

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Miloš D. Jovanović

**SINTEZA LONGAMIDA B I ANALOGA  
RAMNOLIPIDA I NJIHOVA FIZIČKO-HEMIJSKA I  
BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Miloš D. Jovanović

**SYNTHESIS OF LONGAMIDE B AND  
RHAMNOLIPID ANALOGUES AND THEIR  
PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL  
CHARACTERIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

**Mentori:**

---

Dr Vladimir Savić, redovni profesor  
Farmaceutski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

---

Dr Slavica Erić, redovni profesor  
Farmaceutski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

---

Dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

---

Dr Milena Simić, vanredni profesor  
Farmaceutski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

---

Dr Predrag Jovanović, docent  
Farmaceutski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane** \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za organsku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Temu rada predložili su mentori dr Vladimir Savić, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i dr Slavica Erić, vanredni profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu koji su svojim savetima pomagali i usmeravali njenu izradu. Zahvaljujem se mentorima na uloženom vremenu, trudu i prenesenom znanju kao i pomoći tokom izrade i pisanja doktorske teze.

Veliku zahvalnost dugujem članovima komisije dr Jasmini Nikodinović-Runić, dr Mileni Simić i dr Predragu Jovanoviću na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se Veri Lukić sa Instituta za sudsku medicinu i dr Milki Jadranin iz Centra za hemiju IHTM-a na pomoći pri karakterizaciji jedinjenja, dr Jeleni Radivojević i dr Ivani Aleksić sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo za doprinos u delu koji se odnosi na biološku karakterizaciju jedinjenja i dr Stevanu Blagojeviću sa Instituta za opštu i fizičku hemiju za doprinos pri fizičko-hemijskoj karakterizaciji jedinjenja.

Takođe se zahvaljujem dr Milošu Petkoviću, dr Gordani Tasić, Dimitriju Đukanoviću i ostalim kolegama sa Katedre za organsku hemiju Farmaceutskog fakulteta za sve savete i korisne diskusije.

Svojoj porodici i svim osobama iz bliskog okruženja zahvaljujem se za veliku podršku i razumevanje.

Autor

## Sinteza longamida B i analoga ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija

### SAŽETAK

Ramnolipidi su ekološki prihvatljivi biosurfaktanti koje proizvodi bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. Zbog interesantnog biološkog profila i odličnih fizičko-hemijskih svojstava nalaze primenu u biotehnologiji, bioremedijaciji i medicini. Njihova šira i ekonomski prihvatljivija primena je međutim značajno otežana činjenicom da se teško mogu dobiti u većim količinama i u čistoj formi. Kao posledica toga istraživanja u smeru strukturnih modifikacija i sinteze analoga ramnolipida nisu još uvek zaživela, samim tim, fizičko-hemijska i biološka svojstva srodnih molekula nisu još uvek dovoljno istražena. Imajući u vidu neekonomičnost sinteze ramnolipida cilj ovog istraživanja bio je pronaći sintetski pristupačne molekule koji bi imali isti ili bolji biološki ili fizičko-hemijski profil od samih prirodnih ramnolipida. Korišćenjem (*R*)-3-hidroksikiseline kao osnovnog strukturnog fragmenta sintetisani su šećerni, heterociklični i peptidni analozi ramnolipida i ispitivane njihove fizičko-hemijske i antimikrobne osobine. Zamenom ramnoze drugim šećerima smanjuje se cena proizvodnje ovih molekula dok se istovremeno očuvava površinska aktivnost i biorazgradivost. Zamenom ramnoze peptidima dobijajena je serija jedinjenja sa anti-adhezivnim dejstvom na *Candida albicans* (BFIC<sub>50</sub> = 4,5 µg/mL). Najaktivniji derivati su konjugati leucina i 3-hidroksikiselina koje sadrže benzil ester. SAR studijom je pokazano da je optimalan broj aminokiselina u bočnom nizu 1-2, kao i da se anti-biofilm aktivnost povećava sa produženjem alifatičnog niza 3-hidroksikiselina. Ova jedinjenja inhibiraju formiranje biofilma sprečavanjem adhezije *C. albicans* na abiotsku i biološku površinu.

Pored ramnolipida, i mali molekuli koji pripadaju bromopiroolskim alkaloidima takođe ispoljavaju antimikrobna i anti-biofilm svojstva. Longamid B je jedan od naistraživanijih molekula ove grupe. Poznata je njegova antimikrobna aktivnost na bakterijske sojeve *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*. Iz tog razloga predstavlja atraktivan target za totalnu sintezu i šire proučavanje hemijskog prostora definisanog njegovom strukturom. Pretpostavljeno je da se osnovni skelet bromopiroolskih alkaloida, može dobiti intramolekulskom nukleofilnom adicijom na alene. Ispitivanjem ciklizacionih reakcija aminoalena u prisustvu serije metalnih soli došlo se do optimalnih uslova koji su podrazumevali korišćenje stehiometrijske količine AgNO<sub>3</sub>. Zahvaljujući hiralnom ciklizacionom prekursoru reakcija ciklizacije se odvijala stereoselektivno. Razvijena metodologija iskorišćena je u sintezi longamida B i stilizina D.

U cilju diverzifikacije strukture bromopiroolskih alkaloida ispitivane su reakcije i karboaminacije aminoalena katalizovane paladijumom. Ova strategija omogućila je sintezu  $\alpha$ -supstituisanih derivata longamida.

**Ključne reči:** ramnolipidi, površinska aktivnost, biofilm, *Candida albicans*, lipopeptidi, longamid B, stilizin D, anulacija, Ag-kataliza, Pd-kataliza

**Naučna oblast:** Farmaceutska hemija

**Uža naučna oblast:** Medicinska hemija

# Synthesis of longamide B and rhamnolipid analogues and their physico-chemical and biological characterization

## ABSTRACT

Rhamnolipids are environmentally friendly biosurfactants produced mostly by strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Due to their interesting biological profile and excellent physico-chemical properties, they find application in biotechnology, bioremediation and medicine. The inefficient large scale production, however, still hinders their wider application. Consequently, the research on structural modifications and the synthesis of rhamnolipid analogues is still in the early stages and the physico-chemical and biological properties of related molecules are not yet fully explored. Thus this research aimed to find synthetically accessible molecules which would mimic or enhance the properties of the parent molecule. Using (*R*)-hydroxy acids as a core building block, the sugar, heterocyclic and peptide analogues of rhamnolipids were synthesised and their physico-chemical and antimicrobial properties evaluated. Replacing rhamnose with other sugars allows for a reduction in production cost whilst preserving the surface active properties and biodegradability of the parent molecules. The replacement of rhamnose with peptides produced a series of molecules with anti-adhesion effect on *Candida albicans* (BFIC<sub>50</sub> = 4,5 µg/mL). The most potent derivatives were conjugates of leucine and benzyl esters of 3-hydroxyacids. The SAR study showed that the optimal number of amino acids in the sidechain was one or two, furthermore, the elongation of the aliphatic chain also improved the anti-biofilm properties of the peptide derivatives. The compounds were found to exert anti-biofilm properties through inhibition of *C. albicans* adhesion to abiotic and biotic surfaces.

Apart from rhamnolipids, small molecules, members of bromopyrrole alkaloid family, also exert antimicrobial and anti-biofilm properties. Longamid B is one of the most studied molecules of this group. Its antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* is well known. Therefore it represents an attractive target for total synthesis and the exploration of chemical space around the molecule. Our envisaged strategy was based on the hypothesis that the core structure of bromopyrrole alkaloids could be accessed via intramolecular nucleophilic addition to allene moiety. The investigation of cyclization reactions of aminoallenes in the presence of a series of metal salts uncovered a stoichiometric amount of AgNO<sub>3</sub> as the best option for the reaction. The chiral precursor allowed a stereoselective cyclization process. The developed methodology was successfully applied in the synthesis of longamide B and stylisine D.

With the aim of diversificating the structure of bromopyrrole alkaloids the carboamination reactions of aminoallenes catalyzed by palladium were also explored. This strategy allowed the synthesis of  $\alpha$ -substituted derivatives of longamide B.

**Key words:** rhamnolipids, surface activity, biofilm, *Candida albicans*, lipopeptides, longamide B, stylisine D, annulation, Ag-catalysis, Pd-catalysis.

**Scientific field:** Pharmaceutical chemistry

**Scientific subfield:** Medicinal chemistry



## Spisak skraćenica

Ac	acetil
AIBN	azo-bis-izobutironitril
Ar	aril
ATCC	eng. <i>American Type Culture Collection</i>
BBN	9-borabiciklo[3.3.1]nonan
BDIC <sub>50</sub>	koncentracija testiranog jedinjenja pri kojoj se 50% formiranog biofilm rasturi
BFIC <sub>50</sub>	koncentracija testiranog jedinjenja pri kojoj je infibirano 50% formiranja biofilmova
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil
Bn	benzil
Boc	<i>tert</i> butoksikarbonil
Bz	benzoil
Cbz	benziloksikarbonil
CDA	cikloheksan-diacetal
CDCl <sub>3</sub>	deuterohloroform
conc	koncentrovana
COSY	homonuklearna H; H-korelisana 2D NMR spektroskopija (eng. <i>Correlated spectroscopy</i> )
d	dublet
d.e	dijastereoizomerni višak
dba	dibenzilidenaceton
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
DCE	1,2-dihloretan
DCM	dihlormetan
dd	dublet dubleta
DEAD	dietilazo-dikarboksilat
DEPT	poboljšanje prenosa polarizacije bez distorzije
DIPEA	N,N-diizopropiletamin
di-RL	diramnolipidi
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	N,N-dimetil-formamid
DMP	Dess-Martin-ov perjodinan
DMSO	dimetil-sulfoksid
DMSO <sub>d6</sub>	deuterisani dimetil-sulfoksid
dq	dublet kvarteta
dt	dublet tripleta
e.e.	enantiomerni višak
EDCI	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ekv	ekvivalent
Et	etil
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
Fmoc	fluorenilmetoksikarbonil
Gal	galaktoza

GC/MS	gasna hromatografija/masena spektrometrija
Glu	glukoza
HBTU	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium heksafluorofosfat
HLB	hidrofilno-lipofilna ravnoteža
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	visoko efikasna tečna hromatografija
HRMS	maseni spektar visokog razlaganja
HSQC	heteronuklearna korelacija preko jednostrukih kvantnih prelaza (eng. <i>Heteronuclear single quantum coherence</i> )
Hz	herc
IC <sub>50</sub>	koncentracija inhibitora pri kojoj je odgovor smanjen za 50%
iPr	izopropil
iPr	izopropil
IR	infracrvena spektroskopija
J	konstanta kuplovanja
L	ligand
lev	levulinoil
logP	particioni koeficijent
m	multiplet
Me	metil
MeCN	acetonitril
MeOD	deuterometanol
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
mono-RL	monoramnolipidi
MRSA	meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
Ms	mezil
MS	molekulska sita
MTT	(3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid)
NBS	N-bromsukcinimid
NIS	N-jodsukcinimid
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
OD	apsorbanca (eng. <i>Optical density</i> )
PAO1	soj <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PG	zaštitna grupa
Ph	fenil
PHA	polihidroksialkanoat
Piv	pivaloil ( <i>terc</i> -butilkarbonil)
pKa	konstanta disocijacije kiselina
PMB	<i>p</i> -metoksibenzil
py	piridin
q	kvartet
QS	međubakterijska komunikacija, (eng. <i>Quorum sensing</i> )
R	alkil
Rf	faktor zadržavanja u hromatografiji (eng. <i>Retention factor</i> )

rfx	refluks
rha	ramnoza
ROESY	eng. <i>Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy</i>
s	singlet
s.t.	sobna temperatura
SAR	odnos strukture i dejstva (eng. <i>Structure activity relationship</i> )
SiO <sub>2</sub>	silicijum-dioksid
S <sub>N</sub> 1	monomolekulska nukleofilna supstitucija
S <sub>N</sub> 2	bimolekulska nukleofilna supstitucija
t	triplet
T.t.	tačka topljenja
TBAF	tetrabutilamonijum-fluorid
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsilil
TEMPO	(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-il)oksil
TES	trietilsilil
Tf	trifluorometansulfonil
TFA	trifluorosirćetna kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna hromatografija
TMS	trimetilsilil
XantPhos	4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilksanten
γ	površinski napon
Δ	zagrevanje
δ	hemijsko pomeranje
ν	frekvenca

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1 Ramnolipidi i biosurfaktanti .....	1
1.1.1 Prirodne uloge ramnolipida .....	3
1.1.2 Strategije u proizvodnji ramnolipida.....	6
1.1.3 Sinteza ramnolipida.....	7
1.1.4 Sintetski analozi i njihove fizičko-hemijske i biološke osobine .....	18
1.1.4.1 Čisti ramnolipidni kongeneri .....	18
1.1.4.2 Manje zastupljeni ramnolipidni kongeneri .....	21
1.1.4.3 Modifikacije karboksilne kiseline.....	23
1.1.4.4 Modifikacije šećerne komponente i alifatičnog niza.....	26
1.2 Bromopirolski alkaloidi .....	31
1.2.1 Intramolekulska aza-Michael-ova adicija .....	33
1.2.2 Intramolekulska S <sub>N</sub> 2 reakcija na hiralnim sekundarnim alkil-hloridima.....	34
1.2.3 Intramolekulska amidacija .....	35
1.2.4 Dvostruko alilno alkilovanje .....	36
1.2.5 Asimetrično alilno alkilovanje.....	37
1.2.6 S <sub>N</sub> 2 reakcija na 1,2-ciklični sulfamidat.....	38
2. NAŠI RADOVI.....	39
2.1 Sinteza derivata ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija.....	39
2.1.1 Uvod.....	39
2.1.2 Cilj.....	39
2.1.3 Sinteza derivata ramnolipida.....	40
2.1.3.1 Zamena ramnoze drugim šećerima .....	40
2.1.3.2 Varijacija linkera i zamena ramnoze heterociklusima .....	45
2.1.3.3 Zamena ramnoze aminokiselinama i peptidima .....	48
2.1.4 Fizičko-hemijska karakterizacija ramnolipidnih analoga .....	54
2.1.5 Biološka karakterizacija ramnolipidnih analoga .....	58
2.1.5.1 Antimikrobna aktivnost.....	59
2.1.5.2 Inhibicija međubakterijske komunikacije (eng. <i>quorum sensing</i> ) .....	61

2.1.5.3 Rasturanje biofilmova.....	62
2.1.5.4 Inhibicija formiranja biofilma.....	63
2.1.5.5 Citotoksičnost odabranih derivata .....	69
2.1.5.6 Ispitivanje uticaja jedinjenja na adheziju <i>C. albicans</i> i na prelazak <i>C. albicans</i> iz kvasolikog u filamentozni oblik.....	69
2.1.5.7 Potencijalni mehanizam dejstva lipopeptidnih derivata .....	71
2.1.6 Rezime odnosa strukture i dejstva ramnolipidnih analoga .....	73
2.2 Sinteza longamida B, stilizina D i njihovih derivata.....	75
2.2.1 Uvod.....	75
2.2.2 Cilj.....	75
2.2.3 Retrosintetička analiza longamida B i njegovih derivata .....	75
2.2.4 Sinteza ciklizacionog prekursora .....	79
2.2.5 Optimizacija reakcije ciklizacije aminoalena.....	80
2.2.6 Sinteza longamida B i stilizina D.....	82
2.2.7 Sinteza derivata longamida B .....	87
2.2.8 Mehanizam i stereohemija reakcija ciklizacije.....	92
2.2.9 Antimikrobna aktivnost longamida B i njegovih analoga.....	96
3. ZAKLJUČAK.....	98
3.1 Sinteza i karakterizacija ramnolipidnih analoga.....	98
3.2 Sinteza bromopirolskih alkaloida .....	99
4 EKSPERIMENTALNI DEO .....	100
4.1 Sinteza i karakterizacija jedinjenja.....	100
4.2 Određivanje provodljivosti i površinskog napona .....	160
4.3 Određivanje biodegradabilnosti (metoda zatvorene boce).....	160
4.4 Merenje moći penjenja .....	160
4.5 Bakterijski sojevi i njihova kultivacija.....	160
4.6 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) .....	161
4.7 Uticaj jedinjenja na međućelijsku komunikaciju <i>S. marescens</i> i <i>C. violaceum</i> u testu sa diskovima.....	161
4.8 Uticaj jedinjenja na disperziju već formiranog biofilma .....	161
4.9 Uticaj jedinjenja na formiranje biofilmova kod <i>P. aeruginosa</i> PAO1 i <i>C. albicans</i> .....	162
4.10 Uticaj jedinjenja na <i>C. albicans</i> adheziju na ćelije.....	162

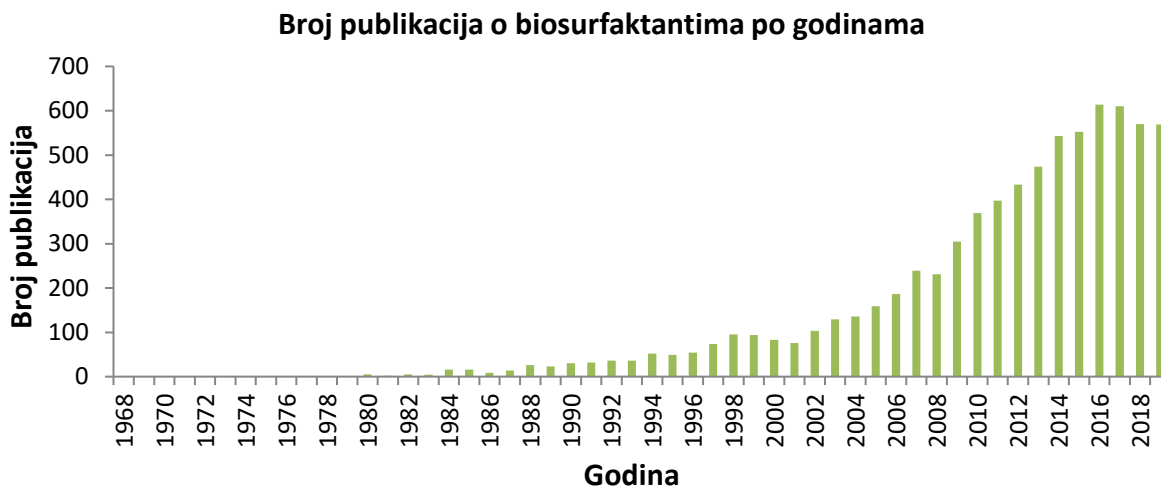
4.11 Uticaj jedinjenja na prelazak <i>C. albicans</i> iz kvasolikog u filamentozni oblik.....	162
4.12 Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja na ćelijama MRC5 ćelijske linije.....	163
5. REFERENCE .....	164
6. BIOGRAFIJA .....	171

# 1. UVOD

## 1.1 Ramnolipidi i biosurfaktanti

Biosurfaktanti su takozvana zelena alternativa konvencionalnim surfaktantima i predstavljaju novi pravac u razvoju industrije surfaktanata. Njihova fizičko-hemijska svojstva su uporediva sa sintetskim surfaktantima, s tim da imaju dodatnu prednost u pogledu biorazgradivosti i opšte bezbednosti po životnu sredinu.<sup>1,2</sup> Poseduju veći kapacitet formiranja pene, aktivni su i pri velikim varijacijama temperature i pH i potpuno netoksični.<sup>3-5</sup> Pored toga biosurfaktanti se proizvode iz bakterijskih izvora korišćenjem ekonomski povoljnih supstrata kao što su biljno ulje, sirovo ulje i šećeri.<sup>6</sup> Strukturna raznolikost, biokompatibilnost i biorazgradivost ovih jedinjenja omogućavaju njihovu širu primenu u poređenju sa klasičnim surfaktantima.<sup>7</sup> Naime, osim uobičajene primene u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, biosurfaktanti su se pokazali korisnim i u procesu bioremedijacije gde imaju prednost u odnosu na sintetske surfaktante zbog bolje sposobnosti solubilizacije hidrofobnih zagađivača.<sup>8</sup> Povrh toga ovi biomolekuli imaju specifične uloge kod mikroorganizama koji ih proizvode i njihove prirodne uloge neretko sugerišu na njihovu potencijalnu primenu u medicini. Brojni biosurfaktanti koji pripadaju podgrupama lipopeptida i glikolipida pokazali su potentna antimikrobna svojstva.<sup>9,10</sup> Međutim i pored svih prednosti koje imaju u odnosu na sintetske surfaktante i moguće primene u medicini i bioremedijaciji, ova jedinjenja još uvek nisu u dovoljnoj meri dostupna i zastupljena na tržištu. Danas postoji nekoliko kompanija koje su razvile komercijalnu proizvodnju ovih molekula, proizvodnja na industrijskoj skali je, međutim, još uvek otežana zbog niza problema koji se javljaju u procesu proizvodnje, počevši od niskih prinosa i preteranog penjenja do skupog procesa prečišćavanja.<sup>11</sup> Drugi nedostaci uključuju patogenost bakterijskih proizvođača kao i činjenicu da bakterije uvek proizvode smesu kongenera od kojih svaki ima različita svojstva.<sup>12,13</sup> Mada je izvodljivo izolovati pojedinačne kongenere u praksi je to neekonomično, naročito na industrijskoj skali.<sup>14</sup> Svi navedeni problemi otežavaju istraživanje hemijskog prostora oko ovih jedinjenja i povezivanje pojedinačnih strukturnih elemenata sa svojstvima molekula.

Prve biosurfaktante, ramnolipide, otkrili su Bergstrom i saradnici 1947. godine, potom su 1961. otkriveni soforolipidi i 1968. surfaktin.<sup>15-17</sup> U nadolazećim decenijama istraživanja na bakterijskim surfaktantima su značajno intenzivirana, što se oslikava i u značajnom porastu broja publikacija u ovoj oblasti (**slika 1**).

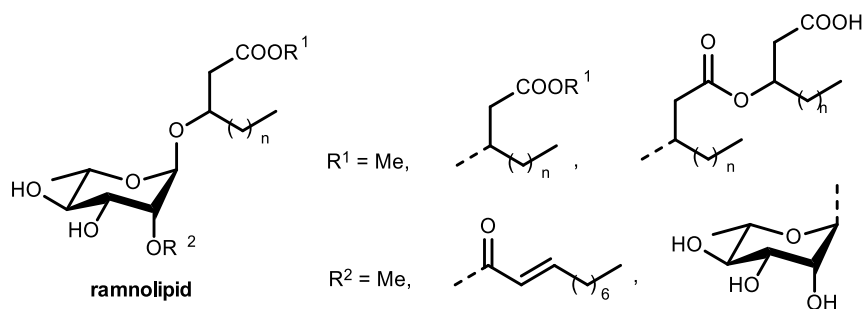


**Slika 1.** Broj publikacija o biosurfaktantima po godinama (rezultati dobijeni na osnovu SciFinder pretrage, ključna reč – “biosurfactant”)

Ova jedinjenja se generalno mogu podeliti na jedinjenja velike molekulske mase, poznatija kao bioemulgatori (lipopolisaharidi i lipoproteini) i na jedinjenja male molekulske mase – biosurfaktanti, koji se potom mogu na osnovu strukturnih karakteristika grupisati u: <sup>1</sup>

1. glikolipide
2. lipopeptide ili lipoproteine
3. masne kiseline, neutralne lipide i fosfolipide
4. polimerne biosurfaktante
5. čestične biosurfaktante

Među ovim jedinjenjima najviše su proučavani ramnolipidi koji strukturno pripadaju klasi glikolipida. Ramnolipidi su prvi put otkriveni 1946. kada je Bergstrom izolovao uljastu supstancu iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (koja je u to vreme imala naziv *Pseudomonas pyocyanea*) i dao joj naziv piolipinska kiselina. Kasnije, Jarvis i Johnson istražuju strukturu jedinjenja i pokazuju da je jedinjenje sastavljeno od L-ramnoze i  $\beta$ -hidroksidekanske kiseline da bi potom Edvards i Hayashi pokazali da su dva molekula ramnoze međusobno povezana 1,2-glikozidnom vezom. <sup>18,19</sup> *P. aeruginosa* je do danas ostala glavni proizvođač ramnolipida i pored svoje patogenosti.<sup>20</sup> Druge vrste koje proizvode ramnolipide uključuju vrste rodova *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* i *Enterobacter*, među njima, značajne su i nepatogene vrste *P. chlororaphis* and *B. thailandensis*.<sup>21-24</sup>



**Slika 2.** Strukturne varijacije ramnolipida.



Tačan sastav proizvedene smese ramnolipida zavisi od bakterijske vrste i soja i od uslova rasta.<sup>25</sup> Iako se određeni stepen kontrole može postići, ramnolipidi uvek bivaju proizvedeni u vidu smese kongenera.<sup>26</sup> Ramnolipidi se mogu proizvesti gajenjem mikroorganizama na različitim izvorima ugljenika uključujući glicerol, glukozu, biljno ulje i otpadna ulja, u prinosima do 40 g/L.<sup>27-29</sup> Do danas je poznato više od 60 kongenera.<sup>30</sup> Generalno, sastavljeni su od jednog ili dva molekula ramnoze, povezanih  $\alpha$ -1,2-glikozidnom vezom i od jednog, dva ili tri fragmenta  $\beta$ -hidroksi karboksilnih kiselina, različitih dužina (C<sub>8</sub> - C<sub>16</sub>) povezanih međusobno estarskom vezom. Konfiguracija na hiralnim C<sub>3</sub> ugljeniku masne kiseline je isključivo R. Karboksilni kraj molekula je samo kod nekoliko kongenera esterifikovan. Pored toga hidroksilna grupa u položaju C<sub>2</sub> ramnoze može biti acilovana dugolančanom alkenom kiselinom (**slika 2**).<sup>30</sup>

Amfifilna priroda molekula uslovljava odličnu površinsku aktivnost, koja je uporediva sa sintetskim surfaktantima. Ramnolipidi smanjuju površinski napon vode ( $\gamma$ ) sa 72 mN/m na 24 mN/m, imaju relativno nisku kritičnu micelarnu koncentraciju (CMC), između 8 i 234 mg/L (**tabela 1**).<sup>13,31</sup> Pored toga, ova svojstva ramnolipida ostaju očuvana i na velikom opsegu temperatura i pH vrednosti.<sup>32</sup> Ova svojstva zajedno sa biodegradabilnošću i biokompatibilnošću čine ramnolipide pogodnim za primenu u brojnim industrijskim sektorima, ali i omogućavaju nešto specifičniju primenu kao što je primena u bioremedijaciji i medicini.<sup>33,34</sup>

**Tabela 1.** Rezime fizičko-hemijskih osobina ramnolipida

Fizičko-hemijske osobine		Referenca
CMC	8-234 mg/L	13,31
$\gamma$	24.0-32.8 mN/m	13
HLB	4-6	14

### 1.1.1 Prirodne uloge ramnolipida

Prirodne uloge ramnolipida su direktna posledica njihove površinske aktivnosti. Kao surfaktanti ramnolipidi omogućavaju domaćinima rast na hidrofobnim supstratima tako što solubilizuju hidrofobne molekule unutar micela i olakšavaju njihovo unošenje u bakterijsku ćeliju.<sup>35</sup> Ova uloga ramnolipida našla je primenu i u bioremedijaciji zagađenih zemljišta i voda, gde je bioraspoloživost kontaminanata glavni ograničavajući faktor.<sup>36</sup> U odnosu na sintetske surfaktante ovde još jednom dolazi do izražaja njihova biodegradabilnost i biokompatibilnost pa su stoga u oblasti bioremedijacije biosurfaktanti korak ispred sintetskih.

Druga potencijalna primena ramnolipida krije se u njihovoj ključnoj ulozi koju imaju u životnom ciklusu bakterije domaćina to jest proizvođača. Naime danas je poznato da ogromna većina mikroorganizama ne obitava u slobodnoj planktonskoj formi, već se udružuje u agregate obložene polimernim matriksom poznatijim kao biofilm.<sup>37</sup> Ovaj oblik rasta bakterije preferiraju u odnosu na planktonski, jer pruža veći nivo zaštite od ostalih mikroorganizama, fagocita i od antimikrobnih lekova. Infekcije koje potiču od biofilmova predstavljaju ogroman izazov za modernu antimikrobnu terapiju jer su mikroorganizmi koji žive u biofilmu i do 1000 puta otporniji na antimikrobne lekove u odnosu na planktonske bakterije.<sup>38,39</sup> Osim toga, biofilmovi se često formiraju na medicinskoj opremi kao što su kateteri ili implantati i tako predstavljaju ogromnu opasnost po imunokompromitovane pacijente.<sup>40</sup>

Kod *P. aeruginosa* ramnolipidi su uključeni u različite stadijume razvoja biofilma, od najranije interakcije između ćelije i površine, preko održavanja biofilma pa sve do finalne disperzije mikroorganizma sa biofilma omogućavajući kolonizaciju novih površina.<sup>41</sup> U fazi inicijalne kolonizacije, u zavisnosti od prirode površine, različite interakcije mogu biti od značaja. Za biotične površine specifične interakcije između proteina ćelijskog zida mogu biti od značaja za adheziju, a za abiotične površine najverovatnije su u pitanju nespecifične hidrofobne interakcije.<sup>42-44</sup> Na startu kolonizacije abioloških površina ramnolipidi menjaju površinu ćelije mikroorganizma indukujući otpuštanje lipopolisaharida što povećava hidrofobnost ćelija i olakšava njenu adheziju na površinu.<sup>45</sup> Hidrofobnost bakterijske ćelije može biti promenjena i adsorpcijom surfaktanata na njenu površinu. Zhong i saradnici su predložili da kada se ramnolipidi izlučuju u niskim koncentracijama, hidrofilni deo molekula stupa u interakciju sa površinom *P. aeruginosa* a hidrofobni deo biva orijentisan ka okolini što dovodi do brzog porasta hidrofobnosti ćelije. U ovom procesu dužina alkil niza ramnolipida nije od velikog značaja.<sup>46</sup> Koji god mehanizam da je u pitanju, povećana hidrofobnost ćelija *P. aeruginosa* olakšava njihovu međusobnu agregaciju i adheziju na različite površine. Ovo je proces nastanka prvih mikrokolonija. Tokom rasta biofilma ramnolipidi su neophodni za formiranje i održavanje vodenih kanala kroz strukturu biofilma, a u kasnijim fazama pomažu odvajanje i disperziju pojedinačnih bakterijskih ćelija.<sup>41,47</sup> Još jedna od funkcija *P. aeruginosa* koja umnogome zavisi od proizvodnje ramnolipida je pokretljivost bakterijske populacije.<sup>48</sup>

Proizvodnja ramnolipida kod *P. aeruginosa* je strogo regulisan proces. Na proizvodnju ramnolipida prevashodno utiču eksterni faktori poput nedostatka nutrijenata i azota.<sup>49</sup> Drugo, proizvodnja ramnolipida regulisana je *quorum sensing*-om, regulatornim mehanizmom koji je uslovljen gustinom ćelijske populacije.<sup>50</sup> I *quorum sensing* i nedostatak nutrijenata regulišu ekspresiju *rhlAB* gena, koji kodiraju enzime ključne za biosintezu ramnolipida.<sup>51</sup> Pravovremena ekspresija *rhlAB* gena je ključan faktor od kojeg zavisi pravilno formiranje biofilma i njegova struktura.<sup>26</sup> Ova stroga regulacija se, međutim, može iskoristiti protiv svog domaćina. Naime, kada se *P. aeruginosa*-i egzogeno dodaju ramnolipidi, dolazi do inhibicije formiranja biofilma.<sup>41</sup> Ovakvo dejstvo ramnolipida primećeno je i kod drugih vrsta koje proizvode biofilmove kao što su na primer neke Gram-pozitivne bakterije, (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*), Gram-negativne bakterije (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) ali i neke fungalne vrste (*Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica*).<sup>52-57</sup> Noviji podaci o anti-biofilm svojstvima ramnolipida predstavljeni su u **tabeli 2.**

**Tabela 2.** Anti-biofilm svojstva ramnolipida

Vrsta ramnolipida	Mikroorganizam	Formiranje biofilma (%)*	Referenca
R90 AGAE Technologies	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	50	58
R90 AGAE Technologies	<i>P. aeruginosa</i> DM50	45	58
R90 AGAE Technologies	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	78	58
R90 AGAE Technologies	<i>S. aureus</i> MRSA	80	58
R90 AGAE Technologies	<i>S. marcescens</i> ATCC 27117	38	58
Di rhamnolipids	<i>C. albicans</i> SC5314	50	59
Mono rhamnolipids	<i>C. albicans</i> SC5314	39	59

\*Izraženo kao procenat formiranog biofilma u prisustvu ramnolipida (50 µg/mL) nakon 24 h, u poređenju sa netretiranim standardom.

Ramnolipidi su veoma važan faktor u životnom ciklusu *P. aeruginosa*, no i pored toga, tačan mehanizam njihovog dejstva još uvek je nerazjašnjen. Još uvek se sa sigurnošću ne može reći da li je njihova fiziološka uloga posledica njihovih fizičko-hemijskih osobina ili postoji specifičan receptor za koji se vezuju. Istraživanjem procesa bakterijske adhezije došlo se međutim, do naznaka potencijalnog vezivnog mesta ovih molekula.

U adheziji, kao inicijalnom koraku u bakterijskoj infekciji, važnu ulogu imaju interakcije između bakterijskih adhezina i ugljenih hidrata biotskih površina.<sup>44,60</sup> Adhezini su uglavnom locirani na bakterijskim izraslinama kao što su pili ili fimbrije i odgovorni su za prepoznavanje specifičnih molekulskih fragmenata na površini ćelija domaćina. Kod *P. aeruginosa* u procesu adhezije glavnu ulogu imaju pili, tanke proteinske tube na čijim krajevima se nalazi receptor koji prepoznaje specifični disaharidni fragment  $\beta$ -D-GalNAc(1-4) $\beta$ -D-Gal.<sup>60</sup> Nakon vezivanja pili vuku bakteriju napred u procesu poznatom kao "grčenje" (eng. *twitching motility*). Još jedan karakterističan vid pokretljivosti *P. aeruginosa* u kojem učestvuju pili je "rojenje" (*swarming motility*). Rojenje predstavlja translokaciju bakterijske populacije i ima značajnu ulogu u ranoj fazi razvoja biofilma. Konkretno kod, *P. aeruginosa* pili tip IV igraju važnu ulogu u ovim procesima.<sup>48</sup> Ramnolipidi i njihovi sintetski analozi pokazali su sposobnost modulacije rojenja *P. aeruginosa*.<sup>61</sup> Shetye i saradnici su pokazali da dodatak male količine ramnolipida ili njihovih analoga reaktivira rojenje kod *rhlA* mutanta (mutant *P. aeruginosa* koji nema sposobnost biosinteze ramnolipida a posledično ni sposobnost rojenja), dok veće količine inhibiraju rojenje, bakterijsku adheziju i formiranje biofilma.<sup>61</sup> Druga potencijalna mesta vezivanja na površini *P. aeruginosa* uključuju lektine, *lecA* i *lecB* koji se vezuju za galaktozu odnosno fukozu i flagela proteini koji se vezuju za mucin i glikolipide i igraju važnu ulogu u rojenju *P. aeruginosa*.<sup>60,62-64</sup>

Proširivanje znanja o interakcijama u procesu adhezije je esencijalno za razvoj novih anti-adhezivnih molekula. Nekoliko istraživačkih grupa je već ispitivalo ramnolipidne analoge u ovom kontekstu i produkovalo nove molekule sa anti-adhezivnim svojstvima protiv bakterijskih ali i fungalnih vrsta.<sup>58,59,61</sup>

S obzirom na sve veći porast bakterijske rezistencije molekuli koji specifično ciljaju bakterijsku adheziju i formiranje biofilma mogu omogućiti pristup ovom problemu iz drugog ugla. Ovo je potkrepljeno činjenicom da molekuli koji ne interferiraju direktno sa bakterijskim rastom u mnogo manjoj meri stimulišu razvoj rezistencije na lekove.<sup>65</sup>

Ramnolipidi ispoljavaju i antimikrobnu aktivnost protiv velikog broja bakterija i fungalnih vrsta (**tabela 3**). Ovo svojstvo ramnolipida, daje *P. aeruginosa* prednost u borbi protiv konkurentnih mikroorganizama. De Freitas Ferreira i saradnici su uočili lizu ćelija *L. monocytogenes* i *B. cereus* na minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIC) ramnolipida (primeri **5** i **14**, **tabela 3**), tako da se pretpostavlja da je mehanizam antimikrobnog dejstva posledica promena strukture citoplazmatske membrane. Ovo dejstvo ramnolipida zavisi od pH sredine pa je npr. u kiseloj sredini efekat ramnolipida na bakterijsku membranu pojačan protiv Gram-pozitivnih vrsta (*L. monocytogenes*, *B. cereus* i *S. aureus*), dok su Gram-negativne vrste (*Salmonella enterica* i *E. coli*) pokazale rezistenciju na svim ispitivanim pH vrednostima sredine. Ovo se objašnjava činjenicom da su ramnolipidi karboksilne kiseline, pa su na  $\text{pH} > \text{pKa}$  većinski u anjonskom obliku. Anjonske vrste otežano stupaju u interakciju sa uglavnom anjonskom površinom bakterijske ćelije. Na nižim vrednostima pH nestaje elektrostatičko odbijanje i ramnolipidi neometano interaguju sa membranom.<sup>66</sup>

**Tabela 3.** Antimikrobna svojstva ramnolipida

Primer	Vrsta	MIC* µg/mL	ref
1	<i>Aerobasidium pullulans</i> ATCC 9348	32	67**
2	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	64	68***
3	<i>Alternaria alternata</i>	4	67
4	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 14604	64	67
5	<i>Bacillus cereus</i>	19,5	66
6	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8	67
7	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	32	67
8	<i>Chaetonium globusum</i> ATCC 6205	32	67
9	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 22636	64	68
10	<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 689	4	68
11	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	64	68
12	<i>Gliocadium virens</i> ATCC 4645	32	68
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CECT 17832	0.5	68
14	<i>Listeria Monocytogenes</i>	156,2	66
15	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9631	64	68
16	<i>Penicilium funiculosum</i> CECT 2914	64	67
17	<i>Penicillium crysogenum</i> CECT 2802	32	67
18	<i>Penicillium funiculosum</i> CECE 2914	16	68
19	<i>Proteus mirabilis</i> CECT 170	8	67
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9721	32	67
21	<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 16028	16	67
22	<i>Serratia marcescens</i> CECT 274	8	68
23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	68
24	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8	67
25	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	4	67

\*Najniža koncentracija jedinjenja koja sprečava rast mikroorganizma

\*\*Smesa ramnolipida izolovana iz *P. aeruginosa* LBI

\*\*\* Smesa ramnolipida izolovana iz *P. aeruginosa* 47T2

### 1.1.2 Strategije u proizvodnji ramnolipida

Uprkos izuzetnim fizičko-hemijskim svojstvima i biološkom profilu, ramnolipidi još uvek nisu konkurentni na tržištu surfaktanata. Mada su biosintetski put i regulatorni mehanizmi biosinteze relativno dobro poznati, optimizacija proizvodnje ramnolipida mikrobiološkim putem još uvek nije postignuta.<sup>69-72</sup> Troškovi proizvodnje ramnolipida iznose \$20-25/kg, a sintetskih surfaktanata \$1-3/kg.<sup>73,74</sup> Još jedan važan problem koji sprečava proizvodnju na većoj skali je patogenost *P. aeruginosa*. Godinama unazad testirane su različite strategije optimizacije proizvodnje, uključujući, genetske modifikacije bakterija proizvođača, optimizacija proizvodnih uslova i primena ekonomski prihvatljivih supstrata. Detaljan pregled genetski modifikovanih vrsta korišćenih u proizvodnji ramnolipida uradili su Dobler i saradnici.<sup>75</sup> Glavni cilj optimizacije proizvodnje ramnolipida je razvoj nepatogene vrste koja će davati visok prinos ramnolipida. Jedan od ispitivanih pristupa je povećanje ekspresije ključnih enzima za biosintezu ramnolipida (RhIA, RhIB i RhIC) kod *P. aeruginosa*.<sup>75</sup> Ekspresija ovih enzima kod nepatogenih bakterija poput

*E. coli* i *P. putida* omogućava prevazilaženje problema patogenosti. Prinos ramnolipida kod ovakvih sojeva je međutim, nezadovoljavajući (7.3 g/L kod *P. putida* i 0.121 g/L kod *E. coli*) u poređenju sa prinosom kod *P. aeruginosa* (112 g/L).<sup>75,76</sup> Još jedan potencijalni pristup je atenuacija patogenosti *P. aeruginosa* enzimatskom razgradnjom njenog toksičnog metabolita, piocijanina.<sup>77</sup> Sastav smese ramnolipida (odnos mono- i di-ramnolipida) se takođe može optimizovati kontrolom ekspresije RhlB i RhlC enzima.<sup>78</sup>

Već pomenuti nedostaci u proizvodnji (teškoće u prečišćavanju, niski prinosi i patogenost bakterijskog proizvođača) naterali su istraživače da traže rešenja specifično za te probleme, pa stoga literatura o ramnolipidima danas uglavnom tematski pokriva proizvodnju, optimizaciju izolovanja ramnolipida i skrining bakterijskih sojeva u potrazi za nepatogenom i hiperproduktivnom vrstom. Sa druge strane jako malo istraživačkih grupa je razmatralo hemijski pristup rešavanju problema proizvodnje ramnolipida.

Uopšteno, problemu proizvodnje ramnolipida može se pristupiti na nekoliko načina:

- 1) **Pronalaženje novih bakterijskih proizvođača i genetske modifikacije** – pronalaženje nepatogenih vrsta ili atenuacija patogenosti *P. aeruginosa*, povećavanje prinosa ramnolipida iz bakterijskih vrsta.
- 2) **Hemijska sinteza** – proizvodnja čistih kongenera i definitivna biološka i fizičko-hemijska karakterizacija.
- 3) **Strukturne modifikacije** – istraživanje hemijskog prostora oko ramnolipida i poboljšanje njihovih svojsta.

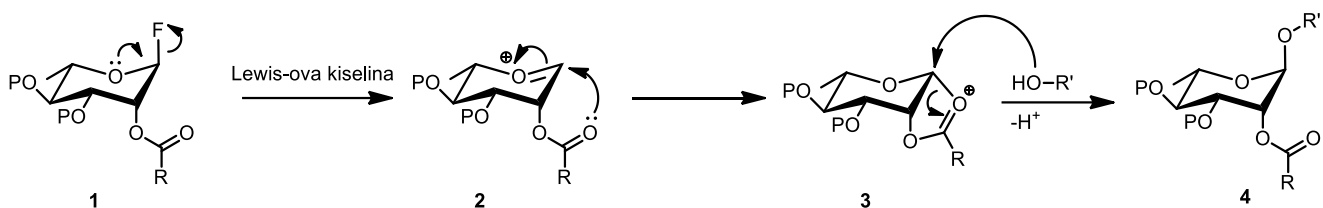
U nastavku biće predstavljen pregled poslednjih dveju strategija. Pored toga biće predstavljen i pregled biološkog profila analoga ramnolipida i sličnih molekula.

### 1.1.3 Sinteza ramnolipida

Zbog odlične površinske aktivnosti, interesantnog biološkog profila ali i još uvek nerešenog problema proizvodnje, ramnolipidi predstavljaju atraktivne molekule za hemijsku sintezu. Sintezom čistih ramnolipidnih kongenera može se iskristalisati definitivni biološki profil ovih jedinjenja, s obzirom da je velika većina podataka o ramnolipidima bazirana na biološkim evaluacijama smesa bakterijski proizvedenih ramnolipida.

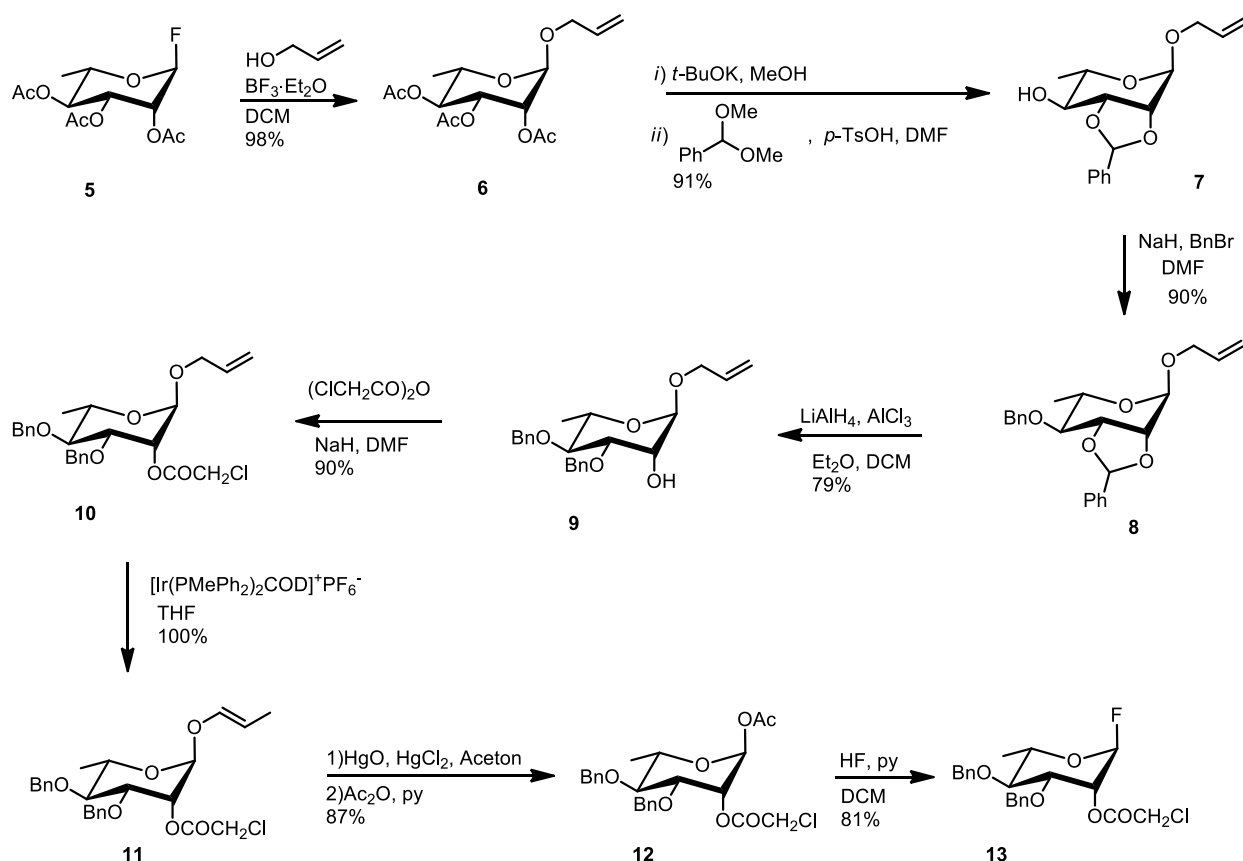
Tri ključna koraka u sintezi ramnolipida su: formiranje kiselinskog fragmenta, formiranje  $\alpha$  – glikozidne veze između masne kiseline i alkohola, i ukoliko se radi o sintezi di-ramnolipida, formiranje  $\alpha$ -1,2 glikozidne veze između dva molekula ramnoze. Ovi izazovi, kao i brojni koraci uvođenja i uklanjanja zaštitnih grupa, karakteristični za hemiju ugljenih hidrata, glavni su razlog zašto još uvek nije razvijena ekonomski prihvatljiva sinteza ramnolipida.

Prvu sintezu ramnolipida objavili su 1988-e Westarudin i saradnici.<sup>79</sup> Autori su iskoristili poznati koncept koji su razvili Lemieux i Fletcher, a koji ističe značaj zaštitnih grupa, naročito u položaju C<sub>2</sub>, u stereoselektivnosti reakcije glikozidacije.<sup>80,81</sup> Konkretno, korišćenjem acil zaštitne grupe na C(2)OH grupi, moguće je stereoselektivno formiranje 1,2-*trans* glikozidne veze usled formiranja intermedijernog aciloksonijum jona **3 (shema 2)**. U slučaju zaštićene L-ramnoze, **shema 2**, anomerni ugljenik može biti napadnut isključivo sa gornje strane što rezultuje nastankom  $\alpha$ -glikozidne veze **4**.



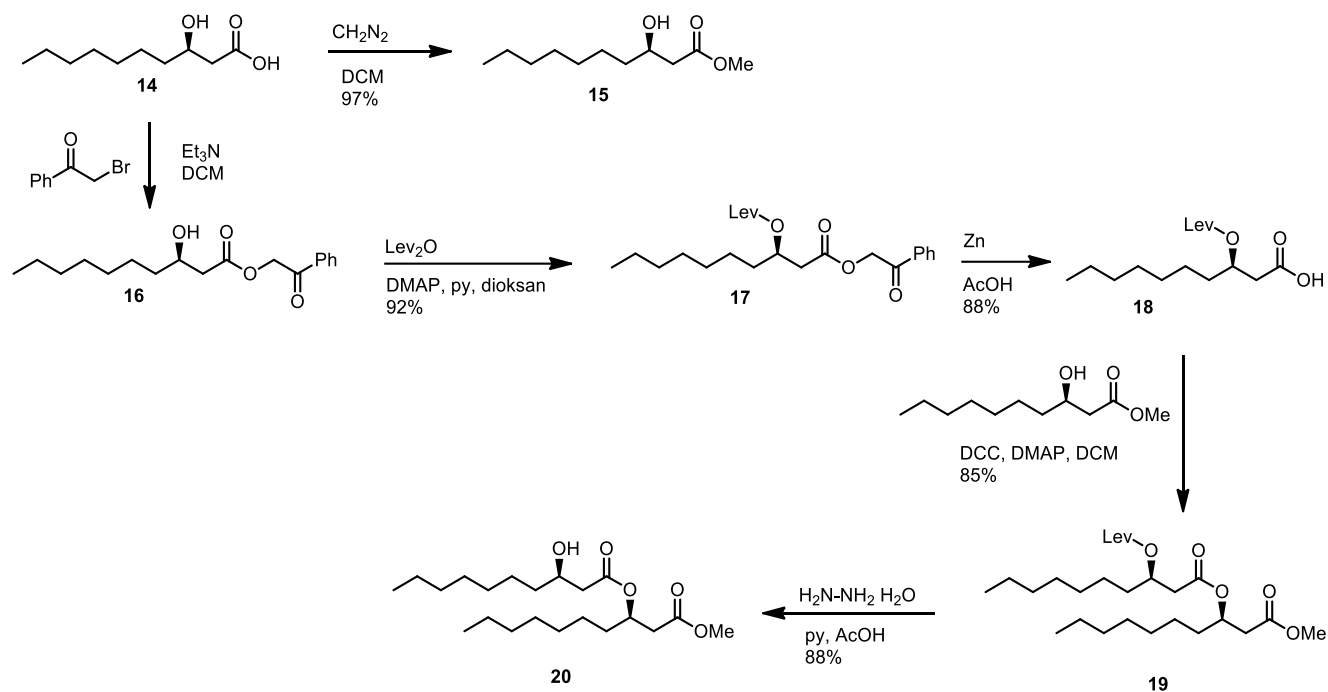
**Shema 2.** Uticaj acil zaštitne grupe na stereohemijski ishod reakcije glikozidacije.

U prvoj sintezi ramnolipida Westerduin-a i saradnika uspešnom formiranju  $\alpha$ -1,2 glikozidne veze između dva šećera prethodio je niz koraka uvođenja i uklanjanja zaštitnih grupa kao i njihov pažljiv odabir (**shema 3**). Umesto uobičajene acetil-zaštite C(2)OH autori su upotrebili hloroacetil grupu kako bi izbegli istovremenu deprotekciju estera na lipidnom delu molekula i acetatne zaštite na šećeru. Hloroacetil grupa se može ukloniti u neutralnim uslovima i u prisustvu drugih estarskih grupa (videti sintezu **21** (**shema 5**)). Selektivno acetilovanje C(2)OH izvedeno je u nekoliko koraka. Iz per O-acetil- $\alpha$ -L-rhamnozil fluorida **5** dobijen je benzilidenski acetal **7** nizom reakcija. Regioselektivno reduktivno raskidanje benzilidenskog acetala **8** LiAlH<sub>4</sub>-AlCl<sub>3</sub>-om dalo je ramnozil derivat **9** sa slobodnom C<sub>2</sub>-OH grupom, što je omogućilo potom i selektivnu zaštitu upotrebom hloroacetil derivata. Izomerizacija dvostruke veze katalizovana iridijumom (I), praćena fluorovanjem HF-om u piridinu dala je isključivo  $\alpha$ -L-rhamnozil fluorid **13** (**shema 3**).



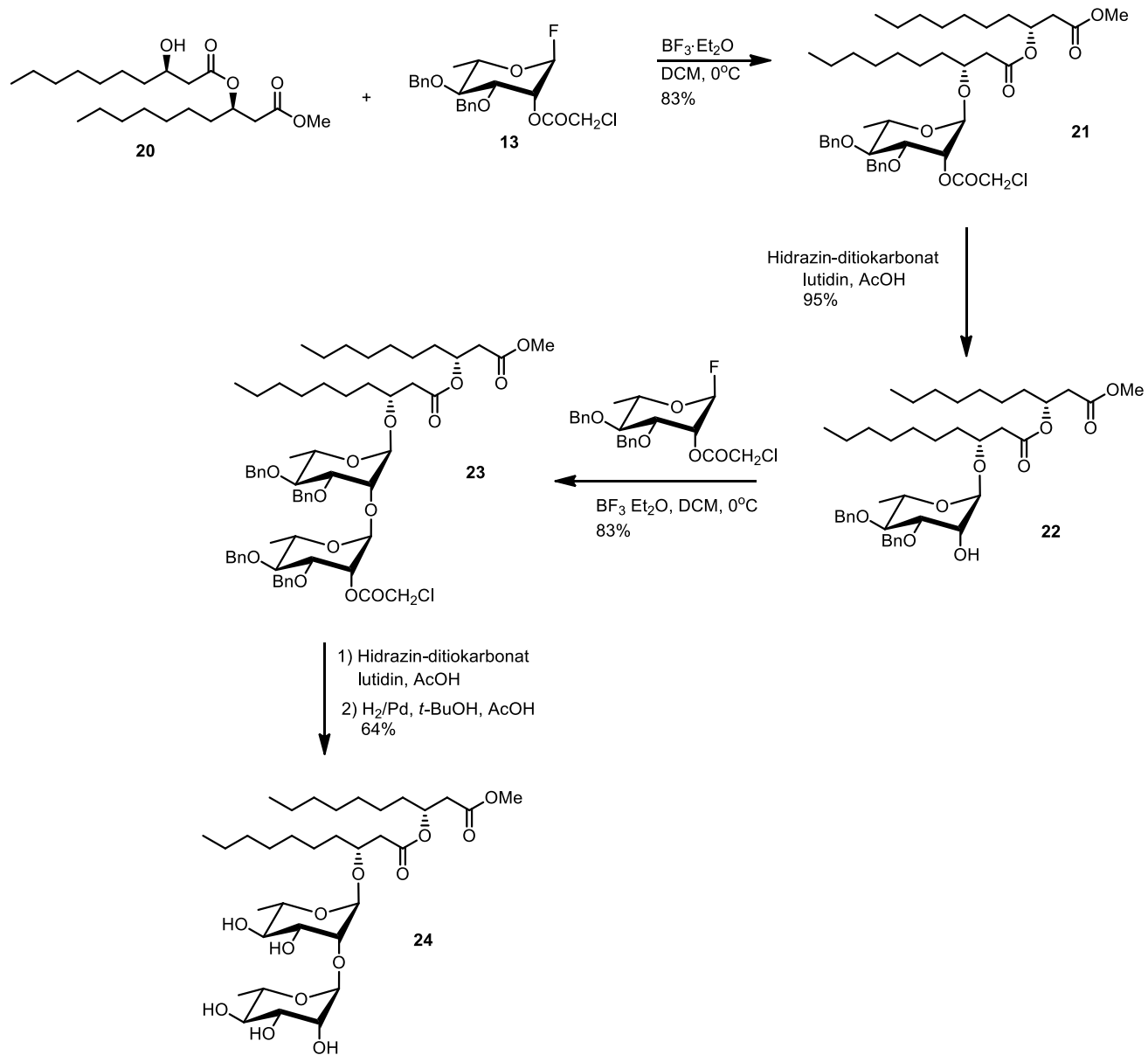
**Shema 3.** Sintaza ramnozil donora Westarduin-a i saradnika.

Lipofilni deo molekula sintetisan je iz (*R*)-3-hidroksidekanske kiseline **14**. Zaštita karboksilne kiseline u obliku metil estera i selektivna zaštita OH grupe drugog molekula hidroksikiseline praćena njihovim međusobnim kuplovanjem dala je di-lipidni fragment **20** (**shema 4**).



**Shema 4.** Sinteza lipidnog dela ramnolipida Westerduin-a i saradnika.

Dva dela, šećerni i estarski su konačno spojeni 1,2-*trans* glikozidnom vezom u reakciji glikozidacije promovisane Lewis-ovom kiselinom, bor-trifluorid eteratom, dajući jedinjenje **21** (**shema 5**). Selektivno uklanjanje hloroacetil zaštitne grupe hidrazin ditiokarbonatom dalo je jedinjenje **22** koje je potom u reakciji sa drugim molekulom ramnozila donora **13** dalo potpuno zaštićen molekul di-ramnolipida **23**. Finalna deprotekcija hloroacetil zaštite i benzil etara dala je metil ester di-ramnolipida **24**.

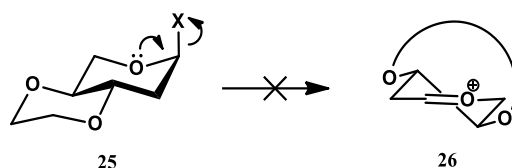


**Shema 5.** Finalno spajanje lipidnog i šećernog fragmenta ramnolipida Westarduin-a i saradnika.



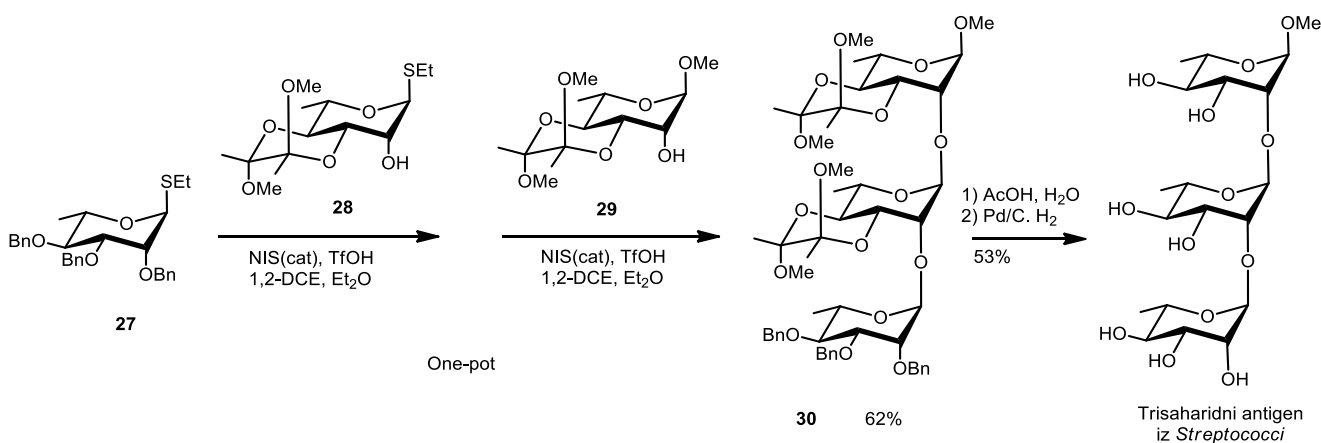
Osim na stereoselektivnost u reakciji glikozidacije, zaštitne grupe takođe mogu da utiču i na reaktivnost glikozil donora. Dobro poznati *armed/disarmed* koncept Fraser-Reid-a pružio je teorijsku osnovu hemoselektivnoj sintezi kompleksnih oligosaharida.<sup>82,83</sup> Osim etarskih i estarskih grupa, tokom godina ispitivana je široka lepeza drugih zaštitnih grupa i ustanovljen njihov uticaj na reaktivnost glikozida. Na taj način napravljena je osnova za fino podešavanje reaktivnosti glikozida, što je otvorilo vrata još efikasnijim sintezama oligosaharida.<sup>84</sup>

Pored stereoelektronskih efekata koje ispoljavaju zaštitne grupe u položaju C<sub>2</sub>, i drugi faktori mogu imati značajan efekat na reaktivnost glikozida, među njima je i torzioni napon koji nastaje ukoliko se koriste ciklične zaštitne grupe.<sup>82,83</sup> Rigidnost cikličnog acetala otežava konformacione promene neophodne za formiranje oksokarbenijum jona (**shema 6**). Ovo usporava reakciju na anomernom ugljeniku glikozida i može biti iskorišćeno kako bi se sprečila samokondenzacija.



**Shema 6.** Otežano nastajanje oksokarbenijum jona kod glikozida sa cikličnim acetalnim grupama.

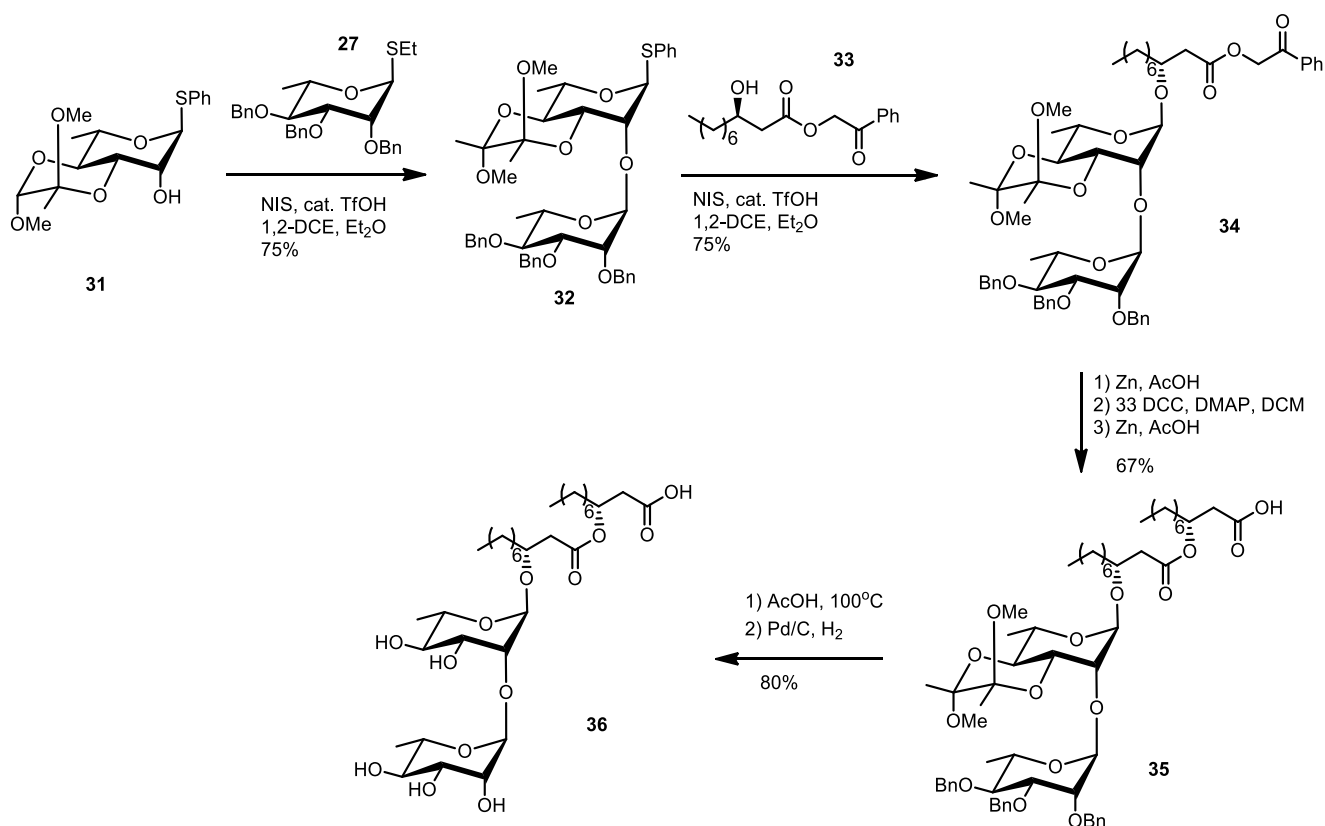
Praktično govoreći, ovo omogućava podešavanje reaktivnosti glikozil donora odnosno njihovo postupno uvođenje u ciljani molekul kao što je demonstrirano elegantnom sintezom trisaharidnog antigena *Streptococcus*-a Ley-a i Priepke-a (**shema 7**).<sup>85</sup> Autori su iskoristili cikloheksan-1,2-diacetalnu zaštitnu grupu (CDA) kako bi kontrolisali reaktivnost ramnozida. Ovo je omogućilo da selektivno aktiviraju S-etil grupu jedinjenja **27** u prisustvu *disarm*-ovanog ramnozida **28**, a potom i selektivno aktiviraju anomernu grupu novonastalog disaharida u reakciji sa terminalnim metil ramnozidom **29** (**shema 7**). Čitav proces izveden je kao *one-pot* reakcija.



**Shema 7.** Sinteza trisaharidnog antigena iz *Streptococcus*-a.

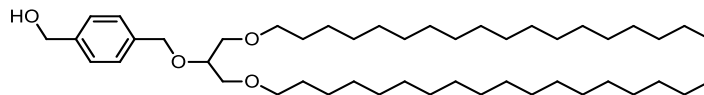
Pomenuta sinteza predstavljala je osnov za novu sintezu ramnolipida Duynstee-a i saradnika.<sup>86</sup> Za razliku od sinteze ramnolipida iz 1988-e gde je čitav niz reakcija bio neophodan za pripremu ramnozila donora, u ovoj sintezi iskorišćena je ciklična acetalna zaštita što je omogućilo ne samo podešavanje reaktivnosti glikozida, već i selektivnu zaštitu C(3)-OH i C(4)-OH. Butan-2,3-diacetalna zaštitna grupa (BDA) iskorišćena je kao jeftinija alternativa CDA zaštitnoj grupi.

Smanjenje reaktivnosti glikozida **31** omogućilo je hemospecifično kuplovanje sa **27** bez sporedne reakcije samokondenzacije. Potpuno zaštićen ramnolipid **34** dobijen je u *one-pot* reakciji kondenzacije jedinjenja **31**, **27** i **33** promovisanu N-jodsukcinimidom i trifluorometan-sulfonskom kiselinom u ukupnom prinosu od 75 %. Uklanjanjem fenacil zaštitne grupe a potom i kuplovanjem sa drugim lipidnim fragmentom dobijeno je jedinjenje **35**. Finalno uklanjanje zaštitnih grupa dalo je di-ramnolipid **36** (**shema 8**).



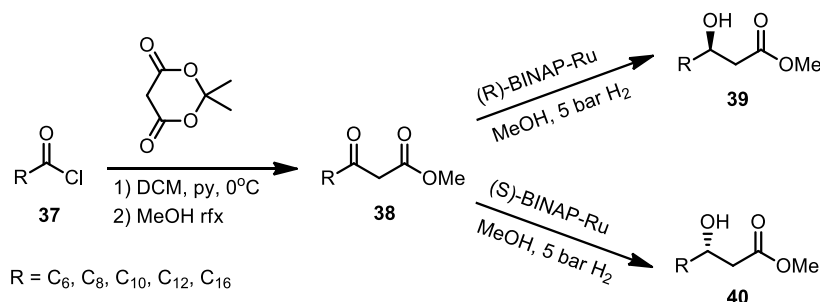
**Shema 8.** Sinteza ramnolipida Duynstee-ja i saradnika.

U narednim godinama ubrzani razvoj reaktivnih glikozil donora i zaštitnih grupa omogućio je nove pristupe u sintezi oligosaharida. Iz rada Frechet-a i Schuerch-a proistekle su brojne sinteze oligosaharida na čvrstoj fazi, među kojima i rad, Bauer-a i Rademann-a koji su 2005-e dizajnirali hidrofobni tag (**slika 3**) koji je omogućio kombinovanje reakcija na čvrstoj fazi sa reakcijama u rastvoru u sintezi oligosaharida.<sup>87,88</sup>



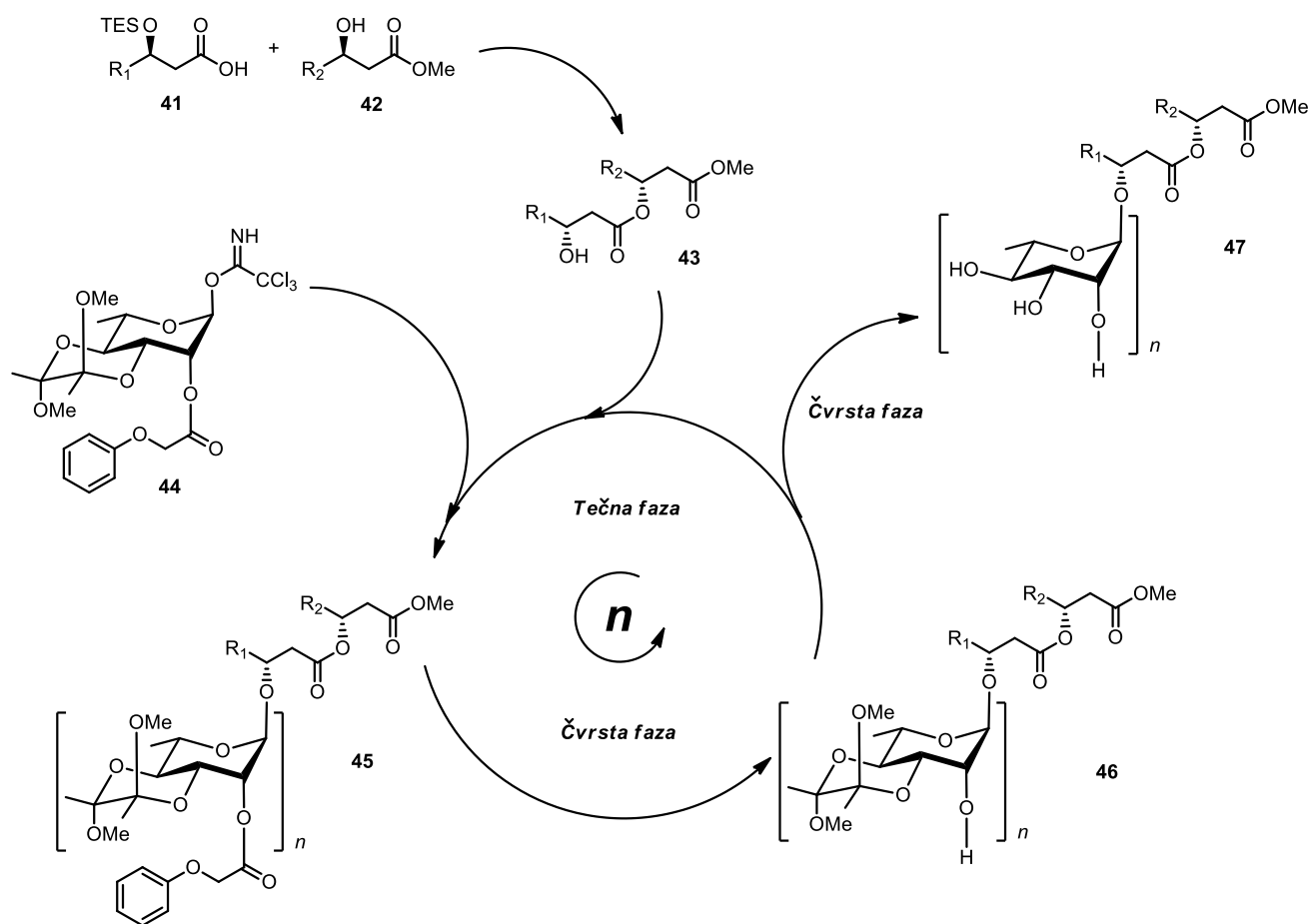
**Slika 3.** Hidrofobni tag Bauer-a i Rademann-a.

Ubrzo potom autori su iskoristili razvijenu metodologiju za sistematsku sintezu biblioteke ramnolipida sa varijacijom u broju ramnoza, alkil nizova, varijacijama u dužini alkil niza i varijacijama u stereohemiji.<sup>89</sup> Ovoga puta kao hidrofobni tag iskorišćen je hidrofobni fragment samog molekula koji se sintetiše. Kod ramnolipida je to dilipidni fragment sastavljen iz dve 3-hidroksikiseline. Sintezu biblioteke ramnolipida Bauer i Rademan su započeli upravo sintezom lipidnog dela molekula (**43**) (**shema 9** i **10**). Iz odgovarajućih estara keto kiselina **38** asimetričnom redukcijom u prisustvu hiralnog katalizatora dobijene su 3-hidroksikiseline derivati **39** i **40** različitih dužina. Izbor katalizatora omogućio je sintezu oba enantiomera 3-hidroksikiselina, a izbor acil hlorida u prethodnoj reakciji C-acilovanja Meldrum-ove kiseline diktirao je dužinu ugljovodoničnog niza (**shema 9**).



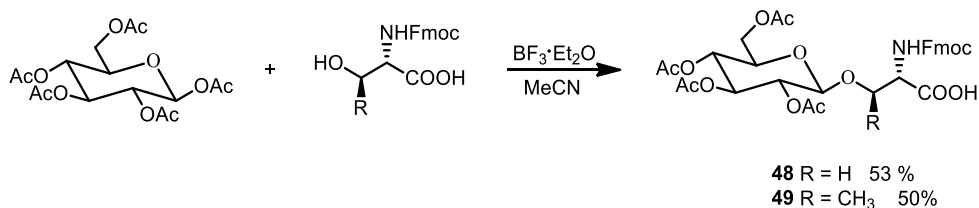
**Shema 9.** Sinteza 3-hidroksikiselinskog fragmenta

Zaštićeni derivati hidroksikiselina **41** i **42** potom su kuplovani korišćenjem EDCI pri čemu je dobijen lipofilni fragment ramnolipida **43** sa varijacijama u broju alkil ostataka, dužini alkil niza i stereohemiji (**shema 10**). Ovako dobijeni dilipidni fragment prečišćen je adsorbicijom na reverzno-fazni (RP) silika gel. Za pripremu ramnozila donora odabran je trihloracetimidat kao odlazeća grupa, a C<sub>3</sub>-OH i C<sub>4</sub>-OH grupe selektivno su zaštićene pomoću BDA (**44**). Preostala C<sub>2</sub>-OH grupa zaštićena je fenoksiacetil grupom koja je ujedno i promovisala formiranje  $\alpha$ -1,2-*trans* glikozidne veze. Lipidni deo molekula uklonjen je sa čvrste faze i glikozilovan je viškom ramnozila donora **44**. Reakcionoj smesi je dodat RP-silika gel koji ima ulogu čvrste faze, pri čemu se dobija glikozid **45** vezan za čvrstu fazu. Uklanjanje zaštitnih grupa izvršeno je na čvrstoj fazi. Selektivno uklanjanje fenoksiacetata omogućava novu glikozidaciju i uvođenje novih ostataka ramnoze. Finalnom deprotekcijom, a potom i desorbicijom sa čvrste faze dobija se metil ester ramnolipida **47** bez ikakvog dodatnog prečišćavanja. Metil ester se uklanja enzimskom reakcijom.



**Shema 10.** Sinteza ramnolipida na čvrstoj fazi Bauer-a i saradnika (prilagođeno iz reference 89).

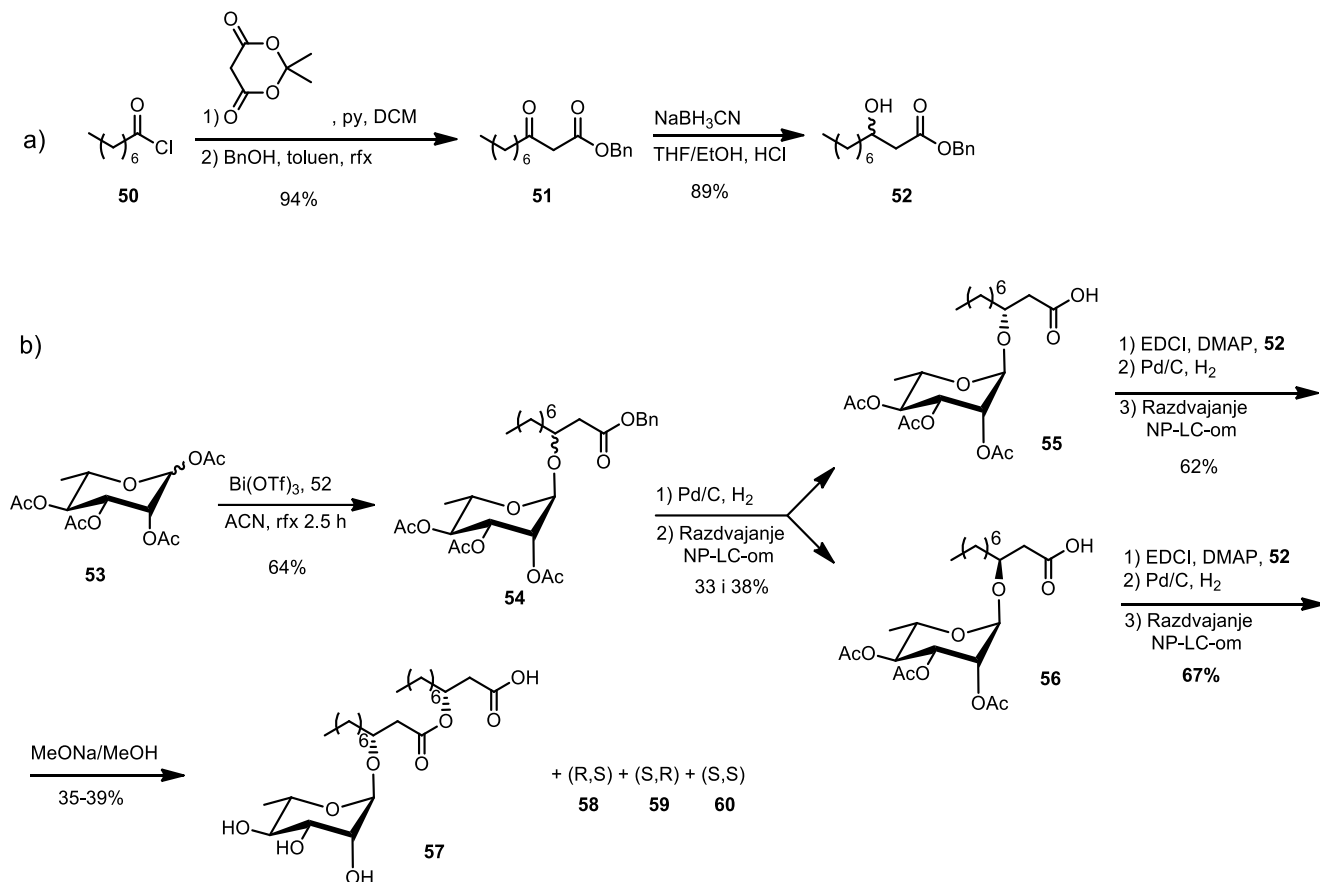
I pored činjenice da je u poređenju sa sintezom iz 1988. broj koraka smanjen i da je omogućena strukturna diverzifikacija molekula, komplikovana i neekonomična priprema glikozil donora ostala je nerešena. Prve pokušaje zaobilazjenja ovog problema imali su Elofsson i saradnici još 1991-e, kada su uspešno izvršili direktnu glikozidaciju Fmoc zaštićenih aminokiselina peracetilovanim šećerima u prisustvu Lewis-ovih kiselina ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{AgOTf}$ ) (**Shema 11**).<sup>90</sup>



**Shema 11.** Direktna glikozidacija peracetilovane glukoze.

U pokušaju redukcije formiranja sporednih proizvoda u sličnoj reakciji između peracetilovanih šećera i Fmoc-L-Ser-OBn, Fmoc-L-Ser-OH ili jednostavnih alkohola Polt i saradnici ispitivali su nešto blaže Lewis-ove kiseline ( $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{InBr}_3$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ). Među ispitivanim Lewis-ovim kiselinama reakcija katalizovana  $\text{InBr}_3$ -om dala je najveće prinose uz minimalno formiranje sporednih proizvoda.<sup>91</sup> Ovi rezultati omogućili su razvoj drugih strategija koje koriste pristupačne glikozil donore bez korišćenja nestabilnih promotera reakcije. Razvijena

metodologija iskorišćena je u sintezi četiri diastereoizomera ramnolipida, gde je peracetilovana ramnoza **53** direktno poslužila kao glikozil donor.<sup>92</sup> Zaštitna grupa u položaju 2 i anomerni efekat osigurali su formiranje isključivo  $\alpha$ -anomera. Lipofilni fragment pripremljen je iz oktanoil-hlorida **50** i Meldrum-ove kiseline kao racemska smesa benzil estara **52** (Shema 12a).

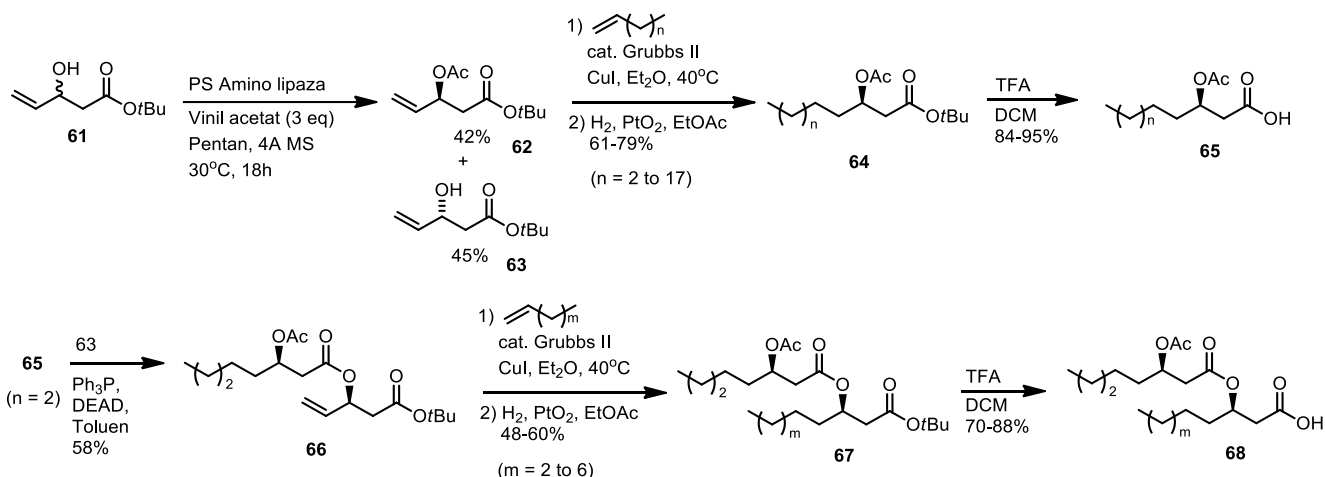


**Shema 12.** a) Sintaza racemskih estara 3-hidroksi kiseline; b) Sintaza četiri diastereoizomera ramnolipida Pacheco-a i saradnika.

U reakciji glikozidacije ispitivane su tri različite Lewis-ove kiseline: InBr<sub>3</sub>, Sc(OTf)<sub>3</sub> and Bi(OTf)<sub>3</sub>. So bizmuta dala je najbolje rezultate, a ujedno je i manje toksična i higroskopna od druge dve soli. Glikozidacija racemskog alkohola **52** peracetilovanom ramnozom **53** u prisustvu Bi(OTf)<sub>3</sub> dala je smesu diastereoizomera **54** koja je debenzilovana i potom razdvojena tečnom hromatografijom (**shema 12b**). Razdvojeni diastereoizomeri su kuplovani sa još jednim molekulom racemskog alkohola **52** u prisustvu EDCI i DMAP pri čemu je dobijena nova smesa diastereoizomera koja je ponovo nakon debenzilovanja razdvojena tečnom hromatografijom. Deacetilovanjem pod Zemplen-ovim uslovima NaOMe/MeOH dobijena su četiri monoramnolipidna proizvoda sa različitim konfiguracijama na hiralnim C-atomima **57**, **58**, **59** i **60**.<sup>92</sup>

S obzirom da je lipofilni deo molekula glavno mesto diverzifikacije ramnolipida, različiti kongeneri pri sintezi mogu se dobiti korišćenjem različitih hidrokisela. Poznate su brojne metode, od kojih su neke već pomenute, koje se mogu iskoristiti u sintezi lipofilnog dela ramnolipida. Osim što su njihov sastavni deo, 3-hidroksi kiseline su opšteprisutne u prirodi i predstavljaju važan gradivni blok mnogih biološki aktivnih lipopeptida.<sup>17,93,94</sup> Stoga su, sinteza i potencijalna diverzifikacija 3-hidroksikiseline od velikog značaja.

Dva najčešća pristupa za dobijanje 3-hidroksikiseline su Reformatsky reakcija i gorepomenuta strategija sa meldrumovom kiselinom.<sup>92,95</sup> Pristup koji omogućava veću diverzifikaciju strukture razvijen je od strane Menhour-a i saradnika. Oni su primenili Mitsunobu-ovu hemiju i reakciju metateze kako bi sintetisali niz optički aktivnih derivata 3-hidroksi kiseline različitih dužina.<sup>96,97</sup> Polazeći od acetoksiestra **62** koji se može dobiti u gramskoj količini korišćenjem PS Amino lipaze, autori su sintetisali malu biblioteku lipidnih fragmenata ramnolipida (**shema 13**). Mitsunobu-ova reakcija je korišćena za spajanje dva lipidna fragmenta, a ukrštena metateza terminalnog alkena omogućila je varijaciju dužine alkil niza u kasnoj fazi sinteze.

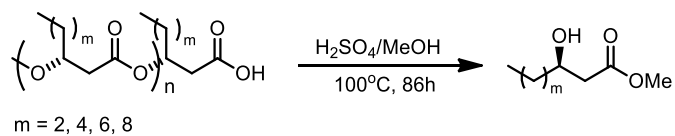


**Shema 13.** Sinteza di-lipidnog fragmenta ramnolipida različitih dužina korišćenjem Mitsunobu reakcije i ukrštene metateze.

Polazni supstrat **62** omogućava sintezu lipidnog fragmenta ramnolipida željene dužine. Metatezom jedinjenja **62** dobija se smesa E/Z alkena koja nakon hidrogenizacije i uklanjanja *tert*-butil estra daje zaštićenu 3-hidroksikiselinu željene dužine (**65**). Ovaj supstrat potom Mitsunobu-ovim kuplovanjem sa **63** daje di-lipidni fragment **66** koji se zahvaljujući terminalnoj dvostrukoj vezi može dalje produžiti što otvara mogućnost novim strukturnim varijacijama.

Još jedan mogući način dobijanja lipidnog fragmenta ramnolipida uključuje korišćenje biotehnološkog procesa kako bi se proizvele velike količine 3-hidroksikiseline iz polihidroksialkanoata (PHA). Polihidroksialkanoati su poliestri sastavljeni od (*R*)-3-hidroksikiseline. Nedavno su dospeli u centar pažnje kao ekološka zamena za petrohemijsku plastiku.<sup>98</sup> Ovo je iznedrilo niz istraživanja u cilju razvoja ekonomski prihvatljivog proizvodnog procesa ovog polimera.<sup>99</sup> Trenutna cena PHA iznosi US\$ 4.96 - 6.06/kg. De Roo i saradnici su koristeći PHA polimer proizveden pomoću *Pseudomonas putida* dobili enantiomerno čiste (*R*)-3-hidroksikiseline i njihove metil estre (**shema 14**).<sup>100</sup> Sastav PHA polimera može biti modifikovan, odabirom odgovarajućeg supstrata i podloge u procesu proizvodnje, pa je ovo jedan od načina za dobijanje različitih hiralnih 3-hidroksikiseline.<sup>98</sup> Ovaj hiralni pool može biti iskorišćen u sintezi

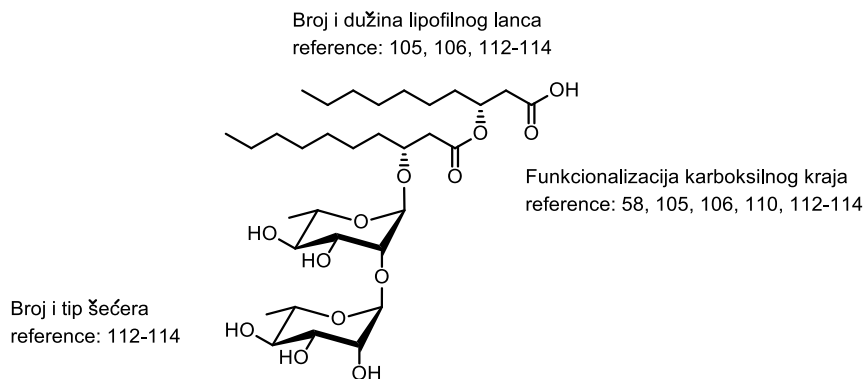
ramnolipida i može predstavljati značajan korak napred ka ekonomski i ekološki prihvatljivijoj proizvodnji. Osim toga ova strategija bi omogućila bolji pristup ramnolipidima sličnim molekulima i omogućilo detaljnije ispitivanje hemijskog prostora oko ovih molekula.



**Shema 14.** Sinteza (*R*)-3-hidroksikiselina iz PHA

### 1.1.4 Sintetski analozi i njihove fizičko-hemijske i biološke osobine

S obzirom na činjenicu da se ramnolipidi proizvode mikrobiološkim putem kao smesa kongenera, fizičko-hemijska i biološka svojstva dobijena ispitivanjem tih smesa ne mogu u potpunosti biti aproksimirana na čiste kongenere. U ovom kontekstu sintetske studije predstavljaju najbolji pristup čistim jedinjenjima i njihovoj karakterizaciji. Nekoliko istraživačkih grupa uradilo je sintezu i biološko i fizičko-hemijsko profilisanje ramnolipidnih derivata i na taj način pružilo uvid u opseg aktivnosti ovih jedinjenja. Sa druge strane, hemijske modifikacije ramnolipidnih molekula su takođe ispitivane. Ova istraživanja daju uvid u biološke uloge i potencijalnu primenu ramnolipida. Posmatrajući strukturu ramnolipida, postoji nekoliko očiglednih načina za njihovu modifikaciju (**slika 4**). Promena u broju i dužini lipofilnog niza ispitana je od strane nekoliko istraživačkih grupa. Karboksilna kiselina ramnolipida se jednostavno može transformisati u druge derivate kiselina. Zamena ramnoze drugim šećerima je način da se detaljnije prouči uloga ove komponente u funkciji ramnolipida ali i mogućnost za redukciju cene proizvodnje molekula ovog tipa. Selektivna funkcionalizacija OH grupa šećerne komponente omogućila bi fino podešavanje površinske aktivnosti ili bioloških svojstava molekula, međutim zbog relativno malih razlika u reaktivnosti ova strategija nije naročito popularna.



**Slika 4.** Strukturne modifikacije ramnolipida sa referencama.

Kao što je već pomenuto ramnolipidi su površinski aktivna jedinjenja čija je površinska aktivnost u rangu sintetskih surfaktanata. Rezultati dobijeni ispitivanjem smesa ramnolipidnih kongenera ne mogu se međutim u potpunosti projektovati na čiste kongenere i, važnije, odnos strukture i dejstva (SAR) ne može se definisati u potpunosti. Detaljnije informacije o SAR-u omogućile bi racionalni dizajn molekula sa ramnolipidnim svojstvima (npr. novih ekološki prihvatljivih surfaktanata ili antimikrobnih agenasa).

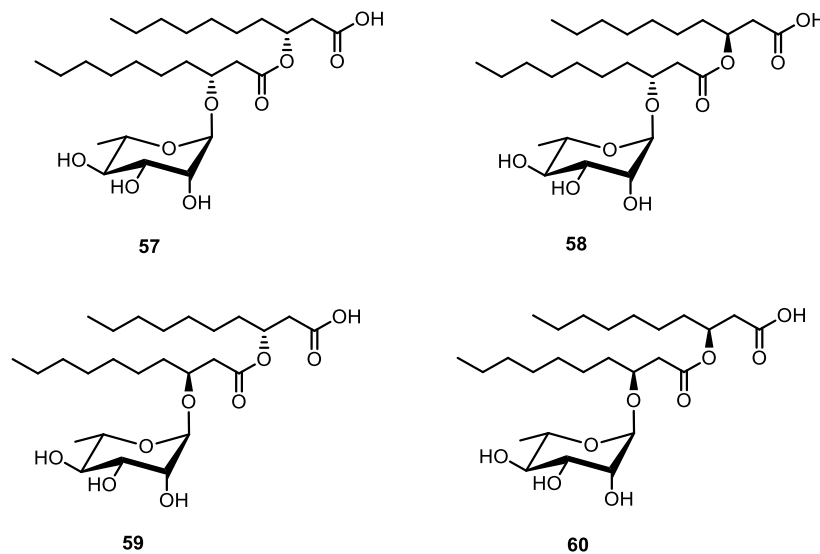
#### 1.1.4.1 Čisti ramnolipidni kongeneri

Rani rezultati dobijeni ispitivanjem smesa ramnolipida sugerišu da ramnolipidi sa dužim ugljovodoničnim nizom imaju manje vrednosti kritične micelarne koncentracije (CMC).<sup>101</sup> Ako se uporede mono-RL (Rha-C<sub>n</sub>-C<sub>n</sub>) i di-RL (Rha-Rha-C<sub>n</sub>-C<sub>n</sub>), mono-RL imaju manje vrednosti CMC (5-60 mg/L u poređenju sa 40-65 mg/L), što se može pripisati većem hidrofobnom karakteru mono-RL. Veći hidrofobni karakter uslovljava jači hidrofobni efekat i veću tendenciju za formiranjem agregata.<sup>46,101</sup>

Pacheco i saradnici su sintetisali i četiri diastereoizomera mono-RL (**shema 12**) i uporedili njihovu površinsku aktivnost na pH 4.0 i 8.0 kako bi analizirali osobine neutralnog i jonskog oblika ramnolipida.<sup>92</sup> Vrednosti CMC su znatno niže na pH 4.0 što je i očekivano s obzirom da



nema elektrostatskog odbijanja između karboksilnih grupa. Blago odstupanje javlja se kod jedinjenja **58** koje ima nešto višu vrednost CMC (25  $\mu\text{M}$ ) što je potkrepljeno i nešto većom površinom preseka molekula (**Tabela 4**). Niska vrednost CMC može se pripisati jakim hidrofobnim interakcijama između alkil lanaca ramnolipida što doprinosi boljem pakovanju u micelarne strukture.<sup>102</sup>



**Slika 5.** Mono-ramnolipidni diastereoizomeri sintetisani od strane Pacheco-a i saradnika.

Na pH 8.0 međutim, izomer **58** ima najgušće pakovanje pa shodno tome i najnižu vrednost CMC, nakon njega slede **59**, **60** i potom **57** sa najvećom vrednošću CMC i najvećom površinom poprečnog preseka molekula (**Tabela 4**). Kada se uporede sa vrednostima dobijenim iz smese ramnolipida izolovanih iz *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, 70-85 %) vrednosti tenzidskih osobina neznatno se razlikuju (CMC 21  $\mu\text{M}$  na pH 4 i CMC 200  $\mu\text{M}$  na pH 8).

**Tabela 4.** Površinska aktivnost monoramnolipidnih diastereoizomera

Mono-RL	pH	CMC ( $\mu\text{M}$ )	$\gamma_{\text{CMC}}$ (mN/m)	površina ( $\text{\AA}^2/\text{molekul}$ )
<b>57</b>	4.0	16 $\pm$ 4	27.5 $\pm$ 0.1	21 $\pm$ 4
	8.0	270 $\pm$ 77	28.1 $\pm$ 0.2	117 $\pm$ 12
<b>58</b>	4.0	25 $\pm$ 1	28.8 $\pm$ 0.1	23 $\pm$ 1
	8.0	79 $\pm$ 3	27.4 $\pm$ 0.2	80 $\pm$ 1
<b>59</b>	4.0	18 $\pm$ 3	27.5 $\pm$ 0.1	21 $\pm$ 2
	8.0	201 $\pm$ 51	29.5 $\pm$ 0.2	93 $\pm$ 7
<b>60</b>	4.0	15 $\pm$ 1	28.2 $\pm$ 0.1	21 $\pm$ 1
	8.0	180 $\pm$ 24	28.5 $\pm$ 0.2	103 $\pm$ 4

Stereohemija lipidnog fragmenta i pH sredine imaju mali uticaj na minimalni površinski napon  $\gamma$  i kod svih molekula on ostaje u opsegu od 27 do 29 mN/m bez obzira na pH vrednost.

U drugoj studiji istog seta jedinjenja Hogan i saradnici ispitivali su uticaj stereochemije lipidnog fragmenta na biodegradabilnost i toksičnost i upoređivali dobijene rezultate sa

biosintetskim ramnolipidima.<sup>103</sup> Biodegradabilnost jedinjenja u prisustvu mikroorganizama iz zemljišta određivana je merenjem količine izdvojenog ugljen-dioksida u periodu od 28 dana. Mada su svi diastereoizomeri bili biorazgradivi, vidljive su bile male razlike. Biosintetska smesa ramnolipida imala je najveći nivo biorazgradivosti 92 %, potom prirodni (*R,R*)-monorhamnolipid **57** (69 %), pa sintetski diastereoizomeri **58** (60 %), **59** (51 %) i **60** (34 %). Niža biodegradabilnost neprirodnih izomera ramnolipida može se objasniti neprilagođenosti test organizama ovim jedinjenjima, tj. nedostatku prethodne izloženosti. U testu toksičnosti na humane MTS ćelije nije bilo značajne razlike među diastereoizomerima. Interesantno je zapažanje autora pri upoređivanju toksičnosti ramnolipida i literaturnih podataka o anjonskim i nejonskim surfaktantima. Naime, primećeno je da dužina hidrofobnog fragmenta ima značajnog uticaja na toksičnost surfaktanta te da su surfaktanti sa 10 ili 12 C atoma u hidrofobnom delu toksičniji od ostalih.<sup>104</sup> Stoga autori sugerišu sintezu ramnolipida koji u hidrofobnom delu molekula sadrže 8 ili 14 C atoma. Od ispitivanih ramnolipida, najnižu toksičnost na humane ćelije pluća (H1299) nakon 72 h ispoljio je diastereoizomer **58** (IC<sub>50</sub> 191.1 μM), a izomer **60** ispoljio je najvišu toksičnost (IC<sub>50</sub> 108.2 μM).

### 1.1.4.2 Manje zastupljeni ramnolipidni kongeneri

Najzastupljeniji ramnolipidni kongeneri su mono i di-ramnolipidi koji sadrže dva alifatična lanca sa 8 do 12 C atoma. Drugi ramnolipidni kongeneri se proizvode u malim količinama pa ih je stoga teško okarakterisati. Wang i saradnici su sintetisali i okarakterisali upravo ove kongenere kao i sintetske analoge ramnolipida sa varijacijama u dužini alifatičnog niza, karboksilne kiseline i stereochemije.<sup>105</sup> Sintetisana jedinjenja predstavljena su u **tabeli 5**.

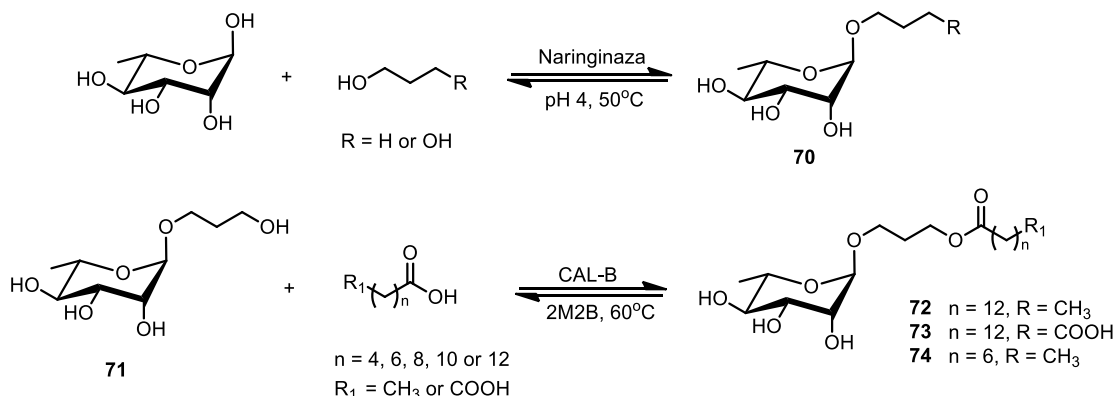
**Tabela 5.** Površinska aktivnost ramnolipida i njihovih analoga (adaptirano iz disertacije Wang-a).<sup>105</sup>

Jedinjenje	Struktura	CMC ( $\mu\text{M}$ )	$\gamma_{\text{CMC}}$ (mN/m)
61		95000 $\pm$ 200	35.0 $\pm$ 0.1
62		99000 $\pm$ 5000	34.6 $\pm$ 0.1
63		63000 $\pm$ 2000	35.0 $\pm$ 0.1
64		21.2 $\pm$ 2.1	30.7 $\pm$ 0.0
65		2800 $\pm$ 500	28.8 $\pm$ 0.5
66		2000 $\pm$ 200	28.4 $\pm$ 0.1
67		344 $\pm$ 39	28.9 $\pm$ 0.2
68		1035 $\pm$ 48	28.4 $\pm$ 0.1
69		26.3 $\pm$ 0.6	28.1 $\pm$ 0.1

Upoređivanjem racemskih jedinjenja **61** i **64** primetno je značajno smanjenje CMC vrednosti sa porastom lipofilnosti, što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima.<sup>101</sup> Slično podacima objavljenih od strane Pacheco-a i saradnika i ovde se može uočiti blago smanjenje CMC vrednosti kod jedinjenja *S*-konfiguracije.<sup>92</sup> Uklanjanje karboksilne grupe takođe rezultira nižim vrednostima CMC, što je najverovatnije posledica povećane hidrofobnosti i smanjenog odbijanja u hidrofilnom regionu prilikom formiranja micela. Kod ramnopiranozida (**65-69**)

primetno je dalje smanjenje vrednosti CMC usled povećanja broja metilenskih grupa. Sa druge strane, grananje na  $\alpha$ -ugljeniku doprinosi povećanju vrednosti CMC (**67** i **68**), što je najverovatnije rezultat sternih smetnji prilikom formiranja agregata. Ovo postaje naročito izraženo u slučaju  $\alpha$  grananja zbog relativnih blizina polarne hidrofilne glave i mesta grananja. U poređenju sa prirodnim ramnolipidima (**61-64**), ramnopiranozidi (**65-69**) takođe imaju i niže vrednosti minimalnog površinskog napona  $\gamma$ .

U sintezi ramnolipidnih analoga Nott i saradnici koristili su enzimatski pristup. Korišćenjem naringinaze, multienzimskog kompleksa koji u svom aktivnom centru sadrži  $\alpha$ -L-ramnozidazu, uspešno je uvedeno nekoliko različitih alkil grupa u cilju ispitivanja efekta dužine alifatičnog niza i varijacije funkcionalnih grupa na površinsku aktivnost ramnopiranozida (**shema 14**).<sup>106</sup> U prvom koraku ove enzimatske sinteze naringinaza je iskorišćena kako bi se izvršila ramnozilacija propanola i 1,3-propandiola. Slobodna primarna alkoholna grupa monoramnozilovanog 1,3-propandiola **71** je potom estarifikovana mono- i di-karboksilnim kiselinama u seriji reakcija katalizovanim komercijalno dostupnom lipazom B iz *Candida antarctica* (CAL-B). Reakcije su se odvijale regioselektivno pa je esterifikovana isključivo primarna alkoholna grupa jedinjenja **71**. Esterifikacija dikiselinama dala je isključivo monoestarske proizvode.



**Shema 14.** Enzimatska sinteza ramnolipidnih analoga.

Upoređene su površinske aktivnosti derivata sa najdužim alkil nizovima **72** i derivata sa terminalnom karboksilnom grupom **73**. Na pH 5 kritična agregaciona koncentracija (CAC) alkil derivata **72** iznosila je  $1.7 \pm 0.16 \mu\text{M}$ , a minimalni površinski napon  $27.6 \pm 0.6 \text{ mN/m}$  što je u opsegu vrednosti komercijalnih surfaktanata. Sa druge strane derivat sa karboksilnom grupom **73** imao je vrednost minimalnog površinskog napona  $50 \text{ mN/m}$  i nije formirao agregate. Ovi rezultati su bili i očekivani s obzirom da je neophodno da molekul zauzme "U" oblik kako bi i karboksilna grupa i ramnoza (obe polarne komponente) bile sa iste strane. Da bi ovakav oblik molekula bio moguć verovatno je neophodno da alkil niz bude još duži.

Takođe je ispitivan i ramnozid sa najkraćim alkil nizom (**74**). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno prijavljenim trendovima – kraći alkil nizovi rezultiraju povećanjem CMC i minimalne površinske aktivnosti. U ovom slučaju konkretne vrednosti bile su  $4000 \mu\text{M}$  i  $33 \text{ mN/m}$ .

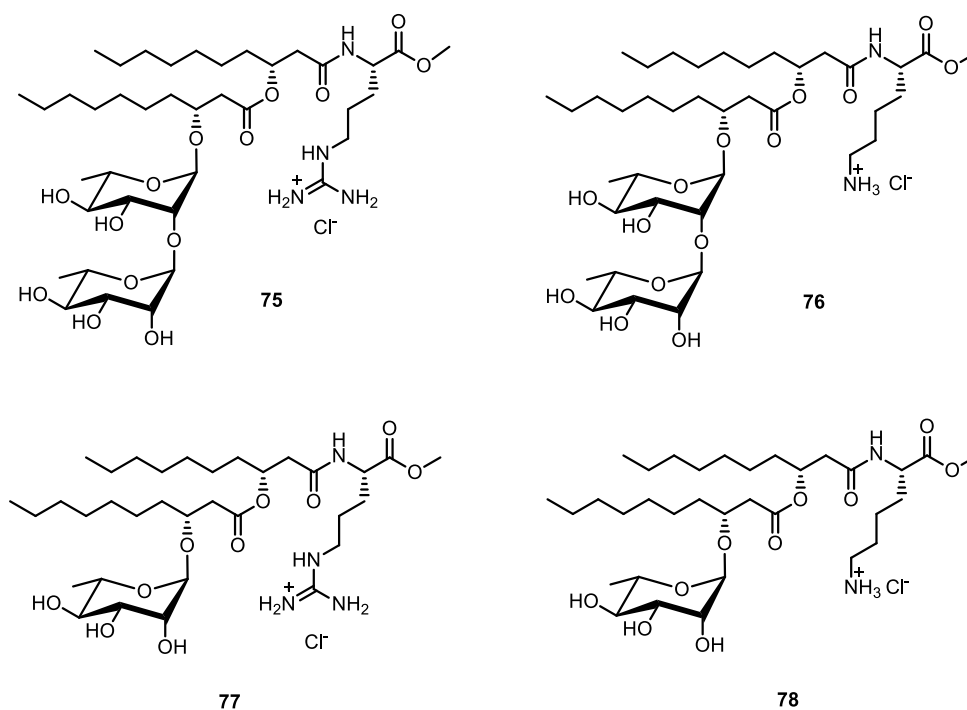
U zaključku, ramnopiranozidi predstavljaju dobre potencijalne targete u dizajnu novih surfaktanata. Vrednosti CMC ramnopiranozida (**65**, **67** i **69** - CMC  $2800 \mu\text{M}$ ,  $340 \mu\text{M}$  i  $26 \mu\text{M}$  redom **tabela 5**) deset puta su niže od odgovarajućih vrednosti kod komercijalnih alkil glukozida

(oktil-, decil- i dodecil- $\beta$ -D-glukopiranozid – CMC 25000  $\mu$ M, 2200  $\mu$ M i 200  $\mu$ M redom) i u opsegu klasičnih komercijalnih surfaktanata (Na-dodecilsulfat, cetiltrimetilamonijum bromid i triton X-100 – 8190  $\mu$ M, 980  $\mu$ M i 350  $\mu$ M redom).<sup>107,108</sup> Dodatni benefit ramnolipida može biti i potencijalno dobra biodegradabilnost s obzirom na strukturnu analogiju sa ramnolipidima.

### 1.1.4.3 Modifikacije karboksilne kiseline

Funkcionalizacija karboksilne kiseline je pristup koji je već primenjivan u derivatizaciji soforolipida pri čemu su dobijena jedinjenja sa potentnijom antimikrobnom aktivnošću.<sup>20</sup> U praksi ovakva modifikacija doprinosi ne samo potencijalnoj promeni biološke aktivnosti već se može iskoristiti za pretvaranje ramnolipida u nejonske ili katjonske surfaktante. Pažljiv odabir supstrata može omogućiti ekonomski prihvatljivu rutu za sintezu novih “zelenih” molekula koji osim površinske aktivnosti mogu ispoljavati i interesantna biološka svojstva.

Korišćenjem ramnolipida dobijenih iz *P. aeruginosa* MB da Silva i saradnici sintetisali su amidne derivate ramnolipida kuplujući ih sa metil estrima arginina i lizina.<sup>110</sup> Smesa dobijena iz *P. aeruginosa* prečišćena je hromatografijom na koloni pa su tako dobijene smese mono-RL i di-RL koje dominantno sadrže C-10 kongenere. Kuplovanjem aminokiselina preko  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> korišćenjem DCC-ja i HOBt-a dobijena su četiri katjonska derivata (**slika 6**). Sintetisana jedinjenja su potom biološki i fizičko-hemijski okarakterisana.



**Slika 6.** Polusintetski derivati ramnolipida sa baznim aminokiselinama.

Vrednosti CMC sintetisanih derivata bile su nešto više u poređenju sa ramnolipidima što se može pripisati jonizaciji amidnih derivata na ispitivanoj pH vrednosti (pH 4.3 - 6.1). Na ispitivanoj pH ramnolipidi su u manjoj meri jonizovani pa imaju i nižu vrednost CMC.

**Tabela 5.** Površinske aktivnosti derivata arginina i lizina.

Jedinjenje	CMC (g/L)	$\gamma_{CMC}$ (mN/m)
<b>RL-mix</b>	0.005	30.6
<b>(75 + 77)*</b>	0.016	31.1
<b>(76 + 78)*</b>	0.008	30.6
<b>Mono-RL</b>	0.010	28.8
<b>77</b>	0.013	28.9
<b>78</b>	0.015	28.3

\*Jedinjenja su dobijena iz smese ramnolipida koja je sadržala 60 % mono-RL i 40 % di-RL.

Poznato je da katjonski surfaktanti poseduju antimikrobna svojstva zahvaljujući svojoj sposobnosti da remete strukturu fosfolipidnog dvosloja indukujući pri tome lizu ćelije.<sup>111</sup> Shodno tome, transformacijom ramnolipida u katjonske surfaktante mogu se potencijalno dobiti novi antimikrobni agensi. U tabeli 6 prikazane su MIC vrednosti katjonskih derivata ramnolipida protiv nekoliko ispitivanih bakterijskih vrsta. Derivati lizina (76 i 78) nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost, dok su derivati arginina (75 i 77) uspešno inhibirali rast Gram-pozitivnih bakterija sa MIC vrednostima u opsegu od 4 do 32  $\mu\text{g/mL}$ . Između ostalog derivati arginina bili su aktivni i na Meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA). Razlika u aktivnosti sintetisanih derivata može se pripisati razlikama u pKa vrednosti (oko 7.5 za derivate lizina 76 i 78 i oko 9.5 za derivate arginina 75 i 77). Na pH vrednosti na kojima se izvodili antimikrobni testovi (fiziološka pH 7.4) samo su derivati arginina protonovani pa stoga mogu stupati u interakciju sa membranom Gram-pozitivnih bakterijskih vrsta, modifikujući pri tome njihovu permeabilnost. Smesa neprečišćenih ramnolipida nije ispoljila antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih sojeva ni na koncentracijama od 250  $\mu\text{g/mL}$ . Naposletku je ispitivana i biodegradabilnost sintetisanih derivata. Sva jedinjenja su prevazišla vrednost od 60 % biodegradabilnosti u roku od 28 dana i shodno tome klasifikovana kao biodegradabilna. U poređenju sa prirodnim ramnolipidima biodegradabilnost je bila nešto niža što se pripisuje prisustvu amidne veze.

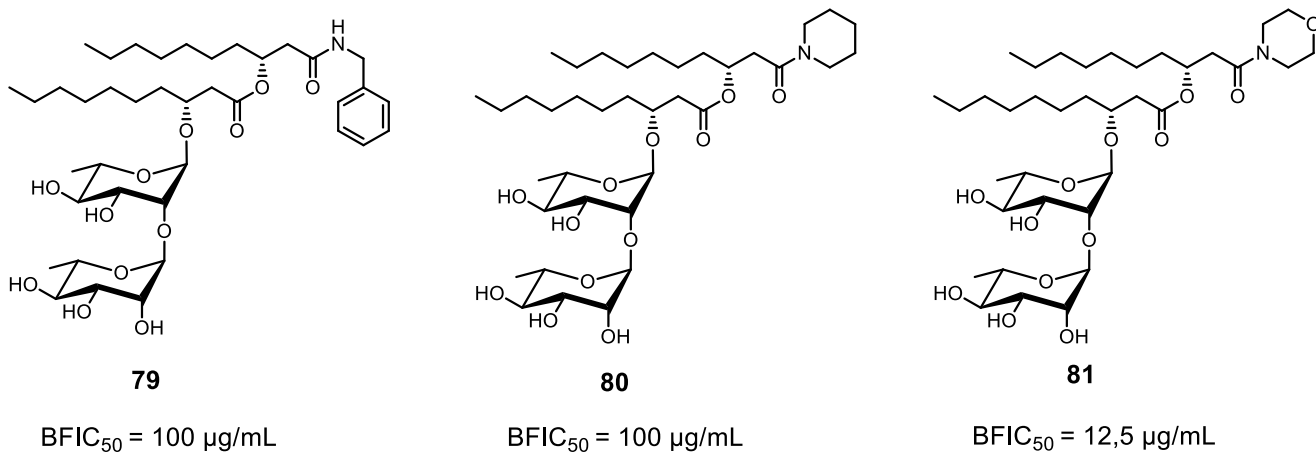
**Tabela 6.** Antimikrobna svojstva amidnih derivata ramnolipida.

Bakterija	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )					ref
	(75 + 77)	77	79	80	81	
<i>B. subtilis</i>	16	16	/*	/	/	110
<i>S. epidermidis</i>	4	4	/	/	/	110
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8	8	/	/	/	110
<i>S. aureus</i> MRSA	32	16	125	62.5	62.5	58,110
<i>L. monocytogenes</i>	16	16	/	/	/	110
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	/	/	62.5	62.5	62.5	58

\*/ - jedinjenje nije ispitivano na dati bakterijski soj.

Aleksić i saradnici su derivatizovali ramnolipide dobijene iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1.<sup>58</sup> Izolovani di-ramnolipidi kuplovani su sa piperidinom, morfolinom i benzilaminom pri čemu su

dobijena tri nova derivata **79**, **80** i **81** (slika 7). Sintetisani derivati sa povećanom lipofilnošću pokazali su bolju antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih sojeva (*S. aureus* ATCC 25923 i *S. aureus* MRSA) sa MIC vrednostima u opsegu od 62.5 do 125 µg/mL (tabela 6). Ramnolipidi izolovani iz *Lysinibacillus* sp. BV152.1 nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih sojeva ni na koncentracijama od 500 µg/mL. U testovima toksičnosti, međutim, amidni derivati **79**, **80** i **81** su pokazali povećanu citotoksičnost u odnosu na ramnolipide. Vrednosti IC<sub>50</sub> za toksičnost na humanim plućnim fibroblastima bile su 2,5 puta niže od MIC vrednosti.



**Slika 7.** Amidni derivati ramnolipida sa njihovim BFIC<sub>50</sub> vrednostima.

Osim antimikrobne aktivnosti upoređivan je efekat sintetisanih derivata i ramnolipida na formiranje biofilma *P. aeruginosa*. Ramnolipidi su na niskim koncentracijama (do 50 µg/mL) promovisali formiranje biofilma, a na višim koncentracijama primećena je inhibicija formiranja biofilma (BFIC<sub>50</sub> 50 µg/mL) (BFIC<sub>50</sub> - koncentracija jedinjenja koja inhibira formiranje biofilma za 50 % u odnosu na netretirani standard). Od sintetisanih jedinjenja konjugat morfolina **81** imao je najizraženija anti-biofilm svojstva sa BFIC<sub>50</sub> vrednošću od 12,5 µg/mL. Derivati benzilamina (**79**) i piperidina (**80**) bili su dva puta manje aktivni od ramnolipida.

Derivat morfolina **81** je takođe i ubrzao disperziju preformiranog biofilma *P. aeruginosa* (BDIC<sub>50</sub> = 12.5 µg/mL) (BDIC<sub>50</sub> predstavlja koncentraciju jedinjenja pri kojoj 50 % biofilma biva dispergovano).

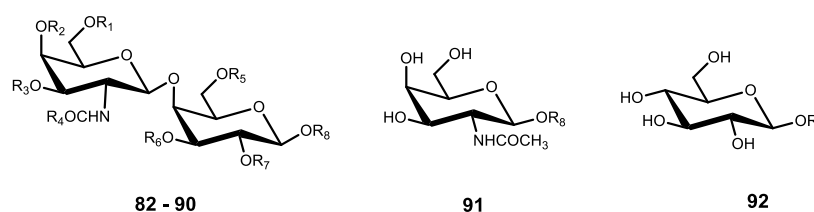
U navedenim literaturnim primerima, može se primetiti da derivatizacija ramnolipida aminima primarno poboljšava njihovu antimikrobnu aktivnost, slično kao i u slučaju soforolipida.<sup>109</sup> Biodegradabilnost i površinska aktivnost ostaju u rangu matičnog molekula. Potencijalni problem povećane citotoksičnosti može međutim predstavljati problem u razvoju antimikrobnih jedinjenja baziranih na amidnim derivatima ramnolipida.

### 1.1.4.4 Modifikacije šećerne komponente i alifatičnog niza

Kao što je ranije pomenuto, *P. aeruginosa* poseduje nekoliko potencijalnih vezivnih mesta za ramnolipide (odjeljak 1.1.1). Nekoliko istraživačkih grupa ispitivalo je ramnolipidima slične molekule u cilju pronalazjenja strukture koja modulira neke od ključnih funkcija ramnolipida, kao što su: adhezija, rojenje i formiranje biofilma. Molekuli su dizajnirani imajući u vidu saznanja o poznatim ligandima kao i o njihovim vezivnim mestima na *P. aeruginosa*.

Rane studije Irwine-a i saradnika pokazale su da pili *P. aeruginosa*, koje najverovatnije igraju ključnu ulogu u adheziji, prepoznaju sekvencu ugljenih hidrata  $\beta$ -D-GalNAc(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-Gal. Schweizer i saradnici primenili su interesantan pristup koji im je omogućio da delimično okarakterišu vezivno mesto na pilima *P. aeruginosa*.<sup>112</sup> Autori su sistematski alkilovali različite pozicije na disaharidnom molekulu kako bi ispitali molekulske interakcije sa receptorima na površini pili-a (**tabela 7**). Pozicija i dužina alkil niza nisu imali značajan uticaj na afinitet vezivanja disaharidnih derivata. Najveći afinitet vezivanja za receptor pokazalo je jedinjenje **88** ( $IC_{50} = 8 \mu M$ ) što je sugerisalo na značaj lipofilnih interakcija na anomernom kraju disaharida.

**Tabela 7.** Strukture i inhibitorne koncentracije sintetisanih jedinjenja Schweizer-a i saradnika.

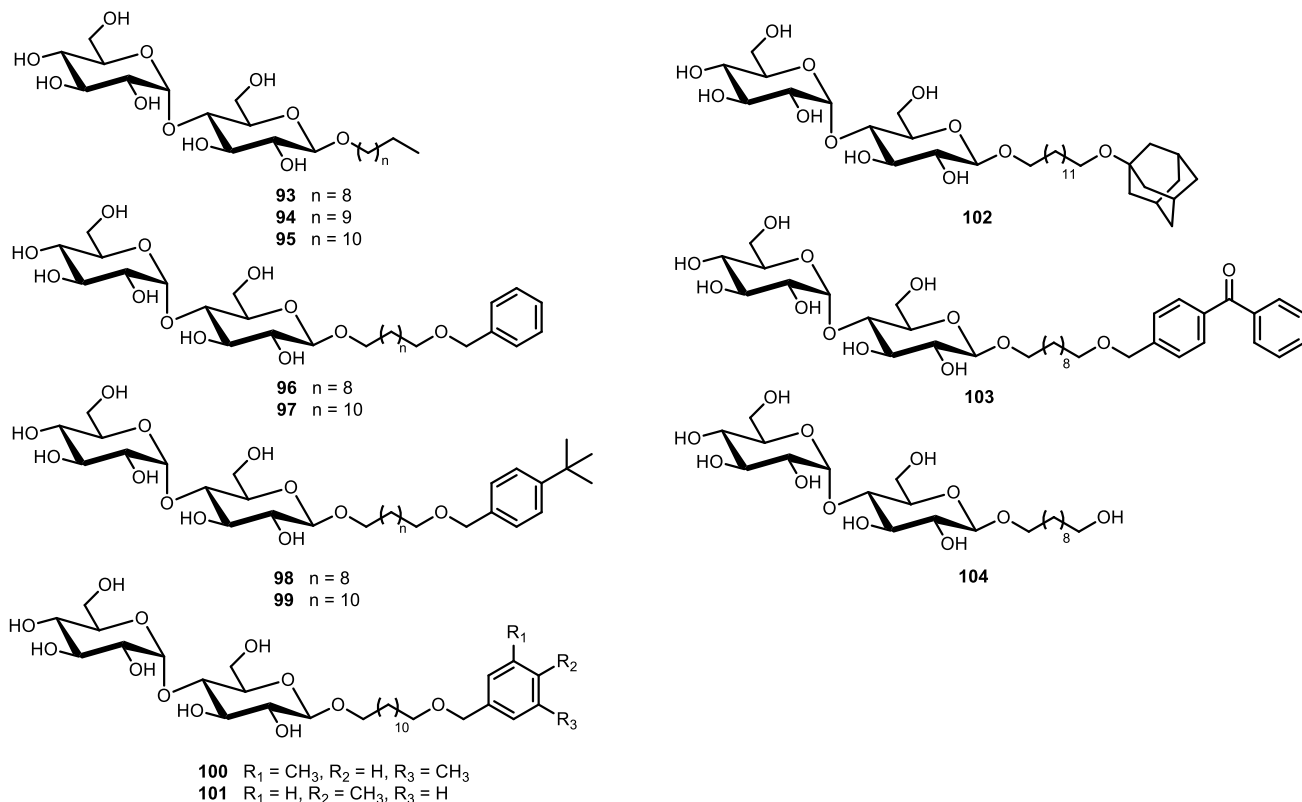


Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>82</b>	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	79±18
<b>83</b>	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	56±13
<b>84</b>	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	30±7
<b>85</b>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	65±7
<b>86</b>	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	130±36
<b>87</b>	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	98±11
<b>88</b>	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	8±4
<b>89</b>	-H	-H	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	129±30
<b>90</b>	-H	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOCH <sub>3</sub>	217±32
<b>91</b>	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOCH <sub>3</sub>	246±14
<b>92</b>	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	/

Uzimajući u obzir male razlike u vezivanju kod monoalkilovanih i polialkilovanih jedinjenja autori predlažu da u interakciji disaharida sa receptorom važnu ulogu igraju molekuli vode odnosno da se derivatizacijom alkil supstituentom samo menja organizacija molekula vode oko molekula. U tom smislu ključni strukturni element za vezivanje sa receptorom najverovatnije predstavlja sami hidrofobni skelet molekula. Posledično, orijentacija OH grupa, tj. tip šećera ne igra važnu ulogu u vezivanju. Sa druge strane lipofilnost grupe u anomernom položaju može biti od značaja s obzirom da je zamena oktil grupe 8-metoksikarboniloktil grupom značajno umanjila inhibitorna svojstva jedinjenja (jedinjenja **82** i **90**, **Tabela 7**).



Sa ciljem pronalaženja mehanizma kojim ramnolipidi ispoljavaju svoje funkcije kod *P. aeruginosa* Shetye i saradnici sintetisali su i evaluirali seriju molekula sličnih ramnolipidima. Molekuli su sadržali maltozu kao šećernu komponentu i alifatični niz sa varijacijama u dužini niza i veličini terminalne funkcionalne grupe (**slika 8**).<sup>61</sup> Autori su ispitivali efekat sintetisanih jedinjenja na rojenje, svojstvo *P. aeruginosa* za koje je neophodna niska koncentracija ramnolipida. Mutant *P. aeruginosa* sa dezaktiviranim *rhlA* genom ne može da biosintetiše ramnolipide pa stoga i nema sposobnost translokacije bakterijske populacije tj. rojenja. Eksterno dodati ramnolipidi, međutim, mogu reaktivirati rojenje kod *rhlA* mutanta.



**Slika 8.** Derivati maltoze Shetye-a i saradnika.

U eksperimentima izvedenim na *rhlA* mutantu, sva jedinjenja osim **93**, **98**, **99** i **104** aktivirala su njegovu sposobnost rojenja pri koncentraciji od 85  $\mu$ M. Dalji eksperimenti su pokazali da su jedinjenja **98** i **99** pri niskim koncentracijama (5-10  $\mu$ M) aktivatori rojenja ali i da se povećanjem njihove koncentracije na preko 40  $\mu$ M u potpunosti gasi sposobnost rojenja. Kada se jedinjenja **98** i **99** pomešaju sa aktivatorom rojenja (**95**) dolazi do potpune inhibicije rojenja *rhlA* mutanta što sugeriše da **98** i **99** potencijalno deluju kao kompetitivni inhibitori hipotetičkog ramnolipidnog receptora.

S obzirom na disaharidnu prirodu molekula i prethodno pomenuto istraživanje Schweizer i saradnika, autori su takođe ispitali i njihova anti-adhezivna i anti-biofilm svojstva. Svi molekuli osim **104** inhibirali su formiranje biofilma više od 40 % na koncentracijama od 110  $\mu$ M. Ispitivanje anti-adhezivnih svojstava dalo je slične rezultate. Generalno, produženje alifatičnog lanca i veličine supstituenta na terminusu povećava anti-biofilm i anti-adhezivna svojstva jedinjenja. Najpotentniju anti-biofilm aktivnost pokazalo je jedinjenje koje sadrži benzofenon na alifatičnom kraju (**103**), dok je najpotentniju anti-adhezivnu aktivnost pokazalo jedinjenje sa 4-

*terc*-butil benzil grupom (**98**). Slični rezultati dobijeni su u testovima disperzije formiranog biofilma (**tabela 8**).

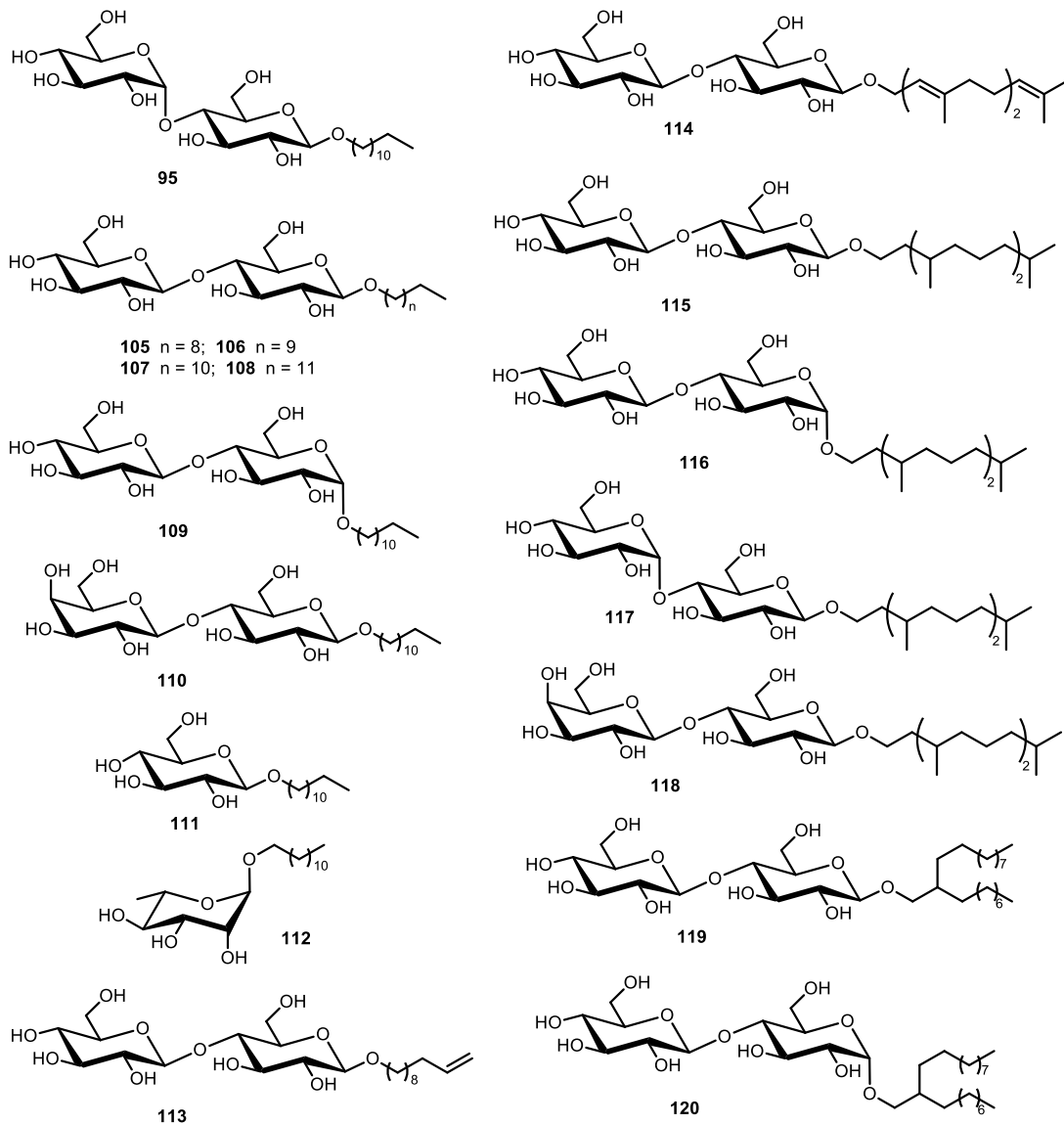
**Tabela 8.** Inhibicija formiranja biofilma (BFIC<sub>50</sub>) i disperzija formiranog biofilma (BDIC<sub>50</sub>) najaktivnijih jedinjenja.

Jedinjenje	BFIC <sub>50</sub> (μM)	BDIC <sub>50</sub> (μM)
<b>95</b>	48	66
<b>97</b>	28	32
<b>98</b>	23	43
<b>101</b>	29	77
<b>103</b>	23	31

Iako su kod svih eksperimenata ustanovljeni određeni strukturni trendovi, uočene su i pojedine nepravilnosti. Naime, upoređujući jedinjenja **97** i **99**, koja se međusobno razlikuju samo po *terc*-butil grupi na benzenu, primećuje se da jedinjenje **97** aktivira, a jedinjenje **99** inhibira rojenje na koncentraciji od 85 μM, dok na nižim koncentracijama (10 μM) deluje kao aktivator rojenja. Ovakve nepravilnosti u rezultatima mogu se pripisati prisustvu jednog ili više ramnolipidnih receptora.

U prilog ovoj teoriji ide i činjenica da komercijalni surfaktanti (Natrijum-dodecilsulfat, dodeciltrimetilamonijum-hlorid i drugi) nisu pokazali nikakvu anti-biofilm aktivnost, kao i činjenica da su aktivna jedinjenja ispoljavala svoje dejstvo na koncentracijama nižim od njihove CMC. Ovo implicira da ispoljene aktivnosti nisu samo rezultat površinske aktivnosti jedinjenja već rezultat interakcija sa receptorom(ima).<sup>61</sup>

U nastavku svog istraživanja Shetye i saradnici ispitali su seriju glikolipidnih molekula kako bi identifikovali strukturne elemente neophodne za oponašanje ili inhibiciju funkcije ramnolipida kod *P. aeruginosa*.<sup>113</sup> Varijacije šećerne komponente uključivale su primenu celobioze (**105-109**, **113-116**, **119** i **120**), maltoze (**95** i **117**), laktoze (**110** i **118**), glukoze (**111**) i ramnoze (**112**), a varijacija alifatičnog niza uključivala je različitu dužinu, zasićenje i grananje alkil niza (**slika 9**).



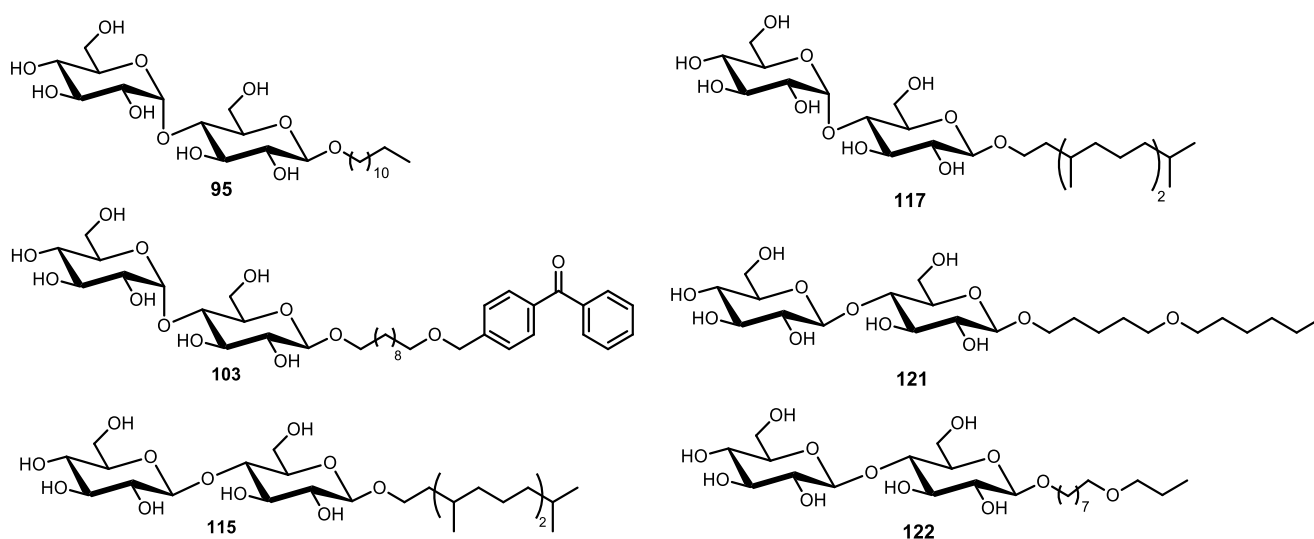
**Slika 9.** Glikolipidi sintetisani od strane Shetye-a i saradnika.

Sintetisana jedinjenja pokazala su varijabilan uticaj na sposobnost rojenja. Primetno je, međutim, ponašanje jedinjenja slično ramnolipidima – tzv. reverzija aktivnosti. Naime jedinjenja **107**, **108**, **111**, **115** i **117** aktiviraju rojenje *rhlA* mutanta na niskim koncentracijama, a inhibiraju na visokim. Jedinjenja **107**, **115** i **117** takođe inhibiraju rojenje i kod PAO1 i to pri koncentracijama (7.5 to 20  $\mu\text{M}$ ) koje su niže od koncentracija ramnolipida pri kojima oni inhibiraju rojenje (30  $\mu\text{M}$ ).

Anti-biofilm aktivnosti još jednom su pokazale značaj voluminozne alifatične grupe u lipofilnom delu molekula (u ovom slučaju u pitanju je bila zasićena farnezil grupa). Najpotentniju anti-biofilm aktivnost pokazala su jedinjenja **107**, **115**, **116** i **117**. Primetno je takođe i da stereochemija šećerne komponente nije imala značajan uticaj na anti-biofilm svojstva jedinjenja. Prisustvo disaharida je međutim, neophodno, s obzirom da monosaharidni derivati poseduju veoma slaba anti-biofilm svojstva.

Značaj zasićene farnezil grupe ispitan je zamenom šećerne komponente drugim polarnim grupama poput tetraetilen glikola ili sulfata. Ova jedinjenja nisu imala nikakvog efekta na formiranje biofilma. Oba derivata su međutim inhibirala rojenje pri niskim koncentracijama (<10  $\mu\text{M}$ ).<sup>113</sup>

Na svom sledećem setu jedinjenja (**slika 10**) autori su demonstrirali da ramnolipidni analozi promovišu formiranje biofilma kod *rhlA* mutanta pri niskim koncentracijama, a inhibiraju njegovo formiranje pri visokim koncentracijama.<sup>114</sup> Ovakvo ponašanje je u potpunosti analogno funkciji ramnolipida kod *P. aeruginosa*.



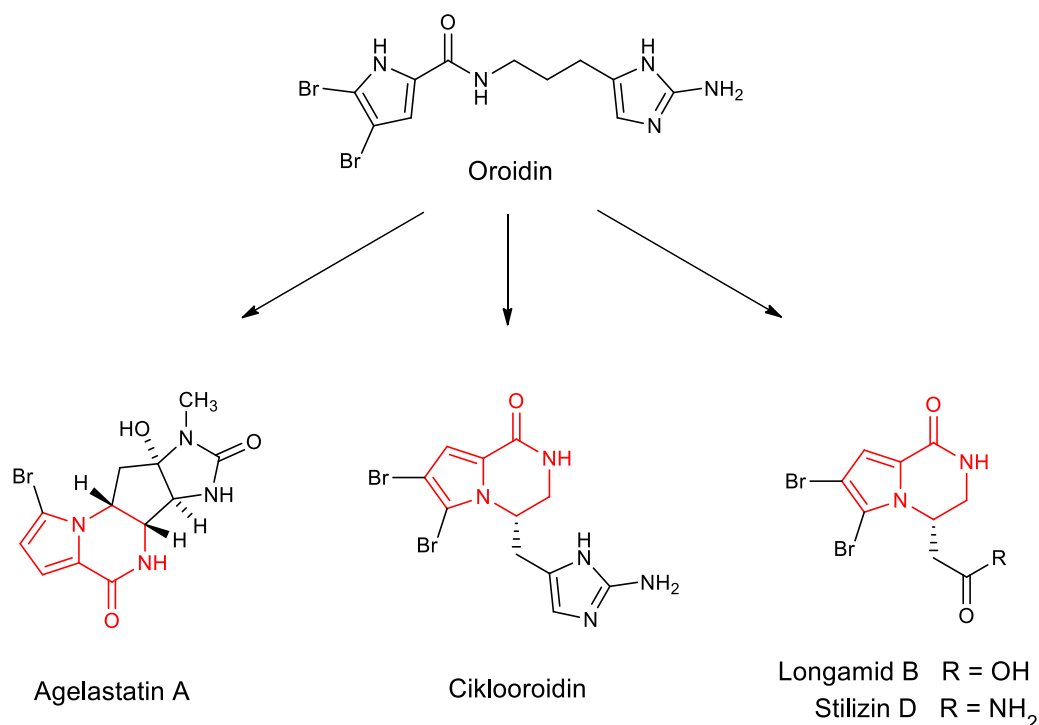
**Slika 10.** Glikolipidi sintetisani od strane Shetye-a i saradnika.

Jedinjenja **95**, **103**, **115** i **117** u koncentracijama od 20 do 170  $\mu\text{M}$  promovišu formiranje biofilma *rhlA* mutanta. Interesantna je i činjenica da sintetisana jedinjenja imaju primetan uticaj i na arhitekturu biofilma. Na niskim koncentracijama (40  $\mu\text{M}$ ) jedinjenja **115** i **117** stimulišu formiranje strukturno kompleksnog biofilma koji sadrži pore i vodene kanale. Inhibicija formiranja biofilma dešava se pri koncentraciji od 340  $\mu\text{M}$ . Jedinjenja **121** i **122** nisu imala značajan efekat na formiranje biofilma niti na sposobnost rojenja kod *rhlA* mutanta i soja PAO1 implicirajući još jednom na značaj koji lipofilni deo molekula ima na aktivnost ramnolipidnih analoga.

## 1.2 Bromopirolski alkaloidi

Osim biosurfaktanata, u borbi protiv bakterijskih infekcija istraživačke grupe inspiraciju pronalaze i u malim molekulima prirodnog porekla. S obzirom na još uvek nerešen problem hroničnih infekcija izazvanih biofilmom, fokus u istraživanju su upravo jedinjenja koja ciljano deluju na biofilm i njegovo formiranje. Jedna od klasa jedinjenja proučavanih u ovom smislu su bromopirolski alkaloidi. Bromopirolski alkaloidi predstavljaju raznovrsnu klasu jedinjenja sa preko 140 predstavnika koje proizvode morski sunđer. <sup>115</sup> Njihova prirodna uloga je zaštita domaćina od predatora i prevencija formiranja bakterijskog biofilma na njihovoj površini. <sup>116</sup> Osim antibakterijskih svojstava ovi molekuli pokazuju širok spektar aktivnosti, pa su neki od njih potentni antagonisti serotonergičkih receptora, inhibitori kinaza ili antitumorski agensi (**shema 1.1**). <sup>117-119</sup> Dobro je poznata izuzetna antitumorska aktivnost Agelastatina A koji je pokazao aktivnost u opsegu od 20 do 190 nM protiv 6 različitih kancerskih ćelijskih linija. <sup>119</sup> Zbog velike strukturne raznovrsnosti i potentnih bioloških aktivnosti interesovanje sintetskih hemičara za ovu grupu jedinjenja poraslo je s početka 21. veka.

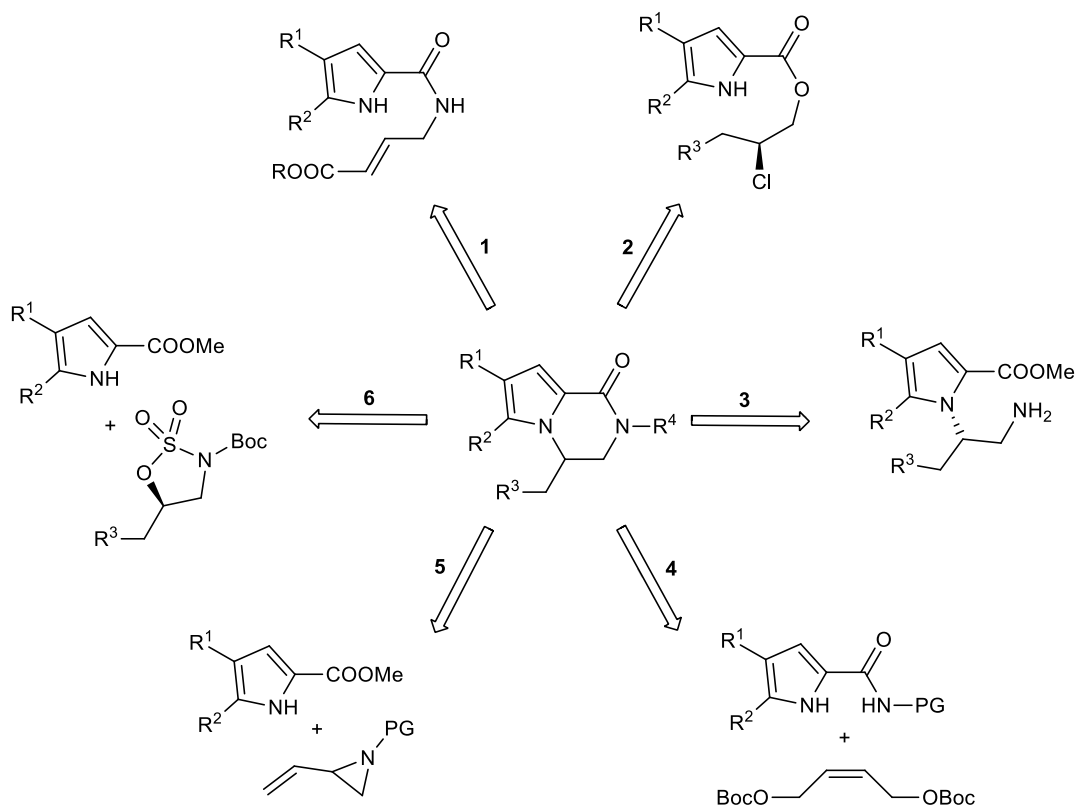
S obzirom da je u biosintetskom smislu najverovatniji prekursor ovih jedinjenja oroidin, osnovni strukturni motiv koji se javlja kod ove grupe jedinjenja je pirol-2-karboksilna kiselina. Nešto ređe je prisutan pirolketopiperazinski skelet koji se javlja kod cikličnog oblika oroidina - ciklooroidina.



**Shema 1.1.** Značajniji predstavnici bromopirolskih alkaloida i njihov zajednički strukturni element – pirolketopiperazinski skelet (crveno).

Pirolketopiperazinski skelet predstavlja važan prekursor u sintezi bromopirolskih alkaloida. Najveći izazov u sintezi ovih jedinjenja je formiranje pirol-2-karboksilnog fragmenta i formiranje hiralne C-N veze. Prethodnih decenija razvijeno je nekoliko različitih pristupa za dobijanje ovog skeleta koji se baziraju na sledećim ključnim reakcijama: intramolekulska aza-Michael-ova adicija

(1),<sup>120</sup> intramolekulska S<sub>N</sub>2 reakcija na sekundarnim alkil-hloridima (2),<sup>121</sup> intramolekulska amidacija (3),<sup>122,123</sup> dvostruko alilno alkilovanje amidopirola (4),<sup>124</sup> asimetrično alilno alkilovanje (5),<sup>125</sup> S<sub>N</sub>2 reakcija na 1,2-ciklični sulfamidat (6)<sup>126</sup> (shema 1.2).

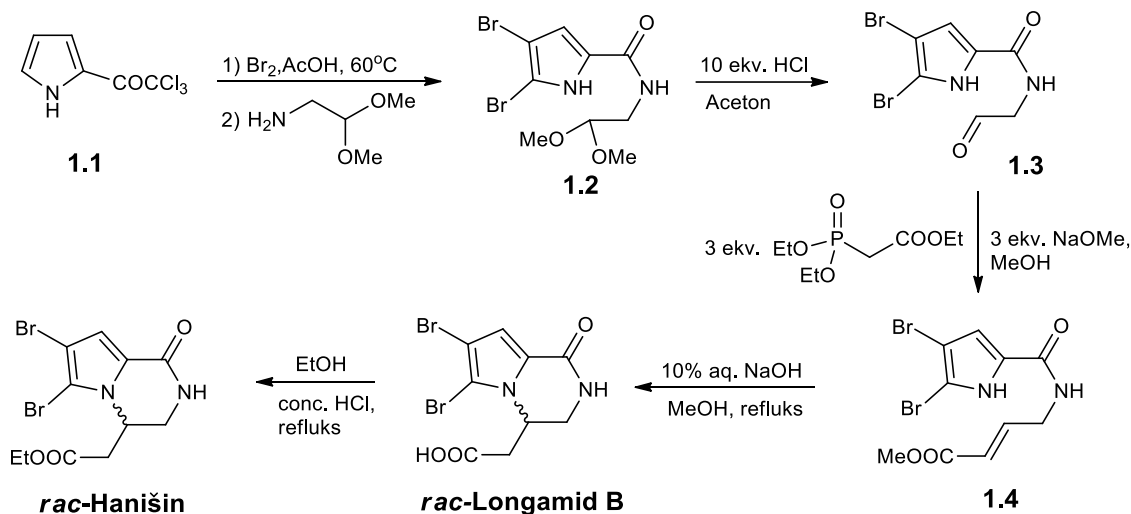


**Shema 1.2.** Pristupi u sintezi pirolCKETOPIPERAZINSKOG skeleta.

### 1.2.1 Intramolekulska aza-Michael-ova adicija

Prva sinteza pirolCKETOPiperazinskog skeleta i nekoliko bromopirolskih alkaloida koji sadrže pomenuti skelet (longamid B i hanišin) izvedena je 1999-te.<sup>120</sup> Reakciona sekvenca koja vodi do bromopirolskih alkaloida prikazana je na **shemi 1.3**.

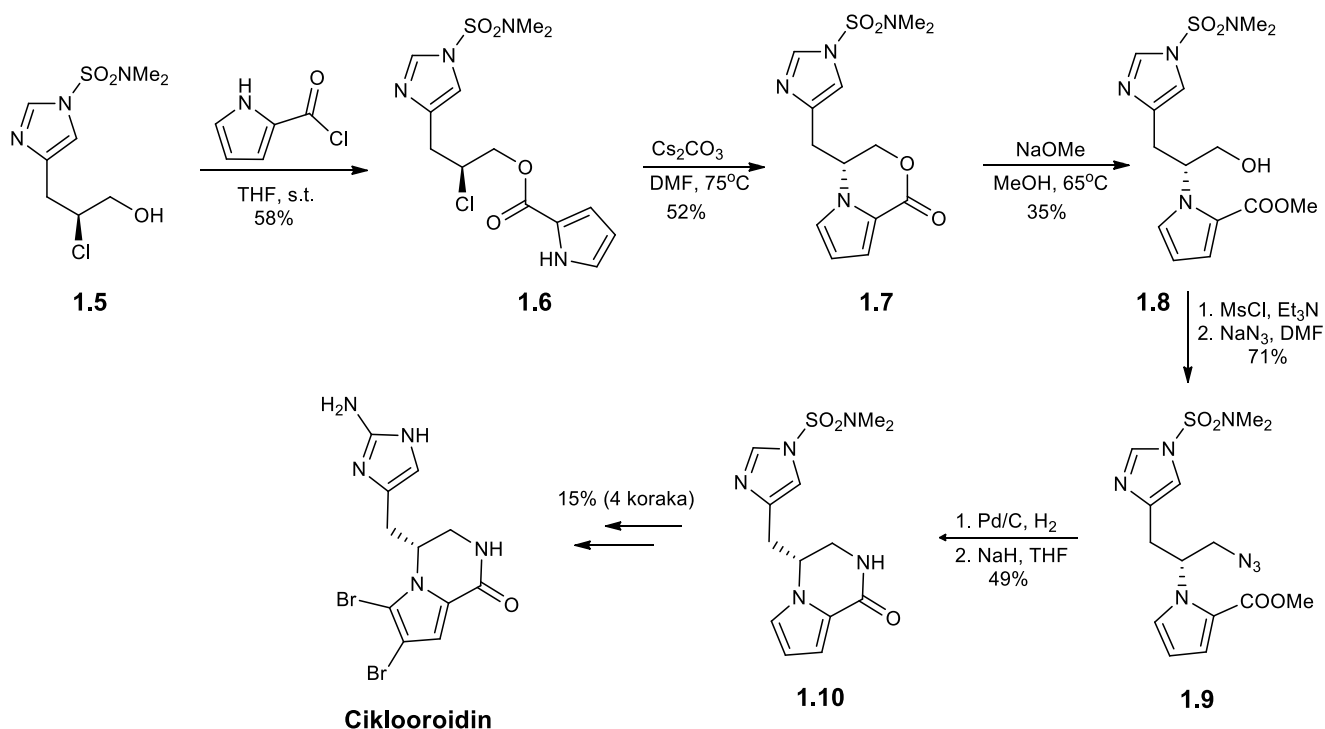
Keton **1.1**, sa dva ekvivalenta Br<sub>2</sub> u sirćetnoj kiselini daje 4,5-dibrom derivat pirola u skoro kvantitativnom prinosu. Dobijeni proizvod preveden je u aldehyd **1.2** korišćenjem dimetil acetala aminoacetaldehida. Produženjem niza Horner-Wadsworth-Emmons-ovom reakcijom i potom intramolekulskom Michael-ovom reakcijom nastalog  $\alpha,\beta$ -nezasićenog estera (**1.4**) dobijen je racemski longamid B. Esterifikacijom longamida dobijen je i racemski hanišin.



**Shema 1.3.** Sinteza hanišina, sa Michael-ovom adicijom kao ključnim korakom.

## 1.2.2 Intramolekulska S<sub>N</sub>2 reakcija na hiralnim sekundarnim alkil-hloridima

U enantiospecifičnoj sintezi ciklooroidina Lovely-ja i saradnika ključna C-N veza formirana je intramolekulskom S<sub>N</sub>2 reakcijom hlorohidrienskog derivata histidina.<sup>121</sup> Ciklizacioni prekursor **1.6** dobijen je acilovanjem derivata histidina pirol-2-karboksilnom kiselinom. Intramolekulska S<sub>N</sub>2 reakcija izvedena je u prisustvu cezijum-karbonata u prinosu od 52 % (**shema 1.4**). Otvaranje laktona i transesterifikacija natrijum-metoksidom dalo je alkohol **1.8** koji je u 2 koraka preveden u azid **1.9**. Redukcijom azida a potom i intramolekulskom amidacijom dobijen je prekursor **1.10** koji je potom u 4 koraka preveden u ciklooroidin.

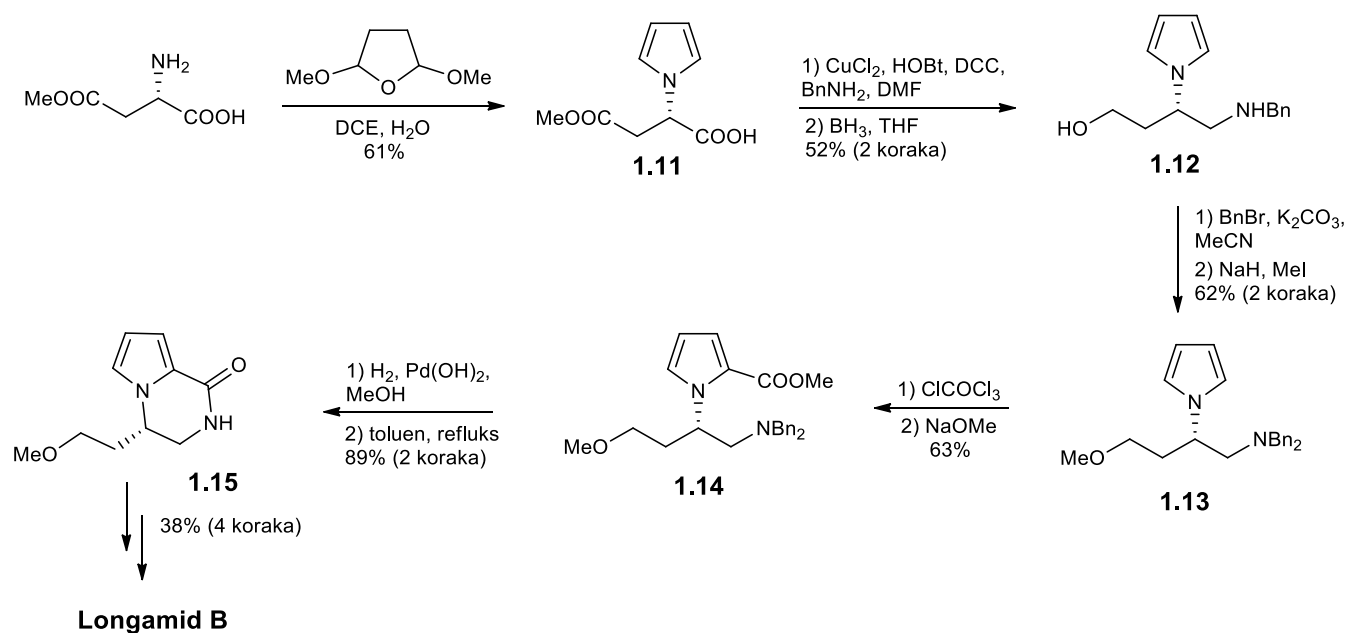


**Shema 1.4.** Sintaza ciklooroidina sa intramolekulskom S<sub>N</sub>2 reakcijom kao ključnim korakom.



### 1.2.3 Intramolekulska amidacija

Strategija Vallee-ja i saradnika zasnivala se na korišćenju molekula iz hiralnog pool-a koji već sadrži hiralsnu C-N vezu, stoga su kao polazno jedinjenje u svojoj sintezi longamida B krenuli iz metil estra L-asparaginske kiseline (**shema 1.5**).<sup>122</sup> Iz ovog molekula su Paal-Knorr-ovom sintezom formirali pirolski prsten koristeći tetrahidro-2,5-dimetoksifuran. Kuplovanjem sa benzilaminom uveden je i drugi azot pirazinskog dela molekula. Redukcijom dobijenog estra i amida bor-hidridom dobijen je amino alkohol **1.12**. Zaštitom nukleofilnih funkcionalnih grupa i Friedel-Crafts-ovim acilovanjem dobijen je derivat pirol-2-karboksilne kiseline **1.14**. Deprotekcijom amina i intramolekulskom amidacijom dobijen je osnovni skelet piroloketopiperazina iz kojeg je potom u 4 koraka dobijen longamid B.

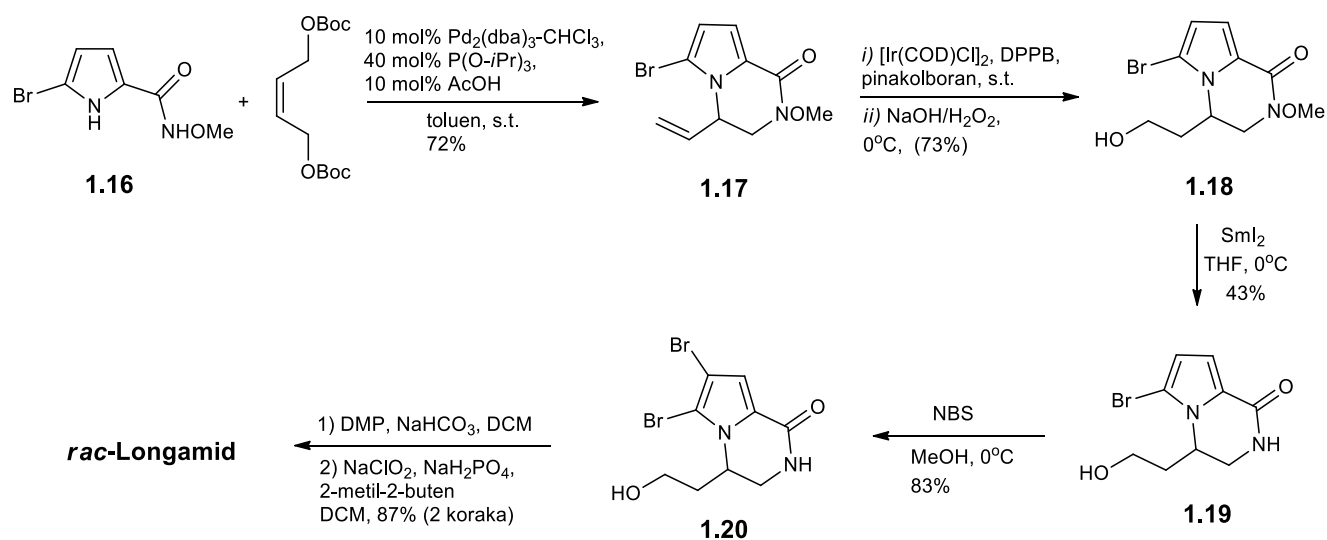


**Shema 1.5.** Sinteza longamida B sa intramolekulskom amidacijom kao ključnim korakom.

### 1.2.4 Dvostruko alilno alkilovanje

Chen i Sun su bazirajući se na Trost-ovom istraživanju paladijumom katalizovanih asimetričnih alilnih alkilacija uspešno izveli dvostruko alilno alkilovanje 2-buten-1,4-diola pirol-2-karboksamidnim derivatom i na taj način formirali pirazinski deo molekula (**shema 1.6**).<sup>124,125</sup> U reakciji ciklizacije jedino je monobrom derivat amidopirola **1.16** davao proizvod **1.17**. Ciklizacija N-benziloksiamido pirola ili dibromopirola davala je smesu regioizomera.

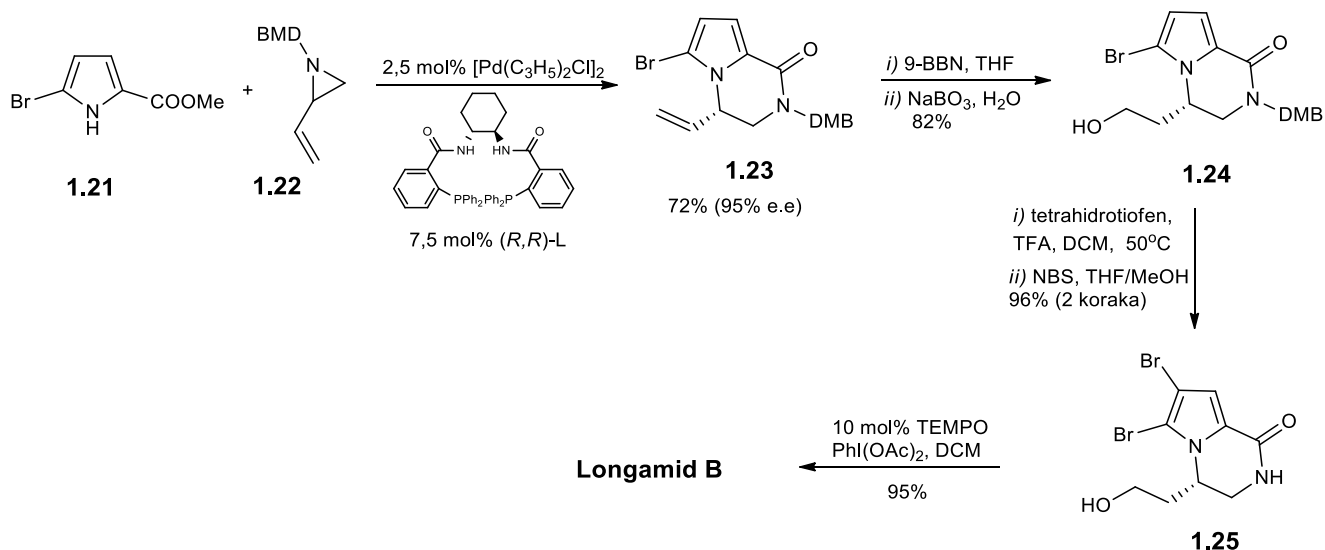
Racemsko jedinjenje **1.17** podvrgnuto je hidroborovanju pomocu 9-BBN-a, međutim umesto ocekivanog hidroborovanja terminalnog alkena, dobijen je proizvod redukcije karbonilne grupe amida. Ovaj problem hemoselektivnosti rešen je hidroborovanjem katalizovanim iridijumom. Oksidacijom proizvoda hidroborovanja vodonik-peroksidom dobijen je alkohol **1.18** u prinosu od 73 %. Deprotekcija amidnog azota samarijum-jodidom urađena je u prinosu od 43 %. Bromovanjem, a potom i oksidacijom primarnog alkohola **1.20** dobijen je racemski longamid B u ukupnom prinosu od 16 %.



**Shema 1.6.** Sinteza rac-longamida sa dvostrukim alilnim alkilovanjem kao ključnim korakom.

### 1.2.5 Asimetrično alilno alkilovanje

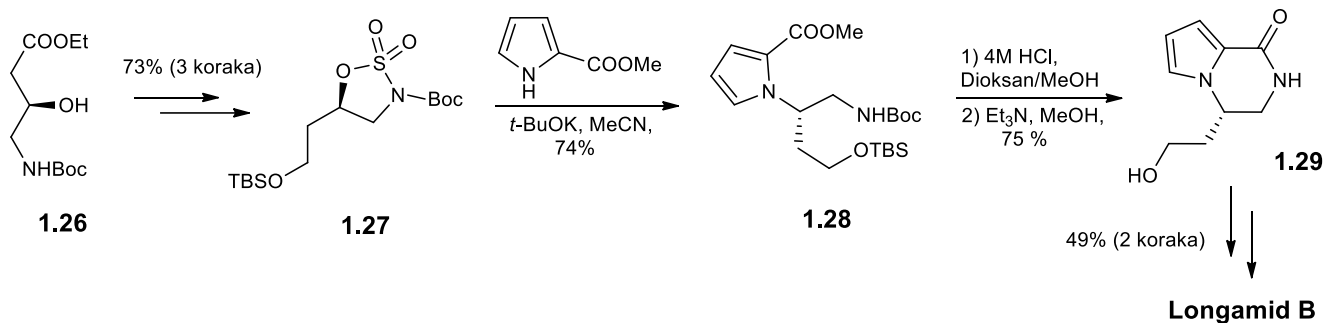
Trost i Dong su 2007. razvili enantioselektivnu metodologiju za formiranje pirolketopiperazinskog skeleta, zasnovanu na anulaciji derivata pirol-2-karboksilne kiseline i vinil aziridina (**shema 1.7**).<sup>125</sup> U reakciji pirolski azot kao nukleofil regioselektivno otvara aziridinski prsten dok estarska grupa služi kao akceptor aziridinskog azota sa kojim potom formira šestočlani laktam. Reakcija anulacije se odvija u prisustvu  $[\text{Pd}(\text{C}_3\text{H}_5)_2\text{Cl}]_2$  i hiralnog katalizatora bez dodatka aditiva. Nakon dobijanja pirolketopiperazinskog derivata **1.23** u prinosu od 72 %, hidrobromovanjem i oksidacijom natrijum-perboratom dobijen je primarni alkohol **1.24** u prinosu od 82 %. Deprotekcija amida, bromovanje i potom oksidacija primarne alkoholne grupe dale su finalni proizvod, longamid B.



**Shema 1.7.** Sinteza longamida B sa simetričnim alilnim alkilovanjem kao ključnim korakom.

### 1.2.6 S<sub>N</sub>2 reakcija na 1,2-ciklični sulfamidat

Shiokawa i saradnici su za konstrukciju pirolCKETOPiperazinskog skeleta primenili ciklične sulfamidate kao glavne prekursore (**shema 1.8**).<sup>126</sup> Nedavno je otkriveno da je ovaj tip jedinjenja pogodan je za sintezu heterocikličnih jedinjenja naročito zbog činjenice da reakciona sekvenca omogućava visok stepen stereokontrole. Ciklični sulfamidat pripremljen je iz amino alkohola **1.26**. Nukleofilna supstitucija na hiralnom ugljeniku 1,2-cikličnog sulfamidata **1.27** u prisustvu *t*-BuOK dala je hiralni derivat pirol-2-karboksilne kiseline **1.28** u prinosu od 74 %. Skidanje boc zaštite i laktamizacija dali su ciljani pirolCKETOPiperazinski skelet. Dobijeni hiralni alkohol **1.29** preveden je u nekoliko koraka do prirodnog proizvoda.



**Shema 1.8.** Sinteza longamida B sa S<sub>N</sub>2 reakcijom kao ključnim korakom.

## 2. NAŠI RADOVI

### 2.1 Sinteza derivata ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija

#### 2.1.1 Uvod

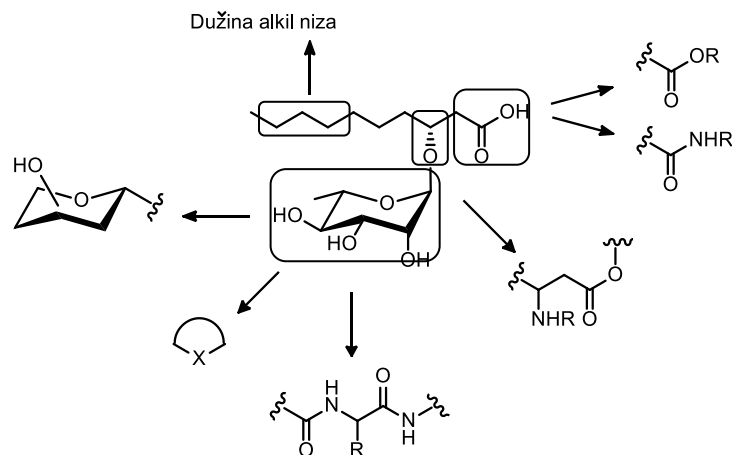
Do nedavno je biološka sinteza praćena sintetskim modifikacijama predstavljala tipičan način istraživanja hemijskog prostora oko ramnolipida. Skorašnji napredak u hemiji ugljenih hidrata učinio je ramnolipide pristupačnijim nego ranije, pa se sa razvojem novih sintetskih puteva pojavio napredak i u SAR studijama ramnolipida. Istraživanja u oblasti sintetskih modifikacija ramnolipida otkrila su relativan značaj pojedinih strukturnih elemenata molekula pa je tako poznato da je šećerna komponenta važna za površinsku aktivnost, dok sa druge strane njena struktura ima mnogo manji uticaj na antimikrobna svojstva. Sa druge strane, struktura lipofilnog fragmenta ima izraženi efekat i na površinski aktivna i na antimikrobna svojstva molekula. S obzirom na pomenute prepreke u komercijalizaciji ramnolipida i njima srodnih molekula od velikog je značaja dalje istraživanje hemijskog prostora oko ovih molekula u cilju pronalaska ekonomski pristupačnijih jedinjenja kao i jedinjenja sa izraženijom antimikrobnom i anti-biofilm aktivnošću.

#### 2.1.2 Cilj

Cilj ovog dela doktorske disertacije je razvoj novih sintetski pristupačnih molekula inspirisanih ramnolipidima koji poseduju visoku površinsku aktivnost i/ili antimikrobna svojstva. Kako bi se ovo postiglo neophodno je ispitati odnos strukture i dejstva sintezom i studijom fizičko-hemijskih i bioloških osobina serije ramnolipidnih analoga. Ovom studijom bilo bi ustanovljeno sledeće:

- 1) Potencijal zamene ramnoze i 3-hidroksikiseline strukturno srodnim fragmentima.
- 2) Profilisanje novih molekula sa fokusom na antimikrobnu aktivnost, površinsku aktivnost i biodegradabilnost.
- 3) Uticaj fizičko-hemijskih parametara na antimikrobnu i antibiofilm aktivnost.

Opšta SAR strategija koja obuhvata modifikacije hidrofilnog i hidrofobnog dela molekula prikazana je na **shemi 2.1**. Zamena ramnoze drugim šećerom predstavljala bi jedan od načina za smanjenje cene proizvodnje molekula ramnolipidnog tipa. Osim toga vršena bi bila i zamena ramnoze heterocikličnim molekulima, zatim malim polarnim molekulima, i naposletku peptidima. Zamena ramnoze peptidima je naročito interesantna sa aspekta antimikrobne i anti-biofilm aktivnosti, osim toga s obzirom na njihovu dostupnost i raznovrsnost, predstavljala bi i odličan način za fino podešavanje fizičko-hemijskih svojstava ovih molekula. Strukturne modifikacije 3-hidroksikiseline obuhvatale bi i zamenu kiseoničnog linkera azotom kao i različitu derivatizaciju karboksilnog kraja. Konačno ispitivan bi bio i efekat povećanja lipofilnosti molekula produženjem alifatičnog niza 3-hidroksikiseline na osobine molekula.



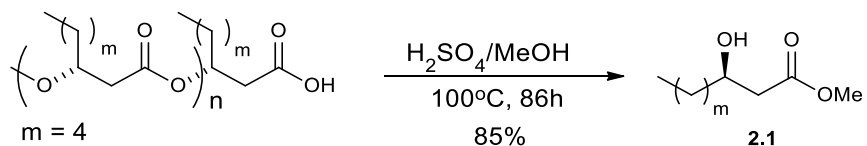
**Shema 2.1.** Strukturne modifikacije ramnolipida ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji.

Kako bi se definisali strukturni elementi neophodni za određena svojstva potrebno je fizičko-hemijski i biološki okarakterisati sintetisana jedinjenja. **Fizičko-hemijska karakterizacija** obuhvata određivanje površinske aktivnosti (CMC, površinski napon, moć penjenja), biodegradabilnost i računarsko izračunavanje particionog koeficijenta i HLB vrednosti. **Biološka karakterizacija** obuhvata određivanje antimikrobnog dejstva (MIC vrednosti za *P. aeruginosa* i *C. albicans*), anti-biofilm dejstva (inhibicija formiranja i rasturanje preformiranog biofilma *P. aeruginosa* i *C. albicans*) i ispitivanje uticaja jedinjenja na međubakterijsku komunikaciju.

### 2.1.3 Sinteza derivata ramnolipida

Sve strukturne modifikacije ramnolipida vršene su u svetlu kreiranja sintetski i ekonomski pristupačnog ili biološki potentnog molekula. Kao polazna tačka za dobijanje sintetskih analoga ramnolipida korišćena je (*R*)-3-hidroksioktanska kiselina. Ovo jedinjenje dostupno je u vidu biopolimera koji se dobija iz *Pseudomonas putida*.<sup>100</sup> Korišćenje ovog prekursora, između ostalog, otvara mogućnost primene zelene hemije u sintezi ramnolipidnih derivata.

Metanolizom PHA polimera na 100°C, nakon 86 h dobijen je metil-estar (*R*)-3-hidroksioktanske kiseline **2.1** u prinosu od 85 % (**shema 2.3**). Gasnom hromatografijom potvrđena je čistoća proizvoda (98 %), a polarimetrijom je potvrđeno da se radi o (*R*) stereoisomeru.

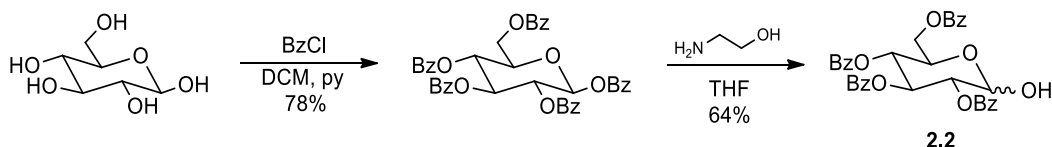


**Shema 2.2.** Metanoliza PHA polimera.

#### 2.1.3.1 Zamena ramnoze drugim šećerima

S obzirom na strukturnu sličnost logičan prvi korak u derivatizaciji ramnolipida bila je zamena ramnoze ekonomski pristupačnijim šećerima. Osim toga niz prethodnih istraživanja sugerise na mali uticaj stereochemije šećerne komponente na biološku aktivnost pa bi hipotetički zamena ramnoze očuvala biološku i površinsku aktivnost matičnog molekula.<sup>61,112,113,114</sup> Kao zamena za ramnozu korišćene su glukoza, laktoza i glukozamin.

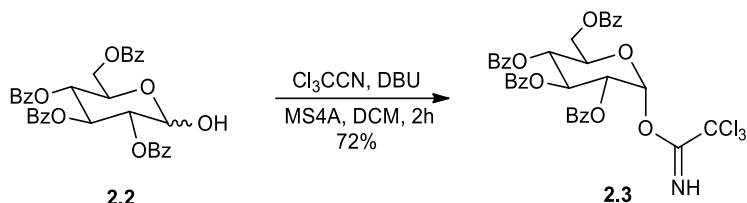
Za uvođenje šećerne komponente bilo je neophodno formirati glikozidnu vezu između šećerne komponente i OH grupe lipofilnog fragmenta **2.1**. Metode glikozidacije se uglavnom zasnivaju na sintezi reaktivnog glikozil donora, a potom njegovoj aktivaciji uz pomoć promotera ili katalizatora pri čemu se u prisustvu odgovarajućeg akceptora formira glikozidna veza. Jedna od najpouzdanijih metoda glikozidacije je trihloracetimidatna metoda.<sup>127</sup> U ovoj metodi se kao glikozil donor koristi trihloracetimidatni derivat šećera. Za sintezu ovog glikozil donora bilo je neophodno sintetisati zaštićeni derivat glukoze **2.2** (**shema 2.4**).



**Shema 2.4.** Prva faza pripreme glikozil donora.

Za zaštitu šećera iskorišćena je benzoil zaštitna grupa s obzirom da se selektivno može ukloniti sa anomerne OH grupe u prisustvu etanolamina. Osim toga benzoil-zaštita bi u procesu glikozidacije trebala da spreči nastajanje smese anomera s obzirom na njen participirajući efekat. Na ovaj način favorizuje se nastajanje  $\beta$ -anomera.<sup>128</sup>

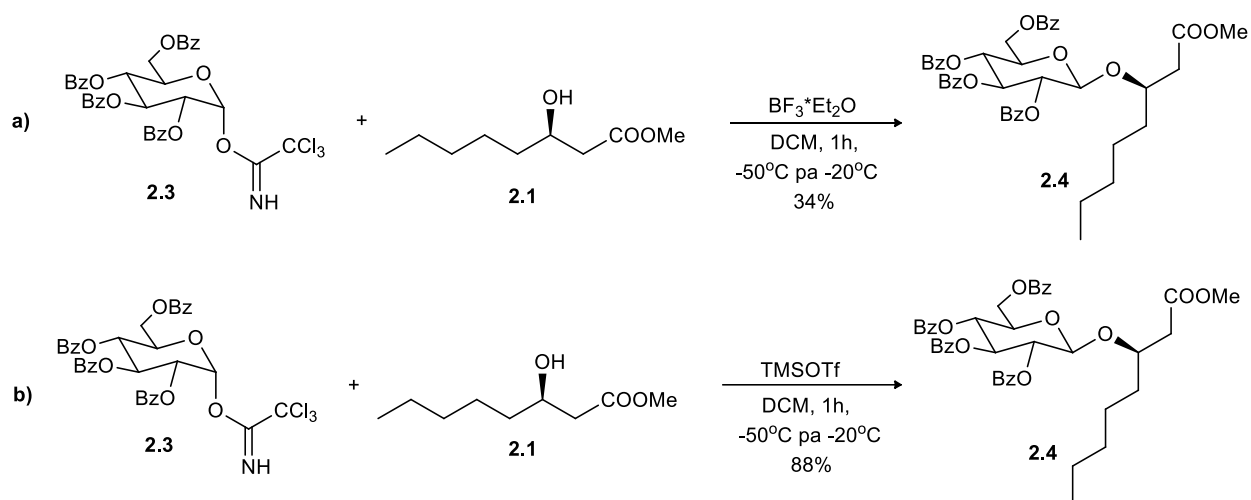
Poznato je da se na trostruku vezu elektron deficitarnih nitrila lako mogu adirati O-nukleofili pri čemu se dobijaju imidati. U slučaju zaštićene glukoze **2.2**, u prisustvu trihloracetonnitrila i DBU nakon 2h dobijen je isključivo  $\alpha$ -anomer trihloracetimidata **2.3** u prinosu od 72 % (**shema 2.5**).



**Shema 2.5.** Priprema glikozil donora.

Mada su trihloracetimidati poznati po većoj stabilnosti od ostalih glikozil donora, za uspešno izolovanje jedinjenja **2.3** hromatografijom na koloni bilo je neophodno primeniti eluent koji sadrži 0,5 % Et<sub>3</sub>N kako bi se sprečila hidroliza trihloracetimidata.

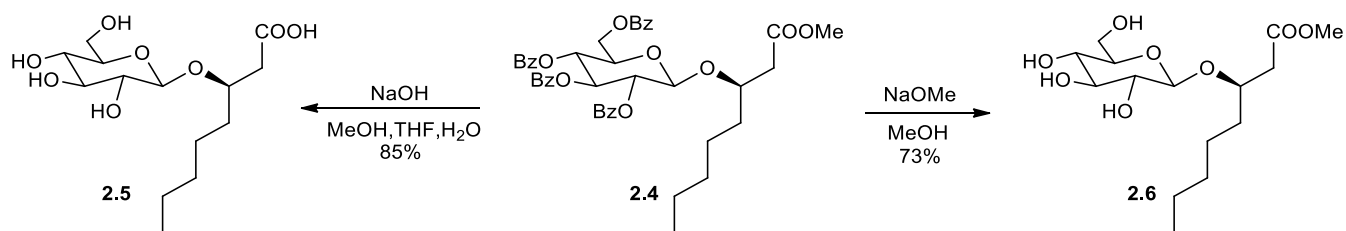
S obzirom na malu baznost trihloroacetamida koji se oslobađa u reakciji glikozidacije, Lewis-ova kiselina koja se primenjuje za aktivaciju trihloracetimidata može se primeniti u katalitičkoj količini, što je značajna prednost u odnosu na Koenigs-Knorr-ovu metodu gde se ponekada koristi i po 4 ekvivalenta promotera (Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, AgOTf itd.). Upravo zbog blagih uslova reakcije ova metoda je danas jedna od najkorišćenijih. Dve najčešće korišćene Lewis-ove kiseline u reakciji glikozidacije sa trihloracetimidatima su BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O i TMSOTf. U cilju pronalaženja optimalnih uslova ove ključne reakcije ispitana su obe Lewis-ove kiseline u katalitičkoj količini od 0,1 ekv (**shema 2.6**).



**Shema 2.6.** Glikozidacija u prisustvu **a)**  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  odnosno u prisustvu **b)** TMSOTf.

U reakciji katalizovanoj  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -om, nakon 1h na TLC-u je bilo primetno još polaznog imidata, međutim i nakon produženja vremena reakcije situacija se nije promenila. Izolovan prinos u reakciji katalizovanoj bor-trifluoroetereatom bio je svega 34 % (**shema 2.6 a**). Sa druge strane u reakciji katalizovanoj TMSOTf-om nakon 1h izreagovala je sva količina imidata i izolovano je jedinjenje **2.4** u prinosu od 88 % (**shema 2.6 b**). U oba slučaja dobijen je isključivo  $\beta$ -anomer što je potvrđeno korelacijama 1,3-diaksijalnih H atoma u ROESY spektru. Ovakav stereohemijski ishod se može pripisati efektu participirajuće zaštitne grupe u položaju  $\text{C}_2$ , što je potkrepljeno i literaturnim podacima koji sugerišu da u kontroli stereohemije anomernog položaja dominantnu ulogu igra zaštitna grupa u položaju  $\text{C}_2$ .<sup>127</sup>

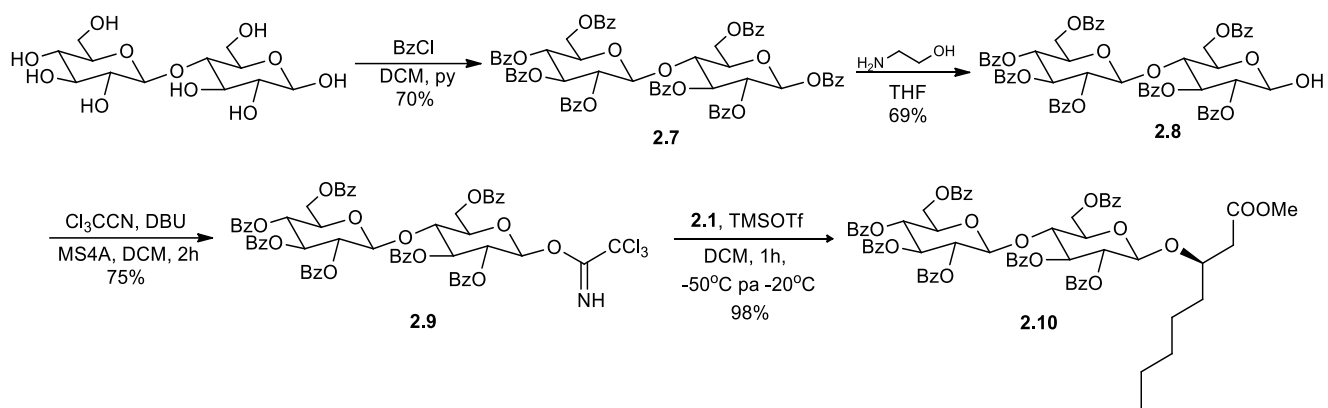
Kako bi se ispitaio uticaj kiselosti i povećane polarnosti na biološke i fizičko-hemijske osobine molekula izvršena je potpuna deprotekcija jedinjenja **2.4** natrijum-hidroksidom pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.5**, ali i selektivna deprotekcija benzoil grupa šećerne komponente natrijum-metoksidom pri čemu je dobijen metil ester **2.6** (**shema 2.7**).



**Shema 2.7.** Deprotekcija proizvoda glikozidacije **2.4**.

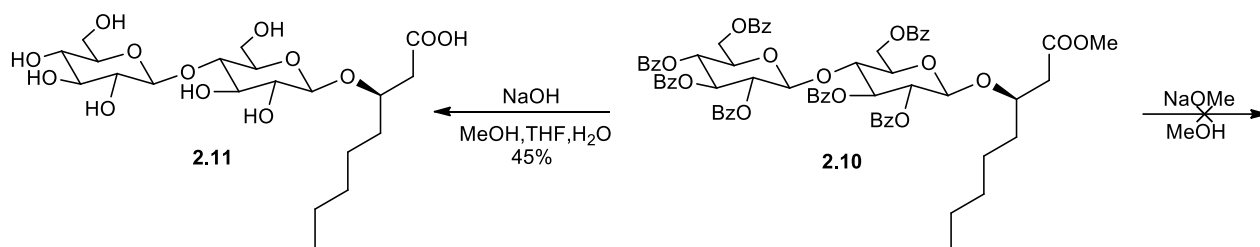
Zamenom ramnoze laktozom postiže se značajno povećanje polarnosti i uvodi disaharidni fragment koji se u istraživanjima Shetye-a i saradnika ispostavio kao ključan za oponašanje funkcije ramnolipida kod *P. aeruginosa*.<sup>113,114</sup> Korišćena je ista sekvenca reakcija kao i u sintezi derivata glukoze (**shema 2.8**). Ključni korak glikozidacije izveden je uz skoro kvantitativan prinos.





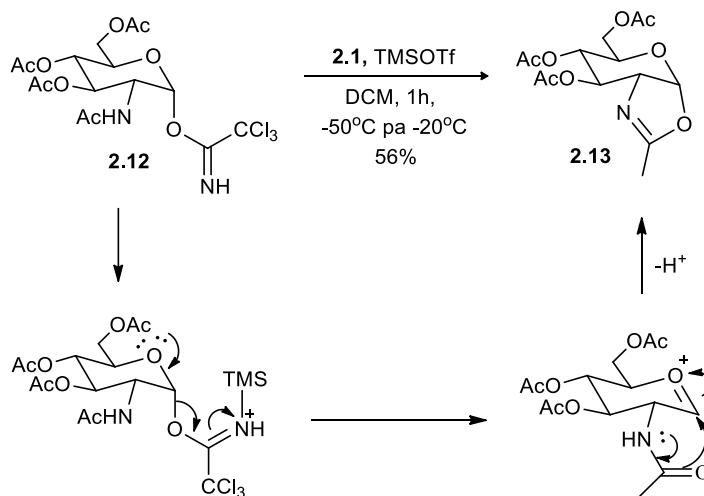
**Shema 2.8.** Sinteza laktoznog analoga ramnolipida.

Skidanje svih zaštitnih grupa laktoznog derivata **2.10** natrijum-hidroksidom izvedeno je u srednjem prinosu od 45 % usled poteškoća u izolovanju jako polarnog proizvoda **2.11**. Selektivno skidanje benzoil zaštite bilo je neuspešno, ponovo usled teškog izolovanja proizvoda (**shema 2.9**).



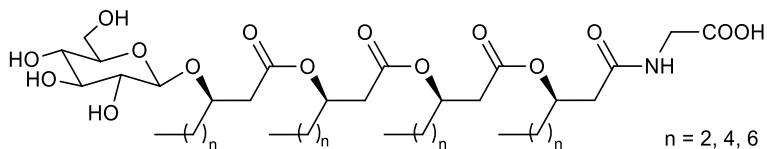
**Shema 2.9.** Deprotekcija laktoznog analoga ramnolipida.

U cilju sinteze derivata glukozamina, sličnim setom reakcija sintetisan je glikozil donor **2.12**. U reakciji glikozidacije sa metil estrom 3-hidroksikiseline (**2.1**) u prisustvu  $\text{TMSOTf}$ , međutim, umesto očekivanog ramnolipidnog analoga dobijen je proizvod **2.13**. Ovaj sporedni proizvod poznat je u literaturi i najverovatnije se dobija intramolekulskom  $\text{S}_{\text{N}}1$  reakcijom usled povećane nukleofilnosti obližnjeg kiseonika amidne funkcionalne grupe (**shema 2.10**).



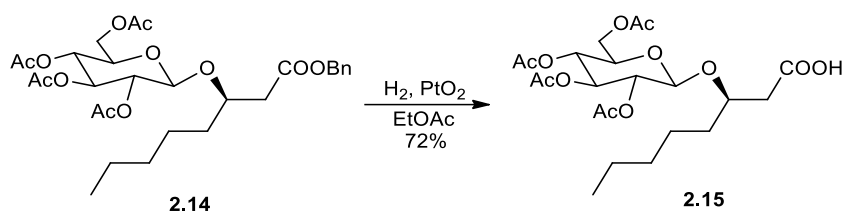
**Shema 2.10.** Intramolekulska ciklizacija glikozil donora pri uslovima za glikozidaciju.

U literaturi je takodje poznat glikolipid po strukturi sličan ramnolipidima izolovan iz bakterije *Alcanivorax borcumensis* (**slika 1**).<sup>129</sup> Ovaj glikolipid pokazuje površinsku aktivnost u rangu ramnolipida ( $\gamma = 29 \text{ nM/m}$ , CMC = 50 mg/L) i povezan je sa ubrzanom degradacijom alkana kod naftnih izliva.<sup>129,130</sup> U cilju ispitivanja svojstava analoga ramnolipida okrenuli smo se i sintezi ovog srodnog molekula. Kako bi se ispitaio uticaj broja lipofilnih fragmenata pristupljeno je linearnoj sintezi, i to sa početkom od glikozidacije jednog lipidnog fragmenta za kojom bi potom sledila esterifikacija karboksilnog dela hidrosikiselinama i ispitivanje fizičko-hemijskih svojstava svakog sintetisanog prekursora.



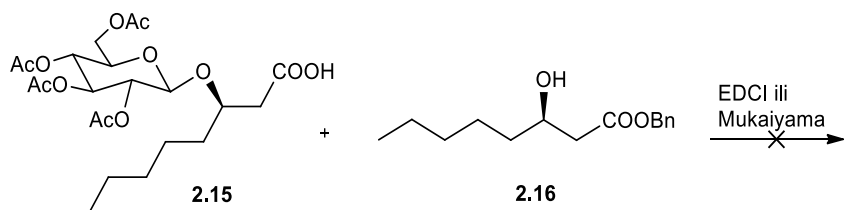
**Slika 1.** Glikolipid *Alcanivorax borcumensis*-a

Glikozid **2.14** dobijen je prethodno opisanim metodama, s tim da je umesto metil estra korišćen benzil estar 3-hidroksi oktanske kiseline kako bi se omogućila selektivna deprotekcija karboksilne kiseline i potom njena dalja funkcionalizacija (**shema 2.11**).



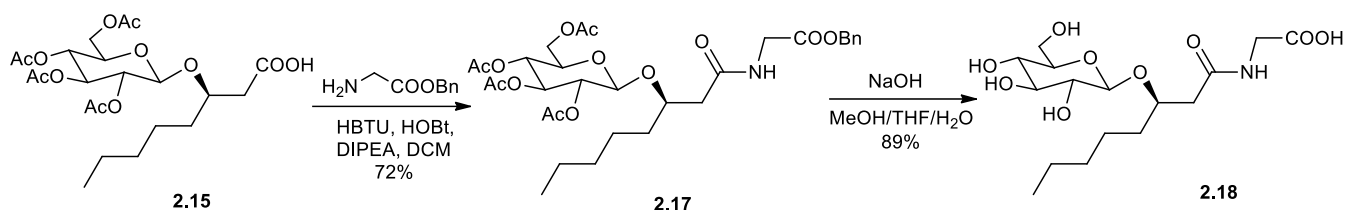
**Shema 2.11.** Selektivna deprotekcija benzil estra glikozida **2.14**.

Dodavanje narednog alifatičnog lanca međutim završilo se neuspehom i nakon nekoliko različitih pokušaja koristeći EDCI kao kuplujući reagens ili Mukaiyama reagens (**shema 2.12**).



**Shema 2.12.** Pokušaji esterifikacije glikozida **2.15**.

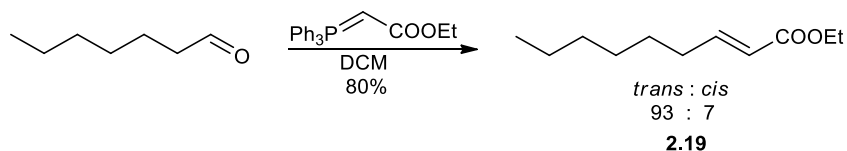
Za razliku od kuplovanja sa alkoholom, kuplovanje sa aminom (benzil estrom glicina) izvršeno je uspešno u prisustvu HBTU i HOBt u prinosu od 72 % (**shema 2.13**). Deprotekcijom u narednom koraku dobijen je aminokiselinski derivat **2.18**.



**Shema 2.12.** Sinteza aminokiselinskog analoga **2.18**.

### 2.1.3.2 Varijacija linkera i zamena ramnoze heterociklusima

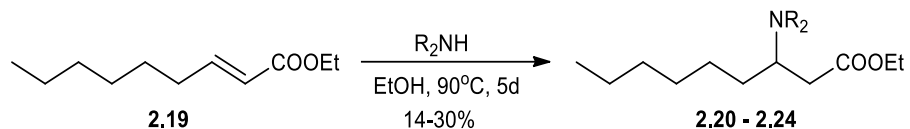
U cilju modifikacije linkera osmišljena je strategija koja se zasniva na Michael-ovoj reakciji. Odgovarajući akceptor **2.19** dobijen je Wittig-ovom reakcijom iz heptanala u prinosu od 80 % (**shema 2.19**).



**Shema 2.19.** Sinteza Michael-ovog akceptora **2.19**.

Kao nukleofili u Michael-ovoj reakciji korišćeni su različiti amini (**tabela 2.1**). U cilju oponašanja strukture šećera korišćen je glukozamin, ali i morfolin kako bi se ispitaio značaj samog cikloheksanskog skeleta na biološku aktivnost jedinjenja s obzirom na literaturne podatke koji pokazuju da biološka aktivnost ne zavisi previše od tipa šećerne komponente. Pored toga ispitana je i zamena šećera aminima voluminoznim aromatičnim ili heterocikličnim supstutentima poput pikolilamina, benzilamina i triptamina (proizvodi **2.21**, **2.22** i **2.23**) koji su po veličini slični šećernom fragmentu ali ne i po lipofilnosti i kiselosti/baznosti. I na kraju zamena šećerne komponente malim polarnim molekulima kao što su etanolamin (ispitivanje neutralne polarne grupe) i aminokiselina sa slobodnom karboksilnom grupom (ispitivanje kisele polarne grupe).

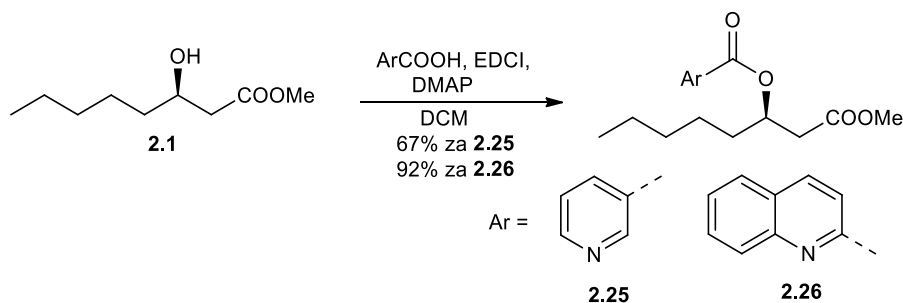
**Tabela 2.1.** Sinteza ramnolipidnih analoga Michael-ovom adicijom.



Šifra proizvoda	R <sub>2</sub> NH	Proizvod	Prinos (%)
/		/	/
<b>2.20</b>			14
<b>2.21</b>			22
<b>2.22</b>			30
<b>2.23</b>			15
<b>2.24</b>			14
/		/	/

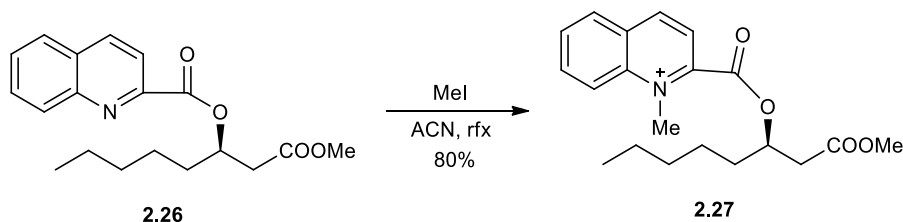
Michael-ova adicija se odvijala 5 dana na temperaturi ključanja etanola. Prinosi u reakcijama bili su niski (14-30 %) bez obzira na dugo reakciono vreme, što najverovatnije može biti pripisano akceptorskim osobinama konjugovanog alkena ili mogućnosti odvijanja reverznog procesa. Glukozamin i metil ester glicina nisu dali proizvod adicije ni nakon nekoliko pokušaja.

Drugi način zamene šećerne komponente heterociklusima je esterifikacija hidroksilne grupe. U ovoj strategiji korišćena je hidroksikiselina dobijena iz polimera tako da i stereochemija odgovara prirodnom proizvodu. U esterifikaciji su korišćene nikotinska kiselina i hinolin-2-karboksilna kiselina (**shema 2.20**).



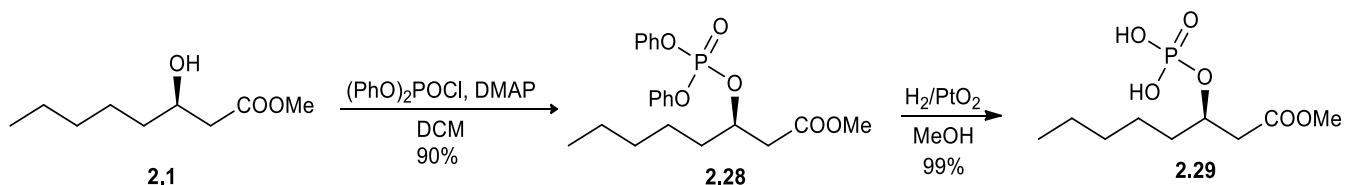
**Shema 2.20.** Zamena šećerne komponente heterociklusima.

Kvaternizacijom jedinjenja **2.26** u DCM-u dobijeno je jedinjenje **2.27** u prinosu od 80% (**shema 2.21**).



**Shema 2.21.** Kvaternizacija heterocikličnog derivata **2.26**.

Konačno u cilju ispitivanja još jedne polarne kisele funkcionalne grupe na mestu šećerne komponente uvedena je i fosfatna funkcionalna grupa. Fosfatna grupa uvedena je pravljjenjem fosfatnog estra alkohola **2.1** sa difenilfosforilhloridom i potom kvantitativnom hidrogenolizom fenil grupa u metanolu (**shema 2.22**).

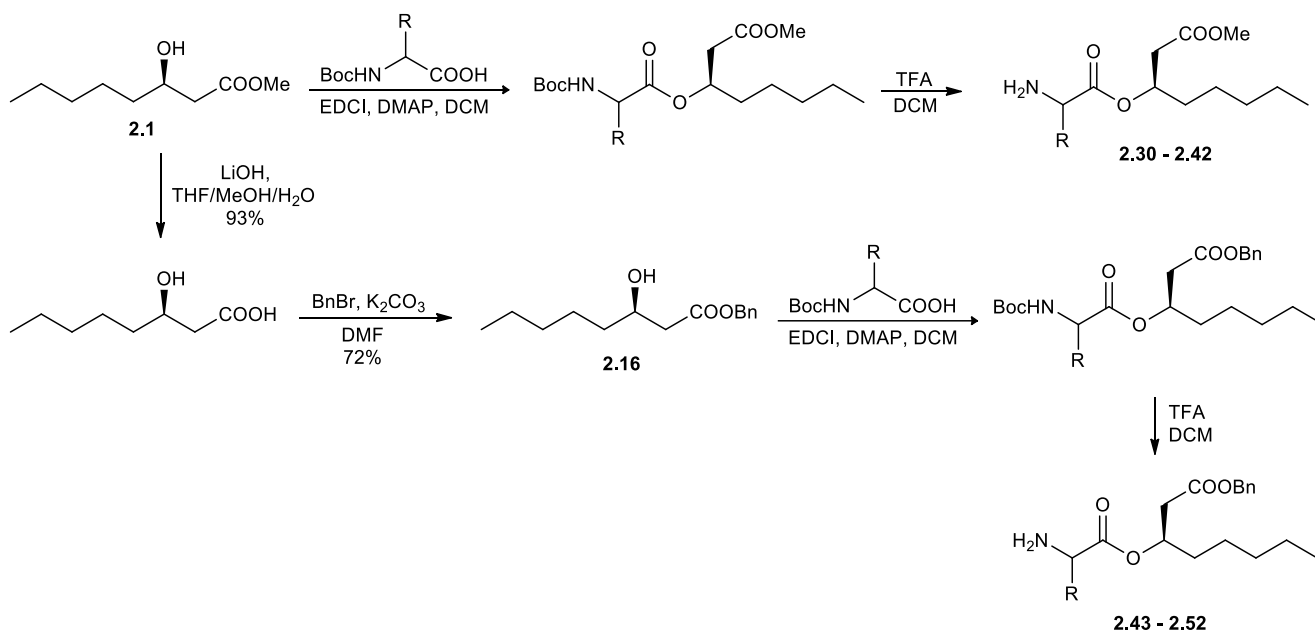


**Shema 2.22.** Sinteza fosfatnog estra.

### 2.1.3.3 Zamena ramnoze aminokiselinama i peptidima

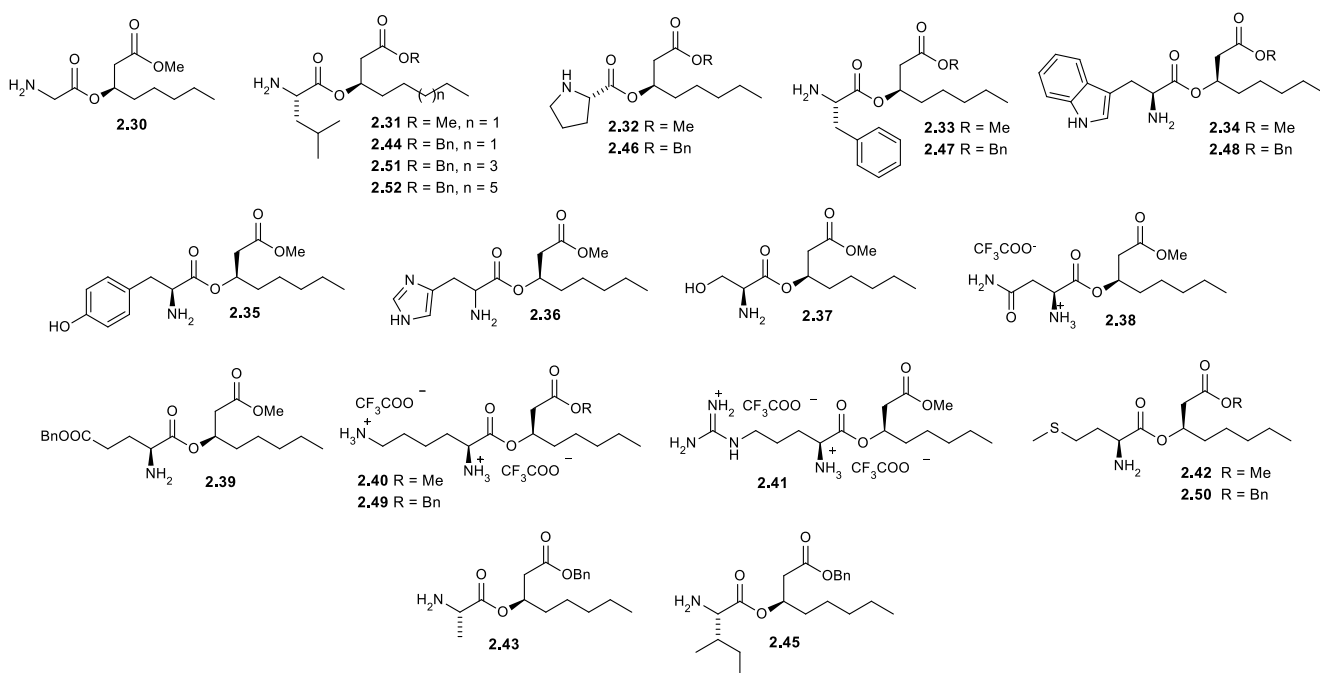
S obzirom na poznate strukturne modifikacije soforolipida aminokiselinama koje su rezultovale potentnim antimikrobnim derivatima, jedna od ideja uključivala je i zamenu čitave šećerne komponente ramnolipida aminokiselinama.<sup>109</sup> Ovaj pristup ima osnovu i u činjenici da ogroman broj peptida i lipopeptida pokazuje antimikrobna svojstva i još važnije, čest strukturni motiv biološki aktivnih lipopeptida je upravo 3-hidroksikiselinski fragment.<sup>9,10,93,94</sup> Zahvaljujući pristupačnosti i raznovrsnosti aminokiselina moguće je racionalno dizajnirati nova jedinjenja koja bi unapredila biološka ili fizičko-hemijska svojstva ramnolipida.

Sinteza aminokiselinskih derivata ramnolipida prikazana je na **shemi 2.23**. Osnovni gradivni blok, jedinjenje **2.1**, dobijeno je metanolizom bakterijski proizvedenog PHA polimera. Metil ester **2.1** iskorišćen je za sintezu benzil estara **2.16**. Inicijalni set aminokiselinskih derivata dobijen je korišćenjem boc-zaštićenih aminokiselina i EDCI kao kupljućeg reagensa. Za razliku od dicikloheksilkarbodiimida (DCC) koji u reakciji kuplovanja daje kao sporedni proizvod u dihlormetanu rastvornu dicikloheksilureu koja se teško uklanja pri obradi reakcije, EDCI daje kao sporedni proizvod u vodi rastvoran derivat uree koji se lako uklanja ekstrakcijom. Nakon kuplovanja deprotekcija dobijenih estara izvršena je standardnom procedurom pomoću trifluorosirćetne kiseline pri čemu su dobijeni aminokiselinski derivati prikazani na **slici 2**.



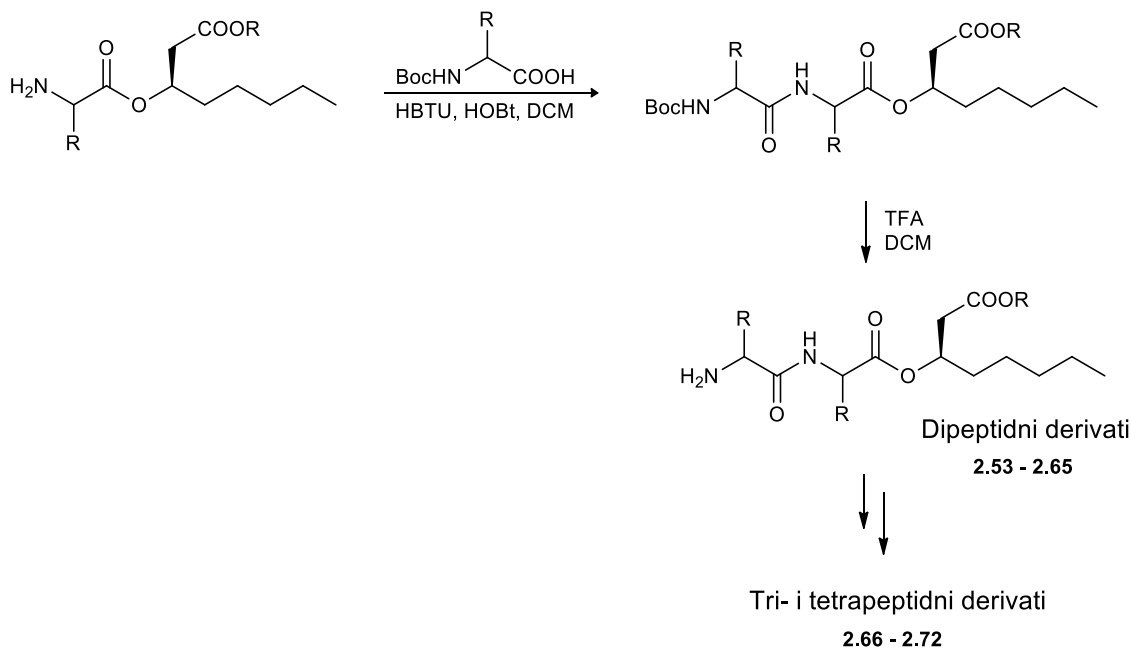
**Shema 2.23.** Sinteza aminokiselinskih derivata ramnolipida.

Aminokiseline su selektovane tako da pokrivaju sve klase ovih jedinjenja (polarni, nepolarni, pozitivno i negativno naelektrisani ostaci). Na ovaj način ispitao bi se čitav opseg fizičko-hemijskih karakteristika. Inicijalni set sintetisanih aminokiselinskih derivata **2.30-2.52**, prikazan je na **slici 2**.

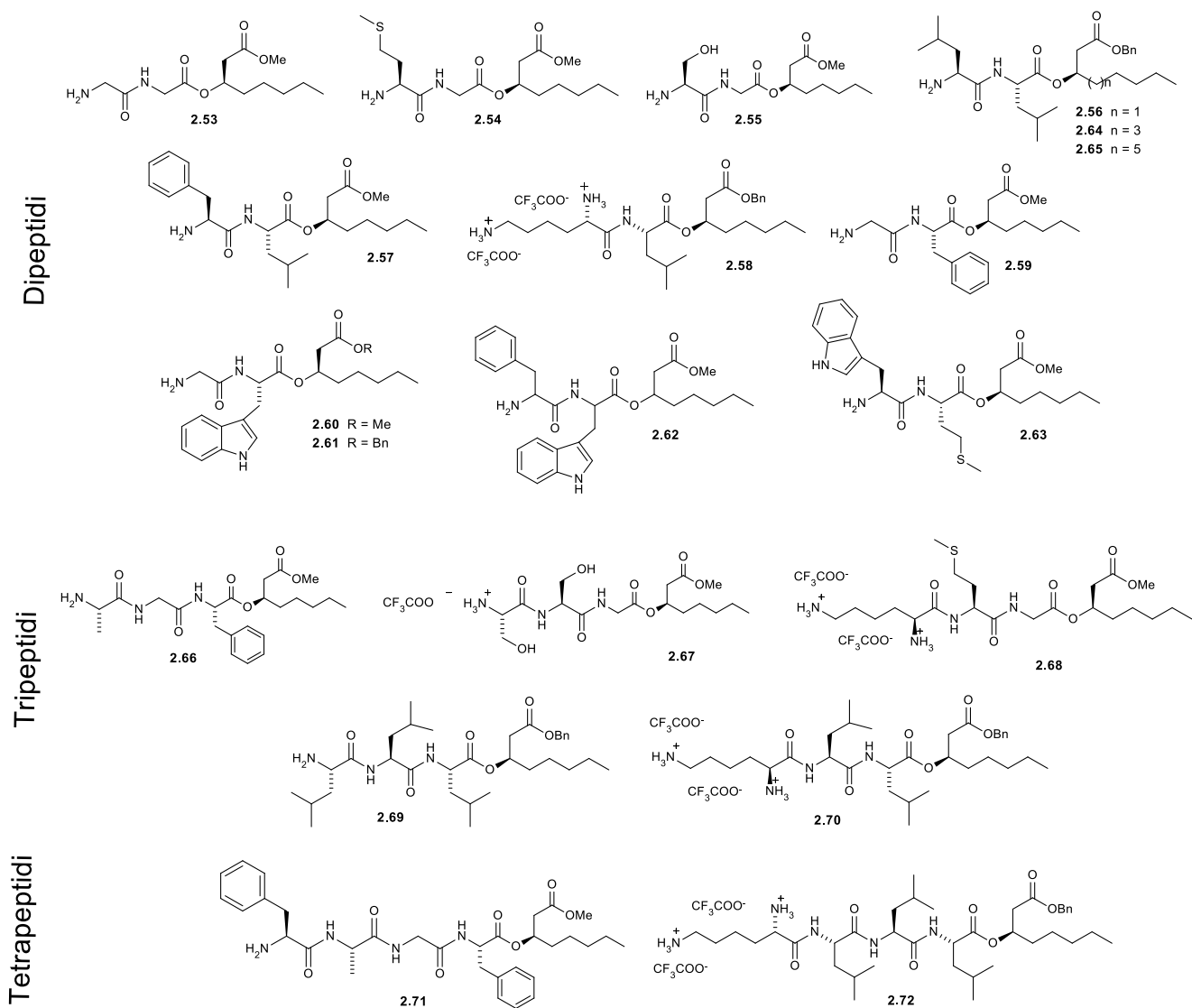


**Slika 2.** Aminokiselinski derivati ramnolipida.

U cilju pronalaženja optimalne dužine peptidnog niza i tipa aminokiselinskih ostataka izvršena je i sinteza di, tri i tetrapeptidnih derivata (**shema 2.24**). U sintezi je korišćen HBTU kao kuplujući reagens uz dodatak HOBT-a kao nukleofilnog katalizatora i reagensa za sprečavanje racemizacije aminokiselina.



**Shema 2.24.** Sintaza peptidnih derivata ramnolipida.

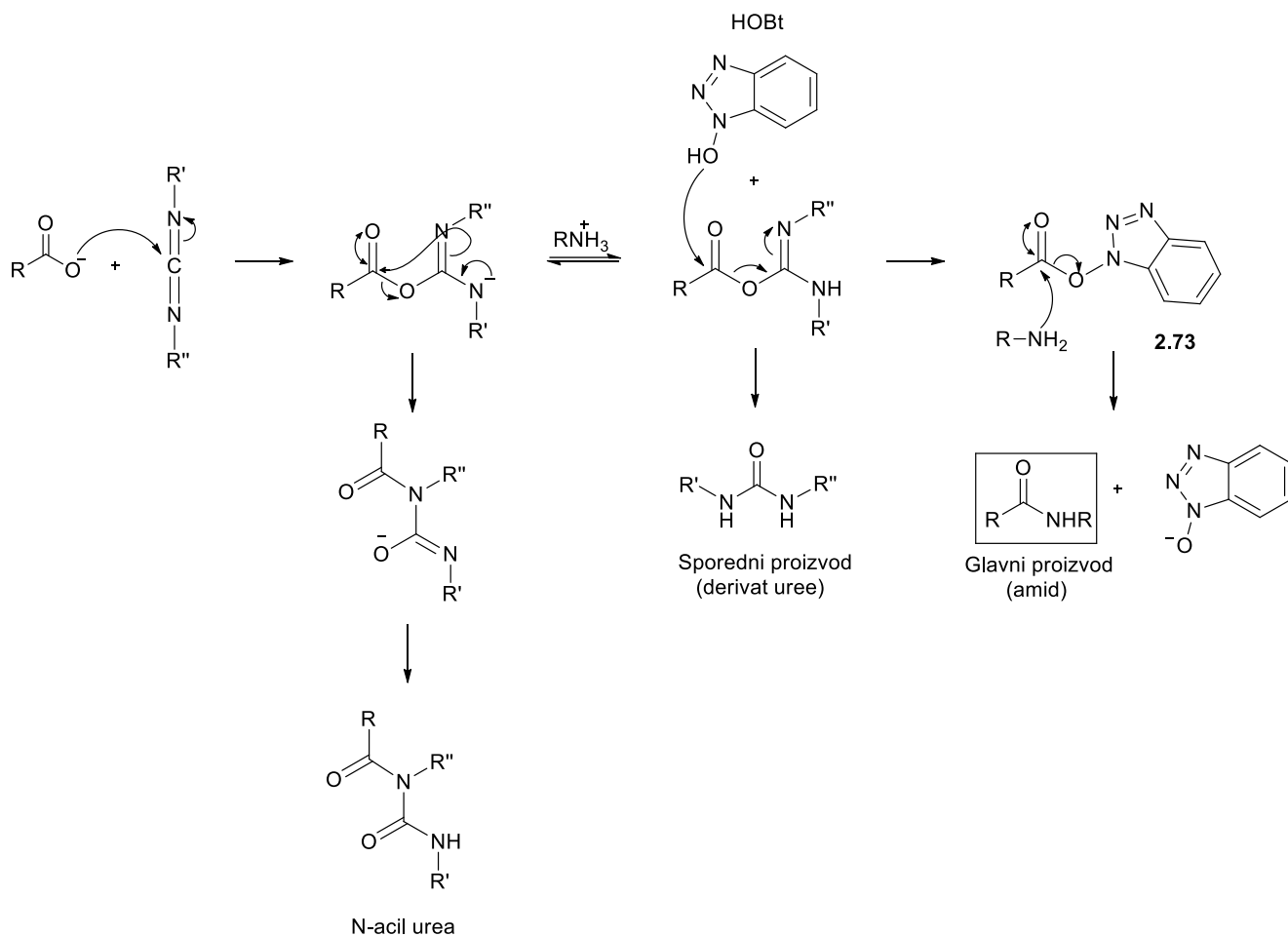


**Slika 3.** Peptidni derivati ramnolipida.

Jedan od problema koji se javio u sintezi peptidnih derivata ramnolipida je nastajanje dijastereoizomera (jedinjenja **2.36** i **2.62**). S obzirom na prisustvo hiralnog centra u  $\alpha$ -položaju do karboksilne grupe, aminokiseline lako mogu izomerizovati, naročito u baznim uslovima u kojima se reakcije kuplovanja inače odvijaju. Osim toga reakcija kuplovanja neretko je praćena formiranjem nereaktivne N-acil uree. Ova sporedna reakcija u velikoj meri može umanjiti prinos kuplovanja. Jedan od načina za smanjenje opsega racemizacije ali i sporedne reakcije je dodatak HOBt-a ili DMAP-a. Mehanizam kuplovanja zajedno sa pratećim sporednim reakcijama prikazan je na **shemi 2.25**. U baznoj sredini karboksilatni anjon napada centralni C-atom karbodiimida pri čemu se generiše anjon *O*-acil izouree. Ovaj anjon može reagovati intermolekulski sa acilujućim reagensom. Osim toga moguća je i prikazana intramolekulska reakcija u kojoj nastaje nereaktivna N-acil urea. Dodatkom nukleofila (HOBt ili DMAP) kompetitivna reakcija nukleofilne adicije-eliminacije odvija se brže od pomenutih acil transfera pa se dobija reaktivan intermedijer **2.73**.

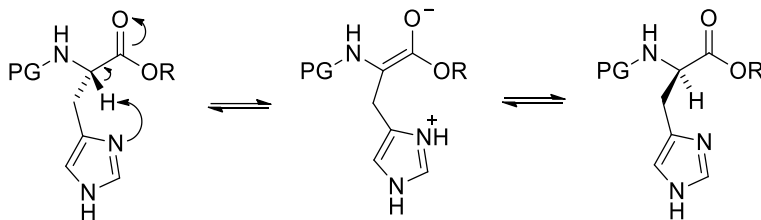


Dakle, osim što umanjuju stepen racemizacije HOBt i DMAP takođe imaju ulogu nukleofilnog katalizatora koji ubrzava glavnu reakciju i sprečava nastajanje sporednog proizvoda N-acil uree.



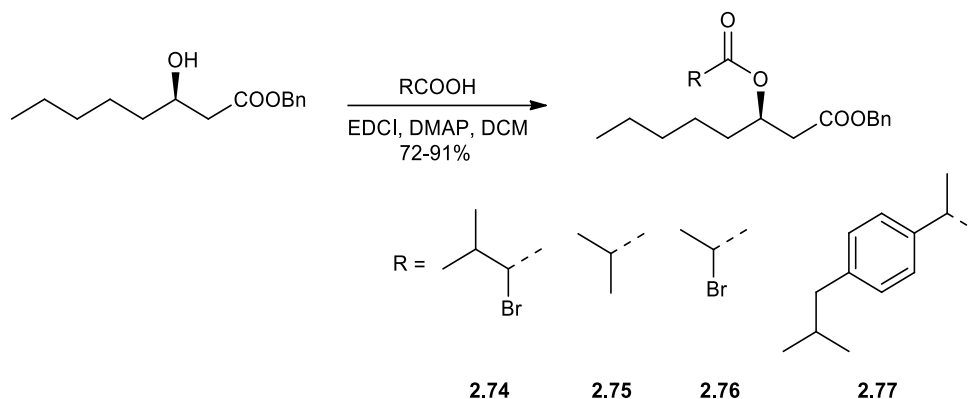
**Shema 2.25.** Mehanizam kuplovanja i uloga HOBt-a.

I pored upotrebe HOBt-a jedinjenja **2.36** i **2.62** su izomerizovala. Jedinjenje **2.36** je derivat histidina za koji je poznato da lako izomerizuje zahvaljujući baznom imidazolskom azotu (**shema 2.26.**).<sup>131</sup>



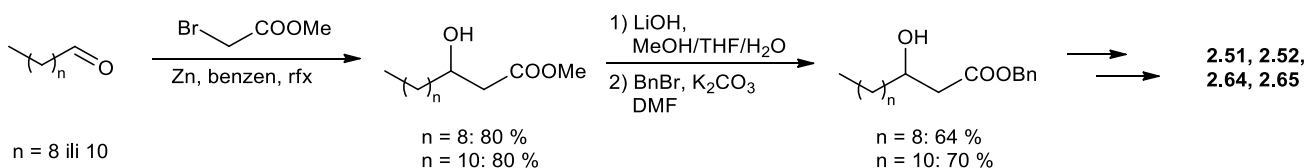
**Shema 2.26.** Mehanizam racemizacije histidina (prilagođeno iz reference 131).

S obzirom na strukture najaktivnijih derivata (leucinski derivati **2.44** i **2.56**) (videti ispod), sintetisani su i estarski derivati alifatičnih kiselina ili njihovih halogenih derivata sličnih sternih karakteristika leucinu (jedinjenja **2.74** - **2.77**) kako bi se ispitaio značaj amino grupe (**Shema 2.27**).



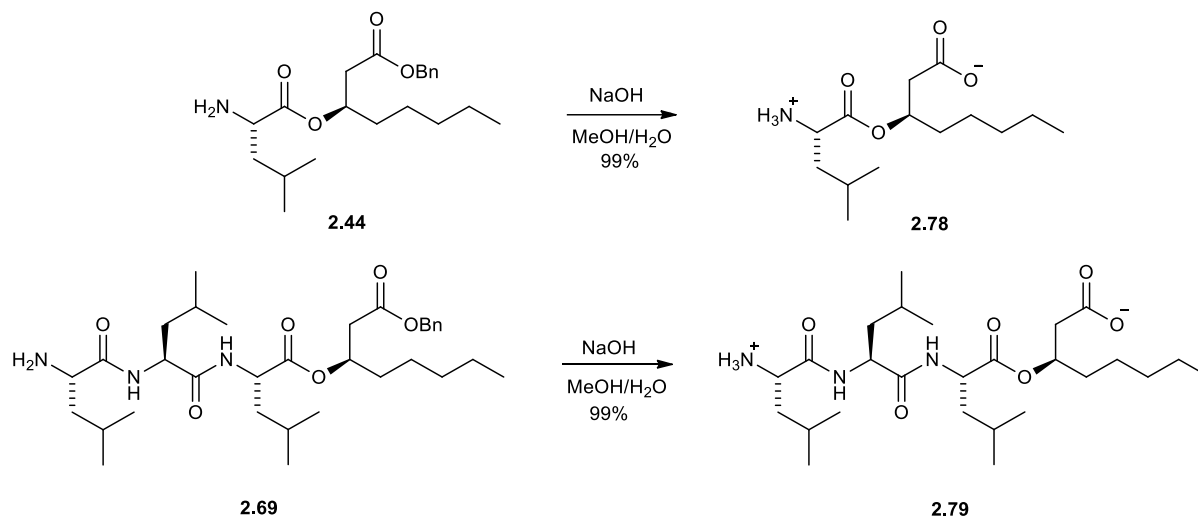
**Shema 2.27.** Sinteza estarskih derivata.

Dalja ekstenzija SAR studije lipopeptidnih derivata rađena je sa fokusom na lipidni deo strukture. Inicijalni set jedinjenja bazirao se na funkcionalizaciji derivata metil estra (*R*)-3-hidroksikiseline **2.1** dobijenog depolimerizacijom PHA polimera. Kako bi se ispitaio uticaj ovog strukturnog fragmenta na biološki profil peptidnih derivata, sintetisana je mala serija C-10 i C-12 kongenera. Produženi kiselinski derivati (**2.51**, **2.52**, **2.64**, **2.65**) sintetisani su u racemskom obliku iz odgovarajućih aldehida (**shema 2.28**) Reformatsky reakcijom po literaturnoj proceduri.<sup>132</sup> Benzil estri dobijeni su na isti način kao i C-8 benzil estri u prinosima od 64 za  $n = 8$  odnosno 70% za  $n = 10$ . Kuplovanjem sa Boc-leucinom, a potom i deprotekcijom kao što je to opisano na **shemi 2.23**, dobijena su jedinjenja **2.51** i **2.52**, a uvođenjem još jednog ostatka leucina kao na **shemi 2.24** dobijeni su dipeptidni C-8 i C-10 derivati **2.64** i **2.65**.



**Shema 2.28.** Sinteza leucinskih derivata sa C-10 odnosno C-12 nizom.

Kako bi se ispitala biološka aktivnost i fizičko-hemijske karakteristike derivata sa slobodnom karboksilnom kiselinom umesto estra, urađena je hidroliza jedinjenja **2.44** i **2.69** u baznim uslovima pri čemu su dobijene cviterjonske strukture **2.78** i **2.79**. S obzirom na slabu rastvorljivost ovih jedinjenja u DMSO-u i u vodi jedinjenja nisu podvrgnuta biološkom ili fizičko-hemijskom ispitivanju pa nije rađena ni deprotekcija ostalih peptidnih derivata.



**Shema 2.29.** Hidroliza benzil estra leucinskih derivata **2.44** i **2.69**.

## 2.1.4 Fizičko-hemijska karakterizacija ramnolipidnih analoga

Osobina ramnolipida koja je do sada našla najznačajniju primenu je njihova površinska aktivnost. Konkretna primena surfaktanata u određenim oblastima zavisi od niza parametara koji su određeni strukturnim elementima datog surfaktanta tj. odnosom lipofilnih i hidrofilnih delova molekula. Površinska aktivnost ramnolipida je po nekim autorima i jedan od ključnih faktora njihove antimikrobne aktivnosti. U tom kontekstu značajno je i pronalaženje eventualne korelacije fizičko-hemijskih parametara i antimikrobne aktivnosti ramnolipidnih analoga. Neki od glavnih parametara bitnih za analizu površinske aktivnosti jedinjenja su kritična micelarna koncentracija (CMC), površinski napon ( $\gamma$ ), sposobnost formiranja pene i hidrofilno-lipofilni balans (HLB).

**Kritična micelarna koncentracija** je koncentracija na kojoj otpočinje formiranje micela, pri čemu dolazi do značajne promene karakteristika rastvora. Na ovoj koncentraciji ispoljavaju se najvažnije karakteristike surfaktanata i površinski napon se približava minimalnoj vrednosti. Na CMC vrednost utiču mnogi faktori, a konkretno u slučaju ramnolipida kao što je to ranije pomenuto najizraženiji uticaj ima dužina alifatičnog niza. Vrednosti CMC komercijalnih surfaktanata koji pripadaju grupi alkil glukozida iznose od (25000  $\mu\text{M}$ , 2200  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$ ).<sup>107,108</sup> CMC se eksperimentalno može odrediti merenjem rasipanja svetlosti ili merenjem provodljivosti rastvora (konduktometrijski) što je i bila metoda izbora za potrebe ove teze.

**Površinski napon** je posledica intermolekulskih interakcija u tečnostima i predstavlja težnju tečnosti da smanji svoju slobodnu površinu. Kvantitativno se predstavlja koeficijentom površinskog napona  $\gamma$ . Osnovno svojstvo surfaktanata je smanjenje površinskog napona, tako na primer, kao što je ranije pomenuto, ramnolipidi snižavaju površinski napon vode sa 72 mN/m na 24 mN/m. Sniženje površinskog napona za potrebe ove teze eksperimentalno je određeno Traube-ovim stalagmometrom.

**Penjenje** je proces dispergovanja gasa u tečnosti. Generalno kod surfaktanata penjenje je poželjno svojstvo, osim u proizvodnji gde može predstavljati ozbiljan problem prilikom prečišćavanja. Penjenje je usko povezano sa kritičnom micelarnom koncentracijom i u najvećem broju slučajeva tečnosti sa niskim vrednostima CMC imaju veću tendenciju formiranja pene. Shodno tome strukturne karakteristike koje snižavaju CMC poput produženja alkil niza povećavaju sposobnost penjenja jedinjenja. Sposobnost penjenja se opisuje indeksom pene tj. visinom stuba pene koji se formira u ispitivanom sudu pod definisanim uslovima.

**Hidrofilno-lipofilni balans** predstavlja jedan od najuspelijih pokušaja kvantifikacije korelacije hemijske strukture jedinjenja i površinske aktivnosti. HLB vrednost predstavlja meru lipofilnosti odnosno hidrofilnosti nekog surfaktanta i može imati vrednost od 0 do 20 do kojih se dolazi primenom različitih soptverskih paketa. Primenu nalazi u predviđanju optimalnog surfaktanta za željene emulzije pa npr. niže HLB vrednosti sugerišu da je jedinjenje slabo rastvorno u vodi i da je pogodno za solubilizaciju vode u ulju tj. za pravljenje emulzija vode u ulju i obratno, više HLB vrednosti sugerišu da je jedinjenje dobro rastvorno u vodi i da se može koristiti za solubilizaciju ulja u vodi tj. za pravljenje emulzija ulja u vodi. Tipični deterdženti imaju HLB vrednost od 13 do 15.<sup>133</sup> Za potrebe ove disertacije HLB vrednosti su računate kompjuterski pomoću Marvin Sketch programa (MarvinSketch 17.2.13.0, 2017, ChemAxon <http://www.chemaxon.com>).<sup>134</sup>

**Biodegradabilnost** je u novije vreme postala jedno od najvažnijih svojstava surfaktanata. Može se definisati kao: "uklanjanje ili uništavanje hemijskih jedinjenja biološkim delovanjem živih

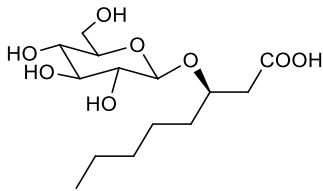
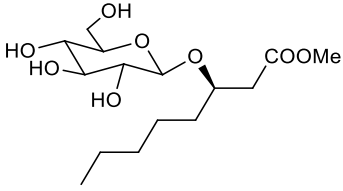
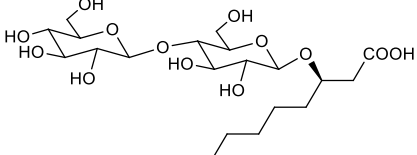
organizama".<sup>135</sup> Za potrebe ove teze biodegradabilnost selektovanih jedinjenja eksperimentalno je određivana metodom zatvorene boce mikroorganizmima iz reke Save.

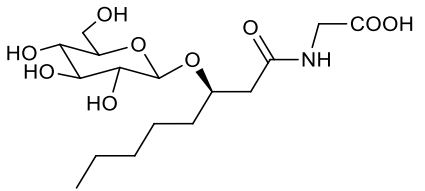
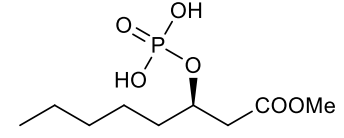
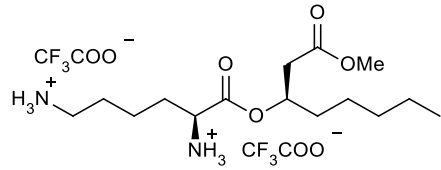
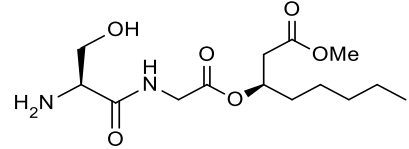
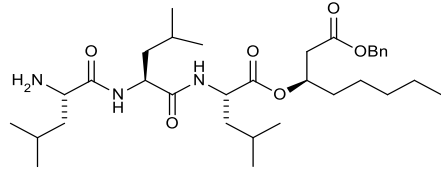
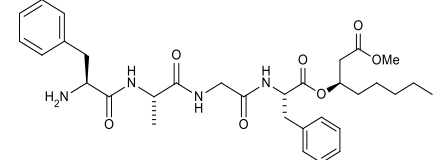
**Particioni koeficijent (LogP)** predstavlja meru lipofilnosti jedinjenja. Preciznije predstavlja odnos koncentracija jedinjenja u smesi dva nemešljiva rastvarača u ravnoteži (najčešće su to voda i 1-oktanol) i jedan je od najvažnijih parametara u ranim fazama razvoja leka. Za potrebe ove disertacije LogP vrednosti su takođe računane kompjuterski pomoću Marvin Sketch programa (MarvinSketch 17.2.13.0, 2017, ChemAxon <http://www.chemaxon.com>).<sup>134</sup>

**Kiselost** sintetisanih jedinjenja u vidu pKa vrednosti je takođe računata kompjuterski pomoću Marvin Sketch programa (MarvinSketch 17.2.13.0, 2017, ChemAxon <http://www.chemaxon.com>).<sup>134</sup>

Za evaluaciju površinske aktivnosti odabrana su pre svega jedinjenja koja imaju jasno odvojene polarne i nepolarne krajeve poput glikolipidnih derivata (**2.5**, **2.6**, **2.11** i **2.18**) i fosfatnog estera (**2.29**), ali i peptidni derivati sa različitim brojem aminokiselina kao i sa različitim polarnostima aminokiselinskih ostataka od polarnih serinskih i lizinskih ostataka do nepolarnih leucinskih i fenilalaninskih (**2.40**, **2.55**, **2.69** i **2.71**). Mada je pretpostavljeno da peptidni derivati neće imati površinsku aktivnost, bitno je bilo okarakterisati ih u ovom smislu jer su kako je kasnije utvrđeno jedni od najpotentnijih jedinjenja u biološkom smislu. Sve fizičko-hemijske karakteristike upoređivane su i sa karakteristikama komercijalno dostupnih ramnolipida.

**Tabela 1.** Fizičko-hemijska svojstva ramnolipida i njihovih sintetskih analoga

Jedinjenje	Struktura	CMC (mg/L) 23°C	$\gamma$ (mN/m) 23°C 0.1%	$\gamma$ (mN/m) 36.5°C 0.1%	Indeks pene 0/3 min	FH osobine
	Voda	/	72.0	69.7	0/0	/
	Ramnolipidi	175	45.5	43.2	3/3	pKa = 4,20* logP = -3,93 HLB = 11,06
<b>2.5</b>		157	40.5	39.7	4/4	pKa = 4,27 logP = -0,30 HLB = 13,13
<b>2.6</b>		335	67.0	66.8	1/0	pKa = 12,21 logP = -0,16 HLB = 12,95
<b>2.11</b>		155	40.3	39.5	5/5	pKa = 4,17 logP = -2,07 HLB = 18,58

2.18		315	52.2	52.0	4/0	pKa = 3,9 logP = -1,41 HLB = 13,94
2.29		162	40.7	40.0	3/3	pKa = 1,49 logP = 1,49 HLB = 9,06
2.40		390	67.6	67.5	1/0	logP = -4,50 HLB = 5,62
2.55		420	68.5	68.0	0/0	pKa = 7,85 logP = -0,45 HLB = 19,98
2.69		400	68.0	68.0	1/0	pKa = 8,13 logP = 6,11 HLB = 10,08
2.71		315	68.2	68.0	2/0	pKa = 7,71 logP = 2,84 HLB = 14,68

\*Vrednosti su izračunate za Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>

Shodno njihovoj strukturalnoj sličnosti ramnolipidima, ne iznenađuje činjenica da glikolipidni derivati pokazuju najbolju površinsku aktivnost. Među njima se izdvajaju **2.5** i **2.11** sa CMC vrednostima od 157 odnosno 155mg/L što je niže i od ispitivane komercijalne smese ramnolipida. Površinski napon je takođe niži ~40 mN/m i približava se vrednostima koje imaju komercijalni surfaktanti ~30 mN/m. Dobijene vrednosti sugerišu da zamena ramnoze drugim šećerima ima osnova te da se na ovaj način mogu relativno jednostavno dobiti pristupačnija jedinjenja sa boljom površinskom aktivnošću od samih ramnolipida. Sa druge strane esterifikovanjem karboksilne grupe gotovo u potpunosti nestaje površinska aktivnost jedinjenja **2.6** (CMC 335 mg/L i  $\gamma$  67 mN/m). Interesantna je i činjenica da jedinjenje **2.18** (CMC 315 mg/L i  $\gamma$  52 mN/m) iako ima slobodnu karboksilnu grupu pokazuje slabu površinsku aktivnost što može biti posledica grananja u blizini polarne karboksilne grupe kao što je to bio slučaj u ranije pomenutoj studiji Wang-a i saradnika (jedinjenja **67** i **68**). Svi ispitivani glikolipidi imaju HLB vrednosti veće od 10 pa su rastvorni u vodi i pogodni za formiranje emulzija ulja u vodi. Moć penjenja je kod površinski aktivnih jedinjenja **2.5** i **2.11** uporediva sa ramnolipidima.

Zamenom ramnoze anjonskom polarnom grupom i esterifikacijom karboksilne kiseline (**2.29**) dobija se jedinjenje sa sličnom površinskom aktivnošću (CMC 162 mg/L i  $\gamma$  40 mN/m) i nešto

većom rastvorljivošću u nepolarnim rastvaračima (HLB = 9,06). Ovaj rezultat sugerira da bi i jedinjenja ovog tipa mogla poslužiti kao sintetski pristupačna alternativa ramnolipidima u kontekstu površinske aktivnosti.

Aminokiselinski i peptidni derivati selektovani su tako da se utvrdi efekat i polarnih (lizin i serin u jedinjenjima **2.40** i **2.55**) i nepolarnih aminokiselina (leucin i fenilalanin u jedinjenjima **2.69** i **2.71**), kao i efekat dužine aminokiselinskog niza (1 do 4 aminokiselina). Sveukupno nijedan faktor nije značajno uticao na površinsku aktivnost peptidnih derivata implicirajući da se i ostali molekuli koji su po strukturnim karakteristikama između ovih ekstrema ponašaju na sličan način. Ovo zapažanje je u skladu sa činjenicom da ovaj tip jedinjenja nema diskretno odvojen polarni i nepolarni kraj.

**Tabela 2.** Biodegradabilnost ramnolipida i njihovih sintetskih analoga.

Dani	Rha-Kom	2.5	2.6	2.11	2.18	2.29	2.40	2.55	2.69	2.71
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	25.7	24.6	24.8	25.0	27.2	25.0	27.8	20.1	26.7	25.5
6	45.2	45.5	50.0	45.2	44.7	44.8	42.5	40.2	46.1	50.2
10	86.3	88.4	97.3	88.0	83.2	85.5	72.5	75.5	73.1	96.8
15	95.5	95.0	-	93.2	88.2	92.3	88.4	82.2	82.1	-
20	99.5	99.8	-	99.5	97.2	98.8	95.5	88.3	92.2	-
25	-	-	-	-	-	-	99.7	90.3	99.5	-

Biodegradabilnost odabranih jedinjenja ispitivana je u periodu od 28 dana. Sva ispitivana jedinjenja pokazala su izuzetnu biodegradabilnost gde je jedinjenje **2.6** gotovo u potpunosti razgrađeno već nakon 10 dana. Ostala jedinjenja su nakon 25 dana razgrađena u potpunosti ili preko 90%. Ovo svojstvo ramnolipidnih analoga je od značaja u kontekstu primene pojedinih jedinjenja ove grupe kao površinski aktivnih agenasa. U tom smislu najveći potencijal imaju jedinjenja **2.5** i **2.11** jer se zamenom ramnoze ekonomski prihvatljivijim šećerom postižu iste ili bolje tenzidske osobine u poređenju sa matičnim molekulom, dok se istovremeno očuvava potpuna biodegradabilnost jedinjenja.

### 2.1.5 Biološka karakterizacija ramnolipidnih analoga

S obzirom na poznata antimikrobna i antibiofilm svojstva ramnolipida, sintetisani analozi podvrgnuti su testovima za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), inhibicije formiranja biofilma, disperzije preformiranog biofilma i inhibicije *quorum sensinga*. U biološkoj evaluaciji ramnolipidnih analoga korišćena je bakterijska vrsta - *Pseudomonas aeruginosa* i fungalna vrsta - *Candida albicans*. Najaktivnija jedinjenja dalje su okarakterisana ispitivanjem njihove citotoksičnosti, uticaja na adheziju *C. albicans* i uticaja na prelazak *C. albicans* iz kvasolikog u filamentozni oblik.

Vrsta *Pseudomonas aeruginosa* obuhvata Gram-negativne bakterije i jedan od najčešćih uzročnika respiratornih infekcija. Zahvaljujući izuzetnoj otpornosti na antimikrobnu terapiju predstavlja jednu od prioritarnih bakterijskih vrsta za razvoj nove terapije. *P. aeruginosa* se brzo adaptira na različite spoljašnje faktore i može uspešno nastaniti medicinsku opremu pri čemu na istoj formira biofilmove. Upravo zbog toga ovaj bakterijski soj je jedan od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Jedan od ključnih razloga visoke rezistencije *P. aeruginosa* sojeva je njihova sposobnost formiranja biofilma.<sup>48</sup> S tog aspekta pronalaženje molekula koji ciljano deluju na formiranje biofilma ili rasturanje već formiranog biofilma predstavljaju jednu od novijih strategija u borbi protiv ove bakterije.<sup>136</sup>

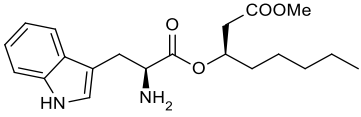
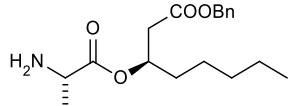
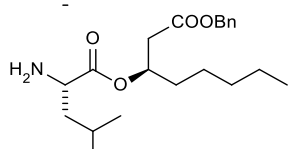
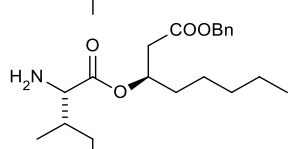
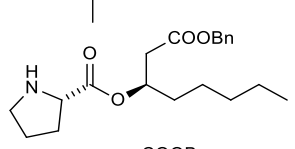
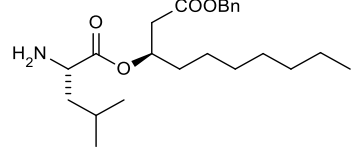
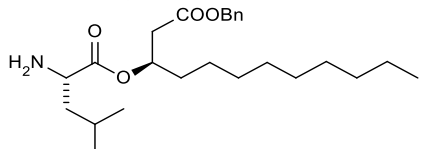
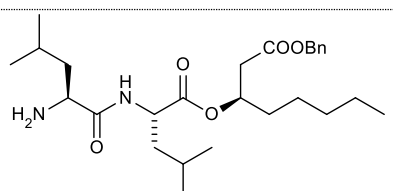
*Candida albicans* je fungalna vrsta koja je deo normalnog ljudskog mikrobioma, ali je oportuni patogen. Osim toga često se javlja u bolničkim uslovima na medicinskoj opremi poput implanata i katetera, pa su i najčešće inficirani upravo bolnički pacijenti ili imunokompromitovane osobe. Najpoznatija je fungalna vrsta koja ima sposobnost formiranja biofilma. Ova osobina omogućava duže zadržavanje *C. albicans* na površini medicinske opreme ali i otežava terapiju kod inficiranih pacijenata usled povećane rezistencije.<sup>137</sup>

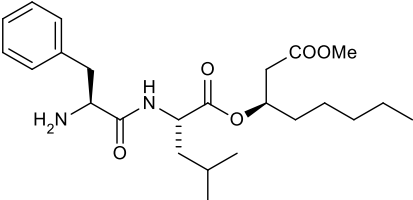
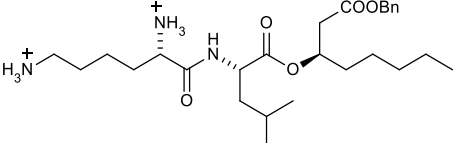
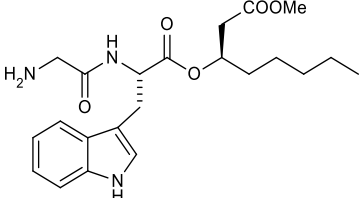
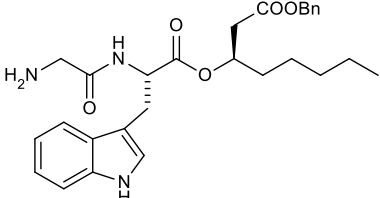
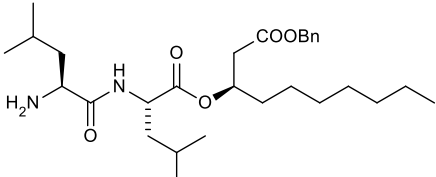
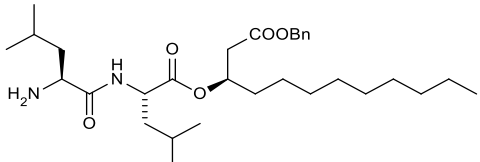


### 2.1.5.1 Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost je analizirana pomoću standardnog mikrodilucionog eseja (format eseja sa 96-bunarića) za određivanje MIC-a na bakterijama i gljivama (National Committee for Clinical Laboratory Standards for bacteria and yeasts: M07-A8 i M27-A2). MIC je definisan kao konc. jedinjenja u bunariću gde test organizam ne raste. Testirane su koncentracije od 500, 200, 100, 50, 25, 12,5 i 6,25 ( $\mu\text{g/ml}$ ). U **tabeli 3** prikazana su jedinjenja koja su ispoljila antimikrobnu aktivnost, ostala jedinjenja imaju MIC vrednosti veće od 500  $\mu\text{g/ml}$  za *P. aeruginosa* odnosno veće od 200  $\mu\text{g/ml}$  za *C. albicans*.

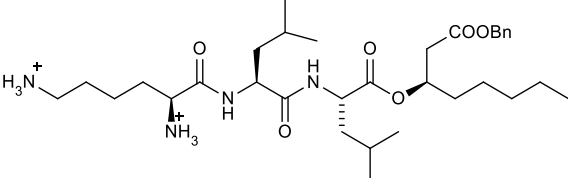
**Tabela 3.** MIC vrednosti jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću.

Derivati	Struktura	<i>P. aeruginosa</i> MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>C. albicans</i> MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
aminokiselinski			
2.34		>500	150
2.43		>500	150
2.44		>500	50
2.45		>500	200
2.46		>500	200
2.51		>500	200
2.52		>500	100
dipeptidni			
2.56		>500	60

2.57		>500	150
2.58		100	100
2.60		500	200
2.61		500	50
2.64		>500	200
2.65		>500	100

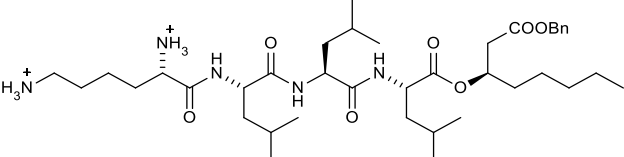
---

tripeptidni

2.70		100	80
------	---	-----	----

---

tetrapeptidni

2.72		100	50
------	--	-----	----

---

Zamenom ramnoze heterocikličnim ili malim polarnim molekulima dolazi do potpunog gubitka antimikrobne aktivnosti jedinjenja. Od svih tipova ramnolipidnih analoga jedino su peptidni derivati pokazali blagu antimikrobnu aktivnost protiv planktonskih oblika *P. aeruginosa* i *C.*

*albicans*. Broj aminokiselina nije imao presudan uticaj na aktivnost ni kod jednog ispitivanog soja. Sa druge strane može se uočiti pravilnost u tipu aminokiselina. Sva tri jedinjenja (**2.58**, **2.70** i **2.72**) koja su bila aktivna protiv *P. aeruginosa* imala su kao N-terminalnu aminokiselinu lizin što sugeriše na relevantnost jonskih interakcija za antimikrobno dejstvo. Ova jedinjenja su takođe demonstrirala i srednju antifungalnu aktivnost. Poznato je da se fungicidni efekat mnogih lipopeptida ispoljava perturbacijom ćelijske membrane, procesom u kome presudnu ulogu imaju upravo elektrostatičke interakcije. Sa druge strane međutim, antifungalno dejstvo su pokazali i lipofilni derivati **2.34**, **2.52**, **2.56** i **2.61** gde sva jedinjenja osim **2.61** imaju leucinske ostatke. Kasnije produženje alkil niza jedinjenja **2.44** i **2.56** na C-10 i C-12 dalo je derivate **2.51/2.52** odnosno **2.64/2.65**. Ova strukturna promena umanjila je antimikrobna svojstva leucinskih derivata u poređenju sa kraćim, C-8 derivatima.

### 2.1.5.2 Inhibicija međubakterijske komunikacije (eng. quorum sensing)

*Quorum sensing* predstavlja vid bakterijske međućelijske komunikacije koji se javlja u bakterijskim populacijama. Ova komunikacija odvija se pomoću malih difuzibilnih molekula tzv. autoinducera. Kada bakterijska populacija dostigne kritičnu ćelijsku gustinu, koncentracija autoinducerskih molekula drastično poraste i ispoljava svoj efekat u vidu povećanja ekspresije gena uključenih u sintezu mnogobrojnih faktora virulencije uključujući i ramnolipide kod *P. aeruginosa*. *Quorum sensing*-om su regulisani mnogi važni fiziološki procesi poput kretanja bakterija, ćelijske diferencijacije i formiranje i održavanje biofilma.<sup>138</sup>

U ispitivanju uticaja jedinjenja na fenomen *quorum sensing*-a rađen je disk esej sa *Serratia marcescens* i *Chromobacterium violaceum*, test sojevima koji se koriste u analizi fenomena *quorum sensing*-a kod bakterija. Sinteza pigmenata kod oba soja je regulisana signalnim molekulima, pa mutna ili izmenjena zona oko diska ukazuje da analizirano jedinjenje utiče na fenomen *quorum sensing*-a, dok je bistra zona pokazatelj antimikrobijalnog efekta. Kod *C. violaceum* CV026 koja se koristi u eksperimentu gen za sintezu autoinducerskog signalnog molekula je mutiran tako bakterija može da sintetiše ljubičasti pigment samo kada se u medijum doda autoinducer.<sup>139</sup> Pojava svetle zone oko diska znači da nema sinteze pigmenta odnosno da jedinjenje inhibira međućelijsku komunikaciju zahvaljujući kompeticiji sa autoinducerskim molekulom.

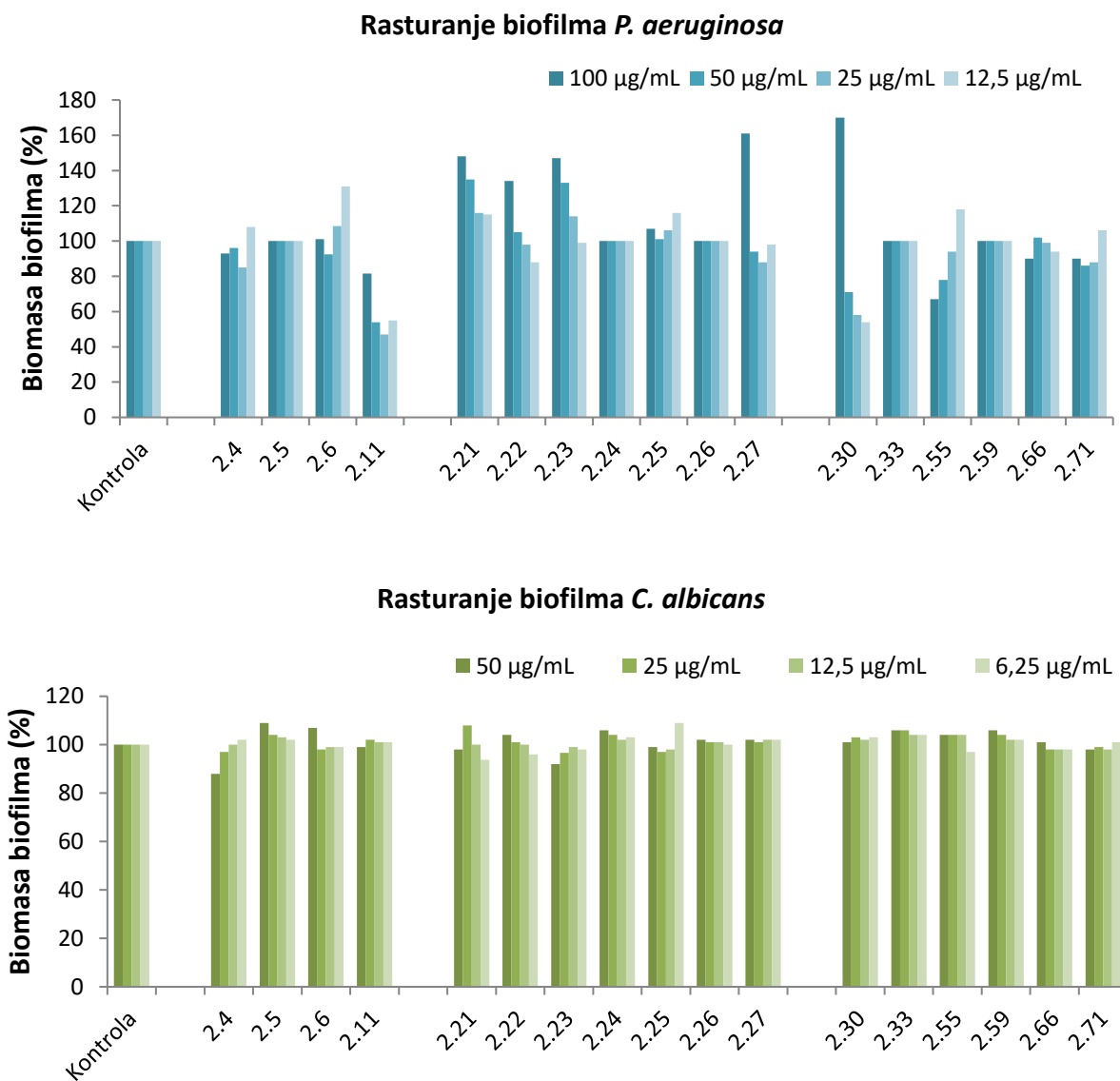
**Tabela 4.** Uticaj ramnolipidnih analoga na međubakterijsku komunikaciju pri količini od 500 µg po disku

Jedinj enje	Efekat na QS		Jedinj enje	Efekat na QS	
	<i>S. marescens</i>	<i>C. violaceum</i>		<i>S. marescens</i>	<i>C. violaceum</i>
<b>2.4</b>	/	/	<b>2.25</b>	/	/
<b>2.5</b>	Pojačava boju	/	<b>2.26</b>	/	/
<b>2.6</b>	1 mm	/	<b>2.27</b>	/	/
<b>2.11</b>	/	/	<b>2.30</b>	6 mm	4 mm
<b>2.21</b>	/	/	<b>2.33</b>	/	2 mm
<b>2.22</b>	/	/	<b>2.55</b>	/	/
<b>2.23</b>	/	1 mm	<b>2.59</b>	2 mm	2 mm
<b>2.24</b>	1 mm	4 mm	<b>2.66</b>	/	2 mm
			<b>2.71</b>	/	/

Iz svake grupe jedinjenja odabrano je po nekoliko predstavnika. Na osnovu veličine zone inhibicije može se zaključiti da šećerni (2.4, 2.5, 2.6 i 2.11) i heterociklični derivati (2.25 – 2.27) nemaju uticaj na međucelijsku komunikaciju. Derivat etanolamina dobijen Michael-ovom adicijom (2.24), kao i nekoliko peptidnih derivata (2.30, 2.33, 2.59 i 2.66) ispoljavaju slab inhibitorski efekat na međucelijsku komunikaciju ovih bakterijskih vrsta.

### 2.1.5.3 Rasturanje biofilмова

Anti-biofilm aktivnost sintetisanih jedinjenja ispitivana je praćenjem njihovog uticaja na formiranje biofilma kao i na rasturanje već formiranog bakterijskog ili fungalnog biofilma. Sposobnost rasturanja preformiranih biofilмова evaluirana je na nekoliko predstavnika sve tri klase sintetisanih ramnolipidnih derivata. Rezultati su predstavljeni kao procenat preostale mase biofilma nakon 24-časovnog tretmana preformiranog biofilma ispitivanim jedinjenjima, u odnosu na netretiranu kontrolu i predstavljaju srednju vrednost iz dva eksperimenta (slika 4).

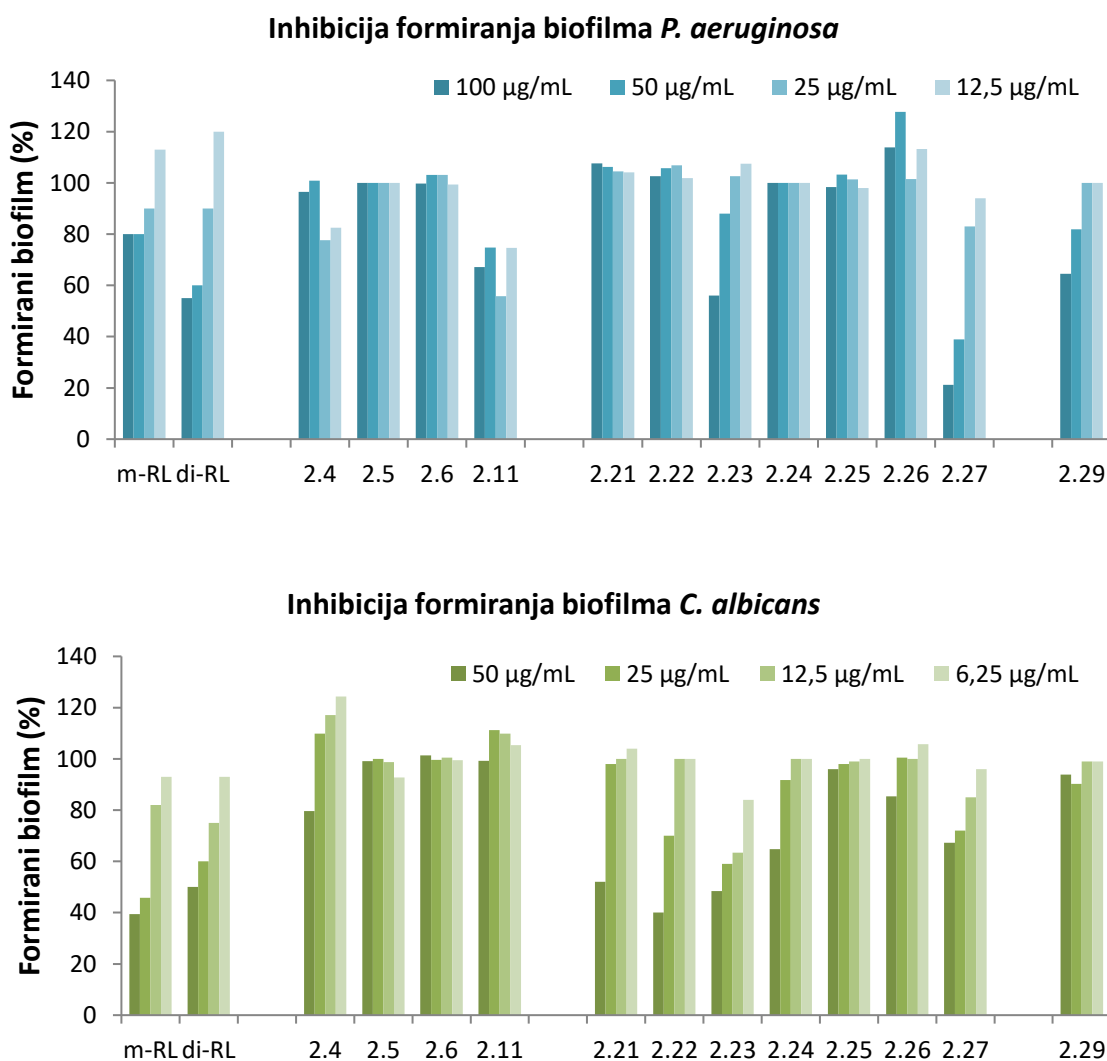


**Slika 4.** Uticaj ispitivanih jedinjenja na rasturanje biofilma.

Na rasturanje biofilma *P. aeruginosa* nekoliko jedinjenja imalo je blag uticaj i to glikolipidni derivat **2.11** i peptidni derivati **2.30** i **2.55**. Najpotentnije jedinjenje u ovom smislu je **2.11** analog kod koga je ramnoza zamenjena laktozom. Nakon tretmana preformiranog biofilma jedinjenjem **2.11** u najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 12,5 µg/mL zaostaje 55% biomase biofilma. Jedinjenja nisu imala uticaja na preformirani biofilm *C. albicans*.

#### 2.1.5.4 Inhibicija formiranja biofilma

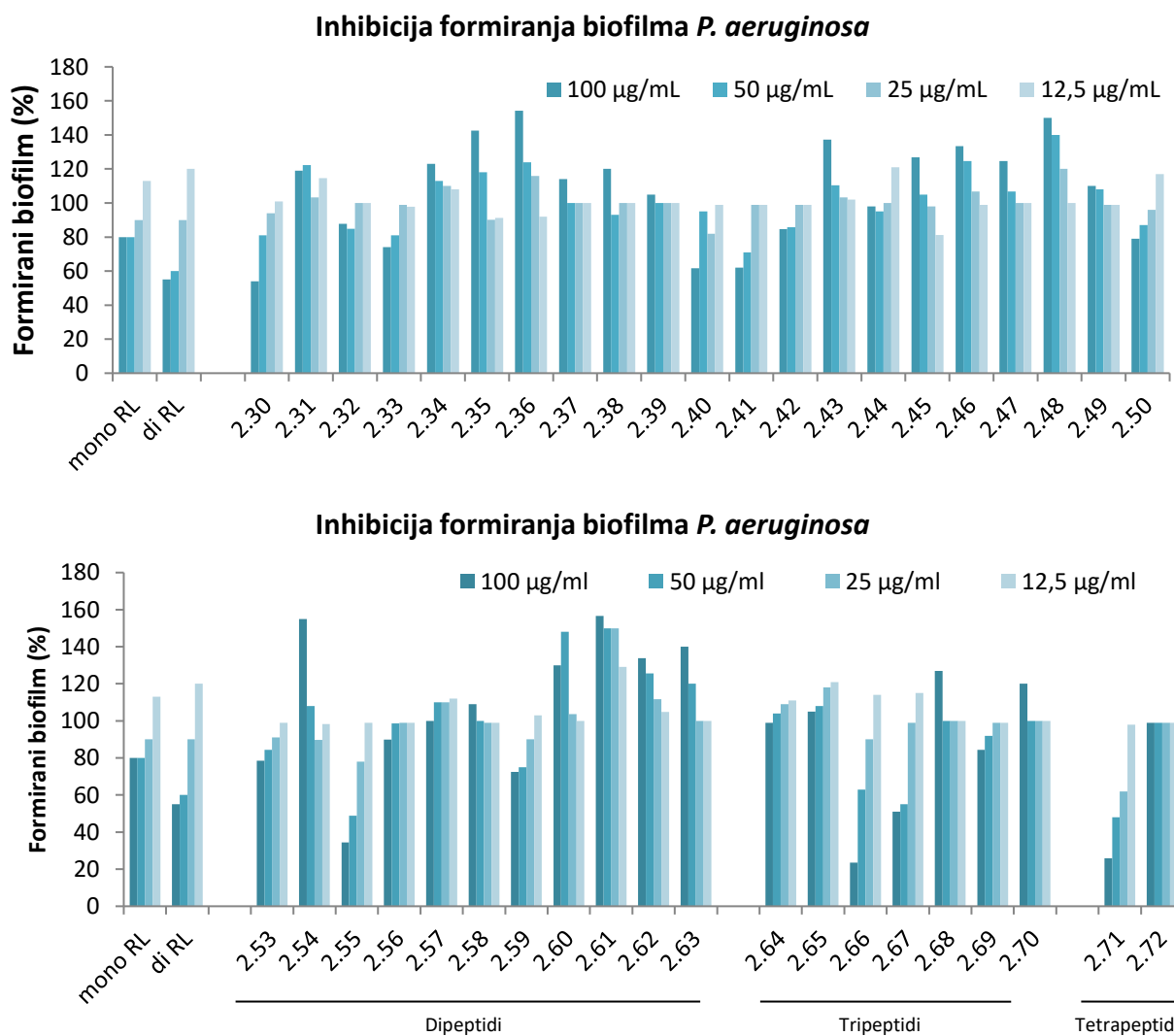
Testovi inhibicije formiranja biofilma rađeni su pod standardnim uslovima na četiri različite koncentracije: (100, 50, 25 i 12,5 µg/ml za *P. aeruginosa* odnosno 50, 25 i 12,5 6,25 µg/ml za *C. albicans* biofilmove). Rezultati su predstavljeni kao procenat fomiranog biofilma nakon 24-časovnog rasta u prisustvu ispitivanog jedinjenja (**slika 5**). Jedinjenja su upoređivana sa mono- i di-ramnolipidima dobijenim prečišćavanjem na koloni komercijalnog uzorka ramnolipida AGAE Technologies) (eluent: DCM : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0,2).



**Slika 5.** Inhibicija formiranja biofilma *P. aeruginosa* i *C. albicans* u prisustvu ispitivanih jedinjenja.

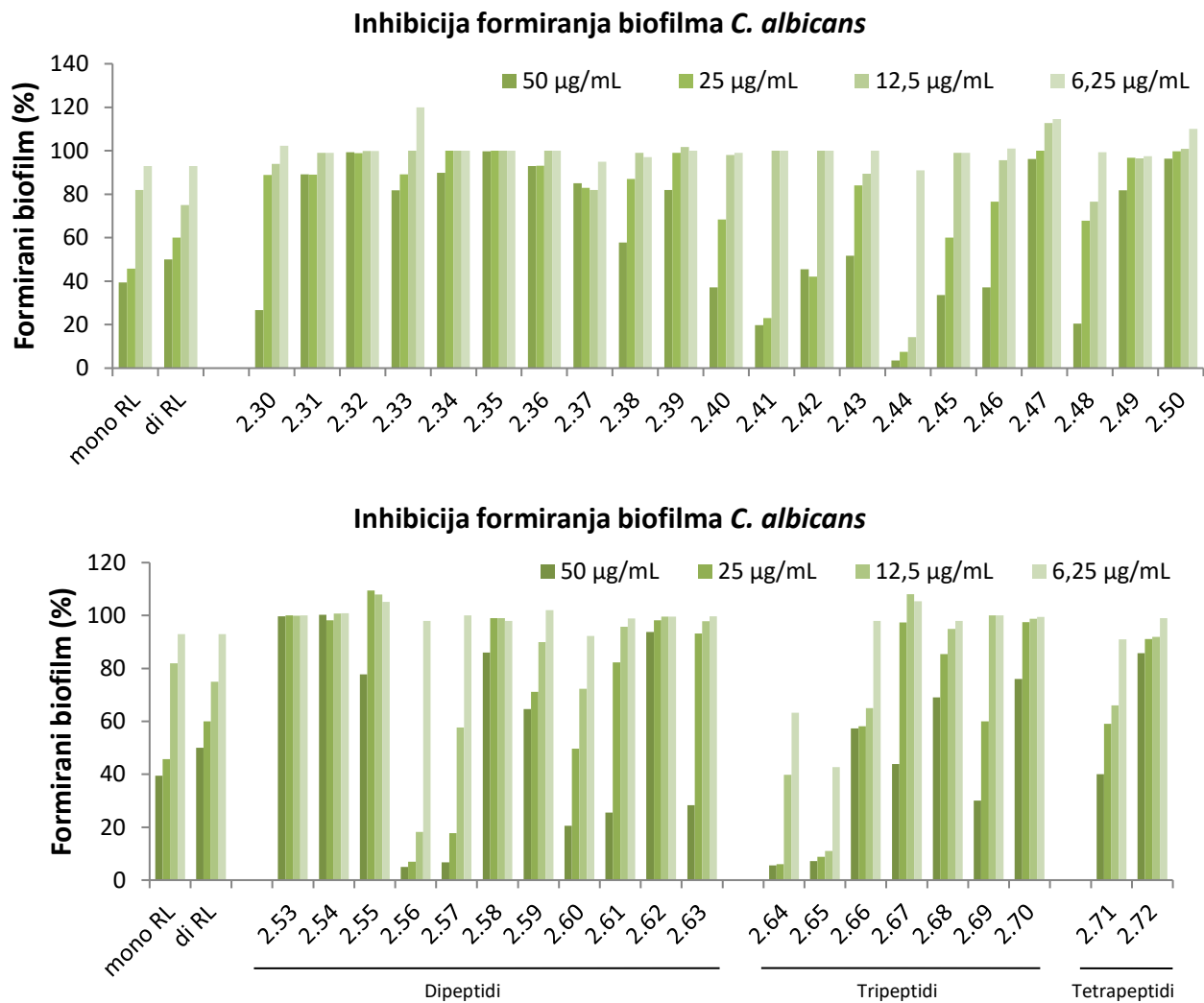
U prvoj seriji jedinjenja ispitivani su glikolipidni derivati (**2.4**, **2.5**, **2.6** i **2.11**) jedinjenja kod kojih je šećerna komponenta zamenjena polarnim jedinjenjem (**2.21**, **2.22**, **2.23**, **2.24** i **2.29**) odnosno heterociklusom (**2.25**, **2.26** i **2.27**). Iako su po strukturi najbliži ramnolipidima samo jedan derivat glikolipida pokazao je aktivnost i to na formiranje biofilma *P. aeruginosa*. U pitanju je najpolarnije od ispitivanih jedinjenja ( $\log P = -2,07$ , HLB = 18,58), derivat laktoze **2.11**, koji je ujedno i pokazivao najbolje tenzidske osobine u testovima fizičko-hemijske karakterizacije. Od ostalih jedinjenja iz prve serije jedino je kvaternarni amonijum derivat **2.27** imao inhibičnu aktivnost na biofilm *P. aeruginosa*. Pri koncentraciji ovog jedinjenja od 100  $\mu\text{g/mL}$  formira se svega 21 % biofilma nakon 24h. Blagu inhibiciju formiranja biofilma *C. albicans* prouzrokovala su jedinjenja **2.22**, **2.23** i **2.27**.

Dobijeni rezultati sugerišu da se zamenom ramnoze drugim šećerom, malim polarnim molekulom ili heterociklusom gubi anti-biofilm aktivnost molekula. Šećerni analozi bez obzira na njihovu izraženu površinsku aktivnost, izuzev laktoznog derivata **2.11**, ne utiču na formiranje biofilma. Ovime se još jednom potvrđuju pretpostavke da anti-biofilm svojstva ramnolipida nisu isključivo rezultat njihovih površinski aktivnih svojstava.



**Slika 6.** Inhibicija formiranja biofilma *P. aeruginosa* u prisustvu aminokiselinskih i peptidnih derivata.

Druga serija jedinjenja obuhvatala je peptidne derivate 3-hidroksioktanske kiseline. Ova jedinjenja u celini nisu imala značajan efekat na formiranje biofilмова *P. aeruginosa*. Svega par jedinjenja, koja su metil estri (2.55, 2.66, 2.67 i 2.71) pokazalo je blagu aktivnost.



**Slika 7.** Inhibicija formiranja biofilma *C. albicans* u prisustvu aminokiselinskih i peptidnih derivata.

Za razliku od biofilma *P. aeruginosa* peptidni derivati imali su mnogo izraženiji uticaj na formiranje biofilma *C. albicans*. Među aminokiselinskim derivatima sa C-8 alkil ostatkom (Slika 7) po aktivnosti se izdvaja jedinjenje 2.44. Na niskoj koncentraciji (6,25 µg/mL; 91 % formiranog biofilma) jedinjenje 2.44 se ponaša slično mono- i diramnofilidima (93 % formiranog biofilma za oba), na nešto višoj koncentraciji (12,5 µg/mL) stepen inhibicije bio je značajno veći pa je formirano svega 14% biofilma nakon 24 h u poređenju sa netretiranom kontrolom. Dalje povećanje koncentracije (50 µg/mL) redukovalo je formiranje biofilma na svega 3,5 % što je i očekivano s obzirom da je MIC jedinjenja za planktonski oblik *C. albicans* takođe 50 µg/mL (Tabela 3). Primetan je značajan uticaj estarske grupe na anti-biofilm svojstva ovog jedinjenja. Zamena benzil estra jedinjenja 2.44, metil estrom (jedinjenje 2.31) rezultuje drastičnim padom aktivnosti. Jedan od razloga ovakvog ponašanja može biti razlika u fizičko-hemijskim svojstvima jedinjenja, konkretno logP (izračunate vrednosti za ova dva jedinjenja su 2.31 - logP 2.95; 2.44 -

logP 4.68). Poznato je da hidrofobnost ćelijske površine i hidrofobne interakcije manoproteina na površini *C. albicans* igraju značajnu ulogu u njenoj adheziji na epitel i plastične površine.<sup>140,141</sup> Shodno tome može se pretpostaviti da će lipofilnije jedinjenje u većoj meri interagovati sa proteinima ćelijskog zida *C. albicans*, kompetitivno inhibirajući njihovu interakciju sa površinom ćelije domaćina ili plastičnom površinom. Drugi razlog ovakve redukcije u aktivnosti kod metil estra može se pripisati njegovoj bržoj razgradnji od strane fungalnih esteraza, s obzirom da su sterno manje zahtevni estri podložniji hidrolizi od strane ovih enzima.<sup>142</sup>

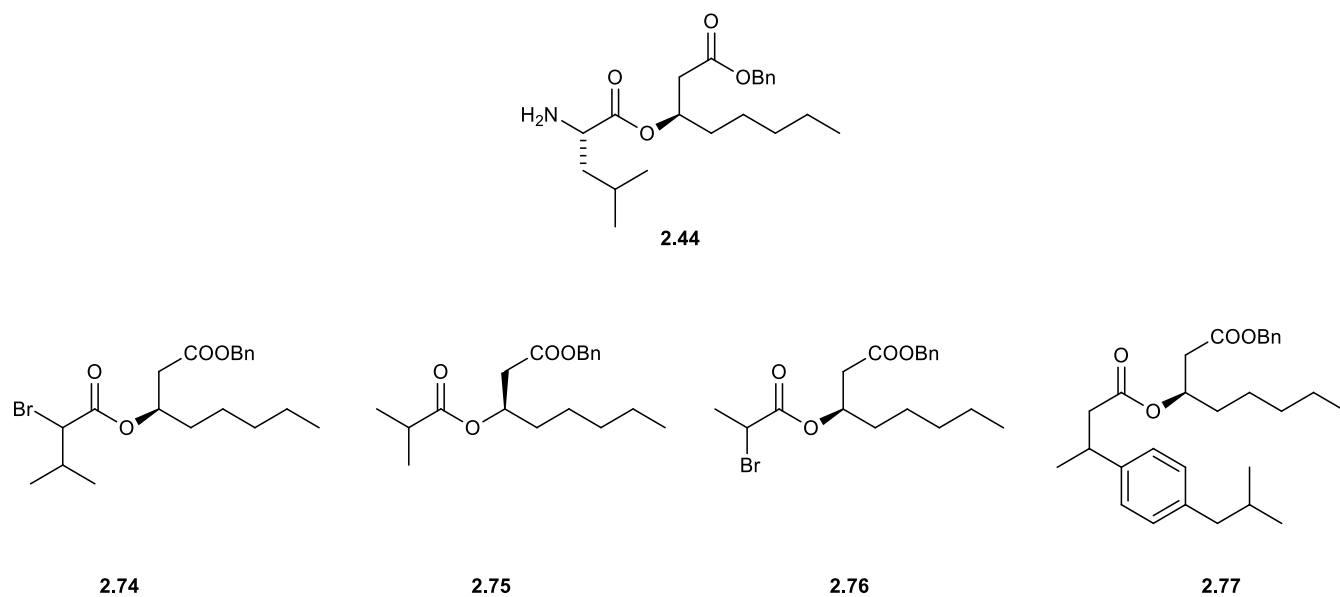
Daljim uvođenjem aminokiselina dobijeni su peptidni derivati na način prikazan na **shemi 2.24**. Među dipeptidnim C-8 derivatima najaktivniji derivati bili su **2.56** i **2.57**. Peptidni fragment ovih jedinjenja sačinjavaju nepolarne aminokiseline. U poređenju sa ramnolipidima pokazali su veći stepen inhibicije formiranja biofilma, konkretno na koncentraciji od 25 µg/mL (**2.56** - 7% formiranog biofilma, **2.57** - 18% formiranog biofilma), a na koncentraciji od 50 µg/mL (**2.56** - 5% formiranog biofilma, **2.57** - 7% formiranog biofilma) dok je jedinjenje **2.56** i na nižoj koncentraciji od 12,5 µg/mL bilo značajno aktivnije od ramnolipidnih derivata omogućivši formiranje svega 18% biofilma u poređenju sa kontrolom.

Dalje produženje peptidnog niza je generalno imalo negativan uticaj na anti-biofilm svojstva jedinjenja. Samo na najvišim koncentracijama pojedina jedinjenja (**2.67**, **2.69**, **2.71**) imala su efekat uporediv sa ramnolipidima.

Sveukupno, većina aktivnih jedinjenja bili su benzil estri, sa primetnom prevalencijom nepolarnih aminokiselinskih ostataka poput leucina, fenilalanina ili metionina. Sva aktivna jedinjenja osim **2.41**, imaju u strukturi leucinski ostatak i fenil grupu, bilo u obliku benzil estra ili kao deo fenilalaninskog ostatka. Sa druge strane, primetno je da veoma mala promena u strukturi (leucinski derivat **2.44**) rezultuje gotovo potpunim gubitkom aktivnosti (izoleucinski derivat **2.45**). Neke od gorepomenutih strukturnih karakteristika su takođe nedavno prijavljene u radu Pierce-a i saradnika.<sup>143</sup> Autori su skenirajući biblioteku od 20 000 malih molekula došli do strukturnih fragmenata koji su neophodni za inhibiciju formiranja biofilma *C. albicans*. Aktivna jedinjenja iz njihove biblioteke bili su derivati diazaspirondekana sa para-izopropilbenzilnim bočnim nizom na piperidinskom azotu. Ovi rezultati sugerišu da ukupna fizičko-hemijska svojstva nisu jedini faktor koji određuje aktivnost ovih jedinjenja. Specifične strukturne karakteristike takođe igraju važnu ulogu.



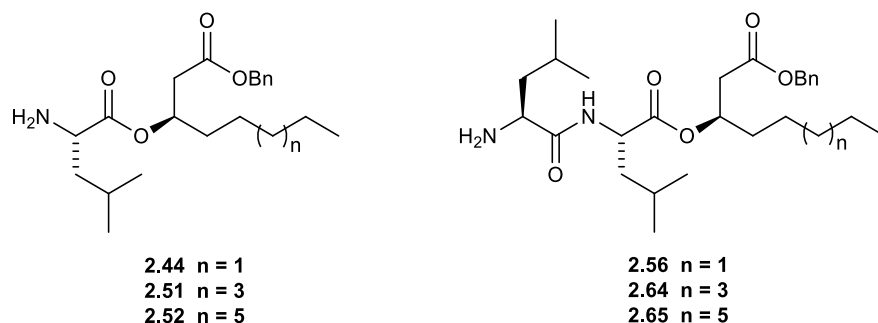
S obzirom na definisane osnovne strukturne motive najaktivnijih jedinjenja, sledeći cilj bio je da se preciznije definišu strukturni elementi neophodni za anti-biofilm aktivnost. U tu svrhu ispitana je serija alifatičnih jedinjenja (**2.74** - **2.77**) koja je strukturno slična najaktivnijem aminokiselinskom derivatu **2.44**. (slika 8).



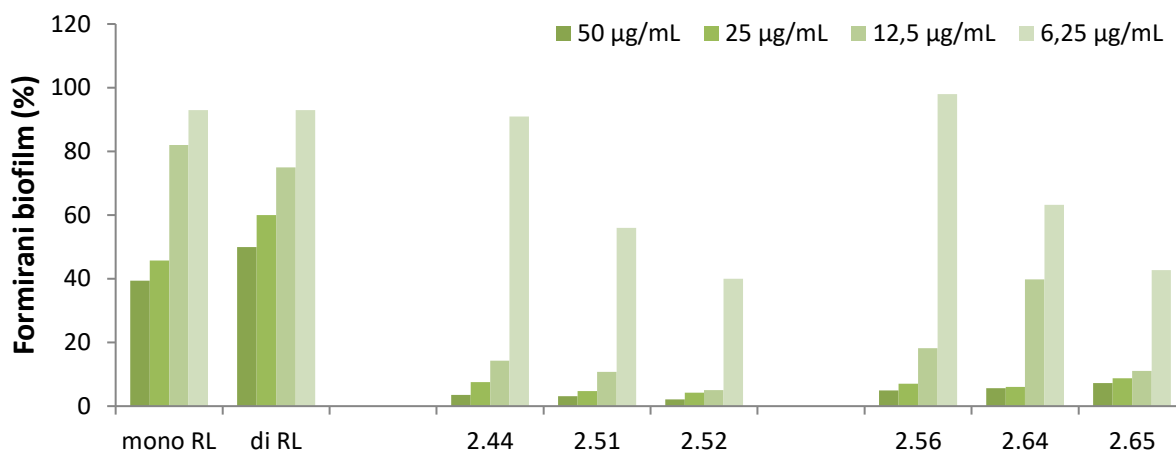
**Slika 8.** Alifatični derivati strukturno slični jedinjenju **2.44**.

Uprkos sličnoj strukturi i povećanoj lipofilnosti nijedno jedinjenje nije pokazalo anti-biofilm aktivnost protiv *C. albicans*. Ovaj rezultat sugeriše na značaj amino grupe za anti-biofilm aktivnost ramnolipidnih analoga.

U daljem toku SAR studije za dalje profilisanje strukturnih elemenata neophodnih za anti-biofilm aktivnost kao osnova korišćeni su najaktivniji aminokiselinski derivati **2.44** i **2.56**. Na **slici 9** prikazan je efekat produženja alkil niza najaktivnijih jedinjenja na inhibiciju formiranja biofilma *C. albicans*. Zamenom C-8 fragmenta najaktivnijih jedinjenja (**2.44** i **2.56**) C-10 i C-12 fragmentima dobijeni su derivati **2.51/2.52** i **2.64/2.65**.



### Inhibicija formiranja biofilma *C. albicans*



**Slika 9.** Uticaj dužine alkil niza na inhibiciju formiranja biofilma *C. albicans*.

Produženjem alkil niza dolazi do povećanja aktivnosti na svim ispitivanim koncentracijama (**slika 9**). Ova jedinjenja su takođe na svim koncentracijama imala bolju anti-biofilm aktivnost od mono- i diramnolipida. Povećana aktivnost jedinjenja u saglasnosti postepenim povećanjem lipofilnosti jedinjenja **2.51** (logP 5.57), **2.52** (logP 6.46), **2.64** (logP 6.3) i **2.65** (logP 7.2), što podržava predašnje zapažanje da anti-biofilm svojstva jedinjenja barem delimično zavise od njihove lipofilnosti.

Bitno je napomenuti da najaktivniji sintetisani derivati inhibiraju formiranje biofilma *C. albicans* na znatno nižim koncentracijama od onih koje interferiraju sa fungalnim rastom (**Tabela 3**). Ovo naglašava anti-biofilm potencijal lipopeptidnih jedinjenja jer ne deluju direktno na preživljavanje ćelija već na fungalnu populaciju u celini i kao takvi imaju znatno manje šanse da prouzrokuju razvoj rezistencije *C. albicans*.

### 2.1.5.5 Citotoksičnost odabranih derivata

Kako bi se procenio dalji potencijal medicinskog razvoja lipopeptidnih derivata u inhibiciji formiranja biofilma *C. albicans* urađeni su *in vitro* testovi citotoksičnosti najpotentnijih jedinjenja (**2.44, 2.51, 2.52, 2.56, 2.64 i 2.65**). Testovi su izvedeni na ćelijama fibroblasta pluća (MRC5). Jedinjenja **2.44** i **2.56** nisu pokazala citotoksične efekte na testiranim koncentracijama, međutim, njihovi C-10 i C-12 analozi **2.51, 2.52, 2.64** i **2.65** pokazali su citotoksične efekte na koncentracijama koje su 2-3 puta veće od njihovih BFIC<sub>50</sub> vrednosti (**tabela 5**). Može se pretpostaviti da su ovi rezultati posledica povećane lipofilnosti (LogP vrednosti **tabela 5**) što implicira na bolju interakciju sa citoplazmatskom membranom.

**Tabela 5.** Uticaj derivata leucina na formiranje biofilma *C. albicans*, njihova citotoksičnost predstavljena kao IC<sub>50</sub> vrednost na ćelijama fibroblasta pluća i fizičko-hemijski parametri.

Jedinjenje	Alkil niz	Formiranje biofilma				MIC (µg/mL)	BFIC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µg/mL)	LogP
		Koncentracija (µg/mL)							
		6.25	12.5	25	50				
<b>2.44</b>	C8	91.1	14.3	7.5	3.4	50	8	>100	4.68
<b>2.51</b>	C10	56.2	10.8	4.7	3.1	200	6	20	5.57
<b>2.52</b>	C12	40.3	5.1	4.2	2.1	100	4.5	15	6.46
<b>2.56</b>	C8	98.2	38.4	7.1	4.9	60	10	>100	5.40
<b>2.64</b>	C10	63.2	39.8	6.1	5.6	200	6.5	12	6.29
<b>2.65</b>	C12	42.7	11.2	8.8	7.2	100	4.5	8	7.18

<sup>a</sup>Koncentracija koja izaziva inhibiciju formiranja biofilma od 50%. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost dva nezavisna eksperimenta urađenih u heksaplikatu uz standardnu devijaciju između 1 i 5%.

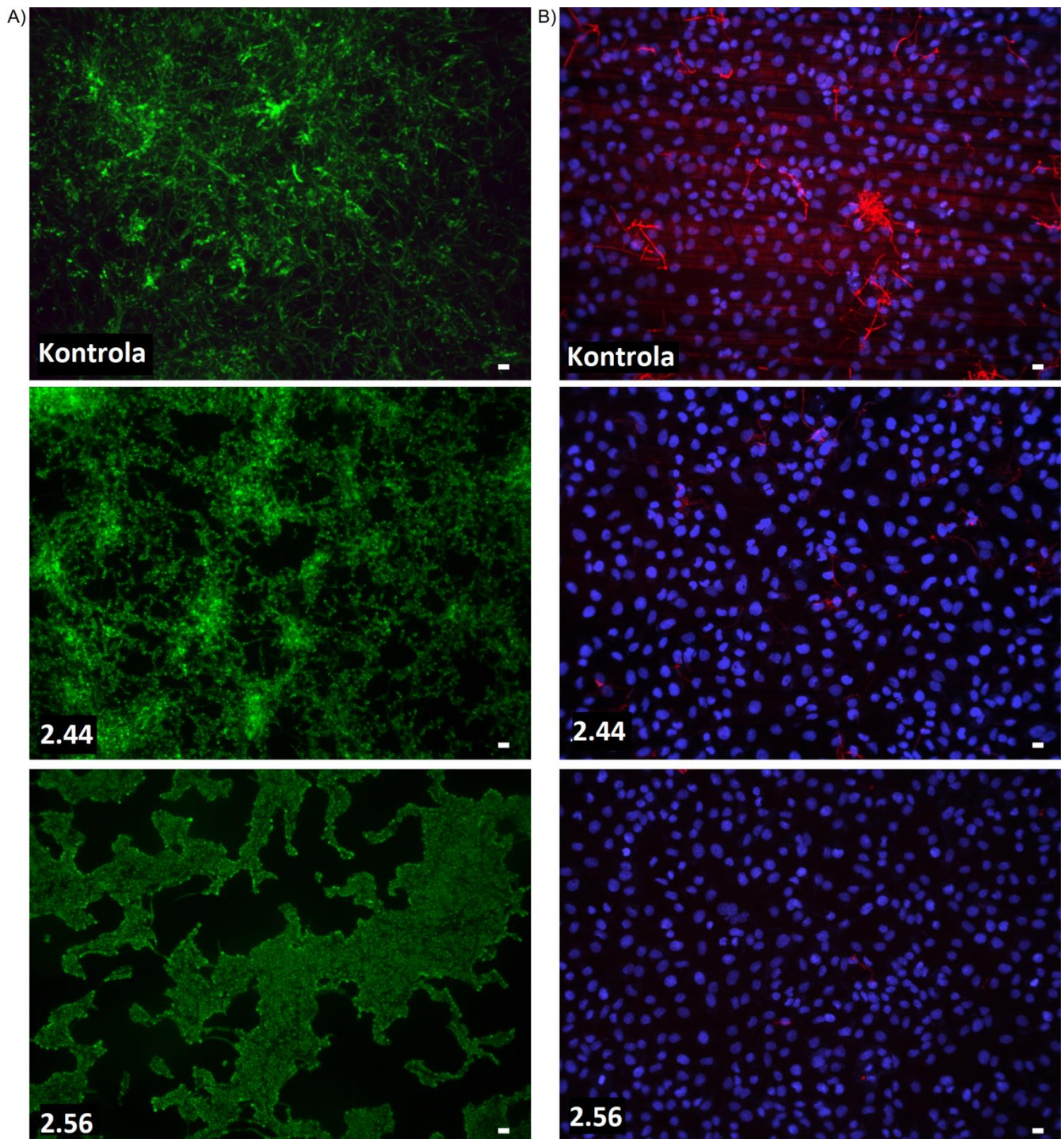
<sup>b</sup>Koncentracija koja izaziva smrt 50% ćelija nakon tretmana od 48h. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost dva nezavisna eksperimenta urađenih u kvadrplikatu uz standardnu devijaciju između 1 i 5%.

U daljem ispitivanju korišćena su dva najaktivnija jedinjenja koja nisu pokazala citotoksičnost **2.44** i **2.56**. U cilju bližeg određivanja potencijalnog mehanizma dejstva urađeni su i testovi kojima se može sagledati uticaj jedinjenja na specifične faze u razvoju biofilma *C. albicans*, konkretno u pitanju je početna faza formiranja biofilma, faza adhezije i intermedijerne faze u kojoj se dešava morfološka promena iz kvasolikog *C. albicans* u filamentozni oblik.

### 2.1.5.6 Ispitivanje uticaja jedinjenja na adheziju *C. albicans* i na prelazak *C. albicans* iz kvasolikog u filamentozni oblik

Adhezija predstavlja prvi korak u formiranju biofilma. Kod *C. albicans* u proces adhezije uključene su nespecifične hidrofobne interakcije i interakcije u kojima učestvuju proteini ćelijskog zida. Za razliku od bakterijskih vrsta kod *C. albicans*, nakon faze adhezije odvija se još jedna specifična faza, a to je morfološki prelazak iz kvasolikog (kružne ćelije) u filamentozni oblik (dugi filamentozni multićelijski oblik). Zreli biofilm *C. albicans* se sastoji iz mešavine kvasolikih ćelija, pseudohifa i hifa.<sup>144</sup>

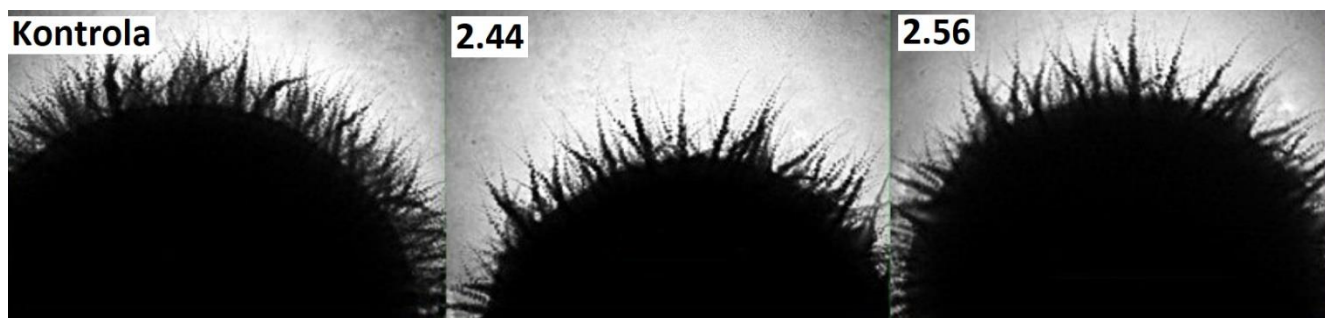
Kako bi utvrdili tačnu fazu u kojoj lipopeptidna jedinjenja **2.44** i **2.56** deluju na formiranje biofilma *C. albicans* ispitivan je njihov uticaj na adheziju *C. albicans* na A549 monosloj ćelija kao i na njihov prelazak iz kvasolikog u filamentozni oblik. MIC vrednosti za jedinjenja **2.44** i **2.56** na *C. albicans* iznose 50 odnosno 60 µg/mL. U ispitivanju njihovog anti-adhezivnog efekta u toku rasta i vizuelizacije biofilma pod fluorescentnim mikroskopom korišćene su koncentracije od 12.5 i 25 µg/mL.



**Slika 10.** a) Formiranje biofilma *C. albicans* SC5314 (GFP) u prisustvu jedinjenja **2.44** i **2.56** u koncentraciji 12.5  $\mu\text{g/mL}$ . b) Adhezija *C. albicans* SC5314 (RFP) na monosloju A549 ćelija (obojenih pomoću DAPI) u prisustvu jedinjenja **2.44** i **2.56** u koncentraciji 25  $\mu\text{g/mL}$ . Kao kontrola je korišćen 0.1% DMSO; linije predstavljaju dimenziju od 10  $\mu\text{m}$ .

Pri ovoj koncentraciji ispitivanih jedinjenja tretirane ćelije ostaju zeleno obojene, tj. nema lize kao što je to i očekivano, međutim tretirani biofilm sadrži predominantno okrugle ćelije *C. albicans* u poređenju sa kontrolom gde dolazi do formiranja mreže izduženih micelija (**slika 10a control**). Sa druge strane jedinjenja **2.44** i **2.56** nisu sprečavala formiranje hifa niti redukovala

dužinu hifa u toku procesa adhezije (**slika 10b**). Ovo je takođe uočeno u *in vitro* uslovima na Spider podlozi koja stimuliše (**slika 11**). Na osnovu ovoga može se zaključiti da lipopeptidni derivati utiču na inhibiciju formiranja biofilma *C. albicans* tako što sprečavaju njenu adheziju na biološke i abiotične površine.



**Slika 11.** Rast i formiranje hifa *C. albicans* u prisustvu i odsustvu jedinjenja **2.44** odnosno **2.56** u subinhibitornim koncentracijama ( $MIC_{80}$ ; 80% od MIC vrednosti određene na planktonskom obliku *C. albicans*) na "Spider" podlozi koja stimuliše filamentaciju.

#### **2.1.5.7 Potencijalni mehanizam dejstva lipopeptidnih derivata**

Na osnovu SAR studije i rezultata bioloških ispitivanja moguće je postaviti hipotezu o potencijalnom mehanizmu dejstva lipopeptidnih derivata na inhibiciju formiranja biofilma *C. albicans*.

Poređenjem rezultata predstavljenih na **slici 7** sa MIC vrednostima u **tabeli 3** može se uočiti da su najaktivnija jedinjenja u smislu inhibicije formiranja biofilma *C. albicans* (**2.44** i **2.56**) takođe pokazivala niske MIC vrednosti. Ove MIC vrednosti su iznad koncentracija neophodnih za inhibiciju biofilma tako da se kod inhibicije formiranja biofilma može isključiti fungicidni efekat. Posmatrajući podatke iz **tabele 5** primetno je da se produženjem hidrofobnog niza jedinjenja **2.44** i **2.56** ne smanjuje njihova MIC vrednost ali se povećava anti-biofilm potencijal (jedinjenja **2.51**, **2.52**, **2.64** i **2.65**). Ova modifikacija je nažalost rezultovala i povećanjem citotoksičnosti čime se isključuje mogućnost terapijske primene. No i pored toga, povećanje citotoksičnosti sugeriše na bolju interakciju sa citoplazmatskom membranom usled povećane hidrofobnosti C-10 i C-12 derivata. U ovom kontekstu moglo bi se očekivati i slično povećanje antimikrobne aktivnosti, ali to nije bio slučaj. Nedostatak korelacije između antifungalne aktivnosti (MIC) i inhibicije formiranja biofilma *C. albicans* sugeriše da ova dva efekta imaju različite mehanizme dejstva pa samim tim zahtevaju i različita strukturna svojstva molekula.

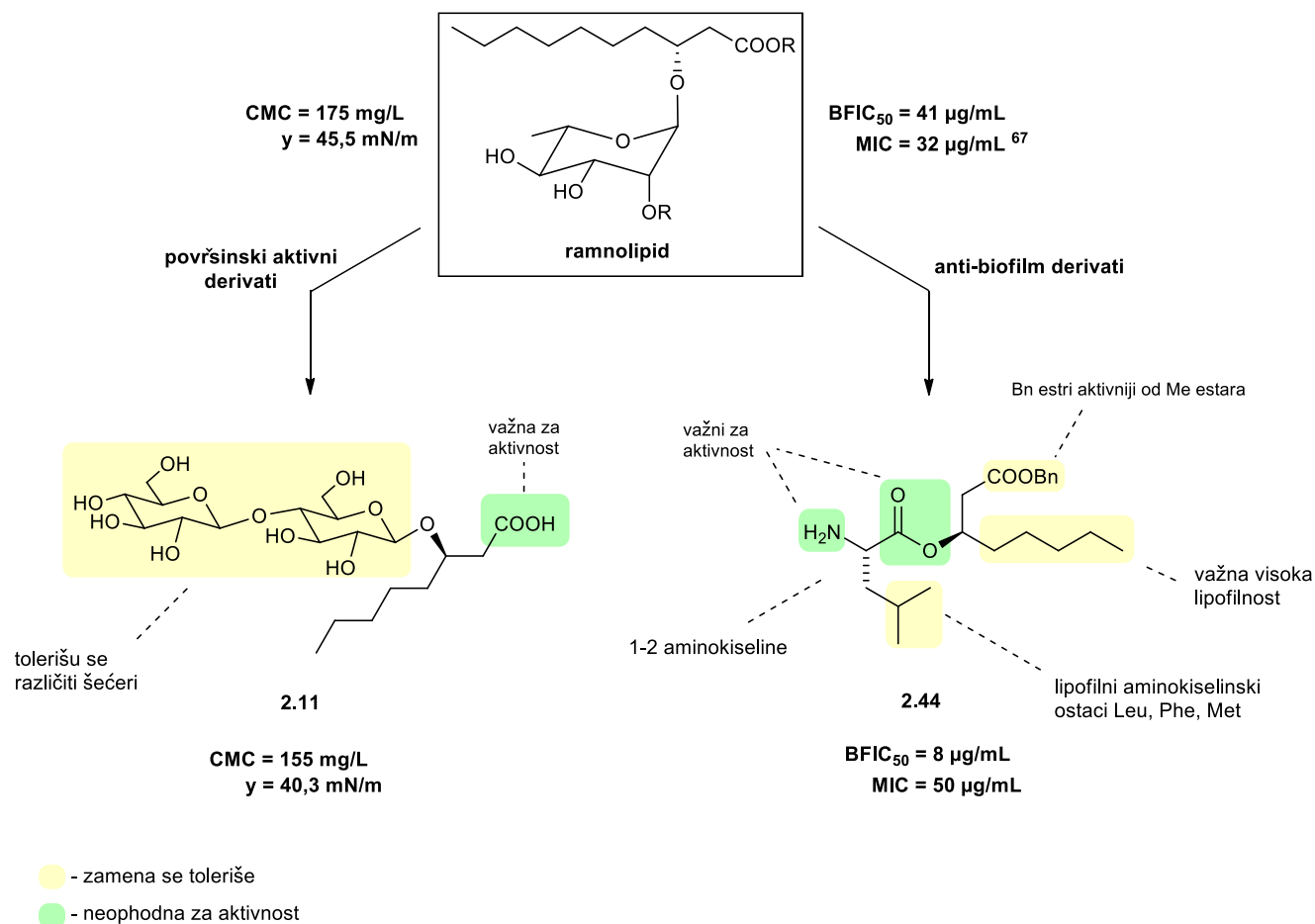
Većina jedinjenja koja su pokazala antifungalnu aktivnost imala je kao terminalnu aminokiselinu lizin što može da sugeriše na značaj jonskih interakcija za antifungalnu aktivnost. Jedinjenja sa anti-biofilm aktivnošću karakterišu se pre svega prisustvom nepolarnih aminokiselina (leucin, fenilalanin i metionin). Osim prevalencije nepolarnih aminokiselina bitno je napomenuti i potpuno gašenje površinske aktivnosti zamenom ramnoze peptidima. Ovi rezultati impliciraju da nasuprot ramnolipidima i drugim anti-biofilm biosurfaktantima poput pseudofaktina II, koji deluju redukcijom hidrofobnosti ćelijske površine, novosintetisani lipopeptidni derivati ispoljavaju aktivnost drugačijim mehanizmom.<sup>26,145,146</sup> Ovo je ilustrovano i velikom osetljivošću anti-biofilm svojstava na male strukturne promene (npr leucinski derivat **2.44** i izoleucinski

derivat **2.45**), što sugeriše da njihova aktivnost nije rezultat jednostavnih fizičko-hemijskih osobina već da je u pitanju specifičniji tip interakcija.

Kako je pokazano da jedinjenja deluju na fazu adhezije *C. albicans* može se pretpostaviti da mehanizam dejstva lipopeptidnih derivata uključuje interakciju sa proteinima ćelijskog zida koji igraju ključnu ulogu u adheziji, adhezinima ili manoproteinima.<sup>140,141,147</sup>

## 2.1.6 Rezime odnosa strukture i dejstva ramnolipidnih analoga

Fizičko-hemijska karakterizacija i biološki testovi otkrili su važne strukturne elemente za površinsku aktivnost odnosno anti-biofilm svojstva ramnolipidnih analoga. Pregled ovih rezultata prikazan je na shemi 2.30.



**Shema 2.30.** Rezime odnosa strukture i dejstva ramnolipidnih derivata

**Zamenom ramnoze drugim šećerima** površinska aktivnost molekula ostaje očuvana. U poređenju sa ramnolipidima i derivati glukoze i laktoze imaju niže kritične micelarne koncentracije (CMC) i snižavaju površinski napon vode ( $\gamma$ ) u proseku za 5 jedinica više od ramnolipida. Za površinsku aktivnost ključna je slobodna karboksilna grupa, s obzirom da su estarski derivati pokazali veoma blagu površinsku aktivnost.

Šećerni analozi, bez obzira na njihovu izuzetnu površinsku aktivnost, za razliku od ramnolipida, ne pokazuju antimikrobna svojstva, niti utiču na formiranje biofilmova.

**Zamenom ramnoze aminokiselinama** dobijaju se jedinjenja sa izraženom anti-biofilm aktivnošću protiv *C. albicans*. Za aktivnost ovih jedinjenja neophodna je slobodna NH<sub>2</sub> grupa na N-terminusu i estarski linker. Uklanjanjem amino grupe iz strukturno sličnih jedinjenja (2.74 - 2.77) gubi se anti-biofilm aktivnost, isti rezultat dobija se zamenom estarskog linkera azotom (2.20 - 2.24).

Karboksilna grupa 3-hidroksikiseline može biti u obliku metil i benzil estera. Mada su obe grupe estara pokazivale aktivnost, najaktivniji derivati sadržali su benzil-estar (**2.44** i **2.56**). Ustanovljeno je da je optimalan broj aminokiselina u peptidnom nizu jedna ili dve, dalje produženje peptidnog niza rezultovalo je slabljenjem anti-biofilm aktivnosti.

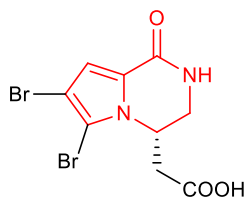
Za anti-biofilm aktivnost protiv *C. albicans* neophodni su lipofilni aminokiselinski ostaci (leucin, fenilalanin i metionin). Produženje dužine ugljovodoničnog niza 3-hidroksikiseline poboljšava anti-biofilm svojstva molekula ali isto tako povećava i *in vitro* citotoksičnost.



## 2.2 Sinteza longamida B, stilizina D i njihovih derivata

### 2.2.1 Uvod

Kao antimikrobni i anti-biofilm agensi poznati su i neki predstavnici bromopiroolskih alkaloida. Longamid B je jedan od najistraživanijih molekula ove grupe. Poznata je njegova antimikrobna aktivnost na sojeve vrsta *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*.<sup>148</sup> Iz tog razloga predstavlja atraktivan molekul za totalnu sintezu ali i osnovu za šire proučavanje hemijskog prostora definisanog njegovom strukturom. Osnovni skelet ovog molekula, dihidro-pirol[1,2-a]pirazin-1-on ulazi u sastav srodnih alkaloida pa razvoj nove sintetske metodologije može poslužiti i u sintezi ostalih alkaloida ove grupe.



Longamid B

Slika 3.1. Longamid B.

### 2.2.2 Cilj

Cilj ovog dela istraživanja bio je razvoj sintetskog puta za dobijanje bromopiroolskog alkaloida longamida B i njegovih derivata. U tu svrhu osmišljena je retrosinteza u kojoj se biciklični skelet molekula formira ciklizacijom aminoalena. Utemeljenost ove strategije bila bi utvrđena:

- 1) Ispitivanjem intramolekulskih hidroaminacija alena u prisustvu različitih metalnih soli
- 2) Ispitivanjem stereoselektivnosti reakcije ciklizacije
- 3) Proširenjem metodologije primenom srodnih reakcija u cilju diverzifikacije strukture longamida B.

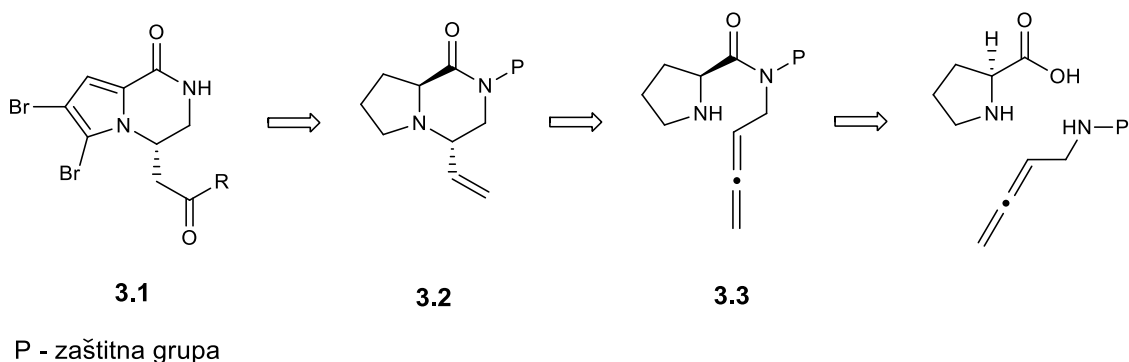
### 2.2.3 Retrosintetička analiza longamida B i njegovih derivata

Strukturno longamid B sadrži bromovani pirolketopiperazinski skelet, sa karboksimetilgrupom vezanom za hiralni C atom u položaju 4. Pretpostavljeno je da se piperazinski prsten može dobiti intramolekulskom nukleofilnom adicijom na aktivirani alen (**shema 3.1**).

Ključna C-N veza bila bi formirana nukleofilnom adicijom prolinskog azota na proksimalnu dvostruku vezu alena. Mada prirodni proizvod **3.1** sadrži pirol, korišćenjem L-prolina kao njegovog prekursora **3.3** moguće je potencijalno uticati na stereoselektivnost reakcije ciklizacije.

Alenski fragment ciklizacionog prekursora osmišljen je imajući na umu potencijalni regiohemijski ishod reakcije. Odabran je alenski fragment od četiri C atoma jer se pretpostavlja da bi takav fragment omogućio formiranje željenog šestočlanog prstena uz formiranje egzociklične dvostruke veze neophodne za kasnije uvođenje karboksilne funkcionalne grupe. Željeni

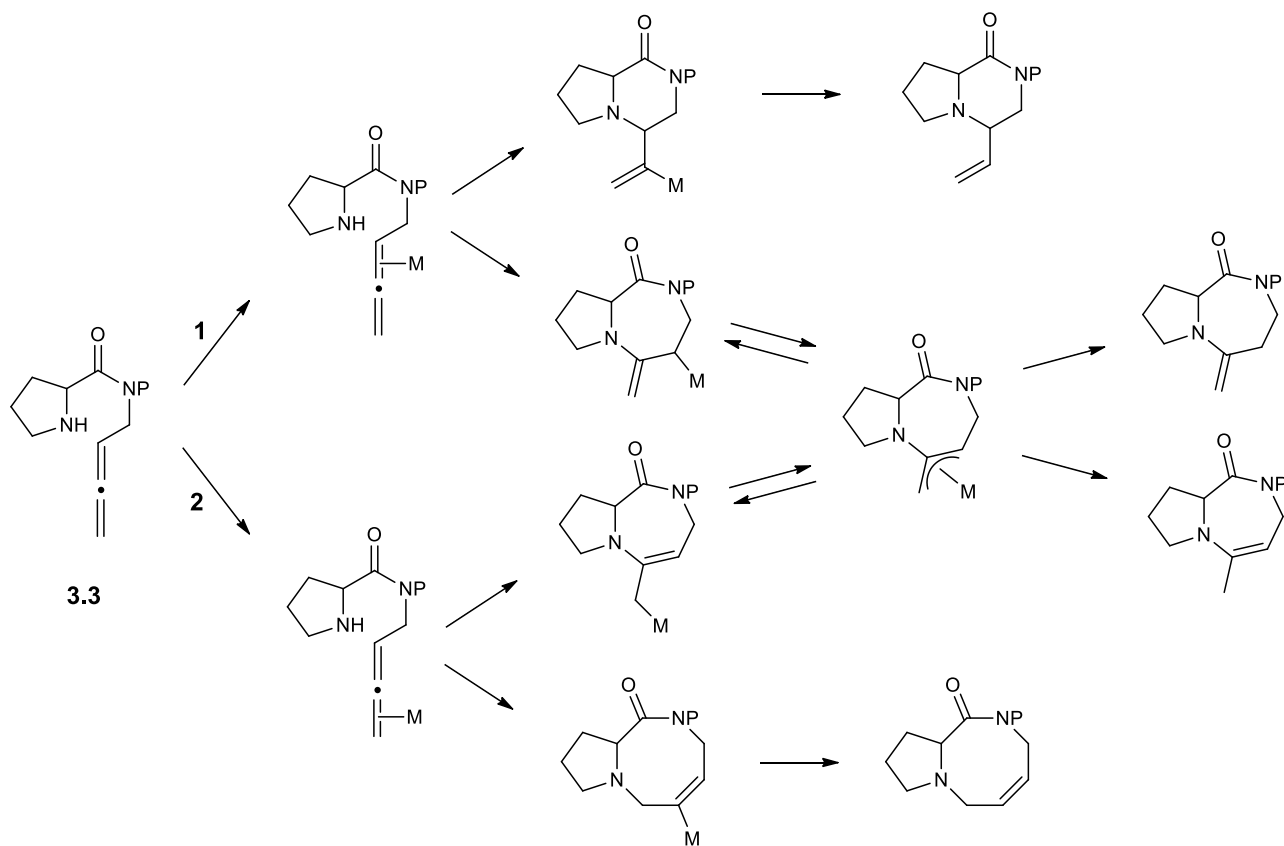
ciklizacioni prekursor **3.3** može se dobiti kuplovanjem prolina i odgovarajuće zaštićenog aminoalena.



**Shema 3.1.** Retrosintetska analiza longamida B.

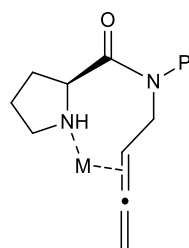
Potencijalni problemi koji se mogu javiti u ovoj strategiji jesu problemi regioselektivnosti i stereoselektivnosti reakcije ciklizacije.

Ciklizacije ovog tipa odvijaju se u prisustvu prelaznih metala i poznatije su kao hidroaminacije. Aktivatori alenske komponente mogu biti različiti prelazni metali: paladijum, srebro, zlato, bakar itd.<sup>149-152</sup> S obzirom da je međutim reaktivnost alena raspoređena na tri susedna C atoma, može se javiti problem regioselektivnosti te može doći do formiranja smese proizvoda. Potencijalni ishodi u kontekstu regiohemije reakcije hidroaminacije jedinjenja **3.3** prikazani su na shemi **3.2**.



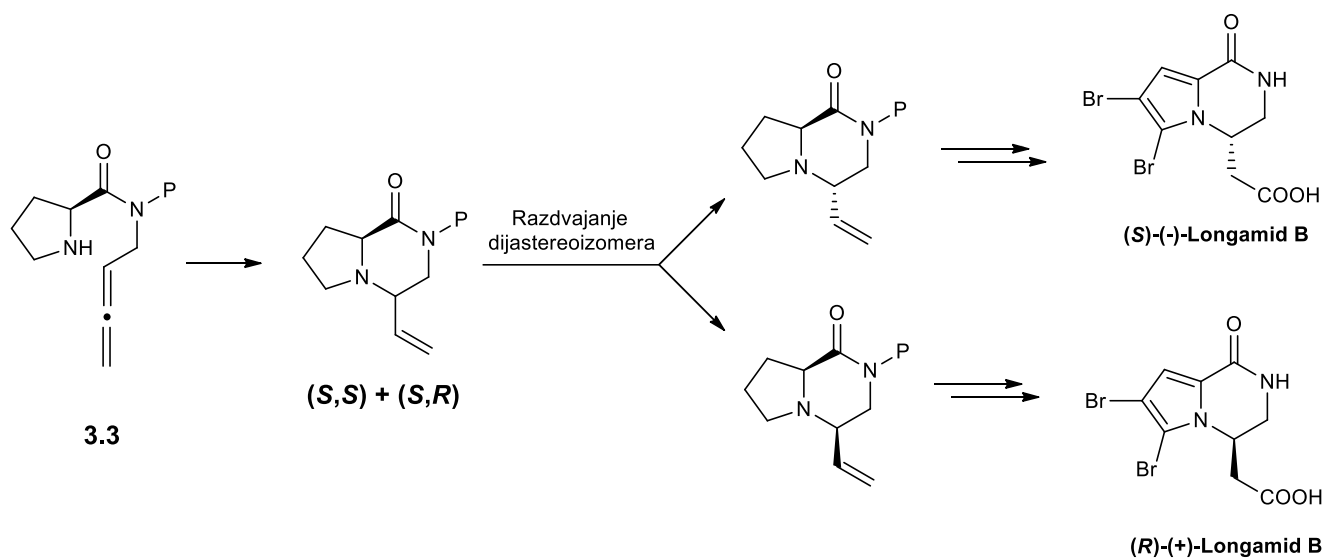
**Shema 3.2.** Mogući ishodi u kontekstu regioselektivnosti u hidroaminacijama jedinjenja **3.3**.

Reakcije katalizovane metalima koji imaju svojstva Lewis-ovih kiselina odvijaju se preko kompleksiranja dvostrukih veza čime se alenski sistem aktivira za napad nukleofila. Kada je metal tvrda Lewis-ova kiselina (Pd) favorizovana je interakcija sa elektronski bogatijom dvostrukom vezom alena pa kao proizvodi nastaju vinil supstituisani prstenovi (**Shema 3.2, reakcioni put 1**). Meke Lewis-ove kiseline (Au) preferiraju sterno povoljniji položaj pa stupaju u interakciju sa terminalnom dvostrukom vezom alena (**Shema 3.2, reakcioni put 2**).<sup>153,154</sup> Mada su teoretski moguća četiri proizvoda, u reakcijama ovog tipa najčešće se formiraju petočlani i šestočlani prstenovi. U slučaju jedinjenja **3.3** prolinski azot pozicioniran je na rastojanju koje favorizuje nastajanje šestočlanog prstena.<sup>155</sup> Osim toga moguća je koordinacija metala sa prolinskim azotom (**slika 2**) što olakšava koordinaciju sa proksimalnom dvostrukom vezom alena favorizujući tako reakcioni put **1** iz **sheme 3.2**.



**Slika 3.2.** Istovremena koordinacija metala sa azotom i proksimalnom dvostrukom vezom alena.

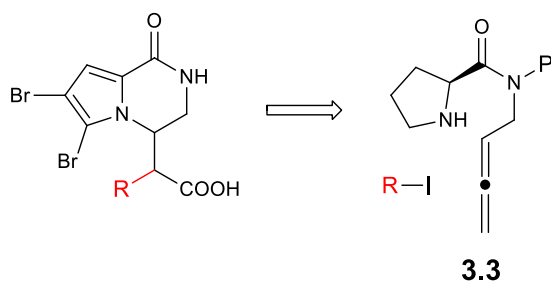
Na stereohemijski ishod reakcije ciklizacije može se potencijalno uticati primenom hiralnog ciklizacionog prekursora. U skladu sa tim zamišljeno je da se ciklizacioni prekursor **3.3** sintetiše iz L-prolina. Mada je visoka stereoselektivnost poželjna, dobijanje oba diastereoizomera može potencijalno omogućiti sintezu oba enantiomera longamida B kao što je prikazano na **shemi 3.3**.



**Shema 3.3.** Primena hiralnog ciklizacionog prekursora **3.3** omogućava potencijalnu sintezu oba enantiomera longamida B.

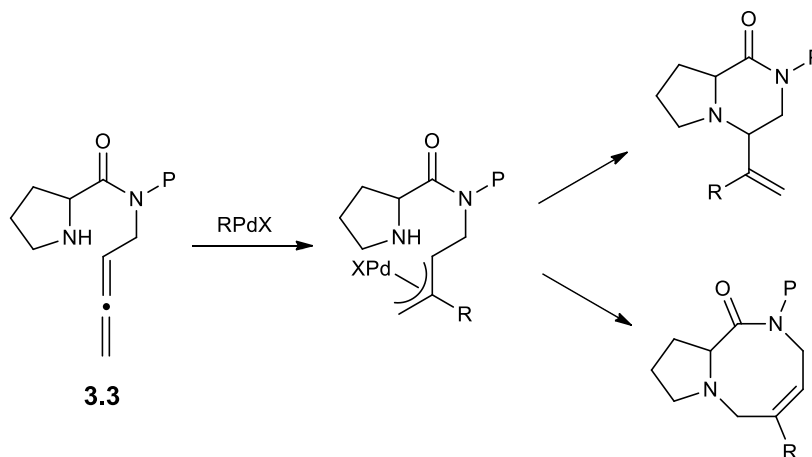
Specifična reaktivnost alena može omogućiti i sintezu nedavno otkrivenih derivata longamida B koji imaju supstituente u  $\alpha$  položaju pored karboksilne kiseline. Naime aminoaleni u prisustvu paladijuma mogu reagovati sa aril-halogenidima u kaskadnom procesu gde dolazi do formiranja C-C a potom i C-N veze.<sup>156</sup> Ovaj proces poznatiji je kao karboaminacija alena. U retrosintetskom

smislu, u reakcijama ovog tipa moguće je koristiti prekursor **3.3** koji se koristi i u sintezi longamida (**shema 3.4**).



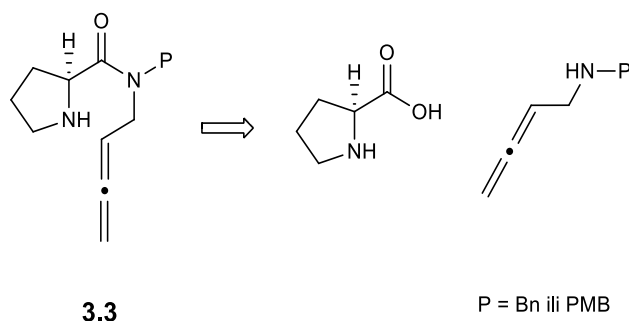
**Shema 3.4.** Retrosinteza analoga longamida.

Ovaj tip reakcija takođe može dati različite proizvode u smislu regiohemije (**shema 3.5**) mada se i ovde kao i u gorepomenutim reakcijama hidroaminacije preferira formiranje šestočlanih prstenova. U ovom procesu paladijum(II), dobijen oksidativnom adicijom paladijuma(0) na aril-halogenid, formira  $\pi$ -alil-paladijum intermedijer sa alenom uz posledično formiranje intermolekulske C-C veze. Na ovaj proces se potom nadovezuje intramolekulski napad amino grupe na  $\pi$ -alil-paladijum intermedijer pri čemu se formiraju supstituisani heterociklusi različitih veličina.<sup>153,154</sup>



**Shema 3.5.** Regioselektivnost u karboaminacijama jedinjenja **3.3**.

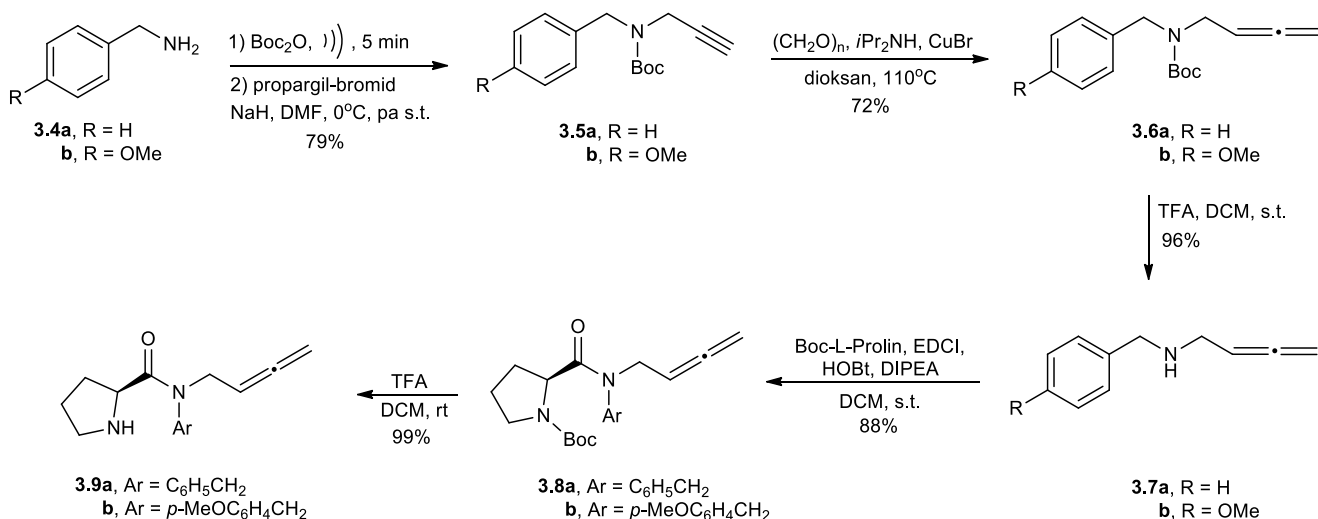
Ciklizacioni prekursor za oba procesa je aminoalen **3.3**, pa je prvi korak u ovoj studiji bila upravo sinteza ovog prekursora (**shema 3.6**). Alenski fragment može se dobiti Crabbe-ovom reakcijom, a kako bi kuplovanje sa prolinom bilo uspešno korišćene bi bile zaštitne grupe koje ne umanjuju nukleofilnost azota – benzil i *p*-metoksibenzil.



**Shema 3.6.** Retrosinteza ciklizacionog prekursora **3.3**.

### 2.2.4 Sinteza ciklizacionog prekursora

Sinteza ciklizacionog prekursora otpočeta je Boc-zaštitom benzilaminskog derivata **3.4** kako bi se dobio monopropargilovani proizvod **3.5** (**shema 3.7**). Boc-zaštita benzilamina urađena je bez rastvarača na ultrazvučnom kupatilu. Sirovi proizvod alkilovan je propargil-bromidom pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.5** u ukupnom prinosu od 79 %. Homologacijom propargil derivata **3.5** u prisustvu formaldehida, diizopropilamina i CuBr (Crabbe-ova reakcija) dobijen je terminalni alen **3.6**. Uklanjanje Boc-zaštite i potom kuplovanje dobijenog aminoalena sa Boc-L-prolinom dalo je zaštićeni prekursor **3.8** u obliku smese rotamera. Deprotekcijom jedinjenja **3.8** dobijen je ciklizacioni prekursor **3.9**.

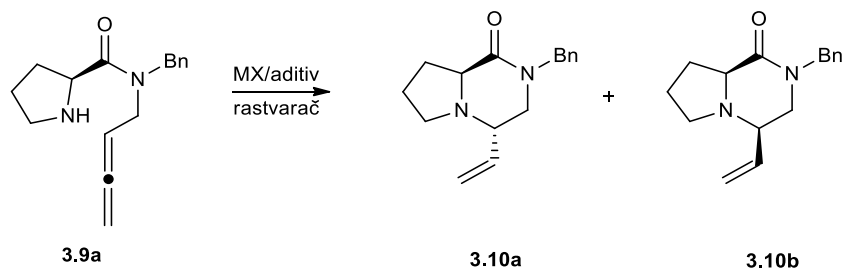


**Shema 3.7.** Sinteza ciklizacionog prekursora **3.9**.

## 2.2.5 Optimizacija reakcije ciklizacije aminoalena

U cilju pronalazjenja optimalnih uslova ciklizacije benzil zaštićenog jedinjenja **3.9** ispitana je serija metalnih soli koje imaju sposobnost koordinacije sa dvostrukom vezom. Prinos reakcije i odnos dijastereoizomera određivan je nakon filtriranja i ekstrakcije NMR spektroskopijom i to u odnosu na interni standard – dioksan.

**Tabela 3.1.** Optimizacija ciklizacije alen-amina u prisustvu metalnih katalizatora



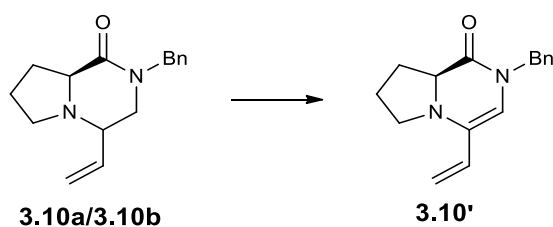
Primer	MX/aditiv	MX (mol %)	rastvarač	vreme	NMR-prinos (%)	Odnos ( <b>3.10a</b> : <b>3.10b</b> )
<b>a</b>	AuCl <sub>3</sub>	5	DCM	5d	48	61:39
<b>b</b>	AuCl <sub>3</sub> /CaCO <sub>3</sub> /MS4Å	5	DCM + 5 % ACN	5d	55	79:21
<b>c</b>	Ph <sub>3</sub> PAuCl	5	DCM	5d	/	/
<b>d</b>	Cu(OTf) <sub>2</sub>	5	DCM	5d	Tragovi	/
<b>e</b>	Cu(OTf) <sub>2</sub>	5	Aceton	5d	57	79:21
<b>f</b>	Cu(OTf) <sub>2</sub> /CaCO <sub>3</sub> /MS4Å	5	Aceton	5d	Tragovi	/
<b>g</b>	TiCl <sub>4</sub>	5	DCM	5d	/	/
<b>h</b>	K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	20	Aceton	5d	/	/
<b>i</b>	Ag <sub>2</sub> O	20	Aceton	18h	28	71:29
<b>j</b>	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	Aceton	18h	Tragovi	/
<b>k</b>	AgNO <sub>3</sub>	20	Aceton	18h	19	69:31
<b>l</b>	CH <sub>3</sub> COOAg	20	Aceton	18h	21	70:30
<b>m</b>	AgOTf	20	Aceton	3d	/	/
<b>n</b>	AgOTf	20	DCM	18h	38	74:26
<b>o</b>	AgNO <sub>3</sub> /K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	Aceton + H <sub>2</sub> O	18h	25	67:33
<b>p</b>	AgNO <sub>3</sub> /CaCO <sub>3</sub>	20	Aceton + H <sub>2</sub> O	18h	21	69:31
<b>q</b>	AgNO <sub>3</sub> /CaCO <sub>3</sub>	40	Aceton + H <sub>2</sub> O	18h	55	86:14
<b>r</b>	AgNO <sub>3</sub> /CaCO <sub>3</sub>	80	Aceton + H <sub>2</sub> O	18h	83 <sup>a</sup>	83:17
<b>s</b>	AgOTf/CaCO <sub>3</sub>	20	Aceton + H <sub>2</sub> O	18h	50	81:19
<b>t</b>	AgOTf/CaCO <sub>3</sub>	40	Aceton + H <sub>2</sub> O	18h	74	77:23
<b>u</b>	Pd(OAc) <sub>2</sub> /TFA	5	THF	18h	/	/

<sup>a</sup>Izolovan prinos

Svi ispitivani reakcioni uslovi rezultovali su srednjim stepenom dijastereoselektivnosti indukovanom hiralinim supstratom. Sa katalitičkim količinama metalnih soli sve reakcije su zahtevale veoma dugo reakciono vreme (i do 5 dana) za zadovoljavajuću konverziju (primeri **a**, **b**, **e**, **tabela 3.1**). Ovi podaci su u skladu sa literaturnim podacima koji sugerišu da su amidi reaktivniji od amina u ovakvim uslovima što je verovatno posledica smanjenih elektron-donorskih osobina amida. Amini sa druge strane zahvaljujući svojim ligandnim svojstavima poništavaju efekat Lewis-ovih kiselina. Reakcija katalizovana AuCl<sub>3</sub>-om davala je difuzne mrlje na

TLC-u i nešto kompleksniji  $^1\text{H}$ NMR spektar (primer **a**), dodatak  $\text{CaCO}_3$  rezultovao je jasno definisanim mrljama na TLC-u i  $^1\text{H}$ NMR spektrom u kome su bili приметni isključivo polazno jedinjenje i ciklizacioni proizvodi (primer **b**). Soli titanijuma i platine nisu dale proizvode reakcije (primeri **g** i **h**). Jedinjenja srebra sa druge strane davala su bolje prinose, ali i zahtevale primenu stehiometrijske količine (primeri **i-t**, **tabela 3.1**). I pored toga, dostupnost jedinjenja srebra potstakla nas je na njihovu detaljniju studiju. U količini od 20 molskih procenata (primeri **i-n**) najaktivnija so bila je  $\text{AgOTf}$  u dihlormetanu kao rastvaraču sa prinosom od 38 %. Ovaj primer je takođe davao i najbolju diastereoselektivnost 74:26. Dodatak  $\text{CaCO}_3$ , reakcijama katalizovanim  $\text{AgNO}_3$ -om i  $\text{AgOTf}$ -om rezultovao je čistijom reakcionom smesom (primeri **p-t**). Sa druge strane dodatak  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (primer **o**) nije imao uticaja na smanjenje količine sporednih proizvoda. Povećanje količine metalnih soli rezultovalo je značajnim povećanjem prinosa reakcija (primeri **q-t**). Mada je reakcija u prisustvu 40 mol%  $\text{AgOTf}$  (primer **t**) davala veće prinose u poređenju sa istom količinom  $\text{AgNO}_3$  (primer **q**), dalje povećanje količine  $\text{AgOTf}$  nije ispitivano s obzirom na osetljivost ovog jedinjenja na vlagu i nepraktičnu primenu na većoj skali. Stoga je količina od 80 mol% primenjena samo na  $\text{AgNO}_3$  pri čemu je nakon 18h izvršena potpuna konverzija polaznog jedinjenja, a prinos nakon izolovanja iznosio je 83 %. Pod ovim uslovima proizvod je dobijen kao razdvojiva smesa diastereoizomera **3.10a** i **3.10b** u odnosu 83:17. Stereochemija proizvoda reakcije određena je ROESY spektrima i utvrđeno je da je glavni proizvod *trans* izomer tj. da stereochemija glavnog proizvoda odgovara stereochemiji longamida B. Naposljetku je pokušana i hidroaminacija amino-alena u prisustvu katalitičke količine  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (primer **u**). Reakcija je izvođena uz dodatak 20 mol% TFA. Nakon 18h u reakciji je bilo prisutno samo polazno jedinjenje.

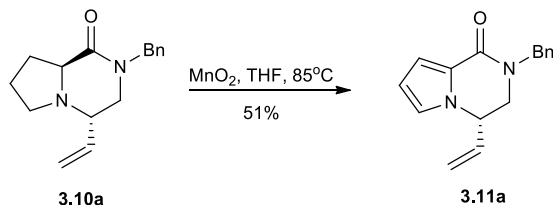
Tokom optimizacije ovog procesa primećeno je da se ubrzo po izolovanju menja boja ciklizacionog proizvoda iz blede žute u tamno ljubičastu. Analizom NMR spektara proizvoda sa izmenjenom bojom usatnovljeno je prisustvo komponente **3.10'** nastale oksidacionom transformacijom. Ova struktura potvrđena je i analizom spektara dobijenih masenom spektroskopijom. Ponovnim snimanjem NMR spektara nakon ove promene, utvrđeno je prisustvo nečistoće sa dvostrukom vezom. Molekulski jon sa 2 H atoma manje na masenoj spektrometriji potvrdio je da se na vazduhu i temperaturi preko  $35^\circ\text{C}$  jedinjenja **3.10a** i **3.10b** ubrzano oksiduju. Pretpostavljena struktura sporednog proizvoda prikazana je na **shemi 3.8**.



**Shema 3.8.** Proizvod degradacije jedinjenja **3.10a** i **3.10b**.

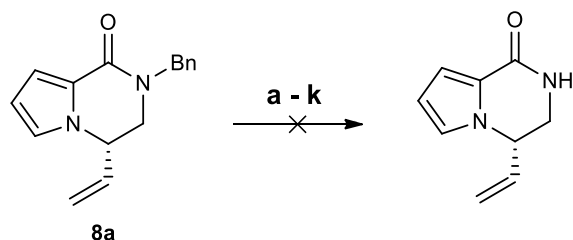
## 2.2.6 Sinteza longamida B i stilizina D

Nakon optimizacije koraka anulacije i utvrđivanja stereochemije jedinjenja **3.10a** i **3.10b** pristupljeno je sintezi longamida B. S obzirom na nestabilnost ciklizacionog proizvoda, odmah po izolovanju željenog diastereoizomera pristupljeno je oksidaciji pirolidinske strukture mangan-dioksidom do pirola (**shema 3.9**). Reakcija je rađena u refleksu THF-a u prisustvu 30 ekvivalenata  $MnO_2$ . Reakcija je praćena na TLC-u do nestanka polaznog jedinjenja. Nakon potpune konverzije izolovano je svega 51 % proizvoda **3.11a** što je najverovatnije posledica adsorpcije jedinjenja na  $MnO_2$ . Pokušaji smanjenja količine  $MnO_2$  u reakciji oksidacije doveli su do nepotpune konverzije polaznog jedinjenja **3.10a**.



**Shema 3.9.** Oksidacija proizvoda ciklizacije mangan-dioksidom.

Naredni korak u sintezi bio je uklanjanje benzil-zaštite sa amida (**shema 3.9**). Literaturna pretraga pokazala je da se za skidanje benzil grupe uglavnom koristi hidrogenoliza ili oksidativna deprotekcija. Pokušaji oksidativne deprotekcije benzil grupe (KBr, okson u  $MeNO_2$  i deprotekcija cerijum-amonijum-nitratom (CAN) u ACN-u) završili su neuspehom. Upotreba CAN-a u nekoliko navrata rezultovala je dobijanjem kompleksne smese iz koje je kao glavni proizvod izolovan 5-nitro pirolski derivat. Jedinjenje **3.11a** korišćeno je i kao model sistem za testiranje reakcije hidrogenolize. Različiti pokušaji hidrogenolize pod atmosferskim ili povišenim pritiskom u neutralnim ili kiselim uslovima sa reakcionim vremenom do 3d ( $H_2$ , Pd/C u MeOH;  $H_2$ ,  $PtO_2$  u MeOH;  $H_2$ , Pd/C u t-BuOH i HCl;  $H_2$ , Pd/C u AcOH; 3 atm  $H_2$ ,  $Pd(OH)_2/C$  u MeOH) rezultovali su isključivo redukcijom dvostruke veze. Nekoliko pokušaja redukcijom pomoću  $HCOONH_4$  i Pd/C u refleksu metanola ili pod mikrotalasnim uslovima takođe nisu omogućili uklanjanje benzil grupe. Naposljetku kod pokušaja uklanjanja benzil-zaštite u kiselim uslovima (u refleksu TFA; u refleksu HCOOH; HBr/ $H_2O$ ) u reakcionoj smesi bilo je prisutno samo polazno jedinjenje.

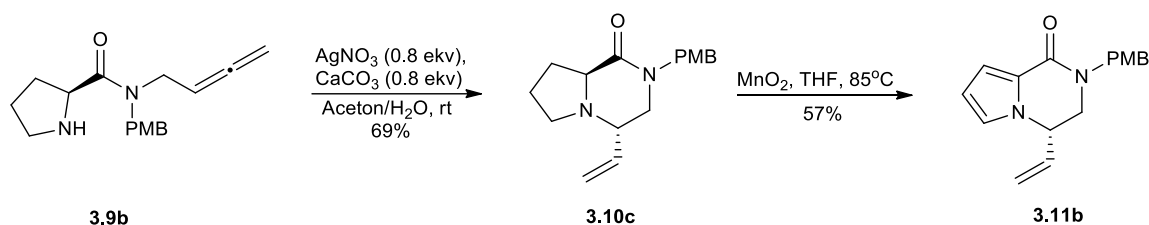


**a)** KBr, okson,  $MeNO_2$ ; **b)** CAN, ACN; **c)**  $H_2$ , Pd/C, MeOH; **d)**  $H_2$ ,  $PtO_2$ , MeOH; **e)**  $H_2$ , Pd/C, t-BuOH, HCl **f)**  $H_2$ , Pd/C u AcOH; **g)** 3 atm  $H_2$ ,  $Pd(OH)_2/C$ , MeOH; **h)**  $HCOONH_4$ , Pd/C, MeOH; **i)** TFA rfx; **j)** HCOOH rfx; **k)** HBr/ $H_2O$ .

**Shema 3.10.** Pokušaji deprotekcije benzil grupe.

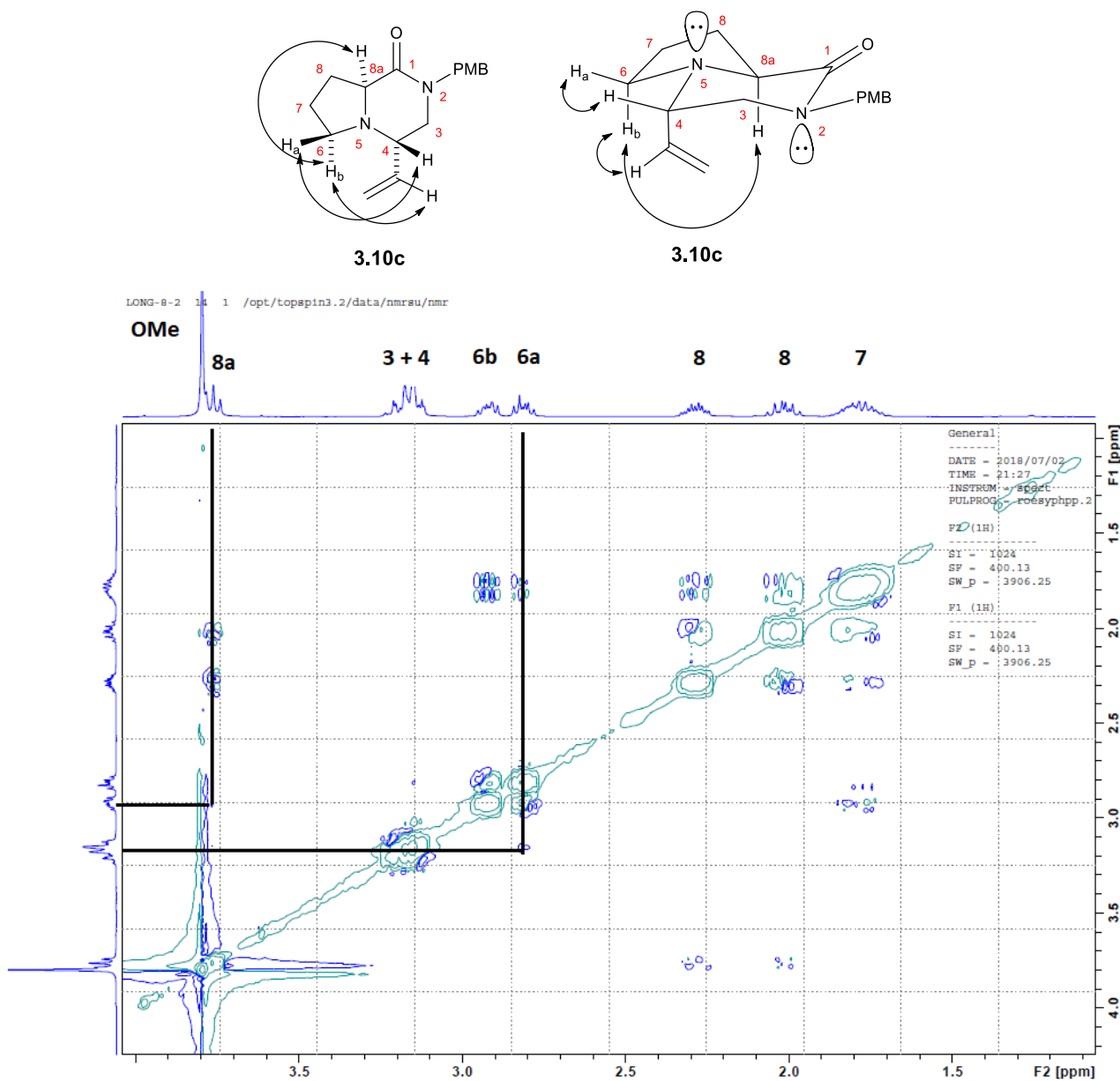


S obzirom na nemogućnost uklanjanja benzil-zaštite neophodna je bila promena strategije. Kako bi se alenski fragment spojio sa karboksilnom kiselinom prolina neophodno je bilo odabrati zaštitnu grupu koja će očuvati nukleofilnost azota pa je stoga odabrana *para*-metoksibenzil (PMB) zaštitna grupa za koju je poznato da se u kiselim uslovima može ukloniti lakše od benzil grupe. U sintezi PMB-zaštićenog derivata krenuto je iz *p*-metoksibenzilamina i već pomenutim sledom reakcija dobijeno je jedinjenje **3.9b** (shema 3.7). Ciklizacijom jedinjenja **3.9b** pod optimizovanim uslovima izolovan je *trans*-dijastereoizomer **3.10c** u prinosu od 69 % (shema 3.11). Prinos u reakciji oksidacije neznatno je povećan ispiranjem zaostalog MnO<sub>2</sub> vrućim THF-om sa 51 na 57 %.



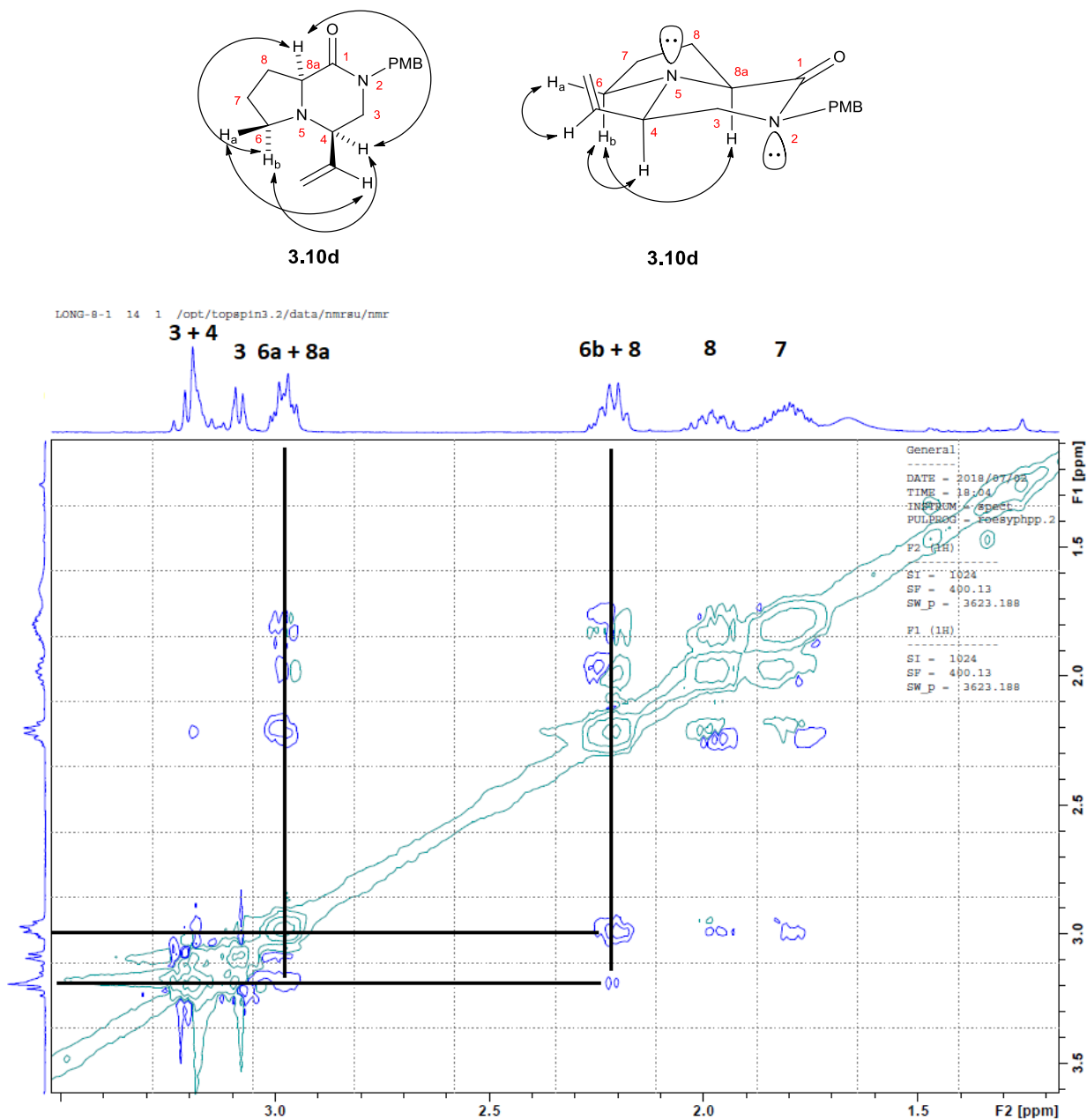
**Shema 3.11.** Ciklizacija i oksidacija PMB-zaštićenog alena.

Stereohemija oba diastereoisomera **3.10c** i **3.10b** potvrđena je korelacijama u ROESY spektrima (**slika 3.3** i **slika 3.4**). Kod glavnog proizvoda ciklizacije **3.10c** diastereotopni protoni 6a(H) i 6b(H) pokazuju korelacije sa prostorno bliskim protonima u položajima 4 odnosno 8a, redom (**slika 3.3**). Nedostatak korelacija između 8a(H) i 4(H) kao i između 6b(H) i 4(H) pokazuje da se radi o *trans* diastereoisomeru. Pored toga korelacioni signal između olefinskog protona i 6b(H) ukazuje na aksijalni položaj vinilne grupe.



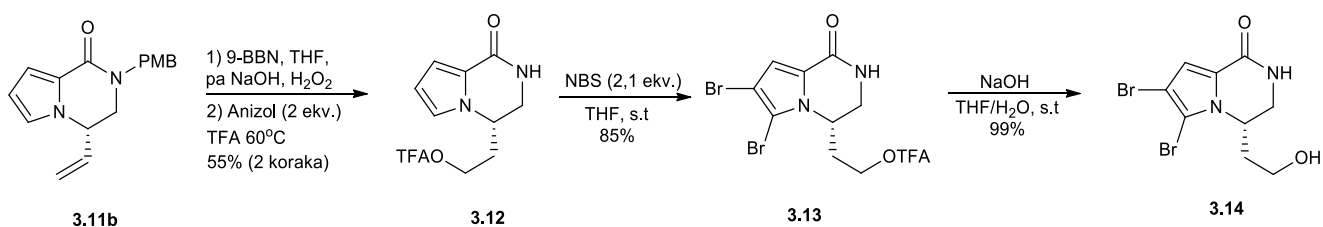
**Slika 3.3.** Značajne korelacije u ROESY spektru jedinjenja **3.10c**.

Ključne korelacije sporednog diastereoizomera prikazane su na **slici 3.4**. Tri protona koja se nalaze sa iste strane bicikličnog sistema 4(H), 6b(H) i 8a(H) imaju vidljive korelacije u ROESY spektru. Osim toga položaj vinilni H ostvaruje korelacije sa drugim diastereotopnim protonom u položaju 6 (6a(H)), što ukazuje na ekvatorijalni položaj vinilne grupe.



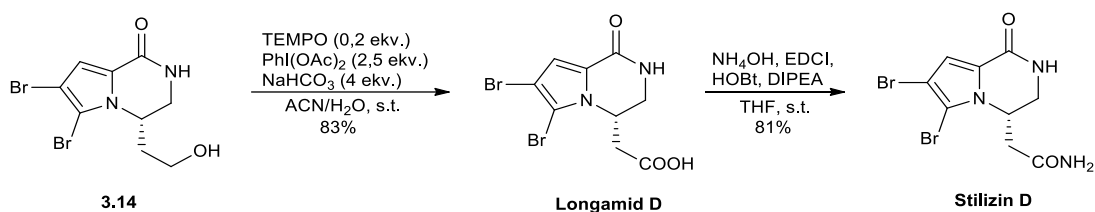
**Slika 3.4.** Značajne korelacije u ROESY spektru jedinjenja **3.10d**.

U nastavku sinteze bilo je neophodno bromovati pirolski prsten i transformisati dvostruku vezu u karboksilnu kiselinu. Ovaj proces započet je hidroborovanjem jedinjenja **3.11b** i oksidacijom intermedijernog proizvoda pomoću peroksida pri čemu je dobijen primarni alkohol koji nije bilo moguće u potpunosti prečistiti od zaostalog 9-BBN-a (**shema 3.12**). Stoga je dobijeni onečišćen proizvod kao takav iskorišćen u reakciji deprotekcije koja se ovoga puta odigrala veoma brzo u trifluorosirćetnoj kiselini na povišenoj temperaturi uz dodatak anizola. Kao proizvod reakcije dobijen je trifluoroacetatni estar **3.12**. Prisustvo estra potvrđeno je kvartetom karakterističnim za CF<sub>3</sub> grupu u <sup>13</sup>C spektru na 157 ppm-a. Naredni korak bilo je dibromovanje pirolskog prstena koje je urađeno u THF-u u prisustvu 2,1 ekvivalenta N-bromosukcinimida (NBS) pri čemu je dobijen proizvod **3.13** u prinosu od 85 %. Uklanjanje TFA-estra urađeno je u skoro kvantitativnom prinosu natrijum-hidroksidom u smesi THF-a i vode.



**Shema 3.12.** Transformacija jedinjenja **3.11b** u alkoholni prekursor longamida **3.14**.

U finalnom koraku ispitivani su različiti uslovi oksidacije primarne alkoholne grupe jedinjenja **3.14** do karboksilne kiseline. Pokušaji oksidacije Jones-ovim reagensom (CrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dali su kompleksnu reakcionu smesu. Čistiju reakcionu smesu dala je reakcija sa PhI(OAc)<sub>2</sub> i TEMPO-om. Nakon 1,5h međutim izolovan je aldehid. Nakon produžetka reakcionog vremena oksidacija se odvila do kraja i dobijen je prirodni proizvod u prinosu od 83 % (**shema 3.13**). Longamid B izolovan je prečišćavanjem na koloni i potom prekrizacijom iz smese DCM : MeOH = 98 : 2 u vidu belih igličastih kristalića rastvornih u metanolu. Spektralni podaci i optička rotacija poklapali su se sa podacima publikovanim u literaturi ( $[\alpha]_D = -5.5$  (c 0.20, CH<sub>3</sub>OH) u poređenju sa  $[\alpha]_D = -5.6$  (c 0.40, CH<sub>3</sub>OH) koju su dobili Fukase i saradnici).<sup>124</sup> Na ovaj način još jednom je potvrđena stereohemija ciklizacionog proizvoda **3.10c** ali i finalnog jedinjenja.

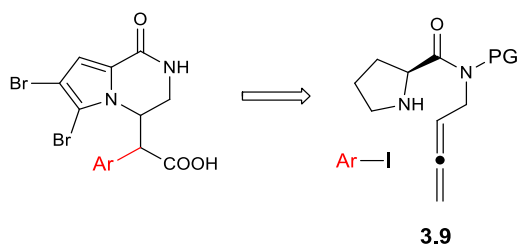


**Shema 3.13.** Sintaza longamida D i stilizina D.

Stilizin D, novootkriveni predstavnik bromopirolskih alkaloida, dobijen je amidacijom karboksilne kiseline longamida D amonijakom u prisustvu kuplujućeg reagensa. Jedinjenje je izolovano u vidu blede žute amorfne mase u prinosu od 81 %.

## 2.2.7 Sinteza derivata longamida B

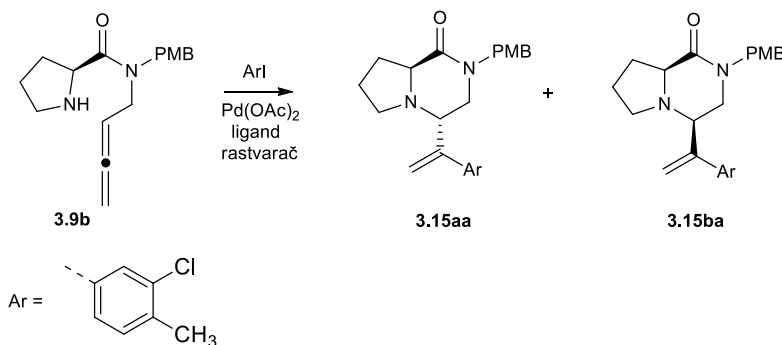
Nakon uspešno razvijene sinteze bromopirolskih alkaloida ispitivana je mogućnosti primene srodnih ciklizacionih reakcija promovisanih paladijumovim kompleksima u cilju dobijanja sintetskih derivata longamida B. Hipotetički, karbopaladacijom jedinjenja **3.9**, i pratećom intramolekulskom nukleofilnom supstitucijom, moguće je sintetisati derivate longamida B koji imaju supstituent u  $\alpha$ -položaju karboksilne grupe (**shema 3.14**). Nedavno su iz morskog sundera *Agelas sp.* izolovani bromopirolski alkaloidi sa antifungalnim svojstvima, koji sadrže supstituent u ovom položaju.<sup>157</sup>



**Shema 3.14.** Retrosintetska analiza derivata longamida.

Optimizacija procesa ciklizacije jedinjenja **3.9b** uz prisustvo Pd-katalizatora prikazana je u **tabeli 3.2**. Reakcija je rađena sa 1,2 ekvivalenta aril-halogenida i Pd(OAc)<sub>2</sub>/PPh<sub>3</sub> katalitičkim sistemom u DMF-u u prisustvu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kao baze. Primarno formirani  $\pi$ -alilpaladijumov intermedijer, dobijen po adiciji arilpaladijumove vrste na alen, reaguje intramolekulski sa sekundarnim aminom dajući biciklični proizvod. Nažalost, očekivani proizvod izolovan je u prinosu od samo 20 % i to kao smesa dijastereoizomera **3.15aa** i **3.15ba** u odnosu 1:1 (**tabela 3.2**, primer **a**).

**Tabela 3.2.** Optimizacije karboaminacije aminoalena **3.9b**.

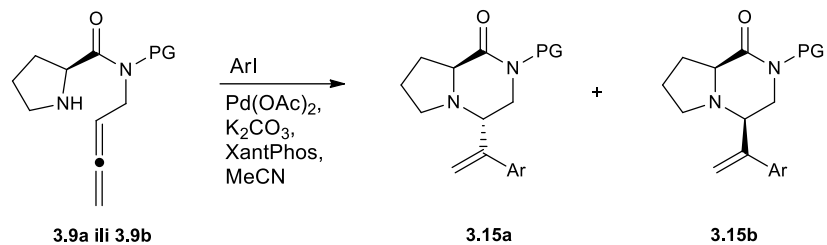


primer <sup>a</sup>	ligand	rastvarač	prinos (%) <sup>b</sup>
<b>a</b>	PPh <sub>3</sub>	DMF	20
<b>b</b>	XantPhos	DMF	38
<b>c</b>	XantPhos	MeCN	58

<sup>a</sup> Uslovi: alen **6b** (0.1 mmol); ArI, (0.1 mmol); Pd(OAc)<sub>2</sub>, (0.01 mmol); PPh<sub>3</sub> (0.02 mmol) ili XantPhos, (0.01 mmol); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (0.23 mmol); MeCN, (3 mL); refluks, 18h. <sup>b</sup> Izolovani ukupni prinos.

Zamenom trifenilfosfina XantPhos-om postignut je nešto bolji prinos od 38 % (**tabela 3.2**, primer **b**). Konačno korišćenjem XantPhos-a i promenom rastvarača u acetonitril (**tabela 3.2**, primer **c**) prinos je još jednom povećan na 58 %. Ovi optimizovani uslovi iskorišćeni su za ispitivanje opsega reakcije kao što je prikazano u **tabeli 3.3**. Svi proizvodi (**tabela 3.3**, **3.15aa** – **3.15be**) izolovani su u dobrim prinosima ali nažalost skoro bez ikakve dijastereoselektivnosti.

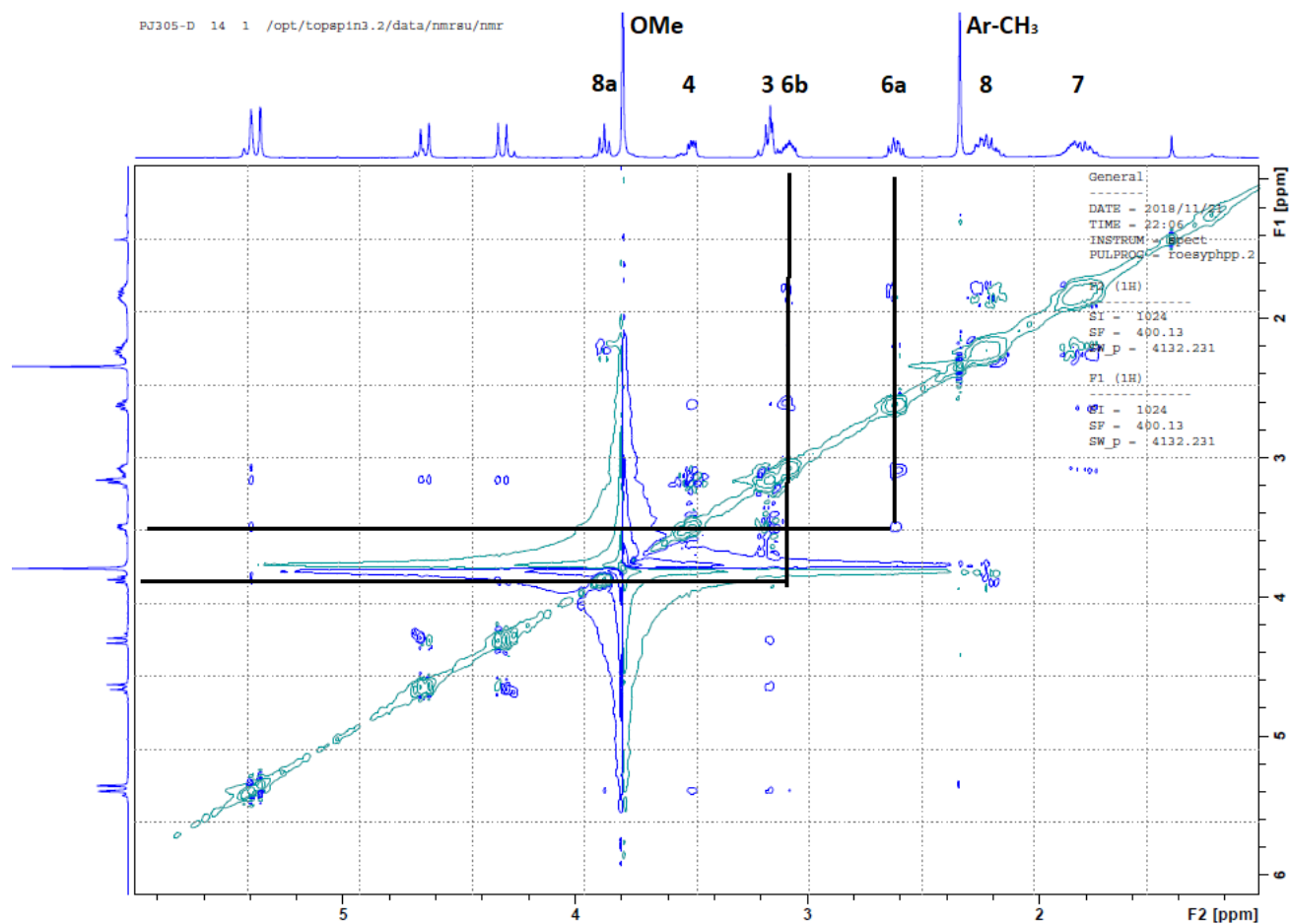
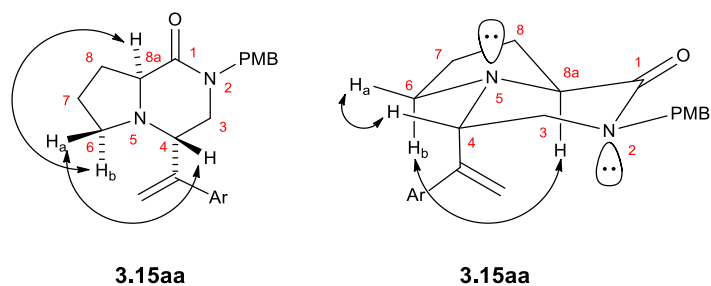
**Tabela 3.3.** Varijacija jodida u Pd-katalizovanoj reakciji ciklizacije



Primer	ArI	Proizvod	Prinos % ( <b>3.15a</b> : <b>3.15b</b> odnos)
<b>a</b>			58 (45:55)
<b>b</b>			59 (44:56)
<b>c</b>			53 (44:56)
<b>d</b>			68 (43:57)
<b>e</b>			75 (43:57)

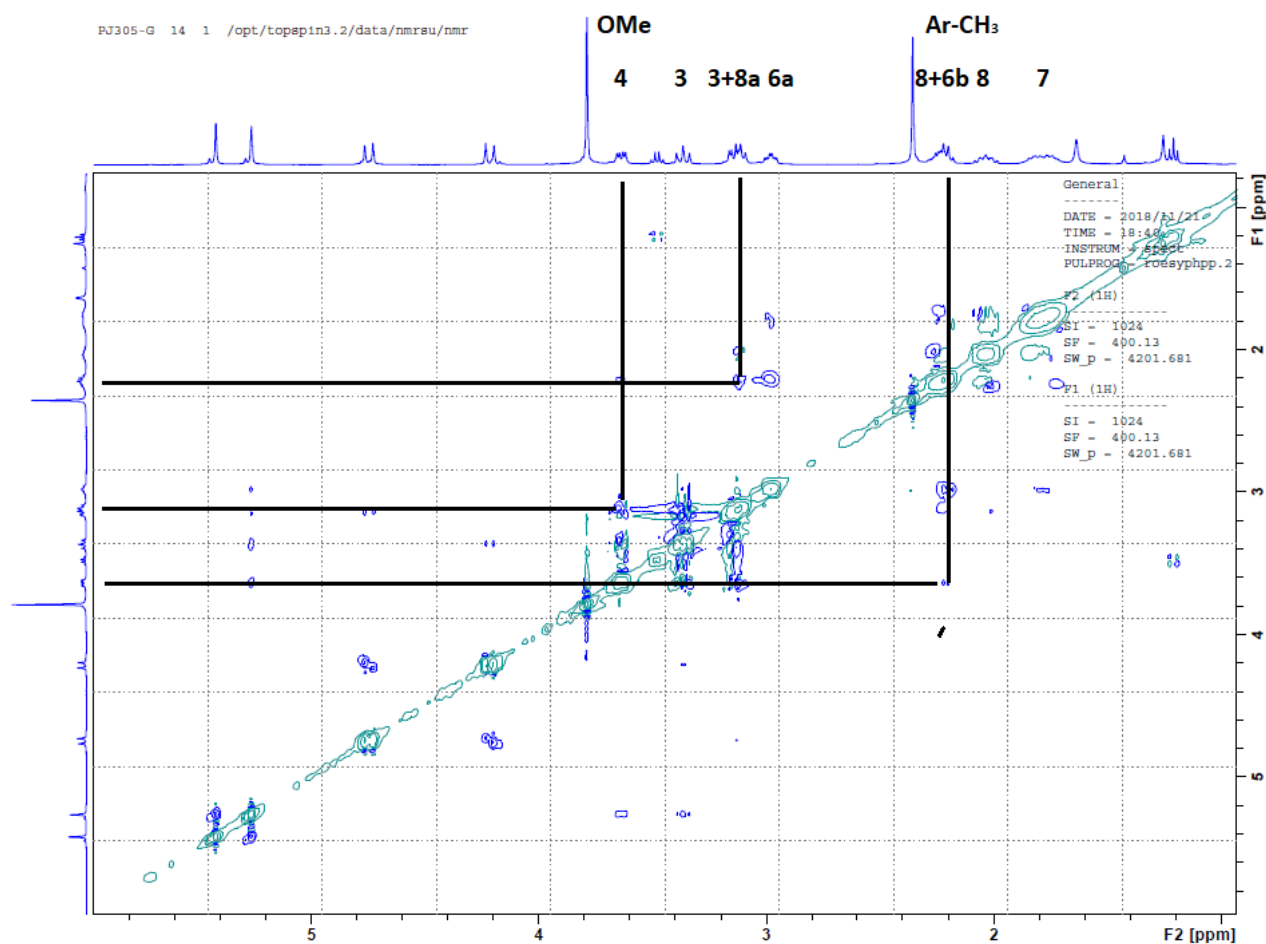
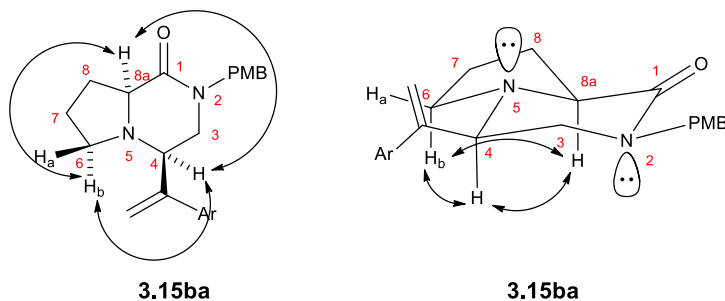
<sup>a</sup>Uslovi: alen **3.9a** ili **3.9b**, (0.1 mmol); ArI, (0.1 mmol); Pd(OAc)<sub>2</sub>, (0.01 mmol); XantPhos, (0.01 mmol); K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (0.23 mmol); MeCN, (3 mL); refluks, 18h. <sup>b</sup>Izolovani prinosi; odnos diastereoizomera određen pomoću <sup>1</sup>H NMR spektroskopije.

Stereohemija proizvoda reakcije određena je analizom ROESY spektara (**slike 3.5 i 3.6**). Kod dijastereoizomera **3.15aa** nema interakcije između protona na hiralnim C atomima u položajima 4 i 8a (**slika 3.5**). Dalja potvrda *trans* odnosa dva vodonika na hiralnim centrima vidi se iz korelacija protona u hiralnim položajima sa dijastereotopnim protonima u položaju 6. Korelacioni signal se javlja između dva ekvatorijalna protona 8a(H) i 6b(H), dok 6b(H) nema korelaciju sa 4(H). Drugi dijastereotopni proton 6a(H) pokazuje interakciju sa 4(H).



**Slika 3.5.** Značajne korelacije u ROESY spektru jedinjenja **3.15aa**.

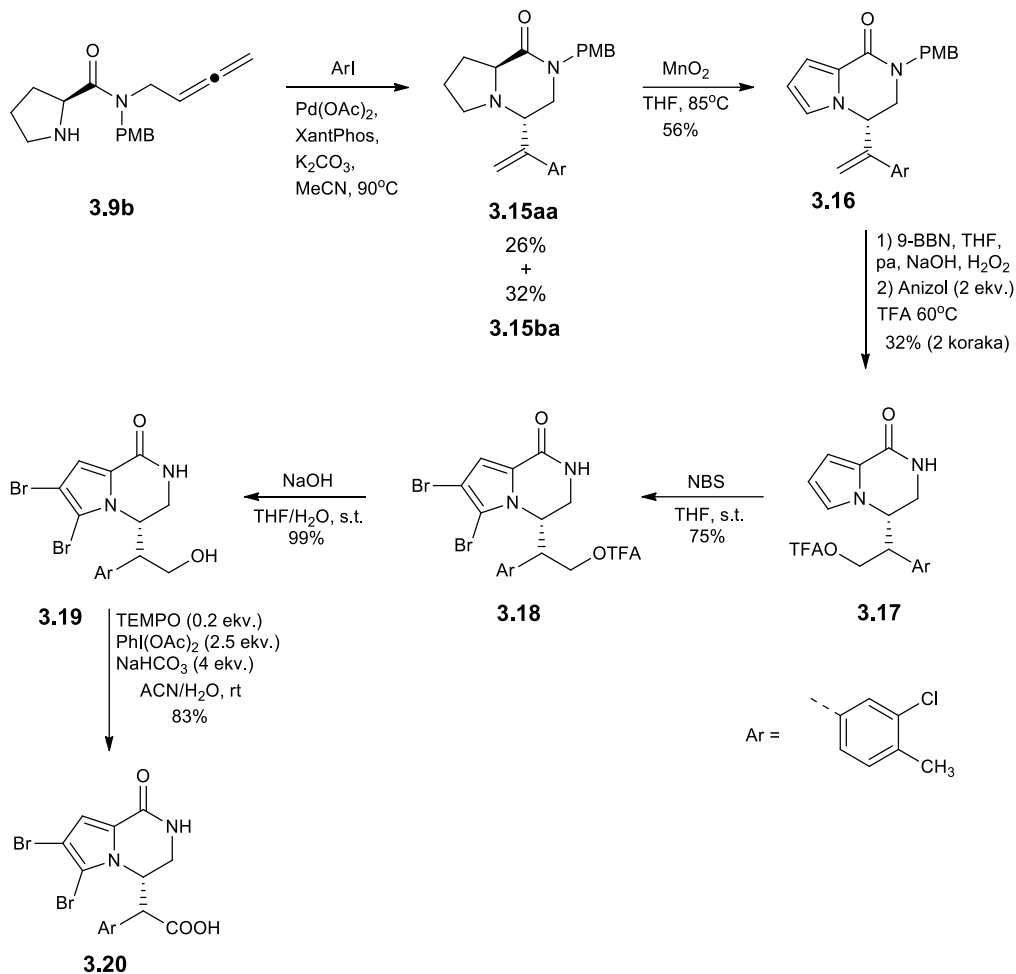
Kod dijastereoizomera **3.15ba** uočljive su međusobne interakcije 3 aksijalnih protona 4(H), 6b(H) i 8a(H) (**slika 3.6**). Pored toga drugi dijastereotopni proton 6a(H) ne pokazuje interakciju sa 4(H). Na ovaj način potvrđen je *cis* odnos protona na hiralnim centrima.



**Slika 3.6.** Značajne korelacije u ROESY spektru jedinjenja **3.15ba**.



Nakon ispitivanja Pd-promovisanih ciklizacija nastavljeno je sa transformacijom ciklizacionog proizvoda **3.15aa** na sličan način kao što je to urađeno u sintezi longamida B, kako bi se demonstrirala pogodnost metode u sintezi derivata longamida. Svi prethodno optimizovani koraci u sintezi longamida odvijali su se na zadovoljavajući način i u sintezi derivata longamida kao što je prikazano na **shemi 3.15**.



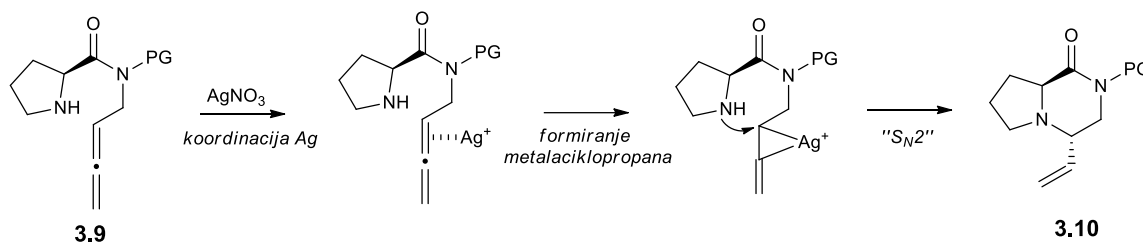
**Shema 3.15.** Sinteza derivata longamida B.

Hidroborovanje terminalnog alkena jedinjenja **3.16** dalo je smesu diastereoizomera gde je kao glavna komponenta dobijeno jedinjenje **3.17** u ukupnom prinosu 32 % nakon koraka deprotekcije trifluorosirćetnom kiselinom i anizolom. Stereohemija novoformiranog stereogenog centra pretpostavljena je na osnovu ranije razvijenih modela za proces hidroborovanja.<sup>158</sup> Bromovanje NBS-om u THF-u dalo je 75 % jedinjenja **3.18** čijom je kvantitativnom deprotekcijom natrijum-hidroksidom dobijen primarni alkohol **3.19**. Finalna oksidacija alkohola, međutim, dala je smesu diastereoizomera **3.20** koja nastaje najverovatnije prilikom kiselinsko-bazne obrade reakcije usled osetljivosti novonastalog hiralnog centra koji se nalazi u  $\alpha$ -položaju pored karboksilne grupe. U ovoj fazi nisu ispitivane druge metode oksidacije kako bi se sprečio ili redukovao proces izomerizacije.

## 2.2.8 Mehanizam i stereochemija reakcija ciklizacije

Iako imaju slične ishode, dve metode ciklizacije, Ag i Pd promovisane transformacije dale su značajno različite rezultate u stereochemijskom smislu. Dok ciklizacioni proces katalizovan srebrom zahteva stehiometrijsku količinu soli, za ciklizaciju u prisustvu paladijuma dovoljna je katalitička količina ovog metala. Uvođenje dodatnog supstituenta, samim tim i dodatnih sternih zahteva, u Pd-katalizovanom procesu nije doprinelo boljoj stereoselektivnosti. Maksimalna vrednost diastereoizomernog viška iznosila je 14% (**tabela 3.3** primeri **d** i **e**). Sa druge strane sve reakcije katalizovane srebrom pokazivale su određeni stepen diastereoselektivnosti (od  $de = 34\%$  za primer **o** do  $de = 72\%$  za primer **q** (**tabela 3.1**)). U cilju razumevanja pomenutih razlika neophodno je sagledati mehanističke procese i prelazna stanja oba ciklizaciona procesa.

Verovatan mehanizam hidroaminacije jedinjenja **3.9** u prisustvu  $\text{AgNO}_3$  prikazan je na **shemi 3.16**. Reakcija otpočinje koordinacijom karbofilnog srebra na dvostruku vezu alena. Ovaj proces praćen je formiranjem metalaciklopropanskog sistema što rezultuje povećanjem elektrofilnosti ugljenikovih atoma alenskog fragmenta. Finalna faza odvija se preko prelaznog stanja sličnog  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakciji. Konačno, transfer protona rezultuje formiranjem ciklizacionog proizvoda **3.10**.<sup>151,159</sup>

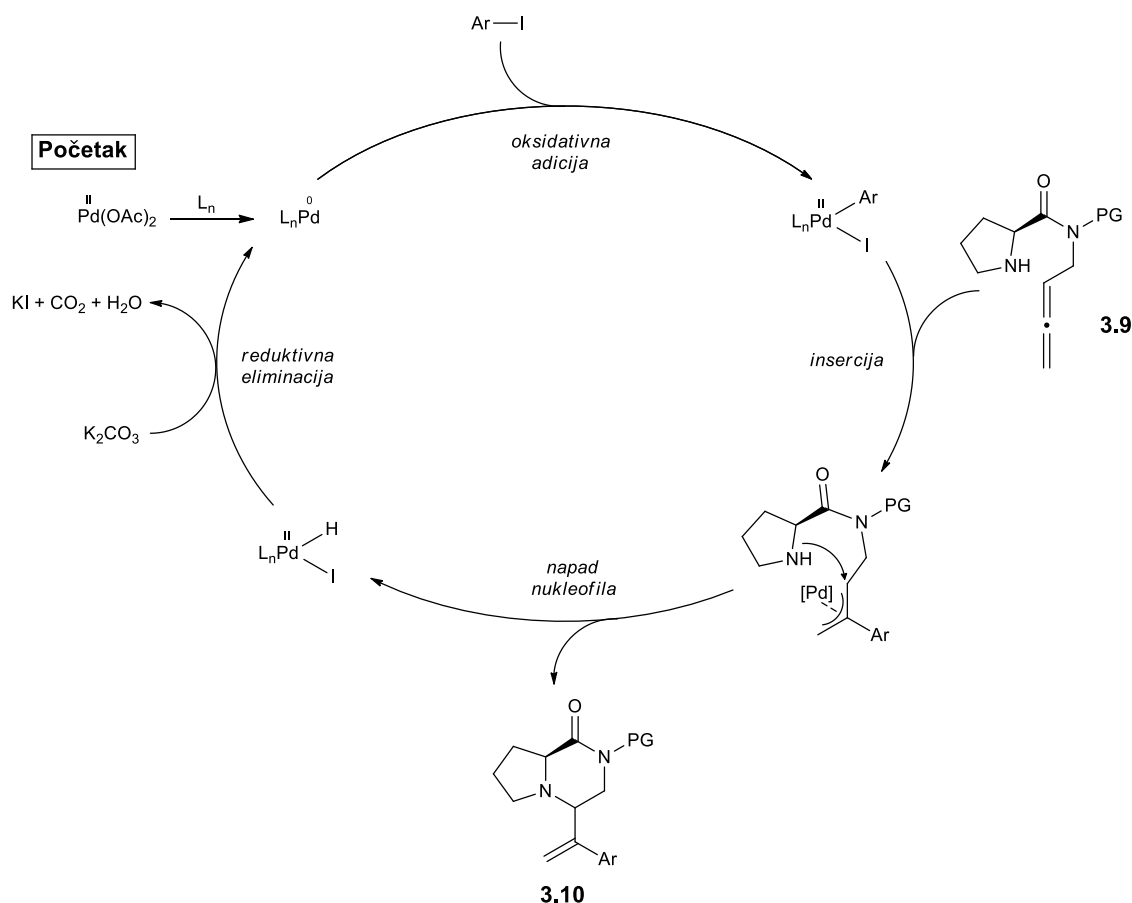


**Shema 3.16.** Mehanizam hidroaminacije aminoalena **3.9** u prisustvu  $\text{AgNO}_3$ .

Činjenica da je za reakciju neophodna stehiometrijska, a ne katalitička količina srebra, koja bi se mogla očekivati iz gornjeg mehanizma, može se objasniti tendencijom srebra da se koordiniše sa aminskim azotom. Slične rezultate prijavili su Fox i Gallagher koji su predložili da proces ciklizacije nije klasičan bimolekulski proces već da uključuje još jedan molekul aminoalena koji koordiniše sa srebrom. Shodno tome količine srebra ispod 50 mol % nisu davale optimalne prinose i diastereoselektivnost.<sup>159</sup> Slično, u našim primerima, reakcije u prisustvu 20 ili 40 mol % (**tabela 3.1** primeri **p** i **q**) davale su značajno manje prinose (21 i 55 % respektivno) od reakcije sa 80 mol % srebrne soli (**tabela 3.1** primer **r**) koja je dala potpunu konverziju polaznog jedinjenja. U skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Fox-a i Gallagher-a, može se pretpostaviti da karbofilnost srebra smanjuju dva molekula alena te da je za potpunu konverziju uz odgovarajuću diastereoselektivnost neophodna količina veća od 50 mol % srebrne soli. Uloga  $\text{CaCO}_3$  u ovom procesu nije u potpunosti razjašnjena, ali je činjenica da njegovo prisustvo povećava prinose reakcije i daje čistiju reakcionu smesu.

Pokušaj hidroaminacije u prisustvu Pd nije bio uspešan (**tabela 3.1**, primer **u**), sa druge strane reakcije karboaminacije u prisustvu paladijuma bile su uspešne sa svim ispitivanim ligandima (**tabela 3.2**) i supstratima (**tabela 3.3**). Mehanizam karboaminacije jedinjenja **3.9** prikazan je na **shemi 3.17**. Katalitički proces počinje *in situ* redukcijom Pd(II) do Pd(0), nakon čega se odigrava oksidativna adicija Pd(0) u C-I vezu. Nakon koordinacije Pd za jednu od dvostrukih veza alena dolazi do insercije alena u Pd(II)-Ar vezu pri čemu se formira nova C-C veza između centralnog atoma alena i aril grupe. Ovaj proces se još naziva i proces karbopaladacije. Ovako nastali  $\pi$ -alilpaladijumov intermedijer aktiviran je za napad obližnjeg azotnog nukleofila pa dolazi do 6-

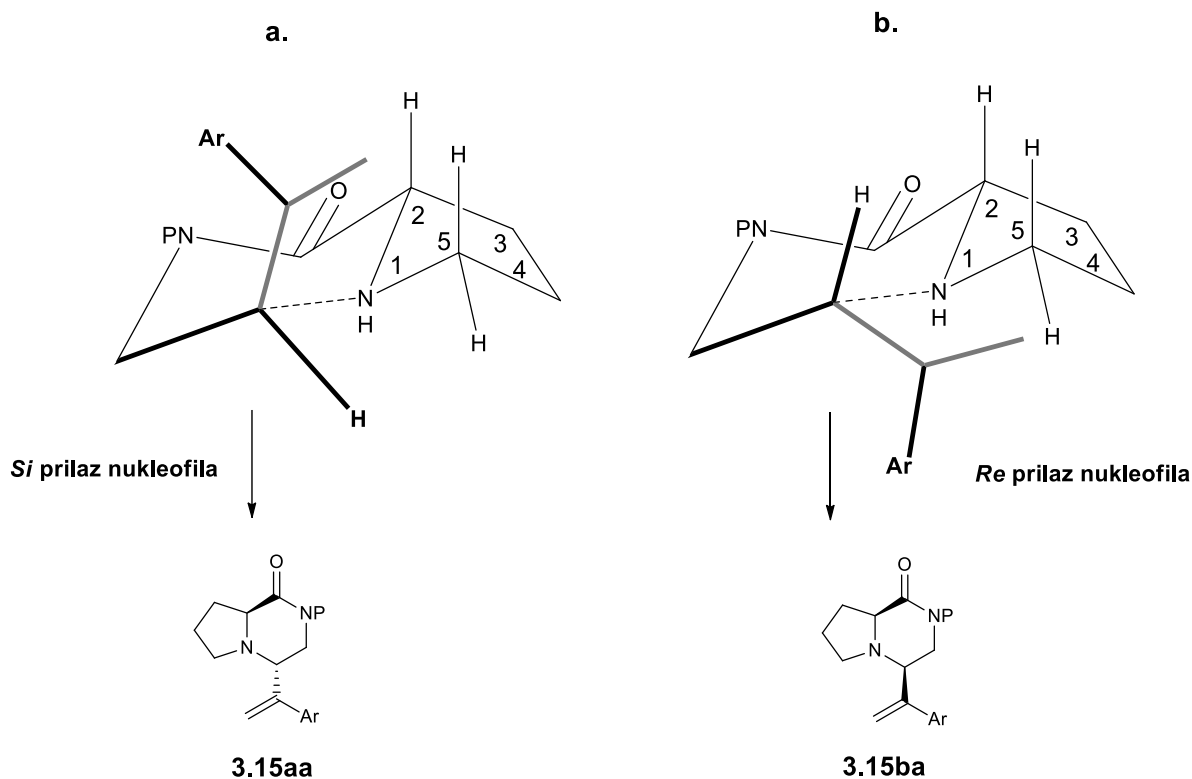
egzo-trig ciklizacije pri čemu nastaje proizvod reakcije (jedinjenje **3.10**) i H-Pd(II)-I koji u reakciji sa bazom regeneriše Pd(0).



**Shema 3.17.** Katalitički ciklus karboaminacije jedinjenja **3.9**.

U cilju razjašnjenja značajne razlike u diastereoselektivnosti dva procesa razmatrana su potencijalna prelazna stanja ovih procesa. Analizom molekulskih modela došlo se do najverovatnijih prelaznih stanja (**slika 3.6** i **slika 3.7**). Stereoselektivnost ciklizacije u prisustvu Ag soli (**tabela 3.1**) značajno je bolja od stereoselektivnosti Pd-katalizovanog procesa (**tabela 3.3**). Mehanistički (**sheme 3.16** i **3.17**) ova dva procesa se razlikuju pa shodno tome uključuju i različite intermedijere. Dok se u Pd-katalizovanom procesu pre procesa ciklizacije formira  $\pi$ -alilpaladijumov intermedijer, u procesu promovisanom srebrom dolazi do koordinacije Ag-soli za jednu od dvostrukih veza alena. U oba slučaja nastaje isključivo proizvod 6-egzo ciklizacije. U slučaju Pd-katalizovane ciklizacije (**slika 3.6**) dva najverovatnija moda ciklizacije uključuju *Si* stranu (**slika 3.6a**) ili *Re* stranu (**slika 3.6b**) prohiralnog C-atoma  $\pi$ -alilpaladijuma. Iako bi se očekivalo da je prelazno stanje koje nastaje nukleofilnim napadom sa *Si* strane (**slika 3.6a**) nepovoljno zbog 1,3 diaksijalnih interakcija  $\pi$ -alilpaladijumske grupe i pseudoaksijalnih veza pirolidina C(2)H/C(5)H što bi posledično rezultovalo određenim stepenom selektivnosti, ovo nije bio slučaj. Stereoselektivnost u Pd-katalizovanoj ciklizaciji je jako mala i u svim slučajevima oba diastereoizomera su izolovana u gotovo jednakim količinama. Ovo se može pripisati činjenici da je alilna grupa planarna i da je radi smanjenja sternih interakcija sa pseudoaksijalnim C-H vezama aromatičan prsten pozicioniran u istoj ravni. Sa druge strane diaksijalne interakcije u koje se javljaju pri napadu nukleofila sa *Si* strane (**slika 3.6b**) mogu biti uporedive sa sternim

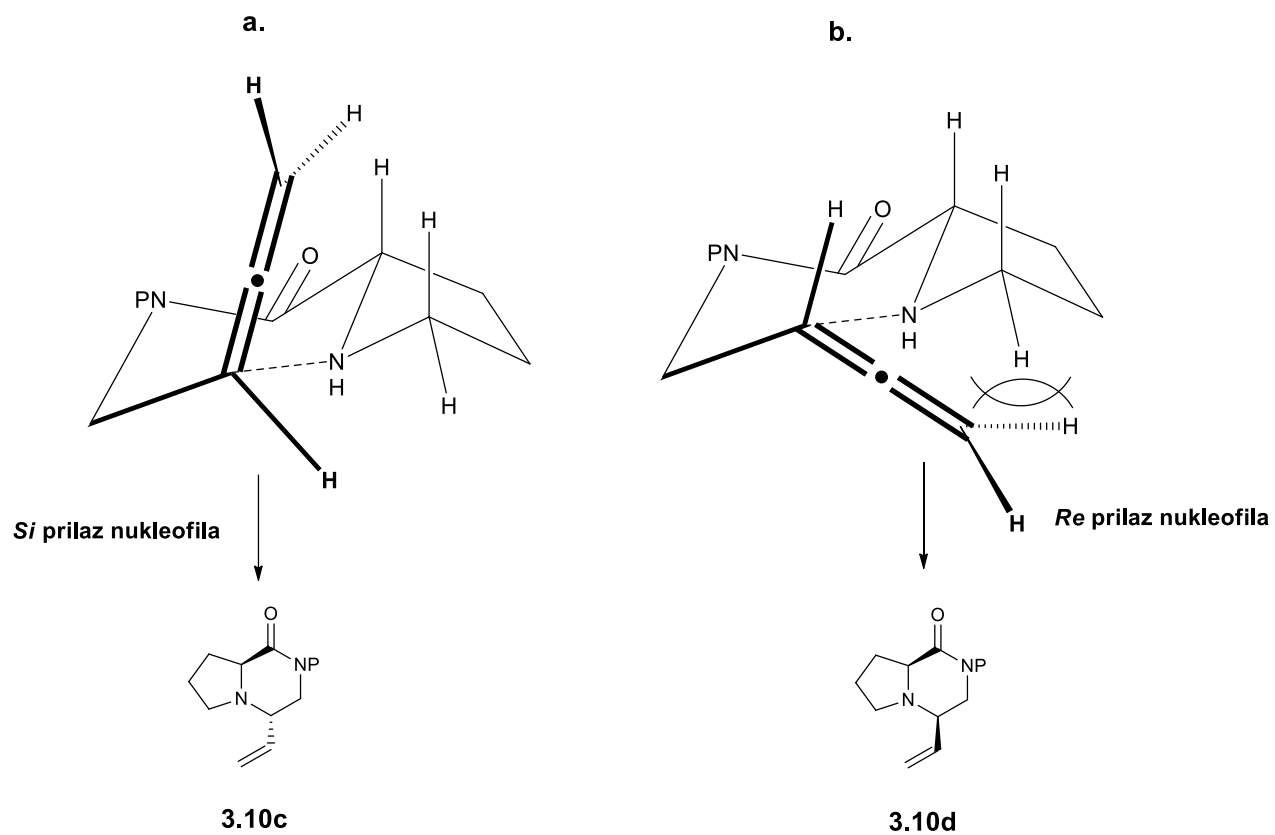
interakcijama između pseudoekvatorijalnih alil grupa i C(5)H<sub>2</sub> supstituenta prolina u prelaznom stanju b (**slika 3.6b**). Ovaj model objašnjava i mali efekat aril supstituenata na diastereoselektivnost reakcije ciklizacije.



$\pi$ -alilpaladijumska struktura prikazana je sivom bojom, Pd je izostavljen radi boljeg pregleda.

**Slika 3.6.** Prelazna stanja Pd-katalizovane ciklizacije aminoalena.

Razmatranje molekularnih modela za prelazno stanje u Ag-promovisanoj transformaciji otkriva mogući razlog dobijenih rezultata (**slika 3.7**). U slučaju napada nukleofila sa *Re* strane, alenski fragment biva orijentisan pseudoekvatorijalno (**slika 3.7b**). U takvom položaju dolazi do nepovoljne sterne interakcije s obzirom da alenski fragment pozicionira terminalnu metilensku grupu blizu prolinskog C(5)H<sub>2</sub>. Ova interakcija ima veći uticaj u odnosu na 1,3-diaksijalne interakcije kod pseudoaksijalnog alena (**slika 3.7a**). Usled toga favorizovan je napad nukleofila sa *Si* strane, odnosno prelazno stanje u kome se alenski fragment nalazi u pseudoaksijalnom položaju, što kao krajnji rezultat daje dominantno formiranje *trans* proizvoda **3.10c** kao glavnog proizvoda reakcije.

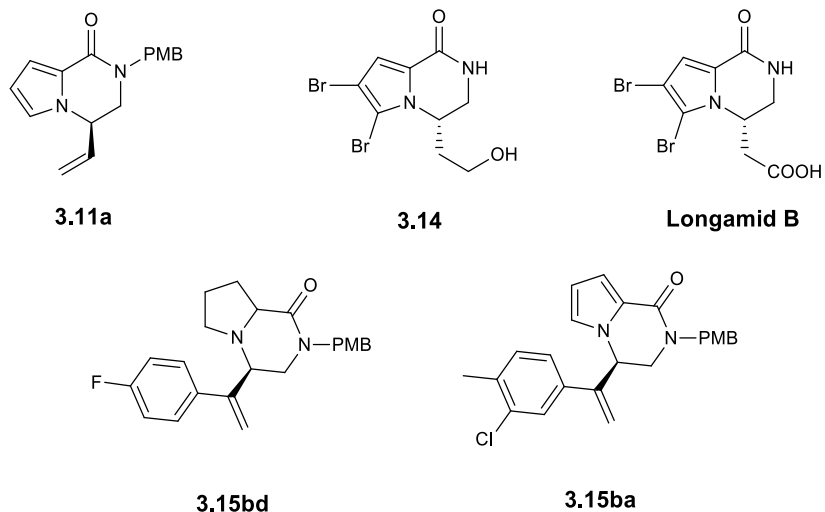


Koordinisano srebro je izostajeno radi boljeg pregleda

**Slika 3.7.** Prelazna stanja ciklizacije aminoalena u prisustvu Ag-soli.

### 2.2.9 Antimikrobna aktivnost longamida B i njegovih analoga

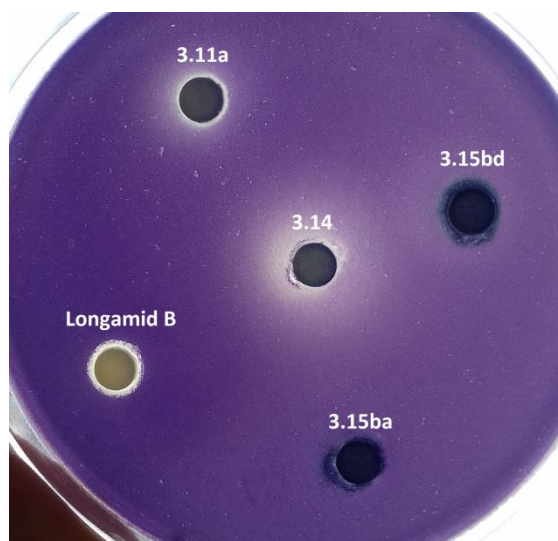
Radi evaluacije antimikrobne aktivnosti longamida B i njegovih derivata odabran je set jedinjenja prikazanih na **slici 3.8**.



**Slika 3.8.** Strukture jedinjenja podvrgnutih biološkim testiranjima.

Antibakterijska aktivnost derivata longamida ispitivana je na *S. aureus* ATCC 9144, *S. aureus* ATCC 25923 i *S. aureus* MRSA. MIC vrednosti svih ispitivanih jedinjenja bile su veće od 250 µg/mL za sve ispitivane sojeve.

Uticaj na međubakterijsku komunikaciju (*quorum sensing*) ispitivan je na soju *Chromobacterium violaceum* CV026 i prikazan je na **slici 3.9**. Inhibicijom međubakterijske komunikacije dolazi do pojave svetle zone oko diska usled kompeticije sa autoinducerskim molekulom. Pojava bele zone označava zonu ubijanja bakterije.



**Slika 3.9.** Uticaj ispitivanih jedinjenja na međučelijsku komunikaciju *Chromobacterium violaceum* CV026.

Jedinjenje **3.14** pokazuje blagu inhibitornu zonu od oko 1 mm, što znači da ima blago dejstvo na inhibiciju međubakterijske komunikacije (**slika 3.9**). Sa druge strane jedinjenje longamid blago ispoljava antimikrobno dejstvo protiv *C. violaceum*.

## 3. ZAKLJUČAK

### 3.1 Sinteza i karakterizacija ramnolipidnih analoga

Sistematskim strukturnim modifikacijama kreirana je biblioteka ramnolipidnih analoga kako bi se ispitao potencijal dobijanja pristupačnih molekula sa površinskom aktivnošću ili antimikrobnim svojstvima. SAR studijom je ustanovljeno sledeće:

**1) Zamenom ramnoze glukozom ili laktozom** dobijaju se molekuli koji imaju niže kritične micelarne koncentracije i snižavaju površinski napon vode u proseku za 5 jedinica više od ramnolipida. Biodegradabilnost šećernih analoga je potpuna. Osim toga korišćenje PHA polimera za dobijanje 3-hidroksikiseline kao osnovnog gradivnog elementa ramnolipidnih analoga omogućava uključivanje zelene hemije u proces i može predstavljati odličnu strategiju za dobijanje novih ekološki prihvatljivih surfaktanata.

**2) Zamenom ramnoze malim polarnim molekulom** na jednostavan način se dobija jedinjenje sa izraženom površinskom aktivnošću (**2.29**), (CMC 162 mg/L i  $\gamma$  40 mN/m) i očuvanom biodegradabilnošću. Ovaj rezultat sugerise da i ovaj tip jedinjenja može poslužiti kao pristupačna alternativa ramnolipidima u kontekstu površinske aktivnosti.

**3) Zamenom ramnoze aminokiselinama** dobijaju se jedinjenja sa antimikrobnom i anti-biofilm aktivnošću. Nekoliko jedinjenja pokazalo je antimikrobnu aktivnost protiv *P. aeruginosa*, dok je znatno veći broj jedinjenja bio aktivan na planktonske ćelije *C. albicans*. Aktivna jedinjenja u oba slučaja su katjonskog tipa (lizin kao terminalna aminokiselina – **2.58**, **2.70** i **2.72**) ili nepolarnog tipa (**2.44** i **2.61**) bez obzira na broj aminokiselina.

Najpotentnije svojstvo ovih jedinjenja jeste njihova sposobnost inhibicije formiranja biofilma *C. albicans* (BFIC<sub>50</sub> najpotentnijih jedinjenja **2.52** i **2.65** iznosi 4,5 µg/mL). Lipopeptidi koji sadrže benzil estar i lipofilne aminokiselinske ostatke (leucin, fenilalanin i metionin) pokazali su najveći stepen inhibicije formiranja biofilma. Dužina alifatičnog lanca poboljšava njihova anti-biofilm svojstva ali isto tako povećava i njihovu *in vitro* citotoksičnost. Ustanovljeno je da je su za anti-biofilm aktivnost neophodne slobodna amino grupa i estarski linker. Optimalan broj aminokiselina je jedna do dve.

Dodatnim eksperimentima (ispitivanje uticaja jedinjenja na adheziju *C. albicans* i na prelazak *C. albicans* iz kvasolikog u filamentozni oblik) utvrđeno je da lipopeptidni derivati deluju na fazu adhezije *C. albicans*. Uzimajući u obzir veliku osetljivost anti-biofilm aktivnosti lipopeptidnih derivata na strukturne karakteristike aminokiselinskih ostataka može se pretpostaviti da ova jedinjenja imaju specifične targete na ćelijskoj površini *C. albicans* (adhezini ili manoproteini).

Najpotentnija jedinjenja (**2.44**, **2.51**, **2.52**, **2.56**, **2.64** i **2.65**) inhibiraju formiranje biofilma bez uticaja na rast fungalnih ćelija. Na ovaj način se minimalno indukuje razvoj rezistencije u *C. albicans* pa ciljana strategija inhibicije biofilma može poslužiti kao alternativna terapijska opcija u borbi protiv ove fungalne vrste.



## 3.2 Sinteza bromopirolskih alkaloida

U cilju sinteze bromopirolskih alkaloida longamida B i stilizina D ispitivane su ciklizacione reakcije aminoalena. Pretpostavljeno je da se osnovni strukturni motiv bromopirolskih alkaloida, pirolCKETOPiperazin, može se dobiti intramolekulskom nukleofilnom adicijom na alene katalizovanom prelaznim metalima. Na osnovnu predloženog retrosintetskog plana ostvarena je sinteza ciklizacionog prekursora **3.9**, koji je poslužio kao osnova za detaljno ispitivanje reakcija ciklizacije.

**1)** Reakcija hidroaminacije **3.9** u prisustvu  $\text{AgNO}_3$  dala je očekivani proizvod. Hiralni prekursor omogućio je stereoselektivnost reakcije ciklizacije i biciklični proizvod dobijen ovim procesom uspešno je iskorišćen u sintezi longamida B i stilizina D.

**2)** Razvijena je i komplementarna metoda koja omogućava funkcionalizaciju prirodnog proizvoda. Naime, kombinacijom istog ciklizacionog prekursora **3.9** i aril-jodida u prisustvu paladijuma kao katalizatora, moguće je uvođenje supstituenta u  $\alpha$ -položaju do karboksilne grupe.

Razvijena metoda za anelaciju pirolidinskog prstena je od opšteg karaktera i može se primenuti u sintezi ostalih bromopirolskih alkaloida, kao i strukturno srodnih, pirolizidinskih alkaloida.

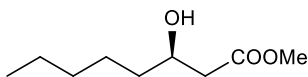
Antimikrobnim testovima utvrđeno je da longamid B ima blago antibakterijsko dejstvo na *C. violaceum*, dok njegov prekursor, alkohol **3.14**, u blagoj meri inhibira međubakterijsku komunikaciju iste vrste.

## 4 EKSPERIMENTALNI DEO

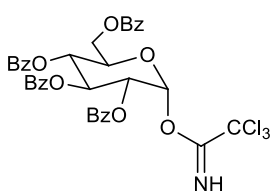
### 4.1 Sinteza i karakterizacija jedinjenja

<sup>1</sup>H NMR Spektri snimljeni su na Bruker Ascend 400 (400 MHz) i Bruker Avance III (500 MHz). <sup>13</sup>C NMR merenja rađena su na istim instrumentima na 101, odnosno 125 MHz. Spektri su snimljeni u deuterisanim rastvaračima (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O i DMSO-*d*<sub>6</sub>). Hemijska pomeranja (δ) data su u ppm u odnosu na TMS kao interni standard, a konstante kuplovanja (*J*) u Hercima (Hz). Maseni spektri su snimljeni na instrumentu Agilent Technologies 6520 Q-TOF spectrometerom u kombinaciji sa Agilent 1200 HPLC uređajem ili Agilent Technologies 5975C MS u kombinaciji sa Agilent Technologies 6890N GC. Infracrveni spektri su snimljeni IR Termo Scientific NICOLET iS10 (4950) uređajem. Optičke rotacije su izmerene na AUTOPOL IV automatskom polarimetru Rudolph Research Analytical. Vrednosti [α]<sub>D</sub> date su u deg mL g<sup>-1</sup> dm<sup>-1</sup>. Prečišćavanje proizvoda reakcija izvršeno je hromatografijom na koloni pod pritiskom (eng. *flash chromatography*), pri čemu je korišćen silika-gel 60 (230-400 mesh).<sup>160</sup> Reakcije su praćene hromatografijom na tankom sloju korišćenjem aluminijumskih ploča sa 0,25 mm silika-gela (Kieselgel 60 F254 Merck). Rastvarači korišćeni u reakcijama i za prečišćavanje proizvoda destilovani su pre upotrebe.

#### (*R*)-Metil 3-hidroksioktanoat (2.1).

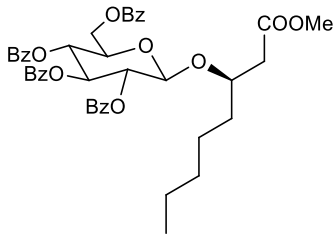


Jedinjenje je sintetisano prema eksperimentalnim procedurama iz literature. Spektralni podaci jedinjenja **2.1** identični su literaturnim.<sup>100</sup>



#### (*2R,3R,4S,5R,6R*)-2-((benzoiloksi)metil)-6-(2,2,2-trihlor-1-iminoetoksi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triil tribenzoat (2.3)

Jedinjenje je sintetisano po literaturnim procedurama polazeći iz glukoze u ukupnom prinosu od 36 %.<sup>161,162</sup> Spektralni podaci identični su literaturnim.<sup>163</sup>



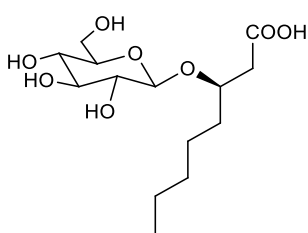
#### (*2R,3R,4S,5R,6R*)-2-((benzoiloksi)metil)-6-(((*R*)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triil tribenzoat (2.4)

U smesu imidata **2.4** (1,789 mg, 2,36 mmol), alkohola **2.1** (374 mg, 2,15 mmol) i molekulskih sita 4Å, u suvom dihlormetanu (20 mL) na -50°C pod strujom azota dodat je TMSOTf (40 μL, 0,22 mmol). Nakon 1h mešanja na -20 °C reakcija je okončana dodatkom Et<sub>3</sub>N. Reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar = 2 : 3) pri čemu je dobijen glikozid **2.4** (1423 mg, 88 %) kao bela amorfna supstanca.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,01 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,96 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,56 – 7,46 (m, 3H), 7,35 (ddt, *J* = 22,9, 13,3, 6,8 Hz, 9H), 5,89 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 5,65 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 5,52 (t, *J* = 8,9 Hz, 1H), 4,96 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 4,53 (ddd, *J* = 17,0, 12,1, 3,9 Hz, 2H), 4,11 (dd, *J* = 9,2, 4,7 Hz, 2H), 3,59 (s, 3H), 2,89 (dd, *J* = 16,0, 5,6 Hz, 1H),

2,45 (dd,  $J = 16,0, 6,9$  Hz, 1H), 1,35 – 1,24 (m, 2H), 1,21 – 1,00 (m, 1H), 1,00 – 0,77 (m, 5H), 0,63 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H).

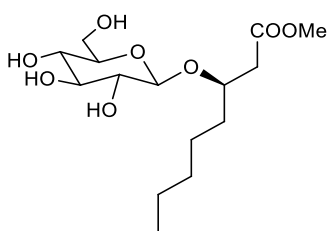
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  171,80, 166,10, 165,82, 165,19, 164,98, 133,40, 133,18, 133,07, 129,83, 129,77, 129,60, 129,30, 128,88, 128,85, 128,39, 128,36, 128,33, 128,28, 102,13, 78,87, 72,96, 72,03, 71,94, 69,81, 63,13, 51,52, 41,01, 35,16, 31,50, 24,76, 22,16, 13,84.



**(*R*)-3-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)oktanska kiselina (2.5)**

Rastvoru glikozida **2.4** (30 mg, 0,04 mmol) u smesi MeOH, THF,  $\text{H}_2\text{O}$  (1 : 2 : 1) (4 mL) dodat je NaOH (16 mg, 0,4 mmol). Nakon 2 h mešanja na sobnoj temperaturi pH reakcione smese je podešena na 3 dodatkom DOWEX-a. Tako zakišljen rastvor ekstrahovan je etil acetatom (3 x 5 mL), rastvarač uparen pod sniženim pritiskom a sirov proizvod ispiran etrom. Dobijeno je 10,9 mg (85 %) amorfno blede žutog proizvoda.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )**  $\delta$  4,41 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 4,09 (dd,  $J = 13,8, 7,8$  Hz, 1H), 3,78 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H), 3,64 (dd,  $J = 12,3, 4,4$  Hz, 1H), 3,45 – 3,34 (m, 2H), 3,32 – 3,26 (m, 1H), 3,14 (t,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 2,62 – 2,50 (m, 2H), 1,59 – 1,39 (m, 2H), 1,36 – 1,13 (m, 6H), 0,77 (t,  $J = 6,2$  Hz, 3H).

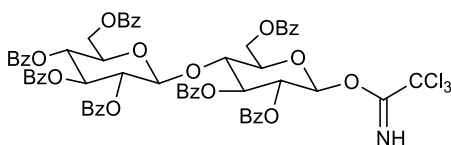


**(*R*)-metil 3-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)oktanoat (2.6)**

Rastvoru glikozida **2.4** (30 mg, 0,04 mmol) u metanolu (5 mL) dodat je 0,5 M rastvor NaOMe u metanolu tako da finalna koncentracija NaOMe u reakcionoj smesi bude 0,05 M. Nakon 3h pH reakcione smese se DOWEX-om podesi na 6, reakciona smesa se profiltrira i rastvarač upari pod sniženim pritiskom. Sirovi ostatak prečišćen je hromatografijom na koloni ( $\text{SiO}_2$ , etar : metanol = 98 : 2) pri čemu je dobijen glikozid **2.6** (9,8 mg, 73%) kao blede žuto ulje.

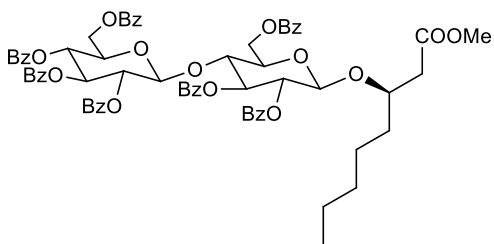
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  4,36 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 4,12 – 4,04 (m, 1H), 3,87 – 3,72 (m, 2H), 3,69 (s, 2H), 3,51 (dd,  $J = 14,1, 7,6$  Hz, 2H), 3,36 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 3,31 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H), 2,66 (dd,  $J = 15,4, 7,6$  Hz, 1H), 2,49 (dd,  $J = 15,4, 4,2$  Hz, 1H), 1,71 – 1,47 (m, 2H), 1,48 – 1,37 (m, 1H), 1,31 (d,  $J = 14,6$  Hz, 5H), 0,92 – 0,86 (m, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  172,73, 102,48, 75,65, 73,58, 70,04, 62,01, 51,83, 40,98, 35,17, 31,70, 24,90, 22,51, 13,99.



**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-((benzoiloksi)metil)-6-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-4,5-bis(benzoiloksi)-2 ((benzoiloksi)metil)-6-(2,2,2-trihlor-1-iminoetoksi)tetrahidro-2H-piran-3-il)oksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil tribenzoat (2.9)**

Jedinjenje je sintetisano po literaturnim procedurama polazeći iz laktoze u ukupnom prinosu od 36 %.<sup>161,162,164</sup> Spektralni podaci identični su literaturnim.<sup>164</sup>

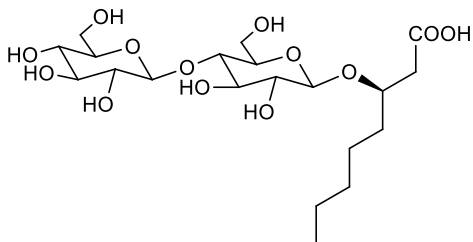


**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-((benzoiloksi)metil)-6-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-bis(benzoiloksi)-2-((benzoiloksi)metil)-6-(((*R*)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)tetrahidro-2*H*-piran-3-il)oksi)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil tribenzoat (2.10)**

U smesu imidata **2.9** (926 mg, 0,762 mmol), alkohola **2.1** (133 mg, 0,762 mmol) i molekulskih sita 4Å, u suvom dihlormetanu (10 mL) na -50°C pod strujom azota dodat je TMSOTf (14 µL, 0,076 mmol). Nakon 1h mešanja na -20°C reakcija je okončana dodatkom Et<sub>3</sub>N. Reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat = 2 : 3) pri čemu je dobijen glikozid **2.10** (838 mg, 98 %) kao bela amorfná supstanca.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,97 (ddd, *J* = 11,2, 9,6, 1,5 Hz, 10H), 7,90 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,73 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,65 – 7,55 (m, 3H), 7,52 – 7,46 (m, 5H), 7,38 (ddd, *J* = 24,9, 11,2, 5,8 Hz, 9H), 7,21 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,14 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 5,81 – 5,68 (m, 3H), 5,44 (dd, *J* = 9,9, 8,1 Hz, 1H), 5,36 (dd, *J* = 10,4, 3,4 Hz, 1H), 4,85 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 4,79 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,48 (dt, *J* = 12,0, 7,4 Hz, 2H), 4,21 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,97 (s, 1H), 3,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,77 (dd, *J* = 9,8, 2,4 Hz, 1H), 3,73 – 3,65 (m, 2H), 3,49 (s, 3H), 2,79 (dd, *J* = 15,9, 5,7 Hz, 1H), 2,37 (dd, *J* = 15,9, 7,0 Hz, 1H), 1,43 – 1,29 (m, 2H), 1,16 – 0,98 (m, 2H), 0,95 – 0,79 (m, 4H), 0,61 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 165,83, 165,57, 165,41, 165,37, 165,22, 165,08, 164,78, 133,51, 133,36, 133,22, 133,10, 130,01, 129,76, 129,66, 129,61, 129,56, 129,48, 129,37, 128,92, 128,77, 128,70, 128,62, 128,55, 128,51, 128,31, 128,23, 101,97, 101,00, 72,96, 72,90, 71,79, 71,44, 69,96, 67,58, 62,37, 61,11, 60,37, 51,37, 40,93, 35,11, 31,48, 24,68, 22,14, 14,19, 13,81.

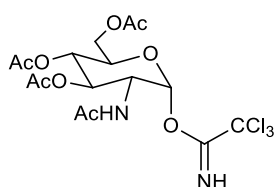


**(*R*)-3-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3,4-dihidroksi-6-(hidroksimetil)-5-(((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oksi)oktanska kiselina (2.11)**

Rastvoru glikozida **2.10** (40 mg, 0,033 mmol) u smesi MeOH, THF, H<sub>2</sub>O (1 : 2 : 1) (4 mL) dodat je NaOH (26 mg, 0,66 mmol). Nakon 2 h mešanja na sobnoj temperaturi pH reakcione smese je podešena na 3 dodatkom DOWEX-a. Tako zakišeljén rastvor ekstrahovan je etil acetatom (3 x 5 mL), rastvarač uparen pod sniženim pritiskom a sirov proizvod ispiran etrom i etil-acetatom. Dobijeno je 7,2 mg (45 %) amorfno g blede žutog proizvoda.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 4,48 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,40 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,15 – 4,10 (m, 1H), 3,90 – 3,85 (m, 2H), 3,76 – 3,66 (m, 4H), 3,60 (dd, *J* = 11,6, 8,2 Hz, 3H), 3,49 (dd, *J* = 9,9, 7,8 Hz, 2H), 3,23 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 2,61 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,64 – 1,46 (m, 2H), 1,34 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H), 1,23 (dd, *J* = 10,3, 7,4 Hz, 4H), 0,81 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 176,17, 130,34, 125,82, 102,98, 101,98, 78,30, 77,77, 75,41, 74,60, 74,50, 72,99, 72,63, 71,05, 68,64, 61,08, 60,04, 40,65, 33,97, 30,88, 23,96, 21,89, 13,32.

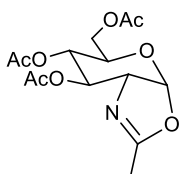


**(2R,3S,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoksimetil)-6-(2,2,2-trihlor-1-iminoetoksi)tetrahydro-2H-pirano-3,4-diol diacetat (2.12)**

Jedinjenje je sintetisano po literaturnim procedurama polazeći iz glukozamina u ukupnom prinosu od 32%.<sup>161,162</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,80 (s, 1H), 6,37 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 5,66 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 5,29 (dt, *J* = 23,9, 9,6 Hz, 2H), 4,56 (ddd, *J* = 10,4, 9,1, 3,6 Hz, 1H), 4,26 (dd, *J* = 12,9, 4,6 Hz, 1H), 4,17 – 4,07 (m, 2H), 2,10 – 2,04 (m, 9H), 1,94 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,60, 170,62, 170,00, 169,18, 160,28, 94,77, 90,82, 70,69, 70,25, 67,28, 61,44, 51,78, 23,07, 20,74, 20,68, 20,58.

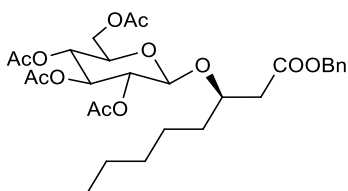


**(3aR,5R,6S,7R,7aR)-5-(acetoksimetil)-2-metil-5,6,7,7a-tetrahydro-3aH-pirano[3,2-d]oksazol-6,7-diol diacetat (2.13)**

U smesu imidata **2.12** (187 mg, 0,38 mmol), alkohola **2.1** (66 mg, 0,380 mmol) i molekulskih sita 4Å, u suvom dihlormetanu (10 mL) na -50°C pod strujom azota dodat je TMSOTf (7 μL, 0,038 mmol). Nakon 1h mešanja na -20 °C reakcija je okončana dodatkom Et<sub>3</sub>N. Reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etilacetat = 2 : 3) pri čemu je dobijen o jedinjenje **2.13** (70 mg, 56 %) kao blede žuta amorfna supstanca.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,97 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 5,27 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 4,93 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 4,18 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 4,16 – 4,11 (m, 1H), 3,61 (dt, *J* = 8,9, 4,3 Hz, 1H), 2,17 – 2,02 (m, 12H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,56, 169,51, 169,18, 166,62, 99,41, 70,43, 68,41, 67,57, 65,02, 63,35, 20,88, 20,81, 20,72, 13,93.

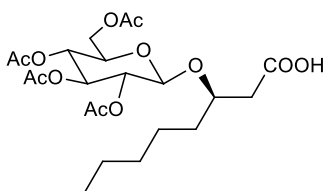


**(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoksimetil)-6-(((R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il)oksi)tetrahydro-2H-pirano-3,4,5-triol triacetat (2.14)**

U reakciji glikozidacije je korišćen imidat glukoze dobijen iz peracetil glukoze po literaturnim procedurama.<sup>161,162</sup> U smesu imidata glukoze (4000 mg, 8,146 mmol), alkohola **2.16** (1852 mg, 7,4 mmol) i molekulskih sita 4Å, u suvom dihlormetanu (20 mL) na -50°C pod strujom azota dodat je TMSOTf (134 μL, 0,74 mmol). Nakon 1h mešanja na -20 °C reakcija je okončana dodatkom Et<sub>3</sub>N. Reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar = 1 : 1) pri čemu je dobijen glikozid **2.14** (2403 mg, 56 %) kao bela amorfna supstanca.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,52 – 7,24 (m, 5H), 5,18 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H), 5,13 (dd, *J* = 15,1, 2,6 Hz, 2H), 5,05 (dd, *J* = 17,4, 7,9 Hz, 1H), 4,99 – 4,91 (m, 1H), 4,61 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,22 (dd, *J* = 12,2, 4,7 Hz, 1H), 4,14 – 3,96 (m, 2H), 3,69 – 3,57 (m, 1H), 2,86 (dd, *J* = 15,9, 5,9 Hz, 1H), 2,50 (dd, *J* = 16,0, 6,6 Hz, 1H), 2,11 – 1,95 (m, 12H), 1,60 – 1,35 (m, 2H), 1,35 – 1,16 (m, 6H), 0,92 – 0,84 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,17, 170,67, 170,30, 169,43, 169,23, 135,79, 128,59, 128,34, 128,28, 101,33, 78,40, 72,90, 71,56, 71,51, 68,39, 66,31, 61,87, 41,14, 35,03, 31,63, 24,78, 22,61, 22,57, 20,60, 14,01.



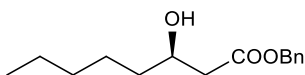
**(R)-3-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoksi-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)oktanska kiselina (2.15)**

Glikozid **2.14** (320 mg, 0,552 mmol) rastvoren je u etil-acetatu (10 mL), i dodato je 12,5 mg PtO<sub>2</sub>. Evakuisan je vazduh iz reakcionog balona, a potom postavljen gumeni balon sa vodonikom. Nakon 18h mešanja na sobnoj temperaturi reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat = 1 : 1) pri čemu je dobijena kiselina **2.15** (194 mg, 72 %) kao bela amorfna supstanca.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,19 (t, *J* = 9,5 Hz, 1H), 5,07 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,97 (dd, *J* = 9,5, 8,2 Hz, 1H), 4,61 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,19 (ddd, *J* = 14,4, 12,3, 3,3 Hz, 2H), 4,02 (s, 1H), 3,64 (dt, *J* = 9,8, 3,5 Hz, 1H), 2,64 (ddd, *J* = 21,4, 16,2, 5,9 Hz, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,06 – 1,99 (m, 9H), 1,60 – 1,46 (m, 2H), 1,38 (dd, *J* = 8,2, 5,9 Hz, 1H), 1,27 (d, *J* = 4,0 Hz, 5H), 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,20, 171,12, 170,33, 169,44, 169,20, 101,48, 78,51, 72,84, 71,61, 71,44, 68,62, 61,99, 40,95, 35,30, 31,63, 24,93, 22,60, 20,78, 20,63, 20,61, 20,60, 14,01.

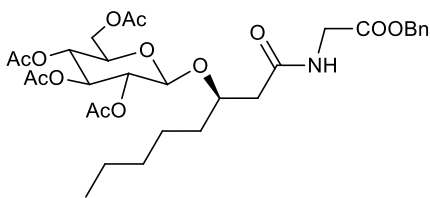
**(R)-benzil 3-hidroksioktanoat (2.16)**



Rastvoru jedinjenja **2.1** (2 g, 11,5 mmol) u THF-u (20mL) i metanolu (10mL) dodat je vodeni rastvor LiOH (18,40 mL, 2,5 M). Reakciona smesa se mešala preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga pH rastvora je podešen na 2, pomoću 1M HCl i dobijeni rastvor ekstrahovan etil-acetatom (20 mL). Ekstrakt je ispran zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (10 mL) i osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijena (R)-3-hidroksioktanska kiselina (1,71 g, 93 %) kao bezbojno ulje. Rastvoru (R)-3-hidroksioktanske kiseline (1,71 g, 10,7 mmol) u DMF-u (20 mL) na 0°C, dodati su K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,44 g, 32,1 mmol) i benzil-bromid (5,49 g, 3,81 mL, 32,1 mmol). Nakon mešanja 12h na sobnoj temperaturi u smesu je dodata voda (20 mL). Dobijena smesa ekstrahovana je etrom (3 x 40 mL). Kombinovane organske faze isprane su zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (50 mL) i osušene anhidrovanim natrijum-sulfatom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar: etar, v : v = 9 : 1) pri čemu je dobijen benzil-estarski derivat **2.16** (1,96 g, 72 %) kao bezbojno ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,35 - 7,22 (m, 5H), 5,45 (s, 1H), 5,38 - 5,21 (m, 2H), 4,20 (s, 1H), 2,61 (d, *J* = 89,6 Hz, 2H), 1,47 (d, *J* = 13,4 Hz, 2H), 1,29 - 1,08 (m, 6H), 1,00 - 0,92 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,84, 136,99, 128,33, 128,33, 128,21, 128,21, 128,18, 68,59, 66,51, 42,90, 37,42, 31,51, 25,30, 22,94, 14,02.

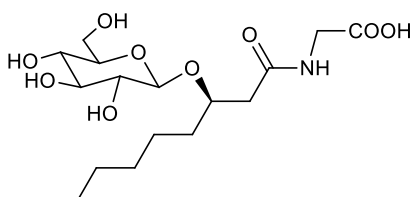


**(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoximetil)-6-(((R)-1-((2-(benziloksi)-2-oksoetil)amino)-1-oksooktan-3-il)oksi) tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat (2.17)**

Rastvoru jedinjenja **2.15** (150 mg, 0,30 mmol) u anhidrovanom dihlormetanu (10 mL), pod atmosferom azota dodati su HBTU (171 mg, 0,45 mmol), HOBt (69 mg, 0,45 mmol) i DIPEA (77 mg, 0,6 mmol). Smesa se meša 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je dodat glicin benzil estar hidrohlorid (60 mg, 0,30 mmol). Rastvor se meša 12h na sobnoj temperaturi. Nakon 12h rastvarač je uparen i sirovi ostatak rastvoren u etil-acetatu (10 mL) a zatim ispran zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (3 x 5 mL), zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 5 mL), 0,1M HCl-om (3 x 5 mL) i konačno zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 5 mL). Organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi ostatak prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat = 1 : 1) pri čemu se dobija peptidni derivat **2.17** (138 mg, 72%) kao bledo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,52 – 7,30 (m, 5H), 6,74 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 5,20 (dd, *J* = 16,0, 6,4 Hz, 3H), 5,06 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 5,00 (dd, *J* = 9,7, 8,1 Hz, 1H), 4,61 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,18 (ddd, *J* = 14,7, 12,3, 3,6 Hz, 2H), 4,06 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,97 (dd, *J* = 11,2, 5,7 Hz, 1H), 3,69 (ddd, *J* = 9,9, 4,6, 2,5 Hz, 1H), 2,61 – 2,50 (m, 2H), 2,14 – 1,99 (m, 12H), 1,61 – 1,51 (m, 2H), 1,26 (d, *J* = 3,7 Hz, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,62, 170,24, 169,74, 169,39, 169,36, 135,36, 128,63, 128,47, 128,40, 100,74, 78,20, 72,64, 71,90, 71,40, 68,26, 67,03, 61,66, 42,12, 41,25, 34,14, 31,68, 24,98, 22,61, 20,65, 20,61, 14,01.

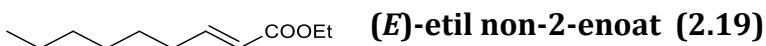


**2-(((R)-3-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)oktanamido)sirćetna kiselina (2.18)**

Rastvoru glikozida **2.17** (10 mg, 0,016 mmol) u smesi MeOH, THF, H<sub>2</sub>O (1 : 2 : 1) (4 mL) dodat je NaOH (12,6 mg, 0,314 mmol). Nakon 2 h mešanja na sobnoj temperaturi pH reakcione smese je podešena na 3 dodatkom DOWEX-a. Tako zakišeljjen rastvor ekstrahovan je etil acetatom (3 x 5 mL), rastvarač uparen pod sniženim pritiskom a sirov proizvod ispiran etrom i etil-acetatom. Dobijeno je 5,4 mg (89 %) amorfno, blede žuto proizvoda.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 4,47 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 4,15 – 4,05 (m, 1H), 3,96 – 3,81 (m, 3H), 3,65 (dd, *J* = 12,2, 5,6 Hz, 1H), 3,37 (dq, *J* = 33,6, 9,2 Hz, 3H), 3,20 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H), 2,59 (t, *J* = 10,5 Hz, 2H), 1,62 – 1,47 (m, 2H), 1,34 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,24 (s, 5H), 0,82 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 174,17, 173,92, 101,80, 77,47, 75,85, 75,77, 73,30, 69,75, 60,91, 41,65, 41,54, 33,56, 30,92, 23,88, 21,84, 13,30.



**(E)-etil non-2-enoat (2.19)**

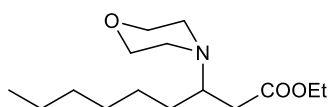
Rastvoru heptanala (500 mg, 4,39 mmol) u dihlormetanu 10 mL na 0°C doda se u porcijama trifenilfosfonijum ilid (1831 mg, 5,26 mmol). Nakon 18h mešanja na sobnoj temperaturi reakcija je završena. Rastvarač je delimično uparen pod sniženim pritiskom a ostatak prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar, v : v = 85 : 15). Sakupljene frakcije podvrgnute

su destilaciji pri čemu je dobijen proizvod (646 mg, 80%) kao bledo žuto isparljivo ulje. GC/MS analiza pokazala je prisustvo molekulskog jona.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,07 – 6,90 (m, 1H), 5,83 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 4,20 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,21 (dd, *J* = 14,0, 6,9 Hz, 2H), 1,46 (dd, *J* = 13,6, 6,6 Hz, 2H), 1,25 – 1,42 (m, 9H), 0,90 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H).

### Opšti postupak Michael-ove adicije na alken 2.19 (sinteza jedinjenja 2.20 – 2.24).

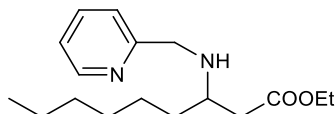
Rastvoru jedinjenja 2.19 (20 mg, 0,109 mmol) u etanolu (5 mL) dodato je 0,109 mmol amina. Rastvor je mešan na refluksu 5 dana, nakon čega je rastvarač uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni.



#### Etil 3-morfolinononanoat (2.20)

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku Michael-ove adicije. Sirovi proizvod reakcije prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar, v : v = 6 : 4) pri čemu je dobijen željeni proizvod (4,1 mg, 14%) kao braon ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 4,34 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,65 (t, *J* = 4,7 Hz, 4H), 2,97 (p, *J* = 6,1 Hz, 1H), 2,53 – 2,44 (m, 5H), 2,27 – 2,21 (m, 1H), 1,29 – 1,19 (m, 13H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

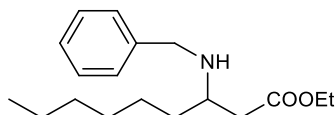


#### Etil 3-((piridin-2-ilmetil)amino)nonanoat (2.21)

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku Michael-ove adicije. Sirovi proizvod reakcije prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, etar : metanol, v : v = 9 : 1) pri čemu je dobijen željeni proizvod (7,0 mg, 22%) kao braon ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,54 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 7,63 (td, *J* = 7,7, 1,8 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,15 (dd, *J* = 6,5, 5,0 Hz, 1H), 4,14 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,94 (s, 2H), 3,06 (p, *J* = 6,2 Hz, 1H), 2,62 – 2,41 (m, 2H), 1,61 – 1,43 (m, 2H), 1,39 – 1,32 (m, 2H), 1,31 – 1,22 (m, 12H), 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,56, 159,66, 149,15, 136,42, 122,26, 121,92, 60,35, 54,63, 53,40, 52,24, 39,30, 34,27, 21,74, 29,68, 29,34, 25,60, 22,58, 14,21, 14,05.



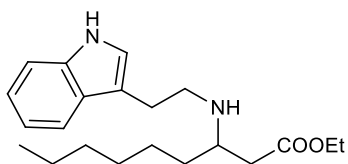
#### Etil 3-(benzilamino)nonanoat (2.22)

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku Michael-ove adicije. Sirovi proizvod reakcije prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar, v : v = 1 : 1) pri čemu je dobijen željeni proizvod (9,5 mg, 30%) kao žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,35 – 7,16 (m, 5H), 4,14 (tt, *J* = 7,2, 3,6 Hz, 2H), 3,78 (s, 2H), 3,02 (p, *J* = 6,2 Hz, 1H), 2,45 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,48 (ddd, *J* = 14,0, 11,0, 4,0 Hz, 2H), 1,36 – 1,22 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,62, 140,56, 128,34, 128,14, 126,86, 60,27, 54,28, 50,98, 39,32, 34,32, 31,76, 29,35, 25,62, 22,58, 14,22, 14,05.



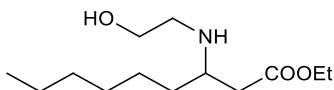


### Etil 3-((2-(1H-indol-3-il)etil)amino)nonanoat (2.23)

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku Michael-ove adicije. Sirovi proizvod reakcije prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, etar : metanol, v : v= 9 : 1) pri čemu je dobijen željeni proizvod (5,6 mg, 15%) kao narandžasto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,02 (s, 1H), 7,61 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,21 – 7,16 (m, 1H), 7,13 – 7,09 (m, 1H), 7,06 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 4,04 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,10 – 2,89 (m, 5H), 2,46 – 2,33 (m, 2H), 1,52 – 1,38 (m, 2H), 1,30-1,16 (m, 12H), 0,90 – 0,83 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,57, 136,39, 127,39, 122,02, 119,28, 118,82, 113,79, 111,09, 60,30, 54,82, 46,72, 39,04, 34,11, 31,71, 29,30, 25,81, 25,62, 22,54, 14,14, 14,04.



### Etil 3-((2-hidroksietil)amino)nonanoat (2.24)

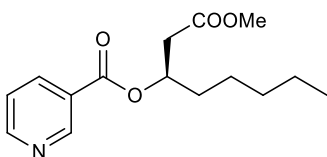
Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku Michael-ove adicije. Sirovi proizvod reakcije prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, etar : metanol, v : v= 9 : 1) pri čemu je dobijen željeni proizvod (3,7 mg, 14%) kao narandžasto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 4,15 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,68 – 3,59 (m, 2H), 3,06 – 2,95 (m, 1H), 2,87 – 2,75 (m, 2H), 2,45 (ddd, *J* = 22,9, 15,4, 6,3 Hz, 3H), 1,58-1,50 (m, 1H), 1,45 - 1,40 (m, 1H), 1,32 – 1,22 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,58, 60,76, 60,57, 54,44, 47,75, 38,97, 34,17, 31,72, 30,30, 29,64, 29,28, 25,80, 22,56, 14,19, 14,03.

### Opšti postupak za esterifikaciju jedinjenja 2.1 (dobijanje jedinjenja 2.25, 2.26 i 2.74 – 2.77).

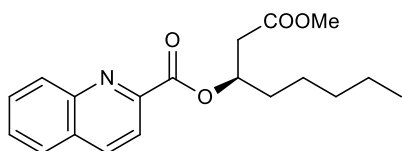
Rastvoru kiseline (0,2 mmol) u anhidrovanom dihlormetanu (5 mL), u atmosferi azota dodati su EDCI (0,3 mmol), i DMAP (0,3 mmol). Smesa je ohlađena na 0°C nakon čega je dodat alkohol 2.1 (0,2 mmol). Rastvor se meša 12h na sobnoj temperaturi. Nakon 12h rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom i sirov proizvod prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat) pri čemu se dobijaju estarski derivati i 2.25, 2.26 i 2.74 – 2.77.



### (R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il nikotinat (2.25)

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku za esterifikaciju. Nakon prečišćavanja na koloni dobijen je estar nikotinske kiseline (37,4 mg, 67%) kao bledo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9,21 (s, 1H), 8,78 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 8,29 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,53 – 7,33 (m, 1H), 5,64 – 5,35 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,73 (qd, *J* = 15,5, 6,2 Hz, 2H), 1,85 – 1,69 (m, 2H), 1,42 - 1,25 (m, 6H), 0,88 (s, 3H).

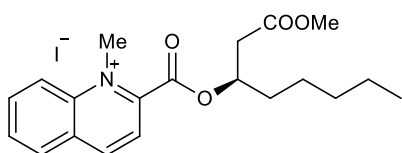


**(R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il hinolin-2-karboksilat (2.26)**

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku za esterifikaciju. Nakon prečišćavanja na koloni dobijen je estar hinolin-2-karboksilne kiseline (60,5 mg, 92%) kao bledo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,30 (dd, *J* = 14,6, 8,6 Hz, 2H), 8,12 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,88 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,81 – 7,74 (m, 1H), 7,65 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,67 – 5,52 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,88 (dd, *J* = 15,6, 7,4 Hz, 1H), 2,76 (dd, *J* = 15,6, 5,5 Hz, 1H), 1,94 – 1,73 (m, 2H), 1,52 – 1,40 (m, 2H), 1,39 – 1,27 (m, 4H), 0,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,69, 164,60, 153,41, 150,91, 137,09, 126,22, 123,28, 71,86, 51,83, 39,02, 34,01, 31,47, 24,79, 22,43, 13,91.

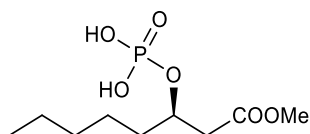


**(R)-2-(((1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)karbonil)-1-metilhinolin-1-ijum jodid (2.27).**

Rastvoru jedinjenja **2.26** (15 mg, 0,046 mmol) u acetonitrilu dodat je metil-jodid (14 μL, 0,227 mmol). Reakciona smesa je mešana na 80°C preko noći, nakon čega je rastvarač uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak ispran etrom nakon čega je dobijen proizvod (17,3 mg, 80%) kao tamno crveno ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9,56 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,82 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,55 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,41 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,29 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,09 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,81 – 5,65 (m, 1H), 4,91 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 2,86 (ddd, *J* = 20,2, 16,9, 6,3 Hz, 2H), 1,99 – 1,78 (m, 2H), 1,47 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 1,44 – 1,34 (s, 4H), 0,94 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,81, 160,02, 149,24, 147,77, 139,86, 138,43, 131,57, 131,20, 130,39, 121,95, 120,25, 52,42, 44,31, 37,98, 33,88, 31,28, 24,91, 22,42, 13,95.

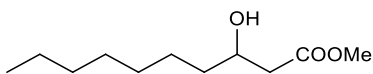


**(R)-metil 3-(fosfonooksi)oktanoat (2.29).**

Rastvoru alkohola **2.1** (50 mg, 0,287 mmol) u dihlorometanu (5 mL) dodat je DMAP (56 mg, 0,459 mmol) i potom polako ukapan difenil fosforil hlorid (71 μL, 0,345 mmol). Reakciona smesa mešana je na sobnoj temperaturi 18h, nakon čega je pod sniženim pritiskom uparen rastvarač. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar = 1 : 1) pri čemu je dobijen sirovi proizvod **2.28** (116 mg) onečišćen polaznim alkoholom. Sirovi proizvod **2.28** (116 mg) rastvoren je u metanolu (10 mL), i dodato je 6,5 mg PtO<sub>2</sub>. Evakuisan je vazduh iz reakcionog balona, a potom postavljen gumeni balon sa vodonikom. Nakon 18h mešanja na sobnoj temperaturi reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen, a sirovi ostatak ispran etrom. Dobijeni fosfatni estar (65,0 mg, 90%) izolovan je kao žuto ulje.

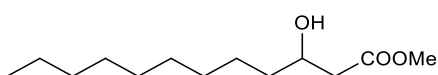
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9,56 (s, 2H), 4,69 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H), 2,67 (ddd, *J* = 20,2, 15,7, 5,8 Hz, 2H), 1,74 – 1,56 (m, 2H), 1,49 – 1,33 (m, 2H), 1,29 (s, 4H), 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,12, 75,16, 52,15, 40,22, 35,29, 31,51, 24,32, 22,44, 13,96.



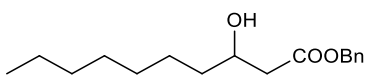
### Metil 3-hidroksidekanoat (2.1a) <sup>132</sup>

Suspenzija aktiviranog cinka u prahu (2,28 g, 35 mmol) u anhidrovanom benzenu (10 mL) zagrejana je do refluksa. Nakon 10 minuta mešanja u suspenziju je u periodu od 1h polako dodavana smesa n-oktanal (4,22 g, 5,15 mL, 33 mmol) i metilbromoacetata (5,54 mL, 35 mmol) u benzenu (60 mL). Nakon 2h reakciona smesa je ohlađena na 0 °C. U ovako ohlađenu smesu dodata je 1M HCl (30 ml) i smesa ekstrahovana etrom (40 mL × 3). Kombinovane organske faze osušene su natrijum-sulfatom, a rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat, v : v = 9 : 1) pri čemu je dobijen željeni β-hidroksiestar (5,30 g, 80 %) kao bezbojno ulje. Spektralni podaci jedinjenja **2.1a** identični su literaturnim.<sup>95</sup>



### Metil 3-hidroksidodekanoat (2.1b) <sup>132</sup>

Suspenzija aktiviranog cinka u prahu (2,28 g, 35 mmol) u anhidrovanom benzenu (10 mL) zagrejana je do refluksa. Nakon 10 minuta mešanja u suspenziju je u periodu od 1h polako dodavana smesa n-dekanal (5,15g, 6,20 mL, 33 mmol) i metilbromoacetata (5,54 mL, 35 mmol) u benzenu (60 mL). Nakon 2h reakciona smesa je ohlađena na 0 °C. U ovako ohlađenu smesu dodata je 1M HCl (30 ml) i smesa ekstrahovana etrom (40 mL × 3). Kombinovane organske faze osušene su anhidrovanim natrijum-sulfatom, a rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat, v : v = 9 : 1) pri čemu je dobijen željeni β-hidroksiestar (6,10 g, 80 %) kao bezbojno ulje. Spektralni podaci jedinjenja **2.1b** identični su literaturnim.<sup>95</sup>

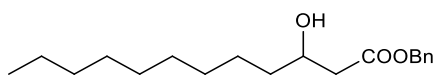


### Benzil 3-hidroksidekanoat (2.1c)

Rastvoru jedinjenja metil 3-hidroksidekanoata (101 mg, 0,50 mmol) u smesi THF-a (4mL) i metanola (2mL), dodat je vodeni rastvor LiOH (0,8mL, 2,5 M). Nakon mešanja 12h na sobnoj temperaturi u reakcionu smesu je dodata 1M HCl do pH 1. Ovako zakišljen rastvor ekstrahovan je etil-acetatom (3 x 5 mL). Ekstrakt je potom ispran zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (5 mL) i osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijena čista 3-hidroksidekanska kiselina (87 mg, 93 %) kao bezbojno ulje. Rastvoru 3-hidroksidekanske kiseline (87 mg, 0,46 mmol) u DMF-u (5 mL) na 0°C, dodati su K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (190 mg, 1,38 mmol) i benzil bromid (164 μl, 236 mg, 1,38 mmol). Nakon mešanja 12h na sobnoj temperaturi, dodato je 10 mL vode i smesa ekstrahovana etrom (3 x 10 mL). Kombinovane organske faze su isprane zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (10 mL) i osušene anhidrovanim natrijum-sulfatom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat, v : v = 9 : 1 to 1:1) pri čemu je dobijen benzil-estarski derivat (**2.1c**) (82 mg, 64 %) kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,43 - 7,27 (m, 5H), 5,15 (s, 2H), 4,18 - 3,78 (m, 1H), 2,87 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 2,50 (ddd, *J* = 25,3, 16,4, 6,1 Hz, 2H), 1,52 (s, 1H), 1,40 (dd, *J* = 16,5, 5,0 Hz, 2H), 1,30 (d, *J* = 26,5 Hz, 9H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,83, 135,70, 128,63, 128,55, 128,37, 128,27, 127,62, 126,98, 68,10, 66,47, 41,45, 36,59, 31,80, 29,49, 29,22, 25,48, 22,64, 14,07.



### Benzil 3-hidroksidodekanoat (2.1d)

Rastvoru metil 3-hidroksidodekanoata (115 mg, 0,5 mmol) u smesi THF-a (4 mL) i metanola (2 mL) dodat je vodeni rastvor LiOH (0,8 mL, 2,5 M). Nakon mešanja 12h na sobnoj temperaturi u reakcionu smesu je dodata 1M HCl do pH 1. Dobijeni rastvor ekstrahovan je etil-acetatom (3 x 3 mL). Dobijeni ekstrakt je potom ispran zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (5 mL) i osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijena čista 3-hidroksidodekanska kiselina (93 mg, 86 %). Rastvoru 3-hidroksidodekanske kiseline (93 mg, 0,43 mmol) u DMF-u (2 mL) na 0°C dodati su K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (178 mg, 1,29 mmol) i benzil bromid (221 mg, 153 μl, 1,29 mmol). Nakon mešanja 12h na sobnoj temperaturi, dodata je voda (5 mL) i smesa ekstrahovana etrom (3 x 5 mL). Kombinovane organske faze isprane su zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (3 x 5 mL) osušene anhidrovanim natrijum-sulfatom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etar, v : v = 9 : 1 do 1 : 1) pri čemu je dobijen benzil-estarski derivat (**2.1d**) (92 mg, 70 %) kao svetlo žuto ulje.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45 - 7,28 (m, 5H), 5,15 (s, 2H), 4,02 (s, 1H), 2,86 (s, 1H), 2,51 (ddd, J = 25,3, 16,4, 6,1 Hz, 2H), 1,57 - 1,47 (m, 1H), 1,46 - 1,38 (m, 2H), 1,34 - 1,20 (m, 13H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172,82, 135,70, 128,63, 128,38, 128,27, 68,10, 66,47, 41,45, 36,60, 31,90, 29,57, 29,55, 29,54, 29,31, 25,48, 22,68, 14,09.

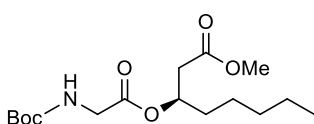
**Generalna procedura za boc-zaštitu aminokiseline:** U suspenziju aminokiseline (3 mmol) u smesi rastvarača THF/H<sub>2</sub>O (v : v = 10 mL : 10 mL) dodat je NaOH (12 mmol). Rastvor je potom ohlađen na 0°C i dodat je Boc<sub>2</sub>O (3,3 mmol; 6,3 mmol za tirozin, lizin i histidin; 9,3 mmol za arginin). Nakon mešanja 12h na sobnoj temperaturi uparen je THF pod sniženim pritiskom, a zaostali vodeni sloj ispran etrom (2 x 5 mL). U vodeni sloj dodata je 1M HCl do pH 1, pa je potom ekstrahovan dihlormetanom (3 x 10 mL). Organska faza je osušena anhidrovanim natrijum-sulfatom i rastvarač uparen pod sniženim pritiskom pri čemu se dobija zaštićena aminokiselina.

**Generalna procedura za sintezu boc-zaštićenih mono-aminokiselinskih derivata 2.30a - 2.45a (Procedura A):** Rastvoru boc-zaštićene aminokiseline (1 mmol) u anhidrovanom dihlormetanu (5 mL), u atmosferi azota dodati su EDCI (1,5 mmol), i DMAP (1,2mmol). Smesa je ohlađena na 0°C nakon čega je dodato jedinjenje **2.1** ili **2.16** (1 mmol). Rastvor se meša 12h na sobnoj temperaturi. Nakon 12h rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom i sirov proizvod prečišćen hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, petroletar : etil-acetat) pri čemu se dobijaju zaštićeni mono-aminokiselinski derivati **2.30a - 2.45a**.

**Generalna procedura za sintezu boc-zaštićenih di-, tri-, i tetra-peptidnih derivata (2.53a - 2.72a). (Procedura B):** Rastvoru boc-zaštićene aminokiseline (0,8 mmol) u anhidrovanom dihlormetanu (8 mL), pod atmosferom azota dodati su HBTU (1,2 mmol), HOBt (1,2 mmol) i DIPEA (1,6 mmol). Smesa se meša 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se dodaju mono-, di- ili tri-peptidni derivati sa slobodnom NH<sub>2</sub> grupom (0,8 mmol). Rastvor se meša 12h na sobnoj temperaturi. Nakon 12h rastvarač je uparen i sirovi ostatak rastvoren u etil-acetatu (10 mL), a zatim ispran zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (3 x 5 mL), zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 5 mL), 0,1M HCl-om (3 x 5 mL) i konačno zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 5 mL). Organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, rastvarač uparen

pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi ostatak prečišćen je hromatografijom na koloni pri čemu se dobija zaštićeni peptidni derivat.

**Generalna procedura za uklanjanje boc-zaštitne grupe (Procedura C):** Rastvoru boc-zaštićenog derivata (0,8 mmol) u dihlormetanu (5 mL) dodata je TFA (10 mmol). Reakciona smesa se meša 12 h na sobnoj temperaturi. Nakon 12h uparen je rastvarač, a suvi ostatak rastvoren u etil-acetatu (5 mL) i potom ispran zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (3 x 5 mL) i zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 5 mL). Organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, a rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Ukoliko je bilo neophodno, dobijeni proizvod prečišćavan je i hromatografijom na koloni (SiO<sub>2</sub>, etil-acetat : metanol, v:v = 9:1) pri čemu se dobija čist aminokiselinski (**2.30 - 2.45**) ili peptidni derivat (**2.53 - 2.72**).



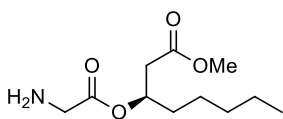
**(R)-metil 3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)acetoksi)oktanoat (2.30a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-glicina u prinosu od 84 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,36 - 5,14 (m, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,00 - 3,76 (m, 2H), 3,67 (s, 3H), 2,72 - 2,43 (m, 2H), 1,68 - 1,54 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,36 - 1,24 (m, 6H), 0,91 - 0,85 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,27, 169,53, 155,36, 96,14, 71,55, 51,63, 38,82, 33,94, 31,43, 28,33, 24,69, 22,42, 13,93.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>] 332,2068, izmereno 332,2066.



**(R)-metil 3-(2-aminoacetoksi)oktanoat (2.30)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.30a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

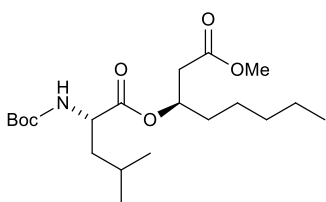
**[α]<sub>D</sub>** = -2,5 (c 0,40, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,33 - 5,22 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,40 (s, 2H), 2,66 - 2,51 (m, 2H), 1,70-1,56 (m, 2H), 1,51 (s, 2H), 1,39 - 1,19 (m, 6H), 0,91-0,85 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 173,66, 170,75, 71,14, 51,73, 44,02, 38,95, 33,98, 31,44, 24,74, 22,42, 13,89.

**IR (ATR) v:** 3299, 2956, 2932, 2860, 1741, 1198 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 232,1543, izmereno 232,1537.



**(R)-metil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.31a)**

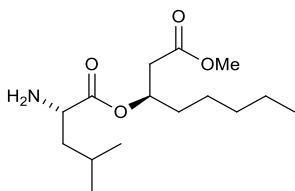
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-leucina u prinosu od 78 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,29 - 5,17 (m, 1H), 4,87 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,26 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,60 (qd, *J* = 15,5, 6,5 Hz, 2H), 1,74 - 1,65 (m, 1H), 1,64 -

1,54 (m, 3H), 1,50 - 1,39 (m, 10H), 1,36 - 1,22 (m, 6H), 0,94 (dd,  $J = 6,5, 2,0$  Hz, 6H), 0,88 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,71, 170,65, 155,30, 79,67, 71,49, 52,32, 51,77, 41,86, 38,99, 33,86, 31,40, 28,31, 24,79, 24,66, 22,84, 22,41, 21,93, 13,89.

HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_6 + \text{Na}^+]$  410,2513, izmereno 410,2517,



**(R)-metil 3-(((S)-2-amino-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.31)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.31a** u prinosu od 95 % kao svetlo žuto ulje.

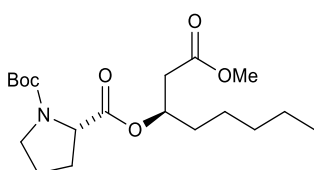
$[\alpha]_{\text{D}} = +5,5$  (c 0,20,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,28 - 5,19 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,42 (dd,  $J = 8,5, 5,8$  Hz, 1H), 2,67 - 2,51 (m, 2H), 1,83-1,71 (m, 1H), 1,68 - 1,58 (m, 2H), 1,58 - 1,52 (m, 1H), 1,51 (s, 2H), 1,44 - 1,37 (m, 1H), 1,30 (d,  $J = 6,2$  Hz, 6H), 0,95 - 0,91 (m, 6H), 0,90-0,85 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,02, 170,77, 70,89, 53,04, 51,72, 43,92, 38,98, 33,92, 31,41, 24,79, 24,71, 22,92, 22,42, 21,88, 13,86.

IR (ATR)  $\nu$ : 2955, 2932, 2870, 1738, 1169  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_4 + \text{H}^+]$  288,2169, izmereno 288,2164.



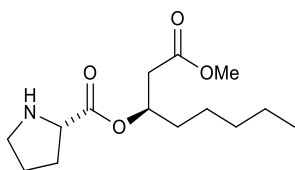
**(S)-1-terc-butil 2-(((R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il) pirolidin-1,2-dikarboksilat (2.32a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-prolina u prinosu od 83 % kao bistro ulje.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,30 - 5,12 (m, 1H), 4,27 (ddd,  $J = 12,0, 8,5, 3,0$  Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,56 - 3,30 (m, 2H), 2,69 - 2,50 (m, 2H), 2,27 - 2,12 (m, 1H), 2,03 - 1,81 (m, 3H), 1,66 - 1,55 (m, 2H), 1,45 (s, 4H), 1,43 (s, 5H), 1,37 - 1,24 (m, 6H), 0,95 - 0,84 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,37, 170,85, 170,69, 153,88, 79,91, 79,57, 71,37, 71,10, 59,29, 59,16, 51,73, 46,51, 46,29, 39,22, 38,88, 33,94, 31,50, 30,97, 29,98, 28,45, 28,39, 24,78, 24,62, 24,24, 23,35, 22,44, 13,96.

HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}_6 + \text{Na}^+]$  394,2200, izmereno 394,2199.



**(S)-(R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il pirolidin-2-karboksilat (2.32)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.32a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

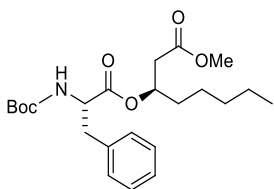
$[\alpha]_{\text{D}} = -25,8$  (c 0,50,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,32 - 5,19 (m, 1H), 3,73 (dd,  $J = 8,5, 5,5$  Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,99 (ddt,  $J = 69,4, 10,2, 6,6$  Hz, 2H), 2,59 (qd,  $J = 15,4, 6,4$  Hz, 2H), 2,21 (s, 1H), 2,18 - 2,07 (m, 1H), 1,89 - 1,68 (m, 3H), 1,67 - 1,55 (m, 2H), 1,35 - 1,23 (m, 6H), 0,88 (dd,  $J = 8,5, 4,7$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,83, 170,74, 71,05, 59,86, 51,77, 46,92, 39,05, 33,95, 31,41, 30,27, 25,37, 24,73, 22,43, 13,90.

**IR (ATR) v:** 2954, 293, 2961, 1733, 1168 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 272,1856, izmereno 272,1853.



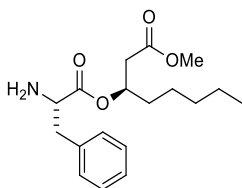
**(R)-metil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.33a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-fenilalanina u prinosu od 92 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,32 - 7,12 (m, 5H), 5,27 - 5,15 (m, 1H), 4,94 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,53 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,06 (ddd, *J* = 49,8, 13,9, 6,3 Hz, 2H), 2,56 (qd, *J* = 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,62 - 1,53 (m, 2H), 1,40 (s, 9H), 1,32 - 1,20 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,41, 170,63, 155,03, 136,13, 129,40, 128,50, 126,97, 79,81, 71,96, 54,54, 51,81, 38,82, 38,36, 33,81, 31,48, 28,30, 24,66, 22,43, 13,96.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 444,2357, izmereno 444,2358.



**(R)-metil 3-(((S)-2-amino-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.33)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz 2.33a u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

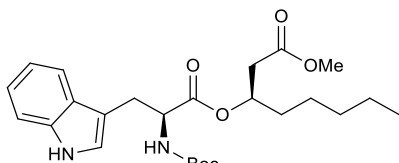
**[α]<sub>D</sub>** = +4 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,38 - 7,12 (m, 5H), 5,26 - 5,19 (m, 1H), 3,77 - 3,60 (m, 4H), 2,95 (ddd, *J* = 21,5, 13,6, 6,8 Hz, 2H), 2,58 (qd, *J* = 15,4, 6,4 Hz, 2H), 1,66 - 1,46 (m, 4H), 1,30 - 1,20 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,54, 170,75, 137,29, 129,28, 128,49, 126,75, 71,20, 55,91, 51,77, 40,95, 38,87, 33,84, 31,43, 24,66, 22,40, 13,93.

**IR (ATR) v:** 3383, 2954, 2931, 2959, 1740, 1171 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 322,2013, izmereno 322,2016.



**(R)-metil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.34a)**

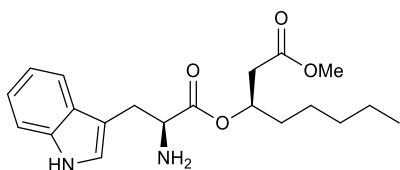
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-triptofana u prinosu od 78 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,15 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,18 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,11 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 5,25 - 5,11 (m, 1H), 5,04 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,61 (dd, *J* = 13,3, 6,1 Hz, 1H), 3,64 (s, 3H), 3,25 (ddd, *J* = 42,2, 14,8, 5,8 Hz, 2H), 2,51 (qd, *J* =

15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,54-1,48 (m, 1H), 1,41 (s, 9H), 1,33-1,27 (m, 1H), 1,20 (s, 6H), 0,85 (t,  $J = 6,7$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  171,83, 170,71, 155,20, 136,13, 127,77, 122,66, 122,19, 119,61, 118,86, 111,11, 110,40, 79,72, 71,82, 54,37, 53,42, 51,77, 38,78, 33,76, 31,45, 28,31, 28,02, 24,59, 22,39, 13,95.

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6 + \text{Na}^+]$  483,2466, izmereno 483,2465.



**(R)-metil 3-(((S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.34)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.34a** u prinosu od 99 % kao braon ulje.

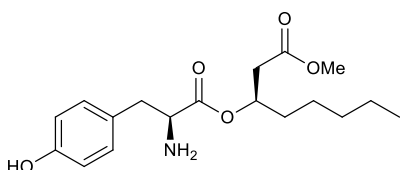
**$[\alpha]_{\text{D}}$**  = +2,5 (c 1,00,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8,18 (s, 1H), 7,63 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,35 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,22 - 7,16 (m, 1H), 7,15 - 7,09 (m, 1H), 7,06 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 5,27 - 5,17 (m, 1H), 3,81 (dd,  $J = 8,0, 5,1$  Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,13 (ddd,  $J = 22,4, 14,4, 6,3$  Hz, 2H), 2,68 - 2,44 (m, 2H), 1,82 (s, 2H), 1,66 - 1,46 (m, 2H), 1,30-1,16 (m, 6H), 0,86 (td,  $J = 7,1, 2,7$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  174,76, 170,84, 136,31, 127,54, 122,86, 122,18, 119,53, 118,80, 111,44, 111,19, 71,21, 55,19, 51,77, 38,92, 33,87, 31,46, 30,78, 24,69, 22,42, 13,95.

**IR (ATR) v:** 3376, 2953, 2929, 2860, 1733, 1172, 741  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}^+]$  361,2122, izmereno 361,2122.



**(R)-metil 3-(((S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil)oksi)oktanoat (2.35)**

Boc-zaštićeni prekursor je sintetisan prateći proceduru A iz bis-boc-L-tirozina. Dobijeni sirovi proizvod iskorišćen je u narednoj fazi. Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C, iz boc-zaštićenog derivata u prinosu od 73 % kao svetlo žuto ulje.

**$[\alpha]_{\text{D}}$**  = -1,4 (c 0,50,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

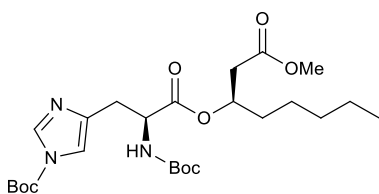
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7,01 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 6,67 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 5,32 - 5,15 (m, 1H), 3,76 - 3,59 (m, 4H), 3,41 (s, 3H), 2,90 (ddd,  $J = 21,8, 13,8, 6,6$  Hz, 2H), 2,67 - 2,48 (m, 2H), 1,65 - 1,52 (m, 2H), 1,35 - 1,21 (m, 6H), 0,88 (t,  $J = 6,2$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  174,34, 170,87, 155,23, 130,36, 128,17, 115,66, 71,49, 55,71, 51,85, 39,67, 38,89, 33,90, 31,45, 24,73, 22,42, 13,94.

**IR (ATR) v:** 2954, 2860, 1736, 1172  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_5 + \text{H}^+]$  338,1962, izmereno 338,1953.





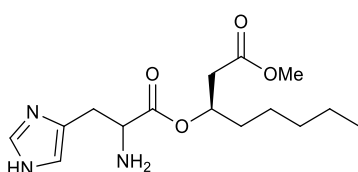
**tert-butil4-((S)-2-((tert-butoksikarbonil)amino)-3-(((R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)-3-oksopropil)-1H-imidazole-1-karboksilat (2.36a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz bis-boc-L-histidina u prinosu od 56 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,97 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 5,73 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,29 - 5,11 (m, 1H), 4,61 - 4,45 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,03 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,56 (ddd, *J* = 21,5, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,60 (s, 12H), 1,43 (s, 10H), 1,22-1,30 (m, 6H), 0,87 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,20, 170,62, 155,38, 146,88, 138,74, 136,79, 114,54, 85,50, 79,57, 71,69, 53,24, 51,74, 38,87, 33,81, 31,45, 30,23, 28,30, 27,86, 24,62, 22,42, 13,95.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> + H<sup>+</sup>] 512,2966, izmereno 512,2980.



**(R)-metil 3-((2-amino-3-(1H-imidazol-4-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.36)**

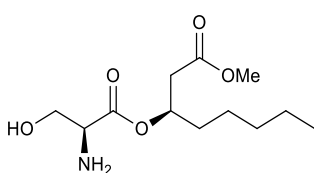
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz 2.36a u prinosu od 85 % kao žuto ulje. Jedinjenje je izolovano kao smesa dijastereoizomera u odnosu 9:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,56 (s, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 7,44 (s, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 6,89 (s, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 6,85 (s, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 5,33 - 5,20 (m, 1H<sub>oba izomera</sub>), 4,71 (s, 2H<sub>oba izomera</sub>), 3,74 (s, 1H<sub>oba izomera</sub>), 3,70 - 3,62 (m, 3H<sub>oba izomera</sub>), 3,20 (dd, *J* = 16,1, 4,8 Hz, 1H<sub>sporedni izomer</sub>) 3,09 (dd, *J* = 14,8, 4,0 Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 2,84 (dd, *J* = 14,9, 8,1 Hz, 1H<sub>oba izomera</sub>), 2,68 - 2,54 (m, 2H<sub>oba izomera</sub>), 1,69 - 1,54 (m, 2H<sub>oba izomera</sub>), 1,34 - 1,22 (m, 6H<sub>oba izomera</sub>), 0,90 - 0,84 (m, 3H<sub>oba izomera</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,20, 170,94, 134,87, 120,06, 71,47, 54,56, 51,85, 38,85, 33,95, 31,45, 30,97, 24,75, 22,45, 13,95

**IR (ATR) v:** 3121, 2930, 2860, 1737, 1172 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 312,1918, izmereno 312,1915.



**(R)-metil 3-(((S)-2-amino-3-hidroksipropanoil)oksi)oktanoat (2.37)**

U rastvor *p*-toluensulfonske kiseline (18,4mg, 0,107mmol) i piridina (8,4mg, 0,107mmol) u 5 mL dihlorometana, dodat je boc-L-serin (220mg, 1,07 mmol). Nakon toga u rastvor je u kapima dodat dihidropiran (225 mg, 2,68mmol). Ovako dobijeni rastvor je mešan na sobnoj temperaturi preko noći. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, a ostatak potom rastvoren u etil-acetatu (10 mL), ispran vodom (2 x 5 mL) i osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno 173 mg bezbojnog ulja. Sirovi proizvod uskorišćen je u reakciji kuplovanja sa (*R*)-metil 3-hidroksioktanoatom (procedura A), pri čemu je dobijeno 205 mg estarskog proizvoda. Sirovi estarski proizvod (205 mg, 0,46 mmol) rastvoren je u 5 mL dioksana pa je dodato 2,3 mL 2M HCl. Rastvor je mešan pod atmosferom azota 4 h. Nakon toga reakciona smesa je uparena pod sniženim pritiskom, rastvorena u etil-acetatu i isprana zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (3 x 5 mL) i zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 5

mL). Organski sloj osušen je anhidrovanim natrijum-sulfatom i rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni ostatak je prečišćen hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno jedinjenje **8** kao bistro ulje (35 mg, 12,5 %).

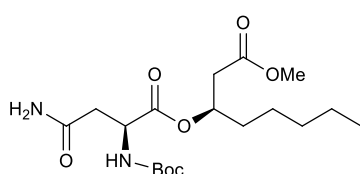
$[\alpha]_D = +7,5$  (c 0,40, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,40 - 5,11 (m, 1H), 3,80 (dt, *J* = 11,7, 7,1 Hz, 1H), 3,76 - 3,70 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,60 - 3,52 (m, 1H), 2,75 - 2,46 (m, 5H), 1,70 - 1,55 (m, 2H), 1,38 - 1,20 (m, 6H), 0,92 - 0,83 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,98, 71,58, 71,43, 64,03, 55,99, 52,08, 51,91, 38,89, 38,84, 34,05, 33,99, 31,45, 31,42, 24,79, 24,70, 22,44, 13,92.

**IR (ATR) v:** 3365, 2955, 2931, 2861, 1739, 1204 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 262,1649, izmereno 262,1648.



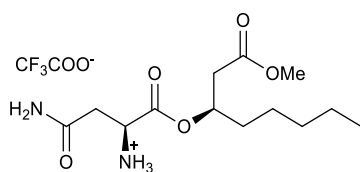
**(R)-metil 3-(((S)-4-amino-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-oksobutanoil)oksi)oktanoat (2.38a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-asparagina u prinosu od 58 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,91 (d, *J* = 40,2 Hz, 2H), 5,71 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 5,33 - 5,13 (m, 1H), 4,58 - 4,35 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,81 (ddd, *J* = 67,2, 16,0, 4,0 Hz, 2H), 2,60 (ddd, *J* = 21,3, 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,70 - 1,53 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,37 - 1,18 (m, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,24, 170,84, 170,78, 155,66, 79,92, 72,11, 51,80, 50,43, 38,79, 37,37, 33,71, 31,41, 28,28, 24,54, 22,39, 13,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 411,2102, izmereno 411,2101.



**(S)-4-amino-1-(((R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)-1,4-dioksobutan-2-aminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.38)**

U rastvor jedinjenja **2.38a** (35 mg, 0,09 mmol) u dihlormetanu (2 mL), dodata je TFA (69 μL, 0,9mmol). Reakciona smesa se mešala na sobnoj temperaturi preko noći nakon čega je uparen rastvarač pri čemu je dobijeno jedinjenje **9** kao narandžasto ulje (99 %).

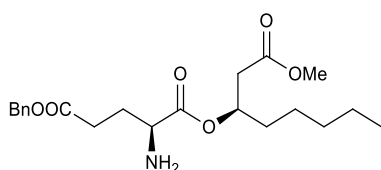
$[\alpha]_D = +1,7$  (c 0,30, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 5,41 - 5,21 (m, 1H), 4,24 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,04 - 2,85 (m, 2H), 2,75 - 2,61 (m, 2H), 1,77 - 1,59 (m, 2H), 1,39 - 1,24 (m, 6H), 0,90 (t, *J* = 6,3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 171,74, 171,08, 167,82, 73,26, 50,95, 49,40, 37,85, 33,35, 33,19, 31,20, 24,25, 22,07, 12,91.

**IR (ATR) v:** 2957, 1743, 1670, 1200, 1179, 1133 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>] 289,1758, izmereno 289,1755.



**(S)-5-benzil 1-((R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il) 2-amino pentandioat (2.39)**

Smesi benzil alkohola (1 mL, 9,6 mmol) i toluena (5 mL) dodata je p-toluenesulfonska kiselina (1,32 g, 7,68 mmol) i L-glutaminska kiselina (847 mg, 5,76 mmol). Nakon 2 h na 50 °C, reakciona smesa je mešana na 30 °C dodatnih 3 h. U reakcionu smesu je dodata voda (10 mL) a organski sloj uklonjen. Vodeni sloj razblažen je etanolom (5 mL). Sporim dodavanjem vodenog rastvora amonijaka (25 %) do pH 6 izvršena je precipitacija proizvoda u vidu belih pahulja. Dobijena bela čvrsta supstanca isprana je hladnim etanolom i vodom i osušena pod sniženim pritiskom na 50 °C. Dobijeno je 751 mg (55 %) bele čvrste supstance ((S)-2-amino-5-(benziloksi)-5-oksopentanska kiselina). Tačka topljenja: 173-176 °C. Boc zaštićena aminokiselina pripremljena je prateći generalnu proceduru za boc-zaštitu aminokiselina pri čemu je dobijen 5-benzil estar boc-L-glutaminske kiseline (769 mg, 72 %). Prateći proceduru A doijeno je 675 mg (60 %) proizvoda. Sirovi proizvod iskorišćen je u koraku deprotekcije (procedura C) pri čemu je dobijeno 430 mg blede žutog ulja (80 %).

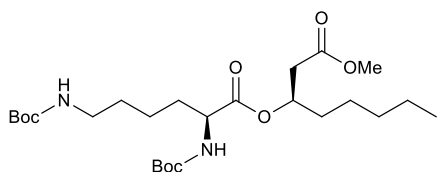
$[\alpha]_D = -11$  (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,40 - 7,28 (m, 5H), 5,28 - 5,20 (m, 1H), 5,12 (s, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,43 (dd, *J* = 8,5, 5,1 Hz, 1H), 2,57 (dd, *J* = 6,4, 3,2 Hz, 2H), 2,52 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,17 - 2,03 (m, 1H), 1,89-1,77 (m, 1H), 1,69 - 1,56 (m, 2H), 1,52 (s, 2H), 1,28 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,92, 172,93, 170,75, 136,00, 128,56, 128,22, 128,18, 71,25, 66,30, 53,92, 51,78, 38,93, 33,96, 31,43, 30,67, 29,53, 24,78, 22,43, 13,93.

**IR (ATR) v:** 3354, 2956, 2864, 1737, 1704, 1196 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>] 394,2224, izmereno 394,2219.



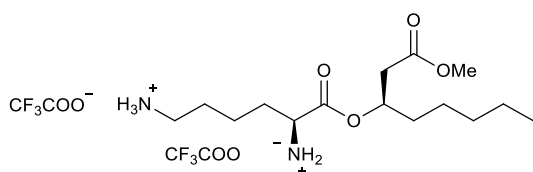
**(R)-metil 3-(((S)-2,6-bis((terc-butoksikarbonil)amino) heksanoil)oksi)oktanoat (2.40a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz bis-boc-L-lizina u prinosu od 86 % kao bezbojno ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,33 - 5,17 (m, 1H), 5,08 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,64 (s, 1H), 4,23 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,11 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,59 (qd, *J* = 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,86 - 1,74 (m, 1H), 1,70 - 1,56 (m, 3H), 1,56 - 1,47 (m, 2H), 1,44 (s, 18H), 1,40 - 1,33 (m, 2H), 1,34 - 1,23 (m, 6H), 0,90 - 0,84 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,99, 170,60, 156,00, 155,37, 79,72, 79,04, 71,62, 71,36, 53,44, 51,77, 40,13, 38,91, 36,02, 33,84, 32,35, 31,37, 30,31, 29,57, 28,40, 28,30, 24,67, 22,44, 22,39, 18,32, 13,88, 13,71.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + Na<sup>+</sup>] 525,3146, izmereno 525,3148.



**(S)-6-(((R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)-6-oksoheksan-1,5-diaminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.40)**

Rastvoru jedinjenja **2.40a** (50,2 mg, 0,1mmol) u dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77  $\mu$ L, 1 mmol) i reakciona smesa je mešana na sobnoj temperaturi preko noći. Reakciona smesa je potom uparena pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.40** kao a žuto ulje (99 %).

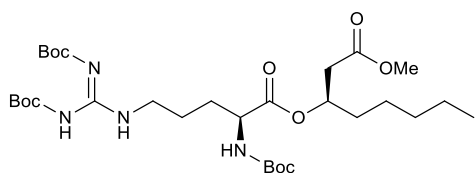
$[\alpha]_D = -0,2$  (c 0,50, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)**  $\delta$  5,42 - 5,24 (m, 1H), 4,02 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,05 - 2,86 (m, 2H), 2,77 - 2,59 (m, 2H), 2,05 - 1,83 (m, 2H), 1,78 - 1,63 (m, 4H), 1,63 - 1,44 (m, 2H), 1,42 - 1,25 (m, 6H), 0,94 - 0,87 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)**  $\delta$  171,11, 168,38, 161,43, 161,08, 73,25, 52,40, 50,98, 38,84, 37,79, 33,36, 31,12, 29,63, 26,59, 24,45, 22,09, 21,76, 12,89.

**IR (ATR) v:** 2935, 1673, 1200, 1178, 1131, 722cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>] 152,1176, izmereno 152,1176.

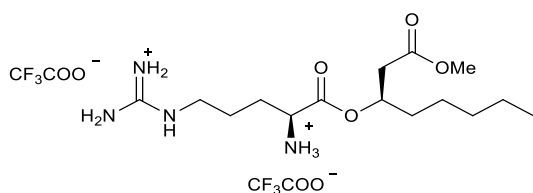


**(R)-metil3-(((S)-5-((Z)-2,3-bis(terc-butoksikarbonil)gvanidino)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)pentanoil)oksi)oktanoat (2.41a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz tris-boc-L-arginina u prinosu od 70 % kao bezbojno ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  9,28 (d,  $J = 66,4$  Hz, 2H), 5,35 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 5,30 - 5,19 (m, 1H), 4,23 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 3,95 - 3,80 (m, 2H), 3,67 (s, 3H), 2,59 (ddd,  $J = 21,3, 15,6, 6,5$  Hz, 2H), 1,85 - 1,74 (m, 1H), 1,71 - 1,57 (m, 5H), 1,52 (s, 9H), 1,50 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 1,35 - 1,21 (m, 6H), 0,87 (t,  $J = 6,6$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  171,87, 170,64, 163,70, 160,53, 155,36, 154,94, 83,82, 79,56, 78,77, 71,54, 53,52, 51,77, 44,12, 38,88, 33,83, 31,38, 29,14, 28,35, 28,26, 28,02, 24,90, 24,68, 22,39, 13,92.



**(S)-5-((amino(iminio)metil)amino)-1-(((R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il)oksi)-1-oksopentan-2-aminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.41)**

Rastvoru jedinjenja **2.41a** (63 mg, 0,1mmol) u dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77  $\mu$ L, 1mmol) i reakciona smesa je mešana na sobnoj temperaturi preko noći. Reakciona smesa je potom uparena pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.41** kao žuto ulje (99 %).

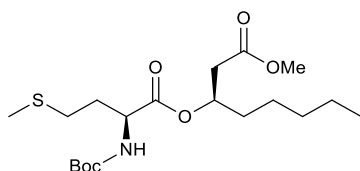
$[\alpha]_D = +2,2$  (c 2,00, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 5,43 - 5,24 (m, 1H), 4,05 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,32-3,29 (m, 1H), 3,25 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,77 - 2,63 (m, 2H), 2,08 - 1,86 (m, 2H), 1,86 - 1,74 (m, 1H), 1,74 - 1,62 (m, 3H), 1,40-1,27 (m, 6H), 0,91 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 171,09, 168,30, 161,87, 161,52, 157,41, 73,30, 52,27, 50,97, 40,25, 37,78, 33,38, 31,11, 27,31, 24,45, 24,26, 22,07, 12,89.

**IR (ATR) v:** 3177, 2958, 1667, 1178, 1131, 722 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>] 166,1206, izmereno 166,1207.



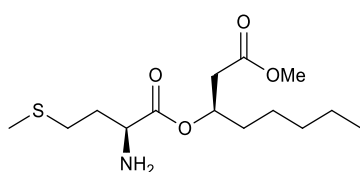
**(R)-metil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-(metiltio)butanoil)oksi)oktanoat (2.42a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-metionina u prinosu od 89 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,30 - 5,21 (m, 1H), 5,10 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,37 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,72 - 2,47 (m, 4H), 2,18 - 2,06 (m, 4H), 1,95 - 1,83 (m, 1H), 1,70 - 1,55 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,37 - 1,22 (m, 6H), 0,90 - 0,83 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,53, 170,56, 155,24, 79,91, 71,95, 71,89, 53,38, 53,05, 51,80, 38,87, 38,79, 33,91, 33,86, 32,36, 31,40, 29,93, 29,84, 28,29, 24,70, 22,40, 15,45, 15,40, 13,89.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>19</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>6</sub>S + Na<sup>+</sup>] 428,2077, izmereno 428,2077.



**(R)-metil 3-(((S)-2-amino-4-(metiltio)butanoil)oksi)oktanoat (2.42)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.42a** u prinosu od 95 % kao žuto ulje.

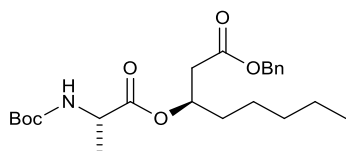
**[α]<sub>D</sub>** = -3,5 (c 0,40, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5,29 - 5,21 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,55 (dd, *J* = 8,2, 4,9 Hz, 1H), 2,66 - 2,57 (m, 4H), 2,11 (s, 3H), 2,07-1,97 (m, 1H), 1,85 - 1,74 (m, 1H), 1,69 (s, 2H), 1,65 - 1,55 (m, 2H), 1,37-1,23 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,05, 170,75, 71,23, 53,51, 51,79, 38,91, 33,95, 33,83, 31,42, 30,47, 24,77, 22,43, 15,37, 13,91.

**IR (ATR) v:** 2955, 2929, 2960, 1737, 1171 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>S + H<sup>+</sup>] 306,1734, izmereno 306,1727.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)propanoate)oksi)oktanoat (2.43a)**

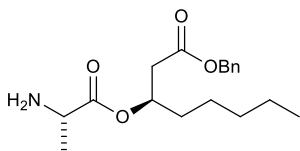
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-alanina u prinosu od 83 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,57 - 7,28 (m, 5H), 5,32 - 5,26 (m, 1H), 5,12 (s, 2H), 5,01 (s, 1H), 4,23 (s, 1H), 2,63 (qd, *J* = 15,5, 6,5 Hz, 2H), 1,68 - 1,54 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,33 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,32 - 1,22 (m, 6H), 0,86 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,57, 169,98, 154,97, 135,73, 128,60, 128,42, 128,36, 71,59, 66,58, 39,20, 33,88, 31,42, 28,36, 24,63, 22,41, 18,74, 13,91.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 444,2357, izmereno 444,2362.

**(*R*)-benzil 3-(((*S*)-2-aminopropanoil)oksi)oktanoat (2.43)**



Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.43a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

**[α]<sub>D</sub>** = +253,0 (*c* 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

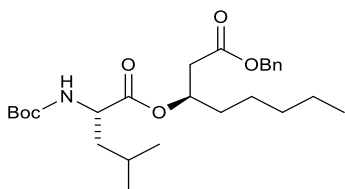
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,35 (s, 5H), 5,30-5,22 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,38 (q, *J* = 7,0 Hz, 1H), 2,71 - 2,52 (m, 2H), 1,67-1,56 (m, 2H), 1,49 (s, 2H), 1,38-1,20 (m, 9H), 0,90-0,83 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,99, 170,14, 135,76, 128,59, 128,44, 128,39, 70,97, 66,52, 50,07, 39,27, 33,99, 31,44, 24,70, 22,43, 20,47, 13,91.

**IR (ATR) v:** 2956, 2931, 2860, 1737, 1168 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 322,2013, izmereno 322,2012.

**(*R*)-benzil 3-(((*S*)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.44a)**



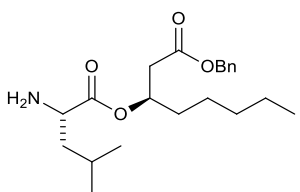
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-leucina u prinosu od 76 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,43 - 7,28 (m, 5H), 5,30 - 5,21 (m, 1H), 5,12 (s, 2H), 4,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,25 (dd, *J* = 14,1, 8,6 Hz, 1H), 2,64 (ddd, *J* = 21,3, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,74 - 1,64 (m, 1H), 1,59 (s, 2H), 1,57 - 1,50 (m, 1H), 1,47 - 1,38 (m, 10H), 1,35 - 1,20 (m, 6H), 0,95 - 0,90 (m, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,61, 170,00, 155,31, 135,74, 128,58, 128,36, 128,31, 71,51, 66,52, 52,32, 41,79, 39,14, 33,80, 31,41, 28,32, 24,78, 24,63, 22,86, 22,40, 21,91, 18,44, 13,90.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 486,2826, izmereno 486,2825.

**(*R*)-benzil 3-(((*S*)-2-amino-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.44)**



Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.44a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

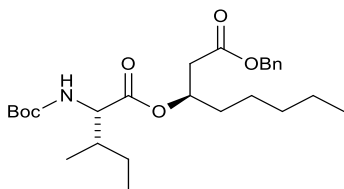
**[α]<sub>D</sub>** = +5,8 (*c* 0,40, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,40 - 7,30 (m, 5H), 5,32 - 5,21 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,31 (dd, *J* = 8,6, 5,8 Hz, 1H), 2,72 - 2,55 (m, 2H), 1,81-1,69 (m, 1H), 1,68 - 1,55 (m, 2H), 1,54 - 1,47 (m, 1H), 1,45-1,42 (m, 2H), 1,40 - 1,33 (m, 1H), 1,33-1,23 (m, 6H), 0,95 - 0,83 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 176,07, 170,17, 135,73, 128,58, 128,39, 128,37, 70,89, 66,50, 52,91, 43,79, 39,21, 33,93, 31,42, 24,77, 24,69, 22,95, 22,42, 21,85, 13,89.

**IR (ATR) v:** 2955, 2931, 2869, 1736, 1165 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 364,2482, izmereno 364,2473.



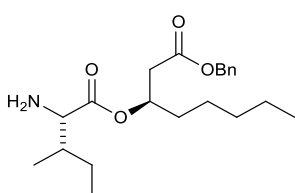
**(R)-benzil 3-(((2S,3S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.45a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-leucina u prinosu od 90 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,38 - 7,30 (m, 5H), 5,34 - 5,21 (m, 1H), 5,12 (s, 2H), 4,99 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 4,22 (dd, *J* = 8,6, 4,4 Hz, 1H), 2,64 (ddd, *J* = 21,4, 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,84 (s, 1H), 1,66 - 1,53 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,40 - 1,32 (m, 1H), 1,32 - 1,22 (m, 6H), 1,15 - 1,05 (m, 1H), 0,95 - 0,83 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,62, 169,98, 155,52, 135,74, 128,59, 128,37, 128,33, 79,63, 71,67, 66,56, 58,16, 39,10, 37,97, 33,78, 31,45, 28,36, 24,80, 24,68, 22,44, 15,50, 13,92, 11,62.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 486,2826, izmereno 486,2831.



**(R)-benzil 3-(((2S,3S)-2-amino-3-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.45)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz 2.45a u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

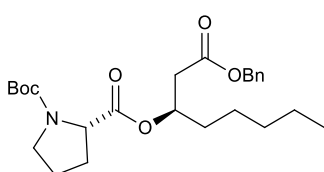
**[α]<sub>D</sub>** = +9,6 (c 0,50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,46 - 7,29 (m, 5H), 5,32 - 5,22 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,19 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 2,75 - 2,52 (m, 2H), 1,78 - 1,68 (m, 1H), 1,67 - 1,52 (m, 2H), 1,43 - 1,32 (m, 3H), 1,31 - 1,23 (m, 6H), 1,22 - 1,11 (m, 1H), 0,99 - 0,82 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,16, 170,18, 135,77, 128,59, 128,41, 128,37, 70,97, 66,51, 59,24, 39,21, 38,75, 33,94, 31,48, 24,75, 24,39, 22,47, 15,81, 13,92, 11,65.

**IR (ATR) v:** 2959, 2932, 2873, 1732, 1164 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 364,2482, izmereno 364,2482.



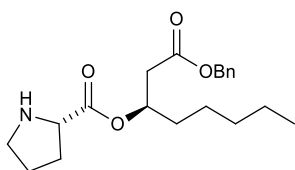
**(S)-2-((R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il) 1-*tert*-butil pirolidin-1,2-dikarboksilat (2.46a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-prolina u prinosu od 71 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,38 - 7,29 (m, 5H), 5,29 - 5,20 (m, 1H), 5,18 - 5,05 (m, 2H), 4,34 - 4,15 (m, 1H), 4,06 - 4,00 (m, 1H), 3,53 - 3,27 (m, 2H), 2,68 - 2,44 (m, 2H), 2,19 - 2,1 (m, 1H), 1,96 - 1,75 (m, 2H), 1,65 - 1,52 (m, 2H), 1,44 (s, 4H), 1,43 (s, 5H), 1,37 - 1,19 (m, 6H), 0,91 - 0,84 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,07, 128,65, 128,40, 128,28, 68,10, 66,51, 53,20, 46,30, 41,40, 38,29, 36,53, 33,90, 31,72, 31,50, 28,40, 25,14, 22,58, 22,42, 13,99.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 470,2513, izmereno 470,2524.



**(S)-(R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il pirolidin-2-karboksilat (2.46)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.46a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

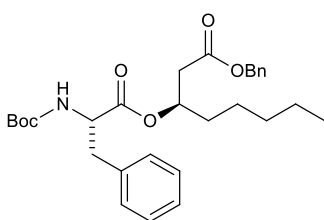
**[α]<sub>D</sub>** = -19,0 (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,42 - 7,27 (m, 5H), 5,33 - 5,20 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,66 (dd, *J* = 8,5, 5,4 Hz, 1H), 2,96 (ddt, *J* = 63,3, 10,0, 6,7 Hz, 2H), 2,63 (qd, *J* = 15,4, 6,4 Hz, 2H), 2,16 - 1,92 (m, 2H), 1,89 - 1,67 (m, 3H), 1,65 - 1,55 (m, 2H), 1,33 - 1,21 (m, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,77, 170,13, 135,73, 128,58, 128,40, 128,35, 71,09, 66,55, 59,82, 46,85, 39,26, 33,96, 31,44, 30,17, 25,28, 24,73, 22,45, 13,92.

**IR (ATR) v:** 3364, 2955, 2929, 2871, 1736, 1165 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 348,2169, izmereno 348,2176.



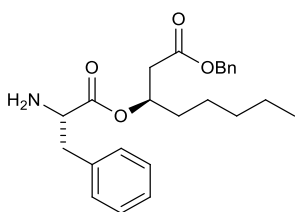
**(R)-benzil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.47a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-fenilalanina u prinosu od 79 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,43 - 7,08 (m, 10H), 5,28 - 5,19 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,92 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 4,50 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 3,03 (ddd, *J* = 59,0, 13,8, 6,2 Hz, 2H), 2,61 (ddd, *J* = 21,4, 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,63 - 1,53 (m, 2H), 1,40 (s, 9H), 1,30 - 1,15 (m, 6H), 0,86 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,31, 169,97, 154,99, 136,15, 135,73, 129,39, 128,60, 128,47, 128,40, 128,36, 126,94, 79,78, 71,97, 66,56, 54,55, 39,00, 38,28, 33,77, 31,48, 28,31, 24,63, 22,41, 13,95.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 520,2670, izmereno 520,2683.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-amino-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.47)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.47a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

**[α]<sub>D</sub>** = -8,5 (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

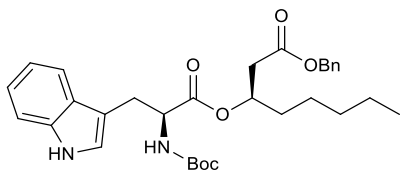
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,42 - 7,11 (m, 10H), 5,29 - 5,20 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,57 (dd, *J* = 7,8, 5,7 Hz, 1H), 2,90 (ddd, *J* = 21,5, 13,6, 6,8 Hz, 2H), 2,70 - 2,55 (m, 2H), 1,64 - 1,48 (m, 2H), 1,43 (s, 2H), 1,31 - 1,16 (m, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).



**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,56, 170,14, 137,39, 135,74, 129,31, 128,60, 128,50, 128,43, 128,39, 126,75, 71,23, 66,53, 55,87, 40,89, 39,15, 33,89, 31,48, 24,67, 22,42, 13,95.

**IR (ATR) v:** 3030, 2930, 2860, 1735, 1166, 698 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 398,2326, izmereno 398,2329.



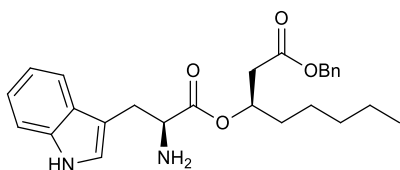
**(R)-benzil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.48a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-triptofan u prinosu od 68 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,99 (s, 1H), 7,58 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,41 - 7,28 (m, 6H), 7,17 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,10 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 5,25 - 5,16 (m, 1H), 5,08 (s, 2H), 5,00 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,62-4,54 (m, 1H), 3,23 (ddd, *J* = 41,9, 14,6, 5,7 Hz, 2H), 2,54 (ddd, *J* = 21,5, 15,7, 6,4 Hz, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,45 - 1,25 (m, 9H), 1,24-1,13 (m, 6H), 0,84 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,69, 170,01, 155,13, 136,10, 135,76, 128,57, 128,36, 128,32, 122,63, 122,21, 119,63, 118,89, 111,05, 71,83, 66,48, 54,37, 38,93, 33,71, 31,44, 28,31, 24,56, 22,36, 13,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 559,2779, izmereno 559, 2776.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.48)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.48a** u prinosu od 99 % kao braon ulje.

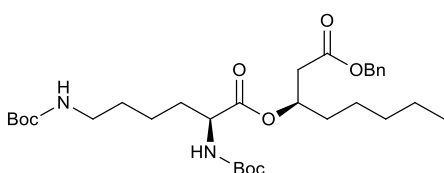
**[α]<sub>D</sub>** = +1,8 (c 0,50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,13 (s, 1H), 7,61 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,36 - 7,30 (m, 5H), 7,18 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,11 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 5,30 - 5,21 (m, 1H), 5,10 (s, 2H), 3,71 (dd, *J* = 7,6, 5,3 Hz, 1H), 3,09 (ddd, *J* = 22,4, 14,4, 6,6 Hz, 2H), 2,69 - 2,52 (m, 2H), 1,61 (s, 2H), 1,58 - 1,47 (m, 2H), 1,28-1,15 (m, 6H), 0,85 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,80, 170,21, 136,28, 135,73, 128,59, 128,40, 128,37, 127,55, 122,83, 122,16, 119,52, 118,84, 111,48, 111,17, 71,19, 66,52, 55,15, 39,13, 33,87, 31,46, 30,68, 24,66, 22,41, 13,95.

**IR (ATR) v:** 3372, 3059, 2931, 2869, 1734, 1169, 741 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 437,2435, izmereno 437,2426.



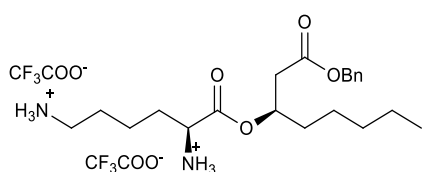
**(R)-benzil 3-(((S)-2,6-bis((*tert*-butoksikarbonil)amino)heksanoil)oksi)oktanoat (2.49a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz bis-boc-L-lizina u prinosu od 80 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,40-7,32 (m, 5H), 5,30-5,23 (m, 1H), 5,12 (s, 2H), 5,05-4,97 (m, 1H), 4,64-4,52 (s, 1H), 4,26-4,17 (m, 1H), 3,14-3,02 (m, 2H), 2,63 (ddd, *J* = 21,4, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,80-1,72 (m, 1H), 1,65-1,55 (m, 4H), 1,44 (s, 18H), 1,37 - 1,19 (m, 9H), 0,90-0,85 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,96, 169,99, 156,03, 155,36, 135,73, 128,61, 128,39, 79,77, 79,11, 71,69, 66,58, 53,44, 40,20, 39,12, 33,83, 32,38, 31,42, 29,59, 28,45, 28,36, 24,69, 22,43, 13,93.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + Na<sup>+</sup>] 601,3459, izmereno 601,3457.



**(S)-6-(((R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il)oksi)-6-oksoheksan-1,5-diaminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.49)**

Rastvoru jedinjenja **2.49a** (58 mg, 0,1mmol) u dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77 μL, 1mmol). Rastvor je mešan na sobnoj temperaturi preko noći. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.49** kao žuto ulje.

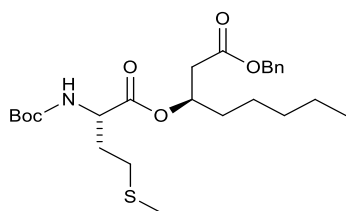
**[α]<sub>D</sub>** = +1,3 (c 0,30, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 7,36 (d, *J* = 3,1 Hz, 5H), 5,41 - 5,28 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 3,90 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 2,99 - 2,87 (m, 2H), 2,75 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,97 - 1,80 (m, 2H), 1,74 - 1,62 (m, 4H), 1,57 - 1,42 (m, 2H), 1,38 - 1,24 (m, 6H), 0,95 - 0,82 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 170,31, 169,37, 168,37, 167,61, 161,43, 135,98, 128,22, 128,03, 128,01, 73,28, 66,21, 52,36, 38,82, 38,02, 33,29, 31,12, 29,56, 26,58, 24,43, 22,08, 21,77, 12,91.

**IR (ATR) v:** 2937, 1745, 1674, 1201, 1134, 722 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 379,2591, izmereno 379,2592.



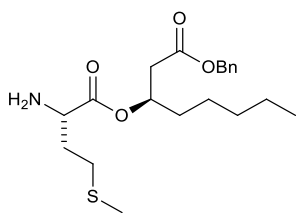
**(R)-benzil 3-(((S)-2-((tert-butoksikarbonil)amino)-4-(metiltio)butanoil)oksi)oktanoat (2.50a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-metionina u prinosu od 89 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,46 - 7,29 (m, 5H), 5,35 - 5,22 (m, 1H), 5,12 (s, 2H), 5,05 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,34 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 2,64 (qd, *J* = 15,6, 6,4 Hz, 2H), 2,55 - 2,42 (m, 2H), 2,13 - 2,05 (m, 4H), 1,94 - 1,77 (m, 1H), 1,66 - 1,53 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,36 - 1,20 (m, 6H), 0,90 - 0,82 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,49, 169,94, 155,23, 135,70, 128,62, 128,42, 128,38, 79,91, 71,93, 66,61, 53,04, 39,06, 33,84, 32,34, 31,43, 29,93, 28,33, 24,70, 22,43, 15,48, 13,93.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>S + Na<sup>+</sup>] 504,2390, izmereno 504,2404.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-amino-4-(metiltio)butanoil)oksi)oktanoat (2.50)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.50a** u prinosu od 99 % kao žuto ulje.

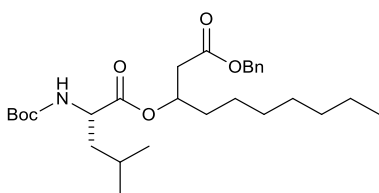
$[\alpha]_D = -10,0$  (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,50 - 7,28 (m, 5H), 5,31 - 5,23 (m, 1H), 5,11 (d, *J* = 1,2 Hz, 2H), 3,42 (dd, *J* = 8,2, 4,9 Hz, 1H), 2,70 - 2,54 (m, 4H), 2,09 (s, 3H), 2,03-1,92 (m, 1H), 1,78-1,68 (m, 1H), 1,67 - 1,55 (m, 2H), 1,48 (s, 2H), 1,34-1,22 (m, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,11, 170,12, 135,72, 128,61, 128,45, 128,41, 71,22, 66,56, 53,45, 39,20, 33,99, 33,81, 31,45, 30,51, 24,77, 22,45, 15,40, 13,93.

**IR (ATR) v:** 2929, 2860, 1735, 1167 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>S + H<sup>+</sup>] 382,2047, izmereno 382,2049.



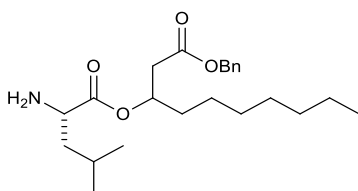
**Benzil 3-(((S)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanoil)oksi)dekanooat (2.51a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-leucina and benzil 3-hidroksidekanooata u prinosu od 65 % kao bistro ulje u obliku smese dijastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,42 - 7,28 (m, 5H), 5,34 - 5,21 (m, 1H), 5,15 - 5,08 (2 x s, 2 x 1H<sub>oba</sub> izomera), 4,82 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,30 - 4,20 (m, 1H), 2,81 - 2,47 (m, 2H), 1,70 - 1,53 (m, 3H), 1,55 - 1,47 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,40 - 1,33 (m, 1H), 1,32 - 1,20 (m, 10H), 0,95 - 0,83 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,84, 170,05, 170,00, 155,31, 135,78, 135,69, 128,60, 128,37, 128,35, 128,33, 79,71, 71,53, 66,54, 52,25, 41,78, 39,16, 34,02, 33,89, 31,74, 31,72, 29,30, 29,25, 29,10, 29,08, 28,34, 25,00, 24,80, 22,87, 22,62, 21,94, 14,05.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 514,3139, izmereno 514,3153.



**Benzil 3-(((S)-2-amino-4-metilpentanoil)oksi)dekanooat (2.51)**

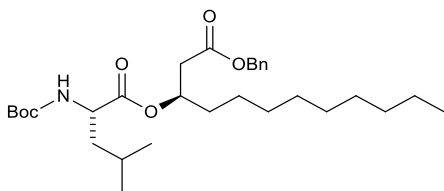
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.51a** u prinosu od 99 % kao svetložuto ulje u obliku smese dijastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,41 - 7,28 (m, 5H<sub>oba</sub> izomera), 5,33 - 5,19 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,12 - 5,09 (2 x s, 2 x 1H), 3,39 - 3,28 (2 x dd, *J* = 8,7, 5,7 Hz, 1H<sub>oba</sub> izomera), 2,68 - 2,53 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,81 - 1,69 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,67 - 1,54 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,54 - 1,44 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,43 - 1,36 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,33 - 1,18 (m, 11H<sub>oba</sub> izomera), 0,93 - 0,84 (m, 9H<sub>oba</sub> izomera).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 176,10, 175,85, 170,17, 170,13, 135,76, 135,70, 128,60, 128,40, 128,38, 128,31, 128,23, 70,98, 70,90, 66,52, 53,11, 52,93, 43,89, 43,83, 39,24, 34,01, 31,73, 31,70, 29,29, 29,24, 29,09, 25,09, 25,06, 24,79, 24,78, 22,97, 22,61, 21,87, 21,81, 14,06.

**IR (ATR) v:** 2955, 2926, 2856, 1733, 1162, 697 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 392,2795, izmereno 392,2799.



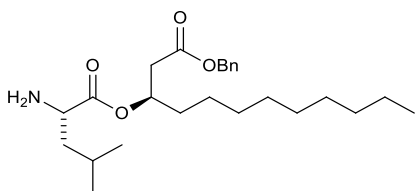
**(R)-benzil 3-(((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanoil)oksi)dodekanoat (2.52a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru A iz boc-L-leucina i benzil 3-hidroksidodekanoata u prinosu od 59 % kao bistro ulje u obliku smese diastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,47 - 7,28 (m, 5H), 5,39 - 5,19 (m, 1H), 5,13 - 5,08 (2 x s, 2 x 1H<sub>oba</sub> izomera), 4,83 (t, *J* = 9,2 Hz, 1H), 4,30 - 4,20 (m, 1H), 2,78 - 2,44 (m, 2H), 1,76 - 1,48 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,40 - 1,34 (m, 1H), 1,34 - 1,18 (m, 12H), 0,99 - 0,83 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,84, 172,68, 170,05, 170,01, 155,38, 135,78, 135,69, 128,60, 128,37, 128,35, 128,33, 79,69, 71,53, 66,53, 52,35, 52,23, 41,77, 40,92, 39,15, 34,02, 33,89, 31,88, 29,50, 29,48, 29,45, 29,43, 29,35, 29,29, 28,50, 28,34, 25,01, 24,80, 23,86, 22,87, 22,67, 21,94, 21,89, 20,82, 17,50, 17,31, 14,65, 14,09, 7,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>6</sub> + Na<sup>+</sup>] 542,3452, izmereno 542,3465.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-amino-4-metilpentanoil)oksi)dodekanoat (2.52)**

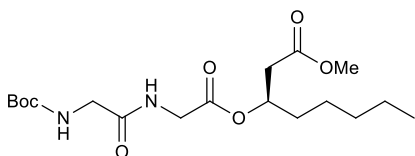
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz 2.52a u prinosu od 99 % kao svetložuto ulje u obliku smese diastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,42 - 7,28 (m, 5H<sub>oba</sub> izomera), 5,32 - 5,22 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,13 - 5,09 (2 x s, 2 x 1H), 3,39 - 3,28 (2 x dd, *J* = 8,5, 5,8 Hz, 2 x 0,5H), 2,79 - 2,53 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,80 - 1,70 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,67 - 1,54 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,52 - 1,45 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,41 (s, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,37 - 1,33 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,32 - 1,18 (m, 14H<sub>oba</sub> izomera), 0,95 - 0,84 (m, 9H<sub>oba</sub> izomera).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 176,10, 175,86, 170,18, 170,14, 135,75, 135,69, 128,60, 128,41, 128,39, 70,98, 70,91, 66,53, 53,10, 52,93, 43,88, 43,81, 39,24, 34,01, 31,88, 29,49, 29,45, 29,34, 29,28, 25,09, 25,07, 24,79, 24,77, 22,98, 22,67, 22,61, 21,87, 21,81, 14,09, 14,06.

**IR (ATR) v:** 2955, 2925, 2855, 1735, 1162, 697 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 420,3108, izmereno 420,3116.



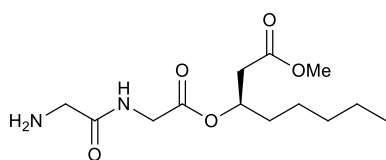
**(R)-metil 3-(2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)acetamido)acetoksi)oktanoat (2.53a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-glicina i 2.30 u prinosu od 91 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 6,64 (s, 1H), 5,37 - 5,25 (m, 1H), 5,19 (s, 1H), 4,12 - 3,95 (m, 2H), 3,85 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,68 (s, 3H), 2,67 - 2,53 (m, 2H), 1,67 - 1,55 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,35 - 1,23 (s, 6H), 0,88 (t, *J* = 5,3 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,73, 169,67, 169,18, 72,04, 51,88, 41,28, 38,80, 33,91, 31,41, 28,29, 24,69, 22,41, 13,92.

HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7 + \text{Na}^+]$  411,2102, izmereno 411,2101.



**(R)-metil 3-(2-(2-aminoacetamido)acetoksi)oktanoat (2.53)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.53a** u prinosu od 99 % kao svetložuto ulje.

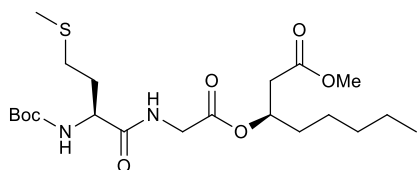
$[\alpha]_{\text{D}} = +33,0$  (c 0,10,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,71 (s, 1H), 5,34-5,24 (m, 1H), 4,15-3,96 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,41 (s, 2H), 2,69 - 2,52 (m, 2H), 1,95 (s, 2H), 1,69-1,54 (m, 2H), 1,29 (s, 6H), 0,91-0,84 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,00, 170,69, 169,42, 71,86, 51,84, 44,59, 40,91, 38,83, 33,90, 31,42, 24,69, 22,41, 13,92.

IR (ATR)  $\nu$ : 3299, 2049, 2955, 2928, 2860, 1742, 1682, 1197  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}^+]$  289,1758, izmereno 289,1767.



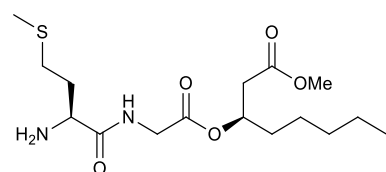
**(R)-metil 3-(2-((S)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)-4-(metiltio)butanamido)acetoksi)oktanoat (2.54a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-metionina and **2.30** u prinosu od 83 % kao svetlo žuto ulje.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,73 (s, 1H), 5,35 - 5,20 (m, 2H), 4,34 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H), 4,02 (d,  $J = 5,3$  Hz, 2H), 3,68 (s, 3H), 2,74 - 2,48 (m, 4H), 2,18 - 2,06 (m, 4H), 1,95 (dt,  $J = 14,2, 7,2$  Hz, 1H), 1,69 - 1,55 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,35 - 1,23 (m, 6H), 0,88 (t,  $J = 6,5$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,71, 170,69, 168,98, 72,02, 51,89, 41,37, 38,83, 33,92, 31,63, 31,43, 30,16, 28,33, 24,72, 22,44, 15,27, 13,95.

HRMS (ESI/Q-TOF):  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7\text{S} + \text{Na}^+]$  485,2292, izmereno 485,2297.



**(R)-metil 3-(2-((S)-2-amino-4-(metiltio)butanamido)acetoksi)oktanoat (2.54)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.54a** u prinosu od 99 % kao svetložuto ulje.

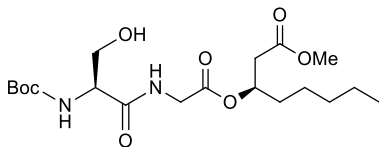
$[\alpha]_{\text{D}} = -8,4$  (c 0,50,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,70 (s, 1H), 5,33 - 5,24 (m, 1H), 4,11 - 3,94 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,56 (dd,  $J = 8,0, 4,6$  Hz, 1H), 2,70 - 2,52 (m, 4H), 2,23 - 2,13 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 1,85-1,74 (m, 1H), 1,62 (s, 4H), 1,29 (s, 6H), 0,88 (t,  $J = 6,5$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174,88, 170,69, 169,39, 71,88, 54,15, 51,87, 41,08, 38,85, 34,01, 33,93, 31,45, 30,61, 24,73, 22,45, 15,31, 13,95.

IR (ATR)  $\nu$ : 3365, 2926, 2858, 1739, 1668, 1193  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S + H<sup>+</sup>] 363,1948, izmereno 363,1944.



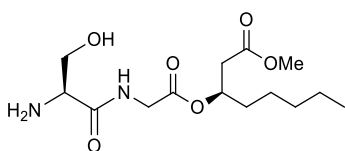
**(R)-metil 3-(2-((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-hidroksipropanamido)acetoksi)oktanoat (2.55a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-serina and **2.30** u prinosu od 52 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,09 (s, 1H), 5,62 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 5,34 - 5,23 (m, 1H), 4,23 (s, 1H), 4,15 - 4,02 (m, 2H), 3,95 (dd, *J* = 18,1, 5,4 Hz, 1H), 3,73-3,64 (m, 4H), 3,27 (s, 1H), 2,67 - 2,50 (m, 2H), 1,70 - 1,53 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,35-1,23 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,78, 170,73, 169,23, 72,20, 63,04, 51,89, 41,47, 38,79, 33,88, 31,40, 28,29, 24,68, 22,40, 13,90.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + Na<sup>+</sup>] 441,2207, izmereno 441,2210.



**(R)-metil 3-(2-((S)-2-amino-3-hidroksipropanamido)acetoksi)oktanoat (2.55)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.55a** u prinosu od 99 % kao bistro ulje.

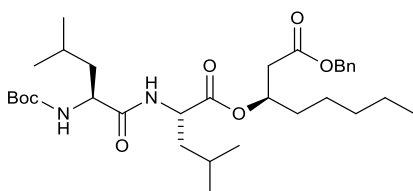
**[α]<sub>D</sub>** = +116,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,94 (s, 1H), 5,38 - 5,17 (m, 1H), 4,10 - 3,93 (m, 2H), 3,89 (dd, *J* = 10,7, 4,4 Hz, 1H), 3,79 - 3,73 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,57 (s, 1H), 3,23 (s, 3H), 2,68 - 2,49 (m, 2H), 1,71 - 1,53 (m, 2H), 1,36 - 1,23 (m, 6H), 0,91 - 0,84 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,75, 169,35, 72,05, 68,06, 65,22, 51,89, 41,17, 38,81, 36,52, 33,89, 31,42, 24,69, 22,42, 13,91.

**IR (ATR) v:** 3355, 2955, 2931, 2860, 1741, 1674, 1200 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>] 319,1864, izmereno 319,1863.



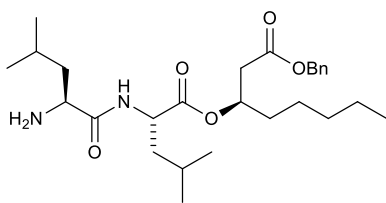
**(R)-benzil 3-(((S)-2-((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.56a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-leucina i **2.44** u prinosu od 86 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,41 - 7,29 (m, 5H), 6,34 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,30 - 5,22 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,87 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,55 (td, *J* = 8,8, 4,8 Hz, 1H), 4,15 - 3,99 (m, 1H), 2,63 (qd, *J* = 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,73 - 1,55 (m, 6H), 1,55 - 1,47 (m, 2H), 1,47 - 1,39 (m, 9H), 1,37 - 1,19 (m, 6H), 0,99 - 0,82 (m, 15H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,05, 171,89, 169,96, 135,70, 128,59, 128,36, 128,34, 71,69, 66,56, 50,87, 41,56, 39,08, 33,79, 31,40, 28,27, 24,73, 24,66, 22,89, 22,41, 22,12, 21,81, 13,90.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 599,3667, izmereno 599,3665.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-((S)-2-amino-4-metilpentanamido)-4-metil pentanoil)oksi)oktanoat (2.56)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.56a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

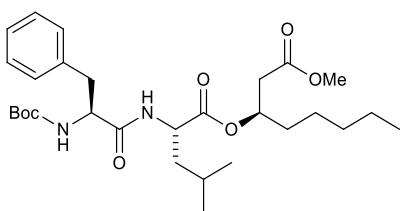
$[\alpha]_D = -27,8$  (c 0,40, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,56 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,41 - 7,28 (m, 5H), 5,29 - 5,21 (m, 1H), 5,12 (d, *J* = 0,7 Hz, 2H), 4,56 (td, *J* = 8,8, 4,9 Hz, 1H), 3,38 (dd, *J* = 9,9, 3,8 Hz, 1H), 2,65 (ddd, *J* = 21,6, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,78 - 1,58 (m, 6H), 1,53 - 1,47 (m, 3H), 1,37 - 1,22 (m, 7H), 0,98 - 0,90 (m, 12H), 0,87 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,30, 172,40, 170,02, 135,74, 128,56, 128,30, 128,28, 71,58, 66,52, 53,55, 50,48, 44,10, 41,59, 39,09, 33,74, 31,39, 24,95, 24,90, 24,66, 23,42, 22,90, 22,42, 21,96, 21,35, 13,89.

**IR (ATR) v:** 3327, 2956, 2931, 2870, 1738, 1167 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 477,3323, izmereno 477,3315.



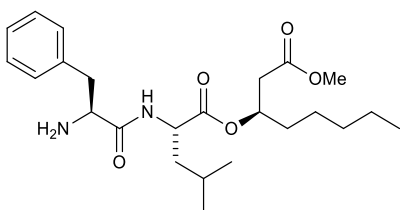
**(R)-metil 3-(((S)-2-((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanamido)-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.57a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-fenilalanina i **2.44** u prinosu od 70 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,34 - 7,17 (m, 5H), 6,31 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,29 - 5,11 (m, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,52 (td, *J* = 8,5, 4,9 Hz, 1H), 4,36 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,15 - 2,96 (m, 2H), 2,58 (qd, *J* = 15,5, 6,4 Hz, 2H), 1,65 - 1,52 (m, 4H), 1,49 - 1,43 (m, 1H), 1,41 (s, 9H), 1,34 - 1,23 (m, 6H), 0,94 - 0,83 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,79, 170,83, 170,62, 155,35, 136,60, 129,40, 129,27, 128,63, 126,92, 80,16, 71,74, 51,82, 50,95, 41,63, 38,86, 33,77, 31,38, 28,23, 24,69, 22,81, 22,43, 21,91, 13,90.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 557,3197, izmereno 557,3193.



**(R)-metil 3-(((S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamido)-4-metil pentanoil)oksi)oktanoat (2.57)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.57a** u prinosu od 99 % kao žuto ulje.

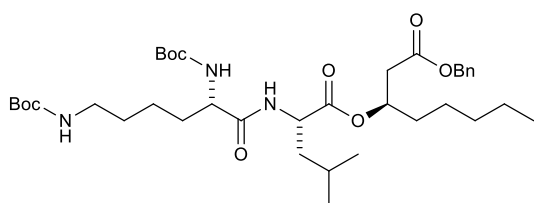
$[\alpha]_D = -38,0$  (c 0,30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,66 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,35 - 7,20 (m, 5H), 5,30 - 5,14 (m, 1H), 4,62 - 4,53 (m, 1H), 3,71 - 3,58 (m, 4H), 3,24 (dd, *J* = 13,7, 3,8 Hz, 1H), 2,72 (dd, *J* = 13,7, 9,3 Hz, 1H), 2,60 (ddd, *J* = 21,4, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,71 - 1,47 (m, 7H), 1,36 - 1,22 (m, 6H), 0,97 - 0,91 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 173,90, 172,31, 170,66, 137,72, 129,34, 129,24, 128,75, 128,70, 126,84, 71,61, 56,34, 51,81, 50,54, 41,50, 40,82, 38,91, 33,78, 31,39, 24,88, 24,69, 22,90, 22,44, 21,94, 13,90.

**IR (ATR) v:** 3363, 2956, 2930, 2870, 1740, 1668, 1193, 1171, 702 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 435,2853, izmereno 435,2844.

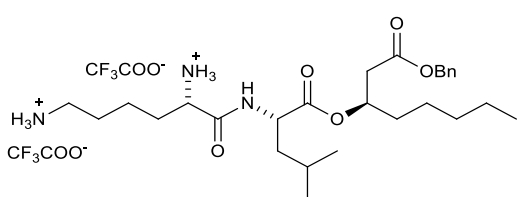


**(R)-benzil 3-(((S)-2-((S)-2,6-bis((terc-butoksikar bonil)amino)heksanamido)-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.58a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz bis-boc-L-lizina i jedinjenja **2.44** u prinosu od 61 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,45 - 7,28 (m, 5H), 6,38 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 5,29-5,22 (m, 1H) 5,15-5,08 (m, 2H), 4,7-4,62 (m, 1H), 4,54 (td, *J* = 8,3, 4,9 Hz, 1H), 4,09-3,99 (m, 1H), 3,16-3,04 (m, 1H), 2,63 (ddd, *J* = 21,4, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,87 - 1,76 (m, 1H), 1,68-1,55 (m, 6H), 1,54 - 1,47 (m, 4H), 1,45-1,42 (m, 18H), 1,40 - 1,33 (m, 2H), 1,32-1,22 (m, 6H), 0,92 (d, *J* = 5,7 Hz, 6H), 0,88-0,84 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,01, 171,71, 169,99, 156,12, 135,73, 128,60, 128,39, 128,35, 80,04, 79,09, 71,74, 66,58, 54,23, 53,76, 53,41, 51,73, 50,89, 41,45, 39,97, 39,08, 33,78, 31,91, 31,40, 29,61, 28,46, 28,31, 24,78, 24,67, 22,89, 22,59, 22,43, 21,82, 13,92.



**(S)-6-(((S)-1-(((R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il)oksi)-4-metil-1-oksoptan-2-il)amino)-6-oksoheksan-1,5-diaminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.58)**

Rastvoru jedinjenja **2.58a** (69 mg, 0,1mmol) u dihlorometanu (2 mL) dodata je TFA (77 μL, 1mmol) i reakcija je mešana na sobnoj temperaturi preko noći. Rastvarač je potom uparen pri čemu je dobijen proizvod kao žuto ulje (99 %).

**[α]<sub>D</sub>** = -1,3 (c 0,80, CH<sub>3</sub>OH).

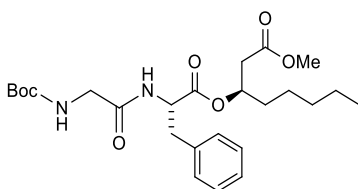
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 7,43 - 7,26 (m, 5H), 5,36 - 5,23 (m, 1H), 5,13 (q, *J* = 12,3 Hz, 2H), 4,47 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,96 - 3,83 (m, 1H), 3,01 - 2,91 (m, 2H), 2,75 - 2,64 (m, 2H), 1,91 (dd, *J* = 15,2, 8,0 Hz, 2H), 1,76 - 1,66 (m, 3H), 1,65 - 1,50 (m, 7H), 1,36 - 1,22 (m, 6H), 1,01 - 0,83 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 172,10, 170,53, 168,71, 135,96, 128,20, 127,95, 127,93, 71,78, 66,27, 52,49, 51,05, 39,94, 38,91, 38,70, 33,52, 31,11, 30,66, 26,71, 24,54, 24,42, 22,08, 21,85, 21,02, 20,26, 12,86.

**IR (ATR) v:** 2959, 1673, 1202, 1136, 723 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 492,3432, izmereno 492,3440.





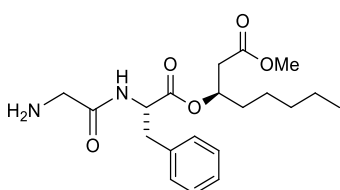
**(R)-metil 3-(((S)-2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)acetamido)-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.59a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-glicina i **2.33** u prinosu od 82 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,31 - 7,20 (m, 3H), 7,18 - 7,10 (m, 2H), 6,49 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 5,25 - 5,16 (m, 1H), 5,10 (s, 1H), 4,82 (dd, *J* = 14,0, 6,2 Hz, 1H), 3,77 (ddd, *J* = 22,5, 16,7, 8,6 Hz, 2H), 3,65 (s, 3H), 3,10 (ddd, *J* = 47,6, 14,0, 6,2 Hz, 2H), 2,56 (qd, *J* = 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,65 - 1,50 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,33 - 1,18 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,73, 170,58, 168,94, 135,66, 129,30, 128,52, 127,08, 80,18, 72,18, 53,07, 51,82, 44,18, 38,62, 38,57, 37,74, 33,70, 31,40, 28,24, 24,62, 22,38, 13,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 501,2571, izmereno 501,2572.



**(R)-metil 3-(((S)-2-(2-aminoacetamido)-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.59)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.59a** u prinosu od 99 % kao žuto ulje.

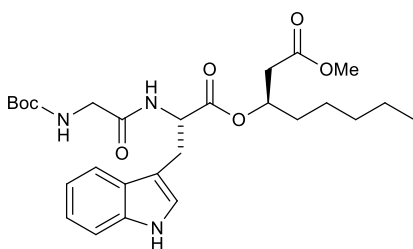
**[α]<sub>D</sub>** = -3,6 (c 0,14, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,59 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,32 - 7,16 (m, 5H), 5,26 - 5,12 (m, 1H), 4,84 (dt, *J* = 8,3, 6,5 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,38 - 3,26 (m, 2H), 3,11 (ddd, *J* = 55,9, 13,9, 6,5 Hz, 2H), 2,57 (ddd, *J* = 21,3, 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,65 - 1,51 (m, 4H), 1,32 - 1,17 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,26, 171,05, 170,61, 136,05, 129,28, 128,46, 127,00, 71,99, 52,78, 51,81, 44,61, 38,72, 37,97, 33,71, 31,43, 24,62, 22,40, 13,94

**IR (ATR) v:** 3327, 2954, 2930, 2860, 1741, 1674, 1200, 1173, 701 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 379,2227, izmereno 379,2223.



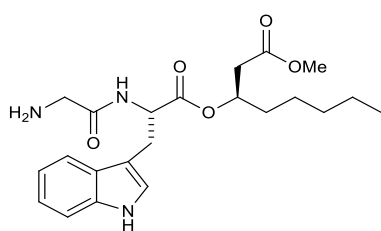
**(R)-metil 3-(((S)-2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)acetamido)-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.60a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-glicina i **2.34** u prinosu od 89 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,42 (s, 1H), 7,54 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,10 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,62 (s, 1H), 5,21 - 5,15 (m, 1H), 5,12 (s, 1H), 4,86 (dd, *J* = 13,5, 6,1 Hz, 1H), 3,70 (s, 2H), 3,63 (s, 3H), 3,28 (ddd, *J* = 46,7, 14,9, 6,0 Hz, 2H), 2,53 (qd, *J* = 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,60 - 1,47 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,25 - 1,14 (m, 6H), 0,89 - 0,82 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,26, 170,77, 169,19, 155,90, 136,14, 127,62, 122,92, 122,18, 119,60, 118,44, 111,31, 109,80, 72,12, 51,81, 38,68, 33,72, 31,41, 28,25, 27,52, 24,62, 22,38, 13,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 540,2680, izmereno 540,2701.



**(R)-metil 3-(((S)-2-(2-aminoacetamido)-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.60)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.60a** u prinosu od 99 % kao braon ulje.

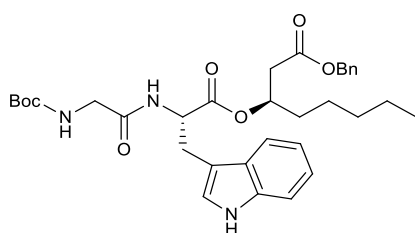
$[\alpha]_D = -12,0$  (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,38 (s, 1H), 7,62 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,16 (dd, *J* = 11,1, 4,0 Hz, 1H), 7,10 (dd, *J* = 11,0, 3,9 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 5,26 - 5,15 (m, 1H), 4,92 (dd, *J* = 14,2, 6,2 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,40-3,19 (m, 4H), 2,65 - 2,47 (m, 2H), 1,70 (s, 2H), 1,60-1,49 (m, 2H), 1,31-1,16 (m, 6H), 0,85 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,53, 171,48, 170,72, 136,13, 127,79, 122,68, 122,14, 119,45, 118,63, 111,25, 110,30, 71,97, 52,72, 51,79, 38,75, 33,73, 31,44, 27,77, 24,64, 22,41, 13,94.

**IR (ATR) v:** 3331, 2954, 2929, 2859, 1738, 1667, 1202, 1175, 743 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 418,2336, izmereno 418, 2330.



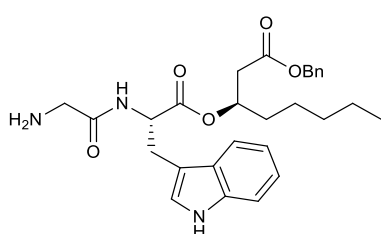
**(R)-benzil 3-(((S)-2-(2-(*tert*-butoksikarbonil)amino)acetamido)-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.61a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-glicina i jedinjenja **2.48** u prinosu od 89 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,05 (s, 1H), 7,54 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,41 - 7,26 (m, 6H), 7,22 - 7,15 (m, 1H), 7,14 - 7,08 (m, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,40 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,29 - 5,14 (m, 1H), 5,12 - 5,05 (m, 2H), 4,97 (s, 1H), 4,90 - 4,80 (m, 1H), 3,71 (s, 2H), 3,27 (ddd, *J* = 46,8, 14,9, 5,8 Hz, 2H), 2,56 (qd, *J* = 15,6, 6,3 Hz, 2H), 1,62 - 1,56 (m, 1H), 1,54 - 1,47 (m, 1H), 1,41 (s, 9H), 1,28 - 1,13 (m, 6H), 0,84 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,08, 170,03, 168,92, 136,07, 135,72, 128,61, 128,37, 127,73, 122,75, 122,33, 119,76, 118,58, 111,23, 110,08, 80,19, 72,18, 66,55, 53,05, 38,86, 33,70, 31,44, 28,28, 27,48, 24,63, 22,40, 13,94.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 616,2993, izmereno 616,3008.



**(R)-benzil 3-(((S)-2-(2-aminoacetamido)-3-(1H-indol-3-il)propanoil)oksi)oktanoat (2.61)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.61a** u prinosu od 99 % kao braon ulje.

$[\alpha]_D = -8,5$  (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

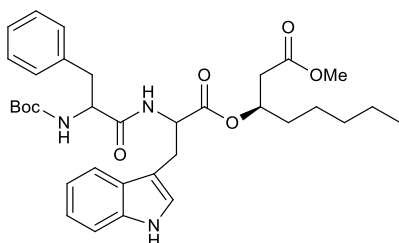
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,14 (s, 1H), 7,63 - 7,48 (m, 2H), 7,37 - 7,29 (m, 5H), 7,17 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,09 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 5,29 - 5,17 (m, 1H), 5,07 (s, 2H), 4,92 (dd, *J*

= 14,2, 6,0 Hz, 1H), 3,37-3,18 (m, 4H), 2,58 (ddd,  $J = 21,4, 15,6, 6,4$  Hz, 2H), 1,61 - 1,49 (m, 2H), 1,49-1,40 (m, 3H), 1,28 - 1,12 (m, 6H), 0,84 (t,  $J = 6,7$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  172,47, 171,41, 170,05, 136,09, 135,74, 128,58, 128,31, 127,85, 122,60, 122,19, 119,51, 118,71, 111,20, 110,47, 71,99, 66,51, 52,73, 44,71, 38,91, 33,69, 31,44, 27,75, 24,61, 22,40, 13,95.

**IR (ATR) v:** 3326, 2930, 2859, 1737, 1662, 1171, 742  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_5 + \text{H}^+]$  494,2649, izmereno 494,2667.



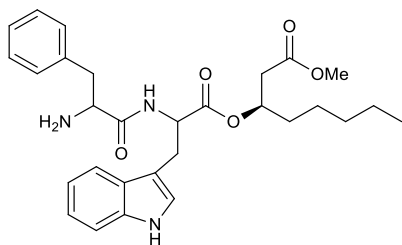
**(3R)-metil 3-((2-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-fenilpropanamido)-3-(1H-indol-3-il)propanoilo)oksi)oktanoat (2.62a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-fenilalanina i jedinjenja **2.34** u prinosu od 55 % kao žuto ulje u obliku smese diastereoizomera u odnosu 2 : 1.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8,12 (s, 1H), 7,50 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 7,42 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 7,32 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H<sub>oba izomera</sub>), 7,28 - 7,02 (m, 7H<sub>oba izomera</sub>), 6,90 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 6,86 (s, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 6,40 (t,  $J = 8,7$  Hz, 1H<sub>oba izomera</sub>), 5,22 - 5,07 (m, 1H<sub>oba izomera</sub>), 5,00 (s, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 4,87 (s, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 4,82 (dd,  $J = 13,1, 5,9$  Hz, 1H<sub>oba izomera</sub>), 4,32 (s, 1H<sub>oba izomera</sub>), 3,63 (s, 3H<sub>glavni izomer</sub>), 3,61 (s, 3H<sub>sporedni izomer</sub>), 3,31 - 3,13 (m, 2H<sub>oba izomera</sub>), 3,03 (dd,  $J = 13,9, 6,3$  Hz, 1H<sub>oba izomera</sub>), 2,94 (s, 1H<sub>oba izomera</sub>), 2,58 - 2,40 (m, 2H<sub>oba izomera</sub>), 1,56 - 1,42 (m, 2H<sub>oba izomera</sub>), 1,34 (s, 9H<sub>oba izomera</sub>), 1,29 - 1,12 (m, 6H<sub>oba izomera</sub>), 0,88 - 0,82 (m, 3H<sub>oba izomera</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  170,89, 170,76, 170,64, 155,25, 136,68, 136,08, 129,44, 129,32, 128,58, 127,64, 126,88, 122,79, 122,28, 119,69, 118,58, 111,24, 110,00, 80,00, 72,07, 53,18, 52,90, 51,77, 38,69, 38,34, 35,86, 33,70, 31,42, 28,19, 27,63, 24,61, 24,52, 22,39, 18,22, 13,93, 13,74.

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_7 + \text{Na}^+]$  630,3150, izmereno 630,3148.



**(3R)-metil 3-((2-(2-amino-3-fenilpropanamido)-3-(1H-indol-3-il)propanoilo)oksi)oktanoat (2.62)**

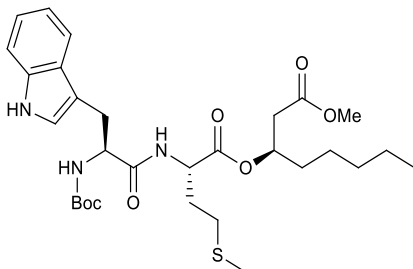
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.62a** u prinosu od 99 % kao braon ulje, u obliku smese diastereoizomera u odnosu 2 : 1.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8,23 (s, 1H<sub>oba izomera</sub>), 7,79 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 7,71 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 7,57 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 7,52 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 7,37 - 7,06 (m, 8H<sub>oba izomera</sub>), 7,00 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 6,96 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 5,19 (dt,  $J = 12,7, 6,4$  Hz, 1H<sub>oba izomera</sub>), 4,98 - 4,81 (m, 1H<sub>oba izomera</sub>), 3,62 (s, 3H<sub>sporedni izomer</sub>), 3,61 (s, 3H<sub>glavni izomer</sub>), 3,57 - 3,47 (m, 1H<sub>oba izomera</sub>), 3,34 - 3,21 (m, 2H<sub>oba izomera</sub> + 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 3,11 (dd,  $J = 13,7, 3,6$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 2,63 - 2,46 (m, 2H<sub>oba izomera</sub> + 1H<sub>sporedni izomer</sub>), 2,40 (dd,  $J = 13,6, 9,5$  Hz, 1H<sub>glavni izomer</sub>), 1,65 - 1,43 (m, 4H<sub>oba izomera</sub>), 1,32 - 1,14 (m, 6H<sub>oba izomera</sub>), 0,85 (t,  $J = 6,0$  Hz, 3H<sub>oba izomera</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 173,86, 171,46, 171,37, 170,70, 138,03, 137,88, 136,08, 129,32, 129,22, 128,70, 128,66, 127,84, 126,76, 122,69, 122,16, 119,49, 118,84, 118,67, 111,21, 110,39, 71,93, 56,25, 52,75, 51,79, 40,58, 38,80, 38,76, 33,72, 31,44, 27,83, 24,64, 22,41, 13,96.

**IR (ATR) v:** 3319, 2953, 2929,, 2858, 1738, 1661, 1201, 743cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 508,2806, izmereno 508,2803.



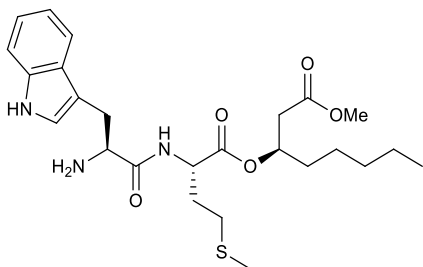
**(R)-metil 3-(((S)-2-((S)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-(1H-indol-3-il)propanamido)-4-(metiltio)butanoil)oksi)oktanoat (2.63a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-triptofana i jedinjenja **2.42** u prinosu od 68 % kao žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,36 (s, 1H), 7,67 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,23 - 7,17 (m, 1H), 7,16 - 7,10 (m, 1H), 7,03 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 6,35 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,24 - 5,12 (m, 2H), 4,55 (td, *J* = 7,3, 5,0 Hz, 1H), 4,45 (s, 1H), 3,69 (s, 3H), 3,24 (ddd, *J* = 21,9, 14,4, 6,2 Hz, 2H), 2,66 - 2,46 (m, 2H), 2,32 - 2,22 (m, 2H), 2,08 - 1,95 (m, 4H), 1,87 - 1,76 (m, 1H), 1,63 - 1,52 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,33 - 1,18 (m, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,53, 170,87, 170,65, 155,38, 136,33, 127,40, 123,38, 122,25, 119,72, 118,79, 111,28, 110,36, 72,00, 51,94, 51,68, 38,70, 33,79, 31,87, 31,40, 29,56, 28,32, 24,69, 22,43, 15,33, 13,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S + Na<sup>+</sup>] 614,2870, izmereno 614,2869.



**(R)-metil 3-(((S)-2-((S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanamido)-4-(metiltio)butanoil)oksi)oktanoat (2.63)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.63a** u prinosu od 99 % kao žuto ulje.

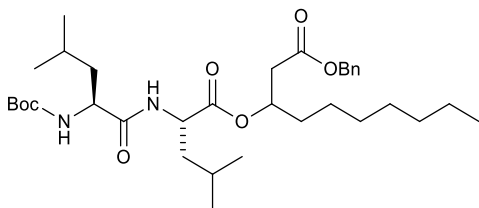
**[α]<sub>D</sub>** = -39,6 (c 0,50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8,33 (s, 1H), 7,76 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,66 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,21 (dd, *J* = 11,1, 4,0 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 11,0, 3,9 Hz, 1H), 7,08 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 5,32 - 5,19 (m, 1H), 4,66 (td, *J* = 7,8, 5,1 Hz, 1H), 3,77 (dd, *J* = 8,3, 4,4 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,17 (ddd, *J* = 22,8, 14,4, 6,3 Hz, 2H), 3,13 (s, 2H) 2,60 (qd, *J* = 15,7, 6,4 Hz, 2H), 2,45 - 2,27 (m, 2H), 2,16- 2,08 (m, 1H), 2,05 (s, 3H) 1,95 - 1,85 (m, 1H), 1,68 - 1,55 (m, 2H), 1,34 - 1,22 (m, 6H), 0,90 - 0,83 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 174,58, 171,17, 170,72, 136,44, 127,52, 123,26, 122,31, 119,70, 118,89, 111,32, 71,98, 55,55, 51,90, 51,40, 38,81, 33,82, 31,93, 31,42, 30,69, 29,82, 24,75, 22,45, 15,43, 13,94.

**IR (ATR) v:** 3307, 2927, 2859, 1738, 1663, 1200, 1172, 743 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S + H<sup>+</sup>] 492,2527, izmereno 492,2545.



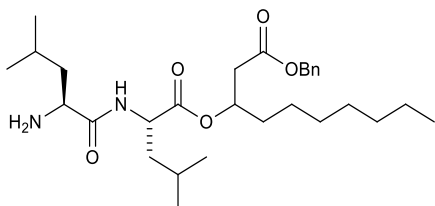
**Benzil 3-(((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)oksi)dekanooat (2.64a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-leucina i **2.51** u prinosu od 66 % kao svetlo žuto ulje u obliku smese diastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,44 - 7,28 (m, 5H<sub>oba</sub> izomera), 6,44 - 6,23 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,35 - 5,19 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,15 - 5,05 (2 x s, 2 x 1H<sub>oba</sub> izomera), 4,88 (s, 1H<sub>oba</sub> izomera), 4,58 - 4,50 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 4,09 (s, 1H<sub>oba</sub> izomera), 2,74 - 2,53 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,71 - 1,58 (m, 6H<sub>oba</sub> izomera), 1,57 - 1,48 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,47 - 1,43 (s, 9H<sub>oba</sub> izomera), 1,34 - 1,20 (m, 10H<sub>oba</sub> izomera), 0,97 - 0,85 (m, 15H<sub>oba</sub> izomera).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,17, 172,08, 171,97, 171,90, 170,02, 169,96, 155,70, 135,73, 135,65, 128,60, 128,37, 128,34, 80,02, 71,68, 66,56, 66,55, 50,89, 50,77, 41,54, 41,02, 39,10, 33,98, 33,86, 31,88, 31,74, 31,71, 29,44, 29,28, 29,23, 29,08, 28,29, 25,02, 24,74, 24,68, 22,90, 22,67, 22,61, 22,13, 21,83, 21,78, 14,06

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + H<sup>+</sup>] 605,4160, izmereno 605,4169.



**Benzil 3-(((*S*)-2-((*S*)-2-amino-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)oksi)dekanooat (2.64)**

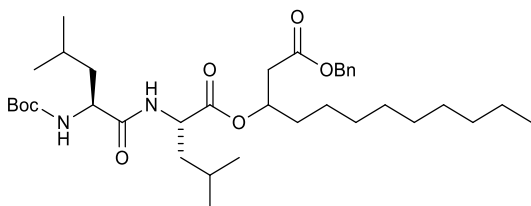
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.64a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje u obliku smese diastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,56 (dd, *J* = 8,1, 4,3 Hz, 1H<sub>oba</sub> izomera), 7,41 - 7,29 (m, 5H<sub>oba</sub> izomera), 5,35 - 5,18 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,12 - 5,07 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 4,59 - 4,51 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 3,48 - 3,30 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 2,74 - 2,54 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,79 - 1,53 (m, 6H<sub>oba</sub> izomera), 1,52 - 1,44 (m, 3H<sub>oba</sub> izomera), 1,38 - 1,17 (m, 11H<sub>oba</sub> izomera), 0,98 - 0,84 (m, 15H<sub>oba</sub> izomera).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,40, 175,29, 172,41, 172,34, 170,10, 170,02, 135,77, 135,68, 128,61, 128,58, 128,35, 128,33, 128,32, 71,61, 66,56, 66,53, 53,59, 50,51, 50,46, 44,13, 41,63, 41,53, 39,18, 39,12, 33,98, 33,83, 31,74, 31,71, 29,29, 29,23, 29,10, 29,09, 25,02, 24,96, 24,94, 23,44, 22,93, 22,62, 21,99, 21,87, 21,38, 14,06.

**IR (ATR) v:** 2955, 2927, 2869, 1738, 1155, 697 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 505,3636, izmereno 505,3645.



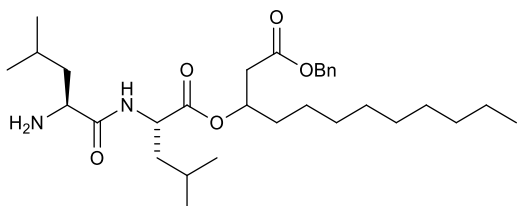
**Benzil 3-(((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)oksi)dodekanoat (2.65a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-leucina i **2.52** u prinosu od 43 % kao svetlo žuto ulje u obliku smese diastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,39 - 7,31 (m, 5H), 6,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,38 - 5,20 (m, 1H), 5,14 - 5,07 (2 x s, 2 x 1H), 4,90 - 4,84 (m, 1H), 4,65 - 4,48 (m, 1H), 4,09 (s, 1H), 2,75 - 2,53 (m, 2H), 1,74 - 1,48 (m, 7H), 1,47 - 1,42 (m, 10H), 1,35 - 1,20 (m, 14H), 0,95 - 0,85 (m, 15H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,14, 172,05, 171,97, 171,90, 170,02, 169,96, 155,68, 135,74, 135,65, 128,60, 128,37, 128,34, 80,02, 71,70, 66,56, 66,55, 53,01, 50,89, 50,77, 41,56, 41,00, 39,10, 33,99, 33,87, 31,88, 31,74, 29,51, 29,48, 29,44, 29,34, 29,28, 29,09, 28,29, 25,02, 24,75, 24,70, 22,90, 22,67, 22,61, 22,11, 21,84, 21,79, 14,09.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + Na<sup>+</sup>] 655,4293, izmereno 655,4307.



**Benzil 3-(((*S*)-2-((*S*)-2-amino-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)oksi)dodekanoat (2.65)**

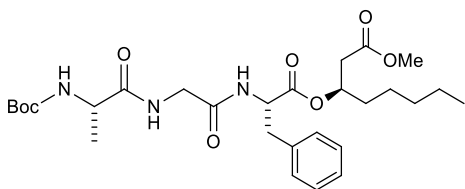
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.65a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje u obliku smese dijastereoizomera u odnosu 1:1.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,60 - 7,50 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 7,42 - 7,28 (m, 5H<sub>oba</sub> izomera), 5,32 - 5,19 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,16 - 5,04 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 4,60 - 4,47 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 3,40 (td, *J* = 9,5, 3,8 Hz, 1H<sub>oba</sub> izomera), 2,76 - 2,54 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,78 - 1,51 (m, 9H<sub>oba</sub> izomera), 1,38 - 1,20 (m, 15H<sub>oba</sub> izomera), 1,02 - 0,82 (m, 15H<sub>oba</sub> izomera).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,31, 175,21, 172,40, 172,33, 170,11, 170,03, 135,77, 135,67, 128,61, 128,58, 128,33, 71,63, 66,57, 66,54, 53,60, 50,52, 50,47, 44,08, 41,62, 41,52, 39,18, 39,12, 33,98, 33,83, 31,89, 31,74, 30,35, 29,71, 29,51, 29,46, 29,35, 29,29, 29,10, 25,04, 24,96, 24,94, 23,43, 22,93, 22,68, 22,62, 21,99, 21,86, 21,40, 14,09.

**IR (ATR) v:** 3356, 2958, 2927, 2855, 1742, 1678, 1157, 698 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H<sup>+</sup>] 533,3949, izmereno 533,3964.



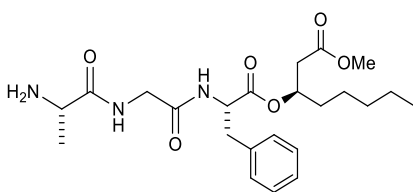
**(6*S*,12*S*)-(R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il 12-benzil-2,2,6-trimetil-4,7,10-triokso-3-oksa-5,8,11-triaza tridekan-13-oat (2.66a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-alanina i **2.59** u prinosu od 78 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,31 - 7,20 (m, 3H), 7,18 - 7,10 (m, 2H), 6,79 (s, 1H), 6,58 (s, 1H), 5,26 - 5,14 (m, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,81 (dd, *J* = 14,4, 6,5 Hz, 1H), 4,21 - 4,09 (m, 1H), 3,92 (ddd, *J* = 21,8, 16,8, 5,6 Hz, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,10 (ddd, *J* = 60,1, 14,0, 6,4 Hz, 2H), 2,56 (qd, *J* = 15,5, 6,3 Hz, 2H), 1,62 - 1,49 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,35 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,24 (dd, *J* = 15,4, 9,2 Hz, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 173,06, 170,76, 170,63, 168,26, 162,94, 155,55, 149,29, 135,79, 130,04, 129,32, 128,54, 127,74, 127,08, 80,36, 72,14, 53,25, 51,88, 50,32, 43,23, 42,95, 38,69, 37,61, 33,98, 33,68, 31,41, 28,30, 24,65, 22,40, 18,11, 16,33, 13,94.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> + Na<sup>+</sup>] 572,2942, izmereno 572,2946.



**(R)-metil 3-(((S)-2-(2-((S)-2-aminopropanamido)acetamido)-3-fenilpropanoil)oksi)oktanoat (2.66)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.66a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

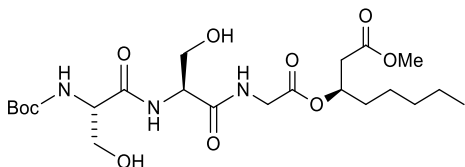
$[\alpha]_D = -8,2$  (c 0,17, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,82 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,31 - 7,21 (m, 3H), 7,19 - 7,09 (m, 2H), 6,64 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 5,24 - 5,13 (m, 1H), 4,86 - 4,73 (m, 1H), 3,98 - 3,85 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,50 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,10 (ddd, *J* = 60,6, 14,0, 6,3 Hz, 2H), 2,56 (ddd, *J* = 21,1, 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,63 (s, 2H), 1,61 - 1,50 (m, 2H), 1,32 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,30 - 1,20 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 176,37, 170,69, 170,61, 168,67, 135,76, 129,32, 128,47, 127,00, 72,13, 53,18, 51,82, 50,57, 42,87, 38,62, 37,63, 33,68, 31,39, 24,61, 22,37, 21,49, 13,91.

**IR (ATR) v:** 3296, 2954, 2931, 2860, 1738, 1652, 1519, 1201, 1173, 700 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>] 450,2599, izmereno 450,2592.



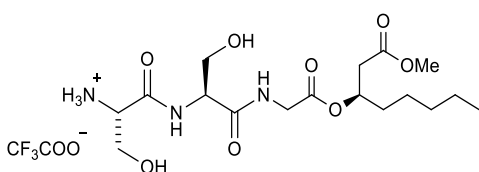
**(6S,9S)-(R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il 6,9-bis(hidroksimetil)-2,2-dimetil-4,7,10-triokso-3-oksa-5,8,11-triazatridekan-13-oat (2.67a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-serina i **2.55** u prinosu od 45 % kao bistro ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,72 (s, 1H), 7,65 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 5,78 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 5,32 - 5,16 (m, 1H), 4,69 - 4,55 (m, 1H), 4,36-4,27 (m, 1H), 4,17 - 4,04 (m, 3H), 4,01 (dd, *J* = 10,9, 4,2 Hz, 1H), 3,87 (dd, *J* = 17,8, 5,0 Hz, 1H), 3,79 (dd, *J* = 11,3, 4,3 Hz, 1H), 3,74 - 3,64 (m, 4H), 2,66 - 2,50 (m, 2H), 1,69 - 1,52 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,34-1,23 (m, 6H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,66, 170,94, 169,75, 156,02, 80,59, 72,18, 63,00, 62,47, 55,91, 54,96, 51,93, 41,48, 38,73, 33,84, 31,42, 28,29, 24,65, 22,40, 13,92.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> + Na<sup>+</sup>] 528,2528, izmereno 528,2534.



**(5R,11S,14S)-15-hidroksi-11-(hidroksimetil)-3,7,10,13-tetraokso-5-pentil-2,6-dioksa-9,12-diazapentadekan-14-aminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.67)**

Rastvoru jedinjenja **2.67a** (50,5 mg, 0,1mmol) in dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77 μL, 1mmol). Rastvor je mešan na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon toga rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.67** (99 %) kao svetlo žuto ulje.

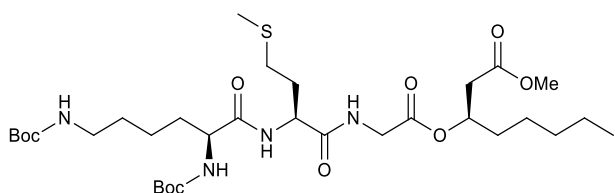
$[\alpha]_D = -8,5$  (c 1,00, CH<sub>3</sub>OH).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO, temperatura 338K)** δ 8,47 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,18 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,16 - 7,99 (m, 2H), 5,21 - 5,15 (m, 1H), 4,49 (dt, *J* = 7,9, 5,7 Hz, 1H), 4,01 (dd, *J* = 6,4, 4,7 Hz, 1H), 3,90 (dd, *J* = 5,8, 1,9 Hz, 2H), 3,83 (ddd, *J* = 17,8, 11,4, 6,6 Hz, 2H), 3,73 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,67 (s, 3H), 2,67 (qd, *J* = 15,7, 6,4 Hz, 2H), 1,67 - 1,61 (m, 2H), 1,39 - 1,29 (m, 6H), 0,94 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO, temperatura 298K)** δ 171,16, 170,45, 169,49, 167,44, 71,48, 61,89, 60,74, 56,63, 55,76, 54,66, 52,05, 41,20, 33,65, 31,23, 24,43, 22,25, 18,72, 14,23.

**IR (ATR) v:** 3279, 2934, 1667, 1538, 1200, 1134, 722 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>] 406,2184, izmereno 406,2178.



**(10*S*,13*S*)-(R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il 10-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-2,2-dimetil-13-(2-(metiltio)etil)-4,11,14-triokso-3-oksa-5,12,15-triazaheptadekan-17-oat (2.68a)**

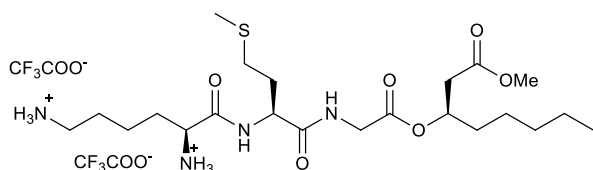
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz bis-boc-L-lizina i **2.54** u prinosu od 87 % kao

svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,17 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 5,31 - 5,17 (m, 1H), 4,74 (s, 1H), 4,70 - 4,63 (m, 1H), 4,07 - 3,97 (m, 2H), 3,96 - 3,86 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,24 - 3,02 (m, 2H), 2,68 - 2,50 (m, 4H), 2,18 - 2,07 (m, 5H), 1,90 - 1,78 (m, 2H), 1,71 (s, 1H), 1,65 - 1,55 (m, 2H), 1,54 - 1,48 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 1,42 - 1,35 (m, 2H), 1,35 - 1,21 (m, 6H), 0,90 - 0,84 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,29, 170,69, 168,87, 156,53, 80,53, 79,26, 71,87, 52,36, 51,84, 41,38, 38,79, 33,88, 31,46, 30,07, 29,82, 28,49, 28,36, 24,71, 22,44, 15,15, 13,96.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S + Na<sup>+</sup>] 713,3766, izmereno 713,3764.



**(5*R*,11*S*,14*S*)-11-(2-(metiltio)etil)-3,7,10,13-tetraokso-5-pentil-2,6-dioksa-9,12-diazaoktadekan-14,18-diaminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.68)**

Rastvoru jedinjenja **2.68a** (69 mg, 0,1mmol) in dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77 μL, 1mmol). Rastvor je mešan na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon toga rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.68** žuto ulje.

**[α]<sub>D</sub>** = -11,7 (c 0,30, CH<sub>3</sub>OH).

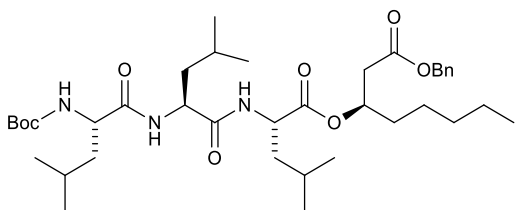
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 5,32 - 5,20 (m, 1H), 4,56 (dd, *J* = 8,4, 5,6 Hz, 1H), 3,97 - 3,93 (m, 1H), 3,93 (dd, *J* = 76,8, 17,6 Hz, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,00 - 2,92 (m, 2H), 2,72 - 2,53 (m, 4H), 2,16 - 2,05 (m, 4H), 2,05 - 1,95 (m, 1H), 1,91 (dd, *J* = 14,9, 7,6 Hz, 2H), 1,76 - 1,66 (m, 2H), 1,65 - 1,57 (m, 3H), 1,57 - 1,46 (m, 2H), 1,38 - 1,25 (m, 6H), 0,93 - 0,86 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 172,49, 171,29, 169,14, 168,67, 71,66, 52,55, 50,97, 40,72, 38,88, 38,40, 33,65, 31,42, 31,24, 30,53, 29,48, 27,34, 26,57, 24,42, 22,11, 21,03, 13,79, 12,93.

**IR (ATR) v:** 2932, 1667, 1199, 1133, 722cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S + H<sup>+</sup>] 491,2898, izmereno 491,2907.





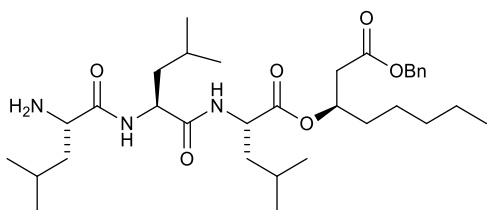
**(6*S*,9*S*,12*S*)-(R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il  
6,9,12-triisobutil-2,2-dimetil-4,7,10-triokso-3-oksa-  
5,8,11-triazatridekan-13-oat (2.69a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-leucina i **2.56** u prinosu od 80 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,40 - 7,29 (m, 5H), 6,45 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,40 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,30 - 5,22 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,85 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,52 (td, *J* = 8,8, 4,9 Hz, 1H), 4,42 (td, *J* = 8,7, 5,3 Hz, 1H), 4,10 - 4,02 (m, 1H), 2,63 (ddd, *J* = 21,4, 15,6, 6,5 Hz, 2H), 1,70 - 1,55 (m, 8H), 1,56 - 1,47 (m, 3H), 1,48 - 1,40 (m, 9H), 1,27 (d, *J* = 7,0 Hz, 6H), 0,96 - 0,83 (m, 21H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,51, 171,76, 171,27, 169,96, 135,72, 128,58, 128,35, 128,33, 124,86, 80,26, 71,69, 66,54, 53,38, 51,54, 50,94, 41,39, 39,08, 33,78, 31,40, 28,26, 24,76, 24,65, 24,59, 22,94, 22,87, 22,84, 22,41, 21,96, 21,80, 13,89.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>38</sub>H<sub>63</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> + Na<sup>+</sup>] 712,4507, izmereno 712,4518.



**(R)-benzil 3-(((*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-4-metil  
pentanamido)-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil)  
oksi)oktanoat (2.69)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.69a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

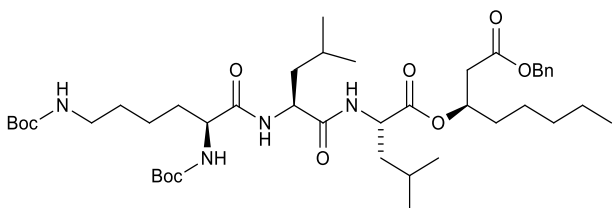
[α]<sub>D</sub> = -53,2 (c 0,50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,61 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,42 - 7,29 (m, 5H), 6,53 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,29-5,21 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,50 (td, *J* = 8,4, 5,0 Hz, 1H), 4,41 (td, *J* = 8,6, 5,5 Hz, 1H), 3,39 (dd, *J* = 9,7, 3,4 Hz, 1H), 2,63 (ddd, *J* = 21,3, 15,5, 6,5 Hz, 2H), 1,76 - 1,65 (m, 4H), 1,64-1,53 (m, 8H), 1,38 - 1,31 (m, 1H), 1,28 (d, *J* = 17,4 Hz, 6H), 0,97 - 0,85 (m, 21H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,85, 171,85, 171,71, 169,98, 135,72, 128,57, 128,34, 128,31, 71,66, 66,55, 53,51, 51,19, 51,05, 44,02, 41,31, 40,63, 39,09, 33,78, 31,40, 24,88, 24,84, 24,78, 24,64, 23,38, 22,94, 22,77, 22,40, 22,04, 21,93, 21,35, 13,88.

**IR (ATR) v:** 3297, 2955, 2930, 2870, 1739, 1644, 1163, 697 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** *m/z* izračunato za [C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>] 590,4164, izmereno 590,4153.



**(10*S*,13*S*,16*S*)-(R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-  
3-il 10-((*terc*-butoksikarbonil)amino)-13,16-  
diisobutil-2,2-dimetil-4,11,14-triokso-3-oksa-  
5,12,15-triazaheptadekan-17-oat (2.70a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz bis-boc-L-lizina i jedinjenja **2.56** u prinosu od 83

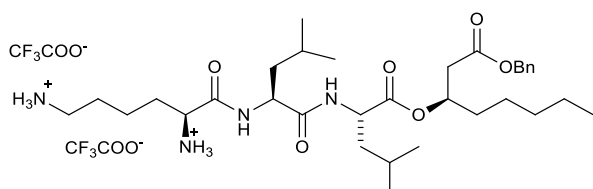
% kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,43 - 7,29 (m, 5H), 6,54-6,50 (m, 2H), 5,31 - 5,17 (m, 2H), 5,11 (s, 2H), 4,72--4,68 (m, 1H), 4,52 (td, *J* = 8,6, 4,9 Hz, 1H), 4,42 (td, *J* = 8,8, 5,1 Hz, 1H), 4,04-4,00 (m,

1H), 3,16-3,04 (m, 2H), 2,64 (ddd,  $J = 21,4, 15,6, 6,5$  Hz, 2H), 1,87 - 1,75 (m, 2H), 1,71 - 1,55 (m, 7H), 1,55 - 1,47 (m, 4H), 1,45-1,42 (m, 18H), 1,41-1,33 (m, 2H), 1,31-1,21 (m, 6H), 1,00 - 0,82 (m, 15H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  172,12, 171,82, 171,14, 170,01, 156,31, 135,73, 128,60, 128,37, 128,35, 80,24, 79,18, 71,69, 66,56, 54,60, 51,70, 50,98, 41,36, 40,92, 39,64, 39,07, 33,79, 31,43, 29,67, 28,47, 28,31, 24,77, 24,67, 22,98, 22,86, 22,43, 21,88, 14,21, 13,93.

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{43}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_{10} + \text{Na}^+]$  827,5141, izmereno 827,5138.



**(5*R*,8*S*,11*S*,14*S*)-8,11-diisobutil-3,7,10,13-tetraokso-5-pentil-1-fenil-2,6-dioksa-9,12-diazaoktadekane-14,18-diaminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.70)**

Rastvoru jedinjenja **2.70a** (80 mg, 0,1mmol) u dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77  $\mu\text{L}$ , 1mmol). Rastvor je mešan na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon toga rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno jedinjenje **2.70** kao žuto ulje.

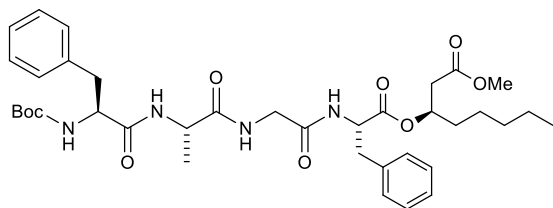
**$[\alpha]_{\text{D}}$**  = -16,8 (c 0,50,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{MeOD}$ )**  $\delta$  7,39 - 7,27 (m, 5H), 5,36 - 5,20 (m, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,45 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 4,42 - 4,33 (m, 1H), 4,07 - 3,78 (m, 1H), 2,99 - 2,90 (m, 2H), 2,72 - 2,55 (m, 2H), 2,02 - 1,80 (m, 2H), 1,80 - 1,64 (m, 4H), 1,65 - 1,52 (m, 6H), 1,51 - 1,40 (m, 2H), 1,25 (d,  $J = 25,7$  Hz, 6H), 1,00 - 0,84 (m, 15H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{MeOD}$ )**  $\delta$  173,18, 173,03, 171,86, 171,54, 170,39, 169,72, 168,52, 168,19, 135,91, 128,19, 127,94, 71,48, 66,23, 52,40, 51,88, 51,17, 40,52, 39,96, 38,85, 38,82, 33,68, 31,21, 30,59, 26,52, 24,44, 24,39, 24,33, 22,11, 22,07, 21,87, 20,95, 20,47, 12,90

**IR (ATR)  $\nu$ :** 2959, 2973, 1671, 1203, 723  $\text{cm}^{-1}$ .

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_6^{2+}]$  303,2172, izmereno 303,2169.



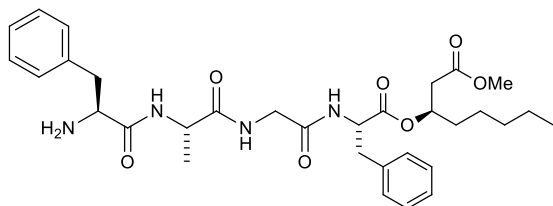
**(6*S*,9*S*,15*S*)-(R)-1-metoksi-1-oksooktan-3-il 6,15-dibenzil-2,2,9-trimetil-4,7,10,13-tetraokso-3-oksa-5,8,11,14-tetraazaheksadekan-16-oat (2.71a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz boc-L-fenilalanina i jedinjenja **2.66** u prinosu od 64 % kao svetlo žuto ulje.

**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7,31 - 7,14 (m, 10H), 6,92 - 6,81 (m, 2H), 6,64 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 5,22 - 5,17 (m, 1H), 5,14 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H), 4,79 (dd,  $J = 14,3, 6,7$  Hz, 1H), 4,40 (p,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 4,33 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1H), 3,88 (dd,  $J = 16,9, 5,5$  Hz, 1H), 3,83 (dd,  $J = 16,8, 5,7$  Hz, 1H), 3,64 (s, 3H), 3,16 (dd,  $J = 14,0, 6,2$  Hz, 1H), 3,09 - 2,96 (m, 3H), 2,56 (ddd,  $J = 21,1, 15,6, 6,4$  Hz, 2H), 1,63 - 1,48 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,31 (d,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 1,29 - 1,18 (m, 6H), 0,87 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,19, 171,60, 170,79, 168,45, 155,76, 136,28, 136,00, 129,30, 129,25, 128,69, 128,46, 127,08, 126,96, 80,58, 72,05, 55,99, 51,84, 49,24, 43,01, 38,64, 38,00, 37,63, 33,65, 31,41, 28,20, 24,58, 22,37, 17,71, 13,93.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> + Na<sup>+</sup>] 719,3627, izmereno 719,3623.



**(R)-metil 3-(((S)-2-(2-((S)-2-((S)-2-amino-3-phenylpropanamido)propanamido)acetamido)-3-phenylpropanoilo)oksi)oktanoat (2.71)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru C iz **2.71a** u prinosu od 99 % kao svetlo žuto ulje.

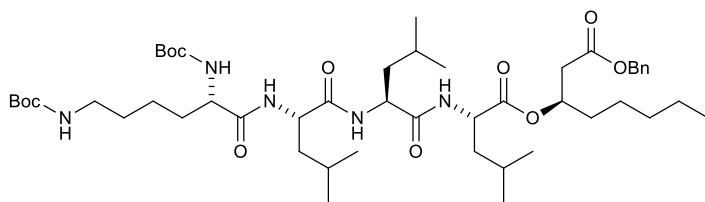
**[α]<sub>D</sub>** = -36,0 (c 0,50, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,67 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,34 - 7,08 (m, 12H), 6,77 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,19 - 5,13 (m, 1H), 4,79 (dt, *J* = 7,8, 6,3 Hz, 1H), 4,40 (p, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,08 (dd, *J* = 16,8, 6,6 Hz, 1H), 3,73 (dd, *J* = 16,8, 5,0 Hz, 1H), 3,67 - 3,60 (m, 4H), 3,21 (dd, *J* = 13,7, 4,0 Hz, 1H), 3,10 (ddd, *J* = 53,1, 14,0, 6,3 Hz, 2H), 2,69 (dd, *J* = 13,8, 9,2 Hz, 1H), 2,56 (ddd, *J* = 21,1, 15,6, 6,4 Hz, 2H), 1,64 - 1,46 (m, 4H), 1,35 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 1,30 - 1,18 (m, 7H), 0,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175,09, 172,53, 170,91, 170,67, 168,43, 137,50, 135,85, 129,36, 129,22, 128,67, 128,44, 127,01, 126,87, 72,19, 56,00, 53,39, 53,18, 51,85, 48,63, 42,96, 40,57, 38,65, 37,55, 33,67, 31,39, 24,63, 22,36, 16,93, 13,91.

**IR (ATR) v:** 3299, 2955, 1740, 1652, 1521, 1201, 1174, 701 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> + H<sup>+</sup>] 597,3283, izmereno 597,3274.



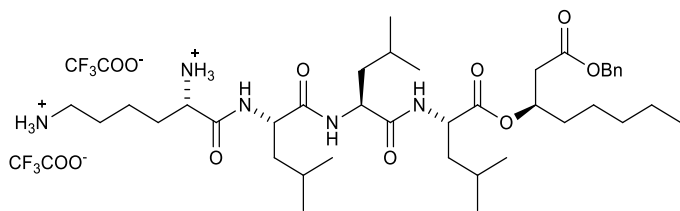
**(10S,13S,16S,19S)-(R)-1-(benziloksi)-1-oksooktan-3-il 10-((terc-butoksi karbonil)amino)-13,16,19-triisobutil-2,2-dimetil-4,11,14,17-tetraokso-3-oksa-5,12,15,18-tetraazaikozan-20-oat (2.72a)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru B iz bis-boc-L-lizina i **2.69** u prinosu od 60 % kao svetlo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,45 - 7,29 (m, 5H), 6,94 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,54 (s, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,28 - 5,20 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,77 (s, 1H), 4,55 - 4,45 (m, 2H), 4,35 (s, 1H), 3,93 (s, 1H), 3,18 - 3,05 (m, 2H), 2,66 (ddd, *J* = 66,8, 15,7, 6,4 Hz, 2H), 1,86 - 1,75 (m, 3H), 1,76 - 1,53 (m, 12H), 1,45 (d, *J* = 5,4 Hz, 18H), 1,40 - 1,32 (m, 2H), 1,32 - 1,21 (m, 6H), 0,99 - 0,81 (m, 21H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 172,70, 171,85, 171,66, 170,17, 156,78, 135,85, 128,55, 128,50, 128,30, 128,22, 80,64, 79,38, 71,39, 66,43, 60,39, 55,67, 52,61, 51,60, 51,06, 40,85, 40,66, 40,39, 39,09, 33,75, 31,45, 28,48, 28,30, 24,96, 24,77, 24,68, 24,64, 23,02, 22,44, 22,03, 21,77, 21,65, 13,95.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>49</sub>H<sub>83</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> + Na<sup>+</sup>] 940,5981, izmereno 940,5976.



**(5*R*,8*S*,11*S*,14*S*,17*S*)-8,11,14-triisobutil-3,7,10,13,16-pentaokso-5-pentil-1-fenil-2,6-dioksa-9,12,15-triazahenikozan-17,21-diaminijum 2,2,2-trifluoroacetat (2.72)**

Rastvoru jedinjenja **2.72a** (91,8 mg, 0,1 mmol) u dihlormetanu (2 mL) dodata je TFA (77  $\mu$ L, 1 mmol). Rastvor je mešan na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon toga rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno kao žuto ulje (99 %).

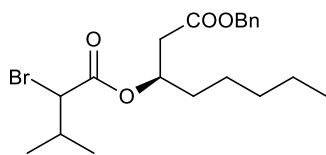
$[\alpha]_D = -31,2$  (c 0,60, CH<sub>3</sub>OH)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)**  $\delta$  8,27 (d,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 7,47 - 7,16 (m, 5H), 5,34 - 5,20 (m, 1H), 5,16 - 5,03 (m, 2H), 4,52 - 4,31 (m, 3H), 3,94 - 3,86 (m, 1H), 2,95 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,73 - 2,55 (m, 2H), 1,99 - 1,81 (m, 2H), 1,79 - 1,64 (m, 5H), 1,64 - 1,52 (m, 9H), 1,52 - 1,44 (m, 2H), 1,34 - 1,23 (m, 6H), 1,05 - 0,76 (m, 21H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)**  $\delta$  172,92, 172,26, 171,87, 170,61, 170,40, 165,83, 135,95, 133,73, 128,18, 127,95, 127,91, 71,51, 66,20, 52,49, 52,11, 51,37, 50,98, 40,66, 40,51, 40,07, 38,87, 38,74, 33,62, 31,19, 30,66, 26,64, 24,43, 24,32, 22,11, 22,08, 21,98, 21,91, 21,16, 20,73, 20,56, 20,46, 12,91.

**IR (ATR) v:** 3283, 2958, 2872, 1671, 1644, 1202, 1138, 723 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>39</sub>H<sub>69</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>2+</sup>] 359,7593, izmereno 359,7591.

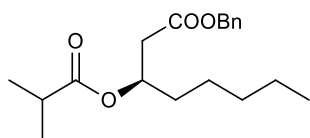


**(3*R*)-benzil 3-((2-bromo-3-metilbutanoil)oksi)oktanoat (2.74)**

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku za esterifikaciju, iz alkohola **2.16**. Nakon prečišćavanja na koloni dobijen je estar 2-bromoizovalerijanske kiseline **2.74** (59,5 mg, 72%) kao bledo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7,43 - 7,27 (m, 5H), 5,37 - 5,24 (m, 1H), 5,12 (qd,  $J = 12,2, 4,6$  Hz, 2H), 3,96 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 2,75 - 2,56 (m, 2H), 2,18 (dq,  $J = 13,0, 6,6$  Hz, 1H), 1,64 (dt,  $J = 11,1, 6,5$  Hz, 2H), 1,36 - 1,23 (m, 6H), 1,07 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 0,98 (dd,  $J = 6,6, 1,5$  Hz, 3H), 0,87 (t,  $J = 5,9$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  169,95, 169,93, 168,82, 168,69, 135,64, 128,58, 128,42, 128,38, 128,35, 72,19, 72,13, 66,63, 66,59, 54,87, 54,68, 38,99, 38,96, 33,73, 33,69, 32,12, 32,06, 31,42, 31,40, 24,60, 22,43, 19,98, 19,96, 19,93, 19,86, 13,92.

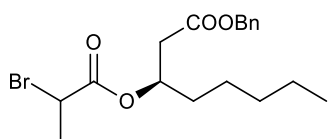


**(*R*)-benzil 3-(izobutiriloksi)oktanoat (2.75)**

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku za esterifikaciju, iz alkohola **2.16**. Nakon prečišćavanja na koloni dobijen je estar izobuterne kiseline **2.75** (52,5 mg, 82%) kao bledo žuto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7,45 - 7,27 (m, 5H), 5,31 - 5,18 (m, 1H), 5,15 - 5,06 (m, 2H), 2,69 - 2,53 (m, 2H), 2,46 (dt,  $J = 14,0, 7,0$  Hz, 1H), 1,65 - 1,55 (m, 2H), 1,34 - 1,23 (m, 6H), 1,10 (dd,  $J = 8,6, 7,0$  Hz, 6H), 0,90 - 0,82 (m, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,35, 170,29, 135,78, 128,55, 128,35, 128,28, 70,17, 66,45, 39,35, 34,08, 33,97, 31,48, 24,72, 22,46, 18,92, 18,88, 13,93.

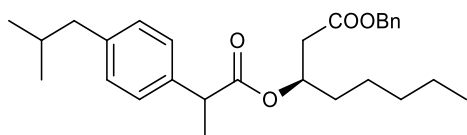


**(3R)-benzil 3-((2-bromopropanoil)oksi)oktanoat (2.76)**

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku za esterifikaciju, iz alkohola **2.16**. Nakon prečišćavanja na koloni dobijen je estar 2-bromopropanske kiseline **2.76** (62,2 mg, 81%) kao bledo žuto ulje.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45 – 7,28 (m, 5H), 5,31 (dd, *J* = 12,6, 5,6 Hz, 1H), 5,13 (d, *J* = 14,3 Hz, 2H), 4,28 (tt, *J* = 13,4, 6,7 Hz, 1H), 2,71 – 2,58 (m, 2H), 1,62 (dt, *J* = 14,9, 7,6 Hz, 5H), 1,27 (s, 6H), 0,87 (t, *J* = 6,4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,95, 169,89, 169,43, 169,31, 135,64, 128,59, 128,45, 128,42, 128,37, 72,34, 72,27, 66,63, 66,60, 52,70, 52,49, 39,04, 33,81, 33,79, 31,40, 24,61, 24,55, 22,42, 21,39, 21,30, 13,91.

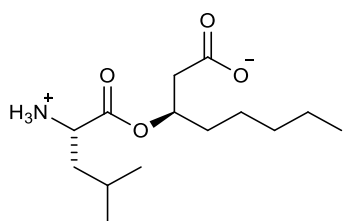


**(3R)-benzil 3-((2-(4-izobutilfenil)propanoil)oksi)oktanoat (2.77)**

Jedinjenje je sintetisano po opštem postupku za esterifikaciju, iz alkohola **2.16**. Nakon prečišćavanja na koloni dobijen je estar ibuprofena **2.77** (80,6 mg, 92%), kao bledo žuto ulje u vidu smese diastereoizomera u odnosu 1 : 1.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,38 – 7,21 (m, 5H<sub>oba</sub> izomera), 7,21 – 7,10 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 7,10 – 7,00 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 5,29 – 5,17 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 5,14 – 5,01 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 4,93 (q, *J* = 12,3 Hz, 1H<sub>oba</sub> izomera), 3,60 (dq, *J* = 25,5, 7,1 Hz, 1H<sub>oba</sub> izomera), 2,68 – 2,45 (m, 2H<sub>oba</sub> izomera), 2,41 (dd, *J* = 6,9, 5,5 Hz, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,82 (tq, *J* = 13,4, 6,7 Hz, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,60 – 1,53 (m, 1H<sub>oba</sub> izomera), 1,49 – 1,38 (m, 4H<sub>oba</sub> izomera), 1,23 (s, 2H<sub>oba</sub> izomera), 1,08 (ddd, *J* = 11,5, 6,6, 3,3 Hz, 3H<sub>oba</sub> izomera), 0,90 – 0,76 (m, 9H<sub>oba</sub> izomera).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173,99, 173,95, 170,23, 170,05, 140,43, 137,83, 137,60, 135,79, 135,74, 129,22, 129,21, 128,56, 128,51, 128,32, 128,27, 128,22, 127,18, 70,75, 70,54, 66,43, 66,32, 45,31, 45,17, 45,03, 39,33, 39,17, 33,88, 33,81, 31,45, 31,34, 30,17, 30,16, 24,64, 24,32, 22,43, 22,36, 18,25, 18,23, 13,92, 13,87.

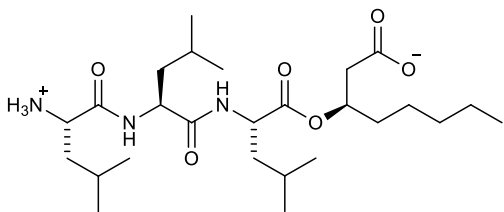


**(R)-3-(((S)-2-amonio-4-metilpentanoil)oksi)oktanoat (2.78)**

Leucinski derivat **2.44** (40 mg, 0,110 mmol) rastvoren je u etil-acetatu (5 mL), i dodato je 2,5 mg PtO<sub>2</sub>. Evakuisan je vazduh iz reakcionog balona, a potom postavljen gumeni balon sa vodonikom. Nakon 18 h mešanja na sobnoj temperaturi reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen, a sirovi ostatak ispran etrom pri čemu je dobijen cviterjonski oblik **2.78** (29,7 mg, 99 %) kao beli amorfni prah.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5,36 (s, 1H), 3,31 (dt, *J* = 3,2, 1,5 Hz, 4H), 2,46 (d, *J* = 64,4 Hz, 2H), 1,77 (s, 2H), 1,65 (s, 2H), 1,32 (s, 6H), 0,99 (dd, *J* = 8,7, 6,2 Hz, 6H), 0,90 (d, *J* = 5,7 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD)  $\delta$  74,80, 33,87, 31,60, 31,27, 24,98, 24,62, 22,26, 22,15, 21,40, 21,27, 21,00, 12,95, 12,87.

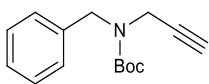


**(R)-3-(((S)-2-((S)-2-((S)-2-amino-4-metilpentan amido)-4-metilpentanamido)-4-metilpentanoil) oksio)oktanoat (2.79)**

Leucinski derivat **2.69** (65 mg, 0,110 mmol) rastvoren je u etil-acetatu (5 mL), i dodato je 2,5 mg PtO<sub>2</sub>. Evakuisan je vazduh iz reakcionog balona, a potom postavljen gumeni balon sa vodonikom. Nakon 18 h mešanja na sobnoj temperaturi reakciona smesa je profiltrirana kroz celit, rastvarač uparen, a sirovi ostatak ispran etrom pri čemu je dobijen cviterjonski oblik **2.79** (54,3 mg, 99 %) kao beli amorfni prah.

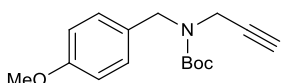
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5,26 (s, 2H), 4,41 (d,  $J$  = 39,5 Hz, 2H), 3,86 – 3,46 (m, 2H), 2,41 (s, 2H), 1,83 (s, 1H), 1,64 (d,  $J$  = 14,2 Hz, 9H), 1,32 – 1,20 (m, 6H), 1,02 – 0,80 (m, 21H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  50,81, 40,18, 34,37, 31,54, 24,95, 24,90, 24,71, 23,03, 22,92, 22,47, 22,22, 21,79, 21,57, 13,91.



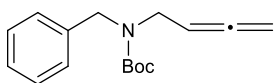
**Terc-butil benzil(prop-2-in-1-il)karbamat (3.5a)**

Jedinjenje je sintetisano prema eksperimentalnim procedurama iz literature polazeći iz benzilamina (3,00 g, 28,04 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.5a** u prinosu od 72 % (4,95g, 20,19 mmol) kao bistro ulje.<sup>165</sup> Spektralni podaci identični su literaturnim.<sup>166</sup>



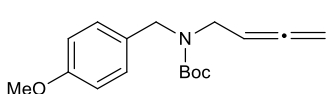
**Terc-butil 4-metoksibenzil(prop-2-in-1-il)karbamat (3.5b)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.5a** polazeći iz *p*-metoksibenzilamina (4,20 g, 30,66 mmol). Jedinjenje **3.5b** dobijeno je u prinosu od 79 % (6,67 g, 24,25 mmol) kao bistro ulje. Spektralni podaci identični su literaturnim.<sup>158</sup>



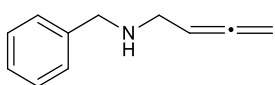
**Terc-butil benzil(buta-2,3-dien-1-il)karbamat (3.6a)**

Jedinjenje je sintetisano prema eksperimentalnoj proceduri iz literature polazeći iz **3.5a** (4,95 g, 20,19 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.6a** u prinosu od 69 % (3,61 g, 13,93 mmol) kao svetlo žuto ulje. Spektralni podaci identični su literaturnim.<sup>167</sup>



**Terc-butil buta-2,3-dien-1-il(4-metoksibenzil)karbamat (3.6b)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.6a** iz **3.5b** (5,00 g, 18,18 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.6b** u prinosu od 72 % (3,79 g, 13,11 mmol) kao svetlo žuto ulje. Spektralni podaci identični su literaturnim.<sup>167</sup>



**N-benzilbuta-2,3-dien-1-amin (3.7a)**

Rastvoru jedinjenja **3.6a** (923 mg, 3,56 mmol) u dihlormetanu (25 mL) dodata je TFA (2,73 mL, 35,6 mmol) i rastvor je mešan 12 h na sobnoj

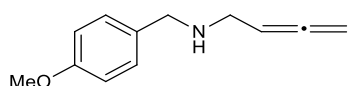
temperaturi. Rastvarač je uparen iz reakcione smese, a ostatak rastvoren u etil-acetatu (30 mL) i ispran zasićenim natrijum-hidrogenkarbonatom (3 x 30 mL) i zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (30 mL). Organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, a rastvarač uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijen proizvod **3.7a** prinosu od 99 % (561 mg, 3,53 mmol) kao braon ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,42 - 7,30(m, 5H), 5,22 (p, *J* = 6,5 Hz, 1H), 4,87 - 4,74 (m, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,27 (dt, *J* = 6,2, 3,0 Hz, 2H), 2,65 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 208,61, 139,34, 128,45, 128,38, 127,16, 88,66, 76,15, 52,78, 46,97.

**IR (ATR) v:** 3026, 2835, 1954, 1674, 1453, 1120 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N + H<sup>+</sup>] 160,1121, izmereno 160,1125.



***N*-(4-metoksibenzil)buta-2,3-dien-1-amin (3.7b)**

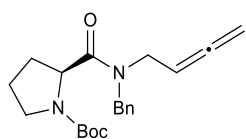
Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.7a** iz **3.6b** (3,41 g, 11,80 mmol), TFA (9,0 mL, 118 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.7b** u prinosu od 96 % (2,14 g, 11,32 mmol) kao svetlo braon ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,24 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,86 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 5,23 (p, *J* = 6,5 Hz, 1H), 4,83 - 4,73 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,76 (s, 2H), 3,26 (dt, *J* = 6,0, 2,9 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 208,46, 158,69, 132,22, 129,45, 113,80, 89,23, 76,02, 67,10, 55,27, 52,44, 47,04.

**IR (ATR) v:** 2997, 2908, 2834, 1955, 1511, 831 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO + H<sup>+</sup>] 190,1226, izmereno 190,1230.



**(*S*)-terc-butyl 2-(benzil(buta-2,3-dien-1-il)karbamoi)pirolidin-1-karboksilat (3.8a)**

Rastvoru boc-L-Prolina (700 mg, 3,25 mmol) u anhidrovanom dihlormetanu (30 mL), pod atmosferom azota dodati su EDCI (682 mg, 3,55 mmol), HOBT (480 mg, 3,55 mmol) i DIPEA (1,03 mL, 5,92 mmol). Reakciona smesa je ohlađena na 0°C i dodato jedinjenje **3.7a** (470 mg, 2,96 mmol) i rastvor je mešan 12 h na sobnoj temperaturi. Rastvarač je potom uparen pod sniženim pritiskom i prečišćen hromatografijom na silika gelu pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.8a** u prinosu od 76 % (800 mg, 2,25 mmol) kao svetlo žuto ulje.

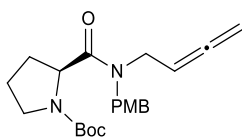
**TLC:** R<sub>f</sub> 0,30 (PE : EtOAc = 7 : 3).

**<sup>1</sup>H NMR/<sup>13</sup>C NMR** signali nisu popisani s obzirom da je jedinjenje dobijeno kao kompleksna smesa rotamera. Potpuna karakterizacija izvršena je u narednom koraku kod jedinjenja **3.9a**.

**IR (ATR) v:** 2975, 2876, 1954, 1694, 1396, 1163 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = +29,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Na<sup>+</sup>] 379,1992, izmereno 379,2001.



**(S)-*tert*-butil 2-(buta-2,3-dien-1-il(4-metoksibenzil)karbamoi)pirolidin-1-karboksilat (3.8b)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.8a** polazeći iz **3.7b** (1,70 g, 9,00 mmol), boc-L-prolina (2,13 g, 9,89 mmol), EDCI (2,16 g, 1,35 mmol), HOBt (1,80 g, 1,35 mmol) i DIPEA (3,12 mL, 19,78 mmol). pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.8b** u prinosu od 88 % (3,36 g, 8,70 mmol) kao žuto ulje.

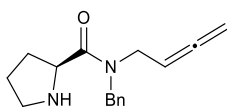
**TLC:** Rf 0,50 (PE : EtOAc = 1 : 1).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** smesa rotamera δ 7,33 – 7,15 (m, 2H), 6,93 - 6,80 (m, 2H), 5,23 – 5,04 (m, 1H), 4,91 – 4,82 (m, 1H), 4,79 - 4,73 (m, 1H), 4,73 – 4,62 (m, 1H), 4,60 - 4,53 (m, 1H), 4,52 – 4,42 (m, 0,5H), 4,30 (d, *J* = 14,4 Hz, 0,5H), 4,03 – 3,91 (m, 1H), 3,86 - 3,74 (m, 3H), 3,72 - 3,57 (m, 1H), 3,55 – 3,37 (m, 1H), 2,25 – 2,06 (m, 2H), 2,01 – 1,76 (m, 3H), 1,51 - 1,45 (m, 6H), 1,33 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** smesa rotamera δ 209,60, 209,29, 208,87, 208,65, 173,45, 173,13, 173,04, 172,78, 159,25, 159,09, 158,82, 154,52, 153,93, 153,78, 130,18, 129,60, 129,53, 129,36, 128,81, 128,58, 128,33, 114,20, 113,93, 113,90, 87,46, 86,92, 86,43, 86,13, 79,81, 79,68, 79,41, 56,28, 56,02, 55,29, 55,25, 48,40, 47,00, 46,96, 46,88, 45,30, 45,24, 31,44, 31,38, 30,30, 28,56, 28,51, 28,34, 24,47, 23,54.

**IR (ATR) v:** 2974, 1954, 1693, 1394, 1162, 847 cm<sup>-1</sup>.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 387,2278, izmereno 387,2285.



**(S)-*N*-benzil-*N*-(buta-2,3-dien-1-il)pirolidin-2-karboksamid (3.9a)**

Rastvoru jedinjenja **3.8a** (400 mg, 1,12 mmol) u dihlorometanu (20 mL) dodata je TFA (0,86 mL, 11,2 mmol) i reakciona smesa mešana 12 h na sobnoj temperaturi. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, ostatak rastvoren u etil-acetatu (30 mL) i ispran zasićenim natrijum-hidrogenkarbonatom (3 x 30 mL) i zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (1 x 30 mL). Organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom i rastvarač uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.9a** u prinosu od 92 % (264 mg, 1,03 mmol) kao tamno narandžasto ulje.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** smesa rotamera δ 7,40 – 7,27 (m, 3H), 7,25 – 7,18 (m, 2H), 5,17 – 5,04 (m, 1H), 4,93 – 4,85 (m, 1H), 4,81 – 4,73 (m, 1,5H), 4,65 (d, *J* = 16,7 Hz, 0,5H), 4,50 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 4,23 – 4,14 (m, 0,5H), 4,13 – 4,07 (m, 0,5H), 4,06 – 3,99 (m, 0,5H), 3,94 - 3,72 (m, 1,5H), 3,35 - 3,19 (m, 2H), 3,01 – 2,85 (m, 1H), 2,24 - 2,14 (m, 0,5H), 2,11 – 2,01 (m, 0,5H), 1,94 – 1,69 (m, 3H).

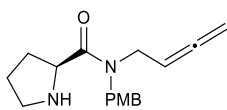
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** smesa rotamera δ 209,09, 208,80, 173,97, 173,74, 136,95, 136,01, 128,97, 128,68, 128,21, 127,83, 127,55, 126,77, 86,40, 77,91, 58,44, 58,28, 49,70, 48,50, 47,72, 47,67, 44,58, 43,94, 31,38, 31,28, 26,53, 26,48.

**IR (ATR) v:** 3300, 2964, 2871, 1964, 1640, 1219 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -237,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] 257,1648, izmereno 257,1658.





**(S)-N-(buta-2,3-dien-1-il)-N-(4-metoksibenzil)pirolidin-2-karboksamid (3.9b)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.9a** polazeći iz **3.8b** (3,00 g, 7,77 mmol) i TFA (5,90 mL 77,7 mmol) u prinosu od 99 % (2,20 g, 7,69 mmol) kao braon ulje.

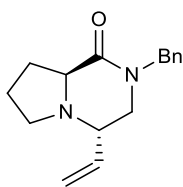
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** smesa rotamera δ 7,19 - 7,08 (m, 2H), 6,92 - 6,82 (m, 2H), 5,41 (bs, 1,5H), 5,15 - 5,02 (m, 1H), 4,90 (s, 1H), 4,81 - 4,77 (m, 0,5H), 4,68 (d, *J* = 14,5 Hz, 0,5H), 4,58 (d, *J* = 16,2 Hz, 0,5H), 4,49 - 4,38 (m, 1H), 4,27 - 4,20 (m, 1H), 3,93 - 3,70 (m, 5H), 3,33 - 3,23 (m, 1H), 3,13 - 2,96 (m, 1H), 2,31 - 2,08 (m, 1H), 1,97 - 1,73 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** smesa rotamera δ 209,05, 208,79, 172,76, 172,56, 159,33, 159,13, 129,65, 128,72, 128,25, 127,49, 114,36, 114,08, 86,30, 77,99, 58,28, 58,12, 55,32, 55,27, 49,25, 47,98, 47,34, 47,29, 44,37, 43,63, 31,16, 31,01, 26,16, 26,11.

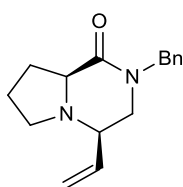
**IR (ATR) v:** 2956, 1955, 1645, 1512, 1247, 848 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -57,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 287,1754, izmereno 287,1762.



**3.10a**



**3.10b**

**(4S,8aS)-2-benzil-4-vinilheksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on 3.10a) i (4R,8aS)-2-benzil-4-vinilheksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.10b)**

Jedinjenje **3.9a** (50 mg, 0,195 mmol) rastvoreno je u smesi acetona i vode (5 mL, 1:1) u balonu obmotanim aluminijumskom folijom. U reakcionu smesu su potom dodati kalcijum-karbonat (15,6 mg, 0,156 mmol) i srebro-nitrat (26,6 mg, 0,156 mmol) i reakcija mešana na sobnoj temperaturi preko noći. Reakciona smesa je potom filtrirana i aceton uparen pod sniženim pritiskom, vodeći računa pritom da temperatura na vakuum uparivaču ne pređe 30 °C kako bi se sprečilo formiranje ljubičastog sporednog proizvoda. Zaostali vodeni rastvor ekstrahovan je etrom (3 x 5 mL) i organski sloj potom osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom a dobijeni sirov proizvod prečišćen hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.10a** u prinosu od 69 % (34,4 mg, 0,134 mmol) kao svetlo žuto ulje i jedinjenje **3.10b** u prinosu od 14 % (7 mg, 0,027 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** Rf<sub>3.10b</sub> 0,40 (EtOAc : MeOH = 4 : 1) i Rf<sub>3.10a</sub> 0,55 (EtOAc : MeOH = 4 : 1).

**3.10a: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,36 - 7,26 (m, 4H), 7,25 - 7,23 (m, 1H), 5,72 - 5,57 (m, 1H), 5,23 - 5,14 (m, 2H), 4,61 (q, *J* = 14,6 Hz, 2H), 3,78 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 3,25 - 3,12 (m, 3H), 2,96 - 2,89 (m, 1H), 2,85 - 2,78 (m, 1H), 2,34 - 2,24 (m, 1H), 2,08 - 1,99 (m, 1H), 1,89 - 1,69 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,88, 136,83, 136,77, 128,67, 128,17, 127,56, 118,37, 61,50, 59,21, 52,52, 49,90, 49,68, 28,70, 22,86.

**IR (ATR) v:** 3466, 2917, 1640, 1494, 927, 700 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -29,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] 257,1648, izmereno 257,1658.

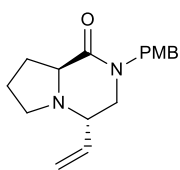
**3.10b: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,35 – 7,26 (m, 4H), 7,25 - 7,23 (m, 1H), 5,72 (ddd, *J* = 17,4, 10,2, 7,4 Hz, 1H), 5,28 – 5,12 (m, 2H), 4,74 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H), 4,41 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H), 3,26 – 3,15 (m, 2H), 3,12 - 3,07 (m, 1H), 3,03 - 2,96 (m, 2H), 2,28 – 2,17 (m, 2H), 2,05 – 1,93 (m, 1H), 1,88 – 1,73 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 169,86, 136,91, 136,33, 128,62, 128,18, 127,42, 118,62, 65,18, 62,05, 50,89, 50,23, 49,31, 26,46, 21,42.

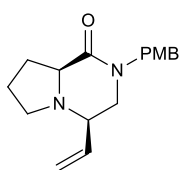
**IR (ATR) v:** 3465, 2919, 1639, 1494, 926, 700 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -138,0 (c 0,05, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] 257,1648, izmereno 257,1660.



**3.10c**



**3.10d**

**(4*S*,8*aS*)-2-(4-metoksibenzil)-4-vinilheksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.10c) i (4*R*,8*aS*)-2-(4-metoksibenzil)-4-vinilheksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.10d)**

Jedinjenja su sintetisana prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.10a/3.10b** polazeći iz **3.9b** (1,3 g, 4,54 mmol), CaCO<sub>3</sub> (363 mg, 3,63 mmol) i AgNO<sub>3</sub> (618 mg, 3,63 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.10c** u prinosu od 69 % (896 mg, 3,13 mmol) kao svetlo žuto ulje i jedinjenje **3.10d** u prinosu od 14 % (184 mg, 0,64 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** R<sub>f3.10c</sub> 0,20 (EtOAc : MeOH = 9 : 1), R<sub>f3.10d</sub> 0,35 (EtOAc : MeOH = 9 : 1).

**3.10c: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,19 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,64 (ddd, *J* = 17,0, 10,2, 6,6 Hz, 1H), 5,23 - 5,14 (m, 2H), 4,54 (q, *J* = 14,4 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,76 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H), 3,25 – 3,10 (m, 3H), 2,97 – 2,87 (m, 1H), 2,85 - 2,77 (m, 1H), 2,33 - 2,22 (m, 1H), 2,07 - 1,96 (m, 1H), 1,87 – 1,68 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,71, 159,13, 136,79, 129,55, 128,84, 118,43, 114,06, 61,50, 59,20, 55,28, 52,49, 49,61, 49,04, 28,68, 22,82.

**IR (ATR) v:** 2956, 2835, 1644, 1512, 1246, 1033 cm<sup>-1</sup>.

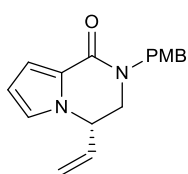
**[α]<sub>D</sub>** = -25,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 287,1754, izmereno 287,1764.

**3.10d: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,19 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,71 (ddd, *J* = 10,2, 8,8, 5,4 Hz, 1H), 5,25 (d, *J* = 17,2 Hz, 1H), 5,17 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 4,67 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 4,34 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,25 – 3,12 (m, 2H), 3,11 - 3,05 (m, 1H), 3,02 - 2,93 (m, 2H), 2,22 (dt, *J* = 16,8, 8,2 Hz, 2H), 1,98 (ddd, *J* = 21,7, 11,4, 8,4 Hz, 1H), 1,88 – 1,73 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 169,75, 159,07, 136,30, 129,63, 128,99, 118,80, 114,05, 65,19, 62,12, 55,28, 50,66, 50,30, 48,68, 26,43, 21,40.

\*Zbog nestabilnosti jedinjenja ono je oksidovano kao što je opisano ispod (jedinjenje **3.11b**) i dalje karakterisano i sačuvano kao drugi enantiomer jedinjenja **3.11b**, pod imenom **3.11a**.



**(S)-2-(4-metoksibenzil)-4-vinil-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.11b)**

U prethodno izareni balon dodato je jedinjenje **3.10c** (800 mg, 2,80 mmol), sveže destilovan THF (20 mL) i MnO<sub>2</sub> (6,16 g, 70,80 mmol). Reakciona smesa je zagrejana na 85 °C i mešana preko noći. Nakon toga smesa je profiltrirana kroz celit, celit je potom ispran vrućim THF-om i potom vraćen u reakcioni balon i refluktovan u THF-u još 30 minuta. Ova smesa je potom ponovo profiltrirana kroz celit i kombinovani filtrat koncentrovan pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.11b** u prinosu od 57 % (450 mg, 1,60 mmol) kao bledo žuto ulje.

**TLC:** R<sub>f</sub> 0,28 (Et<sub>2</sub>O : PE = 3 : 1).

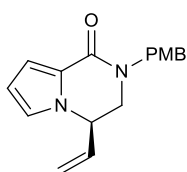
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,24 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,01 (dd, *J* = 3,7, 1,4 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,71 (s, 1H), 6,32 – 6,21 (m, 1H), 5,77 (ddd, *J* = 17,1, 10,2, 7,0 Hz, 1H), 5,33 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 5,12 (d, *J* = 17,0 Hz, 1H), 4,77 – 4,58 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,53 (dd, *J* = 12,7, 4,5 Hz, 1H), 3,40 (dd, *J* = 12,7, 7,6 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 159,33, 159,12, 133,70, 129,72, 129,04, 124,41, 121,95, 120,71, 114,02, 109,98, 56,76, 55,28, 49,88, 48,55.

**IR (ATR) v:** 2911, 2836, 1634, 1511, 1242, 733 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -1,3 (c 0,30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

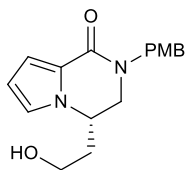
**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 283,1441, izmereno 283,1449.



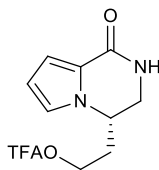
**3.11a - IR (ATR) v:** 2911, 2836, 1634, 1512, 1243, 732 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = +1,0 (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 283,1441, izmereno 283,1455.



**3.12a**



**3.12**

**(S)-4-(2-hidroksietil)-2-(4-metoksibenzil)-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on 3.12a i (S)-2-(1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazin-4-il)etil 2,2,2-trifluoroacetat (3.12)**

Rastvoru jedinjenja **3.11b** (400 mg, 1,42 mmol) u THF-u (15 mL) dodat je rastvor 9-BBN-a u THF-u (0,5 M, 4,26 mmol, 8,51 mL). Reakcija je praćena TLC-om do nestanka polaznog alkena nakon 3h. Nakon toga reakciona smesa je ohlađena na 0 °C i dodati su NaOH (1,0 M, 12,76 mL) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 wt %/vol, 1,54 mL). Reakcija je potom mšana preko noći na sobnoj temperaturi. Reakciona smesa je potom prebaćena u levak za odvajanje, dodato je 10 mL zasićenog rastvora natrijum-hidrogenkarbonata i izvršena ekstrakcija etil-acetatom (3 x 10 mL). Odvojeni organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, filtriran i rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno 352 mg bistrog bezbojnog ulja (**3.12a**), kontaminiranim ostacima 9-BBN-a. **TLC:** R<sub>f</sub> 0,30 (EtOAc : Benzena = 1 : 1). Dobijeno ulje je bez daljeg prečišćavanja iskorišćeno u narednom koraku. Sirovo

jedinjenje **3.12a** je pod atmosferom azota rastvoreno u TFA (5 mL), potom je dodat anizol (0,26 mL, 2,37 mmol). Reakcija je mešana na temperaturi od 60 °C preko noći. Rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom a sirovi ostatak rastvoren u etil-acetatu (15 mL) i ispran zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata(3 x 15 mL). Organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, filtriran i rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečišćen je hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.12** u prinosu u dva koraka od 55 % (216 mg, 0,78 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** Rf 0,35 (EtOAc = 100 %).

**3.12a: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,24 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,95 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,80 (s, 1H), 6,23 – 6,14 (m, 1H), 4,90 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 4,42 – 4,29 (m, 2H), 3,83 – 3,74 (m, 4H), 3,54 – 3,46 (m, 1H), 3,45 – 3,38 (m, 1H), 3,30 (dd, *J* = 12,8, 2,6 Hz, 1H), 1,88 – 1,83 (m, 1H), 1,74 – 1,65 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 159,39, 159,20, 129,97, 129,12, 128,34, 123,69, 122,59, 114,07, 113,87, 109,66, 58,61, 55,31, 50,85, 49,00, 48,56, 35,58.

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 301,1547, izmereno 301,1555.

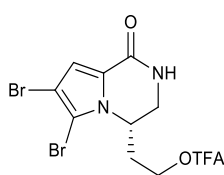
**3.12: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 6,99 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,85 – 6,72 (m, 2H), 6,31 – 6,24 (m, 1H), 4,55 – 4,45 (m, 1H), 4,40 – 4,32 (m, 1H), 4,17 – 4,09 (m, 1H), 3,98 (dd, *J* = 12,8, 3,9 Hz, 1H), 3,50 – 3,42 (m, 1H), 2,42 – 2,30 (m, 1H), 2,22 (ddd, *J* = 14,9, 9,9, 5,2 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 161,15, 157,16, 134,77, 123,26, 114,67, 110,25, 64,44, 50,82, 44,76, 31,63.

**IR (ATR) v:** 2884, 1784, 1634, 1552, 1334, 741 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -57,6 (c 0,34, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 277,0795, izmereno 277,0792.



**(S)-2-(6,7-dibromo-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazin-4-il)etil 2,2,2-trifluoroacetat (3.13)**

Rastvoru jedinjenja **3.12** (120 mg, 0,44 mmol) u THF-u (5 mL) na sobnoj temperaturi dodat je rastvor NBS-a (162 mg, 0,913 mmol) u THF-u (1 mL). Reakcija je mešana preko noći na sobnoj temperaturi. Rastvarač je potom uparen pod sniženim pritiskom, a sirovi ostatak prečišćen hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.13** u prinosu od 85 % (160 mg, 0,37 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** Rf 0,40 (EtOAc = 100 %).

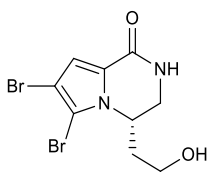
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,02 (s, 1H), 4,52 – 4,46 (m, 1H), 4,45 – 4,40 (m, 2H), 3,96 (dd, *J* = 13,2, 3,9 Hz, 1H), 3,56 (dd, *J* = 12,9, 4,7 Hz, 1H), 2,40 – 2,26 (m, 1H), 2,26 – 2,13 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 159,41, 157,21, 124,74, 116,56, 106,94, 101,42, 64,16, 51,05, 43,32, 31,04.

**IR (ATR) v:** 2927, 1651, 1428, 1337, 943, 750 cm<sup>-1</sup>.

$[\alpha]_D = -18,6$  (c 0,50, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 432,9005, izmereno 432,9001.



**(S)-6,7-dibromo-4-(2-hidroksietil)-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.14)**

Rastvoru jedinjenja **3.13** (50 mg, 0,115 mmol) u smesi metanola, THF-a i vode (5 mL, 1 : 2 : 1) dodat je u kapima rastvor NaOH (0,46 mL, 1M). Nakon 3 h metanol i THF su upareni pod sniženim pritiskom a zaostali vodeni rastvor ekstrahovan etil-acetatom (3 x 5 mL). Kombinovani organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom i filtriran. Rastvarač je potom uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.14** u prinosu od 99 % (38,5 mg, 0,114 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** R<sub>f</sub> 0,40 (EtOAc : MeOH = 9 : 1).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,01 (s, 1H), 5,91 (s, 1H), 4,61 – 4,47 (m, 1H), 3,90 (dd, *J* = 12,9, 3,9 Hz, 1H), 3,78 (s, 2H), 3,69 (dd, *J* = 12,6, 5,0 Hz, 1H), 2,16 - 2,05 (m, 1H), 1,97 – 1,87 (m, 1H).

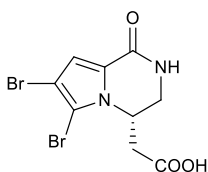
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 159,03, 121,81, 116,13, 106,66, 100,84, 59,26, 52,16, 43,31, 34,47.

**IR (ATR) v:** 3306, 2360, 1645, 1549, 1338, 1063 cm<sup>-1</sup>.

$[\alpha]_D = -27,0$  (c 0,10, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 336,9182, izmereno 336,9188.

**Longamid B**



Rastvoru jedinjenja **3.14** (15 mg, 0,045 mmol) u smesi acetonitrila i vode (3 mL, 1 : 1) dodati su jodbenzen diacetat (BAIB) (36 mg, 0,112 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (15 mg, 0,176 mmol) i 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oksil (TEMPO) (1,6 mg, 0,011 mmol). Reakciona smesa je mešana 18 h na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije u reakcionu smesu dodato je 5 mL zasićenog rastvora natrijum-hidrogenkarbonata i reakciona smesa prebačena u levak za odvajanje gde je vodena faza isprana etil-acetatom (3 x 5 mL). Zaostali vodeni rastvor zakišeljjen je 2M HCl-om do pH 2 i ekstrahovan etil-acetatom (3 x 5 mL). Kombinovani organski sloj je osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom i filtriran. Rastvarač je potom uparen pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijen čvrst beli sirov proizvod. Sirovi proizvod ispran je smesom dihlormetana i petroletra (2 : 8) i potom rekristalisan iz smese dihlormetana i metanola (98 : 2). Dobijeni su beli igličasti kristali longamida B u prinosu od 83 % (12,5 mg, 0,037 mmol).

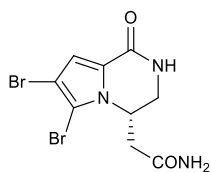
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 98 % CDCl<sub>3</sub> + 2 % MeOD)** δ 7,00 (s, 1H), 4,75 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 3,89 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 3,70 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 2,97 – 2,89 (m, 1H), 2,56 (d, *J* = 16,6 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, 98 % CDCl<sub>3</sub> + 2 % MeOD)** δ 171,90, 159,57, 124,68, 116,39, 106,88, 101,29, 50,53, 42,86, 35,38.

**IR (ATR) v:** 3305, 2359, 1634, 1338, 1059, 749 cm<sup>-1</sup>.

$[\alpha]_D = -5,5$  (c 0,20, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 350,8974, izmereno 350,8971.



### Stilizin D

Rastvoru **longamida B** (10 mg, 0,028 mmol) na 0°C u THF-u (5 mL) dodati su EDCI (8,2 mg, 0,043 mmol), HOBt (5,8 mg, 0,043 mmol) i DIPEA (8,4 μL, 0,048 mmol). Nakon 5 minuta mešanja u rastvor je dodat 25 % rastvor amonijum hidroksida u vodi (6,8 mg, 0,048 mmol) i rastvor mešan 18 h na sobnoj temperaturi. Nakon završetka reakcije rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom. Sirovi ostatak rastvoren je u etil-acetatu (5 mL) i potom ispran 0,5 M HCl-om (3 x 5 mL) pa zasićenim rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata (3 x 5 mL) i konačno zasićenim rastvorom natrijum-hlorida (2 x 5 mL). Organski sloj je potom osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom, a rastvarač uparen pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi ostatak prečišćen je hromatografijom na koloni pri čemu je dobijen stilizin D u prinosu od 81 % (8,1 mg, 0,023 mmol) kao svetlo žuta amorfna supstanca.

**TLC:** R<sub>f</sub> 0,15 (EtOAc : MeOH = 9 : 1).

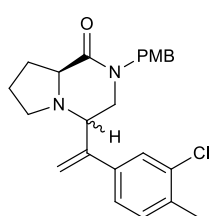
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 98 % CDCl<sub>3</sub> + 2 % MeOD)** δ 6,99 (s, 1H), 4,82 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H), 3,87 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,63 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 2,84 – 2,73 (m, 1H), 2,49 (d, *J* = 14,9 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, 98 % CDCl<sub>3</sub> + 2 % MeOD)** δ 171,69, 124,72, 116,43, 107,10, 101,23, 50,96, 42,94, 36,41.

**IR (ATR) v:** 3381, 1635, 1349, 1331, 999, cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -7,0 (c 0,10, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 349,9134, izmereno 349,9139.



### (4*R*,8*aS*)-4-(1-(3-hlor-4-metilfenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.15ba) i (4*S*,8*aS*)-4-(1-(3-hlor-4-metilfenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.15aa)

Rastvoru jedinjenja **3.9b** (1114 mg, 3,90 mmol) u acetonitrilu (10 mL), pod atmosferom azota dodati su K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1075 mg, 7,79 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (87,3 mg, 0,39 mmol), XantPhos (225,5 mg, 0,39 mmol) i 2-hlor-4-jod-1-metilbenzen (982,8 mg, 3,90 mmol). Rastvor je refluktovan 18h. Nakon završetka reakcije rastvarač je uparen pod sniženim pritiskom, a sirov proizvod prečišćen hromatografijom na koloni. Dobijeno je jedinjenje **3.15ba** u prinosu od 32 % (512,9 mg, 1,25 mmol) kao svetlo žuto ulje i jedinjenje **3.15aa** u prinosu od a 26 % (416,8 mg, 1,01 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** R<sub>f</sub>3.15ba 0,50 (Et<sub>2</sub>O = 100 %), R<sub>f</sub>3.15aa 0,40 (Et<sub>2</sub>O = 100 %).

**3.15ba: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,46 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,32 – 7,27 (m, 1H), 7,18 - 7,12 (m, 3H), 6,84 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,42 (s, 1H), 5,26 (s, 1H), 4,75 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 4,21 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,64 (dd, *J* = 10,6, 4,6 Hz, 1H), 3,37 (t, *J* = 11,3 Hz, 1H), 3,19 – 3,08 (m, 2H), 2,98 (td, *J* = 8,6, 3,9 Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,29 - 2,18 (m, 2H), 2,03 (dt, *J* = 12,7, 9,6 Hz, 1H), 1,87 – 1,71 (m, 2H), 1,64 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 158,99, 145,09, 138,83, 135,62, 134,32, 130,79, 129,44, 128,97, 127,35, 125,03, 117,20, 114,01, 65,26, 62,86, 55,26, 49,84, 49,77, 48,70, 26,86, 21,64, 19,74.

**IR (ATR) v:** 2923, 1645, 1512, 1246, 821, 734 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -55,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 411,1834, izmereno 411,1837.

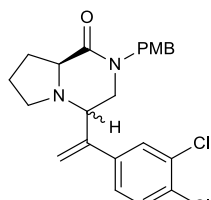
**3.15aa: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,28 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,08 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,00 (dd, *J* = 7,9, 1,6 Hz, 1H), 6,86 – 6,79 (m, 2H), 5,38 (d, *J* = 15,7 Hz, 2H), 4,65 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 4,31 (d, *J* = 14,3 Hz, 1H), 3,87 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,50 (dd, *J* = 8,1, 4,4 Hz, 1H), 3,22 – 3,11 (m, 2H), 3,11 – 3,04 (m, 1H), 2,67 – 2,57 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,28 – 2,14 (m, 2H), 1,90 – 1,75 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,62, 159,09, 145,47, 139,30, 135,32, 134,27, 130,74, 129,62, 129,55, 128,90, 128,31, 127,13, 126,51, 124,77, 116,26, 114,04, 62,32, 60,98, 55,23, 53,47, 49,32, 49,03, 28,45, 24,00, 19,72.

**IR (ATR) v:** 2915, 1646, 1511, 1245, 818, 734 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -7,0 (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 411,1834, izmereno 411,1836.



**(4*R*,8*aS*)-4-(1-(3,4-dihlorfenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil) heksahidro pirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-on (3.15bb) i (4*S*,8*aS*)-4-(1-(3,4-dihlorfenil) vinil)-2-(4-metoksibenzil) heksahidropirol[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-on (3.15ab)**

Jedinjenja su sintetisana prateći proceduru za jedinjenja **3.15aa/3.15ba** polazeći iz **3.9b** (30,0 mg, 0,105 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (29,0, 0,210 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (2,4 mg, 0,0105 mmol), XantPhos (6,1 mg, 0,0105 mmol) i 1,2-dihlor-4-jodbenzena (28,7 mg, 0,105 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.15bb** u prinosu od 33 % (15,1 mg, 0,035 mmol) kao žuto ulje i jedinjenje **3.15ab** u prinosu od 26 % (11,8 mg, 0,028 mmol) kao žuto ulje.

**TLC:** Rf<sub>3.15bb</sub> 0,40 (Et<sub>2</sub>O = 100 %), Rf<sub>3.15ab</sub> 0,30 (Et<sub>2</sub>O = 100 %).

**3.15bb: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,59 (s, 1H), 7,36 (s, 2H), 7,15 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 5,44 (s, 1H), 5,30 (s, 1H), 4,72 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 4,25 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,65 (dd, *J* = 10,6, 4,7 Hz, 1H), 3,35 (t, *J* = 11,3 Hz, 1H), 3,21 – 3,07 (m, 2H), 2,92 (td, *J* = 8,4, 4,1 Hz, 1H), 2,30 – 2,18 (m, 2H), 2,04 (dt, *J* = 12,9, 9,4 Hz, 1H), 1,87 – 1,71 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,23, 159,09, 144,41, 139,46, 132,46, 131,96, 130,26, 129,45, 128,90, 128,84, 126,25, 118,23, 114,07, 65,07, 62,65, 55,28, 49,60, 49,18, 48,76, 26,96, 21,75.

**IR (ATR) v:** 2920, 2645, 1511, 1244, 1029, 817 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -65,7 (c 0,30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 431,1288, izmereno 431,1303.

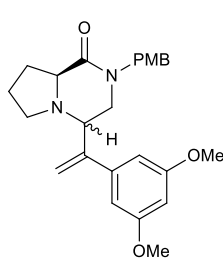
**3.15ab:**  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,38 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H), 7,29 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,14 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 7,03 (dd,  $J = 8,3, 2,0$  Hz, 1H), 6,83 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 5,39 (d,  $J = 24,0$  Hz, 2H), 4,67 (d,  $J = 14,4$  Hz, 1H), 4,30 (d,  $J = 14,4$  Hz, 1H), 3,86 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,46 (dd,  $J = 8,2, 4,2$  Hz, 1H), 3,21 – 3,11 (m, 2H), 3,11 – 3,03 (m, 1H), 2,59 (dd,  $J = 15,9, 9,1$  Hz, 1H), 2,30 – 2,16 (m, 2H), 1,90 – 1,75 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,58, 159,22, 144,85, 140,08, 132,41, 131,65, 130,20, 129,65, 128,86, 128,67, 126,01, 117,36, 114,11, 62,59, 60,79, 55,27, 53,48, 49,04, 48,86, 28,39, 24,10.

**IR (ATR) v:** 2932, 1645, 1511, 1245, 1029, 818  $\text{cm}^{-1}$ .

$[\alpha]_{\text{D}}$  = -7,6 (c 0,50,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}^+]$  431,1288, izmereno 431,1302.



**(4*R*,8*aS*)-4-(1-(3,5-dimetoksifenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)heksahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-on (3.15bc) i (4*S*,8*aS*)-4-(1-(3,5-dimetoksifenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)heksahidropirololo[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-on (3.15ac)**

Jedinjenja su sintetisana prateći proceduru za jedinjenja **3.15aa/3.15ba** polazeći iz **3.9b** (30,0 mg, 0,105 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (29,0, 0,210 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (2,4 mg, 0,0105 mmol), XantPhos (6,1 mg, 0,0105 mmol) i 1-jod-3,5-dimetoksibenzena (27,7 mg, 0,105 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.15bc** u prinosu od 29 % (12,8 mg, 0,030 mmol) kao žuto ulje i jedinjenje **3.15ac** u prinosu od 24 % (10,6 mg, 0,025 mmol) kao žuto ulje.

**TLC:**  $R_{\text{f}3.15\text{bc}}$  0,35 ( $\text{Et}_2\text{O} = 100\%$ ),  $R_{\text{f}3.15\text{ac}}$  0,25 ( $\text{Et}_2\text{O} = 100\%$ ).

**3.15bc:**  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,16 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 6,83 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 6,65 (d,  $J = 2,1$  Hz, 2H), 6,41 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 5,29 (s, 1H), 4,75 (d,  $J = 14,5$  Hz, 1H), 4,20 (d,  $J = 14,5$  Hz, 1H), 3,82 – 3,75 (m, 9H), 3,62 (dd,  $J = 10,3, 4,3$  Hz, 1H), 3,38 (t,  $J = 11,3$  Hz, 1H), 3,16 (dd,  $J = 11,9, 4,6$  Hz, 1H), 3,12 – 3,01 (m, 2H), 2,30 – 2,18 (m, 2H), 2,02 (dt,  $J = 12,3, 10,0$  Hz, 1H), 1,87 – 1,72 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,14, 160,63, 158,97, 146,23, 141,85, 129,45, 129,04, 117,32, 113,98, 105,23, 99,55, 65,42, 63,29, 55,31, 55,25, 50,31, 50,02, 48,65, 26,76, 21,57.

**IR (ATR) v:** 2954, 2835, 1651, 1589, 1155, 846  $\text{cm}^{-1}$ .

$[\alpha]_{\text{D}}$  = -66,7 (c 0,34,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

**HRMS (ESI/Q-TOF):**  $m/z$  izračunato za  $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}^+]$  423,2278, izmereno 423,2296.

**3.15ac:**  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,13 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 6,81 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 6,44 (d,  $J = 2,1$  Hz, 2H), 6,38 (t,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 5,39 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 4,59 (d,  $J = 14,4$  Hz, 1H), 4,35 (d,  $J = 14,5$  Hz, 1H), 3,89 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,76 (s, 6H), 3,53 (dd,  $J = 8,3, 4,2$  Hz, 1H), 3,24 – 3,13 (m, 2H), 3,13 – 3,06 (m, 1H), 2,66 (dd,  $J = 16,3, 8,7$  Hz, 1H), 2,31 – 2,23 (m, 1H), 2,24 – 2,14 (m, 1H), 1,85 (ddd,  $J = 27,5, 14,5, 8,3$  Hz, 2H).

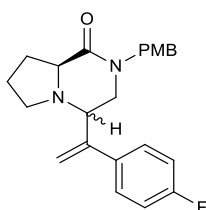


**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,60, 160,62, 160,38, 159,04, 146,91, 142,49, 129,46, 128,96, 125,53, 116,17, 113,99, 105,09, 99,34, 62,30, 61,10, 55,29, 55,21, 53,50, 49,60, 49,13, 30,33, 28,59, 23,95.

**IR (ATR) v:** 2935, 2837, 1645, 1589, 1154, 734 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -9,3 (c 0,30, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>] 423,2278, izmereno 423,229.



**(4*R*,8*aS*)-4-(1-(4-fluorofenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)heksahidropirolu [1,2-*a*]pirazin-1(2H)-on (3.15bd) i (4*S*,8*aS*)-4-(1-(4-fluorofenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)heksahidropirolu[1,2-*a*]pirazin-1(2H)-on (3.15ad)**

Jedinjenja su sintetisana prateći proceduru za jedinjenja **3.15aa/3.15ba** polazeći iz **3.9b** (30,0 mg, 0,105 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (29,0, 0,210 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (2,4 mg, 0,0105 mmol), XantPhos (6,1 mg, 0,0105 mmol) i 1-fluor-4-jodbenzena (23,3mg, 0,105 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.15bd** u prinosu od 39 % (15,4 mg, 0,041 mmol) kao narandžasto ulje i jedinjenje **3.15ad** u prinosu od 29 % (11,7mg, 0,031 mmol) kao narandžasto ulje.

**TLC:** Rf<sub>3.15bd</sub> 0,40 (Et<sub>2</sub>O = 100 %), Rf<sub>3.15ad</sub> 0,35 (Et<sub>2</sub>O = 100 %).

**3.15bd: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,52 – 7,42 (m, 2H), 7,15 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,98 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,83 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,39 (s, 1H), 5,25 (s, 1H), 4,74 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 4,20 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,64 (dd, *J* = 10,9, 4,6 Hz, 1H), 3,36 (t, *J* = 11,2 Hz, 1H), 3,20 – 3,08 (m, 2H), 2,98 (td, *J* = 8,6, 3,9 Hz, 1H), 2,28 – 2,16 (m, 2H), 2,10 – 1,97 (m, 1H), 1,86 – 1,69 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170,26, 159,05, 145,39, 129,47, 129,04, 128,62, 128,54, 128,36, 126,83, 116,90, 115,30, 115,09, 114,03, 65,29, 63,21, 55,27, 49,78, 49,74, 48,75, 26,89, 21,68.

**IR (ATR) v:** 2958, 2835, 1651, 1509, 1245, 842 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -72,1 (c 0,38, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 381,1973, izmereno 381,1992.

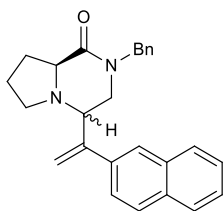
**3.15ad: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,24 – 7,10 (m, 4H), 6,92 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,83 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 5,35 (d, *J* = 24,5 Hz, 2H), 4,69 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 4,26 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 3,88 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,47 (dd, *J* = 8,3, 4,2 Hz, 1H), 3,21 – 3,12 (m, 2H), 3,12 – 3,04 (m, 1H), 2,66 – 2,56 (m, 1H), 2,28 – 2,20 (m, 2H), 1,91 – 1,75 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171,67, 159,18, 145,76, 129,69, 129,65, 129,03, 128,30, 128,22, 126,55, 115,83, 115,24, 115,03, 114,07, 62,84, 60,99, 55,28, 53,52, 49,18, 49,00, 28,38, 24,08.

**IR (ATR) v:** 2903, 1634, 1508, 1245, 840, 816 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -2,1 (c 0,47, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 381,1973, izmereno 381,1992.



**(4*R*,8*aS*)-2-benzil-4-(1-(naftalen-2-il)vinil)heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.15be) i (4*S*,8*aS*)-2-benzil-4-(1-(naftalen-2-il)vinil)heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.15ae)**

Jedinjenja su sintetisana prateći proceduru za jedinjenja **3.15aa/3.15ba** polazeći iz **3.9a** (26,9 mg, 0,105 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (29,0, 0,210 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (2,4 mg, 0,0105 mmol), XantPhos (6,1 mg, 0,0105 mmol) i 2-jodnaftalena (26,7 mg, 0,105 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.15be** u prinosu od 43 % (17,3 mg, 0,045 mmol) kao narandžasto ulje i jedinjenje **3.15ae** u prinosu od 32 % (12,7 mg, 0,033 mmol) kao narandžasto ulje.

**TLC:** Rf<sub>3.15be</sub> 0,60 (Et<sub>2</sub>O = 100 %), Rf<sub>3.15ae</sub> 0,40 (Et<sub>2</sub>O = 100 %).

**3.15be:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,96 (s, 1H), 7,83 - 7,75 (m, 3H), 7,60 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,51 - 7,41 (m, 2H), 7,32 - 7,27 (m, 2H), 7,24 - 7,20 (m, 2H), 5,58 (s, 1H), 5,38 (s, 1H), 4,83 (d, *J* = 14,7 Hz, 1H), 4,27 (d, *J* = 14,7 Hz, 1H), 3,82 (dd, *J* = 10,7, 4,6 Hz, 1H), 3,48 (t, *J* = 11,3 Hz, 1H), 3,23 (dd, *J* = 12,0, 4,7 Hz, 1H), 3,18 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 3,10 (td, *J* = 8,5, 3,6 Hz, 1H), 2,34 - 2,20 (m, 2H), 2,16 - 2,02 (m, 1H), 1,89 - 1,72 (m, 2H), 1,61 - 1,49 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,46, 146,33, 137,03, 136,95, 133,27, 132,96, 128,62, 128,29, 128,06, 127,92, 127,54, 127,41, 126,24, 126,13, 125,68, 125,07, 117,41, 65,47, 63,18, 50,58, 49,98, 49,34, 26,86, 21,67.

**IR (ATR) v:** 3058, 2961, 1645, 1453, 752, 700 cm<sup>-1</sup>.

[α]<sub>D</sub> = -48,0 (c 0,05, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] 383,2118, izmereno 383,2123.

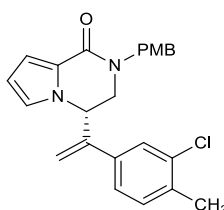
**3.15ae:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,83 - 7,77 (m, 1H), 7,75 - 7,70 (m, 2H), 7,66 (s, 1H), 7,50 - 7,44 (m, 2H), 7,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,30 - 7,26 (m, 2H), 7,22 - 7,16 (m, 2H), 5,53 (d, *J* = 4,4 Hz, 2H), 4,72 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H), 4,37 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H), 3,95 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 3,73 (dd, *J* = 8,7, 4,0 Hz, 1H), 3,31 - 3,19 (m, 2H), 3,18 - 3,12 (m, 1H), 2,75 - 2,67 (m, 1H), 2,32 - 2,21 (m, 2H), 1,94 - 1,80 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171,85, 146,71, 137,53, 136,98, 133,23, 132,84, 128,67, 128,19, 127,94, 127,56, 127,53, 126,20, 126,04, 125,16, 125,02, 116,42, 62,42, 61,18, 53,65, 50,01, 49,74, 28,55, 24,06.

**IR (ATR) v:** 3058, 2922, 1652, 1454, 753, 701 cm<sup>-1</sup>.

[α]<sub>D</sub> = 0,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] 383,2118, izmereno 383,2124.



**(*S*)-4-(1-(3-hlor-4-metilfenil)vinil)-2-(4-metoksibenzil)-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.16)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.11b** polazeći iz **3.15ba** (320 mg, 0,78 mmol) i MnO<sub>2</sub> (1716 mg, 19,5 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.16** u prinosu od 56 % (178 mg, 0,44 mmol) kao

svetlo žuto ulje.

**TLC:** Rf 0,20 (PE : Et<sub>2</sub>O = 1 : 1).

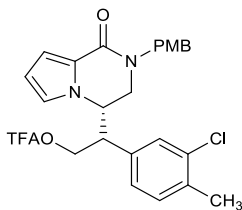
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,13- 7,08 (m, 3H), 7,06 - 7,02 (m, 2H), 6,83 - 6,75 (m, 4H), 6,39 - 6,24 (m, 1H), 5,24 (s, 1H), 5,12 - 5,06 (s, 1H), 4,76 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H), 4,34 - 4,22 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,75 (dd, *J* = 12,9, 4,7 Hz, 1H), 3,25 (dd, *J* = 12,8, 2,8 Hz, 1H), 2,35 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 159,13, 144,51, 137,49, 136,08, 134,64, 131,06, 129,87, 128,92, 128,66, 126,98, 126,50, 125,00, 124,61, 122,88, 116,50, 113,92, 113,72, 110,49, 57,15, 55,24, 48,45, 48,17, 19,76.

**IR (ATR) v:** 2912, 2835, 1634, 1243, 1072, 733 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -72,5 (c 0,20, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>] 407,1521, izmereno 407,1526.



**(S)-4-((S)-1-(3-hlor-4-metilfenil)-2-hidroksietil)-2-(4-metoksibenzil)-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.17a) i (S)-2-(3-hlor-4-metilfenil)-2-((S)-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazin-4-il)etil 2,2,2-trifluoroacetat (3.17)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.12** polazeći iz **3.16** (170 mg, 0,42 mmol), 9-BBN (0,5 M rastvor u THF-u) (2,52 mL, 1,26 mmol), potom rastvora NaOH (1M, 3,77 mL) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 wt %/vol, 0,46 mL) pri čemu je dobijen sirov proizvod **3.17a**. Sirov proizvod rastvoren je u TFA (5 mL) i potom je dodat anizol (90,1 mg, 0,84 mmol). Nakon obrade reakcije kao kod jedinjenja **3.12** dobijeno je jedinjenje **3.17** u ukupnom prinosu od 32 % (53,9 mg, 0,134 mmol) kao svetlo žuto ulje.

**TLC:** Rf<sub>3.17a</sub> 0,5 (Et<sub>2</sub>O = 100 %), Rf<sub>3.17</sub> 0,3 (Et<sub>2</sub>O = 100 %).

**3.17a: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,13 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,06 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,01 (s, 2H), 6,97 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,61 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,28 - 6,19 (m, 1H), 4,68 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 4,53 (dd, *J* = 10,9, 3,5 Hz, 1H), 4,28 (d, *J* = 14,4 Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,69 (dd, *J* = 12,9, 4,1 Hz, 1H), 3,50 - 3,38 (m, 2H), 3,01 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 2,95 - 2,85 (m, 1H), 2,34 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 159,43, 159,17, 138,47, 135,21, 134,70, 131,26, 130,05, 129,07, 128,58, 126,87, 124,37, 123,50, 114,05, 109,56, 63,04, 55,25, 54,51, 48,72, 48,39, 47,73, 19,71.

**IR (ATR) v:** 3376, 2919, 2870, 2161, 1616, 751 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -91,0 (c 0,10, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 425,1626, izmereno 425,1637.

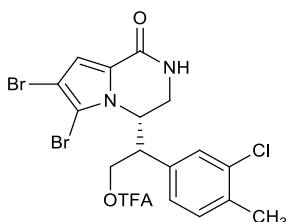
**3.17: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,31 (s, 1H), 7,26 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,38 - 6,24 (m, 1H), 4,58 (dd, *J* = 10,9, 2,7 Hz, 1H), 4,40 (dd, *J* = 11,2, 2,4 Hz, 1H), 4,04 (dd, *J* = 11,3, 4,8 Hz, 1H), 3,79 (dd, *J* = 13,0, 3,7 Hz, 1H), 3,57 (dd, *J* = 7,2, 3,6 Hz, 1H), 3,20 (dd, *J* = 12,9, 4,8 Hz, 1H), 2,38 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 161,31, 157,19, 156,84, 156,41, 136,55, 136,22, 135,38, 131,94, 128,55, 126,44, 124,00, 123,31, 114,87, 110,31, 68,15, 54,80, 45,24, 42,93, 19,75.

**IR (ATR) v:** 3298, 2923, 1545, 1330, 1061, 742 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -44,5 (c 0,20, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 401,0874, izmereno 401,0885.



**(S)-2-(3-hlor-4-metilfenil)-2-((S)-6,7-dibromo-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazin-4-il)etil 2,2,2-trifluoroacetat (3.18)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.13** polazeći iz **3.17** (25 mg, 0,062 mmol) i NBS (23 mg, 0,124 mmol) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.18** u prinosu od 75 % (26 mg, 0,046 mmol) kao žuto ulje.

**TLC:** R<sub>f</sub> 0,35 (Et<sub>2</sub>O = 100 %).

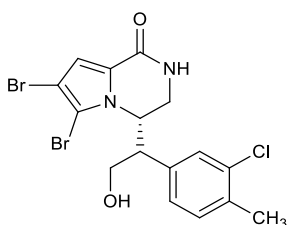
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,30 - 7,24 (m, 2H), 7,11 - 7,05 (m, 2H), 6,19 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,63 (dd, J = 10,5, 2,7 Hz, 1H), 4,53 (dd, J = 11,3, 7,0 Hz, 1H), 4,26 (dd, J = 11,3, 5,4 Hz, 1H), 3,72 (dd, J = 13,2, 3,6 Hz, 1H), 3,67 - 3,58 (m, 1H), 3,23 (dd, J = 13,2, 4,5 Hz, 1H), 2,39 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 158,76, 156,95, 156,52, 136,92, 135,51, 135,41, 132,03, 128,42, 126,36, 125,53, 125,12, 117,19, 107,74, 101,69, 67,53, 55,19, 46,09, 43,02, 19,80.

**IR (ATR) v:** 3234, 1775, 1705, 1335, 1181, 749 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = -6,0 (c 0,10, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sup>+</sup>] 556,9085, izmereno 556,9075.



**(S)-6,7-dibromo-4-((S)-1-(3-hlor-4-metilfenil)-2-hidroksietil)-3,4-dihidropirol[1,2-a]pirazin-1(2H)-on (3.19)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu jedinjenja **3.14** polazeći iz **3.18** (15 mg, 0,029 mmol) i NaOH (0,1 mL, 1M) pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.19** u prinosu od 99 % (13,2 mg, 0,029 mmol) kao žuto ulje.

**TLC:** R<sub>f</sub> 0,40 (EtOAc = 100 %).

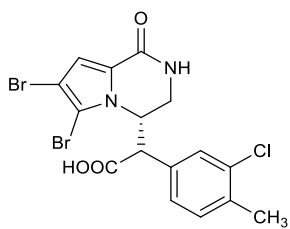
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,29 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 7,26 - 7,22 (m, 1H), 7,12 - 7,05 (m, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,29 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,52 (dd, J = 10,2, 3,0 Hz, 1H), 3,88 (dd, J = 10,6, 8,9 Hz, 1H), 3,67 (dd, J = 13,2, 3,7 Hz, 1H), 3,50 (dd, J = 10,8, 4,6 Hz, 1H), 3,42 - 3,32 (m, 1H), 3,23 (dd, J = 13,1, 5,3 Hz, 1H), 2,37 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 158,90, 137,55, 136,12, 135,29, 131,83, 128,65, 126,80, 125,20, 116,60, 108,05, 101,10, 63,35, 55,59, 49,73, 42,94, 19,77.

**IR (ATR) v:** 3310, 2879, 1660, 1335, 1053, 749 cm<sup>-1</sup>.

**[α]<sub>D</sub>** = +12,5 (c 0,20, CH<sub>3</sub>OH).

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za  $[C_{16}H_{15}Br_2ClN_2O_2 + H^+]$  460,9262, izmereno 460,9276.



**2-(3-hlor-4-metilfenil)-2-((S)-6,7-dibromo-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirol[1,2-a]pirazin-4-il) sirćetna kiselina (3.20)**

Jedinjenje je sintetisano prateći proceduru za sintezu **longamida B** polazeći iz **3.19** (4,00 mg, 0,009 mmol), BAIB (7,24 mg, 0,022 mmol),  $NaHCO_3$  (3,00 mg, 0,036 mmol) i TEMPO (0,15 mg, 0,001 mmol). Sirovi proizvod dobijen u ovoj reakciji prečišćen je hromatografijom na koloni pri čemu je dobijeno jedinjenje **3.20** kao nerazdvojiva smesa dijastereoizomera (44 % : 56 %) u prinosu od 83 % (3,56 mg, 0,007 mmol) u vidu svetlo žute amorfne supstance.

**TLC:** Rf 0,50 (EtOAc = 100 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )** smesa dijastereoizomera (44 % : 56 %),  $\delta$  7,42 (bs, 1H), 7,19 (s, 0,5H), 7,16 – 7,09 (m, 1,5H), 7,01 - 6,85 (m, 2H), 4,86 - 4,78 (m, 1H), 4,03 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 3,93 - 3,77 (m, 1,5H), 3,76 - 3,72 (m, 0,5H), 2,34 - 2,27 (m, 3H).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )** smesa dijastereoizomera (44 % : 56 %)  $\delta$  159,96, 159,18, 136,73, 134,86, 132,07, 131,43, 131,31, 129,42, 127,35, 125,03, 116,51, 108,65, 101,68, 55,79, 55,00, 53,19, 42,39, 29,70, 19,76.

**IR (ATR) v:** 3255, 2923, 2498, 2161, 1201, 751  $cm^{-1}$ .

**HRMS (ESI/Q-TOF):** m/z izračunato za  $[C_{16}H_{13}Br_2ClN_2O_3 + H^+]$  474,9054, izmereno 474,9068.

## 4.2 Određivanje provodljivosti i površinskog napona

Provodljivost rastvora ispitivanih jedinjenja merena je u cilju određivanja njihove kritične micelarne koncentracije. Merenja provodljivosti izvedena su na 23 °C digitalnim konduktometrom SensION 5 (Hach, USA) sa preciznošću od 0.5 %, korišćenjem 51975 probe. Vrednosti CMC ispitivanih rastvora određene su konvencionalnom metodom (Williams-ova metoda) kao i metodom predloženom od strane Carpena-e i saradnika.<sup>168</sup> Površinski naponi određeni su stalagmometrom (Traube stalagmometer Neubert Glass BN033010208), i metodom brojanja kapi. Sva merenja površinskog napona vršena su na temperaturi od 23,0 °C.

## 4.3 Određivanje biodegradabilnosti (metoda zatvorene boce)

Test zatvorene boce za određivanje biodegradabilnosti jedinjenja urađen je po nacionalnom standardu SRPS ISO 10707: 1994 pod nazivom: *Kvalitet vode - Procena "potpune" aerobne biorazgradivosti organskih jedinjenja u vodenoj sredini - Metoda analize biohemijske potrošnje kiseonika (metoda zatvorene boce)*.<sup>169</sup> Korišćen je preadaptirani mikroorganizam iz reke Save. Vodeni medijum (pH 7.2) sadržao je minerale i mikronutrijente neophodne za podržavanje bakterijske aktivnosti (2.75 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.252 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.32 g/L KCl i 0.0018 g/L FeSO<sub>4</sub>). Testirane formulacije dodate su u medijum sa mikroorganizmom kako pri čemu je dobijena koncentracija od 100 mg/L. Svaki uzorak inokulisan je sa 1 mL suspenzije anaerobnog mikroorganizma koncentracije 15 g/L. Uzorci su ostavljeni u inkubator (Velp Scientifica FOC 120E, Italy) pri čemu je temperatura održavana na 25 °C. Biodegradabilnost je merena na svakih 5 dana u trajanju od maksimalnih 28 dana, korišćenjem senzorskog sistema (Sensor system 6 Velp Scientifica, Italy).

## 4.4 Merenje moći penjenja

Određivanje zapremine pene urađeno je po nacionalnom standardu SRPS ISO 696: 2000 pod nazivom: *Površinski aktivne materije - Merenje moći penjenja - Modifikovana metoda po Rosu i Majlsu*.<sup>170</sup>

Evaluacija moći penjenja ispitivanih jedinjenja urađena je merenjem zapremine pene nakon slobodnog protoka 0,4% rastvora ispitivanih jedinjenja. Rezervoar je pozicioniran na takav način da je izlazna cev pozicionirana iznad centra prijemnog suda a udaljenost do dna suda 1 m.

## 4.5 Bakterijski sojevi i njihova kultivacija

U biološkim ispitivanjima korišćeni su sojevi *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NCTC 10332), *Candida albicans* (ATCC 1023) i *C. albicans* (SC 5314) (ATCC MYA-2876; GFP i RFP sojevi dobijeni su ljubaznošću prof Bernhard Hube-a, Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology Hans Knoell Institute, Jena, Germany). *P. aeruginosa* je gajena u Luria Bertani bujonu sledećeg sadržaja (**LB**; 10 g/L peptona, 5 g/L ekstrakta kvasca, 5 g/L NaCl, pH 7.2). *C. albicans* sojevi su gajeni u Sabouraud bujonu sledećeg sadržaja (**SAB**; 10 g/L peptona, 40 g/L dekstroze, pH 5.6) u rotirajućem šejkeru na 180 obrtaj/min na 37°C.

## 4.6 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Minimalna inhibitorna koncentracija testiranih jedinjenja određena je standardnom mikrodilucionom metodom po protokolu Nacionalnog Komiteta za kliničke i laboratorijske standarde (eng. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (M07-A8 i M27-A3, za bakterije odnosno gljive).<sup>171,172</sup> Eksperiment je rađen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna. Za rastvaranje jedinjenja korišćen je DMSO. Napravljen je osnovni rastvor sa koncentracijama od 50 mg/mL. Najviša testirana koncentracija bila je 500 µg/mL a najmanja 0,5 µg/mL. Kulture su razblažene tako da se u svakom bunarčiću nalazilo 10<sup>8</sup> CFU/mL (eng. CFU-colony-forming unit) bakterijske vrste odnosno 10<sup>5</sup> CFU/mL fungalne vrste. Nakon inokulacije (t=0) kao i nakon inkubacije od 24 h na 37°C merena je na optička gustina (eng. Optical Density, OD) na aparatu Tecan Infinite 200 Pro Multiplate Reader (Tecan, Švajcarska). Minimalna inhibitorna koncentracija je utvrđivana kao najniža koncentracija testiranog jedinjenja koja inhibira vidljivi rast nakon 24 h tretmana.

## 4.7 Uticaj jedinjenja na međucelijsku komunikaciju *S. marcescens* i *C. violaceum* u testu sa diskovima

Prekonočne kulture vrste *S. marcescens* i *C. violaceum* CV026 pripremane su u LB hranljivoj podlozi i gajene na 180 obrt/min na orbitalnoj mešalici na 30 °C. Ovako pripremljene kulture razblažene su 100 puta u polučvrstoj LA podlozi i razlivane u Petrijeve šolje. Za pripremanje Petrijevih šolja za disk test, u bakterijsku kulturu *C. violaceum* CV026, dodavan je i N-heksanoil-L-homoserin lakton (HHL), inducer proizvodnje ljubičastog pigmenta violaceina, u finalnoj koncentraciji 5 µM.<sup>139</sup> Po stezanju polučvrstog agara stavljeni su sterilni diskovi na površinu podloge, i na njih nanošena jedinjenja u koncentraciji od 500 µg/disku. Inhibitorno dejstvo testiranih jedinjenja detektovano je kao zona odsustva sinteze pigmenta oko diska.

## 4.8 Uticaj jedinjenja na disperziju već formiranog biofilma

Aktivnost jedinjenja na disperziju biofilma ispitivana je na razvijenom biofilmu *P. aeruginosa* i *C. albicans* u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića zaobljenog dna (eng. *round bottom plates*) metodom koja je ranije opisana u literaturi.<sup>173,174</sup> Biofilmovi su formirani tokom 24 h u uslovima koji odgovaraju korišćenom soju. Nakon inkubacije planktonske ćelije su uklonjene, a ploča isprana dva puta sterilnim PBS puferom. Ovako isprane ćelije sakupljene su centrifugiranjem i resuspendovane u RPMI-1640 sa 2% glukoze pri čemu je podešena gustina ćelija na 1 × 10<sup>6</sup> ćelija/mL korišćenjem Neubauer hemocitometra. Biofilmovi su formirani korišćenjem inkubacijom pripremljenih suspenzija ćelija (100 µL) u bunarićima 24 h na 37°C. Formirani biofilmovi isprani su PBS puferom i tretirani rastvorima testiranih jedinjenja u koncentracionom opsegu od 100 do 6,25 µg/mL u trajanju od 24 h na 37°C. Nakon inkubacije biofilmovi su isprani dva puta sterilnim PBS puferom, a adherirane ćelije obojene kristal violetom (0.1% v/v). Apsorbanca je merena na 590 nm na Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

## **4.9 Uticaj jedinjenja na formiranje biofilmova kod *P. aeruginosa* PAO1 i *C. albicans***

Testiranje jedinjenja na proces formiranja biofilmova izabranih sojeva rađeno je u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića (Kartel, Italija). Prekonoćne kulture su razblaživane do optičke gustine (eng. Optical Density, OD)  $OD_{600}$  0,05. U bunarčiće je sipano po 100  $\mu$ l ovako razblažene kulture u prisustvu subinhibitornih koncentracija jedinjenja. Svaka koncentracija jedinjenja (u opsegu od 100-1.5  $\mu$ g/mL) testirana je u minimum šest ponovaka, zajedno sa kontrolama, sterilnosti i kontrole formiranja biofilma (DMSO 0,1%, v/v). Tako pripremljene ploče inkubirane su u uslovima odgovarajućim za ispitivani soj. Nakon inkubacije, planktonske ćelije uklonjene su iz bunarčića, a ploča je ispirana dva puta uranjanjem u posude sa destilovanom vodom i potom osušena. Ukupna biomasa biofilma obojena je dodavanjem 150  $\mu$ l kristal violeta (0,1 %, v/v, Serva, Nemačka), nakon čega je ploča inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi. Ploča je na isti način isprana i osušena, a zatim je boja rastvorena dodavanjem 150  $\mu$ l sirćetne kiseline (33%, v/v, Serva, Nemačka). Kvantifikacija biofilma je određivana merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 590 nm na aparatu Tecan Infinite 200 Pro Multiplate Reader (Tecan Group Ltd., Švajcarska). Inhibicija biofilma je izražavana kao razlika u procentu formiranog biofilma u odnosu na netretiran biofilm testiranih sojeva. Vrednosti inhibicije biofilma grafički su analizirane u odnosu na logaritam koncentracije. Nelinearnom regresionom analizom korišćenjem Graphpad Prism software verzija 5.0 za Windows (Graphpad Software, CA, USA) dobijena je sigmoidalna kriva dozne zavisnosti. Inhibicija formiranja biofilma odabranih jedinjenja izražena je kao koncentracija jedinjenja koja inhibira formiranje biofilma za 50 % (BFIC<sub>50</sub>). Biofilmovi *C. albicans* SC5314 takođe su ispitivani i fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, USA) pri 20 x uvećanju.<sup>59</sup>

## **4.10 Uticaj jedinjenja na *C. albicans* adheziju na ćelije**

Sposobnost *C. albicans* SC5314 da adherira na A549 ćelije (ćelije humanog epitelijalnog adenokarcinoma, dobijene od strane American Type Culture Collection) ispitivana je u prisustvu odabranih jedinjenja metodom prethodno opisanom od strane Wachtlera i saradnika.<sup>175</sup> *C. albicans* ćelije su dodate monosloju A549 ćelija i ko-inkubirane 1 h u RPMI-1640 medijumu bez dodatog seruma, sa ili bez dodatka testiranih jedinjenja u koncentracijama od 25  $\mu$ g/mL na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Adherirane ćelije *C. albicans* vizuelizovane su fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, USA) pri 20 × uvećanju.

## **4.11 Uticaj jedinjenja na prelazak *C. albicans* iz kvasolikog u filamentozni oblik**

Morfološke promene *C. albicans* u prisustvu i odsustvu odabranih jedinjenja pri subinhibitornim koncentracijama (MIC<sub>80</sub>; 80% MIC vrednosti za planktonski rast) promatrane su nakon rasta *C. albicans* na Spider podlozi kao što je prethodno opisano u literaturi od strane Raja Mohamed-a i saradnika.<sup>176</sup>



## 4.12 Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja na ćelijama MRC5 ćelijske linije

Citotoksičnost (anti-proliferativna aktivnost) ramnolipida i sintetisanih amino- i pepidnih derivata određivana je standardnom kolorimetrijskom metodom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) ustanovljenoj od strane Hansena i saradnika.<sup>177</sup> Metabolički aktivne ćelije se izdvajaju na osnovu svoje redukcionne sposobnosti, što se vizualizuje prelaskom MTT iz žute boje u ljubičastu koju daje formazan.

MRC5 ćelije se čuvane u krioprotektivnoj podlozi u tečnom azotu do potreba eksperimenata, a oživljavane se u RPMI-1640 podlozi (Sigma-Aldrich, Nemačka) sa dodatkom 100 µg/ml streptomocina (Sigma-Aldrich, Nemačka), 100 U/ml penicilina (Sigma-Aldrich, Nemačka) i 10% (v/v) goveđeg fetalnog seruma (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, Nemačka). Ovako pripremljena suspenzija ćelija stavljana je u plastične posude za gajenje ćelijskih kultura (Sarstedt, Nemačka) u inkubatoru sa 5% CO<sub>2</sub> i na temperaturi od 37 °C do tri dana kada se formira konfluentan sloj ćelija. Nakon isteka inkubacije formirani ćelijski sloj je prvo ispiran sterilnim PBS puferom, a onda su ćelije odvajane od podloge tretmanom sa 1% tripsin-EDTA rastvorom (Sigma-Aldrich, Nemačka) uz inkubaciju na 37 °C, u trajanju od 2 do 3 minuta. Tako pripremljene ćelije su mešane sa RPMI podlogom i prebačene u nove plastične posude, do postavke eksperimenta. U mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija) dodavano je 1×10<sup>4</sup> ćelije po bunarčiću, zajedno sa jedinjenjima u subinhibitornim koncentracijama (od 0,1 do 250 µg/mL). Kao kontrola je korišćen 1% DMSO. Nakon inkubacije od 48 h dodavan je MTT. Ćelije su inkubirane na 37<sup>o</sup> C u prisustvu 5% CO<sub>2</sub> u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije podloga je uklonjena i dodat je DMSO (50 µl, 100% DMSO), da bi se rastvorili kristali formiranog formazana. Na aparatu Tecan Infinite 200 pro Multiplate Reader (Tecan, Švajcarska) merena je apsorbanca na talasnoj dužini 540 nm. Uticaj jedinjenja je izražavan u odnosu na kontrolu (1% DMSO). Inhibicija rasta ćelija za 50% predstavljala je IC<sub>50</sub> vrednost.

## 5. REFERENCE

- [1] I. M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. G. Martinotti, L. Fracchia, T. J. Smyth and R. Marchant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **87**, 427–444.
- [2] G. Georgiou, S.C. Lin and M. M. Sharma, *Nat. Biotechnol.*, 1992, **10**, 60–65.
- [3] H. Razafindralambo, M. Paquot, A. Baniel, Y. Popineau, C. Hbid, P. Jacques and P. Thonart, *J Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 149–151.
- [4] A. Kretschmer, H. Bock and F. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, **44**, 864–870.
- [5] O. Pornsunthorntawe, P. Wongpanit, S. Chavadej, M. Abe and R. Rujiravanit, *Bioresour. Technol.*, 2008, **99**, 1589–1595.
- [6] I. M. Banat, S. K. Satpute, S. S. Cameotra, R. Patil and N. V. Nyayanit, *Front. Microbiol.*, 2014, **5**, 697.
- [7] I. M. Banat, R. S. Makkar and S. S. Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **53**, 495–508.
- [8] Z. Zeng, Y. Liu, H. Zhong, R. Xiao, G. Zeng, Z. Liu, M. Cheng, C. Lai, C. Zhang, G. Liu and L. Qin, *Sci. Total Environ.*, 2018, **634**, 1–11.
- [9] K. R. Meena and S. S. Kanwar, *Biomed. Res. Int.*, DOI:10.1155/2015/473050.
- [10] A. de J. Cortés-Sánchez, H. Hernández-Sánchez and M. E. Jaramillo-Flores, *Microbiol. Res.*, 2013, **168**, 22–32.
- [11] K. K. Sekhon Randhawa and P. K. S. M. Rahman, *Front. Microbiol.*, 2014, **5**, 454.
- [12] V. U. Irerere, T. J. Smyth, D. Cobice, S. McClean, R. Marchant and I. M. Banat, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, **102**, 6163–6174.
- [13] M. Nitschke, S. G. V. A. O. Costa and J. Contiero, *Biotechnol. Progr.*, 2005, **21**, 1593–1600.
- [14] M. M. Müller, J. H. Kügler, M. Henkel, M. Gerlitzki, B. Hörmann, M. Pöhnlein, C. Syltatk and R. Hausmann, *J. Biotechnol.*, 2012, **162**, 366–380.
- [15] M. S. Davis and R. E. Tranquada, *Med. Care*, 1969, **7**, 105–117.
- [16] P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer and A. P. Tulloch, *Can. J. Chem.*, 1961, **39**, 846–855.
- [17] K. Arima, A. Kakinuma and G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, **31**, 488–494.
- [18] F. G. Jarvis and M. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 4124–4126.
- [19] J. R. Edwards and J. A. Hayashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1965, **111**, 415–421.
- [20] M. Irfan-Maqsood and M. Seddiq-Shams, *Ind. Biotechnol. (New Rochelle NY)*, 2014, **10**, 285–291.
- [21] D. Dubeau, E. Déziel, D. E. Woods and F. Lépine, *BMC Microbiol.*, 2009, **9**, 263.
- [22] A. P. Rooney, N. P. J. Price, K. J. Ray and T.-M. Kuo, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, **295**, 82–87.
- [23] M. Hošková, O. Schreiberová, R. Ježdík, J. Chudoba, J. Masák, K. Sigler and T. Řezanka, *Bioresour. Technol.*, 2013, **130**, 510–516.
- [24] N. W. Gunther, A. Nuñez, W. Fett and D. K. Y. Solaiman, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 2288–2293.
- [25] M. M. Müller, B. Hörmann, M. Kugel, C. Syltatk and R. Hausmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **89**, 585–592.
- [26] A. Nickzad and E. Déziel, *Let. Appl. Microbiol.*, 2014, **58**, 447–453.
- [27] S. D. Wadekar, S. B. Kale, A. M. Lali, D. N. Bhowmick and A. P. Pratap, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2012, **42**, 249–266.
- [28] E. O. Ehinmitola, E. F. Aransiola and O. P. Adeagbo, *S. Afr. J. Chem. Eng.*, 2018, **26**, 42–48.
- [29] A. Wittgens and F. Rosenau, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, **102**, 8175–8185.

- [30] A. M. Abdel-Mawgoud, F. Lépine and E. Déziel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **86**, 1323–1336.
- [31] I. Mnif, S. Ellouz-Chaabouni and D. Ghribi, *J. Polym. Environ.*, 2018, **26**, 2192–2206.
- [32] R. B. Lovaglio, F. J. dos Santos, M. Jafelicci and J. Contiero, *Colloids Surf. B.*, 2011, **85**, 301–305.
- [33] T. T. Nguyen, N. H. Youssef, M. J. McInerney and D. A. Sabatini, *Water Res.*, 2008, **42**, 1735–1743.
- [34] Q. Wang, X. Fang, B. Bai, X. Liang, P. J. Shuler, W. A. Goddard and Y. Tang, *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, **98**, 842–853.
- [35] R. K. Hommel, in *Biochemistry of microbial degradation*, ed. C. Ratledge, Springer Netherlands, Dordrecht, 1994, pp. 63–87.
- [36] C. N. Mulligan and S. Wang, *Eng. Geol.*, 2006, **85**, 75–81.
- [37] T. Bjarnsholt, O. Ciofu, S. Molin, M. Givskov and N. Høiby, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, **12**, 791–808.
- [38] H. Anwar, M. K. Dasgupta and J. W. Costerton, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, **34**, 2043–2046.
- [39] T. B. Rasmussen and M. Givskov, *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, **296**, 149–161.
- [40] M. Burmølle, T. R. Thomsen, M. Fazli, I. Dige, L. Christensen, P. Homøe, M. Tvede, B. Nyvad, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, C. Moser, K. Kirketerp-Møller, H. K. Johansen, N. Høiby, P. Ø. Jensen, S. J. Sørensen and T. Bjarnsholt, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2010, **59**, 324–336.
- [41] M. E. Davey, N. C. Caiazza and G. A. O’Toole, *J. Bacteriol.*, 2003, **185**, 1027–1036.
- [42] W. M. Dunne, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, **15**, 155–166.
- [43] Y. Zhang and R. M. Miller, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 2101–2106.
- [44] R. J. Pieters, *Med. Res. Rev.*, 2007, **27**, 796–816.
- [45] R. A. Al-Tahhan, T. R. Sandrin, A. A. Bodour and R. M. Maier, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 3262–3268.
- [46] H. Zhong, G. M. Zeng, J. X. Liu, X. M. Xu, X. Z. Yuan, H. Y. Fu, G. H. Huang, Z. F. Liu and Y. Ding, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **79**, 671–677.
- [47] S. R. Schooling, U. K. Charaf, D. G. Allison and P. Gilbert, *Biofilms*, 2004, **1**, 91–99.
- [48] T. Köhler, L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden and J.-C. Pechère, *J. Bacteriol.*, 2000, **182**, 5990–5996.
- [49] C. N. Mulligan and B. F. Gibbs, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**, 3016–3019.
- [50] U. A. Ochsner, A. K. Koch, A. Fiechter and J. Reiser, *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, 2044–2054.
- [51] R. S. Reis, A. G. Pereira, B. C. Neves and D. M. G. Freire, *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 6377–6384.
- [52] D. H. Dusane, Y. V. Nancharaiah, S. S. Zinjarde and V. P. Venugopalan, *Colloids Surf. B.*, 2010, **81**, 242–248.
- [53] L. V. de Araujo, F. Abreu, U. Lins, L. M. de M. S. Anna, M. Nitschke and D. M. G. Freire, *Food Res. Int.*, 2011, **44**, 481–488.
- [54] M. Zezzi do Valle Gomes and M. Nitschke, *Food Control*, 2012, **25**, 441–447.
- [55] D. H. Dusane, S. Dam, Y. V. Nancharaiah, A. R. Kumar, V. P. Venugopalan and S. S. Zinjarde, *Aquat. Biosyst.*, 2012, **8**, 17.
- [56] M. Sodagari, H. Wang, B. Z. Newby and L.-K. Ju, *Colloids Surf. B.*, 2013, **103**, 121–128.
- [57] N. Singh, S. C. Pemmaraju, P. A. Pruthi, S. S. Cameotra and V. Pruthi, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, **169**, 2374–2391.

- [58] I. Aleksic, M. Petkovic, M. Jovanovic, D. Milivojevic, B. Vasiljevic, J. Nikodinovic-Runic and L. Senerovic, *Front. Microbiol.*, 2017, **8**, 2454.
- [59] M. Jovanovic, J. Radivojevic, K. O'Connor, S. Blagojevic, B. Begovic, V. Lukic, J. Nikodinovic-Runic and V. Savic, *Bioorg. Chem.*, 2019, **87**, 209–217.
- [60] H. B. Sheth, K. K. Lee, W. Y. Wong, G. Srivastava, O. Hindsgaul, R. S. Hodges, W. Paranchych and R. T. Irvin, *Mol. Microbiol.*, 1994, **11**, 715–723.
- [61] G. S. Shetye, N. Singh, C. Jia, C. D. K. Nguyen, G. Wang and Y.-Y. Luk, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 1514–1523.
- [62] C.-P. Chen, S.-C. Song, N. Gilboa-Garber, K. S. S. Chang and A. M. Wu, *Glycobiology*, 1998, **8**, 7–16.
- [63] A. Imberty, M. Wimmerová, E. P. Mitchell and N. Gilboa-Garber, *Microb. Infect.*, 2004, **6**, 221–228.
- [64] R. Ramphal, S. K. Arora and B. W. Ritchings, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, **154**, S170–S174.
- [65] K. E. Boyle, S. Heilmann, D. van Ditmarsch and J. B. Xavier, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013, **16**, 207–212.
- [66] J. de Freitas Ferreira, E. A. Vieira and M. Nitschke, *Food Res. Int.*, 2019, **116**, 737–744.
- [67] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira and A. Manresa, *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 2004, **85**, 1–8.
- [68] E. Haba, A. Pinazo, O. Jauregui, M. J. Espuny, M. R. Infante and A. Manresa, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **81**, 316–322.
- [69] M. M. Burger, L. Glaser and R. M. Burton, *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 2595–2602.
- [70] G. Hauser and M. L. Karnovsky, *J. Biol. Chem.*, 1957, **224**, 91–105.
- [71] U. A. Ochsner, T. Hembach and A. Fiechter, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1996, **53**, 89–118.
- [72] R. M. Maier and G. Soberón-Chávez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **54**, 625–633.
- [73] T. B. Lotfabad, N. Ebadipour and R. RoostaAzad, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2016, **91**, 1368–1377.
- [74] S. Lang and D. Wullbrandt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 22–32.
- [75] L. Dobler, L. F. Vilela, R. V. Almeida and B. C. Neves, *N. Biotechnol.*, 2016, **33**, 123–135.
- [76] Q. Li, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 2017, **11**, 27–36.
- [77] H. Chong and Q. Li, *Microb. Cell Fact.*, 2017, **16**, 137.
- [78] L. F. D. Tavares, P. M. Silva, M. Junqueira, D. C. O. Mariano, F. C. S. Nogueira, G. B. Domont, D. M. G. Freire and B. C. Neves, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97**, 1909–1921.
- [79] P. Westerduin, P. E. de Haan, M. J. Dees and J. H. van Boom, *Carbohydr. Res.*, 1988, **180**, 195–205.
- [80] D. Horton, Ed., in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, 1999, vol. 54.
- [81] R. K. Ness and H. G. Fletcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 4710–4714.
- [82] B. Fraser-Reid, U. E. Udodong, Z. Wu, H. Ottosson, J. R. Merritt, C. S. Rao, C. Roberts and R. Madsen, *Synlett*, 1992, **1992**, 927–942.
- [83] D. R. Mootoo, Peter. Konradsson, Uko. Udodong and Bert. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 5583–5584.
- [84] B. Fraser-Reid and J. C. López, *Top. Curr. Chem.*, 2011, **301**, 1–29.
- [85] S. V. Ley and H. W. M. Priepke, *Angew. Chem.*, 1994, **33**, 2292–2294.
- [86] H. I. Duynstee, M. J. van Vliet, G. A. van der Marel and J. H. van Boom, *Eur. J. Org. Chem.*, 1998, **1998**, 303–307.
- [87] C. Schuerch and J. M. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 492–496.

- [88] J. Bauer and J. Rademann, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 7296–7297.
- [89] J. Bauer, K. Brandenburg, U. Zähringer and J. Rademann, *Chem. Eur. J.* 2006, **12**, 7116–7124.
- [90] M. Elofsson, B. Walse and J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 7613–7616.
- [91] M. R. Lefever, L. Z. Szabò, B. Anglin, M. Ferracane, J. Hogan, L. Cooney and R. Polt, *Carbohydr. Res.*, 2012, **351**, 121–125.
- [92] R. Palos Pacheco, R. J. Eismin, C. S. Coss, H. Wang, R. M. Maier, R. Polt and J. E. Pemberton, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 5125–5132.
- [93] D. Seebach and M. G. Fritz, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999, **25**, 217–236.
- [94] I. Grangemard, J. M. Bonmatin, J. Bernillon, B. C. Das and F. Peypoux, *J. Antibiot.*, 1999, **52**, 363–373.
- [95] M. Sailer, K. I. Dubicki and J. L. Sorensen, *Synth.*, 2015, **47**, 79–82.
- [96] B. Menhour, P. Mayon, K. Plé, S. Bouquillon, S. Dorey, C. Clément, M. Deleu and A. Haudrechy, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 1159–1161.
- [97] B. Menhour, F. O. Akong, P. Mayon, K. Plé, S. Bouquillon, S. Dorey, C. Clément, M. Deleu, D. Harakat and A. Haudrechy, *Tetrahedron*, 2016, **72**, 7488–7495.
- [98] C. Kourmentza, J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H. N. Gavala and M. A. M. Reis, *Bioengineering*, 2017, **4**, 55.
- [99] Q. Ren, K. Ruth, L. Thöny-Meyer and M. Zinn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **87**, 41–52.
- [100] G. de Roo, M. B. Kellerhals, Q. Ren, B. Witholt and B. Kessler, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **77**, 717–722.
- [101] J. C. Mata-Sandoval, J. Karns and A. Torrents, *J. Chromatogr. A.*, 1999, **864**, 211–220.
- [102] F. J. Aranda, M. J. Espuny, A. Marqués, J. A. Teruel, Á. Manresa and A. Ortiz, *Langmuir*, 2007, **23**, 2700–2705.
- [103] D. E. Hogan, F. Tian, S. W. Malm, C. Olivares, R. Palos Pacheco, M. T. Simonich, A. S. Hunjan, R. L. Tanguay, W. T. Klimecki, R. Polt, J. E. Pemberton, J. E. Curry and R. M. Maier, *J. Hazard. Mater.*, 2019, **364**, 600–607.
- [104] M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, J. Núñez-Olea and F. Ríos, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2016, **125**, 1–8.
- [105] W. Hui, *Solution and Interfacial Characterization of Rhamnolipid Biosurfactants and Their Synthetic Analogues*, Diss. Ph. D. Thesis, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Arizona, Tucson, AZ, 2011.
- [106] K. Nott, G. Richard, P. Laurent, C. Jérôme, C. Blecker, JP. Wathelet, M. Paquot and M. Deleu, *Process Biochem.*, 2013, **48**, 133–143.
- [107] K. Shinoda, T. Yamaguchi and R. Hori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1961, **34**, 237–241.
- [108] H. Razafindralambo, C. Blecker, S. Delhaye and M. Paquot, *J. Colloid Interface Sci.*, 1995, **174**, 373–377.
- [109] A. Azim, V. Shah, G. F. Doncel, N. Peterson, W. Gao and R. Gross, *Bioconjugate Chem.*, 2006, **17**, 1523–1529.
- [110] A. Ramos da Silva, M. Á. Manresa, A. Pinazo, M. T. García and L. Pérez, *Colloids Surf. B.*, 2019, **181**, 234–243.
- [111] G. Shahane, W. Ding, M. Palaiokostas, H. S. Azevedo and M. Orsi, *J. Membrane Biol.*, 2019, **252**, 317–329.
- [112] F. Schweizer, H. Jiao, O. Hindsgaul, W. Y. Wong and R. T. Irvin, *Can. J. Microbiol.*, 1998, **44**, 307–311.
- [113] N. Singh, G. S. Shetye, H. Zheng, J. Sun and Y.-Y. Luk, *ChemBioChem*, 2016, **17**, 102–111.

- [114] H. Zheng, N. Singh, G. S. Shetye, Y. Jin, D. Li and Y.-Y. Luk, *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, **25**, 1830–1838.
- [115] R. Rane, N. Sahu, C. Shah and R. Karpoornath, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, **14**, 253–273.
- [116] P. Proksch, *Toxicol.*, 1994, **32**, 639–655.
- [117] J. Kobayashi, Y. Ohizumi, H. Nakamura and Y. Hirata, *Experientia*, 1986, **42**, 1176–1177.
- [118] L. Meijer, A.-M. Thunnissen, A. White, M. Garnier, M. Nikolic, L.-H. Tsai, J. Walter, K. Cleverley, P. Salinas, Y.-Z. Wu, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, S.-H. Kim and G. Pettit, *Chem. Biol.*, 2000, **7**, 51–63.
- [119] S. Han, D. S. Siegel, K. C. Morrison, P. J. Hergenrother and M. Movassaghi, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 11970–11984.
- [120] M. G. Banwell, A. M. Bray, A. C. Willis and D. J. Wong, *New J. Chem.*, 1999, **23**, 687–690.
- [121] S. Mukherjee, R. Sivappa, M. Yousufuddin and C. J. Lovely, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 4940–4943.
- [122] J. Patel, N. Pelloux-Léon, F. Minassian and Y. Vallée, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 9081–9084.
- [123] G. Cheng, X. Wang, H. Bao, C. Cheng, N. Liu and Y. Hu, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 1062–1065.
- [124] X.-T. Sun and A. Chen, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 3459–3461.
- [125] B. M. Trost and G. Dong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 6054–6055.
- [126] Z. Shiokawa, S. Inuki, K. Fukase and Y. Fujimoto, *Synlett*, 2016, **27**, 616–620.
- [127] R. R. Schmidt and W. Kinzy, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, ed. D. Horton, Academic Press, 1994, vol. 50, pp. 21–123.
- [128] A. V. Demchenko, in *Handbook of Chemical Glycosylation*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, pp. 1–27.
- [129] A. Passeri, M. Schmidt, T. Haffner, V. Wray, S. Lang and F. Wagner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **37**, 281–286.
- [130] M. Bookstaver, A. Bose and A. Tripathi, *Langmuir*, 2015, **31**, 5875–5881.
- [131] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez and F. Albericio, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 2455–2504.
- [132] Y.-S. Hon, C.-H. Hsieh and Y.-W. Liu, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 2713–2723.
- [133] W. C. GRIFFIN, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1949, **1**, 311–326.
- [134] MarvinSketch 17.2.13.0, 2017, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- [135] D. Myers, *Surfactant science and technology*, J. Wiley, Hoboken, N.J, 3rd ed., 2006.
- [136] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu and H. O. Sintim, *Future Med. Chem.*, 2015, **7**, 647–671.
- [137] J. Chandra and P. K. Mukherjee, *Microbiol. Spectr.*, 2015, 115–134.
- [138] D. H. Dusane, S. S. Zinjarde, V. P. Venugopalan, R. J. C. McLean, M. M. Weber and P. K. S. M. Rahman, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2010, **27**, 159–184.
- [139] K. H. McClean, M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. Stewart and P. Williams, *Microbiology*, 1997, **143**, 3703–3711.
- [140] K. C. Hazen, J. G. Lay, B. W. Hazen, R. C. Fu and S. Murthy, *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 3469–3476.
- [141] W. L. Chaffin, J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo and J. P. Martínez, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 130–180.
- [142] A. A. Imani Fooladi, M. Riazipour and H. R. Tavakoli, *Jundishapur J. Microbiol.*, 2011, **4**, 43–48.
- [143] C. G. Pierce, A. K. Chaturvedi, A. L. Lazzell, A. T. Powell, S. P. Saville, S. F. McHardy and J. L. Lopez-Ribot, *NPJ Biofilms Microbiomes.*, 2015, **1**, 1–8.
- [144] H. Bujdaková, *Future Microbiol.*, 2016, **11**, 235–251.
- [145] T. Janek, M. Łukaszewicz and A. Krasowska, *BMC Microbiol.*, 2012, **12**, 24.

- [146] E. Walencka, S. Różalska, B. Sadowska and B. Różalska, *Folia Microbiol.*, 2008, **53**, 61.
- [147] M. Cuéllar-Cruz, E. López-Romero, J. C. Villagómez-Castro and E. Ruiz-Baca, *Future Microbiol.*, 2012, **7**, 755–771.
- [148] F. Cafieri, E. Fattorusso and O. Tagliatalata-Scafati, *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 122–125.
- [149] H. Ohno, A. Toda, Y. Miwa, T. Taga, E. Osawa, Y. Yamaoka, N. Fujii and T. Ibuka, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2992–2993.
- [150] S. Qiu, Y. Wei and G. Liu, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 2751–2754
- [151] N. Morita and N. Krause, *Org. Lett.* 2004, **6**, 4121–4123.
- [152] A. Tshako, D. Oikawa, K. Sakai and S. Okamoto, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 6529–6532.
- [153] E. M. Beccalli, G. Broggin, M. S. Christodoulou and S. Giofrè, in *Advances in Organometallic Chemistry*, ed. P. J. Pérez, Academic Press, 2018, vol. 69, pp. 1–71.
- [154] R. W. Bates and V. Satcharoen, *Chem. Soc. Rev.*, 2002, **31**, 12–21.
- [155] B. Alcaide and P. Almendros, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, **353**, 2561–2576.
- [156] S. Ma and Z. Shi, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 6387–6389.
- [157] Y. Zhu, Y. Wang, B.-B. Gu, F. Yang, W.-H. Jiao, G.-H. Hu, H.-B. Yu, B.-N. Han, W. Zhang, Y. Shen and H.-W. Lin, *Tetrahedron*, 2016, **72**, 2964–2971.
- [158] K. N. Houk, N. G. Rondan, Y.-D. Wu, J. T. Metz and M. N. Paddon-Row, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 2257–2274.
- [159] D. N. A. Fox and T. Gallagher, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 4697–4710.
- [160] W. C. Still, M. Kahn, and A. Mitra, *J. Org. Chem.* 1978, **43**, 2923–2925.
- [161] M. Hartmann, P. Betz, Y. Sun, S. N. Gorb, T. K. Lindhorst and A. Krueger, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 6485–6492.
- [162] S. S. Nigudkar, K. J. Stine and A. V. Demchenko, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 921–923.
- [163] S. S. Nigudkar, A. R. Parameswar, P. Pornsuriyasak, K. J. Stine and A. V. Demchenko, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 4068–4076.
- [164] M. Chwalek, K. Plé and L. Voutquenne-Nazabadioko, *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, **52**, 965–971.
- [165] A. Amira, H. K'tir, M. Berredjem and NE. Aouf, *Monatsh Chem.*, 2014, **145**, 509–515.
- [166] R. Robles-Machín, J. Adrio and J. C. Carretero, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 5023–5026.
- [167] B. Alcaide, P. Almendros, M. T. Quirós and I. Fernández, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, **9**, 818–826.
- [168] P. Carpena, J. Aguiar, P. Bernaola-Galván and C. Carnero Ruiz, *Langmuir*, 2002, **18**, 6054–6058.
- [169] SRPS EN ISO 10707:2009 Water quality - Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds - Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test) (ISO 10707:1994), Institute for Standardization of Serbia.  
[http://www.iss.rs/en/standard/?natstandard\\_document\\_id=23286](http://www.iss.rs/en/standard/?natstandard_document_id=23286).
- [170] SRPS ISO 696:2000, Surface active agents -- Measurement of foaming power -- Modified Ross-Miles method, Institute for Standardization of Serbia.  
[https://www.iss.rs/en/standard/?natstandard\\_document\\_id=15636](https://www.iss.rs/en/standard/?natstandard_document_id=15636).
- [171] M07-A8: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [172] M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [173] J. H. Merritt, D. E. Kadouri and G. A. O'Toole, *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2005, **22**, 1B–1.

- [174] C. G. Pierce, P. Uppuluri, A. R. Tristan, F. L. Wormley, E. Mowat, G. Ramage and J. L. Lopez-Ribot, *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 1494–1500.
- [175] B. Wächtler, D. Wilson, K. Haedicke, F. Dalle, B. Hube, *PLoS ONE*, 2011, **6**, e17046.
- [176] B. S. Raja Mohamed, M. Subramanian and K. P. Shunmugiah, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, **98**, 6775–6785.
- [177] M.B. Hansen, S.E. Nielsen, K. Berg, *J. Immunol. Methods*, 1989, **119**, 203–210.



## 6. BIOGRAFIJA

Miloš D. Jovanović rođen je 4. marta 1991. godine u Prokuplju gde je završio osnovnu i srednju školu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, (smer magistar farmacije) upisao je 2010. godine, a diplomirao 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,12.

Od marta 2016. godine zaposlen je na projektu br. 172009 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom *Kompjutersko dizajniranje, sinteza i biološka evaluacijanovih heterocikličnih jedinjenja kao selektivnih inhibitora tumorogeneze*.

Od marta 2020. godine zaposlen je na Katedri za organsku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милош Јовановић

Број индекса 12/15

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

СИНТЕЗА АМИНАЦИЈА Б И АНАЛОГА РАМКОЛИЦИДА А  
И ИСКОРЕНА ФИЗИКОХЕМИЈСКА И БИОЛОШКА ТРАНСФОРМАЦИЈА

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

Потпис аутора

У Београду, 17. 4. 2020

M. Jovanovic

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милош Јовковић  
 Број индекса 12/15  
 Студијски програм ФАРМАЦЕУТСКА ХЕМИЈА  
 Наслов рада СИНТЕЗА АЛКАРИДА Б И ФРАКТА РАМЕНОКЛАА И ЊИХОВА  
ДИСКИМ-СИНТЕЗА И ФИЗИЧКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА  
 Ментор Др Владимир Селић и Др Славица Грбић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 17.4.2020

M. Jovkovic

## Изјава о коришћењу

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

СИНТЕЗА АМИДА Б и АНАЛОГА РЕЦИКЛИЦИДА  
и њихова физичко-хемијска и биолошка карактеристика

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 17.4.2020



1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прерада, 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.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прерада, 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 прерада.** Дозвољава се умножавање, 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.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прерада, 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 прерада.** Дозвољава се умножавање, 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.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прерада, 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.