

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet



Pavle A. Stojković

Dizajn i sinteza derivata sklareola koji pokazuju
antitumorsku aktivnost protiv rezistentnih ćelijskih
linija glioblastoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

University of Belgrade

Faculty of Chemistry



Pavle A. Stojković

Design and synthesis of sclareol derivatives exhibiting
antitumor activity against resistant glioblastoma and
non-small cell lung cancer cell lines

doctoral dissertation

Belgrade, 2026.

Mentori:

Dr Igor Opsenica, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Dr Nataša Terzić-Jovanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Komisija:

dr Dragana Milić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Života Selaković, docent

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Jovana Francuz, redovni profesor

Prirodno-matematički fakultet – Univerzitet u Novom Sadu

dr Miroslav Novaković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Milica Pešić, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Dizajn i sinteza derivata sklareola koji pokazuju antitumorsku aktivnost protiv rezistentnih ćelijskih linija glioblastoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća

SAŽETAK

Rak je jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svetu, a najčešći metod lečenja je hemoterapija. Njena efikasnost je često ograničena usled razvoja višestruke rezistencije na lekove, a P-glikoprotein identifikovan je kao potencijalna meta za prevazilaženje rezistencije. Stoga je razvoj novih jedinjenja sposobnih da ispolje citotoksično dejstvo i na rezistentne tumorske ćelije od velikog značaja.

Cilj ove doktorske disertacije bio je dizajn i sinteza novih derivata labdanskog diterpena sklareola sa poboljšanim antitumorskim svojstvima, ispitivanim u modelima senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija glioblastoma (U87 i U87-TxR) i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI/H460 i NCI/H460R). Hemijske modifikacije izvođene su uz očuvanje tercijarne alilne hidroksilne grupe, ključne za biološku aktivnost. Sintetisani hibridi sklareola sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom pokazali su snažno citotoksično dejstvo na ćelijama U87 i U87-TxR, pri čemu je kod pojedinih jedinjenja uočena kolateralna senzitivnost. Pokazano je da jedinjenja ubrzavaju progresiju ćelijskog ciklusa i povećavaju koncentraciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, čime dovode do smanjene vijabilnosti rezistentnih ćelija. Derivati sklareola sa aminoadamantanskim motivom pokazali su izuzetnu citotoksičnost na ćelijama NCI/H460 i NCI/H460R, indukujući apoptozu i nekrozu. Nekoliko derivata se odlikuje potencijalom za prevazilaženje rezistencije na doksorubicin kod rezistentne ćelijske linije. Sklareol i derivati sa adamantanom spontano formiraju čestice nanometarskog reda veličine, što otvara mogućnost njihove primene u nanoformulacijama lekova. U završnom delu prikazana je i sinteza derivata sklareola sa karbamidnim strukturnim motivom.

Ključne reči: tumor, prirodni proizvodi, sklareol, hibridni molekuli, [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin, adamantan, urea, višestruka rezistencija na lekove, glioblastom, nesitnoćelijski karcinom pluća

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija

Design and synthesis of sclareol derivatives exhibiting antitumor activity against resistant glioblastoma and non-small cell lung cancer cell lines

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of mortality worldwide, and chemotherapy remains the most common treatment modality. Its effectiveness is often limited by the development of multidrug resistance, with P-glycoprotein identified as a potential target for overcoming this resistance. Therefore, the development of new compounds capable of exerting cytotoxic effects also on resistant tumor cells is of great importance.

The aim of this doctoral dissertation was the design and synthesis of new derivatives of the labdane diterpene sclareol with improved antitumor properties, evaluated in models of sensitive and resistant glioblastoma cell lines (U87 and U87-TxR) and non-small cell lung cancer cell lines (NCI/H460 and NCI/H460R). Chemical modifications were performed while preserving the tertiary allylic hydroxyl group, which is crucial for biological activity. Synthesized sclareol containing [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine core exhibited strong cytotoxic activity against U87 and U87-TxR cells, with collateral sensitivity observed for certain compounds. The compounds were shown to accelerate cell cycle progression and increase intracellular levels of reactive oxygen species, leading to reduced viability of resistant cells. Sclareol derivatives containing an aminoadamantane motif displayed pronounced cytotoxicity toward NCI/H460 and NCI/H460R cells, inducing apoptosis and necrosis. Several derivatives demonstrated potential to overcome doxorubicin resistance in the resistant cell line. Furthermore, sclareol and adamantane-containing derivatives spontaneously form nanoparticles, enabling their potential application in nanoparticle-based drug formulations. The final part of the study presents the synthesis of sclareol derivatives bearing a carbamate structural motif.

Keywords: cancer, natural products, sclareol, hybrid molecules, [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine, adamantane, urea, multidrug resistance, glioblastoma, non-small cell lung carcinoma

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Organic Chemistry

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je rezultat istraživanja sprovedenog u istraživačkim grupama dr Igora Opsenice, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, i dr Milice Pešić, naučnog savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Njima dugujem izuzetnu zahvalnost jer su omogućili da ovo istraživanje bude ostvareno.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim mentorima, dr Igoru Opsenici i dr Nataši Terzić-Jovanović. Vodili ste me kroz ovo putovanje, svako na svoj način, i pomogli mi da se usavršim kao hemičar i budući istraživač. Hvala na neizmernom strpljenju, podršci, savetima i kritikama, ali i na tome što niste odustajali od mene kada sam ja odustajao od sebe.

Zahvaljujem se članovima komisije, dr Dragani Milić, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, dr Životi Selakoviću, docentu Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, dr Jovani Francuz, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, dr Miroslavu Novakoviću, naučnom savetniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, i dr Milici Pešić, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, što su prihvatili učešće u komisiji za pregled ove disertacije i svojim sugestijama doprineli da ona bude unapređena.

Koleginicama sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – dr Ani Podolski Renić, Emi Lupšić i Ani Stepanović, čiji je rad na biološkom delu istraživanja upotpunio ovu disertaciju, dugujem posebnu zahvalnost. Koleginicama i kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu hvala na saradnji i brojnim analizama.

Zahvalan sam svojim koleginicama i kolegama iz laboratorija 432, 468 i 474 na divnom vremenu koje smo proveli zajedno proteklih godina. Milice, Andrea, Katarina, Dunja, Ana, Andriana, Života, Andrija, Miloše – hvala vam. Ulepšali ste ovaj put i zahvalan sam vam na brojnim šalama, pričama, lepim rečima i pomoći. Male stvari često mnogo znače.

Zahvalnost dugujem i kolegini Ljiljani Koračak, doktorandu-saborcu, Branislavu Kokiću, kao i dr Vladimiru Ajdačiću, na divnoj atmosferi i vremenu provedenom u laboratoriji 524. Dejanu Opsenici sam zahvalan na mnogim savetima i rešenim nedoumicama.

Zahvalnost dugujem ekipi sa Organske hemije – Željku, Milici i Miri, i sa Organskih sinteza – Filipu, Milošu, Andreju, Ivanu i Mariji. Asistentovanje, vežbe i saradnja sa vama bili su pravo zadovoljstvo. Hvala i profesorima Hemijskog fakulteta, dr Deani Andrić, dr Dragani Milić, dr Mariu Zlatoviću, dr Radomiru Saičiću i dr Filipu Biheloviću na prijatnoj saradnji u nastavi.

Zahvaljujem se svojim prijateljima, Jeleni, Jeleni, Jeleni, Jovani, Petri, Ivani, Milošu i Milovanu i koji su bili oslonac u mom životu. Naučili ste da „počeo sam kolonu“ znači da ću najverovatnije kasniti i niste se ljutili na mene.

Najzad, zahvalan sam svojim roditeljima i porodici na podršci, razumevanju, strpljenju i ljubavi koju su mi pružili.

Lista skraćenica

ABC	engl. <i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	engl. <i>ATP-binding cassette subfamily B member 1 (MDR1)</i>
ABCC1	engl. <i>ATP-binding cassette subfamily C member 1 (MRP1)</i>
Ad	adamantil-
ADMET	engl. <i>absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity</i>
ALK	engl. <i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ARE	engl. <i>antioxidant response element</i>
ATR	engl. <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
BAD	engl. <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAG	engl. <i>Bcl-2-associated athanogene</i>
BAK	engl. <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	engl. <i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCL-10	engl. <i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>
BCL-2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-W	engl. <i>Bcl-2-like 2 protein</i>
BCL-X	engl. <i>Bcl-2-like protein X</i>
BCL-XL	engl. <i>Bcl-2-like 1 isoform XL</i>
BCL-XS	engl. <i>Bcl-2-like 1 isoform XS</i>
BCRP	engl. <i>breast cancer resistance protein</i>
BH3	engl. <i>Bcl-2 homology domain 3</i>
BID	engl. <i>BH3 Interacting-Domain Death Agonist</i>
BIM	engl. <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BLK	engl. <i>B lymphocyte kinase</i>
Boc	<i>terc-butiloksikarbonil</i>
br s	prošireni singlet
BRAF	engl. <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
Bu	butil-
CAD	engl. <i>caspase-activated DNase</i>
CD95	engl. <i>Fas receptor</i>
CDK	engl. <i>cyclin-dependent kinase</i>
CNS	centralni nervni sistem
CYP3A4	engl. <i>citohrom P450 3A4</i>
d	dublet
dATP	deoksiadenozin-trifosfat
DAMP	engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>
dd	dublet dubleta
ddt	dublet dubleta tripleta
DIABLO	engl. <i>direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>
DIPEA	<i>N,N-diizopropiletilamin</i>
DMAP	<i>N,N-dimetilaminopiridin</i>
DMF	<i>N,N-dimetilformamid</i>
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DR3	engl. <i>death receptor 3</i>
E2F1	engl. <i>E2F transcription factor 1</i>
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
ERCC 1	engl. <i>excision repair cross-complementation group 1</i>
ESI	engl. <i>electrospray ionization</i>

EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
FAK	engl. <i>focal adhesion kinase</i>
FAR	odnos aktivnosti i fluorescencije
FBS	fetalni goveđi serum
FLT3	engl. <i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
FRR	faktor relativne rezistencije
FSC-A	engl. <i>forward scatter area</i>
FSC-H	engl. <i>forward scatter height</i>
FSC-W	engl. <i>forward scatter width</i>
H2A.X	histon H2A varijanta
HetAr	heterociklični aromatični prsten
HESI	engl. <i>heated electrospray ionization</i>
HIF-1α	engl. <i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HIV	engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
HPV	humani papiloma virus
HMBC	engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	engl. <i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IAP	engl. <i>inhibitor apoptotic proteins</i>
IC	infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
IC₅₀	koncentracija jedinjenja koja dovodi do inhibicije ispitivane biološke funkcije 50% u poređenju sa kontrolnim uzorkom
IDH	izocitrat dehidrogenaza
IS	indeks senzitivnosti
J	konstanta spin-spin kuplovanja
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
KEAP1	engl. <i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KRAS	engl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M	molarnost (mol/dm ³)
m	multiplet
m/z	odnos mase i naelektrisanja
mCPBA	<i>m</i> -hlorperoksibenzoeva kiselina
MDR	višestruka rezistencija na lekove (engl. <i>multidrug resistance</i>)
Me	metil-
MEK	engl. <i>MAPK/ERK kinase</i>
MEM	minimalni esencijalni medijum
MET	engl. <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
MFI	srednji intenzitet fluorescencije
MeOH	metanol
MPT	engl. <i>mitochondrial permeability transition</i>
NAD(P)H	nikotinamid-adenin-dinukleotid- (fosfat), redukovan
NF-κB	engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMR	nuklearno–magnetna rezonantna spektroskopija
NOESY	engl. <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
NOXA	engl. <i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
Nrf2	engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related Factor 2</i>
NTRK	engl. <i>neurotrophic tyrosine receptor kinase</i>
P-gp	P-glikoprotein

PARP	engl. <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	natrijum-fosfatni pufer
PCC	piridinijum-hlorhromat
PDGFR	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDI	indeks polidisperzije
Ph	fenil-
PhMe	toluen
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
ppm	delova na milion
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
q	kvartet
quint	kvintet
RAF	engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	engl. <i>rat sarcoma</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivne azotne vrste
ROS	reaktivne kiseonične vrste
ROS1	engl. <i>ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>
RP	reverzno-fazna
s	singlet
s. t.	sobna temperatura
SAR	veza između strukture i aktivnosti (engl. <i>structure-activity relationship</i>)
SI	indeks selektivnosti
SMAC	engl. <i>second mitochondrial-derived activator of caspases</i>
SOD	superoksid dismutaza
STAT3	engl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SERPINE1	engl. <i>serpin family E member 1</i>
t	triplet
T.T.	temperatura topljenja
TFA	trifluorsirćetna kiselina
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i>
TERT	engl. <i>telomerase reverse transcriptase</i>
TLC	tankoslojna hromatografija
TNFR1	engl. <i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TP	[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin
TP53	engl. <i>tumor protein 53</i>
tr	retenciono vreme
TRAIL-R1	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1</i>
TRAIL-R2	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>
p-TsOH	p-toluensulfonska kiselina
tt	triplet tripleta
TQD	engl. <i>triple quadrupole</i>
UPLC	engl. <i>ultra-performance liquid chromatography</i>
UV	ultraljubičasto zračenje
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	engl. <i>World Health Organization</i> , Svetska zdravstvena organizacija
ZP	zeta potencijal
δ	hemijsko pomeranje u NMR-u (u ppm)
v	talasni broj u IR spektroskopiji (u cm ⁻¹)
μW	mikrotalasno ozračivanje

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	2
2.1. Ćelijski ciklus	3
2.2. Ćelijska smrt.....	4
2.3. Reaktivne kiseoniĉne vrste	6
2.4. Hemoterapeutici	7
2.5. Prirodni proizvodi u terapiji raka.....	10
2.5.1. Semisintetski derivati prirodnih proizvoda u terapiji raka.....	10
2.6. P-glikoprotein i uloga u višestrukoj rezistenciji na lekove.....	12
2.6.1. Inhibitori P-glikoproteina	13
2.7. Glioblastom	15
2.8. Nesitnoćelijski karcinom pluća	16
2.9. Sklareol.....	16
2.9.1. Antitumorska aktivnost sklareola	18
2.9.2. Semisintetski derivati sklareola sa biološkom aktivnošću.....	19
3. NAŠI RADOVI	24
3.1. Derivati sklareola sa [1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i>]pirimidinskom farmakoforom	24
3.1.1. Ispitivanja biološke aktivnosti jedinjenja sa [1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i>]pirimidinskom farmakoforom	29
3.2. Derivati sklareola sa adamantanom.....	36
3.2.1. Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja sklareola sa adamantanskim motivom	42
3.3. Derivati sklareola sa karbamidnim strukturnim motivom	49
4. EKSPERIMENTALNI DEO	53
5. ZAKLJUČAK.....	143
6. LITERATURA.....	145
7. PRILOZI.....	155
7.1. Totalna asignacija jedinjenja 86g	155
7.2. Totalna asignacija jedinjenja 113a	164
7.3. Biološka ispitivanja jedinjenja sa [1,2,4]triazolo[1,5- <i>a</i>]pirimidinskom farmakoforom	174
7.4. Biološka ispitivanja jedinjenja sa adamantanskim strukturnim motivom	179

1. UVOD

Prirodni proizvodi predstavljaju raznovrsnu grupu jedinjenja koja se stvaraju u organizmima tokom njihovog životnog ciklusa. Oni se dele na *primarne metabolite*, esencijalne za funkcionisanje organizma, i *sekundarne metabolite*, čija je uloga povećavanje sposobnosti preživljavanja organizma delovanjem na okruženje. U primarne metabolite spadaju ugljeni hidrati, proteini, nukleinske kiseline i masti. U sekundarne metabolite spadaju alkaloidi, terpeni i poliketidi. Sekundarni metaboliti su od posebnog značaja jer se odlikuju raznovrsnim strukturnim motivima, brojnim funkcionalnim grupama i pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti. Hemijskim modifikacijama sekundarnih metabolita moguće je dobiti jedinjenja sa poboljšanom aktivnošću i selektivnošću. Budući da rak predstavlja jedan od vodećih uzroka smrti u svetu, od posebnog je značaja pronalazak lekova koji mogu efikasno usporiti napredovanje bolesti ili čak dovesti do izlečenja.

Cilj ove doktorske disertacije bio je dizajn i sinteza novih derivata sklareola, prirodnog proizvoda izolovanog iz muskatne žalfije (*Salvia sclarea*), sa potencijalnom antitumorskom aktivnošću prema osetljivim i rezistentnim ćelijskim linijama glioblastoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Rezistentne ćelijske linije korišćene u istraživanju odlikuju se prekomernom ekspresijom P-glikoproteina, transportnog proteina koji povećava efluks ksenobiotika i doprinosi razvoju višestruke rezistencije na lekove. Pored uticaja na vijabilnost tumorskih ćelija, pod dejstvom sintetisanih derivata, ispitan je i njihov uticaj na prolazak ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa, efekat na indukciju ćelijske smrti, promenu nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta, uticaj na aktivnost P-glikoproteina, kao i potencijal za reverziju rezistencije na citostatike. Ispitana su i svojstva sklareola i njegovih derivata da spontano stvaraju nanočestice bez korišćenja fizičkih sila i hemijskih tretmana.

Ova doktorska disertacija se sastoji iz četiri dela:

U **Opštem delu** dat je pregled literature koja opisuje važne ćelijske procese uključene u nastanak i razvoj tumora, višestruku rezistenciju na lekove, kao i pregled hemoterapeutika u kliničkoj primeni. U drugom delu Opšteg dela dat je prikaz prirodnih proizvoda i njihovih semisintetskih analoga koji se koriste u terapiji raka. Poseban akcenat je stavljen na dosadašnja istraživanja antitumorske aktivnosti sklareola i njegovih analoga.

U **Našim radovima** prikazani su rezultati istraživanja postignuti tokom izrade ove doktorske disertacije. Opisani su postupci derivatizacije sklareola i načini za dobijanje diaminskih derivata, hibrida sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom, kao i jedinjenja sa aminoadamantanskim strukturnim motivom. Za svaku grupu jedinjenja ispitana je antitumorska aktivnost prema osetljivim i rezistentnim ćelijskim linijama glioblastoma ili nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Ispitana je interakcija najaktivnijih jedinjenja sa P-glikoproteinom, kao i njihov potencijal da indukuju ćelijsku smrt. Odabranim jedinjenjima sa adamantanskim motivom ispitana su nanočestična svojstva, kao i potencijal za prevazilaženje rezistencije na doksorubicin. Prikazana je i sinteza derivata sklareola sa karbamidnom funkcionalnom grupom.

U **Eksperimentalnom delu** prikazani su eksperimentalni postupci sinteze jedinjenja, kao i podaci o njihovoj karakterizaciji (temperature topljenja, IC, NMR, optička aktivnost, HRMS). U nastavku je opisano određivanje čistoće jedinjenja (HPLC metodama) kojima je ispitivana biološka aktivnost. Na kraju je opisano ispitivanje biološke aktivnosti. Sinteza, karakterizacija i određivanje čistoće jedinjenja su urađeni u laboratorijama Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a ispitivanje bioloških aktivnosti u laboratorijama Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu.

U **Zaključku** je dat skraćeni pregled svih rezultata do kojih se došlo prilikom izrade ove disertacije.

2. OPŠTI DEO

Rak predstavlja grupu oboljenja koja se odlikuju nekontrolisanim i prekomernim rastom i umnožavanjem ćelija.¹ Ovo oboljenje nastaje iz somatskih ćelija kao posledica promena u genetskom materijalu koje se javljaju usled grešaka tokom ćelijske deobe, dejstva spoljašnjih faktora ili naslednih mutacija. Od mutacija najčešće su prisutne mutacije onkogene, tumor-supresorskih gena i gena zaduženih za popravku DNK, kao i epigenetske promene koje utiču na ekspresiju gena bez promene DNK sekvence.² Zahvaljujući mutacijama, tumorske ćelije ne podležu kontrolnim mehanizmima proliferacije ćelija. U procesu koji se zove metastaza, maligne ćelije mogu da se odvoje od primarnog tumora i migriraju u druge delove tela, gde nastavljaju sa nekontrolisanim rastom. Brojni spoljašnji faktori, poput izlaganja duvanskom dimu, UV zračenju, industrijskim hemikalijama i humanom papiloma virusu (HPV), mogu značajno povećati rizik za razvoj raka.³ Maligni tumori narušavaju normalne fiziološke funkcije organizma, usled agresivnog rasta, potrošnje fizioloških resursa i stvaranja metabolita koji remete homeostazu organizma.

Jedan od glavnih uslova za uspešno lečenje predstavlja rana dijagnostika. Međutim, nije uvek moguće otkriti tumor na vreme, a tome doprinosi kasno ispoljavanje simptoma bolesti. Razvijeno je nekoliko glavnih pristupa lečenju raka:

Hirurško lečenje – uklanjanje tumora i okolnog tkiva hirurškim putem;

Radioterapija – korišćenje radio–talasa visoke energije za uništavanje proliferativnih ćelija;

Hemoterapija – primena lekova sa citostatičkim ili citotoksičnim dejstvom;

Ciljana terapija – korišćenje lekova koji mogu da specifično blokiraju određene metaboličke puteve ključne za rast i preživljavanje tumorskih ćelija;

Imunoterapija – pomaganje imunom sistemu da prepozna i eliminiše tumorske ćelije;

Hormonska terapija – blokiranje hormona i receptora za prepoznavanje hormona kod tumorskih ćelija čiji rast zavisi od hormona (rak dojke, prostate, materice);

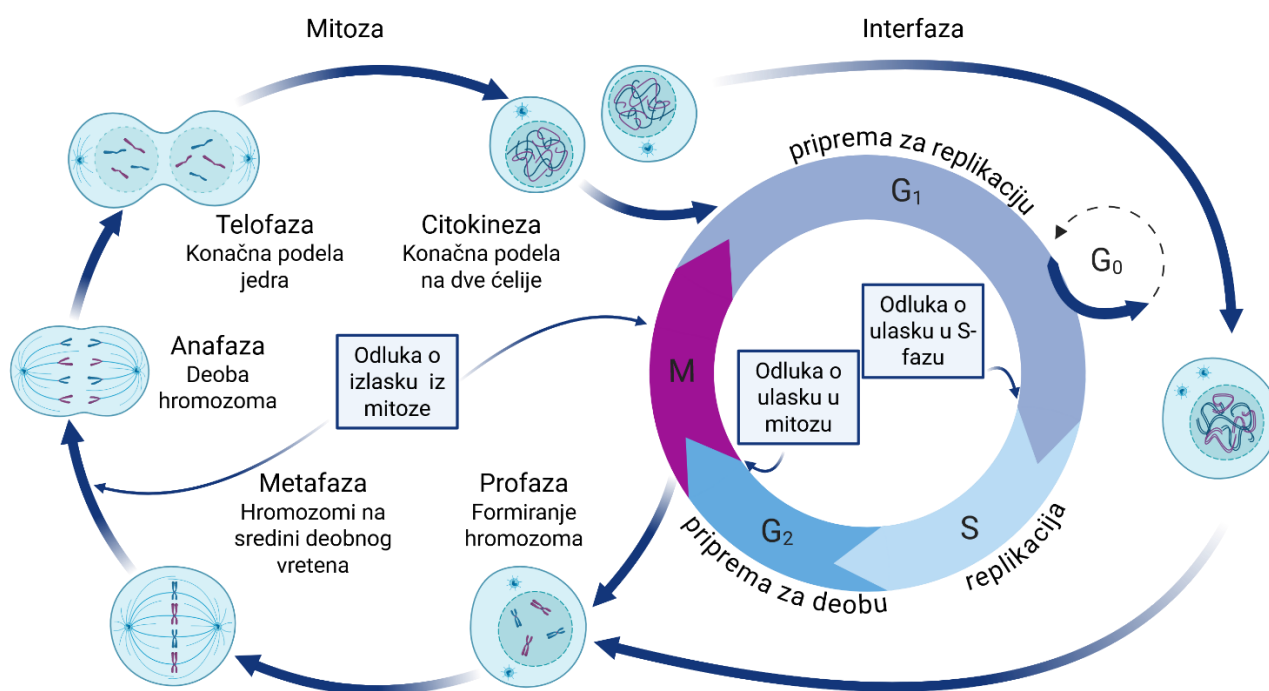
Nanoterapija – korišćenje nanočestica za efikasniju isporuku terapeutika.

Tumorske ćelije podležu različitim procesima koji dovode do genetskih i epigenetskih razlika unutar same tumorske mase.⁴ Posledica intratumorske heterogenosti je da različiti delovi istog tumora mogu drugačije reagovati na tretmane, što dalje može dovesti do pojave rezistencije na primenjenu terapiju. Dodatni problem predstavlja činjenica da hemoterapija i radioterapija oštećuju i zdrave ćelije, dok nepotpuno uklanjanje tumora može dovesti do recidiva i metastaze nakon završetka terapije.

Uprkos mogućnosti korišćenja različitih pristupa u lečenju, rak i dalje ostaje jedan od vodećih uzroka smrtnosti. Uzimajući ovo u obzir, poseban značaj za efikasnije lečenje ima dublje razumevanje mehanizama nastanka i progresije bolesti, unapređenje dijagnostičkih metoda, ali i identifikacija i sinteza novih terapijskih agenasa.

2.1. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus predstavlja uređeni i kontrolisani sled događaja kroz koje ćelija prolazi pripremajući se za deobu i tokom same deobe na dve ćelije.⁵ U najširem smislu, ćelijski ciklus se sastoji od interfaze i M-faze (mitoza kod somatskih ćelija). Tokom interfaze ćelija raste, sintetiše DNK, RNK i proteine, dok se u M-fazi genetski materijal ravnomerno raspoređuje u dve ćerke ćelije. Interfaza se može podeliti na tri uzastopne faze. Prva je prereplikativna G1 faza (engl. *gap phase*) u kojoj ćelija intenzivno sintetiše proteine i priprema se za replikaciju DNK. U ovoj fazi donosi se ključna odluka da li će ćelija ući u ciklus ili će ući u neproliferativnu fazu G0, u kojoj se nalazi većina ćelija u telu odraslog čoveka. Sledi faza sinteze (S-faza) tokom koje dolazi do replikacije DNK. U poslednjoj, postsintetičkoj G2 fazi, ćelija se priprema za deobu. Nakon interfaze, ćelija ulazi u M-fazu, koja se u idealnom slučaju završava nastankom dve nove, genetski identične ćelije. Tokom ćelijskog ciklusa postoje tri glavne kontrolne tačke, locirane u G1, G2 i M fazi, koje omogućavaju detekciju i korekciju potencijalnih grešaka u genetskom materijalu. Ove kontrolne tačke imaju ključnu ulogu u očuvanju genomske stabilnosti, jer mogu usporiti ili potpuno zaustaviti progresiju ćelijskog ciklusa, čime se sprečava dalje umnožavanje oštećenih ćelija.⁶



Slika 1. Prikaz ćelijskog ciklusa somatske ćelije (napravljeno pomoću platforme *BioRender.com*).

Najčešće mutacije koje se javljaju kod raka obuhvataju mutacije gena tumor-supresorskog proteina p53, kao i promene koje dovode do pojačane transkripcije gena uključenih u prelazak iz G1 u S fazu.^{7,8} Takođe, pokazano je da je c-Myc protein kontinuirano eksprimiran u tumorskim ćelijama i da predstavlja ključni onkogen u procesu tumorigeneze.⁹ Kod ćelija tumora je izražen replikativni stres usled ubrzanog ulaska ćelija u S fazu.¹⁰ Ovaj fenomen nastaje kao posledica grešaka u sintezi DNK, prekomerne ekspresije onkogenih, kao i metaboličkih i oksidativnih poremećaja u ćeliji. Mehanizmi kontrole replikativnog stresa dovode do usporavanja sinteze DNK i stabilizacije replikacionih viljuški, čime se omogućava popravka DNK.¹¹ Međutim, prolongirano trajanje replikacije može rezultovati kidanjem dvolančane DNK i kolapsom replikacionih viljuški. Smatra se da je replikativni stres izvor genomske i hromozomske nestabilnosti i da može predstavljati uzrok

tumorske heterogenosti.¹² Na prelazu iz metafaze u anafazu aktivan je sistem kontrole zadužen za pravilno sastavljanje deobnog vretena i ravnomernu podelu hromozoma (engl. *spindle assembly checkpoint*).¹³ Poremećaji u ovom kontrolnom sistemu predstavljaju jedan od uzroka aneuploidije, odnosno prisustva nepravilnog broja hromozoma u ćeliji, što može biti posledica poremećene ekspresije gena uključenih u regulaciju deobnog vretena.¹⁴ Zbog kontinualne proliferacije, ćelije raka su posebno zavisne od mehanizama kontrole ćelijskog ciklusa, što predstavlja osnovu za razvoj terapijskih strategija usmerenih na modulaciju ovih procesa.

2.2. Ćelijska smrt

Ćelijska smrt predstavlja proces u kojem ćelija trajno gubi sposobnost obavljanja svojih vitalnih funkcija.¹⁵ Može biti programirana, kada je tok ćelijske smrti genski regulisan, kao u slučaju apoptoze, ili nekontrolisana, kada se odvija u vidu nekroze.¹⁶ Programirana ćelijska smrt ima ključnu ulogu tokom razvoja i održavanja homeostaze organizma, jer omogućava eliminaciju ćelija koje su funkcionalno oštećene, neadekvatno diferencirane ili više ne mogu da obavljaju normalne fiziološke funkcije.¹⁶

Nekroza predstavlja oblik nekontrolisane ćelijske smrti koji se odvija bez utroška energije, pri čemu ćelije prolaze kroz stadijum bubrenja nakon čega dolazi do pucanja ćelijske membrane i izlivanja intracelularnog sadržaja u okolinu.¹⁷ Uglavnom nastaje kao posledica delovanja spoljašnjih faktora, poput ishemije, hipoksije, inflamacije, jonizujućeg zračenja, povišene temperature i izloženosti toksičnim hemikalijama.¹⁸

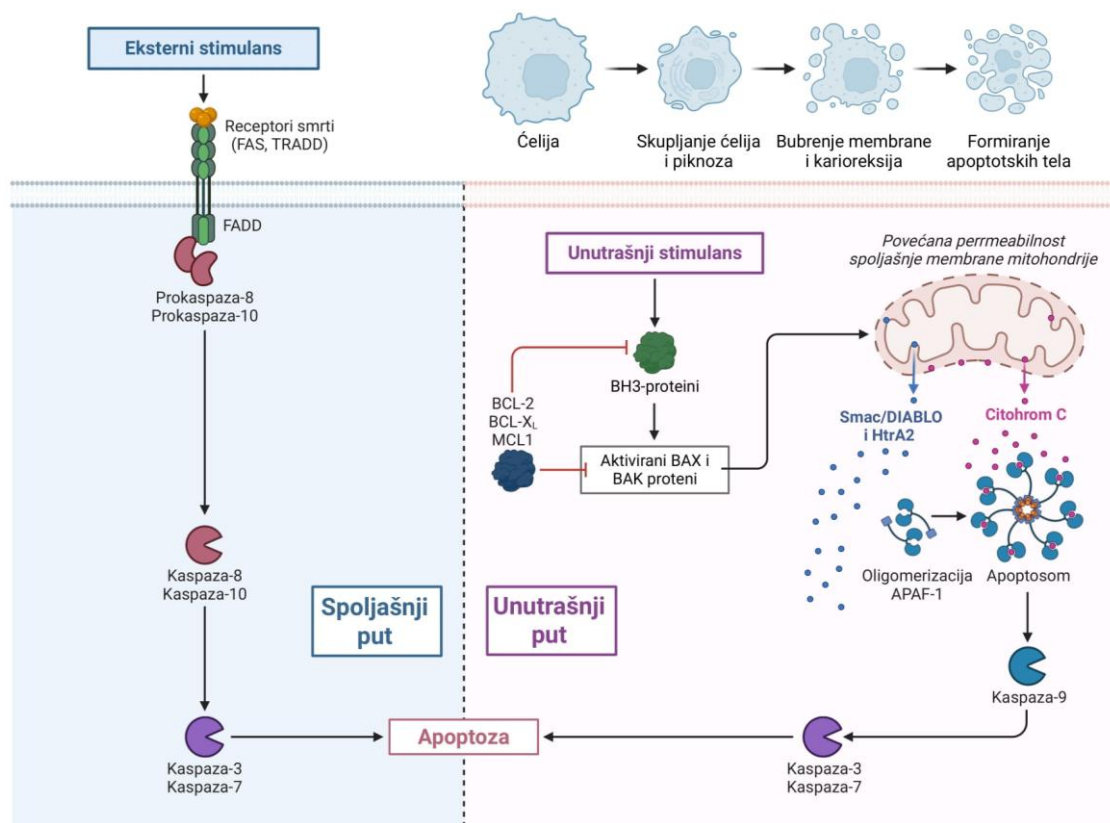
Nekroza se često javlja u čvrstim tumorima, kada zbog širenja tumora ćelije u centralnim delovima tumorske mase ostaju udaljene od krvnih sudova, a samim tim lišene adekvatnog snabdevanja kiseonikom i hranljivim materijama, naročito glukozom.¹⁹ Pucanjem nekrotičnih ćelija dolazi do oslobađanja molekula povezanih sa oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns* – DAMP) koji aktiviraju imunski odgovor i indukuju inflamatorne procese.¹⁹ Hronična inflamacija doprinosi genetskoj nestabilnosti i akumulaciji mutacija, podstiče proliferaciju ćelija i inhibira ćelijsku smrt, čime podstiče dalji rast tumora. Prisustvo nekroze u tumoru je povezano sa lošijom prognozom bolesti i smanjenim odgovorom na terapiju.²⁰

Apoptoza je jedan od vidova programirane ćelijske smrti čiji je mehanizam genski regulisan i determinisan.²¹ Ovaj proces se odvija tokom razvoja i starenja organizma, predstavljajući jedan od načina za očuvanje homeostaze tkiva.¹⁶ Apoptoza je praćena morfološkim promenama: dolazi do smanjenja veličine ćelije (skupljanja) i piknoze (kondenzacije hromatina), nakon čega slede karioreksija (fragmentacija hromatina) i formiranje apoptotskih tela. Apoptotska tela uklanjaju se fagocitozom, čime se sprečava izlivanje ćelijskog sadržaja u okolinu i pojava inflamatornih procesa.²²

Proces apoptoze se odvija uz utrošak energije i zavisi od cistein-aspartičnih proteaza - kaspaza. Kaspaze se mogu svrstati u dve kategorije: inicijatorske kaspaze (8 i 9) i efektorske kaspaze (3, 6 i 7). Postoje dva opšta mehanizma inicijacije apoptoze - unutrašnji (mitohondrijski) put i spoljašnji (put posredovan receptorima smrti) (Slika 2).²³

Unutrašnji mehanizam se pokreće kada je ćelija izložena hipoksiji, zračenju, reaktivnim kiseoničnim vrstama, virusima ili toksičnim reagensima.²⁴ Apoptoza može biti inicirana i neuspehom u inaktivaciji programa smrti u odsustvu signala za preživljavanje kao što su citokini, hormoni i faktori rasta u okolini ćelije. U normalnom stanju pro-apoptotski molekuli su inhibirani, dok aktivirani oblici ovih proteina utiču na permeabilnost membrana mitohondrije otvaranjem MPT (engl. *mitochondrial permeability transition*) pora i otpuštanjem proapoptotskih proteina kao što su citohrom C, Smac/DIABLO i HtrA2 u citosol.²⁵ Citohrom c se dalje vezuje za Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor*) i dATP formirajući apoptosom. Apoptosom vezuje prokaspazu-9 i prevodi je u aktivnu kaspazu-9 koja dalje aktivira efektornu kaspazu-3. Proteini Smac/DIABLO i HtrA2/Omi

inhibiraju proteine familije IAP (engl. *inhibitors of apoptosis* - inhibitori apoptoze).²⁶ Glavni kontrolni mehanizam apoptotskih procesa čine proteini iz Bcl-2 porodice. Ovi proteini regulišu permeabilnost membrane i mogu biti pro-apoptotski (BCL-10, BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BLK, PUMA, NOXA) i antiapoptotski (BCL-2, BCL-X, BCL-XL, BCL-XS, BCL-W, BAG).²⁷ Apoptoza će biti inicirana aktivacijom nekog od pro-apoptotskih proteina, a sprečena aktivacijom nekog od antiapoptotskih proteina.



Slika 2. Shematski prikaz puteva apoptoze (napravljeno pomoću platforme *BioRender.com*).

Spoljašnji mehanizam apoptoze započinje aktiviranjem receptora smrti iz familije TNF (engl. *tumor necrosis factor*) eksprimiranih na površini ćelijske membrane vezivanjem nekog od liganada za receptore smrti (TNFR1, CD95, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2).²⁸ Vezivanjem odgovarajućeg liganda za receptor smrti dolazi do prevođenja prokaspaze-8 u aktivni oblik koji pokreće apoptozu bilo direktnom aktivacijom efektivnih kaspaza, bilo uz učešće proteina mitohondrija u inaktivaciji IAP. Nakon iniciranja apoptoze, efektivne kaspaze aktiviraju endonukleazu CAD u citoplazmi koja razgrađuje DNK. Kaspaza 3 vrši i fragmentaciju gelsolina, proteina koji povezuje aktinske filamente, što kao posledicu ima razaranje citoskeleta i poremećaj intracelularnog transporta i onemogućavanje deobe ćelije.

Iako su tumorske ćelije konstantno izložene faktorima stresa, one uspešno izbegavaju aktivaciju apoptotskih puteva pomoću brojnih mehanizama. Određene mutacije kao što su inaktivacija gena za BH3-proteine (npr. BIM, BID, BAD, PUMA, NOXA) ili kaspaze dovode do rezistencije na pro-apoptotske stimulse.²⁹

2.3. Reaktivne kiseonične vrste

Reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species* - ROS) predstavljaju skup nestabilnih i reaktivnih vrsta koje nastaju tokom nepotpune redukcije kiseonika.³⁰ ROS mogu biti neradikalne vrste, kao što su vodonik-peroksid (H_2O_2), organski hidroperoksidi (ROOH), ozon (O_3), singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), hipohlorasta i hipobromasta kiselina (HOCl , odnosno HOBr), kao i elektronski ekscitovana karbonilna jedinjenja. U radikalne ROS se ubrajaju superoksidni anjon ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroksil- ($\text{OH}^{\cdot}$), peroksil- ($\text{ROO}^{\cdot}$) i alkiloksi-radikali ($\text{RO}^{\cdot}$). ROS nastaju kao sporedni proizvodi normalnih metaboličkih puteva, prvenstveno tokom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, ali i prilikom β -oksidacije masnih kiselina u peroksizomima i oksidacijom proteina u endoplazmatičnom retikulumu. Glavni izvor superoksidnog anjon-radikala su kompleksi I i III elektron-transportnog lanca i NAD(P)H oksidaze.³¹ Superoksid se dejstvom metaloenzima superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase* - SOD) prevodi u vodonik-peroksid i molekulski kiseonik.³² U reakciji superoksida sa azot(II)-oksidom nastaje peroksinitrit ($\text{ONOO}^{\cdot}$), koji je još jače oksidaciono sredstvo. Daljim reakcijama peroksinitrita formiraju se reaktivne azotne vrste (RNS), poput N_2O_3 , $\text{ONOOCO}_2^{\cdot-}$ i $\text{NO}_2^{\cdot}$. Fentonovom reakcijom u prisustvu Fe^{2+} nastaju hidroksil-radikali raspadom vodonik-peroksida. ROS mogu nastati i pod dejstvom eksternih stimulanasa - zagađenog vazduha, radijacije, duvanskog dima, hrane, narkotika i lekova.

U ćelijama ROS imaju i ulogu sekundarnih prenosnika signala.³³ Vodonik-peroksid omogućava reverzibilnu oksidaciju proteina, čime menja njihove aktivnosti, lokalizacije i interakcije sa drugim proteinima.³⁴ Ovaj molekul je uključen u procese proliferacije, diferencijacije, migracije i angiogeneze. Prevelika koncentracija ROS izaziva oksidativni stres, koji narušava signalne puteve i dovodi do nespecifične oksidacije biomolekula, kako reverzibilne, tako i ireverzibilne, što može dovesti do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, senescencije i apoptoze.³⁵ U ćeliji se eksprimiraju antioksidativni proteini, koji štite ćeliju od oksidativnog stresa, kao što su NAD(P)H-hinon dehidrogenaza 1, hem oksigenaza 1, tioredoksin reduktaza, superoksid dismutaze (citosolna Cu/Zn-SOD1 i mitohondrijska Mn-SOD2), glutation peroksidaza i katalaza. Ekspresija gena koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani regulišu Nrf2 (engl. *nuclear erythroid 2-related factor*) i KEAP1 (engl. *kelch-like associated protein 1*) koji podstiče degradaciju Nrf2.³⁶ U uslovima oksidativnog stresa dolazi do inhibicije dejstva KEAP1 što omogućava Nrf2 da se veže za ARE (engl. *antioxidant response element*), specifičan deo DNK, i time aktivira transkripciju antioksidativnih enzima.

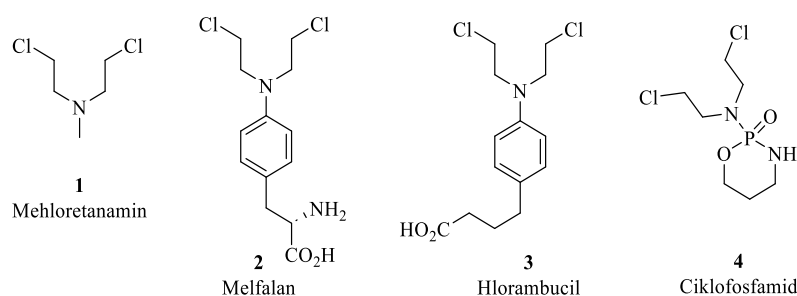
Za tumorske ćelije pokazano je da imaju povišenu koncentraciju ROS u poređenju sa zdravim ćelijama.³⁷ Usled intenzivne proliferacije, tumorske ćelije imaju povećanu potrebu za nutrijentima i energijom, što dovodi do ubrzanja metabolizma i povećane proizvodnje ROS u mitohondrijama. Faktori koji dodatno doprinose povećanom nastanku ROS su mutacije mitohondrijske DNK i hipoksična mikrookolina tumora koja je česta kod solidnih tumora. ROS u tumorskim ćelijama mogu imati dvostruku ulogu: citotoksičnu i onkogenu. Oni oštećuju DNK izazivajući dvostruke prekide DNK lanca kao i oksidaciju ili oksidativnu modifikaciju guanozina u 8-okso-7-hidroksi-2'-deoksiguanozin, koji može da se upari i sa citozinom i sa adeninom, što doprinosi mutagenim promenama. Akumulacija ovih mutacija dovodi do genomske nestabilnosti i karcinogeneze. Kod glioblastoma je pokazano da visoke koncentracije ROS ubrzavaju progresiju tumora pospešujući ekspresiju faktora HIF-1 α (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*) čime se povećava koncentracija serinske proteaze SERPINE1.³⁸ Kod leukemije ROS ubrzavaju glikolizu i stimulišu proliferaciju povećavajući ekspresiju ključnog regulatornog enzima 6-fosfofrukto-2-kinaze/fruktoza-2,6-bifosfataze.³⁹ Ispitivanja na ćelijama mišjeg melanoma (Nex10C) ukazala su da superoksid anjon radikal utiče na Rac1-PI3K signalni put, čime se stimuliše migracija i metastaziranje.⁴⁰ Prevelika koncentracija ROS aktivira apoptozu unutrašnjeg puta aktivacijom proapoptotskih proteina BAK i BAX, kao i spoljašnjeg puta aktivacijom receptora smrti.⁴¹

2.4. Hemoterapeutici

Hemoterapija podrazumeva upotrebu lekova koji ciljaju tumorske ćelije tokom procesa njihove proliferacije. Ovi lekovi deluju tako što inhibiraju mitozu ili oštećuju DNK, što kasnije dovodi do ćelijske smrti.^{42,43} Hemoterapeutici utiču i na zdrave ćelije koje se brzo dele, kao što su ćelije koštane srži, digestivnog trakta i folikula kose, te se kao sporedni efekti hemoterapije javljaju pad imunog sistema usled oštećenja koštane srži, anemija, oboljenja digestivnog trakta, opadanje kose. Hemoterapeutici se prema mehanizmu dejstva mogu svrstati u nekoliko grupa:

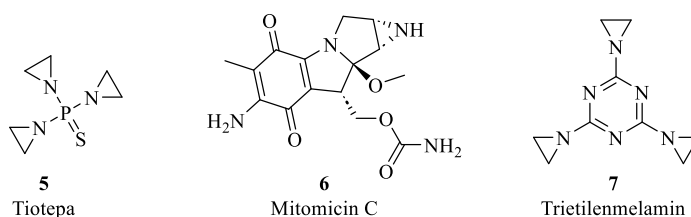
Alkilujuć agensi: izazivaju oštećenja DNK alkilovanjem azotnih baza (najčešće guanina) ili kovalentnim vezivanjem za oba lanca DNK.⁴⁴ Na ovaj način sprečavaju replikaciju i transkripciju, izazivaju prekide u jednom ili oba lanca DNK, što dovodi do apoptoze ćelije. Najveći problem ove klase lekova predstavlja njihova visoka toksičnost, kao posledica neselektivnog delovanja. Hemoterapeutici mogu oštetiti ćelije koštane srži i dovesti do pojave leukemije. Alkilujuć agensi se prema strukturi klasifikuju u nekoliko grupa:

1) Azotni iperiti (Slika 3) - mehloretanamin (**1**), melfalan (**2**), hlorambucil (**3**) i ciklofosfamid (**4**). Mehanizam njihovog dejstva zasniva se na intramolekulskom formiranju aziridinjuma koji može reagovati sa nukleofilima u ćeliji, kao što su bočni ostaci aminokiselina i azotne baze, dajući proizvode otvaranja aziridinskog prstena.⁴⁵



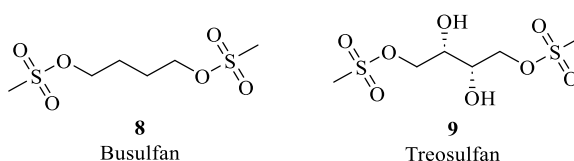
Slika 3. Primeri azotnih iperita.

2) Aziridinski derivati - jedinjenja kao što su tiotepa (**5**), mitomicin C (**6**) i trietilenmelamin (**7**) sadrže aziridinski prsten i imaju sličan mehanizam dejstva kao azotni iperiti (Slika 4).⁴⁶



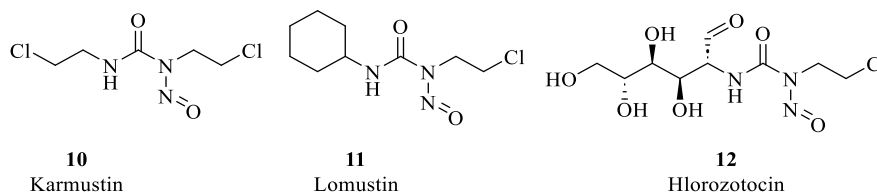
Slika 4. Primeri aziridinskih lekova.

3) Alkil-sulfonati - busulfan (**8**) i treosulfan (**9**) imaju dva elektrofilna ugljenika zahvaljujući kojima mogu da reaguju sa guaninom i adeninom umrežavajući dva lanca DNK (Slika 5).⁴⁷



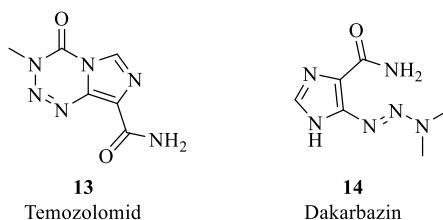
Slika 5. Primeri alkil-sulfonata.

4) Nitrozouree - u svojoj strukturi sadrže 2-hloretil-grupu koja može alkilovati DNK, ali i *N*-nitrozokarbamidnu grupu koja se neenzimski raspada, pri čemu nastaju izocijanat i diazonijum-jon. Ovi produkti mogu vršiti karbamoilovanje odnosno alkilovanje azotnih baza. Na ovaj način *N*-nitrozouree umrežavaju dva lanca DNK, čime se sprečava njihovo rasplitanje prilikom transkripcije i replikacije. U grupu *N*-nitrozouree spadaju karmustin (**11**), lomustin (**12**) i hlorozotocin (**14**), koji se koriste za lečenje maligniteta mozga (Slika 6).⁴⁸



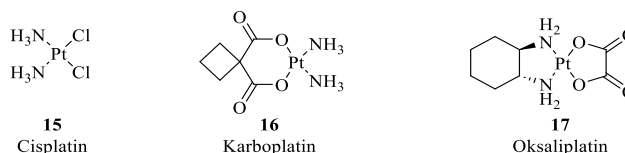
Slika 6. Primeri nitrozourea.

4) Triazeni - odlikuju se triazenskom funkcionalnošću, koja se pod dejstvom enzima jetre raspada, pri čemu nastaje metildiazonijum-jon koji alkiluje nukleotidne baze DNK. Ovoj klasi jedinjenja pripadaju temozolomid (**13**) i dakarbazin (**14**) prikazani na slici 7.⁴⁹



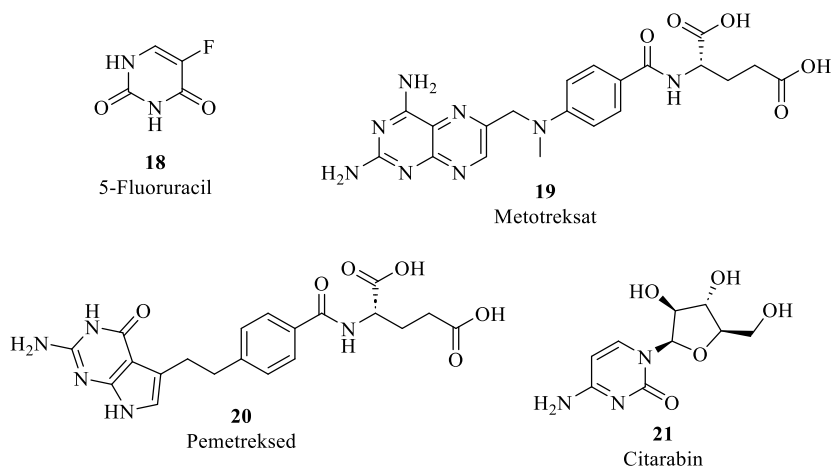
Slika 7. Primeri triazena u kliničkoj upotrebi.

5) Analizi platine - jedinjenja tetrakoordinovane platine, poput cisplatina (**15**), karboplatina (**16**) i oksaliplatina (**17**), koja se vezuju za azotne baze DNK (Slika 8).⁵⁰



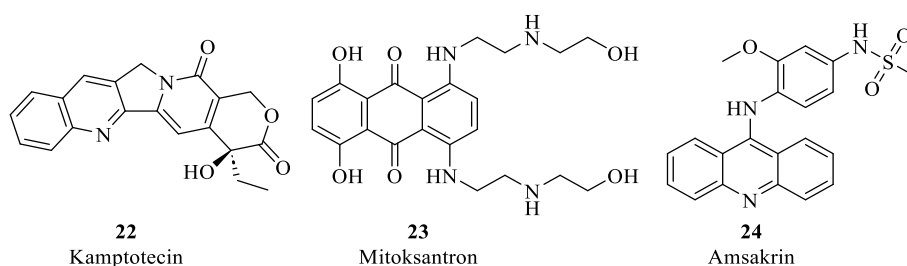
Slika 8. Primeri analoga platine u kliničkoj upotrebi.

Antimetaboliti: klasa lekova koja je strukturno slična purinskim i pirimidinskim bazama, nukleozidima i folatnim kofaktorima potrebnim za biosintezu nukleotida (Slika 9). Antimetaboliti deluju tako što inhibiraju enzime uključene u procese replikacije i transkripcije ili se ugrađuju u nukleinske kiseline. Primeri antimetabolita koji se koriste u kliničkoj praksi su 5-fluoruracil (**18**), metotreksat (**19**), pemetreksed (**20**) i citarabin (**21**).^{51, 52}



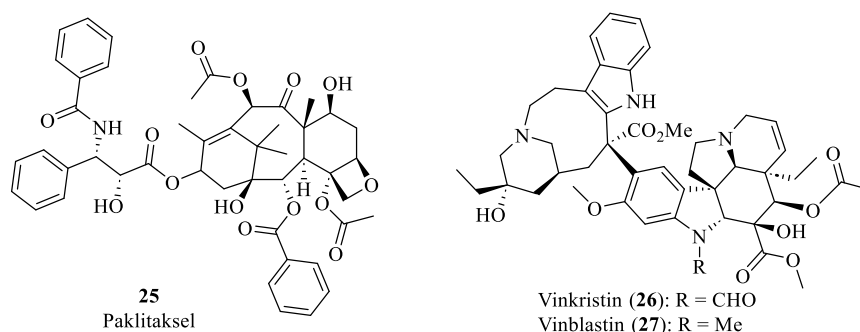
Slika 9. Primeri antimetabolita u kliničkoj upotrebi.

Inhibitori topoizomeraza: utiču na topoizomerase, enzime koji učestvuju u replikaciji i transkripciji i održavaju strukturnu stabilnost DNK (Slika 10). Topoizomeraza I privremeno raskida jedan od DNK lanaca, omogućavajući njegovo odmotavanje, dok topoizomeraza II uvodi dvolančane prekide DNK, što omogućava razdvajanje isprepletanih molekula DNK. U inhibitore topoizomeraze I spadaju kamptotecin (**22**) i njegovi analozi, dok u inhibitore topoizomeraze II spadaju mitoksantron (**23**) i amsakrin (**24**).^{53,54}



Slika 10. Primeri inhibitora topoizomeraza.

Antimikrotubularni agensi: inhibiraju polimerizaciju mikrotubula, čime onemogućavaju pravilno funkcionisanje deobnog vretena što dovodi do apoptoze. U ovu grupu spadaju paklitaksel (**25**) i vinka alkaloidi - vinkristin (**26**) i vinblastin (**27**) (Slika 11).⁵⁵



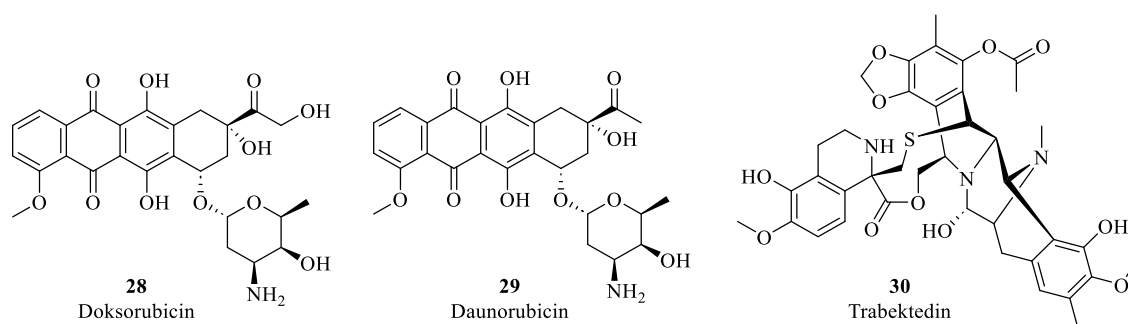
Slika 11. Antimikrotubularni agensi.

Efikasnost hemoterapeutika može se značajno poboljšati primenom nanoterapije. Nanoterapija predstavlja savremeni terapijski pristup koji koristi nanočestice za ciljanu isporuku lekova do tumorskih ćelija.⁵⁶ Na ovaj način moguće je postići veću efikasnost lekova, dužu metaboličku stabilnost, povećanu rastvorljivost, produženo vreme delovanja, kao i smanjenje

negativnih efekata na zdrava tkiva. Razvijeno je više strategija za pripremu nanoformulacija, uključujući enkapsulaciju lekova u liposome, micelarne sisteme, dendrimere, kao i neorganske i polimerne nanočestice.⁵⁷ Nanonosači se mogu funkcionalizovati specifičnim ligandima na svojoj površini, koji omogućavaju prepoznavanje tumorskih ćelija i dovode do selektivne apsorpcije lekova.⁵⁸ Primeri nanoterapeutika u kliničkoj upotrebi uključuju Doxil i Myocet (lipozomalne formulacije doksorubicina), Vyxeos (lipozomalna formulacija daunorubicina i citarabina), Genexol (micelarna formulacija paklitaksela) i Marqibo (lipozomalni vinkristin-sulfat).^{59,60}

2.5. Prirodni proizvodi u terapiji raka

Primeri prirodnih proizvoda sa antitumorskom aktivnošću su brojni, ali je tek nekolicina njih ušla u kliničku upotrebu. Paklitaksel (**25**) (Slika 11), izolovan iz drveta tise, *Taxus brevifolia*, koristi se u kliničkoj praksi za lečenje raka jajnika, dojke, grlića materice, jednjaka, pankreasa i Kapošijevog sarkoma.⁶¹ Mehanizam njegovog dejstva zasniva se na vezivanju za mikrotubule deobnog vretena, čime se sprečava njihova depolimerizacija i zaustavlja ćelijska deoba na prelazu iz metafaze u anafazu. Vinkristin (**26**) i vinblastin (**27**) (Slika 11), koji spadaju u grupu vinka alkaloida, izolovani iz *Catharanthus roseus*, koriste se za lečenje raka testisa, mozga, pluća, bešike, melanoma i Hodžkinsovog limfoma. Deluju tako što sprečavaju polimerizaciju tubulinskih dimera i formiranje deobnog vretena.⁶² Antraciklini doksorubicin (**28**) i daunorubicin (**29**) (Slika 12), izolovani iz bakterija roda *Streptomyces*, spadaju u inhibitore topoizomeraza. Oni interkaliraju DNK i istovremeno stabilizuju kompleks koji topoizomeraza II formira kada preseče DNK dovodeći do akumulacije dvolančanih prekida DNK i ćelijske smrti.^{63,64} Koriste se za lečenje raka dojke, bešike, limfoma, Kapošijevog sarkoma i akutne limfocitne leukemije.⁶⁵ Trabektedin (**30**), izolovan iz plaštaša *Ecteinascidia turbinata*, koristi se za lečenje sarkoma mekog tkiva i raka jajnika. Mehanizam njihovog delovanja nije u potpunosti razjašnjen. Pokazano je da se vezuje za manji žleb heliksa DNK i metiluje guaninske baze, čime dovodi do deformacije strukture DNK i ometa transkripciju i replikaciju.⁶⁶

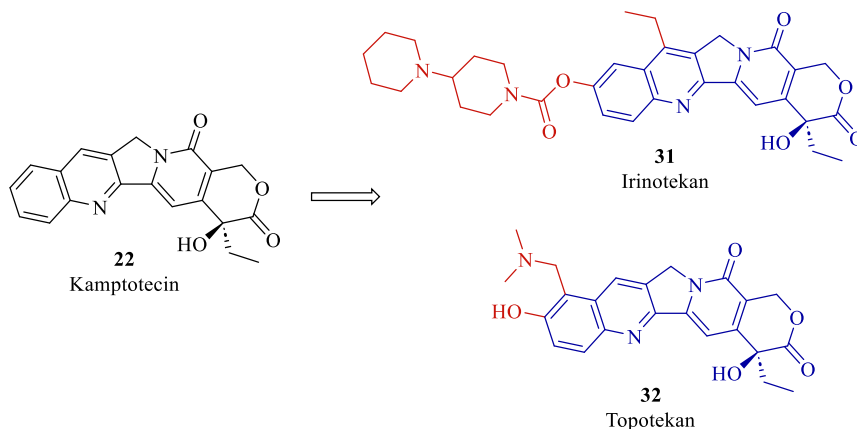


Slika 12. Prirodni proizvodi sa antitumorskom aktivnošću u kliničkoj upotrebi.

2.5.1. Semisintetski derivati prirodnih proizvoda u terapiji raka

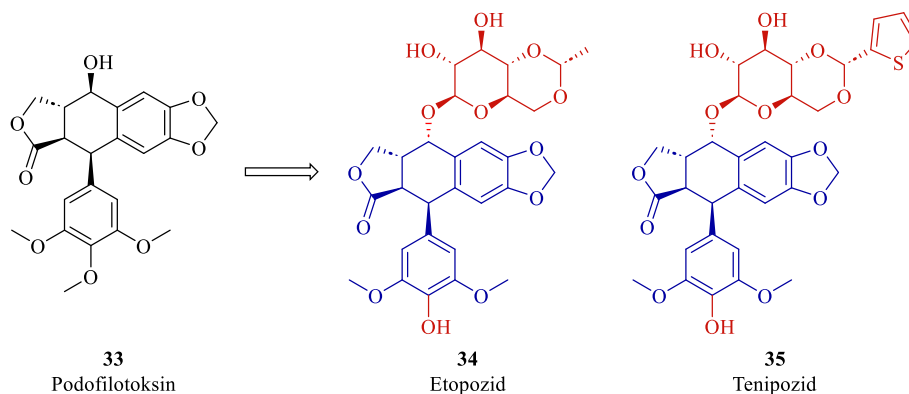
Sekundarni metaboliti često predstavljaju osnovu za sintezu semisintetskih derivata. Strukturne modifikacije mogu da dovedu do boljih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih osobina, kao što su smanjena toksičnost, poboljšana rastvorljivost, povećana hemijska stabilnost i otpornost na metaboličku razgradnju.⁶⁷⁻⁶⁹ Kamptotekani su inhibitori topoizomeraze I, izvedeni iz monoterpenskog alkaloida kamptotecina (**22**) (Slika 13), izolovanog iz biljke *Camptotheca acuminata*.⁷⁰ I pored izražene antitumorske aktivnosti, kamptotecin ima ograničenu efikasnost usled brze hidrolize, slabe rastvorljivosti u vodi i visoke toksičnosti prema ćelijama. Irinotekan (**31**) je semisintetski derivat kamptotecina kojem je rastvorljivost u vodi povećana uvođenjem karbamatnog bočnog ostatka na C-9 (Slika 13). U *in vivo* uslovima irinotekan podleže hidrolizi bočnog ostatka i prelazi u aktivnu supstancu. Koristi se za lečenje raka debelog creva i

sitnoćelijskog karcinoma pluća. Topotekan (**32**), zahvaljući dimetilamino-grupi (Slika 13), u fiziološkim uslovima postoji u obliku amonijum-soli što ga čini rastvorljivijim u vodi. Ušao je u kliničku upotrebu za lečenje raka grlića materice, jajnika i pluća.



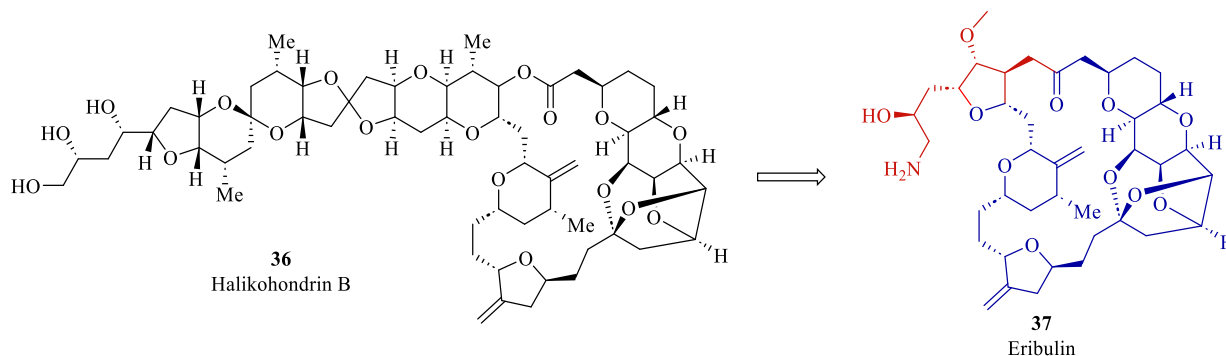
Slika 13. Analozi kamptotecina (**22**) - irinotekan (**31**) i topotekan (**32**).

Podofilotoksin (**33**) (Slika 14), izolovan iz biljaka roda *Podophyllum*, pokazao je potentnu antitumorsku aktivnost protiv karcinoma pluća, limfoma i genitalnih tumora, i ponaša se kao inhibitor polimerizacije tubulina.⁷¹ Nije bio pogodan za lečenje maligniteta zbog pojave neželjenih dejstava kao što su mučnina, povraćanje i oštećenje normalnog tkiva. Kako bi se to prevazišlo, razvijeni su semisintetski derivati etopozid (**34**) i tenipozid (**35**), koji se odlikuju glukozidnom acetalnom podjedinicom. Ova strukturna modifikacija uticala je na mehanizam dejstva i omogućila vezivanje jedinjenja za topoizomerazu II. Formiraju ternarni kompleks sa DNK, čime ometaju popravku jednostrukih prekida DNK lanaca. Ova jedinjenja našla su primenu u lečenju sitnoćelijskog karcinoma pluća, limfoma i Kapošijevog sarkoma.



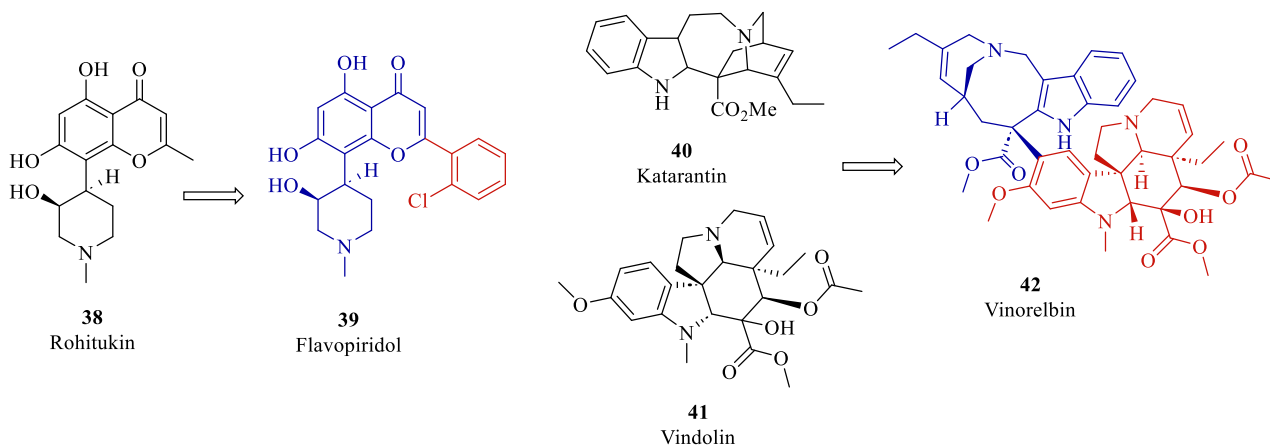
Slika 14. Podofilotoksin (**33**) i njegovi analozi.

Halikohondrin B (**36**) (Slika 15) je polietarski makrolid izolovan iz vrste sundera *Halichondria okadai*.⁷² Njegov strukturno jednostavniji analog, eribulin (**37**), koristi se za lečenje metastatskog raka dojke i liposarkoma. U ćelijama, eribulin smanjuje koncentracije tubulina potrebnog za formiranje deobnog vretena, indukujući njegovu agregaciju i sprečavajući pravilnu polimerizaciju.



Slika 15. Halikohondrin B (36) i eribulin (37).

Flavopiridol (38) (Slika 16) je sintetski inhibitor ciklin-zavisnih kinaza i koristi se za lečenje akutne mijeloidne leukemije.⁷³ Rohitukin (39), flavonski alkaloid izolovan iz biljaka roda *Dysoxylum*, poslužio je kao inspiracija za njegovo dobijanje. Vinorelbin (42) je sintetski analog vinkristina i vinblastina. Dobija se semisintetskim postupkom, polazeći od prirodnih alkaloida katarantina (40) i vindolina (41).⁷⁴ Njegov mehanizam dejstva sličan je mehanizmu dejstva ostalih vinka-alkaloida, a koristi se za lečenje nesitnoćelijskog karcinoma pluća i raka dojke.



Slika 16. Sintetski lekovi inspirisani prirodnim proizvodima u kliničkoj upotrebi - flavopiridol (39) i vinorelbin (42).

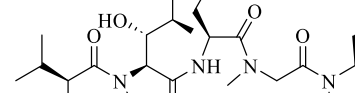
2.6. P-glikoprotein i uloga u višestrukoj rezistenciji na lekove

Višestruka rezistencija na lekove (engl. *multidrug resistance*, MDR) nastaje kada maligne ćelije postanu otporne na različite vrste antitumorskih lekova, te uspevaju da prežive uprkos primeni terapije.⁷⁵ Pojava rezistencije je jedan od glavnih razloga za neuspeh hemoterapije prilikom lečenja raka. Rezistencija kod malignih ćelija može biti urođena, usled urođenih genetskih i metaboličkih promena prisutnih pre izlaganja hemoterapeuticima, ili stečena, kada se razvija nakon izlaganja ćelija lekovima. Postoje različiti mehanizmi kojima dolazi do nastanka rezistencije, kao što su aktiviranje proto-onkogeni i inhibicija tumorskih supresora, promene u ciljnim molekulima lekova, promene u metabolizmu tumora, efluks lekova transmembranskim transporterima i promene u tumorskom mikrokruženju. Značajan doprinos razvoju rezistencije imaju ABC (engl. *ATP-binding cassette*) transportni proteini, familija ATP-zavisnih pumpi, koji vrše efluks ksenobiotika i toksičnih supstanci kroz ćelijsku membranu radi održavanja homeostaze. Do sada je prijavljeno 48 različitih ABC proteina kod ljudi, dok je za 13 proteina potvrđeno da direktno ili indirektno učestvuju u razvoju MDR, među kojima su najpoznatiji P-glikoprotein (glikoprotein permeabilnosti, ABCB1/MDR1),

2.6.1. Inibitori P-glikoproteina



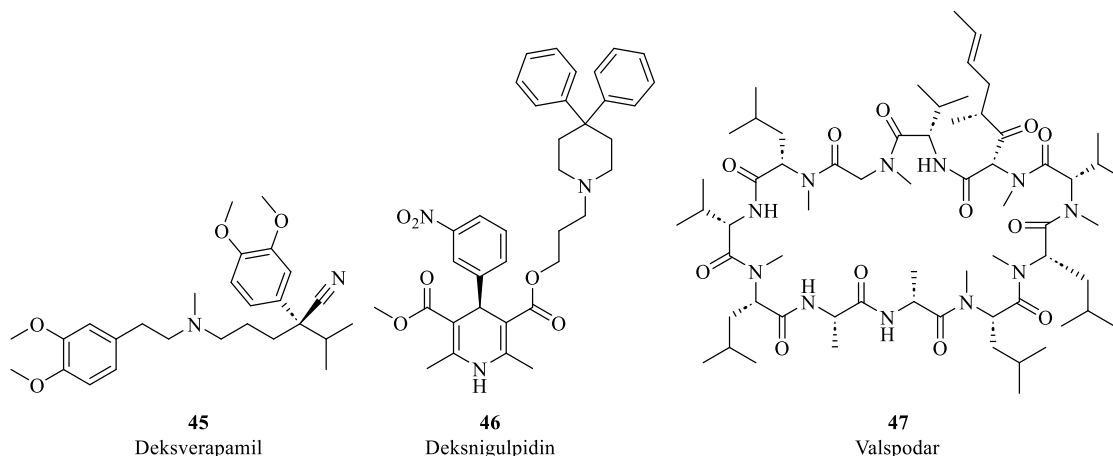
43
Verapamil



44
Ciklosporin A

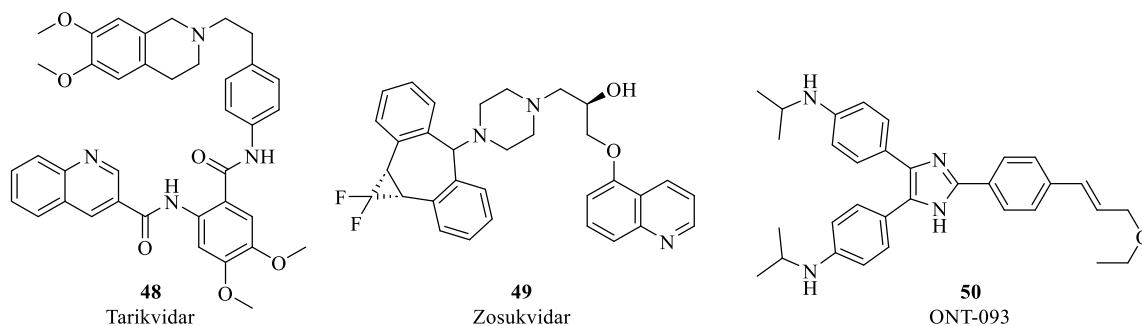
Druga generacija inhibitora razvijena je modifikacijama i enantiomernim razdvajanjem inhibitora prve generacije, sa ciljem dobijanja molekula bez neželjenih farmakoloških osobina izvornog leka (Slika 18). Deksverapamil (**45**), *R*-enantiomer verapamila, pokazao je slabiju sposobnost blokade kalcijumskih kanala, uz očuvanu potentnost prema P-glikoproteinu.⁸⁷ Deksnigulpidin (**46**) ispoljava i do 45 puta slabiju inhibiciju kalcijumskih kanala u poređenju sa odgovarajućim *S*-enantiomerom nigulpidina, ali zadržava jednaku efikasnost u modulaciji P-gp i reverziji rezistencije.⁸⁸ Valspodar (**47**), strukturni analog ciklosporina A (**44**), ispoljava veću potentnost u modulaciji aktivnosti P-gp u odnosu na ciklosporin A, ali nema imunosupresivno dejstvo.⁸⁹ Iako se ova generacija odlikovala poboljšanim farmakološkim profilom, inhibicija metabolizma i ekskrecije citotoksičnih jedinjenja dovođila je do izražene toksičnosti. Dodatno, budući da su ove supstance supstrati citohroma P-450, i udružena inhibicija izoenzima CYP3A4 i

ABC transportera dovela je do značajnih lek-lek interakcija, što je zahtevalo prilagođavanje doza prilikom primene.



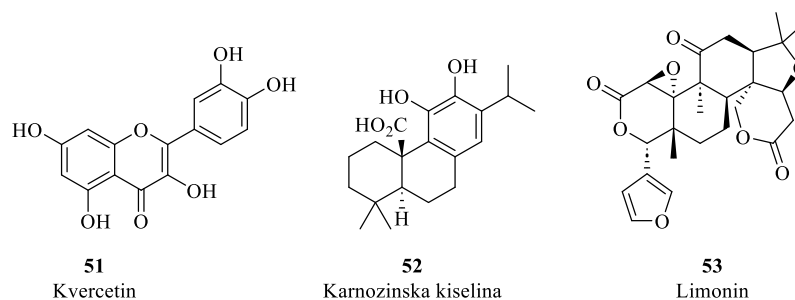
Slika 18. Inhibitori P-glikoproteina II generacije.

Na osnovu rezultata prve i druge generacije inhibitora, kao i ispitivanja veze između strukture i aktivnosti (SAR), dizajnirani su inhibitori treće generacije (Slika 19), kao što su tarikvidar (**48**)⁹⁰, zosukvidar (**49**)⁹¹ i ONT-093 (**50**).⁹² Ova jedinjenja nekompetitivno inhibiraju P-gp i imaju mali uticaj na farmakokinetiku citotoksičnih lekova, čime se smanjuje rizik od sistemske toksičnosti. Potencijalni problem u primeni ovih jedinjenja predstavlja njihova sposobnost inhibicije P-glikoproteina u tkivima gde on ima zaštitnu ulogu (krvno-moždana barijera i gastrointestinalni trakt). Inhibitori treće generacije imaju ograničenu kliničku primenu usled male kliničke efikasnosti i pojave neželjenih efekata.



Slika 19. Inhibitori P-glikoproteina III generacije.

U četvrtu generaciju inhibitora P-gp spadaju prirodni proizvodi i njihovi analozi, kao i peptidomimetici, surfaktanti i lipidi.⁸⁰ Do sada je testiran veliki broj flavonoida, kumarina, halkona, alkaloida, bufadienolida, kardenolida i različitih klasa terpena u cilju ispitivanja uticaja na P-gp.⁹³ Flavonoid kvercetin (**51**), izolovan iz listova biljke *Ginkgo biloba*, interaguje sa P-gp, MRP1 i BCRP transportnim proteinima⁹⁴, dok kod različitih tumorskih ćelija dovodi do senzitivizacije na 5-fluoruracil (**18**), cisplatin (**15**), doksorubicin (**28**) i paklitaksel (**25**).⁹⁵ Diterpen karnozinska kiselina (**52**) dovodi do senzitivizacije na daunorubicin kod ćelija raka grlića materice,⁹⁶ dok tetranortriterpen limonin (**53**), sastojak mnogih vrsta citrusa, dovodi do reverzije rezistencije na doksorubicin inhibicijom P-glikoproteina kod ćelijskih linija leukemije i raka debelog creva.⁹⁷



Slika 20. Primeri inhibitora P-gp četvrte generacije.

2.7. Glioblastom

Gliomi su grupa tumora centralnog nervnog sistema (CNS) koji nastaju iz glijalnih ćelija. Difuzni gliomi odraslih mogu se klasifikovati prema molekularnim karakteristikama u astrocitome (gradusi 2–4), oligodendrogliome (gradusi 2 i 3) i glioblastome (gradus 4).⁹⁸ Astrocitomi i glioblastomi nastaju iz astrocita, pomoćnih ćelija CNS zvezdastog oblika. Kod astrocitoma gradusa 4 prisutne su mutacije gena *IDH*, dok kod glioblastoma ove mutacije ne postoje (engl. *IDH-wildtype*). Druge genske karakteristike glioblastoma su mutacije *TERT* promotera i *EGFR* gena, dok su kod najvećeg broja glioblastoma prisutne i mutacije *TP53*.⁹⁹

Glioblastom spada u najčešće i najagresivnije oblike glioma. Javlja se kod svih starosnih grupa, a najčešći je kod osoba starosti između 55 i 60 godina.^{100,101} Prosečan životni vek nakon dijagnoze iznosi 14-15 meseci, uprkos dostupnim metodama lečenja. Faktori rizika za razvoj glioblastoma nisu u potpunosti utvrđeni, međutim, dokazano je da jonizujuće zračenje povećava rizik za nastanak bolesti. Drugi faktori, kao što su izlaganje hemikalijama (vinil-hlorid, pesticidi) i pušenje, ne mogu se sa sigurnošću povezati sa razvojem bolesti. Određena genetska oboljenja, kao što su Li-Fraumeni sindrom, neurofibromatoza tip 1 i tip 2, tuberozna skleroza, povećavaju rizik od nastanka glioblastoma.^{102,103}

Glioblastom se javlja kao lezija nepravilnog oblika u beloj moždanoj masi, a ćelijska populacija tkiva je pleomorfna. Prema starijoj klasifikaciji, glioblastomi mogu biti primarni i sekundarni tip u zavisnosti od kliničke slike, ali i genetskih faktora. Primarni tip se javlja bez ikakve postojeće lezije u mozgu, dok sekundarni nastaje iz već postojećeg maligniteta, najčešće iz difuznog ili anaplastičnog astrocitoma. Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO, World Health Organization) iz 2021. godine, sekundarni glioblastom je klasifikovan kao astrocitom gradusa 4 zbog prisustva mutacije *IDH*.⁹⁸

Poslednji značajan napredak u standardnoj terapiji glioblastoma bio je 2005. godine, kada se preporučilo lečenje kombinacijom operativnog uklanjanja što većeg dela tumora, adjuvantne radioterapije i hemoterapije uz primenu temozolomida (**13**).¹⁰⁴ Najveći izazov u lečenju glioblastoma leži u činjenici da se ovaj tip tumora odlikuje velikom histopatološkom heterogenošću, kao i da kod većine pacijenata dolazi do nastanka stečene rezistencije na hemoterapeutike.¹⁰⁵ Značajnu prepreku predstavlja i činjenica da većina antitumorskih lekova u kliničkoj upotrebi predstavlja pogodne supstrate za P-gp i teško prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, čime je smanjena efikasnost lečenja. Kod većine pacijenata dolazi do recidiva bolesti, a stopa petogodišnjeg preživljavanja je izuzetno mala (oko 5%).¹⁰⁶

2.8. Nesitnoćelijski karcinom pluća

Karcinom pluća je jedan od vodećih uzroka smrti u svetu, kao i u Srbiji. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC) pri Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), u Srbiji je 2022. godine 6879 ljudi obolelo od raka pluća, dok je 5818 preminulo, što karcinom pluća svrstava među vodeće uzroke smrti. U svetu je prijavljeno 2 480 675 novih slučajeva sa ovom dijagnozom, pri čemu Srbija zauzima visoko mesto po incidenci.¹⁰⁷ Glavni uzročnik raka pluća je pušenje, dok su dokazani faktori rizika zagađenje vazduha, pasivno izlaganje duvanskom dimu, izloženost azbestu, arsenu, hromu, dimu nastalom sagorevanjem drveta, radonu, kao i HIV infekcija, genetski faktori i bolesti pluća.¹⁰⁸ Dva osnovna histološka tipa karcinoma pluća su sitnoćelijski i nesitnoćelijski. Nesitnoćelijski karcinom pluća je češći (85% slučajeva) i deli se na tri podtipa: adenokarcinom, karcinom velikih ćelija pluća i skvamocelularni karcinom.¹⁰⁹

Nesitoćelijski karcinom pluća može se klasifikovati u kliničke stadijume u zavisnosti od veličine tumora, zahvaćenosti lokalnih limfnih čvorova i prisustva metastaza.¹¹⁰ Stadijum 0 (karcinom in situ) se odlikuje prisustvom tumorskih ćelija u površinskom sloju epitela, bez prisustva metastaza. Može se uspešno izlečiti hirurškim uklanjanjem. I stadijum bolesti se odlikuje tumorom lokalizovanim u plućima, bez zahvatanja limfnih čvorova, i može se ukloniti hirurškim putem, a preporučena je adjuvantna terapija. Kod II stadijuma tumor je veći ili se proširio na susedne limfne čvorove. Lečenje obuhvata preoperativnu hemoterapiju, hirurško uklanjanje, pa postoperativnu hemoterapiju, imunoterapiju ili ciljnu terapiju. Kod III stadijuma bolesti tumor je zahvatio okolne strukture ili medijastinalne limfne čvorove. Terapijski pristup je kompleksan i obuhvata kombinaciju hirurškog, radioterapijskog i hemoterapijskog lečenja. IV stadijum bolesti predstavlja stadijum u kojem se tumor proširio i na udaljene organe (metastaze) ili kada je prisutan maligni pleuralni izliv. Lečenje je izrazito kompleksno, ali često neuspešno.

Sekvenciranje DNK tumorskih ćelija omogućilo je klasifikaciju različitih tipova karcinoma pluća i primenu personalizovane ciljane terapije.¹¹¹ Na ovaj način moguće je selektivno uticati na mutirane signalne puteve i metaboličke procese kod tumorskih ćelija, uz minimalan uticaj na zdrava tkiva. Od posebnog interesa za ovaj tip karcinoma su aberacije VEGF/VEGFR signalnog puta, kao i aberacije u genima *KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET*, *MET*, *NTRK*, koje omogućavaju primenu selektivnih tirozin-kinaznih inhibitora, kao što su sotorasib (tumori sa *KRAS* mutacijom), osimertinib (tumori sa *EGFR* mutacijom), lorlatinib (tumori sa rearanžmanima gena *ROS1* ili *ALK*), dabrafenib (tumori sa *BRAF* mutacijom), selpercatinib (tumori sa *RET* mutacijom), capmatinib (tumori sa *MET* mutacijom).¹¹² U terapiji NSCLC primenjuju se i imunoterapeutici tremelimumab, atezolizumab i nivolumab, kao i monoklonska antitela bevacizumab, ramucirumab i amivantamab. Hemoterapija i dalje predstavlja jedan od najčešće primenjivanih terapijskih pristupa lečenju nesitnoćelijskog karcinoma pluća, a najčešće se primenjuju cisplatin (**15**), karboplatin (**16**), pemetreksed (**20**), doksorubicin (**28**), etopozid (**34**) i vinorelbin (**42**) (Slike 6, 7, 9, 12, 14 i 16). Ozbiljan problem prilikom lečenja NSCLC predstavlja pojava rezistencije na ciljanu terapiju. Ona može biti posledica sekundarnih mutacija u genima, promena u signalnim putevima i tumorskoj mikrosredini, prekomerne ekspresije transportera, kao i preobražaja u druge histološke fenotipove.¹¹³

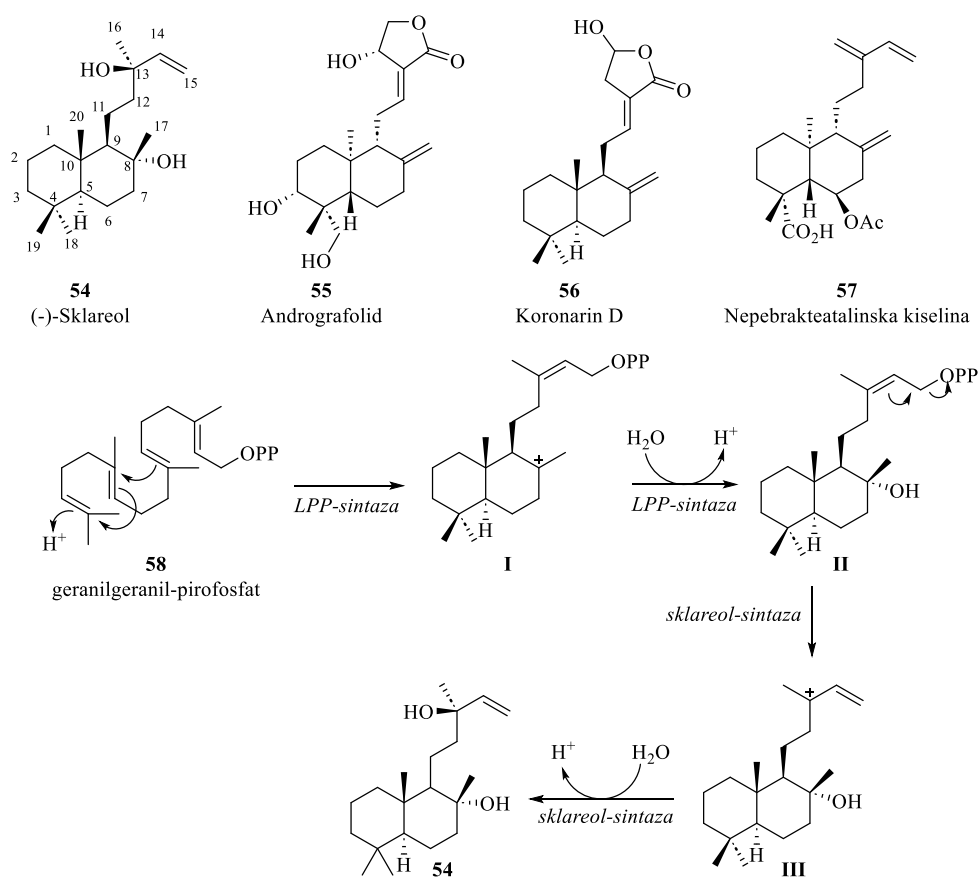
2.9. Sklareol

Labdanski diterpeni predstavljaju grupu jedinjenja koja se odlikuje *trans*-dekalinskim jezgrom i širokim spektrom bioloških aktivnosti. Od posebnog interesa su sklareol (**54**), andrografolid (**55**) i koronararin D (**56**), koji su pokazali potentnu antitumorsku aktivnost (Shema 1). Andrografolid (**55**) ispoljava aktivnost protiv različitih tipova tumora, uključujući rak debelog creva, pluća, dojke, grlića materice, centralnog nervnog sistema, jetre i bubrega. Pokazano je da moduliše signalne puteve kao što su PI3K/Akt, RAS/MEK, FLT3 i kaspazna signalizacija, čime dovodi do inhibicije proliferacije, migracije i invazije, blokade ćelijskog ciklusa, indukcije apoptoze, inhibicije

angiogeneze i prevazilaženja rezistencije na lekove.¹¹⁴ Koronarin D izaziva zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi uz indukciju apoptoze u ćelijskim linijama osteosarkoma i hepatocelularnog karcinoma, dok u ćelijama glioblastoma dovodi do aresta u G1 fazi, fragmentacije DNK, kao i inhibicije proliferacije i migracije.¹¹⁵ Mehanizam dejstva koronarina D zasniva se na aktivaciji JNK (engl. *Jun N-terminal kinase*) i povećanju nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Diterpen nepebraktealinska kiselina (**57**) ima sposobnost spontanog formiranja negativno naelektrisanih nanočestica uniformne veličine, koje pokazuju manju citotoksičnost u poređenju sa monomernom formom, što ukazuje na značaj nanočestičnih struktura za kontrolisano otpuštanje aktivne supstance. Ovo jedinjenje ispoljava antiinflamatorno dejstvo putem inhibicije NF- κ B signalnog puta i smanjenja koncentracije proinflamatornih citokina, dok su in vivo ispitivanja pokazala da povoljno utiče na zarastanje rana, ubrzavajući angiogenezu i depoziciju kolagena.¹¹⁶

Sklareol (**54**) (Shema 1) je labdanski diterpen koji se može naći u biljkama roda *Salvia* (*S. chrysophylla*,¹¹⁸ *S. candidissima*,¹¹⁹ *S. pocalata*,¹²⁰ *S. palaestina*,¹²¹ *S. reuterana*¹²²), roda *Cistus* (*C. incanus* subsp. *creticus*¹²³), biljkama *Gnaphalium pellitum*, *Gnaphalium graveolens*, *Nicotiana glutinosa*, *Teucrium orientale*,¹²⁴ kao i u biljkama vrste *Acacia*.¹²⁵ Odlikuje se terminalnom dvostrukom vezom između ugljenika 14 i 15, kao i dvema tercijarnim hidroksilnim grupama na položajima 8 i 13.



Shema 1. Labdanski diterpeni i biosinteza sklareola.

Biosinteza sklareola (Shema 1) započinje ciklizacijom geranylgeranyl-pirofosfata (**58**) u karbokatjon **I**.¹²⁶ Hidroksilacijom položaja 8, katalizovanom diterpen-sintazom II (LPP-sintazom), dobija se labda-13-en-8-ol-difosfat (**II**). Daljom eliminacijom pirofosfata, katalizovanom diterpen-sintazom I (sklareol-sintaza), dolazi do nastanka alilnog karbokatjona **III**, čijom daljom hidroksilacijom u položaju 13 nastaje sklareol.

2.9.1. Antitumorska aktivnost sklareola

Sklareol je našao primenu kao prirodni mirisni sastojak šampona, etarskih ulja u komercijalnoj upotrebi, parfemima, sapunima i deterdžentima. Odlikuje se niskom toksičnošću i ne izaziva neželjena dejstva prilikom oralnog unosa.¹²⁷ Dosadašnja ispitivanja ukazala su da sklareol poseduje širok spektar bioloških aktivnosti.¹²⁸

Ispitivanja sprovedena na ćelijskim linijama leukemije pokazala su da sklareol ispoljava snažan citostatički efekat, sa IC_{50} vrednošću ispod 20 $\mu\text{g/mL}$ nakon 48 h tretmana. Primećena je inhibicija sinteze DNK i zaustavljanje ćelijskog ciklusa, uz akumulaciju ćelija u G0/G1 fazi.¹²⁸ Detaljnija ispitivanja mehanizma pokazala su da apoptoza nastaje usled značajnog smanjenja koncentracije proonkogenog c-Myc proteina u ćelijama.¹¹³ Sklareol nije uticao na koncentraciju Bcl-2 proteina, koji inhibira otpuštanje citohroma C iz međumembranskog prostora mitohondrija prilikom otpočinjanja apoptoze.¹²⁹

Sprovedena su detaljna istraživanja uticaja sklareola na ćelije humanog karcinoma debelog creva. Pokazano je da sklareol dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi pri koncentraciji od 100 μM .¹³⁰ Analiza ćelijskog ciklusa je ukazala na razliku između proliferativnih i neproliferativnih ćelija - ćelije u G1 fazi ostajale su vijabilne, dok su ćelije u drugim fazama ciklusa imale fragmentisanu DNK što je dovelo do ulaska u apoptozu. Primećen je porast koncentracije kaspaza 8 i 9 nakon tretmana sklareolom, što ukazuje na aktivaciju i spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze. Kod tretiranih ćelija je primećena snižena koncentracija proteina PARP (engl. *poly(ADP-ribose) polymerase*) familije. PARP familija enzima učestvuje u popravci DNK, a poznato je da je koncentracija PARP povećana kada je DNK ćelije značajno oštećena.¹³¹ Inhibicija i smanjenje koncentracije PARP u ćeliji dovodi do povećanja osetljivosti tumora na hemoterapeutike koji oštećuju DNK, kao i do indukcije smrti ćelija zavisnih od PARP-a.¹³² Indukcija apoptoze sklareolom bila je ireverzibilna, jer je apoptoza nastupila i nakon premeštanja prethodno tretiranih ćelija u medijum bez sklareola. Efikasnost sklareola protiv karcinoma debelog creva je ispitana i *in vivo* korišćenjem humanog ksenografta u mišjem modelu.¹³³ Zbog velike lipofilnosti i slabe rastvorljivosti sklareola u vodenim rastvorima, primenjena je enkapsulacija u liposome izgrađene od fosfatidilholina i dipalmitoilfosfatidilglicerola. Primenom ovakve formulacije, tumori kod miševa su smanjeni do 50% u poređenju sa kontrolnom grupom. Enkapsulacija je omogućila primenu više doze sklareola (275 mg/kg) u poređenju sa vodenim nosačem (50 mg/kg). Takođe je pokazano da se sklareol akumulira u citosolu ćelija.¹³⁴

Ispitivanja rađena na varijantama ćelijske linije raka dojke sa ekspresijom i bez ekspresije p53 pokazala su da izlaganje ćelija koncentracijama od 100 μM sklareola dovodi do ireverzibilne ćelijske smrti.¹³⁵ Indukcija ćelijske smrti je bila u sličnom opsegu kod obe varijante, što ukazuje da aktivnost nije povezana sa regulacijom p53. Ćelijski ciklus zaustavljen je u G1/S fazi uz indukciju apoptoze. Efekat sklareola je pokazao vremensku i doznu zavisnost. Sklareol je značajno pojačao efekat etopozida i doksorubicina, dok je umerenije povećao osetljivost ispitivanih ćelija na cisplatin, što ukazuje na mogućnost modulacije MDR.

Testovi rađeni na ćelijama raka grlića materice pokazali su da sklareol inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu, pri čemu je efekat vremenski i dozno zavisna.¹³⁶ Radi utvrđivanja mehanizma dejstva, ispitana je uticaj sklareola na koncentraciju proteina kaveolin-1 (Cav-1) i SOD1. Kaveolin-1 je protein koji učestvuje u formiranju kaveola, invaginacija ćelijske membrane, kao i u regulaciji određenih signalnih puteva.¹³⁷ Tretiranje ćelija raka grlića materice sklareolom u koncentraciji od 5 $\mu\text{g/mL}$ dovelo je do smanjenja nivoa SOD1 i povećanja ekspresije Cav-1.

Tretiranje ćelija osteosarkoma sklareolom dovelo je do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi i smanjenja broja ćelija u S/G2 fazama.¹³⁸ Primećen je antiproliferativni efekat, praćen gubitkom

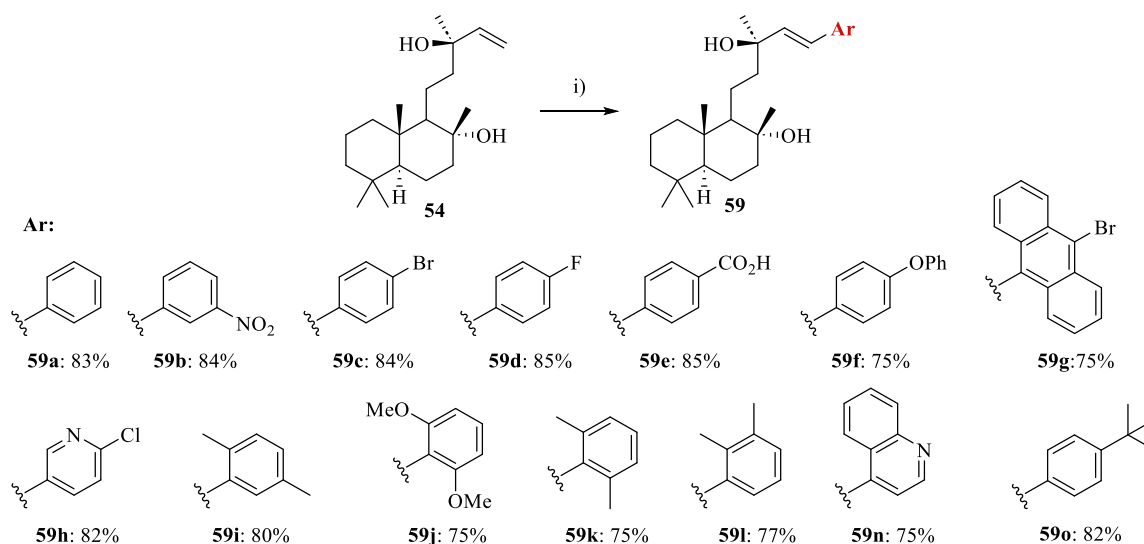
membranskog potencijala mitohondrija (depolarizacija). Pokazano je da sklareol izaziva anoikis, specifičnu vrstu programirane ćelijske smrti do koje dolazi kada ćelija izgubi povezanost sa ekstracelularnim matriksom.¹³⁹ Osnovna uloga anoikisa jeste eliminacija ćelija koje se ne nalaze na svom mestu, te je supresija anoikisa važan korak u procesu metastaziranja raka.¹³⁹ Pokazano je da su u proces supresije anoikisa uključeni protein Ezrin, koji povezuje citoskeleta sa membranom, i tirozin-kinaza FAK.^{140,141} Sklareol je smanjivao ekspresiju tirozin-kinaze FAK i Ezrina, što je dovelo do indukcije anoikisa, i sprečavalo invazivno širenje ćelija osteosarkoma.

Antitumorska aktivnost sklareola protiv sitnoćelijskog karcinoma pluća ispitana je *in vitro* i *in vivo* eksperimentima na modelima miša.¹⁴² Ćelije su pokazale osetljivost na sklareol u opsegu IC₅₀ vrednosti od 40 µM do 70 µM nakon 24 h tretmana. Analiza ćelijskog ciklusa je pokazala da se ćelije prvo akumuliraju u G1 fazi, a zatim ulaze u apoptozu. Sklareol je smanjivao ekspresiju ciklina D, CDK4 (engl. *cyclin-dependent kinase 4*), fosforilovanog Rb proteina, a povećavao ekspresiju E2F1 što je dovelo do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G0/G1 fazi. Primećeno je i povećanje nivoa fosfohistona H2A.X Ser139 čija povećana koncentracija ukazuje na dvostruke prekide lanaca DNK, kao i proteina ATR (engl. *ataxia-telangiectasia and Rad3 related*) i fosforilovanog Chk1 (engl. *checkpoint kinase 1*). Kada su ćelije tretirane inhibitorom ATR puta (BAY1895344) ili Chk1 inhibitorom (AZD7762) zabeleženo je smanjenje zaustavljanja ćelijskog ciklusa indukovano sklareolom, što ukazuje da je aktivacija ATR/Chk1 puta uključena u njegov mehanizam dejstva. *In vivo* ispitivanja na humanom ksenograftu u modelu miša rađena su primenom 300 mg/kg sklareola tokom 21 dana. Sklareol je usporio rast tumora, a analiza telesne mase miševa, težine organa i hematoloških parametara pokazala da ne dolazi do značajnih sporednih efekata.

Na ćelijama adenokarcinoma pluća primećeno je da sklareol smanjuje ekspresiju ERCC1 (engl. *excision repair cross-complementation group 1*), enzima odgovornog za popravku oštećenja DNK.¹⁴³ Pokazano je da prekomerna ekspresija ovog proteina doprinosi razvoju rezistencije na cisplatin. *In vivo* ispitivanja rađena na miševima sa humanim ksenograftom pokazala su da sklareol ne utiče značajno na rast tumora čak ni pri dnevnoj dozi od 200 mg/kg. Međutim, kombinacija sklareola (200 mg/kg) i cisplatina (6 mg/kg) značajno je usporila rast tumora nakon dve nedelje, bez izraženih toksičnih efekata.

2.9.2. Semisintetski derivati sklareola sa biološkom aktivnošću

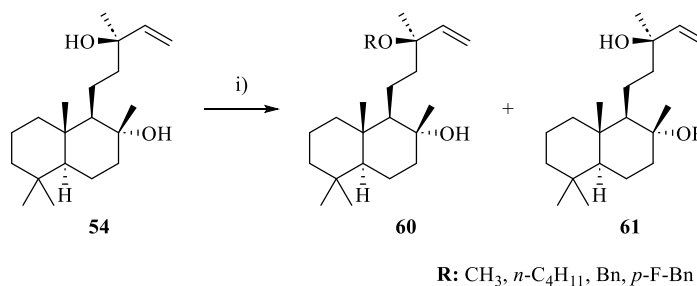
Semisintetski analozi sklareola sa aril-grupama na poziciji C15 pokazali su antitumorsku aktivnost na ćelijskim linijama raka prostate, pluća i grlića materice.¹⁴⁴ Sintetisani su u jednom koraku oksidativnom Hekovom reakcijom, koristeći aril-boronske kiseline i Pd(OAc)₂ kao katalizator. Zahvaljujući elektron-siromašnim osobinama dvostruke veze sklareola, dobijeni su linearni proizvodi, dok je konfiguracija disupstituisane dvostruke veze bila *trans*-geometrije. Na osnovu MTT eseja, pokazano je da većina novih molekula ima bolju antitumorsku aktivnost u odnosu na polazni sklareol, dok je jedinjenje 15-(4-fluorfenil)-sklareol (**59d**) ispoljilo jak citotoksični efekat prema ćelijskoj liniji raka prostate (IC₅₀ = 0,082 µM). Detaljnijim ispitivanjem mehanizma dejstva, pokazano je da jedinjenje **59d** istovremeno indukuje apoptozu i autofagiju ćelija putem interakcije sa proteinom Bcl-2 i BH3 domenom proteina beclin 1. Protein beclin 1 doprinosi početnoj nukleaciji vezikula i formiranju autofagozoma, dok je Bcl-2 anti-apoptotski protein. Ova dva proteina formiraju kompleks beclin 1 – Bcl-2, koji učestvuje u regulaciji autofagije. Jedinjenje **59d** inhibira proliferaciju PC-3 ćelija interagujući sa Bcl-2, dok umerenom interakcijom sa BH3 domenom beclin 1 indukuje autofagiju.



Reakcioni uslovi: i) Ar-B(OH)₂, Pd(OAc)₂, Cu(OAc)₂, NaOAc, DMF, 80 °C, 3 - 6 h.

Shema 2. Dobijanje derivata sklareola primenom Hekove reakcije.

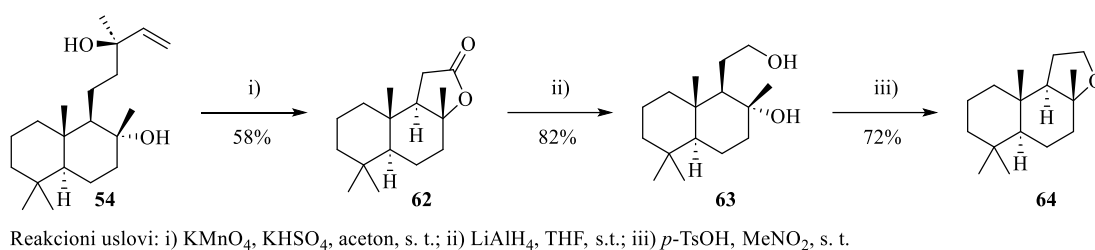
U cilju ispitivanja antifungalne aktivnosti sintetisano je 20 strukturno različitih derivata sklareola.¹⁴⁵ Nova jedinjenja testirana su *in vitro* na biljnim patogenim gljivicama *Botrytis cinerea*, *Fusarium coeruleum*, *Fusarium graminearum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria brassicae*, a njihova aktivnost je upoređena sa sklareolom i tiabendazolom, komercijalno dostupnim fungicidom. Monoetarski derivati sklareola **60** i **61** sintetisani su deprotonovanjem natrijum-hidridom uz DMF kao rastvarač, a potom reakcijom sa odgovarajućim halogenalkanima (Shema 3). Dobijaju se dva regioizomerna proizvoda, od kojih je 8-alkiloksi izomer (**61**) bio dominantan. U poređenju sa sklareolom, aktivnost etarskih derivata je bila značajno smanjena, što ukazuje na važnost prisustva slobodnih hidroksilnih grupa na pozicijama 8 i 13 za antifungalnu aktivnost.



Reakcioni uslovi: i) NaH, DMF, R-X, s. t.

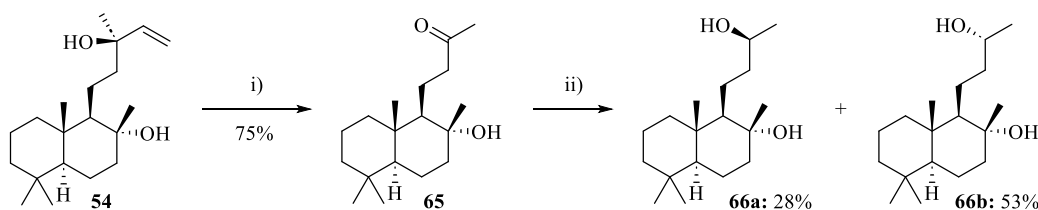
Shema 3. Sintaza etarskih derivata sklareola.

Oksidacijom sklareola kalijum-permanganatom (Shema 4) dobijeni su različiti proizvodi, zavisno od reakcionih uslova. U prisustvu KHSO₄, nastajao je sklareolid (**62**), seskviterpenski lakton. Redukcija sklareolida pomoću LiAlH₄ davala je diol **63**. Kiselo-katalizovanom ciklizacijom diola uz *p*-TsOH dobijen je ambroksan (**64**). Sklareolid i ambroksan pokazali su se kao slabiji inhibitori rasta gljivica, dok je diol **63** imao jaču antifungalnu aktivnost u odnosu na sklareol.



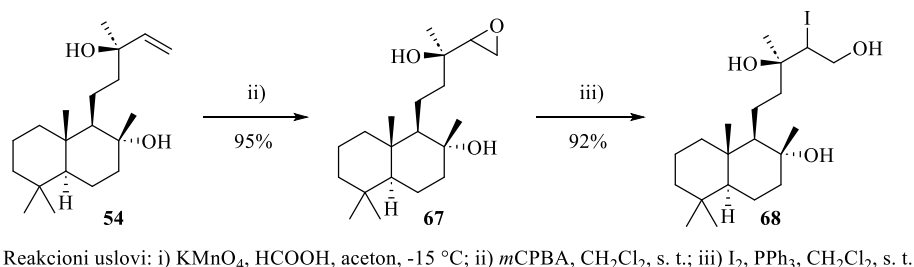
Shema 4. Transformacija sklareola u ambroksan.

Oksidativnom degradacijom bočnog niza sklareola u neutralnim uslovima (KMnO_4 u acetonu) dobijen je metil-keton **65** (Shema 5). Redukcijom metil-ketona nastajala su dva diastereoizomerna diola, **66a** i **66b**, koji su bili aktivniji protiv *B. cinerea* u odnosu na sklareol.



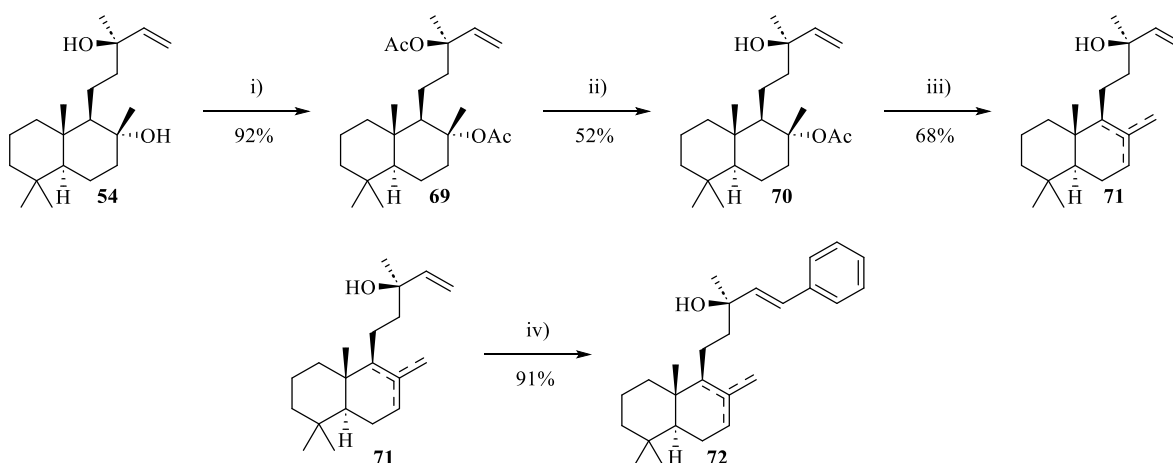
Shema 5. Sintaza jedinjenja 62-65 iz sklareola.

U cilju dobijanja jodohidrina **68** terminalna dvostruka veza sklareola je prvo epoksidovana pomoću *m*CPBA. Dobijeni epoksid **67** iskorišćen je potom za sintezu jodhidrinskog derivata **68** u reakciji sa I_2 uz prisustvo PPh_3 . Epoksid **67** nije ispoljio značajnu antifungalnu aktivnost, dok je jodhidrin **68** iskazao izraženo antifungalno dejstvo.



Shema 6. Sintaza jedinjenja 66-68.

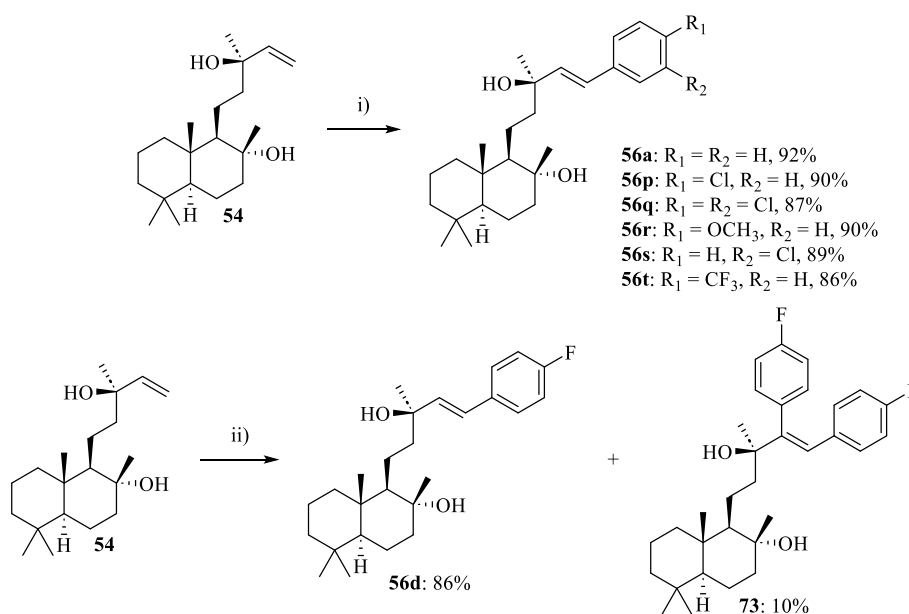
Sklareol je aktivan protiv parazita *Schistosoma mansoni*, koji pripada vrsti metilja koja izaziva intestinalnu tropsku bolest šistozomijazu.¹⁴⁶ Aktivnost je pokazao protiv parazita u stadijumu larve ($\text{IC}_{50} \approx 13 \mu\text{M}$), juvenilnoj fazi ($\text{IC}_{50} = 5,0 \mu\text{M}$), kao i protiv odraslih jedinki ($\text{IC}_{50} = 19,3 \mu\text{M}$), te je poslužio kao osnova za sintezu derivata sa antišistozomalnom aktivnošću (Shema 7). Peracetilovanje hidroksilnih grupa postignuto je upotrebom acetil-hlorida u prisustvu *N,N*-dimetilanilina. Tercijarna alilna hidroksilna grupa je uspešno regenerisana baznom hidrolizom u prisustvu KOH . Reakcijom nastalog monoestra sa NaHCO_3 uz ozračivanje mikrotalasima dobijena je smeša izomernih proizvoda eliminacije acetata na poziciji 8. Proizvod sa *exo*-metilenskom grupom je nastajao u višku (*exo* : *endo* = 2 : 1). Tako dobijeni dehidratirani proizvod je, oksidativnom Hekovom reakcijom transformisan u linearni *trans*-disupstituisani proizvod.



Reakcioni uslovi: i) AcCl , N,N -DMA, CH_2Cl_2 , s. t.; ii) KOH , H_2O , EtOH , s. t.; iii) NaHCO_3 , DMSO, μW (100 W, 200 °C);
 iii) PhB(OH)_2 , Pd(OAc)_2 , NaOAc , μW (300 W, 130 °C).

Shema 7. Sintaza jedinjenja 69-72.

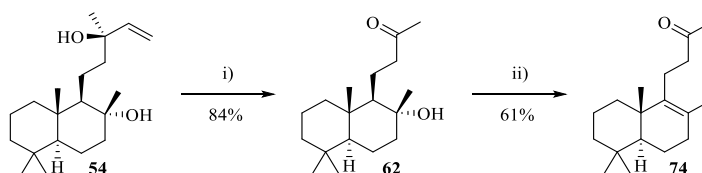
Sklareol je podvrgnut oksidativnoj Hekovoj reakciji prema prethodno opisanim uslovima uz primenu mikrotalasnog ozračivanja (Shema 8). Korišćenjem *p*-fluorfenilboronske kiseline uz konvencionalno zagrevanje reakcione smeše, bez primene mikrotalasa, nastajao je i proizvod dvostruke Hekove reakcije (**73**).



Reakcioni uslovi: i) ArB(OH)_2 , Pd(OAc)_2 , NaOAc , μW (300 W, 130 °C); ii) $p\text{-FC}_6\text{H}_4\text{B(OH)}_2$, Pd(OAc)_2 , Cu(OAc)_2 , DMF, 80 °C.

Shema 8. Primena oksidativne Hekove reakcije uz mikrotalasno i konvencionalno zagrevanje.

Nakon oksidativne degradacije bočnog niza sklareola i eliminacije hidroksilne grupe pomoću elementarnog joda, dobijen je keto-alken **74** u dobrom prinosu (Shema 9).



Reakcioni uslovi: i) KMnO_4 , MgSO_4 , aceton, s. t.; ii) I_2 , PhMe, Δ .

Shema 9. Sinteza jedinjenja 74.

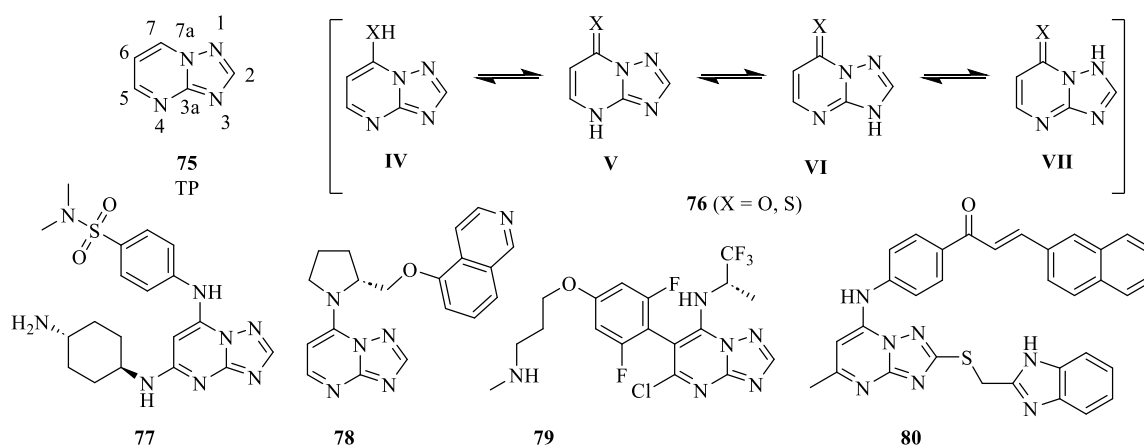
Ispitivanje antišistozomalne i citotoksične aktivnosti prema ćelijskoj liniji raka jetre ukazalo je na određene veze između strukture i aktivnosti. Peracetilovanje sklareola dovodi do drastičnog gubitka aktivnosti. Monoacetat sklareola **70**, kao i dehidratisani sklareol **71**, pokazali su antišistozomalnu aktivnost sličnu sklareolu. Ovo ukazuje na značaj slobodne tercijarne alilne hidroksilne grupe za biološku aktivnost. Jedinjenja koja nisu imala ovaj strukturni motiv (proizvodi oksidativne degradacije bočnog niza) nisu pokazivala značajnu biološku aktivnost. Proizvodi Hekove reakcije **56** pokazali su generalno dobru antišistozomalnu aktivnost, pri čemu je *p*-fluorfenilni derivat **56d** bio najpotentnije jedinjenje.

3. NAŠI RADOVI

Osnovna ideja ovog istraživanja bila je sinteza različitih derivata sklareola i ispitivanje njihove antitumorske aktivnosti. Budući da je za biološku aktivnost derivata sklareola neophodno prisustvo tercijarne alilne hidroksilne grupe (13-OH), sve hemijske transformacije izvedene su uz očuvanje tog strukturnog motiva. U sklopu ove disertacije sintetisani su derivati sklareola koji u svojoj strukturi uključuju [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinsku farmakoforu, adamantansko jezgro, kao i derivati sa arilureom kao strukturnim motivom. Biološki deo istraživanja sproveden je u Laboratoriji za molekularnu neuroonkologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – Univerzitet u Beogradu, a pod rukovodstvom dr Milice Pešić, naučnog savetnika. Antitumorska aktivnost novih jedinjenja je ispitana na ćelijskim linijama glioblastoma (U87 i U87-TxR) i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460 i NCI-H460/R). Korišćene su ćelijske linije senzitivne na citostatike (U87 i NCI-H460), kao i linije koje ispoljavaju višestruku rezistenciju na lekove (MDR) zahvaljujući prekomernoj ekspresiji P-glikoproteina (U87-TxR i NCI-H460/R). Kao model normalnih (netransformisanih) ćelija korišćena je ćelijska linija fibroblasta pluća embrionalnog porekla (MRC-5).

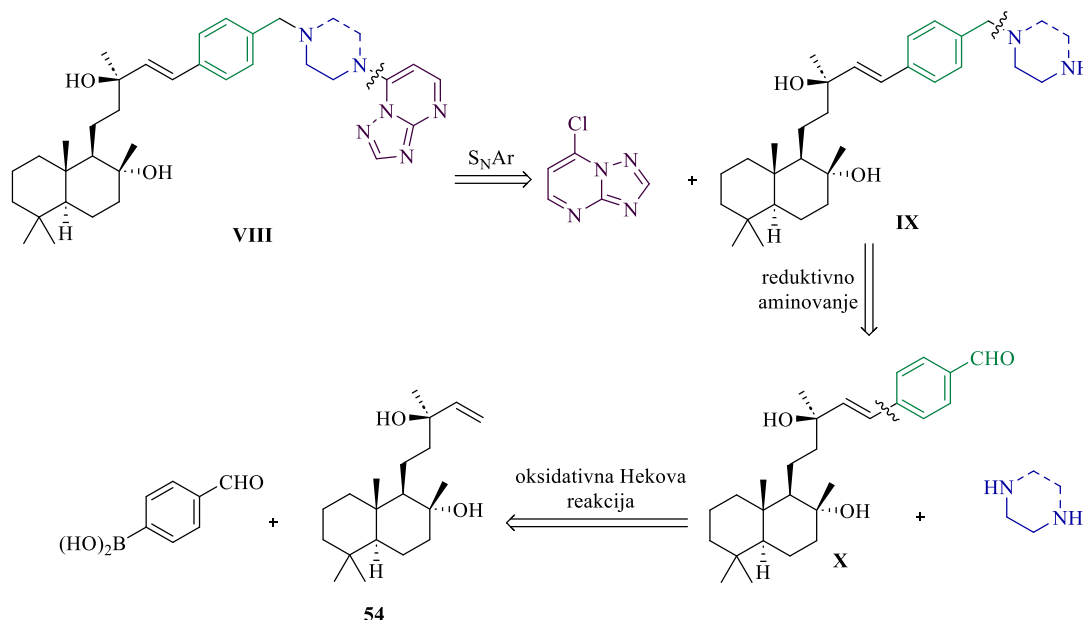
3.1. Derivati sklareola sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom

[1,2,4]Triazolo[1,5-*a*]pirimidinsko jezgro (**75**, TP) spada među privilegovane strukture u medicinskoj hemiji (Slika 20).¹⁴⁷ U svojoj strukturi sadrži elektronski bogat 1,2,4-triazol kondenzovan sa elektronski siromašnim pirimidinskim prstenom. Samo jezgro ne može učestvovati u anularnoj tautomeriji, ali odgovarajući hidroksi- i merkpto-derivati (**76**) mogu postojati u obliku okso- i tiookso-tautomera (**IV–VII**). Zbog prisustva tri atoma azota (N1, N3, N4) sa slobodnim elektronskim parovima, postoji mogućnost koordinacije za metalne katjone. TP jezgro je 10π -elektronski sistem i strukturno je i elektronski sličan purinu, što ga čini pogodnim za izosternu zamenu purinskog jezgra kod nenukleozidnih molekula. Na slici 21 su prikazani primeri biološki aktivnih jedinjenja sa TP jezgrom, među kojima su inhibitori enzima koji učestvuju u onkogenim procesima – ciklin-zavisnih kinaza,¹⁴⁸ fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K)¹⁴⁹ i metionin-aminopeptidaze 2.¹⁵⁰ Jedinjenje **77** pokazalo je snažno inhibiciono dejstvo prema CDK2 ($IC_{50} = 120$ nM),¹⁴⁸ dok se jedinjenje **78** istaklo kao potentan inhibitor MetAP-2 ($IC_{50} = 38$ nM).¹⁵⁰ Ovo je od posebnog značaja u medicinskoj hemiji, budući da ovi enzimi predstavljaju aktivne mete za razvoj antitumorskih lekova. Cevipabulin (**79**) je tubulinski inhibitor sa potvrđenom *in vivo* aktivnošću, koji je ušao u klinička ispitivanja kao potencijalni lek za lečenje malignih tumora. Ovaj molekul se vezuje za vinblastin-vezujuće mesto na β -tubulinu, kao i novootkriveno sedmo mesto na $\alpha 2$ -tubulinu, čime destabilizuje tubulinsku strukturu i indukuje njegovu degradaciju.¹⁵¹ Jedinjenje **80** identifikovano je kao potentni modulator P-glikoproteina.¹⁵² U ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma debelog creva, **80** dovodi do povećane akumulacije doksorubicina (**28**) i paklitaksela (**25**) što može da dovede do reverzije višestruke rezistencije na lekove.



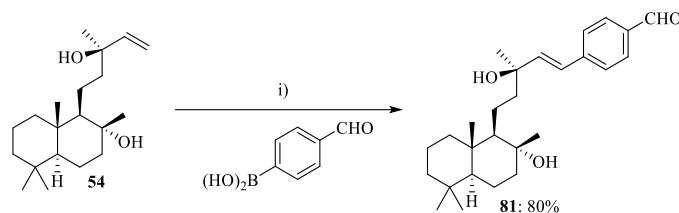
Slika 21. [1,2,4]Triazolo[1,5-*a*]pirimidinsko jezgro (75), moguća tautomerija 7-tio- i 7-okso- supstituisanih jezgara (76, IV–VII). Primeri biološki aktivnih jedinjenja sa TP farmakoforom (77–80).

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je razvoj derivata sklareola (VIII) (Slika 22) sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom. Sklareol u svojoj strukturi sadrži hidroksilne grupe koje su značajne za biološku aktivnost i zbog toga nisu pogodne za strukturne modifikacije. U prethodnim istraživanjima je sklareol uspešno modifikovan uvođenjem aril-grupe na terminalnu dvostruku vezu reakcijom oksidativnog Hekovog kuplovanja, koja je katalizovana kompleksnim jedinjenjima paladijuma, pri čemu je očuvana tercijarna alilna hidroksilna grupa.^{144,146} Retrosintetski plan (Slika 21) uključivao je uvođenje aromatičnog jezgra sa aldehidnom grupom u molekul (X) reakcijom sa *p*-formilfenilboronskom kiselinom. Reakcijom reduktivnog aminovanja u molekul su uvedeni diaminski strukturni fragmenti (IX). Nakon toga, reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije uvedeno je TP jezgro.



Slika 22. Retrosintetski plan sinteze hibrida sklareola i [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidina.

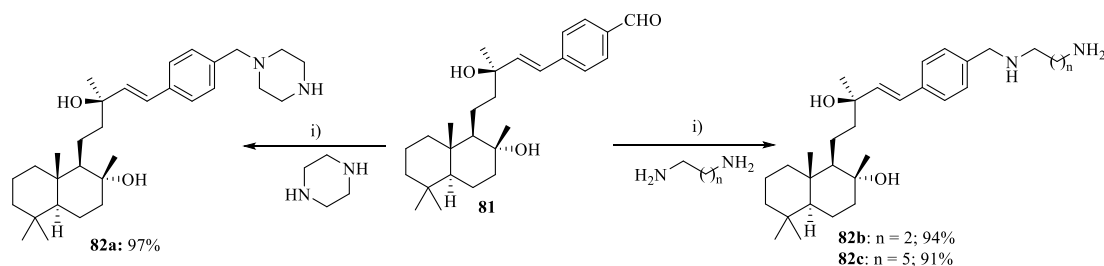
Reakcijom sklareola sa *p*-formilfenilboronskom kiselinom sintetisan je aldehidni derivat **81** u vrlo dobrom prinosu (Shema 10). Kao katalizator korišćen je $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, dok su $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ i NaOAc služili kao oksidans i baza.



Reakcioni uslovi: i) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, NaOAc , DMF, Ar, 80 °C, 2 h.

Shema 10. Sinteza aldehidnog derivata sklareola **81**.

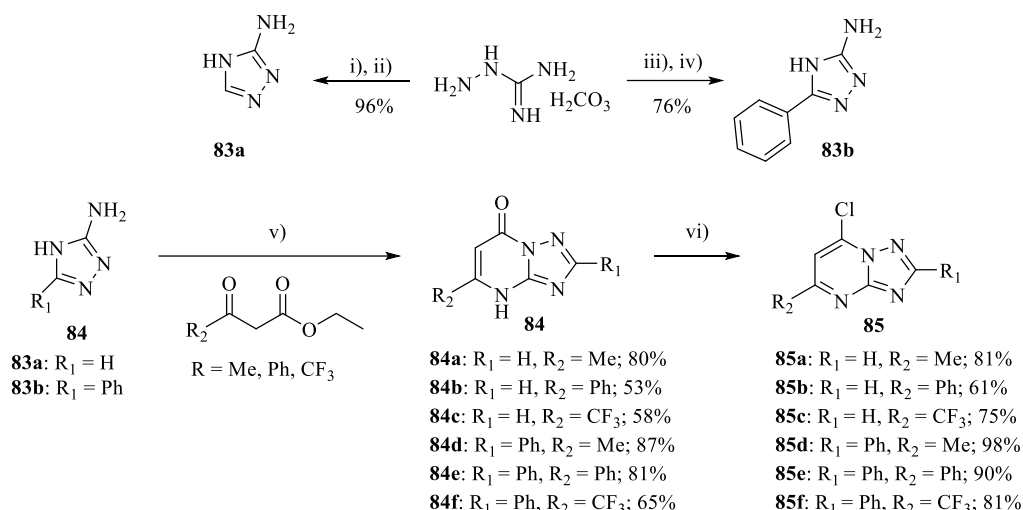
Uvođenje diaminskog motiva uspešno je izvedeno primenom reakcije reduktivnog aminovanja, polazeći od aldehida **81** i odgovarajućih alkil-diamina, u prisustvu $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$ i NaBH_4 kao redukcionog sredstva (Shema 11). Da bi se ispitaio uticaj dužine i strukture diaminskog fragmenta na antitumorsku aktivnost jedinjenja, korišćeni su linearni diamini sa različitim brojem metilenskih jedinica (nizovi od tri i šest ugljenikovih atoma). Takođe je korišćen ciklični, konformaciono rigidniji piperazin. Na ovaj način sintetisani su diaminski derivati sklareola **82a–c** u visokim prinosima.



Reakcioni uslovi: i) $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$, MeOH, s. t., 16 h, potom NaBH_4 , s. t., 2 h.

Shema 11. Sinteza diaminskih derivata sklareola **82a–c**.

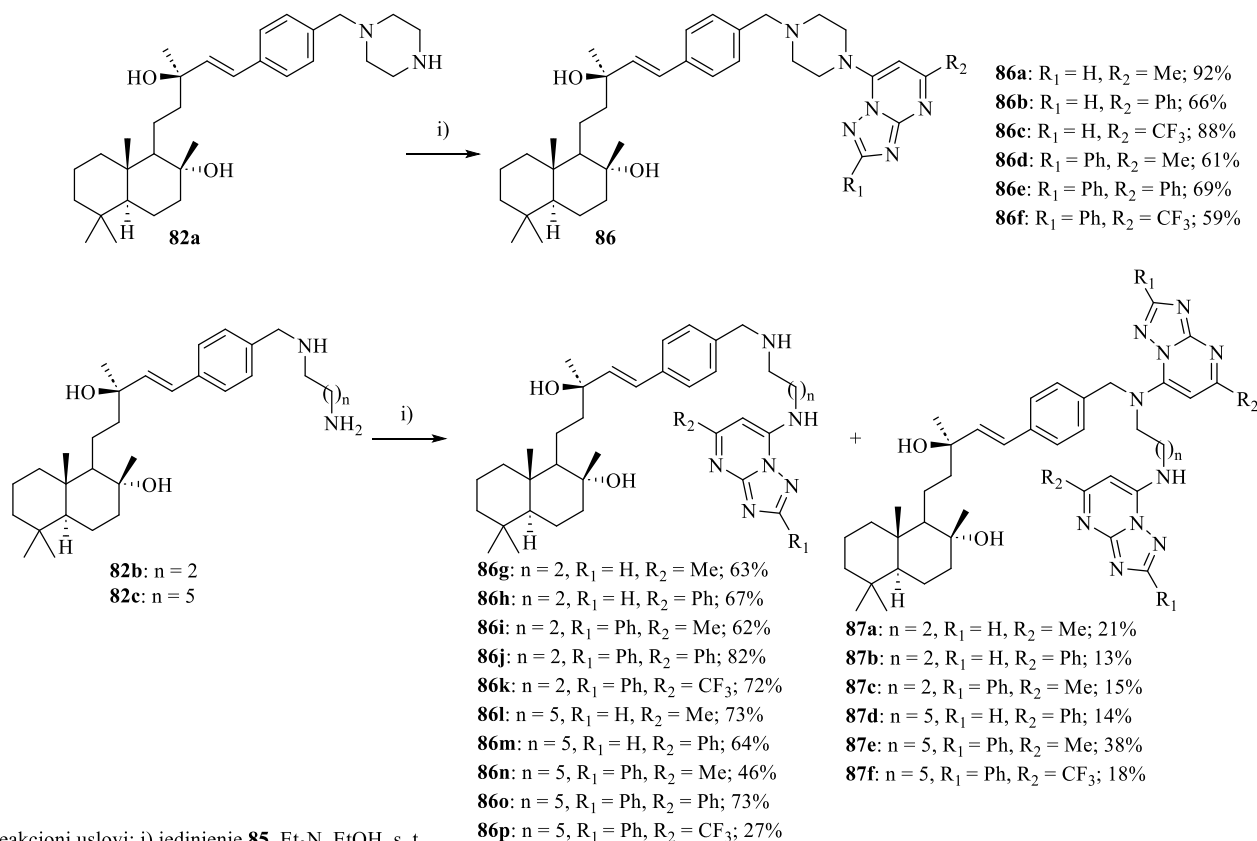
Sinteza [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskog jezgra započeta je kondenzacijom aminoguanidinium-hidrogenkarbonata sa HCOOH . Na ovaj način je dobijen 1,2,4-triazol-3-amin (**83a**) u odličnom prinosu (Shema 12). Odgovarajući 5-fenil-1,2,4-triazol-3-amin (**83b**) sintetisan je reakcijom aminoguanidinium-hidrogenkarbonata sa benzoil-hloridom uz prisustvo tetrabutilamonijum-bromida. Dalja kondenzacija dobijenih triazola sa supstituisanim β -ketoestrima, u prisustvu glacijalne sirćetne kiseline, dovela je do formiranja 7-okso-triazolo[1,5-*a*]pirimidina **84** sa različitim supstituentima. U položaju 2 nalazili su se vodonik (H) ili fenil- (Ph) grupa, a u položaju 5: metil- (Me), fenil- (Ph) ili trifluorometil- (CF_3) grupa. Ovim postupkom obezbeđena je raznovrsnost u pogledu supstituenata na heterocikličnom jezgru, što omogućava ispitivanje uticaja supstituenata na biološku aktivnost krajnjih hibrida. Reakcijom sa POCl_3 dobijeni su 7-hlortriazolo[1,5-*a*]pirimidini **85** u visokim prinosima.



Reakcioni uslovi: i) HCOOH , 80°C , 1 h; ii) 120°C , 5 h; iii) PhCOCl , TBAB, 1,4-dioksan, 0°C - s. t., 12 h; iv) H_2O , 100°C , 12 h; v) AcOH , 120°C , 2 - 10 h; vi) POCl_3 , 110°C , 1 h.

Shema 12. Sinteza 7-hlortriazolo[1,5-a]pirimidina **85a-f**.

Reakcija nukleofilne aromatične supstitucije diaminskih derivata sklareola **82a-c** sa 7-hlortriazolo[1,5-a]pirimidinima **85a-f** omogućila je dobijanje hibrida **86** u dobrim prinosima (Shema 13). Reakcije su izvođene u etanolu kao rastvaraču, uz prisustvo trietil-amina kao baze, na sobnoj temperaturi. U reakciji jedinjenja **82a** dobijeni su hibridni proizvodi **86a-f** sa piperazinskim motivom u zadovoljavajućim prinosima. Međutim, prilikom reakcije jedinjenja **82b-c** uočeno je da, pored željenih proizvoda **86g-p**, nastaju i sporedni proizvodi **87a-f**. Ova jedinjenja sadrže dve triazolopirimidinske farmakofore, što je posledica dvostruke nukleofilne supstitucije.

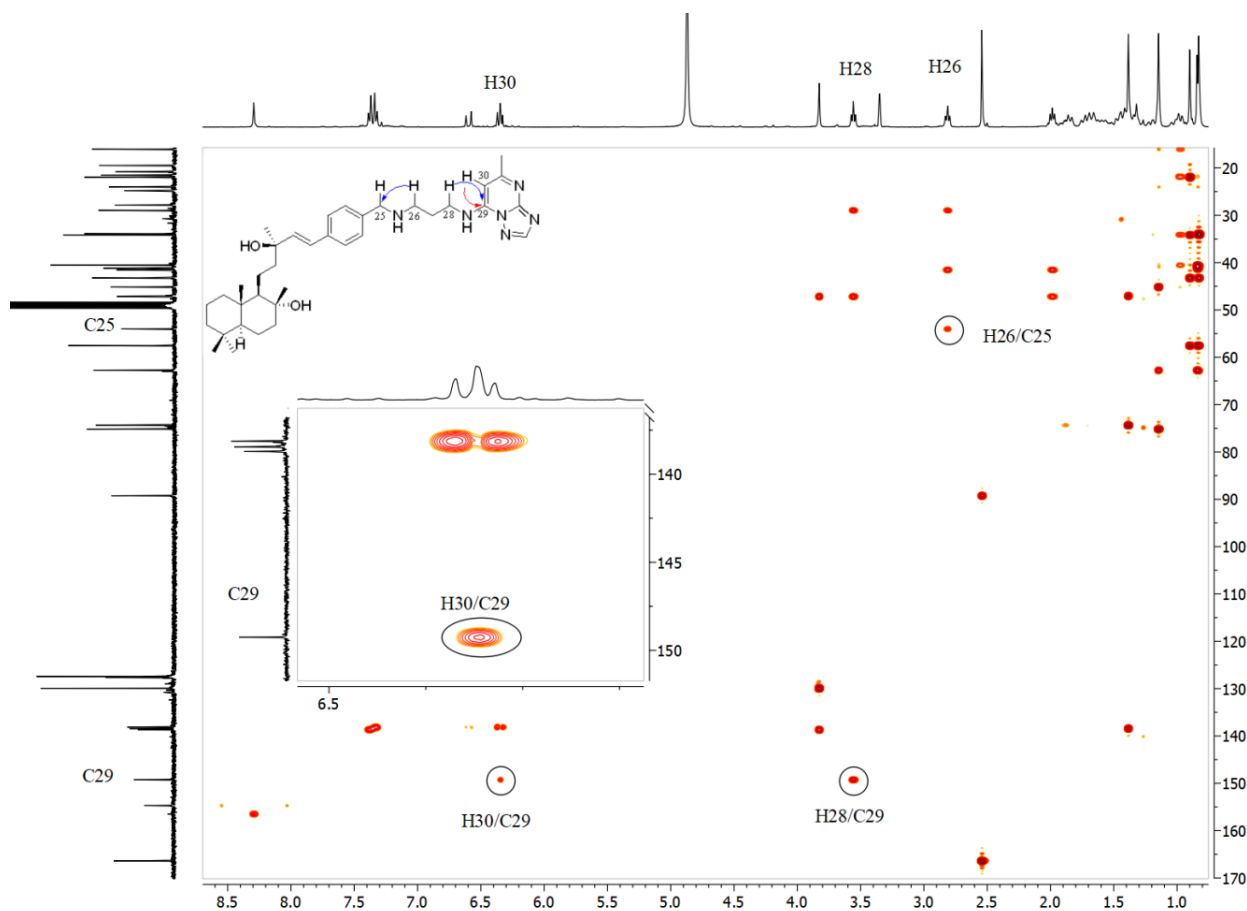


Reakcioni uslovi: i) jedinjenje **85**, Et_3N , EtOH , s. t.

Shema 13. Sinteza hibrida sklareola sa [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidinskom farmakoforom **86a-p** i **87a-f**.

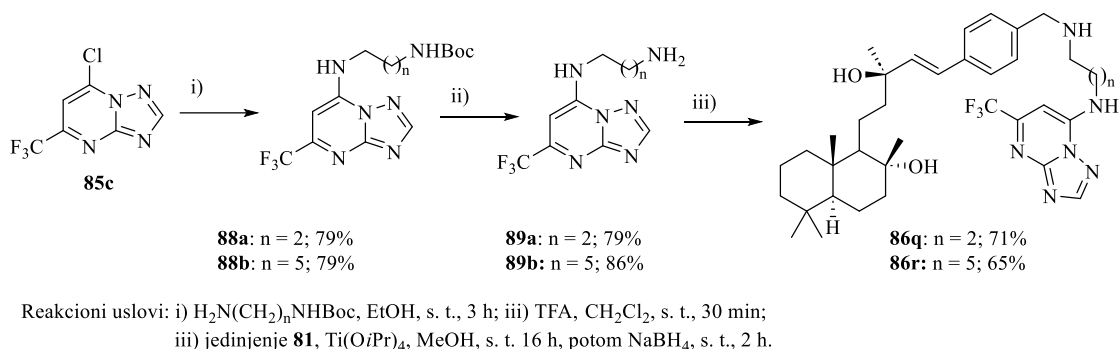
Strukture željenih jedinjenja potvrđene su primenom jednodimenzionalnih i dvodimenzionalnih NMR eksperimenata. Totalna asignacija reprezentativnog jedinjenja **86g** pokazana je u Prilogu 1. Korelacije u ^1H - ^{13}C HMBC spektru (Slika 23) koje su nedvosmisleno ukazale da do nukleofilne aromatične supstitucije dolazi na terminalnom azotu derivata **82b** bile su:

- korelacija protona metilenske grupe H26 sa benzilnim ugljenikom C25;
- korelacija ugljenika C29 iz TP jezgra (dokazan zahvaljujući korelaciji sa H30) sa protonom H28 diaminskog fragmenta.

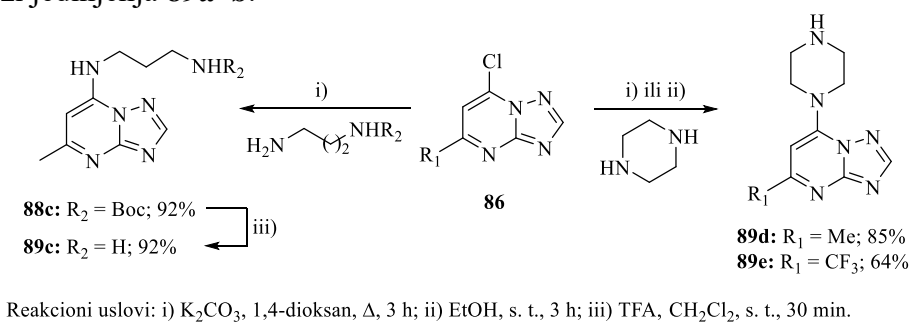


Slika 23. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra jedinjenja **87g** sa označenim ključnim korelacijama.

U reakciji diamina **82b–c** sa jedinjenjem **85c** formiraju se sporedni proizvodi, čije odvajanje od željenih hibrida **86q–r** nije bilo moguće. Zbog toga je primenjen alternativni sintetski pristup (Shema 14). Reakcijom **85c** sa *N*-Boc zaštićenim diaminima u EtOH dobijeni su derivati **88a–b**. Oni su kiselo-katalizovanom deprotekcijom uz TFA prevedeni u diaminske derivate **89a–b**. Naposljetku, reduktivno aminovanje aldehida **81a** i diamina **89a–b** uz $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$ kao aktivator i NaBH_4 kao redukciono sredstvo, dovelo je do željenih hibrida **86q–r** u dobrim prinosima.

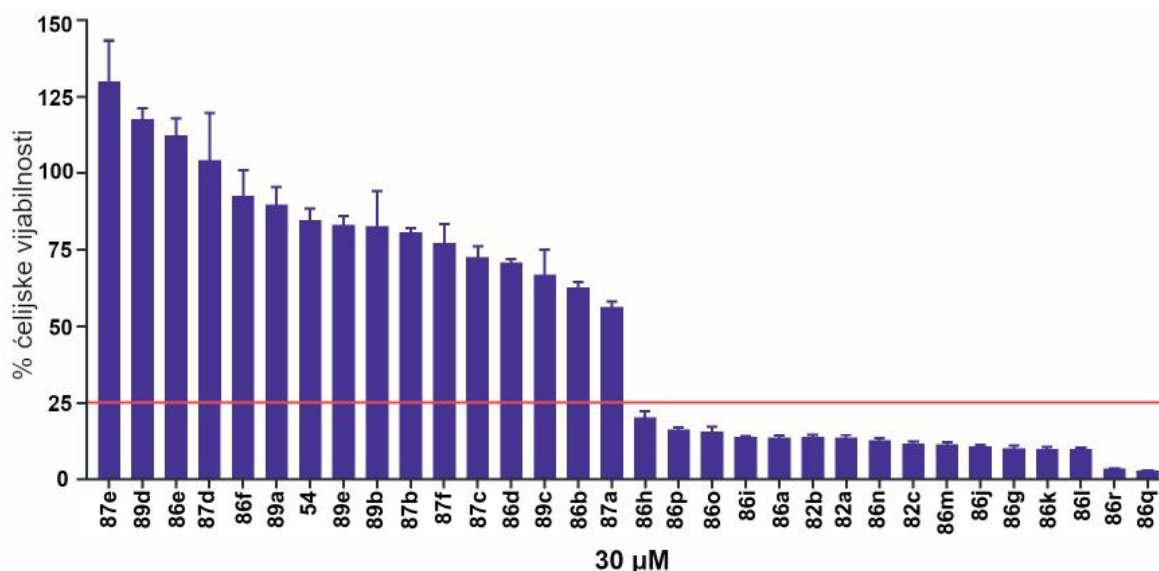
Shema 14. Dobijanje jedinjenja **86q–r**.

Dodatno, sintetisani su diaminski derivati sa TP jezgrom **89c–e**, radi ispitivanja da li ova grupa jedinjenja ispoljava antitumorsko dejstvo. U zavisnosti od supstituenta na TP jezgru, sinteze su izvedene korišćenjem K_2CO_3 kao baze ($\text{R}_1 = \text{Me}$) ili bez dodatka baze ($\text{R}_1 = \text{CF}_3$). Derivat **89c** nije mogao da bude sintetisan direktno iz diamina, već je dobijen preko *N*-Boc zaštićenog derivata **88c**, analogno sintezi jedinjenja **89a–b**.

Shema 15. Sinteza jedinjenja **89c–e**.

3.1.1. Ispitivanja biološke aktivnosti jedinjenja sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom

Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskim jezgrom izvršeno je na ćelijskim linijama humanog glioblastoma U87 i U87-TxR, dok je kao model zdravih ćelija korišćena ćelijska linija fibroblasta pluća embrionalnog porekla MRC-5. Ćelijska linija U87 je senzitivna na citostatike, dok se linija U87-TxR odlikuje rezistencijom na paklitaksel (**25**) usled prekomerne ekspresije P-glikoproteina. Ova rezistentna linija je dobijena kontinuiranim izlaganjem U87 ćelija postepeno rastućim koncentracijama paklitaksela tokom šest do devet meseci.¹⁵³ Prvobitno ispitivanje citotoksičnog efekta sprovedeno je na ćelijskoj liniji U87, za ukupno 23 derivata sklareola sa TP jezgrom (**86a–q** i **87a–f**, izuzev **86c** koji je bio nerastvoran u DMSO), 3 odgovarajuća diaminska derivata sklareola (**82a–c**), sklareol (**54**) i diaminske derivate sa TP jezgrom (**89a–e**). Ispitivanja su izvedena primenom MTT esej pri koncentraciji 30 μM (Slika 24). Nakon 72 časa primećeno je izraženo citotoksično dejstvo jedinjenja **82a–c**, **86a** i **86g–r** (smanjenje ćelijske vijabilnosti ispod 25%). Nasuprot tome, diaminski derivati sa TP jezgrom **89a–e**, jedinjenja sa dve TP farmakofore **87a–e** i piperazinski hibridi **86b** i **86d–f** su pokazali slabu citotoksičnu aktivnost, zbog čega nisu bila predmet daljih ispitivanja.



Slika 24. Prikaz preliminarnog ispitivanja citotoksičnog dejstva ispitivanih jedinjenja na U87 ćelijskoj liniji. Ćelije su bile tretirane sklareolom i njegovim derivatima u koncentraciji od 30 µM tokom 72 časa. Vijabilnost je ispitana MTT testom u tri nezavisna eksperimenta (n = 3). Vijabilnost kontrolne grupe je podešena na 100%.

Za najaktivnija jedinjenja određene su IC_{50} vrednosti na ćelijskim linijama U87, U87-TxR i MRC-5 (Tabela 1, Slike P21 i P22). Na osnovu dobijenih vrednosti izračunati su indeks selektivnosti (SI) i faktor relativne rezistencije (FRR) (Tabela 1).

Indeks selektivnosti (SI) prikazuje sposobnost jedinjenja da selektivno deluje na tumorske ćelije u odnosu na zdrave ćelije. Definisano je kao odnos IC_{50} vrednosti određene za MRC-5 liniju (model zdrave ćelijske linije) i aritmetičke sredine IC_{50} vrednosti dobijenih za tumorske ćelijske linije U87 i U87-TxR. Rezultati (Tabela 1) pokazuju da jedinjenja **82b**, **82c**, **86i**, **86l**, **86n**, **86q** i **86r** imaju viši indeks selektivnosti u poređenju sa sklareolom (**54**), odnosno, da ispoljavaju izraženije citotoksično dejstvo prema ćelijama raka u poređenju sa zdravim ćelijama.

Faktor relativne rezistencije (FRR) predstavlja odnos IC_{50} vrednosti dobijenih za U87-TxR liniju i IC_{50} vrednosti dobijene za U87 ćelijsku liniju. Visoka vrednost FRR ukazuje na slabiju aktivnost jedinjenja prema MDR ćelijama, dok se pojava rezistencije definiše kao $FRR \geq 2$, odnosno, kada su jedinjenja najmanje dva puta manje aktivna prema rezistentnim ćelijama u odnosu na senzitivne.

Na osnovu vrednosti FRR moguće je identifikovati i pojavu kolateralne senzitivnosti. Kolateralna senzitivnost predstavlja sposobnost jedinjenja da sa većom efikasnošću deluju na rezistentne ćelije u odnosu na senzitivne. Ova pojava je od velikog značaja, jer omogućava selektivno uklanjanje rezistentnih tumorskih ćelija.

Sva testirana jedinjenja uspešno su prevazišla višestruku rezistenciju na lekove, na šta ukazuje činjenica da su IC_{50} vrednosti dobijene za U87-TxR ćelijsku liniju bile slične ili niže od onih dobijenih za U87. Pojava rezistencije uočena je kod jedinjenja **86r** (Tabela 1). Nasuprot tome, jedinjenja **82c**, **86a**, **86g**, **86j**, **86k**, **86m**, **86n**, kao i sam sklareol, ispoljila su kolateralnu senzitivnost. Posebno su se izdvojila jedinjenja **86l** i **86r**, koja pokazuju nanomolarnu aktivnost – više od 100 puta veću potentnost u odnosu na sklareol.

Tabela 1. Citotoksični efekat sklareola (**54**) i odabranih jedinjenja **82a–c**, **86a**, **86g–r** ispitan na humanoj senzitivnoj ćelijskoj liniji glioblastoma U87, njenoj rezistentnoj odgovarajućoj ćelijskoj liniji U87-TxR i humanim ćelijama plućnih fibroblasta MRC-5.

Jedinjenje	IC ₅₀ vrednosti (μM) ^a			FRR ^b	SI ^c
	U87	U87-TxR	MRC-5		
82a	5,122 ± 0,118	4,145 ± 0,092	8,936 ± 0,367	0,81	1,93
82b	3,183 ± 0,086	2,711 ± 0,062	6,097 ± 0,217	0,85	2,07 ^S
82c	6,327 ± 0,189	5,067 ± 0,101	12,411 ± 0,545	0,80 ^{cs}	2,18 ^S
86a	7,787 ± 0,172	6,068 ± 0,105	8,121 ± 0,198	0,78 ^{cs}	1,17
86g	1,906 ± 0,041	1,487 ± 0,024	2,043 ± 0,039	0,78 ^{cs}	1,20
86h	1,572 ± 0,048	1,532 ± 0,040	1,456 ± 0,034	0,97	0,94
86i	1,440 ± 0,040	1,540 ± 0,049	3,441 ± 0,084	1,07	2,31 ^S
86j	3,646 ± 0,104	2,478 ± 0,054	1,826 ± 0,045	0,68 ^{cs}	0,60
86k	1,700 ± 0,040	1,101 ± 0,032	1,824 ± 0,038	0,65 ^{cs}	1,30
86l	0,296 ± 0,007	0,258 ± 0,009	0,595 ± 0,012	0,87	2,15 ^S
86m	2,559 ± 0,097	1,710 ± 0,045	2,739 ± 0,093	0,67 ^{cs}	1,28
86n	2,016 ± 0,067	1,311 ± 0,036	2,102 ± 0,060	0,65 ^{cs}	1,65
86o	2,945 ± 0,097	3,381 ± 0,114	3,369 ± 0,103	1,15	1,06
86p	1,247 ± 0,026	1,207 ± 0,024	1,145 ± 0,025	0,97	0,93
86q	1,209 ± 0,024	1,270 ± 0,021	2,802 ± 0,071	1,05	2,26 ^S
86r	0,144 ± 0,004	0,330 ± 0,014	0,401 ± 0,017	2,29 ^R	1,69
54	51,625 ± 6,420	39,174 ± 4,750	64,045 ± 9,987	0,82b ^s	1,41

^a IC₅₀ vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija; ^b FRR – Faktor relativne rezistencije, izračunat kao odnos IC₅₀ vrednosti određene za U87-TxR ćelijsku liniju i IC₅₀ vrednosti dobijene za odgovarajuću osetljivu U87 ćelijsku liniju; ^c SI – Indeks selektivnosti, izračunat kao $IC_{50}(MRC-5)/(IC_{50}(U87) + IC_{50}(U87-TxR))/2$; ^R Rezistencija, definisana tako da je IC₅₀ vrednost za dato jedinjenje najmanje dvostruko viša kod rezistentnih ćelija u poređenju sa odgovarajućim osetljivim ćelijama; ^{cs} Kolateralna senzitivnost, definisana tako da je IC₅₀ vrednost datog jedinjenja najmanje 20% niža kod rezistentnih U87-TxR ćelija u poređenju sa odgovarajućim osetljivim U87 ćelijama. ^S Selektivnost prema ćelijama raka, definisana tako da je IC₅₀ vrednost datog jedinjenja najmanje dva puta veća kod normalnih (netumorskih) MRC-5 ćelija u poređenju sa prosečnom IC₅₀ vrednošću za U87 i U87-TxR ćelije raka.

3.1.1.1. Uticaj na P-glikoprotein

Radi ispitivanja uticaja jedinjenja na funkciju P-glikoproteina (P-gp), rezistentne ćelije U87-TxR su istovremeno tretirane 5 μM rastvorom fluorescentne boje rodamin 123 i 5 μM rastvorom odabranih jedinjenja – diaminskih derivata **82a–c** i njihovih analoga sa TP motivom **86a**, **86g** i **86h**. Rodamin 123 je fluorescentna boja i supstrat P-gp čija je akumulacija u ćeliji obrnuto srazmerna aktivnosti P-gp. Nakon tretmana, meren je srednji intenzitet fluorescencije (MFI, engl. *mean fluorescence intensity*), koji je proporcionalan intracelularnoj akumulaciji boje - povećanje MFI ukazuje na smanjenu aktivnost P-gp, tj. na inhibiciju transportne funkcije ovog proteina. Kao negativna kontrola, korišćene su netretirane U87-TxR ćelije, dok je kao pozitivna proba upotrebljen tarikvidar (**48**) (Slika 19), inhibitor P-gp treće generacije, u koncentraciji 50 nM. Na osnovu izmerenih vrednosti MFI, moguće je izračunati FAR (engl. *fluorescence activity ratio*), definisan kao odnos MFI tretiranih U87-TxR ćelija i MFI netretiranih U87-TxR ćelija.

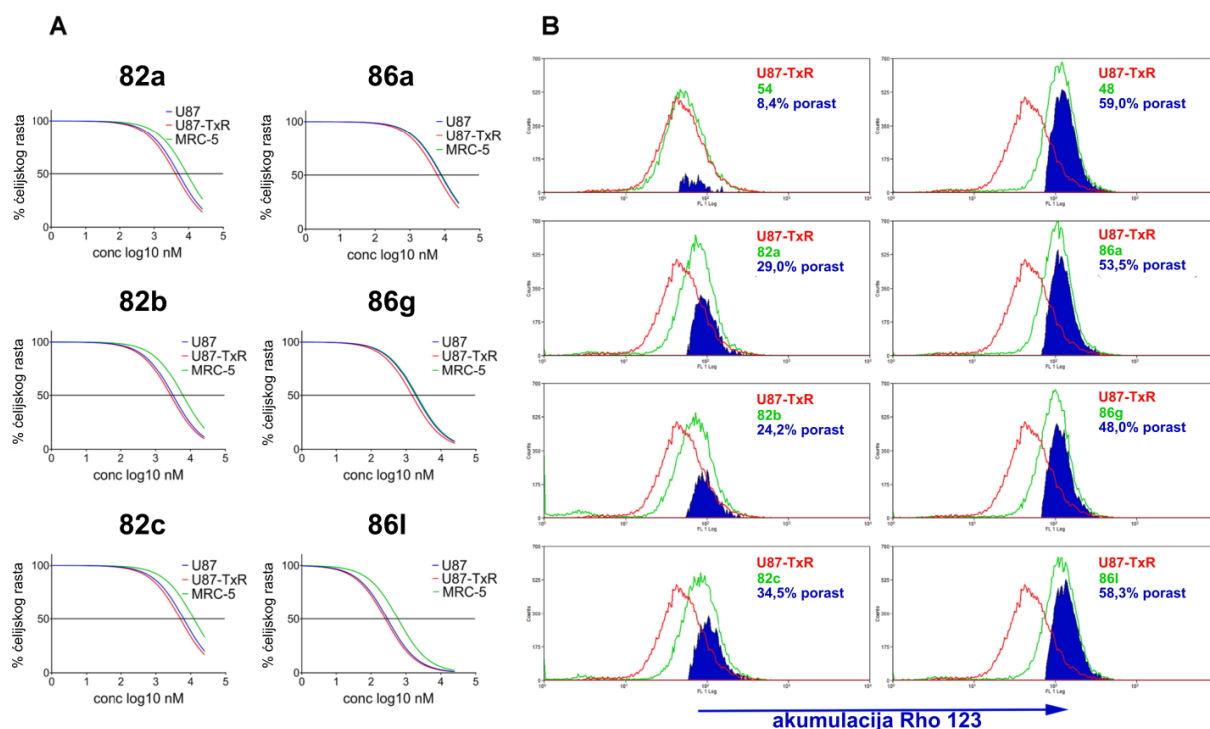
Na osnovu vrednosti MFI i FAR (Tabela 2), uočeno je da derivati sklareola izazivaju povećanje akumulacije rodamina 123 (Rho 123) u odnosu na netretirane ćelije. Ovakav rezultat ukazuje da jedinjenja dovode do smanjene aktivnosti P-gp. Nasuprot tome, sklareol (**54**) nije pokazivao značajnu aktivnost. Jedinjenja **86a**, **86g–r** značajno su povećavala akumulaciju rodamina 123 u ćeliji, pri čemu su se posebno izdvojili hibridi **86l**, **86q** i **86r**, kod kojih je vrednost FAR bila čak veća nego posle primene tarikvidara. Ovi rezultati ukazuju da jedinjenja **86l**, **86q** i **86r** imaju potencijal da povećaju osetljivost rezistentnih tumorskih ćelija na hemoterapeutike supstrate P-gp.

Tabela 2. Ispitivanje promene u akumulaciji rodamina 123 u ćelijama U87-TxR nakon tretmana 5 μ M jedinjenjima **54**, **82a–c**, **86a** i **86g–r**.

Jedinjenje	MFI ^a	FAR ^b	Jedinjenje	MFI ^a	FAR ^b
U87	188,46 $\pm$ 1,91	2,90 $\pm$ 0,04	86i	114,04 $\pm$ 1,98	1,76 $\pm$ 0,05
U87-TxR	64,88 $\pm$ 4,43	/	86j	115,50 $\pm$ 2,06	1,78 $\pm$ 0,05
48^c	124,97 $\pm$ 2,24	1,93 $\pm$ 0,05	86k	121,21 $\pm$ 2,05	1,87 $\pm$ 0,05
54	61,52 $\pm$ 3,68	0,95 $\pm$ 0,08	86l	126,76 $\pm$ 1,79	1,95 $\pm$ 0,04
82a	84,68 $\pm$ 2,40	1,31 $\pm$ 0,05	86m	110,09 $\pm$ 2,28	1,70 $\pm$ 0,05
82b	77,44 $\pm$ 1,94	1,19 $\pm$ 0,04	86n	113,11 $\pm$ 2,05	1,74 $\pm$ 0,05
82c	93,10 $\pm$ 2,26	1,43 $\pm$ 0,05	86o	121,61 $\pm$ 2,05	1,87 $\pm$ 0,05
86a	115,05 $\pm$ 3,11	1,77 $\pm$ 0,07	86p	115,50 $\pm$ 2,06	1,78 $\pm$ 0,05
86g	107,12 $\pm$ 1,81	1,65 $\pm$ 0,04	86q	143,26 $\pm$ 3,71	2,21 $\pm$ 0,08
86h	97,62 $\pm$ 1,94	1,50 $\pm$ 0,04	86r	156,49 $\pm$ 3,42	2,41 $\pm$ 0,08

^a MFI (engl. *Mean Fluorescence Intensity*) – izmereni srednji intenzitet fluorescencije, prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija; ^b FAR (engl. *Fluorescence Activity Ratio*) – odnos fluorescentnih aktivnosti, izračunat kao odnos MFI (tretiranih rezistentnih ćelija)/MFI (netretiranih rezistentnih ćelija), prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija; ^c Tarikvidar (**48**) korišćen kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp pri 50 nM.

Na osnovu uporedne analize rezultata ispitivanja citotoksičnosti (Slika 25A) i modulacije P-gp (Slika 25B), pokazano je da diaminski derivati sklareola **82a–c** imaju slabiji efekat na modulaciju P-gp u poređenju sa odgovarajućim hibridima **86a**, **86g** i **86l**. Međutim, nije bilo moguće utvrditi jasan odnos između citotoksičnosti i selektivnosti derivata sklareola i njihovih hibrida. Hibrid **86l**, kao i njegov diaminski analog **82c**, pokazali su odličnu citotoksičnost i selektivnost prema ćelijama glioblastoma, te su zbog tih karakteristika izabrani za dalju biološku evaluaciju.



Slika 25. Poređenje citotoksičnosti derivata sklareola i njegovih hibridnih jedinjenja, kao i njihov uticaj na aktivnost P-gp. (A) Nelinearne inhibicione krive, dobijene softverom „GraphPad Prism 8.0.2“ na osnovu MTT testa, pokazuju citotoksični efekat i selektivnost derivata sklareola (**82a**, **86a**, **82b**, **86g**, **82d** i **86l**) prema osetljivim (U87) i rezistentnim (U87-TxR) ćelijama glioblastoma, kao i prema normalnim humanim fibroblastima (MRC-5). (B) Upoređeni su efekti ispitanih jedinjenja na akumulaciju rodamina 123 (Rho 123) u MDR ćelijama U87-TxR, sa jedinjenjem **54** kao matičnim jedinjenjem i tarikvidarom (**48**) kao pozitivnom kontrolom. Analiza protočne citometrije pokazuje razlike između tretiranih uzoraka, izražene u procentima povećanja akumulacije rodamina 123.

3.1.1.2. Uticaj strukture na aktivnost

Analizom odnosa strukture i aktivnosti (SAR) testiranih jedinjenja utvrđeno je da diaminski derivati **82a–c** i većina hibridnih molekula **86** pokazuju poboljšanu citotoksičnu aktivnost u poređenju sa sklareolom (**54**) i diaminskim derivatima triazolopirimidina **89a–e** (Slika 24). Hibridi **86g–r** pokazali su veću potentnost prema obe ćelijske linije, U87 i U87-TxR, u poređenju sa odgovarajućim diaminima **82b–c**, pri čemu je izuzetak predstavljalo jedinjenje **86j**, koje je imalo manju aktivnost od **82b** prema ćelijskoj liniji U87 (Tabela 1). Upoređivanjem hibridnih jedinjenja koji sadrže isti TP fragment (serija **86a–f** i **86g–r**) može se zaključiti da prisustvo piperazinskog prstena u molekulu dovodi do smanjenja aktivnost u odnosu na linearne alkil-diaminske fragmente (Slika 24). Poređenjem jedinjenja koja sadrže jedno triazolo[1,5-*a*]pirimidinsko jezgro (**86g**, **86h**, **86i**, **86m**, **86n** i **86p**) sa njihovim bis([1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskim) analognim derivatima (**87a–f**) utvrđeno je da uvođenje drugog TP jezgra dovodi do značajnog pada aktivnosti (Slika 24).

Na osnovu vrednosti FAR (Tabela 2) uočeno je da svi derivati sklareola **82a–c** i hibridi **86a–r** značajnije inhibiraju aktivnost P-gp u poređenju sa sklareolom (**54**). Hibridi sa CF₃- supstituentom na C5 poziciji TP jezgra (**86q**, **86r** i **86k**) pokazali su izraženiju modulaciju aktivnosti P-gp u odnosu na odgovarajuće hibridne derivate sa fenil- (**86h**, **86m** i **86j**) ili metil-grupom (**86g**, **86l** i **86i**) na istoj poziciji. Izuzetak predstavlja jedinjenje **86p**, koje je pokazalo manju aktivnost u odnosu na **86o**.

Uticaj supstituenata na triazolopirimidinskom jezgru utvrđen je poređenjem IC₅₀ vrednosti hibrida **86** sa istim diaminskim strukturnom motivom (Tabela 1). Uočene su sledeće pravilnosti:

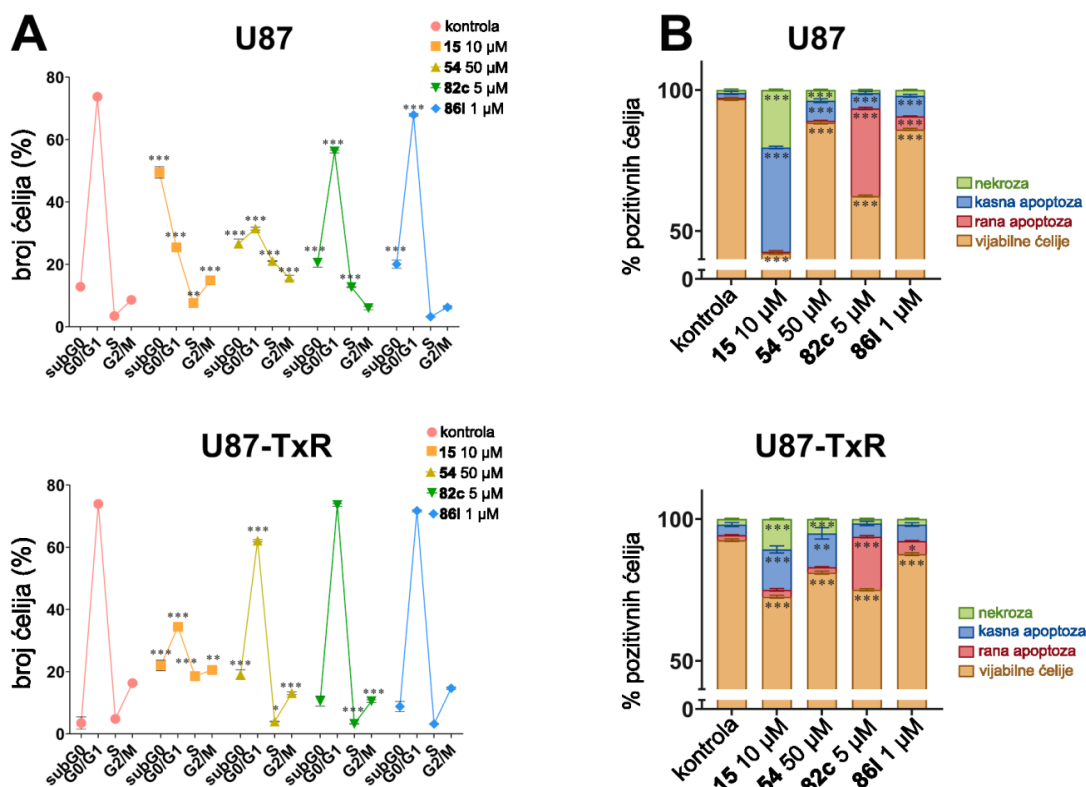
1. Hibridi sa fenil-grupom na poziciji C2 pokazuju manju citotoksičnu aktivnost u odnosu na odgovarajuće hibride sa vodonikom na C2 (**86g** vs. **86i**, **86h** vs. **86j**, **86q** vs. **86k**, **86l** vs. **86n**, **86m** vs. **86o**, **86r** vs. **86p**). Izuzetak su jedinjenja **86g** i **86i** kod U87 i jedinjenja **86q** i **86k** na ćelijskoj liniji U87-TxR.
2. Zamena metil-grupe fenil-grupom na poziciji C5 (**86g** vs. **86h**, **86i** vs. **86j**, **86l** vs. **86m**, **86n** vs. **86o**) uglavnom dovodi do smanjenja aktivnost, pri čemu je izuzetak jedinjenje **86h**, koje je bilo potentnije od **86g** prema ćelijskoj liniji U87;
3. Zamena metil-grupe trifluormetil-grupom na poziciji C5 povećava aktivnost (**86g** vs. **86q**, **86i** vs. **86k**, **86l** vs. **86r**, **86n** vs. **86p**). Izuzeci su jedinjenja **86i**, koje je bilo potentnije od **86k** prema ćelijskoj liniji U87), i **86l**, koje je bilo potentnije od **86r** prema U87-TxR ćelijskoj liniji.

3.1.1.3. Uticaj sintetisanih jedinjenja na ćelijske procese

Analiza ćelijskog ciklusa bojenjem propidijum-jodidom (PI) kod U87 i U87-TxR ćelijskih linija izvedena je u cilju ispitivanja potencijalnog mehanizma koji dovodi do kolateralne osetljivosti (Slike 26A i P23). Ćelije su tretirane sa 50 μM rastvorom jedinjenja **54**, 5 μM **82c**, 1 μM **86l** i 10 μM cisplatinom (**15**, pozitivna kontrola). Kod netretiranih U87 i U87-TxR ćelija, nakon 48 časova najveći deo populacije (70–75%) bio je u G0/G1 fazi što ukazuje na sporu progresiju ćelijskog ciklusa. Tretman sklareolom doveo je do povećanja broja ćelija u subG0 fazi, što ukazuje na prisustvo ćelijske smrti, smanjenja broja ćelija u G0/G1 fazi, kao i povećanja broja ćelija u S i G2/M fazama. Sličan efekat na obe ćelijske linije primećen i kod jedinjenja **82c** i **86l**. Međutim, uticaj na ćelijski ciklus bio je znatno manje izražen kod rezistentne ćelijske linije U87-TxR, što ukazuje da kolateralna osetljivost nije direktno povezana sa izmenama u ćelijskom ciklusu. Ovi rezultati sugerišu da ispitivana jedinjenja stimulišu proliferaciju ćelija, čime ih čine osetljivijim na supstance koje oštećuju DNK. Na ovaj način se može objasniti ranije zabeleženo sinergijsko dejstvo sklareola sa etopozidom, cisplatinom, doksorubicinom, bortezomibom i ciklofosfamidom, kod različitih tipova tumora.^{119–123}

Dvojno bojenje za detekciju apoptoze sa aneksin-V i propidijum-jodidom (AV/PI) rađeno je nakon 24, 48, i 72 časova. Pokazalo se da sklareol indukuje kasnu apoptozu i nekrozu (Slika P24),

pri čemu je najizraženiji efekat zabeležen posle 48 časova (Slike 26B i P24). Jedinjenje **82c** indukovalo je ranu apoptozu već posle 24 časa. Ovaj efekat je bio vremenski zavisen, te je kod U87 ćelijske linije bio je najizraženiji nakon 48 časova, dok je kod U87-TxR ćelijske linije bio najizraženiji posle 72 časa (Slika P24). Sa druge strane, jedinjenje **86l** je indukovalo ranu i kasnu apoptozu, nezavisno od trajanja tretmana i to kod obe ćelijske linije. Cisplatin (**15**), korišćen kao pozitivna kontrola, indukovao je nekrozu i kasnu apoptozu kod obe ćelijske linije, pri čemu je uticaj na rezistentnu ćelijsku liniju U87-TxR bio manji (Slike 26B i P24).

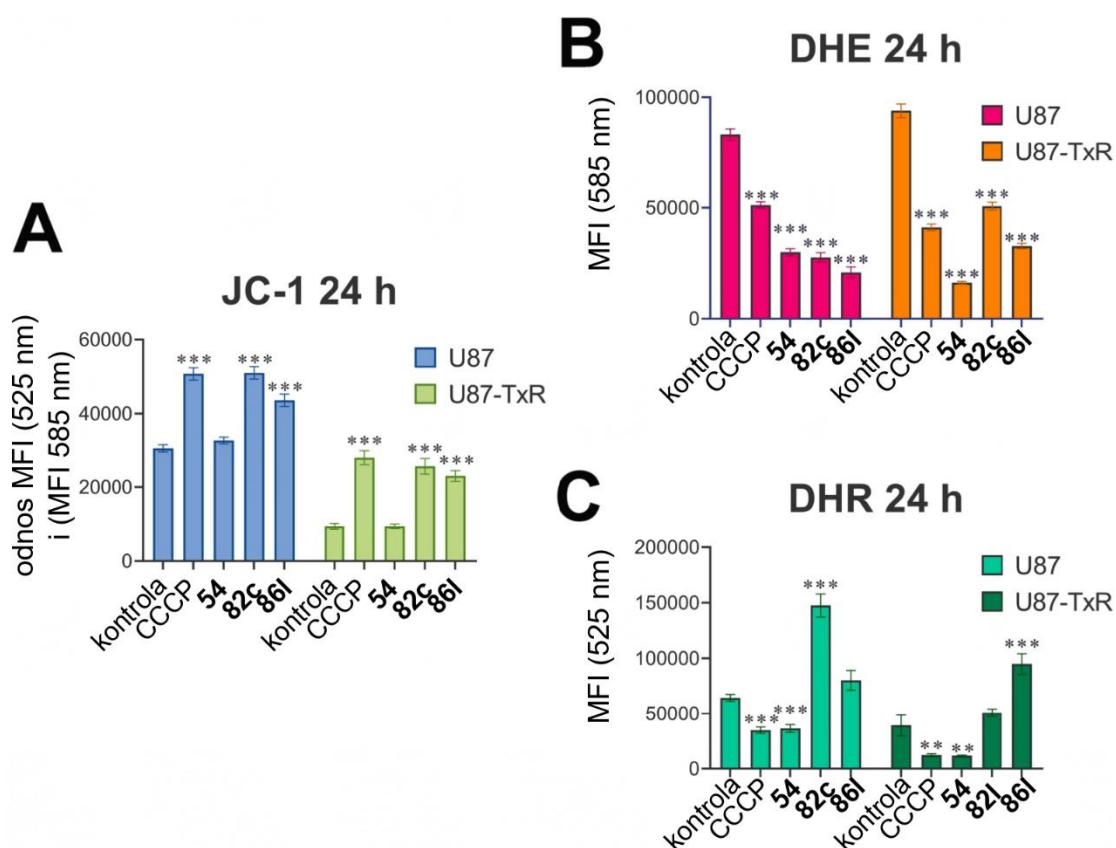


Slika 26. Poremećaj ćelijskog ciklusa i indukcija ćelijske smrti nakon tretmana sa jedinjenjima **54** i njegovim derivatima (**82c** i **86l**). **54** je primenjen u koncentraciji od 50 μM, dok su za jedinjenja **82c** i **86l** korišćene značajno niže koncentracije (5 μM i 1 μM, redom). Cisplatin (**15**) u koncentraciji od 10 μM poslužio je kao referentni lek. (A) Analiza ćelijskog ciklusa izvršena je protočnom citometrijom (PI bojenje DNK) nakon 48 h tretmana. Faze ciklusa (subG₀, G₀/G₁, S i G₂/M) su prikazane u procentima prema slici P23. (B) Indukcija ćelijske smrti analizirana je protočnom citometrijom uz AV/PI bojenje nakon 48 h tretmana. Klasifikacija tipova ćelijske smrti (nekroza, rana i kasna apoptoza) je prikazana u procentima prema slici P24. Statistička analiza je urađena u „GraphPad Prism 8.0.2“ softveru pomoću ANOVA testa („Dunnett“ test za višestruka poređenja), a značajne razlike između tretiranih i kontrolnih uzoraka označene su kao *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001.

3.1.1.4. Uticaj na oksidativni stres

Uticaj jedinjenja na mitohondrijski membranski potencijal ispitivan je korišćenjem JC-1 katjonske boje. Pri narušenom membranskom potencijalu JC-1 se nalazi u obliku monomera, koji emituju zelenu fluorescenciju na 525 nm, dok kod neoštećene membrane mitohondrija, JC-1 formira agregate i emituje crvenu fluorescenciju na 585 nm. Odnos emitovane zelene i crvene fluorescencije direktno zavisi od mitohondrijskog membranskog potencijala, te porast intenziteta zelene fluorescencije ukazuje na depolarizaciju mitohondrijske membrane. Kao pozitivna kontrola korišćen je karbonil cijanid *m*-hlorfenil hidrazon (CCCP), inhibitor oksidativne fosforilacije i dekuplujući agens mitohondrija. Jedinjenja **82c** i **86l** značajno su smanjivala mitohondrijski membranski potencijal, dok sklareol nije ispoljio značajniji uticaj (Slike 27A i P25).

Praćena je i koncentracija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Nivo superoksidnog radikal-anjona ($O_2^{\cdot-}$) određena je reakcijom sa dihidroetidijumom (DHE), koji se oksidacijom prevodi u 2-hidroksietidijum (DHR), fluorescirajuće jedinjenje sa maksimumom emisije na 585 nm. Nastanak peroksinitrita ($ONOO^-$) i vodonik-peroksida (H_2O_2) praćen je pomoću dihidrorodamina, koji oksidacijom formira rodamin, jedinjenje koje fluorescira na 525 nm. Intenzitet fluorescencije oksidovanih formi boja bio je proporcionalan koncentraciji odgovarajućih reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta. Analiza koncentracije superoksidnog radikal-anjona pokazala je da jedinjenja **82c** i **86l** smanjuju nivo superoksida u ćelijama (Slike 27B i P26A). Suprotno tome, zabeležen je značajan porast koncentracije vodonik-peroksida i peroksinitrita, što ukazuje da ova jedinjenja indukuju oksidativni stres u ćelijama glioblastoma (Slike 27C i P26B). Za **54** je primećeno antioksidativno dejstvo, odnosno značajno smanjenje koncentracije superoksida, peroksinitrita i vodonik-peroksida (Slike 27 i P26).



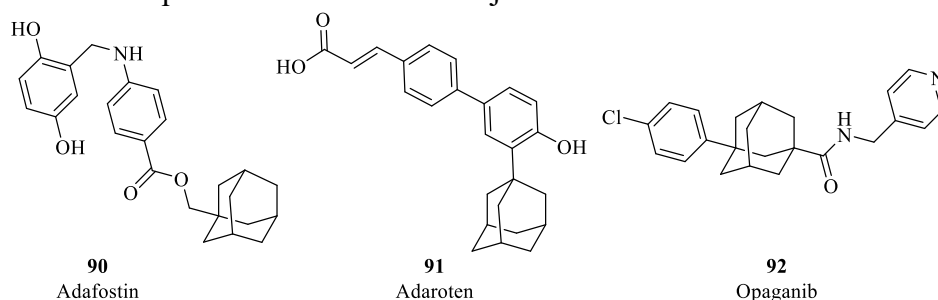
Slika 27. Uticaj jedinjenja **54**, **82c** i **86l** na mitohondrijski membranski potencijal i nivo reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS i RNS) u ćelijama glioblastoma U87 i U87-TxR. (A) Promene membranskog potencijala mitohondrija procenjene su JC-1 bojenjem, gde prelazak crvenih fluorescentnih agregata u zelene monomere ukazuje na smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala. Jedinjenje **54** je primenjeno u koncentraciji od 50 μ M, dok su jedinjenja **82c** i **86l** korišćena u nižim koncentracijama (5 μ M i 1 μ M). (B) Produkcija superoksidnog radikal-anjona ($O_2^{\cdot-}$) ispitivana je korišćenjem DHE boje, koja postaje fluorescentna samo pri interakciji sa superoksidnim radikal-anjonom. (C) Produkcija vodonik-peroksida (H_2O_2) i peroksinitrita ($ONOO^-$) mereni su pomoću DHR fluorescentne boje, koja emituje fluorescenciju samo uz prisustvo ovih molekula. Kao standard za poređenje u svim testovima korišćen je CCCP (10 μ M). Statistička analiza izvršena je u „GraphPad Prism 8.0.2“ sa ANOVA testom („Dunnett“ test za višestruka poređenja), gde su značajne razlike između tretiranih i kontrolnih uzoraka označene kao ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Ako se uzme u obzir činjenica da su U87-TxR ćelije osetljivije na oksidativni stres u odnosu na U87 liniju¹⁵⁴, može se zaključiti da je opažena kolateralna osetljivost rezistentnih U87-TxR ćelija pod dejstvom jedinjenja **82c** i **86l** posledica povećanja nivoa reaktivnih azotnih vrsta, kao i narušavanja funkcije mitohondrija.

3.2. Derivati sklareola sa adamantanom

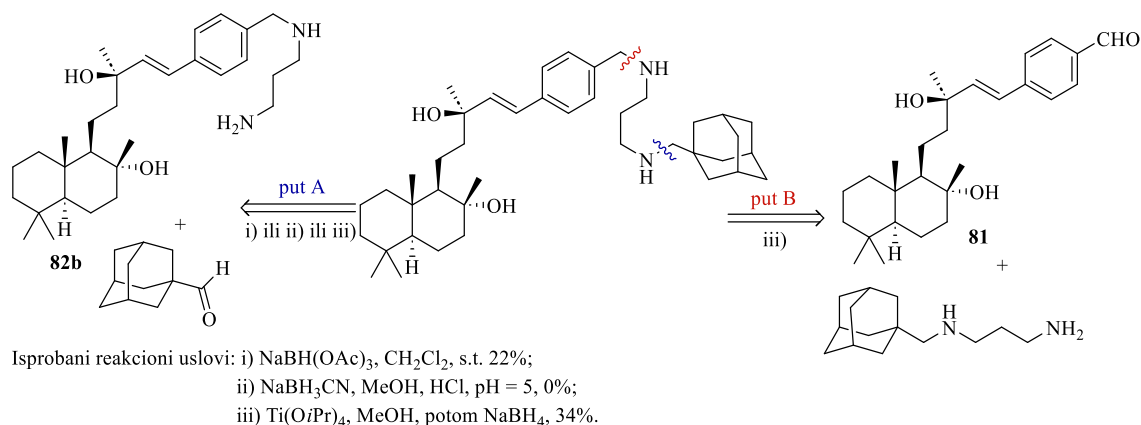
Adamantan predstavlja čest strukturni motiv u biološki aktivnim jedinjenjima, prvenstveno zbog svog uticaja na farmakokinetičke osobine molekula (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost – ADMET).¹⁵⁵ Zahvaljujući visokoj hidrofobnosti, adamantan, i njegovi derivati, najviše se koriste pri dizajnu lekova namenjenih za lečenje bolesti centralnog nervnog sistema, jer omogućavaju efikasan prolazak kroz krvno-moždanu barijeru.¹⁵⁶ Strukturno, adamantan se sastoji od četiri cikloheksanska prstena u konformaciji stolice, te je veoma rigidne strukture, ali je pod malim ugaonim naponom. Građen je isključivo od alifatičnih C-C i sekundarnih i tercijarnih C-H veza, te pokazuje nisku hemijsku reaktivnost. Ispitivanja izvedena na derivatima 19-nortestosterona pokazala su da esterifikacija položaja 17 adamantan-karboksilnim kiselinama povećava metaboličku stabilnost, što je rezultat sterne zaštite reaktivnog centra od hidrolitičkih enzima, ali i uvođenja voluminoznog adamantanskog ostatka.¹⁵⁷

Najpoznatiji derivati adamantana sa antitumorskom aktivnošću su adafostin (**90**), adaroten (**91**) i opaganib (**92**).¹⁵⁸ Adafostin (**90**) deluje kao inhibitor tirozin kinaze, sa izraženom antitumorskom aktivnošću, naročito prema modelima leukemijskih ćelija. Njegov mehanizam delovanja uključuje indukciju oksidativnog stresa povećanjem koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta, vezivanjem za kompleks III u transportnom lancu elektrona¹⁵⁹ i pojačavanjem ekspresije enzima kao što su glutation S-transferaza, superoksid dismutaza i hem oksigenaza.¹⁶⁰ Dokazano je da adamantanski skelet značajno poboljšava farmakokinetička svojstva *in vivo* i povećava citotoksičnost adafostina u poređenju sa metil-estarskim analogom.¹⁵⁹ Adaroten, atipični sintetski retinoid, pokazao je snažnu aktivnost protiv različitih tumorskih ćelijskih linija.^{161,162} Može da indukuje ćelijsku smrt u 2D i 3D modelima humanog karcinoma dojke.¹⁶³ Opaganib je lek u kliničkoj upotrebi za lečenje različitih maligniteta i inflamatornih procesa, uključujući karcinom pluća, prostate, debelog creva, jajnika i jetre, multipli mijelom, limfom i leukemiju.¹⁶⁵ Deluje kao inhibitor sfingozin-kinaze-2, dihidroceramid-desaturaze i glukozilceramid-sintaze.¹⁶⁵ Opaganib stimuliše autofagiju i/ili apoptozu u tumorskim ćelijama smanjujući nivo sfingozin-1-fosfata, čime povećava koncentraciju ceramida u tumorskim ćelijama, što za posledicu ima suzbijanje signalnih puteva u ćelijama, kao što su pERK i pAKT.¹⁶⁶ Opaganib je pokazao potencijal i u lečenju pacijenata obolelih od COVID-19, gde je potvrđena njegova bezbedna primena u kliničkim studijama.¹⁶⁶



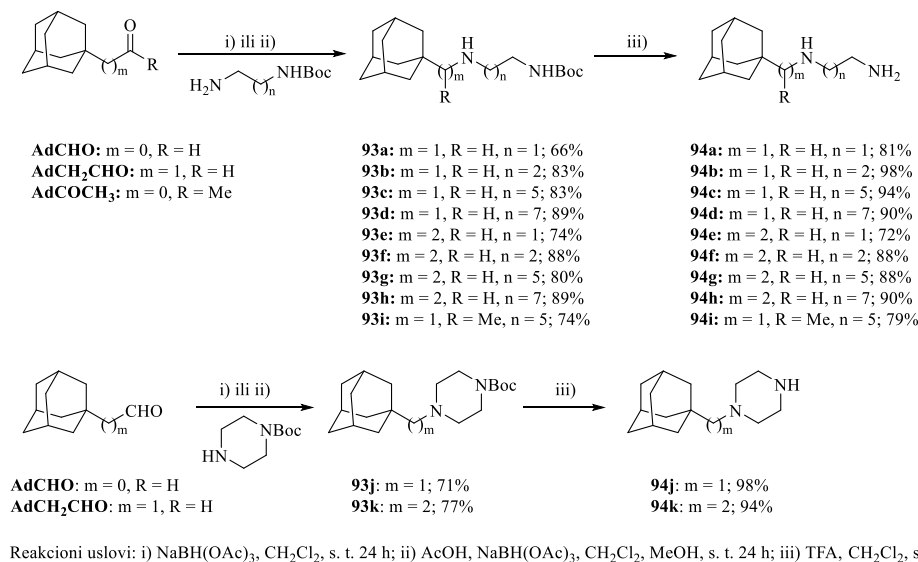
Slika 28. Primeri biološki aktivnih jedinjenja sa adamantanskim motivom.

Imajući u vidu značaj prisustva adamantanskog strukturnog motiva na farmakokinetičke osobine biološki aktivnih molekula, osmišljeni su derivati sklareola koji su povezani sa adamantanom preko diaminskog fragmenta. Reduktivno aminovanje diaminskog derivata **82b** sklareola sa adamantanskim aldehidom nije se pokazalo kao optimalni metod usled niskih prinosa i nastanka smeše regioizomera. Zbog toga je odabran alternativni sintetski put koji se zasniva na reakciji aldehida **81** sa odgovarajućim adamantanskim diaminima, što je omogućilo efikasnije dobijanje željenog proizvoda (Slika 29).



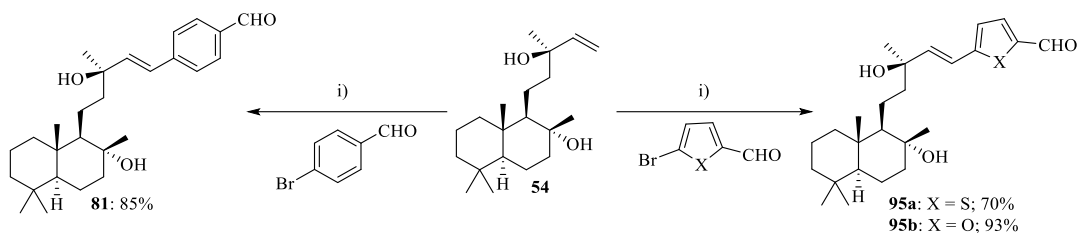
Slika 29. Retrosintetski putevi za sintezu jedinjenja sklareola sa adamantanom.

Sinteza aminoadamantanskih derivata ostvarena je u dva koraka (Shema 16). Prvi korak obuhvatao je reduktivno aminovanje 1-adamantankarboksaldehida **AdCHO** odgovarajućim *N*-Boc-supstituisanim diaminima različitih dužina, korišćenjem $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ kao redukcionog sredstva. Na taj način dobijeni su Boc-zaštićeni derivati aminoadamantana **93**. U drugom koraku deprotekcija terminalne amino-grupe izvedena je primenom viška trifluorsirćetne kiseline. Primenjena metodologija je bila uspešno iskorišćena i za sintezu jedinjenja **94i** polazeći od komercijalno dostupnog 1-adamantimetilketona **AdCOCH₃**. Na sličan način, sintetisana su jedinjenja **94e–h** i **94k** izvedena iz 2-(1-adamantil)etanal **AdCH₂CHO** uz sirćetnu kiselinu kao regulatora pH vrednosti. S obzirom na to da je utvrđeno da na biološku aktivnost derivata sklareola utiče dužina diaminskog strukturnog motiva, korišćeni su diamini sa dva, tri, šest i osam metilenskih grupa, kao i ciklični piperazin.



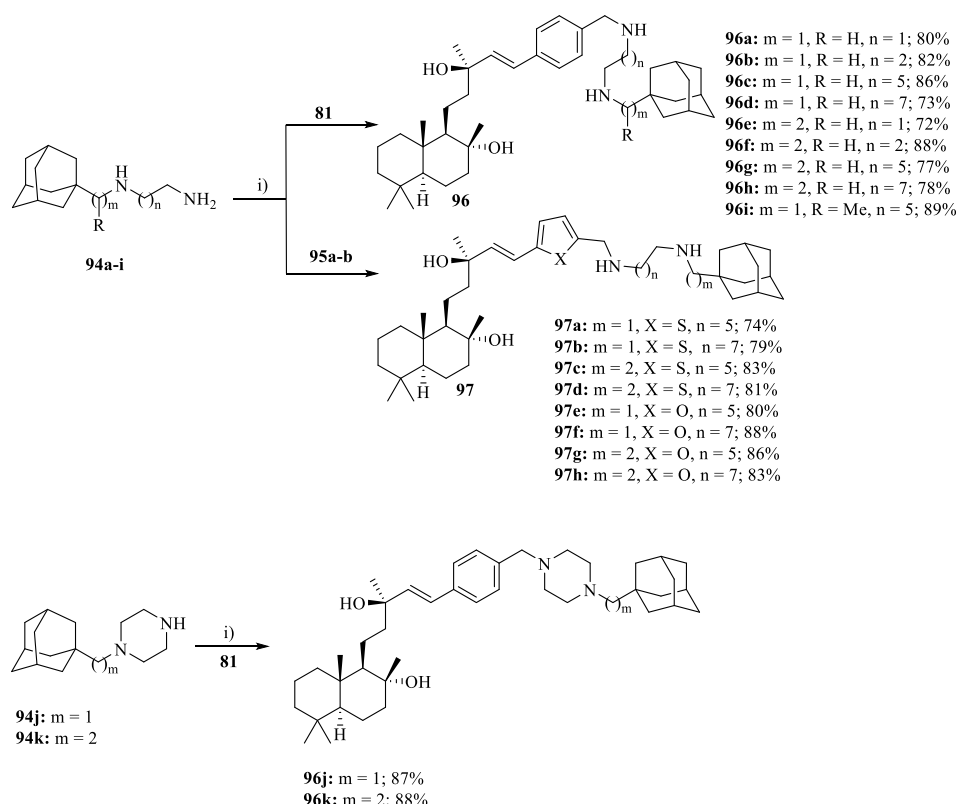
Shema 16. Sinteza diaminskih derivata adamantana **94a–k**.

Bilo je značajno ispitati da li modifikacija aromatičnog jezgra može poboljšati biološku aktivnost. Tiofensko i furansko jezgro se često koriste kao izosterne zamene za benzen, te je pokušana sinteza jedinjenja **95a–b**. Ova jedinjenja nije bilo moguće dobiti oksidativnom Hekovom reakcijom iz odgovarajućih boronskih kiselina. Međutim, kada su primenjeni uslovi za Hekovu reakciju, uspešno su dobijeni željeni derivati polazeći iz heteroaril-bromida. U reakciji su korišćeni $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ kao katalizator, K_2CO_3 kao baza, a rastvarač je bio MeCN . Ova metodologija se pokazala efikasnom i pri sintezi jedinjenja **81**, kad je kao polazni materijal korišćen 4-brombenzaldehyd.



Shema 17. Dobijanje aldehydnih derivata **81** i **95a–b** sklareola Hekovom reakcijom.

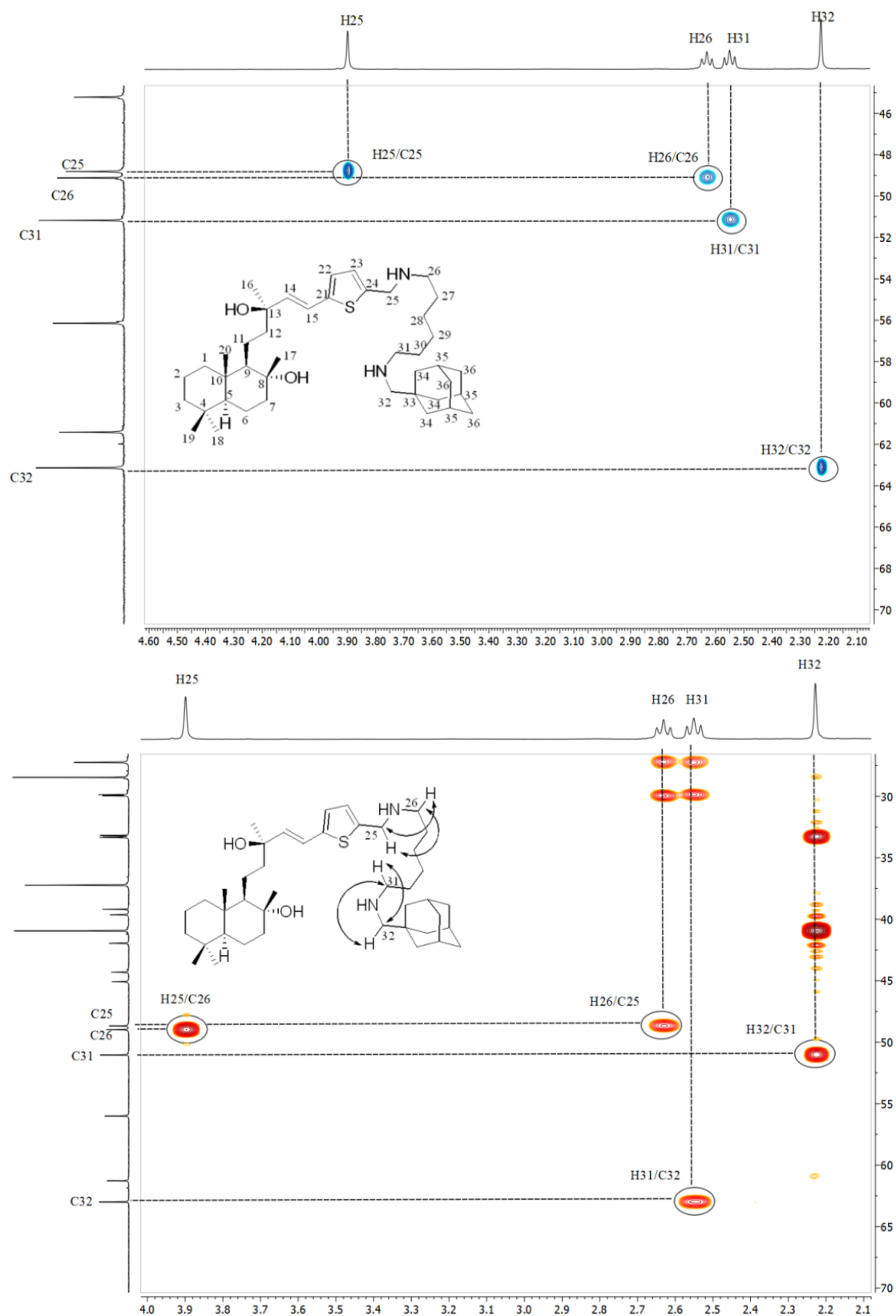
Poslednji korak u sintezi bilo je formiranje C-N veze reduktivnim aminovanjem u prisustvu $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$ i NaBH_4 . U reakciji su kao supstrati korišćeni aldehidi **81** i **95a–b**, čime je postignuta strukturna raznovrsnost aromatičnog jezgra novodobijenih jedinjenja (Shema 18).



Shema 18. Sintaza aminoadamantanskih derivata sklareola **96** i **97**.

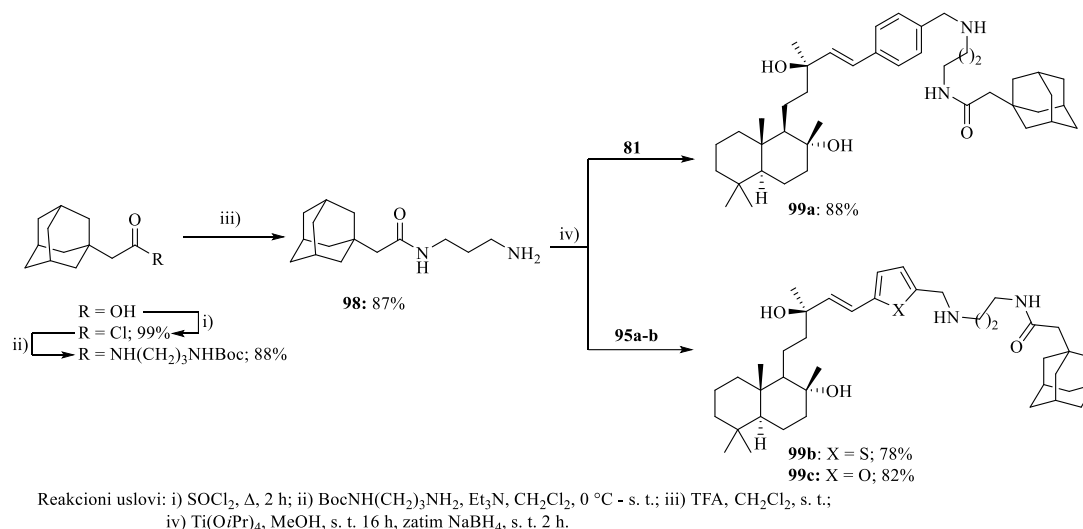
Reakcija se selektivno odvijala preko terminalne amino-grupe aminoadamantanskih derivata, što je potvrđeno korelacijama u HSQC i HMBC spektrima. Na slici 30 prikazani su ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC spektri jedinjenja **97a** sa značajnim korelacijama za potvrdu strukture. U ^1H NMR spektru uočene su četiri metilenske grupe u susedstvu azota na hemijskim pomeranjima 3,90 ppm (H25, singlet), 2,63 ppm (H26, triplet), 2,55 ppm (H31, triplet) i 2,23 ppm (H32, singlet). Korelacije u HMBC spektru koje su nedvosmisleno ukazale da je do vezivanja došlo preko terminalnog azota bile su:

- korelacija benzilne grupe 25 sa metilenskom grupom na položaju 26 iz diaminskog fragmenta (H25/C26 i H26/C25);
- korelacija metilenske grupe 32 u susedstvu adamantana sa metilenskom grupom 31 iz diaminskog fragmenta (H31/C32 i H32/C31).



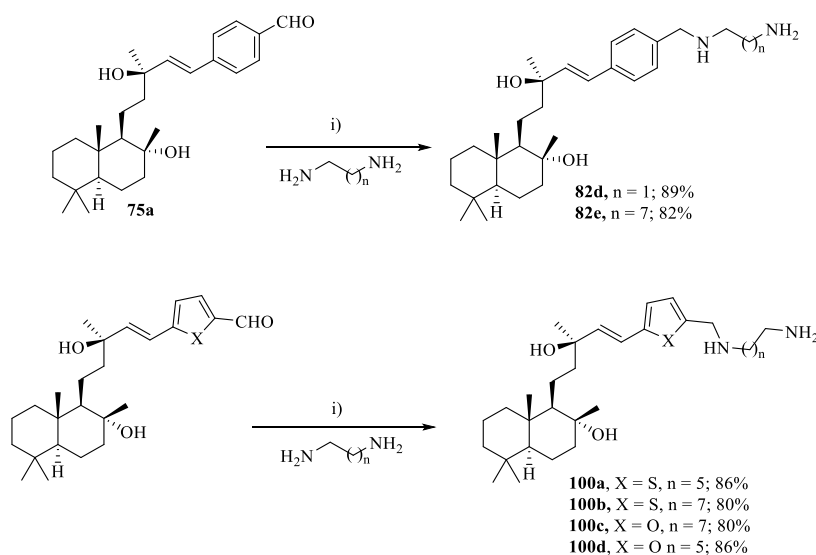
Slika 30. ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC spektri jedinjenja **97a** sa označenim ključnim korelacijama.

Jedinjenja u kojima je aminska funkcionalna grupa metilenskog mosta zamenjena amidnom, sintetisana su iz prekursora **98**. Sinteza jedinjenja **98** je izvedena prema procedurama opisanim u literaturi: 2-(1-adamantil)sirćetna kiselina je prevedena u odgovarajući alkanoil-hlorid upotrebom SOCl_2 , a zatim je u reakciji sa *N*-Boc-zaštićenim 1,3-diaminopropanom dobijen odgovarajući zaštićeni amid.¹⁶⁷ Nakon uklanjanja zaštitne grupe, jedinjenje **98** je podvrgnuto reduktivnom aminovanju sa aldehydima **81** i **95a–b**, pri čemu su amidni derivati **99a–c** sklareola dobijeni u odličnim prinosima (Shema 19).



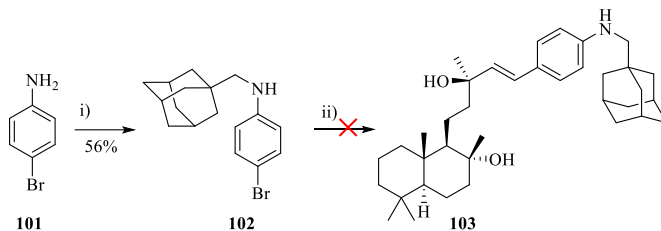
Shema 19. Sinteza jedinjenja **99a–c**.

Primenom prethodno optimizovane procedure za dobijanje diaminskih derivata sklareola sintetisani su derivati **82d–e** i **100a–d** (Shema 20). Na ovaj način dobijeni su analozi jedinjenja **98** i **99** koji ne sadrže adamantansko jezgro u cilju ispitivanja uticaja adamantil-grupe na biološku aktivnost.



Shema 20. Sinteza diaminskih derivata sklareola **82d–e** i **100a–d**.

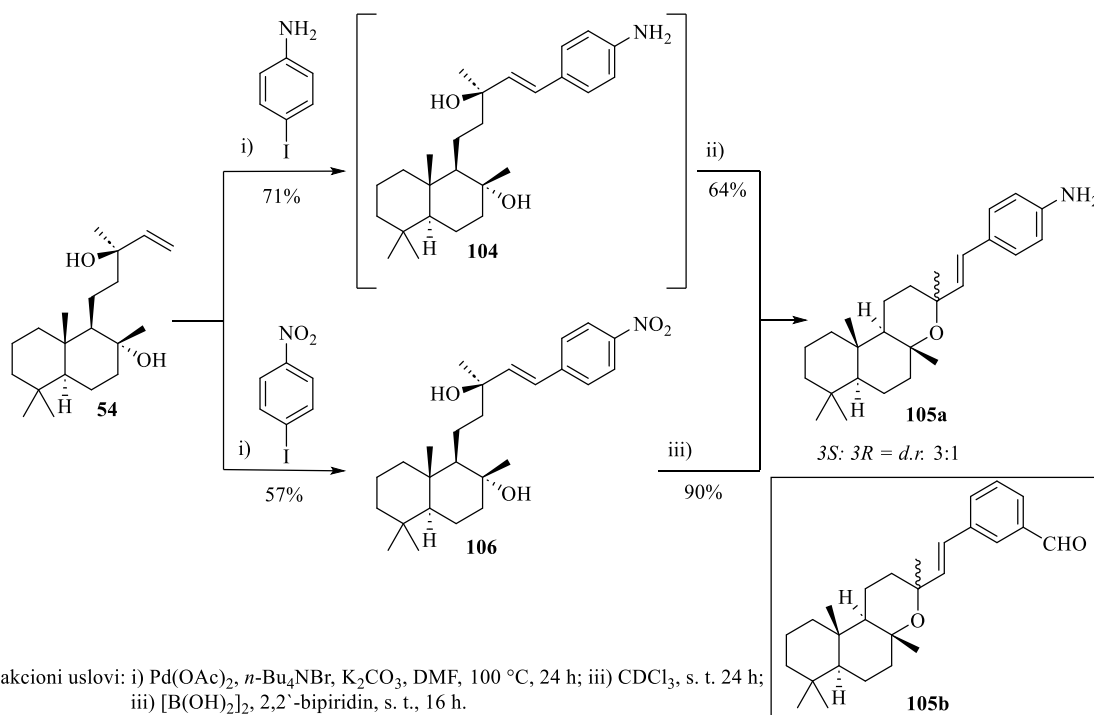
U nastavku istraživanja je pokušana sinteza analognih jedinjenja **103** koja umesto benzilnog položaja imaju direktno vezan azot za aromatično jezgro. U direktnoj reakciji između adamantanom-modifikovanog *p*-bromanilina **102** i sklareola pod uslovima za Hekovu reakciju nije došlo do konverzije.



Reakcioni uslovi: i) $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, MeOH, s. t., 16 h, potom NaBH_4 , 2 h ;
ii) jedinjenje **54** $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, K_2CO_3 , MeCN, Ar, Δ , 24 h.

Shema 21. Pokušaj sinteze jedinjenja sa anilinskim motivom **103**.

Isto tako, pokušao je alternativni metodološki pristup za dobijanje željenih derivata. Plan je bio da se u prvom koraku dobije anilinski amin **104**, za koji bi se naknadno vezao adamantan reduktivnim aminovanjem. Reakcija nije bila uspešna primenom prethodno opisanih uslova Hekove i oksidativne Hekove reakcije. Međutim, reakcijom sa *p*-jodanilinom uz prisustvo *n*- Bu_4NBr i $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ nastao je željeni derivat **104** u dobrom prinosu. Stajanjem u CDCl_3 , došlo je do intramolekulske ciklizacije, pri čemu je nastala smeša derivata manoiloksida i 13-*epi*-manoiloksida **105a**. Struktura ovih produkata potvrđena je dvodimenzionalnim NMR eksperimentima i IR spektroskopijom. Radi potvrde ovog zapažanja, jedinjenje **105a** uspešno je dobijeno i redukcijom *p*-nitrofenil-derivata sklareola **106** primenom $[\text{B}(\text{OH})_2]_2$ i 2,2'-bipiridina. Pregledom literature, utvrđeno je da aril-supstituisani derivati manoiloksida pokazuju umereno antitumorsko dejstvo prema različitim tumorskim ćelijama, pri čemu je najpotentniji derivat (**105b**) pokazao slabije dejstvo od sklareola.¹⁶⁸ Zbog toga ova jedinjenja nisu bila predmet daljih ispitivanja.

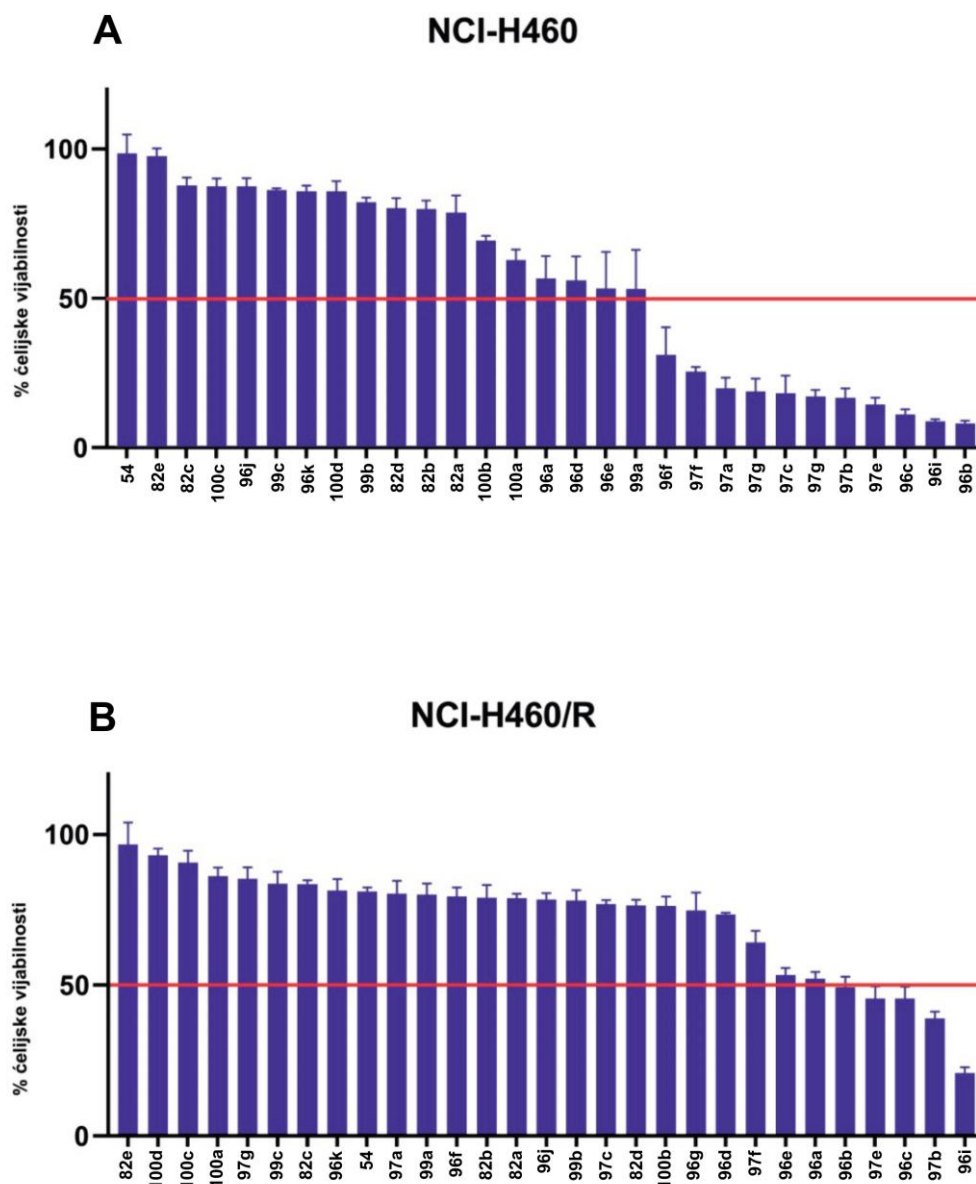


Reakcioni uslovi: i) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, *n*- Bu_4NBr , K_2CO_3 , DMF, 100 °C, 24 h; iii) CDCl_3 , s. t. 24 h;
iii) $[\text{B}(\text{OH})_2]_2$, 2,2'-bipiridin, s. t., 16 h.

Shema 22. Pokušaj sinteze anilinskog derivata sklareola **104**.

3.2.1. Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja sklareola sa adamantanskim motivom

Preliminarno ispitivanje citotoksičnosti sklareola (**54**), 19 derivata sklareola sa adamantanskim motivom (**96a–k**, **97a–h** i **99a–c**) i 9 diaminskih analoga (**82a–e** i **100a–d**) sprovedeno je MTT testom na humanim senzitivnim ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460) i odgovarajućim rezistentnim ćelijama (NCI-H460/R) pri koncentraciji od 1 μ M (Slika 31). NCI-H460/R ćelijska linija se odlikuje prekomernom ekspresijom P-gp i dobijena je postepenim izlaganjem NCI-H460 ćelijske linije rastućim koncentracijama doksorubicina.¹⁶⁹ Zbog nerastvorljivosti u DMSO, jedinjenja **96h**, **97d** i **97h** nisu bila uključena u biološku evaluaciju.



Slika 31. Prikaz preliminarnog ispitivanja citotoksičnog dejstva novih derivata sklareola. Ispitivanja su izvedena na humanim ćelijskim linijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća – osetljivoj liniji NCI-H460 (A) i rezistentnoj liniji NCI-H460/R (B). Ćelije su tretirane sklareolom i njegovim derivatima u koncentraciji od 1 μ M tokom 72 h. Vijabilnost ćelija je ispitana MTT testom u tri nezavisna eksperimenta. Vijabilnost netretiranih ćelija podešena je na 100%, dok crvena linija označava 50% ćelijske vijabilnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata (Slika 31) odabrano je devet derivata sklareola (**96b**, **96c**, **96i**, **97a**, **97b**, **97c**, **97e**, **97f** i **97g**) koji su pri koncentraciji od 1 μM izazvali inhibiciju rasta $\geq 50\%$ kod osetljivih NCI-H460 ćelija. Za ova jedinjenja je izvršeno dozno-zavisno ispitivanje citotoksičnosti MTT testom (Tabela 3 i Slika P27). Derivati sklareola sa adamantanskim motivom pokazali su skoro 100 puta veću citotoksičnost prema ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća u poređenju sa sklareolom (**54**). Četiri derivata (**96b**, **96c**, **96i** i **97e**) pokazala su izuzetnu aktivnost i prema višestruko rezistentnim ćelijama NCI-H460/R (Slika 31).

Tabela 3. Ispitivanje citotoksičnog efekta jedinjenja **54**, **96b**, **96c**, **96i**, **97a-c** i **97e-g**, prema ćelijskim linijama NCI-H460, NCI-H460/R i MRC-5.

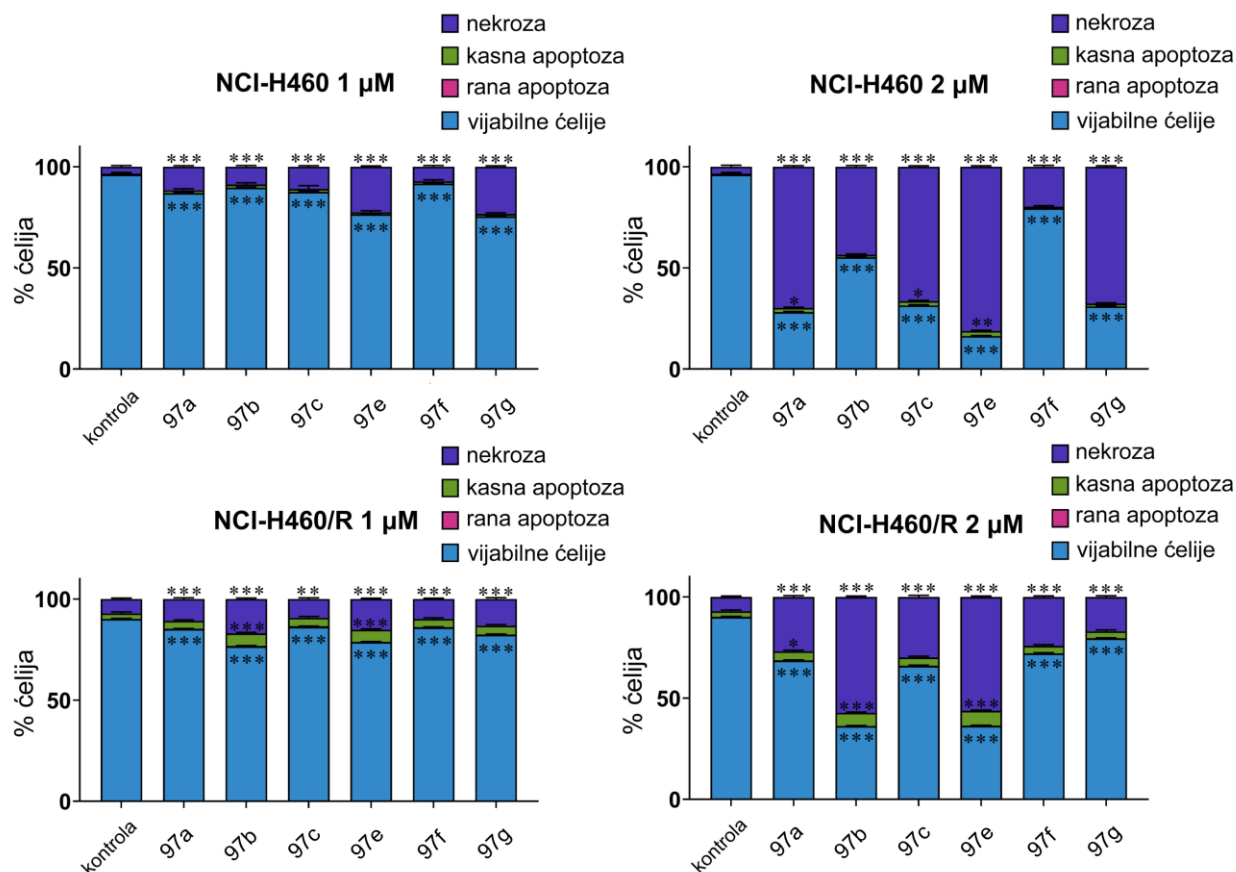
Jedinjenje	IC ₅₀ vrednost (μM) ^a			FRR ^b	SI ^c
	NCI-H460	NCI-H460/R	MRC-5		
54	45,7 $\pm$ 1,0	63,9 $\pm$ 1,8	75,2 $\pm$ 3,4	1,40	1,37
96b	0,468 $\pm$ 0,009	1,062 $\pm$ 0,026	1,158 $\pm$ 0,015	2,27 ^R	1,51
96c	0,599 $\pm$ 0,013	1,043 $\pm$ 0,023	0,930 $\pm$ 0,013	1,74	1,13
96i	0,470 $\pm$ 0,009	1,032 $\pm$ 0,023	0,746 $\pm$ 0,013	2,19 ^R	0,99
97a	0,759 $\pm$ 0,017	2,089 $\pm$ 0,048	1,772 $\pm$ 0,038	2,75 ^R	1,24
97b	0,897 $\pm$ 0,018	0,565 $\pm$ 0,009	2,265 $\pm$ 0,039	0,6 ^{CS}	3,10 ^S
97c	0,348 $\pm$ 0,007	1,222 $\pm$ 0,027	1,539 $\pm$ 0,027	3,51 ^R	1,96
97e	0,225 $\pm$ 0,004	0,978 $\pm$ 0,023	0,900 $\pm$ 0,017	4,35 ^R	1,50
97f	0,867 $\pm$ 0,016	2,468 $\pm$ 0,062	1,785 $\pm$ 0,037	2,85 ^R	1,07
97g	0,644 $\pm$ 0,014	1,361 $\pm$ 0,036	2,366 $\pm$ 0,050	2,11 ^R	2,36 ^S

^a IC₅₀ vrednosti su prikazane kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija; ^b FRR – Faktor relativne rezistencije, izračunat kao odnos IC₅₀ vrednosti određene za NCI-H460/R ćelijsku liniju i IC₅₀ vrednosti dobijene za odgovarajuću osetljivu NCI-H460 ćelijsku liniju; ^c SI – Indeks selektivnosti, izračunat kao $\text{IC}_{50}(\text{MRC-5}) / ((\text{IC}_{50}(\text{NCI-H460})) + (\text{IC}_{50}(\text{NCI-H460/R}))) / 2$; ^R Rezistencija, definisana tako da je IC₅₀ vrednost za dato jedinjenje najmanje dvostruko viša kod rezistentnih ćelija u poređenju sa odgovarajućim osetljivim ćelijama; ^{CS} Kolateralna osetljivost, definisana tako da je IC₅₀ vrednost datog jedinjenja najmanje 20% niža kod rezistentnih NCI-H460/R ćelija u poređenju sa odgovarajućim osetljivim NCI-H460 ćelijama. Prag od 20% usvojen je kao konvencionalni kriterijum u literaturi; ^S Selektivnost prema ćelijama raka, definisana tako da je IC₅₀ vrednost datog jedinjenja najmanje dva puta veća kod normalnih (netumorskih) MRC-5 ćelija u poređenju sa prosečnom IC₅₀ vrednošću za NCI-H460 i NCI-H460/R ćelije.

Analizom podataka prikazanih u Tabeli 3, može se uočiti povećan stepen rezistencije kod svih ispitivanih jedinjenja u poređenju sa sklareolom (**54**). Jedino je jedinjenje **97b** izazvalo kolateralnu senzitivnost kod NCI-H460/R ćelija (FRR = 0,6) i izraženu selektivnost prema tumorskim ćelijama (SI = 3,10), čime se izdvojilo kao najperspektivniji kandidat za dalja biološka ispitivanja. Pored njega, i derivat **97g** pokazao je selektivnost prema ćelijama raka (SI = 2,36). Analiza odnosa strukture i aktivnosti (Slika 31, Tabela 3) pokazala je da uvođenje alkil-adamantanskih grupa u molekul značajno povećava citotoksičnost prema obe ćelijske linije. Adamantanski derivati **96a-i** i **97a-h** pokazali su veću aktivnost u poređenju sa odgovarajućim diaminskim analogima **82a-e** i **100a-d**. Među njima, jedinjenja sa acikličnim diaminskim fragmentom (**96a-i**) ispoljila su veći citotoksični potencijal od jedinjenja sa piperazinskom strukturom (**96j-k**). Dalja uporedna analiza derivata **96a-d** i **96e-h** ukazuje da C3 i C6 strukturni motivi generalno doprinose povećanju citotoksičnosti, sa izuzetkom jedinjenja **96e**. Poređenjem jedinjenja **96c** i **96g** sa istim C6 diaminskim fragmentom uočeno je da **96c** pokazuje bolju aktivnost, što sugeriše da je adamantilmetil-grupa povoljnija u odnosu na adamantiletal-grupu. Ovaj trend je uočen i poređenjem ostalih parova jedinjenja sa istim diaminskim nizom: **96b** vs. **96f**, **96c** vs. **96g** i **97e** vs. **97g** (izuzetak predstavlja par **97c** vs. **97a**). Uvođenje amidne funkcionalne grupe kod jedinjenja **99a-c** nije dovelo do značajnog poboljšanja aktivnosti.

3.2.1.1. Indukcija ćelijske smrti i promene u raspodeli ćelijskog ciklusa

Analiza ćelijske smrti pomoću dvojnog AV/PI bojenja (Slike 32, P28 i P29) je sprovedena za derivate **97a–c** i **97e–g**. Tretman je primenjen u trajanju od 72 h pri koncentraciji 1 μM . Utvrđeno je da ispitivani derivati prvenstveno indukuju nekrozu kao dominantan oblik ćelijske smrti kod obe ispitivane ćelijske linije, dok je kod rezistentnih NCI-H460/R ćelija zabeležen porast broja ćelija i u fazi kasne apoptoze.



Slika 32. Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom adamantanskih derivata sklareola (**97a**, **97b**, **97c**, **97e**, **97f** i **97g**) pri koncentracijama od 1 μM i 2 μM . Ispitivanja su sprovedena na NCI-H460 i NCI-H460/R ćelijskim linijama nakon 48 časova tretmana, a zatim podvrgnute AV/PI bojenju. Svaki eksperiment ponovljen je tri puta. Procenat ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi, nekrozi, kao i vijabilnih ćelija prikazan je na histogramima. Statistička analiza izvršena je u programu „GraphPad Prism 8.0.2“ uz dvofaktorsku analizu varijanse (ANOVA) i „Dunnett“ test. Statistički značajna razlika između tretiranih uzoraka i netretirane kontrole je označena na sledeći način: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Upoređivanjem udela mrtvih ćelija može se uočiti da jedinjenja **97a**, **97c**, **97e–g** imaju manji efekat na rezistentne ćelije, odnosno, procenat mrtvih ćelija bio je niži kod rezistentne linije NCI-H460/R u poređenju sa senzitivnom NCI-H460 ćelijskom linijom. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim MTT testom (Tabela 3). Kod jedinjenja **97b** primećen je veći udeo mrtvih ćelija kod rezistentne linije NCI-H460/R u poređenju sa senzitivnom linijom NCI-H460, i to pri obe ispitivane koncentracije, čime je potvrđena kolateralna senzitivnost (Tabela 3). Uzimajući u obzir da jedinjenje **82c** indukuje ranu apoptozu u ćelijama glioblastoma U87 i U87-TxR nakon 48 h, može se zaključiti da su efekti derivata sklareola specifični za određene tipove tumorskih ćelija. Na ovaj zaključak ukazuju i činjenice da hibridi sklareola i doksorubicina izazivaju ranu apoptozu u ćelijama astrocitoma gradusa 3,¹⁷⁰ dok derivat **56d** indukuje istovremeno i apoptozu i autofagiju kod PC-3 ćelija raka prostate.¹⁴⁴

Analiza raspodele ćelijskog ciklusa izvedena je bojenjem pomoću PI nakon 72 h tretmana pri koncentraciji od 1 μM (Tabela 4, Slike P30 i P31). Upoređivanjem udela ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (subG0, G0/G1, S, G2/M) sa netretiranim ćelijama, uočeno je da je jedinjenje **97e** izazvalo najizraženiji poremećaj ćelijskog ciklusa. Ovaj derivat smanjuje udeo ćelija u G0/G1 fazi i povećanja broj ćelija u subG0 fazi kod obe linije (NCI-H460 i NCI-H460/R), dok se kod rezistentne linije primećuje smanjen udeo ćelija u G2/M fazi. Kod jedinjenja **97b**, na osnovu udela ćelija u subG0 fazi u odnosu na netretirane NCI-H460/R ćelije, kolateralna senzitivnost nije potvrđena (Tabela 4). Ovaj derivat je povećao udeo ćelija u G0/G1 fazi i smanjio udeo u G2/M fazi kod NCI-H460 ćelija. Jedinjenja **97c** i **97g** u NCI-H460 ćelijama, kao i **97f** u NCI-H460/R ćelijama dovela su do značajnog smanjenja udela ćelija u G0/G1 fazi.

Tabela 4. Ispitivanje uticaja jedinjenja **97a–c** i **97e–g** na distribuciju ćelijskog ciklusa kod NCI-H460 i NCI-H460/R ćelijskih linija.

NCI-H460							
Faza ^a	Kontrola	97a	97b	97c	97e	97f	97g
subG0 ^b	1,76 ± 0,14	6,07 ± 3,18	3,33 ± 2,03	7,20 ± 3,03	8,65 ± 2,89	3,47 ± 1,35	8,57 ± 2,96
G0/G1	54,36 ± 1,04	55,14 ± 1,69	63,86 ± 1,73	48,10 ± 1,84	46,06 ± 1,85	57,18 ± 2,02	48,70 ± 1,85
S	19,95 ± 1,30	16,66 ± 2,18	16,82 ± 2,32	20,07 ± 2,24	16,99 ± 2,09	18,18 ± 2,31	17,51 ± 2,13
G2/M	21,08 ± 4,17	19,68 ± 6,48	14,03 ± 4,01	22,03 ± 7,64	24,15 ± 8,27	18,55 ± 4,84	21,80 ± 4,84
NCI-H460/R							
Faza	Kontrola	97a	97b	97c	97e	97f	97g
subG0	8,90 ± 3,02	8,78 ± 4,22	10,78 ± 4,66	7,95 ± 5,07	22,07 ± 4,94	16,33 ± 4,92	11,42 ± 5,31
G0/G1	57,38 ± 1,76	57,93 ± 2,22	57,73 ± 2,48	59,99 ± 2,56	50,70 ± 2,89	47,46 ± 3,05	54,54 ± 2,93
S	14,43 ± 1,35	12,98 ± 1,71	13,84 ± 1,88	12,47 ± 2,07	11,67 ± 2,18	16,44 ± 2,05	14,39 ± 2,10
G2/M	20,40 ± 4,51	21,09 ± 5,14	18,72 ± 5,53	20,32 ± 6,35	16,14 ± 8,15	20,88 ± 8,10	20,71 ± 7,17

^a Distribucija ćelija je izražena u %, prikazana kao srednja vrednost ± standardna devijacija; ^b subG0 predstavlja populaciju ćelija u procesu apoptoze.

3.2.1.2. Nanočestična priroda sklareola i njegovih derivata

Sklareol (**54**) spontano formira čestice nanometarskog reda veličine jednostavnim rastvaranjem u ultračistoj vodi, bez potrebe za posebnom pripremom (Tabela 5 i Slika P32). Veličina čestica sklareola je oko 210 nm, dok je indeks polidisperzije (PDI) približno 0,2, što ukazuje na njihovu uniformnost. Čestice poseduju negativan zeta potencijal (ZP) ispod -20 mV, što sugerise nisku sklonost ka agregaciji. Diaminski derivati sklareola sa tiofenskim i furanskim prstenom (**100a–d**) spontano formiraju znatno manje čestice, veličine (110–170 nm), sa niskim PDI i pozitivnim zeta-potencijalom. Nizak PDI je uočen i kod derivata **97c**, **97e** i **97f**, koji takođe imaju pozitivan ZP (Tabela 5 i Slika P32). Derivati sklareola sa adamantanom formiraju čestice sličnih veličina kao kod sklareola (prečnika oko 200–300 nm), ali sa pozitivnim ZP većim od +30 mV, što ukazuje na nisku verovatnoću spontane agregacije (Tabela 5 i Slika P32). Među derivatima, jedinjenje **97g** imalo je najbolji PDI ($< 0,2$), veličinu manju od 200 nm i ZP preko 35 mV.

Visoka citotoksičnost ispitivanih derivata može biti posledica njihove sklonosti ka formiranju pozitivno naelektrisanih čestica nanometarskog reda veličine, koje se efikasno vezuju za negativno naelektrisanu ćelijsku membranu tumorskih ćelija, što obezbeđuje prodor u tumorske ćelije i selektivni efekat u odnosu na normalne ćelije. Uticaj veličine čestica ogleda se u indeksu selektivnosti: jedinjenje **97f** formira najveće nanočestice (~ 287 nm), i pokazuje nizak indeks selektivnosti ($SI = 1,07$), dok jedinjenje **97g**, koje formira kompaktnije nanočestice (~ 195 nm) sa visokim zeta potencijalom (+37,5 mV), pokazuje značajno viši indeks selektivnosti ($SI = 2,36$).

Tabela 5. Ispitivanja nanočestičnih osobina sklareola i njegovih derivata **100a–d**, **97a–c** i **97e–g**.

Jedinjenja	Veličina (nm) ^a	PDI ^b	ZP ^c (mV)
54	210,43 $\pm$ 10,25	0,226 $\pm$ 0,023	-23,4 $\pm$ 2,3
100a	112,57 $\pm$ 0,38	0,168 $\pm$ 0,004	30,9 $\pm$ 5,7
100b	165,70 $\pm$ 1,05	0,272 $\pm$ 0,004	29,6 $\pm$ 3,3
100c	118,77 $\pm$ 1,06	0,053 $\pm$ 0,010	16,4 $\pm$ 3,0
100d	122,03 $\pm$ 2,17	0,148 $\pm$ 0,010	28,6 $\pm$ 1,6
97a	208,57 $\pm$ 5,65	0,157 $\pm$ 0,014	35,0 $\pm$ 0,9
97b	215,63 $\pm$ 2,65	0,188 $\pm$ 0,011	37,4 $\pm$ 0,4
97c	204,27 $\pm$ 4,82	0,174 $\pm$ 0,016	37,3 $\pm$ 3,1
97e	249,43 $\pm$ 2,82	0,239 $\pm$ 0,015	39,2 $\pm$ 0,4
97f	286,93 $\pm$ 2,85	0,228 $\pm$ 0,019	29,8 $\pm$ 3,8
97g	195,23 $\pm$ 3,90	0,131 $\pm$ 0,009	37,5 $\pm$ 0,8

^a Rezultati merenja su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija; ^a PDI – indeks polidisperznosti; ^b ZP – zeta potencijal.

3.2.1.3. Inhibicija aktivnosti P-glikoproteina derivatima sklareola sa adamantanom

Jedinjenjima **54**, **97a–c** i **97e–g** ispitana je sposobnost modulacije aktivnosti P-gp, pri čemu je kao referentno jedinjenje korišćen je tarikvidar (**48**). Sva testirana jedinjenja, osim sklareola (**54**), povećala su akumulaciju rodamina 123 u rezistentnim ćelijama NCI-H460/R pri koncentraciji od 5 μ M, što ukazuje na inhibiciju aktivnosti P-gp (Tabela 6). Međutim, njihov inhibitorski efekat nije dostigao nivo tarikvidara (**48**), što se vidi na osnovu MFI vrednosti u Tabeli 6. Indeks senzitivnosti (IS), koji odražava sposobnost jedinjenja da dovede do reverzije rezistencije ($IS=100$ kod senzitivnih NCI-H460 ćelija), premašio je vrednost od 50 jedino kod tarikvidara (**48**).

Među testiranim jedinjenjima, derivat **97b** se izdvojio kao snažan inhibitor P-gp (Tabela 6), a pored toga je izazvao kolateralnu senzitivnost kod NCI-H460/R ćelijske linije (Tabela 3, Slika 31). Derivati **97e** i **97f** takođe su značajno inhibirali aktivnost P-gp (Tabela 6), ali su istovremeno pokazali nižu citotoksičnost u rezistentnim ćelijama u odnosu na senzitivne ćelije (Tabela 3), što ukazuje da su ovi derivati supstrati za P-gp.

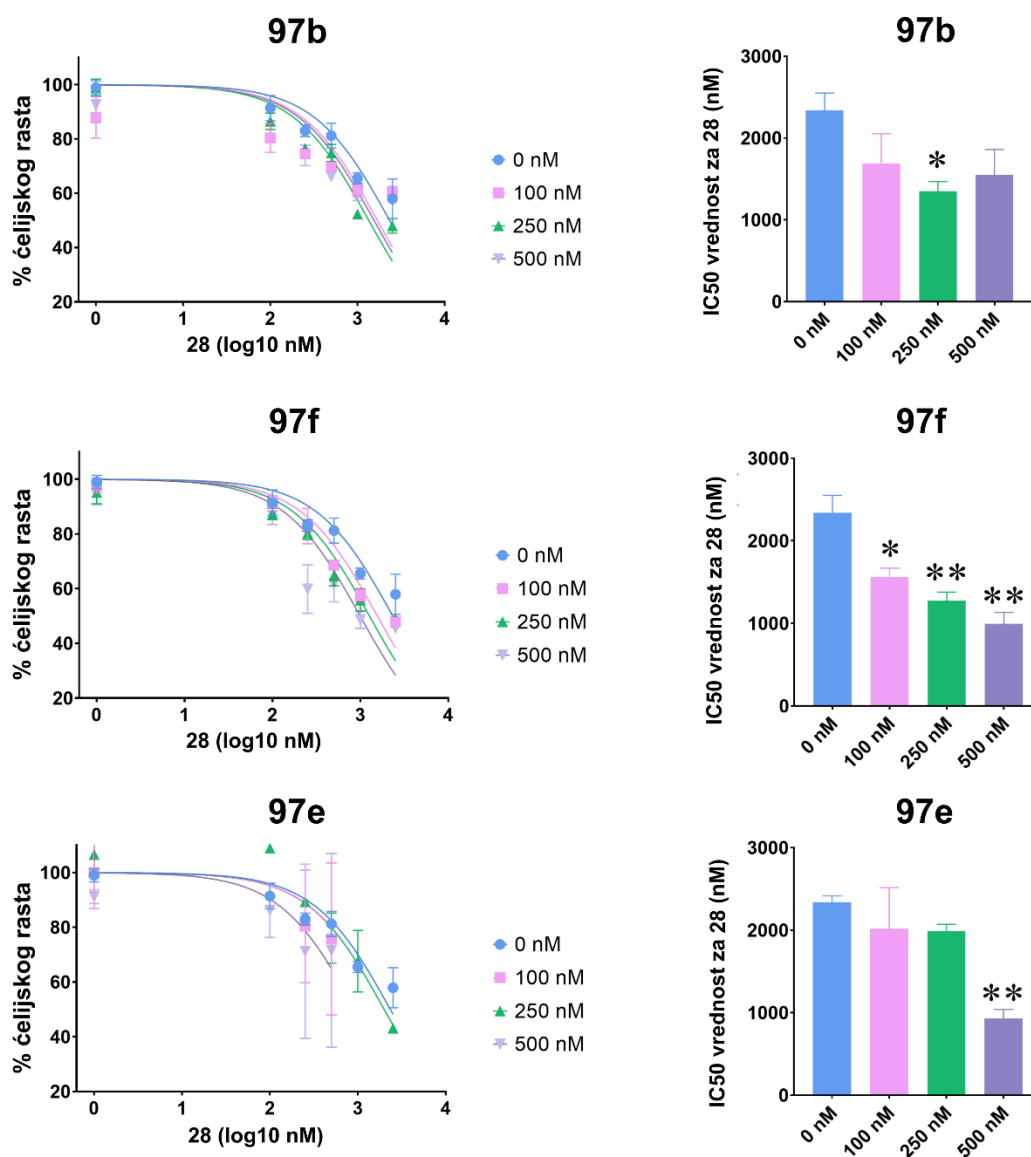
Tabela 6. Inhibicija aktivnosti P-glikoproteina indukovana jedinjenjima **54**, **97a–c** i **97e–g** pri 5 μ M.

Ćelijske linije i jedinjenja	MFI ^a	FAR ^b	IS ^c
NCI-H460	332903 $\pm$ 455	9,36	100,00
NCI-H460/R	35577 $\pm$ 69	/	10,69
48 ^d	279759 $\pm$ 455	7,86	84,04
54 ^e	51051 $\pm$ 65	1,43	15,33
97a	69177 $\pm$ 84	1,94	20,78
97b ^{INH}	126613 $\pm$ 497	3,56	38,03
97c	59102 $\pm$ 88	1,66	17,75
97e ^{SUB}	129509 $\pm$ 486	3,64	38,09
97f ^{SUB}	104011 $\pm$ 605	2,92	31,24
97g	71129 $\pm$ 103	1,99	21,37

^a MFI (engl. *Mean Fluorescence Intensity*) – izmereni srednji intenzitet fluorescencije, prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija; ^b FAR (engl. *Fluorescence Activity Ratio*) – odnos fluorescentnih aktivnosti, izračunat kao odnos MFI (tretiranih rezistentnih ćelija)/MFI (netretiranih rezistentnih ćelija), prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija; ^c IS – Indeks senzitivnosti, izračunat kao MFI (rezistentnih tretiranih ćelija) $\times$ 100/MFI (senzitivnih netretiranih ćelija); ^d Tarikvidar (**48**) korišćen kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp pri koncentraciji 50 nM; ^e Sklareol je primenjen u koncentraciji 50 μ M; ^{INH} jedinjenja inhibitori P-gp koja zaobilaze rezistentni fenotip na osnovu MTT testa i inhibiraju aktivnost P-gp prema testu akumulacije rodamina 123; ^{SUB} jedinjenja supstrati za P-gp sa značajno višim IC₅₀ vrednostima u rezistentnim ćelijama u poređenju sa senzitivnim ćelijama (prema rezultatima MTT testa pokazuju rezistentni profil), dok istovremeno povećavaju akumulaciju rodamina 123.

3.2.1.4. Reverzija rezistencije na doksorubicin u NCI-H460/R ćelijama primenom derivata sklareola sa adamantanskim motivom

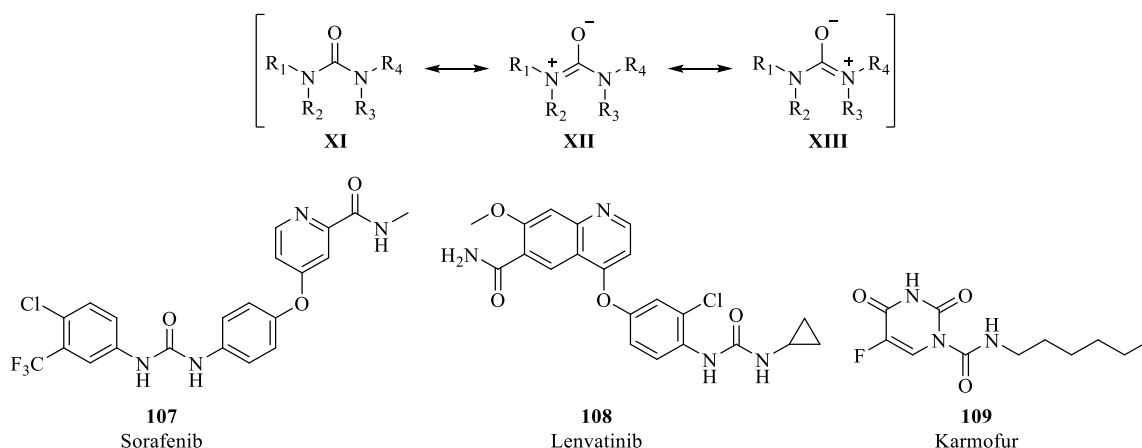
Doksorubicin je poznat kao supstrat P-gp i njegova efikasnost u rezistentnim ćelijama je smanjena usled povećanog efluksa.¹⁷¹ Jedinjenja koja inhibiraju aktivnost P-gp mogu dovesti do senzitivizacije ćelija na citostatike. Jedinjenja **97b**, **97e** i **97f**, koja su pokazala snažnu modulaciju aktivnosti P-gp, ispitana su u pogledu sposobnosti da dovedu do reverzije rezistencije na doksorubicin. Rast rezistentnih NCI-H460/R ćelija je praćen tokom tretmana doksorubicinom, kao i u kombinaciji sa ispitivanim jedinjenjima (Slika 33). Može se uočiti da se IC₅₀ vrednosti za doksorubicin smanjuju pri kombinovanom tretmanu sa testiranim jedinjenjima, što ukazuje na efikasnu senzitivizaciju NCI-H460/R ćelija. Efekat **97b** je bio najizraženiji pri 250 nM (Slika 33), koncentracija niža od IC₅₀ vrednosti određene za rezistentnu ćelijsku liniju (Tabela 3). Najizraženiji efekat senzitivizacije postignut je primenom 500 nM jedinjenja **97e** (Slika 33), što je u skladu sa dobijenim najvišim FAR vrednostima za **97e** (Tabela 6). Dozno-zavisan efekat na povećanje osetljivosti na doksorubicin se jasno uočava u kombinaciji sa **97f** (Slika 33).



Slika 33. Ispitivanje reverzije rezistencije na doksorubicin kod NCI-H460/R ćelija u kombinaciji sa jedinjenjima **97b**, **97e** i **97f**. Rast ćelija praćen je tokom tretmana doksorubicinom, pojedinačno i u kombinaciji sa ispitivanim jedinjenjima, tokom 72 h, nakon čega je vijabilnost određena MTT testom. Statistička analiza i vizuelizacija rezultata izvršene su softverom „GraphPad Prism 8.0.2“ korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) uz „Brown-Forsythe“ i „Welch“ testove za višestruka poređenja. Statistički značajne razlike između tretiranih uzoraka i netretirane kontrole označene su na sledeći način: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

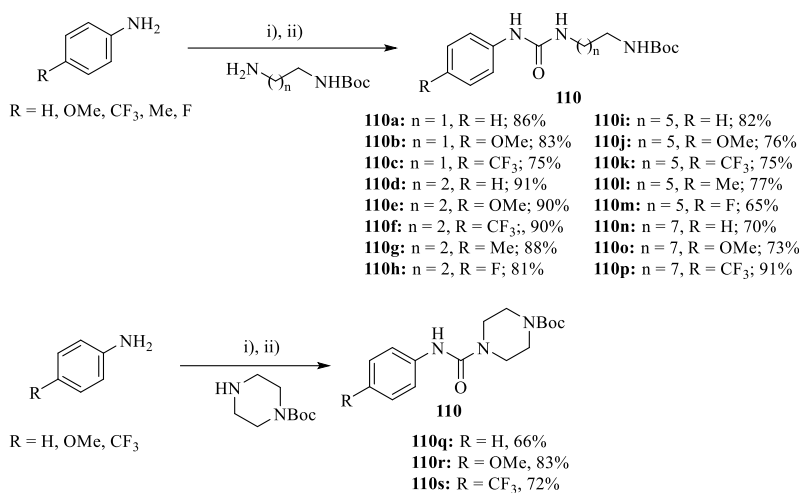
3.3. Derivati sklareola sa karbamidnim strukturnim motivom

Karbamidna funkcionalna grupa postoji kao rezonantni hibrid tri strukture (Slika 34, **XI** – **XIII**), u kojima atomi azota učestvuju u delokalizaciji, što dovodi do značajne konformacione rigidnosti.^{172,173} Struktura karbamida sadrži i donore i akceptore vodoničnih veza, što povećava ukupnu hidrofilnost molekula, ali i omogućava interakcije sa proteinima u ćeliji. Pokazano je da NH- π interakcije između uree i aromatičnih bočnih lanaca aminokiselina u proteinima značajno doprinose interakciji lekova sa karbamidnom strukturom. Karbamidni strukturni motiv prisutan je u velikom broju lekova u kliničkoj upotrebi, među kojima su *N*-nitrozouree (Slika 6): karmustin (**10**), lomustin (**11**) i hlrozotocin (**12**), kao i sorafenib (**108**) i lenvatinib (**109**) (Slika 34). Sorafenib (**107**) je inhibitor brojnih kinaza uključenih u proliferaciju i angiogenezu tumora, kao što su VEGF, PDGFR, RAF¹⁷⁴ i koristi se u lečenju raka bubrega¹⁷⁵, jetre¹⁷⁶ i štitaste žlezde.¹⁷⁷ Lenvatinib (**108**) je inhibitor VEGF receptora, PDGFR α , receptora faktora rasta fibroblasta i pojedinih proto-onkogen¹⁷⁸, a primenjuje se u kliničkoj terapiji raka štitaste žlezde¹⁷⁹ i raka jetre.¹⁸⁰ Karmofur (**109**), lipofilni prolek 5-fluoruracila (**18**) (Slika 9), inhibira ceramidazu, čija je neregulisana funkcija povezana sa Alchajmerovom bolešću i tumorima.¹⁸¹ Ušao je u kliničku upotrebu za lečenje raka debelog creva, ali se više ne primenjuje zbog izazivanja leukoencefalopatije kod pacijenata.¹⁸²



Slika 34. Primeri jedinjenja sa karbamidnom funkcionalnom grupom.

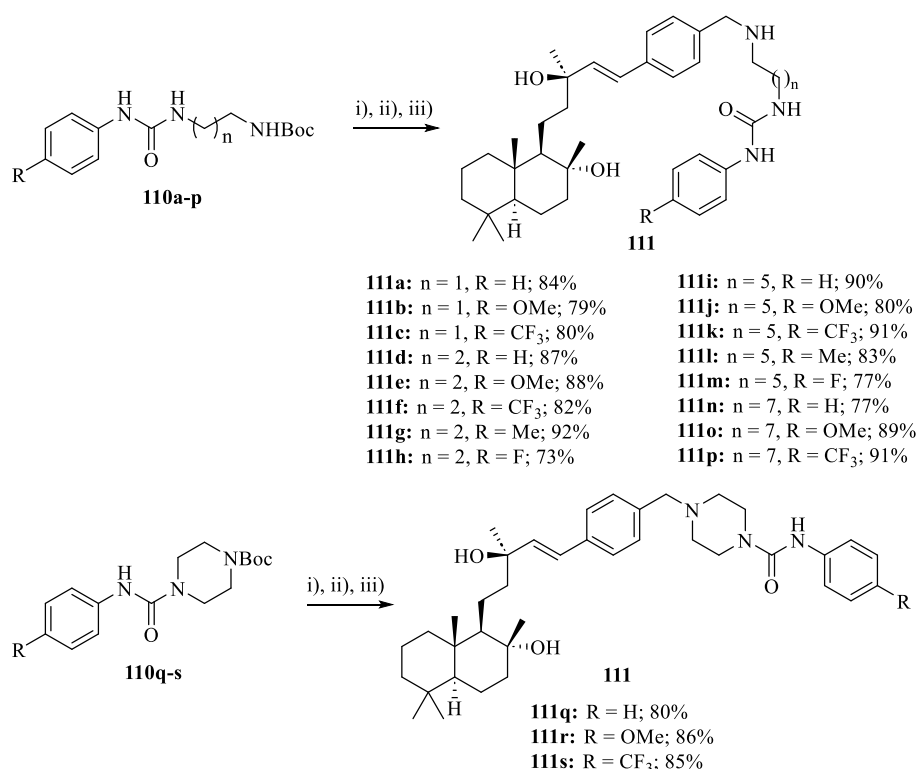
Prvobitna ruta za sintezu željenih derivata sklareola sa karbamidnom farmakoforom uključivala je reakciju diaminskih derivata sklareola (**82a–d**) sa supstituisanim fenil-izocijanatima. Međutim, ovaj postupak davao je dva regioizomera koja nije bilo moguće razdvojiti. Kako bi se povećala regioselektivnost sinteze, razvijen je alternativni sintetski put. Reakcijom *p*-supstituisanih anilina sa trifozgenom uz prisustvo DIPEA kao baze dobijeni su aril-izocijanati, nakon čega su u isti reakcioni sud dodavani mono-*N*-Boc-zaštićeni alkil-diamini. *N*-Boc-zaštićene uree dobijene su u dobrim prinosima (Shema 23). Direktna reakcija sa alkil-diaminima pokazala se nepogodna zbog nastanka složene smeše proizvoda.



Reakcioni uslovi: i) (Cl₃CO)₂CO, DIPEA, CH₂Cl₂, 0 °C - s. t. 2 h; ii) CH₂Cl₂, s. t.

Shema 23. Sintaza N-Boc zaštićenih urea 110a–s.

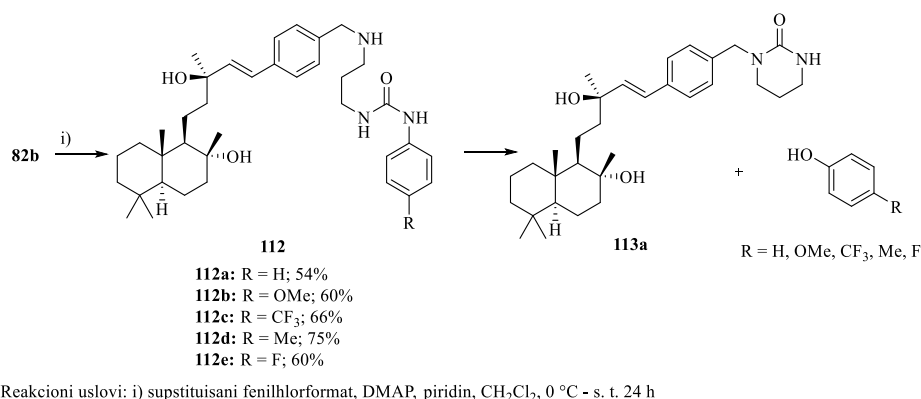
Kvantitativno uklanjanje zaštitne grupe sa jedinjenja **114** uspešno je izvedeno primenom HCl u MeOH. Dobijena jedinjenja dalje su korišćena u obliku hidrohloridnih soli, jer su se slobodne baze pokazale kao nestabilne. Kako bi se obezbedila nukleofilna amino-grupa za reakciju reduktivnog aminovanja, amonijum-grupa je neutralisana dodatkom K₂CO₃, nakon čega su u reakcioni sud dodati aldehid **81** i Ti(O*i*Pr)₄. Karbamidni derivati sklareola **111** su dobijeni u dobrim prinosima, a reakcija se odvijala regioselektivno (Shema 24).



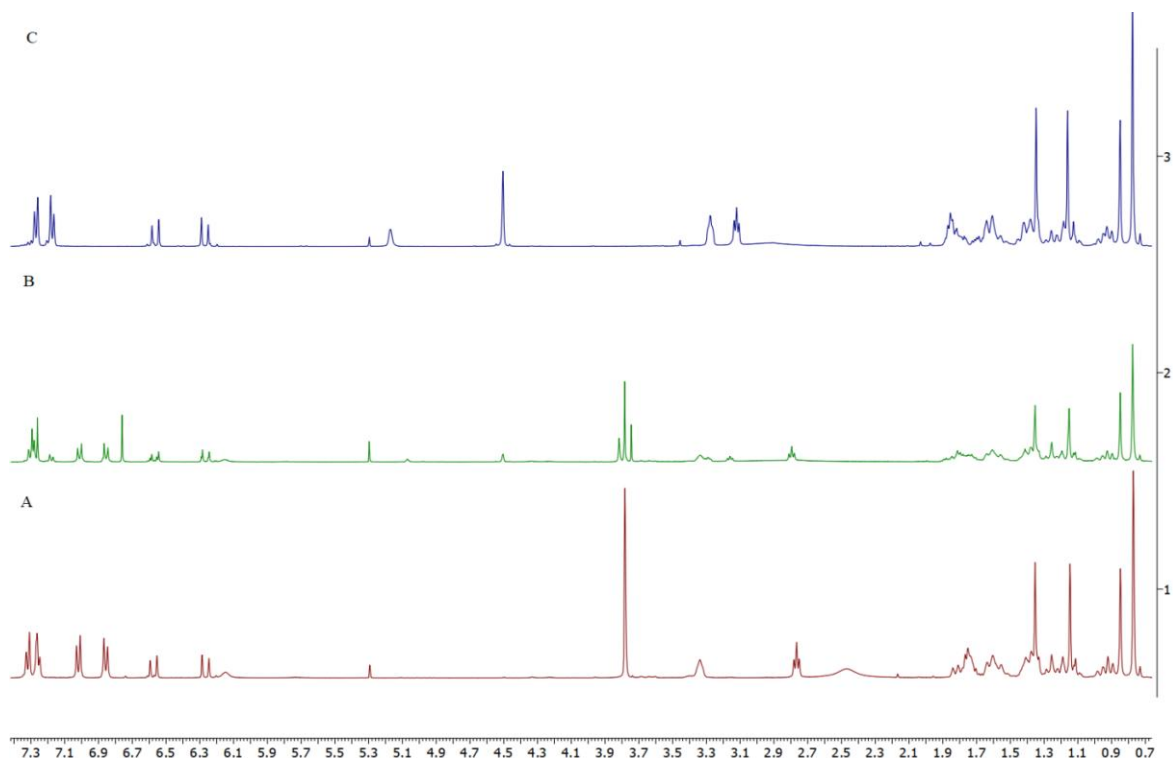
Reakcioni uslovi: i) HCl, MeOH, s. t. 1 h; ii) K₂CO₃, MeOH, s. t. 1 h; iii) jedinjenje **81**, Ti(O*i*Pr)₄, MeOH, s. t. 16 h, potom NaBH₄, s. t. 2 h.

Shema 24. Sintaza karbamidnih derivata sklareola 111a–s.

Kako bi se ispitao uticaj zamene karbamidnog motiva karbamatom na antitumorsku aktivnost jedinjenja, izvedena je sinteza aril-karbamatnih derivata sklareola. Reakcijom aril-hlorformijata sa diaminom **82b**, u prisustvu DMAP i piridina dobijani su terminalni karbamati **112** u umerenim prinosima (Shema 25). Međutim, utvrđeno je da jedinjenja **112** pri stajanju podležu degradaciji, pri čemu nastaje jedinjenje **113a**, uz oslobađanje odgovarajućeg fenola. Primećeno je da prisustvo elektron-odvlačećeg supstituenta u fenolnom ostatku ubrzava degradaciju karbamata ($-\text{CF}_3 > -\text{F} > -\text{Me} \sim -\text{H} > -\text{OMe}$), što ukazuje na adicio-eliminacioni mehanizam u kojem se fenoksidni anjon ponaša kao odlazeća grupa. Na slici 35 prikazani su uporedni spektri izolovanog aril-karbamata, spektri snimljeni nakon nekoliko dana i spektar izolovanog proizvoda **113a**.

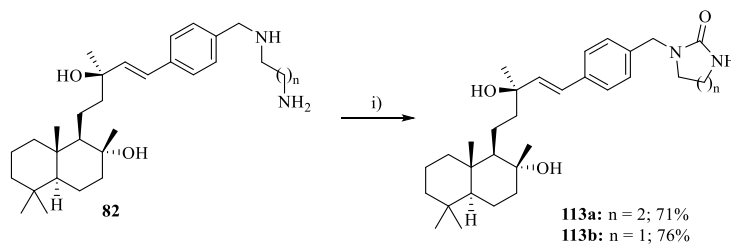


Shema 25. Sinteza jedinjenja **112** i ciklizacija u **113a**.



Slika 35. ^1H NMR spektri. A: jedinjenje **112b** snimljeno po izolovanju; B: jedinjenje **112b** snimljeno nakon mesec dana; C: jedinjenje **113a** snimljeno nakon prečišćavanja.

Ovo zapažanje potvrđeno je reakcijom diaminskog derivata sklareola **82b** sa *p*-nitrofenilhlorformijatom pod istim reakcionim uslovima. Proizvod ciklizacije dobijen je nakon 24 časa na sobnoj temperaturi, u dobrom prinosu (Shema 26). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa adiciono-eliminacionim mehanizmom, imajući u vidu da rezonantna stabilizacija fenoksidnog anjona pomoću elektron-odvlačeće nitro-grupe povećava njegovu sposobnost da deluje kao odlazeća grupa. Reakcija je uspešno primenjena i za sintezu jedinjenja **113b** polazeći od diamina **82d**. Strukture jedinjenja su potvrđene dvodimenzionalnim NMR eksperimentima, a potpuna asignacija jedinjenja **113b** prikazana je u Prilogu 2.



Reakcioni uslovi: i) 4-nitrofenilhlorformat, DMAP, piridin, CH_2Cl_2 , 0 °C - s. t. 24 h.

Shema 26. Dobijanje cikličnih urea sklareola **113a–b**.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Tačke topljenja određivane su na aparatu Boetius PMHK i nisu korigovane. Tačke topljenja čvrstih supstanci određivane su nakon hromatografskog prečišćavanja i udaljavanja rastvarača pod sniženim pritiskom bez dodatnog prečišćavanja, osim ukoliko nije naglašeno suprotno. IR spektri su snimani na Thermo-Scientific Nicolet 6700 FT-IR „Diamond crystal“ spektrofotometru. Položaji apsorpcionih traka izraženi su u cm^{-1} . ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimani su na Varian spektrometru (na 400 i 100 MHz) i Bruker Ultrashield AVANCE III spektrometru (na 500 i 125 MHz) u navedenom rastvaraču. Hemijska pomeranja izražena su u ppm, konstante kuplovanja (J) u Hz, a multiplicitet signala je označen kao s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), quint (kvintet), dd (dublet dubleta), dt (dublet tripleta), td (triplet dubleta), tt (triplet tripleta), ddt (dublet dubleta tripleta), b rs (prošireni singlet), i m (multiplet). Optička aktivnost je merena na automatskom polarimetru Rudolph Research Analytical Autopol IV sa natrijumovom lampom (589 nm) i ćelijom za merenje od 10 cm. Kao rastvarač za polarimetrijska određivanja korišćen je metanol.

HRMS-HESI spektri snimani su na LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) masenom spektrometru. Uzorci su rastvoreni u čistom acetonitrilu (HPLC čistoće) i direktno injektovani u instrument. Jonizacija je vršena u pozitivnom modu na zagrejanom sondi za elektrosprej jonizaciju. Korišćeni su sledeći HESI parametri: napon spreja + 4,7 kV, temperatura isparivača 60 °C, protok gasa za sušenje i pomoćnog gasa 24 i 10 a. u. (*arbitrary units*), respektivno, napon kapilare 49 V, temperatura kapilare 275 °C, napon sočiva na cevi 80 V, rezolucija (za m/z 400): 30,000. HRMS-HESI spektri snimani su i na Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Inc., Bremen, Germany) masenom spektrometru opremljenim zagrejanim izvorom HESI-II. Jonizacija je vršena u pozitivnom i negativnom modu na zagrejanom sondi za elektrosprej jonizaciju. Korišćeni su sledeći HESI parametri za snimanje u pozitivnom modu: napon spreja + 3,5 kV, temperatura kapilare 320 °C, protok gasa za sušenje i pomoćnog gasa 36 i 11 a. u. (*arbitrary units*), respektivno, napon kapilare 49 V, S-Lens RF nivo 50,00. Za snimanje u negativnom modu korišćeni su sledeći HESI parametri: napon spreja -3,6 kV, temperatura kapilare 320 °C, protok gasa za sušenje i pomoćnog gasa 5 i 0 a. u. respektivno, S-Lens RF nivo 50,00. Za snimanje masenih spektara niske rezolucije korišćen je tandemno-maseni spektrometar sa trostrukim kvadrupolom UPLC-QqQ-MS Waters Acquity UPLC H-Class i TQD. Jedinjenja su bila rastvorena u metanolu, tako da je konačna koncentracija jedinjenja iznosila ~ 1 mg/mL. Kao stacionarna faza korišćena je kolona ACQUITY UPLC BEH C18 50 mm x 2,1 mm x 1,7 μm , temperatura kolone je bila 40 °C, a mobilnu fazu činili su 0,2% HCOOH u vodi (A) i acetonitril. 0–1 min 5% B, 1–10 min 5% → 95% B, 10–11 min 95% B, 11–12 min 95% → 5% B, 12–13 min 5% B. Maseni spektrometar je opremljen trostrukim kvadrupolom, od kojih jedan predstavlja kolizionu ćeliju sa argonom kao kolizionim gasom. ESI jonizacija je vršena u pozitivnom i negativnom modu, a napon konusa je bio 35 V.

Za tankoslojnu hromatografiju korišćene su ploče SiO_2 i RP-18 (Merck). Za *dry-flash* hromatografiju korišćen je SiO_2 (0,018–0,032 mm) i RP-18 (0,018–0,040 mm). Biološki aktivnim jedinjenjima je određivana čistoća visokoefikasnom tečnom hromatografijom na HPLC sistemu Agilent 1200 opremljenog pumpom Quat Pump (G1311B), injektorom (G1329B) 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i detektorom 1260 DAD VL+ (G1315C) koristeći najmanje dve različite metode. Merenja su vršena na talasnim dužinama koje odgovaraju apsorpcionim maksimumima jedinjenja kako bi se ostvarila maksimalna selektivnost. Jedinjenja su bila rastvorena u metanolu HPLC čistoće, tako da je konačna koncentracija jedinjenja iznosila ~ 1 mg/mL. Korišćene su sledeće metode:

Metoda A. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 × 100 mm 1,8 μm , S. N. USUYD04738. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio 0,5 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda B. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax SB-C18 $4,6 \times 150$ mm 5μ , S. N. USCM074615. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,5% HCOOH u vodi (A) i 0,3% HCOOH u metanolu (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda C. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax SB-C18 $4,6 \times 150$ mm 5μ , S. N. USCM074615. Eluent čine sledeći rastvarači: 5% HCOOH u vodi (A) i 4% HCOOH u metanolu (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–2 min 95% A, 2–8 min 95% A → 5% A, 8–9 min 5% A, 9–12 min 5% A → 95% A, 12–15 min 95% A.

Metoda D. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax SB-C18 $4,6 \times 150$ mm 5μ , S. N. USCM074615. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda E. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax SB-C18 $4,6 \times 150$ mm 5μ , S. N. USCM074615. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–12 min 5% A → 95% A, 12–13 min 95% A.

Metoda F. Kao stacionarna faza je korišćena kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 $4,6 \times 100$ mm $2,7 \mu$, S. N. USKBM01053. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio 0,6 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–8 min 5% A, 8–11 min 5% A → 95% A, 11–13 min 95% A.

Metoda G. Kao stacionarna faza je korišćena kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 $4,6 \times 100$ mm $2,7 \mu$, S. N. USKBM01053. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,5% HCOOH u vodi (A) i 0,3% HCOOH u metanolu (B). Protok je bio 0,5 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–12 min 5% A, 12–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda H. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax SB-C18 $4,6 \times 150$ mm 5μ , S. N. USCM074615. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–12 min 5% A, 12–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda I. Kao stacionarna faza je korišćena kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 $4,6 \times 100$ mm $2,7 \mu$, S. N. USKBM01053. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 0,6 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–12 min 5% A, 12–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda J. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax Eclipse Plus C18 $4,6 \times 100$ mm $1,8 \mu$, S. N. USUYD04738. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–8 min 5% A, 8–11 min 5% A → 95% A, 11–13 min 95% A.

Metoda K. Kao stacionarna faza je korišćena kolona InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 $4,6 \times 100$ mm $2,7 \mu$, S. N. USKBM01053. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 0,6 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda L. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax SB-C18 $4,6 \times 150$ mm 5μ , S. N. USCM074615. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio

0,5 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda M. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax XDB–C18 4,6 × 150 mm 5 μ, S. N. USKH161360. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda N. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 × 100 mm 1,8 μ, S. N. USUYD04738. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 0,6 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda O. Kao stacionarna faza je korišćena kolona Zorbax XDB–C18 4,6 × 150 mm 5 μ, S. N. USKH161360. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Protok je bio 1,0 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Metoda P. Kao stacionarna faza je korišćena kolona InfinityLab Poroshell 120 CS–C18 4,6 × 100 mm 2,7 μ, S. N. USKBM01053. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Protok je bio 0,6 mL/min. Eluiranje sa kolone je rađeno sistemom gradijenata: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–11 min 5% A, 11–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Tokom izrade ove doktorske disertacije korišćeni su *N*-Boc zaštićeni diamini, koji su sintetisani iz komercijalno dostupnih diamina i (Boc)₂O postupcima poznatim u literaturi. Aldehidi **AdCHO** i **AdCH₂CHO** su sintetisani postupkom poznatim u literaturi polazeći iz odgovarajućih alkohola oksidacijom pomoću piridinium-hlorhromata (PCC). Jedinjenja su pravljena neposredno pre upotrebe usled smanjene stabilnosti molekula.

Opšta procedura A za Hekovu reakciju

U reakcioni balon, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su sklareol **54** (1,0 ekv.), odgovarajući bromaldehid (2,0 ekv.), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 ekv.), K₂CO₃ (3,0 ekv.) i suv MeCN (12,3 mL/mmol sklareol). Atmosfera u balonu je zamenjena argonom, a reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta, nakon čega je zagrevana u uljanom kupatilu na temperaturi ključanja rastvarača tokom 24 časa. Nakon završene reakcije rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu.

Opšta procedura B za reduktivno aminovanje

U reakcioni balon, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su jedinjenje **76** (1,0 ekv.), Ti(OiPr)₄ (4,0 ekv.) i suv MeOH (1 mL/mmol). Uz neprekidno mešanje u reakcionu smešu je dodat diamin (6,0 ekv.) i mešanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi tokom 16 časova. Zatim je dodat NaBH₄ (2,0 ekv.), a mešanje je nastavljeno tokom 2 časa. Nakon toga dodata je voda i reakciona smeša je proceđena kroz tanak sloj SiO₂. SiO₂ je potom dodatno ispran smešom MeOH/NH_{3(aq)} (v/v: 9/1). Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura C za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-ona

U reakcioni balon, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodati su 3-amino-1,2,3-triazol **83** (1,0 ekv.) i supstituisani etil-acetoacetat (1,1 ekv.) i AcOH (1 mL/mmol). Reakciona smeša je zagrevana do temperature ključanja rastvarača tokom 2-10 časova. Po završetku reakcije, smeša je

ohlađena do sobne temperature, talog je odvojen ceđenjem i ispiran hladnim 96% etanolom. Jedinjenja **84a-c** su sintetisana prema prethodno objavljenim procedurama.^{183,184}

Opšta procedura D za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidina

U reakcionom balonu, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodati su 2,5-disupstituisani [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4*H*)-on **84** (1,0 ekv.) i POCl₃ (19,5 ekv.), nakon čega je reakciona smeša zagrevana u uljanom kupatilu na temperaturi ključanja rastvarača tokom 2 časa. Nakon hlađenja do sobne temperature, sadržaj balona je izliven u smešu leda i vode. Mešavina je prenetu u levak za odvajanje, a proizvod je ekstrahovan CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). Spojeni organski ekstrakti su osušeni iznad anhidrovanog MgSO₄ i rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu (SiO₂). Jedinjenja **85a-c** su sintetisana prema prethodno objavljenim procedurama.^{183,184}

Opšta procedura E za nukleofilnu aromatičnu supstituciju

U reakcionom balonu, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su redom jedinjenje **82a** (1,0 ekv.), apsolutni EtOH (4 mL/mmol), Et₃N (1,5 ekv.), i 2,5-disupstituisani 7-hlor[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (**86**, 1,1 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 3 časa, uz praćenje toka reakcije tankoslojnom hromatografijom (TLC). Po završetku reakcije, rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura F za nukleofilnu aromatičnu supstituciju

U reakcionom balonu, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su redom diaminski derivat sklareola (**82b-c**, 1,0 ekv.), apsolutni EtOH (4 mL/mmol), Et₃N (1,5 ekv.), i 2,5-disupstituisani-7-hlor[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (**89**, 1,0 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 16 časova, uz praćenje toka reakcije tankoslojnom hromatografijom (TLC). Po završetku reakcije rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura G za reduktivno aminovanje

U reakcionom balonu, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su redom **81** (1,0 ekv.), suv MeOH (1 mL/mmol), **90** (1,1 ekv.) i Ti(O*i*Pr)₄ (4,0 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 16 sati, nakon čega je dodat NaBH₄ (2,0 ekv.) i mešanje je nastavljeno 2 časa. U reakcionu smešu je dodata voda i sadržaj iz balona je proceden kroz tanak sloj SiO₂, pri čemu je SiO₂ dodatno ispran dihlormetanom. Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom i sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura H za reduktivno aminovanje¹⁸⁵

U reakcionom balonu su dodati karbonilno jedinjenje sa adamantanskim motivom (1,0 ekv.), *N*-Boc zaštićeni diamin (1,2 ekv.) i CH₂Cl₂ (15 mL/mmol). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 2 časa, nakon čega je dodat NaBH(OAc)₃ (4,0 ekv.). Mešanje je nastavljeno tokom 24 časova, nakon čega je dodat 1M vodeni rastvor NaOH. Reakciona smeša je prebačena u levak za odvajanje, organski sloj je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahovan CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). Spojeni organski slojevi su osušeni iznad anhidrovanog Na₂SO₄, nakon čega je rastvarač uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura I za reduktivno aminovanje¹⁸⁵

U reakcionom balonu napravljen je rastvor 2-(1-adamantil)etanala (1,0 ekv.) u smeši CH₂Cl₂/MeOH (v/v: 2/1, 15 mL/mmol), nakon čega su dodati *N*-Boc zaštićeni diamin (2,0 ekv.) i glacijalna sirćetna kiselina (2,0 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 3 časa, a zatim je dodat NaBH(OAc)₃ (3,0 ekv.). Mešanje je nastavljeno tokom 24 časa na sobnoj temperaturi. Reakcija je prekinuta dodatkom 1M vodenog rastvora NaOH. Smeša je prebačena u levak za odvajanje, organski sloj je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahovan CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). Spojeni organski slojevi su osušeni iznad anhidrovanog Na₂SO₄, nakon čega je rastvarač uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura J za uklanjanje Boc-zaštitne grupe

U reakcionom balonu dodati su redom jedinjenje **99** (1,0 ekv.), CH₂Cl₂ (10 mL/mmol) i TFA (20 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 3 časa, nakon čega je reakcija prekinuta dodatkom 1M vodenog rastvora NaOH do pH ~ 10. Organski sloj je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahovan CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). Spojeni organski slojevi su osušeni iznad anhidrovanog Na₂SO₄, nakon čega je rastvarač uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura K za reduktivno aminovanje

U reakcionom balonu, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su redom jedinjenje **75** (1,0 ekv.), suvi MeOH (5 mL/mmol) i jedinjenje **99** (3,0 ekv.). Atmosfera u reakcionom balonu je izmenjena argonom, nakon čega je dodat Ti(OiPr)₄ (4,0 ekv.). Reakciona smeša je mešana tokom 16 časova, nakon čega je dodat NaBH₄ (2,0 ekv.) i mešanje je nastavljeno 2 časa. U reakcionu smešu je dodata voda, a sadržaj iz balona je proceden kroz tanak sloj SiO₂, koji je dodatno ispran MeOH/NH_{3(aq)} (v/v: 9/1). Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom, a dobijeni sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura L za sintezu *N*-Boc-zaštićenih urea

U reakcionom balonu dodati su trifozgen (0,4 ekv.) i suvi CH₂Cl₂ (5 mL/mmol). Reakcionom balonu je ohlađen u ledenom kupatilu, nakon čega je tokom 1 sata ukapavan rastvor odgovarajućeg anilina (1,0 ekv.) i DIPEA (2,2 ekv.) u CH₂Cl₂ (5 mL/mmol). Reakciona smeša je zatim zagrejana do sobne temperature i mešanje je nastavljeno tokom 1 časa. U dobijeni rastvor izocijanata je dodat rastvor *N*-Boc zaštićeni alkil-diamin (1,1 ekv.), a mešanje je nastavljeno tokom 3 časa. Nakon završetka reakcije, smeša je prebačena u levak za ekstrakciju i isprana vodom. Organski sloj je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu SiO₂.

Opšta procedura M za sintezu karbamida sklareola

U reakcionom balonu dodati su jedinjenje **110** (1,0 ekv.) i 1M rastvor HCl/MeOH (10 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 1 časa nakon čega su rastvarači uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dobijena sirova hidrohloridna so je korišćena dalje bez prečišćenja.

U novi reakcionom balonu su dodati dobijena hidrohloridna so (2,0 ekv.), MeOH (5 mL/mmol) i K₂CO₃ (3,0 ekv.). Nakon mešana tokom 1 časa, dodati su jedinjenja **81** (1,0 ekv.) i Ti(OiPr)₄ (4,0 ekv.). Reakciona smeša je mešana tokom 16 časova na sobnoj temperaturi, a zatim je dodat NaBH₄ (2,0 ekv.). Nakon 2 časa reakcija je prekinuta dodatkom vode, sadržaj iz balona je proceden kroz SiO₂ i dodatno isprano je metanolom. Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom, nakon čega je čvrsti ostatak raspoređen između CH₂Cl₂ i H₂O. Organski sloj je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahovan CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). Organski ekstrakti su spojeni, osušeni iznad anhidrovanog Na₂SO₄.

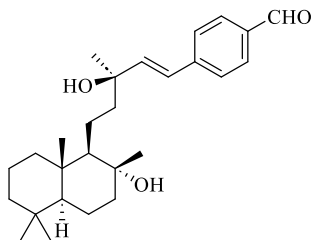
i rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen hromatografijom na stubu SiO₂ (*dry-flash* i gravitaciona hromatografija).

Opšta procedura N za sintezu cikličnih karbamida sklareola

U plamenom osušen reakcioni balon, sa aktiviranim molekulskim sitima (4 Å), dodati su DMAP (1,0 ekv.), piridin (1,0 ekv.), diaminski derivat sklareola (**76**, 1,0 ekv.) i suvi CH₂Cl₂ (10 mL/mmol). Reakciona smeša je ohlađena u ledenom kupatilu, nakon čega tokom 2 časa ukapavan rastvor 4-nitrofenilhlorformijata (1,0 ekv.) u CH₂Cl₂ (1 mL/mmol). Po završetku ukapavanja reakciona smeša je zagrejana do sobne temperature i mešana tokom 24 časa. Po završetku reakcije, reakciona smeša je raspoređena između slojeva EtOAc i vode. Organski sloj je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahovan EtOAc (3 × 10 mL). Spojeni organski ekstrakti su osušeni iznad anhidrovanog Na₂SO₄ i rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen hromatografijom na stubu SiO₂.

Sinteza jedinjenja 81 oksidativnom Hekovom reakcijom

4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzaldehyd



U reakcioni balon osušen plamenom, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodati su sklareol **54** (150 mg, 0,486 mmol, 1,0 ekv.), 4-formilfenilboronska kiselina (109 mg, 0,729 mmol, 1,5 ekv.), Cu(OAc)₂ (177 mg, 0,972 mmol, 2,0 ekv.), NaOAc (120 mg, 1,458 mmol, 3,0 ekv.) i Pd(OAc)₂ (11 mg, 0,049 mmol, 10 mol%) i suv DMF (7,5 mL). Atmosfera u balonu je zamenjena argonom i reakciona smeša je zagrevana u uljanom kupatilu na 80 °C tokom 2 časa. Po završetku reakcije, reakciona smeša je procedena kroz celit i filtrat je raspoređen između vode i etil-acetata. Organski sloj je odvojen, a vodeni sloj je ekstrahovan etil-acetatom (3 × 50 mL). Spojeni organski ekstrakti su osušeni iznad anhidrovanog MgSO₄, rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom i sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu (SiO₂: Hex/EtOAc = 7/3). Dobijeno je 169 mg (84%) proizvoda **81** u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3379, 2927, 2868, 2735, 1698, 1601, 1568, 1461, 1388, 1306, 1266, 1214, 1167, 1133, 1099, 1085, 1065, 1039, 997, 972, 938, 908, 863, 812, 786, 737, 702, 661 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9,97 (s, 1H, –CHO), 7,81 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,50 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,69 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,46 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH–), 2,45 (brs, 2H, 2 × –OH), 1,84 (d, J = 12,1 Hz, 1H), 1,80–1,72 (m, 2H), 1,68–1,53 (m, 4H), 1,47–1,39 (m, 3H), 1,38 (s, 3H, Me), 1,37–1,33 (m, 1H), 1,29–1,25 (m, 1H), 1,24–1,21 (m, 1H), 1,17 (s, 3H, Me), 1,15–1,07 (m, 1H), 1,02–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,78 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 191,9; 143,7; 142,0; 135,3; 130,3; 127,0; 125,7; 75,2; 73,7; 61,4; 56,2; 45,1; 44,6; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 27,6; 24,5; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,4 ppm.

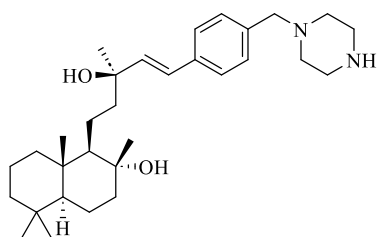
HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ izračunato za C₂₇H₄₁O₃Na⁺ 435,28697; detektovano 435,28704.

[α]_D²⁰ = +36,2 ° (c 0,21, MeOH)

4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzaldehyd (81**)**

Primenom opšte procedure **A** za Hekovu reakciju, polazeći od sklareola **54** (100 mg, 0,324 mmol) i 4-brombenzaldehyda (120 mg, 0,648 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **81** (115 mg, 85%) u obliku žutog ulja. Spektroskopski podaci se slažu sa prethodno dobijenim prilikom sinteze oksidativnom Hekovom reakcijom.

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(piperazin-1-ilmetil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (82a**)**



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (102 mg, 0,25 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **82a** (119 mg, 97%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 85 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3373, 2931, 2868, 1668, 1511, 1459, 1388, 1366, 1345, 1135, 1005, 971, 939, 864 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7,32 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,22 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 6,47 (dd, *J*₁ = 16,0 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H, =CH-), 6,27 (dd, *J*₁ = 16,1 Hz, *J*₂ = 1,6 Hz, 1H, =CH-), 3,40 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,74 (t, *J* = 4,8 Hz, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 2,32 (s, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 1,78–1,73 (m, 1H), 1,67 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 1,61 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 1,56–1,47 (m, 3H), 1,47–1,39 (m, 1H), 1,38–1,28 (m, 3H), 1,22 (s, 1H), 1,21 (s, 3H, **Me**), 1,16 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 1,15–1,03 (m, 1H), 0,98 (s, 1H), 0,96 (s, 3H, **Me**), 0,92–0,82 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, **Me**), 0,74 (s, 3H, **Me**), 0,71 (s, 3H, **Me**) ppm.

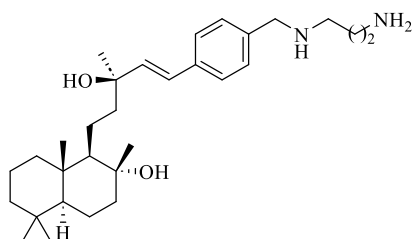
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 160,7; 159,0; 138,3; 136,1; 129,2; 125,9; 125,2; 72,3; 72,0; 61,1; 55,8; 48,6; 46,1; 44,9; 44,2; 33,3; 32,9; 28,2; 23,9; 21,4; 20,1; 19,3; 18,0; 15,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M + H]⁺ izračunato za C₃₁H₅₁N₂O₂⁺ 483,39451; detektovano 483,39451.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda E: *t_R* = 8,056 min, površina 99,04%; metoda F: *t_R* = 8,692 min, površina 98,73%.

[α]²⁰_D = + 15,8 ° (c 0,12, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((3-aminopropil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (82b**)**



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (50 mg, 0,121 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **82b** (55 mg, 96%) u obliku bezbojne pene.

T. T. = 74 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3352, 2932, 2867, 1664, 1511, 1463, 1388, 1132, 970, 938, 909 cm⁻¹.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,31 (d, J = 7,9 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,23 (d, J = 7,7 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,57 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 3,75 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$), 2,77 (t, J = 6,8 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 2,68 (t, J = 6,9 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 2,31 (b rs, 5H, $2 \times -\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$), 1,82 (dt, J_1 = 12,1 Hz, J_2 = 3,1 Hz, 1H), 1,78–1,70 (m, 2H), 1,68–1,50 (m, 5H), 1,46–1,36 (m, 4H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,33–1,31 (m, 1H), 1,26–1,17 (m, 2H), 1,14 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,07 (m, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm.

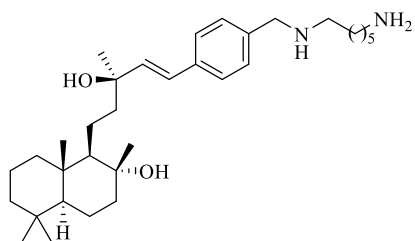
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,2; 137,9; 136,2; 128,5; 126,6; 126,6; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,8; 47,4; 45,4; 44,5; 42,1; 40,6; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 33,1; 27,6; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 471,39451; detektovano 471,39349.

HPLC čistoća (λ = 254 nm).metoda A: t_R = 8,665 min, površina 98,27%; metoda D: t_R = 7,421 min, površina 98,79%.

$[\alpha]^{20}_D$ = + 23,0 ° (c 0,10, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R*,*E*)-5-(4-(((6-aminoheksil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (82c)



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (280 mg, 0,679 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/(MeOH/ $\text{NH}_3(aq)$ 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **82c** (334 mg, 96%) u obliku bezbojnog ulja.

IC (ATR): ν = 3363, 2930, 2864, 1511, 1462, 1388, 1132, 970, 938 cm^{-1} .

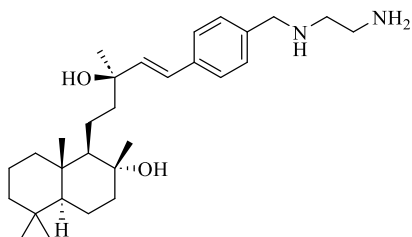
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,32 (d, J = 7,6 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH–), 3,75 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$), 2,66 (t, J = 7,0 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 2,60 (t, J = 7,2 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 1,99 (b rs, 5H, $2 \times -\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$), 1,82 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,1 Hz, 1H), 1,79–1,70 (m, 2H), 1,66–1,59 (m, 3H), 1,56 (t, J = 3,1 Hz, 1H), 1,53–1,47 (m, 2H), 1,46–1,37 (m, 5H), 1,36 (s, 3H, **Me**), 1,34–1,29 (m, 5H), 1,26 (s, 1H), 1,23–1,18 (m, 1H), 1,14 (s, 3H, **Me**), 1,15–1,06 (m, 1H), 1,01–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,5; 137,7; 136,2; 128,5; 126,5; 126,4; 74,9; 73,6; 61,5; 56,2; 53,8; 49,3; 45,4; 44,5; 42,2; 42,1; 39,9; 39,4; 33,7; 33,5; 33,4; 30,1; 27,8; 27,3; 26,9; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 513,4415; detektovano 513,4407.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda A: t_R = 8,676 min, površina 99,09%; metoda D: t_R = 7,377 min, površina 99,46%.

$[\alpha]^{20}_D$ = + 20,0 ° (c 0,10, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-(((2-aminoetil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (82d)

Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (192 mg, 0,465 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 7/3), dobijen je proizvod **82d** (188 mg, 89%) u obliku bezbojnog ulja koje stajanjem očvršćava.

T. T. = 49–50 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3361, 2933, 2668, 2385, 2314, 1590, 1512, 1462, 1416, 1388, 1366, 1341, 1266, 1173, 1132, 1085, 1040, 996, 972, 939, 909, 864, 804, 737, 703 cm⁻¹.

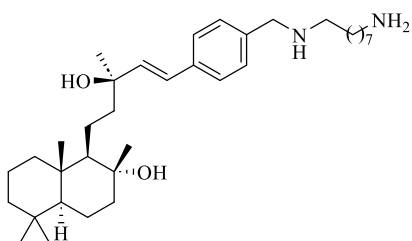
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,33 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,58 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 3,76 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,80 (t, J = 5,8 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,68 (t, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,28 (br s, 5H, 2 × –OH, –NH, –NH₂), 1,88–1,79 (m, 1H), 1,78–1,70 (m, 2H), 1,66–1,52 (m, 4H), 1,46–1,37 (m, 4H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,27–1,22 (m, 1H), 1,19 (t, J = 3,8 Hz, 1H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 0,99–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 139,4; 137,9; 136,2; 128,5; 126,5; 126,3; 74,9; 73,5; 61,6; 56,2; 53,6; 51,7; 45,4; 44,5; 42,1; 41,6; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 27,6; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₂₉H₄₉N₂O₂⁺ 457,37886; detektovano 457,37807.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda M: t_R = 7,125 min, površina 98,95%; metoda O: t_R = 5,210 min, površina 98,44%.

[α]²⁰_D = +21,6 ° (c 0,55, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-(((8-amino-oktil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (82e)

Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (100 mg, 0,242 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 7/3), dobijen je proizvod **82e** (108 mg, 82%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 68–70 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3358, 2929, 2856, 1675, 1568, 1511, 1463, 1387, 1310, 1202, 1134, 1085. 1035. 971, 939, 909, 863, 802, 722 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,33 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, J = 8,2 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,59 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,28 (dd, J_1 = 16,1 Hz, J_2 = 1,3 Hz, 1H, =CH–), 3,76 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,66 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,60 (t, J = 7,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,91 (b rs, 5H, 2 × –OH, –NH, –NH₂), 1,83 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 1,78–1,70 (m, 2H), 1,66–1,54 (m, 4H), 1,52–1,46 (m, 2H), 1,45–1,37 (m, 5H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,34–1,32 (m, 1H), 1,31–1,25 (m, 6H), 1,23–1,18 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13–1,08 (m, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

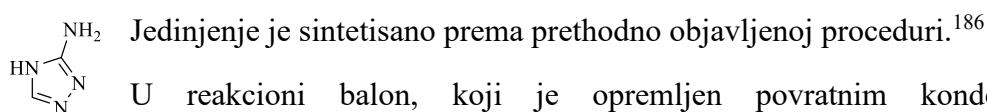
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,6; 137,7; 136,1; 128,5; 126,5; 126,4; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,9; 49,4; 45,4; 44,5; 42,3; 42,1; 39,9; 39,4; 33,8; 33,5; 33,4; 30,1; 29,6; 29,5; 27,7; 27,3; 27,0; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ izračunato za $\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{O}_2\text{N}_2^+$ 541,47276; detektovano 541,47205.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 5,974 min, površina 97,47%; metoda L: t_R = 9,930 min, površina 95,83%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +18,4 ° (c 0,49, MeOH)

1*H*-1,2,4-triazol-3-amin (83a)



Jedinjenje je sintetisano prema prethodno objavljenoj proceduri.¹⁸⁶

U reakcionu balon, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodat je aminoguanidinijum-bikarbonat (950 mg, 6,98 mmol, 1,0 ekv.) nakon čega je HCOOH (0,28 mL, 7,40 mmol, 1,06 ekv.) dodavana u porcijama tokom 30 minuta. Reakciona smeša je zatim zagrevana na 80 °C dok nije postala potpuno homogena. Dobijeni rastvor aminoguanidinijum-formijata je zatim zagrevan na 120 °C tokom 5 časova. Nakon hlađenja do sobne temperature dodato je 3,5 mL 95% etanola. Smeša je zatim zagrejana do ključanja i procedena na toplo. Rastvarači su uklonjeni pod sniženim pritiskom i proizvod je sušen pod istim uslovima. Dobijeno je 563 mg jedinjenja **83a** (96%) u obliku bezbojne kristalne supstance. Proizvod je prečišćen ponovnom kristalizacijom iz apsolutnog EtOH.

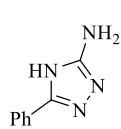
T. T. = 153–154 °C (EtOH)

IC (ATR): ν = 3419, 3321, 3229, 3092, 2954, 2868, 2780, 2727, 1808, 1690, 1640, 1555, 1488, 1363, 1265, 1118, 1062, 1013, 974, 907, 755, 606, 442 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7,44 (s, 1H, =CH–), 5,75 (s, 2H, –NH₂) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 162,5; 147,8 ppm.

3-fenil-1*H*-1,2,4-triazol-5-amin (83b)



Jedinjenje je sintetisano prema prethodno objavljenoj proceduri.¹⁸⁷

U balon su dodati aminoguanidinijum-bikarbonat (3,00 g, 22,04 mmol, 2,0 ekv.), tetrabutylamonijum-bromid (355 mg, 1,10 mmol, 0,1 ekv.) i 1,4-dioksan (55 mL). Suspenzija je ohlađena u ledenom kupatilu na 0 °C, nakon čega je benzoil-hlorid (1,28 mL, 11,02 mmol, 1,0 ekv.) ukapavan tokom 30 minuta. Reakciona smeša je potom zagrejana do sobne temperature, a mešanje je nastavljeno tokom 12 časova. Rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak je rastvoren u 30 mL vode, a pH vrednost rastvora je podešena na 12 ukapavanjem 1M rastvora NaOH. Nastali talog je odvojen ceđenjem, nakon čega je suspendovan u 30 mL vode i suspenzija je zagrevana do temperature ključanja tokom 12 časova. Nakon hlađenja do sobne temperature, proizvod je odvojen ceđenjem i osušen. Dobijeno je 1,35 g (76%) jedinjenja **83b** u obliku žute čvrste supstance.

T. T. = 184 °C (amorfni prah)

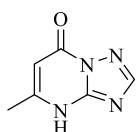
IC (ATR): $\nu = 3367, 3127, 2995, 2934, 2856, 2810, 1665, 1599, 1580, 1535, 1495, 1464, 1444, 1430, 1400, 1344, 1288, 1174, 1159, 1132, 1109, 1083, 1049, 1026, 1000, 985, 910, 822, 768, 747, 722, 695, 682, 664, 518, 494, 481, 440 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): $\delta = 7,89$ (d, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ph-H}$), $7,40$ (t, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ph-H}$), $7,34$ (t, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), $5,98$ (s, 2H, -NH₂) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): $\delta = 158,2; 157,7; 131,8; 128,4; 125,3 \text{ ppm}$.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_5^+$ 248,18697; detektovano 248,18661.

5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4*H*)-on (84a)



Primenom opšte procedure **C** za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4*H*)-ona, polazeći od jedinjenja **83a** (200 mg, 2,379 mmol) i etil-acetoacetata (334 μL , 2,616 mmol) dobijen je proizvod **84a** (286 mg, 80%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

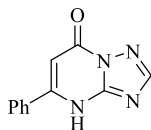
T. T. = 285 °C (EtOH)

IC (ATR): $\nu = 3259, 3110, 2889, 2806, 1834, 1687, 1615, 1568, 1479, 1410, 1384, 1334, 1298, 1312, 1298, 1253, 1208, 1190, 1155, 1141, 1055, 1017, 957, 921, 846, 822, 750, 662, 648, 594, 520, 478 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): $\delta = 8,17$ (s, 1H, HetAr-H₂), $5,82$ (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 1H, HetAr-H₆), $2,31$ (d, $J = 0,8 \text{ Hz}$, 3H, Me-HetAr) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): $\delta = 155,8; 151,8; 151,6; 150,6; 98,2; 18,6 \text{ ppm}$.

5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4*H*)-on (84b)



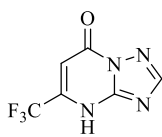
Primenom opšte procedure **C** za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4*H*)-ona, polazeći od jedinjenja **83a** (105 mg, 1,249 mmol) i etil-benzoilacetata (238 μL , 1,374 mmol) dobijen je proizvod **84b** (140 mg, 53%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 294 °C (EtOH)

IC (ATR): $\nu = 3286, 3258, 3107, 3032, 2955, 2835, 2790, 2569, 1885, 1686, 1624, 1558, 1510, 1488, 1455, 1407, 1367, 1295, 1269, 1245, 1229, 1199, 1156, 1126, 1061, 1026, 980, 945, 911, 875, 829, 791, 775, 756, 718, 699, 676, 628, 598, 536 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): $\delta = 8,34$ (s, 1H, HetAr-H₂), $7,91$ (dd, $J_1 = 7,5 \text{ Hz}$, $J_2 = 2,4 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ph-H}$), $7,56-7,49$ (m, 3H, $3 \times \text{Ph-H}$), $6,33$ (s, 1H, HetAr-H₆) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): $\delta = 156,6; 154,4; 152,0; 150,2; 134,0; 130,8; 128,9; 127,5; 96,8 \text{ ppm}$.

5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-on (84c)


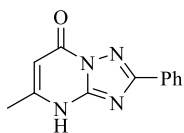
Primenom opšte procedure **C** za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-ona, polazeći od jedinjenja **83a** (150 mg, 1,784 mmol) i etil-trifluoroacetoacetata (354 μ L, 1,962 mmol) dobijen je proizvod **84c** (211 mg, 58%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 264 °C (EtOH)

IC (ATR): ν = 3366, 2910, 2695, 1698, 1661, 1563, 1541, 1454, 1345, 1275, 1235, 1169, 1130, 1101, 1058, 978, 942, 908, 872, 827, 770, 733, 718, 685, 640, 628, 604, 531, 435 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ = 8,38 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,94 (s, 1H, =NH-), 6,12 (s, 1H, HetAr-**H**₆) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ = 157,0; 153,8; 150,0 (q, $^2J_{\text{C-F}}$ = 33,1 Hz); 149,2; 142,9; 121,8 (q, $^1J_{\text{C-F}}$ = 275,1 Hz); 94,8 (q, $^3J_{\text{C-F}}$, J = 2,5 Hz) ppm.

5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-on (84d)


Primenom opšte procedure **C** za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-ona, polazeći od jedinjenja **83b** (150 mg, 0,936 mmol) i etil-acetoacetata (131 μ L, 1,030 mmol) dobijen je proizvod **84d** (185 mg, 87%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

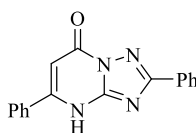
T. T. = 317 °C (EtOH)

IC (ATR): ν = 3071, 2924, 2781, 1684, 1620, 1576, 1531, 1444, 1424, 1370, 1339, 1307, 1175, 1119, 1072, 1028, 966, 925, 857, 789, 749, 721, 710, 694, 678, 547, 494 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ = 8,11 (dd, J_1 = 7,6 Hz, J_2 = 2,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ph-**H**), 7,57–7,48 (m, 3H, 3 $\times$ Ph-**H**), 5,84 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 2,33 (s, 3H, **Me**-HetAr) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO-*d*6): δ = 160,7; 155,7; 151,4; 151,3; 130,2; 130,1; 128,8; 126,5; 98,4; 18,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}^+$ 227,09274; detektovano 227,09264.

2,5-difenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-on (84e)


Primenom opšte procedure **C** za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-ona, polazeći od jedinjenja **83b** (150 mg, 0,936 mmol) i etil-benzoilacetata (178 μ L, 1,030 mmol) dobijen je proizvod **84e** (220 mg, 81%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 240 °C (EtOH)

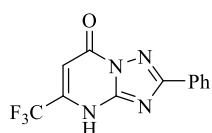
IR (ATR): ν = 3322, 3060, 1982, 1702, 1680, 1620, 1580, 1444, 1412, 1370, 1325, 1308, 1279, 1248, 1177, 1154, 1118, 1091, 1073, 1015, 983, 920, 892, 849, 835, 784, 730, 691, 634, 604, 589, 530, 504, 491, 459, 412 cm^{-1} .

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,17 (dd, *J*₁ = 7,8 Hz, *J*₂ = 1,7 Hz, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,98–7,93 (m, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,56–7,49 (m, 6H, 6 × Ph-**H**), 6,29 (s, 1H, HetAr-**H**₆) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 160,4; 156,7; 134,5; 130,6; 130,4; 130,0; 128,7; 128,7; 128,6; 127,2; 126,5; 125,5; 95,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M + H]⁺ izračunato za C₁₇H₁₃N₄O⁺ 289,10839; detektovano 289,10817.

2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7 (4H)-on (84f)



Primenom opšte procedure **C** za sintezu 2,5-disupstituisanih [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7(4H)-ona, polazeći od jedinjenja **83b** (250 mg, 1,561 mmol) i etil-trifluoracetoacetata (251 μL, 1,717 mmol) dobijen je proizvod **84d** (284 mg, 65%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 234 °C (EtOH)

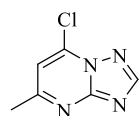
IC (ATR): ν = 3389, 3308, 3070, 2965, 2876, 1903, 1699, 1666, 1602, 1582, 1560, 1547, 1523, 1461, 1445, 1410, 1381, 1331, 1280, 1193, 1156, 1137, 1094, 1073, 1027, 1012, 980, 962, 944, 924, 891, 948, 817, 789, 766, 730, 693, 6334, 604, 498, 459 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8,17 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,52–7,40 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 5,99 (s, 1H, HetAr-**H**₆) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 161,5; 158,8; 157,9; 149,9 (q, ²*J*_{C-F} = 32,8 Hz); 131,9; 129,5; 128,6; 126,6; 120,6 (q, ¹*J*_{C-F} = 275,2 Hz); 92,4 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M + H]⁺ izračunato za C₁₂H₈F₃N₄O⁺ 281,06447; detektovano 281,06444.

7-hlor-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (85a)



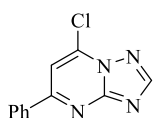
Primenom opšte procedure **D** za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidina, polazeći od jedinjenja **84a** (250 mg, 1,665 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 6/4), dobijen je proizvod **85a** (214 mg, 76%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 150 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3116, 3070, 1800, 1749, 1708, 1676, 1624, 1609, 1562, 1521, 1443, 1381, 1368, 1308, 1286, 1250, 1192, 1054, 990, 905, 875, 772, 653, 631, 497 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,49 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,10 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 2,72 (s, 3H, Me-HetAr) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 165,4; 156,2; 155,9; 139,1; 111,4; 25,2 ppm.

7-hlor-5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (85b)

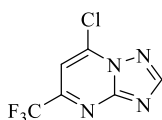
Primenom opšte procedure **D** za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidina, polazeći od jedinjenja **84b** (174 mg, 0,820 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 8/2), dobijen je proizvod **85b** (116 mg, 61%) obliku u žute čvrste supstance.

T. T. = 148 °C (amorfni prah)

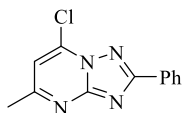
IC (ATR): ν = 3116, 3046, 2925, 1615, 1526, 1491, 1452, 1433, 1377, 1334, 1314, 1292, 1280, 1256, 1224, 1186, 1168, 1088, 1070, 1028, 1001, 934, 918, 858, 842, 789, 764, 701, 684, 653, 632, 570, 485 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,57 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 8,21–8,17 (m, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,69 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 7,59–7,53 (m, 3H, 3 × Ph-**H**) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 162,0; 156,8; 156,2; 139,8; 135,5; 132,1; 129,4; 128,1; 108,0 ppm.

7-hlor-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (85c)

Primenom opšte procedure **D** za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidina, polazeći od jedinjenja **84c** (50 mg, 0,245 mmol), nakon ekstrakcije, dobijen je sirovi proizvod **85c** (41 mg, 75%) koji je korišćen dalje bez prečišćavanja.

7-hlor-5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (85d)

Primenom opšte procedure **D** za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidina, polazeći od jedinjenja **84d** (20 mg, 0,088 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 8/2), dobijen je proizvod **85d** (21 mg, 97%) obliku u žute čvrste supstance.

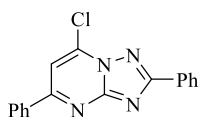
T. T. = 217 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3120, 3062, 3007, 1686, 1608, 1582, 1521, 1496, 1461, 1442, 1398, 1350, 1324, 1298, 1284, 1258, 1202, 1163, 1133, 1056, 1027, 988, 956, 928, 906, 864, 838, 789, 764, 750, 714, 703, 691, 655, 628, 615, 546, 518, 496, 435, 408 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,39–8,31 (m, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,52–7,46 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 7,02 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 2,68 (s, 3H, **Me**-HetAr) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 166,2; 164,8; 156,6; 138,5; 131,0; 130,2; 128,8; 127,8; 110,9; 25,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₂H₁₀ClN₄⁺ 245,05885; detektovano 245,05905.

7-hlor-2,5-difenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin (85e)


Primenom opšte procedure **D** za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina, polazeći od jedinjenja **84e** (210 mg, 0,728 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 9/1), dobijen je proizvod **85e** (201 mg, 90%) obliku u žute čvrste supstance.

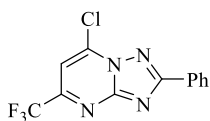
T. T. = 213 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3056, 2957, 2920, 2851, 1732, 1606, 1579, 1524, 1487, 1448, 1435, 1392, 1352, 1286, 1262, 1226, 1179, 1070, 1031, 1011, 973, 929, 867, 824, 806, 792, 775, 718, 706, 691, 632, 604, 573, 472 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,45–8,40 (m, 2H, 2 × Ph–H), 8,26–8,20 (m, 2H, 2 × Ph–H), 7,63 (s, 1H, HetAr–H₆), 7,58–7,54 (m, 3H, 3 × Ph–H), 7,54–7,50 (m, 3H, 3 × Ph–H) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 166,9; 161,3; 157,0; 139,3; 135,6; 131,9; 131,1; 130,2; 129,3; 128,9; 129,0; 127,9; 107,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₇H₁₂ClN₄⁺ 307,0745; detektovano 307,07463.

7-hlor-2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin (85f)


Primenom opšte procedure **D** za sintezu 2,5-disupstituisanih-7-hlor-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina, polazeći od jedinjenja **84f** (250 mg, 0,892 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 8/2), dobijen je proizvod **85f** (216 mg, 81%) obliku u bezbojne čvrste supstance.

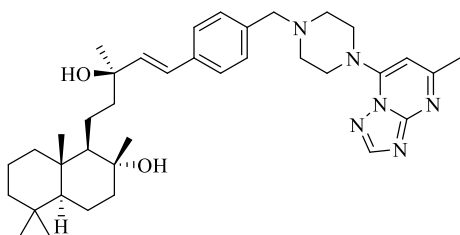
T. T. = 150 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3134, 3101, 3075, 1604, 1539, 1522, 1447, 1394, 1372, 1331, 1305, 1283, 1248, 1179, 1160, 1140, 1098, 1031, 951, 933, 880, 836, 819, 793, 768, 722, 694, 656, 616, 501, 453, 410 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,43–8,39 (m, 2H, 2 × Ph–H), 7,56–7,53 (m, 3H, 3 × Ph–H), 7,51 (s, 1H, HetAr–H₆) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168,6; 155,7; 151,3 (q, ²J_{C-F} = 37,9 Hz); 141,3; 131,9; 129,3; 129,1; 128,2; 120,0 (q, ¹J_{C-F} = 276,1 Hz); 106,7 (q, ³J_{C-F} = 2,4 Hz) ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₂H₆F₃ClN₄⁺ 299,03059; detektovano 299,03059.

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-((4-(5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)piperazin-1-il)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86a)


Primenom opšte procedure **E** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82a** (12 mg, 0,025 mmol) i **85a** (4,6 mg, 0,027 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **86a** (14 mg, 92%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 105 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3420, 2925, 2865, 1601, 1548, 1360, 1256, 1203, 1131, 1000, 828 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) $\delta = 8,29$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,38 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, $2 \times$ Ar-**H**), 7,29 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, $2 \times$ Ar-**H**), 6,59 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 6,43 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 6,34 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 3,90 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 3,58 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,68 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 2,52 (s, 3H, **Me**-HetAr), 1,86 (td, $J_1 = 12,9$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, 1H), 1,80 (dt, $J_1 = 12,4$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H), 1,72–1,65 (m, 2H), 1,64–1,62 (m, 1H), 1,61–1,57 (m, 1H), 1,56–1,50 (m, 1H), 1,45 (td, $J_1 = 13,5$ Hz, $J_2 = 3,8$ Hz, 1H), 1,42–1,36 (m, 2H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,33–1,29 (m, 1H), 1,28–1,25 (m, 1H), 1,17–1,10 (m, 2H), 1,10 (s, 3H, **Me**), 0,99–0,89 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,78 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 3H, **Me**) ppm.

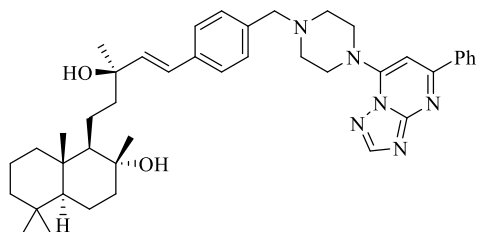
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CD_3OD) $\delta = 166,6; 158,0; 154,2; 151,5; 138,6; 138,3; 137,0; 130,8; 127,6; 127,4; 95,9; 75,1; 74,3; 63,3; 62,7; 57,5; 53,3; 49,9; 47,1; 45,1; 43,2; 41,1; 40,5; 34,1; 33,9; 27,9; 24,7; 24,0; 22,0; 21,5; 20,8; 19,5; 16,1$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}^+$ 637,42005; detektovano 637,41880.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda E: $t_R = 6,385$ min, površina 98,49%; metoda F: $t_R = 6,345$ min, površina 97,36%

$[\alpha]^{20}_D = + 8,0$ (c 0,10, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-((4-(5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)piperazin-1-il)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86b)



Primenom opšte procedure E za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82a** (43 mg, 0,089 mmol) i **85Fb** (23 mg, 0,098 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **86b** (40 mg, 66%) u obliku žućkaste, čvrste supstance.

T. T. = 126 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3407, 2931, 2866, 1605, 1551, 1509, 1452, 1418, 1388, 1338, 1306, 1256, 1236, 1206, 1131, 1040, 1027, 1000, 972, 933, 765, 694 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 8,36$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 8,12 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,9$ Hz, 2H, $2 \times$ Ph-**H**), 7,50–7,45 (m, 3H, $3 \times$ Ph-**H**), 7,39 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, $2 \times$ Ar-**H**), 7,30 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, $2 \times$ Ar-**H**), 6,91 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 6,59 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, =CH-), 6,33 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 3,97 (t, $J = 5,4$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 3,58 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,69 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 1,91–1,76 (m, 2H), 1,73–1,68 (m, 1H), 1,67–1,60 (m, 2H), 1,58–1,46 (m, 2H), 1,45–1,39 (m, 1H), 1,39–1,36 (m, 2H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,34–1,31 (m, 1H), 1,30–1,25 (m, 1H), 1,20–1,11 (m, 2H), 1,10 (s, 3H, **Me**), 1,02–0,90 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,79 (s, 3H, **Me**), 0,78 (s, 3H, **Me**) ppm.

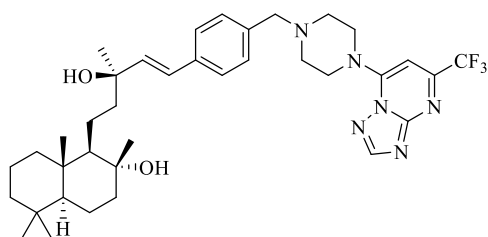
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) $\delta = 163,6; 158,5; 154,7; 152,2; 138,56; 138,5; 138,2; 137,2; 131,9; 130,8; 129,8; 128,8; 127,7; 127,4; 93,0; 75,2; 74,4; 63,4; 62,7; 57,5; 53,4; 49,2; 47,1; 45,2; 43,2; 41,2; 40,5; 34,2; 33,9; 27,9; 24,0; 22,0; 21,5; 20,8; 19,5; 16,1$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}^+$ 699,43570; detektovano 699,43413.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda E: $t_R = 7,144$ min, površina 98,80 %; metoda F: $t_R = 6,618$ min, površina 96,59%

$[\alpha]^{20}_D = +20,5$ (c 0,13, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R*,*E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-((4-(5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)piperazin-1-il)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86c)



Primenom opšte procedure E za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82a** (37 mg, 0,077 mmol) i **85c** (19 mg, 0,084 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (RP-SiO₂: H₂O/MeOH = 6/94), dobijen je proizvod **86c** (45 mg, 88%) u obliku crvenkaste, čvrste supstance.

T. T. = 102 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3379, 2925, 2866, 1611, 1563, 1437, 1388, 1323, 1297, 1251, 1146, 1026, 998, 971, 945, 863, 791, 772, 709, 672, 641, 538$ cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 8,41$ (s, 1H, HetAr-H₂), 7,35 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,30–7,23 (m, 2H, 2 × Ar-H), 6,60 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH–), 6,53 (s, 1H, HetAr-H₆), 6,29 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, =CH–), 4,04 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N–), 3,58 (s, 2H, Ar-CH₂-NH–), 2,70 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N–), 1,83 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H), 1,79–1,70 (m, 2H), 1,66–1,51 (m, 4H), 1,47–1,39 (m, 2H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,35–1,31 (m, 2H), 1,30–1,23 (m, 2H), 1,22–1,19 (m, 1H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13–1,07 (m, 1H), 0,99–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

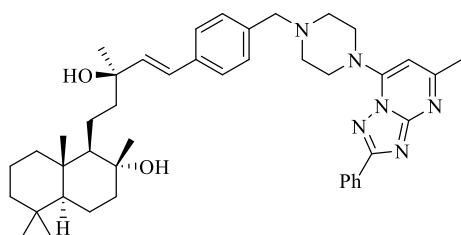
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 157,0; 155,4; 152,1$ (d, $^2J_{C-F} = 35,7$ Hz); 151,0; 138,2; 136,8; 136,1; 129,5; 126,5; 126,1; 120,8 (d, $^1J_{C-F} = 276,2$ Hz); 89,9 (q, $^3J_{C-F} = 2,7$ Hz); 75,0; 73,6; 62,5; 61,5; 56,2; 52,4; 48,7; 45,3; 44,5; 42,1; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 27,6; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₃₇H₅₂F₃N₆O₂⁺ 669,40984; detektovano 669,40903.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda E: $t_R = 8,877$ min, površina 98,79%; metoda F: $t_R = 6,683$ min, površina 98,91%.

$[\alpha]^{20}_D = +18,1$ (c 0,27, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R*,*E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-((4-(5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)piperazin-1-il)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86d)



Primenom opšte procedure E za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82a** (45 mg, 0,093 mmol) i **85d** (25 mg, 0,103 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **86d** (39 mg, 61%) u obliku žute, čvrste supstance.

T. T. = 127–128 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3408, 2932, 1611, 1586, 1550, 1446, 1417, 1387, 1327, 1269, 1204, 1156, 1132, 1027, 1001, 972, 939, 766 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 8,18–8,15 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 7,47–7,44 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,38 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,29 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,59 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,37–6,30 (m, 2H, =CH–, HetAr–H₆), 3,90 (t, J = 4,9 Hz, 4H, HetAr–N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 3,57 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,67 (t, J = 4,9 Hz, 4H, HetAr–N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,50 (s, 3H, Me–HetAr), 1,86 (dd, J_1 = 12,8 Hz, J_2 = 5,1 Hz, 1H), 1,79 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,1 Hz, 1H), 1,71–1,65 (m, 2H), 1,63–1,49 (m, 3H), 1,47–1,36 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,31 (s, 1H), 1,26 (dt, J_1 = 9,2 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,20–1,10 (m, 2H), 1,09 (s, 3H, Me), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,78 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 3H, Me) ppm.

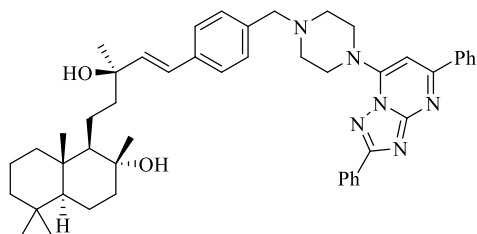
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 166,2; 164,2; 159,0; 151,2; 138,5; 138,3; 137,2; 131,7; 131,5; 130,8; 129,7; 128,2; 127,7; 127,4; 95,8; 75,2; 74,3; 63,4; 62,7; 57,5; 53,4; 49,0; 47,1; 45,1; 43,2; 41,1; 40,5; 34,1; 33,9; 27,9; 24,8; 24,0; 22,0; 21,5; 20,8; 19,5; 16,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_2^+$ 691,4694; detektovano 691,46795.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda E: t_R = 7,261 min, površina 99,50%; metoda F: t_R = 8,692 min, površina 98,73%.

$[\alpha]^{20}_D$ = + 11,4 (c 0,13, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-((4-(2,5-difenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)piperazin-1-il)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86e)



Primenom opšte procedure E za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82a** (43 mg, 0,09 mmol) i **85e** (30 mg, 0,098 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 1/9), dobijen je proizvod **86e** (46 mg, 69%) u obliku žute, čvrste supstance.

T. T. = 128 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3396, 2926, 2867, 1604, 1585, 1549, 1447, 1386, 1326, 1269, 1236, 1208, 1028, 1001, 971, 939, 763, 718, 694 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,34 (dd, J_1 = 7,3 Hz, J_2 = 2,4 Hz, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 8,17–8,11 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 7,50–7,44 (m, 6H, 6 $\times$ Ph–H), 7,37 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,66 (s, 1H, HetAr–H₆), 6,62 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,31 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 3,97 (t, J = 4,9 Hz, 4H, HetAr–N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 3,62 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,76 (t, J = 4,8 Hz, HetAr–N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,53 (b rs, 2H, 2 $\times$ –OH), 1,84 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,80–1,71 (m, 2H), 1,66–1,52 (m, 4H), 1,47–1,40 (m, 3H), 1,38 (s, 3H, Me), 1,36–1,32 (m, 1H), 1,26 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 1,23–1,19 (m, 1H), 1,16 (s, 3H, Me), 1,14–1,08 (m, 1H), 1,01–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,78 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 3H, Me) ppm.

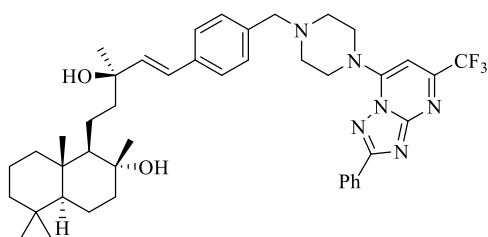
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 164,4; 161,5; 158,5; 150,6; 138,1; 137,6; 136,7; 136,4; 131,0; 130,7; 130,4; 129,6; 128,9; 128,7; 127,7; 127,5; 126,5; 126,3; 91,3; 75,0; 73,7; 62,7; 61,5; 56,2; 52,4; 48,3; 45,3; 44,5; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,3; 27,8; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{48}H_{61}N_6O_2^+$ 753,48505; detektovano 753,48333.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda F: $t_R = 9,930$ min, površina 96,76%; metoda I: $t_R = 7,148$ min, površina 98,52%.

$[\alpha]^{20}_D = +15,0$ (c 0,15, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-((4-(2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)piperazin-1-il)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86f)



Primenom opšte procedure E za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82a** (43 mg, 0,089 mmol) i **85f** (29 mg, 0,098 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **86f** (39 mg, 59%) u obliku žute, čvrste supstance.

T. T. = 126 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3386, 2926, 2868, 1612, 1565, 1515, 1446, 1386, 1326, 1256, 1185, 1145, 1114, 1029, 998, 953, 792, 766, 723, 694$ cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, CD_3OD) $\delta = 8,18-8,13$ (m, 2H, 2 $\times$ Ph-**H**), 7,45 (dd, $J_1 = 5,3$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 3H, 3 $\times$ Ph-**H**), 7,39 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-**H**), 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-**H**), 6,79 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 6,59 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 6,34 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 4,14 (t, $J = 4,9$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 3,61 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,73 (t, $J = 4,8$ Hz, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 1,86 (td, $J_1 = 12,8$ Hz, $J_2 = 5,1$ Hz, 1H), 1,82-1,76 (m, 1H), 1,72-1,65 (m, 2H), 1,64-1,51 (m, 3H), 1,47-1,37 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,34-1,31 (m, 1H), 1,27 (s, 1H), 1,19-1,12 (m, 2H), 1,10 (s, 3H, **Me**), 1,01-0,90 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,79 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 3H, **Me**) ppm.

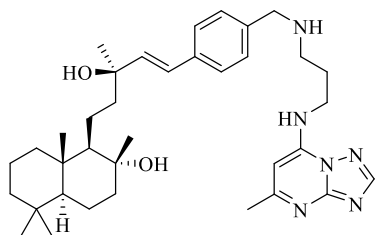
^{13}C { 1H } NMR (100 MHz, CD_3OD) $\delta = 165,5; 158,9; 152,6$ (d, $^2J_{C-F} = 28,4$ Hz); 151,9; 138,6; 138,3; 137,1; 132,0; 131,1; 130,8; 129,8; 128,4; 127,7; 127,4; 122,3 (q, $^1J_{C-F} = 274,8$ Hz); 91,8 (q, $^3J_{C-F} = 2,9$ Hz); 75,2; 74,3; 63,3; 62,7; 57,5; 53,4; 49,9; 47,1; 45,2; 43,2; 41,2; 40,5; 34,2; 33,9; 27,9; 24,0; 21,9; 21,5; 20,8; 19,5; 16,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + Na]^+$ Izračunato za $C_{43}H_{55}N_6O_2Na^+$ 767,42308; detektovano 767,42123.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda F: $t_R = 7,857$ min, površina 99,38%; metoda I: $t_R = 6,919$ min, površina 99,14%.

$[\alpha]^{20}_D = +18,0$ (c 0,13, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((3-((5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86g)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (19 mg, 0,040) i **89s** (6,8 mg, 0,040 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **86g** (15 mg, 62%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 93 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3368, 2925, 2855, 1695, 1626, 1591, 1534, 1442, 1369, 1341, 1254, 1192, 1134, 969, 820, 775, 647 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ = 8,22 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,53 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH-), 6,32 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH-), 6,25 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 4,02 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,51 (t, J = 6,8 Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 3,01 (t, J = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 2,45 (s, 3H, **Me**-HetAr), 2,04 (quint, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-), 1,82 (dd, J_1 = 13,0 Hz, J_2 = 4,9 Hz, 1H), 1,76 (dt, J_1 = 12,4 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,68–1,64 (m, 1H), 1,63–1,54 (m, 3H), 1,50–1,44 (m, 1H), 1,44–1,39 (m, 1H), 1,39–1,32 (m, 2H), 1,31 (s, 3H, **Me**), 1,30–1,28 (m, 1H), 1,27–1,22 (m, 1H), 1,15–1,10 (m, 1H), 1,10–1,07 (m, 1H), 1,06 (s, 3H, **Me**), 0,96–0,88 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 3H, **Me**), 0,75 (s, 3H, **Me**) ppm.

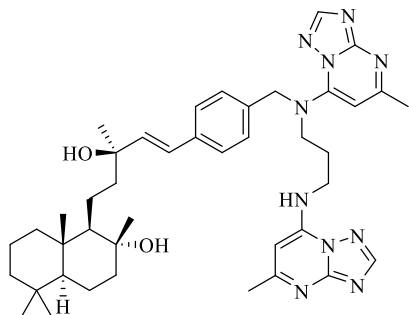
¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CD₃OD) δ = 166,5; 156,4; 154,7; 149,1; 139,5; 133,7; 130,8; 127,8; 127,3; 89,3; 75,2; 74,3; 62,7; 57,5; 52,7; 49,8; 47,0; 46,2; 45,1; 43,2; 41,1; 40,6; 40,5; 34,2; 33,9; 27,9; 27,3; 24,8; 24,0; 21,9; 21,5; 20,8; 19,5; 16,1 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ izračunato za C₃₆H₅₄N₆O₂Na⁺ 625,4200; detektovano 625,4187.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda D: t_R = 7,973 min, površina 99,31%; metoda E: t_R = 6,321 min, površina 97,81%.

[α]²⁰_D = + 8,0 (c 0,10, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(3-((5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (87a)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (19 mg, 0,040) i **85a** (6,8 mg, 0,040 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 95/5), dobijen je proizvod **87a** (6 mg, 21%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 143 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3389, 2926, 2867, 1623, 1550, 1510, 1439, 1387, 1365, 1341, 1254, 1201, 1131, 1085, 1032, 970, 939, 772, 642 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 8,27 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 8,23 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,28 (d, J = 8,3 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,19 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,50 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH-), 6,29 (s,

1H, HetAr-H₆), 6,27 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 6,18 (s, 1H, HetAr-H₆), 5,05 (s, 2H, Ar-CH₂-NH), 4,12–4,02 (m, 2H, -CH₂-CH₂-N-), 3,50 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 2,44 (s, 3H, Me-HetAr), 2,37 (s, 3H, Me-HetAr), 2,20 (quint, $J = 6,6$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,87–1,73 (m, 2H), 1,70–1,56 (m, 4H), 1,56–1,42 (m, 2H), 1,43–1,31 (m, 4H), 1,31 (s, 3H, Me), 1,28–1,24 (m, 1H), 1,13 (dd, $J_1 = 13,9$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, 1H), 1,08 (s, 1H), 1,06 (s, 3H, Me), 0,99–0,86 (m, 1H), 0,82 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 3H, Me), 0,75 (s, 3H, Me) ppm.

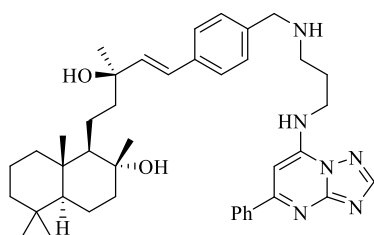
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CD₃OD) $\delta = 166,4; 166,0; 163,8; 158,5; 156,4; 154,8; 154,4; 151,1; 149,1; 138,9; 138,6; 136,0; 128,7; 127,8; 127,4; 95,2; 89,3; 75,2; 74,3; 62,7; 57,5; 55,4; 47,0; 45,2; 43,2; 41,2; 40,5; 40,4; 34,2; 33,9; 28,0; 27,9; 24,8; 24,5; 24,0; 21,9; 21,5; 20,9; 19,5; 16,0$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₂H₅₉N₁₀O₂⁺ 735,4817; detektovano 735,4795.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda B: $t_R = 10,771$ min, površina 96,31%; metoda D: $t_R = 9,515$ min, površina 97,11%; metoda F: $t_R = 7,055$ min, površina 96,62%.

$[\alpha]^{20}_D = +18,0$ (c 0,10, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((3-((5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86h)



Primenom opšte procedure F za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (41 mg, 0,087) i **85b** (20 mg, 0,087 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2), dobijen je proizvod **86h** (39 mg, 67%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 114 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3385, 2927, 2866, 1625, 1593, 1511, 1462, 1387, 1342, 1254, 1216, 1188, 1157, 971, 938, 908, 766, 693$ cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 8,28$ (s, 1H, HetAr-H₂), 8,11–8,07 (m, 2H, 2 × Ph-H), 7,47–7,45 (m, 3H, 3 × Ph-H), 7,37 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,29 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 6,57 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 6,47 (s, 1H, HetAr-H₆), 6,26 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH-), 3,84 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,59 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 2,93 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 1,98 (quint, $J = 5,1$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,83 (dt, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 3,1$ Hz, 1H), 1,80–1,67 (m, 2H), 1,65–1,53 (m, 4H), 1,48–1,37 (m, 3H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,33 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 1,25 (s, 1H), 1,23–1,18 (m, 1H), 1,15 (s, 3H), 1,12–1,07 (m, 1H), 1,00–0,87 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 3H, Me) ppm.

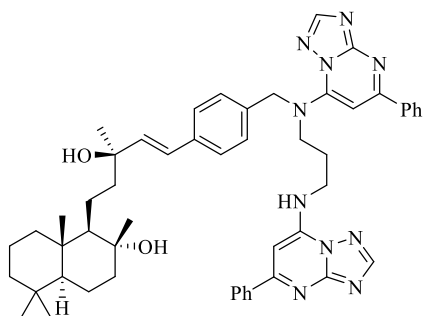
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 162,1; 156,0; 154,9; 147,9; 138,2; 138,1; 136,6; 130,5; 129,5; 128,9; 128,8; 127,7; 126,5; 126,2; 84,7; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,9; 53,6; 47,8; 45,4; 44,5; 42,4; 42,1; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 27,7; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ izračunato za C₄₁H₅₆N₆O₂Na⁺ 687,4357; detektovano 687,43458.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda B: $t_R = 8,125$ min, površina 97,21%; metoda D: $t_R = 8,086$ min, površina 99,16%; metoda F: $t_R = 6,040$ min, površina 99,50%.

$[\alpha]^{20}_D = +15,0$ (c 0,07, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(3-((5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (87b)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (41 mg, 0,087) i **85b** (20 mg, 0,087 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 95/5), dobijen je proizvod **87b** (10 mg, 13%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 130 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3634, 3305, 2926, 2866, 1604, 1555, 1511, 1466, 1387, 1364, 1344, 1255, 1233, 1188, 1159, 1129, 1031, 938, 765, 694 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,62 (d, J = 2,4 Hz, 1H, HetAr-**H**₂), 8,25 (d, J = 1,9 Hz, 1H, HetAr-**H**₂), 8,00–7,93 (m, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,85–7,77 (m, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,44 (t, J = 5,2 Hz, 1H, CH₂-NH-HetAr), 7,37–7,32 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 7,31–7,26 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 7,25 (d, J = 7,0 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,14 (d, J = 7,0 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,53–6,40 (m, 2H, =CH-, HetAr-**H**₆), 6,33 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 6,20 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 4,77 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 4,19–4,09 (m, 2H CH₂-CH₂-N-), 3,47 (q, J = 5,6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-HetAr), 2,28 (quint, J = 7,2 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,79–1,72 (m, 1H), 1,72–1,67 (m, 1H), 1,66–1,59 (m, 1H), 1,57–1,48 (m, 3H), 1,46–1,41 (m, 1H), 1,37–1,30 (m, 2H), 1,27 (s, 3H, **Me**), 1,26–1,21 (m, 2H), 1,14–1,10 (m, 2H), 1,07 (s, 3H, **Me**), 1,04–0,99 (m, 1H), 0,90–0,78 (m, 2H), 0,74 (s, 3H, **Me**), 0,68 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

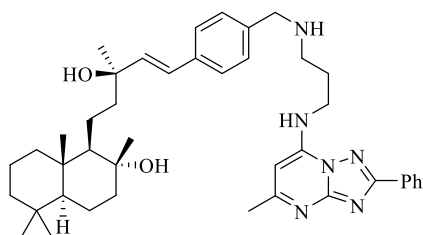
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 162,0; 161,7; 158,1; 155,9; 155,7; 155,0; 150,0; 147,7; 139,2; 137,9; 137,6; 137,3; 133,5; 130,6; 130,5; 128,8; 127,7; 127,5; 127,2; 125,5; 90,9; 84,7; 74,9; 73,5; 61,6; 56,2; 54,8; 48,5; 45,2; 44,4; 42,1; 39,8; 39,4; 39,3; 33,5; 33,3; 27,8; 27,3; 24,4; 21,5; 20,6; 19,1; 18,5; 15,4 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ Izračunato za C₅₂H₆₃N₁₀O₂⁺ 859,51300; detektovano 859,51049.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda D: t_R = 10,737 min, površina 97,70%; metoda G: t_R = 11,522 min, površina 96,17%.

[α]²⁰_D = + 13,5 (c 0,07, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((3-((5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86i)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (39 mg, 0,083) i **85d** (20 mg, 0,083 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2), dobijen je proizvod **86i** (35 mg, 62%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 107 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3378, 2924, 2866, 1626, 1594, 1554, 1510, 1446, 1388, 1325, 1300, 1224, 1131, 1061, 1032, 971, 938, 767, 719, 694 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,25–8,22 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 7,43–7,41 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,35 (d, J = 7,8 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,26 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,53 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,21 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 5,86 (s, 1H, HetAr–H₆), 3,90 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,49 (t, J = 6,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–HetAr), 2,95 (t, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,49 (s, 3H, Me–HetAr), 1,99 (quint, J = 5,5 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,83 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,3 Hz, 1H), 1,79–1,73 (m, 1H), 1,73–1,69 (m, 1H), 1,67–1,53 (m, 4H), 1,46–1,37 (m, 4H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,31 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 1,25 (s, 1H), 1,22–1,19 (m, 1H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,13–1,07 (m, 1H), 0,99–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

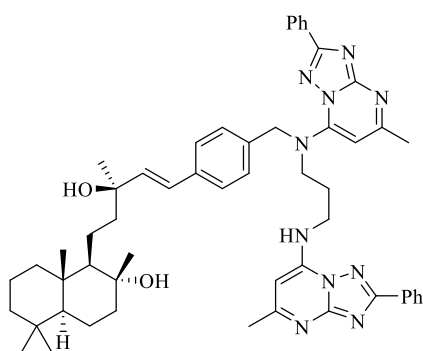
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 164,5; 164,2; 160,7; 156,4; 147,0; 138,1; 136,6; 131,2; 130,1; 128,8; 128,7; 127,5; 126,7; 126,1; 87,6; 75,0; 73,6; 61,6; 56,2; 53,8; 47,6; 45,3; 44,5; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 27,7; 25,5; 24,5; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ Izračunato za C₄₂H₅₈N₆O₂Na⁺ 701,45135; detektovano 701,45006.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda B: t_R = 8,036 min, površina 96,76%; metoda E: t_R = 6,985 min, površina 96,21%; metoda F: t_R = 6,108 min, površina 99,65%.

[α]²⁰_D = + 15,0 (c 0,07, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(3-((5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (87c)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (39 mg, 0,083) i **85d** (20 mg, 0,083 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc), dobijen je proizvod **87c** (11 mg, 15%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 144 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3390, 2928, 2868, 1626, 1596, 1551, 1446, 1389, 1325, 1302, 1204, 1131, 1072, 1028, 970, 939, 766, 718, 695 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,30–8,25 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 8,24–8,19 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 7,44 (d, J = 8,1 Hz, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,42–7,38 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,27 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,23 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,43 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,20 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,15 (t, J = 5,8 Hz, 1H, –CH₂–CH₂–NH–), 6,03 (s, 1H, HetAr–H₆), 5,79 (s, 1H, HetAr–H₆), 4,94 (d, J = 5,2 Hz, 2H, Ar–CH₂–N–), 3,99 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–N–), 3,42 (q, J = 6,5 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–HetAr), 2,48 (s, 3H, Me–HetAr), 2,43 (s, 3H, Me–HetAr), 2,23–2,15 (m, 2H, –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,84 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,0 Hz, 1H), 1,80–1,73 (m, 1H), 1,73–1,67 (m, 1H), 1,66–1,57 (m, 3H), 1,56–1,49 (m, 1H), 1,48–1,42 (m, 1H), 1,42–1,35 (m, 2H), 1,34 (s, 3H, Me), 1,33–1,32 (m, 1H), 1,26 (s, 1H), 1,23–1,20 (m, 1H), 1,16 (s, 3H, Me), 1,14–1,06 (m, 1H), 1,02–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

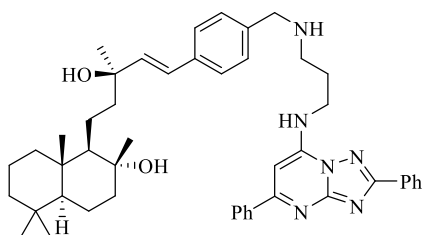
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 164,8; 164,5; 164,4; 164,0; 158,6; 156,1; 149,0; 146,6; 138,8; 137,5; 134,3; 130,9; 130,9; 130,5; 130,4; 128,8; 128,7; 128,1; 127,5; 127,4; 127,0; 125,5; 94,1; 87,8; 74,9; 73,4; 61,7; 56,2; 54,8; 47,7; 45,1; 44,5; 42,1; 39,9; 39,7; 39,4; 33,5; 33,4; 27,3; 27,3; 25,4; 25,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,1; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{54}H_{67}N_{10}O_2^+$ 887,5443; detektovano 887,54165.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda A: $t_R = 14,290$ min, površina 98,99%; metoda B: $t_R = 12,326$ min, površina 96,84%; metoda D: $t_R = 10,990$ min, površina 98,57%; metoda F: $t_R = 8,124$ min, površina 95,33%.

$[\alpha]^{20}_D = +16,2$ (c 0,08, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((3-((2,5-difenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86j)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (35 mg, 0,074 mmol) i **85e** (23 mg, 0,074 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 7/3), dobijen je proizvod **86j** (45 mg, 82%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 123 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3395, 3062, 2926, 2867, 1623, 1594, 1448, 1434, 1385, 1325, 1294, 1248, 1178, 1132, 1084, 1028, 970, 938, 763, 719, 695$ cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 8,33$ – $8,26$ (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 8,16–8,11 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 7,99 (b rs, 1H, NH), 7,47–7,45 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,44–7,41 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,33 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,26 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,54 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH–), 6,46 (s, 1H, HetAr–H₆), 6,21 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH–), 3,85 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,57 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–HetAr), 2,93 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,98 (quint, $J = 6,1$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–), 1,87–1,80 (m, 1H), 1,78–1,70 (m, 2H), 1,66–1,52 (m, 4H), 1,46–1,37 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,24 (s, 1H), 1,23–1,17 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,10 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

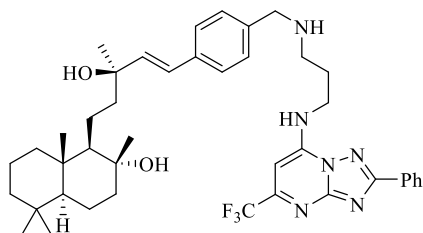
^{13}C { 1H } NMR (100 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 164,7; 161,6; 156,8; 147,6; 138,6; 138,1; 137,9; 136,4; 131,2; 130,4; 130,2; 128,8; 128,7; 128,6; 127,7; 127,6; 126,7; 126,2; 84,6; 75,0; 73,7; 61,6; 56,2; 54,0; 47,9; 45,3; 44,5; 42,6; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,3; 27,8; 27,7; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + Na]^+$ izračunato za $C_{47}H_{60}N_6O_2Na^+$ 763,46700; detektovano 763,46541.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda B: $t_R = 8,317$ min, površina 96,00%; metoda F: $t_R = 6,220$ min, površina 99,22%.

$[\alpha]^{20}_D = +13,6$ (c 0,07, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((3-((2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86k)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82b** (35 mg, 0,074 mmol) i **85f** (22 mg, 0,074 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 7/3), dobijen je proizvod **86k** (39 mg, 72%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 109 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3380, 2928, 2867, 1631, 1597, 1511, 1447, 1385, 1328, 1287, 1200, 1146, 1107, 1029, 971, 937, 794, 768, 723, 694 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,22 (dd, J_1 = 7,9 Hz, J_2 = 1,8 Hz, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,48–7,39 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,26 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,54 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,33 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 6,21 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 3,87 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,56 (t, J = 6,0 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-HetAr), 2,99–2,92 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH), 1,97 (quint, J = 5,8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,83 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,78–1,69 (m, 2H), 1,67–1,54 (m, 3H), 1,45–1,37 (m, 4H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,31 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 1,26 (s, 1H), 1,21 (t, J = 4,2 Hz, 1H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,07 (m, 1H), 1,01–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

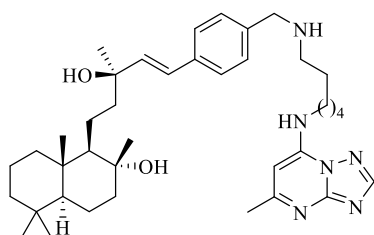
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 165,6; 155,7; 151,9 (d, $^2J_{C-F}$ = 35,4 Hz); 148,0; 138,2; 137,8; 136,3; 130,5; 130,3; 128,6; 128,5; 127,5; 126,6; 126,0; 120,8 (d; $^1J_{C-F}$ = 275,7 Hz); 84,0 (q, $^3J_{C-F}$ = 2,9 Hz); 74,8; 73,5; 61,4; 56,1; 53,8; 48,0; 45,2; 44,4; 43,2; 42,0; 39,7; 39,2; 33,3; 33,2; 27,6; 26,9; 24,3; 21,4; 20,5; 19,1; 18,4; 15,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ izračunato za C₄₂H₅₅F₃N₆O₂Na⁺ 755,42308; detektovano 755,42129.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda B: t_R = 8,203 min, površina 96,76%; metoda D: t_R = 8,164 min, površina 98,76%; metoda E: t_R = 8,203 min, površina 98,18%.

[α]²⁰_D = + 16,8 (c 0,11, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((6-((5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86l)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (33 mg, 0,064 mmol) i **85a** (11 mg, 0,064 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **86l** (30 mg, 72%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 108 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3384, 2933, 2865, 1624, 1591, 1510, 1441, 1387, 1340, 1255, 1199, 1149, 1084, 1033, 971, 939, 773 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,25 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,31 (d, J = 7,8 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-**H**), 7,23 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-**H**), 6,57 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,26 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,15 (b rs, 1H, HetAr-NH-CH₂), 5,98 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 3,75 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,37 (q, J = 7,1 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 2,62 (t, J = 7,1 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 2,56 (s, 3H, **Me**-HetAr), 1,83 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 1,78–1,69 (m, 4H), 1,65–1,50 (m, 6H), 1,47–1,37 (m, 8H), 1,36 (s, 3H, **Me**), 1,24–1,16 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,06 (m, 1H), 1,01–0,87 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ **Me**) ppm.

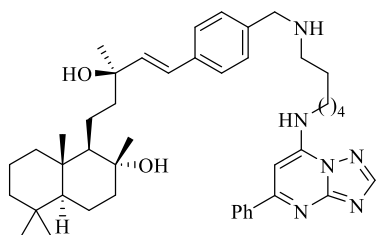
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 165,1; 155,6; 154,6; 147,2; 139,5; 137,7; 136,2; 128,4; 126,5; 126,3; 87,8; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,9; 49,2; 45,4; 44,5; 42,4; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,3; 30,0; 28,9; 27,8; 27,0; 26,8; 25,6; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ Izračunato za C₃₉H₆₀N₆O₂Na⁺ 667,46700; detektovano 667,46503.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda D: t_R = 8,005 min, površina 99,26%; metoda E: t_R = 6,341 min, površina 97,69%.

$[\alpha]^{20}_D$ = + 16,8 (c 0,11, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((6-((5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86m)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (32 mg, 0,062 mmol) i **85b** (14 mg, 0,062 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **86m** (28 mg, 63%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 97–98 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3390, 2930, 2861, 1625, 1593, 1511, 1463, 1387, 1340, 1254, 1216, 1157, 1032, 971, 938, 766, 697 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,32 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 8,12 (dd, J_1 = 6,6 Hz, J_2 = 3,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ph-**H**), 7,49 (dd, J_1 = 5,3 Hz, J_2 = 1,8 Hz, 3H, 3 $\times$ Ph-**H**), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-**H**), 7,24 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-**H**), 6,60–6,52 (m, 2H, =CH-, HetAr-**H**₆), 6,33 (t, J = 5,1 Hz, 1H, -CH₂-NH-HetAr), 6,26 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 3,79 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,51–3,44 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH-HetAr), 2,88 (br s, 3H, 2 $\times$ -OH, -NH), 2,65 (t, J = 7,2 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 1,86–1,70 (m, 5H), 1,67–1,53 (m, 6H), 1,50–1,37 (m, 9H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,33 (s, 1H), 1,25 (s, 1H), 1,23–1,18 (m, 1H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,14–1,06 (m, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ **Me**) ppm.

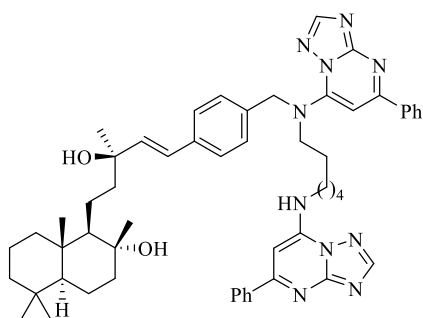
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 167,3; 162,4; 156,0; 155,1; 147,8; 138,1; 138,1; 136,6; 130,6; 128,9; 128,8; 127,8; 126,6; 126,2; 85,0; 75,0; 73,6; 61,6; 56,2; 53,1; 48,5; 45,4; 44,5; 42,5; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 29,2; 28,9; 27,8; 26,9; 26,7; 24,5; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ izračunato za C₄₄H₆₂N₆O₂Na⁺ 729,48265; detektovano 729,48103.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda D: t_R = 8,127 min, površina 99,48%; metoda F: t_R = 6,124 min, površina 99,50%.

$[\alpha]^{20}_D = +13,5$ (c 0,07, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)(6-(((5-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (87d)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (32 mg, 0,062 mmol) i **85b** (14 mg, 0,062 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 95/5), dobijen je proizvod **87d** (8 mg, 14%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 113 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3354, 2926, 2854, 1729, 1624, 1602, 1554, 1511, 1464, 1378, 1343, 1308, 1254, 1157, 1031, 972, 765, 696 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 8,33$ (s, 2H, 2 × HetAr-**H**₂), 8,11 (dd, $J_1 = 6,6 \text{ Hz}$, $J_2 = 2,9 \text{ Hz}$, 2H, 2 × Ph-**H**), 8,00 (dd, $J_1 = 6,6 \text{ Hz}$, $J_2 = 2,9 \text{ Hz}$, 2H, 2 × Ph-**H**), 7,52–7,45 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 7,48–7,42 (m, 3H, 3 × Ph-**H**), 7,35 (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,23 (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,62–6,51 (m, 3H, =CH-, 2 × HetAr-**H**₆), 6,28 (d, $J = 16,1 \text{ Hz}$, 1H, =CH-), 6,27–6,20 (m, 1H, –CH₂–NH–HetAr), 5,07 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,90 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 2H, –CH₂–CH₂–N–), 3,48 (q, $J = 6,7 \text{ Hz}$, 2H, –CH₂–CH₂–NH–HetAr), 1,88–1,69 (m, 8H), 1,66–1,57 (m, 3H), 1,56–1,48 (m, 4H), 1,47–1,38 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,32 (d, $J = 2,7 \text{ Hz}$, 1H), 1,30–1,22 (m, 1H), 1,21 (d, $J = 3,7 \text{ Hz}$, 1H), 1,14 (s, 3H, **Me**), 1,14–1,07 (m, 1H), 1,00–0,86 (m, 2H), 0,83 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

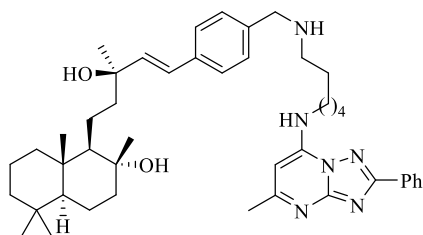
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 162,4; 161,6; 158,2; 155,9; 155,1; 154,6; 150,0; 147,7; 138,6; 138,0; 137,8; 137,4; 134,7; 130,7; 130,6; 128,9; 128,9; 127,8; 127,7; 127,6; 127,1; 125,9; 90,9; 84,9; 75,0; 73,7; 61,5; 56,2; 54,8; 51,3; 45,3; 44,6; 42,5; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 29,0; 28,0; 27,9; 26,7; 26,5; 24,5; 21,6; 20,7; 19,2; 18,6; 15,5 \text{ ppm}$.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za C₅₅H₆₉N₁₀O₂⁺ 901,55995; detektovano 901,55702.

HPLC čistoća ($\lambda = 254 \text{ nm}$) metoda D: $t_R = 11,480 \text{ min}$, površina 96,75%; metoda G: $t_R = 11,811 \text{ min}$, površina 95,71%.

$[\alpha]^{20}_D = +7,0$ (c 0,10, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((6-((5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86n)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (50 mg, 0,097 mmol) i **85d** (24 mg, 0,097 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **86n** (42 mg, 60%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 91 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3392, 2930, 2863, 1626, 1594, 1508, 1445, 1388, 1324, 1298, 1224, 1131, 1030, 971, 938, 767, 719, 695 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8,32\text{--}8,27$ (m, 2H, $2 \times \text{Ph-H}$), $7,51\text{--}7,41$ (m, 3H, $3 \times \text{Ph-H}$), $7,31$ (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), $7,25$ (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), $6,56$ (d, $J = 16,1 \text{ Hz}$, 1H, $=\text{CH-}$), $6,26$ (d, $J = 16,0 \text{ Hz}$, 1H, $=\text{CH-}$), $6,19$ (t, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2\text{-NH-HetAr}$), $5,96$ (s, 1H, HetAr-**H**₆), $3,78$ (s, 2H, Ar-**CH**₂-NH-), $3,37$ (q, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-HetAr}$), $2,65$ (t, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), $2,55$ (s, 3H, **Me**-HetAr), $2,26$ (b rs, 3H, $2 \times \text{-OH}$, $-\text{NH}$), $1,82$ (dt, $J_1 = 12,2 \text{ Hz}$, $J_2 = 3,1 \text{ Hz}$, 1H), $1,80\text{--}1,70$ (m, 4H), $1,66\text{--}1,51$ (m, 6H), $1,46\text{--}1,37$ (m, 6H), $1,35$ (s, 3H, **Me**), $1,33$ (s, 1H), $1,27\text{--}1,24$ (m, 1H), $1,23\text{--}1,18$ (m, 1H), $1,15$ (s, 3H, **Me**), $1,13\text{--}1,06$ (m, 1H), $1,02\text{--}0,88$ (m, 2H), $0,84$ (s, 3H, **Me**), $0,77$ (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm.

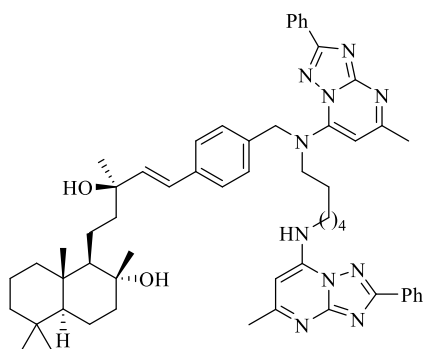
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 167,4; 164,8; 164,5; 156,4; 146,9; 137,9; 136,4; 131,1; 130,3; 128,7; 128,6; 127,5; 126,6; 126,3; 87,8; 75,0; 73,7; 61,6; 56,2; 54,5; 48,9; 45,4; 44,5; 42,4; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 29,6; 29,0; 27,8; 27,0; 26,8; 25,6; 24,5; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 \text{ ppm}$.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{45}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}^+$ 743,4983; detektovano 743,49672.

HPLC čistoća ($\lambda = 254 \text{ nm}$) metoda B: $t_R = 8,238 \text{ min}$, površina 95,14%; metoda E: $t_R = 7,036 \text{ min}$, površina 95,74%; metoda F: $t_R = 6,122 \text{ min}$, površina 97,09%.

$[\alpha]^{20}_D = +18,0$ (c 0,10, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)(6-(((5-metil-2-fenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (87e)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (50 mg, 0,097 mmol) i **85d** (24 mg, 0,097 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **87e** (27 mg, 30%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 119 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3358, 3379, 2925, 2862, 1625, 1594, 1552, 1445, 1388, 1324, 1301, 1204, 1130, 1070, 1031, 969, 766, 718, 694 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8,30\text{--}8,24$ (m, 4H, $4 \times \text{Ph-H}$), $7,47\text{--}7,40$ (m, 6H, $6 \times \text{Ph-H}$), $7,35$ (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), $7,24$ (d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), $6,58$ (d, $J = 16,1 \text{ Hz}$, 1H, $=\text{CH-}$), $6,28$ (d, $J = 16,0 \text{ Hz}$, 1H, $=\text{CH-}$), $6,12$ (t, $J = 5,7 \text{ Hz}$, 1H, $-\text{CH}_2\text{-NH-HetAr}$), $5,95$ (s, 1H, HetAr-**H**₆), $5,91$ (s, 1H, HetAr-**H**₆), $5,04$ (s, 2H, Ar-**CH**₂-N-), $3,86$ (t, $J = 7,7 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$), $3,39\text{--}3,30$ (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-HetAr}$), $2,53$ (s, 3H, **Me**-HetAr), $2,48$ (s, 3H, **Me**-HetAr), $1,86\text{--}1,80$ (m, 3H), $1,77\text{--}1,71$ (m, 3H), $1,66\text{--}1,52$ (m, 4H), $1,51\text{--}1,36$ (m, 7H), $1,35$ (s, 3H, **Me**), $1,32$ (s, 1H), $1,27\text{--}1,19$ (m, 2H), $1,14$ (s, 3H, **Me**), $1,13\text{--}1,05$ (m, 1H), $1,02\text{--}0,87$ (m, 2H), $0,84$ (s, 3H, **Me**), $0,76$ (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 164,8; 164,5; 164,1; 163,6; 158,7; 156,4; 155,4; 149,1; 146,8; 138,6; 137,2; 134,9; 131,2; 131,1; 130,3; 130,2; 128,7; 128,6; 127,7; 127,5; 127,4; 127,0; 125,9; 93,4;$

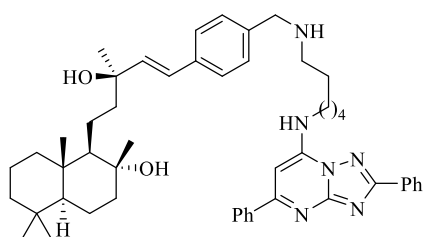
87,7; 75,0; 73,6; 61,5; 56,2; 54,5; 51,1; 45,2; 44,6; 42,4; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,3; 29,1; 28,0; 27,8; 26,8; 26,6; 25,6; 25,3; 24,5; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,4 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{45}H_{65}N_6O_2^+$ 929,59125; detektovano 929,59031.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda D: $t_R = 11,518$ min, površina 95,51%; metoda E: $t_R = 11,700$ min, površina 95,20%.

$[\alpha]^{20}_D = +12,8$ (c 0,14, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((6-((2,5-difenil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86o)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (30 mg, 0,058 mmol) i **85e** (18 mg, 0,058 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **86o** (27 mg, 59%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 90 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3397, 2925, 2856, 1623, 1593, 1512, 1448, 1384, 1324, 1248, 1177, 1133, 1085, 1029, 970, 938, 764, 719, 694$ cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 8,32$ (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,7$ Hz, 2H, 2 × Ph-**H**), $8,12$ (dd, $J_1 = 6,5$ Hz, $J_2 = 2,9$ Hz, 2H, 2 × Ph-**H**), $7,45$ (s, 6H, 6 × Ph-**H**), $7,34$ – $7,20$ (m, 4H, 4 × Ar-**H**), $6,54$ (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH-), $6,47$ (s, 1H, HetAr-**H**₆), $6,37$ (t, $J = 6,2$ Hz, 1H, -CH₂-NH-HetAr), $6,24$ (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, =CH-), $3,81$ (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), $3,40$ (t, $J = 10,8$, 2H, -CH₂-CH₂-NH-HetAr), $3,11$ (b rs, 3H, 2 × -OH, -NH), $2,69$ (t, $J = 7,3$ Hz, 2H-CH₂-CH₂-NH-), $1,82$ (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), $1,77$ – $1,66$ (m, 5H), $1,64$ – $1,52$ (m, 5H), $1,46$ – $1,36$ (m, 8H), $1,33$ (s, 3H, **Me**), $1,25$ (q, $J = 6,5$ Hz, 1H), $1,18$ – $1,16$ (m, 1H), $1,14$ (s, 3H, **Me**), $1,12$ – $1,05$ (m, 1H), $0,99$ – $0,86$ (m, 2H), $0,84$ (s, 3H, **Me**), $0,76$ (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

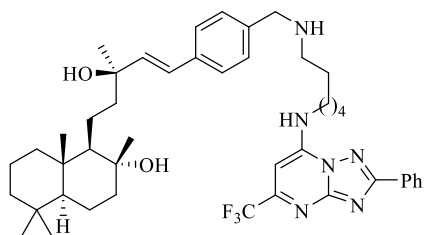
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 164,8; 161,8; 156,6; 155,4; 147,4; 138,3; 137,9; 136,8; 130,9; 130,5; 130,4; 128,9; 128,8; 128,8; 128,7; 127,7; 127,5; 126,6; 126,0; 84,8; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,1; 48,6; 45,3; 44,4; 42,5; 42,1; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 28,9; 27,4; 26,8; 26,7; 24,3; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + Na]^+$ Izračunato za $C_{50}H_{66}N_6O_2Na^+$ 805,51395; detektovano 805,51172.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda B: $t_R = 8,364$ min, površina 95,17%; metoda F: $t_R = 6,252$ min, površina 96,36%.

$[\alpha]^{20}_D = +12,0$ (c 0,10, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((6-((2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86p)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (60 mg, 0,117 mmol) i **85f** (35 mg, 0,117 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **86p** (48 mg, 53%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 97–98 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3383, 2932, 2865, 1632, 1598, 1512, 1447, 1386, 1329, 1287, 1202, 1176, 1146, 1107, 1029, 972, 938, 724 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,34–8,30 (m, 2H, 2 × Ph–H), 7,51–7,48 (m, 3H, 3 × Ph–H), 7,32 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, J = 8,2 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,62 (b rs, 1H, –CH₂–NH–HetAr), 6,57 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,44 (s, 1H, HetAr–H₆), 6,26 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 3,77 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,51 (t, J = 6,8 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–HetAr), 2,65 (t, J = 7,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,88–1,79 (m, 3H), 1,78–1,74 (m, 2H), 1,65–1,60 (m, 2H), 1,60–1,54 (m, 4H), 1,52–1,44 (m, 4H), 1,43–1,37 (m, 3H), 1,36 (s, 3H, **Me**), 1,34–1,32 (m, 1H), 1,26 (s, 1H), 1,24–1,20 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,08 (m, 1H), 1,03–0,87 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

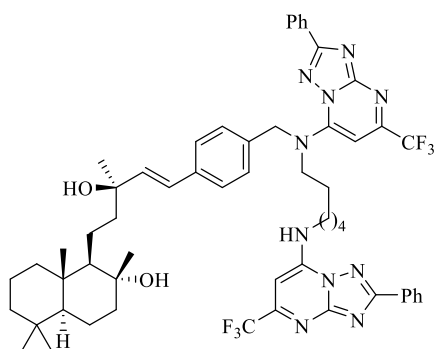
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 166,0; 155,7; 152,2 (d, $^2J_{C-F}$ = 35,7 Hz); 148,2; 138,4; 137,0; 130,9; 130,5; 130,3; 129,2; 128,8; 127,7; 126,7; 126,0; 120,9 (d, $^1J_{C-F}$ = 275,8 Hz); 84,4; 75,0; 73,6; 61,6; 56,2; 52,8; 48,2; 45,3; 44,5; 42,7; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,3; 28,8; 27,6; 26,7; 26,5; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ Izračunato za C₄₅H₆₁F₃N₆O₂Na⁺ 797,47003; detektovano 797,46814.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda B: t_R = 8,293 min, površina 96,76%; metoda F: t_R = 6,315 min, površina 98,96%.

[α]²⁰_D = + 17,7 (c 0,07, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)(6-((2-fenil-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (87f)



Primenom opšte procedure **F** za nukleofilnu supstituciju, polazeći od jedinjenja **82c** (60 mg, 0,117 mmol) i **85f** (35 mg, 0,117 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 1/1), dobijen je proizvod **87f** (22 mg, 18%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 121 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3390, 2930, 2864, 1629, 1601, 1563, 1512, 1446, 1386, 1330, 1287, 1174, 1145, 1108, 1028, 972, 954, 936, 795, 766, 722, 693 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,32–8,25 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 8,28–8,21 (m, 2H, 2 $\times$ Ph–H), 7,51–7,46 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,45–7,41 (m, 3H, 3 $\times$ Ph–H), 7,37 (d, J = 8,3 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,24 (d, J = 8,3 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,59 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,55 (t, J = 6,1 Hz, 1H–CH₂–NH–HetAr), 6,40 (s, 1H, HetAr–H₆), 6,39 (s, 1H, HetAr–H₆), 6,29 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 5,19 (s, 2H, Ar–CH₂–N–), 3,98 (t, J = 7,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–N–), 3,49 (q, J = 6,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–HetAr), 1,94–1,87 (m, 2H), 1,88–1,78 (m, 3H), 1,77–1,74 (m, 2H), 1,65–1,47 (m, 8H), 1,45–1,34 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,34–1,31 (m, 1H), 1,23–1,22 (m, 2H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,10 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 0,96–0,87 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

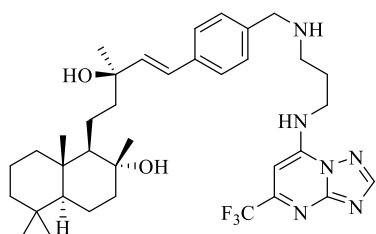
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 166,1; 165,2; 158,2; 155,6; 152,3 (q, $^2J_{C-F}$ = 35,9 Hz); 151,7 (q, $^2J_{C-F}$ = 35,5 Hz); 150,1; 148,1; 138,9; 137,7; 133,9; 131,0; 131,0; 130,9; 130,3; 130,2; 128,9; 128,9; 128,8; 127,7; 127,6; 127,2; 125,8; 120,9 (q, $^1J_{C-F}$ = 275,8 Hz); 89,1 (q, $^3J_{C-F}$ = 2,5 Hz); 84,3 (q, $^3J_{C-F}$ = 3,7 Hz); 75,1; 73,7; 61,5; 56,2; 55,2; 51,9; 45,2; 44,6; 42,7; 42,1; 39,9; 39,4; 33,5; 33,4; 29,0; 27,9; 26,7; 26,6; 24,5; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,4 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ Izračunato za C₅₇H₆₇F₆N₁₀O₂⁺ 1037,53472; detektovano 1037,5321.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda D: t_R = 12,575 min, površina 98,83%; metoda F: t_R = 12,503 min, površina 99,06%; metoda H: t_R = 13,578 min, površina 97,98%.

$[\alpha]^{20}_D$ = + 19,7 (c 0,11, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((3-((5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)propil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86q)



Primenom opšte procedure **G** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (30 mg, 0,073 mmol) i **90d** (21 mg, 0,080 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **86q** (34 mg, 71%) u obliku bezbojne pene.

T. T. = 84 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3349, 2927, 2868, 1633, 1592, 1512, 1436, 1388, 1366, 1349, 1284, 1260, 1196, 1175, 1152, 1114, 971, 938, 864, 800, 735, 640 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,39 (s, 1H, HetAr–H₂), 7,38 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,39 (s, 1H, HetAr–H₆), 6,27 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 3,84 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,59 (t, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,97–2,92 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,95 (quint, J = 5,8 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,84 (dt, J_1 = 12,1 Hz, J_2 = 3,1 Hz, 1H), 1,78–1,71 (m, 2H), 1,67–1,53 (m, 4H), 1,47–1,37 (m, 3H), 1,37 (s, 3H, Me), 1,36–1,31 (m, 1H), 1,24 (s, 2H), 1,23–1,18 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,14–1,09 (m, 1H), 1,01–0,87 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

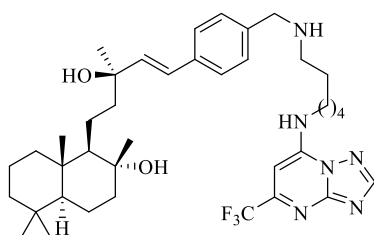
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 155,7; 155,0; 152,4 (q, $^2J_{C-F}$ = 35,5 Hz); 148,6; 138,4; 137,5; 136,9; 129,1; 126,5; 126,0; 120,9 (q, $^1J_{C-F}$ = 275,7 Hz); 84,3; 75,0; 73,6; 61,6; 56,2; 53,7; 47,8; 45,3; 44,4; 42,1; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 33,3; 29,8; 27,5; 26,8; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + Na]⁺ izračunato za C₃₆H₅₁F₃N₆O₂Na⁺ 679,39178; detektovano 679,39007.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda D: $t_R = 8,018$ min, površina 96,40%; metoda F: $t_R = 6,136$ min, površina 95,18%.

$[\alpha]^{20}_D = + 6,5$ (c 0,26, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R*,*E*)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-(((6-((5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)amino)heksil)amino)metil)fenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (86r)



Primenom opšte procedure **G** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **81** (40 mg, 0,097 mmol) i **90e** (32 mg, 0,107 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **86r** 65 mg, 96%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 84 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3304, 2928, 2862, 1631, 1593, 1511, 1434, 1387, 1349, 1282, 1260, 1195, 1147, 1113, 1030, 996, 970, 908, 862, 798, 753, 731, 679, 640, 606, 563 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,32$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,22 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,17 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,47 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH-), 6,37 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 6,19 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 4,45 (s, 4H, 2 × -OH, 2 × -NH), 3,74 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,41 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-HetAr), 2,60 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 1,80–1,60 (m, 5H), 1,59–1,45 (m, 6H), 1,41–1,27 (m, 8H), 1,27 (s, 3H), 1,15–1,07 (m, 2H), 1,08 (s, 3H, **Me**), 1,08–0,98 (m, 1H), 0,91–0,79 (m, 2H), 0,77 (s, 3H, **Me**), 0,69 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 155,8; 155,0; 152,5$ (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35,7$ Hz); 148,7; 138,7; 137,0; 135,8; 129,1; 126,6; 125,8; 120,81 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276,0$ Hz); 84,44 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,7$ Hz); 74,9; 73,4; 61,7; 56,2; 52,4; 47,8; 45,3; 44,3; 42,6; 42,1; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 28,5; 28,2; 27,2; 26,5; 26,4; 24,3; 21,5; 20,6; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

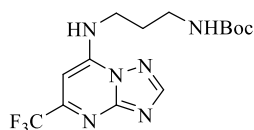
HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ izračunato za $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}^+$ 721,43873; detektovano 721,43762.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda D: $t_R = 8,077$ min, površina 98,65%; metoda F: $t_R = 6,153$ min, površina 99,15%.

$[\alpha]^{20}_D = + 8,3$ (c 0,12, MeOH)

***N*'-(5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)propan-1,3-diamin (89a)**

Nukleofilna supstitucija (**88a**):



U reakcionom balonu je dodati su jedinjenja **85c** (126 mg, 0,566 mmol, 1,0 ekv.) i apsolutni EtOH (2 mL), nakon čega je uz mešanje, u porcijama dodat *tert*-butil-(3-aminopropil)karbammat (148 mg, 0,849 mmol, 1,5 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 2 časa, nakon čega su rastvarači uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod **88a** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO_2 : EtOAc) u obliku bezbojne čvrste supstance (149 mg, 73%).

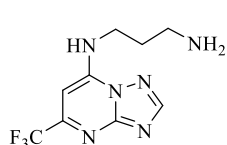
T. T. = 134 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3363, 2981, 2936, 1682, 1639, 1597, 1515, 1440, 1393, 1367, 1352, 1319, 1284, 1259, 1196, 1162, 1140, 1040, 1004, 963, 919, 867, 801, 725, 712, 638, 610, 572, 536 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,43$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,72 (b rs, 1H, HetAr-NH-CH₂-), 6,46 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 5,02 (t, $J = 6,2 \text{ Hz}$, 1H, -CH₂-NHCOO-), 3,61 (q, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 3,33 (q, $J = 6,4 \text{ Hz}$, 2H, -CH₂-CH₂-NHBoc), 1,91 (quint, $J = 6,7 \text{ Hz}$, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,45 (s, 9H, -NHCOO-C(CH₃)₃) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 157,2; 156,1; 155,1; 152,5$ (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35,5 \text{ Hz}$); 120,8 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 275,8 \text{ Hz}$); 84,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,7 \text{ Hz}$); 80,2; 39,7; 37,2; 29,7; 28,5 ppm.

Boc-deprotekcija (**89a**):



U reakcioni balon dodati su redom jedinjenje **88a** (50 mg, 0,139 mmol, 1,0 ekv.), CH_2Cl_2 (2 mL) i TFA (531 μL , 6,94 mmol, 50 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega je dodat zasićeni rastvor amonijaka u metanolu do potpune neutralizacije TFA. Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod **89a** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 7/3) = 9/1) u obliku žućkaste, čvrste supstance (29 mg, 80%).

T. T. = 151 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3067, 2902, 2135, 1888, 1673, 1473, 1438, 1195, 1143, 1088, 842, 802, 726, 601, 518, 410 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,38$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 6,41 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 3,64 (t, $J = 6,1 \text{ Hz}$, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 3,14–3,01 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 1,93 (quint, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 155,9; 155,2; 152,4$ (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35,5 \text{ Hz}$); 148,6; 120,9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 275,8 \text{ Hz}$); 84,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,9 \text{ Hz}$); 43,4; 41,2; 29,4 ppm.

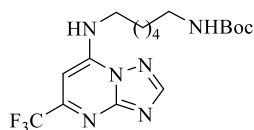
HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{F}_3^+$ 261,10701; detektovano

261,10694.

HPLC čistoća ($\lambda = 320 \text{ nm}$) metoda C: $t_R = 5,663 \text{ min}$, površina 99,34%; metoda E: $t_R = 4,224 \text{ min}$, površina 99,47%.

N-(5-(trifluorometil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)heksan-1,6-diamin (**89b**)

Nukleofilna supstitucija (**88b**):



U reakcioni balon je dodati su jedinjenje **85c** (100 mg, 0,449 mmol, 1,0 ekv.) i apsolutni EtOH (2 mL), nakon čega je, uz mešanje, u porcijama dodat *tert*-butil-(6-aminoheksil)karbammat (146 mg, 0,674 mmol, 1,5 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 2 časa, nakon čega su rastvarači uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod **88b** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO_2 : EtOAc) u obliku žućkaste, čvrste supstance (142 mg, 79%).

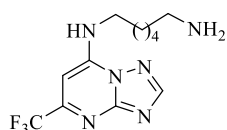
T. T. = 76 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3370, 2983, 2940, 2874, 1688, 1640, 1593, 1520, 1482, 1437, 1390, 1366, 1345, 1279, 1252, 1220, 1167, 1112, 1049, 995, 977, 925, 870, 780, 726, 712, 680, 639, 608 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,40 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,06 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H, HetAr-NH-CH₂-), 6,45 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 4,63 (s, 1H, -CH₂-NHCOO-), 3,52 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 3,11 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NHBoc), 1,80 (quint, *J* = 7,2 Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 1,54–1,44 (m, 4H, 2 × -CH₂-), 1,41 (s, 9H, -NHCOO-C(CH₃)₃), 1,38–1,33 (m, 2H, -CH₂-) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 156,2; 155,9; 155,0; 152,5 (q, ²*J*_{C-F} = 35,9 Hz); 148,6; 120,8 (q, ¹*J*_{C-F} = 275,8 Hz); 84,4 (q, ³*J*_{C-F} = 2,7 Hz); 79,2; 42,6; 40,2; 30,1; 28,7; 26,2; 26,1; 26,1 ppm.

Boc-deprotekcija (**89b**):



U reakcioni balon dodati su redom jedinjenje **88b** (80 mg, 0,199 mmol, 1,0 ekv.), CH₂Cl₂ (2 mL) i TFA (761 μL, 9,95 mmol, 50 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega je dodat zasićeni rastvor amonijaka u metanolu do potpune neutralizacije TFA. Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod **89b** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO₂: EtOAc/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 9/1) u obliku žućkaste, čvrste supstance (52 mg, 86%).

T. T. = 119 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3065, 2904, 2138, 1884, 1675, 1475, 1437, 1193, 1128, 952, 841, 802, 724, 601, 518, 410 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + CD₃OD): δ = 8,30 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 6,41 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 3,44 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 2,61 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 1,73 (quint, *J* = 7,3 Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 1,47–1,30 (m, 6H, 3 × -CH₂-) ppm.

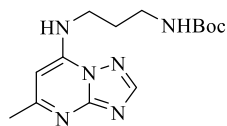
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃ + CD₃OD): δ = 155,4; 154,9; 152,4 (q, ²*J*_{C-F} = 35,8 Hz); 148,7; 120,7 (q, ¹*J*_{C-F} = 275,7 Hz); 84,5 (q, ³*J*_{C-F} = 2,7 Hz); 42,6; 41,3; 32,6; 28,5; 26,4; 26,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) *m/z*: [M + H]⁺ izračunato za C₁₂H₁₈N₆F₃⁺ 303,15396; detektovano 303,15368.

HPLC čistoća (λ = 320 nm) metoda C: t_R = 7,123 min, površina 97,14%; metoda E: t_R = 4,779 min, površina 98,73%.

*N*¹-(5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-7-il)propan-1,3-diamin (**89c**)

Nukleofilna supstitucija (**88c**):



U reakcioni balon, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodati su jedinjenje **85a** (111 mg, 0,658 mmol, 1,0 ekv.), *tert*-butil-(3-aminopropil)karbammat (115 mg, 0,658 mmol, 1,0 ekv.), K₂CO₃ (109 mg, 0,790 mmol, 1,2 ekv.) i 1,4-dioksan (3,4 mL). Reakciona smeša je potom zagrevana u uljanom kupatilu na temperaturi ključanja rastvarača tokom 3 časa. Nakon hlađenja do sobne temperature, sadržaj balona je proceden, a talog je ispran 1,4-dioksanom. Talog je odbačen, a spojeni filtrati su koncentrovani uklanjanjem rastvarača pod sniženim pritiskom. Proizvod **88c** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 95/5) u obliku bezbojne, čvrste supstance (185 mg, 92%).

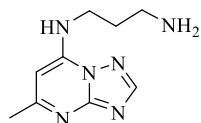
T. T. = 151 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3353, 3253, 3114, 3050, 2970, 2924, 2480, 2386, 1695, 1626, 1587, 1499, 1462, 1437, 1416, 1389, 1365, 1340, 1312, 1278, 1251, 1236, 1194, 1140, 1083, 1036, 1014, 956, 926, 901, 868, 801, 813, 785, 770, 754, 705, 680, 638, 595, 547, 476 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,26$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 7,17 (s, 1H, HetAr-NH-CH₂-), 5,96 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 5,53 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, -CH₂-NHCOO), 3,48 (q, $J = 6,4$ Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 3,27 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NHBoc), 2,51 (s, 3H, **Me**-HetAr), 1,88 (quint, $J = 6,5$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,40 (s, 9H, -NHCOO-C(CH₃)₃) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 164,9; 156,8; 155,6; 154,5; 147,2; 87,7; 79,5; 39,4; 37,4; 29,3; 28,5; 25,4$ ppm.

Boc-deprotekcija (**89c**):



U reakcioni balon dodati su redom jedinjenje **88c** (50 mg, 0,163 mmol, 1,0 ekv.), CH_2Cl_2 (2 mL) i TFA (624 μL , 8,15 mmol, 50 ekv.). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, nakon čega je dodat zasićeni rastvor amonijaka u metanolu do potpune neutralizacije TFA. Rastvarači su uklonjeni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod **89c** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO_2 : EtOAc/(MeOH/ $\text{NH}_3(\text{aq})$ 9/1) = 9/1) u obliku žućkaste, čvrste supstance (31 mg, 92%).

T. T. = 228 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3590, 3062, 2973, 2642, 1628, 1587, 1508, 1476, 1435, 1373, 1340, 1315, 1298, 1253, 1203, 1189, 1157, 1146, 1061, 959, 935, 895, 822, 769, 723, 683, 641, 610, 549, 499, 410 \text{ cm}^{-1}$.

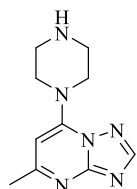
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,20$ (s, 1H, HetAr-**H**₂), 5,97 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 3,48 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, HetAr-NH-CH₂-CH₂-), 2,93 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH₂), 2,51 (s, 3H, **Me**-HetAr), 1,86 (quint, $J = 6,4$ Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 165,0; 155,5; 154,3; 147,3; 87,8; 41,4; 40,0; 30,5; 25,2$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_6^+$ 207,13527; detektovano 207,13509.

HPLC čistoća ($\lambda = 320$ nm) metoda C: $t_R = 6,454$ min, površina 98,60%; metoda E: $t_R = 4,642$ min, površina 98,56%.

5-metil-7-(piperazin-1-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin (**89d**)



U reakcioni balon, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodati su jedinjenje **85a** (51 mg, 0,302 mmol, 1,0 ekv.), piperazin (26 mg, 0,302 mmol, 1,0 ekv.), K_2CO_3 (50 mg, 0,362 mmol, 1,2 ekv.) i 1,4-dioksan (1,5 mL). Reakciona smeša je zagrevana u uljanom kupatilu na temperaturi ključanja rastvarača tokom 3 časa. Nakon hlađenja do sobne temperature, sadržaj balona je proceden, a talog je ispran 1,4-dioksanom. Talog je odbačen, a spojeni filtrati su koncentrovani uklanjanjem rastvarača pod sniženim pritiskom. Proizvod **89d** je dobijen kao žuta, čvrsta supstanca (56 mg, 85%).

T. T. = 198 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3362, 2923, 2722, 1653, 1606, 1547, 1372, 1331, 1305, 1271, 1218, 1205, 1127, 1057, 993, 831, 813, 772, 690, 648, 565, 455 \text{ cm}^{-1}$.

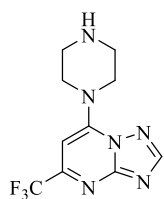
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8,28 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 6,13 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 3,79–3,74 (m, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)-N-), 3,15–3,06 (m, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)-NH), 2,57 (s, 3H, Me-HetAr) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 165,0; 157,4; 154,3; 150,6; 94,6; 49,3; 45,7; 25,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_6^+$ 219,13527; detektovano 219,13534.

HPLC čistoća (λ = 280 nm) metoda D: t_R = 4,590 min, površina 98,35%; metoda E: t_R = 10,780 min, površina 99,44%.

7-(piperazin-1-il)-5-(trifluormetil)-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (**89d**)



U reakcionom balonu su dodati jedinjenje **85c** (48 mg, 0,216 mmol, 1,0 ekv.) i apsolutni EtOH (1 mL). Zatim je tokom 10 minuta, uz mešanje, ukapavan rastvor piperazina (37 mg, 0,432 mmol, 2,0 ekv.) u apsolutnom EtOH (1 mL). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 3 časa, nakon čega je rastvarač uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dobijeni suvi ostatak je raspoređen između slojeva CH_2Cl_2 i vode. Organski sloj je odvojen, dok je vodeni sloj je ekstrahovan CH_2Cl_2 (2×20 mL). Spojeni organski ekstrakti su osušeni iznad anhidrovanog MgSO_4 , nakon čega je rastvarač uklonjen pod sniženim pritiskom. Proizvod **89d** je dobijen nakon *dry-flash* hromatografije na stubu (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1) u obliku žute, amorfne supstance (37 mg, 63%).

T. T. = 159 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3305, 3110, 3052, 2921, 2853, 1610, 1563, 1445, 1329, 1296, 1246, 1216, 1195, 1163, 1140, 1016, 951, 896, 825, 808, 791, 769, 708, 670, 638, 616, 595, 540, 470 cm^{-1} .

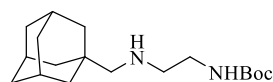
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,39 (s, 1H, HetAr-**H**₂), 6,54 (s, 1H, HetAr-**H**₆), 4,04–3,97 (m, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)-N-), 3,15–3,08 (m, 4H, HetAr-N-(CH₂-CH₂)-NH), 1,98 (s, 1H, -NH-) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 157,0; 155,4; 152,1 (q, $^2J_{\text{C-F}}$ = 35,7 Hz); 151,1; 120,8 (q, $^1J_{\text{C-F}}$ = 275,9 Hz); 89,8 (q, $^3J_{\text{C-F}}$ = 2,7 Hz); 49,8; 45,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_6^+$ 273,10701; detektovano 273,10695.

HPLC čistoća (λ = 320 nm) metoda C: t_R = 7,123 min, površina 97,14%; metoda E: t_R = 4,779 min, površina 98,73%.

tert-butil (2-(((adamantan-1-il)metil)amino)etil)karbammat (**93a**)



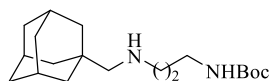
Primenom opšte procedure **H** za reduktivno aminovanje, polazeći od adamantan-1-karbaldehida (57 mg, 0,353 mmol) i *N*-Boc-1,2-diaminoetana (68 mg, 0,424 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **93a** (74 mg, 66%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3351, 2976, 2902, 2847, 1715, 1522, 1453, 1391, 1366, 1272, 1251, 1174, 1042, 987, 866, 779 cm^{-1} .

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,04 (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,33–3,26 (m, 1H, –CH₂–NH–CH₂–), 3,16 (q, J = 6,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHBoc), 2,65 (t, J = 6,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,18 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,93–1,89 (m, 3H, 3 $\times$ –CH (Ad)), 1,73–1,56 (m, 6H, 3 $\times$ –CH₂ (Ad)), 1,46 (s, 6H, 3 $\times$ –CH₂ (Ad)), 1,40 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 156,3; 79,1; 62,3; 50,0; 40,9; 37,3; 33,5; 28,5; 28,4 ppm.

terc-butil (3-(((adamantan-1-il)metil)amino)propil)karbamat (93b)



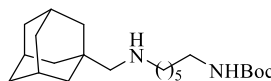
Primenom opšte procedure **H** za reduktivno aminovanje, polazeći od adamantan-1-karbaldehida (63 mg, 0,384 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (80 mg, 0,460 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **93b** (102 mg, 82%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3342, 2975, 2902, 2847, 2658, 1700, 1516, 1453, 1391, 1365, 1346, 1275, 1252, 1174, 1116, 1065, 1049, 870, 780 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,06 (s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,17 (q, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHBoc), 2,64 (t, J = 6,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,18 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,92 (s, 3H, 3 $\times$ –CH (Ad)), 1,71–1,60 (m, 6H, 3 $\times$ –CH₂ (Ad)), 1,60–1,55 (m, 2H, –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,48 (br s, 6H, 3 $\times$ –CH₂ (Ad)), 1,38 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 156,3; 78,6; 62,8; 49,7; 40,9; 40,4; 37,3; 33,3; 28,8; 28,5; 28,5 ppm.

terc-butil (6-(((adamantan-1-il)metil)amino)heksil)karbamat (93c)



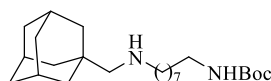
Primenom opšte procedure **H** za reduktivno aminovanje, polazeći od adamantan-1-karbaldehida (80 mg, 0,487 mmol) i *N*-Boc-1,6-diaminoheksana (126 mg, 0,584 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2), dobijen je proizvod **93c** (148 mg, 83%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3350, 2904, 2486, 1736, 1667, 1563, 1452, 1362, 1345, 1316, 1121 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,70 (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,02 (q, J = 6,7 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHBoc), 2,47 (t, J = 7,3 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,15 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,96–1,82 (m, 3H, 3 $\times$ –CH (Ad)), 1,68–1,53 (m, 6H, 3 $\times$ –CH₂ (Ad)), 1,44 (s, 6H, 3 $\times$ –CH₂ (Ad)), 1,42–1,37 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–CH₂–NH–), 1,36 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,28–1,22 (m, 4H, –CH₂–CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 156,0; 78,8; 63,0; 51,0; 40,9; 40,5; 37,2; 33,3; 30,0; 29,8; 28,5; 28,4; 27,0; 26,7 ppm.

terc-butil (8-(((adamantan-1-il)metil)amino)oktil)karbamat (93d)



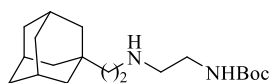
Primenom opšte procedure **H** za reduktivno aminovanje, polazeći od adamantan-1-karbaldehida (92 mg, 0,560 mmol) i *N*-Boc-1,8-diaminooktana (164 mg, 0,672 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH₃(aq)) 9/1 = 95/5), dobijen je proizvod **93d** (195 mg, 89%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3343, 2975, 2903, 2849, 1697, 1528, 1453, 1391, 1365, 1273, 1251, 1174, 1041, 1001, 870, 779 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 4,54$ (s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NHCOO}-$), 3,07 (q, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 2,53 (t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 2,22 (s, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,99–1,92 (m, 3H, $3 \times -\text{CH}$ (Ad)), 1,74–1,58 (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), 1,50 (s, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), 1,48–1,43 (m, 4H, $2 \times -\text{CH}_2-$), 1,42 (s, 9H, $-\text{NHCOO}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,36–1,24 (m, 8H, $4 \times -\text{CH}_2-$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 156,1; 79,1; 63,2; 51,2; 41,1; 37,4; 33,4; 30,2; 30,0; 29,6; 29,4; 28,6; 28,5; 27,4; 26,9 \text{ ppm}$.

terc-butil (2-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)etil)karbamat (93e)



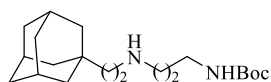
Primenom opšte procedure **I** za reduktivno aminovanje, polazeći od 2-(1-adamantil)etanala (90 mg, 0,505 mmol) i *N*-Boc-1,2-diaminoetana (162 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2), dobijen je proizvod **93e** (120 mg, 74%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3338, 2975, 2903, 2846, 1700, 1521, 1451, 1391, 1365, 1273, 1251, 1174, 1045, 988, 870, 779 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 5,11$ (s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NHCOO}-$), 3,17 (q, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 2,68 (t, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 2,62–2,50 (m, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,92–1,84 (m, 3H, $3 \times -\text{CH}$ (Ad)), 1,69–1,52 (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), 1,44 (d, $J = 3,1 \text{ Hz}$, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), 1,40 (s, 9H, $-\text{NHCOO}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,27–1,16 (m, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 156,2; 79,1; 49,4; 44,6; 44,0; 42,7; 37,2; 31,9; 28,7; 28,5 \text{ ppm}$.

terc-butil (3-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)propil)karbamat (93f)

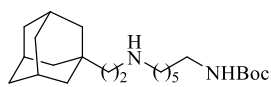


Primenom opšte procedure **I** za reduktivno aminovanje, polazeći od 2-(1-adamantil)etanala (95 mg, 0,533 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (186 mg, 1,07 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2), dobijen je proizvod **93f** (158 mg, 88%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3346, 2907, 2848, 1701, 1518, 1453, 1391, 1366, 1275, 1252, 1175, 870, 779 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 5,16$ (s, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NHCOO}-$), 3,17 (t, $J = 6,6 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 2,66 (t, $J = 6,7 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 2,61–2,53 (m, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,95–1,86 (m, 3H, $3 \times -\text{CH}$ (Ad)), 1,71–1,56 (m, 5H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,46 (d, $J = 3,2 \text{ Hz}$, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), 1,41 (s, 9H, $-\text{NHCOO}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,31–1,20 (m, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 156,3; 79,1; 47,6; 44,3; 44,2; 42,7; 39,1; 37,2; 32,0; 29,8; 28,8; 28,5 \text{ ppm}$.

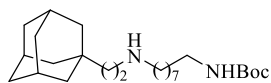
tert-butil (6-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)heksil)karbamat (93g)

Primenom opšte procedure **I** za reduktivno aminovanje, polazeći od 2-(1-adamantil)etanala (90 mg, 0,505 mmol) i *N*-Boc-1,6-diaminoheksana (218 mg, 1,01 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 7/3), dobijen je proizvod **93g** (153 mg, 80%) u obliku bezbojnog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3344, 2906, 2848, 1697, 1523, 1452, 1390, 1365, 1273, 1251, 1174, 1041, 869, 779 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 4,58$ (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,06 (q, $J = 6,7$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHBoc), 2,59–2,52 (m, 4H, Ad–CH₂–CH₂–NH–CH₂–), 1,93–1,86 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,70–1,55 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,50–1,47 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,46–1,41 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,40 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,32–1,26 (m 4H, 2 × –CH₂–), 1,26–1,20 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 156,1; 79,0; 50,1; 44,7; 44,4; 42,7; 37,3; 31,9; 30,1; 30,0; 28,8; 28,5; 27,1; 26,8; 26,4$ ppm.

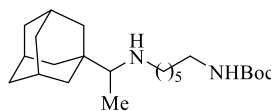
tert-butil (8-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)oktil)karbamat (93h)

Primenom opšte procedure **I** za reduktivno aminovanje, polazeći od 2-(1-adamantil)etanala (60 mg, 0,337 mmol) i *N*-Boc-1,8-diaminooktan (164 mg, 0,673 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 7/3), dobijen je proizvod **93h** (104 mg, 76%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3353, 2975, 2903, 2849, 1700, 1525, 1453, 1391, 1365, 1346, 1272, 1250, 1174, 1042, 1000, 870, 779 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 4,53$ (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,07 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHBoc), 2,62–2,52 (m, 4H, Ad–CH₂–CH₂–NH–CH₂–), 1,94–1,88 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,72–1,58 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,48 (d, $J = 3,1$ Hz, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,47–1,43 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,42 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,31–1,22 (m, 10H, 4 × CH₂, Ad–CH₂–CH₂–NH–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 156,1; 79,1; 50,3; 44,7; 44,4; 42,8; 40,7; 37,3; 32,0; 30,2; 29,6; 29,3; 28,8; 28,6; 27,5; 26,9$ ppm.

tert-butil (6-((1-(adamantan-1-il)etil)amino)heksil)karbamat (93i)

Primenom opšte procedure **H** za reduktivno aminovanje, polazeći od adamantil-metil-ketona (77 mg, 0,432 mmol) i *N*-Boc-1,6-diaminoheksana (112 mg, 0,518 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **93i** (121 mg, 74%) u obliku žutog ulja.

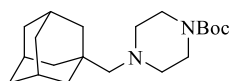
IC (ATR): $\nu = 3344, 2974, 2907, 2850, 1710, 1527, 1452, 1392, 1365, 1273, 1251, 1175, 1079, 1042, 1013, 870, 778, 650 \text{ cm}^{-1}$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 4,54$ (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,27 (br s, 1H, –CH₂–NH–CH₂–), 3,08 (dd, $J_1 = 12,9$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHBoc), 2,78 (dt, $J_1 = 11,6$ Hz, $J_2 = 7,4$ Hz, 1H, Ad–CH(Me)–NH–CH₂–CH₂–), 2,46 (dt, $J_1 = 11,6$ Hz, $J_2 = 7,4$ Hz, 1H, Ad–CH(Me)–NH–CH₂–

CH₂–), 2,13 (q, $J = 6,4$ Hz, 1H, Ad–CH(Me)–NH–), 1,99–1,93 (m, 3H, $3 \times$ –CH (Ad)), 1,74–1,55 (m, 10H), 1,53–1,45 (m, 6H), 1,42 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,35–1,27 (m, 4H, $2 \times$ –CH₂–), 0,99 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, –CH–Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 156,0; 79,0; 62,7; 48,2; 40,5; 38,5; 37,1; 35,8; 30,0; 29,1; 28,4; 28,1; 26,9; 26,6; 12,9$ ppm.

tert-butil 4-((adamantan-1-il)metil)piperazin-1-karboksilat (93j)



Primenom opšte procedure **H** za reduktivno aminovanje, polazeći od adamantan-1-karbaldehida (100 mg, 0,609 mmol) i 1-Boc-piperazina (136 mg, 0,731 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 8/2), dobijen je proizvod

93j (145 mg, 71%) u obliku bezbojnog praha.

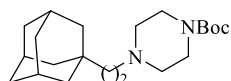
T. T. = 92 °C

IC (ATR): $\nu = 2976, 2901, 2847, 2676, 1696, 1475, 1455, 1419, 1365, 1321, 1289, 1267, 1242, 1175, 1125, 1105, 1086, 1011, 866, 794, 772, 588, 532$ cm^{–1}.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 3,35$ (t, $J = 4,9$ Hz, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–NBoc), 2,38 (t, $J = 5,2$ Hz, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–NBoc), 1,94–1,87 (m, 5H, $3 \times$ –CH (Ad), Ad–CH₂–N–), 1,70–1,55 (m, 6H, $3 \times$ –CH₂ (Ad)), 1,46–1,44 (m, 6H, $3 \times$ –CH₂ (Ad)), 1,42 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 155,0; 79,4; 71,1; 55,8; 41,0; 37,3; 35,1; 28,6; 28,5$ ppm.

tert-butil 4-(2-(adamantan-1-il)etil)piperazin-1-karboksilat (93k)



Primenom opšte procedure **I** za reduktivno aminovanje, polazeći od 2-(1-adamantil)etanala (63 mg, 0,353 mmol) i 1-Boc-piperazina (132 mg, 0,707 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 7/3), dobijen je proizvod

93k (95 mg, 77%) u obliku bezbojnog praha.

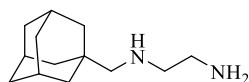
T. T. = 86 °C

IC (ATR): $\nu = 2975, 2903, 2847, 2814, 1700, 1451, 1420, 1365, 1344, 1286, 1247, 1173, 1125, 1004, 869, 770$ cm^{–1}.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 3,38$ (t, $J = 5,2$ Hz, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–NBoc), 2,37–2,25 (m, 6H, –N–(CH₂–CH₂)₂–NBoc, Ad–CH₂–CH₂–N–), 1,89 (s, 3H, $3 \times$ –CH (Ad)), 1,70–1,53 (m, 6H, $3 \times$ –CH₂ (Ad)), 1,44 (d, $J = 2,9$ Hz, 6H, $3 \times$ –CH₂ (Ad)), 1,41 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,26–1,19 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) $\delta = 154,8; 79,6; 53,2; 52,9; 42,6; 40,9; 37,2; 31,8; 28,7; 28,5$ ppm.

N-((adamantan-1-il)metil)etan-1,2-diamin (94a)



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93a** (75 mg, 0,243 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH₃(aq) 9/1) = 7/3), dobijen je proizvod **94a** (41 mg, 81%) u obliku žutog ulja.

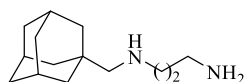
IC (ATR): $\nu = 3305, 2902, 2847, 1667, 1572, 1452, 1346, 1153, 1104 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 2,78$ (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,64$ (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,23$ (s, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,21$ (br s, 3H, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$), $1,97-1,91$ (m, 3H, $3 \times -\text{CH}$ (Ad)), $1,73-1,59$ (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), $1,51$ (d, $J = 3,3$ Hz, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 62,7; 53,1; 41,3; 41,0; 37,3; 33,6; 28,6$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2^+$ 209,20123; detektovano 209,20118.

***N*-((adamantan-1-il)metil)propan-1,3-diamin (94b)**



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93b** (98 mg, 0,304 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_{3(aq)} 9/1) = 7/3$), dobijen je proizvod **94b** (66 mg, 98%) u

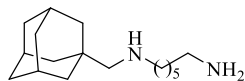
obliku žutog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3299, 2902, 2846, 1736, 1667, 1563, 1452, 1362, 1345, 1316, 1121 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 2,76$ (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,64$ (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,23$ (s, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{NH}-$), $1,95$ (s, 3H, $3 \times -\text{CH}$ (Ad)), $1,74-1,63$ (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), $1,63-1,59$ (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), $1,51$ (d, $J = 3,2$ Hz, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), $1,48$ (br s, 3H, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 63,3; 49,2; 41,1; 40,9; 37,4; 33,8; 33,5; 28,6$ ppm.

***N*-((adamantan-1-il)metil)heksan-1,6-diamin (94c)**



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93c** (112 mg, 0,307 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_{3(aq)} 9/1) = 7/3$), dobijen je proizvod **94c** (76 mg, 94%) u

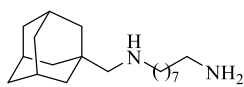
obliku žutog ulja.

IC (ATR): $\nu = 3289, 2904, 2848, 1660, 1559, 1453, 1376, 1315, 1201, 1153, 1121, 721 \text{ cm}^{-1}$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 2,92$ (br s, 3H, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$), $2,67$ (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,54$ (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $2,22$ (s, 2H, Ad- $\text{CH}_2-\text{NH}-$), $1,96-1,91$ (m, 3H, $3 \times -\text{CH}$ (Ad)), $1,71-1,58$ (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), $1,49$ (d, $J = 3,3$ Hz, 6H, $3 \times -\text{CH}_2$ (Ad)), $1,48-1,40$ (m, 4H, $2 \times -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), $1,33-1,24$ (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 63,0; 51,0; 41,7; 41,0; 37,3; 33,4; 32,8; 29,7; 28,6; 27,2; 26,8$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_2^+$ 265,26383; detektovano 265,26357.

N-((adamantan-1-il)metil)oktan-1,8-diamin (94d)

Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93d** (195 mg, 0,495 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 7/3), dobijen je proizvod **94d** (131 mg, 90%) u

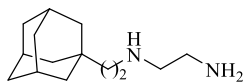
obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3279, 2913, 2848, 1658, 1562, 1511, 1452, 1362, 1345, 1316, 1221, 1153, 1118, 830, 748 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 2,66 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,54 (t, J = 7,4 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,22 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,98–1,93 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,74–1,59 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,51 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,51–1,40 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,36–1,23 (m, 8H, 4 × –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 63,1; 51,2; 42,2; 41,1; 37,4; 33,7; 33,4; 30,0; 29,6; 29,5; 28,6; 27,4; 26,9 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₉H₃₇N₂⁺ 293,29513; detektovano 293,29481.

N-((adamantan-1-il)etil)etan-1,2-diamin (94e)

Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93e** (105 mg, 0,326 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **94e** (62 mg, 86%) u

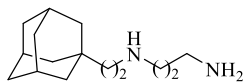
obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3350, 2904, 2847, 1661, 1568, 1451, 1346, 1317, 1265, 1202, 1106, 813, 737, 702 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,84–2,77 (m, 5H, –CH₂–CH₂–NH–, –NH, –NH₂), 2,68 (t, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,65–2,54 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–), 1,92–1,85 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,67–1,53 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,44 (d, J = 3,2 Hz, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,30–1,22 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 52,0; 44,1; 44,0; 42,6; 41,1; 37,2; 31,9; 28,7; 28,7 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₄H₂₇N₂⁺ 223,21688; detektovano 223,21691.

N-((adamantan-1-il)etil)propan-1,3-diamin (94f)

Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93f** (190 mg, 0,565 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **94f** (118 mg, 88%) u

obliku žutog ulja.

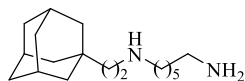
IC (ATR): ν = 3374, 2905, 2848, 1684, 1564, 1451, 1388, 1124, 735 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,80–2,65 (m, 7H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–, –NH, –NH₂), 2,61–2,55 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–), 1,95–1,89 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,71–1,57 (m, 8H, 3 × –CH₂ (Ad), –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,47 (d, J = 3,1 Hz, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,28–1,21 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 48,1; 44,6; 44,5; 42,8; 40,6; 37,3; 33,4; 32,0; 28,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_2^+$ 237,23225; detektovano 237,2225.

N-((adamantan-1-il)metil)heksan-1,6-diamin (94g)



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93g** (80 mg, 0,211 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **94g** (51 mg, 88%) u obliku žutog ulja.

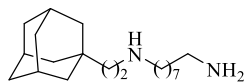
IC (ATR): ν = 3289, 2903, 2847, 1689, 1451, 1346, 1316, 1202, 176, 1132, 832, 800, 721 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 2,66 (t, J = 6,9 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 2,62–2,57 (m, 4H, $2 \times -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 2,31 (br s, 3H, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$), 1,93–1,88 (m, 3H, $3 \times -\text{CH}(\text{Ad})$), 1,70–1,56 (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2(\text{Ad})$), 1,55–1,49 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{NH}-$), 1,46 (d, J = 3,2 Hz, 6H, $3 \times -\text{CH}_2(\text{Ad})$), 1,44–1,38 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,34–1,22 (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2-$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 50,0; 44,3; 42,8; 42,1; 37,3; 33,4; 32,0; 29,8; 28,8; 27,3; 26,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_2^+$ 279,27948; detektovano 279,27923.

N-((adamantan-1-il)etil)oktan-1,8-diamin (94h)



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93h** (90 mg, 0,221 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **94h** (61 mg, 90%) u obliku žutog ulja.

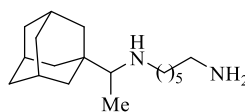
IC (ATR): ν = 3271, 2904, 2848, 1661, 1563, 1451, 1346, 1316, 1201, 1123, 1039, 813, 734 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 3,01 (br s, 3H, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$), 2,71–2,56 (m, 6H, $3 \times -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,91 (br s, 3H, $3 \times -\text{CH}(\text{Ad})$), 1,70–1,57 (m, 3H, $3 \times -\text{CH}_2(\text{Ad})$), 1,53–1,40 (m, 4H, $2 \times -\text{CH}_2-$), 1,47 (d, J = 3,3 Hz, 1H, $3 \times -\text{CH}_2(\text{Ad})$), 1,32–1,29 (m, 10H, $5 \times -\text{CH}_2-$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 49,8; 44,1; 43,9; 42,7; 42,0; 37,2; 33,2; 31,9; 29,5; 29,5; 29,4; 28,8; 27,3; 26,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_2^+$ 307,31078; detektovano 307,31015.

N-(1-(adamantan-1-il)etil)heksan-1,6-diamin (94i)



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93i** (110 mg, 0,291 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ 9/1) = 6/4), dobijen je proizvod **94i** (64 mg, 79%) u obliku žutog ulja.

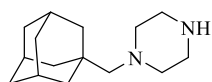
IC (ATR): ν = 3308, 2904, 2848, 1666, 1566, 1450, 1375, 1345, 1118, 731 cm^{-1} .

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,70 (dt, J_1 = 14,1 Hz, J_2 = 5,6 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,56–2,35 (m, 5H, –CH₂–CH₂–NH–, –NH–, –NH₂), 2,05 (q, J = 6,5 Hz, 1H, Ad–CH(Me)–NH–), 1,99–1,92 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,72–1,54 (m, 10H), 1,52–1,43 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,36–1,27 (m, 4H, 2 × CH₂), 0,94 (d, J = 6,6 Hz, 3H, CH–Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 62,8; 48,9; 41,9; 38,8; 37,4; 36,1; 33,0; 30,0; 28,7; 27,3; 26,9; 13,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₈H₃₅N₂⁺ 279,27948; detektovano 279,27926.

1-((adamantan-1-il)metil)piperazin (94j)



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93j** (87 mg, 0,260 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **94j** (60 mg, 98%) u obliku bezbojnog praha.

T. T. = 86 °C (amorfni prah)

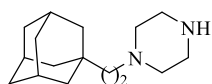
IC (ATR): ν = 3220, 2898, 2845, 1672, 1453, 1361, 1347, 1320, 1272, 1155, 1124, 1103, 1062, 1013, 860, 791, 601 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,98 (br s, 1H, –NH), 2,83 (t, J = 4,9 Hz, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,46–2,39 (m, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 1,93–1,87 (m, 5H, 3 × –CH (Ad), Ad–CH₂–NH–), 1,70–1,55 (m, 3H, 6 × –CH₂ (Ad)), 1,44 (d, J = 3,2 Hz, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 71,8; 57,1; 46,2; 41,1; 37,4; 35,1; 28,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₅H₂₇N₂⁺ 235,21688; detektovano 235,21686.

1-((adamantan-1-il)etil)piperazin (94k)



Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **93k** (94 mg, 0,270 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **94k** (63 mg, 94%) u obliku bezbojnog praha.

T. T. = 74–75 °C (amorfni prah)

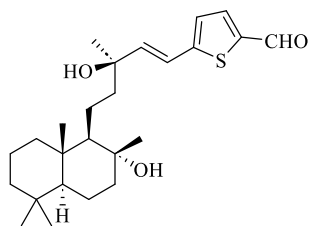
IC (ATR): ν = 3272, 2901, 2848, 2817, 2788, 2675, 1688, 1449, 1370, 1344, 1313, 1299, 1272, 1185, 1151, 1197, 1029, 954, 861, 797, 735, 630 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,87 (t, J = 4,9 Hz, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,39 (br s, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,33–2,25 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–N–), 2,15 (s, 2H), 1,93–1,88 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,71–1,56 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,47 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,29–1,21 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–N–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 54,8; 53,5; 46,1; 42,7; 40,8; 37,3; 31,9; 28,8 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₁₄H₂₇N₂⁺ 223,21688; detektovano 223,21691.

5-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)tiofen-2-karbaldehid (95a)



Primenom opšte procedure **A** za Hekovu reakciju, polazeći od sklareola **54** (100 mg, 0,324 mmol) i 5-brom-2-tiofenkarbaldehida (124 mg, 0,648 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **95a** (94 mg, 69%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3379, 3078, 2933, 2867, 1665, 1522, 1450, 1388, 1366, 1226, 1190, 1158, 1121, 1093, 1047, 996, 961, 938, 908, 841, 802, 756,

723, 695, 663, 542 cm⁻¹.

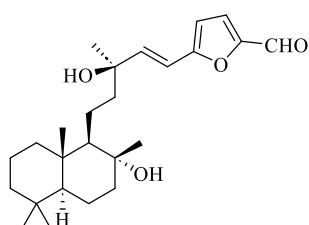
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9,79 (s, 1H, -CHO), 7,60 (d, J = 3,9 Hz, 1H, Ar-H), 6,98 (d, J = 3,9 Hz, 1H, Ar-H), 6,77 (d, J = 15,7 Hz, 1H, =CH-), 6,39 (d, J = 15,7 Hz, 1H, =CH-), 1,84 (dt, J_1 = 12,5 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,81–1,72 (m, 1H), 1,70–1,50 (m, 5H), 1,46–1,36 (m, 4H), 1,34 (s, 3H, Me), 1,24–1,20 (m, 1H), 1,16 (s, 3H, Me), 1,15–1,06 (m, 2H), 0,96–0,86 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 3H, Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 182,7; 152,8; 143,6; 141,1; 137,5; 125,9; 119,1; 75,0; 73,1; 61,3; 56,0; 44,7; 44,2; 41,9; 39,6; 39,2; 33,3; 33,2; 26,3; 24,0; 21,5; 20,4; 18,8; 18,4; 15,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M – H][–] izračunato za C₂₅H₃₇O₃S 417,24579; detektovano 417,24721. [M + CH₃COO][–] izračunato za C₂₇H₄₁O₅S[–] 477,26692; detektovano 477,26808.

[α]_D²⁰ = +52,9 ° (c 0,24, MeOH)

5-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)furan-2-karbaldehid (95b)



Primenom opšte procedure **A** za Hekovu reakciju, polazeći od sklareola **54** (50 mg, 0,162 mmol) i 5-brom-2-furaldehida (57 mg, 0,324 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 3/7), dobijen je proizvod **95b** (61 mg, 93%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3385, 2933, 2868, 1671, 1563, 1501, 1462, 1390, 1367, 1342, 1290, 1246, 1204, 1177, 1133, 1084, 1025, 997, 968, 938, 908, 845,

793, 757, 715 cm⁻¹.

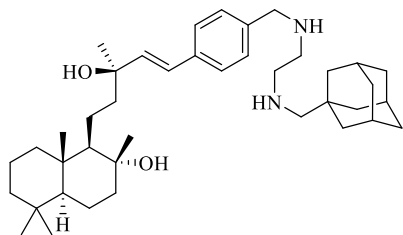
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 9,53 (s, 1H, -CHO), 7,20 (d, J = 3,6 Hz, 1H, Ar-H), 6,64 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH-), 6,53 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH-), 6,36 (d, J = 3,8 Hz, 1H, Ar-H), 3,00 (s, 2H, 2 × -OH), 1,83 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,3 Hz, 1H), 1,74–1,68 (m, 2H), 1,63–1,50 (m, 4H), 1,45–1,34 (m, 4H), 1,33 (s, 3H, Me), 1,30–1,20 (m, 1H), 1,16 (s, 3H, Me), 1,16–1,15 (m, 1H), 1,14–1,08 (m, 1H), 0,98–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 177,1; 158,9; 151,6; 144,1; 114,2; 114,2; 109,9; 75,2; 73,4; 61,5; 56,1; 44,7; 44,4; 42,0; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 26,8; 24,3; 21,6; 20,6; 18,9; 18,5; 15,4 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M – H][–] izračunato za C₂₅H₃₇O₄ 401,26864; detektovano 401,27002. [M + CH₃COO][–] izračunato za C₂₇H₄₁O₆ 461,28977; detektovano 461,29136.

[α]_D²⁰ = +73,8 ° (c 0,24, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((2-(((adamantan-1-il)metil)amino)etil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96a)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (48 mg, 0,116 mmol) i **94a** (73 mg, 0,349 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (RP SiO₂: MeOH/H₂O = 94/6), dobijen je proizvod **96a** (56 mg, 80%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 69–71 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3349, 2904, 2847, 1665, 1511, 1455, 1388, 1365, 1345, 1271, 1188, 1154, 1132, 1085, 1036, 971, 939, 909, 863, 806 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,31 (d, J = 7,6 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,57 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 3,75 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,70 (s, 4H, –NH–CH₂–CH₂–NH–), 2,20 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,95 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,82 (dt, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,74–1,67 (m, 5H), 1,66–1,54 (m, 7H), 1,51–1,48 (m, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,44–1,36 (m, 3H), 1,34 (s, 3H, Me), 1,33–1,30 (m, 1H), 1,28–1,20 (m, 1H), 1,18 (t, J = 3,8 Hz, 1H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,13–1,08 (m, 1H), 0,99–0,87 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

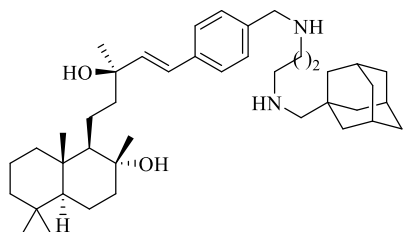
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 139,6; 137,8; 136,1; 128,5; 126,5; 126,2; 74,9; 73,5; 62,8; 61,6; 56,2; 53,7; 50,2; 48,5; 45,3; 44,4; 42,1; 41,0; 39,8; 39,3; 37,4; 33,5; 33,5; 33,3; 28,6; 27,5; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₀H₆₅N₂O₂⁺ 605,50406; detektovano 605,50349.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 6,550 min, površina 97,10%; metoda N: t_R = 6,449 min, površina 96,64%.

[α]²⁰_D = +18,9 ° (c 0,33, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((3-(((adamantan-1-il)metil)amino)propil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96b)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (59 mg, 0,143 mmol) i **94b** (95 mg, 0,429 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **96b** (73 mg, 82%) u obliku bezbojnog ulja.

IC (ATR): ν = 3359, 2904, 2847, 1675, 1568, 1512, 1457, 1414, 1388, 1366, 1346, 1346, 1270M 1201, 1132, 1100, 1037, 971, 939, 908, 862, 805, 655 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,32 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,25 (d, J = 7,7 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,58 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 3,76 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,72–2,63 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 2,22 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,94 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,87–1,79 (m, 1H), 1,78–1,76 (m, 8H), 1,66–1,53 (m, 6H), 1,49 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,46–1,38 (m, 3H), 1,37 (s, 3H, Me), 1,33 (s, 1H), 1,25 (s, 1H), 1,22 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 0,99–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,78 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

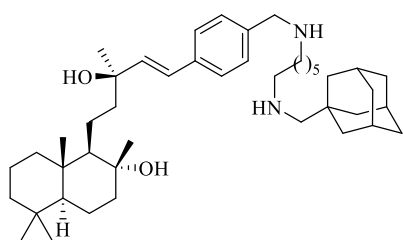
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,4; 137,4; 135,9; 128,3; 126,4; 126,3; 74,8; 73,6; 63,0; 61,4; 56,1; 53,8; 49,8; 48,3; 45,2; 44,4; 42,0; 40,9; 39,7; 39,2; 37,2; 33,4; 33,3; 33,2; 29,7; 28,4; 27,7; 24,3; 21,5; 20,5; 19,2; 18,4; 15,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 619,51971; detektovano 619,52005.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda M: t_R = 7,398 min, površina 98,22%; metoda O: t_R = 5,511 min, površina 98,03%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +13,2 ° (c 0,27, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-(((6-(((adamantan-1-il)metil)amino)heksil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96c)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (26 mg, 0,063 mmol) i **94c** (50 mg, 0,189 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(aq)$ 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **96c** (36 mg, 86%) u obliku žućkaste pene.

T. T. = 78–80 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3355, 2905, 2848, 1678, 1571, 1512, 1456, 1416, 1387, 1366, 1345, 1317, 1272, 1190, 1155, 1131, 1100, 1085, 1036, 971, 939, 909, 862, 806 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,32 (d, J = 7,6 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,26 (d, J = 6,6 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH–), 3,78 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$), 2,79 (br s, 4H, $2 \times \text{-OH}$, $2 \times \text{-NH}$), 2,62 (t, J = 7,4 Hz, 4H, $2 \times \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 2,30 (s, 2H, $\text{Ad-CH}_2\text{-NH-}$), 1,97 (s, 3H, $3 \times \text{-CH (Ad)}$), 1,83 (dt, J_1 = 11,7 Hz, J_2 = 3,0 Hz, 1H), 1,78–1,68 (m, 6H), 1,68–1,59 (m, 8H), 1,58–1,52 (m, 13H), 1,45–1,37 (m, 4H), 1,36 (s, 3H, **Me**), 1,34 (s, 6H, $3 \times \text{-CH}_2$ (**Ad**)), 1,27–1,22 (m, 3H), 1,20 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 1,16 (s, 3H, **Me**), 1,11 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 1,02–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,78 (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm.

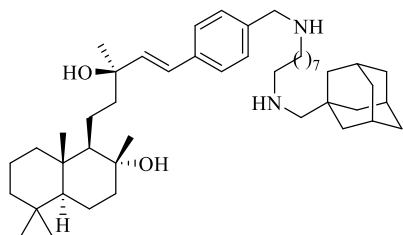
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 138,5; 138,0; 136,4; 128,7; 126,6; 126,3; 74,9; 73,6; 62,3; 61,6; 56,2; 53,5; 50,7; 49,1; 45,4; 44,5; 42,1; 40,9; 39,9; 39,4; 37,2; 37,2; 33,5; 33,4; 33,3; 29,6; 28,9; 28,5; 27,6; 27,2; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{44}\text{H}_{73}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 661,56666; detektovano 661,56770.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda M: t_R = 7,414 min, površina 98,98%; metoda O: t_R = 5,593 min, površina 99,07%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +18,8 ° (c 0,24, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((8-(((adamantan-1-il)metil)amino)oktil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96d)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći iz jedinjenja **81** (40 mg, 0,097 mmol) i **94d** (85 mg, 0,291 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **96d** (36 mg, 86%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 54–55 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3345, 2924, 2848, 1657, 1511, 1456, 1387, 1345, 1316, 1189, 1154, 1129, 1040, 970, 971, 939, 862, 806 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,32 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH–), 3,75 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,60 (t, J = 7,3 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,54 (t, J = 7,3 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,23 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,96 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,82 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,4 Hz, 1H), 1,76–1,67 (m, 5H), 1,67–1,60 (m, 7H), 1,53–1,50 (m, 8H), 1,49–1,38 (m, 8H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,34–1,32 (m, 1H), 1,30–1,26 (m, 8H), 1,23–1,19 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13 (d, J = 4,2 Hz, 2H), 1,00–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

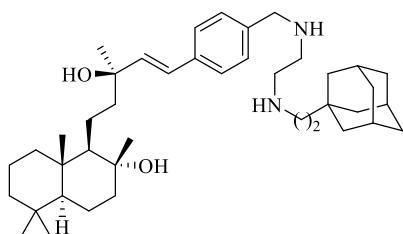
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 139,5; 137,4; 135,9; 128,3; 126,3; 126,3; 74,8; 73,5; 63,0; 61,4; 56,0; 53,7; 51,1; 49,4; 45,2; 44,4; 42,0; 40,9; 39,7; 39,2; 37,2; 33,4; 33,3; 33,2; 30,0; 29,9; 29,5; 28,5; 27,6; 27,3; 24,3; 21,4; 20,5; 19,1; 18,4; 15,3 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₆H₇₇N₂O₂⁺ 689,59796; detektovano 689,59845.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 6,497 min, površina 96,26%; metoda P: t_R = 8,207 min, površina 95,89%.

[α]²⁰_D = +15,0 ° (c 0,33, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((2-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)etil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96e)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (27 mg, 0,063 mmol) i **94e** (44 mg, 0,196 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **96e** (29 mg, 72%) u obliku bezbojnog ulja.

IC (ATR): 3352, 2906, 2847, 1734, 1666, 1608, 1511, 1452, 1387, 1365, 1272, 1133, 1019, 970, 939, 811 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,31 (d, J = 8,2 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,23 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,57 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 3,76 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,72 (s, 4H, –NH–CH₂–CH₂–NH–), 2,58–2,51 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–NH–), 1,96–1,90 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,82 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,78–1,66 (m, 5H), 1,65–1,54 (m, 7H), 1,47 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,43–1,31 (m, 4H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,27–1,22 (m, 3H), 1,19 (t, J = 3,8 Hz, 1H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,10 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 0,99–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me), 1,10 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 0,99–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

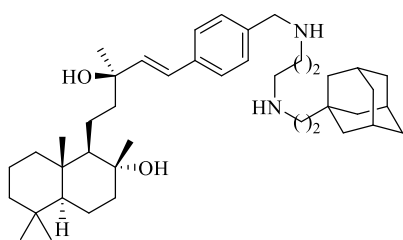
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,6; 137,7; 136,1; 128,4; 126,5; 126,4; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,8; 49,7; 48,9; 45,4; 44,8; 44,5; 44,3; 42,8; 42,1; 39,9; 39,4; 37,3; 33,5; 33,4; 32,0; 28,8; 27,7; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 619,51971; detektovano 619,51881.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 6,311 min, površina 96,25%; metoda M: t_R = 7,893 min, površina 97,73%.

$[\alpha]^{20}_D = +16,4^\circ$ (c 0,08, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-(((3-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)propil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96f)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (46 mg, 0,113 mmol) i **94f** (79 mg, 0,338 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(aq)$ 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **96f** (62 mg, 88%) u obliku žutog ulja koje stajanjem očvršćava.

T. T. = 64–65 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3363, 2905, 2846, 1684, 1511, 1452, 1388, 1366, 1345, 1317, 1274, 1201, 1132, 1085, 1035, 971, 939, 908, 863, 811 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,29 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 7,19 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 6,55 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,24 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 3,72 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,70–2,63 (m, 4H, 2 $\times$ CH₂-CH₂-NH-), 2,60–2,53 (m, 2H, Ad-CH₂-CH₂-NH-), 2,43 (br s, 4H, 2 $\times$ -OH, 2 $\times$ -NH), 1,90 (s, 3H, 3 $\times$ -CH (Ad)), 1,79 (dt, J_1 = 12,1 Hz, J_2 = 3,7 Hz, 1H), 1,75–1,63 (m, 7H), 1,62–1,51 (m, 7H), 1,45 (s, 6H, 3 $\times$ -CH₂ (Ad)), 1,42–1,29 (m, 4H), 1,32 (s, 3H, Me), 1,27–1,20 (m, 3H), 1,16 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 1,12 (s, 3H, Me), 1,10–1,05 (m, 1H), 0,93–0,85 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, Me), 0,74 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

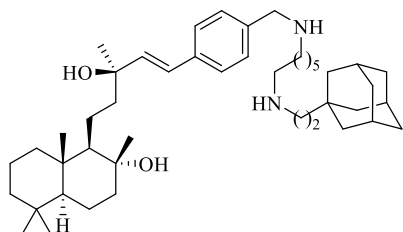
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,3; 137,9; 136,2; 128,4; 126,5; 126,2; 74,9; 73,5; 61,6; 56,2; 53,7; 48,9; 48,0; 45,3; 44,5; 44,3; 44,3; 42,7; 42,1; 39,8; 39,3; 37,2; 33,5; 33,3; 32,0; 29,7; 28,8; 27,5; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 633,53536; detektovano 633,53460.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 6,250 min, površina 98,31%; metoda P: t_R = 8,216 min, površina 96,17%.

$[\alpha]^{20}_D = +21,6^\circ$ (c 0,53, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((6-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)heksil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96g)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (38 mg, 0,092 mmol) i **94g** (77 mg, 0,276 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **96g** (48 mg, 77%) u obliku žućkaste čvrste supstance.

T. T. = 63–64 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3364, 2906, 2847, 1679, 1601, 1511, 1452, 1415, 1387, 1366, 1346, 1272, 1021, 1133, 1085, 1035, 971, 939, 909, 862, 800, 721 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,32 (d, J = 8,2 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,57 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH–), 3,75 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,63–2,55 (m, 6H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–, Ad–CH₂–CH₂–NH–), 2,30 (br s, 4H, 2 × –OH, 2 × –NH), 1,95–1,89 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,82 (dt, J_1 = 12,1 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,78–1,66 (m, 5H), 1,64–1,55 (m, 7H), 1,53–1,46 (m, 8H), 1,44–1,23 (m, 13H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,19 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,13–1,08 (m, 1H), 0,97–0,89 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

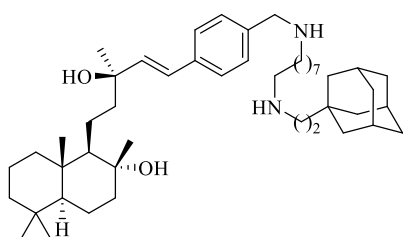
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 139,5; 137,7; 136,2; 128,5; 126,5; 126,4; 74,9; 73,6; 61,6; 56,2; 53,8; 49,9; 49,4; 45,4; 44,5; 44,2; 44,1; 42,7; 42,1; 39,9; 39,4; 37,3; 33,5; 33,4; 32,0; 30,1; 29,6; 28,8; 27,7; 27,4; 27,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₅H₇₅N₂O₂⁺ 675,58231; detektovano 675,58239.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 6,306 min, površina 99,08%; metoda P: t_R = 8,167 min, površina 97,43%.

[α]²⁰_D = +19,8 ° (c 0,17, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(4-(((8-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)oktil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96h)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (27 mg, 0,065 mmol) i **94h** (60 mg, 0,196 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **96h** (36 mg, 79%) u obliku žućkaste čvrste supstance.

T. T. = 53–55 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3362, 2924, 2848, 1660, 1511, 1458, 1415, 1365, 1273, 1157, 1130, 1084, 1034, 970, 939, 909, 862, 811 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,36–7,29 (m, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH–), 3,76 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,70–2,53 (m, 10H, 2 × CH₂–CH₂–NH–, Ad–CH₂–CH₂–NH–, 2 × –OH, 2 × –NH), 1,93 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,83 (dd, J_1 = 12,4 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,78–1,73 (m, 1H), 1,72–1,66 (m, 5H), 1,65–1,58 (m, 7H), 1,56 (t, J = 2,9 Hz, 1H), 1,51–1,46 (m, 12H), 1,44–1,37 (m, 2H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,34–1,21

(m, 18H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,14–1,06 (m, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

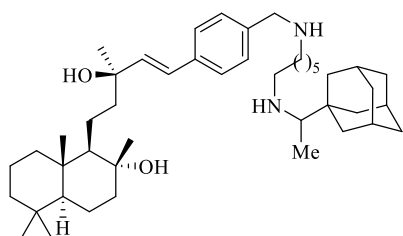
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 138,2; 136,6; 129,5; 128,9; 126,6; 126,1; 74,9; 73,5; 61,7; 56,2; 48,7; 48,7; 45,4; 44,4; 43,6; 42,4; 42,1; 41,4; 39,8; 39,4; 37,1; 33,5; 33,3; 31,8; 29,1; 29,0; 28,9; 28,6; 27,6; 27,3; 26,9; 26,7; 24,4; 24,3; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{47}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 703,61361; detektovano 703,61418.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 6,342 min, površina 99,13%; metoda P: t_R = 5,693 min, površina 99,19%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +19,5 ° (c 0,20, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((3R,E)-5-(4-(((6-((1-(adamantan-1-il)etil)amino)heksil)amino)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96i)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (20 mg, 0,048 mmol) i **94i** (40 mg, 0,145 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(aq)$ 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **96i** (29 mg, 89%) u obliku žutog ulja koje stajanjem očvršćava.

T. T. = 56–57 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3346, 2925, 2849, 1656, 1511, 1387, 1132, 970, 938, 802, 736 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,32 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,24 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH-), 6,27 (d, J = 16,2 Hz, 1H, =CH-), 3,76 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,72 (dt, J_1 = 11,5 Hz, J_2 = 7,2 Hz, 1H, Ad-CH(Me)-NH-CH₂-CH₂-), 2,61 (t, J = 7,2 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-N), 2,42 (dt, J_1 = 11,5 Hz, J_2 = 7,2 Hz, 1H, Ad-CH(Me)-NH-CH₂-CH₂-), 2,06 (q, J = 6,5 Hz, 1H, Ad-CH(Me)-NH-), 1,99–1,95 (m, 3H, 3 × -CH (Ad)), 1,83 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,79–1,67 (m, 4H), 1,66–1,55 (m, 10H), 1,53–1,45 (m, 6H), 1,45–1,39 (m, 2H), 1,36 (s, 3H, **Me**), 1,35–1,30 (m, 5H), 1,28–1,23 (m, 3H), 1,23–1,18 (m, 1H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,11 (d, J = 11,9 Hz, 1H), 0,95 (d, J = 6,6 Hz, 3H, Ad-CH-**Me**), 0,93–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

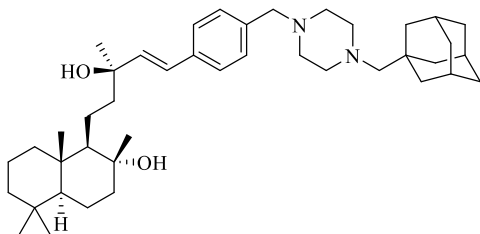
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 139,2; 137,8; 136,2; 128,5; 126,5; 126,3; 74,9; 73,6; 62,7; 61,6; 56,2; 49,4; 49,0; 45,4; 44,5; 42,1; 39,8; 39,4; 38,8; 37,5; 36,1; 33,5; 33,3; 30,1; 30,1; 29,8; 28,7; 27,6; 27,5; 27,4; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5; 13,6 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{45}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_2^+$ 675,58231; detektovano 675,58103.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda M: t_R = 7,436 min, površina 99,60%; metoda O: t_R = 5,573 min, površina 99,73%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +10,3 ° (c 0,11, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-(((adamantan-1-il)metil)piperazin-1-il)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96j)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (45 mg, 0,109 mmol) i **94j** (77 mg, 0,327 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 3/7), dobijen je proizvod **96j** (61 mg, 89%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 78–79 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3384, 2903, 2846, 2805, 2765, 1662, 1511, 1456, 1388, 1365, 1349, 1275, 1159, 1131, 1104, 1084, 1013, 970, 937, 863, 836, 802 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,32 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 3,47 (s, 2H, Ar–CH₂–N–), 2,50 (t, J = 4,8 Hz, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,42 (s, 4H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 1,95–1,89 (m, 5H, 3 × –CH (Ad), Ad–CH₂–N(CH₂–CH₂)₂–N–), 1,83 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,79–1,72 (m, 2H), 1,71–1,54 (m, 10H), 1,47 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,44–1,37 (m, 3H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,33 (s, 1H), 1,24–1,19 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

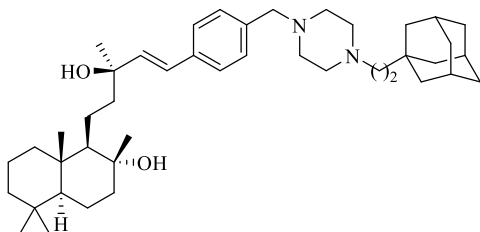
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 137,6; 137,4; 136,2; 129,7; 126,5; 126,3; 75,0; 73,7; 71,1; 63,0; 61,5; 56,2; 56,1; 53,6; 45,4; 44,6; 42,1; 41,2; 39,9; 39,4; 37,4; 35,2; 33,5; 33,4; 28,7; 27,8; 24,5; 21,6; 20,7; 19,3; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₂H₆₇N₂O₂⁺ 631,51971; detektovano 631,52041.

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda K: t_R = 7,321 min, površina 99,17%; metoda P: t_R = 8,983 min, površina 98,43%.

[α]²⁰_D = +18,0 ° (c 0,07, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(4-((2-(adamantan-1-il)etil)piperazin-1-il)metil)fenil)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (96k)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći iz **81** (28 mg, 0,068 mmol) i **94k** (51 mg, 0,204 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc), dobijen je proizvod **96k** (38 mg, 87%) u obliku bezbojne čvrste supstance.

T. T. = 80–81 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3363, 2905, 2846, 1664, 1511, 1450, 1387, 1366, 1345, 1314, 1298, 1271, 1187, 1132, 1084, 1035, 1008, 970, 938, 909, 863, 833 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,30 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,23 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,57 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 3,47 (s, 2H, Ar–CH₂–N–), 3,17 (br s, 2H, 2 × –OH), 2,50 (s, 8H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 2,40–2,32 (m, 2H, Ad–CH₂–CH₂–N–), 1,92 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,85–1,72 (m, 3H), 1,71–1,66 (m, 3H), 1,65–1,54 (m, 7H), 1,47 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,42–1,37 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, Me), 1,33–1,31 (m, 1H), 1,29–1,21 (m, 3H), 1,19

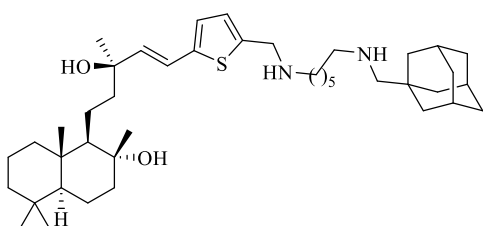
(s, 1H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,07 (m, 1H), 0,96–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{43}H_{69}N_2O_2^+$ 645,53536; detektovano 645,53585.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda K: $t_R = 7,189$ min, površina 99,28%; metoda P: $t_R = 9,083$ min, površina 97,38%.

$[\alpha]^{20}_D = +18,7^\circ$ (c 0,37, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(5-(((6-(((adamantan-1-il)metil)amino)heksil)amino)metil)tiofen-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97a)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95a** (35 mg, 0,084 mmol) i **94c** (66 mg, 0,251 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $CH_2Cl_2/(MeOH/NH_3(aq))$ 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **97a** (41 mg, 74%) u obliku žućkaste čvrste supstance.

T. T. = 69–71 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3345, 2904, 2848, 1678, 1454, 1387, 1365, 1345, 1201, 1178, 1133, 1035, 958, 938, 908, 832, 797, 721$ cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 6,73$ (s, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,67 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, =CH–), 6,06 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, =CH–), 3,90 (s, 2H, Ar-CH₂-NH–), 2,63 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, –CH₂-CH₂-NH–), 2,55 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, –CH₂-CH₂-NH–), 2,23 (s, 2H, Ad-CH₂-NH–), 1,96 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,83 (dt, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H), 1,75–1,68 (m, 5H), 1,67–1,54 (m, 7H), 1,51 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,49–1,39 (m, 4H), 1,39–1,28 (m, 8H), 1,33 (s, 3H, **Me**), 1,27–1,21 (m, 1H), 1,20–1,18 (m, 1H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,12 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 0,98–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 3H, 2 × **Me**) ppm.

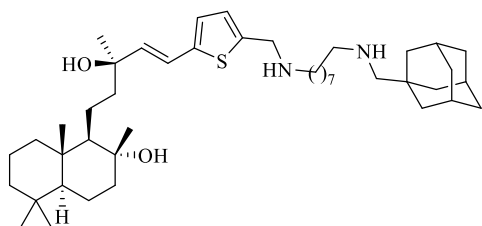
^{13}C { 1H } NMR (100 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 142,9; 141,7; 137,4; 125,1; 125,0; 120,4; 74,9; 73,3; 63,1; 61,4; 56,1; 51,2; 49,1; 48,8; 45,2; 44,4; 42,1; 41,1; 39,8; 39,3; 37,4; 33,5; 33,4; 33,3; 30,1; 30,0; 28,6; 28,6; 27,4; 27,4; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,4$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{42}H_{71}O_2N_2S^+$ 667,528; detektovano 667,52254.

HPLC čistoća ($\lambda = 285$ nm) metoda K: $t_R = 6,351$ min, površina 98,32%; metoda N: $t_R = 6,626$ min, površina 98,16%.

$[\alpha]^{20}_D = +16,6^\circ$ (c 0,19, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(5-(((8-(((adamantan-1-il)metil)amino)oktil)amino)metil)tiofen-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97b)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95a** (26 mg, 0,062 mmol) i **94d** (55 mg, 0,186 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **97b** (35 mg, 82%) u obliku žućkaste, čvrste supstance.

T. T. = 55–56 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3346, 2925, 2848, 1631, 1456, 1387, 1366, 1345, 1262, 1189, 1132, 1098, 1034, 959, 938, 908, 795, 728 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,74 (s, 2H, 2 × Ar–H), 6,67 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,07 (d, J = 15,8 Hz, 1H, =CH–), 3,91 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,66–2,55 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 2,27 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 2,03–1,91 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,83 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,75–1,68 (m, 5H), 1,67–1,57 (m, 7H), 1,58–1,46 (m, 12H), 1,45–1,39 (m, 1H), 1,33 (s, 3H, Me), 1,31–1,24 (m, 10H), 1,23–1,18 (m, 1H), 1,16 (s, 3H, Me), 1,15–1,08 (m, 1H), 1,01–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

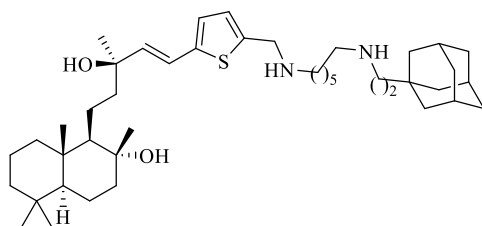
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 142,7; 141,8; 137,4; 125,3; 125,1; 120,4; 74,9; 73,4; 62,8; 61,4; 56,2; 51,1; 49,0; 48,7; 45,2; 44,5; 42,1; 41,0; 39,8; 39,3; 37,3; 33,5; 33,4; 33,3; 30,0; 29,6; 29,6; 28,6; 27,5; 27,4; 27,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₄H₇₅O₂N₂S⁺ 695,55438; detektovano 695,55529.

HPLC čistoća (λ = 280 nm) metoda M: t_R = 7,462 min, površina 96,52% (λ = 285 nm); metoda O: t_R = 5,750 min, površina 96,94%.

[α]_D²⁰ = +22,3 ° (c 0,53, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(5-(((6-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)heksil)amino)metil)tiofen-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97c)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95a** (20 mg, 0,05 mmol) i **94g** (50 mg, 0,19 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **97c** (35 mg, 82%) u obliku žućkaste, čvrste supstance.

T. T. = 65–66 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3344, 2905, 2847, 1630, 1452, 1387, 1365, 1345, 1189, 1131, 1084, 1035, 958, 939, 794 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,72 (s, 2H, 2 × Ar–H), 6,65 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,06 (d, J = 15,8 Hz, 1H, =CH–), 3,89 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,62 (t, J = 7,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,59–2,53 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,96–1,89 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,82 (dt, J_1 = 12,1 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,74–1,65 (m, 5H), 1,65–1,57 (m, 6H), 1,55 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 1,48 (s, 10H), 1,45–1,35 (m, 4H), 1,33–1,29 (m, 2H), 1,32 (s, 3H, Me), 1,27–1,22 (m, 3H), 1,19 (t, J = 3,9 Hz, 1H), 1,14

(s, 3H, **Me**), 1,11 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 0,98–0,87 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 6H, $2 \times$ **Me**) ppm.

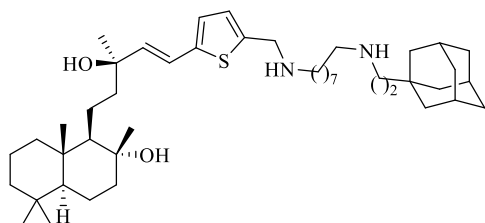
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 143,0; 141,7; 137,3; 125,2; 125,1; 120,4; 74,9; 73,3; 61,4; 56,2; 50,3; 49,1; 48,8; 45,2; 44,8; 44,5; 44,4; 42,8; 42,1; 39,8; 39,4; 37,3; 33,5; 33,3; 32,0; 30,3; 30,1; 28,8; 27,5; 27,5; 27,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}^+$ 681,53873; detektovano 681,53955.

HPLC čistoća ($\lambda = 285$ nm) metoda K: $t_R = 6,235$ min, površina 98,60%; metoda N: $t_R = 7,040$ min, površina 95,16%.

$[\alpha]^{20}_D = +27,1^\circ$ (c 0,14, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(5-(((8-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)oktil)amino)metil)tiofen-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97d)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95a** (30 mg, 0,072 mmol) i **94h** (66 mg, 0,215 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **97d** (41 mg, 81%) u obliku žućkaste čvrste supstance.

T. T. = 69–71 $^\circ\text{C}$ (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3350, 2924, 2848, 1679, 1452, 1387, 1365, 1345, 1269, 1189, 1131, 1100, 1085, 1036, 958, 939, 909, 794$ cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 6,74$ (s, 2H, $2 \times$ Ar-**H**), 6,66 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, =CH–), 6,07 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, =CH–), 3,91 (s, 2H, Ar-CH₂-N), 2,74–2,66 (m, 4H, –CH₂–CH₂–NH–, Ad-CH₂–CH₂–NH–), 2,63 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,94 (s, 3H, $3 \times$ –CH (**Ad**)), 1,83 (dt, $J_1 = 12,1$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H), 1,75–1,67 (m, 5H), 1,66–1,56 (m, 9H), 1,50–1,47 (m, 9H), 1,43–1,40 (m, 1H), 1,40–1,37 (m, 2H), 1,33 (s, 3H, **Me**), 1,33–1,27 (m, 9H), 1,26 (s, 3H, **Me**), 1,23–1,19 (m, 2H), 1,16 (s, 3H, **Me**), 1,14–1,08 (m, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,78 (s, 6H, $2 \times$ **Me**) ppm.

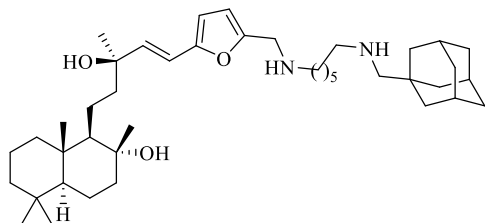
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 142,9; 141,8; 137,3; 125,3; 125,1; 120,5; 74,9; 73,4; 61,4; 56,2; 49,4; 49,0; 48,8; 45,2; 44,5; 43,9; 42,6; 42,4; 42,1; 39,8; 39,4; 37,3; 37,2; 33,5; 33,4; 32,0; 29,9; 29,8; 29,4; 28,7; 27,6; 27,3; 27,2; 24,5; 21,6; 20,6; 19,3; 18,6; 15,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{45}\text{H}_{77}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}^+$ 709,57003; detektovano 709,56915.

HPLC čistoća ($\lambda = 280$ nm) metoda K: $t_R = 7,596$ min, površina 99,02%; metoda N: $t_R = 5,793$ min, površina 97,03%.

$[\alpha]^{20}_D = +19,9^\circ$ (c 0,23, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-(((3*R*,*E*)-5-(5-(((6-((adamantan-1-il)metil)amino)heksil)amino)metil)furan-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97e)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95b** (41 mg, 0,102 mmol) i **94c** (81 mg, 0,306 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 85/15), dobijen je proizvod **97e** (53 mg, 80%) u obliku žućkaste čvrste supstance.

T. T. = 52–53 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3344, 2904, 2848, 1667, 1532, 1456, 1387, 1365, 1344, 1256, 1187, 1154, 1099, 1035, 965, 938, 908, 780 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,36 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,19 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,10 (d, J = 3,4 Hz, 1H, Ar–H), 6,08 (d, J = 3,3 Hz, 1H, Ar–H), 3,72 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,59 (t, J = 7,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,53 (t, J = 7,3 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,21 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,97–1,91 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,81 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,3 Hz, 1H), 1,73–1,66 (m, 5H), 1,66–1,56 (m, 7H), 1,54 (t, J = 3,1 Hz, 1H), 1,51–1,44 (m, 10H), 1,43–1,35 (m, 4H), 1,31 (s, 3H, Me), 1,30–1,20 (m, 4H), 1,16 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,12–1,06 (m, 1H), 0,99–0,87 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

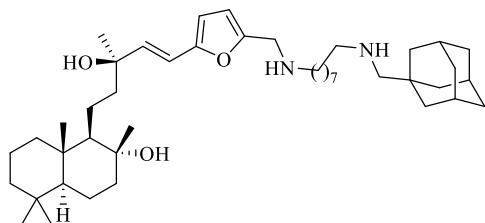
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 153,3; 152,4; 136,3; 115,4; 108,7; 108,1; 74,9; 73,3; 62,7; 61,7; 56,2; 51,0; 49,1; 46,4; 45,3; 44,4; 42,1; 41,0; 41,0; 39,8; 39,3; 37,3; 33,5; 33,4; 33,3; 30,0; 29,6; 29,5; 28,5; 27,4; 27,4; 27,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,1; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₂H₇₁O₃N₂⁺ 651,54592; detektovano 651,54605.

HPLC čistoća (λ = 270 nm) metoda K: t_R = 6,197 min, površina 97,98%; metoda P: t_R = 8,136 min, površina 96,14%.

[α]_D²⁰ = +18,9 ° (c 0,84, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-(((*R*,*E*)-5-(5-(((8-(((adamantan-1-il)metil)amino)oktil)amino)metil)furan-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97f)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95b** (41 mg, 0,102 mmol) i **94d** (90 mg, 0,306 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **97f** (61 mg, 88%) u obliku žute pene.

T. T. = 56–58 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3356, 2926, 2848, 1669, 1591, 1456, 1388, 1345, 1259, 1189, 1132, 1038, 965, 939, 911, 782, 710 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,36 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,18 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,10 (d, J = 3,5 Hz, 1H, Ar–H), 6,07 (d, J = 3,5 Hz, 1H, Ar–H), 3,71 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,60–2,53 (m, 4H, 2 × CH₂–CH₂–NH–), 2,23 (s, 2H, Ad–CH₂–NH–), 1,95–1,92 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,80 (dt, J_1 = 11,9 Hz, J_2 = 3,3 Hz, 1H), 1,72–1,65 (m, 5H), 1,64–1,55 (m, 7H), 1,50 (s, 6H, 3 × –CH₂ (Ad)), 1,48–1,43 (m, 4H), 1,41–1,33 (m, 4H), 1,30 (s, 3H, Me), 1,28–1,22 (m, 8H), 1,20 (d, J =

3,5 Hz, 1H), 1,17–1,14 (m, 1H), 1,13 (s, 3H, **Me**), 1,11–1,05 (m, 1H), 0,96–0,86 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, **Me**), 0,75 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

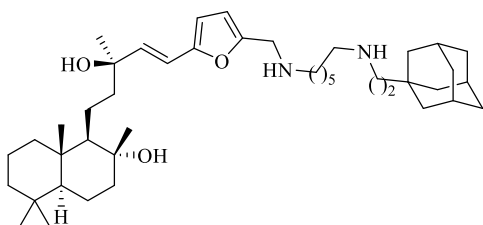
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 153,3; 152,4; 136,3; 115,4; 108,7; 108,1; 74,9; 73,3; 62,7; 61,7; 56,2; 51,0; 49,1; 46,4; 45,3; 44,4; 42,1; 41,0; 41,0; 39,8; 39,3; 37,3; 33,5; 33,4; 33,3; 30,0; 29,6; 29,5; 28,5; 27,4; 27,4; 27,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,1; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{44}\text{H}_{75}\text{O}_3\text{N}_2^+$ 679,57722; detektovano 679,57759.

HPLC čistoća (λ = 280 nm) metoda M: t_R = 7,452 min, površina 95,51% (λ = 285 nm); metoda O: t_R = 5,608 min, površina 95,26%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +21,1 ° (c 0,67, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-5-(5-(((6-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)heksil)amino)metil)furan-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97g)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95b** (28 mg, 0,070 mmol) i **94g** (58 mg, 0,209 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(aq))$ 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **97g** (40 mg, 86%) u obliku žute pene.

T. T. = 53–54 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3322, 2905, 2847, 1532, 1451, 1387, 1344, 1187, 1131, 1014, 966, 939, 781 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 6,36 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,19 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,10 (d, J = 3,3 Hz, 1H, Ar–H), 6,07 (d, J = 3,2 Hz, 1H, Ar–H), 3,72 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,62–2,52 (m, 6H, 3 × –CH₂–CH₂–NH–), 2,39 (br s, 4H, 2 × –OH, 2 × –NH), 1,94–1,88 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,81 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,72–1,64 (m, 5H), 1,63–1,53 (m, 7H), 1,50–1,44 (m, 10H), 1,39 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 1,37–1,32 (m, 3H), 1,31 (s, 3H, **Me**), 1,30–1,22 (m, 7H), 1,18–1,15 (m, 1H), 1,13 (s, 3H, **Me**), 1,12–1,05 (m, 1H), 0,97–0,87 (m, 2H), 0,83 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

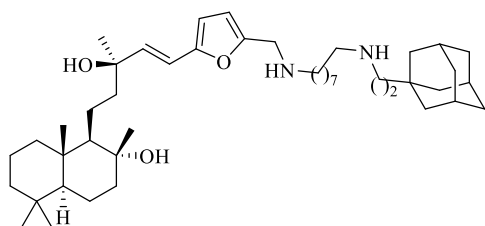
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 153,3; 152,4; 136,4; 115,4; 108,7; 108,1; 74,8; 73,2; 61,7; 56,2; 50,1; 48,9; 46,4; 45,3; 44,4; 44,4; 44,2; 42,7; 42,1; 39,8; 39,3; 37,3; 33,5; 33,3; 31,9; 29,9; 29,9; 28,8; 27,3; 27,3; 27,2; 24,4; 21,6; 20,6; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{O}_3\text{N}_2^+$ 665,56157; detektovano 665,56222.

HPLC čistoća (λ = 270 nm) metoda K: t_R = 6,305 min, površina 95,58%; metoda P: t_R = 8,224 min, površina 95,77%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +23,0 ° (c 0,27, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(5-(((8-((2-(adamantan-1-il)etil)amino)oktil)amino)metil)furan-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (97h)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95b** (30 mg, 0,075 mmol) i **94h** (69 mg, 0,224 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 9/1), dobijen je proizvod **97h** (43 mg, 83%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3354, 2925, 2849, 1564, 1452, 1407, 1388, 1132, 1084, 1016, 967, 939, 781, 653 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,38 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,20 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,12 (d, J = 3,3 Hz, 1H, Ar–H), 6,10 (d, J = 3,4 Hz, 1H, Ar–H), 3,74 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,61–2,55 (m, 6H, 3 × CH₂–CH₂–NH–), 1,92 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,86–1,79 (m, 1H), 1,72–1,65 (m, 5H), 1,64–1,58 (m, 6H), 1,56–1,53 (m, 1H), 1,49–1,46 (m, 10H), 1,45–1,36 (m, 4H), 1,33 (s, 3H, Me), 1,30–1,25 (m, 12H), 1,18 (t, J = 3,5 Hz, 1H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,13–1,08 (m, 1H), 0,99–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 153,5; 152,4; 136,2; 115,6; 108,7; 108,2; 74,9; 73,4; 61,7; 56,2; 50,2; 49,1; 46,5; 45,3; 44,5; 44,5; 44,4; 42,8; 42,1; 39,8; 39,4; 37,3; 33,5; 33,4; 32,0; 30,0; 30,0; 29,6; 29,5; 28,8; 27,6; 27,5; 27,3; 24,5; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

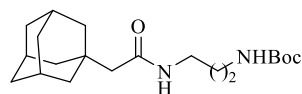
HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₅H₇₇O₃N₂⁺ 693,59287; detektovano 693,59318.

HPLC čistoća (λ = 270 nm) metoda M: t_R = 7,616 min, površina 99,01%; metoda O: t_R = 5,869 min, površina 95,55%.

[α]_D²⁰ = +15,0 ° (c 0,14, MeOH)

Sinteza jedinjenja 98

tert-butil (6-(2-(adamantan-1-il)acetamido)heksil)karbamat (**98-Boc**)



Prema prethodno prijavljenoj sintezi.¹⁵²

U balon, koji je opremljen povratnim kondenzatorom, dodati su 1-adamantansirćetna kiselina (150 mg, 0,772 mmol, 1,0 ekv.) i SOCl₂ (1,1 mL, 15,44 mmol, 20 ekv.), nakon čega je reakciona smeša zagrevana u uljanom kupatilu na temperaturi ključanja rastvarača tokom 2 časa. Višak SOCl₂ uklonjen je isparavanjem pod sniženim pritiskom, a 1-adamantanacetil-hlorid (163 mg, 99%) je dobijen u obliku žutog ulja i korišćen je bez daljeg prečišćavanja.

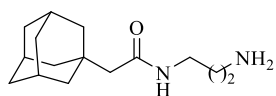
U reakcionom balonu je pripremljen rastvor 1-adamantilacetil-hlorida u CH₂Cl₂ (5 mL) smeša je ohlađena na 0 °C u ledenom kupatilu, nakon čega je dodat Et₃N (130 μ L, 0,926 mmol, 1,2 ekv.). Uz hlađenje, u reakcionu balon je tokom 30 minuta ukapavan rastvor *N*-Boc-1,3-diaminopropana (161 mg, 0,926 mmol, 1,2 ekv.) u CH₂Cl₂ (3 mL). Reakciona smeša je mešana na 0 °C tokom 1 časa, nakon čega je zagrejana do sobne temperature i mešana tokom 16 časova. Po završetku reakcije, smeša je prebačena u levak za odvajanje, vodeni sloj je odbačen, a organski sloj je ispran vodom. Organski ekstrakt je osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄, nakon čega je rastvarač uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na stubu SiO₂ (*dry-flash*, Hex/EtOAc = 3/7) prilikom čega je dobijeno 237 mg (88%) jedinjenja **103-Boc** u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 128–130 °C (amorfni prah)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,45 (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 5,22 (br s, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,21 (quint, *J* = 6,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 3,15–3,03 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,92–1,85 (m, 5H, 3 × –CH (Ad), Ad–CH₂–CONH–), 1,67–1,51 (m, 14H), 1,37 (d, *J* = 4,4 Hz, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171,5; 156,7; 79,1; 51,8; 51,7; 42,6; 36,8; 35,7; 32,7; 30,3; 28,6; 28,4 ppm.

2-(adamantan-1-il)-*N*-(3-aminopropil)acetamid (**98**)



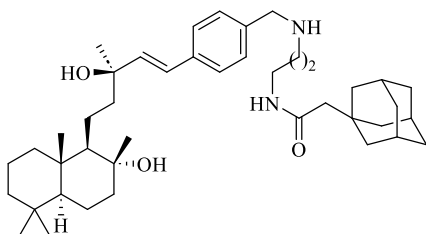
Primenom opšte procedure **J** za uklanjanje Boc-zaštitne grupe, polazeći od jedinjenja **98-Boc** (300 mg, 0,856 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **98** (186 mg, 87%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3292, 3069, 2903, 2848, 2675, 1641, 1549, 1451, 1336, 1315, 1275, 1202, 1175, 1133, 800, 721 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,54 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, –CH₂–NHCOO–), 3,25 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHCO–), 3,00 (s, 2H, Ad–CH₂–CONH–), 2,72 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,89 (br s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,85 (s, 2H, –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,68–1,50 (m, 14H, 6 × –CH (Ad), –NH–CH₂–CH₂–CH₂–NH–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171,4; 51,8; 42,7; 39,5; 37,3; 36,8; 32,7; 32,0; 28,7 ppm.

2-(adamantan-1-il)-*N*-(3-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)propil)acetamid (**99a**)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **81** (28 mg, 0,068 mmol) i **98** (51 mg, 0,204 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)} 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **99a** (38 mg, 88%) u obliku čvrste supstance žute boje.

T. T. = 83–85 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3308, 2905, 2847, 1645, 1550, 1453, 1388, 1366, 1337, 1315, 1293, 1274, 1202, 1155, 1131, 1101, 1085, 1034, 971, 938, 909, 863 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,36–7,31 (m, 2H, 2 × Ar–H), 7,23 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,64–6,51 (m, 2H, =CH–, –CONH–CH₂–), 6,27 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH), 3,74 (s, 2H, Ar–CH₂–N), 3,33 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H, CH₂–CH₂–NHCO), 2,72 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,23 (br s, 3H, 2 × –OH, –NH), 1,94 (s, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,86 (s, 2H, Ad–CH₂–CONH–), 1,85–1,80 (m, 1H), 1,75 (td, *J*₁ = 7,6 Hz, *J*₂ = 3,9 Hz, 1H), 1,72–1,64 (m, 6H), 1,64–1,55 (m, 12H), 1,45–1,37 (m, 3H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,34 (s, 1H), 1,30–1,22 (m, 2H), 1,21 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 1,16 (s, 3H, Me), 1,14–1,07 (m, 1H), 1,00–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,78 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

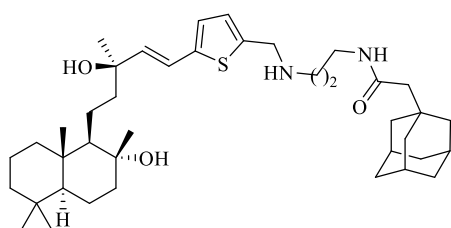
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171,0; 139,0; 138,0; 136,4; 128,4; 126,6; 126,1; 74,9; 73,5; 61,6; 56,2; 53,8; 52,1; 47,8; 45,3; 44,4; 42,7; 42,1; 39,8; 39,3; 38,6; 36,9; 33,5; 33,3; 32,8; 29,1; 28,8; 27,5; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,4 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{42}H_{67}N_2O_3^+$ 647,51462; detektovano 647,51376.

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda K: $t_R = 6,497$ min, površina 96,26%; metoda P: $t_R = 8,207$ min, površina 95,89%.

$[\alpha]^{20}_D = +18,7^\circ$ (c 0,49, MeOH)

2-(adamantan-1-il)-N-(3-(((5-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)tiofen-2-il)metil)amino)propil)acetamid (99b)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95a** (36 mg, 0,086 mmol) i **98** (65 mg, 0,258 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $CH_2Cl_2/(MeOH/NH_3(aq))$ 9/1) = 91/9), dobijen je proizvod **99b** (44 mg, 78%) u obliku žute, amorfne supstance.

T. T. = 80–81 °C (amorfni prah)

IC (ATR): $\nu = 3340, 2925, 2849, 1725, 1648, 1552, 1453, 1388, 1315, 1275, 1203, 1155, 1131, 1085, 1033, 960, 939, 909, 801, 723, 654, 543$ cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 6,82$ – $6,61$ (m, 4H, $-CONH-CH_2-$, $2 \times Ar-H$, $=CH-$), $6,05$ (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, $=CH-$), $3,93$ (s, 2H, $Ar-CH_2-NH-$), $3,32$ (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, $-CH_2-CH_2-NHCO-$), $2,77$ (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, $-CH_2-CH_2-NH-$), $2,72$ (br s, 3H, $2 \times -OH$, $-NH$), $1,95$ – $1,90$ (m, 5H, $3 \times -CH(Ad)$, $Ad-CH_2-CONH-$), $1,81$ (dt, $J_1 = 12,4$ Hz, $J_2 = 3,3$ Hz, 1H), $1,74$ – $1,63$ (m, 7H), $1,62$ – $1,53$ (m, 12H), $1,44$ – $1,33$ (m, 4H), $1,30$ (s, 3H, **Me**), $1,25$ – $1,22$ (m, 1H), $1,21$ – $1,17$ (m, 1H), $1,14$ (s, 3H, **Me**), $1,12$ – $1,04$ (m, 1H), $0,99$ – $0,86$ (m, 2H), $0,83$ (s, 3H, **Me**), $0,76$ (s, 6H, $2 \times$ **Me**) ppm.

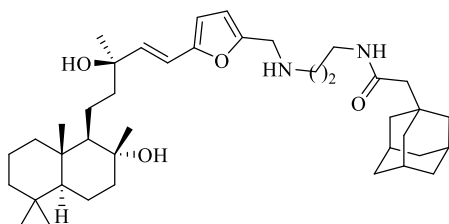
^{13}C { 1H } NMR (100 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 171,5; 142,6; 138,0; 126,6; 125,2; 120,2; 75,0; 73,4; 61,5; 56,2; 52,0; 48,4; 47,2; 45,2; 44,5; 42,8; 42,1; 39,8; 39,4; 38,3; 36,9; 33,5; 33,4; 32,9; 28,8; 28,5; 27,4; 24,5; 21,6; 20,6; 19,1; 18,6; 15,5$ ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[M + H]^+$ izračunato za $C_{40}H_{65}O_3N_2S^+$ 653,47104; detektovano 653,46994,

HPLC čistoća ($\lambda = 280$ nm) metoda M: $t_R = 8,306$ min, površina 95,45%; metoda O: $t_R = 6,681$ min, površina 96,89%.

$[\alpha]^{20}_D = +16,7^\circ$ (c 0,30, MeOH)

2-(adamantan-1-il)-N-(3-(((5-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R,2R,4aS,8aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)furan-2-il)metil)amino)propil)acetamid (99c)



Primenom opšte procedure **K** za reduktivno aminovanje polazeći od jedinjenja **95b** (37 mg, 0,092 mmol) i **98** (69 mg, 0,276 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 93/7), dobijen je proizvod **99c** (48 mg, 82%) u obliku žute, amorfne supstance.

T. T. = 93–94 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3312, 2905, 2848, 1646, 1549, 1453, 1388, 1337, 1275, 1203, 1155, 1312, 1032, 966, 939, 909, 783 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,58 (t, J = 5,6 Hz, 1H, –CONH–CH₂–), 6,36 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,20 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,14 (d, J = 3,4 Hz, 1H, Ar–H), 6,08 (d, J = 3,3 Hz, 1H, Ar–H), 3,74 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,30 (q, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NHCO–), 2,72 (t, J = 6,3 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,97–1,90 (m, 3H, 3 × –CH (Ad)), 1,87 (s, 2H, Ad–CH₂–CONH–), 1,86–1,78 (m, 1H), 1,71–1,53 (m, 23H), 1,45–1,35 (m, 4H), 1,31 (s, 3H, Me), 1,24–1,16 (m, 2H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,12–1,05 (m, 1H), 0,97–0,87 (m, 2H), 0,83 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

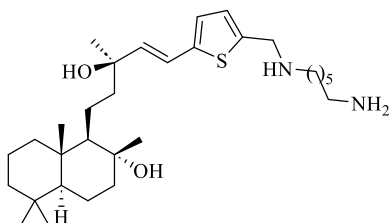
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 171,3; 152,7; 152,0; 136,8; 115,3; 109,4; 108,1; 74,9; 73,3; 61,7; 56,2; 52,0; 47,1; 46,0; 45,2; 44,3; 42,8; 42,7; 42,1; 39,8; 39,3; 38,3; 36,9; 36,9; 33,5; 33,3; 32,8; 28,8; 28,7; 27,3; 24,4; 21,6; 20,6; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₄₀H₆₅O₄N₂⁺ 637,49388; detektovano 637,49276.

HPLC čistoća (λ = 272 nm) metoda M: t_R = 8,195 min, površina 99,39%; (λ = 270 nm) metoda O: t_R = 6,595 min, površina 97,18%.

[α]²⁰_D = +22,0 ° (c 0,56, MeOH)

(1*R,2R,4aS,8aS*)-1-((*R,E*)-5-(5-(((6-aminoheksil)amino)metil)tiofen-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (100a)



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **95a** (44 mg, 0,105 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 7/3), dobijen je proizvod **100a** (48 mg, 88%) u obliku žutog ulja.

IC (ATR): ν = 3354, 2929, 2862, 1631, 1582, 1461, 1388, 1366, 1262, 1189, 1132, 1085, 1029, 959, 938, 908, 798, 700 cm⁻¹,

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,72 (s, 2H, 2 × Ar–H), 6,65 (d, J = 15,8 Hz, 1H, =CH), 6,06 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 3,89 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,67 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,62 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,45 (b rs, 5H, 2 × –OH, –NH, –NH₂), 1,82 (dt, J_1 = 12,4 Hz, J_2 = 3,3 Hz, 1H), 1,76–1,65 (m, 2H), 1,64–1,54 (m, 4H), 1,53–1,54 (m, 4H), 1,45–1,36 (m, 4H), 1,35–1,29 (m, 4H), 1,32 (s, 3H, Me), 1,24 (s, 1H), 1,18 (t, J = 3,7 Hz, 1H), 1,14 (s, 3H, Me), 1,10 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 0,99–0,86 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,76 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

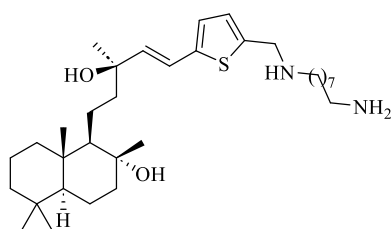
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 142,9; 141,8; 137,5; 125,3; 125,1; 120,4; 74,9; 73,3; 61,5; 56,2; 48,8; 45,3; 44,4; 42,1; 41,9; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 33,1; 29,9; 27,4; 27,1; 26,7; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ 519,39788; detektovano 519,39796.

HPLC čistoća (λ = 280 nm) metoda M: t_R = 7,097 min, površina 96,82%; metoda O: t_R = 5,331 min, površina 95,55%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +20,6 ° (c 0,23, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-(((*R,E*)-5-(5-(((8-aminooktil)amino)metil)tiofen-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (100b)



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **95a** (20 mg, 0,048 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{MeOH}/\text{NH}_3(aq))$ 9/1) = 93/7), dobijen je proizvod **100b** (21 mg, 80%) u obliku žutog ulja koje stajanjem očvršćava.

T. T. = 77–78 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3351, 2926, 2854, 1630, 1572, 1462, 1387, 1366, 1335, 1189, 133, 1085, 1036, 996, 959, 939, 909, 795, 724 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 6,73 (s, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 6,65 (d, J = 15,8 Hz, 1H, =CH-), 6,06 (d, J = 15,8 Hz, 1H, =CH-), 3,90 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 2,69–2,59 (m, 4H, 2 $\times$ -CH₂-CH₂-NH-), 2,25 (b rs, 5H, 2 $\times$ -OH, -NH, -NH₂), 1,86–1,78 (m, 1H), 1,76–1,64 (m, 2H), 1,65–1,52 (m, 4H), 1,51–1,35 (m, 7H), 1,32 (s, 3H, **Me**), 1,31–1,23 (m, 10H), 1,21–1,15 (m, 1H), 1,14 (s, 3H, **Me**), 1,10 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 0,98–0,88 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 6H, 2 $\times$ **Me**) ppm.

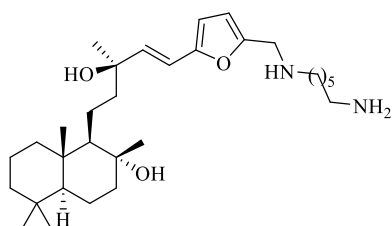
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 143,0; 141,7; 137,4; 125,2; 125,1; 120,4; 74,9; 73,3; 61,5; 56,2; 49,0; 48,8; 45,3; 44,5; 42,2; 42,1; 39,8; 39,4; 33,7; 33,5; 33,3; 30,0; 29,5; 27,5; 27,2; 26,9; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ 547,42918; detektovano 547,42925.

HPLC čistoća (λ = 280 nm) metoda M: t_R = 7,087 min, površina 97,44%; metoda O: t_R = 5,352 min, površina 95,97%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +24,8 ° (c 0,17, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(5-(((6-aminoheksil)amino)metil)furan-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (100c)



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **95b** (50 mg, 0,124 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **100c** (58 mg, 93%) u obliku žutog ulja koje stajanjem očvršćava.

T. T. = 71–72 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3353, 2932, 2834, 1641, 1533, 1462, 1388, 1366, 1340, 1257, 1177, 113, 1085, 1031, 966, 939, 909, 783, 728 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,35 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,20 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,10 (d, J = 2,8 Hz, 1H, Ar–H), 6,07 (d, J = 3,2 Hz, 1H, Ar–H), 3,72 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,64 (t, J = 7,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,58 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,55–2,38 (b rs, 5H, 2 × –OH, –NH, –NH₂), 1,81 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 5,0 Hz, 1H), 1,76–1,64 (m, 2H), 1,63–1,53 (m, 4H), 1,51–1,35 (m, 8H), 1,34–1,28 (m, 3H), 1,31 (s, 3H, **Me**), 1,26–1,20 (m, 1H), 1,17–1,14 (m, 1H), 1,13 (s, 3H, **Me**), 1,11–1,06 (m, 1H), 0,98–0,86 (m, 2H), 0,83 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

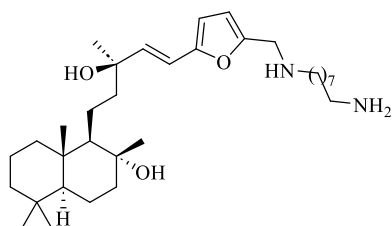
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 153,3; 152,4; 136,6; 115,3; 108,8; 108,1; 74,8; 74,7; 73,1; 73,1; 61,8; 56,2; 48,7; 46,3; 45,3; 44,3; 42,1; 41,9; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 33,2; 29,8; 27,1; 27,0; 26,7; 24,3; 21,6; 20,6; 19,1; 18,6; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : [M + H]⁺ izračunato za C₃₁H₅₅N₂O₃⁺ 503,42072; detektovano 503,42068.

HPLC čistoća (λ = 270 nm) metoda K: t_R = 5,990 min, površina 95,22%; metoda N: t_R = 6,501 min, površina 95,81%.

[α]²⁰_D = +31,9 ° (c 0,32, MeOH)

(1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-((*R,E*)-5-(5-(((8-aminooktil)amino)metil)furan-2-il)-3-hidroksi-3-metilpent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (100d)



Primenom opšte procedure **B** za reduktivno aminovanje, polazeći od jedinjenja **95b** (45 mg, 0,112 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: CH₂Cl₂/(MeOH/NH_{3(aq)}) 9/1) = 8/2), dobijen je proizvod **100d** (54 mg, 91%) u obliku žutog ulja koje stajanjem očvršćava.

T. T. = 83–85 °C (amorfni prah)

IC (ATR): ν = 3359, 2928, 2856, 1567, 1462, 1410, 1388, 1342, 1177, 1132, 1085, 1033, 965, 938, 781, 722, 652 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,36 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,19 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,10 (d, J = 3,4 Hz, 1H, Ar–H), 6,07 (d, J = 3,3 Hz, 1H, Ar–H), 3,72 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 2,64 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,58 (t, J = 7,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,16 (b rs, 5H, 2 × –OH, –NH, –NH₂), 1,81 (dt, J_1 = 12,2 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,68 (td, J_1 = 9,3 Hz, J_2 = 6,0 Hz, 1H), 1,64–1,52 (m, 4H), 1,50–1,34 (m, 8H), 1,30 (s, 3H, **Me**), 1,29–1,24 (m, 9H), 1,23–1,19 (m, 1H), 1,15 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 1,13 (s, 3H, **Me**), 1,12–1,05 (m, 1H), 0,97–0,87 (m, 2H), 0,83 (s, 3H, **Me**), 0,75 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

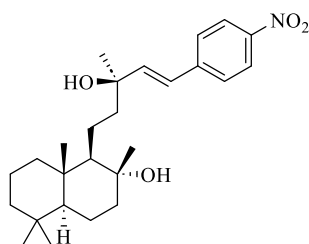
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 153,3; 152,4; 136,5; 115,3; 108,7; 108,1; 74,7; 73,2; 61,7; 56,2; 49,0; 46,4; 45,3; 44,4; 42,1; 42,1; 39,8; 39,3; 33,6; 33,5; 33,3; 29,9; 29,4; 29,4; 27,3; 27,2; 26,9; 24,3; 21,6; 20,6; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

HRMS (HESI/Orbitrap) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_3^+$ 531,45202; detektovano 531,45097.

HPLC čistoća (λ = 270 nm) metoda M: t_R = 7,066 min, površina 96,91%; metoda O: t_R = 5,303 min, površina 97,62%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +23,8 ° (c 0,32, MeOH)

(1R,2R,4aS,8aS)-1-((R,E)-3-hidroksi-3-metil-5-(4-nitrofenil)pent-4-en-1-il)-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-2-ol (106)



U reakcionom balonu, koji je prethodno osušen plamenom, dodati su sklareol **54** (100 mg, 0,46 mmol, 1,5 ekv.), *p*-jodnitrobenzen (76 mg, 0,30 mmol, 1,0 ekv.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (7 mg, 0,03 mmol, 0,1 ekv.), *n*- Bu_4NBr (196 mg, 0,61 mmol, 2,0 ekv.), K_2CO_3 (105 mg, 0,76 mmol, 2,5 ekv.) i suv DMF (1,6 mL). Reakciono balono je mešano na sobnoj temperaturi tokom 10 minuta, a zatim zagrevano na 100 °C tokom 24 sata. Po završetku reakcije, smeša je razblažena dodatkom EtOAc i ispirana vodom i rastvorom NaCl. Organski sloj je sušen iznad Na_2SO_4 , rastvarač je uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom i sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu (SiO_2 : Hex/EtOAc = 1/1). Dobijeno je 74 mg (57%) proizvoda **106** čvrste supstance žute boje.

T. T. 76–78 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3376, 2926, 2868, 1732, 1674, 1596, 1517, 1462, 1388, 1366, 1343, 1267, 1180, 1133, 1110, 1084, 1040, 972, 938, 908, 865, 829, 793, 747, 692 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,14 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,47 (d, J = 8,5 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 6,70 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,47 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 1,85 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,3 Hz, 1H), 1,80–1,69 (m, 2H), 1,66–1,52 (m, 4H), 1,45–1,38 (m, 3H), 1,37 (s, 3H, **Me**), 1,30–1,22 (m, 1H), 1,21–1,18 (m, 1H), 1,17 (s, 3H, **Me**), 1,16–1,13 (m, 1H), 1,10 (dd, J_1 = 13,0 Hz, J_2 = 4,2 Hz, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

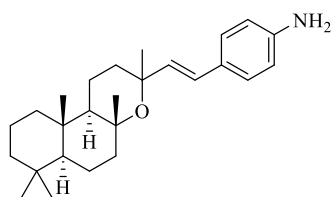
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 146,7; 144,2; 143,4; 126,9; 124,6; 124,0; 75,2; 73,6; 61,5; 56,2; 45,0; 44,5; 42,1; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 27,1; 24,4; 21,6; 20,6; 19,0; 18,5; 15,4 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 429 ($[\text{M}]^-$), 395 ($[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}]^-$), 474 ($[\text{M} + \text{HCOO}]^-$).

$[\alpha]^{20}_D$ = +32,6 ° (c 0,69, MeOH)

4-((E)-2-((4aR,6aS,10aS,10bR)-3,4a,7,7,10a-pentametildodekahidro-1H-benzo[f]hromen-3-il)vinil)anilin (105a)

U reakcionom balonu su dodati jedinjenje **106** (60 mg, 0,140 mmol, 1,0 ekv.), 2,2'-bipiridin (0,22 mg, 0,0014 mmol, 1 mol%) i DMF (2 mL), nakon čega je uz mešanje dodat $[\text{B}(\text{OH})_2]_2$ (50,1 mg, 0,559 mmol, 4,0 ekv.). Mešanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi tokom 12 časova, a zatim je reakciona smeša raspoređena između vode i CH_2Cl_2 . Organski sloj je odvojen, dok je vodeni sloj je ekstrahovan



CH_2Cl_2 (3×20 mL). Spojeni organski ekstrakti su sušeni iznad anhidrovanog Na_2SO_4 , nakon čega je rastvarač uklonjen isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod je prečišćen *dry-flash* hromatografijom na stubu (SiO_2 : Hex/EtOAc = 8/2). Dobijeno je 48 mg (90%) proizvoda **105a** u obliku žute, smolaste supstance. Dobijena je smeša dva diastereomera (*d. r.* 3:1) koju nije bilo moguće razdvojiti.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,17 (d, J = 8,1 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,63 (d, J = 8,1 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,20 (d, J = 16,7 Hz, 1H, =CH–), 6,13 (d, J = 16,7 Hz, 1H, =CH–), 3,65 (b rs, 2H, –NH₂), 2,32–2,25 (m, 1H), 1,78 (dt, J_1 = 12,0 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,69–1,49 (m, 6H), 1,47–1,33 (m, 4H), 1,29–1,26 (m, 1H), 1,25–1,23 (m, 1H), 1,22 (s, 3H, Me), 1,22 (s, 3H, Me), 1,14 (td, J_1 = 13,2 Hz, J_2 = 4,4 Hz, 1H), 0,85 (s, 4H, Me, –CH), 0,77 (s, 3H, Me), 0,69 (s, 3H, Me) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 145,7; 135,7; 128,4; 127,3; 124,4; 115,3; 76,0; 73,2; 58,7; 56,5; 43,1; 42,3; 39,4; 36,9; 35,9; 33,4; 33,4; 33,0; 24,3; 21,4; 20,0; 18,7; 16,1; 15,9 ppm.

izomer 2:

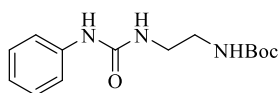
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 6,62–6,58 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,40 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,05 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 2,04 (s, 1H, –CH), 1,89–1,83 (m, 1H), 1,75–1,70 (m, 1H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,32 (s, 3H, Me), 0,79 (s, 3H, Me), 0,79 (s, 3H, Me) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 145,5; 136,5; 128,5; 127,5; 125,5; 115,2; 75,3; 73,3; 56,4; 56,1; 43,4; 42,1; 39,1; 37,1; 36,6; 33,4; 33,3; 29,1; 25,6; 21,4; 20,0; 18,6; 15,6; 15,5 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 382 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +76,5^\circ$ (c 0,14, MeOH)

terc-butyl (2-(3-fenilureido)etil)karbamat (110a)



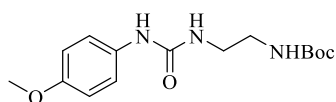
Primenom opšte procedure **L** polazeći od anilina (63 mg, 0,675 mmol) i *N*-Boc-etilen-diamina (119 mg, 0,743 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 3/7), dobijen je proizvod **110a** (163 mg, 86%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 152–154 °C

IC (ATR): 3337, 3058, 2978, 2933, 1699, 1663, 1605, 1551, 1535, 1452, 1412, 1392, 1368, 1329, 1293, 1248, 1229, 1161, 1120, 1066, 1014, 968, 838, 762, 656 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 7,37–7,28 (m, 3H, $2 \times \text{Ar-H}$, –NHCO–), 7,28–7,21 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,02 (t, J = 7,2 Hz, 1H, Ar–H), 5,79 (b rs, 1H, –NHCO–), 5,19 (b rs, 1H, –NHCO–), 3,35–3,28 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,25–3,19 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,41 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 157,1; 156,8; 139,0; 129,2; 123,5; 120,6; 79,8; 41,2; 40,6; 28,5 ppm.

terc-butil (2-(3-(4-metoksifenil)ureido)etil)karbamat (110b)


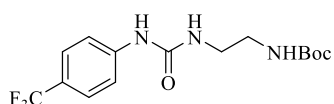
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metoksianilina (83 mg, 0,675 mmol) i *N*-Boc-etilen-diamina (119 mg, 0,743 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 2/8), dobijen je proizvod **110b** (174 mg, 83%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 112–113 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3343, 2977, 2934, 2836, 1688, 1652, 1604, 1558, 1512, 1464, 1411, 1392, 1366, 1274, 1243, 1171, 1109, 1037, 829, 762, 662, 522 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,21 (s, 1H, –NHCO–), 7,17 (d, J = 8,6 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,84–6,74 (m, 2H, 2 × Ar–H), 5,71 (t, J = 5,6 Hz, 1H, –NHCO–), 5,30 (t, J = 5,8 Hz, 1H, –NHCO–), 3,75 (d, J = 1,1 Hz, 3H, –OMe), 3,29 (q, J = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,20 (q, J = 6,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,41 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 157,4; 156,9; 156,4; 131,6; 123,5; 114,5; 79,6; 55,6; 41,3; 40,5; 28,5 ppm.

terc-butil (2-(3-(4-(trifluorometil)fenil)ureido)etil)karbamat (110c)


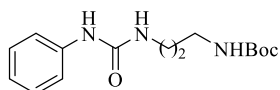
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-(trifluorometil)anilina (109 mg, 0,675 mmol) i *N*-Boc-etilen-diamina (119 mg, 0,743 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 2/8), dobijen je proizvod **110c** (176 mg, 75%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 195–196 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3393, 3334, 3205, 3140, 2983, 2933, 1659, 1598, 1555, 1501, 1442, 1392, 1367, 1312, 1277, 1248, 1172, 1040, 855, 754, 694, 507 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8,97 (s, 1H, –NHCO–), 7,60–7,51 (m, 4H, 4 × Ar–H), 6,86 (t, J = 5,7 Hz, 1H, –NHCO–), 6,28 (t, J = 5,8 Hz, 1H, –NHCO–), 3,12 (q, J = 6,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 2,99 (q, J = 6,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,36 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 155,8; 154,9; 144,3; 117,2; 126,0 (q, ³*J*_{C-F} = 4,0 Hz); 124,7 (q, ¹*J*_{C-F} = 270,9 Hz); 120,9 (q, ²*J*_{C-F} = 31,9 Hz); 77,7; 40,2; 39,1; 28,3 ppm.

terc-butil (3-(3-fenilureido)propil)karbamat (110d)


Primenom opšte procedure **L** polazeći od anilina (38,6 μL, 0,423 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (81 mg, 0,465 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 2/8), dobijen je proizvod **110d** (113 mg, 91%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

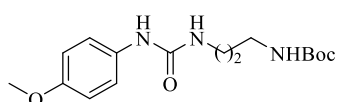
T. T. = 129–131 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3340, 3059, 2977, 2934, 2871, 1659, 1598, 1555, 1500, 1442, 1392, 1367, 1312, 1277, 1248, 1172, 1040, 855, 754, 694, 506 cm⁻¹.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 7,38 (b rs, 1H, $-\text{NHCO}-$), 7,30 (d, J = 7,9 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$), 7,24 (t, J = 7,9 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$), 6,99 (td, J_1 = 7,3 Hz, J_2 = 1,4 Hz, 1H, $\text{Ar}-\text{H}$), 5,80 (b rs, 1H, $-\text{NHCO}-$), 5,07 (t, J = 6,0 Hz, 1H, $-\text{NHCO}-$), 3,21 (q, J = 6,3 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 3,13 (q, J = 6,5 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 1,57 (quint, J = 6,3 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,42 (s, 9H, $-\text{NHCOO}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 156,8; 156,7; 139,2; 129,2; 123,1; 120,2; 79,5; 37,4; 36,8; 30,8; 28,5 ppm.

***tert*-butil (3-(3-(4-metoksifenil)ureido)propil)karbamat (110e)**



Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metoksianilina (52 mg, 0,423 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (81 mg, 0,465 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 5/95), dobijen je proizvod **110e** (104 mg, 90%) u obliku žute, čvrste supstance.

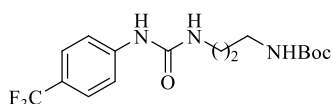
T. T. = 106–107 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3349, 3117, 3043, 2971, 2940, 1683, 1645, 598, 1575, 1528, 1511, 1450, 1411, 1386, 1324, 1284, 1243, 1172, 1141, 1108, 1035, 998, 829, 876, 829, 766, 635, 551, 521 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,12 (d, J = 8,5 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$), 6,87 (s, 1H, $-\text{NHCO}-$), 6,76 (d, J = 8,6 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$), 5,44 (t, J = 5,8 Hz, 1H, $-\text{NHCO}-$), 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 1H, $-\text{NHCO}-$), 3,70 (s, 3H, $-\text{OMe}$), 3,24 (q, J = 5,7 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 3,16 (t, J = 6,0 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 1,42–1,31 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,34 (s, 9H, $-\text{NHCOO}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 157,3; 156,9; 156,6; 139,1; 131,4; 124,0; 114,6; 79,7; 55,6; 41,3; 40,7; 28,5; 21,0 ppm.

***tert*-butil (3-(3-(4-(trifluorometil)fenil)ureido)propil)karbamat (110f)**



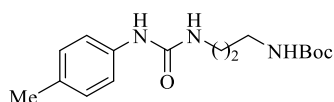
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-(trifluorometil)anilina (53 μL , 0,423 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (81 mg, 0,465 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 3/7), dobijen je proizvod **110f** (137 mg, 90%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 132–133 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3350, 3069, 2960, 2927, 2856, 1667, 1604, 1550, 1456, 1410, 1393, 1367, 1326, 1258, 1164, 1113, 1068, 1016, 841, 803, 741, 647, 593, 509 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8,93 (s, 1H, $-\text{NHCO}-$), 7,58 (d, J = 8,9 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$), 7,55 (d, J = 9,0 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$), 6,80 (t, J = 5,9 Hz, 1H, $-\text{NHCO}-$), 6,28 (t, J = 5,8 Hz, 1H, $-\text{NHCO}-$), 3,08 (q, J = 6,5 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 2,96 (q, J = 6,6 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 1,53 (quint, J = 6,6 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,38 (s, 9H, $-\text{NHCOO}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 155,8; 154,9; 144,3; 125,9 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 4,0 Hz); 124,7 (q, $^1J_{\text{C-F}}$ = 270,9 Hz); 120,9 (q, $^2J_{\text{C-F}}$ = 32,3 Hz); 117,2; 77,5; 37,4; 36,6; 30,2; 28,3 ppm.

terc-butil (3-(3-(*p*-tolil)ureido)propil)karbamat (110g)

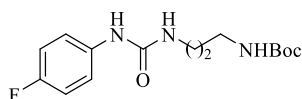
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metilanilina (54 mg, 0,506 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (97 mg, 0,557 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 2/8), dobijen je proizvod **110g** (137 mg, 88%) u obliku žute, čvrste supstance.

T. T. = 124–125 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3341, 3120, 2976, 2930, 2870, 1690, 1657, 1600, 1553, 1515, 1453, 1404, 1392, 1366, 1313, 1276, 1247, 1172, 1040, 859, 817, 780, 667, 508 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,18 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,09 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,76 (s, 1H, -NHCO-), 5,49 (s, 1H, -NHCO-), 4,98 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H, -NHCO-), 3,26 (q, *J* = 6,2 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-CO-), 3,16 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-CO-), 2,29 (s, 3H, Ar-Me), 1,60 (quint, *J* = 6,4 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,43 (s, 9H, -NHCOO-C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 156,6; 136,2; 133,5; 129,9; 121,4; 121,4; 79,5; 37,3; 36,8; 30,9; 28,5; 20,9 ppm.

terc-butil (3-(3-(4-fluorfenil)ureido)propil)karbamat (110h)

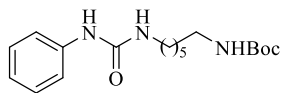
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-fluoranilina (40 μL, 0,423 mmol) i *N*-Boc-1,3-diaminopropana (81 mg, 0,465 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 1/9), dobijen je proizvod **110h** (106 mg, 81%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 116–117 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3322, 3130, 2974, 2932, 2869, 1683, 1632, 1608, 1588, 1528, 1507, 1452, 1405, 1391, 1366, 1276, 1250, 1218, 1172, 1094, 1068, 1042, 999, 867, 834, 791, 760, 727, 660, 585, 516 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,31–7,27 (m, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,02–6,94 (m, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,83 (s, 1H, -NHCO-), 5,59 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H, -NHCO-), 4,91 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H, -NHCO-), 3,27 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-CO-), 3,19 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-CO-), 1,61 (quint, *J* = 6,2 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-), 1,43 (s, 9H, -NHCOO-C(CH₃)₃) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 159,24 (d, ¹*J*_{C-F} = 242,8 Hz); 156,4; 134,9; 122,61 (d, ³*J*_{C-F} = 7,4 Hz); 115,85 (d, ²*J*_{C-F} = 22,5 Hz); 79,7; 37,2; 36,7; 30,9; 28,5 ppm.

terc-butil (6-(3-fenilureido)heksil)karbamat (110i)

Primenom opšte procedure **L** polazeći od anilina (62 μL, 0,672 mmol) i *N*-Boc-1,6-heksandiamina (160 mg, 0,740 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110i** (182 mg, 72%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

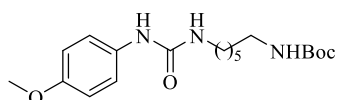
T. T. = 85–87 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3337, 3056, 2976, 2932, 2859, 1658, 1598, 1556, 1512, 1500, 1441, 1392, 1366, 1312, 1275, 1244, 1173, 1040, 895, 863, 829, 754, 695, 507 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7,78 (s, 1H, –NHCO–), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,20 (dd, J_1 = 8,5 Hz, J_2 = 7,3 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,95 (t, J = 7,4 Hz, 1H, Ar–H), 5,80 (t, J = 5,8 Hz, 1H, –NHCO–), 4,79 (t, J = 5,9 Hz, 1H, –NHCO–), 3,13 (q, J = 6,6 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,04 (q, J = 6,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,43 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,41–1,36 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–CH₂–NH–), 1,26–1,20 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 156,7; 156,6; 139,6; 129,0; 122,5; 119,4; 79,4; 40,4; 39,8; 30,0; 29,9; 28,5; 26,3 ppm.

terc-butil (6-(3-(4-metoksifenil)ureido)heksil)karbamat (110j)



Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metoksianilina (83 mg, 0,672 mmol) i *N*-Boc-1,6-heksandiamina (160 mg, 0,740 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110j** (186 mg, 76%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

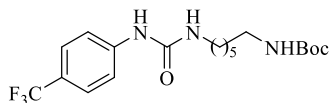
T. T. = 67–68 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3339, 2975, 2933, 2861, 1682, 1632, 1526, 1462, 1392, 1365, 1335, 1270, 1247, 1173, 1108, 1031, 992, 869, 829, 782, 629, 524 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7,21 (d, J = 8,9 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,83 (d, J = 8,9 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,79 (s, 1H, –NHCO–), 5,11 (s, 1H, –NHCO–), 4,65 (s, 1H, –NHCO–), 3,77 (s, 3H, –OMe), 3,18 (q, J = 6,6 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,09 (q, J = 6,7 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,48–1,41 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–CH₂–NH–), 1,46 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,32–1,26 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 156,7; 156,3; 131,7; 123,4; 114,5; 79,3; 55,5; 40,2; 39,8; 29,9; 29,8; 28,5; 26,0 ppm.

terc-butil (6-(3-(4-(trifluormetil)fenil)ureido)heksil)karbamat (110k)



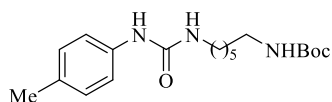
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-(trifluormetil)anilina (84 μ L, 0,672 mmol) i *N*-Boc-1,6-heksandiamina (160 mg, 0,740 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110k** (204 mg, 75%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 102–103 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3340, 3131, 2978, 2934, 2861, 1663, 1604, 1534, 1460, 1411, 1393, 1367, 1326, 1248, 1165, 1118, 1068, 1014, 842, 648, 594, 509 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8,07 (s, 1H, –NHCO–), 7,51–7,45 (m, 4H, 4 $\times$ Ar–H), 5,80 (t, J = 5,9 Hz, 1H, –NHCO–), 4,80 (t, J = 6,2 Hz, 1H, –NHCO–), 3,18 (q, J = 6,4 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,08 (q, J = 6,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,48–1,41 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–CH₂–NH–), 1,46 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,31–1,23 (m, 4H, 2 $\times$ –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 156,9; 156,0; 143,1; 126,3 (d, $^3J_{C-F}$ = 3,8 Hz); 124,5 (q, $^1J_{C-F}$ = 270,9 Hz); 123,9 (q, $^4J_{C-F}$ = 32,7 Hz); 118,1; 79,8; 40,2; 39,6; 30,0; 29,6; 28,6; 25,9; 25,9 ppm.

tert-butil (6-(3-(*p*-tolil)ureido)heksil)karbamat (110l)

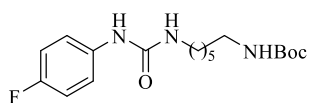
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metilanilina (72 mg, 0,672 mmol) i *N*-Boc-1,6-heksandiamina (160 mg, 0,740 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110l** (181 mg, 77%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 88–89 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3337, 2976, 2932, 2859, 1656, 1598, 1555, 1516, 1501, 1442, 1392, 1366, 1312, 1275, 1247, 1173, 1042, 863, 816, 754, 694, 509 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7,25 (s, 1H, –NHCO–), 7,21 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,06 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 5,44 (s, 1H, –NHCO–), 4,70 (s, 1H, –NHCO–), 3,17 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,08 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 2,28 (s, 3H, Ar–Me), 1,47–1,41 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,45 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,30–1,24 (m, 4H, 2 × –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 156,7; 156,5; 136,7; 132,6; 129,7; 120,5; 79,4; 40,4; 39,8; 30,1; 29,9; 28,6; 26,2; 20,9 ppm.

tert-butil (6-(3-(4-fluorfenil)ureido)heksil)karbamat (110m)

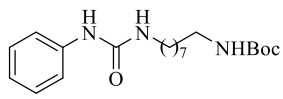
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-fluoranilina (75 mg, 0,672 mmol) i *N*-Boc-1,6-heksandiamina (160 mg, 0,740 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110m** (154 mg, 65%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 123–124 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3327, 2977, 2935, 2865, 1674, 1633, 1607, 1564, 1509, 1477, 1465, 1405, 1391, 1366, 1334, 1269, 1251, 1215, 1176, 1096, 1046, 975, 863, 838, 794, 764, 640, 573, 517, 461 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7,45 (s, 1H, –NHCO–), 7,32–7,26 (m, 2H, 2 × Ar–H), 6,96–6,91 (m, 2H, 2 × Ar–H), 5,49 (s, 1H, –NHCO–), 4,73 (s, 1H, –NHCO–), 3,17 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,09 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,49–1,42 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,45 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,32–1,25 (m, 4H, 2 × –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 158,7 (d, ¹*J*_{C–F} = 241,3 Hz); 156,7; 156,5; 135,5; 121,4 (d, ³*J*_{C–F} = 6,1 Hz); 115,7 (d, ²*J*_{C–F} = 22,3 Hz); 79,6; 40,3; 39,7; 30,1; 29,7; 28,6; 26,0 ppm.

tert-butil (8-(3-fenilureido)oktil)karbamat (110n)

Primenom opšte procedure **L** polazeći od anilina (62 μL, 0,674 mmol) i *N*-Boc-1,8-oktandiamina (181 mg, 0,741 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110n** (172 mg, 70%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

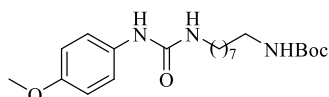
T. T. = 106–108 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3335, 3139, 3057, 2975, 2929, 2856, 1655, 1597, 1553, 1499, 1441, 1391, 1366, 1311, 1273, 1244, 1170, 1042, 895, 868, 752, 693, 505, 458, 421 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 7,83 (s, 1H, –NHCO–), 7,32 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,20 (t, J = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,95 (td, J_1 = 7,3 Hz, J_2 = 1,2 Hz, 1H, Ar–H), 5,83 (t, J = 5,5 Hz, 1H, –NHCO–), 4,77 (t, J = 5,9 Hz, 1H, –NHCO–), 3,14 (q, J = 6,6 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,07 (q, J = 6,8 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,44 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,43–1,35 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,27–1,19 (m, 8H, 4 × –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 156,7; 156,5; 139,6; 129,0; 122,5; 119,4; 79,4; 40,7; 40,1; 30,1; 29,1; 29,1; 28,5; 26,8; 26,6 ppm.

terc-butil (8-(3-(4-metoksifenil)ureido)oktil)karbamat (110o)



Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metoksianilina (83 mg, 0,673 mmol) i *N*-Boc-1,8-oktandiamina (181 mg, 0,741 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 3/7), dobijen je proizvod **110o** (194 mg, 73%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

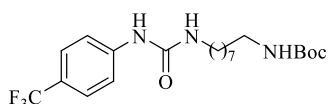
T. T. = 86–88 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3338, 3065, 2975, 2930, 2856, 1692, 1657, 1603, 1557, 1512, 1464, 1411, 1392, 1366, 1296, 1276, 1243, 1175, 1108, 1039, 829, 779, 675, 522 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,18 (d, J = 8,8 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,94 (s, 1H, –NHCO–), 6,84–6,77 (m, 2H, 2 × Ar–H), 5,15 (d, J = 5,8 Hz, 1H, –NHCO–), 4,63 (b rs, 1H, –NHCO–), 3,74 (s, 3H, –OMe), 3,16 (q, J = 6,6 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,06 (q, J = 7,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,47–1,37 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,42 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,29–1,20 (m, 8H, 4 × –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 156,9; 156,3; 132,0; 123,4; 114,5; 79,3; 55,6; 46,0; 40,7; 40,3; 30,2; 30,1; 29,1; 28,6; 27,0; 26,8; 26,6 ppm.

terc-butil (8-(3-(4-(trifluormetil)fenil)ureido)oktil)karbamat (110p)



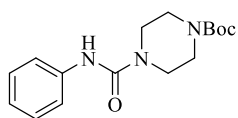
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-(trifluormetil)anilina (84 μL, 0,673 mmol) i *N*-Boc-1,8-oktandiamina (181 mg, 0,741 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: Hex/EtOAc = 4/6), dobijen je proizvod **110p** (263 mg, 91%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 76–77 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3340, 3132, 2977, 2931, 2858, 1664, 1604, 1554, 1456, 1411, 1393, 1367, 1326, 1249, 1165, 1119, 1068, 1014, 842, 652, 509 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8,25 (s, 1H, –NHCO–), 7,44 (s, 4H, 4 × Ar–H), 5,92 (t, J = 5,6 Hz, 1H, –NHCO–), 4,82 (t, J = 6,1 Hz, 1H, –NHCO–), 3,17 (q, J = 6,5 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,07 (q, J = 6,8 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 1,44 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃), 1,43–1,35 (m, 4H, 2 × –CH₂–CH₂–NH–), 1,27–1,16 (m, 8H, 4 × –CH₂–) ppm.

¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 156,8; 156,2; 143,1; 126,2; 124,5 (d, ¹ J_{C-F} = 271,1 Hz); 123,88 (q, ² J_{C-F} = 32,5 Hz); 118,1; 79,6; 40,7; 40,1; 30,0; 30,0; 29,1; 28,6; 26,8; 26,5 ppm.

terc-butil 4-(fenilkarbamoi)piperazin-1-karboksilat (110q)


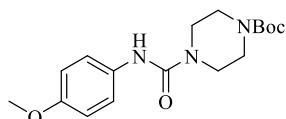
Primenom opšte procedure **L** polazeći od anilina (46 μ L, 0,508 mmol) i 1-Boc-piperazina (104 mg, 0,558 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 1/1), dobijen je proizvod **110q** (103 mg, 66%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 148–149 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3295, 3096, 2989, 2973, 2887, 2854, 1693, 1637, 1594, 1539, 1522, 1443, 1411, 1370, 1344, 1319, 1304, 1288, 1249, 1231, 1199, 1164, 1133, 1098, 1031, 1012, 997, 959, 877, 861, 838, 816, 793, 759, 722, 696, 665, 624, 597, 600, 502 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 7,36–7,32 (m, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,30–7,27 (m, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,04 (tt, J_1 = 7,3 Hz, J_2 = 1,3 Hz, 1H, 2 $\times$ Ar–H), 6,46 (s, 1H, Ar–NHCON–), 3,48 (s, 8H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 1,48 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 155,1; 154,8; 138,9; 129,1; 123,5; 120,2; 80,5; 44,0; 28,5 ppm.

terc-butil 4-((4-metoksifenil)karbamoi)piperazin-1-karboksilat (110r)


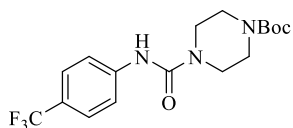
Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-metoksianilina (83 mg, 0,674 mmol) i 1-Boc-piperazina (138 mg, 0,741 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 1/1), dobijen je proizvod **110r** (187 mg, 83%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 179–180 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3221, 3131, 2976, 2932, 2861, 1696, 1638, 1602, 1513, 1459, 1416, 1366, 1289, 1238, 1169, 1131, 1098, 998, 865, 827, 763, 566, 523 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,22 (d, J = 8,7 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,46 (s, 1H, Ar–NHCON–), 3,77 (s, 3H, –OMe), 3,45 (s, 8H, –N–(CH₂–CH₂)₂–N–), 1,48 (s, 9H, –NHCOO–C(CH₃)₃) ppm.

^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 156,2; 155,7; 154,8; 131,8; 122,8; 114,2; 80,4; 55,6; 43,9; 28,5 ppm.

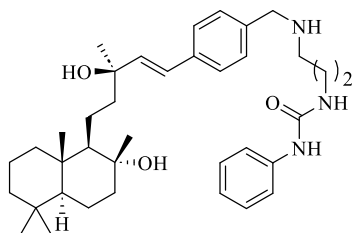
terc-butil 4-((4-(trifluormetil)fenil)karbamoi)piperazin-1-karboksilat (110s)


Primenom opšte procedure **L** polazeći od 4-(trifluormetil)anilina (109 mg, 0,674 mmol) i 1-Boc-piperazina (138 mg, 0,741 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : Hex/EtOAc = 3/7), dobijen je proizvod **110s** (182 mg, 72%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 195–196 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3325, 3125, 2979, 2932, 2865, 1698, 1656, 1603, 1536, 1478, 1460, 1418, 1368, 1326, 1288, 1242, 1167, 1068, 1015, 999, 842, 760, 594, 508 cm^{-1} .

1-(3-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)propil)-3-fenilurea (111d)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110d** (90 mg, 0,305 mmol) i **81** (63 mg, 0,153 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 7/3) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111d** (78 mg, 87%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 121–122 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3322, 2927, 2867, 1667, 1598, 1556, 1500, 1462, 1441, 1388, 1314, 1248, 1130, 1084, 1031, 997, 972, 938, 907, 863, 817, 754, 737, 696 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7,44–7,35 (m, 4H, 4 × Ar–H), 7,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,20 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,94 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, Ar–H), 6,54 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,32 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 4,10 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,30–3,23 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,02 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,92–1,84 (m, 2H), 1,83–1,72 (m, 2H), 1,66–1,52 (m, 4H), 1,52–1,41 (m, 2H), 1,40–1,30 (m, 3H), 1,29 (s, 3H, Me), 1,26–1,17 (m, 2H), 1,14–1,07 (m, 1H), 1,04 (s, 3H, Me), 0,92–0,85 (m, 2H), 0,81 (s, 3H, Me), 0,74 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

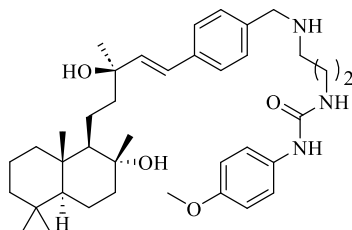
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CD₃OD) δ = 159,0; 140,7; 140,2; 140,0; 131,3; 131,1; 129,8; 128,0; 127,1; 123,6; 120,3; 75,2; 74,3; 62,6; 57,5; 52,1; 47,0; 45,8; 45,1; 43,2; 41,1; 40,5; 37,1; 34,1; 33,9; 28,3; 27,9; 24,0; 22,0; 21,5; 20,7; 19,5; 16,1 ppm.

MS (ESI/TQD) *m/z*: 590 ([M + H]⁺).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 6,192 min, površina 98,46%; metoda M: t_R = 7,961 min, površina 97,30%.

[α]²⁰_D = +21,3 ° (c 0,17, MeOH)

1-(3-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)propil)-3-(4-metoksifenil)urea (111e)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od **110e** (85 mg, 0,262 mmol) i **81** (54 mg, 0,131 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111e** (71 mg, 88%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 96–97 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3326, 2927, 2868, 1665, 1603, 1555, 1511, 1463, 1412, 1388, 1323, 1239, 1181, 1161, 1115, 1084, 1067, 1037, 972, 908, 828, 737 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 7,38 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,33 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,23 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,89–6,82 (m, 2H, 2 × Ar–H), 6,58 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,33 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 3,84 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,77 (s, 3H, –OMe), 3,27 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 2,75 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,89–1,75 (m, 4H), 1,75–1,59 (m, 4H), 1,58–1,52 (m, 1H), 1,48–1,37 (m, 4H), 1,36 (s, 3H, Me), 1,33–1,27 (m, 1H),

1,19 (dd, $J_1 = 14,0$ Hz, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 1,15–1,10 (m, 4H, **Me**, **CH**), 1,04–0,93 (m, 2H), 0,88 (s, 3H, **Me**), 0,82 (s, 6H, $2 \times$ **Me**) ppm.

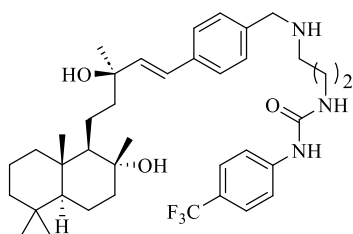
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD) $\delta = 157,7; 155,7; 137,2; 137,0; 135,9; 132,2; 128,8; 126,2; 126,1; 121,5; 113,7; 73,7; 72,9; 61,3; 56,1; 54,5; 52,2; 45,7; 45,2; 43,7; 41,8; 39,7; 39,1; 36,8; 32,7; 32,5; 28,8; 26,4; 22,6; 20,5; 20,1; 19,4; 18,1; 14,6$ ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 620 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 602 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda O: $t_R = 7,559$ min, površina 98,16%; metoda M: $t_R = 7,898$ min, površina 98,58%.

$[\alpha]^{20}_D = +15,0^\circ$ (c 0,09, MeOH)

1-(3-(((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)propil)-3-(4-(trifluormetil)fenil)urea (111f)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110f** (98 mg, 0,271 mmol) i **81** (56 mg, 0,136 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 7/3) i gravitacione hromatografije ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$), dobijen je proizvod **111f** (73 mg, 82%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 108–110 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3325, 2927, 2868, 1675, 1603, 1554, 1461, 1411, 1389, 1323, 1250, 1183, 1162, 1113, 1067, 1041, 1014, 971, 937, 907, 842, 738, 592, 509, 423 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) $\delta = 7,49\text{--}7,38$ (m, 4H, $4 \times \text{Ar-H}$), $7,29\text{--}7,22$ (m, 4H, $4 \times \text{Ar-H}$), 6,47 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH–), 6,22 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH–), 3,86 (s, 2H, Ar-CH₂-NH–), 3,22 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, –CH₂-CH₂-NH-CO–), 2,84–2,76 (m, 2H, –CH₂-CH₂-NH–), 1,82–1,71 (m, 3H), 1,68–1,59 (m, 2H), 1,60–1,44 (m, 4H), 1,37–1,30 (m, 3H), 1,27 (s, 3H, **Me**), 1,22 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 1,19 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 1,07 (s, 3H, **Me**), 1,06–1,00 (m, 1H), 0,91–0,80 (m, 2H), 0,77 (s, 3H, **Me**), 0,71 (s, 3H, **Me**), 0,70 (s, 3H, **Me**) ppm.

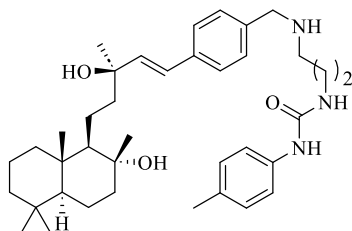
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) $\delta = 155,9; 141,9; 138,2; 137,1; 131,4; 128,5; 125,9; 125,0$ (q, $^3J_{C-F} = 3,8$ Hz); 124,5; 122,8 (q, $^2J_{C-F} = 32,7$ Hz); 123,5 (q, $^1J_{C-F} = 271,3$ Hz); 117,0; 73,7; 72,2; 60,5; 55,2; 51,2; 44,2; 44,1; 42,8; 41,0; 38,8; 38,3; 35,6; 32,3; 32,2; 26,9; 25,3; 22,8; 20,4; 19,4; 18,1; 17,5; 14,4 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 658 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda O: $t_R = 7,828$ min, površina 98,96%; metoda M: $t_R = 8,081$ min, površina 98,81%.

$[\alpha]^{20}_D = +14,7^\circ$ (c 0,59, MeOH)

1-(3-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)propil)-3-(*p*-tolil)urea (111g)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110g** (77 mg, 0,247 mmol) i **81** (51 mg, 0,124 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 6/4) i gravitacione hromatografije ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 85/15), dobijen je proizvod **111g** (69 mg, 92%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 120–121 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3333, 2926, 2867, 1664, 1601, 1555, 1514, 1460, 1405, 1388, 1314, 1246, 1131, 1084, 1040, 972, 908, 864, 817, 737, 509 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ = 7,43 (s, 4H, 4 $\times$ Ar–H), 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,06 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,58 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 6,37 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 4,14 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,36–3,26 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,06 (t, J = 7,1 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 2,26 (s, 3H, Ar–Me), 1,90 (quint, J = 7,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–CH₂–), 1,85–1,76 (m, 2H), 1,72–1,59 (m, 4H), 1,58–1,46 (m, 1H), 1,44–1,35 (m, 3H), 1,33 (s, 4H, Me, CH), 1,30–1,22 (m, 1H), 1,20–1,12 (m, 1H), 1,11–1,07 (m, 4H, Me, –CH–), 1,00–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, Me), 0,78 (s, 6H, 2 $\times$ Me) ppm.

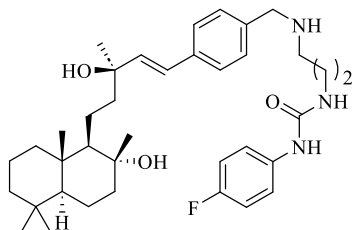
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, CD_3OD) δ = 159,2; 140,2; 140,0; 138,0; 133,3; 131,3; 131,1; 130,3; 128,0; 127,1; 120,7; 75,2; 74,3; 62,7; 57,5; 52,1; 47,0; 45,8; 45,1; 43,2; 41,1; 40,5; 37,1; 34,1; 33,9; 28,3; 27,9; 24,0; 22,0; 21,5; 20,9; 20,8; 19,5; 16,1 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 604 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 6,374 min, površina 95,91%; metoda M: t_R = 8,081 min, površina 95,63%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +15,5 ° (c 0,19, MeOH)

1-(4-fluorfenil)-3-(3-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)propil)urea (111h)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110h** (79 mg, 0,257 mmol) i **81** (53 mg, 0,128 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 9/1), dobijen je proizvod **111h** (57 mg, 73%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 112–115 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 13318, 2926, 2854, 1666, 1613, 1563, 1509, 1461, 1406, 1388, 1309, 1265, 1215, 1157, 1131, 1099, 1084, 1040, 998, 971, 937, 907, 864, 833, 791, 737, 702, 514 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 8,77 (s, 1H, Ar–NHCON–), 7,32 (d, J = 8,0 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,28 (d, J = 4,8 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 7,18 (d, J = 7,7 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,86 (t, J = 8,5 Hz, 2H, 2 $\times$ Ar–H), 6,77 (s, 1H, –CH₂–NHCON–), 6,49 (d, J = 15,9 Hz, 1H, =CH–), 6,24 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 3,90 (s, 2H, Ar–CH₂–N), 3,10 (s, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 2,82 (s, 2H, –CH₂–CH₂–NH),

1,85–1,72 (m, 4H), 1,67–1,52 (m, 5H), 1,44–1,33 (m, 4H), 1,31 (s, 3H, **Me**), 1,25 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 1,16 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,05 (m, 2H), 0,94–0,86 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, $2 \times$ **M**) ppm.

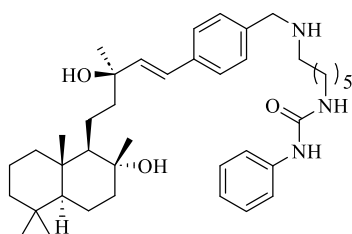
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 158,5$ (d, $^1J_{\text{C-F}} = 242,1$ Hz); 158,1; 140,3; 138,6; 135,4; 130,5; 129,3; 127,0; 125,2; 120,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 6,1$ Hz); 115,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,9$ Hz); 75,2; 73,5; 61,9; 56,2; 51,4; 45,3; 44,8; 44,1; 42,1; 39,8; 39,4; 36,2; 33,5; 33,3; 29,8; 29,5; 27,2; 26,3; 24,2; 21,6; 20,5; 19,0; 18,5; 15,6 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 658 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda O: $t_R = 6,237$ min, površina 95,44%; metoda M: $t_R = 7,992$ min, površina 96,82%.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +23,3^\circ$ (c 0,13, MeOH)

1-(6-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)heksil)-3-fenilurea (111i)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110i** (104 mg, 0,310 mmol) i **81** (64 mg, 0,155 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111i** (88 mg, 90%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 102–104 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3324, 2929, 2863, 1666, 1597, 1554, 1499, 1461, 1441,

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 8,71$ (s, 1H, Ar–NHCON–), 7,47–7,41 (m, 4H, $4 \times$ Ar–H), 7,38 (dd, $J_1 = 8,6$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 2H, $2 \times$ Ar–H), 7,19 (dd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 7,4$ Hz, 2H, $2 \times$ Ar–H), 6,86 (tt, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 1,1$ Hz, 1H, Ar–H), 6,52 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH–), 6,42–6,26 (m, 2H, =CH–, –CH₂–NHCON–), 4,55 (s, 1H, –OH), 4,04 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,84 (s, 1H, –OH), 3,06 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 2,87–2,78 (m, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,74 (td, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, 1H), 1,70–1,65 (m, 1H), 1,65–1,56 (m, 3H), 1,55–1,48 (m, 3H), 1,47–1,38 (m, 3H), 1,37–1,26 (m, 7H), 1,22 (s, 3H, **Me**), 1,25–1,18 (m, 1H), 1,17–1,03 (m, 2H), 0,99–0,94 (m, 1H), 0,96 (s, 3H, **Me**), 0,91–0,84 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, **Me**), 0,74 (s, 3H, **Me**), 0,71 (s, 3H, **Me**) ppm.

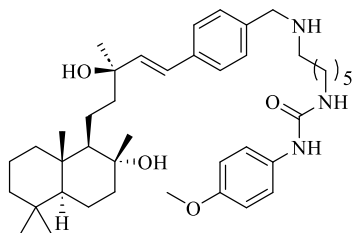
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 155,3$; 140,7; 139,5; 137,8; 131,3; 130,1; 128,6; 126,2; 124,9; 120,8; 117,4; 72,3; 72,0; 61,1; 55,8; 49,9; 46,5; 46,1; 44,1; 41,7; 39,4; 38,8; 38,7; 33,3; 32,9; 29,5; 28,2; 25,9; 25,8; 25,7; 23,9; 21,4; 20,1; 19,3; 18,0; 15,2 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 632 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda O: $t_R = 6,612$ min, površina 95,94%; metoda M: $t_R = 7,964$ min, površina 97,13%.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +18,0^\circ$ (c 0,17, MeOH)

1-(6-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)heksil)-3-(4-metoksifenil)urea (111j)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110j** (161 mg, 0,441 mmol) i **81** (91 mg, 0,221 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111j** (117 mg, 80%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 88–91 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3333, 2928, 2856, 1661, 1604, 1558, 1511, 1463, 1410, 1388, 1298, 1239, 1180, 1132, 1084, 1038, 971, 938, 908, 828, 736 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,58 (s, 1H, Ar–NHCON–), 7,29–7,25 (m, 2H, 2 × Ar–H), 7,24–7,17 (m, 4H, 4 × Ar–H), 6,75 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,55 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, =CH–), 5,65 (s, 1H, –CH₂–NHCON–), 3,73 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,71 (s, 3H, –OMe), 3,36 (b rs, 3H, 2 × OH, –NH), 3,08 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 2,54 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–), 1,86–1,73 (m, 2H), 1,71–1,53 (m, 5H), 1,48–1,35 (m, 8H), 1,34 (s, 3H, Me), 1,26 (td, *J*₁ = 7,2 Hz, *J*₂ = 1,3 Hz, 1H), 1,23–1,16 (m, 5H), 1,15 (s, 3H, Me), 1,11 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 0,96–0,86 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, Me), 0,77 (s, 6H, 2 × Me) ppm.

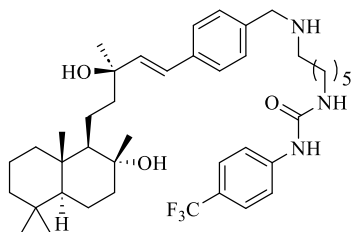
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 157,1; 155,8; 138,5; 137,3; 136,6; 132,3; 128,8; 126,6; 125,9; 122,6; 114,3; 74,9; 73,5; 61,7; 56,2; 55,5; 53,2; 48,7; 45,3; 44,2; 42,1; 40,0; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 30,0; 29,1; 26,9; 26,8; 26,7; 24,3; 21,6; 20,5; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

MS (ESI/TQD) *m/z*: 662 ([M + H]⁺), 644 ([M + H – H₂O]⁺).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 7,086 min, površina 96,96%; metoda M: t_R = 7,928 min, površina 99,60%.

[α]_D²⁰ = +15,0 ° (c 0,11, MeOH)

1-(6-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)heksil)-3-(4-(trifluormetil)fenil)urea (111k)



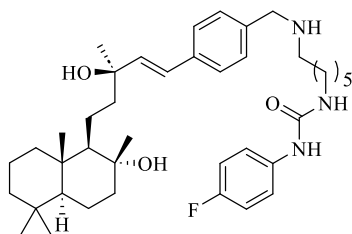
Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110k** (104 mg, 0,257 mmol) i **81** (53 mg, 0,128 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111k** (84 mg, 80%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 97–99 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3318, 2927, 2855, 1681, 1603, 1553, 1462, 1411, 1388, 1325, 1241, 1182, 1162, 1118, 1067, 1014, 971, 938, 908, 842, 738, 593 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,55 (s, 1H, Ar–NHCON–), 7,45 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,37 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,24 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,19 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,54 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,26 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,16 (s, 1H, –CH₂–NHCON–), 3,87 (b rs, 3H, 2 × –OH, –NH), 3,71 (s, 2H, Ar–CH₂–NH–), 3,09 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H, –

1-(4-fluorfenil)-3-(6-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)heksil)urea (111m)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110m** (115 mg, 0,330 mmol) i **81** (68 mg, 0,165 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111m** (82 mg, 77%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 107–110 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3326, 2933, 2865, 1668, 1612, 1562, 1509, 1462, 1406, 1388, 1307, 1266, 1214, 1156, 1132, 1098, 1084, 1029, 971, 938, 908, 833, 737, 703, 514 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8,80 (s, 1H, Ar-NHCON-), 7,47 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,44 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,40–7,36 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,06–7,00 (m, 2H, 2 × Ar-H), 6,52 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,40–6,33 (m, 2H, =CH-, -CH₂-NHCON-), 4,56 (s, 1H, -OH), 4,08 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,84 (s, 1H, -OH), 3,06 (q, *J* = 6,6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-CO-), 2,89–2,81 (m, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 1,74 (td, *J*₁ = 12,3 Hz, *J*₂ = 4,5 Hz, 1H), 1,70–1,56 (m, 4H), 1,55–1,48 (m, 3H), 1,47–1,37 (m, 3H), 1,37–1,27 (m, 7H), 1,22 (s, 3H, Me), 1,19 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 1,17–1,05 (m, 2H), 0,98 (s, 1H), 0,96 (s, 3H, Me), 0,91–0,83 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, Me), 0,74 (s, 3H, Me), 0,70 (s, 3H, Me) ppm.

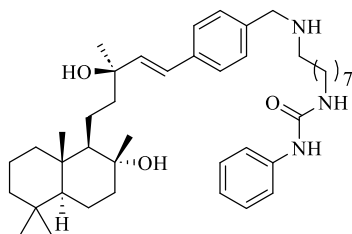
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 156,7 (d, ¹*J*_{C-F} = 236,7 Hz); 155,4; 139,6; 138,0; 137,1 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,5 Hz); 130,5; 130,3; 126,2; 124,9; 118,9 (d, ³*J*_{C-F} = 7,4 Hz); 115,0 (d, ²*J*_{C-F} = 22,1 Hz); 72,3; 72,0; 61,1; 55,8; 49,6; 46,3; 46,0; 44,1; 41,7; 39,4; 38,8; 38,7; 33,3; 32,9; 29,5; 28,2; 25,8; 25,7; 25,3; 23,9; 21,4; 20,1; 19,3; 18,0; 15,2 ppm.

MS (ESI/TQD) *m/z*: 650 ([M + H]⁺), 632 ([M + H - H₂O]⁺).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 6,435 min, površina 97,03%; metoda M: t_R = 8,106 min, površina 97,71%.

[α]²⁰_D = +16,0 ° (c 0,30, MeOH)

1-(8-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)oktil)-3-fenilurea (111n)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110n** (97 mg, 0,267 mmol) i **81** (55 mg, 0,133 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111n** (68 mg, 77%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 103–106 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3328, 2930, 2857, 1668, 1597, 1555, 1500, 1462, 1441, 1388, 1313, 1239, 1202, 1134, 1083, 1031, 971, 938, 907, 801, 737, 696, 507 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,61 (s, 1H, Ar-NHCON-), 7,45 (s, 4H, 4 × Ar-H), 7,37 (dt, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 1,7 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,19 (dd, *J*₁ = 8,4 Hz, *J*₂ = 7,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 6,86 (tt, *J*₁ = 7,3 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 6,52 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,37 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,28 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, -CH₂-NHCON-), 4,54 (s, 1H, -OH), 4,08 (s, 2H), 3,82 (s, 1H, -

OH), 3,06 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 2,91–2,76 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,75 (td, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 4,6$ Hz, 1H), 1,70–1,65 (m, 1H), 1,61 (s, 3H), 1,55–1,45 (m, 3H), 1,45–1,38 (m, 3H), 1,38–1,32 (m, 3H), 1,31–1,26 (m, 8H), 1,24–1,18 (m, 1H), 1,22 (s, 3H, **Me**), 1,18–1,11 (m, 1H), 1,11–1,05 (m, 1H), 0,99–0,95 (m, 1H), 0,96 (s, 3H, **Me**), 0,92–0,84 (m, 2H), 0,83 (s, 3H, **Me**), 0,74 (s, 3H, **Me**), 0,71 (s, 3H, **Me**) ppm.

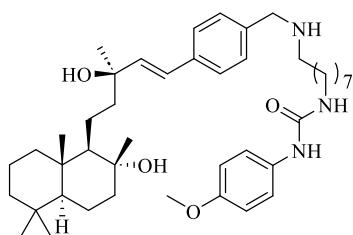
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 155,3; 140,7; 139,6; 138,0; 130,5; 130,2; 128,5; 126,2; 124,8; 120,7; 117,4; 72,3; 72,0; 61,0; 55,8; 49,7; 46,4; 46,0; 44,1; 41,7; 39,4; 38,7; 33,3; 32,9; 29,7; 28,4; 28,4; 28,2; 26,2; 25,9; 25,3; 23,9; 21,3; 20,1; 19,2; 18,0; 15,2$ ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 660 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 642 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda O: $t_R = 6,392$ min, površina 95,60%; metoda M: $t_R = 8,032$ min, površina 95,61%.

$[\alpha]^{20}_D = +14,6^\circ$ (c 0,23, MeOH)

1-(8-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)oktil)-3-(4-metoksifenil)urea (111o)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110o** (78 mg, 0,199 mmol) i **81** (41 mg, 0,099 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$), dobijen je proizvod **111o** (61 mg, 89%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 99–101 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3334, 2930, 2856, 1665, 1603, 1556, 1511, 1463, 1411, 1388, 1299, 1229, 1180, 1131, 1084, 1037, 938, 828, 735 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 8,47$ (s, 1H, Ar-NHCON-), 7,47–7,40 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,28 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 6,79 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 6,52 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, =CH-), 6,36 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, =CH-), 6,21 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NHCON}-$), 5,75 (brs, 2H, 2 × -OH), 4,04 (s, 2H, Ar-CH $_2$ -NH-), 3,85 (br s, 1H, -NH-), 3,68 (s, 3H, -OMe), 3,04 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$), 2,84–2,78 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 1,75 (td, $J_1 = 12,3$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, 1H), 1,67 (dt, $J_1 = 12,0$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 2H), 1,64–1,57 (m, 3H), 1,55–1,45 (m, 3H), 1,44–1,31 (m, 6H), 1,28 (d, $J = 11,3$ Hz, 11H), 1,22 (s, 3H, **Me**), 1,20–1,15 (m, 1H), 1,14–1,05 (m, 1H), 0,99–0,96 (m, 1H), 0,96 (s, 3H, **Me**), 0,91–0,83 (m, 2H), 0,82 (s, 3H, **Me**), 0,74 (s, 3H, **Me**), 0,70 (s, 3H, **Me**) ppm.

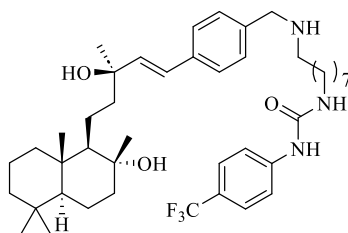
^{13}C { ^1H } NMR (100 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 155,6; 153,7; 139,5; 137,8; 133,9; 131,2; 130,1; 126,2; 124,9; 119,1; 113,8; 72,3; 72,0; 61,1; 55,8; 55,1; 49,9; 46,5; 46,1; 44,1; 41,7; 39,0; 38,7; 33,3; 32,9; 29,8; 28,5; 28,5; 28,2; 26,2; 26,0; 25,6; 23,9; 21,4; 20,1; 19,3; 18,0; 16,1; 15,2$ ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 690 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 585 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$), 1203 ($[2\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254$ nm) metoda O: $t_R = 6,455$ min, površina 99,94%; metoda M: $t_R = 7,975$ min, površina 99,94%.

$[\alpha]^{20}_D = +15,9^\circ$ (c 0,21, MeOH)

1-((4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)amino)oktil)-3-(4-(trifluormetil)fenil)urea (111p)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110p** (107 mg, 0,247 mmol) i **81** (51 mg, 0,124 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 8/2) i gravitacione hromatografije (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111p** (82 mg, 91%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 92–95 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3344, 2928, 2856, 1672, 1604, 1554, 1464, 1411, 1388, 1325, 1240, 1203, 1182, 1162, 1119, 1067, 1015, 971, 938, 908, 842, 800, 722, 593 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9,10 (s, 1H, Ar-NHCON-), 7,55 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,50 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,36–7,28 (m, 4H, 4 × Ar-H), 6,49–6,41 (m, 2H, =CH-, -CH₂-NHCON-), 6,27 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 4,50 (br s, 1H, -NH-), 3,79 (s, 2H, Ar-CH₂-NH-), 3,04 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H-CH₂-CH₂-NH-CO-), 2,58 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-NH-), 1,71 (td, *J*₁ = 12,2 Hz, *J*₂ = 4,4 Hz, 1H), 1,63 (dt, *J*₁ = 11,9 Hz, *J*₂ = 2,8 Hz, 1H), 1,57 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 1,51–1,35 (m, 8H), 1,34–1,20 (m, 12H), 1,18 (s, 3H, Me), 1,13–1,00 (m, 2H), 0,96–0,91 (m, 1H), 0,92 (s, 3H, Me), 0,87–0,79 (m, 2H), 0,78 (s, 3H, Me), 0,70 (s, 3H, Me), 0,67 (s, 3H, Me) ppm.

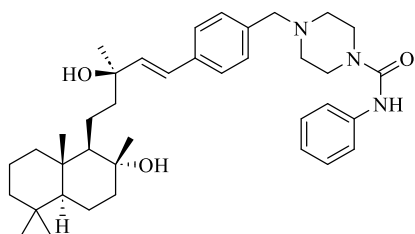
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 154,9; 144,4; 138,7; 136,7; 136,6; 135,7; 129,1; 126,0; 125,9 (q, ³*J*_{C-F} = 3,8 Hz); 125,1; 124,7 (q, ¹*J*_{C-F} = 270,7 Hz); 120,9; 120,7 (q, ²*J*_{C-F} = 31,9 Hz); 117,0; 72,3; 72,0; 61,1; 55,8; 51,4; 47,7; 46,1; 44,1; 41,7; 39,4; 39,0; 38,7; 33,3; 32,9; 29,6; 28,8; 28,6; 28,2; 27,7; 26,4; 26,3; 23,9; 21,4; 20,1; 19,3; 18,0; 15,2 ppm.

MS (ESI/TQD) *m/z*: 728 ([M + H]⁺), 710 ([M + H - H₂O]⁺).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 6,726 min, površina 97,36%; metoda M: t_R = 8,118 min, površina 96,29%.

[α]²⁰_D = +13,8 ° (c 0,24, MeOH)

4-(4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)-*N*-fenilpiperazin-1-karboksamid (111q)



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110q** (70 mg, 0,228 mmol) i **81** (47 mg, 0,114 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO₂: EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111q** (55 mg, 80%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 109–111 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3345, 2925, 2867, 1643, 1598, 1537, 1501, 1388, 1347, 1310, 1245, 1133, 1084, 1030, 1001, 971, 938, 907, 866, 789, 752, 737, 695 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,38–7,29 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,26–7,22 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,01 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, Ar-H), 6,64–6,54 (m, 2H, =CH, Ar-NHCON-), 6,29 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, =CH-), 3,53 (s, 2H, Ar-CH₂-N-), 3,52–3,48 (m, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 2,48 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 1,83 (dd, *J*₁ = 12,3 Hz, *J*₂ = 3,1 Hz, 1H), 1,79–1,68 (m, 2H), 1,66–1,51 (m, 4H),

1,45–1,36 (m, 3H), 1,36 (s, 3H, **Me**), 1,34–1,32 (m, 1H), 1,24–1,21 (m, 1H), 1,19 (s, 1H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,06 (m, 1H), 0,99–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

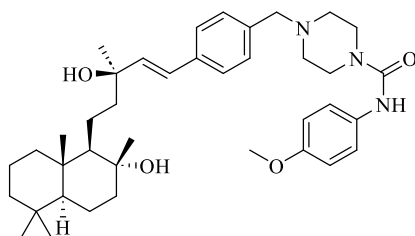
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 155,2; 139,1; 138,2; 136,7; 129,6; 128,9; 126,5; 126,1; 123,2; 120,2; 75,0; 73,6; 62,6; 61,6; 56,2; 52,7; 45,3; 44,4; 44,0; 42,1; 39,8; 39,4; 33,5; 33,3; 27,5; 24,4; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,5 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 602 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 585 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$), 1203 ($[2\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 6,220 min, površina 95,61 %; metoda M: t_R = 8,499 min, površina 95,23%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +19,3 ° (c 0,23, MeOH)

4-(4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)-*N*-(4-metoksifenil)piperazin-1-karboksamid (111r**)**



Primenom opšte procedure **M** polazeći od jedinjenja **110r** (86 mg, 0,257 mmol) i **81** (53 mg, 0,128 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **111r** (70 mg, 86%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 104–106 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3344, 2933, 2867, 1639, 1512, 1462, 1420, 1388, 1347, 1298, 1242, 1180, 1133, 1084, 1037, 1001, 971, 938, 908, 864, 825, 737, 703, 564, 523 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 7,31 (d, J = 8,1 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,24–7,17 (m, 4H, 4 × Ar-**H**), 6,78 (d, J = 9,0 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,65 (s, 1H, Ar-NHCON-), 6,57 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,27 (d, J = 16,1 Hz, 1H, =CH-), 3,73 (s, 3H, -OMe), 3,51 (s, 2H, Ar-CH₂-N-), 3,45 (t, J = 4,9 Hz, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 3,32 (b rs, 2H, 2 × -OH), 2,44 (t, J = 5,0 Hz, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 1,81 (dt, J_1 = 12,3 Hz, J_2 = 3,2 Hz, 1H), 1,78–1,72 (m, 1H), 1,71–1,64 (m, 1H), 1,63–1,51 (m, 4H), 1,43–1,35 (m, 3H), 1,33 (s, 3H, **Me**), 1,33–1,31 (m, 1H), 1,22–1,18 (m, 1H), 1,16 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 1,14 (s, 3H, **Me**), 1,11–1,06 (m, 1H), 0,96–0,86 (m, 2H), 0,84 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 3H, **Me**), 0,76 (s, 3H, **Me**) ppm.

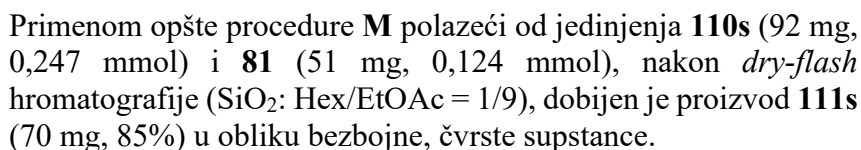
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 155,9; 155,7; 138,3; 136,7; 135,8; 132,1; 129,6; 126,4; 125,9; 122,6; 114,1; 74,9; 73,5; 62,4; 61,5; 56,1; 55,5; 52,5; 45,2; 44,3; 43,8; 42,0; 39,7; 39,3; 33,4; 33,3; 27,2; 24,2; 21,5; 20,5; 19,1; 18,5; 15,4 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 632 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 615 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$), 1263 ($[2\text{M} + \text{H}]^+$).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 6,164 min, površina 99,37%; metoda M: t_R = 8,020 min, površina 99,36%.

$[\alpha]^{20}_D$ = +20,3 ° (c 0,21, MeOH)

4-(4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((*1R,2R,4aS,8aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8a-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)-*N*-(4-(trifluormetil)fenil)piperazin-1-karboksamid (111s)



T. T. = 109–111 °C (amorfní prah)

IC (ATR): 3335, 2926, 2868, 1650, 1602, 1534, 1460, 1420, 1389, 1324, 1247, 1185, 1162, 1117, 1067, 1001, 971, 938, 907, 841, 790, 738, 703, 592, 508 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,47 (s, 4H, 4 × Ar-**H**), 7,32 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 7,23 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, 2 × Ar-**H**), 6,87 (s, 1H, Ar-NHCON-), 6,59 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 6,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH-), 3,60–3,39 (m, 6H, Ar-CH₂-N-, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 2,44 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H, -N-(CH₂-CH₂)₂-N-), 1,83 (dt, *J*₁ = 12,1 Hz, *J*₂ = 3,1 Hz, 1H), 1,78–1,68 (m, 2H), 1,66–1,53 (m, 4H), 1,45–1,37 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,34–1,31 (m, 1H), 1,24–1,17 (m, 2H), 1,15 (s, 3H, **Me**), 1,13–1,10 (m, 1H), 0,98–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

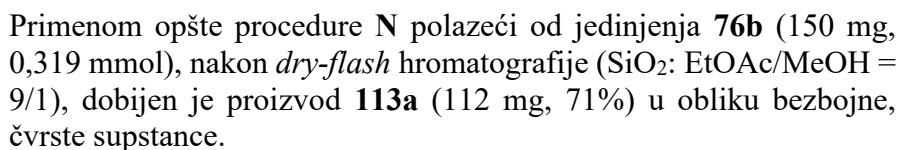
¹³C {¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 154,6; 142,5; 138,2; 136,6; 136,5; 129,5; 126,5; 126,1 (q, ³J_{C-F} = 1,8 Hz); 124,7 (q, ²J_{C-F} = 32,8 Hz); 124,4 (q, ¹J_{C-F} = 271,3 Hz); 126,1; 119,3; 75,0; 73,6; 62,7; 61,6; 56,2; 52,7; 45,3; 44,4; 44,2; 42,1; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 27,4; 24,3; 21,6; 20,6; 19,2; 18,5; 15,5 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 670 ($[M + H]^+$), 653 ($[M + H - H_2O]^+$), 1339 ($[2M + H]^+$).

HPLC čistoća ($\lambda = 254 \text{ nm}$) metoda O: $t_R = 6,612 \text{ min}$, površina 99,42%; metoda M: $t_R = 8,324 \text{ min}$, površina 99,92%.

$$[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +17,6^{\circ} (\text{c } 0,23, \text{MeOH})$$

1-(4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-on (113a)



T. T. = 67–70 °C (amorfní prah)

 **IC (ATR):** 3328, 3049, 2926, 2867, 1644, 1519, 1456, 1416, 1388, 1365, 1346, 1306, 1281, 1209, 1182, 1160, 1132, 1108, 1085, 1011, 969, 938, 908, 864, 804, 737, 702 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,27 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 7,17 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, 2 × Ar–H), 6,56 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,27 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 5,17 (b rs, 1H, –CH₂–NHCON–), 4,51 (s, 2H, Ar–CH₂–N–CONH–), 3,27 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–NH–CO–), 3,12 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H, –CH₂–CH₂–N–CO–), 1,89–1,75 (m, 4H), 1,73–1,67 (m, 1H), 1,67–1,54 (m, 4H), 1,47–1,37 (m, 4H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,30–1,21 (m, 1H), 1,19 (t, *J* = 3,7 Hz, 1H), 1,16 (s, 3H, **Me**), 1,14–1,08 (m, 1H), 1,00–0,89 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,78 (s, 6H, 2 × **Me**) ppm.

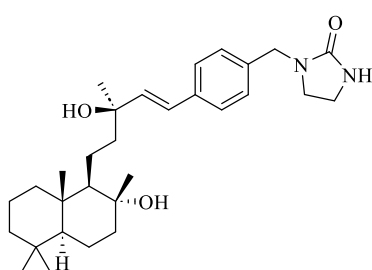
^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 156,7; 138,4; 137,0; 136,5; 128,2; 126,6; 125,9; 74,8; 73,3; 61,6; 56,2; 50,5; 45,3; 44,7; 44,2; 42,1; 40,6; 39,8; 39,3; 33,5; 33,3; 27,1; 24,3; 22,2; 21,6; 20,6; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 496 (M^+), 495 ($[\text{M} - \text{H}]^+$), 497 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 479 ($[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$), 461 ($[\text{M} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 8,667 min, površina 96,33 %; metoda M: t_R = 9,414 min, površina 96,45%.

$[\alpha]^{20}_D = +19,0^\circ$ (c 0,10, MeOH)

1-(4-((*R,E*)-3-hidroksi-5-((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-2-hidroksi-2,5,5,8*a*-tetrametildekahidronaftalen-1-il)-3-metilpent-1-en-1-il)benzil)imidazolidin-2-on (113b)



Primenom opšte procedure N polazeći od jedinjenja **82b** (180 mg, 0,394 mmol), nakon *dry-flash* hromatografije (SiO_2 : EtOAc/MeOH = 9/1), dobijen je proizvod **113b** (144 mg, 76%) u obliku bezbojne, čvrste supstance.

T. T. = 68–70 °C (amorfni prah)

IC (ATR): 3345, 3050, 2926, 2868, 1692, 1495, 1450, 1416, 1388, 1364, 1267, 1192, 1131, 1102, 1084, 1065, 1029, 996, 971, 937, 908,

738, 704, 658 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,30 (d, J = 8,2 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7,18 (d, J = 7,9 Hz, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 6,58 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 6,28 (d, J = 16,0 Hz, 1H, =CH–), 5,06 (b rs, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NHCON}-$), 4,33 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2-\text{N-CONH}-$), 3,37 (t, J = 6,7 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH-CO}-$), 3,27 (t, J = 6,1 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N-CO}-$), 1,84 (dt, J_1 = 12,6 Hz, J_2 = 3,4 Hz, 1H), 1,77 (dd, J_1 = 9,4 Hz, J_2 = 5,8 Hz, 1H), 1,74–1,67 (m, 1H), 1,66–1,53 (m, 4H), 1,47–1,37 (m, 3H), 1,35 (s, 3H, **Me**), 1,34–1,32 (m, 1H), 1,31–1,21 (m, 1H), 1,20–1,18 (m, 1H), 1,16 (s, 3H, **Me**), 1,14–1,06 (m, 1H), 1,00–0,88 (m, 2H), 0,85 (s, 3H, **Me**), 0,77 (s, 6H, $2 \times \text{Me}$) ppm.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl_3) δ = 162,9; 138,5; 136,8; 136,0; 128,4; 126,7; 125,9; 74,9; 73,4; 61,6; 56,2; 47,5; 45,3; 44,6; 44,3; 42,1; 39,8; 39,3; 38,2; 33,5; 33,3; 27,2; 24,3; 21,6; 20,6; 19,1; 18,5; 15,5 ppm.

MS (ESI/TQD) m/z : 465 ($[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$), 447 ($[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$).

HPLC čistoća (λ = 254 nm) metoda O: t_R = 8,368 min, površina 98,08%; metoda M: t_R = 9,292 min, površina 98,60% (λ = 254 nm).

$[\alpha]^{20}_D = +19,3^\circ$ (c 0,55, MeOH)

Biološka ispitivanja

Biološka ispitivanja su sprovedena u Laboratoriji za molekularnu neuroonkologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, pod rukovodstvom dr Milice Pešić, naučnog savetnika.

Hemikalije i reagensi

U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće hemikalije i reagensi: RPMI-1640 medijum, fetalni goveđi serum (FBS), mešavina antibiotika penicilin-streptomycin, mešavina antibiotika i antimikotika (penicilin, streptomycin, amfotericin B), neesencijalne aminokiseline za minimalni esencijalni medijum, tripsin/EDTA, minimalni esencijalni medijum (MEM), L-glutamin, dimetilsulfoksid (DMSO), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT), rodamin 123, propidijum-jodid (PI), aneksin V/propidijum-jodid (AV/PI), ribonukleaza A, dihidroetidijum (DHE), dihidrorodamin (DHR), JC-1, kao i dvojno bojenje za detekciju apoptoze sa aneksin-V i propidijum-jodidom (AV/PI).

Ispitivane supstance

Sve ispitivane supstance su razblažene u dimetilsulfoksidu (DMSO), a njihovi alikvoti čuvani su na -20 °C. Prilikom testiranja jedinjenja na ćelijskim linijama U87 i U87-TxR korišćeni su alikvoti koncentracije 10 mM za jedinjenja **82a–c**, **86a–r**, **87a–f** i **89a–e**, dok je za sklareol (**54**) korišćen alikvot koncentracije 20 mM. Kada su jedinjenja **54**, **82a–e**, **96a–k**, **97a–h**, **99a–c** i **100d** testirana na ćelijskim linijama NCI-H460 i NCI-H460/R, korišćeni su alikvoti koncentracije 10 mM. Tarikvidar (**48**) je takođe razblažen u DMSO, a njegovi alikvoti od 10 µM čuvani su na -20 °C. Jedinjenja **86c**, **96h**, **97d** i **97h** nisu bili rastvorljiva u DMSO, te nisu bila uključena u biološku evaluaciju. Radni rastvori svih jedinjenja pripremljeni su u sterilnoj dejonizovanoj vodi neposredno pre tretmana.

Ćelije i ćelijska kultura

Humana ćelijska linija glioblastoma U87 je nabavljena iz American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Ćelije U87-TxR, sa visokom ekspresijom P-glikoproteina (P-gp), su dobijene selekcijom od U87 ćelija kontinuiranim izlaganjem postepeno rastućim koncentracijama paklitaksela tokom šest do devet meseci.¹⁵³ Ćelije U87 i U87-TxR su gajene u MEM sa dodatkom 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% antibiotika penicilin-streptomycin i 1% neesencijalnih aminokiselina.

Humana ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 je nabavljena iz American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Ćelije NCI-H460/R dobijene su selekcijom od NCI-H460 ćelija kontinuiranim izlaganjem postepeno rastućim koncentracijama doksorubicina. Humana ćelijska linija fibroblasta pluća embrionalnog porekla (MRC-5) je nabavljena iz Evropske kolekcije autentičnih ćelijskih kultura (ECACC, Porton Down, Velika Britanija). NCI-H460 i NCI-H460/R ćelije su gajene u RPMI-1640 medijumu sa 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 10 000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina i 25 mg/mL amfotericina B. Ćelije MRC-5 su gajene u MEM sa 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina, 2 mM neesencijalnih aminokiselina, 5000 U/mL penicilina i 5 mg/mL streptomicina. Sve ćelije su gajene na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ i presejavane dva puta nedeljno uz korišćenje 0,25% tripsin/EDTA.

MTT test

Vijabilnost ćelija određena je pomoću MTT testa. Ova metoda zasniva se na redukciji jedinjenja 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida (MTT) u nerastvorni ljubičasti formazan u aktivnim mitohondrijama živih ćelija. Za potrebe početnog skrininga, ćelije su zasejane

u ploče sa 96 bunarića (U87: 4000 ćelija po bunariću; NCI-H460 i NCI-H460/R: 2000 ćelija po bunariću) i inkubirane preko noći. Nakon toga, ćelije su tretirane ispitivanim jedinjenjima, tokom 72 h. Ćelije U87 su tretirane sa 30 μM ispitivanih derivata, dok su NCI-H460 i NCI-H460/R tretirane sa 1 μM ispitivanih derivata.

Za određivanje IC_{50} vrednosti **54** i derivata **82a–c**, **86a** i **87g–r**, ćelije (U87, U87-TxR i MRC-5) su sejane pod istim uslovima (4000 ćelija po bunariću), a zatim tretirane rastućim koncentracijama jedinjenja **54** (5, 10, 20, 50 i 100 μM) i izabranih derivata (1, 2,5, 5, 10 i 25 μM). Svi tretmani su trajali 72 h.

Radi određivanja IC_{50} vrednosti za jedinjenja **96b**, **96c**, **96i**, **97a**, **97b**, **97c**, **97e**, **97f** i **97g**, ćelije (NCI-H460, NCI-H460/R i MRC-5) su sejane u ploče sa 96 bunarića pod istim uslovima (2000 ćelija po bunariću), inkubirane preko noći i tretirane rastućim koncentracijama izabranih derivata sklareola sa adamantanskim motivom (0,1, 0,2, 0,5, 1 i 2 μM). U simultanim kombinovanim tretmanima na NCI-H460/R ćelijama, 3 koncentracije jedinjenja **97b**, **97e** i **97f** (100, 250 i 500 nM) kombinovane su sa 5 koncentracija doksorubicina (100, 250, 500, 1000 i 2500 nM).

Po završetku tretmana, u svaki bunarić je dodat MTT rastvor (2 mg/mL) u zapremini od 100 μL , nakon čega su ploče inkubirane na 37 °C tokom 4 h. Formazan, koji se formirao u ćelijama sa funkcionalnim mitohondrijama, rastvoren je u 100 μL DMSO. Apsorbanca dobijenog rastvora izmerena je na talasnoj dužini 570 nm, sa referentnom talasnom dužinom 690 nm, na „Multiskan Sky“ čitaču mikrotitarskih ploča (Thermo Scientific, Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države). IC_{50} vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju svakog jedinjenja potrebnu da inhibira rast ćelija za 50%, izračunate su nelinearnom regresionom analizom korišćenjem softverskog paketa „GraphPad Prism 8.0.2“.

Analiza ćelijske smrti

Udeo apoptotskih, nekrotičnih i živih ćelija određen je korišćenjem dvojnog bojenja AV/PI. Za ispitivanje ćelijske smrti kod U87 i U87-TxR, ćelije su sejane u ploče sa šest bunarića, u gustini od 100 000 ćelija po bunariću i inkubirane preko noći. Ćelije su zatim tretirane tokom 24 h, 48 h, i 72 h sa jedinjenjima **15** (10 μM), **54** (50 μM), **82c** (5 μM) i **86l** (1 μM). Za ispitivanje ćelijske smrti kod NCI-H460 i NCI-H460/R, ćelije su sejane u ploče sa šest bunarića, u gustini od 50 000 ćelija po bunariću i inkubirane preko noći. Ćelije su zatim tretirane sa 1 μM i 2 μM jedinjenja **97a–c** i **97e–g** tokom 48 h.

Nakon inkubacije, ćelije su obojene AV/PI metodom i analizirane protočnom citometrijom. Intenzitet fluorescencije je meren u zelenom (525 nm) i crvenom (585 nm) kanalu pomoću protočnog citometra „CytoFLEX“ Beckman Coulter, Indianapolis, Sjedinjene Američke Države). Za svaki uzorak zabeleženo je 20 000 događaja, a procenti živih (AV– PI–), ćelija u ranoj apoptozi (AV+ PI–), ćelija u kasnoj apoptozi (AV+ PI+) i ćelija u nekrozi (AV– PI+) kvantifikovani su korišćenjem softvera „CytExpert“ (Beckman Coulter, Indianapolis, Sjedinjene Američke Države).

Analiza ćelijskog ciklusa

Ćelije glioblastoma (U87 i U87-TxR) su sejane u ploče sa 6 bunarića sa po 100 000 ćelija u svakom bunariću, dok su ćelije nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460 i NCI-H460/R) sejane u ploče sa 200 000 ćelija po bunariću, nakon čega je usledila inkubacija preko noći. Efekti jedinjenja **15** (10 μM), **54** (50 μM), derivata **82c** (5 μM) i **86l** (1 μM) na distribuciju faza ćelijskog ciklusa ispitivani su nakon 48 h kod ćelijskih linija glioblastoma. Efekti 1 μM derivata **97a–c** i **97e–g** ispitani su nakon 72 h kod ćelijskih linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Nakon tretmana, ćelije su tripsinizovane, sakupljene centrifugiranjem, isprane PBS-om i fiksirane u 70% etanolu tokom 24 h

na -20 °C. Nakon fiksacije, ćelije su ponovo isprane PBS-om i inkubirane u prisustvu 50 µg/mL ribonukleaze A tokom 15 min na 37 °C. PI je dodat do postizanja konačne koncentracije od 2 µg/mL. Analiza rezultata je sprovedena pomoću protočnog citometra „CytoFLEX“ (Beckman Coulter, Indianapolis, Sjedinjene Američke Države), uz merenje fluorescencije u crvenom kanalu (585 nm) i prikupljanje podataka iz najmanje 10 000 događaja po uzorku. Raspodela ćelijskog ciklusa analizirana je pomoću softvera „CytExpert“ (Beckman Coulter, Indianapolis, Sjedinjene Američke Države). Brzina protoka je podešena na nisku vrednost kako bi se osigurala tačnost prikupljanja podataka. Odabir pojedinačnih ćelija (diskriminacija duplikata) je izvršen korišćenjem dot-plot analize FSC-A naspram FSC-H (ili FSC-W).

Akumulacija rodamina 123

Akumulacija fluorescentne boje rodamin 123 ispitivana je metodom protočne citometrije. Pošto je rodamin 123 supstrat P-gp, njegov intenzitet fluorescencije direktno odražava njegovu akumulaciju u ćeliji. Ćelije U87-TxR i NCI-H460/R sa izraženom ekspresijom P-gp su brojane i resuspendovane u medijumu. Ćelije su istovremeno bile izložene ispitivanim jedinjenjima (5 µM) zajedno sa rodaminom 123 (5 µM za U87-TxR i 1 µM za NCI-H460/R) i inkubirane na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ tokom 30 min. Tarikvidar (**48**) (50 nM) je korišćen kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-gp. Kao pozitivna kontrola za akumulaciju rodamina 123 korišćene su U87 i NCI-H460 ćelije, koje ne eksprimiraju P-gp. Nakon inkubacije, ćelije su centrifugirane, ispirane dva puta PBS-om i resuspendovane u 1 mL hladnog PBS-a. Fluorescencija u zelenom kanalu (525 nm) je merena pomoću protočnog citometra „CytoFLEX“ (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, Sjedinjene Američke Države), a podaci su analizirani pomoću softvera „CytExpert“. Za svaki uzorak analizirano je najmanje 20 000 događaja.

Ispitivanje uticaja na membranski potencijal mitohondrija

Za analizu membranskog potencijala mitohondrija korišćena je boja JC-1. U zdravim mitohondrijama, JC-1 formira crvene aggregate, dok gubitak membranskog potencijala dovodi do prisustva zelenih monomera u citoplazmi. Ćelije glioblastoma (U87 i U87-TxR) sejane su u ploče sa šest bunarića, sa 100 000 ćelija po bunariću, inkubirane preko noći, a zatim tretirane sa 10 µM CCCP (referentno jedinjenje), 50 µM jedinjenja **54**, 5 µM jedinjenja **82c** i 1 µM jedinjenja **86l** tokom 24 h. Nakon toga, ćelije su tripsinizovane, prikupljene u 500 µL medijuma sa 2 µM boje JC-1 i inkubirane 30 min na 37 °C u mraku. Nakon ispiranja PBS-om, mereni su signali u zelenom i crvenom kanalu (525 nm i 585 nm) pomoću protočnog citometra „CytoFLEX“. Analizirano je najmanje 10 000 događaja po uzorku. Konturne mape generisane su korišćenjem softvera „CytExpert“, dok je racimetrijska analiza izvedena u softveru „Summit V4.3“.

Detekcija superoksidnog anjona, vodonik-peroksida i peroksinitrita

Nivo reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (ROS i RNS) u ćelijama procenjen je metodom protočne citometrije. Intenzitet fluorescencije DHE korišćen je kao mera za nivo superoksidnog anjona, dok je DHR ukazivao na koncentraciju vodonik-peroksida i peroksinitrita. Ćelije glioblastoma (U87 i U87-TxR) su tretirane 24 h sa CCCP (10 µM), **54** (50 µM), **82c** (5 µM) i **86l** (1 µM). Nakon tretmana, adherentne ćelije su tripsinizovane i inkubirane u medijumu sa 1 µM DHE ili DHR tokom 30 min na 37 °C u mraku. Ćelije su potom dvaput isprane PBS-om, a zatim analizirane pomoću protočnog citometra „CytoFLEX“. Detektovana je fluorescencija boje DHE (525 nm) ili DHR (585 nm). Po uzorku je analizirano najmanje 10 000 događaja. Srednji intenzitet fluorescencije (MFI) izračunat je nakon korekcije za autofluorescenciju, a analiza je vršena pomoću softverskog paketa „Summit V4.3“.

Fizičko–hemijska karakterizacija sklareola i izabranih derivata sklareola

Fizičko-hemijske karakteristike derivata sklareola sa adamantanskim motivom **97a–c** i **97e–g** određene su pomoću uređaja „Malvern Zetasizer Nano ZS“ (Malvern Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo). Ovaj instrument omogućava merenje veličina čestica u opsegu od 0,6 nm do 6 μ m. Srednja veličina, indeks polidisperzije (PDI) i zeta potencijal određeni su na 25 °C. Pre merenja, svaki uzorak razblažen je 100 puta ultračistom vodom. Da bi se osigurala tačnost, merenja su izvršena tri puta, a prikazan je prosečan rezultat.

Statistička analiza

Svi eksperimenti, MTT test, AV/PI bojenje za analizu ćelijske smrti, PI bojenje za analizu distribucije faza ćelijskog ciklusa, karakterizacija nanočestica pomoću „Zetasizer“ uređaja i akumulacija rodamina 123, izvedeni su u triplicatu ($n = 3$). Indukcija ćelijske smrti, raspodela faza ćelijskog ciklusa, nivo ROS i RNS, kao i depolarizacija mitohondrijske membrane procenjeni su primenom dvofaktorske analize varijanse (ANOVA), dok je kombinovani efekat sa doksorubicinom procenjen jednofaktorskom ANOVA metodom. Za dvofaktorsku ANOVA metodu korišćen je „Dunnett“ test višestrukih poređenja sa srednjim vrednostima netretiranih kontrolnih uzoraka, dok su za jednofaktorsku analizu varijanse ANOVA korišćeni „Brown-Forsythe“ i „Welch“ testovi za višestruka poređenja.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije razvijena je metodologija za sintezu novih hibridnih derivata sklareola, prirodnog labdanskog diterpena, u kojima je sklareolska struktura povezana sa odabranim farmakoforama ([1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin (TP), adamantan i aril-karbamid) preko aril-diaminskih linkera različite strukture. Sintetisano je i strukturno okarakterisano 80 novih derivata sklareola, dok je biološka aktivnost ispitana za 51 derivat.

Hemijske modifikacije izvedene su uz očuvanje tercijarne alilne hidroksilne grupe, koja se pokazala ključnom za antitumorsku aktivnost ovih derivata. Dodatno, po prvi put je uočeno da Hekovo kuplovanje sklareola sa *p*-jodanilinom dovodi do formiranja derivata prirodnog proizvoda manoil-oksida (**105a**).

Hibridizacija sklareola sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom rezultovala je dobijanjem proizvoda jednostruke (**86**) i dvostruke supstitucije (**87**). Utvrđeno je da hibridi sa jednom TP jedinicom **86** ispoljavaju veoma potentnu citotoksičnost prema ćelijskim linijama glioblastoma (U87 i U87-TxR), dok hibridi **87** nisu aktivni. Posebno su se izdvojila jedinjenja **86l** i **86r**, koja su ispoljila nanomolarnu aktivnost. Kod diaminskog derivata **82c** i hibrida **86a**, **86g**, **86j**, **86k**, **86m** i **86n** uočen je fenomen kolateralne osetljivosti, pri čemu su navedena jedinjenja ispoljila izraženiji citotoksični efekat prema rezistentnoj nego prema odgovarajućoj senzitivnoj ćelijskoj liniji. Istovremeno je potvrđeno da diaminski derivati TP (**89**), kao i sam sklareol, ne pokazuju citotoksično dejstvo, što jasno ukazuje na to da je upravo hibridizacija odgovorna za postizanje antitumorske aktivnosti.

Ispitivanja mehanizma dejstva potvrdila su da se hibridi serije **86** ponašaju kao modulatori aktivnosti P-glikoproteina, pri čemu su posebno značajni rezultati dobijeni za jedinjenja **86l**, **86q** i **86r**. Ovi rezultati ukazuju na potencijal ovih derivata kao hemosenzitizera i njihovu primenu u konceptu prevazilaženja višestruke rezistencije na lekove. Dodatno je utvrđeno da je kolateralna osetljivost rezistentnih ćelija posledica indukovano povećanja koncentracije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, kao i depolarizacije membrane mitohondrija. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da hibridizacija sklareola sa TP povoljno utiče na biološku aktivnost i predstavlja obećavajuću snovu za razvoj citotoksičnih jedinjenja namenjenih tretiranju višestruko rezistentnih tumora.

U drugom delu istraživanja razvijena je metodologija za sintezu derivata sklareola **96**, **97** i **99**, koji u strukturi sadrže aminoadamantanski strukturni motiv. Utvrđeno je da derivati **96** (sa benzenovim jezgrom) i **97** (sa tiofenskim ili furanskim jezgrom) imaju snažnije antitumorsko dejstvo od jedinjenja odgovarajućih amidnih derivata **99**. Većina sintetisanih jedinjenja pokazala je poboljšanu antitumorsku aktivnost protiv ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NCI-H460 i NCI-H460/R) u poređenju sa sklareolom (**54**) i odgovarajućim diaminskim analogima (**82** i **95**). Utvrđeno je da više derivata izaziva izraženu inhibiciju rasta osetljivih NCI-H460 ćelija pri koncentraciji 1 μM, pri čemu se jedinjenje **97b** izdvojilo pojavom kolateralne senzitivnosti i najvećim indeksom selektivnosti (SI = 3,10). Pokazano je da hibridi sklareola sa adamantanom indukuju nekrozu kao dominantni oblik ćelijske smrti i utiču na progresiju ćelijskog ciklusa. Posebno je važno da jedinjenja **97b**, **97e** i **97f** pokazuju potencijal za reverziju rezistencije na doksorubicin kod NCI-H460/R ćelija, što je u skladu sa rezultatima koji ukazuju na njihovu interakciju sa P-gp: jedinjenja **97e** i **97f** ponašaju se kao supstrati, dok se jedinjenje **97b** može klasifikovati kao inhibitor P-gp.

Dodatno, utvrđeno je da jedinjenja **97a–c** i **97e–g** sa aminoadamantanskim motivom, kao i njihovi diaminski analozi **95a–d**, spontano formiraju nanočestice pri rastvaranju u vodi, bez dodatne primene fizičkih i hemijskih tretmana. Dobijene nanočestice odlikuju se niskim indeksom polidisperzije, što ukazuje na njihovu uniformnost, kao i pozitivnom vrednošću zeta potencijala. Ovi rezultati potvrđuju da aminoadamantanski motiv povoljno modifikuje fizičko-hemijske osobine molekula, povećavajući njegov biološki potencijal i istovremeno omogućavajući stvaranje nanočestičnih sistema koji se efikasnije vezuju za negativno naelektrisanu membranu tumorskih ćelija. Na taj način, ovi derivati predstavljaju perspektivnu osnovu za dalji razvoj antitumorske terapije, uključujući i nanoformulacije.

U posljednjem delu istraživanja razvijena je metoda za sintezu karbamidnih derivata sklareola **111a–s**. Kod derivata sklareola sa karbamatnom strukturnom jedinicom uočena je reakcija intramolekulske ciklizacije, pri čemu dolazi do formiranja cikličnih urea **113**. Ovakva reakcija do sada nije prijavljena u literature i otvara mogućnost za dalje funkcionalizacije sklareola u pravcu dobijanja novih bioaktivnih molekula.

Na osnovu ukupnih rezultata postignutih u ovoj disertaciji može se zaključiti da razvijene sintetičke strategije predstavljaju dobru osnovu za dobijanje biološki aktivnih derivata sklareola. Hibridizacija sklareola pokazala se kao efikasan pristup dizajnu jedinjenja kod kojih farmakofore deluju sinergijski, obezbeđujući ne samo snažnu antitumorsku aktivnost, već i sposobnost modulacije aktivnosti P-gp, što dobijena jedinjenja kvalifikuje kao dobre osnove za razvoj hemosenzitizera. Fenomen kolateralne senzitivnosti zabeležen kod jedinjenja **86a**, **86g**, **86j**, **86k**, **86m**, **86n** i **97b** posebno naglašava značaj ovih derivata za tretiranje višestruko rezistentnih tumora, dok sposobnost sklareola i njegovih derivata da spontano formiraju nanočestice otvara dodatne mogućnosti njihove primene u nanočestičnim formulacijama lekova.

6. LITERATURA

1. D. M. Hausman, What is cancer? *Perspect. Biol. Med.* **2019**, 62(4), 778–784.
2. S. H. Hassanpour, M. Dehghani, Review of cancer from perspective of molecular, *J. Cancer Res. Pract.* **2017**, 4(4), 127–129.
3. S. Wu, W. Zhu, P. Thompson, Y. A. Hannun, Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 3490.
4. R. Vendramin, K. Litchfield, C. Swanton, Cancer evolution: Darwin and beyond, *EMBO J.* **2021**, 40, e108389.
5. T. Hunt, K. Nasmyth, B. Novák, The cell cycle, *Phil. Trans. R. Soc. B* **2011**, 366, 3494–3497.
6. Matthews, H. K.; Bertoli, C.; de Bruin, R. A. M. Cell cycle control in cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, 23, 74–88.
7. H. K. Matthews, C. Bertoli, R. A. M. de Bruin, Cell cycle control in cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2022**, 23, 74–88.
8. D. L. Burkhardt, J. Sage, Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene, *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8, 671–682.
9. M. D. Miller, S. D. Thomas, A. Islam, D. Muench, K. Sedoris, c-Myc and cancer metabolism, *Clin. Cancer Res.*, **2012**, 18, 5546–5553.
10. H. Gaillard, T. García-Muse, A. Aguilera, Replication stress and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, 15, 276–289.
11. M. Zeman, K. Cimprich, Causes and consequences of replication stress, *Nat. Cell Biol.*, **2014**, 16, 2–9.
12. R. Fagundes, L. K. Teixeira, Cyclin E/CDK2: DNA replication, replication stress and genomic instability, *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 774845.
13. M. Löbrich, P. A. Jeggo, The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 861–869.
14. E. Sdeor, H. Okada, R. Saad, T. Ben-Yishay, U. Ben-David, Aneuploidy as a driver of human cancer, *Nat. Genet.*, **2024**, 56, 2014–2026.
15. G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.*, **2009**, 16, 3–11.
16. E. Lee, C.-H. Song, S.-J. Bae, K.-T. Ha, R. Karki, Regulated cell death pathways and their roles in homeostasis, infection, inflammation, and tumorigenesis, *Exp. Mol. Med.*, **2023**, 55, 1632–1643.
17. C. Kern, J. V. Bonventre, A. W. Justin, K. Kashani, E. Reynolds, K. Siew, B. Davis, H. Karakoy, N. Grzesiak, D. M. Bailey, Necrosis as a fundamental driver of loss of resilience and biological decline: what if we could intervene?, *Oncogene*, **2025**, 44, 1893–1904.
18. P. Golstein, G. Kroemer, Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends Biochem. Sci.*, **2007**, 32, 37–43.
19. A. Murao, M. Aziz, H. Wang, M. Brenner, P. Wang, Release mechanisms of major DAMPs, *Apoptosis*, 2021, 26, 152–162.
20. P. P. Yee, W. Li, Tumor necrosis: A synergistic consequence of metabolic stress and inflammation, *BioEssays*, **2021**, 43, e2100029.
21. L. Lossi, The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis, *Biochem. J.*, **2022**, 479(3), 357–384.
22. G. Häcker, The morphology of apoptosis, *Cell Tissue Res.*, **2000**, 301, 5–17.
23. T.-J. Fan, L.-H. Han, R.-S. Cong, J. Liang, Caspase family proteases and apoptosis, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **2005**, 37(11), 719–727.
24. F. L. Kiechle, X. Zhang, Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications, *Clin. Chim. Acta*, **2002**, 326, 27–45.
25. S. W. G. Tait, D. R. Green, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, 11, 621–632.

26. X. Wei, T. Fan, M. Yu, Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **2008**, *40*, 278–288.
27. V. Shoshan-Barmatz, T. Arif, A. Shteiinfer-Kuzmine, Apoptotic proteins with non-apoptotic activity: expression and function in cancer, *Apoptosis*, **2023**, *28*, 730–753.
28. R. Kumar, P. E. Herbert, A. N. Warrens, An introduction to death receptors in apoptosis, *Int. J. Surg.*, **2005**, *3*, 268–277.
29. K. Fernald, M. Kurokawa, Evading apoptosis in cancer, *Trends Cell Biol.*, **2013**, *23*, 620–633.
30. I. Fridovich, Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1999**, *893*, 13–18.
31. J. F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.*, **2003**, *552* (Pt 2), 335–344.
32. I. Fridovich, Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, **1995**, *64*, 97–112.
33. Y. Hong, A. Boiti, D. Vallone, N. S. Foulkes, Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution, *Antioxidants*, **2024**, *13*(3), 312.
34. H. Sies, Role of Metabolic H₂O₂ Generation in Redox Signaling and Oxidative Stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **2014**, *289*(13), 8735–8741.
35. H. Sies, C. Berndt, D. P. Jones, Oxidative Stress, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, *86*, 715–748.
36. M. Kobayashi, M. Yamamoto, Nrf2–Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species, *Adv. Enzyme Regul.*, **2006**, *46*(1), 113–140.
37. E. C. Cheung, K. H. Vousden, The role of ROS in tumour development and progression, *Nat. Rev. Cancer*, **2022**, *22*, 280–297.
38. L. Zhang, Y. Cao, X. Guo, X. Wang, X. Han, K. Kanwore, X. Hong, H. Zhou, D. Gao, Hypoxia-induced ROS aggravate tumor progression through HIF-1 α –SERPINE1 signaling in glioblastoma, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **2023**, *24*, 32–49.
39. A. J. Robinson, G. L. Hopkins, N. Rastogi, M. Hodges, M. Doyle, S. Davies, P. S. Hole, N. Omidvar, R. L. Darley, A. Tonks, Reactive oxygen species drive proliferation in acute myeloid leukemia via the glycolytic regulator PFKFB3, *Cancer Res.*, **2020**, *80*, 937–949.
40. R. Eller-Borges, E. G. Rodrigues, A. C. S. Teodoro, M. S. Moraes, D. C. Arruda, T. Paschoalin, M. F. Curcio, P. E. da Costa, I. R. Do Nascimento, L. A. Calixto, A. Stern, H. P. Monteiro, W. L. Batista, Bradykinin promotes murine melanoma cell migration and invasion through endogenous production of superoxide and nitric oxide, *Nitric Oxide–Biol. Chem.*, **2023**, *132*, 15–26.
41. W. Zhao, P. Zhuang, Y. Chen, Y. Wu, M. Zhong, Y. Lun, “Double-Edged Sword” Effect of Reactive Oxygen Species (ROS) in Tumor Development and Carcinogenesis, *Physiol. Res.*, **2023**, *72*(3), 301–317.
42. N. Behranvand, F. Nasri, R. Z. Eameh, P. Khani, A. Hosseini, J. Garssen, R. Falak, Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment, *Cancer Immunol. Immunother.*, **2022**, *71*, 507–526.
43. D. Galmarini, C. M. Galmarini, F. C. Galmarin, Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2012**, *84*, 181–199.
44. R., Ralhan, J., Kaur, Alkylating agents and cancer therapy, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2007**, *17*, 1061–1075.
45. B. Diethelm-Varela, Y. Ai, D. Liang, F. Xue, Nitrogen mustards as anticancer chemotherapies: historic perspective, current developments and future trends, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2019**, *19*, 691–712.
46. F. M. D. Ismail, D. O. Levitsky, V. M. Dembitsky, Aziridine alkaloids as potential therapeutic agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3373–3387.
47. A. Galaup, A. Paci, Pharmacology of dimethanesulfonate alkylating agents: busulfan and treosulfan, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2013**, *9*, 333–347.
48. C. T. Gnewuch, G. Sosnovsky, A Critical Appraisal of the Evolution of N–Nitrosoureas as Anticancer Drugs, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*(3), 829–1014.

49. F. Marchesi, M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino, L. De Vecchis, Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacol. Res.*, **2007**, *56*(4), 275–287.
50. S. Rottenberg, C. Disler, P. Perego, The rediscovery of platinum–based cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **2021**, *21*, 37–50.
51. G. J. Peters, Novel Developments in the Use of Antimetabolites, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, **2014**, *33*(4–6), 358–374.
52. G. V. Scagliotti, G. Selvaggi, Antimetabolites and cancer: emerging data with a focus on antifolates, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2006**, *16*(2), 189–200.
53. X. Liang, Q. Wu, S. Luan, Z. Yin, C. He, L. Yin, Y. Zou, Z. Yuan, L. Li, X. Song, M. He, C. Lv, W. Zhang, A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade, *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *171*, 129–168.
54. P. A. Yakkala, N. R. Penumallu, S. Shafi, A. Kamal, Prospects of Topoisomerase Inhibitors as Promising Anti–Cancer Agents, *Pharmaceuticals*, **2023**, *16*(10), 1456.
55. A. Devi Tangutur, D. Kumar, V. Kommalapati, S. Kantevari, Microtubule Targeting Agents as Cancer Chemotherapeutics: An Overview of Molecular Hybrids as Stabilizing and Destabilizing Agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2017**, *17*(22), 2523–2537.
56. A. Ediriwickrema, W. M. Saltzman, Nanotherapy for cancer: targeting and multifunctionality in the future of cancer therapies, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2015**, *1*, 64–78.
57. C. N. M. Hoang, S. H. Nguyen, M. T. Tran, Nanoparticles in cancer therapy: Strategies to penetrate and modulate the tumor microenvironment – A review, *Smart Mater. Med.*, **2025**, *6*, 270–284.
58. Z. Zhao, A. Ukidve, J. Kim, S. Mitragotri, Targeting strategies for tissue-specific drug delivery, *Cell*, **2020**, *181*, 151–167.
59. F. Rodríguez, P. Caruana, N. De la Fuente, P. Español, M. Gámez, J. Balart, E. Llurba, R. Rovira, R. Ruiz, C. Martín-Lorente, et al., Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges, *Biomolecules*, **2022**, *12*, 784.
60. Y. Jia, Y. Jiang, Y. He, W. Zhang, J. Zou, K. T. Magar, H. Boucetta, C. Teng, W. He, Approved nanomedicine against diseases, *Pharmaceutics*, **2023**, *15*, 774.
61. S. Zhao, Y. Tang, R. Wang, M. Najafi, Mechanisms of cancer cell death induction by paclitaxel: an updated review, *Apoptosis*, **2022**, *27*, 647–667.
62. M. Moudi, R. Go, C. Y. S. Yien, M. Nazre, Vinca alkaloids, *Int. J. Prev. Med.*, **2013**, *4*(11), 1231–1235.
63. M. Kciuk, A. Gielecińska, S. Mujwar, D. Kołat, Ż. Kałuzińska-Kołat, I. Celik, R. Kontek, Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity, *Cells*, **2023**, *12*, 659.
64. D. A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, *57*, 727–741.
65. J. V. McGowan, R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J. M. Walker, D. M. Yellon, Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2017**, *31*, 63–75.
66. M. D’Incalci, N. Badri, C. M. Galmarini, P. Allavena, Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment, *Br. J. Cancer*, **2014**, *111*, 646–650.
67. T. Rodrigues, D. Reker, P. Schneider, G. Schneider, Counting on natural products for drug design, *Nat. Chem.*, **2016**, *8*, 531–541.
68. A. L. Harvey, Natural products in drug discovery, *Drug Discov. Today*, **2008**, *13*(19–20), 894–901.
69. A. M. Clark, Natural Products as a Resource for New Drugs, *Pharm. Res.*, **1996**, *13*, 1133–1141.
70. E. Martino, S. Della Volpe, E. Terribile, E. Benetti, M. Sakaj, A. Centamore, A. Sala, S. Collina, The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*(4), 701–707.

71. Z. Shah, U. F. Gohar, I. Jamshed, A. Mushtaq, H. Mukhtar, M. Z.–U. Haq, S. I. Toma, R. Manea, M. Moga, B. Popovici, Podophyllotoxin: History, Recent Advances and Future Prospects, *Biomolecules*, **2021**, *11*(4), 603.
72. U. Swami, U. Shah, S. Goel, Eribulin in Cancer Treatment, *Mar. Drugs*, **2015**, *13*(8), 5016–5058.
73. H. Joshi, H. S. Tuli, A. Ranjan, A. Chauhan, S. Haque, S. Ramniwas, G. K. Bhatia, D. Kandari, The Pharmacological Implications of Flavopiridol: An Updated Overview, *Molecules*, **2023**, *28*(22), 7530.
74. A. Capasso, Vinorelbine in Cancer Therapy, *Current Drug Targets*, **2012**, *13*(8), 1065–1071.
75. A. Catalano, D. Iacopetta, J. Ceramella, D. Scumaci, F. Giuzio, C. Saturnino, S. Aquaro, C. Rosano, M. S. Sinicropi, Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies, *Molecules*, **2022**, *27*(3), 616.
76. C. P. Heming, W. Muriithi, L. W. Macharia, P. N. Filho, V. Moura–Neto, V. Aran, P–glycoprotein and cancer: what do we currently know, *Heliyon*, **2022**, *8*(10), e11171.
77. I. I. A. Juvalé, A. A. Abdul Hamid, K. B. Abd Halim, A. T. Che Has, P–glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease, *Heliyon*, **2022**, *8*(6), e09777.
78. C. Karthika, R. Sureshkumar, M. Zehravi, R. Akter, F. Ali, S. Ramproshad, B. Mondal, P. Tagde, Z. Ahmed, F. S. Khan, M. H. Rahman, S. Cavalu, Multidrug Resistance of Cancer Cells and the Vital Role of P–Glycoprotein, *Life*, **2022**, *12*(6), 897.
79. R. B. Wang, C. L. Kuo, L. L. Lien, E. J. Lien, Structure–activity relationship: analyses of P–glycoprotein substrates and inhibitors, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **2003**, *28*(3), 203–228.
80. A. Palmeira, E. Sousa, M. H. Vasconcelos, M. M. Pinto, Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds, *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*(13), 1946–2025.
81. Baumert, C., Hilgeroth, A. Recent advances in the development of P-gp inhibitors, *Anti–Cancer Agents Med. Chem.*, **2009**, *9*(4), 415–436.
82. Darby, A. J., Callaghan, R., McMahon, R. M. P–glycoprotein inhibition: The past, the present and the future, *Curr. Drug Metab.*, **2011**, *12*(8), 722–731.
83. T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil, *Cancer Res.*, **1981**, *41*(5), 1967–1972.
84. S. Harder, Verapamil: A Promising Agent for Circumvention of Multidrug–Resistance?, *Onkologie*, **1991**, *14*(3), 212–217.
85. B. Ryffel, P. Donatsch, M. Madörin, B. E. Matter, G. Rüttimann, H. Schön, R. Stoll, J. Wilson, Toxicological evaluation of cyclosporin A, *Arch. Toxicol.*, **1983**, *53*, 107–141.
86. M. Qadir, K. L. O'Loughlin, S. M. Fricke, N. A. Williamson, W. R. Greco, H. Minderman, M. R. Baer, Cyclosporin A is a broad–spectrum multidrug resistance modulator, *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*(6), 2320–2326.
87. W. H. Wilson, C. Jamis–Dow, G. Bryant, F. M. Balis, R. W. Klecker, S. E. Bates, B. A. Chabner, S. M. Steinberg, D. R. Kohler, R. E. Wittes, Phase I and pharmacokinetic study of the multidrug resistance modulator dexverapamil with EPOCH chemotherapy, *J. Clin. Oncol.*, **1995**, *13*(8), 1985–1994.
88. D. R. Ferry, P. J. Malkhandi, M. A. Russell, D. J. Kerr, Allosteric regulation of [³H]vinblastine binding to P–glycoprotein of MCF–7 ADR cells by dexniguldipine, *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *49*(12), 1851–1861.
89. P. M. Fracasso, G. A. Fisher Jr, S. A. Goodner, J. H. Beumer, M. J. Egorin, C. L. Fears, J. D. Wildi, G. J. Jones, T. E. Pearce, B. I. Sikic, A Phase I Trial of the ABCB1 Inhibitor, Oral Valspodar, in Combination With Paclitaxel in Patients With Advanced Solid Tumors, *Am. J. Clin. Oncol.*, **2023**, *46*(8), 353–359.
90. E. Fox, S. E. Bates, Tariquidar (XR9576): a P–glycoprotein drug efflux pump inhibitor, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2007**, *7*(4), 447–459.

91. L. D. Cripe, H. Uno, E. M. Paietta, M. R. Litzow, R. P. Ketterling, J. M. Bennett, J. M. Rowe, H. M. Lazarus, S. Luger, M. S. Tallman, Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999, *Blood*, **2010**, *116*(20), 4077–4085.
92. I. E. L. M. Kuppens, T. M. Bosch, M. J. van Maanen, H. Rosing, A. Fitzpatrick, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, Oral bioavailability of docetaxel in combination with OC144–093 (ONT–093), *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *55*, 72–78.
93. B. Tinoush, I. Shirdel, M. Wink, Phytochemicals: potential lead molecules for MDR reversal, *Front. Pharmacol.*, **2020**, *11*, 832.
94. K. Miklós, I. Hódi, B. Kiss, K. Nagy, A. Tóth, B. G. Szabó, D. Orosz, Z. Szakács, Inhibitory effects of quercetin and its main methyl, sulfate, and glucuronic acid conjugates on cytochrome P450 enzymes, and on OATP, BCRP and MRP2 transporters, *Nutrients*, **2020**, *12*, 2306.
95. H. Deng, F. Wei, W. Han, Y. Li, X. Xu, L. Zhang, Y. Zhang, Synergistic chemotherapy and immunomodulatory effects of Quercetin in cancer: a review, *Front. Immunol.*, **2025**, *16*, 1547992.
96. M. González-Vallinas, S. Molina, G. Vicente, A. de la Cueva, T. Vargas, S. Santoyo, M. R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero, A. R. de Molina, Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals, *Pharmacol. Res.*, **2010**, *61*, 259–263.
97. M. Z. El-Readi, D. Hamdan, N. Farrag, A. El-Shazly, M. Wink, Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from *Citrus* species in human colon and leukaemia cell lines, *Eur. J. Pharmacol.*, **2010**, *626*, 139–145.
98. D. N. Louis, A. Perry, P. Wesseling, D. J. Brat, I. A. Cree, D. Figarella-Branger, C. Hawkins, H. K. Ng, S. M. Pfister, G. Reifenberger, et al., The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Neuro-Oncology*, **2021**, *23*, 1231–1251.
99. S. Singh, D. Dey, D. Barik, I. Mohapatra, S. Kim, M. Sharma, S. Prasad, P. Wang, A. Singh, G. Singh, Glioblastoma at the crossroads: current understanding and future therapeutic horizons, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2025**, *10*, 213.
100. S. Grochans, A. M. Cybulska, D. Simińska, J. Korbecki, K. Kojder, D. Chlubek, I. Baranowska-Bosiacka, Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review, *Cancers* **2022**, *14*(10), 2412.
101. L. R. Schaff, I. K. Mellinghoff, Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review, *JAMA* **2023**, *329*(7), 574–587.
102. M. H. Yoshikawa, N. N. Rabelo, J. P. M. Telles, E. G. Figueiredo, Modifiable risk factors for glioblastoma: a systematic review and meta-analysis, *Neurosurg. Rev.*, **2023**, *46*, 143.
103. C. J. Smith, T. A. Perfetti, C. Chokshi, C. Venugopal, J. W. Ashford, S. K. Singh, Risk factors for glioblastoma are shared by other brain tumor types, *Hum. Exp. Toxicol.*, **2024**, *43*, 09603271241241796.
104. R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. B. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N. Eng. J. Med.* **2005**, *352*(10), 987–996.
105. S. S. K. Yalamarty, N. Filipczak, X. Li, M. A. Subhan, F. Parveen, J. A. Ataide, B. A. Rajmalani, V. P. Torchilin, Mechanisms of resistance and current treatment options for glioblastoma multiforme (GBM), *Cancers*, **2023**, *15*(7), 2116.
106. K. D. Krex, B. Klink, C. Hartmann, M. Baur, B. J. Sobel, G. Schackert, Long-term survival with glioblastoma multiforme, *Brain*, **2007**, *130*, 2596–2606.
107. Podaci preuzeti sa sajta organizacije *The Global Cancer Observatory (GCO)* <https://gco.iarc.fr/en>
108. C. Gridelli, A. Rossi, D. P. Carbone, J. Guarize, N. Karachaliou, T. Mok, F. Petrella, L. Spaggiari, R. Rosell, Non-small-cell lung cancer, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2015**, *1*, 15009.

109. Z. Chen, C. M. Fillmore, P. S. Hammerman, C. F. Kim, K.-K. Wong, Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases, *Nat. Rev. Cancer*, **2014**, *14*, 535–546.
110. S. Tsimas, C. A. O'Dowd, R. Milroy, S. Davidson, *Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): A review*, *Respir. Med.*, **2010**, *104* (12), 1767–1774.
111. R. Ramos, C. S. Moura, M. Costa, N. J. Lamas, R. Correia, D. Garcez, J. M. Pereira, T. Lindahl, C. Sousa, N. Vale, Lung Cancer Therapy: The Role of Personalized Medicine, *Cancers*, **2025**, *17*(5), 725.
112. M. Araghi, R. Mannani, A. Heidarnejad Maleki, Recent advances in non-small cell lung cancer targeted therapy; an update review, *Cancer Cell Int.*, **2023**, *23*, 162.
113. J. Rotow, T. G. Bivona, Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC, *Nat. Rev. Cancer*, **2017**, *17*, 637–658.
114. B. Zeng, A. Wei, Q. Zhou, M. Yuan, K. Lei, Y. Liu, J. Song, L. Guo, Q. Ye, Andrographolide: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity and clinical trials and pharmaceutical researches, *Phytother. Res.*, **2022**, *36*(1), 336–364.
115. C. Bailly, Anticancer activities and mechanism of action of the labdane diterpene coronarin D, *Pathol. Res. Pract.*, **2020**, *216* (6), 152946.
116. M. Chen, X. He, Z. Sun, X. Huo, Y. Hou, X. Xu, H. Wu, L. Shi, G. Ma, Natural carrier-free self-assembled diterpene nanoparticles with its efficient anti-inflammation through the inhibition of NF- κ B pathway for accelerated wound healing, *Biomed. Pharmacother.*, **2023**, *165*, 115041.
117. B. Çulhaoğlu, G. Yapar, T. Dirmenci, G. Topçu, Bioactive constituents of *Salvia chrysophylla* Stapf, *Nat. Prod. Res.*, **2013**, *27*, 438–447.
118. S. Stankov, H. Fidan, N. Petkova, I. Dincheva, A. Stoyanova, B. C. Senkal, T. Uskutoglu, Phytochemical composition of *Salvia candidissima* Vahl. ssp. *occidentalis* from Turkey, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **2020**, *23*, 710–718.
119. U. Kolak, I. Gazioglu, M. Öztürk, F. Ozgokce, G. Topcu, A. Ulubelen, Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*, *Turk. J. Chem.*, **2009**, *33*, 813–823.
120. A. Ulubelen, M. Miski, C. Johansson, E. Lee, T. J. Mabry, S. A. Matlin, Terpenoids from *Salvia palaestina*, *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 1386–1387.
121. M. M. Farimani, M. Miran, Labdane diterpenoids from *Salvia reuterana*, *Phytochemistry*, **2014**, *108*, 264–269.
122. I. Chinou, C. Demetzos, C. Harvala, C. Roussakis, J. F. Verbis, Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*, *Planta Med.*, **1994**, *60*, 34–36.
123. M. Alviri, M. B. Bahadori, S. Bahadori, Flavonoid and diterpenoid components from *Teucrium orientale* subsp. *orientale* and their radical scavenging activity, *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **2022**, *12*, 682–689.
124. P. G. Forster, E. L. Ghisalberti, P. R. Jefferies, Labdane diterpenes from an *Acacia* species, *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 2991–2993.
125. A. Caniard, P. Zerbe, S. Legrand, A. Cohade, N. Valot, J.-L. Magnard, J. Bohlmann, L. Legendre, Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture, *BMC Plant Biol.*, **2012**, *12*, 119.
126. I. S. Tamburlin, E. Roux, M. Feuillée, J. Labbé, Y. Aussaguès, F. E. El Fadle, F. Fraboul, G. Bouvier, Toxicological safety assessment of essential oils used as food supplements to establish safe oral recommended doses, *Food Chem. Toxicol.*, **2021**, *157*, 112603.
127. J. Zhou, X. Xie, H. Tang, C. Peng, F. Peng, The bioactivities of sclareol: A mini review, *Front. Pharmacol.*, **2022**, *13*, 1014105.
128. K. Dimas, D. Kokkinopoulos, C. Demetzos, B. Vaos, M. Marselos, M. Malamas, T. Tzavaras, The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines, *Leuk. Res.*, **1999**, *23*, 217–234.

129. W. D. Fairlie, E. F. Lee, Co-operativity between MYC and BCL-2 pro-survival proteins in cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *22*, 2841.
130. K. Dimas, C. Demetzos, V. Vaos, P. Ioannidis, T. Trangas, Labdane type diterpenes down-regulate the expression of c-Myc protein, but not of Bcl-2, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis, *Leuk. Res.*, **2001**, *25*, 449–454.
131. K. Dimas, S. Hatziantoniou, S. Tseleni, H. Khan, A. Georgopoulos, K. Alevizopoulos, J. H. Wyche, P. Pantazis, C. Demetzos, Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells in vitro and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice, *Apoptosis*, **2007**, *12*, 685–694.
132. J. Morales, L. Li, F. J. Fattah, Y. Dong, E. A. Bey, M. Patel, J. Gao, D. A. Boothman, Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **2014**, *24*, 15–28.
133. S. Hatziantoniou, K. Dimas, A. Georgopoulos, N. Sotiriadou, C. Demetzos, Cytotoxic and antitumor activity of liposome incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts, *Pharmacol. Res.*, **2006**, *53*, 80–87.
134. A. Paradissis, S. Hatziantoniou, A. Georgopoulos, A.-M. G. Psarra, K. Dimas, C. Demetzos, Liposomes modify the subcellular distribution of sclareol uptake by HCT-116 cancer cell lines, *Biomed. Pharmacother.*, **2007**, *61*, 120–124.
135. K. Dimas, M. Papadaki, C. Tsimplouli, S. Hatziantoniou, K. Alevizopoulos, P. Pantazis, C. Demetzos, Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs, *Biomed. Pharmacother.*, **2006**, *60*, 127–133.
136. T. Zhang, T. Wang, P. Cai, Sclareol inhibits cell proliferation and sensitizes cells to the antiproliferative effect of bortezomib via upregulating the tumor suppressor caveolin-1 in cervical cancer cells, *Mol. Med. Rep.*, **2017**, *15*, 3566–3574.
137. M. I. Díaz, P. Díaz, J. Castillo Bennett, H. Urrea, R. Ortiz, P. Contreras Orellana, C. Hetz, A. F. G. Quest, Caveolin-1 suppresses tumor formation through the inhibition of the unfolded protein response, *Cell Death Dis.*, **2020**, *11*, 648.
138. L. Wang, H.-S. He, H.-L. Yu, Y. Zeng, H. Han, N. He, Z.-G. Liu, Z.-Y. Wang, S.-J. Xu, M. Xiong, Sclareol, a plant diterpene, exhibits potent antiproliferative effects via the induction of apoptosis and mitochondrial membrane potential loss in osteosarcoma cancer cells, *Mol. Med. Rep.*, **2015**, *11*, 4273–4278.
139. J. Mo, R. Yang, D. Zhang, Modulation of anoikis resistance in MG63 osteosarcoma cells by sclareol via inhibiting Ezrin/FAK expression, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2016**, *9*, 6795–6803.
140. F. Sattari Fard, N. Jalilzadeh, A. Mehdizadeh, F. Sajjadian, K. Velaei, Understanding and targeting anoikis in metastasis for cancer therapies, *Cell Biol. Int.*, **2023**, *47*(4), 683–698.
141. R. Gudneppanavar, C. Di Pietro, H. H. Öz, P.-X. Zhang, E.-C. Cheng, P. H. Huang, T. Tebaldi, G. Biancon, S. Halene, A. D. Hoppe, C. Kim, A. L. Gonzalez, D. S. Krause, M. E. Egan, N. Gupta, T. S. Murray, E. M. Bruscia, Ezrin drives adaptation of monocytes to the inflamed lung microenvironment, *Cell Death Dis.*, **2024**, *15*, 864.
142. H. L. Chen, J. Y. Gong, S.-C. Lin, S. Li, Y.-C. Chiang, J.-H. Hung, C.-C. Yen, C.-C. Lin, Effects of sclareol against small cell lung carcinoma and the related mechanism: In vitro and in vivo studies, *Anticancer Res.*, **2020**, *40*, 4947–4960.
143. C.-H. Pan, S.-Y. Chen, J.-Y. Wang, S.-P. Tsao, H.-Y. Huang, W.-C. Chiu, et al., Sclareol ameliorated ERCC1-mediated cisplatin resistance in A549 human lung adenocarcinoma cells and a murine xenograft tumor model by suppressing AKT-GSK3 β -AP1/Snail and JNK-AP1 pathways, *Chem. Biol. Interact.*, **2020**, *332*, 109304.
144. Shakeel-u-Rehman, B. Rah, S. H. Lone, R. U. Rasool, S. Farooq, D. Nayak, N. A. Chikan, S. Chakraborty, A. Behl, D. M. Mondhe, A. Goswami, K. A. Bhat, Design and synthesis of antitumor coupled sclareol analogues: modulation of BH3 family members by SS-12 in autophagy and apoptotic cell death, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 3432–3444.

145. M. Ma, J. Feng, R. Li, S.-W. Chen, H. Xu, Synthesis and antifungal activity of ethers, alcohols, and iodohydrin derivatives of sclareol against phytopathogenic fungi in vitro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 2773–2777.
146. A. Crusco, H. Whiteland, R. Baptista, J. E. Forde–Thomas, M. Beckmann, L. A. J. Mur, R. J. Nash, A. D. Westwell, K. F. Hoffmann, Antischistosomal properties of sclareol and its Hecoupled derivatives: design, synthesis, biological evaluation, and untargeted metabolomics, *ACS Infect. Dis.*, **2019**, 5, 1188–1199.
147. K. Oukoloff, B. Lucero, K. R. Francisco, K. R. Brunden, C. Ballatore, 1,2,4–Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines in drug design, *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, 165, 332–346.
148. C. M. Richardson, D. S. Williamson, M. J. Parratt, J. Borgognoni, A. D. Cansfield, P. Dokurno, G. L. Francis, R. Howes, J. D. Moore, J. B. Murray, A. Robertson, A. E. Surgenor, C. J. Torrance, Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: protein structure–guided design and SAR, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 1353–1357.
149. R. M. Sanchez, K. Erhard, M. A. Hardwicke, H. Lin, J. McSurdy–Freed, R. Plant, K. Raha, C. M. Rominger, M. D. Schaber, M. D. Spengler, M. L. Moore, H. Yu, J. I. Luengo, R. Tedesco, R. A. Rivero, Synthesis and structure–activity relationships of 1,2,4–triazolo[1,5-*a*]pyrimidin–7(3H)–ones as novel series of potent b isoform selective phosphatidylinositol 3–kinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 3198–3202.
150. T. Heinrich, H.–P. Buchstaller, B. Cezanne, F. Rohdich, J. Bomke, M. Friesen–Hamim, M. Krier, T. Knöchel, D. Musil, B. Leuthner, F. Zenke, Novel reversible methionine aminopeptidase–2 (MetAP–2) inhibitors based on purine and related bicyclic templates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, 27, 551–556.
151. J. Yang, Y. Yu, Y. Li, W. Yan, H. Ye, L. Niu, M. Tang, Z. Wang, Z. Yang, H. Pei, H. Wei, M. Zhao, J. Wen, L. Yang, L. Ouyang, Y. Wei, Q. Chen, W. Li, L. Chen, Cevipabulin–tubulin complex reveals a novel agent binding site on α -tubulin with tubulin degradation effect, *Sci. Adv.*, **2021**, 7 (21), eabg4168.
152. L. Chang, M. Xiao, L. Yang, S. Wang, S.–Q. Wang, A. Bender, A. Hu, Z.–S. Chen, B. Yu, H.–M. Liu, Discovery of a non–toxic [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidin–7–one (WS–10) that modulates ABCB1–mediated multidrug resistance (MDR), *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 5006–5017.
153. A. Podolski–Renić, T. Anđelković, J. Banković, N. Tanić, S. Ruždijić, M. Pešić, The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines, *Biomed. Pharmacother.*, **2011**, 65 (5), 345–353.
154. T. Stanković, B. Dankó, A. Martins, M. Dragoj, S. Stojković, A. Isaković, H.–C. Wang, Y.–C. Wu, A. Hunyadi, M. Pešić, Lower antioxidative capacity of multidrug–resistant cancer cells confers collateral sensitivity to protoflavone derivatives, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2015**, 76, 555–565.
155. G. Lamoureux, G. Artavia, Use of the adamantane structure in medicinal chemistry, *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17, 2967–2978.
156. J. Liu, D. Obando, V. Liao, T. Lifa, R. Codd, The many faces of the adamantyl group in drug design, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 1949–1963.
157. R. T. Rapala, R. J. Kraay, K. Gerzon, The adamantyl group in medicinal agents. II. Anabolic steroid β –adamantoates, *J. Med. Chem.*, **1965**, 8, 580–583.
158. L. Wanka, K. Iqbal, P. R. Schreiner, The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives, *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 3516–3604.
159. J. Chandra, J. Hackbarth, S. Le, D. Loegering, N. Bone, L. M. Bruzek, V. L. Narayanan, A. A. Adjei, N. E. Kay, A. Tefferi, J. E. Karp, E. A. Sausville, S. H. Kaufmann, Involvement of reactive oxygen species in adaphostin–induced cytotoxicity in human leukemia cells, *Blood*, **2003**, 102, 4512–4519.
160. C. Hose, G. Kaur, E. A. Sausville, A. Monks, Transcriptional profiling identifies altered intracellular labile iron homeostasis as a contributing factor to the toxicity of adaphostin: decreased vascular endothelial growth factor secretion is independent of hypoxia–inducible factor–1 regulation, *Clin. Cancer Res.*, **2005**, 11, 6370–6381.

161. S. Assi, H. El Hajj, B. Hayar, C. Pisano, W. Saad, N. Darwiche, Development and challenges of synthetic retinoid formulations in cancer, *Curr. Drug Deliv.*, **2023**, 20 (9), 1314–1326.
162. A. M. Di Francesco, P. Ubezio, A. R. Torella, D. Meco, F. Pierri, G. Barone, G. Cusano, C. Pisano, M. D'Incalci, R. Riccardi, Enhanced cell cycle perturbation and apoptosis mediate the synergistic effects of ST1926 and ATRA in neuroblastoma preclinical models, *Invest. New Drugs*, **2011**, 30, 1319–1330.
163. R. R. Nasr, R. A. Hmadi, R. M. El-Eit, A. N. Iskandarani, M. N. Jabbour, G. S. Zaatari, F.–X. Mahon, C. C. P. Pisano, N. D. Darwiche, ST1926, an orally active synthetic retinoid, induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells and prolongs survival in a murine model, *Int. J. Cancer*, **2015**, 137, 698–709.
164. P. Aouad, M. Saikali, R. Abdel-Samad, S. Fostok, L. El-Houjeiri, C. Pisano, R. Talhouk, N. Darwiche, Antitumor activities of the synthetic retinoid ST1926 in two-dimensional and three-dimensional human breast cancer models, *Anti-Cancer Drugs*, **2017**, 28, 757–770.
165. K. J. French, Y. Zhuang, L. W. Maines, P. Gao, W. Wang, V. Beljanski, J. J. Upson, C. L. Green, S. N. Keller, C. D. Smith, Pharmacology and antitumor activity of ABC294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010, 333, 129–139.
166. C. D. Britten, E. Garrett-Mayer, S. H. Chin, K. Shirai, B. Ogretmen, T. A. Bentz, A. Brisendine, K. Anderton, S. L. Cusack, L. W. Maines, Y. Zhuang, C. D. Smith, M. B. Thomas, A phase I study of ABC294640, a first-in-class sphingosine kinase-2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors, *Clin. Cancer Res.*, **2017**, 23, 4642–4650.
167. E. J. Rastelli, S. Sannino, D. J. Hart, E. R. Sharlow, J. S. Lazo, J. L. Brodsky, P. Wipf, Synthesis and evaluation of bifunctional PTP4A3 phosphatase inhibitors activating the ER stress pathway, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, 46, 128167.
168. I. Gani, Z. I. Sofi, G. Kaur, A. Goswami, K. A. Bhat, Hemisynthesis and cytotoxic evaluation of manoyl oxide analogs from sclareol: effect of two tertiary hydroxyls & Heck coupling on cytotoxicity, *Nat. Prod. Res.*, **2025**, 39, 5452–5461.
169. M. Pešić, J. Z. Marković, D. Janković, S. Kanazir, I. D. Marković, L. Rakić, S. Ruždijić, Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs, *J. Chemother.*, **2006**, 18, 66–73.
170. A. Stepanović, N. T. Jovanović, A. Korać, M. Zlatović, I. Nikolić, I. Opsenica, M. Pešić, Novel hybrid compounds of sclareol and doxorubicin as potential anticancer nanotherapy for glioblastoma, *Biomed. Pharmacother.*, **2024**, 174, 116496.
171. S. Mirzaei, M. H. Gholami, F. Hashemi, A. Zabolian, M. V. Farahani, K. Hushmandi, A. Zarrabi, A. Goldman, M. Ashrafizadeh, G. Orive, Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects, *Drug Discov. Today*, **2022**, 27, 436–455.
172. A. K. Ghosh, M. Brindisi, Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry, *J. Med. Chem.*, **2019**, 63, 2751–2788.
173. A. D. Jagtap, N. B. Kondekar, A. A. Sadani, J. W. Chern, Ureas: applications in drug design, *Curr. Med. Chem.*, **2017**, 24, 622–651.
174. R. Iyer, G. Fetterly, A. Lugade, Y. Thanavala, Sorafenib: a clinical and pharmacologic review, *Expert Opin. Pharmacother.*, **2010**, 11, 1943–1955.
175. J. M. Larkin, T. Eisen, Renal cell carcinoma and the use of sorafenib, *Ther. Clin. Risk Manag.* **2006**, 2(1), 87–98.
176. G. M. Keating, A. Santoro, Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma, *Drugs*, **2009**, 69, 223–240.
177. F. Pitoia, F. Jerkovich, Selective use of sorafenib in the treatment of thyroid cancer, *Drug Des. Dev. Ther.*, **2016**, 1119–1131.
178. Z. Hao, P. Wang, Lenvatinib in management of solid tumors, *Oncologist*, **2020**, 25(2), e302–e310.

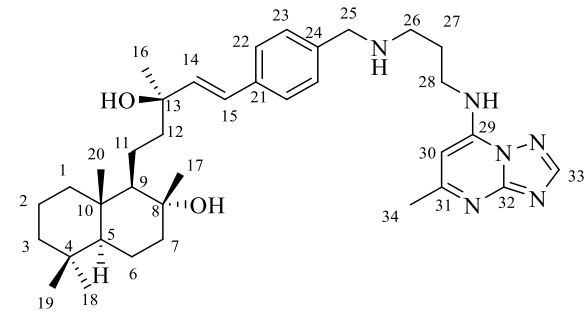
179. M. Tahara, N. Kiyota, T. Yamazaki, N. Chayahara, K. Nakano, L. Inagaki, K. Toda, T. Enokida, H. Minami, Y. Imamura, T. Sasaki, T. Suzuki, K. Fujino, C. E. Dutcus, S. Takahashi, Lenvatinib for anaplastic thyroid cancer, *Front. Oncol.*, **2017**, 7, 25.
180. Jin H., Shi Y., Lv Y., Yuan S., Ramirez C. F. A., Lieftink C., Wang L., Wang S., Wang C., Dias M. H., Jochems F., Yang Y., Bosma A., Hijmans E. M., de Groot M. H. P., Vegna S., Cui D., Zhou Y., Ling J., Wang H., Guo Y., Zheng X., Isima N., Wu H., Sun C., Beijersbergen R. L., Akkari L., Zhou W., Zhai B., Qin W., Bernards R., EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib, *Nature*, **2021**, 595, 730–734.
181. N. Realini, C. Solorzano, C. Pagliuca, D. Pizzirani, A. Armirotti, R. Luciani, M. P. Costi, T. Bandiera, D. Piomelli, Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity, *Sci. Rep.*, **2013**, 3, 1035.
182. J. M. Baehring, R. K. Fulbright, Delayed leukoencephalopathy with stroke-like presentation in chemotherapy recipients, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2008**, 79(5), 535–539.
183. M.A. Phillips, R. Gujjar, N.A. Malmquist, J. White, F. El Mazouni, J. Baldwin, P. K. Rathod, Triazolopyrimidine-based dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with potent and selective activity against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Med. Chem.* **2008**, 51 3649–3653.
184. E.S. Zuniga, A. Korkegian, S. Mullen, E.J. Hembre, P.L. Ornstein, G. Cortez, K. Biswas, N. Kumar, J. Cramer, T. Masquelin, P.A. Hipskind, J. Odingo, T. Parish, The synthesis and evaluation of triazolopyrimidines as anti-tubercular agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, 25, 3922–3946.
185. J. Konstantinović, M. Videnović, S. Orsini, K. Bogojević, S. D'Alessandro, D. Scaccabarozi, N. Terzić Jovanović, L. Gradoni, N. Basilico, B. A. Šolaja, Novel Aminoquinoline Derivatives Significantly Reduce Parasite Load in *Leishmania infantum* Infected Mice, *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, 9, 629–634.
186. G. Sjostedt, Leopold Gringas, 3-Amino-1*H*-1,2,4-triazole, *Org. Synth.* **1946**, 26, 11–12,
187. L. Huang, J. Ding, M. Li, Z. Hou, Y. Geng, Xi. Li, H. Yu, Discovery of [1,2,4]-triazolo [1,5-*a*]pyrimidine-7(4*H*)-one derivatives as positive modulators of GABAA1 receptor with potent anticonvulsant activity and low toxicity, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 185, 111824.

7. PRILOZI

7.1. Totalna asignacija jedinjenja 86g

Jedinjenje **86g** izolovano je nakon nukleofilne aromatične supstitucije između jedinjenja **82b** i **85a**, kao bezbojna čvrsta supstanca. Masenom spektrometrijom visoke rezolucije detektovan je jon $m/z = 625,4187$, što odgovara jonu $C_{36}H_{54}N_6O_2Na^+$ (izračunato 625,4200 za $[M + Na]^+$). U IR spektru uočene su trake 3368 cm^{-1} (OH istežuća vibracija) i 1626 cm^{-1} (C=C istežuća vibracija). Struktura jedinjenja potvrđena je analizom NMR spektara (Tabela P1).

Tabela P1. Asignacija signala jedinjenja **86g** (CD₃OD, 400 MHz).

Položaj	δ_{H} (<i>J</i> , Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]			
1	α : 1,77–1,71 (m, 1H) β : 1,07–1,00 (m, 1H)	41,17			
2	α : 1,46–1,44 (m, 1H) β : 1,64–1,59 (m, 1H)	19,50			
3	α : 1,41–1,39 (m, 1H) β : 1,24–1,18 (m, 1H)	43,24			
4	/	34,16			
5	1,00–0,93 (m, 1H)	57,54			
6	α : 1,34–1,30 (m, 1H) β : 1,68–1,64 (m, 1H)	21,53			
7	α : 1,87–1,80 (m, 1H) β : 1,50–1,46 (m, 1H)	45,17			
8	/	75,17			
9	1,16 (m, 1H)	62,73			
10	/	40,55			
11	1,58–1,51 (m, 1H) 1,44–1,42 (m, 1H)	20,83			
12	1,89 (td, <i>J</i> = 12,7, 5,1, 1H) 1,71–1,68 (m, 1H)	47,07			
13	/	74,33			
14	6,35 (d, <i>J</i> = 16,0, 1H)	138,45			
15	6,60 (d, <i>J</i> = 16,1, 1H)	127,65			
16	1,38 (s, 3H)	27,85			
17	1,15 (s, 3H)	24,00			
18	0,90 (s, 3H)	33,90			
19	0,83 (s, 3H)	21,95			
20	0,84 (s, 3H)	16,06			

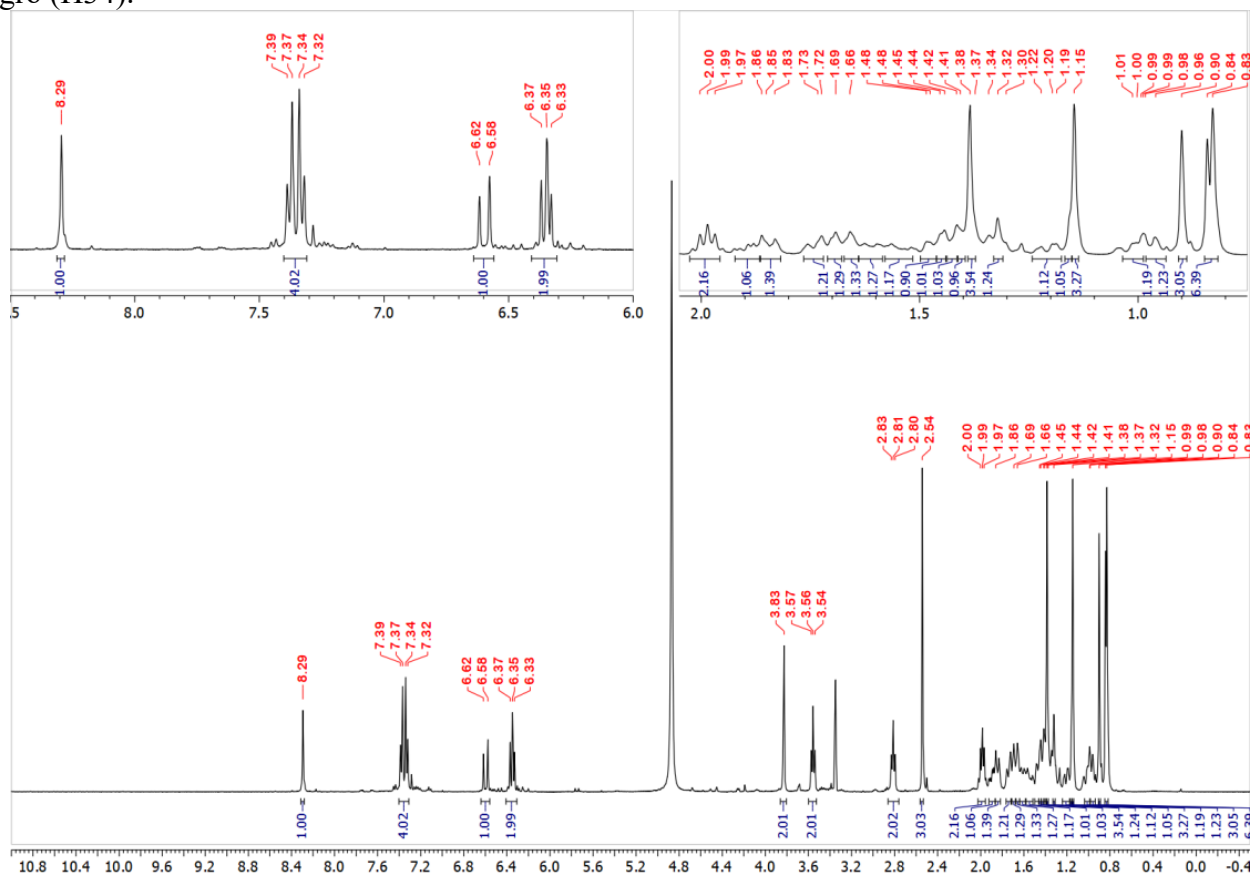
Položaj	δ_{H} (<i>J</i> , Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]
21	/	138,12
22	7,38 (d, <i>J</i> = 8,0)	127,45
23	7,33 (d, <i>J</i> = 8,0)	129,93
24	/	138,71
25	3,83 (s, 2H)	54,02
26	2,81 (t, <i>J</i> = 7,0, 2H)	47,16
27	1,99 (t, <i>J</i> = 7,0, 2H)	28,97
28	3,56 (t, <i>J</i> = 6,8, 2H)	41,53
29	/	149,26
30	6,35 (s, 1H)	89,26
31	/	166,39
32	/	156,49
33	8,29 (s, 1H)	154,72
34	2,54 (s, 3H)	24,80

7.1.1. Analiza 1H , ^{13}C i 1H - ^{13}C HSQC spektara

U 1H NMR spektru (Slika P1) uočeno je:

- Signali u obliku singleta, integrala 1 na 6,35 ppm (H30) i 8,29 ppm (H33), karakteristični za triazolo[1,5-a]pirimidinsko jezgro.
- Dubleti integrala 2 na 7,33 ppm ($J = 8,0$ Hz) i 7,38 ppm ($J = 8,0$ Hz) koji ukazuju na *p*-disupstituisano benzenovo jezgro (H22 i H23).
- Singlet integrala 2 na 3,83 ppm, koji potiče od benzilnih protona na poziciji 25.
- Dubleti protona dvostruke veze nalaze se na 6,35 ppm ($J = 16,1$ Hz) i 6,60 ppm ($J = 16,1$ Hz), što na osnovu konstante sprezanja potvrđuje *trans*-disupstituciju.

- Singleti integrala 3 na 0,83 ppm, 0,84 ppm, 0,90 ppm, 1,15 ppm i 1,38 ppm koji odgovaraju metil-grupama sklareola na pozicijama 16, 17, 18, 19 i 20.
- Signal na 2,54 ppm koji odgovara metil-grupi vezanoj za [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinsko jezgro (H34).

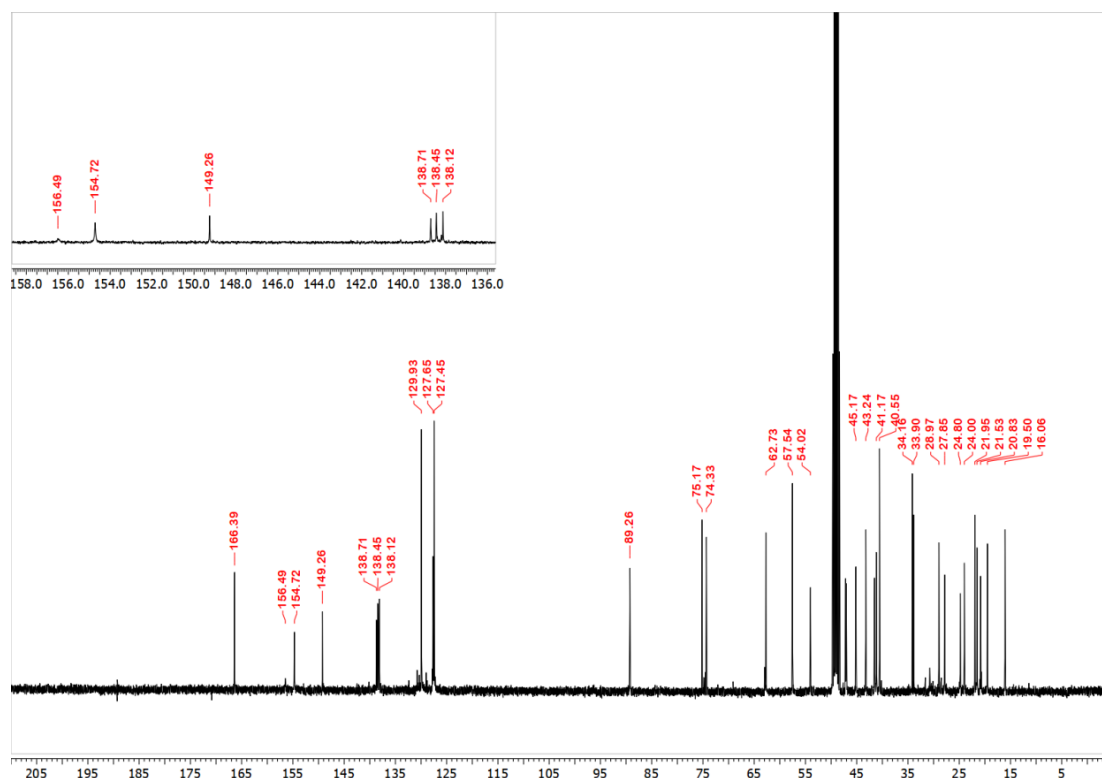


Slika P1. ^1H NMR spektar jedinjenja **86g**.

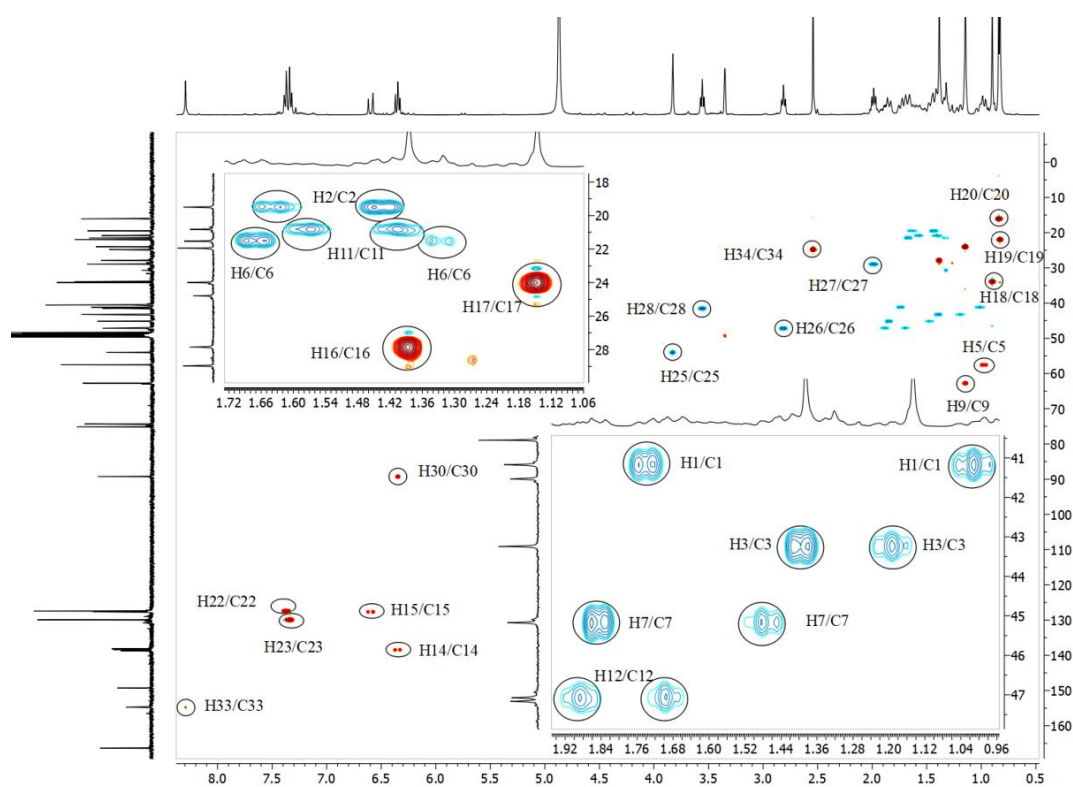
U ^{13}C NMR spektru (Slika P2) uočeno je 34 signala:

- 11 signala poreklom od dvostruke veze, benzenovog i TP jezgra.
- Signali na hemijskim pomeranjima 74,33 ppm i 75,17 ppm koji se mogu pripisati oksigenovanim ugljenicima na položajima C8 i C13.

Analizom ^1H - ^{13}C HSQC spektra ugljenicima su pripisani odgovarajući vodonikovi atomi, pri čemu je identifikovano 9 kvaternarnih ugljenika i 11 metilenskih grupa, od kojih je 7 diastereotopno (Slika P3).



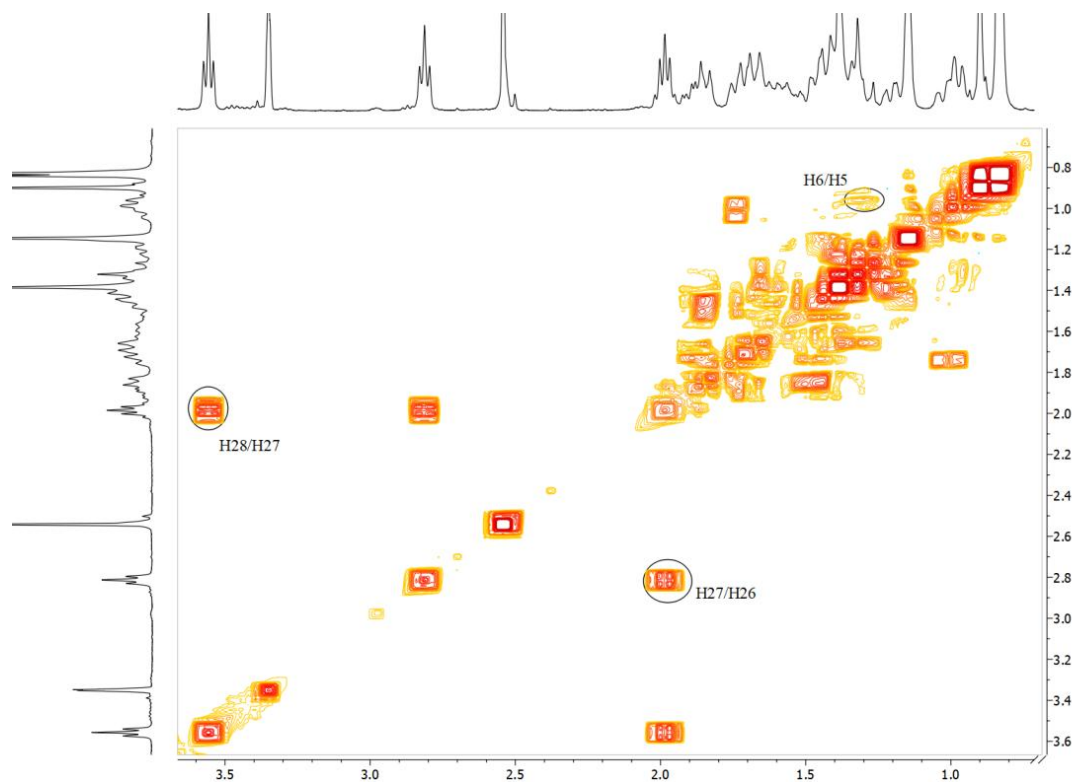
Slika P2. ^{13}C NMR spekter jedinjenja **86g**.



Slika P3. ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter jedinjenja **86g** sa označenim ključnim korelacijama.

7.1.2. Analiza ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^1H TOCSY spektara

U ^1H - ^1H COSY spektru (Slika P4), koji prikazuje sprezanje susednih protona, uspešno je uočeno sprezanje unutar propilen–diaminskog fragmenta: proton H28 se spreže sa protonom H27, koji se pak dalje spreže sa H26. Ostatak spektra u oblasti 0,80–1,90 ppm prisustvo veliko broja preklapajućih korelacija učinio je taj region neupotrebljivim za dalju analizu. Jedina značajna korelacija bila je sprezanje nesusednih vodonika na 0,97 ppm i 1,32 ppm, koji su identifikovani kao protoni H5 i H6, redom.

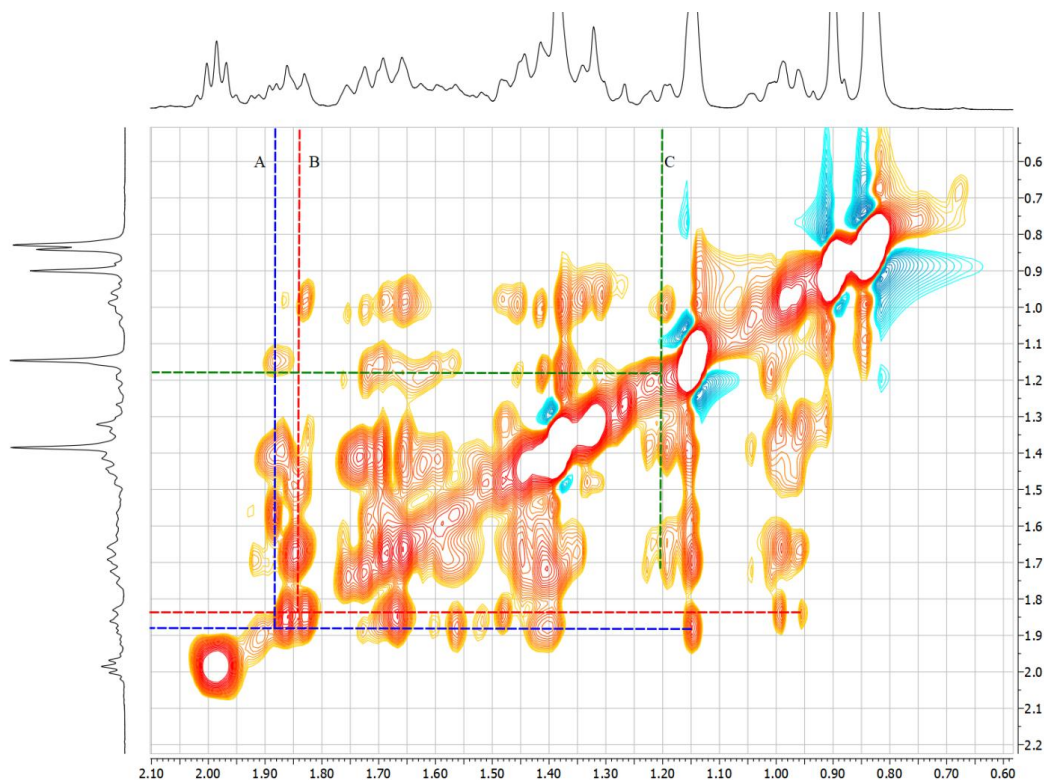


Slika P4. ^1H - ^1H COSY spektar jedinjenja **86g** sa označenim ključnim korelacijama.

U ^1H - ^1H TOCSY spektru, koji pokazuje sva skalarno spregnuta jezgra u okviru istog spinskog sistema, uočeno je da u oblasti 0,80 –1,90 ppm postoje tri spinska sistema (Slika P5):

- Spinski sistem A: protoni sa pomeranjima 0,97 ppm, 1,32 ppm, 1,48 ppm, 1,66 ppm i 1,85 ppm.
- Spinski sistem B: protoni na hemijskim pomeranjima 1,02 ppm, 1,21 ppm, 1,41 ppm, 1,44 ppm, 1,62 ppm i 1,74 ppm,
- Spinski sistem C sačinjen od protona na pomeranjima 1,16 ppm, 1,42 ppm, 1,56 ppm, 1,69 ppm i 1,89 ppm.

Upoređivanjem ovih podataka sa podacima dobijenim iz HSQC spektra, može se zaključiti da spinski sistem B odgovara trima metilenskim grupama koje su na pozicijama 1–3 u molekulu.

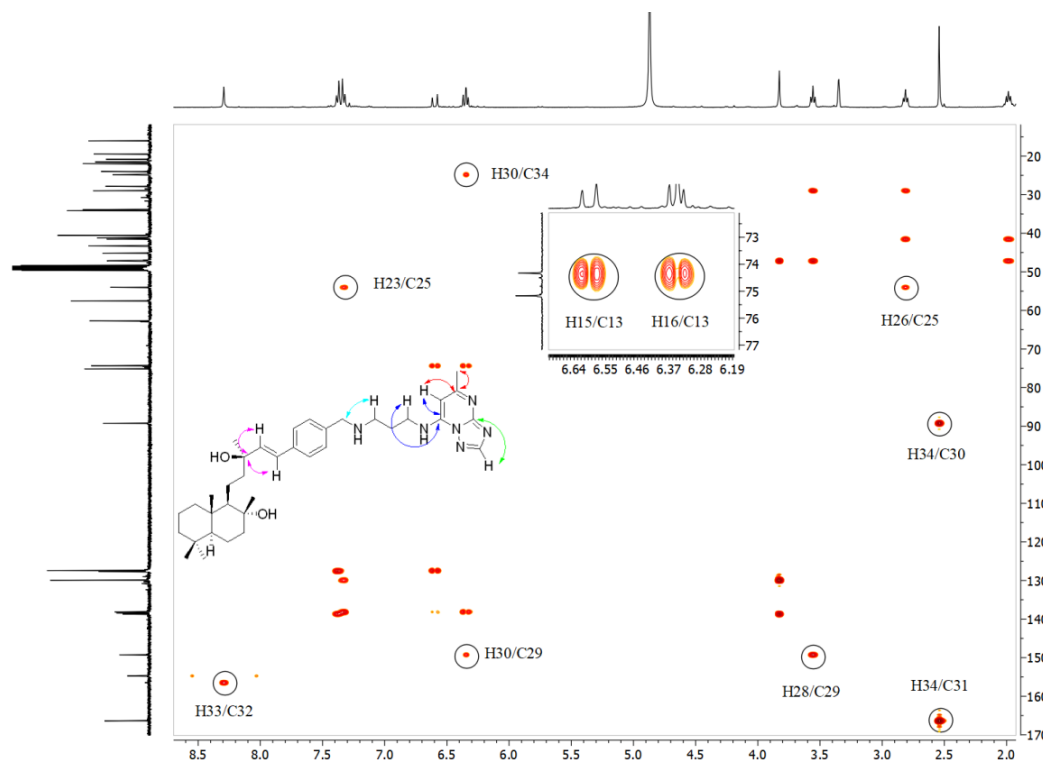


Slika P5. ^1H - ^1H TOCSY spektar jedinjenja **86g** sa označenim korelacijama ključnim za strukturnu karakterizaciju molekula.

7.1.3. Analiza ^1H - ^{13}C HMBC spektra

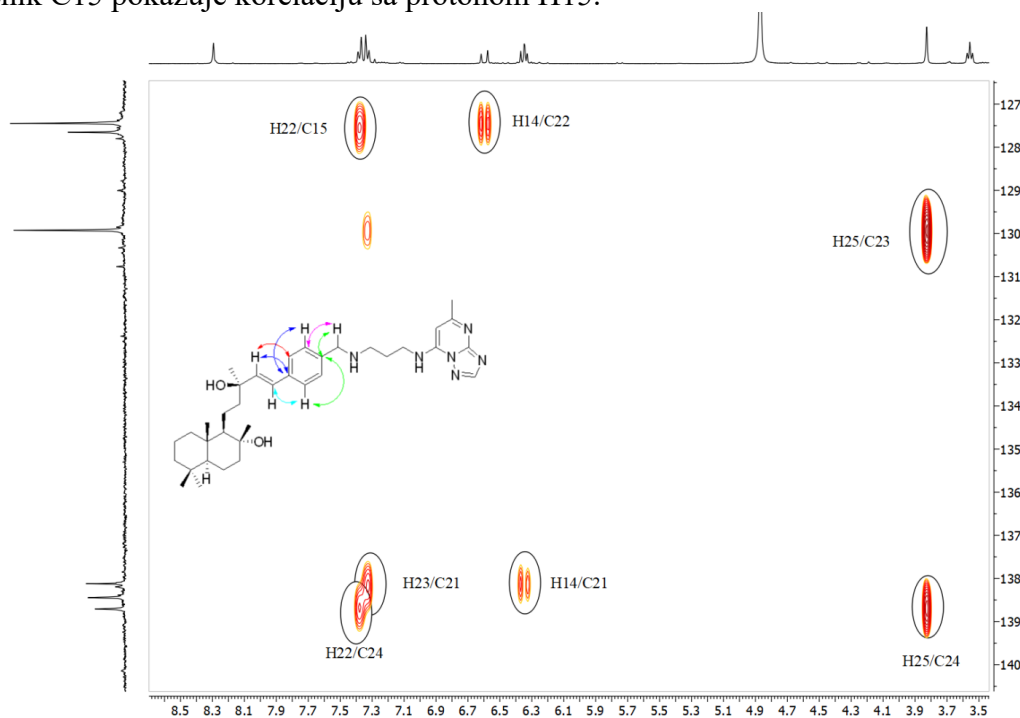
Na osnovu ^1H - ^{13}C HMBC spektra, koji prikazuje korelacije između protona i ugljenika preko 2, 3 ili 4 hemijske veze, izvršena je asignacija jedinjenja:

- Signal karakterističan za TP jezgro na pomeranju 6,35 ppm (proton H30) pokazuje korelacije sa ugljenikom metil-grupe C34 (Slika P6).
- Protoni H34 pokazuju korelacije sa signalima ugljenika C30 i C31.
- Signal H33 pokazuje korelaciju sa kvaternarnim ugljenikom C32.
- Ugljenik C29 je asigniran zahvaljujući sprezanju sa protonom H30 i protonom H28 iz propilen-diaminskog strukturnog motiva.
- Proton H26 pokazuje korelaciju sa benzilaminskim ugljenikom C25, čime je utvrđeno da se reakcija nukleofilne aromatične supstitucije odvijala preko manje supstituisane amino-grupe.
- Protoni dvostruke veze H14 i H15 pokazuju korelacije sa oksigenovanim ugljenikom C13.



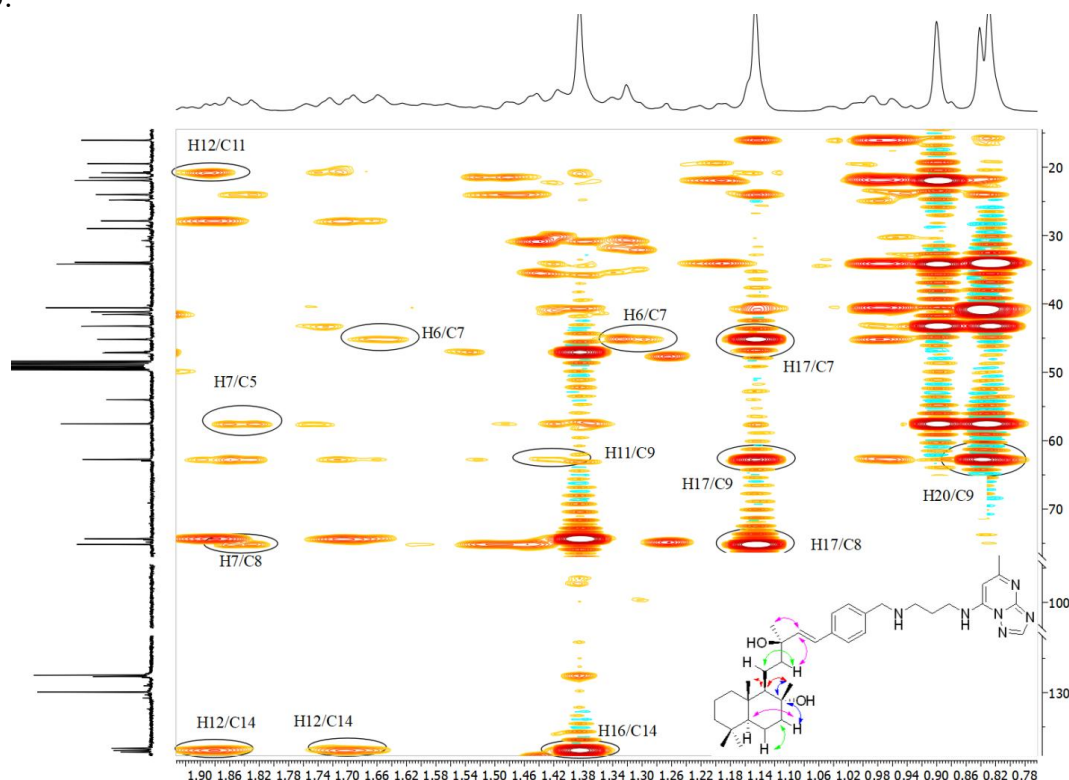
Slika P6. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra sa označenim korelacijama ključnim za strukturnu karakterizaciju molekula.

- Benzilni proton H25 pokazuje korelacije sa ugljenikom C23 i kvaternarnim ugljenikom C24 (Slika P7).
- Ugljenik C24 pokazuje korelaciju sa protonom H22.
- Kvaternarni ugljenik na poziciji C21 asigniran je zahvaljujući korelacijama sa protonom H14 (dvostruka veza) i protonom iz benzenovog jezgra.
- Ugljenik C15 pokazuje korelaciju sa protonom H15.



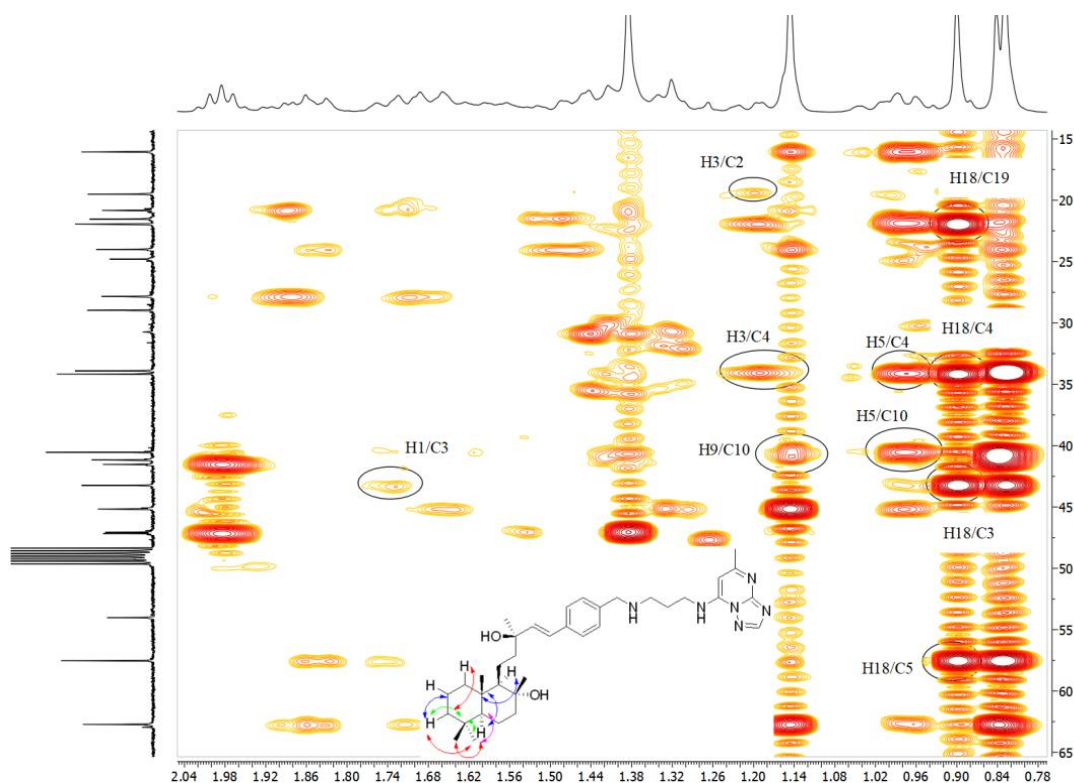
Slika P7. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra sa označenim korelacijama ključnim za strukturnu karakterizaciju molekula.

- Ugljenik C14 (dvostruka veza) pokazuje korelacije sa protonima metil-grupe H16 i diastereotopnim protonima H12 (Slika P8), koji su deo TOCSY spinskog sistema C.
- Protoni H12 dalje pokazuju korelacije sa ugljenikom C11, dok proton H11 korelira sa ugljenikom C9.
- Ugljenik C9 pokazuje korelacije sa protonima metil-grupa na pozicijama H20 i H17.
- Protoni metil-grupe H17 spregnuti su sa ugljenikom C7 i kvaternarnim oksigenovanim ugljenikom C8; asignacija C8 je dodatno potvrđena sprežanjem sa protonom H7.
- Ugljenik C7 pokazuje korelacije sa protonima H6, a proton H7 pokazuje korelaciju sa ugljenikom C5.



Slika P8. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra sa označenim korelacijama ključnim za strukturnu karakterizaciju molekula.

- Ugljenik C5 pokazuje sprežanja sa protonima metil-grupe H18 (Slika P9).
- Tri protona H18 dalje pokazuju korelacije sa ugljenicima C19, C3, kao i sa kvaternarnim ugljenikom C4.
- Asignacija kvaternarnog ugljenika C4 dodatno je potvrđena korelacijama sa protonima H3 i H5.
- Kvaternarni ugljenik C10 pokazuje sprežanja sa protonima H5 i H9.
- Proton H3 spregnut je sa ugljenikom C2.
- Ugljenik C3 spregnut sa protonom H1.



Slika P9. Deo ^1H - ^{13}C HMBC sa označenim ključnim korelacijama.

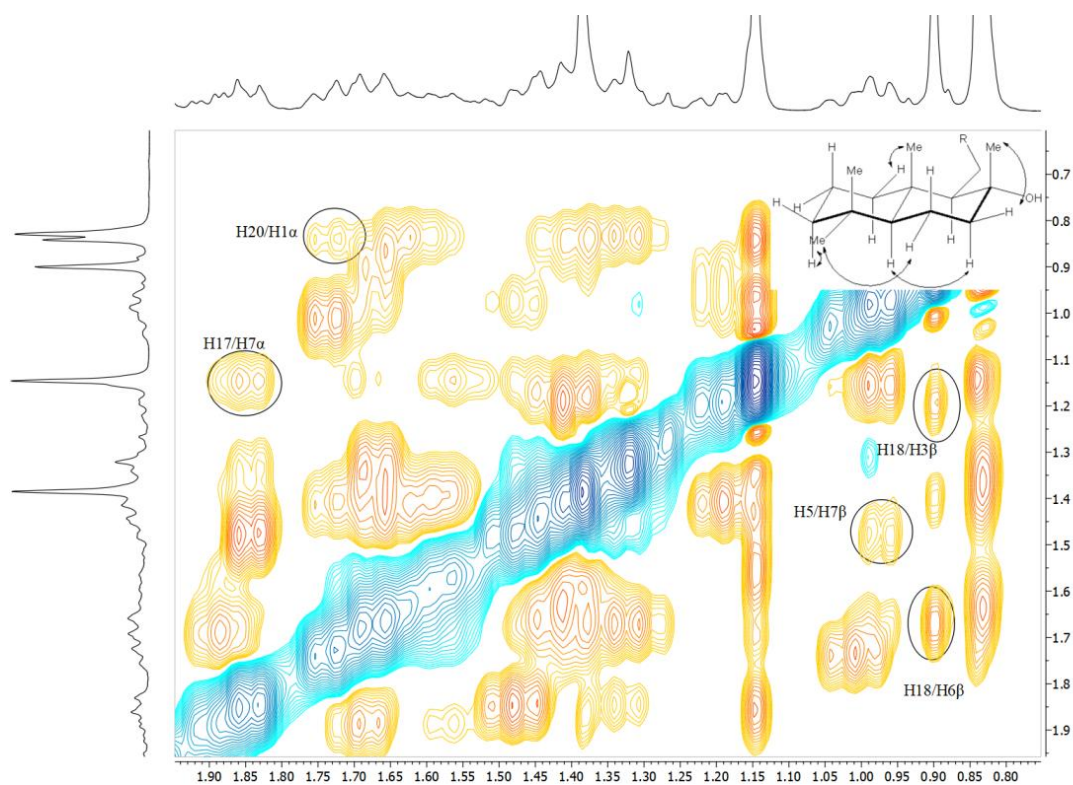
7.1.4. Analiza ^1H - ^1H NOESY spektra

^1H - ^1H NOESY spektar (Slika P10) omogućio je određivanje relativne konfiguracije protona u metilenskim grupama dekahidronaftalenskog sistema:

- Protoni aksijalne metil-grupe na poziciji H17 pokazuju korelacije sa ekvatorijalnim protonom H7 α , dok odgovarajući aksijalni proton H7 β pokazuje korelaciju sa protonom H5.
- Metil-grupa na poziciji H18 pokazuje korelacije sa protonima H6 β i H3 β .
- Relativna konfiguracija protona H1 α određena je zahvaljujući sprezanjima sa protonima metil-grupe H20.
- Relativna konfiguracija protona na poziciji H2 nije mogla biti sa sigurnošću utvrđena na osnovu spektra.

Uzimajući u obzir činjenicu da se aksijalni protoni nalaze na nižem hemijskom pomeranju u odnosu na ekvatorijalne usled anizotropnog efekta jednostrukih veza, može se pretpostaviti da se proton H2 α nalazi na hemijskom pomeranju 1,44 ppm.*

* M. Baranac-Stojanović, M. Stojanović, Magnetic Anisotropy of the C–C Single Bond, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4249–4254.

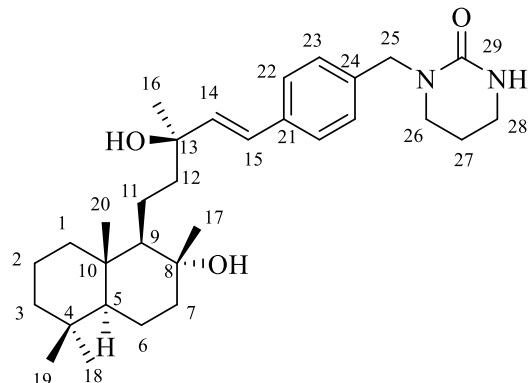


Slika P10. Deo ^1H - ^1H NOESY spektra sa označenim ključnim korelacijama.

7.2. Totalna asignacija jedinjenja 113a

Jedinjenje **113a** izolovano je nakon reakcije jedinjenja **82b** sa *p*-nitrofenilhlorformatom kao bezbojna uljasta supstanca koja stajanjem očvršćava. Masenom spektrometrijom niske rezolucije je detektovan molekulski jon m/z sa vrednošću 496, kao i joni m/z vrednosti 497 ($[M + H]^+$), 495 ($[M - H]^+$), 479 ($[M - H_2O]^+$), 461 ($[M - 2H_2O]^+$), što ukazuje na prisustvo dve hidroksilne grupe u molekulu. U infracrvenom (IR) spektru posebno privlače pažnju široka, intenzivna traka na 3328 cm^{-1} (O–H istežuća vibracija) i intenzivna traka na 1644 cm^{-1} (C=O istežuća vibracija). Struktura jedinjenja utvrđena je detaljnom analizom 1D i 2D NMR spektara (Tabela P2).

Tabela P2. Asignacija signala jedinjenja **113a** (CDCl_3 , 400 MHz).

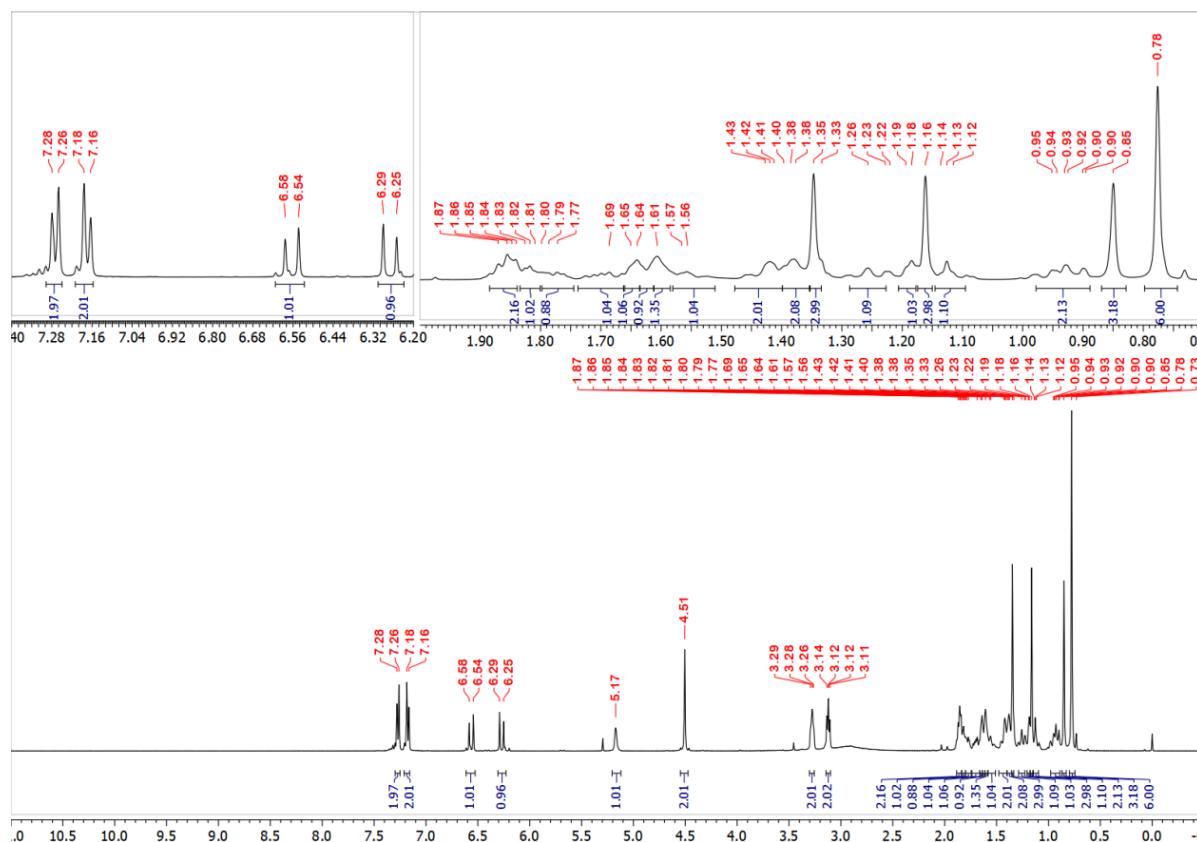
Položaj	δ_{H} (J, Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]																																					
1	α : 1,65–1,59 (m, 1H) β : 0,96 (m, 1H)	39,77																																					
2	α : 1,42 (m, 1H) β : 1,58–1,54 (m, 1H)	18,54																																					
3	α : 1,37 (m, 1H) β : 1,13 (td, J =13,2; 4,2, 1H)	42,11																																					
4	/	33,31																																					
5	0,91 (m, 1H)	56,18																																					
6	α : 1,26 (m, 1H) β : 1,65–1,59 (m, 1H)	20,55																																					
7	α : 1,83–1,80 (m, 1H) β : 1,42 (m, 1H)	44,16																																					
8	/	74,75																																					
9	1,18 (m, 1H)	61,61																																					
10	/	39,32																																					
11	1,65–1,59 (m, 1H) 1,38 (m, 1H)	19,12																																					
12	1,80–1,75 (m, 1H) 1,74–1,68 (m, 1H)	45,30																																					
13	/	73,32																																					
14	6,27 (d, J = 16,0, 1H)	138,39																																					
15	6,56 (d, J = 16,0, 1H)	129,50																																					
16	1,35 (s, 3H)	27,07																																					
17	1,16 (s, 3H)	24,35																																					
18	0,85 (s, 3H)	33,49																																					
19	0,78 (s, 3H)	21,58																																					
			<table><tr><th>Položaj</th><th>δ_{H} (J, Hz) [ppm]</th><th>δ_{C} [ppm]</th></tr><tr><td>20</td><td>0,78 (s, 3H)</td><td>15,49</td></tr><tr><td>21</td><td>/</td><td>136,50</td></tr><tr><td>22</td><td>7,27 (d, J = 7,8, 2H)</td><td>126,59</td></tr><tr><td>23</td><td>7,17 (d, J = 7,9, 2H)</td><td>128,19</td></tr><tr><td>24</td><td>/</td><td>136,96</td></tr><tr><td>25</td><td>4,51 (s, 2H)</td><td>50,51</td></tr><tr><td>26</td><td>3,12 (t, J = 5,9, 2H)</td><td>44,69</td></tr><tr><td>27</td><td>1,86 (m, 2H)</td><td>22,25</td></tr><tr><td>28</td><td>3,28 (t, J = 5,9, 2H)</td><td>40,56</td></tr><tr><td>29</td><td>/</td><td>156,71</td></tr><tr><td>NH</td><td>5,17 (b rs, 1H)</td><td>/</td></tr></table>	Položaj	δ_{H} (J, Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]	20	0,78 (s, 3H)	15,49	21	/	136,50	22	7,27 (d, J = 7,8, 2H)	126,59	23	7,17 (d, J = 7,9, 2H)	128,19	24	/	136,96	25	4,51 (s, 2H)	50,51	26	3,12 (t, J = 5,9, 2H)	44,69	27	1,86 (m, 2H)	22,25	28	3,28 (t, J = 5,9, 2H)	40,56	29	/	156,71	NH	5,17 (b rs, 1H)	/
Položaj	δ_{H} (J, Hz) [ppm]	δ_{C} [ppm]																																					
20	0,78 (s, 3H)	15,49																																					
21	/	136,50																																					
22	7,27 (d, J = 7,8, 2H)	126,59																																					
23	7,17 (d, J = 7,9, 2H)	128,19																																					
24	/	136,96																																					
25	4,51 (s, 2H)	50,51																																					
26	3,12 (t, J = 5,9, 2H)	44,69																																					
27	1,86 (m, 2H)	22,25																																					
28	3,28 (t, J = 5,9, 2H)	40,56																																					
29	/	156,71																																					
NH	5,17 (b rs, 1H)	/																																					

7.2.1. Analiza ^1H , ^{13}C i ^1H - ^{13}C HSQC spektara

Analizom ^1H NMR spektra jedinjenja (Slika P11) mogu uočeni su sledeći signali:

- Pet singleta sa integralom 3, koji se mogu pripisati metil-grupama (položaji H16, H17, H18, H19, H20) na hemijskim pomeranjima 0,78, 0,85, 1,35 i 1,16 ppm.
- Dubleti na 6,27 ppm ($J=16,1$ Hz) i 6,56 ppm ($J=16,0$ Hz) koji pripadaju protonima dvostruke veze H14–H15. Na osnovu konstante kuplovanja (~ 16 Hz) može se zaključiti da je dvostruka veza *trans*-disupstituisana.
- Dubleti na 7,17 ppm ($J=7,9$ Hz) i 7,27 ppm ($J=7,7$ Hz), integrala 2, odgovaraju *p*-disupstituisanom benzenovom jezgru.

- Tripleti na 3,12 ppm ($J = 5,9$ Hz) i 3,28 ppm ($J = 5,9$ Hz), integrala 2, odgovaraju protonima u susedstvu azota na pozicijama H26 i H28.
- Singlet na pomeranju 5,17 ppm integrala 1, može se pripisati protonu vezanom za azot.
- Singlet na 4,51 ppm odgovara benzilnim protonima, vezanim za ugljenik C25.

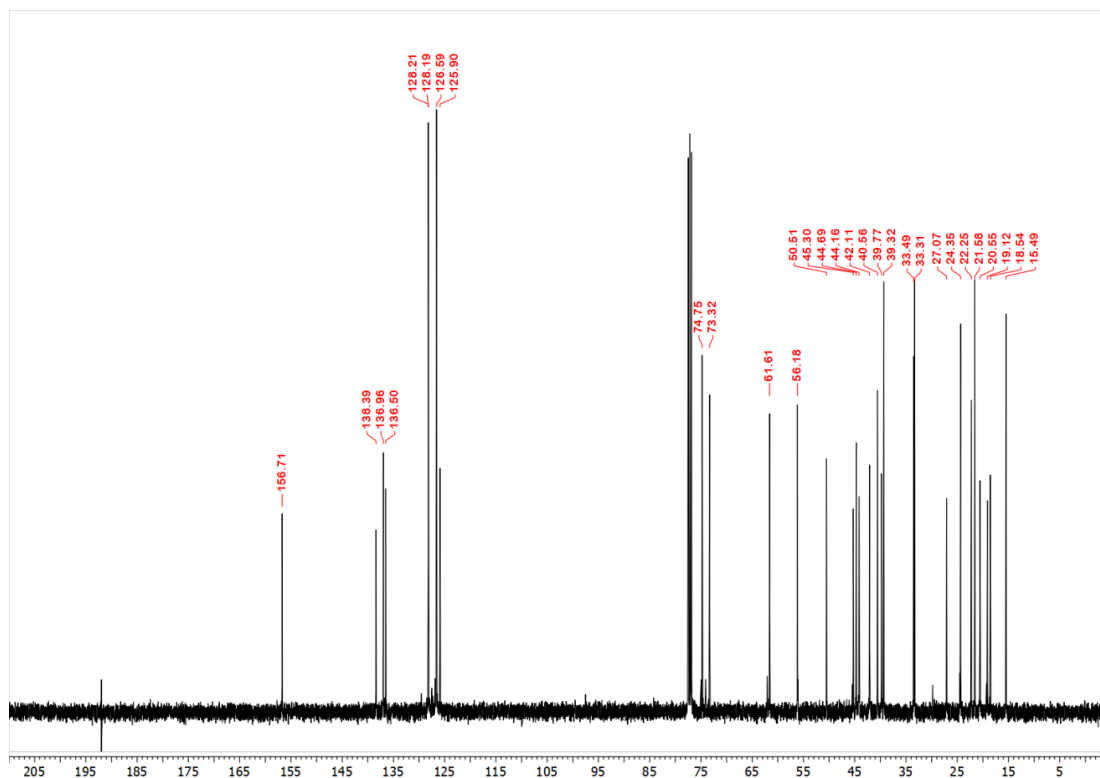
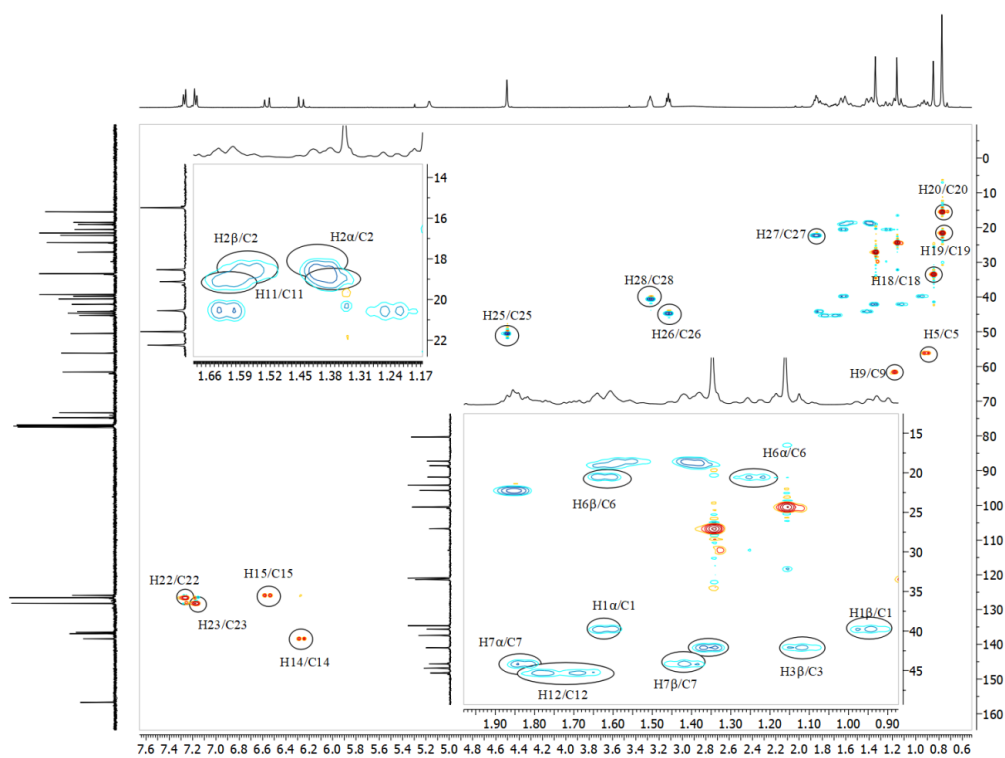


Slika P11. ^1H NMR spektar jedinjenja **113a**.

Na osnovu analize ^{13}C spektra (Slika P12) uočeno je 29 signala:

- Šest signala nalaze se između 120–140 ppm i odgovaraju ugljenicima iz aromatičnog jezgra i dvostruke veze (Slika P12).
- Signal na 156,71 ppm pripada karbamidnom ugljeniku C29.
- Dva signala na hemijskim pomeranjima 73,32 ppm i 74,75 ppm odgovaraju oksigenovanim ugljenicima C8 i C13.

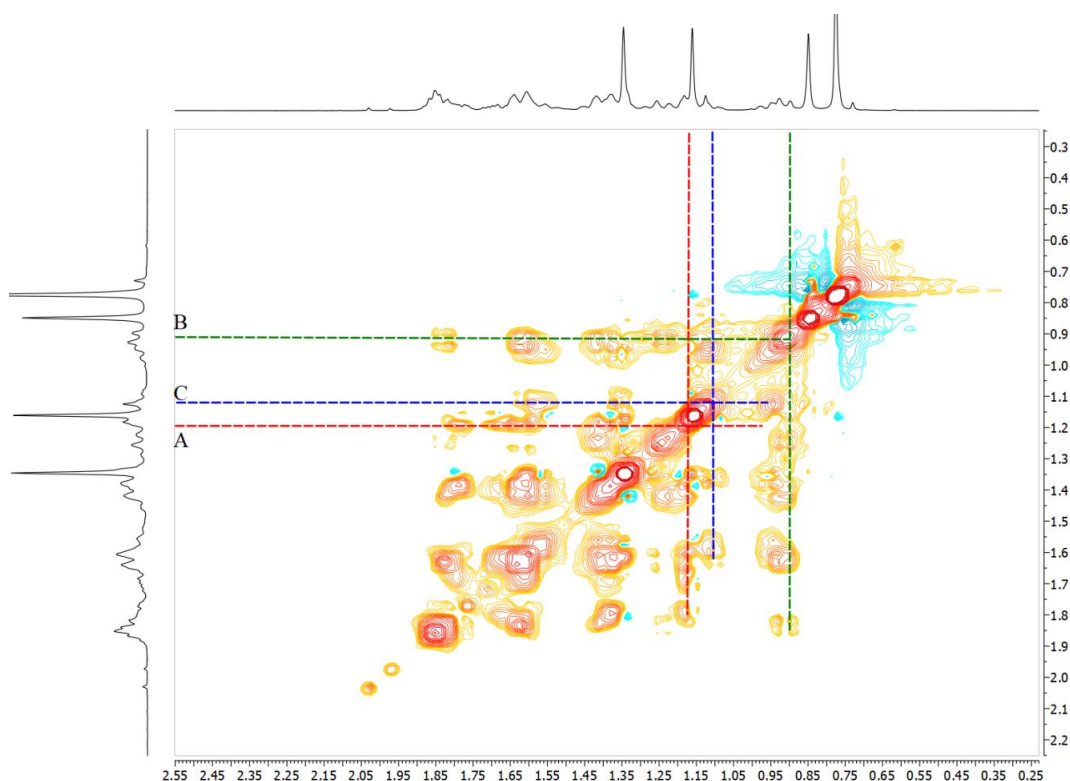
Na osnovu ^1H - ^{13}C HSQC spektra izvršena je asignacija protona odgovarajućim ugljenicima (Slika P13). Utvrđeno je prisustvo sedam kvaternarnih ugljenika i 11 metilenskih grupa, od kojih je sedam diastereotopnih. Prošireni singlet na 5,17 ppm nije pokazao korelacije u HSQC spektru i pripisan je karbamidnoj NH grupi.

Slika P12. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **113a**.Slika P13. ^1H - ^{13}C HSQC spektar jedinjenja **113a**.

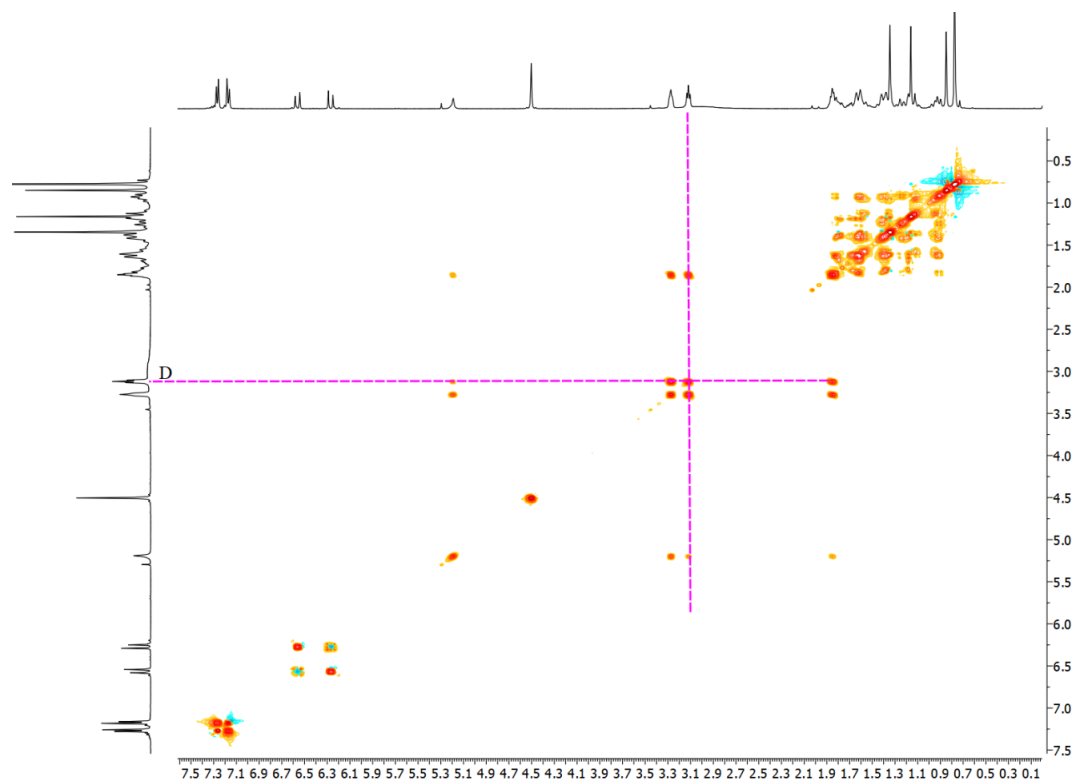
7.2.2. Analiza ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^1H TOCSY spektara

U ^1H - ^1H TOCSY spektru (Slika P14) uočeno je postojanje četiri spinska sistema u alifatičnoj oblasti:

- Spinski sistem A: proton na hemijskom pomeranju 1,18 ppm (C–H grupa) pokazuje korelacije sa protonima na 1,38 ppm, 1,71 ppm, 1,75–1,80 ppm i jednim protonom iz multipleta 1,59–1,65 ppm.
- Spinski sistem B: protoni 0,91 ppm (C–H grupa), 1,26 ppm, 1,42 ppm, 1,80–1,83 ppm, kao i jedan proton iz oblasti 1,59–1,65 ppm.
- Spinski sistem C: protoni 1,13 ppm 0,96 ppm, 1,37 ppm, 1,42 ppm, 1,58–1,54 ppm i jedan proton iz multipleta 1,59–1,65 ppm.
- Spinski sistem D: singlet protona spregnut sa karbamidnim protonom na 5,17 ppm (NH), triplet na 3,28 ppm (CH_2 grupa) i 3,12 ppm (CH_2 grupa), kao i protonski signali metilenske grupe na 1,86 ppm. Ovaj spinski sistem se može pripisati protonima na pozicijama 28, 27 i 26, spregnutim sa karbamidnom NH grupom (Slika P15).



Slika P14. Deo TOCSY spektra jedinjenja **113a** sa obeleženim korelacijama spinskih sistema A – C.

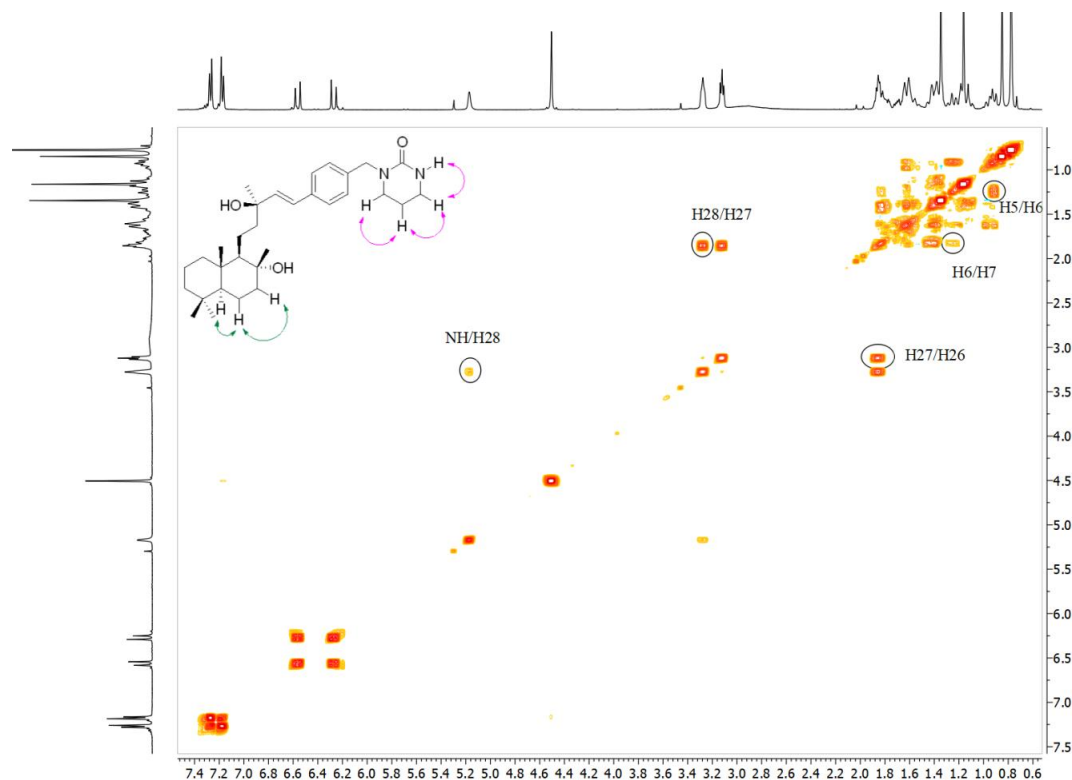


Slika P15. ^1H - ^1H TOCSY spektar jedinjenja **113a** sa obeleženim korelacijama spinskog sistema D.

Pomoću ^1H - ^1H COSY spektra (Slika P16) povezana su susedna jezgra, međusobno skalarno spregnuta preko tri hemijske veze. Na osnovu ovih korelacija određen je redosled protona u spinskim sistemima:

- U spinskom sistemu D identifikovane su korelacije između NH/H28, H28/H27, H27/H26, što je omogućilo asignaciju protona na pozicijama 28, 27 i 26.
- U spinskom sistemu B uočene su korelacije između protona H5/H6 i H6/H7.

U oblasti od 1,33 ppm do 1,65 ppm došlo je do preklapanja velikog broja protona, pa su dalje korelacije u COSY spektru bile nepouzidane.

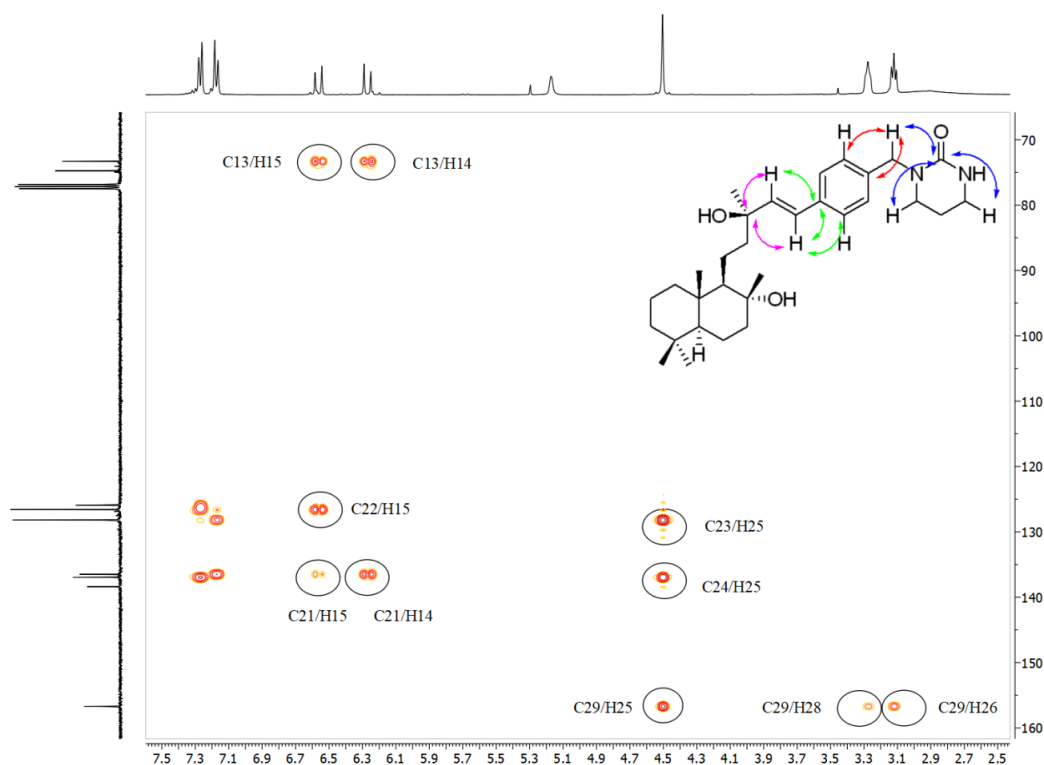


Slika P16. ^1H - ^1H COSY spektar sa označenim ključnim korelacijama.

7.2.3. Analiza ^1H - ^{13}C HMBC spektra

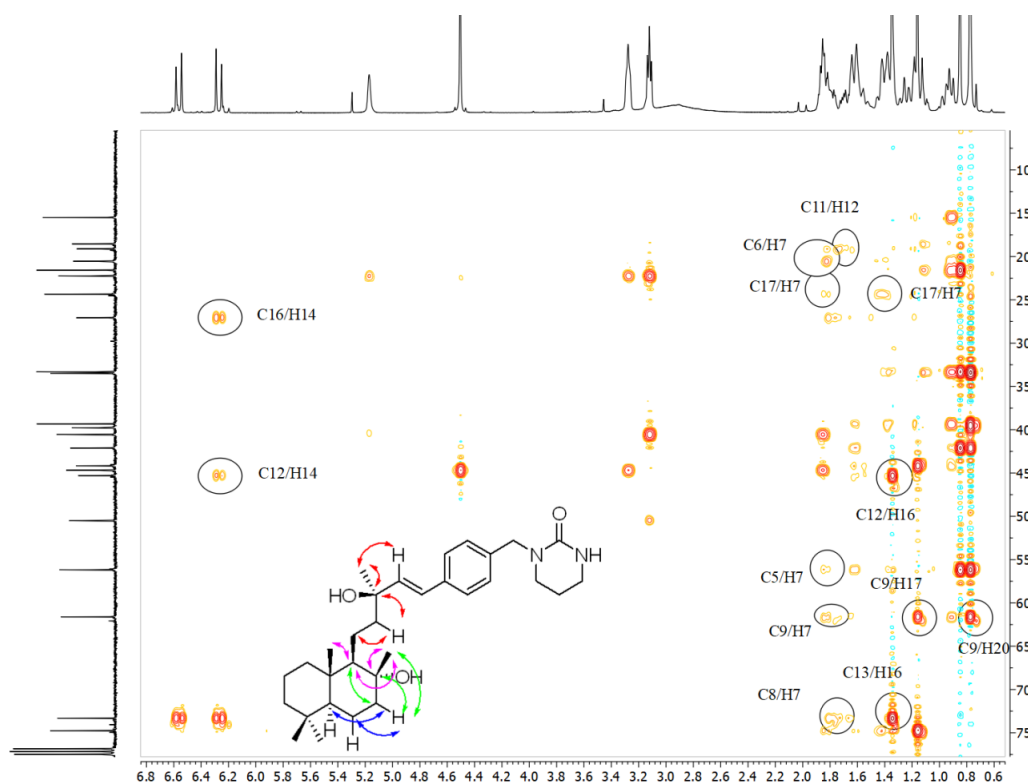
Na osnovu ^1H - ^{13}C HMBC spektra, koji prikazuje korelacije protona i ugljenika vezanih preko dve, tri ili četiri hemijske veze, izvršena je konačna asignacija jedinjenja:

- Karbamidni ugljenik pokazuje korelacije sa protonima H25, H28 i H26, čime je potvrđeno da je nastalo jedinjenje ciklična urea (Slika P17).
- Protoni H25 pokazuju korelacije i sa ugljenicima C23 i C24.
- Kvaternarni ugljenik na pomeranju 136,50 ppm pokazuje korelacije sa protonima dvostruke veze H14 i H15, čime je utvrđeno da se radi o ugljeniku C21.
- Proton H15 pokazuje korelaciju sa ugljenikom C22, čime je omogućena asignacija protona na pozicijama 14, 15 i 22.
- Oksigenovani ugljenik na pomeranju 73,32 ppm pokazuje korelacije sa protonima H14 i H15, čime je potvrđeno da se radi o ugljeniku C13.



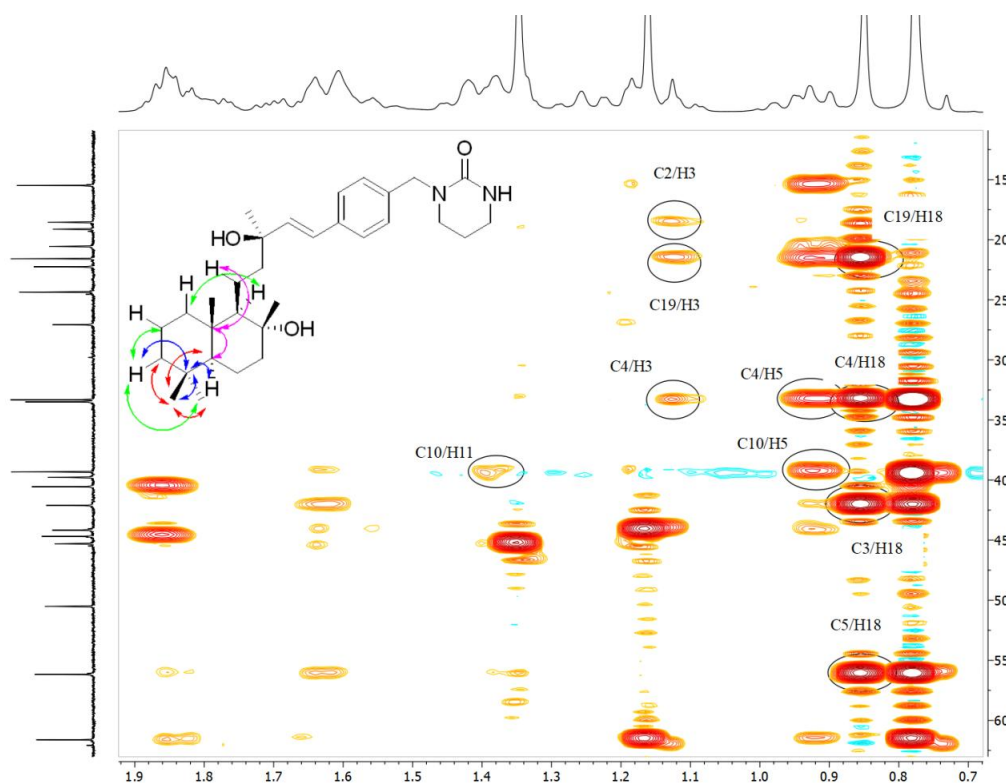
Slika P17. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra sa označenim ključnim korelacijama.

- Korelacija H14/C16, kao i korelacija H16/C13, omogućile su utvrđivanje položaja metil-grupe na poziciji 16 (Slika P18).
- Korelacije H16/C12, H14/C12, kao i H12/C11 omogućile su asignaciju TOCSY spinskog sistema A na pozicije 9, 11 i 12.
- Ugljenik C9 pokazao je korelacije sa protonima metil-grupa na pozicijama H7 i H20.
- Korelacija singleta na 1,16 ppm sa C8 dala je dodatnu potvrdu položaja metil-grupe H17.
- Sprezanje ugljenika C17 sa diastereotopnim metilenskim protonima H7, kao i korelacije C8/H7 i C9/H7, omogućile su pozicioniranje spinskog TOCSY sistema B i povezivanje sistema A sa sistemom B.
- Proton H7 pokazuje korelaciju sa ugljenikom C5, čime je završena asignacija sistema B.



Slika P18. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra sa ključnim označenim ključnim korelacijama.

- Protoni metil-grupe na hemijskom pomeranju 0,85 ppm pokazuju korelacije sa C3, C5 i C19, čime je potvrđena njihova pripadnost metil-grupi na poziciji C1. Signal ugljenika na 21,58 ppm pripisan je metil-grupi na poziciji C19 (Slika P19).
- Kvaternarni ugljenik na pomeranju 33,41 ppm pokazuje korelacije sa H18 i H3, te je identifikovan kao C4.
- Kvaternarni ugljenik C10 asigniran je na osnovu korelacije sa protonima H11.
- Korelacije H3/C19, H3/C2 i C1/H9 omogućile su određivanje položaja C1, C2 i C3, čime je kompletiran TOCSY spinski sistem C.



Slika P19. Deo ^1H - ^{13}C HMBC spektra sa označenim ključnim korelacijama.

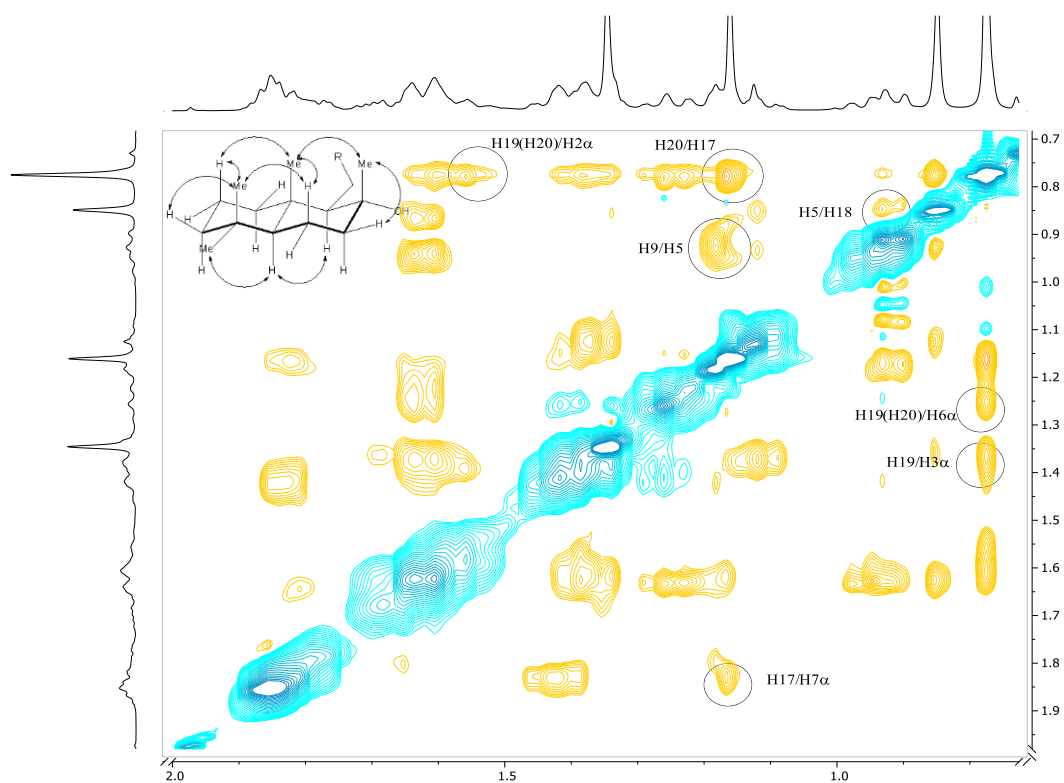
7.2.4. Analiza ^1H - ^1H NOESY spektra

Analiza NOESY spektra (Slika P20) omogućila je utvrđivanje relativnog stereohemijskog odnosa metil-grupa, kao i dijastereotopnih protona metilenskih grupa.

- Protoni metil-grupe H17 u aksijalnom položaju pokazuju korelacije sa multiplotom H7, kao i sa signalom metil-grupe H20, čime je potvrđeno da se ovi protoni nalaze u *cis*- odnosu prema metil-grupi H17 (α -položaj).
- Proton H5 (β -položaj) pokazuje korelaciju sa signalom metil-grupe H18 (0,85 ppm), što ukazuje da se metil-grupa nalazi u β -položaju, dok je metil-grupa H19 u α -položaju.
- Signali metil-grupe na 0,78 ppm pokazuju korelacije sa protonima H2 α , H3 α i H6 α .
- Orijentacija protona H9 određena je kao β , zahvaljujući korelaciji H9/H5.

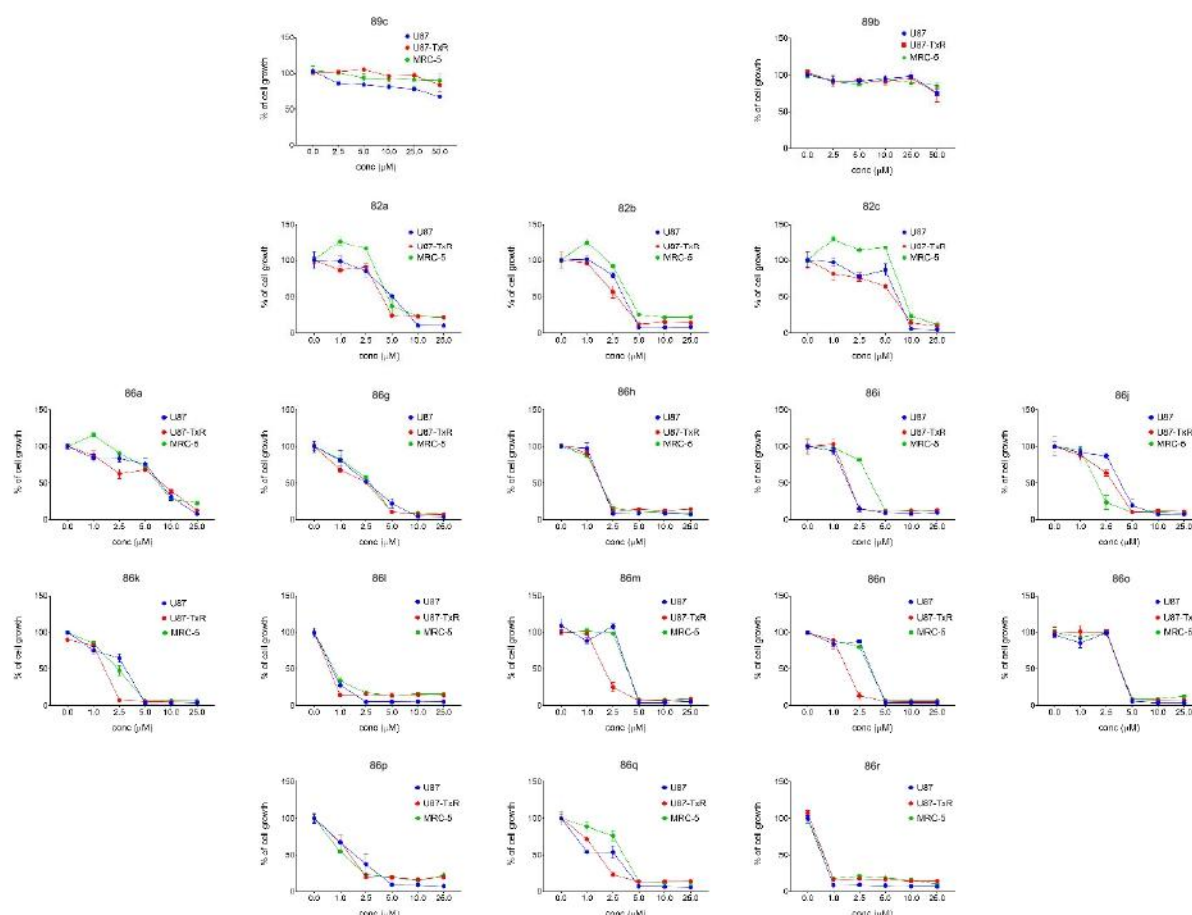
Na osnovu NOESY spektra nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti orijentaciju protona na poziciji H1. Međutim, imajući u vidu anizotropne efekte jednostrukih veza, koji dovode do manje zaštite ekvatorijalnih protona, može se pretpostaviti da se proton na hemijskom pomeranju 0,96 ppm nalazi u aksijalnom položaju (H1 β).*

* M. Baranac-Stojanović, M. Stojanović, Magnetic Anisotropy of the C–C Single Bond, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 4249–4254.



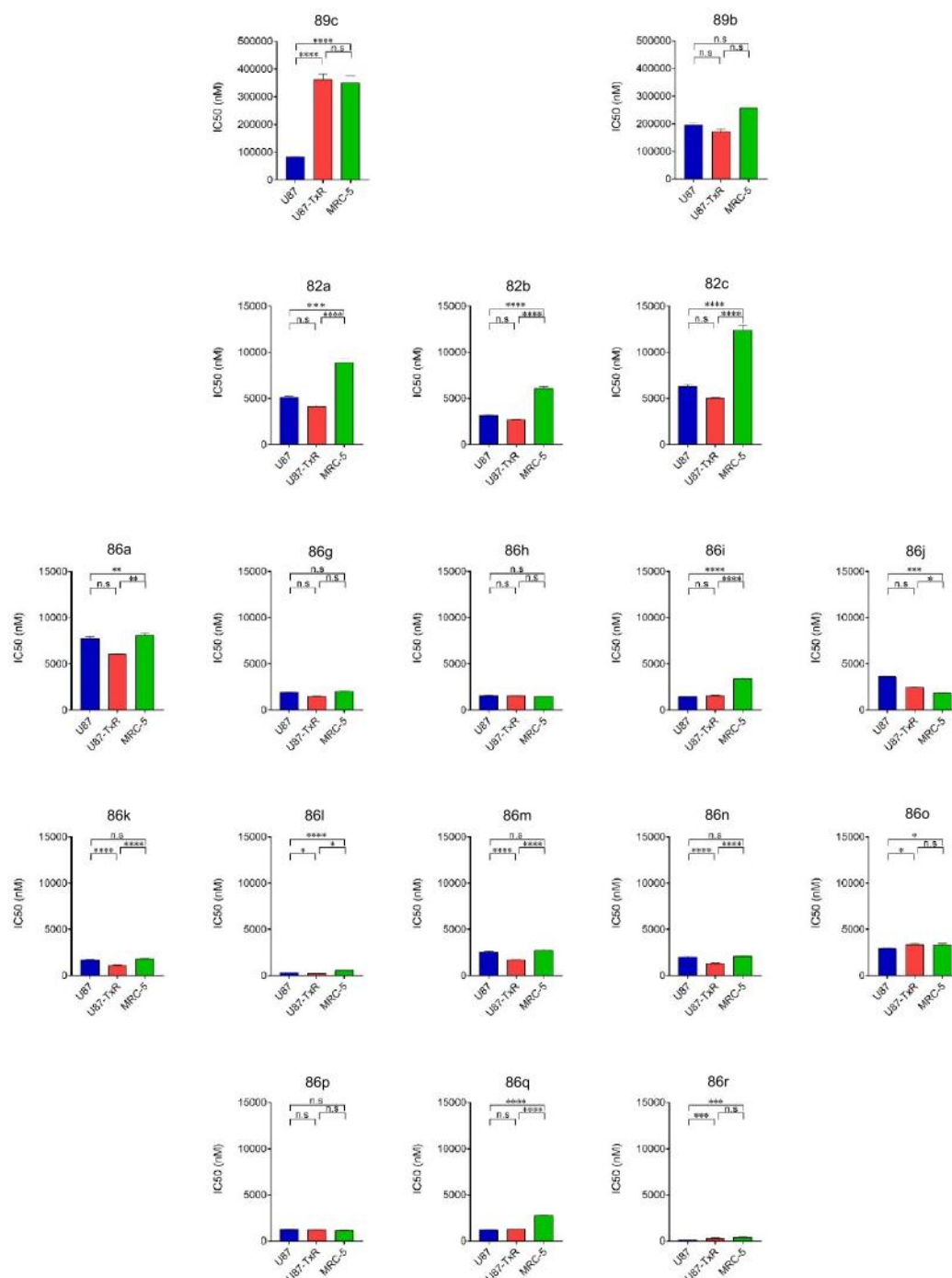
Slika P20. Deo ^1H - ^1H NOESY spektra sa označenim sa označenim ključnim korelacijama.

7.3. Biološka ispitivanja jedinjenja sa [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidinskom farmakoforom

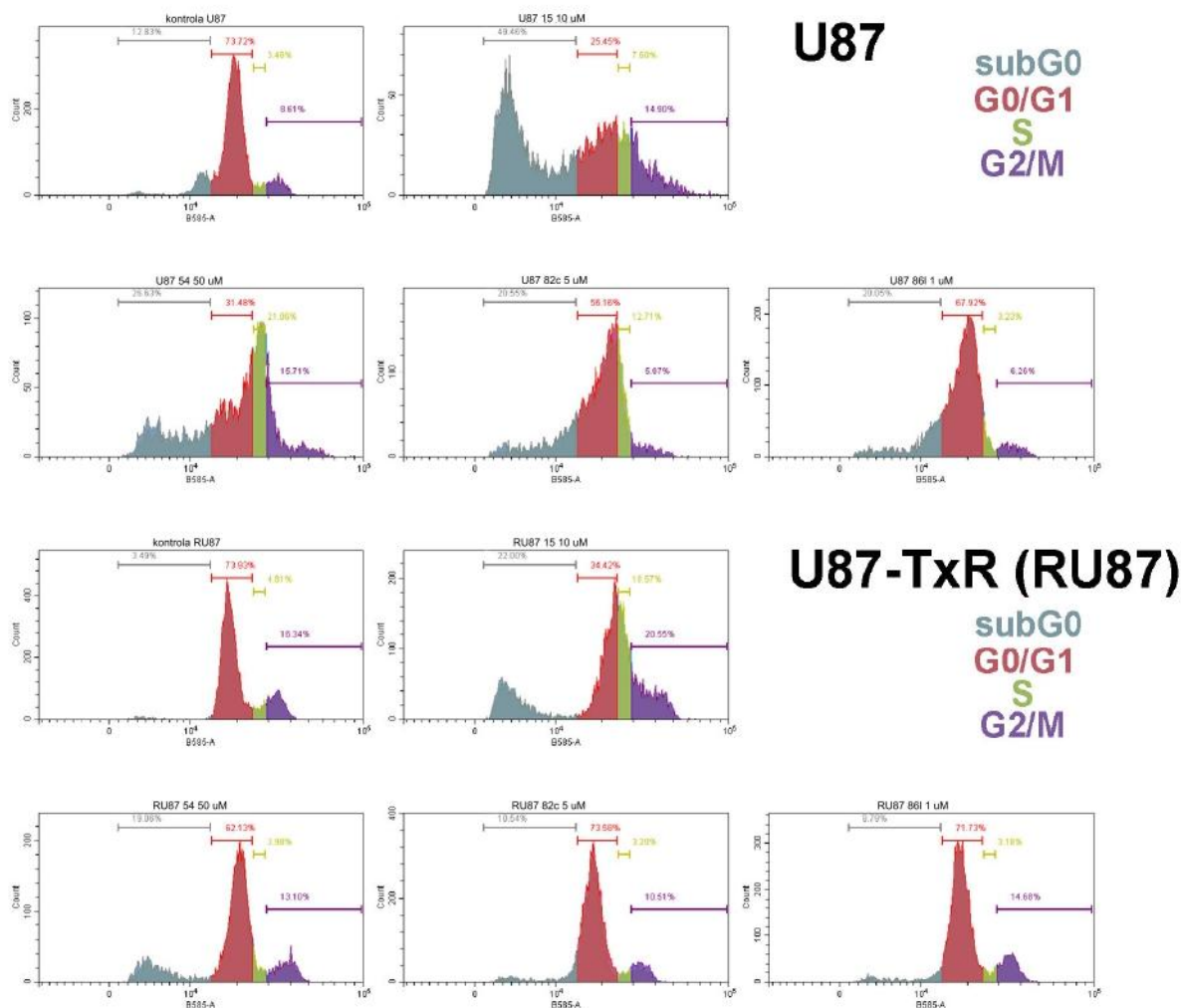


Slika P21. Profil inhibicije rasta pod dejstvom odabranih derivata upoređeni kod ćelija glioblastoma (U87 i U87-TxR) i normalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Dejstvo derivata TP **89b–c** ispitano je pri koncentracijama od 2,5; 5; 10; 25 i 50 μM . Dejstvo diaminskih derivata sklareola **82a**, **82b**, **82c** i hibrida sklareola sa TP farmakoforom **86a** i **86g–r** ispitano je pri koncentracijama od 1, 2,5, 5, 10 i 25 μM . Ćelije su tretirane tokom 72 sata, nakon čega je rast ćelija procenjen MTT testom. Vrednost za kontrolne, netretirane ćelije je postavljena na 100%. Izvedena su najmanje tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$).

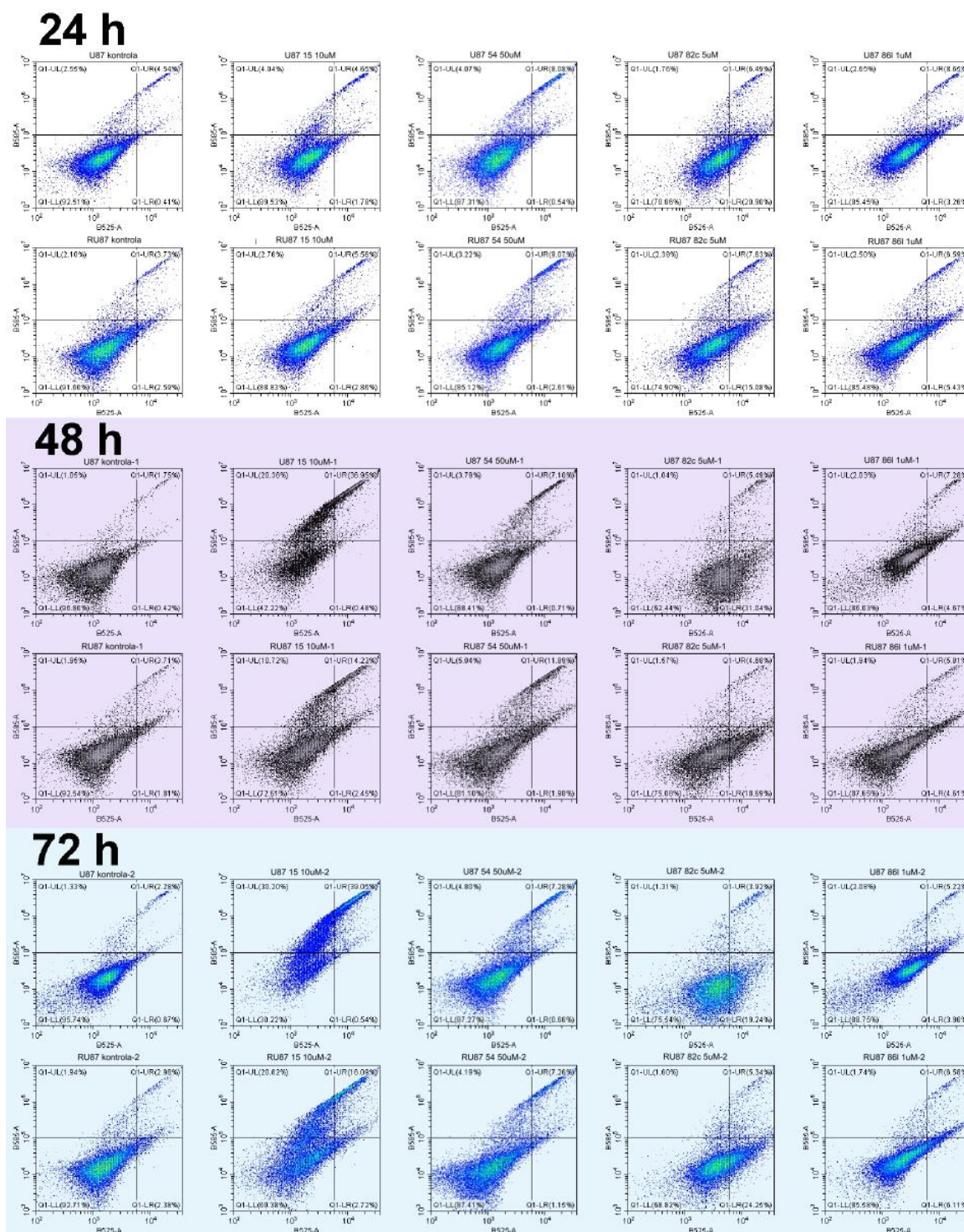
Slika P21. Profil inhibicije rasta pod dejstvom odabranih derivata upoređeni kod ćelija glioblastoma (U87 i U87-TxR) i normalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5).



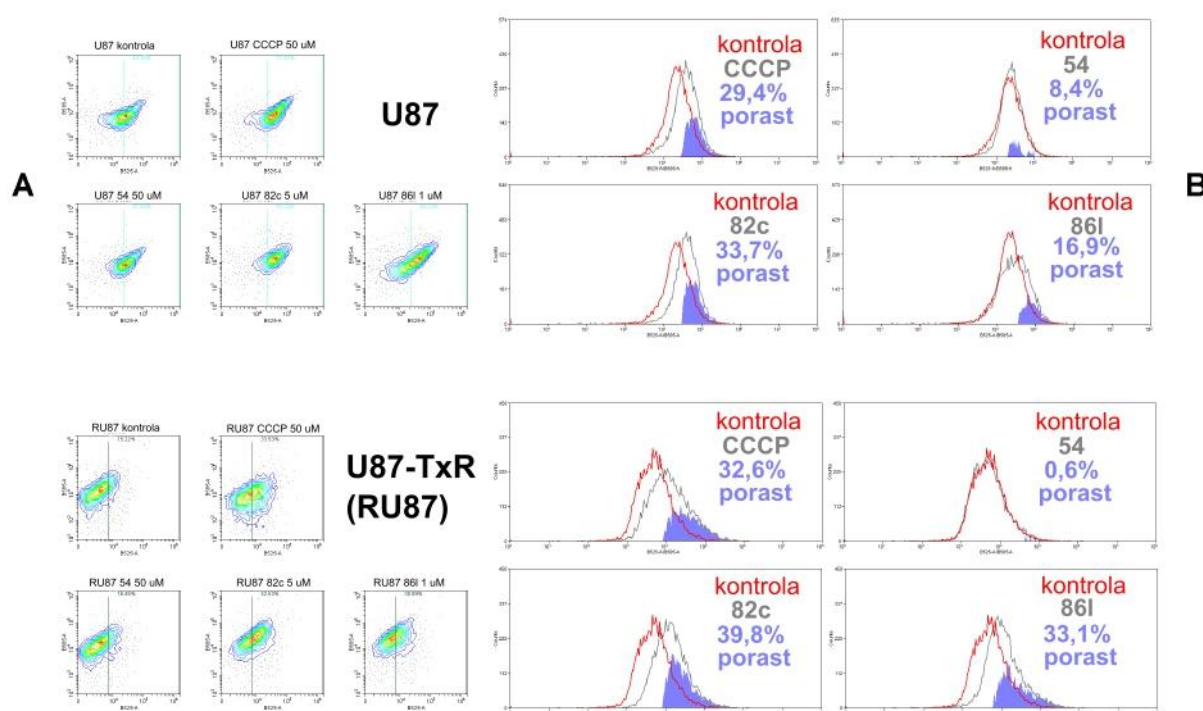
Slika P22. IC₅₀ vrednosti derivata 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirimidina (**89b–c**), diaminskih derivata sklareola (**82a**, **82b**, **82c**) i hibrida (**86a**, **86g–r**) kod ćelija glioblastoma (U87, U87-TxR) i normalnih fibroblasta pluća (MRC-5). IC₅₀ vrednosti izražene u nM su određene MTT testom nakon 72 h tretmana. Podaci predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. Izvedena su najmanje tri nezavisna eksperimenta (n = 3).



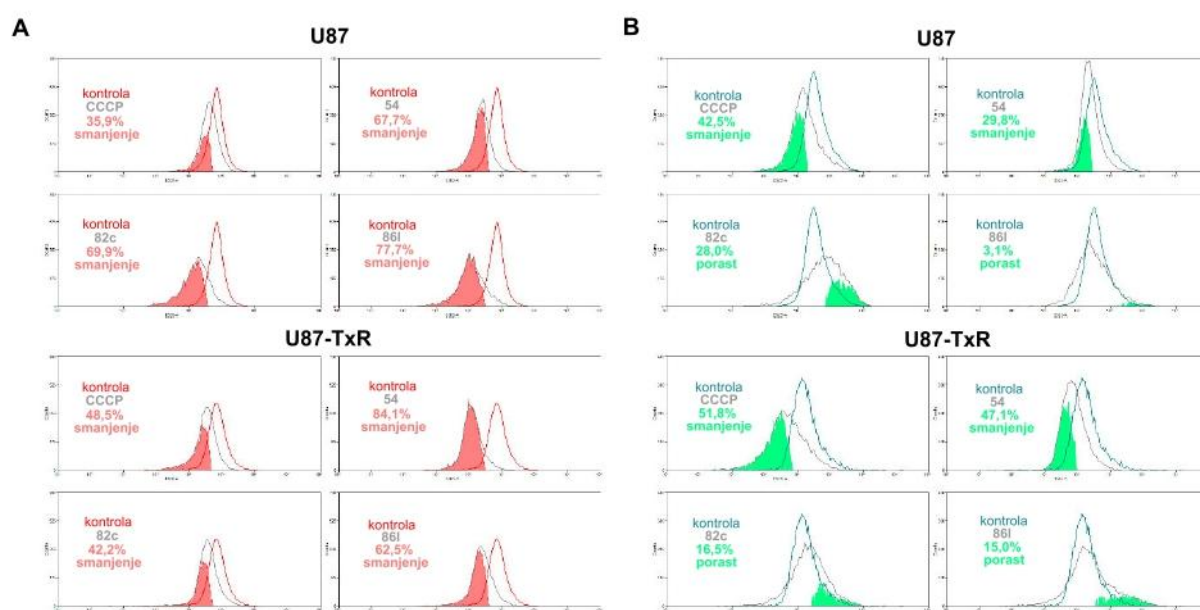
Slika P23. Analiza ćelijskog ciklusa kod U87 i U87-TxR ćelija nakon tretmana jedinjenjima **54** (50 μ M), **82c** (5 μ M), **86l** (1 μ M) i **15** (cisplatin, 10 μ M) kao referentnim jedinjenjem. Ćelije su tretirane ispitivanim jedinjenjem tokom 72 sata, nakon čega je distribucija ćelijskog ciklusa procenjena bojenjem propidijum-jodidom (PI). Analiza efekata je izvedena protočnom citometrijom pri čemu je za svaki eksperimentalni uzorak prikupljeno najmanje 10 000 događaja.



Slika P24. Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom 50 μM sklareola **54**, 5 μM diaminskog derivata **82c**, 1 μM hibrida sklareola **86i** i 10 μM cisplatina **15** kao referentnog jedinjenja. Ispitivanja su sprovedena na ćelijskim linijama U87 i U87-TxR (RU87). Nakon tretmana ćelija ispitivanim jedinjenjima primenjeno je dvojno AV/PI bojenje. Analiza efekata je izvedena protočnom citometrijom pri čemu je za svaki eksperimentalni uzorak analizirano najmanje 20 000 događaja (ćelija). Svaki eksperiment je ponovljen tri puta. Procentualni udeo ćelija u ranoj apoptozi (AV+ PI-), kasnoj apoptozi (AV+ PI+), nekrozi (AV- PI+), kao i vijabilnih ćelija (AV- PI-) prikazan je na histogramima.

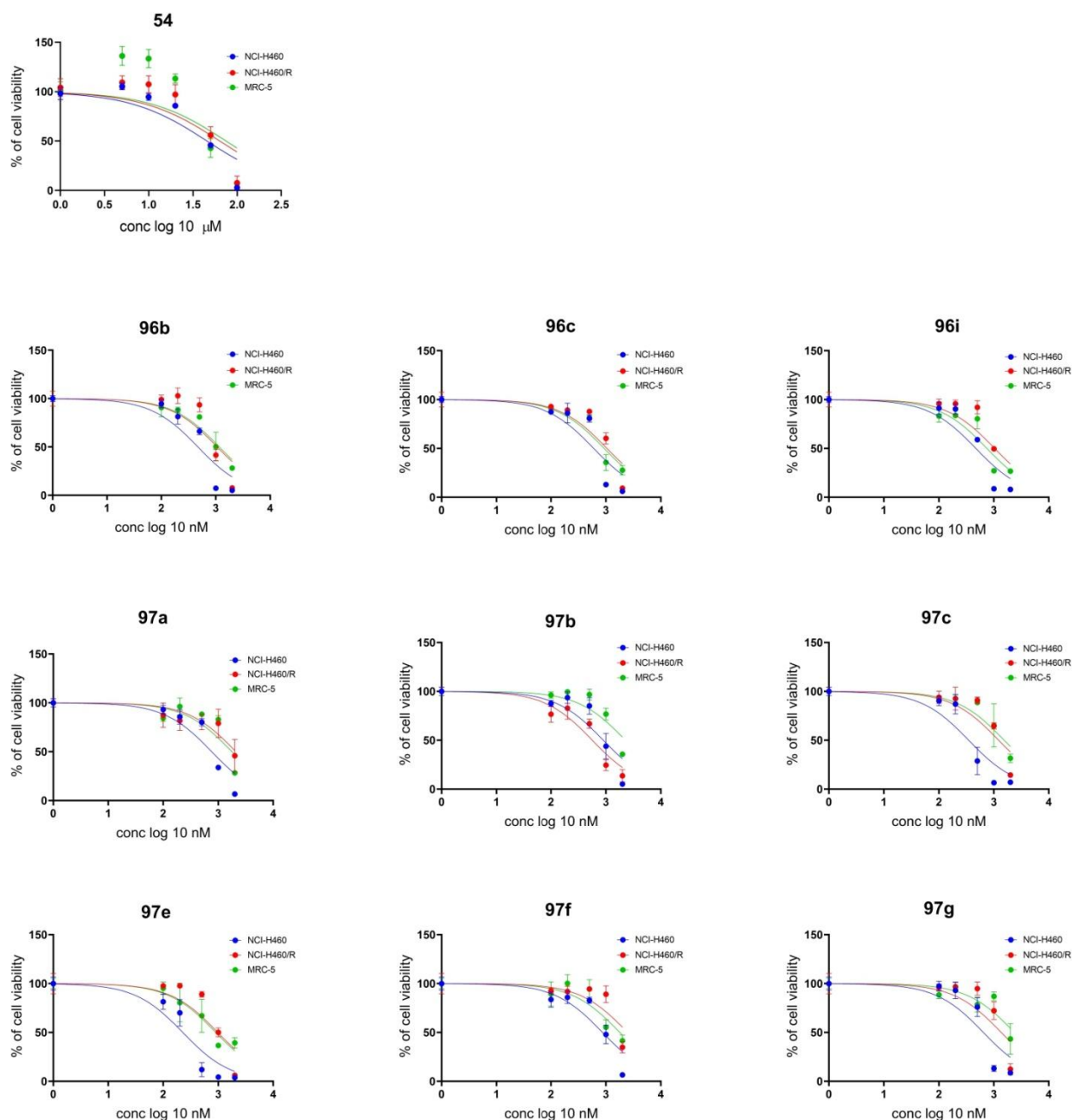


Slika P25. Uticaj jedinjenja **54**, **82c** i **86l** na potencijal membrane mitohondrija na ćelijama glioblastoma U87 i U87-TxR (RU87). Ćelije su tretirane 50 μ M **54**, 5 μ M, **82c**, 1 μ M **86l** i 10 μ M CCCP kao referentnim jedinjenjem. Za svaki uzorak analizirano je najmanje 10 000 događaja (ćelija).

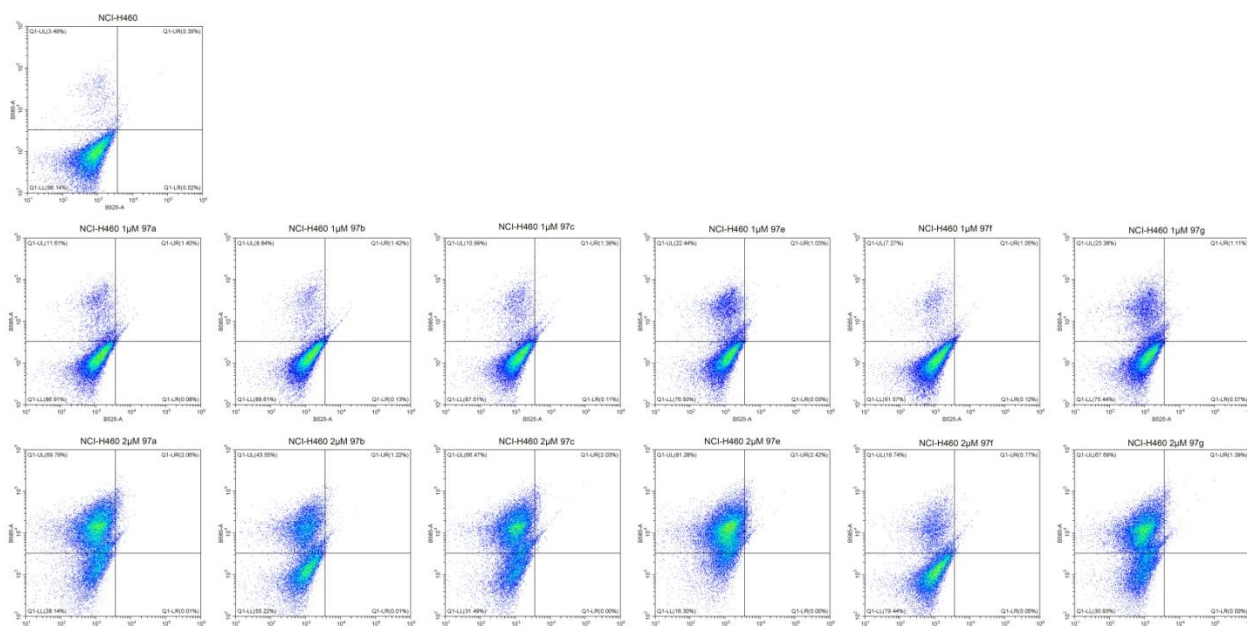


Slika P26. Uticaj jedinjenja **54**, **82c** i **86l** na produkciju ROS/RNS u ćelijama glioblastoma U87 i U87-TxR (RU87). **A)** Analiza intenziteta fluorescencije DHE protočnom citometrijom, što odgovara intracelularnom nivou superoksidnog radikal-anjona ($O_2^{\cdot-}$). **B)** Analiza intenziteta DHR fluorescencije protočnom citometrijom, što odgovara intracelularnom nivou H_2O_2 i $ONOO^-$. Ćelije su tretirane sa 50 μ M **54**, 5 μ M, **82c** i 1 μ M **86l** i 10 μ M CCCP kao referentnim jedinjenjem. Za svaki uzorak analizirano je najmanje 10 000 događaja (ćelija).

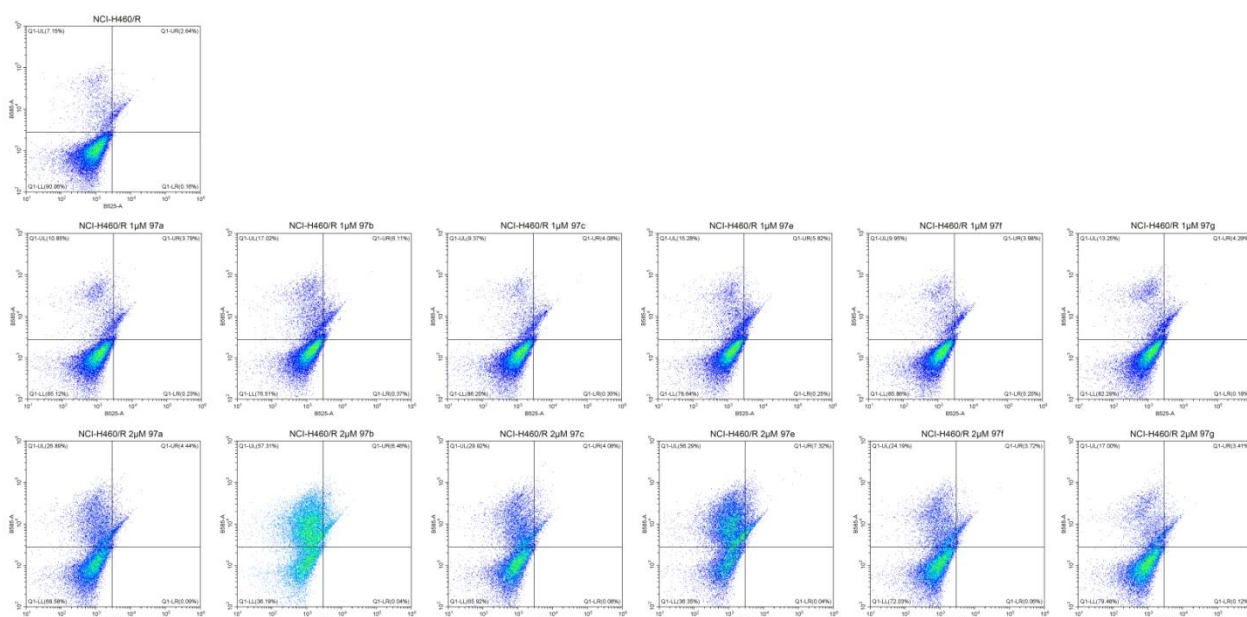
7.4. Biološka ispitivanja jedinjenja sa adamantanskim strukturnim motivom



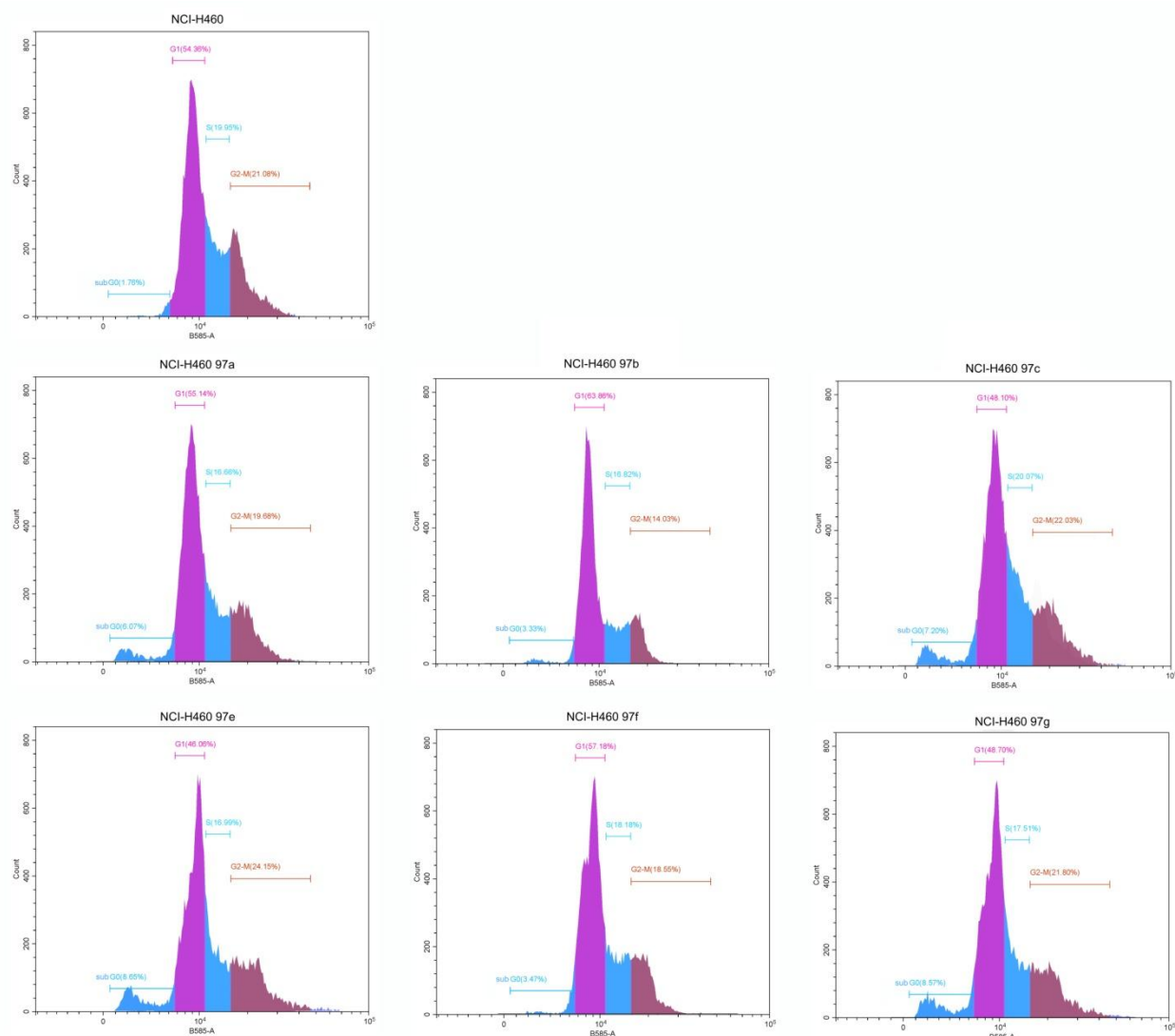
Slika P27. Dozno–zavisni sklareola (**54**) i odabranih derivata sklareola sa adamantanskim motivom (**96b**, **96c**, **96i**, **97a–c** i **97e–g**) na NCI-H460, NCI-H460/R i MRC-5 ćelijske linije ilustruje selektivnost ka tumorskim ćelijama u odnosu na normalne ćelije, kao i selektivnost ka rezistentnim tumorskim ćelijama u odnosu na senzitivne tumorske ćelije. Efekti pet različitih koncentracija na vijabilnost ćelija određeni su pomoću MTT testa nakon 72 sata tretmana. Inhibicija vijabilnosti ćelija prikazana je analizom nelinearne regresije.



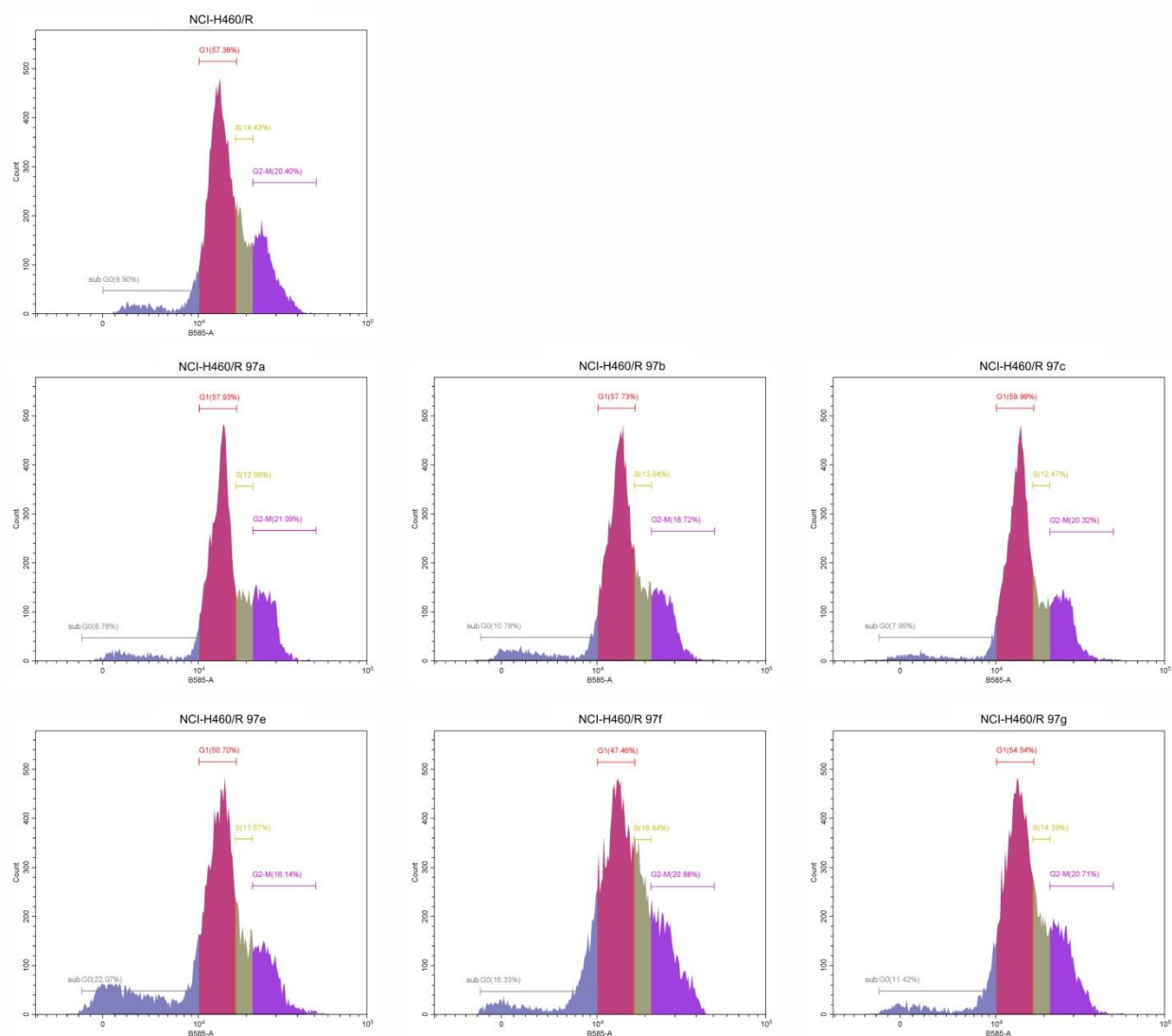
Slika P28. Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom jedinjenja 97a–c i 97e–g sprovedena na NCI-H460 ćelijskoj liniji. Dejstvo jedinjenja je ispitivano pri koncentracijama 1 μM i 2 μM tokom 48 sati, nakon čega je primenjeno dvojno AV/PI bojenje. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta. Procentualni udeo ćelija u ranoj apoptozi (AV+ PI–), kasnoj apoptozi (AV+ PI+), nekrozi (AV– PI+), kao i vijabilnih ćelija (AV– PI–) prikazan je na histogramima.



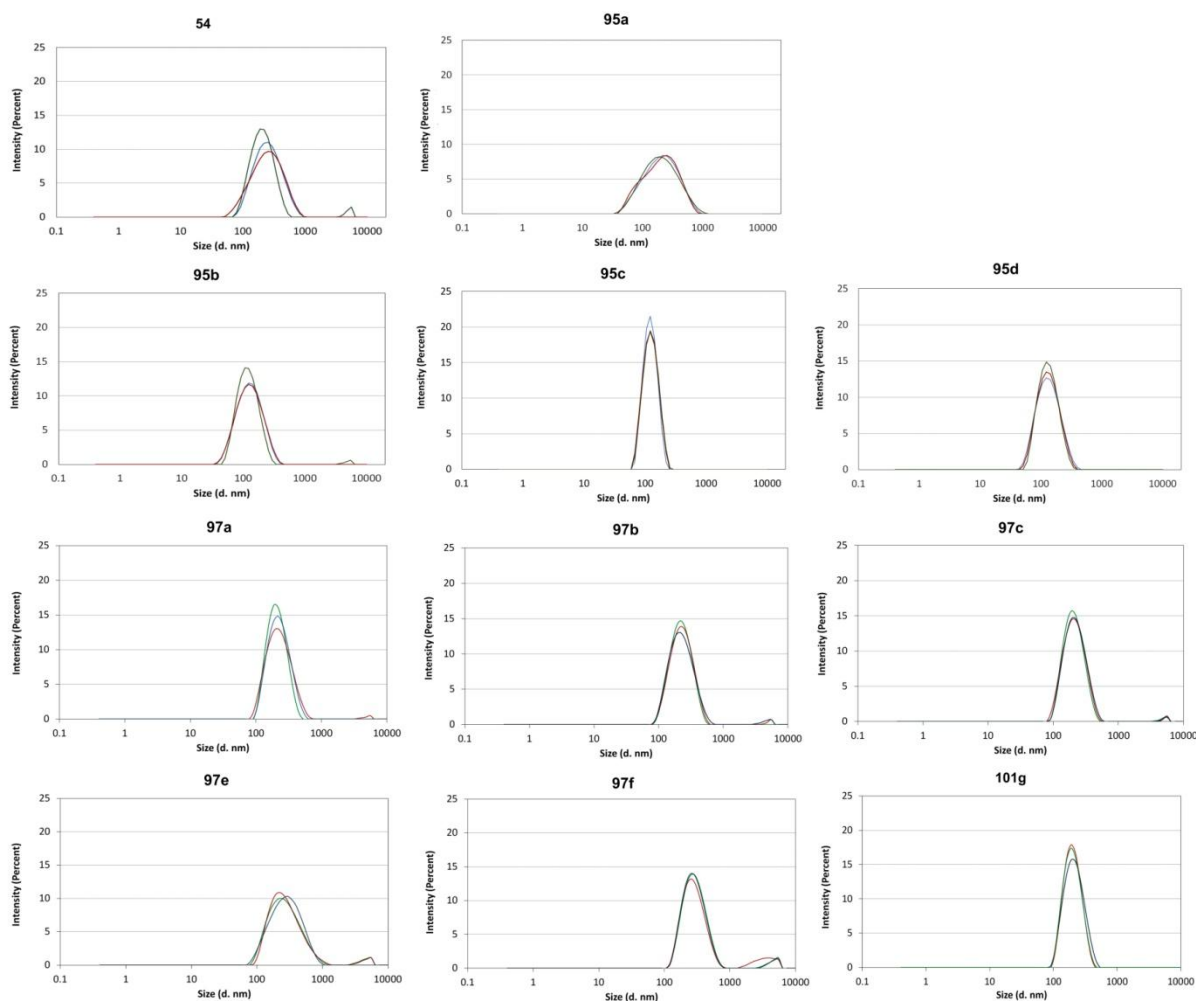
Slika P29. Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom 97a–c i 97e–g sprovedena na NCI-H460/R ćelijskoj liniji. Dejstvo jedinjenja je ispitivano pri koncentracijama 1 μM i 2 μM tokom 48 sati, nakon čega je primenjeno dvojno AV/PI bojenje. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta. Procentualni udeo ćelija u ranoj apoptozi (AV+ PI–), kasnoj apoptozi (AV+ PI+), nekrozi (AV– PI+), kao i vijabilnih ćelija (AV– PI–) prikazan je na histogramima.



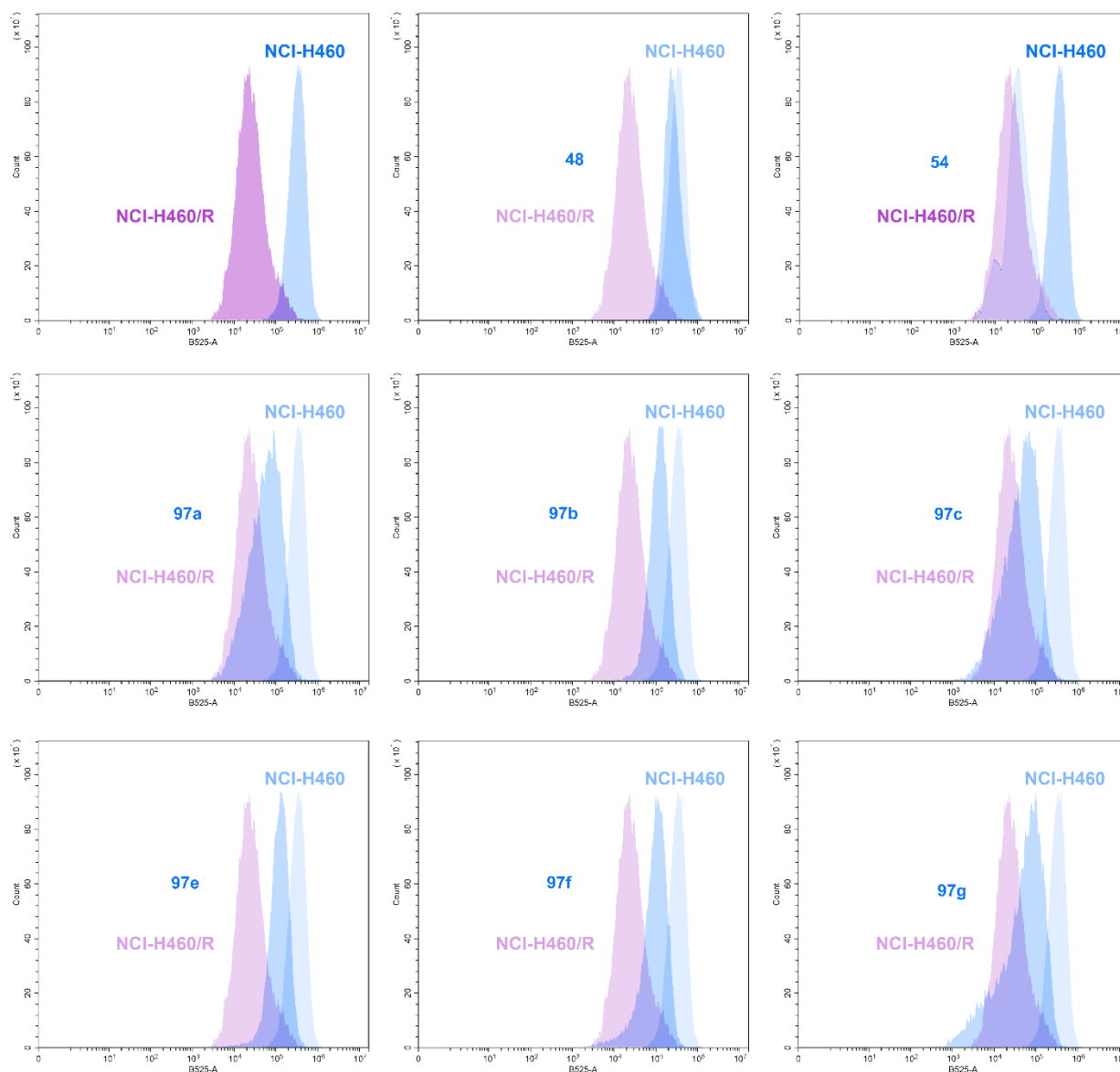
Slika P30. Analiza ćelijskog ciklusa u NCI-H460 ćelijama nakon tretmana derivatima sklareola sa adamantanskim motivom **97a–c** i **97e–g**. Ćelije su tretirane sa 1 μM ispitivanog jedinjenja tokom 72 sata, nakon čega je distribucija ćelijskog ciklusa procenjena bojenjem propidijum-jodidom (PI). Analiza efekata je izvedena protočnom citometrijom pri čemu je za svaki eksperimentalni uzorak prikupljeno najmanje 10 000 događaja.



Slika P31. Analiza ćelijskog ciklusa u NCI-H460/R ćelijama nakon tretmana derivatima sklareola sa adamantanskim motivom **97a–c** i **97e–g**. Ćelije su tretirane sa 1 μ M ispitivanog jedinjenja tokom 72 sata, nakon čega je distribucija ćelijskog ciklusa procenjena bojenjem propidijum-jodidom (PI). Analiza efekata je izvedena protočnom citometrijom pri čemu je za svaki eksperimentalni uzorak je prikupljeno najmanje 10 000 događaja.



Slika P32. Ispitivanje nanočestičnih osobina jedinjenja **54**, **95a–d**, **97a–c** i **97e–g** pomoću „Zetasizer” uređaja. Veličina i polidisperzija nanočestica su mereni nezavisno u tri ponovljena eksperimenta.



Slika P33. Ispitivanje akumulacije rodamina 123 nakon tretmana NCI-H460/R ćelija jedinjenjima **54**, **97a–c** i **97e–g**. Ćelije su podvrgnute tretmanu sa 50 μM sklareola (**54**) i 5 μM derivata sklareola sa adamantanskim strukturnim motivom (**97a–c** i **97e–g**). Senzitivne NCI-H460 ćelije, koje ne eksprimiraju P-glikoprotein, korišćene su kao pozitivna kontrola za akumulaciju rodamina 123. Tarikvidar (**48**) je primenjen u koncentraciji od 50 nM kao pozitivna kontrola za inhibiciju P-glikoproteina. Akumulacija rodamina 123 ispitana je protočnom citometrijom u zelenom kanalu (emisioni maksimum pri 525 nm), pri čemu je analizirano najmanje 20 000 događaja (ćelija) po uzorku. Profili dobijeni protočnom citometrijom prikazuju efekte ispitivanih jedinjenja.

Biografija

Pavle Stojković rođen je 29. marta 1996. godine u Pančevu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Hemija, upisao je školske 2015/16. godine. Diplomski rad odbranio je 2019. godine na Katedri za organsku hemiju, sa prosečnom ocenom 9,97 tokom osnovnih studija i ocenom 10 na završnom radu. Tokom letnje prakse 2019. godine boravio je na Katalonskom institutu za hemijska istraživanja (ICIQ), Španija. Master akademske studije završio je 2020. godine na Katedri za organsku hemiju, sa prosečnom ocenom 10 i ocenom 10 na završnom radu. Doktorske akademske studije na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2020/21. godine.

Od 2021. godine zaposlen je na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu u zvanju asistenta za užu naučnu oblast organska hemija. Učestvovao je u izvođenju vežbi iz predmeta Organska hemija 1 i 2 za studente studijskih programa Hemija, Hemija životne sredine i Nastava hemije, Teorija hemijske veze, Organske sinteze 1 i 2 za studente studijskog programa Hemija, kao i iz predmeta Organska hemija i Osnovi hemije za studente Biološkog fakulteta. Od 2023. godine učesnik je projekta PhotoSCLART (Razvoj fotoreaktivnih agenasa protiv raka zasnovanih na prirodnim proizvodima – derivati sklareola i artemizininina u modelima raka rezistentnih na više lekova: osnova za teranostički pristup), finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, dok je od 2024. godine učesnik projekta MiMoSenSa (Razvoj MIP@MOF-funkcionalizovanog elektrohemijskog senzora za kontrolu bezbednosti hrane).

Objavljeni radovi koji čine deo disertacije

Iz rezultata ove doktorske disertacije proistekla su 2 rada objavljena u međunarodnim časopisima, kao i 6 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima:

Vodeći međunarodni časopis kategorije M21a

1. P. Stojković, A. Kostić, E. Lupšić, N. T. Jovanović, M. Novaković, P. Nedialkov, A. Trendafilova, M. Pešić, I. M. Opsenica, Novel hybrids of sclareol and 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine show collateral sensitivity in multidrug-resistant glioblastoma cells, *Bioorg. Chem.*, **2023**, 138, 106605.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106605>

2. P. Stojković, E. Lupšić, N. Terzić Jovanović, A. Stepanović, P. Nedialkov, A. Podolski-Renić, M. Pešić, I. M. Opsenica, Sclareol-based natural nanoparticles with adamantane moieties exert anticancer effects against non-small cell lung carcinoma cells, *Bioorg. Chem.*, **2025**, 165, 108967.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.108967>

M34 – Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. P. Stojković, A. Kostić, N. Terzić Jovanović, M. Novaković, A. Trendafilova, M. Pešić, I. M. Opsenica, “Synthesis of novel sclareol derivatives and evaluation of their anticancer activity”, 8th EuChemS Chemistry Congress, Lisbon (Portugal), 28th august – 1st september 2022, Book of Abstracts PO.E.18, pp. 593; ISBN 978-989-8124-35-7.

2. P. Stojković, A. Kostić, E. Lupšić, N. Terzić Jovanović, M. Novaković, M. Pešić, I. M. Opsenica, “Synthesis and cytotoxicity of novel sclareol derivatives”, 10th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 7-8 September 2023, Zagreb, Croatia, pp. 31.

3. P. Stojković, A. Kostić, E. Lupšić, N. Terzić Jovanović, M. Novaković, M. Pešić, I. Opsenica, “Synthesis of sclareol-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine hybrids, evaluation of their anticancer activity and mechanism of action”, 9th EuChemS Chemistry Congress (ECC9), Dublin, Ireland, July 7-11, 2024.

4. V. Ajdačić, P. Stojković, A. Nikolić, A. Andrijević, E. Lupšić, A. Stepanović, A. Podolski-Renić, N. Terzić-Jovanović, M. Pešić, I. M. Opsenica, “Synthesis and anticancer activity of novel sclareol derivatives”, XXVIII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Rome, Italy, September 1-5, 2024, Book of Abstracts P285, page 320.

5. E. Lupšić, M. Grozdanić, P. Stojković, I. M. Opsenica, M. Pešić, A. Podolski-Renić, “Adamantane–sclareol hybrids selectively target multidrug resistant glioblastoma cells by inducing oxidative stress”, The 1st Regional SDIR-HDIR-MOKAD Congress, Belgrade, Serbia, October 8-10, 2025, Book of Abstracts, P69, page 144.

M64 – Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu

1. Pavle A. Stojković, Ana Kostić, Ema Lupšić, Nataša Terzić Jovanović, Miroslav Novaković, Milica Pešić, Igor M. Opsenica, “Sinteza i citotoksičnost novih derivata sklareola”, 59. Savetovanje Srpskog hemijskog društva (SHD), 1-2. jun 2023. Novi Sad, Srbija, Kratki izvodi radova/Knjiga radova, strana 77, ISBN 978-86-7132-081-8

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Павле А. Стојковић

Број индекса: ДХ04/2020

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Дизајн и синтеза деривата склареола који показују антитуморску активност против резистентних ћелијских линија глиобластома и неситноћелијског карцинома плућа

- 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 докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Павле Стојковић

Број индекса: ДХ04/2020

Студијски програм: Хемија

Наслов рада: Дизајн и синтеза деривата склареола који показују антитуморску активност против резистентних ћелијских линија глиобластома и неситноћелијског карцинома плућа

Ментори: др Игор Опсеница, др Наташа Терзић-Јовановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Дизајн и синтеза деривата склареола који показују антитуморску активност против резистентних ћелијских линија глиобластома и неситноћелијског карцинома плућа

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 докторанда

У Београду, _____

1. **Ауторство** - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.