43,40$ (c = 1,20, CHCl₃). IR (KBr): 2957 j, 2930 j, 2876 sl, 1739 j, 1632 sl, 1448 sl, 1378 sr, 1249 j, 1168 sl, 1182 sl, 1034 sr, 969sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,08 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94-0,79 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂-C(4''), CH₃CH₂-C(4''), H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,52; 170,58; 108,62; 108,47; 75,24; 70,65; 51,47; 47,28; 45,01; 43,29; 38,33; 37,61; 34,64; 34,52; 30,80; 30,68; 28,67; 28,39; 27,09; 25,67; 22,72; 22,04; 21,56; 21,36; 17,43; 12,15; 11,52. Mikroanaliza za (C₃₇H₅₈O₁₀ (662,87)): izračunato C 67,04; H 8,82; nađeno C 67,08; H 9,11.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)- i (4''*S* ili *R*)-*t*-butil)cikloheksan (138j i 138k).

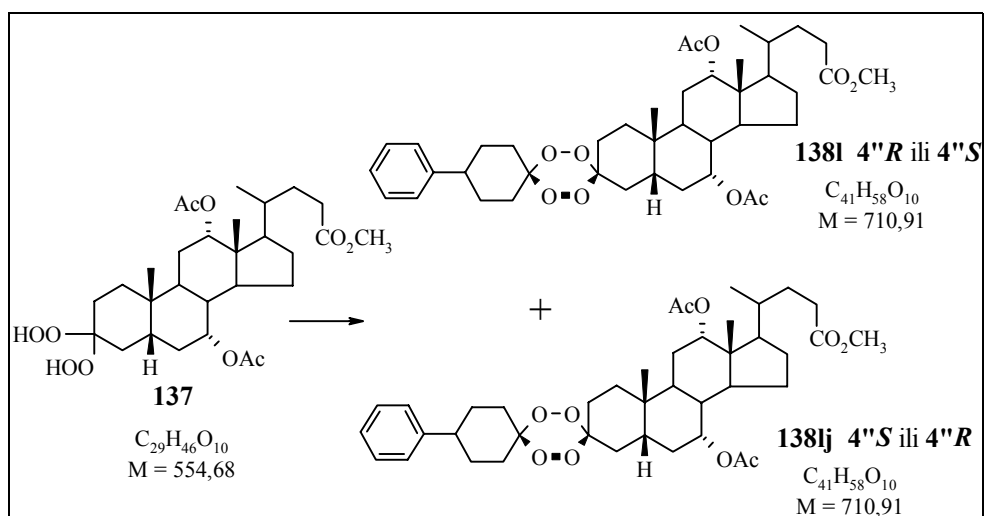


Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep, eluent heptan / EtOAc = 85 / 15.

138j (4''*R* ili *S*): prinos 68 mg (11%). Bezbojna pena, omekšava na 111-114 °C. $[\alpha]_D^{20} = +41,04$ ($c = 1,06$, CHCl₃). IR (KBr): 2951 j, 2873 sr, 1739 j, 1440 sl, 1377 sr, 1239 j, 1196 sl, 1175 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,62 (s, CH₃O₂C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,86 (s, (CH₃)₃C-C(4'')), 0,81 (d, $J = 6,0$ Hz H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,60; 170,66; 108,46; 108,32; 75,25; 70,66; 51,47; 47,38; 47,25; 44,98; 43,26; 37,58; 34,62; 34,51; 32,23; 30,79; 30,65; 28,35; 27,50; 27,06; 25,64; 22,69; 22,00; 21,56; 21,34; 17,39; 12,13. MS (ESI, m/z (%)): 1403,90 ([2M+Na]⁺, 24), 729,42 ([M+K]⁺, 11), 713,45 ([M+Na]⁺, 100), 708,50 ([M+NH₄]⁺, 36). HRMS-ESI: m/z 713,4236 odgovara molekulkovj formuli C₃₉H₆₂O₁₀Na (greška u ppm: 0,6). Mikroanaliza za (C₃₉H₆₂O₁₀ (690,90)): izračunato C 67,80; H 9,05; nađeno C 67,52; H 9,40.

138k (4''*S* ili *R*): Prinos 174 mg (28%). Bezbojna pena, omekšava na 104-107 °C. $[\alpha]_D^{20} = +40,93$ ($c = 0,96$, CHCl₃). IR (KBr): 2995 sr, 1739 j, 1637 sl, 1441 sl, 1377 sr, 1239 j, 1078 sl, 1029 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,86 (s, (CH₃)₃C-C(4'')), 0,81 (d, $J = 6,2$ Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,57; 170,56; 108,46; 108,32; 75,23; 70,66; 51,49; 47,25; 44,99; 43,24; 37,60; 34,60; 32,27; 30,81; 30,68; 28,35; 27,50; 27,10; 25,62; 22,73; 22,05; 21,31; 17,45; 12,15. MS (ESI, m/z (%)): 1403,86 ([2M+Na]⁺, 19), 729,41 ([M+K]⁺, 13), 713,43 ([M+Na]⁺, 98), 708,47 ([M+NH₄]⁺, 100). HRMS-ESI: m/z 713,4263 odgovara molekulkovj formuli C₃₉H₆₂O₁₀Na (greška u ppm: 3,1). Mikroanaliza za (C₃₉H₆₂O₁₀ x 0,5 H₂O (699,93)): izračunato C 66,93; H 9,07; nađeno C 67,15; H 8,33.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)- i (4''*S* ili *R*)-fenil)cikloheksan (138l i 138lj).

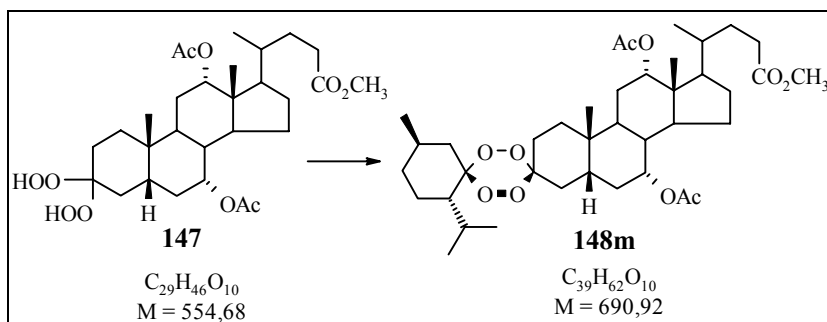


Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep, eluent heptan / EtOAc = 85 / 15; RP-8, Lobar B, LichroPrep, eluent MeOH / H₂O = 9 / 1.

138l (4''*R* ili *S*): prinos 96 mg (15%). Bezbojna pena, omekšava na 101-104 °C. $[\alpha]_D^{20} = +34,27$ (c = 1,14, CHCl₃). IR (KBr): 2945 sr, 2875 sr, 1737 j, 1449 sr, 1378 sr, 1248 j, 1072 sr, 1030 sr, 945 sl, 938 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,93 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,10 (šs, CH₃COO-), 0,95 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 6,0 Hz H₃C-C(20)), 0,74 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,53; 170,54; 145,74; 128,43; 126,76; 126,28; 108,65; 107,83; 75,24; 70,65; 51,48; 47,29; 44,99; 43,43; 43,26; 37,63; 34,63; 34,53; 30,81; 30,68; 29,57; 28,36; 27,10; 25,64; 22,75; 22,05; 21,58; 21,32; 17,45; 12,15. Mikroanaliza za (C₄₁H₅₈O₁₀ x 0,5 H₂O (719,92)): izračunato C 68,40; H 8,26; nađeno C 68,60; H 8,30.

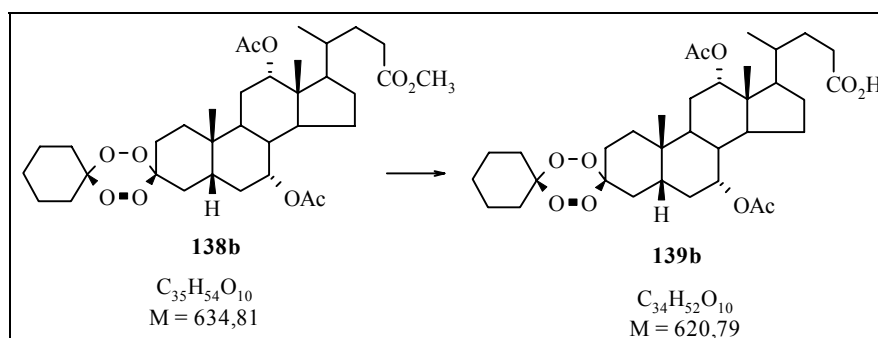
138lj (4''*S* ili *R*): Prinos 77 mg (12%). Bezbojna pena, omekšava na 186-190 °C. $[\alpha]_D^{20} = +47,67$ (c = 1,03, CHCl₃). IR (KBr): 2951 sr, 2880 sr, 1738 j, 1449 sr, 1378 sr, 1253 j, 1128 sl, 1062 sl, 1025 sl, 970 sl, 932 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 7,40-7,20 (m, Ph-C(4'')), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,93 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂C(24)), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,96 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz H₃C-C(20)), 0,74 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,53; 170,60; 145,73; 128,42; 126,79; 126,28; 108,66; 107,87; 75,25; 70,64; 51,48; 47,30; 45,02; 43,56; 43,30; 37,62; 34,66; 34,53; 30,81; 30,69; 29,53; 28,42; 27,10; 25,69; 22,73; 22,06; 21,38; 17,44; 12,17. Mikroanaliza za (C₄₁H₅₈O₁₀ (710,91)): izračunato C 69,27; H 8,22; nađeno C 68,93; H 7,89.

Metil 7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanat-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(-)-mentan (138m).



Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent heptan / EtOAc = 8 / 2. Proizvodi su izolovani kao jedna frakcija, kao smeša diastereomera. Prinos 118 mg (19%). Bezbojna pena, omekšava na 93-95 °C. IR (KBr): 2953 sr, 1739 j, 1619 sl, 1440 sl, 1239 j, 1026 sr cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,08 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,66 (s, CH₃O₂(C24)), 2,15 (šs, CH₃COO-), 2,085 (šs, CH₃COO-), 2,080 (šs, CH₃COO-), 2,06 (šs, CH₃COO-), 0,98-0,86 (H₃C-C(10) i HC-C(2'')), 0,81 (d, H₃C-C(20), *J* = 5,4Hz), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 174,53; 170,73; 170,53; 170,01; 111,19; 108,42; 108,35; 75,25; 75,31; 70,65; 70,57; 51,47; 49,80; 49,65; 47,23; 44,99; 43,34; 38,95; 38,82; 37,95; 37,60; 34,51; 34,20; 32,68; 31,94; 31,14; 30,77; 30,65; 30,43; 28,94; 28,64; 28,32; 27,08; 26,84; 25,62; 24,91; 24,53; 24,42; 23,04; 22,80; 22,70; 21,96; 21,78; 21,47; 21,25; 18,79; 18,43; 17,39; 12,15. MS (ESI, *m/z* (%)): 729,34 ([M+K]⁺, 12), 713,38 ([M+Na]⁺, 100), 708,32 ([M+NH₄]⁺, 33). Mikroanaliza za (C₃₉H₆₂O₁₀ (690,92)): izračunato C 67,80; H 9,05; nađeno C 68,27; H 9,83.

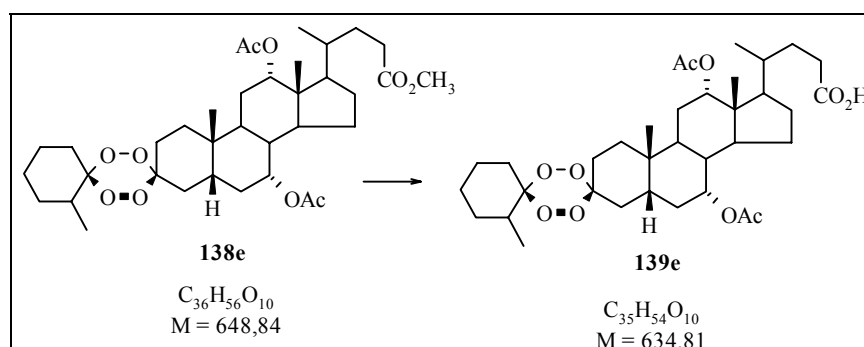
7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spirocikloheksan (139b).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138b** (151,5 mg, 0,24 mmol) preveden je u 131 mg (89 %) **139b** pomoću NaOH (14,3 mg, 0,37 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v, 6 mL). TT = 213-216 °C (bezbojne prizme, aceton / heksan). [α]_D²⁰ = +44,50 (c = 1,00, CHCl₃). IR (KBr): 3465 sl, 3266 sl, 2968 sr, 2946 sr, 1738 j, 1710 sr, 1454 sl, 1390 sr, 1283 j, 1255 j, 1084 sr, 1034 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,12

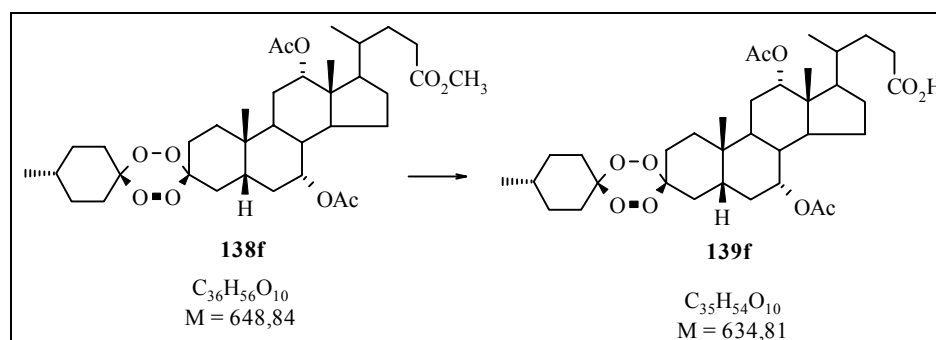
(šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,83; 170,62; 108,45; 108,36; 75,25; 70,67; 47,26; 45,02; 43,27; 37,62; 34,64; 34,47; 30,74; 30,44; 28,38; 27,08; 25,66; 25,29; 22,72; 22,04; 21,58; 21,36; 17,42; 12,17. MS (LSI, *m/z* (%)): 659,35 ([M+K]⁺, 36), 643,37 ([M+Na]⁺, 100), 501,35 (3), 338,37 (42). Mikroanaliza za (C₃₄H₅₂O₁₀ (620,79)): izračunato C 65,78; H 8,44; nađeno C 65,49; H 8,26.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'-(1',2',4', 5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(2''-metil)cikloheksan (139e).



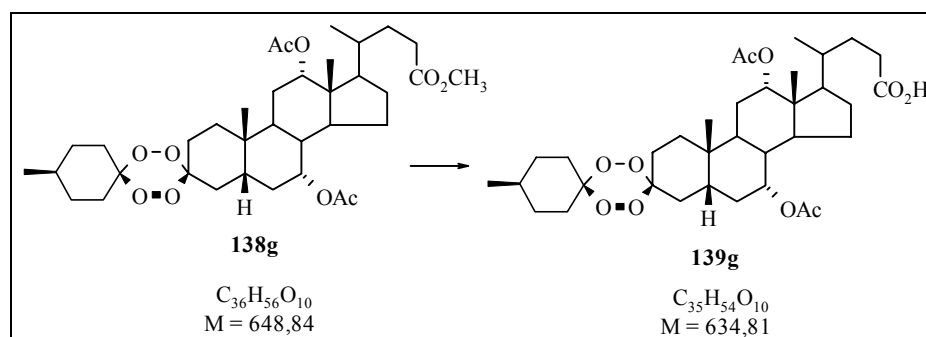
Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, smeša metil-estara **138e** (151,5 mg, 0,24 mmol) prevedena je u 166 mg (85%) smeše kiseline **139e** pomoću NaOH (18,5 mg, 0,46 mmol) u smeši *i*-PrOH/H₂O (3:1, v/v, 8 mL). Bezbojna pena, omekšava na 199-205 °C. $[\alpha]_D^{20} = +32,46$ (*c* = 1,04, CHCl₃). IR (KBr): 3471 sl, 3265 sl, 2970 sr, 2941 sr, 1737 j, 1709 sr, 1456 sl, 1391 sr, 1280 j, 1259 j, 1082 sr, 1041 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,93 (šs, H-C(7)), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,10 (šs, CH₃COO-), 2,07 (šs, CH₃COO-), 1,00 (d, *J* = 6,8 Hz, H₃C-C(2'')), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,74 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,72; 170,69; 170,62; 108,41; 108,36; 75,29; 70,69; 47,28; 45,03; 43,27; 34,62; 34,63; 34,59; 34,49; 30,74; 30,46; 28,37; 27,08; 25,65; 22,72; 22,04; 21,53; 21,40; 17,42; 13,57; 12,17. ESI-MS (*m/z* (%)): 583,46 (100), 571,39 (25), 557,38 (17), 511,39 (75). HRMS-ESI: *m/z* 657,3563, odgovara molekulknoj formuli C₃₅H₅₄O₁₀Na (greška u ppm: 7,6); *m/z* 635,3824 odgovara molekulknoj formuli C₃₅H₅₄O₁₀H (greška u ppm: 4,5); *m/z* 687,3485 odgovara molekulknoj formuli C₃₅H₅₄O₁₀K (greška u ppm: 14,6). Mikroanaliza za (C₃₅H₅₄O₁₀ (634,81)): izračunato C 66,22; H 8,57; nađeno C 66,35; H 8,75.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R*)-metil)cikloheksan (139f).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138f** (500 mg, 0,77 mmol) preveden je u 351 mg (72 %) **139f** pomoću NaOH (46,4 mg, 1,16 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3 : 1, v/v, 20 mL). TT = 130-133 °C (bezbojni prah, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +38,38$ (c = 1,11, CHCl₃). IR (KBr): 3457 sr, 2953 sr, 2932 sr, 2875 sr, 1738 j, 1717 sr, 1646 sl, 1454 sl, 1390 sl, 1262 j, 1169 sl, 1027 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 1,00-0,95 (m, H₃C-C(10) i H₃C-C(4'')), 0,82 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,58; 170,61; 108,48; 108,35; 75,27; 70,71; 47,29; 45,03; 43,27; 34,65; 34,63; 34,50; 31,56; 30,72; 30,46; 28,38; 27,10; 25,65; 22,75; 22,60; 22,05; 21,58; 21,34; 17,45; 14,07; 12,18. ESI-MS (*m* / *z* (%)): 675,35 (9), 674,38 (16), 673,38 ([M+K]⁺, 39), 664,50 (27), 663,50 (61), 659,46 (11), 658,40 (38), 657,40 ([M+Na]⁺, 100), 654,46 (11), 653,45 (39), 652,45 ([M+NH₄]⁺, 88). HRMS-ESI: *m* / *z* 767,2751 odgovara molekularnoj formuli C₃₅H₅₄O₁₀Cs (greška u ppm: 1,93). Mikroanaliza za (C₃₅H₅₄O₁₀ x 0,5C₆H₁₄ (677,90)): izračunato C 67,33; H 9,07; nađeno C 66,95; H 9,30.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*S*)-metil)cikloheksan (139g).

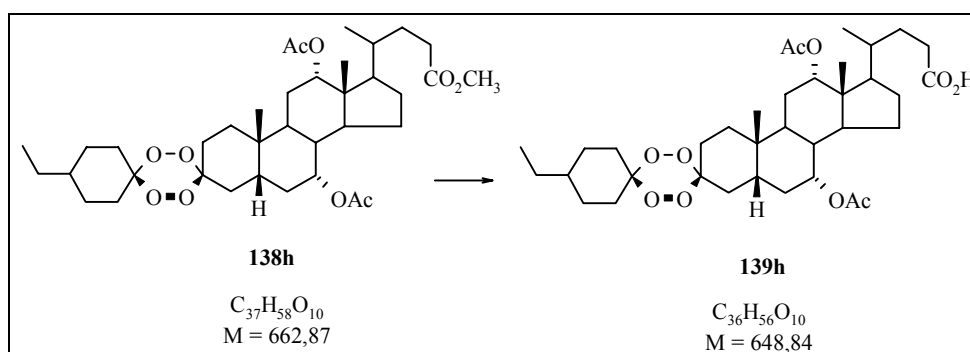


Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138g** (500 mg, 0,77mmol) preveden je u 380 mg (78 %) **139g** pomoću NaOH (46,4 mg, 1,16 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v, 20 mL). TT = 213-215 °C (bezbojne prizme, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = +44,38$ (c=1,05, CHCl₃). IR (KBr): 3280 sl, 2968 sr, 2904 sr, 2868 sr, 1738 j, 1702 j, 1454 sl, 1390 sr, 1276 j, 1169

sl, 1084 sr, 1034 sr, 963 sl, 899sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (d, *J* = 6,2 Hz, H₃C-C(4'')), 0,79 (d, *J* = 6,4 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,29; 170,63; 108,50; 108,40; 75,28; 70,70; 45,32; 45,07; 43,32; 37,67; 34,67; 34,51; 31,68; 30,68; 30,48; 28,43; 27,11; 25,71; 22,76; 22,07; 21,58; 21,40; 17,45; 12,20. ESI-MS (*m/z* (%)): 673,33 ([M+K]⁺, 15), 657,36 ([M+Na]⁺, 46), 652,41 ([M+NH₄]⁺, 15), 581,20 (7), 413,26 (8), 373,35 (4), 304,29 (8), 284,33 (100), 274,27 (8), 240,23 (12). Mikroanaliza za (C₃₅H₅₄O₁₀ (634,81)): izračunato C 66,22; H 8,57; nađeno C 66,33; H 8,77.

Kristalografska analiza 139g. (Slika 6). Kristal (0,60 x 0,36 x 0,15 mm) je unet u inertno ulje i strujom hladnog gasa prenet u MAR345 komoru. Za prikupljane podataka korišćeno je MoK α zračenje monohromatizovano grafitnim monohromatorom ($\lambda = 0,71069 \text{ \AA}$), Podaci su prikupljeni na temperaturi 293 K. Kristalni podaci za C₃₅H₅₄O₁₀ su: Mr = 634,78, ortorombna prostorna grupa, P2₁2₁2₁. Dimenzije jedinične ćelije: a = 10,399(3) \AA , $\alpha = 90^\circ$; b = 12,172(4) \AA , $\beta = 90^\circ$; c = 26,433(8) \AA $\gamma = 90^\circ$; Zapremina 3345,8(18) \AA^3 . Prikupljeno je 90 slika na rastojanju od 140 mm detektora i $\Delta\phi = 2^\circ$ dajući ukupno 20469 refleksija od kojih je 3313 nezavisno [R(int) = 0,0570]. Struktura je utačnjena metodom najmanjih kvadrata.⁸⁶ Pozicije vodonikovih atoma su izračunate i uključene u prečišćavanje sa uobičajenim izotropnim temperaturnim faktorom (*U* = 0,052 \AA).⁸⁷ Atom vodonika sa karboksilne grupe nije mogao biti lokalizovan. Uspešnost poklapanja = 1,085. Konačne R vrednosti: R₁ = 0,046 za 3118 refleksija sa *I* > 2 σ (*I*), wR₂ = 0,1182. Za sve podatke: R₁ = 0,0482, wR₂ = 0,1244.

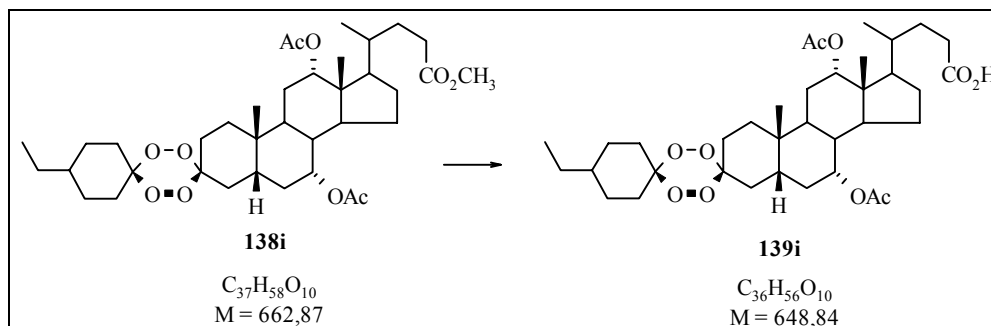
7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-etil)cikloheksan (139h).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138h** (250 mg, 0,38 mmol) preveden je u 196 mg (80 %) **139h** pomoću NaOH (22,6 mg, 0,57 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v /v, 20 mL). TT = 133-135 °C (bezbojni prah, Et₂O / heksan). $[\alpha]_D^{20} = + 41,74$ (c=1,09, CHCl₃). IR (KBr): 2951 j, 2880 sr, 1738 j, 1455 sl, 13780 sr, 1248 j, 1172 sl, 1030 sr, 943 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs,

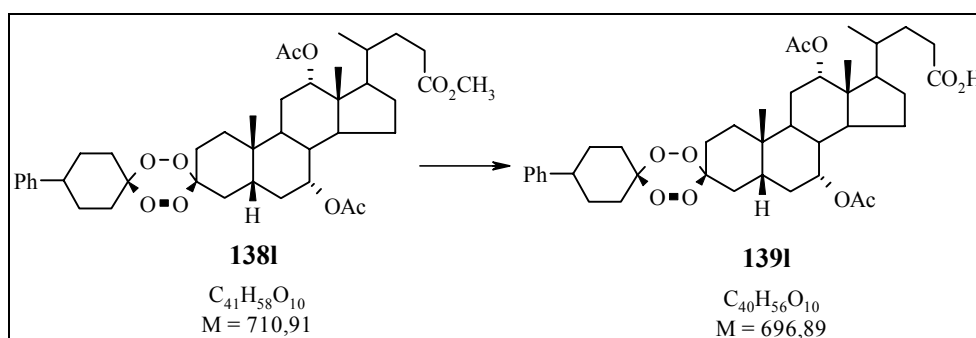
CH₃COO-), 0,94-0,80 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂-C(4''), CH₃CH₂-C(4''), H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,77; 170,60; 108,60; 108,46; 75,26; 70,70; 47,27; 45,01; 43,26; 38,24; 37,63; 34,62; 34,48; 31,53; 30,75; 30,45; 28,60; 28,36; 27,08; 25,63; 22,73; 22,59; 22,04; 21,57; 21,32; 17,43; 14,06; 12,17; 11,52. Mikroanaliza za (C₃₆H₅₆O₁₀ (648,84)): izračunato C 66,64; H 8,70; nađeno C 66,81; H 8,96.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S ili R)-etil)cikloheksan (139i).



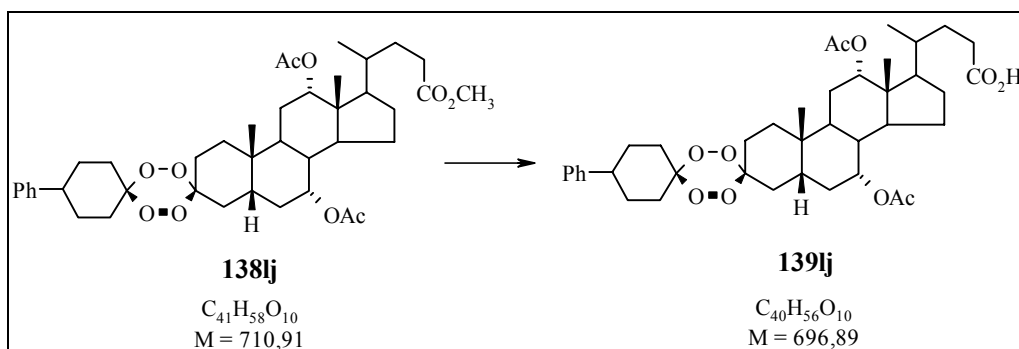
Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138i** (250 mg, 0,38mmol) preveden je u 183 mg (75%) **139i** pomoću NaOH (22,6 mg, 0,57 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v, 10 mL). Bezbojna pena, omekšava na 112-116 °C. $[\alpha]_D^{20} = +67,39$ (c = 0,88, CHCl₃). IR (KBr): 2951 j, 2880 sr, 1743 j, 1449 sl, 1378 sr, 1248 j, 1085 sl, 1030 sr, 965 sl, 938 sl, 905 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94-0,80 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂-C(4''), CH₃CH₂-C(4''), H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,60; 170,65; 108,64; 108,49; 75,27; 70,69; 47,28; 45,04; 43,30; 38,35; 37,63; 4,65; 34,49; 30,73; 30,46; 28,69; 28,40; 27,08; 25,69; 22,73; 22,04; 21,58; 21,38; 17,43; 12,18; 11,54. Mikroanaliza za (C₃₆H₅₆O₁₀ x 0,5C₆H₁₄ (691,93)): izračunato C 67,70; H 9,18; nađeno C 67,79; H 8,75.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''R ili S)-fenil)cikloheksan (139l).



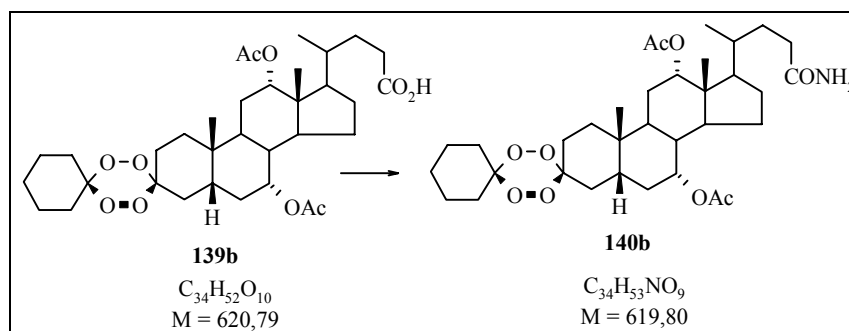
Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138I** (250 mg, 0,35 mmol) preveden je u 215 mg (88 %) **139I** pomoću NaOH (21,1 mg, 0,53 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v, 10 mL). Bezbojna pena, omekšava na 139-143 °C. $[\alpha]_D^{20} = +32,48$ (c = 1,10, CHCl₃). IR (KBr): 3419 sl, 2945 sr, 2880 sl, 1738 j, 1449 sl, 1383 sr, 1247 j, 1123 sl, 1079 sl, 1030 sl, 970sl, 932sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,93 (šs, H-C(7)), 2,13 (šs, CH₃COO-), 0,96 (s, H₃C-C(10)), 0,83 (d, *J* = 4,6 Hz, H₃C-C(20)), 0,74 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 170,62; 145,72; 128,42; 126,75; 126,28; 108,64; 107,84; 75,24; 70,68; 47,23; 44,98; 43,41; 37,59; 34,61; 34,46; 30,45; 29,56; 28,34; 27,05; 25,62; 24,49; 22,71; 22,04; 21,58; 21,33; 17,42; 12,16. Mikroanaliza za (C₄₀H₅₆O₁₀ x H₂O (714,90)): izračunato C 67,20; H 8,18; nađeno C 67,23; H 8,31.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanska kiselina-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S ili R)-fenil)cikloheksan (139Ij)



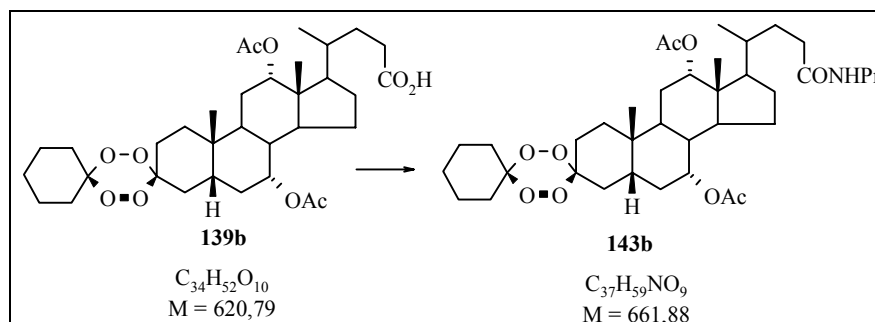
Prema postupku koji je opisan za dobijanje kiseline **129**, metil-estar **138Ij** (250 mg, 0,35mmol) preveden je u 229 mg (93%) **139Ij** pomoću NaOH (21,1 mg, 0,53 mmol) u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v, 10 mL). Bezbojna pena, omekšava na 137-140 °C. $[\alpha]_D^{20} = +43,87$ (c = 1,06, CHCl₃). IR (film): 3436 j, 2946 sl, 1739 sr, 1642 sr, 1448 sl, 1378 sl, 1244 sr, 1131 sl, 1061 sl, 1033sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,93 (šs, H-C(7)), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 0,96 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 5,6 Hz, H₃C-C(20)), 0,74 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 179,78; 170,68; 145,72; 128,42; 126,78; 126,28; 108,65; 107,88; 75,26; 70,68; 47,26; 45,02; 43,54; 43,28; 37,60; 34,65; 34,46; 30,45; 29,53; 28,39; 27,07; 25,69; 22,71; 22,05; 21,59; 21,40; 17,41; 12,18. Mikroanaliza za (C₄₀H₅₆O₁₀ x 0,5H₂O (705,90)): izračunato C 68,06; H 8,14; nađeno C 67,97; H 7,83.

**7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spirocikloheksan (140b).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139b** (310,9 mg, 0,5 mmol) prevedena je u 233 mg (75%) **140b** pomoću suspenzije 10 ekv. NH_4Cl i 10 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep, eluent $EtOAc$. TT = 208-210 °C (bezbojni prah, Et_2O). $[\alpha]_D^{20} = +48,30$ ($c = 1,00$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3488 j, 3358 sr, 2950 j, 2892 sr, 1730 j, 1694 j, 1615 sl, 1458 sr, 1386 j, 1257 j, 1077 sr, 1034 sr, 955 sl cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 5,6-5,4 (m, $H_2N-C(24)$), 5,10, (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,12 (šs, CH_3COO-), 2,09 (šs, CH_3COO-), 0,94 (s, $H_3C-C(10)$), 0,83 (d, $J = 6,00$ Hz, $H_3C-C(20)$), 0,73 (s, $H_3C-C(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 175,70; 170,58; 108,34; 75,24; 70,63; 47,41; 45,02; 43,26; 37,60; 34,63; 32,65; 31,29; 28,37; 27,14; 25,66; 25,27; 22,73; 22,04; 21,57; 21,37; 17,53; 12,19. MS (ESI, m/z (%)): 1261,81 ($[2M+Na]^+$, 24), 658,39 ($[M+K]^+$, 22), 642,41 ($[M+Na]^+$, 100), 620,43 ($[M+NH_4]^+$, 9). HRMS-ESI: m/z 620,3804 odgovara molekularnoj formuli $C_{34}H_{53}NO_9Na$ (greška u ppm: 0,8). Mikroanaliza za ($C_{34}H_{53}NO_9$ (619,80)): izračunato C 65,89; H 8,62; nađeno C 66,11; H 8,84.

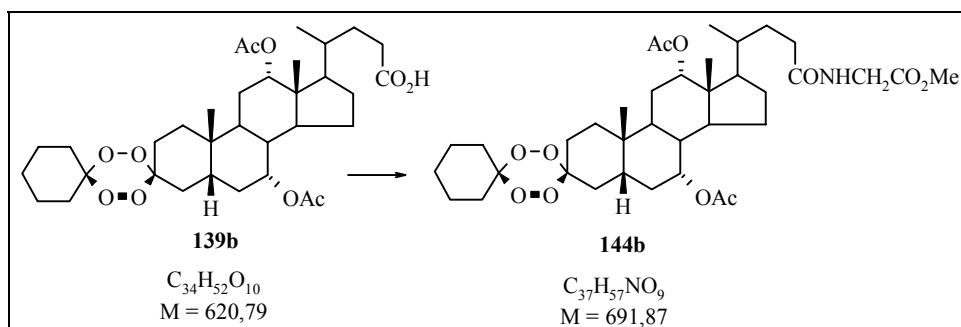
***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
spirocikloheksan (143b).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139b** (311,6 mg, 0,5 mmol) prevedena je u 233 mg (70%) **143b** pomoću $n-PrNH_2$ (82,1 μL , 1 mmol). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent $EtOAc$ / heptan = 95 / 5. TT = 208-210 °C (bezbojni prah, Et_2O). $[\alpha]_D^{20} = +40,60$ ($c = 1,00$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3473 sr, 3402 sr, 3351 sr,

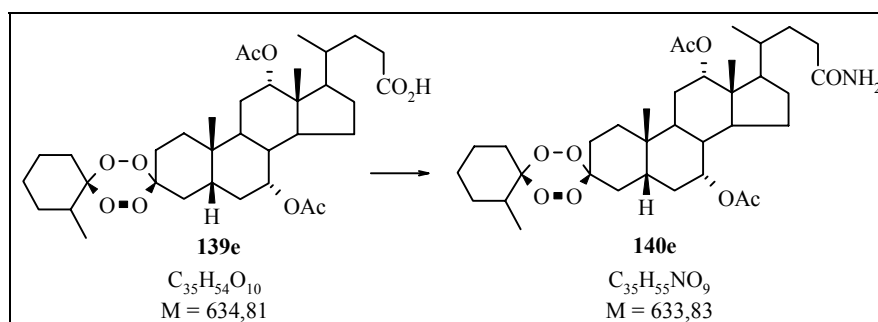
2942 j, 2878 sr, 1744 j, 1658 j, 1551 sr, 1450 sr, 1386 j, 1250 j, 1085 sr, 1034 sr, 963 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,50, (šs, HN-C(24)), 5,08 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,3-3,1 (m, CH₃CH₂CH₂HN-C(24)), 2,10 (šs, CH₃COO-), 2,07 (šs, CH₃COO-), 1,40-1,60 (m, CH₃CH₂CH₂HN-C(24)), 1,00-0,85 (m, H₃C-C(10) i CH₃CH₂CH₂HN-C(24)), 0,80 (d, *J* = 6,00 Hz, H₃C-C(20)), 0,71 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,22; 170,57; 108,43; 108,32; 75,27; 70,64; 47,46; 45,01; 43,25; 41,12; 37,61; 34,68; 34,62; 33,55; 31,55; 28,37; 27,12; 25,65; 25,27; 22,82; 22,72; 22,03; 21,55; 21,35; 17,53; 12,17; 11,28. MS (ESI, *m/z* (%)): 1345,85 ([2M+Na]⁺, 32), 700,40 ([M+K]⁺, 14), 684,43 ([M+Na]⁺, 100), 662,44 ([M+H]⁺, 82). HRMS-ESI: *m/z* 662,4287 odgovara molekulknoj formuli C₃₇H₆₀NO₉ (greška u ppm: 2,8). Mikroanaliza za (C₃₇H₅₉NO₉ x C₆H₁₄O (764,06)): izračunato C 67,60; H 9,63; nađeno C 67,89; H 9,39.

***N*-(Metil etanoat-2-il)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spirocikloheksan (144b).**



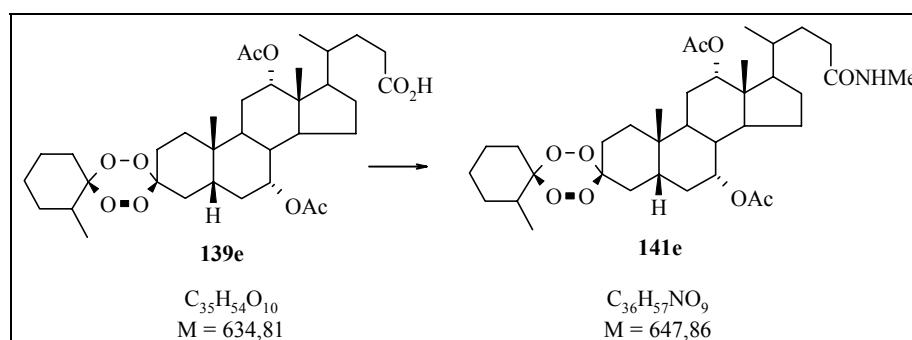
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139b** (300,9 mg, 0,48 mmol) prevedena je u 216 mg (64%) **144b** pomoću suspenzije 6 ekv. NH₂CH₂CO₂Me x HCl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. TT = 114-117 °C (bezbojni prah, Et₂O / heksan). [α]_D²⁰ = +36,60 (*c* = 1,00, CHCl₃). IR (KBr): 3452 j, 2950 j, 2878 sl, 1759 j, 1737 j, 1666 j, 1551 sr, 1450 sr, 1379 j, 1257 j, 1207 j, 1085 sr, 1034 sr, 963 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,96, (šs, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 4,04 (d, *J* = 5,20 Hz, CH₃O₂CCH₂HN-C(24)), 3,77 (s, CH₃O₂CCH₂HN-C(24)), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 6,00 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,38; 170,58; 108,45; 108,34; 75,27; 70,64; 52,34; 47,41; 45,02; 43,26; 41,12; 37,62; 34,64; 33,03; 31,25; 30,60; 28,38; 27,12; 25,66; 25,28; 22,73; 22,04; 21,58; 21,37; 17,52; 12,18. MS (ESI, *m/z* (%)): 1405,84 ([2M+Na]⁺, 9), 730,39 ([M+K]⁺, 16), 714,42 ([M+Na]⁺, 100), 692,43 ([M+H]⁺, 18). HRMS-ESI: *m/z* 692,4027 odgovara molekulknoj formuli C₃₉H₆₂O₁₀Na (greška u ppm: 2,4). Mikroanaliza za (C₃₇H₅₇NO₁₁ (691,87)): izračunato C 64,23; H 8,30; nađeno C 64,17; H 8,36.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(2''-metil)cikloheksan (140e).



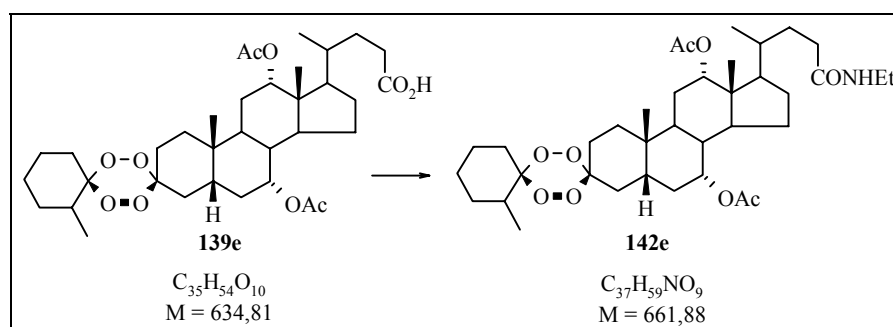
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, smeša kiselina **139e** (322,2 mg, 0,50 mmol) prevedena je u 220 mg (68%) smeše amida **140e** pomoću suspenzije 10 ekv. NH_4Cl / 10 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent $EtOAc$. Bezbojna pena, omekšava na 131-138 °C. $[\alpha]_D^{20} = +36,69$ ($c = 1,21$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3444 j, 2946 j, 2875 sr, 1745 j, 1674 j, 1624 sl, 1454 sr, 1383 j, 1248 j, 1077 sl, 1034 sr, 970 sl cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 5,77 (šs, $H_2N-C(24)$), 5,54 (šs, $H_2N-C(24)$), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,14 (šs, CH_3COO^-), 2,13 (šs, CH_3COO^-), 2,11 (šs, CH_3COO^-), 2,07 (šs, CH_3COO^-), 1,00 (d, $J = 6,8$ Hz, $H_3C-C(2'')$), 0,94 (s, $H_3C-C(10)$), 0,83 (d, $J = 5,8$ Hz, $H_3C-C(20)$), 0,74 (s, $H_3C-C(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 175,97; 170,61; 109,38; 108,31; 75,25; 70,62; 47,38; 45,00; 43,21; 37,57; 34,62; 34,57; 32,64; 31,28; 30,47; 28,33; 27,10; 25,61; 24,44; 22,69; 21,99; 21,49; 21,37; 17,49; 13,54; 12,15; ESI-MS (m/z (%)): 675,29 (2), 674,30 (7), 673,30 (11), 672,29 ($[M+K]^+$, 26), 659,32 (2), 658,32 (11), 657,32 (43), 656,32 ($[M+Na]^+$, 100), 634,34 (9), 574,33 (4), 514,31 (9). HRMS-ESI: m/z 656,3737 odgovara molekulknoj formuli $C_{35}H_{55}NO_9Na$ (greška u ppm: 5,7); m/z 634,3939 odgovara molekulknoj formuli $C_{35}H_{55}NO_9H$ (greška u ppm: 2,5). Mikroanaliza za ($C_{35}H_{55}NO_9 \times C_6H_{14}O$ (736,01)): izračunato C 66,91; H 9,45; nađeno C 67,11; H 9,27.

N-Metil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(2''-metil)cikloheksan (141e).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, smeša kiselina **139e** (255 mg, 0,40 mmol) prevedena je u 168 mg (64%) smeše amida **141e** pomoću suspenzije 6 ekv. MeNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na stubu SiO₂: Lobar, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 122-127 °C. $[\alpha]_D^{20} = +37,05$ (c = 1,42, CHCl₃). IR (KBr): 3437 sr, 2946 j, 2882 sr, 1745 j, 1660 sr, 1560 sl, 1447 sr, 1383 sr, 1248 j, 1077 sl, 1034 sr, 970 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,54 (šs, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,80 (d, *J* = 4,60 Hz, CH₃HN-C(24)), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,10 (šs, CH₃COO-), 1,00 (d, *J* = 6,80 Hz, H₃C-C(2'')), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,81 (d, *J* = 6,20 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,90; 170,63; 108,34; 75,29; 70,64; 47,44; 45,01; 43,24; 37,63; 34,70; 34,60; 33,35; 31,48; 30,50; 28,35; 27,11; 26,23; 25,65; 24,50; 22,72; 22,02; 21,51; 21,41; 17,52; 13,55; 12,17. ESI-MS (*m/z* (%)): 686,31 ([M+K]⁺, 8), 672,34 (3), 671,34 (11), 670,34 ([M+Na]⁺, 28), 651,37 (3), 650,36 (11), 649,36 (42), 648,36 ([M+H]⁺, 100), 588,34 (28), 528,32 (22). HRMS-ESI: *m/z* 670,3914 odgovara molekulskej formuli C₃₆H₅₇NO₉Na (greška u ppm: 2,5). *m / z* 648,4075 odgovara molekulskej formuli C₃₆H₅₇NO₉H (greška u ppm: 5,6); *m / z* 686,3603, odgovara molekulskej formuli C₃₆H₅₇NO₉K (greška u ppm: 9,8). Mikroanaliza za (C₃₆H₅₇NO₉ (647,86)): izračunato C 66,74; H 8,87; nađeno C 66,37; H 9,27.

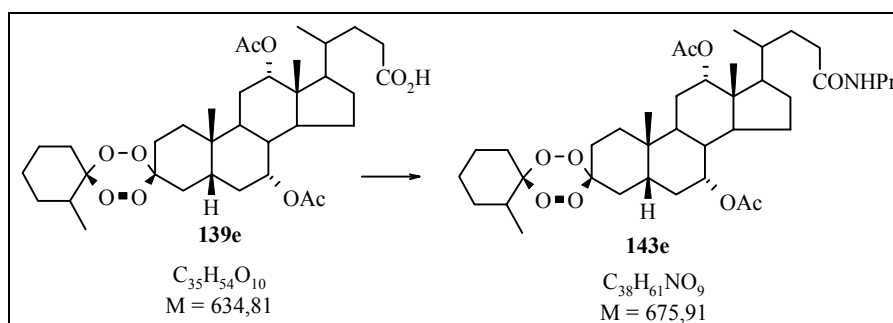
***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spiro-1''-(2''-metil)cikloheksan (**142e**).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, smeša kiselina **139e** (246 mg, 0,39 mmol) prevedena je u 179 mg (96%) smeše amida **142e** pomoću suspenzije 6 ekv. EtNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 119-125 °C. $[\alpha]_D^{20} = +38,29$ (c = 1,28, CHCl₃). IR (KBr): 3444 j, 2946 j, 2882 sr, 1745 j, 1660 sr, 1553 sl, 1447 sr, 1383 sr, 1248 j, 1084 sl, 1034 sr, 970 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,48 (šs, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,36-3,20 (m, CH₃CH₂HN-C(24)), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,10 (šs, CH₃COO-), 2,06 (šs, CH₃COO-), 1,18-1,05 (m,

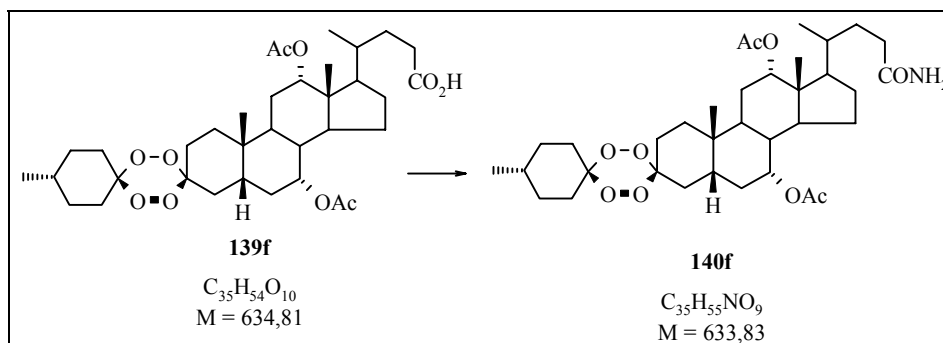
CH₃CH₂HN-C(24)), 1,00 (d, *J* = 6,60 Hz, H₃C-C(2'')), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, *J* = 6,00 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,09; 170,62; 170,32; 108,33; 75,29; 70,64; 47,43; 45,01; 43,24; 37,58; 34,68; 34,60; 34,25; 33,49; 31,49; 30,48; 28,34; 27,12; 25,64; 24,49; 22,71; 22,01; 21,51; 21,42; 17,54; 14,83; 13,54; 12,16. ESI-MS (*m/z* (%)): 701,33 (6), 700,32 ([M+K]⁺, 12), 686,36 (6), 685,35 (21), 684,35 ([M+Na]⁺, 53), 665,37 (3), 664,38 (9), 663,37 (32), 662,37 ([M+H]⁺, 100), 602,35 (32), 542,33 (15). HRMS-ESI: *m/z* 662,4267 odgovara molekulknoj formuli C₃₇H₅₉NO₉H (greška u ppm: 0,2). Mikroanaliza za (C₃₇H₅₉NO₉ (661,88)): izračunato C 67,14; H 8,98; nađeno C 67,09; H 9,20.

***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(2''-metil)cikloheksan (143e).**



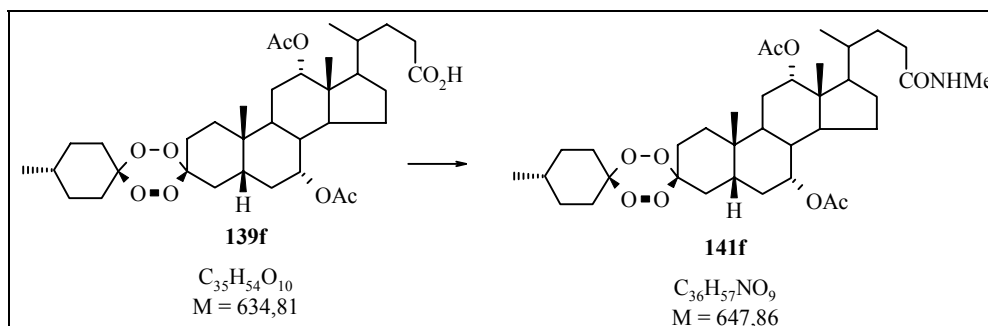
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, smeša kiselina **139e** (257,6 mg, 0,41 mmol) prevedena je u 193 mg (70%) smeše amida **143e** pomoću *n*-PrNH₂ (67 μ L, 0,81 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 111-116 °C. $[\alpha]_D^{20} = +41,85$ (*c* = 1,02, CHCl₃). IR (KBr): 3430 sr, 2946 j, 2875 sr, 1738 j, 1660 sr, 1553 sl, 1447 sr, 1383 sr, 1248 j, 1077 sl, 1034 sr, 970 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,43 (šs, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,30-3,10 (m, CH₃CH₂CH₂HN-C(24)), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,10 (šs, CH₃COO-), 2,06 (šs, CH₃COO-), 1,65-1,40 (m, CH₃CH₂CH₂HN-C(24)), 1,00 (d, *J* = 6,80 Hz, H₃C-C(2'')), 0,96-0,85 (m, H₃C-C(10) i CH₃CH₂CH₂HN-C(24)), 0,82 (d, *J* = 6,20 Hz, H₃C-C(21)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,20; 170,67; 108,38; 75,32; 70,66; 47,49; 45,05; 43,27; 41,16; 37,64; 34,72; 34,64; 33,60; 31,58; 30,56; 28,39; 27,15; 25,68; 24,45; 22,86; 22,81; 22,04; 21,54; 17,57; 13,59; 12,20; 11,30. ESI-MS (*m/z* (%)): 717,35 (2), 716,34 (5), 715,34 (22), 714,33 ([M+K]⁺, 27), 701,38 (4), 700,36 (14), 699,36 (42), 698,36 ([M+Na]⁺, 100), 678,38 (4), 677,38 (9), 676,38 (18), 616,36 (7), 556,36 (2), 525,35 (4). HRMS-ESI: *m/z* 698,4250 odgovara molekulknoj formuli C₃₈H₆₁NO₉Na (greška u ppm: 0,9); *m / z* 676,4403 odgovara molekulknoj formuli C₃₈H₆₁NO₉H (greška u ppm: 3,2); *m / z* 714,3967 odgovara molekulknoj formuli C₃₈H₆₁NO₉K (greška u ppm: 2,3). Mikroanaliza za (C₃₈H₆₁NO₉ (675,91)): izračunato C 67,53; H 9,10; nađeno C 67,82; H 9,37.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R*)-metil)cikloheksan (140f).



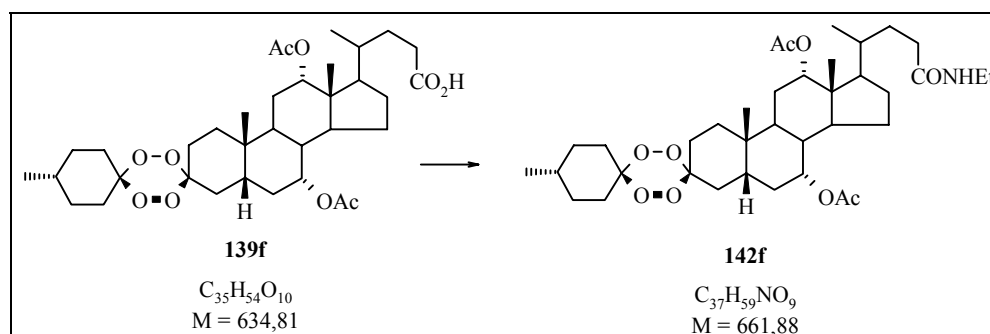
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139f** (321,5 mg, 0,51mmol) prevedena je u 240 mg (74%) **140f** pomoću suspenzije 10 ekv. NH₄Cl / 10 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 137-141 °C. $[\alpha]_D^{20} = +44,71$ (c = 1,04, CHCl₃). IR (KBr): 3458 j, 2946 j, 2882 sr, 1738 j, 1681 sr, 1454 sl, 1383 sr, 1255 j, 1106 sl, 1027 sr, 978 sl, 906 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,60-5,40 (m, H₂N-C(24), izmenljiv sa D₂O), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (d, J = 6,0 Hz, H₃C-C(4'')), 0,83 (d, J = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 175,72; 170,54; 108,46; 108,33; 75,26; 70,66; 47,42; 45,04; 43,25; 37,63; 34,66; 34,62; 32,66; 31,55; 31,31; 30,61; 28,37; 27,15; 25,65; 22,80; 22,04; 21,57; 21,33; 17,55. 12,19. ESI-MS (m / z (%)): 674,40 (3), 673,41 (9), 672,40 ([M+K]⁺, 16), 663,50 (6), 659,42 (3), 658,43 (12), 657,42 (41), 656,42 ([M+Na]⁺, 100), 652,46 (6), 651,46 ([M+NH₄]⁺, 12), 640,41 (3), 635,45 ([M+H]⁺, 16). HRMS-ESI: m / z 766,2913 odgovara molekularnoj formuli C₃₅H₅₅NO₉Cs (greška u ppm: 1,65). Mikroanaliza za (C₃₅H₅₅NO₉ (633,83)): izračunato C 66,33; H 8,75; nađeno C 66,00; H 9,12.

N-Metil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R*)-metil)cikloheksan (141f).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitoanhidrida, kiselina **139f** (301,2 mg, 0,47 mmol) preveden je u 252 mg (82%) **141f** pomoću suspenzije 6 ekv. MeNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 129-134 °C. $[\alpha]_D^{20} = +43,66$ (c = 1,06, CHCl₃). IR(KBr): 3465 sr, 3415 sr, 2953 sr, 2882 sr, 1745 j, 1653 sr, 1560 sl, 1454 sl, 1390 sr, 1248 j, 1027 sr, 978 sl, 906 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200MHz, CDCl₃): 5,46 (šs, HN-C(24), izmenljiv sa D₂O), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 2,80 (d, *J* = 4,80 Hz, H₃C-NH), 2,10 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (d, *J* = 5,80 Hz, H₃C-C(4'')), 0,81 (d, *J* = 6,0 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃): 173,89; 170,56; 108,47; 108,33; 75,28; 70,66; 47,46; 45,02; 43,25; 37,63; 34,72; 34,62; 33,39; 31,55; 30,58; 28,37; 27,13; 26,25; 25,64; 22,80; 22,04; 21,57; 21,33; 17,56; 12,19; ESI-MS (*m/z* (%)): 684,60 (2), 687,42 (5), 686,41 ([M+K]⁺, 12), 672,47 (2), 671,44 (8), 670,43 ([M+Na]⁺, 17), 667,48 (3), 666,48 (12), 665,48 ([M+NH₄]⁺, 27), 651,46 (3), 650,46 (10), 649,46 (35), 648,45 ([M+H]⁺, 100), 634,50 (1), 632,44 (1). HRMS-ESI: *m/z* 780,3007 odgovara molekulknoj formuli C₃₆H₅₇NO₉Cs (greška u ppm: 9,63). Mikroanaliza za (C₃₆H₅₇NO₉ x H₂O (665,87)): izračunato C 64,94; H 8,93; nađeno C 64,68; H 8,79.

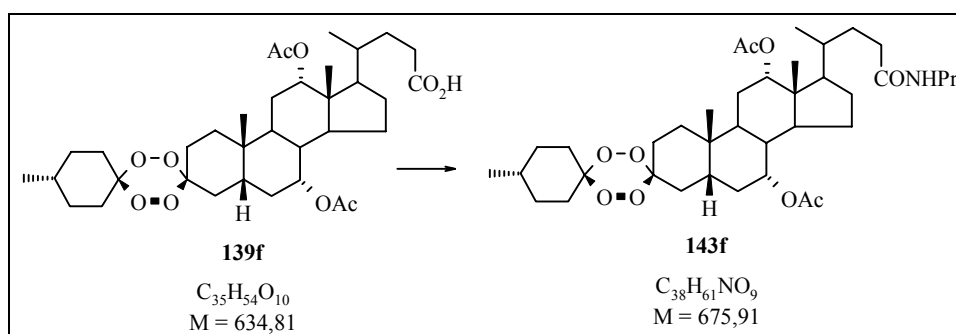
***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4'')*R*)-metil)cikloheksan (**142f**).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitoanhidrida, kiselina **139f** (308,5 mg, 0,49 mmol) prevedena je u 288 mg (90%) **142f** pomoću suspenzije 6 ekv. EtNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 124-129 °C. $[\alpha]_D^{20} = +43,98$ (c = 1,06, CHCl₃). IR (KBr): 3444 sr, 2953 j, 2875 sr, 1738 j, 1653 sr, 1553 sl, 1454 sl, 1383 sr, 1248 j, 1027 sr, 978 sl, 906 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,42 (šs, HN-C(24) izmenljiv sa D₂O), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,40-3,15 (m, CH₃CH₂-NH-), 2,11 (šs CH₃COO-), 2,08 (šs CH₃COO-), 1,20-1,05 (m, CH₃CH₂-NH-), 0,94 (s, H₃C-C(10)), 0,92 (d, *J* = 5,60 Hz, H₃C-C(4'')), 0,82 (d, *J* = 6,00 Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,08; 170,56; 108,47; 108,33; 75,28; 70,66; 47,45; 45,02; 43,25; 37,63; 34,70; 34,62; 34,28; 33,52; 31,55;

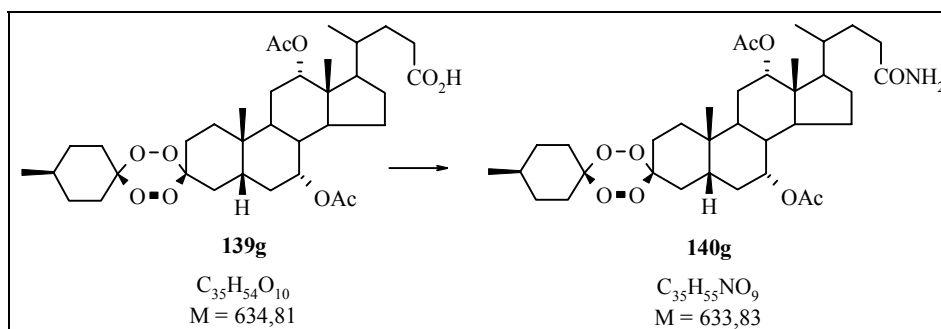
30,58; 28,37; 27,14; 25,64; 22,80; 22,04; 21,57; 21,33; 17,57; 14,85; 12,18. ESI-MS (m/z (%)): 703,43 (4), 701,42 (7), 700,43 ($[M+K]^+$, 18), 687,47 (4), 686,46 (11), 685,45 (43), 684,45 ($[M+Na]^+$, 100), 679,49 ($[M+NH_4]^+$, 2), 669,46 (1), 668,49 (29), 664,48 (7), 663,48 (21), 662,47 ($[M+H]^+$, 50). HRMS-ESI: m/z 794,3223 odgovara molekularnoj formuli $C_{37}H_{59}NO_9Cs$ (greška u ppm: 1,89). Mikroanaliza za ($C_{37}H_{59}NO_9 \times C_6H_{14}O$ (764,06)): izračunato C 67,60; H 9,63; nađeno C 67,61; H 9,52.

***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(4''*R*)-metilcikloheksan (143f).**



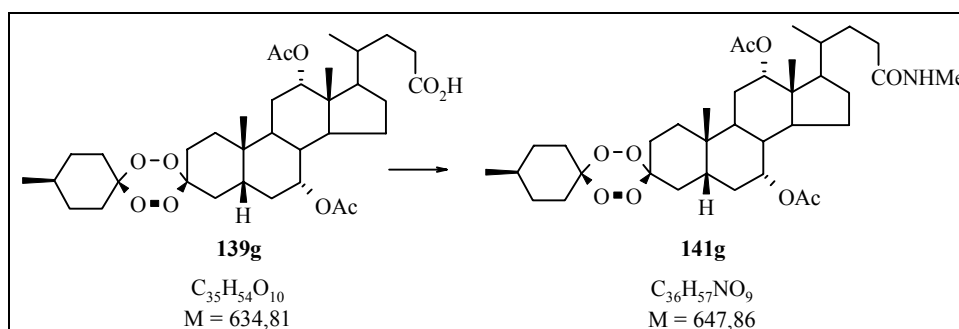
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139f** (402,2 mg, 0,63 mmol) prevedena je u 315 mg (74%) **143f** pomoću *n*-PrNH₂ (104,26 μ L, 1,27 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 117-124 °C. $[\alpha]_D^{20} = +43,40$ ($c = 1,00$, CHCl₃). IR (KBr): 3437 sr, 2953 j, 2875 sr, 1738 j, 1653 sr, 1553 sl, 1454 sr, 1383 sr, 1255 j, 1027 sr, 978 sl, 907 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,60-5,40 (m, HN-C(24) izmenljiv sa D₂O), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,30-3,10 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 1,65-1,40 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 1,00-0,85 (m, H₃C-C(10), H₃C-C(4'') i CH₃CH₂CH₂-NH-), 0,82 (d, $J = 6,20$ Hz, H₃C-C(21)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,23; 170,57; 108,47; 108,33; 75,29; 70,67; 47,47; 45,02; 43,25; 41,15; 37,64; 34,71; 34,62; 33,58; 31,56; 30,58; 28,37; 27,14; 25,64; 22,85; 22,75; 22,04; 21,56; 21,33; 17,56; 12,18; 11,28. ESI-MS (m/z (%)): 716,45 (3), 715,45 (11), 714,45 ($[M+K]^+$, 22), 709,45 (3), 700,48 (11), 699,47 (39), 698,47 ($[M+Na]^+$, 89), 679,50 (3), 676,48 ($[M+H]^+$, 100), 664,49 (3), 663,49 (6), 662,48 (3). HRMS-ESI: m/z 808,3432 odgovara molekularnoj formuli $C_{38}H_{61}NO_9Cs$ (greška u ppm: 4,56). Mikroanaliza za ($C_{38}H_{61}NO_9 \times H_2O$ (684,92)): izračunato C 66,64; H 9,12; nađeno C 66,49; H 9,28.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S)-metil)cikloheksan (140g).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139g** (311,5 mg, 0,49mmol) prevdena je u 237 mg (76%) **140g** pomoću suspenzije 10 ekv. NH_4Cl / 10 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. TT = 205-206 °C (Et_2O). $[\alpha]_D^{20} = +47,23$ ($c = 1,12$, hl). IR (KBr): 3458 sr, 2953 sr, 2875 sr, 1738 j, 1681 sr, 1454 sr, 1383 sr, 1248 j, 1084 sl, 1027 sr, 978 sl, 906 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,60-5,40 (m, $\text{H}_2\text{N-C}(24)$, izmenljiv sa D_2O), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 0,94 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,92 (d, $J = 6,8$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(4'')$), 0,83 (d, $J = 6,0$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 175,77; 170,60; 108,48; 108,37; 75,26; 70,65; 47,42; 45,04; 43,28; 37,62; 34,64; 32,66; 31,64; 31,03; 30,56; 28,40; 27,14; 25,69; 22,79; 22,04; 21,38; 17,53; 12,20. ESI-MS (m/z (%)): 674,41 (2), 673,40 (6), 672,40 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 14), 663,49 (2), 659,43 (2), 658,43 (10), 657,43 (42), 656,42 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 656,89 (1), 652,47 (6), 651,47 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 13), 635,44 (6), 634,43 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 12). HRMS-ESI: m/z 766,2897 odgovara molekulskej formuli $\text{C}_{35}\text{H}_{55}\text{NO}_9\text{Cs}$ (greška u ppm: 3,74). Mikroanaliza za ($\text{C}_{35}\text{H}_{55}\text{NO}_9$ (633,83)): izračunato C 66,33; H 8,75; nađeno C 66,35; H 8,92.

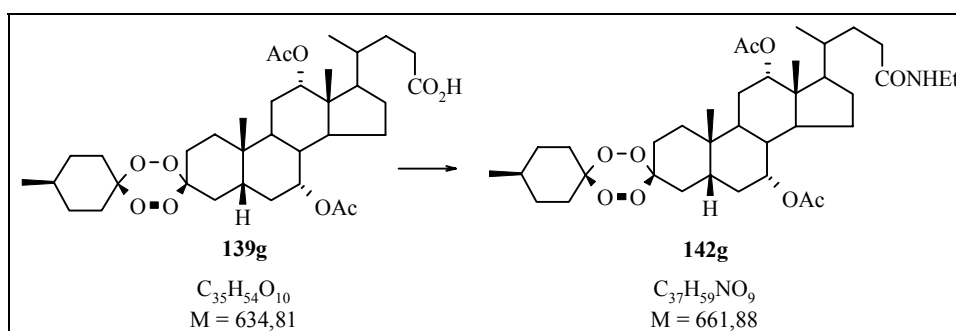
N-Metil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S)-metil)cikloheksan (141g).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139g** (323,3 mg, 0,51 mmol) preveden je u 230 mg (70%) **141g** pomoću suspenzije 6 ekv. MeNH_3Cl / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60,

eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 130-135 °C. $[\alpha]_D^{20} = +46,02$ ($c = 1,03$, CHCl_3). IR (KBr): 3422 sr, 2953 j, 2882 sr, 1738 j, 1660 sr, 1560 sl, 1454 sl, 1383 sr, 1248 j, 1169 sl, 1084 sl, 1027 sr, 978 sl, 906 sl cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 5,48 (šs, $\text{HN-C}(24)$, izmenljiv sa D_2O), 5,09 (šs, $\text{H-C}(12)$), 4,91 (šs, $\text{H-C}(7)$), 2,80 (d, $J = 4,80$ Hz, $\text{H}_3\text{C-NH}$), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 0,94 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,92 (d, $J = 6,6$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(4'')$), 0,81 (d, $J = 5,8$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): 173,90; 170,62; 108,49; 108,38; 75,29; 70,66; 47,47; 45,04; 43,28; 37,63; 34,72; 34,65; 33,39; 31,65; 31,50; 30,56; 28,40; 27,12; 26,25; 25,69; 22,80; 22,04; 21,57; 21,38; 17,55; 12,20. ESI-MS (m/z (%)): 688,41 (5), 687,42 (8), 686,41 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 15), 673,45 (3), 672,44 (11), 671,44 (43), 670,44 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 665,49 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 3), 663,49 (3), 656,42 (3), 650,46 (5), 649,45 (11), 648,45 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 29). HRMS-ESI: m/z 780,3006 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{NO}_9$ (greška u ppm: 9,76). Mikroanaliza za ($\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{NO}_9 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$ (656,86)): izračunato C 65,83; H 8,90; nađeno C 65,84; H 8,85.

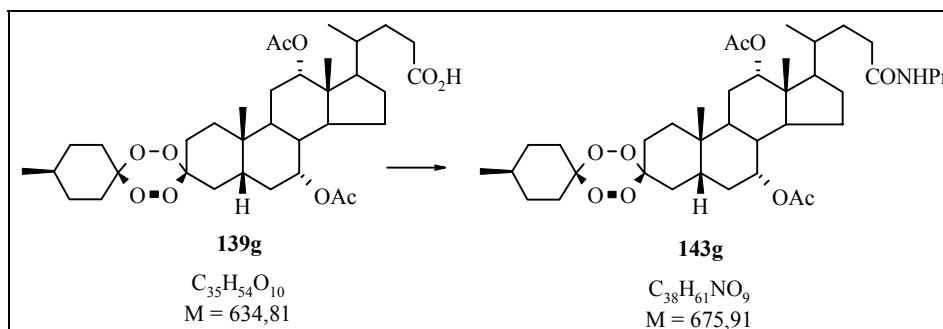
***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S)-metil)cikloheksan (142g).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139g** (316,5 mg, 0,50 mmol) preveden je u 288 mg (90%) **142g** pomoću suspenzije 6 ekv. EtNH_3Cl / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5). Bezbojna pena, omekšava na 122-126 °C. $[\alpha]_D^{20} = +44,13$ ($c = 1,06$, CHCl_3). IR (KBr): 3415 sr, 2946 sr, 2882 sr, 1738 j, 1653 sr, 1553 sl, 1454 sl, 1383 sr, 124 lj, 1084 sl, 1027 sr, 970 sl, 907 sl cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 5,41 (šs, $\text{HN-C}(24)$ izmenljiv sa D_2O), 5,09 (šs, $\text{H-C}(12)$), 4,91 (šs, $\text{H-C}(7)$), 3,40-3,15 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH-}$), 2,12 (šs $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs $\text{CH}_3\text{COO-}$), 1,20-1,05 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH-}$), 0,94 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,92 (d, $J = 6,4$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(4'')$), 0,81 (d, $J = 6,20$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): 173,09; 170,62; 108,50; 108,39; 75,31; 70,67; 47,47; 45,06; 43,30; 37,65; 34,66; 34,29; 33,54; 31,66; 31,52; 30,58; 28,42; 27,14; 25,70; 22,81; 22,06; 21,58; 21,40; 17,58; 14,86; 12,20. ESI-MS (m/z (%)): 703,44 (4), 702,43 (11), 701,44 (13), 700,43 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 32), 687,47 (2), 686,46 (14), 685,46 (44), 684,45 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 679,50 (2), 666,67 (1), 664,49 (5), 663,48 (18), 662,47 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 37).

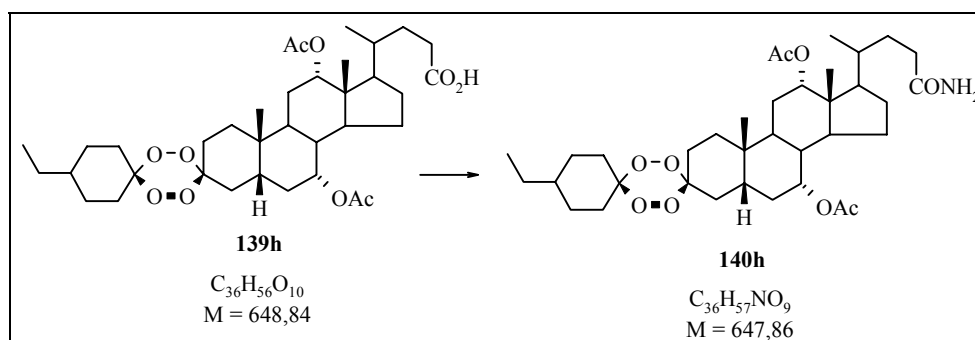
HRMS-ESI: m/z 794,3146 odgovara molekulknoj formuli $C_{37}H_{59}NO_9Cs$ (greška u ppm: 9,90). Mikroanaliza za ($C_{37}H_{59}NO_9 \times 0,5 H_2O$ (670,89)): izračunato C 66,24; H 9,01; nađeno C 66,36; H 9,10.

***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*S*)-metil)cikloheksan (143g).**



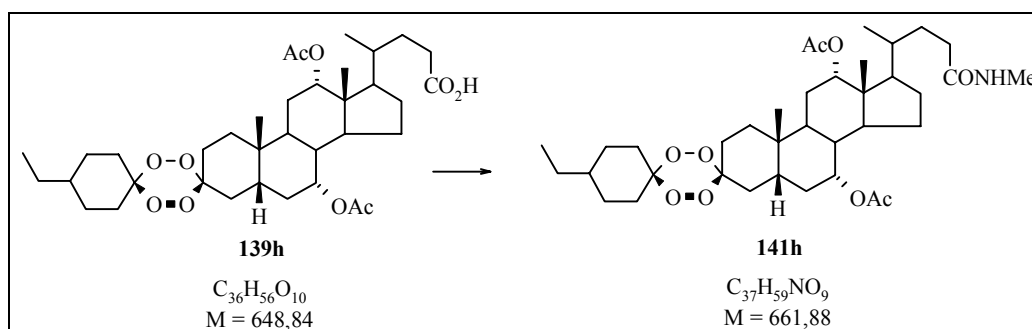
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139g** (325,1 mg, 0,51 mmol) preveden je u 241 mg (70%) **143g** pomoću *n*-PrNH₂ (83,74 μ l, 1,02 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. TT = 208-210 °C (CH₂Cl₂ / (*i*-Pr)₂O. $[\alpha]_D^{20} = +44,88$ ($c = 1,05$, CHCl₃). IR (KBr): 3309 sl, 2953 sr, 2868 sr, 1745 j, 1653 sr, 1553 sr, 1461 sr, 1383 sr, 1241 j, 1162 sl, 1084 sl, 1041 sr, 970 sl, 942 sl, 907 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,60-5,40 (m, HN-C(24) izmenljiv sa D₂O), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,30-3,10 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 2,12 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 1,60-1,35 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 1,00-0,85 (m, H₃C-C(10), H₃C-C(4'') i CH₃CH₂CH₂-NH-), 0,81 (d, $J = 6,20$ Hz, H₃C-C(21)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,20; 170,60; 108,48; 108,36; 75,29; 70,66; 47,47; 45,03; 43,27; 41,13; 37,62; 34,69; 34,64; 33,57; 31,64; 31,56; 28,39; 27,12; 25,69; 22,84; 22,73; 22,04; 21,55; 21,38; 17,54; 12,19; 11,28. ESI-MS (m/z (%)): 735,55 (2), 721,55 (1), 717,45 (3), 715,45 ([M+K]⁺ + H, 6), 714,45 ([M+K]⁺, 13), 709,42 (3), 701,48 (3), 700,47 (10), 699,47 ([M+Na]⁺ + H, 44), 698,47 ([M+Na]⁺, 100), 690,50 (1), 684,44 (1), 678,50 (5), 677,49 (14), 676,48 ([M+H]⁺, 30), 671,44 (1), 663,49 (3), 616,45 (18), 570,37 (2), 556,43 (7), 410,32 (10). HRMS-ESI: m/z 808,3256 odgovara molekulknoj formuli $C_{38}H_{61}NO_9Cs$ (greška u ppm: 11,32). Mikroanaliza za ($C_{38}H_{61}NO_9$ (675,91)): izračunato C 67,53; H 9,10; nađeno C 67,75; H 9,21.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-etil)cikloheksan (140h).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139h** (345,3 mg, 0,53mmol) preveden je u 294 mg (85%) **140h** pomoću suspenzije 10 ekv. NH_4Cl / 10 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 133-136 °C. $[\alpha]_D^{20} = +46,17$ ($c = 1,12$, CHCl_3). IR (KBr): 3462 sr, 3370 sr, 2945 j, 2875 sr, 1738 j, 1678 sr, 1455 sr, 1383 sr, 1248 j, 1128 sl, 1085 sl, 1030 sr, 970 sl, 938 sl, 905 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,84-5,60 (m, $\text{H}_2\text{N-C}(24)$), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,11 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,09 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 0,945-0,80 (m, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 176,04; 170,52; 108,52; 108,38; 75,20; 70,61; 47,34; 44,96; 43,16; 38,16; 37,55; 34,60; 34,54; 32,61; 31,25; 30,49; 28,53; 28,29; 27,07; 25,57; 22,66; 21,97; 21,50; 21,26; 17,48; 12,12; 11,46. Mikroanaliza za ($\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{NO}_9$ (647,86)): izračunato C 66,74; H 8,87; nađeno C 66,65; H 9,01.

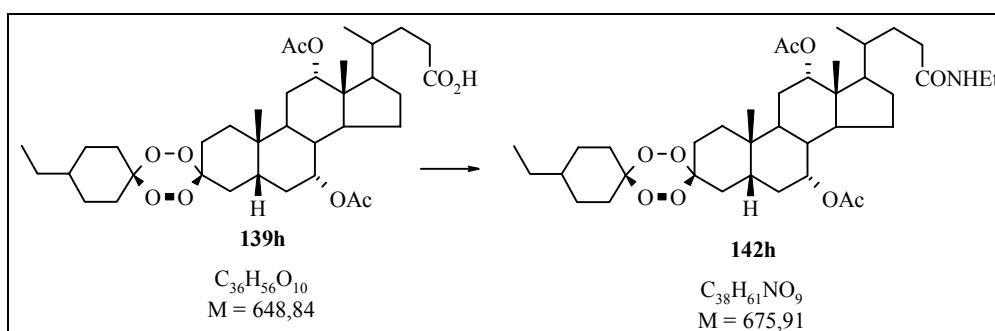
***N*-Metil-7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-etil)cikloheksan (141h).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139h** (326,2 mg, 0,50 mmol) prevedena je u 254 mg (76%) **141h** pomoću suspenzije 6 ekv. MeNH_3Cl / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 123-127 °C. $[\alpha]_D^{20} = +46,01$ ($c = 1,15$, CHCl_3). IR (KBr): 3404 sr, 2952 j, 2882 sr, 1739 j, 1664 sr, 1551 sl, 1454 sl, 1378 sr, 1249 j, 1169 sl, 1082 sl, 1028 sr, 969 sl, 937 sl, 904 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,70-5,60 (m, $\text{HN-C}(24)$), 5,08

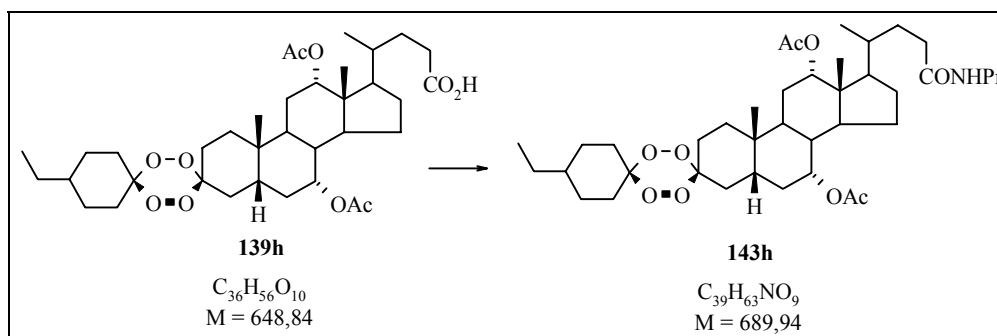
(šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(12)), 2,78 (d, $J = 4,80$ Hz, H_3C-NH), 2,10 (šs, CH_3COO^-), 2,08 (šs, CH_3COO^-), 0,94-0,79 (m, $H_3C-C(10)$, $CH_3CH_2-C(4'')$, $CH_3CH_2-C(4'')$, $H_3C-C(20)$), 0,73 (s, $H_3C-C(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 173,94; 170,47; 108,48; 108,34; 75,18; 70,57; 47,36; 44,91; 43,13; 38,12; 37,51; 34,63; 34,51; 33,24; 31,41; 28,50; 28,26; 27,02; 26,13; 25,53; 22,64; 21,94; 21,46; 17,45; 12,09; 11,42. Mikroanaliza za ($C_{37}H_{59}NO_9 \times 0,5 H_2O$ (670,89)): izračunato C 66,24; H 9,01; nađeno C 66,58; H 9,28.

***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1', 2', 4', 5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''R ili S)-etil)cikloheksan (142h).**



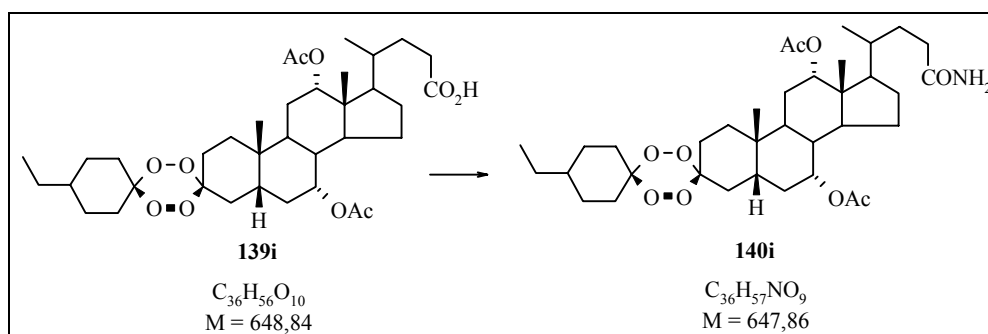
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139h** (301,1 mg, 0,48 mmol) prevedena je u 265 mg (82%) **142h** pomoću suspenzije 6 ekv. $EtNH_3Cl$ / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent $EtOAc$ / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 115-118 °C. $[\alpha]_D^{20} = +46,09$ ($c = 1,06$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3343 sl, 2951 j, 2880 sr, 1743 j, 1656 sr, 1542 sr, 1455 sr, 1378 sr, 1242 j, 1161 sl, 1085 sl, 1030 sr, 970 sr, 938 sr, 905 sr cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 5,75-5,60 (m, $HN-C(24)$), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,40-3,15 (m, CH_3CH_2-NH-), 2,11 (šs CH_3COO^-), 2,08 (šs CH_3COO^-), 1,20-1,05 (m, CH_3CH_2-NH-), 0,94-0,80 (m, $H_3C-C(10)$, $CH_3CH_2-C(4'')$, $CH_3CH_2-C(4'')$, $H_3C-C(20)$), 0,73 (s, $H_3C-C(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 173,09; 170,46; 108,48; 108,35; 75,19; 70,57; 47,35; 44,91; 43,14; 38,13; 37,52; 34,61; 34,51; 34,16; 33,39; 31,42; 28,50; 28,26; 27,03; 25,53; 22,64; 21,94; 21,46; 21,23; 17,46; 14,74; 12,08; 11,42. Mikroanaliza za ($C_{38}H_{61}NO_9$ (675,91)): izračunato C 67,53; H 9,10; nađeno C 67,61; H 9,03.

***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-etil)cikloheksan (143h).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139h** (304,1 mg, 0,47 mmol) prevedena je u 245 mg (79%) **143h** pomoću *n*-PrNH₂ (75,95 μ L, 0,94 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 112-116 °C. $[\alpha]_D^{20} = +45,44$ ($c = 1,01$, CHCl₃). IR (KBr): 3321 sl, 2962 j, 2935 j, 2875 sr, 1738 j, 1655 sr, 1547 sr, 1455 sr, 1378 sr, 1248 j, 1161 sl, 1085 sl, 1031 sr, 965 sl, 938 sl, 905 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,60-5,40 (m, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,30-3,10 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 2,11 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 1,65-1,35 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 1,00-0,80 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂-C(4'')), CH₃CH₂-C(4''), CH₃CH₂CH₂-NH-), H₃C-C(21)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,20; 170,52; 108,55; 108,42; 75,25; 70,63; 47,43; 44,98; 43,20; 41,11; 38,19; 37,59; 34,67; 34,57; 33,52; 31,53; 30,53; 28,56; 28,33; 27,11; 25,60; 22,80; 22,70; 22,00; 21,53; 21,30; 17,52; 12,14; 11,49; 11,27. Mikroanaliza za (C₃₉H₆₃NO₉ (689,94)): izračunato C 67,90; H 9,20; nađeno C 67,77; H 9,18.

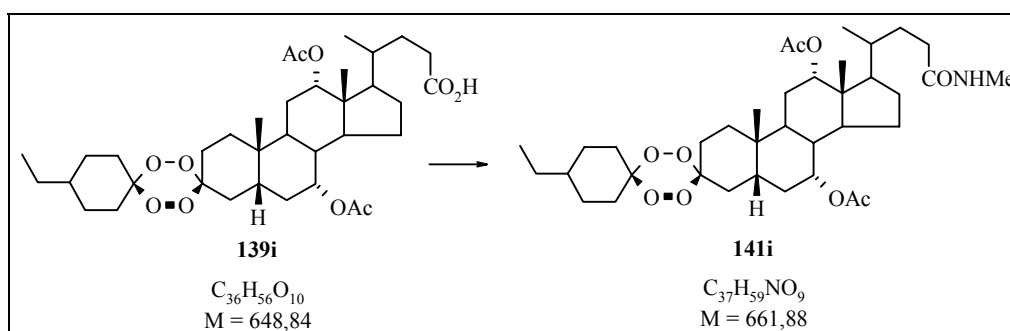
7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*S* ili *R*)-etil)cikloheksan (140i).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139i** (355,6 mg, 0,55mmol) prevedena je u 269 mg (76%) **140i** pomoću suspenzije 10 ekv. NH₄Cl / 10 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 131-134 °C. $[\alpha]_D^{20} = +45,43$ ($c = 1,12$, CHCl₃). IR (KBr): 3457 sr, 3364 sr, 2950 j, 2880 sr, 1743 j, 1683 j, 1455 sr, 1384 j, 1248 j, 1128 sl, 1166 sl,

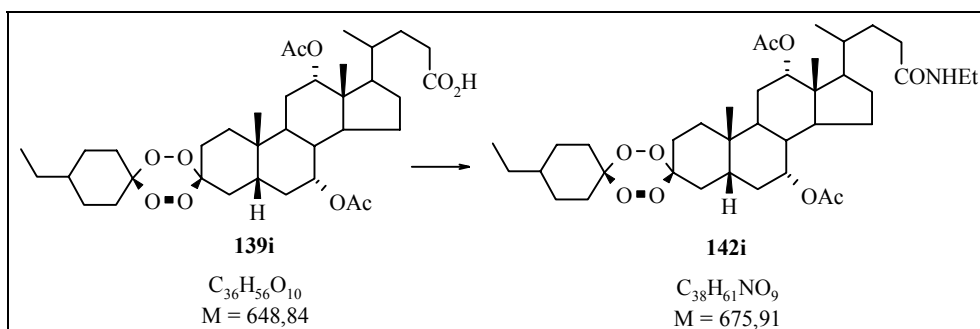
1085 sl, 1057 sr, 1030 sr, 970 sl, 938 sl, 905 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,85-5,40 (m, $\text{H}_2\text{N-C}(24)$), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 0,95-0,80 (m, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 175,97; 170,59; 108,59; 108,42; 75,23; 70,62; 47,37; 44,00; 43,24; 38,28; 37,57; 34,60; 32,63; 31,27; 28,64; 28,35; 27,10; 25,64; 22,68; 22,00; 21,54; 21,35; 17,49; 12,16; 11,50. Mikroanaliza za ($\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{NO}_9$ (647,86)): izračunato C 66,74; H 8,87; nađeno C 66,67; H 8,65.

***N*-Metil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1', 2', 4', 5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-(4''*S* ili *R*)-etilcikloheksan (141i).**



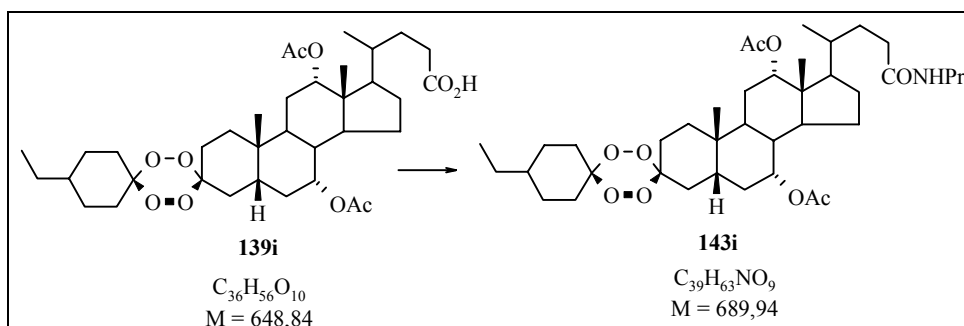
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139i** (315,9 mg, 0,49 mmol) prevedena je u 247 mg (77%) **141i** pomoću suspenzije 6 ekv. MeNH_3Cl / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc . Bezbojna pena, omekšava na 122-125 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +43,78$ ($c = 0,98$, CHCl_3). IR (KBr): 3356 sr, 2962 j, 2935 j, 2876 sr, 1739 j, 1659 sr, 1551 sr, 1454 sr, 1378 j, 1249 j, 1163 sl, 1082 sr, 1044 sr, 969 sl, 932 sl, 909 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,75-5,60 (m, $\text{HN-C}(24)$), 5,08 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(12)), 2,79 (d, $J = 4,80$ Hz, $\text{H}_3\text{C-NH}$), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 1,00-0,79 (m, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 173,95; 170,54; 108,54; 108,38; 75,21; 70,58; 47,38; 44,94; 43,19; 38,24; 37,52; 34,64; 34,55; 33,26; 31,43; 28,59; 28,31; 27,03; 26,16; 25,60; 22,65; 21,96; 21,49; 21,31; 17,46; 12,11; 11,46. Mikroanaliza za ($\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{NO}_9$ (661,88)): izračunato C 67,14; H 8,98; nađeno C 67,06; H 9,20.

***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spiro-1''-((4''*S* ili *R*)-etil)cikloheksan (142h).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139i** (315,5 mg, 0,49 mmol) prevedena je u 248 mg (75%) **142i** pomoću suspenzije 6 ekv. EtNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu 20 mL). Hromatografija na stubu SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava 115-119 °C. $[\alpha]_D^{20} = +42,72$ (c = 1,03, CHCl₃). IR (KBr): 3392 sl, 2956 j, 2934 j, 2875 sr, 1743 j, 1656 sr, 1536 sr, 1460 sr, 1378 sr, 1242 j, 1166 sl, 1085 sl, 1030 sr, 970 sl, 938 sl, 905sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 5,50-5,35 (m, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,91 (šs, H-C(7)), 3,40-3,10 (m, CH₃CH₂-NH-), 2,12 (šs CH₃COO-), 2,08 (šs CH₃COO-), 1,20-1,05 (m, CH₃CH₂-NH-), 1,00-0,75 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂-C(4''), CH₃CH₂-C(4''), H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,07; 170,50; 108,52; 108,36; 75,19; 70,56; 47,36; 44,93; 43,18; 38,22; 37,51; 34,60; 34,53; 34,16; 33,39; 31,42; 28,58; 28,29; 27,03; 25,59; 22,64; 21,94; 21,47; 21,29; 17,46; 14,74; 12,10; 11,44. Mikroanaliza za (C₃₈H₆₁NO₉ x 2/3 H₂O (687,92)): izračunato C 66,35; H 9,13; nađeno C 66,08; H 9,02.

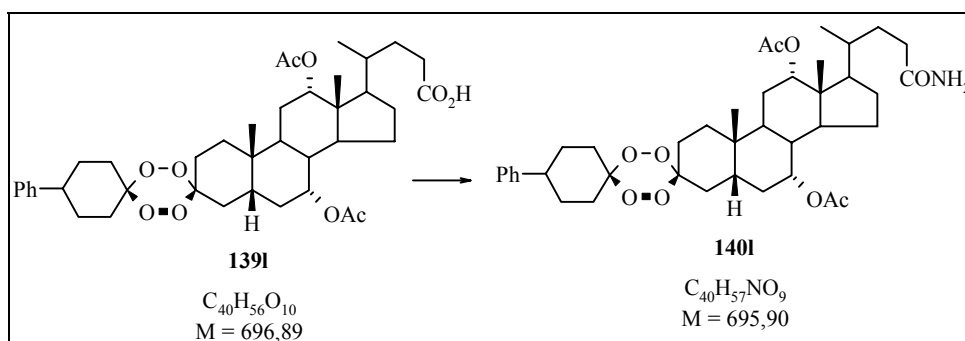
***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spiro-1''-((4''*S* ili *R*)-etil)cikloheksan (143i).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139i** (304,7 mg, 0,47 mmol) prevedena je u 251 mg (77%) **143i** pomoću *n*-PrNH₂ (77,17 μ L, 0,94 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 113-117 °C. $[\alpha]_D^{20} = +44,32$ (c = 1,06, CHCl₃). IR (KBr): 3408 sl,

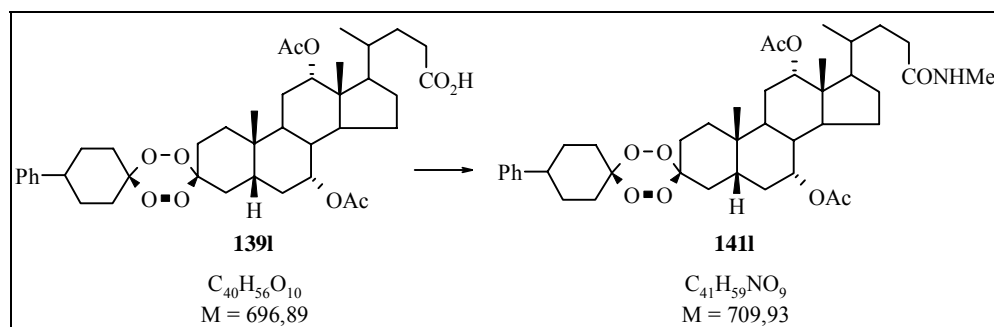
2962 j, 2939 j, 2875 sr, 1743 j, 1661 sr, 1547 sr, 1449 sr, 1378 sr, 1242 j, 1166 sl, 1079 sl, 1031 sr, 970 sl, 938 sl, 905 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 5,60-5,40 (m, $\text{HN-C}(24)$), 5,09 (šs, $\text{H-C}(12)$), 4,91 (šs, $\text{H-C}(7)$), 3,30-3,10 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 1,65-1,35 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$), 1,00-0,80 (m, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-C}(4'')$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$), $\text{H}_3\text{C-C}(21)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 173,20; 170,59; 108,61; 108,45; 75,27; 70,64; 47,45; 45,01; 43,26; 41,12; 38,31; 37,60; 34,67; 34,63; 33,54; 31,55; 28,65; 28,37; 27,12; 25,67; 22,82; 22,71; 22,02; 21,54; 21,37; 17,53; 12,17; 11,51; 11,28. Mikroanaliza za ($\text{C}_{39}\text{H}_{63}\text{NO}_9$ (689,94)): izračunato C 67,90; H 9,20; nađeno C 68,02; H 9,01.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'--(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-fenil)cikloheksan (140I).



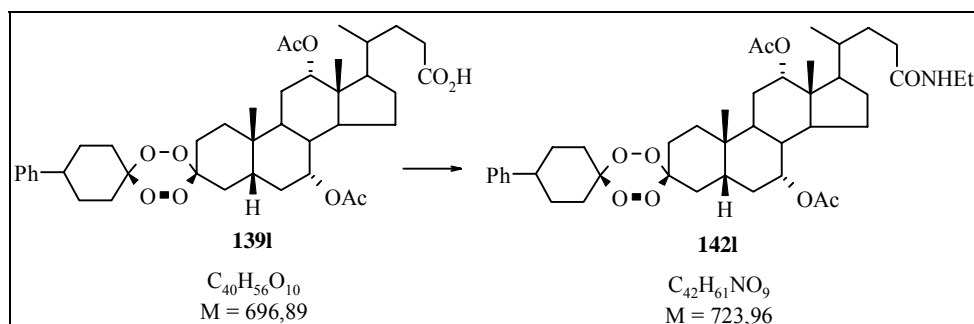
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139I** (263,4 mg, 0,38mmol) preveden je u 209 mg (79%) **140I** pomoću suspenzije 10 ekv. NH_4Cl / 10 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc . Bezbojna pena, omekšava na 142-146 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +35,79$ ($c = 1,08$, CHCl_3). IR (KBr): 3458 sr, 2946 j, 2876 sr, 1739 j, 1675 sr, 1621 sl, 1448 sr, 1378 sr, 1243 j, 1131 sl, 1082 sr, 1034 sr, 969 sl, 937 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 7,40-7,00 (m, $\text{Ph-C}(4'')$), 5,80-5,40 (m, $\text{H}_2\text{N-C}(24)$), 5,10 (šs, $\text{H-C}(12)$), 4,93 (šs, $\text{H-C}(7)$), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,10 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 0,95 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,83 (d, $J = 5,6$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,74 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 175,90; 170,57; 145,72; 128,43; 126,75; 126,28; 108,63; 107,83; 75,24; 70,65; 47,40; 45,01; 43,41; 43,23; 37,60; 34,61; 32,66; 31,29; 29,59; 28,34; 27,14; 25,64; 22,73; 22,04; 21,58; 21,34; 17,53; 12,18. Mikroanaliza za ($\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{NO}_9 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$ (704,91)): izračunato C 68,16; H 8,29; nađeno C 68,09; H 8,22.

***N*-Metil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-fenil)cikloheksan (141I).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139I** (263,7 mg 0,38 mmol) prevedena je u 210 mg (78%) **141I** pomoću suspenzije 6 ekv. MeNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na stubu SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 133-137 °C. $[\alpha]_D^{20} = +28,03$ ($c = 1,09$, CHCl₃). IR (KBr): 3353 sl, 2945 j, 2880 sl, 1738 j, 1656 sr, 1553 sl, 1455 sl, 1378 sr, 1253 j, 1128 sl, 1079 sl, 1030 sr, 965 sl, 943 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,60-5,40 (m, HN-C(24)), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(12)), 2,80 (d, $J = 4,80$ Hz, H₃C-NH), 2,12 (šs, CH₃COO-), 0,95 (s, H₃C-C(10)), 0,82 (d, $J = 5,80$ Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,93; 170,58; 145,71; 128,42; 126,74; 126,26; 108,62; 107,82; 75,25; 70,64; 47,42; 44,98; 43,40; 43,21; 37,59; 34,69; 34,60; 33,35; 31,47; 30,54; 29,55; 28,34; 27,12; 26,25; 25,62; 22,72; 22,04; 21,58; 21,33; 17,52; 12,17. Mikroanaliza za (C₄₁H₅₉NO₉ x 0,5 H₂O (718,94)): izračunato C 68,50; H 8,41; nađeno C 68,84; H 8,71.

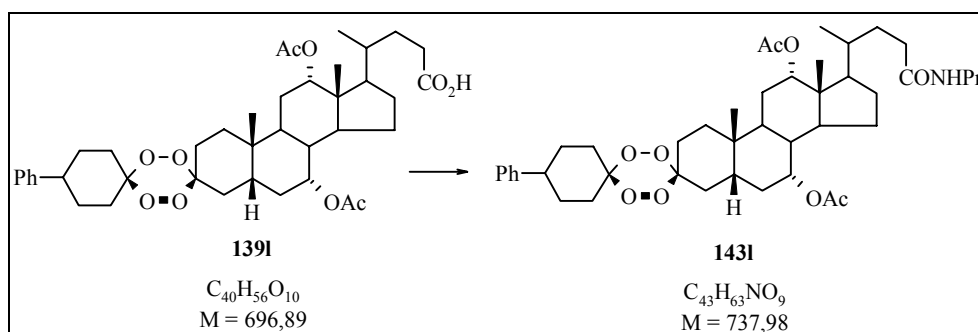
***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-fenil)cikloheksan (142I).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139I** (261,3 mg, 0,37 mmol) preveden je u 216 mg (80%) **142I** pomoću suspenzije 6 ekv. EtNH₃Cl / 6 ekv. Et₃N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 128-131 °C. $[\alpha]_D^{20} = +34,36$ ($c = 1,04$, CHCl₃). IR (KBr): 3326 sl, 2951 sr, 2880 sr, 1738 j, 1656 sr, 1547 sl, 1455 sr, 1379 sr, 1248 j, 1128

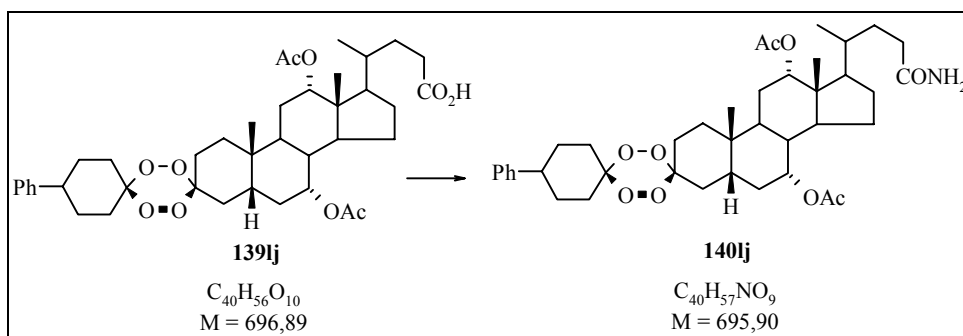
sl, 1085 sl, 1030 sr, 965 sl, 938 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,60-5,40 (m, HN-C(24)), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,40-3,10 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH-}$), 2,12 (šs $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,09 (šs $\text{CH}_3\text{COO-}$), 1,13 (t, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH-}$), 0,95 (s, $\text{H}_3\text{C-C(10)}$), 0,82 (d, $J = 6$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C(20)}$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C(13)}$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 173,11; 170,58; 145,72; 128,42; 126,74; 126,28; 108,63; 107,82; 75,25; 70,63; 47,42; 44,98; 43,40; 43,22; 37,58; 34,67; 34,60; 34,25; 33,49; 31,48; 30,53; 29,43; 28,34; 27,12; 25,61; 22,71; 22,04; 21,56; 21,33; 17,54; 14,83; 12,16. Mikroanaliza za ($\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{NO}_9 \times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ (732,96)): izračunato C 68,83; H 8,53; nađeno C 68,81; H 8,57.

***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*R* ili *S*)-fenil)cikloheksan (143I).**



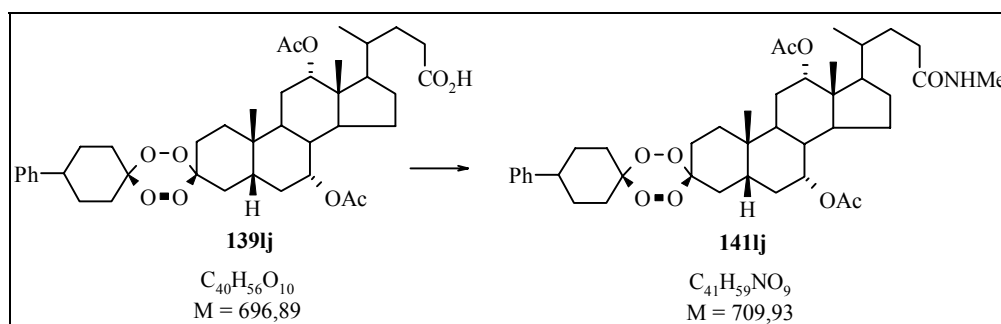
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139I** (259,2 mg, 0,37 mmol) prevedena je u 210 mg (76%) **143I** pomoću *n*-PrNH₂ (60,24 μL , 0,74 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 125-127 °C. $[\alpha]_D^{20} = +32,25$ ($c = 1,10$, CHCl_3). IR (KBr): 3413 sl, 3326 sl, 2945 j, 2875 sr, 1738 j, 1656 sr, 1547 sl, 1455 sr, 1378 sr, 1248 j, 1128 sl, 1078 sr, 1030 sr, 965 sl, 943 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,60-5,40 (m, HN-C(24)), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,93 (šs, H-C(7)), 3,40-3,10 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$), 2,12 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 1,70-1,20 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$), 1,00-0,80 (m, $\text{H}_3\text{C-C(10)}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$), 0,82 (d, $J = 6,0$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C(21)}$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C(13)}$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 173,21; 170,59; 145,73; 128,43; 126,76; 126,28; 108,64; 107,83; 75,27; 70,65; 47,45; 44,99; 43,41; 43,23; 41,13; 37,59; 34,61; 33,55; 31,54; 29,55; 28,34; 27,13; 25,62; 22,83; 22,04; 21,57; 21,34; 17,54; 12,17; 11,30. Mikroanaliza za ($\text{C}_{43}\text{H}_{63}\text{NO}_9 \times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ (746,99)): izračunato C 69,14; H 8,64; nađeno C 68,94; H 8,85.

7 α ,12 α -Diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S ili R)-fenil)cikloheksan (140lj).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139lj** (273,5 mg, 0,39mmol) prevedena je u 236 mg (86%) **140lj** pomoću suspenzije 10 ekv. NH_4Cl / 10 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 141-144 °C. $[\alpha]_D^{20} = +41,37$ ($c = 1,02$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3463 sl, 3356 sl, 2952 sr, 2876 sr, 1739 j, 1675 sr, 1621 sl, 1448 sr, 1384 sr, 1249 j, 1131 sl, 1061 sl, 1028 sr, 969 sl, 942 sl cm^{-1} . 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,70-5,30 (m, H_2N -C(24)), 5,13 (šs, H-C(12)), 4,95 (šs, H-C(7)), 2,16 (šs, CH_3COO^-), 2,12 (šs, CH_3COO^-), 0,99 (s, H_3C -C(10)), 0,86 (d, $J = 5,8$ Hz, H_3C -C(20)), 0,77 (s, H_3C -C(13)). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): 175,83; 170,63; 145,74; 128,43; 126,80; 126,29; 108,66; 107,89; 75,28; 70,66; 47,43; 45,06; 43,56; 43,30; 37,63; 34,67; 32,70; 31,31; 29,56; 28,42; 27,15; 25,71; 22,75; 22,06; 21,59; 21,43; 17,55; 12,21. Mikroanaliza za ($C_{40}H_{57}NO_9 \times 0,5 H_2O$ (704,91)): izračunato C 68,16; H 8,29; nađeno C 68,27; H 8,57.

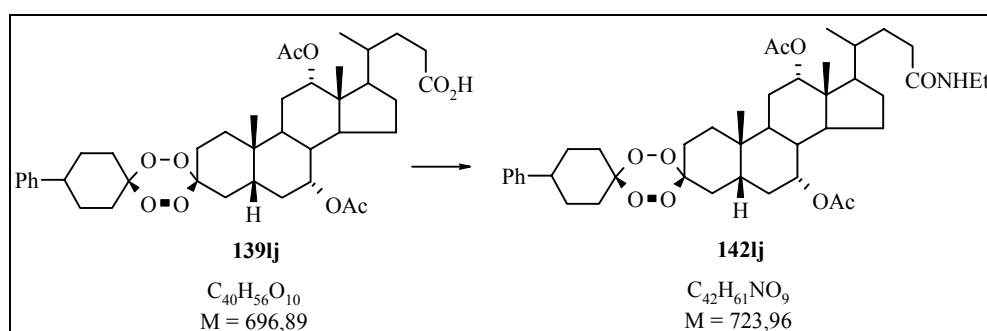
N-Metil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''S ili R)-fenil)cikloheksan (141lj).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139lj** (256,7 mg, 0,37 mmol) prevedena je u 217 mg (83%) **141lj** pomoću suspenzije 6 ekv. $MeNH_3Cl$ / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc. Bezbojna pena, omekšava na 137-140 °C. $[\alpha]_D^{20} = +47,15$ ($c = 0,90$, $CHCl_3$). IR (KBr): 3402 sl, 3343 sl, 2945 j, 2875 sr, 1738 j, 1661 sr, 1553 sl, 1449 sr, 1378 sr, 1248 j, 1169 sl,

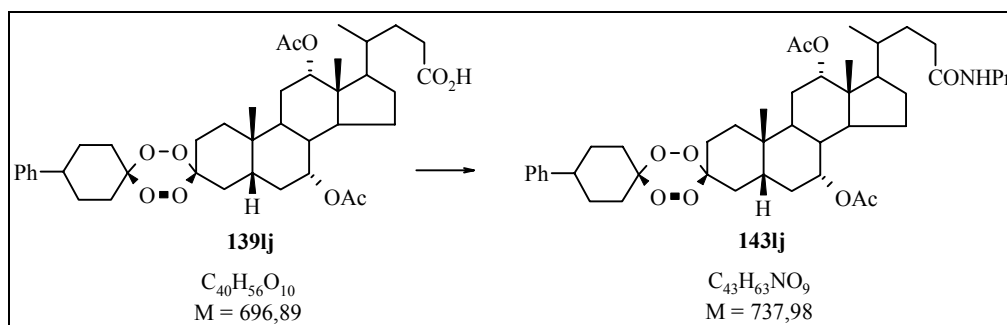
1128 sl, 1063 sr, 1030 sr, 970 sl, 938 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,60-5,30 (m, HN-C(24)), 5,09 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(12)), 2,80 (d, $J = 5,0$ Hz, $\text{H}_3\text{C-NH}$), 2,13 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,08 (šs, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 0,96 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,81 (d, $J = 6,0$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 173,90; 170,63; 145,74; 128,43; 126,79; 126,28; 108,67; 107,88; 75,29; 70,65; 47,47; 45,04; 43,56; 43,29; 37,63; 34,67; 33,39; 31,50; 30,58; 29,60; 28,42; 27,13; 26,27; 25,70; 22,75; 22,06; 21,59; 21,41; 17,55; 12,21. Mikroanaliza za ($\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{NO}_9 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$ (718,94)): izračunato C 68,50; H 8,41; nađeno C 68,69; H 8,30.

***N*-Etil-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-
-spiro-1''-(4''*S* ili *R*)-fenil)cikloheksan (**142lj**).**



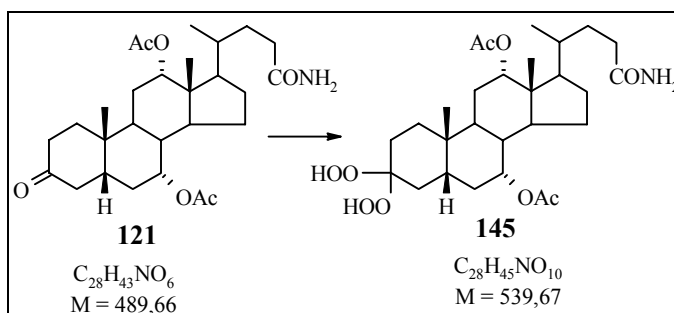
Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139lj** (256,5 mg, 0,37 mmol) prevedena je u 224 mg (84%) **142lj** pomoću suspenzije 6 ekv. EtNH_3Cl / 6 ekv. Et_3N u suvom dihlormetanu (20 mL). Hromatografija na SiO_2 : Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 129-132 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +46,12$ ($c = 0,97$, CHCl_3). IR (KBr): 3440 sr, 2951 j, 2880 sr, 1738 j, 1655 sr, 1547 sl, 1449 sr, 1378 sr, 1248 j, 1128 sl, 1063 sl, 1030 sr, 970 sl, 943 sl cm^{-1} . ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,60-5,40 (m, HN-C(24)), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,40-3,10 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH-}$), 2,13 (šs $\text{CH}_3\text{COO-}$), 2,09 (šs $\text{CH}_3\text{COO-}$), 1,30-1,10 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH-}$), 0,96 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(10)$), 0,82 (d, $J = 5,8$ Hz, $\text{H}_3\text{C-C}(20)$), 0,73 (s, $\text{H}_3\text{C-C}(13)$). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 173,15; 170,60; 170,40; 145,69; 128,39; 126,76; 126,25; 108,62; 107,84; 75,26; 70,62; 47,42; 45,00; 43,51; 43,26; 37,58; 34,63; 34,24; 33,49; 31,48; 30,53; 29,48; 28,38; 27,11; 25,67; 22,70; 22,03; 21,54; 21,38; 17,53; 14,82; 12,17. Mikroanaliza za ($\text{C}_{42}\text{H}_{61}\text{NO}_9 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$ (732,96)): izračunato C 68,83; H 8,53; nađeno C 68,70; H 8,89.

***N*-(*n*-Propil)-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid-3-spiro-6'-(1',2',4',5'-tetraoksacikloheksan)-3'-spiro-1''-((4''*S* ili *R*)-fenil)cikloheksan (**143lj**).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje amida **121** pomoću mešovitog anhidrida, kiselina **139lj** (258,1 mg, 0,37 mmol) prevedena je u 214 mg (78%) **143lj** pomoću *n*-PrNH₂ (59,92 μ L, 0,74 mmol). Hromatografija na SiO₂: Lobar B, LichroPrep Si 60, eluent EtOAc / heptan = 95 / 5. Bezbojna pena, omekšava na 127-131 °C. $[\alpha]_D^{20} = +45,23$ ($c = 1,07$, CHCl₃). IR (KBr): 3402 sl, 3321 sl, 2945 j, 2880 sr, 1738 j, 1656 sr, 1547 sl, 1449 sr, 1378 sr, 1248 j, 1128 sl, 1063 sl, 1030 sr, 970 sl, 938 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 7,40-7,10 (m, Ph-C(4'')), 5,50-5,30 (m, HN-C(24)), 5,10 (šs, H-C(12)), 4,92 (šs, H-C(7)), 3,40-3,10 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 2,13 (šs, CH₃COO-), 2,08 (šs, CH₃COO-), 1,70-1,30 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 1,00-0,80 (m, H₃C-C(10), CH₃CH₂CH₂-NH-), 0,82 (d, $J = 6,0$ Hz, H₃C-C(21)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 173,21; 170,62; 145,73; 128,42; 126,78; 126,28; 108,65; 107,87; 75,29; 70,64; 47,47; 45,03; 43,55; 43,28; 41,13; 37,61; 34,66; 33,58; 31,56; 29,53; 28,41; 27,13; 25,70; 22,85; 22,05; 21,57; 21,41; 17,55; 12,20; 11,30. Mikroanaliza za (C₄₃H₆₃NO₉ (737,98)): izračunato C 69,99; H 8,60; nađeno C 70,03; H 8,88.

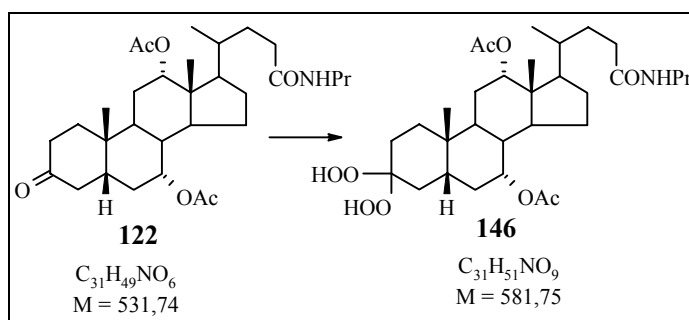
3,3-dihidroperoksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid (145**).**



Prema postupku koji je opisan za dobijanje *gem*-dihidroperoksida **137**, keton **121** (484,8 mg, 0,99 mmol) preveden je u **145** pomoću 30% H₂O₂ (1,03 mL). Proizvod je izolovan u smeši sa ketonom **121**. IR (KBr): 3447 j, 2952 sr, 2882 sl, 1729 j, 1664 j, 1615 sl, 1448 sr, 1383 j, 1255 j, 1125 sl, 1082 sl, 1028 sr, 964 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): *dati su samo signali koji pripadaju 145*, 6,02 (šs, H₂N-C(24), izmenljiv sa D₂O), 5,91 (šs, H₂N-C(24), izmenljiv sa D₂O), 5,09 (šs, H-C(12)),

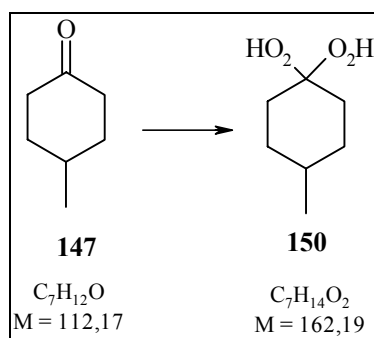
4,89 (šs, H-C(7)), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 0,95 (s, H₃C-C(10)), 0,79 (d, $J = 6,0$ Hz, H₃C-C(20)), 0,73 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 177,05; 170,92; 170,83; 170,64; 110,05; 70,86; 70,58; 53,34; 47,32; 44,99; 43,22; 43,12; 42,02; 38,19; 37,56; 36,48; 34,59; 34,49; 34,27; 32,52; 32,11; 31,23; 30,60; 29,71; 28,47; 27,02; 25,62; 24,28; 22,65; 22,02; 21,45; 21,33; 21,19; 17,40; 12,08.

N-(*n*-Propil)-3,3-dihidroperoksi-7 α ,12 α -diacetoksi-5 β -holanamid (146).



Prema postupku koji je opisan za dobijanje *gem*-dihidroperoksida **137**, keton **122** (526,4 mg, 0,99 mmol) preveden je u **146** pomoću 30% H₂O₂ (1,03 mL). Proizvod je izolovan u smeši sa ketonom **122**. IR (KBr): 3377 j, 2957 sr, 2882 sl, 1739 j, 1637 sr, 1556 sl, 1448 sl, 1382 sr, 1255 j, 1131 sl, 1082 sl, 1028 sr, 964 sl cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): *dati su samo signali koji pripadaju 146*, 10,56 (šs, HOO-C(3)), 5,90-5,70 (m, H₂N-C(24)) 5,08 (šs, H-C(12)), 4,89 (šs, H-C(7)), 3,30-3,10 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 2,14 (šs, CH₃COO-), 2,09 (šs, CH₃COO-), 1,70-1,30 (m, CH₃CH₂CH₂-NH-), 1,00-0,8 (m, H₃C-C(10) i CH₃CH₂CH₂-NH-), 0,80 (d, $J = 5,4$ Hz, H₃C-C(20)), 0,72 (s, H₃C-C(13)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 175,30; 170,92; 170,78; 110,08; 75,38; 70,81; 47,37; 45,04; 43,30; 41,65; 38,25; 37,60; 34,74; 34,60; 33,65; 32,20; 31,44; 30,69; 28,54; 27,11; 25,74; 24,43; 22,72; 22,49; 22,10; 21,65; 21,55; 17,49; 12,19; 11,25. ESI-MS (m/z , (%)): 620,29 ([M+K]⁺, 6), 604,32 ([M+Na]⁺, 56), 582,33 ([M+H]⁺, 38), 554,32 (22), 522,31 (9), 428,30 (31), 410,29 (16), 385,24 (100), 284,32 (34), 233,62 (6).

1,1-Dihidroperoksi-4-metil-cikloheksan (150).



Prema postupku za dobijanje *gem*-dihidroperoksida **137**, keton **147** (1,21 mL, 9,9 mmol) preveden je u **150** pomoću 30% H₂O₂ (20,6 mL). Proizvod je izolovan u smeši sa polaznim ketonom (7,5%, kvantitativni IR). IR (film): 3420 j, 2935 j, 2865 j, 1712 sr, 1637 sl, 1554 sr, 1378 sr, 1357 sr, 1265 sr, 1200 sl, 1158 sr, 1104 sr, 1050 sr, 1017 sr, 980 sr, 910 sr, 861 sr cm⁻¹. IR (CCl₄): 3431 sr, 2957 j, 2930 j, 2865 sr, 1712 sl, 1551 j, 1454 sr, 1384 sr, 1357 sr, 1255 j, 1222 j, 1162 sl, 1103 sr, 1071 sr, 1012 j, 980 j cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): *dati su samo signali koji pripadaju 148*, 9,40-9,00 (m, HOO-C(1)), 2,30-2,00 (m), 1,70-1,30 (m), 1,30-1,10 (m), 0,93 (d, *J* = 6,2 Hz, H₃C-C(4)). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 110,73; 40,83; 31,59; 30,58; 29,03; 21,38.

Određivanje antimalarijske aktivnosti

Ispitivanja *in vitro* antimalarijske aktivnosti vršena su u Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) Washington DC, USA, prema proceduri koju je opisao Desjardins sa saradnicima,⁸⁸ sa modifikacijama koje su razvili Milhous i saradnici.⁸⁹

Ispitivanje aktivnosti zasniva se na određivanju potrošnje ³H-hipoksantina od strane parazita i inhibicija ugradnje izotopa se pripisuje aktivnosti kontrolne ili ispitivane supstance. Ugradnja hipoksantina je mera sinteze DNK parazita tako da inhibicija njegove ugradnje predstavlja inhibiciju rasta parazita. Kao kontrolne supstance uzimani su provereni antimalarici. Inkubacioni period je trajao 66 sati, a polazna parazitemija iznosi 0,2% sa 1% hematokrita. Za razvijanje kulture korišćena je RPMI-1640 hranljiva podloga koja ne sadrži folate i PABA, sa humanom plazmom koja je 10% dezaktivirana pri normalnoj temperaturi. Za kvantitativno *in vitro* određivanje efikasnosti ispitivanih supstanci korišćeni su dobro okarakterisani *P. falciparum* sojevi W2 i D6.⁹⁰ Korišćen je klon W2 Indochina I soja koji je rezistentan prema hlorokinu i pirimetaminu, a osetljiv prema meflokinu. Takođe, korišćen je klon D6 Sierra I/UNC soja koji je osetljiv prema hlorokinu i pirimetaminu, a pokazuje smanjenu osetljivost prema meflokinu i halofantrinu. Ispitivane supstance su direktno rastvarane u DMSO i rastvor je razblaživan 400 puta, zajedno sa hranljivom podlogom. Rastvori supstanci su potom 11 puta dvostruko razblaživani do koncentracije koja je 1048 puta manja od polazne. Razblaživanja su vršena automatski Biomek 1000 ili 2000 Liquid Handling System instrumentom u mikrolitarskim posudama sa 96 oglednih mesta. Razblaženi rastvori (25 µL) ispitivanih supstanci su prebacivani u ogledne posude, dodavani su rastvori zaraženih eritrocita (po 200 µL; 0,2% parazitemija i 1% hematokrita) i smeše su inkubirane na 37 °C pod kontrolisanom atmosferom (5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂). Nakon 42 sata dodavano je 25 µL ³H-hipoksantina i posude su inkubirane dodatnih 24 sata. Nakon inkubacionog perioda od 66 sati posude su zamrzavane na -70 °C da se izvrši razgradnja eritrocita. Nakon odmrzavanja i sakupljanja preko filtera od sinterovanog stakla prebrojavanje uzoraka je vršeno scintilatornim brojačem, a rezultati su automatizovano prikupljeni softverom razvijenim u WRAIR-u. Za svaku supstancu određivan je

koncentracioni profil odgovora i njihove antimalarijske aktivnosti su prikazane kao 50% inhibitorne koncentracije (IC_{50}). Dobijene vrednosti IC_{50} predstavljaju koncentraciju supstance koja izaziva 50% inhibicije ugradnje hipoksantina.

Određivanje antiproliferativne aktivnosti i citotoksičnosti

Ispitivanja *in vitro* antiproliferativne i citotoksične aktivnosti vršena su u Onkološkom institutu u Beogradu, prema modifikacijama MTT testa koja su razvili Ohno i Abe⁹¹, a prethodno opisao Mossman.⁹²

Materijali i metode. Rastvor ispitivane supstance je pripreman u DMSO do koncentracije 8 mM, i potom razblaživan hranljivom podlogom [RPMI-1640 sa L-glutaminom (3 mM), streptomycinom (100 μ g / mL) i pencilinom (100 IU / mL), dezaktiviran 10% toplotom, FBS i 25 mM HEPES, na pH 7,2 (bikarbonatni pufer)] do različitih koncentracija. MTT je rastvoren do koncentracije 5 mg / mL u fosfatnom puferu pH 7,2 i pre korišćenja profiltriran kroz Millipor filter (0,22 μ m). RPMI 1640 i FBS su nabavljeni od Sigma chemicals.

Ćelijske kulture. Humane maligne Fem-x ćelije melanoma, HeLa ćelije karcinoma grlića materice i ćelije mijeloidne leukemije K562 rasle su u suspenziji u navedenoj hranljivoj podlozi. Ćelije su rasle na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂.

Tretman Fem-x i HeLa ćelija. Ciljne ćelije su posejane u triplicatu, (2000 ćelija po probi) u mikrolitarskim posudama sa 96 oglednih mesta i nakon 24 sata ispitivana jedinjenja su dodavana u pet različitih koncentracija. U kontrolnu posudu sa ćelijama je dodavan hranljivi medijum kao rastvor DMSO, odgovarajuće koncentracije, ali bez ispitivanih supstanci. Sve analize su rađene u triplicatu. Hranljivi medijum, sa rastvorima supstanci odgovarajuće koncentracije, ali bez ćelija, korišćen je kao slepa proba, takođe u triplicatu. K562 ćelijama ispitivani agensi dodavani su 2 sata nakon zasejanja.

Određivanje preživelih HeLa, Fem-x i K562 ćelija. Preživele ćelije su određivane MTT testom 72 sata nakon dodavanja supstanci, onako kako je opisano u literaturi.⁹³ Ukratko, 20 μ l rastvora MTT (5 mg / ml PBS) je dodavano u svaku eksperimentalnu posudu. Uzorci su inkubirani naredna 4 sata na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Potom, 100 μ L 10% SDS u 0,01 M HCl je dodavano u posude. Narednog dana je merena optička gustina (OD) na 570 nm. Procenat preživelih ćelija dobijen je deljenjem vrednosti optičke gustine uzorka ćelija sa ispitivanim supstancama (OD) sa kontrolnom optičkom gustinom (OD_C) i količnik je množen sa 100. Vrednost OD uzoraka ćelija sa ispitivanim supstancama dobijana je iz razlike stvarne vrednosti OD uzorka i vrednosti OD slepe probe. Dobijeni rezultati su prikazani kao IC_{50} vrednosti koje su definisane kao koncentracije pri kojima je inhibirano preživljavanje 50% ispitivanih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak.

Priprema mononuklearnih ćelija krvi (PBMC). PBMC su razdvojene iz pune krvi sa heparinom i dobijene su od tri zdrava dobrovoljna davaoca gradijentnim centrifugiranjem (Lymphoprep™; Oslo, Norveška). Ćelije su tri puta oprane hranljivim medijumom, prebrojane i ponovo suspendovane u hranljivom medijumu. Potom je 100 000 PBMC posejano u 100 μ L hranljivog medijuma sa ili bez fitohemaglutina (PHA) i nakon 2 sata dodavano je 50 μ L rastvora ispitivanih supstanci, različitih koncentracija. U kontrolnom uzorku u kulturi PBMC dodavan je samo hranljivi medijum. Konačna koncentracija PHA u hranljivom medijumu je bila 5 μ g /mL. Određivanje preživelih PBMC i IC₅₀ je vršeno na isti način kao i u slučaju HeLa i Fem-X ćelija.

Probno testiranje prema tri ćelijske linije: Testiranje je vršeno u National Cancer Institute (NCI-NIH) Bethesda, USA, u okviru DTP (Developmental Therapeutics Program). Ćelije se smeštaju u posude sa 96 ogleđnih mesta gde stoje 24 sata da bi se zatim obojile sulforodamin B (SRB), da bi se odredilo t₀ proteinske mase. Ispitivana jedinjenja se testiraju prema tri ćelijske linije raka NCI-H460 (rak pluća), MCF7 (rak dojke) i SF-268 (rak CNS-a) pri koncentraciji 100 μ M. Nakon 48 sati izlaganja dejstvu ispitivanih supstanci, svih 96 ogleđnih posuda se boji sa SRB, da bi se kvantitativno odredio procenat rasta testiranih i kontrolnih uzoraka. Dva uzorka se pripremaju i procenjuju za svaku ćelijsku liniju. Procenat rasta za svaki uzorak određuje se poređenjem optičke gustine (OD) dva merenja ispitivanog uzorka i srednje vrednosti OD kontrolnog merenja. Jedinjenje koje pokaže aktivnost koja dozvoljava maksimalano 32% rasta bar jedne ćelijske linije raka, biva odabrano za dalje testiranje na panel od 60 ćelijskih linija.

Testiranje prema panelu od 60 ćelijskih linija (NCI-NIH, Bethesda, USA): Ovo ispitivanje se zaniva na proceduri koja je opisana za probno testiranje prema tri ćelijske linije. Koncentracije ispitivanih supstanci su u rasponu 0,01 μ M do 100 μ M i to (0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M i 100 μ M) i ispitivanje se vrši prema 60 ćelijskih linija tumora čoveka. Dobijeni rezultati se prikazuju kao GI₅₀, TGI i LC₅₀ vrednosti.

Stereoelektronska izračunavanja

Stereoelektronski proračuni su rađeni u Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) Washington DC, USA. Izračunavanja na semi-empirijskom nivou (AM1) su rađena programom SPARTAN verzija 5.0, na Silicon Graphics radnoj stanici. Iznalaženje optimalne konformacije svakog od ispitivanih molekula vršeno je višestrukom rotacijom oko prostih veza u molekulima, i na taj način je generisano nekoliko konformera niske energije sa različitim rasporedom gustine. Identifikovani su konformeri sa najmanjim sadržajem energije. Geometrije konformera su optimizovane i na osnovu njih izračunate su stereoelektronske karakteristike ispitivanih jedinjenja. Optimizacija i proračuni vršeni su za jedinjenja u gasnoj fazi pomoću AM1 semi-empirijske kvantno-hemijske metode koja je ugrađena u SPARTAN programski paket. Strukture ispitivanih

tetraoksana koje su optimizovane AM1 metodom uvežene su u program CATALYST i izvršena je optimizacija do najbližeg lokalnog minimuma pomoću molekulske mehanike zasnovane na CHARMM polju sila. Algoritam programa CATALYST omogućava iznalaženje najbolje konformacije generisanjem 250 konformera svakog molekula u energetskom opsegu 0 – 25 kcal / mol iznad globalnog minimuma energije konformacije. Tako dobijeni konformacioni modeli trebalo bi da olakšaju pronalaženje najboljeg prostornog rasporeda funkcionalnih grupa i korišćeni su za generisanje hipoteze. Postoje dve glavne metode za generisanje hipoteze programom CATALYST. Prva je interaktivno građenje hipoteze jednom od nekoliko procedura koje su na raspolaganju i zasnovaju se na važnosti funkcionalnih grupa i fragmenata ispitivanog molekula. Drugom metodom hipoteza se automatski generiše na osnovu struktura najznačajnijih jedinjenja kojima su određene biološke aktivnosti, prema istoj vrsti (u slučaju malarije potrebno je da su poznate vrednosti aktivnosti prema istom soju parazita – recimo prema D6 ili prema W2). U ovom ispitivanju korišćene su obe metode. Statistička važnost hipoteza koje su generisane na različite načine određena je na osnovu vrednosti u odnosu na nultu hipotezu i korelacionih koeficijenata. Hipoteza je potom korišćena za izračunavanje aktivnosti probnog seta jedinjenja.

5. ZAKLJUČAK

U toku izrade ove doktorske disertacije sintetisani su tetraoksani derivata holne kiseline i ispitana je njihova antimalarijska, citotoksična i antiproliferativna aktivnost. U toku rada dobijeni su sledeći rezultati:

1. Razvijena su dva postupka za sintezu *bis*-steroidnih tetraoksana: 1) direktna peroksiacetalizacija odgovarajućih 3-keto derivata holne kiseline, 2) derivatizacija prethodno dobijenih *bis*-steroidnih tetraoksana. Primenom oba postupka sintetisano je 14 *bis*-steroidnih tetraoksana derivata holne kiseline, **123-136**. Prema prvom postupku sintetisani su *bis*-steroidni tetraoksani **123 - 128**. Proizvodi **123** i **124** dobijeni su reakcijom ketona **119** sa 30% H₂O₂ / 50% H₂SO₄, u prinosu od 25% i 28%, a proizvodi **125 - 128** u reakcijama ketona **121** i **122** sa (Me₃Si)₂O₂ / TMSOTf, na 0 °C u prinosu 28 – 50% (Shema 24). Utvrđeno je da u reakcijama ketona **119** sa (Me₃Si)₂O₂ / TMSOTf i **121** i **122** sa 30% H₂O₂ i 50% H₂SO₄ dominantno nastaju proizvodi Baeyer – Villiger-ove reakcije. Prema drugom postupku sintetisani su tetraoksani **127– 136**. Karboksilne kiseline **129** i **130** dobijene su selektivnom hidrolizom C(24) metil-estarskih grupa tetraoksana **123** i **124** na dva načina: a) hidrolizom 1,25 M rastvorom NaOH u smeši CH₂Cl₂ / MeOH na sobnoj temperaturi u toku 3 dana (72 – 79%); b) hidrolizom pomoću NaOH u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v) na temperaturi ključanja u toku 15 min. (90 – 95%, Shema 24). Kiseline **129** i **130** prevedene su preko mešovitog anhidrida u amide **131 – 136** (54 – 81%) kao i prethodno sintetisane amide **127** i **128** (Shema 25). Izolovana su oba predviđena diastereomera a na osnovu spektralnih podataka i analize monokristala derivata **123** X-zracima, pripisana je struktura sintetisanim derivatima: *cis*-C(2)C(2a) seriji pripadaju derivati **123**, **125**, **127**, **129**, **131**, **133** i **135**, a *trans*-C(2)C(2a) seriji pripadaju derivati **124**, **126**, **128**, **130**, **132**, **134** i **136**.
2. Razvijen je postupak za sintezu *gem*-dihidroperoksida derivata holne kiseline (**137**, **145** i **146**, Shema 29) koji uspešno može da se primeni i za dobijanje *gem*-dihidroperoksida jednostavnih cikličnih ketona (**149**, **150** i **76**, Shema 30). *Gem*-dihidroperoksidi su sintetisani reakcijom odgovarajućeg ketona i 30% H₂O₂ u smeši CH₂Cl₂ / CH₃CN (1:3, v/v) u prisustvu katalitičkih količina konc. HCl u visokom prinosu (> 90%). Postupak razvijen u toku ovog rada je jednostavniji, ekonomičniji i bitno poboljšan u odnosu na postupke do sada opisane u literaturi (ref. 45, 47, Shema 13).
3. Sintetisana su 53 mešovita tetraoksana derivata holne kiseline, **138 – 144b**. Metil-estri **138** dobijeni su kuplovanjem *gem*-dihidroperoksida **137** sa jednostavnim, supstituisanim i nesupstituisanim, cikličnim ketonima (~ 30%, Shema 27). Reakcija se vrši u dihlormetanu, u prisustvu katalitičkih količina H₂SO₄. Reakcijom ciklopentanona, cikloheksanona i ciklooktanona dobijen je i izolovan po jedan proizvod, a svaki od prohiralnih 4-metil-, 4-etil-, 4-

t-butil- i 4-fenil-cikloheksanona daju oba očekivana diastereoizomera. Reakcijama 2,6-dimetil-, 2-metil-cikloheksanona i mentona proizvodi su izolovani u obliku odgovarajućih smeša. Reakcija *gem*-dihidroperoksida **137** sa aromatičnim karbonilnim jedinjenjima - 2-furil-metil- keton, 4-nitroacetofenon, 6-metoksitetralon-1-on i *p*-metoksibenzaldehid - nije dala očekivane proizvode. Selektivnom hidrolizom C(24) metil-estarske grupe tetraoksana **138** sa NaOH u smeši *i*-PrOH / H₂O (3:1, v/v) na temperaturi ključanja dobijene su odgovarajuće karboksilne kiseline **139** (72 – 93%), koje su preko mešovitog anhidrida prevedene u odgovarajuće amide **140 – 144b** (~ 80%, Shema 28). Na osnovu spektralnih podataka i analize monokristala kiseline **139g** X-zracima određena je konfiguracija C(4'') atoma 4''-metil derivata. Utvrđeno je da derivati **138f**, **139f** i **140f – 143f** pripadaju (4''*R*) seriji, a da derivati **138g**, **139g** i **140g – 143g** pripadaju (4''*S*) seriji. Postupak razvijen u toku ovog rada je jednostavniji i ekonomičniji u odnosu, na do sada, jedini u literaturi opisan postupak sinteze mešovitih tetraoksana (ref. 65, Shema 22).

4. Svim sintetisanim tetraoksanima derivata holne kiseline određena je *in vitro* antimalarijska aktivnost prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2. Utvrđeno je da prisustvo derivata holne kiseline kao osnovnih nosioca tetraoksanske strukture značajno doprinosi porastu antimalarijske aktivnosti, u poređenju sa jednostavnim tetraoksanima kao što je **91**. Zamenom jednog steroidnog dela molekula *bis*-steroidnih tetraoksana manjim spirocikloalkilidenskim fragmentom dodatno raste antimalarijska aktivnost. Pretpostavlja se da, barem jednim delom, to jeste posledice amfifilične strukture holne kiseline koja obezbeđuje olakšan prolaz ovih derivata kroz ćelijske membrane. Kod *bis*-steroidnih tetraoksana nije utvrđen dominirajući uticaj *cis*-C(2)C(2a) ili *trans*-C(2)C(2a) geometrije na aktivnost. Nasuprot tome, kod mešovitih tetraoksana, utvrđeno je da su derivati (4''*R*)-metil serije uvek aktivniji od odgovarajućih iz (4''*S*)-metil serije. Isto tako, kod mešovitih tetraoksana derivata holne kiseline utvrđeno je da na antimalarijsku aktivnost najpovoljnije utiče supstitucija na C(4'')-atomu. Utvrđeno je da je kod obe grupe derivata, *bis*-steroidnih i mešovitih tetraoksana, za izraženu antimalarijsku aktivnost neophodno prisustvo bar jednog H-atoma u C(24) amidnoj grupi. Značajan doprinos antimalarijskoj aktivnosti, kod obe grupe tetraoksana, ima supstitucija na C(24) i aktivnost se menja u nizu CONH₂ > CONHR₁ > CO₂Me > CO₂H > CONR₁R₂. Izuzetak od ovog pravila predstavljaju kiseline (4''*R*)-metil **139f**, 4''-Et **139i** i 4''-Ph **139l** koje su aktivnije od odgovarajućih metil-estara. *13 Mešovitih tetraoksana pokazuje veću antimalarijsku aktivnost od artemizinina: 138f, 138h, 139f, 139h, 140f – 143f, 141h, 143h, 142l (Tabele 21 i 22)*. Od svih tetraoksana derivata holne kiseline, najveću antimalarijsku aktivnost pokazuje (4''*R*)-metil primarni amid **140f** (D6 IC₅₀ = 1,49 nM, W2 IC₅₀ = 0,58 nM) koji je je 14 puta aktivniji od

artemizinina (1), 6 puta aktivniji od artelinske kiseline (141) i tetraoksana 91 i 2 puta aktivniji od artemetra (11a, do sada jedinog odobrenog derivata artemizinina za lečenje od malarije).

5. Svim *bis*-steroidnim tetraoksanima određena je *in vitro* antiproliferativna aktivnost prema HeLa i Fem-X ćelijskim linijama. Utvrđeno je da *bis*-steroidni tetraoksani ne pokazuju značajnu razliku u IC₅₀ vrednostima prema ovim ćelijskim linijama, ali indukuju različite procese: nakon izlaganja dejstvu ispitivanih supstanci, HeLa ćelije umiru prema mehanizmu koji je karakterističan za apoptozu, a Fem-X ćelije prema mehanizmu koji je karakterističan za nekrozu. Najveću aktivnost pokazuju amidi **125** i **126**, kiseline **129** i **130** i glicil-amid **132**. Njihova aktivnost je bliska aktivnosti *cis*-platine, dok su amid **125** i **132** jednaki po aktivnosti sa *cis*-platinom (Tabela 16). Za šest metil-estara mešovutih tetraoksana tipa **138** (**138a** – **138c**, **138e** – **138g**) određena je antiproliferativna aktivnost prema HeLa i Fem-X ćelijskim linijama. Ispitivani metil-estri mešovutih tetraoksana pokazuju 2 – 7 puta veću aktivnost prema HeLa nego prema Fem-X ćelijama (Tabela 23). Ispitivani metil-estri mešovutih tetraoksana ispoljavaju direktan toksični efekat prema HeLa ćelijama, a prema Fem-X ćelijama nisu direktno toksični. Za osam tetraoksana derivata holne kiseline (3 *bis*-steroidna i 5 mešovutih) određena je citotoksična aktivnost prema nestimulisanim i stimulisanim ćelijama PBMC. Ispitivani tetraoksani pokazuju umerenu do slabu aktivnost prema ćelijama limfocita (PBMC). Izuzetak predstavlja *bis*-steroidni tetraoksan **132** koji pokazuje vrlo visoku toksičnost (IC₅₀ = 3,0 µM, Tabela 16). Utvrđeno je da ispitivani tetraoksani (osim **132**) pokazuju 1000 do 16000 puta manju aktivnost prema PBMC nego prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2.
6. Za *in vitro* ispitivanje antiproliferativne aktivnosti National Cancer Institute (NIH-NCI) Bethesda, USA, odabrao je 10 *bis*-steroidnih (**123**, **125**, **128**, **129**, **131** - **136**) i 25 mešovutih tetraoksana derivata holne kiseline (**138a**, **138b**, **138c**, **138f**, **138g**, **138h**, **138j**, **138k**, **138l**, **139b**, **139f**, **139g**, **139h**, **139l**, **140b**, **144b**, **140f**, **142f**, **140g**, **142g**, **143g**, **140h**, **142h**, **140l** i **141l**). Preliminarno testiranje prema 3 ćelijske linije nije zadovoljilo 5 *bis*-steroidnih (**131**, **133**, **134**, **135**, **136**) i 5 mešovutih tetraoksana (**138h**, **138k**, **138l**, **142h** i **141l**), a ostali su odabrani za testiranje prema panelu od 60 ćelijskih linija. Utvrđeno je da tri tetraoksana – *bis*-steroidni **128** i mešoviti **140b** i **143g** pokazuju veoma dobru aktivnost prema UO-31 ćelijskoj liniji raka bubrega, od kojih su dva *N-Prⁿ*-amidni derivati tetraoksana - **128** i **143g** (Tabela 26). Izuzetno dobru aktivnost prema više ćelijskih linija pokazuje cikloheksilidenski-derivat, primarni-amid **140b** (npr. UO-31: GI₅₀ < 0,01 µM, TGI = 0,014 µM, LC₅₀ = 0,04 µM).
7. Na osnovu prikupljenih podataka o strukturi steroidnih tetraoksana derivata holne kiseline izvršeno je računarsko modelovanje njihovih struktura. Na osnovu optimizovanih struktura i podataka o antimalarijskoj aktivnosti izvršeno je generisanje hipoteze – farmakofore. Utvrđeno je da je za dobru antimalarijsku aktivnost bitno prisustvo četiri strukturno-hemijske

karakteristike: dva akceptora vodonične veze – peroksidni atomi kiseonika, jedan donor vodonične veze – H-atom C(24) amidne grupe i jedan alifatični hidrofobni deo – C(4'')-alkil supstituent (Slike 10 i 11). Na osnovu QSAR analize utvrđeno je da:

- a) povećanjem dipolnog momenta molekula raste antimalarijska aktivnost (Slika 14)
- b) opadanjem energija HOMO i LUMO orbitala i smanjivanjem razlike njihovih energija (GAP) raste antimalarijska aktivnost (Slike 15 – 17)
- c) opadanjem vrednosti particionog koeficijenta ($\log P$) molekula raste antimalarijska aktivnost (Slika 20)
- d) antimalarijska aktivnost vrlo malo zavisi od pozitivnog (MEP+) i negativnog (MEP-) elektrostatičkog potencijala molekula (Slike 18 i 19).

Proračuni pokazuju da je tetraoksan koji pokazuje najveću antimalarijsku aktivnost (4'R)-metil primarni amid **140f** za 1,88 kcal / mol stabilniji od svog (4'S)-metil epimera **140g**. Pokazano je da u slučaju **140f** potrebno za 7,3 kcal / mol manje energije za homolitičko raskidanje jedne peroksidne veze, O(1')-O(2'), u odnosu na istu vezu (4'S)-metil epimera **140g**. Prema proračunu interakcija tetraoksana **140f** sa hemom koji je za 33,53 kcal / mol energetski povoljnija u odnosu na odgovarajuću interakciju **140g** sa hemom.

Na kraju, sintetisano je 67 tetraoksana derivata holne kiseline koji pokazuju dobru do odličnu *in vitro* antimalarijsku aktivnost prema *P. falciparum* sojevima D6 i W2. Derivati pokazuju nisku citotoksičnost koja je 1000 do 16000 puta manja u odnosu na antimalarijsku aktivnost. QSAR analiza ukazuje da ovi derivati mogu da imaju sličan mehanizam dejstva kao artemizinin i njegovi derivati.

5. SUMMARY

Within this thesis a cholic acid-derived 1,2,4,5-tetraoxacyclohexanes (tetraoxanes) were synthesised and characterised, their *in vitro* antimalarial activity was evaluated and cytotoxicity determined. In addition, the tetraoxanes reported in this thesis were evaluated as potential antiproliferatives against various cancers cell lines. The results can be summarised as follows:

1. Two procedures for preparation of bis steroidal tetraoxanes were developed: 1) direct peroxyacetalisation of the corresponding 3-keto cholic acid derivatives, 2) transformation of the previously prepared tetraoxanes into its derivatives. 14 *bis*-Steroidal tetraoxanes, **123-136**, were prepared utilising both procedures. Tetraoxanes **123-128** were obtained according to the first procedure. Compounds **123** and **124** were prepared by reacting of ketone **119** with 30% H₂O₂ / 50% H₂SO₄ in 25% and 28% yield, respectively, while the compounds **125-128** were obtained from the ketones **121** and **122** using TMS₂O₂ / TMSOTf at 0 °C, in 28-50% yield (Scheme 24). Ketone **119** with TMS₂O₂ / TMSOTf, as well as ketones **121** and **122** with 30% H₂O₂ / 50% H₂SO₄, afforded as main products the Baeyer-Villiger products. Procedure 2) was utilised for preparation of tetraoxanes **127-136**. The carboxylic acids **129** and **130** were obtained by selective hydrolysis of C(24) methyl ester moiety of tetraoxanes **123** and **124**, respectively, utilising a) hydrolysis with 1.25 M NaOH/CH₂Cl₂-CH₃OH at r.t. for 3 days (72-79%), and b) hydrolysis with NaOH / *i*-PrOH-H₂O (3:1, v/v) at reflux for 15 min (90-95%, Scheme 24). The acids **129** and **130** were further transformed *via* their mixed anhydrides into corresponding amides **131-136** (54-81%), as well as into previously synthesised amides **127** and **128** (Scheme 25). Both predicted diastereomers were isolated and their structures was assigned from corresponding spectral data and confirmed by X-ray analysis of tetraoxane **123** monocrystal: compounds **123**, **125**, **127**, **129**, **131**, **133**, and **135** belong to *cis*-C(2)C(2a) series, and to corresponding *trans*-C(2)C(2a) series belong the compounds **124**, **126**, **128**, **130**, **132**, **134**, and **136**.
2. The procedure developed for the synthesis of cholic acid-derived *gem*-dihydroperoxides (**137**, **145**, **146**, Scheme 29) was also applied for synthesis *gem*-dihydroperoxides of simple cyclic systems (**149**, **150** and **76**, Scheme 30). It embodies the treatment of a ketone with 30% H₂O₂ in CH₂Cl₂-CH₃CN mixture (1:3, v/v) in the presence of cat. HCl (> 90%). The procedure developed within this thesis represents a significant improvement in terms of simplicity and economy as compared with the known ones (ref. 45, 47, Scheme 13).
3. 53 Mixed tetraoxanes derived from cholic acid were prepared (**138-144b**). Mixed steroidal tetraoxane methyl esters **138** were synthesised by coupling of *gem*-dihydroperoxide **137** to

simple substituted and non-substituted cycloalkanones (~30%, Scheme 27). The coupling reaction was performed in dichloromethane in the presence of cat. H₂SO₄. The reaction of cyclopentanone, cyclohexanone and cyclooctanone afforded only one corresponding tetraoxane each, while the reaction of 4-methyl, 4-ethyl, 4-*t*-butyl, and 4-phenylcyclohexanone afforded both expected diastereomers each. Aromatic ketones failed to produce a tetraoxane in a reaction with the same dihydroperoxide. Selective hydrolysis of tetraoxanes **138** with NaOH / *i*-PrOH-H₂O as above afforded the corresponding acids **139** (72-93%), which were *via* their mixed anhydrides transformed into corresponding amides **140-144b** (~80%, Scheme 28). The configuration at C(4'') in 4''-methyl series was determined by X-ray analysis of tetraoxane acid **139g**. It is found that tetraoxanes **138f**, **139f**, and **140f-143f** belong to (4''*R*)-series, while their respective (4''*S*) diastereoisomers are **138g**, **139g**, and **140g-143g**. The procedure developed within this thesis represents a significant improvement in terms of simplicity and economy as compared with the known one (ref. 65, Scheme 22).

4. For all synthesised tetraoxanes the *in vitro* antimalarial activity against *P. falciparum* strains D6 and W2 was assessed. It was found that the cholic acid carrier significantly enhances the activity in comparison to simple tetraoxanes, such as **91**. Replacing of a steroidal part of *bis*-steroidal tetraoxane with smaller cycloalkylidene fragment further enhanced antimalarial activity. It is presumed that in part the amphiphilic character of the cholic acid-derived carrier is responsible for membrane permeability of this type of compounds. The explicit influence of *cis*- or *trans*-geometry with *bis*-steroidal tetraoxanes was not detected. However, with (4'')-methyl series of mixed steroidal tetraoxanes the clear dependence on stereochemistry of C(4) was found: (4''*R*)-methyl series is always more active as compared to diastereomeric (4''*S*)-series. In addition, it was found that substitution at C(4'') most favourably influences the antimalarial activity as compared to substitutions at other C'' carbons. Further, it was found that existence of at least one hydrogen at C(24) amide moiety (in both, *bis*-steroidal and mixed tetraoxanes) is needed for pronounced antimalarial activity. The relative order of antimalarial activity in dependence of C(24) substitution pattern can be summarised as follows: CONH₂ > CONHR₁ > CO₂CH₃ > CO₂H > CONR₁R₂. The only exceptions are the carboxylic acids (4''*R*)-methyl **139f**, 4''-ethyl **139i**, and 4''-phenyl **139l**, which exert higher antimalarial activity as compared to the corresponding methyl esters. *13 Compounds from mixed tetraoxane pool are found to be more active than artemisinin: 138f, 138h, 139f, 139h, 140f-143f, 141h, 143h, and 142l (Table 21 and Table 22).* Most prominent antimalarial synthesised within this thesis is (4''*R*)-methyl primary amide **140f** (D6 IC₅₀ = 1.49 nM, W2 IC₅₀ = 0.58 nM) being 14 times more active than artemisinin (I), 6 times more active than artelinic acid (I4I) and tetraoxane 91, and 2 times as active as artemether (11a), the only know artemisinin-based commercial antimalarial so far).

5. For all synthesised *bis*-steroidal tetraoxanes the *in vitro* antiproliferative activity against HeLa and Fem-X cells lines was assessed. It was found that they didn't show significant IC₅₀ values differences against these cells, but induced different processes: they cause apoptosis with HeLa cells and necrosis with Fem-X cells. Most active compounds are amides **125** and **126**, acids **129** and **130** and glycol-amide **132**. They active almost as *cis*-platinum, but amides **125** and **132** are equal active as *cis*-platinum (Table 16). For six methyl-esters of mixed tetraoxanes **138** (**138a** – **138c**, **138e** – **138g**) the *in vitro* antiproliferative activity against HeLa and Fem-X cells lines was assessed. They are 2 – 7 times more active against HeLa than Fem-X cells (Table 23), and are direct toxic toward HeLa cells, but not against Fem-X. Cytotoxic activity of eight tetraoxanes (3 *bis*-steroidal and 5 mixed) has been determined against non-stimulated and stimulated PBMC. In general, the tested tetraoxanes exhibit moderate to low activity against healthy cells. The only exception is *bis*-steroidal tetraoxane **132** which is toxic at low micromolar concentrations (IC₅₀ = 3.0 μM, Table 16). These tests revealed that PBMC-screened tetraoxanes (except **132**) show cytotoxicity / antimalarial potency ratio of 1 / 1000-16 000.
6. *bis*-Steroidal tetraoxanes (10 compounds: **123**, **125**, **128**, **129**, **131-136**) and mixed tetraoxanes (25 compounds: **138a**, **138b**, **138c**, **138f**, **138g**, **138h**, **138j**, **138k**, **138l**, **139b**, **139f**, **139g**, **139h**, **139i**, **140b**, **144b**, **140f**, **142f**, **140g**, **142g**, **143g**, **140h**, **142h**, **140i**, **141i**) were chosen by National Cancer Institute (NIH-NCI), Bethesda, USA, for *in vitro* antiproliferative screen. Out of 35 compounds submitted for initial screening on 3 cell lines 5 of each group failed to pass, while the other compounds were screened against a panel of 60 cell lines. It was found that three tetraoxanes, **128**, **140b**, **143g**, are potent antiproliferatives against renal cancer cell line UO-31 (Table 26). Most potent among them is primary amide **140b** (e.g., UO-31: GI₅₀ < 0.01 μM, TGI = 0.014 μM, LC₅₀ = 0.04 μM).
7. Based on acquired structural and antimalarial activity data of steroidal tetraoxanes, the computer modelling has been undertaken in order to build a hypothesis - pharmacophore. It was found that for good antimalarial activity the four structural and chemical characteristics are needed: two hydrogen acceptors (peroxide oxygens), one hydrogen donor (H-NC(24)), and one aliphatic hydrophobic part (in our case C(4'') alkyl), figures 10 and 11). QSAR analysis revealed the following:
 - a) Antimalarial activity increases with dipole moment (Figure 14).
 - b) With the decrease of HOMO and LUMO energy, as well as with decrease of their energy difference (GAP), the antimalarial activity increases (Figures 15-17).
 - c) With the decrease of partition coefficient (logP) of the molecule, the antimalarial activity increases (Figure 20).

d) Antimalarial activity does not depend on the great extent on positive (MEP+) and negative (MEP-) electrostatic potential of the molecule (Figures 18 and 19).

According to calculations it appears that the tetraoxane with highest antimalarial activity (**140f**, (4''*R*)-methyl primary amide) is for 1.88 kcal / mol more stable than its (4''*S*)-methyl epimer **140g**. In addition, calculations revealed that the O(1')-O(2') scission energy in **140f** is for 7.3 kcal / mol lower than the energy required for scission of the O(1')-O(2') bond in its (4''*S*) epimer **140g**. Docking of **140f** and **140g** to heme revealed that the lowest energy conformation of **140f**-heme pair is for 33.53 kcal / mol lower in energy than corresponding **140g**-heme pair.

To conclude, within this thesis 67 cholic acid-based tetraoxanes was synthesised. Their overall *in vitro* antimalarial activity against D6 and W2 *P. falciparum* strains can be described as good to excellent. Their cytotoxicity is 1000-16000 lower as compared to respective antimalarial activity. QSAR analysis indicates that synthesised tetraoxane derivatives may act by the same mechanism as artemisinin and its derivatives.

LITERATURA

- ¹. (a) Malaria Foundation International, <http://www.malaria.org/>. (b) M. Wahlgren, M. T. Bejarano. A blueprint of 'bad air'. *Nature* **1999**, *400*, 506.
- ². Malaria Foundation International, Roll Back Malaria, <http://www.malaria.org/RBM.html>, i linkovi dati na sajtu.
- ³. D. Kosanović-Četković i saradnici, Akutne infektivne bolesti, VIII izdanje, *Dečije novine*, **1990**, str. 406.
- ⁴. O. Billker, V. Lindo, M. Panico, A. E. Etienne, T. Paxton, A. Dell, M. Rogers, R. S. Sinden and H. R. Morris, *Nature*, **1998**, *392*, 289.
- ⁵. a) M. Foley and L. Tilley, *Parasitology Today*, **1995**, *11*, 436; b) K. R. Lingelbach, *Exp. Parasitology*, **1993**, *76*, 318.
- ⁶. P. J. Rosental, S. R. Meshnik, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1996**, *83*, 131.
- ⁷. A. D. Wright, H. Wang, M. Gurrath, G. M. Konig, G. Kocak, G. Neumann, P. Loria, M. Foley and L. Tilley, *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 873.
- ⁸. D. Monti, B. Vodopivec, N. Basilico, P. Olliaro and D. Taramelli, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 8858.
- ⁹. A Lange Medical Book: Basic and Clinical Pharmacology, 3rd Ed., Edited by Bertram G. Katzung, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut/Los Altos, California, 1987, Chapter 42: Principles of Antimicrobial Drug Action, str. 515.
- ¹⁰. A Lange Medical Book: Basic and Clinical Pharmacology, 3rd Ed., Edited by Bertram G. Katzung, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut/Los Altos, California, 1987, Chapter 56: Antiprotozoal Drugs, Malaria, str. 618.
- ¹¹. a) J. M. Karle, R. Olmeda, L. Gerena and W. K. Milhous, *Exp. Parasitology*, **1993**, *76*, 345.; b) A. K. Bhattacharjee and J. M. Karle, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4622.
- ¹². D. S. Bohle, P. Debrunner, P. A. Jordan, S. K. Madsen and C. E. Sculz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8255.
- ¹³. S. Girault, P. Grellier, A. Berecibar, L. Maes, E. Mouray, P. Lemiere, M.-A. Debreu, E. Davioud-Charvet and C. Sergeraert, *J. Med. Chem.*, **2000** *43*, 2646.
- ¹⁴. S. K. Martin, A. M. J. Oduola, W. K. Milhous, *Science*, **1987**, *235*, 899.
- ¹⁵. a) V. L. Dubois, D. F. N. Platel, G. Pauly and J. Tribouley-Duret, *Exp. Parasitology*, **1995**, *81*, 117.; b) P. G. Bray, O. Janneh, K. J. Raynes, M. Mungthin, H. Ginsburg and S. A. Ward, *The Journal of Cell Biology*, **1999**, *145*, 363.

-
- ¹⁶. J. L. Vennerstrom and J. W. Eaton, *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 1269.
- ¹⁷. D. L. Klayman, *Science*, **1985**, *228*, 1049.
- ¹⁸. D. Jeremić, A. Jokić, A. Behbud and M. Stefanović, *8th International Symposium on The Chemistry of Natural Products New Delhi, 1972*, C-54, 221.
- ¹⁹. X.-D. Luo and C.-C. Shen, *Medicinal Research Reviews*, **1987**, *7*, 29.
- ²⁰. A. Jeng, D. L. Klayman and W. K. Milhous, *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 2147.
- ²¹. A. Jeng Lin and R.E. Miller, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 764.
- ²². M. A. Avery, S. Mehrotra, T. L. Johnson, J. D. Bonk, J. A. Vroman and R. Miller, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4149.
- ²³. a) D. S. Torok, H. Ziffer, S. R. Meshnick, X.-Q. Pan and A. Ager, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 5045; b) B. Mekonnen, E. Weiss, E. Katz, J. Ma, H. Ziffer and D. E. Kyle, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2000**, *8*, 1111; c) M. A. Avery, J. D. Bonk, W. K. M. Chong, S. Mehrotra, R. Miller, W. Milhous, D. K. Goins, S. Venkatesan, C. Wyandt, I. Khan and B. A. Avery, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 5038.
- ²⁴. Y.-J. Rong and Y.-L. Wu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1993**, 2149.
- ²⁵. K. Ramu and J. K. Baker, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 1911.
- ²⁶. a) T. T. T. Nga, C. Menage, J.-P. Beque, D. Bonnet-Delpon, J.-C. Gantier, B. Pradines, J.-C. Doury and T. D. Thac, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4101; b) P. O'Neill, N. L. Searle, K.-W. Kan, R. C. Storr, J. L. Maggs, S. A. Ward, K. Raynes and K. Park, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 5487; c) Y. M. Pu, D. S. Torok, H. Ziffer, X.-Q. Pan and S. R. Meshnik, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4120.
- ²⁷. P. M. O'Neil, L. P. Bishop, R. C. Storr, S. R. Hawley, J. L. Maggs, S. A. Ward and B. K. Park, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4511.
- ²⁸. P. M. O'Neill, A. Miller, S. A. Ward, B. K. Park, F. Scheinmann and A. V. Stachulski, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 9129.
- ²⁹. G. H. Posner, M. H. Parker, J. Northorp, J. S. Elias, P. Ploypradith, S. Xie and T. A. Shapiro, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 300.
- ³⁰. a) M. A. Avery, P. Fan, J. M. Karle, R. Miller and K. Goins, *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 3965; b) M. A. Avery, P. Fan, J. M. Karle, J. D. Bonk, R. Miller and D. K. Goins, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1885.
- ³¹. G. H. Posner and C. H. Oh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 8328.
- ³². G. H. Posner, C. H. Oh, D. Wang, L. Gerena, W. K. Milhous, S. R. Meshnick and W. Asawamahasadka, *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1256.

-
- ³³. P. M. O'Neill, A. Miller, L. P. D. Bishop, S. Hindley, J. L. Maggs, S. A. Ward, S. M. Roberts, F. Scheinmann, A. V. Stachulski, G. H. Posner and B. K. Park, *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 58.
- ³⁴. a) G. H. Posner, J. N. Cumming, P. Ploypraadith and C. H. Oh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5885; b) G. H. Posner, S. B. Park, L. Gonzalez, D. Wang, J. N. Cumming, D. Klinedinst, T. A. Shapiro and M. D. Bachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 3537.
- ³⁵. a) C. W. Jefford, F. Favarger, M. G. H. Vicente and Y. Jacquier, *Helv. Chim. Acta*, **1995**, *78*, 452; b) C. W. Jefford, S. Kohmoto, D. Jaggi, G. Timari, J.-C. Rossier, M. Rudaz, O. Barbuzzi, D. Gerard, U. Burger, P. Kamalaprija, J. Mareda, G. Bernardinelli, *Helv. Chim. Acta*, **1995**, *78*, 647; c) C. W. Jefford, M. G. H. Vicente, Y. Jacquier, F. Favarger, J. Mareda, P. Millason-Schmidt, G. Brunner and U. Burger, *Helv. Chim. Acta.*, **1996**, *79*, 1475; d) C. W. Jefford, U. Burger, P. Millasson-Schmidt, G. Bernardinelli, B. L. Robinson and W. Peters, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 1239.
- ³⁶. Jerry March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed., John Wiley & Sons, New York, **1992**, 1067.
- ³⁷. a) R. K. Hynes and S. C. Vonwiller, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 253; b) R. K. Hynes and S. C. Vonwiller, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 257.
- ³⁸. a) A. Robert and B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 5968; b) A. Robert and B. Meunier, *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 1287; c) J. Cazelles, A. Robert and B. Meunier, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 609; d) A. Robert, J. Cazelles and B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1954.
- ³⁹. a) Y. Wu, Z.-Y. Yue and Y.-L. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2580; b) D.-Y. Wang and Y.-L. Wu, *Chem. Commun.*, **2000**, 2193; c) W.-M. Wu, Z.-J. Yao, Y.-L. Wu, K. Jiang, Y.-F. Wang, H.-B. Chen, F. Shan and Y. Li, *Chem. Commun.*, **1996**, 2213.
- ⁴⁰. W.-M. Wu, Y. Wu, Y.-L. Wu, Z.-J. Yao, C.-M. Zhou, Y. Li and F. Shan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 3316.
- ⁴¹. W. Asawamahasakda, I. Ittarat, Y.-M. Pu, H. Ziffer and S. R. Meshnick, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, *38*, 1854.
- ⁴². J. Bhisutthibhan, X.-Q. Pan, P. A. Hossler, D. J. Walker, C. A. Yowell, J. Carlton, J. B. Dame and S. R. Meshnick, *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, *273*, 16192.
- ⁴³. a) A. Baeyer and V. Villiger, *Chem. Ber.*, **1900**, *33*, 2479; b) A. Rieche and R. Meister, *Chem. Ber.*, **1939**, *72*, 1933; c) Von R. Criegee, W. Schnorrenberg and J. Becke, *Annalen*, **1949**, *565*, 7.
- ⁴⁴. S. M. Kirschke, "Cyclic Peroxides" in "Organic Peroxides", Vol. III, Ed. Daniel Swern, Wiley & Sons, Interscience, New York, 1972., 69.

-
- ⁴⁵. a) J. Warnant, R. Joly, J. Mathieu and L. Velluz, *Bull. Soc. Chim.*, **1957**, 331; b) L. Velluz, G. Amiard, J. Martel et J. Warnant, *Memories Presentes a la Societe Chimique*, **1957**, 1484; c) L. Velluz, G. Amiard, J. Martel et J. Warnant, *Memories Presentes a la Societe Chimique*, **1957**, 879.
- ⁴⁶. N. M. Todorović, M. Stefanović, B. Tinant, J.-P. Declercq, M. T. Makler and B. A. Šolaja, *Steroids*, **1996**, *61*, 688.
- ⁴⁷. K. Tsuchiya, Y. Hamada, A. Masuyama, M. Nojima, K. J. McCullough, H.-S. Kim, Y. Shibata, Y. Wataya, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 4077.
- ⁴⁸. M. S. Kharasch and G. Sosnovsky, *J. Org. Chem.*, **1958**, *23*, 1322.
- ⁴⁹. a) P. R. Story, B. Lee, C. E. Bishop, D. D. Denson and P. Busch, *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 3059; b) J. R. Sanderson, K. Paul, P. R. Story, D. D. Denson and J.A. Alford, *Synthesis*, **1975**, 159.
- ⁵⁰. T. Ledaal, *Acta Chem. Scand.*, **1967**, *21*, 1656.
- ⁵¹. J. L. Vennerstrom, H.-N. Fu, W. Y. Ellis, A. L. Ager, Jr., J. K. Wood, S. L. Andersen, L. Gerena and W. K. Milhous, *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 3023.
- ⁵². Y. Dong, H. Matile, J. Chollet, R. Kaminsky, J. K. Wood and J. L. Vennerstrom, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1477.
- ⁵³. a) J. R. Sanderson and A. G. Zeiler, *Synthesis*, **1975**, 125. b) J. H. Sanderson, A. G. Zeile and R. J. Wilterdink, *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 2239; c) J. R. Sanderson, R. J. Wilterdink and A. G. Zeler, *Synthesis*, **1976**, 479.
- ⁵⁴. E. G. E. Hawkins, *J. Chem. Soc. (C)*, **1969**, 2691.
- ⁵⁵. C. W. Jefford, A. Jaber, J. Boukouvalas, *Synthesis*, **1998**, 391.
- ⁵⁶. M. Suzuki, H. Takada and R. Noyori, *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 902.
- ⁵⁷. Y. Dong and J. L. Vennerstrom, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 8582.
- ⁵⁸. H.-S. Kim, Y. Shibata, Y. Wataya, K. Tsuchiya, A. Masuyama and M. Nojima, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2604.
- ⁵⁹. P. H. Dussault and J. M. Raible, *Organic Lett.*, **2000**, *2*, 3377.
- ⁶⁰. P. R. Story, D. D. Denson, C. E. Bishop, B. C. Clark, Jr. and J.-C. Farine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 817.
- ⁶¹. J. R. Sanderson, K. Paul and P. R. Story, *Synthesis*, **1975**, 275.
- ⁶². Y. Ito, M. Tone, H. Yokoya and T. Matsuura, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2240.
- ⁶³. M. Mohnhaupt, H. Hagemann, J.-P. Perler, H. Bill, J. Boukouvalas, J.-C. Rossier and C. W. Jefford, *Helv. Chem. Acta*, **1988**, *71*, 992.

-
- ⁶⁴. a) M. Bertrand, S. Fliszar and Y. Rousseau, *J. Org. Chem.*, **1968**, *33*, 1931; b) T. Ledaal, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 3661.
- ⁶⁵. J. L. Vennerstrom, Y. Dong, S. L. Andersen, A. L. Ager Jr., H.-N. Fu, R. E. Miller, D. L. Wesche, D. E. Kyle, L. Gerena, S. M. Walters, J. K. Wood, G. Edwards, A. D. Holme, W. G. McLean and W. K. Milhous, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 2753.
- ⁶⁶. H.-S. Kim, Y. Shibata, Y. Wataya, K. Tsuchiya, A. Masuyama and M. Nojima, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2604.
- ⁶⁷. H.-S. Kim, K. Tsuchiya, Y. Shibata, Y. Wataya, Y. Ushigoe, A. Masuyama, M. Nojima and K. J. McCullough, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1999**, 1867.
- ⁶⁸. C. W. Jefford, J.-C. Rossier and W. K. Milhous, *Heterocycles*, **2000**, *52*, 1345.
- ⁶⁹. J. L. Vennerstrom, A. L. Ager, Jr., S. L. Andersen, J. M. Grace, V. Wongpanich, C. K. Angerhofer, J. K. Hu and D. L. Wesche, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2000**, *62*, 573.
- ⁷⁰. a) G. H. Posner, P. Ploypradith, W. Hapangama, D. Wang, J. N. Cumming, P. Dolan, T. W. Kensler, D. Klinedinst, T. A. Shapiro, Q. Y. Zheng, C. K. Murray, L. G. Pilkington, L. R. Jayasinghe, J. F. Bray and R. Daughenbaugh, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1997**, *5*, 1257; b) G. H. Posner, P. Ploypradith, M. H. Parker, H. O'Dowd, S.-H. Woo, J. Northrop, M. Krasavin, P. Dolan, T. W. Kensler, S. Xie and T. A. Shapiro, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4275.
- ⁷¹. Y. Li, F. Shan, J.-M. Wu, G.-S. Wu, J. Ding, D. Xiao, W.-Y. Yang, G. Atassi, S. Leonce, D.-H. Caignard and P. Renard, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, *11*, 5.
- ⁷². A. K. Bhattacharjee and J. M. Karle, *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, *12*, 422.
- ⁷³. P. A. Procopiou, S. P. D. Baugh, S. S. Flack and G. G. A. Inglis, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 2342.
- ⁷⁴. K. J. McCulloch, J. K. Wood, A. K. Bhattacharjee, Y. Dong, D. E. Kyle, W. K. Milhous, J. L. Vennerstrom, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1246.
- ⁷⁵. W. L. Duax, C. M. Weeks, D. C. Rohrer, *Topics in Stereochemistry*, Vol. 9, John Wiley and Sons, New York, 1976, 271.
- ⁷⁶. R. C. Duke, J. J. Cohen, *Morphological and Biochemical Assays of Apoptosis*. In *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeck, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, John Wiley and Sons, New York, 1992, 3.17.1-3.17.16.
- ⁷⁷. National Cancer Institute, Bethesda, MD, <http://dtp.nci.nih.gov>.
- ⁷⁸. D. Cremer, J. A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354.
- ⁷⁹. National Cancer Institute, Bethesda, MD, <http://dtp.nci.nih.gov>.
- ⁸⁰. E. Knappe, D. Peteri, *Z. Anal. Chem.* **1962**, *190*, 386.

-
- ⁸¹. Plattner, P. A.; Heuser, H. Über Beziehungen zwischen Konstitution und optischer Drehung in der Cholsäure-Reihe. *Helv. Chim. Acta* **1944**, *27*, 748-757.
- ⁸². Jones, A. S.; Webs, M.; Smith, F. Basic Derivatives of Steroids. 3-Amino-7:12-dihydroxy- and 3-Amino-12-hydroxy-cholanic acid. *J. Chem. Soc.* **1949**, 2164-2168.
- ⁸³. (a) *Beilstein Handbuch Der Organischen Chemie*, E-III, **10**; Springer-Verlag, Berlin / Göttingen / Heidelberg, 1972; p 4583, (b) *ibid.* p 4582.
- ⁸⁴. Sheldrick, G. M. Phase annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures. *Acta crystallogr.* **1990**, *A46*, 467-473.
- ⁸⁵. Sheldrick, G.M. SHELXL-93. *Program for the Refinement of Crystal Structures.* **1993**. University of Göttingen, Germany,
- ⁸⁶. G. M. Sheldrick G.M. SHELXL97. *Program for the Solution and the Refinement of Crystal Structures.* **1997** University of Göttingen, Germany.
- ⁸⁷. A. L. Spek, *PLUTON Program for molecular graphic*, **1992**, University of Utrecht, The Netherlands.
- ⁸⁸. R. E. Desjardins, C. J. Canfield, D. E. Haynes, J. D. Chulay, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710.
- ⁸⁹. W. K. Milhous, N. F. Weatherly, J. H. Bowdre, R. E. Desjardins, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 525.
- ⁹⁰. A. M. J. Oduola, W. K. Milhous, W. N. F. Eatherly, J. H. Bowdre, R. E. Desjardins, *Exp. Parasitol.* **1988**, *67*, 354.
- ⁹¹. M. Ohno and T. Abe, *J. Immunol. Methods* **1991**, *145*, 199.
- ⁹². T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- ⁹³. Z. Juranić, S. Radulović, J. Joksimović, I. Juranić, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **1998**, *17*, 269.

BIOGRAFIJA

Dejan M. Opsenica rođen je 20.04.1967. godine u Zemunu, od oca Miloša i majke Bisenije, rođene Ikodinović.

Srednju školu završio je u Zemunu gde je maturirao 1986. godine. Studije hemije, smer Opšta hemija, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisao je 1987. godine i diplomirao 1992. godine. Poslediplomske studije na istom fakultetu upisao je 1992. godine, i Magistarski rad pod nazivom "Dobijanje i karakterizacija μ -O,O'-geometrijskih izomera dinuklearnih kompleksa kobalta(II) sa N,N',N'',N'''-tetrakis(2-piridilmetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekanom i aminokarboksilato-ligandima" odbranio 1996. godine.

U Institutu za Hemiju, Tehnologiju i Metalurgiju, Centar za hemiju, zaposlen je kao istraživač-saradnik od 1.11.1998 godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Опсеница Дејан М.

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Стероидни тетраоксани: синтеза и биолошка активност

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 21.03.2014.



Dejan Opsenica

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Стероидни тетраоксани: синтеза и биолошка активност

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис

У Београду, 21.03.2014.

