

Rozprawa doktorska
mgr Natalia Piórkowska

„Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowaniu innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”

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 wykonana została w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” zgodnie z trójstronną umową pomiędzy Natalia Piórkowską, firmą Celon Pharma S.A. a Uniwersytetem Mikołaja Kopernika w Toruniu, współfinansowana przez MNiSW (obecnie MEiN).

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi, Panu prof. dr hab. Jackowi Ścianowskiemu, za nieocenioną pomoc, poświęcony czas oraz za wszystkie cenne rady i wskazówki.

Pragnę również podziękować mojemu promotorowi pomocniczemu, Panu dr Abdellah Yamani, za możliwość rozwoju naukowego, wszystkie cenne rady i uwagi oraz za wszelką otrzymaną pomoc.

Dziękuję także całemu zespołowi z laboratorium szóstego za wspólny czas i dyskusje na tematy chemiczne i nie tylko.

Spis treści

Streszczenie

Doctoral Dissertation Abstract

Cel pracy

1. Wykaz skrótów.....	12
2. Część teoretyczna.....	18
2.1. Ostra białaczka szpikowa.....	19
2.1.1. Charakterystyka ostrej białaczki szpikowej.....	19
2.1.2. Sposoby leczenia ostrej białaczki szpikowej (AML).....	21
2.2. Rola i budowa kinazy FLT3.....	33
2.2.1. Rola kinazy FLT3 w organizmie ludzkim.....	33
2.2.2. Budowa kinazy FLT3.....	34
2.2.3. Ligand kinazy FLT3.....	37
2.2.4. Kinaza FLT3 typu „dzikiego” (FLT3-WT).....	37
2.2.5. Mechanizm aktywacji.....	38
2.3. Mutacje kinazy FLT3 w rozwoju ostrej białaczki szpikowej.....	39
2.3.1. Rodzaje mutacji kinazy FLT3.....	40
2.3.1.1. Wewnętrzna duplikacja tandemowa (Internal Tandem Duplication)...	41
2.3.1.2. Mutacje punktowe (FLT3-TKD, FLT3-D835).....	41
2.4. Rola i znaczenia inhibitorów kinazy FLT3.....	42
2.4.1. Inhibitory pierwszej (I) generacji.....	47
2.4.1.1. Sorafenib.....	47
2.4.1.2. Sunitynib.....	52
2.4.1.3. Midostauryna.....	54
2.4.1.4. Lestaurtynib.....	57
2.4.1.5. Tandutynib.....	59
2.4.2. Inhibitory drugiej (II) generacji.....	63
2.4.2.1. Gilterytynib.....	63
2.4.2.2. Krenolanib.....	66
2.4.2.3. Kwizartytib.....	68
2.4.2.4. KW-2449.....	71
2.4.3. Inhibitory nowszej generacji.....	72

2.4.3.1. Ponatynib.....	72
2.5. Oporność wielolekowa.....	74
2.6. Zastosowanie technologii reaktorów mikrofalowych i przepływowych (FLOW) w syntezie chemicznej.....	76
2.6.1. Reaktor mikrofalowy.....	76
2.6.2. Technologia przepływowa (systemy FLOW).....	80
3. Badania własne.....	84
Wstęp.....	85
3.1. Wybór kandydatów do dalszych badań.....	86
3.2. Aktywność biologiczna nowo opracowanych cząsteczek, ich właściwości fizykochemiczne oraz analiza ADMET.....	90
3.3. Związki wiodące.....	106
4. Część doświadczalna.....	110
4.1. Synteza nowo opracowanych cząsteczek.....	111
4.2. Opis syntezy nowych pochodnych pirymidynowych i pirolopirymidynowych..	117
.....	117
4.2.1. Opis syntezy pochodnych pirymidynowych.....	117
4.2.2. Opis syntezy otrzymywania pochodnych pirolopirymidynowych.....	136
5. Optymalizacja ścieżki syntezy.....	198
5.1. Technologia przepływowa.....	198
5.1.1. Reakcja nukleofilowej substytucji aromatycznej.....	199
5.1.2. Reakcja <i>N</i> -aminowania.....	201
5.1.3. Reakcja krzyżowego sprzęgania Sonogashiry.....	217
5.1.4. Reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.....	223
5.1.5. Optymalizacja reakcji halogenowania (-Br).....	231
5.2. Nowa ścieżka syntezy do optymalizacji.....	241
5.2.1. Synteza 4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}amino)cykloheksan-1-olu.....	243
5.2.2. Reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.....	247
5.2.3. Reakcja zabezpieczania grupy hydroksylowej.....	250
5.2.4. Synteza 5-bromo-2-chloro-7-[(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy]-cyklo-heksylo]-7- <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyny.....	254
5.2.5. Reakcja <i>N</i> -aminowania.....	256
5.2.6. Reakcja Suzuki.....	265

5.3. Technologia mikrofalowa.....	271
5.3.1. Reakcja Sonogashiry.....	272
5.3.2. Reakcja zabezpieczania grupy hydroksylowej grupą <i>tert</i> -butylochlo- dimetylosilanową.....	273
5.3.3. Reakcja <i>N</i> -aminowania.....	277
6. Podsumowanie otrzymanych wyników.....	280
7. Literatura.....	283

Streszczenie pracy doktorskiej

„Zastosowanie technologii chemii mikrofalowej i przepływowej w opracowaniu innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”

Celem niniejszej pracy było opracowanie i optymalizacja syntezy inhibitorów kinazy FLT3 odpowiedzialnej za rozwój ostrej białaczki szpikowej AML. W części literaturowej przedstawiłam opis złośliwej choroby nowotworowej jaką jest AML oraz sposoby jej leczenia. Do tego celu najczęściej stosowana jest intensywna chemioterapia oraz transplantacja szpiku kostnego. Do rozwoju ostrej białaczki szpikowej ale również innych chorób nowotworowych przyczyniają się w głównej mierze mutacje kinazy FLT3, która to należy do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych klasy III (RTK III). Reguluje ona szereg procesów odpowiedzialnych za proces proliferacji czyli namnażania się komórek, ich różnicowania, adhezji, ruchliwości, metabolizmu oraz zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy). Co więcej kinaza FLT3 nadzoruje prawidłowy rozwój komórek macierzystych i układu odpornościowego. Wewnętrzna duplikacja tandemowa i mutacje punktowe to główne rodzaje nieprawidłowości w funkcjonowaniu kinazy FLT3. Niszczenie w trakcie chemioterapii zarówno komórek nowotworowych jak i zdrowych, a także skutki uboczne oraz toksyczność tej terapii przyczyniły się do rozwoju leków celowanych. Preparaty te to nic innego jak inhibitory, które muszą wykazywać aktywność terapeutyczną, niską toksyczność ale przede wszystkim powinny działać na komórki rakowe przy jednoczesnym oszczędzeniu komórek zdrowych. Obecnie opracowano już wiele inhibitorów kinazy FLT3, które zakwalifikowały się do badań klinicznych. Ze względu na prawa patentowe związane z syntezą inhibitorów w pracy tej nie przedstawiłam reakcji prowadzących do ich otrzymywania. Ograniczona skuteczność kliniczna opracowanych dotychczas inhibitorów kinazy FLT3 oraz pojawiająca się często w trakcie leczenia oporność wielolekowa i niejednokrotnie krótkotrwała odpowiedź organizmu na zastosowane leczenie, zainspirowały mnie do podjęcia prac związanych z opracowaniem nowatorskiego, małowcząsteczkowego inhibitora FLT3 o wysokiej biodostępności po podaniu doustnym i niskiej toksyczności oraz korzystnym profilu farmakokinetycznym. Dodatkowo opracowany inhibitor powinien być bezpieczny i wysoce skuteczny w leczeniu osób z ostrą białaczką szpikową.

W opracowaniu nowej biologicznie aktywnej cząsteczki wykorzystałam w pierwszej kolejności metody bioinformatyczne *in silico*, głównie program KNIME. Stworzyłam dzięki niemu wirtualną bibliotekę związków zawierającą 700 struktur. Z kolei dokowanie molekularne dostarczyło mi informacji na temat sposobu dopasowania potencjalnych inhibitorów do receptora. Co więcej metody te pomogły mi w wyborze modyfikacji, które poprawiły zarówno aktywność jak i właściwości cząsteczki. Po szczegółowej analizie danych otrzymanych z dokowania przeprowadziłam syntezę 110 związków do dalszych badań. Syntezowane przeze mnie cząsteczki to przede wszystkim pochodne pirymidynowe jak i pirolopirymidynowe, bowiem jak wynika z dostępnych w literaturze danych, pirymidyna jest jednym z ważniejszych elementów strukturalnych wielu preparatów leczniczych. Związki te należą także do rodziny związków heterocyklicznych zawierających w swej strukturze element strukturalnie podobny do pierścienia purynowego. Dla wszystkich cząsteczek określona została aktywność ich działania względem kinazy FLT3 oraz wybranych związków referencyjnych, którymi były: UNC2025 i MRX-2843. Wyznaczona została również stabilność chemiczna oraz stabilność na mikrosomach mysich oraz ludzkich. Określone zostały parametry fizykochemiczne oraz rozpuszczalność w roztworach o pH 4,5 i 7,4. Przeprowadzone były również analizy pozwalające na określenie przepuszczalności nowych cząsteczek przez błony biologiczne. Pochodne o jak najlepszej selektywności wobec kinazy FLT3 były następnie testowane na modelach komórkowych takich jak: KASUMI-1, NOMO-1 oraz MOLM-13. Są to ludzkie linie komórkowe ostrej białaczki szpikowej. Spośród zsyntezowanych przeze mnie związków wybrałam dwie struktury wiodące. Związki te zostały wybrane na podstawie podobieństwa strukturalnego względem związków referencyjnych. Co więcej wartości IC_{50} wybranych związków były zbliżone do wartości IC_{50} związków referencyjnych. Ponadto wybór ten podyktowany był badaniem *in vitro*, które wykazało dużo lepszą efektywność działania związków, które posiadają w swej strukturze układ C1-C4 z jednym wiązaniem nienasyconym. Molekuły te wykazują także dużo lepszą rozpuszczalność oraz biodostępność. Dodatkowo związki te trafiły na badania toksykologiczne w celu wyznaczenia dla nich maksymalnej tolerowalnej dawki. Jeden z wybranych związków wiodących wykazuje duży potencjał na „lek” i zakwalifikowanie go w przyszłości do badań klinicznych.

W pracy tej opisałam również proces optymalizacji ścieżki syntezy jednego z wybranych związków referencyjnych. Prace optymalizacyjne wykonałam głównie przy wykorzystaniu prężnie rozwijającej się w ostatnich latach technologii przepływowej (FLOW). Niektóre etapy optymalizowałam także przy zastosowaniu reaktora mikrofalowego.

Doctoral Dissertation Abstract

„Application of Microwave and FLOW chemistry technologies in development of innovative small-molecule inhibitor as high antitumor activity against acute myeloid leukemia (AML)“

The aim of this study was to develop and optimize the synthesis of inhibitors of FLT3 kinase responsible for the development of acute myeloid leukemia AML. In the literature part, I present a description of the malignant cancer disease AML and methods of its treatment. For this purpose, intensive chemotherapy and bone marrow transplantation are most often used. Mutations in the FLT3 kinase, which belongs to the family of class III receptor tyrosine kinases (RTK III), contribute mainly to the development of acute myeloid leukemia as well as other cancer diseases. It regulates a number of processes responsible for proliferation, i.e. cell multiplication, differentiation, adhesion, mobility, metabolism and programmed cell death (apoptosis). Moreover, FLT3 kinase oversees the proper development of stem cells and the immune system. Internal tandem duplication and point mutations are the main types of abnormalities in FLT3 kinase function. Destruction during chemotherapy, which includes both disease cells and effects, as well as side effects and toxicity of this therapy that may occur as a result of targeted treatments. These preparations are nothing more than inhibitors that must have therapeutic activity, exclude toxicity, but above all, access to cancer cells while releasing access to resources. Currently, many FLT3 kinase inhibitors have been developed and have qualified for clinical trials. Due to patent rights related to the synthesis of inhibitors, in this work I did not present the reactions leading to their preparation. The limited clinical effectiveness of the FLT3 kinase inhibitors developed so far, as well as the multidrug resistance that often appears during treatment and the body's often short-term response to the treatment, inspired me to undertake work related to with the development of an innovative, small-molecule FLT3 inhibitor with high oral bioavailability, low toxicity and a favorable pharmacokinetic profile. Additionally, the developed inhibitor should be safe and highly effective in the treatment of people with acute myeloid leukemia.

In the development of a new biologically active molecule, I first used in silico bioinformatics methods, mainly the KNIME program. Thanks to it, I created a virtual library of compounds containing 700 structures. Molecular docking, in turn, provided me with

information on how to match potential inhibitors to the receptor. Moreover, these methods helped me choose modifications that improved both the activity and properties of the molecule. After a detailed analysis of the data obtained from docking, I synthesized 110 compounds for further research. The molecules which I synthesize are primarily pyrimidine derivatives such as and pyrrolopyrimidine, because, according to the data available in the literature, pyrimidine is one of the most important structural elements of many medicinal preparations. These compounds also belong to the family of heterocyclic compounds containing in their structure an element structurally similar to the purine ring. For all molecules, their activity towards FLT3 kinase and selected reference compounds was determined: UNC2025 and MRX-2843. Chemical stability and stability on mouse and human microsomes were also determined. Physicochemical parameters and solubility in solutions with pH 4.5 and 7.4 were determined. Analyzes were also carried out to determine the permeability of new molecules through biological membranes. Derivatives with the best possible selectivity for FLT3 kinase were then tested on cell models such as: KASUMI-1, NOMO-1 and MOLM-13. These are human acute myeloid leukemia cell lines. Among the compounds I synthesized, chose two leading structures. These compounds were selected based on structural similarity to reference compounds. Moreover, the IC_{50} values of the selected compounds were close to the IC_{50} values of the reference compounds. Moreover, this choice was dictated by an in vitro study, which showed much better effectiveness of compounds that have a C1-C4 system with one unsaturated bond in their structure. These molecules also have much better solubility and bioavailability. Additionally, these compounds were subjected to toxicological tests in order to determine their maximum tolerable dose. One of the selected lead compounds shows great potential for being a "medicine" and qualifying for clinical trials in the future.

In this work, I also described the process of optimizing the synthesis path of one from selected reference compounds. I performed the optimization work mainly using flow technology (FLOW), which has been dynamically developing in recent years. I also optimized some stages using a microwave reactor.

Cel pracy

Ostra białaczka szpikowa AML jest agresywną chorobą nowotworową. Dotychczas opracowanych zostało zaledwie kilka metod terapeutycznych, niestety żadna z dostępnych metod leczenia, czyli chemioterapia, radioterapia, transplantacja szpiku kostnego lub komórek macierzystych oraz terapie celowane, nie zapewniają pacjentowi całkowitej remisji choroby. AML charakteryzuje się nagromadzeniem nieprawidłowo funkcjonujących białych krwinek w wyniku czego dochodzi do zmniejszenia produkcji krwinek czerwonych, zakażenia a nawet dysfunkcji narządów. Na chorobę tą narażone są głównie osoby starsze powyżej 60 roku życia, których odporność oraz ogólna kondycja jest słabsza. W jej rozwoju kluczową rolę odgrywa kinaza FLT3, enzym niezbędny we wczesnych etapach hematopoezy, a przede wszystkim jego mutacje, które obserwowane są u około 30% osób chorych na AML. Jej defekt prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek białaczkowych.

Dotychczas opracowano już szereg inhibitorów FLT3, które trafiły do badań klinicznych. Niestety charakteryzuje je ograniczona skuteczność kliniczna, niska specyficzność działania względem kinazy FLT3 a nawet toksyczność. Przyczyną tego jest szereg nieznanych jeszcze czynników, które wpływają na rozwój nie tylko ostrej białaczki szpikowej ale również innych chorób nowotworowych i sprawiają, że terapie celowane nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. Dodatkowym utrudnieniem jest złożoność procesów biologicznych, które trudno kontrolować za pomocą jednej substancji leczniczej. Dlatego też celem prowadzonych przeze mnie badań w pracy doktorskiej realizowanej w ramach projektu „doktorat wdrożeniowy - II edycja”, będzie opracowanie nowatorskiego, małocząsteczkowego inhibitora FLT3 o wysokiej biodostępności po podaniu doustnym i niskiej toksyczności. Dodatkowo powinien on wykazywać korzystny profil farmakokinetyczny, być bezpieczny ale przede wszystkim skuteczny (aktywny) w leczeniu pacjentów z ostrą białaczką szpikową.

W realizacji zamierzonego celu wykorzystane będą metody bioinformatyczne *in silico* oraz badania SAR (Structure-activity relationship). Techniki te nie tylko pomagają w określeniu budowy strukturalnej związków ale również pozwalają na identyfikację grupy funkcyjnej, która biologicznie oddziałuje z organizmem. Wiedza ta z kolei pomaga w wyborze nowych grup chemicznych, które to wpłyną na aktywność związku oraz jego powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu. Dla wszystkich zsyntezowanych cząsteczek wykonane zostaną również

badania przedkliniczne, pomagające w określeniu ich aktywności wobec kinazy FLT3, skuteczności działania, biodostępności oraz właściwości farmakokinetycznych. Dzięki analizie właściwości fizykochemicznych takich jak: rozpuszczalność, lipofilowość czy też stabilność chemiczna i mikrosomalna przeprowadzone zostaną modyfikacje poprzez wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych w strukturę związku wiodącego, które pomogą w uzyskaniu „nowego leku” o pożądanych właściwościach fizycznych i farmakokinetycznych. Co więcej w celu przyspieszenia prac syntetycznych związanych z tworzeniem biblioteki czy też z syntezą półproduktów wykorzystane zostaną pręźnie rozwijające się w ostatnim czasie technologie takie jak: chemia przepływowa oraz mikrofalowa. Do określenia dokładnej struktury związku zastosowana zostanie analiza magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C , DEPT NMR) oraz chromatografia cieczowa ze spektrometrem masowym (LC-MS). Niniejsza praca i wszystkie wykonane w jej ramach badania będą miały na celu nie tylko poszerzenie wiedzy ale przede wszystkim wzmocnienie fazy badań klinicznych poprzez opracowanie odpowiedniego, bezpiecznego w stosowaniu i o skutecznym działaniu kandydata na lek w terapii leczenia ostrej białaczki szpikowej AML.

1. Wykaz skrótów

Ala- alanina

(ABC)- białko transportowe

(AC886)- metabolit Kwizartynibu

ADPGIo- test biologiczny do określania aktywności związków

(AGP)- kwaśna glikoproteina

(AKT)- kinaza białkowa B

ALL- ostra białaczka limfoblastyczna

AML (acute myleoid leukemia)- ostra białaczka szpikowa

(t-AML)- wtórna ostra białaczka szpikowa

Asp/D835- kwas asparaginowy

ATP- adenozynotrójfosforan lub adenozyno-5'-trifosforan

AXL- to receptorowa kinaza tyrozynowa, która podobnie jak kinaza TYRO3 i MERTK należy do kinaz z rodziny TAM

API active pharmaceutical ingredient – substancja czynna

(AUC)- parametr określający biodostępność związku

Ba/F3- mysia linia komórkowa (limfoidalna)

BCR-ABL- kinaza tyrozynowa

C- cysteina

(CCR, conventional care regiment)- konwencjonalny sposób leczenia

CGP62221- metabolit Midostauryny

CGP52421- metabolit Midostauryny

(CR)- remisja choroby

(CYP3A4)- cytochrom P450

(C_{max})- maksymalne stężenie

(DFG-in)- oznaczenie aktywnej konformacji receptora

(DFG-out)- oznaczenie nieaktywnej konformacji receptora

(DKMS)- baza dawców szpiku kostnego

(DTC)- nowotwór tarczycy

E- kwas glutaminowy

ED- domena zewnątrzkomórkowa

(ELN)- europejska organizacja LeukemiaNet

(EFS)- to czas, w którym nie stwierdza się u pacjenta powikłań

(EMA)- Europejska Agencja Leków

F- fenyloalanina

FDA- Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

FLT3- kinaza tyrozynowa

FL- ligand kinazy FLT3

(FLT3-ITD)- mutacja typu wewnętrzna duplikacja tandemowa

(FLT3-TKD)- mutacje punktowe

(FLT3-WT)- kinaza FLT3 typu „dzikiego”

FLT3-F691- rodzaj mutacji kinazy FLT3

(Fgr)- kinaza tyrozynowo-białkowa

GAB2- białko adaptorowe

GRB2- białko adaptorowe

(GIST)- nowotwór żołądka i jelita

Gly/G- glicyna

GVHD- choroba potransplantacyjna, przeszczep przeciwko gospodarzowi

H- histydyna

(HCC)- wątrobowokomórkowy nowotwór

HLA- antygeny zgodności tkankowej

HGFR- receptory czynnika wzrostu hepatocytów

I836- izoleucyna

IC₅₀- to parametr określający stężenie danego leku przy którym obserwuje się zahamowanie wzrostu badanej populacji komórek o 50%

IS- insercja

JAK2- kinaza należąca do rodziny niereceptorowych tyrozynowych kinaz białkowych

JMD- domena przyścienna

JM-B- element wiążący domeny przyściennej

JM-S- tzw. przełącznik domeny przyściennej

JM-Z- tzw. suwak domeny przyściennej

KIT- kinaza należąca do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych klasy III (RTKIII)

Kasumi-1 ludzka linia komórkowa pochodząca od ostrej białaczki szpikowej

Met/M- metionina

M10, M16 i M17- metabolity Gilteitinibu

MOLM-13- ludzka linia komórkowa pochodząca od ostrej białaczki szpikowej

MOLM-14- ludzka linia komórkowa pochodząca od ostrej białaczki szpikowej

MV4-11- ludzka linia komórkowa pochodząca od ostrej białaczki szpikowej

MAPK- szlak sygnałowy

(MTD)- maksymalna tolerowalna dawka leku

NGFR- receptory czynnika wzrostu nerwów

(NCCN, National Comprehensive Cancer Network)- ogólnokrajowa kompleksowa sieć onkologiczna

[nM]- nanomole

NOMO-1; ludzka linia komórkowa pochodząca od ostrej białaczki szpikowej

(OS, overall survival)- całkowite przeżycie

(QT i QTc)- to odstępy na elektrokardiogramie

(PK)- parametry farmakokinetyczne

(PKC)- kinaza białkowa C

Phe- fenyloanilina

P3IK- kinaza 3-fosfatydyloinazytolu

PIP2- 4, 5- difosforan fosfatydyloinazytolu

PIP3- 3,4,5- trifosforan fosfatydyloinazytolu

PDGFR- receptory płytkopochodnego czynnika wzrostu

(PR)- częściowa remisja

RAF- receptorowe efekторы kinazy tyrozynowej

RAS- białko

(RCC)- rak nerki

RET- białko

RNA- kwas rybonukleinowy

RTK III- receptorowe kinazy tyrozynowe klasy III

SAR (Structure-activity relationship)- analiza zależności struktura-aktywność

STK1- kinaza należąca do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych klasy III (RTK III)

STAT5- cytoplazmatyczny czynnik transkrypcyjny genów

SHC- białko adaptorowe

SHP- białko adaptorowe

SHIP- białko adaptorowe

(Syk)- kinaza tyrozynowa śledziona

(SOC- standard of care)- standardowe postępowanie lecznicze

(Src)- protoonkogenna kinaza tyrozynowo-białkowa

SCID- to rodzaj myszy na których prowadzi się badania *in vivo*

Trp- tryptofan

Tyr/Y- tyrozyna

TM- domena transbłonowa

TKD- wysoce konserwatywna wewnątrzkomórkowa domena kinazy tyrozynowej

TKD I- I komponent tworzący wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej

TKD II- II komponent tworzący wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej

(Trka A, B i C)- kinaza receptorowa topoisomerazy

(t_{max})- czas po którym stężenie substancji w osoczu jest najwyższe

(UGT1A9)- glukuronylotransferaza UDP

UGT1 1A1- białko odpowiedzialne za przekształcenie toksycznej postaci bilirubiny w formę nietoksyczną

UDP 1A1- poza wątrobowa glukuronylotransferaza 1A1

Val/V- walina

VEGFR- receptory czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego

WHO- Światowa Organizacja Zdrowia

32D- mysia linia komórkowa (szpikowa)

Część doświadczalna:

ACN- acetonitryl

(Ar)- argon

Cl- atom chloru

CuI- jodek miedzi (I)

DCM- dichlorometan

DMA- dimetyloacetamid

DMF- dimetylosulfotlenek

DMSO- dimetylosulfotlenek

EtOH-etanol

FLOW- technologia chemii przepływowej

HPLC- wysokosprawna chromatografia cieczowa

IPA- izopropanol

MeOH- metanol

NBS- N-bromosukcynoimid

NMP- N-metylopirolidon

NMR- magnetyczny rezonans jądrowy

Pd(PPh₃)₂- katalizator palladowy

Pd(PPh₃)₄- katalizator palladowy

TEA- trietyloamina

THF- tetrahydrofuran

2. Część teoretyczna

2.1. Ostra białaczka szpikowa AML

2.1.1. Charakterystyka ostrej białaczki szpikowej

Ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia) jest złośliwą chorobą nowotworową układu krwiotwórczego, stwierdzaną każdego roku prawie u 11 000 pacjentów. Wyrażenie „leukemia” pochodzi z języka greckiego w którym słowo *leukos* oznacza biały natomiast wyrażenie *haima* to określenie krwi. Termin ten w XIX wieku został użyty przez europejskich lekarzy w celu określenia białaczki jako rodzaju schorzenia. Choroba ta rozwija się z komórek szpiku kostnego. Komórki białaczkowe funkcjonują niezależnie od mechanizmów regulujących i mają zdolność do niekontrolowanego namnażania się. Szpik kostny to dobrze zorganizowana, miękka, silnie ukrwiona i unerwiona, galaretowato-gąbczasta tkanka wypełniająca wnętrze jam szpikowych kości długich oraz przestrzeni międzybeleczkowych w obrębie istoty gąbczastej kości. Szpik kostny w procesie hematopoezy produkuje każdego dnia ponad 200 miliardów nowych elementów morfotycznych krwi. Dodatkowo odpowiedzialny jest za nadzór immunologiczny (odpornościowy) organizmu i usuwanie z niego nieprawidłowych i starzejących się komórek oraz cząstek stałych. Zbudowany jest głównie z komórek zrębu czyli komórek siatkowych (fibroblastów), komórek śródbłonna i komórek tłuszczowych (adiopocytów) oraz komórek mięsnych. U osoby dorosłej masa szpiku kostnego wynosi około 2.5 kg. Wyróżnia się dwa rodzaje szpiku kostnego: czerwony oraz żółty. Dzieci nie posiadają szpiku żółtego, który pozbawiony jest zdolności krwiotwórczych a jego głównym zadaniem jest magazynowanie komórek tłuszczowych, które organizm może wykorzystać jako źródło energii. Ponadto żółty szpik zawiera mezenchymalne komórki macierzyste, które mogą przekształcać się w wiele innych komórek np.: kości, tłuszczu, chrząstek czy nawet mięśni. W sytuacji kiedy dochodzi do utraty dużej ilości krwi czy wysokiej temperatury, szpik żółty może przekształcić się w szpik czerwony, odpowiedzialny przede wszystkim za proces hematopoezy. Czerwony szpik składa się z delikatnej, silnie unaczynionej tkanki włóknistej, w której komórki macierzyste krwi, mogą przekształcić się w różne typy krwinek, które z kolei po osiągnięciu dojrzałości nabywają zdolność przenikania do krwiobiegu. Możliwość przenikania dojrzałych krwinek do krwi obwodowej związana jest z posiadaniem przez te krwinki odpowiedniego białka dzięki któremu przyłączają się do

śródbłonna naczyń krwionośnych, które z kolei zapobiega opuszczeniu szpiku kostnego przez niedojrzałe krwinki.^{1,2,3}

W prawidłowo funkcjonującym szpiku kostnym w wyniku podziałów komórek mieloidalnych powstają erytrocyty, płytki krwi oraz wszystkie rodzaje krwinek białych z wyjątkiem limfocytów. Każdy rodzaj krwinek spełnia w organizmie określone funkcje:

- erytrocyty (czerwone krwinki) odpowiedzialne są za transport tlenu w organizmie, dzięki obecności hemoglobiny,
- białe krwinki (leukocyty) odpowiedzialne są za regulowanie procesów immunologicznych organizmu i zwalczanie infekcji,
- płytki krwi (trombocyty) uczestniczą w procesie krzepnięcia krwi.

Krwinkami białymi są również limfocyty i biorą one udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu skierowanej przeciwko zagrażającym bakteriom, wirusom czy pasożytom. Tak więc limfocyty odpowiedzialne są za rozpoznanie antygeny i reakcje mające na celu zwalczanie ich. Wyróżnia się limfocyty typu B i T oraz tzw. komórki NK. Limfocyty typu T i B odpowiedzialne są za nabytą odporność organizmu. Z kolei komórki NK odpowiadają za odporność wrodzoną ponieważ nie posiadają one zrekombinowanych receptorów antygenowych.^{3,4}

Codziennie w naszych organizmach powstają komórki nowotworowe, które dzięki prawidłowemu funkcjonowaniu systemu odpornościowego i mechanizmów ochronnych ulegają degradacji. Czasami jednak komórki szpiku mogą ulegać mutacjom i w zależności od rodzaju nieprawidłowości prowadzić do wystąpienia różnego rodzaju białaczek w tym ostrej białaczki szpikowej (AML). Białaczka ta według Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób ICD-10 należy do grupy C92 czyli głównej grupy białaczek szpikowych. W przypadku nabycia nieprawidłowości w DNA, dochodzi do proliferacji komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym prowadząc do nadprodukcji nieprawidłowo funkcjonujących białych krwinek, które cechuje znacznie dłuższy czas przeżycia, odporność na czynniki hamujące podziały i zdolność przenikania do krwi obwodowej, naciekania na różne tkanki a nawet na narządy. Następstwem tego jest zmniejszenie produkcji krwinek czerwonych czyli niedokrwistość jak również małopłytkowość, zakażenie czy nawet dysfunkcja niektórych narządów. Do rozwoju ostrej białaczki szpikowej przyczyniają się nie tylko choroby czy zmiany genetyczne ale także wpływ mają czynniki środowiskowe takie jak: promieniowanie jonizujące, związki chemiczne a nawet przyjmowane leki np. fenylobutazon czy cytostatyki np. inhibitory topoizomerazy II oraz leki alkilujące.¹

Ostra białaczka występuje najczęściej u osób dorosłych powyżej 60 roku życia i stanowi aż 80% wszystkich białaczek. Według danych literaturowych w ciągu roku na AML choruje średnio od 3.7 do 5 osób na 100 000 mieszkańców. Na ostrą białaczkę szpikową częściej chorują osoby starsze głównie przez mniejszą liczbę białych krwinek odpowiedzialnych za odporność organizmu oraz przez gorszą kondycję fizyczną. Ponadto z wiekiem długość telomerów chromosomu ulega skróceniu a krótsze telomery są mniej stabilne genetycznie. Konsekwencją tego są liczne uszkodzenia genetyczne komórek macierzystych oraz aberracji cytogenetycznych w obrębie 5 lub 5q, 7 lub 7q i 17 chromosomu. Jednak zależność ta nie została do końca wyjaśniona i nadal trwają prace tłumaczące wpływ wieku pacjenta z AML na nieprawidłowości w obrębie wskazanych chromosomów. Co więcej u osób w podeszłym wieku wzrasta śmiertelność tuż po rozpoczęciu pierwszego etapu leczenia. U osób tych prawdopodobieństwo wczesnego zgonu wzrasta aż do 82%. Oprócz tego naukowcy przypuszczają, że niepowodzenie w leczeniu osób starszych związane jest z pojawiającą się lekoopornością czy wytworzeniem mechanizmów chemooporności. Ponadto osoby starsze gorzej tolerują chemioterapie przez co leczeni są niższymi dawkami chemioterapeutyków. Dlatego też wyniki ich leczenia są gorsze w porównaniu z wynikami osób młodszych i średnia przeżycia wynosi jedynie od 5 do 10 miesięcy.^{1,5,6,7}

2.1.2. Sposoby leczenia ostrej białaczki szpikowej AML

Sposób leczenia ostrej białaczki szpikowej nie zmienił się zbyt wiele na przestrzeni ostatnich 30 lat. Wstępny etap leczenia osób chorych opiera się na kwalifikacji pacjenta do intensywnej chemioterapii indukcyjnej, której głównym celem jest osiągnięcie remisji choroby. Po jej osiągnięciu konieczna jest terapia poremisyjna.^{6,7} Oprócz chemioterapii wielolekowej w niektórych przypadkach stosuje się również przeszczep komórek krwiotwórczych.

Leczenie osób chorych odbywa się w 3 etapach:

1. indukcja remisji, której celem jest usunięcie komórek nowotworowych, śmiertelność na tym etapie leczenia wynosi od 10 do 15% i następuje głównie w wyniku infekcji, krwotoku oraz oporności na leczenie,
2. konsolidacja remisji, polega na usunięciu komórek resztkowych, które są chorobowo zmienione, na tym etapie leczenia wykonuje się przeszczep komórek krwiotwórczych,
3. leczenie pokonsolidacyjne, którego celem jest zapobieganie nawrotom choroby.

W terapii indukcyjnej nadal podstawę stanowi Cytarabina podawana we wlewie ciągłym z antracykliną. Cytarabina to analog nukleozydu pirymidynowego klasyfikowana jako antymetabolit cytozyny, który hamuje syntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego. Antymetabolity są bardzo podobne do substancji występujących w komórkach oraz specyficzne dla cyklu komórkowego przede wszystkim fazy S. W momencie zastosowania antymetabolitu dochodzi do pozbawienia komórki zdolności dzielenia się i namnażania. Cytarabina spowalnia lub całkowicie wstrzymuje wzrost komórek rakowych i stosuje się ją w celu uzyskania remisji choroby oraz zmniejszenia masy guza. Remisje choroby (CR) stwierdza się gdy obserwuje się mniej niż 5% blastów białaczkowych w szpiku kostnym oraz gdy normalizacji ulegnie morfologia krwi obwodowej. W oparciu o przeprowadzone badania udowodniono, że wykorzystanie Cytarabiny w monoterapii pozwala około 40% pacjentom uzyskać całkowitą remisję choroby. Jednak pomimo tego terapia skojarzona jest bardziej preferowana. Z kolei antracykliny to pochodne antrachinonu, antybiotyki stosowane w leczeniu chorób nowotworowych. Głównym ich przedstawicielem jest Daunorubicyna, która prowadzi do zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy) poprzez utworzenie trwałego, niemożliwego do rozplecenia kompleksu z helisą DNA. W Wielkiej Brytanii, Narodowy Instytut Badań nad Rakiem (NCRI) wykonał badania dotyczące wpływu większej dawki Daunorubicyny niż powszechnie stosowanej. Wpływ dawki badano u 1206 osób chorych na ostrą białaczkę szpikową poniżej 60 roku życia. Jednak badania te nie wykazały znaczącego wpływu dawki leku na całkowitą odpowiedź organizmu czy przeżycie. W przypadku pacjentów poniżej 60 roku życia pełną odpowiedź organizmu oszacowano na poziomie 60-85% natomiast w przypadku osób chorych powyżej 60 roku życia odpowiedź organizmu uzyskano na poziomie 40-60%. Przeprowadzone zostały także badania nad terapią Gemtuzumabem Ozogamycyny o nazwie Mylotarg, która wskazana jest do skojarzonego stosowania z Cytarabiną lub Daunorubicyną w leczeniu pacjentów w wieku 15 lat i starszych, chorych na ostrą białaczkę szpikową z ekspresją antygenu CD-33. Skuteczność tej terapii stwierdzono jedynie w przypadku osób chorych na AML z pośrednim oraz korzystnym obrazem cytogenetycznym. Natomiast u osób z niekorzystnym obrazem ciężko było jednoznacznie określić efekt terapeutyczny powyższego produktu leczniczego.^{7,8,9}

Z kolei terapia konsolidacyjna opiera się przede wszystkim na chemioterapii jak również przeszczepie komórek krwiotwórczych. W etapie tym w przypadku osób w wieku 60 lat i młodszych o korzystnym profilu genetycznym również wykorzystuje się Cytarabinę w dawkach pośrednich w 2 lub 4 cyklach. Natomiast u osób starszych o niekorzystnym obrazie

cytogenetycznym, współistniejącymi schorzeniami czy ogólnym złym stanem zdrowia, dla których standardowa chemioterapia jest za silna i nie zapewni całkowitej remisji choroby, proponuje się „delikatniejszą postać” chemioterapii, która polega na użyciu mniejszej dawki cytostatyku lub leczeniu eksperymentalnym polegającym na wprowadzeniu nowych terapii podtrzymujących.⁷ W mniej intensywnej chemioterapii wykorzystuje się mniejsze ilości Cytarabiny bądź leki hipometylujące takie jak: Decytabina czy Azacytydyna. Działanie ich sprawdzane było w dwóch dużych międzynarodowych badaniach klinicznych: CALBG 9221 i AZA-001. Zarówno Decytabina i Azacytydyna są pierwszymi lekami epigenetycznymi i analogami pierścieniowymi cytozyny o działaniu hipometylującym. Predyspozycje tych związków do hipometylacji wynikają przede wszystkim z ich zdolności do hamowania metylotransferaz kwasu deoksyrybonukleinowego. Co więcej Azacytydyna ma zdolność do wbudowania się w strukturę RNA, dzięki czemu wykazuje działanie we wszystkich fazach cyklu komórkowego podczas gdy Decytabina działa jedynie w fazie S cyklu komórkowego. Dzięki działaniu Azacytydyny we wszystkich fazach cyklu reguluje ona większą liczbę genów niż Decytabina i dodatkowo hamuje syntezę białek. W badaniu prowadzonym przez grupę CALBG (The Cancer and Leukemia Group B) oceniano terapię Azacytydyną podskórną lub dożylną co 4 tygodnie przez 7 dni. Z kolei celem badań prowadzonych w ramach projektu AZA-001 było wykazanie korzyści ze stosowania Azacytydyny w leczeniu osób chorych na ostrą białaczkę szpikową w porównaniu z konwencjonalnymi metodami leczenia (CCR *conventional care regiment*). Badanie to wykazało, że mediana przeżycia całkowitego (OS, *overall survival*) wydłużyła się do 24.5 miesiąca u osób otrzymujących Azacytydynę w porównaniu z pacjentami poddanymi standardowym metodom leczenia (CCR), dla których OS wynosiła 16 miesięcy. Dodatkowo udowodniono, że pacjenci przyjmujący Azacytydynę mają większe szanse na 2-letnie przeżycie wolne od choroby niż osoby poddane konwencjonalnym metodom leczenia. Wykazano również, że preparat ten był dobrze tolerowany przez pacjentów a ilość nabytych infekcji związanych z terapią Azacytydyną była zdecydowanie niższa. W grudniu 2008 Azacytydyna nazywana również Vidazą została zarejestrowana w Europie do leczenia osób z AML, którzy nie kwalifikują się do przeszczepu komórek krwiotwórczych. Z kolei w 2012 roku do leczenia ostrej białaczki szpikowej została zarejestrowana Decytabina, która podawana jest dożylnie w cyklu co 6 tygodni w pierwszym i trzecim dniu.^{10,11}

Chemioterapia to sposób leczenia, który prowadzi do usunięcia z organizmu pacjenta chorobowo zmienionych komórek. Po terapii tej dochodzi do odbudowy prawidłowo

funkcjonującego szpiku kostnego, jednak pomimo tej zalety terapia ta niestety prowadzi do uszkodzenia nie tylko komórek nowotworowych ale także zdrowych. Dodatkowo po chemioterapii u leczonej osoby może pojawić się szereg skutków ubocznych min:

- niedokrwistość (anemia), dochodzi do niej w wyniku spadku ilości produkowanych krwinek czerwonych,
- neutropenia, rozwija się, gdy w organizmie spada ilość produkowanych białych krwinek odpowiedzialnych za walkę z bakteriami, wirusami i różnego typu infekcjami,
- małopłytkowość, występuje gdy w wyniku zahamowania funkcji szpiku kostnego obniża się ilość płytek krwi odpowiedzialnych za proces krzepnięcia. Jeśli ich liczba jest zbyt mała może dochodzić do powstawania siniaków nawet w wyniku delikatnego uderzenia, przedłużonego lub nadmiernego krwawienia z ran, nosa, dziąseł czy krwawienia bez zranienia,
- utrata włosów,
- mdłości i wymioty,
- podrażnienia a nawet owrzodzenia jamy ustnej
- zmęczenie, przeziębienie.

Po przebytej chemioterapii pacjent może czuć ogólne osłabienie mogą też wystąpić problemy związane z pogorszeniem pracy serca i płuc, wysypka skórna oraz wiele innych. Niektóre z wymienionych skutków są tymczasowe a inne mogą niestety utrzymywać się przez dłuższy czas.¹²

W leczeniu chorób nowotworowych wykorzystuje się również radioterapie. Często sposób ten określany jest mianem terapii oszczędzającej przede wszystkim przez fakt iż terapia ta jest bezbolesna. Metoda ta polega na napromieniowaniu (naświetleniu) promieniami X miejsc chorobowo zmienionych oraz powstałych w węzłach chłonnych przerzutów. Radioterapia daje najlepsze rezultaty w przypadku bardzo wczesnych zmian nowotworowych, gdy masa powstałego guza jest jeszcze stosunkowo niewielka. W odróżnieniu od chemioterapii, w trakcie której uszkodzeniu ulegają zarówno komórki zdrowe jak i chore to stosowane w radioterapii promieniowanie jonizujące jest dużo bardziej skuteczniejsze w uszkodzaniu komórek nowotworowych niż zdrowych. Sam proces napromieniowania trwa zazwyczaj kilka minut, ale należy go powtarzać. W praktyce naświetlania prowadzone są przez kilka tygodni, zazwyczaj przez 5 dni z dwudniową przerwą w celu regeneracji zdrowych tkanek. Dodatkową zaletą radioterapii jest zdecydowanie większy zakres leczenia niż w przypadku zabiegów

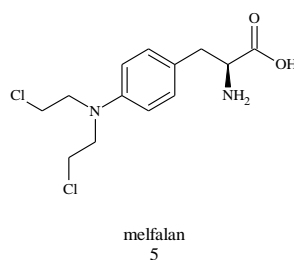
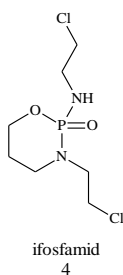
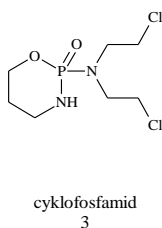
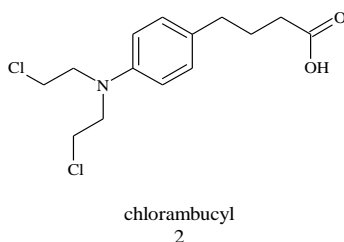
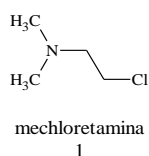
chirurgicznych, ponieważ dzięki dokładnie określonym dawkom promieniowania możliwa jest skuteczna eliminacja z organizmu pacjenta wszystkich komórek nowotworowych w obecnym guzie oraz w okolicznych węzłach chłonnych. O skierowaniu pacjenta na radioterapie decyduje głównie typ nowotworu i jego wrażliwość na napromieniowanie. Wszelkiego typu białaczki czy też chłoniaki złośliwe wykazują najwyższą wrażliwość na promieniowanie, z kolei nowotwory jelita grubego, tarczycy oraz mięsaki tkanek miękkich cechuje niska wrażliwość na promieniowanie. Pacjenci poddani radioterapii cierpią najczęściej z powodu odczynu popromiennego, który może pojawić się już po około 10 godzinach od pierwszej serii napromieniowania. Występuje on w postaci zaczerwienienia skóry jej owrzodzenia, pojawiają się również przebarwienia, swędzenie a nawet wysięk. Oparzenia po radioterapii trudno się goją a skóra nie zawsze wraca do formy sprzed leczenia. Mogą pojawić się na niej blizny i zgrubienia w wyniku uszkodzenia w trakcie naświetleń tkanki łącznej, naczyń oraz gruczołów potowych i łojowych. Po radioterapii wystąpić mogą również nudności, zapalenia błony śluzowej przewodu pokarmowego, suchość w jamie ustnej oraz zmiany w odczuwaniu smaku czy zapachu oraz problemy z apetytem.^{13,14,15}

Z wielu przeprowadzonych badań onkologicznych wynika, iż stosowanie samej chemioterapii lub skojarzonej z radioterapią w celu leczenia nie tylko ostrej białaczki szpikowej, ale również innych nowotworów złośliwych często prowadzi do rozwoju wtórnych nowotworów w tym wtórnej białaczki szpikowej (t-AML). W 2008 roku wtórna białaczka szpikowa (t-AML) została wyodrębniona przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) w ogólnym podziale nowotworów układu krwionośnego. Rozpoznaje się ją z częstością od 10 do 36%, częściej u kobiet niż mężczyzn. Duży wpływ na jej rozwój ma rodzaj stosowanego chemioterapeutyku a także jego dawka (leki alkilujące lub inhibitory topoizomerazy II) oraz samo promieniowanie jonizujące. Do czynników wpływających także na rozwój wtórnej białaczki należą również nieorganiczne związki platyny czy karboplatyny używane w dużych dawkach (Rysunek 1). W niektórych też przypadkach sami pacjenci wykazują dziedziczną skłonność do rozwoju wtórnej białaczki szpikowej. Przykładem predyspozycji genetycznej są osoby z zespołem Blooma czy Njmegena. Wtórna białaczka szpikowa podobnie jak pierwotna charakteryzuje się nieprawidłowościami w zakresie cytogenetyki, które wiążą się głównie z utratą całości lub części chromosomu 5 i/lub 7 a także częstymi mutacjami genów np.: NPM1 czy też FLT3. Niestety wyniki leczenia osób chorych ze zdiagnozowaną t-AML nie są zadowalające czego dowodem było uzyskanie w latach 80 po terapii indukującej jedynie 10% całkowitej remisji (CR) choroby. Próbowano także leczyć t-AML chemioterapią z dużymi

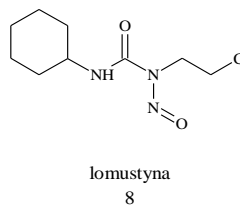
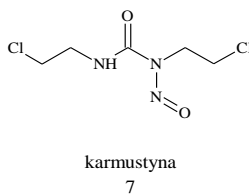
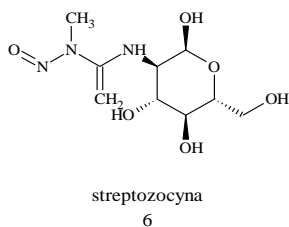
dawkami leku, jednak nie wykazano zmniejszenia ryzyka nawrotu choroby, czego przyczyną mogła być większa oporność klonu białaczkowego na stosowane leczenie. W związku z tym wielu ekspertów w kwestii leczenia zarówno pierwotnej ostrej białaczki szpikowej jak i wtórej ogromne nadzieje pokłada w terapiach transplantacyjnych.¹⁶

- **Czynniki alkilujące:**

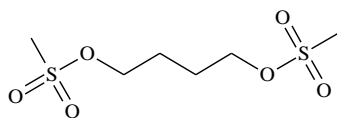
- **Pochodne iperytu azotowego:**



- **Pochodne nitrozomocznika:**

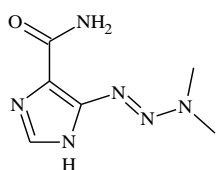


▪ **Pochodne alkilowe sulfonianów:**

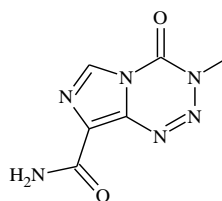


busulfan
9

▪ **Teriazyny:**

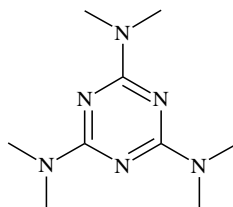


dakarbazyna
10



temozolomid
11

▪ **Etylenoiminy:**



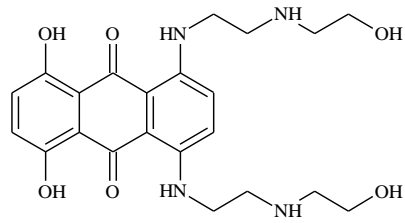
altretamina
12

▪ **Inhibitory topoizomerazy II:**

▪ **Akrydyny:**

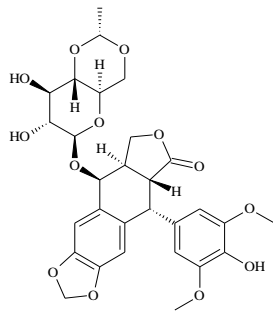
- m-AMSA (amsakryna), m-AMCA, AMCA, DACA

▪ **Antracenediony:**

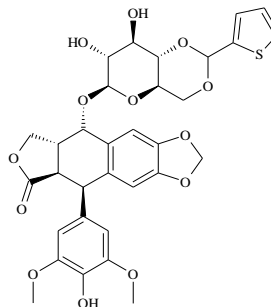


mitoksantron
13

▪ **Epipodofylotoksyny:**

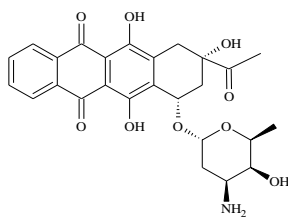


etopozyd
14

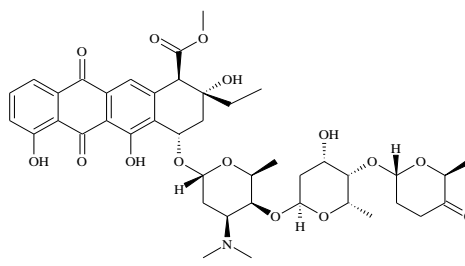


tenipozyd
15

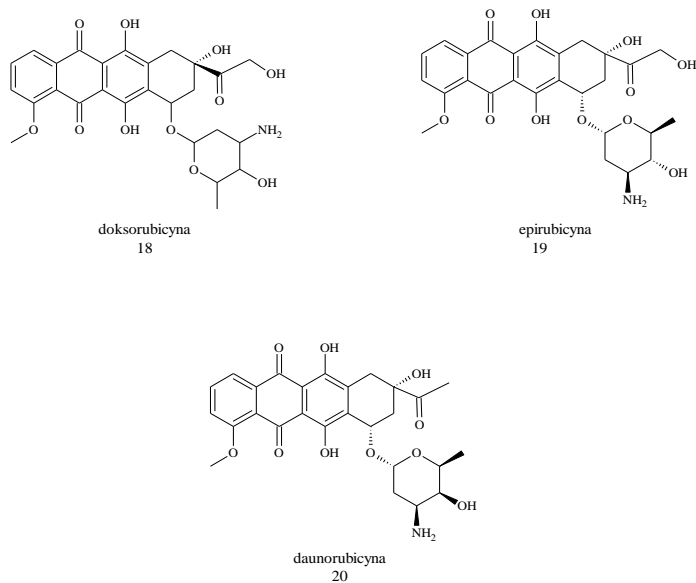
▪ **Antracykliny:**



idarubicyna
16



aklarubicyna
17



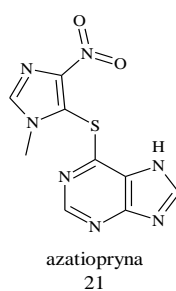
▪ **Inne:**

▪ *Asparaginaza*

▪ *Pochodne platyny:*

- cisplatyna, karboplatyna

▪ *Antymetaboly:*



Rysunek 1.: Chemioterapeutyki wpływające na rozwój wtórnej białaczki szpikowej (t-AML).

Z dostępnych danych literaturowych i przeprowadzonych badań wynika iż największą szansę na wyleczenie mają osoby poniżej 60 roku życia z łagodnymi zmianami cytogenetycznymi i molekularnymi bez zmian pozaszpikowych. Uważa się, że sama chemioterapia daje dużą szansę na wyleczenie jedynie w przypadku białaczki promielocytowej

w pozostałych przypadkach szansa na pełne wyleczenie jest bardzo mała i wynosi jedynie 10-15%. W leczeniu ostrej białaczki szpikowej po osiągnięciu już pierwszej remisji choroby bardzo często wykonuje się allogeniczny lub autologiczny przeszczep szpiku kostnego połączony z intensywną chemioterapią konsolidacyjną. Ponadto wielu lekarzy stwierdza, że przeszczepy dają większe szanse na przeżycie osób chorych na ostrą białaczkę szpikową niż sama chemioterapia konsolidacyjna z zastosowaniem dużych dawek Cytarabiny lub Daunorubicyny. Co więcej uważa się, że transplantacja komórek krwiotwórczych to najskuteczniejsza metoda leczenia ostrej białaczki szpikowej. Jednak ze względu na powikłania do przeszczepu kwalifikowani są jedynie Ci chorzy, którym leczenie to przyniesie największe korzyści i gdy prawdopodobieństwo nawrotu choroby jest duże natomiast ryzyko możliwych niebezpiecznych dla zdrowia i życia powikłań jest jak najmniejsze. Przeszczep polega na wymianie „chorego” bądź uszkodzonego szpiku na nowy poprzez dożylną podanie wcześniej pobranych komórek krwiotwórczych. Pacjenci, którzy mają spokrewnionego lub niespokrewnionego ale identycznego pod względem HLA kierowani są do przeszczepu allogenicznego. HLA to antygeny zgodności tkankowej, które są produktem układu genów HLA znajdujących się na krótszym ramieniu chromosomu 6. Antygeny HLA odpowiadają przede wszystkim za tak zwaną tolerancję immunologiczną. Ponadto odpowiedzialne są także za rozpoznanie własnych komórek oraz tkanek. Jeśli układ ten rozpozna „obce” komórki wówczas przy udziale limfocytów dochodzi do odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko nim, czego wynikiem jest odrzucenie przeszczepu. Dlatego też tak wiele zależy w przypadku transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych od zgodności pacjenta i jego dawcy w zakresie układu HLA. Wyróżnia się 3 klasy (I, II i III) antygenów zgodności tkankowej HLA, z czego w przypadku transplantacji komórek krwiotwórczych największe znaczenie mają antygeny HLA klasy I czyli HLA-A, HLA-B, HLA-C oraz klasy II; HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1. Każdy człowiek posiada dwa komplety antygenów HLA klasy I i II (haplotypy), z czego jeden pochodzi od matki a drugi od ojca co powoduje dużą różnorodność genetyczną. Dla każdego antygeny występują liczne kombinacje, przez co tak trudno znaleźć odpowiedniego dawcę. Zgodność antygenowa zapewnia tolerancję immunologiczną, dzięki której układ odpornościowy osoby chorej nie potraktuje przeszczepionych komórek krwiotwórczych jako obce ciało, które należy zwalczyć. Ponadto im większe podobieństwo pod względem HLA biorcy i dawcy, tym jest większa szansa na przyjęcie przeszczepu oraz mniejsze ryzyko rozwinięcia się choroby (przeszczep przeciw gospodarzowi, GVHD), która jest najpoważniejszym powikłaniem terapii transplantacyjnej. Gdy dawcą szpiku jest członek rodziny np. brat lub siostra wówczas oprócz zgodności

antygenowej na poziomie HLA występują także podobne inne geny, dzięki czemu ryzyko powikłań po przeszczepie jest zdecydowanie mniejsze. Jeśli w gronie najbliższych nie ma dawcy zgodnego z pacjentem na poziomie HLA wówczas prowadzone są poszukiwania osoby, która mogłaby zostać dawcą szpiku. W celu określenia antygenów zgodności tkankowej wykonuje się badania serologiczne, w których oznaczane są antygeny A, B, C, DRB1, DQB1 i DPB1 lub badania DNA. Do badań wykorzystuje się również wymaz z wewnętrznej strony policzka. Próbka ta jest bardziej preferowana do tego typu badań niż krew, głównie przez fakt, iż jest bardziej stabilna nawet po kilku dniach od jej pobrania oraz na jej jakość nie mają wpływu przyjmowane leki. Niestety nie tak łatwo jest znaleźć „bliźniaka genetycznego”, ponieważ prawdopodobieństwo znalezienia odpowiedniej osoby, od której można byłoby pobrać szpik wynosi 1 do 20 000, natomiast w przypadku rzadkiego genotypu prawdopodobieństwo jest jeszcze mniejsze. Informacje dotyczące antygenów HLA przesyłane są do bazy dawców (DKMS) aby przyspieszyć proces poszukiwania odpowiedniego dla osoby potrzebującej przeszczepu szpiku lub komórek macierzystych dawcy.¹⁷ W celu przeszczepu od dawcy pobierane mogą być komórki krwiotwórcze, szpik kostny z kości biodrowej i komórki krwiotwórcze z krwi pępowinowej. Przeszczep allogeniczny w przeciwieństwie do autologicznego chroni w większym stopniu przed nawrotem choroby, zapewnia także krótszy czas regeneracji neutrofilów czy też płytek krwi. Potwierdzeniem tego faktu są wyniki otrzymane z badań przeprowadzonych przez holenderską grupę badawczą, które wykazały iż w przypadku przeszczepu allogenicznego regeneracja neutrofilów następuje w ciągu 21 dni a płytek krwi już po 19 dniach. Natomiast w przypadku przeszczepu autologicznego do regeneracji neutrofilów dochodzi po 39 dniach, natomiast płytek dopiero po 2 miesiącach.¹⁸ Ponadto ten rodzaj przeszczepu daje aż 60% szansę na remisję choroby a nawet jej pełne wyleczenie. Niestety ze względu na możliwe powikłania związane z częstym występowaniem toksyczności narządowej czy infekcji oraz ryzykiem odrzucenia przeszczepu, śmiertelność jest wyższa. Co więcej po przeszczepie allogenicznym u pacjenta aktywują się liczne wirusy, które wcześniej były w stanie uśpienia i w wyniku osłabienia organizmu wywołują one różnego typu stany zapalne. Osoby, które nie mają dawcy kierowani są na przeszczep autologiczny, który również zastępuje zniszczone lub uszkodzone komórki krwiotwórcze zdrowymi, oddanymi wcześniej przez pacjenta po uzyskaniu remisji choroby. Pobrane komórki są zamrażane i przechowywane często w znormalizowanym roztworze soli Hanka, do momentu aż pacjent będzie gotowy na przeszczep. Szpik kostny pobierany jest podobnie jak w przypadku przeszczepu allogenicznego na drodze wielu nakłuć kości biodrowej, często też pobiera się komórki krążące po całym organizmie. Przed przeszczepem konieczna jest chemioterapia w celu usunięcia resztkowych

komórek nowotworowych oraz zniszczenia lub spowolnienia procesu ich wzrostu, podziału czy namnażania. Przeszczep ten daje jedynie 40% szans na wyleczenie jednak wiąże się on z mniejszą ilością niebezpiecznych dla życia pacjenta powikłań. Niestety u większości pacjentów po chemioterapii oraz przeszczepie dochodzi do nawrotu choroby. Spowodowane jest to często krótkotrwałym poniżej 6 miesięcy okresu remisji choroby, niekorzystnymi czynnikami genetycznymi, starszym wiekiem, zbyt wczesnym przeszczepem allogenicznym a także ogólnym złym stanem zdrowia.^{5,6} Jak można zauważyć w przypadku nowotworów płuc czy tarczycy rokowania co do przeżycia 5 lat są obiecujące ale niestety w kwestii ostrej białaczki szpikowej procent przeżycia 5 lat wynosi jedynie 26%, dlatego wciąż istnieje zapotrzebowanie na leki nowej generacji, które będą skuteczne a przede wszystkim bezpieczne w leczeniu osób chorych na AML i zapobiegą nawrotom choroby oraz możliwemu rozwojowi wtórnej białaczki szpikowej (t-AML).

2.2. Rola i budowa kinazy FLT3

2.2.1. Rola kinazy FLT3 w organizmie ludzkim

Kinaza białkowa to nic innego jak enzym, który zaangażowany jest w proces przeniesienia grupy γ -fosforanowej z ATP na reszty białkowe zawierające w swej strukturze grupę hydroksylową. Ludzki genom obejmuje około 535 białek kinazy. Białkowe kinazy ze względu na resztę substratu podzielić można na: kinazy tyrozynowe w tym receptorowe i niereceptorowe, kinazy serynowo–treoninowe oraz tyrozynowe enzymy podobne do kinazy.¹⁹

Zgodnie z powyższą klasyfikacją kinaz białkowych, FLT3 jest kinazą tyrozynową należącą do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych klasy III (RTK III), odpowiadających za komunikację między komórkami. Wiadomo także, że receptory to nic innego jak wyspecjalizowane komórki bądź narządy zmysłowe odbierające sygnały z otoczenia. Receptory zazwyczaj mają spiralną strukturę i w momencie odbioru sygnału stymulującego grupują się w dimer (czyli połączenie dwóch receptorów). Receptorowe kinazy tyrozynowe odpowiadają za szereg procesów zachodzących w komórce min: za proces proliferacji czyli namnażania się komórek, ich różnicowania, adhezji, ruchliwości, metabolizmu oraz zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy). Ponadto kinazy tyrozynowe to dodatkowo enzymy, które za pomocą ATP regulują proces fosforylacji wybranych reszt tyrozynowych w wybranych białkach. Dodatkowo kinazy tyrozynowe odbierają sygnał z otoczenia, który następnie za pośrednictwem wielu cząsteczek wewnątrzkomórkowych przekazywany jest dalej. Odpowiadają one również za prawidłowy rozwój komórek macierzystych i układu odpornościowego. Udało się także wyznaczyć struktury dla kompleksów jakie tworzą receptorowe kinazy tyrozynowe klasy III (RTK III) dzięki wykorzystaniu metod hybrydowych w dziedzinie biologii strukturalnej. Rodzina RTK klasy III obejmuje aż 20 podrodzin, do których oprócz kinazy FLT3 należą także: kinaza (STK1), receptory płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR), receptory czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR), receptory czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR), receptory czynnika wzrostu nerwów (NGFR) oraz KIT.^{20,21,24,28,42} Pomimo nadzoru szeregu procesów w komórce przez receptorowe kinazy tyrozynowe znane są one również z mutacji, które niestety wpływają na rozwój różnych chorób nowotworowych w tym ostrej białaczki szpikowej.²³

Gen kodujący kinazę FLT3 znajduje się na 13 chromosomie w pozycji q12 i składa się z 24 egzonów chociaż wcześniejsze badania sugerowały obecność jedynie 21 egzonów. Gen

ten zawiera około 96 par zasad.^{25,42} Jego rozmiar nie został dokładnie określony głównie przez obecność dużego intronu występującego pomiędzy 2 i 3 egzonem.⁵⁰ Wynikiem ekspresji genu FLT3 są min. progenitorowe komórki krwiotwórcze szpiku kostnego oraz limfopoetyczne grasicy i węzłów chłonnych. W oparciu o wyniki z licznych badań stwierdza się, że w trakcie procesu różnicowania się komórek, ekspresja genu FLT3 na początku ulega znacznemu osłabieniu a później praktycznie zanika.^{27,28,45,51}

2.2.2. Budowa kinazy FLT3

Kinaza FLT3 zbudowana jest z:

- zewnątrzkomórkowej domeny (ED), która z kolei składa się z pięciu immunoglobulino pochodnych domen, z których każda posiada po 100 reszt aminokwasowych (Ig-pochodne). Trzy z nich najbardziej oddalone od błony odpowiedzialne są za wiązanie liganda natomiast dwa pozostałe zaangażowane są w proces dimeryzacji receptora,
- domeny transbłonowej (TM),
- domeny przyściennej (JMD) znajdującej się w błonie komórkowej,
- wysoce konserwatywnej wewnątrzkomórkowej domeny kinazy tyrozynowej (TKD) podzielonej na dwie podstruktury: TKD I i TKD II oraz „koniec-C”. Zarówno I jak i II domena kinazy tyrozynowej określane są jako „płat N i C”, połączone ze sobą pojedynczym elastycznym odcinkiem polipeptydowym nazywanym domeną interkinazy, która umożliwia ruch obrotowy dwóch domen względem siebie.^{30,47,50}

Domena zewnątrzkomórkowa dzięki „N-końcowi” odpowiedzialna jest za proces przyłączenia odpowiednich ligandów, czyli odpowiada za wychwytywanie sygnałów molekularnych.^{21,22,23,42,50} Z kolei domena transbłonowa odpowiedzialna jest za proces dimeryzacji, który zachodzić może również pod nieobecność ligandów oraz domeny zewnątrzkomórkowej. Natomiast domena wewnątrzkomórkowa ulega różnego typu modyfikacjom chemicznym w celu powiązania z innymi białkami obecnymi wewnątrz komórki. Proces ten zachodzi dzięki zawartej w domenie wewnątrzkomórkowej TKD II pętli aktywacyjnej, która umożliwia przyłączenie kolejnych substratów.^{21,23} Wszystkie receptory z grupy kinaz tyrozynowych z wyjątkiem receptora insuliny i insulinopodobnych występują w stanie nieaktywnym jako monomer (inhibitor). Dimer powstający po związaniu się z ligandem, jest dopiero w pełni gotową strukturą do przekazania sygnału, bowiem uważa się, że dopiero dimer aktywuje międzycząsteczkową autofosforylację receptorów. Utworzenie dimeru prowadzi następnie do stymulacji szeregu cząsteczek efektorowych, wpływających na

proces fosforylacji substratów cytoplazmatycznych regulujących proces namnażania i różnicowania niedojrzałych komórek krwiotwórczych.^{21,45}

Domena przyścienna (JMD), pętla aktywacji oraz „płaty N i C” wewnątrzkomórkowych domen kinazy tyrozynowej uczestniczą w stabilizacji kinazy oraz ochronie jej nieaktywnej konformacji. Tak więc struktury te zapewniają autoinhibicje receptora.

„Płat N” składa się z pięcioniciowej antyrównoległej struktury β określanej jako ($\beta 1$ - $\beta 5$), która przylega do α -helisy nazywanej αC . Z kolei „płat C” zawiera siedem helis α (αD , αE , αEF , αF - αI) oraz trzy nici β ($\beta 6$, 7 i 8). Pętla aktywacyjna, przyłączona jest do „płata C” i występuje w formie długiego elastycznego fragmentu peptydowego zawierającego dwie dodatkowe nici $\beta 10$ i $\beta 11$. Nić $\beta 6$ łączy się z nicią $\beta J1$ w domenie przyściennej, która zawiera dodatkową nić $\beta J2$.

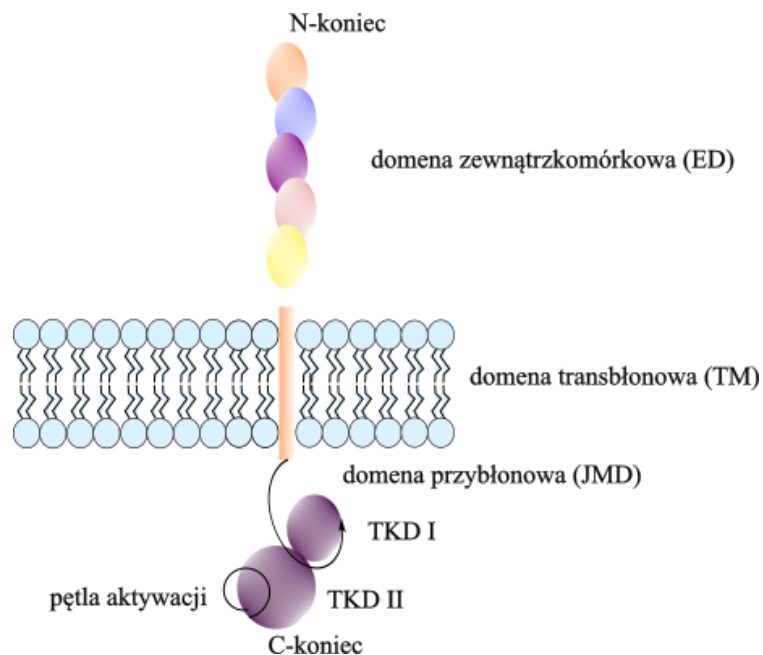
Pętla aktywacji: łączy nić $\beta 8$ z helisą αEF . Jej końce ograniczone są przez sekwencje Asp829-Phe830-Gly831 oraz Trp854-Met855-Ala856, które zlokalizowane są na N i C końcowych zawiasach pętli. Reszta Asp829 pełni funkcje zasady katalitycznej i uczestniczy w fosfotransferowych reakcjach. Gdy reszty tyrozynowe nie są fosforylowane wówczas pętla aktywacji wchodzi w szczelinę między „płatami N i C”, ograniczając w ten sposób dostęp do miejsca wiązania ATP. Pętla FLT3 w odróżnieniu od pozostałych pętli kinaz, posiada tylko jedną niefosforylowaną resztę tyrozyny (Tyr842). Zamknięta postać pętli stabilizowana jest przez pierścień fenyłowy skierowany do miejsca aktywnego oraz wiązaniem wodorowym z łańcuchem bocznym Asp811, który tworzy dodatkowo parę jonową z łańcuchem bocznym Arg834.

Domena przyścienna: tworzona jest przez trzy komponenty budulcowe: wiążący (JM-B), przełącznik (JM-S) oraz suwak (JM-Z).

Element wiążący (JM-B) zawiera reszty Tyr572-Met578 i jest praktycznie całkowicie schowany w strukturze kinazy FLT3. Rozpoczyna się tyrozyną (Tyr572) i pomimo, że składa się jedynie z siedmiu reszt to łączy się ze wszystkimi strukturami odpowiedzialnymi za aktywację kinazy. Odcinek ten łączy się z przełącznikiem (JM-S) w wyniku wydłużenia jego nici β opisywanej jako $\beta J1$. Dodatkowo kompozycja wiążąca pełni funkcje tzw. „klinu”, bowiem stabilizuje nieaktywną konformację kinazy poprzez ograniczanie rotacji „płata N” w kierunku „płata C”, która niezbędna jest do wytworzenia aktywnego fałdu kinazy. Ponadto właściwości stabilizacyjnych struktury (JM-B) nadaje bliskie sąsiedztwo z N-końcowym zawiasem pętli aktywacyjnej.

Przełącznik (JM-S) składa się z 14 reszt (Val579-Val592) w postaci dwuniciowego skrętu β zlokalizowanego na końcu „płata C”. Struktura ta określana jest jako przełącznik dlatego, że zawiera dwie ważne reszty tyrozynowe, których fosforylacja wpływa na aktywację kinazy. Dzięki przedłużeniu nici β a dokładniej β J1 przełącznik wiąże się z (JM-B), pomiędzy Met578 a Val579. Z kolei nić β J1 kończy się na reszcie Val581, której pięciorezstwowa pętla łączy się z czteroosztową nicią β J2 posiadającą dwie tyrozyny (Tyr589 i Tyr591). Tyrozyny te skierowane są bezpośrednio na „płatek C”. Sugeruje się, że głównym zadaniem przełącznika jest zapewnienie sztywnego połączenia się z elementem wiążącym aby reszty tyrozynowe (Tyr589 i Tyr591) wstawiły się pomiędzy nim a „płatem C”.

Z kolei suwak (JM-Z), znajduje się na C-końcu domeny przyściennej i związany jest z „płatem N”. Zawiera w swej strukturze (Asp593-Trp603) i zapętla się wokół α -helisy. Co więcej uważa się, że region ten podlega licznym obrotom względem „płata N” umożliwiając w ten sposób przełącznikowi (JM-S) na prawidłową aktywację bądź też autoinhibicję kinazy FLT3.⁴⁷ Schemat budowy kinazy FLT3 przedstawiony jest poniżej (Rysunek 2).



Rysunek 2. Budowa kinazy FLT3.²³

2.2.3. Ligand kinazy FLT3

Ligand FLT3 przyłącza się do „N-końca” domeny zewnątrzkomórkowej i często zapisywany jest w skrócie jako FL. Jest białkiem transbłonowym typu I o masie 20 kD. Powstaje z komórek zrębowych szpiku i może być uwalniany jako rozpuszczalne białko homodimeryczne i ulegać ekspresji w komórkach hematopoetycznych szpiku kostnego, szpiku fibroblastów oraz limfocytów typu T i B.^{32,50,51} Może on występować także w postaci trzech izoform jako:

- glikoproteiny o masie cząsteczkowej 30 kD z czterema α -helisami z domeną zakończoną grupą aminową i cytoplazmatycznym regionem odpowiedzialnym za wiązanie się i aktywacją receptora,
- aktywnie biologicznej i rozpuszczalnej postaci,
- struktury powstającej na drodze alternatywnego splicingu, którego wynikiem jest przedwczesny kodon stop.

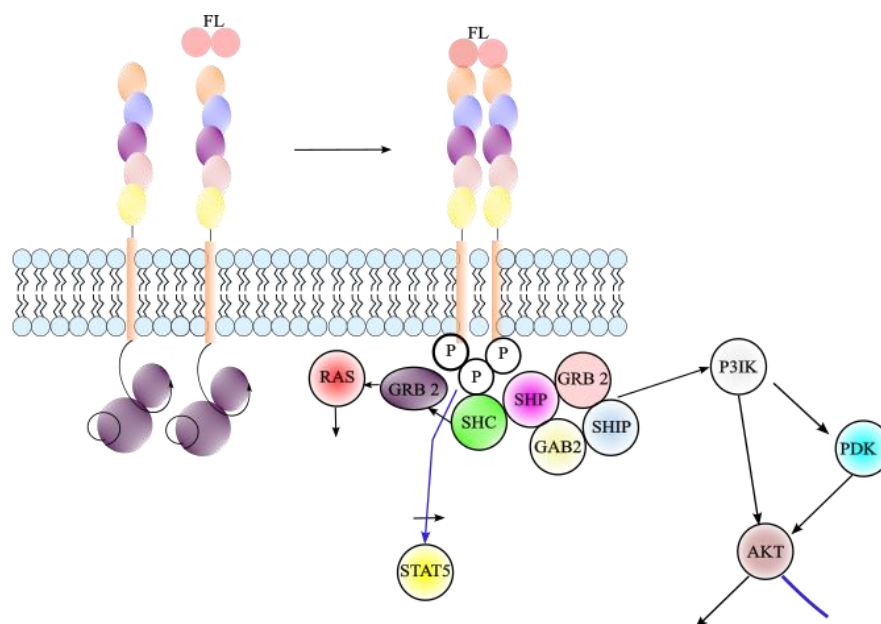
Ligand FLT3 wpływa na aktywność receptora kinazy tyrozynowej i pobudza proces wzrostu komórek progenitowych w szpiku kostnym. Proces ten zachodzi jedynie przy współdziałaniu z innymi krwiotwórczymi czynnikami wzrostu i interleukinami, ponieważ sam FL podobnie jak ligand c-KIT nie mają zdolności do aktywnego namnażania prawidłowych komórek szpikowych czy też limfoidalnych. W przypadku komórek białaczkowych, ligand FL aktywuje receptor FLT3 co sprzyja namnażaniu oraz przetrwaniu komórek blastycznych w wyniku spowolnienia apoptozy.^{20,24,30,50}

2.2.4. Kinaza FLT3 typu „dzikiego” (FLT3-WT)

Liczne badania wskazują także na występowanie kinazy FLT3 typu „dzikiego”, występującą na powierzchni komórki w postaci monomeru i nieaktywnej formie. Dopiero po związaniu się z ligandem dochodzi do dimerazacji, której następstwem jest aktywacja wielu procesów komórkowych.^{50,51} FLT3 typu „dzikiego” wyrażana jest głównie przez komórki CD34⁺ szpiku kostnego oraz przez niewielką część komórek typu CD34⁻. FLT3 typu „dzikiego” o skrócie (FLT3-WT) zaangażowana jest w metabolizm fosfolipidów, transkrypcje oraz aktywację wielu szlaków min.: PI3K, RAS, STAT. Receptor FLT3 „typu dzikiego” może aktywować zarówno prawidłowo jak również nieprawidłowo funkcjonujący szlak sygnalizacyjny, ponieważ (FLT3-WT) ulega ekspresji w kilku przypadkach nowotworów hematologicznych. Ekspresja kinazy FLT3 typu „dzikiego” stanowi aż 93% przypadków ostrej białaczki szpikowej.^{34,35,50}

2.2.5. Mechanizm aktywacji receptora kinazy FLT3

Gdy receptory kinaz tyrozynowych nie są związane z żadnym ligandem pozostają w stanie nieaktywnym przyjmując konformację cis. Za stan ten odpowiedzialna jest głównie domena przyścienna (JMD), która zajmuje miejsce pomiędzy „końcem C i N” domen kinazy tyrozynowej generując w ten sposób utworzenie nieaktywnej struktury. Uważa się również, że receptor FLT3 występuje w postaci nieaktywnej gdy „płatek N” odwrócony jest od domeny kinazy na końcu karboksylowym. Natomiast w sytuacji gdy oba „płaty” domeny obrócone są w tym samym kierunku wówczas istotne reszty katalityczne są wyrównane co prowadzi do zmiany konformacji kinazy na aktywną.⁵⁰ Mechanizm aktywacji oraz dalszej sygnalizacji receptorowych kinaz tyrozynowych zależy również od procesu wiązania odpowiednich ligandów z domeną zewnątrzkomórkową (ED). Proces ten z kolei prowadzi do utworzenia tzw. homodimeru w błonie komórkowej czyli aktywnego kompleksu receptor-ligand. Po utworzeniu aktywnej struktury trans dochodzi do autofosforylacji receptora za pośrednictwem powstającego fosforanu w wyniku przekształcenia adenozynotrójfosforanu (ATP) w adenozynodifosforan. Autofosforylacja prowadzi również do wychylenia się bocznych łańcuchów tyrozyny i aktywacji szeregu cząsteczek efektorowych odpowiedzialnych za regulowanie wielu procesów o których wspomniano wcześniej (Rysunek 3).^{22,32} Do cząsteczek efektorowych należy między innymi kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), białko RAS oraz cytoplazmatyczny czynnik transkrypcyjny genów STAT5, które następnie są aktywowane poprzez utworzone z białkami adaptorowymi takimi jak SHC, GAB2, SHP, SHIP czy też GRB2 kompleksy. Aktywna dzięki powstałym kompleksom kinaza PI3K katalizuje reakcję fosforylacji 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) do 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP3). Powstały w ten sposób fosfolipid bierze z kolei udział w procesie aktywacji kinazy białkowej B (AKT), która to na drodze fosforylacji aktywuje kolejne białka odpowiedzialne za proces proliferacji, wzrostu czy przeżycia komórek.²⁵



Rysunek 3. Szlak sygnalizacyjny generowany w wyniku dimeryzacji zachodzącej wskutek przyłączenia się liganda FL do receptora FLT3.²⁵

Z przedstawionych powyżej informacji wynika, że dopiero aktywowana postać kinazy FLT3 pobudza szereg szlaków sygnalizujących wewnątrz komórki, regulując tym samym proces dojrzewania, przeżycia, namnażania czy różnicowania się komórek krwiotwórczych.⁶⁰

2.3. Mutacje kinazy FLT3 w rozwoju ostrej białaczki szpikowej

Mutacje kinazy FLT3 powstają na drodze stałej aktywacji receptora FLT3 niezależnej od liganda w komórkach białaczkowych.^{32,33} Stwierdzono, że aż 30% osób chorych na ostrą białaczkę szpikową posiada zmutowaną kinazę FLT3. Przyczyną tego może być nadekspresja genu FLT3 do której dochodzi już na poziomie RNA³⁸ bądź też autokrynne lub parakrynne wydzielanie liganda FL. Jednak główną przyczyną nieprawidłowości w funkcjonowaniu receptora FLT3 są przede wszystkim mutacje aktywujące kinazę FLT3, zlokalizowane w obszarach domeny przybłonowej oraz wewnątrzkomórkowej domenie kinazy tyrozynowej (TKD).^{22,26,28,31} Wynikiem mutacji jest nieprawidłowa sygnalizacja wewnątrzkomórkowa następstwem której jest niekontrolowany proces namnażania komórek białaczkowych oraz gromadzenie niedojrzałych morfologicznie i czynnościowo komórek krwiotwórczych.^{27,28,29} Dodatkowo nieprawidłowości, które są następstwem mutacji często też prowadzą do zaburzeń

cyklu komórkowego, zakażenia i dysfunkcji narządów. Wszystkie typy mutacji FLT3 niekorzystnie wpływają na uzyskanie całkowitej remisji (CR) choroby po zastosowanym leczeniu, powodują nawroty choroby oraz skracają czas przeżycia pacjenta.³¹ Ze względu na częstość występowania mutacji FLT3, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), National Comprehensive Cancer Network (NCCN) i europejska LeukemiaNet (ELN) zalecają wykonywanie badań genetycznych FLT3 z testami cytogenetycznymi i przesiewowymi w chwili zdiagnozowania u pacjenta AML nie tylko w celach diagnostycznych ale przede wszystkim w kwestii wyboru dla chorego jak najlepszej terapii leczenia, która przyniesie oczekiwane rezultaty.²⁶

2.3.1. Rodzaje mutacji kinazy FLT3

Mutacje genetyczne receptorowych kinaz tyrozynowych klasy III mają ogromny wpływ na rokowania pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Nadeskpresja genu FLT3 jest jednym z czynników sprzyjających rozwojowi ostrej białaczki szpikowej AML. Uważa się także, że na wystąpienie mutacji wpływ ma wiek pacjenta bowiem obserwowane są one częściej u osób powyżej 50 roku życia.^{30,31} Rzadziej stwierdza się mutacje związane z autokrynną lub parakrynną aktywacją receptora FLT3.^{27,28,31} Jednak kwestia ta nie została jeszcze do końca wyjaśniona i nadal trwają badania mające na celu określenie wpływu autokrynnnej i parakrynnnej aktywacji kinazy FLT3. W temacie aberracji również często wskazuje się na rolę receptora FLT3 „typu dzikiego”, który również aktywuje szlak sygnalizacyjny w komórce. Tak więc może on aktywować zarówno prawidłowy jak i nieprawidłowo funkcjonujący szlak sygnalizacyjny.^{32,34,35}

Dodatkowo uważa się, że mutacje kinazy FLT3 prowadzą do konstytutywnej aktywacji poprzez zmianę konformacji i umożliwiają tym samym nieograniczony dostęp do pętli aktywacyjnej. W udowodnieniu tego stwierdzenia pomogła określona w 2004 roku struktura krystaliczna kinazy FLT3.⁵¹

Wyróżnia się dwa główne typy mutacji:

- wewnętrzną duplikację tandemową (FLT3-ITD)
- punktową (FLT3-TKD)

Powyższe mutacje należą dodatkowo do II klasy mutacji zaangażowanych w leukemogenezę i klasyfikowane są jako aktywne.³⁷

2.3.1.1. Wewnętrzna duplikacja tandemowa (Internal Tandem Duplication)

Nieprawidłowość ta została odkryta w 1991 roku^{47,48} i opisana w literaturze naukowej po raz pierwszy przez Nakao i jego zespół badawczy. Pomimo często prawidłowego kariotypu u osób chorych obserwuje się wysoki poziom blastów we krwi co niestety wiąże się z krótkotrwałą odpowiedzią na zastosowane leczenie, częstszymi nawrotami choroby oraz krótkim czasem remisji choroby (CR), całkowitym czasem przeżycia (OS) i czasem przeżycia wolnego od nawrotów.^{42,44} Mutacje tą stwierdza się u około 30% pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Wewnętrzna duplikacja tandemowa (FLT3-ITD) występuje w domenie przyściennej (JMD) kodowanej przez 14 i 15 egzon.^{27,28,29,45} Związana jest z powtarzaniem się od 3 do 400 par zasad najczęściej lecz nie zawsze w pobliżu 590 i 600 sekwencji aminokwasowej FLT3.^{38,42} Wstawienie zduplikowanych fragmentów przebiega w kierunku głowa → ogon w obrębie wymienionych wyżej egzonów. Insercje (IS, insertion sites) charakteryzuje duża zmienność lokalizacji oraz wielkość powtórzonych fragmentów.²⁷ Obecność tych samych sekwencji powoduje wydłużenie się domeny (JMD) co ma ogromny wpływ na dostępność pętli aktywacyjnej oraz proces autoinhibicji.⁵¹ U każdego pacjenta lokalizacja oraz długość zduplikowanych fragmentów różni się. Jednak nowe transkrypty zawsze pozostają w tzw. ramce.³⁶ Jak wcześniej wspomniano, domena przyścienna, dzięki strukturze wiążącej, przełącznika oraz suwaka, oprócz funkcji stabilizacji kinazy FLT3 pełni także funkcje ochronne nieaktywnej konformacji kinazy poprzez zawadę steryczną. Tak więc powyższy rodzaj nieprawidłowości skutkuje utratą przez domenę przyścienną mechanizmu autohamującego i w konsekwencji dochodzi do konstytutywnej aktywacji receptora.^{44,45}

2.3.1.2. Mutacje punktowe (FLT3-TKD, FLT3-D835)

Zostały zidentyfikowane w 2001 roku i określane są jako mutacje zmieniające sens genu FLT3. Najczęściej występują w pętli aktywacyjnej (D835).^{52,54} Polegają na podstawieniu pojedynczego aminokwasu (Asp835) w egzonie 20, który odpowiedzialny jest za kodowanie sekwencji aminokwasów w cząsteczce białka. W wyniku ich działania najczęściej dochodzi do zamiany kwasu asparaginowego na tyrozynę (D835Y) na drodze mutacji GAT→TAT, rzadziej stwierdza się podstawienie przez walinę (D835V) w wyniku zmiany GAT→GTT, histydynę (D835H), która to z kolei jest następstwem zmiany aminokwasu GAT na CAT czy też resztę kwasu glutaminowego (D835E) lub asparaginę (D835N).⁵⁰ Substytucje te sprawiają, iż receptor wykazuje dłuższą aktywność bez obecności swojego liganda. Nieprawidłowość ta może wystąpić także w kodonie 680 (egzon 16), która polega na podstawieniu waliny w miejscu

alaniny (A680V). Mutacje punktowe wyrażane są nie tylko poprzez substytucje ale także wynikają z delecji. Przykładem takiej mutacji punktowej powstałej w wyniku delecji jest nieprawidłowość (I836).³⁹ Jednak izoleucyna może również jak kwas asparaginowy (D835) ulec podstawieniu najczęściej przez asparaginę (I836N) oraz metioninę (I836M).⁵⁰

Mutacje punktowe są mniej powszechne a ich pojawienie nie zależy od wieku czy płci pacjenta. U pacjentów z ostrą białaczką szpikową częstość występowania tej mutacji szacuje się na 5-10%.⁴³ W mniejszym stopniu wpływają na rokowanie osób chorych w momencie rozpoznania. Niemniej jednak są klinicznie ważne, bowiem potwierdzono, że wpływają one na rozwój oporności lekowej, pojawiającej w trakcie terapii leczenia ostrej białaczki szpikowej różnego rodzaju inhibitorami FLT3. Co więcej liczne badania i analizy wykazały iż aberracje punktowe pojawiają się też wraz z nawrotem choroby białaczkowej jako tzw. mutacje wtórne. Mutacje (FLT3-TKD) uważa się także za nieprawidłowości somatyczne związane z białaczką.^{29,40,51,55}

Oprócz „klasycznych” typów mutacji FLT3 w literaturze naukowej pojawiły się doniesienia o innych przypadkach aberracji. Do nieprawidłowości tych należy między innymi mutacja zewnątrzkomórkowa typu K429E.¹¹² W egzonie 20 stwierdzono również mutacje polegające na wstawieniu glicyny lub seryny między aminokwasami 840 i 841. Dotyczą one głównie pacjentów z nowo zdiagnozowaną AML. Natomiast u chorych z nieprawidłowościami cytogenetycznymi, u których doszło do nawrotu choroby odkryto także zmiany związane z podstawieniem tyrozyny kodonem cysteiny 842 (Y842C) lub asparaginy 841.⁵⁰

2.4. Rola i znaczenie inhibitorów FLT3

Od dawna chemioterapia była standardową metodą leczenia chorób nowotworowych. Niestety niszczenie zarówno komórek nowotworowych jak i prawidłowo funkcjonujących oraz skutki uboczne i toksyczność tej terapii spowodowało rozwój leków celowanych. W odróżnieniu od leków wykorzystywanych w chemioterapii, leki celowane muszą wykazywać aktywność terapeutyczną, skuteczność działania, niską toksyczność a przede wszystkim powinny działać na komórki rakowe przy jednoczesnym oszczędzeniu komórek zdrowych (niezmienionych chorobowo). Leki celowane czyli inaczej inhibitory można podzielić na małowcząsteczkowe oraz makrowcząsteczkowe. Małowcząsteczkowe inhibitory wykazują zazwyczaj korzystne właściwości farmakokinetyczne (PK). Niestety w przypadku leczenia chorób nowotworowych głównym ograniczeniem terapii celowanych jest często pojawiająca się oporność oraz brak lub też krótkotrwała odpowiedź organizmu pacjenta na

zastosowane leczenie. Amerykańska FDA (Food and Drug Administration) oraz chińska NMPA (National Medical Products Administration) zatwierdziły obecnie 89 małocząsteczkowych preparatów antynowotworowych o szerokim zakresie działania. Leki te mają działać min. na kinazy, proteasomy czy też epigenetyczne białka regulatorowe.²²

O przydatności klinicznej każdego związku (leku) decydują w pierwszej kolejności wyniki z testów przedklinicznych. W zakresie badań przedklinicznych najczęściej przeprowadza się testy:

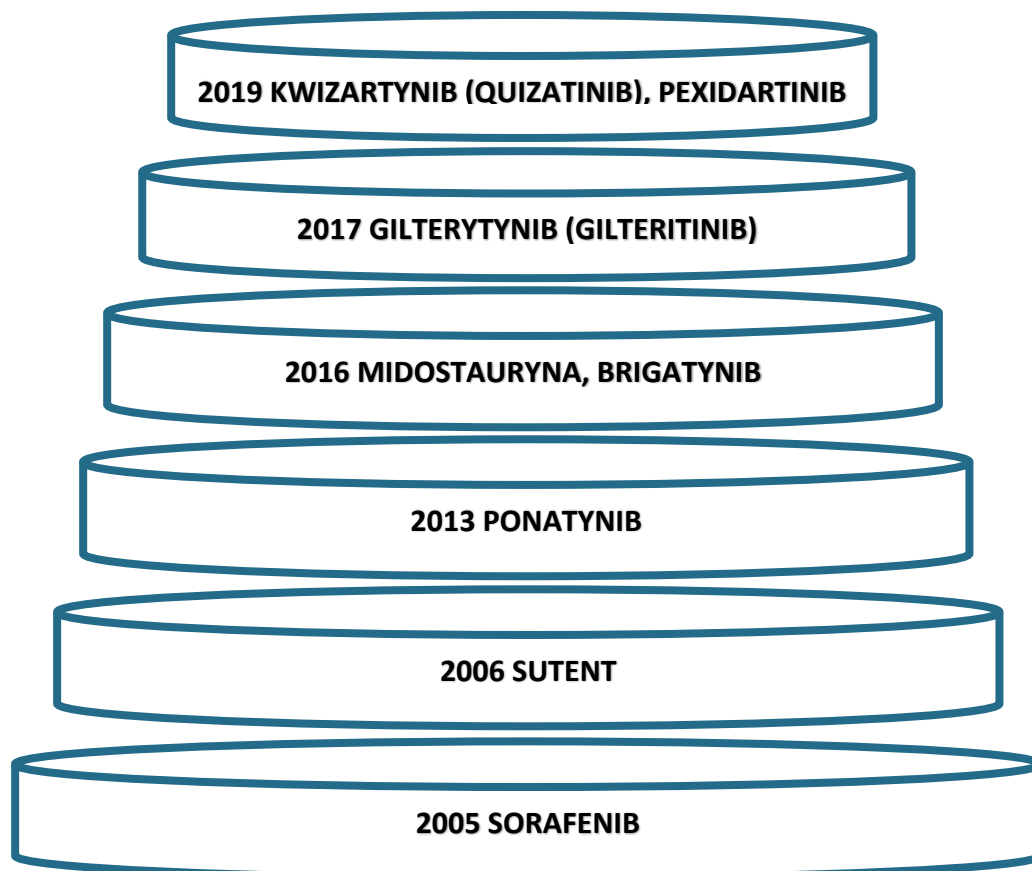
- *in vitro*
- *in vivo*
- cytotoksyczności

W przypadku receptora FLT3 analiza *in vitro* pomaga w ocenie zdolności hamowania aktywności kinazy FLT3 przez badany związek. Dodatkowo testy te obrazują siłę wiązania się danego inhibitora z białkami osocza. Ze względu na hydrofobowy charakter inhibitorów zazwyczaj silnie są wiązane przez białka osocza. Skutkuje to niestety obniżeniem jego stężenia, które odpowiada za działanie farmakologiczne.²⁴ Z kolei testy *in vivo* przeprowadzane na liniach komórkowych pomagają w określeniu zdolności autofosforylacji i wyznaczeniu wartości IC₅₀ (to parametr opisujący stężenie danego leku przy którym obserwuje się zahamowanie wzrostu badanej populacji komórek o 50%). W badaniach tych najczęściej wykorzystuje się mysie linie komórkowe takie jak Ba/F3 (limfoidalne) lub 32D (szpikowe). Stosuje się także linie komórkowe MV4-11 czy też MOLM-13 lub MOLM-14, które to pochodzą od ludzkiej AML i wykazują dodatkowo ekspresję mutacji typu (FLT3-ITD).

Natomiast badania cytotoksyczności pozwalają na weryfikację, że testowany inhibitor działa toksycznie na linie komórkowe FLT3 i tym samym w znaczący sposób ogranicza ich aktywność. Dodatkowo badania te dostarczają informacji na temat selektywności danego inhibitora względem kinazy FLT3, ponieważ niższa wartość IC₅₀ niż ta określona w testach autofosforylacji wskazuje na jego aktywność również względem innych kinaz. Potwierdzają to także często obserwowane różnice między krzywą zależności dawka-odpowiedź otrzymaną w testach cytotoksyczności a krzywą uzyskaną z analiz autofosforylacji.^{38,49}

Na przełomie ostatnich 20 lat opracowano już wiele inhibitorów FLT3 (Rysunek 4). Wiele z nich trafiło do II i III fazy badań klinicznych. Midostauryna oraz Gilterytynib zostały już zaakceptowane przez Federalną Agencję Leków (FDA) do leczenia pacjentów z AML w Stanach Zjednoczonych. Głównym zadaniem wszystkich opracowanych inhibitorów jest

inicjowanie procesu apoptozy, zahamowanie cyklu komórkowego oraz proliferację komórek białaczkowych.⁴²



Rysunek 4: Rozwój inhibitorów kinazy FLT3.

Inhibitory FLT3 to przede wszystkim związki heterocykliczne, które zawierają w swej strukturze komponent przypominający pierścień purynowy, dzięki któremu terapeutyki te konkurują z ATP o miejsce aktywne receptora FLT3.⁴⁹ Ze względu na budowę strukturalną małowiązątkowe inhibitory FLT3 klasyfikowane są jako pochodne:

- chinoksalin bicyklicznych lub trójcyklicznych - związki te pomimo wykazanej aktywności względem kinazy FLT3 wykorzystuje się głównie w testach *in vitro* ze względu na ograniczoną rozpuszczalność. Spośród trójcyklicznych chinoksalin związki AGL2033 i AGL2043 dużo lepiej rozpuszczają się w wodzie dzięki czemu mogą zostać włączone do badań klinicznych,
- indoli,
- indolokarbazoli.

Ze względu na specyficzność działania wszystkie inhibitory nie tylko FLT3 podzielić można na inhibitory I oraz II generacji (Tabela 1).

Tabela 1: Inhibitory I i II generacji

<i>Inhibitory I generacji</i>	<i>Inhibitory II generacji</i>
<i>Sorafenib</i>	Gilterytytib (Gilteritytib)
<i>Sunitinib</i>	Krenolanib
<i>Midostauryna (Midostaurin)</i>	Kwizartinib (Quizartinib)

Biorąc pod uwagę mechanizm oddziaływania inhibitorów z receptorem według klasyfikacji Roskoskiego można je podzielić na VI typów. Najważniejsze z tej grupy to inhibitory I i II typu przedstawione poniżej (Tabela 2).²² Wszystkie inhibitory w zakresie od I-V są odwracalne i mogą ograniczać aktywność w sposób kompetencyjny, niekonkurencyjny oraz mieszany. Inhibitory typu I współzawodniczą o miejsce aktywne receptora z adenozynotrójfosforanem (ATP) gdy receptor znajduje się w aktywnej konformacji określanej jako (DFG-in). Z kolei inhibitory typu II oddziałują z miejscem hydrofobowym, który bezpośrednio przylega do miejsca wiązania się ATP tylko wtedy gdy receptor jest w nieaktywnej konformacji opisywanej jako (DFG-out).⁴⁴ W skład DFG wchodzi trzy reszty aminokwasowe: D829, F830 i G831, których orientacja przestrzenna wskazuje na konformację kinazy FLT3. W przypadku aktywnej konformacji receptora (DFG-in) łańcuch boczny reszty aminokwasowej D829 jest skierowany do miejsca wiązania ATP a pierścień aromatyczny w łańcuchu bocznym reszty F830 znajduje się w szczelinie tylnej. Natomiast w nieaktywnej formie kinazy (DFG-out), pierścień aromatyczny w łańcuchu bocznym reszty aminokwasowej F830 jest skierowany do miejsca wiązania ATP a łańcuch boczny reszty D829 umieszczony jest w tylnej szczelinie, generując w ten sposób dodatkową warstwę hydrofobową, która przylega do miejsca wiązania ATP. Z kolei inhibitory typu III i IV mają charakter allosteryczny i wykorzystują one dalsze obszary względem miejsca wiążącego ATP. Dodatkowo określa się je jako inhibitory niekompetycyjne. Inhibitory typu V to dwuwartościowe cząsteczki, które obejmują dwa różne regiony domeny kinazowej. Z kolei inhibitory typu VI są nieodwracalne i wiążą się kowalencyjnie z miejscem aktywnym kinazy czego następstwem jest całkowite zahamowanie jej aktywności.^{19,54}

Wszystkie inhibitory o czym już wspomiano konkurują z ATP o miejsce aktywne, zapobiegając tym samym autofosforylacji receptora i późniejszej aktywacji różnych szlaków sygnałowych zachodzących w komórce.⁵⁴

Tabela 2: Inhibitory I i II typu

<i>Inhibitory I typu</i>	<i>Inhibitory II typu</i>
<i>Sunitynib</i>	Sorafenib
<i>Midostauryna</i>	Kwizartinib (Quizartinib)
<i>Krenolanib</i>	Ponatinib
<i>Gilteritynib</i>	Tandutinib
<i>Lestaurtynib</i>	

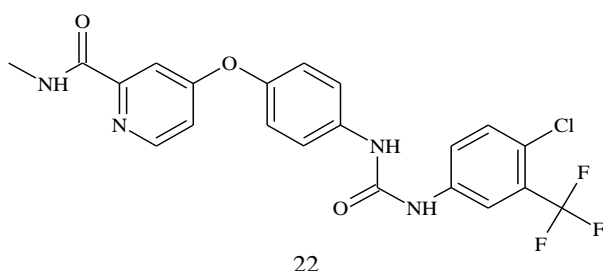
Z dostępnych danych literaturowych wynika, że terapia leczenia inhibitorami I typu osób chorych na białaczkę szpikową przyczynia się do ograniczenia aktywności kinazy FLT3 zarówno z mutacjami punktowymi (FLT3-TKD) oraz z duplikacjami tandemowymi (FLT3-ITD) podczas gdy inhibitory II typu hamują jedynie aberracje typu (FLT3-ITD). Dodatkowo inhibitory I typu nie wpływają na rozwój oporności poprzez nowe mutacje punktowe w przeciwieństwie do inhibitorów II typu, które nie są skuteczne wobec mechanizmów rozwijającej się oporności nabytej.^{44,52} Co więcej z doniesień literaturowych wynika, że to rodzaj podstawienia w pętli aktywacyjnej (D835) w przypadku mutacji punktowej, decyduje o sile oporności na terapię inhibitorami typu II. Uważa się, że substytucja kwasu asparaginowego histydyną (D835H), prowadzi do pośredniej oporności podczas gdy podstawienie tyrozyną bądź też waliną (D835Y/V) wiąże się z wysokim stopniem oporności nabytej. Z kolei aberracje związane z wstawieniem alaniny, glicyny, asparaginy czy kwasu glutaminowego (D835A/G/N/E) nadal pozostają wrażliwe na terapię leczenia inhibitorami II typu. Zgodnie z przedstawionymi powyżej opisami, inhibitory II typu hamują aktywność kinazy FLT3 tylko wtedy gdy jest ona w konformacji nieaktywnej. Sugeruje się, że na utrzymanie nieaktywnej formy (DFGout) wpływa wiązanie wodorowe pomiędzy grupą hydroksylową łańcucha bocznego lub grupą amidową łańcucha głównego seryny⁸³⁸. W tworzeniu wiązania wodorowego uczestniczyć również może grupa amidowa łańcucha głównego metioniny⁸³⁷. W przypadku mutacji związanych z silną opornością nie tworzy się

wiązanie wodorowe co prowadzi do zmiany konformacji kinazy FLT3 na aktywną i tym samym brakiem skuteczności terapeutycznej inhibitorów II typu.⁴⁶

2.4.1. Inhibitory I generacji:

Inhibitory I pierwszej generacji cechuje mniejsza specyficzność działania przez wzgląd iż działają nie tylko na jeden cel terapeutyczny ale oddziałują również z innymi kinazami takimi jak np. KIT, RAS/RAF czy VGFR. Dodatkowo ich wielokinazowe działanie sprawia, że są one również bardziej toksyczne w przeciwieństwie do inhibitorów II generacji, które cechuje dużo większą specyficzność działania.⁵⁴

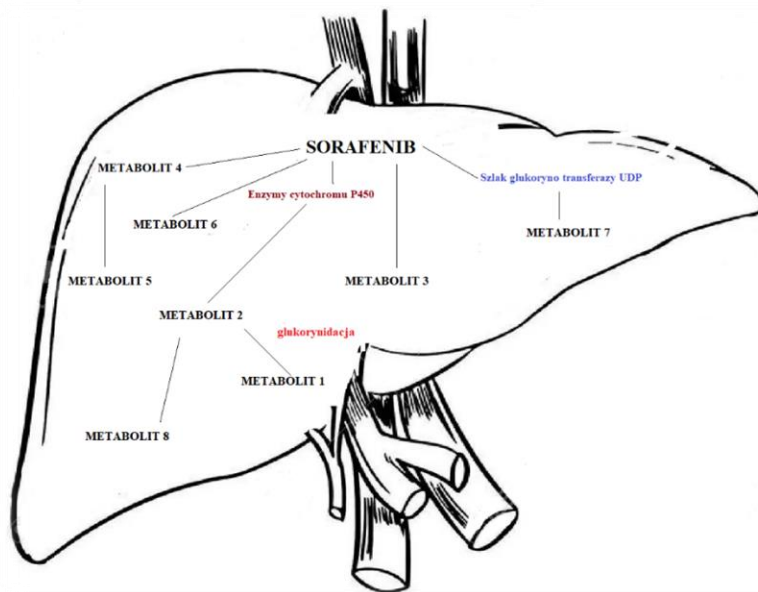
2.4.1.1. Sorafenib



Sorafenib znany jest jako doustny lek pod nazwą Nexavar (BAY43-9006), opracowany w 1995 roku przez firmy Bayer i Onyx.⁵⁶ Zaakceptowany został w Stanach Zjednoczonych przez FDA (Food and Drug Administration) do leczenia nowotworu wątrobowokomórkowego (HCC), który niestety nie nadaje się do operacyjnego leczenia, zaawansowanej postaci raka nerki (RCC), czy też zróżnicowanego, opornego na jodoterapię nowotworu tarczycy (DTC).^{51,57,58,65} Ze względu na swoją multikinazową aktywność klasyfikowany jest jako inhibitor I generacji, a jak wspomniano powyżej inhibitory należące do tej klasy wykazują działanie toksyczne.⁵⁹ Stosowanie Sorafenibu może prowadzić do pojawienia się u pacjenta: mdłości, biegunki, nadciśnienia tętniczego (HTN) oraz problemów skórnych najczęściej w postaci wysypki.⁶⁰ Klasyfikowany jest również jako inhibitor typu II. Inhibitory tego typu zajmują miejsce allosteryczne, bezpośrednio przylegające do kieszeni wiążącej adenosynotrójfosforan (ATP). Kieszeń ta utworzona jest przez pętle aktywacyjną, gdy

receptor znajduje się w nieaktywnej konformacji.⁶¹ Wykazuje on zdolność do hamowania wielu cząsteczek antyapoptycznych.⁶² Badania przedkliniczne wykazały, że Sorafenib hamuje aż 1000-krotnie silniej proces fosforylacji kinazy FLT3 z mutacjami (FLT3-ITD) i (D835G) niż w komórkach białaczkowych z mutacją typu (D835Y) lub bez stwierdzonych nieprawidłowości FLT3.¹¹ Przebadano skuteczność Sorafenibu zarówno w monoterapii jak i leczeniu podtrzymującym związanym ze stosowaniem Sorafenibu w połączeniu z klasyczną chemioterapią, bądź przed lub już po przeszczepie szpiku kostnego. Badania kliniczne I fazy wykazały aktywność kliniczną Sorafenibu, który zahamował wzrost guza w zmutowanych blastach.⁶³

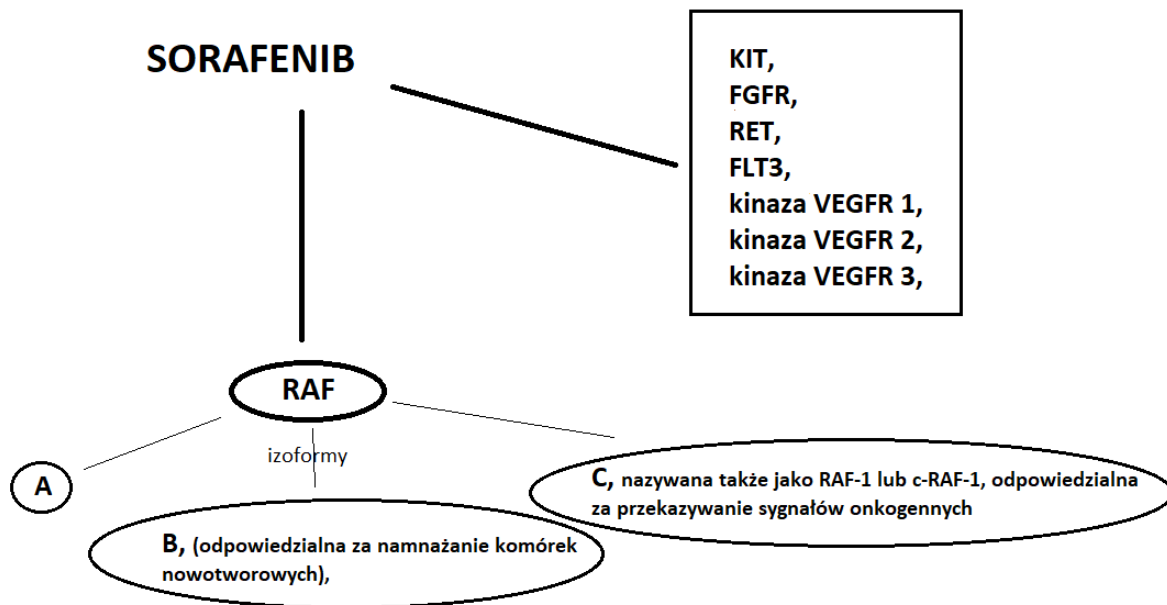
Pod względem chemicznym Sorafenib jest bi-arylomocznikiem o nazwie chemicznej: *N*-(3-trifluorometylo-4-chlorofenylo)-*N*-(4-[2-metylokarbamoilopirydyn4ylo]oksyfenylo)mocznik.⁵⁶ Dodatkowo jest lipofilowym związkiem o słabej rozpuszczalności ale o wysokiej przepuszczalności, który po podaniu doustnym szybko przedostaje się z przewodu pokarmowego do wątroby, gdzie jest metabolizowany przez szlak cytochromu P450 (CYP3A4) i glukuroniltransferazę UDP (UGT1A9). Metabolizm jakiegokolwiek związku opisywany jest jako reakcje I oraz II fazy. Do reakcji I fazy należą takie procesy jak: utlenianie, hydroliza oraz redukcja, w wyniku których powstają związki bardziej polarne. Za reakcje I fazy odpowiedzialne są enzymy cytochromu P450 (CYP3A4). Natomiast proces sprzęgania ze związkami endogennymi, w wyniku którego powstają nieaktywne substancje gotowe już do usunięcia z organizmu, należy do reakcji II fazy za które odpowiedzialna jest w głównej mierze UDP-glukuroniltransferaza, metylotransferaza oraz *N*-acetylotransferaza.⁶⁴ Przeprowadzone badania farmakokinetyczne pozwoliły na zdefiniowanie aż 8 metabolitów Sorafenibu, z których główny to metabolit 2. Powstaje on w wyniku reakcji utlenienia samego inhibitora przez cytochrom (CYP3A4). Metabolit 2 jest następnie metabolizowany do *N*-tlenku *N*-hydroksymetylo-Sorafenibu czyli do metabolitu 1 oraz poprzez glukuronidację do metabolitu 8. Z kolei metabolit 7 powstaje w wyniku glukuronidacji samego Sorafenibu przez bezpośrednie działanie szlaku glukuroniltransferazy UDP (reakcje metaboliczne II fazy) (Rysunek 5).⁶⁵ Dodatkowo wykazano, że pozostałe metabolity takie jak: metabolit 4 czy 5 wpływają na aktywność szlaku VEGFR oraz ścieżki sygnalizacyjnej szlaku PDGFR.



Rysunek 5: Szlak metaboliczny Sorafenibu.

W początkowym stadium badań Sorafenib klasyfikowany był głównie jako inhibitor kinazy RAF czyli receptorowych efektorów kinazy tyrozynowej. Kinaza ta określana jest mianem onkogenu, ponieważ w wyniku jej mutacji dochodzi do niekontrolowanego namnażania się komórek nowotworowych. Natomiast w prawidłowo funkcjonującej komórce odpowiedzialna jest za regulowanie wielu procesów np.: różnicowanie się komórek, metabolizm, funkcje neurologiczne, progresja cyklu komórkowego oraz apoptoza komórek. Znane są trzy formy kinazy RAF: A, B i C, która opisywana jest w literaturze naukowej jako RAF-1 lub też c-RAF-1. Niestety przeprowadzone na przełomie ostatnich 20 lat badania nie potwierdziły jednoznacznie, która z izoform odpowiada za właściwości onkogenne kinazy RAF. Niektóre z tych badań wykazują, że forma c-RAF-1 odpowiedzialna jest w głównej mierze za przekazywanie sygnałów onkogennych, natomiast mutacje B-RAF wpływają na namnażanie się komórek nowotworowych w organizmie.⁶⁷ Sorafenib hamuje aktywność szlaku RAF, jednak dalsze badania zarówno *in vitro* czy *in vivo* wykazały jego aktywność również na wiele innych receptorów kinaz tyrozynowych takich jak: VEGFR 1, 2 i 3, PDGFR, KIT, FLT3, FGFR1 i RET oraz kinaz serynowo-treoninowych (Rysunek 6).^{51,65} Działanie Sorafenibu polega na blokowaniu procesu autofosforylacji receptorowych kinaz tyrozynowych oraz hamowaniu szlaku RAF. Proces zahamowania szlaku RAF przyczynia się do zmniejszenia zmiany nowotworowej (guza), a tym samym spowolnienia procesu tworzenia się nowych naczyń krwionośnych (angiogeneza). Dodatkowo wyciszenie wspomnianego szlaku zmniejsza

inwazyjność komórek nowotworowych co ma ogromny wpływ na proces namnażania się komórek a tym samym ich apoptozy.⁶³



Rysunek 6: Aktywność Sorafenibu.

Liczne badania wykazały, że przyjmowanie przez pacjentów większych dawek Sorafenibu prowadzi do wystąpienia poważniejszych skutków ubocznych, które niestety często skłaniały lekarzy do zmniejszenia dawki a nawet tymczasowego zaprzestania przyjmowania opisywanej substancji leczniczej.⁵¹

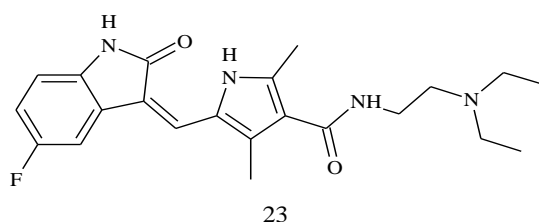
Skuteczność oraz aktywność Sorafenibu jak wspomniano wcześniej oceniano w monoterapii oraz w połączeniu z chemioterapią lub przeszczepem szpiku jako leczenie uzupełniające zwane również terapią podtrzymującą. Wyniki badań otrzymane z leczenia Sorafenibem połączonym z klasyczną chemioterapią wykazały iż wskaźnik CR choroby (całkowita remisja) w grupie osób chorych na (FLT3-ITD) wyniósł 75% a OS (całkowite przeżycie) 74%.⁶⁶ Istnieje także twierdzenie, że na skuteczność działania Sorafenibu przyczyniającego się do remisji choroby u pacjentów będących już po przeszczepie wpływ ma synergizm pomiędzy stosowanym inhibitorem w procesie leczenia a mechanizmami alloimmunologicznymi związanymi z przebytą transplantacją.^{38,68} Zgodnie z powyższym twierdzeniem połączenie Sorafenibu z przeszczepem wzmacnia efektywność leczenia osób chorych na ostrą białaczkę szpikową. Udowodniono również skuteczne działanie Sorafenibu w przypadkach pacjentów z AML i stwierdzoną dodatkowo wewnętrzną duplikacją tandemową (FLT3-ITD), którzy są po allogeniczej transplantacji komórek krwiotwórczych. Jak wiadomo

pacjenci chorzy na AML z mutacją tandemową nawet po przeszczepie narażeni są na nawroty choroby oraz pojawiającą się oporność organizmu na stosowane leczenie. W wielu ośrodkach badawczych pojawiająca się oporność czy też nawrót choroby stwierdzane są na podstawie wzrostu liczby blastów we krwi obwodowej czy też w szpiku kostnym.^{62,68} Otrzymane wyniki wykazały, że stosowanie Sorafenibu u pacjentów będących już po przeszczepie opóźnia pojawienie się oporności na stosowane leczenie w odróżnieniu od pacjentów, którzy to z różnych powodów nie są jeszcze po transplantacji. U nich oporność na leczenie pojawia się częściej i w krótszym okresie czasu od rozpoczęcia terapii leczenia Sorafenibem. Wiele instytucji badających działanie kliniczne inhibitorów FLT3 np. Pratz i współpracownicy ujawnili, iż powodem ograniczonej skuteczności działania Sorafenibu jak również innych inhibitorów może być sam ligand kinazy FLT3.^{69,70} Do najczęstszych powikłań pojawiających się w wyniku stosowania Sorafenibu należą problemy skórne o różnym stopniu nasilenia. Najczęściej występujący to II stopień. Co więcej problemy skórne mogą być również następstwem rozwoju choroby GVHD (potransplantacyjnej), w której to limfocyty T osoby chorej odbierają komórki dawcy jako obce i zaczynają atakować skórę, błony śluzowe jamy ustnej bądź narządów wewnętrznych. Często też dochodzi do toksyczności hematologicznej, której następstwem jest małopłytkowość, niedokrwistość czy neutropenia. Rzadziej stwierdza się przypadki, w których Sorafenib powodowałby zawał serca, podwyższenie enzymów wątrobowych, perforacje przewodu pokarmowego czy krwawienie wewnątrzczaszkowe.^{62,68,69,70}

Sorafenib odkryty w wyniku przeszukiwania biblioteki związków małowcząsteczkowych jest dużo bardziej efektywny w terapiach skojarzonych niż w samej monoterapii.⁵¹ Stosowanie go nie zagwarantuje w 100% braku nawrotu choroby ale przyczynia się w dużej mierze do remisji choroby i wydłużenia jej czasu. Badania farmakodynamiczne wykonane dla Sorafenibu wykazały także, że w jego metabolizmie nie uczestniczy białko UGT 1A1, odpowiedzialne za reakcje glukuronidacji bilirubiny, powstającej na drodze rozkładu krwinek czerwonych. Wspomniane białko przekształca toksyczną postać bilirubiny w formę związaną (nietoksyczną), gotową do usunięcia z organizmu. Pomimo tego, że UDP 1A1 nie bierze udziału w metabolizmie Sorafenibu to jego przyjmowanie hamuje aktywność opisanego powyżej białka, w wyniku czego dochodzi do hiperbilirubinemii. Podwyższony poziom bilirubiny w surowicy krwi w trakcie terapii Sorafenibem w niektórych przypadkach zmusił do zaprzestania jego przyjmowania.⁶⁵ W przypadku rzadziej występującej mutacji punktowej (FLT3-TKD) działanie terapeutyczne Sorafenibu nie zostało do końca określone. Przyczyną

tego może być niewyjaśniona patofizjologia samej mutacji punktowej, dlatego też konieczne jest przeprowadzenie szeregu dodatkowych badań.⁷¹ Stwierdzono także, że mutacje punktowe mogą pojawić się również w trakcie terapii leczenia Sorafenibem pacjentów chorych na ostra białaczkę szpikowa ze zdiagnozowaną wcześniej mutacją wewnątrz tandemową (FLT3-ITD).⁶¹ Ograniczoną skuteczność działania Sorafenibu w monoterapii tłumaczy się często pojawiającą opornością w wyniku powstania nowych mutacji, które nie zostały rozpoznane przed rozpoczęciem leczenia.^{11,72} Ograniczona skuteczność działania Sorafenibu sprawia, że nadal konieczne jest przeprowadzenie licznych badań, które pozwoliłyby scharakteryzować wszystkie czynniki wpływające na rozwój ostrej białaczki szpikowej i opracowanie nowego typu inhibitora skutecznego w terapii leczenia osób chorych na AML.

2.4.1.2. Sunitynib (Sunitinib)



Sunitynib (jabłczan sunitinibu, Sutent®, firmy Pfizer), również znany jako (SU11248), jest drobnocząsteczkowym inhibitorem kilku kinaz tyrozynowych (RTK), odpowiedzialnych za wzrost i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych oraz proces angiogenezy (czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych). Oprócz aktywności względem kinazy FLT3 hamuje on także aktywność: receptorów płytkowego czynnika wzrostu, czynników wzrostu śródbłonna naczyniowego, receptorów glejopochodnego czynnika neurotroficznego oraz kinaz KIT.^{73,74} 26 stycznia 2006 roku zatwierdzony został do leczenia nieoperacyjnego lub już z obecnymi przerzutami na inne organy nowotworu żołądka i jelit (GIST) oraz w 2007 roku w Europie do leczenia raka nerkowokomórkowego (RCC) i w przypadku stwierdzonych guzów neuroendokrynych trzustki.^{74,75} Jest doustnie podawanym preparatem w formie twardych kapsułek. Przed rozpoczęciem stosowania powyższego leku, lekarz musi przeprowadzić dokładny wywiad aby wykluczyć wszystkie przeciwwskazania będące ograniczeniem w możliwości wykorzystania Sutentu w leczeniu. Z dostępnych informacji wynika, że pokarm nie wpływa na biodostępność samego Sunitynibu

oraz jego metabolitu w przeciwieństwie do opisywanego wcześniej Sorafenibu, dla którego biodostępność maleje aż o 29% wraz ze spożyciem posiłku o dużej zawartości tłuszczu.⁷⁶

Sutent jest pochodną indolu i należy do związków z rodziny piroli i amidu kwasu karboksylowego o nazwie chemicznej *N*-[2-(dietylamino)etyl]-5-[(*Z*)-(5-fluoro-2okso-1*H*-indol-3-ylideno)metyl]-2,4-dimetyl-1*H*-pirolo-3-karboksyamid. Podobnie ja Sorafenib metabolizowany jest przez cytochrom P450 (CYP 3A4). Głównym jego metabolitem jest dietyln sunitynibu (SU12662), który ulega dalszym reakcjom metabolicznym i wykazuje podobne właściwości do samego Sunitynibu.⁽⁷³⁾ Następnie aktywny metabolit czyli (SU12662) przekształcany jest do nieaktywnego metabolitu, którym jest z kolei (SU14335) i reakcja ta trwa zdecydowanie dłużej niż reakcja metaboliczna związana z przemianą inhibitora w aktywną postać metaboliczną. Etap ten wpływa na czas półtrwania metabolicznie aktywnej formy (SU12662).⁷⁶

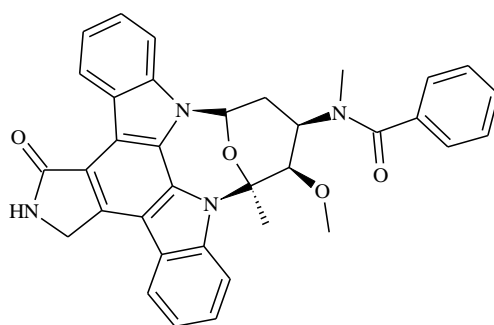
Sunitinib należy do inhibitorów 1 generacji typu I, które wiążą się bezpośrednio z miejscem wiązania adenosynotrójfosforanu (ATP) z receptorem, występującym w aktywnej konformacji. Jako, że należy do inhibitorów I generacji wykazuje mniejszą specyficzność działania i większą toksyczność. Do najczęściej obserwowanych działań niepożądanych wynikających ze stosowania Sunitynibu należy ogólne osłabienie pacjenta, problemy żołądkowe, dermatologiczne, trudności z oddychaniem, brak apetytu, anemia, bóle stawów, głowy, wysypka lub też drętwienie dłoni i stóp, nadciśnienie jak również niedoczynność tarczycy, leukopenia, neutropenia i małopłytkowość. Natomiast do najpoważniejszych powikłań jakie mogą się pojawić należy: krwawienia wewnętrzne niewydolność serca i nerek, zatorowość płucna (zakrzep w naczyniu krwionośnym zasilającym płuca) oraz perforacja przewodu pokarmowego.⁷⁴

Sutent jako pierwszy z opracowanych inhibitorów FLT3 trafił do badań klinicznych.⁷⁷ Wykazuje on taką samą skuteczność działania zarówno wobec duplikacji tandemowej oraz mutacji punktowej. Wczesne badania kliniczne z 2005 roku wykazały również, że już mała dawka Sutentu skutecznie hamuje proces fosforylacji w przypadku ostrej białaczki szpikowej z dodatkowymi mutacjami FLT3. Co więcej badania *in vitro* pokazały spotęgowane działanie Sutentu na proliferację i apoptozę komórek ostrej białaczki szpikowej w połączeniu z chemioterapeutykami takimi jak Daunorubicyna czy też Arabinozyd cytozyny (Ara-C). Synergistyczne działanie Sunitynibu w połączeniu z chemioterapią przyczyniło się do rozpoczęcia badań klinicznych I i II fazy u osób powyżej 60 roku życia chorych na AML i z rozpoznanymi mutacjami FLT3. W badaniach tych Sunitinib podawany był przez 2 lata z możliwością eskalacji dawki jeśli nie stwierdzi się u pacjenta poważniejszych skutków

ubocznych. Badania kliniczne I i II fazy miały pomóc w określeniu bezpiecznej i tolerowanej przez starszych pacjentów dawki opisywanego inhibitora w terapii połączonej ze standardową chemioterapią. Dodatkowo badania te wykazały, że jeśli doszło do nawrotu choroby to nie zaobserwowano już mutacji FLT3, które zdiagnozowano tuż przed rozpoczęciem terapii leczenia.⁷⁷

Niestety zdecydowanie więcej jest dostępnych danych literaturowych dotyczących zastosowania Sunitynibu w leczeniu nowotworu żołądka i jelit (GIST), raka nerkowokomórkowego (RCC) oraz guzów neuroendokrynych trzustki niż wyników z terapii leczenia ostrej białaczki szpikowej.^{78,79,80,81,82}

2.4.1.3. Midostauryna



24

Midostauryna w skrócie (Mido) jest lekiem sprzedawanym pod nazwą Rydapt & Tauritmo firmy Novartis. Lek ten początkowo opracowany był jako inhibitor kinazy białkowej C (PKC) i zalecany w kuracji guzów litych.^{83,84} W kwietniu 2017 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła Midostaurynę do leczenia dorosłych pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką szpikową AML i dodatkowo ekspresją FLT3. Obecnie Midostauryna jest pierwszym lekiem celowanym w leczeniu ostrej białaczki szpikowej ze stwierdzonymi mutacjami FLT3. Połączenie Rydaptu z chemioterapią jest obecnie standardową metodą leczenia osób chorych na AML.⁸⁵ Klasyfikowana jest jako inhibitor I generacji i jak wszystkie inhibitory z tej grupy, Mido jest mało specyficznym inhibitorem, który hamuje nie tylko aktywność kinazy FLT3 ale działa również na receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGFR) i receptory płytkowego czynnika wzrostu α i β czyli

(PDGFR- α , PDGFR- β). Działa także na szereg innych kinaz np.: na kinazę tyrozynową śledziony (Syk), kinazę tyrozynową protoonkogeny KIT, kinazę zależną od cykliny, protoonkogeną kinazę tyrozynowo-białkową (Src) oraz kinazę tyrozynowo-białkową (Fgr).⁸⁵ Natomiast jako inhibitor typu I wiąże się ona z domeną „gatekeeper” receptora w pobliżu pętli aktywacyjnej bądź też w kieszeni wiążącej adenozyno-5'-trifosforan (ATP), gdy receptor znajduje się w aktywnej konformacji. Taki mechanizm oddziaływania Mido z receptorem decyduje o jego aktywności klinicznej. Przeprowadzone badania dowiodły, że Midostauryna wykazuje antyproliferacyjne właściwości zarówno dla komórek prawidłowo funkcjonujących jak i nowotworowych. Badania dowiodły, że Rydept ma zdolność do aktywnego ograniczania sygnalizacji receptora FLT3 i proliferacji komórek oraz indukuje proces apoptozy w komórkach białaczkowych z mutacjami (FLT3-ITD i FLT3-TKD). Dodatkowo stwierdzono, że Midostauryna może ograniczać pojawiającą się oporność wielolekową zależną od glikoproteiny P. Co więcej badania *in vitro* wykazały, nie tylko skuteczność działania Mido w przypadku ekspresji (FLT3-ITD) ale również zdolność jej do aktywnego hamowania cyklu komórkowego fazy G1, który często jest zmieniany (transdukowany) w wyniku wewnątrzrandemowej duplikacji.⁸⁵

Midostauryna inaczej (N-benzoilostaurosporyna) jest doustnie przyjmowanym preparatem w postaci miękkich kapsułek. Należy do pochodnych indolokarbazoli i podobnie jak wcześniej opisane inhibitory FLT3, metabolizowana jest w wątrobie, głównie przy udziale enzymów cytochromu P450 (CYP 3A4).^{84,85} Badania farmakokinetyczne pozwoliły na zdefiniowanie 2 głównych i aktywnych produktów przemiany materii. Metabolit CGP62221 powstaje w wyniku demetylacji. Natomiast CGP52421 tworzy się na drodze reakcji hydroksylacji Midostauryny i ma on zdolność do odkładania się w wyniku powtarzających cykli leczenia. Dodatkowo dzięki badaniom farmakokinetycznym zaobserwowano, że Mido w odróżnieniu od innych bardziej selektywnych inhibitorów FLT3 silniej wiąże się z białkami osocza, przez co konieczne jest stosowanie większych dawek tego leku. Ponadto zdolność ta zdecydowanie wydłuża proces usuwania leku i jego metabolitów z osocza.^{84,85} Przeprowadzone badania wykazały także, że przyjmowane farmaceutyki przed rozpoczęciem terapii Midostauryną mają ogromny wpływ na poziom jej stężenia w osoczu i tym samym na skuteczność jej działania oraz bezpieczeństwo stosowania. Wykazano, że przyjmowanie silnych induktorów cytochromu P450 powoduje aż 10-krotny spadek stężenia leku oraz jego metabolitów w osoczu co prowadzi do osłabienia i skrócenia działania terapeutycznego. Z kolei zażywanie silnych inhibitorów powoduje aż 10-krotny wzrost stężenia Midostauryny w osoczu.

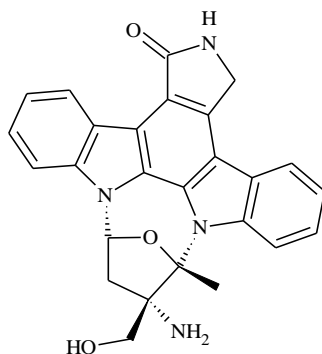
Z tego też powodu zalecane jest aby w trakcie terapii leczenia Midostauryną nie stosować silnych leków, które wpływają na pracę enzymów cytochromu. Jeśli niemożliwe jest przerwanie zażywania inhibitorów lub aktywatorów cytochromu P450 w trakcie terapii leczenia Mido, wówczas pacjent musi przebywać pod baczna obserwacją lekarza w celu szybkiego rozpoznania i zwalczania skutków ubocznych związanych z przyjmowaniem Rydaptu.^{85,86}

Skuteczność działania Midostauryny w leczeniu ostrej białaczki szpikowej sprawdzono w monoterapiach ale również w połączeniu jej ze standardową chemioterapią, w połączeniu z lekami hipermetylującymi oraz w terapiach podtrzymujących czyli u pacjentów, którzy są po przeszczepieniu. Monoterapię Rydaptem stosowano u pacjentów ze zdiagnozowaną oporną lub nawrotową białaczką szpikową i towarzyszącą mutacją FLT3, którzy nie kwalifikowali się do chemioterapii. Przeprowadzone badania wykazały, że monoterapia Rydaptem prowadzi do aktywnego ograniczenia autofosforylacji receptora FLT3. Ponadto wykazano iż przyjmowanie go w 2 dawkach na dobę jest dobrze tolerowane i równie skuteczne jak w przypadku przyjmowania 3 dawek. Głównym skutkiem ubocznym pojawiającym się w trakcie terapii to nudności i wymioty. Rzadko kiedy były one przyczyną zaprzestania kuracji. Niestety badania udowodniły także, że monoterapia Mido prowadzi jedynie do częściowych odpowiedzi organizmu pacjenta na terapię, które trwają zaledwie od 3 do 6 miesięcy. Odpowiedź organizmu definiowano jako zmniejszenie ilości blastów we krwi obwodowej lub szpiku kostnym o co najmniej 50%. Niestety w badaniach tych nie stwierdzono istotnej aktywności klinicznej Rydaptu. Niepowodzenie monoterapii tłumaczy się często obserwowanym w trakcie leczenia spadkiem stężenia przyjmowanego leku, w wyniku czego u pacjentów obserwuje się krótki czas odpowiedzi. Przyczyną są także powstające nowe lekooporne mutacje FLT3 zlokalizowane w obrębie domeny kinazy tyrozynowej. Z kolei badania skuteczności działania Midostauryny w połączeniu z chemioterapią indukującą oraz terapią konsolidacyjną dużymi dawkami Ara-C pokazały, że ta metoda leczenia prowadzi do remisji choroby oraz wydłuża czas przeżycia i można ją stosować u osób powyżej 60 roku życia.^{83,85,87} Przy stosowaniu większej dawki Midostauryny pojawiła się toksyczność ze strony przewodu pokarmowego. Natomiast objawów tych nie stwierdzono przy niższej dawce leku. Często w trakcie leczenia pojawia się toksyczność hematologiczna czyli małopłytkowość, neutropenia, niedokrwistość. Pojawiają się także stany gorączkowe, hipokalikemia oraz podwyższenie enzymów wątrobowych a u osób starszych również toksyczność kardiologiczna. 3 i 4 stopień powyższych skutków ubocznych często jest powodem do zaprzestania leczenia, dlatego też lekarze coraz częściej zalecają

podawanie Mido sekwencyjnie a nie łącznie z chemioterapią.^{83,84,85,87} Rydapt można również bezpiecznie stosować w połączeniu z Azacytydyną. Skuteczność terapeutyczna Midostauryny badana była także w terapii podtrzymującej u osób po przeszczepie. Niestety w wielu przypadkach ze względu na toksyczność należało przerwać leczenie. Terapia ta dopiero jest skuteczna i wydłuża czas przeżycia wolny od choroby jeśli rozpocznie się przyjmowanie Mido po upływie setnej doby od przeszczepu. Co więcej połączenie Mido ze standardowym postępowaniem leczniczym (SOC – standard of care) ukazało zmniejszenie ryzyka nawrotu choroby oraz hamowanie procesu autofosforylacji receptora FLT3.⁸⁵ Obecnie trwają liczne badania mające na celu ocenę skuteczności działania Midostauryny w terapiach podtrzymujących.

Do grupy inhibitorów I generacji należy również Lestaurtynib oraz Tandutynib.

2.4.1.4. Lestaurtynib (Lestaurtinib)



25

Lestaurtynib (CEP-701) opracowany został przez firmę Cephalon (West Chester, PA) i w 2006 roku FDA nadała mu status tzw. "leku sierociego" do leczenia pacjentów z ostrą białaczką szpikową. Status ten oznacza, że koszty jakie ponosi producent w związku z opracowaniem a następnie produkcją danego preparatu są znacznie wyższe niż przewidywalne zyski związane ze sprzedażą danego produktu leczniczego. Jest wielokinazowym inhibitorem, który wpływa na aktywność nie tylko kinazy FLT3 ale działa także na kinazy receptora tropomiozyny (Trka A, B i C) oraz kinazy JAK2. Inhibitor ten jest półsyntetycznym związkiem, strukturalnie zbliżonym do staurosporyny i jest alkaloidową pochodną indolokarbazolu.⁸⁸ Jest doustnym preparatem, który ogranicza aktywność kinazy

FLT3 indukując tym samym proces apoptozy komórek nowotworowych ze stwierdzonymi mutacjami FLT3.^{89,90} Kompetencyjnie hamuje on wiązanie ATP (adenozynotrójfosforan).

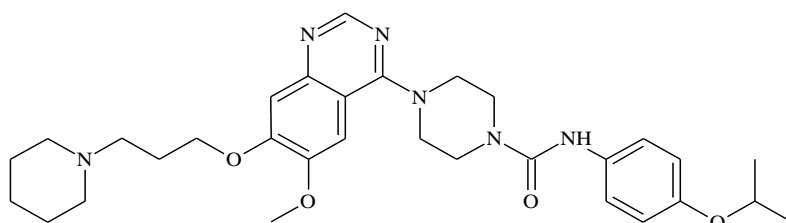
CEP-701 szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i silnie wiąże się z białkami głównie z kwaśną glikoproteina (AGP).^{88,91} Podobnie jak inne opisane już inhibitory FLT3 metabolizowany jest w wątrobie przez enzymy cytochromu P450 (CYP3A4).

Pozytywne wyniki z badań *in vivo* oraz *in vitro* sprawiły, że Lestaurtynib szybko zakwalifikował się do badań klinicznych. Przeprowadzone badania *in vivo* wykazały, że inhibitor ten ma zdolność silnego wiązania się z białkami osocza. Z kolei analiza *in vitro* wykazała działanie ograniczające aktywność ekspresji kinazy FLT3. Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku zastosowania tego inhibitora łącznie z chemioterapeutykami bądź tuż po chemioterapii.⁹¹ W badaniach I fazy u pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową z ekspresją FLT3, stwierdzono zmniejszenie liczby blastów oraz poprawę prawidłowej hematopoezy. Przeprowadzone testy biologiczne *ex vivo* wykazały znaczne ograniczenie autofosforylacji FLT3 o 10-15%. Niestety w trakcie badań I fazy uzyskane odpowiedzi na terapię Lestaurtynibem były zbyt krótkie bowiem trwały one jedynie od 2 tygodni do trzech miesięcy.⁸⁸ Badanie I fazy wykazały także ograniczoną skuteczność kliniczną CEP-701 wynikającą między innymi z lekooporności. Pomimo tego produkt ten zakwalifikowano do badań klinicznych II fazy. Badania II fazy wykonane u chorych z nawrotową ostrą białaczkę szpikową wykazały iż podawanie inhibitora CEP-701 w skojarzeniu z chemioterapią indukcyjną przyczyniło się do wzrostu liczby pacjentów u których stwierdzono drugą całkowitą remisję choroby w przeciwieństwie do osób poddawanych samej chemioterapii. W badaniu tym podawanie Lestaurtynibu rozpoczynano po upływie 2 dni od zakończenia chemioterapii i kontynuowano przez kolejne 113 dni. Lek ten był dobrze tolerowany przez pacjentów a najczęściej obserwowanymi skutkami ubocznymi wynikającymi ze stosowania CEP-701 były problemy żołądkowo-jelitowe.⁸⁹ W trakcie prowadzonych badań nie stwierdzono poważniejszego o dużym stopniu nasilenia skutku ubocznego, który wiązałby się z koniecznością zaprzestania terapii leczenia CEP-701. Zdolność silnego wiązania się opisywanego inhibitora do białka wykazała, że dawka 80 mg jest idealna, ponieważ pozwala ona na utrzymanie stałego stężenia leku i tym samym pozwala na uzyskanie odpowiedzi klinicznej. Co więcej dawka ta umożliwiła zahamowanie aktywności FLT3 na oczekiwanym poziomie (10-15%). Natomiast niższe dawki niestety nie gwarantują uzyskania odpowiedzi na zastosowane leczenie. Główną przyczyną braku odpowiedzi jest stwierdzona w trakcie terapii lekooporność.⁸⁸ Lecznicze działanie Lestaurtynibu podobnie jak w przypadku innych inhibitorów określano na podstawie zmniejszenia ilości blastów w krwi obwodowej czy

osiągnięcia prawidłowej homeostazy. Badania kliniczne II fazy przeprowadzono również u starszych pacjentów w wieku powyżej 60 lat z nieleczoną wcześniej AML. Chorym podawano Lestaurynib dostępny w postaci jasno-żółtego roztworu umieszczonego w fiolkach z oranżowego szkła, który z fiołki dodawano do soku owocowego. Chorzy początkowo otrzymywali niższe dawki leku z możliwością jej zwiększenia przez 56 dni. Lek ten był dobrze tolerowany a efekty uboczne były łagodniejsze od tych, które pojawiają w wyniku standardowej chemioterapii. Najczęściej pojawiającymi się skutkami ubocznymi były głównie problemy żołądkowo-jelitowe. Jak wspomniano wcześniej, również w leczeniu osób starszych Lestaurynib wykazał ograniczoną skuteczność kliniczną a odpowiedź na leczenie była krótkotrwała.⁹²

W terapii ostrej białaczki szpikowej ze stwierdzonymi dodatkowo mutacjami FLT3, CEP-701 pomimo dobrej tolerancji, zdolności ograniczenia autofosforylacji kinazy FLT3 oraz skutków ubocznych o małym stopniu nasilenia, przyczynił się jedynie do uzyskania przez pacjentów krótkich odpowiedzi na zastosowane leczenie. Powodem tego może być pojawiająca się w trakcie leczenia lekooporność bądź też skomplikowana farmakokinetyka produktu leczniczego. W ocenie pełnej skuteczności klinicznej CEP-701 pomogłyby wyniki badania klinicznego III fazy, w których Lestaurynib stosowano w leczeniu poindukcyjnym. Dotychczas jednak nie opublikowano rezultatów z tego badania, dlatego też FDA nadała mu status leku sierociego i nie zaakceptowała jako typowego leku do leczenia osób chorych na ostrą białaczkę szpikową.⁸⁸

2.4.1.5. Tandutynib (Tandutinib)



26

Tandutynib określany dawniej jako MLN518 oraz CT53518, jest obiecującym małocząsteczkowym inhibitorem receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) w tym kinazy FLT3 o działaniu przeciw białczkowemu.⁹³⁻⁹⁶ Wykazuje również aktywność względem kinaz KIT oraz PDGFR β .⁽⁹⁹⁾ Co więcej wykazuje on dużo większą selektywność niż inne inhibitory

I generacji dzięki braku aktywności względem większej liczby kinaz.⁽⁹⁶⁾ Pod względem sposobu oddziaływania z receptorem klasyfikowany jest jako inhibitor III typu. Obiecujące dane przedkliniczne, które wykazały aktywność Tandutynibu w przypadku różnego typu nowotworu sprawiły, że podjęto decyzje testowania go w terapii leczenia przerzutowego raka nerkowokomórkowego.⁹⁹

Tandutinib o nazwie chemicznej 4-[6-metoksy-7-(3-piperydyn-1-ylo-propoksy)-chinazolin-4-ylo]-N-(4-propan-2-yloksyfenylo)piperazyno-1-karboksyamid należy do grupy chinazolin, fenylomoczników, piperydyn oraz amin.^{94,96} Jest również arylopiiperazyną, w której wodór przyłączony do atomu azotu w pozycji 1 jest zastąpiony grupą 6-metoksy-7-[3-(piperydyn-1-ylo)propoksy]chinazolin-4-yłową, z kolei wodór przy azocie w pozycji 4 podstawiony jest grupą (p-izopropoksyfenylo)aminokarbonylową.⁹⁸ Jest biodostępnym preparatem po podaniu doustnym w formie kapsułek, w których Tandutynib jest w postaci soli siarczanowej. Przeprowadzone badania przedkliniczne wykazały, że spożywany pokarm obniża biodostępność opisywanej substancji leczniczej. W związku z tym rekomenduje się pacjentom aby 2h przed przyjęciem leku oraz 2h po jego spożyciu zrezygnować z przyjmowania posiłków i napojów. Co więcej MLN518 jest substancją metabolizowaną przy udziale UDP-glukorynotransferazy i usuwana z organizmu z żółcią. Testy farmakokinetyczne ukazały, że po przyjęciu dawki leku bardzo szybko dochodzi do spadku stężenia Tandutynibu w osoczu co wiąże się z jego dystrybucją, po tym jednak dochodzi do powolnej eliminacji. Z kolei testy farmakodynamiczne wykazały hamujący wpływ MLN518 na fosforylację FLT3 w blastach białaczkowych.⁹⁴

Korzystne wyniki uzyskane z badań przedklinicznych dla Tandutynibu czyli: aktywność, korzystny profil farmakologiczny, dobra biodostępność, długi okres półtrwania w osoczu i przede wszystkim skuteczność działania na mysim modelu, przyczyniły się do przeprowadzenia badań klinicznych.⁹⁶ I faza badań klinicznych dotyczyła monoterapii leczenia Tandutynibem osób chorych na ostrą białaczkę szpikową ze zdiagnozowaną dodatkowo mutacją FLT3. W badaniu tym zaobserwowano, że niskie dawki opisywanego inhibitora nie zapewniają osiągnięcia odpowiedniego stężenia leku w osoczu a tym samym odpowiedzi na zastosowane leczenie. Z kolei dawki pośrednie przyczyniają się do rozwinięcia w trakcie terapii posocznicy. Dopiero wyższe dawki tego leku przyjmowanego dwa razy na dobę przyczyniają się do zmniejszenia liczby blastów we krwi obwodowej jak i w szpiku. Często jednak przy dawkach tych pacjenci zgłaszają ogólne zmęczenie czy też osłabienie mięśni o 3 i 4 stopniu nasilenia co wiąże się często z koniecznością zmniejszenia przyjmowanej dawki preparatu a nawet zakończeniem kuracji. Przy dawkach tych pojawić się

mogą również nudności, obrzęki, migotania lub zapalenie wątroby bez rozwoju problemów neurologicznych. Podsumowując badania kliniczne I fazy wykazały ograniczoną skuteczność działania Tandutynibu w monoterapii leczenia pacjentów z ostrą białaczką szpikową i ekspresją FLT3. Głównym powodem ograniczonej skuteczności działania była pojawiająca się pomimo działania przeciwbiałaczkowego, toksyczność, która niestety zmuszała do zaprzestania leczenia. Następstwem tego była progresja oraz nawrót choroby. W trakcie badań I fazy nie stwierdzono remisji choroby nawet w częściowym stopniu ale przez wzgląd na złożoność ostrej białaczki szpikowej wykorzystano MLN518 do badań II fazy aby potwierdzić jego działanie terapeutyczne.^{94,97} Badania II fazy wykazały, że połączenie Tandutynibu ze standardową terapią indukcyjną w leczeniu AML wzmacnia działanie antyproliferacyjne oraz proapoptyczne.⁹⁷ Dodatkowo nie zaobserwowano aby MLN518 podawany z Cytarabiną lub Daunorubicyną powodował mielosupresję, kardiotoxycznosc czy zapalenie błony śluzowej. Udowodniono również, że terapie Tandutynibu z Cytarabiną lub Daunorubicyną mają charakter synergistyczny i prowadzą do ograniczenia proliferacji komórek białaczkowych z ekspresją (FLT3-ITD) i ich apoptozy. U osób starszych, chorych na ostrą białaczkę szpikową, agresywna chemioterapia jest ograniczona głównie z powodu chorób współistniejących a także niższą tolerancję na standardową chemioterapię. W badaniu tym zaobserwowano, że dla osób tych skojarzona terapia Cytarabiny i Daunorubicyny z Tandutynibem umożliwia zmniejszenie dawki cytostatyku, bez utraty aktywności przeciwnowotworowej. Co więcej możliwość zmniejszenia dawki ogranicza pojawienie się skutków ubocznych związanych z terapią o dużym stopniu nasilenia, które niestety zmuszają do przerwania leczenia. Podsumowując połączenie Tandutynibu z Cytarabiną i/lub Daunorubicyną jest skuteczniejsze niż sama chemioterapia w przypadku ostrej białaczki szpikowej z mutacją (FLT3-ITD).⁹⁴ Dodatkowo aplikacja Tandutynibu w połączeniu ze standardowymi chemioterapeutykami poprawia odpowiedź kliniczną poprzez akumulację leku wewnątrz komórki nowotworowej i ograniczenie jego „wypływu” z komórki poprzez transportery.⁹⁹

Pomimo pozytywnych wyników z badań *in vivo* oraz *in vitro* dla CT53518, wskazujących na aktywność ograniczającą proliferację, dobrą biodostępność oraz działanie proapoptyczne, monoterapia nie dostarczyła w pełni satysfakcjonujących rezultatów. Główną tego przyczyną była pojawiająca się toksyczność stosowanej terapii. Dużo lepsze rezultaty uzyskuje się w leczeniu skojarzonym MLN518 z cytostatykami. Terapia ta umożliwia zmniejszenia dawki cytostatyku bez zmniejszenia jego właściwości leczniczych, co jest bardzo korzystne dla osób starszych, którzy często z powodu chorób współistniejących nie kwalifikują się do standardowej chemioterapii.

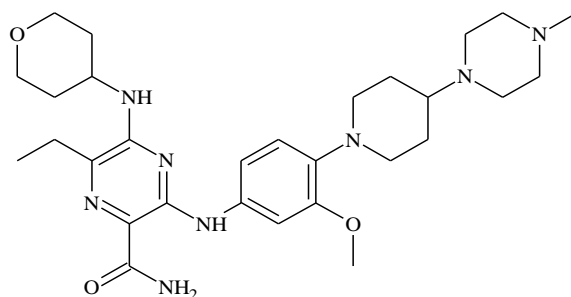
Podsumowanie:

Jak możemy zauważyć z opisu inhibitorów I generacji wszystkie z nich wykazują ograniczoną skuteczność w monoterapii leczenia osób z ostrą białaczką szpikową i dodatkową ekspresją FLT3. Często powodem braku aktywności klinicznej są pojawiające się w trakcie terapii nowe mutacje tzw. wtórne oraz oporność. Jednak największym ograniczeniem są skutki niepożądane i stopień ich nasilenia. Pojawianie się ich wiąże się często z koniecznością zmniejszenia dawki przyjmowanego leku a nawet wstrzymania leczenia. Stały się one główną przyczyną wstrzymania prowadzenia dalszych badań klinicznych dla wielu inhibitorów z wyjątkiem Midostauryny. Dla niej nie wstrzymano dalszych analiz klinicznych głównie przez uzyskane wyniki z badań III fazy, które to wykazały iż chemioterapia w połączeniu z Mido poprawia wskaźnik OS (całkowite przeżycie) dla pacjentów z ostrą białaczką szpikową i mutacją FLT3.²²

2.4.2. Inhibitory II generacji:

Ze względu na przejściowe działanie przeciwbiałaczkowe głównie w monoterapii inhibitorów I generacji oraz ich toksyczność wynikająca z aktywności działania wobec wielu kinaz, rozpoczęto opracowywanie nowych leków. W ten sposób powstały inhibitory II generacji, które są bardziej specyficzne. Tym samym wykazują one dużo lepszą aktywność wobec kinazy FLT3 i dzięki wysokiej selektywności są mniej toksyczne. Pozwala to stosować wyższe dawki leków natomiast niepożądane dolegliwości związane z leczeniem można w prosty sposób złagodzić poprzez zmniejszenie dawki leku przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej skuteczności działania.^{26,44,52}

2.4.2.1. Gilterytynib (Gilteritinib)



27

Gilterytynib (Xospata), znany wcześniej jako ASP2215, to podwójny małowiązaniowy inhibitor kinaz FLT3 oraz AXL. Ma on ogromne znaczenie w patogenezie ostrej białaczki szpikowej i opracowany został przez japońską firmę Astellas Pharma Inc.^{55,100} Klasyfikowany jest jako inhibitor I typu, który zalecany jest w terapii leczenia dorosłych pacjentów z ostrą białaczką szpikową, u których doszło do nawrotu choroby bądź nie uzyskano poprawy stanu zdrowia po wcześniejszym leczeniu.¹⁰¹ Ten selektywny inhibitor FLT3 w porównaniu ze standardową chemioterapią znacznie lepiej poprawia przeżywalność pacjentów z nawracającą bądź oporną na leczenie ostrą białaczką szpikową i zdiagnozowanymi mutacjami FLT3. Japonia, 21 września 2018 roku zatwierdziła w swoim kraju Gilteritinib jako lek do leczenia opornej bądź nawrotowej ostrej białaczki szpikowej. Podobnie 28 listopada 2018 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła go do stosowania w leczeniu onkologicznym w Stanach Zjednoczonych. Natomiast w Europie ma on nadany przez Europejską Agencję Leków (EMA) status leku sierociego.

Gilterytynib to związek oparty na strukturze karboksamidu pirazyny, o nazwie chemicznej 6-etylo-3-{3-metoksy-4-[4-(4-metylopiperazyn-1-ylo)piperdyn-1-ylo]anilino}-5-[(oksan-4-ylo)amino]pirazyno-2-karboksamid.^{55,100,103} Dostępny jest w formie jasnożółtej tabletki powlekanej i metabolizowany w wątrobie przez enzymy cytochromu P450 (CYP3A4). Głównymi metabolitami Gilterytynibu jest: M17, powstały w wyniku reakcji N-dealkilacji oraz oksydacji, M16 i M10, które są produktami reakcji dealkilacji. Jednak farmakologiczne działanie tych metabolitów na receptory FLT3 czy AXL są nieznane. Silnie wiąże się z albuminą. Należy pamiętać aby jednocześnie nie przyjmować go z lekami, które są silnymi induktorami cytochromu (CYP3A4) lub glikoproteiny P, ponieważ mogą one zmniejszyć stężenie Gilterytynibu w osoczu. Na stężenie jego wpływ ma także pokarm o wysokiej zawartości tłuszczu.¹⁰¹

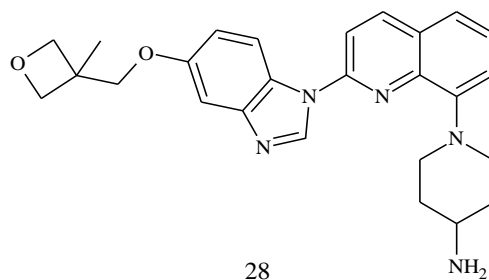
Badania przedkliniczne wykazały wysoką selektywność Gilterytynibu względem wspomnianych już wcześniej kinaz, czyli FLT3 oraz AXL bez stwierdzonej aktywności wobec pozostałych kinaz tyrozynowych. Stwierdzono, że wykazuje on silne działanie hamujące względem mutacji wewnątrz tandemowej (FLT3-ITD) oraz mutacji punktowych (FLT3-TKD), które to przyczyniają się do rozwoju oporności na stosowane leki.⁵⁵ Zaobserwowano również jego właściwości ograniczające względem mutacji typu (FLT3-F691) lecz nie tak silne jak w przypadku wyżej wspomnianych nieprawidłowości. Właściwości hamujące Gilterytynibu wynikają ze sposobu jego wiązania się z kinazą FLT3, ponieważ inhibitor ten wiąże się w pętli aktywacyjnej daleko od miejsca D835, hamując w ten sposób aktywność kinazy FLT3 z aberacjami. Badania na modelach zwierzęcych oraz komórkowych wskazały, że Xospata ogranicza fosforylację FLT3, wpływa na zmniejszenie się guza i charakteryzuje się względnie niską toksycznością. Co więcej inhibitor ten upośledza szlak sygnalizacyjny w głąb komórki ograniczając w ten sposób proces namnażania się komórek białaczkowych. Pozytywne wyniki uzyskane z badań przedklinicznych wskazujących na silną skuteczność hamującą względem komórek białaczkowych z mutacjami FLT3 przyczyniły się do wykorzystania Xospaty w badaniach klinicznych.¹⁰⁰ Zadaniem badań klinicznych I fazy było dostarczenie informacji określających profil farmakodynamiczny oraz farmakokinetyczny, wskazania odpowiedniej i bezpiecznej dla pacjenta dawki a także toksyczności wynikającej ze stosowania Gilterytynibu. Stwierdzono, że niska dawka powoduje zahamowanie autofosforylacji FLT3 a należy pamiętać, że hamowanie trwające jedynie kilka godzin jest niewystarczające do zniszczenia komórek białaczkowych z mutacjami FLT3. Przy wyższych dawkach często stwierdza się u pacjentów podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych o 3 stopniu nasilenia, co wiąże się

z koniecznością zmniejszenia dawki. Skutkami ubocznymi pojawiającymi w trakcie terapii jest także często: gorączka, cytopenia, zapalenie płuc, posocznica, zmęczenie, podwyższony poziom enzymów we krwi, zespół różnicowania jak również zaburzenia rytmu serca (wydłużenie odstępu QT na elektrokardiogramie).^{55,101,102}

Zbadano skuteczność działania Gilbertynybu zarówno w monoterapii jak i terapiach skojarzonych. Badania dotyczące monoterapii wykazały, że stosowanie tego preparatu przyczynia się do uzyskania przez pacjenta odpowiedzi klinicznej o dłuższym czasie trwania niż w przypadku standardowej chemioterapii.¹⁰² Dodatkowo wykazano, że inhibitor ten prowadzi do trwałego zahamowania autofosforylacji FLT3 oraz zapewnia uzyskanie remisji choroby. Badano również aktywność Gilbertynybu w połączeniu z innymi inhibitorami np. Midostauryną, aktywną wobec nowo rozpoznanej ostrej białaczki szpikowej z mutacjami FLT3.⁽¹⁰⁷⁾ Badanie kliniczne ADMIRAL III fazy było kluczowe i wiązało się z oceną skuteczności Gilbertynybu w porównaniu z chemioterapią ratunkową. Zakwalifikowani do tego badania pacjenci przydzieleni byli do schematu leczenia opartego na chemioterapii o wysokiej bądź niskiej intensywności. Leczenie pacjentów w grupie intensywnej chemioterapii składało się z 1 lub 2 cykli podczas gdy leczenie pacjentów przyjmujących Gilbertynyb i chemioterapię o niskiej intensywności trwało do momentu spełnienia kryterium warunkującego przerwanie terapii. Badanie to wykazało, że połączenie Xospaty z Idarubicyną lub Daunorubicyną prowadzi do wydłużenia (o około 4 miesiące) czasu całkowitego przeżycia wolnego od choroby w porównaniu z samą chemioterapią. Wstępne dane z powyższego badania wykazały, że Gilbertynyb zmniejsza ryzyko śmierci o 36% i prowadzi do uzyskania wyższego wskaźnika odpowiedzi klinicznej.^{102,104,105,106} Xospata podawana była również pacjentom po transplantacji jako leczenie podtrzymujące. U pacjentów tych stwierdzono dłuższe przeżycie w porównaniu do tych, którzy nie zakwalifikowali się do przeszczepu oraz tych, którzy nie przyjmowali Gilbertynybu jako leku podtrzymującego po przeszczepie.⁵⁵ Sprawdzano również jego aktywność działania u pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową ale z nawrotem choroby zlokalizowanym poza szpikiem kostnym (EMR), którzy byli już po przeszczepie komórek macierzystych. Badanie to wykazało, że terapia Gilbertynybem przyczynia się do zmniejszenia guzów poza szpikowych co potwierdza tomografia komputerowa. W trakcie tej terapii nie zaobserwowano nieprawidłowej pracy wątroby czy też wydłużenia odstępu QT. Skutkami ubocznymi, które zmuszały do przerwania leczenia Gilbertynybem była powtarzająca się posocznica oraz sepsa. Pomimo tego największym ograniczeniem w ocenie skuteczności działania Xospaty była rozwijająca się

w trakcie leczenia choroba (GVHD), czyli przeszczep przeciwko gospodarzowi. Dlatego też konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, które pomogą ocenić skuteczność działania Xospaty w leczeniu pacjentów z ostrą białaczką szpikową z aberacjami FLT3 oraz nawrotem choroby zlokalizowanym poza szpikiem kostnym.¹⁰⁶

2.4.2.2. Krenolanib



Krenolanib (Crenolanib, CP-868596, Besylan Krenolanibu), został opracowany przez firmę AROG Pharmaceuticals, LLC, początkowo jako silny i selektywny inhibitor receptora PDGF. Aktywny jest też wobec kinazy FLT3 i jej mutacjom.^{100,108} Podobnie jak Gilteryty nib charakteryzuje się silnym działaniem hamującym względem mutacji wewnątrzrandemowej (FLT3-ITD) oraz mutacji punktowych (FLT3-TKD). Stwierdzono także, że jest aktywny wobec kinazy FLT3 typu dzikiego (FLT3-WT) i jego stosowanie prowadzi do mitofagii czyli procesu samooczyszczania się komórki z mitochondrium, które są uszkodzone.¹⁰⁹ Inhibitor ten wykazuje silne działanie antyproliferacyjne oraz indukuje apoptozę komórek nowotworowych. Ponadto ma szerokie spektrum działania i wyższą specyficzność.¹¹⁰ Jest małowcząsteczkowym inhibitorem typu I, który wiąże się z receptorem będącym w aktywnej konformacji i w miejscu wiązania się z ATP. Co więcej charakteryzuje się on dużo wyższą czułością działania niż inhibitor Dazatynib.^{108,109}

Krenolanib to związek o nazwie chemicznej: 1-[2-[5-[(3-metyloksetan-3-ylo)-metoksy]benzimidazol-1-ylo]chinolin-8-ylo]piperydin-4-amina. Należy on również do benzimidazoli, chinoli, oksetanu, aminopiperydiny, aromatycznego eteru oraz trzeciorzędowego związku aminowego.⁽¹¹¹⁾ Jest biodostępny po podaniu doustnym i metabolizowany przy udziale cytochromu P450. Ze względu na krótki czas półtrwania, trwający jedynie 8h konieczne jest częste przyjmowanie go w ciągu doby.¹⁰⁸

Skuteczność działania Krenolanibu testowano w II fazie badań klinicznych związanych z nawracającą lub też oporną na leczenie ostrą białaczką szpikową z mutacjami

FLT3. W badaniu tym pacjenci przyjmowali dawkę 100 mg doustnie co 8h. Wykazano iż dawka ta jest idealnie dobrana w celu utrzymania odpowiedniego stężenia inhibitora warunkującego aktywność hamującą procesu autofosforylacji receptora FLT3 niezależnie od typu mutacji.¹⁰⁸ Niestety monoterapia Krenolanibem pomimo jego dużej aktywności działania i uzyskania przez pacjentów w trakcie leczenia wysokiego wskaźnika odpowiedzi klinicznej prowadzi do rozwoju lekooporności i późniejszego nawrotu choroby. Udowodniono jednak, że na rozwój oporności związanej z terapią Krenolanibem wpływa głównie mechanizm genetyczny bądź epigenetyczny czy też mutacje współistniejące a w mniejszym stopniu pojawiające się mutacje wtórne.¹¹² Nadal trwają badania związane z oceną skuteczności, bezpieczeństwem stosowania oraz tolerancją Krenolanibu.

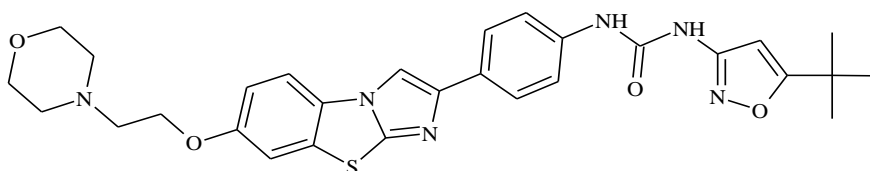
W badaniu (NCT02283177) prowadzonym w latach 2015-2019, sprawdzano działanie Krenolanibu w terapii skojarzonej z intensywną chemioterapią u dorosłych pacjentów z nowo rozpoznaną AML i stwierdzoną mutacją FLT3. W badaniu tym uczestniczyło 44 pacjentów w wieku od 19 do 75 lat. Zgłoszono w nim uzyskanie wysokiego wskaźnika remisji choroby na poziomie 89% już po 1 lub 2 cyklach chemioterapii połączonej z Krenolanibem. U pacjentów powyżej 60 roku życia mediana przeżycia wolnego od zdarzeń wynosiła średnio 8 miesięcy a mediana całkowitego przeżycia około 20 miesięcy. Niestety u niektórych pacjentów doszło do nawrotu choroby ale nie stwierdzono już mutacji FLT3. Nawrót choroby w tym sposobie leczenia tłumaczony był jako rezultat rozwijających się nowych szlaków oporności czy też nowych mutacji.¹¹⁰ Dane te pokazują, że terapia Krenolanibem w konsolidacji z chemioterapią wpływa na poprawę ogólnego wyniku leczenia pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką szpikową i mutacjami FLT3. Dlatego też rozpoczęto w 2018 roku kolejne, randomizowane badanie kliniczne III fazy (NCT03258931), dotyczące standardowej chemioterapii połączonej z Krenolanibem lub Mido u nowo zdiagnozowanych pacjentów z AML i aberracjami FLT3.¹¹³

Badano także skuteczność działania Krenolanibu w leczeniu osób u których doszło do nawrotu choroby w trakcie leczenia innymi inhibitorami np. Gilterytytibem. Po leczeniu Gilterytytibem dochodzi do progresji choroby i pacjenci Ci często mają nabyte mutacje typu FLT3-F691 lub zmutowane klony RAS, które z kolei wpływają na oporność stosowanej dotychczas terapii i nawrotu choroby. Do badań tych zakwalifikowano 7 pacjentów i zaobserwowano u nich, że terapia Krenolanibem skojarzona z intensywną chemioterapią pozwala na eliminację mutacji FLT3 zlokalizowanych w obrębie domeny kinazy tyrozynowej czy różnego typu mutacji punktowych.¹¹⁴ Z kolei badanie (NCT02400255) dotyczyło

sprawdzenia skuteczności działania Krenolanibu w terapiach podtrzymujących u chorych na AML z mutacjami FLT3, którzy uzyskali remisję choroby po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych. Badanie to pomogło w określeniu optymalnej i bezpiecznej dawki inhibitora. W trakcie tej terapii najczęściej obserwowanymi skutkami ubocznymi były: nudności, wymioty oraz biegunka o średnim stopniu nasilenia. Zgłaszano również efekty niepożądane o 3 stopniu nasilenia, które określono jako powikłanie potransplantacyjne, czyli (przeszczep przeciw gospodarzowi, GVHD). Nie zaobserwowano skutków o wyższym stopniu nasilenia, który wiązałby się z koniecznością ograniczenia czy zakończenia powyższej terapii.¹¹⁵

Przeprowadzono również badanie nad bezpieczeństwem i skutecznością działania Krenolanibu w połączeniu go z chemioterapią Fludarabiną lub Cytarabiną w przypadku pediatrycznych pacjentów chorych na nawracająca bądź oporną na leczenie AML z mutacjami FLT3. Realizowane były w ramach badania klinicznego II fazy (NCT03324243). W badaniu tym odnotowano jeden przypadek, w którym należało zmniejszyć dawkę przyjmowanego leku ale nie stwierdzono pojawiającej się kardiotoxyczności czy wysięku osierdziowego. Co więcej u 4 z 5 pacjentów uzyskano odpowiedź kliniczną. Wykazano również terapeutyczne właściwości Krenolanibu w połączeniu z chemioterapią ratunkową, ponieważ terapia ta pozwoliła na uzyskanie remisji choroby nie tylko w przypadku różnych wariantów aberracji FLT3 ale również współwystępujących innych mutacji. Niestety badanie to zostało wycofane.¹¹⁶

2.4.2.3. Kwizartynib (Quizartinib)



29

Kwizartynib (Ambit) dawniej znany jako AC220 to silnie selektywny inhibitor FLT3, który jest również aktywny lecz w mniejszym stopniu wobec: kinazy RET, c-KIT, receptora czynnika stymulującego tworzenie kolonii-1 oraz receptora płytkopochodnego czynnika

wzrostu. Indukuje proces apoptozy komórek nowotworowych i ogranicza ich niekontrolowane namnażanie się. Jako inhibitor I typu, wiąże się on z receptorem w miejscu hydrofobowym przylegającym do miejsca wiązania ATP, które z kolei dostępne jest gdy receptor FLT3 znajduje się w nieaktywnej konformacji zapobiegając aktywacji receptora. W związku z tym AC220 wykazuje aktywność względem duplikacji tandemowej (FLT3-ITD) o IC₅₀ wnoszącym odpowiednio 1.1 nM. Natomiast w przypadku mutacji punktowych (FLT3-TKD), które prowadzą do aktywnej konformacji receptora, nie stwierdzono jego aktywności. W czerwcu 2019 roku Ministerstwo Zdrowia, Pracy i Opieki Społecznej Japonii zaakceptowało Kwizartynib znany też jako Vanflyta, do leczenia osób dorosłych, chorych na nawracającą lub oporną na leczenie ostrą białaczką szpikową ze stwierdzoną mutacją (FLT3-ITD).^{48,117}

AC220 to związek o nazwie chemicznej: N-(5-tert-Butylo-1,2-oksazol-3-ilo)-N'-(4-{7-[2-(morfolin-4-ylo)etoksy]imidazo[2,1-b][1,3]benzotiazol-2-ilo}fenylo)mocznik. Zawiera on w swojej strukturze morfolinę i należy do grupy benzoimidazotriazoli, fenylomocznika i izoksazoli. Jest szybko wchłaniany i biodostępny po podaniu doustnym w postaci roztworu oraz metabolizowany w wątrobie przy udziale cytochromu P450. Przyjmowanie go z lekami cytochromu P450 może prowadzić do wystąpienia interakcji. Przy dawkowaniu Kwizartynibu z silnym inhibitorem cytochromu P450 należy pamiętać o zmniejszeniu dawki inhibitora FLT3 bowiem dochodzi do dwukrotnego wzrostu jego stężenia. Natomiast w przypadku stosowania AC220 ze słabym inhibitorem cytochromu nie ma potrzeby zmniejszania jego dawki. Przeprowadzone badania farmakokinetyczne pozwoliły na zdefiniowanie aż 41 metabolitów, z których główny i aktywny to metabolit (AC886). Wykonane testy wykazały, iż sam metabolit (AC886) jest selektywny i działa jako inhibitor mutacji (FLT3-ITD) oraz mutacji typu „dzikiego” (FLT3-Wt). Dodatkowo naukowcy przypuszczają, że metabolit ten wzmacnia działanie farmakologiczne Kwizartynibu.^{117,118}

Uzyskane wyniki z badań przedklinicznych potwierdzające aktywność AC220 wobec komórek nowotworowych AML i mutacji typu FLT3-ITD przyczyniły się do wykorzystania go w badaniach klinicznych. Wieloośrodkowe badanie kliniczne I fazy związane było z oceną różnych dawek Kwizartynibu przyjmowanego przez pacjentów z nawrotową lub oporną na leczenie ostrą białaczką szpikową. W badaniu tym uczestniczyło 76 pacjentów u których nie wymagano stwierdzenia obecności mutacji FLT3. Badanie to pozwoliło określić maksymalną tolerowaną dawkę leku (MTD). Wykazano także, że już niskie dawki zapewniają uzyskanie odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie. Spośród 76 osobowej grupy: u 23 osób stwierdzono odpowiedź kliniczną, u 9 pacjentów ustąpiły objawy choroby (CR) a u 14

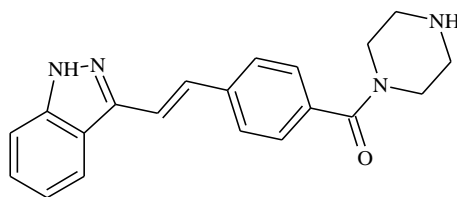
zaobserwowano częściową remisję (PR). Odpowiedź kliniczna utrzymywała się średnio przez 14 tygodni. Dodatkowo w badaniu tym stwierdzono dużo wyższe odpowiedzi kliniczne u osób ze zdiagnozowaną mutacją (FLT3-ITD) w porównaniu z pacjentami chorymi na AML bez mutacji FLT3.^{117,119} We wstępnych badaniach klinicznych fazy 2 oceniano skuteczność działania AC220 u chorych na AML w wieku poniżej 60 roku życia jak również osób starszych, którzy nie kwalifikują się do transplantacji. W kolejnej części badań klinicznych 2 fazy, w której uczestniczyło 76 pacjentów z nawracającą lub oporną na leczenie ostrą białaczkę szpikową z dodatkowo zdiagnozowaną mutacją (FLT3-ITD), stwierdzono u chorych częściową remisję choroby oraz czas przeżycia (OS) wynoszący około 25 tygodni. Odpowiedź kliniczną stwierdzono u 47% chorych już po pierwszym cyklu stosowania AC220.

Międzynarodowe badanie kliniczne 3 fazy (QUANTUM-R) dotyczyło oceny skuteczności klinicznej Kwizartynibu w porównaniu z chemioterapią indukcyjną oraz konsolidacyjną. W badaniu tym uczestniczyło 367 pacjentów i wykazało ono, że przyjmowanie AC220 w porównaniu z chemioterapią wydłuża zarówno czas całkowitego przeżycia (OS) oraz czas w którym pacjent pozostaje wolny od powikłań (EFS). Co więcej udowodniono, że terapia Kwizartynibem zmniejsza ryzyko śmierci o 24% i zapewnia uzyskanie przez pacjentów częściowej remisji choroby, która utrzymuje się średnio przez 12 tygodni czyli trwa aż o 7 tygodni dłużej niż w przypadku chemioterapii. Zwiększa również szanse na transplantację.¹¹⁷

Wykonano również szereg badań oceniających działanie Kwizartynibu w monoterapii, w leczeniu skojarzonym z intensywną chemioterapią oraz leczeniu podtrzymującym po przeszczepie. Niestety w trakcie leczenia w wyniku pierwotnych lub też nabytych mutacji punktowych oraz różnego rodzaju niezależnych mechanizmów rozwija się oporność na AC220.

Pomimo wykazania w badaniu (NCT00989261) dużo lepszej czułości oraz skuteczności klinicznej Kwizartynibu niż konwencjonalnej chemioterapii, inhibitor ten nie został zatwierdzony przez FDA oraz Europejską Agencję Leków (EMA) do leczenia osób dorosłych z nawracającą lub oporną na leczenie ostrą białaczkę szpikową z aberracją FLT3-ITD. Głównym tego powodem były często pojawiające się w zaawansowanym stadium problemy kardiologiczne oraz ciężka supresja szpiku kostnego w wyniku której dochodzi do zmniejszenia produkcji komórek zapewniających odporność organizmu. Stwierdzono także, że ryzyko związane z terapią jest dużo wyższe niż korzyści wynikające z leczenia.^{48, 117}

2.4.2.4. KW- 2449



30

KW-2449 został wybrany z biblioteki związków chemicznych Kyowa Hakko Kirin. Silnie hamuje aktywność komórek białaczkowych z mutacjami kinazy FLT3 o wartości IC_{50} na poziomie 6 nM. Oprócz aktywności wobec kinazy FLT3 wykazuje on również działanie ograniczające wobec kinazy Aurora, ABL i jej mutacji typu (ABL T315I). Silną aktywność KW-2449 wobec komórek białaczkowych oraz mutacji FLT3 potwierdzono już w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. Badania *in vivo* przeprowadzone na myszach SCID wykazały, że podawanie KW-2449 w dawce 2.5 lub 5 mg/kg masy ciała prowadzi do zahamowania wzrostu guza. Natomiast większe dawki przyczyniają się zarówno do regresji nowotworu i guza. Z kolei badanie kliniczne 1 fazy z udziałem 37 pacjentów, z których 11 miało stwierdzone mutacje FLT3 potwierdziły, że leczenie KW-2449 prowadzi do zmniejszenia liczby komórek białaczkowych zarówno w krwi obwodowej jak i w szpiku kostnym. Związek ten był szybko metabolizowany a hamowanie autofosforylacji FLT3 czy STAT5 obserwowano jedynie przez 8h. W badaniach tych nie udało się ustalić maksymalnej tolerowanej dawki leku (MTD) i ze względu na toksyczność żołądkowo-jelitową badanie to zostało przerwane.^{48,119,120} Związku tego nie zakwalifikowano do dalszych badań klinicznych.

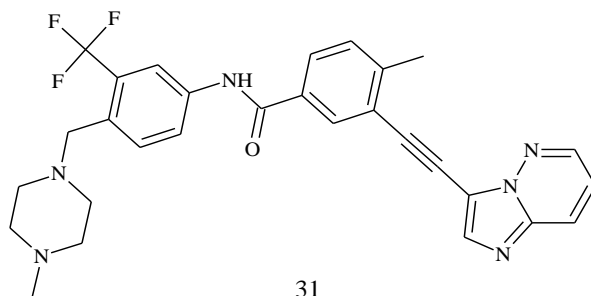
Podsumowanie

Pomimo wysokiej selektywności, aktywności wobec kinazy FLT3 i jej mutacjom oraz mniejszej toksyczności, inhibitory II generacji wykazują podobnie jak inhibitory I generacji ograniczoną skuteczność a to dlatego, że ich działanie ukierunkowane na FLT3 sprawia, że nie hamują one także równoległych szlaków sygnałowych w komórce wpływających na rozwój ostrej białaczki szpikowej.⁴⁴

2.4.3 Inhibitory nowszej generacji

Naukowcy opracowali również inhibitory nowszej generacji. Do grupy tej należy Ponatynib oraz FLX925.²⁶

2.4.3.1. Ponatynib (Ponatinib)



Ponatynib (AP24534) to lek opracowany przez firmę ARIAD Pharmaceuticals, dostępny pod nazwą handlową Iclusig. Klasyfikowany jest jako tzw. pan-inhibitor kinazy tyrozynowej BCR-ABL. Zaakceptowany przez FDA w grudniu 2012 roku i przez EMA w 2013 roku do leczenia min. ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) z chromosomem Filadelfia oraz przewlekłej białaczki szpikowej z przełomem blastycznym.^{44,121,122,123} Ponatynib wykazuje aktywność również wobec kinaz: c-KIT, FGFR, VEGFR, PDGFR i SRC. Przeprowadzone badania przedkliniczne potwierdziły także jego wysoką cytotoksyczność wobec komórek białaczkowych z mutacją FLT-ITD prowadząc do apoptozy komórek nowotworowych a nawet regresji choroby. Inhibitor ten wykazuje dużo mniejszą skuteczność działania w przypadku mutacji punktowych.

(AP24534) to związek o nazwie chemicznej: 3-(2-imidazo[1,2-b]pirydazyn-3-yloetynylo)-4-metylo-N-[4-[(4-metylo-1-piperazyńnylo)metylo]-3-(trifluorometylo)fenylo]-benzamid, biodostępny po podaniu doustnym. Lek ten dostępny jest w postaci tabletek powlekanych a terapię leczenia przerywa się jeśli pacjent w ciągu 3 miesięcy nie zareaguje na leczenie albo też stwierdzi się u niego progresję choroby bądź skutki uboczne o wysokim stopniu nasilenia. Metabolizowany jest jak większość inhibitorów w wątrobie przy udziale cytochromu P450. W trakcie leczenia Ponatynibem należy pamiętać, że jednoczesne przyjmowanie go z silnymi inhibitorami CYP3A prowadzi do wzrostu jego stężenia. Natomiast przyjmowanie go z induktorami cytochromu obniża jego stężenie.¹²³

Dzięki wykazanej przez Iclusig aktywności w badaniach przedklinicznych zakwalifikowano go do dalszych badań klinicznych. W badaniu I fazy oceniano skuteczność jego działania a także bezpieczeństwo stosowania u pacjentów z ostrą białaczką szpikową i stwierdzoną mutacją (FLT3-ITD). W badaniu tym Ponatynib wykazał akceptowalny profil bezpieczeństwa. Ponadto analizy te potwierdziły, że przyjmowanie go zapewnia uzyskanie częściowej jak również całkowitej remisji choroby z niepełnym odzyskaniem prawidłowej morfologii krwi. Do najczęściej obserwowanych zdarzeń niepożądanych związanych z leczeniem i dawką leku należy zapalenie trzustki oraz wybroczyny. Zmniejszenie dawki lub kilkudniowe odstawienie leku łagodzi ich stopień nasilenia. W momencie stwierdzenia u pacjentów mielosupresji, niedrożności naczyń, krwotoku czy zaburzenia czynności wątroby konieczne jest przerwanie leczenia.^{122,123} W badaniu klinicznym (NCT02428543) oceniano jego skuteczność oraz bezpieczeństwo stosowania w połączeniu z Cytarabiną u pacjentów z mutacją (FLT3-ITD). Z kolei badanie (NCT02829840) dotyczyło oceny aktywności Ponatynibu u pacjentów z AML i stwierdzoną mutacją (FLT3-ITD), którzy nie kwalifikują się do chemioterapii.⁽⁴⁴⁾ Z badań tych wynika również, że Ponatynib skutecznie działa wobec mutacji typu (F691) pojawiającej się w trakcie leczenia Kwizartynibem. Jednak wobec mutacji typu (D835) nie wykazuje on żadnej skuteczności terapeutycznej.⁵²

2.5. Oporność wielolekowa

Pomimo znacznego postępu w rozwoju nowszych generacji inhibitorów FLT3, wykazujących dużo większą specyficzną i siłę działania, to nadal w trakcie leczenia największe ograniczenie stanowi pojawiająca się oporność wielolekowa. Ogranicza skuteczność działania leków i w dużej mierze przyczynia się do nawrotu choroby. Na jej rozwój duży wpływ mają nieprawidłowości kinazy FLT3.

Wyróżnia się dwa typy oporności:

1. pierwotna
2. wtórna (nabyta)

Rezystancja pierwotna powstaje na skutek różnej siły działania względem odpowiednich mutacji FLT3, różnym sygnałom i mechanizmom aktywowującym. Z kolei oporność wtórna pojawia się w wyniku nabytych w trakcie leczenia nowych mutacji, które wcześniej nie zostały zdiagnozowane u pacjenta. Oporność nabyta obejmuje mutacje punktowe w resztach pętli aktywującej (np. D835, D839, I836, i Y842) oraz miejscu (F691). Wtórne mutacje osłabiają powinowactwo inhibitorów FLT3 względem kinazy FLT3.

Oporność na leki powstaje również na skutek mechanizmów „on-target” lub „off-target”. Wykazano także, że na pojawiającą się oporność wielolekową ogromny wpływ ma białko transportowe (ABC), którego kasetę wiąże się z ATP i energia powstająca w wyniku hydrolizy ATP wykorzystywana jest do przetransportowania przez błonę do wnętrza komórki różnego rodzaju substratów. Transportery (ABC) mogą znacznie zmniejszyć stężenie wewnątrzkomórkowe leków przeciwnowotworowych poprzez zwiększenie ich „wypływu” i tym samym osłabiając ich cytotoksyczne działanie.^{48,54,99} Ponadto wykazano również, że mikrośrodowisko szpiku kostnego wpływa na rozwój oporności wobec inhibitorów FLT3 na drodze tzw. zewnętrznych mechanizmów oporności. W wyniku przebytej chemioterapii szpik kostny zwiększa wydzielanie ligandu FLT3 co prowadzi do zwiększonej sygnalizacji nawet w obecności inhibitorów FLT3. Aktywacja szlaków sygnałowych takich jak MAPK czy STAT5 przez mikrośrodowisko szpiku kostnego powoduje zahamowanie apoptozy komórek białaczkowych z nowymi mutacjami FLT3 wykazującymi silną rezystancję wobec inhibitorów FLT3. Jest to przykład pierwotnej oporności. Na ograniczoną i tymczasową skuteczność inhibitorów FLT3 wpływa również cytochrom P450, który podobnie jak transportery (ABC) wpływa na stężenie leku w osoczu. Nieodpowiednie stężenie inhibitora w osoczu jest wynikiem zbyt szybkiego metabolizmu w wątrobie przez enzymy CYP3A4 a niski poziom leku nie zapewni silnego hamowania mutacji.^{26,41,44,52}

Obecnie głównym sposobem przezwyciężenia oporności jest leczenie skojarzone. Ma ono na celu poprawić wskaźnik odpowiedzi u pacjentów, wydłużyć czas remisji jak również ograniczyć do minimum toksyczność chemioterapii. W przypadku ostrej białaczki szpikowej polega ono na przyjmowaniu w określonych schematach zatwierdzonych inhibitorów FLT3 z Cytarabiną, Daunorubicyną, środkami hipermetylującymi i innymi chemioterapeutykami.²⁶

2.6. Zastosowanie technologii reaktorów mikrofalowych i przepływowych (FLOW) w syntezie chemicznej

W przemyśle chemicznym jak i farmaceutycznym, synteza związków organicznych oraz substancji czynnych (API – active pharmaceutical ingredient) prowadzona jest najczęściej w sposób klasyczny czyli przy wykorzystaniu kolb okrągłodennych z zewnętrznym źródłem ciepła. W literaturze taki sposób prowadzenia reakcji określany jest także jako „wsadowy”. Metoda ta w wielu przypadkach pozwala na otrzymanie oczekiwanego produktu z dobrą wydajnością. Niestety konwencjonalny sposób prowadzenia transformacji chemicznej związany z tworzeniem biblioteki związków czy optymalizacją reakcji syntezy pochłania bardzo dużo czasu. Ponadto trudno jest kontrolować w sposób ciągły parametry reakcji takie jak: ciśnienie czy temperatura. Dodatkowym ograniczeniem jest również utrudniony sposób kontroli procesów egzotermicznych. Często też prace syntetyczne wymagają użycia dużej ilości rozpuszczalników a także pracy z reagentami, przy których należy zachować szczególną ostrożność.

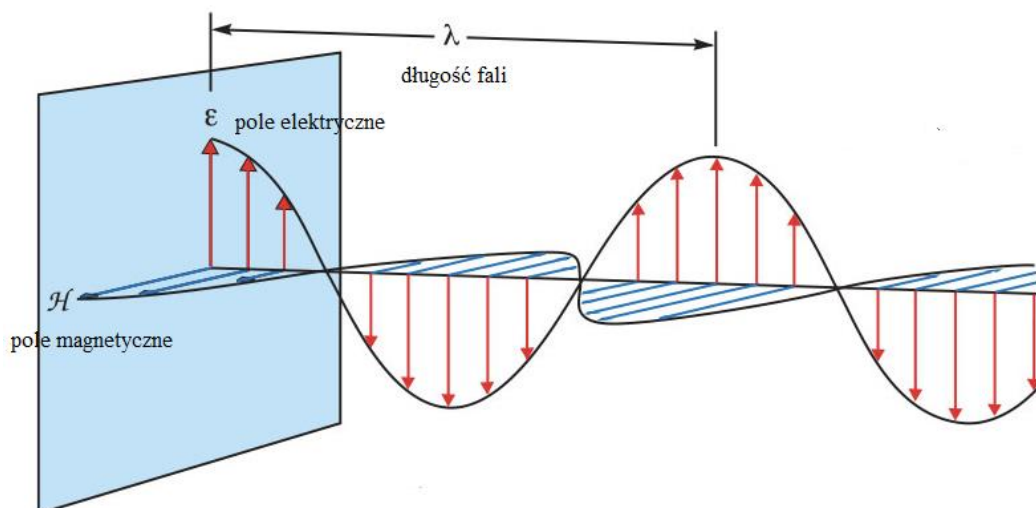
W celu udoskonalenia procesów syntetycznych od wielu lat opracowywano szereg innowacyjnych systemów, z których w ostatnim czasie duże zainteresowanie nie tylko w środowisku akademickim ale przede wszystkim w przemyśle farmaceutycznym oraz chemicznym wzbudza technologia reaktorów mikrofalowych (MW) i przepływowych (określanych również jako „system FLOW”). Zarówno mikrofałe jak i aparatura FLOW znacznie przyspieszają szybkość reakcji, pozwalają na szybką optymalizację wielu procesów chemicznych często trudnych i pochłaniających sporo czasu. Dodatkowymi korzyściami wynikającym ze stosowania wskazanych technologii jest również: dużo lepsza czystość otrzymanych związków oraz wydajność procesów chemicznych.¹²⁴

2.6.1. Reaktor mikrofalowy

Energia mikrofalowa odkryta została już w czasach II wojny światowej i znalazła wiele zastosowań nie tylko w kuchenkach mikrofalowych w celu podgrzania żywności ale także: w przemyśle wulkanizacyjnym, do suszenia produktów, analizy wilgoci i tłuszczu w produktach spożywczych czy też usuwania siarki i innych zanieczyszczeń. Natomiast pierwsze doniesienia związane z wykorzystaniem reaktorów mikrofalowych w syntezie organicznej pojawiły się dopiero w 1986 roku.^{124,125}

W technologii mikrofal stosuje się energie elektromagnetyczną o długości fali w zakresie od 1centymetra do 1 metra. Zakres ten z kolei odpowiada wartościom częstotliwości

od 300 do 300 000 megaherców (MHz). W reaktorach mikrofalowych używanych do syntez chemicznych stosuje się najczęściej częstotliwość o wartości 2450 (MHz). Z kolei pole magnetyczne i elektryczne to komponenty energii mikrofalowej (Rysunek 7).



Rysunek 7: Komponenty energii mikrofalowej.¹²⁵

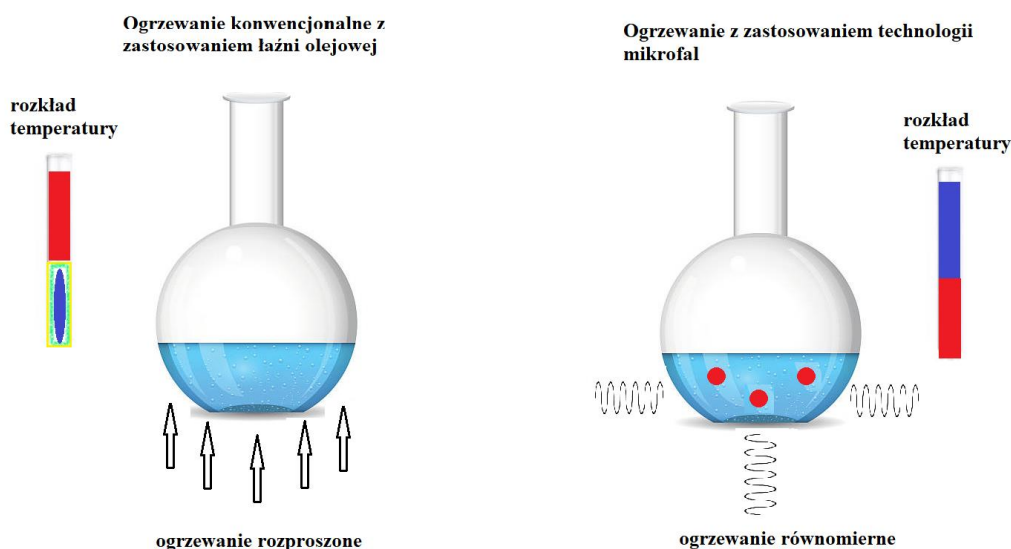
Uważa się, że na ogrzewanie substancji wpływa przede wszystkim pole elektryczne natomiast oddziaływania pola magnetycznego zazwyczaj nie obserwuje się w pracach syntetycznych. Dodatkowo reaktory mikrofalowe nie zmieniają struktury cząsteczki, ponieważ energia elektromagnetyczna zaangażowana jest jedynie w rotacje cząsteczek a energia fotonów mikrofalowych jest zbyt mała w porównaniu z energią potrzebną do rozerwania wiązań.^{124,125}

W syntezie organicznej reaktory mikrofalowe wykorzystywane są głównie jako źródło energii. Do transformacji chemicznych najczęściej używane są jednomodowe wnęki mikrofalowe. Reakcje prowadzi się w specjalnych naczyniach mikrofalowych o określonej objętości, które są całkowicie przepuszczalne dla promieniowania mikrofalowego i wykonane ze szkła borokrzemianowego bądź z politetrafluoroetyleny, które nadają odporność na działanie silnych zasad oraz kwasów. Mikrofałe przeznaczone do prowadzenia reakcji chemicznych wyposażone są w systemy umożliwiające monitorowanie temperatury, mocy oraz ciśnienia w trakcie prowadzonych reakcji. Zabezpieczenia te chronią przed pęknięciem lub eksplozją naczynia mikrofalowego jeśli dojdzie do nadmiernego wzrostu którego z parametrów. Dodatkowo po reakcji dochodzi do automatycznego i szybkiego ochładzania mieszaniny reakcyjnej.¹²⁴

Udowodniono, że wdrożenie technologii mikrofal w prace syntetyczne wnosi wiele korzyści, ponieważ tego typu reaktory:

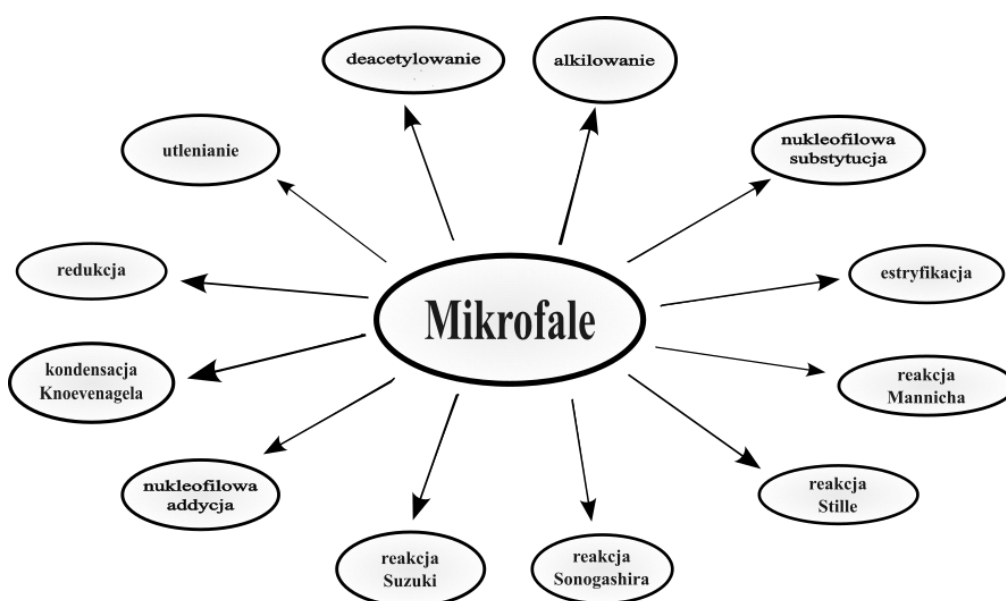
- skracają czas prowadzonych reakcji – dzięki możliwości stosowania w reaktorach mikrofalowych wyższych temperatur, mieszanina podgrzewana jest w ciągu kilku minut a nie godzin czy nawet dni. Na wzrost szybkości wpływa również ilość wprowadzonej do układu energii mikrofalowej, która zdecydowanie przewyższa wartość energii potrzebnej do osiągnięcia energii aktywacji. Ponadto mikrofałe przenoszą energię szybciej niż cząsteczki ulegną relaksacji, fakt ten także ma wpływ na wzrost szybkości prowadzonej syntezy. Dane z przeprowadzonych dotychczas badań wykazały, że wdrożenie reaktorów mikrofalowych w syntezę chemiczną przyspiesza szybkość prowadzonych reakcji nawet 1000 razy w porównaniu z klasycznym sposobem ogrzewania,
- zapewniają lepszą wydajność i czystość procesu – podczas syntez wspomaganych chemią mikrofałi powstaje mniej produktów ubocznych co wiąże się z dużo lepszą wydajnością,
- powtarzalność reakcji – dzięki możliwości ciągłego kontrolowania wartości kluczowych parametrów reakcji, syntezy można łatwo powtórzyć,
- umożliwiają prowadzenie reakcji w mniejszych objętościach lub nawet bez użycia rozpuszczalnika co jest niemożliwe w przypadku syntez wykonywanych w sposób konwencjonalny,
- gwarantują równomierne ogrzewanie oraz mniejsze straty energii – w reaktorach mikrofalowych w wyniku promieniowania mikrofalowego dochodzi do wydajnego procesu przenoszenia ciepła i tym samym bezpośredniego i równomiernego ogrzewania substancji bez generowanych strat energii. W mikrofałi substancje ogrzewane są w wyniku oddziaływania z polem elektrycznym lub na drodze przewodności jonowej. Przewodzenie jonowe występuje gdy w mieszaninie reakcyjnej występują formy jonowe lub też wolne jony. W wyniku działania pola elektrycznego generowany jest ruch jonów w wyniku czego dochodzi do wzrostu temperatury i tym samym wydajnego procesu przenoszenia energii. Z kolei w trakcie ogrzewania mieszaniny reakcyjnej za pomocą płyty grzewczej lub łaźni olejowej jako zewnętrznego źródła energii, dochodzi do rozproszonego sposobu ogrzewania, w wyniku czego jako pierwsza ogrzewa się łaźnia a następnie dopiero rozpuszczalnik i reagenty. Jest to nieefektywny i powolny proces przenoszenia energii do układu.

Następstwem tego są w początkowym etapie różnice temperatur pomiędzy ściankami naczyń a mieszaniną reakcyjną i musi upłynąć odpowiednio długi czas aby uzyskać równowagę termiczną. Taki sposób ogrzewania mieszaniny reakcyjnej wiąże się również z dużymi stratami energii (Rysunek 8).^{125,125,126}



Rysunek 8: Różnice w sposobie ogrzewania mieszaniny reakcyjnej realizowanej metodą klasyczną i za pomocą reaktorów mikrofalowych.¹²⁷

Z doniesień literaturowych wynika, że chemia mikrofalowa umożliwia przeprowadzenie szeregu typowych reakcji chemicznych zwiększając ich wydajność i diametralnie skracając czas ich prowadzenia.^{124,126} Do reakcji tych należy min.:



Schemat 1: Typy reakcji, jakie można przeprowadzić z wykorzystaniem reaktorów mikrofalowych.

2.6.2. Technologia przepływowa (systemy FLOW)

Technologia przepływowa to innowacyjny sposób prowadzenia syntezy chemicznej, polegający na przebiegu reakcji w ciągłym przepływie strumienia. Określana jest również jako chemia przepływowa lub tłokowa.¹²⁸ Jest przyjazna środowisku i na przełomie ostatnich 7 lat cieszy się ogromnym zainteresowaniem nie tylko w kręgu akademickim ale również w przemyśle chemicznym oraz farmaceutycznym do produkcji substancji czynnych. Dotychczas instalacje systemów przepływowych wykorzystywane były głównie w przemyśle paliwowym do rafinacji ropy naftowej oraz chemii masowej. Opisane w literaturze systemy przepływowe według Kobayashiego i jego współpracowników można podzielić na 4 typy. Systemy typu I zapewniają przepływ wszystkich reagentów przez reaktor a następnie zbieranie oczekiwanego produktu reakcji. W typie II jeden z reagentów umieszczony jest w reaktorze, przez który przepływa drugi reagent a wypływająca z reaktora mieszanina zawiera jedynie pożądaną produkt. Stosowanie tego rodzaju systemów przepływowych nie wymaga używania katalizatorów oraz izolacji produktu właściwego. Z kolei w typie III używa się katalizatora, który przepływa wspólnie z reagentami przez reaktor ale po reakcji konieczny jest podział chromatograficzny w celu uzyskania czystego produktu. Natomiast w przypadku IV typu katalizator naniesiony jest na stałym nośniku w reaktorze, przez który przepływają reagenty. Ten rodzaj systemów przepływowych jest najczęściej stosowany przede wszystkim przez możliwość ponownego wykorzystania katalizatora. Dodatkową zaletą prowadzenia reakcji w ciągłym przepływie strumienia jest możliwość jej konsolidacji z innymi systemami np.: reaktorami mikrofalowymi, źródłem ogrzewania indukcyjnego, strumieniem elektrycznym lub strumieniem fotonów w celu wykonania przemian fotochemicznych i elektrochemicznych.¹²⁹

Każdy z systemów przepływowych składa się z poniższych komponentów:

- zaworów trójdzielnych pozwalających na przełączenie pomiędzy dozowanymi reagentami a rozpuszczalnikiem,
- pompy,
- reaktora,
- miksera, zapewniającego łączenie się ze sobą reagentów bezpośrednio przed reaktorem. Mają one postać łącznika w kształcie litery T bądź Y,
- regulatora ciśnienia wstecznego,
- zaworu trójdzielnego umożliwiającego zbieranie oczekiwanego produktu reakcji oraz produktów ubocznych określanych jako odpady,

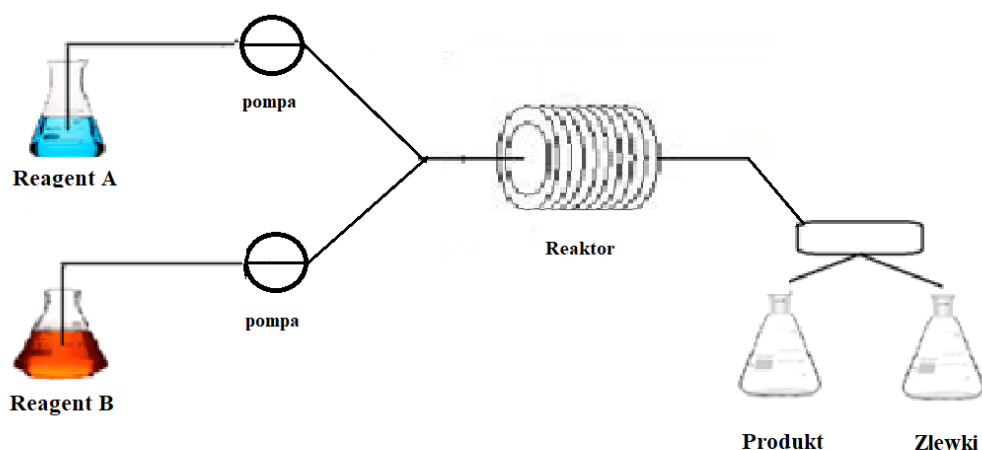
- ekranu sterującego, dzięki któremu można dobierać parametry reakcji,
- czujnika temperatury reaktora.¹³⁰

Pompy zapewniają precyzyjny przepływ substancji i najczęściej stosuje się pompy strzykawkowe, tłokowe lub perystaltyczne.

Reaktor przepływowy to najważniejszy element budulcowy, odpowiednik kolby reakcyjnej powszechnie używanej w klasycznych reakcjach wsadowych. Wyróżnia się 3 główne rodzaje reaktorów: mikroreaktory (płytkowe), rurkowe (zwojowe) i tubowe (ze złożem, wykorzystywane w reakcjach w których niezbędne jest użycie katalizatorów). Reaktory płytkowe jak sama nazwa wskazuje zbudowane są z płytki wykonanej z materiału chemicznie odpornego o objętości kilku mililitrów. Wewnątrz każdego mikroreaktora znajdują się kanaliki przez które przepływają reagenty. Reaktory te pomimo dużo lepszego transferu masy oraz ciepła, wynikające z małej przestrzeni, często niestety przeciekają lub zarastają. Reaktory zwojowe mają postać rurki wykonanej również z obojętnego chemicznie materiału najczęściej z politetrafluoroetylenem (PTFE) lub perfluoroalkoksyalokanu (PFA). W zależności od rodzaju prowadzonych reakcji reaktory te umieszczone są w płaszczu grzejnym lub chłodzącym umożliwiając tym samym prowadzenie reakcji zarówno w niskich (-70 °C) jak i wysokich temperaturach (150, 250 °C). Reaktory umożliwiające pracę w wysokiej temperaturze często wykonane są ze stali nierdzewnej lub kwasoodpornych stopów. Co więcej w zależności od rodzaju sprzętu przepływowego i charakteru prowadzonej reakcji można połączyć ze sobą kilka reaktorów. Trzeci rodzaj reaktora ma najczęściej szklaną obudowę i zgodnie z wcześniej przedstawioną klasyfikacją aparatury przepływowej należy do IV typu, który umożliwia ponowne użycie zastosowanego katalizatora.¹²⁹

Regulator ciśnienia służy do kontrolowania zadanego ciśnienia, co umożliwia prowadzenie reakcji w temperaturach powyżej temperatury wrzenia zastosowanego w reakcji rozpuszczalnika. Dodatkowo regulator ciśnienia zapewnia ciągły przepływ reagentów niwelując w aparaturze tworzenie się pęcherzyków gazu.

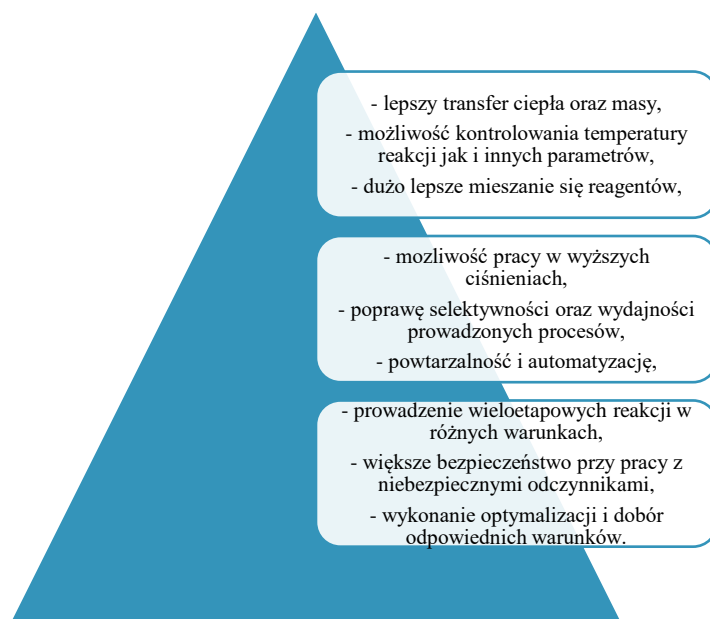
Proces chemiczny realizowany przy wykorzystaniu systemu przepływowego FLOW polega na początkowym pompowaniu przez pompy odpowiednich substratów do elementu mieszającego. Następnie reagenty przechodzą do reaktora z kontrolowaną temperaturą, w którym zachodzi właściwa transformacja chemiczna (Schemat 2).¹²⁸



Schemat 2: Sposób prowadzenia reakcji przy udziale aparatury FLOW.¹³⁰

Technologia FLOW umożliwia przeprowadzenie wielu reakcji. Systemy przepływowe obecnie są powszechnie stosowane w produkcji artemizyniny (lek przeciwko malarii) oraz tamoksifenu (preparat ten wykorzystywany jest w terapii raka piersi). Chemie przepływową wykorzystano także w procesie wytworzenia Lombustyny ((1-(2-chloroetylo)-3-cykloheksylo-1-nitrozo-mocznik)), stosowanej w leczeniu chłoniaka Hodgkina i guzów mózgu. Ponadto układy te znalazły zastosowanie w syntezie polimerów, nanomateriałów, związków nieorganicznych oraz metaloorganicznych.^{128,131}

Z przeprowadzonych badań wynika, że aparatura ciągłego przepływu zapewnia:



Rysunek 9: Zalety wynikające z prowadzeniem reakcji chemicznych przy zastosowaniu technologii przepływowej.^{129, 131}

Niestety pomimo wielu zalet i możliwości wszechstronnego zastosowania, systemy FLOW wykazują również pewne ograniczenia. Związane są one głównie z blokowaniem reaktorów w wyniku krystalizacji półproduktu lub też produktu głównego reakcji. Stosując technologie przepływową należy wybierać rozpuszczalniki, które dobrze rozpuszczą niezbędne do przeprowadzenia danej reakcji substraty. Oczywiście możliwa jest praca na zawiesinach ale nie eliminuje to ryzyka blokowania się kanałków reaktora lub okolic regulatora ciśnienia wstecznego. Niektóre też reakcje pomimo wysokich temperatur wymagają dużo czasu aby uzyskać dobrą konwersję substratu w produkt. Jeśli czas rezystancji (T_{res}) w reaktorach przepływowych jest dłuższy niż 1h, wówczas technologia FLOW nie jest odpowiednia do przeprowadzenia takiego procesu. Jest to niestety jedno z kluczowych utrudnień w wykorzystaniu chemii przepływowej w reakcjach chemicznych.^{129,130}

3. Badania własne

Wstęp

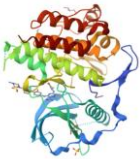




Opracowanie nowych substancji chemicznych o potencjalnych właściwościach terapeutycznych jest długotrwałym, pracochłonnym oraz kosztownym procesem. W rozwoju potencjalnych substancji leczniczych kluczową rolę odgrywają parametry fizykochemiczne oraz ich metabolizm bowiem decydują one o dalszych losach badanej substancji chemicznej. Rozwój związków o niskiej biodostępności, słabej rozpuszczalności czy wysokim klirensie często kończy się niepowodzeniem na kolejnych etapach. Ponadto cząsteczki o słabych parametrach fizykochemicznych często są nieskuteczne w kolejnej fazie badań. Dlatego tak ważne jest aby opracowane związki wykazywały korzystny profil farmakokinetyczny. Zadanie to jednak nie jest proste do zrealizowania. Pomimo opracowania już i dostępności kilku inhibitorów FLT3 nadal występuje ogromne zapotrzebowanie na inhibitory nowej generacji, które będą wykazywać wysoką skuteczność działania, korzystny profil farmakokinetyczny ale przede wszystkim będą bezpieczne w terapiach leczenia ostrej białaczki szpikowej. Dostępne inhibitory często wykazują ograniczoną skuteczność terapeutyczną a nawet toksyczność. Nie zapewniają też osobom chorym długoterminowej remisji choroby. W związku z tym podjęłam próby związane z opracowaniem innowacyjnego małowcząsteczkowego inhibitora kinazy FLT3 o wysokiej aktywności i możliwości wykorzystania go w przyszłości w terapii leczenia AML.

132,133

Jak wiadomo substancje lecznicze to nic innego jak ligandy, które wiązać się mogą z: receptorem, białkiem lub też enzymem. Określane są one jako cele biologiczne. Leki mogą być agonistami lub antagonistami. Agonista łączy się z celem biologicznym wywołując reakcję w komórce natomiast antagoniści (inhibitory) łączą się z receptorem hamując jego aktywność. Struktura ligandu musi być komplementarna do miejsca aktywnego celu biologicznego. Ligand w wyniku interakcji z łańcuchami bocznymi aminokwasów w miejscu aktywnym receptora wiąże się z nim. Ligand łączy się z receptorem za pomocą wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych czy siły van der Waalsa.⁽¹³⁴⁾ W projektowaniu i poszukiwaniu nowej cząsteczki aktywnej pierwszym etapem jest modelowanie komputerowe. Pozwala ono na wyselekcjonowanie potencjalnych kandydatów do dalszych badań w celu określenia ich aktywności oraz parametrów fizykochemicznych. Proces modelowania przedstawiany jest najczęściej w postaci lejka filtracyjnego. W związku z powyższym przed przystąpieniem do właściwej syntezy chemicznej wykorzystałam metody bioinformatyczne *in silico*, głównie program KNIME, dzięki któremu stworzyłam wirtualną bibliotekę związków zawierającą około 700 struktur. Z kolei sprawdzenie bazy PDB (ang. Protein Data Bank) pozwoliło mi na

pozyskanie wiedzy o opracowanych 5-ciu strukturach krystalograficznych receptora FLT3 z inhibitorami typu 1 i 1.5 oraz kowalencyjnym inhibitorem.

Tabela 3: Struktury krystalograficzne kinazy FLT3.¹³⁵⁻¹³⁹

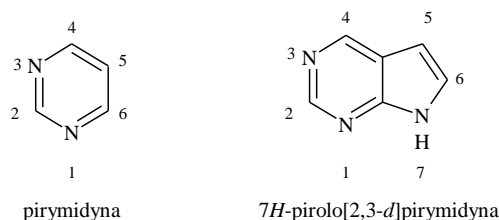
Struktury krystalograficzne				
6JQR	4XUF	5XO2	6IL3	4RT7
				

Powyższe dane pozwoliły z kolei na wykonanie dokowania molekularnego. Jest to metoda określająca sposób dopasowania się ligandu do receptora. Poprzez zastosowanie odpowiednich funkcji oceniających jak również filtrów strukturalnych np. log P, log D, wybrani zostali kandydaci do dalszych badań. Funkcje oceniające pozwalają ocenić powinowactwo ligandu do receptora. W celu dokładniejszego określenia struktury związków skorzystałam także z analizy zależności struktura-aktywność (SAR, ang. Structure-Activity Relationship). Jak wiadomo technika ta pozwala na identyfikację grupy funkcyjnej, która biologicznie oddziałuje z organizmem. Wiedza ta z kolei pomaga w wyborze szeregu modyfikacji związku biologicznie aktywnego poprzez wprowadzenie nowych grup chemicznych, których celem jest poprawa właściwości wybranych cząsteczek w tym jak największe powinowactwo do miejsca aktywnego receptora bądź białka oraz aktywność biologiczna na poziomie submikromolarnej lub subnanomolowej. Wyróżnia się także ilościowe korelacje między strukturą a aktywnością związku, określane jako tzw. analizy (QSAR, ang. Quantitative Structure-Activity Relationship). Metoda ta z kolei pomaga w wyznaczeniu parametrów fizykochemicznych cząsteczki.^{133,140}

3.1. Wybór kandydatów do dalszych badań

Po przestudiowaniu uzyskanych wyników z dokowania oraz wizualnej analizie kieszeni wiążącej do syntezy oraz dalszej optymalizacji wybrane zostały związki o wartości docking-score - 4 i podobnym sposobie oddziaływania do wybranych związków referencyjnych. Optymalizacja ma na celu poprawę właściwości fizyko- jak i farmakokinetycznych cząsteczek, które to jak wspomniałam wcześniej decydują o dalszych losach potencjalnych leków.

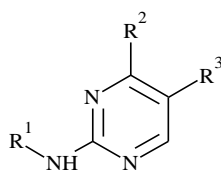
Synteżowane przede wszystkim cząsteczki to przede wszystkim pirymidynowe jak i pirolopirymidynowe pochodne ponieważ jak wynika z informacji dostępnych w literaturze, pirymidyna jest jednym z ważniejszych elementów strukturalnych wielu leków (Rysunek 10).¹²²



Rysunek 10: Struktura pirymidyny oraz pirolopirymidyny.

Wszelkie wprowadzone modyfikacje dotyczyły grup funkcyjnych, które wpływają na rozpuszczalność związku oraz jego wiązanie z białkiem.

Nowe pochodne pirymidyny powstały w wyniku wprowadzenia nowych grup funkcyjnych przy 2, 4 oraz 5 atomie węgla zgodnie z przedstawionym poniżej wzorem ogólnym:

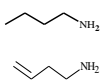
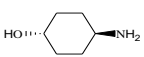
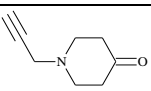

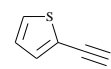
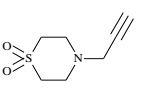
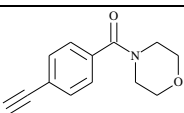
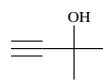
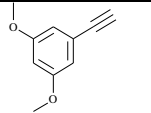
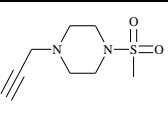
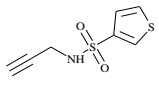
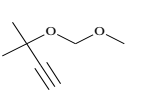
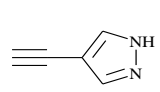
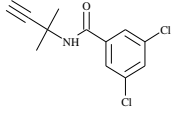
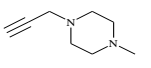
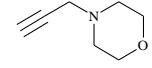
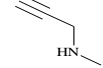
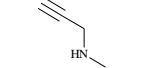
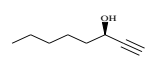
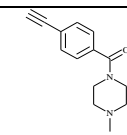
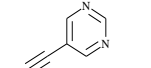
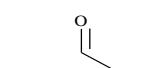
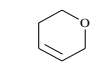
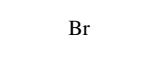
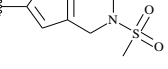


Rysunek 11: Wzór ogólny (I) nowo opracowanych pochodnych pirymidyny z modyfikacjami R¹, R² i R³.

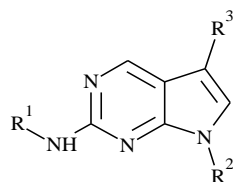
W powyższym wzorze:

- podstawnik R¹ oznacza układ C₁-C₄ alkiłowy lub alkenowy;
- podstawnik R² to cykloalkil podstawiony pojedynczą grupą hydroksylową (-OH);
- R³ to halogenek, alkił lub sześcioczłonowy, niearomatyczny układ z pięcioma atomami węgla i jednym atomem tlenu (dihdropiran), tiofen połączony z 1-metanosulfonylopiperydyną:

Tabela 4: Podstawniki występujące w strukturze pochodnych pirymidynowych

Podstawniki				
R ¹	R ²	R ³		
				
				
				
				
				
				
				
				

Pochodne pirolpirymidyny także powstały w wyniku modyfikacji przy 2, 4 oraz 5 atomie zgodnie z poniższym wzorem ogólnym:



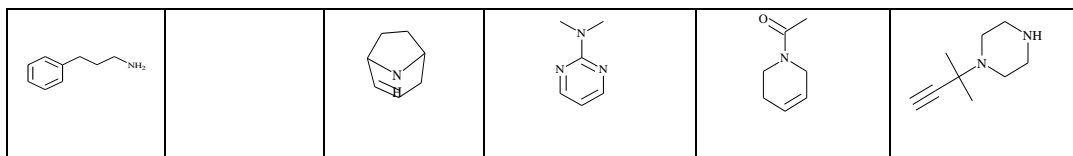
Rysunek 12: Wzór ogólny (II) nowo opracowanych pochodnych pirolpirymidynowych z modyfikacjami R¹, R² i R³.

Gdzie:

- R¹ oznacza łańcuch alkilowy, alkenylowy oraz alkinylowy, cykloalkil lub halogenek głównie -Cl;
- R² to cykloalkil podstawiony pojedynczą grupą hydroksylową (-OH) lub (CH₃)₃-Si(CH₃)₂-;
- R³ to alkinył, halogenek, tiofen połączony z 1-metanosulfonylopiperydyną, benzen oraz heteroaromatyczne układy połączone z sześć lub siedmioczłonowymi układami heterocyklicznymi, dibenzofuran:

Tabela 5: Podstawniki występujące w strukturze pochodnych pirolipirymidynowych

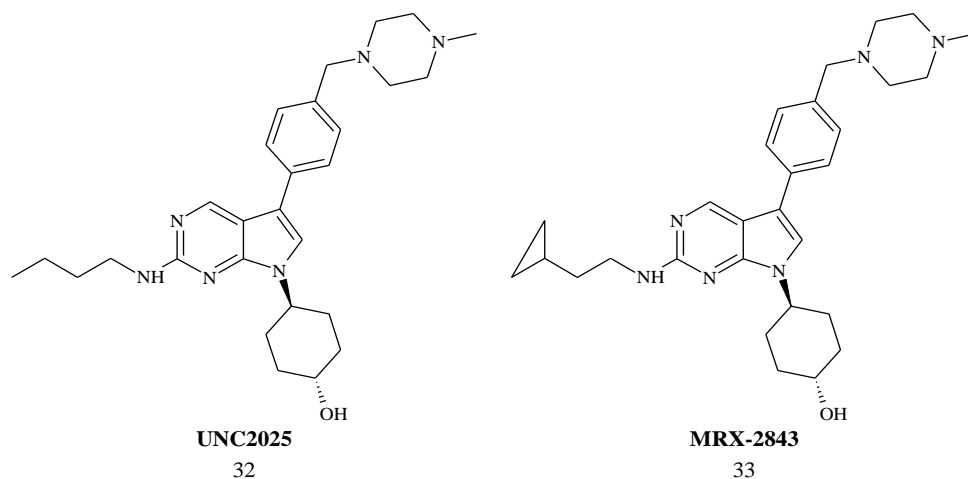
Podstawniki					
R ¹	R ²	R ³			
		Br			
Cl					



Wprowadzenie modyfikacji pozwoliło mi na syntezę biblioteki związków składającej się ze 110 struktur. Wszystkie molekuly z biblioteki podobnie jak opracowane dotychczas leki przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML) należą do rodziny związków heterocyklicznych zawierających w strukturze komponent strukturalny zbliżony do pierścienia purynowego.⁴⁶ Natomiast cząsteczki zawierające nienasycone wiązania oraz sześciocłonowe układy aromatyczne lub heterocykliczne zakwalifikować można do grupy nieklasycznych układów strukturalnych.

3.2. Aktywność biologiczna nowo opracowanych cząsteczek, ich właściwości fizykochemiczne oraz analiza ADMET

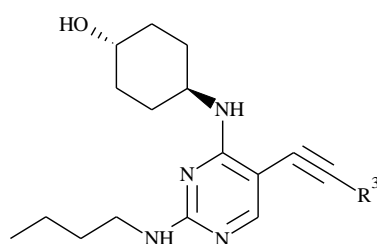
Dla nowo otrzymanych związków dzięki współpracy z Działem Biologii firmy CelonPharma S.A. została określona efektywność (aktywność) ich działania z wykorzystaniem testu ADPG10 względem kinazy FLT3 oraz związków referencyjnych, którymi był: UNC2025 i MRX-2843 (Rysunek 13).



Rysunek 13: Struktura chemiczna związków: UNC2025 i MRX-2843.

Wykonane testy biochemiczne oraz komórkowe *in vitro* pozwoliły na wyznaczenie dla każdej opracowanej struktury parametru IC_{50} , który to dostarcza informacji na temat aktywności i selektywności badanego związku. Wyznaczona została również stabilność chemiczna oraz stabilność na mikrosomach mysich oraz ludzkich. Określone zostały także parametry fizykochemiczne, które to jak wiadomo są jednym z kluczowych czynników decydujących o możliwości wykorzystania nowo opracowanej cząsteczki do dalszych badań. Do elementów farmakokinetycznych należy między innymi: współczynnik podziału ($\log P$) oraz rozpuszczalność ($\log D$). Wartość współczynnika podziału zależy przede wszystkim od wielkości cząsteczki jak również jej budowy ponieważ wartość ($\log P$) zależy od ilości i rodzaju grup funkcyjnych, fragmentów alkilowych czy wiązań nienasyconych. Zbadana została także rozpuszczalność związków w roztworach o pH 4.5 i 7.4 [μM]. Przeprowadzone były również analizy pozwalające na określenie przepuszczalności nowych cząsteczek przez błony biologiczne. Przepuszczalność to jeden z kluczowych parametrów, który definiuje biodostępność badanego związku. Pochodne o jak najlepszej selektywności wobec kinazy FLT3 były następnie testowane na modelach komórkowych takich jak: KASUMI-1, NOMO-1 oraz MOLM-13. Są to ludzkie linie komórkowe ostrej białaczki szpikowej. Badania *in vivo* dostarczyły informacji nt. dostępności (AUC), maksymalnego stężenia (C_{max}) oraz czasu po którym stężenie substancji w osoczu jest najwyższe (t_{max}).

Wartości parametru IC_{50} dla poszczególnych pochodnych przedstawiają poniższe tabele.



Rysunek 14: Nowe pochodne pirymidyny o wzorze ogólnym (III), podstawionej C1-C4 alkilem w miejscu R^1 i różnymi acetylenami jako podstawniki R^3 .

Tabela 6: Zestawienie wyników aktywności dla pochodnych pirymidynowych z podstawnikami acetylenowymi w miejscu R³

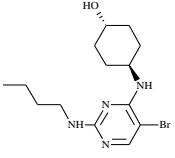
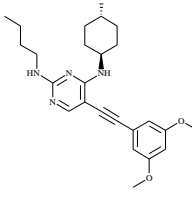
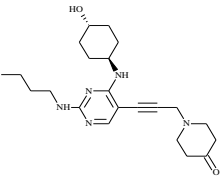
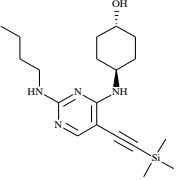
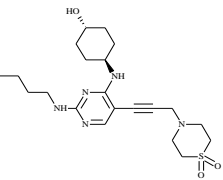
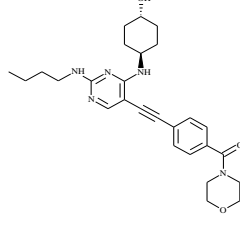
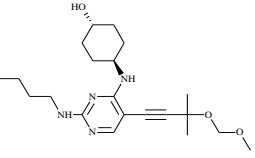
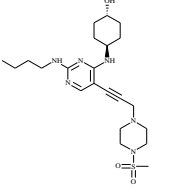
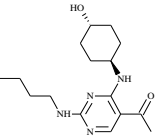
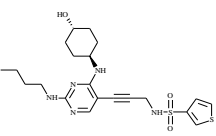
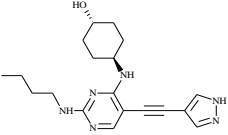
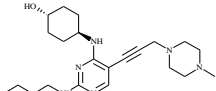
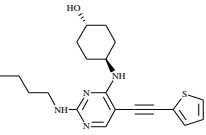
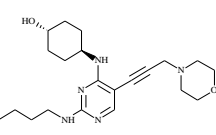
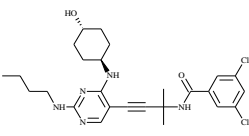
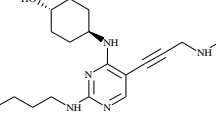
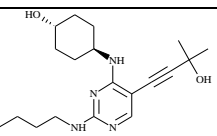
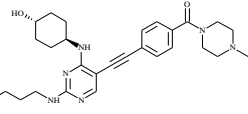
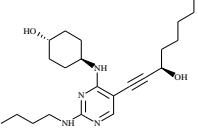
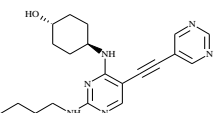
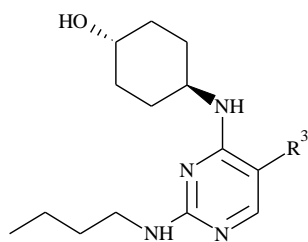
Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
 <p>40</p>	343.27	20.67	3.31	 <p>44</p>	424.54	22.62	3.96
 <p>41</p>	399.54	19.19	2.5	 <p>45</p>	360.57	78.38	3.77
 <p>42</p>	435.8	18.7	2.65	 <p>46</p>	477.61	2.634	3.36
 <p>43</p>	390.53	17.96	3.3	 <p>47</p>	464.62	15.72	0.99

Tabela 7: Zestawienie wyników aktywności dla pochodnych pirydynowych z podstawnikami acetylenowymi w miejscu R³

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
 48	306.40	19.38	2.21	 54	463.61	256.2	2.81
 49	354.46	7.554	2.67	 55	400.56	17.68	2.27
 50	370.51	24.18	4.04	 56	387.53	21.26	2.82
 51	51.47	411.5	5.8	 57	331.45	74.24	2.04
 52	346.46	19.25	2.41	 58	490.64	6.326	3.27
 53	388.54	40.76	3.98	 59	366.46	22.84	2.2

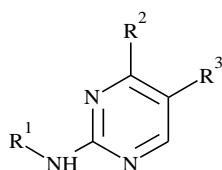


Rysunek 15: Nowe pochodne pirydyny o wzorze ogólnym (IV) podstawionej C1-C4 alkilem w miejscu R¹ oraz różnymi estrami lub kwasami boronowymi jako podstawniki R³.

Tabela 8: Otrzymane wyniki dla pochodnych pirymidynowych

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
<p>60</p>	479.66	9.341	2.27	<p>61</p>	346.46	398.1	2.32

Wykonane były także analizy dla pochodnych pirymidynowych zawierających w swojej strukturze wiązanie nienasycone w miejscu R¹.



Rysunek 16: Pochodne pirydynowe o wzorze ogólnym (I) z nienasyconym wiązaniem w miejscu R¹.

Tabela 9: Wyniki dla pochodnych z podstawnikiem alkenowym w miejscu R¹

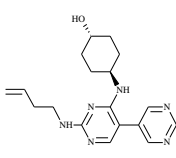
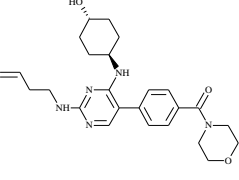
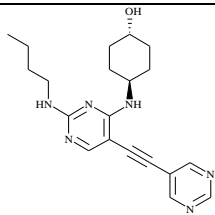
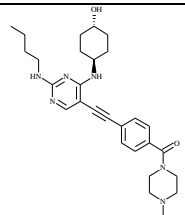
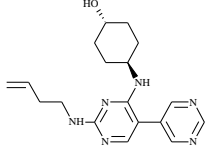
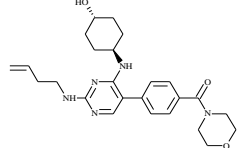
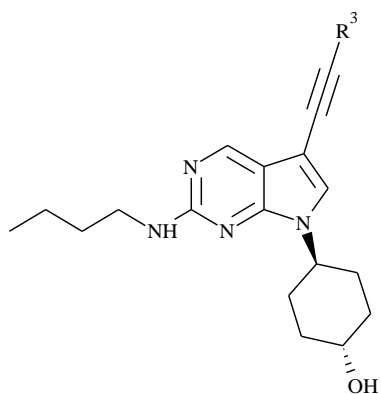
Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
 <p>62</p>	340.43	864.6	1.424	 <p>63</p>	451.57	119.5	2.423

Tabela 10: Zestawione dla porównania wyniki aktywności dla pochodnych z nasyconym oraz nienasyconym układem w miejscu R¹

Struktura związku	IC ₅₀ Flt3 [nM]	Struktura związku	IC ₅₀ Flt3 [nM]
 <p>59</p>	22.84	 <p>58</p>	2.634
 <p>62</p>	864.6	 <p>63</p>	119.5



Rysunek 17: Nowe pochodne piropirymidyny o wzorze ogólnym (V) z wiązaniem alkilowym w miejscu R¹ oraz różnymi podstawnikami acetylenowymi w R³.

Tabela 11: Wyniki aktywności dla pochodnych piropirymidynowych z podstawnikami acetylenowymi w miejscu R³

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
<p>64</p>	495.66	39.37	4.49	<p>65</p>	413.52	19.96	4.6
<p>66</p>	341.45	31.73	2.23	<p>67</p>	352.47	33.91	3.88

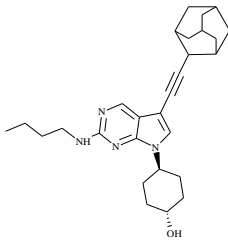
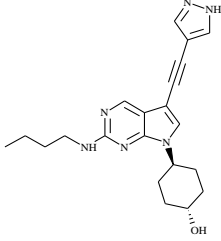
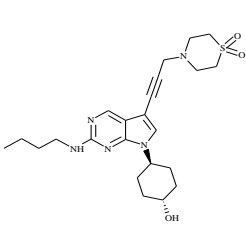
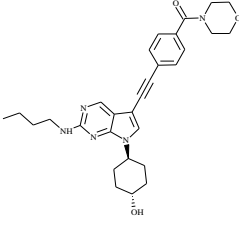
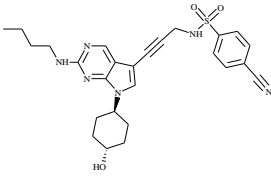
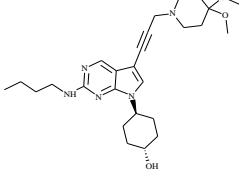
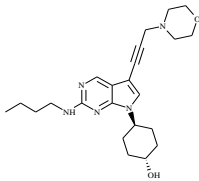
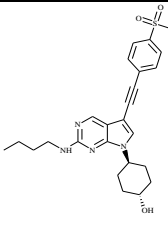
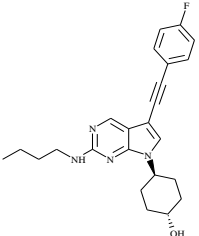
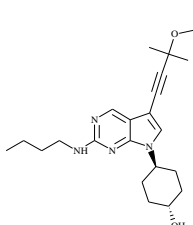
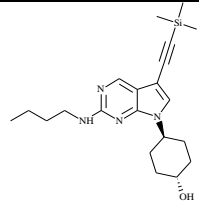
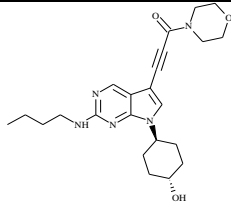
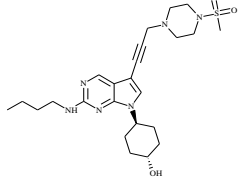
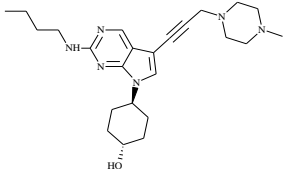
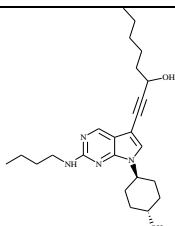
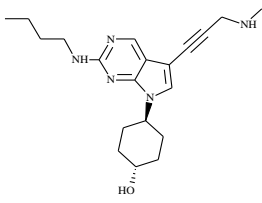
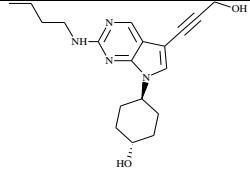
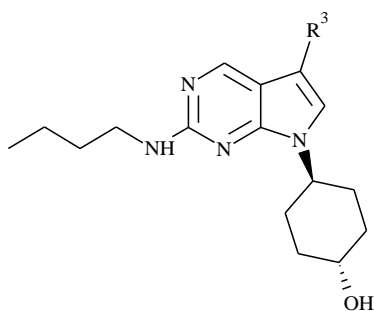
 <p style="text-align: center;">68</p>	446.63	286.5	5.44	 <p style="text-align: center;">69</p>	378.48	2.324	3.05
 <p style="text-align: center;">70</p>	459.6	2.74	3.29	 <p style="text-align: center;">71</p>	501.63	3.09	3.83
 <p style="text-align: center;">72</p>	506.62	38.65	4.86	 <p style="text-align: center;">73</p>	469.62	4.513	3.14

Tabela 12: Wyniki aktywności dla pochodnych pirolopirymidynowych z podstawnikami acetylenowymi w miejscu R³

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
 74	411.54	5.977	2.81	 75	466.59	9.05	3.59
 76	406.5	202.3	4.73	 77	414.55	28.32	3.94
 78	384.6	132.5	4.38	 79	425.52	16.45	2.35
 80	488.64	3.58	3.08	 81	424.58	6.227	2.89
 82	412.56	75.86	4.6	 83	355.47	3.214	2.66

	390.48	15.74	2.83		455.59	21.02	4.14
	355.47	5.662	2.64		438.61	2.104	3.2
	312.4	50.34	2.78		437.54	8.182	2.96
	448.56	465.5	4.43		388.51	125.6	4.75
	454.61	1.828	2.94		378.47	98.59	3.81
	554.73	32.49	4.44		416.56	851.4	5.64

	342.44	12.51	2.33				
---	--------	-------	------	--	--	--	--



Rysunek 18: Nowe pochodne piropirymidyny o wzorze ogólnym (VI) otrzymane na drodze reakcji Suzuki w miejscu R^3 .

Tabela 13: Wyniki aktywności dla pochodnych piropirymidynowych z odpowiednimi podstawnikami w miejscu R^3 , otrzymane w reakcji Suzuki

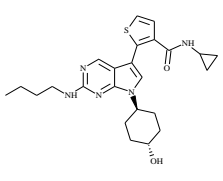
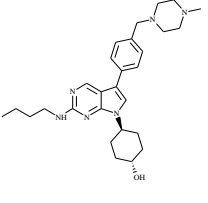
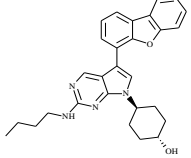
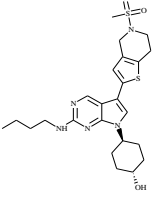
Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
 97	453.6	4.347	3.59	 32	476.66	0.26	4.48
 98	454.56	238.9	6.75	 99	503.68	1.606	2.89

Tabela 14: Wyniki aktywności dla pochodnych pirolipiryimidynowych z odpowiednimi podstawnikami w miejscu R³, otrzymane w reakcji Suzuki

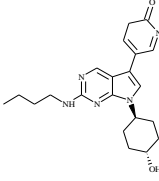
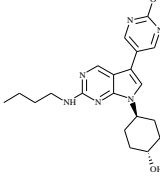
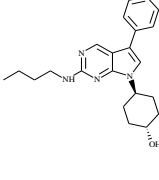
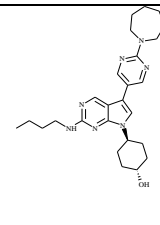
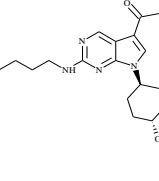
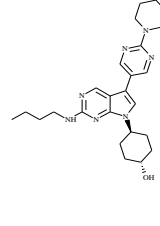
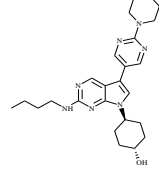
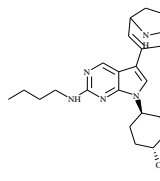
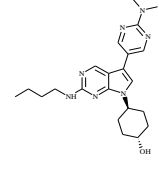
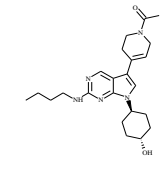
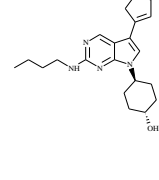
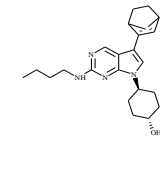
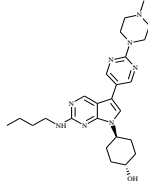
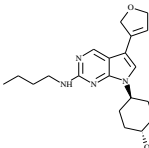
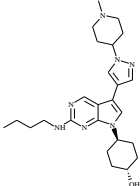
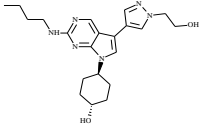
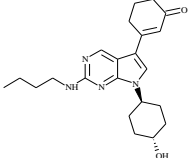
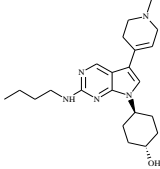
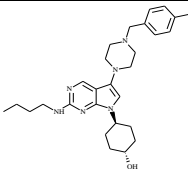
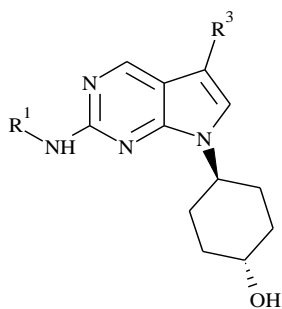
Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
	381.47	986.2	1.98		396.48	16.77	2.87
	364.49	15.25	4.27		463.61	31.82	4.43
	330.42	45.87	2.19		449.59	15.81	3.99
	451.56	6.658	2.92		395.54	2.442	3.15
	409.52	17.22	3.14		411.54	0.65	2.23
	355.48	2.906	2.33		380.53	64.48	4.14

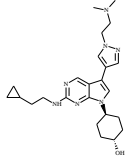
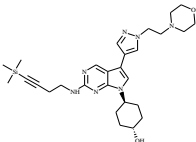
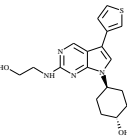
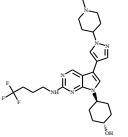
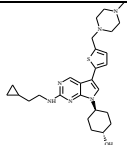
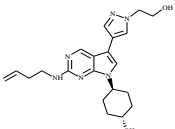
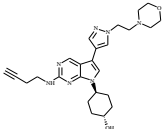
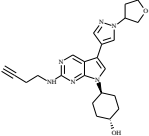
Tabela 15: Wyniki aktywności dla pochodnych pirolopirymidynowych z wiązaniem C1-C4 alkilowym w miejscu R¹ i odpowiednimi podstawnikami estrów lub kwasów boronowych w miejscu R³

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
	464.61	3.223	2.99		356.46	1.408	2.65
112				113			
	451.62	0.29	84.03		398.51	1.22	2.01
114				115			
	382.51	7.20	3.66		383.54	0.46	3.01
116				117			
	476.66	111.8	4.82				
118							



Rysunek 19: Nowe pochodne pirolopirymidynowe o wzorze ogólnym (VII) z różnymi podstawnikami w miejscu R¹ i R³.

Tabela 16: Wyniki aktywności dla pochodnych pirolopirymidynowych z różnymi podstawnikami w miejscu R¹ i R³

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
 119	437.59	0.52	2.46	 120	535.77	81.3	3.11
 121	358.46	31.73	2.04	 122	505.57	0.925	4.14
 123	494.7	0.56	3.69	 124	396.49	1.55	1.71
 125	463.59	4.05	1.69	 126	420.52	1.67	1.79

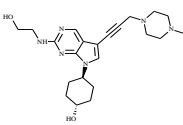
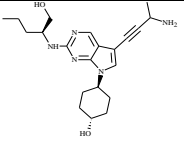
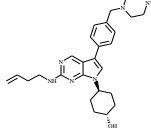
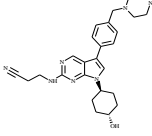
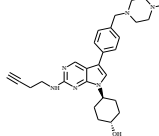
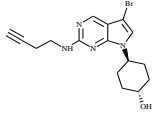
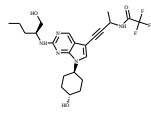
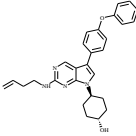
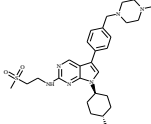
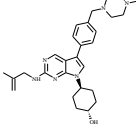
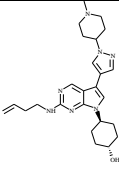
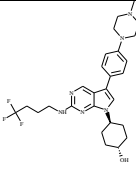
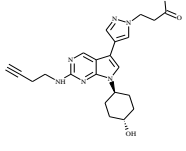
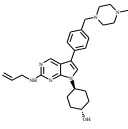
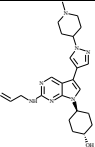
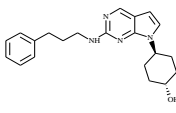
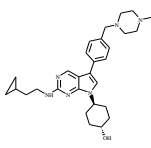
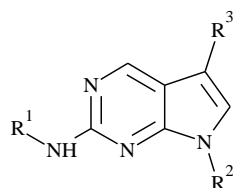
	412.53	363.2	0.88		385.5	3989	2.01
127				128			
	474.64	0.943	3.76		473.61	3.177	3.98
129				130			

Tabela 17: Wyniki aktywności dla pochodnych piropirymidynowych z różnymi podstawnikami w miejscu R¹ i R³

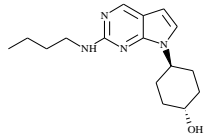
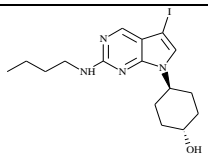
Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
	472.63	6.369	3.84		363.25	106.3	2.59
131				132			
	481.51	206.1	2.96		454.56	80.6	5.47
133				134			
	526.7	1.91	1.42		474.64	7.32	3.71
135				136			
	449.59	0.396	84.03		514.63	0.5402	69.45
137				138			

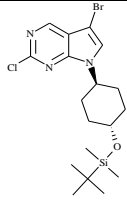
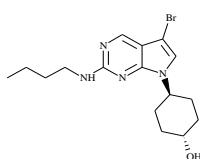
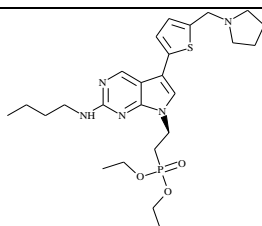
	422.49	5.63	118.09		460.62	1.703	69.45
	435.57	2.195	84.03		350.46	205	3.76
	488.68	0.442	3.886				



Rysunek 20: Nowe pochodne pirolopirymidynowe o wzorze ogólnym (VIII) z różnymi podstawnikami w miejscu R¹, R² i R³.

Tabela 18: Wyniki aktywności dla pochodnych pirolopirymidynowych z różnymi podstawnikami w miejscu R¹, R² i R³

Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Struktura związku	M [g/mol]	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P
	288.39	111.1	3.19		288.39	111.1	3.19

 <p>38</p>	444.87	60 000	5.44	 <p>145</p>	367.29	40.7	3.4
 <p>146</p>	519.64	2.85	4.295				

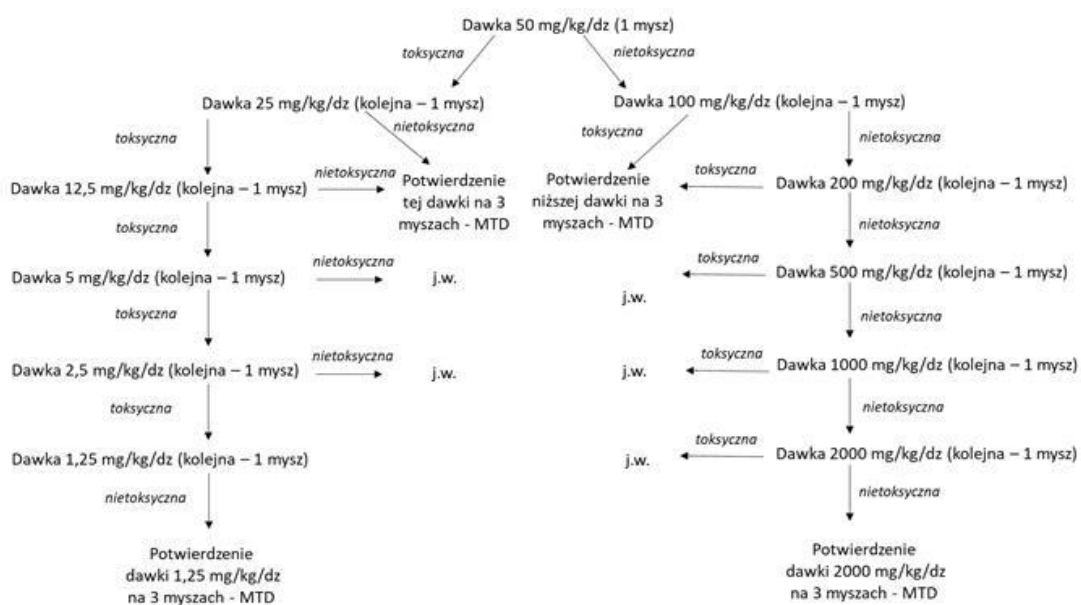
Wnioski:

Wartości IC_{50} dla wszystkich syntezowanych przeze mnie cząsteczek są na poziomie nanomoli [nM]. Poziom ten świadczy o bardzo dobrej aktywności i selektywności badanych cząsteczek oraz ich potencjale jako kandydatów na „nowe” leki. Analiza otrzymanych danych z powyższych badań pozwoliła mi na wybór związków wiodących. Wybrałam cząsteczki o numerach **69** i **129**. Obecnie znajdują się one w zaawansowanej fazie badań przedklinicznych.

3.3. Związki wiodące

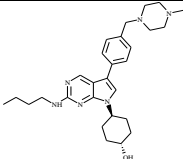
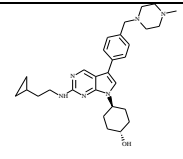
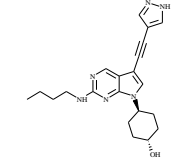
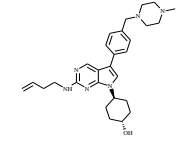
Przy wyborze związków wiodących z biblioteki zawierającej 110 struktur pomocna była ponowna wizualna analiza kieszeni wiążącej kinazy FLT3 dzięki której szukałam związków o dużym podobieństwie strukturalnym do związków referencyjnych. Podobieństwo strukturalne wiąże się także z podobnym sposobem oddziaływania. Struktura związku o numerze **129** jest wręcz identyczna do struktury związku referencyjnego UNC2025. Jediną różnicą między ich strukturami jest wiązanie nienasycone w miejscu R^1 dla wybranego związku wiodącego. Parametr IC_{50} dla wybranych związków jest zbliżony do wartości IC_{50} związków referencyjnych. Ponadto wybór był także podyktowany badaniem *in vitro*, które wykazało dużo lepszą efektywność działania dla związków, które posiadają w swej strukturze układ C1-C4 z jednym wiązaniem nienasyconym. Molekuły te wykazują również dużo lepszą rozpuszczalność oraz biodostępność co pokazały badania farmakokinetyczne wykonane na

dwóch nośnikach: buforu octanowego i Solutolu. Bufory te reprezentują roztwory o pH 4.5 i 7.4 [uM]. Dodatkowo związki te trafiły na badania toksykologiczne na zwierzętach głównie (MTD – maksymalna tolerowalna dawka) pozwalające na wyznaczenie dla nich maksymalnej tolerowalnej dawki po podaniu *per os* - czyli z pokarmem i *iv* - czyli dożylnie (Schemat 3). Przeprowadzone zostały także testy oceniające stabilność wybranych związków w oparciu o które związek **129** wykazuje lepszą stabilność w porównaniu ze związkiem **69**.



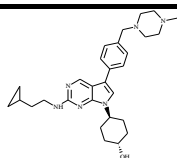
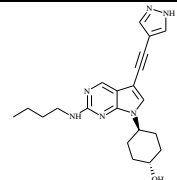
Schemat 3: Sposób wykonania badań MTD.

Tabela 19: Wyniki z badań aktywności, stabilności, rozpuszczalności oraz przepuszczalności przez błony dla związków referencyjnych oraz wiodących

	Struktura związku	IC ₅₀ Flt3 [nM]	log P	Rozp. w pH 4.5 [uM]	Rozp. w pH 7.4 [uM]	Stabilność chemiczna [% degradacja po 24h w pH 7.4]	Stabilność metaboliczna u ludzi	Stabilność metaboliczna u myszy	Przep. IAM
Związek referencyjny 32		0.259	4.48	500	439	0	17	45.6	
Związek referencyjny 33		0.442	4.48	500	256	0	11.3	43.5	
Związek wiodący 69		2.324	3.05	35.7	1	1.68	16,3	62.3	8.08
Związek wiodący 129		0.943	3.76	500	323.1	0	20.1	48.3	5.88

Z kolei poniższa tabela przedstawia wyniki testów dla jednego z wybranych związków wiodących oraz jednego referenta, przeprowadzonych na modelach komórkowych takich jak: KASUMI-1, NOMO-1 oraz MOLM-13.

Tabela 20: Wyniki badań na modelach komórkowych

		<i>KASUMI-1</i>	<i>NOMO-1</i>	<i>MOLM-13</i>
Związek referencyjny		0.107	9.061	0.0128
Związek wiodący		2.543	13.1	0.135

Analizując powyższe dane wyraźnie widać iż związek wiodący jest najbardziej aktywny wobec linii komórkowej MOLM-13 podczas gdy związek referencyjny wykazuje aktywność nie tylko wobec linii komórkowej MOLM-13 ale również względem linii KASUMI-1.

4. Część doświadczalna

4.1. Synteza nowo opracowanych cząsteczek

Związki syntezowałam z wykorzystaniem głównie metod klasycznych. W niektórych przypadkach w celu przyspieszenia prac syntetycznych korzystałam z technologii mikrofalowej. Do reakcji używałam substratów komercyjnie dostępnych. Reakcje, które wymagały bezwodnych warunków przeprowadzałam w atmosferze argonu. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu cienkowarstwowej chromatografii wykonywanej na płytkach pokrytych żel krzemionkowym (żel Kiesel F254) i wizualizowałam za pomocą lampy UV (lampa ultrafioletowa ($\lambda = 254 \text{ nm}$)). Do kontroli postępu reakcji stosowałam także spektrometry masowy (LC-MS) oraz UPLC. Widma masowe z elektrorozpyleniem (ES-MS) monitorowane były za pomocą kompaktowego spektrometru masowego (Advion) lub kwadrupolowego spektrometru masowego (LC-MS) 6130 Agilent w trybie ESI lub APCI. Dane widmowe rejestrowane były jako wartości m/z .

Produkty reakcji głównie oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem odpowiednio dobranego złoża. W tym celu korzystałam z żelu krzemionkowego firmy Merck 60 (230-400 mesh ASTM) jak również z systemu typu FLASH. Oprócz technik chromatograficznych korzystałam również z filtracji oraz krystalizacji.

Struktura oraz czystość związków potwierdzana była za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C NMR) oraz chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym (LC-MS). Wszystkie związki posiadają odpowiednią czystość HPLC powyżej 95%. Widma protonowe ^1H NMR wykonywane były na spektrometrze Varian Inova 300 NMR lub spektrometrze Bruker DRX 500 NMR z ^1H obserwowanym, odpowiednio, przy 300 MHz, 500 MHz lub 600 MHz. Widma ^{13}C NMR wykonywano na spektrometrze Varian Inova 300 NMR lub 500 NMR z ^{13}C obserwowanym przy odpowiednio 75 MHz lub 125 MHz. Przesunięcia chemiczne (δ) dla widm ^1H i ^{13}C NMR wyrażone zostały w (ppm). W analizach wzorcem wewnętrznym był tetrametylosilan TMS (δ 0,00 ppm).

Skróty obecne na widmach NMR-owych opisują multipletowość sygnałów:

s (singlet),

d (doublet),

t (triplet),

m (multiplet),

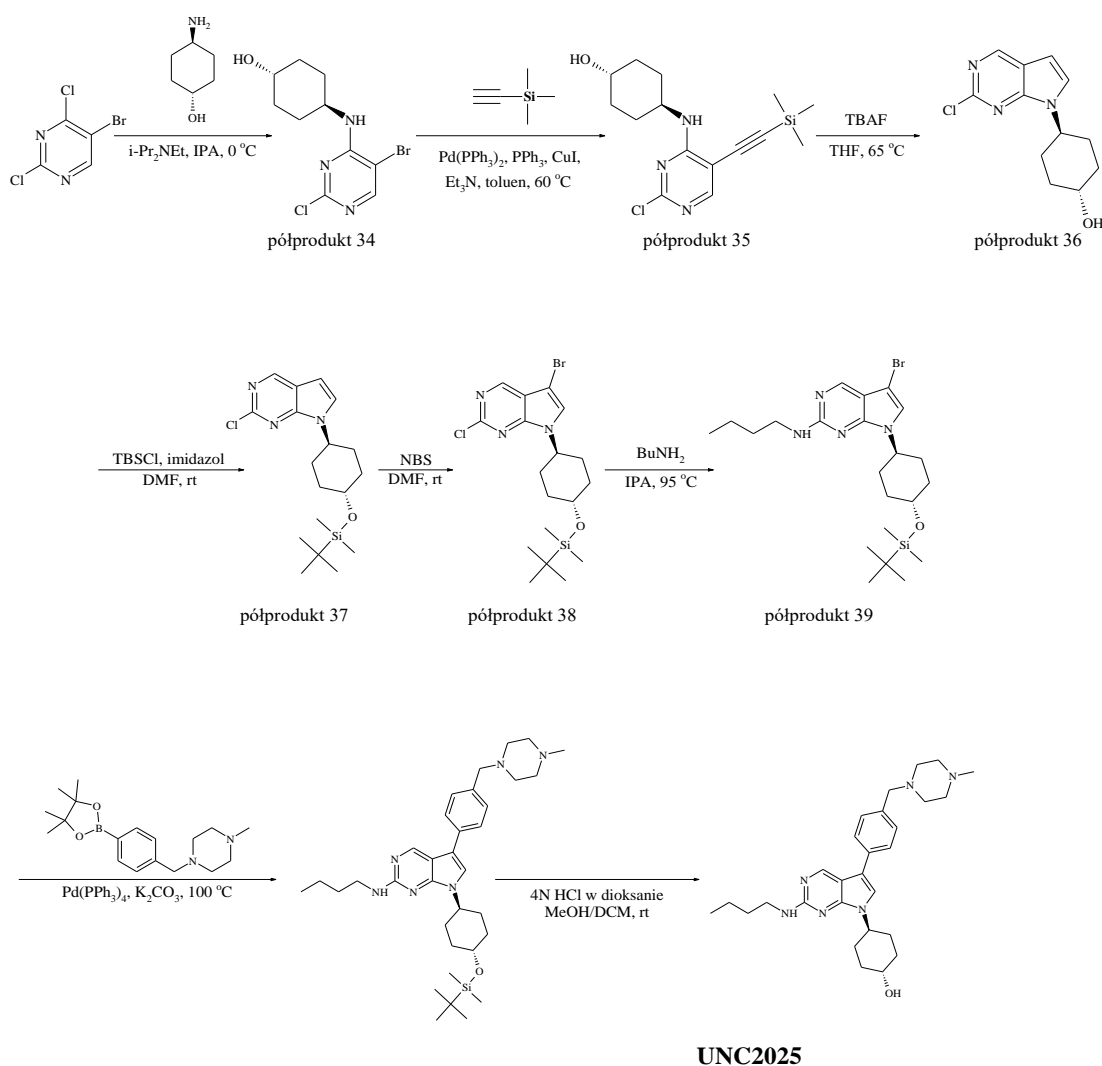
dd (dublet dubletów),

dt (dublet tripletu),

q (kwartet)

Jednostką stałej sprzężenia (J) były herce [Hz]. Jako rozpuszczalnik stosowany był: chloroform-d lub dimetylosulfotlenek-d₆.

Syntezę nowych pochodnych realizowałam w oparciu o opracowaną przez Uniwersytet Północnej Karoliny ośmio-etapową ścieżkę syntezy dla związku UNC2025 (Schemat 4).



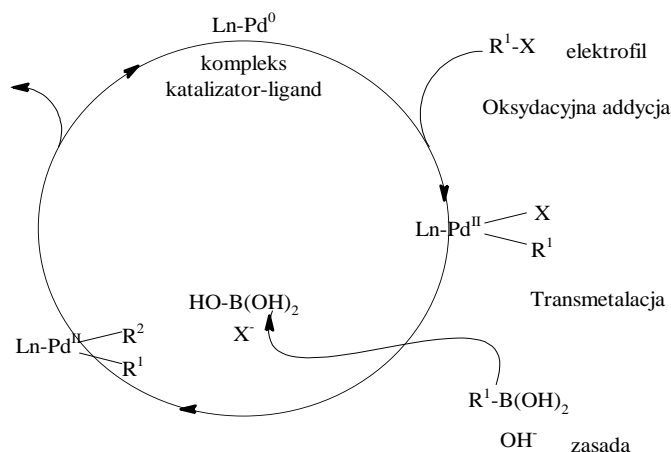
Schemat 4: Ścieżka syntezy inhibitora UNC2025.

Zgodnie z Schematem 4, pochodne pirymidyny otrzymywałam na drodze aromatycznego podstawienia nukleofilowego w pozycji 4 związku 5-bromo-2,4-

dichloropirymidyny natomiast dalsza reakcja sprzęgania Suzuka lub Sonogashiry w pozycji 5 oraz aromatyczne podstawienie nukleofilowe w pozycji 2 pozwoliła mi na otrzymanie nowych związków. Z kolei pochodne pirolopirymidyny uzyskiwałam na drodze 5 etapowej syntezy tj. aromatycznego aminowania, krzyżowego sprzęgania Sonogashiry, cyklizacji, wprowadzenia grupy zabezpieczającej oraz bromowania. Kolejne aminowanie, reakcje krzyżowego sprzęgania Suzuka lub Sonogashiry oraz odbezpieczenie grup zabezpieczających umożliwiły mi uzyskanie szeregu strukturalnych modyfikacji. W trakcie prowadzenia prac syntetycznych sprzęganie Suzuki oraz Sonogashira należały do najważniejszych reakcji, ponieważ dzięki nim uzyskałam nowe struktury potencjalnych inhibitorów FLT3.

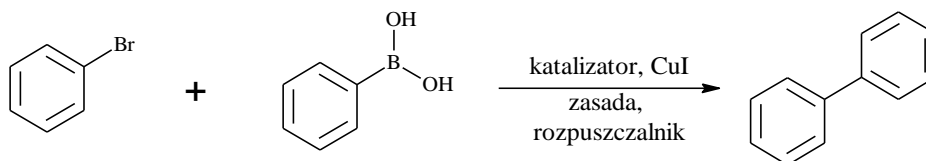
Krzyżowe sprzęganie Suzuka

Znana jest także jako reakcja krzyżowego sprzęgania Suzuki-Miyaura, w wyniku którego tworzy się wiązanie węgiel-węgiel (C-C). Sprzęganie zachodzi pomiędzy halogenkiem arylowym (elektrofil) a organoboranami (nukleofil) w obecności katalizatora, ligandu oraz wodnej zasady. W reakcji tej można wykorzystać nie tylko pochodne aryłowe ale również: alkany, alkeny oraz alkiiny. Dodatkowo można zastosować nie tylko kwasy boroorganiczne ale również estry czy nawet trifluoroborany potasu. Reakcja Suzuki rozpoczyna się (Schemat 5) od utworzenia kompleksu katalizator-ligand do którego w wyniku addycji oksydacyjnej wprowadzany jest organiczny elektrofil. Następnie dochodzi do transmetalacji, podczas której do kompleksu wprowadzany zostaje organoborowy nukleofil. Z kolei w wyniku reduktywnej eliminacji produkt reakcji zostaje oddzielony od kompleksu katalizator-ligand. W trakcie tej reakcji katalizator zmienia swój stopień utlenienia po to aby przyłączyć elektrofil a następnie ulega redukcji. Do tego typu przemiany chemicznej wykorzystuje się najczęściej katalizator palladowy, który jest utleniany z Pd(0) do Pd(II) a później ulega redukcji i z powrotem wraca do Pd(0). Ponadto niezbędna jest obecność zasady aby przekształcić kwas boronowy w bardziej reaktywne organoborany, które z kolei ulegają sprzęganiu z elektrofilem. Pod względem mechanizmu, sprzęganie Suzuki, wykazuje duże podobieństwo do procesu Stille'a oraz sprzęgania Negishiego. W sprzęganiu Stille'a i Negishiego wykorzystuje się przede wszystkim cynoorganiczne reagenty. Procesy te różnią się od reakcji Suzuka brakiem konieczności aktywacji przez zasadę związku boroorganicznego.^{141,142}



gdzie: X - halogen

Schemat 5: Mechanizm reakcji Suzuka.¹⁴²



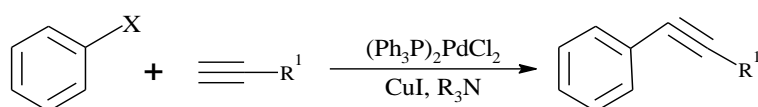
Schemat 6: Przykład krzyżowego sprzęgania Suzuki-Miyaura.⁽¹⁴²⁾

Sprzęganie Suzuki ma wiele zalet w porównaniu z innymi reakcjami sprzęgania bowiem wykorzystywane związki organoborane są mniej toksyczne i odporne na ciepło, tlen czy wodę. Z kolei tworzące się w trakcie reakcji produkty uboczne łatwo można oddzielić od oczekiwanego produktu na drodze ekstrakcji lub chromatografii. Dzięki tym właściwościom krzyżowe sprzęganie Suzuki ma szerokie zastosowanie nie tylko w procesach chemicznych ale również w przemyśle farmaceutycznym (Schemat 6).⁽¹⁴²⁾

Sprzęganie Sonogashiry

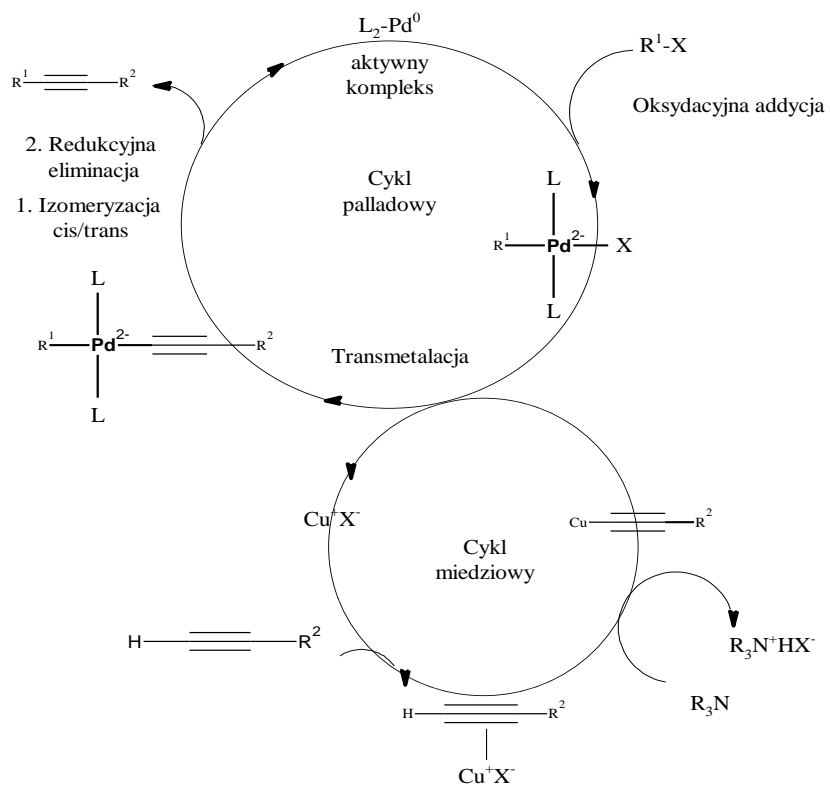
Reakcja Sonogashiry opracowana została w 1975 roku przez Sonogashirę i Hagihara. Stosowana była do produkcji leków, produktów naturalnych, w chemii polimerów oraz nanochemii. Podobnie jak reakcja Suzuki stosowana jest do tworzenia wiązania C-C pomiędzy aryłowymi lub winylowymi halogenami a terminalnymi alkinami w obecności katalizatora

palladowego, miedzi (I) jako tzw. ko-katalizatora oraz zasady aminowej. Sonogashira i Hagihara udowodnili iż zastosowanie jodku miedzi (I) w ilościach katalitycznych nie tylko przyspiesza reakcje ale dodatkowo umożliwia przeprowadzenie procesu alkinylowania już w temperaturze pokojowej.^(143,144) Z reguły sprzężenie Sonogashiry wymaga bezwodnych warunków. Jednak dotychczas opracowano wiele procedur, w których spełnienie powyższego wymogu nie jest konieczne. Przykładowa reakcja Sonogashiry została przedstawiona poniżej (Schemat 7).¹⁴⁵



Schemat 7: Przykład sprzężenia Sonogashiry.¹⁴⁵

Reakcja ta przebiega na drodze dwóch cykli katalitycznych: palladowego i miedziowego. W cyklu palladowym powstaje wiązanie węgiel-węgiel poprzez uformowanie w pierwszej kolejności aktywnej postaci kompleksu palladowego zapisywanego jako $(\text{Pd}(0)\text{L}_2)$. Kolejny etap to utleniająca addycja, która uważana jest za najważniejszą bowiem decyduje o szybkości przebiegu całego procesu Sonogashiry. Następnie dochodzi do transmetalacji, w wyniku której generowany jest produkt pośredni, który w dalszej kolejności ulega izomeryzacji cis/trans a finalnie redukcyjnej eliminacji, której następstwem jest finalny produkt. Z kolei cykl miedziowy zaangażowany jest w aktywację reagenta acetylenowego, który z kolei bierze udział w transmetalacji cyklu palladowego (Schemat 8).¹⁴⁶

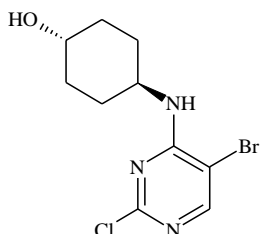


Schemat 8: Mechanizm reakcji Sonogashiry.¹⁴⁶

4.2. Opis syntezy pochodnych pirymidynowych oraz pirolopirymidynowych

4.2.1. Opis syntezy pochodnych pirymidynowych

Synteza półproduktu 34, 4-((5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino)cykloheksan-1-ol



Do roztworu 2,4-dichloro-5-bromopirymidyny (0.258 g, 1.11 mmol) i *N,N*-diizopropyletyloaminy (0.185 g, 1.43 mmol) w bezwodnym alkoholu izopropylowym (1 mL) powoli dodano w temperaturze 0 °C roztwór *trans*-4-aminocykloheksanol (0.140 g, 1.18 mmol) rozpuszczony w bezwodnym alkoholu izopropylowym (1 mL). Mieszaninę reakcyjną przez 3 godziny mieszałam w temperaturze 0 °C a następnie pozwoliłam jej na osiągnięcie temperatury pokojowej, w której mieszanie kontynuowane było przez noc. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuściłam w octanie etylu (50 mL), przemyłam wodą (3 x 20 mL) i solanką (50 mL). Wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i zatężyłam. Otrzymany bledożółty olej oczyszczałam przy użyciu systemu chromatograficznego typu FLASH (eluent: heptan /octan etylu). Oczekiwany produkt eluował przy 30% octanu etylu. Uzyskałam czysty półprodukt **34** w postaci białego osadu (210 mg, 61.7%).

MS-APCI: m/z 307.6 [M+H]⁺

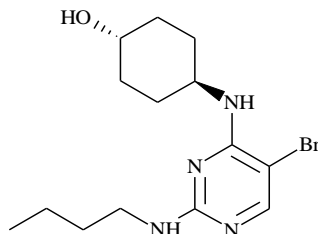
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.11 – 8.06 (m, 1H), 5.32 – 5.25 (m, 1H), 4.04 – 3.93 (m, 1H), 3.71 – 3.61 (m, 1H), 2.15 – 2.07 (m, 2H), 2.04 – 1.98 (m, 2H), 1.64 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 1.52 – 1.43 (m, 2H), 1.37 – 1.26 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 159.50 (s), 158.83 (s), 156.46 (s), 103.03 (s), 69.68 (s), 49.36 (s), 33.74 (s), 30.49 (s).

Ze względu na nakładanie się sygnałów od cykloheksanolu na widmie ¹³C nie wszystkie sygnały są widoczne.

4-[[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan-1-ol, (40)

Ogólna procedura (1) reakcji *N*-aminowania



Do kolbki odważyłam 4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol (9.99 g, 32.6 mmol) następnie dodałam *n*-butyloaminę (23 mL, 231 mmol), *N,N*-diizopropylloetyloaminę (8.9 g, 66.8 mmol) oraz 60 mL izopropanolu. Po dodaniu wszystkich reagentów mieszanie kontynuowałam przez 24h w temperaturze 95 °C Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (chlorek metylenu/metanol 95:5 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Wykonałam ekstrakcję z chlorkiem metylenu. Otrzymaną warstwę organiczną przemyłam nasyconym roztworem NaCl (200 mL) a następnie suszyłam nad Na₂SO₄. Po oddzieleniu środka suszącego i odparowaniu nadmiaru rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany surowy produkt oczyszczany był za pomocą systemu FLASH (eluent: chlorek metylenu /metanol). Oczekiwany produkt eluował przy 2% metanolu. Uzyskałam czysty związek w postaci jasnego osadu (6.17 g, 55.2%).

MS-APCI: m/z 344.5 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.82 (s, 1H), 4.89 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.96 – 3.80 (m, 1H), 3.65 (tt, J = 10.5, 4.2 Hz, 1H), 3.30 (td, J = 7.1, 5.9 Hz, 2H), 2.11 (ddd, J = 7.8, 2.8, 1.4 Hz, 2H), 2.03 – 1.97 (m, 2H), 1.58 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.34 (m, 4H), 1.32 – 1.20 (m, 2H), 0.92 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

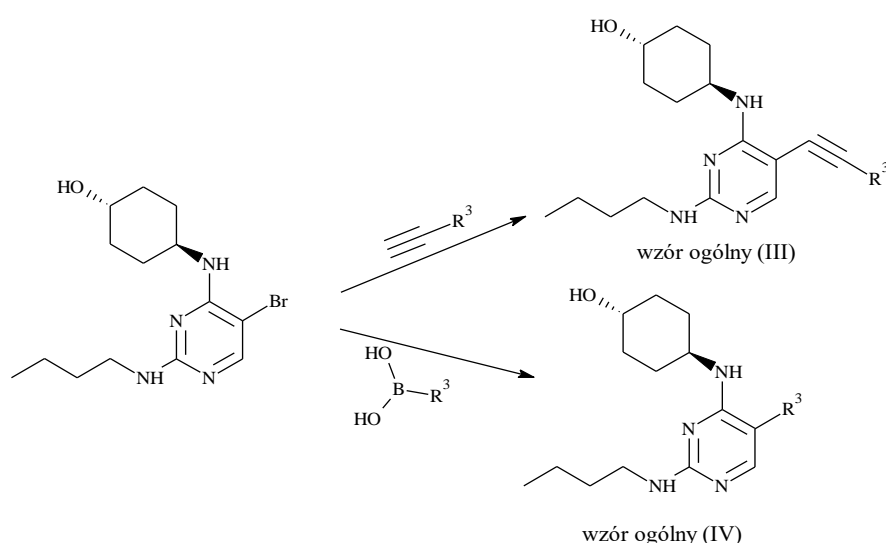
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 161.27 (s), 157.70 (s), 155.88 (s), 69.86 (s), 48.93 (s), 41.50 (s), 34.04 (s), 31.94 (s), 30.71 (s), 20.22 (s), 13.95 (s).

Z uwagi na nakładanie się sygnałów od cykloheksanolu na widmie ¹³C nie wszystkie sygnały są widoczne.

Stosowanie powyższej metody umożliwia otrzymanie szeregu innych produktów *N*-aminowania, dlatego też określiłam ją jako procedurę (1).

Kolejne reakcje 4-{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu (**40**) z alkinami katalizowane palladem na przykład Pd(PPh₃)₄ przy użyciu CuI, trietyloaminy jako zasady oraz DMF jako rozpuszczalnika umożliwiają otrzymanie pochodnych o wzorze ogólnym (III) przedstawionym na poniższym schemacie. Metodę tą określiłam jako ogólną procedurę (2).

Z kolei reakcje 4-{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu (**40**) z różnymi kwasami bądź estrami boronowymi w obecności katalizatora palladowego i zasady jak węglan cezu oraz dioksan jako rozpuszczalnik pozwalają na otrzymanie pochodnych o wzorze ogólnym (IV) (Schemat 9). Metodę tą nazwałam jako ogólną procedurę (3).



Schemat 9: Metody przygotowania związków o wzorach ogólnych (III i IV).

Ogólna procedura (2) pozwalająca na otrzymanie związków o wzorze ogólnym (III) dotyczy krzyżowego sprzęgania Sonogashiry.

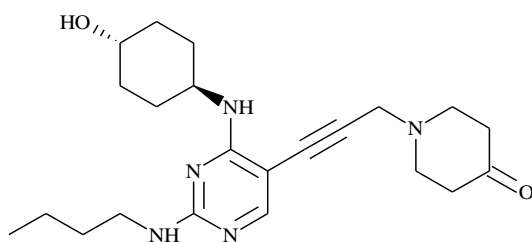
Do roztworu 4-{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu (1 eq) w DMF dodawałam odpowiedni acetylen (3 eq), trietyloaminę (5 eq), bis(trifenylfosfino)pallad (0.1 eq) i jodek miedzi (0.1 eq). Mieszaninę reakcyjną mieszałam w temperaturze 90 °C przez 12 godzin. Postęp reakcji monitorowałam za pomocą analizy TLC. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam poprzez dodanie wody i wykonałam ekstrakcje

z dichlorometanem. Otrzymaną warstwę organiczną przemywałam nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Następnie suszyłam ją nad siarczanem (VI) sodu, przesączyłam i odparowałam nadmiar rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowe produkty oczyszczałam metodą chromatografii kolumnowej, uzyskując pożądane związki o wzorze (III).

Ogólna procedura (3) pozwalająca na otrzymanie związków o wzorze ogólnym (IV) dotyczy reakcji Suzuki.

Do roztworu 4-{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu (1 eq) w mieszaninie dioksan/woda (4:1, v/v) dodawałam odpowiedni kwas bądź ester boronowy (3 eq), tetrakis(trifenylofosfino)pallad (0.1 eq) i węglan cezu (3 eq). Mieszaninę reakcyjną mieszałam w temperaturze 100 °C przez 12 godzin. Postęp reakcji monitorowałam za pomocą analizy TLC. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam poprzez dodanie wody i wykonałam ekstrakcje z dichlorometanem. Otrzymaną warstwę organiczną przemywałam nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Następnie suszyłam ją nad siarczanem (VI) sodu, przesączyłam i odparowałam nadmiar rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowe produkty oczyszczałam metodą chromatografii kolumnowej, uzyskując pożądane związki o wzorze (IV).

1-{3-[2-(butyloamino)-4-{{(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]amino}pirymidyn-5-ylo]prop-2-yn-1-ylo}piperydyn-4-on, (41)



Tytułowy związek syntezowałam zgodnie z procedurą (2) w postaci jasnego osadu (33.5 mg, 14.3%).

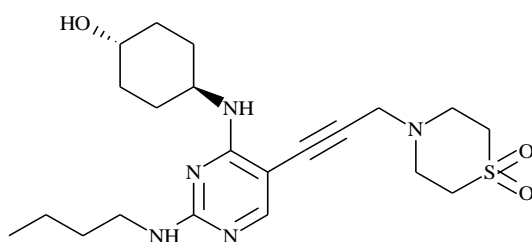
MS-APCI: m/z 401.0 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.76 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.02 – 3.90 (m, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.62 – 3.54 (m, 1H), 3.52 (s, 1H), 3.35 – 3.27 (m, 2H), 2.94 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.66 (dd, J =

9.7, 5.7 Hz, 2H), 2.50 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.12 – 1.88 (m, 4H), 1.82 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 1.65 – 1.48 (m, 2H), 1.49 – 1.28 (m, 6H), 0.96 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 206.54 (s), 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 99.41 (s), 86.40 (s), 72.03 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 50.86 (s), 50.54 (s), 41.53 (s), 39.59 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

4-{3-[2-(butyloamino)-4-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]amino]pirymidyn-5-ylo]prop-2-yn-1-ylo}-1'6-tiomorfolina -1,1-dion, (42)



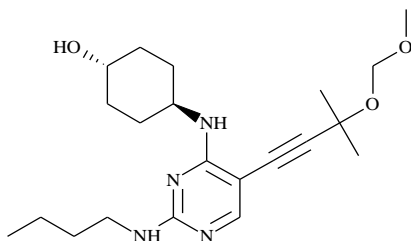
Powyższy związek powstał w oparciu o procedurę (2) w postaci żółtego osadu (267 mg, 75%).

MS-APCI: m/z 436.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.78 (s, 1H), 4.11 – 3.82 (m, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.67 – 3.50 (m, 1H), 3.40 – 3.25 (m, 6H), 3.24 – 3.03 (m, 8H), 2.17 – 1.84 (m, 4H), 1.69 – 1.50 (m, 2H), 1.49 – 1.29 (m, 6H), 0.96 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 99.41 (s), 86.40 (s), 72.03 (s), 70.89 (s), 52.81 (s), 52.41 (s), 52.18 (s), 47.31 (s), 47.09 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-[3-(metoksymetoksy)-3-metylobut-1-yn-1-ylo]pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan-1-ol, (43)



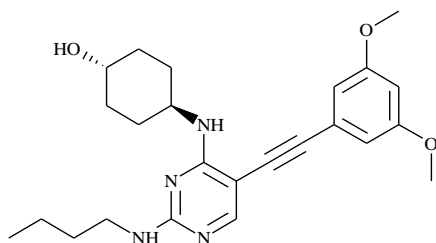
Powyższy związek zsyntezowałam zgodnie z opisaną powyżej procedurą (2) w postaci żółtej substancji oleistej (170 mg, 26%).

MS-APCI: m/z 391.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (d, *J* = 26.3 Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.08 – 4.85 (m, 2H), 4.08 – 3.86 (m, 1H), 3.78 – 3.64 (m, 1H), 3.50 – 3.45 (m, 3H), 3.45 – 3.35 (m, 2H), 2.22 – 1.99 (m, 4H), 1.66 – 1.56 (m, 8H), 1.54 – 1.39 (m, 4H), 1.32 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 100.87 (s), 92.33 (s), 91.17 (s), 70.83 (d, *J* = 14.6 Hz), 67.35 (s), 55.45 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 31.07 (s), 30.52 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-[2-(3,5-dimetoksyfenylo)etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino]-cykloheksan-1-ol, (44)



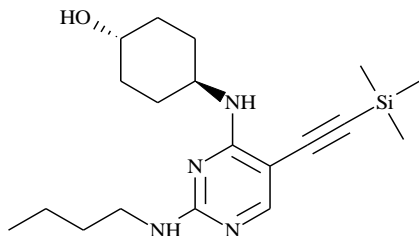
Tytułowy związek powstał w oparciu o procedurę (2) w postaci jasnożółtego osadu (450 mg, 57.3%)

MS-APCI: m/z 425.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.98 (s, 1H), 6.68 – 6.54 (m, 2H), 6.51 – 6.36 (m, 1H), 5.27 – 5.09 (m, 1H), 4.09 – 3.85 (m, 1H), 3.81 (d, *J* = 4.4 Hz, 6H), 3.75 – 3.62 (m, 1H), 3.40 (td, *J* = 7.1, 6.0 Hz, 2H), 2.24 – 1.96 (m, 4H), 1.68 – 1.53 (m, 2H), 1.53 – 1.37 (m, 4H), 1.36 – 1.22 (m, 2H), 1.00 – 0.84 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.98 (s), 160.80 (s), 159.44 – 159.23 (m), 153.02 (s), 124.68 (s), 106.12 – 105.72 (m), 102.85 (s), 100.87 (s), 91.46 (s), 88.30 (s), 70.89 (s), 56.23 (s), 55.83 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan-1-ol, (45)



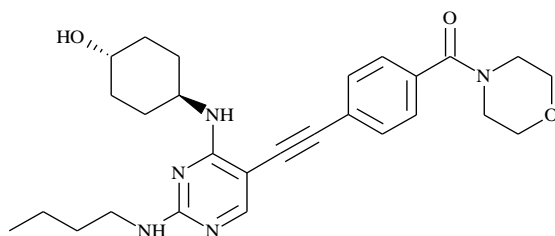
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci intensywnie żółtego osadu (420 mg, 12.8%).

MS-APCI: m/z 361.5 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 7.92 (s, 1H), 5.12 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.67 (tt, $J = 10.4, 4.2$ Hz, 1H), 3.34 (td, $J = 7.1, 5.9$ Hz, 2H), 2.13 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 2.00 (dt, $J = 7.9, 4.5$ Hz, 2H), 1.56 – 1.51 (m, 2H), 1.47 – 1.34 (m, 4H), 1.25 (dt, $J = 9.9, 8.9$ Hz, 2H), 0.92 (dd, $J = 8.6, 6.1$ Hz, 3H), 0.22 – 0.21 (m, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ 161.88 (s), 160.79 (s), 158.04 (s), 158.01 (s), 101.50 (s), 99.38 (s), 69.93 (s), 48.65 (s), 41.31 (s), 33.99 (s), 32.02 (s), 30.66 (s), 20.28 (s), 13.98 (s), 0.30 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-{2-[4-(morfolino-4-karbonylo)fenylo]etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan-1-ol, (46)



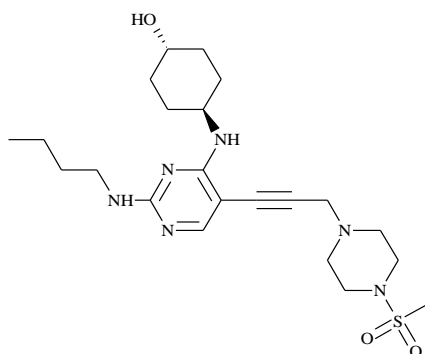
Tytułowy związek syntezowałam zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (88.4 mg, 25.4%).

MS-APCI: m/z 478.6 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.52 – 7.46 (m, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 2H), 5.22 (s, 1H), 4.06 – 3.89 (m, 1H), 3.70 (s, 9H), 3.42 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.83 (s, 1H), 2.11 (dd, $J = 39.4, 11.2$ Hz, 4H), 1.60 (dt, $J = 14.8, 7.3$ Hz, 2H), 1.41 (dd, $J = 14.8, 7.3$ Hz, 4H), 1.26 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 0.96 (dd, $J = 8.1, 6.4$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 170.36 (s), 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 135.68 (s), 132.82 – 132.61 (m), 128.85 – 128.63 (m), 122.94 (s), 100.87 (s), 92.39 (s), 86.55 (s), 70.89 (s), 67.41 – 67.01 (m), 52.18 (s), 44.59 (s), 44.20 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

4-[[2-(butyloamino)-5-[3-(4-metanosulfonylopiperazyn-1-ylo)prop-1-yn-1-ylo]pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol, (47)



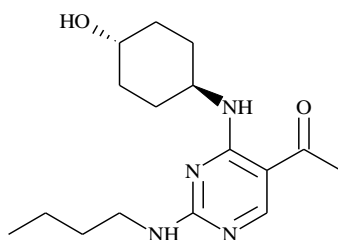
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci brązowego osadu (10 mg, 2%).

MS-APCI: m/z 465.6 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.82 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 4.53 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.83 (ddd, $J = 11.3, 8.0, 3.7$ Hz, 1H), 3.59 (s, 2H), 3.49 – 3.35 (m, 1H), 3.25 – 3.17 (m, 2H), 3.18 – 3.04 (m, 4H), 2.87 (s, 3H), 2.67 – 2.54 (m, 4H), 1.86 (s, 4H), 1.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.40 – 1.24 (m, 6H), 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 99.41 (s), 86.40 (s), 72.03 (s), 70.89 (s), 53.30 (s), 52.90 (s), 52.18 (s), 45.16 (s), 44.85 (s), 41.53 (s), 39.61 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

1-[2-(butyloamino)-4-[[*(1*r*,4*r*)*-4-hydroksycykloheksylo]amino]pirymidyn-5-ylo]etan-1-on, (48)



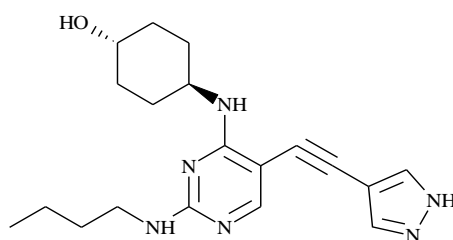
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci białego osadu (89.1 mg, 35%).

MS-APCI: m/z 307.5 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 8.51 (s, 1H), 4.06 (s, 1H), 3.66 (s, 1H), 3.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.16 (s, 2H), 2.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.53 – 1.30 (m, 6H), 1.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 198.37 (s), 163.42 (s), 163.30 (s), 162.16 (s), 143.81 (s), 105.58 (s), 70.29 (s), 42.02 (s), 34.61 (s), 32.79 (s), 31.35 (s), 25.72 (s), 21.20 (s), 14.23 (s).

(*1*r*,4*r*)*-4-[[2-(butyloamino)-5-[2-(*1*H*-pirazol-4-ilo)etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan-1-ol, (49)*



Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (53.3 mg, 15 %).

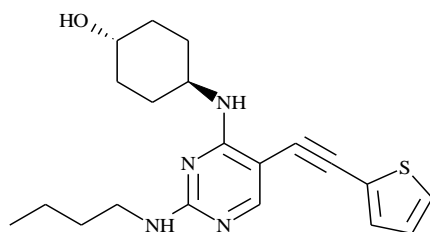
MS-APCI: m/z 355.5 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13.10 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 5.85 (d, $J = 43.7$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.43 (dd,

$J = 14.4, 10.3 \text{ Hz}$, 1H), 3.25 (dd, $J = 13.4, 6.7 \text{ Hz}$, 2H), 1.89 (s, 4H), 1.62 – 1.17 (m, 8H), 0.92 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 134.53 (s), 133.46 (s), 100.87 (s), 99.78 (s), 91.30 (s), 74.52 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{[2-(butyloamino)-5-[2-(tiofen-2-ylo)etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol, (50)



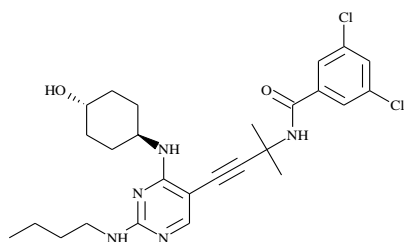
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci brązowego osadu (90 mg, 24%).

MS-APCI: m/z 371.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.00 (s, 1H), 7.28 (dd, $J = 5.2, 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.21 (dd, $J = 3.6, 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.00 (dd, $J = 5.2, 3.6 \text{ Hz}$, 1H), 5.10 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 1H), 3.96 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.39 (dd, $J = 13.0, 7.0 \text{ Hz}$, 2H), 2.15 (d, $J = 12.4 \text{ Hz}$, 2H), 2.03 (d, $J = 12.7 \text{ Hz}$, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.39 (m, 6H), 0.95 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 135.08 (s), 134.24 (s), 129.07 (s), 122.84 (s), 100.87 (s), 82.84 (s), 71.13 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

N*-{4-[2-(butyloamino)-4-[[*(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]amino]pirymidyn-5-ylo]-2-metylobut-3-yn-2-ylo}-3, 5-dichlorobenzamid, (51)



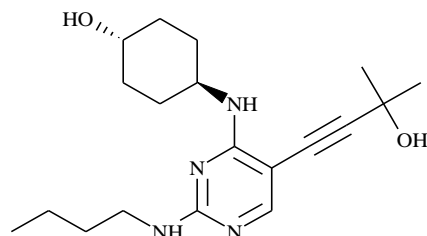
Powyższy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (2) w postaci żółtego osadu (150 mg, 29%).

MS-APCI: m/z 519.5 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.86 (s, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.45 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 5.11 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.07 – 3.94 (m, 1H), 3.71 – 3.59 (m, 1H), 3.39 (q, $J = 13.0, 7.0$ Hz, 2H), 2.18 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 2.00 (d, $J = 10.4$ Hz, 2H), 1.51 (d, $J = 51.5$ Hz, 6H), 1.38 (s, 6H), 1.21 (q, $J = 21.5, 11.7$ Hz, 2H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 135.08 (s), 134.24 (s), 129.07 (s), 122.84 (s), 100.87 (s), 82.84 (s), 71.13 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-(3-hydroksy-3-metylobut-1-yn-1-ylo)pirymidyn-4-ylo]-amino]cykloheksan-1-ol, (52)



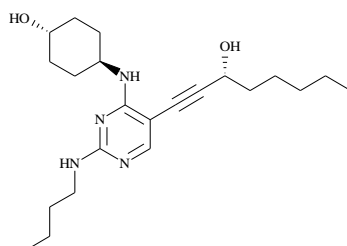
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci kremowego osadu (120 mg, 35 %).

MS-APCI: m/z 347.5 $[M+H]^+$

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (s, 1H), 5.04 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.36 (dd, J = 13.0, 7.0 Hz, 2H), 2.13 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 2.02 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 1.60 (s, 6H), 1.57 – 1.22 (m, 8H), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 100.87 (s), 92.92 (s), 73.83 (s), 70.89 (s), 64.57 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.32 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-[(3*R*)-3-hydroksyokt-1-yn-1-ylo]pirymidyn-4-ylo]amino]-cykloheksan-1-ol, (53)



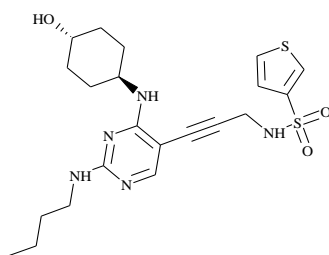
Powyższy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (2) w postaci pomarańczowego osadu (96.9 mg, 28.5%).

MS-APCI: m/z 389.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (s, 1H), 5.10 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 4.58 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.67 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.36 (dd, J = 13.1, 6.8 Hz, 2H), 2.12 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.02 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 1.86 – 1.67 (m, J = 13.1, 6.5 Hz, 2H), 1.61 – 1.24 (m, J = 30.3, 27.0, 18.9, 8.4 Hz, 15H), 0.98 – 0.84 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.15 (s), 160.39 (s), 153.03 (s), 100.15 (s), 93.19 (s), 74.48 (s), 70.89 (s), 61.67 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 37.76 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 31.51 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 25.34 (s), 22.94 (s), 20.23 (s), 14.13 (s), 13.81 (s).

***N*-{3-[2-(butyloamino)-4-[[*(1r,4r)*-4-hydroksycykloheksylo]amino]pirymidyn-5-ylo]-prop-2-yn-1-ylo}tiofeno-3-sulfonamid, (54)**



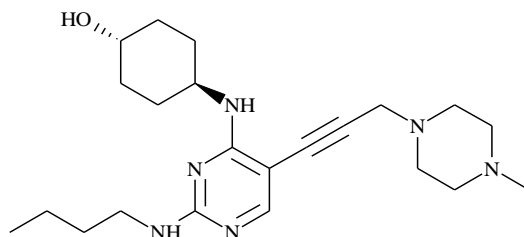
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci pomarańczowego osadu (100 mg, 21.5 %).

MS-APCI: m/z 464.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.15 (dd, $J = 3.1, 1.3$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.62 – 7.59 (m, 1H), 7.43 (dd, $J = 5.2, 1.3$ Hz, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.98 (dd, $J = 9.2, 5.6$ Hz, 1H), 3.68 – 3.55 (m, 1H), 3.38 – 3.29 (m, 2H), 2.04 (dd, $J = 9.0, 5.0$ Hz, 4H), 1.67 – 1.54 (m, 2H), 1.50 – 1.37 (m, 6H), 1.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 141.55 (s), 122.48 (s), 116.05 (s), 99.41 (s), 95.22 (s), 70.89 (s), 61.77 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 29.99 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

***(1r,4r)*-4-[[2-(butyloamino)-5-[3-(4-metylopiperazyn-1-ylo)prop-1-yn-1-ylo]pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan- 1-ol, (55)**



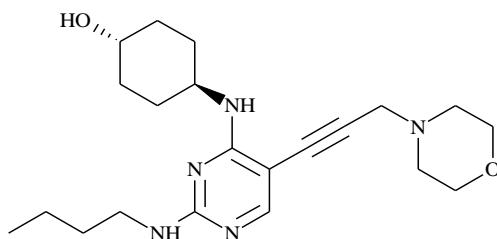
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci pomarańczowego osadu (90 mg, 22.5%).

MS-APCI: m/z 401.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (s, 1H), 5.09 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 3.92 (dd, *J* = 16.6, 9.2 Hz, 1H), 3.68 (td, *J* = 10.3, 5.1 Hz, 1H), 3.53 (s, 2H), 3.36 (dd, *J* = 13.0, 7.1 Hz, 2H), 2.66 (s, 4H), 2.53 (s, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.12 (d, *J* = 12.2 Hz, 2H), 2.02 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H), 1.57 (dt, *J* = 14.8, 7.2 Hz, 2H), 1.48 – 1.35 (m, 4H), 1.25 (t, *J* = 14.3 Hz, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 99.41 (s), 86.40 (s), 72.03 (s), 70.89 (s), 54.46 (s), 54.06 (s), 52.92 (s), 52.52 (s), 52.18 (s), 45.96 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{[2-(butyloamino)-5-[3-(morfolin-4-yl)prop-1-yn-1-yl]pirymidyn-4-yl]-amino}cykloheksan-1-ol, (56)



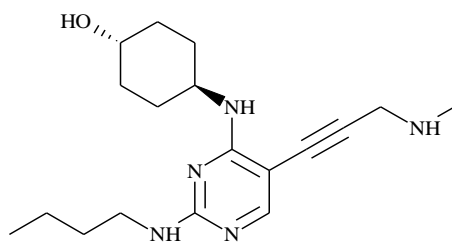
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci brązowego osadu (80 mg, 21 %).

MS-APCI: *m/z* 388.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.92 (s, 1H), 5.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 3.99 – 3.84 (m, 1H), 3.80 – 3.73 (m, 4H), 3.73 – 3.62 (m, *J* = 10.3, 6.1 Hz, 1H), 3.53 (s, 2H), 3.37 (dd, *J* = 13.0, 7.1 Hz, 2H), 2.65 – 2.56 (m, 4H), 2.13 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H), 2.03 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 1.62 – 1.27 (m, 8H), 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 99.41 (s), 86.40 (s), 72.03 (s), 70.89 (s), 68.04 (s), 67.82 (s), 52.18 (s), 51.99 (s), 51.60 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-[3-(metyloamino)prop-1-yn-1-ylo]pirymidyn-4-ylo]-amino]cykloheksan-1-ol, (57)



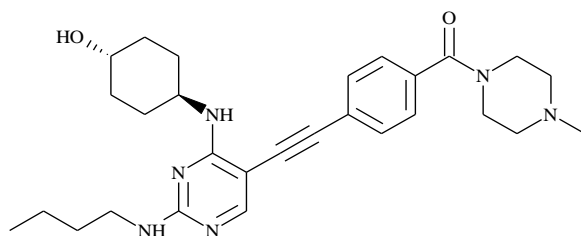
Powyższy produkt otrzymałam w reakcji wykonanej zgodnie z procedurą (2) w postaci pomarańczowej substancji olejowej (70 mg, 21 %).

MS-APCI: m/z 332.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (s, 1H), 5.10 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.99 (s, 1H), 3.92 (dtd, $J = 10.9, 7.3, 3.8$ Hz, 1H), 3.72 – 3.59 (m, 3H), 3.36 (kw, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.13 (d, $J = 11.6$ Hz, 2H), 2.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 1.62 – 1.51 (m, $J = 12.0, 7.3$ Hz, 2H), 1.48 – 1.33 (m, $J = 18.5, 10.1, 3.0$ Hz, 6H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.23 (s), 159.97 (s), 153.08 (s), 99.41 (s), 83.63 (s), 71.17 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 36.45 (s), 35.60 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-{2-[4-(4-metylopiperazyno-1-karbonylo)fenylo]etynylo]-pirymidyn-4-ylo]amino]cykloheksan-1-ol, (58)



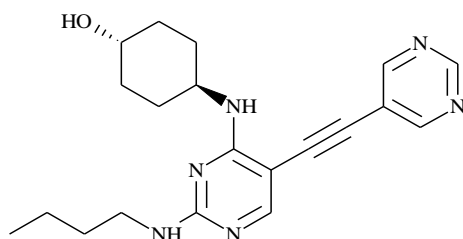
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci pomarańczowego osadu (70 mg, 14%)

MS-APCI: m/z 491.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, C₃D₆O): δ 8.00 (d, *J* = 20.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.52 (m, 2H), 7.51 – 7.42 (m, 2H), 4.06 (s, 1H), 3.63 (d, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.89 (d, *J* = 13.8 Hz, 6H), 2.42 (s, 4H), 2.30 (s, 3H), 2.03 (s, 2H), 1.73 – 1.59 (m, 2H), 1.44 (dt, *J* = 26.0, 12.9 Hz, 7H), 1.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, C₃D₆O): δ 170.36 (s), 168.98 (s), 160.80 (s), 153.02 (s), 135.68 (s), 132.82 (s), 132.61 (s), 128.85 (s), 128.63 (s), 122.94 (s), 100.87 (s), 92.39 (s), 86.55 (s), 70.89 (s), 52.56 (s), 52.34 (s), 52.18 (s), 45.96 (s), 44.50 (s), 44.19 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[[2-(butyloamino)-5-[2-(pirymidyn-5-ylo)etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino]-cykloheksan-1-ol, (59)



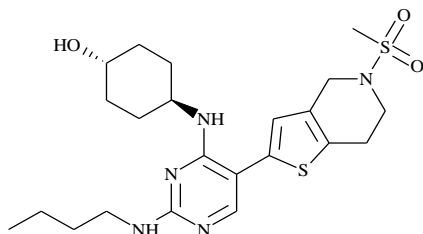
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci białego osadu (3.7 mg, 1.2%)

MS-APCI: *m/z* 367.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.11 (s, 1H), 8.78 (s, 2H), 8.05 (s, 1H), 5.04 (s, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.69 (td, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 13.0, 7.0 Hz, 2H), 2.24 – 1.97 (m, 4H), 1.60 (dd, *J* = 8.5, 6.0 Hz, 4H), 1.41 (dd, *J* = 14.6, 7.6 Hz, 5H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.98 (s), 163.85 (s), 160.80 (s), 155.96 – 155.75 (m), 153.02 (s), 113.94 (s), 100.87 (s), 99.12 (s), 86.30 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 41.53 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.87 (s), 30.22 (s), 29.82 (s), 20.23 (s), 14.02 (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]-pirymidyn-4-yl]amino}cykloheksan-1-ol, (60)



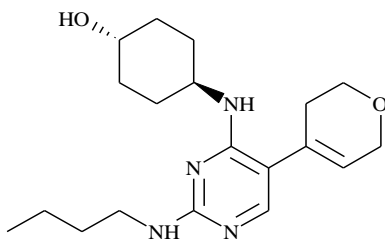
Powyższy produkt otrzymałam w wyniku reakcji Suzuki, zgodnie z procedurą (3) w postaci beżowego osadu (257.2 mg, 61.4%).

MS-APCI: m/z 480.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.98 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.38 (t, $J = 1.5$ Hz, 2H), 4.02 – 3.87 (m, 1H), 3.67 – 3.59 (m, 3H), 3.50 – 3.46 (m, 1H), 3.43 – 3.32 (m, 2H), 2.97 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.93 – 2.84 (m, 3H), 2.12 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 2.00 (d, $J = 10.6$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 10.9$ Hz, 2H), 1.59 (ddd, $J = 12.0, 8.8, 6.5$ Hz, 2H), 1.49 – 1.33 (m, 4H), 0.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.82 (s), 159.29 – 158.42 (m), 155.48 (s), 136.13 (s), 132.60 (s), 131.32 (s), 123.12 (s), 69.82 (s), 48.59 (s), 45.35 (s), 43.42 (s), 41.19 (s), 36.60 (s), 33.94 (s), 31.97 (s), 30.61 (s), 29.63 (s), 25.26 (s), 20.13 (s), 13.82 (s).

4-[[2-(butyloamino)-5-(3,6-dihydro-2*H*-piran-4-ylo)pirymidyn-4-yl]amino}cykloheksan-1-ol, (61)



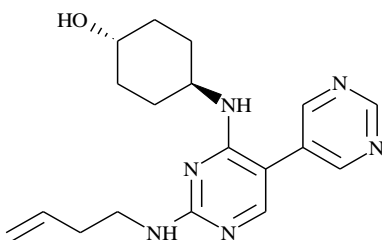
Powyższy produkt otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci jasnoróżowego osadu (70.3 mg, 23.1%).

MS-APCI: m/z 347.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.48 (s, 1H), 5.80 (tt, J = 2.8, 1.6 Hz, 1H), 4.27 (q, J = 2.7 Hz, 2H), 4.01 (dd, J = 9.4, 5.5 Hz, 1H), 3.93 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.61 (dt, J = 10.3, 5.5 Hz, 1H), 2.31 (dt, J = 7.2, 2.7 Hz, 2H), 2.02 (ddd, J = 22.3, 10.5, 7.7 Hz, 4H), 1.70 – 1.57 (m, 2H), 1.43 (ddd, J = 17.3, 9.1, 5.2 Hz, 6H), 1.00 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 160.39 (s), 158.82 (s), 151.17 (s), 129.65 (s), 125.32 (s), 109.34 (s), 68.69 (s), 64.51 (s), 63.53 (s), 40.11 (s), 33.15 (s), 31.20 (s), 29.50 (s), 28.18 (s), 19.29 (s), 12.35 (s).

4-({2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-[5,5'-bipirymidyn]-4-ylo}amino)cycloheksan-1-ol, (62)



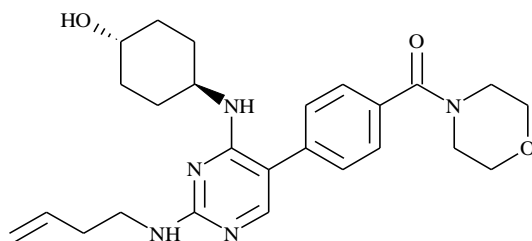
Powyższy związek otrzymałam w wyniku reakcji Suzuki zgodnie z procedurą (3) poprzedzonej *N*-aminowaniem półproduktu 34 wykonanego zgodnie z procedurą (1) w postaci białego osadu (22.1 mg, 22.2%).

MS-APCI: m/z 341.5 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.19 (s, 1H), 8.74 (s, 2H), 7.66 (s, 1H), 5.91 – 5.81 (m, 1H), 5.22 – 5.07 (m, 2H), 4.00 (dd, J = 15.2, 7.9 Hz, 1H), 3.64 – 3.54 (m, 1H), 3.54 – 3.46 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.48 – 2.34 (m, 2H), 2.10 (t, J = 12.9 Hz, 2H), 2.01 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 1.48 – 1.40 (m, 2H), 1.24 (tt, J = 18.2, 9.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 166.77 (s), 158.05 (s), 155.84 (s), 155.39 (s), 147.84 (s), 147.62 (s), 134.10 (s), 130.00 (s), 121.99 (s), 117.05 (s), 70.89 (s), 52.18 (s), 40.12 (s), 33.83 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.22 (s), 29.82 (s).

4-({2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-5-[4-(morfolino-4-karbonylo)fenylo]pirymidyn-4-ylo}-amino)cykloheksan-1-ol, (63)



Tytułowy związek otrzymałam również na drodze reakcji Suzuki przeprowadzonej z wykorzystaniem procedury (3) poprzedzonej reakcją N-aminowania półproduktu **34** wykonanej według procedury (1) w postaci białego osadu (53.5 mg, 40%).

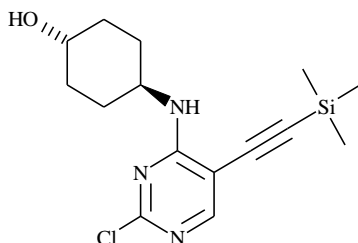
MS-APCI: m/z 452.6 $[M+H]^+$

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.75 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 5.93 (ddt, $J = 17.1, 10.2, 6.8$ Hz, 1H), 5.28 – 5.11 (m, 2H), 4.76 (s, 1H), 4.05 (ddq, $J = 15.1, 7.8, 3.8$ Hz, 1H), 3.71 (ddd, $J = 14.7, 10.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.57 (dd, $J = 13.0, 6.6$ Hz, 3H), 2.47 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.24 (s, 1H), 2.15 (t, $J = 15.4$ Hz, 2H), 2.07 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 1.51 (qd, $J = 13.1, 3.4$ Hz, 2H), 1.35 (dd, $J = 16.5, 6.1$ Hz, 4H), 1.24 (td, $J = 13.1, 3.0$ Hz, 3H), 0.99 – 0.91 (m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ 170.36 (s), 166.60 (s), 158.31 (s), 155.85 (s), 135.18 (s), 134.47 (s), 134.10 (s), 126.91 (s), 126.69 (s), 125.81 (s), 125.60 (s), 118.20 (s), 117.05 (s), 70.89 (s), 67.41 (s), 67.01 (s), 52.18 (s), 44.59 (s), 44.20 (m), 40.12 (s), 33.83 (s), 32.73 (s), 32.33 (s), 30.22 (s), 29.82 (s).

4.2.2. Opis syntezy otrzymywania pochodnych pirolopirymidynowych

Synteza półproduktu **35**; *trans*-4-((2-chloro-5-((trimetylosililo)etynylo)pirymidyn-4-ylo)-amino)cykloheksanol



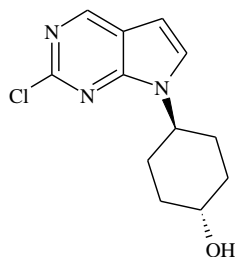
Do zargonowanej mieszaniny półproduktu **34** (4.10 g, 13.40 mmol) w bezwodnym toluenie (35 mL) dodałam w temperaturze pokojowej trimetylosililoacetylen (1.32 g, 13 mmol), jodek miedzi (I) (0.057 g, 0.294 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.193 g, 0.27 mmol) oraz trietyloaminę (49.80 g, 489 mmol). Po odgazowaniu mieszaniny reakcyjnej rozpoczęłam jej ogrzewanie w temperaturze 60 °C, które kontynuowałam przez 5h. Postęp reakcji monitorowałam metodą TLC na żelu krzemionkowym w układzie (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji wykonałam ekstrakcję za pomocą octanu etylu (400 mL). Warstwę organiczną przemyłam wodą destylowaną (2 x 300 mL) i solanką (2 x 100 mL) po czym suszyłam ją nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄). Po czynności tej usunęłam nadmiar rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt reakcji oczyściłam przy użyciu chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (eluent: heptan/octan etylu 1:1 v/v) uzyskując oczekiwany związek w postaci jasnożółtego osadu (1.636 g, 38.7%).

MS-APCI: m/z 324.9 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.06 (s, 1H), 5.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.04 – 3.93 (m, 1H), 3.71 – 3.64 (m, 1H), 2.19 – 2.09 (m, 2H), 2.05 – 1.97 (m, 2H), 1.64 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 1.53 – 1.44 (m, 2H), 1.32 – 1.26 (m, 2H), 0.26 – 0.24 (m, 9H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 162.11 (s), 159.62 (s), 158.12 (s), 106.32 (s), 101.06 (s), 95.96 (s), 69.61 (s), 48.82 (s), 33.61 (s), 31.94 (s), 30.44 (s), 22.75 (s), 14.17 (s), -0.12 (s).

Synteza półproduktu 36; *trans*-4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksan-1-ol



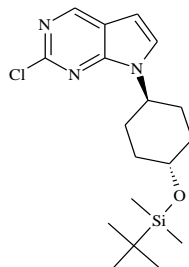
Po 15 minutowym argonowaniu roztworu półproduktu *trans*-4-((2-chloro-5-((trimetylosililo)etynylo)pirymidyn-4-yl)-amino)cykloheksanolu (2.25 g, 6.95 mmol) w bezwodnym tetrahydrofuranie (300 mL) w temperaturze pokojowej dodałam 1.0 M roztwór fluorku tetrabutylamoniowego w tetrahydrofuranie (17.4 mL). Otrzymaną mieszaninę reakcyjną ogrzewałam przez noc w temperaturze 65 °C. Postęp reakcji monitorowałam metodą TLC na żelu krzemionkowym (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji rozcieńczono wodą (300 mL) i ekstrahowano octanem etylu (3 x 300 mL). Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym siarczanem magnezu (Na₂SO₄) i następnie odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (metanol/octan etylu, 0-1%) uzyskując oczekiwany półprodukt **36** w postaci białego osadu (1.34 g, 76.6%).

MS-APCI: m/z 252.8 [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(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).

Wytwarzanie półproduktu 37; 7-(*trans*-4-((*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy)cyklohekylo)-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna



37

Do roztworu związku **36** (3.572 g, 14.20 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (240 mL) dodałam imidazol (2.41 g, 35.3 mmol) i chlorek *tert*-butylo-dimetylosililu (3.21 g, 21.30 mmol) w temperaturze 0 °C. Otrzymaną mieszaninę mieszałam przez 1 godzinę w temperaturze 0 °C, a następnie pozwoliłam jej na uzyskanie temperatury pokojowej, w której mieszanie kontynuowałam przez noc. Postęp reakcji monitorowałam za pomocą TLC na żelu krzemionkowym w układzie (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji dodałam wody (200 mL) i ekstrahowałam dichlorometanem (3 x 600 mL). Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i następnie usunęłam nadmiar rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (eluent: octan etylu/heptan, 0-15%) uzyskując półprodukt 37 (3.64g, 70%) w postaci białego osadu.

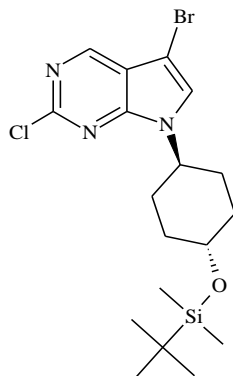
MS-APCI: m/z 367.0 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) 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-D₆-D₆) 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 (s), 17.8 (s), -4.7 (s).

W kolejnych doświadczeniach do reakcji zabezpieczania grupy hydroksylowej zamiast dimetyloformamidu stosowałam dichlorometan.

Wytwarzanie półproduktu 38; 5-bromo-7-{4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo}-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna



38

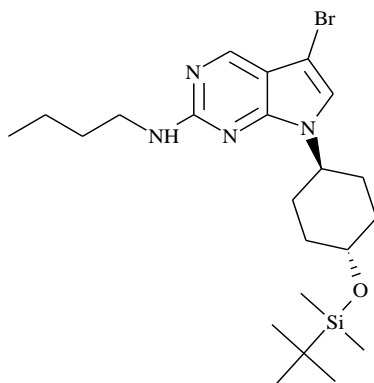
Do roztworu 7-(*trans*-4-((*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy)cykloheksylo)-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny (12.3 g, 33.5 mmol) w bezwodnym dimetyloformamidzie (65 mL) w temperaturze pokojowej dodałam *N*-bromosukcynoimid (6.02 g, 33.5 mmol) w kilku porcjach. Otrzymaną mieszaninę mieszałam przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji monitorowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (octan etylu/heptan 1:1 v/v). Po zakończeniu reakcji dodałam wody (1300 mL) i wykonałam ekstrakcję z dichlorometanem (3 x 400 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (Na₂SO₄) i następnie zateżyłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (eluent: octan etylu/heptan, 5-50%) uzyskując 5-bromo-7-{4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo}-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidynę w postaci białego osadu (11.2 g, 75.8%).

MS-APCI: *m/z* 445.9 [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 (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).

Synteza półproduktu 39



39

Reakcja syntezy oczekiwanego półproduktu opiera się na poniższej metodzie ogólnej określonej jako ogólna procedura (4). W sposobie tym do roztworu półproduktu **38** (1eq) w bezwodnym izopropanolu w temperaturze pokojowej dodaje się *n*-butyloaminę (5eq) i *N,N*-diizopropylloetyloaminę (1.5 eq). Otrzymaną mieszaninę miesza się przez noc w temperaturze 95 °C.

Do roztworu 5-bromo-7-{4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo}-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny (6.02 g, 12.4 mmol) w izopropanolu (15 mL) dodałam *n*-butyloaminę (8.81 g, 65.5 mmol) i *N,N*-diizopropylloetyloaminę (2.45 g, 19 mmol). Otrzymaną mieszaninę mieszałam przez noc w temperaturze 95 °C. Postęp reakcji monitorowałam metodą TLC na żelu krzemionkowym (heptan/octan etylu 9:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam za pomocą systemu FLASH w układzie (heptan/octan etylu). Produkt eluował przy 3% octanu etylu. Uzyskałam pożądaný półprodukt **39** w postaci białego osadu (2.81 g, 47.1%).

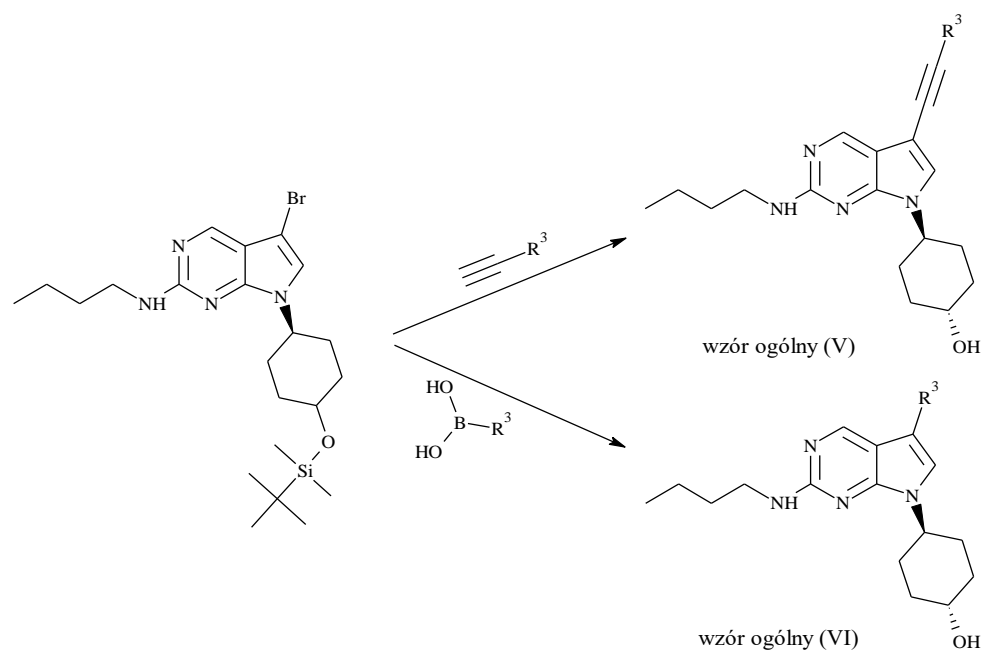
MS-APCI: m/z 482.6 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 5.02 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.45 (tt, *J* = 12.1, 3.8 Hz, 1H), 3.66 (tt, *J* = 10.6, 4.2 Hz, 1H), 3.43 (td, *J* = 7.1, 5.8 Hz, 2H), 2.04 – 1.96 (m, 4H), 1.80 – 1.71 (m, 2H), 1.63 – 1.57 (m, 2H), 1.57 – 1.50 (m, 2H), 1.46 – 1.38 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.91 – 0.88 (m, 9H), 0.09 – 0.06 (m, 6H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 159.71 (s), 151.93 (s), 149.99 (s), 120.81 (s), 113.25 – 112.07 (m), 88.14 (s), 70.56 (s), 52.48 (s), 41.56 (s), 34.94 (s), 31.89 (s), 30.88 (s), 25.94 (s), 20.24 (s), 13.97 (s), -4.55 (s).

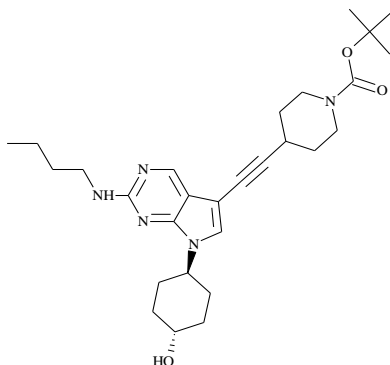
Reakcja krzyżowego sprzęgania Sonogashiry 5-bromo-*N*-butylo-7-{4-[(*tert*-butyldimetylosililo)oksy]cykloheksylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (2) i w kolejnym kroku odbezpieczanie grupy zabezpieczającej umożliwia otrzymanie oczekiwanych związków o wzorze ogólnym (V) (Schemat 10). Wzór ten dotyczy struktur o numerach (64-96)

Z kolei reakcja Suzuki półproduktu **39** zgodnie z opisaną już procedurą (3) i w następnym kroku odbezpieczanie grupy zabezpieczającej pozwala na otrzymanie oczekiwanych związków o wzorze ogólnym (VI) (Schemat 10). Wzór ten opisuje związki o numerach (97-118).



Schemat 10: Metody otrzymania związków o wzorach ogólnych (V i VI).

***tert*-butylo 4-{2-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]etynylo}piperidyno-1-karboksylan, (64)**



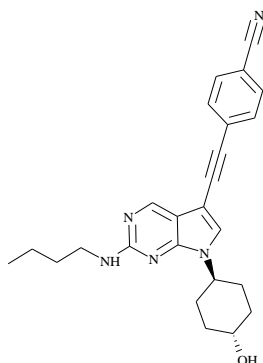
Tytułowy związek otrzymałam zgodnie z procedurą (2) w postaci czerwonego osadu (30.1 mg, 77.5%).

MS-APCI: m/z 496.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.40 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 4.57 – 4.43 (m, 1H), 3.87 – 3.76 (m, 2H), 3.76 – 3.66 (m, 1H), 3.46 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.33 – 3.24 (m, 2H), 2.97 – 2.87 (m, 1H), 2.19 – 2.09 (m, 2H), 2.08 – 1.99 (m, 3H), 1.99 – 1.87 (m, 3H), 1.74 – 1.63 (m, 4H), 1.57 – 1.44 (m, 13H), 1.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 155.02 (s), 152.85 (s), 133.36 (s), 129.43 (s), 115.59 (s), 80.96 (s), 79.43 (s), 70.89 (s), 67.17 (s), 55.91 (s), 43.66 (s), 43.35 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.30 (s), 27.65 (s), 27.26 (s), 23.19 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

4-{2-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]etynylo}benzonitryl, (65)



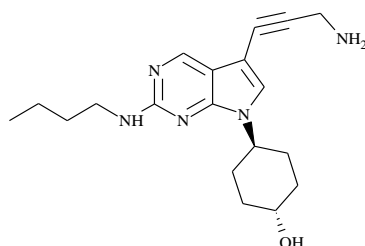
Tytułowy związek wytworzono zgodnie z powyższą ogólną procedurą (2) w postaci pomarańczowego osadu (56.4 mg, 22 %).

MS-APCI: m/z 414.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.53 (s, 1H), 7.53 (q, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.13 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.45 (t, $J = 11.9$ Hz, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.41 (dd, $J = 12.9, 6.7$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 11.9$ Hz, 4H), 1.78 (dd, $J = 23.5, 11.3$ Hz, 2H), 1.66 – 1.52 (m, 4H), 1.40 (dt, $J = 14.7, 7.3$ Hz, 2H), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 159.53 (s), 152.38 (s), 149.94 (s), 131.75 (s), 128.63 (s), 126.85 (s), 119.64 (s), 118.53 (s), 111.68 (s), 110.84 (s), 95.38 (s), 89.78 (s), 86.93 (s), 69.65 (s), 52.57 (s), 41.44 (s), 34.40 (s), 31.71 (s), 30.48 (s), 20.10 (s), 13.79 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(3-aminoprop-1-yn-1-ylo)-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (66)



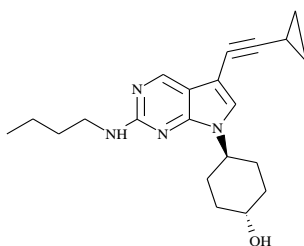
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z ogólną procedurą (2) w postaci białego osadu (30.9 mg, 100 %).

MS-APCI: m/z 342.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.33 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.23 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 3.43 (s, 3H), 1.79 (dd, J = 23.5, 11.4 Hz, 6H), 1.42 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.32 – 1.10 (m, 7H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 134.75 (s), 134.54 (s), 132.87 (s), 132.66 (s), 129.38 (s), 126.43 (s), 122.72 (s), 119.78 (s), 115.59 (s), 109.73 (s), 82.82 (s), 77.29 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2-cyklopropyloetynylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (67)



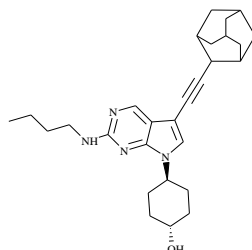
Tytułowy związek uzyskałam zgodnie z ogólną procedurą (2) w postaci delikatnie żółtej substancji stałej (77 mg, 87.1 %).

MS-APCI: m/z 353.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.11 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.54 – 4.39 (m, 1H), 3.82 – 3.67 (m, 1H), 3.46 (dd, J = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.18 – 2.01 (m, 4H), 1.87 – 1.70 (m, 2H), 1.68 – 1.50 (m, 5H), 1.45 (dd, J = 15.6, 7.6 Hz, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.91 – 0.78 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 133.36 (s), 122.64 (s), 115.59 (s), 79.43 (s), 70.89 (s), 56.19 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 16.18 (s), 15.78 (s), 14.02 (s), -1.47 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-[2-(adamantan-2-yl)etynylo]-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (68)



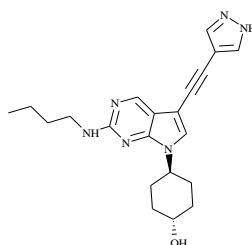
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci białego osadu (70.1 mg, 30.2%).

MS-APCI: m/z 447.7 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.49 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.95 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.54 – 4.39 (m, 1H), 3.81 – 3.65 (m, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 2.18 – 1.95 (m, 12H), 1.86 – 1.69 (m, 7H), 1.66 – 1.58 (m, 4H), 1.58 – 1.50 (m, 2H), 1.49 – 1.37 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 133.36 (s), 127.25 (s), 115.59 (s), 79.43 (s), 73.94 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 37.49 (s), 37.09 (s), 35.90 (s), 32.58 (s), 32.20 (s), 32.20 – 32.10 (m), 30.87 (s), 29.75 – 29.54 (m), 28.68 – 28.29 (m), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(1*H*-pirazol-4-ilo)etynylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (69)



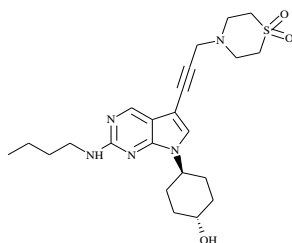
Powyższy związek uzyskałam postępując według procedury (2) w postaci żółtego osadu (26.9 mg, 11.4%).

MS-APCI: m/z 379.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.36 (s, 1H), 7.69 (s, 2H), 7.24 (s, 1H), 4.39 (dt, J = 10.0, 5.7 Hz, 1H), 3.66 – 3.50 (m, 1H), 3.34 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.11 – 1.78 (m, 6H), 1.62 – 1.31 (m, 7H), 0.97 – 0.84 (m, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 134.53 (s), 134.14 (s), 131.32 (s), 116.55 (s), 115.59 (s), 99.55 (s), 81.50 (s), 77.80 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

4-{3-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]prop-2-yn-1-yl}-1λ⁶-tiomorfolino-1,1-dion, (70)



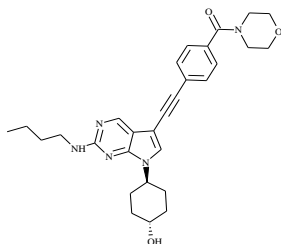
Tytułowy związek uzyskałam wykorzystując do tego celu procedurę (2) w postaci brązowego osadu (349.6 mg, 90%).

MS-APCI: m/z 461.0 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.58 – 4.40 (m, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.50 – 3.40 (m, 2H), 3.15 (d, J = 2.7 Hz, 5H), 3.09 (s, 2H), 2.21 – 1.99 (m, 4H), 1.81 (dd, J = 23.4, 11.5 Hz, 4H), 1.62 (dd, J = 14.6, 7.4 Hz, 5H), 1.44 (dd, J = 15.0, 7.7 Hz, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 108.32 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 64.69 (s), 55.91 (s), 52.81 (s), 52.41 (s), 47.31 (s), 47.09 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{2-[4-(morfolino-4-karbonylo)fenylo]etynylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (71)



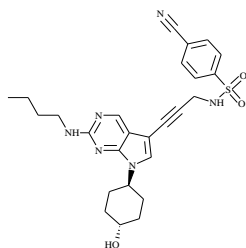
Powyższy związek opracowany został przy zastosowaniu procedury (2) w postaci żółtego osadu (118 mg, 37.9%)

MS-APCI: m/z 502.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.61 (s, 1H), 7.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 5.02 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.51 (t, J = 12.0 Hz, 1H), 3.71 (br m, 9H), 3.47 (q, J = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.13 (t, J = 12.0 Hz, 4H), 1.84 (q, 2H), 1.70 – 1.56 (m, J = 11.1 Hz, 4H), 1.52 – 1.39 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.36 (s), 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 135.68 (s), 132.82 (s), 132.61 (s), 129.38 (s), 128.85 (s), 128.63 (s), 126.43 (s), 122.94 (s), 115.59 (s), 82.82 (s), 77.29 (s), 70.89 (s), 67.41 (s), 67.01 (s), 55.91 (s), 44.59 (s), 44.20 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

***N*-{3-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]prop-2-yn-1-yl}-4-cyjanobenzeno-1-sulfonamid, (72)**



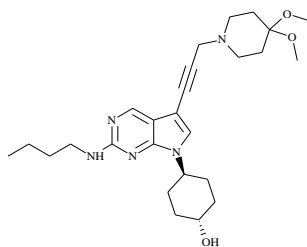
Tytułowy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (60 mg, 20.8%).

MS-APCI: m/z 507.9 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.15 (s, 1H), 8.07 – 8.01 (m, 2H), 7.81 – 7.75 (m, 2H), 7.04 (s, 1H), 4.52 – 4.36 (m, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.78 – 3.61 (m, 1H), 3.42 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.65 (s, 1H), 2.16 – 1.85 (m, 6H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.52 – 1.38 (m, 4H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 148.41 (s), 133.79 (s), 133.58 (s), 132.04 (s), 129.82 (s), 129.43 (s), 119.78 (s), 118.58 (s), 115.59 (s), 105.41 (s), 79.81 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.83 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-(4,4-dimetoksy-piperydyn-1-ylo)prop-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (73)



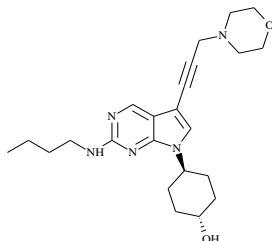
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (51.54 mg, 20.9%)

MS-APCI: m/z 470.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 5.07 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.54 – 4.41 (m, 1H), 3.81 – 3.71 (m, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.52 – 3.40 (m, 2H), 2.96 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 2.54 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 2.21 – 2.02 (m, 4H), 1.90 – 1.71 (m, 2H), 1.70 – 1.52 (m, 4H), 1.52 – 1.37 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 108.32 (s), 103.31 (s), 78.43 (s), 76.98 (s), 70.89 (s), 64.69 (s), 55.91 (s), 49.56 (s), 49.35 (s), 48.90 (s), 48.51 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 34.73 (s), 34.51 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-(morfolin-4-ylo)prop-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]piry-
midyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (74)**



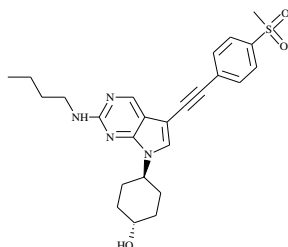
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci brązowego osadu (399 mg, 61.2%).

MS-APCI: m/z 412.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.52 – 4.40 (m, 1H), 3.81 – 3.75 (m, 5H), 3.55 (s, 2H), 3.48 – 3.41 (m, 2H), 2.69 – 2.61 (m, 4H), 2.11 (t, $J = 15.6$ Hz, 5H), 1.81 (dd, $J = 18.8, 6.8$ Hz, 4H), 1.69 – 1.36 (m, 8H), 0.96 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 108.32 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 68.04 (s), 67.82 (s), 64.69 (s), 55.91 (s), 51.99 (s), 51.60 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

**(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(4-metanosulfonylofenylo)etynylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-
pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (75)**



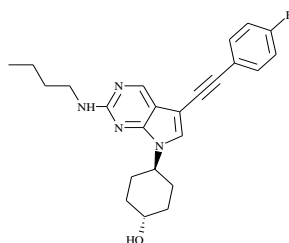
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci w postaci żółtego osadu (80 mg, 27.5%).

MS-APCI: m/z 467.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.51 (t, J = 11.9 Hz, 1H), 3.77 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 3.48 (dd, J = 12.9, 6.9 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.14 (t, J = 12.1 Hz, 4H), 1.93 – 1.76 (m, J = 25.3, 12.8 Hz, 2H), 1.70 – 1.54 (m, 4H), 1.52 – 1.39 (m, J = 14.1, 7.2 Hz, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 150.30 (s), 130.46 (s), 130.24 (s), 129.38 (s), 128.55 (s), 127.63 (s), 127.23 (s), 126.43 (s), 115.59 (s), 82.82 (s), 77.29 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 43.05 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

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



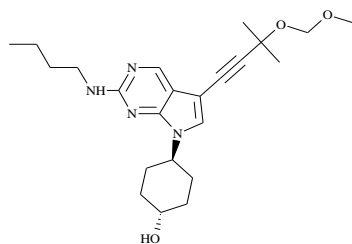
Powyższy związek opracowany został przy zastosowaniu procedury (2) w postaci brązowego osadu (56 mg, 9.57%)

MS-APCI: m/z 407.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.94 (s, 1H), 7.15 – 7.04 (m, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.91 – 6.76 (m, 3H), 5.27 (s, 1H), 4.47 (ddd, J = 15.6, 8.0, 3.8 Hz, 1H), 3.82 – 3.64 (m, 1H), 3.42 (td, J = 7.0, 5.8 Hz, 2H), 2.18 – 2.01 (m, 4H), 1.73 (dt, J = 15.3, 6.5 Hz, 2H), 1.67 – 1.50 (m, 4H), 1.50 – 1.36 (m, 2H), 0.95 (t, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.36 (s), 161.15 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 133.02 (s), 132.36 (s), 129.38 (s), 126.43 (s), 116.16 (s), 115.53 (s), 115.44 (s), 82.82 (s), 77.29 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-(metoksymetoksy)-3-metylobut-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (77)



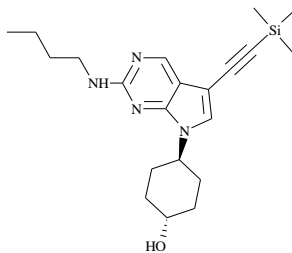
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtej substancji oleistej (200 mg, 73.7%).

MS-APCI: m/z 415.6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.27 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.57 – 4.44 (m, 1H), 3.89 – 3.64 (m, 2H), 3.51 (dd, J = 12.8, 6.9 Hz, 3H), 2.28 – 2.04 (m, 6H), 1.99 – 1.75 (m, 4H), 1.75 – 1.38 (m, 9H), 1.01 (t, J = 7.3 Hz, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 134.52 (s), 115.59 (s), 114.23 (s), 92.33 (s), 80.28 (s), 72.95 (s), 70.89 (s), 70.53 (s), 55.91 (s), 55.45 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 31.07 (s), 30.52 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (78)



Tytułowy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (41.8 mg, 17.7%).

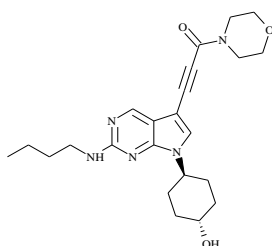
MS-APCI: m/z 385.7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.53 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 5.12 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 4.46 (tt, J = 11.9, 3.8 Hz, 1H), 3.81 – 3.66 (m, 1H), 3.45 (td, J = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.11 (dd, J = 26.6, 11.1

Hz, 4H), 1.77 (dt, J = 16.1, 6.5 Hz, 2H), 1.61 (tdd, J = 23.7, 13.4, 10.1 Hz, 4H), 1.49 – 1.36 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.25 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 130.69 (s), 115.59 (s), 100.18 (s), 90.18 (s), 72.55 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s), 0.34 (s), -0.06 (s).

3-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]-1-(morfolin-4-ylo)prop -2-yn-1-on, (79)



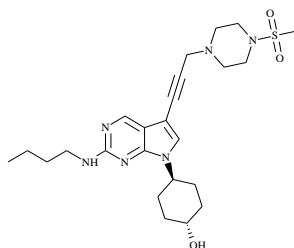
Powyższy związek opracowany została przy zastosowaniu procedury (2) w postaci pomarańczowego osadu (12.4 mg, 5.12%).

MS-APCI: m/z 426.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.53 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 4.57 – 4.43 (m, 1H), 3.93 – 3.84 (m, 2H), 3.79 – 3.73 (m, 2H), 3.70 – 3.63 (m, 5H), 3.42 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.17 – 1.88 (m, 6H), 1.68 – 1.59 (m, 2H), 1.54 – 1.38 (m, 4H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 159.24 (s), 153.58 (s), 152.05 (s), 149.08 (s), 130.13 (s), 91.97 (s), 85.96 (s), 82.13 (s), 68.24 (s), 65.99 (s), 65.49 (s), 52.78 (s), 41.29 (s), 40.32 (s), 33.30 (s), 30.79 (s), 29.40 (s), 19.26 (s), 12.31 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-(4-metanosulfonylopiperazyn-1-ylo)prop-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*] pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (80)



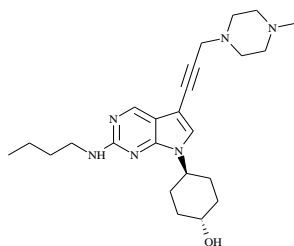
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (2) w postaci beżowego osadu (109 mg, 39.2%).

MS-APCI: m/z 489.9 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 4.48 (ddd, $J = 15.6, 7.9, 3.7$ Hz, 1H), 3.83 – 3.69 (m, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.46 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.37 – 3.27 (m, 4H), 2.79 (s, 3H), 2.78 – 2.72 (m, 4H), 2.12 (dd, $J = 23.3, 8.8$ Hz, 4H), 1.80 (dt, $J = 15.7, 6.5$ Hz, 2H), 1.61 (dt, $J = 22.6, 9.3$ Hz, 4H), 1.45 (dq, $J = 14.3, 7.2$ Hz, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 108.32 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 64.69 (s), 55.91 (s), 53.30 (s), 52.90 (s), 45.16 (s), 44.85 (s), 41.53 (s), 39.61 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-(4-metylopiperazyn-1-ylo)prop-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*] pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (81)



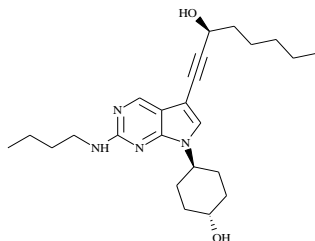
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci pomarańczowego osadu (93 mg, 20.7%).

MS-APCI: m/z 425.7 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.39 (d, $J = 19.3$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.81 – 3.62 (m, 3H), 3.54 – 3.42 (m, 3H), 2.86 (s, 8H), 2.56 (s, 3H), 2.06 (dt, $J = 19.1, 13.0$ Hz, 6H), 1.67 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.60 – 1.43 (m, 4H), 1.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 108.32 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 64.69 (s), 55.91 (s), 54.46 (s), 54.06 (s), 52.92 (s), 52.52 (s), 45.96 (s), 41.53 (s), 39.69 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[(3*S*)-3-hydroksyokt-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (82)



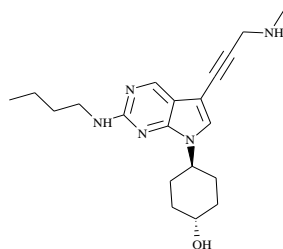
Powyższy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (2) w postaci żółtego osadu (43.8 mg, 17%).

MS-APCI: m/z 413.6 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.53 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.03 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.62 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.46 (t, $J = 11.9$ Hz, 1H), 3.74 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 2.19 – 2.02 (m, 4H), 1.86 – 1.75 (m, 4H), 1.66 – 1.51 (m, 6H), 1.44 (dd, $J = 15.1, 7.5$ Hz, 2H), 1.35 (dd, $J = 7.3, 3.6$ Hz, 4H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 133.36 (s), 127.63 (s), 115.59 (s), 79.43 (s), 78.50 (s), 70.89 (s), 62.01 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 37.76 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 31.51 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 25.34 (s), 22.94 (s), 20.23 (s), 14.13 (s), 13.81 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-(metyloamino)prop-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (83)



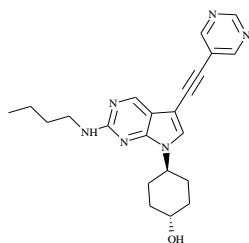
Tytułowy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (28.3 mg, 12.8%).

MS-APCI: m/z 356.5 $[M+H]^+$

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.40 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 4.46 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.67 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.09 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 2.03 – 1.86 (m, 4H), 1.63 (dt, *J* = 14.4, 7.1 Hz, 2H), 1.56 – 1.37 (m, 4H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 109.73 (s), 78.43 (s), 74.21 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 36.45 (s), 35.99 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

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



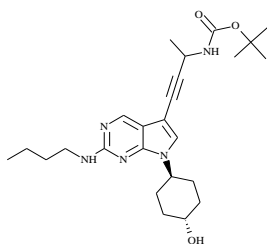
Powyższy związek otrzymałam przy zastosowaniu procedury (2) w postaci białego osadu (4.7 mg, 1%).

MS-APCI: *m/z* 391.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.06 (s, 1H), 8.78 (s, 2H), 8.55 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.56 – 4.35 (m, 1H), 3.70 (dd, *J* = 9.6, 5.4 Hz, 1H), 3.51 – 3.30 (m, 2H), 2.16 – 2.01 (m, 4H), 1.77 (dd, *J* = 13.9, 11.0 Hz, 2H), 1.56 (ddd, *J* = 20.5, 10.2, 3.0 Hz, 4H), 1.40 (dd, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 2H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 163.85 (s), 161.26 (s), 157.74 (s), 155.96 (s), 155.75 (s), 152.85 (s), 129.38 (s), 121.10 (s), 115.59 (s), 113.94 (s), 77.29 (s), 72.69 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 – 32.19 (m), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

***tert*-butylo-*N*-{4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-5-ylo]but-3-yn -2-ylo}karbaminian, (85)**



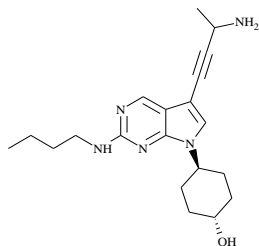
Powyższy związek otrzymałam w wyniku zastosowania procedury (2) w postaci pomarańczowego osadu (250 mg, 88%).

MS-APCI: m/z 456.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.51 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 5.00 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.85 – 4.69 (m, 2H), 4.46 (tt, J = 11.9, 3.9 Hz, 1H), 3.81 – 3.66 (m, J = 4.2 Hz, 1H), 3.45 (td, J = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.20 – 2.01 (m, 4H), 1.91 – 1.66 (m, 4H), 1.66 – 1.54 (m, 4H), 1.49 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 155.84 (s), 152.85 (s), 133.36 (s), 117.90 (s), 115.59 (s), 80.65 (s), 79.43 (s), 70.89 (s), 69.69 (s), 55.91 (s), 44.43 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.30 (s), 22.47 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(3-aminobut-1-yn-1-ylo)-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (86)



Wykorzystanie procedury (2) umożliwiło otrzymanie powyższego związku w postaci kremowego osadu (39.1 mg, 31.2%).

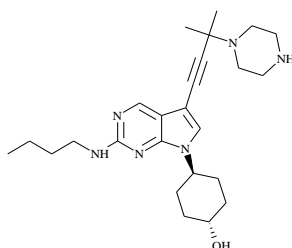
MS-APCI: m/z 356.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.48 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.80 – 4.65 (m, 1H), 4.49 – 4.32 (m, 1H), 3.89 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 3.57 (s, 1H), 3.35 (dd, J = 13.0, 6.9 Hz, 2H),

2.40 – 2.16 (m, 2H), 1.96 (dd, J = 23.8, 11.8 Hz, 6H), 1.67 – 1.53 (m, 2H), 1.48 – 1.34 (m, 7H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 133.36 (s), 115.59 (s), 114.18 (s), 79.48 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.51 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 24.35 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[3-metylo-3-(piperazyn-1-ylo)but-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (87)



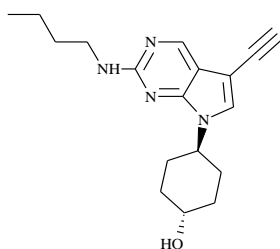
Powyższy związek otrzymałam wykorzystując procedurę (2) w postaci jasnożółtego osadu (50 mg, 35.1%).

MS-APCI: m/z 439.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.53 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.98 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.47 (t, J = 12.0 Hz, 1H), 3.74 (t, J = 10.8 Hz, 1H), 3.46 (dd, J = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 3.05 – 2.91 (m, 4H), 2.80 – 2.66 (m, 4H), 2.09 (dd, J = 23.7, 12.9 Hz, 4H), 1.83 – 1.69 (m, 2H), 1.67 – 1.50 (m, 4H), 1.49 (s, 6H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 134.52 (s), 115.59 (s), 97.33 (s), 80.28 (s), 70.84 (s), 65.37 (s), 55.91 (s), 48.14 (s), 47.74 (s), 45.56 (s), 45.25 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 31.55 (s), 31.16 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-etynylo-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (88)



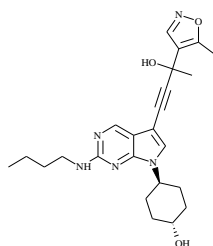
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci białego osadu (3.1 mg, 35.9%).

MS-APCI: m/z 313.5 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.55 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.56 – 4.40 (m, 1H), 3.74 (dt, $J = 15.1, 5.4$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 3.14 (s, 1H), 2.20 – 2.03 (m, 4H), 1.91 – 1.73 (m, 3H), 1.70 – 1.52 (m, 4H), 1.44 (dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 161.79 (s), 157.05 (s), 152.67 (s), 135.32 (s), 131.56 (s), 115.59 (s), 85.25 (s), 74.26 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

4-[2-(butyloamino)-5-[3-hydroksy-3-(5-metylo-1,2-oksazol-4-ilo)but-1-yn-1-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (89)



Powyższy związek otrzymałam wykorzystując procedurę (2) w postaci pomarańczowego osadu (42 mg, 23.1%).

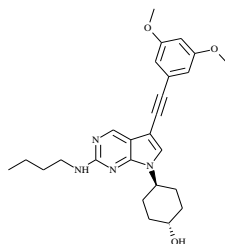
MS-APCI: m/z 438.7 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.52 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.16 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 5.36 (s, 1H), 4.55 – 4.38 (m, 1H), 3.83 – 3.64 (m, 1H), 3.44 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 2.44 (d, $J = 0.8$

Hz, 3H), 2.19 – 2.00 (m, 5H), 1.96 (s, 3H), 1.87 – 1.70 (m, 2H), 1.69 – 1.55 (m, 4H), 1.44 (dd, J = 15.1, 7.5 Hz, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 167.27 (s), 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 147.30 (s), 134.52 (s), 132.85 (s), 131.84 (s), 115.59 (s), 92.57 (s), 80.28 (s), 70.89 (s), 61.20 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 31.70 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s), 13.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(3,5-dimetoksyfenylo)etynylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (90)



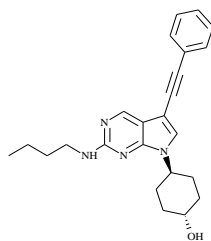
Tytułowy związek uzyskałam stosując procedurę (2) w postaci jasnożółtego osadu (45.2 mg, 42.3%).

MS-APCI: m/z 449.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.62 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.69 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.46 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 5.17 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.58 – 4.44 (m, 1H), 3.82 (s, 6H), 3.79 – 3.71 (m, 1H), 3.48 (dd, J = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.24 – 2.06 (m, 4H), 1.93 – 1.76 (m, 2H), 1.71 – 1.56 (m, 4H), 1.53 – 1.39 (m, 2H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 159.44 (s), 159.23 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 129.38 (s), 127.48 (s), 124.68 (s), 115.59 (s), 106.12 (s), 105.72 (s), 102.85 (s), 88.39 (s), 77.29 (s), 70.89 (s), 56.23 (s), 55.70 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2-fenyletynylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (91)



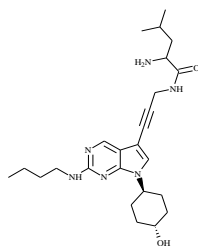
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci żółtego osadu (80.3 mg, 39.8%).

MS-APCI: m/z 389.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.62 (s, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 2H), 7.40 – 7.30 (m, 3H), 7.15 (s, 1H), 5.17 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.59 – 4.43 (m, 1H), 3.84 – 3.71 (m, 1H), 3.48 (dd, J = 12.8, 7.0 Hz, 2H), 2.23 – 2.06 (m, 4H), 1.93 – 1.77 (m, 2H), 1.71 – 1.54 (m, 4H), 1.53 – 1.40 (m, 2H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 131.64 (s), 131.24 (s), 129.38 (s), 128.79 (s), 128.42 (s), 126.43 (s), 122.56 (s), 115.59 (s), 82.82 (s), 77.29 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

2-amino-N-{3-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]prop-2-yn-1-yl}-4-metylopentanamid, (92)



Powyższy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (2) w postaci kremowego osadu (90 mg, 85.1%).

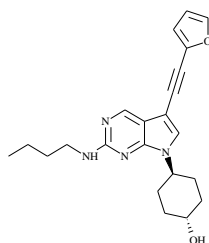
MS-APCI: m/z 455.7 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.41 (s, 1H), 8.29 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.90 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.43 – 4.26 (m, 1H), 4.11 (d,

$J = 5.3$ Hz, 2H), 3.98 (dd, $J = 14.6, 8.8$ Hz, 1H), 3.51 (dt, $J = 15.3, 8.0$ Hz, 1H), 3.34 – 3.23 (m, 2H), 1.89 (dd, $J = 23.6, 11.0$ Hz, 6H), 1.69 – 1.47 (m, 3H), 1.47 – 1.22 (m, 15H), 0.95 – 0.81 (m, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 174.37 (s), 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 111.20 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 64.51 (s), 55.91 (s), 49.97 (s), 43.07 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 25.20 (s), 23.34 (s), 22.94 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(furan-2-yl)etynylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (93)



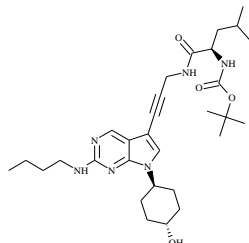
Tytułowy związek uzyskałam w oparciu o procedurę (2) w postaci żółtego osadu (41.8 mg, 17.7%).

MS-APCI: m/z 379.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.52 (s, 1H), 7.35 (dd, $J = 1.9, 0.7$ Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.55 (dd, $J = 3.4, 0.7$ Hz, 1H), 6.35 (dd, $J = 3.4, 1.9$ Hz, 1H), 5.04 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.43 (ddd, $J = 15.7, 8.0, 3.7$ Hz, 1H), 3.76 – 3.61 (m, 1H), 3.39 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 2.05 (dd, $J = 14.3, 11.1$ Hz, 5H), 1.74 (dt, $J = 15.9, 6.5$ Hz, 3H), 1.63 – 1.48 (m, 3H), 1.37 (dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 2H), 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 159.56 (s), 152.21 (s), 150.25 (s), 143.28 (s), 137.50 (s), 126.52 (s), 114.65 (s), 111.74 (s), 110.91 (s), 95.26 (s), 85.93 (s), 80.65 (s), 69.64 (s), 52.48 (s), 41.43 (s), 34.41 (s), 31.73 (s), 30.46 (s), 20.10 (s), 13.79 (s).

***tert*-butylo-*N*-[1-({3-[2-(butyloamino)-7-(4-hydroksycykloheksylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]piry-
midyn-5-ylo]prop-2-yn-1-ylo}karbamoilo)-3-metylobutyl], (94)**



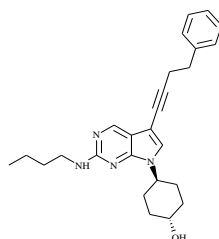
Tytułowy związek uzyskałam w oparciu o procedurę (2) w postaci pomarańczowego osadu (129 mg, 37.3%).

MS-APCI: m/z 555.9 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.41 (s, 1H), 8.29 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.90 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.43 – 4.26 (m, 1H), 4.11 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.98 (dd, $J = 14.6, 8.8$ Hz, 1H), 3.51 (dt, $J = 15.3, 8.0$ Hz, 1H), 3.34 – 3.23 (m, 2H), 1.89 (dd, $J = 23.6, 11.0$ Hz, 6H), 1.69 – 1.47 (m, 3H), 1.47 – 1.22 (m, 15H), 0.95 – 0.81 (m, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 174.53 (s), 161.26 (s), 158.31 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 111.20 (s), 80.65 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 64.51 (s), 55.91 (s), 51.68 (s), 41.53 (s), 40.44 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.30 (s), 25.39 (s), 23.34 (s), 22.94 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

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



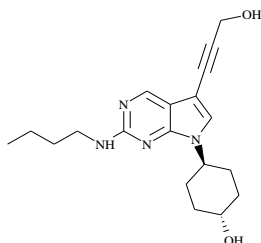
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (2) w postaci jasnożółtego osadu (85 mg, 51.5%).

MS-APCI: m/z 417.5 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.41 (s, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 5H), 6.97 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.53 – 4.39 (m, 1H), 3.83 – 3.68 (m, 1H), 3.46 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 2H), 2.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.23 – 2.01 (m, 4H), 1.89 – 1.72 (m, 2H), 1.70 – 1.55 (m, 4H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 140.90 (s), 132.04 (s), 129.07 (s), 128.59 (s), 126.54 (s), 120.86 (s), 115.59 (s), 78.43 (s), 72.23 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 34.38 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 19.95 (s), 14.02 (s).

4-[2-(butyloamino)-5-(3-hydroksyprop-1-yn-1-ylo)-7H-pirololo[2,3-d]pirymidyn-7-ylo]-cykloheksan-1-ol, (96)



Powyższy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (2) w postaci jasnożółtego osadu (11 mg, 29.2%).

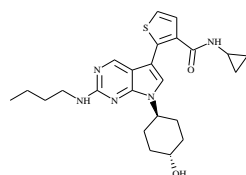
MS-APCI: m/z 343.5 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.45 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.56 – 4.47 (m, 1H), 4.46 (s, 2H), 3.79 – 3.65 (m, 1H), 3.45 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.13 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 2.07 – 1.93 (m, 4H), 1.73 – 1.61 (m, 2H), 1.57 – 1.41 (m, 4H), 1.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 122.34 (s), 115.59 (s), 78.43 (s), 73.48 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 50.29 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Związki o numerach (97-118) to pochodne pirolopirymidynowe o przedstawianym już wcześniej wzorze ogólnym (VI) zsyntezowane w reakcji Suzuki.

2-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]-*N*-cyklopropylotiofeno-3-karboksyamid, (97)



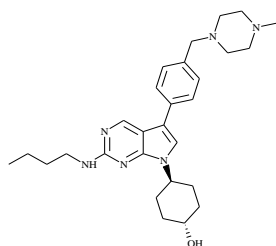
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (3) w postaci jasnoczerwonego osadu (20 mg, 4%).

MS-APCI: m/z 454.6 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 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).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 168.76 (s), 158.99 (s), 156.29 (s), 154.83 (s), 142.11 (s), 131.49 (s), 130.84 (s), 130.29 (s), 123.42 (s), 113.97 (s), 111.93 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 25.58 (s), 20.23 (s), 14.02 (s), 9.02 (s), 8.71 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-yl)metylo]fenylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (32)



Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci białego osadu (104 mg, 9.71%).

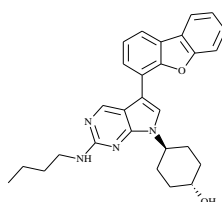
MS-APCI: m/z 477.8 $[M+H]^+$

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 8.76 (s, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 2H), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 5.08 – 4.97 (m, 1H), 4.51 (tt, $J = 12.0, 3.8$ Hz, 1H), 3.74 (tt, $J = 11.0, 4.2$ Hz, 1H),

3.51 (s, 2H), 3.45 (dt, $J = 14.4, 7.2$ Hz, 2H), 2.39 (dd, $J = 38.3, 33.0$ Hz, 8H), 2.30 – 2.22 (m, 3H), 2.17 – 2.05 (m, 4H), 1.85 (tt, $J = 13.0, 6.6$ Hz, 2H), 1.65 – 1.58 (m, 2H), 1.57 – 1.52 (m, 2H), 1.43 (dq, $J = 14.6, 7.4$ Hz, 2H), 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 159.20 (s), 153.28 (s), 150.33 (s), 136.22 (s), 133.37 (s), 129.92 (s), 126.36 (s), 118.62 (s), 115.85 (s), 110.20 (s), 69.82 (s), 62.83 (s), 55.17 (s), 53.11 (s), 52.17 (s), 46.07 (s), 41.59 (s), 34.71 (s), 31.98 (s), 30.72 (s), 20.27 (s), 14.00 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{8-oksatricyklo[7.4.0.0²,7]trideka-1(9),2,4,6,10,12-heksaen-6-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (98)



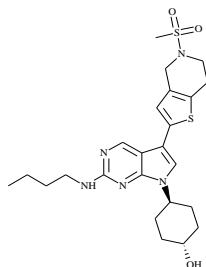
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (3) w postaci brązowej substancji oleistej (23 mg, ok.10.0 %).

MS-APCI: m/z 455.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 8.44 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.16 – 8.11 (m, 1H), 7.73 (dd, $J = 24.0, 8.3$ Hz, 1H), 7.62 – 7.41 (m, 5H), 6.37 (d, $J = 27.5$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 14.1, 6.7$ Hz, 2H), 3.53 – 3.43 (m, 3H), 3.02 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 2.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 1.88 (s, 2H), 1.70 (dd, $J = 14.3, 5.3$ Hz, 4H), 1.58 – 1.45 (m, 5H), 1.09 – 1.00 (m, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 157.35 (s), 154.48 (s), 149.99 (s), 149.77 (s), 129.55 (s), 128.84 (s), 128.58 (s), 125.75 (s), 123.15 (s), 122.58 (s), 122.18 (s), 120.29 (s), 116.97 (s), 113.70 (s), 111.77 (s), 110.77 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (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-yl}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (99)



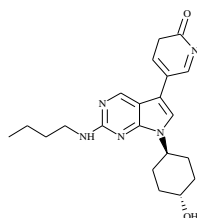
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci pomarańczowego osadu (126 mg, 25.1%).

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).

5-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroxycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]-2,3-dihydropirydyn-2-on, (100)



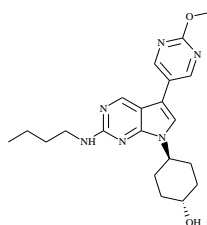
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci kremowego osadu (3.7 mg, 1.6%).

MS-APCI: m/z 382.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.47 (s, 1H), 7.71 (ddd, J = 9.3, 6.7, 2.1 Hz, 1H), 7.59 (ddd, J = 6.9, 2.1, 0.8 Hz, 1H), 6.70 – 6.63 (m, 1H), 6.50 (td, J = 6.8, 1.3 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 3.46 – 3.36 (m, 2H), 2.77 (dd, J = 23.0, 10.7 Hz, 1H), 2.45 – 2.16 (m, 1H), 2.12 – 1.93 (m, 4H), 1.79 – 1.56 (m, 4H), 1.53 – 1.34 (m, 4H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 170.08 (s), 158.40 (s), 155.35 (s), 155.08 (s), 153.84 (s), 126.62 (s), 125.40 (s), 116.17 (s), 114.82 (s), 112.17 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 30.52 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2-metoksypirymidyn-5-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (101)



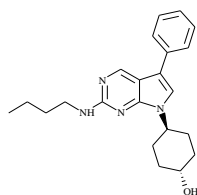
Powyższy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (3) w postaci kremowego osadu (7 mg, 2.83%).

MS-APCI: m/z 397.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.71 (s, 2H), 8.67 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 5.10 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.55 (ddd, J = 12.0, 8.2, 3.8 Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 3.78 (ddd, J = 11.0, 7.6, 4.1 Hz, 1H), 3.53 – 3.44 (m, 2H), 2.14 (d, J = 12.2 Hz, 4H), 1.90 (dd, J = 12.3, 3.3 Hz, 2H), 1.62 (ddd, J = 16.0, 10.0, 5.5 Hz, 4H), 1.49 – 1.41 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 163.67 (s), 157.35 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 149.06 (s), 148.85 (s), 125.38 (s), 119.98 (s), 113.86 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 54.17 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-fenyl-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (102)



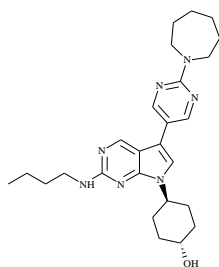
Powyzszy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci białego osadu (50 mg, 20.8%).

MS-APCI: m/z 365.6 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.77 (s, 1H), 7.61 – 7.53 (m, 2H), 7.42 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 5.16 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.55 (t, $J = 12.0$ Hz, 1H), 3.78 (t, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz, 2H), 2.15 (t, $J = 10.5$ Hz, 4H), 1.90 (dd, $J = 16.0, 13.4, 3.7$ Hz, 2H), 1.71 – 1.55 (m, 4H), 1.53 – 1.40 (m, $J = 14.6, 7.2$ Hz, 2H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 157.35 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 137.15 (s), 128.78 (s)–128.56 (s), 127.49 (s), 127.09 (s), 126.43 (s), 125.39 (s), 119.92 (s), 113.86 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 43.46 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 22.40 (s), 11.70 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-[2-(azepan-1-yl)pirymidyn-5-yl]-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (103)



Tytułowy związek otrzymałam wykorzystując do tego celu procedurę (3) w postaci beżowego osadu (180 mg, 58.9%).

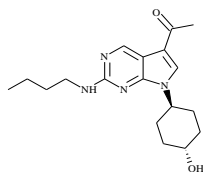
MS-APCI: m/z 464.9 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.63 (s, 1H), 8.51 (s, 2H), 6.91 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.53 (ddd, $J = 15.6, 8.0, 3.7$ Hz, 1H), 3.82 – 3.73 (m, 4H), 3.48 (dd, $J = 12.9, 6.9$ Hz, 2H), 2.14 (dd, $J =$

13.7, 10.8 Hz, 4H), 1.96 – 1.77 (m, 6H), 1.68 – 1.55 (m, 8H), 1.45 (dd, J = 15.0, 7.4 Hz, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.87 (dd, J = 14.8, 7.6 Hz, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 160.35 (s), 158.56 (s), 155.44 (s), 153.08 (s), 148.79 (s), 117.51 (s), 115.63 (s), 110.67 (s), 110.00 (s), 69.75 (s), 52.34 (s), 47.14 (s), 41.42 (s), 37.04 (s), 34.53 (s), 31.80 (s), 30.44 (s), 29.62 (s), 27.88 (s), 27.27 (s), 20.11 (s), 13.81 (s).

1-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]etan-1-on, (104)



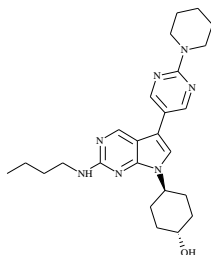
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (3) w postaci beżowego osadu (138 mg, 45.8%).

MS-APCI: m/z 331.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.06 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 5.29 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 4.52 (tt, J = 12.0, 3.7 Hz, 1H), 3.87 – 3.71 (m, 1H), 3.46 (dd, J = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.16 (dd, J = 12.0, 8.3 Hz, 4H), 1.88 (ddd, J = 15.7, 13.3, 3.7 Hz, 2H), 1.70 – 1.54 (m, 4H), 1.44 (dq, J = 14.0, 7.1 Hz, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 193.46 (s), 158.07 (s), 152.64 (s), 150.96 (s), 127.81 (s), 119.48 (s), 115.68 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 29.05 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(piperydyn-1-ylo)pirymidyn-5-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (105)



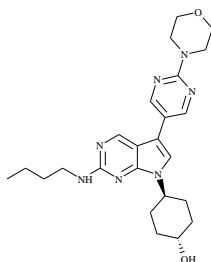
W otrzymaniu powyższego związku zastosowałam procedurę (3), dzięki niej otrzymałam oczekiwany związek w postaci beżowego osadu (152 mg, 63%).

MS-APCI: m/z 450.6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.64 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.98 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.59 – 4.46 (m, 1H), 3.89 – 3.73 (m, 5H), 3.53 – 3.43 (m, 2H), 2.22 – 2.07 (m, 4H), 1.99 – 1.82 (m, 2H), 1.76 – 1.60 (m, 10H), 1.52 – 1.38 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.41 (s), 157.35 (s), 153.70 (s), 150.51 (s), 150.29 (s), 149.70 (s), 125.83 (s), 119.98 (s), 113.86 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 46.67 (s), 46.27 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 25.08 (s), 24.76 (s), 23.31 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(morfolin-4-yl)pirymidyn-5-yl]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (106)



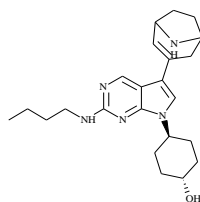
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci białego osadu (250 mg, 89%).

MS-APCI: m/z 452.6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.64 (s, 1H), 8.54 (s, 2H), 6.93 (s, 1H), 5.01 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.61 – 4.46 (m, 1H), 3.88 – 3.73 (m, 9H), 3.48 (dd, J = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.24 – 2.07 (m, 4H), 2.00 – 1.81 (m, 2H), 1.67 – 1.55 (m, 4H), 1.52 – 1.39 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 161.41 (s), 157.35 (s), 153.70 (s), 150.51(s), 150.29 (s), 149.70 (s), 125.83 (s), 119.98 (s), 113.86 (s), 70.89 (s), 66.81 (s), 66.60 (s), 55.91 (s), 47.04 (s), 46.64 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-{8-azabicyklo[3.2.1]okt-2-en-3-ylo}-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7 -ylo)cykloheksan-1-ol, (107)



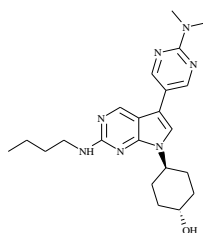
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (3) w postaci beżowego osadu (62.7 mg, 77.8%).

MS-APCI: m/z 396.6 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.70 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.91 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.53 – 4.39 (m, 1H), 3.89 – 3.80 (m, 2H), 3.80 – 3.68 (m, 1H), 3.45 (dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz, 2H), 2.83 (dd, $J = 16.8, 4.7$ Hz, 1H), 2.20 – 1.91 (m, 10H), 1.87 – 1.71 (m, 2H), 1.68 – 1.49 (m, 4H), 1.44 (dd, $J = 15.2, 7.5$ Hz, 2H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 158.05 (s), 154.67 (s), 153.53 (s), 128.27 (s), 120.89 (s), 115.19 (s), 112.09 (s), 110.19 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 53.13 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 31.39 (s), 30.87 (s), 30.28 (s), 29.30 (s), 28.68 (s), 28.29 (m), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(dimetyloamino)pirymidyn-5-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (108)



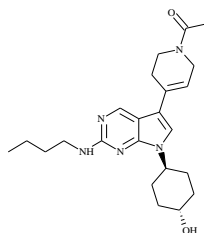
Powyższy osad uzyskałam stosując procedurę (3) w postaci beżowego osadu (12.5 mg, 2.8%).

MS-APCI: m/z 410.5 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.64 (s, 1H), 8.53 (s, 2H), 6.91 (s, 1H), 5.03 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.53 (ddd, $J = 15.8, 8.0, 3.9$ Hz, 1H), 3.78 (tt, $J = 10.9, 4.1$ Hz, 1H), 3.51 – 3.43 (m, 2H), 3.24 (d, $J = 3.3$ Hz, 5H), 2.14 (ddd, $J = 14.1, 9.3, 3.3$ Hz, 4H), 2.00 – 1.83 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 4H), 1.54 – 1.36 (m, 3H), 0.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 165.59 (s), 157.35 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 149.45 – 149.05 (m), 123.28 (s), 119.98 (d, $J = 12.0$ Hz), 113.86 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 38.00 (s), 37.60 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

1-[4-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo]-1,2,3,6-tetrahydropirydyn-1-ylo]etan-1-on, (109)



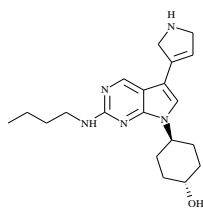
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci jasnożółtego osadu (34.2 mg, 7.1%).

MS-APCI: m/z 412.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.70 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 6.04 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 4.99 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.55 – 4.40 (m, 1H), 4.27 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 4.17 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.82 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.51 – 3.41 (m, 2H), 2.52 (d, $J = 15.3$ Hz, 2H), 2.14 (t, $J = 9.1$ Hz, 4H), 1.90 – 1.38 (m, 13H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.23 (s), 158.05 (s), 154.67 (s), 153.53 (s), 135.36 (s), 122.97 (s), 117.31 (s), 115.19 (s), 110.66 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 45.26 (s), 43.90 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 26.90 (s), 22.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2,5-dihydro-1*H*-pirol-3-ilo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan -1-ol, (110)



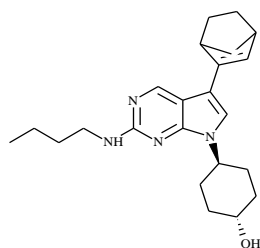
Powyższy związek uzyskałam stosując procedurę (3) w postaci kremowego osadu (30.3 mg, 20.4%).

MS-APCI: m/z 356.5 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.73 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.77 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.35 (ddd, $J = 16.0, 11.0, 5.3$ Hz, 1H), 3.87 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H), 3.76 (d, $J = 1.4$ Hz, 2H), 3.61 – 3.43 (m, 1H), 3.44 – 3.21 (m, 4H), 1.90 (dd, $J = 23.5, 11.9$ Hz, 5H), 1.61 – 1.47 (m, 2H), 1.36 (dt, $J = 14.3, 7.2$ Hz, 5H), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 158.05 (s), 154.67 (s), 153.53 (s), 130.33 (s), 123.45 (s), 120.27 (s), 115.19 (s), 103.59 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 55.26 (s), 54.22 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-{bicyklo[2.2.1]hept-2-en-2-ylo}-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksan-1-ol, (111)



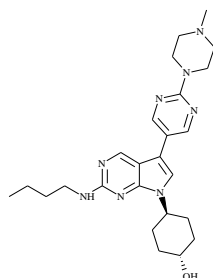
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (3) w postaci jasnożółtego osadu (80.5 mg, 81.8%).

MS-APCI: m/z 381.7 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.62 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.15 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.47 (tt, $J = 12.0, 3.9$ Hz, 1H), 3.85 – 3.68 (m, 1H), 3.46 (td, $J = 7.0, 5.9$ Hz, 2H), 3.12 (s, 1H), 3.00 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 2.20 – 2.02 (m, 4H), 1.94 – 1.70 (m, 4H), 1.66 – 1.49 (m, 6H), 1.49 – 1.37 (m, 2H), 1.17 (ddd, $J = 23.6, 12.3, 4.0$ Hz, 2H), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 134.34 (s), 133.53 (s), 130.75 (s), 116.27 (s), 104.76 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 45.49 (d, $J = 1.5$ Hz), 43.43 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 27.57 (s), 26.19 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[2-(4-metylopiperazyn-1-ylo)pirymidyn-5-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (112)



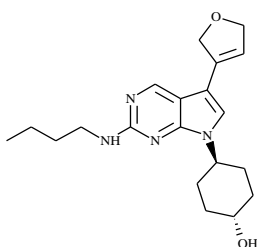
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci białego osadu (81 mg, 56.1%).

MS-APCI: m/z 465.6 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 8.63 (s, 2H), 8.63 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 4.57 (dd, $J = 15.3, 8.7$ Hz, 1H), 3.95 – 3.85 (m, 4H), 3.80 – 3.68 (m, 1H), 3.47 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.61 – 2.50 (m, 4H), 2.39 (s, 1H), 2.15 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 1.69 (dt, $J = 14.9, 7.4$ Hz, 2H), 1.61 – 1.43 (m, 4H), 1.04 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 161.41 (s), 157.35 (s), 153.70 (s), 150.51 (s), 150.29 (s), 149.70 (s), 125.83 (s), 119.98 (s), 113.86 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 52.71 (s), 52.31 (s), 47.01 (s), 46.61 (s), 45.96 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (m), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(2,5-dihydrofuran-3-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (113)



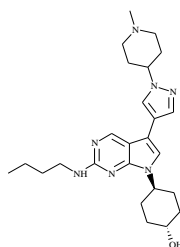
Powyższy związek otrzymałam wykorzystując procedurę (3) w postaci jasnożółtego osadu (82.5 mg, 72.6%).

MS-APCI: m/z 357.5 $[M+H]^+$

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.77 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.82 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.32 – 6.22 (m, 1H), 4.79 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 4.70 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 4.66 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.41 – 4.28 (m, 1H), 3.58 – 3.44 (m, 1H), 3.36 – 3.24 (m, 2H), 2.01 – 1.76 (m, 6H), 1.61 – 1.48 (m, 2H), 1.35 (dq, J = 14.1, 7.2 Hz, 4H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 158.05 (s), 154.67 (s), 153.53 (s), 139.09 (s), 131.37 (s), 124.51 (s), 115.19 (s), 97.76 (s), 72.81 (s), 70.89 (s), 70.26 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(1-metylopiperidyn-4-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol, (114)



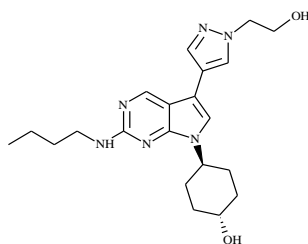
Powyższy związek uzyskałam w oparciu o procedurę (3) w postaci białego osadu (57.3 mg, 57.2%).

MS-APCI: m/z 452.6 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 8.75 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.40 – 4.32 (m, 1H), 4.15 – 4.07 (m, 1H), 3.57 – 3.48 (m, 1H), 3.32 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 2.89 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.10 (s, 2H), 1.99 (dd, J = 30.0, 7.6 Hz, 6H), 1.88 (t, J = 10.2 Hz, 4H), 1.60 – 1.49 (m, 2H), 1.41 – 1.30 (m, 4H), 0.92 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 159.0 (s), 152.0 (s), 150.0 (s), 135.5 (s), 124.0 (s), 117.7 (s), 114.6 (s), 109.0 (s), 106.3 (s), 68.1 (s), 58.1 (s), 54.1 (s), 51.7 (s), 45.7 (s), 40.6 (s), 34.5 (s), 32.0 (s), 31.3 (s), 30.1 (s), 19.7 (s), 13.8 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-[1-(2-hydroksyetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]-pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (115)



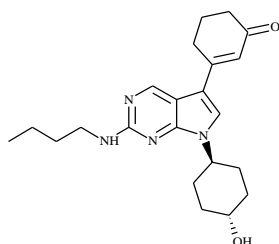
Tytułowy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (3) w postaci żółtego osadu (25 mg, 62.5%).

MS-APCI: m/z 399.5 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.64 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 4.55 (ddd, $J = 16.0, 10.6, 5.1$ Hz, 1H), 4.32 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.98 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.81 – 3.68 (m, 1H), 3.49 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.14 (t, $J = 17.6$ Hz, 2H), 2.09 – 1.97 (m, 4H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 1.61 – 1.45 (m, 4H), 1.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD): 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), 70.89 (s), 57.88 (s), 55.91 (s), 50.96 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

3-[2-(butyloamino)-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-5-yl]cykloheks-2-en-1-on, (116)



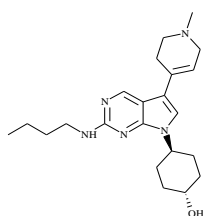
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (3) w postaci kremowego osadu (95 mg, 92.1%).

MS-APCI: m/z 383.5 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.75 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 6.99 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.68 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.49 – 4.33 (m, 1H), 3.52 (ddd, J = 11.6, 7.0, 4.1 Hz, 1H), 3.31 (dd, J = 13.5, 6.2 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.35 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.07 – 1.81 (m, 8H), 1.61 – 1.47 (m, 2H), 1.36 (dt, J = 14.1, 7.0 Hz, 4H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 199.46 (s), 158.05 (s), 154.67 (s), 153.53 (s), 149.53 (s), 126.14 (s), 123.85 (s), 115.19 (s), 112.00 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 36.94 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 27.51 (s), 23.27 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-(1-metylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyn-4-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7 -ylo]cykloheksan-1-ol, (117)



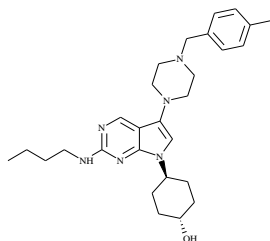
Powyższy związek otrzymałam w oparciu o procedurę (3) w postaci żółtego osadu (45.4 mg, 41.8%).

MS-APCI: m/z 384.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.46 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.30 (tt, J = 12.0, 3.9 Hz, 1H), 3.54 (ddd, J = 15.0, 10.8, 4.1 Hz, 1H), 3.30 – 3.23 (m, 4H), 2.83 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.53 (s, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.92 (dd, J = 22.2, 11.6 Hz, 4H), 1.76 – 1.56 (m, 2H), 1.52 – 1.22 (m, 7H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 158.00 (s), 152.70 (s), 149.17 (s), 128.35 (s), 118.83 (s), 115.38 (s), 114.58 (s), 108.77 (s), 68.68 (s), 52.83 (s), 51.62 (s), 50.66 (s), 48.41 (s), 43.49 (s), 40.64 (s), 33.53 (s), 31.07 (s), 29.82 (s), 29.00 (s), 25.54 (s), 21.98 (s), 19.46 (s), 13.33 (s), 13.11 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-{4-[(4-metylofenylo)metylo]piperazyn-1-ylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (118)



Powyższy związek otrzymałam zgodnie z procedurą (3) w postaci brązowego osadu (30 mg, 16%).

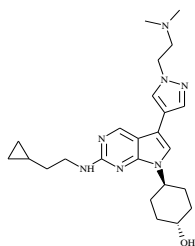
MS-APCI: m/z 477.8 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.55 (s, 1H), 7.22 – 7.07 (m, 4H), 5.71 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.67 – 3.61 (m, 4H), 3.56 – 3.52 (m, 2H), 3.40 (s, 1H), 3.34 (s, 1H), 2.85 – 2.81 (m, 2H), 2.68 – 2.64 (m, 2H), 2.35 – 2.23 (m, 5H), 2.20 – 2.09 (m, 2H), 1.75 – 1.69 (m, 4H), 1.64 (s, 1H), 1.57 – 1.53 (m, 2H), 1.41 – 1.37 (m, 1H), 1.01 – 0.93 (m, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.60 (s), 160.37 (s), 158.43 (s), 135.28 (s), 134.34 (s), 131.50 (s), 130.02 (s), 129.65 (s), 129.65 (s), 129.31 (s), 107.77 (s), 105.16 (s), 70.89 (s), 63.10 (s), 55.91 (s), 51.13 (s), 50.73 (s), 49.66 (s), 49.26 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 21.31 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

Kolejne związki to pochodne pirolopirymidynowe z różnymi podstawnikami w miejscu R¹ i R³.

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-cyklopropyloetylo)amino]-5-[1-[2-(dimetyloamino)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (119)



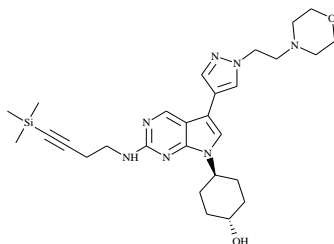
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci beżowego osadu (19 mg, 96.6%).

MS-APCI: m/z 438.6 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.65 (d, $J = 22.6$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 4.59 (ddd, $J = 17.4, 10.0, 4.7$ Hz, 3H), 3.85 (qd, $J = 10.8, 5.3$ Hz, 1H), 3.67 – 3.57 (m, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.52 (s, 7H), 2.24 (d, $J = 11.6$ Hz, 2H), 2.17 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H), 1.98 – 1.89 (m, 3H), 1.69 – 1.61 (m, 5H), 0.88 – 0.81 (m, 1H), 0.55 (dd, $J = 16.4, 11.1$ Hz, 2H), 0.21 – 0.13 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 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), 70.89 (s), 58.43 (s), 55.91 (s), 48.61 (s), 45.66 (s), 45.35 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 9.82 (s), 8.18 (s), 7.79 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-{1-[2-(morfolin-4-ylo)etylo]-1*H*-pirazol-4-ilo}-2-{[4-(trimetylosililo)but-3-yn-1-ylo]amino}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol, (120)



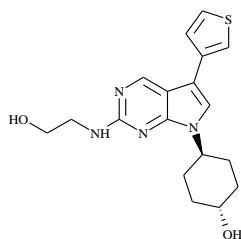
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci kremowego osadu (70 mg, 51.5%).

MS-APCI: m/z 536.8 $[M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 8.75 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.83 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.42 – 4.33 (m, 1H), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.59 – 3.49 (m, 5H), 3.45 (dd, $J = 13.4, 6.9$ Hz, 2H), 2.74 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.52 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 2.44 – 2.39 (m, 4H), 1.97 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.90 (d, $J = 14.7$ Hz, 4H), 1.36 (dt, $J = 16.3, 11.9$ Hz, 2H), 0.09 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 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), 100.48 (s), 89.24 (s), 70.89 (s), 68.04 (s), 67.82 (s), 55.91 (s), 53.38 (s), 53.14 (s), 52.74 (s), 48.79 (s), 38.20 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 22.40 (s), 0.34 (s), -0.06 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-(tiofen-3-ylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (121)



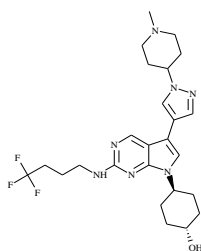
Tytułowy związek otrzymałam zgodnie z procedurą (4) i (3) w postaci kremowego osadu (105 mg, 73.7%).

MS-APCI: m/z 359.5 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.88 (s, 1H), 7.71 (dd, $J = 2.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.63 – 7.55 (m, 2H), 7.50 (dd, $J = 5.0, 1.2$ Hz, 1H), 6.65 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.67 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.48 – 4.33 (m, 1H), 3.62 – 3.47 (m, 3H), 3.41 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.93 (dd, $J = 24.2, 9.1$ Hz, 6H), 1.37 (dt, $J = 17.0, 8.0$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 159.70 (s), 155.16 (s), 152.69 (s), 148.71 (s), 135.22 (s), 131.27 (s), 127.18 (s), 122.73 (s), 116.27 (s), 108.27 (s), 70.89 (s), 60.68 (s), 55.91 (s), 41.93 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[1-(1-metylopiperydyn-4-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-2-[(4,4,4-trifluorobutylo)-amino]-7*H*- pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (122)



Powyższy związek uzyskałam w oparciu o procedurę (4) i (3) w postaci białego osadu (52.5 mg, 35%).

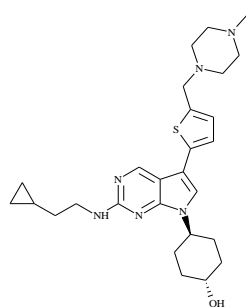
MS-APCI: m/z 506.7 $[M+H]^+$

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.83 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.97 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.43 (td, $J = 11.6, 5.7$ Hz,

1H), 3.57 – 3.49 (m, 1H), 3.45 (s, 2H), 3.40 (dd, J = 13.0, 6.6 Hz, 2H), 2.45 – 2.21 (m, 10H), 2.15 (s, 3H), 1.93 (dt, J = 28.7, 10.2 Hz, 6H), 1.85 – 1.78 (m, 2H), 1.41 – 1.32 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 132.39 (s), 126.01 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 70.89 (s), 56.25 (s), 55.91 (s), 52.79 (s), 52.48 (s), 45.96 (s), 41.83 (s), 33.48 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 26.77 (s), 26.56 (s), 25.16 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-cyklopropyloetylo)amino]-5-{5-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7*H*-pirolo[2, 3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (123)



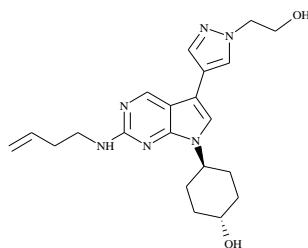
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci delikatnie różowego osadu (51.6 mg, 71.9%).

MS-APCI: m/z 495.7 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.63 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.05 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.77 (s, 5H), 4.52 – 4.41 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.49 (dd, J = 7.7, 6.7 Hz, 2H), 2.52 (s, 7H), 2.27 (s, 3H), 2.09 (d, J = 12.7 Hz, 2H), 1.96 (ddd, J = 25.1, 11.4, 4.2 Hz, 4H), 1.53 (dd, J = 14.3, 7.0 Hz, 3H), 0.80 – 0.68 (m, 1H), 0.49 – 0.43 (m, 2H), 0.11 – 0.05 (m, 2H).

¹³C NMR (101 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), 70.89 (s), 59.19 (s), 55.91 (s), 54.46 (s), 54.06 (s), 53.37 (s), 53.05 (s), 45.96 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 9.82 (s), 8.18 (s), 7.79 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-[1-(2-hydroksyetylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol, (124)



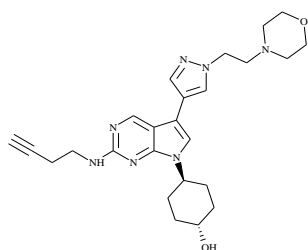
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci żółtego osadu (20.3 mg, 55.4%).

MS-APCI: m/z 397.5 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.59 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.91 (ddt, $J = 17.1, 10.2, 6.9$ Hz, 1H), 5.18 – 5.02 (m, 2H), 4.50 (ddd, $J = 16.1, 10.7, 5.7$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.92 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.74 – 3.64 (m, 1H), 3.53 – 3.45 (m, 2H), 2.41 (t, $J = 10.4$ Hz, 2H), 2.11 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 2.07 – 1.94 (m, 4H), 1.60 – 1.43 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD): δ 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), 70.89 (s), 57.88 (s), 55.91 (s), 50.96 (s), 40.12 (s), 33.83 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-yn-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, (125)



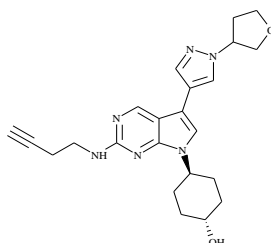
Powyższy związek otrzymałam wykorzystując do tego celu procedurę (4) i (3) w postaci kremowego osadu (36.4 mg, 70.3%).

MS-APCI: m/z 464.7 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.76 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.87 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.66 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.42 – 4.33 (m, 1H), 4.23 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.54 (dd, J = 14.8, 10.2 Hz, 5H), 3.45 (dd, J = 13.4, 7.0 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.74 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.48 – 2.44 (m, 2H), 2.42 (d, J = 4.1 Hz, 4H), 2.01 – 1.83 (m, 6H), 1.36 (ddd, J = 18.1, 13.1, 6.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 158.5 (s), 151.9 (s), 149.8 (s), 135.8 (s), 126.4 (s), 118.1 (s), 114.6 (s), 109.4 (s), 106.3 (s), 82.8 (s), 71.8 (s), 68.0 (s), 66.2 (s), 57.7 (s), 53.1 (s), 51.8 (s), 48.7 (s), 40.4 (s), 34.5 (s), 30.1 (s), 18.7 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-[(but-3-yn-1-yl)amino]-5-[1-(oksolan-3-yl)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo-[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (126)



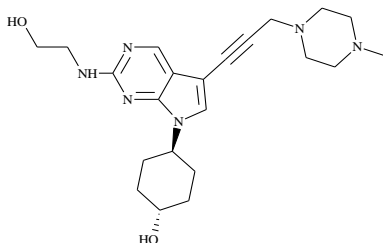
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci kremowego osadu (25.4 mg, 92.1%).

MS-APCI: m/z 421.8 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.79 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.87 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 5.05 – 4.98 (m, 1H), 4.66 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.42 – 4.32 (m, 1H), 4.00 (qd, J = 7.6, 3.7 Hz, 2H), 3.93 (dd, J = 9.3, 3.8 Hz, 1H), 3.84 (td, J = 8.2, 5.6 Hz, 1H), 3.58 – 3.48 (m, 1H), 3.45 (dd, J = 13.3, 7.0 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.48 – 2.43 (m, 2H), 2.36 (ddt, J = 15.2, 12.0, 6.4 Hz, 2H), 1.96 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 1.89 (t, J = 9.3 Hz, 4H), 1.36 (dt, J = 17.2, 11.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 158.4 (s), 151.9 (s), 150.0 (s), 136.1 (s), 124.8 (s), 118.3 (s), 115.0 (s), 109.4 (s), 106.1 (s), 82.8 (s), 72.2 (s), 71.8 (s), 68.0 (s), 66.8 (s), 60.9 (s), 51.7 (s), 40.4 (s), 34.5 (s), 32.1(s), 30.1(s), 18.6 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-hydroksyetylo)amino]-5-[3-(4-metylopiperazyn-1-ylo)prop-1-yn-1-ylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (127)



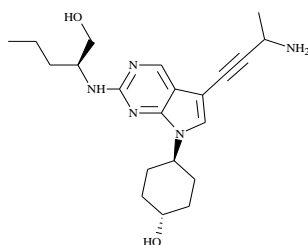
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci beżowego osadu (172 mg, 65.3%).

MS-APCI: m/z 413.7 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.35 (s, 1H), 6.67 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.35 – 4.19 (m, 1H), 3.43 (s, 5H), 3.29 (dd, $J = 11.9, 5.9$ Hz, 5H), 2.42 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz, 10H), 1.80 (dd, $J = 24.8, 11.6$ Hz, 5H), 1.21 (dd, $J = 20.1, 15.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 161.26 (s), 157.74 (s), 152.85 (s), 132.04 (s), 115.59 (s), 108.32 (s), 78.43 (s), 70.89 (s), 64.69 (s), 60.68 (s), 55.91 (s), 54.46 (s), 54.06 (s), 52.92 (s), 52.52 (s), 45.96 (s), 41.93 (s), 39.69 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-(3-aminobut-1-yn-1-ylo)-2-[(2*S*)-1-hydroksypentan-2-ylo]amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (128)



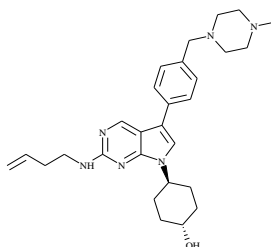
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (2) w postaci jasno-żółtego osadu (17.4 mg, 15.1%).

MS-APCI: m/z 386.5 $[M+H]^+$

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.59 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 5.32 – 5.25 (m, 1H), 4.53 – 4.40 (m, 1H), 4.40 – 4.27 (m, 1H), 4.09 – 3.96 (m, 1H), 3.84 – 3.59 (m, 3H), 2.19 – 1.96 (m, 4H), 1.89 – 1.65 (m, 2H), 1.65 – 1.43 (m, 9H), 1.39 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 159.93 (s), 158.31 (s), 153.22 (s), 133.36 (s), 115.73 (s), 114.18 (s), 79.48 (s), 70.89 (s), 64.76 (s), 55.91 (s), 54.21 (s), 41.50 (s), 32.97 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 24.35 (s), 19.07 (s), 14.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-yl)amino]-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-yl)metylo]fenylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol, (129)



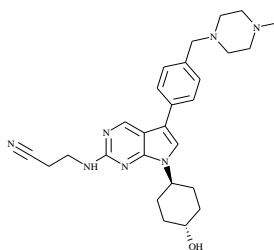
Tytułowy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (4) i (3) w postaci delikatnie żółtego osadu (8.4 g, 70.1%).

MS-APCI: *m/z* 475.6 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.80 (s, 1H), 7.58 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.53 (s, 1H), 7.27 (d, 2H *J* = 8.1 Hz), 6.78 (t, 1H *J* = 5.7 Hz), 5.86 (ddt, 1H *J* = 17.0, 10.2, 6.7 Hz), 5.07 (ddd, 1H *J* = 17.2, 3.3, 1.5 Hz), 5.01 – 4.97 (m, 1H), 4.64 (d, 1H *J* = 3.7 Hz), 4.43 – 4.36 (m, 1H), 3.59 – 3.48 (m, 1H), 3.41 (s, 2H), 3.37 (dd, 2H *J* = 13.4, 6.8 Hz), 2.42 – 2.20 (m, 10H), 2.11 (s, 3H), 1.98 – 1.83 (m, 6H), 1.39 – 1.27 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.29 (s), 151.91 (s), 150.63 (s), 137.22 (s), 136.32 (s), 133.60 (s), 129.87 (s), 126.17 (s), 120.47 (s), 116.45 (s), 114.66 (s), 109.56 (s), 68.59 (s), 62.41 (s), 55.29 (s), 53.11 (s), 46.27 (s), 41.23 (s), 35.10 (s), 34.10 (s), 30.60 (s).

3-[(5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]fenylo}-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-2-ylo)amino]propanonitryl, (130)



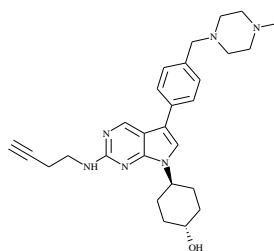
Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci białego osadu (32.1 mg, 45.3%).

MS-APCI: m/z 474.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.87 (s, 1H), 7.68 – 7.59 (m, 3H), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.53 – 4.39 (m, 1H), 3.58 (dd, $J = 12.4, 6.3$ Hz, 3H), 3.45 (s, 2H), 2.82 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 8H), 2.16 (s, 3H), 2.05 – 1.82 (m, 6H), 1.48 – 1.28 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.1 (s), 152.4 (s), 150.2 (s), 135.8 (s), 132.9 (s), 129.3 (s), 125.7 (s), 120.3 (s), 119.7 (s), 114.1 (s), 109.5 (s), 68.0 (s), 61.8 (s), 54.6 (s), 52.4 (s), 52.0 (s), 45.6 (s), 37.4 (s), 34.5 (s), 30.1 (s), 17.4 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-yn-1-ylo)amino]-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]fenylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (131)



Powyższy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci kremowego osadu (25.4 mg, 58.4%).

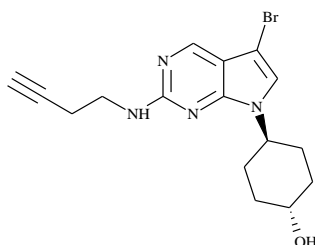
MS-APCI: m/z 473.6 [M+H]⁺

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.73 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.39 (dd, $J = 8.0, 2.7$ Hz, 3H), 4.62 – 4.47 (m, 1H), 3.77 – 3.67 (m, 1H), 3.67 – 3.54 (m, 4H), 2.79 – 2.49 (m, 6H),

2.40 (s, 3H), 2.17 – 1.92 (m, 7H), 1.63 – 1.42 (m, 2H), 1.38 – 1.21 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6): δ 158.4 (s), 156.9 (s), 152.7 (s), 149.8 (s), 135.4 (s), 133.2 (s), 129.4 (s), 125.6 (s), 120.2 (s), 114.0 (s), 113.8 (s), 108.4 (s), 68.0 (s), 61.6 (s), 54.3 (s), 52.0 (s), 51.9 (s), 46.5 (s), 45.1 (s), 34.5 (s), 30.0 (s), 25.0 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-bromo-2-[(but-3-yn-1-yl)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol, (132)



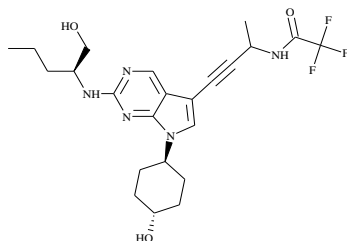
Powyższy związek uzyskałam w postaci jasno-beżowego osadu (23.7 mg, 92.1%).

MS-APCI: m/z 364.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.38 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.10 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.46 – 4.30 (m, 1H), 3.46 (dt, $J = 13.4, 5.6$ Hz, 3H), 2.79 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.44 (td, $J = 7.1, 2.5$ Hz, 2H), 1.98 – 1.78 (m, 6H), 1.42 – 1.22 (m, 2H).

^{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), 82.35 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 37.85 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 18.95 (s).

2,2,2-trifluoro-*N*-[4-(2-[[*(2S)*-1-hydroksypentan-2-ylo]amino)-7-[[*(1*r*,4*r*)-4-hydroksy-cykloheksylo]-7*H*-pirolo [2,3-*d*]pirymidyn-5-ylo)but-3-yn-2-ylo]acetamid, (133)*



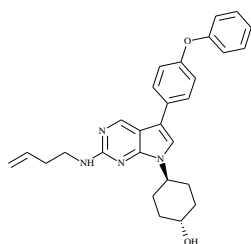
Powyzszy związek uzyskałam postępując zgodnie z procedurą (4) i (2) w postaci jasno-żółtego osadu (24.4 mg, 17%).

MS-APCI: m/z 482.7 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.50 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.69 – 6.55 (m, 1H), 5.24 – 5.01 (m, 1H), 4.51 – 4.34 (m, 1H), 4.17 – 4.00 (m, 1H), 3.90 – 3.59 (m, 3H), 2.21 – 1.99 (m, 4H), 1.89 – 1.68 (m, 2H), 1.65 – 1.36 (m, 10H), 0.96 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 159.93 (s), 158.31 (s), 157.61 (s), 153.22 (s), 133.36 (s), 117.90 (s), 115.73 (s), 79.43 (s), 70.89 (s), 69.69 (s), 64.76 (s), 55.91 (s), 54.21 (s), 42.61 (s), 32.97 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 22.47 (s), 19.07 (s), 14.23 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-ylo]amino]-5-(4-fenoksyfenylo)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol, (134)



Powyzszy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (4) i (3) w postaci jasno-zielonego osadu (48.7 mg, 66.2%).

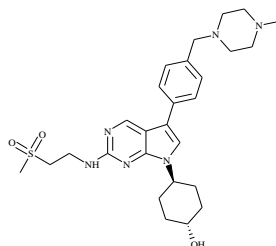
MS-APCI: m/z 455.6 [M+H]⁻

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.66 (s, 1H), 7.52 – 7.45 (m, 2H), 7.41 – 7.31 (m, 2H), 7.16 – 7.03 (m, 6H), 5.88 (ddt, $J = 17.0, 10.1, 6.8$ Hz, 2H), 5.24 – 5.08 (m, 2H), 4.61 – 4.48 (m, 1H),

3.86 – 3.71 (m, 1H), 3.58 (dd, J = 12.7, 6.8 Hz, 2H), 2.44 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.17 (dt, J = 14.0, 11.9 Hz, 4H), 1.99 – 1.82 (m, 2H), 1.60 (dt, J = 24.1, 6.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 159.3 (s), 157.4 (s), 155.2 (s), 153.1 (s), 150.6 (s), 137.2 (s), 130.6 (s), 130.5 (s), 127.9 (s), 123.9 (s), 120.4 (s), 119.7 (s), 119.0 (s), 116.5 (s), 114.1 (s), 109.5 (s), 68.6 (s), 52.6 (s), 41.2 (s), 35.1(s), 34.1 (s), 30.6 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(2-metanosulfonyloetylo)amino]-5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]-fenylo}-7*H*-pirolo[2,3-*d*] pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (135)



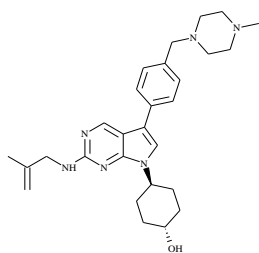
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci białego osadu (39.4 mg, 58%).

MS-APCI: m/z 527.7 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.86 (s, 1H), 7.64 – 7.59 (m, 3H), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.99 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 4.44 (dd, J = 13.4, 8.9 Hz, 1H), 3.75 (dd, J = 13.3, 6.4 Hz, 2H), 3.54 (dd, J = 12.3, 8.2 Hz, 1H), 3.43 (s, 2H), 3.42 – 3.38 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 2.41 – 2.25 (m, 6H), 2.13 (s, 3H), 1.94 (dd, J = 21.0, 11.0 Hz, 6H), 1.42 – 1.33 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 157.35 (s), 153.70 (s), 149.70 (s), 140.12 (s), 135.91 (s), 128.19 (s), 127.98 (s), 126.43 (s), 123.09 (s), 122.88 (s), 119.92 (s), 113.86 (s), 70.89 (s), 63.10 (s), 55.91 (s), 54.46 (s), 54.06 (s), 52.92 (s), 52.52 (s), 52.36 (s), 45.96 (s), 39.75 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]fenylo}-2-[(2-metyloprop-2-en-1-ylo)-amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol, (136)



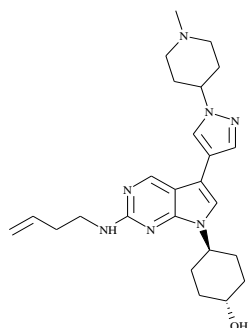
Tytułowy związek otrzymałam stosując procedurę (4) i (3) w postaci białego osadu (73.5mg, 55.4%).

MS-APCI: m/z 475.6 $[M+H]^+$

1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 8.60 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.28 (t, $J = 3.9$ Hz, 3H), 4.84 (s, 1H), 4.41 (dt, $J = 15.7, 7.9$ Hz, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.64 – 3.53 (m, 1H), 3.49 (s, 2H), 3.38 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 2.55 (d, $J = 38.0$ Hz, 7H), 2.32 (s, 3H), 2.01 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 1.94 (dd, $J = 8.2, 2.7$ Hz, 4H), 1.71 (s, 3H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 1.27 – 1.15 (m, 2H), 0.80 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD): δ 160.1(s), 154.5 (s), 150.6 (s), 144.7 (s), 135.9 (s), 135.1 (s), 131.2 (s), 127.4 (s), 121.4 (s), 116.8 (s), 111.3 (s), 110.3 (s), 70.4 (s), 63.2 (s), 55.4 (s), 53.6 (s), 52.7 (s), 48.1 (s), 45.2 (s), 35.4 (s), 31.4 (s), 20.6 (s), 7.6 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(but-3-en-1-ylo)amino]-5-[1-(1-metylopiperydyn-4-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (137)



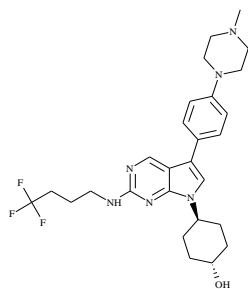
Tytułowy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (4) i (3) w postaci kremowego osadu (703 mg, 23.1%).

MS-APCI: m/z 450.6 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.77 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.74 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.88 (ddt, J = 17.0, 10.2, 6.8 Hz, 1H), 5.13 – 4.98 (m, 2H), 4.66 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.37 (dt, J = 15.6, 8.6 Hz, 1H), 4.16 – 4.06 (m, 1H), 3.53 (td, J = 10.8, 6.3 Hz, 1H), 3.38 (dd, J = 13.4, 6.8 Hz, 2H), 2.87 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 2.34 (dd, J = 14.2, 7.0 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.07 (dd, J = 16.3, 8.2 Hz, 2H), 2.04 – 1.93 (m, 6H), 1.89 (t, J = 10.2 Hz, 4H), 1.36 (td, J = 16.8, 11.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 158.40 (s), 155.35 (s), 153.84 (s), 139.33 (s), 134.10 (s), 132.39 (s), 117.05 (s), 114.77 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 70.89 (s), 56.25 (s), 55.91 (s), 52.79 (s), 52.48 (s), 45.96 (s), 33.83 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 26.77 (s), 26.56 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[4-(4-metylocykloheksylo)fenylo]-2-[(4,4,4-trifluorobutylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7 -ylo}cykloheksan-1-ol, (138)



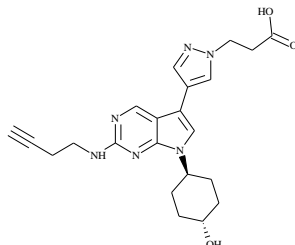
Powyższy związek otrzymałam zgodnie z procedurą (4) i (3) w postaci białego osadu (60.8 mg, 75.7%).

MS-APCI: m/z 517.7 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.64 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.99 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 3.66 (s, 1H), 3.53 – 3.45 (m, 2H), 3.22 – 3.18 (m, 4H), 2.65 – 2.57 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 2.25 (dd, J = 15.9, 11.2 Hz, 2H), 2.08 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 2.03 – 1.95 (m, 4H), 1.91 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 1.50 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 158.74 (s), 153.02 (s), 149.76 (s), 149.39 (s), 129.02 (s), 126.99 (s), 126.17 (s), 118.75 (s), 116.46 (s), 115.90 (s), 110.34 (s), 69.07 (s), 54.67 (s), 52.73 (s), 44.76 (s), 40.22 (s), 34.08 (s), 31.07 (s), 30.79 (s), 30.12 (s), 22.32 (s), 21.77 (s).

kwask 3-(4-{2-[(but-3-yn-1-ylo)amino]-7-[(1*r*,4*r*)-4-hydroksycykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyna-5-ylo}-1*H*-pirazol-1-ilo)propanowy, (139)



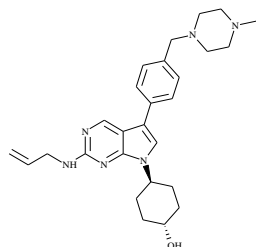
Powyższy związek otrzymałam przy zastosowaniu procedury (4) i (3) w postaci żółtego osadu (3.6 mg, 31.8%).

MS-APCI: m/z 423.5 [M+H]⁻

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.34 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.87 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.41 – 4.36 (m, 1H), 4.33 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.53 (ddd, $J = 9.8, 8.0, 1.9$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 13.4, 6.9$ Hz, 2H), 2.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.47 – 2.44 (m, 2H), 2.02 – 1.83 (m, 6H), 1.36 (ddd, $J = 15.4, 11.4, 5.0$ Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): 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), 82.35 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 48.25 (s), 37.85 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 31.53 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 18.95 (s).

(1*r*,4*r*)-4-(5-{4-[(4-metylopiperazyn-1-ylo)metylo]fenylo}-2-[(prop-2-en-1-ylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)cykloheksan-1-ol, (140)



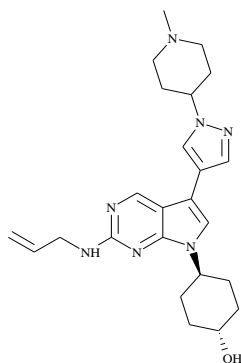
Powyższy związek otrzymałam zgodnie z procedurą (4) i (3) w postaci kremowego osadu (39.7 mg, 72.9%).

MS-APCI: m/z 461.8 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.83 (s, 1H), 7.66 – 7.56 (m, 3H), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.97 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 5.94 (ddd, J = 22.4, 10.5, 5.3 Hz, 1H), 5.25 – 5.00 (m, 2H), 4.67 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.42 (dd, J = 13.5, 9.5 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.59 – 3.49 (m, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.38 (dd, J = 10.5, 3.9 Hz, 8H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (dt, J = 24.1, 7.5 Hz, 6H), 1.36 (dt, J = 13.2, 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 157.72 (s), 153.60 (s), 148.94 (s), 140.12 (s), 135.96 (s), 128.19 (s), 127.98 (s), 126.43 (s), 123.09 (s), 122.88 (s), 119.92 (s), 114.80 (s), 114.09 (s), 70.89 (s), 63.10 (s), 55.91 (s), 54.46 (s), 54.06 (s), 52.92 (s), 52.52 (s), 45.96 (s), 39.55 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{5-[1-(1-metylopiperydyn-4-ylo)-1*H*-pirazol-4-ilo]-2-[(prop-2-en-1-ylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (141)



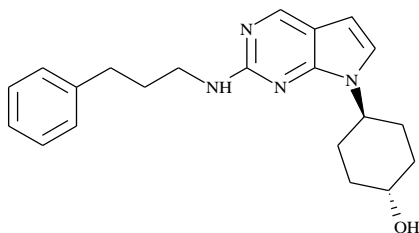
Tytułowy związek otrzymałam wykorzystując do tego celu procedurę (4) i (3) w postaci białego osadu (74.3 mg, 68%).

MS-APCI: m/z 436.7 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.77 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.78 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.91 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 5.94 (ddt, J = 17.1, 10.5, 5.4 Hz, 1H), 5.24 – 5.00 (m, 2H), 4.68 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.43 – 4.31 (m, 1H), 4.17 – 4.05 (m, 1H), 3.96 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.52 (td, J = 10.7, 6.7 Hz, 1H), 2.89 (d, J = 10.7 Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.15 – 2.05 (m, 2H), 2.05 – 1.91 (m, 6H), 1.91 – 1.80 (m, 4H), 1.42 – 1.30 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 158.83 (s), 155.20 (s), 152.99 (s), 139.33 (s), 136.02 (s), 132.39 (s), 115.08 (s), 114.76 (s), 113.50 (s), 108.19 (s), 70.89 (s), 56.25 (s), 55.91 (s), 52.79 (s), 52.48 (s), 45.96 (s), 39.55 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 26.77 (s), 26.56 (s).

(1*r*,4*r*)-4-{2-[(3-fenylpropylo)amino]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo}cykloheksan-1-ol, (142)



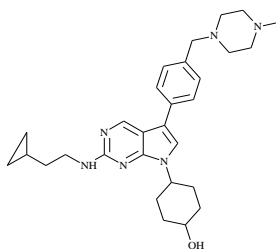
Powyższy związek otrzymałam postępując zgodnie z procedurą (4) w postaci beżowego osadu (525 mg, 99%).

MS-APCI: m/z 351.5 $[M+H]^+$

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.46 (s; 1H), 7.30 – 7.26 (m; 2H), 7.24 – 7.21 (m; 2H), 7.17 (ddt, $J = 6.0, 4.7, 2.3$ Hz; 1H), 7.14 (d, $J = 3.7$ Hz; 1H), 6.77 (t, $J = 5.7$ Hz; 1H), 6.28 (d, $J = 3.6$ Hz; 1H), 4.68 (d, $J = 4.5$ Hz; 1H), 4.36 (tt, $J = 11.7, 4.2$ Hz; 1H), 3.59 – 3.47 (m; 1H), 2.65 (dd, $J = 18.1, 10.2$ Hz; 2H), 2.01 – 1.69 (m; 10H), 1.40 – 1.29 (m; 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6): δ 159.41 (s), 152.40 (s), 150.80 (s), 142.65 (s), 128.81 (s), 128.76 (s), 126.15 (s), 123.10 (s), 111.49 (s), 99.61 (s), 68.57 (s), 52.39 (s), 41.34 (s), 35.08 (s), 33.39 (s), 31.54 (s), 30.66 (s).

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, (33)



Tytułowy związek otrzymałam z wykorzystaniem w pierwszej kolejności procedury (4) a następnie (3) w postaci delikatnie żółtego osadu (1.74 g, 53%).

MS-APCI: m/z 489.7 $[M+H]^+$

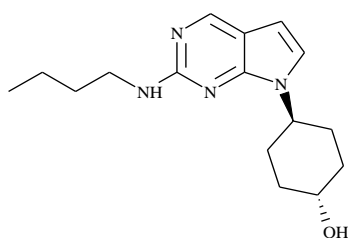
1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.77 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.41 – 4.31 (m, 1H), 3.58 –

3.44 (m, 1H), 3.39 (s, 2H), 3.34 (dd, J = 14.6, 5.9 Hz, 2H), 2.30 (ddd, J = 81.6, 34.6, 3.2 Hz, 6H), 2.09 (d, J = 11.2 Hz, 3H), 1.92 (t, J = 12.9 Hz, 4H), 1.84 (d, J = 10.2 Hz, 2H), 1.43 (dd, J = 14.6, 7.1 Hz, 2H), 1.36 – 1.27 (m, 2H), 0.75 – 0.67 (m, 1H), 0.41 – 0.32 (m, 2H), 0.05 – -0.00 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ 155.12 (s), 149.58 (s), 140.21 (s), 135.75 (s), 128.16 (s), 127.95 (s), 126.91 (s), 123.15 (s), 122.75 (s), 119.87 (s), 113.49 (s), 69.52 (s), 63.66 (s), 55.01 (s), 54.58 (s), 54.37 (s), 53.04 (s), 52.82 (s), 46.05 (s), 42.07 (s), 33.12 (s), 32.48 (s), 32.27 (s), 27.33 (s), 26.94 (s), 9.82 (s), 8.18 (s), 7.79 (s).

Kolejne pochodne pirolopirymidynowe posiadają w swojej strukturze różne podstawniki w miejscu R¹, R² i R³.

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol, (143)



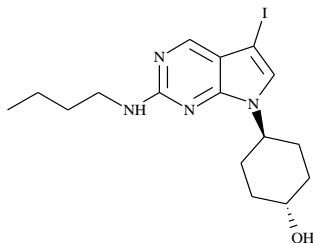
Powyższy związek otrzymałam w postaci żółtej substancji oleistej (627 mg, 61.4%).

MS-APCI: m/z 289.5 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (s, 1H), 6.83 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.28 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.47 (tt, J = 12.0, 3.9 Hz, 1H), 3.74 (tt, J = 11.1, 4.3 Hz, 1H), 3.44 (td, J = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.09 (dddd, J = 13.2, 8.5, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 1.65 – 1.50 (m, 4H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 159.06 (s), 152.60 (s), 150.34 (s), 121.95 (s), 111.84 (s), 99.77 (s), 69.95 (s), 52.11 (s), 41.62 (s), 34.68 (s), 31.97 (s), 30.64 (s), 20.27 (s), 13.99 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-5-jodo-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol,
(144)



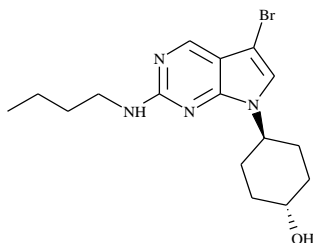
Powyższy związek otrzymałam w postaci żółtego osadu (75 mg, 95%).

MS-APCI: m/z 415.5 $[M+H]^+$

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.23 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.48 (tt, $J = 11.9, 3.8$ Hz, 1H), 3.74 (tt, $J = 11.0, 4.2$ Hz, 1H), 3.46 (td, $J = 7.0, 5.9$ Hz, 2H), 2.21 – 2.02 (m, 4H), 1.92 – 1.73 (m, 2H), 1.60 (tdd, $J = 14.7, 10.4, 5.4$ Hz, 4H), 1.51 – 1.37 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 166.46 (s), 158.93 (s), 157.72 (s), 114.49 (s), 110.86 (s), 70.89 (s), 55.91 (s), 41.53 (s), 32.58 (s), 32.19 (s), 30.87 (s), 28.68 (s), 28.29 (s), 25.68 (s), 20.23 (s), 14.02 (s).

(1*r*,4*r*)-4-[5-bromo-2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol,
(145)



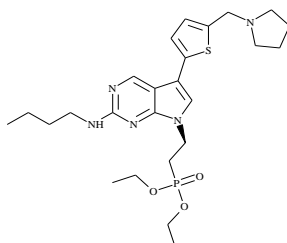
Powyższy związek otrzymałam w bezpośredniej reakcji *N*-aminowania (1*r*,4*r*)-4-[5-bromo-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-olu, w postaci białego osadu (1.3 g, 41.1%).

MS-APCI: m/z 368.5 $[M+H]^+$

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.39 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.06 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.48 (tt, *J* = 12.1, 3.9 Hz, 1H), 3.73 (tt, *J* = 10.9, 4.3 Hz, 1H), 3.45 (td, *J* = 7.1, 5.8 Hz, 2H), 2.13 (ddd, *J* = 8.1, 4.3, 2.2 Hz, 2H), 2.06 (ddd, *J* = 11.8, 4.6, 2.6 Hz, 2H), 1.79 (ddd, *J* = 25.4, 13.1, 3.4 Hz, 2H), 1.62 (dq, *J* = 12.7, 7.5 Hz, 2H), 1.58 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.40 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 160.38 (s), 159.27 (s), 152.65 (s), 151.46 (s), 150.49 (s), 149.44 (s), 120.76 (s), 111.52 (s), 89.32 (s), 87.48 (s), 69.99 (s), 52.58 (s), 41.41 (s), 34.55 (s), 31.85 (s), 30.53 (s), 19.86 (s), 14.92 (s), 12.56 (s).

dietylo{2-[2-(butyloamino)-5-{5-[(pirolidyn-1-ylo)metylo]tiofen-2-ylo}-7H-pirololo[2,3-d]-pirymidyn-7-ylo]etylo} fosfonian, (146)



Powyższy produkt otrzymałam w postaci różowego osadu (41.3 mg, 40.8%).

MS-APCI: *m/z* 520.7 [M+H]⁺

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.74 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.43 (dt, *J* = 14.3, 7.3 Hz, 2H), 4.11 (p, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.95 (s, 2H), 3.56 – 3.45 (m, 2H), 2.72 (d, *J* = 18.0 Hz, 4H), 2.53 (dt, *J* = 18.1, 7.3 Hz, 2H), 1.91 (s, 4H), 1.74 – 1.66 (m, 2H), 1.51 (dq, *J* = 14.9, 7.4 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

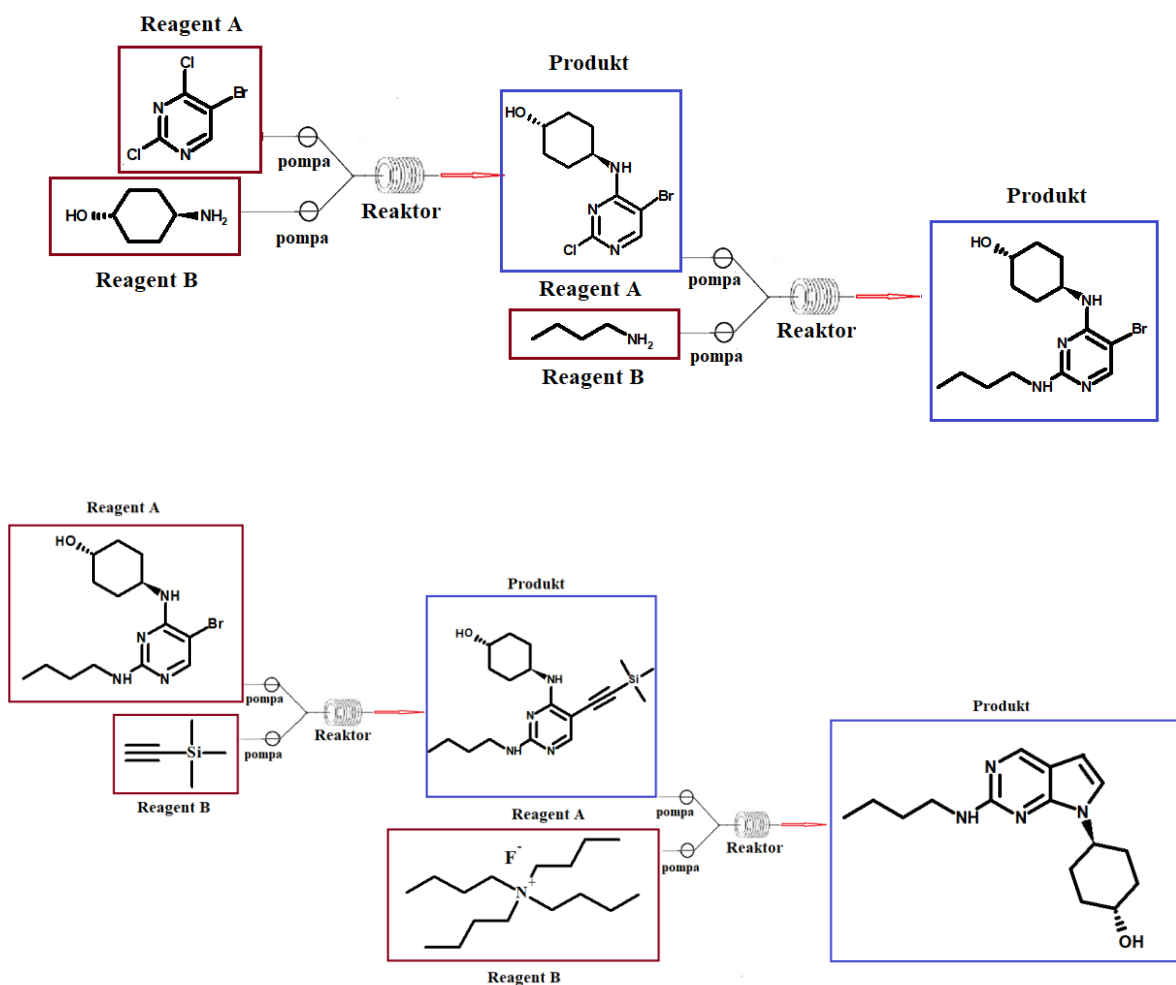
¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD): δ 161.99 (s), 157.21 (s), 156.21 (s), 154.94 (s), 137.28 (s), 134.86 (s), 130.48 (s), 125.56 (s), 119.81 (s), 113.37 (s), 62.93 (s), 62.03 (s), 58.36 (s), 55.50 (s), 55.11 (s), 41.53 (s), 40.80 (s), 30.87 (s), 25.36 (s), 25.14 (s), 25.04 (s), 15.16 (s), 16.70 (s), 16.00 (s), 20.02 (s), 15.16 (s), 14.02 (s).

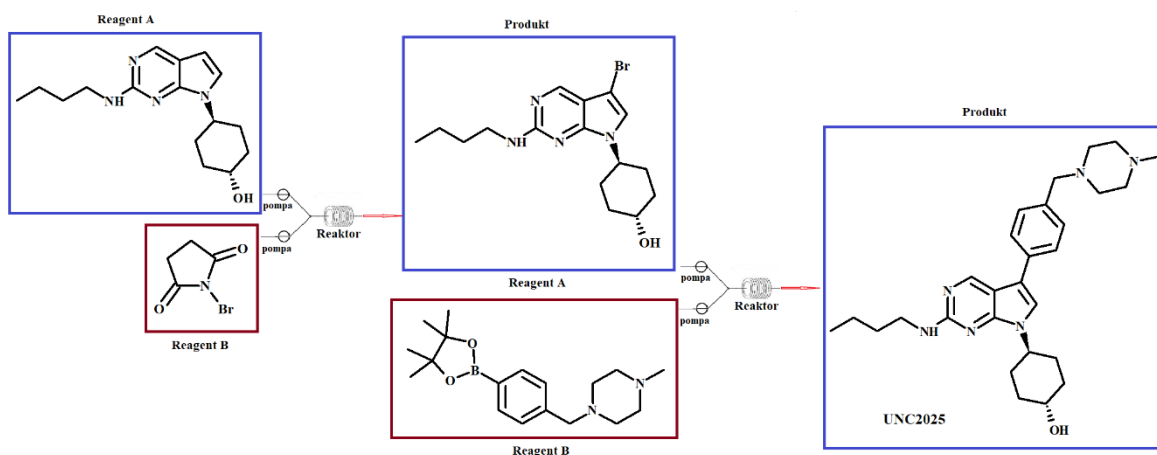
5. Optymalizacja ścieżki syntezy

Obecnie coraz częściej przed rozpoczęciem optymalizacji reakcji składającej się z kilku etapów wykorzystuje się w pierwszej kolejności modelowanie komputerowe (DFT i DOE). Metody te umożliwiają obliczenie energii aktywacji i dobór jak najlepszych warunków doświadczalnych. Dzięki temu reakcję prowadzone są już w określonych warunkach co diametralnie skraca czas procesu optymalizacyjnego. W swojej pracy nie miałam możliwości skorzystania z takiego modelu obliczeniowego dlatego też niektóre etapy optymalizacji wymagały ode mnie więcej czasu i pracy związanej z doбором jak najlepszych warunków reakcji.

5.1. Technologia przepływowa

Przy zastosowaniu systemu przepływowego zaplanowałam optymalizację poniższej ścieżki syntezy, która to pozwala na otrzymanie związku referencyjnego UNC2025 (Schemat 11).





Schemat 11: Optymalizowana ścieżka syntezy przy zastosowaniu technologii przepływowej.

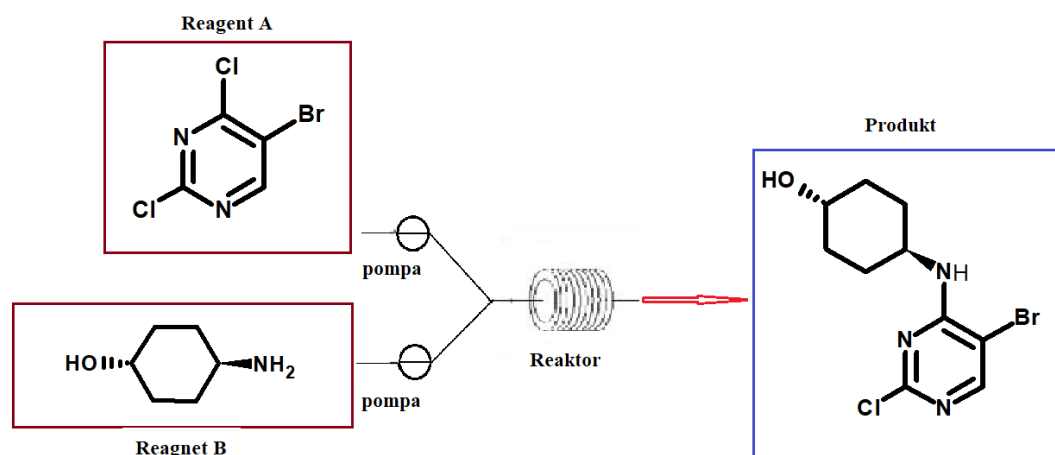
Optymalizowane etapy porównywałam do reakcji otrzymywania danego związku metodami klasycznym. W trakcie prac optymalizacyjnych głównym parametrem określającym oczekiwany przebieg reakcji był stopień konwersji substratu w produkt określany za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.

Tabela 21: Warunki chromatograficzne

Parametry		
Kolumna	Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm	
Fazy mobilne	Faza A: woda Faza B:ACN	
Przepływ	0.6 mL/min	
Czas analizy	10 minut	
Gradient		
Czas [minuty]	Faza mobilna A [%]	Faza mobilna B [%]
0		
1	98	2
5	10	90
8.5	10	90
9.5	98	2
10		

5.1.1. Reakcja nukleofilowej substytucji aromatycznej

Otrzymywanie *trans*-4-((5-bromo-2-chloropirymidyn-4-yl)amino)cykloheksan-1-olu przy aplikacji technologii przepływowej:



Schemat 12: Reakcja nukleofilowej substytucji aromatycznej w systemie FLOW.

W celu zoptymalizowania przedstawionego powyżej etapu, reakcje prowadzone były z zastosowaniem różnych rozpuszczalników, temperatur, stężenia substratów jak również ilości ekwiwalentów: 5-bromo-2,4-dichloropirymidyny do *trans*-4-aminocykloheksanolu, zapisanego w tabeli jako (Ratio). Do reakcji tej stosowany był głównie reaktor typu mikrochip (LTF-V) o objętości 1.7 mL i rozmiarze kanalików 1 milimetra.

- Reakcje prowadzone w izopropanolu (IPA)
- Stężenie 0.5 M

Tabela 22: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej oraz uzyskane wyniki przy Ratio 1:1

<i>L.p.</i>	<i>R_t</i> [minuty]	<i>Temperatura</i> (°C)	<i>Stężenie</i> (M)	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja</i> [wg HPLC]
1	3	28	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> • analiza HPLC: 45.86% dla substratu 54.14% dla produktu
	5	28	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> • analiza HPLC: 24.04% dla substratu 75.96% dla produktu
	8	28	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> • analiza HPLC: 22.28% dla substratu 77.72% dla produktu
2	3	50	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> • analiza HPLC: 45.86% dla substratu 54.14% dla produktu
	5	50	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> • analiza HPLC: 9.49% dla substratu 90.51% dla produktu
	8	50	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> • analiza HPLC: 9.49% dla substratu

					90.51% dla produktu
3	3	80	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 7.69% dla substratu 92.31% dla produktu
	5	80	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	8	80	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
4	3	100	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 7.69% dla substratu 92.31 % dla produktu
	5	100	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	8	100	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: w oparciu o uzyskane wyniki zauważyć można, że syntezy prowadzone w wyższych temperaturach czyli w 80 i 100 °C zapewniają całkowite przereagowanie substratu w oczekiwany produkt już po 5 minutach trwania reakcji.

Tabela 23: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej oraz uzyskane wyniki przy Ratio 1:2

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
5	3	28	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	28	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 4.21% dla substratu 95.79% dla produktu
6	3	50	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 6.12% dla substratu 93.88% dla produktu
	5	50	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 6.40% dla substratu 93.60% dla produktu
7	3	80	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	80	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
8	3	100	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	100	0.5	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: z powyższych analiz wynika, że Ratio 1:2, zapewnia osiągnięcie 100% konwersji w reakcjach prowadzonych już w temperaturze 28 °C.

Tabela 24: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej oraz uzyskane wyniki przy Ratio 1:1.5

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
9	3	28	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 10.85% dla substratu 89.15% dla produktu
	5	28	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 11.36% dla substratu 88.64% dla produktu
10	3	50	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 9.76% dla substratu 90.24% dla produktu
	5	50	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 7.12% dla substratu 92.88% dla produktu
11	3	80	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	80	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
12	3	100	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	100	0.5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: na podstawie otrzymanych danych zaobserwować można, że wyższa temperatura wpływa na wzrost przemiany chemicznej substratu w produkt.

➤ Stężenie 1 M

Tabela 25: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki przy Ratio 1:1

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
13	3	28	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 14.89% dla substratu 85.11% dla produktu
	5	28	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 7.04% dla substratu 92.44% dla produktu
	8	28	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 7.53% dla substratu 92.47% dla produktu

14	3	50	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 9.70% dla substratu 90.30% dla produktu
	5	50	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 5.78% dla substratu 94.22% dla produktu
	8	50	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 6.49% dla substratu 93.51% dla produktu
15	3	80	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 5.23% dla substratu 94.77% dla produktu
	5	80	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 4.93% dla substratu 95.07% dla produktu
	8	80	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 5.60% dla substratu 94.40% dla produktu
16	3	100	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 5.10% dla substratu 94.90% dla produktu
	5	100	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 5.10% dla substratu 94.90% dla produktu
	8	100	1	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 5.82% dla substratu 94.18% dla produktu

Tabela 26: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki przy Ratio 1:2

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
17	3	28	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 4.17% dla substratu 95.83% dla produktu
	5	28	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 3.80% dla substratu 96.20% dla produktu
18	3	50	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 4.31% dla substratu 95.69% dla produktu
	5	50	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 4.10% dla substratu 95.90% dla produktu
19	3	80	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 2.16% dla substratu 97.84% dla produktu
	5	80	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 2.16% dla substratu 97.84% dla produktu
20	3	100	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: jak można zauważyć z przedstawionych danych, wyższe stężenie reagentów umożliwi osiągnięcie konwersji substratu w produkt na poziomie 90% i nieco powyżej. Dopiero przy reakcjach prowadzonych w temperaturze 100 °C i Ratio 1:2 obserwuje się 100% konwersję.

➤ Reakcje prowadzone w etanolu (EtOH)

➤ Stężenie 0.5 M

Tabela 27: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki przy Ratio 1:1

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
1	3	28	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 27.47% dla substratu 72.53% dla produktu
	5	28	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 19.80% dla substratu 80.20% dla produktu
	8	28	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 22.36% dla substratu 77.64% dla produktu
2	3	50	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 19.97% dla substratu 80.03% dla produktu
	5	50	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 2.38% dla substratu 97.62% dla produktu
	8	50	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 2.80% dla substratu 97.20% dla produktu
3	3	80	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	80	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	8	80	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
4	3	100	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 0.99% dla substratu 99.01 % dla produktu
	5	100	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 0.17% dla substratu 99.83% dla produktu
	8	100	0.5	1:1	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: z powyższych danych wynika iż wyższe temperatury reakcji gwarantują osiągnięcie całkowitej konwersji.

Tabela 28: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki przy Ratio 1:2

L.p.	R _t [minuty]	Temperatura (°C)	Stężenie (M)	Ratio	Konwersja [wg HPLC]
5	3	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
6	3	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
7	3	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu oraz produktu reakcji
8	3	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: pozyskane dane z powyższych analiz potwierdzają tezę, że wyższa temperatura reakcji umożliwia osiągnięcie całkowitej konwersji zarówno przy Ratio 1:1 jak również 1:2. Dodatkowo wykorzystanie etanolu jako rozpuszczalnika zapewniło dużo lepszą rozpuszczalność aminobenzalkoholu.

Wykonałam także reakcje z wykorzystaniem etanolu (EtOH) jako rozpuszczalnika dla których czas rezystancji (R_t) wynosił odpowiednio 1 i 2 minuty.

Tabela 29: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki przy Ratio 1:2

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
1	1	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	2	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
2	1	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	2	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: 2.73% dla substratu 97.27% dla produktu
3	1	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	2	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
4	1	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	2	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: jak można zauważyć już po minucie trwania reakcji uzyskujemy pełną konwersję przy każdej zastosowanej temperaturze.

- Powyższa reakcja przeprowadzona została również na większą skalę.

Tabela 30: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
1	3	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

W reakcji tej uzyskano całkowitą konwersję substratu w produkt już po 3 minutach trwania reakcji w temperaturze pokojowej z 90% wydajnością obliczoną zgodnie z poniższym wzorem:

$$mR_a = VR_a / (VR_a + VR_b) \times vp \times C \times MR_a$$

Gdzie: mR_a – to masa reagenta A (mg)

VR_a – stosunek objętościowy reagenta A

VR_x – stosunek objętościowy reagenta B

vp – objętość mieszaniny poreakcyjnej (mL)

C – stężenie reagenta A (M)

MR_a – masa molowa reagenta A (g/mol)

Następnie z zależności:

$MRA \text{ ————— } MP$

$mRA \text{ ————— } x$ gdzie x- to masa teoretyczna produktu,

MP – masa molowa produktu reakcji

$$W [\%] = \frac{mP}{x} \times 100$$

➤ Reakcje prowadzone w dimetyloformamidzie (DMF)

➤ Stężenie 0.5 M

Tabela 31: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
1	3	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
2	3	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: 16.73% substratu 83.27% dla produktu
3	3	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
4	3	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: 7.69% dla substratu 92.31 % dla produktu
	5	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: z przedstawionych powyżej danych wynika, że zastosowanie dimetyloformamidu jako rozpuszczalnika także umożliwi uzyskanie pełnej konwersji substratu w produkt już po 3 minutach trwania reakcji w temperaturze 28 °C.

- Reakcje prowadzone w dimetylosulfotlenku (DMSO)
 - Stężenie 0.5 M

Tabela 32: Warunki reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej i otrzymane wyniki

<i>L.p.</i>	<i>R_t [minuty]</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Stężenie (M)</i>	<i>Ratio</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
1	3	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	28	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
2	3	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	50	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
3	3	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
	5	80	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
4	3	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100 % dla produktu
	5	100	0.5	1:2	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

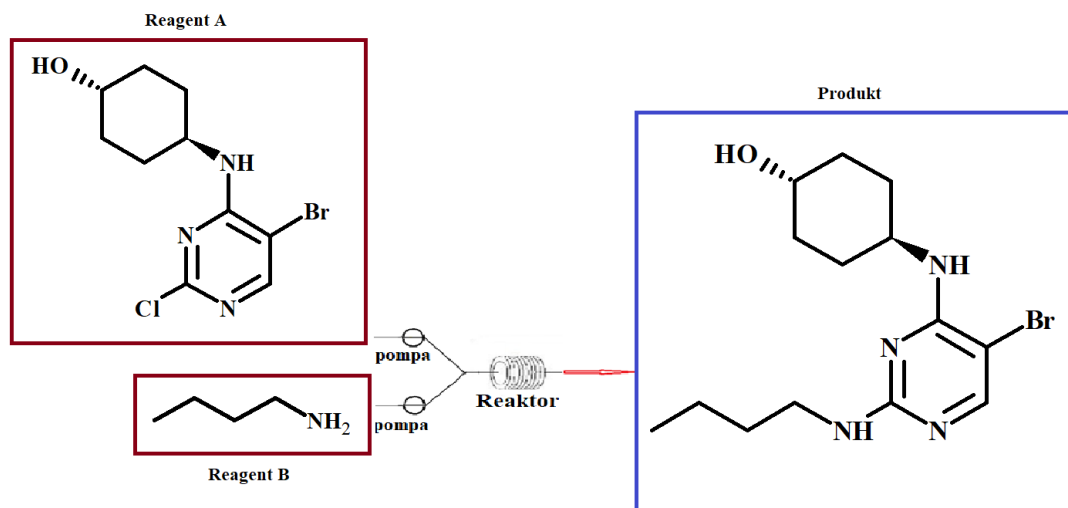
Wnioski: z analizy wyników umieszczonych w powyższej tabeli, wynika, że wykorzystanie dimetylosulfotlenku również prowadzi do otrzymania 100% konwersji substratu w produkt już po 3 minutach trwania reakcji we wszystkich zastosowanych zakresach temperatur.

Podsumowanie:

W oparciu o uzyskane wyniki z powyższych doświadczeń zauważyć można, że aplikacja technologii przepływownej do prowadzenia reakcji nukleofilowej substytucji aromatycznej idealnie się sprawdza. Reakcja przebiega nie tylko w krótszym czasie ale także z bardzo dobrą

wydajnością oraz konwersją procesu. Najlepszym rozpuszczalnikiem okazał się etanol, ponieważ nie tylko zapewnił on dużo lepszą rozpuszczalność aminobenzalkoholu w porównaniu z innymi rozpuszczalnikami ale także umożliwił otrzymanie 100% konwersji już po 1 minucie trwania reakcji w temperaturze 28 °C.

5.1.2. Reakcja *N*-aminowania



Schemat 13: Reakcja *N*-aminowania.

W celu zoptymalizowania powyższego etapu, reakcje prowadziłam z zastosowaniem różnych rozpuszczalników oraz temperatur. W niektórych też przypadkach używałam układów sprzężonych składających się z dwóch reaktorów oraz podłączonej zewnętrznej pompy. Stopień konwersji substratu w produkt określany był za pomocą HPLC o którym już wspomniałam.

- Reakcje prowadzone w tetrahydrofuranie (THF):

Tabela 33: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	<i>n</i> -butyloamina	5

Uwagi: w tetrahydrofuranie uzyskuje się całkowite rozpuszczenie *trans*-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-yl)amino]cykloheksan-1-olu.

Tabela 34: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
1	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150), FLOW = 0.333 ml/min, $R_t = 15$ min., analiza HPLC: 92.19% dla substratu 7.81% dla produktu
2	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150), FLOW = 0.166, $R_t = 30$ min., analiza HPLC: 85.34% dla substratu 14.66% dla produktu
3	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150), FLOW = 0.1, $R_t = 48$ min., analiza HPLC: 77.35% dla substratu 22.65% dla produktu

Tabela 35: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
4	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, $R_t = 15$ min., analiza HPLC: 79.56% dla substratu 20.44% dla produktu
5	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, $R_t = 30$ min., analiza HPLC: 70.38% dla substratu 29.62% dla produktu

Wnioski: z przedstawionych danych wynika, że podłączenie do systemu przepływowego (FLOW) zewnętrznej pompy prawie 3x krotnie poprawia stopień konwersji substratu w produkt w reakcji o czasie rezystancji ($R_t = 15$ minut) w temperaturze 100 °C.

Tabela 36: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
6	THF	120	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) FLOW=1, R_t = 5 min., analiza HPLC: 90.70% dla substratu 9.30% dla produktu
7	THF	120	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 35.97% dla substratu 64.03% dla produktu
8	THF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: 31.58% dla substratu 68.42% dla produktu
9	THF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 7.02% dla substratu 92.98% dla produktu

Wnioski: z analizy otrzymanych wyników zauważyć można iż prowadzenie reakcji w wyższych temperaturach tj. 120 i 140 °C oraz podłączonej pompie zewnętrznej zapewnia uzyskanie dużo lepszej konwersji substratu w produkt w przeciwieństwie do procesu, który przebiega w temperaturze 100 °C.

➤ Reakcje prowadzone w izopropanolu (IPA):

Tabela 37: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	<i>n</i> -butyloamina	7

Uwagi: w izopropanolu „Reagent A” słabo się rozpuszcza dlatego też w celu uzyskania klarownego roztworu fiolkę oznaczoną jako „Reagent A” należy wstawić na 5 minut do łaźni ultradźwiękowej i podgrzać.

Tabela 38: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
10	IPA	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: 19.75% dla substratu 80.25% dla produktu
11	IPA	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 5.33% dla substratu 94.67% dla produktu

➤ Reakcje prowadzone w etanolu (EtOH):

Tabela 39: Zastosowane proporcje reagentów

	Proporcja (eq)
Reagent A <i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-yl)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B <i>n</i> -butyloamina	7

Tabela 40: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
12	EtOH	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: 24.39% dla substratu 75.61% dla produktu
13	EtOH	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 5.24% dla substratu 94.66% dla produktu

➤ Reakcje prowadzone w dimetyloformamidzie (DMF):

Tabela 41: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	<i>n</i> -butyloamina	7

Tabela 42: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
14	DMF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 1, R_t = 5 min., analiza HPLC: 14.69% dla substratu 46.08% dla produktu 39.24% dla produktu ubocznego
15	DMF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.5, R_t = 10 min., analiza HPLC: brak substratu 50.26% dla produktu 49.74% dla produktu ubocznego

16	DMF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: brak substratu 46.64% dla produktu 53.36% dla produktu ubocznego
17	DMF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: brak substratu 46.63% dla produktu 53.37% dla produktu ubocznego

Wnioski: prowadzenie syntezy z wykorzystaniem dimetyloformamidu (DMF) wiąże się z generowaniem oprócz oczekiwanego produktu dodatkowo produktu ubocznego.

➤ Reakcje prowadzone w dimetylosulfotlenku (DMSO):

Tabela 43: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	<i>n</i> -butyloamina	7

Tabela 44: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]
18	DMSO	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 1, R_t = 5 min., analiza HPLC: 18.48% dla substratu 81.52% dla produktu
19	DMSO	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.714, R_t = 7 min., analiza HPLC: 11.43% dla substratu

			88.57% dla produktu
20	DMSO	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.5, R_t = 10 min., analiza HPLC: 5.52% dla substratu 94.48% dla produktu
21	DMSO	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
22	DMSO	150	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 1, R_t = 5 min., analiza HPLC: 7.49% dla substratu 92.51% dla produktu
23	DMSO	150	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.5, R_t = 10 min., analiza HPLC: 1.49% dla substratu 98.51% dla produktu

Wnioski: uzyskane dane z syntez prowadzonych w DMSO obrazują, że zastosowanie wyższej temperatury umożliwiła uzyskanie satysfakcjonującej konwersji substratu w produkt (powyżej 90%) w krótszym czasie trwania reakcji.

➤ Reakcje prowadzone w 1,4-dioksanie:

Tabela 45: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	<i>n</i> -butyloamina	7

Tabela 46: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
24	Dioksan	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: 17.41% dla substratu 82.59% dla produktu
25	Dioksan	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 5.45% dla substratu 94.55% dla produktu

➤ Reakcje prowadzone w acetonitrylu (ACN):

Tabela 47: Warunki reakcji aminowania i otrzymane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
26	ACN	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min., analiza HPLC: 30.27% dla substratu 69.73% dla produktu
27	ACN	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 27.71% dla substratu 72.29% dla produktu

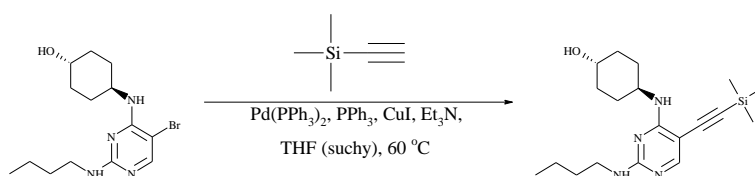
Podjęłam także próby przeprowadzenia reakcji w toluenie jednak ze względu na brak uzyskania nie tylko klarownego roztworu ale również zawiesiny dla *trans*-4-{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-olu zrezygnowałam z realizacji tego planu.

Podsumowanie:

Z otrzymanych danych wyraźnie widać, że w przypadku reakcji *N*-aminowania na stopień konwersji i czas jej prowadzenia wpływ ma rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika jak również temperatura reakcji. Pełną konwersję substratu w produkt obserwuje się już po 15 minutach trwania reakcji w przypadku syntez prowadzonych w dimetylosulfotlenku i w temperaturze 140 °C.

5.1.3. Reakcja krzyżowego sprzężenia Sonogashiry

Reakcja prowadzona metodą „wsadową”:



Do kolbki odważyłam *trans*-4-([5-bromo-2-(butylamino)pirymidyn-4-ylo]amino)-cykloheksan-1-ol (3.58 g, 10.4 mmol) po czym dodałam 50 mL tetrahydrofuranu (THF). Następnie do mieszaniny dodawałam kolejne reagenty (proces ten prowadzony był w temperaturze pokojowej i w atmosferze argonu (Ar)): trimetylosililoacetylen (3.1 mL, 20.9 mmol), jodek miedzi (I) (100 mg, 0.417 mmol), dichlorek bis(trifenylofosfino)palladu(II) (395.5 mg, 0.521 mmol) oraz 7.5 mL trietyloaminy. Po kilkuminutowym mieszananiu otrzymanej mieszaniny w atmosferze gazu obojętnego mieszaninę prowadziłam w temperaturze 60 °C przez 24h. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (heptan/octan etylu 11 v/v). Na płycie TLC widoczny był substrat reakcji. Pomimo tego reakcje postanowiłam zakończyć. Mieszaninę reakcyjną przesączyłam przez lejek typu Schott z celitem, który przemyłam kilkakrotnie chlorkiem metylenu. Nadmiar rozpuszczalnika odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem a otrzymany surowy półprodukt oczyszczałam za pomocą systemu FLASH (eluent: heptan /octan etylu). Oczekiwany produkt eluował przy 40% octanu etylu. Uzyskałam czysty związek w postaci intensywnie żółtego osadu (624 mg, 16.6%).

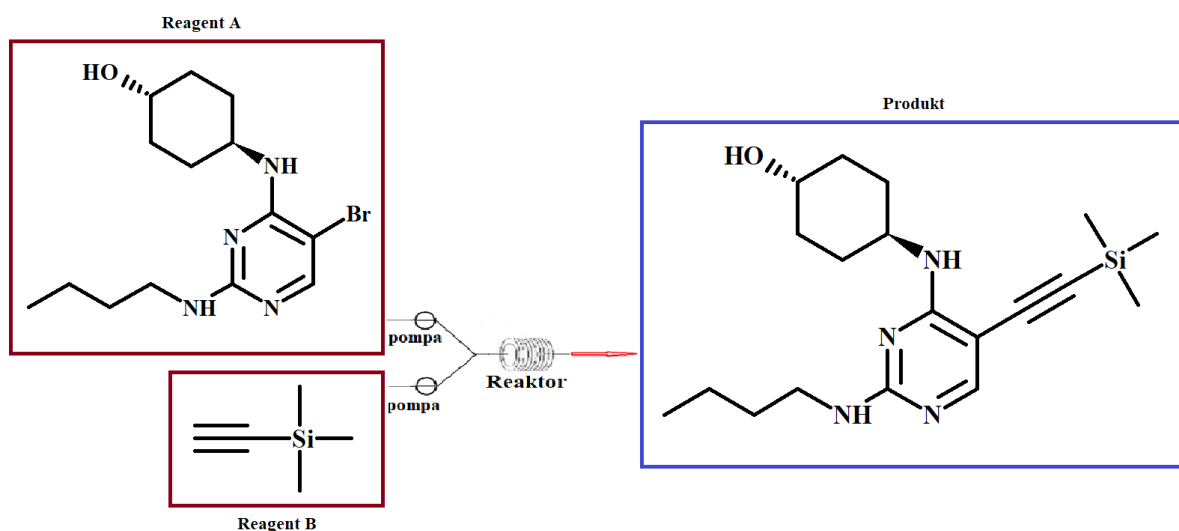
MS-APCI: *m/z* 361.3 [M+H]⁺

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.11 (t, $J = 17.8$ Hz, 2H), 3.91 (qd, $J = 11.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.69 (tt, $J = 10.4, 4.2$ Hz, 1H), 3.36 (td, $J = 7.1, 6.0$ Hz, 2H), 2.15 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 2.07 – 1.96 (m, 2H), 1.60 – 1.53 (m, 2H), 1.50 – 1.35 (m, 4H), 1.33 – 1.22 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.25 – 0.23 (m, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 161.03 (s), 158.67 (s), 99.54 (s), 69.86 (s), 41.21 (s), 33.93 (s), 31.95 (s), 30.62 (s), 22.76 (s), 20.20 (s), 13.93 (s), 0.24 (s).

W reakcji krzyżowego sprzężenia Sonogashiry ogromne znaczenie ma kolejność dodawanych do mieszaniny reagentów, ponieważ w reakcji prowadzonej również w tetrahydrofuranie (THF), gdzie jako pierwszą po substracie dodałam trietyloaminę (TEA) następnie jodek miedzi i katalizator palladowy a na samym końcu trimetylosililoacetylen nie udało mi się otrzymać oczekiwanego produktu.

Synteza przy wykorzystaniu systemu przepływowego:



Schemat 14: Reakcja Sonogashiry.

W celu zoptymalizowania powyższego etapu, reakcje prowadzone były z zastosowaniem różnych rozpuszczalników, katalizatora palladowego, temperatur oraz reaktorów z podłączoną zewnętrzną pompą. Stopień konwersji substratu w produkt określany był za pomocą analiz MS-TLC oraz HPLC.

➤ Reakcje prowadzone w *N*-metylopirolidynie (NMP):¹⁴⁷

Tabela 48: Warunki reakcji krzyżowego sprzęgania Sonogashiry

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg MS-TLC]</i>
1	NMP	160	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (250), FLOW = 0.7, R_t = 10 min., analiza MS-TLC: <ul style="list-style-type: none"> +344 masa substratu +361 śladowe ilości masy produktu

Wnioski: niestety nie udało mi się uzyskać oczekiwanego produktu opierając się na procedurze opisanej w literaturze.

➤ Reakcje prowadzone w tetrahydrofuranie (THF):

Tabela 49: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-{{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol}	1
Reagent B	trimetylosililoacetylen	2

Tabela 50: Warunki reakcji krzyżowego sprzęgania Sonogashiry

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]</i>
1	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min., analiza HPLC: 97.58% dla substratu 2.42% dla produktu
2	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min., analiza HPLC: 69.85% dla substratu 30.15% dla produktu

Wnioski: jak można zauważyć prowadzenie reakcji w temperaturze 100 °C zapewnia prawie 15-krotny wzrost konwersji substratu w produkt.

➤ Reakcje prowadzone w dimetyloacetamidzie (DMA):

Tabela 51: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-{{[5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol}	1
Reagent B	trimetylosililoacetylen	2

Tabela 52: Warunki reakcji krzyżowego sprzęgania Sonogashiry

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]
1	DMA	160	<ul style="list-style-type: none"> • Pojedynczy reaktor typu Heater (250) oraz pompa zewnętrzna <ul style="list-style-type: none"> • FLOW = 0.1, R_t = 50 min., • analiza HPLC: 84.37% dla substratu 6.56% dla produktu 9.07% dla produktu ubocznego
2	DMA	170	<ul style="list-style-type: none"> • Pojedynczy reaktor typu Heater (250) oraz pompa zewnętrzna <ul style="list-style-type: none"> • FLOW = 0.166, R_t = 30 min., • analiza HPLC: 82.46% dla substratu 12.19% dla produktu 5.35% dla produktu ubocznego

Wnioski: analizując powyższe dane wyraźnie widać, że wykorzystanie dimetyloacetamidu jako rozpuszczalnika wiąże się z powstawaniem produktu ubocznego.

➤ Reakcje prowadzone w dimetylosulfotlenku (DMSO):

Tabela 53: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	<i>trans</i> -4-{{5-bromo-2-(butyloamino)pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	trimetylosililoacetylen	2

Tabela 54: Warunki reakcji krzyżowego sprzęgania Sonogashiry

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji, konwersja [wg HPLC]
1	DMSO	60	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min., analiza HPLC: 85.34% dla substratu 14.66% dla produktu
2	DMSO	80	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 44.78% dla substratu 55.22% dla produktu
3	DMSO	130	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 85.31% dla substratu 14.69% dla produktu
4	DMSO	160	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (250) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min., analiza HPLC: 78.26% dla substratu 21.74% dla produktu
5	DMSO	180	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (250) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., analiza HPLC: 63.81% dla substratu 6.33% dla produktu 29.85% dla produktu ubocznego (związek bez -Br)

Po przeanalizowaniu otrzymanych danych do kolejnych reakcji wybrałam temperaturę 100 °C jako najbardziej optymalną i sprawdziłam stopień konwersji.

Tabela 55: Warunki reakcji krzyżowego sprzęgania Sonogashiry

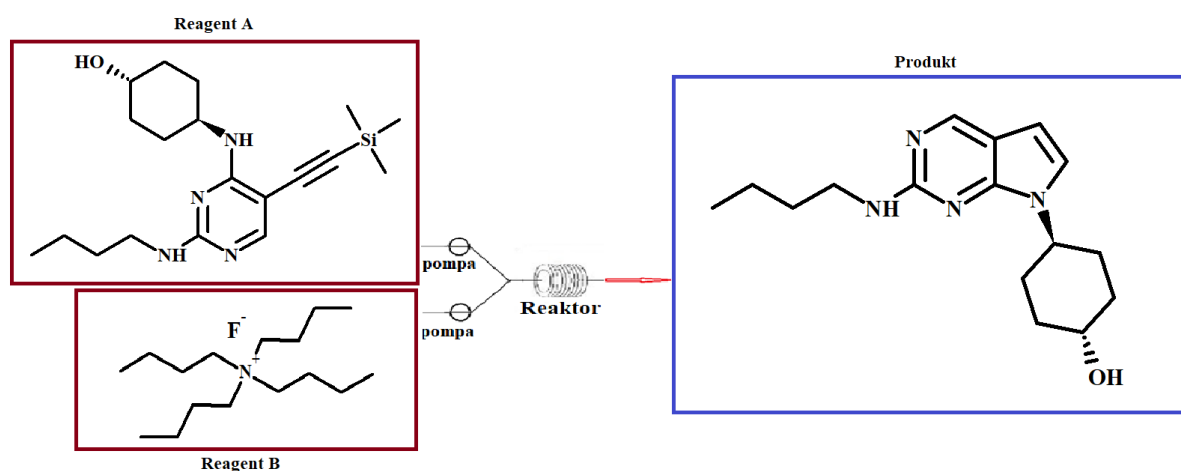
<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none">• Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna• FLOW = 1, R_t = 5 min.,• analiza HPLC: 68% dla substratu 32% dla produktu
2	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none">• Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna• FLOW = 0.333, R_t = 15 min.,• analiza HPLC: 66.91% dla substratu 33.09% dla produktu
3	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none">• Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna• FLOW = 0.250, R_t = 20 min.,• analiza HPLC: 62.99% dla substratu 37.01% dla produktu
4	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none">• Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna• FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,• analiza HPLC: 50.86% dla substratu 49.04% dla produktu
5	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none">• Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna• FLOW = 0.125, R_t = 40 min.,• analiza HPLC: 67.96% dla substratu 32.04% dla produktu
6	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none">• Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna• FLOW = 0.1, R_t = 50 min.,• analiza HPLC: 48.33% dla substratu 51.67% dla produktu

Wnioski: analizując dane otrzymane z doświadczeń prowadzonych w dimetylosulfotlenku zauważyć można, że najbardziej optymalne warunki reakcji Sonogashira to temperatura w zakresie od 80 do 100 °C. Warunki te umożliwiają osiągnięcie konwersji na poziomie 50% czego nie osiąga się przy wyższych temperaturach.

Podsumowanie:

W oparciu o pozyskane wyniki, stwierdzić można, że najlepsze rezultaty dla reakcji krzyżowego sprzęgania Sonogashiry osiąga się w zakresie temperatur od 80 do 100 °C wykorzystując jako rozpuszczalnik dimetylosulfotlenek. Warunki te prowadzą do uzyskania konwersji na poziomie 50%.

5.1.4. Reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji



Schemat 15: Reakcja cyklizacji.

Na etapie reakcji cyklizacji (Schemat 15) jedynym sposobem oceny stopnia przereagowania substratu w produkt była analiza magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), ponieważ masa molowa produktu cyklicznego jest taka sama jak substratu pozbawionego grupy trimetylosililowej $-(\text{CH}_3)_3\text{-Si}$.

Opisane poniżej próby 1 i 2 reakcji cyklizacji przeprowadziłam przy zastosowaniu technologii przepływowej (FLOW) i wykorzystaniu procedur syntetycznych przedstawionych w literaturze.¹⁴⁸

Próba 1

W tym celu:

- do fiolki oznaczonej jako „Reagent A” odważyłam 4-[[2-(butyloamino)-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-yl]amino]cykloheksan-1-ol (0.040 g, 0.111 mmol) i dodałam 10 mL tetrahydrofuranu (THF) otrzymując żółty roztwór o $C = 0.01$ M.

- do fiolki oznaczonej jako „Reagent B” dodałam roztwór fluorku tetrabutylamoniowego (1 mol/l w THF) (0.2 mL, 0.2 mmol) oraz 10 mL (THF) uzyskując roztwór o C= 0.02 M.

Tabela 56: Warunki reakcji cyklizacji

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji</i>
1	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> • Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna • FLOW = 1, R_t = 5 min.,
2	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> • Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna • FLOW = 0.5, R_t = 10 min.,
3	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> • Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna • FLOW = 0.25, R_t = 20 min.,

Dla każdej mieszaniny reakcyjnej otrzymanej na drodze zastosowanych metod wykonałam w pierwszej kolejności ekstrakcję z chlorkiem metylenu a po osuszeniu fazy organicznej wykonałam analizę NMR. Niestety nie udało mi się otrzymać oczekiwanego produktu reakcji.

Próba 2

W tym celu:

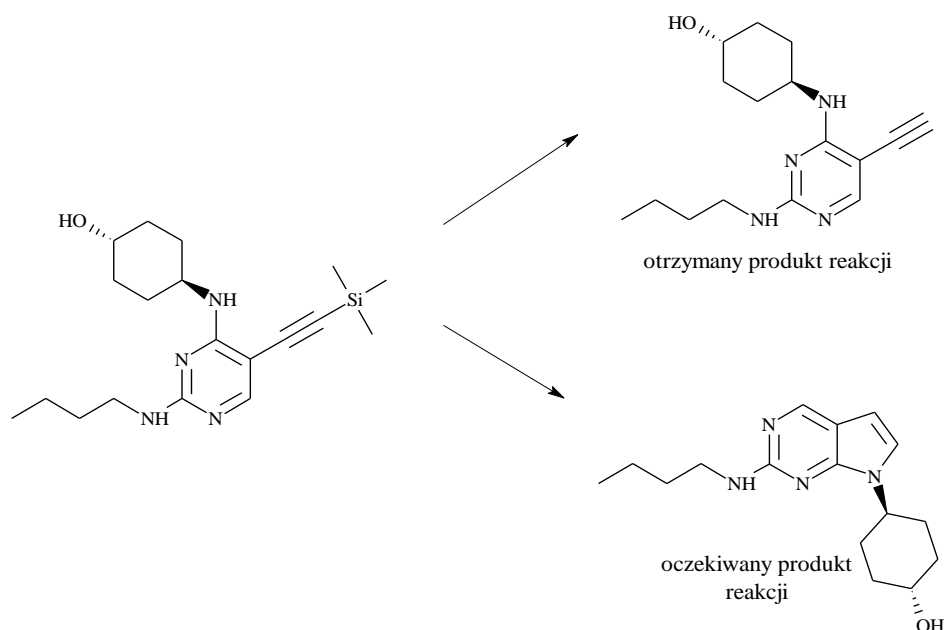
- do fiolki oznaczonej jako „Reagent A” odważyłam 4-[[2-(butyloamino)-5-[2(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol (0.0713 g, 0.198 mmol) i dodałam 10 mL tetrahydrofuranu (THF) oraz tert-butanolan potasu (0.0546 g, 0.472 mmol) otrzymując brązową zawiesinę o C = 0.02 M.

- do fiolki oznaczonej jako „Reagent B” dodałam roztwór fluorku tetrabutylamoniowego (1 mol/l w THF) (0.4 mL, 0.4 mmol) oraz 10 mL (THF) uzyskując roztwór o C= 0.04 M.

Tabela 57: Warunki reakcji cyklizacji

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji
1	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.25, R_t = 20 min.,
2	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,

Podobnie jak w przypadku pierwszej próby dla otrzymanych mieszanin wykonałam ekstrakcje a następnie analizę NMR. Niestety na widmach nie widać 3 charakterystycznych dla związku cyklicznego protonów w części aromatycznej co świadczyłoby o otrzymaniu oczekiwanego produktu. Ponadto nie widać 9 protonów od grupy trimetylosililowej ((CH₃)₃-Si). Dane te świadczą o fakcie, że w trakcie prowadzonych reakcji otrzymywany jest 4-{[2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol a nie oczekiwany *trans*-4-[2(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksan-1-ol (Schemat 16).



Schemat 16. Oczekiwany oraz otrzymany produkt reakcji cyklizacji.

Wiedząc już, że produktem wcześniejszych reakcji jest 4-{{2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol powtórzyłam próbę 1 oraz wykonałam reakcje odbezpieczania grupy ((CH₃)₃-Si).

Tabela 58: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	4-{{2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	fluorek tetrabutylamonowy	2.5

Tabela 59: Warunki reakcji

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji
1	THF	80	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,

Po wykonanym podziale chromatograficznym w układzie heptan/octan etylu wyizolowałam 9 mg białego związku. Niestety analiza NMR wykazała, że jest to substrat reakcji a nie produkt cykliczny.

- Reakcja odbezpieczania grupy trimetylosililowej prowadzona klasycznie:

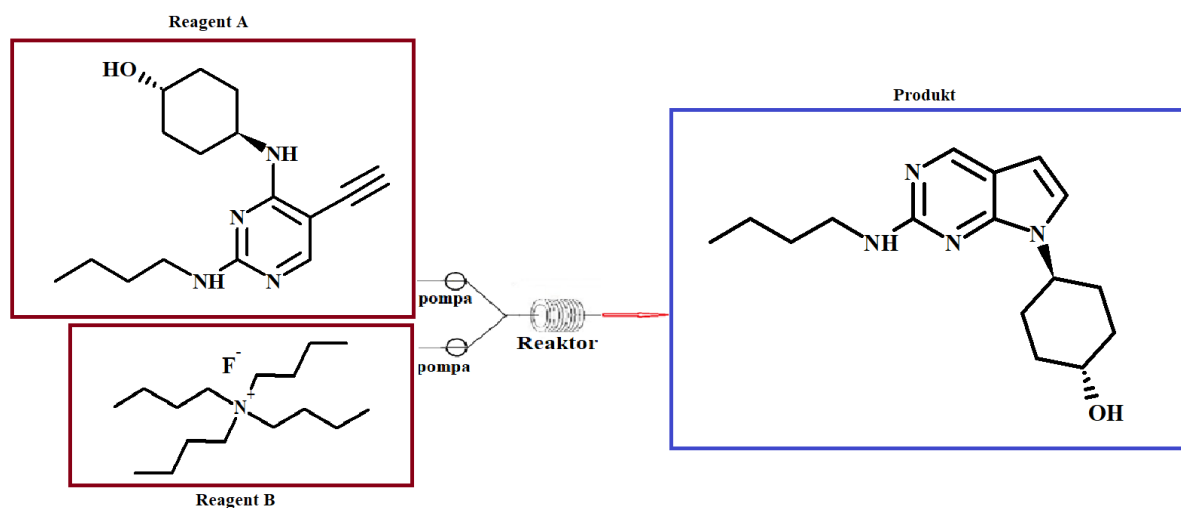
Do kolbki odważyłam 4-{{2-(butyloamino)-5-[2 (trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol (0.400 g, 1.11 mmol) po czym dodałam 15 mL metanolu (MeOH) oraz węglań potasu (0.028 g, 0.201 mmol). Całość mieszałam w temperaturze pokojowej przez 3.5h. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (heptan/octan etylu 1:1 v/v). Ze względu na obserwowane śladowe ilości substratu reakcje przerwałam. Z mieszaniny usunęłam nadmiar rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie surowy produkt oczyszczałam. Podział chromatograficzny prowadziłam przy aplikacji systemu FLASH (eluent: heptan /octan etylu). Uzyskałam związek w postaci beżowego osadu (445.8 mg, 79.6%).

MS-APCI: m/z 289.3 [M+H]⁺

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.97 (s, 1H), 5.21 (d, $J = 103.5$ Hz, 2H), 3.98 – 3.88 (m, 1H), 3.67 (tt, $J = 10.5, 4.2$ Hz, 1H), 3.41 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 3.39 – 3.34 (m, 2H), 2.13 (s, 2H), 2.03 (dd, $J = 8.7, 3.9$ Hz, 2H), 1.60 – 1.54 (m, 2H), 1.48 – 1.37 (m, 4H), 1.33 – 1.24 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 161.22 (s), 159.29 (s), 83.79 (s), 78.35 (s), 69.87 (s), 41.19 (s), 34.07 (s), 31.94 (s), 30.76 (s), 21.34 (s), 19.27 (s), 15.53 (s), 13.17 (s).

Posiadając związek 4-{{2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol przystąpiłam do dalszej optymalizacji procesu cyklizacji (Schemat 17).



Schemat 17: Ogólny schemat cyklizacji prowadzonej przy aplikacji technologii przepływowej.

- Reakcja prowadzona w dimetyloformamidzie (DMF):

Tabela 60: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	4-{{2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	fluorek tetrabutylamoniowy	1

Tabela 61: Warunki reakcji cyklizacji

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji</i>
1	DMF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,
2	DMF	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min.,

Wnioski: analiza NMR wykonana dla otrzymanych mieszanin z powyższych reakcji nie wykazała otrzymania oczekiwanego produktu. Dlatego też kolejne reakcje cyklizacji wykonałam przy użyciu technologii mikrofalowej.

- Reakcja A

W tym celu do naczynka mikrofalowego o pojemności 10 mL odważyłam 4-{[2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol (0.0343 g, 0.119 mmol) i dodałam 2.3 mL tetrahydrofuranu (THF). Uzyskaną mieszaninę mieszałam przez około 5 minut w atmosferze gazu obojętnego (Ar) po czym dodałam roztwór fluorku tetrabutylamonowego (1 mol/l w THF) (0.270 mL, 0.27 mmol).

Naczynko wstawiłam do mikrofal:

Tabela 62: Warunki reakcji cyklizacji

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Parametry reakcji</i>
1	THF	65	<ul style="list-style-type: none"> t = 10 min., Moc (P) = 100 [Watt], Ciśnienie (p) = 300 [psi] Maksymalna siła = wyłączona
2	THF	65	<ul style="list-style-type: none"> t = 20 min., Moc (P) = 100 [Watt], Ciśnienie (p) = 300 [psi] Maksymalna siła = wyłączona
3	THF	100	<ul style="list-style-type: none"> t = 10 min., Moc (P) = 100 [Watt], Ciśnienie (p) = 300 [psi] Maksymalna siła = wyłączona

Wnioski: podobnie jak wcześniej w tym przypadku również nie udało mi się otrzymać oczekiwanego związku.

- Reakcja B przygotowana na podstawie procedury opisanej w literaturze¹³⁵

Do naczynka mikrofalowego o pojemności 10 mL odważyłam 4-{[2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo]amino}cykloheksan-1-ol (0.0363 g, 0.126 mmol), *tert*-butanolan potasu (0.2555 g, 2.21 mmol) i 2 mL (DMF). Po rozpuszczeniu substratów naczynko wstawiłam do mikrofal:

Tabela 63: Warunki reakcji cyklizacji

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Parametry reakcji</i>
1	DMF	120	<ul style="list-style-type: none">• t = 30 min.,• Moc (P) = 100 [Watt],• Ciśnienie (p) = 300 [psi]• Maksymalna siła = wyłączona Na TLC widoczny substrat więc naczynko ponownie wstawiłam do mikrofal na:
2	DMF	120	<ul style="list-style-type: none">• t = 15 min.,• Moc (P) = 100 [Watt],• Ciśnienie (p) = 300 [psi]• Maksymalna siła = wyłączona• Łączny czas prowadzenia reakcji to 45 min.

Wnioski: dla jednej z frakcji otrzymanej z podziału chromatograficznego wstępna analiza NMR potwierdziła strukturę oczekiwanego produktu cyklicznego.

W związku z powyższym syntezę powtórzyłam ale tym razem przy zastosowaniu systemu przepływowego.

Tabela 64: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	4-{{2-(butyloamino)-5-etynylopirymidyn-4-ylo}amino}cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	<i>tert</i> -butanolan potasu	20

Tabela 65: Warunki reakcji cyklizacji

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji
1	DMF	120	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,
2	DMF	120	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min.,
3	DMF	120	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 1, R_t = 5 min.,

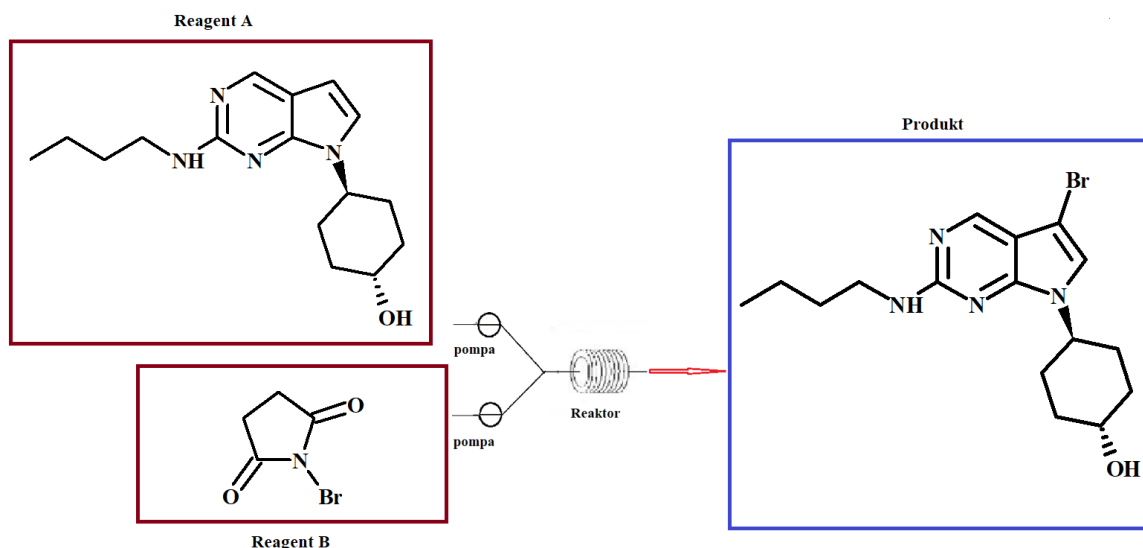
Wnioski: dla 3 otrzymanych mieszanin reakcyjnych wykonałam podział chromatograficzny a następnie analizę (NMR). Analiza widm potwierdziła otrzymanie oczekiwanej struktury cyklicznej. Co więcej dla frakcji pozyskanej z Metody 3, trwającej jedynie 5 minut widmo jest najczystsze. Dodatkowo otrzymane wyniki z powyższych reakcji potwierdzają, że reakcje cyklizacji z sukcesem można prowadzić przy zastosowaniu technologii przepływowej i synteza trwająca jedynie 5 minut pozwala już na otrzymanie oczekiwanego produktu (14.5 mg, 27%).

¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 1H), 6.83 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.28 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.47 (tt, J = 12.0, 3.9 Hz, 1H), 3.74 (tt, J = 11.1, 4.3 Hz, 1H), 3.44 (td, J = 7.0, 5.9 Hz, 2H), 2.09 (dddd, J = 13.2, 8.5, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 1.65 – 1.50 (m, 4H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ 159.06 (s), 152.60 (s), 150.34 (s), 121.95 (s), 111.84(s), 99.77 (s), 69.95 (s), 52.11 (s), 41.62 (s), 34.68 (s), 31.97 (s), 30.64 (s), 20.27 (s), 13.99 (s).

5.1.5. Optymalizacja reakcji halogenowania (-Br)

Kolejnym etapem optymalizacji jest reakcja halogenowania a dokładniej addycji bromu (-Br) do cząsteczki (1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-olu zgodnie z poniższym schematem (Schemat 18).



Schemat 18: Reakcja halogenowania (1*r*,4*r*)-4-[2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-olu.

Reakcje prowadzone przy wykorzystaniu technologii przepływowej:

- Reakcje wykonane w acetonitrylu (ACN) w oparciu o metodę opisaną w literaturze¹³⁰

Tabela 66: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[2-(butyloamino)-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	NBS (<i>N</i> -bromosukcynoimid)	1

Tabela 67: Warunki reakcji halogenowania

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji</i>
1	ACN	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,
2	ACN	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min.,

Wnioski: niestety wykonana analiza MS-TLC dla otrzymanych mieszanin reakcyjnych nie wykazała masy oczekiwanego produktu. Czas rezystancji (R_t) trwający 0.5h był za krótki aby otrzymać nawet ślady produktu ponieważ widoczna była jedynie plamka jak i masa molowa substratu co potwierdziła analiza MS-TLC. Natomiast w przypadku reakcji o (R_t) wynoszącym 50 minut nie obserwuje się masy produktu ani substratu.

Sprawdziłam także reakcje, które prowadziłam w jednym naczynku do którego dodałam wszystkie reagenty.

W metodzie (3) użyłam większą ilość NBS (*N*-bromosukcynoimidu) odważając (0.062 g, 0.348 mmol) w odróżnieniu od metody (4), w której zastosowałam temperaturę 160 °C i stosunek molowy substratu oraz NBS (1:1 czyli 0.170 : 0.170 mmol).

Tabela 68: Warunki reakcji halogenowania

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji</i>
3	ACN	140	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150), pojedyncze naczynko oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.5, R_t = 20 min.,
4	ACN	160	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) pojedyncze naczynko oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.1, R_t = 50 min.,

Wnioski: podobnie jak przypadku wcześniejszych reakcji również powyższe metody nie przyniosły oczekiwanego rezultatu.

➤ Reakcje prowadzone w dimetyloformamidzie (DMF):

Tabela 69: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	(1r,4r)-4-[2-(butyloamino)-7H-pirololo[2,3-d]pirymidyn-7-yl]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	NBS (<i>N</i> -bromosukcynoimid)	1

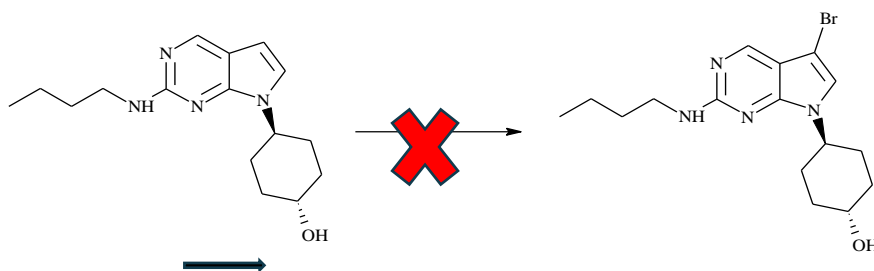
Tabela 70: Warunki reakcji halogenowania

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji
1	DMF	40	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150), oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,
2	DMF	60	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min.,

Wnioski: prowadzenie reakcji halogenowania w dimetyloformamidzie także nie doprowadziło do otrzymania właściwego produktu.

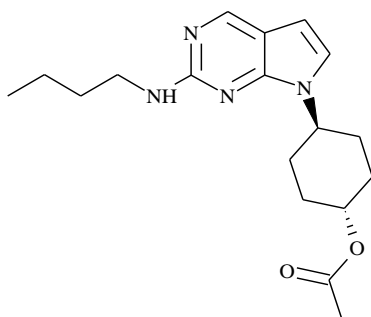
W celu sprawdzenia wykonałam dodatkowo reakcje pilotową w dimetyloformamidzie metodą klasyczną w temperaturze pokojowej. Niestety reakcja ta nie przyniosła oczekiwanych rezultatów.

Początkowo sądziłam, że za brak postępu powyższych reakcji odpowiada wolna (niezabezpieczona) grupa hydroksylowa (-OH) pochodząca od cykloheksanolu.

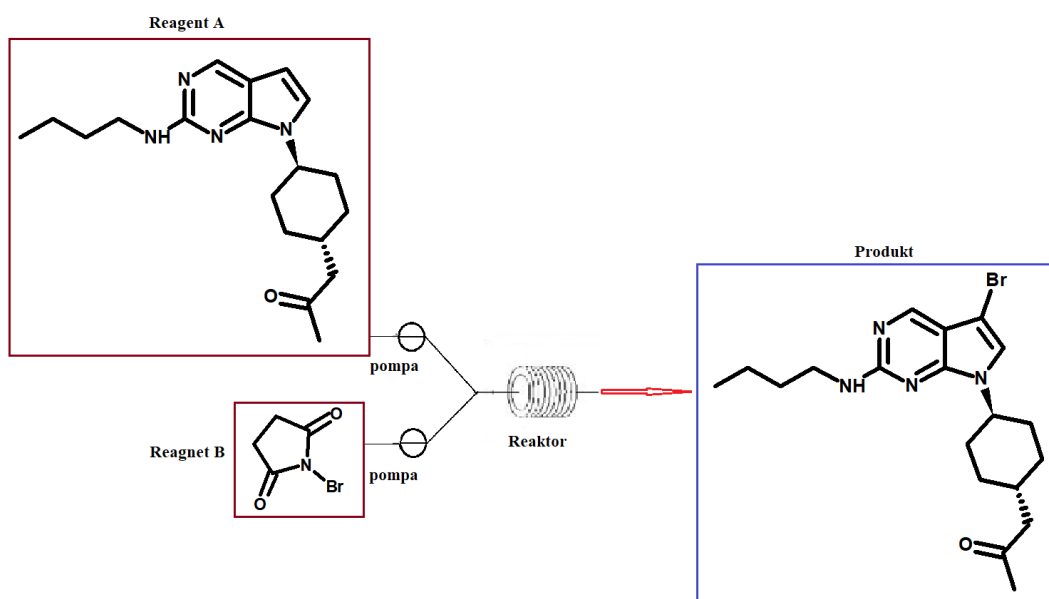


Schemat 19: Wskazanie czynnika odpowiedzialnego za brak postępu reakcji halogenowania.

W związku z tym kolejne reakcje addycji bromu (-Br) prowadziłam z zastosowaniem octanu *trans*-4-[2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl]cykloheksylu, w którym grupa hydroksylowa zabezpieczona jest grupą acetylową CH₃-C(=O)R (Rysunek 21, Schemat 20).



Rysunek 21: Struktura „nowego” substratu stosowanego do dalszych prac związanych z optymalizacją reakcji halogenowania.



Schemat 20: Sposób prowadzenia reakcji z zastosowaniem chemii przepływowej i „nowego” substratu.

➤ Reakcje przeprowadzone w dimetyloformamidzie (DMF- suchy):

Tabela 71: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	octan <i>trans</i> -4-[2-(butyloamino)-7H-piolo[2,3-d]pirymidyn-7-ylo]cykloheksylu	1
Reagent B	NBS (<i>N</i> -bromosukcynoimid)	1

Tabela 72: Warunki reakcji halogenowania

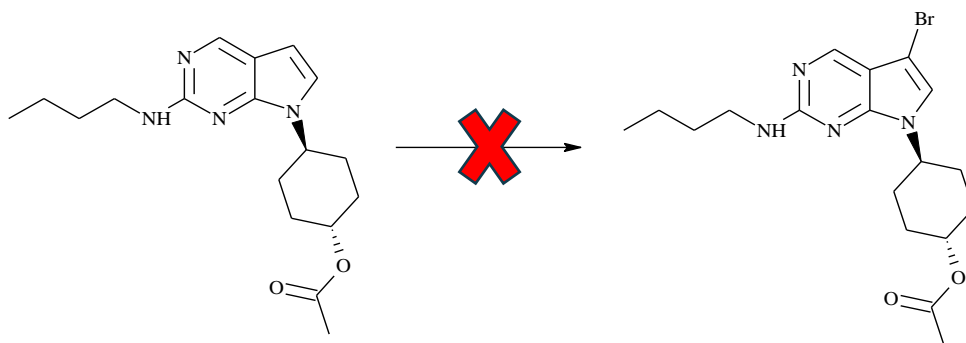
Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji
1	DMF	60	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.166, R_t = 30 min., Brak substratu oraz produktu reakcji
2	DMF	60	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 0.333, R_t = 15 min.,
3	DMF	60	<ul style="list-style-type: none"> Pojedynczy reaktor typu Heater (150) oraz pompa zewnętrzna FLOW = 1, R_t = 5 min.,

Wnioski: powyższe metody syntezy również nie doprowadziły do otrzymania właściwego związku.

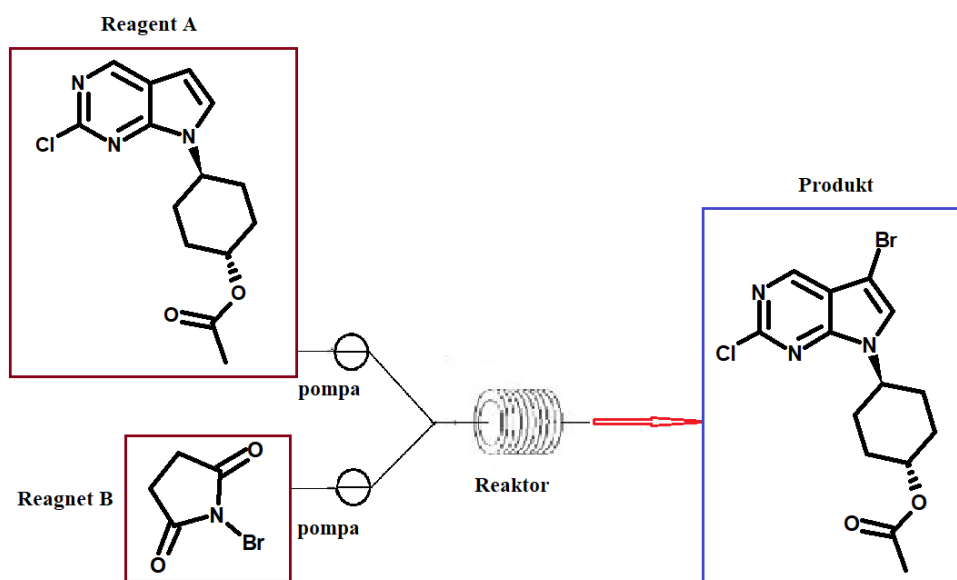
Wykonałam także reakcje pilotowe z wykorzystaniem klasycznych sposobów prowadzenia syntezy chemicznej i z zastosowaniem różnych rozpuszczalników między innymi: dimetyloformamidu (DMF świeżo destylowany), tetrahydrofuranu (THF) oraz dichlorometanu (DCM).

Tabela 73: Warunki reakcji halogenowania

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Obserwacje
1	DMF	0 → rt	<ul style="list-style-type: none"> Brak postępu reakcji
2	THF	rt	<ul style="list-style-type: none"> Brak postępu reakcji
3	DCM	0 → rt	<ul style="list-style-type: none"> Brak postępu reakcji

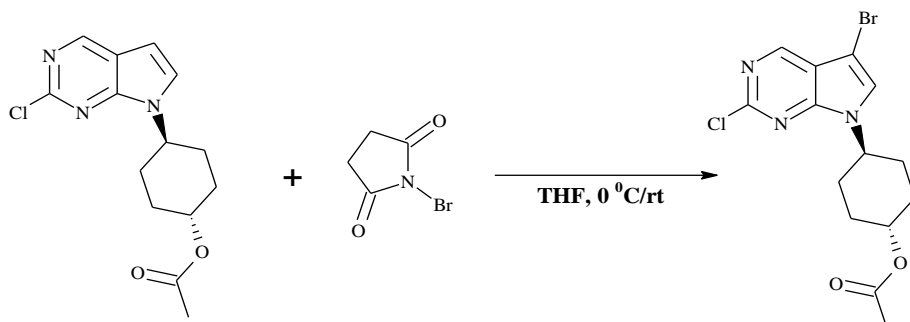


Brak oczekiwanych rezultatów w powyższej reakcji przyczynił się do sprawdzenia przeze mnie przebiegu reakcji gdy substratem będzie octan *trans*-4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksylu (Schemat 21).



Schemat 21: Optymalizacja procesu bromowania octanu *trans*-4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksylu jako substratu przy użyciu technologii FLOW.

Reakcja bromowania octanu *trans*-4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksylu prowadzona klasycznie:



Do kolbki przepłukanej argonem odważyłam octan 4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksylu (0.052 mg, 0.17 mmol) następnie dodałam tetrahydrofuran (suchy) (1.3 mL) i kolbkę wstawiłam do łaźni wodno-lodowej. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej dodałam NBS (*N*-bromosukcynoimid) (46.7 mg, 0.255 mmol). Po dodaniu wszystkich reagentów mieszanie w temperaturze 0 °C kontynuowałam przez około 10 minut a następnie mieszanie prowadziłam w temperaturze pokojowej przez 1h. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (heptan/octan etylu 3:1 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczany był za pomocą systemu FLASH (eluent: heptan /octan etylu, 3:1; produkt eluował przy 15% octanu etylu). Uzyskałam półprodukt 4 (50.2 mg) w postaci białego osadu z wydajnością 79.1%.

MS-APCI: m/z 373.0 [M+H]⁺

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.82 – 4.71 (m, 2H), 2.20 – 2.09 (m, 4H), 2.06 (s, 3H), 1.84 (ddd, *J* = 16.8, 12.8, 6.6 Hz, 2H), 1.70 – 1.60 (m, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 170.66 (s) , 154.49 (s) , 150.88 (s), 150.66 (s) , 125.63 (s), 117.57 (s), 88.83 (s), 71.38 (s), 52.63 (s), 30.91 (s), 30.49 (s), 21.38 (s). Z uwagi na nakładanie się sygnałów od cykloheksanu na powyższym widmie nie wszystkie sygnały są widoczne.

Reakcja bromowania *trans*-4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksylu przy wykorzystaniu technologii przepływowej:

Tabela 74: Zastosowane proporcje reagentów

		Proporcja (eq)
Reagent A	octan <i>trans</i> -4-[2-(butyloamino)-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-7-yl]cykloheksylu	1
Reagent B	NBS (<i>N</i> -bromosukcynoimid)	1.5

Uwagi: Przed rozpoczęciem nowej metody (M1-M4) roztwory odpowiednich reagentów „A i B” przygotowywane były bezpośrednio przed reakcją.

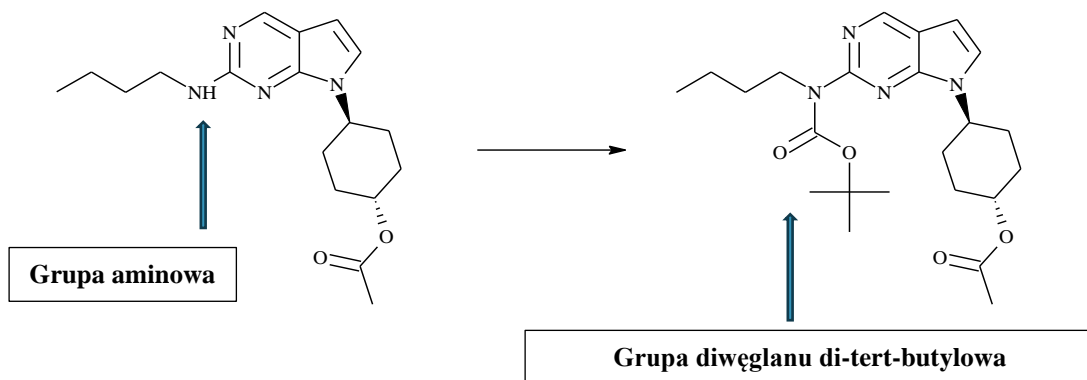
Tabela 75: Warunki reakcji halogenowania

Metoda	Rozpuszczalnik	Temperatura [°C]	Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]
1	THF	30	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30.12 min., Analiza HPLC: 0% dla substratu 100% dla produktu
2	THF	30	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15.02 min., analiza HPLC: 24.84% dla substratu 75.16% dla produktu
3	THF	50	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30.12 min., analiza HPLC: 91.00% dla substratu 9% dla produktu
4	DMF	30	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30.12 min., analiza HPLC: 100% dla substratu 0% dla produktu

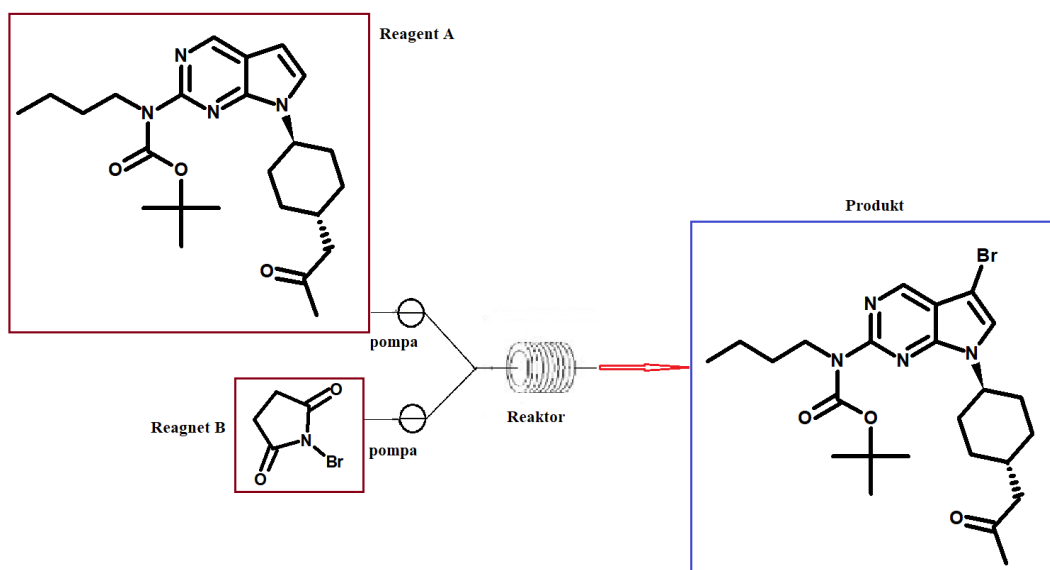
Wnioski: z przedstawionych w tabeli danych można zauważyć, że prowadzenie reakcji halogenowania w tetrahydrofuranie przy aplikacji systemu przepływowego pozwala na

otrzymanie oczekiwanego produktu już po 30 minutach reakcji ze 100% konwersją substratu w produkt.

Dodatkowo analizując powyższe dane stwierdzić można, że podstawienie aminy w miejscu chloru (-Cl) utrudnia reakcje bromowania. Dlatego też kolejne próby reakcji halogenowania przeprowadziłam gdy atom azotu przy aminie był zabezpieczony grupą diwęglanu di-*tert*-butylu (tzw. grupa BOC) zgodnie z poniższym rysunkiem (Rysunek 22, Schemat 22).



Rysunek 22: Zabezpieczenie atomu azotu od butyloaminy grupą diwęglanu di-*tert*-butylową.



Schemat 22: Optymalizacja procesu bromowania przy użyciu technologii FLOW i zabezpieczonym atomie azotu od butyloaminy grupą diwęglanu di-*tert*-butylową.

Reakcja bromowania octanu 4-(2-[[*tert*-butoksy]karbonylo](*butylo*)amino}-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksylu:

➤ Reakcje przeprowadzone w tetrahydrofuranie (THF) i dimetyloformamidzie (DMF):

Tabela 76: Warunki reakcji halogenowania i zebrane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC,%]</i>
1	THF	30	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30.12 min., analiza MS-TLC: + 409 (pik fragmentacyjny) + 510, 512 (pik od produktu)
2	THF	30	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.1, Rt=50 min., analiza MS-TLC: + 431 (pik od substratu)
3	DMF	30	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30.12 min., analiza HPLC: + 431 (pik od substratu)

Wnioski: jedynie metoda 1 pozwoliła na otrzymanie oczekiwanego produktu reakcji bromowania co potwierdziła wykonana analiza rezonansu magnetycznego.

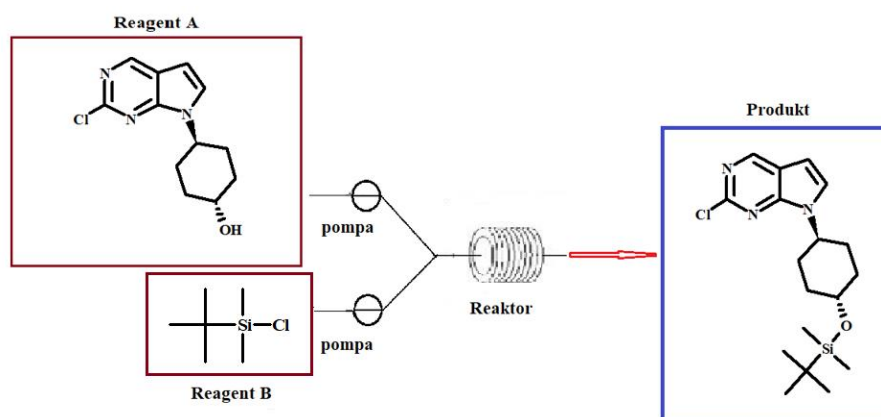
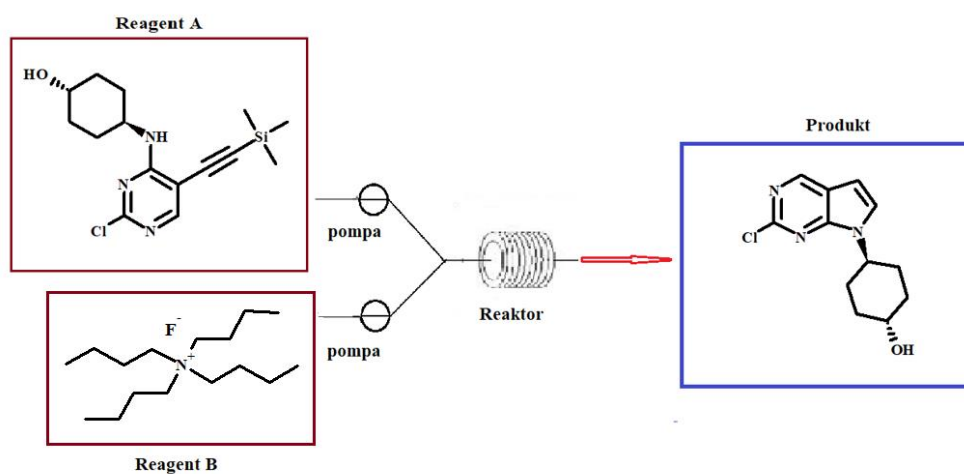
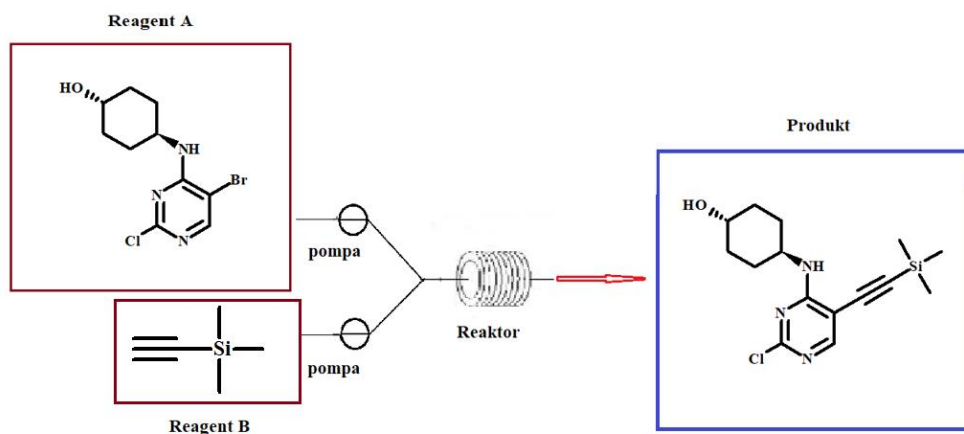
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 4.83 – 4.76 (m, 1H), 4.64 (tt, J = 12.0, 3.8 Hz, 1H), 3.94 – 3.88 (m, 2H), 2.15 (ddd, J = 15.0, 13.0, 8.3 Hz, 4H), 2.06 – 2.05 (m, 3H), 1.88 (qd, J = 12.9, 3.0 Hz, 2H), 1.65 – 1.59 (m, 4H), 1.48 (s, 9H), 1.33 (dd, J = 15.0, 7.5 Hz, 2H), 0.89 (dd, J = 12.2, 4.8 Hz, 3H).

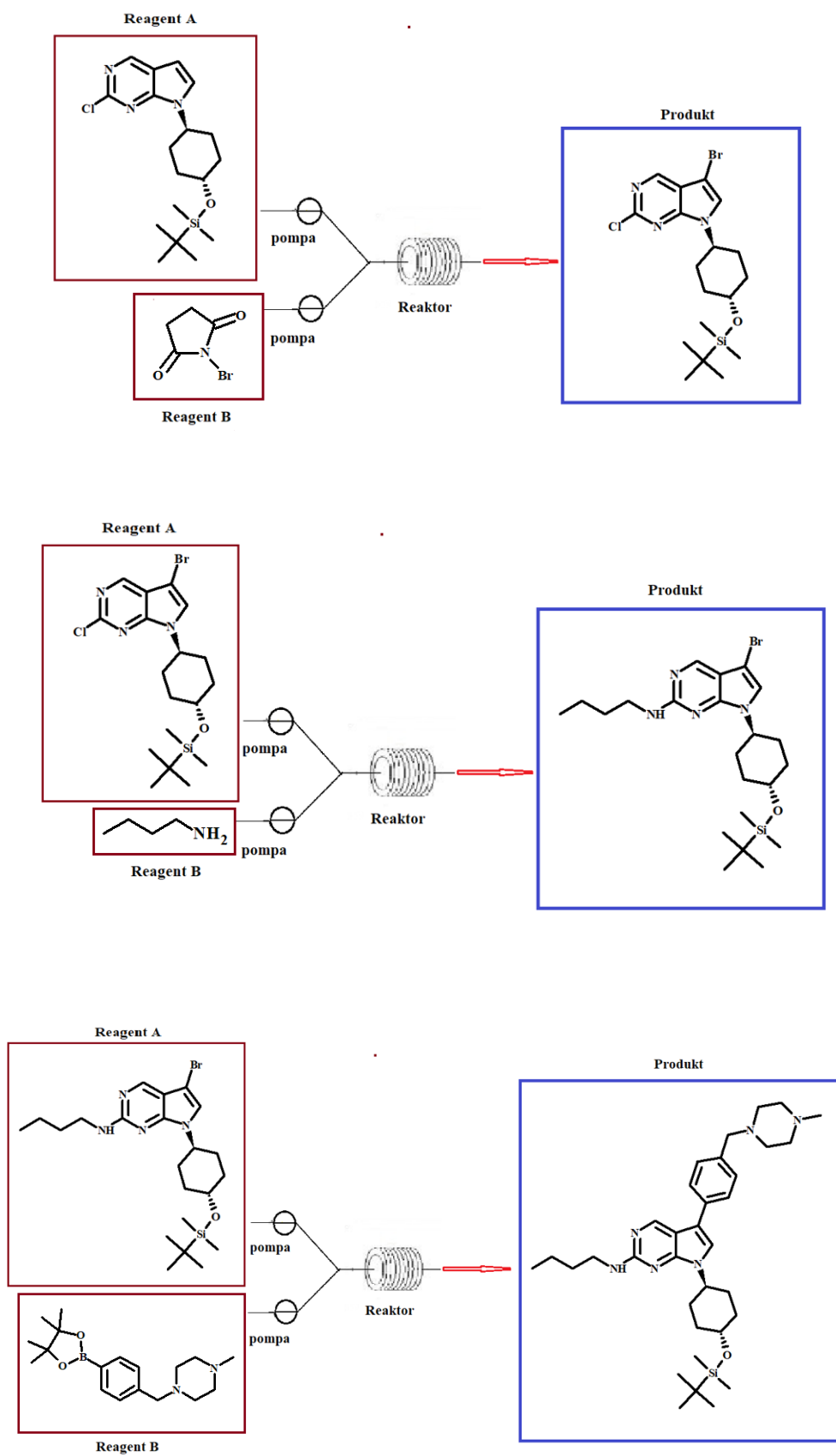
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 170.60 (s) , 156.02 (s) , 154.43 (s) , 150.54 (s), 149.48 (s), 124.57 (s), 115.50 (s) , 88.27 (s), 80.74 (s), 71.57 (s), 52.71 (s), 48.37 (s), 31.16 (s), 30.73 (s), 30.66 (s), 28.41 (s), 21.37 (s), 20.19 (s), 13.94 (s).

Pomimo kolejnych prób realizowanych nie tylko przy udziale systemu przepływowego ale także metodami klasycznymi nie udało mi się osiągnąć zamierzonego celu. W związku z powyższym proces optymalizacji rozpoczęłam na nowo (Schemat 23). Zgodnie z przedstawionym poniżej schematem, nowo optymalizowana ścieżka syntezy składa się z następujących etapów: krzyżowego sprzęgania Sonogashiry, wewnątrzcząsteczkowej

cyklizacji, zabezpieczenia grupy hydroksylowej (1*r*,4*r*)-4-{2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]piry-
midyn-7-yl}cykloheksan-1-olu grupą TBS. Kolejne etapy to reakcja bromowania, *N*-
aminowania oraz Suzuki.

5.2. Nowa ścieżka syntezy do optymalizacji:

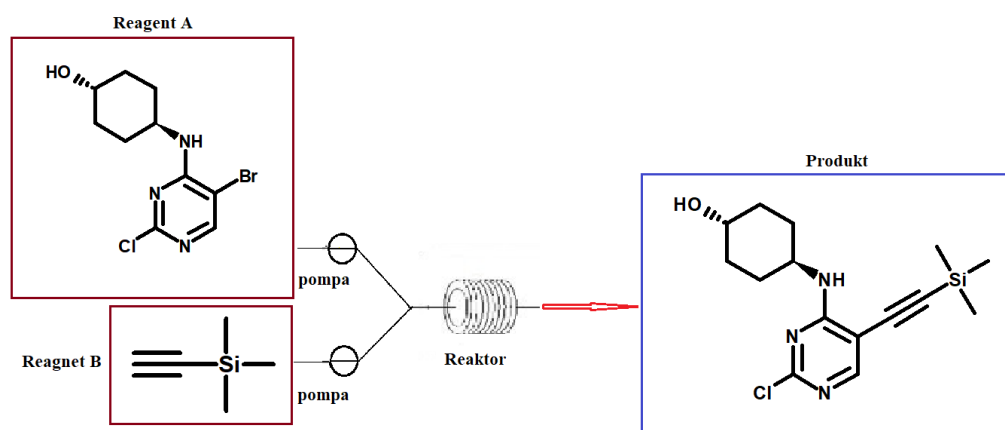




Schemat 23: Ścieżka syntezy do optymalizacji przy użyciu systemu FLOW.

W trakcie optymalizacji poszczególnych etapów kierowałam się procedurami opisanymi w literaturze a reakcje z poszczególnych etapów również i w tym przypadku porównywałam z syntezą danego produktu prowadzoną metodą klasyczną.

5.2.1. Synteza 4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}amino)cykloheksan-1-olu



Schemat 24: Reakcja Sonogashira wykonywana przy zastosowaniu systemu FLOW.

Powyższą reakcję prowadziłam głównie w toluenie jako rozpuszczalniku oraz przy zastosowaniu różnych temperatur.

- Reakcje prowadzone w toluenie

Tabela 77: Stosowana proporcja reagentów

		<i>Proporcja (eq)</i>
<i>Reagent A</i>	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
<i>Reagent B</i>	trimetylosililoacetylen	1

Tabela 78: Warunki reakcji Sonogashiry i zebrane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.333, Rt=15 min.,• analiza HPLC: 20.34% dla substratu 79.66% dla produktu
2	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.166, Rt=30 min.,• analiza HPLC: 15.81% dla substratu 84.19% dla produktu
3	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.111, Rt=45 min.,• analiza HPLC: 11.84% dla substratu 88.16% dla produktu
4	Toluen	100	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.333, Rt=15 min.,• analiza HPLC: 29.81% dla substratu 70.19% dla produktu
5	Toluen	100	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.166, Rt=30 min.,• analiza HPLC: 24.14% dla substratu 75.86% dla produktu
6	Toluen	120	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.333, Rt=15 min.,• analiza HPLC: 44.48% dla substratu 55.52% dla produktu
7	Toluen	120	<ul style="list-style-type: none">• Reaktor typu Heater (150),• FLOW=0.166, Rt=30 min.,• analiza HPLC: 25.14% dla substratu 74.86% dla produktu

Wnioski: analizując dane z powyższych doświadczeń zauważyć można, że w przypadku reakcji Sonogashiry, wyższa temperatura nie gwarantuje poprawy stopnia przereagowania substratu w produkt. Dodatkowo w oparciu o pozyskane wyniki wyznaczyć można optymalną temperaturę reakcji. W tej reakcji jest to temperatura 80 °C bowiem zapewnia ona prawie 80% konwersję już po 15 minutach prowadzenia reakcji.

W związku z powyższą obserwacją wykonałam dodatkowe analizy, które przeprowadziłam w temperaturze 80 °C również przy użyciu toluenu jako rozpuszczalnika ale z inną ilością ekwiwalentów reagenta B do A.

Tabela 79: Stosowana proporcja

		<i>Proporcja (eq)</i>
Reagent A	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	trimetylosililoacetylen	5

Tabela 80: Warunki reakcji Sonogashiry i zebrane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=5, Rt=1 [minuta], analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
2	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=1, Rt=5 min., analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
3	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: 19.37% dla substratu 80.63% dla produktu
4	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30 min., analiza HPLC: 17.89% dla substratu 82.11% dla produktu

Wnioski: powyższe doświadczenia pozwoliły na uzyskanie całkowitego przereagowania substratu w produkt już po 1 i 5 minutach prowadzenia reakcji.

➤ Reakcje prowadzone w dimetylosulfotlenku (DMSO)

Tabela 81: Stosowana proporcja reagentów

		<i>Proporcja (eq)</i>
<i>Reagent A</i>	<i>trans</i> -4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol	1
<i>Reagent B</i>	trimetylosililoacetylen	1

Tabela 82: Warunki prowadzenia reakcji Sonogashiry i zebrane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: 56.55% dla substratu 43.45.66% dla produktu
2	DMSO	100	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), program Proporcji objętościowej czyli: FLOW(A)=0.222, FLOW(B)=0.444 Rt=15 min., analiza HPLC: 63.16% dla substratu 36.84% dla produktu

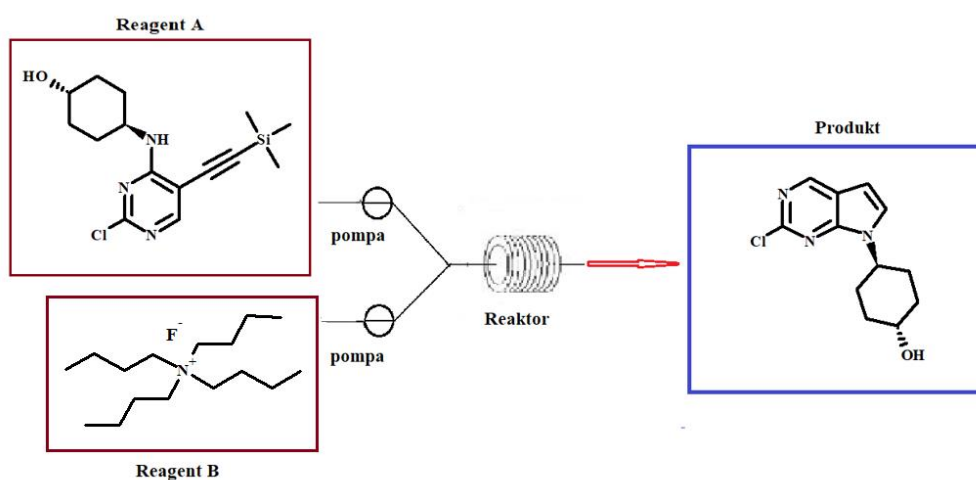
Wnioski: powyższe metody nie zapewniły uzyskania 100% konwersji substratu w produkt. Jednak wynik ten był zbliżony do tego jaki uzyskałam w sprzęganiu Sonogashiry, gdy substrat był podstawiony w miejscu -Cl butyloaminą.

Podsumowanie:

Dzięki uzyskaniu całkowitego stopnia konwersji substratu w produkt etapu tego nie optymalizowałam dalej. Szczegółowa analiza uzyskanych wyników wykazała iż w przypadku sprzęgania Sonogashira dłuższy czas reakcji i wyższa temperatura powyżej 80 °C nie determinuje uzyskania 100% konwersji. W tym przypadku stopień przereagowania zależy przede wszystkim od proporcji użytych reagentów. Ponadto reakcje tą prowadziłam również przy wykorzystaniu technologii mikrofalowej, w której 100% konwersję uzyskałam gdy

zastosowałam proporcję: trans-4-[(5-bromo-2 chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-ol do trimetylosililoacetyleny; 1 do 5. Dodatkowo zaobserwowałam, że prowadzenie reakcji przy aplikacji technologii przepływowej nie generuje dużej liczby produktów ubocznych co zaobserwowałam w przypadku reakcji prowadzonej w reaktorze mikrofalowym. Sprzężanie Sonogashiry metodą klasyczną trwa co najmniej 5 h przy czym nie uzyskuje się 100% konwersji substratu w produkt, którą za to otrzymuje się już po minucie trwania reakcji Sonogashiry realizowanej przy zastosowaniu systemu przepływowego.

5.2.2. Reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji



Schemat 25: Schemat wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.

Zgodnie z opisaną w literaturze procedurą reakcje cyklizacji prowadziłam przy wykorzystaniu tetrahydrofuranu (THF) oraz toluenu. Dodatkowo doświadczenia prowadziłam przy proporcji reagentów A i B (1:1) w różnych temperaturach (40, 50, 70, 80 °C).

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

Tabela 83: Stosowana proporcja reagentów

		<i>Proporcja (eq)</i>
Reagent A	4-({2-chloro-5-[2-(trimetylosililo)etynylo]pirymidyn-4-ylo}amino)cykloheksan-1-ol	1
Reagent B	fluorek tetrabutylamoniowy	1

Tabela 84: Warunki wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	THF	70	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=5, Rt=1 [minuta], • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
2	THF	70	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=1, Rt=5 min., • analiza HPLC: brak substratu 100 % dla produktu
3	THF	70	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=0.333, Rt=15 min., • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
4	THF	50	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=5, Rt=1 min., • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
5	THF	50	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=1, Rt=5 min., • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
6	THF	50	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=0.333, Rt=15 min., • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

➤ Synteza w toluenie

Tabela 85: Warunki wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji

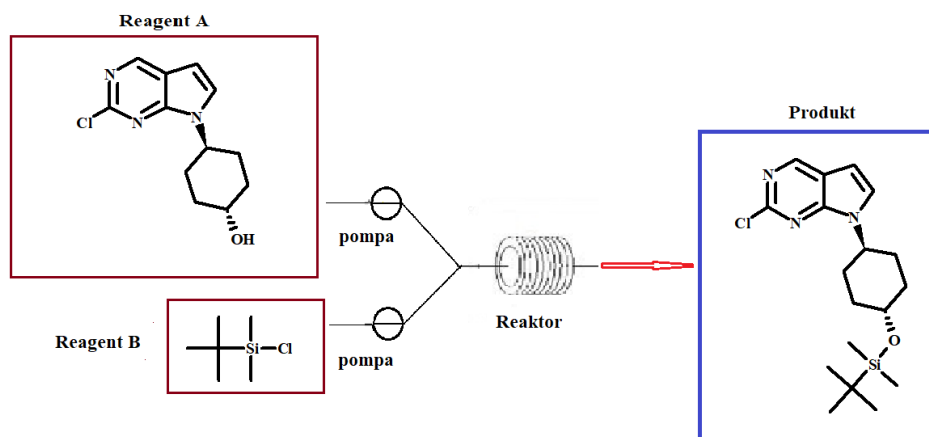
<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	Toluen	40	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=5, Rt=1 min., analiza HPLC: 96.15% dla substratu 3.85% dla produktu
2	Toluen	40	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=1, Rt=5 min., analiza HPLC: 92.43 % dla substratu 7.57 % dla produktu
3	Toluen	40	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: 82.65% dla substratu 17.35% dla produktu
4	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=1, Rt=5 min., analiza HPLC: 95.25% dla substratu 4.75% dla produktu
5	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: 92.76% dla substratu 7.24% dla produktu
6	Toluen	80	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30 min., analiza HPLC: 93.69% dla substratu 6.31% dla produktu

Wnioski: analizując przedstawione w tabelach dane, wyraźnie widać, że na stopień konwersji wpływa zastosowany do reakcji rozpuszczalnik. W reakcjach prowadzonych z wykorzystaniem tetrahydrofuranu (THF) jako rozpuszczalnika otrzymuje się 100% przereagowanie już po minucie trwania reakcji zarówno w temperaturze 50 jak i 70 °C.

Podsumowanie:

Dzięki uzyskaniu pełnej konwersji substratu w produkt etapu tego nie optymalizowałam dalej.

5.2.3. Reakcja zabezpieczania grupy hydroksylowej



Schemat 26: Schemat reakcji zabezpieczania grupy hydroksylowej.

Zgodnie z opisaną w literaturze procedurą głównie do reakcji zabezpieczania wykorzystuje się dimetyloformamid (DMF) jako rozpuszczalnik. Osobiście do tego typu reakcji częściej stosowałam dichlorometan (DCM) niż (DMF). Podczas reakcji zabezpieczania prowadzonej w dichlorometanie powstaje chlorowoderek imidazolu, który to mógłby zatkać reaktor przepływowy. Z tego też powodu w pierwszym podejściu przeprowadziłam doświadczenia w dimetyloformamidzie.

➤ Reakcje prowadzone w dimetyloformamidzie (DMF)

W reakcjach parametrem zmiennym była temperatura natomiast ekwiwalent poszczególnych reagentów wynosił (1:3:3).

Tabela 86: Stosowana proporcja reagentów

		<i>Proporcja (eq)</i>
Reagent A	(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-{2-chloro-7 <i>H</i> -piolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol	1
	imidazol	3
Reagent B	<i>tert</i> -butylo(chloro)dimetylosilan	3

Tabela 87: Zestawienie wyników reakcji zabezpieczania w DMF-ie

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów Ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC,%]</i>
1	DMF	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150 °C), • FLOW=5, Rt=1 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu 0% dla produktu
2	DMF	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=1, Rt=5 min., • analiza HPLC: 100 % dla substratu 0 % dla produktu
3	DMF	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=0.333, Rt=15 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu 0% dla produktu
4	DMF	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=0.166, Rt=30 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu 0% dla produktu
5	DMF	60	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=0.166, Rt=30 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu 0% dla produktu
6	DMF	30	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=5, Rt=1 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu 0% dla produktu
7	DMF	30	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=1, Rt=5 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu

				0% dla produktu
8	DMF	30	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=0.333, Rt=15 min., • analiza HPLC: <p>100% dla substratu 0% dla produktu</p>

Wnioski: w oparciu o powyższe dane wyraźnie widać brak jakiegokolwiek postępu reakcji nawet przy zmianie temperatury. W związku z powyższym podjęłam próby przeprowadzenia powyższej reakcji w dichlorometanie.

➤ Reakcje w dichlorometanie

W próbach syntetycznych prowadzonych w dichlorometanie zmiennym parametrem była zastosowana proporcja (eq) użytych reagentów oraz temperatura.

Tabela 88: Stosowana proporcja reagentów

		<i>Proporcja (eq)</i>		
Reagent A	(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-{2-chloro-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyn-7-yl}cykloheksan-1-ol	1	1	1
	imidazol	3	5	10
Reagent B	<i>tert</i> -butylo(chloro)dimetylosilan	3	5	10

Tabela 89: zestawienie wyników reakcji zabezpieczania w DCM-ie

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów Ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	DCM	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktor typu Heater (150), • FLOW=5, Rt=1 min., • analiza HPLC: <p>100% dla substratu</p>

				0% dla produktu
2	DCM	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., <ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 86.67 % dla substratu 13.33 % dla produktu
3	DCM	40	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.1, Rt=50 min., <ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 74.98% dla substratu 25.02% dla produktu
4	DCM	40	1:5:5	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.1, Rt=50 min., <ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 37.66% dla substratu 62.33% dla produktu
5	DCM	60	1:5:5	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.1, Rt=50 min., <ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 21.23% dla substratu 78.77% dla produktu
6	DCM	60	1:10:10	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.1, Rt=50 min., <ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 45.60% dla substratu 54.40% dla produktu
7	DCM	60	1:10:10	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.166, Rt=30 min., zatkanie reaktora
8	DCM	60	1:5:5	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., <ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 61.63% dla substratu 38.37% dla produktu
9	DCM	60	1:5:5	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=1, Rt=5 min.,

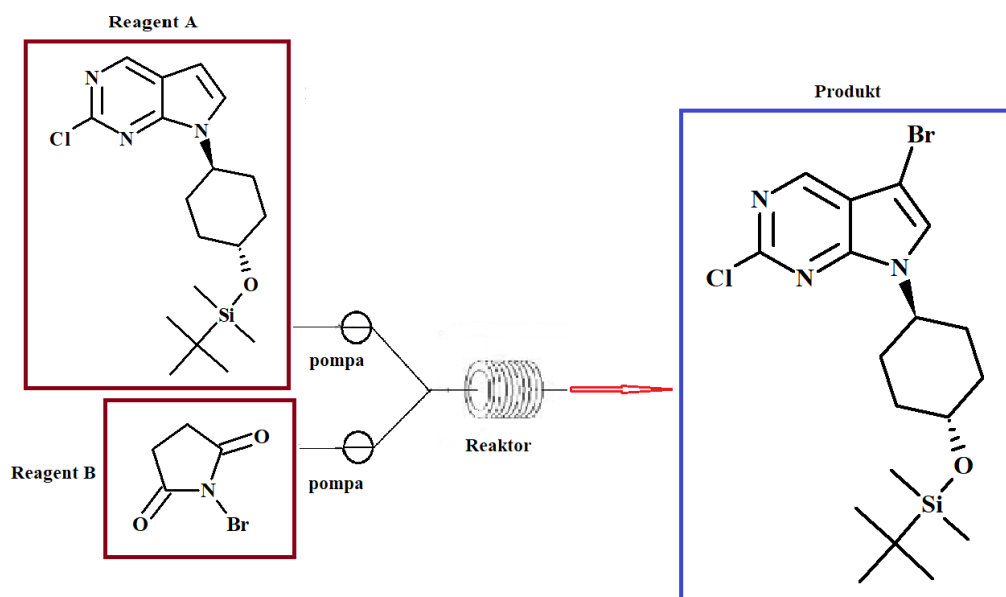
				<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 56.20% dla substratu 43.80% dla produktu
--	--	--	--	--

Wnioski: w oparciu o zestawione wyniki wyraźnie widać, że zmiana rozpuszczalnika z DMFu na dichlorometan oraz zwiększenie ilości ekwiwalentów imidazolu oraz chlorku *tert*-butyldimetylosililu w stosunku do (1*r*,4*r*)-4-{2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}-cykloheksan-1-olu umożliwiła wzrost stopnia konwersji do 80%. Także wyższa temperatura wpływa na poprawę stopnia przereagowania.

Podsumowanie:

Stopień konwersji na poziomie 80% uznałam za zadowalający dlatego też nie prowadziłam kolejnych doświadczeń optymalizacyjnych dla powyższego etapu. Ponadto z danych wynika, że najlepsze rezultaty osiąga się gdy proporcja (1*r*,4*r*)-4-{2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl}-cykloheksan-1-olu : imidazolu : *tert*-butyldimetylosililu wynosi 1:5:5. Wyższe wartości przyczyniają się do generowania większej ilości wspomnianego już chlorowodoru imidazolu, który zatyka reaktor i uniemożliwia przeprowadzenie danego doświadczenia.

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



Schemat 27: Reakcja halogenowania.

Reakcje halogenowania przeprowadziłam w dimetyloformamidzie w różnych temperaturach oraz ilościach ekwiwalentów reagenta A i B (Schemat 27).

Tabela 90: Stosowana ilość (eq) reagenta A i B

		<i>Proporcja (eq)</i>	
<i>Reagent A</i>	2-chloro-7-[(1r,4r)-4-[(tert-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7H-pirololo[2,3-d]pirymidyna	1	1
<i>Reagent B</i>	N-bromosukcynoimid	1.1	2.2

Tabela 91: Warunki reakcji halogenowania

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów Ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	DMF	30	1:1.1	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 19.04% dla substratu 80.96% dla produktu
2	DMF	50	1:1.1	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> brak substratu 100 % dla produktu
3	DMF	70	1:1.1	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 72.33% dla substratu 27.67% dla produktu
4	DMF	50	1:2.2	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=1, Rt=5 min., analiza HPLC:

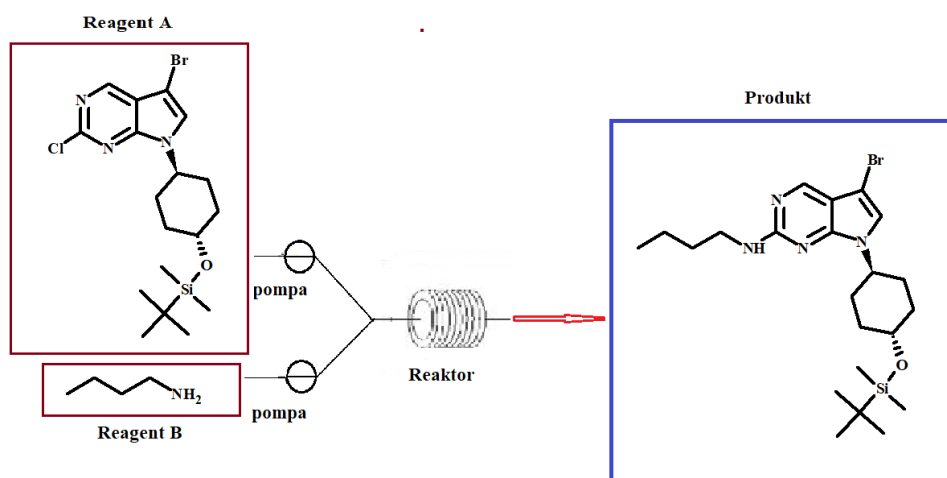
					brak substratu 100% dla produktu
5	DMF	50	1:2.2	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW=0.333, Rt=15 min., analiza HPLC: 	brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: w oparciu o zestawione wyniki dostrzec można, że pełną konwersję substratu w produkt otrzymuje się już po 15 minutach trwania reakcji w temperaturze 50 °C.

Podsumowanie:

Ze względu na otrzymanie całkowitej konwersji substratu w produkt nie prowadziłam kolejnych doświadczeń optymalizacyjnych danego etapu. Dodatkowo analizując powyższe dane stwierdzić można iż temperatura 50 °C jest najlepsza dla reakcji halogenowania bowiem zapewnia uzyskanie 100% konwersji substratu w produkt. W przypadku reakcji prowadzonych z zastosowaniem większej ilości *N*-bromosukcynoimidu w stosunku do 2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny, całkowite prze-reagowanie substratu w oczekiwany produkt uzyskuje się już po 5 minutach trwania reakcji ale analiza HPLC wskazuje na powstanie dodatkowo dużo więcej produktów ubocznych.

5.2.5. Reakcja *N*-aminowania



Schemat 28: Reakcji *N*-aminowania.

Reakcje optymalizacyjne powyższego etapu wykonałam z wykorzystaniem systemu: Easy MedChem oraz R-Series. Doświadczenia optymalizacyjne prowadziłam przy zmiennej temperaturze z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników oraz różnej ilości ekwiwalentów butyloaminy względem 5-bromo-2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]-cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny (Schemat 28). Dodatkowo prace optymalizacyjne realizowałam przy wykorzystaniu dwóch typów reaktorów: Heater (150 °C) i Heater (250 °C). Często też korzystałam z układów sprzężonych czyli połączonych ze sobą 2 reaktorów typu Heater (150 °C) bądź Heater (250 °C).

- System przepływowy typu: Easy MedChem:

Zaletą tego systemu jest możliwość pracy na zawieszinach natomiast jego ograniczeniem jest praca przy ciśnieniu 10 bar. Przekroczenie górnej granicy ciśnienia powoduje zwolnienie pracy pomp i tym samym użytkownik zmuszony jest do przerywania prowadzonej reakcji.

Tabela 92: Stosowana ilość (eq) reagenta A i B

		<i>Proporcja (eq)</i>	
Reagent A	5-bromo-2-chloro-7-[(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(<i>tert</i> -butylo-dimetylosililo)oksy]-cykloheksylo]-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyna	1	1
	<i>N,N</i> -diizopropylloetyloamina	1.5	1.5
Reagent B	<i>n</i> -butyloamina	2	5

Tabela 93: Warunki i zebrane dane dla reakcji prowadzonych przy użyciu systemu Easy MedChem

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów</i> <i>Ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	IPA	95	1:2	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW = 1, Rt = 5 min., analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
2	IPA	105	1:5	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW = 0.5, Rt = 10 min., analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
3	THF	95	1:5	<ul style="list-style-type: none"> Reaktor typu Heater (150), FLOW = 0.1, Rt = 50 min., analiza HPLC: 95.02% dla substratu 4.98% dla produktu
4	THF	70	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1)=0.166, Rt = 60 min., FLOW(2) = 0.166, Rt=60 min., Rt=120 min., analiza HPLC: 55.68% dla substratu 44.32% dla produktu
5	THF	110	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1)=0.166, Rt=60 min., FLOW(2)=0.166, Rt=60 min., Rt=120 min., analiza HPLC: 36.12% dla substratu

				63.88% dla produktu
6	THF	140	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1)=0.166, Rt=60 min., FLOW(2)=0.166, Rt=60 min., Rt=120 min., analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 29.20% dla substratu 70.80% dla produktu
7	DMF	110	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 1, Rt = 10 min., FLOW(2) = 1, Rt = 10 min., Rt = 20 min., analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 41.22% dla substratu 58.68% dla produktu
8	DMF	110	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 0.333, Rt = 30 min., FLOW(2) = 0.333, Rt = 30 min., Rt = 60 min., analiza HPLC*: <ul style="list-style-type: none"> 21.07% dla substratu 78.93% dla produktu
9	DMF	110	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 0.166, Rt=60 min., FLOW(2) = 0.166, Rt = 60 min., Rt = 120 min., analiza HPLC*: <ul style="list-style-type: none"> brak substratu brak produktu

10	DMF	130	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 2, Rt = 5 min., FLOW(2) = 2, Rt = 5 min., Rt = 10 min., analiza HPLC: 58.28% dla substratu 41.72% dla produktu
11	DMF	130	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 1, Rt = 10 min., FLOW(2) = 1 Rt = 10 min., Rt = 20 min., analiza HPLC: 41.38% dla substratu 58.62% dla produktu

Uwagi: umieszczona (*) przy reakcjach prowadzonych w dimetyloformamidzie o numerach 8 i 9 dotyczy stopnia przereagowania, który obliczyłam bez uwzględnienia powstającego w nadmiarze produktu ubocznego.

Wnioski: w oparciu o dane zawarte w tabeli można stwierdzić, że przy zastosowaniu układu sprzężonego składającego się z dwóch reaktorów otrzymuje się dużo lepszą konwersję. Ponadto wyższa temperatura reakcji oraz czas jej trwania także poprawiają stopień przereagowania. Słaby postęp reakcji w przypadku doświadczeń prowadzonych w izopropanolu może być związany z ograniczoną rozpuszczalnością 5-bromo-2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny. Najlepsze rezultaty otrzymałam dla analiz prowadzonych w tetrahydrofuranie.

- System R-Series:

Jest urządzeniem dużo bardziej złożonym w porównaniu z Easy MedChemem i umożliwia pracę przy dużo wyższych wartościach ciśnienia.

Ilość butyloaminy względem 5-bromo-2-chloro-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)-oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyny wynosiła 5 do 1.

Tabela 94: Warunki i zebrane dane dla reakcji prowadzonych przy użyciu systemu R-Series

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów Ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	THF	100	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 0.166, Rt = 30 min., FLOW(2) = 0.166, Rt = 30 min., Rt = 60 min., analiza HPLC: 37.96% dla substratu 62.04% dla produktu
2	THF	120	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 0.166, Rt = 30 min., FLOW(2) = 0.166, Rt = 30 min., Rt = 60 min., analiza HPLC: 43.93% dla substratu 56.07% dla produktu
3	THF	140	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 0.166, Rt = 30 min., FLOW(2) = 0.166, Rt = 30 min., Rt = 60 min., analiza HPLC: 33.16% dla substratu 66.84% dla produktu
4	THF	140	1:5	<ul style="list-style-type: none"> układ dwóch reaktorów typu Heater (150), FLOW(1) = 0.333, Rt = 15 min.,

				<ul style="list-style-type: none"> • FLOW(2) = 0.333, Rt = 15 min., • Rt = 30 min., • analiza HPLC: 32.35% dla substratu 67.65% dla produktu
5	THF	160	1:5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (250), • FLOW=0.166, Rt = 30 min., • analiza HPLC: 27.01% dla substratu 72.99% dla produktu
6	THF	160	1:5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (250), • FLOW=0.333, Rt = 15 min., • analiza HPLC: 22.66% dla substratu 77.34% dla produktu
7	THF	170	1:5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (250), • FLOW=1, Rt=5 min., • analiza HPLC: 64.43% dla substratu 35.57% dla produktu
8	THF	170	1:5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (250), • FLOW=0.333, Rt=15 min., • analiza HPLC: 37.85% dla substratu 62.15% dla produktu
9	THF	180	1:5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (250), • FLOW=0.333, Rt = 15 min., • analiza HPLC: 35.92% dla substratu 64.08% dla produktu
10	THF	180	1:5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (250), • FLOW=0.166, Rt = 30 min., • analiza HPLC: 43.67% dla substratu 56.33% dla produktu

Wnioski: powyższe analizy pozwoliły mi na dobór do dalszych doświadczeń odpowiedniej temperatury reakcji. Do kolejnych analiz wybrałam temperaturę 170 °C.

Wiedząc już jaki jest stopień konwersji w przypadku 5 ekwiwalentów reagenta B względem reagenta A, w kolejnych analizach sprawdziłam wpływ ilości użytej aminy na stopień przereagowania substratu w produkt w czasie trwania reakcji przez 30 i 45 minut.

Tabela 95: Stosowana ilość (eq) reagenta A i B

<i>Reagent A</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>Reagent B</i>	10	15	20	25

Tabela 96: Warunki i zebrane wyniki reakcji N-aminowania przy różnym ekwiwalencie BuNH₂

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
<i>1</i>	THF	170	1:10	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.333, • FLOW(2) = 0.333, • Rt = 30 min., • analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 27.86% dla substratu 62.99% dla produktu
<i>2</i>	THF	170	1:10	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.222, • FLOW(2) = 0.222, • Rt = 45 min., • analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 15.46% dla substratu 84.54% dla produktu
<i>3</i>	THF	170	1:15	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.333,

4				<ul style="list-style-type: none"> • FLOW(2) = 0.333, • Rt = 30 min., • analiza HPLC: 27.96% dla substratu 72.04% dla produktu
	THF	170	1:15	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.222, • FLOW(2) = 0.222, • Rt = 45 min., • analiza HPLC: 19.41% dla substratu 80.59% dla produktu
5	THF	170	1:20	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.333, • FLOW(2) = 0.333, • Rt = 30 min., • analiza HPLC: 15.30% dla substratu 84.70% dla produktu
	THF	170	1:20	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.222, • FLOW(2) = 0.222, • Rt = 45 min., • analiza HPLC: 8.20% dla substratu 91.90% dla produktu
7	THF	170	1:25	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.333, • FLOW(2) = 0.333, • Rt = 30 min., • analiza HPLC: 12.25% dla substratu 87.75% dla produktu

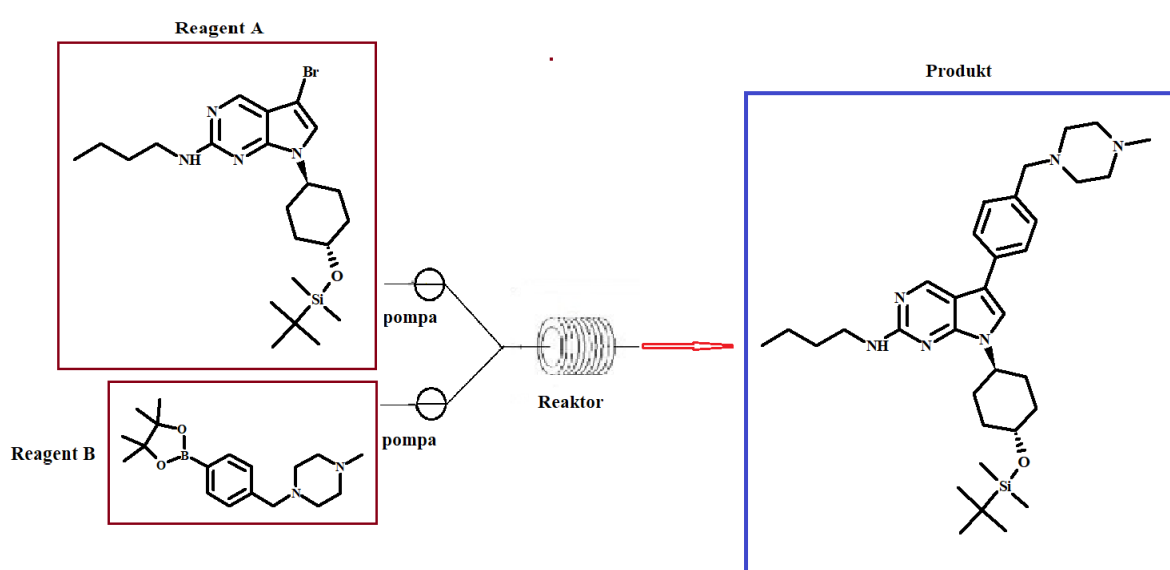
8	THF	170	1:25	<ul style="list-style-type: none"> • układ dwóch reaktorów typu Heater (250), • FLOW(1) = 0.222, • FLOW(2) = 0.222, • Rt = 45 min., • analiza HPLC: 5.78% dla substratu 94.22% dla produktu
---	-----	-----	------	--

Wnioski: w oparciu o pozyskane dane stwierdzić można, że najlepszą konwersję uzyskuje się po 45 minutach trwania reakcji przy 4 i 5- krotnym nadmiarze aminy względem reagenta A.

Podsumowanie:

Z faktu otrzymania prawie 95% konwersji substratu w produkt zakończyłam analizy optymalizacyjne dla powyższego etapu. Wykorzystanie systemu przepływowego do reakcji *N*-aminowania pozwala na uzyskanie oczekiwanego produktu w zdecydowanie krótszym czasie niż w przypadku reakcji prowadzonej metodą klasyczną (synteza półproduktu **39**).

5.2.6. Reakcja Suzuki



Schemat 29: Reakcja Suzuki.

Zgodnie z opisaną w literaturze procedurą reakcje prowadziłam w mieszaninie dioksan/woda (4:1; v/v), węglanu cezu jako zasady oraz przy zastosowaniu różnych temperatur oraz ilości reagenta B względem reagenta A (Schemat 29). W pierwszych analizach wykorzystałam katalizator tetrakis(trifenylofosfino)pallad(0). Reakcje prowadziłam na systemie Easy MedChem.

Tabela 97: Stosowana ilość (eq) reagenta A i B

		<i>Proporcja (eq)</i>	
Reagent A	5-bromo- <i>N</i> -butylo-7-[(1 <i>r</i> ,4 <i>r</i>)-4-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7 <i>H</i> -pirolo[2,3- <i>d</i>]pirymidyno-2-amina	1	1
	Węglan cezu	3	3
	Pd(PPh ₃) ₄	0.05	0.05
Reagent B	kwasy 4-(4-metylopiperazyno)metylofenyloborony, ester pinakolowy	1.5	3

Tabela 99: Warunki i wyniki reakcji Suzuki

<i>Metoda</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	100	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 0.333, Rt = 15 min., • analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 100% dla substratu brak produktu
2	120	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 0.333, Rt = 15 min., • analiza HPLC: <ul style="list-style-type: none"> 100% dla substratu brak produktu

3	140	1:15	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 0.333, Rt = 15 min., • Zatkanie reaktora,
4	120	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 1, Rt = 5 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
5	120	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 0.333, Rt = 15 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
6	120	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 0.166, Rt = 30 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu

Wnioski: pozyskane wyniki świadczą o braku postępu reakcji, dlatego też podjęłam próby syntezy oczekiwanego produktu przy użyciu tego samego katalizatora palladowego i proporcji 5-bromo-*N*-butylo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy do 1-metylo-4-{[4-(4,4,5,5-tetrametylo-1,3,2-dioksaborolan-2-yl)fenylo]metylo}piperazyny 1 do 3 przy wykorzystaniu technologii mikrofal.

Tabela 99: Warunki i wyniki reakcji Suzuki

<i>Metoda</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	100	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 5 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
2	120	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 5 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC:

			100% dla substratu brak produktu
3	120	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 45 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu

Wnioski: powyższe warunki prowadzonych analiz również nie przyniosły oczekiwanego rezultatu więc postanowiłam przeprowadzić reakcje z innymi katalizatorami palladowymi i w niższej temperaturze (90 °C).

Tabela 100: Warunki i wyniki reakcji Suzuki

<i>Metoda</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Katalizator</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC, %]</i>
1	90	1:3	dichlorek bis(trifenylfosfino)palladu(II)	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 30 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
2	90	1:3	1,1 bis(difenylofosfino)ferrocen	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 30 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: w oparciu o powyższe dane stwierdzić można, że pełną konwersję uzyskuje się w reakcji z katalizatorem ferrocenowym, w związku z tym wykonałam dwie dodatkowe reakcje również w mikrofali, które trwały 5 i 15 minut.

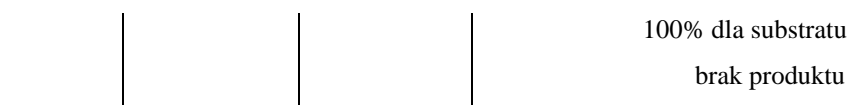
Tabela 101: Warunki i wyniki reakcji Suzuki

<i>Metoda</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC,%]</i>
1	90	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 5 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
2	90	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • czas: 15 min., moc; 150 [W], • analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: powyższe wyniki świadczą o opracowaniu warunków reakcji, które zapewniają otrzymanie pełnej konwersji. W związku z tym postanowiłam przeprowadzić kolejne próby w tych samych warunkach i tym samym czasie na systemie przepływowym.

Tabela 102: Warunki i wyniki reakcji Suzuki prowadzonej na systemie FLOW

<i>Metoda</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Proporcja reagentów ekwiwalenty [eq]</i>	<i>Opis reakcji, konwersja [wg HPLC,%]</i>
1	90	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 1, Rt = 5 min., • analiza HPLC: 100% dla substratu brak produktu
2	90	1:3	<ul style="list-style-type: none"> • reaktor typu Heater (150), • FLOW= 0.333, Rt = 15 min., • analiza HPLC:



Podsumowanie:

Reakcja Suzuki to jedyny etap, którego nie udało mi się zoptymalizować przy aplikacji systemu przepływowego. Niestety nie udało mi się przełożyć warunków reakcji zapewniających pełną konwersję z technologii mikrofal na system FLOW. Być może zastosowany przeze mnie reaktor nie jest odpowiedni do prowadzenia reakcji Suzuki. Co więcej podjęłam próby przeprowadzenia powyższego etapu z wykorzystaniem systemu przepływowego Thales Nano. Reakcje prowadziłam w temperaturze 75, 100 i 130 °C przy przepływie 0.4 i 07 ml/min.. Niestety również i w tym przypadku nie udało mi się uzyskać oczekiwanego produktu.

5.3. Technologia mikrofalowa

Zgodnie z wcześniejszym opisem technologia mikrofalowa umożliwia przeprowadzenie szeregu typowych reakcji chemicznych. Ponadto jej zastosowanie wpływa na zwiększenie wydajności prowadzonej przemiany chemicznej a co najważniejsze w wielu przypadkach diametralnie skraca czas reakcji, które prowadzone metodami klasycznymi trwają nawet kilka dni.

Przy zastosowaniu chemii mikrofalowej przeprowadzone zostały reakcje takie jak:

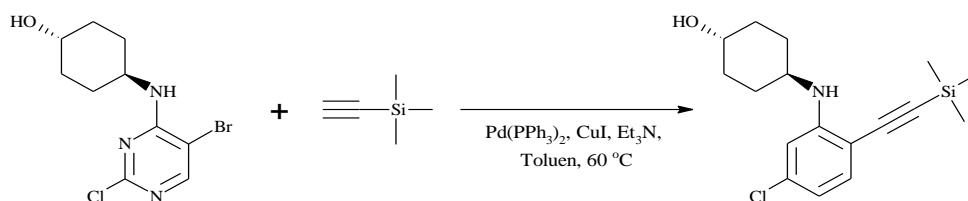
- sprzężanie Sonogashiry,
- zabezpieczanie grupy hydroksylowej (-OH) grupą *tert*-butylochlorodimetylosilanową (TBSCl),
- *N*-aminowanie,

Transformacja (konwersja) substratu w oczekiwany produkt podobnie jak w przypadku reakcji prowadzonych przy zastosowaniu technologii przepływowej określana była za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.

Tabela 103: Warunki chromatograficzne

Parametry		
Kolumna	Kinetex 5u EVO C18 100A 250 x 4.6 mm	
Fazy mobilne	Faza A: woda Faza B:ACN	
Przepływ	0.6 mL/min	
Czas analizy	10 minut	
Gradient		
Czas [minuty]	Faza mobilna A [%]	Faza mobilna B [%]
0		
1	98	2
5	10	90
8.5	10	90
9.5	98	2
10		

5.3.1. Reakcja Sonogashiry



Schemat 30: Reakcja Sonogashiry.

Synteza z wykorzystaniem technologii mikrofalowej przeprowadzona została w temperaturze 80 °C w toluenie jako rozpuszczalniku i przy zmiennych parametrach takich jak: czas oraz proporcja czyli (ekwiwalenty, eq) związków: *trans*-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-ylo)amino]cykloheksan-1-olu do trimetylosililoacetyleny.

Tabela 104: Warunki reakcji Sonogashiry i uzyskane wyniki

Metoda	Rozpuszczalnik	Moc [W]	Czas [minuty]	Ekiwalenty [eq] substratów	Konwersja [HPLC, %]
1	Toluen	100	1	1:1	• analiza HPLC: 56.77% dla substratu 43.23% dla produktu
2	Toluen	100	5	1:1	• analiza HPLC: 49.46% dla substratu 50.54% dla produktu
3	Toluen	100	15	1:1	• analiza HPLC: 56.68% dla substratu 43.32% dla produktu
4	Toluen	100	1	1:5	• analiza HPLC: 9.65% dla substratu 90.35% dla produktu
5	Toluen	100	5	1:5	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
6	Toluen	100	15	1:5	• analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

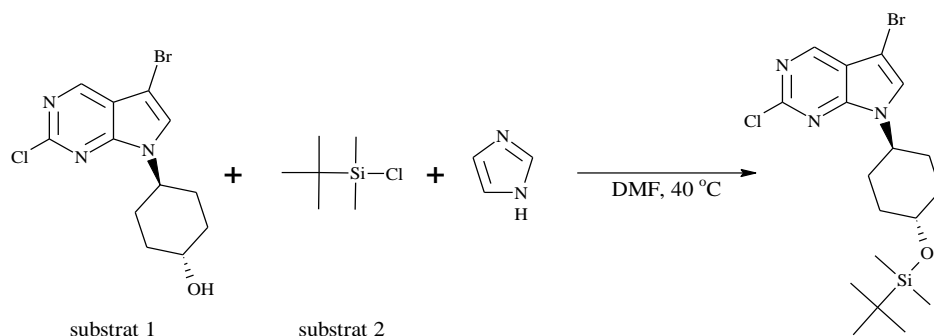
Wnioski: po analizie uzyskanych danych stwierdzić można, że stopień konwersji zależy przede wszystkim od proporcji użytych reagentów.

Podsumowanie:

Na podstawie otrzymanych wyników z reakcji sprzęgania Sonogashiry widać iż parametrem gwarantującym 100% konwersje substratu w produkt nie jest czas prowadzenia reakcji a proporcja użytych reagentów (substratów). Zastosowanie równoważnika (1:5 eq) umożliwia uzyskanie pełnej konwersji już po 5 minutach trwania reakcji.

Ponadto wyniki z powyższych analiz potwierdzają możliwość wykorzystania technologii mikrofalowej do reakcji sprzęgania Sonogashiry gwarantując przy tym otrzymanie oczekiwanego produktu w krótszym czasie niż w przypadku reakcji prowadzonej metodą klasyczną. Jediną wadą jaką zaobserwowałam w trakcie syntezy to generowanie większej liczby produktów ubocznych w przeciwieństwie do reakcji sprzęgania Sonogashiry przy aplikacji technologii przepływowej.

5.3.2. Reakcja zabezpieczenia grupy hydroksylowej grupą *tert*-butylochloro-dimetylosilanową



Schemat 31: Reakcja zabezpieczenia przy użyciu grupy (TBSCl).

Synteza z wykorzystaniem technologii mikrofalowej przeprowadzona została w temperaturze 40 °C w dimetyloformamidzie (DMF) jako rozpuszczalniku przy zmiennych parametrach takich jak: czas, moc oraz proporcje (ekwiwalenty, eq) *trans*-4-(5-bromo-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksan-1-olu względem *tert*-butylochlorodimetylosilanu. Dzięki wykorzystaniu DMFu jako rozpuszczalnika w trakcie reakcji nie powstaje

sól (chlorek imidazolu), która generuje się w trakcie reakcji zabezpieczania prowadzonej klasycznie w dichlorometanie (DCM).

Tabela 105: Warunki reakcji i uzyskane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Moc [W]</i>	<i>Czas [minuty]</i>	<i>Ekiwalenty [eq] substratów</i>	<i>Konwersja [HPLC,%]</i>
1	DMF	150	15	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 92.18% dla substratu 7.82% dla produktu
2	DMF	150	10	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 95.19% dla substratu 4.81% dla produktu
3	DMF	150	5	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 86.70% dla substratu 13.30% dla produktu
4	DMF	150	30	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 88.67% dla substratu 11.33% dla produktu
5	DMF	150	45	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 78.08% dla substratu 21.92% dla produktu
6	DMF	150	60	1:1.5	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 94.45% dla substratu 5.55% dla produktu
7	DMF	150	15	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 25.85% dla substratu 74.15% dla produktu
8	DMF	100	15	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 20.24% dla substratu 79.76% dla produktu
9	DMF	100	30	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 50.29% dla substratu 49.71% dla produktu
10	DMF	150	30	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 47.03% dla substratu 52.97% dla produktu

Wnioski: w oparciu o zebrane dane zauważyć można, że głównym czynnikiem wpływającym na poprawę konwersji jest nie tyle moc służąca do podgrzania mieszaniny reakcyjnej do zadanej

temperatury, co użyte proporcje substratów. Użycie równoważnika (1:2) prowadzi do wzrostu stopnia przemiany substratu w produkt w krótszym czasie w porównaniu z proporcją (1:1.5).

Ze względu na brak osiągnięcia 90% konwersji i znalezienia najlepszych warunków reakcji przeprowadzono kolejne analizy. W pierwszej kolejności widząc, że wydłużanie czasu prowadzenia reakcji nie wpływa na poprawę konwersji zdecydowałam o przeprowadzeniu reakcji, które kontynuowane były przez 1 i 2 minuty przy proporcji: *trans*-4-(5- bromo-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksan-1-olu do *tert*-butylochorodimetylosilanu (1:2 eq).

Tabela 106: Warunki reakcji i uzyskane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Moc [W]</i>	<i>Czas [minuty]</i>	<i>Ekiwalenty [eq] substratów</i>	<i>Konwersja [HPLC, %]</i>
11	DMF	100	1	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 20.08% dla substratu 79.02% dla produktu
12	DMF	100	2	1:2	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 67.85% dla substratu 32.15% dla produktu

Wnioski: na podstawie uzyskanych wyników widać, że powyższe warunki reakcji nie są odpowiednie aby uzyskać oczekiwaną konwersję.

W związku z powyższym zdecydowałam o przeprowadzeniu doświadczeń, w których zastosowałam proporcję: *trans*-4-(5- bromo-2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-yl)cykloheksan-1-ol : imidazol : *tert*-butylochorodimetylosilan (1:3:3 eq).

Tabela 107: Warunki reakcji i uzyskane wyniki

<i>Metoda</i>	<i>Rozpuszczalnik</i>	<i>Moc [W]</i>	<i>Czas [minuty]</i>	<i>Ekiwalenty [eq] substratów</i>	<i>Konwersja [HPLC, %]</i>
13	DMF	100	15	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 84.82% dla substratu 15.18% dla produktu
14	DMF	100	1	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: 4.56% dla substratu

					95.44% dla produktu
15	DMF	100	5	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu
16	DMF	100	10	1:3:3	<ul style="list-style-type: none"> analiza HPLC: brak substratu 100% dla produktu

Wnioski: w oparciu o dane z powyższych doświadczeń widzimy, że zastosowanie większej ilości (proporcji) reagentów pozwala na uzyskanie całkowitej konwersji już po 5 minutach prowadzonej reakcji.

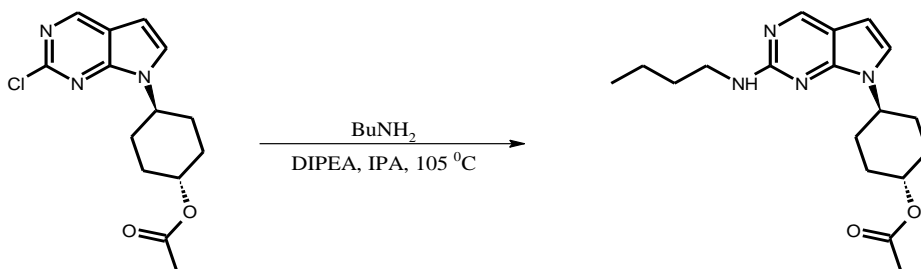
Podsumowanie:

Na podstawie otrzymanych wyników z reakcji zabezpieczania grupy hydroksylowej grupą (TBSCl), zauważyć można, że czynnikiem warunkującym uzyskanie wysokiej konwersji nie jest moc z jaką mieszanina reakcyjna zostaje podgrzana do zadanej temperatury a proporcja użytych reagentów (substratów). Zastosowanie równoważnika (1:2 eq) umożliwia uzyskanie konwersji na poziomie około 80% natomiast zastosowanie proporcji (1:3 eq) zapewnia otrzymanie całkowitego przereagowania substratu w produkt już po 5 minutach trwania reakcji.

Ponadto dane te świadczą o możliwości wykorzystania technologii mikrofalowej do prowadzenia reakcji zabezpieczania. Jej zastosowanie gwarantuje uzyskanie całkowitego przereagowania substratu w produkt. W porównaniu z reakcją wykonywaną metodą wsadową, która trwa średnio 3h w obecności mikrofal przebiega ona już po 5 minutach.

5.3.3. Reakcja *N*-aminowania

Synteza octanu 4-[2-(butyloamino)-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo]cykloheksylu prowadzona metodą klasyczną (Schemat 32):



Schemat 32: Reakcja *N*-aminowania.

Do kolbki odważyłam octan 4-(2-chloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyn-7-ylo)-cykloheksylu (7 g, 23.8 mmol) następnie dodałam alkohol izopropylowy (45 mL), butyloaminę (12 mL, 120 mmol) oraz *N,N*-diizopropyletyloaminę (6.5 mL, 37.3 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszałam przez 48 godzin w temperaturze 105 °C. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym w układzie (metanol/chlorek metylenu 5:95 v/v). Po zakończeniu reakcji, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczany był kilkakrotnie za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (eluent: metanol /dichlorometan, 5-95% i 3-97%) uzyskując oczekiwany produkt w postaci delikatnie żółtego osadu (0.869 g, 11%).

MS-APCI: m/z 331.0 [M+H]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (s, 1H), 6.82 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.79 (tt, *J* = 11.4, 4.2 Hz, 1H), 4.49 (tt, *J* = 12.0, 3.9 Hz, 1H), 3.44 (td, *J* = 7.1, 5.8 Hz, 2H), 2.17 – 2.06 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 1.87 (qd, *J* = 12.9, 3.0 Hz, 2H), 1.65 – 1.55 (m, 4H), 1.47 – 1.36 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.67 (s), 159.20 (s), 152.55 (s), 150.64 (s), 121.71 (s), 111.88 (s), 99.86 (s), 72.02 (s), 51.75 (s), 41.64 (s), 32.01 (s), 30.82 (s), 30.48 (s), 21.42 (s), 20.27 (s), 14.66 (s), 12.98 (s).

Synteza prowadzona przy aplikacji reaktora mikrofalowego:

Synteza z wykorzystaniem technologii mikrofalowej przeprowadzona została w izopropanolu (IPA) przy zmiennej temperaturze, mocy i czasie prowadzonych reakcji. Warunki reakcji i uzyskane dane przedstawia poniższa tabela.

Tabela 108: Warunki reakcji i uzyskane wyniki

<i>Czas reakcji [min]</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Moc [W]</i>	<i>Konwersja [wg HPLC]</i>
10	105	150	brak konwersji
20	105	150	brak konwersji
50	105	150	80.66% dla substratu 19.34% dla produktu
80	105	150	72.75% dla substratu 27.25% dla produktu
140	105	150	64.39% dla substratu 35.61% dla produktu
260	105	150	53.15% dla substratu 46.85% dla produktu
60	120	150	68.32% dla substratu 31.68% dla produktu
120	120	150	53.10% dla substratu 46.90% dla produktu
210	120	150	42.33% dla substratu 57.67% dla produktu
270	120	150	37.71% dla substratu 62.29% dla produktu
330	120	150	33.88% dla substratu 66.12% dla produktu
390	120	150	30.81% dla substratu 69.19% dla produktu
510	120	150	32.00% dla substratu 68.00% dla produktu
60	140	150	36.47% dla substratu 63.53% dla produktu
120	140	150	22.63% dla substratu 77.37% dla produktu
180	140	150	17.78% dla substratu

			82.22% dla produktu
240	140	150	18.21% dla substratu 81.79% dla produktu
60	140	175	31.87% dla substratu 68.13% dla produktu
120	140	175	22.27% dla substratu 77.73% dla produktu
180	140	175	18.66% dla substratu 81.34% dla produktu
60	140	300	33.22% dla substratu 66.78% dla produktu
120	140	300	19.79% dla substratu 80.21% dla produktu
120	160	300	22.79% dla substratu 77.21% dla produktu

Podsumowanie:

Z przedstawionych w tabeli danych można zauważyć, że wyższa temperatura reakcji oraz moc korzystnie wpływają na poprawę stopnia konwersji substratu w produkt. Dodatkowo wyższe wartości tych parametrów wpływają na skrócenie czasu reakcji potrzebnego do uzyskania co najmniej 70% konwersji. Ponadto otrzymane wyniki potwierdzają fakt, że technologia mikrofalowa idealnie nadaje się do prowadzenia reakcji aminowania bowiem już po 2 godzinach przemiany chemicznej otrzymujemy dobrą konwersję. W tym przypadku jest to kwestia godzin a nie dni co ma miejsce w reakcji aminowania prowadzonej metodami klasycznymi.

6. Podsumowanie otrzymanych wyników

Na podstawie przedstawionych wyników z przeprowadzonych przeze mnie prac badawczych stwierdzić można, że zrealizowałam określony we wstępie cel pracy. Dotyczył on opracowania innowacyjnego, małowcząsteczkowego inhibitora/liganda kinazy FLT3 o wysokiej biodostępności po podaniu doustnym, niskiej toksyczności, lepszych bądź zbliżonych do związków referencyjnych tj. UNC2025 i MRX-2843 parametrach fizykochemicznych oraz korzystnym profilem farmakokinetycznym.

Przed przystąpieniem do właściwej syntezy wykorzystałam metody bioinformatyczne *in silico*, przede wszystkim program KNIME, dzięki któremu stworzyłam wirtualną bibliotekę związków zawierających 700 struktur. Modelowanie komputerowe oraz badania (SAR) pozwoliły mi na określenie budowy strukturalnej związków oraz identyfikację grupy funkcyjnej odpowiedzialnej za oddziaływanie z organizmem. Wiedza ta pozwoliła mi na wybór spośród wirtualnej biblioteki związku o jak najlepszej obliczonej wartości IC_{50} do syntezy i dalszej optymalizacji, która miała na celu poprawę właściwości farmakokinetycznych. Zsyntezowałam bibliotekę składającą się ze 110 molekuł, które w swojej strukturze posiadają pierścień pirymidynowy lub pirolopirymidynowy. Pochodne pirymidyny otrzymywałam na drodze aromatycznego podstawienia nukleofilowego w pozycji 4 związku 5-bromo-2,4-dichloropirymidyny i kolejne aromatyczne podstawienie nukleofilowe w pozycji 2 oraz w następnym kroku reakcja sprzęgania Suzuki lub Sonogashira w pozycji 5 pozwoliła mi na otrzymanie nowych związków. Z kolei pochodne pirolopirymidyny uzyskiwałam na drodze 5 etapowej syntezy tj. aromatycznego aminowania, krzyżowego sprzęgania Sonogashira, cyklizacji, wprowadzenia grupy zabezpieczającej oraz bromowania. Kolejne aminowanie, reakcje krzyżowego sprzęgania Suzuki lub Sonogashira oraz odbezpieczenie grupy zabezpieczającej umożliwiły mi uzyskanie szeregu strukturalnych modyfikacji. W trakcie prowadzenia prac syntetycznych sprzęganie Suzuki oraz Sonogashiry należały do najważniejszych reakcji, ponieważ dzięki nim uzyskałam nowe struktury potencjalnych inhibitorów FLT3. Związki z reguły otrzymywałam na drodze klasycznych metod syntezy. Czasami jednak w celu przyspieszenia prac syntetycznych korzystałam z innowacyjnej technologii mikrofalowej. Technologia ta nie tylko ułatwia prace syntetyczne ale przede wszystkim skraca ona czas reakcji, które prowadzone metodami klasycznymi trwają niekiedy kilka dni. Dla każdego zsyntezowanego związku wykonane zostały testy biochemiczne oraz komórkowe, które pozwoliły na wyznaczenie parametru IC_{50} świadczącego o aktywności danych związków. Wszystkie z nich wykazały aktywność na poziomie nanomoli. Dodatkowo

dla wszystkich struktur wykonane zostały testy fizykochemiczne, które to dostarczają informacji na temat rozpuszczalności, lipofilowości oraz stabilności chemicznej i mikrosomalnej związków. Jako struktury wiodące wybrałam związki o dużym podobieństwie strukturalnym oraz o zbliżonej wartości IC_{50} względem przynajmniej jednego związku referencyjnego. Dla wybranych związków wykonane zostały badania *in vitro* oraz *in vivo*. Jak również testy określające ich rozpuszczalność, stabilność oraz biodostępność. Trafiły one także na badania MTD w celu określenia dla nich maksymalnej tolerowalnej dawki. W oparciu o dane z wykonanych dotychczas badań przedklinicznych jeden z wybranych związków o numerze **129** wykazuje duży potencjał jako kandydat na lek. Jednak otrzymanie statusu leku wymaga nakładu nie tylko czasu ale również badań klinicznych.

Struktury otrzymanych związków potwierdzone były analizą magnetycznego rezonansu jądrowego (1H , ^{13}C NMR) oraz chromatografią cieczą ze spektrometrem masowym (LC-MS). Wszystkie związki wykazywały czystość HPLC powyżej 95%.

Ostatnim celem prowadzonych przeze mnie badań była optymalizacja ścieżki syntezy związku referencyjnego UNC2025 przy aplikacji systemu przepływowego FLOW, który podobnie jak technologia mikrofalowa oprócz zapewnienia większego bezpieczeństwa pracy z niebezpiecznymi reagentami przede wszystkim skraca czas trwania prowadzonych reakcji. Przy zastosowaniu technologii przepływowej z sukcesem zoptymalizowałam wszystkie etapy z wyjątkiem reakcji Suzuki, która wymaga przeprowadzenia kolejnych reakcji optymalizacyjnych w celu znalezienia odpowiednich warunków zapewniających oczekiwaną transformację substratu w produkt. System FLOW idealnie się sprawdza w przypadku prowadzenia między innymi reakcji Sonogashira. W reakcji tej stopień przereagowania zależy przede wszystkim od proporcji użytych reagentów. Sprzęganie Sonogashira prowadziłam również przy wykorzystaniu technologii mikrofalowej, w której 100% konwersję uzyskałam gdy zastosowałam proporcję: *trans*-4-[(5-bromo-2-chloropirymidyn-4-yl)amino]cykloheksan-1-olu do trimetylosililoacetyleny; 1 do 5. Dodatkowo zaobserwowałam, że prowadzenie reakcji przy aplikacji technologii przepływowej nie generuje dużej liczby produktów ubocznych co zaobserwowałam w przypadku reakcji prowadzonej w reaktorze mikrofalowym. Sprzęganie Sonogashira metodą klasyczną trwa co najmniej 5 h przy czym nie uzyskuje się 100% konwersji substratu w produkt, którą za to otrzymuje się już po minucie trwania reakcji realizowanej przy zastosowaniu systemu przepływowego. W trakcie prac optymalizacyjnych zaobserwowałam również, że nie wszystkie rozpuszczalniki wskazane w procedurze gwarantują uzyskanie postępu reakcji. Sytuacja ta miała miejsce w trakcie optymalizacji reakcji

zabezpieczenia grupy hydroksylowej. W procedurze wskazany był dimetyloformamid jako rozpuszczalnik ale niestety prowadząc tą reakcję w systemie FLOW nie otrzymałam oczekiwanego produktu reakcji. Dopiero zmiana rozpuszczalnika na dichlorometan pozwoliła otrzymać oczekiwany produkt. System Flow idealnie sprawdza się także w przypadku reakcji halogenowania oraz aminowania. Zastosowanie w reakcji aminowania układu sprzężonego składającego się z połączonych ze sobą dwóch reaktorów umożliwia po 0.5 h trwania reakcji uzyskanie prawie 90% konwersji. W przypadku syntezy związku 5-bromo-*N*-butylo-7-[(1*r*,4*r*)-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy]cykloheksylo]-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirymidyno-2-aminy udało mi się dobrać odpowiednią ilość ekwiwalentów aminy, która gwarantuje otrzymanie prawie 95% konwersji po 45 minutach trwania reakcji. W tym celu zastosowałam dużo większą ilość aminy niż wskazana w procedurze literaturowej. Jednak należy mieć na uwadze fakt, że nie we wszystkich reakcjach aminowania odpowiedni jest tak duży nadmiar aminy. Reakcja aminowania prowadzona metodami klasycznymi średnio trwa od 1-go do kilku dni a użycie systemu przepływowego umożliwia otrzymanie oczekiwanego produktu już w ciągu 1 h.

Uważam, że przedstawione wyniki oraz korzystanie z prężnie rozwijających się w ostatnim czasie technologii mikrofalowej i systemu przepływowego podkreślają innowacyjny oraz wdrożeniowy charakter prowadzonych przeze mnie badań. Opracowany związek o numerze **129** ma potencjał aby zakwalifikować się w przyszłości do badań klinicznych, w których sprawdzana będzie skuteczność działania.

7. Literatura

1. A. Cieřlik:, „EPIDEMIOLOGIA BIAŁACZEK W POLSCE”, *Studia Medyczne – Prace pogładowe*, **2011**, 21, 53-60, [https://studiamedyczne.ujk.edu.pl/doc/SM_21_net.pdf, data dostępu: 30.04.2023]
2. G. L. Gulati , J. K. Ashton, B. H. Hyun, ” Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis ”, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **1988**, 2(4), 495-511
3. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/285666>, [data dostępu: 30.04.2023]
4. D. F. LaRosa, J. S. Orange:, „1. Lymphocytes”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2007**, 121(2), 364-369
5. F. R. Appelbaum, H. Gundacker, D. R. Head, M. L. Slovak, Ch. L. Willman, J. E. Godwin, J. E. Anderson, S. H. Petersdorf:, „ Age and acute myeloid leukemia , *BLOOD*, **2006**, 107(9), 3481-3485
6. M. Wiercińska, „ Ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia – AML) – przyczyny, objawy, rokowania”, [<https://www.mp.pl/pacjent/hematologia/choroby/170548,ostra-bialaczka-szpikowa>, data dostępu mp.pl, 22.12.2021]
7. H. Döhner, D.J. Weisdorf, C.D. Bloomfield:, „ Acute Myeloid Leukemia”, *The New England Journal of Medicine*, **2015**, 373, 1136-52
8. H. I. El-Subbagh, A. A. Al-Badr:, „Cytarabine”, *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Chapter 2, ISSN 0099-5428, **2009**, 34, 37-113
9. www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mylotarg-epar-product-information_pl.pdf, [data dostępu: 20.03.2023]
10. K. Wińniewski, J. Góra-Tybor, „Leki wpływające na mechanizmy epigenetyczne w ostrej białaczce szpikowej”, *Hematologia*, **2018**, 9(2), 110-122
11. J. Hołowiecki, A. Hołowiecka:, „Leczenie celowane w ostrych białaczkach szpikowych”, *Acta Haematologica Polonica*, **2013**, 44, 85–92
12. <https://hematoonkologia.pl/chemioterapia/artukul/id/3667-skutki-uboczne-chemioterapii-i-sposoby-ich-lagodzenia>, [data dostępu: 02.03.2022]
13. <https://www.zwrotnikraka.pl/na-czym-polega-radioterapia/>, [data dostępu: 02.03.2022]
14. https://www.onkonet.pl/dp_praktyka_zmpoprom.php, [data dostępu: 02.03.2022]
15. <https://hematoonkologia.pl/radioterapia/artukul/id/3669-skutki-uboczne-radioterapii>, [data dostępu: 18.03.2022]
16. S. Grosicki:, „Therapy-related acute myeloid leukemia- the risk factors and treatment”, *Hematologia*, **2014**, 5 (2), 136-144
17. <https://www.dkms.pl/o-pobranie/jest-zgodnosc-antygeny-zgodnosc-tkankowej-hla>, [data dostępu: 10.02.2022]
18. B. Lowenberg, L. J. Verdonck, A. W. Dekker, R. Willemze, F. E. Zwaan, M. de Planque, J. Abels, P. Sonneveld, J. van der Lelie, R. Goudsmit, W.L.J. van Putten, W. Sizoo, A. Hagenbeek, G. C. de Gast:, „Autologous Bone Marrow Transplantation in Acute Myeloid Leukemia in First Remission: Results of a Dutch Prospective Study”, *Journal of Clinical Oncology*, **1990**, 8(2), 287-294
19. L. Zhong, Y. Li, L. Xiong, W. Wang, M. Wu, T. Yuan, W. Yang, Ch. Tian, Z. Miao, T. Wang, Sh. Yang:, „Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives”, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **2021**, 6(201), 1-48
20. D.G. Gilliland, J. D. Griffin: „The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia”, *BLOOD*, **2002**, 100(5), 1532-1542

21. E. Li, K. Hristova: „Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies”, *Biochemistry*, **2006**, 45(20), 6241-6251
22. R. Berenstein, : „ Class III receptor tyrosine kinases in acute leukemia- biological functions and modern laboratory analysis”, *Biomarker Insights*, **2015** (10:S3)
23. K. Verstraete, SN. Savvides,: „Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases”, *Nature Reviews Cancer*, **2012**, 12(11), 753-766
24. H. Kiyoi, N. Kawashima, Y. Ishikawa,: „FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development”, *Cancer Science*, **2019**, 00, 1–11
25. A. Markovica, K. L. MacKenzie, R. B. Lock,: „FLT-3: a new focus in the understanding of acute leukemia”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2005**, 37, 1168–1172
26. N. Daver, R. F. Schlenk, Ni. H. Russell, M. J. Levis, : „Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence”, *Leukemia*, **2019**, 33(2), 299-312
27. E. Patkowska, J. Sawczuk-Chabin, I. Solarska, K. Borg, E. Lech-Marańda,: „Trudności w leczeniu chorego na ostrą białaczkę szpikową z mutacją FLT3-ITD i wysokim stosunkiem allelicznym — oporność na standardową chemioterapię indukującą w połączeniu z midostauryną”, *Hematologia*, **2020**; 11(4), 253–258
28. B. Nasiłowska-Adamska, I. Malinowska,: „The role of FLT3 gene mutations in acute leukemia – review”, *Borgis - Postępy Nauk Medycznych*, **2007**, 7-8, 333-337
29. Sz. Zmorzyński, D. Koczkodaj, M. Michalak, E. Wąsik-Szczepanek, A. Filip,: „Badanie wewnątrzrandemowej duplikacji genu FLT3 u chorych z ostrą białaczką szpikową”, *Acta Haematologica Polonica*, **2012**, 43(2b), 229–233
30. H. Kiyoi, M. Yanada, K. Ozekia,: „Clinical Significance of FLT3 in Leukemia”, *International Journal of Hematology*, **2005**, 82, 85-92
31. J. Cheng, L. Qu, J. Wang, L. Cheng, Y. Wang,: „High expression of FLT3 is a risk factor in leukemia”, *Molecular Medicine Reports*, **2018**, 17, 2885-2892
32. R. Zheng, M. Levis, O. Piloto, P. Brown, B. R. Baldwin, N. C. Gorin, M. Beran, Z. Zhu, D. Ludwig, D. Hicklin, L. Witte, Y. Li, D. Small,: „FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells”, *BLOOD*, **2004**, 103(1), 267-274
33. R. Zheng, E. Bailey, B. Nguyen, X. Yang, O. Piloto, M. Levis, D. Small,: „Further activation of FLT3 mutants by FLT3 ligand”, *Oncogene*, **2011**, 1–11
34. M. Perez, J. Blankenhorn, K. J. Murray, L. L. Parker,: „High-throughput identification of FLT3 wild-type and mutant kinase substrate preferences and application to design of sensitive in vitro kinase assay substrates”, *Molecular & Cellular Proteomics*, **2018** as Manuscript RA118.001111, 1-38
35. H. Kiyoi, T. Naoe, S. Yokota, M. Nakao, S. Minami, K. Kuriyama, A. Takeshita, K. Saito, S. Hasegawa, S. Shimodaira, J. Tamura, C. Shimazaki, K. Matsue, H. Kobayashi, N. Arima, R. Suzuki, H. Morishita, H. Saito, R. Ueda, R. Ohno, Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho): „Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia”, *Leukemia*, **1997**, 11, 1447–1452
36. H. Quentmeier, J. Reinhardt, M. Zaborski, H.G. Drexler,: „FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines”, *Leukemia*, **2003**, 17, 120–124
37. S. Grosicki,: „Perspektywy dla terapii celowanej w ostrej białaczce szpikowej”, *Hematologia*, **2011**, 2 (1), 23–32
38. D. Small,: „FLT3 Mutations: Biology and Treatment”, *American Society of Hematology*, **2006**, 178-184

39. Ch. Choudhary, J. Schwab, Ch. Brandts, L. Tickenbrock, B. Sargin, Th. Kindler, Th. Fischer, W. E. Berdel, C. Müller-Tidow, H. Serve, „AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations”, *BLOOD*, **2005**, 106 (1), 265-273
40. Y. Yamamoto, H. Kiyoi, Y. Nakano, R. Suzuki, Y. Kodaera, Sh. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, F. Yagasaki, Ch. Shimazaki, H. Akiyama, K. Saito, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, A. Takeshita, H. Saito, R. Ueda, R. Ohno, T. Naoe, „Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies”, *BLOOD*, **2001**, 97(8), 2434-2439
41. V. E. Kennedy, C. C. Smith, „FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies”, *Frontiers in Oncology*, **2020**, 10 (612880), 1-20
42. M. Levis, D. Small, „FLT3: ITD does matter in leukemia”, *Leukemia*, **2003**, 17, 1738–1752
43. U. Bacher, C. Haferlach, W. Kern, T. Haferlach, S. Schnittger, „Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients”, *BLOOD*, **2008**, 111 (5), 2527-2536
44. M. Larrosa-Garcia, M. R. Baer, „FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions”, *Molecular Cancer Therapeutics*, **2017**, 16, 991-1001
45. T. Naoe, H. Kiyoi, „Normal and oncogenic FLT3”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2004**, 61, 2932–2938
46. C.C. Smith, K. Lin, A. Stecula, A. Sali, N.P. Shah, „FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors”, *Leukemia*, **2015**, 1–3
47. J. Griffith, J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke, K. Saxena, „The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain”, *Molecular Cell*, **2004**, 13, 169–178
48. H. Kiyoi, „FLT3 inhibitors: recent advances and problems for clinical application”, *Nagoya Journal of Medical Science*, **2015**, 77, 7-17
49. M. Levis, D. Small, „Small Molecule FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors”, *Current Pharmaceutical Design*, **2004**, 10, 1183-1193
50. T. Grafone, M. Palmisano, Ch. Nicci, S. Storti, „An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment”, *Oncology Reviews*, **2012**, 6(1), 64-74
51. Sh. Mori, J. Cortes, H. Kantarjian, W. Zhang, M. Andreef, F. Ravandi, „Potential role of sorafenib in the treatment of acute myeloid leukemia”, *Leukemia & Lymphoma*, **2008**, 49(12), 2246–2255
52. G. Ghiaur, M. Levis, „Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors and the Role of the Bone Marrow Microenvironment”, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **2017**, 1-12
53. L. Zhong, Y. Li, L. Xiong, W. Wang, M. Wu, T. Yuan, W. Yang, Ch. Tian, Z. Miao, T. Wang, Sh. Yang, „Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives”, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **2021**, 6 (201), 1-48
54. Z. Wang, J. Cai, J. Cheng, W. Yang, Y. Zhu, H. Li, T. Lu, Y. Chen, Sh. Lu, „FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Challenges and Recent Developments in Overcoming Resistance”, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2021**, 64, 2878–2900
55. M. Levis, A. E. Perl, „Gilteritinib: potent targeting of FLT3 mutations in AML”, *The American Society of Hematology*, **2020**, 4 (6), 1178-1191
56. A. Gauthier, M. Ho, „Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update”, *Hepatology Research*, **2013**, 43, 147–154
57. Li Gong, M. M. Giacomini, C. Giacomini, M. L. Maitland, R. B. Altman, T. E. Klein, „PharmGKB summary: sorafenib pathways”, *Pharmacogenetics and Genomics*, **2017**, (27), 240–246

58. T. Schroeder, F. Zohren, Ch. Saure, I. Bruns, A. Czibere, N. N. Safaian, R. Fenk, R. Haas, G. Kobbe, : „Sorafenib Treatment in 13 Patients with Acute Myeloid Leukemia and Activating FLT3 Mutations in Combination with Chemotherapy or as Monotherapy”, *Acta Haematologica*, **2010**, 124, 153–159
59. F. Ravandi, C. A. Yi, J.E. Cortes, M. Levis, S. Faderl, G. Garcia-Manero, E. Jabbour, M. Konopleva, S. O’Brien, Z. Estrov, G. Borthakur, D. Thomas, S. Pierce, M. Brandt, K. Pratz, R. Luthra, M. Andreeff, H. Kantarjian, : „Final report of phase II study of sorafenib, cytarabine and idarubicin for initial therapy in younger patients with acute myeloid leukemia”, *Leukemia*, **2014**, 28, 1543–1572
60. A. I. Antar, Z. K. Otrrock, E. Jabbour, M. Mohty, A. Bazarbachi, : „FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions”, *Leukemia*, **2019**, 1-15
61. W. Zhang, Ch. Gao, M. Konopleva, Ye Chen, R. O. Jacamo, G. Borthakur, J. E. Cortes, F. Ravandi, A. Ramachandran, M. Andreeff, : „Reversal of Acquired Drug Resistance in FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia Cells via Distinct Drug Combination Strategies”, *Clinical Cancer Research*, **2014**, 20, 2363-2374
62. Ch. Röllig , Ch. Brandts, Sh. Shaid, M. Hentrich, A. Krämer, Ch. Junghan ß, E. Schleyer, C. Müller-Tidow, W. E. Berdel, B. Ritter, Karl-Heinz Pflüger, M. Kramer, M. Haibach, G. Ehninger, H. Serve, S. W. Krause, : „Survey and analysis of the efficacy and prescription pattern of sorafenib in patients with acute myeloid leukemia”, *Leukemia & Lymphoma*, **2012**, 53(6), 1062–1067
63. J. Hasskarl, : „ Sorafenib”, *Small Molecules in Oncology*, **2009**, 61-70
64. https://www.umb.edu.pl/photo/pliki/WF_jednostki/samodzielna-pracownia-biofarmacji/farmakokinetyka/seminarium_iii_-_patofarmakokinetyka.pdf, E. Chabielska, „Wpływ genotypu na działanie leków” [data dostępu: 05.12.2022]
65. L. Gong, M.M. Giacomini, C. Giacomini, M. L. Maitland, R.B. Altman, T. E. Klein, : „PharmGKB summary: sorafenib pathways”, *Pharmacogenetics and Genomics*, **2017**, 27, 240–246
66. B. Piątkowska-Jakubas, A. Sporek-Kunicka, : „Ostre białaczki szpikowe – leczenie postaci nawrotowych i opornych”, *Acta Haematologica Polonica*, **2015**, 46, 121-127
67. D. T. Leicht, V. Balan, A. Kaplun, V. Singh-Gupta, L. Kaplun, M. Dobson, G. Tzivion, : „Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1773, 1196–1212
68. S.K. Metzelder, T. Schroeder, A. Finck, S. Scholl, M. Fey, K. Gotze, Y.C. Linn, M. Kröger, A. Reiter , H.R. Salih, T. Heinicke, R. Stuhlmann, L. Müller, A. Giagounidis, R.G. Meyer, W. Brugger, M. Vöhringer, P. Dreger, M. Mori, N. Basara, K. Schäfer-Eckart, B. Schultheis, C. Baldus, A. Neubauer, A. Burchert, : „High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses”, *Leukemia*, **2012**, 1–7
69. A. Antar, M. A. Kharfan-Dabaja, R. Mahfouz, A. Bazarbachi, : „Sorafenib Maintenance Appears Safe and Improves Clinical Outcomes in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation”, *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, **2015**, 15 (5), 298-302
70. M. Sharma, F. Ravandi, U. D. Bayraktar, A. Chiattono, Q. Bashir, S. Giralt, J. Chen, M. Qazilbash, P. Kebriaei, M. Konopleva, M. Andreeff, J. Cortes, D. McCue, H. Kantarjian, R. E. Champlin, M. de Lima, : „Treatment of FLT3-ITD-Positive Acute Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Sorafenib”, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **2011**, 17, 1874-1877
71. T. Schroeder, F. Zohren, Ch. Saure, I. Bruns, A. Czibere, N. N. Safaian, R. Fenk, R. Haas, G. Kobbe, : „Sorafenib Treatment in 13 Patients with Acute Myeloid Leukemia and Activating FLT3 Mutations in Combination with Chemotherapy or as Monotherapy”, *Acta Haematologica*, **2010**, 124, 153–159
72. Ch. H. Man, T. K. Fung, Ch. Ho, H. HC Han, H. CH Chow, A. CH Ma, W. WL Choi, Si Lok, A. MS Cheung, C. Eaves , Y. L. Kwong, A. YH Leung, : „Sorafenib treatment of FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia: favorable initial outcome and mechanisms of subsequent non-responsiveness associated with the emergence of a D835 mutation”, *BLOOD*, **2012**, 1-27
73. B. I. Rini, : „Sunitinib”, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2007**,8(14), 2359-2369

74. EMA/487080/2014 EMEA/H/C/000687 „Sutent, sunitynib”, *European Medicines Agency*, Streszczenie EPAR dla ogółu społeczeństwa, **2014**, 1-3
75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548118/>, [data dostępu: 15.12.2022]
76. A. Kim, F. M. Balis, B. C. Widemann, „Sorafenib and Sunitinib”, *The Oncologist*, **2009**, 14, 800–805
77. W. Fiedler, S. Kayser, M. Kebenko, M. Janning, J. Krauter, M. Schittenhelm, K. Götze, D. Weber, G. Göhring, V. Teleanu, F. Thol, M. Heuser, K. Döhner, A. Ganser, H. Döhner, R. F. Schlenk, „A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations”, *British Journal of Haematology*, **2015**, 169, 694–700
78. K. S. Gajiwala, J. C. Wub, J. Christensenc, G. D. Deshmukhb, W. Diehla, J. P. DiNittob, J. M. Englishb, M. J. Greiga, You-Ai Hea, S. L. Jacquesb, E. A. Lunneya, M. McTiguea, D. Molinaa, T. Quenzera, P. A. Wellsd, X. Yua, Y. Zhangb, A. Zoud, M. R. Emmette, A. G. Marshalle, Hui-Min Zhange, G. D. Demetri, „KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2009**, 106(5), 1542-1547
79. M. C. Heinrich, R. G. Maki, Ch. L. Corless, C. R. Antonescu, A. Harlow, D. Griffith, A. Town, A. McKinley, Wen-Bin Ou, J. A. Fletcher, Ch. D.M. Fletcher, X. Huang, D. P. Cohen, Ch. M. Baum, G. D. Demetri, „Primary and Secondary Kinase Genotypes Correlate With the Biological and Clinical Activity of Sunitinib in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor”, *Journal of Clinical Oncology*, **2008**, 26(33), 5352-5359
80. Ch. Eichelberg, W. L. Vervenne, M. De Santis, L. Fischer von Weikersthal, P. J. Goebell, Ch. Lerchenmüller, U. Zimmermann, M. M.E.M. Bos, W. Freier, S. Schirrmacher-Memmel, M. Staehler, S. Pahernik, M. Los, M. Schenck, A. Flörcken, C. van Arkel, K. Hauswald, M. Indorf, D. Gottstein, M.S. Michel, „SWITCH: A Randomised, Sequential, Open-label Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Sorafenib-sunitinib Versus Sunitinib-Sorafenib in the Treatment of Metastatic Renal Cell Cancer”, *European Urology*:EURURO-6176, **2015**, 1-11
81. R. J. Motzer, K. Penkov, J. Haanen, B. Rini, L. Albiges, M. T. Campbell, B. Venugopal, Ch. Kollmannsberger, S. Negrier, M. Uemura, J. L. Lee, A. Vasiliev, W. H. Miller, H. Gurney, M. Schmidinger, J. Larkin, M. B. Atkins, J. Bedke, B. Alekseev, J. Wang, M. Mariani, P. B. Robbins, A. Chudnovsky, C. Fowst, S. Hariharan, B. Huang, A. di Pietro, T. K. Choueiri, „Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma”, *The New England Journal of Medicine*, **2019**, 1-13
82. B.I. Rini, E.R. Plimack, V. Stus, R. Gafanov, R. Hawkins, D. Nosov, F. Pouliot, B. Alekseev, D. Soulières, B. Melichar, I. Vynnychenko, A. Kryzhanivska, I. Bondarenko, S.J. Azevedo, D. Borchiellini, C. Szczylik, M. Markus, R.S. McDermott, J. Bedke, S. Tartas, Y.-H. Chang, S. Tamada, Q. Shou, R.F. Perini, M. Chen, M.B. Atkins, T. Powles, „Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma”, *The New England Journal of Medicine*, 2019, 1-12
83. M. T. Voso, R. A. Larson, D. Jones, G. Marcucci, T. Prior, J. Kraüter, M. Heuser, S. Lavorgna, J. Nomdedeu, S. M. Geyer, A. Walker, A. H. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. M. de Witte, J. H. Jansen, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, R. F. Schlenk, A. Ganser, S. Amadori, Y. Cheng, YinMiao Chen, C. Pallaud, L. Du, A. Piciocchi, G. Ehninger, J. Byrd, Ch. Thiede, K. Döhner, R. M. Stone, H. Döhner, C. D. Bloomfield, F. Lo-Coco, „Midostaurin in patients with acute myeloid leukemia and FLT3-TKD mutations: a subanalysis from the RATIFY trial”, *Blood Advances*, **2020**, 4(19), 4945-4954
84. R. F. Schlenk, S. Kayser, „Midostaurin: A Multiple Tyrosine Kinases Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia and Systemic Mastocytosis”, *Recent Results in Cancer Research*, **2018**, 199-214
85. A. Wierzbowska, M. Czemerska, „Rola midostauryny w leczeniu ostrej białaczki szpikowej z towarzyszącą mutacją FLT3”, *Hematologia*, **2019**, 10(4), 163–173
86. Aneks i charakterystyka produktu leczniczego „Rydapt, INN-midostaurin”, Podmiot odpowiedzialny Novartis Europharm Limited Vista Building Elm Park, Merrion Road Dublin 4 Irlandia, Wytwórca Novartis Pharma GmbH Roonstrasse 25, 90429 Norymberga Niemcy
87. R.M. Stone, S.J. Mandrekar, B.L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C.D. Bloomfield, C. Thiede, T.W. Prior, K. Döhner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R.B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M.A. Sanz, J.M. Brandwein, T. de Witte, D.

Niederwieser, F.R. Appelbaum, B.C. Medeiros, M.S. Tallman, J. Krauter, R.F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R.A. Larson, and H. Döhner.; „Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation”, *The New England Journal of Medicine*, **2017**, 1-10

88. M. Shabbir, R. Stuart.; „Lestaurtinib, a multitargeted tyrosinase kinase inhibitor: from bench to bedside”, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2010**, 19(3), 427-436

89. <https://www.medscape.com/viewarticle/529597>, [data dostępu: 05.01.2021]

90. B. D. Smith, M. Levis, M. Beran, F. Giles, H. Kantarjian, K. Berg, K. M. Murphy, T. Dausers, J. Allebach, D. Small.; „Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia”, *BLOOD*, **2004**, 103(10), 3669-3676

91. M. Levis, F. Ravandi, E. S. Wang, M. R. Baer, A. Perl, S. Coutre, H. Erba, R. K. Stuart, M. Baccarani, L. D. Cripe, M. S. Tallman, G. Meloni, L. A. Godley, A. A. Langston, S. Amadori, I. D. Lewis, A. Nagler, R. Stone, K. Yee, A. Advani, D. Douer, W. W. Jędrzejczak, G. Juliusson, M. R. Litzow, S. Petersdorf, M. Sanz, H. M. Kantarjian, T. Sato, L. Tremmel, D. M. Bensen-Kennedy, D. Small, B. D. Smith.; „Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse”, *BLOOD*, **2011**, 117(12), 3294-3301

92. S. Knapper, A. K. Burnett, T. Littlewood, W. J. Kell, S. Agrawal, R. Chopra, R. Clark, M. J. Levis, D. Small.; „A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy”, *BLOOD*, **2006**, 108(10), 3262-3270

93. N. Brownlow, M. Vaid, N.J. Dibb.; „Tandutinib inhibits FMS receptor signalling, and macrophage and osteoclast formation in vitro”, *Leukemia*, **2008**, 22, 1452–1453

94. D. J. DeAngelo, R. M. Stone, M. L. Heaney, S. D. Nimer, R. L. Paquette, R. B. Klisovic, M. A. Caligiuri, M. R. Cooper, J.M. Lecerf, M. D. Karol, Sh. Sheng, N. Holford, P. T. Curtin, B. J. Druker, M. C. Heinrich.; „Phase I clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics”, *BLOOD*, **2006**, 108(12), 3674-3681

95. D. R. Shepard, M. M. Cooney, P. Elson, R. M. Bukowski, R. Dreicer, B. I. Rini, J. A. Garcia.; „A phase II study of tandutinib (MLN518), a selective inhibitor of type III tyrosine receptor kinases, in patients with metastatic renal cell carcinoma”, *Investigational New Drugs*, **2012**, 30, 364–367

96. L. M. Kelly, Jin-Chen Yu, Ch. L. Boulton, M. Apatira, J. Li, C. M. Sullivan, I. Williams, S. M. Amaral, D. P. Curley, Ni. Duclos, D. Neuberg, R. M. Scarborough, A. Pandey, S. Hollenbach, K. Abe, N. A. Lokker, D. G. Gilliland, N. A. Giese.; „CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML)”, *Cancer Cell*, **2002**, 1, 421-431

97. P. H. Wiernik.; „FLT3 Inhibitors for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia”, *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, **2010**, 8 (6), 429-437

98. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tandutinib>, [data dostępu: 03.04.2023]

99. W. Deng, Chun-Ling Dai, Jun-Jiang Chen, R. J. Kathawala, Yue-Li Sun, Hai-Fan Chen, Li-Wu Fu, Zhe-Sheng Chen.; „Tandutinib (MLN518) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux activity of the multidrug resistance protein 7 (ABCC10)”, *Oncology Reports*, **2013**, 29, 2479-2485,

100. M. Mori, N. Kaneko, Y. Ueno, M. Yamada, R. Tanaka, R. Saito, I. Shimada, K. Mori, S. Kuromitsu.; „Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia”, *Investigational New Drugs*, **2017**, 1-10

101. Aneks i charakterystyka produktu leczniczego.; „Xospata, INN-gilteritinib”, Podmiot odpowiedzialny i wytwórca Astellas Pharma Europe B.V. Sylviusweg 62, 2333 BE Leiden, Holandia

102. J. Zhao, Y. Song, D. Liu.; „Gilteritinib: a novel FLT3 inhibitor for acute myeloid leukemia”, *Biomarker Research*, **2019**, 7(19), 1-6

103. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=PL&Expert=504652, [data dostępu: 03.04.2023]

104. D. Capelli, D. Menotti, A. Fiorentini, F. Saraceni, A. Olivieri, „Overcoming Resistance: FLT3 Inhibitors Past, Present, Future and the Challenge of Cure”, *Cancers*, **2022**, 14(4315), 1-27
105. K. Tzogani, H. Røshol, H. H. Olsen, I. B. Aas, M. L. Dalhus, G. D. Håkonsen, L. S. Nilssen, V. Lindberg, M. Økvist, B. Bolstad, I. Rogovska, N. Karpova, H. Enzmann, Ch. Gisselbrecht, F. Pignattl, „The European Medicines Agency Review of Gilteritinib (Xospata) for the Treatment of Adult Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia with an FLT3 Mutation”, *The Oncologist*, **2020**, 25, 1–7
106. M. Kida, Y. Kuroda, M. Kido, R. Chishaki, K. Kuraoka, T. Ito, „Successful treatment with gilteritinib for isolated extramedullary relapse of acute myeloid leukemia with FLT3 ITD mutation after allogeneic stem cell transplantation”, *International Journal of Hematology*, **2020**, 1-6
107. A.E. Perl, G. Martinelli, J.E. Cortes, A. Neubauer, E. Berman, S. Paolini, P. Montesinos, M.R. Baer, R.A. Larson, C. Ustun, F. Fabbiano, H.P. Erba, A. Di Stasi, R. Stuart, R. Olin, M. Kasner, F. Ciceri, W.-C. Chou, N. Podoltsev, C. Recher, H. Yokoyama, N. Hosono, S.-S. Yoon, J.-H. Lee, T. Pardee, A.T. Fathi, C. Liu, N. Hasabou, X. Liu, E. Bahceci, M.J. Levis, „Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML”, *The New England Journal of Medicine*, **2019**, 381(18), 1728-1740
108. A. Galanis, H. Ma, T. Rajkhowa, A. Ramachandran, D. Small, J. Cortes, M. Levis, „Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants”, *BLOOD*, **2014**, 123(1), 94-100
109. K. M. Kampa-Schittenhelm, J. Frey, L. A. Haeusser, B. Illing, A. A. Pavlovsky, G. Blumenstock, M. M. Schittenhelm, „Crenolanib is a type I tyrosine kinase inhibitor that inhibits mutant KIT D816 isoforms prevalent in systemic mastocytosis and core binding factor leukemia”, *Oncotarget*, **2017**, 8(47), 82897-82909
110. E.S Wang, A.D. Goldberg, R.B. Walter, et al., „Long-term results of a phase 2 trial of crenolanib combined with 7+3 chemotherapy in adults with newly diagnosed FLT3 mutant AML”, *Journal of Clinical Oncology*, **2022**, 40(16), 7007
111. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Crenolanib>, [data dostępu: 17.02.2023]
112. H. Zhang, S. Savage, A. R. Schultz, D. Bottomly, L. White, E. Segerdell, B. Wilmot, Sh. K. McWeeney, Ch. A. Eide, T. Nechiporuk, A. Carlos, R. Henson, Ch. Lin, R. Searles, H. Ho, Y. L. Lam, R. Sweat, C. Follit, V. Jain, E. Lind, G. Borthakur, G. Garcia-Manero, F. Ravandi, H. M. Kantarjian, J. Cortes, R. Collins, D. R. Buelow, Sh. D. Baker, B. J. Druker, J. W. Tyner, „Clinical resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms”, *NATURE COMMUNICATIONS*, **2019**, 10(244), 1-13
113. A. D. Goldberg, R. H. Collins, R. M. Stone, R. B. Walter, Ch. Karanes, C. E Vigil, E. S. Wang, M. S. Tallman, „Addition of Crenolanib to Induction Chemotherapy Overcomes the Poor Prognostic Impact of Co-Occurring Driver Mutations in Patients with Newly Diagnosed FLT3-Mutated AML”, *BLOOD*, **2018**, 132(1), 1436
114. A. D. Goldberg, M. B. Geyer, J. Kell, E. Di Bona, T. S. Pardee, R. Bhave, M. R. Grunwald, G. Marconi, Y. Wang, A. Pathan, B. Messahel, „Clinical Benefit of Crenolanib, with or without Salvage Chemotherapy, in Multiply Relapsed, FLT3 Mutant AML Patients after Prior Treatment with Gilteritinib”, *BLOOD*, **2020**, 136(1), 8–9
115. B. Oran, S. O. Ciurea, D. Marin, J. M. McCarty, Q. Bashir, S. Ahmed, A. L. Olson, U. Popat, Y. Nieto, P. Kebriaci, E. J. Shpall, T. Agrawal, R. E. Champlin, „Safety Analysis of Intra-Patient Dose- Study of Crenolanib Maintenance Therapy in Patients with FLT3 Mutant AML Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant”, *BLOOD*, **2018**, 132(1), 3426
116. K. Tarlock, S. Meshinchi, J. E. Rubnitz, S. E. Karol, B. Spitzer, A. J. Sabnis, A. Pathan, B. Messahel, „Clinical Benefit and Tolerability of Crenolanib in Children with Relapsed Acute Myeloid Leukemia Harboring Treatment Resistant FLT3 ITD and Variant FLT3 TKD Mutations Treated on Compassionate Access”, *BLOOD*, **2020**, 136(1), 23
117. A. Garcia-Horton, K. W. Yee, „Qwizartinib for the treatment of acute myeloid leukemia”, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2020**, 21(17), 2077-2090
118. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quizartinib>, [data dostępu: 17.03.2023]

119. T. Kindler, D. B. Lipka, Th. Fischer, „FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years”, *BLOOD*, **2010**, 116(24), 5089-5102
120. Y. Shiotsu, H. Kiyoi, Y. Ishikawa, R. Tanizaki, M. Shimizu, H. Umehara, K. Ishii, Y. Mori, K. Ozeki, Y. Minami, A. Abe, H. Maeda, T. Akiyama, Y. Kanda, Y. Sato, Sh. Akinaga, T. Naoe, „KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation”, *BLOOD*, **2009**, 114(8), 1607-1617
121. C. C. Ayala-Aguilera, T. Valero, Á. Lorente-Macías, D. J. Baillache, S. Croke, A. Unciti-Broceta, „Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995–2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis”, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2022**, 65, 1047–1131
122. N. P. Shah, M. Talpaz, M. W. N. Deininger, M. J. Mauro, I. W. Flinn, D. Bixby, S. Lustgarten, J. M. Gozgit, T. Clackson, Ch. D. Turner, F. G. Haluska, H. Kantarjian, J. E. Cortes, „Ponatinib in patients with refractory acute myeloid leukaemia: findings from a phase 1 study”, *British Journal of Haematology*, **2013**, 162, 547–569
123. Aneks I, charakterystyka produktu leczniczego, „Iclusig, INN-ponatinib”, Podmiot odpowiedzialny: ARIAD Pharma Ltd. Riverbridge House Guildford Road Leatherhead, Surrey KT22 9AD, Wielka Brytania; Wytwórca Haupt Pharma Amareg GmbH Donaustaufener Str. 378, 93055 Regensburg, Niemcy
124. M. Larhed, A. Hallberg, „Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery”, *Drug Discovery Today*, **2001**, 8(6), 406-416
125. <https://cem.com/microwave-chemistry/introduction>, [data dostępu; 15.05.2023]
126. S. Nain, R. Singh, S. Ravichandran, „Importance of Microwave Heating in Organic Synthesis”, *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, **2019**, 2(2), 94-104
127. M. A. Surati, S. Jauhari, K. R. Desai, „A brief review: Microwave assisted organic reaction”, *Archives of Applied Science Research*, **2012**, 4 (1), 645-661
128. <https://www.vapourtec.com/flow-chemistry/>, [data dostępu; 15.05.2023]
129. R. Porta, M. Benaglia, A. Puglisi, „Flow Chemistry: Recent Developments in the Synthesis of Pharmaceutical Products”, *Organic Process Research & Development*, **2015**, 1-66
130. Ni. E. Leadbeater; The New Synthetic Methods Group Connecticut, „An introduction to Flow chemistry: a practical laboratory course”, *Vapourtec*, **2013**, 1-6
131. M. Baumann, T. S. Moody, M. Smyth, S. Wharry, „A Perspective on Continuous Flow Chemistry in the Pharmaceutical Industry”, *Organic Process Research & Development*, **2020**, 1-51
132. W. Zhang, D. DeRyckere, D. Hunter, J. Liu, M. A. Stashko, K. A. Minson, Ch. T. Cummings, M. Lee, T. G. Glaros, D. L. Newton, S. Sather, D. Zhang, D. Kireev, W. P. Janzen, H. Shelton Earp, D. K. Graham, S. V. Frye, X. Wang, „UNC2025, a Potent and Orally Bioavailable MER/FLT3 Dual Inhibitor”, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57, 7031–7041
133. S. Polak, B. Wiśniowska, „Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – projektowanie i poszukiwanie cząsteczki aktywnej, ocena właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej”, *Farmacja Polska*, **2009**, 65(3), 214-223
134. <https://www.slideshare.net/KannanIyanar/in-silico-drug-designmolecular-docking>, [data dostępu: 22.07.2023]
135. <https://www.rcsb.org/structure/6JQR>, [data dostępu: 22.07.2023]
136. <https://www.rcsb.org/structure/4XUF>, [data dostępu: 22.07.2023]
137. <https://www.rcsb.org/structure/5X02>, [data dostępu: 22.07.2023]
138. <https://www.rcsb.org/structure/6IL3>, [data dostępu: 22.07.2023]
139. <https://www.rcsb.org/structure/4RT7>, [data dostępu: 22.07.2023]

140. <https://www.creative-proteomics.com/services/structure-activity-relationship-sar-analysis.htm>, [data dostępu: 22.07.2023]
141. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/suzuki-coupling.shtm>, [data dostępu: 30.07.2023]
142. S. Mukai, Y. Yamada,; „Catalyst Recycling in the Suzuki Coupling Reaction: Toward a Greener Synthesis in the Pharmaceutical Industry”, *Knowledge*, **2023**, 3, 1–17
143. R. Chinchilla, C. Nájera,; „The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry”, *Chemical Reviews*, **2007**, 107, 874–922
144. K. K. Manar, P. Ren,; „Recent progress on group 10 metal complexes of pincer ligands: From synthesis to activities and catalysis”, *Advances in Organometallic Chemistry*, Rozdział 4, ISSN 0065-3055, **2021**, 76, 241
145. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/sonogashira-coupling.shtm>, [data dostępu: 18.06.2023]
146. A. Szłapa-Kula,; „Reakcje sprzęgania, cykloaddycji i kondensacji w syntezie nowych materiałów na potrzeby organicznej elektroniki- rozprawa doktorska”, *Uniwersytet Śląski; INSTYTUT CHEMII*, **2018**, 21-27
147. D. Znidar, Ch.Hone, Ph. Inglesby, A. Boyd, C. O. Kappe,; „Development of a Continuous-Flow Sonogashira Cross-Coupling Protocol using Propyne Gas under Process Intensified Conditions”, *Organic Process Research & Development*, **2017**, 1-19
148. Sh. H. Chung, J. Park, J. W. Lee, J. Song, D. Jung, K.. Min,; „Structure-activity relationship of 7-aryl-2-anilino-p yrrlopyrimidines as Mer and Axl tyrosine kinase inhibitors”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2020**, 35(1), 1822–1833

Dorobek naukowy

Publikacje:

1. R. Niekraś, **N. Piórkowska**, I. Łakomska, J. Wietrzyk,: „ Influence of leaving groups on cytotoxicity of platinum(II) complexes”, *Vitoria-Gasteiz : Eurobask*, **2012**.
2. 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.
3. 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:

- P. Grygielewicz, **N. Piórkowska**, A. Mikołajczyk, J. Hucz-Kalitowska, A. Yamani, K. Dubiel, M. Wieczorek, A. Stanczak,: „Preclinical evaluation of a novel, selective pan-FGFR kinase inhibitor CPL-304-110 as a potential anticancer targeted therapy”. - 10th Protein Kinases in Drug Discovery Conference, Berlin, Germany, 2015.
- 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.
- **N. Piórkowska**, P. Olejkowska, P. Maliszewski, M. Naitana, A. Mikulska, A. Mikołajczyk, T. Kornatowski, D. Popiel, A. Yamani, J. Ścianowski, K. Dubiel, M. 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.
- P. Olejkowska, **N. Piórkowska**, P. Maliszewski, M. Naitana, A. Mikulska, A. Mikołajczyk, K. Jastrzębska, D. Popiel, A. Yamani, J. Ścianowski, K. Dubiel, M.

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.

- **N. Piórkowska**, P. Olejkowska, P. Maliszewski, M. Naitana, A. Mikulska, A. Mikołajczyk, T. Kornatowski, D. Popiel, A. Yamani, J. Ścianowski, K. Dubiel, M. 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.
- P. Olejkowska, **N. Piórkowska**, P. Maliszewski, M. Naitana, A. Mikulska, A. Mikołajczyk, K. Jastrzębska, D. Popiel, A. Yamani, J. Ścianowski, K. Dubiel, M. 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.

Konferencje i szkolenia:

- Najnowsze rozwiązania w Chromatografii Flash – Poznań, 2013.
- The 50th International Conference on Medicinal Chemistry – 50e RICT, Rouen, Francja, 2014.
- Scientific Update training course „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.
- 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 przepływowej i mikrofal w opracowaniu innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”. 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 przepływowej i mikrofal w opracowaniu innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”. 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 reaktorów przepływowych i mikrofalowych w opracowaniu innowacyjnego inhibitora drobnocząsteczkowego o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej przeciwko ostrej białaczce szpikowej (AML)”. 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.