

Rozprawa doktorska

mgr Patrycja Olejkowska

Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowywaniu innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL).

Promotor: **prof. dr hab. Jacek Ścianowski**

Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promotor pomocniczy: **dr Abdellah Yamani**

Celon Pharma S.A.

Toruń 2023

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach doktoratu wdrożeniowego w oparciu o umowę trójstronną pomiędzy Patrycją Olejkowską, firmą Celon Pharma S.A. a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu i współfinansowana przez MNiSW (obecnie MEiN).

PODZIĘKOWANIA

Pragnę złożyć podziękowania promotorom niniejszej pracy. Dziękuję prof. dr. hab. Jackowi Ścianowskiemu za poświęcony czas oraz cenne rady, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej. Ogromne wyrazy wdzięczności składam dr. Abdellahowi Yamani za możliwość prowadzenia niezwykle ciekawych badań, które stawiały przede mną wiele wyzwań, ale przede wszystkim za nieocenioną pomoc na każdej płaszczyźnie, poświęcony czas, całą przekazaną wiedzę, wyrozumiałość i cierpliwość.

Chciałabym podziękować Koleżankom i Kolegom z zespołu badawczego, który wspólnie tworzymy od kilku lat. Dziękuję Natalii, Agacie, Pawłowi oraz Wojtkowi za okazane mi wsparcie, motywację, bezcenne sugestie oraz każdą możliwą pomoc. Współpraca z Wami jest niezwykle ciekawa i nieprzewidywalna, za co dziękuję i cieszę się, że właśnie z Wami mogę tworzyć ten zespół.

Szczególne podziękowania kieruję do moich Rodziców przede wszystkim za wsparcie oraz wiarę we mnie na całej mojej drodze edukacji. Bez Was nie byłabym w tym miejscu, w którym jestem dzisiaj. Dziękuję także mojemu Bratu i Angelice za nieustanny doping i wspólne spacerowanie.

Osobne podziękowania należą się mojemu Narzeczonemu Marcinowi za wyrozumiałość, cierpliwość, wszelaką pomoc oraz okazane mi wsparcie w trakcie studiów i pisania rozprawy doktorskiej.

Pracę dedykuję moim Najbliższym –
Rodzicom, Marcinowi, Bratu i Angelice.

Kocham Was i dziękuję za wszystko.

Streszczenie rozprawy doktorskiej

„Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowywaniu innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL).”

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie odpowiedniej biblioteki związków chemicznych oraz wybranie spośród nich potencjalnego małowcząsteczkowego inhibitora kinazy Mer hamującego rozwój ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). Celem dodatkowym było także zastosowanie nowych technologii, takich jak reaktor mikrofalowy oraz przepływowy do syntezy wspomnianej klasy cząsteczek.

Ogólnie pojęta białaczka to choroba układu krwiotwórczego polegająca na niekontrolowanym namnażaniu się komórek obecnych w szpiku kostnym i węzłach chłonnych, które w rezultacie stają się komórkami nowotworowymi. Jednym z rodzajów tego nowotworu jest ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), która jest najczęstszym rodzajem raka występującym u dzieci w wieku od 2 do 5 lat. Polega ona na nowotworowych zmianach komórek limfoidalnych, co prowadzi do kumulacji niedojrzałych limfoblastów B i T w szpiku kostnym oraz krwi i wyparcia zdrowych komórek. Leczenie osób, głównie dzieci, cierpiących na ten rodzaj nowotworu polega najczęściej na podaniu chemioterapii, czyli zastosowaniu takich związków chemicznych, które wykazują działanie niszczące w stosunku do komórek nowotworowych. Ostateczną formą terapii jest przeszczep allogeniczny. Jest to rodzaj transplantacji, w której dawca jest osobą spokrewnioną z biorcą lub nie. Ostra białaczka limfoblastyczna ALL ściśle powiązana jest z receptorowymi kinazami tyrozynowymi, a mianowicie z nieprawidłową ekspresją kinazy Mer. Kinaza ta należy do rodziny TAM receptorowych kinaz tyrozynowych, w skład której wchodzi dodatkowo kinazy Tyro-3 oraz Axl. Są to enzymy odpowiedzialne za reakcję fosforylacji białka, a skutkiem ich nieprawidłowej ekspresji jest patogeneza ludzkich nowotworów. Ze względu na to, że kinazy te są bardzo aktywne w komórkach nowotworowych stały się intrygującym tematem dla grup badawczych poszukujących nowe leki onkologiczne. Istniejące obecnie małowcząsteczkowe inhibitory charakteryzują się wielospecyficznością wobec kinaz rodziny TAM, co związane jest z niską selektywnością i znaczną toksycznością. Wobec tego cały czas poszukiwane są takie cząsteczki, które posiadają wysoką aktywność antynowotworową przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej, zdolność do selektywnego hamowania receptora MerTK,

a także nie wykazują toksycznych skutków ubocznych. Po wstępnej analizie ogólnodostępnej literatury, wybraniu związku referencyjnego (MRX2843) oraz zastosowaniu bioinformatycznych metod *in silico*, z uwzględnieniem właściwości cząsteczek, zaprojektowano bibliotekę nowych struktur. Następnym krokiem było dokowanie tych związków do kryształu kinazy MERTK w celu wizualizacji każdej struktury w kieszeni aktywnej receptora. Na tej podstawie stworzono odpowiednie modyfikacje w miejscach grup funkcyjnych i zbadano pod kątem zależności między strukturą a aktywnością biologiczną związków (SAR). Dzięki temu otrzymano bibliotekę złożoną ze 120 cząsteczek, będących pochodnymi pirolopirymidyny oraz pirymidyny. Syntezę chemiczną wykonano w Laboratorium Działu Chemii Medycznej, natomiast badania ADMET w Laboratorium Analiz Fizykochemicznych oraz Dziale Badań Przedklinicznych firmy Celon Pharma S.A. Otrzymane związki w pierwszej kolejności zostały przebadane na kinazie Mer w celu określenia ich aktywności, a także pod względem rozpuszczalności w środowisku kwaśnym i obojętnym oraz stabilności na mikrosomach. Spośród całej biblioteki wybrano trzy cząsteczki, których wyniki powyższych testów były najbardziej zbliżone do związku referencyjnego, po czym wykonano optymalizację oraz skalowanie procesu syntezy w celu otrzymania gramowych ilości każdej cząsteczki. Dla tak przygotowanych związków przeprowadzono dalsze badania fizykochemiczne, stabilnościowe, a także testy na komórkach i zwierzętach w celu wyłonienia najlepszego związku wiodącego (proces „hit to lead”). Kolejne etapy, czyli badania toksykologiczne, a następnie kliniczne są w trakcie realizacji. Jednocześnie, w trakcie trwania badań przeprowadzona została optymalizacja wszystkich etapów syntezy, która prowadziła do otrzymania związku referencyjnego MRX2843. Do tego celu wykorzystano reaktor mikrofalowy Discover 2.0 oraz reaktor przepływowy E-series Vapourtec Easy MedChem. Obydwie te technologie pozwoliły na znaczne skrócenie czasu trwania pojedynczych etapów jak i całej syntezy, co wiąże się z intensyfikacją procesów, jak również mają pozytywny wpływ na ocenę ekologiczną oraz ekonomiczną.

Doctoral dissertation abstract

„Application of microwave technology in the development of a synthesis pathway for an innovative small-molecule MERTK inhibitor with high anticancer activity against acute lymphoblastic leukemia (ALL).”

The main goal of this doctoral thesis was to design and synthesize an appropriate library of chemical compounds and to select among them a potential small-molecule Mer kinase inhibitor inhibiting the development of acute lymphoblastic leukemia (ALL). An additional goal was also to use new technologies, such as a microwave and flow reactor for the synthesis of the mentioned class of molecules.

Generally speaking, leukemia is a disease of the hematopoietic system that involves the uncontrolled multiplication of cells present in the bone marrow and lymph nodes, which ultimately become cancer cells. One type of this cancer is acute lymphoblastic leukemia (ALL), which is the most common type of cancer occurring in children aged 2 to 5 years. It involves cancerous changes in lymphoid cells, which leads to the accumulation of immature B and T lymphoblasts in the bone marrow and blood and the displacement of healthy cells. Treatment of people, mainly children, suffering from this type of cancer most often involves the administration of chemotherapy, i.e. the use of chemical compounds that have a destructive effect on cancer cells. The final form of therapy is allogeneic transplant. This is a type of transplant in which the donor is a person related to the recipient or not. Acute lymphoblastic leukemia ALL is closely associated with receptor tyrosine kinases, namely with abnormal expression of Mer kinase. This kinase belongs to the TAM family of receptor tyrosine kinases, which also includes Tyro-3 and Axl kinases. These are enzymes responsible for the protein phosphorylation reaction, and their incorrect expression results in the pathogenesis of human cancers. Due to the fact that these kinases are very active in cancer cells, they have become an intriguing topic for research groups looking for new oncological drugs. Currently, existing small molecule inhibitors are characterized by multispecificity towards TAM family kinases, which is associated with low selectivity and significant toxicity. Therefore, molecules that have high anticancer activity against acute lymphoblastic leukemia, the ability to selectively inhibit the MerTK receptor, and do not have toxic side effects are still being sought. After a preliminary analysis of publicly available literature, selecting a reference compound (MRX2843) and using in silico bioinformatics methods, taking into account the properties of the molecules, a library of

new structures was designed. The next step was to dock these compounds onto a MerTK kinase crystal to visualize each structure in the active pocket of the receptor. On this basis, appropriate modifications were created at the sites of functional groups and examined for the relationship between the structure and biological activity of the compounds (SAR). As a result, a library of 120 molecules, which are pyrrolopyrimidine and pyrimidine derivatives, was obtained. Chemical synthesis was performed in the Laboratory of the Medicinal Chemistry Department, while ADMET tests were performed in the Physicochemical Analysis Laboratory and the Preclinical Research Department of Celon Pharma S.A. The obtained compounds were first tested on Mer kinase to determine their activity, as well as in terms of solubility in acidic and neutral media and stability on microsomes. From the entire library, three molecules were selected whose results of the above tests were most similar to the reference compound, and the synthesis process was optimized and scaled to obtain gram amounts of each molecule. Further physicochemical and stability tests, as well as tests on cells and animals, were carried out for the compounds prepared in this way in order to select the best lead compound ("*hit to lead*" process). The next stages, i.e. toxicological and then clinical tests, are underway. At the same time, during the research, optimization of all stages of the synthesis was carried out, which led to obtaining the reference compound MRX2843. For this purpose, the Discover 2.0 microwave reactor and the E-series Vapourtec Easy MedChem flow reactor were used. Both of these technologies allowed for a significant reduction in the duration of individual stages and the entire synthesis, which involves the intensification of processes and also has a positive impact on the ecological and economic evaluation.

Spis treści

1. Wykaz skrótów	11
2. Wstęp	14
3. Część literaturowa	16
3.1 Białaczka	16
3.1.1 Ostra białaczka limfoblastyczna	20
3.1.1.1 Występowanie	22
3.1.1.2 Objawy	22
3.1.1.3 Diagnoza	23
3.1.1.4 Genetyka	24
3.1.1.5 Czynniki prognostyczne	25
3.1.1.5.1 Cechy kliniczne	28
3.1.1.5.2 Immunofenotyp	28
3.1.1.5.3 Cechy biologiczne i genetyczne	29
3.1.1.5.4 Wczesna odpowiedź na leczenie	29
3.1.1.6 Rokowanie	30
3.1.1.7 Leczenie	30
3.1.1.7.1 Chemioterapia	35
3.1.1.7.2 Przeszczep allogeniczny	41
3.1.1.8 Nawrót choroby.....	43
3.2 Receptorowe kinazy tyrozynowe	50
3.2.1 Ligandy	54
3.2.2 Kinaza Mer	55
3.2.2.1 Inhibitory kinazy Mer	57
3.3 Technologia chemii przepływowej FLOW	68
3.4 Technologia mikrofalowa	73
3.5 Reakcja sprzęgania Sonogashiry	77
3.6 Reakcja sprzęgania Suzuki	78
4. Część eksperymentalna	82
4.1 Opis badań	82
4.2 Optymalizacja syntezy na podstawie ścieżki otrzymywania związku referencyjnego MRX2843	103
4.2.1 Reakcja nukleofilowego podstawienia aromatycznego	103
4.2.1.1 Metoda klasyczna	104
4.2.1.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	104
4.2.2 Reakcja sprzęgania Sonogashiry	112
4.2.2.1 Metoda klasyczna	112
4.2.2.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	113
4.2.2.3 Metoda z wykorzystaniem technologii przepływowej	123
4.2.2.4 Wnioski	124
4.2.3 Reakcja cyklizacji	125
4.2.3.1 Metoda klasyczna	125
4.2.3.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	126
4.2.3.3 Metoda z wykorzystaniem technologii przepływowej	129
4.2.3.4 Wnioski	130

4.2.4	Reakcja zabezpieczenia grupy hydroksylowej	131
4.2.4.1	Metoda klasyczna	131
4.2.4.2	Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	132
4.2.5	Reakcja bromowania	136
4.2.5.1	Metoda klasyczna	136
4.2.5.2	Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	137
4.2.6	Reakcja aminowania	141
4.2.6.1	Metoda klasyczna	141
4.2.6.2	Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	142
4.2.6.3	Metoda z wykorzystaniem technologii przepływowej.....	146
4.2.6.4	Wnioski	148
4.2.7	Reakcja sprzęgania Suzuki-Miyaury	148
4.2.7.1	Metoda klasyczna	148
4.2.7.2	Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	149
4.2.8	Reakcja odbezpieczenia grupy funkcyjnej	152
4.2.8.1	Metoda klasyczna	152
4.2.8.2	Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej	153
5.	Podsumowanie badań własnych	154
6.	Część doświadczalna	160
6.1	Informacje ogólne	160
6.2	Synteza (1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]- cykloheksan-1-olu	161
6.3	Synteza (1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4- ylo}-amino)-cykloheksan-1-olu	162
6.4	Synteza (1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-{2-chloro-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-7-ylo}cyklohe- ksan-1-olu.....	163
6.5	Synteza 2-chloro-7-[(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(tert-butyłodimetylosililo)-oksy]cyklohe- ksylo]-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyny	164
6.6	Synteza 5-bromo-2-chloro-7-[(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(tert-butyłodimetylosililo)-oksy]- cykloheksylo]-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyny	165
6.7	Synteza 5-bromo-7-{4-[(tert-butyłodimetylosililo)oksy]cykloheksylo}- 7 <i>H</i> -pirolo-[2,3- <i>d</i>]pirymidyno-2-aminy	166
6.8	Synteza pochodnych poprzez reakcję sprzęgania Suzukiego-Miyaury oraz odbezpieczenie grupy hydroksylowej	177
6.9	Synteza <i>N</i> -butylo-7-metylo-5-(tiofen-2-ylo)-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn- 2-aminy.....	256
6.9.1	5-bromo- <i>N</i> -butylo-7-metylo-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyno-2-amina	256
6.9.2	<i>N</i> -butylo-7-metylo-5-(tiofen-2-ylo)-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-2- amina	257
6.10	Synteza (1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-{[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-ylo)metylo]tio- fen-2-ylo}pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu	258
6.10.1	(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1- ol	258

6.10.2	(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol	259
6.10.3	tert-butylo-4-({5-[2-(butyloamino)-4-{{(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-hydroksycykloheksylo]amino}pirymidyn-5-ylo]tiofen-2-ylo}metylo)piperazyno-1-karboksylan	260
6.10.4	(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-{[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol	261
7.	Doktorat wdrożeniowy – wdrożenie do przemysłu	262
8.	Literatura	263

1. Wykaz skrótów

4M HCl	4-molowy roztwór kwasu chlorowodorowego
Å ²	angstrom kwadratowy
ACN	acetonitryl
ALL	ostra białaczka limfoblastyczna
AML	ostra białaczka szpikowa
APCI	jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
Br	brom
¹³ C	izotop węgla
CDCl ₃	chloroform deuterowany
Cl	chlor
CLL	przewlekła białaczka limfocytowa
CML	przewlekła białaczka szpikowa
CuI	jodek miedzi (I)
Cs ₂ CO ₃	węglan cezu
DCM	dichlorometan
DEPT	bezzakłócenkowe wzmocnienie sygnału poprzez transfer polaryzacji
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropyletyloamina
DMF	dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
DMSO-d ₆	dimetylosulfotlenek deuterowany
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
ESI	jonizacja przez elektrorozpylanie
ES-MS	spektrometr masowy z elektrorozpylaniem
Et ₃ N	trietyloamina
EtOH	etanol
eq	ekwiwalent
FTIR	spektroskopia fourierowska
GBM	glejak wielopostaciowy
GHz	gigaherc
¹ H	proton
H ₂ O	woda

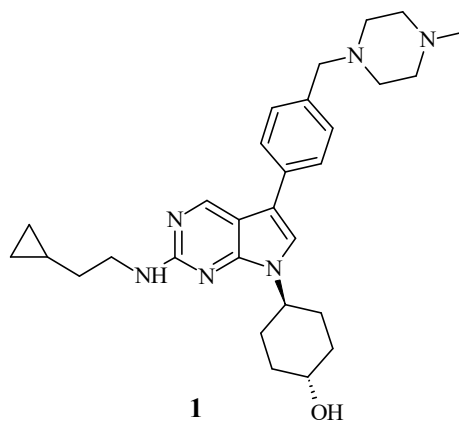
HLA	ludzki antygen leukocytarny
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSCT	transplantacja komórek krwiotwórczych
I	jod
IC ₅₀	połowa maksymalnego stężenia hamującego
iPr ₂ NEt	<i>N,N</i> -diizopropylaminy
iPrOH	izopropanol
LC/MS	spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową
logD	logarytm współczynnika dystrybucji
logP	logarytm współczynnika podziału
M	stężenie molowe [mol/dm ³]
MeOH	metanol
MHz	megaherc
MLL	białaczkę o mieszanej linii
mM	milimol
MRD	minimalna choroba resztkowa
MTD	maksymalna tolerowana dawka
m/z	stosunek masy do ładunku
NBS	<i>N</i> -bromosukcynoimid
NCI	Narodowy Instytut Onkologiczny
-NH ₂	grupa aminowa
NHBE	normlany nabłonek oskrzeli
NIS	<i>N</i> -jodosukcynoimid
NK	komórki „urodzeni” zabójcy
nm	nanometr
nmol	nanomol
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
NSCLC	niedrobnokomórkowy rak płuc
-OH	grupa hydroksylowa
OTF	grupa triflatowa (CF ₃ SO ₃ -)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
Pd/C	pallad na węglu

PdCl ₂	chlerek palladu (II)
PdCl ₂ (CH ₃ CN) ₂	bis(acetonitryl)dichloropallad(II)
Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	[1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloropallad(II), kompleks z dichlorometanem
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenylofosfino)pallad(0)
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	dichlorek bis(trifenylofosfino)palladu(II)
PDX	kсенoprzeszczepy pochodzące od pacjentów
PK	farmakokinetyka
pKa	ujemny logarytm dziesiąty ze stałej dysocjacji kwasowej
PPh ₃	trifenylofosfina
RNA	kwas rybonukleinowy
SAR	relacja struktura-aktywność
sh RNA	RNA o strukturze spinki do włosów
-SO ₂ CH ₃	mesylan
SPLIF	strukturalne odciski palców interakcji białko-ligand
TBAF	fluorek tetra-n-butyloamoniowy
TBSCl	chlerek tert-butyldimetylosililu
tertBuOH	<i>tert</i> -butanol
THF	tetrahydrofuran
TKI	inhibitor kinaz tyrozynowych
TLC	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
v/v	stężenie procentowe objętościowe
W	jednostka „wat”
WBC	liczba białych krwinek

2. Wstęp

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) to najczęściej spotykany nowotwór złośliwy występujący u dzieci, który spowodowany jest nieprawidłową ekspresją kinazy Mer. Kinaza ta należy do rodziny TAM, receptorowych kinaz tyrozynowych, które ulegają nadmiernej ekspresji lub są hiperaktywne w komórkach nowotworowych, a zatem są atrakcyjnym celem w leczeniu nowotworów. W chwili obecnej nie ma zarejestrowanych małych cząsteczek chemicznych zdolnych do hamowania selektywnego receptora MerTK. Większość istniejących małowcząsteczkowych inhibitorów wykazuje wielospecyficzną w stosunku do reprezentantów kinazy rodziny TAM, wykazując w ten sposób niską selektywność i znaczący toksyczny efekt uboczny.

Celem tego projektu jest zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowej klasy małowcząsteczkowych związków, które selektywnie hamują kinazę Mer oraz nie powodują toksycznych efektów ubocznych, a także zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej podczas syntezy. Na początku po szczegółowej analizie opublikowanych patentów, które mogłyby zagrozić zaprojektowaniu struktury nowego inhibitora MerTK oraz na podstawie struktury krystalicznej kinazy Mer, zaproponuję i poddam syntezie kilka związków w celu zajęcia aktywnej kieszeni białka MerTK. Struktura kompleksu związku z kinazą Mer umożliwi określenie pozycji tego związku pod kątem łatwych modyfikacji, aby zoptymalizować siłę hamowania, selektywność i biodostępność. Kluczowym krokiem jest określenie takiej części struktury, która będzie wykazywała powinowactwo do miejsc aktywnych enzymu w aktywności sub-mikromolarnej lub sub-nanomolowej. W celu zaprojektowania struktury odpowiedniego inhibitora kinazy Mer przeprowadzę badania SAR (Structure-activity relationship). Aby uzyskać wstępne informacje na ten temat, zsyntetyzuję bibliotekę cząsteczek złożoną z modyfikacji w kilku pozycjach związku wzorcowego. Jako związek wzorcowy do zaprojektowania nowego zestawu struktur wybrałam opublikowany inhibitor MRX2843 (1).



Biblioteka związków zawierać będzie pochodne pirolopirymidyny oraz pirymidyny. W przypadku analogów pirymidyny synteza składać się będzie z trzech etapów tj. kolejno aromatycznego podstawienia nukleofilowego w pozycji 4, reakcji sprzęgania Suzuki/Sonogashira w pozycji 5 oraz aromatycznego podstawienia nukleofilowego w pozycji 2, gdzie wyjściową strukturą jest 5-bromo-2,4-dichloropirymidyna. Będzie ona także wykorzystana do zsyntetyzowania szkieletu pirolopirymidynowego i prowadzona w pięciu etapach: aromatycznego aminowania, reakcji „cross coupling” Sonogashiry, cyklizacji, wprowadzenia grupy blokującej funkcje aktywne oraz bromowania/jodowania. Kolejne trzyetapowe reakcje: aminowanie, sprzęganie Suzuki/Sonogashira oraz odbezpieczenie grupy funkcyjnej pozwolą na uzyskanie szeregu modyfikacji strukturalnych. Tak otrzymana grupa związków zostanie przebadana pod kątem siły hamowania aktywności kinazy Mer w badaniach *in vitro*. Aby znaleźć ostatecznego kandydata na lek do rozwoju klinicznego z pożądanymi właściwościami fizycznymi i farmakologicznymi, konieczne będzie rozpoczęcie optymalizacji związku wiodącego przez zmniejszenie interakcji lub poprawę stabilności metabolicznej, która zostanie osiągnięta poprzez dodanie grup funkcyjnych. Co więcej, w celu przyspieszenia planu pracy, wykorzystywana będzie technologia mikrofalowa i przepływowa do syntezy półproduktów, szkieletów, budowania biblioteki podczas procesów optymalizacji od hitu do związku wiodącego, a później, aby zwiększyć skalę syntezy w odpowiedniej ilości do badań klinicznych. Wykorzystanie technologii chemii mikrofalowej oraz przepływowej do syntezy nowych inhibitorów pozwoli między innymi na skrócenie czasu reakcji, zwiększenie temperatury danego procesu oraz zwiększenie bezpieczeństwa w kontaktach z reaktywnymi i niebezpiecznymi półproduktami.

3. Część literaturowa

3.1 Białaczka

Białaczka, nazywana również leukemią, to grupa chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, które powstają poprzez jego upośledzenie. Wyróżnia się zmianami leukocytów, czyli białych krwinek występujących w szpiku, krwi, śledzionie oraz węzłach chłonnych pod względem ilościowym jak i jakościowym. Inaczej mówiąc, ma miejsce patologiczny rozrost komórek układu krwiotwórczego, które obecne są w szpiku kostnym i węzłach chłonnych. Skutkiem tego jest powstanie komórek nowotworowych, które zaburzają odpowiednią ilość leukocytów, erytrocytów oraz płytek krwi w krwioobiegu. Komórki te poprzez swoją ofensywność atakują i wypierają krwinki czerwone oraz płytki krwi, a także skupiają się na narządach naciekając węzły chłonne, układ nerwowy, skórę, wątrobę, nerki oraz śledzionę. W czasie wystąpienia oraz trwania białaczki zaburzony jest skład krwi, a mianowicie dominację nad prawidłowymi komórkami przejmują niedojrzałe krwinki białe. Powoduje to upośledzenie działania poszczególnych organów oraz zaburzenie pełnienia swoich funkcji przez układ odpornościowy. Białaczka jest częstym nowotworem złośliwym występującym zarówno u dzieci jak i dorosłych. Pojawia się gdy zmiany w normalnych procesach regulacyjnych komórek powodują niekontrolowaną proliferację krwiotwórczych komórek macierzystych w szpiku kostnym. Skorygowany z wiekiem wskaźnik zachorowalności na białaczkę w Stanach Zjednoczonych wynosi 12,8 na 100 000 osób rocznie. Częstość występowania białaczki jest na ogół wyższa u osób rasy białej i mężczyzn oraz wzrasta wraz z wiekiem. Około jedna na 70 osób choruje w swoim życiu na białaczkę. Zależnie od dynamiki rozwoju i postępowania choroby, białaczki dzielą się na postaci ostre i przewlekłe. Biorąc pod uwagę linię pochodzenia wyróżniamy białaczki limfatyczne i szpikowe. Cztery podtypy białaczki najczęściej spotykane przez lekarzy pierwszego kontaktu to: ostra limfoblastyczna (ALL), ostra szpikowa (AML), przewlekła limfocytowa (CLL) i przewlekła szpikowa (CML).¹ Ostra białaczka limfoblastyczna występuje częściej u dzieci, podczas gdy inne podtypy występują częściej u dorosłych. Czynniki ryzyka obejmują predyspozycje genetyczne, a także czynniki środowiskowe. Kilka zespołów genetycznych, w tym zespół Downa i nerwiakowłókniakowatość, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci i ostrej białaczki szpikowej.¹ Osoby narażone na promieniowanie jonizujące, takie jak osoby, które przeżyły wybuch bomby atomowej, pracownicy zajmujący się napromienianiem

medycznym przed 1950 r. oraz pacjenci z nowotworami poddawani radioterapii, mają zwiększone ryzyko rozwoju ostrej białaczki limfoblastycznej, ostrej białaczki szpikowej i przewlekłej białaczki szpikowej.^{1, 2} Dowody z badań epidemiologicznych sugerują, że ilość promieniowania z dwóch lub trzech tomografii komputerowych wiąże się ze statystycznie istotnym wzrostem ryzyka zachorowania na raka, w tym białaczki, z większym ryzykiem u osób młodszych.¹ Narażenie zawodowe i środowiskowe na benzen (substancja chemiczna stosowana w produkcji farb i tworzyw sztucznych, a także uwalniana podczas spalania ropy naftowej i węgla) jest ustalonym czynnikiem ryzyka białaczki u dorosłych, szczególnie ostrej białaczki szpikowej.^{1, 2} Narażenie na pestycydy w gospodarstwie domowym w okresie płodowym i w pierwszych trzech latach życia wiąże się ze zwiększonym ryzykiem dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej.⁶ Otyłość może również zwiększać ryzyko. Wzrost wskaźnika masy ciała o 5 kg na m² jest związany z 13% względnym wzrostem ryzyka białaczki.¹ Przebyte nowotwory hematologiczne są również czynnikiem ryzyka rozwoju innego podtypu białaczki w późniejszym życiu.¹ Objawy są niespecyficzne i obejmują gorączkę, zmęczenie, utratę masy ciała, ból kości, siniaki lub krwawienie. Pełna morfologia krwi zwykle ujawnia leukocytozę i inne nieprawidłowo podwyższone lub obniżone linie komórkowe. Zgodnie z trzema retrospektywnymi przeglądami przypadków białaczki dziecięcej (w których 75% do 100% przypadków była ostrą białaczką limfoblastyczną), powszechne objawy obejmują gorączkę (17% do 77%), letarg (12% do 39%) i krwawienie (10 – 45%). Około jedna trzecia dzieci miała objawy ze strony układu mięśniowo-szkieletowego, szczególnie w kręgosłupie i kościach długich, 75% miało powiększoną wątrobę lub śledzionę, a prawie 60% miało powiększenie węzłów chłonnych.^{1, 2, 3} Zajęcie ośrodkowego układu nerwowego występuje u około 7% dzieci w momencie rozpoznania.¹⁰ Z kolei u dorosłych za 80% przypadków ostrej białaczki odpowiada ostra białaczka szpikowa. Dorośli mają również objawy ogólnoustrojowe, takie jak gorączka, zmęczenie i utrata masy ciała. Mogą mieć objawy związane z anemią, takie jak duszność czy ból w klatce piersiowej, lub objawy związane z małopłytkowością, takie jak nadmierne siniaczenie, krwawienia z nosa lub obfite miesiączki u kobiet. Dorośli są mniej podatni na ból kości. Hepatosplenomegalia i powiększenie węzłów chłonnych występują rzadko u dorosłych z ostrą białaczką szpikową, ale występują u około 50% dorosłych z ostrą białaczką limfoblastyczną. Zajęcie ośrodkowego układu nerwowego występuje u około 5% do 8% dorosłych z ostrą białaczką limfoblastyczną.¹ Podtypy przewlekłej białaczki występują prawie wyłącznie u dorosłych. Pacjenci z przewlekłą białaczką mogą

być bezobjawowi w momencie rozpoznania. Około 50% pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową i 20% pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową otrzymuje diagnozę przypadkowo, gdy w badaniu morfologicznym krwi uzyskanym z niezwiązanej przyczyny zostanie stwierdzona znaczna leukocytoza. Objawy konstytucyjne występują rzadziej, występują u 15% pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową i około jednej trzeciej pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową.^{1,2} U osób z przewlekłą białaczką szpikową często stwierdza się powiększenie wątroby i śledziony oraz powiększenie węzłów chłonnych.^{13,14} Krwawienia i siniaki są mniej powszechnymi objawami w podtypach przewlekłej białaczki. Charakterystykę głównych podtypów białaczki przedstawia **Tabela 1**.

Podtyp	Cechy charakterystyczne	Typowe grupy dotknięte chorobą	Objawy	Pięcioletni względny wskaźnik przeżycia*
Ostra białaczka limfoblastyczna	Komórki blastyczne w rozmazie krwi obwodowej lub aspirat szpiku kostnego	Dzieci i młodzi dorośli (53% nowych przypadków występuje u osób w wieku poniżej 20 lat)	gorączka, letarg, krwawienie, bóle mięśniowo-szkieletowe lub dysfunkcja, powiększenie wątroby i śledziony oraz powiększenie węzłów chłonnych	< 50 lat: 75% ≥ 50 lat: 25%
Ostra białaczka szpikowa	Komórki blastyczne w rozmazie krwi obwodowej lub aspirat szpiku kostnego; pręciki Auera na rozmazie obwodowym	Dorośli (stanowi 80% ostrej białaczki u dorosłych)	gorączka, zmęczenie, utrata masy ciała, krwawienie lub siniaki, powiększenie wątroby i śledziony oraz powiększenie węzłów chłonnych (rzadko)	< 50 lat: 55% ≥ 50 lat: 14%
Przewlekła białaczka limfocytowa	Ekspansja klonalna co najmniej 5000 limfocytów B na μl ($5,0 \times 10^9$ na l) we krwi obwodowej	Osoby starsze (85% nowych przypadków występuje u osób > 65 lat)	50% pacjentów jest bezobjawowych, powiększenie wątroby i śledziony oraz powiększenie węzłów chłonnych	< 50 lat: 94% ≥ 50 lat: 83%
Przewlekła białaczka szpikowa	Chromosom Filadelfia (gen fuzyjny)	Dorośli	20% pacjentów jest bezobjawowych, splenomegalia	< 50 lat: 84% ≥ 50 lat: 48%
*Przeżycie względne porównuje kohortę osób, które przeżyły białaczkę (diagnoza postawiona w 2005 r.) z podobną kohortą osób bez raka.				

Tabela 1. Charakterystyka głównych podtypów białaczki (Davis A. S., Viera A. J., Mead M. D., Leukemia: An overview for primary care, *American Family Physician*, 2014; 89(9): 731-738)

Charakterystycznym odkryciem laboratoryjnym w przewlekłej białaczce szpikowej i przewlekłej białaczce limfocytowej jest znacząca leukocytoza, często większa niż 100 000 białych krwinek na μl ($100,0 \times 10^9$ na litr). Ponad 96% pacjentów z przewlekłą

białaczką szpikową ma liczbę białych krwinek większą niż 20 000 na μl ($20,0 \times 10^9$ na litr), w porównaniu z zaledwie 34% do 38% pacjentów z ostrą białaczką szpikową lub ostrą białaczką limfoblastyczną.^{9,10,13} Ostrą białaczkę należy podejrzewać, gdy w rozmazie krwi obwodowej lub w próbce szpiku kostnego występuje nadmierna liczba komórek blastycznych (najwcześniejsza forma krwiotwórczych komórek prekursorowych). Klasycznie ostra białaczka szpikowa charakteryzuje się obecnością pręcików Auera w rozmazie obwodowym. Jednakże, ponieważ pręciki Auera nie są powszechnie wykrywane, wymagane jest immunofenotypowanie za pomocą cytometrii przepływowej i testów cytogenetycznych, aby odróżnić podtypy ostrej białaczki, takie jak ostra białaczka szpikowa lub ostra białaczka limfoblastyczna.^{1,2} Rozpoznanie przewlekłej białaczki limfocytowej opiera się na ekspansji klonalnej co najmniej 5000 limfocytów B na μl ($5,0 \times 10^9$ na litr) we krwi obwodowej, potwierdzonej immunofenotypowaniem. Wymaga również cytogenetycznych lub molekularnych badań szpiku kostnego lub krwi obwodowej pod kątem specyficznej nieprawidłowości zwanej chromosomem Philadelphia lub genem fuzyjnym BCR-ABL1.¹⁶ W przewlekłej białaczce szpikowej wzajemna translokacja między chromosomami 9 i 22 powoduje powstanie genu fuzyjnego BCR-ABL1, który zaburza normalne procesy regulacyjne komórek w szpiku kostnym. Skrócony chromosom 22 (chromosom Philadelphia) występuje u 95% pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową.¹ Pozostałe 5% pacjentów ma inną rearanżację chromosomową, ale nadal tworzy nieprawidłowy gen fuzyjny BCR-ABL1. Leczenie ostrej białaczki może obejmować chemioterapię, radioterapię, przeciwciała monoklonalne lub przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych. Rodzaj leczenia zależy od podtypu białaczki, wyników cytogenetycznych i molekularnych, wieku pacjenta oraz chorób współistniejących. Wczesne stadium przewlekłej białaczki limfocytowej (tj. brak niedokrwistości lub małopłytkowości i mniej niż trzy obszary zajęcia węzłów chłonnych) można monitorować bez leczenia. Chorobę w stadium aktywnym definiuje się jako pogorszenie trombocytozy, trombocytopenii lub niedokrwistości, postępująca limfadenopatia lub splenomegalia bądź obecność objawów konstytucyjnych.¹ Odkrycie inhibitorów kinazy tyrozynowej zrewolucjonizowało leczenie przewlekłej białaczki szpikowej. Nieprawidłowy gen fuzyjny utworzony przez translokację chromosomów 9 i 22 koduje kinazę tyrozynową, enzym aktywujący kaskady przekazywania sygnałów, które powodują niekontrolowaną proliferację komórek. To ukierunkowane podejście do hamowania enzymu kinazy tyrozynowej nie jest lecznicze, ale może utrzymać długoterminową kontrolę choroby bez niepożądanych

skutków chemioterapii. Działanie lecznicze polega na przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych, które jest zwykle zarezerwowane dla młodszych pacjentów lub gdy choroba nie reaguje na inhibitory kinazy tyrozynowej.¹ Następstwem leczenia mogą być różne powikłania. Zespół rozpadu guza występuje w wyniku chemioterapii (lub rzadko spontanicznie), gdy rozległe zniszczenie komórek uwalnia zawartość wewnątrzkomórkową do krwioobiegu. Rezultatem jest wysoki poziom potasu, fosforu, kwasu moczowego i mocznika we krwi. Immunosupresja spowodowana chemioterapią, przeszczepem krwiotwórczych komórek macierzystych lub samą białaczką może zwiększyć ryzyko poważnych infekcji. U pacjentów z białaczką, gorączka z neutropenią (mniej niż 500 neutrofilów na μl ($0,5 \times 10^9$ na liter)) powinna skłonić do oceny źródła zakażenia i rozpoczęcia empirycznej antybiotykoterapii o szerokim spektrum działania.¹ Rokowanie zależy od takich czynników, jak wiek, choroba współistniejąca, podtyp białaczki oraz cechy cytogenetyczne i molekularne (**Tabela 1**). Osoby, które przeżyły białaczkę, mają zwiększone ryzyko kolejnych nowotworów, prawdopodobnie z powodu uszkodzenia komórek spowodowanego chemioterapią lub radioterapią. W badaniu Childhood Cancer Survivor Study (kohorta ponad 17 000 dzieci, które przeżyły raka w Ameryce Północnej, leczonych w latach 1970-1986), 30-letnia skumulowana częstość występowania nowotworu po białaczkę wyniosła 5,6%, a mediana czasu do wystąpienia kolejnego nowotworu to dziewięć lat.¹ Najczęstszymi drugimi nowotworami u dzieci, które przeżyły białaczkę, są różne podtypy białaczki lub chłoniaka. Inne drugie nowotwory to nowotwory kości, tkanek miękkich lub ośrodkowego układu nerwowego.

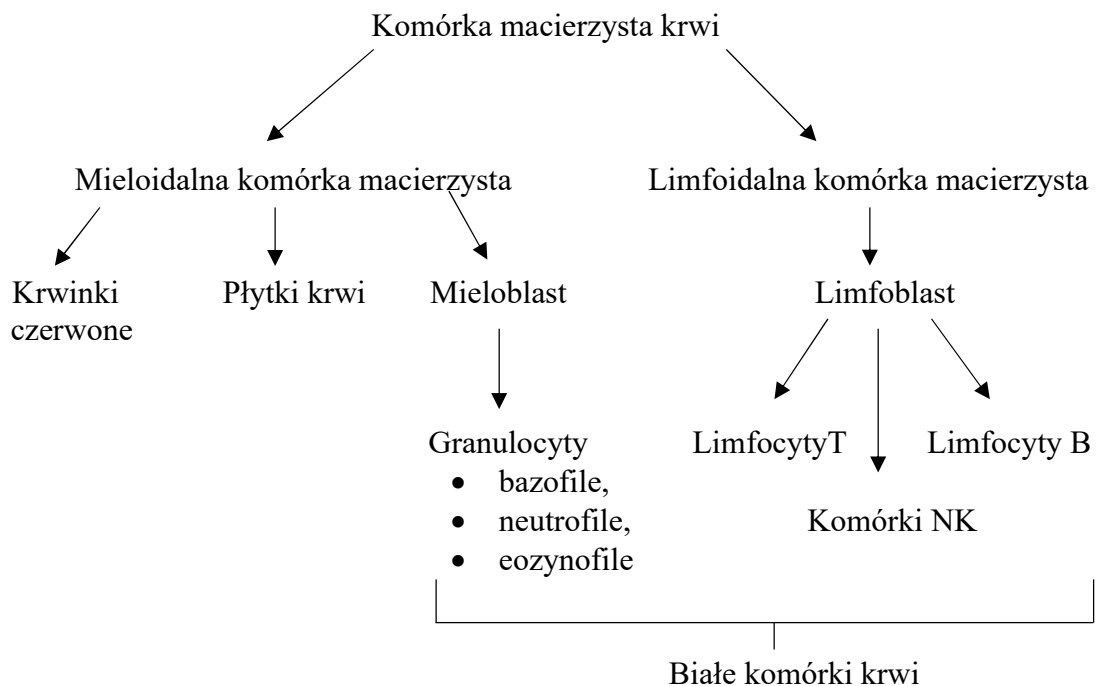
3.1.1 Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL)

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL, ang. *Acute Lymphoblastic Leukemia*) to nowotwór złośliwy, który najczęściej występuje u dzieci i stanowi 75-80% wszystkich ostrych białaczek. Te z kolei stanowią 34% wszystkich nowotworów w tej grupie wiekowej, gdzie najczęstsze ich występowanie przypada na wiek od 2 do 5 lat.²² ALL jest również najczęstszą przyczyną zgonu przed 20 rokiem życia. Szpik kostny zdrowego dziecka wytwarza komórki macierzyste krwi (niedojrzałe komórki), które z czasem stają się dojrzałymi krwinkami. Komórka macierzysta krwi może stać się mieloidalną lub limfoidalną komórką macierzystą (**Schemat 1**). Z mieloidalnej komórki macierzystej powstają trzy typy dojrzałych komórek krwi, do których należą:

- erytrocyty (krwinki czerwone), odpowiedzialne za transport tlenu oraz innych substancji do wszystkich tkanek ciała,
- granulocyty (białe krwinki), odpowiedzialne za zwalczanie infekcji oraz chorób,
- płytki krwi, odpowiedzialne za tworzenie skrzepów krwi, w celu zatrzymania krwawienia.

Z kolei z limfoidalnej komórki macierzystej powstaje komórka limfoblastu, a z niej krwinki białe, podzielone na trzy grupy:

- limfocyty B, odpowiedzialne za wytwarzanie przeciwciał, które pomagają zwalczać infekcje,
- limfocyty T, odpowiedzialne za pomoc limfocytom B w wytwarzaniu przeciwciał,
- komórki NK, odpowiedzialne za zwalczanie komórek rakowych i wirusów.²³



Schemat 1. Podział komórek krwi

Ostra białaczka limfoblastyczna charakteryzuje się tym, że jest chorobą szybko postępującą, wywołaną nowotworową modyfikacją limfoidalnych komórek. Komórki te namnażają się w sposób niekontrolowany, co w konsekwencji doprowadza do nagromadzenia się w szpiku kostnym i krwi obwodowej niedojrzałych limfocytów B lub T, które wypierają komórki zdrowe, prowadząc do upośledzenia funkcji szpiku.

3.1.1.1 Występowanie

Występowanie dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej przeważa u dzieci poniżej 15 roku życia (3 – 4 przypadki na 100 000) i w niewielkim stopniu częściej spotykane jest wśród chłopców.^{24a,b} Nadmierna częstość występowania ALL ujawnia się wśród dzieci rasy białej.²⁵ U osób dorosłych, które częściej narażone są na ostre białaczki szpikowe (AML) i przewlekłe białaczki limfocytowe, odsetek ten jest znacznie niższy. Tak jak w przypadku dzieci tak i u osób dorosłych występowanie ostrej białaczki limfoblastycznej niewiele przeważa u osób płci męskiej. ALL rzadko przedstawiana jest jako nowotwór wtórny, a raczej jako choroba typu *de novo*. Jej pojawienie się uwarunkowane jest czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, tak więc osoby z zespołem Downa, zespołem Blooma, nerwiakowłokniakowatością typu I i ataksją-teleangiektazją posiadają większe predyspozycje na wystąpienie u nich ostrej białaczki limfoblastycznej. Ponadto zwiększone ryzyko zachorowania na ALL dotyczy także dzieci, które będąc w łonie matki są narażone na promieniowanie jonizujące, pestycydy i rozpuszczalniki.²⁶ Ostra białaczka limfoblastyczna posiada kilka podtypów i ze względu na to, że nie jest ona chorobą jednorodną, różnią się one między sobą. Różnice te dotyczą cech molekularnych, komórkowych, biologicznych, a także odpowiedzi na leczenie i ryzyka nawrotu. Na przestrzeni ostatnich lat stwierdzono poprawę wskaźnika przeżycia dzieci z ALL do prawie 90%, co jest rezultatem akceptacji zmodyfikowanych terapii. Polegają one na zastosowaniu indywidualnej farmakodynamiki i farmakogenomiki pacjentów, a także na terapiach dostosowanych do ryzyka i udoskonalonej opiece podtrzymującej.²⁷ Chcąc dokonać podziału na grupy ryzyka należy wziąć pod uwagę szereg cech. Są to cechy molekularne, cytogenetyczne, genetyczne, kliniczne, biologiczne, immunofenotypowe, a także wczesna odpowiedź rdzenia kręgowego na leczenie indukcyjne. Najważniejszym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z ALL jest poziom minimalnej choroby resztkowej (MRD) i to od niego uzależniona jest wczesna odpowiedź na leczenie.²⁸ Białaczka ta charakteryzuje się także najczęściej ostrym klinicznym początkiem, choć zdarzają się przypadki, w których ALL ewoluuje przez kilka miesięcy.

3.1.1.2 Objawy

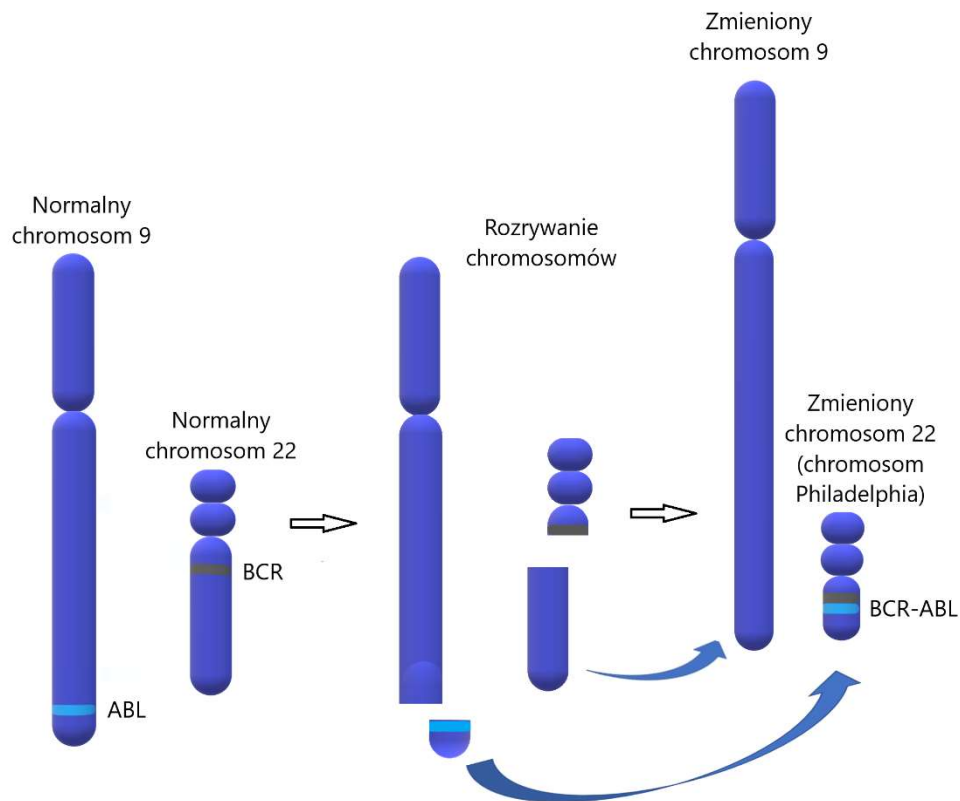
Objawy ostrej białaczki limfoblastycznej powiązane są bezpośrednio z ilością komórek białaczkowych, a także ze stopniem wymiany szpiku. Prowadzi to do zmniejszenia liczby dojrzałych komórek, czyli tak zwanej cytopenii. Najbardziej

powszechnymi objawami są: gorączka spowodowana białaczką lub wtórną infekcją, zmęczenie będące skutkiem anemii, letarg, ból kości i stawów, niedotlenienie tkanek i narządów spowodowane niedokrwistością, czego skutkiem jest osłabienie, nietolerancja wysiłku fizycznego, kołatanie serca, duszność wysiłkowa lub spoczynkowa, a także skaza krwotoczna.²⁹ Są to wszelkiego rodzaju wybroczyny, podskórne wylewy, krwawienia z nosa oraz rzadziej występujące ale także obecne krwawienia z przewodu pokarmowego lub do ośrodkowego układu nerwowego, które są związane z małopłytkowością. W czasie trwania ALL komórki nowotworowe rozprzestrzeniają się i zajmują pozaszpikowe tkanki i narządy, takie jak węzły chłonne, wątrobę, śledzionę czy ośrodkowy układ nerwowy (OUN), a w przypadku mężczyzn także jądra. Zajęcie OUN daje o sobie znać poprzez wystąpienie zawrotów i bólu głowy, zaburzenia świadomości, wymiotów, nudności oraz porażenia nerwów czaszkowych. Ostra białaczka limfoblastyczna charakteryzuje się nagłym początkiem i szybkim przebiegiem, a nieleczona prowadzi do śmierci już w ciągu kilku-, kilkunastu tygodni.

3.1.1.3 Diagnoza

W celu zdiagnozowania dziecięcej ALL stosuje się badanie fizykalne, czyli takie, które ma na celu sprawdzenie ogólnego stanu zdrowia, w tym objawów choroby, takich jak na przykład guzki. Badanie to pozwala także sprawdzić czy komórki białaczki rozprzestrzeniły się na inne części ciała lub narządy. Historia zdrowia pacjenta, czyli informacje na temat przebytych chorób i ich leczenia jest weryfikowana w tym samym celu. Dodatkowo wykonywana jest pełna morfologia krwi z rozmazem, która polega na pobraniu próbki krwi i sprawdzeniu jej pod kątem liczby czerwonych krwinek i płytek krwi, liczby i rodzaju białych krwinek oraz ilości hemoglobiny w erytrocytach. Najczęściej występujące nieprawidłowości laboratoryjne w ostrej białaczce limfoblastycznej dotyczą około 15% pacjentów pediatrycznych i obejmują niedokrwistość, małopłytkowość, neutropenię i leukopenię lub leukocytozę z hiperleukocytozą ($>100 \times 10^9/l$).³⁰ Inne, ale równie częste nieprawidłowości laboratoryjne to podwyższony poziom kwasu moczowego i dehydrogenazy laktozowej w surowicy, korelujący z rozmiarem guza i jego stopniem rozpadu.²⁹ Analiza molekularna powszechnych zmian genetycznych w komórkach białaczkowych w dużym stopniu przyczyniła się do zrozumienia patogenezы i rokowania ALL. Chociaż częstość występowania poszczególnych podtypów genetycznych różni się u dzieci i dorosłych, mechanizmy leżące u podstaw indukcji ALL są podobne.^{31,32} Zmiany w niektórych

chromosomach mogą być oznaką raka. Na przykład w chromosomie Philadelphia-dodatnim ALL kawałek chromosomu 9 i kawałek chromosomu 22 odrywają się i zamieniają miejscami. Gen BCR-ABL powstaje na chromosomie 22, do którego przyłącza się fragment chromosomu 9. Zmieniony chromosom 22 nazywa się chromosomem Philadelphia (**Rysunek 1**).



Rysunek 1. Tworzenie chromosomu Philadelphia.^{96a}

3.1.1.4 Genetyka

Ostra białaczka limfoblastyczna wyróżnia się zaburzeniami genetycznymi hamującymi różnicowanie prekursorowych komórek limfocytów co wspomaga ich proliferację. Do zaburzeń tych zaliczają się duże aberracje chromosomalne takie jak translokacje czy duże delecje oraz zmiany submikroskopowe czyli aberracje typu zmiany liczby kopii fragmentów DNA (np. mikroinsercje, duplikacje, delecje) i substytucje pojedynczych nukleotydów. Aberracje strukturalne materiału genetycznego to tzw. pierwsze uderzenie, czyli zderzenie inicjujące. Prowadzą one, za pomocą ich fuzji z innymi genami lub ich sekwencjami wzmacniającymi, do deregulacji genów, najczęściej czynników transkrypcyjnych, receptorów cytokinowych, kinaz tyrozynowych

lub modyfikatorów epigenetycznych. Drugie uderzenie nazywane wtórnym zaburzeniem genomowym prowokuje progres białaczki i wynika ono z niestabilności genetycznej wywołanej przez pierwsze uderzenie. Uderzenie to może obejmować zmianę liczby kopii fragmentów DNA, które zawiera geny czynników transkrypcyjnych limfocytów, a także substytucje pojedynczych nukleotydów. Genomy dziecięcego ALL zawierają średnio tylko 10 do 20 niechcianych mutacji kodujących w momencie diagnozy i około dwa razy więcej w momencie nawrotu. Wiele mutacji zaburza kluczowe procesy komórkowe, w tym regulację transkrypcji i cyklu komórkowego, a także metabolizm nukleozydów.³³ Ostra białaczka limfoblastyczna może należeć do prekursorów komórek B lub linii komórek T. U 25% do 30% dzieci z ALL z limfocytów B komórki białaczkowe mają wysoką hiperdiploidalność (> 50 chromosomów) z powodu nielosowego przyrostu chromosomów. Podtyp ten wiąże się z doskonałym rokowaniem. Hipodiploidalność (< 44 chromosomy) z kolei występuje u 2 – 3% dzieci z ALL z komórek B i jest silnym negatywnym czynnikiem rokowniczym.³⁴ Translokacje chromosomów i rearanżacje wewnątrzchromosomalne są wczesnymi objawami, prawdopodobnie inicjującymi zdarzenia w leukemogenezie. Kilka z nich można wykryć w próbkach krwi noworodków na wiele lat przed pojawieniem się klinicznych objawów białaczki. Te translokacje i rearanżacje są zwykle obecne we wszystkich komórkach białaczkowych, pozostają przy nawrocie i przy dodatkowych zmianach genetycznych wywołują białaczkę w doświadczalnych układach modelowych. Istnieją dwie funkcjonalne klasy translokacji. Pierwsza klasa przenosi onkogeny do regionów regulatorowych genów aktywnie transkrybowanych, powodując rozregulowaną ekspresję nienaruszonego białka. Druga klasa translokacji zestawia ze sobą dwa geny kodujące białko chimeryczne, które pełni inne funkcje niż białka, z których pochodzi. W kilku podtypach ALL nie ma jednej definiującej zmiany chromosomalnej, ale te podtypy są definiowane przez inne cechy patologiczne lub genomowe. Na przykład, wczesna prekursorowa ostra białaczka limfoblastyczna komórek T jest agresywną białaczką z komórek macierzystych i progenitorowych, która ma odrębny immunofenotyp i zmiany genetyczne ukierunkowane na czynniki transkrypcyjne, szlaki sygnałowe i regulację epigenetyczną.³⁵

3.1.1.5 Czynniki prognostyczne

Czynniki prognostyczne zwiększonej lub zmniejszonej szansy na wyleczenie są brane pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o intensywności chemioterapii i wyborze

pacjentów w pierwszej remisji do allogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych (Tabela 2). Główne czynniki prognostyczne obejmują cechy kliniczne obecne w momencie diagnozy, cechy biologiczne i genetyczne komórek białaczkowych oraz wczesną odpowiedź na leczenie.³⁶

Zmienna	Korzystny czynnik	Niekorzystny czynnik	Zastosowanie w stratyfikacji ryzyka
Cechy demograficzne i kliniczne			
Wiek	1 rok do <10 lat	<1 rok lub ≥10 lat	ta cecha jest częścią definicji grupy ryzyka Narodowego Instytutu Nowotworów
Płeć	kobieta	mężczyzna	brak
Rasa lub grupa etniczna	biała, azjatycka	czarna, rodowici Amerykanie, Hiszpanie	brak
Początkowa liczba białych krwinek	niska (< 50 000/mm ³)	wysoka (≥ 50 000/mm ³)	część definicji grupy ryzyka Narodowego Instytutu Nowotworów
Cechy biologiczne lub genetyczne komórek białaczkowych			
Immunofenotyp	linia komórek B	linia komórek T	często używany do wyboru terapii kręgosłupa
Cechy cytogenetyczne	ETV6-RUNX1, hiperdiploidia, korzystne trisomie chromosomów	BCR-ABL1, rearanżacje MLL, hipodiploidia	często używany do wyboru intensywności leczenia, przypisania pacjenta do HSCT lub obu tych opcji; niektóre cechy (np. BCR-ABL1) można wykorzystać do wyboru terapii celowanej
Cechy genomowe	delecje ERG	delecje lub mutacje IKZF1; ALL podobny do chromosomu Philadelphia ze	niektóre grupy badawcze wykorzystują delecje IKZF1 do przydzielania

		zmianami genu kinazy	pacjentów do bardziej intensywnej terapii; mutacje genu kinazy mogą być wykorzystywane do przypisywania pacjentów do terapii celowanej, ale nie jest to jeszcze częścią rutynowej opieki
Wczesna odpowiedź na leczenie			
Odpowiedź na 1 tydzień terapii glikokortykosteroidami	dobra odpowiedź na prednizon (<1000 blastów/mm ³)	słaba odpowiedź na prednizon (≥1000 blastów/mm ³)	łatwy do zmierzenia i używany przez wiele grup; może zostać zastąpiony przez minimalną chorobę resztkową
Blasty szpiku po 1–2 tygodniach terapii wielolekowej	szpik M1 (<5% blastów) do dnia 8 lub 15	brak szpiku M1 (≥5% blastów) do dnia 8 lub 15	łatwy do zmierzenia i używany wcześniej przez wiele grup; obecnie wypierany przez minimalną chorobę resztkową
Oznaczenie ilościowe minimalnej choroby resztkowej podczas lub na końcu indukcji	osiągnięcie niskiego (<0,01%) lub niewykrywalnego poziomu minimalnej choroby resztkowej w określonych punktach czasowych	trwałość minimalnej choroby resztkowej ≥0,01% w określonych punktach czasowych; im wyższy, tym gorsze rokowanie	najważniejszy pojedynczy czynnik prognostyczny dla współczesnej terapii; krytyczny dla nowoczesnej stratyfikacji ryzyka
Minimalna choroba resztkowa po 3-4 miesiącach	niski poziom (<0,01%), najlepiej niewykrywalny	trwałość minimalnej choroby resztkowej ≥0,01%	może pomóc w selekcji pacjentów do przeszczepu hematopoetycznych komórek macierzystych lub nowych terapii w pierwszej remisji

Tabela 2. Ważne czynniki prognostyczne w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) u dzieci.³⁶

3.1.1.5.1 Cechy kliniczne

Cechami klinicznymi, które umożliwiają przewidzieć rokowanie, są wiek pacjenta oraz początkowa liczba leukocytów. Im osoba jest starsza lub posiada wyższą liczbę krwinek białych rokowanie to się pogarsza. W literaturze zdefiniowano dwa rodzaje ryzyka określone jako „ryzyko standardowe” oraz „ryzyko wysokie”. To pierwsze charakteryzuje się występowaniem u dzieci w wieku od roku do 10 lat, a także początkową liczbą leukocytów poniżej 50 000/mm³. „Ryzyko wysokie” natomiast dotyczy dzieci powyżej 10 roku życia, u których początkowa liczba białych krwinek jest wyższa niż 50 000/mm³. Ryzyko podgrupy ostrej białaczki limfoblastycznej, zarówno standardowe jak i to wysokie, obejmuje odpowiednio około $\frac{2}{3}$ i $\frac{1}{3}$ dzieci z ALL z linii komórek B.³⁷ Niestety grupą pacjentów z gorszymi rokowaniami są niemowlęta, które nie ukończyły jeszcze roku swojego życia. Wspomniane na początku cechy kliniczne, czyli wiek oraz początkowa liczba leukocytów wykazują znikome znaczenie prognostyczne w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek T. Zdarzają się również przypadki, gdzie niektóre typy ALL występują z różną intensywnością w zależności od rasy lub grupy etnicznej. Mianowicie typ TCF3-PBX1 występuje częściej u osób rasy czarnej, a CRLF2 u Latynosów. W związku z tym dla patogenyzy ostrej białaczki limfoblastycznej istotna jest dziedziczna zmienność genetyczna.^{36, 38}

3.1.1.5.2 Immunofenotyp

Dziecięca ostra białaczka limfoblastyczna zaklasyfikowana jest do podgrup prekursorowych limfocytów B (85%) lub T (15%) ze względu na powierzchnię komórki, a także immunofenotyp, czyli zestaw antygenów charakterystycznych dla określonej grupy limfocytów. Wspomniane podtypy występują u różnego rodzaju pacjentów. Pacjentami chorującymi na ALL powiązaną z limfocytami T są najczęściej mężczyźni czarnej rasy w starszym wieku z wyższą początkową liczbą białych krwinek oraz zajęciem węzłów chłonnych i ośrodkowego układu nerwowego. Natomiast osoby zapadające na ostrą białaczkę limfoblastyczną komórek B są młodszy i częściej są Latynosami. Biorąc pod uwagę dzieci chorujące na ALL, dawniej ich przeżywalność była zdecydowanie słabsza w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej powiązanej z limfocytami T. Obecnie po zastosowaniu intensywnych terapii przeżywalność ta znacznie wzrosła.³⁹ Zachorowalność na ALL z komórek T wśród chłopców i młodych mężczyzn powiązana jest ze specyficznymi mutacjami, które skierowane są przeciwko genom usytuowanym na chromosomie X.

3.1.1.5.3 Cechy biologiczne i genetyczne

Z wynikiem u dzieci z ALL wiąże się kilka zmian genetycznych. Wysoka hiperdiploidalność i translokacje t(12;21) kodujące gen ETV6-RUNX1 są związane z korzystnym wynikiem. Natomiast hipodiploidalność z mniej niż 44 chromosomami, rearanżacje MLL, BCR-ABL1, podobieństwo do chromosomu Philadelphia ze zmianami genu kinazy, rearanżacje CRLF2, wewnątrzchromosomalna amplifikacja chromosomu 21 i wczesny prekursor komórek T ALL są związane z cechami klinicznymi wysokiego ryzyka lub słabym wynikiem. Zmiany w IKZF1, który koduje limfoidalny czynnik transkrypcyjny, są powszechne w ALL z chromosomem Philadelphia. Te zmiany są również związane ze złymi wynikami.^{36, 40}

3.1.1.5.4 Wczesna odpowiedź na leczenie

W celu całkowitego wyeliminowania wszystkich komórek nowotworowych potrzebny jest czas, który określany jest jako najpotężniejszy czynnik prognostyczny ALL wśród dzieci. Innym ważnym elementem jest badanie poziomu minimalnej choroby resztkowej za pomocą cytometrii przepływowej, dzięki której możliwe jest wykrycie nieprawidłowych kombinacji antygenów powierzchniowych komórek.⁴¹ Wśród dzieci, których minimalny poziom choroby resztkowej jest równy 0,01%, ryzyko niepowodzenia leczenia, a także zgonu jest około 3 – 5 razy wyższe niż wśród dzieci z poziomem poniżej 0,01%. W związku z tym, aby poprawić ich rokowanie należy u takich pacjentów zintensyfikować terapię. Wykrycie minimalnej choroby resztkowej jest możliwe dzięki technikom sekwencjonowania nowej generacji. Zapewniają one wykrycie komórek nowotworowych poniżej poziomu wykrytego wcześniej za pomocą innych technik.⁴² Klasycznymi cechami osób chorych jest starszy wiek, wysoki poziom leukocytów, niekorzystny immunofenotyp oraz zaburzenia genetyczne, lecz jednak najsilniejszym czynnikiem ryzyka wznowy choroby jest obecność minimalnej choroby resztkowej już po uzyskaniu całkowitej remisji. Jest to powszechnie uznany czynnik wskazujący do przeszczepu allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych. Innym niekorzystnym czynnikiem występującym po pierwszym cyklu leczenia indukującego jest brak hematologicznej remisji. Stąd po uzyskaniu całkowitej remisji konieczne jest monitorowanie choroby resztkowej u wszystkich osób chorych.

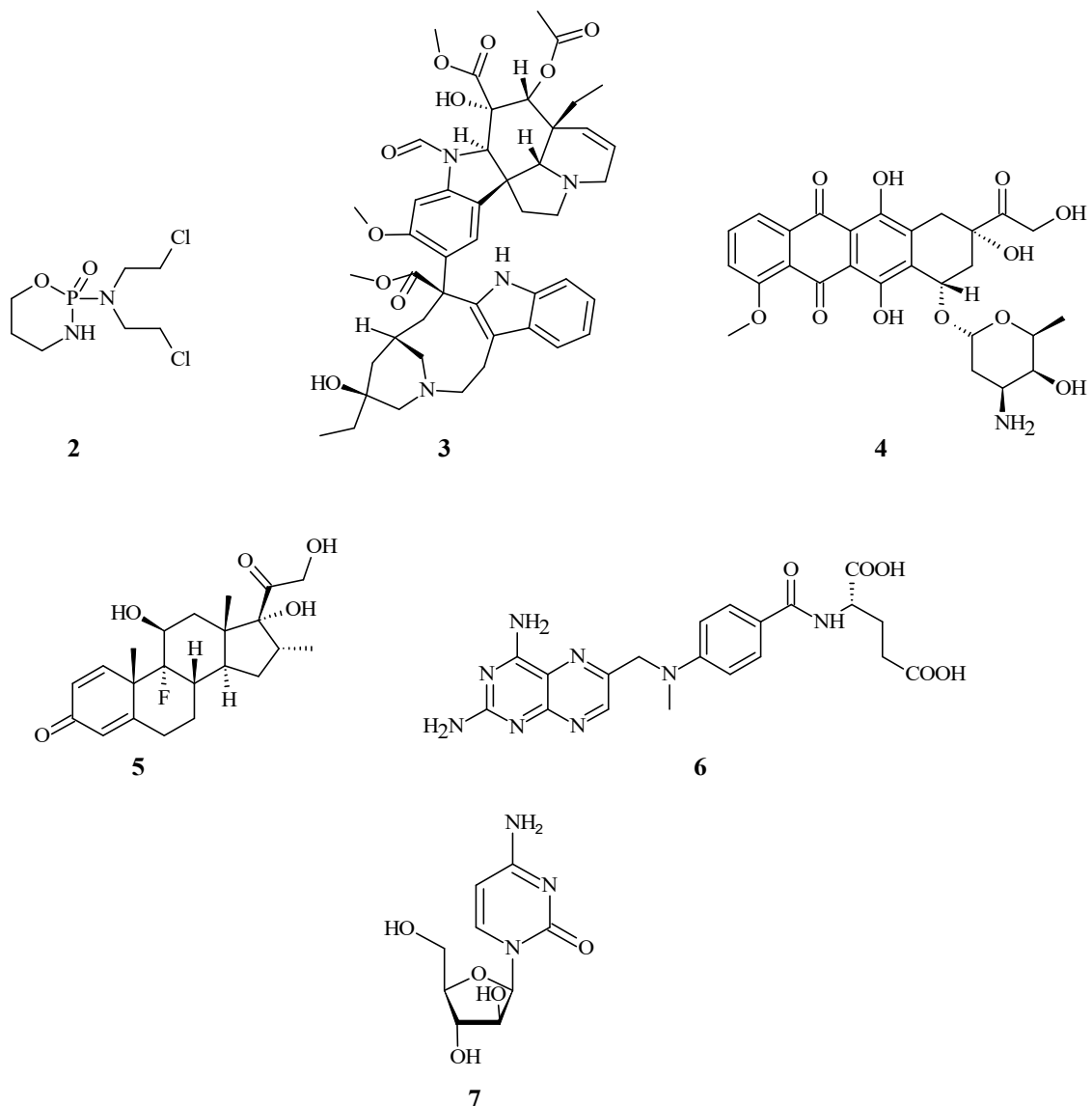
3.1.1.6 Rokowanie

Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat zauważono, że rokowanie w ALL uległo znacznej poprawie. Jest to wynik umiejętne dostosowania terapii do poziomu ryzyka nawrotu, a także poprawy opieki podtrzymującej i optymalizacji istniejących leków chemioterapeutycznych. Przeżycie pacjentów pediatrycznych chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną uległo zmianie od 10% w latach 60 do około 75 – 80% obecnie.³⁰ Natomiast biorąc pod uwagę pacjentów dorosłych, te perspektywy nie są już tak optymistyczne. Co prawda wskaźniki remisji potrafią osiągnąć nawet 90%, jednak całkowity współczynnik przeżycia znajduje się w przedziale 40 – 50%.⁴³ Większość pacjentów posiada słabe cechy ryzyka, co skutkuje niskim wolnym przeżyciem od choroby. Z kolei 25% osób chorych ma standardowe cechy ryzyka, które zapewniają ponad 50% przeżycie bez choroby. Wszyscy pacjenci z ALL są leczeni według algorytmów integrujących cechy immunofenotypowe, cechy białaczki oraz wczesną odpowiedź na terapię.⁴⁴ Chore osoby dorosłe, które posiadają niskie ryzyko nawrotu, stosują terapię antymetabolitami, natomiast pacjenci pediatryczni z wysokim ryzykiem nawrotu lub utrzymującą się minimalną chorobą resztkową po pierwszych dwóch tygodniach indukcji otrzymują bardziej agresywną terapię. Dodatkowo brani są oni pod uwagę do allogenicznego przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych. Wszystkie pozostałe przypadki są klasyfikowane jako standardowe ryzyko nawrotu i są leczone intensywnymi schematami chemioterapii wieloczynnikowej.

3.1.1.7 Leczenie

Stopniowe postępy w terapii doprowadziły do znacznej poprawy przeżywalności od czasu pierwszego leczenia, przy czym te postępy podkreślają znaczenie badań klinicznych poprzez współpracę grup wieloośrodkowych. Dziecięca ALL często służy jako wzór terapii opartej na ryzyku, w której ocena intensywności leczenia opiera się na ryzyku jego niepowodzenia. Jedną z cech charakterystycznych leczenia dziecięcej ALL jest poleganie na stratyfikacji opartej na ryzyku. Identyfikując cechy, które wykazano, że wpływają na rokowanie, pacjentów można podzielić na grupy na podstawie ryzyka niepowodzenia leczenia. Osoby zapadające na chorobę z większym ryzykiem leczone są bardziej toksycznymi terapiami, w przeciwieństwie do osób z korzystnymi cechami. W związku z tym kluczowe jest identyfikowanie tych cech, ponieważ mają one bezpośredni wpływ na rokowanie i pośredni na leczenie. Określone kryteria, takie jak wiek oraz liczba leukocytów, pomagają w powyższej klasyfikacji, a ich zastosowanie

powoduje, że dzieci w przedziale wiekowym 1 – 10 lat z początkową liczbą białych krwinek poniżej 50 000/ml przyporządkowane są do ryzyka standardowego, a te, które nie spełniają tych parametrów, kwalifikują się jako ryzyko wysokie.⁴⁵ U chorych ze standardowym ryzykiem przez co najmniej 2 lata prowadzi się leczenie podtrzymujące remisję. W tej grupie można również rozważyć wykonanie przeszczepienia autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych. Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej ma charakter radykalny i jest prowadzone z intencją wyleczenia chorego. Wybór schematu terapeutycznego głównie determinują obecność lub brak genu fuzyjnego BCR-ABL1/t(9;22) oraz wiek chorego. Ze względu na brak randomizowanych badań w tej stosunkowo rzadkiej chorobie u dorosłych nie istnieją powszechnie przyjęte standardy chemioterapii, a w poszczególnych krajach stosuje się protokoły terapeutyczne wypracowane przez wielośrodkowe grupy badawcze. W Europie i na świecie przeprowadza się dwa typy programów chemioterapii: wielolekowe schematy wzorowane na protokołach pediatrycznych oraz program hyper-CVAD (IIA). W protokołach podobnych do pediatrycznych leczenie opiera się na wielolekowej chemioterapii, która jest podzielona na 4 fazy: fazę przedleczenia, leczenie indukujące, konsolidujące i podtrzymujące remisję. Leczenie według programu hyper-CVAD polega na naprzemiennym podawaniu dwóch bloków chemioterapii (Schemat 1): bloku A złożonego z dużych frakcjonowanych dawek cyklofosfamidu (2) i dodatkowo winkrystyny (3), doksorubicyny (4) i deksametazonu (5) oraz bloku B złożonego z dużych dawek metotreksatu (6) i dużych dawek arabinozydu cytozyny (7).⁴⁶



Schemat 1. Struktury związków podawanych w ramach chemioterapii.

Leczenie hyper-CVAD wywiera silniejszy efekt mielosupresyjny i wiąże się z wyższym ryzykiem gorączki neutropenicznej, powikłań infekcyjnych, a także późnych powikłań, takich jak niepłodność, kardiomiopatia i wtórne nowotwory. Natomiast po leczeniu opartym na protokołach pediatrycznych częściej obserwuje się działania niepożądane charakterystyczne dla asparaginazy, takie jak toksyczność wątrobowa, zapalenie trzustki i powikłania zakrzepowo – zatorowe. Pozaszpikowe lokalizacje anatomiczne to miejsca, które dla chemioterapii ogólnoustrojowej są bardzo trudno dostępne, dlatego zajęcie tych miejsc w momencie wstępnej diagnozy także zdefiniowano jako cechę wysokiego ryzyka. W trakcie rozpoznania, u niewielkiego odsetku pacjentów, ujawnia się choroba ośrodkowego układu nerwowego, z kolei u około 2% chłopców podczas diagnozy ALL następuje zajęcie jąder, co objawia się powiększonym,

niebolesnym narządem. Zajęcie białaczkowe ośrodkowego układu nerwowego lub jąder wyklucza klasyfikację standardowego ryzyka w większości schematów leczenia. Pacjenci leczeni kortykosteroidami przed pełną diagnostyką są również uważani za pacjentów wysokiego ryzyka, ponieważ ogromna skuteczność sterydów w leczeniu ALL może niedoszacować początkowej liczby białych krwinek i zajęcia miejsc rezerwatowych oraz ograniczyć pewność co do stopnia zaawansowania.⁴⁵ Chcąc określić, którzy pacjenci są bardziej zagrożeni wykonuje się w tym celu charakterystykę komórek białaczkowych. Za pomocą cech immunofenotypowych można opisać komórki nowotworowe z uwagi na białka, które ulegają ekspresji, a także na podobieństwo do komórek będących ostatecznie limfocytami B lub limfocytami T. Zdolność ta ma wpływ na rokowanie. U większości pacjentów pediatrycznych chorujących na ostrą białaczkę limfoblastyczną występuje immunofenotyp prekursora B (Bp ALL). W tej grupie znajdują się osoby posiadające wysoki odsetek wyleczeń w przeciwieństwie do osób z immunofenotypem komórek T, dla których ten odsetek jest dużo niższy. Zastosowanie bardziej agresywnych terapii i schematów leczenia doprowadziło tych pacjentów do osiągnięcia wskaźników przeżycia jak w przypadku pacjentów z Bp ALL.⁴⁷ Molekularna klasyfikacja ryzyka powodowana jest niekiedy przez nawracające cytogenetyczne nieprawidłowości w blastach nowotworowych, przy okazji zauważając, że niektóre markery powiązane są z korzystnymi lub niekorzystnymi wynikami. Te pierwsze to wysoka hiperdiploidia, którą obserwuje się w 20% do 25% przypadków Bp ALL i translokacja ETV6/RUNX1. Hiperdiploidia jest podgrupą dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej zawierającą 51 – 65 chromosomów na komórkę lub indeks DNA większy niż 1,16. Jest ona szczególnie korzystna, gdy jest równocześnie powiązana z trisomią chromosomów 4 i 10. Translokacja ETV6/RUNX1, tak jak hiperdiploidia, jest diagnozowana w 20 – 25% przypadków Bp ALL. Wiąże się ona z poprawą przeżywalności, nawet po nawrocie.⁴⁸ Oprócz korzystnych cytogenetycznych zmian występują również te niekorzystne. Jedną z nich jest hipodiploidia, czyli mniej niż 44 chromosomy lub wskaźnik DNA mniejszy niż 0,81. Kolejna niekorzystna zmiana, która dodatkowo związana jest z wysokim ryzykiem to fuzja BCR-ABL, obserwowana u 3% dzieci z ALL i znana jako chromosom Philadelphia. Pozostałe zmiany to rearanżacje MLL obejmujące gen 11q23, występujące u 5% dzieci z ALL oraz wewnątrzchromosomalna amplifikacja chromosomu 21 (iAMP21, obserwowana w 1 – 2% Bp ALL).⁴⁹ W przypadku osób chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną z chromosomem Philadelphia ich terapia opiera się na stosowaniu inhibitora kinaz tyrozynowych (TKI, ang. *Tyrosine Kinase Inhibitor*), co

kojarzone jest z zastosowaniem chemioterapii o zredukowanej intensywności. Po uzyskaniu remisji należy jak najszybciej przeprowadzić przeszczepienie allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych. Po transplantacji konieczne jest częste monitorowanie choroby resztkowej. W przypadku wykrycia transkryptu BCR-ABL1 należy rozpocząć leczenie wyprzedzające TKI, optymalnie na podstawie analizy mutacji BCR-ABL1. Alternatywnie u wszystkich chorych po transplantacji można prowadzić leczenie podtrzymujące remisję z użyciem inhibitora kinaz tyrozynowych, niezależnie do statusu minimalnej choroby resztkowej. U starszych chorych, u których nie jest możliwe przeprowadzenie przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych, stosuje się przewlekłe inhibitor kinazy tyrozynowej w leczeniu podtrzymującym remisję. U chorych, u których stwierdza się ekspresję CD20 na co najmniej 20% blastów, równoległe do leczenia chemioterapią i TKI w trakcie indukcji, konsolidacji i leczenia podtrzymującego również stosuje się rytuksymab.⁵⁰ Oprócz tych cech, które są wykorzystywane do informowania o rokowaniu, odpowiedź na początkową terapię okazała się szczególnie silnym niezależnym predyktorem. Jako definicję całkowitej remisji traktowano wykrywalność blastów poniżej 5% podczas badania morfologii pod koniec indukcji. Jej niepowodzenie zwiastuje bardzo złe rokowanie i występuje w przedziale 3 – 5% dzieci, którym zdiagnozowano ALL. Całkowita przeżywalność tych dzieci szacowana jest na około 33%.⁵¹ Ocena szpiku kostnego za pomocą mikroskopii jest często stosunkowo mało czuła i wykazano, że jest uzupełniana i częściowo zastępowana przez ocenę minimalnej choroby resztkowej (MRD). Ta technika wykorzystuje cytometrię przepływową lub reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) do oceny choroby przy znacznie niższej granicy wykrywalności (1 białaczka blastyczna w 10 000–100 000 komórek). Ocena MRD szpiku kostnego pod koniec indukcji okazała się niezależnym czynnikiem prognozującym wynik leczenia, a także wykazano jej przydatność we krwi obwodowej już w 8 dniu terapii. Indukcja końcowa minimalnej choroby resztkowej została ustalona w stratyfikacji ryzyka pacjentów z ALL komórek B, podczas gdy badania wykorzystujące MRD do dostosowania leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek T są obecnie w toku, ale są również obiecujące.⁴⁵

⁵² Współpracujące ze sobą grupy specjalistów w dziedzinie onkologii dziecięcej opracowały przy pomocy różnych metod zastosowanie czynników ryzyka. Na przykład Dziecięca Grupa Onkologiczna oprócz cytogenetyki i odpowiedzi na terapię, stosuje kryteria Narodowego Instytutu Onkologicznego, natomiast grupa Berlin-Franklin-Münster interesuje się odpowiedzią na leczenie początkowe za pomocą minimalnej

choroby resztkowej. Poszczególne zmiany cytogenetyczne określane są jako ryzyko wysokie bez względu na odpowiedź na leczenie (**Tabela 3**).⁵³

Cechy wysokiego ryzyka w ostrej białaczce limfatycznej u dzieci
<ul style="list-style-type: none">• Wiek poniżej 1 roku lub powyżej 10 lat• Początkowa liczba białych krwinek większa niż 50 000/ml• Zajęcie ośrodkowego układu nerwowego• Zajęcie jąder• Niekorzystna cytogenetyka (hipodiploidia, t(9;22), 11q23, iAMP21)• Suboptymalna odpowiedź indukcyj (niepowodzenie indukcyj lub dodatnia minimalna choroba resztkowa)

Tabela 3. Cechy wysokiego ryzyka w ostrej białaczce limfatycznej u dzieci.⁴⁵

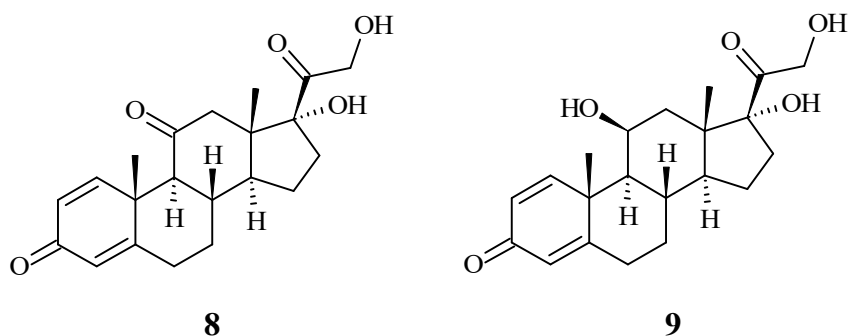
3.1.1.7.1 Chemioterapia

Leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej, nowo zdiagnozowanej, oparte jest na 4 głównych filarach, które w celu uniknięcia rozwoju oporności bazują na wielolekowych schematach. W zależności od grupy pacjentów z grupy ryzyka zmienia się intensywność poszczególnych bloków chemioterapii, a także bardziej intensywne schematy korelują z bardziej agresywnymi kategoriami chorób. Uznanie, że ALL jest chorobą heterogenną, doprowadziło do leczenia ukierunkowanego na fenotyp, genotyp i ryzyko. W związku z tym ostra białaczka limfoblastyczna z dojrzałych komórek B jest jedynym podtypem, który jest leczony krótkotrwałą intensywną chemioterapią.⁵⁴ W przypadku wszystkich pozostałych pacjentów specyficzne podejście do leczenia jest różne, ale konsekwentnie kładzie się nacisk na terapię indukującą remisję, po której następuje intensyfikacja (lub konsolidacja) terapii i kontynuacja leczenia w celu wyeliminowania resztkowej białaczki. Schemat leczenia skierowany na ośrodkowy układ nerwowy zależny jest od ryzyka nawrotu choroby u pacjenta, intensywności leczenia systemowego oraz zastosowania lub nienapromieniania czaszki. Terapia ta rozpoczyna się na wczesnym etapie przebiegu klinicznego i trwa przez różny dla każdego pacjenta czas. W ramach tego schematu działanie poszczególnych leków zależne jest od dawki oraz sposobu podawania i rodzaju podawanych jednocześnie leków.⁵⁵

A. Indukcja remisji

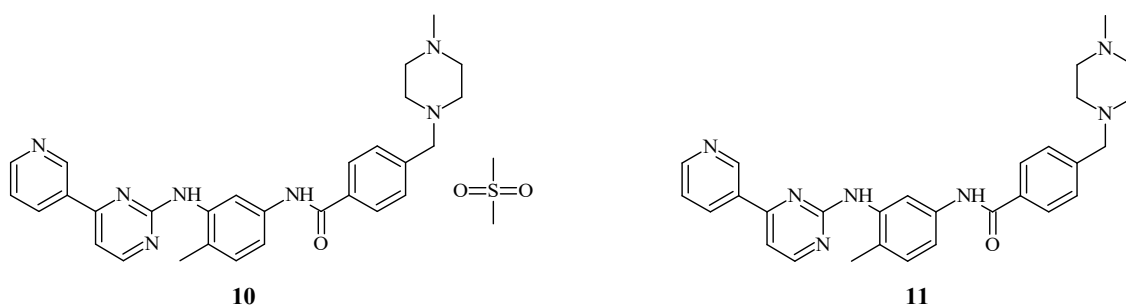
Pierwszym etapem chemioterapii jest trwająca od 4 do 6 tygodni indukcyjna remisja. Jej głównym zadaniem jest eliminacja ponad 99% komórek białaczkowych, a także

przywrócenie prawidłowej hematopoezy. Podczas gdy do końca tego etapu pełna remisja nie zostanie osiągnięta, wówczas pacjenci narażeni są na śmierć z powodu nieodpowiedniego leczenia. Osoby doświadczające niepowodzenia indukcji poddawane są przeważnie allogenicznemu przeszczepowi szpiku kostnego, natomiast w celu osiągnięcia remisji przed przeszczepem stosowana jest chemioterapia.⁵⁶ Ta faza leczenia prawie zawsze obejmuje podawanie glukokortykoidu (prednizonu (**8**), prednizolonu (**9**) lub deksametazonu (**5**)), winkrystyny (**3**) i co najmniej jednego innego środka (zwykle asparaginazy, antracykliny lub obu).



W badaniach z randomizacją wykazano, że antracykliny mają podobną skuteczność i toksyczność.⁵⁷ Prednizon (**8**) i deksametazon (**5**) to kortykosteroidy stosowane wymiennie. Ten drugi działa pozytywnie na ośrodkowy układ nerwowy oraz zmniejsza ryzyko nawrotu. Niestety stosowanie go posiada także wady. Jedną z nich i w zasadzie najgroźniejszą jest zwiększenie częstości występowania toksyczności, w tym jałowej martwicy, infekcji i ograniczenia wzrostu liniowego.⁵⁸ Innymi poznanymi środkami są asparaginaza PEG i asparaginaza Erwinia, których celem jest zmniejszenie ilości asparaginy. Asparaginazę PEG otrzymano przez kowalencyjne przyłączenie glikolu polietylenowego. Modyfikacja ta wykazuje dłuższy okres półtrwania, a także, w porównaniu z natywną L-asparaginazą *Escherichia coli*, charakteryzuje się zmniejszoną immunogennością, a także wyższą skutecznością.⁵⁹ Podczas podawania tej asparaginazy pacjentom możliwe jest wystąpienie reakcji alergicznej, wówczas zastępuje się ją asparaginazą Erwinia, która wymaga większej częstotliwości podawania. Dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną wysokiego lub bardzo wysokiego ryzyka oraz prawie wszyscy młodzi dorośli z ALL otrzymują cztery lub więcej leków podczas terapii indukującej remisję. Ulepszenia w chemioterapii i opiece podtrzymującej doprowadziły do całkowitej remisji około 98% u dzieci i około 85% u dorosłych. Podejmowano próby zintensyfikowania terapii indukcyjnej, wychodząc z założenia, że szybsze i całkowite

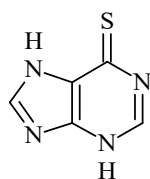
zmniejszenie obciążenia komórek białaczkowych może zapobiec oporności na leki i poprawić wskaźniki wyleczenia. Jednak intensywna terapia indukcyjna może nie być konieczna u dzieci ze standardowym ryzykiem ALL, pod warunkiem, że otrzymają one odpowiednią intensyfikację terapii poindukcyjnej.^{60,61} Zbyt agresywna terapia indukcyjna może w rzeczywistości prowadzić do zwiększonej chorobowości i śmiertelności. Dodanie cyklofosfamidu (2), cytarabiny (7) lub antracykliny w dużych dawkach nie przyniosło wyraźnych korzyści u dorosłych, częściowo dlatego, że taka terapia jest źle tolerowana przez starszych pacjentów.⁶² Przypuszczalnie ze względu na zwiększoną penetrację do ośrodkowego układu nerwowego i dłuższy okres półtrwania, stosowanie deksametazonu (5) w terapii indukcyjnej i poremisyjnej wydaje się zapewniać lepszą kontrolę w ośrodkowym układzie nerwowym i ogólnoustrojowym niż prednizon (8) lub prednizolon (9). Jednakże jedno małe badanie sugerowało, że zwiększona dawka prednizolonu (9) w kontekście innego intensywnego leczenia może dać wyniki podobne do tych uzyskanych przy zastosowaniu deksametazonu (5).⁶³ Rozwój mesylanu imatynibu (10), inhibitora kinazy tyrozynowej, poprawił leczenie białaczki z fuzją BCR-ABL, zwłaszcza u osób starszych. Imatynib (11) jako pojedynczy lek lub jako część schematów skojarzonych z powodzeniem wywołał i utrzymał remisję.^{64,65} Chociaż jego zdolność do poprawy wskaźnika wyleczeń pozostaje niepewna, imatynib (11) wyraźnie przyczynił się do wydłużenia przeżycia wolnego od choroby i poprawy jakości życia wśród tych pacjentów.



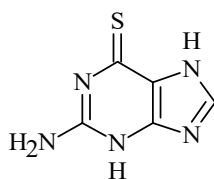
B. Terapia intensyfikująca

Po przywróceniu prawidłowej hematopoezy chorzy w remisji stają się kandydatami do terapii intensyfikującej, zwanej również konsolidacją. Jej celem jest wyeliminowanie submikroskopowej choroby resztkowej, która pozostaje po uzyskaniu całkowitej remisji. Etap ten, w zależności od różnych protokołów, różni się długością oraz intensywnością. Zazwyczaj trwa od 6 do 9 miesięcy, gdzie ten dłuższy i bardziej intensywny schemat konsolidacji dotyczy pacjentów z chorobą wysokiego ryzyka.⁶⁶ Terapia dotycząca

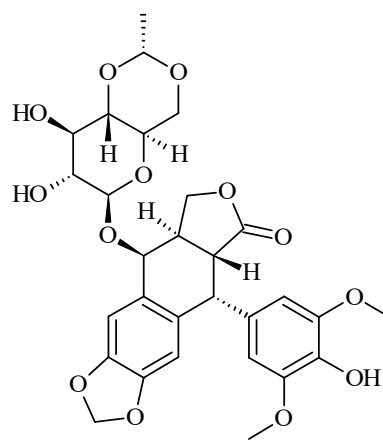
leczenia dziecięcej ALL polega na podawaniu dużych dawek metotreksatu (6) z merkaptopuryną (12), dużych dawek asparaginazy stosowanych przez dłuższy czas, a także leczeniu reindukującym.⁶⁷ Stosowanie jednego schematu nie powinno wykluczać stosowania innych, a może być pożądane zastosowanie wszystkich tych metod leczenia u pacjentów z ALL wysokiego lub bardzo wysokiego ryzyka. Stosowanie terapii intensyfikującej praktykowane jest najczęściej w warunkach ambulatoryjnych, aczkolwiek zdarzają się sytuacje, w których wymagana jest opieka szpitalna. Chcąc zmaksymalizować synergę, a także zminimalizować lekooporność podczas fazy konsolidacji podawane są pacjentom środki, których niestosowano w czasie indukcji remisji. Tymi środkami są merkaptopuryna (12), tioguanina (13), metotreksat (6), cyklofosfamid (2), etopozyd (14) i cytarabina (7).⁴⁵



12



13



14

Wydaje się, że bardzo wysokie dawki metotreksatu (6) poprawiają rokowanie u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną z komórek T. To odkrycie jest zgodne z mniejszą akumulacją poliglutaminianów metotreksatu (tj. aktywnych metabolitów) w ALL z komórek T niż w ALL z prekursorów komórek B; w związku z tym do uzyskania odpowiedniego efektu terapeutycznego potrzebne są wyższe stężenia metotreksatu (6) w surowicy. Komórki blastyczne z fuzją TEL-AML1 lub E2A-PBX1 gromadzą znacznie niższe poziomy poliglutaminianów metotreksatu niż te z innymi nieprawidłowościami genetycznymi, co sugeruje, że pacjenci z tymi genotypami mogą również odnieść korzyści ze zwiększonej dawki metotreksatu (6).⁶⁸ Intensywne stosowanie asparaginazy w okresie postindukcji przyniosło doskonałe wyniki leczenia przy stosunkowo niskiej chorobowości, zwłaszcza w zakresie powikłań zakrzepowych i hiperglikemii, co utrudnia stosowanie asparaginazy podczas terapii indukującej remisję, gdy jednocześnie stosuje się glikokortykosteroid.⁶¹ Istnieje kilka form asparaginazy, z których każda ma unikalny

profil farmakokinetyczny, a co za tym idzie, inne wymagania dotyczące dawkowania.⁶⁹ Jeśli chodzi o kontrolę białaczki, intensywność dawki i czas trwania leczenia asparaginazą są ważniejsze niż rodzaj stosowanej asparaginazy. W jednym badaniu nie zaobserwowano różnic w wynikach między pacjentami losowo wybranymi do otrzymywania dwóch różnych form asparaginazy, ale wynik kliniczny wśród pacjentów, którzy otrzymywali mniej niż 25-tygodniowych dawek, był znacznie gorszy niż u pacjentów, którzy otrzymywali środek przez 26 do 30 tygodni.⁷⁰ W innym badaniu forma asparaginazy o krótszym okresie półtrwania dawała gorsze wyniki leczenia, co obecnie powszechnie uznaje się za wynik stosowania nieodpowiedniej dawki. Leczenie reindukujące, czyli powtórzenie początkowej terapii indukcyjnej stosowanej podczas pierwszych kilku miesięcy remisji, stało się integralną częścią skutecznych protokołów leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej.^{60,67} W jednym badaniu drugie leczenie z opóźnioną intensyfikacją dodatkowo poprawiło wyniki wśród pacjentów z pośrednim ryzykiem ALL. Warto zauważyć, że dodatkowa winkrystyna (3) i prednizon (8) po jednym leczeniu reindukującym nie były korzystne, co sugeruje, że obserwowana poprawa była spowodowana zwiększoną intensywnością dawki innych środków, takich jak asparaginaza.⁷¹ Ze względu na częste występowanie martwicy kości po reindukcji leczenia, terapia glikokortykosteroidami podawana co drugi tydzień jest badana jako strategia zmniejszenia tego powikłania. Chociaż poprzednie badania nie wykazały korzyści z intensyfikacji leczenia u dorosłych, nowsze badania bez randomizacji zdecydowanie sugerowały, że intensywne leczenie konsolidacyjne poprawiło wyniki, zwłaszcza u młodych dorosłych. Wydaje się, że w przypadku ALL z komórek T korzyści terapeutyczne przyniosły cyklofosfamid (2) i cytarabina (7), podczas gdy w innych typach ALL odzwierciedlało to stosowanie cytarabiny (7) w dużych dawkach.⁷²

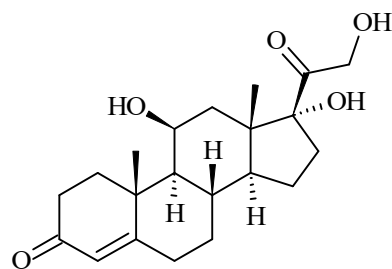
C. Chemioterapia podtrzymująca

Najdłuższym etapem chemioterapii podczas leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci jest chemioterapia podtrzymująca. W momencie jej wydłużenia, po ustaleniu remisji, ryzyko nawrotu choroby zmniejsza się. Etap ten związany jest z niższą toksycznością i jest podawany ambulatoryjnie, a trwa zazwyczaj co najmniej 2 lata. Fundamentem tego etapu chemioterapii jest leczenie pacjentów za pomocą terapii antymetabolitowej metotreksatem (6) i merkaptopuryną (12), podawanych w formie doustnej.⁷³ Znaczenie różnic międzypersonalnych w metabolizmie jest uwidaczniane dzięki farmakogenomice tych leków. Zwiększona mielosupresja oraz

inne toksyczności powiązane są z polimorfizmami genotypowymi metylotransferazy tiopuryny, natomiast inne polimorfizmy, które posiadają zmniejszony poziom aktywnego metabolitu, przyznają stan „hipermetabolizatora”.⁷⁴ Na podstawie różnic obecnych w metabolizmie zauważono, że stopień mielosupresji ma związek z ryzykiem nawrotu. W celu skompensowania ryzyka mielosupresji oraz ryzyka zakażenia bądź krwawienia należy dostosować dawkę chemioterapii. Istnieją także takie schematy leczenia, które wskazują comiesięczne stosowanie winkrystyny (**3**) oraz steroidów, mimo iż brakuje dowodów na dodatkowe korzyści.⁷⁵

D. Terapia skierowana na ośrodkowy układ nerwowy

Jest to czwarty i zarazem ostatni etap leczenia ALL, który odnosi się do terapii pacjentów z kliniczną chorobą OUN oraz profilaktyki u osób posiadających subkliniczną postać tej choroby. W momencie gdy nie istnieje specyficzna terapia ukierunkowana na szpik kostny, u większości dzieci występuje nawrót nowotworu, mimo iż dzięki ogólnoustrojowej chemioterapii można osiągnąć remisję w szpiku kostnym. Sposobem na wyłączenie choroby jest napromieniowanie czaszki, bezpośrednie dokanałowe podanie chemioterapii oraz ogólnoustrojowa chemioterapia, która ma możliwość penetracji bariery krew – mózg. We wszystkich schematach leczenia pojawia się, rozpoczynające się podczas indukcji remisji, dooponowe podanie chemioterapii. Leczenie dokanałowe, według niektórych protokołów, trwa przez całą terapię, natomiast czasem zdarza się, że nie jest ono brane pod uwagę w czasie trwania leczenia podtrzymującego. Do chemioterapii dooponowej zalicza się stosowanie metotreksatu (**6**) dooponowo lub dokanałowo, a także cytarabiny (**7**) i hydrokortyzonu (**15**).



15

Podczas zastosowania potrójnej terapii dooponowej zauważono zmniejszenie częstości występowania nawrotów, choć nie zarejestrowano różnicy między tymi dwoma lekami biorąc pod uwagę całkowity lub wolny od zdarzeń czas przeżycia.⁷⁶ W skład ogólnoustrojowej chemioterapii, która oddziałuje na ośrodkowy układ nerwowy

wchodzą: deksametazon (5) oraz duże dawki metotreksatu (6), cytarabiny (7) i asparaginazy. Wspomnianym wcześniej innym sposobem na eradykację nowotworu jest napromieniowanie jonizujące czaszki. Wykorzystanie tej metody stopniowo spada ze względu na ryzyko toksyczności, które w szczególności u młodszych pacjentów, przejawia się najczęściej niepełnosprawnością intelektualną, a także wtórnymi nowotworami złośliwymi. W związku z tym wiele protokołów leczenia wyraża zgodę na jego użycie tylko w przypadku osób z najwyższym ryzykiem nawrotu do OUN, inne zaś całkowicie rezygnują z jego zastosowania. Odroczenie napromieniania czaszki występuje także u pacjentów z jawną chorobą ośrodkowego układu nerwowego, aczkolwiek aby potwierdzić tę strategię wymagane są dokładniejsze badania.⁷⁷

3.1.1.7.2 Przeszczep allogeniczny

Końcową postacią intensyfikacji leczenia jest przeszczep allogeniczny, po zastosowaniu którego, dla osób dorosłych z ALL długotrwałe wskaźniki przeżycia wolnego od choroby mieszczą się w przedziale od 45% do 75%. Dla porównania, przy zastosowaniu chemioterapii, wskaźniki te wynoszą 30 – 40%. Niewielka liczba badanych pacjentów oraz sama ich selekcja komplikują interpretację wyników. Pomimo tego, zauważalne są pozytywne efekty przeszczepu allogenicznego występujące u pacjentów zarówno pediatrycznych jak i dorosłych z BCR-ABL+ ALL lub słabą początkową odpowiedzią na leczenie.^{78,79} Metoda ta udoskonala wyniki kliniczne dorosłych pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną z t(4;11), lecz jeśli mowa o niemowlętach z takich samym genotypem, tej pewności już nie ma. W badaniach z ostatnich lat zauważono, że podczas przeszczepu komórek od dopasowanego niespokrewnionego dorosłego dawcy lub z krwi pępowinowej wyniki są podobne do tych uzyskanych w wyniku transplantacji od dobranych spokrewnionych dawców.⁸⁰ W związku z tym kryteria przeszczepu powinny stale podlegać ocenie, ze względu na ulepszenia w tej procedurze jak i w chemioterapii. Ze względu na wyższą aktywność przeciwbiałaczkową gwarantowaną przez przeszczep allogeniczny, należy wykonać go u wszystkich pacjentów z dawcą identycznym pod względem HLA. Zmniejszenie ryzyka nawrotu jest bezsprzecznie lepsze niż sama chemioterapia lub autologiczny przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych. Największe badanie na ten temat wykazało pozytywne wyniki u pacjentów ze standardowym ryzykiem po przeszczepie hematopoetycznych komórek macierzystych, ale nie u pacjentów z wysokim ryzykiem. W ostateczności, częściowo z powodu śmiertelności związanej z transplantacją,

wskaźniki przeżycia były podobne do tych, gdzie w badaniach przyjęto dostosowaną do ryzyka strategię przeszczepu hematopoetycznych komórek macierzystych. Badania odnoszące się do allogenicznego przeszczepie hematopoetycznych komórek macierzystych wykazały przeżycie na poziomie powyżej 60% u pacjentów ze standardowym ryzykiem, gdzie śmiertelność związana z przeszczepami wynosiła od 16% do 20%. Natomiast biorąc pod uwagę pacjentów wysokiego ryzyka, 5-letnie przeżycie wahało się od 33% do 75%. Śmiertelność związana z transplantacją wynosiła aż 36%.⁸¹ W przypadku pacjentów obarczonych bardzo wysokim ryzykiem, źródłem komórek macierzystych są niespokrewnieni z rodziną dawcy – ochotnicy, ponieważ rodzeństwo identyczne pod względem HLA to 24% do 40% kwalifikujących się pacjentów.^{82a} Wraz z autologicznym przeszczepem hematopoetycznych komórek macierzystych, metoda ta pozwala na zwiększenie wykonalności przeszczepu o ponad 50%, a nawet 70%. Przeżycie w pierwszej całkowitej remisji wynosi około 42% do 45%, z niższym odsetkiem nawrotów i wyższym poziomem śmiertelności związanej z transplantacją w porównaniu z przeszczepem hematopoetycznych komórek macierzystych dawcy rodzeństwa. Porównując ze sobą dawców rodzinnych oraz niespokrewnionych, ci drudzy przeważnie są młodsi i powinni charakteryzować się mniejszą zachorowalnością. Spełniając powyższe kryteria, osiągnęte są lepsze wyniki niż w przypadku dawców rodzeństwa. Według analizy Europejskiej Grupy ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku, przeżycie wolne od choroby u 91 dorosłych pacjentów z medianą wieku 40 lat wynosiło 18%, ze śmiertelnością związaną z transplantacją 24% i ryzykiem nawrotu 58%.^{82b} Mimo iż wyniki te mogą wydawać się nie do końca zadowalające, zarówno u młodszych pacjentów ze współistniejącymi chorobami, jak i w podeszłym wieku, z wysokim ryzykiem nawrotu po chemioterapii, stosowano przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych z kondycjonowaniem o zmniejszonej intensywności. Zatem przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych z ulepszoną opieką wspomagającą dla pacjentów w podeszłym wieku może być nowym obszarem. Terapią eksperymentalną nazywany jest haploidentyczny przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych. Przydatność tej terapii ma być zbadana w późnym stadium choroby oraz w stanach bardzo wysokiego ryzyka.⁸³ Przeszczep ten wydaje się być zoptymalizowany dzięki niemieloablacyjnemu kondycjonowaniu, a także potransplantacyjnemu zastosowaniu cyklofosfamidu (2) w dużych dawkach. Jest on kolejną opcją dla pacjentów bez spokrewnionego/niespokrewnionego dawcy. Alternatywą allogenicznego przeszczepu hematopoetycznych komórek macierzystych jest terapia dużymi dawkami. Wówczas

następuje autologiczny przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych, który uzyskuje się przez pobranie szpiku kostnego lub aferezę macierzystych komórek krwi pobudzonych mieloidalnymi czynnikami wzrostu. Dobierając schemat leczenia, bywa że pacjenci zostają wykluczeni z możliwości allogenicznego przeszczepu hematopoetycznych komórek macierzystych, a w zamian za to przydzielani są do chemioterapii i autologicznego przeszczepu. Niekiedy lepsze rezultaty osiąga się dzięki chemioterapii, ale bywa też, że marginalną przewagę przejmuje autologiczny przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych, szczególnie u pacjentów z wysokim ryzykiem.^{84, 85} W analizie retrospektywnej dotyczącej autologicznego przeszczepu hematopoetycznych komórek macierzystych, 50 pacjentów z ujemnym wynikiem minimalnej choroby resztkowej (co oznaczało ujemny wynik minimalnej choroby resztkowej zarówno pacjenta, jak i autologicznych komórek macierzystych) miało znacznie wyższy stopień przeżycia.^{82b}

3.1.1.8 Nawrót choroby

Najczęstszą przyczyną niepowodzeń leczenia jest nawrót choroby, który dotyka 15 – 20% pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną. Częstość występowania nawrotów zależna jest od podtypu immunofenotypowego, genetycznego, a także inaczej zdefiniowanej kategorii ryzyka ALL.⁸⁶ U dzieci częstość ta wynosi około 25%, natomiast u dorosłych 50%. Najczęściej w czasie pierwszych 3 – 5 lat po otrzymaniu diagnozy występują nawroty większości ostrych białaczek limfoblastycznych. Jedynie w bardzo małej ilości przypadków nawroty te następują po więcej niż 5 latach, a w pojedynczych sytuacjach mogą wystąpić nawet 10 do 20 lat później. ALL zdiagnozowana po nawrocie zlokalizowana jest w szpiku kostnym lub w tkankach pozaszpikowych takich jak OUN, jądra czy jajniki. Nawroty pojawiające się w szpiku kostnym związane są z niekorzystnym rokowaniem w przeciwieństwie do tych pozaszpikowych lub łączonych.³⁰ Cechy morfologiczne i immunofenotypowe nawrotowej ostrej białaczki limfoblastycznej są często w dużej mierze podobne do tych obserwowanych w momencie początkowego rozpoznania. Można jednak również zaobserwować zmienne zmiany immunofenotypowe, w wyniku których niektóre antygeny mogą zwiększyć lub zmniejszyć intensywność, a nawet zniknąć przy nawrocie. Takie zmiany można znaleźć u 34% do 73% pediatrycznej B-ALL i 15% pediatrycznej T-ALL.⁸⁷ Najbardziej skrajne zmiany obejmują zmianę linii z B-ALL na T-ALL lub z ALL na AML lub białaczkę bifenotypową. Konwencjonalna cytogenetyka i analiza molekularna zazwyczaj

identyfikują translokacje i transkrypty fuzyjne obecne w momencie początkowej diagnozy. Ponadto analiza cytogenetyczna często (75%) identyfikuje nowo nabyte nieprawidłowości. Bardzo rzadko można zidentyfikować całkowicie inny kariotyp, co sugeruje możliwość wystąpienia drugiej *de novo* ostrej białaczki limfoblastycznej. Badania molekularne dokumentują zmiany we wzorcu rearanzacji genów, a nawet nabywanie nowych genów fuzyjnych. W rzadkich przypadkach (0,5% – 1,5%) szczegółowe badania molekularne mogą wspierać nową (drugą) ALL, różną od poprzedniej choroby. Wydaje się, że połączenie badań immunofenotypowych i molekularnych może rozróżnić trzy kategorie nawrotów ostrej białaczki limfoblastycznej: podobny do białaczki występującej w początkowej diagnozie, klonalnie wywodzący się z początkowej białaczki i rzadko drugi *de novo* ALL.⁸⁸ W przypadku intensywnej terapii, która może obejmować przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych, całkowite przeżycie z powodu nawrotu ostrej białaczki limfoblastycznej wynosi około 40%.^{45, 89} Zarówno pacjenci z nowo rozpoznaną jak i nawrotową ALL mogą być poddani stratyfikacji ryzyka. Czynniki prognostyczne w momencie nawrotu obejmują jego czas (krótszy czas wiąże się z gorszym rokowaniem), immunofenotyp (immunofenotyp limfocytów T wiąże się z gorszym rokowaniem) i miejsce (choroba szpiku kostnego wiąże się z gorszym rokowaniem niż choroba pozaszpikowa).⁹⁰ Zarówno miejsce nawrotu jak i długość pierwszej całkowitej remisji to dwa najważniejsze czynniki prognostyczne. Nawroty występujące w przeciągu 18 miesięcy od momentu rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej typu B są określane jako te najgorsze. Zdiagnozowane nawroty po ponad 3 latach od czasu rozpoznania charakteryzują się najlepszym rokowaniem. Przeżycie pacjentów w stanie wolnym od choroby dochodzi do poziomu 50%. Ze średnim rokowaniem związane są nawroty pojawiające się między 18 a 36 miesiącem po rozpoznaniu. Komórki białaczki uzyskane od pacjentów z wczesnym nawrotem często zawierają mutacje zmniejszające wrażliwość na powszechnie stosowane leki chemioterapeutyczne.⁹¹ Jeśli nawrót nastąpi po zakończeniu leczenia podstawowego, większość dzieci wejdzie w drugą remisję, a szansa na wyleczenie wynosi około 50%. Natomiast jeśli podczas terapii nastąpi nawrót, szansa na osiągnięcie drugiej remisji wynosi tylko 50% do 70%, a tylko 20% do 30% pacjentów zostaje wyleczonych. Po nawrocie choroby znacznie częściej stosuje się allogeniczny przeszczep komórek krwiotwórczych (u \geq 50% pacjentów) niż podczas terapii pierwotnej (u 5 do 10% pacjentów). Ocena odpowiedzi minimalnej choroby resztkowej może być pomocna

w ustaleniu, którzy pacjenci powinni przejść przeszczep w czasie drugiej remisji, a którzy nie.⁹² Bardzo ważną cechą ryzyka jest miejsce nawrotu, które najczęściej zlokalizowane jest w szpiku kostnym (miejsce to odnosi się do 50 – 60% przypadków). U 20% pacjentów występuje izolowana choroba OUN, u 5% – izolowana choroba jąder, natomiast pozostali zmagają się z połączeniem choroby szpiku kostnego i choroby pozaszpikowej. Porównując ze sobą izolowane nawroty pozaszpikowe oraz szpikowe, te pierwsze charakteryzują się znacznie lepszym rokowaniem. Natomiast, jeśli u kogoś występuje zarówno zajęcie szpiku kostnego jak i pozaszpikowe, wtedy rokowanie jest pośrednie.⁹³ Istotną rolę podczas nawrotu odgrywa grupa ryzyka. Mianowicie u osób, które początkowo zostały sklasyfikowane jako pacjenci standardowego ryzyka określono zwiększoną przeżywalność niż u grupy wysokiego ryzyka. Potwierdzeniem tego jest analiza osób z immunofenotypem komórek T, bowiem są to przypadki, które po nawrocie doznają szczególnie słabego rokowania. Podobna sytuacja ma miejsce odnośnie pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną, dopiero co zdiagnozowaną. W tym przypadku znaczenie prognostyczne ma odpowiedź na chemioterapię reindukującą.⁴⁵ Osoby, które zakończyły pierwszy cykl chemioterapii reindukcyjnej ale nadal zmagają się z chorobą morfologiczną odznaczają się szczególnie złym rokowaniem. Natomiast u pacjentów z ciągłą minimalną chorobą resztkową, mimo remisji morfologicznej, zauważalne jest gorsze rokowanie niż w przypadku osób z ujemną MRD po reindukcji.⁹⁴ Schemat leczenia za pomocą chemioterapii reindukcyjnej opiera się na 4-lekowej indukcji, tej samej jak w przypadku pierwszej diagnozy. Składa się ona z zastosowania winkrystyny (**3**), steroidów, asparaginazy i antracykliny. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie całkowitej remisji na poziomie nawet 85% już po pierwszym nawrocie. Leczenie poremisyjne w momencie drugiej całkowitej remisji uzależnione jest od ryzyka. Polega ono na przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych pacjentom z immunofenotypem komórek T oraz takim, którzy doświadczyli wczesnego nawrotu choroby szpiku. Za pomocą jedynie chemioterapii często jest możliwość wyleczenia osób z późnym nawrotem ALL. W momencie izolowanych nawrotów na OUN, pacjenci traktowani są kombinacją chemioterapii i napromieniowaniem czaszki, gdzie jako pierwszą podaje się chemioterapię w celu zapobiegania nawrotowi choroby. Z biegiem czasu okazało się, że promieniowanie czaszkowo-rdzeniowe nie przynosi większych efektów, stąd obecnie zrezygnowano z jego stosowania. Zauważono także, że w sytuacji izolowanych nawrotów ALL typu B w ośrodkowym układzie nerwowym, które miały miejsce w trakcie 18 miesięcy od chwili zdiagnozowania, odsetek przeżycia na poziomie

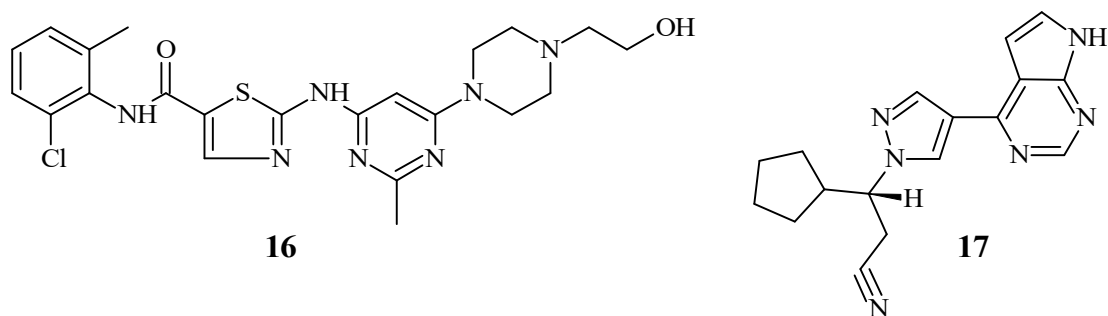
70% jest możliwy do osiągnięcia przy zastosowaniu jedynie chemioterapii. Dlatego też przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych nie jest już wymagany. W wypadku kiedy u pacjentów występuje wczesny izolowany nawrót w ośrodkowym układzie nerwowym i/lub immunofenotyp limfocytów T, wtedy rokowanie jest gorsze. W związku z tym wykonywany jest przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych, mimo iż nie ma przesłanek do stwierdzenia, że metoda ta pozwoli na uzyskanie lepszych wyników. Kolejny nawrót, który jest zależny od czasu trwania pierwszej całkowitej remisji to izolowany nawrót do jąder, przy czym gorsze wyniki osiągają pacjenci, którzy otrzymywali terapię wstępną. Leczenie tego rodzaju nawrotów polega na intensywnej chemioterapii reindukcyjnej z zastosowaniem dużych dawek metotreksatu (6), a także napromieniania jąder. W momencie braku osiągnięcia całkowitej remisji stosuje się orchidektomię.⁴⁵ W momencie wystąpienia drugiego czy kolejnego nawrotu choroby, ich terapia nie jest jasno określona, a przeżycie długoterminowe tych pacjentów jest raczej słabe. W wyniku pierwszego nawrotu osoby leczone wyłącznie chemioterapią, po osiągnięciu trzeciej remisji, przechodzą przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych. Natomiast biorąc pod uwagę osoby, które w czasie drugiej całkowitej remisji są po przeszczepie takich komórek, mogą być zakwalifikowane do drugiego przeszczepu. W przypadku nawrotowej ALL po przeszczepie krwiotwórczych komórek macierzystych, podawanie do organizmu pacjenta leukocytów od dawców zazwyczaj prowadzi do nietrwałej remisji, szczególnie gdy są stosowane w monoterapii.⁹⁵ Większość stosowanych chemioterapeutyków powoduje skutki uboczne takie jak: mielosupresja, zapalenie błony śluzowej, nudności i wymioty. W **Tabeli 4** zestawiono chemioterapeutyki wykorzystywane w leczeniu ALL wraz z efektami ich stosowania.

Środek chemioterapeutyczny	<u>Efekty/objawy</u>
Asparaginaza	Reakcje nadwrażliwości, zapalenie trzustki, zakrzepica
Klofarabina	Kardiotoksyczność, zespół uwalniania cytokin, hepatotoksyczność (w tym zespół niedrożności zatok), zapalenie trzustki, nefrotoksyczność
Kortykosteroidy	Nadciśnienie tętnicze, hiperglikemia, martwica kości, zatrzymanie płynów, psychoza
Cyklofosfamid	Nefrotoksyczność, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, hiponatremia, zatrzymanie płynów
Cytarabina	Zapalenie spojówek, objawy grypopodobne
Dokсорubicyna/ daunorubicyna	Kardiotoksyczność, łagodny czerwony mocz
Etopozyd	Nefrotoksyczność, hepatotoksyczność, reakcje nadwrażliwości
Merkaptopuryna	Hepatotoksyczność
Metotreksat	Zapalenie błony śluzowej, nefrotoksyczność, hepatotoksyczność, encefalopatia
Tioguanina	Hepatotoksyczność (w tym zespół niedrożności zatok sinusoidalnych i nadciśnienie wrotne)
Winkrystyna	Zespół niewłaściwego hormonu moczopędnego, neuropatia (opadanie stopy/nadgarstka, parestezje, zaparcia, opadanie powiek, niedowład strun głosowych)

Tabela 4. Wpływ powszechnych środków chemioterapeutycznych stosowanych w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej na organizm pacjenta.⁴⁵

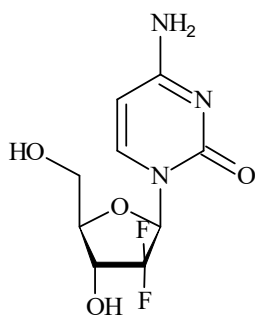
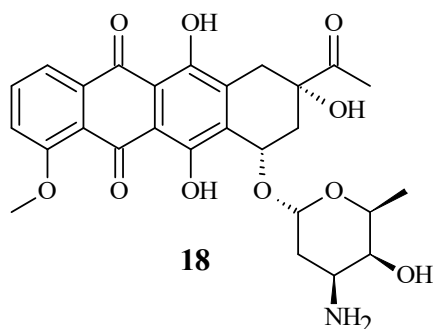
Po stosowaniu przez kilka lat kombinacji chemioterapii jako metody leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej możliwe jest osiągnięcie u wszystkich nowo zdiagnozowanych pacjentów 80% całkowitego przeżycia. Dla osób z większym ryzykiem nawrotu przewidziana jest bardziej agresywna terapia, w przeciwieństwie do pacjentów z korzystniejszymi wynikami, którym oszczędza się toksycznych skutków ubocznych. Wraz z biegiem czasu, niezależnie od zajęcia OUN w momencie diagnozy, stosuje się terapię skierowaną właśnie na ten układ, a samo leczenie nie jest już tak bardzo intensywne. W celu poprawy przeżywalności prowadzone są dalsze badania nowych

podejść terapeutycznych.⁴⁵ Takim podejściem jest terapia celowana, czyli taki rodzaj leczenia, w którym do identyfikacji i atakowania określonych komórek rakowych wykorzystuje się leki lub inne substancje. Terapie celowane, w porównaniu z chemioterapią i radioterapią, powodują mniej szkód na zdrowych komórkach. Jednym z rodzajów terapii celowanej jest terapia inhibitorem kinazy tyrozynowej, która ma celu zablokowanie enzymu. Skutkiem tego jest rozwój komórek macierzystych w większą ilość białych krwinek niż jest to potrzebne dla organizmu.^{96a} Mesyln imatynibu (**10**) i dazatynib (**16**) są inhibitorami kinazy tyrozynowej w leczeniu dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną z chromosomem Philadelphia. Natomiast ruksolitynib (**17**) jest inhibitorem kinazy tyrozynowej, który jest badany w leczeniu nowo zdiagnozowanej ostrej białaczki limfoblastycznej wysokiego ryzyka.

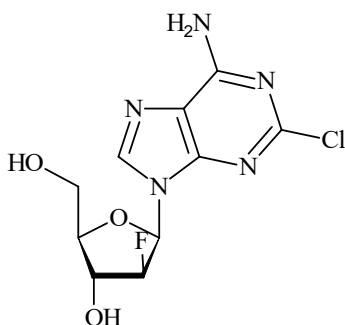


Przyszłość leczenia białaczki polega na określeniu szlaków molekularnych leżących u podstaw patogenezy tej choroby i dalszym wyjaśnieniu czynników farmakogenetycznych gospodarza. Jeśli wysiłki te zakończą się sukcesem, pozwolą zidentyfikować nowe geny, których produkty białkowe nadają się do terapii celowanej. Paradygmatem takiej terapii jest zastosowanie mesylanu imatynibu (**10**) i inhibitorów kinazy ABL drugiej generacji, które niedawno opracowano w celu przezwyciężenia oporności na imatynib (**11**).^{96b} Inne nowe leki we wczesnej fazie badań klinicznych obejmują inhibitory FLT3, inhibitory farnesylotransferazy, inhibitory γ -sekreazy i leki epigenetyczne do reaktywacji wyciszonych genów supresorowych nowotworów.⁹⁷ Inhibitory proteasomu i krótkie interferujące RNA są również badane jako potencjalne terapie. Chociaż nie są ukierunkowane na cele molekularne, opracowano kilka nowych preparatów istniejących środków, aby poprawić skuteczność i zmniejszyć toksyczne działanie związków macierzystych. Na przykład asparaginaza została zmodyfikowana przez kowalencyjne sprzężenie z glikolem monometoksylopolietylenowym w celu wydłużenia jej okresu półtrwania i zmniejszenia immunogenności.⁹⁸ Niedawno opracowana rekombinowana postać asparaginazy może być mniej immunogenna niż

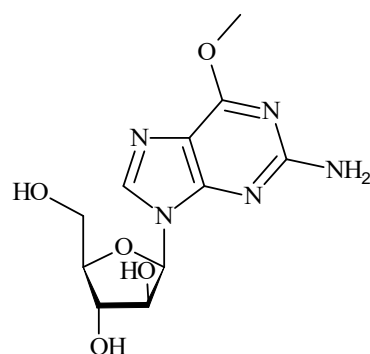
oryginalny produkt. Badane jest podawanie winkrystyny (**3**) i daunorubicyny (**18**) w postaci liposomalnej w celu zmniejszenia odpowiednio neurotoksyczności i kardiotoxyczności. Liposomalna cytarabina (**7**) o przedłużonym okresie półtrwania jest również testowana jako terapia dooponowa w celu poprawy kontroli choroby w ośrodkowym układzie nerwowym.⁹⁹ Kilka nowych analogów nukleozydów, takich jak gemcytabina (**19**), klofarabina (**20**) i nelarabina (**21**), okazało się obiecujących w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej. Wydaje się, że nelarabina (**21**) jest preferencyjnie skuteczna przeciwko ALL z komórek T.¹⁰⁰ Przeciwciała monoklonalne rytuksymab, gemtuzumab ozogamycyny, alemtuzumab i epratuzumab zostały włączone do niektórych schematów leczenia przeciwbiałczkowego ze względu na ich aktywność przeciwko niektórym antygenom związanym z białaczką. Wreszcie, ostatnie postępy w immunologii mogą doprowadzić do skutecznej adopcynnej immunoterapii komórkowej.¹⁰¹ Razem te postępy w terapii w przyszłości mogą zwiększyć odsetek wyleczeń ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci do ponad 90%, a u dorosłych do ponad 50%.



19



20

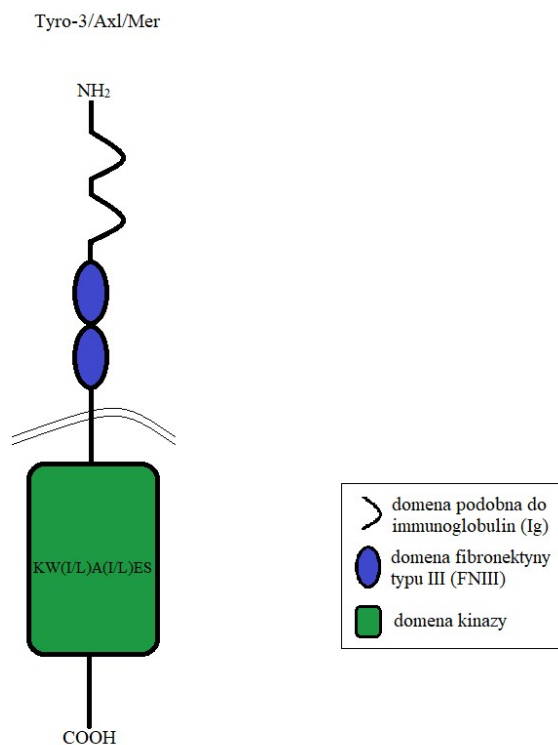


21

3.2 Receptorowe kinazy tyrozynowe

Kinazy tyrozynowe są jednym z rodzajów kinaz białkowych, czyli enzymów, które zaangażowane są w reakcję fosforylacji białka. Reakcja ta polega na przyłączeniu grupy fosforanowej do danej cząsteczki peptydu, co prowadzi do zmiany konformacji, czyli układu atomów. Powoduje to zmianę w aktywności białka albo jego zdolności do wiązania się z innymi białkami.

Receptorowymi kinazami tyrozynowymi (RTKs, ang. *Receptor Tyrosine Kinases*) nazywane są białka transbłonowe, których zadaniem jest transport sygnału do cytoplazmy i jądra komórkowego ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Dzięki temu kinazy mają możliwość regulacji procesów komórkowych takich jak przeżycie, wzrost, różnicowanie, adhezja i ruchliwość.¹⁰⁵ Zwiększona aktywność oraz ekspresja receptorowych kinaz tyrozynowych bezpośrednio prowadzi do patogenezy ludzkich nowotworów. Z biegiem czasu stało się to interesującym tematem do rozwoju i testów inhibitorów kinazy tyrozynowej jako leków przeciwnowotworowych. Ludzki genom posiada 58 receptorowych kinaz tyrozynowych. Biorąc pod uwagę podobieństwo sekwencji aminokwasów w domenie kinazy, a także podobieństwo strukturalne w zewnątrzkomórkowych regionach, wyodrębniono 20 rodzin.¹⁰² Niniejszy rozdział koncentruje się na rodzinie TAM, do której należą receptory Tyro-3, Axl i Mer, posiadające ligandy Gas6 i białko S, które zależne są od witaminy K. Kinazy z rodziny TAM posługują się szlakami sygnałowymi w celu posiadania wpływu na różne funkcje komórkowe. Tymi funkcjami często jest usuwanie makrofagów z komórek apoptotycznych, agregacja płytek krwi oraz różnicowanie komórek NK.¹⁰⁵ Wszystkie RTKs zbudowane są z trzech domen: zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i kinazy wewnątrzkomórkowej (**Rysunek 2**).



Rysunek 2. Budowa kinazy z rodziny TAM.¹⁰⁵

Ze względu na strukturę genomową najbardziej podobne do siebie są Tyro-3 i Axl, bowiem posiadają 20 sekwencji kodujących, w przeciwieństwie do MerTK, który ma ich 19.¹⁰³ Natomiast, jeśli brana jest pod uwagę sekwencja aminokwasów domeny kinazy, następuje zmiana podobnych do siebie kinaz. W tym przypadku to Axl i MerTK są wobec siebie bliźniacze. Biorąc pod uwagę domeny zewnątrzkomórkowe w ludzkich receptorach kinazy tyrozynowej około 36% sekwencji białkowych jest identycznych, a aż 57% podobnych, natomiast w obszarze wewnątrzkomórkowym identycznych jest 59%, a podobnych 75%.¹⁰⁵ Jak wspomniano wcześniej, kinazy Tyro-3, Axl i Mer to enzymy czyli białka, które składają się odpowiednio z 890, 894 i 999 aminokwasów. Na podstawie tej wiedzy rozmiar białek powinien wynosić 97, 98 i 110 kDa dla Tyro-3, Axl i Mer. Jednak ze względu na modyfikacje potranslacyjne rzeczywista masa cząsteczkowa mieści się w przedziale 100 – 140 kDa dla Axl i Tyro-3 oraz 165 – 205 kDa dla Mer.¹⁰⁴

Wracając do początków, wiadomo, że na odkrycie rodziny TAM receptorowych kinaz tyrozynowych potrzebowano trzech lat, a opublikowanie ich przez różne grupy badawcze spowodowało nieścisłości w nomenklaturze (**Tabela 5**).¹⁰⁵ Pod koniec XX wieku po raz pierwszy zidentyfikowano Axl. Został wykryty u dwóch pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową jako transformujący gen. Po trzech latach od tego wydarzenia inne

dwie grupy dokonały tego samego odkrycia, gdzie jedna z nich nazwała gen jako Axl (gr. *anexelekto*, czyli niekontrolowany), a druga dała mu nazwę UFO ze względu na jego jeszcze niepoznaną funkcję. W podobnym czasie kolejna grupa dokonała sklonowania mysiego genu. Nazwano go Ark. W tym samym roku kolejni badacze wyizolowali ze szczurzego mózgu 13 fragmentów PCR, w skład których wchodziło około 60 aminokwasów katalitycznej domeny kinazy tyrozynowej. Aminokwasy te nazwano od Tyro-1 do Tyro-13, z czego Tyro-3, -7 i -12 zakwalifikowano do nowej podrodziny ze względu na oryginalną sekwencję aminokwasów. Po pewnym czasie i zaawansowanych badaniach udowodniono, że Tyro-7 to ten sam gen co Axl/UFO, Tyro-12 jest genem Mer, natomiast Tyro-3 jest odrębnym, trzecim członkiem rodziny TAM. Cztery lata po odnalezieniu kinazy Axl, wyizolowano z retrowirusa drobiu RLP30 drugiego członka rodziny TAM o nazwie v-ryk. W 1992 roku sklonowano ludzki gen *gt11*, który otrzymał nazwę *c-mer*, pochodzącą od umiejscowienia go w monocytach, ale też w tkankach nabłonkowych i rozrodczych. Rok później sklonowano mysiego *c-mer*, a ludzki gen sklonowano w niezależnym laboratorium i nazwano Nyk. Kinaza Mer dostała także nazwę MerTK, która pochodzi od kinazy tyrozynowej. Po czasie, fragmenty mysiego Tyro-3 nazwano Etk-2, a w 1994 roku sklonowano mysiego oraz ludzkie geny przez liczne laboratoria. Dtk, Brt, Rse, Tyro-3 to nowe nazwy genu mysiego, podczas gdy Sky, Tif lub Rse – genu ludzkiego. Dwa lata później sklonowano homologiczny gen drobiu, któremu nadano nazwę Rek, ponieważ posiadał średnią identyczność aminokwasów względem mysich i ludzkich genów. Mimo powstania tak wielu nazw to właśnie Tyro-3, Axl i Mer (lub MerTK) przetrwały do dzisiaj i są najczęściej publikowane.¹⁰⁵

Kinaza	Synonimy
Tyro-3	Brt (m), Dtk (m), Rse, Sky, Tif, Etk-2 (m), Rek (ch)
Axl	Ark (m), Ufo, Tyro-7 (r)
Mer	Eyk (ch), MerTK, Nyk, Tyro-12 (r)
m – mysz, r – szczur, ch – drób	

Tabela 5. Nomenklatura receptorów TAM.¹⁰⁵

Ekspresja mRNA rodziny TAM receptorowych kinaz tyrozynowych widoczna jest na etapie embrionalnym. Mimo to, osobniki nawet z potrójnymi delecjami po urodzeniu nie posiadają widocznych wad rozwojowych. Na podstawie tego można wyciągnąć wniosek, że receptorowe kinazy tyrozynowe TAM nie mają większego znaczenia w czasie embriogenezy oraz, że dorosłe myszy bez aktywnych kinaz rodziny TAM mogą rozwijać

różnorodne fenotypy. W dorosłych tkankach, Tyro-3 najczęściej pojawia się w układzie nerwowym oraz jajnikach, jądrach, piersiach, płucach, nerkach, osteoklastach, siatkówce, a także w wielu liniach komórek krwiotwórczych, w tym monocytach, makrofagach i płytkach krwi. Obecność Axl potwierdzono w hipokampie i mózdku, jak również w monocytach, makrofagach, płytkach krwi, komórkach śródbłonna, sercu, mięśniach szkieletowych, wątrobie, nerkach i jądrach. Natomiast Mer jest ekspresjonowany w monocytach, makrofagach, komórkach dendrytycznych, komórkach NK, komórkach NKT, megakariocytach i płytkach krwi. Ekspresja kinazy Mer na wyższym poziomie odbywa się w jajnikach, prostaty, jądrach, płucach, siatkówce i nerkach, a jego niższe poziomy mają miejsce w sercu, mózgu i mięśniach szkieletowych.^{105, 106} Nadekspresja kinaz rodziny TAM ujawnia się w licznych nowotworach takich jak białaczki szpikowe i limfoblastyczne, czerniak, rak piersi, płuc, okrężnicy, wątroby, żołądka, nerki, jajnika, macicy i mózgu (**Tabela 6**). Warto zauważyć, że w danym nowotworze występuje różna konfiguracja kinaz rodziny TAM. To oznacza, że przykładowo w białaczce limfoblastycznej występuje jedynie kinaza Mer, natomiast w raku tarczycy tylko Axl.

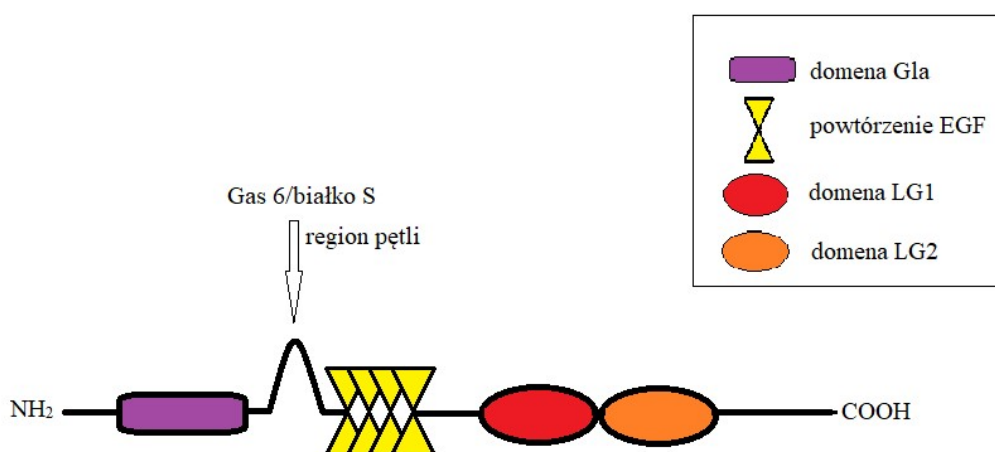
Nowotwór	Axl	Mer	Tyro-3
Białaczki szpikowe (AML, CML)	✓		✓
Białaczka limfoblastyczna (ALL)		✓	
Białaczka erytroidalna	✓		
Białaczka megakariocytowa	✓		
Chłoniak z komórek płaszczka		✓	
Szpiczak mnogi			✓
Rak endometrium macicy	✓		
Rak żołądka	✓	✓	
Rak jelita grubego	✓		
Rak prostaty	✓	✓	
Rak tarczycy	✓		
Rak płuc	✓		
Rak piersi	✓	✓	
Rak jajnika	✓		
Rak wątroby	✓		
Rak nerkowokomórkowy	✓		

Gwiaździatek/glejak wielopostaciowy	✓		
Gruczołek przysadki		✓	
Czerniak	✓	✓	
Kostniakomięsak	✓		
Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy		✓	

Tabela 6. Ekspresja receptora TAM w ludzkich nowotworach.¹⁰⁵

3.2.1 Ligandy

Ligandami receptorowych kinaz tyrozynowych z rodziny TAM jest białko Gas6 oraz białko S. To pierwsze na początku zostało odkryte jako zależny od witaminy K ligand dla kinazy Axl, natomiast to drugie jako ligand Tyro-3, aczkolwiek kolejne badania udowodniły, że Gas6 jest idealnym ligandem dla wszystkich trzech kinaz rodziny TAM. W kolejnych badaniach wykazano, że drugi ligand, czyli białko S, aktywuje zarówno kinazę Mer jak i Tyro-3.¹⁰⁶ Na temat aktywacji kinazy Axl przez białko S nie dostarczono jeszcze dostatecznych dowodów. Inne prowadzone eksperymenty miały na celu wyznaczyć powinowactwo między ligandami a receptorami TAM. Na ich podstawie zauważono, że Gas6 wiąże się do kinazy Axl i Tyro-3 z podobnym powinowactwem, natomiast powinowactwo z MerTK jest 3 – 10-krotnie niższe.¹⁰⁷ Budowa białek Gas6 oraz S jest bardzo podobna, ponieważ posiadają one tę samą strukturę domeny, a sekwencja aminokwasów jest identyczna w 43%. Jediną różnicą są miejsca cięcia trombiny, których brakuje w ligandzie Gas6 (**Rysunek 3**).¹⁰⁸



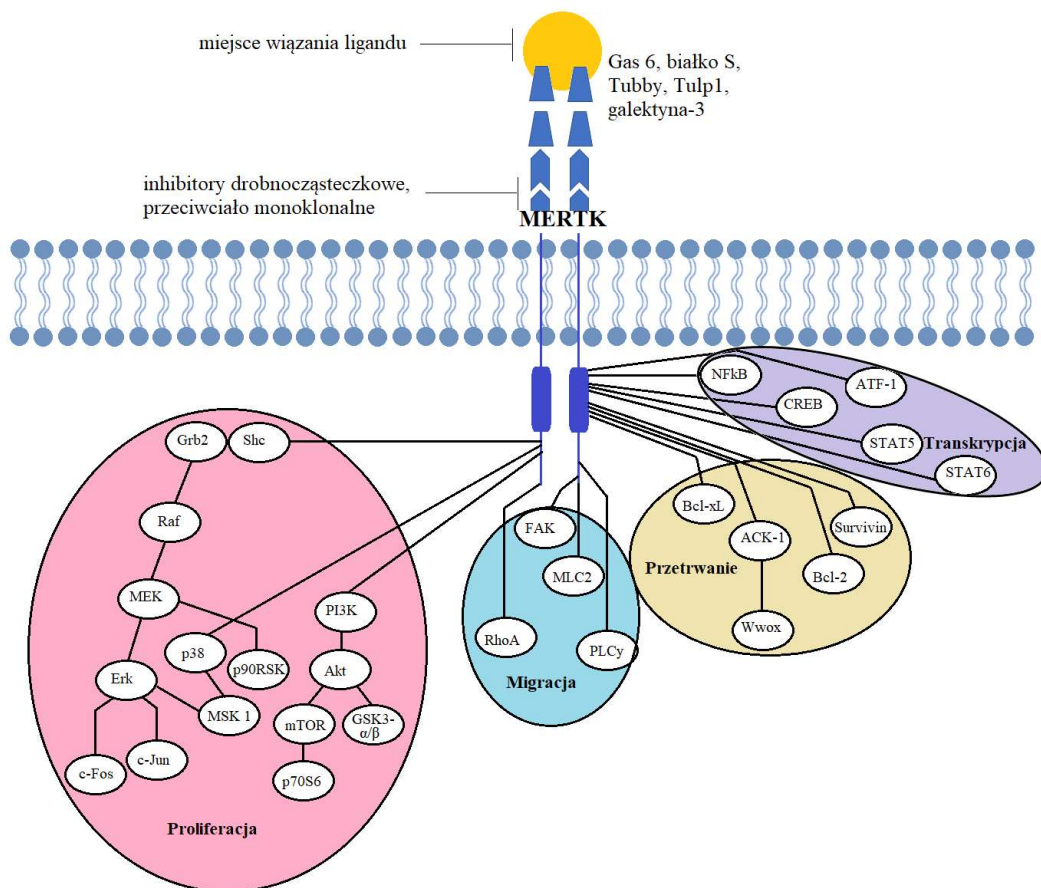
Rysunek 3. Struktura domeny ligandów Gas6 i białka S receptora TAM.¹⁰⁵

Struktura ligandów zaczyna się od domeny zawierającej reszty kwasu glutaminowego, zakończonej grupą aminową. Następnym elementem są cztery powtórzenia EGF (ang. *epidermal growth factor*), czyli obszary wykazujące podobieństwo do czynnika wzrostu naskórka oraz dwie domeny LG (domeny globularne lamininy (G)) zakończone grupą karboksylową. Zadaniem domeny kwasu glutaminowego (Gla) jest wiązanie ujemnie naładowanych fosfolipidów błonowych występujących na powierzchni komórek apoptotycznych, natomiast domeny LG mają być pośrednikami w trakcie interakcji między ligandem a receptorem.¹⁰⁹ Obydwa białka występują w krwi ludzkiej dzięki wydzielaniu ich przez różne typy komórek, aczkolwiek ilość białka S jest tysiąc razy większa. Ostatnimi czasy pojawiły się nowo zidentyfikowane 3 ligandy MerTK takie jak Tubby, białko Tuby-like 1 (Tulp1) i galektyna-3, które indukują jej autofosforylację.¹¹⁰ Pomimo, że ligandy te nie były sprawdzane na nowotworach kierowanych przez MerTK, potwierdzono, że galektyna-3 wykazuje nadekspresję w wielu innych nowotworach.

3.2.2 Kinaza Mer

MerTK jest receptorową kinazą tyrozynową zaangażowaną w ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL), najczęstszy nowotwór złośliwy u dzieci. Należy do rodziny TAM, w skład której wchodzi także kinaza Tyro-3 oraz Axl. Każdy członek rodziny TAM zawiera domenę zewnątrzkomórkową, transbłonową i kinazy wewnątrzkomórkowej.¹⁰⁵ Wewnątrzkomórkowa domena kinazy z rodziny TAM posiada 40% identyczności sekwencji aminokwasów względem innych kinaz tyrozynowych, co powoduje, że MerTK może być selektywną kinazą wobec małych cząsteczek. Głównym zadaniem kinaz z rodziny TAM jest wzrost komórek w różnych narządach, a także rodzajach nowotworu. Dlatego też w komórkach ostrej białaczki szpikowej (AML) i limfoblastycznej (ALL) dostrzeżono nadespresję kinazy Mer. W normalnych warunkach fizjologicznych kinaza MerTK promuje proliferację i przeżycie komórek, agregację płytek krwi, usuwanie makrofagów z komórek apoptotycznych i uwalnianie cytokin. Nieprawidłowa aktywacja MerTK jest powiązana z onkogenezą wielu ludzkich nowotworów i często wiąże się ze złymi wskaźnikami prognostycznymi.¹¹¹ Ta nieprawidłowa ekspresja pojawia się w ALL komórek B jak i T, natomiast nie występuje, na żadnym etapie rozwoju, w normalnych limfocytach B i T. Podobna sytuacja tyczy się ostrej białaczki szpikowej (AML), a mianowicie kinaza Mer znajduje się w ponad połowie linii komórkowych tej białaczki, za to nie występuje w zdrowych komórkach szpiku kostnego. W innym przypadku MerTK powiązana jest z liniami

komórkowymi niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), pomimo że ani komórki nabłonka oskrzeli ani tkanka płuc, która przylega do guzów nie wykazują ekspresji białka MerTK. Taka sama sytuacja miała miejsce w przypadku innych guzów litych, w tym glejaka wielopostaciowego (GBM), czerniaka przerzutowego, raka prostaty, piersi, okrężnicy, żołądka, gruczolakach przysadki i mięśniakomięsakach prążkowano-komórkowych. Sytuacja ta może doprowadzić do aktywacji kilku onkogennych szlaków sygnałowych (**Rysunek 4**).¹¹² Szlaki te mają wpływ na zwiększenie proliferacji i migracji, a także zmniejszenie apoptozy i chemiowrażliwości. Przedstawiona poniżej na Rysunku 4 kaskada sygnalizacyjna zapoczątkowana jest przez autofosorylację MerTK, która to z kolei jest indukowana przez ligandy Gas6, białko S, Tubby, Tulp1 i Galectin-3.



Rysunek 4. Sieć sygnalizacyjna MerTK.¹¹²

W komórkach nowotworowych zdarzenia sygnalizacyjne skutkują zmniejszoną apoptozą, zwiększoną migracją, opornością na chemioterapię, zwiększonym tworzeniem kolonii oraz guzów w modelach mysich. Wszelkie nowotwory związane z MerTK wynikały z nieprawidłowej ekspresji tej kinazy, a także stymulacji komórek

nowotworowych poprzez autofosforylację nakreślaną przez białko Gas6 oraz aktywację Erk1/2 i Akt. W przypadku ludzkich linii komórkowych ALL komórek T, Gas6 był także odpowiedzialny za aktywację MerTK, Erk1/2, Akt, STAT5 i STAT6.^{112, 113}

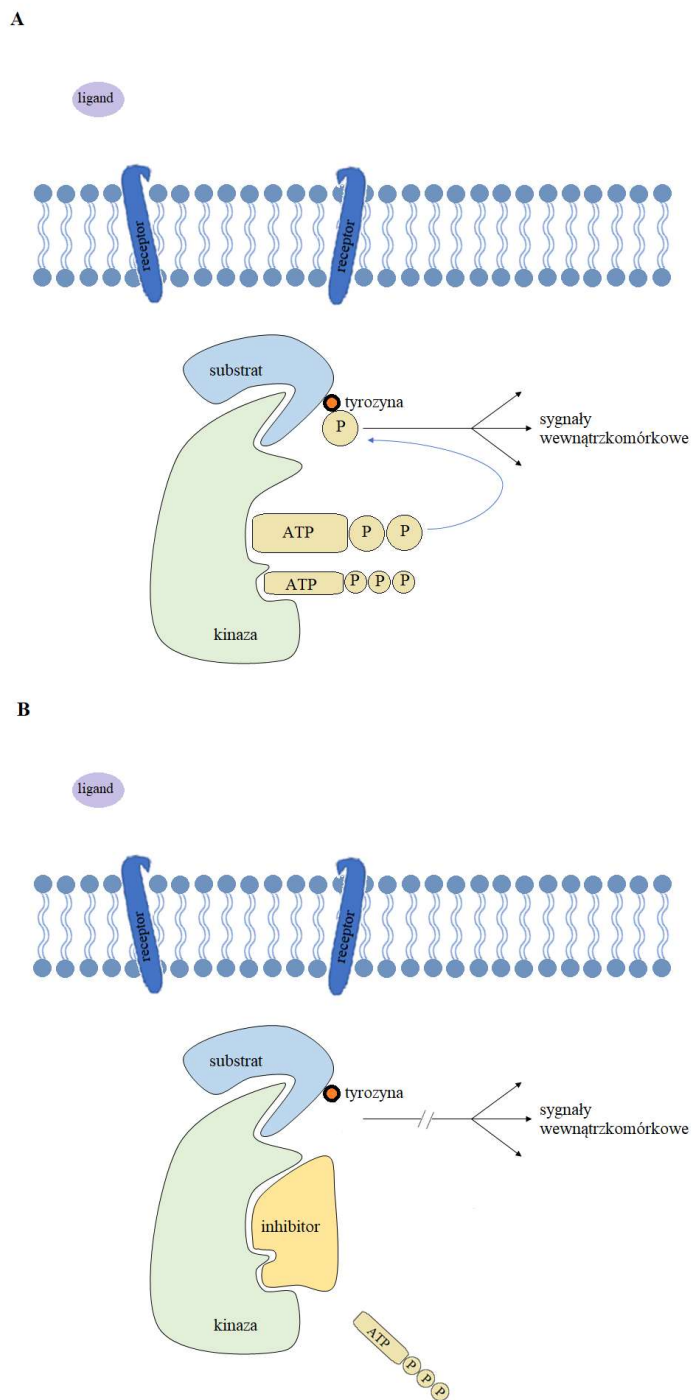
W ciągu ostatnich lat skuteczność przedłużania życia w różnych typach nowotworów wzrosła dzięki odpowiednim środkom terapeutycznym. Aczkolwiek znaczna ilość pacjentów onkologicznych posiada złożone czynniki onkogenne i to identyfikacja dodatkowych celów terapeutycznych stała się głównym celem badań. Jednym z nich jest kinaza Mer i to jej sygnalizacja daje przewagę komórce nowotworowej.¹¹² Pełni ona także ważną rolę w onkogenezie jak również w aktywności antyapoptotycznej w różnych typach nowotworu. W związku z tym MerTK określany jest jako nowy cel terapeutyczny w przypadku leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej i szpikowej, niedrobnokomórkowego raka płuc, ale też i pozostałych chorób mających związek z kinazą Mer. Ostatnimi czasy, rosną oczekiwania wobec inhibitorów kinazy Mer w związku z bezpośrednim działaniem przeciwnowotworowym, proapoptotycznym oraz pogłębianiem chemiowrażliwości w połączeniu ze standardowymi terapiami. Od momentu odkrycia kinazy Mer, jest ona nieprzerwanie zaangażowana w patogenezę nowotworów. Mimo iż w dużej ilości linii komórkowych ALL ulega nieprawidłowej ekspresji, jest on nieobecny w zdrowych limfocytach T i B. Świadczy to o tym, że receptorowa kinaza tyrozynowa Mer ma szansę być atrakcyjnym celem podczas terapeutycznego rozwoju dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej.^{112, 114}

3.2.2.1 Inhibitory kinazy Mer

Kinazy tyrozynowe odgrywają bardzo ważną, a nawet kluczową rolę w takich procesach jak transdukcja sygnałów, kontrola wielu ważnych procesów w komórkach prawidłowych i nowotworowych, a także hamowanie szlaków sygnałowych. Ten ostatni proces, realizowany poprzez onkogenne kinazy tyrozynowe zdaje się być obiecującym celem terapii przeciwnowotworowej.¹¹⁵ Wspomniana wcześniej chemioterapia, która jest jedną z trzech podstawowych metod leczenia nowotworów, opiera się na stosowaniu naturalnych i syntetycznych leków cytostatycznych. Niestety, większość z nich nie jest selektywna i nie działa jedynie na komórki nowotworowe, ale także uszkadza prawidłowe, szybko dzielące się komórki takie jak szpik kostny, komórki nabłonkowe, komórki rozrodcze czy komórki układu chłonnego. Niesie to ze sobą wiele istotnych działań niepożądanych. Ze względu na wąski współczynnik terapeutyczny leków cytostatycznych jak również ich nieswoiste działanie, skuteczność konwencjonalnej

terapii jest ograniczona i często trudna do przewidzenia. Skutkiem tego jest coraz większe zainteresowanie lekami przeciwnowotworowymi, których mechanizm działania całkowicie różni się od dotychczas stosowanych cytostatyków.¹¹⁶ Rozwój wiedzy na temat molekularnych podstaw funkcjonowania komórek nowotworowych oraz mechanizmów transformacji nowotworowej umożliwił powstanie nowego podejścia terapeutycznego zwanego terapią celowaną. Jest to terapia, która polega na hamowaniu wyznaczonych szlaków sygnałowych, mających udział w procesie onkogenezy. Hamowanie to odbywa się za pomocą związków, które w sposób selektywny modyfikują biologiczne właściwości komórek nowotworowych lub otaczającego je środowiska. Przede wszystkim terapia ta skupia się na konkretnych uszkodzeniach przekazu informacji, a nie na samym podziale komórkowym. Dzięki temu podejściu, nowe leki są bardziej selektywne wobec komórek nowotworowych niż klasyczne cytostatyki. Takimi preparatami są inhibitory kinaz tyrozynowych. Porównując konwencjonalną chemioterapię oraz terapię celowaną, terapia ta uzyskuje przewagę ze względu na wysoką specyficzność wobec komórek nowotworowych, co niewątpliwie wiąże się z większą skutecznością oraz niższym poziomem toksyczności wobec prawidłowych tkanek.¹¹⁷ W związku z tym, iż kinazy tyrozynowe biorą udział w transdukcji sygnałów, precyzyjna regulacja ich aktywności warunkuje prawidłowe funkcjonowanie wszystkich komórek organizmu. W wielu chorobach, przeważnie nowotworowych, występują zaburzenia w przekazie sygnału realizowanego przy udziale właśnie kinaz tyrozynowych. Zdarza się również, że na skutek mutacji oraz nadekspresji genów, które kodują kinazy, następują zmiany w strukturze, a także w konstytutywnej, niezależnej od wiązania z ligandem aktywacji tych enzymów. Końcowym efektem jest indukcja efektów antyapoptotycznych, promocja angiogenezy, przerzutowanie, a także niekontrolowany wzrost i proliferacja komórek nowotworowych. Stąd zahamowanie sygnału przekazywanego przez kinazy tyrozynowe stało się obiecującym celem terapii przeciwnowotworowej. Chociaż rodzina TAM receptorowych kinaz tyrozynowych nie jest czynnikiem onkogennym, ich wewnętrzna i nabyta oporność terapeutyczna oraz działanie immunosupresyjne sugerują, że mogą być skutecznymi celami hamowania nowotworu przy użyciu drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz, specyficznych przeciwciał monoklonalnych lub domen zewnątrzkomórkowych, które działają jako „pułapki ligandów”. Najlepsze podejście może zależeć od kontekstu, na przykład małe cząsteczki, które hamują zarówno kinazę Mer, jak i Axl, mogą być najbardziej przydatne w leczeniu raka płuc, w którym oba są wyrażane i mogą odgrywać niezależną rolę

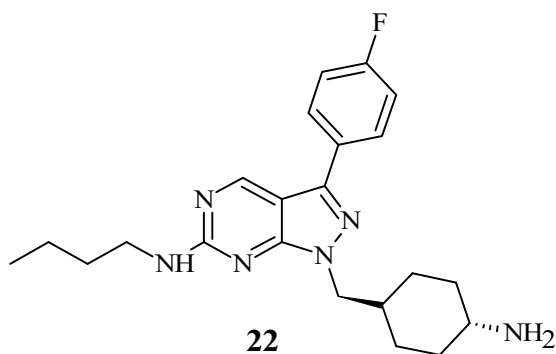
w progresji guza. Natomiast zastosowanie środka selektywnego może zminimalizować skutki uboczne związane z terapią, na przykład selektywny inhibitor lub przeciwciało kinazy Mer może być najlepszy w pediatrycznej ostrej białaczce limfoblastycznej, w której MerTK jest często wyrażany, ale Axl już nie. Selektywne inhibitory kinazy Mer będą również w wąskim zakresie ukierunkowane na immunosupresyjny fenotyp makrofagów. Alternatywnie, może być konieczne zahamowanie kilku receptorowych kinaz tyrozynowych z rodziny TAM aby wpłynąć na szereg wrodzonych komórek odpornościowych i skutecznie stymulować odporność przeciwnowotworową.¹¹⁸ Inhibitory kinaz tyrozynowych to nic innego jak grupa leków ukierunkowana molekularnie, która jest stosowana w leczeniu przeciwnowotworowym. W ramach terapii celowanej mają one działanie selektywne, przez co dają zdecydowanie mniej działań niepożądanych. Działanie inhibitorów kinaz tyrozynowych polega na wiązaniu i blokowaniu domeny odpowiedzialnej za wiązanie ATP, w centrum katalitycznym enzymu (**Rysunek 5**).¹¹⁵ Dokładniej mówiąc, konstytutywnie aktywna kinaza tyrozynowa Bcr-Abl przyłącza cząsteczkę ATP, po czym następuje przeniesienie reszty fosforanowej z ATP na tyrozinę białka substratowego (**Rysunek 5A**). Dzięki temu sygnał proliferacyjny jest nieustannie przekazywany do jądra komórkowego. W momencie gdy inhibitor przyłącza się do kinazy tyrozynowej w miejscu przeznaczonym dla cząsteczki ATP, uniemożliwia to fosforylację reszty tyrozynowej substratu i tym samym blokuje aktywację białek przekazujących sygnał proliferacyjny do jądra komórkowego (**Rysunek 5B**). Większość inhibitorów nie jest całkowicie specyficzna i wykazuje powinowactwo do kilku kinaz tyrozynowych.



Rysunek 5. Molekularny mechanizm działania inhibitorów kinaz tyrozynowych.

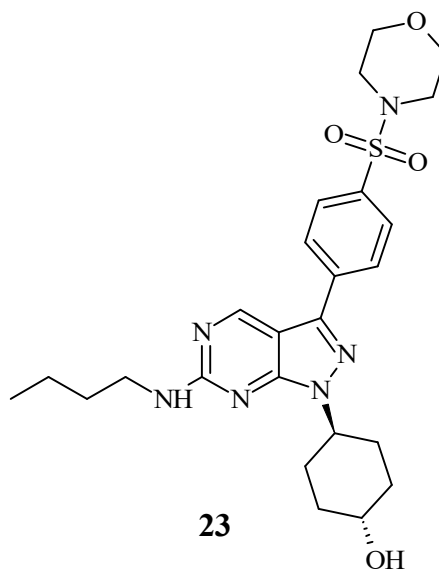
Drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych są lekami skutecznymi. Wykazują selektywność wobec komórek nowotworowych, w związku z czym posiadają mniejsze lub inne działania niepożądane niż klasyczne leki cytostatyczne. Niewątpliwą zaletą tych leków jest również to, że większość z nich występuje w formie doustnej, co podnosi komfort życia pacjentów podczas terapii oraz eliminuje ryzyko powikłań występujących po podaniu donaczyniowym. Ze względu na korzystny profil bezpieczeństwa oraz

synergistyczne działanie, mogą być one stosowane razem z klasycznymi cytostatykami i radioterapią.¹¹⁹ Inhibitory kinaz tyrozynowych są obecnie z powodzeniem stosowane w terapii nowotworów, dlatego też wciąż trwają badania nad nowymi lekami z tej grupy. Wiele inhibitorów kinaz tyrozynowych znajduje się w fazie badań klinicznych. Jednym z pierwszych zgłoszonych selektywnych inhibitorów MerTK był UNC569 (**22**), czyli 1-[(*trans*-4-aminocykloheksylo)metylo]-*N*-butylo-3-(4-fluorofenylo)-1*H*-pirazolo-[3,4-*d*]-pirymidyno-6-amina, który silnie hamował fosforylację MerTK w liniach komórkowych B i T ostrej białaczki limfoblastycznej, a także posiadał skuteczność terapeutyczną w modelu T-ALL danio pręgowanego.¹²⁰



Struktura kryształu Mer w kompleksie z UNC569 (**22**) pokazała, że inhibitor pozostaje zamknięty w stosunkowo małej kieszonce adeninowej. Prawdopodobnym jest, że obecność większych aminokwasów, takich jak Leu671 oraz Ile650, w tylnej kieszeni lipofilowej ogranicza dostęp do inhibitora. Wstępne wyniki badań farmakokinetycznych wykazały, że UNC569 (**22**) miał obiecujące właściwości, w tym niski klirens ogólnoustrojowy, dużą objętość dystrybucji i zadowalającą biodostępność po podaniu doustnym, a także był w stanie zahamować autofosforylację Mer w ludzkich komórkach B ostrej białaczki limfoblastycznej z wartością IC_{50} wynoszącą 0,141 mM. Inhibitor ten zastosowano również do udowodnienia, że hamowanie kinazy Mer odwróciło oporność niedrobnokomórkowego raka płuc na leczenie Erlotylibem. Niemniej jednak UNC569 (**22**) hamował zdolność białaczkową i litych komórek nowotworowych do tworzenia kolonii, uwrażliwiał blasty białaczkowe na środki chemioterapeutyczne i hamował progresję guza w modelu T-ALL z ekspresją MerTK. Wykazywał on także niecelową aktywność w stosunku do hERG i suboptymalną siłę działania w stosunku do MerTK, o czym sądzono, że jest związane z obecnością pierwszorzędowej grupy aminowej. Podjęto zatem chemiczną optymalizację wokół pirazolo[3,4-*d*]pirymidyny, która doprowadziła do identyfikacji UNC1062 (**23**), ulepszonego, silnego i selektywnego

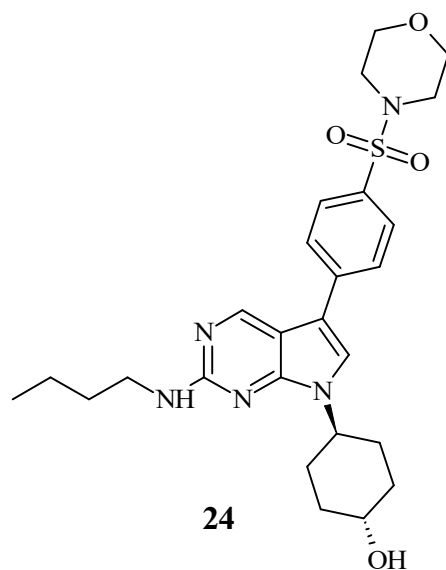
inhibitora kinazy Mer ($IC_{50} = 1,1 \text{ mM}$), w którym grupę *trans*-4-aminocykloheksylometylową zastąpiono grupą 4-hydroksycykloheksylową.



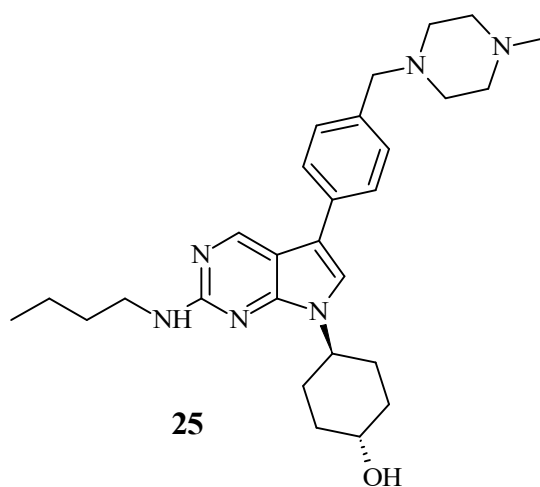
Chociaż obecność grupy dostarczającej wiązanie wodorowe była kluczowa dla utrzymania aktywności, to konfiguracja grupy hydroksylowej była nieistotna.

UNC1062 (**23**) o nazwie *trans*-4-{6-(butyloamino)-3-[4-(4-morfolinylsulfonylo)fenylo]-1*H*-pirazolo-[3,4-*d*]pirymidyn-1-yl}cykloheksanol, który jest pochodną UNC569 (**22**) o zwiększonej sile działania i mniejszym potencjale toksyczności kardiologicznej, hamował sygnalizację przeżycia MerTK w komórkach czerniaka, prowadząc do zahamowania tworzenia kolonii w różnych liniach komórek rakowych. Co ciekawe, UNC1062 (**23**) był 78- i 54-krotnie bardziej aktywny na kinazę Mer niż odpowiednio na Axl i Tyro3. Niemniej jednak, pomimo tego, że inhibitor ten był obiecującym kandydatem do opracowania leku przeciwnowotworowego, UNC1062 (**23**) wykazywał słabe właściwości farmakokinetyczne, takie jak niska rozpuszczalność i brak ekspozycji doustnej.¹²¹

Kolejna pochodna, UNC1666 (**24**) *trans*-4-{2-butyloamino-5-[4-(4-morfolinylsulfonylo)-fenylo]-1*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksanol (**Schemat 4**), ma zmniejszoną aktywność wobec hERG i zwiększoną siłę działania wobec MerTK, ale jest nieodpowiedni do badań translacyjnych ze względu na profile farmakokinetyczne.¹²²

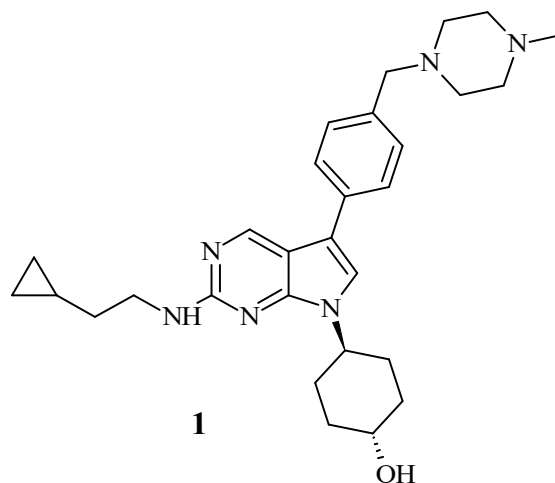


Aby zoptymalizować inhibitory MerTK do użytku klinicznego, dalsze modyfikacje UNC1062 (**23**) dały UNC2025 (**25**), czyli *trans*-4-[2-(butyloamino)-5-[4-[(4-metylo-1-piperazylo)metylo]fenylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksanol.



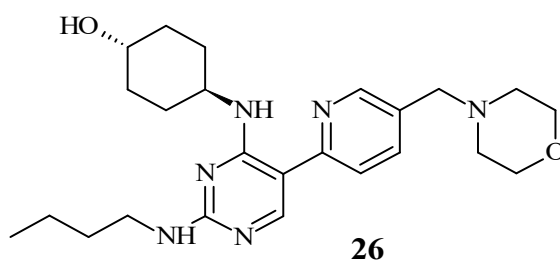
Zastąpienie łącznika sulfonamidowego prostą grupą metylenową zaowocowało odkryciem tego analogu o wysokiej aktywności ($IC_{50} = 0,74$ nM) oraz doskonałej rozpuszczalności, niskim klirensie, dłuższym okresie półtrwania i wysokiej ekspozycji doustnej (100%). Przeprowadzono badanie przesiewowe selektywności ponad 305 kinaz za pomocą zewnętrznego testu elektroforezy mikrokapilarnej, gdzie UNC2025 (**25**) wykazało hamowanie Mer i Flt3 z największą siłą (odpowiednio $IC_{50} = 0,46$ nM i 0,35 nM), ale wykazywało niewielką selektywność wobec rodziny TAM ($IC_{50} = 1,65$ nM dla Axl i $IC_{50} = 5,83$ nM dla Tyro3). Ponadto, inhibitor ten ma silne działanie przeciwko MerTK z $IC_{50} = 2,7$ nM i jest 45-krotnie bardziej selektywny niż Tyro3 lub Axl w testach

komórkowych. Pojedyncza dawka doustna 3 mg/kg dała $C_{\max} = 1,6$ M przy $T_{1/2} = 3,8$ h u myszy. Związek był dobrze tolerowany z minimalną i możliwą do kontrolowania toksycznością w modelach zwierzęcych. Co więcej, w przypadku myszy, które w szpiku kostnym posiadały komórki białaczkowe, UNC2025 powoduje prawie całkowite zahamowanie fosforylacji kinazy Mer. W modelach ksenoprzeszczepów linii komórkowych B-ALL zależnej od MerTK leczenie UNC2025 (**25**) zwiększało przeżywalność zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z chemioterapią cytotoksyczną. Monoterapia w przypadku pacjenta z modelem ksenoprzeszczepu AML jest wystarczająca do regresji choroby w szpiku kostnym, śledzionie i krwi. Z ponad 200 próbek otrzymanych od pacjentów chorych na białaczkę około jedna trzecia z nich była szczególnie wrażliwa na działanie UNC2025 (**25**), a prawie połowa reagowała na leczenie tym inhibitorem. W związku z powyższym, można stwierdzić, że terapia inhibitorem UNC2025 (**25**) pacjentów z białaczką może dawać zadowalające wyniki i mieć korzystny wpływ na dalszy rozwój kliniczny.¹²³ Dzięki temu, Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła do badań klinicznych związek analogiczny do UNC2025 (**25**). Jest nim inhibitor MRX2843 (**1**), który od UNC2025 (**25**) różni się jedynie zmianą łańcucha bocznego, co nie zmienia profilu toksyczności ani właściwości farmakokinetycznych. Dodatkowo posiada także właściwości indukowania apoptozy oraz hamuje tworzenie się kolonii komórek nowotworowych z ekspresją na MerTK.



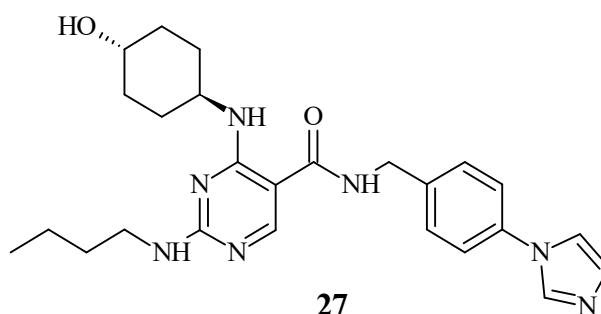
Równoległe inna rodzina inhibitorów Mer została opracowana przy użyciu matrycy 5-pirydylopirymidynowej. Cząsteczki te zostały zaprojektowane tak, aby poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe pomiędzy atomem azotu pierścienia pirydynowego a egzocyklicznym NH w pozycji 6 pirymidyny utworzyć pseudo-pierścień, który naśladowałby sztywną konformację narzuconą przez ugrupowanie

pirazolowe w UNC569 (**22**). Celem było uzyskanie analogów o różnych właściwościach fizykochemicznych i uproszczenie ich syntezy w celu ułatwienia badań SAR. Utrzymując te same podstawniki w pierścieniu pirymidynowym jak w UNC1062 (**23**), takie jak grupa 4-hydroksycykloheksylowa i łańcuch butyloaminy, w pozycji 5 na rdzeniu pirydynowym wprowadzono grupę morfolinometylenową, prowadząc do związku UNC2250 (**26**), który wykazał wyższą skuteczność wobec Mer ($IC_{50} = 1,7 \text{ nM}$) i selektywność względem kinaz z rodziny TAM niż związki już opisane: 150- i 60-krotnie bardziej aktywny wobec Mer w porównaniu z odpowiednio Axl i Tyro3.¹²¹

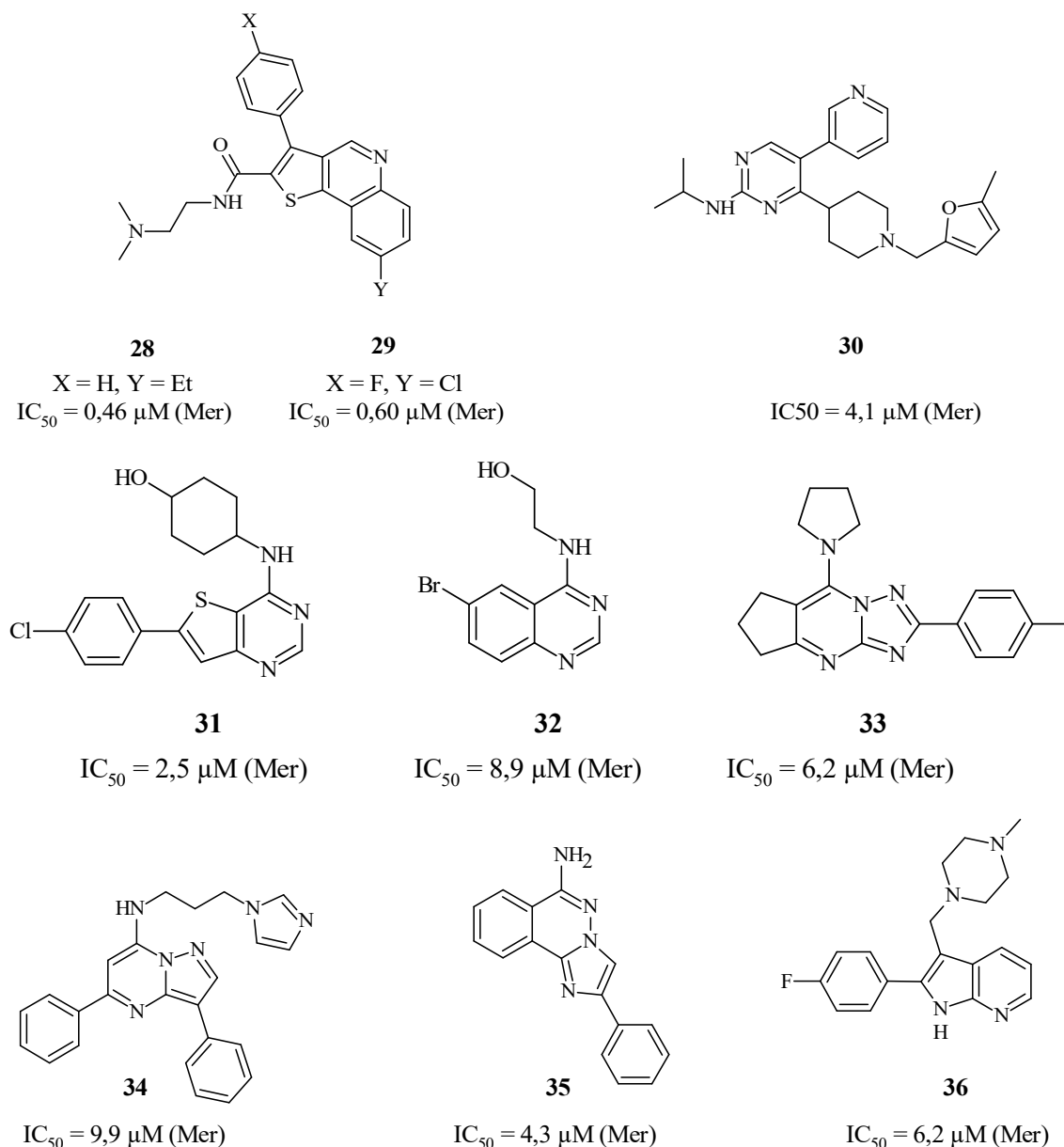


Profil farmakokinetyczny inhibitora UNC2250 (**26**), którego nazwa to *trans*-4-[[2-(butyloamino)-5-[5-(4-morfolinylometylo)-2-pirydynylo]-4-pirymidynylo]amino]-cykloheksanol, *in vivo* u myszy po podaniu dożylnym lub doustnym wykazywał okres półtrwania 1,59 h, klirens 62,2 ml/min/kg, umiarkowane wchłanianie doustne na poziomie 25% i dobrą rozpuszczalność. Ponadto UNC2250 (**26**) był w stanie zahamować fosforylację Mer w dwóch różnych liniach komórkowych (697 B-ALL i Colo699 niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC)) i zmniejszyć tworzenie się kolonii rabdoidalnych komórek nowotworowych i komórek NSCLC, potwierdzając jego działanie przeciwproliferacyjne. Profil selektywności UNC2250 (**26**) na panelu 30 kinaz wykonano stosując stężenie 100-krotnie wyższe od IC_{50} dla Mer. Tylko cztery kinazy tyrozynowe (FGFR1, receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGFR-2, receptor płytkowego czynnika wzrostu PDGFR i kinaza receptora tropomiozyny TRKA) były hamowane w ponad 50%. Ponieważ grupa pirydylowa w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego oddziałuje głównie z rozpuszczalnikiem bez wpływu na aktywność, zastosowano ją do dostrojenia rozpuszczalności i właściwości farmakokinetycznych. Dlatego przygotowano drugą generację inhibitorów Mer w oparciu o podstawione rusztowanie 2-aminopirymidynowe.¹²⁴ Pierścień pirydynowy został zastąpiony resztą amidową, w której atom tlenu grupy karbonylowej działa jako akceptor wiązania wodorowego, tak że wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe, a tym samym ogólna konformacja wiązania cząsteczki jest zachowana. Związek UNC2881 (**27**) został

zidentyfikowany jako związek wiodący po szeroko zakrojonych badaniach SAR. Hamował Mer z $IC_{50} = 4,3 \text{ nM}$ i był 84- i 58-krotnie bardziej aktywny na Mer niż odpowiednio na Axl i Tyro3. *N*-metylacja grupy 2-aminowej dała analog o znacznie obniżonej aktywności ($IC_{50} = 5,9 \text{ mM}$), co potwierdza znaczenie utrzymania wolnego NH w celu umożliwienia tworzenia wiązania wodorowego z regionem zawiasowym (Pro672), a tym samym zachowanie aktywności.



Inhibitor UNC2881 (**27**) wykazywał słabe właściwości farmakokinetyczne w porównaniu z odpowiadającym mu analogiem UNC2250 (**26**). Oprócz hamowania fosforylacji Mer *in vivo*, UNC2881 (**27**) był w stanie hamować stymulowaną kolagenem agregację płytek krwi, tym samym wykazując potencjał selektywnego inhibitora Mer w leczeniu i zapobieganiu zakrzepicy. Na początku 2015 roku zidentyfikowano nowe inhibitory MerTK w oparciu o różne strukturalne rdzenie.¹²⁵ Dysponując trzema krystalicznymi strukturami białek Mer, za pomocą dokowania oraz odpowiednich filtrów, wykonano wirtualne przesiewowe badanie na niespełna 4 milionach związków dostępnych komercyjnie. Spośród wszystkich struktur wybrano 62, dla których określono siłę hamowania kinazy Mer. Następnie wyłoniono 15 o wartościach IC_{50} , których wartości mieściły się w przedziale 0,46 – 9,9 mM. Inhibitory te można podzielić na trzy rodziny ze względu na ich budowę chemiczną (**Schemat 2**): tieno[3,2-*c*]chinolony (**28** i **29**), pirymidyno-2-aminy (np. **30**) oraz skondensowane pochodne pirymidyny (**31**, **32**, **33** i **34**), przy czym druga grupa jest najliczniejsza, ponieważ jest strukturalnie spokrewniona z zatwierdzonymi inhibitorami kinaz. Zidentyfikowano także imidazoftalazynę (**35**) i pochodne pirolopirydyny (**36**), wykazujące dużą różnorodność strukturalną, która może dostosować się do hamowania kinazy Mer. Chociaż są słabszymi inhibitorami niż związek UNC569 (**22**), wykazują wysoką wydajność ligandów, co czyni je cennymi strukturami wyjściowymi do dalszej optymalizacji.



Schemat 2. Podział inhibitorów ze względu na budowę chemiczną.

Inhibitory kinaz tyrozynowych stanowią bardzo liczną i dynamicznie rozwijającą się grupę związków. Z wykorzystania ich w praktyce klinicznej wynikają istotne korzyści podczas leczenia wielu nowotworów. Sukces tych leków jest motywacją do poszukiwania bardziej selektywnych związków, które będą lepiej tolerowane przez ludzki organizm. Mając na uwadze często występującą oporność, coraz więcej uwagi poświęca się możliwościom optymalizacji terapii tymi lekami. W efekcie różnorodnych zmian genetycznych, szlaki sygnałowe w komórkach nowotworowych są w różnych stopniu zaburzane, dlatego też zahamowanie jednego szlaku sygnałowego jest niewystarczające. Przedmiotem dyskusji staje się więc kwestia skuteczności stosowania jednego nieselektywnego inhibitora o szerokim spektrum działania bądź połączenia kilku

selektywnych inhibitorów. Najwłaściwszym sposobem zwiększenia efektywności terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych jest indywidualizacja terapii, mająca na celu dopasowanie leku zarówno do rodzaju nowotworu jak i konkretnego pacjenta. Uwzględniając swoistość danego leku, jego właściwości farmakokinetyczne, efekty toksyczne, prawdopodobieństwo wystąpienia oporności, jak również specyfikę nowotworu, w jednym przypadku skuteczniejsze może okazać się zastosowanie jednego inhibitora o szerokim spektrum działania, w innym lepsze rezultaty kliniczne pozwoli uzyskać połączenie kilku selektywnych inhibitorów.¹¹⁹

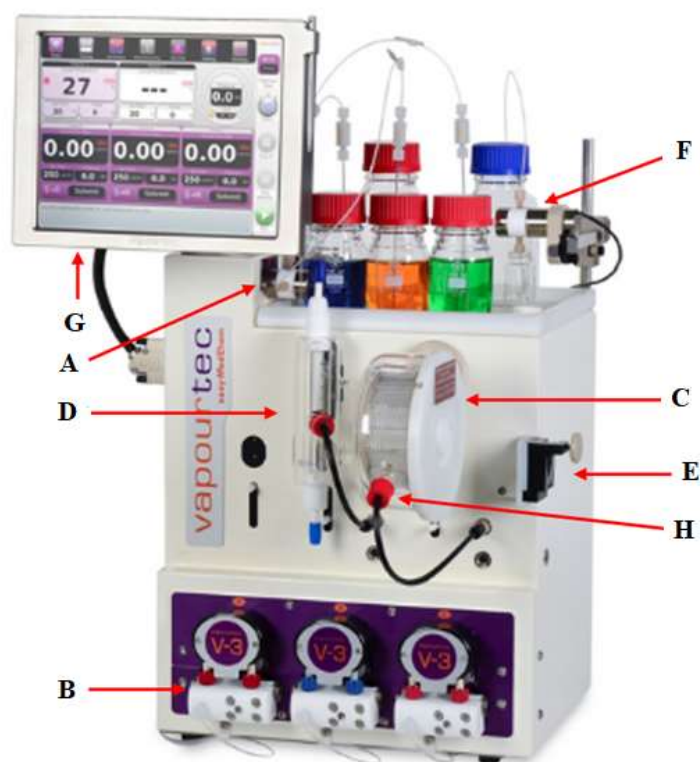
Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) jest najczęstszym nowotworem złośliwym u dzieci. Choć wskaźniki przeżycia uległy poprawie, pacjenci z niektórymi podtypami biologicznymi nadal mają wyniki suboptymalne. Obecne schematy chemioterapeutyczne wiążą się z krótko- i długoterminową toksycznością i potrzebne są nowe, mniej toksyczne strategie terapeutyczne. Kinaza tyrozynowa receptora Mer jest nieprawidłowo wyrażana w próbkach i liniach komórkowych pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną. Inhibitory tej kinazy, dzięki hamowaniu ekspresji MerTK, a w rezultacie między innymi zwiększeniu wrażliwości na chemioterapię oraz opóźnieniu rozwoju białaczki *in vivo*, są odpowiednimi kandydatami do terapii celowanych. Stanowią one rozwijającą się grupę leków ukierunkowanych molekularnie, których zastosowanie w praktyce klinicznej odmieniło strategię postępowania terapeutycznego w leczeniu wielu nowotworów. Duża przydatność terapeutyczna tych leków wynika nie tylko z ich wysokiej skuteczności, ale również stosunkowo niskiej toksyczności.

3.3 Technologia chemii przepływowej FLOW

W celu zrównoważenia rozwoju otaczającego nas świata bardzo ważna jest optymalizacja nowoczesnych procesów z zakresu inżynierii chemicznej. Korzystanie z ogromnej ilości globalnych zasobów nie tylko prowadzi do utraty trwałości danego procesu ale również powoduje ubytek niezbędnych materiałów. Opracowanie bardziej wydajnych procesów ma za zadanie zniwelować wspomniany niedobór. Tym procesem jest chemia przepływowa FLOW, która polega na prowadzeniu reakcji w małych naczyniach w sposób ciągły.¹²⁶ Zamiast tradycyjnych kolb, w technologii tej wykorzystywane są pompy, cewki reaktora oraz przewody rurowe. W porównaniu z konwencjonalną metodą prowadzenia reakcji, technologia przepływowa „wyprzedza” ją pod względem ekonomicznym, bezpieczeństwa oraz wydajności.¹²⁷ Głównym celem technologii FLOW jest zwiększenie lub ułatwienie możliwości wykonania zadania.

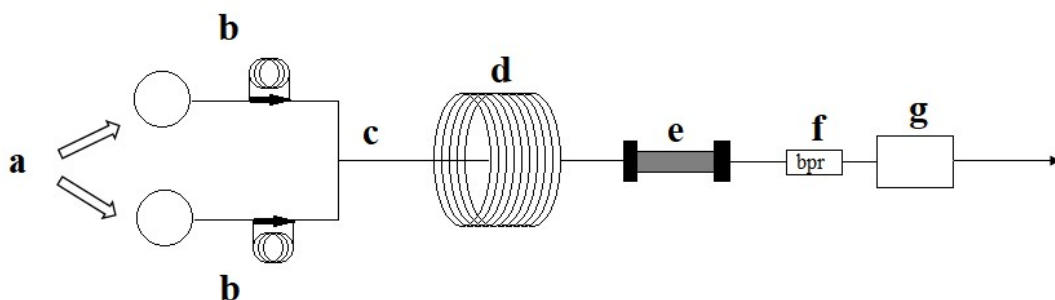
W chemii sprzęt mikroprzepływowy pojawił się jako technologia, która miała na celu zwiększenie zdolności badacza do przeprowadzania reakcji chemicznych, ponieważ małe wymiary reaktorów zapewniały wyjątkową kontrolę nad kluczowymi parametrami reakcji.¹²⁸ Wieloetapowe syntezy lub kompleksowa produkcja aktywnych składników farmaceutycznych jest obecnie atrakcyjnym obszarem chemii przepływowej, ponieważ procesy te mają mniejsze zapotrzebowanie przestrzenno-czasowe. Jednak na wyprodukowanie jednego związku potrzeba zbyt wiele czasu i zasobów, aby był on użyteczny dla przeciętnego laboratorium syntetycznego.¹²⁹ W czasie prowadzenia reakcji za pomocą technologii FLOW dopuszczalne są takie warunki, które w reakcjach okresowych są niemożliwe do osiągnięcia w bezpieczny sposób. Skutkiem tego jest otrzymanie produktu w krótszym czasie oraz o wyższej jakości z mniejszą ilością produktów ubocznych. Elementami budowy systemu do prowadzenia reakcji w przepływie, na przykładzie Vapourtec easy-Medchem, są:

- A. Zawory trójdzielne umożliwiające przejścia między reagentem a rozpuszczalnikiem
- B. Pompy perystaltyczne
- C. Reaktor rurowy
- D. Reaktor kolumnowy
- E. Regulator ciśnienia
- F. Zawór trójdzielny umożliwiający zbieranie produktu (produkt/odpady)
- G. Panel sterujący
- H. Czujnik temperatury reaktora



Rysunek 6. System FLOW Vapourtec easy-Medchem. A) zawór trójdzielny rozpuszczalnik/reagent B) pompy, C) reaktor rurowy, D) reaktor kolumnowy, E) regulator ciśnienia, F) zawór trójdzielny produkt/odpady, G) ekran sterujący H) czujnik temperatury reaktora.

Aparat do prowadzenia reakcji w ciągłym przepływie składa się z pomp odpowiedzialnych za transport reagentów i rozpuszczalników do pętli reakcyjnych, które to doprowadzają odczynniki w małych objętościach do złącza mieszania. W tym miejscu strumienie odczynników łączą się ze sobą i już razem przepuszczane są do reaktora wężowego w celu zapewnienia odpowiedniego czasu trwania reakcji. Istnieje także możliwość wprowadzenia mieszaniny reakcyjnej do reaktora kolumnowego, w którym znajdują się stałe reagenty oraz katalizatory. Kontrola systemu odbywa się dzięki wbudowanemu regulatorowi ciśnienia wstecznego, bowiem ciśnienie i analizy w linii dostarczają przydatne informacje na temat wydajności danej reakcji. Dodatkowo w czasie rzeczywistym informacje zwrotne otrzymywane są dzięki spektroskopii FTIR *in situ*. Pomaga to na bieżąco ulepszać proces syntezy. Schemat ideowy układu ciągłego przepływu przedstawia poniższy **Rysunek 7**.



Rysunek 7. Schemat ideowy technologii przepływowej FLOW.

Oznaczone na powyższym rysunku litery przedstawiają:

- a** – pompy, które służą do dostarczania powtarzalnych ilości rozpuszczalników i odczynników; typowe typy pomp to odśrodkowe tłokowe, perystaltyczne, strzykawkowe lub zębate,
- b** – pętle reakcyjne, które służą do wprowadzania małych objętości odczynników,
- c** – trójnik, główny punkt mieszania, w którym łączą się strumienie odczynników,
- d** – reaktor cewkowy, który zapewnia czas przebywania reakcji,
- e** – reaktor kolumnowy, wypełniony stałymi odczynnikami lub katalizatorami,
- f** – regulator ciśnienia wstecznego, który kontroluje ciśnienie w układzie,
- g** – jednostka odpowiedzialna za analitykę in-line, operacje obróbki itp.

Stosowanie chemii z przepływem ciągłym ma wiele zalet, które zdefiniowane są w porównaniu ze standardowymi metodami chemii wsadowej. Pierwsza z nich to lepsza kontrola i powtarzalność reakcji. Najważniejsze parametry reakcji, czyli czas trwania procesu, jego mieszanie oraz ogrzewanie, są dokładniej kontrolowane, a to pozwala na otrzymanie produktu z lepszą wydajnością oraz zminimalizowanie zanieczyszczeń. Kolejną zaletą jest dostępność szerszego zakresu parametrów reakcji. W związku z tym możliwe jest prowadzenie reakcji w temperaturach przekraczających temperaturę wrzenia rozpuszczalnika biorącego udział w procesie, co zapewnia wyższą wydajność produktu. Sytuacja taka nie jest możliwa w przypadku reakcji z wykorzystaniem konwencjonalnej metody wsadowej. Aparat do chemii przepływowej FLOW ma charakter modułowy, co jest ułatwieniem podczas jego konfiguracji w momencie osiągnięcia określonych parametrów danej reakcji. Ważną zaletą technologii z ciągłym przepływem jest zwiększone bezpieczeństwo procesu, ze względu na to, że w tych reakcjach mieszają się bardzo małe ilości reagentów. Dzięki temu oraz braku konieczności ręcznego pobierania próbek, narażenie na toksyczne reagenty również jest

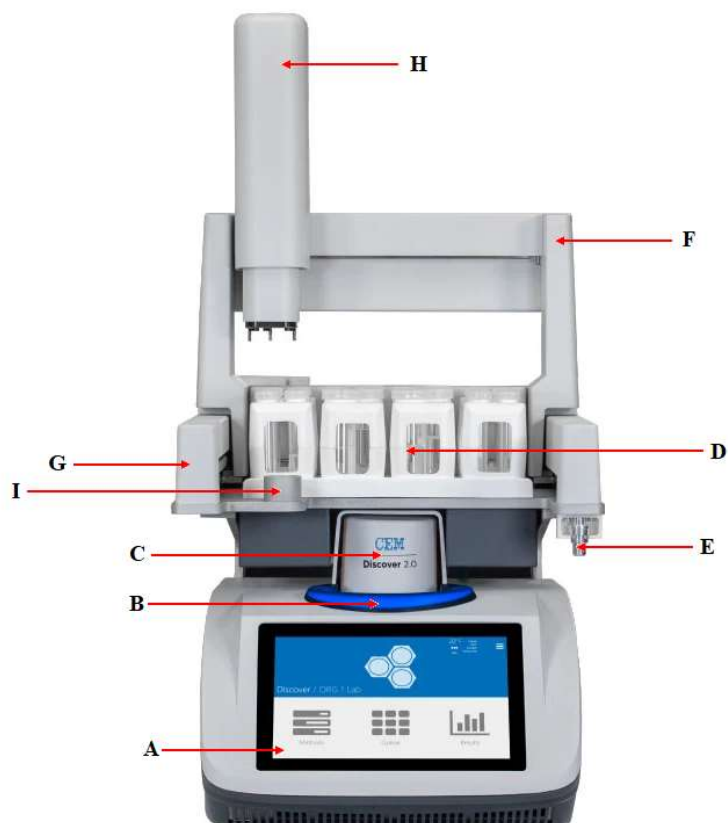
zminimalizowane. Kolejną z zalet jest szybkość optymalizacji, prowadzenia analizy, a także skalowania reakcji chemicznych. Optymalizacja w procesach przepływowych jest zdecydowanie szybsza ze względu na mniejszą ilość substratów i innych odczynników, a analiza w czasie rzeczywistym przekazuje od razu informację zwrotną odnośnie tego, jak zmiana parametrów wpływa na wydajność reakcji. Dzięki kontroli nad warunkami procesu oraz bezpieczeństwu podczas jego trwania znacznej poprawie ulega ogólna wydajność. Minimalizacji podlega także poziom wytwarzanych zanieczyszczeń. Jak widać chemia przepływowa posiada bardzo dużo zalet. Nie oznacza to jednak, że nie ma ona wad. Pierwszą z nich jest pompowanie jedynie określonych ilości reagentów, mimo iż według definicji jest to proces ciągły. Korzystając z próbek małego rozmiaru mamy także do czynienia z ograniczoną przepustowością tego aparatu, aczkolwiek poprzez instalację większej ilości pomp można ten problem rozwiązać. Kolejnym ograniczeniem jest korzystanie jedynie z homogenicznych roztworów, gdyż heterogeniczne mieszaniny reakcyjne mogą prowadzić do zatkania przewodów reakcyjnych.¹³⁰ To utrudnienie można uniknąć poprzez zastosowanie reaktorów zbiornikowych z ciągłym mieszaniem w przepływie. Są to specjalne reaktory, z których można korzystać w przypadku ciał stałych.¹³¹ Ze względu na to, że nie każde laboratorium jest w posiadaniu aparatu do prowadzenia reakcji w ciągłym przepływie, wdrażanie tych procesów jest bardzo kosztowne. Jednakże zainwestowanie w taki sprzęt wydaje się ekonomiczne dzięki wysokiej wydajności procesów w przeciwieństwie do konwencjonalnych metod syntezy. Związane to jest także z mniejszym zużyciem odczynników oraz innych zasobów, co w efekcie pozytywnie przyczynia się do osiągnięcia zrównoważonego rozwoju w inżynierii i nauce.¹³²

Biorąc pod uwagę wymienione cechy chemii przepływowej FLOW jej wdrożenie może być bardzo pomocne dla różnych gałęzi przemysłu. Już w tej chwili technologia ta zostaje wykorzystywana w reakcjach związanych z syntezą termochemiczną, fotochemiczną, elektrochemiczną, heterogeniczną, syntezą polimerów i nie tylko.¹³⁷ Dzięki FLOW możliwe jest także szybsze określenie składu reakcji, ponieważ istnieje sposobność na połączenie jej z technikami analitycznymi. Poza dodatkowymi zaletami w postaci bezpieczniejszych alternatyw i wydajniejszych ścieżek reakcji, chemia przepływowa znacznie obniża koszty złożonych procesów.

3.4 Technologia mikrofalowa

Technologia mikrofalowa została odkryta przez dr. Percy'ego Spencera w 1946 roku. Naukowiec ten podczas testów laboratoryjnych urządzenia generującego pole magnetyczne, zwanego magnetronem, całkowicie przypadkiem zauważył, że od promieniowania mikrofalowego w jego kieszeni roztopił się batonik. Na tej podstawie dr Spencer zgłębiał temat i wykazał, że mikrofałe są bardzo dobrą metodą służącą do ogrzewania. Rok później ten sam naukowiec zaprojektował pierwszą kuchenkę mikrofalową na potrzeby domowe. Od tego czasu rozwój promieniowania mikrofalowego jako źródła ogrzewania następował stopniowo. Obecnie w środowisku naukowym temat technologii mikrofalowej jest coraz bardziej popularny i w związku z tym można twierdzić, że za kilka lat metoda ta będzie wykorzystywana przez większość laboratoriów chemicznych. Mając na uwadze zagadnienie zielonej chemii technologia ta jest doskonałą alternatywą dla konwencjonalnych metod ogrzewania. Reakcje przeprowadzane przy użyciu syntezy mikrofalowego w porównaniu z konwencjonalną metodą trwają krócej, są mniej zanieczyszczone, bardziej ekonomiczne i przyjazne środowisku. Zarówno do syntezy jak i analizy chemicznej w tej metodzie wykorzystywane jest promieniowanie mikrofalowe.^{133a,b} W skład elementów syntezy mikrofalowego wykorzystywanego w badaniach, CEM Discover 2.0 (**Rysunek 8**), wchodzi:

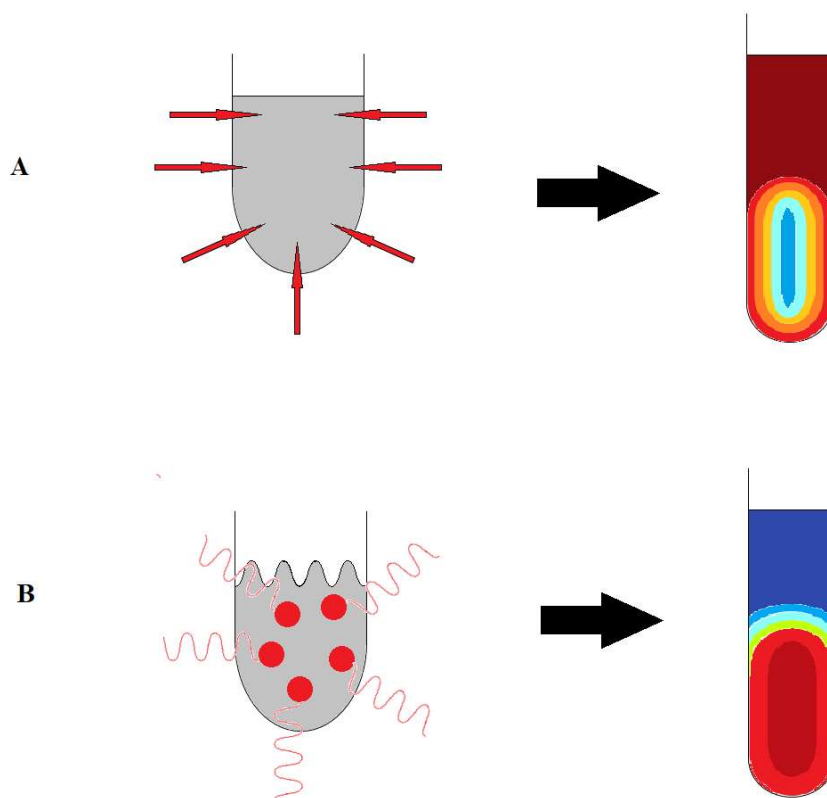
- A. Ekran sterujący
- B. Atenuator
- C. Automatyczne urządzenie ciśnieniowe
- D. Statywy z naczynkami mikrofalowymi
- E. Narzędzie do kalibracji
- F. Ramię autosamplera poruszające się względem osi X
- G. Ramię autosamplera poruszające się względem osi Y
- H. Ramię autosamplera poruszające się względem osi Z
- I. Lokalizacja adaptera



Rysunek 8. Syntezator mikrofalowy CEM Discover 2.0. A) Ekran sterujący, B) Atenuator, C) Automatyczne urządzenie ciśnieniowe, D) Statywy z naczynkami mikrofalowymi, E) Narzędzie do kalibracji, F) Ramię autosamplera poruszające się względem osi X, G) Ramię autosamplera poruszające się względem osi Y, H) Ramię autosamplera poruszające się względem osi Z, I) Lokalizacja adaptera.

Fale mikrofalowe mieszczą się w zakresie długości 0,01 – 1 m i zakresie częstotliwości 0,3 – 30 GHz, czyli dokładnie pomiędzy falami radiowymi i podczerwonymi, aczkolwiek w warunkach laboratoryjnych najczęściej wykorzystywane są fale o częstotliwości 2,45 GHz. Mieszanie się polarnych cząsteczek lub jonów i generowanie przypadkowych ich ruchów pod wpływem oscylującego pola elektrycznego lub magnetycznego powoduje wydzielanie ciepła. W metodzie konwencjonalnej, czyli przy użyciu szklanych kolb, ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej najczęściej odbywa się pod chłodnicą zwrotną za pomocą rozgrzanej łaźni olejowej będącej źródłem ciepła. Temperatura, w której prowadzona jest taka reakcja, określana jest przez pryzmat stosowanego rozpuszczalnika i jego temperatury wrzenia. Zagłębiając się w schemat ogrzewania mieszaniny reakcyjnej, początkowo energia cieplna pochodząca z gorącej łaźni olejowej przekazywana jest na powierzchnię kolby lub innego naczynia reakcyjnego. W kolejnym

etapie ciepło z gorącej powierzchni oddawane jest na zawartość tego naczynia (**Rysunek 9A**).



Rysunek 9. Ilustracja wprowadzania ciepła i rozkładu temperatury w mieszaninie reakcyjnej dla (A) konwencjonalnego ogrzewania i (B) ogrzewania mikrofalowego.

W metodzie konwencjonalnej istnieje ryzyko, że gorąca powierzchnia naczynia może spowodować rozkład otrzymanych produktów lub wcześniej reagentów poprzez przegrzanie mieszaniny reakcyjnej. Ponadto, reakcje prowadzone klasycznie trwają dłużej i są energetycznie nieefektywne. Znane powszechnie prawo Arrheniusa pozwala na ich przyspieszenie. Według tego prawa zwiększenie temperatury o 10°C podwaja szybkość reakcji, w związku z czym możliwe jest zakończenie syntezy znacznie szybciej. Wspomniane wyżej prawo znajduje zastosowanie w syntezach prowadzonych za pomocą syntezatora mikrofalowego. Naczynia reakcyjne, w których umieszczone są reagenty wraz z rozpuszczalnikiem są szczelnie zamykane, po to by później móc ogrzewać je do wysokich temperatur, często przekraczających temperaturę wrzenia użytego rozpuszczalnika. Promieniowanie mikrofalowe ma zdolność do przenikania przez szklaną ścianę naczynia, w którym znajduje się mieszanina reakcyjna i bezpośredniego ogrzewania jej na zasadzie oddziaływania z cząsteczkami. W związku z tym w tej metodzie nie występuje wcześniejsze nagrzewanie ścianek naczynia (**Rysunek 9B**).

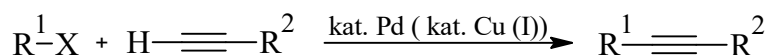
Ze względu na możliwość stosowania bardzo wysokich temperatur, czas reakcji ulega skróceniu do nawet kilku minut. W porównaniu z metodą wsadową szybkość prowadzenia reakcji zwiększa się od 10 do aż 1000 razy. Dzięki temu, że mieszanina reakcyjna osiąga w szybkim czasie zadaną temperaturę ograniczone jest także tworzenie się zanieczyszczeń czy produktów ubocznych. Ma to również wpływ na wydajność procesu, która jest wyższa niż w przypadku klasycznej metody. Dla przykładu wydajność syntezy aspiryny w mikrofalach zwiększa wydajność z 85% do 92%. Dzięki temu, że w reaktorze mikrofalowym w trakcie reakcji ogrzewana jest jedynie próbka bez podgrzewania całego aparatu, proces ten jest energooszczędny ze względu na mniejsze zużycie energii.¹³⁴ Prowadzenie syntez w mikrofalach jest niezwykle powtarzalne, co może być istotne podczas skalowania reakcji bądź planowania kilku syntez jednocześnie. W przypadku technologii mikrofalowej istnieje także ogrzewanie selektywne, które związane jest z różną pochłaniałością promieniowania mikrofalowego. Zależy to od postaci danego materiału. Przykładem tutaj może być synteza siarczku metalu, która przez lotność oparów siarki trwa nawet kilka tygodni przy zastosowaniu klasycznego ogrzewania. Innym problemem jest także to, że w momencie nagrzania siarki i nagromadzenia się jej oparów, możliwy jest wybuch. W przypadku wykorzystania do tej reakcji ogrzewania mikrofalowego, czas syntezy znacznie się skraca i nie ma zagrożenia wybuchem. Dzieje się tak, ponieważ dla promieniowania mikrofalowego siarka jest niewidoczna, przezroczysta i ogrzewaniu poddany jest jedynie metal.^{133a, 135} Jedną z zalet korzystania z mikrofal jest to, że reakcje są mniej zanieczyszczone, a co za tym idzie zmniejszona została częstość i ilość oczyszczania produktów końcowych syntez wykorzystujących toksyczne reagenty. Syntezator mikrofalowy pozwala na równomierne ogrzewanie mieszanin reakcyjnych oraz kontrolę pozostałych parametrów procesu, dzięki czemu reakcje są powtarzalne. Jest to szczególnie istotne w trakcie optymalizacji procesu otrzymywania związków wiodących podczas opracowywania nowych leków w firmach farmaceutycznych.^{134,136} Technologia mikrofalowa ma bardzo szerokie zastosowanie i jest wykorzystywana w różnych gałęziach przemysłu, od biotechnologii, przez farmację aż do tworzyw sztucznych. Głównie jednak stosowana jest w syntezie chemicznej, aczkolwiek póki co jest ograniczona do skali laboratoryjnej.

Pomimo, że synteza wspomagana reaktorem mikrofalowym jest na wczesnym etapie rozwoju wyraźnie widać jej zalety oraz szerokie możliwości zastosowania w syntezie organicznej. Istnieje prawdopodobieństwo, że z biegiem czasu oraz

jednocześnie wraz z rozwojem nauki i technologii, syntezyator mikrofalowy będzie podstawowym wyposażeniem nowoczesnego laboratorium chemicznego.^{133a}

3.5 Reakcja sprzęgania Sonogashiry

Reakcja Sonogashiry jest krzyżowym sprzęganiem fluorowca w aromatycznych lub winyloowych halogenkach, przez terminalną grupę alkinową w celu otrzymania sprzężonych enynów i aryloalkinów (**Schemat 3**).



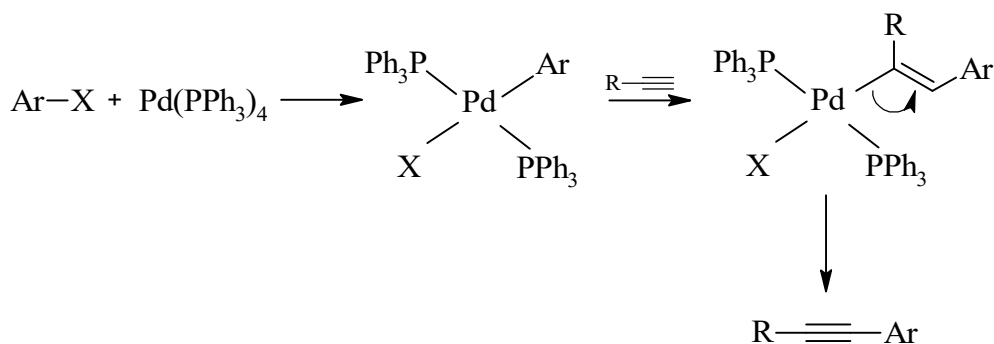
R¹ - aryl, heteroaryl, winyl

R² - aryl, heteroaryl, alkenyl, alkil, SiR₃

X - I, Br, Cl, OTf

Schemat 3. Ogólna reakcja sprzęgania Sonogashiry.¹⁴¹

Reakcja ta zazwyczaj zachodzi w obecności katalizatorów palladowych w postaci soli na drugim stopniu utlenienia (PdX₂), soli zawierającej w sferze koordynacyjnej Pd^{II} ligandy (PdX₂L₂), palladu na zerowym stopniu utlenienia w formie kompleksu (PdL₄), czy też Pd⁰ na węglu aktywnym. Zastosowanie katalizatora palladowego podczas sprzęgania prowadzi do uzyskania produktu z dużą wydajnością. Mechanizm działania najczęściej stosowanego katalizatora, tetrakis(trifenylfosfino)palladu przedstawia **Schemat 4**.¹³⁸

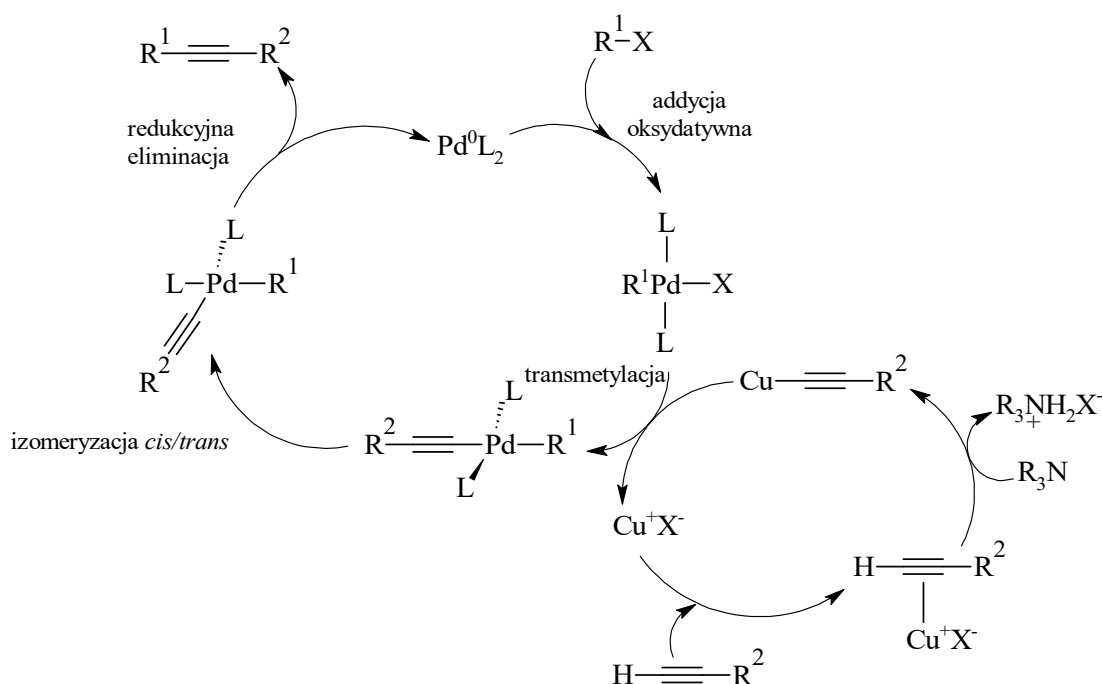


Schemat 4. Mechanizm działania katalizatora palladowego w reakcji Sonogashiry.

Dodatkowo konieczna jest obecność w układzie reakcyjnym katalitycznej ilości soli Cu(I), choć alternatywne procedury opisują reakcje sprzęgania Sonogashiry przeprowadzane bez kokatalizatora miedziowego (I). Niezbędnym składnikiem układu reakcyjnego jest zasada w ilości co najmniej stechiometrycznej, której rola polega na zobojętnianiu powstającego w wyniku reakcji HX (gdzie X = halogen). Najczęściej stosowanymi zasadami są aminy (i-Pr₂NH, i-Pr₂NEt, Et₃N, n-BuNH₂ lub benzyloamina), a także np. sproszkowany NaOH w toluenie, Cs₂CO₃, Na₂CO₃, octan

tetrabutylamoniowy (Bu_4NOAc) oraz octan sodu (NaOAc).¹³⁹ Najlepiej rolę grupy odchodzącej w reakcji Sonogashiry spełnia atom jodu, przy czym halogenki winylowe są bardziej aktywne od odpowiadających im halogenków arylowych: jodek winylowy ~ bromek winylowy > jodek arylowy > chlorek winylowy >> bromek arylowy. Ogólny szereg aktywności grup odchodzących w reakcji Sonogashiry przedstawia się następująco: $\text{I} \sim \text{OTf} \sim \text{Br} > \text{Cl}$.¹⁴⁰ Równie ważny, jak kokatalizator czy zasada, jest rozpuszczalnik. Zapewnia on mniejszą lub większą homogeniczność wieloskładnikowej mieszaniny reakcyjnej, a także może brać udział w kompleksowaniu palladu, a więc modyfikować jego aktywność. Najstarszym i nadal spotykanym rozwiązaniem jest użycie zasady (aminy) również jako rozpuszczalnika. Inne stosowane w reakcji Sonogashiry rozpuszczalniki to: DMSO, THF, dioksan, DMF, *N,N*-dimetyloacetamid, ACN, *N*-metylopirolidon, benzen i toluen. Znane są również przykłady użycia jako rozpuszczalnika mieszanych układów wodnoorganicznych, np. 1,2-dimetoksyetan/ H_2O , THF/ H_2O , ACN/ H_2O , czy nawet samej wody.

Kokatalizowane palladem i miedzią sprzęganie Sonogashiry przebiega przez dwa niezależne cykle katalityczne przedstawione na **Schemacie 5**.

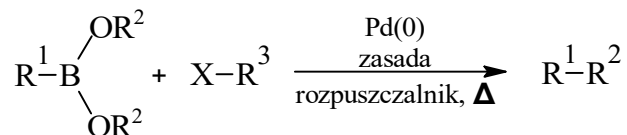


Schemat 5. Cykl katalityczny kokatalizowanej palladem i miedzią reakcji Sonogashiry.¹⁴¹

3.6 Reakcja sprzęgania Suzuki

Reakcja sprzęgania Suzuki-Miyaura to katalizowana, przeważnie palladem, reakcja pomiędzy alkenylem (winylem), aryłem lub kwasem bądź estrem boronowym

a halogenkiem. Reakcja ta jest wykorzystywana do tworzenia wiązań węgiel-węgiel w celu otrzymania sprzężonych układów alkenów, styrenów lub związków biarylowych (**Schemat 6**).¹⁴²



R¹ - aryl, alken (winyl), alkin

R² - H (kwas boronowy), alkil (ester boronowy)

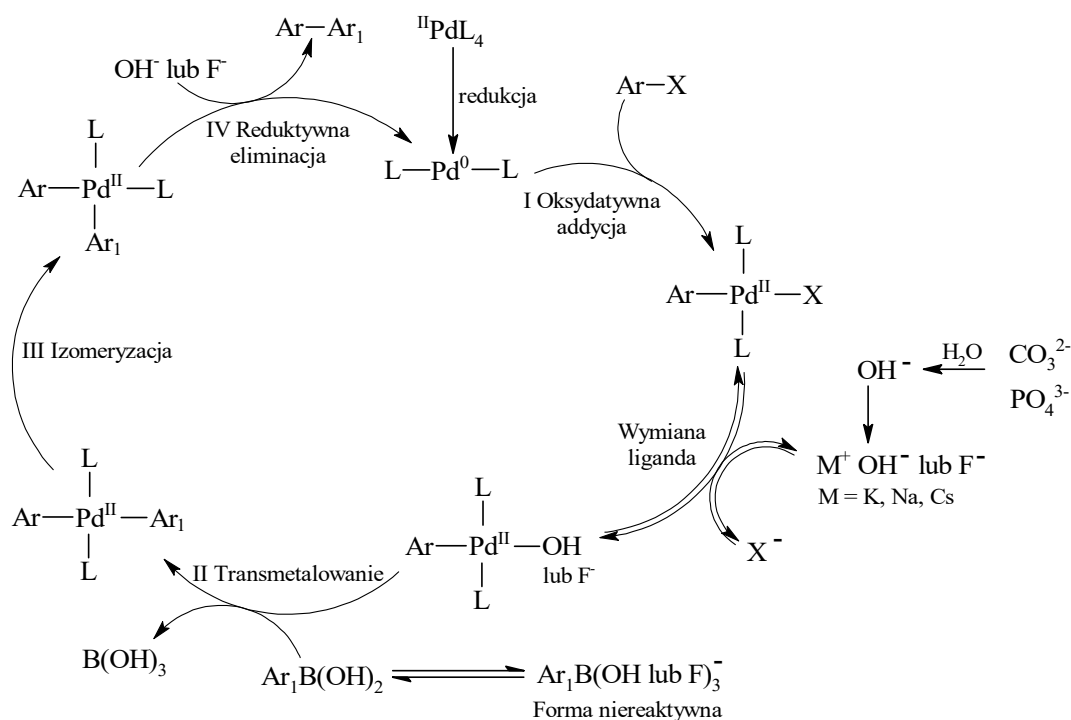
R³ - aryl, alken (winyl), alkin

X - halogenek (I, Br, Cl*), -OTf

*Cl wymaga specjalnych warunków aktywacji

Schemat 6. Ogólny schemat reakcji sprzęgania Suzuki.

Cykl katalityczny sprzęgania Suzuki-Miyaura składa się z czterech etapów: oksydacyjnej addycji, transmetalowania, izomeryzacji oraz reduktywnej eliminacji, jak przedstawiono na **Schemacie 7**.¹⁴³ Oksydacyjna addycja halogenków arylu do kompleksu Pd(0) jest początkowym etapem prowadzącym do uzyskania związku pośredniego zawierającego Pd(II). Przy udziale zasady związek borowodorowy reaguje z półproduktem w transmetalacji, dając kolejny związek pośredni. Kolejno następuje reduktywna eliminacja, która skutkuje otrzymaniem pożądanego produktu i regeneracją pierwotnych form Pd(0). W cyklu katalitycznym dopuszczalne są dodatkowe procesy takie jak asocjacja czy dysocjacja ligandu lub rozpuszczalnika, które zależą od systemów katalitycznych.¹⁴⁴



Schemat 7. Cykl katalityczny sprzęgania metodą Suzuki-Miyaura.

Do reakcji Suzuki najczęściej wykorzystuje się katalizatory palladowe, których struktura składa się z dwóch części: prekursora (na przykład: $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ lub $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) i ligandów. Aby zwiększyć reaktywność i stabilność katalizatora, opracowano je tak, aby były bogate w elektrony i obszerne przestrzennie, co zapewnia wysoką liczbę obrotów (TON) i małe obciążenie.¹⁴⁵ Dodatkowo ligandy zawierające dużą ilość elektronów ułatwiają przejście przez addycję oksydacyjną, natomiast struktury o dużej przestrzeni umożliwiają reduktywną eliminację. Na podstawie tego, który atom jest skoordynowany z metalem, ligandy są klasyfikowane jako ligandy fosfinowe, ligandy węglowe lub ligandy azotowe, z czego najpopularniejsze są te pierwsze.

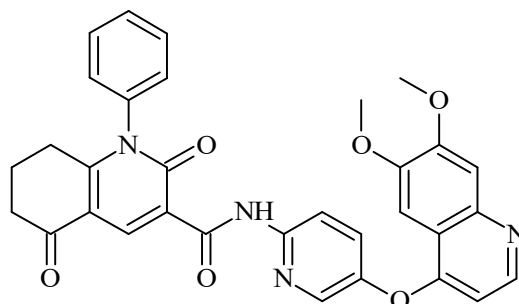
Bez wątpienia można powiedzieć, że reakcja sprzęgania metodą Suzuki-Miyaura jest jedną z najpopularniejszych i najczęściej używanych reakcji katalizowanych kompleksami palladu. Wykorzystywana jest ona do syntezy licznej grupy związków tj. związków pochodzenia naturalnego, nowych materiałów, substancji leczniczych czy katalizatorów.¹⁴⁶ Reakcja ta zyskała swoją popularność z uwagi na liczne zalety, takie jak: trwałość oraz łatwa dostępność jednego z komponentów, którym jest pochodna boronowa, duża kompatybilność grup funkcyjnych oraz łagodne warunki sprzęgania, co umożliwia sprzęganie substratów posiadających liczne grupy funkcyjne. Reakcja Suzuki-Miyaura posiada również wady, ale jest ich niewiele i większość z nich ma coraz mniejsze znaczenie z uwagi na zastosowanie nowych wydajnych ligandów

pozwalających nawet na sprzężanie niereaktywnych chlorków arylowych. Ogromne znaczenie tej reakcji uhonorowane zostało w 2010 roku przyznaniem jej twórcom Nagrody Nobla.

4. Część eksperymentalna

4.1 Opis badań

Większość istniejących małowcząsteczkowych inhibitorów wykazuje wielospecyficzną w stosunku do reprezentantów rodziny kinazy TAM, wykazując w ten sposób niską selektywność i znaczący toksyczny efekt uboczny. W chwili obecnej nie ma zarejestrowanych małych cząsteczek chemicznych zdolnych do hamowania selektywnego receptora MerTK. Jak dotąd racjonalne projektowanie selektywnych inhibitorów kinazy Mer jest wielkim wyzwaniem, ponieważ do tej pory istnieją trzy homologiczne kinazy, które mają wysoką ochronę strukturalną wokół katalitycznego miejsca aktywnego, a także dlatego, że molekularny mechanizm oddziaływania ligandu inhibitorowego z nimi nadal pozostaje w dużej mierze niezbadany. Na ten moment, najbardziej zaawansowane badania dotyczące inhibitorów kinazy Mer prowadzone są przez grupy pochodzące z Uniwersytetu Północnej Karoliny (UNC2025 (**25**) i MRX2843 (**1**), Mer/ Flt-3) i Ono Pharmaceutical (ONO-7475 (**37**), inhibitor Mer/Axl). Niemniej jednak do tego czasu nie odnotowano żadnych postępów po wejściu w fazę kliniczną.



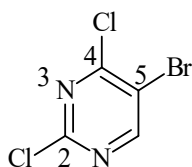
37

Głównym celem tej pracy doktorskiej było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowej klasy związków małowcząsteczkowych, które selektywnie hamują kinazę MerTK. Wykorzystane metody bioinformatyczne *in silico* okazały się pomocne w opracowaniu nowych małych inhibitorów MerTK o wysokiej doustnej biodostępności, korzystnym profilu farmakokinetycznym, niskiej toksyczności, ale przede wszystkim o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL). Badania ADMET (ang. (A) *Absorption* - wchłanianie (D) *Distribution* - dystrybucja (M) *Metabolism* - metabolizm (E) *Excretion* - wydalanie and (T) *Toxicity* - toksyczność) zostały wykonane w Laboratorium Analiz Fizykochemicznych oraz Dziale Badań Przedklinicznych firmy Celon Pharma S.A. Współpraca z tymi działami umożliwiła wykonanie niezbędnych badań *in vitro* oraz *in vivo*, a także określono eksperymentalne

wartości parametrów fizykochemicznych takich jak lipofilowość czy rozpuszczalność. Dla wybranych związków zbadano również stabilność chemiczną i metaboliczną. Wykonane testy biochemiczne i komórkowe pozwoliły na wyznaczenie parametru IC₅₀, który określa zarówno aktywność jak i selektywność badanych cząsteczek. Parametr ten mierzony jest przez zdolność związków do hamowania konwersji ATP do ADP podczas reakcji enzymatycznej. W tym celu, do oznaczania kinazy Mer, wykorzystano zestaw ADP-Glo firmy Promega.

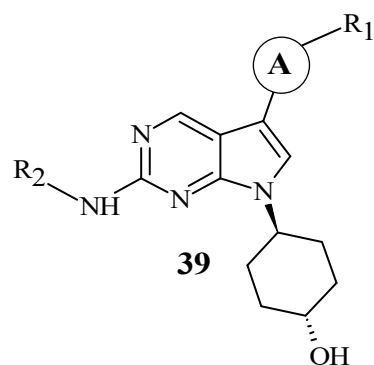
Innym celem było także wykorzystanie technologii chemii mikrofalowej oraz przepływowej do syntezy nowych inhibitorów, zintegrowanie typowo oddzielnych procesów (takich jak synteza, obróbka i analiza), jak również optymalizacja szybkości reakcji. Zanim jednak przystąpiono do właściwej syntezy, wybrano związek wzorcowy, opublikowany inhibitor MRX2843 (**1**), w celu zaprojektowania nowego zestawu struktur. Do zbudowania wirtualnej biblioteki cząsteczek wykorzystano metody bioinformatyczne *in silico*, głównie program KNIME®, dzięki któremu zostało wygenerowanych około 200 000 związków bazujących na modyfikacjach: pirymidynowych i układzie pirolopirymidynowym. Układy te według literatury są najczęstszym rdzeniem istniejących leków. Po uwzględnieniu właściwości cząsteczek takich jak: masa molowa, logP, logD, akceptory i donory wiązań wodorowych oraz liczby wiązań rotacyjnych, liczba struktur spadła do 2000. Dla wszystkich związków, które przeszły kryteria *drug-like* przeprowadzone zostało dokowanie do kryształu kinazy MerTK, zdeponowanego w krystalograficznej bazie PDB, ang. *Protein Data Bank* za pomocą programu AutoDock Vina. Następnie za pomocą oprogramowania PyMOL dokonano wizualizacji każdego związku w kieszeni aktywnej receptora. Trójwymiarową strukturę związków przygotowano na podstawie obliczonych wartości odpowiednich parametrów, m.in. pK_a z zastosowaniem programu JChem 21.13.0. Pozwoliło to ustalić odpowiednie stany protonacyjne struktur. W celu poprawy ich właściwości, po przeanalizowaniu wyników dokowania, zaproponowano modyfikacje wybranych struktur. Wybór poszczególnych grup funkcyjnych, które były modyfikacjami układu pirolopirymidynowego oraz pirymidyny, uwarunkowany był wynikami wyżej wspomnianego dokowania molekularnego. Wybór ten wynikał także z obliczonych i przybliżonych wartości parametrów fizykochemicznych otrzymanych przy pomocy odpowiednich programów (np. MarvinSketch). Wyselekcjonowane struktury poddano dalszej optymalizacji chcąc poprawić ich właściwości fizykochemiczne takie jak rozpuszczalność, lipofilowość czy stabilność chemiczną oraz parametry

farmakokinetyczne. Modyfikacje utworzono w miejscach grup funkcyjnych odpowiedzialnych za wiązanie z białkiem, a także na fragmentach wpływających na rozpuszczalność (tzw. fragment dorozpuszczalnikowy inhibitora). Badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną związków (SAR, ang. *Structure – Activity Relationship*) pozwoliły na zbudowanie bazy danych i selekcję najlepszych cząsteczek do syntezy oraz stworzenia odpowiedniej biblioteki związków. Efektem tego było otrzymanie 120 cząsteczek finalnych, w skład których wchodzi pochodne pirolopirymidyny oraz pirymidyny. Struktura cząsteczek została potwierdzona za pomocą technik chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (HPLC-MS) i magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C , DEPT NMR). Analog pirymidyny uzyskano za pomocą aromatycznego podstawienia nukleofilowego w pozycji 4, reakcji sprzęgania Suzuki w pozycji 5 oraz aromatycznego podstawienia nukleofilowego w pozycji 2, gdzie wyjściową strukturą jest 5-bromo-2,4-dichloropirymidyna (**38**). Jest ona także wykorzystana do zsyntetyzowania szkieletu pirolopirymidynowego.



38

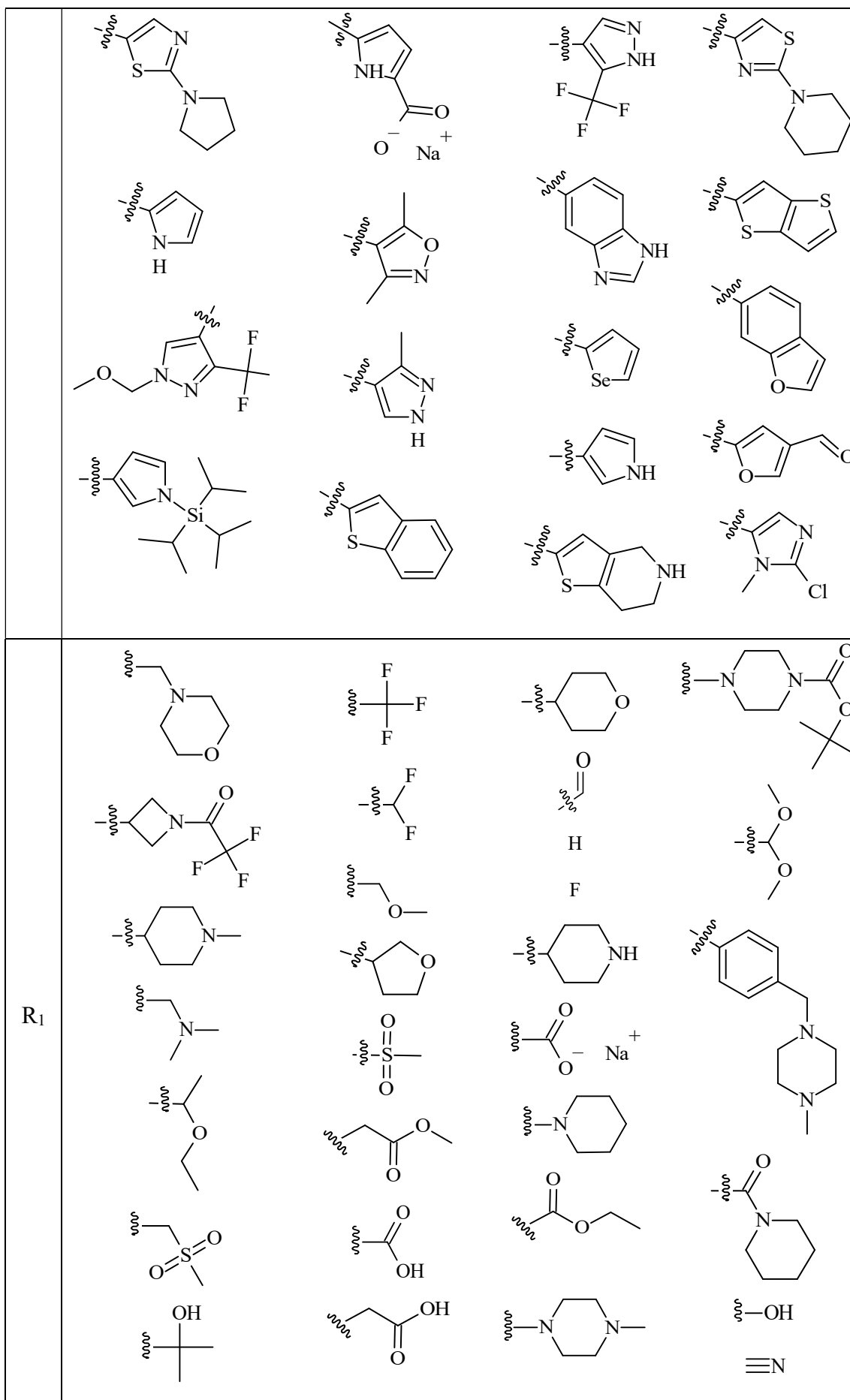
Synteza pirolopirymidyny to pięć etapów syntetycznych: aromatyczne aminowanie, sprzęganie Sonogashira, cyklizacja, wprowadzenie grupy blokującej funkcje aktywne oraz bromowanie. Za pomocą dodatkowych trzech kolejnych reakcji takich jak aminowanie, sprzęganie Suzuki oraz odbezpieczenie grupy funkcyjnej uzyskano szereg modyfikacji strukturalnych. Struktura rdzenia oraz pozostałych części związku chemicznego jest kluczowa podczas projektowania aktywnych i selektywnych inhibitorów, w tym inhibitorów MerTK. Dobór odpowiednich podstawników ma wpływ na właściwości cząsteczki, ponieważ każdy fragment ma swoją funkcję. Może on wpływać na właściwości fizykochemiczne, a także jest odpowiedzialny za tworzenie swoistych dla danego receptora oddziaływań. W przypadku wybranych struktur opartych na szkielecie pirolopirymidynowym (**39**) fragment A i R^1 odpowiada za aktywność oraz selektywność związku, natomiast część aminowa R^2 rdzenia odpowiada za jego selektywność.



Gdzie:

- pierścień A oznacza pirazol, furan, tiofen lub układ bicykliczny,
- R₁ to pochodne cztero-, pięcio- lub sześciocłonowego układu heterocyklicznego, układu bicyklicznego, pięciocłonowego heterocyklicznego układu aromatycznego, łańcuch alkilowy, łańcuch alkilowy zakończony grupą -OH, -NH₂ lub atomami fluoru, halogenek, -H, łańcuch alkilowy zawierający atom tlenu, grupa aldehydowa lub grupa ketonowa,
- R₂ to łańcuch alkilowy, alkenyłow, cykloalkilowy, aryłow, alkilowy zakończony grupą -OH, -NH₂, -SO₂CH₃, atomem azotu, atomami fluoru, alkilowy zawierający atom tlenu lub azotu (**Tabela 7**).

Podstawniki			
A			



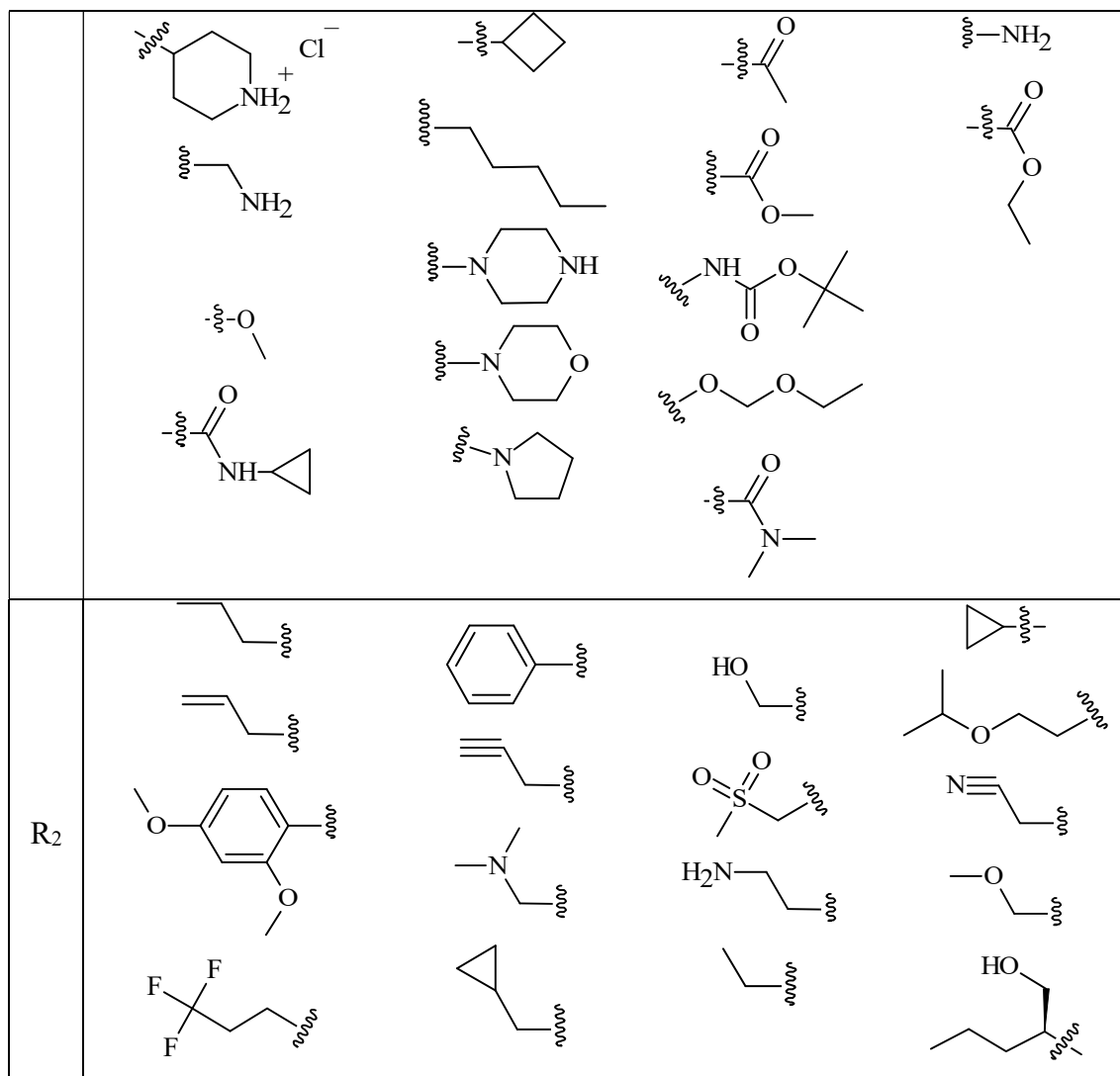
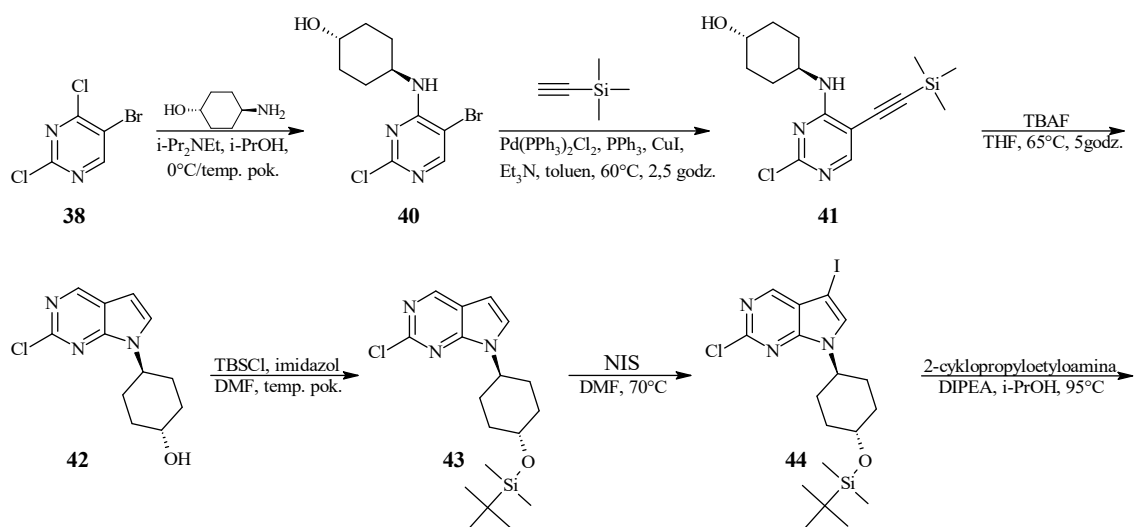
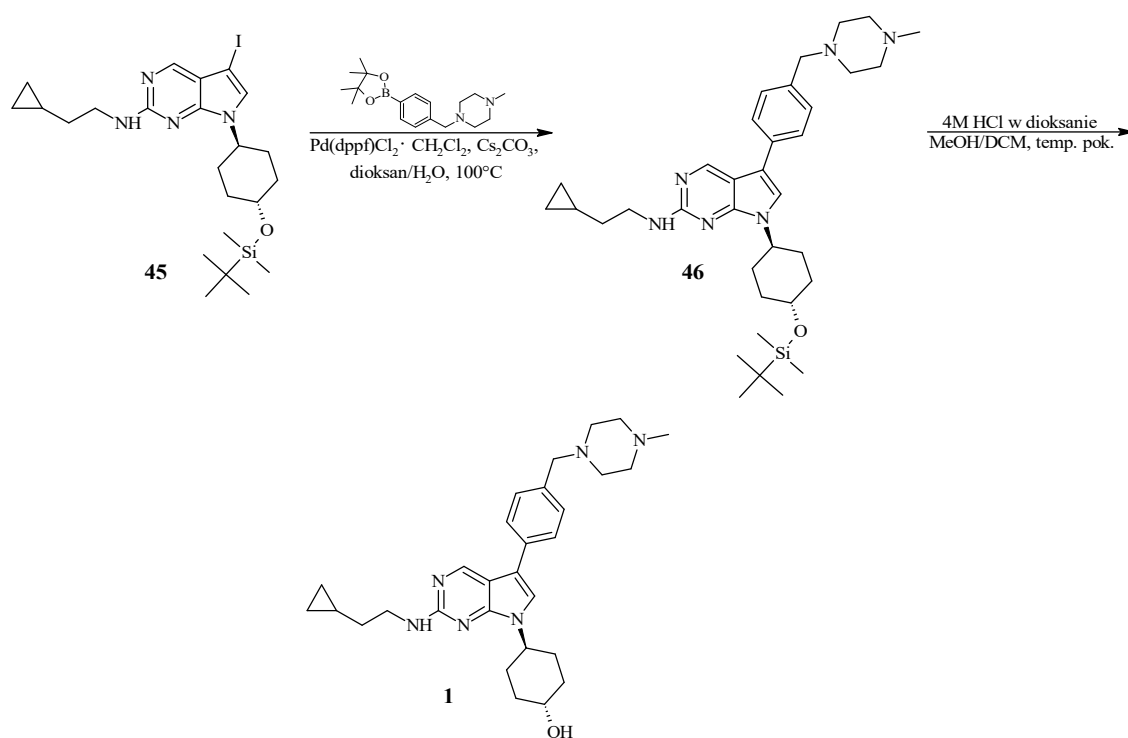


Tabela 7. Podstawniki występujące w modyfikacjach strukturalnych pirolopirymidyny (40).

Schemat 8 przedstawia ścieżkę syntezy związku wzorcowego MRX2843 (1), która została wykorzystana do uzyskania modyfikacji tegoż wzorca.

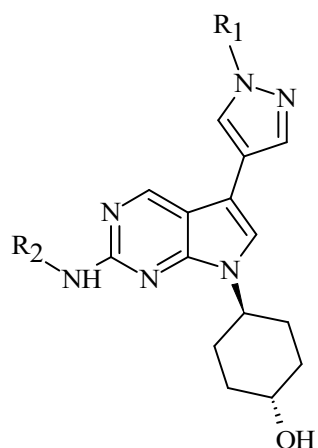




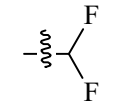
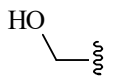
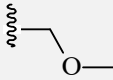
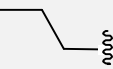
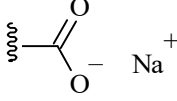
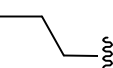
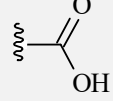

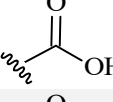
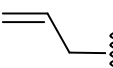
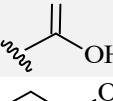
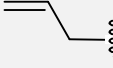
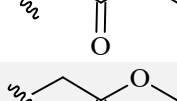
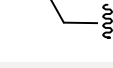
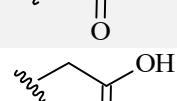
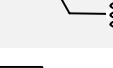
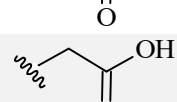

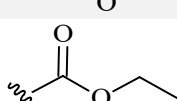
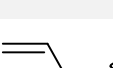
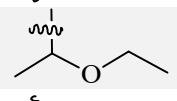
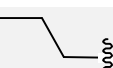
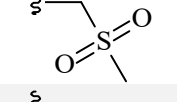
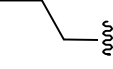
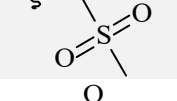
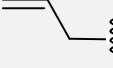
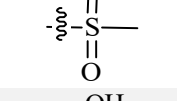
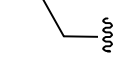
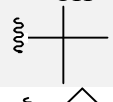
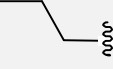
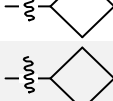
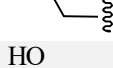




Schemat 8. Ścieżka syntezy MRX2843.

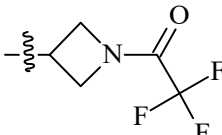
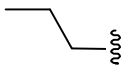
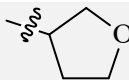
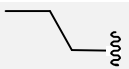
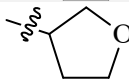
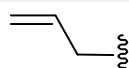
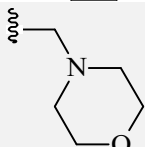
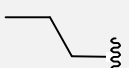
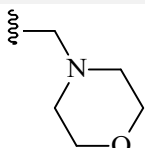
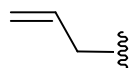
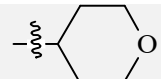
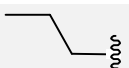
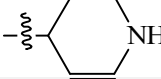
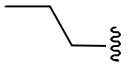
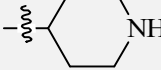
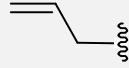
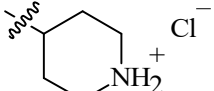
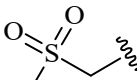
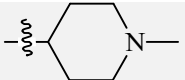
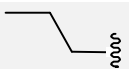
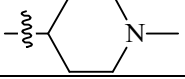
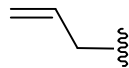
W tabelach poniżej przedstawiono wszystkie uzyskane modyfikacje wraz z wartościami aktywności biologicznej względem kinazy Mer oraz logP. Parametry te pozwoliły na wstępną weryfikację cząsteczek zsyntetyzowanych w ramach biblioteki. Wartości IC_{50} zostały wyliczone jako wartość średnia z dwóch niezależnych eksperymentów.

A.

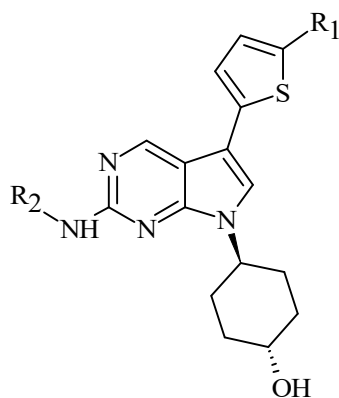


	R ₁	R ₂	M [g/mol]	IC ₅₀ [nmol]	logP
49)	H		354,44	1,627	2,58
50)			425,57	1,5	2,72
51)			423,56	1,10	2,42
52)			421,54	0,919	1,91
53)			459,27	7,841	4017
54)			397,52	2,30	1,91
55)			436,48	0,9	3,66
56)			424,43	24,82	1,64
57)			404,45	2,125	3,63
58)			402,44	1,08	3,33
59)			400,43	0,665	2,82

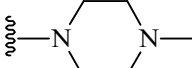
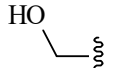
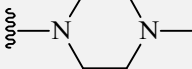
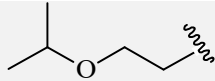

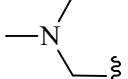
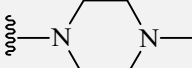
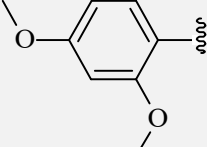
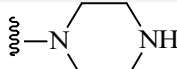
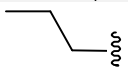
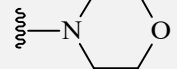
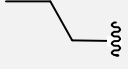
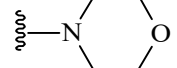
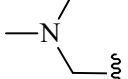
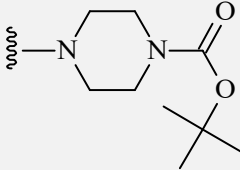
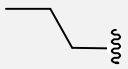
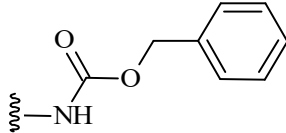
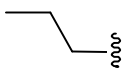
60)			392,4	54,4	1,62
61)			412,52	1,503	2,66
62)			434,48	2,545	2,18
63)			396,45	37,82	1,32
64)			410,47	1,38	0,18
65)			408,45	2,335	-0,32
66)			440,53	1,918	2,56
67)			438,52	1,17	2,26
68)			426,52	1,921	2,42
69)			424,50	0,662	0,43
70)			438,52	0,89	2,38
71)			426,55	2,135	3,35
72)			460,6	1,17	1,38
73)			458,58	1,598	1,08
74)			432,53	0,88	1,39
75)			426,55	2,51	2,71
76)			408,26	0,78	3,61
77)			396,48	65,7	1,6

78)			505,53	0,90	2,97
79)			424,53	1,428	2,60
80)			422,52	1,40	2,30
81)			467,61	46	2,50
82)			465,59	0,972	2,20
83)			438,56	158,6	2,66
84)			437,58	0,895	2,35
85)			436,58	1,921	2,04
86)			487,62	11,21	-0,30
87)			451,6	1,49	2,73
88)			450,6	2,583	2,43

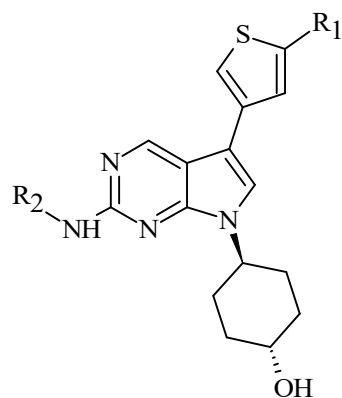
B.



	R ₁	R ₂	M [g/mol]	IC ₅₀ [nmol]	logP
89)	H		370,51	0,9	4,92
90)	H		356,49	19,67	
91)	H		358,45	43,81	2,04
92)	H		371,49	2519	1,99
93)	H		367,47	16,2	2,5
94)	H		424,48	116,3	4,24
95)	F		388,5	10,75	4,36
96)	≡N		395,52	2,18	4,04
97)			398,52	0,97	3,9
98)			412,56	2,05	3,74
99)			428,54	3,935	3,82
100)			442,57	2,606	3,97
101)			453,64	0,121	4,53
102)			467,66	0,2	4,97
103)			482,68	0,152	3,97

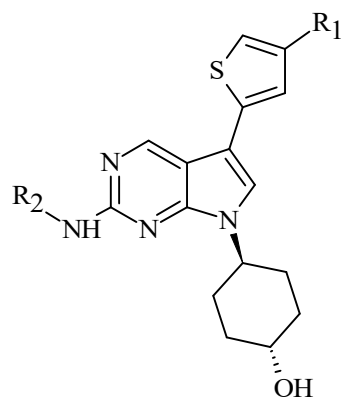
104)			470,63	9,269	1,96
105)			526,75	10,5	3,44
106)			497,69	965,1	2,67
107)			576,75	72,7	4,06
108)			468,67	0,96	3,59
109)			469,65	0,495	4,69
110)			484,65	1453	2,6
111)			568,77	19,34	4,87
112)			533,69	30,57	5,47

C.



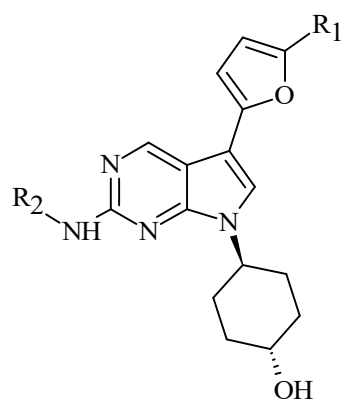
	R ₁	R ₂	M [g/mol]	IC ₅₀ [nmol]	logP
113)	H		370,52	5	4,06
114)			400,53	0,54	3,28
115)			400,53	14,12	3,89
116)			414,52	0,951	3,84
117)			399,55	0,214	3,31
118)			442,57	3,797	4,55
119)			469,64	0,5	4,69
120)			457,58	4,913	1,9

D.



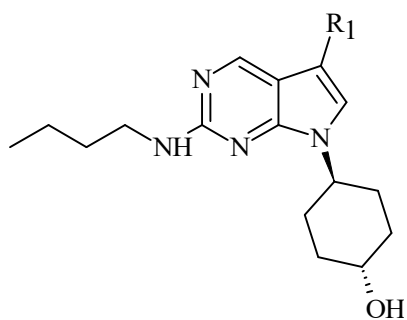
	R ₁	R ₂	M [g/mol]	IC ₅₀ [nmol]	logP
121)			454,67	1608	6,79
122)			441,6	1,956	3,35
123)			453,6	14	3,59
124)			481,65	0,87	4,33
125)			483,62	20,68	2,97

E.

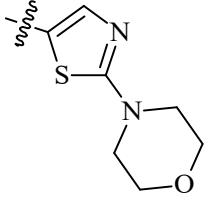
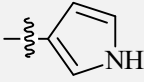
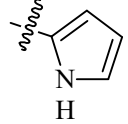
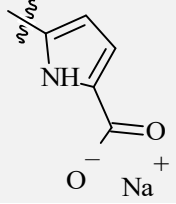
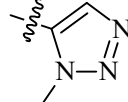
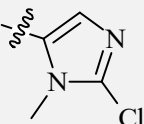
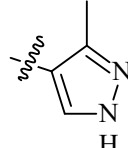
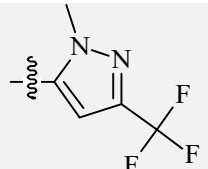
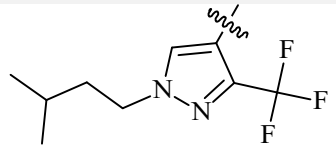
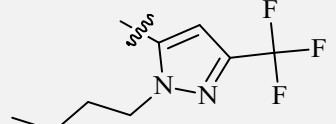
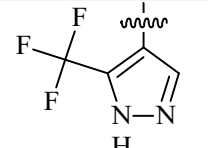
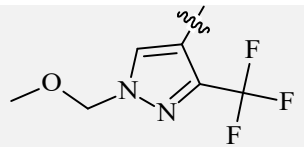


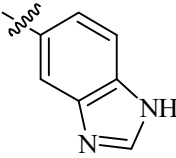
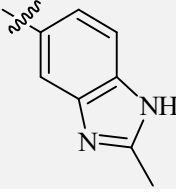
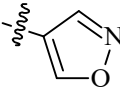
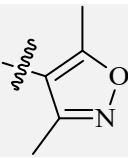
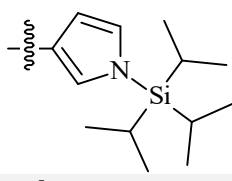
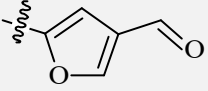
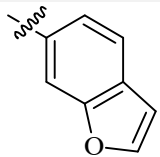
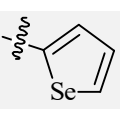
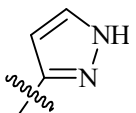
	R ₁	R ₂	M [g/mol]	IC ₅₀ [nmol]	logP
126)	H		354,45	3,67	3,34
127)			383,49	1,453	2,38
128)			369,46	1,62	
129)			442,55	4,915	3,55
130)			426,5	10,09	3,62
131)			398,45	5,354	2,91
132)			428,53	13,53	3,49
133)			483,6	32,79	3,87

F.

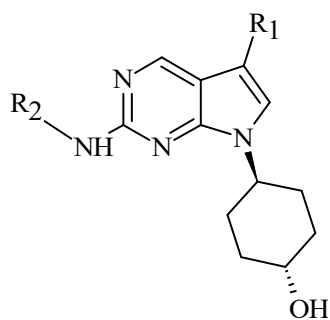


	R ₁	M [g/mol]	IC ₅₀ [nmol]	logP
134)		409,56	7,804	4,55
135)		400,55	50,28	3,89
136)		420,57	94,55	5,15
137)		426,59	54,02	5,03
138)		425,59	1,114	3,78
139)		503,68	3,717	2,89
140)		371,51	2,303	2,93
141)		440,6	8,282	4,13
142)		454,64	30,64	4,96

143)		456,6	3,953	3,5
144)		353,46	9,003	3,35
145)		353,47	4,359	2,65
146)		419,45	1,63	2,85
147)		369,46	3,866	2,24
148)		402,92	3,045	3,21
149)		368,47	1,355	2,71
150)		436,47	20,15	3,89
151)		492,58	508,8	5,58
152)		478,55	280,1	5,21
153)		422,45	13,52	3,38
154)		466,49	35,25	4,03

155)		404,5	2,56	3,56
156)		418,54	5,177	3,68
157)		355,43	1,271	2,64
158)		383,49	751,7	2,97
159)		509,8	435,3	6,3
160)		382,46	7,245	3,05
161)		404,51	34,07	4,43
162)		417,41	14,42	3,24
163)		354,44	6,67	2,96

G.

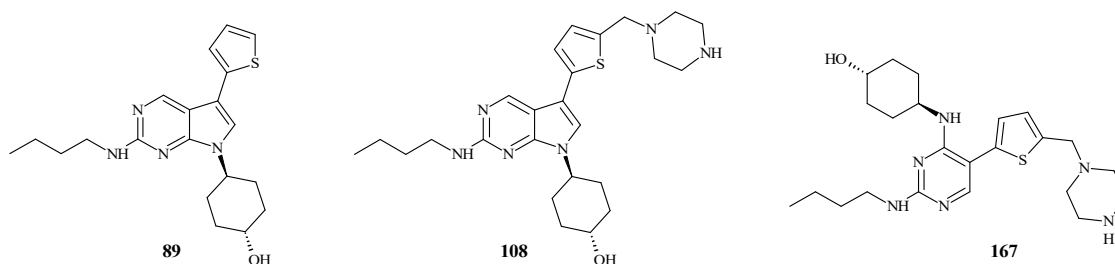


	R₁	R₂	M [g/mol]	IC₅₀ [nmol]	logP
164)			413,56	43,48	1,77
165)			533,71	42,23	2,26
1)			488,68	0,25	4,48

H.

	Struktura	M [g/mol]	IC₅₀ [nmol]	logP
166)		286,4	3102	3,64
167)		444,63	44,63	2,97

Nowopowstałe cząsteczki przebadano pod kątem aktywności na odpowiedniej kinazie MerTK, rozpuszczalności w dwóch roztworach o pH: kwaśnym i obojętnym oraz stabilności na mikrosomach mysich i ludzkich, a także wyliczono parametr PSA (*ang. Polar Surface Area*). Jest to powszechnie stosowany wskaźnik służący do optymalizacji zdolności leku do przenikania do komórek. Cząsteczki o powierzchni polarnej większej niż 140 Å² zwykle słabo przenikają przez błony komórkowe. Aby cząsteczki mogły przeniknąć przez barierę krew-mózg (a tym samym oddziaływać na receptory w ośrodkowym układzie nerwowym), zwykle potrzebny jest PSA mniejszy niż 90 Å². Na podstawie wizualnej analizy kieszeni wiążącej danego białka, wybrano z biblioteki te związki, których sposób oddziaływania wykazuje duże podobieństwo do związku referencyjnego. Przeprowadzając syntezę, a następnie wstępne badania, wybrano grupę trzech kandydatów do dalszego rozwoju (**Schemat 9**).



Schemat 9. Struktury wybranych związków wiodących.

Są to cząsteczki o największym powinowactwie do kinazy Mer i najbardziej optymalnych właściwościach fizykochemicznych, a tym samym najbardziej obiecujące inhibitory kinazy Mer. Prezentują one około 70% strukturalnego podobieństwa w stosunku do związku referencyjnego (MRX 2843 (**1**)), w związku z czym wykorzystano je do dalszych analiz selektywności na innych kinazach: Axl i Tyro (**Tabela 8**).

Numer związku	PSA Å ²	IC ₅₀ [nmol]		
		MerTK	Axl	Tyro3
MRX 2843	69,45	0,25	1,053	11,9
89	91,21	0,9	73,65	175,5
108	78,24	0,96	4,49	23,11
167	85,34	44,63	196,5	300

Wartości IC₅₀ zostały wyliczone jako wartość średnia z dwóch niezależnych eksperymentów.

Tabela 8. Wartości PSA oraz aktywności dla wybranych, najbardziej obiecujących związków na kinazach z rodziny TAM.

Następnie związki te testowano na komórkach na modelu MOLM-13 i MV4-11 (**Tabela 9**) badając ich aktywność metaboliczną.

Numer związku	Rozpuszczalność [uM]		Stabilność metaboliczna [$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]		Aktywność metaboliczna [nmol]	
	pH 4,5	pH 7,4	MLM	HLM	MOLM-13	MVT-11
	MRX 2843	500	256	43,5	11,3	12,89
89	54	5	139,2	144,2	227,5	168,6
108	382,2	315,9	3,4	15,4	18,01	12,16
167	500	474,5	3,9	9,5	68,2	71,12

Wartości IC_{50} zostały wyliczone jako wartość średnia z dwóch niezależnych eksperymentów.

Tabela 9. Porównanie wybranych parametrów dla związków **89**, **108** i **167**; MLM (ang. *Mouse Liver Microsomes*) – badanie na mikrosomach mysich, HLM (ang. *Human Liver Microsomes*) – badania na mikrosomach ludzkich.

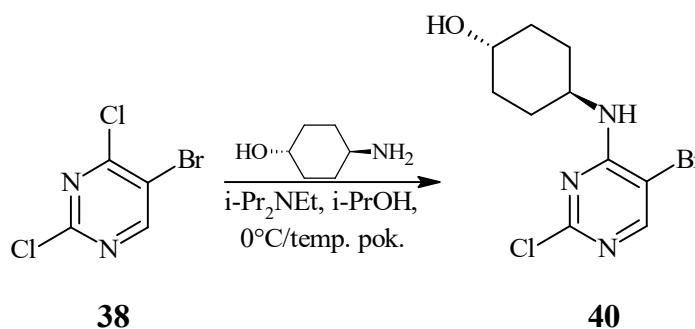
Z powyższej **Tabeli 8** wynika, że wybrane związki wiodące charakteryzują się wysokimi wartościami aktywności (IC_{50} w przedziale 0,9 – 44,63 nmol) oraz selektywności względem kinazy Mer. Porównując te dane z wynikami dla związku referencyjnego MRX2843 (**1**) zauważyć można, że szczególnie cząsteczki **89** oraz **167** mają zbliżone wartości parametru PSA. Natomiast związki **89** i **108** wydają się być bardziej selektywne niż referent. Pozostałe dane dla tych związków są także optymalne i gwarantują wysoki potencjał terapeutyczny. Analizując dane zawarte w **Tabeli 9** widoczne jest, że cząsteczka **167** charakteryzuje się taką samą rozpuszczalnością w pH 4,5 jak związek referencyjny, a w środowisku obojętnym jest ona wyższa. To samo dotyczy stabilności metabolicznej na mikrosomach mysich oraz ludzkich. Najlepsze wyniki osiągnięto dla związku **167**, które są dużo lepsze od wyników dla MRX2843 (**1**). Natomiast biorąc pod uwagę aktywność metaboliczną, przewagę zyskuje struktura **108**, która otrzymała wartości zbliżone do danych dla związku referencyjnego. Opierając się na wynikach badań farmakokinetycznych dla powyższych wybranych związków o biodostępności na poziomie minimum 30%, a także biorąc pod uwagę analizę kosztów i syntezę w większej skali, wykonano optymalizację oraz skalowanie procesu syntezy w celu otrzymania gramowych ilości każdej cząsteczki. Następnie przeprowadzono dla nich kolejne badania fizykochemiczne, stabilnościowe, testy na komórkach i zwierzętach w celu wyłonienia jednego związku wiodącego (proces „*hit to lead*”). Po jego wyłonieniu, kolejnym etapem są badania toksykologiczne, a następnie kliniczne (wejście do I fazy badań klinicznych). Zarówno wyłonienie ostatecznego związku wiodącego jak i przeprowadzenie badań toksykologicznych oraz klinicznych są w trakcie realizacji. Opóźnienia spowodowane są pandemią, która miała miejsce w trakcie prowadzenia badań do doktoratu, przez co czas badań biologicznych znacznie się wydłużył.

4.2 Optymalizacja syntezy związku referencyjnego MRX2843

Ścieżkę syntezy związku referencyjnego, przedstawioną na **Schemacie 2**, zoptymalizowano za pomocą reaktora mikrofalowego Discover 2.0 oraz technologii przepływowej E-series Vapourtec Easy MedChem. Chemia mikrofalowa stała się głównym narzędziem w tej dynamicznej, zależnej od czasu dziedzinie nauki, ponieważ często dramatycznie zmniejsza czas reakcji, zwykle z kilku dni do kilku minut, a nawet sekund. Wiele parametrów reakcji można ocenić w ciągu kilku godzin, aby zoptymalizować pożądaną chemię. Ponadto, chemia przepływowa zapewnia nowe podejście do prowadzenia syntezy chemicznej w ciągłym przepływie zamiast tradycyjnych stacjonarnych reaktorów. W przepływowym układzie chemicznym, dana reakcja chemiczna zachodzi w mikroreaktorze. Reagenty są stale pompowane do mikroreaktora, gdzie mieszają się i reagują, a produkt jest zbierany w sposób ciągły i można go stosować w następnym etapie bez żadnego oczyszczania. Co więcej, te innowacyjne technologie - mikrofałe i chemia przepływowa – zwiększają temperaturę reakcji, zapewniają jej większą kontrolę, ułatwiają podgrzewanie rozpuszczalników powyżej ich temperatury wrzenia, zwiększają bezpieczeństwo w kontaktach z reaktywnymi i niebezpiecznymi półproduktami oraz względną prostotę dozowania w reakcjach wieloetapowych. Łącznie prowadzą one do ogólnej intensyfikacji procesów oraz oceny ekologicznej i ekonomicznej podczas opracowywania procesu, a także do przyszłego otrzymywania odpowiedniej ilości wiodącego kandydata do badań klinicznych.

4.2.1 Reakcja nukleofilowego podstawienia aromatycznego

Produktem tej reakcji jest (1*r*,4*r*)-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-yl)amino]cykloheksan-1-ol (**40**), który został otrzymany według **Schematu 10**.



Schemat 10. Otrzymywanie (1*r*,4*r*)-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-yl)amino]cykloheksan-1-olu.

4.2.1.1 Metoda klasyczna

Do roztworu 2,4-dichloro-5-bromopirymidyny (30 g, 227,88 mmol) i *N,N*-diizopropylloetyloaminy (22.1 g, 166 mmol) w bezwodnym alkoholu izopropylowym (100 ml) powoli dodano w temperaturze 0 °C roztwór *trans*-4-aminocykloheksanolu (15.5 g, 132 mmol) rozpuszczonego w bezwodnym alkoholu izopropylowym (80 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0°C przez 4 godziny, a następnie pozwolono dojść do temperatury pokojowej i mieszano przez noc. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 2:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie (1 l), przemyto wodą (3 x 1 l) i solanką (0.5 l), następnie wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i zatężono. Otrzymany bladożółty olej krystalizowano z mieszaniny dichlorometanu i heptanu uzyskując związek **40** w postaci białej substancji stałej (36,9 g, 94,4%).

MS (APCI): 307 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30–8.18 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.42 (br s, 1H), 3.98–3.71 (m, 1H), 3.48–3.27 (m, 1H), 1.92–1.69 (m, 4H), 1.50 (dt, *J* = 12.9, 6.5 Hz, 2H), 1.36–1.10 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.35, 158.71, 156.27, 102.87, 69.53, 49.26, 33.61, 30.35.

4.2.1.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura I

W naczynku mikrofalowym umieszczono 2,4-dichloro-5-bromopirymidynę (10 mg, 0,0426 mmol), *N,N*-diizopropylloetyloaminę (7,15 mg, 0,0553 mmol), alkohol izopropylowy (0,1 ml) oraz *trans*-4-aminocykloheksanol (5,16 mg, 0,0439 mmol). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 2:1 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 10**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	80	10	100	95,64
2	80	10	150	97,87
3	80	10	200	96,01
4	80	10	300	98,03
5	100	10	100	98,94
6	100	10	150	98,09
7	100	10	200	99,59
8	100	10	300	99,19
9	80	5	100	96,72
10	80	5	150	97,72
11	80	5	200	96,46
12	80	5	300	96,81
13	80	2	100	95,97
14	80	2	150	96,46
15	80	2	200	95,42
16	80	2	300	95,93
17	80	20	100	97,53
18	80	20	150	97,65
19	80	20	300	97,28
20	80	20	200	98,31
21	100	20	100	98,66
22	100	20	150	99,42
23	100	20	200	99,07
24	100	20	300	99,16
25	80	30	100	97,62
26	80	30	300	97,37
27	80	30	200	98,25
28	80	30	150	98,09
29	100	30	100	99,53

30	100	30	150	99,06
31	100	30	200	98,77
32	100	30	300	99,07
33	80	40	100	98,32
34	80	40	300	99,17
35	80	40	200	98,56
36	80	40	150	98,79
37	100	40	100	99,38
38	100	40	150	99,35
39	100	40	200	99,06
40	100	40	300	98,77

Tabela 10. Wyniki optymalizacji.

Powyższa tabela przedstawia wyniki optymalizacji reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego, która polegała na dopasowaniu temperatury, czasu trwania reakcji oraz mocy jej ogrzewania, tak aby uzyskać jak najwyższą konwersję substratu. Najlepsze wyniki osiągnięto dla reakcji prowadzonej w temperaturze 100°C przez 10 minut przy mocy 200 W. Jej konwersja wynosiła 99,59%.

B. Chcąc uzyskać całkowitą konwersję, w poniższej metodzie zwiększono ilość *trans*-4-aminocykloheksanolu. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I zmieniając ilość dodanego *trans*-4-aminocykloheksanolu. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 11**.

Lp.	<i>trans</i> -4-aminocykloheksanol	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	7,58 mg	80	1.5	300	98.64
2	0,0645 mmol	80	3	300	98.98
3	10,1 mg 0,086 mmol	80	2	100	99.56
4		80	5	100	99.78
5		80	10	100	100
6		80	20	100	100
7		80	30	100	99.85
8		80	40	100	100
9		80	3	200	100
10		80	6	200	100
11		80	10	200	100
12		80	1.5	300	100
13		80	3	300	100
14		60	1.5	300	98.93

Tabela 11. Wyniki optymalizacji.

Powyższa tabela przedstawia wyniki optymalizacji reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego, która polegała na dopasowaniu temperatury, czasu trwania reakcji oraz mocy jej ogrzewania, tak aby uzyskać jak najwyższą konwersję substratu. Najlepsze wyniki osiągnięto dla reakcji prowadzonej w temperaturze 80°C przez 1,5 minuty przy mocy 300 W. Jej konwersja wynosiła 100%.

C. Kolejna próba optymalizacji polegała na 10-krotnym zwiększeniu ilości rozpuszczalnika. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I zmieniając ilość dodanego *trans*-4-aminocykloheksanolu (10,1 mg, 0,086 mmol) oraz rozpuszczalnika (1 ml). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 12**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	80	1.5	300	96.91

Tabela 12. Wyniki optymalizacji.

Powyższy wynik, w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą B, przedstawia niższą konwersję. Oznacza to, że większa ilość rozpuszczalnika, a co za tym idzie, mniejsza molarność roztworu, negatywnie wpływa na konwersję reakcji.

D. Poprawę konwersji oraz warunków reakcji próbowano dokonać także poprzez zmianę ilości *N,N*-diizopropylaminy. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I zmieniając ilość dodanej *N,N*-diizopropylaminy (11,1 mg, 0,086 mmol) oraz *trans*-4-aminocykloheksanolu (7,58 mg, 0,0645 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 13**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	80	1.5	300	97.24
2	80	3	300	99.73

Tabela 13. Wyniki optymalizacji.

Powyższe wyniki, w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą B, przedstawiają niższą konwersję w przypadku trwania reakcji przez 1,5 minuty oraz większą odnośnie 3 minut. Oznacza to, że większa ilość aminy w przypadku prowadzenia reakcji przez 3 minuty pozytywnie wpływa na jej konwersję.

E. Zamiana zasady z *N,N*-diizopropylloetyloaminy na trietyloaminę oraz dodatek węgla potasu to kolejne próby optymalizacji reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I zamieniając *N,N*-diizopropylloetyloaminę na trietyloaminę (5,69 mg, 0,0559 mmol) oraz utrzymując ilość *trans*-4-aminocykloheksanolu jak w punkcie **C** (10,1 mg, 0,086 mmol). W drugiej próbie do naczynka dodano substraty według powyższej procedury oraz dodatkowo węgiel potasu (3 mg, 0,0215 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 14**.

Lp.	Zasada	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	TEA	80	1,5	300	99,54
2	TEA/K ₂ CO ₃	80	1,5	300	99,33

Tabela 14. Wyniki optymalizacji.

Porównując powyższe wyniki z wynikami zawartymi w **Tabeli 11**, zauważyć można, iż zamiana zasady z *N,N*-diizopropylloetyloaminy na trietyloaminę powoduje zmniejszenie stopnia konwersji. Dodatek węgla potasu do reakcji jeszcze bardziej zaniża przereagowanie substratu.

F. Mając na uwadze powyższe wnioski, zwiększono ilość trietyloaminy jako nowej zasady, a także dodano węgiel potasu. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I zamieniając *N,N*-diizopropylloetyloaminę na trietyloaminę (8,75 mg, 0,086 mmol) oraz utrzymując ilość *trans*-4-aminocykloheksanolu jak w punkcie **D** (7,58 mg, 0,0645 mmol). W drugiej próbie do naczynka dodano substraty według powyższej procedury oraz dodatkowo węgiel potasu (3 mg, 0,0215 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 15**.

Lp.	Zasada	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	TEA	80	3	300	99,50
2	TEA/K ₂ CO ₃	80	3	300	99,06

Tabela 15. Wyniki optymalizacji.

Wyniki te, w porównaniu z wynikami umieszczonymi w **Tabeli 13** oraz **Tabeli 14** przedstawiają niższy stopień konwersji. Świadczy to o tym, że zarówno zmiana zasady z *N,N*-diizopropylloaminy na trietyloaminę jak i dodatek węgla potasu mają gorszy wpływ na przereagowanie substratu.

G. Parametrem, który zmieniano w celu optymalizacji reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego była zamiana rozpuszczalnika. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I utrzymując ilość *trans*-4-aminocykloheksanolu jak w punkcie **C** (10,1 mg, 0,086 mmol) oraz zmieniając rozpuszczalnik. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 16**.

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	MeOH	80	1,5	300	99,45
2	EtOH	80	1,5	300	99,70
3	t-BuOH	80	1,5	300	99,18
4	DMF	80	1,5	300	99,66
5	DMSO	80	1,5	300	99,85
6	toluen	80	1,5	300	94,46
7	THF	80	1,5	300	97,19
8	dioksan	80	1,5	300	94,85
9	H ₂ O	80	1,5	300	98,34
10	4M HCl w dioksanie	80	1,5	300	7,16

Tabela 16. Wyniki optymalizacji.

Zauważono, że spośród powyższych rozpuszczalników, największy stopień konwersji osiągnięto przy wykorzystaniu DMSO. Jednakże w porównaniu z wynikami zawartymi w **Tabeli 11**, gdzie używano alkoholu izopropylowego, wynik ten jest niższy. Stwierdzono zatem, że najlepszym rozpuszczalnikiem do reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego był alkohol izopropylowy.

H. Zamiana zasady, jako jednego z substratów oraz prowadzenie reakcji bez rozpuszczalnika to kolejna próba optymalizacji. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I utrzymując ilość *trans*-4-aminocykloheksanolu jak w punkcie C (10,1 mg, 0,086 mmol), zmieniając zasadę (0,086 mmol) oraz rezygnując z zastosowania rozpuszczalnika. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 17**.

Lp.	Zasada	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	pirydyna	80	1,5	300	99,15
2	TEA	80	1,5	300	97,93
3	DIPEA	80	1,5	300	98,70

Tabela 17. Wyniki optymalizacji.

Spośród powyższych zasad, użycie pirydyny jako zasady dało największy stopień konwersji. Jednakże w porównaniu z wynikami zawartymi w **Tabeli 11**, użycie *N,N*-diizopropylodetyloaminy oraz rozpuszczalnika (alkoholu izopropylowego) powoduje całkowite przereagowanie substratu i otrzymanie oczekiwanego produktu.

I. Skalowanie syntezy to ostatni etap optymalizacji, będący swego rodzaju jej podsumowaniem. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury I zmieniając ilość 2,4-dichloro-5-bromopirymidyny oraz rozpuszczalnika w celu uzyskania takiego samego stężenia roztworu w każdej próbie, a także utrzymując ilość *trans*-4-aminocykloheksanolu jak w punkcie C (10,1 mg, 0,086 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 18**.

Lp.	2,4-dichloro-5-bromopirymidyna [mg]	iPrOH [ml]	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	100	1	80	1,5	300	99,97
2	500	5	80	1,5	300	99,97
3	1000	10	80	1,5	300	99,94

Tabela 18. Wyniki optymalizacji.

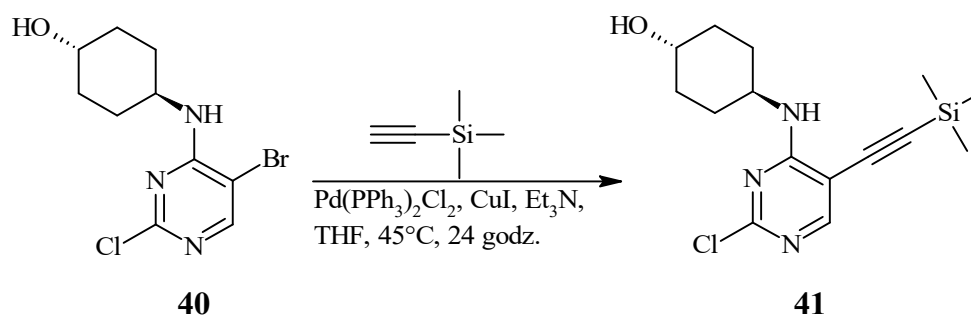
Powyższe wyniki przedstawiają bardzo wysoki stopień konwersji substratu w produkt. Wybrana metoda z **Tabeli 11** znalazła odwzorowanie w momencie zwiększenia skali prowadzonej reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego.

J. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezyatora mikrofalowego oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 24 godzin do 1,5 minuty. Nie ma także potrzeby chłodzenia otrzymanego roztworu, co dodatkowo przyspiesza przygotowanie mieszaniny reakcyjnej.

4.2.2 Reakcja sprzęgania Sonogashiry

Produktem tej reakcji jest (1*r*,4*r*)-4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}amino)cykloheksan-1-ol (**41**), który został otrzymany według **Schematu 11**.



Schemat 11. Otrzymywanie (1*r*,4*r*)-4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}amino)cykloheksan-1-olu.

4.2.2.1 Metoda klasyczna

Do odgazowanej mieszaniny związku **40** (30 g, 19.60 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (250 ml) i trietyloaminy (49.80 g, 489 mmol) dodano, w temperaturze pokojowej, jodek miedzi (I) (761 mg, 3.91 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (2.1 g, 2.94 mmol) i trimetylosililoacetylen (10.70 g, 108 mmol). Po odgazowaniu mieszaniny reakcyjnej przez 20 minut, powstały roztwór ogrzewano w 45 °C w atmosferze argonu przez 24 godziny. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę przesączono przez celit. Przesącz ekstrahowano za pomocą octanu etylu (500 ml). Warstwę organiczną przemyto za pomocą solanki (2 x 100 ml) i wody destylowanej (2 x 100 ml), wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄), a następnie zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu

krzemionkowym (heptan/octan etylu 1:1 v/v) uzyskując związek **41** w postaci jasnopomarańczowej substancji stałej (13,9 g, 43,8%).

MS (APCI): 323 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (s, 1H), 5.35 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.02-3.84 (m, 1H), 3.58-3.35 (m, 1H), 3.73-3.57 (m, 1H), 2.16 – 2.04 (m, 2H), 2.00-1.88 (m, 2H), 1.48-1.33 (m, 2H), 1.31-1.15 (m, 2H), 0.21-0.20 (m, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.2, 159.6, 158.1, 106.5, 101.2, 96.0, 69.6, 49.0, 33.7, 30.6.

4.2.2.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura II

W naczynku mikrofalowym, do roztworu związku **40** (30 mg, 0,0979 mmol) w toluenie (0,3 ml), w atmosferze argonu umieszczono trimetylosililoacetylen (9,71 mg, 0,0979 mmol), jodek miedzi (I) (0,38 mg, 0,00196 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1,37 mg, 0,00196 mmol) oraz trietyloaminę (49,8 mg, 0,489 mmol). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 19**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	60	2	100	0
2	60	10	100	0
3	60	20	100	0
4	80	20	100	0
5	80	20	200	0
6	100	20	300	0
7	100	40	300	0
8	150	40	300	0
9	150	90	300	0

Tabela 19. Wyniki optymalizacji.

Powyższe warunki prowadzenia reakcji sprzęgania Sonogashiry nie były odpowiednie, ponieważ substrat nie uległ przereagowaniu.

B. Zmiana ilości dodawanego trimetylosililoacetyleny do reakcji była pierwszą próbą optymalizacji sprzęgania Sonogashiry. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II zmieniając ilość trimetylosililoacetyleny (19,4 mg, 0,196 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 20**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	100	20	300	0
2	100	40	300	0
3	100	80	300	0

Tabela 20. Wyniki optymalizacji.

Powyższe warunki prowadzenia reakcji sprzęgania Sonogashiry nie były odpowiednie, ponieważ substrat nie uległ przereagowaniu.

C. Kolejną próbą optymalizacji była zmiana ilości dodawanego katalizatora w postaci $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ oraz jodku miedzi (I). Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **B** (19,4 mg, 0,196 mmol), a także zmieniając ilość $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (6,87 mg, 0,00979 mmol) oraz jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 21**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	100	40	300	0
2	150	40	300	0
3	150	30	300	49,22
4	150	20	300	5,09

Tabela 21. Wyniki optymalizacji.

Zwiększenie ilości katalizatora oraz jodku miedzi (I) było pomocne w uzyskaniu prawie połowicznej konwersji substratu w produkt.

D. Kolejnym etapem optymalizacji było powrót do początkowych ilości dodawanych substratów. Zmiana dotyczyła parametrów prowadzenia reakcji takich jak temperatura i moc grzania. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 22**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	50	3	80	44,58
2	50	5	80	53,36
3	50	10	80	51,51

Tabela 22. Wyniki optymalizacji.

Porównując powyższe wyniki z wynikami zestawionymi w **Tabeli 19**, zmniejszenie temperatury prowadzenia reakcji oraz mocy grzania spowodowało zwiększenie stopnia konwersji z 0% do 53,36%.

E. Korzystając z powyższych parametrów i zauważalnej konwersji substratu postanowiono zwiększyć ilość dodawanego trimetylosililoacetyleny. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **B** (19,4 mg, 0,196 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 23**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	50	5	80	60,40
2	50	10	80	56,72

Tabela 23. Wyniki optymalizacji.

Wyniki otrzymane tą metodą w porównaniu z wynikami zawartymi w **Tabeli 21** są dużo wyższe. Świadczy to o tym, iż niższa temperatura, krótszy czas prowadzenia reakcji oraz mniejsza moc grzania są dogodniejszymi parametrami w przypadku reakcji sprzęgania Sonogashiry.

F. Zauważając, że wzrost ilości dodawanego trimetylosililoacetyleny pomaga w stopniu przereagowania substratu zdecydowano o pięciokrotnym zwiększeniu naważek katalizatora i jodku miedzi (I). Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **B** (19,4 mg, 0,196 mmol), oraz ilość Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,87 mg, 0,00979 mmol) i jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu **C**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 24**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	50	5	80	81,59
2	50	10	80	95,24
3	50	15	80	77,78

Tabela 24. Wyniki optymalizacji.

Powyższe wyniki w porównaniu z wynikami zawartymi w **Tabeli 23**, różniącymi się ilością dodawanego katalizatora i jodku miedzi (I), przedstawiają zwiększenie stopnia konwersji z 56,72% do 95,24%.

G. Respektując powyższe ilości poszczególnych substratów dodawanych do reakcji sprzęgania Sonogashiry próbowano dopasować temperaturę prowadzenia reakcji oraz moc grzania. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **B** (19,4 mg, 0,196 mmol), oraz ilość Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,87 mg, 0,00979 mmol) i jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu **C**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 25**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	60	10	80	56.77
2	50	10	90	81.62

Tabela 25. Wyniki optymalizacji.

Zwiększenie temperatury prowadzenia reakcji, a także wzrost mocy grzania nie dostarczyło zadowalających wyników, ponieważ w porównaniu z wynikami zawartymi w **Tabeli 24**, są one niższe.

H. Poprzez zmianę powyższych parametrów nie otrzymano całkowitej konwersji, stąd ponownie zwiększono ilość dodawanego trimetylosililoacetyleny. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II zwiększając ilość trimetylosililoacetyleny oraz utrzymując ilość Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,87 mg, 0,00979 mmol) i jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu **C**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 26**.

Lp.	Trimetylosililoacetylen	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	24,8 mg 0,245 mmol	50	10	80	95,17
2	29,7 mg 0,294 mmol	50	10	80	96,29
3	49,5 mg 0,489 mmol	50	10	80	98,48
4	69,4 mg 0,685 mmol	50	10	80	98,43

Tabela 26. Wyniki optymalizacji.

Zwiększenie ilości trimetylosililoacetyleny do 5 eq (0,489 mmol) zwiększyło także stopień konwersji z 95,24% do 98,48%.

I. Kolejną próbą optymalizacji w celu uzyskania całkowitej konwersji substratu w reakcji sprzęgania Sonogashiry było manewrowanie parametrami syntezy mikrofalowej takimi jak temperatura w jakiej prowadzona była reakcja, czas jej trwania oraz moc grzania. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II zwiększając ilość trimetylosililoacetyleny (49,5 mg, 0,489 mmol) oraz utrzymując ilość Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,87 mg, 0,00979 mmol) i jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu C. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 27**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	50	5	80	68,09
2	50	15	80	86,90
3	50	15	100	92,10
4	50	15	150	84,99
5	50	20	80	84,43
6	30	10	80	46,71
7	60	10	80	93,15
8	60	20	80	96,29
9	60	20	100	92,08
10	60	30	80	90,21
11	70	10	80	97,98
12	70	15	80	97,62
13	70	20	80	100
14	70	5	100	96,10
15	70	10	100	97,57
16	70	15	100	100
17	70	10	120	96,74
18	80	10	80	96,98

Tabela 27. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższą tabelę i porównując z wynikami umieszczonymi w **Tabeli 25** zauważyć można, że w temperaturze 50°C skracając bądź wydłużając czas trwania reakcji, konwersja jest niższa niż przy czasie 10 minut. Dla reakcji prowadzonej przez 15 minut w temperaturze 50°C zwiększono moc grzania do 100, a następnie 150 W. W przypadku pierwszej zmiany uzyskano nieco większy stopień konwersji niż w przypadku mocy 80 W. Po kolejnym wzroście do 150 W konwersja spadła o ponad 7 punktów procentowych. Zmniejszając temperaturę do 30°C również otrzymano spadek stopnia konwersji. Prowadząc reakcję w temperaturze 60°C i sprawdzając różny czas jej trwania (10 minut, 20 minut, 30 minut) maksymalnie otrzymano 96,29% konwersji. Zwiększając moc grzania do 100 W stopień konwersji spadł do 92,08%. Zauważając, że podwyższenie temperatury ma pozytywny wpływ na przereagowywanie substratu prowadzono reakcję w 70°C. W czasie 20 minut uzyskano całkowitą konwersję substratu w oczekiwany produkt. Po podwyższeniu mocy grzania z 80 W do 100 W całkowite przereagowanie substratu uzyskano w czasie 15 minut. Przy kolejnej zmianie mocy grzania lub temperatury na wyższe wartości stopień konwersji malał.

J. Po wybraniu parametrów, dzięki którym możliwe jest otrzymanie całkowitego przereagowania substratu postanowiono sprawdzić, który rozpuszczalnik jest najlepszym wyborem w przypadku reakcji sprzęgania Sonogashiry. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II zmieniając rozpuszczalnik, a także utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **I** (49,5 mg, 0,489 mmol) oraz Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,87 mg, 0,00979 mmol) i jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu **C**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 28**.

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	ACN	70	15	100	87,12
2	THF	70	15	100	88,05
3	DMF	70	15	100	38,61
4	DMSO	70	15	100	72,36
5	MeOH	70	15	100	0
6	EtOH	70	15	100	97,37
7	H ₂ O	70	15	100	58,44
8	dioksan	70	15	100	92,40

Tabela 28. Wyniki optymalizacji.

Spośród powyższych rozpuszczalników największy stopień konwersji uzyskano w przypadku użycia etanolu. Nie było to jednak całkowite przereagowanie substratu, w związku z tym najlepszym rozpuszczalnikiem jest toluen, który był pierwotnie używany.

K. Wybór odpowiedniego katalizatora to również ważny parametr mający wpływ na stopień konwersji. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II zmieniając katalizator (0,00979 mmol), a także utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **I** (49,5 mg, 0,489 mmol) oraz jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu **C**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 29**.

Lp.	Katalizator	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	Pd(PPh ₃) ₄	70	15	100	100
2	PdCl ₂	70	15	100	0
3	Pd/C	70	15	100	0
4	PdCl ₂ (CH ₃ CN) ₂	70	15	100	0

Tabela 29. Wyniki optymalizacji.

K'. Syntezę wykonano według poniższej procedury, natomiast izolację przeprowadzono jak w procedurze II.

W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **40** (30 mg, 0,0979 mmol), trimetylosililoacetylen (10,9 mg, 0,108 mmol), jodek miedzi (I) (0,19 mg, 0,000979 mmol), Pd/C (0,521 mg, 0,000489 mmol) oraz dietyloaminę (144 mg, 0,204 mmol).¹⁴⁷ Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 30**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	70	15	100	0

Tabela 30. Wyniki optymalizacji.

K''. Syntezę wykonano według poniższej procedury, natomiast izolację przeprowadzono jak w procedurze II.

W naczynku mikrofalowym, do roztworu związku **40** (30 mg, 0,0979 mmol) w acetonitrylu (0,3 ml), umieszczono trimetylosililoacetylen (12,9 mg, 0,127 mmol), węglan cezu (80,5 mg, 0,245 mmol) i PdCl₂(CH₃CN)₂ (0,635 mg, 0,00245 mmol).¹⁴⁸ Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 31**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	70	15	100	0

Tabela 31. Wyniki optymalizacji.

K'''. Syntezę wykonano według poniższej procedury, natomiast izolację przeprowadzono jak w procedurze II.

W naczynku mikrofalowym, do roztworu związku **40** (30 mg, 0,0979 mmol) w wodzie (0,3 ml), umieszczono trimetylosililoacetylen (19,8 mg, 0,196 mmol), węglan sodu (41,5 mg, 0,391 mmol) i bromek tetrabutylamonowy (32,2 mg, 0,0979 mmol).¹⁴⁹ Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 32**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	70	15	100	0
2	175	15	150	0

Tabela 32. Wyniki optymalizacji.

Analizując wyniki zawarte w powyższych tabelach zauważyć można, że najlepszym katalizatorem okazał się Pd(PPh₃)₄. Reakcja z jego udziałem osiągnęła 100% konwersji substratu w oczekiwany produkt. Pozostałe katalizatory nie wykazały jakiegokolwiek przereagowania substratu, nawet po zmianie początkowych warunków reakcji.

L. Ostatnim etapem optymalizacji reakcji sprzęgania Sonogashiry było skalowanie syntezy. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury II zmieniając ilość związku **40** oraz rozpuszczalnika w celu uzyskania takiego samego stężenia roztworu w każdej próbie, a także utrzymując ilość trimetylosililoacetyleny z punktu **I** (49,5 mg, 0,489 mmol) oraz Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,87 mg, 0,00979 mmol) i jodku miedzi (I) (1,9 mg, 0,00979 mmol) z punktu **C**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 33**.

Lp.	Związek 41 [mg]	Toluen [ml]	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	100	1	70	15	100	100
2	500	5	70	15	100	97,43
3	1000	10	70	15	100	100

Tabela 33. Wyniki optymalizacji.

Powyższe wyniki przedstawiają całkowity lub bardzo wysoki stopień konwersji substratu w produkt. Wybrana metoda z **Tabeli 27** znalazła odwzorowanie w przypadku zwiększenia skali prowadzonej reakcji sprzęgania Sonogashiry.

L. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezy mikrofalowej oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 24 godzin do 15 minut. Nie ma także potrzeby wcześniejszego

20-minutowego argonowania roztworu, jak w przypadku metody klasycznej, co dodatkowo przyspiesza przygotowanie mieszaniny reakcyjnej.

4.2.2.3 Metoda z wykorzystaniem technologii przepływowej

A. Optymalizację w reaktorze przepływowym zaczęto od parametrów, które w synteźatorze mikrofalowym dały najwyższy stopień konwersji.

Procedura III

W fiolce A umieszczono związek **40** (500 mg, 1,63 mmol), który rozpuszczono w toluenie (4 ml), a następnie dodano jodek miedzi (I) (31,7 mg, 0,163 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (117 mg, 0,163 mmol) oraz trietyloaminę (829 mg, 8,15 mmol). Jednocześnie w fiolce B umieszczono trimetylosililoacetylen (826 mg, 8,15 mmol), który także rozpuszczono w toluenie (4 ml). Obydwie fiolki podłączono do systemu przepływowego. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 34**.

Lp.	Przepływ [ml/min]	Czas rezystancji [min]	Temperatura [°C]	Objętość pobrana [ml]	Objętość zebrana [ml]	Stopień konwersji [%]
1	0,33	15	70	2	6,94	90,47
2	0,166	30	70	2	6,39	92,10
3	0,33	15	80	2	6,94	88,68
4	1	5	80	2	6,65	84,84

Tabela 34 . Wyniki optymalizacji.

Powyższe dane przedstawiają zależność, że wraz z wydłużeniem czasu reakcji wzrasta stopień konwersji. Natomiast wraz ze wzrostem temperatury przereagowanie substratu maleje.

B. Korzystając z powyższych wyników zdecydowano o przeprowadzeniu reakcji ze zmniejszoną ilością katalizatora i jodku miedzi (I). Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury III zmieniając ilość Pd(PPh₃)₂Cl₂ (23,4 mg, 0,0326 mmol) oraz jodku miedzi (I) (6,34 mg, 0,0326 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 35**.

Lp.	Przepływ [ml/min]	Czas rezystancji [min]	Temperatura [°C]	Objętość pobrana [ml]	Objętość zebrana [ml]	Stopień konwersji [%]
1	1	5	70	2	6,64	88,29
2	0,33	15	70	2	6,95	93,23
3	0,166	30	70	2	6,38	95,23
4	1	5	80	2	6,64	89,53
5	0,33	15	80	2	6,95	96,97
6	0,166	30	80	2	6,38	92,98
7	0,33	15	90	2	6,95	93,20

Tabela 35. Wyniki optymalizacji.

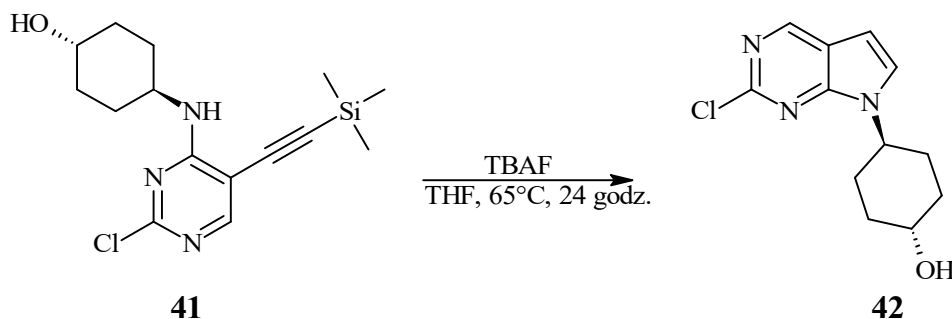
Porównując wyniki z **Tabeli 34** oraz **Tabeli 35** można zauważyć, że zmniejszenie ilości dodawanego katalizatora oraz jodku miedzi (I) zwiększa stopień konwersji. Także zmiana temperatury z 70°C do 80°C w czasie 15 minut prowadzi do większego przereagowania substratu w oczekiwany produkt.

4.2.2.4 Wnioski

Prowadzenie reakcji sprzęgania Sonogashiry w reaktorze mikrofalowym oraz za pomocą technologii przepływowej odbywa się w bardzo podobnych warunkach. W obu przypadkach najwyższy stopień konwersji osiągnięto podczas prowadzenia reakcji przez 15 minut w temperaturze 70°C dla syntezy mikrofalowego i 80°C w przypadku metody przepływowej. Jednak pod względem stopnia konwersji na prowadzenie wysuwa się technologia mikrofalowa, ponieważ w niższej temperaturze osiągnięto całkowite przereagowanie substratu w oczekiwany produkt. Pod względem ekonomicznym przeważa natomiast technologia przepływowa, ponieważ najwyższy stopień konwersji osiągnięto przy zastosowaniu 0,02 eq katalizatora oraz jodku miedzi (I), w przeciwieństwie do syntezy mikrofalowego, gdzie zużyto 0,1 eq obydwu substratów.

4.2.3 Reakcja cyklizacji

Produktem tej reakcji jest (1*r*,4*r*)-4-{2-chloro-7-*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (**42**), który został otrzymany według **Schematu 12**.



Schemat 12. Otrzymywanie (1*r*,4*r*)-4-{2-chloro-7-*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-olu.

4.2.3.1 Metoda klasyczna

Roztwór związku **41** (2.25 g, 6.95 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (300 ml) odgazowywano przez 15 minut. Następnie w temperaturze pokojowej dodano 1.0 M roztwór fluorku tetrabutylamoniowego w tetrahydrofuranie (17.4 ml). Otrzymaną mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez noc w temperaturze 65°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą (300 ml) i ekstrahowano octanem etylu (3 x 300 ml). Połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (metanol/octan etylu, 0-1%) uzyskując związek **42** w postaci białej substancji stałej (1,34 g, 76,6%).

MS (APCI): 251 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.88 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.60-4.40 (m, 1H), 3.52 (tt, *J* = 11.6, 4.3 Hz, 1H), 2.04-1.79 (m, 6H), 1.52-1.29 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 153.1, 151.5, 150.8, 126.6, 117.9, 100.2, 69.5, 52.5, 34.3, 31.0.

4.2.3.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura IV

W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **41** (30 mg, 0,0926 mmol), który rozpuszczono w tetrahydrofuranie (2,3 ml). Klarowny jasnożółty roztwór mieszano w atmosferze argonu. Następnie dodano fluorek tetra-n-butyloamoniowy (211 mg, 0,232 mmol), co pogłębiło barwę roztworu. Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 36**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	65	2,5	100	100
2	65	5	100	100
3	65	7	100	100
4	65	10	100	100
5	65	15	100	100

Tabela 31. Wyniki optymalizacji.

Wszystkie powyższe próby optymalizacji reakcji cyklizacji zakończone zostały z całkowitą konwersją, bez względu na czas jej trwania.

B. Kolejnym krokiem optymalizacji była zmiana temperatury prowadzenia reakcji. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IV. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 37**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	40	2,5	100	100
2	45	2,5	100	100
3	50	2,5	100	100
4	55	2,5	100	100
5	60	2,5	100	100

Tabela 37. Wyniki optymalizacji.

Tak jak w przypadku zmiany czasu, tak również podczas zmiany temperatury prowadzenia reakcji cyklizacji, stopień konwersji wynosił 100%.

C. Na podstawie wyników z **Tabeli 37** wybrano najniższą temperaturę prowadzenia reakcji i skrócono czas jej trwania do 1 minuty. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IV. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 38**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	40	1	100	100

Tabela 38. Wyniki optymalizacji.

Na podstawie powyższej tabeli zauważyć można, że skrócony czas reakcji do 1 minuty nie wpływa na stopień konwersji.

D. Kolejnym etapem optymalizacji reakcji cyklizacji było prowadzenie syntezy w różnych rozpuszczalnikach. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IV zmieniając rozpuszczalnik. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 39**.

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	MeOH	40	1	100	100
2	EtOH	40	1	100	100
3	tertBuOH	40	1	100	100
4	iPrOH	40	1	100	100
5	DMF	40	1	100	100
6	DMSO	40	1	100	100
7	toluen	40	1	100	100
8	dioksan	40	1	100	100
9	H ₂ O	40	1	100	100
10	4M HCl w dioksanie	40	1	100	0

Tabela 39. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki i porównując je z poprzednimi, zauważono, że zmiana rozpuszczalnika nie powoduje zmniejszenia stopnia konwersji. Jedynie 4M HCl w dioksanie nie jest odpowiednim rozpuszczalnikiem do prowadzenia w nim reakcji cyklizacji ze względu na brak jakiegokolwiek przereagowania substratu.

E. Zmiana ilości dodawanego substratu, TBAF, to kolejna próba optymalizacji. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IV zmieniając ilość fluorku tetra-n-butyloamoniowego. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 40**.

Lp.	TBAF	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	84,6 mg 0,0926 mmol	40	1	100	100
2	127 mg 0,139 mmol	40	1	100	100
3	169 mg 0,185 mmol	40	1	100	100

Tabela 40. Wyniki optymalizacji.

Zmiana ilości dodawanego substratu, jakim był TBAF, nie zmienia stopnia konwersji i ponownie wynosi on 100%.

F. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezy mikrofalowej oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 24 godzin do 1 minuty. Nie ma także potrzeby prowadzenia reakcji w temperaturze 65°C, jak w metodzie klasycznej, ponieważ temperatura 40°C jest wystarczająca.

4.2.3.3 Metoda z wykorzystaniem technologii przepływowej

W fiolce A umieszczono związek **41** (100 mg, 0,309 mmol), który rozpuszczono w tetrahydrofuranie (6,5 ml). Jednocześnie w fiolce B umieszczono fluorek tetra-n-butyloamoniowy (705 mg, 0,772 mmol), który także rozpuszczono w tetrahydrofuranie (6,5 ml). Obydwie fiołki podłączono do systemu przepływowego. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 41**.

Lp.	Przepływ [ml/min]	Czas rezystancji [min]	Temperatura [°C]	Objętość pobrana [ml]	Objętość zebrana [ml]	Stopień konwersji [%]
1	5	1	40	2	9,31	100
2	2,16	2,5	40	2	9,26	100
3	1	5	40	2	6,49	100
4	0,25	20	40	2	6,23	100
5	5	1	30	2	9,31	0
6	2,16	2,5	30	2	9,31	22,05
7	1	5	30	2	6,54	43,48
8	0,25	20	30	2	6,28	100

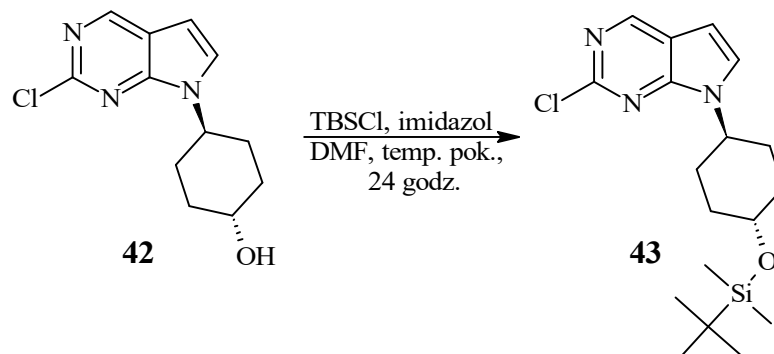
Tabela 41. Wyniki optymalizacji.

4.2.3.4 Wnioski

Porównując wyniki zebrane w **Tabeli 38** oraz w **Tabeli 41** obniżenie temperatury do 30°C, przy czasie prowadzenia reakcji przez 1 minutę, spowodowało brak przereagowania substratu. Zauważyć można także, że wydłużenie czasu trwania syntezy powoduje wzrost stopnia konwersji do 100% przy 20 minutach. Natomiast prowadzenie reakcji w temperaturze 40°C, tak jak w przypadku wykorzystania reaktora mikrofalowego, skutkuje otrzymaniem całkowitego przereagowania substratu w każdym punkcie czasowym. Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, iż reaktor mikrofalowy oraz reaktor przepływowy można stosować zamiennie, ze względu na brak zauważalnej przewagi któregoś z wymienionych.

4.2.4 Reakcja zabezpieczenia grupy hydroksylowej

Produktem tej reakcji jest 2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyloдимetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna (**43**), która została otrzymana według Schematu 13.



Schemat 13. Otrzymywanie 2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyloдимetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny.

4.2.4.1 Metoda klasyczna

Do roztworu związku **42** (3.572 g, 14.20 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (240 ml) dodano imidazol (2.41 g, 35.3 mmol) i *tert*-butylochlorodimetylosilan (3.21 g, 21.30 mmol) w temperaturze 0°C. Otrzymaną mieszaninę mieszano przez 1 godzinę w temperaturze 0°C, a następnie pozwolono dojść do temperatury pokojowej i mieszano przez noc. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą (200 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 600 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan, 0-15%) uzyskując związek **43** w postaci białej substancji stałej (3,64g, 70%).

MS (APCI): 365 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.89 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.62 – 4.51 (m, 1H), 3.76 (td, *J* = 10.6, 5.3 Hz, 1H), 2.02 – 1.86 (m, 6H), 1.51 (dd, *J* = 23.5, 10.0 Hz, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.9 (s), 151.2 (d, *J* = 7.2 Hz), 150.7 (s), 128.6 (s), 117.7 (s), 100.0 (s), 69.9 (s), 52.2 (s), 34.4 (s), 30.1 (s), 25.8 (q, *J* = 5.9 Hz), 17.8 (s), -4.7 (d, *J* = 2.2 Hz).

4.2.4.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura V

W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **42** (20 mg, 0,0795 mmol), który rozpuszczono w dimetyloformamidzie (0,4 ml). Do powstałego bezbarwnego roztworu dodano tert-butylochlorodimetylosilan (18 mg, 0,119 mmol) i imidazol (13,7 mg, 0,199 mmol). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (MeOH:DCM 5:95 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 42**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	40	5	100	72,80
2	40	7	100	62,25
3	40	10	100	47,55
4	40	15	100	96,20
5	40	20	100	80,38
6	40	30	100	54,78
7	40	40	100	17,50

Tabela 42. Wyniki optymalizacji.

Na podstawie powyższych wyników zauważyć można, że najlepszymi parametrami reakcji zabezpieczenia grupy hydroksylowej są temperatura 40°C, czas 15 minut i moc grzania równa 100 W. Nie jest to jednak całkowite przereagowanie substratu, dlatego podjęto kolejne próby optymalizacji.

B. Mając na uwadze wyniki zawarte w **Tabeli 42**, postanowiono w pierwszej kolejności zmienić moc grzania reakcji. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury V. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 43**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	40	15	5	61,04
2	40	15	20	52,16
3	40	15	40	51,73
4	40	15	60	71,29
5	40	15	80	60,87
6	40	15	150	82,13
7	40	15	200	88,32
8	40	15	250	67,16
9	40	15	300	61,35

Tabela 43. Wyniki optymalizacji.

Porównując otrzymane wyniki z wynikami zawartymi w **Tabeli 42** otrzymano niższe wartości stopnia konwersji. W związku z tym moc grzania nie jest parametrem, który zwiększa przereagowanie substratu.

C. Kolejnym parametrem, który ulegał zmianie była temperatura, w której prowadzona była reakcja. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury V. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 44**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	60	15	100	79,38
2	80	15	100	66,10
3	100	15	100	54,87
4	120	15	100	48,82
5	150	15	100	41,87

Tabela 44. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki oraz porównując z danymi zawartymi w **Tabeli 42**, zauważyć można zależność między temperaturą prowadzenia reakcji a stopniem konwersji. Mianowicie wraz ze wzrostem temperatury stopień konwersji maleje.

D. Zauważając, że zmiana parametrów syntezy mikrofalowego nie daje oczekiwanych wyników, postanowiono zmienić ilość dodawanych substratów. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury V zmieniając ilość tert-butylochlorodimetylosilanu oraz imidazolu. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 45**.

Lp.	TBSCl	imidazol	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	24 mg 0,159 mmol	13,7 mg 0,199 mmol	40	5	100	90,14
2			40	10	100	95
3			40	15	100	100
4	35,9 mg 0,238 mmol	13,7 mg 0,199 mmol	40	5	100	90,67
5			40	10	100	95,69
6			40	15	100	99,27
7	24 mg 0,159 mmol	16,4 mg 0,238 mmol	40	5	100	96,71
8			40	10	100	93,05
9			40	15	100	97,18
10	35,9 mg 0,238 mmol	16,4 mg 0,238 mmol	40	5	100	97,31
11			40	10	100	100
12			40	15	100	100

Tabela 45. Wyniki optymalizacji.

Zmiana ilości dodawanego tert-butylochlorodimetylosilanu oraz imidazolu doprowadziła do całkowitego przereagowania substratu w oczekiwany produkt. Najlepsze wyniki osiągnięto dla reakcji, w której zwiększono ilość TBSCl do 2 eq, a czas jej trwania wyniósł 15 minut. Po dodaniu większej ilości tert-butylochlorodimetylosilanu (3 eq) oraz imidazolu (3 eq) całkowitą konwersję uzyskano dla reakcji trwającej 10 minut.

E. Ostatnim etapem optymalizacji reakcji zabezpieczenia grupy hydroksylowej było prowadzenie syntezy w różnych rozpuszczalnikach. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury V utrzymując ilość tert-butylochlorodimetylosilanu (35,9 mg, 0,238 mmol) oraz imidazolu (16,4 mg, 0,238 mmol) z punktu D. Wyniki przedstawiono w Tabeli 46.

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	ACN	40	10	100	99,09
2	THF	40	10	100	64,11
3	toluen	40	10	100	0
4	DMSO	40	10	100	100
5	MeOH	40	10	100	0
6	EtOH	40	10	100	0
7	H ₂ O	40	10	100	0
8	dioksan	40	10	100	44,78

Tabela 46. Wyniki optymalizacji.

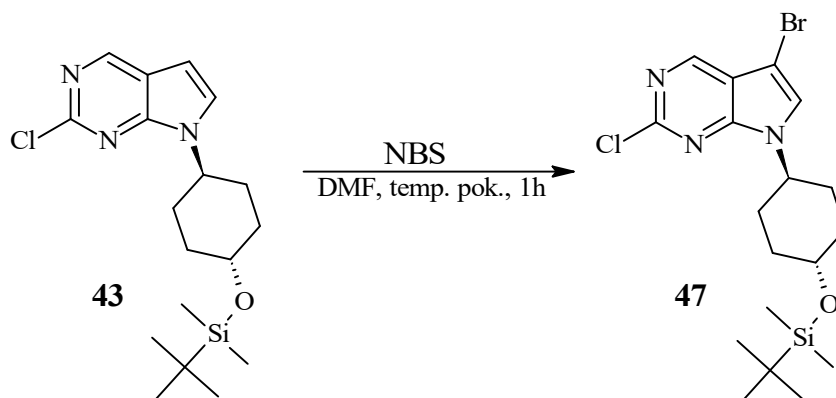
Analizując powyższe wyniki można zauważyć, że jedynie reakcja prowadzona w DMSO uzyskuje całkowity stopień konwersji.

F. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezy mikrofalowej oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 24 godzin do 15 minut. Nie ma także potrzeby wcześniejszego chłodzenia przygotowanego roztworu, jak w metodzie klasycznej, co dodatkowo przyspiesza przygotowanie mieszaniny reakcyjnej.

4.2.5 Reakcja bromowania

Produktem tej reakcji jest 5-bromo-2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)-oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna (**47**), która została otrzymana według Schematu 14.



Schemat 14. Otrzymywanie 5-bromo-2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny.

4.2.5.1 Metoda klasyczna

Do roztworu związku **43** (3.48 g, 9.51 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (30 ml) dodano *N*-bromosukcynoimid (3.59 g, 11.50 mmol) w kilku porcjach, w temperaturze pokojowej. Otrzymaną mieszaninę mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę rozcieńczono wodą (1300 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 400 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan, 5-50%) uzyskując związek **47** w postaci białej substancji stałej (11,2 g, 75,8%).

MS (APCI): 444 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.85 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 4.61 (td, J = 11.0, 4.3 Hz, 1H), 3.91 – 3.59 (m, 1H), 2.16 – 1.78 (m, 6H), 1.66 – 1.42 (m, 2H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153.5, 150.9, 150.7, 128.7, 117.6, 87.7, 70.4, 53.3, 34.9, 30.6, 26.3, 26.3, 18.3, -4.1.

4.2.5.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura VI

W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **43** (10 mg, 0,0273 mmol), który rozpuszczono w dimetyloformamidzie (0,2 ml). Do powstałego bezbarwnego roztworu dodano *N*-bromosukcynoimid (4,91 mg, 0,0273 mmol). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 47**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	40	5	100	60,30
2	40	10	100	65,24
3	40	15	100	64,01
4	40	20	100	57,72
5	40	30	100	66,29
6	40	40	100	51,26

Tabela 47. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki zauważyć można, że najwyższy stopień konwersji (66,29%) uzyskano podczas prowadzenia reakcji w 40°C przez 30 minut i przy mocy grzania 100 W. Nieco niższy stopień konwersji (65,24%) uzyskano dla tych samych parametrów z wyjątkiem czasu prowadzenia reakcji, który w tym przypadku wynosił 10 minut. Ze względu na krótszy czas trwania reakcji warunki te wykorzystano do dalszej optymalizacji.

B. Mając ustalony czas trwania reakcji na podstawie powyższych wyników, kolejnym etapem była optymalizacja temperatury, w której prowadzona była reakcja bromowania. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VI. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 48**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	50	10	100	70,80
2	60	10	100	67,23
3	70	10	100	77,28
4	80	10	100	68,52
5	90	10	100	77,38
6	100	10	100	48,82

Tabela 48. Wyniki optymalizacji.

Porównując powyższe wyniki z wynikami umieszczonymi w **Tabeli 47** zauważyć można, że wzrost temperatury prowadzenia reakcji bromowania powoduje zwiększenie stopnia konwersji do 77,38%.

C. W kolejnym etapie optymalizacji postanowiono zmienić moc grzania reakcji. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VI. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 49**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	90	10	80	78,14
2	90	10	120	72,03
3	90	10	150	73,03
4	90	10	300	67,66

Tabela 49. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki zauważono, że wraz ze wzrostem mocy grzania mieszaniny reakcyjnej maleje stopień konwersji. W związku z tym największy stopień przereagowania substratu osiągnięto przy wartości 80 W.

D. Na podstawie wyników umieszczonych w powyższych tabelach, a mianowicie braku otrzymania całkowitej konwersji, zdecydowano o zwiększeniu ilości dodawanego substratu. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VI zwiększając ilość *N*-bromosukcynoimidu (9,83 mg, 0,0546 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 50**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	90	10	80	100
2	90	5	80	100
3	90	2	80	100

Tabela 50. Wyniki optymalizacji.

Na podstawie powyższych danych wynika, że zwiększenie ilości dodawanego *N*-bromosukcynoimidu do 2 eq znacznie poprawiło stopień konwersji doprowadzając do całkowitego przereagowania substratu w krótkim czasie (2 minuty).

E. Korzystając z danych umieszczonych w **Tabeli 50** w kolejnym kroku zaproponowano przeprowadzenie reakcji w niższej temperaturze. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VI utrzymując ilość *N*-bromosukcynoimidu (9,83 mg, 0,0546 mmol) z punktu **D**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 51**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	70	2	80	96,40
2	80	2	80	95,19

Tabela 51. Wyniki optymalizacji.

Po porównaniu danych zawartych w **Tabeli 50** oraz **Tabeli 51** zauważono, że zmiana temperatury na niższą niż 90°C obniża stopień konwersji.

F. Ostatnim parametrem jaki zmieniono podczas optymalizacji reakcji bromowania był rozpuszczalnik. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VI utrzymując ilość *N*-bromosukcynoimidu (9,83 mg, 0,0546 mmol) z punktu **D**, a także zmieniając rozpuszczalnik. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 52**.

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	ACN	90	2	80	100
2	THF	90	2	80	100
3	DMSO	90	2	80	100
4	dioksan	90	2	80	100
5	toluen	90	2	80	73,25
6	MeOH	90	2	80	0
7	EtOH	90	2	80	0
8	H ₂ O	90	2	80	0

Tabela 52. Wyniki optymalizacji.

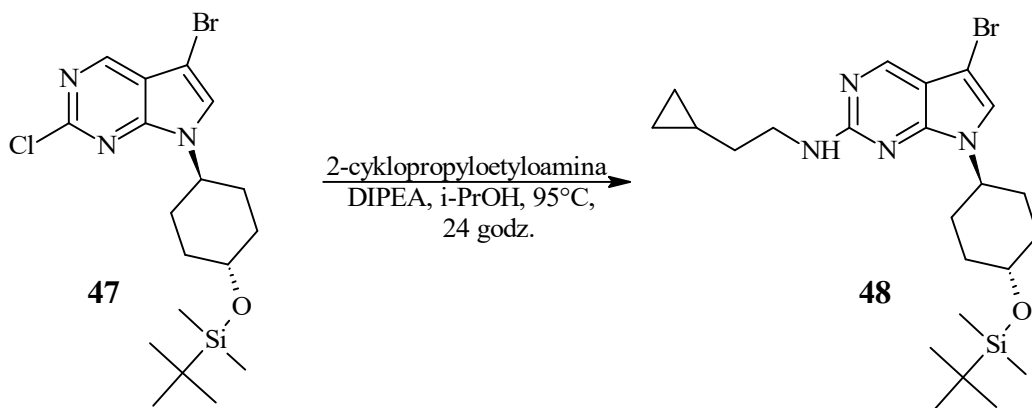
Powyższe wyniki przedstawiają całkowitą konwersję substratu podczas prowadzenia reakcji w takich rozpuszczalnikach jak: acetonitryl (ACN), tetrahydrofuran (THF), dimetylosulfotlenek (DMSO) oraz dioksan. Obok dimetyloformamidu są to rozpuszczalniki, które również z powodzeniem można użyć w reakcji bromowania.

G. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezyatora mikrofalowego oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 1 godziny do 2 minut. Nie ma także potrzeby korzystania z bezwodnych rozpuszczalników ani dodawania substratu porcjami, jak w metodzie klasycznej, co dodatkowo przyspiesza przygotowanie mieszaniny reakcyjnej.

4.2.6 Reakcja *N*-aminowania

Produktem tej reakcji jest 5-bromo-*N*-(2-cyklopropyloetylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (**48**), która została otrzymana według Schematu 15.



Schemat 15. Otrzymywanie 5-bromo-*N*-(2-cyklopropyloetylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy.

4.2.6.1 Metoda klasyczna

Do roztworu związku **47** (1 g, 2,25 mmol) w bezwodnym 2-propanolu (12 ml), w temperaturze pokojowej dodano 2-cyklopropyloetyloaminę (1,44 g, 11,2 mmol) i *N,N*-diizopropyletyloaminę (0,436 g, 3,37 mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszano przez noc w temperaturze 95 °C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (heptan/octan etylu 1:1, v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozcieńczono w octanie etylu (100 ml) i ekstrahowano wodą (3x100 ml). Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (heptan/octan etylu 1:1, v/v) uzyskując związek **48** w postaci jasnopomarańczowego osadu (220 mg, 19,8%).

MS (APCI): 495 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.63 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 3.41 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 2.27 – 2.23 (m, 2H), 2.09 – 2.05 (m, 2H), 1.90 – 1.86 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 50H), 1.11 (s, 1H), 1.09 – 1.05 (m, 9H), 0.70 – 0.66 (m, 2H), 0.44 – 0.40 (m, 2H), 0.27 – 0.23 (m, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 29.19 – 28.79 (m), 28.10 – 27.78 (m), 25.76 – 25.55 (m), 18.59 (s), 9.82 (s), 8.18 – 7.79 (m), -2.89 – -3.29 (m).

4.2.6.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura VII

W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **47** (20 mg, 0,045 mmol), chlorowodorek 2-cyklopropyloetyloaminy (28,8 mg, 0,225 mmol), 2-propanol (0,3 ml) oraz *N,N*-diizopropylloetyloaminę (8,99 mg, 0,0674 mmol). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 5:95 v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 53**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	95	5	100	0
2	95	10	100	0
3	95	15	100	0
4	95	20	100	6,83
5	95	30	100	11,15
6	95	40	100	11,70

Tabela 53. Wyniki optymalizacji.

Prowadzenie reakcji w temperaturze 95°C, tak jak w przypadku metody klasycznej, w czasie od 5 do 40 minut wykazuje niewielki procent przereagowania substratu.

B. W związku z zerowym stopniem konwersji podczas prowadzenia reakcji w temperaturze 95°C zdecydowano o optymalizacji reakcji aminowania w wyższej temperaturze. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VII. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 54**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	120	5	100	14,57
2	120	10	100	12,61
3	120	15	100	35,35
4	120	20	100	20,44
5	120	30	100	39,37
6	120	40	100	32,33

Tabela 54. Wyniki optymalizacji.

Prowadzenie reakcji w temperaturze 120°C wykazuje niski stopień konwersji substratu w oczekiwany produkt. W czasie 30 minut stopień przereagowania wynosi niespełna 40%.

C. Po analizie wyników zebranych w **Tabeli 54** w dalszych próbach optymalizacji zdecydowano o podwyższeniu pozostałych parametrów, czyli czasu trwania reakcji oraz mocy jej grzania. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VII. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 55**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	170	40	100	73,13
2	170	40	300	84,55
3	170	60	100	83,87

Tabela 55. Wyniki optymalizacji.

Na podstawie powyższych danych zauważyć można, że najwyższy stopień konwersji osiągnięto po podwyższeniu temperatury do 170°C oraz podwyższeniu mocy grzania do 300 W.

D. W oparciu o powyższe wyniki zdecydowano o zwiększeniu ilości dodawanej *N,N*-diizopropylloetyloaminy do 5 eq. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VII zwiększając ilość dodawanej zasady (30 mg, 0,225 mmol). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 56**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	170	60	100	90,56
2	170	60	300	94,91

Tabela 56. Wyniki optymalizacji.

Porównując wyniki zamieszczone w **Tabeli 55** oraz **Tabeli 56** zauważyć można, że dodanie większej ilości *N,N*-diizopropylloetyloaminy (5 eq) poprawia stopień konwersji o prawie 7 punktów procentowych dla reakcji prowadzonej przez 60 minut przy mocy grzania 100 W.

E. Dalszym celem optymalizacji było zwiększenie stopnia konwersji, dlatego postanowiono wydłużyć czas reakcji do 120 minut przy mocy grzania 100 i 300 W. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VII utrzymując ilość dodawanej zasady (30 mg, 0,225 mmol) z punktu **D**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 57**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	170	120	100	98,94
2	170	120	300	98,26

Tabela 57. Wyniki optymalizacji.

Wyniki w powyższej tabeli przedstawiają, że wydłużenie czasu trwania reakcji do 120 minut zwiększa stopień konwersji aż do prawie 99%. Jest to jednocześnie najwyższy stopień przereagowania substratu podczas optymalizacji reakcji aminowania.

F. Kolejnym krokiem podczas optymalizacji reakcji aminowania było prowadzenie syntezy w różnych rozpuszczalnikach. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VII utrzymując ilość dodawanej zasady (30 mg, 0,225 mmol) z punktu **D**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 58**.

Lp.	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	ACN	170	120	100	95,53
2	THF	170	120	100	88,01
3	toluen	170	120	100	60,45
4	DMSO	170	120	100	0
5	MeOH	170	120	100	100
6	EtOH	170	120	100	97,46
7	H ₂ O	170	120	100	0
8	dioksan	170	120	100	0

Tabela 58. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki zauważyć można, że podczas prowadzenia reakcji w metanolu uzyskano całkowite przereagowanie substratu w oczekiwany produkt.

G. Na podstawie powyższych danych zaproponowano prowadzenie reakcji w metanolu w krótszym czasie niż 120 minut. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VII utrzymując ilość dodawanej zasady (30 mg, 0,225 mmol) z punktu **D**. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 59**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	170	60	100	98,35
2	170	30	100	97,76

Tabela 59. Wyniki optymalizacji.

Porównując wyniki z **Tabeli 58** oraz **Tabeli 59** zauważyć można, że skrócenie czasu reakcji prowadzonej w metanolu zmniejszyła stopień konwersji.

H. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezy mikrofalowej oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 24. do 2. godzin. Nie ma także potrzeby korzystania z bezwodnych rozpuszczalników, jak w metodzie klasycznej. Zoptymalizowane warunki tej reakcji wykorzystano także podczas syntezy z *n*-butyloaminą i uzyskano całkowitą konwersję, co potwierdza jej użyteczność.

4.2.6.3 Metoda z wykorzystaniem technologii przepływowej

A. Procedura VIII

W fiolce A umieszczono związek **47** (500 mg, 1,12 mmol), który rozpuszczono w 2-propanolu (7,5 ml), a następnie dodano *N,N*-diizopropylloetyloaminę (225 mg, 1,69 mmol). Jednocześnie w fiolce B umieszczono chlorowodorek 2-cyklopropyloetyloaminy (719 mg, 5,62 mmol), który także rozpuszczono w 2-propanolu (7,5 ml). Obydwie fiolki podłączono do systemu przepływowego. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 5:95, v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 60**.

Lp.	Przepływ [ml/min]	Czas rezystancji [min]	Temperatura [°C]	Objętość pobrana [ml]	Objętość zebrana [ml]	Stopień konwersji [%]
1	0,125	40	95	2	6,34	0
2	0,125	40	120	2	6,37	11,26
3	0,167	60	120	2	7,98	9,43
4	0,125	40	140	2	6,34	0
5	0,125	40	170	2	6,50	0
6	0,250	20	170	2	6,50	0

Tabela 60. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższą tabelę, zauważyć można, że prowadzenie reakcji aminowania w reaktorze przepływowym w czasie 20 oraz 40 minut w przedziale temperatur 95-170°C

daje bardzo niską bądź zerową konwersję substratu. Zarówno przy obniżaniu jak i podwyższaniu temperatury, stopień przereagowania substratu maleje. Taka sama zależność dotyczy czasu prowadzenia reakcji.

B. Na podstawie powyższych danych oraz danych zawartych w **Tabeli 58** próbowano wykonać reakcję aminowania w metanolu. Ze względu jednak na brak rozpuszczalności substratu w tym rozpuszczalniku było to niemożliwe. Kolejną próbą była synteza w tetrahydrofuranie. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VIII zmieniając rozpuszczalnik. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 61**.

Lp.	Przepływ [ml/min]	Czas rezystancji [min]	Temperatura [°C]	Objętość pobrana [ml]	Objętość zebrana [ml]	Stopień konwersji [%]
1	0,125	40	120	2	6,37	12,38

Tabela 61. Wyniki optymalizacji.

C. Zauważając, że zmiana rozpuszczalnika podwyższyła nieznacznie stopień konwersji, zdecydowano o przeprowadzeniu reakcji, gdzie zmianie ulegnie stosunek ilości substratów (związku **47** oraz chlorowodoru 2-cyklopropyloetyloaminy). Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury VIII zmieniając ilość dodawanego chlorowodoru 2-cyklopropyloetyloaminy. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 62**.

Lp.	Stosunek substratów	Przepływ [ml/min]	Czas rezystancji [min]	Temp. [°C]	Objętość pobrana [ml]	Objętość zebrana [ml]	Stopień konwersji [%]
1	1:5	0,125	40	120	2	6,37	41,18
2	1:10	0,125	40	120	2	6,37	66,25
3	1:20	0,125	40	120	2	6,37	81,18
4	1:25	0,125	40	120	2	6,37	92,44

Tabela 62. Wyniki optymalizacji.

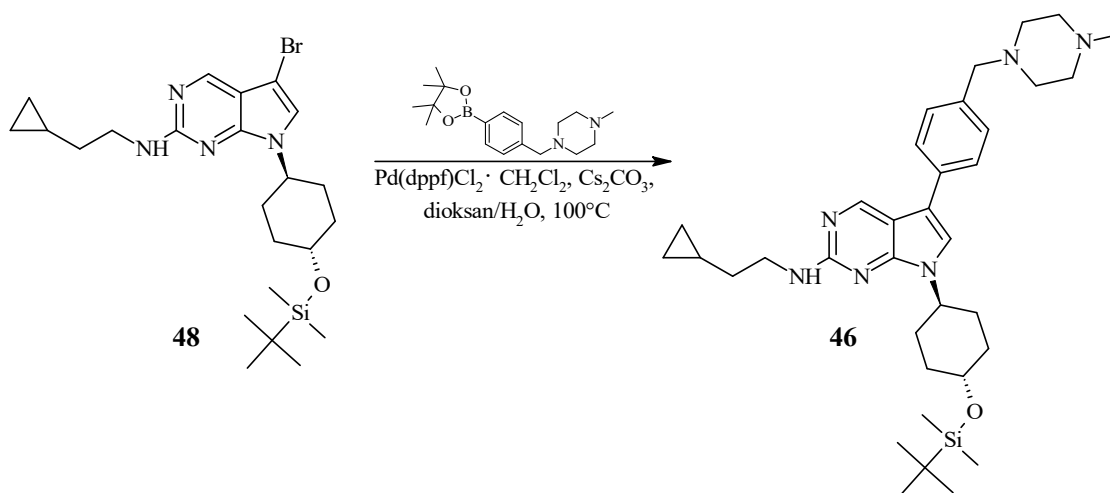
Powyższe dane wskazują zależność, że im większe stężenie chlorowodoru 2-cyklopropyloetyloaminy tym wyższy stopień konwersji.

4.2.6.4 Wnioski

Porównując wyniki otrzymane metodą klasyczną, przy pomocy reaktora mikrofalowego oraz dzięki technologii przepływowej, widać znaczną przewagę syntezatora mikrofalowego. Przy jego wykorzystaniu czas prowadzenia reakcji wynosi 2 godziny, gdzie w metodzie klasycznej synteza trwa 24 godziny. W zestawieniu reaktora mikrofalowego oraz przepływowego pod względem czasu trwania reakcji na prowadzenie wysuwa się ten drugi, jednak ilość zużytych substratów w stosunku 1:25 nie jest ekonomicznym podejściem. Dodatkowo w tym przypadku nie uzyskano całkowitej konwersji, jak miało to miejsce przy użyciu syntezatora mikrofalowego.

4.2.7 Reakcja sprzęgania Suzuki

Produktem tej reakcji jest *N*-(2-cyklopropyloetylo)-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]fenylo}-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(tert-butyldimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pi-rolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (**46**), która została otrzymana według **Schematu 16**.



Schemat 16. Otrzymywanie *N*-(2-cyklopropyloetylo)-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]fenylo}-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(tert-butyldimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pi-rolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy.

4.2.7.1 Metoda klasyczna

W kolbie okrągłodennej umieszczono związek **48** (5 g, 10,1 mmol), ester pinakolowy kwasu 4-(4-metylopiperazyno)metylofenyloboronowego (3,71 g, 11,1 mmol), [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloro-pallad(II), kompleks z dichlorometanem (0,422 g, 0,507 mmol), węglan cezu (10 g, 30,4 mmol) oraz mieszaninę dioksan : woda (250 ml, 4:1 v/v). Otrzymaną mieszaninę mieszano przez noc w temperaturze 100°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 10:90, v/v). Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną

przesączono przez celit na lejku Scotta G4, przemywając dichlorometanem. Przesącz rozcieńczono dichlorometanem (500 ml), a następnie ekstrahowano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (400 ml) oraz wodą (300 ml). Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (chloroform/metanol, 2-7%) uzyskując związek **46** w postaci brązowej żywicy (4,03 g, 66%).

MS (APCI): 604 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.73 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.73 – 7.59 (m, 2H), 7.49 – 7.35 (m, 2H), 4.25 (s, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.67 – 3.63 (m, 2H), 3.42 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 2.71 – 2.63 (m, 4H), 2.52 – 2.51 (m, 2H), 2.49 – 2.46 (m, 4H), 2.34 – 2.30 (m, 3H), 2.30 – 2.16 (m, 4H), 1.73 (s, 1H), 1.64 – 1.59 (m, 4H), 1.16 – 1.07 (m, 10H), 0.72 – 0.68 (m, 2H), 0.45 – 0.41 (m, 2H), 0.27 – 0.23 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 157.35 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 140.12 (s), 135.91 (s), 128.19 – 127.98 (m), 126.43 (s), 123.09 – 122.88 (m), 119.92 (s), 113.86 (s), 70.83 (s), 63.10 (s), 55.91 (s), 54.46 – 54.06 (m), 52.92 – 52.52 (m), 45.96 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 29.19 – 28.79 (m), 28.10 – 27.78 (m), 25.76 – 25.55 (m), 18.59 (s), 9.82 (s), 8.18 – 7.79 (m), -2.89 – -3.29 (m).

4.2.7.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. Procedura IX

W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **48** (20 mg, 0,0405 mmol), ester pinakolowy kwasu 4-(4-metylopiperazyno)metylofenyloboronowego (14,1 mg, 0,0446 mmol), [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloro-pallad(II), kompleks z dichlorometanem (1,69 mg, 0,00203 mmol), węglan cezu (40 mg, 0,122 mmol) oraz mieszaninę dioksan/H₂O (1 ml, 4:1, v/v). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 10:90, v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 63**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	100	2	150	83,39
2	100	5	150	97,85
3	100	10	150	95,61
4	100	15	150	95,81
5	100	20	150	96,84
6	100	30	150	97,42
7	100	40	150	93,88

Tabela 63. Wyniki optymalizacji.

Porównując powyższe wyniki z metodą klasyczną widoczne jest, że w tej samej temperaturze (100°C) w synteźatorze mikrofalowym można uzyskać produkt z bardzo wysoką konwersją w ciągu 5 minut.

B. Mając na celu uzyskanie całkowitej konwersji substratu w oczekiwany produkt postanowiono zmienić temperaturę, w której prowadzona była reakcja sprzęgania Suzukiego. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IX. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 64**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	80	5	150	35,19
2	120	5	150	100

Tabela 64. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki oraz wyniki zestawione w **Tabeli 59** zauważono, że podwyższenie temperatury prowadzenia reakcji do 120°C skutkuje otrzymaniem 100% konwersji.

C. Mając dobrane warunki reakcji, które prowadzą do całkowitego przereagowania substratu postanowiono sprawdzić jak na stopień konwersji wpływa użycie innego katalizatora niż [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloro-pallad(II), kompleks z dichlorometanem. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IX zmieniając katalizator. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 65**.

Lp.	Katalizator	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	Pd(PPh ₃) ₄	120	5	150	100
2	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	120	5	150	100
3	Pd ₂ (dba) ₃	120	5	150	0

Tabela 65. Wyniki optymalizacji.

Prowadzenie reakcji w obecności Pd(PPh₃)₄ lub Pd(PPh₃)₂Cl₂ w warunkach przedstawionych w powyższej **Tabeli 65** nie zmieniają stopnia konwersji, zatem można katalizatory te stosować zamiennie.

D. Na podstawie powyższych danych oraz wybranych parametrów prowadzenia reakcji Suzukiego zaproponowano syntezę z innym estrem kwasu pinakolowego oraz kwasem pinakolowym. Syntezę oraz izolację produktu wykonano według procedury IX zmieniając jeden z substratów. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 66**.

Lp.	Substrat	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	Ester pinakolowy kwasu 5-((4-Boc-pipera-zyno)metylo)-2-tiofenoboronowego	120	5	150	100
2	Kwas tiofeno-2-boronowy	120	5	150	100

Tabela 66. Wyniki optymalizacji.

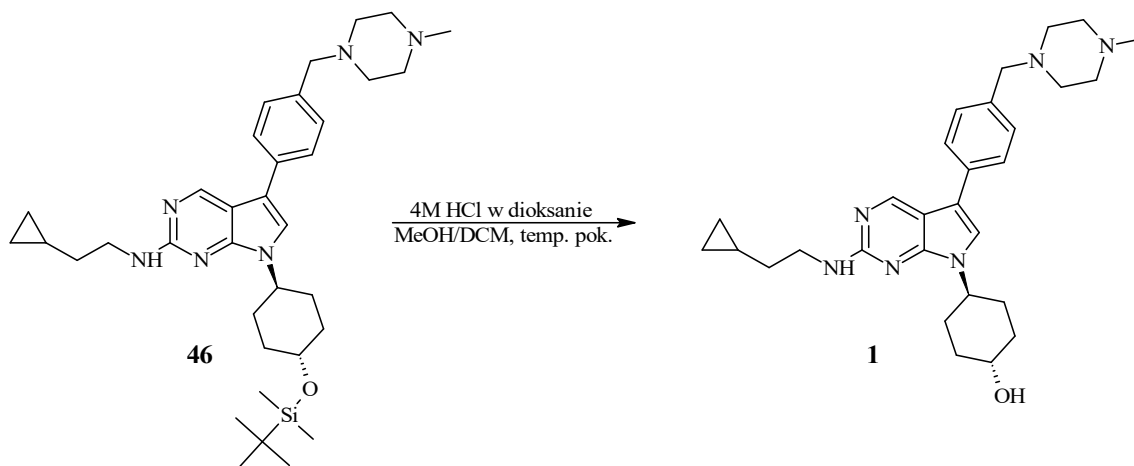
Wybrane parametry prowadzenia reakcji są odpowiednie także dla syntezy z innymi estrami kwasu pinakolowego oraz kwasami pinakolowymi, co przedstawiono w **Tabeli 66**.

E. Wnioski ogólne

Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezyatora mikrofalowego oraz metodą klasyczną widoczna jest przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 24 godzin do 5 minut.

4.2.8 Reakcja odbezpieczenia grupy funkcyjnej

Produktem tej reakcji jest (1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-cyclopropylethyl)amino]-5-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl}cyclohexan-1-ol (**1**), który został otrzymany według **Schematu 17**.



Schemat 17. Otrzymywanie (1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-cyclopropylethyl)amino]-5-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl}cyclohexan-1-olu.

4.2.8.1 Metoda klasyczna

Do roztworu związku **46** (4 g, 6,63 mmol) w mieszaninie dichlorometan : metanol (221 ml, 4:1 v/v) dodano 4M roztwór kwasu solnego w dioksanie (10,4 g, 39,8 mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 20:80, v/v). Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono dichlorometanem (500 ml), a następnie ekstrahowano 1M roztworem wodorotlenku sodu (400 ml). Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (dichlorometan/metanol, 5-20%) uzyskując związek **1** w postaci beżowego osadu (1,74 g, 54%).

MS (APCI): 489 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.81 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.80 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.47 – 4.37 (m, 1H), 3.59 – 3.50 (m, 1H), 3.45 (s, 2H), 3.39 (dd, *J* = 14.1, 6.3 Hz, 2H), 2.44 – 2.25 (m, 8H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (dd, *J* = 28.8, 17.1 Hz, 6H), 1.48 (dd, *J* = 14.5, 7.1 Hz, 2H), 1.38 (t, *J* = 10.8 Hz, 2H), 0.75 (td, *J* = 7.4, 3.9 Hz, 1H), 0.42 (dt, *J* = 7.6, 4.7 Hz, 2H), 0.08 (q, *J* = 4.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 157.35 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 140.12 (s), 135.91 (s), 128.08 (s), 126.43 (s), 122.99 (s), 119.92 (s), 113.86 (s), 68.06 (s), 63.10 (s), 55.11 (s), 54.26 (s), 52.72 (s), 45.96 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 30.46 (s), 27.11 (s), 9.82 (s), 7.99 (s).

4.2.8.2 Metoda z wykorzystaniem technologii mikrofalowej

A. W naczynku mikrofalowym umieszczono związek **46** (10 mg, 0,0166 mmol), mieszaninę DCM/MeOH (0,5 ml, 4:1, v/v) oraz 4M roztwór HCl w dioksanie (26,1 mg, 0,0995 mmol). Zamknięte naczynko umieszczono w reaktorze mikrofalowym. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 20:80, v/v) oraz za pomocą HPLC badając stopień konwersji substratu w produkt. W tym celu wykorzystano kolumnę chromatograficzną Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm, a zastosowanymi eluentami była woda i acetonitryl w gradiencie 98% H₂O przez 90% do 2% acetonitrylu. Przepływ 0,6 ml/min, czas trwania metody 10 minut. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 67**.

Lp.	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc grzania [W]	Stopień konwersji [%]
1	40	1	150	100
2	40	5	150	100
3	40	10	150	100

Tabela 67. Wyniki optymalizacji.

Analizując powyższe wyniki stwierdzono, że prowadzenie reakcji odbezpieczenia grupy funkcyjnej w 40°C wymaga jedynie 1 minuty, aby otrzymać całkowitą konwersję substratu w oczekiwany produkt. Temperatura ta jest najniższą możliwą temperaturą, jaką można zastosować na posiadanym reaktorze mikrofalowym. Porównując wyniki osiągnięte za pomocą syntezy mikrofalowej oraz metodą klasyczną widoczna jest

przewaga metody mikrofalowej. Czas trwania reakcji znacząco się zmniejsza, z 1 godziny do 1 minuty.

5. Podsumowanie badań własnych

Podsumowując przedstawione wyniki badań, można stwierdzić, iż w pełni zrealizowano określone we wstępie cele pracy jakimi były: zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowej klasy związków małowcząsteczkowych, które selektywnie hamują kinazę MerTK oraz wykorzystanie technologii mikrofalowej oraz przepływowej do optymalizacji syntezy nowych inhibitorów.

Badania zaczęto od analizy literatury, która dostarczyła strukturę kryształu kinazy MerTK i sposób wiązania istniejących inhibitorów. Jako związek wzorcowy do zaprojektowania nowego zestawu związków wybrano opublikowany inhibitor MRX2843. Do zbudowania wirtualnej biblioteki cząsteczek wykorzystano metody bioinformatyczne *in silico*. Dzięki programowi KNIME, a także biorąc pod uwagę właściwości fizykochemiczne, takie jak masa molowa, logP, logD, akceptory i donory wiązań wodorowych oraz liczba wiązań rotacyjnych, otrzymano 2000 struktur chemicznych, natomiast program Pymol użyto do analizy białka MerTK i proponowanych interakcji struktur. Na tej podstawie wybrano rdzeń cząsteczki, którym był układ pirolopirymidynowy oraz pierścień pirymidyny. Dobranie modyfikacji tych dwóch układów uzależniony był od wyników dokowania molekularnego oraz obliczonych i przybliżonych wartości parametrów fizykochemicznych otrzymanych poprzez wykorzystanie programów takich jak np. MarvinSketch. Struktury, które zostały wyselekcjonowane ponownie poddano optymalizacji za pomocą metod bioinformatycznych w celu poprawy ich właściwości fizykochemicznych i parametrów farmakokinetycznych. Dzięki badaniu zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną związków wybrano najbardziej interesujące cząsteczki. Na drodze ośmioetapowej syntezy otrzymano bibliotekę związków składającą się ze 120 struktur. Analogi pirymidyny uzyskano za pomocą jednego etapu - aromatycznego aminowania, natomiast jej modyfikacje przeprowadzono na drodze dwóch kolejnych reakcji, którymi było aminowanie i sprzęganie Suzuki. Synteza pirolopirymidyny przebiegała w pięciu etapach syntetycznych. Etapy te to kolejno: aromatyczne aminowanie, „*cross coupling*” Sonogashira, cyklizacja, wprowadzenie grupy blokującej funkcje aktywne oraz bromowanie. Kolejne trzyetapowe reakcje: aminowanie, sprzęganie Suzuki oraz odbezpieczenie grupy funkcyjnej pozwoliły na uzyskanie szeregu modyfikacji

strukturalnych. Postęp prowadzonych reakcji kontrolowano przy użyciu cienkowarstwowej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem masowym (TLC-MS) i/lub chromatografii UHPLC. Związki finalne oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem odpowiednio dobranych złożeń oraz na systemach chromatograficznych typu flash. Otrzymane związki scharakteryzowano za pomocą technik magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C , DEPT NMR) oraz chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (HPLC-MS). Wszystkie zsyntezowane związki wykazywały wymaganą czystość HPLC powyżej 90%. Kolejnym etapem było przekazanie otrzymanych struktur na badania biologiczne w celu wyznaczenia aktywności i selektywności na kinazach z rodziny TAM (Tyro3, Axl, Mer). Badania te zostały wykonane w Dziale Badań Przedklinicznych firmy Celon Pharma S.A. natomiast w Laboratorium Analiz Fizykochemicznych przeprowadzono badania rozpuszczalności w środowisku kwaśnym i obojętnym oraz stabilności metabolicznej na mikrosomach mysich i ludzkich. Na podstawie otrzymanych wyników i porównaniu ich ze związkiem referencyjnym, którym był związek MRX2843 (**1**), a także poprzez analizę kieszeni wiążącej danego białka wybrano trzy cząsteczki wiodące do dalszych analiz. Związki te to (1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(tiofen-2-yl)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (**89**), (1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-yl)metylo]-tiofen-2-yl}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (**108**) i (1*r*,4*r*)-4-{[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-yl)metylo]tiofen-2-yl}pirymidyn-4-yl]amino}-cykloheksan-1-ol (**167**). Sprawdzając ich aktywność metaboliczną na modelach komórkowych MOLM-13 i MVT-11 uzyskano obiecujące wyniki, porównywalne do wartości otrzymanych dla związku referencyjnego, które gwarantują wysoki potencjał terapeutyczny. Chcąc pogłębić wiedzę na temat właściwości wybranych związków wiodących powiększono skalę syntezy do ilości gramowych. Dla tak przygotowanych cząsteczek przeprowadzono kolejne badania fizykochemiczne, stabilnościowe, testy na komórkach i zwierzętach, by móc wybrać jeden związek wiodący w myśl procesu „*hit to lead*”. Ostatnim etapem będzie badanie toksykologiczne, a następnie wejście do I fazy badań klinicznych. Etap ten jest obecnie w trakcie realizacji ze względu na opóźnienia spowodowane przez pandemię, która miała miejsce w trakcie prowadzenia badań do doktoratu.

Podczas prowadzenia badań przez wymienione jednostki badawcze Celon Pharma S.A., równolegle trwała optymalizacja kolejnych etapów syntezy przy pomocy technologii mikrofalowej oraz przepływownej. Pierwszy etap to reakcja nukleofilowego

podstawienia aromatycznego, która przy pomocy metody klasycznej, czyli prowadzonej w kolbie, trwała 24 godziny w temperaturze pokojowej, po uprzednim przygotowaniu substratów w temperaturze 0°C przez 4 godziny. Reakcję tę optymalizowano przy pomocy syntezyatora mikrofalowego. Pierwszym etapem optymalizacji było dopasowanie temperatury i czasu prowadzenia reakcji, a także mocy grzania przez syntezyator. W tym celu wykonano 40 reakcji, aby wybrać najlepsze warunki. Najwyższy stopień konwersji (99,59%) uzyskano dla 100°C, 10 minut i 200 W. Zmierzając do uzyskania całkowitego przereagowania substratu zwiększono ilość dodawanego *trans*-4-aminocykloheksanolu do 1,5 eq i 2 eq względem 2,4-dichloro-5-bromopirymidyny. Po dopasowywaniu parametrów mikrofalowych 100% konwersję uzyskano dla 2 eq *trans*-4-aminocykloheksanolu podczas prowadzenia reakcji w 80°C przez 1,5 minuty i mocy grzania 300 W. Mając wybrane parametry, przy których substrat całkowicie przereagowuje dając oczekiwany produkt próbowano manewrować innymi zmiennymi. Po kolei zmniejszono 10-krotnie molarność mieszaniny reakcyjnej, zwiększano ilość dodawanej *N,N*-diizopropylodetyloaminy do 1,5 eq w stosunku do 2,4-dichloro-5-bromopirymidyny, wymieniało zasadę na trietyloaminę i węglan potasu, zwiększano ich ilość, a także zmieniano rozpuszczalnik. Niestety w żadnej tej próbie nie uzyskano ponownie 100% konwersji, aczkolwiek stopień przereagowania był bardzo wysoki i sięgał ponad 95%. Wybrane parametry znalazły odzwierciedlenie podczas skalowania reakcji dając prawie całkowitą konwersję substratu do oczekiwanego produktu. Jednocześnie zauważono, że prowadzenie reakcji nukleofilowego podstawienia aromatycznego w syntezyatorze mikrofalowym przeważa nad metodą klasyczną ze względu na znaczne skrócenie czasu reakcji oraz prowadzenie reakcji w temperaturze bliskiej temperaturze wrzenia 2-propanolu bez konieczności korzystania z chłodnicy. Kolejną reakcją, która była optymalizowana było sprzęganie Sonogashiry. Początkowe próby optymalizacji polegały na dopasowaniu temperatury, czasu i mocy grzania prowadzonej syntezy. Przy 50°C, 5 minutach i 80 W konwersja wynosiła nieco ponad 50%. Dlatego próbowano zwiększać ilości dodawanych substratów czy katalizatora dostając coraz lepsze wyniki. Przy 5-krotnym zwiększeniu ilości katalizatora oraz jodku miedzi (I) uzyskano konwersję na poziomie prawie 99%. Po wyborze odpowiednich parametrów mikrofalowych (70°C, 15 minut, 100 W) uzyskano całkowite przereagowanie substratu. Kolejny etap optymalizacji polegał na zmianie rozpuszczalnika oraz katalizatora. W przypadku tej pierwszej zmiany, tetrahydrofuran

zdaje się być niezastąpiony, natomiast jeśli chodzi o katalizator, 100% konwersję otrzymano także dla reakcji prowadzonej w obecności tetrakis(trifenylofosfino)palladu (0). W momencie skalowania syntezy wybrane warunki pozwalają uzyskać całkowite przereagowanie substratu. Reakcja sprzęgania Sonogashiry optymalizowana była także za pomocą reaktora przepływowego. Dzięki tej technologii próbowano powtórzyć reakcję w warunkach takich jak przy pomocy syntezy mikrofalowego, bądź lepszych ale niestety się to nie udało. Najwyższy stopień konwersji jaki uzyskano to 96,97% w temperaturze 80°C przez 15 minut. Podsumowując, dla optymalizacji reakcji sprzęgania Sonogashiry lepszą metodą okazał się syntezy mikrofalowy ze względu na krótszy czas prowadzenia reakcji niż w przypadku metody klasycznej oraz braku konieczności utrzymywania bezwodnych warunków reakcji. Trzeci etap syntezy to reakcja cyklizacji. W metodzie klasycznej reakcja ta wymaga prowadzenia jej w bezwodnych warunkach przez noc w temperaturze 65°C. W przypadku wykorzystania do tej syntezy reaktora mikrofalowego czas skraca się do 1 minuty, a temperatura maleje do 40°C. Tak jak w przypadku sprzęgania Sonogashira nie ma konieczności prowadzenia reakcji w warunkach bezwodnych. W momencie korzystania z reaktora przepływowego i cyklizowania substratu w temperaturze 30°C potrzeba więcej czasu aby otrzymać 100% konwersję. Natomiast w 40°C tak jak i w reaktorze mikrofalowym całkowite przereagowanie można otrzymać w czasie 1 minuty. W przypadku reakcji cyklizacji obydwie technologie można stosować wymiennie. Zabezpieczanie grupy hydroksylowej to kolejny etap, który postanowiono zoptymalizować za pomocą syntezy mikrofalowego. Po początkowym dopasowaniu parametrów mikrofalowych osiągnięto 96,20% konwersji dla reakcji prowadzonej w 40°C przez 15 minut i mocy grzania 100 W. Zarówno manewrowanie mocą grzania jak i temperaturą stopień konwersji malał. Dlatego zdecydowano o zwiększeniu ilości dodawanych substratów. W momencie kiedy ich stosunek wynosił 1:2 (związek 42 : *tert*-butylochlorodimetylosilan) po 15 minutach prowadzenia reakcji w temperaturze 40°C i 100 W osiągnięto całkowite przereagowanie substratu. Przy stosunku 1:3:3 (związek 42 : *tert*-butylochlorodimetylosilan : imidazol) 100% konwersję otrzymano w czasie 10 minut. Dla tej reakcji sprawdzano również możliwość prowadzenia jej w innym rozpuszczalniku, jednak aby uzyskać całkowite przereagowanie substratu możliwe jest to jedynie dla DMSO. W przypadku bromowania, czyli kolejnego etapu syntezy optymalizacja początkowa polegała na manewrowaniu parametrami mikrofalowymi. Niestety nie udało się uzyskać całkowitej konwersji więc

postanowiono zwiększyć ilość dodawanego *N*-bromosukcynoimidu do 2 eq. Wtedy 100% przereagowanie substratu uzyskano dla reakcji prowadzonej w temperaturze 90°C w ciągu 2 minut przy mocy grzania równej 80 W. Syntezę tę próbowano prowadzić w różnych rozpuszczalnikach i 100% konwersję uzyskano dla acetonitrylu, tetrahydrofuranu, dimetylosulfotlenku i dioksanu. Podczas reakcji aminowania, czyli 6 etapu syntezy związku referencyjnego, optymalizację zaczęto od dopasowania temperatury reakcji, czasu jej trwania i mocy grzania, gdzie najwyższa wartość konwersji wynosiła 84,55%. Po zwiększeniu ilości dodawanej *N,N*-diizopropylloetyloaminy do 5 eq względem związku **47**, stopień przereagowania wzrósł do prawie 95%. Wówczas parametry mikrofalowe wynosiły 170°C, 60 minut i 300 W. W momencie próby zmiany rozpuszczalnika zauważono, że prowadząc reakcję aminowania w metanolu w powyższych warunkach otrzymano całkowitą konwersję. Korzystanie z syntezy mikrofalowej skraca czas prowadzenia reakcji aminowania z 24 do 2. godzin. Synteza 5-bromo-*N*-(2-cyklopropyloetylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy optymalizowana była także za pomocą reaktora przepływowego. Chcąc ulepszyć warunki prowadzenia tej reakcji, przy pomocy technologii przepływowej próbowano skrócić czas jej trwania bądź zmniejszyć temperaturę. Niestety przy tych próbach nie uzyskano chociażby połowicznego przereagowania substratu. W momencie kiedy zwiększono ilość dodawanej aminy konwersja zaczęła rosnąć i najlepsze wyniki (92,44%) osiągnięto dla stosunku związek **47** : chlorowodorek 2-cyklopropyloetyloaminy 1:25. Mimo wysokiej konwersji jest to metoda nieekonomiczna ze względu na dużą ilość użytego substratu. Reakcja sprzęgania Suzuki to przedostatnia reakcja ze ścieżki syntezy, którą postanowiono zoptymalizować. Prowadząc tę reakcję w kolbie potrzebowano 24 godzin, natomiast za pomocą mikrofalii czas ten skrócono do 5 minut. Korzystając z tej samej temperatury, czyli 100°C otrzymano konwersję na poziomie prawie 98%. Zwiększając temperaturę do 120°C substrat całkowicie przereagował dając oczekiwany produkt. Mając dobrane warunki reakcji, wykorzystano je do syntezy z innym estrem kwasu pinakolowego oraz kwasem pinakolowym. Próba ta wykazała powtarzalność reakcji i użyteczność opracowanej metody. Ostatnią reakcją poddaną optymalizacji była reakcja odbezpieczenia grupy funkcyjnej. Podczas prowadzenia tej syntezy metodą klasyczną konwersja substratu w produkt trwała godzinę i przebiegała w temperaturze pokojowej. Natomiast korzystając

z syntezy mikrofalowego całkowite przereagowanie substratu osiągnięto podczas prowadzenia reakcji przez 1 minutę w 40°C.

Podsumowując całą optymalizację zauważono, że technologia mikrofalowa jest bardzo użyteczną metodą, którą warto wykorzystać podczas wieloetapowej syntezy. Całkowity czas syntezy skrócono z ponad 5 dni do prawie 2,5 godziny. W trakcie korzystania z syntezy mikrofalowego możliwe jest korzystanie z mniejszej ilości rozpuszczalnika a niekiedy i substratów. Reaktor ten pozwala także na prowadzenie syntezy w wysokich temperaturach, czasem wyższych niż temperatury wrzenia użytych rozpuszczalników. Oczywiście technologia ta posiada także różne ograniczenia, jednak w przypadku prowadzenia tej ścieżki syntezy nie wpływały one znacząco na jej przebieg. Analizując wykorzystanie technologii przepływowej uważam, że w trakcie syntezy związku MRX2843 nie wykazała się szczególną użytecznością, ponieważ w etapach, w których została użyta przewaga znajdowała się po stronie syntezy mikrofalowego. Przygotowana optymalizacja może zostać wykorzystana także podczas syntezy struktur pochodnych związku referencyjnego.

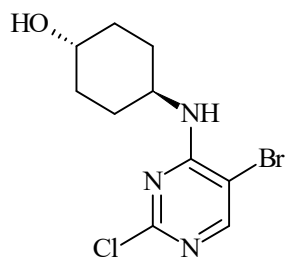
6. Część doświadczalna

6.1 Informacje ogólne

Odczynniki oraz rozpuszczalniki, które zostały użyte do przygotowania niniejszej pracy doktorskiej oczyszczono oraz osuszono z zastosowaniem ogólnych procedur. Reakcje, które wymagały zastosowania warunków beztlenowych i bezwodnych były przeprowadzone w atmosferze argonu.

Wszystkie użyte substraty wyjściowe były dostępne komercyjnie i korzystałam z nich w dostarczonej postaci. Reakcje wymagające bezwodnych warunków przeprowadziłam w wysuszonym naczyniu szklanym, a następnie schłodzonym w atmosferze argonu lub azotu. O ile nie zaznaczono inaczej, reakcje prowadziłam w naczyniu ze stałym dostępem gazu obojętnego. Postęp reakcji monitorowałam analityczną metodą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej wykonywanej na płytkach pokrytych żel krzemionkowym (żel Kiesel F254) i wizualizowałam za pomocą lampy ultrafioletowej ($\lambda = 254 \text{ nm}$) lub poprzez zanurzenie w roztworze ninhydryny w etanolu (0,3% v/v) zawierającego kwas octowy (3% v/v) lub w etanolem roztworze kwasu fosfomolibdenowego (2,5% v/v) i wywoływałam przy użyciu opalarki. Chromatografię typu flash przeprowadzałam na żelu krzemionkowym Merck 60 (230-400 mesh). Widma ^1H NMR wykonywałam na spektrometrze Varian Inova 300 NMR lub spektrometrze Bruker DRX 500 NMR z ^1H obserwowanym, odpowiednio, przy 300 MHz lub 500 MHz. Widma ^{13}C NMR wykonywałam na spektrometrze Varian Inova 300 NMR lub 500 NMR z ^{13}C obserwowanym przy odpowiednio 75 MHz lub 125 MHz. Ze względu na słabą rozpuszczalność niektórych otrzymanych związków finalnych pominęłam standardowe charakteryzowanie metodą ^{13}C NMR. Niekiedy miało również miejsce nakładanie się sygnałów od cykloheksanolu, stąd nie są one widoczne w opisach widm. Przesunięcia chemiczne dla widm ^1H i ^{13}C NMR podałam w d (ppm) przy użyciu tetrametylosilanu jako wzorca wewnętrznego. Skróty dla multipletowości sygnałów były następujące: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet), dd (dublet dubletów), dt (dublet tripletu), q (kwartet). Stałe sprzężenia (J) wyraziłam w hercach. Jako rozpuszczalnik stosowałam chloroform-d, dimetylosulfotlenek- d_6 lub deuterowany metanol oraz TMS (δ 0,00 ppm). Widma masowe z elektrorozpyleniem (ES-MS) rejestrowałam stosując kompaktowe spektrometry masowe (Advion) lub kwadrupolowy spektrometr masowy LC/MS 6130 Agilent w trybie ESI lub APCI. Dane widmowe rejestrowałam jako wartości m/z. Wszystkie zsyntezowane związki wykazywały wymaganą czystość HPLC powyżej 90%.

6.2 Synteza (1*r*,4*r*)-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]-cykloheksan-1-olu (**40**).



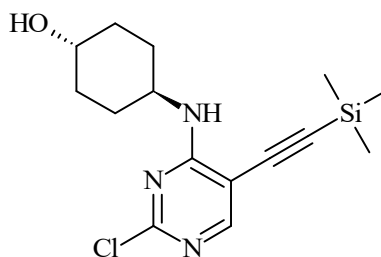
Do roztworu 2,4-dichloro-5-bromopirymidyny (30 g, 227,88 mmol) i *N,N*-diizopropyletoaminy (22,1 g, 166 mmol) w bezwodnym alkoholu izopropylowym (100 ml) powoli dodano w temperaturze 0 °C roztwór *trans*-4-aminocykloheksanol (15,5 g, 132 mmol) rozpuszczony w bezwodnym alkoholu izopropylowym (80 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0°C przez 4 godziny, a następnie pozwolono dojść do temperatury pokojowej i mieszano przez noc. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 2:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie (1 L), przemyto wodą (3 x 1 L) i solanką (0.5 L), następnie wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i zateżono. Otrzymany bladeżółty olej krystalizowano z mieszaniny dichlorometanu i heptanu uzyskując związek **40** w postaci białego osadu (36,9 g, 94,4%).

MS (APCI): *m/z* 307,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30–8.18 (m, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 3.98–3.71 (m, 1H), 3.48–3.27 (m, 1H), 1.92–1.69 (m, 4H), 1.50 (dt, *J* = 12.9, 6.5 Hz, 2H), 1.36–1.10 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.35 (s), 158.71 (s), 156.27 (s), 102.87 (s), 69.53 (s), 49.26 (s), 33.61 (s), 30.35 (s).

6.3 Synteza (1*r*,4*r*)-4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}-amino)-cykloheksan-1-olu (**41**).



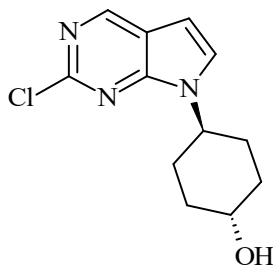
Do odgazowanej mieszaniny związku **40** (30 g, 19,60 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (250 ml) i trietyloaminy (49,80 g, 489 mmol) dodano, w temperaturze pokojowej, jodek miedzi (I) (761 mg, 3,91 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (2,1 g, 2,94 mmol) i trimetylosililoacetylen (10,70 g, 108 mmol). Po odgazowaniu mieszaniny reakcyjnej przez 20 minut, powstały roztwór ogrzewano w 45°C w atmosferze argonu przez 24 godziny. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę przesączono przez celit. Przesącz ekstrahowano za pomocą octanu etylu (500 ml). Warstwę organiczną przemyto za pomocą solanki (2 x 100 ml) i wody destylowanej (2 x 100 ml), wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄), a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (heptan/octan etylu 1:1 v/v) uzyskując związek **41** w postaci jasnopomarańczowego osadu (13,9 g, 43,8%).

MS (APCI): m/z 324,8 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (s, 1H), 5.35 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.02-3.84 (m, 1H), 3.58-3.35 (m, 1H), 3.73-3.57 (m, 1H), 2.16 – 2.04 (m, 2H), 2.00-1.88 (m, 2H), 1.48-1.33 (m, 2H), 1.31-1.15 (m, 2H), 0.21-0.20 (m, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.2 (s), 159.6 (s), 158.1 (s), 106.5 (s), 101.2 (s), 96.0 (s), 69.6 (s), 49.0 (s), 33.7 (s), 30.6 (s).

6.4 Synteza (1*r*,4*r*)-4-{2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-olu (42).



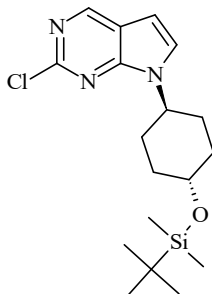
Roztwór związku **41** (2,25 g, 6,95 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (300 ml) odgazowywano przez 15 minut. Następnie w temperaturze pokojowej dodano 1 M roztwór fluorku tetrabutylamoniowego w tetrahydrofuranie (17,4 ml). Otrzymaną mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez noc w temperaturze 65°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą (300 ml) i ekstrahowano octanem etylu (3 x 300 ml). Połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (metanol/octan etylu, 0-1%) uzyskując związek **42** w postaci białego osadu (1,34 g, 76,6%).

MS (APCI): *m/z* 252,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.88 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.60-4.40 (m, 1H), 3.52 (tt, *J* = 11.6, 4.3 Hz, 1H), 2.04-1.79 (m, 6H), 1.52-1.29 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153.1 (s), 151.5 (s), 150.8 (s), 126.6 (s), 117.9 (s), 100.2 (s), 69.5 (s), 52.5 (s), 34.3 (s), 31.0 (s).

6.5 Synteza 2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyldimetylosililo)-oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny (43).



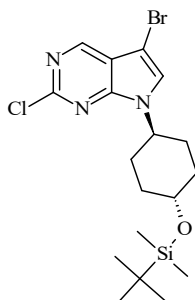
Do roztworu związku **42** (3,572 g, 14,20 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (240 ml) dodano imidazol (2,41 g, 35,3 mmol) i chlorek *tert*-butyldimetylosililu (3,21 g, 21,30 mmol) w temperaturze 0°C. Otrzymaną mieszaninę mieszano przez 1 godzinę w temperaturze 0°C, a następnie pozwolono dojść do temperatury pokojowej i mieszano przez noc. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą (200 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 600 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan, 0-15%) uzyskując związek **43** w postaci białego osadu (3,64g, 70%).

MS (APCI): m/z 366,9 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.89 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.62 – 4.51 (m, 1H), 3.76 (td, *J* = 10.6, 5.3 Hz, 1H), 2.02 – 1.86 (m, 6H), 1.51 (dd, *J* = 23.5, 10.0 Hz, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO- *d*₆) δ 151.9 (s), 151.2 (s), 150.7 (s), 128.6 (s), 117.7 (s), 100.0 (s), 69.9 (s), 52.2 (s), 34.4 (s), 30.1 (s), 25.8 (s), 17.8 (s), 4.7 (s).

6.6 Synteza 5-bromo-2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny (47).



Do roztworu związku **43** (3,48 g, 9,51 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (30 ml) dodano *N*-bromosukcynoimid (3,59 g, 11,50 mmol) w kilku porcjach, w temperaturze pokojowej. Otrzymaną mieszaninę mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę rozcieńczono wodą (1300 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 400 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan, 5-50%) uzyskując związek **47** (11,2 g, 75,8%) w postaci białej substancji stałej.

MS (APCI): *m/z* 445,8 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ 8.85 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 4.61 (td, *J* = 11.0, 4.3 Hz, 1H), 3.91 – 3.59 (m, 1H), 2.16 – 1.78 (m, 6H), 1.66 – 1.42 (m, 2H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H).

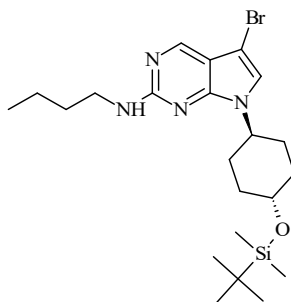
¹³C NMR (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ 153.5 (s), 150.9 (s), 150.7 (s), 128.7 (s), 117.6 (s), 87.7 (s), 70.4 (s), 53.3 (s), 34.9 (s), 30.6 (s), 26.3 (s), 26.3 (s), 18.3 (s), 4.1 (s).

6.7 Synteza 5-bromo-7-[4-[(tert-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy (168-184).

Ogólna procedura A

Do roztworu związku **47** (1 eq) w bezwodnym 2-propanolu ($M = 0,37 \text{ mol/dm}^3$), w temperaturze pokojowej dodano odpowiednią aminę (5 eq) i diizopropyletyloaminę (1,5 eq mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszano przez noc w temperaturze 95°C . Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (metanol/dichlorometan 5:95 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym uzyskując pożądaný związek.

5-bromo-*N*-butylo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(tert-butylodimetylosililo)oksy]-cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (168)



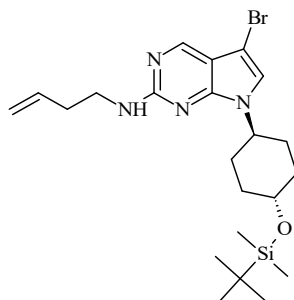
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białego osadu (5,573 g, 96,4%).

MS (ESI): m/z 482,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.47 (tt, $J = 12.0, 3.7 \text{ Hz}$, 1H), 3.68 (tt, $J = 10.5, 4.1 \text{ Hz}$, 1H), 3.45 (td, $J = 7.0, 5.9 \text{ Hz}$, 2H), 2.11 – 1.92 (m, 4H), 1.86 – 1.33 (m, 8H), 0.97 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 3H), 0.91 (s, $J = 3.0 \text{ Hz}$, 9H), 0.09 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.30 (s), 151.32 (s), 149.08 (s), 121.94 (s), 110.06 (s), 86.55 (s), 69.98 (s), 52.22 (s), 40.58 (s), 34.66 (s), 31.08 (s), 29.68 (s), 25.73 (s), 19.64 (s), 17.78 (s), 13.72 (s), 4.69 (s).

5-bromo-*N*-(but-3-en-1-ylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]-cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (169)



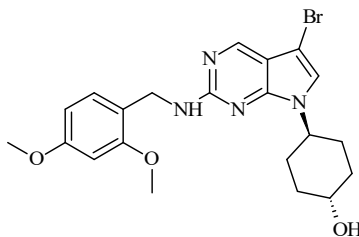
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci jasnoróżowego osadu (40,6 g, 62,8%).

MS (APCI): m/z 480,5 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 5.88-5.82 (m, 1H), 5.08-4.98 (m, 2H), 4.39-4.34 (m, 1H), 3.72-3.67 (m, 1H), 3.37-3.34 (m, 2H), 2.31 (dd, *J* = 14.3, 6.9 Hz, 2H), 1.98-1.83 (m, 6H), 1.44-1.37 (m, 2H), 0.86 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.2 (s), 151.2 (s), 149.2 (s), 136.5 (s), 128.1 (s), 121.9 (s), 115.8 (s), 110.2 (s), 86.5 (s), 69.9 (s), 40.5 (s), 34.6 (s), 33.3 (s), 29.7 (s), 25.7 (s), 17.7 (s), 4.7 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-bromo-2-[(2,4-dimetoksyfenylo)metylo]amino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol (170)



Tytułowy związek otrzymano postępując zgodnie z ogólną procedurą A w postaci jasnożółtego osadu (1,06 g, 79,9%).

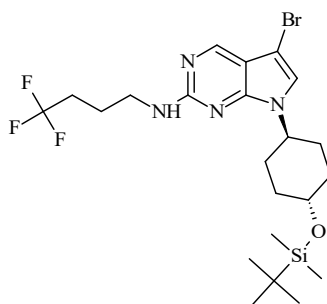
MS (APCI): m/z 462 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.36 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 5.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H),

4.47 (dd, $J = 9.8, 5.9$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.74 – 3.65 (m, 1H), 2.18 – 1.96 (m, 4H), 1.84 – 1.67 (m, 2H), 1.55 (dd, $J = 14.9, 12.2$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 161.07 (s), 160.68 (s), 159.58 (s), 152.94 (s), 149.74 (s), 129.91 (s), 125.75 (s), 122.51 (s), 119.87 (s), 106.01 (s), 97.59 (s), 88.34 (s), 70.89 (s), 56.79 (s), 55.97 (s), 37.12 (s), 32.58 (s), 28.68 (s).

5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyldimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-*N*-(4,4,4-trifluorobutylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-amina (171)



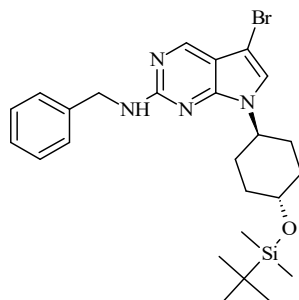
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci kremowego osadu (6,11 g, 100%).

MS (APCI): m/z 536,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.36 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.13 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.46 – 4.33 (m, 1H), 3.79 – 3.64 (m, 1H), 3.38 (dd, $J = 12.9, 6.7$ Hz, 2H), 2.43 – 2.19 (m, 2H), 2.06 – 1.71 (m, 8H), 1.54 – 1.33 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 41.83 (s), 33.48 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 25.16 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

***N*-benzylo-5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (172)**



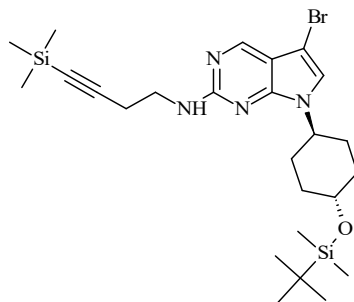
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci jasnożółtego osadu (325 mg, 36%).

MS (APCI): m/z 5516,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.70 (s, 1H), 7.29 – 7.17 (m, 5H), 7.02 (s, 1H), 4.73 – 4.61 (m, 3H), 4.37 (s, 1H), 2.53 (s, 1H), 2.13 – 2.09 (m, 2H), 2.02 – 1.98 (m, 2H), 1.97 – 1.93 (m, 2H), 1.63 – 1.59 (m, 2H), 1.08 – 1.04 (m, 9H), 0.28 – 0.24 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.58 (s), 152.94 (s), 149.74 (s), 139.75 (s), 128.55 (s), 127.72 (s), 126.93 (s), 125.75 (s), 119.87 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 40.95 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-*N*-[4-(trimetylosililo)but-3-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (173)



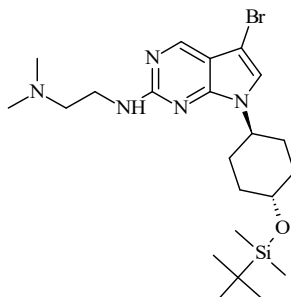
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białego osadu (3,09 g, 62,5%).

MS (APCI): m/z 550,6 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.37 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.07 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.44 – 4.36 (m, 1H), 3.77 – 3.67 (m, 1H), 3.44 (dd, $J = 13.4, 7.0$ Hz, 2H), 2.51 – 2.47 (m, 2H), 1.97 – 1.81 (m, 6H), 1.50 – 1.38 (m, 2H), 0.87 (s, 9H), 0.07 (d, $J = 6.6$ Hz, 15H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159.21 (s), 157.34 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 80.65 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 38.38 (s), 29.19 (s), 28.52 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

5-bromo-*N*-[2-(dimetyloamino)etylo]-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyloдимetylosililo)-oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2 -amina (174)



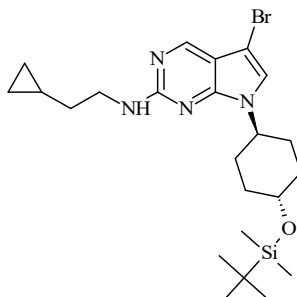
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci kremowej substancji stałej (1,05 g, 99%).

MS (APCI): m/z 497,6 [M+H]⁻

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.41 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.48 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.48 (tt, $J = 11.9, 3.7$ Hz, 1H), 3.74 – 3.62 (m, 1H), 3.53 (dd, $J = 11.6, 6.2$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.01 (dd, $J = 8.3, 4.9$ Hz, 4H), 1.84 – 1.66 (m, 2H), 1.63 – 1.47 (m, 2H), 0.91 (s, 9H), 0.09 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 154.10 (s), 124.89 (s), 74.62 (s), 62.36 (s), 56.44 (s), 49.47 (s), 43.47 (s), 39.03 (s), 35.03 (s), 30.02 (s), 0.44 (s).

5-bromo-*N*-(2-cyklopropyloetylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyloдимetylosililo)-oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (175)



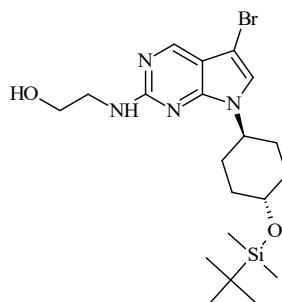
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białego osadu (554 mg, 48,9%).

MS (APCI): m/z 494,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.65 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 3.44 – 3.34 (m, 3H), 2.12 – 2.05 (m, 4H), 1.96 – 1.92 (m, 3H), 1.78 – 1.74 (m, 2H), 1.64 – 1.60 (m, 2H), 1.17 – 1.06 (m, 10H), 0.63 – 0.59 (m, 2H), 0.27 – 0.20 (m, 8H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 18.59 (s), 9.82 (s), 8.18 (s), 2.89 (s).

2-({5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyldimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-yl)amino)etan-1-ol (176)



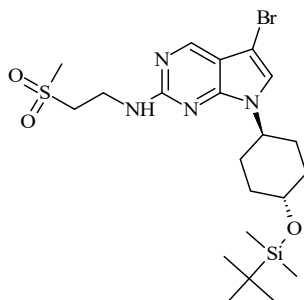
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białej substancji stałej (810 mg, 81%).

MS (APCI): m/z 470,4 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.31 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 4.36 (tt, J = 11.8, 3.6 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 5.4, 4.1 Hz, 2H), 3.64 – 3.51 (m, 3H), 3.24 (s, 1H), 2.09 – 2.08 (m, 1H), 1.99 – 1.88 (m, 4H), 1.73 – 1.41 (m, 4H), 0.83 – 0.79 (m, 9H), 0.01 – -0.02 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 60.68 (s), 55.91 (s), 41.93 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

5-bromo-*N*-(2-metanosulfonyloetylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylo-sililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (177)



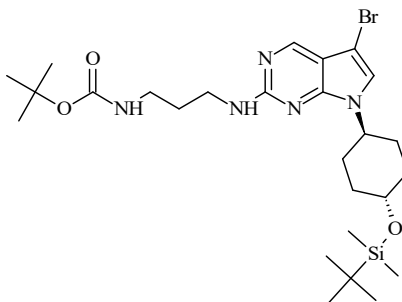
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci jasnoróżowego osadu (297,7 mg, 49,8%).

MS (APCI): m/z 532,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.66 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.94 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.63 – 3.59 (m, 2H), 3.06 – 3.02 (m, 3H), 2.10 – 2.06 (m, 1H), 2.04 – 2.00 (m, 2H), 2.00 – 1.96 (m, 2H), 1.77 – 1.73 (m, 2H), 1.69 (s, 1H), 1.10 – 1.06 (m, 9H), 0.26 – 0.22 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 52.36 (s), 39.75 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

***tert*-butylo-*N*-[3-({5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]-cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-yl}amino)propylo]karbaminian (178)**



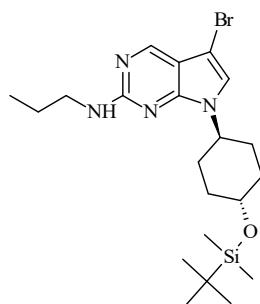
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białego osadu (510,5 mg, 39%).

MS (APCI): m/z 583,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.51 (ddd, *J* = 11.6, 7.9, 3.6 Hz, 1H), 3.77 – 3.64 (m, 1H), 3.55 (dt, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 2H), 3.26 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.05 (d, *J* = 4.0 Hz, 4H), 1.81 (dt, *J* = 11.8, 5.9 Hz, 3H), 1.75 – 1.54 (m, 4H), 1.49 (s, 9H), 0.96 – 0.91 (m, 9H), 0.13 – 0.09 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.21 (s), 157.34 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 80.65 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 38.38 (s), 29.19 (s), 28.52 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

5-bromo-*N*-propylo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (179)



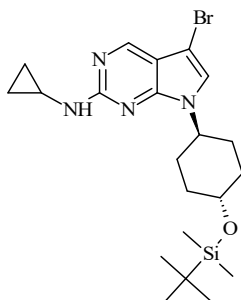
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białej substancji stałej (6,514 g, 100%).

MS (APCI): *m/z* 468,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.45 – 4.31 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 12.6, 8.8 Hz, 1H), 3.25 (dd, *J* = 13.9, 6.1 Hz, 2H), 2.06 – 1.76 (m, 6H), 1.57 (dt, *J* = 14.4, 7.4 Hz, 2H), 1.51 – 1.30 (m, 2H), 0.94 – 0.82 (m, 12H), 0.06 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 43.46 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 22.40 (s), 18.59 (s), 11.70 (s), 2.89 (s).

5-bromo-*N*-cyklopropylo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (180)



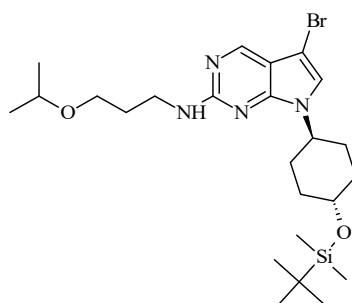
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci beżowego osadu (573 mg, 80%).

MS (APCI): m/z 466,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.37 (s, 1H), 2.40 (s, 1H), 2.12 – 1.99 (m, 3H), 1.99 – 1.93 (m, 3H), 1.71 (s, 1H), 1.63 – 1.59 (m, 2H), 1.09 – 1.05 (m, 9H), 0.72 – 0.68 (m, 2H), 0.60 – 0.56 (m, 2H), 0.28 – 0.24 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.62 (s), 154.35 (s), 152.20 (s), 125.75 (s), 120.41 (s), 88.34 (s), 70.83 (s), 55.91 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 23.04 (s), 18.59 (s), 9.05 (s), 2.89 (s).

5-bromo-*N*-[3-(propan-2-yloksy)propylo]-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (181)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci jasnożółtej substancji stałej (465 mg, 78,7%).

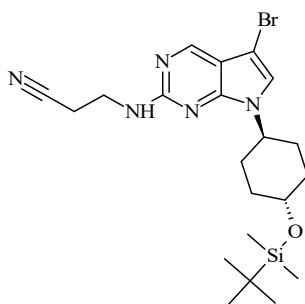
MS (ESI): m/z 526,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.26 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 4.46 (ddd, *J* = 15.8, 10.7, 5.1 Hz, 1H), 3.82 – 3.69 (m, 1H), 3.57 (ddd, *J* = 10.0, 9.2, 5.0 Hz, 3H), 3.48 (t, *J* = 6.8 Hz,

2H), 2.04 – 1.82 (m, 9H), 1.50 (dt, $J = 11.1, 9.4$ Hz, 2H), 1.16 – 1.12 (m, 6H), 0.90 – 0.88 (m, 9H), 0.09 – 0.07 (m, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 159.21 (s), 153.30 (s), 151.11 (s), 125.75 (s), 119.73 (s), 88.34 (s), 73.30 (s), 70.83 (s), 65.39 (s), 55.91 (s), 39.30 (s), 31.67 (s), 29.19 (s), 28.10 (s), 25.76 (s), 23.63 (s), 18.59 (s), 2.89 (s).

3-({5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butyldimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-yl)amino)propanonitryl (182)



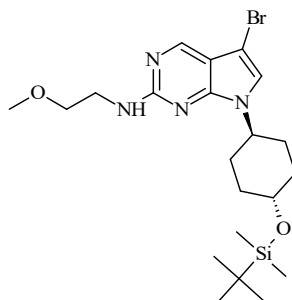
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białego osadu (184,5 g, 17,2%).

MS (APCI): m/z 479,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.41 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.33 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.43 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.72 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H), 3.56 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.06 – 1.77 (m, 6H), 1.43 (dd, $J = 22.8, 10.4$ Hz, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 138.87 (s), 132.27 (s), 130.49 (s), 127.68 (s), 119.35 (s), 114.35 (s), 113.64 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 35.81 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 16.21 (s).

5-bromo-*N*-(2-metoksyetylo)-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (183)



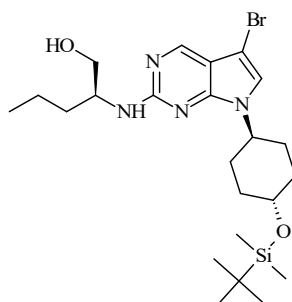
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci pomarańczowego oleju (280 mg, 51,5%).

MS (ESI): m/z 484,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.27 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.48 – 4.31 (m, 1H), 3.66 – 3.49 (m, 5H), 3.40 (s, 1H), 3.31 (s, 3H), 1.99 – 1.87 (m, 4H), 1.74 – 1.57 (m, 2H), 1.55 – 1.40 (m, 2H), 0.83 – 0.80 (m, 9H), 0.02 – -0.02 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.37 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 139.74 (s), 138.54 (s), 130.06 (s), 129.02 (s), 116.56 (s), 114.35 (s), 113.72 (s), 73.67 (s), 68.06 (s), 57.81 (s), 55.11 (s), 45.55 (s), 39.53 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 24.97 (s), 23.31 (s).

(2*S*)-2-({5-bromo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-yl}amino)pentan-1-ol (184)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą A w postaci białej substancji stałej (799,5 mg, 69,5%).

MS (APCI): m/z 512,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.57 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.38 (t, $J = 11.4$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 3.72 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.54 – 3.44 (m, 1H), 3.40 (dd, $J = 10.9, 5.4$ Hz, 1H), 1.93 (dd, $J = 24.4,$

12.7 Hz, 6H), 1.66 – 1.51 (m, 1H), 1.51 – 1.21 (m, 5H), 0.96 – 0.81 (m, 12H), 0.07 (s, 6H).

^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 158.62 (s), 154.35 (s), 152.20 (s), 125.75 (s), 120.41 (s), 88.34 (s), 68.06 (s), 64.76 (s), 55.11 (s), 54.21 (s), 32.97 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 19.07 (s), 14.23 (s).

6.8 Synteza pochodnych poprzez reakcję sprzęgania Suzukiego-Miyaura (ogólna procedura B) oraz odbezpieczenie grupy hydroksylowej (ogólna procedura C) (49 – 165).

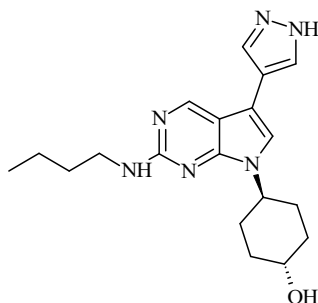
Ogólna procedura B

W kolbie okrągłodennej umieszczono odpowiednią aminę (1 eq), odpowiedni kwas boronowy lub ester pinakolowy kwasu boronowego (1,1 eq), tetrakis(trifenylofosfino)pallad(0) lub [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloropallad(II), kompleks z dichlorometanem (0,05 eq), węglan cezu (3 eq) oraz mieszaninę dioksan : woda (4:1 v/v, $M = 0,08 \text{ mol/dm}^3$). Otrzymaną mieszaninę mieszano przez noc w temperaturze 100°C . Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną przesączono przez celit na lejku Scotta G4, przemywając dichlorometanem. Przesącz rozcieńczono dichlorometanem (150 ml), a następnie ekstrahowano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (100 ml) oraz wodą (100 ml). Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na_2SO_4) i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym uzyskując pożądaną związek.

Ogólna procedura C

Do roztworu odpowiedniego związku uzyskanego poprzez sprzęganie Suzukiego-Miyaura (1 eq) w mieszaninie $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DCM}$ (1 : 4, v/v, $M = 0,04 \text{ mol/dm}^3$) dodano 4M roztwór kwasu chlorowodorowego w dioksanie (6 eq). Otrzymaną mieszaninę mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 1M roztworem wodorotlenku sodu i ekstrahowano trzykrotnie dichlorometanem. Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu (Na_2SO_4) i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym uzyskując pożądaną związek.

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1*H*-pirazol-4-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (49)



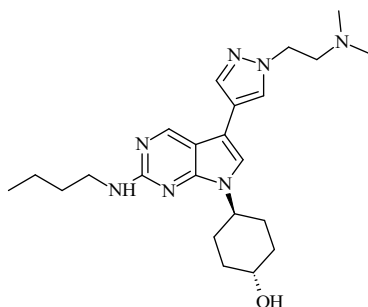
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnozielonego osadu (75,2 mg, 55%).

MS (APCI): m/z 355,4 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.58 (s, 1H), 7.88 (s, 2H), 7.27 (s, 1H), 4.51 (dd, *J* = 10.4, 5.5 Hz, 1H), 3.78 – 3.62 (m, 1H), 3.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.18 – 1.91 (m, 6H), 1.71 – 1.59 (m, 2H), 1.48 (td, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 4H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 138.26 (s), 124.30 (s), 117.47 (s), 116.27 (s), 114.98 (s), 114.66 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{1-[2-(dimetyloamino)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (50)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (210,3 mg, 43,7%).

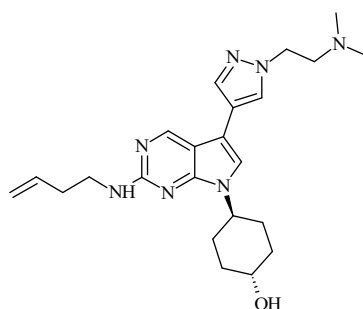
MS (APCI): m/z 426,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.60 – 4.44 (m, 1H), 4.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.84 – 3.71 (m, 1H), 3.55 – 3.42 (m, 2H), 2.83 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.32 (s, 6H), 2.23 – 2.05 (m, 4H),

1.98 – 1.79 (m, 2H), 1.63 (dt, $J = 26.5, 10.9$ Hz, 2H), 1.54 – 1.34 (m, 4H), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 125.40 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 58.43 (s), 55.11 (s), 48.61 (s), 45.66 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-[2-(dimetyloamino)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (51)



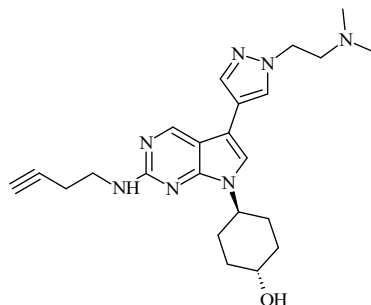
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (94,3 mg, 64%).

MS (APCI): m/z 424,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.73 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.73 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 5.87 (ddd, $J = 17.1, 6.8, 3.5$ Hz, 1H), 5.05 (dd, $J = 35.3, 13.7$ Hz, 2H), 4.70 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.37 (ddd, $J = 15.4, 10.4, 5.0$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.53 (dd, $J = 14.9, 10.7$ Hz, 1H), 3.49 – 3.42 (m, 2H), 2.69 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.33 (dd, $J = 14.1, 7.0$ Hz, 2H), 2.19 (s, 6H), 1.96 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.93 – 1.82 (m, 4H), 1.35 (ddd, $J = 23.3, 12.0, 4.5$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 158.8 (s), 152.0 (s), 149.8 (s), 136.7 (s), 135.8 (s), 126.4 (s), 117.9 (s), 115.9 (s), 114.6 (s), 109.1 (s), 106.2 (s), 68.0 (s), 58.5 (s), 51.7 (s), 49.3 (s), 45.0 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.5 (s), 30.1 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-yn-1-yl)amino]-5-{1-[2-(dimetyloamino)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (52)



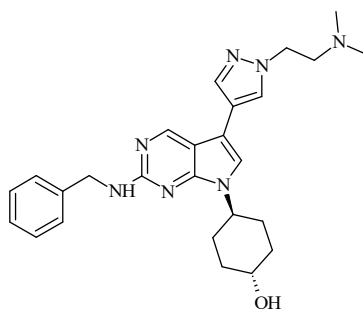
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (29,5 mg, 61%).

MS (APCI): m/z 422,2 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.79 – 7.73 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.87 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.43 – 4.32 (m, 1H), 4.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.58 – 3.49 (m, 1H), 3.45 (dd, *J* = 13.4, 7.1 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.68 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.49 – 2.43 (m, 2H), 2.18 (s, 6H), 2.01 – 1.83 (m, 6H), 1.36 (ddd, *J* = 16.7, 12.2, 5.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.4 (s), 151.9 (s), 149.9 (s), 135.7 (s), 128.8 (s), 128.2 (s), 126.4 (s), 125.3 (s), 118.1 (s), 114.5 (s), 109.4 (s), 106.3 (s), 68.0 (s), 58.6 (s), 51.8 (s), 49.4 (s), 45.1 (s), 40.4 (s), 34.5 (s), 30.1 (s), 23.0 (s), 18.6 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(benzyloamino)-5-{1-[2-(dimetyloamino)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (53)



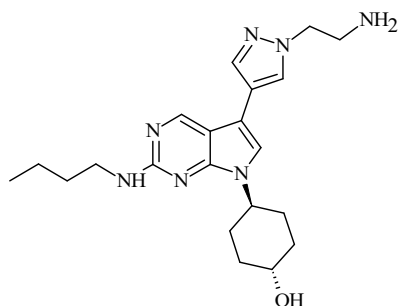
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (5,3 mg, 19,7%).

MS ESI: m/z 460,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.61 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 2H), 7.29 (dt, *J* = 6.0, 2.7 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.22 – 7.15 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.50 – 4.36 (m, 1H), 4.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.73 – 3.58 (m, 1H), 2.84 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H), 2.05 (d, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.92 (dt, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 4H), 1.56 – 1.40 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 158.47 (s), 152.43 (s), 148.84 (s), 140.44 (s), 136.41 (s), 118.71 (s), 115.34 (s), 110.07 (s), 106.66 (s), 68.89 (s), 58.40 (s), 52.76 (s), 49.18 (s), 45.04 (s), 44.13 (s), 33.97 (s), 29.78 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[1-(2-aminoetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl }cykloheksan-1-ol (54)



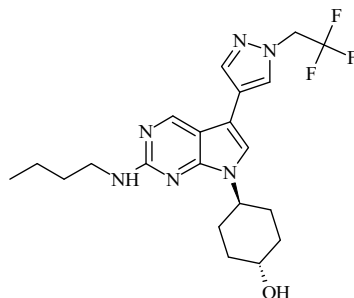
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (7,9 mg, 85,6%).

MS (APCI): *m/z* 398,4 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.73 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.72 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.42 – 4.31 (m, 1H), 4.08 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.53 (dt, *J* = 8.6, 4.8 Hz, 1H), 3.32 (d, *J* = 7.6 Hz, 4H), 2.95 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.98 (t, *J* = 15.0 Hz, 2H), 1.88 (t, *J* = 11.0 Hz, 4H), 1.55 (dt, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 2H), 1.36 (dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 125.40 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 53.02 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(2,2,2-trifluoroetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-7-ylo]cykloheksan-1-ol (55)



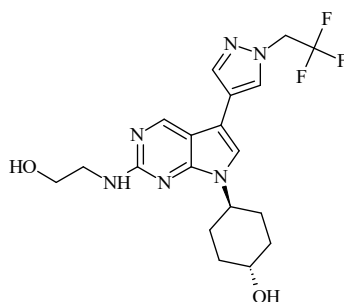
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (163,7 mg, 40,3%).

MS (APCI): m/z 437,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.75 (q, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.59 – 4.45 (m, 1H), 3.86 – 3.67 (m, 1H), 3.48 (dd, *J* = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.13 (t, *J* = 13.3 Hz, 4H), 1.92 – 1.78 (m, 2H), 1.72 – 1.53 (m, 4H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 136.05 (s), 123.28 (s), 119.56 (s), 114.77 (s), 113.59 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 56.55 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-[1-(2,2,2-trifluoroetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (56)



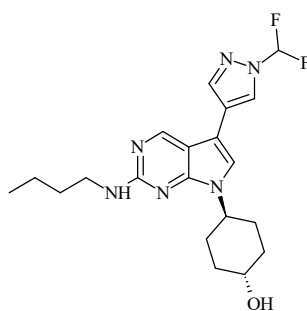
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (9,5 mg, 27,5%).

MS (APCI): m/z 425,4 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.61 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.96 (q, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.60 – 4.43 (m, 1H), 3.77 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.74 – 3.64 (m, 1H), 3.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.16 – 1.88 (m, 6H), 1.63 – 1.43 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 136.05 (s), 123.28 (s), 119.56 (s), 114.77 (s), 113.59 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 60.68 (s), 56.55 (s), 55.11 (s), 41.93 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(difluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (57)



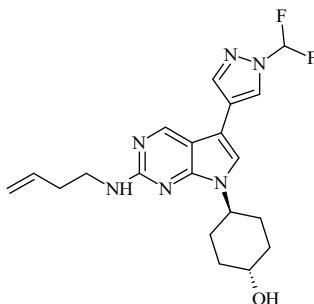
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (152,2 mg, 41%).

MS (APCI): *m/z* 405,4 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 1H), 7.02 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.60 – 4.44 (m, 1H), 3.77 (td, *J* = 10.9, 5.5 Hz, 1H), 3.55 – 3.40 (m, 2H), 2.24 – 2.04 (m, 5H), 1.98 – 1.76 (m, 3H), 1.72 – 1.40 (m, 7H), 1.03 – 0.92 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 134.83 (s), 129.28 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 107.30 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-(difluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (58)



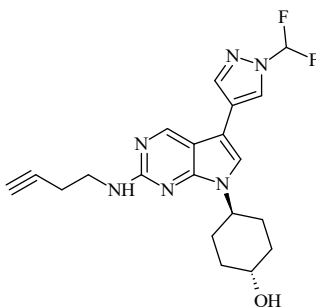
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (73,1 mg, 49,4%).

MS (APCI): m/z 403,7 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.82 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.78 (t, *J* = 59.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.88 (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 6.8 Hz, 1H), 5.15 – 4.98 (m, 2H), 4.71 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.44 – 4.32 (m, 1H), 3.60 – 3.47 (m, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 2H), 2.34 (dd, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 2H), 1.97 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 1.93 – 1.83 (m, 4H), 1.42 – 1.30 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.9 (s), 152.2 (s), 150.0 (s), 140.1 (s), 136.6 (s), 123.7 (s), 119.6 (s), 117.8 (s), 115.9 (s), 110.6 (s), 108.7 (s), 104.4 (s), 68.1 (s), 51.9 (s), 40.6 (s), 34.4 (s), 33.5 (s), 30.1 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-yn-1-yl)amino]-5-[1-(difluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (59)



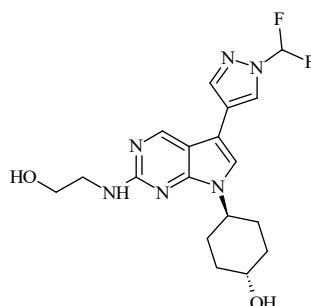
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (32,8 mg, 64%).

MS (APCI): m/z 401,8 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.85 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.79 (t, *J* = 59.4 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.95 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.44 – 4.35 (m, 1H), 3.53 (dd, *J* = 15.1, 10.6 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 13.4, 7.0 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.48 – 2.44 (m, 2H), 1.97 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 1.94 – 1.84 (m, 4H), 1.44 – 1.32 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 159.2 (s), 152.7 (s), 150.6 (s), 140.6 (s), 124.3 (s), 120.4 (s), 118.3 (s), 112.8 (s), 109.5 (s), 105.0 (s), 83.3 (s), 72.4 (s), 52.5 (s), 41.0 (s), 35.0 (s), 30.7 (s), 19.2 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[1-(difluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-2-[(2-hydroksyetylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (60)



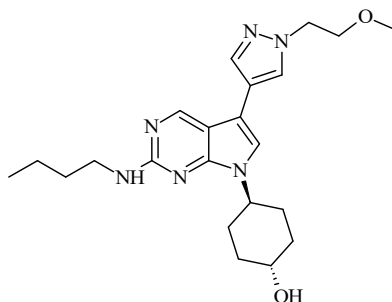
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (186,2 mg, 34,9%).

MS (APCI): *m/z* 393,4 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.83 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.68 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.74 – 4.61 (m, 2H), 4.47 – 4.31 (m, 1H), 3.62 – 3.48 (m, 3H), 3.42 (s, 2H), 1.94 (dd, *J* = 20.9, 9.2 Hz, 6H), 1.35 (dd, *J* = 19.7, 11.5 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 134.83 (s), 129.28 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 107.30 (s), 68.06 (s), 60.68 (s), 55.11 (s), 41.93 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(2-metoksyetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (61)



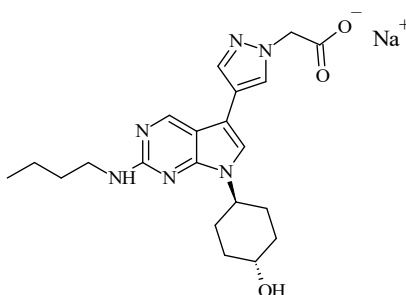
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtej żywicy (17,9 mg, 3,35%).

MS (APCI): m/z 413,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (s, 1H), 7.66 (dd, *J* = 9.7, 0.8 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.48 (ddd, *J* = 11.9, 8.2, 3.8 Hz, 1H), 4.34 – 4.27 (m, 2H), 3.74 (dd, *J* = 11.6, 6.7 Hz, 3H), 3.46 (td, *J* = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 3.33 (d, *J* = 1.8 Hz, 3H), 2.10 (t, *J* = 14.0 Hz, 4H), 1.82 (dt, *J* = 15.8, 6.5 Hz, 2H), 1.69 – 1.52 (m, 4H), 1.50 – 1.37 (m, 3H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.54 (s), 152.80 (s), 146.82 (s), 136.83 (s), 126.54 (s), 118.36 (s), 114.52 (s), 110.19 (s), 107.50 (s), 71.06 (s), 69.64 (s), 58.88 (s), 52.15 (s), 41.32 (s), 34.39 (s), 31.56 (s), 30.35 (s), 29.52 (s), 22.51 (s), 20.00 (s), 13.70 (s), 0.84 (s).

2-{4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]-1*H*-pirazol-1-octan sodu (62)



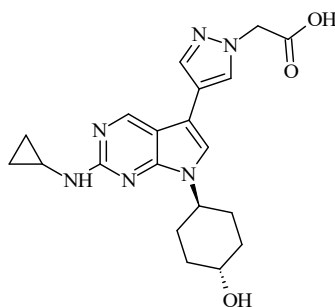
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (9,5 mg, 36,5%).

MS (APCI): m/z 434,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.70 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.76 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.45 – 4.31 (m, 1H), 3.60 – 3.46 (m, 1H), 3.32 (dd, *J* = 13.2, 6.7 Hz, 2H), 2.04 – 1.82 (m, 6H), 1.61 – 1.49 (m, 2H), 1.44 – 1.28 (m, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 173.42 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 137.25 (s), 121.58 (s), 115.08 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 50.36 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Kwas 2-{4-[2-(cyklopropyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]-1*H*-pirazol-1-ilo}octowy (63)



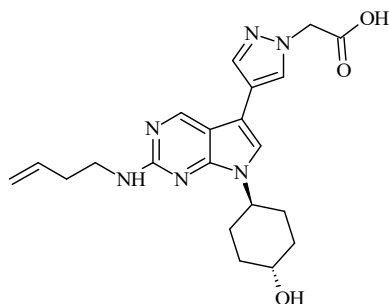
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (79,5 mg, 69,5%).

MS (APCI): *m/z* 397,4 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.74 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.66 (s, 1H), 4.49 – 4.33 (m, 1H), 3.61 – 3.47 (m, 1H), 2.83 – 2.70 (m, 1H), 2.03 – 1.83 (m, 6H), 1.45 – 1.23 (m, 2H), 0.71 – 0.62 (m, 2H), 0.52 – 0.44 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 170.14 (s), 159.01 (s), 155.93 (s), 154.55 (s), 137.25 (s), 121.58 (s), 115.65 (s), 114.98 (s), 114.71 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 52.68 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 23.04 (s), 9.05 (s).

Kwas 2-(4-{2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo}-1*H*-pirazol-1-ilo)octowy (64)



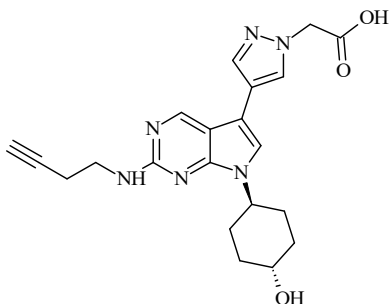
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (8,2 mg, 32,2%).

MS (APCI): m/z 411,5 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.03 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.76 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.95 – 5.81 (m, 1H), 5.05 (dd, $J = 36.4, 13.6$ Hz, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.66 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.38 (dt, $J = 15.1, 4.7$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 12.7, 8.9$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 2H), 2.34 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 2.00 – 1.82 (m, 6H), 1.36 (dd, $J = 20.9, 9.5$ Hz, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO- *d*₆) δ 169.6 (s), 158.8 (s), 152.0 (s), 149.6 (s), 136.7 (s), 136.5 (s), 127.5 (s), 118.1 (s), 115.9 (s), 115.2 (s), 109.1 (s), 106.0 (s), 68.0 (s), 52.6 (s), 51.8 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.5 (s), 30.1 (s).

Kwas 2-(4-{2-[(but-3-yn-1-ylo)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo}-1*H*-pirazol-1-ilo)octowy (65)



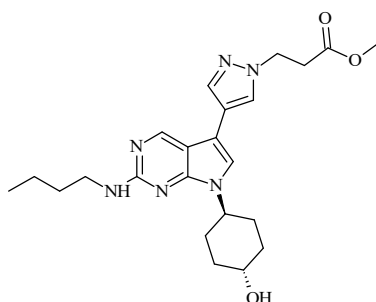
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (6,8 mg, 50,1%).

MS (APCI): związek nie jonizował

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13.04 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.89 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.38 (ddd, *J* = 15.6, 10.0, 5.3 Hz, 1H), 3.58 – 3.49 (m, 1H), 3.45 (dd, *J* = 13.3, 6.9 Hz, 2H), 2.79 (s, 1H), 2.47 (s, 2H), 2.02 – 1.84 (m, 6H), 1.36 (dt, *J* = 13.1, 8.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 170.14 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 137.25 (s), 121.58 (s), 115.08 (s), 108.19 (s), 82.35 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 52.68 (s), 37.85 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 18.95 (s).

3-{4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-5-ylo]-1*H*-pirazol-1-ylo}propanian metylu (66)



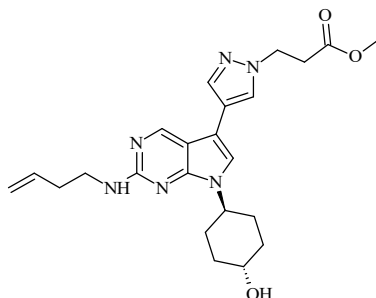
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowej żywicy (50,6 mg, 44,8%).

MS (APCI): *m/z* 441,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.99 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.78 (dd, *J* = 9.5, 5.4 Hz, 1H), 3.73 – 3.67 (m, 3H), 3.48 (dt, *J* = 12.9, 6.4 Hz, 2H), 2.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.12 (t, *J* = 13.9 Hz, 4H), 1.93 – 1.78 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 4H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.50 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 125.40 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 51.82 (s), 45.78 (s), 41.53 (s), 33.27 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

3-(4-{2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-d]pirymidyn-5-ylo}-1*H*-pirazol-1-ilo)propanian metylu (67)



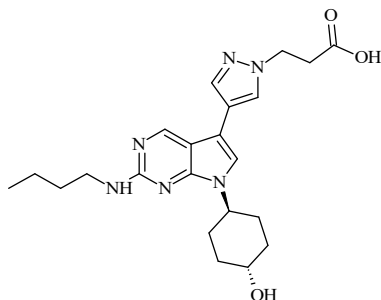
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (54 mg, 50,8%).

MS (APCI): m/z 439,8 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.72 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.87 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.13 – 4.97 (m, 2H), 4.69 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.57 – 3.48 (m, 1H), 3.47 – 3.38 (m, 2H), 2.92 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.38 – 2.30 (m, 2H), 1.96 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 4H), 1.35 (qd, *J* = 12.0, 4.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.50 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 134.10 (s), 125.40 (s), 117.05 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 51.82 (s), 45.78 (s), 33.83 (s), 33.27 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

Kwas 3-{4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-d]pirymidyn-5-ylo]-1*H*-pirazol-1-il}propanowy (68)



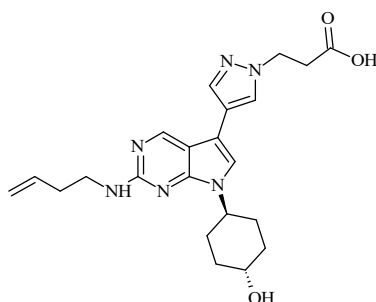
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (11,2 mg, 25,7%).

MS (APCI): m/z 427,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.57 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 4.64 – 4.37 (m, 3H), 3.81 – 3.60 (m, 1H), 3.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.10 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.05 – 1.89 (m, 4H), 1.65 (dt, *J* = 14.8, 7.3 Hz, 2H), 1.59 – 1.37 (m, 4H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 174.45 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 125.40 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 48.25 (s), 41.53 (s), 31.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Kwas 3-(4-{2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo}-1*H*-pirazol-1-ilo)propanowy (69)



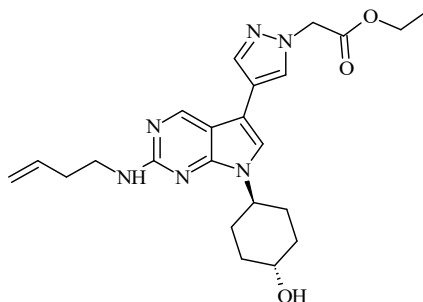
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (35,3 mg, 76,8%).

MS (APCI): *m/z* 425,5 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.35 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.75 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.88 (ddt, *J* = 17.1, 10.2, 6.8 Hz, 1H), 5.14 – 4.98 (m, 2H), 4.66 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.41 – 4.35 (m, 1H), 4.32 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.57 – 3.48 (m, 1H), 3.38 (dd, *J* = 13.4, 6.8 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.34 (dd, *J* = 14.1, 7.1 Hz, 2H), 1.96 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 1.89 (t, *J* = 10.7 Hz, 4H), 1.41 – 1.30 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.2 (s), 158.8 (s), 152.0 (s), 149.8 (s), 136.7 (s), 136.1 (s), 126.3 (s), 118.0 (s), 115.9 (s), 114.7 (s), 109.1 (s), 106.1 (s), 68.1 (s), 51.8 (s), 47.1 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 34.4 (s), 33.6 (s), 30.1 (s).

2-(4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl}-1*H*-pirazol-1-ilo)octan etylu (70)



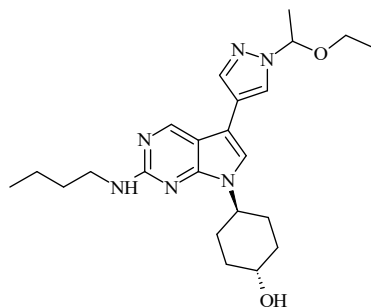
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (32,5 mg, 37,6%).

MS (APCI): m/z 439,8 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.70 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.75 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.88 (ddt, *J* = 17.1, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 17.2, 1.9 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.03 – 5.00 (m, 1H), 4.70 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.38 (ddd, *J* = 15.4, 10.7, 5.1 Hz, 1H), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.58 – 3.49 (m, 1H), 3.49 – 3.41 (m, 2H), 2.38 – 2.29 (m, 2H), 1.96 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H), 1.93 – 1.83 (m, 4H), 1.42 – 1.31 (m, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.75 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 137.25 (s), 134.10 (s), 121.58 (s), 117.05 (s), 115.08 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 61.18 (s), 55.11 (s), 47.34 (s), 33.83 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 14.70 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(1-etoksyetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (71)



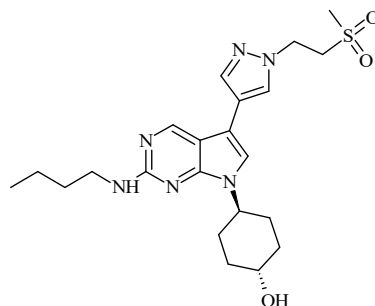
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (112,4 mg, 42,3%).

MS (APCI): m/z 427,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.79 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.54 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.47 – 4.30 (m, 1H), 3.60 – 3.50 (m, 1H), 3.44 (dd, *J* = 9.6, 7.0 Hz, 1H), 3.37 – 3.26 (m, 2H), 3.23 (dd, *J* = 9.6, 7.1 Hz, 1H), 2.05 – 1.82 (m, 6H), 1.64 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.61 – 1.49 (m, 2H), 1.36 (dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 4H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 137.00 (s), 128.06 (s), 114.77 (s), 110.19 (s), 108.19 (s), 85.49 (s), 68.06 (s), 65.51 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 18.08 (s), 15.53 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(2-metanosulfonyloetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (72)



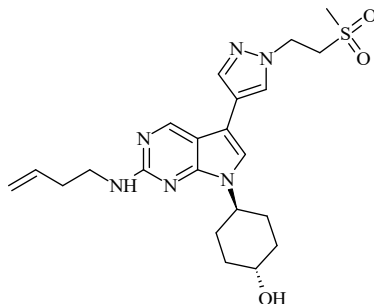
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (61 mg, 69,3%).

MS (APCI): *m/z* 461,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.69 – 4.62 (m, 2H), 4.58 – 4.44 (m, 1H), 3.82 – 3.72 (m, 1H), 3.68 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.21 – 2.05 (m, 4H), 1.95 – 1.78 (m, 2H), 1.69 – 1.55 (m, 4H), 1.53 – 1.40 (m, 3H), 1.34 (s, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 125.40 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 48.26 (s), 43.72 (s), 41.53 (s), 40.13 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-(2-metanosulfonyloetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (73)



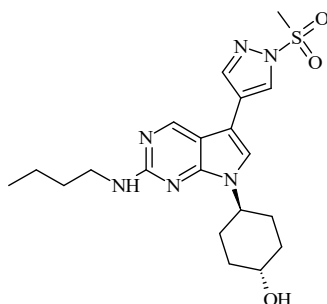
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (53,4 mg, 76,7%).

MS (APCI): m/z 459,8 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.75 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.77 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.88 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.19 – 4.96 (m, 2H), 4.69 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.46 – 4.25 (m, 1H), 3.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.53 (td, *J* = 11.0, 5.9 Hz, 1H), 3.43 – 3.24 (m, 2H), 2.86 (s, 3H), 2.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.92 (dd, *J* = 23.8, 10.9 Hz, 6H), 1.35 (dt, *J* = 15.5, 9.7 Hz, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.8 (s), 152.0 (s), 149.9 (s), 136.7 (s), 136.6 (s), 126.8 (s), 118.1 (s), 115.9 (s), 115.3 (s), 109.1 (s), 105.9 (s), 68.1 (s), 53.3 (s), 51.8 (s), 45.2 (s), 40.7 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.5 (s), 30.1 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1-metanosulfonylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (74)



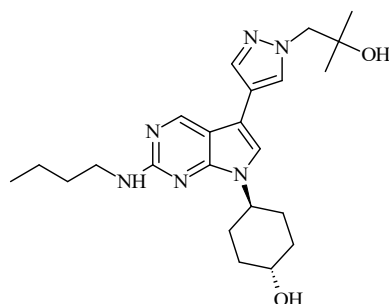
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (58,2 mg, 56,4%).

MS (APCI): m/z 433,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.86 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.84 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.49 – 4.31 (m, 1H), 3.61 – 3.45 (m, 4H), 3.32 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.94 (dd, *J* = 20.4, 9.9 Hz, 6H), 1.61 – 1.49 (m, 2H), 1.36 (dd, *J* = 14.6, 7.2 Hz, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 142.72 (s), 125.64 (s), 119.18 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 40.81 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(2-hydroksy-2-metylopropylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-7-ylo]cykloheksan-1-ol (75)



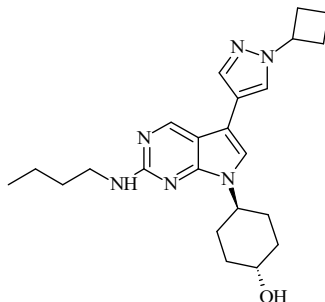
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (80 mg, 66,3%).

MS (APCI): *m/z* 427,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.96 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.59 – 4.45 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.83 – 3.69 (m, 1H), 3.48 (dd, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.12 (t, *J* = 14.7 Hz, 4H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 1.63 (dd, *J* = 14.5, 7.6 Hz, 4H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 1.21 (s, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 136.05 (s), 119.56 (s), 114.77 (s), 113.59 (s), 108.19 (s), 70.18 (s), 68.06 (s), 63.43 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.49 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1-cyklobutylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (76)



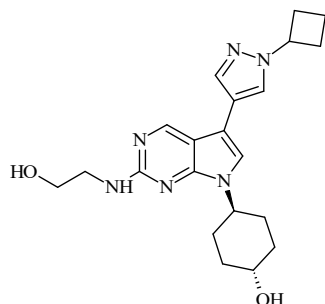
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (91,7 mg, 25,2%).

MS (APCI): m/z 409,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 5.05 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.87 – 4.72 (m, 1H), 4.59 – 4.43 (m, 1H), 3.84 – 3.69 (m, 1H), 3.47 (td, *J* = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.55 (ddd, *J* = 8.0, 6.1, 1.1 Hz, 4H), 2.10 (dd, *J* = 21.3, 16.3 Hz, 4H), 1.96 – 1.78 (m, 4H), 1.71 – 1.52 (m, 4H), 1.52 – 1.39 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 132.39 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 62.03 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 29.18 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 17.56 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(1-cyklobutylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-2-[(2-hydroksyetylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (77)



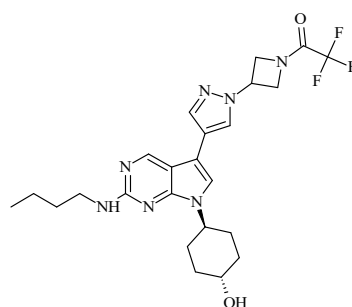
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (55,6 mg, 13,9%).

MS (APCI): m/z 397,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 5.52 – 5.42 (m, 1H), 4.88 – 4.73 (m, 1H), 4.55 – 4.39 (m, 1H), 3.92 – 3.82 (m, 2H), 3.82 – 3.69 (m, 1H), 3.64 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 2H), 2.70 – 2.42 (m, 4H), 2.24 – 2.02 (m, 4H), 1.87 (ddd, *J* = 25.6, 19.5, 11.0 Hz, 4H), 1.70 – 1.47 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 132.39 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 62.03 (s), 60.68 (s), 55.11 (s), 41.93 (s), 30.58 (s), 29.18 (s), 27.23 (s), 17.56 (s).

1-(3-{4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]-1*H*-pirazol-1-ylo}azetydyn-1-ylo)-2,2,2-trifluoroetan-1-on (78)



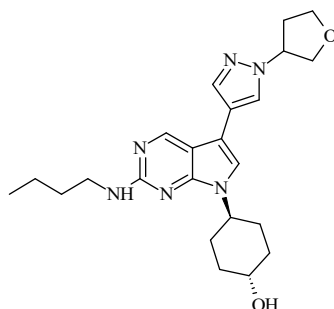
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci pomarańczowego osadu (3 mg, 20,5%).

MS (APCI): *m/z* 506,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 13.7, 6.8 Hz, 1H), 4.89 (dq, *J* = 19.4, 9.6 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.56 – 4.45 (m, 1H), 3.82 – 3.72 (m, 1H), 3.69 – 3.63 (m, 1H), 3.47 (dd, *J* = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.13 (t, *J* = 12.6 Hz, 4H), 1.87 (dd, *J* = 23.7, 11.4 Hz, 3H), 1.64 (ddd, *J* = 25.4, 15.2, 7.8 Hz, 4H), 1.45 (dd, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.07 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 132.39 (s), 116.21 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 58.68 (s), 55.11 (s), 53.77 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(oksolan-3-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (79)



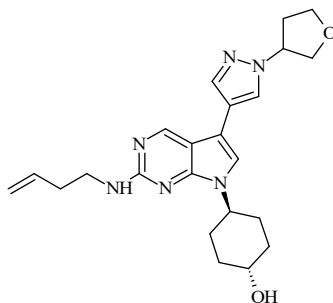
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (40 mg, 11%).

MS (APCI): m/z 425,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.60 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 5.06 (td, *J* = 8.4, 4.5 Hz, 1H), 4.56 – 4.44 (m, 1H), 4.14 (dd, *J* = 15.0, 8.1 Hz, 1H), 4.06 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.92 (td, *J* = 8.4, 5.8 Hz, 1H), 3.76 – 3.61 (m, 1H), 3.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.57 – 2.44 (m, 1H), 2.41 – 2.31 (m, 1H), 2.10 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.05 – 1.92 (m, 4H), 1.70 – 1.60 (m, 2H), 1.58 – 1.41 (m, 4H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 157.78 (s), 152.85 (s), 147.27 (s), 136.62 (s), 125.08 (s), 119.46 (s), 115.26 (s), 109.94 (s), 107.14 (s), 72.33 (s), 68.97 (s), 67.12 (s), 61.69 (s), 52.65 (s), 40.92 (s), 33.98 (s), 32.40 (s), 31.39 (s), 30.00 (s), 29.34 (s), 19.82 (s), 12.87 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-5-[1-(oksolan-3-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (80)



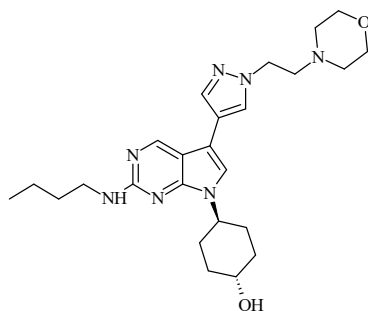
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (59,9 mg, 48,8%).

MS (APCI): m/z 423,7 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.76 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.74 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.87 (ddt, *J* = 17.1, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 17.2, 1.7 Hz, 1H), 5.05 – 4.98 (m, 2H), 4.70 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.37 (dt, *J* = 15.6, 8.6 Hz, 1H), 4.00 (qd, *J* = 7.7, 3.7 Hz, 2H), 3.92 (dd, *J* = 9.3, 3.8 Hz, 1H), 3.84 (td, *J* = 8.2, 5.6 Hz, 1H), 3.58 – 3.49 (m, 1H), 3.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 2H), 2.44 – 2.28 (m, 4H), 1.96 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 1.89 (dd, *J* = 15.4, 4.7 Hz, 4H), 1.35 (td, *J* = 17.0, 11.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 158.6 (s), 152.0 (s), 149.7 (s), 136.6 (s), 136.1 (s), 124.8 (s), 118.2 (s), 115.9 (s), 115.1 (s), 109.1 (s), 106.2 (s), 72.2 (s), 68.1 (s), 66.8 (s), 60.9 (s), 51.7 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.5 (s), 32.1 (s), 30.1 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{1-[2-(morfolin-4-ylo)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (81)



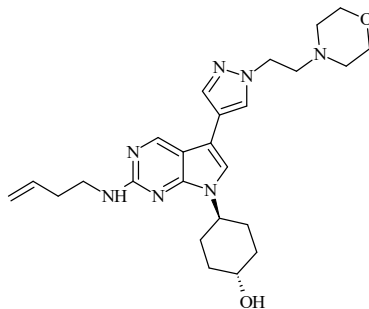
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (15,7 mg, 5,58%).

MS (APCI): *m/z* 468,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (s, 1H), 7.57 (dd, *J* = 11.8, 0.6 Hz, 2H), 6.20 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.31 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.13 (tt, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H), 3.87 – 3.60 (m, 6H), 3.50 – 3.37 (m, 2H), 2.92 (dt, *J* = 13.0, 8.3 Hz, 4H), 2.58 – 2.47 (m, 4H), 2.12 (d, *J* = 11.3 Hz, 2H), 1.80 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 1.74 – 1.59 (m, 2H), 1.53 – 1.27 (m, 4H), 0.97 (dd, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 135.71 (s), 125.40 (s), 115.80 (s), 114.77 (s), 108.19 (s), 67.98 (s), 55.11 (s), 53.38 (s), 53.14 (s), 48.79 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-[2-(morfolin-4-yl)etylo]-1*H*-pirazol-4-yl]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (82)



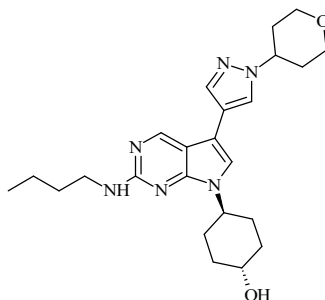
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (85 mg, 96,2%).

MS (APCI): m/z 466,9 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.73 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.88 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.8 Hz, 1H), 5.12 – 4.97 (m, 2H), 4.70 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 1H), 4.23 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.59 – 3.49 (m, 5H), 3.44 (dd, *J* = 17.1, 8.9 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.42 (s, 4H), 2.34 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.96 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 1.93 – 1.83 (m, 4H), 1.41 – 1.31 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.8 (s), 152.0 (s), 149.8 (s), 136.7 (s), 135.8 (s), 126.4 (s), 117.9 (s), 115.9 (s), 114.7 (s), 109.1 (s), 106.3 (s), 68.1 (s), 66.1 (s), 57.7 (s), 53.1 (s), 51.8 (s), 48.6 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.5 (s), 30.1 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(oksan-4-yl)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (83)



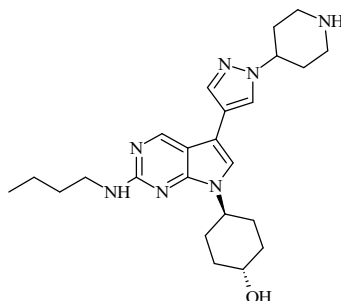
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (11,9 mg, 4,35%).

MS (APCI): m/z 439,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.32 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 6.28 – 6.25 (m, 1H), 4.56 – 4.42 (m, 1H), 4.19 – 4.03 (m, 3H), 3.74 – 3.66 (m, 1H), 3.64 – 3.54 (m, 2H), 3.43 – 3.37 (m, 2H), 2.92 (qd, *J* = 13.2, 3.2 Hz, 2H), 2.21 – 2.00 (m, 6H), 1.79 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 1.71 – 1.59 (m, 2H), 1.52 – 1.41 (m, 2H), 1.39 – 1.24 (m, 2H), 0.99 (dd, *J* = 8.5, 6.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 132.39 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 68.17 (s), 56.43 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 29.66 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(piperidyn-4-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (84)



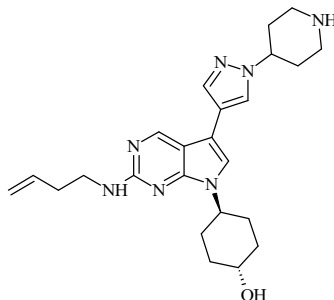
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (40 mg, 74%).

MS (APCI): *m/z* 438,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.58 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 4.71 – 4.43 (m, 2H), 3.81 – 3.63 (m, 1H), 3.55 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.20 (t, *J* = 9.5 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 8.2 Hz, 4H), 2.02 (tt, *J* = 24.1, 11.9 Hz, 6H), 1.69 – 1.34 (m, 7H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 158.89 (s), 152.74 (s), 148.73 (s), 136.74 (s), 124.96 (s), 118.69 (s), 115.40 (s), 109.85 (s), 106.67 (s), 69.00 (s), 55.66 (s), 52.53 (s), 42.97 (s), 40.93 (s), 34.03 (s), 31.51 (s), 30.08 (s), 29.12 (s), 19.84 (s), 12.89 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-(piperydyn-4-yl)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (85)



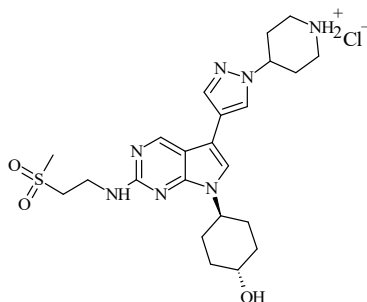
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (47,6 mg, 77,2%).

MS (APCI): m/z 435,9 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.73 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.88 (dd, *J* = 17.2, 10.3 Hz, 1H), 5.16 – 4.94 (m, 2H), 4.69 (s, 1H), 4.48 – 4.30 (m, 1H), 4.30 – 4.12 (m, 1H), 3.60 – 3.47 (m, 1H), 3.45 – 3.22 (m, 3H), 3.05 (dd, *J* = 9.6, 2.7 Hz, 2H), 2.62 (dd, *J* = 12.1, 2.1 Hz, 2H), 2.33 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.03 – 1.74 (m, 8H), 1.47 – 1.27 (m, 2H), 0.93 – 0.77 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.8 (s), 152.0 (s), 150.0 (s), 136.7 (s), 135.4 (s), 123.8 (s), 117.9 (s), 115.9 (s), 114.5 (s), 109.1 (s), 106.4 (s), 68.1 (s), 59.0 (s), 51.7 (s), 45.1 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.6 (s), 33.4 (s), 30.1 (s).

Chlorek 4-(4-{2-[(2-metanosulfonyloetylo)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksy-cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl}-1*H*-pirazol-1-ilo)piperydyn-1-ium (86)



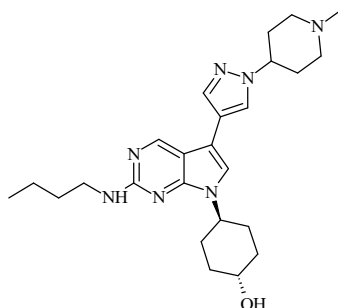
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (4,8 mg, 7,42%).

MS (APCI): m/z 525 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.25 (s, 1H), 9.12 (s, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 18.1 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 4.59 – 4.47 (m, 2H), 3.94 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.61 – 3.56 (m, 2H), 3.52 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.42 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.21 – 3.14 (m, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.34 – 2.20 (m, 4H), 2.02 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.93 (d, *J* = 24.0 Hz, 4H), 1.43 (td, *J* = 17.3, 11.7 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 132.39 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 68.06 (s), 57.69 (s), 55.11 (s), 52.36 (s), 44.94 (s), 39.75 (s), 30.58 (s), 29.44 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(1-metylopiperydyn-4-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-7-ylo]cykloheksan-1-ol (87)



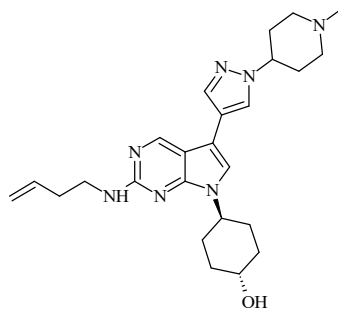
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (50 mg, 29,7%).

MS (APCI): *m/z* 452,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.68 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.80 – 7.71 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.66 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.44 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.23 (dd, *J* = 13.0, 6.7 Hz, 4H), 2.81 (s, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.15 (s, 4H), 1.88 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 1.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 1.46 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.36 – 1.20 (m, 4H), 0.83 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 158.95 (s), 152.00 (s), 149.85 (s), 135.79 (s), 124.27 (s), 117.82 (s), 114.75 (s), 108.92 (s), 106.11 (s), 68.00 (s), 55.98 (s), 52.68 (s), 52.02 (s), 51.67 (s), 43.61 (s), 34.45 (s), 31.22 (s), 30.07 (s), 19.62 (s), 13.71 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-(1-metylopiperydyn-4-yl)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol (88)



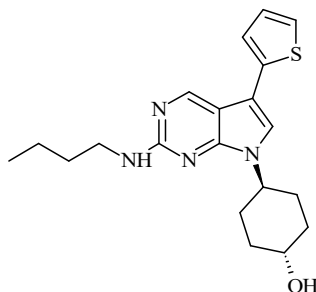
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (767 mg, 97,49%).

MS (APCI): m/z 450,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.73 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.88 (dd, *J* = 17.2, 10.3 Hz, 1H), 5.13 – 4.97 (m, 2H), 4.69 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.36 (t, *J* = 12.9 Hz, 1H), 4.16 – 4.04 (m, 1H), 3.53 (dd, *J* = 19.9, 9.2 Hz, 1H), 3.43 – 3.23 (m, 2H), 2.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.33 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.20 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H), 1.97 (ddd, *J* = 29.4, 20.6, 6.3 Hz, 12H), 1.46 – 1.24 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.8 (s), 152.0 (s), 150.0 (s), 136.7 (s), 135.5 (s), 124.0 (s), 117.9 (s), 115.9 (s), 114.5 (s), 109.1 (s), 106.3 (s), 68.1 (s), 58.1 (s), 54.1 (s), 51.7 (s), 45.7 (s), 40.7 (s), 34.5 (s), 33.6 (s), 32.0 (s), 30.1 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(tiofen-2-yl)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (89)



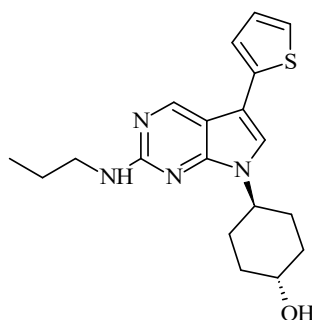
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowej substancji stałej (385 mg, 96,5%).

MS APCI: m/z 371,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.15 – 7.12 (m, 1H), 7.10 (dd, *J* = 3.6, 1.2 Hz, 1H), 7.03 – 6.98 (m, 2H), 5.32 (s, 1H), 4.44 (ddd, *J* = 15.7, 7.9, 3.8 Hz, 1H), 3.70 (ddd, *J* = 11.1, 7.7, 4.2 Hz, 1H), 3.42 (td, *J* = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.07 (ddd, *J* = 14.3, 8.4, 3.8 Hz, 5H), 1.91 – 1.70 (m, 2H), 1.70 – 1.33 (m, 7H), 0.90 (q, *J* = 7.6 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.43 (s), 152.99 (s), 150.41 (s), 136.88 (s), 127.76 (s), 122.70 (s), 122.43 (s), 118.59 (s), 109.95 (s), 69.90 (s), 52.20 (s), 41.60 (s), 34.66 (s), 31.96 (s), 30.67 (s), 20.27 (s), 13.99 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(propyloamino)-5-(tiofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (90)



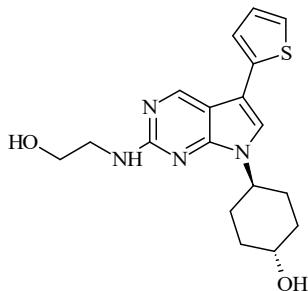
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (104 mg, 84,6%).

MS APCI: *m/z* 357,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.35 (dd, *J* = 27.0, 4.0 Hz, 2H), 7.08 (dd, *J* = 5.0, 3.6 Hz, 1H), 6.87 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.39 (dd, *J* = 13.7, 9.8 Hz, 1H), 3.59 – 3.48 (m, 1H), 3.28 (dd, *J* = 13.4, 6.5 Hz, 2H), 2.01 – 1.83 (m, 6H), 1.62 – 1.53 (m, 2H), 1.40 – 1.30 (m, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 138.87 (s), 132.27 (s), 130.49 (s), 127.68 (s), 114.35 (s), 113.64 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 43.46 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 22.40 (s), 11.70 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-(tiofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (91)



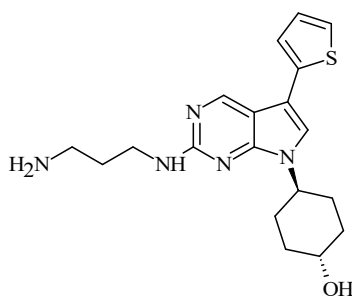
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonej substancji stałej (95,5 mg, 41,7%).

MS APCI: m/z 359,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.79 (s, 1H), 7.23 – 7.16 (m, 2H), 7.11 – 7.05 (m, *J* = 4.3 Hz, 2H), 5.47 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.56 – 4.40 (m, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.94 – 3.85 (m, *J* = 5.3, 4.1 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 9.5, 5.7 Hz, 2H), 2.13 (t, *J* = 13.5 Hz, 4H), 1.94 – 1.76 (m, *J* = 23.8, 11.2 Hz, 2H), 1.66 – 1.49 (m, *J* = 25.6, 11.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 138.87 (s), 132.27 (s), 130.49 (s), 127.68 (s), 114.35 (s), 113.64 (s), 68.06 (s), 60.68 (s), 55.11 (s), 41.93 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(3-aminopropylo)amino]-5-(tiofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (92)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (120 mg, 60,1%).

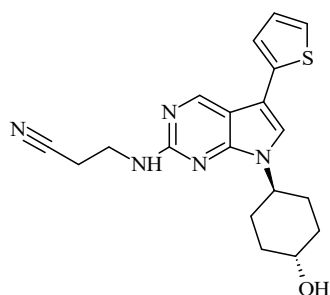
MS APCI: m/z 372,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.66 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.21 – 7.14 (m, 2H), 6.99 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 4.53 – 4.36 (m, 1H), 3.62 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H), 3.50 (t, *J* =

6.3 Hz, 2H), 2.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.03 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.92 (dd, $J = 14.9, 8.3$ Hz, 6H), 1.82 (s, 2H), 1.42 (dd, $J = 11.5, 5.1$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 158.58 (s), 152.19 (s), 148.73 (s), 135.60 (s), 126.69 (s), 121.82 (s), 119.08 (s), 109.38 (s), 68.28 (s), 51.89 (s), 37.32 (s), 36.65 (s), 33.40 (s), 29.54 (s), 27.60 (s), 26.49 (s), 22.11 (s).

**3-({7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-5-(tiofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]piry-
midyn-2-ylo}amino)propanonitryl (93)**



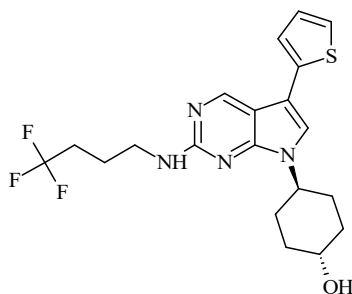
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (60,9 mg, 83,2%).

MS APCI: m/z 368,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.83 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.40 (dd, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 3.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.50 – 4.35 (m, 1H), 3.64 – 3.48 (m, 3H), 2.82 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.93 (dd, $J = 18.3, 7.2$ Hz, 6H), 1.37 (dt, $J = 14.6, 10.1$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 158.4 (s), 152.1 (s), 150.0 (s), 136.3 (s), 127.9 (s), 122.9 (s), 122.4 (s), 120.1 (s), 119.6 (s), 109.2 (s), 108.6 (s), 67.9 (s), 52.1 (s), 37.4 (s), 34.5 (s), 30.0 (s), 17.4 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[5-(tiofen-2-ylo)-2-[(4,4,4-trifluorobutylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-
d]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (94)**



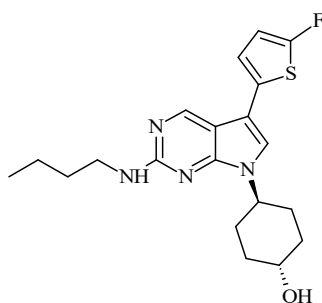
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (79,7 mg, 100%).

MS APCI: m/z 425,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.79 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.39 (dd, *J* = 5.1, 0.9 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 3.6, 1.0 Hz, 1H), 7.12 – 7.02 (m, 2H), 4.68 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.47 – 4.35 (m, 1H), 3.61 – 3.47 (m, 1H), 3.40 (dd, *J* = 13.0, 6.7 Hz, 2H), 2.43 – 2.24 (m, 2H), 2.04 – 1.74 (m, 8H), 1.35 (dt, *J* = 14.0, 10.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.06 (s), 152.27 (s), 150.01 (s), 136.51 (s), 129.69 (s), 127.88 (s), 126.03 (s), 122.81 (s), 122.40 (s), 119.72 (s), 108.74 (s), 67.98 (s), 52.12 (s), 34.52 (s), 30.68 (s), 30.31 (s), 30.03 (s), 21.79 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(5-fluorotiofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-
ylo]cykloheksan-1-ol (95)**



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoróżowego osadu (116 mg, 93,5%).

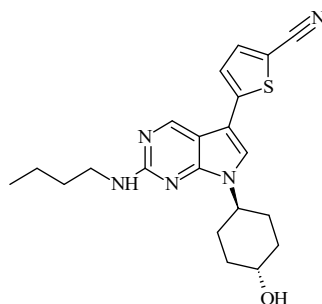
MS ESI: m/z 389,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.73 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.97 (t, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.90 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 4.0, 2.5 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.44 –

4.31 (m, 1H), 3.59 – 3.46 (m, 1H), 3.38 – 3.24 (m, 2H), 1.90 (qd, $J = 10.4, 5.6$ Hz, 6H), 1.62 – 1.49 (m, 2H), 1.35 (dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 4H), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 175.19 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 134.73 (s), 130.38 (s), 129.72 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 106.79 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-5-yl]tiofeno-2-karbonitryl (96)



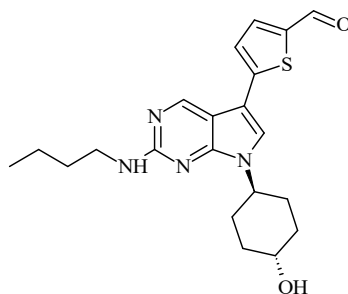
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci zielonożółtego osadu (39,9 mg, 10,5%).

MS APCI: m/z 396,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.12 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 5.15 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.53 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.78 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 12.8, 6.9$ Hz, 2H), 2.25 – 2.06 (m, 4H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 4H), 1.45 (dd, $J = 15.1, 7.4$ Hz, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 138.88 (s), 133.64 (s), 129.72 (s), 128.21 (s), 120.47 (s), 115.31 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pi-
rymidyn-5-ylo]tiofeno-2-karbaldehyd (97)**



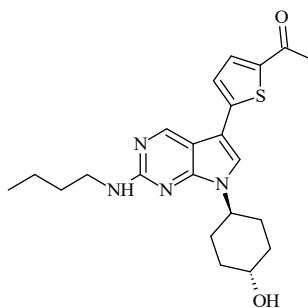
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci pomarańczowego osadu (40,7 mg, 6%).

MS APCI: m/z 399,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.80 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.30 – 7.22 (m, 2H), 4.49 (tt, *J* = 11.9, 3.7 Hz, 1H), 3.78 – 3.63 (m, 1H), 3.43 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.11 (dd, *J* = 11.9, 8.5 Hz, 4H), 1.95 – 1.75 (m, 2H), 1.68 – 1.50 (m, 4H), 1.50 – 1.35 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 181.26 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 141.62 (s), 138.66 (s), 134.48 (s), 133.87 (s), 129.72 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**1-{5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-
d]pirymidyn-5-ylo]tiofen-2-ylo}etan-1-on (98)**



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci pomarańczowego osadu (81 mg, 100%).

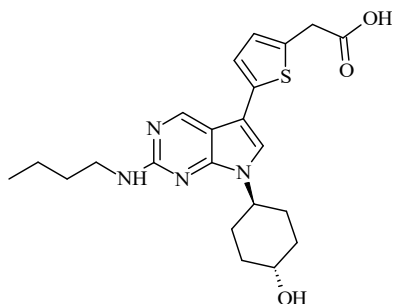
MS ESI: m/z 413,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.23 – 7.15 (m, 2H), 5.06 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.53 (tt, *J* = 11.8, 3.6 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.49

(td, $J = 7.0, 5.9$ Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.15 (dd, $J = 15.4, 8.4$ Hz, 4H), 2.01 – 1.80 (m, 2H), 1.71 – 1.55 (m, 6H), 1.46 (dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 2H), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 191.52 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 138.58 (s), 135.38 (s), 129.72 (s), 129.30 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 26.87 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Kwas 2-{5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-5-yl]tiofen-2-yl}octowy (99)



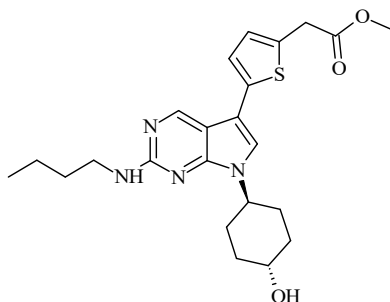
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (16,5 mg, 55%).

MS APCI: m/z 429,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.99 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.54 (t, $J = 11.8$ Hz, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.80 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 3.51 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.18 (d, $J = 11.7$ Hz, 4H), 2.03 – 1.84 (m, 2H), 1.80 – 1.58 (m, 4H), 1.51 (dd, $J = 14.6, 7.0$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.52 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 135.11 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 123.87 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 35.08 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

2-{5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]tiefen-2-ylo}octan metylu (100)



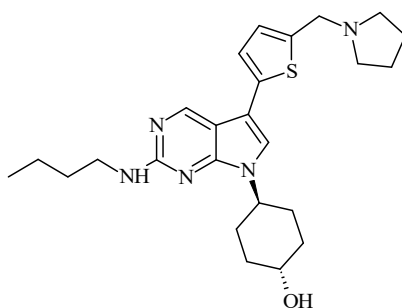
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowej substancji stałej (50,9 mg, 13,2%).

MS APCI: m/z 443,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.79 (s, 1H), 7.05 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 5.12 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.63 – 4.45 (m, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.85 – 3.74 (m, 4H), 3.52 (dt, *J* = 12.9, 6.3 Hz, 2H), 2.25 – 2.09 (m, 4H), 2.09 – 1.81 (m, 2H), 1.74 – 1.57 (m, 4H), 1.50 (dq, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.87 (s), 159.31 (s), 152.94 (s), 150.20 (s), 136.66 (s), 132.25 (s), 127.48 (s), 122.07 (s), 118.48 (s), 109.83 (s), 69.87 (s), 52.17 (s), 41.53 (s), 35.48 (s), 34.60 (s), 31.90 (s), 30.57 (s), 29.69 (s), 20.20 (s), 13.90 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(pirolidyn-1-ylo)metylo]tiefen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (101)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (713,5 mg, 68,7%).

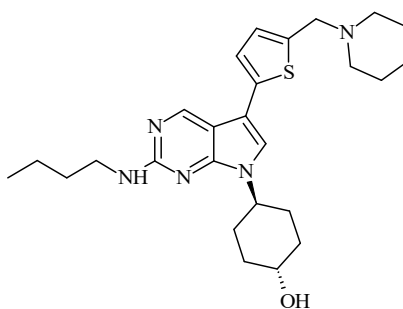
MS APCI: m/z 454,5 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.72 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.54 (dt, *J* = 10.5, 5.7 Hz, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.80 – 3.70 (m, 1H), 3.48

(t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.36 (dt, $J = 3.2, 1.6$ Hz, 2H), 2.67 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.14 (t, $J = 14.6$ Hz, 2H), 2.11 – 1.97 (m, 4H), 1.88 (dt, $J = 6.6, 3.3$ Hz, 4H), 1.73 – 1.62 (m, 2H), 1.62 – 1.47 (m, 4H), 1.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 58.36 (s), 55.50 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 25.36 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperidyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (102)



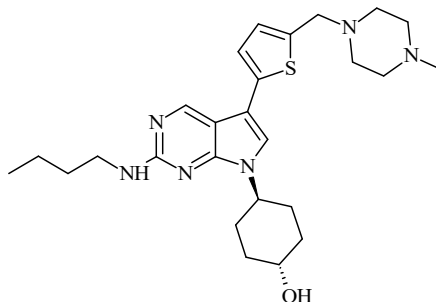
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (63,5 mg, 12%).

MS ESI: m/z 468,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.77 (s, 1H), 7.04 – 6.98 (m, 2H), 6.86 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.98 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.51 (ddd, $J = 15.7, 9.9, 6.0$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 12.2$ Hz, 3H), 3.46 (dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.11 (t, $J = 13.3$ Hz, 4H), 1.79 (ddd, $J = 27.4, 23.3, 11.2$ Hz, 4H), 1.67 – 1.51 (m, 8H), 1.50 – 1.37 (m, 5H), 0.95 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 154.67 (s), 154.39 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 59.19 (s), 55.11 (s), 54.33 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 24.56 (s), 23.31 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-7-ylo]cykloheksan-1-ol (103)



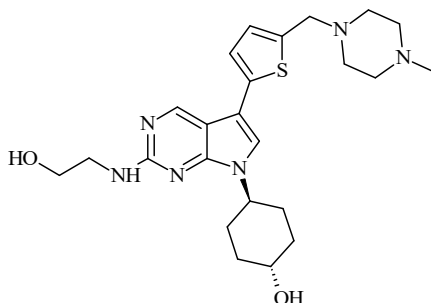
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (94 mg, 100%).

MS APCI: m/z 483,8 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.77 (s, 1H), 7.05 – 6.96 (m, 2H), 6.86 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.99 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.51 (ddd, *J* = 12.0, 8.2, 3.8 Hz, 1H), 3.83 – 3.67 (m, 3H), 3.54 – 3.40 (m, 2H), 2.58 (d, *J* = 18.2 Hz, 7H), 2.33 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.13 (dd, *J* = 14.2, 11.1 Hz, 5H), 1.84 (dt, *J* = 12.8, 6.7 Hz, 3H), 1.68 – 1.53 (m, 4H), 1.45 (dq, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 59.19 (s), 55.11 (s), 54.46 (s), 53.37 (s), 45.96 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-{5-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (104)



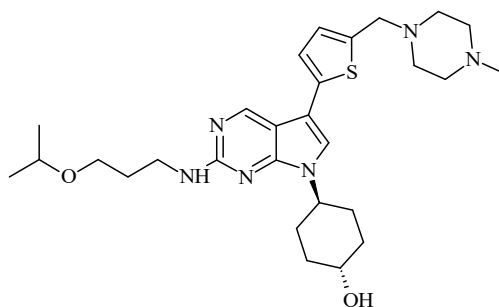
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci zielonożółtego osadu (341,9 mg, 45,5%).

MS ESI: m/z 471,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.76 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.65 – 4.51 (m, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.82 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.78 – 3.64 (m, 3H), 3.56 – 3.40 (m, 2H), 3.26 – 2.97 (m, 4H), 2.89 (s, 3H), 2.77 – 2.45 (m, 2H), 2.20 – 1.90 (m, 6H), 1.62 – 1.45 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 60.68 (s), 59.19 (s), 55.11 (s), 54.46 (s), 53.37 (s), 45.96 (s), 41.93 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-{5-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]tiefen-2-ylo}-2-{[3-(propan-2-yloksy)propylo]amino}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol (105)



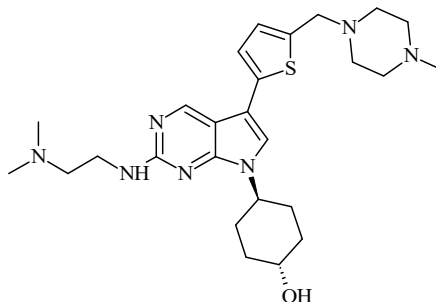
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowej substancji stałej (294,3 mg, 50,9%).

MS APCI: m/z 527,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.66 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.59 – 4.43 (m, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.78 – 3.69 (m, 1H), 3.68 – 3.49 (m, 6H), 3.07 (s, 4H), 2.76 (s, 3H), 2.70 (s, 3H), 2.16 – 1.96 (m, 6H), 1.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.51 (dd, *J* = 10.8, 6.5 Hz, 2H), 1.17 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 73.30 (s), 68.06 (s), 65.39 (s), 59.19 (s), 55.11 (s), 54.46 (s), 53.37 (s), 45.96 (s), 39.30 (s), 31.67 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 23.63 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(2-{[2-(dimetyloamino)etylo]amino}-5-{5-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol (106)



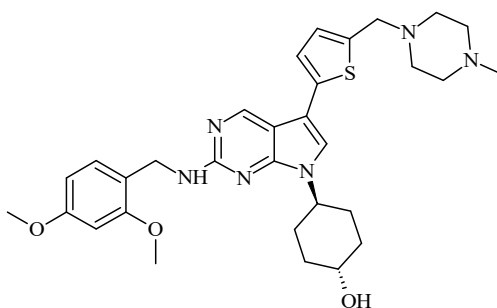
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (75,8 mg, 17,3%).

MS APCI: m/z 498,7[M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.68 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.62 – 4.46 (m, 1H), 3.80 – 3.66 (m, 3H), 3.59 (dd, *J* = 8.8, 5.0 Hz, 2H), 2.61 (dt, *J* = 37.7, 19.0 Hz, 8H), 2.35 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 2.15 – 1.88 (m, 8H), 1.50 (dd, *J* = 11.4, 4.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 59.19 (s), 58.80 (s), 55.11 (s), 54.46 (s), 53.37 (s), 45.96 (s), 45.66 (s), 40.30 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(2-{[(2,4-dimetoksyfenylo)metylo]amino}-5-{5-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol (107)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (177 mg, 47,2%).

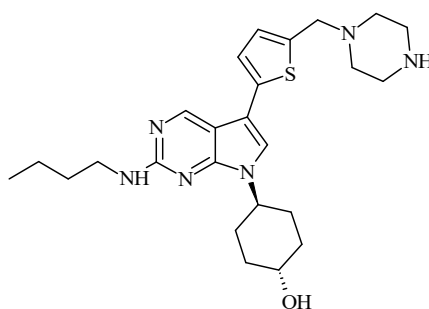
MS APCI: m/z 577,50 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.40 (dd, *J* = 8.2,

2.4 Hz, 1H), 5.53 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.58 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.56 – 4.46 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.71 (s, 2H), 2.55 (d, $J = 19.8$ Hz, 9H), 2.31 (s, 3H), 2.10 (dd, $J = 28.0, 13.2$ Hz, 4H), 1.83 (dd, $J = 23.8, 11.2$ Hz, 2H), 1.68 – 1.48 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 161.07 (s), 160.68 (s), 160.06 (s), 156.21 (s), 155.32 (s), 153.02 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.91 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 122.51 (s), 114.62 (s), 112.97 (s), 106.01 (s), 97.59 (s), 68.06 (s), 59.19 (s), 56.79 (s), 56.04 (s), 55.11 (s), 54.46 (s), 53.37 (s), 45.96 (s), 37.12 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (108)



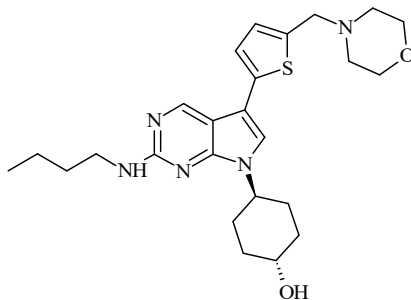
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (1,82 g, 65,3%).

MS APCI: m/z 469,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.66 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.07 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.89 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.49 (tt, $J = 10.8, 5.6$ Hz, 1H), 3.75 – 3.68 (m, 3H), 3.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.89 – 2.79 (m, 5H), 2.56 – 2.46 (m, 5H), 2.16 – 1.91 (m, 7H), 1.65 (dt, $J = 14.8, 7.2$ Hz, 2H), 1.48 (dt, $J = 14.1, 5.7$ Hz, 4H), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 161.64 (s), 155.55 (s), 151.99 (s), 139.93 (s), 139.30 (s), 130.03 (s), 124.35 (s), 121.82 (s), 112.40 (s), 81.15 (s), 71.63 (s), 59.83 (s), 55.39 (s), 47.50 (s), 43.68 (s), 36.64 (s), 34.18 (s), 32.85 (s), 24.99 (s), 22.56 (s), 15.77 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(morfolin-4-yl)metylo]tiofen-2-yl}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (109)



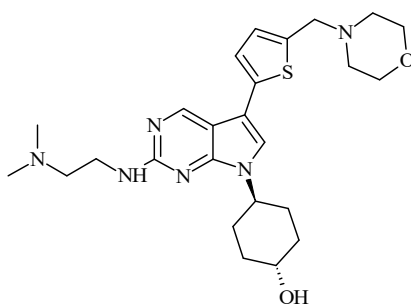
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (51,1 mg, 25,8%).

MS APCI: m/z 470,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.07 – 6.98 (m, 2H), 6.88 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 5.26 (s, 1H), 4.52 (ddd, *J* = 15.7, 9.8, 6.0 Hz, 1H), 3.87 – 3.67 (m, 8H), 3.48 (td, *J* = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.60 – 2.50 (m, 4H), 2.13 (dd, *J* = 14.2, 11.3 Hz, 4H), 1.96 – 1.77 (m, 2H), 1.73 – 1.53 (m, 5H), 1.46 (dq, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 2H), 1.04 – 0.90 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 67.98 (s), 59.19 (s), 55.11 (s), 52.74 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(2-{[2-(dimetyloamino)etylo]amino}-5-{5-[(morfolin-4-yl)metylo]tiofen-2-yl}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksan-1-ol (110)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (133,5 mg, 40,2%).

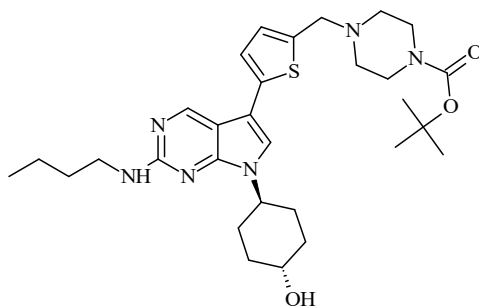
MS APCI: m/z 485,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.68 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.51 (dt, *J* = 9.8, 5.6 Hz, 1H), 3.77 – 3.67 (m, 7H), 3.59 (dd, *J* = 8.4,

5.4 Hz, 2H), 2.63 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.57 – 2.46 (m, 4H), 2.35 (s, 6H), 2.17 – 1.87 (m, 6H), 1.59 – 1.40 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.17 – 67.82 (m), 59.19 (s), 58.80 (s), 55.11 (s), 52.74 (s), 45.66 (s), 40.30 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

tert-butyl-4-({5-[2-(butylamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroxycyclohexyl]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]tiofen-2-yl}metylo)piperazyno-1-karboksylan (111)



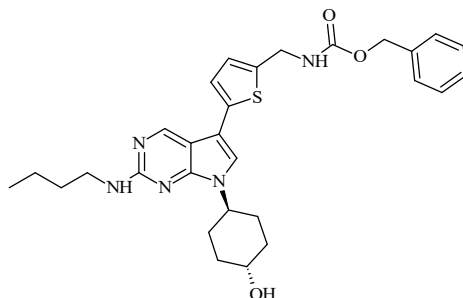
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (89,3mg, 100%).

MS APCI: m/z 569,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 5.31 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.51 (ddd, $J = 15.8, 8.1, 3.9$ Hz, 1H), 3.82 – 3.69 (m, 3H), 3.51 – 3.40 (m, 6H), 2.52 – 2.43 (m, 4H), 2.13 (t, $J = 12.9$ Hz, 4H), 1.84 (dt, $J = 16.0, 6.5$ Hz, 2H), 1.70 – 1.54 (m, 5H), 1.48 – 1.44 (m, 11H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.13 (s), 156.21 (s), 155.54 (s), 155.02 (s), 154.67 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 125.56 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 80.96 (s), 68.06 (s), 59.19 (s), 55.11 (s), 51.70 (s), 44.41 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 28.52 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Benzylo-*N*-(5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]tiofen-2-yl]karbaminian metylu (112)



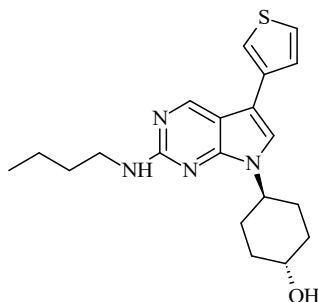
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowej substancji stałej (868 mg, 100%).

MS ESI: m/z 534,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.68 (s, 1H), 7.39 – 7.29 (m, 5H), 7.04 – 6.83 (m, 3H), 5.45 (s, 1H), 5.18 – 5.03 (m, 3H), 4.60 – 4.39 (m, 3H), 3.83 – 3.65 (m, 1H), 3.45 (dd, *J* = 12.5, 6.5 Hz, 2H), 2.08 (dd, *J* = 30.5, 16.6 Hz, 6H), 1.91 – 1.75 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 3H), 1.44 (dq, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 157.43 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 146.77 (s), 137.28 (s), 136.99 (s), 134.86 (s), 129.72 (s), 128.53 (s), 122.97 (s), 114.35 (s), 112.97 (s), 68.06 (s), 67.06 (s), 55.11 (s), 43.70 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(tiofen-3-yl)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (113)



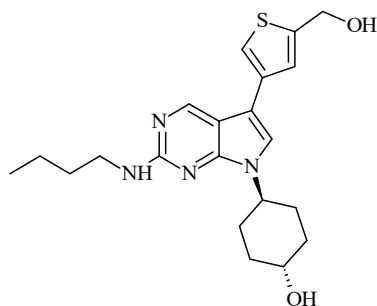
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (49,1 mg, 95%).

MS APCI: m/z 371,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 7.39 (dd, *J* = 4.9, 2.9 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 2.9, 1.3 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 4.9, 1.4 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.97 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.53 (ddd, *J* = 15.8, 8.0, 3.8 Hz, 1H), 3.77 (dt, *J* = 15.2, 5.5 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.14 (t, *J* = 11.9 Hz, 4H), 1.96 – 1.79 (m, 2H), 1.70 – 1.52 (m, 6H), 1.47 (dt, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.25 (s), 152.94 (s), 150.08 (s), 134.92 (s), 126.07 (s), 118.48 (s), 111.31 (s), 110.22 (s), 69.91 (s), 52.05 (s), 41.53 (s), 34.61 (s), 31.92 (s), 30.57 (s), 29.68 (s), 20.18 (s), 13.88 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[5-(hydroksymetylo)tiofen-3-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (114)



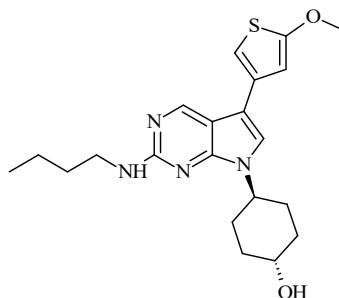
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (2,09 g, 88,8%).

MS APCI: *m/z* 401,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.84 (s, 1H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.32 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.79 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.45 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.70 – 4.60 (m, 3H), 4.45 – 4.30 (m, 1H), 3.60 – 3.45 (m, 1H), 3.38 – 3.24 (m, 2H), 2.07 – 1.80 (m, 6H), 1.62 – 1.47 (m, 2H), 1.35 (tt, *J* = 11.5, 5.7 Hz, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.45 (s), 152.78 (s), 150.51 (s), 146.74 (s), 134.65 (s), 123.60 (s), 120.21 (s), 117.27 (s), 110.78 (s), 109.23 (s), 68.49 (s), 58.84 (s), 52.25 (s), 41.07 (s), 34.97 (s), 31.71 (s), 30.50 (s), 20.12 (s), 14.20 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(5-metoksytien-3-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (115)



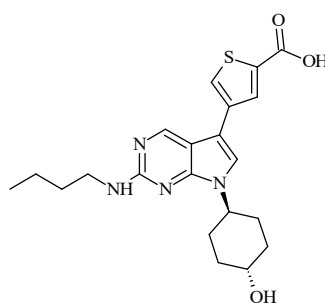
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci zielonego osadu (162,8 mg, 100%).

MS ESI: m/z 401,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.83 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.59 – 4.42 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.76 (dd, *J* = 9.6, 5.5 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 12.8, 6.9 Hz, 2H), 2.21 – 2.03 (m, 4H), 1.85 (dt, *J* = 15.9, 6.5 Hz, 2H), 1.70 – 1.53 (m, 4H), 1.45 (dd, *J* = 15.1, 7.4 Hz, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.85 (s), 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 136.96 (s), 124.34 (s), 119.58 (s), 116.27 (s), 108.35 (s), 95.23 (s), 68.06 (s), 60.49 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Kwas 4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]tieno-2-karboksylowy (116)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (43,3 mg, 98,6%).

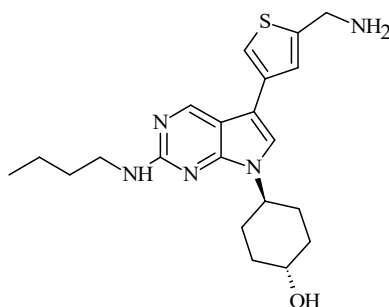
MS APCI: m/z 415,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.69 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 4.61 – 4.38 (m, 1H), 3.78 – 3.64 (m, 1H), 3.43 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.19 – 1.88 (m, *J* =

26.1 Hz, 6H), 1.63 (dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, 2H), 1.57 – 1.39 (m, 4H), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 163.39 (s), 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 146.54 (s), 142.85 (s), 136.62 (s), 130.27 (s), 124.34 (s), 116.27 (s), 108.35 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[5-(aminometylo)tiofen-3-ylo]-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (117)



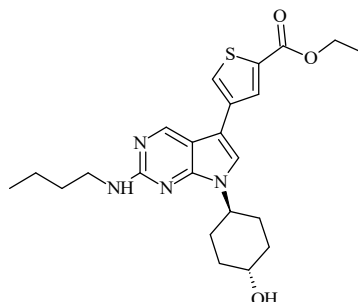
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (242,2 mg, 50,2%).

MS APCI: m/z 400,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.89 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.85 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.52 – 4.36 (m, 1H), 4.19 (s, 2H), 3.63 – 3.24 (m, 5H), 1.95 (dd, $J = 23.3, 10.1$ Hz, 6H), 1.57 (dd, $J = 14.4, 7.5$ Hz, 2H), 1.38 (dq, $J = 14.2, 7.3$ Hz, 4H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 159.70 (s), 153.81 (s), 152.69 (s), 152.27 (s), 147.86 (s), 125.97 (s), 124.34 (s), 122.39 (s), 116.27 (s), 108.35 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 46.05 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-
pirymidyn-5-ylo]tiofeno-2-karboksylan etylu (118)**



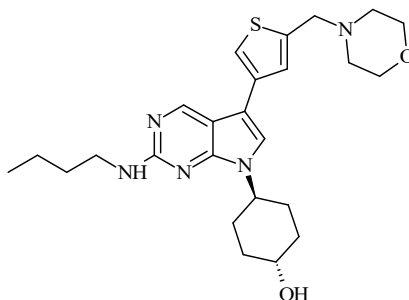
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (106,7 mg, 39%).

MS ESI: m/z 443,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 5.04 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (ddd, *J* = 15.7, 8.0, 3.8 Hz, 1H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.77 (ddd, *J* = 10.9, 7.7, 4.2 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 6.9, 1.0 Hz, 2H), 2.22 – 2.06 (m, 4H), 1.87 (ddd, *J* = 16.0, 13.4, 3.7 Hz, 3H), 1.72 – 1.54 (m, 4H), 1.50 – 1.43 (m, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 162.41 (s), 158.88 (s), 153.01 (s), 148.94 (s), 135.70 (s), 133.83 (s), 131.73 (s), 125.16 (s), 120.34 (s), 110.28 (s), 109.57 (s), 69.00 (s), 61.07 (s), 52.73 (s), 41.01 (s), 34.03 (s), 31.53 (s), 30.11 (s), 19.87 (s), 13.34 (s), 12.97 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(morfolin-4-ylo)metylo]tiofen-3-ylo}-7*H*-
pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (119)**



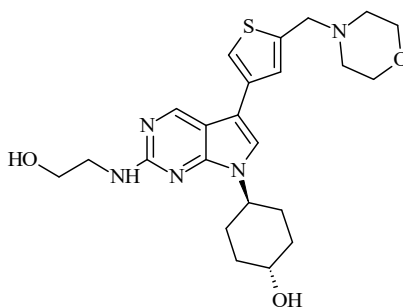
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci różowej substancji stałej (519 mg, 100%).

MS APCI: m/z 470,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.14 – 7.11 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.96 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.53 (ddd, *J* = 15.6, 8.0, 3.8 Hz, 1H), 3.73 (d, *J* = 4.9 Hz, 6H), 3.57 – 3.41 (m, 2H), 2.59 – 2.45 (m, 4H), 2.13 (dd, *J* = 14.0, 10.9 Hz, 4H), 1.85 (dt, *J* = 16.1, 6.4 Hz, 2H), 1.71 – 1.37 (m, 8H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 151.23 (s), 147.86 (s), 125.97 (s), 124.34 (s), 124.01 (s), 116.27 (s), 108.35 (s), 67.98 (s), 57.87 (s), 55.11 (s), 52.74 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-{5-[(morfolin-4-ylo)metylo]tiofen-3-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (120)



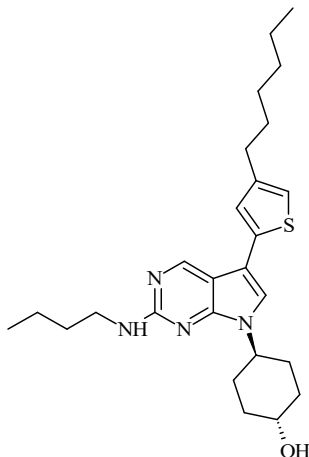
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (91,8 mg, 31,4%).

MS APCI: m/z 458,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.71 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.59 – 4.45 (m, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.80 – 3.73 (m, 4H), 3.73 – 3.65 (m, 5H), 3.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.59 – 2.48 (m, 4H), 2.10 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.98 (dd, *J* = 17.8, 6.3 Hz, 4H), 1.61 – 1.44 (m, *J* = 16.9, 11.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 151.23 (s), 147.86 (s), 125.97 (s), 124.34 (s), 124.01 (s), 116.27 (s), 108.35 (s), 67.98 (s), 60.68 (s), 57.87 (s), 55.11 (s), 52.74 (s), 41.93 (s), 30.58 (s), 27.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(4-heksylofien-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (121)



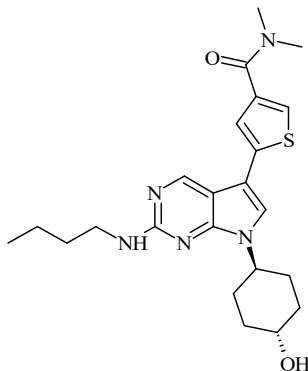
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (464 mg, 100%).

MS APCI: m/z 455,8 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.78 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.01 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 5.00 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.58 – 4.46 (m, 1H), 3.76 (dt, *J* = 15.2, 5.6 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 12.9, 6.9 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.13 (t, *J* = 12.1 Hz, 5H), 1.97 – 1.74 (m, 4H), 1.71 – 1.54 (m, 7H), 1.44 (ddd, *J* = 20.8, 14.3, 6.8 Hz, 4H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.89 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 138.74 (s), 131.98 (s), 130.42 (s), 130.06 (s), 129.40 (s), 114.35 (s), 113.72 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 31.65 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 30.05 (s), 29.24 (s), 28.03 (s), 27.23 (s), 22.94 (s), 20.23 (s), 14.13 (s).

**5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-
pirymidyn-5-ylo]-*N,N*-dimetylotiofeno-3-karboksyamid (122)**



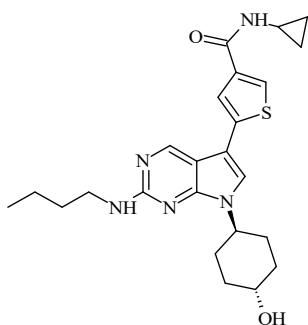
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (98,6 mg, 19,7%).

MS APCI: m/z 442,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.51 (ddd, *J* = 12.0, 8.2, 3.8 Hz, 1H), 3.84 – 3.69 (m, 1H), 3.52 – 3.42 (m, 2H), 3.12 (s, 6H), 2.13 (dd, *J* = 13.4, 10.5 Hz, 4H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.70 – 1.53 (m, 4H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.89 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 139.74 (s), 138.21 (s), 130.06 (s), 129.50 (s), 116.56 (s), 114.35 (s), 113.72 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 36.73 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymi-
dyn-5-ylo]-*N*-cyklopropylotiofeno-3-karboksyamid (123)**



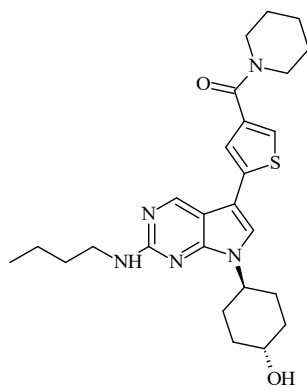
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego (20 mg, 4%).

MS ESI: m/z 454,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.85 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.92 (dd, *J* = 11.9, 6.1 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.36 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.61 – 3.42 (m, 1H), 2.79 (tq, *J* = 7.7, 3.9 Hz, 1H), 2.02 – 1.91 (m, 4H), 1.88 (s, 2H), 1.60 – 1.47 (m, 2H), 1.39 – 1.26 (m, 6H), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.73 – 0.65 (m, 2H), 0.60 – 0.50 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 170.83 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 140.81 (s), 133.51 (s), 133.31 (s), 130.06 (s), 116.08 (s), 114.35 (s), 113.72 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 25.58 (s), 20.23 (s), 14.02 (s), 9.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[4-(piperydino-1-karbonylo)tiofen-2-ylo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (124)



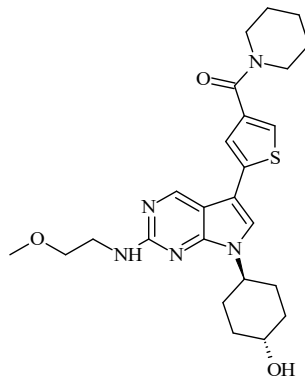
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnobrązowego osadu (128 mg, 21,2%).

MS APCI: m/z 482,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.75 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.56 (dt, *J* = 15.7, 7.8 Hz, 1H), 3.85 – 3.58 (m, 5H), 3.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.29 – 1.90 (m, 6H), 1.90 – 1.61 (m, 8H), 1.60 – 1.42 (m, 4H), 1.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 166.37 (s), 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 139.74 (s), 138.54 (s), 130.06 (s), 129.02 (s), 116.56 (s), 114.35 (s), 113.72 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 45.55 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 24.97 (s), 23.31 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-metoksyetylo)amino]-5-[4-(piperydino-1-karbonylo)tiofen-2-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-7-ylo}cykloheksan-1-ol (125)



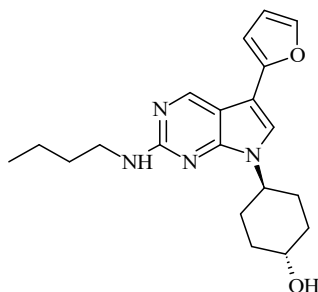
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (100 mg, 16,1%).

MS APCI: m/z 484,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.77 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 5.34 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.61 – 4.43 (m, 1H), 3.73 – 3.56 (m, 8H), 3.40 (d, *J* = 2.3 Hz, 3H), 2.12 (t, *J* = 12.7 Hz, 5H), 1.93 – 1.79 (m, 2H), 1.72 – 1.66 (m, 2H), 1.65 – 1.51 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.43 (s), 159.07 (s), 152.72 (s), 150.11 (s), 137.28 (d, *J* = 12.6 Hz), 122.66 (s), 121.84 (s), 118.89 (s), 109.84 (s), 108.99 (s), 71.33 (s), 69.60 (s), 58.64 (s), 52.04 (s), 41.37 (s), 34.39 (s), 31.76 (s), 30.47 (s), 29.52 (s), 29.18 (s), 24.49 (s), 22.51 (s), 13.92 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(furan-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (126)



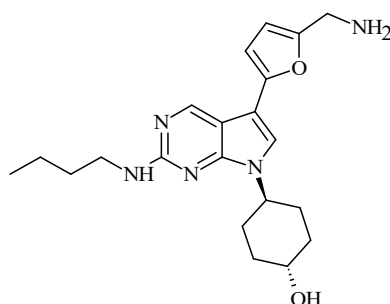
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (38,5 mg, 41,6%).

MS APCI: m/z 355,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 7.41 (dd, *J* = 1.8, 0.7 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.47 (dd, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 3.3, 0.6 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.61 – 4.42 (m, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 1H), 3.55 – 3.41 (m, 2H), 2.13 (t, *J* = 13.2 Hz, 4H), 1.96 – 1.78 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 4H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.23 (s), 152.84 (s), 149.13 (s), 148.64 (s), 140.63 (s), 118.40 (s), 111.26 (s), 108.66 (s), 107.29 (s), 103.77 (s), 69.71 (s), 52.27 (s), 41.41 (s), 34.47 (s), 31.69 (s), 30.45 (s), 20.11 (s), 13.80 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-{5-[5-(aminometylo)furan-2-ylo]-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]piry-
midyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (127)**



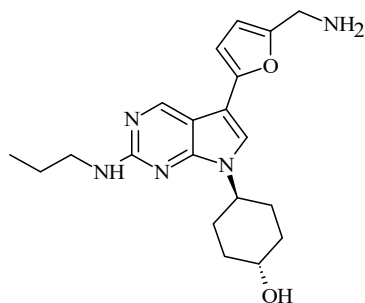
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (27,5 mg, 23%).

MS ESI: m/z 384,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.79 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.85 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.38 (dt, *J* = 16.1, 6.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.61 – 3.46 (m, 1H), 3.31 (dd, *J* = 12.9, 6.6 Hz, 4H), 2.02 – 1.79 (m, 6H), 1.63 – 1.49 (m, 2H), 1.44 – 1.23 (m, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.01 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 151.84 (s), 151.54 (s), 128.62 (s), 114.23 (s), 111.19 (s), 108.82 (s), 106.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 41.25 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[5-(aminometylo)furan-2-ylo]-2-(propyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (128)



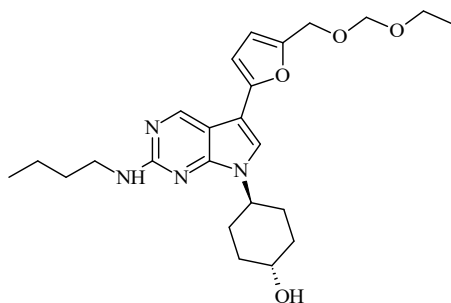
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (94,4 mg, 82,4%).

MS APCI: m/z 370,5 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.80 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.84 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.43 – 4.34 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.58 – 3.50 (m, 1H), 3.31 – 3.18 (m, 4H), 2.00 – 1.81 (m, 6H), 1.63 – 1.52 (m, 2H), 1.40 – 1.29 (m, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.01 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 151.84 (s), 151.54 (s), 128.62 (s), 114.23 (s), 111.19 (s), 108.82 (s), 106.19 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 43.46 (s), 41.25 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 22.40 (s), 11.70 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-[(etoksymetoksy)metylo]furan-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (129)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci pomarańczowego osadu (83,9 mg, 22,8%).

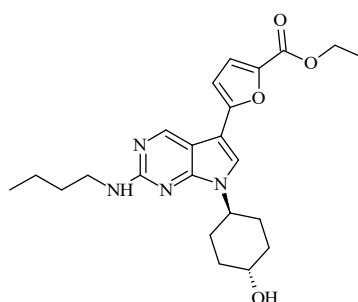
MS APCI: m/z 443,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.41 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.12 – 4.98 (m, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.52 (s, 1H), 3.83 –

3.71 (m, 1H), 3.66 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.47 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 2.12 (t, $J = 13.0$ Hz, 4H), 1.94 – 1.77 (m, 2H), 1.72 – 1.52 (m, 4H), 1.45 (dd, $J = 15.1, 7.5$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.01 (s), 153.64 (d, $J = 8.8$ Hz), 151.54 (s), 150.94 (s), 128.62 (s), 114.23 (s), 111.19 (s), 108.82 (s), 107.76 (s), 95.78 (s), 68.06 (s), 63.56 (s), 61.70 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.87 (s), 14.02 (s).

5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-5-ylo]furano-2-karboksylian etylu (130)



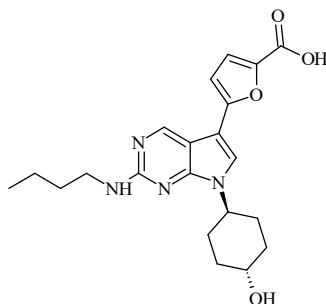
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (64,1 mg, 43,5%).

MS APCI: m/z 427,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.79 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.24 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.54 (ddd, $J = 15.7, 7.9, 3.7$ Hz, 1H), 4.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.76 (dt, $J = 15.0, 5.4$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz, 2H), 2.14 (dd, $J = 17.3, 9.4$ Hz, 4H), 1.85 (dt, $J = 15.6, 6.4$ Hz, 2H), 1.71 – 1.53 (m, 4H), 1.47 (dd, $J = 15.3, 7.5$ Hz, 2H), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.91 (s), 156.01 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 151.93 (s), 145.30 (s), 128.62 (s), 119.51 (s), 114.23 (s), 111.89 (s), 108.82 (s), 68.06 (s), 61.50 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.70 (s), 14.02 (s).

Kwas 5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]furan-2-karboksylowy (131)



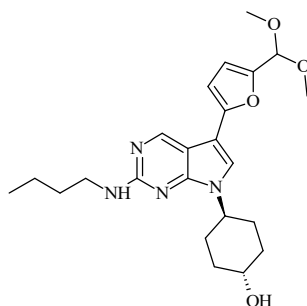
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (21,7 mg, 39,8%).

MS APCI: m/z 399,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.85 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.19 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.97 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.52 – 4.34 (m, 1H), 3.60 – 3.49 (m, 1H), 3.32 (dd, *J* = 13.1, 6.7 Hz, 2H), 2.05 – 1.83 (m, 6H), 1.63 – 1.48 (m, 2H), 1.45 – 1.21 (m, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.32 (s), 156.01 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 151.93 (s), 143.76 (s), 128.62 (s), 120.13 (s), 114.23 (s), 111.89 (s), 108.82 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[5-(dimetoksymetylo)furan-2-ylo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (132)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (38,9 mg, 43,6%).

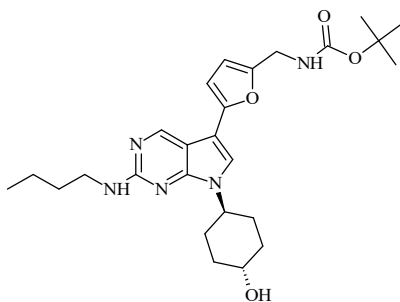
MS ESI: m/z 429,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 7.41 (t, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.45 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 5.13 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.51 (tt, *J* = 11.9, 3.8 Hz, 1H),

3.76 (tt, $J = 11.0, 4.2$ Hz, 1H), 3.47 (dt, $J = 12.9, 6.5$ Hz, 2H), 3.35 (s, 6H), 2.11 (dt, $J = 19.2, 11.7$ Hz, 4H), 1.84 (dt, $J = 16.0, 6.5$ Hz, 2H), 1.69 – 1.53 (m, 4H), 1.45 (dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.01 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 148.94 (s), 131.43 (s), 128.58 (s), 120.63 (s), 114.23 (s), 111.57 (s), 108.54 (s), 100.65 (s), 68.06 (s), 56.45 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

tert-butyl-*N*-({5-[2-(butylamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroxycyclohexyl]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidin-5-yl]furan-2-yl}metylo)karbaminian (133)



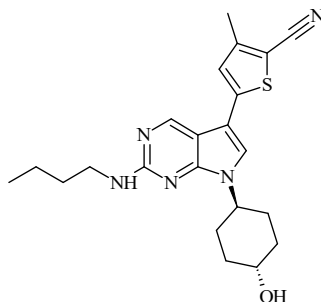
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (161,9 mg, 69,3%).

MS ESI: m/z 484,6 [M+H]⁺

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.83 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.35 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 6.86 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.39 (ddd, $J = 15.7, 9.7, 5.8$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.59 – 3.45 (m, 1H), 3.37 – 3.24 (m, 2H), 1.92 (dd, $J = 24.6, 11.2$ Hz, 6H), 1.62 – 1.49 (m, 2H), 1.45 – 1.28 (m, 13H), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 157.98 (s), 156.01 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 151.54 (s), 150.65 (s), 128.62 (s), 114.23 (s), 112.20 (s), 111.19 (s), 108.82 (s), 80.65 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 39.14 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 28.52 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-
pirymidyn-5-yl]-3-metylotiofeno-2-karbonitryl (134)**



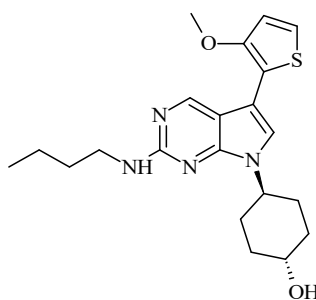
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (20,1 mg, 5,63%).

MS APCI: m/z 410,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H), 7.77 – 7.41 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.59 – 4.45 (m, 1H), 3.77 (dd, *J* = 9.5, 5.4 Hz, 1H), 3.48 (s, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.12 (dd, *J* = 28.7, 16.8 Hz, 4H), 1.95 – 1.78 (m, *J* = 12.4 Hz, 2H), 1.69 – 1.55 (m, 4H), 1.45 (dd, *J* = 14.9, 7.3 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 154.48 (s), 150.05 (s), 130.48 (s), 129.18 (s), 127.95 (s), 116.96 (s), 114.35 (s), 113.00 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 18.21 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(3-metoksytiofen-2-yl)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (135)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (34,5 mg, 8,3%).

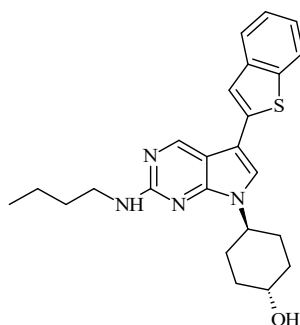
MS APCI: m/z 401,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.85 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.60 – 4.43 (m, 1H), 3.94 (d, *J* = 2.1 Hz, 3H), 3.87 –

3.72 (m, 1H), 3.48 (td, $J = 7.0, 5.9$ Hz, 2H), 2.21 – 2.05 (m, 4H), 1.90 (tt, $J = 13.0, 6.5$ Hz, 3H), 1.61 (ddd, $J = 22.6, 11.2, 3.1$ Hz, 3H), 1.52 – 1.41 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.74 (s), 158.99 (s), 156.29 (s), 154.83 (s), 140.62 (s), 126.59 (s), 122.07 (s), 116.63 (s), 113.97 (s), 108.29 (s), 68.06 (s), 58.46 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(1-benzotiofen-2-yl)-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (136)



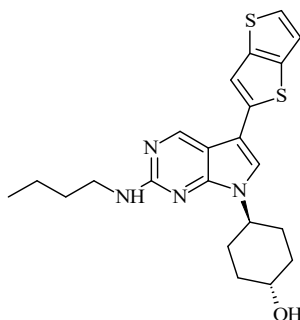
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci różowego osadu (141,9 mg, 31,9%).

MS ESI: m/z 421,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (s, 1H), 7.81 – 7.67 (m, 2H), 7.39 – 7.19 (m, 4H), 5.03 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.49 (tt, $J = 12.0, 3.8$ Hz, 1H), 3.73 (ddd, $J = 10.9, 7.7, 4.2$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz, 2H), 2.11 (dd, $J = 11.7, 8.9$ Hz, 4H), 1.85 (ddd, $J = 15.9, 13.4, 3.7$ Hz, 3H), 1.68 – 1.53 (m, 4H), 1.42 (dq, $J = 14.0, 7.1$ Hz, 2H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 158.81 (s), 152.68 (s), 149.77 (s), 140.15 (s), 137.67 (s), 136.40 (s), 123.94 (s), 123.28 (s), 122.38 (s), 121.45 (s), 119.36 (s), 117.84 (s), 109.38 (s), 69.25 (s), 51.82 (s), 40.97 (s), 34.03 (s), 31.33 (s), 30.67 (s), 19.63 (s), 13.33 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{tieno[3,2-*b*]tiofen-2-yllo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yllo]cykloheksan-1-ol (137)



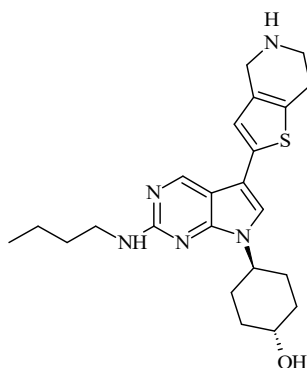
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (25,3 mg, 7,5%).

MS APCI: m/z 427,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (s, 1H), 7.33 (dd, *J* = 2.8, 2.4 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 5.2, 0.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.53 (ddd, *J* = 15.9, 8.0, 3.8 Hz, 1H), 3.85 – 3.64 (m, 1H), 3.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.15 (t, *J* = 11.3 Hz, 4H), 1.98 – 1.81 (m, 2H), 1.72 – 1.55 (m, 4H), 1.54 – 1.39 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 145.12 (s), 133.32 (s), 133.04 (s), 130.25 (s), 129.18 (s), 124.13 (s), 122.11 (s), 114.35 (s), 113.00 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{4*H*,5*H*,6*H*,7*H*-tieno[3,2-*c*]pirydyn-2-yllo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yllo]cykloheksan-1-ol (138)



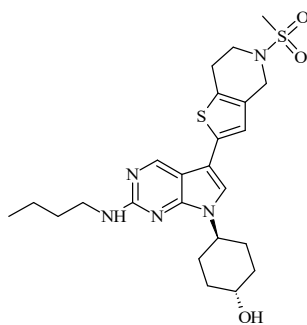
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (158,3 mg, 37,1%).

MS APCI: m/z 426,8 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.37 (ddd, *J* = 11.9, 8.3, 3.8 Hz, 1H), 3.82 (s, 6H), 3.69 – 3.50 (m, 1H), 3.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.91 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 1.99 (t, *J* = 12.1 Hz, 4H), 1.88 – 1.64 (m, 2H), 1.63 – 1.26 (m, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.87 (s), 152.82 (s), 149.50 (s), 135.18 (s), 130.23 (s), 129.59 (s), 119.83 (s), 118.98 (s), 109.54 (s), 109.34 (s), 69.11 (s), 52.34 (s), 43.71 (s), 42.35 (s), 41.19 (s), 33.98 (s), 31.57 (s), 30.45 (s), 23.17 (s), 19.99 (s), 13.62 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{5-metanosulfonylo-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*-tieno[3,2-*c*]pirydyn-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (139)



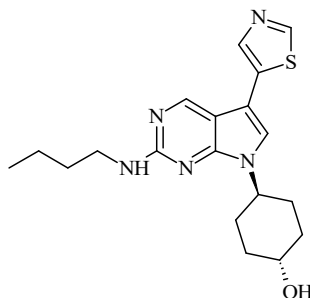
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci pomarańczowego osadu (126 mg, 25,1%).

MS APCI: m/z 504,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.62 – 4.43 (m, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.76 (dd, *J* = 9.5, 5.4 Hz, 1H), 3.66 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.48 (dd, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.98 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.87 (s, 3H), 2.13 (dd, *J* = 14.1, 11.4 Hz, 4H), 1.85 (dt, *J* = 12.9, 6.7 Hz, 2H), 1.71 – 1.35 (m, 6H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.86 (s), 156.83 (s), 153.34 (s), 138.90 (s), 135.18 (s), 134.02 (s), 123.80 (s), 123.13 (s), 113.52 (s), 72.97 (s), 56.51 (s), 49.26 (s), 47.44 (s), 45.09 (s), 39.62 (s), 37.93 (s), 35.51 (s), 34.29 (s), 28.78 (s), 23.94 (s), 17.34 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1,3-tiazol-5-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (140)



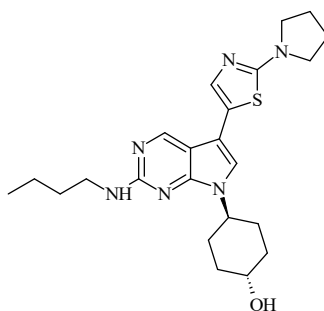
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (22,9 mg, 4%).

MS APCI: m/z 372,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.53 (tt, *J* = 12.0, 3.8 Hz, 1H), 3.85 – 3.71 (m, 1H), 3.56 – 3.42 (m, 2H), 2.15 (td, *J* = 11.3, 7.9 Hz, 4H), 1.97 – 1.80 (m, 2H), 1.72 – 1.55 (m, 4H), 1.46 (dq, *J* = 14.0, 7.1 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 151.07 (s), 137.42 (s), 121.61 (s), 116.16 (s), 114.74 (s), 114.35 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(pirolidyn-1-yl)-1,3-tiazol-5-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyna-7-yl]cykloheksan-1-ol (141)



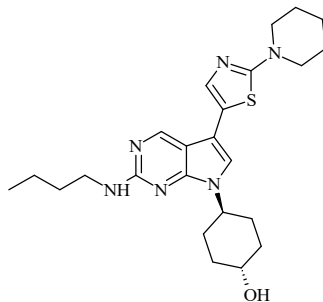
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (64 mg, 53,4%).

MS APCI: m/z 441,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.56 – 4.41 (m, 1H), 3.84 – 3.69 (m, 1H), 3.54 – 3.42 (m, 6H), 2.20 – 2.03 (m, 8H), 1.94 – 1.78 (m, 2H), 1.69 – 1.53 (m, 4H), 1.53 – 1.38 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.13 (s), 158.07 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 132.59 (s), 115.95 (s), 114.71 (s), 114.35 (s), 107.70 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 49.68 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 25.98 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(piperidyn-1-yl)-1,3-tiazol-5-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyna-7-yl]cykloheksan-1-ol (142)



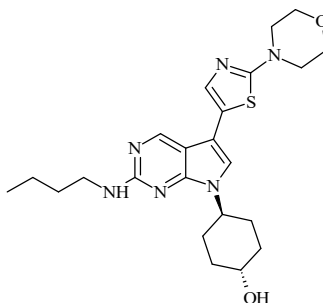
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnobrazowego osadu (82,1 mg, 62,3%).

MS APCI: m/z 455,6 $[\text{M}+\text{H}]^-$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.64 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.57 – 4.41 (m, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.56 – 3.40 (m, 6H), 2.21 – 2.03 (m, 4H), 1.93 – 1.77 (m, 2H), 1.75 – 1.55 (m, 10H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 163.66 (s), 159.22 (s), 153.80 (d, $J = 16.4$ Hz), 141.40 (s), 121.30 (s), 116.98 (s), 110.29 (s), 106.11 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 48.37 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 24.97 (s), 23.31 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(morfolin-4-yl)-1,3-tiazol-5-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyna-7-yl]cykloheksan-1-ol (143)



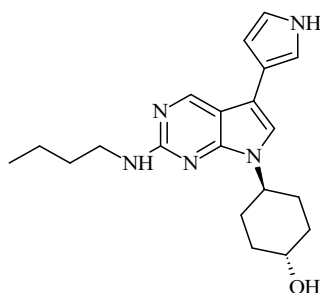
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (41,4mg, 100%).

MS ESI: m/z 457,6 $[\text{M}+\text{H}]^-$

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (s, 1H), 7.31 – 7.25 (m, 1H), 6.87 (s, 1H), 4.97 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.55 – 4.43 (m, 1H), 3.89 – 3.71 (m, 5H), 3.56 – 3.41 (m, 6H), 2.12 (t, *J* = 13.0 Hz, 4H), 1.96 – 1.75 (m, 2H), 1.72 – 1.40 (m, 8H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.13 (s), 157.32 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 132.59 (s), 115.95 (s), 114.71 (s), 114.35 (s), 107.70 (s), 68.06 (s), 67.41 (s), 55.11 (s), 48.74 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1*H*-pirol-3-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]-cykloheksan-1-ol (144)



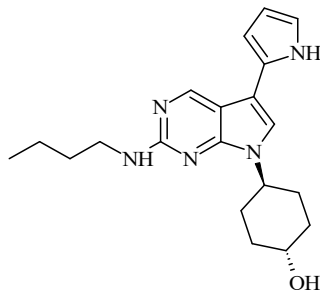
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (65,6 mg, 100%).

MS ESI: m/z 354,6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.75 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.76 (dd, *J* = 4.6, 2.5 Hz, 1H), 6.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.33 (dd, *J* = 4.0, 2.4 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.42 – 4.29 (m, 1H), 3.52 (dt, *J* = 8.1, 6.1 Hz, 1H), 3.38 – 3.25 (m, 2H), 1.91 (dt, *J* = 20.5, 6.3 Hz, 6H), 1.61 – 1.48 (m, 2H), 1.35 (tt, *J* = 12.6, 6.4 Hz, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 127.31 (s), 125.34 (s), 120.04 (s), 116.50 (s), 116.27 (s), 110.36 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1*H*-pirol-2-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]-cykloheksan-1-ol (145)



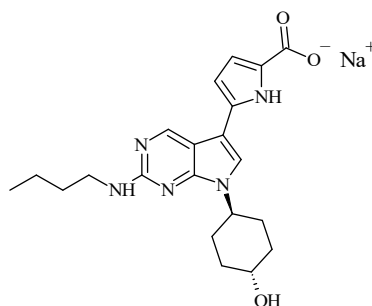
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnobrązowego osadu (12 mg, 8%).

MS APCI: m/z 354,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.64 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.61 – 4.41 (m, 1H), 3.84 – 3.67 (m, 1H), 3.55 – 3.39 (m, 2H), 2.22 – 2.03 (m, 4H), 1.92 – 1.76 (m, 2H), 1.69 – 1.53 (m, 4H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.83 (s), 153.39 (s), 153.14 (s), 131.70 (s), 123.00 (s), 122.12 (s), 117.14 (s), 114.10 (s), 111.90 (s), 111.04 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]-1*H*-pirolo-2-karboksylan sodu (146)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (56 mg, 21,7%).

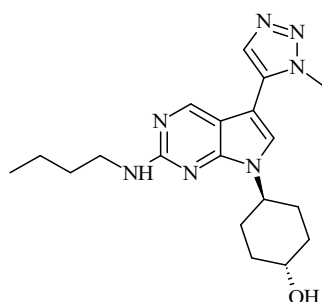
MS APCI: m/z 420,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.27 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 6.76 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 4.35 (s, 1H), 3.56 – 3.44 (m, 1H), 3.35 – 3.25 (m,

2H), 2.02 – 1.86 (m, 4H), 1.86 – 1.70 (m, 2H), 1.61 – 1.47 (m, 2H), 1.35 (dd, $J = 13.6$, 6.0 Hz, 4H), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.83 (s), 158.83 (s), 153.39 (s), 153.14 (s), 133.21 (s), 129.71 (s), 121.92 (s), 117.14 (s), 115.40 (s), 115.14 (s), 113.88 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1-metylo-1*H*-1,2,3-triazol-5-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (147)



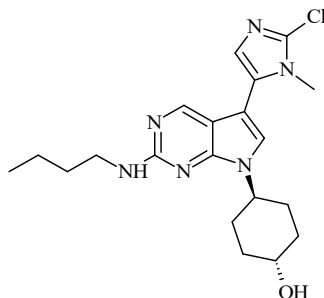
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci brązowego osadu (464 mg, 100%).

MS APCI: m/z 370,5 [M+H]⁺

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.56 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 4.57 (dd, $J = 15.0$, 9.0 Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H), 3.72 (dt, $J = 15.3$, 5.6 Hz, 1H), 3.45 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.18 – 2.00 (m, 6H), 1.75 – 1.60 (m, 2H), 1.60 – 1.40 (m, 4H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 1.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 158.31 (s), 153.12 (s), 147.86 (s), 123.68 (s), 109.58 (s), 100.24 (s), 68.76 (s), 53.34 (s), 40.83 (s), 34.85 (s), 33.86 (s), 31.21 (s), 29.80 (s), 19.73 (s), 12.78 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2-chloro-1-metylo-1*H*-imidazol-5-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-
d]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (148)**



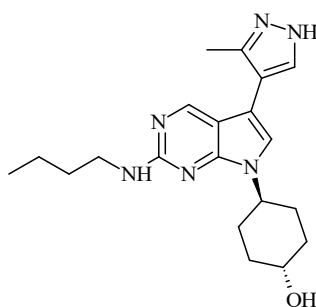
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci kremowego osadu (82,5 mg, 72,6%).

MS ESI: m/z 403,9 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.55 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.87 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.48 – 4.35 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.59 – 3.47 (m, 1H), 3.31 (dd, *J* = 14.9, 5.8 Hz, 2H), 2.06 – 1.83 (m, 6H), 1.61 – 1.48 (m, 2H), 1.45 – 1.27 (m, 4H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.22 (s), 153.80 (d, *J* = 16.4 Hz), 130.34 (s), 128.06 (s), 123.96 (s), 119.59 (s), 118.95 (s), 116.98 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 31.91 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(3-metylo-1*H*-pirazol-4-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-
d]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (149)**



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (56,9 mg, 69,8%).

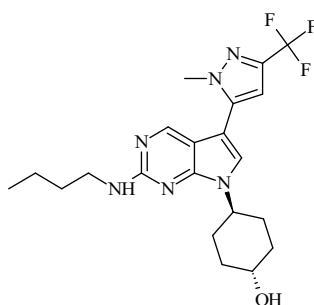
MS APCI: m/z 369,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.73 – 12.35 (m, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.11 – 7.55 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.71 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.39 (dd, *J* = 13.7,

9.5 Hz, 1H), 3.55 (dd, $J = 12.5, 8.2$ Hz, 1H), 3.37 – 3.24 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.07 – 1.80 (m, 6H), 1.54 (dd, $J = 14.4, 7.5$ Hz, 2H), 1.46 – 1.27 (m, 3H), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 159.56 (s), 155.93 (s), 152.79 (s), 142.78 (s), 130.25 (s), 116.05 (s), 115.72 (s), 115.36 (s), 113.97 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s), 13.47 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-metylo-3-(trifluorometylo)-1*H*-pirazol-5-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (150)



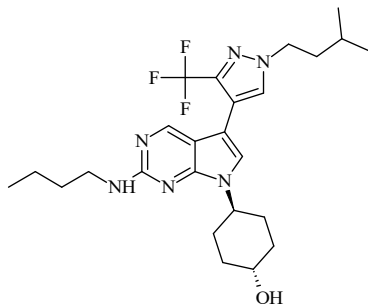
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (13,4 mg, 4,52%).

MS APCI: m/z 437,6 [M+H]⁺

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 8.47 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.62 – 4.48 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.70 (dt, $J = 15.1, 5.5$ Hz, 1H), 3.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.16 – 1.96 (m, 6H), 1.64 (dt, $J = 14.7, 7.3$ Hz, 2H), 1.57 – 1.40 (m, 4H), 0.99 (dd, $J = 8.5, 6.1$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 159.22 (s), 153.80 (s), 140.04 (s), 132.80 (s), 130.88 (s), 126.33 (s), 116.98 (s), 112.73 (s), 106.11 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 38.48 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(3-metylobutylo)-3-(trifluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (151)



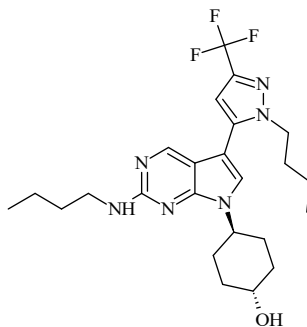
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtej żywicy (40,3 mg, 11,4%).

MS APCI: m/z 493,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 5.04 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.51 (tt, *J* = 11.1, 3.4 Hz, 1H), 4.27 – 4.17 (m, 2H), 3.85 – 3.69 (m, 1H), 3.54 – 3.42 (m, 2H), 2.10 (dd, *J* = 19.8, 9.1 Hz, 4H), 1.97 – 1.75 (m, 4H), 1.72 – 1.53 (m, 4H), 1.45 (dd, *J* = 15.1, 7.5 Hz, 2H), 1.03 – 0.94 (m, 10H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.56 (s), 155.93 (s), 152.79 (s), 134.84 (s), 126.97 (s), 125.17 (s), 116.42 (s), 116.05 (s), 113.73 (s), 113.46 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 52.10 (s), 41.53 (s), 37.34 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 26.92 (s), 22.92 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[1-butyl-3-(trifluorometylo)-1*H*-pirazol-5-ilo]-2-(butylo-amino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (152)



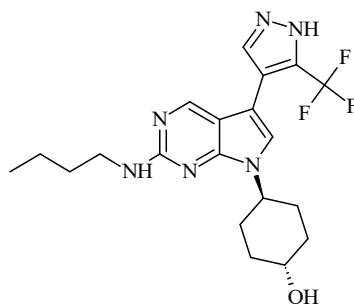
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (44,3 mg, 24,5%).

MS APCI: m/z 479,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.09 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.55 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.20 – 4.12 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.48 (q, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.23 – 2.10 (m, 4H), 1.96 – 1.75 (m, *J* = 24.8, 16.1 Hz, 4H), 1.72 – 1.56 (m, *J* = 19.3, 10.9 Hz, 4H), 1.54 – 1.39 (m, *J* = 15.0, 7.5 Hz, 2H), 1.28 – 1.20 (m, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.84 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.22 (s), 153.80 (s), 137.30 (s), 137.04 (s), 130.20 (s), 121.65 (s), 114.54 (s), 106.48 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 50.07 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 28.66 (s), 27.23 (s), 20.53 (s), 20.23 (s), 14.13 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[5-(trifluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (153)



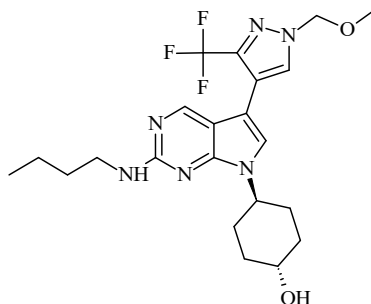
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (33,5 mg, 26,3%).

MS APCI: m/z 423,5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (s, 1H), 7.82 – 7.77 (m, 1H), 6.99 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.58 – 4.45 (m, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 1H), 3.52 – 3.41 (m, 2H), 2.22 – 2.07 (m, 4H), 1.97 – 1.81 (m, 2H), 1.70 – 1.55 (m, 4H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.22 (s), 156.11 (s), 153.99 (s), 134.33 (s), 132.73 (s), 120.17 (s), 114.34 (s), 111.43 (s), 110.39 (s), 109.26 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(metoksymetylo)-3-(trifluorometylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-7-ylo]cykloheksan-1-ol (154)



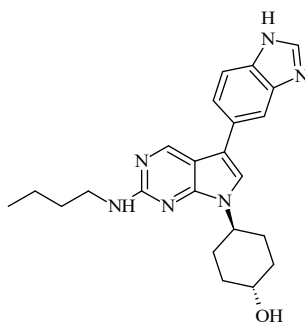
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (120 mg, 60,1%).

MS APCI: m/z 467,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.98 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.62 – 4.43 (m, 1H), 3.90 – 3.71 (m, 1H), 3.55 – 3.44 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 2.14 (t, *J* = 11.5 Hz, 4H), 2.00 – 1.79 (m, 2H), 1.66 – 1.53 (m, 4H), 1.53 – 1.37 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.56 (s), 155.93 (s), 152.79 (s), 131.68 (s), 124.25 (s), 116.42 (s), 116.05 (s), 113.46 (s), 106.85 (s), 78.13 (s), 68.06 (s), 56.64 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(1*H*-1,3-benzodiazol-5-ilo)-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (155)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci żółtego osadu (92,5 mg, 18,3%).

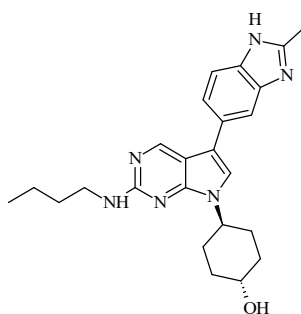
MS APCI: m/z 405,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.40 (ddd, *J* = 11.8, 8.3,

3.7 Hz, 1H), 3.70 – 3.55 (m, 1H), 3.16 – 2.86 (m, 4H), 2.10 – 1.89 (m, 4H), 1.87 – 1.68 (m, 2H), 1.50 (ddd, $J = 23.3, 11.4, 2.8$ Hz, 4H), 1.41 – 1.28 (m, 3H), 0.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 158.00 (s), 152.59 (s), 148.75 (s), 140.61 (s), 136.77 (s), 128.64 (s), 121.45 (s), 118.46 (s), 116.03 (s), 111.73 (s), 109.75 (s), 68.86 (s), 51.69 (s), 48.81 (s), 40.77 (s), 33.70 (s), 31.16 (s), 30.00 (s), 29.06 (s), 19.54 (s), 13.22 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2-metylo-1*H*-1,3-benzodiazol-5-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (156)



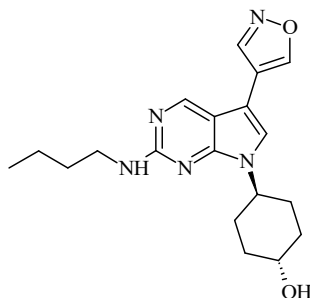
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnożółtego osadu (34,5 mg, 79,1%).

MS APCI: m/z 419,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.00 (s, 1H), 4.46 (t, $J = 11.9$ Hz, 1H), 3.68 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 2.06 (t, $J = 13.8$ Hz, 5H), 1.91 – 1.71 (m, 2H), 1.64 – 1.45 (m, 5H), 0.88 (dd, $J = 19.8, 12.5$ Hz, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.35 (s), 156.07 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 138.22 (s), 137.80 (s), 130.36 (s), 126.66 (s), 121.73 (s), 119.90 (s), 114.54 (s), 114.08 (s), 113.86 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.01 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1,2-oksazol-4-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (157)



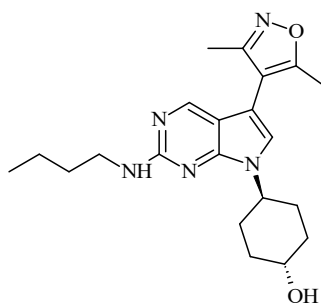
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (33,8 mg, 33,6%).

MS ESI: m/z 356,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 5.10 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.53 (tt, *J* = 11.9, 3.9 Hz, 1H), 3.77 (dt, *J* = 15.1, 5.4 Hz, 1H), 3.48 (td, *J* = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.25 – 2.03 (m, 5H), 1.86 (dt, *J* = 16.0, 6.5 Hz, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 5H), 1.54 – 1.38 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.70 (s), 155.21 (d, *J* = 12.5 Hz), 152.69 (s), 143.49 (s), 126.68 (s), 116.27 (s), 115.33 (s), 108.22 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(3,5-dimetylo-1,2-oksazol-4-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol (158)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (101 mg, 90,5%).

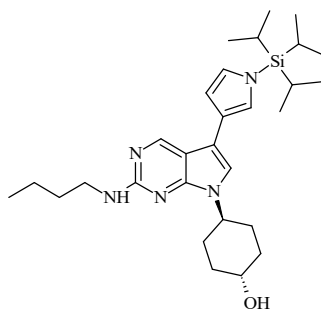
MS APCI: m/z 384,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.00 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.60 – 4.46 (m, 1H), 3.85 – 3.72 (m, 1H), 3.54 – 3.43 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.21

– 2.10 (m, 4H), 1.98 – 1.80 (m, 2H), 1.70 – 1.57 (m, 4H), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 161.52 (s), 160.09 (s), 156.82 (s), 153.40 (s), 153.18 (s), 124.33 (s), 120.21 (s), 116.01 (s), 94.31 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.05 (s), 11.31 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butylamino)-5-{1-[tris(propan-2-yl)silyl]-1*H*-pyrrol-3-yl}-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl]cyclohexan-1-ol (159)



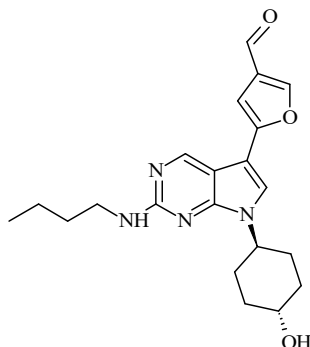
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnoczerwonego osadu (98,9 mg, 31%).

MS ESI: m/z 510,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.69 (s, 1H), 7.03 – 7.01 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.82 (dd, $J = 2.7, 2.1$ Hz, 1H), 6.50 (dd, $J = 2.7, 1.4$ Hz, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.51 (tt, $J = 11.9, 3.9$ Hz, 1H), 3.85 – 3.70 (m, 1H), 3.48 (td, $J = 7.0, 5.9$ Hz, 2H), 2.20 – 2.03 (m, 4H), 1.96 – 1.79 (m, 2H), 1.72 – 1.56 (m, 4H), 1.54 (dd, $J = 7.2, 3.7$ Hz, 1H), 1.46 (dtt, $J = 13.9, 6.9, 3.6$ Hz, 4H), 1.13 (d, $J = 7.4$ Hz, 18H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 124.61 (s), 120.64 (s), 119.46 (s), 116.27 (s), 111.05 (s), 104.78 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 23.07 (s), 20.23 (s), 19.53 (s), 14.02 (s).

5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]furano-3-karbaldehyd (160)



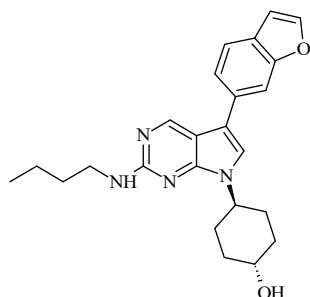
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (38,9 mg, 43,6%).

MS APCI: m/z 383,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.95 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.15 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.53 (ddd, *J* = 12.0, 8.3, 3.9 Hz, 1H), 3.78 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.48 (dd, *J* = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.23 – 2.06 (m, 4H), 1.95 – 1.78 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 4H), 1.45 (dq, *J* = 13.9, 7.1 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 183.40 (s), 156.03 (s), 155.92 (d, *J* = 22.9 Hz), 154.75 (s), 153.67 (s), 152.85 (s), 130.14 (s), 128.58 (s), 116.92 (s), 114.23 (s), 108.54 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(1-benzofuran-6-ylo)-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (161)



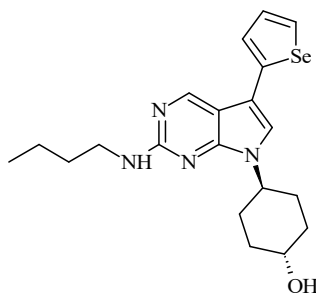
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci białego osadu (62,2 mg, 12,6%).

MS ESI: m/z 405,7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.79 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.51 (dt, *J* = 8.5, 5.1 Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.79 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 4.99 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.56 (tt, *J* = 11.9, 3.6 Hz, 1H), 3.87 – 3.70 (m, 1H), 3.49 (dd, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.23 – 2.06 (m, 4H), 1.98 – 1.82 (m, 2H), 1.78 (s, 2H), 1.71 – 1.58 (m, 3H), 1.48 (dt, *J* = 14.7, 5.1 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.35 (s), 153.70 (s), 152.45 (s), 149.70 (s), 145.85 (s), 131.02 (s), 126.66 (s), 125.91 (s), 123.82 (s), 120.34 (s), 119.90 (s), 113.86 (s), 107.42 (s), 105.97 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(selenofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (162)



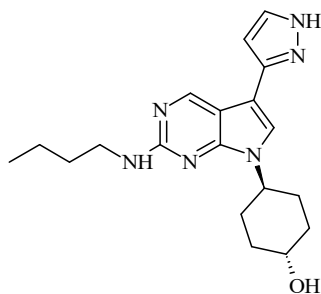
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnozielonego osadu (10 mg, 26.5%).

MS ESI: m/z 418,4 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 5.2, 1.5 Hz, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 4.59 – 4.46 (m, 1H), 3.80 – 3.76 (m, 1H), 3.49 (dd, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.23 – 2.08 (m, 4H), 1.97 – 1.80 (m, 2H), 1.71 – 1.55 (m, 4H), 1.53 – 1.41 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 200.98 (s), 160.74 (s), 154.23 (s), 151.97 (s), 145.53 (s), 127.26 (s), 123.81 (s), 119.40 (s), 116.66 (s), 116.03 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1*H*-pirazol-3-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (163)



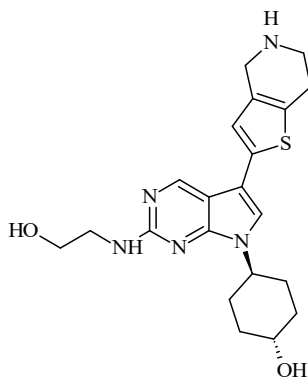
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (11,8 mg, 29,9%).

MS APCI: m/z 355,6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.78 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.48 – 6.43 (m, 1H), 4.49 (tt, *J* = 11.9, 3.8 Hz, 1H), 3.76 – 3.64 (m, 1H), 3.47 – 3.40 (m, 2H), 2.30 (s, 4H), 2.10 (dd, *J* = 19.1, 8.4 Hz, 4H), 1.84 (dt, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 1.66 – 1.53 (m, 2H), 1.48 – 1.35 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160.37 (s), 153.28 (s), 151.89 (s), 145.77 (s), 135.64 (s), 128.72 (s), 118.10 (s), 111.64 (s), 104.80 (s), 68.06 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 30.87 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-{4*H*,5*H*,6*H*,7*H*-tieno[3,2-*c*]pirydyn-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (164)



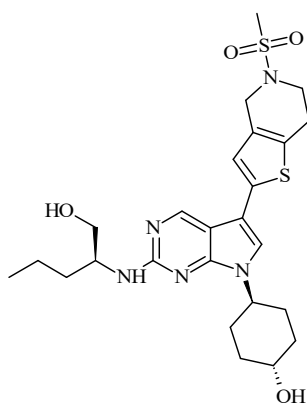
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci pomarańczowego osadu (48,5 mg, 8,64%).

MS APCI: m/z 414,5 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.73 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.71 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.38 (s, 1H), 3.79 (s, 2H), 3.72 – 3.23 (m, 8H), 3.04 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.91 (dd, *J* = 15.8, 10.2 Hz, 6H), 1.35 (dd, *J* = 23.4, 9.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159.13 (s), 155.54 (s), 154.67 (s), 131.17 (s), 129.18 (s), 128.12 (s), 127.14 (s), 123.66 (s), 114.35 (s), 113.00 (s), 68.06 (s), 60.68 (s), 55.11 (s), 44.06 (s), 41.94 (s), 30.58 (s), 27.23 (s), 25.70 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(2-{{(2*S*)-1-hydroksypentan-2-ylo}amino}-5-{5-metanosulfonylo-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*-tieno[3,2-*c*]pirydyn-2-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol (165)



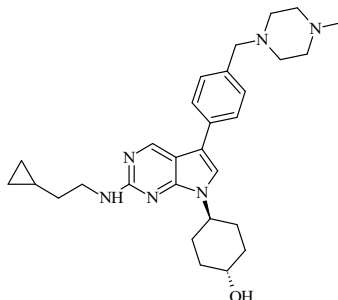
Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci jasnopomarańczowego osadu (145 mg, 96%).

MS APCI: m/z 534,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.73 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.59 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.46 – 4.31 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 4.04 – 3.92 (m, 1H), 3.50 (dd, *J* = 10.3, 4.7 Hz, 4H), 3.45 – 3.34 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 2.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.05 – 1.77 (m, 6H), 1.67 – 1.53 (m, 1H), 1.53 – 1.21 (m, 5H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159.74 (s), 156.08 (s), 155.35 (s), 134.29 (s), 132.15 (s), 129.18 (s), 127.40 (s), 123.77 (s), 115.20 (s), 113.00 (s), 68.06 (s), 64.76 (s), 55.11 (s), 54.21 (s), 45.53 (s), 44.15 (s), 39.53 (s), 32.97 (s), 30.58 (s), 28.12 (s), 27.23 (s), 19.07 (s), 14.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-cyklopropyloetylo)amino]-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)-metylo]fenylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol (1)



Tytułowy związek otrzymano zgodnie z ogólną procedurą B oraz C w postaci beżowego osadu (1,74 g, 53%).

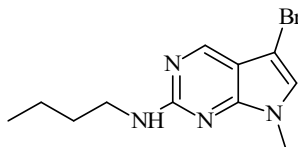
MS APCI: m/z 489,7 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.81 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.80 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.47 – 4.37 (m, 1H), 3.59 – 3.50 (m, 1H), 3.45 (s, 2H), 3.39 (dd, *J* = 14.1, 6.3 Hz, 2H), 2.44 – 2.25 (m, 8H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (dd, *J* = 28.8, 17.1 Hz, 6H), 1.48 (dd, *J* = 14.5, 7.1 Hz, 2H), 1.38 (t, *J* = 10.8 Hz, 2H), 0.75 (td, *J* = 7.4, 3.9 Hz, 1H), 0.42 (dt, *J* = 7.6, 4.7 Hz, 2H), 0.08 (q, *J* = 4.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.41 (s), 153.19 (s), 150.63 (s), 136.27 (s), 133.63 (s), 129.88 (s), 126.16 (s), 120.28 (s), 114.65 (s), 109.37 (s), 68.58 (s), 62.41 (s), 55.29 (s), 53.10 (s), 52.49 (s), 46.28 (s), 41.88 (s), 35.10 (s), 34.67 (s), 30.61 (s), 9.22 (s), 4.82 (s).

6.9 Synteza *N*-butylo-7-metylo-5-(tiofen-2-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-aminy (166)

6.9.1 5-bromo-*N*-butylo-7-metylo-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-amina (185)



Do roztworu 5-bromo-2-chloro-7-metylo-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny (1 g, 3,85 mmol) w 2-propanolu (7 ml) dodano *N*-butyloaminę (1,42 g, 19,3 mmol) i *N,N*-diizopropylaminię (0,747 g, 5,78 mmol). Otrzymany roztwór mieszano przez noc w temperaturze 80°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu

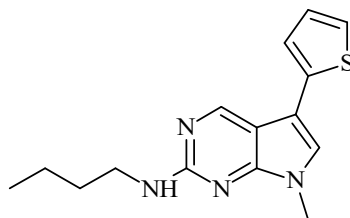
krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan, 6-8%) uzyskując związek **185** w postaci beżowego osadu (0,733 g, 67,1%).

MS APCI: m/z 284,2 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.44 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.51 – 1.37 (m, 2H), 0.99 (dd, *J* = 9.4, 5.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 159.16 (s), 151.99 (s), 148.03 (s), 124.91 (s), 110.08 (s), 86.72 (s), 40.30 (s), 30.84 (s), 28.62 (s), 19.23 (s), 12.26 (s).

6.9.2 *N*-butylo-7-metylo-5-(tiofen-2-yl)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-amina (**166**)



W kolbie okrągłodennej umieszczono związek **185** (101 mg, 0,356 mmol), kwas tiofeno-2-borowy (74,2 mg, 0,562 mmol), tetrakis(trifenylfosfino)pallad (0) (153 mg, 0,13 mmol), węglan potasu (86 mg, 0,616 mmol) oraz mieszaninę dioksan/woda (2,5 ml, 4:1 v/v). Otrzymany roztwór mieszano przez noc w temperaturze 100°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 3:7 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę rozcieńczono wodorowęglanem sodu (40 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 50 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄), a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (heptan/ octan etylu, 10%) uzyskując związek **166** w postaci jasnożółtego osadu (0,044 g, 43,4%).

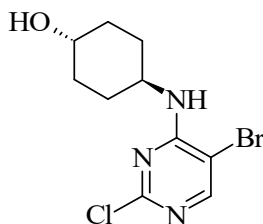
MS APCI: m/z 287,4 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.71 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.40 (dd, *J* = 5.1, 1.1 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 3.6, 1.0 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.59 – 3.51 (m, 2H), 1.79 – 1.64 (m, 2H), 1.48 (dq, *J* = 14.3, 7.2 Hz, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 159.42 (s), 152.91 (s), 149.75 (s), 136.39 (s), 133.94 (s), 130.12 (s), 127.91 (s), 123.21 (s), 108.18 (s), 31.17 (s), 29.99 (s), 19.62 (s), 13.72 (s).

6.10 Synteza (1*r*,4*r*)-4-{[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu (167)

6.10.1 (1*r*,4*r*)-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol (186)



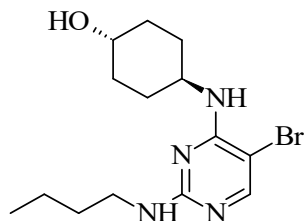
W kolbie okrągłodennej umieszczono 5-bromo-2,4-dichloropirymidynę (50 g, 213 mmol), *N,N*-diizopropyletyloaminy (36,9 g, 277 mmol) oraz 2-propanol (120 ml). Zawartość kolby ochłodzono do 0°C, a następnie przez 50 minut przy pomocy wkraplacza dodawano roztwór *trans*-4-aminocykloheksanolu (25,8 g, 219 mmol) w 2-propanolu (100 ml). Całość mieszano przez 4 godziny w 0°C, a następnie przez noc w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozcieńczono octanem etylu (1000 ml) i ekstrahowano nasyconym roztworem chlorku sodu (2 x 500 ml), a następnie wodą (500 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na_2SO_4), a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Bez konieczności oczyszczania uzyskano związek **186** w postaci białych kryształów (49,5 g, 99%).

MS APCI: m/z 307,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (s, 1H), 5.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.11 – 3.90 (m, 1H), 3.69 (tt, $J = 10.4, 4.2$ Hz, 1H), 2.25 – 2.10 (m, 2H), 2.10 – 1.94 (m, 2H), 1.75 (s, 1H), 1.58 – 1.41 (m, 2H), 1.41 – 1.25 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.39 (s), 158.79 (s), 156.30 (s), 102.93 (s), 69.60 (s), 49.34 (s), 33.68 (s), 30.42 (s).

6.10.2 (1*r*,4*r*)-4-{{5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol (187)



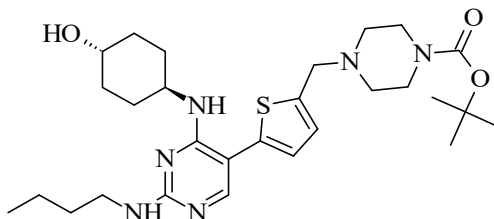
W kolbie okrągłodennej zawieszono związek **186** (69,1 g, 225mmol) w 2-propanolu (445 ml). Następnie dodano *N*-butyloaminę (116 g, 1577 mmol) oraz *N,N*-diizopropyletyloaminę (210,1 g, 1576 mmol). Całość mieszano przez noc w temperaturze 100°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (CH₃OH/DCM 5:95 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozcieńczono octanem etylu (2500 ml) i ekstrahowano wodą (3 x 1000 ml), a następnie nasyconym roztworem chlorku sodu (500 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄), a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Bez konieczności oczyszczania uzyskano związek **187** w postaci beżowych kryształów (75,97 g, 98,2%).

MS APCI: m/z 344,3 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.01 – 3.79 (m, 1H), 3.68 (tt, *J* = 10.4, 4.2 Hz, 1H), 3.38 – 3.23 (m, 3H), 2.21 – 2.08 (m, 2H), 2.08 – 1.97 (m, 2H), 1.64 – 1.49 (m, 2H), 1.49 – 1.34 (m, 4H), 1.33 – 1.20 (m, 2H), 0.98 – 0.88 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.05 (s), 158.25 (s), 155.50 (s), 91.82 (s), 69.81 (s), 48.91 (s), 41.45 (s), 33.97 (s), 32.15 (s), 30.62 (s), 20.15 (s), 13.85 (s).

6.10.3 tert-butylo-4-({5-[2-(butyloamino)-4-{{(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-amino}pirymidyn-5-ylo]tiofen-2-ylo}metylo)piperazyno-1-karboksylan (188)



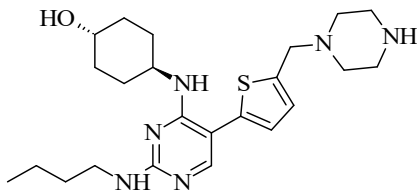
W kolbie okrągłodennej umieszczono związek **187** (550 mg, 1,6 mmol), ester pinakolowy kwasu 5-((4-Boc-piperazyno)metylo)-2-tiofenoboronowego (734 mg, 1,76 mmol), tetrakis(trifenylfosfino)pallad (0) (567 mg, 0,481 mmol), węglan potasu (268 mg, 1,92 mmol) oraz mieszaninę dioksan/woda (10 ml, 4:1 v/v). Otrzymany roztwór mieszano przez noc w temperaturze 100°C. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (CH₃OH/DCM 10:90 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę rozcieńczono nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (100 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 200 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄), a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (DCM/CH₃OH, 1-10%) uzyskując związek **188** w postaci pomarańczowego oleju (135,3 mg, 24,6%).

MS APCI: m/z 545,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 6H), 7.47 (d, *J* = 5.5 Hz, 12H), 7.40 (s, 6H), 4.02 – 3.98 (m, 12H), 3.67 – 3.57 (m, 18H), 3.38 – 3.31 (m, 18H), 3.30 – 3.26 (m, 12H), 3.05 – 3.01 (m, 12H), 2.66 – 2.62 (m, 12H), 2.09 (s, 6H), 2.06 – 1.90 (m, 25H), 1.94 – 1.90 (m, 1H), 1.67 (s, 6H), 1.58 – 1.48 (m, 29H), 1.48 – 1.45 (m, 50H), 1.45 – 1.38 (m, 23H), 1.01 – 0.97 (m, 18H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.58 (s), 159.56 (s), 158.33 (s), 155.02 (s), 154.78 (s), 125.85 (s), 125.08 (s), 119.95 (s), 118.69 (s), 80.96 (s), 70.89 (s), 59.19 (s), 52.18 (s), 51.70 (s), 44.41 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 28.52 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**6.10.4 (1*r*,4*r*)-4-{[2-(butyloamino)-5-{5-[(piperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}piry-
midyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol (167)**



W kolbie okrągłodennej umieszczono związek **188** (135 mg, 0,248 mmol), który rozpuszczono w dichlorometanie (3 ml). Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do 0-4°C, a następnie dodano do niej kwas trifluorooctowy (1142 mg, 9,91 mmol). Otrzymany roztwór mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC na żelu krzemionkowym (CH₃OH/DCM 10:90 v/v). Po zakończeniu reakcji, mieszaninę zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozcieńczono wodą (20 ml), a następnie dodano 2 M roztwór wodorotlenku sodu do osiągnięcia pH=12. Po zneutralizowaniu mieszaniny przeniesiono ją do rozdzielacza i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 200 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄), a następnie zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (DCM/5% CH₃OH/1% TEA) uzyskując związek **167** w postaci jasnożółtego osadu (125,9 mg, 93,3%).

MS APCI: m/z 445,7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.62 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.06 – 3.91 (m, 1H), 3.76 (d, *J* = 0.4 Hz, 2H), 3.56 (dt, *J* = 10.0, 4.6 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 11.9, 6.7 Hz, 4H), 2.68 – 2.55 (m, 4H), 2.00 (dd, *J* = 29.9, 11.2 Hz, 4H), 1.66 – 1.54 (m, 2H), 1.45 – 1.24 (m, 8H), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.62 (s), 159.29 (s), 155.23 (s), 141.27 (s), 137.11 (s), 126.59 (s), 124.70 (s), 69.75 (s), 57.88 (s), 54.09 (s), 48.53 (s), 45.95 (s), 41.18 (s), 33.91 (s), 31.98 (s), 30.52 (s), 29.62 (s), 20.12 (s), 13.82 (s).

7. Doktorat wdrożeniowy – wdrożenie do przemysłu

Powyższa rozprawa doktorska wpisuje się w poczet doktoratu wdrożeniowego i została wykonana w ramach współpracy pomiędzy Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu a firmą farmaceutyczną Celon Pharma S.A. Celem pracy było wykorzystanie metod bioinformatycznych *in silico* do opracowania nowych małych inhibitorów MerTK o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL), jak również zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowej klasy związków małowcząsteczkowych, które selektywnie hamują kinazę Mer. Praca ta dotyczy także wykorzystania technologii chemii mikrofalowej oraz przepływowej do optymalizacji syntezy nowych inhibitorów. Spośród całej biblioteki zsyntetyzowanych związków, dla których wykonano badania aktywności oraz fizykochemiczne wybrano 3 cząsteczki wiodące do dalszych analiz. Uzyskano dla nich wyniki stabilności i aktywności metabolicznej, a także zostały przygotowane w odpowiedniej ilości do badań toksykologicznych oraz I fazy badań klinicznych. Efektem doktoratu jest wdrożenie technologii syntezy wybranych „leadów”, co umożliwi realizację kolejnych etapów prac rozwojowych i wybranie kandydata na lek przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej. Pomyślna realizacja tych etapów pozwoli na poprawę jakości życia pacjentów z ALL, co było głównym przesłaniem podjęcia pracy doktorskiej i wdrożenia jej wyników.

8. Literatura

- ¹ National Cancer Institute, SEER cancer statistics review 2006-2010., <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>, Accessed, January, 9, 2014.
- ² Bhatia S., Robison LL., Epidemiology of leukemia and lymphoma., *Current Opinion in Hematology*, **1999**; 6(4): 201-204.
- ³ Yoshinaga S., Mabuchi K., Sigurdson A. J., Doody M. M., Ron E., Cancer risks among radiologists and radiologic technologists: review of epidemiologic studies., *Radiology*, **2004**; 233(2): 313-321.
- ⁴ Brenner D. J., Hall E. J., Computed tomography an increasing source of radiation exposure., *The New England Journal of Medicine*, **2007**; 357(22): 2277-2284.
- ⁵ Khalade A., Jaakkola M. S., Pukkala E., Jaakkola J. J., Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis., *Environmental Health*, **2010**; 9: 31.
- ⁶ Buffler P. A., Kwan M. L., Reynolds P., Urayama K. Y., Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence., *Cancer Investigation*, **2005**; 23(1): 60-75.
- ⁷ Lichtman M. A., Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma., *Oncologist*, **2010**; 15(10): 1083-1101.
- ⁸ Diller L., Clinical practice. Adult primary care after childhood acute lymphoblastic leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **2011**; 365(15): 1417-1424.
- ⁹ Sinigaglia R., Gigante C., Bisinella G., Varotto S., ZanESCO L., Turra S., Musculoskeletal manifestations in pediatric acute leukemia., *Journal of Pediatric Orthopaedics*, **2008**; 28(1): 20-28.
- ¹⁰ Ma S. K., Chan G. C., Ha S. Y., Chiu D. C. , Lau Y. L., Chan L. C., Clinical presentation, hematologic features and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia: a review of 73 cases in Hong Kong., *Hematological Oncology*, **1997**; 15(3): 141-149.
- ¹¹ Rogalsky R. J., Black G. B., Reed M. H., Orthopaedic manifestations of leukemia in children., *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **1986**; 68(4): 494-501.
- ¹² Cornell R. F., Palmer J., Adult acute leukemia., *Disease-a-Month*, **2012**; 58(4): 219-238.
- ¹³ Savage D. G., Szydlo R. M., Goldman J. M., Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period., *British Journal of Haematology*, **1997**; 96(1): 111-116.

- ¹⁴ Yee K. W., O'Brien S. M., Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment., *Mayo Clinic Proceedings*, **2006**; 81(8): 1105-1129.
- ¹⁵ National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia., http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf, Accessed January 9, **2014**.
- ¹⁶ Vardiman J. W., Thiele J., Arber D. A., Brunning R. D., Borowitz M. J., Porwit A., Harris N. L., Le Beau M. M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C. D., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes., *Blood*, **2009**; 114(5): 937-951.
- ¹⁷ Sawyers C. L., Chronic myeloid leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **1999**; 340(17): 1330-1340.
- ¹⁸ Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating M. J., Montserrat E., Rai K. R., Kipps T. J., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines., *Blood*, **2008**; 111(12): 5446-5456.
- ¹⁹ Moen M. D., McKeage K., Plosker G. L., Siddiqui M. A., Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia., *Drugs*, **2007**; 67(2): 299-320.
- ²⁰ National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: prevention and treatment of cancer-related infections., http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/infections.pdf, Accessed January 9, **2014**.
- ²¹ Friedman D. L., Whitton J., Leisenring W., Mertens A. C., Hammond S., Stovall M., Donaldson S. S., Meadows A. T., Robison L. L., Neglia J. P., Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study., *Journal of the National Cancer Institute*, **2010**; 102(14): 1083-1095.
- ²² Gurney J. G., Severson R. K., Davis S., Robison L. L., Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type., *Cancer*, **1995**; 75(8): 2186-2195.
- ²³ Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®), Patient version, *National Cancer Institute*, <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>.
- ²⁴ a. Bathia S., Robinson L., Epidemiology of leukemia in childhood. In: Nathan D. G., Orkin S. H., Ginsburg D., Look A. T., Nathan and Oski's Hematology of Infancy and

childhood., 6th., *Philadelphia: Saunders*; 2003; 1081-1100. b. Lustosa de Sousa D. W., Valdeci de Almeida Ferreira F., Félix F. H. C., de Oliveira Lopes M. V., Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival., *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **2015**; 37(4): 223-229.

²⁵ National Cancer Institute, SEER Cancer Statistics Review 1975–2006, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, Accessed January 23, **2009**.

²⁶ Spector L. G., Ross J. A., Robison L. L., Epidemiology and etiology.. In: Pui CH, Childhood leukemias., *New York: Cambridge University Press*, **2006**; 48-66.

²⁷ Pui C. H., Robison L. L., Look A. T., Acute lymphoblastic leukemia., *The Lancet*, **2008**; 371(9617): 1030-1043.

²⁸ Borowitz M. J., Devidas M., Hunger S. P., Bowman W. P., Carroll A. J., Carroll W. L., Linda S., Martin P. L., Pullen D. J., Viswanatha D., Willman C. L., Winick N., Camitta B. M., Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group Study, *Blood*, **2008**; 111(12): 5477-5485.

²⁹ Onciu M., Acute lymphoblastic leukemia, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **2009**; 23(4): 655-674.

³⁰ Pui C. H., Acute lymphoblastic leukemia. Childhood leukemias., *New York: Cambridge University Press*; **2006**; 439-472.

³¹ Pui C. H., Evans W. E., Acute lymphoblastic leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **1998**; 339(9): 605-615.

³² Gilliland D. G., Tallman M. S., Focus on acute leukemias., *Cancer Cell*, **2002**; 1(5): 417-420.

³³ Ma X., Edmonson M., Yergeau D., Muzny D. M., Hampton O. A., Rusch M., Song G., Easton J., Harvey R. C., Wheeler D. A., Ma J., Doddapaneni H. V., Vadodaria B., Wu G., Nagahawatte P., Carroll W. L., Chen I. M., Gastier-Foster J. M., Relling M. V., Smith M. A., Devidas M., Auvi J. M. G., Downing J. R., Loh M. L., Willman C. L., Gerhard D. S., Mullighan C. G., Hunger S. P., Zhang J., Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia., *Nature Communications*, **2015**; 6: 6604.

³⁴ Nachman J. B., Heerema N. A., Sather H., Camitta B., Forestier E., Harrison C. J., Dastugue N., Schrappe M., Pui C. H., Basso G., Silverman L. B., Janka-Schaub G. E., Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia., *Blood*, **2007**; 110(4): 1112-1115.

- ³⁵ Zhang J., Ding L., Holmfeldt L., Wu G., Heatley S. L., Payne-Turner D., Easton J., Chen X., Wang J., Rusch M., Lu C., Chen S. C., Wei L., Collins-Underwood J. R., Ma J., Roberts K. G., Pounds S. B., Ulyanov A., Becksfort J., Gupta P., Huether R., Kriwacki R. W., Parker M., McGoldrick D. J., Zhao D., Alford D., Espy S., Bobba K. C., Song G., Pei D., Cheng C., Roberts S., Barbato M. I., Campana D., Coustan-Smith E., Shurtleff S. A., Raimondi S. C., Kleppe M., Cools J., Shimano K. A., Hermiston M. L., Doulatov S., Eppert K., Laurenti E., Notta F., Dick J. E., Basso G., Hunger S. P., Loh M. L., Devidas M., Wood B., Winter S., Dunsmore K. P., Fulton R. S., Fulton L. L., Hong X., Harris C. C., Dooling D. J., Ochoa K., Johnson K. J., Obenauer J. C., Evans W. E., Pui C. H., Naeve C. W., Ley T. J., Mardis E. R., Wilson R. K., Downing J. R., Mullighan C. G., The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia., *Nature*, **2012**; 481(7380): 157-163.
- ³⁶ Stephen P., Hunger M. D., Charles G., Mullighan M. D., Acute Lymphoblastic Leukemia in Children, *The New England Journal of Medicine*, **2015**; 373: 1541-1552.
- ³⁷ Smith M., Arthur D., Camitta B., Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia., *Journal of Clinical Oncology*, **1996**; 14(1): 18-24.
- ³⁸ Pui C. H., Sandlund J. T., Pei D., Rivera G. K., Howard S. C., Ribeiro R. C., Rubnitz J. E., Razzouk B. I., Hudson M. M., Cheng C., Raimondi S. C., Behm F. G., Downing J. R., Relling M. V., Evans W. E., Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children., *JAMA*, **2003**; 290(15): 2001-2007.
- ³⁹ Hunger S. P., Lu X., Devidas M., Camitta B. M., Gaynon P. S., Winick N. J., Reaman G. H., Carroll W. L., Improved survival for children and adolescents from 1990-2005: a report from the Children's Oncology Group., *Journal of Clinical Oncology*, **2012**; 30(14): 1663-1669.
- ⁴⁰ Mullighan C. G., Su X., Zhang J., Radtke I., Phillips L. A. A., Miller C. B., Ma J., Liu W., Cheng C., Schulman B. A., Harvey R. C., Chen I. M., Clifford R. J., Carroll W. L., Reaman G., Bowman W. P., Devidas M., Gerhard D. S., Yang W., Relling M. V., Shurtleff S. A., Campana D., Borowitz M. J., Pui C. H., Smith M., Hunger S. P., Willman C. L., Downing J. R., Deletion of *IKZF1* and prognosis in acute lymphoblastic leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **2009**; 360(5): 470-480.
- ⁴¹ Pui C. H., Pei D., Coustan-Smith E., Jeha S., Cheng C., Bowman W. P., Sandlund J. T., Ribeiro R. C., Rubnitz J. E., Inaba H., Bhojwani D., Gruber T. A., Leung W. H., Downing J. R., Evans W. E., Relling M. V., Campana D., Clinical utility of sequential minimal

residua disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study., *The Lancet Oncology*, **2015**; 16(4): 465-474.

⁴² Faham M., Zheng J., Moorhead M., Carlton V. E. H., Stow P., Coustan-Smith E., Pui C. H., Campana D., Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia., *Blood*, **2012**; 120(26): 5173-5180.

⁴³ Gokbuget N., Hoelzer D., Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia., *Seminars in Hematology*, **2009**; 46(1): 64-75.

⁴⁴ Faderl S., Jeha S., Kantarjian H. M., The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia., *Cancer*, **2003**; 98(7): 1337-1354.

⁴⁵ Cooper S. L., Brown P. A., Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, *Pediatric Clinics of North America*, **2015**; 62(1): 61-73.

⁴⁶ Thomas D. A., O'Brien S., Faderl S., Garcia-Manero G., Ferrajoli A., Wierda W., Ravandi F., Verstovsek S., Jorgensen J. L., Bueso-Ramos C., Andreeff M., Pierce S., Garris R., Keating M. J., Cortes J., Kantarjian H. M., Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia., *Journal of Clinical Oncology*, **2010**; 28(24): 3880-3889.

⁴⁷ Haydu J. E., Ferrando A. A., Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia., *Current Opinion in Hematology*, **2013**; 20(4): 369-373.

⁴⁸ Seeger K., Stackelberg A. V., Taube T., Buchwald D., Körner G., Suttorp M., Dörffel W., Tausch W., Henze G., Relapse of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis., *Journal of Clinical Oncology*, **2001**; 19(13): 3188-3193.

⁴⁹ Heerema N. A., Carroll A. J., Devidas M., Loh M. L., Borowitz M. J., Gastier-Foster J. M., Larsen E. C., Mattano L. A., Maloney K. W., Willman C. L., Wood B. L., Winick N. J., Carroll W. L., Hunger S. P., Raetz E. A., Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group., *Journal of Clinical Oncology*, **2013**; 31(27): 3397-3402.

⁵⁰ Giebel S., Czyz A., Ottmann O., Baron F., Brissot E., Ciceri F., Cornelissen J. J., Esteve J., Gorin N. C., Savani B., Schmid C., Mohty M., Nagler A., Use of tyrosine kinase inhibitors to prevent relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for

patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a position statement of the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation., *Cancer*, **2016**; 122(19): 2941-2951.

⁵¹ Schrappe M., Hunger S. P., Pui C. H., Saha V., Gaynon P. S., Baruchel A., Conter V., Otten J., Ohara A., Versluys A. B., Escherich G., Heyman M., Silverman L. B., Horibe K., Mann G., Camitta B. M., Harbott J., Riehm H., Richards S., Devidas M., Zimmermann M., Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **2012**; 366(15): 1371-1381.

⁵² Borowitz M. J., Devidas M., Hunger S. P., Bowman W. P., Carroll A. J., Carroll W. L., Linda S., Martin P. L., Pullen D. J., Viswanatha D., Willman C. L., Winick N., Camitta B. M., Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study., *Blood*, **2008**; 111(12): 5477-5485.

⁵³ Conter V., Bartram C. R., Valsecchi M. G., Schrauder A., Panzer-Grümayer R., Möricke A., Aricò M., Zimmermann M., Mann G., De Rossi G., Stanulla M., Locatelli F., Basso G., Niggli F., Barisone E., Henze G., Ludwig W. D., Haas O. A., Cazzaniga G., Koehler R., Silvestri D., Bradtke J., Parasole R., Beier R., van Dongen J. J. M., Biondi A., Schrappe M., Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study., *Blood*, **2010**; 115(16): 3206-3214.

⁵⁴ Patte C., Auperin A., Michon J., Behrendt H., Leverger G., Frappaz D., Lutz P., Coze C., Perel Y., Raphaël M., Terrier-Lacombe M. J., The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia., *Blood*, **2001**; 97(11): 3370-3379.

⁵⁵ Pui C. H., Evans W. E., Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia, *The New England Journal of Medicine*, **2006**; 354(2): 166-178.

⁵⁶ Schrappe M., Hunger S. P., Pui C. H., Saha V., Gaynon P. S., Baruchel A., Conter V., Otten J., Ohara A., Versluys A. B., Escherich G., Heyman M., Silverman L. B., Horibe K., Mann G., Camitta B. M., Harbott J., Riehm H., Richards S., Devidas M., Zimmermann M., Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **2012**; 366(15): 1371-1381.

⁵⁷ Escherich G., Zimmermann M., Janka-Schaub G., Doxorubicin or daunorubicin given upfront in a therapeutic window are equally effective in children with newly diagnosed

acute lymphoblastic leukemia. A randomized comparison in trial CoALL 07-03., *Pediatric Blood & Cancer*, **2013**; 60(2): 254-257.

⁵⁸ Mitchell C. D., Richards S. M., Kinsey S. E., Lilleyman J., Vora A., Eden T. O. B., Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial., *British Journal of Haematology*, **2005**; 129(6): 734-745.

⁵⁹ Avramis V. I., Sencer S., Periclou A. P., Sather H., Bostrom B. C., Cohen L. J., Ettinger A. G., Ettinger L. J., Franklin J., Gaynon P. S., Hilden J. M., Lange B., Majlessipour F., Mathew P., Needle M., Neglia J., Reaman G., Holcenberg J. S., Stork L., A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study., *Blood*, **2002**; 99(6): 1986–1994.

⁶⁰ Gaynon P. S., Trigg M. E., Heerema N. A., Sensel M. G., Sather H. N., Hammond G. D., Bleyer W. A., Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995., *Leukemia*, **2000**; 14(12): 2223-2233.

⁶¹ Pession A., Valsecchi M. G., Masera G., Kamps W. A., Magyarosy E., Rizzari C., van Wering E. R., Nigro L. L., van der Does A., Locatelli F., Basso G., Aricò M., Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose of L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia., *Journal of Clinical Oncology*, **2005**; 23(28): 7161-7167.

⁶² Annino L., Vegna M. L., Camera A., Specchia G., Visani G., Fioritoni G., Ferrara F., Peta A., Ciolli S., Deplano W., Fabbiano F., Sica S., Di Raimondo F., Cascavilla N., Tabilio A., Leoni P., Invernizzi R., Baccarani M., Rotoli B., Amadori S., Mandelli F., Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study., *Blood*, **2002**; 99(3): 863-871.

⁶³ Igarashi S., Manabe A., Ohara A., Kumagai M., Saito T., Okimoto Y., Kamijo T., Isoyama K., Kajiwara M., Sotomatsu M., Sugita K., Sugita K., Maeda M., Yabe H., Kinoshita A., Kaneko T., Hayashi Y., Ikuta K., Hanada R., Tsuchida M., No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol., *Journal of Clinical Oncology*, **2005**; 23(27): 6489-6498.

⁶⁴ Thomas D. A., Faderl S., Cortes J., O'Brien S., Giles F. J., Kornblau S. M., Garcia-Manero G., Keating M. J., Andreeff M., Jeha S., Beran M., Verstovsek S., Pierce S.,

Letvak L., Salvado A., Champlin R., Talpaz M., Kantarjian H., Treatment of Philadelphia chromosomepositive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate., *Blood*, **2004**; 103(12): 4396-4407.

⁶⁵ Lee S., Kim Y. J., Min C. K., Kim H. J., Eom K. S., Kim D. W., Lee J. W., Min W. S., Kim C. C., The effect of first-line imatinib interim therapy on the outcome of allogeneic stem cel transplantation in adults with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia., *Blood*, **2005**; 105(9): 3449-3457.

⁶⁶ Seibel N. L., Steinherz P. G., Sather H. N., Nachman J. B., Delaat C., Ettinger L. J., Freyer D. R., Mattano Jr L. A., Hastings C. A., Rubin C. M., Bertolone K., Franklin J. L., Heerema N. A., Mitchell T. L., Pyesmany A. F., La M. K., Edens C., Gaynon P. S., Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group., *Blood*, **2008**; 111(5): 2548.

⁶⁷ Schrappe M., Reiter A., Ludwig W. D., Harbott J., Zimmermann M., Hiddemann W., Niemeyer C., Henze G., Feldges A., Zintl F., Kornhuber B., Ritter J., Welte K., Gadner H., Riehm H., Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90., *Blood*, **2000**; 95(11): 3310-3322.

⁶⁸ Kager L., Cheok M., Yang W., Zaza G., Cheng Q., Panetta J. C., Pui C. H., Downing J. R., Relling M. V., Evans W. E., Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics., *Journal of Clinical Investigation*, **2005**;115(1): 110-117.

⁶⁹ Pinheiro J. P., Boos J., The best way to use asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukaemia - still to be defined?, *British Journal of Haematology*, **2004**; 125(2): 117-127.

⁷⁰ Silverman L. B., Gelber R. D., Dalton V. K., Asselin B. L., Barr R. D., Clavell L. A., Hurwitz C. A., Moghrabi A., Samson Y., Schorin M. A., Arkin S., Declerck L., Cohen H. J., Sallan S. E., Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01, *Blood*, **2001**; 97(5): 1211-1218.

⁷¹ Lange B. J., Bostrom B. C., Cherlow J. M., Sensel M. G., La M. K. L., Rackoff W., Heerema N. A., Wimmer R. S., Trigg M. E., Sather H. N., Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate- risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group., *Blood*, **2002**; 99(3): 825-833.

- ⁷² Hoelzer D., Gokbuget N., New approaches to acute lymphoblastic leukemia in adults: where do we go?, *Seminars in Oncology*, **2000**; 27(5): 540-559.
- ⁷³ Bhatia S., Landier W., Shangguan M., Hageman L., Schaible A. N., Carter A. R., Hanby C. L., Leisenring W., Yasui Y., Kornegay N. M., Mascarenhas L., Ritchey A. K., Casillas J. N., Dickens D. S., Meza J., Carroll W. L., Relling M. V., Wong F. L., Nonadherence to oral mercaptopurine and risk of relapse in Hispanic and non-Hispanic white children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's oncology group., *Journal of Clinical Oncology*, **2012**; 30(17): 2094-2101.
- ⁷⁴ Brackett J., Schafer E. S., Leung D. H., Bernhardt M. B., Use of allopurinol in children with acute lymphoblastic leukemia to reduce skewed thiopurine metabolism., *Pediatric Blood & Cancer*, **2014**; 61(6): 1114-1117.
- ⁷⁵ Eden T. O., Pieters R., Richards S., Systematic review of the addition of vincristine plus steroid pulses in maintenance treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia - an individual patient data meta-analysis involving 5,659 children., *British Journal of Haematology*, **2010**; 149(5): 722-733.
- ⁷⁶ Matloub Y., Lindemulder S., Gaynon P. S., Sather H., La M., Broxson E., Yanofsky R., Hutchinson R., Heerema N. A., Nachman J., Blake M., Wells L. M., Sorrell A. D., Masterson M., Kelleher J. F., Stork L. C., Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia, reported by the Children's Oncology Group., *Blood*, **2006**; 108(4): 1165-1173.
- ⁷⁷ Sirvent N., Suciú S., Riolland X., Millot F., Benoit Y., Plantaz D., Ferster A., Robert A., Lutz P., Nelken B., Plouvier E., Norton L., Bertrand Y., Otten J., Prognostic significance of the initial cerebrospinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881., *European Journal of Cancer*, **2011**; 47(2): 239-247.
- ⁷⁸ Hunault M., Harousseau J. L., Delain M., Truchan-Graczyk M., Cahn J. Y., Witz F., Lamy T., Pignon B., Jouet J. P., Garidi R., Caillot D., Berthou C., Guyotat D., Sadoun A., Sotto J. J., Lioure B., Casassus P., Solal-Celigny P., Stalnikiewicz L., Audhuy B., Blanchet O., Baranger L., Béné M. C., Ifrah N., Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation

(BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial., *Blood*, **2004**; 104(10): 3028-3037.

⁷⁹ Thomas X., Boiron J. M., Huguet F., Dombret H., Bradstock K., Vey N., Kovacsovics T., Delannoy A., Fegueux N., Fenaux P., Stamatoullas A., Vernant J. P. Tournilhac O., Buzyn A., Reman O., Charrin C., Boucheix C., Gabert J., Lhéritier V., Fiere D., Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial., *Journal of Clinical Oncology*, **2004**; 22(20): 4075-4086.

⁸⁰ Rocha V., Labopin M., Sanz G., Arcese W., Schwerdtfeger R., Bosi A., Jacobsen N., Ruutu T., de Lima M., Finke J., Frassoni F., Gluckman E., Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia., *The New England Journal of Medicine*, **2004**; 351(22): 2276-2285.

⁸¹ Goldstone A. H., Richards S. M., Lazarus H. M., Tallman M. S., Buck G., Fielding A. K., Burnett A. K., Chopra R., Wiernik P. H., Foroni L., Paietta E., Litzow M. R., Marks D. I., Durrant J., McMillan A., Franklin I. M., Luger S., Ciobanu N., Rowe J. M., In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/ maintenance chemotherapy in all patients: Final results of the International ALL trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993)., *Blood*, **2008**, 111(4): 1827-1833.

⁸² a. Marks D. I., Perez W. S., He W., Zhang M. J., Bishop M. R., Bolwell B. J., Bredeson C. N., Copelan E. A., Gale R. P., Gupta V., Hale G. A., Isola L. M., Jakubowski A. A., Keating A., Klumpp T. R., Lazarus H. M., Liesveld J. L., Maziarz R. T., McCarthy P. L., Sabloff M., Schiller G., Sierra J., Tallman M. S., Waller E. K., Wiernik P. H., Weisdorf D. J., Unrelated donor transplants in adults with Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia in first complete remission., *Blood*, **2008**, 112(2): 426-434.
b. Bassan R., Hoelzer D., Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia, *Journal of clinical oncology*, **2011**; 29(5): 532-543.

⁸³ Ciceri F., Labopin M., Aversa F., Rowe J. M., Bunjes D., Lewalle P., Nagler A., Di Bartolomeo P., Lacerda J. F., Stanghellini M. T. L., Polge E., Frassoni F., Martelli M. F., Rocha V., A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: A risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation., *Blood*, **2008**; 112(9): 3574-3581.

⁸⁴ Marks D. I., Paietta E. M., Moorman A. V., Richards S. M., Buck G., DeWald G., Ferrando A., Fielding A. K., Goldstone A. H., Ketterling R. P., Litzow M. R., Luger S.

M., McMillan A. K., Mansour M. R., Rowe J. M., Tallman M. S., Lazarus H. M., T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: Clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993)., *Blood*, **2009**; 114(25): 5136-5145.

⁸⁵ Thomas X., Boiron J. M., Huguet F., Dombret H., Bradstock K., Vey N., Kovacsovic T., Delannoy A., Fegueux N., Fenaux P., Stamatoullas A., Vernant J. P., Tournilhac O., Buzyn A., Reman O., Charrin C., Boucheix C., Gabert J., Lhéritier V., Fiere D., Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: Analysis of the LALA-94 trial., *Journal of Clinical Oncology*, **2004**; 22(20): 4075-4086.

⁸⁶ Kantarjian H., Thomas D., O'Brien S., Cortes J., Giles F., Jeha S., Bueso-Ramos C. E., Pierce S., Shan J., Koller C., Beran M., Keating M., Freireich E. J., Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia., *Cancer*, **2004**; 101(12): 2788-2801.

⁸⁷ Chen W., Karandikar N. J., McKenna R. W., Kroft S. H., Stability of leukemia-associated immunophenotypes in precursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: a single institution experience., *American Journal of Clinical Pathology*, **2007**; 127(1):39-46.

⁸⁸ Zuna J., Cave H., Eckert C., Szczepanski T., Meyer C., Mejstrikova E., Fronkova E., Muzikova K., Clappier E., Mendelova D., Boutard P., Schrauder A., Sterba J., Marschalek R., van Dongen J. J. M., Hrusak O., Sary J., Trka J., Childhood secondary ALL after ALL treatment., *Leukemia*, **2007**; 21(7): 1431-1435.

⁸⁹ Locatelli F., Schrappe M., Bernardo M. E., Rutella S., How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood*, **2012**; 120(14): 2807-2816.

⁹⁰ Raetz E. A., Bhatla T., Where do we stand in the treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia?, *Hematology: the American Society of Hematology Education Program*, **2012**; 2012: 129-136.

⁹¹ Meyer J. A., Wang J., Hogan L. E., Yang J. J., Dandekar S., Patel J. P., Tang Z., Zumbo P., Li S., Zavadil J., Levine R. L., Cardozo T., Hunger S. P., Raetz E. A., Evans W. E., Morrison D. J., Mason C. E., Carroll W. L., Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Nature Genetics*, **2013**; 45(3): 290-294.

⁹² Peters C., Schrappe M., von Stackelberg A., Schrauder A., Bader P., Ebell W., Lang P., Sykora K. W., Schrum J., Kremens B., Ehlert K., Albert M. H., Meisel R., Matthes-Martin S., Gungor T., Holter W., Strahm B., Gruhn B., Schulz A., Woessmann W., Poetschger U.,

Zimmermann M., Klingebiel T., Stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia: a prospective international multicenter trial comparing sibling donors with matched unrelated donors - the ALL-SCTBFM- 2003 trial., *Journal of Clinical Oncology*, **2015**; 33(11): 1265-1274.

⁹³ Nguyen K., Devidas M., Cheng S. C., La M., Raetz E. A., Carroll W. L., Winick N. J., Hunger S. P., Gaynon P. S., Loh M. L., Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study., *Leukemia*, **2008**; 22(12): 2142-2150.

⁹⁴ Eckert C., von Stackelberg A., Seeger K., Groeneveld T. W. L., Peters C., Klingebiel T., Borkhardt A., Schrappe M., Escherich G., Henze G., Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia - long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96., *European Journal of Cancer*, **2013**; 49(6): 1346-1355.

⁹⁵ Levine J. E., Barrett A. J., Zhang M. J., Arora M., Pulsipher M. A., Bunin N., Fort J., Loberiza F., Porter D., Giralt S., Drobyski W., Wang D., Pavletic S., Ringden O., Horowitz M. M., Collins Jr R., Donor leukocyte infusions to treat hematologic malignancy relapse following allo-SCT in a pediatric population., *Bone Marrow Transplant*, **2008**; 42(3): 201-205.

⁹⁶ a. <https://www.cancer.northwestern.edu/types-of-cancer/leukemia/CML.html> b. Shah N. P., Tran C., Lee F. Y., Chen P., Norris D., Sawyers C. L., Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor., *Science*, **2004**; 305(5682): 399-401.

⁹⁷ Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy., *Nature*, **2004**; 429(6990): 457-463.

⁹⁸ Pinheiro J. P., Boos J., The best way to use asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukaemia - still to be defined?, *British Journal of Haematology*, **2004**; 125(2): 117-127.

⁹⁹ Bomgaars L., Geyer J. R., Franklin J., Dahl G., Park J., Winick N. J., Klenke R., Berg S. L., Blaney S. M., Phase I trial of intrathecal liposomal cytarabine in children with neoplastic meningitis., *Journal of Clinical Oncology*, **2004**; 22(19): 3916-3921.

¹⁰⁰ Kurtzberg J., Ernst T. J., Keating M. J., Gandhi V., Hodge J. P., Kisor D. F., Lager J. J., Stephens C., Levin J., Krenitsky T., Elion G., Mitchell B. S., Phase I study of 506U78 administered on a consecutive 5-day schedule in children and adults with refractory hematologic malignancies., *Journal of Clinical Oncology*, **2005**; 23(15): 3396-3403.

- ¹⁰¹ Imai C., Iwamoto S., Campana D., Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells., *Blood*, **2005**; 106(1): 376-383.
- ¹⁰² Robinson D. R., Wu Y. M., Lin S. F., The protein tyrosine kinase family of the human genome., *Oncogene*, **2000**; 19(49): 5548-5557.
- ¹⁰³ Gal A., Li Y., Thompson D. A., Weir J., Orth U., Jacobson S. G., Apfelstedt-Sylla E., Vollrath D., Mutations in MerTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa., *Nature Genetics*, **2000**; 26(3): 270-271.
- ¹⁰⁴ Sather S., Kenyon K. D., Lefkowitz J. B., Liang X., Varnum B. C., Henson P. M., Graham D. K., A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation., *Blood*, **2007**; 109(3): 1026-1033.
- ¹⁰⁵ Linger R. M. A., Keating A. K., Earp H. S., Graham D. K., TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer, *Advances in Cancer Research*, **2008**; 100: 35-83.
- ¹⁰⁶ Prasad D., Rothlin C. V., Burrola P., Burstyn-Cohen T., Lu Q., Garcia de Frutos P., Lemke G., TAM receptor function in the retinal pigment epithelium., *Molecular and Cellular Neuroscience*, **2006**; 33(1): 96-108.
- ¹⁰⁷ Fisher P.W., Brigham-Burke M., Wu S. J., Luo J., Carton J., Staquet K., Gao W., Jackson S., Bethea D., Chen C., Hu B., Giles-Komar J., Yang J., A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody., *Biochemical Journal*, **2005**; 387(Pt 3): 727-735.
- ¹⁰⁸ Dahlback B., Villoutreix B. O., Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2005**; 25(7): 1311-1320.
- ¹⁰⁹ Sasaki T., Knyazev P. G., Cheburkin Y., Gohring W., Tisi D., Ullrich A., Timpl R., Hohenester E., Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains., *Journal of Biological Chemistry*, **2002**; 277(46): 44164-44170.
- ¹¹⁰ Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W., Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal., *Journal of Cellular Physiology*, **2012**; 227(2): 401-407.
- ¹¹¹ Brandao L., Migdall-Wilson J., Eisenman K., Graham D.K., TAM receptors in leukemia: expression, signaling, and therapeutic implications., *Critical Reviews in Oncogenesis*, **2011**; 16(1-2): 47-63.

- ¹¹² Cummings C. T., DeRyckere D., Earp H. S., Graham D. K., Molecular Pathways: MerTK Signaling in Cancer, *Clinical Cancer Research*, **2013**; Oct 1; 19(19): 5275–5280.
- ¹¹³ Brandao L. N., Wings A., Christoph S., Sather S., Migdall-Wilson J., Schlegel J., McGranahan A., Gao D., Liang X., Deryckere D., Graham D. K., Inhibition of MerTK increases chemosensitivity and decreases oncogenic potential in T cell acute lymphoblastic leukemia., *Blood Cancer Journal*, **2013**; 3(1): e101.
- ¹¹⁴ Graham D. K., Salzberg D. B., Kurtzberg J., Sather S., Matsushima G. K., Keating A. K., Liang X., Lovell M. A., Williams S. A., Dawson T. L., Schell M. J., Anwar A. A., Snodgrass H. R., Earp H. S., Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia., *Clinical Cancer Research*, **2006**; 12(9): 2662-2669.
- ¹¹⁵ Sobańska K., Szalek E., Kamińska A., Grześkowiak E., Inhibitory kinaz tyrozynowych w terapii przeciwnowotworowej, *Farmacja Współczesna*, **2011**; 4: 185-190.
- ¹¹⁶ Orzechowska-Juzwenko K., Farmakodynamika leków stosowanych w leczeniu Nowotworów., W: *Farmakodynamika* Janiec W., Krupinska J., Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; **2005**: 834-879.
- ¹¹⁷ Saijo N., Progress in Cancer Chemotherapy with special stress on molecular-targeted therapy., *Japanese Journal of Clinical Oncology*, **2010**; 40(9): 855-862.
- ¹¹⁸ Kariolis, M. S., Miao Y. R., Jones D. S., Kapur S., Mathews I. I., Giaccia A. J., Cochran J. R., An engineered AXL ‘decoy receptor’ effectively silences the GAS6–AXL signaling axis., *Nature Chemical Biology*, **2014**; 10(11): 977-983.
- ¹¹⁹ Broekman F., Giovanetti E., Peters G. J., Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted?, *World Journal of Clinical Oncology*, **2011**; 2(2): 80-93.
- ¹²⁰ Christoph S., Deryckere D., Schlegel J., Frazer J. K., Batchelor L. A., Trakhimets A. Y., Sather S., Hunter D.M., Cummings C. T., Liu J., Yang C., Kireev D., Simpson C., Norris-Drouin J., Hull-Ryde E. A., Janzen W. P., Johnson G. L., Wang X., Frye S. V., Earp 3rd H. S., Graham D. K., UNC569, a novel small molecule Mer inhibitor with efficacy against acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo., *Molecular Cancer Therapeutics*, **2013**; 12(11): 2367-2377.
- ¹²¹ Baladi T., Abet V., Piguel S., State-of-the-art of small molecule inhibitors of the TAM family: The point of view of the chemist., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**; 105: 220-237.
- ¹²² Liu J., Zhang W., Stashko M. A., Deryckere D., Cummings C. T., Hunter D., Yang C., Jayakody C. N., Cheng N., Simpson C., Norris-Drouin J., Sather S., Kireev D., Janzen

W. P., Earp H. S., Graham D. K., Frye S. V., Wang X., UNC1062, a new and potent Mer inhibitor., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**; 65: 83-93.

¹²³ DeRyckere D., Lee Sherick A. B., Huey M. G., Hill A. A., Tyner J. W., Jacobsen K. M., Page L. S., Kirkpatrick G. D., Eryildiz F., Montgomery S. A., Zhang W., Wang X., Frye S. V., Earp H. S., Graham D. K., UNC2025, a MerTK small molecule inhibitor, is therapeutically effective alone and in combination with methotrexate in leukemia models., *Clinical Cancer Research*, **2017**; 23(6): 1481-1492.

¹²⁴ Zhang W., McIver A. L., Stashko M. A., DeRyckere D., Branchford B. R., Hunter D., Kireev D., Miley M. J., Norris-Drouin J., Stewart W. M., Lee M., Sather S., Zhou Y., Di Paola J. A., Machius M., Janzen W. P., Earp H. S., Graham D. K., Frye S. V., Wang X., Discovery of Mer specific tyrosine kinase inhibitors for the treatment and prevention of thrombosis, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**; 56(23): 9693-9700.

¹²⁵ Da C., Stashko M., Jayakody C., Wang X., Janzen W., Frye S., Kireev D., Discovery of Mer kinase inhibitors by virtual screening using structural proteineligand interaction Fingerprints, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**; 23(5): 1096-1101.

¹²⁶ Porta R., Benaglia M., Puglisi, A., Flow chemistry: recent developments in the synthesis of pharmaceutical products., *Organic Process Research & Development*, **2016**; 20(1): 2-25.

¹²⁷ McQuade D.T., Seeberge P. H., Applying flow chemistry: methods, materials, and multistep synthesis., *The Journal of organic chemistry*, **2013**; 78(13): 6384-6389.

¹²⁸ Plutschack M. B., Pieber B., Gilmore K., Seeberger P. H., The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry, *Chemical Review*, **2017**; 117(18): 11796-11893.

¹²⁹ Britton J., Raston C. L., Multi-Step Continuous-Flow Synthesis., *Chemical Society Reviews*, **2017**; 46: 1250-1271.

¹³⁰ Anderson N., Gernaey K.V., Jamison T.F., Kircher M., Wiles C., Leadbeater N.E., Sandford G., Richardson P., The challenges and benefits of flow chemistry to optimize drug development., *Future Medicinal Chemistry*, **2012**; 4(14): 1779-1789.

¹³¹ Guan F., Kapur N., Sim L., Taylor C. J., Wen J., Zhang X., Blacker A. J., A universal reactor platform for batch and flow: application to homogeneous and heterogeneous hydrogenation., *Reaction Chemistry & Engineering*, **2020**; 5(10): 1903-1908.

¹³² Wegner J., Ceylan S., Kirschning A., Ten key issues in modern flow chemistry., *Chemical Communications*, **2011**; 47(16): 4583-4592.

¹³³ a. Gaba M., Dhingra N., Microwave Chemistry: General Features and Applications., *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, **2011**; 45(2): 175-183.

- b. Krstenansky J. L., Cotterill I., Recent advances in microwave-assisted organic syntheses., *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, **2000**; 3(4): 454-461.
- ¹³⁴ Nain S., Singh R., Ravichandran S., Importance of Microwave Heating in Organic Synthesis., *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, **2019**; 2(2): 94-104.
- ¹³⁵ Laporterie A., Marquié J., Dubac J., Microwave-assisted reactions on graphite in Microwaves in Organic Synthesis., *Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, **2002**: 219-252.
- ¹³⁶ Loupy A., Petit A., Hamelin J., Texier-Boullet F., Jacquault P., Mathe D., New solvent free organic synthesis using focused microwaves., *Synthesis*, **1998**; 9: 1213-1234.
- ¹³⁷ Saaby S., Knudsen K. R., Ladlow M., Ley S. V., The use of a continuous flow-reactor employing a mixed hydrogen–liquid flow stream for the efficient reduction of imines to amines., *Chemical Communications*, **2005**; 23: 2909-2911.
- ¹³⁸ Skarżewski J., Mechanizmy reakcji organicznych, *Wydawnictwo Naukowe PWN*, 1999.
- ¹³⁹ Li J.H., Liang Y., Zhang X.D., Amine- and phosphine-free palladium(II)-catalyzed homocoupling reaction of terminal alkynes., *Tetrahedron*, **2005**; 61: 1903-1907.
- ¹⁴⁰ Negishi E., Anastasia L., Palladium-Catalyzed Alkynylation, *Chemical Reviews*, **2003**; 103:1979–2018.
- ¹⁴¹[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_\(Inorganic_Chemistry\)/Catalysis/Catalyst_Examples/Sonogashira_Coupling](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Supplemental_Modules_and_Websites_(Inorganic_Chemistry)/Catalysis/Catalyst_Examples/Sonogashira_Coupling)
- ¹⁴² Chemler S. R., Trauner D., Danishefsky S. J., The *B*-Alkyl Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction: Development, Mechanistic Study, and Applications in Natural Product Synthesis., *Angewandte Chemie*, **2001**; 40: 4544-4568.
- ¹⁴³ Grimaud L., Jutand A., Role of Fluoride Ions in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions, *Synthesis*, **2017**; 49: 1182-1189.
- ¹⁴⁴ Barder T. E., Walker S. D., Martinelli J. R., Buchwald S. L., Catalysts for Suzuki–Miyaura coupling processes: scope and studies of the effect of ligand structure, *Journal of the American Chemical Society*, **2005**; 127: 4685-4696.
- ¹⁴⁵ Bedford R. B., Hazelwood S. L., Limmert M. E., Albisson D. A., Draper S. M., Scully P. N., Coles S. J., Hursthouse M. B., Orthopalladated and -platinated Bulky Triarylphosphite Complexes: Synthesis, Reactivity and Application as High-Activity Catalysts for Suzuki and Stille Coupling Reactions, *Chemistry A European Journal*, **2003**; 9: 3216-3227.

- ¹⁴⁶ Maluenda I., Navarro O., Recent Developments in the Suzuki-Miyaura Reaction: 2010–2014, *Molecules*, **2015**; 20: 7528-7557.
- ¹⁴⁷ Menchi G., Scrivanti A., Matteoli U., Improvements in the synthesis of terminal alkynes via coupling of arylbromides with 2-methylbut-3-yn-2-ol, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2000**; 152: 77-82.
- ¹⁴⁸ Anderson K. W., Buchwald S. L., General Catalysts for the Suzuki–Miyaura and Sonogashira Coupling Reactions of Aryl Chlorides and for the Coupling of Challenging Substrate Combinations in Water, *Angewandte Chemie*, **2005**; 44: 6173 –6177.
- ¹⁴⁹ Appukkuttan P., Dehaen W., Eycken E. V., Transition-Metal-Free Sonogashira-Type Coupling Reactions in Water, *European Journal of Organic Chemistry*, **2003**; 4713-4716.

Dorobek naukowy

Publikacje:

1. A. Yamani, D. Zdżalik-Bielecka, J. Lipner, A. Stańczak, N. Piórkowska, P.S. Stańczak, **P. Olejkowska**, J. Hucz-Kalitowska, M. Magdycz, K. Dzwonek, K. Dubiel, M. Lamparska-Przybysz, D. Popiel, J. Pieczykolan, M. Wieczorek, „Discovery and optimization of novel pyrazole-benzimidazole CPL304110, as a potent and selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors FGFR (1-3)”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2021**, 1-96.
2. S. Michałek, A. Powała, L. Gurba-Bryśkiewicz, N. Piórkowska, **P. Olejkowska**, A. Yamani, Z. Ochal, K. Dubiel, M. Wieczorek: „Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor”, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, **2023**, 1-8.

Postery:

1. A. Mikołajczyk, A. Yamani, **P. Olejkowska**, N. Piórkowska, M. Naitana, P. Maliszewski, K. Dubiel, J. Pieczykolan, M. Wieczorek, A. Stańczak: „Rational-based drug design of novel, highly potent MER inhibitors as potential treatment of cancers.” – 30. sympozjum EORTC/AACR/NCI, Dublin, 2018.
2. **Patrycja Olejkowska**, Natalia Piórkowska, Paweł Maliszewski, Mario Naitana, Agata Mikulska, Agata Mikołajczyk, Kinga Jastrzębska, Delfina Popiel, Abdellah Yamani, Jacek Ścianowski, Krzysztof Dubiel, Maciej Wieczorek: „Application of microwave technology in the development of a synthesis pathway for an innovative small-molecule MER kinase inhibitor with high anticancer activity against acute lymphoblastic leukemia (ALL).” – XI Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 2023.
3. Natalia Piórkowska, **Patrycja Olejkowska**, Paweł Maliszewski, Mario Naitana, Agata Mikulska, Agata Mikołajczyk, Tomasz Kornatowski, Delfina Popiel, Abdellah Yamani, Jacek Ścianowski, Krzysztof Dubiel, Maciej Wieczorek: „Application of flow chemistry technology in the development of a synthesis pathway for a potential FLT3 kinase inhibitor with anticancer properties against acute myeloid leukemia (AML).” – XI Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 2023.

4. **Patrycja Olejkowska**, Natalia Piórkowska, Paweł Maliszewski, Mario Naitana, Agata Mikulska, Agata Mikołajczyk, Kinga Jastrzębska, Delfina Popiel, Abdellah Yamani, Jacek Ścianowski, Krzysztof Dubiel, Maciej Wieczorek: „Zastosowanie technologii mikrofalowej w opracowywaniu ścieżki syntezy innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora kinazy Mer o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL).” – 65. zjazd naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Toruń, 2023.
5. Natalia Piórkowska, **Patrycja Olejkowska**, Paweł Maliszewski, Mario Naitana, Agata Mikulska, Agata Mikołajczyk, Tomasz Kornatowski, Delfina Popiel, Abdellah Yamani, Jacek Ścianowski, Krzysztof Dubiel, Maciej Wieczorek: „Zastosowanie technologii chemii przepływowej w opracowaniu ścieżki syntezy potencjalnego inhibitora kinazy FLT3 o właściwościach przeciwnowotworowych przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML).” – 65. zjazd naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Toruń, 2023.

Szkolenia i konferencje:

- „Podstawy metod separacyjnych I – HPLC, TLC, GC.” – Toruń, 2013.
- 10th Protein Kinases in Drug Discovery – Berlin, 2015.
- Scientific Update „Medicinal Chemistry” – Bazylea, 2017.
- Warsztaty naukowe „Advances in organic synthesis methods in the search for biologically active compounds” – Kraków, 2017.
- Nowoczesne metody syntezy i oczyszczania próbek – Kielce, 2018.
- Udział w europejskim programie szkoleniowym z zakresu tzw. twardych kompetencji „HardSkills 2019”. Skierowany do naukowców, studentów, start-upów i przedsiębiorców z całej Europy. Projekt ten realizowany był przy współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi, University of Navarra, Univesidade de Evora i realizowany w ramach sieci EIT Health. – Gdańsk/Barcelona, 2019.
- XI Konwersatorium Chemii Medycznej – Lublin, 2023.
- 65. zjazd naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego – Toruń, 2023.

Pozyskane granty:

- Grant wydziałowy o nr **492/2020**, pozyskany ze środków służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich z zakresu chemii. Tytuł: „Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowywaniu innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL).” Realizowany był na Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Prace badawcze w ramach powyższego grantu trwały w okresie od 03.03 – 30.11.2020.
- Grant wydziałowy o nr **429/2020**, pozyskany ze środków służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich z zakresu chemii. Tytuł: „Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowywaniu innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL).” Realizowany był na Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Prace badawcze w ramach powyższego grantu trwały w okresie od 02.06 – 30.11.2020.
- Grant wydziałowy o nr **PDP**, pozyskany ze środków służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich z zakresu chemii. Tytuł: „Zastosowanie reaktora mikrofalowego oraz chemii przepływowej (FLOW) w opracowywaniu innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora o wysokiej aktywności antynowotworowej przeciwko ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL).” Realizowany był na Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Prace badawcze w ramach powyższego grantu trwały w okresie od 03.03.2021 do 30.11.2021.