



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezės  
ir savybių tyrimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Paulina Voznikaitė**

Projekto autorė

**Dr. Greta Ragaitė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezės ir savybių tyrimas**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Paulina Voznikaitė**

Projekto autorė

**Dr. Greta Ragaitė**

Vadovė

**Doc. dr. Joana Solovjova**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Paulina Voznikaitė

## **Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezės ir savybių tyrimas**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Paulinos Voznikaitės, baigiamasis projektas tema „Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezės 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.

Paulina Voznikaitė

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Voznikaitė, Paulina. Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezės ir savybių tyrimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė dr. Greta Ragaitė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: pirazolas, piperidinas, specifinis optinis sukimo kampas, antioksidacinis aktyvumas, antibakterinis aktyvumas.

Kaunas, 2020. 65 p.

### **Santrauka**

Aminorūgščių dariniai pasižymi plačiomis biologinių savybių galimybėmis – dėl stipraus antioksidacinio, antibakterinio bei antivirusinio poveikio junginiai dažnai naudojami farmacijos pramonėje, įeina į daugelio vaistų sudėtį. Atlikti moksliniai tyrimai patvirtina, kad į struktūrą įterpus pirazolo žiedą, gautų medžiagų biologinis poveikis sustiprėja. Svarbias junginių savybes nulemia tiksli aminorūgščių seka grandinėje ir junginių konfigūracija, o į struktūrą įterpus halogenų pakaitus, sustiprėja jų aktyvi priešvėžinė veikla.

Vis didėjant naujų ir sudėtingesnių aminorūgščių darinių struktūrų paklausai, svarbus tikslas tampa sukurti efektyvias cheminės sintezės strategijas naudojant universalius ir ekonomiškus reagentus. Dėl šios priežasties, siekiant išskirti biologiškai aktyvias medžiagas bei optimizuoti junginių, turinčių amidinį ryšį, sintezę, šiame darbe susintetinti nauji aminorūgščių dariniai, turintys pirazolo žiedą. Gautų enantiomeriškai grynų junginių struktūros patvirtintos  $^1\text{H}$  BMR,  $^{13}\text{C}$  BMR, IR bei masių spektroskopiniais analizės metodais, chiraliskumui patvirtinti atliktas optinių savybių tyrimas.

Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakulteto biotechnologijos laboratorijoje tirtas susintetintų junginių biologinis aktyvumas. Nustatyta, kad 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatai pasižymi antioksidacinėmis, redukcinėmis ir antibakterinėmis savybėmis.

Voznikaite, Paulina. Investigation of the Synthesis and Properties of New Amino Acid Derivatives With a Pyrazole Ring. Master's Final Degree Project / supervisor dr. Greta Ragaitė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: pyrazole, piperidine, the specific optical rotation angle, antioxidant activity, antibacterial activity.

Kaunas, 2020. 65 p.

### Summary

Amino acid derivatives exhibit a wide range of biological properties. Due to their strong antioxidant, antibacterial and antiviral activity, the compounds have been widely used as drugs. Previous studies have shown that compounds of amino acids containing a pyrazole pharmacophore demonstrated enhanced results of biological effects. The important properties of the derivatives are determined by the exact amino acid sequence in the chain and the configuration of the compounds. The incorporation of halogens into the structure has been found to enhance the anticancer activity of the compounds.

The growing need for new and more complex amino acid derivatives required manufacturing compounds by efficient synthetic strategies. Therefore, the search for new more versatile and low-cost reagents becomes a great challenge. For this reason, in this work a novel amino acid derivatives, containing a pyrazole ring, have been synthesized. The synthesis of amide bond formation was optimized and the structures of the products were confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, IR and Mass spectrometry analysis methods. Test of the specific optical rotation angle was performed to confirm the chirality.

The biological properties of novel compounds were investigated in biotechnology laboratory at KTU Faculty of Chemical Technology. *1H*-pyrazol-5-yl-piperidine-1-carboxylates exhibited radical's scavenging, antioxidant, reductive and antibacterial properties.

## Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas .....	7
Įvadas.....	9
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>10</b>
1.1. Peptidų cheminė sintezė .....	10
1.2. Peptidų biologinės savybės.....	18
1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	23
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....</b>	<b>24</b>
2.1. Naudota aparatūra ir tyrimų metodai.....	24
2.2. Naujų junginių sintezės metodika .....	24
2.2.1. Bendras pirazolo junginių sintezės aprašymas .....	24
2.2.2. Bendras karboksirūgščių sintezės aprašymas .....	29
2.2.3. Bendras peptidų sintezės aprašymas .....	32
2.3. Biologinių savybių tyrimai .....	36
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>40</b>
3.1. Aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo fragmentą, sintezė .....	40
3.1.1. Pradinių junginių sintezė .....	40
3.1.2. Pirazolo junginių sintezė .....	41
3.1.3. Piperidin-2-il-1 <i>H</i> -pirazol-4-karboksirūgščių sintezė.....	43
3.1.4. Karboksilatų, turinčių amidinę grupę, sintezė .....	44
3.2. Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, biologinių savybių tyrimų rezultatai	49
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>57</b>
4.1. Tret-butyl-(2 <i>S</i> )-2-[1-(4-chorfenil)-4-{(2 <i>R</i> )-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato ( <b>8b</b> ) gamybos aparatūra ir žaliavos .....	57
4.2. Gamybiniai ir kokybiniai rodikliai .....	58
4.3. Siūloma tret-butyl-(2 <i>S</i> )-2-[1-(4-chorfenil)-4-{(2 <i>R</i> )-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato ( <b>8b</b> ) periodinės gamybos schema .....	59
<b>Išvados .....</b>	<b>62</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>63</b>

## Santrumpų ir terminų sąrašas

$^{13}\text{C}$  BMR anglies –  $^{13}\text{C}$  izotopo branduolių magnetinis rezonansas

$^1\text{H}$  BMR – protonų branduolių magnetinis rezonansas

ABTS – 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgštis)

Al – alifatika

Ar – aromatika

$\text{CDCl}_3$  – deuteriuotas chloroformas

$\text{cm}^{-1}$  – atvirkštiniai centimetrai

DCM – dichlormetanas

DIPEA – diizopropiletilaminas

DMAP – 4-dimetilaminopiridinas

DMSO – dimetilsulfoksidas

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidis

FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia

IR – infraraudonoji spektroskopija

$J$  – protonų tarpsukininės sąveikos konstanta

m – multipletas

m.d. – milijoninės dalys

Me – metilas

MHz – megahercas

mmol – milimolis

MS – masių spektroskopija

$m/z$  – masės ir krūvio santykis

pH – vandenilio jonų ( $\text{H}^+$ ) koncentracijos tirpale matas

PKB – baltymo kinazė B

s – singletas

TFA – trifluoroacto rūgštis

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas

UV – ultravioletinė spinduliuotė

$[\alpha]_D^{11}$  – specifinis optinio sukimo kampas

$\nu$  – bangos skaičius atvirkštiniais centimetrais ( $\text{cm}^{-1}$ )

$\delta$  – cheminis poslinkis milijoninėmis dalimis



## Įvadas

Naujų vaistų poreikis įvairių ligų gydymui yra didžiulis. Iki šių dienų iš bakterijų ir grybų išskiriama daugybė peptidų, kurie pritaikomi farmacinių produktų gamyboje [1]. Peptidai atlieka svarbią funkciją hormonų ir fermentų pernešimo procesuose, dalyvauja daugelyje organizme vykstančių biocheminių reakcijų [2]. Vis didėjant naujų ir sudėtingesnių peptidų struktūrų paklausai bei siekiant sumažinti gamybos išlaidas ir padidinti biologiškai aktyvių junginių išeią, pagrindinis šių dienų tikslas tampa sukurti efektyvias cheminės sintezės strategijas naudojant universalius ir ekonomiškus reagentus [3]. Dėl šios priežasties skiriamas didelis dėmesys aktyvatorių, dalyvaujančių peptidinio ryšio susidaryme, paieškoms – literatūrinėje dalyje apžvelgiami klasikiniai, plačiai naudojami ir neseniai atrasti jungiamieji reagentai bei jų veikimo mechanizmai.

Ankstesni atlikti tyrimai patvirtina, kad peptidai, turintys pirazolo žiedą, pasižymi plačiu biologinių savybių spektru – demonstruoja stiprias antioksidacines, antibakterines, antivirusines, priešvėžines savybes. Stiprų peptidų aktyvumą lemia aminorūgščių seka grandinėje [4] ir junginių konfigūracija, o į struktūrą įterpus halogenų pakaitus, sustiprėja jų aktyvi priešvėžinė veikla [19].

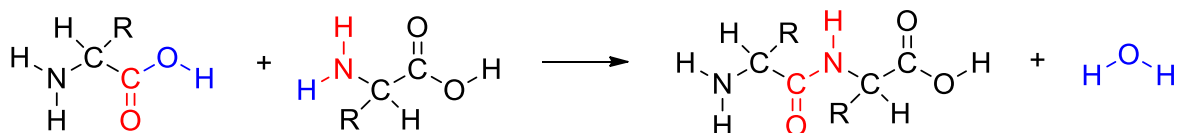
**Darbo tikslas** – susintetinti naujus aminorūgščių darinius, turinčius pirazolo žiedą. Ištirti naujų junginių biologines savybes bei suprojektuoti geriausiomis savybėmis pasižymėjusio junginio gamybos technologinę schemą.

### **Darbo tikslui pasiekti suformuluoti šie uždaviniai:**

1. Išanalizuoti literatūroje aprašytų aminorūgščių darinių ir peptidų, turinčių pirazolo žiedą, savybes bei gavimo būdus.
2. Susintetinti naujus aminorūgščių darinius, turinčius pirazolo žiedą.
3. Atlikti peptidinio ryšio formavimo reakcijų optimizavimą ir susintetinti naujus sintetinius peptidus.
4. Įvertinti 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatų antioksidacines savybes ir redukcinį potencialą.
5. Ištirti 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatų antibakterinį poveikį prieš *R. radiobacter*, *X. Campestris* ir *B. subtilis* bakterijas.
6. Suprojektuoti geriausiomis savybėmis pasižymėjusio junginio gamybos technologinę schemą, kurios našumas būtų 2500 kg/metus.

## 1. Literatūros apžvalga

Aminorūgštys – tai peptidus ir baltymus sudarančios molekulės, turinčios amino (NH<sub>2</sub>) ir karboksirūgšties (COOH) grupę, prijungtą prie centrinio anglies atomo. Šių biologiškai aktyvių junginių molekulinė masė yra 100 – 200 Da. Pagrindinis aminorūgščių biologinis išskirtinumas – jų amfoteriškumas – gebėjimas vienu metu demonstruoti ir rūgštines ir aminams būdingas savybes, kurioms reaguojant tarpusavyje, sudaromas peptidinis ryšys (1.1 pav.). Gauti junginiai, kuriuos sudaro 2 – 100 aminorūgščių arba jų masė neviršija 5000 Da, vadinami peptidais [5].



1.1 pav. Peptidinio ryšio susidarymas

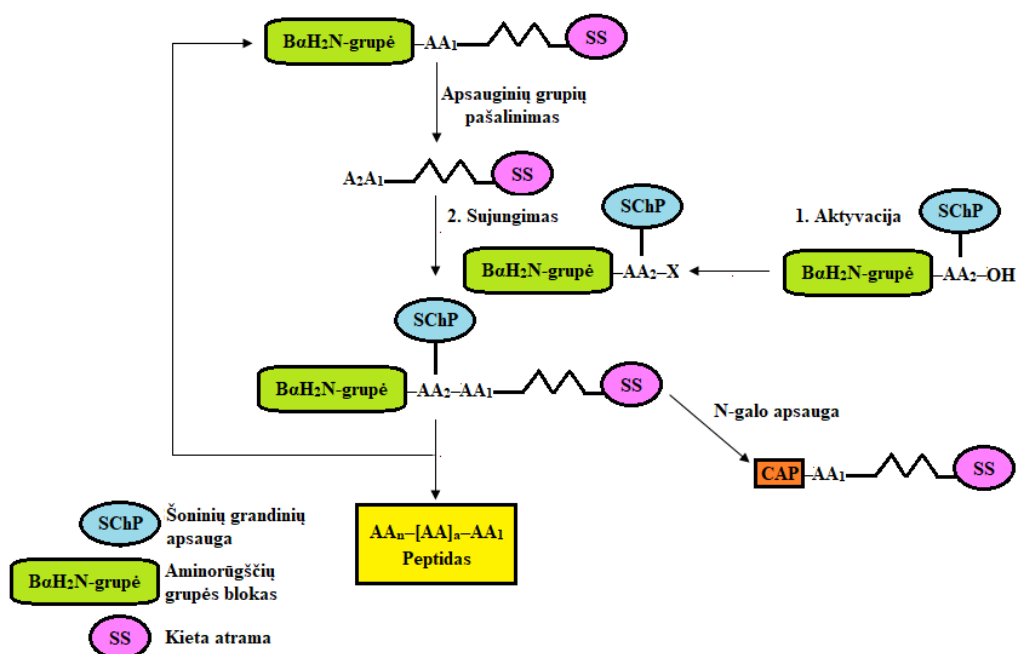
### 1.1. Peptidų cheminė sintezė

Peptidai gaunami taikant genų inžinerijos arba cheminės sintezės metodus. Cheminė sintezė yra pranašesnis būdas, kurio metu gaunami peptidai, sunkiai išskiriami iš mikroorganizmų ar sudaryti iš sintetinių aminorūgščių. Tokiu būdu gautiems produktams nesudėtingai patvirtinama kovalentinė junginio struktūra, jiems nesunku atlikti trimatės struktūros nustatymus taikant branduolių magnetinio rezonanso, kristalografijos metodus. Sintezės būdu gauti peptidai, kurių aktyvumas, selektyvumas ir biostabilumas yra aukštesnis už natūraliai iš mikroorganizmų išskirtų junginių, gali būti nesunkiai pritaikomi industrinėje gamyboje gaminant pramoninius šių biologiškai aktyvių junginių kiekius [3].

Cheminė peptidų sintezė skirstoma į dvi pagrindines grupes:

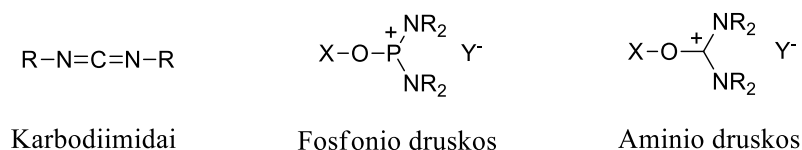
- Kietos fazės peptidų sintezė
- Skystos fazės peptidų sintezė

Kietos fazės peptidų sintezė – metodas, kurio metu aminorūgščių dariniai kovalentiniais ryšiais sujungiami su kieta atramine medžiaga ir sintetinami reakcijos inde, naudojant selektyvias apsaugines grupes. Pagrindinis šio metodo pranašumas – efektyvus sintezės greitis ir, lyginant su skystos fazės peptidų sinteze, lengvas gryninimo procesas. Sintezės metu naudojami funkcines grupes turintys statybiniai blokai, apsaugantys nuo šalutinių produktų susidarymo. Susidarius tiksliniam peptidui, produktas filtruojamas ir cheminiu būdu atskiriamas nuo kietos atraminės medžiagos (1.2 pav.). Nors kietos fazės peptidų sintezė pasižymi ženkliai didesniu greičiu, tačiau atliekant mokslinius tyrimus pastebėta, kad jungiant struktūriškai sudėtingas aminorūgštis ar polipeptidus, gaunama klaidinga junginių seka. Dėl šios priežasties praktikoje iki šiol dažnai taikoma skystos fazės peptidų sintezė, kuri pasižymi plačiomis tirpiklių, apsauginių grupių ir surišimo metodų galimybėmis [6,7].



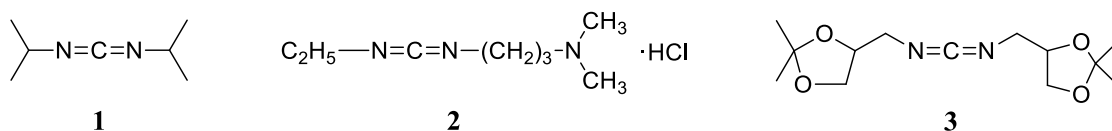
1.2 pav. Kietos fazės peptidų sintezės metodo veikimo mechanizmas

Skystos fazės peptidų sintezėje ypatingai svarbu tinkamai parinkti apsaugines grupes ir jungiamuosius reagentus. Peptidinės jungties formavimas susideda iš dviejų pakopų: aminorūgšties karboksilo grupės aktyvavimo ir nukleofilinio aminorūgšties aminogrupės susijungimo su aktyvuota karboksilo grupe atsipalaiduojant  $H_2O$  molekuli. Karboksilo grupės aktyvacija vyksta labai lėtai, todėl jai pagreitinti naudojami jungiamieji reagentai, dar vadinami aktyvatoriais. Šie junginiai slopina racemizaciją ir padeda išvengti galutinio peptido epimerizacijos. Plačiausiai pramonėje naudojami jungiamieji reagentai yra karbodiimidai, fosfonio ir aminio druskos (1.3 pav.). Jų taikymas priklauso nuo reakcijoje dalyvaujančių aminorūgščių struktūros – aktyvatorių įvairovė lemia skirtingą efektyvumą tam tikroms jungtims [3]. Siekiant išvengti nepageidaujamų šalutinių reakcijų, tokių kaip polimerizacija ar savaiminis aktyvuotos aminorūgšties jungimasis, peptidų sintezėje būtina naudoti *N*-galines ir šonines grandines apsaugančias grupes. Dažniausiai pramonėje naudojamos tert-butiloksikarbonilo (Boc) ir fluorenilmetiloksikarbonilo (Fmoc) apsauginės grupės [5].



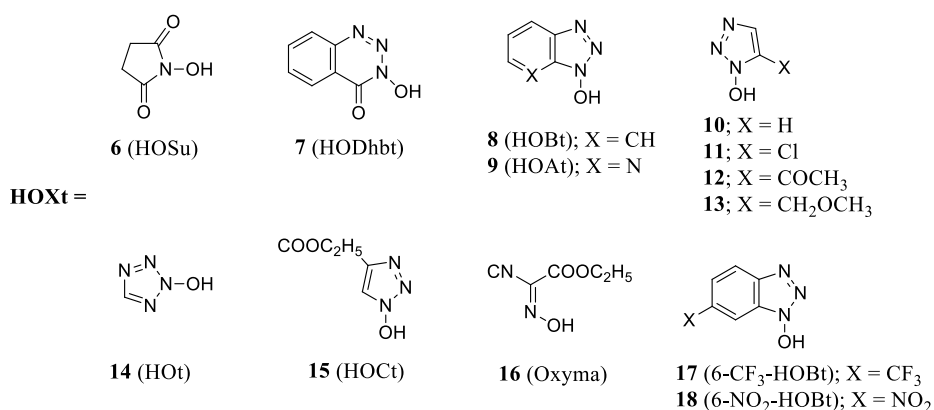
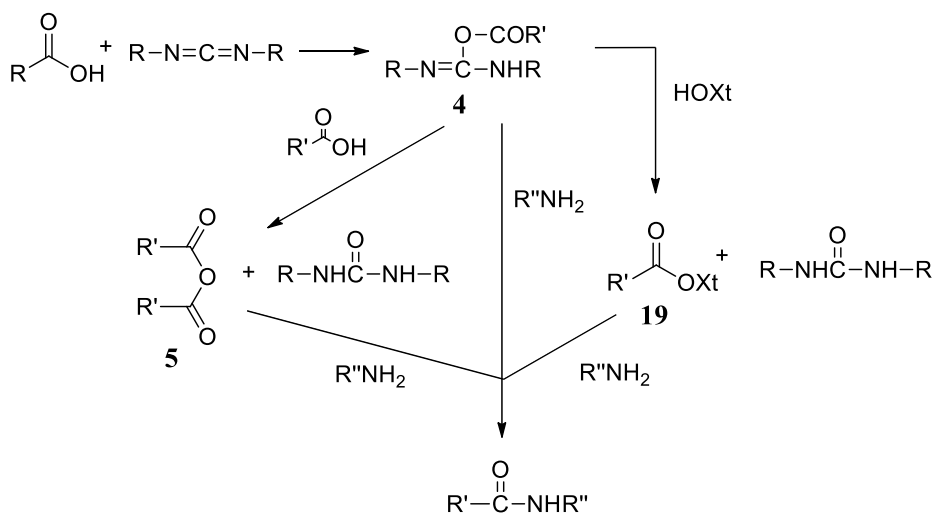
1.3 pav. Peptidų sintezėje taikomi jungiamieji reagentai

Siekiant išsiaiškinti skirtingų jungiamųjų reagentų įtaką peptidinio ryšio susidarymui, Tarfah I. Al-Warhi kartu su mokslininkų grupe [3] atliko tyrimą, kurio metu įvertintas plačiai naudojamų aktyvatorių efektyvumas amidinių ir esterinių jungčių susidarymui. Tyrimo metu vykdyta aminorūgšties karboksigrupės aktyvacija naudojant įvairius karbodiimidinius jungiamuosius reagentus bei *N*-hidroksi priedus (1.1 schema). Plačiausiai naudojamiems karbodiimidams priskiriami DIC (1), EDC·HCL (2) bei BDDC (3) dariniai (1.4 pav.). Jų pritaikomumas priklauso nuo terpės, kurioje vykdoma sintezė [3].



#### 1.4 pav. Peptidų sintezėje naudojami karbodiimido dariniai

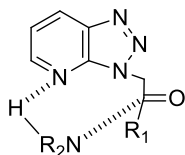
Karboksilo grupė, kartu su karbodiimidu, *in situ* reakcijos metu suformuoja nestabilų O-acilokarbamidą **4**, kuris reaguodamas su aminogrupe, sudaro atitinkamą amidą (1.1 schema). Aktyvacijos procesui pagerinti naudoti įvairūs hidroksilamino priedai **6–18**, padedantys suformuoti aktyvųjį esterį **19**. Naudojant *N*-hidroksi junginius, suformuojamas papildomas vandenilio ryšys, padidinantis amidinės jungties efektyvumą. Tyrimo metu siekta išsiaiškinti, kokie hidroksilamino dariniai pasižymi didesniu efektyvumu susidarant peptidiniam ryšiui. Naudojant įvairius aktyvatorius nustatyta, kad hidroksilamino junginiai, kurių struktūroje yra aromatinis heterociklinis žiedas, pasižymi stipriomis indukcinėmis savybėmis, kurių metu atitraukiant elektronus nuo esterio grupėje esančio anglies atomo, padidinamas žiedo reaktyvumas nukleofilų atžvilgiu. Pastebėta, kad prieduose didinant heteroatomų skaičių, šios savybės gerėja [3].



#### 1.1 schema

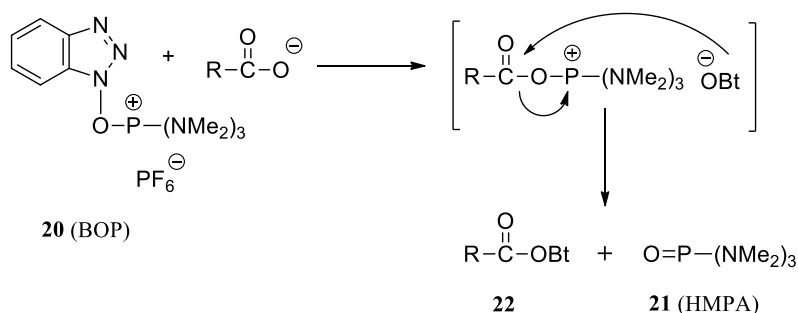
Efektyviausias savybes formuojant peptidinį ryšį parodė aktyvatorius HOAt (**9**), kuris struktūriškai panašus į HOBt (**8**) ir jo darinius (junginiai **17** ir **18**), tačiau dėl benzeno žiede įterpto azoto atomo, pademonstravo didesnę jungimosi greitį ir mažesnę racemizacijos riziką. Azoto įsiterpimas benzeno

žiede sukelia išeinančios grupės stabilizaciją, taip padidindamas reaktyvumą. Be to, toks 7 padėties pakeitimas heteroatomu iššaukia kaimyninės grupės efektą, kuris maksimaliai sumažina konfigūracijos praradimo galimybę (1.5 pav.) [3].



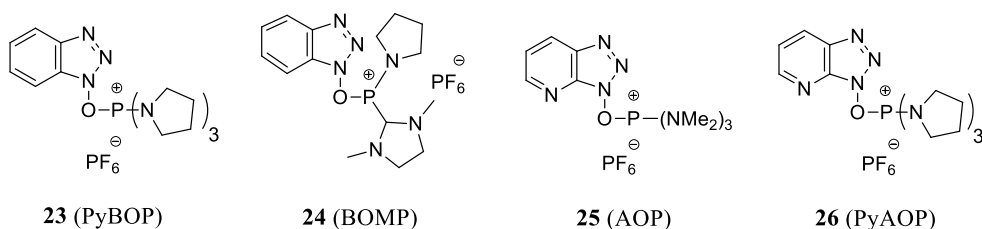
1.5 pav. HOAt sukiamas kaimyninės grupės efektas

Siekiant pagreitinti ir supaprastinti peptidų sintezę pradėti naudoti aktyvatoriai, struktūroje turintys fosfonio katijoną. Pastebėjus, kad šie jungiamieji reagentai skatina spartesnę peptidų jungimąsi nei karbodiimidai, jie greitai pritaikyti pramonėje. Tačiau, ištyrus, kad ilgą laiką plačiai naudotas BOP (20) reakcijų metu išskiria kenksmingą šalutinį produktą HMPA (21), pasižymintį kancerogeninėmis savybėmis, mokslininkai iki šiol ieško efektyvių ir saugių fosfonio darinių (1.2 schema) [8].



1.2 schema

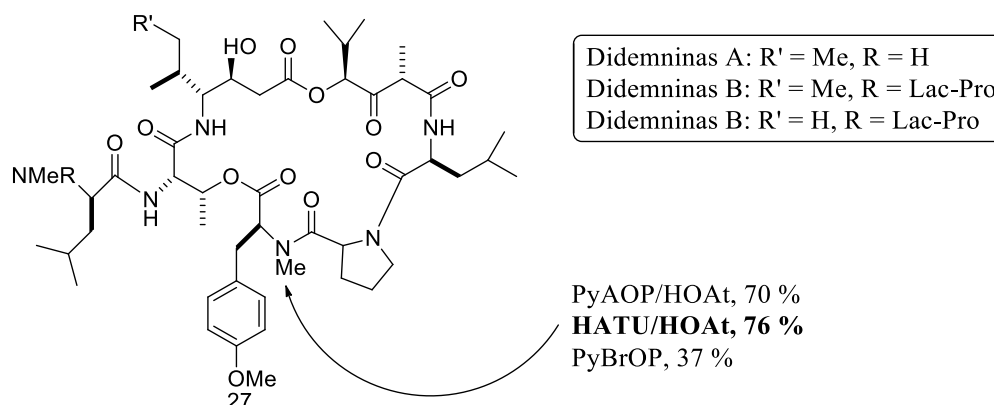
Tyrimo metu atlikta *H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Lys(Z)-Asp(OBn)-Val-Tyr-OH* ciklizacijos reakcija, siekiant palyginti įvairių fosfonio darinių veiksmingumą tomis pačiomis sąlygomis (1 ekv. jungiamojo reagento esant 2 ekv. tretinės bazės) (1.6 pav.). Eksperimento metu ciklizacijos išėiga nustatyta pagal koncentracijų santykį tarp ciklopeptido ir atitinkamo linijinio peptido. Įvertinta, kad didžiausia išėiga pasižymėjo peptidas, kurio sintezėje naudotas PyAOP (26) jungiamasis reagentas – po 1 val. išėiga siekė 56 %. Tuo tarpu naudojant BOP (20) susintetinta tik 38 % tikslinio produkto, iš kurio 20,2 % epimerizavosi šalutinių reakcijų metu [3].



1.6 pav. Tyrime naudoti fosfonio druskų jungiamieji reagentai

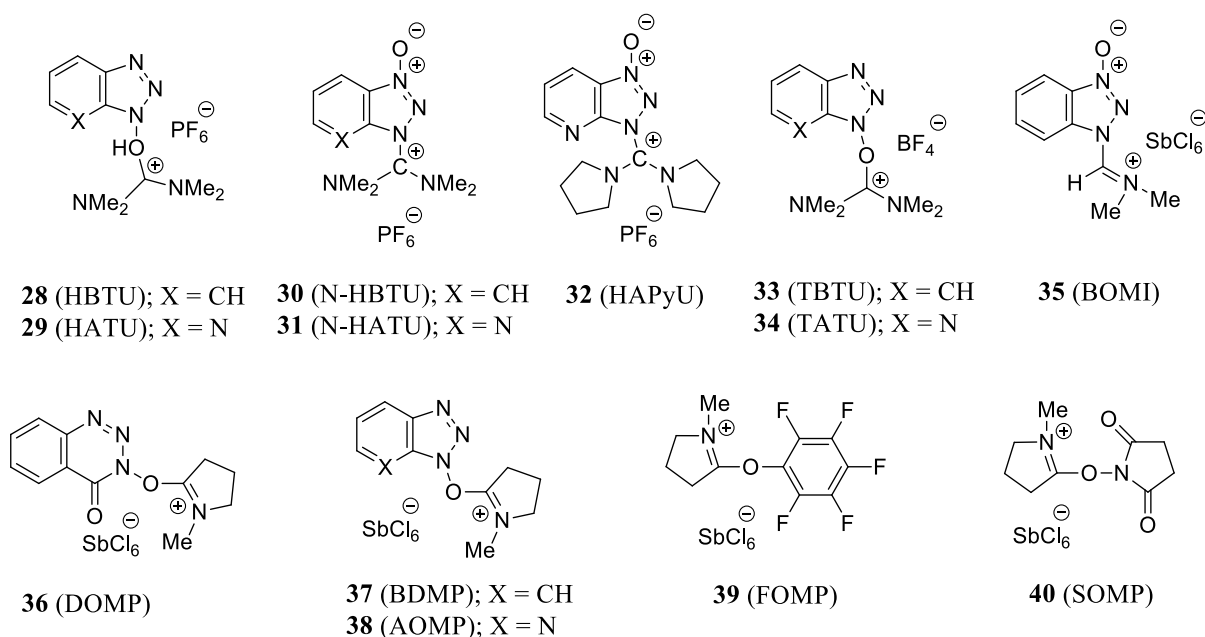
Taikant skystos fazės sintezę, tomis pačiomis sąlygomis sintetinti biologiškai aktyvūs, priešvėžinėmis savybėmis pasižymintys didemninai (27), natūraliai išskiriami iš jūrose gyvenančių bestuburių gyvūnų (1.7 pav.). Gauti rezultatai dar kartą patvirtino, kad geriausiomis savybėmis sudarant

peptidinį ryšį pasižymi PyAOP aktyvatorius **26** – gauto peptido išeiga po 1 val. siekė 70 %. Biologiškai aktyvių junginių sintezei naudotas hidroksilamino HOAt (**9**) priedas. Atliktas tyrimas įrodė, kad fosfonio junginiai, struktūriškai panašūs į HOAt ir benzeno žiedo 7-oje padėtyje turintys heteroatomą, pasižymi didžiausiu aktyvumu formuojant esterines ir amidines jungtis [3].



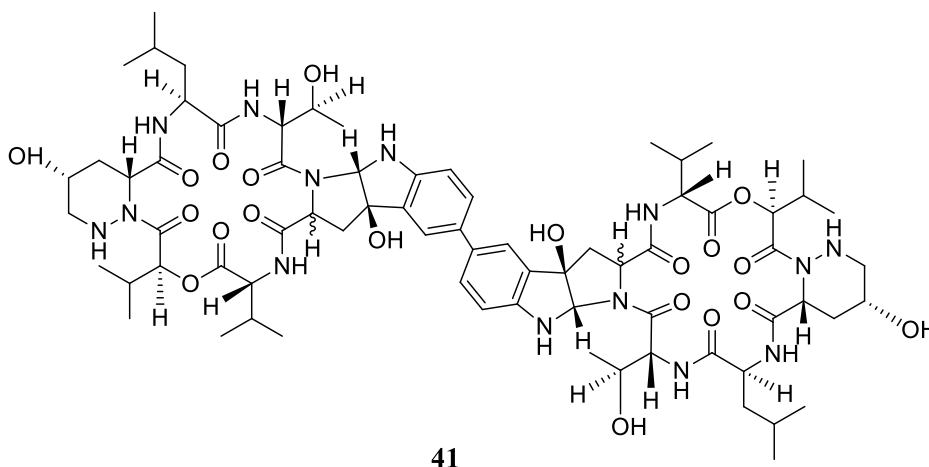
**1.7 pav.** Priešvėžinėmis savybėmis pasižymintys didemninai

Ieškant jungiamųjų reagentų, kurie pasižymėtų didesniu reaktyvumu sudarant aktyviuosius esterius, siekta sujungti karbodiimidų jungiamųjų reagentų ir racemizaciją slopinančių junginių savybes į vieną molekulę [9]. HOBt ir HOAt jungiamųjų reagentų pagrindu sukurti aminio druskų aktyvatoriai **28–40**, kurių efektyvumas palygintas peptidų sintezės metu (1.8 pav.). Tyrimo metu sintetintos *Ala-Ala-MeAla-Ala-Ala*, (3 + 3), *Z-Gly-Gly-Val-OH* + *Ala-Gly-GlyPAL-PS* ir *Z-Phe-Val-OH* + *Pro-PAL-PS* (2+1) sekos. Gauti rezultatai parodė, kad akivaizdų pranašumą polipeptidų susidaryme pademonstravo HOAt kilmės jungiamieji reagentai HAPyU (**32**) ir HATU (**29**), lyginant su HBTU (**28**), TBTU (**33**) ir kitais, HOBt struktūrai giminiškais junginiais. Didelį reaktyvumą ir sintezės greitį bei mažą racemizacijos laipsnį nulėmė HATU ir HAPyU piridino struktūrose esantis azoto atomas, kuris sukeldamas kaimyninės grupės efektą prisideda prie molekulės stabilizacijos [3].



**1.8 pav.** Tyrime naudoti aminio druskų jungiamieji reagentai

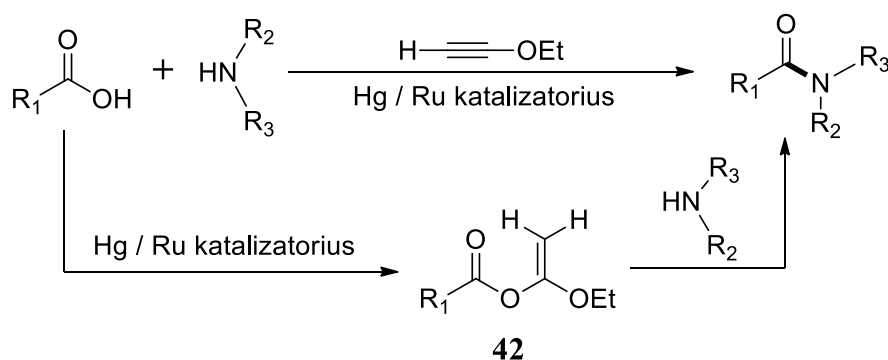
Iki šių dienų aminorūgščių druskos efektyviai naudojamos makrociklinimo reakcijose, jungiant sudėtingas molekules. Naudojant HATU jungiamąjį reagentą sintetinamas priešvėžiniam gydymui skirtas antibiotikas himastatinas (**41**), natūraliai randamas *Streptomyces hygroscopicus* bakterijose (1.9 pav.) [10].



**1.9 pav.** Farmacijoje naudojamas antibiotikas – himastatinas

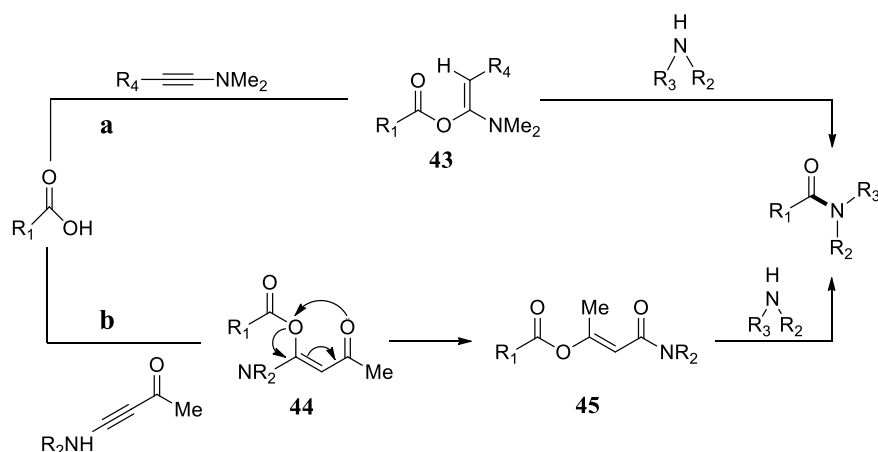
Šiais laikais peptidai tampa vis svarbesni siekiant išrasti veiksmingus vaistus ar diagnozuoti ligas, tačiau jų kaina, palyginti su pigiomis aminorūgščių pradinėmis medžiagomis, yra labai didelė. Šiuo tikslu mokslininkai kuria naujas sintezės strategijas, kurios leistų peptidus gaminti už priimtina kaina [11].

Neseniai mokslininkai aminorūgščių aktyvacijai panaudojo etoksiaceteną, kurios metu susidaro aktyvūs 1-etoksivinilo esteriai **42**, galintys suformuoti amidus ar peptidus. Reakcijos metu išskiriamas vienintelis šalutinis produktas – etilo acetatas (1.3 schema). Deja, bet ši sintezės strategija nepasiteisino, nes peptidinio ryšio formavimas vyko labai lėtai, o kambario temperatūroje nestabilus etoksiacetenas apsunkino reakcijos eigą [12].



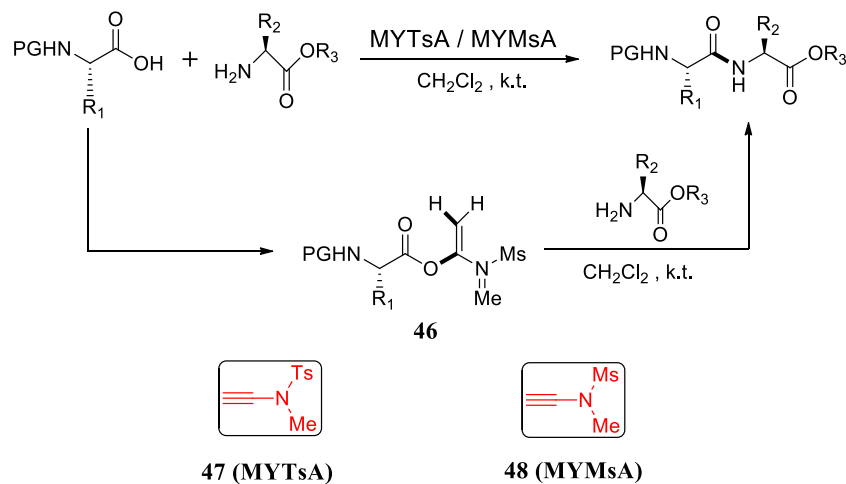
**1.3 schema**

Įkvėpti šio eksperimento, tyrėjai sukūrė struktūriškai panašų, azoto atomą turintį jungiamąjį reagentą inaminą, kurio pagalba suformuojamas aktyvusis esteris **43** (1.4 schema, a). Pastebėjus, kad dipeptidai ir tripeptidai linkę į stiprią racemizaciją, į molekulę įterpta elektronų atitraukianti EWG grupė, veikianti „push – pull“ principu (1.4 schema, b). Nors racemizacijos problema įvedus funkcinę grupę buvo išspręsta, tačiau dėl per mažo šiluminio stabilumo, aktyvatoriaus naudojimas sunkiai pritaikomas cheminėje sintezėje [13].



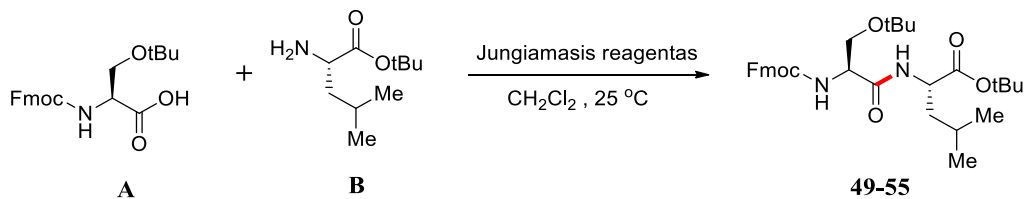
1.4 schema

Mokslinė grupė, vadovaujama Long Hu ir Junfeng Zhao iš Kinijos provincijos [15] nusprendė pasinaudoti atliktų tyrimų rezultatais ir peptidų sintezėje pirmą kartą panaudojo inamidą su įterpta EWG grupe. Ištirta, kad šie junginiai turi daug pranašumų, lyginant su inaminais – pasižymi terminiu stabilumu, nėra jautrūs drėgmei ar orui, lengvai pritaikomi ir panaudojami. Taip pat, dėl indukcinį efektą sukeliančios EWG grupės, aktyvatoriai beveik neutralūs. Reakcijos metu suformuojamas aktyvusis esteris  $\alpha$ -eciloksigenamidas **46**, su aminais sudarantis amidus (1.5 schema). Šiuo pagrindu sukurti du veiksmingi jungiamieji reagentai MYTsA (**47**) ir MYMsA (**48**), švelniomis reakcijos sąlygomis formuojantys peptidines jungtis [11].



1.5 schema

Efektyvumui nustatyti atliktas eksperimentas, kurio metu peptidų sintezei panaudoti įvairūs jungiamieji reagentai (1.6 schema). Rezultatai parodė, kad peptidai, gauti naudojant inamidinius junginius MYTsA ir MYMsA, išlaikė optinį aktyvumą ir pasižymėjo ypač aukšta išeiga – 94 % ir 99 % atitinkamai (1.1 lentelė) [11].



1.6 schema

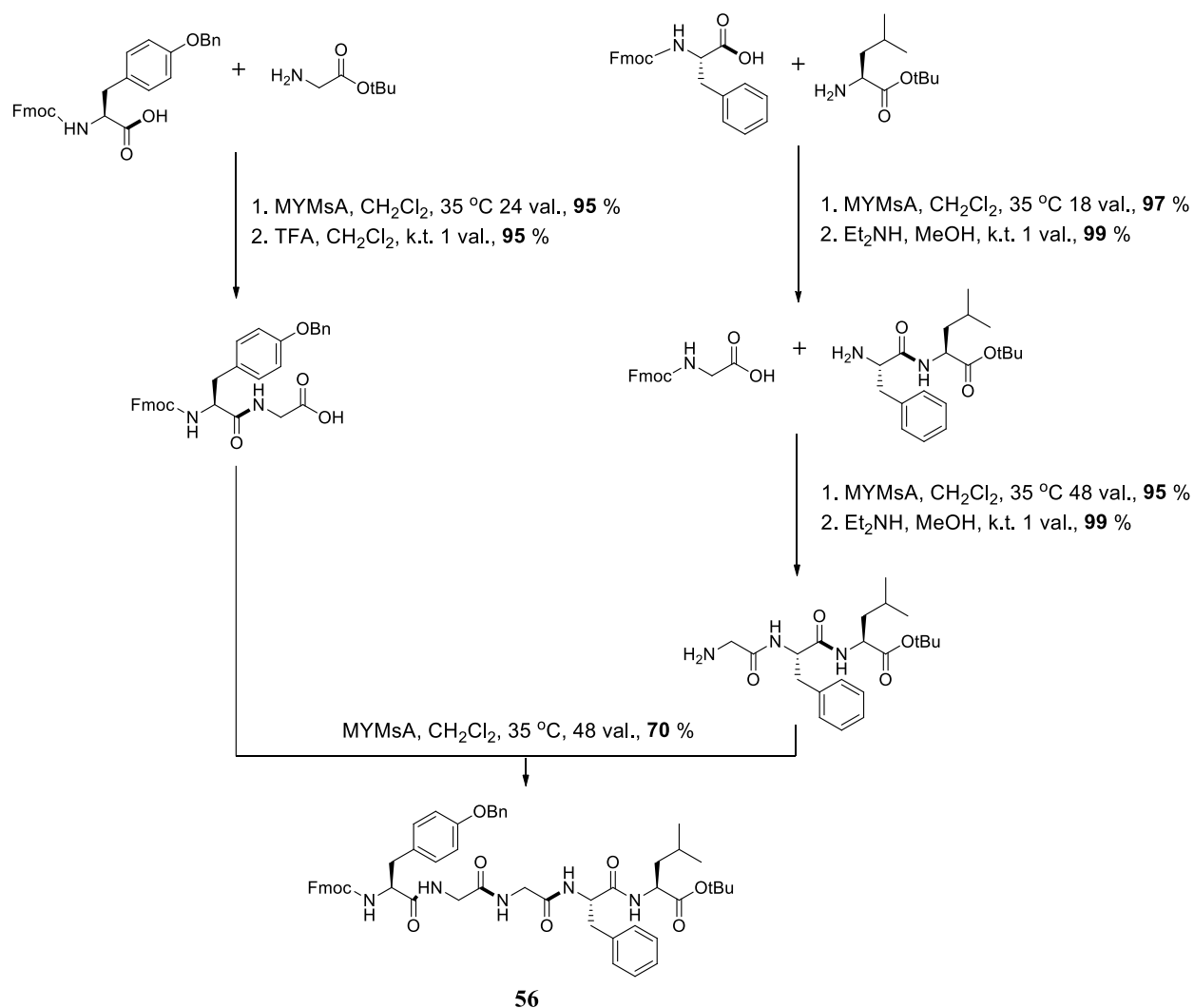


1.1 lentelė. Įvairių jungiamųjų reagentų įtaka peptidinio ryšio susidarymui

Bandymo nr.	Jungiamasis reagentas	Priedas	Laikas	Išeiga, %	HPLC
49	HBTU	DIPEA	10 min.	90	82:18
50	HATU	DIPEA	10 min.	70	87:13
51	PyBOP	DIPEA	10 min.	91	88:12
52	DCC	-	10 min.	98	91:9
53	DEPBT	DIPEA	20 min.	61	99:1
54	MYMsA	-	22 val.	99	100:0
55	MYTsA	-	22 val.	94	100:0

Reakcijos sąlygos: **A** (0,2 mmol), **B** (0,22 mmol), jungiamasis reagentas (0,22 mmol), DIPEA (0,4 mmol).

Pastebėjus, kad jungiamasis reagentas MYMsA (**48**) pasižymėjo geriausiomis savybėmis bei didžiausia išeiga (99 %), nuspręsta naudojant šį aktyvatorių atlikti pentapeptido Leu–enkefalino sintezę (**56**) (1.7 schema) [11]. Biologiškai aktyvus junginys natūraliai randamas gyvūnų bei žmonių smegenyse. Leu–enkefalinas sukelia neigiamas emocijas bei pasižymi analgetinėmis savybėmis [14].



1.7 schema

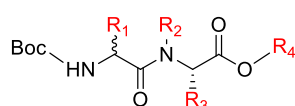
Atlikus septynių pakopų sintezę, gauto produkto išeiga siekė 58 %, racemizacijos požymių nenustatyta. Tai parodė, kad inamidai gali būti sėkmingai pritaikomi ne tik dipeptidų ar tripeptidų sintezei, bet ir ilgesnių peptidų fragmentų kondensacijai, išlaikant optinį aktyvumą [11].

## 1.2. Peptidų biologinės savybės

Svarbiausias biologines peptidų savybes nulemia tiksli aminorūgščių seka grandinėje. Peptidai, turintys tam tikras šonines funkcines grupes ar heteroatomus grandinėje, dalyvauja joms būdingose cheminėse reakcijose ir lemia platų peptidų biologinių ir cheminių savybių spektrą – demonstruoja antioksidacines, antibakterines, priešvirusines ir priešvėžines savybes [5].

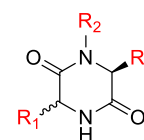
Maliarija – plačiai subtropiniuose regionuose paplitusi virusinė liga, kurią sukelia *Plasmodium* šeimai priklausantys pirmuonys parazitai: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* ir *P. knowlesi* [15]. Siekiant sustabdyti šios, šimtus tūkstančių gyvybių kasmet nusinešančios, ligos plitimą, vienas iš svarbiausių tikslų išlieka efektyvios vakcinos sukūrimas. Lemuel Pérez – Picaso mokslinė grupė [16] nusprendė atlikti tyrimą, kurio metu tirtas ciklinių ir linijinių dipeptidų antimaliarinis poveikis.

Tyrimo metu susintetinta 13 linijinių dipeptidų (**57a–m**) bei 10 diketopiperazinių (**58a–j**) – gamtoje randamų ciklinių peptidų, dėl savitos struktūros demonstruojančių įvairias gydomąsias savybes (1.10 pav.). Siekiant nustatyti stipriausią antimaliarinį poveikį lemiančias aminorūgštis, peptidų sintezei naudoti neproteinogeniniai dariniai sarkozinas ir ornitinas, aromatinėmis savybėmis pasižymintys fenilalaninas ir glicinas bei alifatinės ir hidrofobines ypatybes demonstruojantys lizinas ir valinas [16].



**57**

- a:** R<sub>1</sub>=(S)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn; R<sub>4</sub>=tBu
- b:** R<sub>1</sub>=(S)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn; R<sub>4</sub>=Me
- c:** R<sub>1</sub>=(S)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr; R<sub>4</sub>=tBu
- d:** R<sub>1</sub>=(R)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr; R<sub>4</sub>=Me
- e:** R<sub>1</sub>=(R)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr; R<sub>4</sub>=tBu
- f:** R<sub>1</sub>=(S)-Bn; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=(S)-Bn; R<sub>4</sub>=tBu
- g:** R<sub>1</sub>=(S)-Bn; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr; R<sub>4</sub>=tBu
- h:** R<sub>1</sub>=(S)-Bn; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=H; R<sub>4</sub>=Me
- i:** R<sub>1</sub>=(S)-Bn; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=H; R<sub>4</sub>=tBu
- j:** R<sub>1</sub>=(S)-iPr; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=(S)-iPr; R<sub>4</sub>=tBu
- k:** R<sub>1</sub>=(S)-iPr; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn; R<sub>4</sub>=tBu
- l:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr; R<sub>4</sub>=tBu
- m:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn; R<sub>4</sub>=tBu



**58**

- a:** R<sub>1</sub>=(S)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn
- b:** R<sub>1</sub>=(S)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr
- c:** R<sub>1</sub>=(R)-Pr-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr
- d:** R<sub>1</sub>=(S)-Bu-NHCbz; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr
- e:** R<sub>1</sub>=(S)-Bn; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=(S)-Bn
- f:** R<sub>1</sub>=(S)-iPr; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn
- g:** R<sub>1</sub>=(S)-Bn; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=H
- h:** R<sub>1</sub>=(S)-iPr; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=(S)-iPr
- i:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=Bn
- j:** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=iPr

### 1.10 pav. Tyrime susintetinti linijiniai ir cikliniai dipeptidai

Antimaliarinis junginių poveikis tirtas *in vitro* naudojant *P. berghei* vienląstį parazitą. Slopinančioji koncentracija palyginta su maliarijai gydyti plačiai naudojamu vaistiniu preparatu – chlorokvinu (IC<sub>50</sub> vertė 0,06 μM). Gauti rezultatai parodė, kad stipriausiomis antimaliarinėmis savybėmis pasižymėjo tie linijiniai ir cikliniai peptidai, kurių struktūroje pradinė liekana yra hidrofobinė aminorūgštis valinas arba neproteinogeninė aminorūgštis sarkozinas (1.2 lentelė).

Junginiai **57d** ir **57e** (IC<sub>50</sub> vertės 3,05 μM ir 2,78 μM) bei junginiai **57h**, **57i** ir **58g** (IC<sub>50</sub> vertės 3,63 μM, 3,38 μM ir 2,26 μM) pademonstravo stiprų *P. berghei* parazitų kultūros augimo slopinimą.

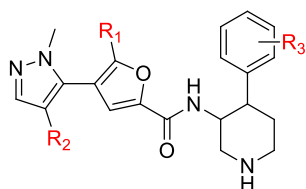
**57g** junginys taip pat pasižymėjo stipriu antimaliariniumi poveikiu (3,23  $\mu\text{M}$ ), tačiau jo analogas, atvirkštinės sekos linijinis dipeptidas **57k** pademonstravo daugiau nei du kartus silpnesnį aktyvumą (7,07  $\mu\text{M}$ ). Nustatyta, kad mažiausiu efektyvumu pasižymėjo tie linijiniai peptidai, kurių pradinė aminorūgštis liekana fenilalaninas (junginiai **57a**, **57b**, **57f**, **57m**). Remiantis dipeptidų sekomis susintetinti diketopiperaziniai daugumoje išskirtiniu poveikiu nepasižymėjo – slopinamoji koncentracija atitiko linijinių dipeptidų antimaliarinį aktyvumą (pavyzdžiui junginio **57d**  $\text{IC}_{50}$  vertė 3,05  $\mu\text{M}$ , o atitinkamo diketopiperazino **58c** – 3,09  $\mu\text{M}$ ). Tačiau, aktyvumu nepasižymėję fenilalanino aminorūgštį turintys atviros grandinės peptidai **57f** ir **57m** ( $\text{IC}_{50}$  vertė 112,20  $\mu\text{M}$  ir 164,05  $\mu\text{M}$ ), ciklinėje formoje (junginiai **58e** ir **58i**) pademonstravo stebinančius *P. berghei* kultūros slopinimo skirtumus ( $\text{IC}_{50}$  vertė 2,54  $\mu\text{M}$  ir 4,26  $\mu\text{M}$ ). Pastebėta, kad akivaizdžius antimaliarinio aktyvumo pokyčius lėmė aminorūgščių liekanų konfigūracija – D forma pasižymėjo ženkliai didesniu efektyvumu nei L (junginiai **57c–e** bei **58b–c**). Nustatyta, kad apsauginės grupės rezultatams didelės įtakos neturėjo [16].

**1.2 lentelė.** Dipeptidų **57a–m** ir **58a–j**  $\text{IC}_{50}$  vertės ( $\mu\text{M}$ ) slopinant *P. berghei* kultūros augimą

Junginys (200 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Junginys (200 $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Boc-Orn(Z)-Phe-O'Bu ( <b>57a</b> )	>200	Boc-Gly-Phe-O'Bu ( <b>57m</b> )	164,05
Boc-Orn(Z)-Phe-OMe ( <b>57b</b> )	>200	Cyclo[Phe-Orn(Z)] ( <b>58a</b> )	123,02
Boc-Orn(Z)-Val-O'Bu ( <b>57c</b> )	33,88	Cyclo[Val-Orn(Z)] ( <b>58b</b> )	66,02
Boc-D-Orn(Z)-Val-OMe ( <b>57d</b> )	3,05	Cyclo[Val-D-Orn(Z)] ( <b>58c</b> )	3,09
Boc-D-Orn(Z)-Val-O'Bu ( <b>57e</b> )	2,78	Cyclo[Val-Lys(Z)] ( <b>58d</b> )	3,12
Boc-Phe-Phe-O'Bu ( <b>57f</b> )	112,20	Cyclo(Phe-Phe) ( <b>58e</b> )	2,54
Boc-Phe-Val-O'Bu ( <b>57g</b> )	3,23	Cyclo(Val-Phe) ( <b>58f</b> )	3,89
Boc-Phe-Sar-OMe ( <b>57h</b> )	3,63	Cyclo(Sar-Phe) ( <b>58g</b> )	2,26
Boc-Phe-Sar-O'Bu ( <b>57i</b> )	3,38	Cyclo(Val-Val) ( <b>58h</b> )	2,45
Boc-Val-Val-O'Bu ( <b>57j</b> )	2,81	Cyclo(Phe-Gly) ( <b>58i</b> )	4,26
Boc-Val-Phe-O'Bu ( <b>57k</b> )	7,07	Cyclo(Val-Gly) ( <b>58j</b> )	3,23
Boc-Gly-Val-O'Bu ( <b>57l</b> )	3,16	Chlorokvinas	0,06

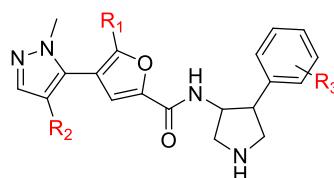
Atliktas tyrimas patvirtino, kad siekiant sukurti veiksmingus vaistus maliarijai gydyti, nebūtina ieškoti ilgų ir sudėtingų struktūrų – tyrimo metu susintetinti linijiniai ir cikliniai dipeptidai gali būti puikiai pritaikomi tolimesniems *in vitro* tyrimams su kitais *Plasmodium* šeimos parazitais, tokiais kaip *P. falciparum* ar *P. vivax* [16].

Progresuojančios onkologinės ligos kelia vis daugiau iššūkių mokslininkams, siekiantiems nustatyti svarbiausias priežastis, sukeliančias negrįžtamus ląstelių pakitimus organizmuose. Baltymų fosforilinimas – vienas reikšmingiausių reguliacinių ląstelės vidaus signalo perdavimo mechanizmų. Šis procesas svarbus vykdant biochemines reakcijas, tokias kaip metabolizmas, genų kopijavimas ar ląstelės gyvavimo ciklo valdymas. Būtent fosforilinimo sutrikimai, o ypač per didelis baltymo kinazės B (PKB) aktyvumas siejamas su dažna vėžinių susirgimų priežastimi [17,18]. Kinijos mokslininkų grupė [19], siekdama atrasti efektyvius vaistinius preparatus, pasižymintį inhibitoriniu poveikiu prieš PKB, susintetino peptidus 3-ioje, 4-oje ir 6-oje padėtyse turinčius įvairius pakaitus (1.11 pav.).



**59**

- a:  $R_1=H$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=H$
- b:  $R_1=H$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=3,4$ -difluoro
- c:  $R_1=Cl$ ;  $R_2=Cl$ ;  $R_3=H$
- d:  $R_1=Cl$ ;  $R_2=Cl$ ;  $R_3=4$ -Cl
- e:  $R_1=Cl$ ;  $R_2=Cl$ ;  $R_3=4$ -CF<sub>3</sub>
- f:  $R_1=Cl$ ;  $R_2=Cl$ ;  $R_3=3,4$ -difluoro

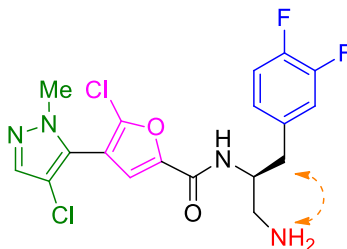


**60**

- a:  $R_1=H$ ;  $R_2=Cl$ ;  $R_3=3,4$ -difluoro
- b:  $R_1=H$ ;  $R_2=Br$ ;  $R_3=3,4$ -difluoro
- c:  $R_1=Cl$ ;  $R_2=Cl$ ;  $R_3=4$ -CF<sub>3</sub>

### 1.11 pav. Slopinamajam PKB poveikiui tirti susintetinti peptidai

Piperidino arba pirolidino fragmentą turintys junginiai gauti naudojant EDC ir HOBt jungiamuosius reagentus. Jų inhibicinis poveikis tirtas *in vitro* ir *in vivo* metodais. Gauti rezultatai parodė halogeninių pakaitų įtaką slopinant PKB. Junginys **59a**, kurio visi pakaitai vandeniliai, pademonstravo 709,6 nM 50 % slopinimo vertę. Tačiau, į struktūrą įterpus fluoro bei chloro pakaitus (junginiai **59b–59f**), PKB slopinamasis poveikis akivaizdžiai padidėjo, o junginių **59e** bei **59f** aktyvumas pasižymėjo panašia slopinamąja galia (IC<sub>50</sub> vertės 7,2 nM ir 6,4 nM) kaip ir kontroliniu preparatu pasirinktas GSK-795 (**61**) (IC<sub>50</sub> vertė 4,7 nM) (1.12 pav.). Pastebėta, kad piperidino fragmentą pakeitus pirolidinu, junginių **60a–c** aktyvumas smarkiai sumažėjo (IC<sub>50</sub> vertės > 500 nM). Ištyrus halogenų svarbą junginių aktyvumui, tolimesniems tyrimams, siekiant nustatyti optimalią junginių konfigūraciją, pasirinkti stipriausias savybes pademonstravę piperidino dariniai, 3-ioje ir 4-oje padėtyse pakaitus tyrintys **59e** ir **59f** peptidai [19].

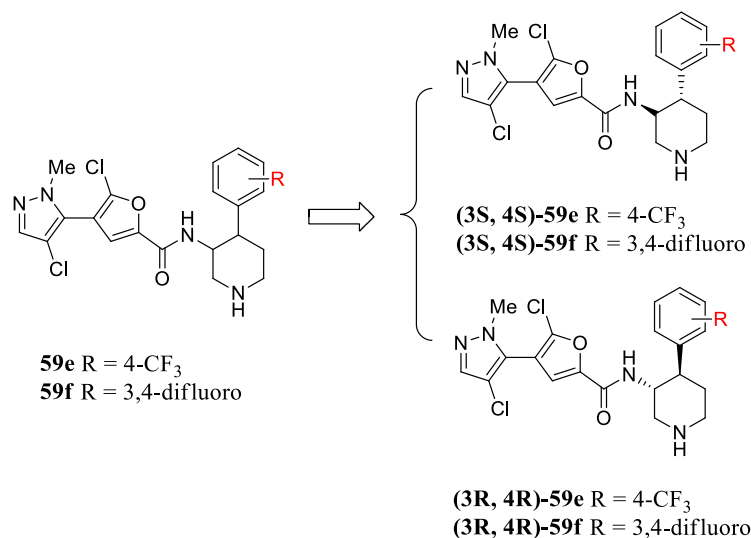


**61**

### 1.12 pav. Etalonas, PKB slopinantis vaistas GSK–795

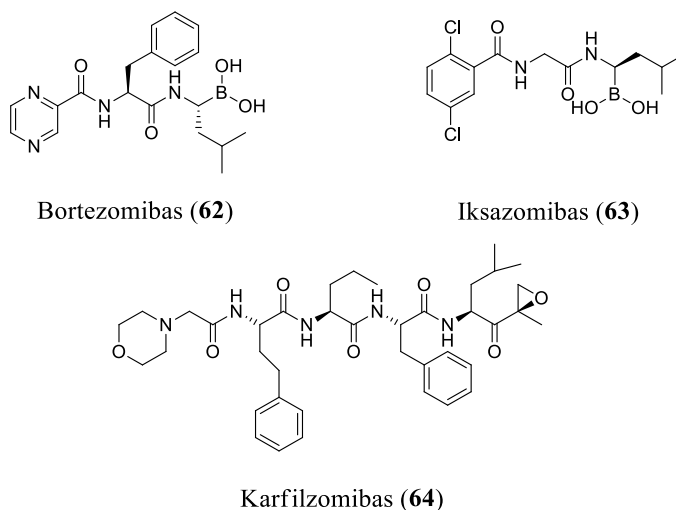
Panaudojus Jorgenseno – Hayashi katalizatorių, gauti keturi skirtingų konfigūracijų peptidai **59g–j** (1.3 lentelė). Jų aktyvumui įvertinti pasirinktos kelios skirtingų vėžinių ląstelių linijos – OVCAR-8 ir HCT116. Nustatyta, kad 3*S*,4*S* enantiomerų (junginiai **59g** ir **59i**) aktyvumas žymiai geresnis nei 3*R*,4*R* enantiomerų (junginiai **59h** ir **59j**). Geriausiomis savybėmis slopinant vėžinių ląstelių vystymąsi bei PKB pasižymėjo peptidas **59i** – gautos vertės kur kas aukštesnės už GSK–795 (**61**), kuris tyrime naudotas kaip etaloninis inhibitorius slopinant baltymo kinazę B. Įvertinus **59i** peptido pranašumą, tyrimas tęstas *in vivo*, naudojant gyvūnus. Iširta, kad pelėse junginys pasižymėjo gera farmakokinetika ir lengvu cheminio preparato įsisavinimu (97,9 %). Peptido priešvėžinis aktyvumas tirtas naudojant MMIS daugybinės mielomos ksenografo modelį – suvartojus 10 mg/kg dozę, po 22 dienų nustatytas 87,5 % vėžinių ląstelių augimo slopinimas [19].

1.3 lentelė. Peptidų 59g–j inhibitorinio PKB poveikio ir priešvėžinio aktyvumo rezultatai



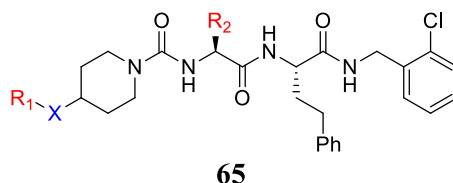
Junginio nr.	<i>Akt1</i> IC <sub>50</sub> (nM)	<i>OVCAR-8</i> (μM)	<i>HCT116</i> (μM)
(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )- <b>59e</b> ( <b>59g</b> )	9,3	0,12	0,28
(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )- <b>59e</b> ( <b>59h</b> )	127,4	0,90	1,05
(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )- <b>59f</b> ( <b>59i</b> )	3,0	0,04	0,21
(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )- <b>59f</b> ( <b>59j</b> )	51,2	0,49	1,09
GSK-795 ( <b>61</b> )	8,3	0,24	0,72

Panašų tyrimą atliko J. Zhang vadovaujama mokslinė grupė, kuri susintetino nekovalentinių, piperidino fragmentą turinčių peptidų seriją, siekiant įvertinti gautų junginių slopinamąjį proteosomų poveikį [20]. Proteosomos atlieka svarbias biochemines reakcijas – reguluoja pažeistų peptidų skaidymą, gamina antigenus, perduoda signalus ir vykdo ląstelių transkripciją ir diferenciaciją, užtikrinančią tinkamą homeostazinę aplinką [21]. Tačiau, sutrikus tinkamai proteosomų veiklai, organizmas nesugeba dorotis su kenksmingais baltymais ir ląstelių DNR pažeidžiama, taip padidinant vėžinių ląstelių atsiradimo riziką. Priešvėžiniai vaistai, slopinantys proteosomų veiklą, plačiai naudojami kraujo vėžiui gydyti, populiariausi iš jų – bortezomibas, iksazomibas ir karfilzomibas (1.13 pav.) [22].



1.13 pav. Kraujo vėžiui gydyti naudojami vaistiniai preparatai

Dauguma kuriamų vaistų, pasižyminčių proteosomų slopinamuoju poveikiu, yra kovalentiniai. Tačiau pastebima, kad tokia struktūra turi įtakos stipriems šalutiniams poveikiams, junginiai pasižymi dideliu reaktyvumu, dėl ko sumažėja jų specifiškumas. Šiuo tikslu susintetinti **65a–n** nekovalentiniai peptidai, kurių poveikis tirtas *in vitro* (1.14 pav.) [20].



- |  |   |
|--|---|
| <b>a:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Methyl      | <b>h:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=CONH- R <sub>2</sub> =Phenylethyl     |
| <b>b:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-CONH- R <sub>2</sub> =Methyl      | <b>i:</b> R <sub>1</sub> =Phenyl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl          |
| <b>c:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Iso-butyl   | <b>j:</b> R <sub>1</sub> = 4-Fluorophenyl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl |
| <b>d:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-CONH- R <sub>2</sub> =Iso-butyl   | <b>k:</b> R <sub>1</sub> =4-Methoxyphenyl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl |
| <b>e:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Benzyl      | <b>l:</b> R <sub>1</sub> =Pyridin-2-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl    |
| <b>f:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-CONH- R <sub>2</sub> =Benzyl      | <b>m:</b> R <sub>1</sub> =Pyridin-3-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl    |
| <b>g:</b> R <sub>1</sub> =Pyrazin-2-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl | <b>n:</b> R <sub>1</sub> =Thiazol-2-yl; X=-NHCO- R <sub>2</sub> =Phenylethyl    |

#### 1.14 pav. Susintetinti proteosomų inhibitoriai

Struktūros ir aktyvumo santykio analizė (1.4 lentelė) parodė, kad dauguma susintetintų peptidų pasižymėjo proteosomų slopinimu (<100 nM), o 4 junginiai (**65i**, **65l**, **65m** ir **65n**) pademonstravo ypač stiprų inhibitorinį poveikį ir geresnes savybes nei kontrolei parinktas vaistas karfilzomibas (**64**). Nustatyta, kad skirtingi pakaitai R<sub>2</sub> padėtyje stipriai lėmė aktyvumo skirtumus. Izobutilo ir feniletilo pakaitus turintys junginiai **65c**, **65d**, **65g**, **65h** pasižymėjo daug stipresniu aktyvumu nei metilo ar benzilo pakaitus turintys peptidai **65a**, **65b**, **65e**, **65f**. Taip pat pastebėta, kad junginiai su karbamoilo grupe –NHCO– (**65a**, **65e**, **65g**) X padėtyje pademonstravo aukštesnes slopinimo vertes nei tie, kurie X padėtyje turėjo acilamino grupę –CONH– (**65b**, **65d**, **65f**, **65h**). Mažiausią įtaką slopinimui lėmė R<sub>1</sub> pakaitai. Remiantis proteosomų chimotripsino slopinamuoju poveikiu, atrinkti aukščiausias vertes parodę peptidai (junginiai **65c**, **65g**, **65i–n**), kurie toliau tirti *in vitro* prieš vėžinių ląstelių linijas *RPMI 8226* ir *MM-1S*. Stipriausia antiproliferacine veikla pasižymėjo junginys **65m** (IC<sub>50</sub> vertės 13,9 ± 1,8 nM prieš *RPMI 8226* ir 9,5 ± 0,5 nM prieš *MM-1S* vėžines ląsteles), kurio poveikį nuspręsta palyginti su peptido analogu be piperidino žiedo. Palygintas fermentinis stabilumas ir pusinės eliminacijos laikas pelių kraujyje ir plazmoje. Junginys **65m** parodė kur kas ilgesnį eliminacijos pusperiodį (435,3 min. plazmoje ir 178,7 min. kraujyje) palyginus su analogu, neturintiu piperidino fragmento (285,3 min. plazmoje ir 111,0 min. kraujyje) [20].

**1.4 lentelė.** Peptidų slopinamojo ir citotoksinio aktyvumo rezultatai

Junginio nr.	Chimotripsinas IC <sub>50</sub> (nM)	Citotoksiškumas IC <sub>50</sub> (nM)	
		<i>RPMI 8226</i>	<i>MM-1S</i>
<b>65a</b>	601,4 ± 129,0	–	–
<b>65b</b>	669,9 ± 94,9	–	–
<b>65c</b>	16,6 ± 1,7	371,1 ± 23,4	260,9 ± 9,7
<b>65d</b>	45,7 ± 1,1	–	–
<b>65e</b>	152,9 ± 26,3	–	–
<b>65f</b>	343,9 ± 69,7	–	–

Junginio nr.	Chimotripsinas IC <sub>50</sub> (nM)	Citotoksiškumas IC <sub>50</sub> (nM)	
		<i>RPMI 8226</i>	<i>MM-1S</i>
65g	14,7 ± 2,4	195,7 ± 18,1	135,3 ± 6,6
65h	23,7 ± 3,5	–	–
65i	3,0 ± 0,4	18,5 ± 2,9	20,2 ± 1,4
65j	16,9 ± 2,0	94,3 ± 3,4	106,7 ± 5,7
65k	15,7 ± 1,3	84,6 ± 5,9	92,9 ± 6,1
65l	2,4 ± 1,0	24,7 ± 1,3	22,2 ± 3,3
65m	1,4 ± 0,1	13,9 ± 1,8	9,5 ± 0,5
65n	4,3 ± 0,9	29,5 ± 1,1	32,5 ± 3,4
Karfilzomibas (64)	8,4 ± 0,9	13,2 ± 0,6	1,5 ± 0,6

Mokslinės grupės atliktu tyrimu nustatyta, kad piperidino žiedas, įterptas į peptido struktūrą, pagerina junginio aktyvumą slopinant proteosomas ir vėžinių ląstelių augimą bei padidina fermentinį biologiškai aktyvių junginių stabilumą [20]. Įrodyta, kad nekovalentiniai peptidai gali būti efektyviai taikomi vėžinių susirgimų tyrimams ir gydymui.

### 1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Platus jungiamųjų reagentų ir aktyvatorių pasirinkimo diapazonas leidžia optimizuoti peptidų sintezę, siekiant gauti didžiausią išeigą ir maksimaliai sumažinti racemizacijos galimybę. Šiame skyriuje aptarti klasikiniai, plačiai naudojami ir neseniai atrasti jungiamieji reagentai bei jų veikimo mechanizmai, apžvelgti aktyvatorių pranašumai ir trūkumai. Aptarti peptidai, turintys pirazolo ir piperidino fragmentus, pasižymi stipriomis antioksidacinėmis, antibakterinėmis, antivirusinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis, todėl gali būti pritaikomi sudėtingų ir progresuojančių ligų gydymui bei veiksmingų biotechnologinių preparatų gamybai.

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Naudota aparatūra ir tyrimų metodai

Pradiniai junginiai (*R*)-1-*N*-*Boc*-piperolio rūgštis ir (*S*)-1-*N*-*Boc*-piperolio rūgštis, peptidų sintezės jungiamieji reagentai bei kiti naudoti cheminiai junginiai pirkti iš žinomų komercinių šaltinių, tokių kaip „Sigma–Aldrich“ ar „Fluorochem“ kompanijų bei papildomai negryninti. Reakcijų vykdymui ir gryninimui naudoti tirpikliai įsigyti iš „Eurochemicals“ ir „Sigma–Aldrich“ įmonių, gryninti distiliacijos metodu. Reakcijų eiga ir baigtis tikrinti plonasluoksnės chromatografijos būdu naudojant Silica–Gel 60F–254 plokšteles (E. Merck). Taškai ant plokštelių stebėti UV lempos šviesoje (254 nm), ryškinti KMnO<sub>4</sub> ar jodo garais. Reakcijų produktų gryninimui pasirinktas kolonėlinės chromatografijos metodas, naudojant Silica–Gel SI 60 (43–60 μm) (E. Merck). Tarpinių ir galutinių junginių struktūros nustatytos infraraudonosios spektroskopijos (IR), branduolių magnetinio rezonanso (BMR) bei masių spektrometriniais (MS) metodais. IR spektrai užrašyti Bruker Vertex V70 prietaisu, naudojant vieno atspindžio deimantinį Platinum ATR priedą, ruošiant supresuotas KBr tabletes. Banginė skalė λ sugraduota cm<sup>-1</sup>. Branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektrai matuoti Bruker Avance III (400 MHz – <sup>1</sup>H BMR, 101 MHz – <sup>13</sup>C BMR) spektrometru, naudojant deuteriuotą tirpiklį CDCl<sub>3</sub>. Cheminis poslinkis δ spektruose išreikštas milijoninėmis dalimis (m.d.). Gauti spektrai apdoroti MestreNova programine įranga, nustatyti multiplietiškumai bei *J* reikšmės nėra koreguotos. Masės spektrai (MS) nustatyti naudojant Shimadzu LCMS–2020 (ESI jonizacija) spektrometrą (EI, 70 eV). Junginių stereochemijai patvirtinti atlikti specifiniai optinio sukimosi tyrimai UniPol–L SCHMIDT+HAENSCH poliarimetru, ruošiant tiriamuosius tirpalus metanolyje.

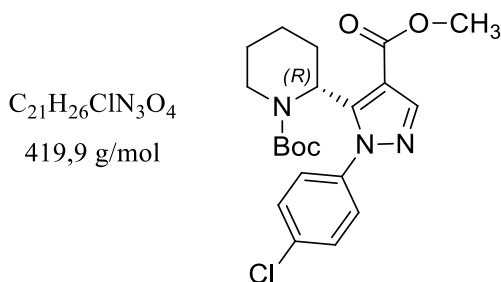
### 2.2. Naujų junginių sintezės metodika

Pradinių junginių 1–4 sintezė atlikta pagal žinomas metodikas [23,24].

#### 2.2.1. Bendras pirazolo junginių sintezės aprašymas

Atitinkamas tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akrioloil)piperidin-1-karboksilatą (1 ekv.) ištirpinamas etanolyje (15 ml). Į mišinį įdedamas hidrazino hidrokloridas (1,2 ekv.) ir reakcija vykdoma 6 val. 75 °C temperatūroje ant magnetinės maišyklės. Reakcijos pabaiga nustatoma plonasluoksnės chromatografijos metodu. Etanolis pašalinamas distiliacijos būdu. Gautas mišinys išgryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu, naudojamas eliuentas: heksanas – etilacetatas, tūriniu santykiu 3:1.

#### Tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (5a)





Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (*R,Z*)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akriloil)piperidin-1-karboksilatą (**2**) (0,3 g, 0,89 mmol) ir 4-chlorfenilhidrazino hidrochloridą (0,19 g, 1,07 mmol). Gauta ryškiai oranžinės spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išiga:** 0,213 g (57 %).

$[\alpha]_D^{25} = 41,6$ .

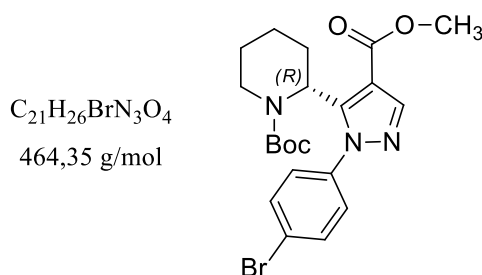
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,29 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> - *t*-butil); 1,36–2,23 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,31–3,37 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,37–5,51 (m, 1H, CH – piperidino); 7,30–7,52 (m, 4H, 4×CH – fenilo); 7,96 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 38,8 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,8 (OCH<sub>3</sub>); 51,5 (CH – piperidino); 80,2 (C); 111,5 (CH – pirazolo); 128,6 (2×CH); 129,4 (2×CH); 135,5 (C); 138,8 (C); 142,0 (C – pirazolo); 150,9 (C – pirazolo); 155,1 (C=O); 163,8 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3369 (CH<sub>Ar</sub>), 2967 (CH<sub>Al</sub>), 1717 (C=O), 1698 (C=O), 1550, 1391, 1231, 841 (C–O–C, C=C, C–N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 419 g/mol. Rasta *m/z*: 420 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (5b)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (*R,Z*)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akriloil)piperidin-1-karboksilatą (**2**) (0,25 g, 0,73 mmol) ir 4-bromfenilhidrazino hidrochloridą (0,2 g, 0,87 mmol). Gauta oranžinės spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išiga:** 0,172 g (51 %).

$[\alpha]_D^{25} = 41,7$ .

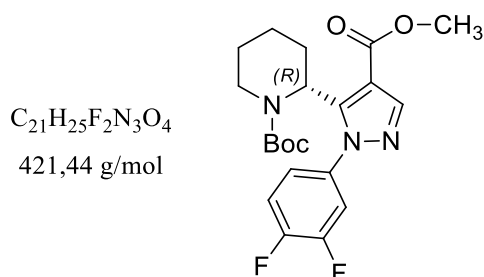
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,32 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> - *t*-butil); 1,43–2,30 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,35–3,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,30–5,32 (m, 1H, CH – piperidino); 7,58–7,63 (m, 4H, 4×CH – fenilo); 8,00 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 38,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,8 (OCH<sub>3</sub>); 51,5 (CH – piperidino); 80,2 (C); 111,5 (CH – pirazolo); 123,6 (2×CH); 128,9 (2×CH); 132,4 (C); 139,3 (C); 142,1 (C – pirazolo); 150,8 (C – pirazolo); 155,1 (C=O); 163,8 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3385 (CH<sub>Ar</sub>), 2967 (CH<sub>Al</sub>), 1713 (C=O), 1698 (C=O), 1502, 1391, 1230, 838 (C–O–C, C=C, C–N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 464 g/mol. Rasta *m/z*: 465 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2R)-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (5c)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (*R,Z*)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akriloil)piperidin-1-karboksilatą (**2**) (0,28 g, 0,83 mmol) ir 3,4-difluorfenilhidrazino hidrochloridą (0,18 g, 0,99 mmol). Gauta ryškiai geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išga:** 0,218 g (62 %).

$[\alpha]_D^{11} = 33,1$ .

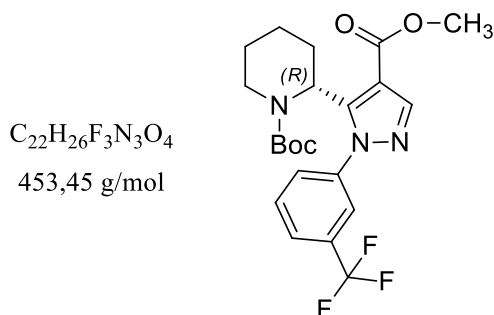
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,43 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> - *t*-butil); 1,47–2,40 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 3,34–3,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 3,95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,28–5,30 (s, 1H, CH – *piperidino*); 7,31–7,42 (m, 3H, 3×CH – *fenilo*); 8,08 (s, 1H, CH – *pirazolo*).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,4 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 22,1 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 28,2 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 39,3 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 50,9 (OCH<sub>3</sub>); 51,5 (CH – *piperidino*); 80,3 (C); 111,5 (CH – *pirazolo*); 117,1 (C); 117,3 (C); 117,5 (C); 117,7 (C); 123,7 (C); 123,9 (C); 142,2 (C – *pirazolo*); 150,9 (C – *pirazolo*); 155,1 (C=O); 163,7 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3390 (CH<sub>Ar</sub>), 2970 (CH<sub>Al</sub>), 1719 (C=O), 1696 (C=O), 1523, 1388, 1228, 1147, 776 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 421 g/mol. Rasta *m/z*: 422 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2R)-2-[4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (5d)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (*R,Z*)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akriloil)piperidin-1-karboksilatą (**2**) (0,26 g, 0,77 mmol) ir 3-(trifluormetil)fenilhidrazino hidrochloridą (0,2 g, 0,93 mmol). Gauta geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išga:** 0,240 g (69 %).

$[\alpha]_D^{11} = 30,0$ .

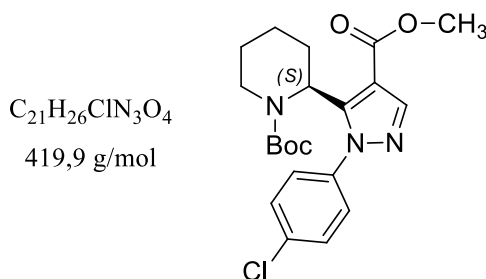
**$^1\text{H}$  BMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,30 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3 - t\text{-butil}$ ); 1,40–2,27 (m, 6H,  $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 3,26–3,32 (m, 2H,  $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 3,85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,27–5,30 (m, 1H,  $\text{CH} - \text{piperidino}$ ); 7,47–7,82 (m, 4H,  $4\times\text{CH} - \text{fenilo}$ ); 8,00 (s, 1H,  $\text{CH} - \text{pirazolo}$ ).

**$^{13}\text{C}$  BMR** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 19,5 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 22,1 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 28,3 ( $3\times\text{CH}_3$ ); 31,01 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 39,2 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 50,9 ( $\text{OCH}_3$ ); 51,5 ( $\text{CH} - \text{piperidino}$ ); 80,3 (C); 111,6 ( $\text{CH} - \text{pirazolo}$ ); 124,4 (C); 126,3 (C); 129,9 (C); 130,6 (C); 131,6 (C); 131,9 (C); 140,8 (C); 142,3 (C – *pirazolo*); 151,1 (C – *pirazolo*); 155,1 (C=O); 163,7 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3436 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 2975 ( $\text{CH}_{\text{Al}}$ ), 1720 (C=O), 1699 (C=O), 1549, 1326, 1134, 811 (C–O–C, C=C, C–N, C=N).

**MS**, apskaičiuota  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ : 453 g/mol. Rasta  $m/z$ : 454 ( $\text{M}+\text{H}^+$ , 100).

**Tret-butyl-(2S)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (6a)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąją pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (*S,Z*)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akrilil)piriperidin-1-karboksilatą (**4**) (0,3 g, 0,86 mmol) ir 4-chlorfenilhidrazino hidrokloridą (0,19 g, 1,06 mmol). Gauta rudos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išeiga:** 0,274 g (74 %).

$[\alpha]_D^{11} = -41,6$ .

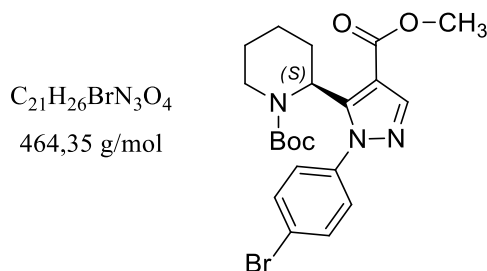
**$^1\text{H}$  BMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,29 (s, 9H,  $3\times\text{CH}_3 - t\text{-butil}$ ); 1,38–2,20 (m, 6H,  $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 3,31–3,36 (m, 2H,  $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 3,82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,25–5,28 (m, 1H,  $\text{CH} - \text{piperidino}$ ); 7,40–7,46 (m, 4H,  $4\times\text{CH} - \text{fenilo}$ ); 7,96 (s, 1H,  $\text{CH} - \text{pirazolo}$ ).

**$^{13}\text{C}$  BMR** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 19,3 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 22,0 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 28,0 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 28,4 ( $3\times\text{CH}_3$ ); 38,8 ( $\text{CH}_2 - \text{piperidino}$ ); 50,8 ( $\text{OCH}_3$ ); 51,5 ( $\text{CH} - \text{piperidino}$ ); 80,2 (C); 111,5 ( $\text{CH} - \text{pirazolo}$ ); 128,6 ( $2\times\text{CH}$ ); 129,4 ( $2\times\text{CH}$ ); 135,5 (C); 138,8 (C); 142,0 (C – *pirazolo*); 150,9 (C – *pirazolo*); 155,1 (C=O); 163,8 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3436 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ ), 2976 ( $\text{CH}_{\text{Al}}$ ), 1717 (C=O), 1698 (C=O), 1550, 1391, 1231, 841 (C–O–C, C=C, C–N, C=N).

**MS**, apskaičiuota  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4$ : 419 g/mol. Rasta  $m/z$ : 420 ( $\text{M}+\text{H}^+$ , 100).

**Tret-butyl-(2S)-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatats (6b)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (S,Z)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akriloil)piperidin-1-karboksilatą (**4**) (0,32 g, 0,93 mmol) ir 4-bromfenilhidrazino hidrochloridą (0,25 g, 1,11 mmol). Gauta geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išga:** 0,289 g (67 %).

$[\alpha]_D^{11} = -41,7$ .

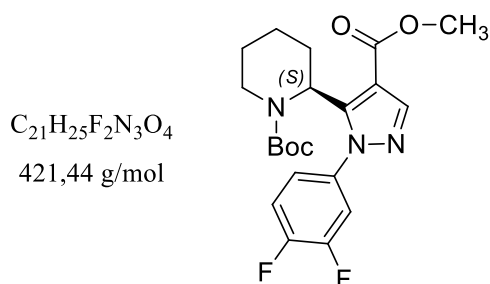
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,32 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> - *t*-butil); 1,44–2,29 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,35–3,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,30–5,32 (m, 1H, CH – piperidino); 7,58–7,68 (m, 4H, 4×CH – fenilo); 8,00 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 38,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,8 (OCH<sub>3</sub>); 51,5 (CH – piperidino); 80,2 (C); 111,5 (CH – pirazolo); 123,6 (2×CH); 128,9 (2×CH); 132,4 (C); 139,3 (C); 142,1 (C – pirazolo); 150,8 (C – pirazolo); 155,1 (C=O); 163,8 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3415 (CH<sub>Ar</sub>), 2967 (CH<sub>Al</sub>), 1713 (C=O), 1698 (C=O), 1502, 1390, 1230, 1147, 838 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 464 g/mol. Rasta *m/z*: 465 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2S)-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatats (6c)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (S,Z)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akriloil)piperidin-1-karboksilatą (**4**) (0,19 g, 0,56 mmol) ir 3,4-difluorfenilhidrazino hidrochloridą (0,12 g, 0,67 mmol). Gauta geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išga:** 0,185 g (78 %).

$[\alpha]_D^{11} = -33,1$ .

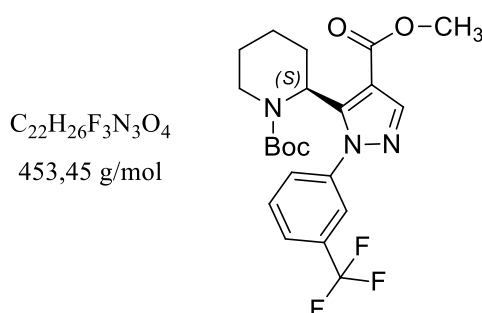
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,42 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,47–2,40 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,34–3,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,29–5,32 (m, 1H, CH – piperidino); 7,30–7,47 (m, 3H, 3×CH – fenilo); 8,07 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 19,4 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,1 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 39,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,9 (OCH<sub>3</sub>); 51,5 (CH – piperidino); 80,3 (C); 111,5 (CH – pirazolo); 117,1 (C); 117,3 (C); 117,5 (C); 117,7 (C); 123,8 (C); 123,9 (C); 142,2 (C – pirazolo); 150,9 (C – pirazolo); 155,1 (C=O); 163,7 (C=O).

**IR (KBr)**, ν (cm<sup>-1</sup>): 3436 (CH<sub>Ar</sub>), 2970 (CH<sub>Al</sub>), 1719 (C=O), 1696 (C=O), 1522, 1388, 1228, 1147, 776 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 421 g/mol. Rasta *m/z*: 422 (M+H<sup>+</sup>, 100).

### Tret-butyl-(2*S*)-2-{4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (6d)



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį pirazolų sintezės aprašymą, naudojant (*S,Z*)-tret-butyl-2-(3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)akrilil)piperidin-1-karboksilatą (**4**) (0,44 g, 1,31 mmol) ir 3-(trifluormetil)fenilhidrazino hidrochloridą (0,33 g, 1,57 mmol). Gauta ryškiai oranžinės spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išiga:** 0,441 (75 %).

**[α]<sub>D</sub><sup>11</sup>** = -30,0.

**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,30 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,40–2,27 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,26–3,32 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,30–5,32 (m, 1H, CH – piperidino); 7,51–7,78 (m, 4H, 4×CH – fenilo); 8,00 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 19,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,3 (3×CH<sub>3</sub>); 39,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,9 (OCH<sub>3</sub>); 51,5 (CH – piperidino); 80,3 (C); 111,6 (CH – pirazolo); 124,4 (C); 126,2 (C); 129,9 (C); 130,6 (C); 131,6 (C); 131,9 (C); 140,8 (C); 142,3 (C – pirazolo); 151,1 (C – pirazolo); 155,1 (C=O); 163,7 (C=O).

**IR (KBr)**, ν (cm<sup>-1</sup>): 3436 (CH<sub>Ar</sub>), 2975 (CH<sub>Al</sub>), 1720 (C=O), 1699 (C=O), 1549, 1326, 1134, 811 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

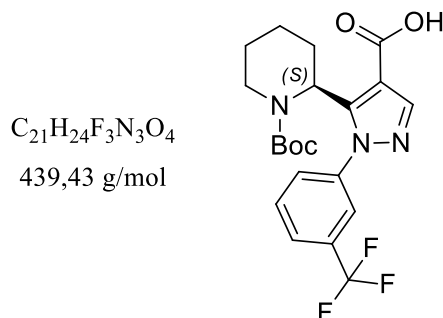
**MS**, apskaičiuota C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 453 g/mol. Rasta *m/z*: 454 (M+H<sup>+</sup>, 100).

### 2.2.2. Bendras karboksirūgščių sintezės aprašymas

Po reakcijos su atitinkamu hidrazino hidrochloridu gautas pirazolo junginys (1 ekv.) ištirpinamas metanolyje ir sulašinamas 2N NaOH vandeninis tirpalas (2 ekv.). Reakcija vykdoma 14–16 val. kambario temperatūroje ant magnetinės maišyklės. Reakcijos baigtis nustatoma plonasluoksnės chromatografijos metodu. Metanolis nudistiliuojamas esant sumažintam slėgiui. Gautas reakcijos

mišinys ištirpinamas vandenyje, ekstrahuojamas etilacetatu (2×15 ml), atskirtas etilacetato sluoksnis pašalinamas. Likęs vandeninis sluoksnis, kuriame yra produktas natrio druskos pavidalu, rūgštinamas 1M KHSO<sub>4</sub> vandeniniu tirpalu iki pH=6 ir ekstrahuojamas etilacetatu (3×50 ml). Ekstraktas plaunamas vandeniu ir sočiu NaCl tirpalu (3×50 ml). Surenkama organinė fazė išdžiovinama bevandeniu Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ir nufiltruojama. Etilacetatas nudistiliuojamas [25].

**5-[(2S)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1H-pirazol-4-karboksirūgštis (7a)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį karboksirūgščių sintezės aprašymą, naudojant tret-butyl-(2S)-2-{4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1H-pirazol-5-il}piperidin-1-karboksilatą (**6d**) (0,3 g, 0,66 mmol). Gauta ryškiai oranžinės spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išeiga:** 0,220 g (76 %).

[α]<sub>D</sub><sup>11</sup> = -40,2.

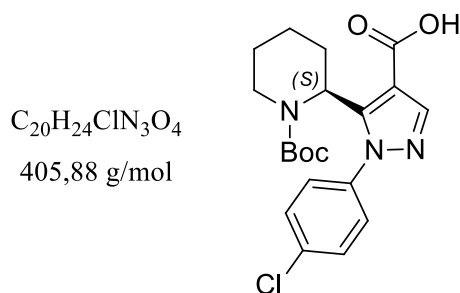
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,31 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,37–1,96 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,23–3,28 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,47 (s, 1H, OH); 5,53–5,55 (m, 1H, CH – piperidino); 7,42–7,84 (m, 4H, 4×CH – fenilo); 8,02 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 19,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,3 (3×CH<sub>3</sub>); 39,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 54,2 (CH – piperidino); 80,5 (C); 122,1 (CH – pirazolo); 124,5 (C); 124,8 (C); 126,2 (C); 127,6 (C); 129,8 (C); 130,8 (C); 131,5 (C); 131,9 (C – pirazolo); 140,9 (C – pirazolo); 143,0 (C=O); 155,3 (C=O).

**IR (KBr)**, ν (cm<sup>-1</sup>): 3436 (CH<sub>Ar</sub>), 2977 (CH<sub>Al</sub>), 1696 (C=O), 1547, 1325, 1153, 809 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 439 g/mol. Rasta *m/z*: 440 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**5-[(2S)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1-(4-chlorfenil)-1H-pirazol-4-karboksirūgštis (7b)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį karboksirūgščių sintezės aprašymą, naudojant tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**6a**) (0,15 g, 0,36 mmol). Gauta šviesiai geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išga:** 0,110 g (76 %).

$[\alpha]_D^{11} = -45,1$ .

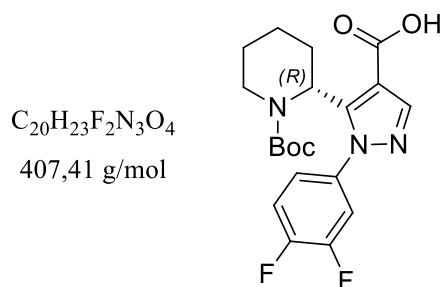
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,30 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,38–1,93 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 2,08–2,20 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 3,50 (s, 1H, OH); 5,42–5,46 (m, 1H, CH – *piperidino*); 7,42–7,45 (m, 4H, 4×CH – *fenilo*); 8,04 (s, 1H, CH – *pirazolo*).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,3 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 21,9 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 28,0 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 39,0 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 50,9 (CH – *piperidino*); 80,5 (C); 111,1 (CH – *pirazolo*); 128,6 (2×CH); 129,4 (2×CH); 135,7 (C); 138,6 (C); 142,9 (C – *pirazolo*); 151,5 (C – *pirazolo*); 155,2 (C=O); 168,4 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3436 (CH<sub>Ar</sub>), 2976 (CH<sub>Al</sub>), 1691 (C=O), 1550, 1402, 1151, 837 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 405 g/mol. Rasta *m/z*: 406 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**5-[(2*R*)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1-(3,4-difluorfenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštis (7c)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį karboksirūgščių sintezės aprašymą, naudojant tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**5c**) (0,15 g, 0,35 mmol). Gauta geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išga:** 0,105 g (75 %).

$[\alpha]_D^{11} = 43,1$ .

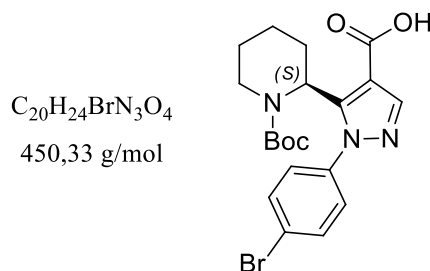
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,35 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,42–1,98 (m, 6H, CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 2,32–2,39 (m, 2H, CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 3,49 (s, 1H, OH); 5,42–5,46 (m, 1H, CH – *piperidino*); 7,27–7,52 (m, 3H, 3×CH – *fenilo*); 8,15 (s, 1H, CH – *pirazolo*).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,4 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 22,1 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 31,1 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 39,5 (CH<sub>2</sub> – *piperidino*); 50,9 (CH – *piperidino*); 80,6 (C); 111,0 (CH – *pirazolo*); 123,8 (C); 124,3 (C); 130,2 (C); 134,9 (C); 136,2 (C); 138,6 (C); 143,0 (C – *pirazolo*); 151,6 (C – *pirazolo*); 155,3 (C=O); 168,1 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3436 (CH<sub>Ar</sub>), 2937 (CH<sub>Al</sub>), 1694 (C=O), 1522, 1404, 1153, 876 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 407 g/mol. Rasta *m/z*: 408 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**1-(4-bromfenil)-5-[(2S)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1H-pirazol-4-karboksirūgštis (7d)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį karboksirūgščių sintezės aprašymą, naudojant tret-butyl-(2S)-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**6b**) (0,15 g, 0,32 mmol). Gauta geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išeiga:** 0,123 g (86 %).

$[\alpha]_D^{25} = -51,1$ .

**$^1H$  BMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1,34 (s, 9H,  $3 \times CH_3$  – *t*-butil); 1,43–2,02 (m, 6H,  $CH_2$  – piperidino); 2,32–2,35 (m, 2H,  $CH_2$  – piperidino); 3,42 (s, 1H, OH); 5,46–5,51 (m, 1H, CH – piperidino); 7,29–7,64 (m, 4H,  $4 \times CH$  – fenilo); 8,06 (s, 1H, CH – pirazolo).

**$^{13}C$  BMR** (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 19,3 ( $CH_2$  – piperidino); 22,0 ( $CH_2$  – piperidino); 28,4 ( $CH_2$  – piperidino); 31,0 ( $3 \times CH_3$ ); 39,0 ( $CH_2$  – piperidino); 50,8 (CH – piperidino); 80,4 (C); 123,6 (CH – pirazolo); 128,8 ( $2 \times CH$ ); 132,4 ( $2 \times CH$ ); 139,2 (C); 140,5 (C); 142,8 (C – pirazolo); 151,2 (C – pirazolo); 155,2 (C=O); 167,6 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3436 ( $CH_{Ar}$ ), 2974 ( $CH_{Al}$ ), 1692 (C=O), 1498, 1397, 1151, 835 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota  $C_{20}H_{24}BrN_3O_4$ : 450 g/mol. Rasta  $m/z$ : 451 ( $M+H^+$ , 100).

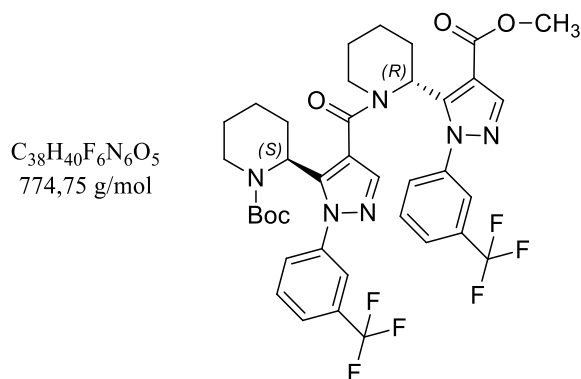
### 2.2.3. Bendras peptidų sintezės aprašymas

Atitinkamas pirazol-5-piperidin-1-karboksilatą ištirpinamas DCM (1 ml), sulašinama TFA (1 ml) ir mišinys paliekamas suktis kambario temperatūroje 15 min. Po to, DCM bei TFA nudistilijuojami ir vakuumuojami esant sumažintam slėgiui 15 min. Gautas laisvą amino grupę turintis junginys toliau naudojamas peptido reakcijoje be papildomo apdoravimo.

Atitinkama piperidin-2-pirazol-4-karboksirūgštis (1 ekv.) ištirpinama DCM (2 ml). Reakcijos mišinys patalpinamas į ledų vonelę ir atšaldomas iki 0 °C temperatūros. Atšaldžius, sudedamas jungiamasis reagentas HATU (1 ekv.) ir mišinys maišomas 10 min. Tada, pipete sulašinama bazė DIPEA (2 ekv.) ir reakcijos mišinys paliekamas suktis 0 °C temperatūroje 10 min. Toliau į reakcijos mišinį sudedamas gautas aminas, ištirpintas mažame kiekyje DCM (1 ml) ir DIPEA (1 ekv.). Reakcija vykdoma 4 val. kambario temperatūroje ant magnetinės maišyklės. Reakcijos baigtis nustatoma plonasluoksnės chromatografijos metodu. DCM nudistilijuojamas. Reakcijos mišinys ištirpinamas etilacetate ir plaunamas 1M  $KHSO_4$  ir 1M  $NaHCO_3$  vandeniniais tirpalais ( $3 \times 20$  ml). Surenkama organinė fazė išdžiovinama bevandeniu  $Na_2SO_4$  ir nufiltruojama. Etilacetatas pašalinamas distiliacijos būdu. Gautas produktas išgryninamas kolonėlinės chromatografijos metodu, naudojant eliuentą: dichlormetanas – metanolis, tūriniu santykiu 100:2.



**Tret-butyl-(2*S*)-2-{4-[(2*R*)-2-{4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (8a)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąją peptidų sintezės aprašymą, naudojant 5-[(2*S*)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštį (**7a**) (0,1 g, 0,24 mmol) ir tret-butyl-(2*R*)-2-{4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**5d**) (0,11 g, 0,24 mmol). Gauta šviesiai geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

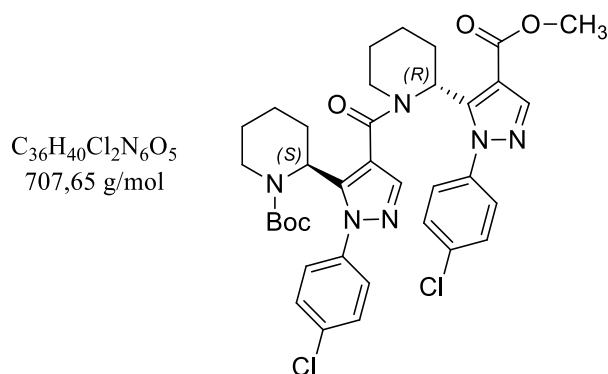
**Išeiga:** 0,120 g (67 %).

**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,29 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,36–2,15 (m, 12H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,41–3,67 (m, 4H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,19 – 5,26 (m, 2H, CH – piperidino); 7,24 (s, 1H, CH – pirazolo); 7,30–7,62 (m, 8H, 8×CH – fenilo); 7,99 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,1 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 19,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,8 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 23,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 27,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 27,7 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,5 (3×CH<sub>3</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 30,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 37,3 (CH – piperidino); 40,4 (CH – piperidino); 51,5 (OCH<sub>3</sub>); 80,0 (C); 126,2 (C); 127,2 (C); 127,4 (C); 127,5 (C); 128,6 (C); 128,7 (C); 128,8 (C); 129,0 (C); 129,2 (C); 129,3 (C); 129,4 (C); 129,4 (C); 129,5 (C); 130,0 (C); 134,7 (C); 135,4 (C); 138,2 (C); 138,9 (C); 142,8 (C); 143,5 (C); 148,2 (C=O); 154,5 (C=O); 163,7 (C=O).  
**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3097 (CH<sub>Ar</sub>), 2947 (CH<sub>Al</sub>), 1719 (C=O), 1690 (C=O), 1499, 1392, 1258, 1091, 835 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>F<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 774 g/mol. Rasta *m/z*: 775 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chorfenil)-4-{(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (8b)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį peptidų sintezės aprašymą, naudojant 5-[(2*S*)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1-(4-chlorfenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštį (**7b**) (0,08 g, 0,18 mmol) ir tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**5a**) (0,08 g, 0,18 mmol). Gauta ryškiai geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išiga:** 0,09 g (69 %).

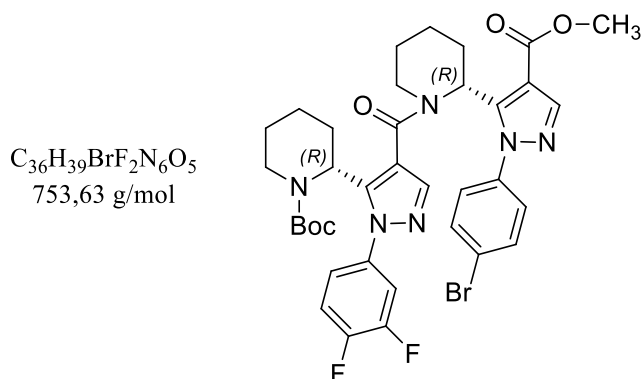
**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,29 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,38–2,19 (m, 12H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,49–3,55 (m, 4H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,12–5,21 (m, 2H, CH – piperidino); 7,39 (s, 1H, CH – pirazolo); 7,52–7,88 (m, 8H, 8×CH – fenilo); 8,03 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 19,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 19,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,0 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,6 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 27,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 27,9 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,4 (3×CH<sub>3</sub>); 39,8 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 40,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 50,6 (CH – piperidino); 50,8 (OCH<sub>3</sub>); 52,6 (CH – piperidino); 80,4 (C); 111,8 (C); 116,0 (C); 116,5 (C); 117,2 (C); 117,5 (C); 117,9 (C); 124,2 (C); 126,0 (C); 129,9 (C); 130,5 (C); 131,1 (C); 132,0 (C); 135,4 (C); 138,2 (C); 139,1 (C); 143,1 (C); 143,3 (C); 147,7 (C); 155,4 (C=O); 161,5 (C=O); 168,2 (C=O).

**IR (KBr)**, ν (cm<sup>-1</sup>): 3070 (CH<sub>Ar</sub>), 2950 (CH<sub>Al</sub>), 1720 (C=O), 1694 (C=O), 1552, 1325, 1128, 1069, 699 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 707 g/mol. Rasta *m/z*: 708 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2*R*)-2-[4-{(2*R*)-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1-(3,4-difluorfenil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**8c**)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąjį peptidų sintezės aprašymą, naudojant 5-[(2*R*)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1-(3,4-difluorfenil)-1*H*-pirazol-4-karboksirūgštį (**7c**) (0,08 g, 0,2 mmol) ir tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**5b**) (0,09 g, 0,2 mmol). Gauta oranžinės spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išiga:** 0,098 g (64 %).

**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,30 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,32–1,91 (m, 12H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,46–3,84 (m, 4H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,29–5,32 (m, 2H, CH – piperidino); 7,26 (s, 1H, CH – pirazolo); 7,27–7,80 (m, 7H, 7×CH – fenilo); 7,98 (s, 1H, CH – pirazolo).

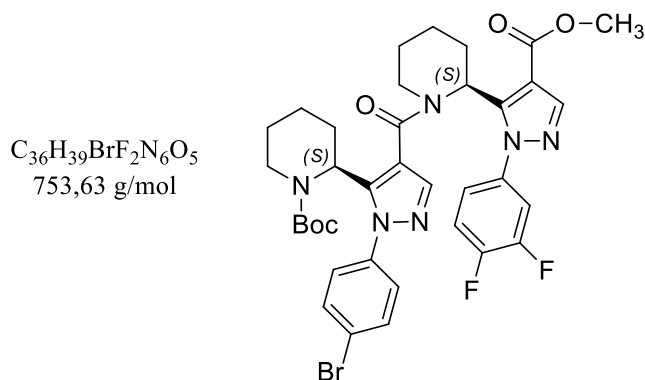
**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 19,2 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 19,6 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,6 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 23,8 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 26,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 27,4 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,5 (3×CH<sub>3</sub>); 38,8 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 44,4 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 51,4 (CH – piperidino); 51,5 (OCH<sub>3</sub>); 53,6 (CH – piperidino); 80,1 (C); 110,9 (C); 115,8 (C); 116,0 (C); 116,8 (C); 117,4 (C); 117,5 (C);

122,4 (C); 123,5 (C); 128,9 (C); 128,9 (C); 132,4 (C); 132,4 (C); 136,3 (C); 138,7 (C); 140,0 (C); 143,0 (C); 143,3 (C); 148,5 (C); 154,7 (C=O); 163,7 (C=O); 166,4 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3066 (CH<sub>Ar</sub>), 2946 (CH<sub>Al</sub>), 1717 (C=O), 1688 (C=O), 1521, 1259, 1160, 775 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 753 g/mol. Rasta  $m/z$ : 754 (M+H<sup>+</sup>, 100).

**Tret-butyl-(2S)-2-[1-(4-bromfenil)-4-[(2S)-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil]-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (8d)**



Reakcija vykdyta pagal bendrąją peptidų sintezės aprašymą, naudojant 1-(4-bromfenil)-5-[(2S)-1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-il]-1H-pirazol-4-karboksirūgštį (**7d**) (0,1 g, 0,22 mmol) ir tret-butyl-(2S)-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1H-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatą (**6c**) (0,09 g, 0,22 mmol). Gauta šviesiai geltonos spalvos dervos pavidalo medžiaga.

**Išiga:** 0,1 g (63 %).

**<sup>1</sup>H BMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,29 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub> – *t*-butil); 1,35–1,86 (m, 12H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,47–3,52 (m, 4H, CH<sub>2</sub> – piperidino); 3,84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,26–5,29 (m, 2H, CH – piperidino); 7,29–7,72 (m, 7H, 7×CH – fenilo); 7,54 (s, 1H, CH – pirazolo); 7,98 (s, 1H, CH – pirazolo).

**<sup>13</sup>C BMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 19,3 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 19,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 21,6 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 22,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 26,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 27,4 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 28,5 (3×CH<sub>3</sub>); 40,4 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 44,5 (CH<sub>2</sub> – piperidino); 51,4 (CH – piperidino); 51,5 (CH – piperidino); 53,6 (OCH<sub>3</sub>); 80,0 (C); 110,9 (C); 116,6 (C); 117,4 (C); 117,6 (C); 117,7 (C); 122,6 (C); 123,9 (C); 125,42 (C); 127,5 (C); 127,8 (C); 128,4 (C); 129,2 (C); 132,3 (C); 135,7 (C); 139,0 (C); 140,0 (C); 143,0 (C); 148,8 (C); 154,8 (C=O); 163,6 (C=O); 166,6 (C=O).

**IR (KBr)**,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3058 (CH<sub>Ar</sub>), 2947 (CH<sub>Al</sub>), 1719 (C=O), 1689 (C=O), 1520, 1215, 1161, 781 (C-O-C, C=C, C-N, C=N).

**MS**, apskaičiuota C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>BrF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 753 g/mol. Rasta  $m/z$ : 754 (M+H<sup>+</sup>, 100).

### 2.3. Biologinių savybių tyrimai

Remiantis moksliniais tyrimais ir literatūroje pateiktais duomenimis galima teigti, kad peptidai, turintys pirazolo ir piperidino fragmentus struktūroje, pasižymi dideliu biologiniu aktyvumu. Vienas iš šio darbo tikslų – atlikti biologinių savybių tyrimus susintetintiems 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatų ir peptidų junginiams, nustatyti antioksidacinį, redukcinį bei antibakterinį aktyvumą.

Biologiniai tyrimai atlikti Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakulteto biotechnologijos laboratorijoje. Tyrimams atlikti naudoti įrenginiai ir prietaisai, esantys biotechnologijos laboratorijoje: pH-metras „Winlab“, termostatuojama vonelė „Biosan“, autoklavas „Certoclav“, laminaras „Telstar BV-100“, termostatas „Binder“, centrifuga „Universal 320 R“, spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“.

#### 2.3.1. Susintetintų biologiškai aktyvių karboksilatų DPPH radikalo slopinimo tyrimas

##### Tyrimui naudoti reagentai:

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas); DMSO; etanolis; DMSO ištirpinti tiriamieji junginiai (1 mg/ml).

##### Tyrimo eiga [26]:

Paruošti tiriamieji junginiai ištirpinti DMSO (1 mg/ml). Pagamintas DPPH tirpalas etanolyje (1 mM). Į 0,1 ml tiriamuosius mėginius įpilta po 0,1 ml paruošto DPPH tirpalo (1 mg/ml). Gauti mišiniai palikti stovėti 20 min. tamsioje vietoje. Paruošti 6 ml palyginamojo DMSO ir DPPH tirpalo (santykiu 1:1). Po 20 min. spektrofotometru išmatuotos tiriamųjų ir palyginamojo tirpalų šviesos sugertys esant 517 nm bangos ilgiui.

##### DPPH slopinimo apskaičiavimas:

$$\text{Slopinimas, \%} = \left( \frac{A_B - A_A}{A_B} \right) \times 100$$

$A_B$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis esant 517 nm;

$A_A$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis esant 517 nm.

#### 2.3.2. Sintetinių junginių redukcinių savybių nustatymas

##### Tyrimui naudoti reagentai:

Natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH = 6,6); 1 %  $K_3[Fe(CN)_6]$ ; 10 % Trichloracto rūgštis; 0,1 %  $FeCl_3$ ; dejonizuotas vanduo; DMSO ištirpinti tiriamieji junginiai (1 mg/ml).

##### Tyrimo eiga [27]:

Paruošti tiriamieji junginiai ištirpinti DMSO (1 mg/ml). Į 0,5 ml tiriamųjų junginių tirpalus įpilta po 1,25 ml 0,2 M natrio fosfatinio buferio ir 1,25 ml kompleksinės kalio druskos  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Mišiniai išmaišyti ir inkubuoti 50 °C temperatūroje 20 min. Po inkubacijos į tiriamuosius tirpalus įpilta po 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, mėgintuvėliai išmaišyti ir centrifuguoti 10 min. Pipete paimti 1,25 ml viršutiniai supernatanto sluoksniai, jie sumaišyti su 1,25 ml dejonizuotu vandeniu ir 0,25 ml

vandeniniu 0,1 % FeCl<sub>3</sub>. Spektrofotometru išmatuotos tiriamųjų junginių šviesos sugertys esant 700 nm bangos ilgiui.

### 2.3.3. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

#### Tyrimui naudoti reagentai:

Acetatinis buferis (pH = 3,6); TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas); HCl; FeCl<sub>3</sub>×6H<sub>2</sub>O; DMSO ištirpinti tiriamieji junginiai (1 mg/ml).

#### Tyrimo eiga [28]:

Paruošti tiriamieji junginiai ištirpinti DMSO (1 mg/ml). Pagamintas FRAP reagentas: 5 ml acetatinio buferio (300 mM) sumaišyti su 0,0156 g TPTZ (10 mmol), kuris ištirpintas 0,2 ml 1N druskos rūgšties tirpale ir 0,027 g FeCl<sub>3</sub>×6H<sub>2</sub>O (20 mmol/l). Į 100 µl tiriamuosius tirpalus įpilta po 3 ml paruošto FRAP reagento. Spektrofotometru išmatuotos tiriamųjų junginių šviesos sugertys esant 593 nm bangos ilgiui.

Kalibracinei kreivei sudaryti, paruošti 5 skirtingų koncentracijų FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O tirpalai: 5, 10, 15, 20, 25 µmol/l. Pagaminti tirpalai sumaišyti su 3 ml FRAP reagentu. Spektrofotometru išmatuotos skirtingų koncentracijų tirpalų šviesos sugertys esant 593 nm bangos ilgiui. Pagal gautus rezultatus sudaryta kalibracinė kreivė, iš kurios nustatyta tiriamųjų junginių Fe<sup>2+</sup> koncentracija. Šiuo tyrimu įvertintos biologiškai aktyvių junginių antioksidacinės savybės, paremtos Fe<sup>3+</sup> virtimu į Fe<sup>2+</sup> jonus.

### 2.3.4. Deoksiribozės apsaugos nuo hidroksi- radikalų tyrimas naudojant susintetintus biologiškai aktyvius junginius

#### Tyrimui naudoti reagentai:

Natrio fosfatinis buferis (pH = 7,4 pH); 2-deoksi-D-ribozė; Fe<sup>3+</sup>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; askorbo rūgštis; 1 % tiobarbitūrinė rūgštis; NaOH; 2,8 % trichloracto rūgštis; dejonizuotas vanduo; tiriamųjų junginių vandeniniai tirpalai (100 µg/ml).

#### Tyrimo eiga [29]:

Paruošti tiriamieji junginiai ištirpinti vandenyje (100 µg/ml). Į 200 µl mėginius įpilta 10 µl 2-deoksi-D-ribozės (100 mmol/l), ištirpintos natrio fosfato buferyje (24 mmol/l), 10 µl Fe<sup>3+</sup> (10 mmol/l), 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mmol/l), 10 µl natrio fosfato buferio (24 mmol/l) ir 100 µl askorbo rūgšties (1 mM). Paruošti junginiai inkubuoti 37 °C temperatūroje 1 val. Kontrolei paruoštas analogiškas mėginys, vietoje tiriamojo junginio vandeninio tirpalo naudojant dejonizuotą vandenį. Po inkubacijos į mėginius įpilta po 1 ml 1 % tiobarbitūrinės rūgšties, ištirpintos NaOH ir 1,5 ml 2,8 % trichloracto rūgšties. Mėginiai išmaišyti ir kaitinti 100 °C temperatūroje vandens vonelėje 15 min. Mėgintuvėliai atvėsinti ir spektrofotometru išmatuotos tiriamųjų junginių šviesos sugertys esant 532 nm bangos ilgiui. Šiuo metodu nustatytos tiriamųjų junginių antioksidacinės savybės, apsaugant deoksiribozę nuo fragmentacijos, kurią sukelia hidroksi radikalai.

#### Hidroksi- radikalų slopinimo apskaičiavimas:

$$\text{Slopinimas, \%} = \left( \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  – kontrolės šviesos sugerties dydis esant 532 nm;  
 $A_1$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis esant 532 nm.

### 2.3.5. Vandenilio peroksido suardymas naudojant biologiškai aktyvius karboksilatus

#### Tyrimui naudoti reagentai:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; fosfatinis buferis (pH = 7,4); tiriamųjų junginių vandeniniai tirpalai (1,5 µg/ml).

#### Tyrimo eiga [30]:

Paruošti tiriamieji junginiai ištirpinti vandenyje (1,5 µg/ml). Pagamintas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirpalas (40 mM), paruoštas fosfatiname buferyje. Į 2 ml tiriamuosius tirpalus įpilta 1,2 ml vandenilio peroksido tirpalo. Gauti mėginiai išmaišyti ir laikyti 30 min. Naudojant kvarcines kiuvetes, spektrofotometru išmatuotos tiriamųjų junginių šviesos sugertys esant 230 nm bangos ilgiui. Gautiems rezultatams palyginti išmatuota vandenilio peroksido tirpalo šviesos sugertis.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suardymo apskaičiavimas:

$$\text{Suardymas, \%} = \left( \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis esant 230 nm;  
 $A_1$  – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis esant 230 nm.

### 2.3.6. Susintetintų karboksilatų ABTS radikalo slopinimo tyrimas

#### Tyrimui naudoti reagentai:

ABTS tabletė; fosfatinis buferis (pH = 7,4); kalio persulfatas; DMSO ištirpinti tiriamieji junginiai (1 mg/ml).

#### Tyrimo eiga [31]:

Paruošti tiriamieji junginiai ištirpinti DMSO (1 mg/ml). Pagamintas ABTS reagentas: 10 mg 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfoninės rūgšties)diamonio druskos tabletė (2 mM) sumaišyta su kalio persulfatu (0,17 mM), kuris ištirpintas fosfatiname buferyje (20 mM). Reagentas laikytas per naktį. Į 0,5 ml tiriamuosius tirpalus įpilta po 1 ml fosfatinio buferio ir 0,3 ml ABTS reagento. Mėginiai išmaišyti ir spektrofotometru išmatuota biologiškai aktyvių junginių šviesos sugertis esant 734 nm bangos ilgiui. Gautiems rezultatams palyginti išmatuota ABTS reagento šviesos sugertis.

#### ABTS slopinimo apskaičiavimas:

$$\text{Slopinimas, \%} = \left( \frac{A_{\text{kontr.}} - A_{\text{tiriam.}}}{A_{\text{kontr.}}} \right) \times 100$$

$A_{\text{kontr.}}$  – kontrolės mišinio šviesos sugerties dydis esant 734 nm;

$A_{\text{tiriam.}}$  – tiriamos medžiagos mėginio šviesos sugerties dydis esant 734 nm.

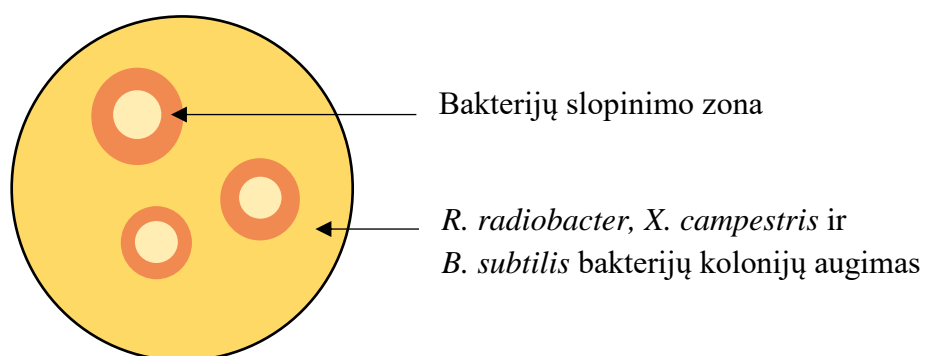
### 2.3.7. Susintetintų karboksilatų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

#### Tyrimui naudoti reagentai:

DMSO ištirpinti tiriamieji junginiai (1 mg/ml); antibiotikas *Ciprofloxacin Actavis*; *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus subtilis* bakterijų suspensijos.

#### Tyrimo eiga [32]:

Susintetintų junginių antibakterinis aktyvumas tirtas naudojant agarą diskų difuzinį metodą: ant paruoštos ir *Petri* lėkštelėse sustingusios Luria-Bertani (LB) terpės užpiltos ir kilpele tolygiai paskirstytos *R. radiobacter*, *X. campestris* ir *B. subtilis* bakterijų suspensijos (50 µl). Ant kiekvienos lėkštelės uždėta po 6 sterilius popierinius filtro diskelius, kurie suvilgyti tiriamųjų junginių, ištirpintų DMSO, tirpalais (po 25 µl ant kiekvieno diskelio). Kontroliniams diskeliams naudotas antibiotikas *Ciprofloxacin Actavis* (50 µg/ml). *Petri* lėkštelės termostatuotos 37 °C temperatūroje 24 val. Po paros stebėtas ir palygintas bakterijų augimo slopinimas bei įvertintas junginių antibakterinis aktyvumas.



2.1 pav. Antibakterinio aktyvumo įvertinimas diskų difuziniu agaru metodu

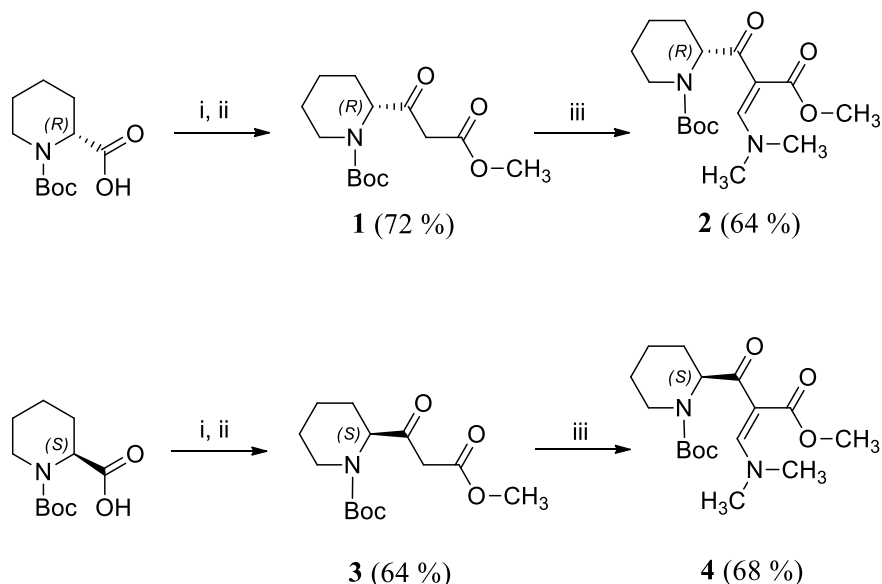
### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo fragmentą, sintezė

##### 3.1.1. Pradinių junginių sintezė

Peptidai demonstruoja platų biologinių savybių spektrą, yra plačiai naudojami farmacijos pramonėje, įeina į daugelio vaistų sudėtį [4]. Atliekant mokslinius tyrimus pastebėta, kad į peptidų struktūrą įterpus pirazolo žiedą, sustiprėja junginių antioksidacinės, antibakterinės ir antivirusinės savybės. Nustatyta, kad tinkama junginių konfigūracija ir halogenų įterpimas į struktūrą lemia stiprų priešvėžinį aktyvumą [19]. Siekiant optimizuoti tokių peptidų gamybą bei praplėsti jų panaudojimo galimybes biotechnologijoje, atlikta aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezė ir stuktūros analizė.

Atsižvelgiant į literatūros apžvalgoje aprašomas piperidino ir pirazolo biologines savybes, pradiniu junginiu naujų aminorūgščių darinių sintezei pasirinkta 1-(tret-butoksikarbonil)piperidin-2-karboksirūgštis, kuri per keletą sintezės stadijų pakeičiama į  $\beta$ -keto esterį (junginiai **1** ir **3**). Pirmiausiai, pradinis junginys, chiraliskai gryna atitinkama karboksirūgštis, ištirpinta DCM ir sumaišyta su 1,1 ekv. Meldrumo rūgšties bei 2 ekv. bazės DMAP. Reakcijos mišinys patalpintas į ledų vonelę ir atšaldžius iki 0 °C temperatūros, mažomis porcijomis suberta 1,1 ekv. aktyviausio EDC·HCl. Reakcija vykdyta 18 val. kambario temperatūroje. Reakcijos metu susidaro tret-butil-2-(3-metoksi-3-oksopropanoil)piperidin-1-karboksilat, kuris praskiestas DCM ir plautas 1M KHSO<sub>4</sub> ir sotaus NaCl vandeniniais tirpalais. Surinktas organinėje fazėje esantis reakcijos produktas išdžiovintas bevandeniu Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ir nufiltruotas. Distiliacijos būdu pašalinus tirpiklį, reakcijos mišinys ištirpintas metanolyje ir kaitintas 18 val. 60 °C temperatūroje (3.1 schema). Plonasluoksnės chromatografijos metodu nustatius reakcijos baigtį, gautų junginių išeiga siekė 64–72 %.



*Reakcijų sąlygos:* i: Meldrumo rūgštis, DMAP, EDC·HCl, DCM, 0 °C - k.t., 18 val.; ii: MeOH, 60 °C, 18 val.; iii: 1,4-dioksanas, *N,N*-dimetilacetamido dimetilacetalis, 100 °C, 5 val.

**3.1 schema**

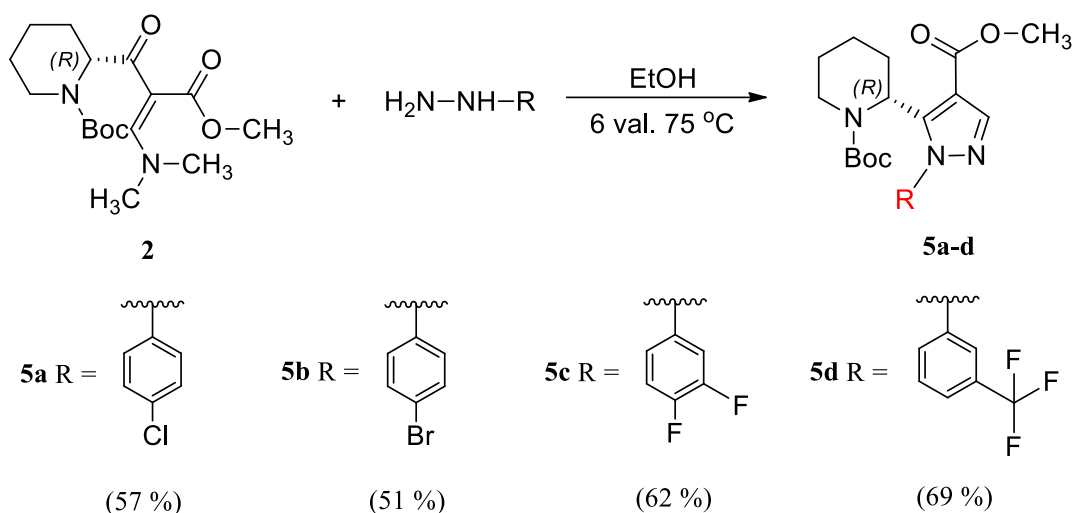


Gauti junginiai (**1** ir **3**) panaudoti prijungimo reakcijoje, kurios metu ištirpinti 1,4-dioksane ir veikti 2 ekv. *N,N*-dimetilacetamido dimetilacetaliu. Reakcija vykdyta 5 val. 100 °C temperatūroje, glicerolio vonelėje ant magnetinės maišyklės. Po reakcijos gauti mišiniai gryninti kolonėlinės chromatografijos būdu, naudojant eliuentą: heksanas – etilacetatas, tūriniu santykiu 1:1. Gauti atitinkamų *S* ir *R* izomerų dimetilamino junginiai (**2** ir **4**), kurių išeiga po gryninimo siekė 64–68 %, panaudoti naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezei.

### 3.1.2. Pirazolo junginių sintezė

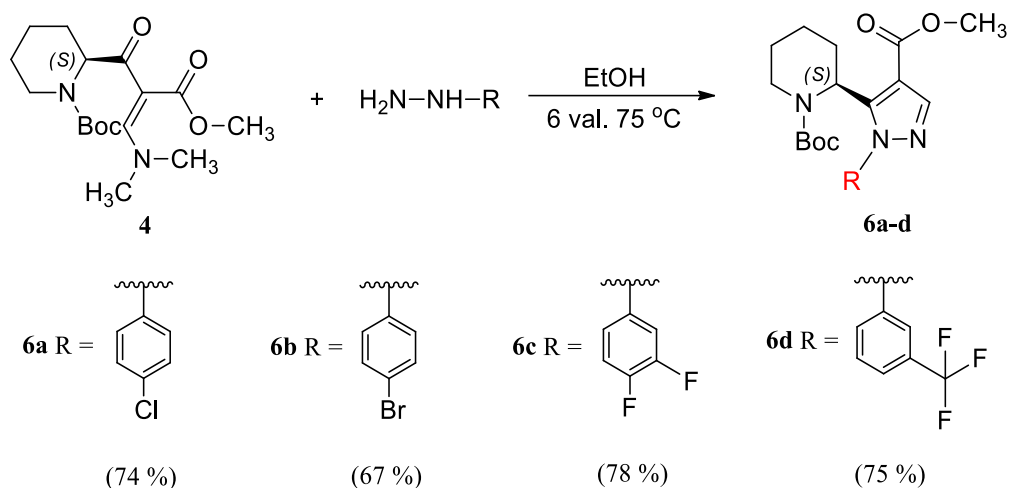
Siekiant susintetinti pirazolo žiedą turinčius junginius, vykdyta organinėje chemijoje naudojama *Knorr* sintezė, kurios metu 1,3-dikarbonilo junginiai veikti įvairiais hidrazinų dariniais. Nukleofilinės reakcijos metu suformuojamas pirazolo žiedas. Tokio tipo reakcijoms reikalingas stiprus nukleofilas ir didelė energija [33].

Tret-butyl-(2*R*)-2-[2*Z*]-3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)prop-2-enoil]piperidin-1-karboksilatas (**2**) ištirpintas etanolyje. Į mišinį įdėti įvairius halogenų pakaitus turintys hidrazino hidrochloridai (1,2 ekv.) ir reakcija vykdyta 6 val. 75 °C temperatūroje (3.2 schema). Po 6 val. reakcijos baigtis nustatyta plonasluoksnės chromatografijos būdu. Distiliacijos metu pašalinus tirpiklį, medžiagos gryninimui pasirinktas kolonėlinės chromatografijos metodas.



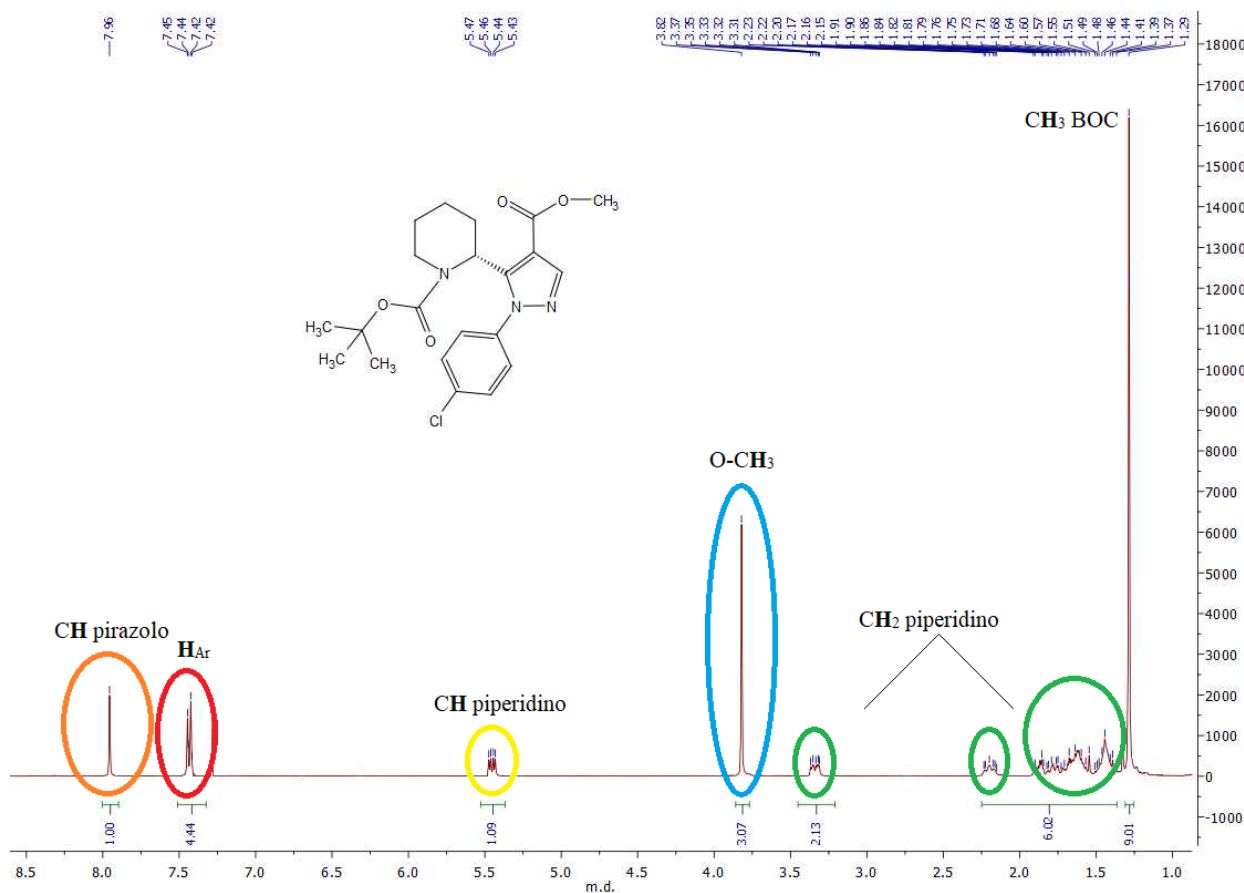
3.2 schema

Analogiškomis sąlygomis atlikta aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, sintezė, naudojant *S* izomerą, pradinį junginį tret-butyl-(2*S*)-2-[2*Z*]-3-(dimetilamino)-2-(metoksikarbonil)prop-2-enoil]piperidin-1-karboksilatą (**4**) (3.3 schema). Gautų izomerinių junginių **5a-d** bei **6a-d** grynumas ir struktūros patvirtintos IR,  $^1H$  ir  $^{13}C$  BMR spektroskopiniais, masių spektrometriniais bei specifinio sukimo kampų tyrimų duomenimis.



### 3.3 schema

Junginio **5a**  $^1H$  BMR protoniniame spektre (3.1 pav.) stebimas tret-butiloksidikarbonilo grupei būdingas singletas ties 1,29 m.d. Piperidino žiedo  $CH_2$  grupių protonų multipletai matomi alifatinėje spektro dalyje 1,36–1,91 m.d., 2,15–2,23 m.d. bei 3,31–3,37 m.d. intervaluose. Ties 5,37–5,51 m.d. fiksuojamas deekranuotas piperidino CH grupės protonas. Pirazolo žiedo smailė matoma ties 7,96 m.d., šalia 7,30–7,52 m.d. ribose išsidėstę aromatiniam žiedui būdingi signalai. Esterinės grupės buvimą junginyje patvirtina ties 3,82 m.d. esantis, metilų žymintis singletas.



3.1 pav. Junginio **5a**  $^1H$  BMR ( $CDCl_3$ ) spektras

Junginio **5a**  $^{13}\text{C}$  BMR spektre stebimas anglinių atomų išsidėstymas. Ties 28,4 m.d. fiksuojamas tretbutiloksikarbonilo grupei būdingas signalas, žymintis trijų  $\text{CH}_3$  grupių buvimą. 19,3–51,5 m.d. intervale matomi piperidino žiedui būdingi CH ir  $\text{CH}_2$  grupių anglies atomai. Ties 50,8 m.d. išsidėsčiusi esterio grupės metilui būdinga smailė. Stipresnio lauko srityje, nuo 111,5 iki 150,9 m.d. stebimi aromatinių fenilo ir pirazolo žiedų angliniai signalai. Tolimesnėje spektro dalyje matomos dvi,  $\text{C}=\text{O}$  grupei priklausančios anglies atomų smailės, atitinkamai ties 155,1 ir 163,8 m.d. Karbonilinių grupių buvimą junginyje taip pat patvirtina IR spektruose užfiksuotos, ties  $1697\text{ cm}^{-1}$  ir  $1716\text{ cm}^{-1}$  esančios absorbcijos juostos.

Struktūros analizė ir tyrimas atliktas visiems susintetintiems pirazolo dariniams (**5a–d** ir **6a–d**). Nustatyta, kad gautų produktų  $^1\text{H}$  BMR spektre tretbutiloksikarbonilo, esterio  $\text{O}-\text{CH}_3$  ir pirazolo žiede esančios CH grupės protonai stebimi singletu panašiuose intervaluose. Piperidino  $\text{CH}_2$  grupių signalai fiksuojami atitinkamai 1,36–1,98 m.d., 2,12 – 2,28 m.d. ir 3,25–3,44 m.d. srityse. 5,25–5,51 m.d. intervale stebimas piperidino CH grupės multipletas. Aromatinio žiedo protonai matomi 7,30–7,82 m.d. ribose imtinai. IR spektruose *R* ir *S* izomerų, turinčių 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilato fragmentą, intervale nuo  $1696\text{ cm}^{-1}$  iki  $1720\text{ cm}^{-1}$  matomos dvi,  $\text{C}=\text{O}$  grupei būdingos absorbcijos juostos.

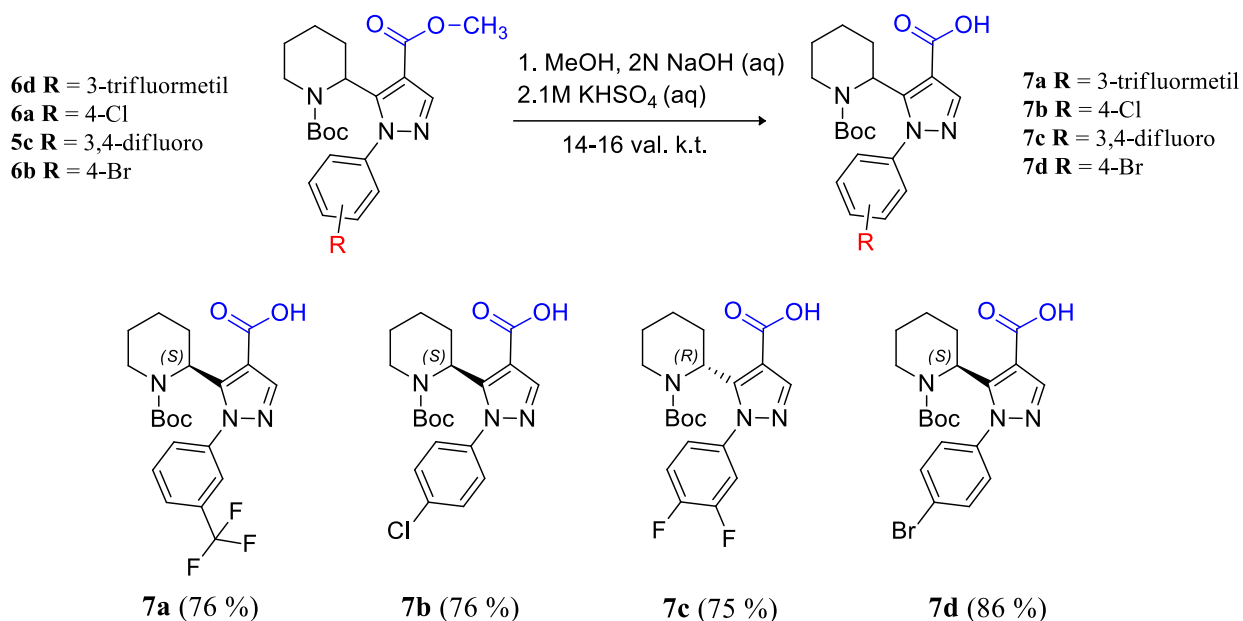
### 3.1.3. Piperidin-2-il-1*H*-pirazol-4-karboksirūgščių sintezė

Amidinio ryšio formavime dalyvauja karboksirūgštys ir aminorai, tarpusavyje sudarydami  $-\text{CONH}-$  grupę. Šiuo tikslu, susintetintiems aminorūgščių dariniams, turintiems pirazolo fragmentą, taikyta hidrolizės reakcija, kurios metu šarminiame tirpale esterio  $-\text{COOR}-$  grupė pakeičiama karboksilo grupe  $-\text{COOH}-$  [34].

Atrinkti 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatams (junginiai **6a**, **6b**, **5c**, **6d**) ištirpinti metanolyje. Į reakcijos mišinį švirkštu sulašinti 2 ekv. 2N NaOH vandeninio tirpalo. Reakcija vykdyta 14–16 val. kambario temperatūroje (3.4 schema). Nustaćius reakcijos baigtį, tirpiklis nudistiliuotas ir gautas reakcijos mišinys išpiltas į vandenį ir ekstrahuotas etilacetatu, atsikratant organinėje fazėje likusių nesureagavusių pradinių junginių. Naudojant  $\text{KHSO}_4$  vandeninį tirpalą, vandeninėje fazėje esantis produktas perkeltas į organinę fazę, praskiestas etilacetatu ir plautas vandeniu bei sočiu NaCl tirpalu. Išgryninus produktą, surinkta organinė fazė išdžiovinta bevandeniu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nufiltruota ir sukoncentruota. Gauti *S* ir *R* izomerai, kurių išeiga siekė 75–86 %.

Atlikus gautų karboksirūgščių (**7a–d**) struktūros analizę nustatyta, kad po hidrolizės reakcijos  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektruose neliko esterio grupę žyminčio metilo singletas – jį pakeitė  $-\text{OH}-$  grupės protonas, kuris dėl mainų procesų ir galimybės lengvai sudaryti vandenilinius ryšius nedidelį singletą demonstruoja stipresnėje lauko dalyje, nuo 3,42 iki 3,50 m.d. intervaluose imtinai [35].

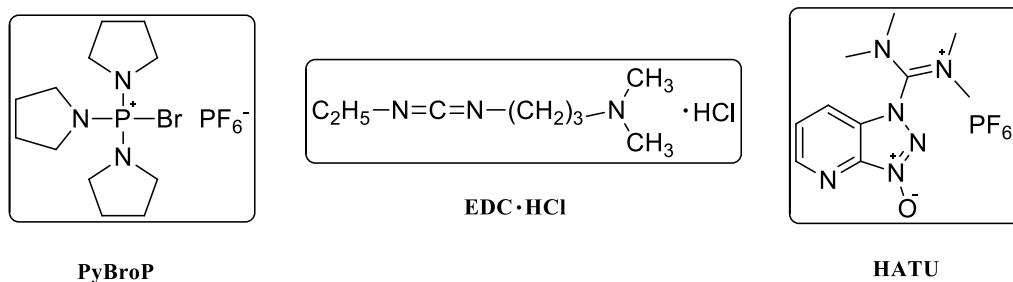
Likusiems 1*H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatams (junginiai **5a**, **5b**, **6c** ir **5d**) pašalinta apsauginė tretbutiloksikarbonilo grupė, naudojant stiprią trifluoracto rūgštį (1 ml) ir DCM tirpiklį (1 ml). Po 15 min. reakcijos kambario temperatūroje, distiliacijos metodu pašalintas tirpiklis [36]. Gauti  $-\text{NH}-$  grupę turintys aminorai, pasiruošę dalyvauti amidinio ryšio formavimo reakcijose.



### 3.4 schema

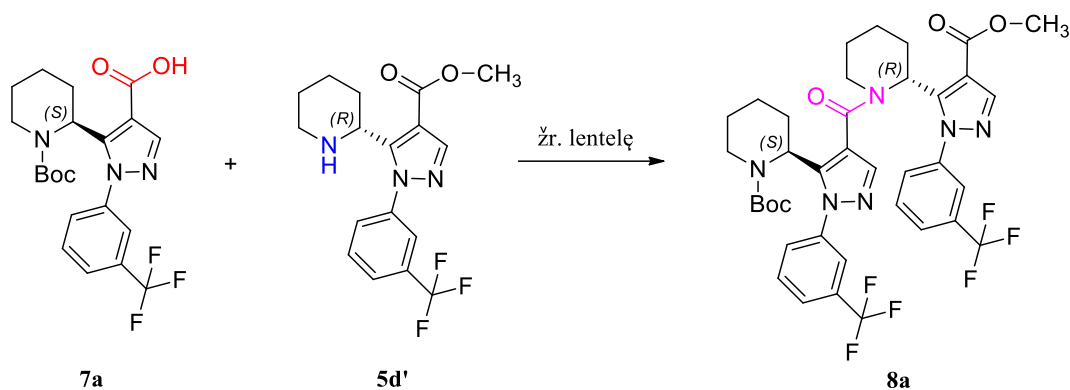
#### 3.1.4. Karboksilatų, turinčių amidinę grupę, sintezė

Vis didėjant naujų ir sudėtingesnių peptidų struktūrų paklausai, svarbi užduotis tampa sukurti efektyvias peptidų sintezės strategijas naudojant universalius ir ekonomiškus reagentus [3]. Šio tyrimo metu atlikta dipeptido tret-butyl-(2*S*)-2-{4-[(2*R*)-2-{4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-5-il]}piperidin-1-karbonil]-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1*H*-pirazol-5-il}piperidin-1-karboksilato (**8a**) sintezė ir reakcijos sąlygų optimizavimas. Siekiant nustatyti geriausias reakcijos sąlygas formuojant amidinį ryšį, dipeptidų sintezei parinkti moksliniuose šaltiniuose aprašomi karbodiimido, fosfonio ir aminorūgščių druskų jungiamieji reagentai (3.2 pav.).



3.2 pav. Peptidų sintezės optimizavimui naudoti jungiamieji reagentai

Amidinio ryšio formavimas pagrįstas vienu funkcinę grupių apsaugojimu, o kitų – aktyvinimu. Aktyviomis turi būti funkcinės grupės, sudarančios peptidinę jungtį – vienos aminorūgšties karboksigrupė ir kitos aminorūgšties aminogrupė (3.5 schema) [37]. Tiesioginė kondensacijos reakcija tarp aminorūgščių liekanų aminogrupės ir karboksigrupės yra įmanoma tik labai aukštoje temperatūroje ( $T > 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tokios termiškai nepalankios reakcijos sąlygos peptidų sintezei negali būti taikomos dėl didelio junginių jautrumo [38]. Dėl šios priežasties amidinio ryšio formavimo reakcijose naudojami jungiamieji reagentai ir aktyvatoriai, galintys žemoje temperatūroje aktyvinti aminorūgščių darinių susijungimą bei stabdyti šalutinių reakcijų susidarymą [37].



3.5 schema

Reakcijai optimizuoti parinkti EDC·HCl, PyBroP ir HATU jungiamieji reagentai. Junginiai lengvai ištirpinti koncentruotame kiekyje DCM, todėl reakcija vykdyta kambario temperatūroje ant magnetinės maišyklės. Reakcijų eiga bei baigtis stebėta plonasluoksnės chromatografijos metodu. Amidinio ryšio formavimo sąlygos ir gautų produktų išeigos pateiktos ir palygintos 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Junginio **8a** sintezės sąlygų optimizavimas

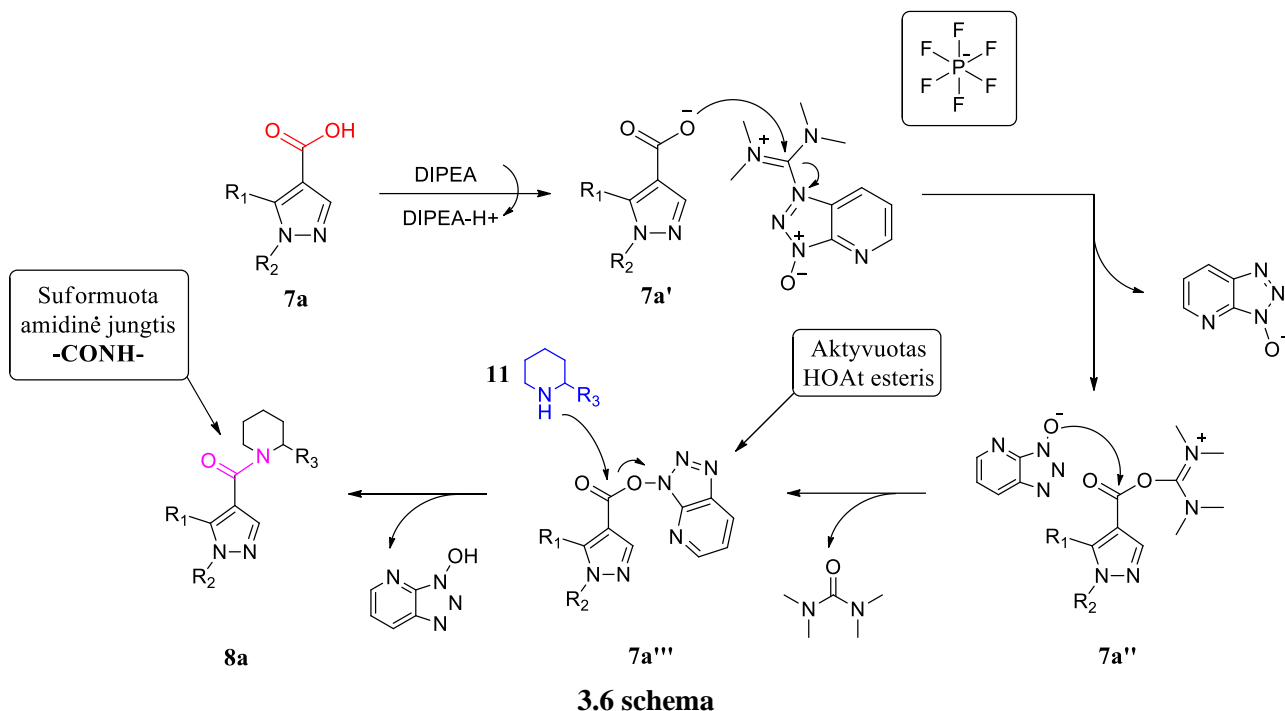
Nr.	Jungiamasis reagentas	Priedas	Bazė	Tirpiklis	Laikas	Išeiga, %
1	EDC·HCl	HOBt	DIPEA	DCM	18 val.	17
2	PyBroP	-	DIPEA	DCM	12 val.	35
3	HATU	-	DIPEA	DCM	4 val.	67

Pirmiausiai peptidų sintezė vykdyta naudojant karbodiimido jungiamąjį reagentą. Karboksirūgštis (**7a**) ištirpinta DCM, į atšaldytą reakcijos mišinį įdėti 1,2 ekv. jungiamojo reagento EDC·HCl, 1 ekv. hidroksilamino priedo HOBt ir 2 ekv. bazės DIPEA. Rūgšties aktyvavimas vykdytas 0 °C temperatūroje 30 min. Plonasluoksnės chromatografijos metodu nustatius rūgšties komplekso susidarymą ir pašalinus apsauginę *N*-galo tret-butiloksikarbonilo grupę, į rūgšties kompleksą pridėtas aminas (**5d'**) ir reakcija vykdyta 18 val. kambario temperatūroje. *In situ* reakcijos metu karboksilo grupė, kartu su karbodiimido jungiamuoju reagentu suformuoja O-acilokarbamidą, kuris reaguodamas su aminu suformuoja amidinę jungtį [3]. Gauto junginio išeiga – 17 %.

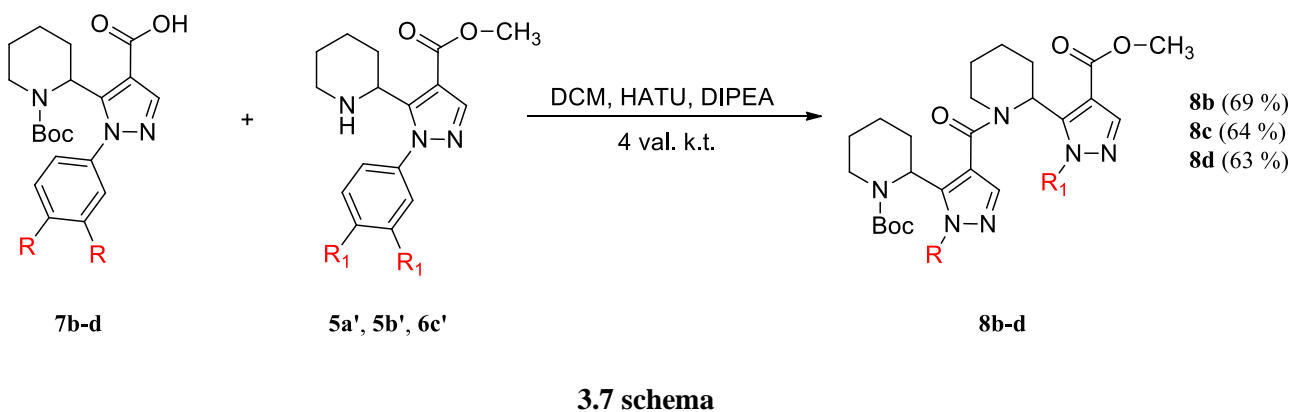
Vėliau, reakcija vykdyta naudojant fosfonio katijoną turintį jungiamąjį reagentą – PyBroP. DCM tirpiklyje ištirpinta karboksirūgštis (**7a**), aminas (**5d'**), pridėti 3 ekv. bazės DIPEA. Reakcijos mišinys atšaldytas ledo vonelėje iki 0 °C temperatūros ir pridėtas 1,1 ekv. jungiamojo reagento PyBroP. Reakcija vykdyta 12 val., jos baigtis nustatyta plonasluoksnės chromatografijos būdu. Amidinės jungties formavimo metu susidaro aktyvus acetilbromidas, kuris, suformavus peptidinį ryšį, atskyla nuo molekulės bromido anijono Br<sup>-</sup> pavidalu [39]. Gauto produkto išeiga – 35 %.

Siekiant maksimaliai sumažinti racemizaciją ir padidinti peptidų sintezės efektyvumą, tolimesniam reakcijos optimizavimui panaudotas didelio reaktyvumo HATU jungiamasis reagentas. DCM tirpiklyje ištirpinta karboksirūgštis (**7a**), kuri atšaldyta iki 0 °C temperatūros. Į reakcijos mišinį įpilti 2 ekv. bazės DIPEA ir 1 ekv. HATU. Po 15 min. sudėtas aminas (**5d'**), ištirpintas DCM su 1 ekv. DIPEA. Reakcijos eiga tikrinta plonasluoksnės chromatografijos metodu, po 4 val. nustatyta reakcijos baigtis. Peptido sintezės metu aminorūgšties karboksigrupės O–H ryšys nutrūksta ir susidaro karboksilato (**7a'**) anijonas (**7a''**), kuris veikdamas su HATU, sudaro aktyvųjį HOAt esterį (**7a'''**). Į

reakcijos mišinį pridėjus amina, įvyksta nukleofilinė ataka, kurios metu suformuojamas –CONH–peptidinis ryšys [40]. Gauto tikslinio produkto (**8a**) išeiga – 67 %. Reakcijos su HATU mechanizmas pavaizduotas 3.6 schemeje.

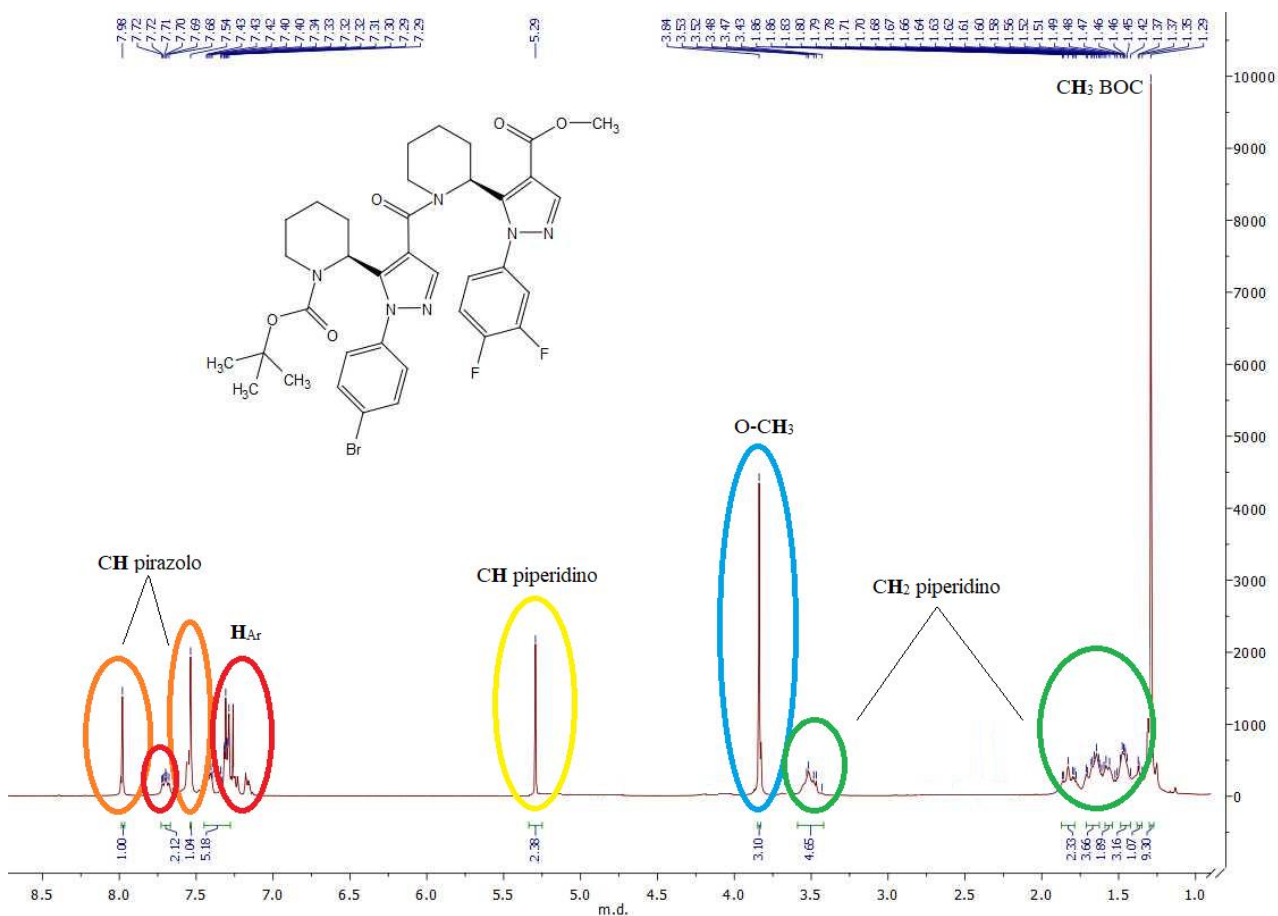


Atlikus peptidų sintezę naudojant įvairius jungiamuosius reagentus nustatyta, kad tokio tipo peptidų sintezei didžiausią išeigą, efektyviausią reakcijos greitį ir mažiausią racemizacijos laipsnį pademonstravo HATU jungiamasis reagentas, todėl toliau aminorūgščių jungimas vykdytas pagal aukščiau aprašytą metodiką. Optimizuotomis sąlygomis įvykdyta *R* ir *S* izomerų peptidų **8b–d** sintezė. Bendra amidinio ryšio formavimo strategija ir gautų junginių išeigos pateiktos 3.7 schemeje. Gautų karboksilatų, turinčių amidinę grupę, grynumas bei struktūros patvirtintos IR, BMR spektroskopiniais bei masių spektrometriniais duomenimis.



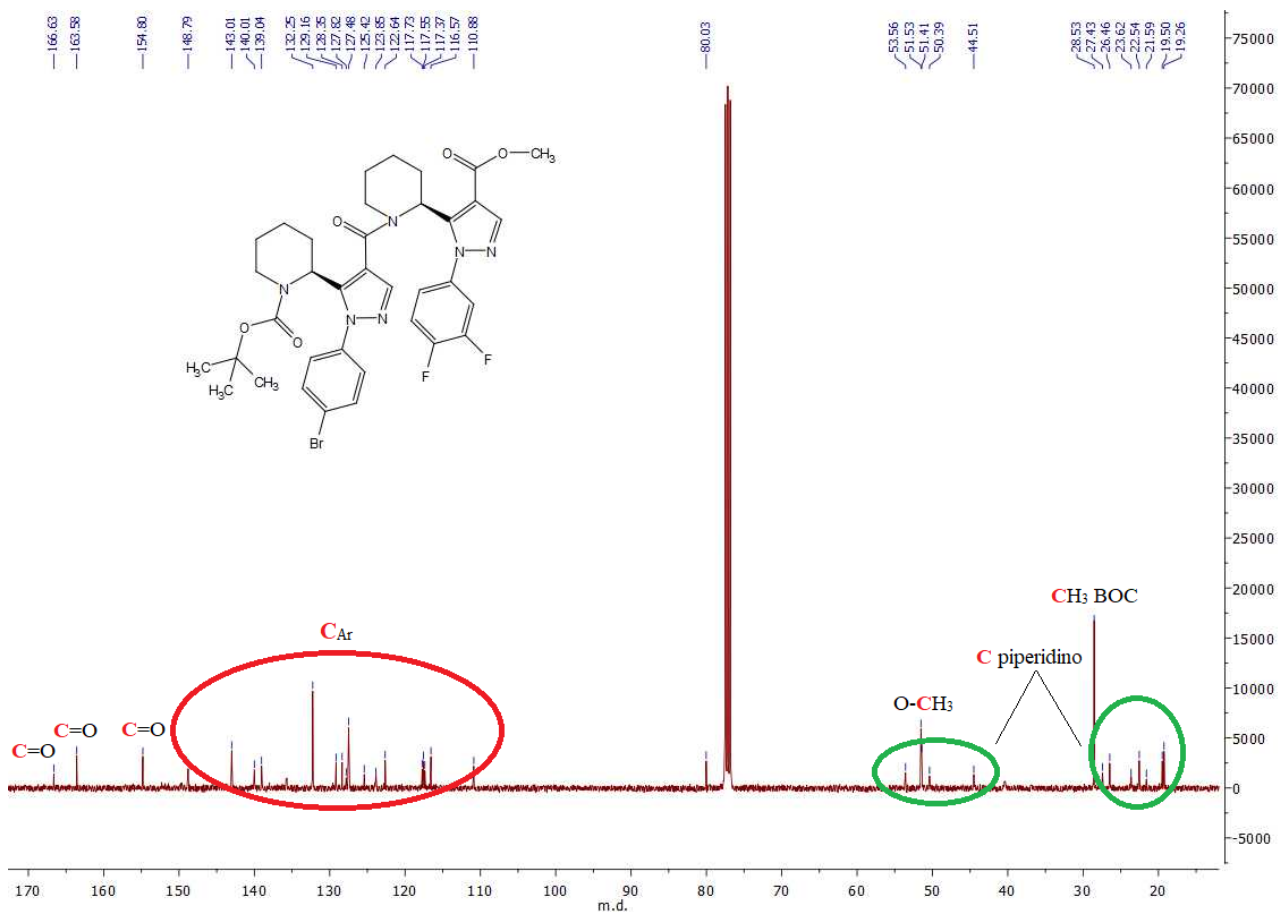
Junginio **8d** protonų spektre (3.3 pav.) stebimas aiškus tret-butiloksidikarbonilo grupei būdingas singletas ties 1,29 m.d. Nuo 1,35 iki 3,53 m.d. intervale fiksuojami dviejuose piperidino žieduose esantys CH<sub>2</sub> grupių multiplėtai. Kitas ryškus singletas ties 3,84 m.d. priklauso metilo esterio grupei. Intervale 5,26–5,29 m.d. stebimos dvi piperidino CH grupės, kurios dėl struktūroje netoli esančių heteroatomų deekranuojamos į silpnesnių laukų pusę. Pirazolo žieduose esantys protonai matomi

singletų pavidalu ties 7,54 bei 7,98 m.d., šalia jų 7,29–7,72 m.d. ribose išsidėsčiusios aromatiniams žiedams būdingos smailės.



3.3 pav. Junginio **8d**  $^1\text{H}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektras

3.4 pav. pateiktas **8d** junginio anglies atomų išsidėstymas. Nuo 19,3 iki 51,5 m.d. stebimi piperidino žieduose esantys CH ir  $\text{CH}_2$  grupių anglies atomai. Šiose ribose, ties 28,5 m.d. išsiskiria aukštas, tretbutiloksikarbonilo grupei būdingas signalas, žymintis trijų  $\text{CH}_3$  grupių buvimą. Esterio grupę junginyje patvirtina ties 53,6 m.d. esanti anglies atomo smailė. Stipresnio lauko srityje, nuo 110,9 iki 148,8 m.d. fiksuojami aromatiniams žiedams – pirazolui ir fenilui – priklausantys anglies atomų signalai. Spektre stebimos trys  $\text{C}=\text{O}$  grupių smailės, ties 154,8 m.d., 163,6 m.d. bei 166,6 m.d. atitinkamai. Karbonilinių grupių buvimą junginyje taip pat patvirtina IR spektrai – ties  $1689\text{ cm}^{-1}$  ir  $1719\text{ cm}^{-1}$  fiksuojamos charakteringos  $\text{C}=\text{O}$  grupių absorbcijos juostos.



3.4 pav. Junginio **8d**  $^{13}\text{C}$  BMR ( $\text{CDCl}_3$ ) spektras

Struktūros analizė ir tyrimas atliktas visiems susintetintiems karboksilatams, turintiems amidinę grupę (**8a–d**). Nustatyta, kad gautų junginių  $^1\text{H}$  ir  $^{13}\text{C}$  BMR spektruose stebimi signalai išsidėstę panašiuose intervaluose. Protoniniame spektre tretbutiloksikarbonilo ir esterio  $-\text{OCH}_3$  grupėms būdingi singletai fiksuojami ties 1,29 m.d. ir 3,81–3,85 m.d. srityje atitinkamai, tuo tarpu piperidino žieduose esantys  $\text{CH}_2$  grupių protonai išsidėsto 1,32–3,84 m.d. ribose imtinai. Piperidino žiedams priklausančios dvi  $\text{CH}$  grupės žymimos 5,12–5,32 m.d. intervaluose, o silpnesnių laukų pusėje nuo 7,27 iki 7,88 m.d. imtinai fiksuojami aromatinių žiedų protonai. Šalia konjuguotoms sistemoms būdingų multipletų signalų, 7,24–8,03 m.d. ribose išsiskiria ryškūs singletai, žymintys pirazolo žiedui būdingas  $\text{CH}$  grupes. Junginiuose esančias  $\text{C}=\text{O}$  grupės patvirtina atlikti  $^{13}\text{C}$  BMR bei IR tyrimai: angliniame spektre išsidėsčiusios karbonilinės grupės fiksuojamas cheminis poslinkis 148,2–168,2 m.d. intervaluose imtinai. Šių grupių intensyvios absorbcinės juostos nustatytos 1690–1720  $\text{cm}^{-1}$  srityje.



### 3.2. Naujų aminorūgščių darinių, turinčių pirazolo žiedą, biologinių savybių tyrimų rezultatai

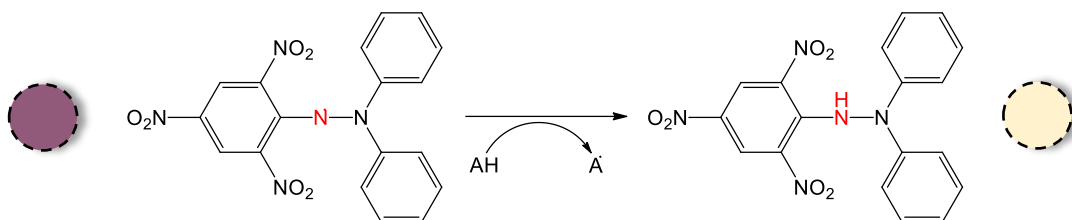
3.2 lentelė. Biologinių savybių tyrimuose analizuoti junginiai

Junginys	Cheminė formulė	Struktūrinė formulė	Junginio pavadinimas
5a	$C_{21}H_{26}ClN_3O_4$		Tret-butil-(2 <i>R</i> )-2-[1-(4-chlorofenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
5b	$C_{21}H_{26}BrN_3O_4$		Tret-butil-(2 <i>R</i> )-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
5c	$C_{21}H_{25}F_2N_3O_4$		Tret-butil-(2 <i>R</i> )-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
5d	$C_{22}H_{26}F_3N_3O_4$		Tret-butil-(2 <i>R</i> )-2-[4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluorometil)fenil]-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
6a	$C_{21}H_{26}ClN_3O_4$		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[1-(4-chlorofenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
6b	$C_{21}H_{26}BrN_3O_4$		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas

Junginys	Cheminė formulė	Struktūrinė formulė	Junginio pavadinimas
6c	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
6d	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
8a	C <sub>38</sub> H <sub>40</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[4-[(2 <i>R</i> )-2-[4-(metoksikarbonil)-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil]-1-[3-(trifluormetil)fenil]-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
8b	C <sub>36</sub> H <sub>40</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[1-(4-chorfenil)-4-[(2 <i>R</i> )-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil]-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
8c	C <sub>36</sub> H <sub>39</sub> BrF <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>		Tret-butil-(2 <i>R</i> )-2-[4-[(2 <i>R</i> )-2-[1-(4-bromfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil]-1-(3,4-difluorfenil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas
8d	C <sub>36</sub> H <sub>39</sub> BrF <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>		Tret-butil-(2 <i>S</i> )-2-[1-(4-bromfenil)-4-[(2 <i>S</i> )-2-[1-(3,4-difluorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil]-1 <i>H</i> -pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas

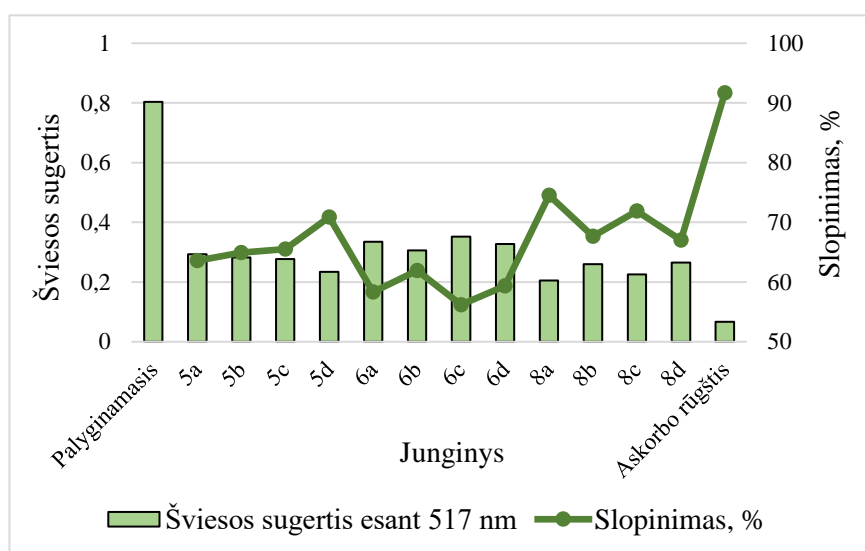
### 3.2.1. Susintetintų biologiškai aktyvių karboksilatų DPPH radikalo slopinimo tyrimas

DPPH radikalo slopinimo tyrimas plačiai naudojamas įvertinant junginių antioksidacinę aktyvumą ir jų gebėjimą skaidyti ar neutralizuoti laisvuosius radikalus. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas – sintetinis radikalas, dėl didelio stabilumo ir techninio jautrumo lengvai pritaikomas biologinėms savybėms tirti. Redukcinės reakcijos metu DPPH, sąveikaudamas su tiriamąja medžiaga, geba prisijungti vandenilio radikalą ir tapti stabilia diamagnetine molekule (3.5 pav.) [41].



3.5 pav. Spalviškai įvertinama DPPH radikalo reakcija su antioksidantu (AH)

Spektrofotometru esant 517 nm bangos ilgiui nustatytos tiriamųjų ir palyginamojo tirpalų šviesos sugertys, apskaičiuotas DPPH radikalo slopinimas (3.6 pav.).

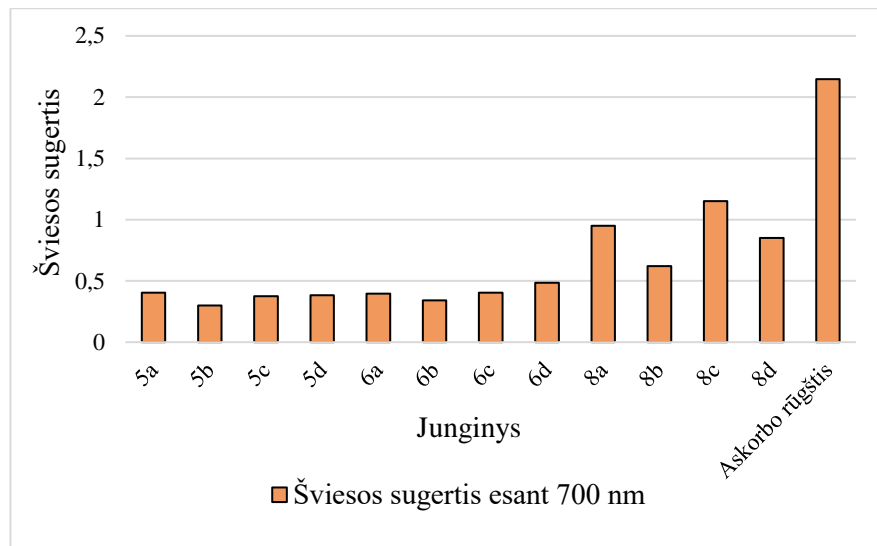


3.6 pav. Tiriamųjų junginių DPPH slopinimo rezultatai

Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis slopinant DPPH radikalą pasižymėjo peptidas **8a**, struktūroje turintis trifluormetilo pakaitus (šviesos sugertis 0,205, slopinimas – 74,5 %). Nustatyta, kad junginys **5d**, peptido **8a** monomerinis vienetas, taip pat pademonstravo stiprų antioksidacinę aktyvumą – šviesos sugertis 0,234, slopinimas – 70,9 %. Apskaičiavus radikalo slopinimą pastebėta, kad *R* konfigūracijos karboksilatai (junginiai **5a–d**) pasižymi didesniu antioksidaciniu poveikiu nei *S* izomerai (junginiai **6a–d**). Susintetintų junginių redukcinės savybės tyrimo metu palygintos su askorbo rūgšties aktyvumu.

### 3.2.2. Sintetinių junginių redukcinių savybių nustatymas

Šiuo metodu spektrofotometru spalviškai įvertintos tiriamųjų junginių redukcinės savybės – kuo didesnė šviesos sugerties vertė, tuo stipresnis junginių redukcinis potencialas (3.7 pav.).

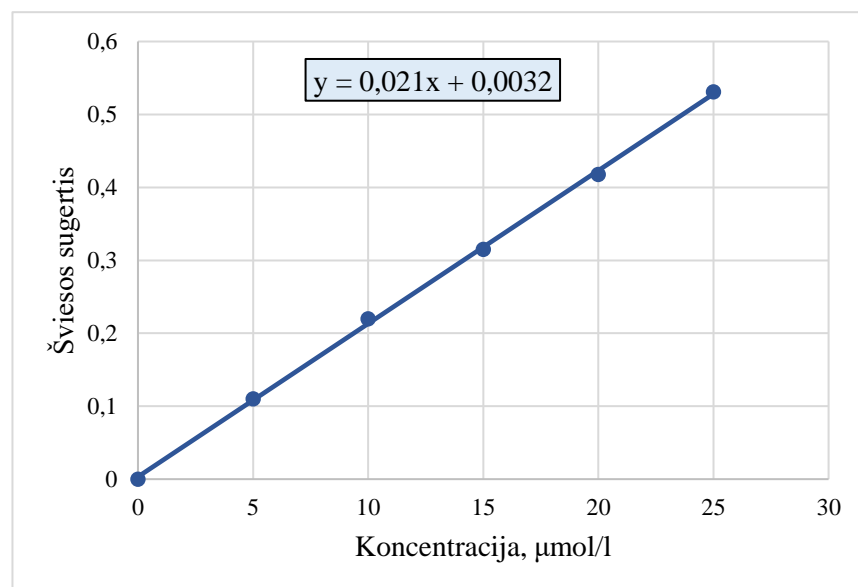


**3.7 pav.** Susintetintų karboksilatų ir peptidų redukcinių savybių rezultatai

Geriausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo peptidai **8a** ir **8c** – reakcijos metu šių junginių spalva pakito iš geltonos į sodriai žalią (šviesos sugertis 0,950 ir 1,150). Pastebėta, kad ir kiti peptidai (junginiai **8b** ir **8d**) pademonstravo aukštesnes absorbcijos vertes už karboksilatus **5a–d** ir **6a–d**, kurių redukcinės savybės panašios. Tyrimas patvirtino, kad susintetinti junginiai pasižymi redukciniu aktyvumu ir geba sudaryti spalvotus kompleksus su metalų druskomis.

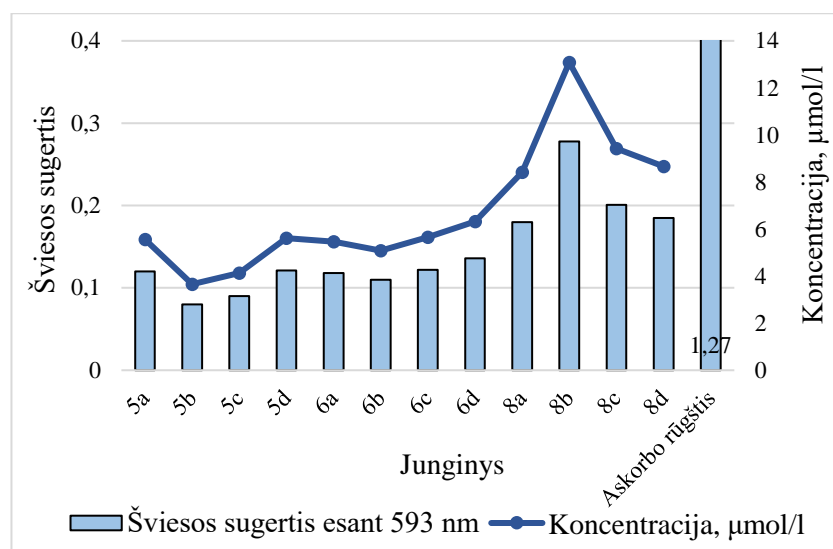
### 3.2.3. Biologiškai aktyvių junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Šiuo metodu nustatytas sintetinių junginių gebėjimas esant žemai pH vertei tirpale redukuoti  $\text{Fe}^{3+}$  į  $\text{Fe}^{2+}$ . Redukcinės savybės įvertintos pagal  $\text{Fe}^{2+}$  koncentraciją, kuri apskaičiuota sudarius kalibracinę  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kreivę (3.8 pav.).



**3.8 pav.**  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kalibracinė kreivė

Pagal gautą lygtį, sudarius  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  kalibracinę kreivę, apskaičiuotos tiriamųjų junginių  $\text{Fe}^{2+}$  koncentracijos (3.9 pav.).

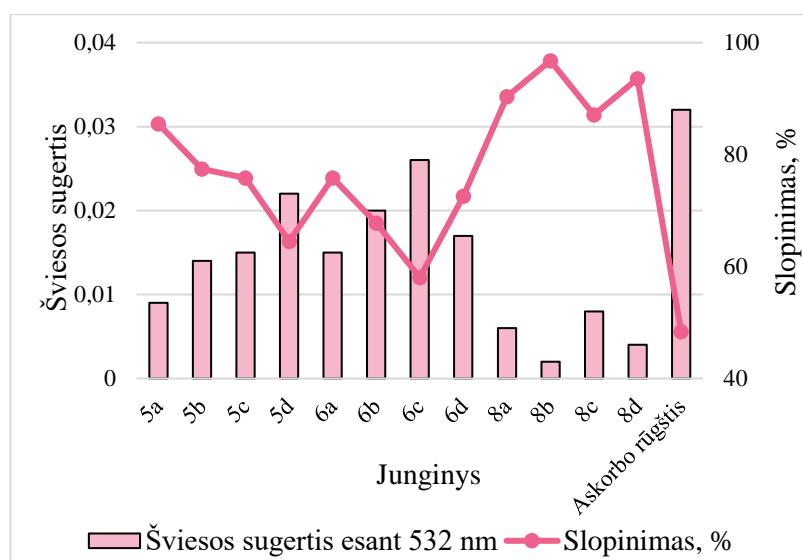


3.9 pav. Susintetintų junginių  $Fe^{2+}$  koncentracijos priklausomybė nuo šviesos sugerties

Spektrofotometru įvertinus aktyvių junginių antioksidacines savybes nustatyta, kad geriausiu rezultatu išsiskyrė junginys **8b** – peptidas, struktūroje turintis chloro pakaitus. Išmatuota šviesos sugertis esant 593 nm bangos ilgiui – 0,278, apskaičiuota junginio  $Fe^{2+}$  koncentracija – 13,09 µmol/l. Pastebėta, kad redukuojant  $Fe^{3+}$  joną peptidai pasižymėjo ženkliai didesniu aktyvumu nei karboksilatai. Gauti rezultatai palyginti su askorbo rūgštimi, plačiai maisto pramonėje ir farmacijoje naudojamu antioksidantu ( $Fe^{2+}$  koncentracija 60,32 µmol/l).

### 3.2.4. Deoksiribozės apsaugos nuo hidroksi- radikalų tyrimas naudojant susintetintus junginius

Šis tyrimas atliktas siekiant įvertinti susintetintų junginių įtaką 2-deoksi-D-ribozės fragmentacijai. Junginiuose esantys antioksidantai geba suardyti hidroksi- radikalus, taip sumažindami deoksiribozės skilimą (3.10 pav.).



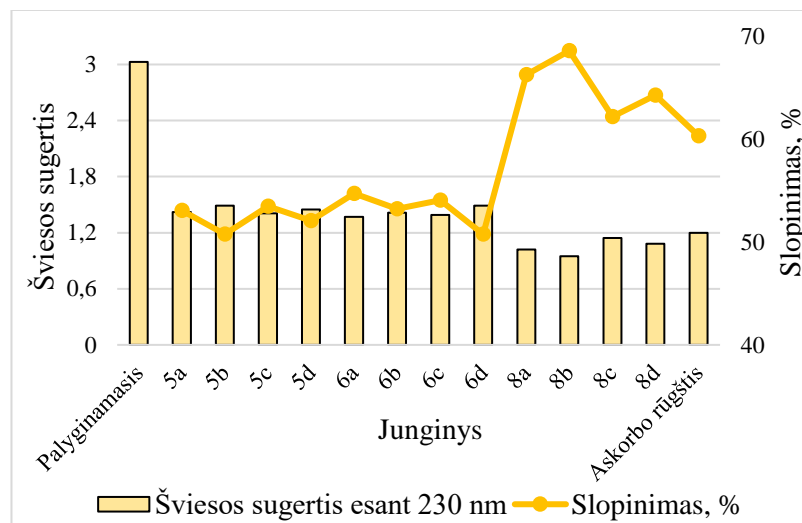
3.10 pav. Tiriamųjų junginių deoksiribozės fragmentacijos slopinimo rezultatai

Išmatavus tiriamųjų junginių šviesos sugertį esant 532 nm bangos ilgiui nustatyta, kad labiausiai deoksiribozės fragmentaciją slopino junginys **8b** – apskaičiuotas slopinimas net 96 %. Tyrimo metu kontrolei naudota askorbo rūgštis parodė mažiausią poveikį suardant hidroksi- radikalus –

apskaičiuotas slopinimas 48 %. Rezultatai patvirtino, kad visi tirti junginiai pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis apsaugant deoksiribozę nuo skilimo.

### 3.2.5. Vandenilio peroksido suardymas naudojant biologiškai aktyvius karboksilatus

Šis metodas skirtas nustatyti susintetintų junginių antioksidacinę aktyvumą slopinant  $H_2O_2$  radikalą. Gauti rezultatai pateikti 3.11 pav.

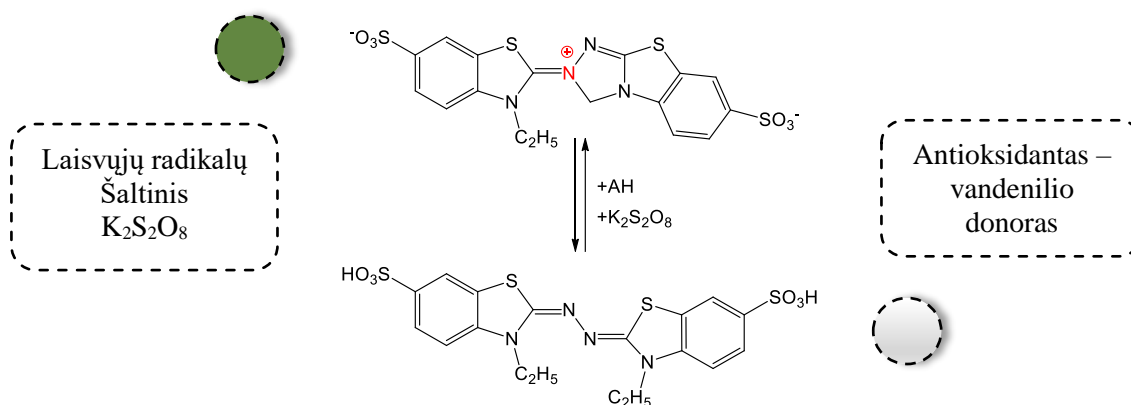


3.11 pav. Tirtų junginių  $H_2O_2$  slopinimo rezultatai

Didžiausią aktyvumą skaidant vandenilio peroksidą pademonstravo junginys **8b** – peptidas, turintis chloro pakaitus. Išmatuota šviesos sugertis – 0,950 (palyginamojo tirpalo 3,026), slopinimas – 68 %. Tuo tarpu askorbo rūgšties slopinimas – 60 %. Rezultatai patvirtino, kad peptidai **8a–d** pasižymėjo stipresniu antioksidaciniu poveikiu (62–68 %) nei jų monomeriniai vienetai **5a–d** ir **6a–d**, kurių apskaičiuotas redukcinis potencialas panašus (50–54 %).

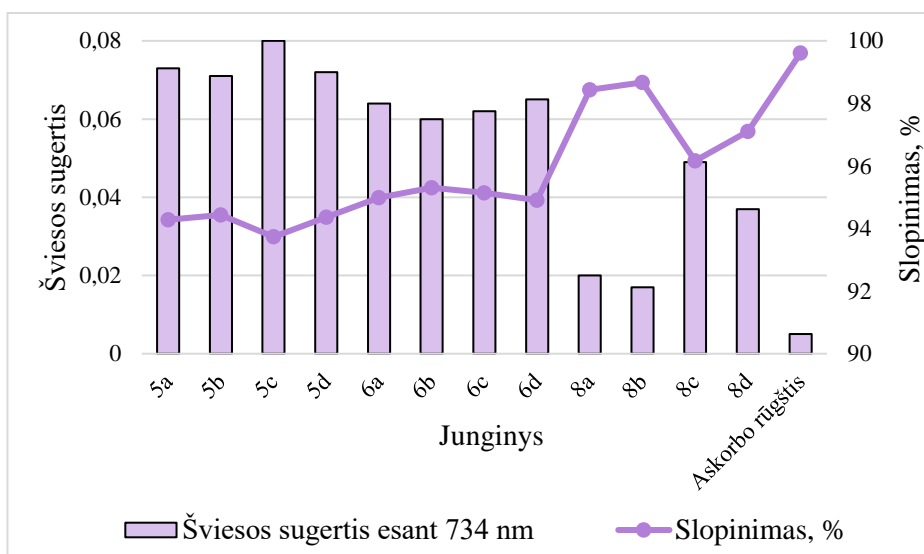
### 3.2.6. Susintetintų karboksilatų ABTS radikalo slopinimo tyrimas

ABTS metodas taikomas siekiant nustatyti antioksidacinę poveikį slopinant laisvųjų radikalų koncentraciją. Šis junginys daugiausiai naudojamas fermentinių reakcijų kinetikoje, dėl ryškiai žalios spalvos lengvai stebimas ir įvertinamas spektrofotometru. Redukcinės reakcijos metu ABTS, reaguodamas su antioksidantais geba prisijungti vandenilio radikalą ir tapti bespalviu tirpalu (3.12 pav.) [42].



3.12 pav. Spalviškai įvertinama ABTS radikalo reakcija su antioksidantu AH ir kalio persulfatu

Pagal spektrofotometru nustatytas tiriamųjų junginių šviesos sugertis apskaičiuotas ABTS radikalo slopinimas (3.13 pav.).

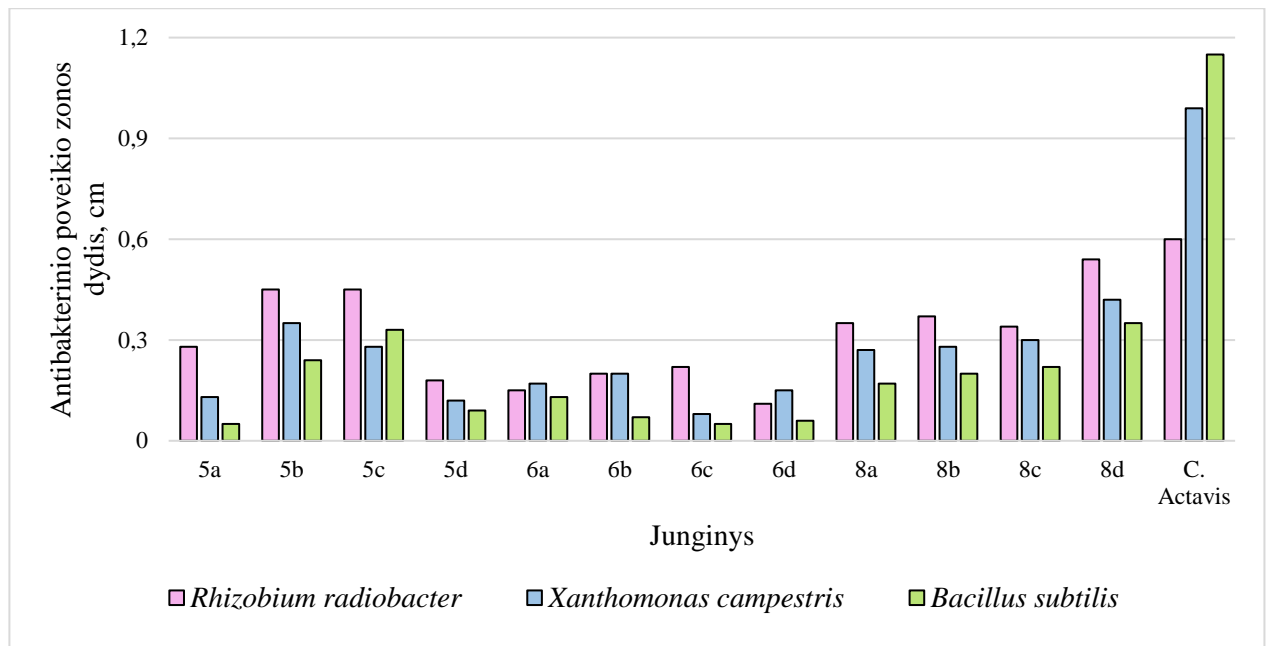


**3.13 pav.** Tiriamųjų junginių ABTS slopinimo rezultatai

Įvykusią reakciją ir nuslopintą ABTS radikalą patvirtino pakitusi tirpalų spalva – iš sodriai žalios tirpalai tapo permatomi ir bespalviai. Esant 734 nm bangos ilgiui, stipriausią antioksidacinę poveikį ir mažiausią šviesos sugertį parodė junginiai **8a** ir **8b** – peptidai, struktūroje turintys trifluormetilo ir chloro pakaitus (0,02 ir 0,017 atitinkamai). Gautas slopinimas – 98 % (askorbo rūgšties slopinimas – 99 %). Iš apskaičiuotų slopinimo verčių nustatyta, kad geresnes redukcines savybes pademonstravo *S* konfigūracijos karboksilatai (junginiai **6a–d**). Rezultatai patvirtino, kad visi tirti junginiai pasižymi dideliu redukciniu potencialu ir geba atiduoti vandenilius slopinant laisvuosius radikalus, ląstelėse sukeliančius negrįžtamus patologinius sutrikimus.

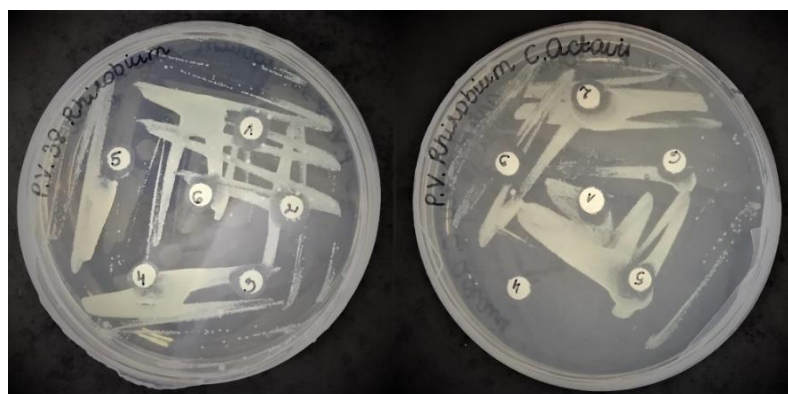
### 3.2.7. Susintetintų karboksilatų antibakterinio aktyvumo įvertinimas

Šiuo tyrimu nustatytas susintetintų karboksilatų ir peptidų, turinčių įvairius halogeninius pakaitus, antibakterinis aktyvumas slopinant *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ir *Bacillus subtilis* bakterijų suspensijas. Po paros laiko stebėtas bakterijų augimo slopinimas, kuris įvertintas išmatavus antibakterinio poveikio zoną aplink tiriamųjų junginių tirpalais sudrėkintus filtro diskelius (3.14 pav.).



**3.14 pav.** *R. radiobacter*, *X. campestris* ir *B. subtilis* bakterijų augimo įvertinimas esant 1000 µg/ml tiriamųjų junginių koncentracijai

Gauti rezultatai palyginti su kontrolei naudotu antibiotiku *Ciprofloxacin Actavis* (50 µg/ml). Didžiausią antibakterinį aktyvumą esant 1000 µg/ml koncentracijai pademonstravo junginys **8d** – peptidas, sudėtyje turintis bromo ir fluoro pakaitus. Poveikio zonos dydis siekė 0,54 cm prieš *R. radiobacter*, 0,42 cm prieš *X. campestris* ir 0,35 cm prieš *B. subtilis* bakterijas. Slopinant *R. radiobacter* bakterijas poveikio zona beveik nesiskyrė nuo antibiotiko *C. Actavis* poveikio (0,6 cm prieš *R. radiobacter*) (3.15 pav.). Pastebėta, kad susintetinti tiriamieji junginiai pasižymėjo didesniu antibakteriniu aktyvumu stabdant gramneigiamų bakterijų (*R. radiobacter* ir *X. campestris*) augimą nei gramteigiamų bakterijų (*B. subtilis*), kurių augimo beveik nenuslopino.



**3.15 pav.** Junginio **8d** ir antibiotiko *C. Actavis* antibakterinio poveikio *R. radiobacter* bakterijų augimui palyginimas



## 4. Rekomendacijų dalis

Amidinio ryšio formavimo reakcijos metu susintetintas peptidas **8b** atliktuose biologinių savybių nustatymo tyrimuose pasižymėjo stipriausiu laisvųjų radikalų slopinamuoju, redukciniu ir antioksidaciniu poveikiu. Dėl šių savybių, šis junginys galėtų būti naudojamas ir pritaikomas farmacijoje bei biotechnologijoje, siekiant sukurti efektyvius vaistus, skirtus laisvųjų radikalų slopinimui, kurie oksiduodami organizmuose esančius junginius sukelia negrįžtamus ląstelių DNR pažeidimus, nulemia degeneracines ligas. Siekiant komercializuoti šio peptido naudojimą, svarbu sukurti ir įvertinti tinkamą gamybos metodiką. Šiame skyriuje pateikta tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-((2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato (**8b**) gamybos technologinė schema ir aptartos rekomendacijos, skirtos sintetinti pramoninius šio biologiškai aktyvaus junginio kiekius.

### 4.1. Tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-((2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato (**8b**) gamybos aparatūra ir žaliavos

Visose gamybos stadijose naudojami reagentai:

- Tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (**5a'**) – pradinė medžiaga, naudojama kondensacijos reakcijoje.
- Tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (**6a**) – pradinė medžiaga, naudojama hidrolizės reakcijoje.
- NaOH – reagentas, naudojamas hidrolizės reakcijoje.
- DIPEA – bazė, naudojama amidinio ryšio formavimo reakcijoje.
- HATU – jungiamasis reagentas, naudojamas amidinio ryšio formavimo reakcijoje.
- Silikagelis – kolonėlinės chromatografijos nejudantis sorbentas.

Reakcijose naudojamus reagentus galima įsigyti iš pramoninių tiekėjų, tokių kaip „Sigma–Aldrich“, „Berchem“, „Fisher Scientific“ ar „Kratom chemistry“.

Tirpikliai:

- Dichlormetanas (DCM) – amidinio ryšio formavimo reakcijos tirpiklis.
- Metanolis – hidrolizės reakcijos tirpiklis.
- Etilacetatas – skirtas ekstrahuoti reakcijos mišinį ekstraktoriuje.
- KHSO<sub>4</sub> vandeninis tirpalas – naudojamas hidrolizės reakcijoje.
- NaHCO<sub>3</sub> vandeninis tirpalas – skirtas padidinti ekstrakcijos efektyvumą.
- Sotus NaCl tirpalas - tirpiklis, skirtas pagerinti reakcijos mišinio ekstrakciją.
- Eliuentas (DCM – MeOH) – skirtas produkto gryninimui kolonėlinės chromatografijos metodu.

Tirpiklius galima įsigyti iš „Labochema“, UAB „Vainesa“, „Eurochemicals“ bei kitų komercinių šaltinių.

#### 4.1 lentelė. Gamybinės linijos aparatūra

Įrenginio nr.	Įrenginys	Įrenginio nr.	Įrenginys
T-1 – T-17	Talpos	D-5	Laikmatis
S-1 – S-17	Išcentriniai siurbliai	D-6	UV spinduliuotė
R-1	Reaktorius	D-7	Masių spektrometras
TR-1	Sraigtinis transporteris	R-7	Garintuvas
D-1	UV spinduliuotė	K-3	Kondensatorius
D-2	Masių spektrometras	R-8	Ekstraktorius
R-2	Garintuvas	R-9	Maišyklė
K-1	Kondensatorius	TR-5	Sraigtinis transporteris
R-3	Ekstraktorius	F-2	Filtrai
D-3	pH-metras	R-10	Garintuvas
R-4	Maišyklė	K-4	Kondensatorius
TR-2	Sraigtinis transporteris	ChK-1	Chromatografinė kolonėlė
F-1	Filtrai	D-8	Detektorius
R-5	Garintuvas	R-11	Garintuvas
K-2	Kondensatorius	K-5	Kondensatorius
R-6	Reaktorius	R-12	Garintuvas
TR-3	Sraigtinis transporteris	K-6	Kondensatorius
TR-4	Sraigtinis transporteris	D-9	Masių spektrometras
D-4	Termostatas		

#### 4.2. Gamybiniai ir kokybiniai rodikliai

##### 4.2 lentelė. Peptido 8b gamybiniai rodikliai

Periodinės gamybos rodikliai	Vertė
Temperatūra, °C	k.t.
Hidrolizės reakcija, val.	14–16
Kondensacijos reakcija, val.	4

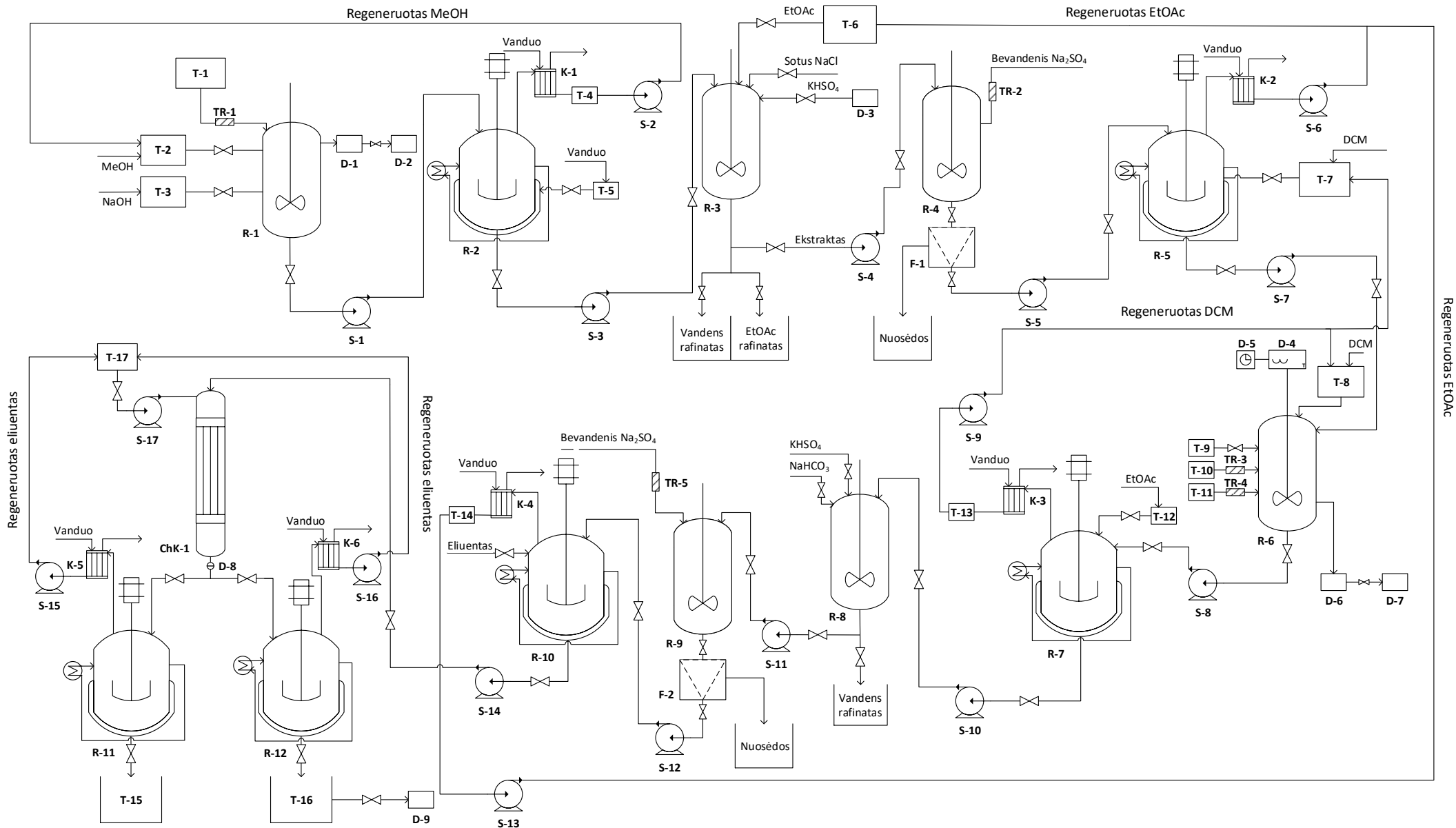
##### 4.3 lentelė. Peptido 8b kokybiniai rodikliai

Rodiklis	Vertė
Fizinis būvis	Derva
Spalva	Ryškiai geltona
Tirpumas	DCM, EtOAc, CDCl <sub>3</sub>
<sup>1</sup> H BMR, <sup>13</sup> C BMR	<sup>1</sup> H BMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 1,29 (s, 9H, 3×CH <sub>3</sub> – <i>t-butyl</i> ); 1,38–2,19 (m, 12H, CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 3,49–3,55 (m, 4H, CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 3,85 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 5,12–5,21 (m, 2H, CH – <i>piperidino</i> ); 7,39 (s, 1H, CH – <i>pirazolo</i> ); 7,52–7,88 (m, 8H, 8×CH – <i>fenilo</i> ); 8,03 (s, 1H, CH – <i>pirazolo</i> ). <sup>13</sup> C BMR (101 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ: 19,3 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 19,5 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 22,0 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 22,6 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 27,2 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 27,9 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 28,4 (3×CH <sub>3</sub> ); 39,8 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 40,2 (CH <sub>2</sub> – <i>piperidino</i> ); 50,6 (CH – <i>piperidino</i> ); 50,8 (OCH <sub>3</sub> ); 52,6 (CH – <i>piperidino</i> ); 80,4 (C); 111,8 (C); 116,0 (C); 116,5 (C); 117,2 (C); 117,5 (C); 117,9 (C); 124,2 (C); 126,0 (C); 129,9 (C); 130,5 (C); 131,1 (C); 132,0 (C); 135,4 (C); 138,2 (C); 139,1 (C); 143,1 (C); 143,3 (C); 147,7 (C); 155,4 (C=O); 161,5 (C=O); 168,2 (C=O).

### 4.3. Siūloma tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-((2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato (8b) periodinės gamybos schema

28 kg pradinės medžiagos tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato (talpa **T-1**) kartu su 2N NaOH vandeniniu tirpalu (225 l) (talpa **T-3**), tiekiami į 1000 litrų talpos reaktorių **R-1**. Hidrolizės metu naudojamas tirpiklis – metanolis (300 l), esantis talpoje **T-2**. Reakcija vykdoma esant kambario temperatūrai atmosferiniame slėgyje, reakcijos trukmė – 14 valandų. Po 13 valandų reakcijos mišinys per kapiliarą patenka į UV spinduliuotės detektorius **D-1** ir masių spektrometrą **D-2**, kuriuose tikrinama reakcijos eiga ir baigtis bei nustatoma tiksli gauto junginio molekulinė masė. Patvirtinus reakcijos baigtį, reakcijos mišinys išcentrinis siurbliu **S-1** tiekiamas į 1000 litrų talpos garintuvą **R-2**, kuriame nudistiliuojamas metanolis. Po distiliacijos surinktas tirpiklis iš kondensatoriaus **K-1** kaupiamas talpoje **T-4** ir regeneruotas siurbliu **S-2** grąžinamas į pradinę talpą **T-2**. Atskyrus metanolį, reakcijos mišinys, atsidarius sklendei, ištirpinamas vandenyje (100 l) iš talpos **T-5** ir išcentrinis siurbliu **S-3** transportuojamas į 500 litrų talpos ekstraktorių **R-3**. Ekstraktoriuje mišinys ekstrahuojamas etilacetatu (150 l) ir pašalinami šalutiniai produktai, esantys organinėje fazėje. Tada mišinys rūgštinamas KHSO<sub>4</sub> vandeniniu tirpalu, kol pasiekiamas pH=6 ir vandeninėje fazėje esantis reakcijos produktas perkeliamas į organinę fazę. Vandenilio jonų koncentracija matuojama pH–metru **D-3**. Pašalinus vandens rafinată mišinys ekstrahuojamas etilacetatu (50 l), esančiu talpoje **T-6**, plaunamas vandeniu (100 l) ir sočiu NaCl tirpalu (100 l), pašalinamas vandens rafinatas. Surinktas organinis sluoksnis siurbliu **S-4** transportuojamas į 250 litrų talpos maišyklę **R-4**, kurioje sraigtniu transporteriu **TR-2** tiekiamas bevandenis Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sulfatui sugėrus vandens ir drėgmės likučius, toliau mišinys paduodamas į rankovinį filtrą **F-1**, kuriame sulaikomos kietos dalelės ir Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> likučiai. Filtracijai pasibaigus, filtras rankiniu būdu pakeičiamas nauju, o naudotas su nuosėdomis pernešamas į surinkimo talpą. Nufiltruota organinė fazė siurbliu **S-5** tiekiamas į 600 litrų talpos garintuvą **R-5**, kuriame atskiriamas ekstrakcijoje naudotas EtOAc. Kondensatoriuje **K-2** surinktas etilacetatas siurbliu **S-6** nukreipiamas į pradinę tirpiklio talpą **T-6**. Nugarinus tirpiklį, atsidaro sklendė, kuri iš talpos **T-7** tiekia DCM (500 l) ir ištirpina po ekstrakcijos ir filtracijos sukonzentruotą hidrolizės produktą. Mišinys siurbliu **S-7** patenka į 1000 litrų talpos reaktorių **R-6**, kuriame termostato **D-4** pagalba palaikoma 0 °C temperatūra. Į reaktorių iš talpos **T-10** sraigtniu transporteriu **TR-3** tiekiamas peptidų sintezės jungiamasis reagentas HATU (20 kg) ir mišinys paliekamas suktis 10 minučių. Reakcijos laikas reaktoriuje sekamas laikmačiu **D-5**. Praėjus 10 minučių, į reaktorių iš talpos **T-9** tiekiamas bazė DIPEA (18 l) ir reakcijos mišinys paliekamas dar 10 minučių 0 °C temperatūroje. Po nustatyto laiko, iš talpos **T-11** į reaktorių sraigtniu transporteriu **TR-4** transportuojamas aminas tret-butyl-(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilatas (16 kg), reakcijos mišinys papildomas DCM (150 l) ir DIPEA (9 l). Sudėjus aminą, reakcija vykdoma 4 valandas esant kambario temperatūrai. Po 4 valandų UV spinduliuotės detektoriumi **D-6** ir masių spektrometru **D-7** nustatoma reakcijos baigtis ir mišinys siurbliu **S-8** tiekiamas į 1000 litrų talpos garintuvą **R-7**, kuriame atskiriamas naudotas tirpiklis DCM. Nukreiptas iš kondensatoriaus **K-3**, jis kaupiamas talpoje **T-13** ir siurbliu **S-9** grąžinamas į talpas **T-7** ir **T-8**. Sukonzentruotas reakcijos mišinys, atsidarius sklendei, ištirpinamas EtOAc (200 l), esančiu talpoje **T-12** ir išcentrinis siurbliu **S-10** transportuojamas į 500 litrų talpos ekstraktorių **R-8**. Ekstraktoriuje ištirpintas reakcijos mišinys plaunamas 1M KHSO<sub>4</sub> (100 l) ir 1M NaHCO<sub>3</sub> (100 l) vandeniniais tirpalais. Pašalinus vandeninės fazės rafinată, surinktas ekstraktas siurbliu **S-11** nukreipiamas į 500 litrų talpos maišyklę **R-9**, kurioje

sraigtniu transporteriu **TR-5** paduodamas bevandeniu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Sulfatui sugėrus likusią drėgmę ir vandens likučius, toliau mišinys tiekiamas į rankovinį filtrą **F-2**, kuriame sulaikomos kietos dalelės ir  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  likučiai. Nufiltruota organinė fazė siurbliu **S-12** transportuojama į 500 litrų talpos garintuvą **R-10**, kuriame ekstrakcijai naudotas etilacetatas sukondensuojamas kondensatoriuje **K-4**, kaupiamas talpoje **T-14** ir siurbliu **S-13** grąžinamas į pradinę EtOAc talpą **T-6**. Pašalinus tirpiklį, atsidaro sklendė, tiekianti nedidelį kiekį eliuento (100 l). Paruošta gryninimui medžiaga išcentrinu siurbliu **S-14** transportuojama į chromatografinę koloną **ChK-1**, užpildytą nejudančiu sorbentu silikageliu. Gryninimui naudojamas pastovaus tūrinio santykio 100:2 eliuentas: DCM – MeOH, kuris į koloną tiekiamas siurbliu **S-17** iš talpos **T-17**. Gryninimas atliekamas naudojant detektorių **D-8** – užfiksuotos priemonės nukreipiamos į garintuvą **R-11**, o produktas – į garintuvą **R-12**. Po distiliacijos kondensatoriuose **K-5** ir **K-6** susikaupęs eliuentas atitinkamais **S-15** ir **S-16** siurbliais grąžinamas periodiniam produkto gryninimui į talpą **T-17**. Sukoncentruotas produktas kaupiamas talpoje **T-16**, iš kurio pakartotinai nustatomi kokybiniai ir kiekybiniai rodikliai masių detektoriumi **D-9**. Taikant tokią siūlomą periodinės gamybos procedūrą, sintezę atliekant du kartus per savaitę – per metus gali būti pagaminama 2500 kg tikslinio peptido tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chorfenil)-4-{(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato (**8b**).



4.1 pav. Junginio 8b siūloma technologinė schema

## Išvados

1. Atlikus literatūros analizę nustatyta, kad peptidai, turintys pirazolo ir piperidino fragmentus, pasižymi stipriu antioksidaciniu, antivirusiniu bei proteasomas slopinančiu poveikiu. Pastebėta, kad tinkama junginių konfigūracija ir halogenų įterpimas į struktūrą lemia stiprų priešvėžinį aktyvumą. Aptarti amidinio ryšio formavimo reakcijose naudojami jungiamieji reagentai ir aktyvatoriai. Efektyviausiomis savybėmis ir mažiausia racemizacijos rizika pasižymi tie jungiamieji reagentai, kurie benzeno žiede turi įsiterpusį azoto heteroatomą – HOAt, PyAOP, HATU, HAPyU.
2. Naudojant pradinius susintetintus  $\beta$ -ketoesterių darinius ir įvairius hidrazinus, *Knorr* sintezės metu gauti *R* ir *S* izomerų aminorūgščių dariniai **5a–d** ir **6a–d**, turintys pirazolo žiedą. Atlikus poliarizuotos šviesos plokštumos specifinio sukimo kampo tyrimą patvirtinta, kad gauti enantiomeriškai gryni junginiai.
3. Atlikus peptidinio ryšio formavimo reakcijų optimizavimą nustatyta, kad vykdant *1H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilato darinių sintezę, efektyviausią greitį, mažiausią racemizaciją ir didžiausią išėigą lėmė jungiamasis reagentas HATU. Optimizuotomis sąlygomis įvykdyta peptidų **8a–d** sintezė.
4. Įvertinus antioksidacines ir redukcines susintetintų *1H*-pirazol-5-il-piperidin-1-karboksilatų savybes nustatyta, kad peptidai (junginiai **8a–d**) pademonstravo žymiai didesnę aktyvumą slopinant laisvuosius radikalus nei aminorūgščių dariniai, neturintys amidinio ryšio (junginiai **5a–d** ir **6a–d**). Geriausiais rezultatais iš tirtų junginių pasižymėjo peptidai **8a** ir **8b**, struktūroje turintys vienodus pakaitus. Stipriausias antioksidacinis poveikis pastebėtas 96 % nuslopinus hidroksi- radikalų susidarymą, taip apsaugant deoksiribozę nuo fragmentacijos.
5. Didžiausią antibakterinį aktyvumą esant 1000  $\mu\text{g/ml}$  tiriamųjų junginių tirpalų koncentracijai pademonstravo junginys **8d** – peptidas, sudėtyje turintis bromo ir fluoro pakaitus. Nustatyta, kad susintetinti tiriamieji junginiai pasižymėjo didesniu antibakteriniu aktyvumu stabdant gramneigiamų bakterijų (*R. radiobacter* ir *X. campestris*) augimą nei gramteigiamų bakterijų (*B. subtilis*), kurių augimo beveik nenuslopinu.
6. Remiantis atliktu amidinio ryšio formavimo reakcijos sąlygų optimizavimu, nubraižyta rekomenduojama geriausiomis biologinėmis savybėmis pasižymėjusio peptido tret-butyl-(2*S*)-2-[1-(4-chorfenil)-4-{(2*R*)-2-[1-(4-chlorfenil)-4-(metoksikarbonil)-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karbonil}-1*H*-pirazol-5-il]piperidin-1-karboksilato (**8b**) periodinės gamybos schema, pritaikyta gaminti 2500 kg tikslinio produkto per metus. Pateikti kokybės ir gamybos rodikliai.

## Literatūros sąrašas

1. DANG, T., SUSSMUTH, RD. Bioactive Peptide Natural Products as Lead Structures for Medicinal Use. *American Chemical Society*, 2017. DOI:10.1021/acs.accounts.7b00159.
2. WEI, G., et. al. Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology. *Royal Society of Chemistry*, 2017, 4661-4708. DOI:10.1039/C6CS00542J.
3. TARFAH, I. Al-Warhi, et. al. Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012, 97-116. DOI:10.1016/j.jsccs.2010.12.006.
4. LINTNER, K. Peptides and proteins. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*, 2010, 290-299. ISBN 978-1-4051-8635-3.
5. BENOITON, N. Leo. Chemistry of Peptide Synthesis. *Taylor & Francis*, 2006. 13:978-1-4200-2769-3.
6. PALOMO, JOSE M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. (PDF). *RSC Advances*, 2014, 4 32658–32672. ISSN 2046-2069.
7. BEHRENDT, R., et. al. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 2016. DOI:10.1002/psc.2836.
8. ERAPALAPATI, V., et. al. Phosphorus pentoxide for amide and peptide bond formation with minimal by-products. *Elsevier*, 2019. DOI:10.1016/j.tetlet.2019.151311.
9. VRETTOS, E. I., et. al. Unveiling and tackling guanidinium peptide coupling reagent side reactions towards the development of peptide-drug conjugates. *Royal Society of Chemistry*, 2017. DOI: 10.1039/c7ra06655d.
10. SIVANATHAN, S., SCHERKENBECK, J. Cyclodepsipeptides: A Rich Source of Biologically Active Compounds for Drug Research. *Molecules*, 2014. ISSN 1420-3049.
11. HU, L., ZHAO, J. Ynamide: A New Coupling Reagent for Amide and Peptide Synthesis. *Synlett*, 2017. ISSN 0936-5214.
12. KRAUSE, T., et. al. Atom-economic catalytic amide synthesis from amines and carboxylic acids activated *in situ* with acetylenes. *Nature Communications*, 2016. DOI:10.1038/ncomms11732.
13. HU, L., et. al. Ynamides as Racemization-Free Coupling Reagents for Amide and Peptide Synthesis. *American Chemical Society*, 2016, 13135-13138. DOI:10.1021/jacs.6b07230.
14. CASSELL, R. J., et al. The Meta-Position of Phe<sup>4</sup> in Leu-Enkephalin Regulates Potency, Selectivity, Functional Activity, and Signaling Bias at the Delta and Mu Opioid Receptors. *Molecules*, 2019. DOI:10.3390/molecules24244542.
15. KAUR, C., et. al. Renal detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* in malaria associated acute kidney injury: a retrospective case – control study. *BMC Res Notes*, 2020. DOI:10.1186/s13104-020-4900-1.

16. PICASO, L. P., et. al. Linear and cyclic dipeptides with antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 7048-7051. DOI:10.1016/j.bmcl.2012.09.094.
17. POLLAK, N., et. al. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *PubMed*, 2007. DOI:10.1042/BJ20061638.
18. BOGDELIS, A. Baltymų kinazių ir kitų signalinių molekulių įtaka širdies miocitų L tipo kalcio srovei. Daktaro disertacija, *Lietuvos sveikatos mokslų universitetas*, 2011, p. 22.
19. DONG, X., et. al. Discovery of 3,4,6-Trisubstituted Piperidine Derivatives as Orally Active, Low hERG Blocking Akt Inhibitors via Conformational Restriction and Structure-Based Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62, 7264–7288. DOI:10.1021/acs.jmedchem.9b00891.
20. ZHANG, J., et. al. Design, synthesis and biological evaluation of novel non-covalent piperidine-containing peptidyl proteasome inhibitors. *Elsevier*, 2016, 6206-6214. DOI:10.1016/j.bmc.2016.10.002.
21. FINLEY, D., PRADO, M. A. The Proteasome and Its Network: Engineering for Adaptability. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2020. DOI:10.1101/cshperspect.a033985.
22. FRICKER, L. D. Proteasome Inhibitor Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2020. DOI:10.1146/annurev-pharmtox-010919-023603.
23. IRM LLC, Bermuda. Preparation of substituted pyrazole derivatives for use as TGR5 agonists [interaktyvus]. Gao Wenqi, Lau Thomas, Pan Shifeng et al. Int. CI: A61P 29/00. US patent, 082947 A1. 2012 06 21. United States Patent and Trademark Office [žiūrėta 2020-05-21]. Prieiga per internetą: <https://scifinder.cas.org>.
24. KUGINYTĖ, J. Naujų (hetero)aromatinių aminorūgščių sintezė, struktūros ir savybių tyrimas. Baigiamasis magistro projektas, *Kauno technologijos universitetas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas*, 2018.
25. SLOOTWEG, J. C., et. al. Efficient Reagent-Saving Method for the N-Terminal Labeling of Bioactive Peptides with Organometallic Carboxylic Acids by Solid-Phase Synthesis. *American Chemical Society*, 2016, 3192 – 3196. DOI:10.1021/acs.organomet.6b00544.
26. SRIDHAR, K., CHARLES, A. L. *In vitro* antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> assays: Estimation methods for EC<sub>50</sub> using advanced statistical programs. *Elsevier*, 2019, 41-49. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.040.
27. VIJAYALAKSHMI, M., RUCKMANI, K. Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2016, 570-572. DOI:10.3329/bjp.v11i13.27663.
28. RODRIGUEZ-BONILLA, P., et. al. Comparative Study of the Antioxidant Capacity of Four Stilbenes Using ORAC, ABTS<sup>•+</sup>, and FRAP Techniques. *Springer*, 2017, 2994-3000. DOI:10.1007/s12161-017-0871-9.
29. SINGH, D. P., et. al. Antioxidant properties and polyphenolic content in terrestrial cyanobacteria. *Springer*, 2017, 134. DOI:10.1007/s13205-017-0786-6.



30. MUKESH, S., et. al. Designing and Synthesis of Flavonoids Derivatives and Screening of their Antioxidant Activity. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2019, 1226-1231. ISSN: 2250-1177.
31. KONAN, K. V., et. al. Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *The Royal Society of Chemistry*, 2016, 5638-5644. DOI:10.1039/c6ay01088a.
32. BALOUIRI, M., et. al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Elsevier*, 2016, 71-79. DOI:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
33. LELLEK, V., et. al. An Efficient Synthesis of Substituted Pyrazoles from One-Pot Reaction of Ketones, Aldehydes, and Hydrazine Monohydrochloride. *Synlett*, 2018, 1071-1075. DOI:10.1055/s-0036-1591941.
34. NAGY, A., et. al.  $\alpha/\beta$ -Chimera peptide synthesis with cyclic  $\beta$ -sugar amino acids: the efficient coupling protocol. *Springer*, 2019, 669-678. DOI:10.1007/s00726-019-02702-9.
35. CHARISIADIS, P., et. al. Determination of Polyphenolic Phytochemicals using highly deshielded -OH  $^1\text{H}$  NMR Signals. *Phytochemical Analysis*, 2016, 159-170. DOI:10.1002/pca.2656.
36. NAYANI, K., HUSSAINI, S. A. Synthesis of cytotoxic cyanobactin, Wewakazole B. *Elsevier*, 2017, 1166-1169. DOI:10.1016/j.tetlet.2017.02.012.
37. MUZAFFAR-UR-REHMAN, M., et. al. Side reactions in peptide synthesis: An overview. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 2018. DOI:10.1002/326982723.
38. FIGUEIREDO, R. M., et. al. Nonclassical Routes for Amide Bond Formation. *American Chemical Society*, 2016, 12029-12122. DOI:10.1021/acs.chemrev.6b00237.
39. JARADAT, D. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Springer*, 2018, 39-68. DOI:10.1007/s00726-017-2516-0.
40. GAI, K., LIU, B., ZHANG, Y. Identification of unexpected unlabeled *N,N*-dimethylamide formation in the synthesis of deuterated fragment of ribociclib by a HATU-mediated coupling reagent. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2019, 62-66. DOI:10.1002/jlcr.3690.
41. HIDAYAT, M. A., et. al. Simple scanometric assay based on DPPH immobilized on pharmaceutical blister for determination of antioxidant capacity in the herbal extracts. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2018, 450-459. DOI:10.12991/jrp.2018.87.
42. ROJAS, J., BUITRAGO, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Elsevier*, 2019, 3-31. DOI:10.1016/B978-0-12-814774-0.00001-3.