



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Naujų *N*,1-difenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidų sintezė ir savybių tyrimas

Baigiamasis magistro projektas

Gita Matulevičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Eglė Arbačiauskienė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Naujų *N,1*-difenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidų sintezė ir savybių tyrimas

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Gita Matulevičiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Eglė Arbačiauskienė

Vadovė

Lekt. dr. Vida Malinauskienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Gita Matulevičiūtė

Naujų *N,1*-difenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidų sintezė ir savybių tyrimas

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Gitos Matulevičiūtės, baigiamasis projektas tema „Naujų *N,1*-difenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidų sintezė ir savybių tyrimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Matulevičiūtė, Gita. Naujų *N*,1-difenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidų sintezė ir savybių tyrimas. Baigiamasis magistro projektas / vadovė doc. dr. Eglė Arbačiauskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: pirazolai, piperidinai, karboksilatai, karboksamidai, IC₅₀.

Kaunas, 2019. 59 p.

Santrauka

Pirazolo dariniai naudojami farmacijoje, dažų chemijoje, žemės ūkyje bei optoelektronikoje. Tiek pakeistoms, tiek kondensuotoms pirazolo sistemoms būdingas įvairus biologinis aktyvumas. Jie taikomi slopinant laisvųjų deguonies radikalų, grybų, bakterijų ar virusų sukeltą neigiamą poveikį organizmui. Be to, dėl struktūros ypatybių tinka vartoti sergant onkologinėmis ligomis, pasireiškus tuberkuliozės simptomams ar atsiradus kraujagyslių sistemos sutrikimams.

Šio baigiamojo magistro projekto metu komerciškai prieinamos piperidino karboksirūgštys per kelias stadijas modifikuotos į piperidino ketoesterius, dalyvavusius pirazolo žiedo uždarymo reakcijose. Panaudojant gautus 4-substituočius piperidinilpirazolo karboksilatus bei chiralinį centrą turinčius jų analogus susintetinti 5-piperidinilpirazolo karboksamidai. Visų projekto metu susintetintų junginių struktūros analizė atlikta remiantis 1D ir 2D BMR, IR spektroskopijū bei MS ir HRMS spektrometrijų duomenimis. Taip pat, panaudojant chiralines kolonėles Amylose-SA bei Cellulose-SB, ištirtas susintetintų junginių enantiomerinis grynumas.

Bendradarbiaujant su kolegomis iš Palackio universiteto Olomouce (Čekija) atlikti tikslių pirazolo karboksamido darinių biologinio aktyvumo tyrimai. Jų metu nustatyta, jog *N*-fenil-5-((3*R*)-piperidin-3-il)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidai pasižymi silpnomis citotoksinėmis savybėmis prieš MCF7 (krūties vėžio), o šio junginio *S*-formos analogas – prieš CEM (leukemijos) ląstelių linijas. Chiralinį centrą turintiems piperidinilpirazolo dariniams būdingas stipresnis citotoksinis poveikis lyginant su piperidin-4-ilpirazolo junginiais.

Matulevičiūtė, Gita. Synthesis and Investigation of Novel *N*,1-Diphenyl-5-piperidinyl-1*H*-pyrazolo-4-carboxamides. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Eglė Arbačiauskienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: pyrazoles, piperidines, carboxylates, carboxamides, IC₅₀.

Kaunas, 2019. 59 pages.

Summary

Pyrazole derivatives are applied in pharmacy, agriculture and optoelectronics technologies. Both substituted and condensed pyrazole systems demonstrate a wide diversity of biological activities. They are used to inhibit reactive oxygen species or suppress a negative impact of various fungi, bacteria and virus in human body. Moreover, due to the special structure pyrazole derivatives are applied to treat tuberculosis, cardiovascular or oncological diseases.

The main aim of this master's final degree project was to synthesize novel piperidine ketoesters *via* several reaction steps from commercially available piperidine carboxylic acids. The desired compounds were obtained from 4-substituted piperidinylpyrazole carboxylates and their analogues with chiral center. Structures of all synthesized compounds were identified with 1D and 2D NMR, IR spectroscopic and MS, HRMS spectrometric data. Enantiomeric excess of chiral compounds was analysed by Amylose-SA and Cellulose-SB chiral columns.

Biological activity of target pyrazole carboxamide derivatives was tested by colleagues at Palacký University Olomouc (Czech Republic). *N*-Phenyl-5-((3*R*)-piperidin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazole-4-carboxamide showed low cytotoxic activity against MCF7 (breast cancer) cell line, while its *S*-form analogue showed activity against CEM (leukemia) cell line. The chiral piperidinylpyrazoles have a better cytotoxic activity than their piperidin-4-ylpyrazole analogues.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas.....	9
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Pirazolas ir jo dariniai.....	10
1.2. Pirazolo darinių biologinės savybės	10
1.2.1. Antibakterinis poveikis.....	10
1.2.2. Antioksidacinis poveikis	11
1.2.3. Priešvėžinis poveikis	13
1.2.4. Antihelmininis poveikis	15
1.2.5. Antivirusinis poveikis.....	16
1.2.6. Antituberkuliozinis poveikis	18
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	21
2.1. Tyrimų metodai ir naudota aparatūra	21
2.2. Junginių sintezės ir jų analizės duomenų aprašymas	21
2.2.1. <i>tret</i> -Butil 3- ir 4-(3-metoksi-3-oksopropanoil)piperidin-1-karboksilatai (2a-c)	21
2.2.2. <i>tret</i> -Butil 3- ir 4-[(2 <i>Z</i>)-3(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)-2-propenoil]piperidin-1-karboksilatai (3a-c).....	21
2.2.3. <i>tret</i> -Butil 3- ir 4-[4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatai (4-7)	22
2.2.4. <i>tret</i> -Butil 3- ir 4-[4-(metoksikarbonil)-1-(2-metilpropil)-1 <i>H</i> -pirazol-3-il]piperidin-1-karboksilatai (8a-c).....	27
2.2.5. 5-[1-(<i>tret</i> -Butoksikarbonil)piperidinil]-1 <i>H</i> -pirazol-4-karboksirūgštis (9a-i)	28
2.2.6. <i>tret</i> -Butil 3 ir 4-[4-(fenilkarbamoil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatai (10a-i).....	31
2.2.7. <i>N</i> ,1-fenil-5-piperidinil-1 <i>H</i> -pirazolo-4-karboksamidai (11a-i)	36
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	40
3.1. Pirazolo žiedo sudarymas	40
3.2. <i>N</i> -alkilinimo metodo taikymas	42
3.3. 1 <i>H</i> -pirazolo-4-karboksamidų gavimas	44
3.4. Chiralinė HPLC analizė.....	48
3.5. Tikslinių junginių 11a-i biologinio aktyvumo tyrimų rezultatai	51
Išvados	55
Literatūros sąrašas	56

Santrumpų ir terminų sąrašas

- ^1H BMR – protono ^1H branduolių magnetinis rezonansas;
 ^{13}C BMR – anglies ^{13}C izotopo branduolių magnetinis rezonansas;
 ^{15}N BMR – azoto ^{15}N izotopo branduolių magnetinis rezonansas;
BMR – branduolių magnetinis rezonansas;
Boc – *tert*-butoksilkarbonilgrupė;
br s – platus singletas;
 CDCl_3 – deuteriuotas chloroformas;
COSY – bidimensinis koreliacinis spektras;
d – dubletas;
DCM – dichlormetanas;
DMAP – 4-dimetilaminopiridinas;
DMF – *N,N*-dimetilformamidas;
EDC·HCl – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidis;
ekv. – ekvivalentas;
 ESI^+ – elektropurkštuvinė jonizacija (teigiama);
FT-IR – infraraudonųjų spindulių spektrometras;
Et – etilgrupė;
EtOAc – etilacetatas;
EtOH – etanolis;
Heks – *n*-heksanas;
HRMS – aukštos rezoliucijos masių spektroskopija;
IR – infraraudonoji spektroskopija;
J – protonų tarpsukininės sąveikos konstanta;
kamb. t. – kambario temperatūra;
m – multipletas;
Me – metilgrupė;
 Me_2CO – acetonas;

MeO – metoksigrupė;
MeOH – metanolis;
MHz – megahercas;
mln. d. – milijoninė dalis;
MS – masių spektrometrija;
m/z – masės ir molekulinės krūvio santykis;
Ph – fenilgrupė;
Pip – piperidino fragmentas;
Pir – pirazolo fragmentas;
q – kvadrupletas;
qd – kvadrupleto dubletas;
qt – kvadrupleto tripletas;
s – singletas;
SAR – struktūros aktyvumo ryšys;
t – tripletas;
td – tripleto dubletas;
TFP – tolfenpiradas;
tt – tripleto tripletas;
T_{lyd} – lydymosi temperatūra;
TMS – tetrametilsilanas;
T_v – virimo temperatūra;
UV – ultravioletiniai spinduliai;
δ – cheminis poslinkis.

Įvadas

Visais amžiais žmonės ieškojo veiksmingų profilaktikos ir gydymo būdų, kurie apsaugotų nuo ligos atsiradimo ar sustabdytų jau prasidėjusį jos progresavimą. Pirmiausiai, atkreiptas dėmesys į gamtą, joje aptinkamus natūralius vaistinius augalus [1]. Vystantis mokslui bei tobulėjant technologijoms, atsirado galimybė ne tik identifikuoti vaistines organines medžiagas, bet ir patiems sintetinti bei modeliuoti potencialiai biologiškai aktyvius junginius. Pasitelkus bioinformatikos ir kombinatorikos metodus, nustatyti farmakoforai, t. y., junginio struktūrinis fragmentas, kuris ir lemia biologinį aktyvumą, terapinio poveikio efektyvumą [2]. Biologiškai aktyvių medžiagų analizė, naujų struktūrų modeliavimas, duomenų ieškojimas, bandymai ir tyrimai suteikė pagrindą išsivystyti šiuolaikinei vaistų chemijai [3].

Vaistų chemijoje labai dažnai naudojami biologiškai aktyvūs heterocikliniai junginiai, savo struktūroje turintys imidazolo, indolo, piridino, chinolino, pirazolo fragmentus [4]. Nustatyta, jog organiniai pirazolo dariniai pasižymi ypač plačiu biologinių savybių spektru. Jiems būdingos antibakterinės [5], priešvėžinės [6], antivirusinės [7], priešgrybelinės [8], antihipertenzinės [9], antioksidacinės [10] bei kitos savybės. Pirazolo analogai naudojami tiek vaistų chemijoje, tiek žemės ūkyje [11] ar optoelektronikoje [12]. Dėl potencialių pritaikymo galimybių daugelyje pramonės sričių, pirazolo fragmentą turinčių junginių sintezė kelia stiprų susidomėjimą tarp farmacijos bei žemės ūkio pramonės atstovų. Tokių heterociklinių junginių sintezės metodų paieška, optimizavimas bei susintetintų darinių analizė, biologinio aktyvumo tyrimai išlieka aktuali medicininės chemijos objektu.

Todėl nuspręsta baigiamojo magistrinio projekto metu atlikti potencialiai biologiškai aktyvių piperidinilpirazolo karboksamidų sintezę.

Darbo tikslas – atlikti naujų *N*,1-difenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidų sintezę ir savybių tyrimus.

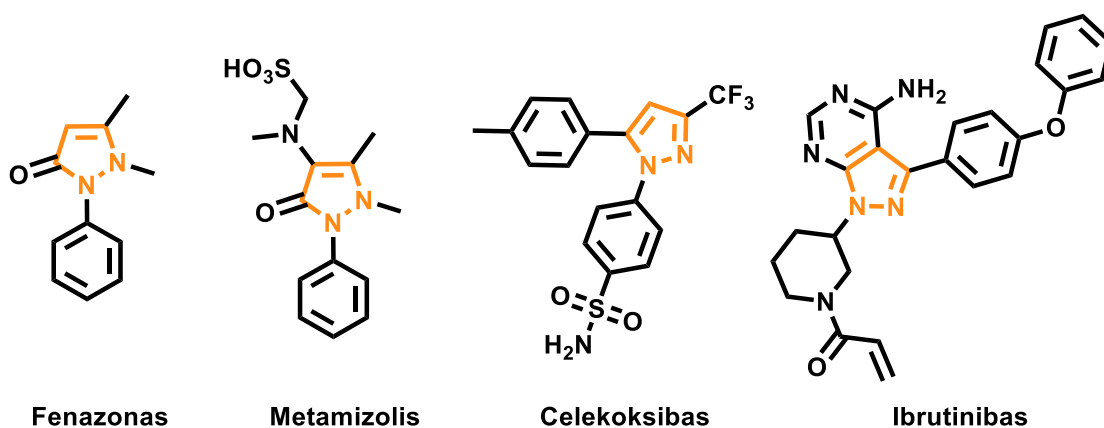
Darbo uždaviniai:

1. panaudojant *tert*-butil 3- ir 4-[(2*Z*)-3(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)-2-propenoil]piperidin-1-karboksilatų, gauti 5-piperidinilpirazolo junginius;
2. turint *tert*-butil 3- ir 4-[4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatų, atlikti jų *N*-alkilavimo reakciją, susintetinant 3-piperidinilpirazolo analogus;
3. modifikuoti esterinę 5-piperidinilpirazolo karboksilatų grupę, formuojant amidinę jungtį ir taip sudarant atitinkamus karboksamidus;
4. išanalizuoti susintetintų 5-piperidinilpirazolo karboksamidų biologinio aktyvumo rezultatus.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Pirazolas ir jo dariniai

Įvairios heterociklinės sistemos dėl savo struktūros ypatybių pasižymi plačiu farmakologinių savybių spektru. Ypač išskirtinio dėmesio sulaukia azoto atomą turinčios molekulės: pirolas, imidazolas, piridinas, chinolinas, indolas bei pirazolas [4]. Pastarojo vardas istorijoje žinomas nuo 1883 m., kai penkianarių ciklinių junginių klasę, kuri pirmojoje ir antrojoje žiedo padėtyje turi *N*-atomą, vokiečių chemikas L. Knorr'as pavadino „pirazolais“ [13]. Pastebėjus, jog pirazolo dariniams būdingos įvairios terapinės savybės, pradėta intensyvi šių junginių sintezė ir analizė. Dabar jie plačiai taikomi farmacijoje. Pavyzdžiui, kaip analgetikai bei antipiretikai vartojami fenazonas ar metamizolis [14]. Nereceptinis vaistas nuo uždegimo celekoksibas yra selektyvus COX-2 inhibitorius [15], kuris efektyviai gydo osteoartritą bei reumatoidinį artritą. Be to, tarp pirazolo darinių išskiriamas ibrutinibas [16]. Vaistas vartojamas gydant lėtinę limfocitinę leukemiją (1.1. pav.).



1.1. pav. Vaistinės medžiagos, turinčios pirazolo fragmentą

Tad pastaraisiais metais ieškoma naujų pirazolo darinių sintezės metodų. Intensyviai tyrinėjamas pirazolo darinių farmakologinis aktyvumas ir nagrinėjamos terapinės savybės. Nustatyta, jog junginiai, kuriems būdingas pirazolo fragmentas, pasižymi analgetinėmis [17], priešūždegiminėmis [18], priešvėžinėmis [6], antibakterinėmis [5], priešgrybelinėmis [8] ir kitomis savybėmis. Taip pat tarp šių junginių pastebima fermentų inhibitorių [19] ar kraujagyslių sistemą veikiančių junginių [20].

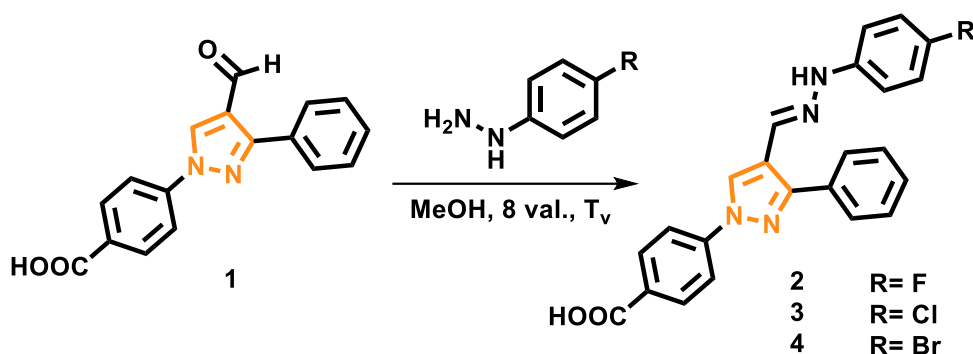
1.2. Pirazolo darinių biologinės savybės

1.2.1. Antibakterinis poveikis

Dažnai susiduriama su bakterijų sukeltomis ligomis. Siekiant kovoti prieš šiuos mikroorganizmus ieškoma vis naujų medžiagų, kurios sumažintų ar galutinai užkirstų bakterijų keliamą pavojų. Įvairias hospitalines infekcijas neretai sukelia *Pseudomonas aeruginosa* patogenas [21]. Jis pasinaudoja nusilpusia imunine sistema, įsiterpia į žmogaus organizmą ir pradeda infekciją. *P. aeruginosa* sukelia šlapimo ir kvėpavimo takų sistemos, kaulų ir sąnarių, virškinamojo trakto, minkštųjų audinių infekcijas, daugumą odos išbėrimų bei bakteriemiją. Patogeno inicijuota infekcija yra rimta problema pacientams, kurie gydomi nudegimus, cistine fibrozę, AIDS ar onkologinius susirgimus [22]. Kita bakterija inicijuojanti hospitalines infekcijas – *Staphylococcus aureus* [23]. Dalis padermių pasižymi gebėjimu sudaryti mikrokapsulę, kas lemia ganėtinai didelį atsparumą įvairiems aplinkos veiksniams. Patogenas plinta kontaktiniu ar oro lašeline būdu. Geba slopinti fagocitozę, sintetina toksinus, gali

sukelti toksinio šoko sindromą, diarėją, septinį artritą. Šie patogenai kelia ypač didelį mokslinį susidomėjimą ir susirūpinimą, nes pasižymi stipriu atsparumu antibiotikams [24]. Todėl sudėtinga parinkti tinkamą bakterijos sukeltų infekcijų gydymą.

Dažnas ir nepagrįstas antibiotikų vartojimas sudaro galimybę antibiotikams atsparių mikroorganizmų atsiradimui. Tad tenka ieškoti kitų veiksmingų priemonių prieš patogenus. Amerikiečių mokslininkas E. Delancey'is kartu su kolegomis tyrė pirazolo darinių, turinčių benzoinės rūgšties fragmentą, poveikį hospitalinių infekcijų sukėlėjams [25]. Pasirinktos gramteigiamos *S. aureus* bei *B. subtilis* ir gramneigiamos *P. aeruginosa* bei *A. baumannii* bakterijos. Kontroliniams bandiniams pasirinktas plataus veikimo spektro antibiotikas chloramfenikolis.



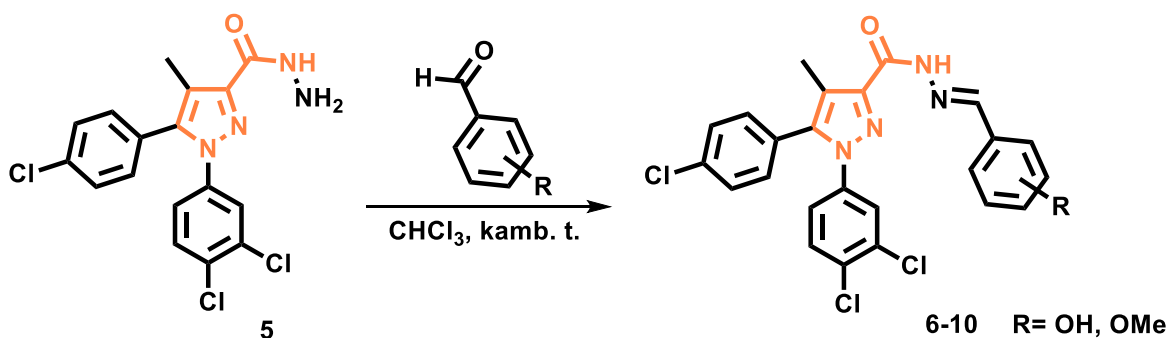
1.1. schema.

Išsiaiškinta, jog susintetintos molekulės pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš tirtas bakterijų padermes. Efektyviausi junginiai **2**, **3** ir **4** (1.1. schema), kuriems nustatyta mažiausia slopinamoji koncentracija (MIC) atitinkamai yra 8, 4 ir 8 $\mu\text{g/ml}$ prieš *A. baumannii* bakterijas. Chloramfenikoliui būdinga 16 $\mu\text{g/ml}$ koncentracija. Susintetintų molekulių poveikis 2 ar net 4 kartus stipresnis lyginant su pasirinkto antibiotiko sukeltu poveikiu. Taigi pirazolo fragmentą turintys junginiai pasižymi antibakteriniu poveikiu prieš hospitalines infekcijas sukeliančias bakterijas.

1.2.2. Antioksidacinis poveikis

Ląstelėse nuolat vyksta oksidacijos ir redukcijos reakcijos. Nepalankių išorės sąlygų metu sutrikdomas šių cheminių reakcijų balansas bei ląstelės detoksikacinė veikla. Besikaupiantys laisvieji radikalai skatina oksidacinių procesų vyksmą organizme [26]. Pažeidžiamos svarbios baltymų, lipidų, angliavandenių, DNR, RNR biomolekulės. Ilgainiui gali išsivystyti tam tikri negalavimai, ligos ar net mutacijos, pavyzdžiui, aterosklerozė, diabetas, Alzheimerio liga ar onkologiniai susirgimai.

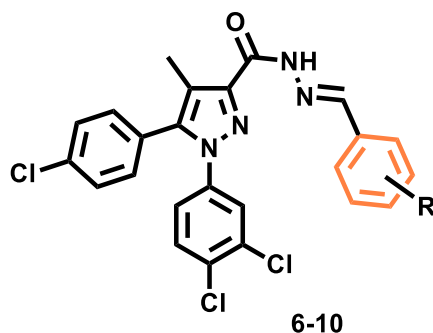
Todėl ląstelėje naudojamos įvairios antioksidacinės sistemos. Jos slopina laisvųjų radikalų ir kitų reaktyvių cheminių junginių inicijuotą oksidacijos procesą. Išskiriamos kelios apsaugos sistemos [27]. Tai antioksidaciniai fermentai (glutathiono peroksidazė, superoksido dismutazė), metalų jonus surišantys baltymai bei mažos molekulinės masės junginiai, gebantys prijungti laisvuosius radikalus (askorbo rūgštis, tokoferolis). Antioksidaciniam aktyvumui nustatyti dažniausiai taikomi ABTS, FRAP bei DPPH tyrimų metodai [28]. Nustatyta, jog pirazolo dariniai, trečioje žiedo padėtyje turintys karbohidrazido grupę, pasižymi antioksidacinėmis savybėmis [29]. Šiems junginiams būdingos stiprios antioksidacinės savybės ir dėl hidroksigrupių esančių fenilo žiede. Tyrimo metu naudotas DPPH metodas. DPPH radikalas sudaro violetinės spalvos tirpalą. Prijungus protoną, spalva pakinta į gelsvą. Spalvos intensyvumas parodo tirtos medžiagos potencialą surišti laisvuosius radikalus.



1.2. schema.

Tirti skirtingų koncentracijų susintetintų junginių tirpalai (1 μM, 10 μM ir 100 μM) (1.1. lentelė). Ferulo rūgštis pasirinkta kaip kontrolinis antioksidantas. Esant 10 μM koncentracijai, junginiui **8** nustatytas 58,60 %, junginiui **10** – 76,24 %, o ferulo rūgščiai – 14,52 % antioksidacinis aktyvumas. Susintetinti junginiai **8** ir **10** pasižymėjo daugiau nei 4 kartus stipresniu antioksidaciniu poveikiu lyginant su kontroliniu bandiniu. Tad pirazolo dariniai veiksmingai slopina oksidacinius procesus.

1.1. lentelė. Junginių 6-10 DPPH tyrimo rezultatai



Junginys	R	DPPH, %		
		1 μM	10 μM	100 μM
6	Ph 4-OH	2,76	2,71	6,43
7	Ph 2,4-OH	3,57	12,20	22,15
8	Ph 3,4-OH	9,85	58,60	92,70
9	Ph 3,4-OMe	2,25	3,73	2,81
10	Ph 4-OH ir 3,5-OMe	11,19	76,24	94,30
Ferulo rūgštis	-	3,06	14,52	78,73

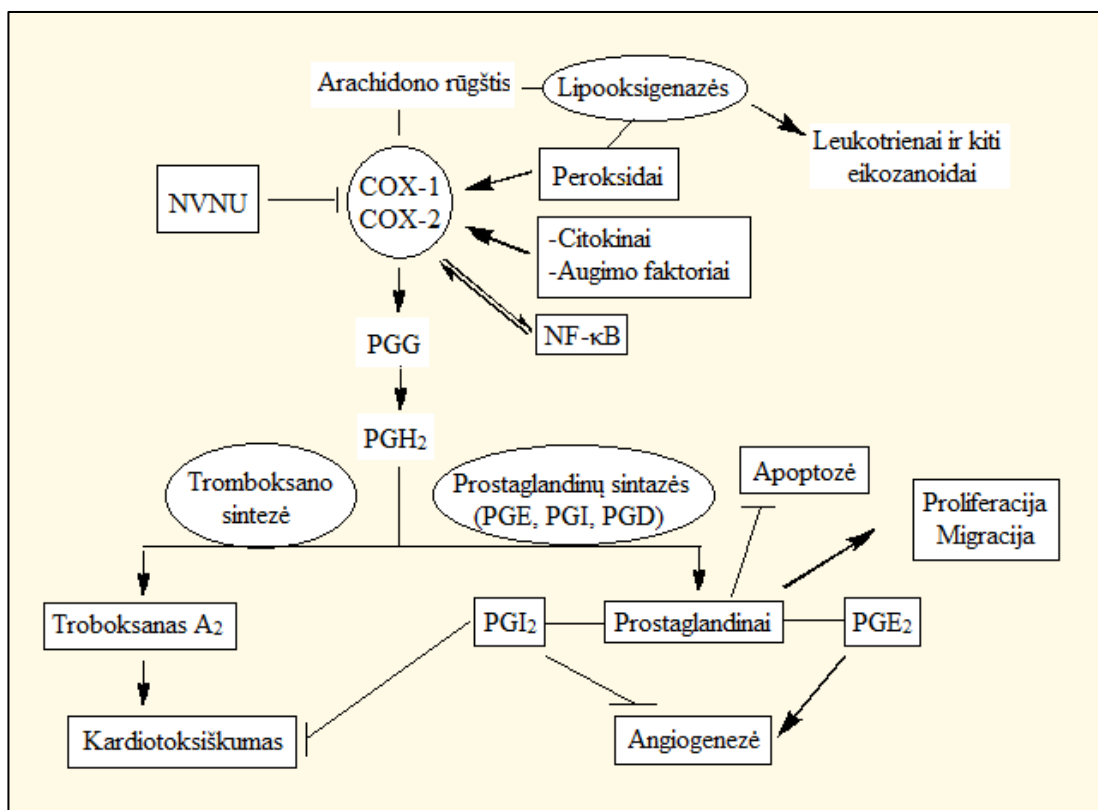
Be to, tyrimo metu nustatyta, kad susintetintų molekulių biologinis aktyvumas priklauso nuo hidroksi- bei metoksi- funkcinių grupių padėties fenilo žiede, prijungtame prie karbohidrazido fragmento. Pavyzdžiui, junginio **6**, turinčio hidroksigrupę padėtyje Ph 4-OH, antioksidacinis aktyvumas tesiekė 2,71 %, o junginio **7** (Ph 2,4-OH) – 12,20 %. Terapinis efektyvumas dėl pasirinktos hidroksigrupės padėties pagerėjo nuo 2,71 % iki 58,60 %. Kalbant apie metoksigrupę, junginys **9** (Ph 3,4-OMe) tepasižymėjo 3,73 % antioksidaciniu aktyvumu. Taigi konkreti hidroksi- bei metoksigrupės padėtis gali pagerinti susintetintos molekulės terapinį efektyvumą.

1.2.3. Priešvėžinis poveikis

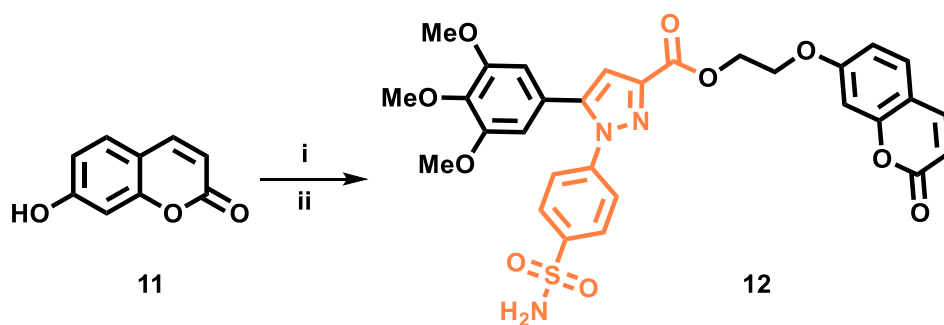
Vėžys – tai dažnai pasitaikanti žmonių mirties priežastis, kurią inicijuoja įvairūs genetiniai pažeidimai. Jų metu ląstelėje vyksta fiziologiniai bei morfologiniai pokyčiai, lemiantys nekontroliuojamą ląstelių dauginimąsi, atsparumą apoptozei, angiogenezės stimuliavimą bei metastazių formavimąsi [30]. Gydomo pobūdis priklauso nuo vėžio stadijos, metastazių išsidėstymo, paties paciento organizmo būklės. Ligoniams taikomos įvairios gydymo strategijos: chirurgija, radioterapija, chemoterapija, kaulų čiulpų transplantacija, priešvėžiniai vaistai bei kiti alternatyvūs gydymo būdai.

Kartu su priešvėžiniais vaistais vartojami ciklooksigenazę (COX) slopinantys preparatai, t. y. nesteroidiniai vaistai nuo uždegimo (NVNU) [31]. Toks kombinuotas gydymas taikomas dėl kelių priežasčių. Pavyzdžiui, COX fermentams būdingos dvi struktūrinės formos. COX-1 fermentas yra nuolat ekspresuojamas organizme, o kilus uždegimui fiksuojamas COX-2 padidėjimas. Būtent pastarasis fermentas pasižymi dideliu specifiskumu uždegimui. Slopinant COX-2, slopinami uždegimo mediatoriai bei mažinamas pats uždegimas. Be to, nustatyta, jog suintensyvėjus COX-2 ekspresijai pakinta vėžinių ląstelių rezistentiškumas ir auglys progresuoja (1.2. pav.) [32]. Ištirta, kad padidėjus COX aktyvumui, skatinamas arachidono rūgšties metabolizmas, susidaro prostaglandinai bei tromboksanai. Šios medžiagos dalyvauja vėžinių ląstelių proliferacijos, migracijos, angiogenezės procesuose, turi kardiotoksinių savybių bei slopina apoptozę.

Pastaruoju metu ieškoma naujų efektyvių NVNU analogų, kurie veiksmingai mažintų COX fermento aktyvumą ir taip sulėtintų onkologinės ligos vystymąsi. Siekiama sukurti specifinius inhibitorius, slopinančius COX-2 aktyvumą ląstelėse ir neturinčius jokio poveikio COX-1 izoformai. Pavyzdžiui,



1.2. pav. COX veikimo mechanizmas pagal literatūros šaltinį [32]



1.3. schema. Reagentai ir sąlygos: (i) KCO_3 , KI, 2-brometanolis, DMF, $65\text{ }^\circ\text{C}$; (ii) KCO_3 , KI, atitinkamas sulfonamidas, DMF, $65\text{ }^\circ\text{C}$.

F. Q. Shen'o mokslinė grupė atliko pirazolo bei kumarino fragmentus turinčių junginių sintezę ir ištyrė jų poveikį COX-2 fermentui [33]. Geriausiu slopinamuoju poveikiu *in vitro* sąlygomis pasižymėjo junginys **12**. Jam nustatyta $\text{IC}_{50} = 0,23 \pm 0,16\ \mu\text{M}$ koncentracija, o COX-2 slopikliui celekoksibui – $\text{IC}_{50} = 0,41 \pm 0,28\ \mu\text{M}$. Junginys **12** yra 2 kartus veiksmingesnis už pasirinktą standartą. Taip pat ištirtas junginio **12** poveikis COX-1 izoformai. Nustatyta, jog fermentinis aktyvumas sumažėja perpus, kai $\text{IC}_{50} = 53,08 \pm 3,47\ \mu\text{M}$, o celekoksibui būdinga koncentracija – $\text{IC}_{50} = 36,44 \pm 2,59\ \mu\text{M}$. Remiantis gautais rezultatais, junginys **12** pasižymi didesniu specifiskumu COX-2 izoformai negu pasirinktas standartas.

1.2. lentelė. Junginio **12** priešvėžinių tyrimų duomenys

Junginys	$\text{IC}_{50}, \mu\text{M} \pm \text{SN}$				
	HT-29	Hela	A549	SMMC-7721	293 T
12	$8,46 \pm 0,85$	$5,51 \pm 1,28$	$4,48 \pm 0,57$	$9,62 \pm 0,35$	$121,86 \pm 0,39$
Celekoksibas	$8,47 \pm 0,31$	$11,06 \pm 0,93$	$7,68 \pm 0,55$	$5,96 \pm 0,76$	$111,86 \pm 1,51$

Toliau nustatytas junginio **12** slopinamasis poveikis vėžinių ląstelių gyvybingumui (1.2. lentelė). Tyrimas atliktas, naudojant 4 skirtingas vėžinių ląstelių linijas: HT-29 (storosios žarnos), Hela (gimdos kaklelio), A549 (plaučių) bei SMMC-7721 (kepenų). Kaip kontrolinė ląstelių linija pasirinktos nevėžinės inkstų epitelio 293 T ląstelės. Analizės duomenys parodė, jog kolorektalinio vėžio atveju tiek junginys **12**, tiek celekoksibas pasižymi vienodu slopinamuoju poveikiu. Kalbant apie SMMC-7721 ląstelių liniją, celekoksibui būdingos stipresnės inhibicinės savybės prieš kepenų vėžį nei analizuojamam junginiui **12**. Tačiau gauti rezultatai prieš gimdos kaklelio ir plaučių vėžines ląsteles yra daug žadantys. Net 2 kartus silpnesnė junginio **12** koncentracija veiksmingai nuslopino tirtų vėžinių ląstelių proliferaciją lyginant su celekoksibo sukeltu poveikiu. Be to, remiantis Pasaulinio vėžio tyrimų fondo pateiktais duomenimis, 2018 m. pasaulyje daugiausia užregistruota kaip tik plaučių vėžio atveju (2,093,876). Toliau yra krūties (2,088,849) ir kolorektaliniai (1,800,977) vėžiniai susirgimai [34].

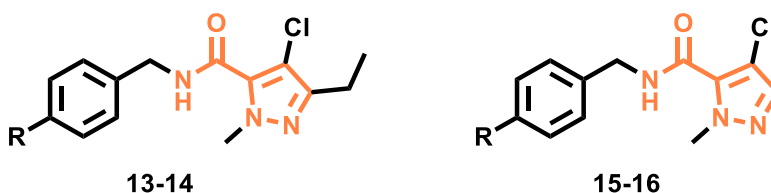
Svarbu paminėti, jog būtina atlikti tyrimus su sveikomis žmogaus ląstelėmis. Susintetintas junginys turi būti saugus vartoti, netoksiškas kitoms organizmo ląstelėms. Todėl atlikti tyrimai su 293 T ląstelių linija. Nustatyta, jog junginys **12** pasižymi silpnesnėmis slopinamosiomis savybėmis nei celekoksibas. Šie atradimai skatina tolimesnius biomedicininis tyrinėjimus ir suteikia galimybę ieškoti veiksmingesnių vėžio gydymo metodų.

1.2.4. Antihelminntinis poveikis

Viena iš pasitaikančių žmogaus organizmo problemų – tai parazitinės kirmėlės [35]. Dažniausiai jų kiaušinėliais ar lervomis užsikrečiama nesilaikant atitinkamų higienos reikalavimų. Pavyzdžiui, pamirštant tinkamai nusiplauti rankas po kontakto su gyvūnais, geriant nevirintą vandenį ar valgant nenuplautus vaisius bei uogas. Lervos patekusios į organizmą eikvoja jo maisto medžiagas, bręsta bei migruoja po vidaus organus. Parazitai inicijuoja uždegimus, įvairius organizmo pakitimus bei toksiškai veikia vidaus organus.

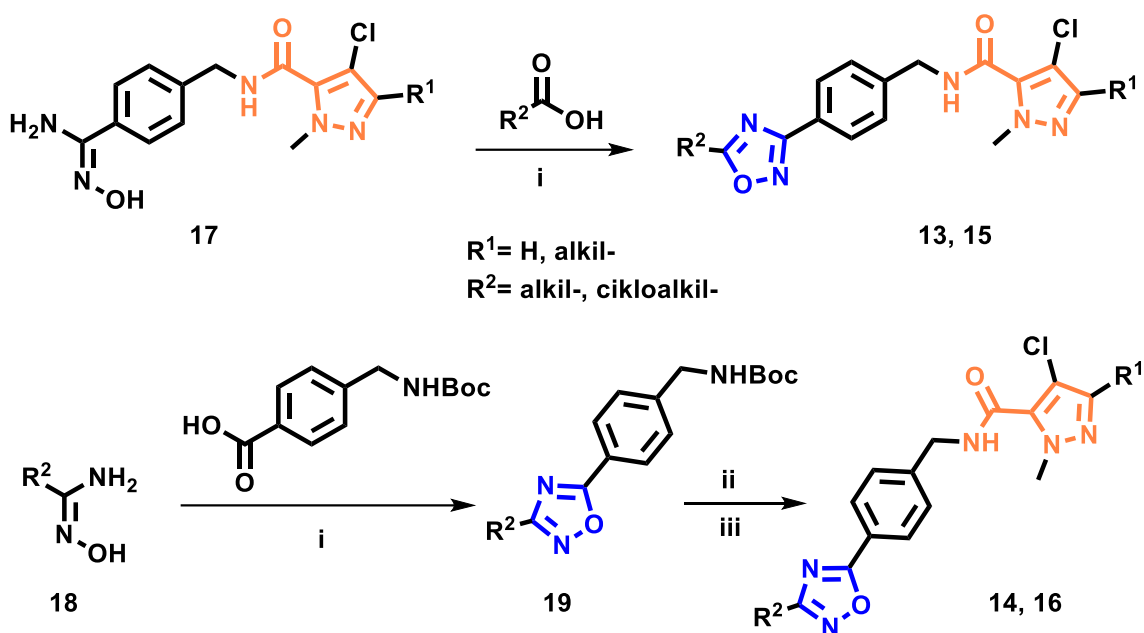
Kartais žmonės net nenutuokia, kad atsiradusių negalavimų priežastis yra parazitai. Būtent žmogaus kūnas yra ideali terpė, kurioje gali gyventi ir daugintis šie kenkėjai. Kitaip tariant, žmogaus organizmui būdinga pastovi temperatūra, palaikomas drėgmės lygis bei gausu maistinių medžiagų. Todėl tokios aplinkos sąlygos yra labai palankios parazitų dauginimuisi. Nesiimant atitinkamų veiksmų, kai kurios kirmėlės žmogaus organizme gali parazituoti dešimtmečius (pavyzdžiui, kaspinuočiai) [36].

1.3. lentelė. Junginių 13-16 antihelminntinių tyrimų duomenys



Junginys	R	IC ₅₀ , μM ± SN	
		Lervų judriui	Lervų vystymuisi
13		0,19 ± 0,16	0,0025 ± 0,0007
14		1,25 ± 0,35	0,0003 ± 0,0003
15		0,93 ± 0,62	0,002 ± 0,002
16		2,3 ± 1,1	0,003 ± 0,004
Monepantelis	-	0,16 ± 0,008	0,075 ± 0,04

Bendradarbiaujant Kinijos, Šveicarijos, Indijos bei Australijos šalių mokslinėms grupėms susintetinti 1*H*-pirazolo-5-karboksamidų dariniai bei ištirtos jų antihelminntinės savybės [37]. Pirmiausia, analizė atlikta prieš *H. contortus* patogeninius nematodus. Siekta išsiaiškinti struktūros aktyvumo ryšio efektyvumą (SAR), keičiant radikalus į penkianarius heterociklinius darinius (1.3. lentelė). Nustatyta, kad junginiai **13** ir **15** ypač stipriai slopina tirtų parazitinių lervų judrumą bei vystymąsi. Užteko vos 2,5 nM koncentracijos, norint sumažinti parazitinių lervų vystymąsi. Junginiai **13** ir **15** pasižymi stipresnėmis prieškirmėlinėmis savybėmis lyginant su monepanteliu.



1.4. schema. Reagentai ir sąlygos: (i) HOBt, EDC, DMF, 180 °C; (ii) 4M HCl dioksane, dioksanas, kamb. t.; (iii) DIPEA, atitinkama pirazolo karboksirūgštis, THF, kamb. t.

Vėliau atlikti junginių **13** ir **15** antihelminčių savybių tyrimai prieš kitus nematodus (1.4. lentelė). Bandymams pasirinktos *H. polygyrus*, *A. ceylanicum* bei *T. muris* kirmėlių rūšys. Gautiems rezultatams palyginti naudotas tolfenpiradas. Kalbant apie *H. polygyrus* nematodus, susintetinti junginiai beveik 3 kartus veiksmingesni už pasirinktą standartą. Esant 100 μM koncentracijai, junginiai **13** ir **15** atitinkamai pasižymėjo 92,2 % ir 92,5 % slopinamuoju poveikiu, o TFP – 32,4 %. Naudojant 10 μM koncentracijos tirpalus prieš *A. ceylanicum*, fiksuotas 100 % slopinamasis poveikis. Tuo tarpu, TFP būdingos šiek tiek silpnesnės antihelminčios savybės. Remiantis gautais duomenimis, nustatyta, jog stipriausiu antihelminčiu poveikiu pasižymi junginys **15**. Galima teigti, jog pirazolo dariniai, turintys karboksamido fragmentą yra potencialūs antihelminčiai preparatai.

1.4. lentelė. Junginių **13** ir **15** antihelminčių tyrimų duomenys

Junginys	Slopinamasis poveikis, %		
	<i>H. polygyrus</i>	<i>A. ceylanicum</i>	<i>T. muris</i>
	100 μM	10 μM	100 μM
13	92,2	100	93,7
15	92,5	100	100
TFP	32,4	94,9	100

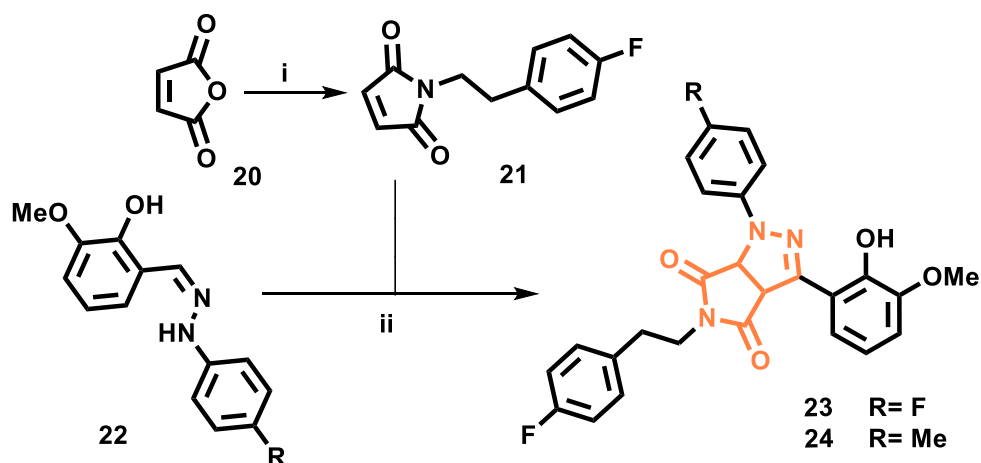
1.2.5. Antivirusinis poveikis

Virusai dėl savo struktūros ypatybių yra paprasčiausia gyvybės forma, turinti tiek gyvosios, tiek negyvosios gamtos bruožų [38]. Virusai neturi ląstelės būdingos sandaros bei savarankiškos medžiagų apykaitos. Dažniausiai sudaryti iš nukleininės rūgšties (DNR arba RNR) molekulės, kurią gaubia baltyminis apvalkalas – kapsidė. Pasižymi itin mažu dydžiu, todėl matuojami nanometrais ir stebimi tik pro elektroninį mikroskopą. Be to, virusai priskiriami prie parazitinių mikroorganizmų,

nes infekuoja šeiminko ląsteles, laisvai dauginasi bei naudojasi ten aptinkamomis maistinėmis medžiagomis [39]. Parazituoja mikrobu, nariuotakojų, augalų, gyvūnų, žmonių gyvoje ląstelėje ir inicijuoja individualias virusines ligas. Pavyzdžiui, žmonėms sukelia gripą, tymus, poliomielitą, AIDS, hepatitą, ŽIV, pūslelinę ir pan.

Į šeiminko ląstelę virusai patenka keliais būdais [38]. Vienas iš būdų, virusai geba produkuoti specialius fermentus, kurie ištirpina ląstelės apvalkalėlį. Padidėjus ląstelės pralaidumui, virusai įsvirkščia savo nukleorūgštį į jos vidų. Kitas variantas, virusai atsitiktinai patenka į šeiminko ląstelę iš aplinkos. Po kurio laiko virusus supantis baltyminis apvalkalas suskaidomas ląstelės citoplazmoje ir laisva nukleorūgštis pasklinda šeiminko ląstelės viduje. Inaktyvavę šeiminko DNR, virusai sintetina naujas savo kopijas, dauginasi bei sekina kolonizuotą organizmą.

Siekiant apsisaugoti nuo virusų sukeltų ligų, dažnai vartojamos įvairios vakcinos ar priešvirusiniai vaistai. Priklausomai nuo viruso tipo, kai kurias vakcinacijas tenka kartoti kasmet [40]. Štai pavyzdžiui, gripo virusas gali lengvai apsikeisti nukleorūgšties fragmentais, genais su kitu virusu, taip įgaunant naujų savybių. Anksčiau įgytas imuninis atsparumas tampa neveiksmingas prieš susiformavusią viruso atmainą. Organizmas dar neturi antikūnių, gebančių atpažinti tokio viruso antigeną ir išaukti imuninį organizmo atsaką. Todėl ieškoma naujų priešvirusinių poveikį turinčių preparatų, gebančių veiksmingai gydyti įvairias virusines ligas.



1.5. schema. Reagentai ir sąlygos: (i) NaOAc, (Ac)₂O, atitinkamas feniletilaminas, T_v; (ii) EtOH, T_v.

Kinijos mokslininkas G. N. Liu'is kartu su kolegomis atliko pirazolo darinių sintezę bei įvertino susintetintų junginių slopinamąjį poveikį žmogaus imunodeficito virusui (ŽIV) (1.5. lentelė) [41]. Šia viruso forma užsikrečiama per kraują, gleivinę ar pažeistą odą. Tokiuose organizmo skysčiuose kaip seilės, šlapimas, prakaitas bei ašaros ŽIV koncentracija yra pakankamai maža, todėl kontakto su oda metu pavojaus nėra [42]. Ligos atveju skiriami antiretrovirusiniai vaistai, pavyzdžiui, zidovudinas (AZT). Medikamentas pasirinktas kaip standartas, atliekant susintetintų pirazolo junginių anti-ŽIV

1.5. lentelė. Junginių 23 ir 24 antivirusinių savybių tyrimo rezultatai

Junginys	R	CC ₅₀ , μM	EC ₅₀ , μM	TI
23	F	> 418,88	3,98	> 105,26
24	Me	> 422,83	4,10	> 103,09
AZT	-	3779	0,0085	444,588

tyrimus [41]. Pagal gautus duomenis junginiams **23** ir **24** būdinga didesnė nei $> 400 \mu\text{M}$ citotoksinė koncentracija. Veiksminga gydomoji dozė yra $\sim 4 \mu\text{M}$, o AZT – $0,0085 \mu\text{M}$. Tad junginiai **23** ir **24** pasižymi mažesniu biologiniu aktyvumu lyginant su gautais AZT rezultatais.

Taip pat tyrimo metu nustatytas terapinis indeksas (TI). Tai santykis tarp citotoksinės (mirtinos) dozės ir efektyvios gydomosios dozės. Išsiaiškinta, kad junginių **23** ir **24** terapinis indeksas yra > 103 . Kuo didesnis vaisto terapinis indeksas, tuo jis mažiau toksiškas organizmui. Be to, vartojant tokius medikamentus rečiau susiduriama su perdozavimo grėsme. Todėl galima teigti, jog susintetinti pirazolo dariniai **23** ir **24** nėra toksiški žmogaus organizmui bei pasižymi pakankamai efektyviu slopinamuoju poveikiu.

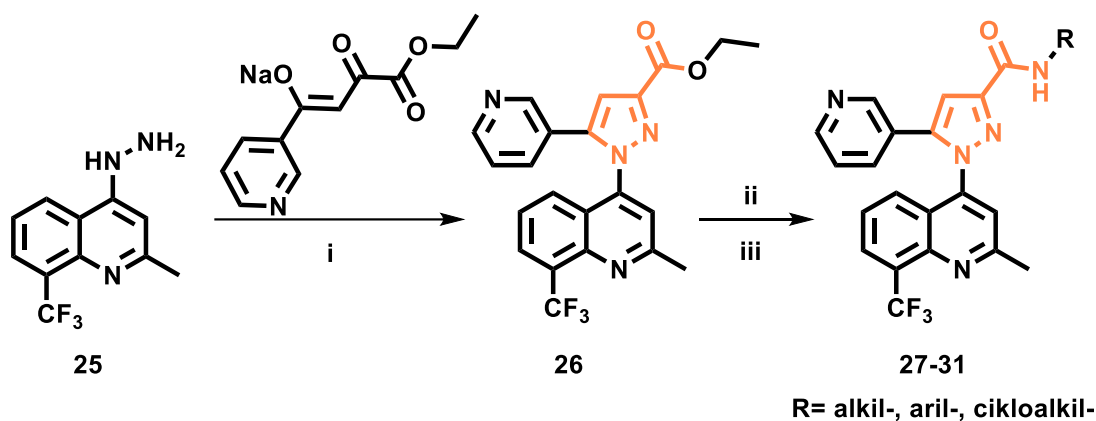
1.2.6. Antituberkuliozinis poveikis

Tuberkuliozė – tai lėtinė užkrečiama infekcinė liga, plintanti oro lašeliniu būdu. Žmogui tuberkuliozę sukelia mikobakterijos: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti* bei *M. canetti* [43]. Dėl panašių antigeninių savybių jos kartais vadinamos tuberkuliozės mikobakterijų kompleksu. Lietuvoje dažniausiai infekciją sukelia mikobakterija *M. tuberculosis*. Patogenas yra gana atsparus aplinkos veiksniams, išskyrus dienos šviesą bei UV spindulius. Tamsioje išlieka gyvybingas iki kelių mėnesių. Pavyzdžiui, tarp knygos puslapių sukėlėjas gali būti aktyvios formos iki 3 mėnesių, o kambaryje iki 1,5 mėnesio [43]. Iš kitų bakterijų išsiskiria atsparumu įvairioms rūgštims ir daugeliui dezinfektantų [43].

Tuberkuliozės bakterija patenka į aplinką, kai žmogus, sergantis atvira plaučių tuberkuliozės forma, kosti, čiaudi, skrepliuojasi ar kalba. Užtenka net visai nedidelio bakterijų kiekio, kad žmogus taptų infekuotas. Patekusios į plaučius sukelia sunkų kosulį, jaučiamas skausmas krūtinėje, žmogus pradeda skrepliuotis, galimi atsikosėjimai krauju. Tačiau ligai išsivystyti reikia laiko [44]. Procesas gali trukti nuo kelių mėnesių iki keliolikos metų. Pasitaiko atvejų, kad infekuoti asmenys niekada net nesuserga aktyvia tuberkuliozės forma. Tai vadinama latentine tuberkuliozės būseną. Šis terminas taikomas, kai tuberkulino mėginys yra teigiamas, tačiau neaptinkama jokių infekcijos požymių [45].

Tuberkuliozės gydymo kursas trunka 6 mėnesius. Vaistams jautri tuberkuliozės forma gydoma izoniazidu, rifampicinu, pirazinamidu ar etambutoliu [43]. Tai keturi efektyviausi vaistai nuo šios infekcijos. Tačiau kiekvieną dieną pasaulyje atsiranda nauji mikroorganizmų štamai, pasižymintys vienokiu ar kitokiu rezistentiškumo mechanizmu. Jų sukelta infekcija sunkiau išgydoma lyginant su ankstesniais atvejais. Todėl išskiriama ir vaistams atspari tuberkuliozės forma. Šiuo atveju taikomi kombinuoti gydymo metodai. Dažnai pacientai miršta, nes jokie žinomi preparatai nepasižymi pakankamu efektyvumu, kovojant su infekcijos sukėlėju. Todėl ieškoma naujų veiksmingų metodų, gebančių sustabdyti ir panaikinti patogenų keliamą grėsmę.

N. Nayak'o mokslinė grupė atliko pirazolo karboksamido darinių, turinčių piridino bei chinolino pakaitą, biologinių savybių tyrimus (1.6. lentelė) [46]. *In vitro* analizės metu stebėtas antituberkuliozinis poveikis prieš *M. tuberculosis* H₃₇Rv bakterijų štamus (1.6. lentelė). Junginiams **29** ir **31** būdingos stipriausios antituberkuliozinės savybės. Jų minimali slopinamoji koncentracija (MIC) yra $3,13 \mu\text{g/ml}$. Remiantis gautais duomenimis, susintetinta junginių klasė pasižymi mažesniu efektyvumu nei standartas izoniazidas (MIC = $0,1 \mu\text{g/ml}$), bet stipresniu poveikiu nei pirazinamidas (MIC = $50 \mu\text{g/ml}$). Junginiams **29** ir **31** būdingas panašus antituberkuliozinis efektyvumas kaip ir vaisto etambutolio. Taip pat ištirtas susintetintų junginių citotoksinis poveikis NIH 3T3 ląstelių

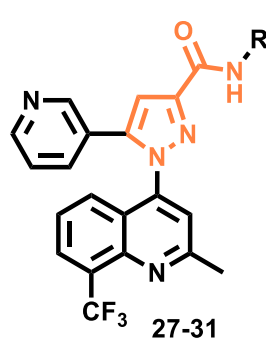


1.6. schema. Reagentai ir sąlygos: (i) AcOH, 105 °C; (ii) LiOH, THF/H₂O/MeOH (1:1:1), kamb. t.; (iii) HATU, DIPEA, atitinkamas aminas, DMF, kamb. t.

linijai. Tai jungiamojo audinio ląstelės, kurios atsakingos už tarpląstelinio užpildo komponentų (kolageno, glikoproteinų, glikozaminoglikanų) gamybą organizme. Esant 50 µg/ml koncentracijai, junginių **29** ir **31** citotoksinis poveikis sveikoms ląstelėms atitinkamai siekė 14,6 % bei 22,8 %. Tad pirazolo karboksamidai yra potencialūs antituberkulioziniai agentai.

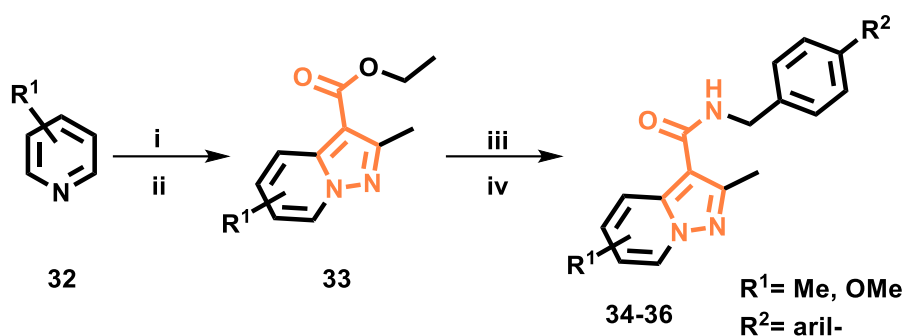
Be to, tyrimo metu nustatyta, jog karboksamidų dariniai, susintetinti iš benzilamino junginių, yra veiksmingesni antituberkulioziniai agentai nei gauti iš anilino analogų. Taigi amidinio ryšio sudarymas, suformuojant *N*-metileno grandinę (-CONHCH₂-) molekulės struktūroje, padidina junginių antituberkuliozinį aktyvumą.

1.6. lentelė. Junginių **27-31** antituberkuliozinių tyrimų duomenys



Junginys	R	MIC, µg/ml
27		25
28		12,5
29		3,13
30		50
31		3,13
Izoniazidas	-	0,1
Etambutolis	-	3,13
Pirazinamidas	-	50

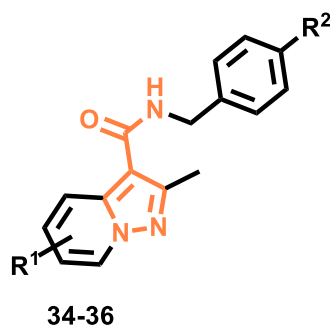
Tais pačiais metais kita mokslininkų komanda publikavo kondensuotų pirazolo junginių biologinio aktyvumo rezultatus (1.7. lentelė) [47]. J. Tang'as kartu su kolegomis atliko kondensuotų pirazolo sistemų, turinčių karboksamido fragmentą, sintezę bei savybių tyrimus. Nustatyta, jog junginiai **34** ir **36** pasižymi puikomis antituberkuliozinėmis savybėmis prieš H₃₇Rv bakterijų štamus (1.7. lentelė). Jiems būdingos MIC vertės atitinkamai yra 6,3 nM bei 5,6 nM. Be to, abiejų junginių IC₅₀ = 2,5 nM.



1.7. schema. Reagentai ir sąlygos: (i) DNPH, MeCN, 40 °C; (ii) K₂CO₃, DMF, kamb. t.; (iii) NaOH, EtOH, H₂O, 60 °C; (iv) HOBt, EDC, Et₃N, atitinkamas aminas, DMF, 80 °C.

Lyginant su standartu rifampicinu, junginiai **34** ir **36** yra efektyvesni prieš tirtus tuberkuliozės patogenus. Citotoksinio poveikio tyrimams pasirinkta VERO (beždžionių inkstų) ląstelių linija. Sveikoms ląstelėms citotoksinis poveikis pastebimas esant > 100 μM susintetintų junginių koncentracijoms. Tad pirazolo karboksamidai, turintys savo struktūroje piperazino ar piperidino pakaitą, pasižymi stipriu biologiniu aktyvumu.

1.7. lentelė. Junginių **34-36** antituberkuliozinių tyrimų duomenys



Junginys	R ¹	R ²	MIC, nM	IC ₅₀ , nM	IC ₉₀ , nM
34	5-Me		6,3	2,5	6,5
35	5-Me		11,0	5,1	12,0
36	5-OMe		5,6	2,5	5,7
Rifampicinas	-	-	6,5	4,1	6,9

Remiantis literatūros duomenų apžvalga galima teigti, jog tiek pakeistiems, tiek kondensuotiems pirazolo junginiams būdingas platus biologinių savybių spektras. Ypač didelį mokslinį susidomėjimą kelia pirazolo karboksamidų dariniai, kurie efektyviai slopina aktyvius deguonies radikalus, pasižymi antihelminciniu bei antituberkulioziniu poveikiu. Nepaisant didelės susintetintų pirazolo analogų gausos kuriami ir išbandomi nauji sintezės metodai bei atliekami gautų molekulių biologinio aktyvumo tyrimai.

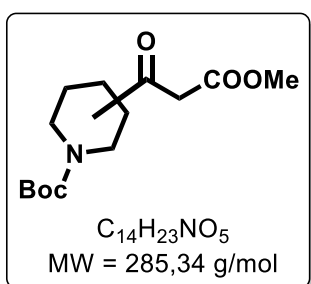
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų metodai ir naudota aparatūra

Visi projektui reikalingi pradiniai junginiai yra komerciškai prieinami (Sigma-Aldrich, Combi-bloks, Fluorochem). Jiems netaikytas joks gryninimo metodas, todėl iš karto naudoti tarpinių junginių bei tikslinių produktų sintezei. Visi projekto metu susintetinti junginiai gryninti ekstrakcijos ar kolonėlinės chromatografijos metodais. Chromatografinis gryninimas atliktas su Silica Gel 60 Å (230-400 μm, Merck). Reakcijų eigai stebėti taikyta plonasluoksnė chromatografija ant Silica Gel plokštelių (Merck Kieselgel 60 F254), naudojant UV lempą (254 nm). Lydymosi temperatūros (T_{lyd}) nustatytos Büchi Melting Point M-560 prietaisu ir nekoreguotos. IR spektrai (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}) užrašyti Bruker Vertex V70 spektrometru. Žemos rezoliucijos masių spektrai užrašyti Shimadzu LCMS-2020 (ESI⁺) prietaisu. Aukštos rezoliucijos masių spektrai užrašyti Bruker micro TOF-QIII (ESI⁺) masių spektrometru. Enantiomerinis grynumas tirtas Shimadzu LC-2030C prietaisu panaudojant chiralines kolonėles Amylose-SA bei Cellulose-SB. BMR spektrai (400 MHz ¹H BMR, 101 MHz ¹³C BMR bei 41 MHz ¹⁵N BMR) užrašyti 400 MHz Bruker Avance III spektrometru, naudojant CDCl₃ ar DMSO-*d*₆ tirpiklius. Vidinis standartas – tetrametilsilanas (TMS), o cheminis poslinkis δ išreikštas milijoninėmis dalimis (mln. d.). Susintetintų junginių struktūros įrodytos 1D ir 2D BMR metodais, užrašant COSY, HSQC ir HMBC spektrus.

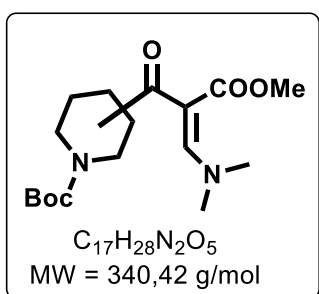
2.2. Junginių sintezės ir jų analizės duomenų aprašymas

2.2.1. *tert*-Butil 3- ir 4-(3-metoksi-3-oksopropanoil)piperidin-1-karboksilatai (2a-c)



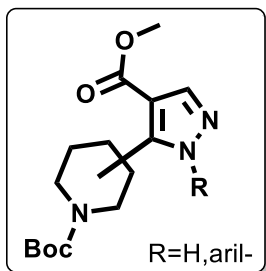
Atitinkama *N*-Boc-piperidino karboksirūgštis (4 g, 17,4 mmol) ištirpinta DCM (24 ml). Į gautą tirpalą sudėtas DMAP (4,26 g, 34,9 mmol) bei meldrumo rūgštis (2,77 g, 19,2 mmol). Į iki 0 °C temperatūros atšaldytą reakcijos mišinį porcijomis subertas EDC·HCl (3,68 g, 19,2 mmol). Reakcija vykdyta kambario temperatūroje 18 val. Reakcijai pasibaigus, reakcijos mišinys praskiestas DCM (10 ml) ir paeiliui praplautas 1 M KHSO₄ (2×15 ml) tirpalu bei sočiu NaCl tirpalu (20 ml). Organinis sluoksnius džiovintas bevandeniu Na₂SO₄, filtruotas ir tirpiklis išgarintas vakuumu. Gautas tarpinis junginys ištirpintas MeOH (20 ml) ir kaitintas tirpiklio virimo temperatūroje 5 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Gautas likutis iš karto naudotas kitame sintezės etape.

2.2.2. *tert*-Butil 3- ir 4-[(2*Z*)-3(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)-2-propenoil]piperidin-1-karboksilatai (3a-c)



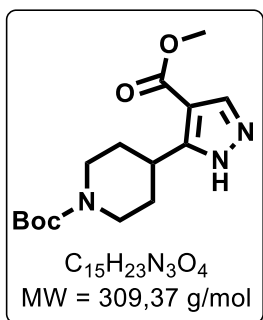
Atitinkamas tarpinis junginys **2** (4,7 g, 16,4 mmol) ištirpintas dioksane (24 ml). Į gautą tirpalą sulašintas *N,N*-dimetilformamido dimetilacetalis (4,4 ml, 32,8 mmol). Reakcijos mišinys kaitintas tirpiklio virimo temperatūroje 5 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Gautas tarpinis junginys iš karto naudotas kitoje sintezės stadijoje.

2.2.3. *tret*-Butil 3- ir 4-[4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatai (4-7)



Atitinkamas tarpinis junginys **3** (0,5 g, 1,5 mmol) ištirpintas EtOH (15 ml). Į gautą tirpalą subertas / sulašintas atitinkamas hidrazino darinys (1,5 mmol). Reakcijos mišinys kaitintas tirpiklio virimo temperatūroje 5 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO.

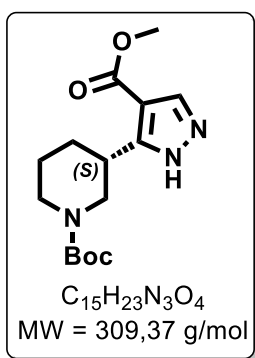
2.2.3.1. *tret*-Butil 4-[4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (4a)



Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3a** ir 55 % hidrazino hidrato vandeninis tirpalas (0,14 ml, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (7:1). Gauti balti junginio **4a** kristalai. Išeiga: 272 mg (60 % per keturias stadijas); T_{lyd} = 129,8 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,63–1,76 (m, 2H, Pip 3,5-H); 1,86–2,02 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,71–2,95 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,52 (tt, *J* = 12,2 Hz, 3,6 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,82 (s, 3H, OCH₃); 4,04–4,40 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,95 (s, 1H, Pir 3-H); 10,82 (br s, 1H, NH). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 28,6 (C(CH₃)₃); 31,0 (2×CH₂, Pip 3,5-C); 34,0 (Pip 4-C); 44,1 (2×CH₂, Pip 2,6-C); 51,3 (OCH₃); 79,9 (C(CH₃)₃); 110,3 (Pir 4-C); 138,8 (Pir 3-C); 149,6 (Pir 5-C); 155,0 (COOC(CH₃)₃); 164,2 (COOCH₃). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3208 (N-H); 2980; 1706 (C=O); 1655 (C=O); 1434; 1165; 763. **HRMS** (ESI⁺), *m/z* [M+Na]⁺: apskaičiuota 332,1581; nustatyta 332,1581.

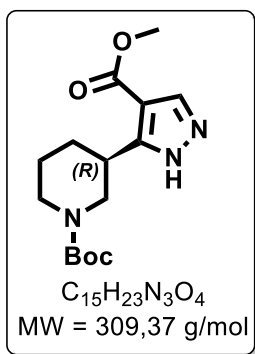
2.2.3.2. *tret*-Butil (3*S*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (4b)



Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3b** ir 55 % hidrazino hidrato vandeninis tirpalas (0,14 ml, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (9:1). Gauta gelsva junginio **4b** derva. Išeiga: 227 mg (50 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,50–1,69 (m, 2H, Pip 5-H); 1,75–1,91 (m, 1H, Pip 4-H); 1,98–2,11 (m, 1H, Pip 4-H); 2,96–3,14 (m, 1H, Pip 6-H); 3,29 (s, 1H, Pip 2-H); 3,45 (tt, *J* = 8,9 Hz, 3,9 Hz, 1H, Pip 3-H); 3,80 (s, 4H, OCH₃ ir Pip 6-H); 3,95–4,11 (m, 1H, Pip 2-H); 7,95 (s, 1H, Pir 3-H); 11,83 (br s, 1H, NH). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 24,6 (Pip 5-C); 28,5 (C(CH₃)₃); 29,8 (Pip 4-C); 34,1 (Pip 3-C); 44,3 (Pip 6-C); 47,4 (Pip 2-C); 51,3 (OCH₃); 80,1 (C(CH₃)₃); 110,7 (Pir 4-C); 138,2 (Pir 3-C); 151,8 (Pir 5-C); 155,3 (COOC(CH₃)₃); 164,0 (COOCH₃). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3219 (N-H); 2937; 1689 (C=O); 1661 (C=O); 1426; 1147; 783. **HRMS** (ESI⁺), *m/z* [M+Na]⁺: apskaičiuota 332,1581; nustatyta 332,1581.

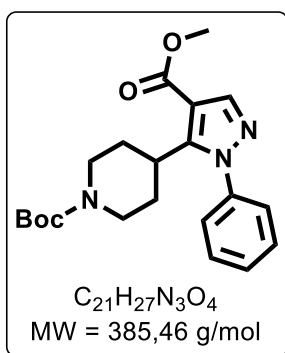
2.2.3.3. *tert*-Butil (3*R*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (4c)



Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3c** ir 55 % hidrazino hidrato vandeninis tirpalas (0,14 ml, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (7:1). Gauta gelsva junginio **4c** derva. Išeiga: 245 mg (54 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,53–1,69 (m, 2H, Pip 5-H); 1,78–1,95 (m, 1H, Pip 4-H); 1,98–2,11 (m, 1H, Pip 4-H); 3,05–3,24 (m, 1H, Pip 6-H); 3,29–3,53 (m, 2H, Pip 2,3-H); 3,67–3,85 (m, 4H, OCH₃ ir Pip 6-H); 3,89–4,02 (m, 1H, Pip 2-H); 7,97 (s, 1H, Pir 3-H); 10,82 (br s, 1H, NH). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 24,5 (Pip 5-C); 28,6 (C(CH₃)₃); 29,7 (Pip 4-C); 34,0 (Pip 3-C); 44,5 (Pip 6-C); 47,6 (Pip 2-C); 51,3 (OCH₃); 80,3 (C(CH₃)₃); 110,8 (Pir 4-C); 139,0 (Pir 3-C); 151,8 (Pir 5-C); 155,3 (COOC(CH₃)₃); 164,0 (COOCH₃). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3203 (N-H); 2980; 1714 (C=O); 1662 (C=O); 1148; 769. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+Na]⁺: apskaičiuota 332,1581; nustatyta 332,1579.

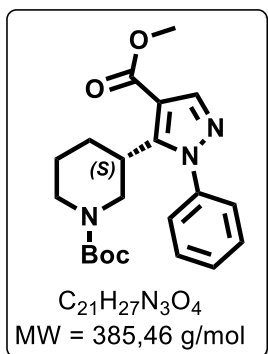
2.2.3.4. *tert*-Butil-4-[4-(metoksikarbonil)-1-fenil-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (5a)



Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3a** ir fenilhidrazinas (0,15 ml, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (7:1). Gauti gelsvi junginio **5a** kristalai. Išeiga: 425 mg (75 % per keturias stadijas); T_{lyd} = 153,5 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,51–1,62 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,25 (qd, *J* = 12,7 Hz, 4,4 Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,50–2,68 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,09 (tt, *J* = 12,4 Hz, 3,7 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,84 (s, 3H, OCH₃); 3,98–4,28 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,30–7,38 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,46–7,54 (m, 3H, Ph 2,4,6-H); 8,02 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 28,6 (C(CH₃)₃); 28,9 (2×CH₂, Pip 3,5-C); 35,3 (Pip 4-C); 43,8 (2×CH₂, Pip 2,6-C); 51,4 (OCH₃); 79,6 (C(CH₃)₃); 112,0 (Pir 4-C); 126,8 (2×CH, Ph 3,5-C); 129,5 (2×CH, Ph 2,6-C); 129,6 (Ph 4-C); 139,5 (Ph 1-C); 143,0 (Pir 3-C); 150,1 (Pir 5-C); 155,0 (COOC(CH₃)₃); 163,7 (COOCH₃). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -293,2 (N-Boc); -159,4 (Pir N-1); -74,7 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 2979; 1712 (C=O); 1674 (C=O); 1255; 765. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+Na]⁺: apskaičiuota 408,1894; nustatyta 408,1894.

2.2.3.5. *tert*-Butil (3*S*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-fenil-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (5b)



(3*S*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-fenil-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-

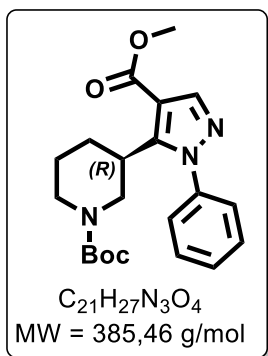
Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3b** ir fenilhidrazinas (0,15 ml, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (11:1). Gauta rusva junginio **5b** derva. Išeiga: 436 mg (77 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,62–1,77 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,46 (q, *J* = 13,3 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,80 (s, 1H, Pip 6-H); 2,94 (s, 1H, Pip 3-H); 3,50–3,73 (m, 1H, Pip 2-H); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,91–4,17 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,34–7,44 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,46–

7,57 (m, 3H, Ph 2,4,6-H); 8,05 (s, 1H, Pir 3-H). ^{13}C BMR (101 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 25,3 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 36,0 (Pip 3-C); 44,0 (Pip 6-C); 46,0 (Pip 2-C); 51,6 (OCH_3); 79,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 112,3 (Pir 4-C); 126,5 ($2\times\text{CH}$, Ph 3,5-C); 129,5 (Ph 4-C); 129,5 ($2\times\text{CH}$, Ph 2,6-C); 139,1 (Ph 1-C); 143,3 (Pir 3-C); 148,1 (Pir 5-C); 154,7 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 163,9 (COOCH_3). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2979; 1717 (C=O); 1684 (C=O); 1408; 1259; 757. MS, m/z: 386 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.3.6. *tret*-Butil karboksilatas (5c)

(3R)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-fenil-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (5c)

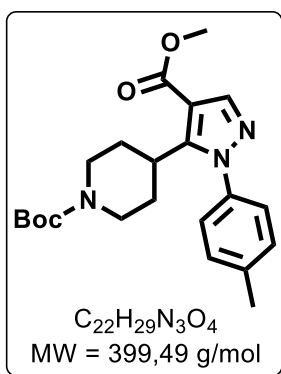


Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3c** ir fenilhidrazinas (0,15 ml, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/ Me_2CO (7:1). Gauta rusva junginio **5c** derva. Išeiga: 379 mg (67 % per keturias stadijas).

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,63–1,76 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,46 (qd, $J = 13,0$ Hz, 4,1 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,81 (t, $J = 13,0$ Hz, 1H, Pip 6-H); 2,94 (t, $J = 11,8$ Hz, 1H, Pip 3-H); 3,53–3,68 (m, 1H, Pip 2-H); 3,86 (s, 3H, OCH_3); 3,94–4,12 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,37–7,43 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,47–7,56 (m, 3H, Ph 2,4,6-H); 8,05 (s, 1H, Pir 3-H). ^{13}C BMR (101 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 25,3 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 36,0 (Pip 3-C); 43,7 (Pip 6-C); 46,1 (Pip 2-C); 51,6 (OCH_3); 79,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 112,3 (Pir 4-C); 126,5 ($2\times\text{CH}$, Ph 3,5-C); 129,4 (Ph 4-C); 129,5 ($2\times\text{CH}$, Ph 2,6-C); 139,1 (Ph 1-C); 143,3 (Pir 3-C); 148,1 (Pir 5-C); 155,4 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 163,9 (COOCH_3). ^{15}N BMR (41 MHz, CDCl_3): δ mln. d. -158,0 (Pir N-1); -75,2 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2975; 1716 (C=O); 1687 (C=O); 1261; 1099; 765. MS, m/z: 386 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.3.7. *tret*-Butil karboksilatas (6a)

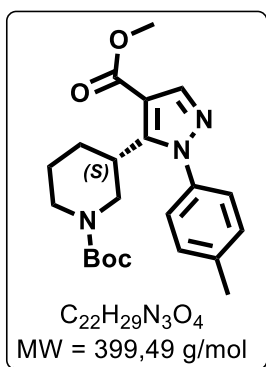
4-[4-(metoksikarbonil)-1-(4-metilfenil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (6a)



Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3a** ir *p*-tolilhidrazino hidrochloridas (233 mg, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/ Me_2CO (7:1). Gauti gelsvi junginio **6a** kristalai. Išeiga: 376 mg (64 % per keturias stadijas); $T_{\text{lyd}} = 134,4$ °C.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 1,44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,49–1,59 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,08–2,30 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,44 (s, 3H, CH_3); 2,49–2,72 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,03–3,17 (m, 1H, Pip 4-H); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 3,98–4,32 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,15–7,23 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,26–7,33 (m, 2H, Ph 2,6-H); 8,00 (s, 1H, Pir 3-H). ^{13}C BMR (101 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 28,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 28,9 ($2\times\text{CH}_2$, Pip 3,5-C); 35,3 (Pip 4-C); 43,9 ($2\times\text{CH}_2$, Pip 2,6-H); 51,4 (OCH_3); 79,6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 111,8 (Pir 4-C); 126,5 ($2\times\text{CH}$, Ph 3,5-C); 130,0 ($2\times\text{CH}$, Ph 2,6-C); 137,0 (Ph 1-C); 139,7 (Ph 4-C); 142,9 (Pir 3-C); 150,1 (Pir 5-C); 155,0 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 163,8 (COOCH_3). ^{15}N BMR (41 MHz, CDCl_3): δ mln. d. -293,5 (N-Boc); -158,6 (Pir N-1); -74,7 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2980; 1703 (C=O); 1688 (C=O); 1255; 779. HRMS (ESI $^+$), m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: apskaičiuota 422,2050; rasta 422,2051.

2.2.3.8. *tert*-Butil karboksilatas (6b)

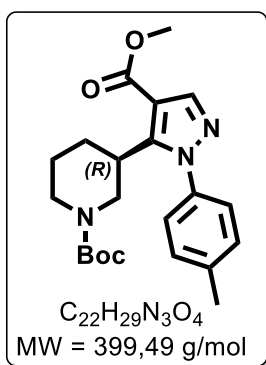


(3S)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-(4-metilfenil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-

Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3b** ir *p*-tolilhidrazino hidrochloridas (233 mg, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (9:1). Gauta rusva junginio **6b** derva. Išeiga: 475 mg (81 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,61–1,74 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,43 (s, 4H, Pip 4-H ir CH₃); 2,79 (s, 1H, Pip 6-H); 2,93 (s, 1H, Pip 3-H); 3,48–3,71 (m, 1H, Pip 2-H); 3,85 (s, 3H, OCH₃); 3,89–4,17 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,25–7,35 (m, 4H, Ph 2,3,5,6-H); 8,03 (s, 1H, Pir 3-H). ¹³C BMR (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 21,4 (CH₃); 25,1 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 (C(CH₃)₃); 36,2 (Pip 3-C); 43,5 (Pip 6-C); 46,4 (Pip 2-C); 51,5 (OCH₃); 79,5 (C(CH₃)₃); 112,1 (Pir 4-C); 126,3 (2×CH, Ph 3,5-C); 130,0 (2×CH, Ph 2,6-C); 136,6 (Ph 1-C); 139,6 (Ph 4-C); 143,1 (Pir 3-C); 148,1 (Pir 5-C); 154,7 (COOC(CH₃)₃); 164,0 (COOCH₃). IR (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 2930; 1714 (C=O); 1688 (C=O); 1261; 822. MS, m/z: 400 [M+H]⁺.

2.2.3.9. *tert*-Butil karboksilatas (6c)

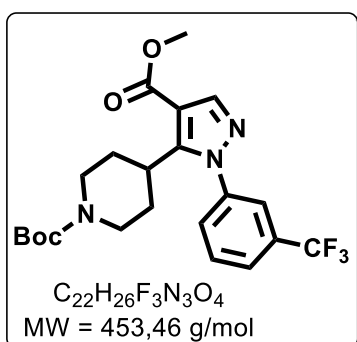


(3R)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-(4-metilfenil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-

Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3c** ir *p*-tolilhidrazino hidrochloridas (233 mg, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (7:1). Gauta rusva junginio **6c** derva. Išeiga: 458 mg (78 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,61–1,77 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,43 (s, 4H, Pip 4-H ir CH₃); 2,79 (s, 1H, Pip 6-H); 2,93 (s, 1H, Pip 3-H); 3,51–3,70 (m, 1H, Pip 2-H); 3,85 (s, 3H, OCH₃); 3,89–4,20 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,24–7,34 (m, 4H, Ph 2,3,5,6-H); 8,03 (s, 1H, Pir 3-H). ¹³C BMR (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 21,4 (CH₃); 25,3 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 (C(CH₃)₃); 36,0 (Pip 3-C); 43,4 (Pip 6-C); 46,4 (Pip 2-C); 51,5 (OCH₃); 79,5 (C(CH₃)₃); 112,1 (Pir 4-C); 126,3 (2×CH, Ph 3,5-C); 130,0 (2×CH, Ph 2,6-C); 136,6 (Ph 1-C); 139,6 (Ph 4-C); 143,1 (Pir 3-C); 148,1 (Pir 5-C); 154,7 (COOC(CH₃)₃), 164,0 (COOCH₃). ¹⁵N BMR (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -158,1 (Pir N-1); -74,9 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 2976; 1710 (C=O); 1692 (C=O); 1148; 824. MS, m/z: 300 [M-Boc+H]⁺.

2.2.3.10. *tert*-Butil 4-[4-(metoksikarbonil)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (7a)

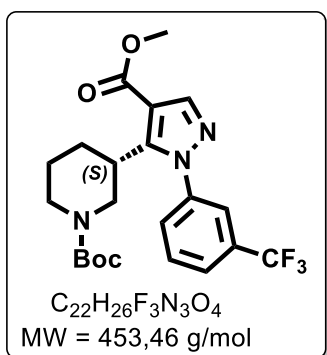


Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3a** ir 3-(trifluormetil)fenilhidrazino hidrochloridas (312 mg, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (5:1). Gauti gelsvi junginio **7a** kristalai. Išeiga: 506 mg (76 % per keturias stadijas); T_{lyd} = 114,4 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,45 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,51–1,69 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,23–2,38 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,49–2,74 (m,

2H, Pip 2,6-H); 3,04 (tt, $J = 12,2$ Hz, 3,6 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,85 (s, 3H, OCH₃); 4,02–4,35 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,52–7,58 (m, 1H, Ph 5-H); 7,62–7,70 (m, 2H, Ph 2,6-H); 7,75–7,81 (m, 1H, Ph 4-H); 8,05 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 28,6 (C(CH₃)₃); 28,9 (2 \times CH₂, Pip 3,5-C); 35,5 (Pip 4-C); 43,9 (2 \times CH₂, Pip 2,6-C); 51,6 (OCH₃); 79,7 (C(CH₃)₃); 112,7 (Pir 4-C); 123,8 (q, $J = 3,7$ Hz, Ph 2-C); 124,8 (q, $J = 271,5$ Hz, CF₃); 126,3 (q, $J = 3,6$ Hz, Ph 4-C); 129,9 (Ph 5-C); 130,2 (Ph 6-C); 132,3 (q, $J = 33,4$ Hz, Ph 3-C); 139,9 (Ph 1-C); 143,6 (Pir 3-C); 150,2 (Pir 5-C); 154,9 (COOC(CH₃)₃); 163,5 (COOCH₃). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -162,3 (Pir N-1), -74,3 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{\max} , cm⁻¹): 2980; 1714 (C=O); 1686 (C=O); 1169; 1062. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+Na]⁺: apskaičiuota 476,1768; rasta 476,1768.

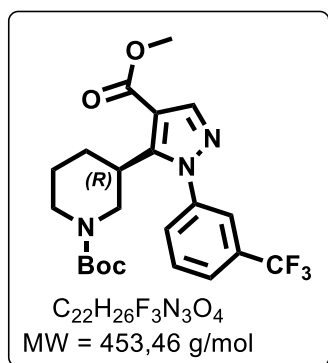
2.2.3.11. *tert*-Butil (3*S*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (7b)



Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3b** ir 3-(trifluormetil)fenilhidrazino hidrochloridas (312 mg, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (11:1). Gauta rusva junginio **7b** derva. Išeiga: 420 mg (63 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,38 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,62–1,83 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,49 (qd, $J = 13,3$ Hz, 4,3 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,88 (s, 2H, Pip 3,6-H); 3,49–3,74 (m, 1H, Pip 2-H); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,94–4,32 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,47–7,61 (m, 1H, Ph 5-H); 7,63–7,69 (m, 1H, Ph 6-H); 7,69–7,73 (m, 1H, Ph 2-H); 7,73–7,81 (m, 1H, Ph 4-H); 8,07 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 25,3 (Pip 5-C); 27,5 (Pip 4-C); 28,4 (C(CH₃)₃); 36,0 (Pip 3-C); 43,4 (Pip 6-C); 45,5 (Pip 2-C); 51,7 (OCH₃); 79,7 (C(CH₃)₃); 112,9 (Pir 4-C); 123,4 (q, $J = 273,7$ Hz, CF₃); 123,6 (Ph 2-C); 126,1 (Ph 4-C); 129,6 (Ph 5-C); 130,1 (Ph 6-C); 132,3 (d, $J = 30,3$ Hz, Ph 3-C); 139,5 (Ph 1-C); 143,8 (Pir 3-C); 148,3 (Pir 5-C); 154,8 (COOC(CH₃)₃); 163,7 (COOCH₃). **IR** (FT-IR, ν_{\max} , cm⁻¹): 2951; 1717 (C=O); 1688 (C=O); 1130; 1099. **MS**, m/z : 454 [M+H]⁺.

2.2.3.12. *tert*-Butil (3*R*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (7c)

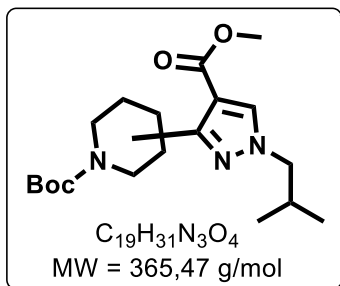


Sintezės metu naudotas tarpinis junginys **3c** ir 3-(trifluormetil)fenilhidrazino hidrochloridas (312 mg, 1,5 mmol). Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (5:1). Gauta rusva junginio **7c** derva. Išeiga: 526 mg (79 % per keturias stadijas).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,38 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,66–1,80 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,49 (qd, $J = 13,2$ Hz, 4,3 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,72–3,01 (m, 2H, Pip 3,6-H); 3,51–3,74 (m, 1H, Pip 2-H); 3,87 (s, 3H, OCH₃); 3,94–4,25 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,49–7,63 (m, 1H, Ph 5-H); 7,63–7,67 (m, 1H, Ph 6-H); 7,68–7,73 (m, 1H, Ph 2-H); 7,73–7,84 (m, 1H, Ph 4-H); 8,07 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 25,3 (Pip 5-C); 27,5 (Pip 4-C); 28,5 (C(CH₃)₃); 36,0 (Pip 3-C); 44,0 (Pip 6-C); 46,2 (Pip 2-C); 51,7 (OCH₃); 79,7 (C(CH₃)₃); 112,9 (Pir 4-C); 123,2 (q, $J = 273,7$ Hz, CF₃); 123,6 (Ph 2-C); 126,2 (Ph 4-C); 129,6 (Ph 5-C); 130,1 (Ph 6-C); 132,4 (d, $J = 36,3$ Hz, Ph 3-C); 139,5 (Ph

1-C); 143,8 (Pir 3-C); 148,3 (Pir 5-C); 154,9 (COOC(CH₃)₃); 163,7 (COOCH₃). ¹⁵N BMR (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -160,5 (Pir N-1), -74,8 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 2951; 1717 (C=O); 1688 (C=O); 1130; 1098. MS, m/z: 354 [M-Boc+H]⁺.

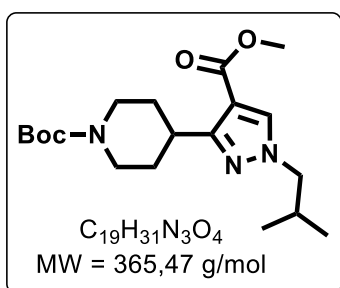
2.2.4. *tert*-Butil 3- ir 4-[4-(metoksikarbonil)-1-(2-metilpropil)-1*H*-pirazol-3-il]piperidin-1-karboksilatai (8a-c)



Atitinkamas junginys **4a-c** (100 mg, 0,3 mmol) ištirpintas DMF (0,75 ml). Į gautą tirpalą sudėtas KOH (27 mg, 0,5 mmol). Tada sulašintas 1-brom-2-metilpropanas (0,11 ml, 1 mmol). Reakcijos mišinys paliktas suktis kambario temperatūroje 4 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Reakcijos mišinys ištirpintas EtOAc (10 ml) ir paeilui praplautas H₂O_{dist} (2×15 ml) bei sočiu NaCl tirpalu (15 ml). Organinis sluoksnis džiovintas bevandeniu Na₂SO₄,

filtruotas ir tirpiklis išgarintas vakuumu. Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (9:1).

2.2.4.1. *tert*-Butil 4-[4-(metoksikarbonil)-1-(2-metilpropil)-1*H*-pirazol-3-il]piperidin-1-karboksilatas (8a)

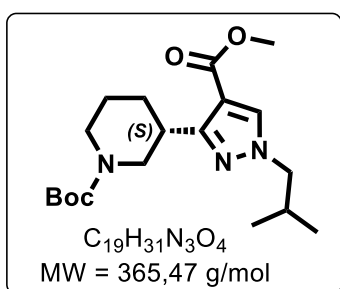


Reakcija vykdyta, naudojant junginį **4a**. Gauti balti junginio **8a** kristalai. Išeiga: 77 mg (65 %); T_{lyd} = 76 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 0,87 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H, CH(CH₃)₂); 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,62–1,78 (m, 2H, Pip 3,5-H); 1,81–1,95 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,11–2,24 (m, 1H, H_{ipr}); 2,75–2,96 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,34 (tt, *J* = 11,6 Hz, 3,7 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 3,82 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂); 4,05–4,31 (m, 2H, Pip 2,6-H);

7,75 (s, 1H, Pir 5-H). ¹³C BMR (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 19,9 (CH(CH₃)₂); 28,6 (C(CH₃)₃); 29,4 (CH(CH₃)₂); 31,2 (2×CH₂, Pip 3,5-C); 34,9 (Pip 4-C); 44,3 (2×CH₂, Pip 2,6-C); 51,1 (OCH₃); 59,9 (CH₂); 79,3 (C(CH₃)₃); 110,2 (Pir 4-C); 134,2 (Pir 5-C); 154,9 (Pir 3-C); 157,9 (COOC(CH₃)₃); 164,0 (COOCH₃). ¹⁵N BMR (41 MHz, CDCl₃): δ ppm -291,4 (N-Boc); -170,8 (Pir N-2); -77,1 (Pir N-1). IR (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 2980; 1686 (C=O); 1539; 1271; 778. HRMS (ESI⁺), m/z [M+Na]⁺: apskaičiuota 388,2207; rasta 388,2207.

2.2.4.2. *tert*-Butil (3*S*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-(2-metilpropil)-1*H*-pirazol-3-il]piperidin-1-karboksilatas (8b)



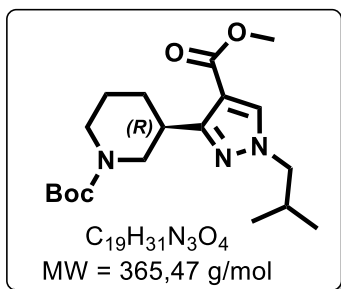
Reakcija vykdyta, naudojant junginį **4b**. Gauta permatoma junginio **8b** derva. Išeiga: 56 mg (47 %).

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 0,79 (d, *J* = 7,1 Hz, 6H, CH(CH₃)₂); 1,36 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,29–1,70 (m, 3H, Pip 4,5-H); 1,86–2,16 (m, 2H, Pip 4-H ir H_{ipr}); 2,61–2,74 (m, 1H, Pip 6-H); 2,81–2,97 (m, 1H, Pip 2-H); 3,18–3,30 (m, 1H, Pip 3-H); 3,70 (s, 3H, OCH₃); 3,75 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂); 3,91–4,26 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,70 (s, 1H, Pir

5-H). ¹³C BMR (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 19,7 (CH(CH₃)₂); 25,2 (Pip 5-C); 28,3 (C(CH₃)₃); 29,2 (CH(CH₃)₂); 30,3 (Pip 4-C); 35,2 (Pip 3-C); 43,7 (Pip 6-C); 48,9 (Pip 2-C); 51,0 (OCH₃); 59,7 (CH₂);

79,1 ($C(CH_3)_3$); 110,6 (Pir 4-C); 134,1 (Pir 5-C); 154,7 (Pir 3-C); 155,7 ($COOC(CH_3)_3$); 163,6 ($COOCH_3$). ^{15}N BMR (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -291,4 (N-Boc); -169,7 (Pir N-2); -76,2 (Pir N-1). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2935; 1687 (C=O); 1418; 1147; 857. HRMS (ESI⁺), m/z $[M+Na]^+$: apskaičiuota 388,2207; rasta 388,2207.

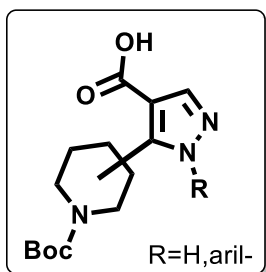
2.2.4.3. *tert*-Butil (3*R*)-3-[4-(metoksikarbonil)-1-(2-metilpropil)-1*H*-pirazol-3-il]piperidin-1-karboksilatas (8c)



Reakcija vykdyta, naudojant junginį **4c**. Gauti permatomi junginio **8c** kristalai. Išeiga: 46 mg (39 %); $T_{lyd} = 87,8$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 0,87 (d, $J=6,8$, 6H, $CH(CH_3)_2$); 1,44 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,51–1,78 (m, 3H, Pip 4,5-H); 1,97–2,11 (m, 1H, Pip 4-H); 2,11–2,24 (m, 1H, H_{iPr}); 2,74 (t, $J = 11,8$ Hz, 1H, Pip 6-H); 2,84–3,07 (m, 1H, Pip 2-H); 3,31 (tt, $J = 11,2$ Hz, 3,8 Hz, 1H, Pip 3-H); 3,70–3,88 (m, 5H, CH_2 ir OCH_3); 4,00–4,43 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,76 (s, 1H, Pir 5-H). ^{13}C BMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 19,9 ($CH(CH_3)_2$); 25,4 (Pip 5-C); 28,6 ($C(CH_3)_3$); 29,4 ($CH(CH_3)_2$); 30,5 (Pip 4-C); 35,4 (Pip 3-C); 43,7 (Pip 6-C); 48,8 (Pip 2-C); 51,2 (OCH_3); 59,9 (CH_2); 79,3 ($C(CH_3)_3$); 110,8 (Pir 4-C); 134,2 (Pir 5-C); 154,9 (Pir 3-C); 155,9 ($COOC(CH_3)_3$); 163,9 ($COOCH_3$). ^{15}N BMR (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -290,6 (N-Boc); -170,3 (Pir N-2); -76,2 (Pir N-1). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2979; 1712 (C=O); 1673 (C=O); 1094; 784. HRMS (ESI⁺), m/z $[M+Na]^+$: apskaičiuota 388,2207; rasta 388,2206.

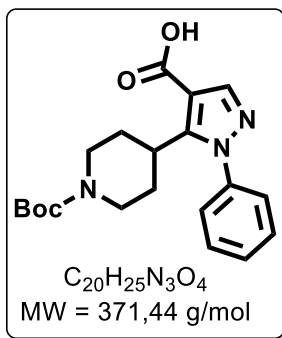
2.2.5. 5-[1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidinil]-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9a-i)



Atitinkamas junginys **5-7** (300 mg) ištirpintas MeOH (0,1 M). Į gautą tirpalą sulašintas 2 M NaOH (4 ekv.). Reakcijos mišinys kaitintas tirpiklio virimo temperatūroje 5 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Reakcijos mišinys ištirpintas H_2O_{dist} (15 ml) ir paeiliui praplautas EtOAc (2×15 ml). Tada vandeninis sluoksnis parūgštintas 1 M $KHSO_4$ tirpalu (pH = 1) ir praplautas EtOAc (2×15 ml). Pastarasis organinis sluoksnis džiovintas bevandeniu Na_2SO_4 , filtruotas ir tirpiklis išgarintas vakuumu.

Gautas junginys iš karto naudotas kitame sintezės etape.

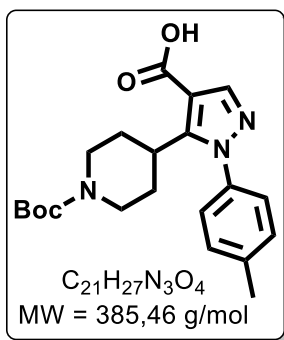
2.2.5.1. 5-[1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-4-il]-1-fenil-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9a)



Gauti rusvi junginio **9a** kristalai. Išeiga: 240 mg (83 %); $T_{lyd} = 192,2$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,57 (d, $J = 12,8$ Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,26 (qd, $J = 12,7$ Hz, 4,3 Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,60 (s, 2H, Pip 2,6-H); 3,12 (tt, $J = 12,5$ Hz, 3,6 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,97–4,30 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,31–7,38 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,47–7,57 (m, 3H, Ph 2,4,6-H); 8,09 (s, 1H, Pir 3-H); 9,40 (br s, 1H, OH). ^{13}C BMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 28,6 ($C(CH_3)_3$); 28,8 (2× CH_2 , Pip 3,5-C); 35,4 (Pip 4-C); 44,9 (2× CH_2 , Pip 2,6-C); 79,8 ($C(CH_3)_3$); 111,5 (Pir 4-C); 126,8 (2×CH, Ph 3,5-C); 129,6 (2×CH, Ph 2,6-C); 129,7 (Ph 4-C); 139,3 (Ph 1-C); 143,9 (Pir 3-C); 150,9 (Pir 5-C); 155,0 ($COOC(CH_3)_3$); 168,4 (COOH). ^{15}N BMR (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -158,5 (Pir N-1); -74,3 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2852; 1675 (C=O); 1547; 1424; 764. MS, m/z : 370 $[M-H]^-$.

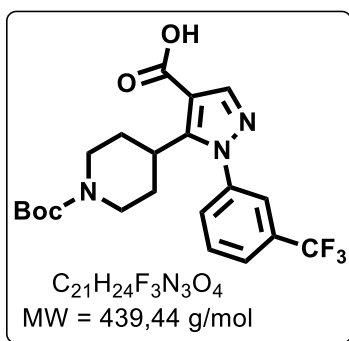
2.2.5.2. 5-[1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-4-il]-1-(4-metilfenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9b)



Gauti rusvi junginio **9b** kristalai. Išeiga: 275 mg (95 %); $T_{lyd} = 192,9$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,56 (d, $J = 12,8$ Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,24 (qd, $J = 12,7$ Hz, 4,3 Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,45 (s, 3H, CH_3); 2,60 (s, 2H, Pip 2,6-H); 3,13 (tt, $J = 12,3$ Hz, 3,7 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,95–4,29 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,18–7,24 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,27–7,34 (m, 2H, Ph 2,6-H); 8,07 (s, 1H, Pir 3-H); 10,07 (br s, 1H, OH). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 28,6 ($C(CH_3)_3$); 28,8 ($2 \times CH_2$, Pip 3,5-C); 35,3 (Pip 4-C); 44,9 ($2 \times CH_2$, Pip 2,6-C); 79,7 ($C(CH_3)_3$); 111,3 (Pir 4-C); 126,5 ($2 \times CH$, Ph 3,5-C); 130,1 ($2 \times CH$, Ph 2,6-C); 136,8 (Ph 1-C); 139,9 (Ph 4-C); 143,7 (Pir 3-C); 150,9 (Pir 5-C); 155,0 ($COOC(CH_3)_3$); 168,4 (COOH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -157,5 (Pir N-1); -74,3 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2915; 1677 (C=O); 1546; 1425; 766. **MS**, m/z: 384 [M-H]⁻.

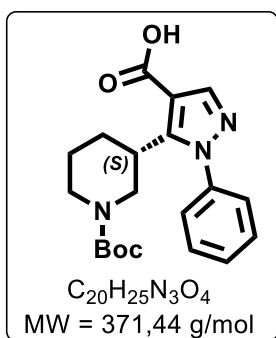
2.2.5.3. 5-[1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-4-il]-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9c)



Gauti rusvi junginio **9c** kristalai. Išeiga: 285 mg (98 %); $T_{lyd} = 168,9$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,47 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,52–1,69 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,31 (qd, $J = 12,6$ Hz, 4,3 Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,61 (s, 2H, Pip 2,6-H); 3,06 (tt, $J = 12,4$ Hz, 3,6 Hz, 1H, Pip 4-H); 4,12 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, Pip 2,6-H); 7,54–7,59 (m, 1H, Ph 5-H); 7,63–7,72 (m, 2H, Ph 2,6-H); 7,76–7,83 (m, 1H, Ph 4-H); 8,11 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 28,5 ($C(CH_3)_3$); 28,8 ($2 \times CH_2$, Pip 3,5-C); 35,5 (Pip 4-C); 44,2 ($2 \times CH_2$, Pip 2,6-C); 79,9 ($C(CH_3)_3$); 112,2 (Pir 4-C); 123,4 (q, $J = 273,7$ Hz, CF_3); 123,9 (d, $J = 3,8$ Hz, Ph 2-C); 126,5 (d, $J = 3,8$ Hz, Ph 4-C); 129,9 (Ph 5-C); 130,3 (Ph 6-C); 132,3 (q, $J = 33,4$ Hz, Ph 3-C); 139,7 (Ph 1-C); 144,4 (Pir 3-C); 151,0 (Pir 5-C); 155,0 ($COOC(CH_3)_3$); 168,0 (COOH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2933; 1678 (C=O); 1542; 1133; 764. **MS**, m/z: 438 [M-H]⁻.

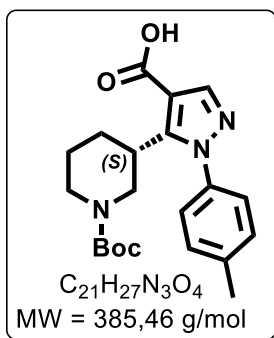
2.2.5.4. 5-[(3*S*)-1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-3-il]-1-fenil-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9d)



Gauti gelsvi junginio **9d** kristalai. Išeiga: 243 mg (84 %); $T_{lyd} = 89,5$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,41 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,62–1,78 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,45 (qd, $J = 12,7$ Hz, 7,3 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,76 (s, 1H, Pip 6-H); 2,98 (s, 1H, Pip 3-H); 3,62 (s, 1H, Pip 2-H); 3,87–4,21 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,36–7,45 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,47–7,57 (m, 3H, Ph 2,4,6-H); 8,15 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 25,2 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,1 (Pip 3-C); 43,5 (Pip 6-C); 46,3 (Pip 2-C); 79,8 ($C(CH_3)_3$); 111,7 (Pir 4-C); 126,5 ($2 \times CH$, Ph 3,5-C); 129,6 ($3 \times CH$, Ph 2,4,6-C); 138,9 (Ph 1-C); 144,1 (Pir 3-C); 148,9 (Pir 5-C); 154,7 ($COOC(CH_3)_3$); 168,4 (COOH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2930; 1687 (C=O); 1412; 1148; 765. **MS**, m/z: 370 [M-H]⁻.

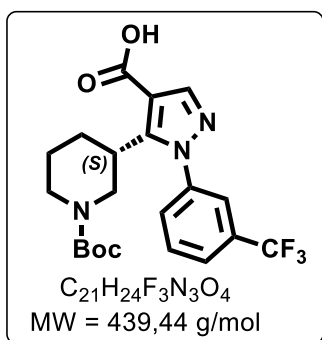
2.2.5.5. 5-[(3S)-1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-3-il]-1-(4-metilfenil)-1H-pirazol-4-karboksirūgštis (9e)



Gauti gelsvi junginio **9e** kristalai. Išeiga: 229 mg (79 %); $T_{lyd} = 102,7\text{ }^{\circ}C$.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,41 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,70 (t, $J = 16,0$ Hz, 2H, Pip 4,5-H); 2,44 (s, 4H, Pip 4-H ir CH_3); 2,76 (s, 1H, Pip 6-H); 2,97 (s, 1H, Pip 3-H); 3,61 (s, 1H, Pip 2-H); 3,89–4,22 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,03–7,42 (m, 4H, Ph 2,3,5,6-H); 8,13 (s, 1H, Pir 3-H); 10,52 (br s, 1H, OH). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 25,2 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,1 (Pip 3-C); 43,6 (Pip 6-C); 46,3 (Pip 2-C); 79,7 ($C(CH_3)_3$); 111,6 (Pir 4-C); 126,3 ($2\times CH$, Ph 3,5-C); 130,1 ($2\times CH$, Ph 2,6-C); 136,4 (Ph 1-C); 139,8 (Ph 4-C); 144,0 (Pir 3-C); 148,9 (Pir 5-C); 154,7 ($COOC(CH_3)_3$); 168,4 (COOH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2928; 1689 (C=O); 1416; 1147; 821. **MS**, m/z: 384 [M-H] $^-$.

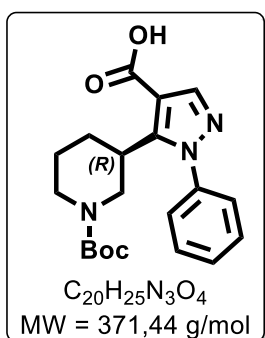
2.2.5.6. 5-[(3S)-1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-3-il]-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1H-pirazol-4-karboksirūgštis (9f)



Gauti gelsvi junginio **9f** kristalai. Išeiga: 230 mg (79 %); $T_{lyd} = 104,0\text{ }^{\circ}C$.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,64–1,87 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,47 (qd, $J = 13,0$ Hz, 4,0 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,79 (s, 1H, Pip 6-H); 2,93 (s, 1H, Pip 3-H); 3,62 (s, 1H, Pip 2-H); 3,87–4,30 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,53–7,75 (m, 3H, Ph 2,5,6-H); 7,75–7,85 (m, 1H, Ph 4-H); 8,18 (s, 1H, Pir 3-H); 10,21 (br s, 1H, OH). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 25,3 (Pip 5-C); 27,5 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,1 (Pip 3-C); 44,4 (Pip 6-C); 46,3 (Pip 2-C); 79,9 ($C(CH_3)_3$); 112,3 (Pir 4-C); 123,5 (q, $J = 273,7$ Hz, CF_3); 123,7 (Ph 2-C); 126,4 (Ph 4-C); 129,7 (Ph 6-C); 130,2 (Ph 5-C); 132,5 (Ph 3-C); 139,3 (Ph 1-C); 144,6 (Pir 3-C); 149,1 (Pir 5-C); 154,8 ($COOC(CH_3)_3$); 168,1 (COOH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2932; 1687 (C=O); 1547; 1130; 698. **MS**, m/z: 438 [M-H] $^-$.

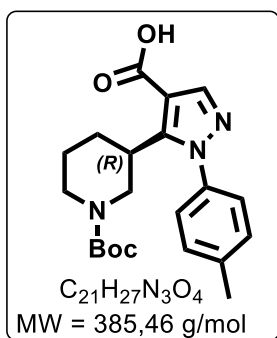
2.2.5.7. 5-[(3R)-1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-3-il]-1-fenil-1H-pirazol-4-karboksirūgštis (9g)



Gauti rusvi junginio **9g** kristalai. Išeiga: 254 mg (88 %); $T_{lyd} = 85,7\text{ }^{\circ}C$.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,41 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,60–1,80 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,38–2,52 (m, 1H, Pip 4-H); 2,76 (s, 1H, Pip 6-H); 2,97 (s, 1H, Pip 3-H); 3,45–3,75 (m, 1H, Pip 2-H); 3,87–4,23 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,36–7,44 (m, 2H, Ph 3,5-H); 7,49–7,57 (m, 3H, Ph 2,4,6-H); 8,15 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 25,2 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,1 (Pip 3-C); 43,5 (Pip 6-C); 46,3 (Pip 2-C); 79,7 ($C(CH_3)_3$); 111,8 (Pir 4-C); 126,5 ($2\times CH$, Ph 3,5-C); 129,6 ($3\times CH$, Ph 2,4,6-C); 138,9 (Ph 1-C); 144,1 (Pir 3-C); 148,8 (Pir 5-C); 154,7 ($COOC(CH_3)_3$); 168,3 (COOH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -157,1 (Pir N-1); -74,9 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2930; 1686 (C=O); 1412; 1147; 764. **MS**, m/z: 370 [M-H] $^-$.

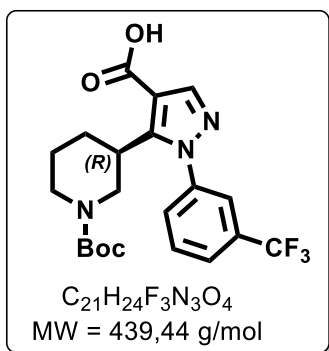
2.2.5.8. 5-[(3*R*)-1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-3-il]-1-(4-metilfenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9h)



Gauta rusva junginio **9h** derva. Išeiga: 269 mg (93 %).

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,41 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,69 (t, $J = 16,2$ Hz, 2H, Pip 4,5-H); 2,44 (s, 4H, Pip 4-H ir CH_3); 2,75 (s, 1H, Pip 6-H); 2,96 (s, 1H, Pip 3-H); 3,60 (s, 1H, Pip 2-H); 3,83–4,25 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,21–7,34 (m, 4H, Ph 2,3,5,6-H); 8,12 (s, 1H, Pir 3-H); 10,29 (br s, 1H, OH). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 25,3 (Pip 5-C); 27,4 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,1 (Pip 3-C); 43,4 (Pip 6-C); 46,4 (Pip 2-C); 79,7 ($C(CH_3)_3$); 111,5 (Pir 4-C); 126,3 ($2 \times CH$, Ph 3,5-C); 130,1 ($2 \times CH$, Ph 2,6-C); 136,4 (Ph 1-C); 139,8 (Ph 4-C); 144,0 (Pir 3-C); 148,9 (Pir 5-C); 155,0 ($COOC(CH_3)_3$); 168,4 (COOH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -157,6 (Pir N-1); -74,8 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2928; 1681 (C=O); 1418; 1148; 729. **MS**, m/z: 384 [M-H]⁻.

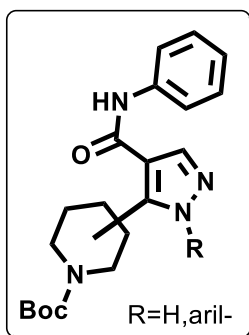
2.2.5.9. 5-[(3*R*)-1-(*tert*-Butoksikarbonil)piperidin-3-il]-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (9i)



Gauta rusva junginio **9i** derva. Išeiga: 282 mg (97 %).

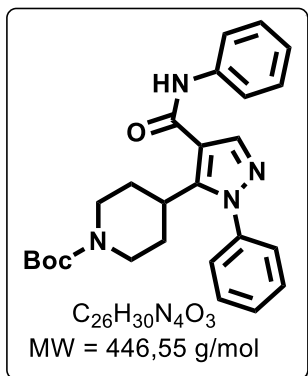
1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,73 (t, $J = 17,0$ Hz, 2H, Pip 4,5-H); 2,47 (qd, $J = 12,9$ Hz, 4,0 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,78 (s, 1H, Pip 6-H); 2,92 (s, 1H, Pip 3-H); 3,50–3,72 (m, 1H, Pip 2-H); 3,86–4,19 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,56–7,76 (m, 3H, Ph 2,5,6-H); 7,76–7,86 (m, 1H, Ph 4-H); 8,17 (s, 1H, Pir 3-H); 9,51 (br s, 1H, OH). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 25,4 (Pip 5-C); 27,5 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,1 (Pip 3-C); 43,6 (Pip 6-C); 45,8 (Pip 2-C); 79,9 ($C(CH_3)_3$); 112,3 (Pir 4-C); 123,6 (q, $J = 273,7$ Hz, CF_3); 123,7 (Ph 2-C); 126,3 (Ph 4-C); 129,7 (Ph 6-C); 130,2 (Ph 5-C); 133,0 (Ph 3-C); 139,3 (Ph 1-C); 144,6 (Pir 3-C); 149,0 (Pir 5-C); 154,8 ($COOC(CH_3)_3$); 168,0 (COOH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -160,0 (Pir N-1); -74,5 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 2933; 1684 (C=O); 1547; 1132; 758. **MS**, m/z: 438 [M-H]⁻.

2.2.6. *tert*-Butil 3 ir 4-[4-(fenilkarbamoil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatai (10a-i)



Atitinkamas junginys **9** (200 mg) ir DMAP (0,1 ekv.) ištirpinti DCM (0,1 M). Į iki 0 °C temperatūros atšaldytą reakcijos mišinį porcijomis subertas EDC·HCl (1,1 ekv.) ir sulašintas anilinas (1 ekv.). Reakcijos mišinys paliktas suktis kambario temperatūroje 48 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Reakcijos mišinys grynintas kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą – Heks/Me₂CO (6:1).

2.2.6.1. *tert*-Butil 4-[1-fenil-4-(fenilkarbamoil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10a)

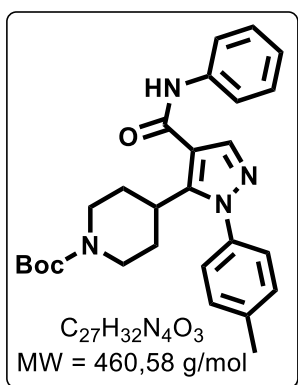


Gauti balti junginio **10a** kristalai. Išeiga: 192 mg (80 %); $T_{lyd} = 188,6$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,42 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,63 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,18–2,33 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,58 (s, 2H, Pip 2,6-H); 3,15 (tt, $J = 12,4$ Hz, 3,5 Hz, 1H, Pip 4-H); 3,99–4,24 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,10–7,18 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,33–7,39 (m, 4H, NHPH 3,5-H ir NPh 3,5-H); 7,48–7,54 (m, 3H, NPh 2,4,6-H); 7,54–7,61 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,67 (s, 1H, NH); 7,90 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 28,6 ($C(CH_3)_3$); 29,6 ($2 \times CH_2$, Pip 3,5-C); 35,4 (Pip 4-C); 44,7 ($2 \times CH_2$, Pip 2,6-C); 79,6 ($C(CH_3)_3$); 116,0 (Pir 4-C); 120,5 ($2 \times CH$, NHPH 2,6-C); 124,6 (NHPH 4-C); 126,8 ($2 \times CH$, NPh 3,5-C); 129,2 ($2 \times CH$, NHPH 3,5-C); 129,5 ($2 \times CH$, NPh 2,6-C); 129,7 (NPh 4-C); 138,0 (NHPH 1-C); 138,9 (Pir 3-C); 139,6 (NPh 1-C); 149,2 (Pir 5-C); 155,0 ($COOC(CH_3)_3$); 161,8 (CONH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -250,7 (NH); -158,9 (Pir N-1); -75,5 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 3390; 1671 (C=O); 1435; 748. **MS**, m/z : 445 [M-H] $^-$.

2.2.6.2. *tert*-Butil karboksilatas (10b)

4-[1-(4-metilfenil)-4-(fenilkarbamoil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-



Gauti balti junginio **10b** kristalai. Išeiga: 191 mg (80 %); $T_{lyd} = 195,0$ °C.

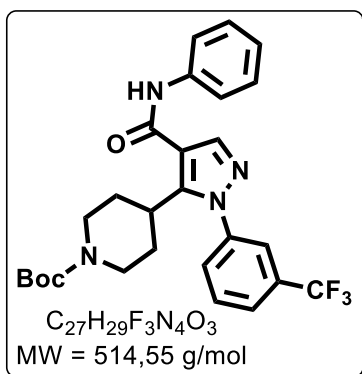
1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,42 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,61 (d, $J = 12,8$ Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,11–2,27 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,44 (s, 3H, CH_3); 2,58 (s, 2H, Pip 2,6-H); 3,16 (tt, $J = 12,4$ Hz, 3,5 Hz, 1H, Pip 4-H); 4,10 (s, 2H, Pip 2,6-H); 7,09–7,16 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,19–7,24 (m, 2H, NPh 3,5-H); 7,27–7,32 (m, 2H, NPh 2,6-H); 7,32–7,39 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,53–7,60 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,66 (s, 1H, NH); 7,87 (s, 1H, Pir 3-H).

^{13}C BMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 28,6 ($C(CH_3)_3$); 29,6 ($2 \times CH_2$, Pip 3,5-C); 35,3 (Pip 4-C); 44,0 ($2 \times CH_2$, Pip 2,6-C); 79,6

($C(CH_3)_3$); 115,8 (Pir 4-C); 120,4 ($2 \times CH$, NHPH 2,6-C); 124,5 (NHPH 4-C); 126,6 ($2 \times CH$, NPh 3,5-C); 129,2 ($2 \times CH$, NHPH 3,5-C); 130,0 ($2 \times CH$, NPh 2,6-C); 137,1 (NPh 1-C); 138,0 (NHPH 1-C); 138,7 (Pir 3-C); 139,8 (NPh 4-C); 149,2 (Pir 5-C); 155,0 ($COOC(CH_3)_3$); 161,9 (CONH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -251,1 (NH); -158,5 (Pir N-1); -74,3 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 3295 (N-H); 1674 (C=O); 1544; 1243; 750. **MS**, m/z : 459 [M-H] $^-$.

2.2.6.3. *tert*-Butil karboksilatas (10c)

4-[1-(3-(trifluormetil)fenil)-4-(fenilkarbamoil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-

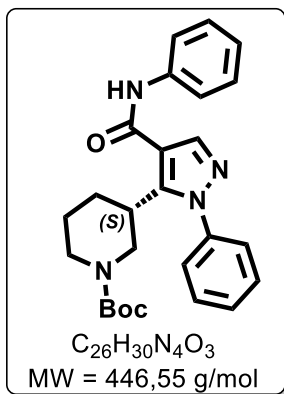


Gauti balti junginio **10c** kristalai. Išeiga: 183 mg (78 %); $T_{lyd} = 167,7$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,43 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); 1,56–1,75 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,20–2,33 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,47–2,70 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,08 (tt, $J = 12,4$ Hz, 3,4 Hz, 1H, Pip 4-H); 4,14 (s, 2H, Pip 2,6-H); 7,11–7,18 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,32–7,41 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,54–7,61 (m, 3H, NPh 5-H ir NHPH 2,6-H); 7,64–7,71 (m, 3H, NH ir NPh 2,6-H); 7,75–7,82 (m, 1H, NPh 4-H); 7,93 (s, 1H,

Pir 3-H). ^{13}C BMR (101 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29,7 ($2\times\text{CH}_2$, Pip 3,5-C); 35,6 (Pip 4-C); 44,5 ($2\times\text{CH}_2$, Pip 2,6-C); 79,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 116,7 (Pir 4-C); 120,5 ($2\times\text{CH}$, NHPH 2,6-C); 123,4 (q, $J = 273,7$ Hz, CF_3); 123,9 (q, $J = 3,7$ Hz, NPh 2-C); 124,7 (NHPH 4-C); 126,4 (q, $J = 3,2$ Hz, NPh 4-C); 129,3 ($2\times\text{CH}$, NHPH 3,5-C); 129,9 (NPh 5-C); 130,2 (NPh 6-C); 132,2 (q, $J = 33,3$ Hz, NPh 3-C); 137,9 (NHPH 1-C); 139,5 (Pir 3-C); 140,0 (NPh 1-C); 149,3 (Pir 5-C); 154,9 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 161,5 (CONH). ^{15}N BMR (41 MHz, CDCl_3): δ mln. d. -251,0 (NH); -161,6 (Pir N-1); -75,3 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 3344 (N-H); 1678 (C=O); 1663 (C=O); 1126; 755. MS, m/z: 513 [$\text{M}-\text{H}$].

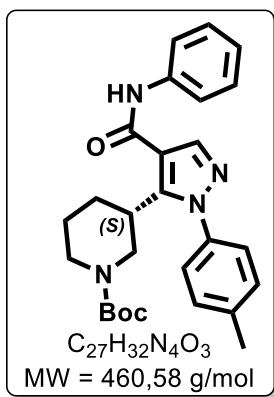
2.2.6.4. *tert*-Butil (3S)-3-[1-fenil-4-(fenilkarbamoil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10d)



Gauti balti junginio **10d** kristalai. Išeiga: 161 mg (67 %); $T_{\text{lyd}} = 208,3$ °C.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 1,39 (s, 10H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,57–1,67 (m, 1H, Pip 5-H); 1,71–1,80 (m, 1H, Pip 4-H); 2,48 (qd, $J = 12,8$ Hz, 4,0 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,69–3,02 (m, 2H, Pip 3,6-H); 3,67 (d, $J = 85,0$ Hz, 1H, Pip 2-H); 3,88–4,20 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,10–7,18 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,33–7,44 (m, 4H, NHPH 3,5-H ir NPh 3,5-H); 7,46–7,61 (m, 5H, NHPH 2,6-H ir NPh 2,4,6-H); 7,75 (s, 1H, NH); 7,92 (s, 1H, Pir 3-H). ^{13}C BMR (101 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 25,2 (Pip 5-C); 27,9 (Pip 4-C); 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 36,3 (Pip 3-C); 43,4 (Pip 6-C); 47,2 (Pip 2-C); 79,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 116,5 (Pir 4-C); 120,6 ($2\times\text{CH}$, NHPH 2,6-C); 124,6 (NHPH 4-C); 126,5 ($2\times\text{CH}$, NPh 3,5-C); 129,2 ($2\times\text{CH}$, NHPH 3,5-C); 129,5 ($3\times\text{CH}$, NPh 2,4,6-C); 138,0 (NHPH 1-C); 139,1 (NPh 1-C); 139,3 (Pir 3-C); 147,0 (Pir 5-C); 154,5 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 161,8 (CONH). ^{15}N BMR (41 MHz, CDCl_3): δ mln. d. -250,5 (NH); -157,4 (Pir N-1); -75,8 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 3402 (N-H); 1677 (C=O); 1405; 1137; 751. MS, m/z: 447 [$\text{M}+\text{H}$]⁺. Enantiomerinis grynumas nustatytas, naudojant HPLC aparatūrą (kolona – CHIRAL ART Amyl-SA; T = 36 °C; UV = 254 nm; mobili fazė – ACN/($\text{H}_2\text{O} + 0,1$ % HCOOH) (30:70→70:30 per 10 min); tēkmės greitis – 1,0 ml/min); $t_{\text{R}} = 6,5$ min (1,8 %), $t_{\text{R}} = 9,2$ min (98,2 %). Susintetintas junginys turi ~ 1,8 % kito enantiomero.

2.2.6.5. *tert*-Butil (3S)-3-[1-(4-metilfenil)-4-(fenilkarbamoil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10e)

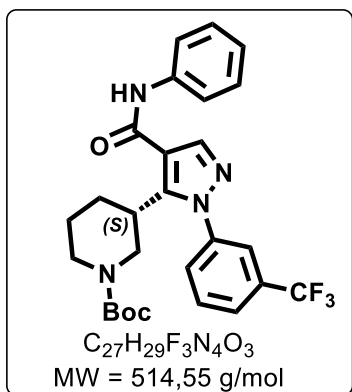


Gauti balti junginio **10e** kristalai. Išeiga: 174 mg (73 %); $T_{\text{lyd}} = 210,1$ °C.

^1H BMR (400 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,56–1,66 (m, 1H, Pip 5-H); 1,73 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, Pip 4-H); 2,33–2,60 (m, 4H, Pip 4-H ir CH_3); 2,68–3,02 (m, 2H, Pip 3,6-H); 3,64 (d, $J = 86,0$ Hz, 1H, Pip 2-H); 3,90–4,20 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,10–7,18 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,22–7,33 (m, 4H, NPh 2,3,5,6-H); 7,33–7,39 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,53–7,59 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,72 (s, 1H, NH); 7,90 (s, 1H, Pir 3-H). ^{13}C BMR (101 MHz, CDCl_3): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 25,2 (Pip 5-C); 27,9 (Pip 4-C); 28,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 36,3 (Pip 3-C); 43,3 (Pip 6-C); 47,3 (Pip 2-C); 79,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 116,3 (Pir 4-C); 120,6 ($2\times\text{CH}$, NHPH 2,6-C); 124,6 (NHPH 4-C); 126,3 ($2\times\text{CH}$, NPh 3,5-C); 129,2 ($2\times\text{CH}$, NHPH 3,5-C); 130,1 ($2\times\text{CH}$, NPh 2,6-C); 136,6 (NPh 1-C); 138,0 (NHPH 1-C); 139,1 (Pir 3-C); 139,5 (NPh 4-C); 147,1 (Pir 5-C); 154,6 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$); 161,9 (CONH). ^{15}N BMR (41 MHz, CDCl_3): δ mln. d. -251,3 (NH); -158,1 (Pir N-1); -75,4 (Pir N-2). IR (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}):

3286; 1661 (C=O); 1433; 1155; 759. **MS**, m/z: 461 [M+H]⁺. Enantiomerinis grynumas nustatytas, naudojant HPLC aparatūrą (kolona – CHIRAL ART Amyl-SA; T = 36 °C; UV = 254 nm; mobili fazė – ACN/(H₂O + 0,1 % HCOOH) (30:70→70:30 per 10 min); tėkmės greitis – 1,0 ml/min); t_R = 7,3 min (2,6 %), t_R = 10,2 min (97,4 %). Susintetintas junginys turi ~ 2,6 % kito enantiomero.

2.2.6.6. *tert*-Butil (3S)-3-[1-(3-(trifluormetil)fenil)-4-(fenilkarbamoil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10f)

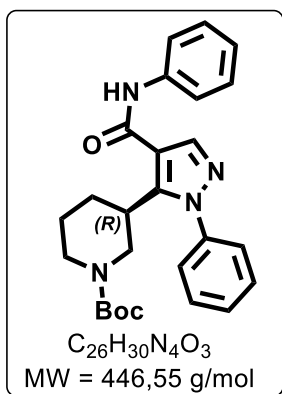


Gauti balti junginio **10f** kristalai. Išeiga: 171 mg (73 %); T_{lyd} = 98,9 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,39 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,59–1,72 (m, 1H, Pip 5-H); 1,72–1,84 (m, 1H, Pip 4-H); 2,52 (qd, J = 13,0 Hz, 3,8 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,86 (s, 2H, Pip 3,6-H); 3,51–3,86 (m, 1H, Pip 2-H); 3,91–4,18 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,12–7,19 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,34–7,42 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,54–7,60 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,61–7,83 (m, 5H, NH ir NPh 2,4,5,6-H); 7,95 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 25,2 (Pip 5-C); 28,1 (Pip 4-C); 28,5 (C(CH₃)₃); 36,3 (Pip 3-C); 44,4 (Pip 6-C); 46,1 (Pip 2-C); 79,7 (C(CH₃)₃); 117,1 (Pir 4-C); 120,7 (2×CH, NHPH 2,6-C); 123,4

(q, J = 273,7 Hz, CF₃); 123,6 (NPh 2-C); 124,8 (NHPH 4-C); 126,1 (NPh 4-C); 129,3 (2×CH, NHPH 3,5-C); 129,6 (NPh 6-C); 130,2 (NPh 5-C); 132,6 (NPh 3-C); 137,8 (NHPH 1-C); 139,5 (Pir 3-C); 139,8 (NPh 1-C); 147,2 (Pir 5-C); 154,6 (COOC(CH₃)₃); 161,5 (CONH). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -251,5 (NH); -160,2 (Pir N-1); -75,9 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3306 (N-H); 1664 (C=O); 1326; 1130; 751. **MS**, m/z: 515 [M+H]⁺. Enantiomerinis grynumas nustatytas, naudojant HPLC aparatūrą (kolona – CHIRAL ART Cell-SB; T = 36 °C; UV = 254 nm; mobili fazė – ACN/(H₂O + 0,1 % HCOOH) (30:70→70:30 per 10 min); tėkmės greitis – 1,0 ml/min); t_R = 12 min (96,6 %), t_R = 8,28 min (3,4 %). Susintetintas junginys turi ~ 3,4 % kito enantiomero.

2.2.6.7. *tert*-Butil (3R)-3-[1-fenil-4-(fenilkarbamoil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10g)



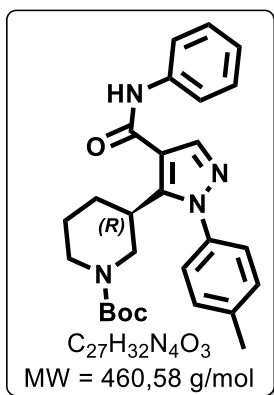
Gauti balti junginio **10g** kristalai. Išeiga: 192 mg (80 %); T_{lyd} = 201,5 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, C(CH₃)₃ ir Pip 5-H); 1,57–1,70 (m, 1H, Pip 5-H); 1,75 (d, J = 13,1 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,48 (qd, J = 12,9 Hz, 4,0 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,69–3,05 (m, 2H, Pip 3,6-H); 3,49–3,81 (m, 1H, Pip 2-H); 3,88–4,24 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,10–7,18 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,33–7,45 (m, 4H, NHPH 3,5-H ir NPh 3,5-H); 7,46–7,59 (m, 5H, NHPH 2,6-H ir NPh 2,4,6-H); 7,72 (s, 1H, NH); 7,92 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 25,3 (Pip 5-C); 27,9 (Pip 4-C); 28,5 (C(CH₃)₃); 36,3 (Pip 3-C); 44,3 (Pip 6-C); 47,3 (Pip 2-C); 79,5 (C(CH₃)₃);

116,5 (Pir 4-C); 120,6 (2×CH, NHPH 2,6-C); 124,7 (NHPH 4-C); 126,5 (2×CH, NPh 3,5-C); 129,3 (2×CH, NHPH 3,5-C); 129,5 (3×CH, NPh 2,4,6-C); 138,0 (NHPH 1-C); 139,1 (NPh 1-C); 139,3 (Pir 3-C); 147,1 (Pir 5-C); 154,6 (COOC(CH₃)₃); 161,8 (CONH). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -251,2 (NH); -157,7 (Pir N-1); -75,4 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3400 (N-H); 1677 (C=O); 1405; 1137; 751. **MS**, m/z: 447 [M+H]⁺. Enantiomerinis grynumas nustatytas, naudojant HPLC aparatūrą (kolona – CHIRAL ART Amyl-SA; T = 36 °C; UV = 254 nm; mobili fazė – ACN/(H₂O +

0,1 % HCOOH) (30:70→70:30 per 10 min); tėkmės greitis – 1,0 ml/min); $t_R = 6,5$ min (100 %). Susintetintas junginys yra enantiomeriškai grynas.

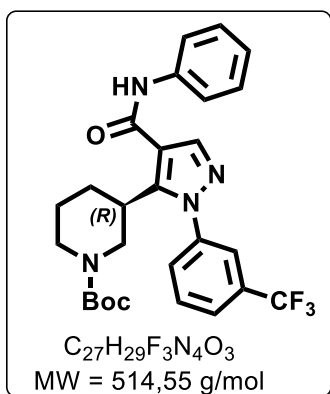
2.2.6.8. *tert*-Butil (3R)-3-[1-(4-metilfenil)-4-(fenilkarbamoil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10h)



Gauti balti junginio **10h** kristalai. Išeiga: 177 mg (74 %); $T_{lyd} = 206,0$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,40 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,57–1,69 (m, 1H, Pip 5-H); 1,74 (s, 1H, Pip 4-H); 2,37–2,52 (m, 4H, Pip 4-H ir CH_3); 2,71–3,01 (m, 2H, Pip 3,6-H); 3,42–3,84 (m, 1H, Pip 2-H); 3,91–4,19 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,09–7,17 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,21–7,32 (m, 4H, NPh 2,3,5,6-H); 7,32–7,39 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,51–7,59 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,77 (s, 1H, NH); 7,90 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 21,4 (CH_3); 25,3 (Pip 5-C); 27,8 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,2 (Pip 3-C); 43,3 (Pip 6-C); 47,2 (Pip 2-C); 79,5 ($C(CH_3)_3$); 116,3 (Pir 4-C); 120,6 (2 \times CH, NHPH 2,6-C); 124,6 (NHPH 4-C); 126,3 (2 \times CH, NPh 3,5-C); 129,2 (2 \times CH, NHPH 3,5-C); 130,1 (2 \times CH, NPh 2,6-C); 136,6 (NPh 1-C); 138,0 (NHPH 1-C); 139,2 (Pir 3-C); 139,7 (NPh 4-C); 147,1 (Pir 5-C); 154,6 ($COOC(CH_3)_3$); 161,9 (CONH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -251,1 (NH); -157,7 (Pir N-1); -76,1 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 3286 (N-H); 1660 (C=O); 1433; 1155; 759. **MS**, m/z: 461 $[M+H]^+$. Enantiomerinis grynumas nustatytas, naudojant HPLC aparatūrą (kolona – CHIRAL ART Amyl-SA; T = 36 °C; UV = 254 nm; mobili fazė – ACN/(H_2O + 0,1 % HCOOH) (30:70→70:30 per 10 min); tėkmės greitis – 1,0 ml/min); $t_R = 7,3$ min (96,7 %), $t_R = 10,2$ min (0,6 %). Susintetintas junginys turi ~ 0,6 % kito enantiomero.

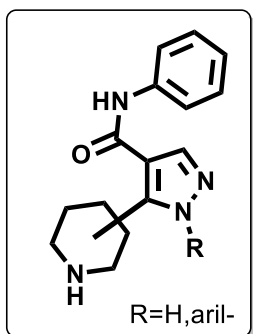
2.2.6.9. *tert*-Butil (3R)-3-[1-(3-(trifluormetil)fenil)-4-(fenilkarbamoil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (10i)



Gauti rusvi junginio **10i** kristalai. Išeiga: 185 mg (79 %); $T_{lyd} = 127,4$ °C.

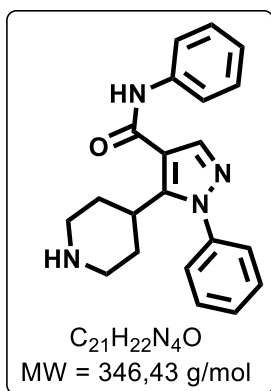
1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,39 (s, 10H, $C(CH_3)_3$ ir Pip 5-H); 1,60–1,72 (m, 1H, Pip 5-H); 1,72–1,86 (m, 1H, Pip 4-H); 2,52 (qd, $J = 13,2$ Hz, 3,6 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,86 (s, 2H, Pip 3,6-H); 3,46–3,80 (m, 1H, Pip 2-H); 3,89–4,26 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,08–7,21 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,32–7,43 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,52–7,62 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,62–7,84 (m, 5H, NH ir NPh 2,4,5,6-H); 7,96 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 25,2 (Pip 5-C); 28,1 (Pip 4-C); 28,5 ($C(CH_3)_3$); 36,2 (Pip 3-C); 44,4 (Pip 6-C); 47,1 (Pip 2-C); 79,7 ($C(CH_3)_3$); 117,1 (Pir 4-C); 120,7 (2 \times CH, NHPH 2,6-C); 122,4 (q, $J = 27,7$ Hz, CF_3); 123,6 (NPh 2-C); 124,8 (NHPH 4-C); 126,1 (NPh 4-C); 129,3 (2 \times CH, NHPH 3,5-C); 129,6 (NPh 6-C); 130,2 (NPh 5-C); 132,5 (NPh 3-C); 137,8 (NHPH 1-C); 139,5 (NPh 1-C); 139,8 (Pir 3-C); 147,2 (Pir 5-C); 154,6 ($COOC(CH_3)_3$); 161,5 (CONH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -251,1 (NH); -160,4 (Pir N-1); -75,6 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm^{-1}): 3342 (N-H); 1656 (C=O); 1132; 749. **MS**, m/z: 515 $[M+H]^+$. Enantiomerinis grynumas nustatytas, naudojant HPLC aparatūrą (kolona – CHIRAL ART Cell-SB; T = 36 °C; UV = 254 nm; mobili fazė – ACN/(H_2O + 0,1 % HCOOH) (30:70→70:30 per 10 min); tėkmės greitis – 1,0 ml/min); $t_R = 8,12$ min (1,4 %), $t_R = 8,28$ min (98,6 %). Susintetintas junginys turi ~ 1,4 % kito enantiomero.

2.2.7. *N*,1-fenil-5-piperidinil-1*H*-pirazolo-4-karboksamidai (11a-i)



Atitinkamas junginys **10** (100 mg) ištirpintas dioksane (4 ml). Į gautą tirpalą sulašintas 4 N HCl tirpalas dioksane (2 ml). Reakcijos mišinys paliktas suktis kambario temperatūroje 16 val. Pasibaigus reakcijai, tirpiklis išgarintas vakuumu. Reakcijos mišinys ištirpintas H₂O_{dist} (15 ml), parūgštintas 1 M HCl tirpalu (pH = 1) ir praplautas EtOAc (2×15 ml). Tada vandeninis sluoksnis neutralizuotas sočiu NaHCO₃ tirpalu (pH = 7) ir praplautas EtOAc (2×15 ml). Pastarasis organinis sluoksnis džiovintas bevandeniu Na₂SO₄, filtruotas ir tirpiklis išgarintas vakuumu.

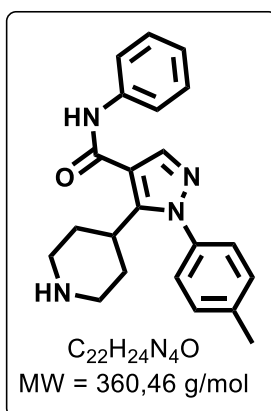
2.2.7.1. *N*,1-difenil-5-(piperidin-4-il)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11a)



Gauti gelsvi junginio **11a** kristalai. Išeiga: 64 mg (83 %); T_{lyd} = 170,9 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,53–1,67 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,06–2,19 (m, 1H, NH); 2,28 (qd, *J* = 12,6 Hz, 4,1 Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,47–2,59 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,00–3,17 (m, 3H, Pip 2,4,6-H); 7,09–7,17 (m, 1H, NPh 4-H); 7,32–7,41 (m, 4H, NPh 3,5-H ir NPh 3,5-H); 7,48–7,54 (m, 3H, NPh 2,4,6-H); 7,56–7,62 (m, 2H, NPh 2,6-H); 7,66–7,78 (m, 1H, CONH); 7,90 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 30,8 (2×CH₂, Pip 3,5-C); 35,5 (Pip 4-C); 46,8 (2×CH₂, Pip 2,6-C); 115,9 (Pir 4-C); 120,5 (2×CH, NPh 2,6-C); 124,6 (NPh 4-C); 126,7 (2×CH, NPh 3,5-C); 129,2 (2×CH, NPh 3,5-C); 129,5 (2×CH, NPh 2,6-C); 129,6 (NPh 4-C); 138,0 (NPh 1-C); 139,1 (Pir 3-C); 139,5 (NPh 1-C); 149,8 (Pir 5-C); 162,0 (CONH). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -251,1 (CONH); -158,3 (Pir N-1); -76,1 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3283; 2924; 1543 (C=O); 1498 (C=O); 752. **HRMS** (ESI⁺), *m/z* [M+H]⁺: apskaičiuota 347,1866; rasta 347,1866.

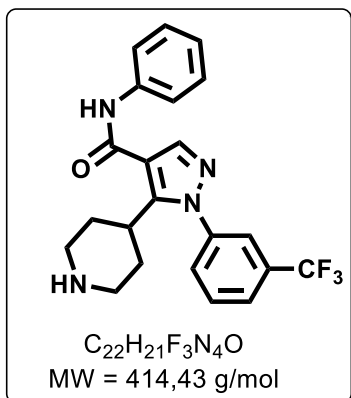
2.2.7.2. 1-(4-Metilfenil)-*N*-fenil-5-(piperidin-4-il)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11b)



Gauti gelsvi junginio **11b** kristalai. Išeiga: 57 mg (73 %); T_{lyd} = 171,1 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,54–1,67 (m, 2H, Pip 3,5-H); 2,24 (qd, *J* = 12,5 Hz, 4,0 Hz, 3H, Pip 3,5-H ir NH); 2,45 (s, 3H, CH₃); 2,48–2,59 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,02–3,19 (m, 3H, Pip 2,4,6-H); 7,09–7,16 (m, 1H, NPh 4-H); 7,19–7,25 (m, 2H, NPh 3,5-H); 7,28–7,32 (m, 2H, NPh 2,6-H); 7,32–7,39 (m, 2H, NPh 3,5-H); 7,53–7,60 (m, 2H, 2H NPh 2,6-H); 7,68 (s, 1H, CONH); 7,87 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 21,4 (CH₃); 30,9 (2×CH₂, Pip 3,5-C); 35,4 (Pip 4-C); 46,8 (2×CH₂, Pip 2,6-C); 115,7 (Pir 4-C); 120,5 (2×CH, NPh 2,6-C); 124,5 (NPh 4-C); 126,5 (2×CH, NPh 3,5-C); 129,2 (2×CH, NPh 3,5-C); 130,1 (2×CH, NPh 2,6-C); 137,1 (NPh 1-C); 138,1 (NPh 1-C); 138,9 (Pir 3-C); 139,7 (NPh 4-C); 149,8 (Pir 5-C); 162,06 (CONH). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -250,7 (CONH); -158,4 (Pir N-1); -76,8 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3295; 2921; 1544 (C=O); 1311; 753. **HRMS** (ESI⁺), *m/z* [M+H]⁺: apskaičiuota 361,2023; rasta 361,2022.

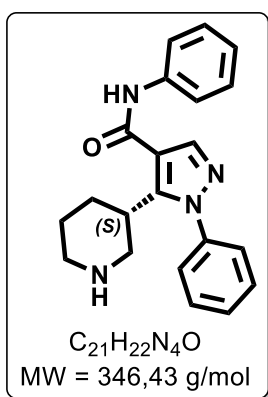
2.2.7.3. *N*-fenil-5-(piperidin-4-il)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11c)



Gauti gelsvi junginio **11c** kristalai. Išeiga: 68 mg (84 %); $T_{lyd} = 195,4$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,54–1,70 (m, 2H, Pip 3,5-H); 1,84 (s, 1H, NH); 2,29 (qd, $J = 12,5$ Hz, 4,1 Hz, 2H, Pip 3,5-H); 2,45–2,61 (m, 2H, Pip 2,6-H); 2,97–3,15 (m, 3H, Pip 2,4,6-H); 7,12–7,18 (m, 1H, NPh 4-H); 7,32–7,42 (m, 2H, NPh 3,5-H); 7,56–7,62 (m, 3H, NPh 5-H ir NPh 2,6-H); 7,63–7,72 (m, 3H, CONH ir NPh 2,6-H); 7,76–7,83 (m, 1H, NPh 6-H); 7,93 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 31,1 (2 \times CH₂, Pip 3,5-C); 35,8 (Pip 4-C); 46,8 (2 \times CH₂, Pip 2,6-C); 116,6 (Pir 4-C); 120,5 (2 \times CH, NPh 2,6-C); 123,5 (q, $J = 273,7$ Hz, CF₃); 123,8 (d, $J = 3,9$ Hz, NPh 2-C); 124,7 (NPh 4-C); 126,3 (d, $J = 3,9$ Hz, NPh 4-C); 129,3 (2 \times CH, NPh 3,5-C); 129,8 (NPh 5-H); 130,2 (NPh 6-H); 132,2 (q, $J = 33,3$ Hz, NPh 3-C); 137,9 (NPh 1-C); 139,6 (Pir 3-C); 140,0 (NPh 1-C); 150,0 (Pir 5-C); 161,7 (CONH). **^{15}N BMR** (41 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. -250,7 (CONH); -161,9 (Pir N-1); -75,7 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm⁻¹): 3347; 2932; 1566 (C=O); 1407; 645. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 415,1740; rasta 415,1740.

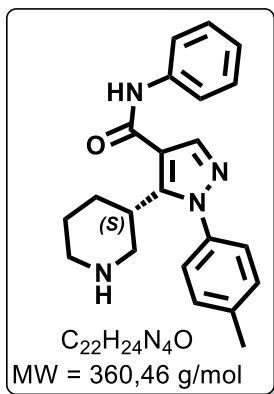
2.2.7.4. *N*,1-difenil-5-((3*S*)-piperidin-3-il)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11d)



Gauti balti junginio **11d** kristalai. Išeiga: 57 mg (73 %); $T_{lyd} = 192,8$ °C.

1H BMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 1,39 (qt, $J = 13,2$ Hz, 4,1 Hz, 1H, Pip 5-H); 1,61–1,73 (m, 1H, Pip 5-H); 1,73–1,84 (m, 1H, Pip 4-H); 2,36 (qd, $J = 12,7$ Hz, 3,9 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,68 (td, $J = 12,5$ Hz, 2,8 Hz, 1H, Pip 6-H); 2,91–3,00 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,03–3,19 (m, 2H, Pip 3-H ir NH); 3,49 (t, $J = 11,6$ Hz, 1H, Pip 2-H); 7,09–7,16 (m, 1H, NPh 4-H); 7,31–7,38 (m, 4H, NPh 3,5-H ir NPh 3,5-H); 7,45–7,52 (m, 3H, NPh 2,4,6-H); 7,54–7,59 (m, 2H, NPh 2,6-H); 7,84–7,95 (m, 2H, Pir 3-H ir CONH). **^{13}C BMR** (101 MHz, $CDCl_3$): δ mln. d. 26,3 (Pip 5-C); 28,3 (Pip 4-C); 36,7 (Pip 3-C); 45,5 (Pip 6-C); 48,7 (Pip 2-C); 116,3 (Pir 4-C); 120,6 (2 \times CH, NPh 2,6-C); 124,5 (NPh 4-C); 126,6 (2 \times CH, NPh 3,5-C); 129,2 (2 \times CH, NPh 3,5-C); 129,5 (NPh 4-C); 129,6 (2 \times CH, NPh 2,6-C); 138,0 (NPh 1-C); 139,2 (Pir 3-C); 139,3 (NPh 1-C); 147,7 (Pir 5-C); 161,9 (CONH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm⁻¹): 3233; 2930; 1677 (C=O); 1498 (C=O); 750. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 347,1866; rasta 347,1866.

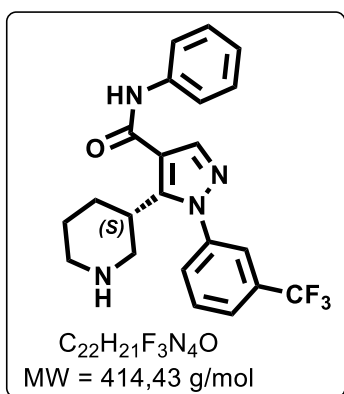
2.2.7.5. 1-(4-Metilfenil)-*N*-fenil-5-((3*S*)-piperidin-3-il)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11e)



Gauti balti junginio **11e** kristalai. Išeiga: 44 mg (56 %); $T_{lyd} = 264,8\text{ }^{\circ}C$.

1H BMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ mln. d. 1,21–1,29 (m, 1H, Pip 5-H); 1,39–1,52 (m, 1H, Pip 5-H); 1,75 (d, $J = 12,2$ Hz, 2H, Pip 4-H); 2,18–2,33 (m, 1H, Pip 6-H); 2,41 (s, 3H, CH₃); 2,65 (td, $J = 12,9$ Hz, 2,8 Hz, 1H, Pip 6-H); 3,05–3,20 (m, 3H, Pip 2,3-H); 7,07–7,15 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,30–7,43 (m, 6H, NHPH 3,5-H ir NPh 2,3,5,6-H); 7,65–7,72 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 8,27 (s, 1H, Pir 3-H); 10,07 (s, 1H, CONH). **^{13}C BMR** (101 MHz, DMSO- d_6): δ mln. d. 21,0 (CH₃); 23,0 (Pip 5-C); 26,4 (Pip 4-C); 33,2 (Pip 3-C); 43,8 (Pip 6-C); 45,5 (Pip 2-C); 116,3 (Pir 4-C); 120,9 (2 \times CH, NHPH 2,6-C); 124,0 (NHPH 4-C); 126,6 (2 \times CH, NPh 3,5-C); 130,2 (2 \times CH, NHPH 3,5-C); 131,9 (2 \times CH, NPh 2,6-C); 136,4 (NPh 1-C); 139,1 (NHPH 1-C); 139,4 (Pir 3-C); 140,4 (NPh 4-C); 145,3 (Pir 5-C); 161,9 (CONH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm⁻¹): 3376; 2923; 1665 (C=O); 1511 (C=O); 1313; 752. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 361,2023; rasta 361,2023.

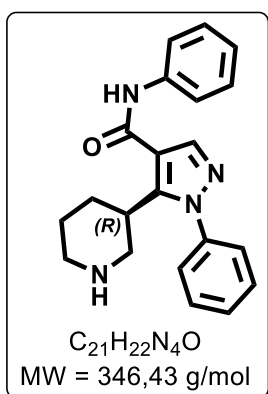
2.2.7.6. *N*-fenil-5-((3*S*)-piperidin-3-il)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11f)



Gauti balti junginio **11f** kristalai. Išeiga: 43 mg (53 %); $T_{lyd} = 273,1\text{ }^{\circ}C$.

1H BMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ mln. d. 1,13–1,30 (m, 1H, Pip 5-H); 1,45–1,63 (m, 2H, Pip 4,5-H); 1,76–1,96 (m, 2H, Pip 4,6-H); 2,30 (qd, $J = 13,0$ Hz, 4,0 Hz, 1H, Pip 3-H); 2,74 (td, $J = 12,9$ Hz, 2,8 Hz, 1H, Pip 2-H); 3,07–3,35 (m, 2H, Pip 2,6-H); 7,08–7,15 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,31–7,41 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,62–7,72 (m, 3H, NHPH 2,6-H ir NPh 5-H); 7,79–7,91 (m, 2H, NPh 2,6-H); 7,95–8,02 (m, 1H, NPh 4-H); 8,39 (s, 1H, Pir 3-H); 10,13 (s, 1H, CONH). **^{13}C BMR** (101 MHz, DMSO- d_6): δ mln. d. 22,1 (Pip 5-C); 25,8 (Pip 4-C); 32,4 (Pip 3-C); 43,4 (Pip 6-C); 44,6 (Pip 2-C); 116,9 (Pir 4-C); 121,0 (2 \times CH, NHPH 2,6-C); 123,8 (q, $J = 273,7$ Hz, CF₃); 123,8 (NPh 2-C); 124,2 (NHPH 4-C); 126,5 (NPh 4-C); 128,9 (2 \times CH, NHPH 3,5-C); 130,4 (NPh 5-H); 130,7 (NPh 6-H); 131,3 (NPh 3-C); 138,9 (NHPH 1-C); 139,2 (NPh 1-C); 141,1 (Pir 3-C); 145,1 (Pir 5-C); 161,6 (CONH). **IR** (FT-IR, ν_{max} , cm⁻¹): 3293; 2917; 1656 (C=O); 1552 (C=O); 1326; 697. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 415,1740; rasta 415,1740.

2.2.7.7. *N*,1-difenil-5-((3*R*)-piperidin-3-il)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidas (11g)

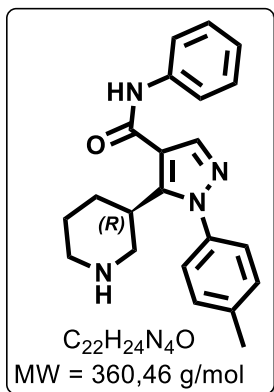


Gauti gelsvi junginio **11g** kristalai. Išeiga: 64 mg (82 %); $T_{lyd} = 183,3\text{ }^{\circ}C$.

1H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,38 (qt, $J = 12,9$ Hz, 4,1 Hz, 1H, Pip 5-H); 1,61–1,72 (m, 1H, Pip 5-H); 1,75–1,88 (m, 1H, Pip 4-H); 2,36 (qd, $J = 12,8$ Hz, 4,0 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,59 (s, 1H, NH); 2,68 (td, $J = 12,5$ Hz, 2,8 Hz, 1H, Pip 6-H); 2,91–3,00 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,06 (tt, $J = 11,7$ Hz, 3,8 Hz, 1H, Pip 3-H); 3,47 (t, $J = 11,5$ Hz, 1H, Pip 2-H); 7,10–7,17 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,30–7,39 (m, 4H, NHPH 3,5-H ir NPh 3,5-H); 7,46–7,51 (m, 3H, NPh 2,4,6-H); 7,54–7,60 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,80–7,85 (m, 1H, CONH); 7,89 (s, 1H, Pir 3-H). **^{13}C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 26,5 (Pip 5-C); 28,5

(Pip 4-C); 36,9 (Pip 3-C); 45,6 (Pip 6-C); 49,0 (Pip 2-C); 116,3 (Pir 4-C); 120,6 (2×CH, NHPH 2,6-C); 124,6 (NHPH 4-C); 126,6 (2×CH, NPh 3,5-C); 129,2 (2×CH, NHPH 3,5-C); 129,5 (NPh 4-C); 129,6 (2×CH, NPh 2,6-C); 138,0 (NHPH 1-C); 139,2 (Pir 3-C); 139,3 (NPh 1-C); 147,9 (Pir 5-C); 162,0 (CONH). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -250,9 (CONH); -158,3 (Pir N-1); -76,7 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3234; 2926; 1676 (C=O); 1497 (C=O); 1437; 749. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 347,1866; rasta 347,1866.

2.2.7.8. 1-(4-Metilfenil)-N-fenil-5-((3R)-piperidin-3-il)-1H-pirazolo-4-karboksamidas (11h)

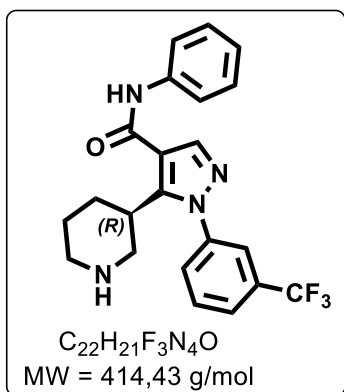


Gauti gelsvi junginio **11h** kristalai. Išeiga: 57 mg (73 %); T_{lyd} = 171,1 °C.

¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,35 (qt, *J* = 13,0 Hz, 4,1 Hz, 1H, Pip 5-H); 1,58–1,70 (m, 1H, Pip 5-H); 1,71–1,84 (m, 1H, Pip 4-H); 2,25–2,51 (m, 5H, Pip 4-H, NH ir CH₃); 2,66 (td, *J* = 12,5 Hz, 2,8 Hz, 1H, Pip 6-H); 2,85–2,96 (m, 2H, Pip 2,6-H); 3,02 (tt, *J* = 11,6 Hz, 3,8 Hz, 1H, Pip 3-H); 3,39–3,49 (m, 1H, Pip 2-H); 7,08–7,15 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,18–7,22 (m, 2H, NPh 3,5); 7,24–7,29 (m, 2H, NPh 2,6-H); 7,30–7,38 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,51–7,58 (m, 2H, NHPH 2,6-H); 7,86 (s, 1H, Pir 3-H); 7,91 (s, 1H, CONH). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 21,3 (CH₃); 26,7 (Pip 5-C);

28,5 (Pip 4-C); 37,1 (Pip 3-C); 45,7 (Pip 6-C); 49,1 (Pip 2-C); 116,1 (Pir 4-C); 120,6 (2×CH, NHPH 2,6-C); 124,4 (NHPH 4-C); 126,4 (2×CH, NPh 3,5-C); 129,1 (2×CH, NHPH 3,5-C); 130,1 (2×CH, NPh 2,6-C); 136,8 (NPh 1-C); 138,1 (NHPH 1-C); 139,1 (Pir 3-C); 139,6 (NPh 4-C); 147,9 (Pir 5-C); 162,1 (CONH). **¹⁵N BMR** (41 MHz, CDCl₃): δ mln. d. -250,5 (CONH); -158,7 (Pir N-1); -76,9 (Pir N-2). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3345; 2923; 1541 (C=O); 1515 (C=O); 1309; 752. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 361,2023; rasta 361,2023.

2.2.7.9. N-fenil-5-((3R)-piperidin-3-il)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1H-pirazolo-4-karboksamidas (11i)



Gauti balti junginio **11i** kristalai. Išeiga: 90 mg (89 %); T_{lyd} = 160,5 °C.

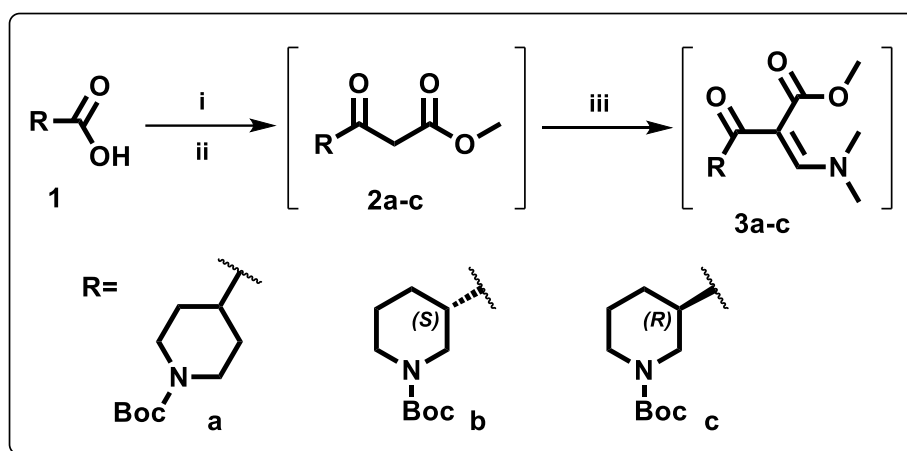
¹H BMR (400 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 1,42–1,59 (m, 1H, Pip 5-H); 1,68–1,88 (m, 2H, Pip 4,5-H); 2,44 (qd, *J* = 12,8 Hz, 3,9 Hz, 1H, Pip 4-H); 2,70–2,98 (m, 2H, Pip 6-H ir NH); 3,02–3,18 (m, 3H, Pip 2,3,6-H); 3,55–3,68 (m, 1H, Pip 2-H); 7,11–7,19 (m, 1H, NHPH 4-H); 7,34–7,42 (m, 2H, NHPH 3,5-H); 7,53–7,60 (m, 3H, NHPH 2,6-H ir NPh 5-H); 7,65–7,71 (m, 3H, CONH ir NPh 2,6-H); 7,73–7,79 (m, 1H, NPh 4-H); 7,94 (s, 1H, Pir 3-H). **¹³C BMR** (101 MHz, CDCl₃): δ mln. d. 26,1 (Pip 5-C); 28,4 (Pip 4-C); 36,6 (Pip 3-C); 45,4 (Pip 6-C); 48,6 (Pip

2-C); 116,9 (Pir 4-C); 120,6 (2×CH, NHPH 2,6-C); 123,7 (q, *J* = 273,5 Hz, CF₃); 123,8 (NPh 2-C); 124,8 (NHPH 4-C); 126,3 (NPh 4-C); 129,3 (2×CH, NHPH 3,5-C); 129,7 (NPh 5-H); 130,3 (NPh 6-H); 132,5 (NPh 3-H); 137,8 (NHPH 1-C); 139,7 (NPh 1-C); 139,8 (Pir 3-C); 147,8 (Pir 5-C); 161,7 (CONH). **IR** (FT-IR, ν_{max}, cm⁻¹): 3265; 2934; 1548 (C=O); 1325 (C=O); 1126; 692. **HRMS** (ESI⁺), m/z [M+H]⁺: apskaičiuota 415,1740; rasta 415,1740.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

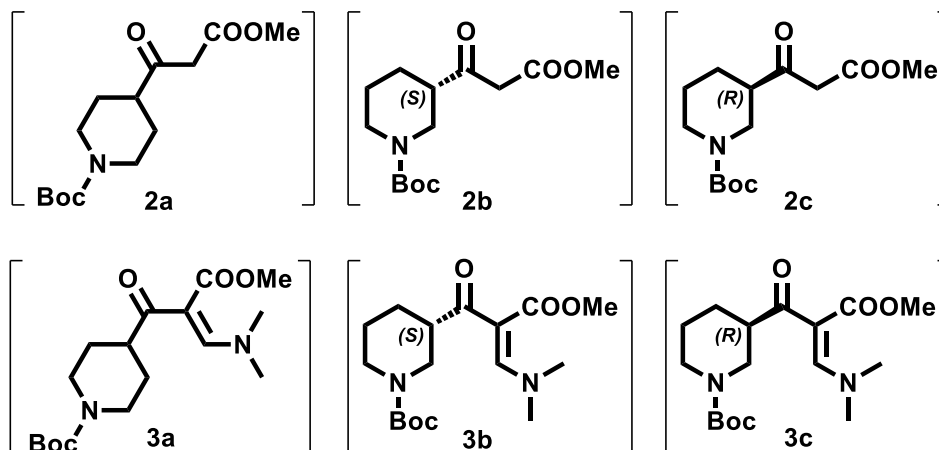
3.1. Pirazolo žiedo sudarymas

Siekiant susintetinti tikslius junginius pasirinkti komerciškai prieinami piperidino karboksirūgščių dariniai: *N*-Boc-piperidino-4-karboksirūgštis (**1a**), (*S*)-1-Boc-piperidino-3-karboksirūgštis (**1b**) bei (*R*)-1-Boc-piperidino-3-karboksirūgštis (**1c**) (3.1. schema). Piperidino fragmentas pasirinktas dėl plataus taikymo vaistų chemijoje [4]. Jie vartojami kaip stimulatoriai, vazodilatatoriai, antipsichoziniai vaistai ar opioidai. Be to, iš literatūros duomenų žinoma, jog *S*- bei *R*-stereioizomerai pasižymi skirtingu terapiniu aktyvumu. Pasitaiko atveju, kad vienam stereioizomerui būdingos silpnesnės arba visiškai nebūdingos terapinės savybės. Pavyzdžiui, varfarinui būdingos dvi aktyvios enantiomerinės *S*- ir *R*-formos. (*S*)-Varfarinas pasižymi 5 kartus stipresniu antikoaguliaciniu poveikiu negu varfarino *R*-enantiomeras [48]. Todėl pasirinkta susintetinti tiek *S*-, tiek *R*-piperidino junginių analogus ir ištirti jų biologines savybes.



3.1. schema. Reagentai ir sąlygos: (i) meldrumo rūgštis, DMAP, EDC·HCl, DCM, kamb. t.; (ii) MeOH, T_v; (iii) *N,N*-dimetilformamido dimetilacetalis, dioksanas, T_v.

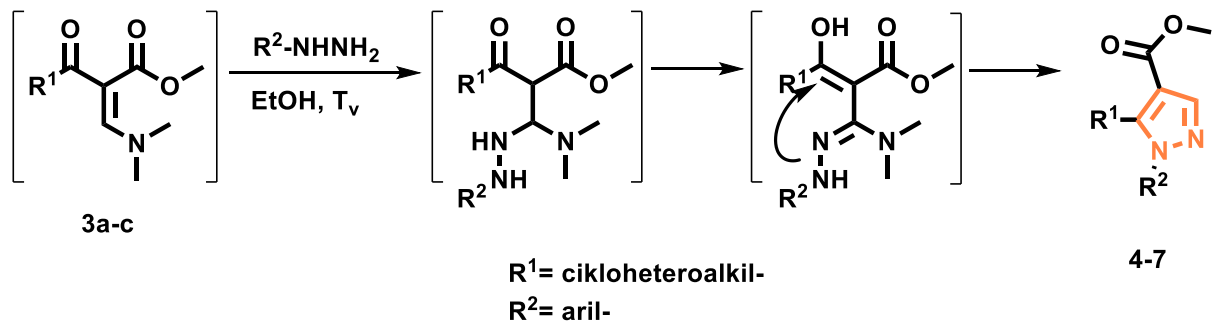
Vykdamt pasirinktos piperidino karboksirūgšties reakciją su meldrumo rūgštimi bei iškart atliekant gauto tarpinio junginio metanolizę, susintetinti ketoesteriai **2a-c** (3.1. pav.). Pastarieji junginiai reakcijos metu su *N,N*-dimetilformamido dimetilacetalium suformavo tarpinius junginius **3a-c**. Šie junginiai ciklizacijos reakcijoje su įvairiais hidraziniais sudarė 5-piperidinilpirazolus **4-7** (3.1. lentelė).



3.1. pav. Tarpiniai junginiai **2a-c** ir **3a-c**

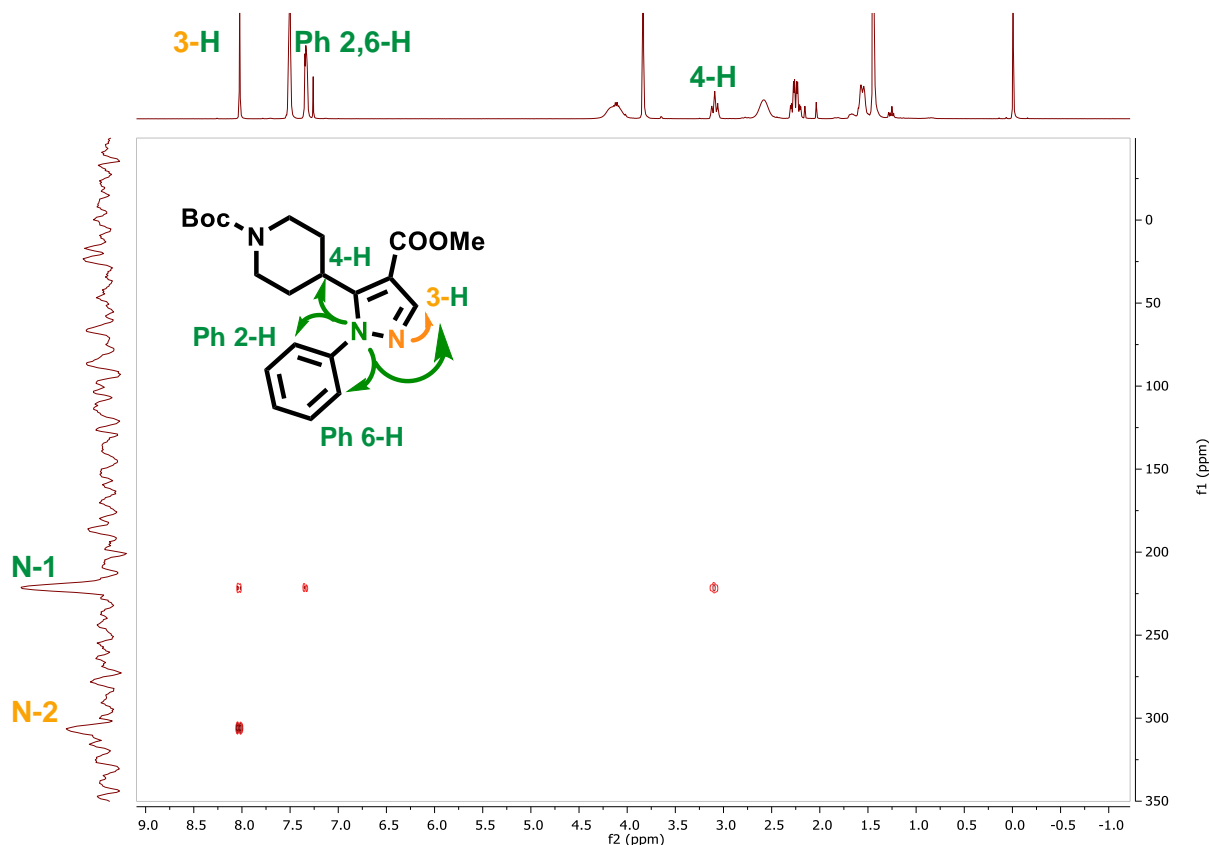
Tolimesnės sintezės metu naudotas hidrazino hidrato vandeninis tirpalas bei skirtingi monopakeisti aromatiniai hidrazinai. Žiedo uždarymo reakcijos atliktos su fenil-, *p*-tolil- bei 3-trifluormetilfenilhidraziniais. Sintezė vykdyta etanolio virimo temperatūroje 5 val. Tikslinių junginių **5-7** išeigos siekia 63 – 81 % (3.1. lentelė). Kiek sunkiau žiedo uždarymo reakcija vyko naudojant hidrazino hidrato vandeninį tirpalą. Junginių **4a-c** išeigos siekia 50 – 60 %. Galima daryti išvadą, jog net ir nedidelis vandens kiekis trukdo pirazolo žiedo susidarymui.

3.1. lentelė. 5-Piperidinilpirazolo karboksilatų dariniai



Pradiniai junginiai	3a	3b	3c
NH_2NH_2	<p>4a (60 %)</p>	<p>4b (50 %)</p>	<p>4c (54 %)</p>
	<p>5a (75 %)</p>	<p>5b (77 %)</p>	<p>5c (67 %)</p>
	<p>6a (70 %)</p>	<p>6b (81 %)</p>	<p>6c (78 %)</p>
	<p>7a (76 %)</p>	<p>7b (63 %)</p>	<p>7c (79 %)</p>

Vykdam ciklizacijos reakcijas su pasirinktais hidrazino dariniais suformuojamas pirazolo fragmentas, turintis piperidino pakaitą penktojoje žiedo padėtyje. Išsamios BMR spektrinės analizės metu gautas junginio **5a** bidimensinis ^1H - ^{15}N HMBC spektras (3.2. pav.). Šiame spektre fiksuojamos azoto ir netoli jo esančių protonų sąveikos, kuriuos skiria du, trys arba kartais net keturi cheminiai ryšiai. Kitaip tariant, identifikuojama tolimoji sąveika.



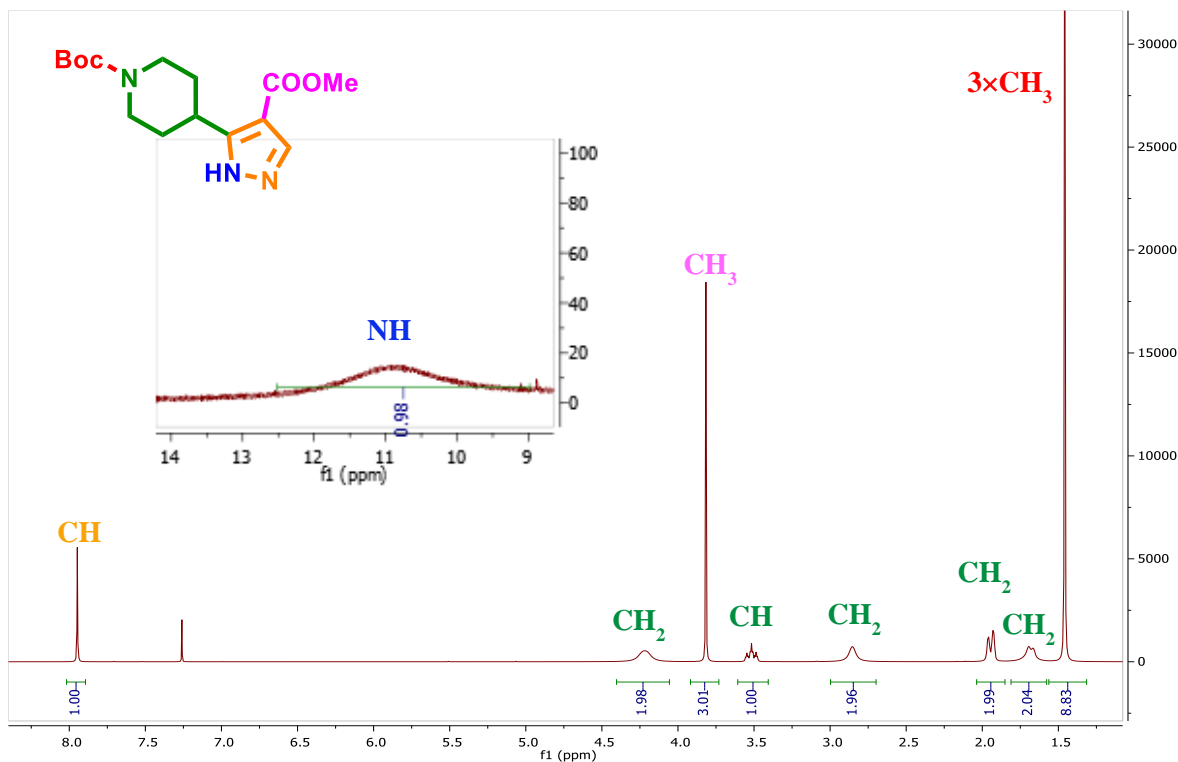
3.2. pav. Junginio **5a** ^1H - ^{15}N HMBC spektras

Iš spektro duomenų matyti, jog azoto atomas N-1 turi sąveikas su piperidino fragmento 4-H, fenilo žiedo 2,6-H bei paties pirazolo ciklo 3-H protonais (3.2. pav.). Kitam azoto atomui N-2 būdinga tik viena sąveika, t. y. su pirazolo žiedo 3-H protonu. Kitos sąveikos su šiuo azoto atomu nefiksuojamos, nes vandenilio protonai išsidėstę per keturis cheminius ryšius nuo tiriamojo branduolio. Tokia sąveika pasižymi labai silpnu signalu, todėl retai aptinkama bei fiksuojama spektre. Turint šiuos 2D BMR spektroskopijos duomenis, išsiaiškinta piperidino ciklo padėtis bei identifikuota tiksli susintetinto junginio **5a** struktūra.

Visų susintetintų 5-piperidinilpirazolo karboksilato junginių **4-7** struktūros patvirtintos BMR, IR spektroskopijų bei MS spektrometrijų duomenimis.

3.2. N-alkilinimo metodo taikymas

Tarpinių piperidino karboksilatų **3a-c** ciklizacijos reakcija atlikta su hidrazino hidrato vandeniniu tirpalu, suformuojant aktyvią NH-grupę. Junginio **4a** ^1H BMR spektre registruojamas platus NH-grupės protono signalas (3.3. pav.). Turint laisvą NH-grupę, nuspręsta taikyti N-alkilinimo metodą ir susintetinti įvairius pirazolo darinių analogus (3.2. lentelė). Kaip alkilinimo agentas pasirinktas halogenalkano junginys 1-brom-2-metilpropanas (3 ekv.). Alkilinimas vykdytas kambario temperatūroje dimetilformamide, naudojant KOH (1,5 ekv.).

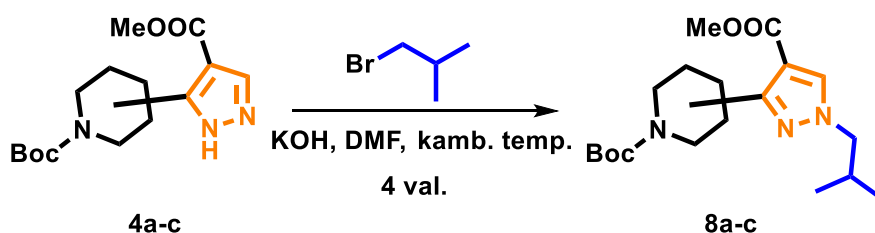


3.3. pav. Junginio **4a** ^1H BMR spektras

Susintetintiems junginiams **8a-c** būdingos nedidelės išeigos (3.2. lentelė). Bandyta optimizuoti reakcijos sąlygas, keičiant bazę į NaH ar Cs_2CO_3 bei keliant reakcijos mišinio temperatūrą. Tačiau reikšmingų pokyčių sintezės eigoje nepastebėta. Išeigos siekia < 40 %.

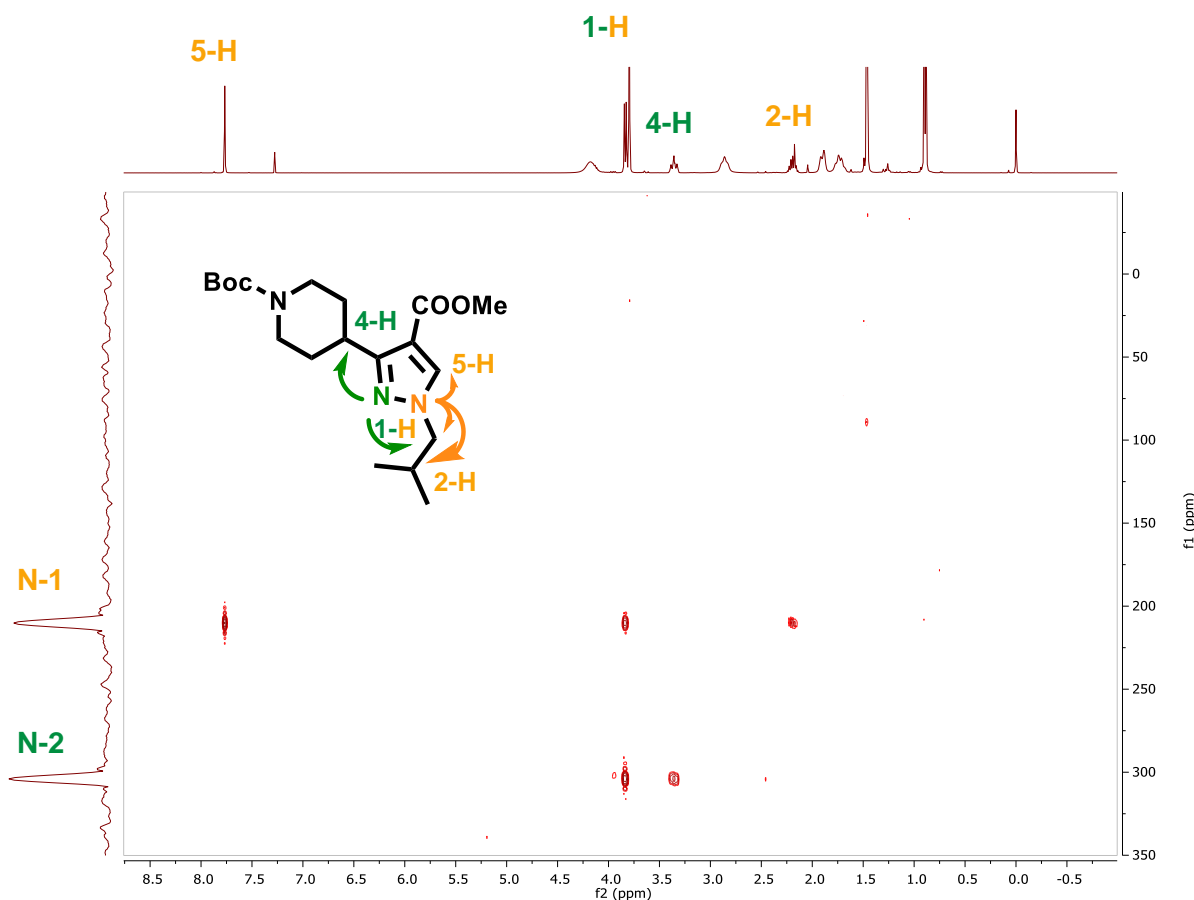
Chiralinio centro neturintis junginys **8a** gautas 65 % išeiga. *S*- bei *R*-enantiomerinėms piperidino struktūroms būdingos perpus mažesnės, negu teoriškai tikėtasi, išeigos. Lyginant susintetintų junginių *S*- ir *R*-formas nustatyta, jog sintezės metu naudojant *R*-formos struktūrinius darinius, tiksliniai produktai gauti mažesniais išeigomis. Be to, atlikus išsamią susintetintų junginių BMR spektrinę analizę, išsiaiškinta, jog *N*-alkilinimo metu susidaro įvairūs 3-piperidinilpirazolo karboksilatų dariniai. Tai patvirtina junginio **8a** ^1H - ^{15}N HMBC spektras (3.4. pav.).

3.2. lentelė. 3-Piperidinilpirazolo karboksilatų dariniai



8a	8b	8c
 (65 %)	 (47 %)	 (39 %)

Įvykdžius junginio **4a** *N*-alkilinimo reakciją su pasirinktais halogenalkanais, susintetintas junginys **8a**. Gavus išsamios BMR spektrinės analizės duomenis išsiaiškinta, jog alkilinimo reakcijos metu pasirinktas alkilinimo agentas prisijungia prie kito azoto atomo negu anksčiau minėtos reakcijos su hidrazino dariniais atveju. Junginio **8a** bidimensiniame ^1H - ^{15}N HMBC spektre fiksuojamos pirazolo žiede esančių azoto atomų sąveikos su netoli išsidėsčiusiais vandenilio protonais (3.4. pav.). Remiantis spektro duomenimis, azoto atomas N-1 turi sąveiką su prijungto pakaito 1,2-H bei pirazolo žiedo 5-H protonais. Kitas azoto atomas N-2 pasižymi sąveika su piperidino ciklo 4-H ir alifatinės grandinės 1-H protonais. Iš gautų spektroskopijos duomenų nustatyta, jog *N*-alkilinimo reakcijos metu susintetintas tikslinis junginys, kuriame azoto atomas N-1 turi prisijungęs pasirinktą pakaitą, tačiau nėra šalia piperidino fragmento. Todėl galima tvirtinti, kad susintetintas junginys **8a** yra 3-piperidinilpirazolo darinys.



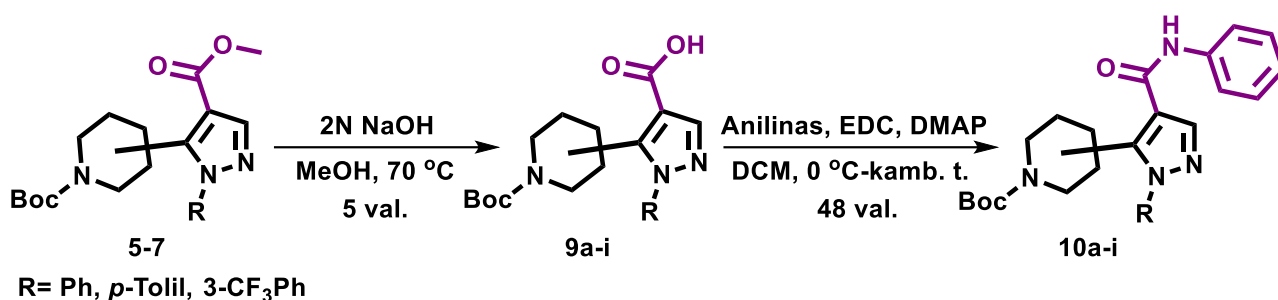
3.4. pav. Junginio **8a** ^1H - ^{15}N HMBC spektras

Taigi atlikus BMR struktūrinę analizę identifikuota ir patvirtinta, kad projekto metu susintetinti tiek 5-piperidinilpirazolo, tiek 3-piperidinilpirazolo dariniai.

3.3. 1*H*-pirazolo-4-karboksamidų gavimas

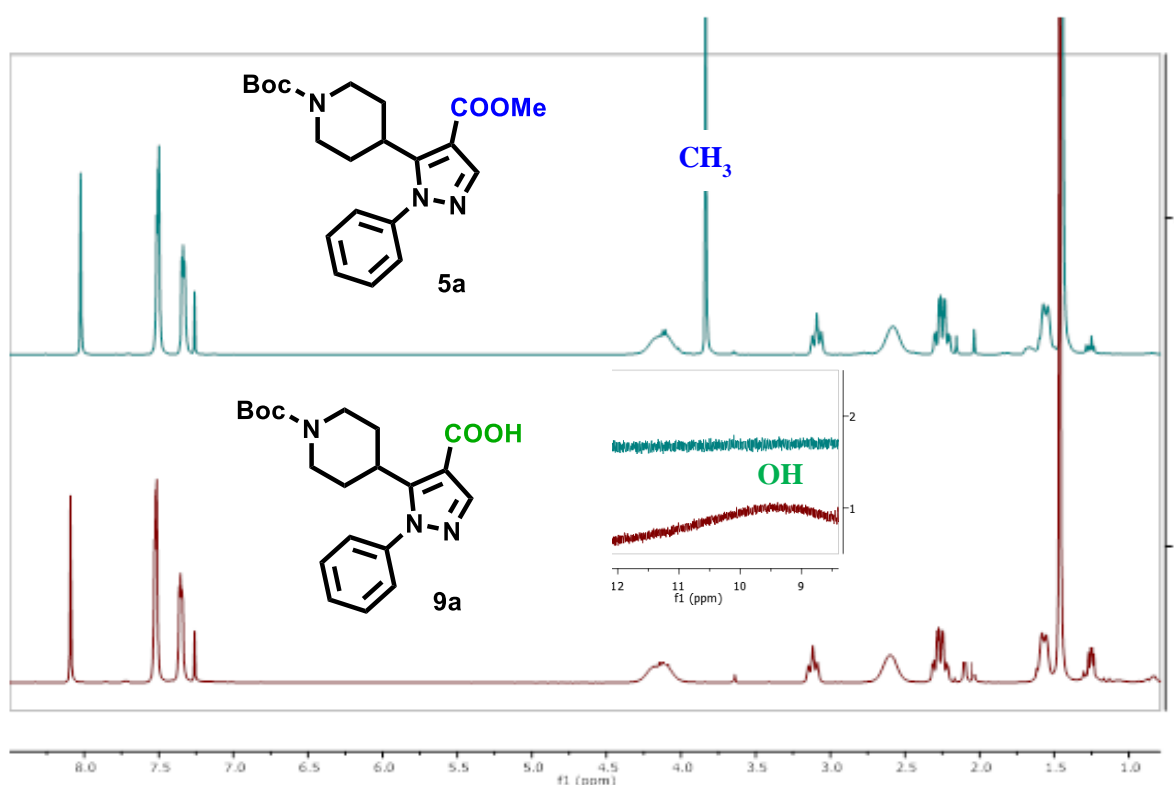
Projekto metu susintetinti 5-piperidinilpirazolo karboksilatai modifikuoti į karboksamidus. Tokia sintezės strategija pasirinkta atsižvelgiant į atliktą pirazolo darinių literatūros analizę [29,37,46,47]. Be to, nustatyta, jog organiniai junginiai, ketvirtojoje pirazolo žiedo padėtyje turintys amidinę jungtį pasižymi slopinamuoju poveikiu prieš urokinazės receptorius (uPAR) [49]. Išsiaiškinta, kad uPAR sudarantys baltymai skatina vėžinių ląstelių invaziją ir metastazių susidarymą žmogaus organizme.

Šių receptorių blokavimas sumažintų vėžinių ląstelių migracijos spartą bei pristabdytų metastazių formavimąsi.



3.2. schema.

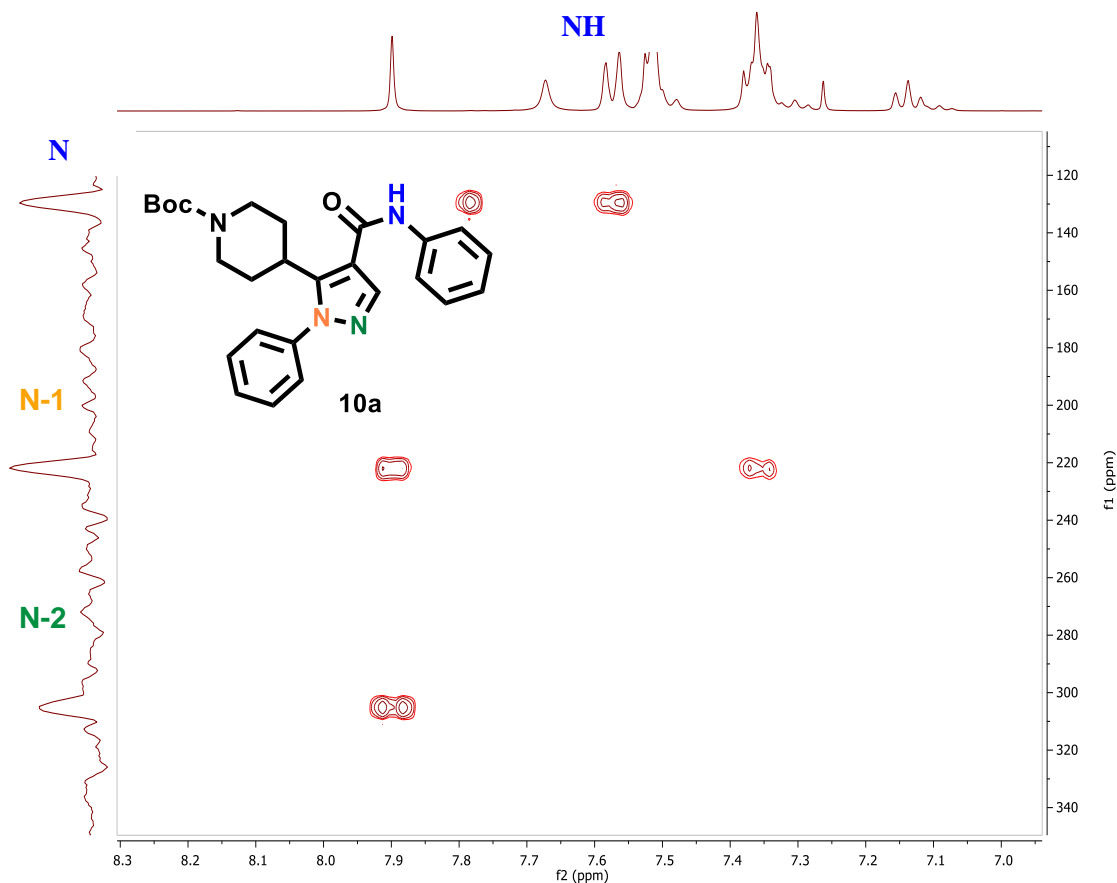
Pirmiausiai, atlikta 5-piperidinilpirazolo karboksilatų esterinės grupės hidrolizė (3.2. schema). Pasirinkta vykdyti hidrolizę šarminėmis sąlygomis, nes rūgštinės hidrolizės metu atsiranda pavojus pašalinti apsauginę *N*-Boc grupę. Gautas junginys pasižymėtų dvejomis aktyviomis funkcinėmis grupėmis: amino (NH-) bei karboksirūgšties (-COOH). Todėl jo išskyrimas iš reakcijos mišinio būtų pakankamai kompliktuotas. Taigi junginių **5-7** hidrolizė vykdyta metanolio virimo temperatūroje, naudojant 2N NaOH tirpalą (4 ekv.).



3.5. pav. Junginių **5a** ir **9a** ¹H BMR spektrai

Sugretinus reakcijos metu naudoto pradinio junginio **5a** ir po reakcijos gauto produkto **9a** protoninius spektrus, stebimas esterinei grupei būdingo -CH₃ protonų signalo išnykymas bei registruojamas platus karboksirūgščiai priklausantis -OH protono singletas (3.5. pav.). Taikant pasirinktas hidrolizės sąlygas tarpiniai junginiai **9a-i** gauti aukštomis išeigomis 79 – 98 %.

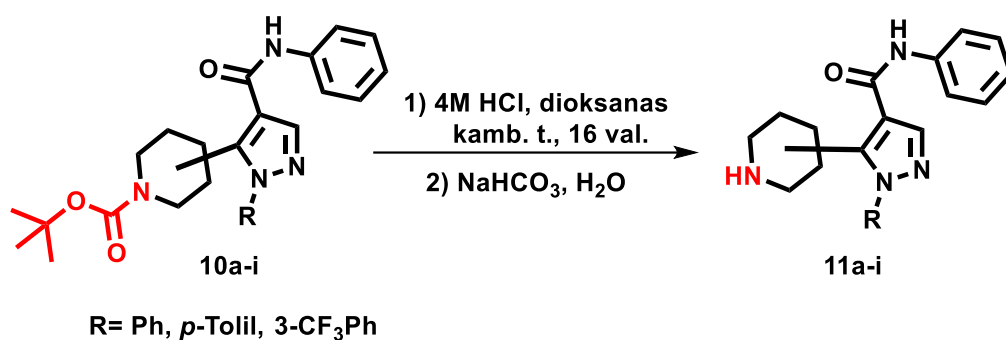
Kitas sintezės etapas – amidinio ryšio sudarymas, gaunant įvairius karboksamidų darinius. Nuspręsta prie susintetintų tarpinių junginių **9a-i** karboksirūgšties grupės prijungti anilino fragmentą. Šis junginys pasirinktas, nes yra elementariausias aromatinis aminas. Žinant, jog bus atlikti tikslinių produktų biologinio aktyvumo tyrimai bei mažstant apie tolimesnį panašios cheminės struktūros piperidinilpirazolo karboksamidų bibliotekos kūrimą, ateityje atsirastų galimybė sekti, kaip skirtingi pakaitai veikia biologinį aktyvumą.



3.6. pav. Junginio **10a** ^1H - ^{15}N HMBC spektras

Laikantis numatytos sintezės strategijos, anilinas į reakcijos mišinį sulašintas $0\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje kaip tirpiklį naudojant DCM, reakcija vykdyta kambario temperatūroje 48 val. Atlikus išsamią BMR spektrinę analizę, junginio **10a** bidimensiniame ^1H - ^{15}N HMBC spektre užfiksuoti abu pirazolo žiedo azoto atomai bei užregistruotas NH-grupės, esančios anilino fragmente, protono signalas (3.6. pav.). Tai įrodo amidinio ryšio susiformavimą. 4-Substituoti piperidino junginiai **10a-c** susidarė geresnėmis išieigomis lyginant su 3-substituotais piperidino analogais **10d-i** (3.3. lentelė).

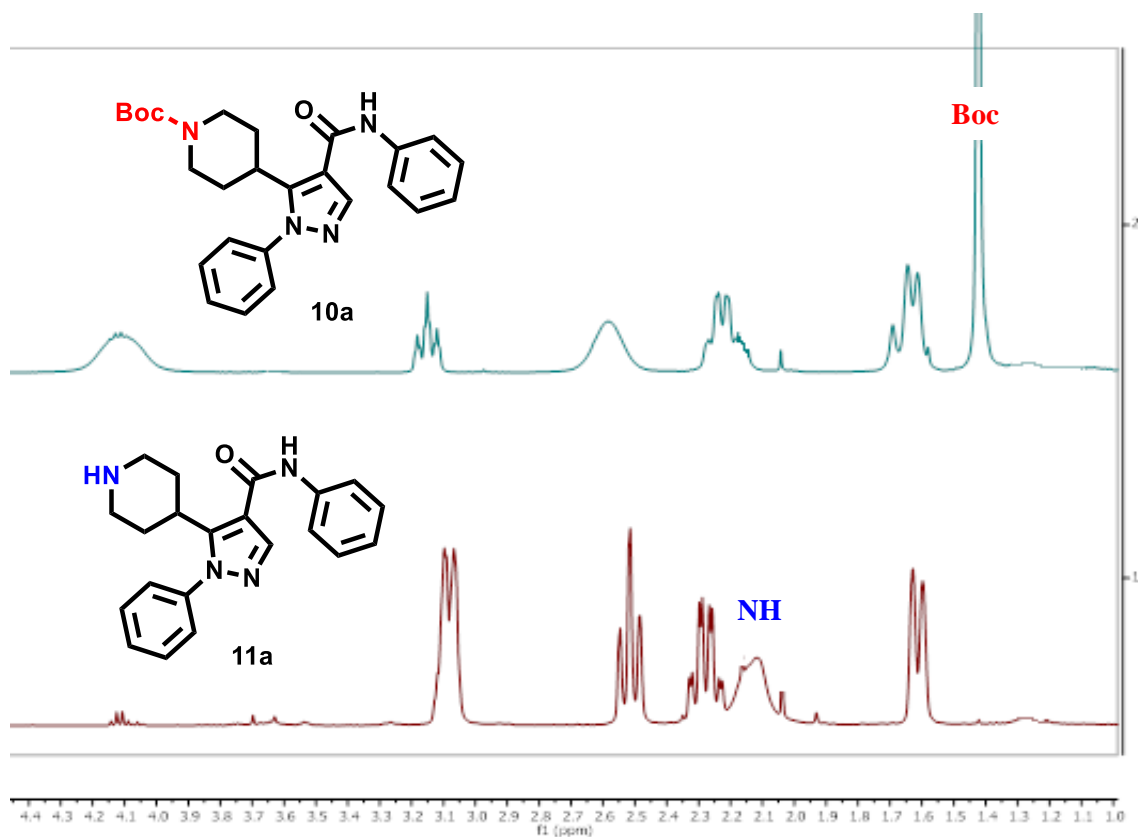
Siekiant gauti junginius tinkamus biologinio aktyvumo tyrimams, buvo pašalinta *N*-Boc apsauginė grupė (3.3. schema). Dažniausiai apsauginė *N*-Boc grupė šalinama taikant standartines TFA/DCM (1:1) reakcijos sąlygas. Tokiu atveju produktas gaunamas TFA druskos pavidalu. TFA yra acto rūgšties analogas, tačiau pasižymi kelis kartus stipresnėmis rūgštinėmis savybėmis negu jos pirmtakas. Turint omenyje, jog susintetinti tiksliniai junginiai **11a-i** bus naudojami biologinio aktyvumo tyrimuose, pasirinktos mažiau toksiškos apsauginės grupės pašalinimo sąlygos, išvengiant TFA pėdsakų bandinyje.



3.3. schema.

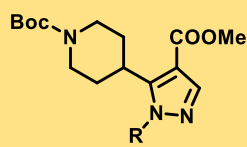
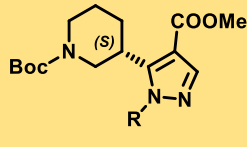
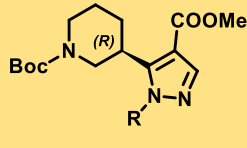
Laisvą aminogrupę turintys junginiai **11a-i** gauti pradinę medžiagą ištirpinus dioksane ir sulašinus 4N HCl tirpalą dioksane. Taikant šias reakcijos sąlygas, junginiai gauti kaip hidrochlorido druskos. Todėl tikslinio produkto išskyrimo metu, reakcijos mišinys neutralizuotas sočiu NaHCO₃ tirpalu. Sulyginus junginių **10a** ir **11a** protoninius spektrus, stebimas *N*-Boc apsauginei grupei priklausanti protonų smailės išnykimas (3.7. pav.). Be to, spektre registruojamas laisvai aminogrupei būdingas platus protono singletas.

Tiek 4-substituoti piperidino junginiai, tiek *R*-formos piperidino dariniai susidaro panašia tikslinio produkto išeiga (73 – 89 %). Tačiau *S*-piperidino enantiomerinės formos analogai susidarė nedidele išeiga (53 – 73 %) (3.3. lentelė). Tai tik patvirtina, jog erdviniai izomerai vienas nuo kito skiriasi savo cheminėmis savybėmis.



3.7. pav. Junginių **10a** ir **11a** ¹H BMR spektrai

3.3. lentelė. 5-Piperidinilpirazolo dariniai

Pradinė medžiaga	Pakaitai	9	10	11
	5a (R=Ph)	9a (83 %)	10a (80 %)	11a (83 %)
	6a (R= <i>p</i> -Tolil)	9b (95 %)	10b (80 %)	11b (73 %)
	7a (R=3-CF ₃ Ph)	9c (98 %)	10c (78 %)	11c (84 %)
	5a (R=Ph)	9d (84 %)	10d (67 %)	11d (73 %)
	6a (R= <i>p</i> -Tolil)	9e (79 %)	10e (73 %)	11e (56 %)
	7a (R=3-CF ₃ Ph)	9f (79 %)	10f (73 %)	11f (53 %)
	5a (R=Ph)	9g (88 %)	10g (80 %)	11g (82 %)
	6a (R= <i>p</i> -Tolil)	9h (93 %)	10h (74 %)	11h (73 %)
	7a (R=3-CF ₃ Ph)	9i (97 %)	10i (79 %)	11i (89 %)

Taigi taikant ciklizacijos bei *N*-alkilinimo reakcijas, susintetinti nauji 3- bei 5-piperidinilpirazolo karboksilatai. Atliktas tarpinių junginių esterinės grupės modifikavimas gaunant karboksamidus. Remiantis BMR, IR spektroskopijų bei MS, HRMS spektrometrijų duomenimis, atlikta visų projekto metu susintetintų junginių struktūros analizė. Įvykdžius junginių **10a-i** HPLC chiralinę analizę, išsiaiškintas susintetintų junginių enantiomerinis grynumas. Tiksliniai junginiai **11a-i** naudoti kituose tyrimuose, analizuojant jų biologinį aktyvumą.

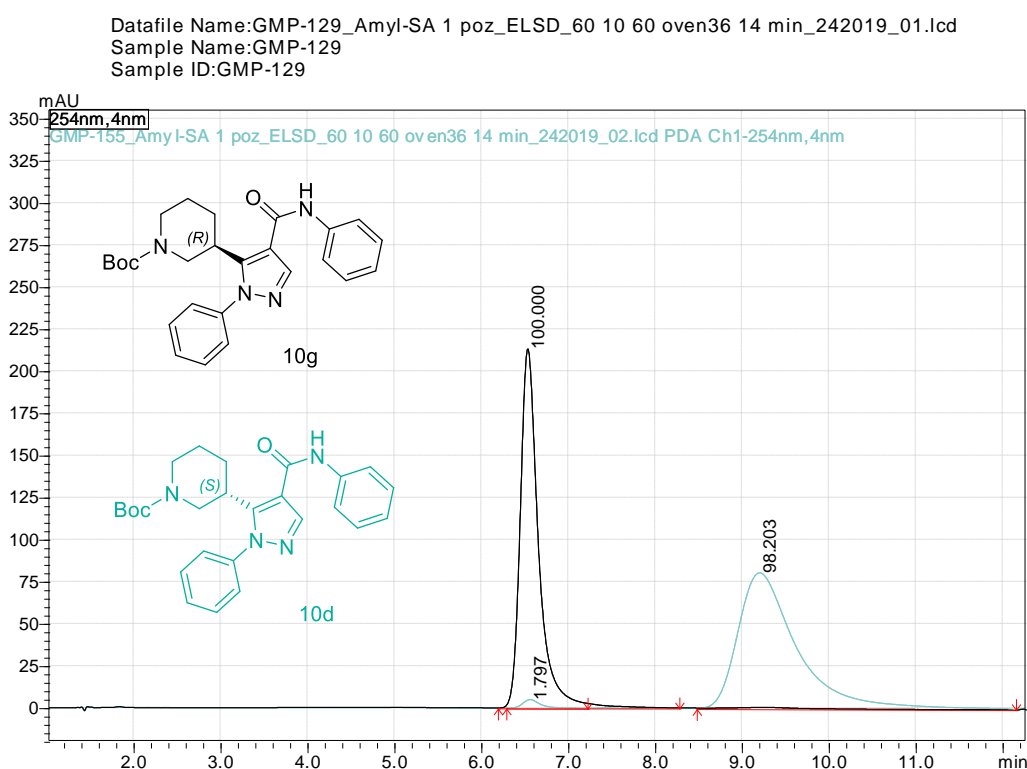
3.4. Chiralinė HPLC analizė

Vaistų chemijoje labai svarbu žinoti tikslią veikliosios medžiagos struktūrą. Todėl būtina išsiaiškinti susintetintos molekulės enantiomerinę formą. Struktūriškai identiškoms molekulėms, besiskiriančios tik erdvinio ryšių išsidėstymu gali visiškai skirtingai veikti žmogaus organizmą. Ekstremaliu atveju, viena enantiomerinė forma veikia kaip vaistas, o kita – kaip nuodai. Štai pavyzdžiui, (*S,S*)-(+)-etambutolis gydo tuberkuliozę, o (*R,R*)-(-)-etambutolis sukelia aklumą [50]. Kitais atvejais, abiem enantiomerinėms formoms būdingos terapinės savybės, bet skiriasi jų biologinio aktyvumo stiprumas [49].

Pirmiausiai, svarbu išsiaiškinti susintetintų molekulių enantiomerinį grynumą. Tik turint enantiomeriškai gryną medžiagą galima atlikti biologinius tyrimus ir iširti jų gydomąsias bei toksines savybes. Todėl reikalingi HPLC analizės duomenys. Dažniausiai organinės medžiagos gryninamos

efektyviosios skysčių chromatografijos metodais. Tačiau įprasti HPLC būdai yra netinkami chiralinį centrą turinčioms medžiagoms. Norint detektuoti enantiomerinius junginius, naudojamos chiralinės kolonėlės, t. y. kolonėlės užpildytos specifiskai modifikuota stacionaria faze. Atsižvelgiant į tiriamų junginių cheminę struktūrą, atliekama sorbento derivatizacija, pagerinanti mišinio komponentų atskyrimą bei aptikimą. Pasitaiko atveju, jog atliekant HPLC chiralinę analizę, ne visada pavyksta atskirti erdvinius izomerus vieną nuo kito. Todėl atskyrimas tampa sudėtingas, ieškoma naujų analizės metodų.

Naudojant chiralines kolonėles Amylose-SA bei Cellulose-SB, ištirtas susintetintų junginių **10a-i** enantiomerinis grynumas. Tiriamoji medžiaga ištirpinta metanolyje. Analizė atlikta gradientinėmis sąlygomis. Pasirinkta mobili fazė: vanduo+0,1 % skruzdžių rūgštis / acetonitrilas (70:30→30:70 per 10 min). Tėkmės greitis 1 ml/min.



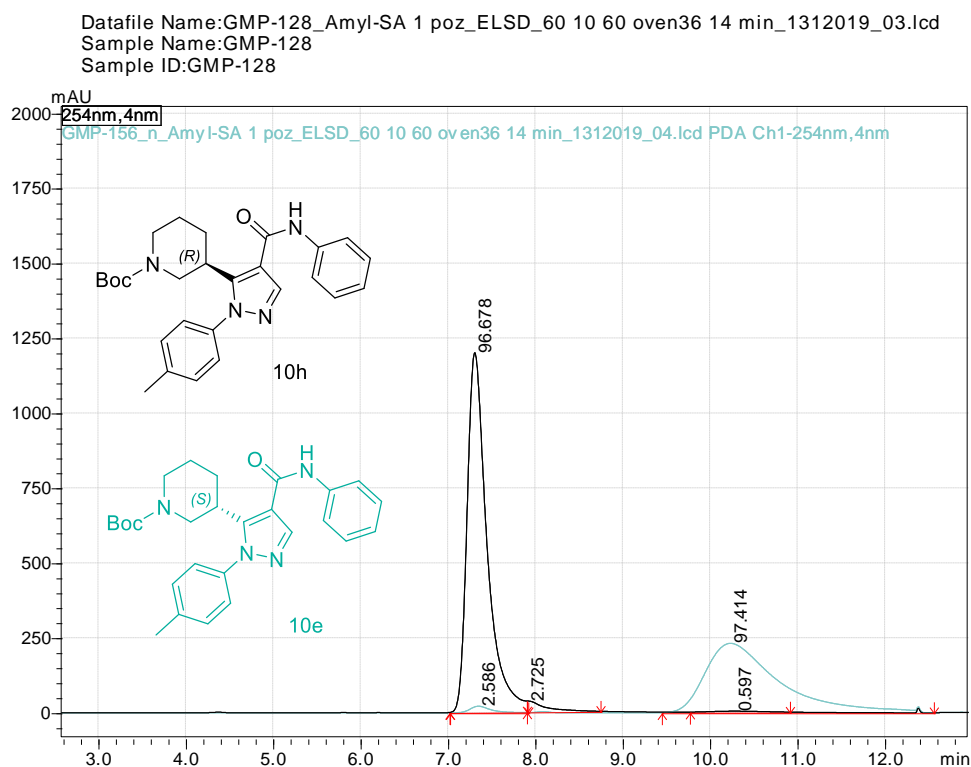
3.8. pav. Junginių **10d** ir **10g** enantiomerinio grynumo analizė

Ištirtas fenil-pakaitą turinčių junginių enantiomerinis grynumas naudojant Amylose-SA chiralinę kolonėlę (3.8. pav.). Nustatyta, jog junginyje **10d** yra 98,2 % *S*-formos enantiomero ir 1,8 % *R*-enantiomero. O junginyje **10g** visiškai neaptikta kito enantiomero. Todėl galima teigti, kas junginiai **10d** ir **10g** pasižymi aukštu enantiomeriniu grynumu.

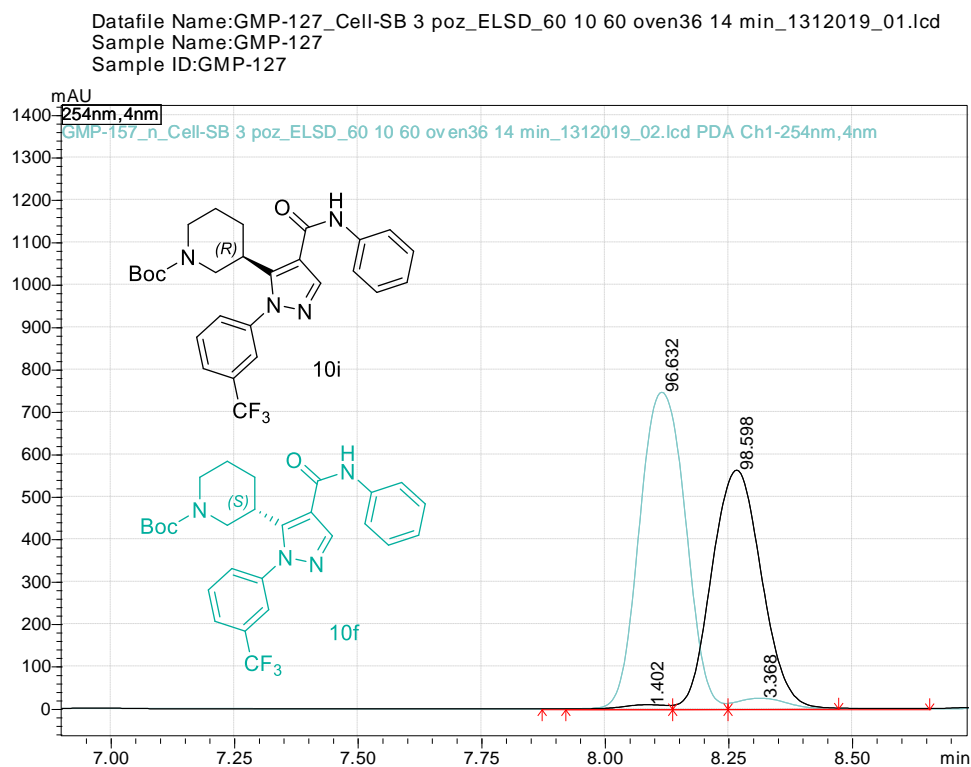
Toliau analizuoti junginiai, turintys *p*-tolil-pakaitą (3.9. pav.). Enantiomerus atskirti pavyko, naudojant Amylose-SA chiralinę kolonėlę. Junginyje **10e** yra 97,4 % *S*-formos enantiomero ir 2,6 % *R*-formos. Junginys **10h** turi 98,2 % *R*-formos enantiomero ir 0,6 % *S*-enantiomero. Be to, analizės metu grafike detektuotas ir priemaišos signalas.

Galiausiai tirti junginiai, turintys 3-trifluormetilfenil-pakaitą (3.10. pav.). Naudojant Cellulose-SB chiralinę kolonėlę, atskirtos individualios enantiomerinės junginių formos. Nustatyta, kad junginys

10f turi 96,6 % *S*-enantiomero bei 3,4 % *R*-formos enantiomero. Junginyje **10i** yra 98,6 % *R*-formos enantiomero ir 1,4 % *S*-enantiomero.



3.9. pav. Junginių **10e** ir **10h** enantiomerinio grynumo analizė



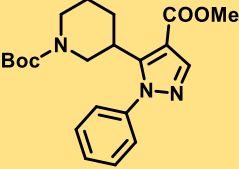
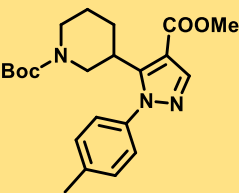
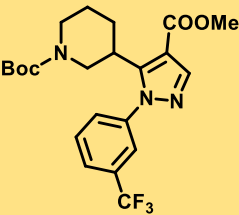
3.10. pav. Junginių **10f** ir **10i** enantiomerinio grynumo analizė

Žinant tikslius procentinius *S*- ir *R*-enantiomerų kiekius, apskaičiuotas enantiomero perteklius (enantiomer excess, ee) junginiuose **10d-i** (3.4. lentelė). Tai enantiomerinių junginių grynumo įvertinimo rodiklis, išreiškiantis santykį tarp tiriamame junginyje esančių erdvinių izomerų kiekių skirtumo ir bendro jų kiekio medžiagoje. Raceminiams mišiniam enantiomerinis perteklius yra 0 %, o visiškai gryno enantiomero – 100 %. Pavyzdžiui, *S*-formos erdviniam izomerui enantiomero perteklius randamas:

$$ee = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} \times 100\%$$

Taip apskaičiuotas ee įvertis junginiui **10d** yra 96,4 %. Remiantis šiuo principu, apskaičiuoti visų likusių junginių ee įverčiai. Nustatyta, jog taikant analogiškas sintezės sąlygas, *R*-formos piperidinilpirazolo karboksamidų dariniai gauti enantiomeriškai grynesni lyginant su *S*-formos junginiais. Galima daryti prielaidą, jog sintezės metu *S*-izomeras yra mažiau stabilus negu *R*-izomeras.

3.4. lentelė. 5-Piperidinilpirazolo darinių enantiomerinio grynumo rodikliai

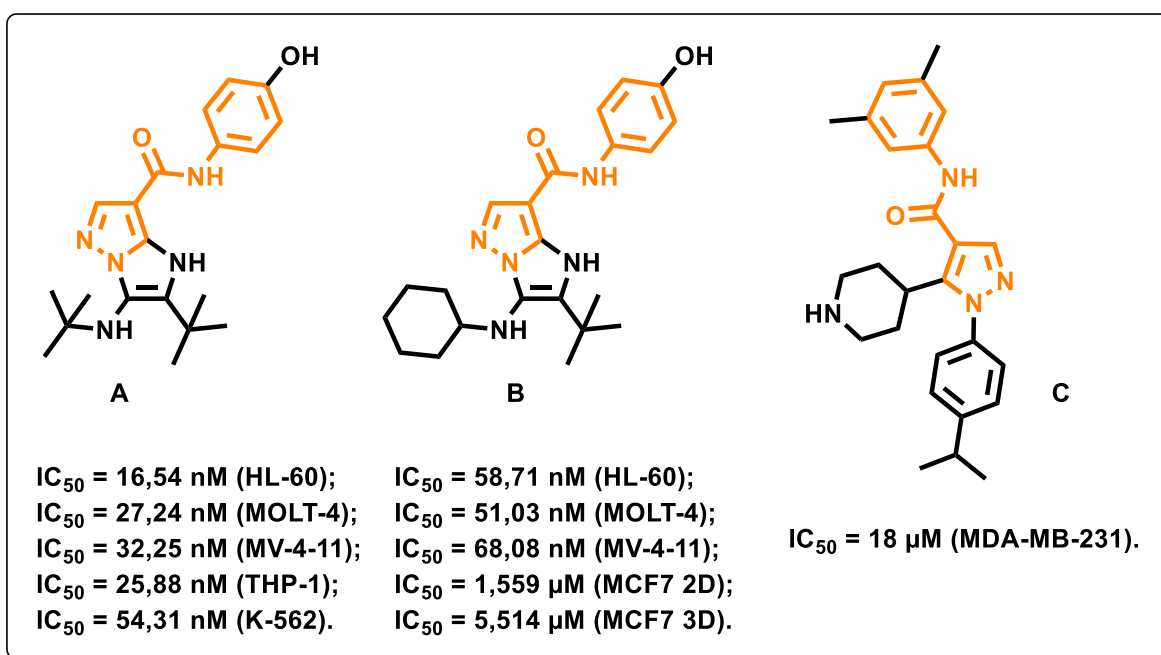
Bendra struktūra	Gautas junginys	<i>S</i> -izomero kiekis, %	<i>R</i> -izomero kiekis, %	ee, %
	10d	98,2	1,8	96,4
	10g	-	100	100
	10e	97,4	2,6	94,8
	10h	0,6	98,2	98,8
	10f	96,6	3,4	93,2
	10i	1,4	98,6	97,2

Tačiau HPLC chiralinė analizė nebuvo atlikta tiksliniams junginiams **11a-i**. Pašalinus *N*-Boc apsauginę grupę, susintetinti junginiai pasižymėjo stipriomis polinėmis savybėmis. Buvo nebeįmanoma atskirti ir detektuoti enantiomerų, panaudojant anksčiau išvardintas chiralines kolonėles. Tikimasi, jog enantiomerinis grynumas pašalinus *N*-Boc apsauginę grupę išlieka nepakitęs.

3.5. Tikslinių junginių **11a-i** biologinio aktyvumo tyrimų rezultatai

Iš literatūros duomenų žinoma, jog pirazolo dariniai, turintys ketvirtojoje žiedo padėtyje karboksamido fragmentą, pasižymi priešvėžinėmis savybėmis [51,52]. Šie junginiai efektyviai

slopina leukemijos (HL-60, THP-1, MOLT-4, MV-4-11 ir K-562) bei krūties (MDA-MB-231 ir MCF7) vėžinių ląstelių proliferaciją ir augimą, sukelia apoptozę bei stabdo metastazių plitimą organizme (3.11. pav.). Todėl šio baigiamojo projekto metu nuspręsta ne tik susintetinti pasirinktus piperidinilpirazolo karboksamidus, bet ir atlikti gautų junginių biologinio aktyvumo tyrimus. Tad įvykdžius tikslinių junginių **11a-i** sintezę, toliau tirtos šių junginių biologinės savybės. Bendradarbiaujant su kolegomis dr. Asta Žukauskaite ir dr. Lucie Rarova iš Palackio universiteto (Čekija), Olomouce nustatytas tikslinių pirazolo karboksamido darinių citotoksinių poveikis vėžinėms ląstelėms. Šiuos tyrimus atliko dr. L. Rarova.



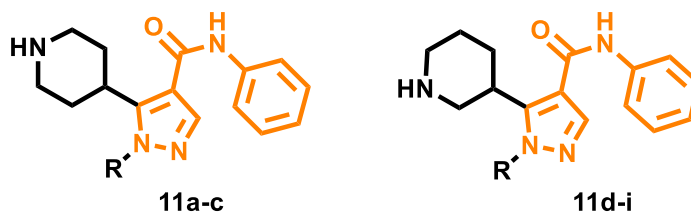
3.11. pav. Junginių A-C citotoksinių tyrimų rezultatai

Tikslinių junginių **11a-i** citotoksiniai tyrimai atlikti su dviejų tipų vėžinėmis ląstelėmis: CEM (ūminės leukemijos) bei MCF7 (krūties vėžio). Taip pat, paraleliai tirtas ir junginių poveikis nevėžinėms žmogaus odos fibroblastų ląstelės BJ. Iš pradžių, naudojant Calcein AM testą, nustatyta procentinė gyvų ląstelių dalis CEM, MCF7 ir BJ ląstelėse 72 val. veikiant 50 μM junginių **11a-i** tirpalais (3.5. lentelė) [53]. Remiantis pateiktais duomenimis, didžiausiu citotoksiniu aktyvumu vėžinėms ląstelėms pasižymėjo junginiai **11i** ir **11f**, turintys CF_3 -pakaitą. Abu junginiai yra struktūriškai identiški, vienintelis skirtumas – erdvinis molekulių išsidėstymas. Junginys **11i** yra *R*-formos piperidinilpirazolo karboksamido darinys, o junginys **11f** yra jo *S*-analogas. Nustatyta, jog junginys **11i** sunaikino 70 % MCF7 ir 33 % CEM ląstelių, o junginys **11f** – 48 % MCF7 ir 42 % CEM ląstelių. Visi kiti tirti tiksliniai junginiai pasižymėjo stipresniu citotoksiniu poveikiu nevėžinėms ląstelėms negu vėžinėms.

Svarbu tai, jog 4-substituotiems piperidino dariniams, nors ir turintiems CF_3 -pakaitą, nustatytas silpnesnis citotoksinių poveikis. Galima teigti, jog NH-grupės padėtis piperidino žiede daro įtaką junginių citotoksinių savybių stiprumui. Todėl nusprendus tęsti darbus baigiamojo projekto tematika, būtų galima susintetinti įvairesnę biblioteką chiralinį centrą turinčių piperidinilpirazolo karboksamido darinių ir iširti jų citotoksines savybes.

Pažymėtina, kad ląsteles paveikus junginiais **11a-i**, kai kuriais atvejais fiksuotas šiek tiek aukštesnis nei 100 % gyvybingų ląstelių kiekis (3.5. lentelė). Galima spręsti, kad junginiai **11a**, **11d** ir **11g** truputį padidino vėžinių ląstelių MCF7 gyvybingumą, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis.

3.5. lentelė. Rezultatai gauti ląsteles veikiant 50 μM junginių **11a-i** koncentracija



Junginys	R	Enantiomerinė forma	Išlikusios gyvos ląstelės (%)		
			CEM	MCF7	BJ
11a	Ph	-	84 %	113 %	77 %
11b	<i>p</i> -Tolil	-	74 %	95 %	56 %
11c	3-CF ₃ Ph	-	68 %	84 %	64 %
11d	Ph	<i>S</i>	76 %	104 %	88 %
11e	<i>p</i> -Tolil	<i>S</i>	68 %	83 %	67 %
11f	3-CF ₃ Ph	<i>S</i>	58 %	52 %	65 %
11g	Ph	<i>R</i>	73 %	110 %	76 %
11h	<i>p</i> -Tolil	<i>R</i>	73 %	94 %	51 %
11i	3-CF ₃ Ph	<i>R</i>	67 %	30 %	43 %

3.6. lentelė. Tikslinių junginių **11a-i** citotoksinio aktyvumo rezultatai prieš vėžines ląsteles

Junginys	IC ₅₀ (μM) \pm SN		
	CEM	MCF7	BJ
11a-11h	> 50	> 50	> 50
 11i	> 50	43,7 \pm 1,1	45,7 \pm 2,0

Be to, tyrimo metu junginiui **11i**, kurio poveikyje po 72 val. gyvų ląstelių kiekis buvo mažesnis nei 50 %, nustatytos IC_{50} koncentracijos, sukeliančios pusės tirtų MCF7 ir BJ ląstelių žūtį (3.6. lentelė). Išsiaiškinta, jog junginio **11i** IC_{50} koncentracija prieš MCF7 ląstelių liniją yra $43,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Tačiau, kaip minėta, junginys **11i** taip pat pasižymi panašiu citotoksiniu aktyvumu ir prieš nevėžines ląsteles BJ ($IC_{50} = 45,7 \pm 2,0 \mu\text{M}$). Visų kitų tikslinių junginių veiksmingos koncentracijos prieš tirtas ląstelių linijas viršija $50 \mu\text{M}$.

Citotoksinio poveikio tyrimo rezultatai parodė, jog susintetinti junginiai **11a-i** pasižymi nedideliu citotoksiniu poveikiu prieš CEM ir MCF7 ląstelių linijas. Efektyviausi junginiai prieš šias leukemijos bei krūties vėžio ląsteles buvo 3-trifluormetilfenil-pakaitą turintys piperidinilpirazolo karboksamidų dariniai. Ateityje planuojama vykdyti angiogenezės tyrimus.

Išvados

1. 5-Piperidinilpirazolo karboksilatus galima gauti ciklizacijos reakcijos metu iš β -ketoesterių, panaudojant įvairius hidrazinų darinius.
2. 3-Piperidinilpirazolo karboksilatus galima susintetinti atliekant 3- ar 4-[4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatų *N*-alkilinimo reakciją, naudojant įvairius halogenalkanų darinius.
3. Piperidinilpirazolo karboksamidai lengvai ir geromis išeigomis gali būti susintetinti iš piperidinilpirazolo karboksilatų. Pirmiausiai, vykdant šių junginių šarminę hidrolizę su 2 N NaOH tirpalu ir vėliau suformuojant amidinį (-CONH-) ryšį su įvairiais NH₂-grupę turinčiais aminojunginiais.
4. Laikantis anksčiau pateiktos karboksamidų sintezės sąlygų galima gauti aukšto enantiomerinio grynumo pirazolo darinius.
5. Susintetinti piperidinilpirazolo karboksamidai **11a-11h** nepasižymi veiksmingu citotoksinu poveikiu prieš CEM bei MCF7 vėžinių ląstelių linijas. Remiantis atliktais tyrimais, tik *N*-fenil-5-((3*R*)-piperidin-3-il)-1-(3-(trifluormetil)fenil)-1*H*-pirazolo-4-karboksamidui būdingas stipresnis citotoksinis poveikis prieš MCF7 ląstelių liniją.

Literatūros sąrašas

1. YUAN, H., MA, Q., YE, L. and G. PIAO. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*. 2016, 21, 559. DOI:10.3390/molecules21050559.
2. EHMKI, E. S. R. and M. RAREY. Exploring Structure-Activity Relationships with Three-Dimensional Matched Molecular Pairs: A Review. *ChemMedChem*. 2018, 13, 482–489. DOI:10.1002/cmdc.201700628.
3. WU, Z., LI, W., LIU, G. and Y. TANG. Network-Based Methods for Prediction of Drug-Target Interactions. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 1134. DOI:10.3389/fphar.2018.01134.
4. European Pharmacopeia 7th ed., 2010. Strasbourg.
5. YU, L. G., NI, T. F., GAO, W., et al. The synthesis and antibacterial activity of pyrazole-fused tricyclic diterpene derivatives. 2015, 90, 10–20. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.11.015.
6. SZEBENI, G., BALOG, J., DEMJÉN, A., et al. Imidazo[1,2-*b*]pyrazole-7-carboxamides Induce Apoptosis in Human Leukemia Cells at Nanomolar Concentrations. *Molecules*. 2018, 23 (11), 2845. DOI:10.3390/molecules23112845.
7. YANG, Z., LI, P. and X. GAN. Novel Pyrazole-Hydrazone Derivatives Containing an Isoxazole Moiety: Design, Synthesis, and Antiviral Activity. *Molecules*. 2018, 23 (7), 1798. DOI:10.3390/molecules23071798.
8. YANG, W., ZHOU, X. ir Z. WU. Design, Synthesis, Antifungal and Antibacterial Activities of *N*-phenyl and *N*-pyridinyl-5-(trifluoromethyl)-pyrazole-4-carboxamide Derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* 2018, 55, 2261. DOI:10.1002/jhet.3277.
9. TRINDADE, N. R., LOPES, P. R., NAVES, L. M., et al. The Newly Synthesized Pyrazole Derivative 5-(1-(3-Fluorophenyl)-1*H*-Pyrazol-4-yl)-2*H*-Tetrazole Reduces Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats *via* NO/cGMP Pathway. *Front. Physiol.* 2018, 9, 1073. DOI:10.3389/fphys.2018.01073.
10. TU, Y., CHEN, Q., WANG, S., et al. Discovery of lipoic acid-4-phenyl-1*H*-pyrazole hybrids as novel bifunctional ROCK inhibitors with antioxidant activity. *RSC Adv.* 2016, 6, 58516–58520. DOI:10.1039/C6RA12081D.
11. TSYGANKOVA, V. A., SHTOMPEL, O. I., et al. Application of Synthetic Low Molecular Weight Heterocyclic Compounds Derivatives of Pyrimidine, Pyrazole and Oxazole in Agricultural Biotechnology as a New Plant Growth Regulating Substances. *Int J Med Biotechnol Genetics S.* 2017, 2, 10–32. ISSN:2379-1020.
12. CETIN, A. and A. KORKMAZ. Synthesis, optical and morphological properties of novel pyrazole-based oligoamide film. *Optical Materials.* 2018, 85, 79–85. DOI:10.1016/j.optmat.2018.08.045.
13. WANG, Z. Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents, 2010. DOI:10.1002/9780470638859.conrr363.
14. Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba. www.vvkt.lt.
15. LIM, J. A., JUNG, K. Y., PARK, B., et al. Impact of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on cortical excitability and electrophysiological properties of the brain in healthy volunteers: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *PloS one.* 2019, 14 (2), e0212689. DOI:10.1371/journal.pone.0212689.
16. WOYACH, J. A., et al. BTK^{C481S}-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2017, 35 (13), 1437–1443. DOI:10.1200/JCO.2016.70.2282.

17. CHIKKULA, K. V. and R. SUNDARARAJAN. Analgesic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities of novel isoxazole/pyrimidine/pyrazole substituted benzimidazole analogs. *Med Chem Res.* 2017, 26, 3026–3037. DOI:10.1007/s00044-017-2000-0.
18. CHOUGALA, M., SAMUNDEESWARI, S., HOLIYACHI, M., et al. Synthesis, characterization and molecular docking studies of substituted 4-coumarinylpyrano[2,3-*c*]pyrazole derivatives as potent antibacterial and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 125, 101–116. DOI:10.1016/j.ejmech.2016.09.021.
19. YAO, T. T., XIAO, D. X., et al. Design, Synthesis, and Fungicidal Evaluation of Novel Pyrazole-furan and Pyrazole-pyrrole Carboxamide as Succinate Dehydrogenase Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65 (26), 5397–5403. DOI:10.1021/acs.jafc.7b01251.
20. MIRIYALA, S., BESS, E., et al. Effect of pyrazoles on mitochondrial bioenergetics in cardiovascular cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2018, 128, S89. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.207.
21. BOUGLÉ, A., MONTRAVERS, P., et al. Impact of the duration of antibiotics on clinical events in patients with *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: study protocol for a randomized controlled study. *Trials.* 2017, 18, 37–45. DOI:10.1186/s13063-017-1780-3.
22. MANTERO, M., GRAMEGNA, A., et al. Once daily aerosolised tobramycin in adult patients with cystic fibrosis in the management of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection. *Multidisciplinary Respiratory Medicine.* 2017, 12, 25–29. DOI:10.1186/s40248-016-0083-y.
23. NGUYEN, H. K., PHAM, T. H., et al. Role of topological scale in the differential fouling of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacterial cells on wrinkled gold-coated polystyrene surfaces. *Nanoscale.* 2018, 10, 5089–5096. DOI:10.1039/C7NR08178B.
24. DAMBRAUSKIENĖ, A., et al. *Pseudomonas aeruginosa* padermių, sukėlusių bakteriemiją, sąsajos su infekcijos židiniu ir jų atsparumas antibiotikams. *Medicina.* 2009, 45, 1–7.
25. ALLISON, D., DELANCEY, E., et al. Synthesis and antimicrobial studies of novel derivatives of 4-(4-formyl-3-phenyl-1*H*-pyrazol-1-yl)benzoic acid as potent anti-*Acinetobacter baumannii* agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 27, 387–392. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.12.068.
26. MILDAŽIENĖ, V., JARMALAITĖ, S. and R. DAUGELAVIČIUS. *Laštelės biologija*, 2004.
27. SILVA, V. L. M., et al. Current progress on antioxidants incorporating the pyrazole core. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 156, 394–429. DOI:10.1016/j.ejmech.2018.07.007.
28. SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A. and A. ŁASZEWSKA. Effect of refining process on antioxidant capacity, total phenolics and prooxidants contents in rapeseed oils. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2015, 64 (2), 853–859. DOI:10.1016/j.lwt.2015.06.069.
29. HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, E., SALGADO-BARRERA, S., et al. Synthesis and molecular docking of *N*'-arylidene-5-(4-chlorophenyl)-1-(3,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carbohydrazides as novel hypoglycemic and antioxidant dual agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 2298–2306. DOI:10.1016/j.bmc.2016.04.007.
30. YATES, L. R. and P. J. CAMPBELL. Evolution of the cancer genome. *Ant. Rev. Genet.* 2012, 13 (11), 795–806. DOI:10.1038/nrg3317.
31. MENG, C., LU, Z., et al. Effect of celecoxib combined with chemotherapy drug on malignant biological behaviors of gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014, 7 (11), 7622–7632. ISSN:1936-2625.
32. ULRICH, C. M., et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6, 130–140. DOI:10.1038/nrc1801.

33. SHEN, F. Q., WANG, Z. C., et al. Synthesis of novel hybrids of pyrazole and coumarin as dual inhibitors of COX-2 and 5-LOX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 27, 3653–3660. DOI:10.1016/j.bmcl.2017.07.020.
34. Pasaulinis vėžio tyrimų fondas. www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data.
35. GANG, S. S., CASTELLETTO, M. L., et al. Targeted mutagenesis in a human-parasitic nematode. *PLoS pathogens*. 2017, 13 (10), e1006675. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006675.
36. BARTULIENĖ, A., V. JASULAITIENĖ, et al. Metodinė medžiaga, skirta trichineliozės ir kitų helmintozių profilaktikos temai. Vilnius, 2004.
37. LE, T. G., et al. Novel 1-Methyl-1H-pyrazole-5-carboxamide Derivatives with Potent Anthelmintic Activity. *J. Med. Chem.* 2019, 62 (7), 3367–3380. DOI:10.1021/acs.jmedchem.8b01790.
38. MASTEIKIENĖ, R. R.. Maisto produktų mikrobiologija. Kaunas, 2002.
39. FORTERRE, P. To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life. *Stud. Hist. Philos. Sci. C.* 2016, 59, 100–108. DOI:10.1016/j.shpsc.2016.02.013.
40. PAVILONIS, A., et al. Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai. Kaunas, 2003.
41. LIU, G. N., LUO, R. H., et al. Synthesis and Anti-HIV-1 Activity Evaluation for Novel 3a,6a-Dihydro-1H-pyrrolo[3,4-c]pyrazole-4,6-dione Derivatives. *Molecules*. 2016, 21 (9), 1198. DOI:10.3390/molecules21091198.
42. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. www.ulac.lt/lt/ligos/%C5%BD/ziv-zmogaus-imunodeficitovirusas.
43. ZABLOCKIS, R., DANILA, E., VASILIAUSKIENĖ, E., et al. Plaučių tuberkuliozės diagnostikos ir gydymo rekomendacijos. Vilnius, 2018.
44. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. www.ulac.lt/ligos/T/tuberkulioze.
45. DIKTANAS, S. Latentinė tuberkuliozė. *Pulmonologijos naujienos*. 2016, 5, 71–73.
46. NAYAK, N., RAMPRASAD, J. and U. DALIMBA. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New 8-Trifluoromethylquinoline Containing Pyrazole-3-carboxamide Derivatives. *J. Heterocyclic Chem.* 2017, 54, 171. DOI:10.1002/jhet.2564.
47. TANG, J., WANG, B., WU, T., et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Pyrazolo[1,5-a]pyridine-3-carboxamides as Novel Antitubercular Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* 2015, 6, 814–818. DOI:10.1021/acsmedchemlett.5b00176.
48. ROGOZIŃSKA, M. and J. MLYNARSKI. Asymmetric synthesis of warfarin and its analogues on water. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2014, 25, 813–820. DOI:10.1016/j.tetasy.2014.04.008.
49. LIU, D., XU, D., et al. Small Molecules Engage Hot Spots through Cooperative Binding To Inhibit a Tight Protein-Protein Interaction. *Biochemistry*. 2017, 56, 1768–1784. DOI:10.1021/acs.biochem.6b01039.
50. DINIZ, L. F., CARVALHO, P. S., et al. Reducing the Hygroscopicity of the Anti-Tuberculosis Drug (S,S)-Ethambutol Using Multicomponent Crystal Forms. *Cryst. Growth Des.* 2017, 17 (5), 2622–2630. DOI:10.1021/acs.cgd.7b00144.
51. SZEBENI, G. J., BALOG, J. A., et al. Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides Induce Apoptosis in Human Leukemia Cells at Nanomolar Concentrations. *Molecules*. 2018, 23, 2845. DOI:10.3390/molecules23112845.

52. WANG, F., LI, J., et al. Virtual Screening Targeting the Urokinase Receptor, Biochemical and Cell-Based Studies, Synthesis, Pharmacokinetic Characterization, and Effect on Breast Tumor Metastasis. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 7193–7205. DOI:10.1021/jm200782y.
53. EIGNEROVA, B., TICHY, M., et al. Synthesis and antiproliferative properties of new hydrophilic esters of triterpenic acids. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 140, 403–420. DOI:10.1016/j.ejmech.2017.09.041.