

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 32900 B1**
(51) Cl. internationale : **C07D 487/04; A61K 31/5025; A61P 25/00**
(43) Date de publication : **01.12.2011**

(21) N° Dépôt : **33943**
(22) Date de Dépôt : **14.06.2011**
(30) Données de Priorité : **16.12.2008 US 61/122,854**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/US2009/067056 08.12.2009**
(71) Demandeur(s) : **ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center Indianapolis Indiana 46285 (US)**
(72) Inventeur(s) : **BURKHOLDER, Timothy, Paul ; CLAYTON, Joshua, Ryan ; MA, Liandong**
(74) Mandataire : **H & H CONSULTING LAW FIRM**

(54) Titre : **COMPOSE D'AMINOPYRAZOLE**
(57) Abrégé : La présente invention porte sur des composés amino pyrazole utiles dans le traitement de troubles myéloprolifératifs chroniques et de divers cancers, par exemple, un glioblastome, un cancer du sein, un myélome multiple, un cancer de la prostate et des leucémies.

ABREGE

- 5 La présente invention porte sur des composés amino pyrazole utiles dans le traitement de troubles myéloprolifératifs chroniques et de divers cancers, par exemple, un glioblastome, un cancer du sein, un myélome multiple, un cancer de la prostate et des leucémies.

COMPOSE D'AMINOPYRAZOLE

32900B1
11 DEC 2011

La Janus kinase 2 (JAK2) est un membre de la famille des tyrosine kinases qui est impliqué dans la signalisation des cytokines. La JAK2 joue un rôle clé dans la voie de signalisation de l'érythropoïétine (EPO), y compris la
5 différenciation des érythrocytes et l'activation de Stat5. Des études récentes ont démontré que des patients souffrant de troubles myéloprolifératifs chroniques tels que la maladie de Vaquez, la thrombocytose essentielle et la myélofibrose avec métaplasie myéloïde et de troubles thrombotiques tels que la résistance
10 activée à la protéine C, la thrombose veineuse splanchnique, le syndrome de Budd-Chiari et la thrombose de la veine porte ont fréquemment acquis des mutations d'activation dans la JAK2. La mutation, une substitution valine-phénylalanine à la position d'acide aminé 617, donne lieu à une activation constitutive de phosphorylation de la tyrosine via un mécanisme encore
15 inconnu. L'activité constitutive de la JAK2 mutante donne lieu à une augmentation des taux de la JAK2 phosphorylée, de la pSTAT5, et de l'activité transcriptionnelle de la STAT5, ce qui donne lieu à la pathogenèse de troubles myéloprolifératifs et de leucémies telles que la leucémie myéloïde chronique atypique. En outre, la JAK2 est activée par la boucle autocrine dépendant de
20 l'interleukine-6 ou par d'autres altérations génétiques dans des tumeurs solides et hématologiques, par exemple le glioblastome, le cancer du sein, le myélome multiple, le cancer de la prostate, la leucémie myéloïde aiguë primaire et secondaire, la leucémie lymphoblastique aiguë à lymphocytes T et à lymphocytes B, le syndrome de myélodysplasie.

Divers inhibiteurs de la tyrosine kinase à base d'aminopyrazole ont été
25 rapportés. Voir par exemple les documents WO 06/087538 et WO 2007/064797.

Toutefois, un besoin subsiste de disposer d'autres composés qui inhibent les tyrosines kinases telles que la JAK2. La présente invention procure un nouveau composé d'aminopyrazole considéré comme possédant une utilité

clinique pour le traitement de troubles myéloprolifératifs dans lesquels la voie de signalisation de la JAK2 est activée ou dans lesquels la signalisation de JAK/STAT est dérégulée.

La présente invention procure la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-
5 (5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

La présente invention procure un procédé de traitement de troubles myéloprolifératifs chroniques choisis parmi le groupe constitué par la maladie de Vaquez, la thrombocytose essentielle et la myélofibrose avec métaplasie
10 myéloïde, dans un mammifère, comprenant l'administration à un mammifère qui manifeste un besoin pour un tel traitement, une quantité efficace de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

La présente invention procure également un procédé de traitement du
15 glioblastome, du cancer du sein, du myélome multiple, du cancer de la prostate, et de leucémies telles que la leucémie myéloïde chronique atypique, la leucémie myéloïde aiguë primaire et secondaire, la leucémie lymphoblastique aiguë à lymphocytes T et à lymphocytes B, le syndrome de myélodysplasie, et
20 des troubles myéloprolifératifs dans un patient, comprenant l'administration à un patient qui manifeste un besoin pour un tel traitement, une quantité efficace de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

La présente invention procure également une composition
25 pharmaceutique comprenant la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables et un support, un diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention procure la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-
30 (5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables et un support, un

diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable en combinaison avec un autre ingrédient thérapeutique.

La présente invention procure la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables à utiliser comme médicament. En outre, la présente invention procure l'utilisation de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables dans la préparation d'un médicament pour traiter des troubles myéloprolifératifs chroniques. En particulier, ces troubles myéloprolifératifs chroniques sont choisis parmi le groupe constitué par la maladie de Vaquez, la thrombocytose essentielle et la myélofibrose avec métaplasie myéloïde. En outre, la présente invention procure une composition pharmaceutique pour le traitement de troubles myéloprolifératifs chroniques choisis parmi le groupe constitué par la maladie de Vaquez, la thrombocytose essentielle et la myélofibrose avec métaplasie myéloïde, comprenant la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à titre d'ingrédient actif.

Le lecteur avisé comprendra que le composé de la présente invention est capable de former des sels. Le composé de la présente invention est une amine et réagit par conséquent avec l'un quelconque des nombreux acides inorganiques et organiques pour former des sels d'addition d'acides pharmaceutiquement acceptables. De tels sels d'addition d'acides pharmaceutiquement acceptables ainsi que la méthodologie courante pour les préparer sont bien connus dans la technique. Voir par exemple, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS : PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHAWiley-VCH, 2002); L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, dans « Encyclopedia of Pharmaceutical Technology ». Eds. J. Swarbrick et J. C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499 ; S. M. Berge, et al., « Pharmaceutical Salts », Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, janvier 1977.

Les dénominations des préparations et des exemples qui suivent se réfèrent à l'utilisation du programme ChemDraw Ultra, Version 10.0.

Schéma 1:

5

Préparation 1

1-(4-méthoxybenzyl)-5-méthyl-1H-pyrazol-3-amine

Procédé 1 :

10 Dans un ballon à fond rond de 1 L, on combine du 5-amino-3-méthylpyrazole (22,8 g, 234,8 mmol) et de la N-méthylpyrrolidone (200 mL). On refroidit le ballon jusqu'à 0 °C et on le place sous atmosphère d'azote. On ajoute de l'hydroxyde de sodium (9,39 g, 1,0 équivalent (équiv.)) au ballon et on agite pendant 30 minutes (min). On ajoute une solution de l'alpha-chloro-4-méthoxytoluène (31 mL, 1,0 équiv.) dans de la N-méthylpyrrolidone (100 mL) au ballon goutte-à-goutte. On laisse le mélange réactionnel se réchauffer

15 jusqu'à la température ambiante (RT) lentement pendant une nuit. On dilue le mélange réactionnel avec de l'eau et on l'extrait dans de l'acétate d'éthyle (EA). On lave les couches organiques avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. On concentre sous vide. On purifie sur un tampon de silice (hexane -> 2:1 hexane:EA -> 3:2 hexane:EA -> 1:1 hexane:EA -> 1:2 hexane:EA -> EA).

20 On concentre les fractions désirées pour obtenir le composé sous rubrique (10,8 g, correspondant à un rendement de 21 % de la théorie). LCMS (4 min) = 218,0 (M+1).

Procédé 2 :

A. (E)-2-(4-méthoxybenzylidène)hydrazinecarboxylate de tert-butyle

On ajoute du 4-méthoxybenzaldéhyde (400 g, 2,94 mol) pendant 20 min à une solution de carbazate de tert-butyle (400 g, 2,94 mol) dans du toluène (750 mL) à 50 °C. On chauffe à reflux pendant un laps de temps de 1 heure (H), on récolte l'eau dans un azéotrope avec le toluène. Après avoir récolté toute l'eau, on refroidit à 60 °C. On ajoute des hexanes jusqu'à ce que le produit précipite hors de la solution. On refroidit davantage le bain jusqu'à 20 °C. On récolte les produits solides par filtration et on les sèche en utilisant une presse sous atmosphère d'azote pour obtenir le composé sous rubrique (750,5 g, correspondant à un rendement de 91 % de la théorie). ¹H RMN [400 MHz, diméthyl sulfoxyde-d₆ (DMSO-d₆)] δ 10,6-10,8 (singulet large, 1 H), 7,88-8,0 (s, 1 H), 7,5-7,55 (d, 2 H), 6,9-57,0 (d, 2 H), 1,45 (s, 9H). ES/MS (m/z): 249 [M-H].

B. 2-(4-méthoxybenzyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle

On ajoute du charbon palladié à 10 % (humidifié à l'eau, 20 g) mis en suspension dans du EA (100 mL) à un réacteur sous pression scellé via un transfert à vide. On rince à la ligne de transfert avec une quantité minimale de EA. On charge du (E)-2-(4-méthoxybenzylidène)hydrazinecarboxylate de tert-butyle (320 g, 1,28 mol) à l'état dissous dans du tétrahydrofurane (THF, 1000 mL) via un transfert à vide et on rince la ligne avec une quantité minimale de THF. On met le réacteur sous pression jusqu'à 50 PSI avec du H₂ et on mélange le contenu du réacteur à 20 ± 10 °C. On poursuit la réaction et on maintient la pression d'hydrogène à 50 PSI, jusqu'à ce que l'on n'observe plus de fixation d'hydrogène. On filtre la solution réactionnelle pour éliminer le catalyseur et on lave le gâteau de filtre de catalyseur avec du THF (500 mL). On ajoute le liquide de lavage au filtrat réactionnel. On concentre la solution sous vide pour obtenir le composé sous rubrique (337 g, correspondant à un rendement de 86 % de la théorie) sous la forme d'une huile. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,1-8,3 (s, 1 H), 7,17,3 (d, 2 H), 6,8-6,9 (d, 2 H), 4,4-4,6 (singulet large, 1 H), 3,7-3,8 (s, 2 H), 3,6-3,7 (s, 3 H), 1,3-1,5 (s, 9H).

C. Dichlorhydrate de (4-méthoxybenzyl)hydrazine

A une solution de chlorure d'hydrogène 4 N dans du dioxanne (2000 mL, 8,00 mol HCl), on ajoute du 2-(4-méthoxybenzyl)hydrazinecarboxylate de tert-butyle (324 g, 1,09 mol) à l'état dissous dans une quantité minimale de dioxanne, lentement pendant un laps de temps de 1 h. Un précipité se forme progressivement. On laisse la solution s'agiter pendant 16 h à 20 ± 5 °C. On récolte les produits solides par filtration. On met les produits solides en suspension dans de l'heptane (2000 mL) et on isole les produits solides par filtration. On sèche les produits solides en utilisant une presse sous atmosphère d'azote pour obtenir le composé sous rubrique (242,3 g, 1,08 mol, correspondant à un rendement de 98 % de la théorie). ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,2-9,0 (singulet large, 5 H), 7,3-7,4 (d, 2 H), 6,8-7,0 (d, 2 H), 4,0 (s, 2 H), 3,7 (s, 3H).

D. 1-(4-méthoxybenzyl)-5-méthyl-1H-pyrazol-3-amine et 1-(4-méthoxybenzyl)-3-méthyl-1H-pyrazol-5-amine

On combine du tert-butoxyde de potassium (191,89 g, 1,71 mol) et du THF (2000 mL) à 22 °C. On mélange jusqu'à ce que l'on obtienne une solution homogène. On refroidit jusqu'à 5 °C. On ajoute une solution prémélangée d'acétonitrile (84,25 g, 2,05 mol) et d'acétate de méthyle (126,7 g, 1,71 mol) à la solution de tert-butoxyde de potassium pendant un laps de temps de 45 min, tout en maintenant une température inférieure à 10 °C. Au terme de l'addition, on laisse le mélange réactionnel se réchauffer jusqu'à 20 ± 5 °C et on agite pendant environ 2 h. On ajoute du dichlorhydrate de (4-méthoxybenzyl)hydrazine (250 g) par portions au mélange réactionnel pendant environ 5 min, avant d'ajouter du chlorure d'hydrogène 4 N dans du dioxanne (262,5 g, 1,00 mol) à un débit qui permet de maintenir la température à une valeur inférieure à 30 °C. Au terme de l'addition, on laisse s'agiter à 25 ± 5 °C pendant environ 16 h. On isole les produit solide par filtration et on lave avec du THF (500 mL). On met les produits solides bruts en suspension dans du dichlorométhane (DCM, 4 L) et de l'eau (2 L) en réglant le pH à >10 avec du NaOH 5 N. On laisse les couches se déposer et on récolte la phase organique.

On lave la phase aqueuse avec du DCM (2 L). On combine les phases organiques et on les sèche sur du sulfate de sodium anhydre et on concentre la solution jusqu'à l'obtention d'un produit solide sous vide afin d'obtenir 165 g de produit brut. On chauffe le produit brut dans de l'acétate d'isopropyle (660 mL) à reflux pour dissoudre la plus grande quantité possible de produits solides. On refroidit jusqu'à 33 °C et on ajoute de l'hexane (600 mL) lentement pendant 1 h. On refroidit jusqu'à 10 °C et on maintient la température à 10 °C pendant 10 min. On isole les produits solides par filtration, on le lave avec de l'hexane (200 mL), et on sèche en utilisant une presse sous atmosphère d'azote pour obtenir un mélange des composés sous rubrique (91,5 g, 0,4 mol, correspondant à un rendement de 48 % de la théorie). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,2-7,3 (d, 2 H), 6,7-6,9 (d, 2 H), 5,1 (singulet large, 2 H), 5,0 (s, 1 H), 4,9 (s, 2 H), 3,6-3,8 (s, 3 H), 1,9 (s, 3H).

Note : ces produits intermédiaires peuvent être séparés par chromatographie ; toutefois, dans ce cas, ils sont isolés sous la forme d'un mélange et ils peuvent être utilisés dans la séquence finale ci-dessous qui implique l'élimination du groupe benzyle à titre de groupe de protection pour obtenir le même produit.

20

Préparation 2

2-chloro-1-(4-chloro-2-fluorophényl)éthanone

Dans un ballon à fond rond de 1 L, on combine de la 4'-chloro-2'-fluoroacétophénone (40 g, 231,8 mmol), de l'heptane (120 mL) et du méthanol (16 mL). On refroidit jusqu'à 0 °C et on place sous atmosphère d'azote. On dissout du chlorure de sulfuryle (21,5 mL, 1,15 équiv.) dans de l'heptane (120 mL) et on charge dans un entonnoir d'addition. On ajoute goutte à goutte au mélange réactionnel pendant 60 min. On agite pendant 2,5 h à 0 °C ; pendant ce temps, un précipité de couleur blanche se forme. On charge l'entonnoir d'addition avec du bicarbonate de sodium 1 M (400 mL) et on ajoute ensuite au mélange réactionnel goutte à goutte. Au terme du dégagement gazeux, on filtre la suspension biphasique pour récolter le composé sous rubrique (38,18 g, correspondant à un rendement de 80 % de la théorie) sous la forme d'aiguilles

de couleur blanche. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 5,00 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz), 7,43 (m, 1 H), 7,63 (m, 1 H), 7,89 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz).

Préparation 3

5 (E)-N'-(6-chloropyridazin-3-yl)-N,N-diméthylacétimidamide

Dans un ballon à fond rond de 2 L, on combine de la 3-chloro-6-pyridazinamine (43,2 g, 333,5 mmol), du toluène (500 mL), et du diméthylacétal de N,N-diméthylacétamide (67,8 mL, 1,25 équiv.). On fixe un condenseur à reflux et on chauffe ensuite à reflux pendant 2 h. On laisse refroidir jusqu'à la
10 RT. On concentre sous vide. On triture la matière brute avec des hexanes et on filtre pour isoler le composé sous rubrique (60,4 g, correspondant à un rendement de 91 % de la théorie) sous la forme d'un produit solide de couleur havane clair. MS = 199,0 (M+1).

15 Préparation 4

(4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanone

Dans un ballon à fond rond, on combine du (E)-N'-(6-chloropyridazin-3-yl)-N,N-diméthylacétimidamide (36,61 g, 184,3 mmol), de la 2-chloro-1-(4-chloro-2-fluorophényl)éthanone (38,15 g, 1 équiv.) et du diméthylformamide
20 (150 mL). On place sous atmosphère d'azote et on chauffe ensuite à 120 °C pendant 4 h. On laisse refroidir jusqu'à la RT et on agite pendant une nuit. On dilue avec du EA (1 L) et de l'eau (500 mL). On extrait les couches organiques à trois reprises dans de l'eau et ensuite dans une solution aqueuse saturée de
25 chlorure de sodium. On sèche les couches organiques sur du sulfate de magnésium anhydre. On filtre et on concentre sous vide. On purifie via un tampon de silice (hexane -> 4:1 hexane:EA -> 3:1 hexane:EA -> 2:1 hexane:EA -> 1:1 hexane:EA) et on isole le composé sous rubrique (33,8 g, correspondant à un rendement de 55 % de la théorie) sous la forme d'un produit solide de
30 couleur vert clair. LCMS (4 min = 324,0, 326,0, M+1).

Préparation 5

2-((6-chloro-3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)méthyl)isoindoline-1,3-dione

On combine de la (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-
5 méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanone (5,6 g, 17,3 mmol), de la N-
phtaloylglycine (6,0 g, 1,7 équiv.), de l'acétonitrile (60 mL), de l'eau (15 mL), de
l'acide trifluoroacétique (0,26 mL, 0,2 équiv.), et du nitrate d'argent (294 mg, 0,1
équiv.) dans un ballon à fond rond auquel on fixe un entonnoir d'addition et on
place sous atmosphère d'azote. On chauffe jusqu'à 70 °C et on maintient à
10 cette température pendant 15 min. On dissout du persulfate d'ammonium (7,1
g, 1,8 équiv.) dans de l'eau (15 mL) et on charge la solution à un entonnoir
d'addition. On ajoute goutte à goutte au ballon réactionnel pendant
approximativement 20 min. On chauffe le mélange réactionnel à 70 °C pendant
1 h. Un précipité se forme pendant ce temps ; on filtre via un entonnoir de
15 Büchner afin d'isoler le composé brut sous rubrique (7,3 g, correspondant à un
rendement de 87 % de la théorie) sous la forme d'un produit solide de couleur
blanc cassé. LCMS (4 min) = 483,0, 485,0, M+1).

Préparation 6

20 (8-(aminométhyl)-6-chloro-2-méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)(4-chloro-2-
fluorophényl)méthanone

On combine de la 2-((6-chloro-3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-
méthylimidazo[1,2b]pyridazin-8-yl)méthyl)isoindoline-1,3-dione (7,30 g, 15,1
mmol), de l'éthanol (200 mL) et de l'hydrazine (1,45 mL, 3 équiv.) dans un
25 ballon à fond rond et on place sous atmosphère d'azote. On agite pendant 2
jours à la RT. On chauffe pendant 2 h à 50 °C, et on concentre ensuite le
mélange réactionnel sous vide. On dilue avec du EA. On lave les couches
organiques avec du HCl 1 N (aq.) pour extraire le produit dans la couche
aqueuse. On rend la couche aqueuse basique avec du NaOH 1 N (aq.) et on
30 extrait dans du EA. On lave la couche de EA avec une solution aqueuse
saturée de chlorure de sodium et on sèche sur du sulfate de magnésium
anhydre. On filtre et on concentre sous vide pour obtenir le composé brut sous

rubrique (1,2 g, correspondant à un rendement de 23 % de la théorie) sous la forme d'un produit solide de couleur vert clair. MS = 355,0, 353,0 (M+1).

Préparation 7

5 (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanone

On combine de la (8-(aminométhyl)-6-chloro-2-méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)(4chloro-2-fluorophényl)méthanone (1,15 g, 3,3 mmol), de l'eau (12 mL), du carbonate de potassium (495 mg, 1,1 équiv.) et de l'éther
10 2-bromoéthylique (0,47 mL, 1,1 équiv) dans un récipient réactionnel à micro-ondes de 20 mL. On ferme hermétiquement avec une capsule-couronne et on chauffe ensuite dans un réacteur à micro-ondes à 120 °C pendant 20 min. On refroidit jusqu'à la température ambiante et on partage entre de l'acétate d'éthyle et de l'eau. On lave la couche d'acétate d'éthyle avec une solution
15 aqueuse saturée de chlorure de sodium et on sèche sur du sulfate de magnésium anhydre. On filtre et on concentre sous vide. On purifie sur du gel de silice (4:1 hexane:EA -> 2:1 hexane:EA -> 1:1 hexane:EA) pour obtenir le composé sous rubrique (0,43 g, correspondant à un rendement de 31 % de la théorie) sous la forme d'une mousse de couleur jaune clair. LCMS (4 min) =
20 423,0, 425,0, M+1.

Préparation 8

(4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanol

25 On combine de la (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanone (0,43 g, 1,0 mmol) et du méthanol (15 mL) dans un ballon à fond rond. On place sous atmosphère d'azote et on refroidit jusqu'à 0°C. On ajoute du borohydrure de sodium (58 mg, 1,5 équiv.) en une seule portion. On agite pendant 5 minutes à cette
30 température et on élimine ensuite le bain de refroidissement et on laisse se réchauffer jusqu'à la température ambiante. Après 15 minutes, on arrête la réaction avec de l'eau et on extrait dans de l'acétate d'éthyle. On lave les

couches organiques avec de l'eau puis avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. On sèche les couches organiques sur du sulfate de magnésium anhydre. On filtre et on concentre sous vide pour obtenir le composé sous rubrique (0,4 g, correspondant à un rendement de 93 % de la théorie). LCMS (4 min) = 425,0, 427,0, M+1.

Préparation 9

4-((6-chloro-3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)méthyl)morpholine

On combine du (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanol (0,4 g, 0,94 mmol), du 1,2-dichloroéthane (25 mL), du triéthylsilane (0,45 mL, 3 équiv.), et de l'acide trifluoroacétique (0,57 mL, 8 équiv.) dans un ballon à fond rond et on place sous atmosphère d'azote. On chauffe à 70 °C pendant une nuit. On concentre le mélange réactionnel sous vide. On charge sur une cartouche d'échange d'ions SCX de 10 g Varian MegaElut® (prélavée avec du méthanol). On élue avec du méthanol pour éliminer les impuretés non basiques. On élue avec de l'ammoniac 2 M dans du méthanol. On concentre sous vide pour obtenir le composé sous rubrique (0,36 g, correspondant à un rendement de 94 % de la théorie). LCMS (4 min) = 409,0, 411,0, M+1.

Préparation 10

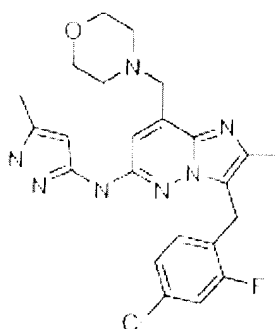
3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-N-(1-(4-méthoxybenzyl)-5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine

On combine de la 4-((6-chloro-3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthylimidazo[1,2b]pyridazin-8-yl)méthyl)morpholine (0,36 g, 0,88 mmol), de la 1-(4-méthoxybenzyl)-5-méthyl-1H-pyrazol-3-amine (0,248 g, 1,3 équiv.), du carbonate de potassium (0,30 g, 2,5 équiv.), du 4,5-bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène (0,076 g, 0,15 équiv.), de l'eau (2 mL) et du 1,4-dioxane (20 mL) dans un ballon à fond rond. On purge convenablement avec de l'azote et on ajoute ensuite du bis(dibenzylidèneacétone)palladium (0,10 g, 0,2 équiv.). On fixe d'un condenseur à reflux et on place sous atmosphère d'azote. On

chauffe le mélange réactionnel à reflux pendant une nuit. On fait passer le mélange réactionnel à travers un tampon de Celite, on lave le tampon avec de l'acétate d'éthyle. On transfère à un entonnoir de séparation et on lave avec de l'eau. On lave les couches organiques avec une solution aqueuse de chlorure de sodium et on sèche sur du sulfate de magnésium anhydre. On filtre et on concentre sous vide. On purifie sur du gel de silice (EA -> méthanol à 10 %:EA) pour obtenir le composé sous rubrique (0,447 g, correspondant à un rendement de 86 % de la théorie) sous la forme d'un produit solide de couleur jaune pâle. LCMS (4 min) = 590,2, 591,2, M+1.

10

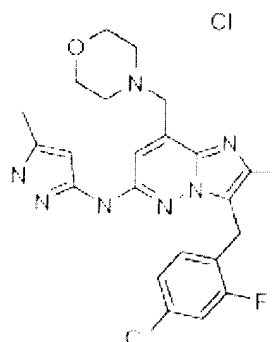
Exemple 1



3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine

On combine de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-N-(1-(4-méthoxybenzyl)-5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine (0,447 g, 0,76 mmol) et de l'acide trifluoroacétique (10 mL) dans un tube réactionnel à micro-ondes de 20 mL. On ferme hermétiquement avec une capsule-couronne et on chauffe ensuite dans un réacteur à micro-ondes à 120 °C pendant 20 minutes. On partage entre de l'acétate d'éthyle et de l'eau que l'on rend basique avec du NaOH aqueux en excès. On lave la phase organique à trois reprises avec du NaOH aqueux et ensuite avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. On sèche sur du sulfate de magnésium anhydre. On filtre et on concentre sous vide. On purifie sur du gel de silice (EA -> méthanol à 10 %:EA) pour obtenir le composé sous rubrique (0,246 g, 0,52 mmol) sous la forme d'un produit solide couleur jaune pâle. LCMS (8 min) = 470,0, M+1.

Exemple 2



5 Chlorhydrate de la E3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine

On combine de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine (0,1 g, 0,21 mmol) et du 1,4-dioxanne (10 mL) dans un ballon en forme de poire et on place sous atmosphère d'azote. On ajoute du chlorure d'hydrogène (4 M dans du 1,4-dioxanne, 0,053 mL, 1,0 équiv.) et on laisse s'agiter à la température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 1,5 heure. On concentre sous vide et on évapore ensuite sous vide dans de l'éthanol absolu à deux reprises. On sèche pendant une nuit dans un four à vide (60 °C) pour obtenir le composé sous rubrique (0,11 g, correspondant à un rendement de 102 % de la théorie). LCMS (8 min) = 470,0, M+1.

10

15

Schéma 2 :

Préparation 11

(E)-N'-(6-chloropyridazin-3-yl)-N,N-diméthylacétimidamide

20 On combine de la 6-chloropyridazin-3-amine (1,500 kg, 11,58 mol), de la 1,1-diméthoxy-N,N-diméthyléthanamine (2,313 kg, 17,37 mol) et de l'éther cyclopentyl méthylique (8,25 L). On chauffe ensuite à 98 °C, tout en éliminant par distillation le sous-produit de méthanol résultant. Après 4 heures, on refroidit le mélange réactionnel jusqu'à la température ambiante et on ajoute des heptanes (11,2 L) à la solution réactionnelle pour la cristallisation du produit. On récolte le composé sous rubrique par filtration et on le sèche. (1,494

25

kg, correspondant à un rendement de 64,95 % de la théorie ; point de fusion = 73°C).

Préparation 12

5 2-chloro-1-(4-chloro-2-fluorophényl)éthanone

On agite un mélange d'heptanes (1,5 L), de méthanol (0,4 L) et de la 1-(4-chloro-2-fluorophényl)éthanone (1 kg, 5,81 mol) tout en refroidissant jusqu'à une température inférieure à 5 °C. On ajoute du chlorure de sulfuryle (0,608 L, 1,02 kg, 7,55 mol) goutte à goutte sous la forme d'une solution dans de l'heptane (1,5 L) au mélange réactionnel tout en maintenant la température de la réaction à une valeur inférieure à 15 à °C au cours de l'addition. Après 2 heures, on arrête la réaction à la température ambiante jusqu'à un pH de 6 avec de l'hydroxyde de sodium (5 N, 2,0 L). On extrait le mélange réactionnel dans du chlorure de méthylène (2 L) et on concentre l'extrait pour obtenir un produit solide de couleur blanche. On filtre et on sèche le produit solide.

Préparation 13

(4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanone

20 On combine de la 2-chloro-1-(4-chloro-2-fluorophényl)éthanone (1,5 kg, 5,44 mol) et du (E)-N'-(6-chloropyridazin-3-yl)-N,N-diméthylacétimidamide (1,19 kg, 5,72 mol) dans du DMF (10,14 L) et on chauffe à 120°C pendant 5 heures. Après refroidissement, on ajoute de l'eau (30 L) et on agite pour cristalliser le produit. On récolte le produit par filtration et on rince le gâteau de filtre avec de l'eau (2 x 12 L) et avec des heptanes (2 x 10 L), et on sèche sous vide pour obtenir le composé sous rubrique. (1,490 kg, correspondant à un rendement de 84,44 % de la théorie ; point de fusion = 160°C , M+ = 324).

Préparation 14

30 (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)méthanone

On ajoute de l'éthanol (12 L), de la (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthylimidazo[1,2b]pyridazin-3-yl)méthanone (897,70 g, 2,77 mol) et du bis-(2,4-pentanedionato)oxovanadium (IV) (146,81 g, 553,67 mmol) un récipient de réaction sous atmosphère d'azote. On ajoute une solution éthanolique (6 L) du
5 4-oxyde de 4-méthylmorpholine (3,89 kg, 33,21 mol) goutte à goutte pendant 150 minutes tout en maintenant la température de la réaction à 23-33°C. Ensuite, on chauffe le mélange réactionnel à 40 °C pendant 48 heures. On refroidit le mélange réactionnel et on le concentre en éliminant le solvant (13 L). On filtre le mélange résultant, on rince le gâteau de filtre avec de l'hexane (1 L)
10 et ensuite on sèche. (728 g, correspondant à un rendement de 66,25 % de la théorie ; point de fusion 145-147°C; M+ = 423).

Préparation 15

Chlorhydrate de la 4-((6-chloro-3 (4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthylimidazo[1,2-
15 b]pyridazin-8-yl)méthyl)morpholine

A 26°C, on combine du triéthylsilane (110 g, 946 mmol) et de la (4-chloro-2-fluorophényl)(6-chloro-2-méthyl-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-
b]pyridazin-3-yl)méthanone (50,1 g, 117,06 mmol) pour obtenir une solution. On
ajoute de l'acide trifluoroacétique (150 mL, 1,98 mol) au mélange réactionnel, et
20 ensuite on chauffe à 78 °C pendant 24 heures. On refroidit le mélange réactionnel jusqu'à la température ambiante et on sépare le mélange pour éliminer la couche supérieure. On dissout la couche inférieure avec de l'acétate d'éthyle (1 L) et on règle le pH à 11 avec de l'hydroxyde de sodium (4 N, 500 mL). On sépare la couche organique et on ajoute du HCl (4 M dans de l'éther
25 éthylique) à la couche organique pour obtenir le sel chlorhydrate. On filtre et on sèche le sel chlorhydrate. (100 g (correspondant à un rendement de 96 % de la théorie) ; point de fusion = 237-238°C; M+ = 409).

Préparation 16

30 Chlorhydrate et base libre de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine

On prépare un catalyseur actif par combinaison du chlorure de palladium (160 mg, 0,90 mmol) et du 4,5-bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène (1,10 g, 1,84 mmol) dans du DMF (25 mL) et on chauffe pour obtenir une solution. On ajoute de catalyseur préformé à une solution de la 3-méthyl-1H-pyrazol-5-amine (3,0 g, 29,65 mmol), du chlorhydrate de la 4-((6-chloro-3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2méthylimidazo[1,2-b]pyridazin-8-yl)méthyl)morpholine (9,0 g, 20,19 mmol), du bicarbonate de potassium (6,0 g, 59,93 mmol) dans du DMF (65 mL) et on chauffe à 150 °C pendant 1 h. On refroidit le mélange réactionnel jusqu'à 60 °C et on ajoute de la silice contenant un groupe fonctionnel de mercaptopropyle (500 mg) et on agite pendant une heure et on filtre ensuite pour éliminer la silice. On refroidit jusqu'à la température ambiante, on ajoute du 2-méthyltétrahydrofuranne (125 mL) et on extrait dans de l'eau pour éliminer le DMF. On ajoute du HCl à la solution organique pour obtenir le sel chlorhydrate de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine. On ajoute le sel chlorhydrate (1,1 g) à de l'hydroxyde de sodium (10 mL, 1N) dans du n-butanol (10 mL) et on agite. On filtre le mélange résultant pour obtenir 0,22 g de la base libre, la 3-[(4-chloro-2-fluorophényl)méthyl]-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8(4-morpholinylméthyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, (avec un rendement de 22 % de la théorie, M+1, = 470).

Exemple 3

Formulation de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine

De manière facultative, on fait passer la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine et des excipients à travers un crible approprié. On combine et on mélange la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, de l'amidon pré-gélatinisé et de l'amidon pré-gélatinisé avec du Diméthicone à 5 % en utilisant dans un dispositif de mélange par culbutage (avec ou sans barre d'intensification) ou dans n'importe quel autre équipement de mélange

approprié. En variante, on ajoute du diméthicone au cours du mélange via un système d'addition de liquides. On remplit des capsules avec la poudre mélangée en utilisant un équipement d'encapsulation approprié. On surveille l'uniformité pondérale et les paramètres appropriés au cours du processus de remplissage. Le cas échéant, on dépoussière les capsules finales ou bien on les soumet à un polissage via des procédés manuels ou automatisés.

Dosage à base de cellules de JAK2 EPO-TF1/pSTATS

Cellomics ArrayScan® HCS

10 Le dosage de JAK2 EPO-TF1/pSTATS à base de cellules imite l'activation constitutive de JAK2-STATS dans des cellules souches érythroïdes qui entraînent la surproduction des érythrocytes, à savoir un marqueur de la maladie de vaquez (PV).

15 On maintient des cellules TF-1 (leucémie érythroïde humaine) dans un milieu RPMI 1640 (le milieu RPMI-1640 a été mis au point par Moore et. al. au Roswell Park Memorial Institute. La formulation se base sur la série de milieux RPMI-1630 qui utilisent un système de tampon au bicarbonate et des altérations dans les quantités des acides aminés et des vitamines, avec du sérum bovin fœtal à 10 % (FBS), du bicarbonate de sodium à 0,075 %, 1 mM de pyruvate de sodium, l'antibiotique/antimycotique 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA) et du glucose à 0,45 %. On ajoute au milieu du GMCSF (facteur de croissance hématopoïétique) à une concentration finale de 2 ng/mL. On maintient les cellules à 37 °C avec du CO₂ à 5 %. On prive les cellules de ressources dans un milieu exempt de sérum pour éliminer les facteurs de croissance endogènes. On compte les cellules TF-1 et on récolte les cellules pour ensemercer 2 x 10⁷ cellules par plaques de 96 puits à une densité de 2 x 10⁵ cellules par puits. On rince les cellules à deux reprises avec un milieu RPMI 1640 laissé tel quel (RPMI 1640 avec du bicarbonate de sodium à 0,075 %, 1 mM de pyruvate de sodium, un antibiotique/antimycotique 1x et du glucose à 0,45 %) avant de mettre les cellules en suspension à une concentration finale de 5 x 10⁵ cellules/mL dans un milieu RPMI avec FBS à 0,6 %. On réintroduit les cellules à l'état dilué dans des ballons de culture tissulaire et on incube

pendant une nuit à 37 °C. On prépare des composés d'essai dans du DMSO à 100 % à une concentration de 10 mM. On soumet les composés à une dilution en série 1:3 avec du DMSO à 100 % dans une plage de concentration-réponse de 10 points-200x (4 mM - 200 nM). Dans une plaque séparée à 96 puits profonds, on ajoute 2,5 µL de la solution de composé 200x à 125 µL du milieu complet RPMI 1640 avec du FBS à 10 % pour une plaque pour composés à une concentration de 4x.

Pour la mise en œuvre du dosage, on récolte des cellules prélevées de sérum et on les lave une fois avec un milieu RPMI 1640 laissé tel quel. On met les cellules en suspension dans un milieu RPMI complet avec du FBS à 10 % pour obtenir une concentration finale de 8×10^5 cellules/mL. On ajoute une quantité aliquote de 250 µL de cellules diluées (2×10^5 cellules) à chaque puits dans la plaque pour composés à une concentration de 4x. On mélange les cellules par tourbillonnement et on incube la plaque à 37 °C dans un bain-marie pendant 10 minutes. On prépare une solution de travail fraîche 4x d'érythropoïétine (EPO) à 6,4 unités/mL en utilisant un milieu complet RPMI 1640 préchauffé, avec du FBS à 10 %. Après avoir traité les cellules avec le composé dans 10 minutes, on ajoute 125 µL du milieu EPO à chaque puits et on soumet la plaque à un tourbillonnement. On incube les cellules dans un bain-marie à 37 °C pendant 20 minutes et on mélange toutes les 5 minutes pendant le laps de temps que dure l'incubation. La plage de concentration-réponse finale à 10 points s'élève à 20 µM - 1 nM à une concentration finale de DMSO à 0,5 % et de EPO à 1,6 U/mL. Après le traitement des cellules, on ajoute à chaque puits 500 µL d'une solution de formaldéhyde à 1 % (fraîchement préparée avec une solution saline dans un tampon de phosphate (PBS) et que l'on conserve chaude à 37 °C). On scelle les plaques et on les renverse à une fréquence de 8 à 10 fois pour les mélanger. On place les plaques dans un bain-marie à 37 °C pendant 10 minutes. Après l'incubation, on soumet les plaques cellulaires à une centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes à la température ambiante (RT). On aspire le produit surnageant pour laisser subsister 100 µL de cellules (2×10^5 cellules). On soumet les cellules à un tourbillonnement et on les lave à deux reprises avec 800 µL de PBS en

répétant les étapes de centrifugation, pour laisser subsister 100 μ L contenant $\sim 2 \times 10^5$ cellules après le lavage final. On ajoute une quantité aliquote de 800 μ L de méthanol froid à 90 % aux cellules et on place à une température de -20°C pendant une nuit. On soumet des plaques à une centrifugation et on élimine le méthanol. On lave les cellules avec un tampon FACS (PBS avec FBS à 5 % et azide de sodium à 0,02 %). On ajoute une quantité aliquote de 200 μ L d'une dilution de 1 à 10 d'anticorps de souris anti-pSTATS (pY694) Alexa Fluor 647® dans un tampon de triage cellulaire activé par fluorescence (FACS) aux cellules. On mélange convenablement les cellules et on les incube à la température ambiante dans le noir pendant 2 heures. On lave les cellules une fois avec PBS et on laisse subsister 100 μ L de cellules. On prépare une solution de travail de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) avec du PBS. On ajoute une quantité aliquote de 200 μ L à chaque puits et on incube les cellules à la température ambiante dans le noir pendant 10 minutes. On lave les cellules avec du PBS et on ajoute 50 μ L de Cytofix (BD Biosciences, San Jose, CA) aux cellules. On transfère les cellules à des plaques de culture tissulaire de couleur noire à 96 puits que l'on ferme de manière hermétique. On soumet des plaques à une centrifugation. Les données d'intensité de fluorescence moyenne sont récoltées et analysées en utilisant le programme Cellomics Arrayscan® VTi. On compare le traitement avec le composé au traitement avec le véhicule pour déterminer les données du pourcentage d'inhibition. On détermine le rapport significatif minimal (MSR) entre deux composés d'essai possédant des valeurs CI_{50} différentes, comme s'élevant à 2,2. On calcule la valeur relative CI_{50} en utilisant une analyse d'ajustage de courbe logistique à 4 paramètres avec le programme ActivityBase 4,0. Pour la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, la valeur $\text{CI}_{50} = 0,033 \mu\text{M}$, $n = 4$. Les résultats de ce dosage démontrent que la 3-(4-chloro-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine représente un inhibiteur puissant de la JAK2.

Dosage à base de cellules de JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5

Cellomics ArrayScan® HCS

IL-2 active la voie de signalisation de JAK3 dans des cellules tueuses naturelles (NK) pour entraîner la prolifération des lymphocytes NK et CD8. Par conséquent, un dosage à base de cellules de NK92/pSTAT5 à l'état stimulé par IL2 permet de procéder à une évaluation de l'activité cellulaire JAK3 des composés JAK2 *in vitro*.

On maintient des cellules NK-92 (tueuses naturelles) cellules (ATCC, Manassas, VA) dans un milieu essentiel minimal (MEM) Alpha avec du sérum bovin foetal à 15 %, du sérum équin à 15 % et l'antibiotique/antimycotique 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA). On ajoute au milieu IL-2 (R&D systems, Minneapolis, MN) pour obtenir une concentration finale de 4 ng/mL. On maintient les cellules à 37 °C avec du CO₂ à 5 %. On prive les cellules de ressources dans un milieu exempt de sérum pour éliminer les facteurs de croissance endogènes. On compte les cellules NK-92 et on récolte les cellules pour ensemercer 2 x 10⁷ cellules par plaques de 96 puits à une densité de 2 x 10⁵ cellules par puits. On rince les cellules à deux reprises avec un milieu MEM Alpha laissé tel quel (MEM Alpha) avant de mettre les cellules en suspension à une concentration finale de 8 x 10⁵ cellules/mL dans un milieu MEM Alpha avec du sérum à 0,6 % (FBS à 0,3 %, sérum équin à 0,3 %). On réintroduit les cellules à l'état dilué dans des ballons de culture tissulaire et on incube pendant une nuit à 37 °C. On prépare des composés d'essai dans du DMSO à 100 % à une concentration de 10 mM. On soumet les composés à une dilution en série 1:3 avec du DMSO à 100 % dans une plage de concentration-réponse de 10 points-200x (4 mM - 200 nM). Dans une plaque séparée à 96 puits profonds, on ajoute 2,5 µL de la solution de composé 200x à 125 µL du milieu complet RPMI 1640 avec du FBS à 10 % pour une plaque pour composés à une concentration de 4x.

Pour la mise en œuvre du dosage, on récolte des cellules prélevées de sérum et on les lave une fois avec un milieu RPMI 1640 laissé tel quel. On met les cellules en suspension dans un milieu RPMI complet avec du FBS à 10 % pour obtenir une concentration finale de 8 x 10⁵ cellules/mL. On ajoute une quantité

aliquote de 250 μ L de cellules diluées (2×10^5 cellules) à chaque puits dans la plaque pour composés à une concentration de 4x. On mélange les cellules par tourbillonnement et on incube la plaque à 37 °C dans un bain-marie pendant 10 minutes. On prépare une solution de travail fraîche 4x de IL-2 à 2 ng/mL en utilisant un milieu complet RPMI 1640 préchauffé, avec du FBS à 10 %. Après avoir traité les cellules avec le composé dans 10 minutes, on ajoute 125 μ L de milieu IL-2 à chaque puits. On mélange les cellules par tourbillonnement. On incube les cellules dans un bain-marie à 37 °C pendant 20 minutes et on mélange toutes les 5 minutes pendant le laps de temps que dure l'incubation.

5 La plage de concentration-réponse finale à 10 points s'élève à 20 μ M -1 nM à une concentration finale de DMSO à 0,5 % et de IL-2 à 0,5 ng/mL. Après le traitement des cellules, on ajoute à chaque puits 500 μ L d'une solution de formaldéhyde à 1 % (fraîchement préparée avec une solution saline dans un tampon de phosphate (PBS) et que l'on conserve chaude à 37 °C). On scelle les plaques et on les renverse à une fréquence de 8 à 10 fois pour les mélanger. On place les plaques dans un bain-marie à 37 °C pendant 10 minutes. Après l'incubation, on soumet les plaques cellulaires à une centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes à la température ambiante (RT). On aspire le produit surnageant pour laisser subsister 100 μ L de cellules (2×10^5 cellules). On soumet les cellules à un tourbillonnement et on les lave à deux reprises avec 800 μ L de PBS en répétant les étapes de centrifugation, pour laisser subsister 100 μ L contenant $\sim 2 \times 10^5$ cellules après le lavage final. On ajoute une quantité aliquote de 800 μ L de méthanol froid à 90 % aux cellules et on place à une température de -20 °C pendant une nuit.

20 On soumet des plaques à une centrifugation et on élimine le méthanol. On lave les cellules avec un tampon FACS (PBS avec FBS à 5 % et azide de sodium à 0,02 %). On ajoute une quantité aliquote de 200 μ L d'une dilution de 1 à 10 d'anticorps de souris anti-pSTATS (pY694) Alexa Fluor 647® dans un tampon de triage cellulaire activé par fluorescence (FACS) aux cellules. On mélange convenablement les cellules et on les incube à la température ambiante dans le noir pendant 2 heures. On lave les cellules une fois avec PBS et on laisse subsister 100 μ L de cellules. On prépare une solution de travail de 2 μ g/mL de

25

30

Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) avec du PBS. On ajoute une quantité aliquote de 200 μ L à chaque puits et on incube les cellules à la température ambiante dans le noir pendant 10 minutes. On lave les cellules avec du PBS et on ajoute 50 μ L de Cytifix (BD Biosciences, San Jose, CA) aux

5 cellules. On transfère les cellules à des plaques de culture tissulaire de couleur noire à 96 puits que l'on ferme de manière hermétique. On soumet des plaques à une centrifugation. Les données d'intensité de fluorescence moyenne sont récoltées et analysées en utilisant le programme Cellomics Arrayscan® VTi. On compare le traitement avec le composé au traitement avec le véhicule pour

10 déterminer les données du pourcentage d'inhibition. On détermine le rapport significatif minimal (MSR) entre deux composés d'essai possédant des valeurs CI_{50} différentes, comme s'élevant à 2,06. On calcule la valeur relative CI_{50} en utilisant une analyse d'ajustage de courbe logistique à 4 paramètres avec le programme ActivityBase 4.0. Pour la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-

15 méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, la valeur CI_{50} = 0,94 μ M, n = 4. Les résultats du dosage de JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 démontrent que la 3-(4-chloro-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine est un inhibiteur moins puissant de JAK3 (par comparaison aux résultats du dosage à

20 base de cellules de JAK2 IL-2-NK-92/pSTAT5 avec une valeur CI_{50} = 0,033 μ M). À partir de ces résultats, le rapport JAK3/JAK2, on détermine la valeur CI_{50} comme étant égale à 28,5 fois, ce qui démontre que la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine représente un inhibiteur sélectif de JAK2 par

25 rapport à JAK3.

Dosage à base de cellules de Ba/F3JAK2V617F

Cellomics ArrayScan® HCS

On évalue l'inhibition cible de JAK2 dans des cellules Ba/F3 exprimant

30 JAK2 V617F via un transfert de Western comme rapporté dans Wernig et al. (Wernig G, et al. *Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera*, Cancer Cell, Apr;

13(4):311-20). On établit un dosage Cellomics à débit moyen pour évaluer l'inhibition cible de JAK2 dans des cellules Ba/F3 exprimant JAK2V617F. Ce dosage permet de découvrir un agent thérapeutique efficace pour traiter des troubles qui sont associés à une mutation JAK2V617F.

5 On maintient des cellules Ba/F3 (pro-B murines) exprimant JAK2V617F dans un milieu RPMI 1640 avec FBS à 10 %, du bicarbonate de sodium à 0,07 %, 1 mM de pyruvate de sodium, l'antibiotique/antimycotique 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA) et du glucose à 0,45 %. On maintient les cellules à 37 °C avec du CO₂ à 5 %. On prépare des composés d'essai dans du DMSO à 100 % à une concentration de 10 mM. On soumet les composés à une dilution en série 1:3 avec du DMSO à 100 % dans une plage de concentration-réponse de 10 points-200x (4 mM - 200 nM). Dans une plaque séparée à 96 puits profonds, on ajoute 2,5 µL de la solution de composé 200x à 125 µL du milieu complet RPMI 1640 avec du FBS à 10 % pour une plaque pour composés à une concentration de 4x.

15 Pour la mise en œuvre du dosage, on récolte des cellules prélevées de sérum et on les lave une fois avec un milieu RPMI 1640 laissé tel quel. On met les cellules en suspension dans un milieu RPMI complet avec du FBS à 10 % pour obtenir une concentration finale de 4×10^5 cellules/mL. Ensuite, on transfère 500 µl de cellules (2×10^5 cellules) dans des plaques à 96 puits profonds. Enfin, on ajoute aux cellules 2,5 µl (dilution au 200e) d'une solution de réserve du composé et on incube avec des cellules dans un bain-marie à 37 °C pendant 60 minutes.

25 Après le traitement des cellules, on ajoute à chaque puits 500 µL d'une solution de formaldéhyde à 1 % (fraîchement préparée avec une solution saline dans un tampon de phosphate (PBS) et que l'on conserve chaude à 37 °C). On scelle les plaques et on les renverse à une fréquence de 8 à 10 fois pour les mélanger. On place les plaques dans un bain-marie à 37 °C pendant 10 minutes. Après l'incubation, on soumet les plaques cellulaires à une centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes à la température ambiante (RT). On aspire le produit surnageant pour laisser subsister 100 µL de cellules (2×10^5 cellules). On soumet les cellules à un tourbillonnement et on

les lave à deux reprises avec 800 μ L de PBS en répétant les étapes de centrifugation, pour laisser subsister 100 μ L contenant $\sim 2 \times 10^5$ cellules après le lavage final. On ajoute une quantité aliquote de 800 μ L de méthanol froid à 90 % aux cellules et on place à une température de -20 °C pendant une nuit. On soumet des plaques à une centrifugation et on élimine le méthanol. On lave les cellules avec un tampon FACS (PBS avec FBS à 5 % et azide de sodium à 0,02 %). On ajoute une quantité aliquote de 200 μ L d'une dilution de 1 à 10 d'anticorps de souris anti-pSTATS (pY694) Alexa Fluor 647® dans un tampon de triage cellulaire activé par fluorescence (FACS) aux cellules. On mélange convenablement les cellules et on les incube à la température ambiante dans le noir pendant 2 heures. On lave les cellules une fois avec PBS et on laisse subsister 100 μ L de cellules. On prépare une solution de travail de 2 μ g/mL de Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) avec du PBS. On ajoute une quantité aliquote de 200 μ L à chaque puits et on incube les cellules à la température ambiante dans le noir pendant 10 minutes. On lave les cellules avec du PBS et on ajoute 50 μ L de Cytifix (BD Biosciences, San Jose, CA) aux cellules. On transfère les cellules à des plaques de culture tissulaire de couleur noire à 96 puits que l'on ferme de manière hermétique. On soumet des plaques à une centrifugation. Les données d'intensité de fluorescence moyenne sont récoltées et analysées en utilisant le programme Cellomics Arrayscan® VTi. On compare le traitement avec le composé au traitement avec le véhicule pour déterminer les données du pourcentage d'inhibition. On calcule la valeur relative CI_{50} en utilisant une analyse d'ajustage de courbe logistique à 4 paramètres avec le programme ActivityBase 4,0. Pour la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, la valeur $CI_{50} = 0,03$ μ M. Les résultats de ce dosage démontrent que la 3-(4-chloro-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine inhibe de manière efficace la cible JAK2V617F dans des cellules Ba/F3 exprimant le gène JAK2V617F.

Les composés de la présente invention sont de préférence formulés sous la forme de compositions pharmaceutiques que l'on administre via diverses voies.

De manière de loin préférée, lesdites compositions sont destinées à une administration par voie orale. De telles compositions pharmaceutiques ainsi que les procédés pour les préparer sont bien connus dans la technique. Voir par exemple, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, *et al.*, eds., 19e édition, Mack Publishing Co., 1995).

Les composés de la présente invention sont généralement efficaces dans une large plage posologique. Par exemple, des posologies quotidiennes rentrent normalement dans la plage d'environ 1 mg à environ 1000 mg de dose quotidienne totale, de préférence de 500 mg à 1000 mg de dose quotidienne totale, de manière plus préférée de 600 mg à 1000 mg de dose quotidienne totale. Dans certains cas, des doses inférieures à la limite inférieure de la plage susmentionnée peuvent s'avérer plus qu'adéquates, tandis que dans d'autres cas des doses encore plus importantes peuvent être utilisées. Les domaines posologiques indiqués ci-dessus ne sont pas destinés à limiter le cadre de l'invention en aucune manière. On comprendra que la quantité du composé réellement administré sera déterminée par un médecin, à la lumière des circonstances pertinentes y compris l'affection à traiter, la voie choisie pour l'administration, le composé ou les composés réellement administrés, l'âge, le poids et la réponse du patient individuel, ainsi que la gravité des symptômes du patient.

REVENDEICATIONS

1. 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.
2. Composé selon la revendication 1, qui est la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine.
3. Composé selon la revendication 1, qui est le chlorhydrate de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholino-méthyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine.
4. Procédé pour le traitement de troubles myéloprolifératifs chroniques choisis parmi le groupe constitué par la maladie de Vaquez, la thrombocytose essentielle et la myélofibrose avec métaplasie myéloïde, dans un mammifère, comprenant l'administration à un mammifère qui manifeste un besoin pour un tel traitement, une quantité efficace de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholinométhyl)-imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.
5. Procédé de traitement du glioblastome, du cancer du sein, du myélome multiple, du cancer de la prostate, et de leucémies telles que la leucémie myéloïde chronique atypique, la leucémie myéloïde aiguë primaire et secondaire, la leucémie lymphoblastique aiguë à lymphocytes T et à lymphocytes B, le syndrome de myélodysplasie, et des troubles myéloprolifératifs dans un patient, comprenant l'administration à un patient qui manifeste un besoin pour un tel traitement, une quantité efficace de la 3-(4-chloro-2-fluorobenzyl)-2-méthyl-N-(5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-8-(morpholino-

Rf

méthyl)imidazo[1,2-b]pyridazin-6-amine, ou d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

5 6. Composition pharmaceutique comprenant un composé selon la revendication 1, 2 ou 3, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables et un support, un diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10 7. Composé selon la revendication 1, 2 ou 3, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser comme médicament.

15 8. Composé selon la revendication 1, 2 ou 3, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser dans le traitement du glioblastome, du cancer du sein, du myélome multiple, du cancer de la prostate et de leucémies, de la leucémie lymphoblastique aiguë à lymphocytes T et à lymphocytes B, du syndrome de myélodysplasie, et de troubles myéloprolifératifs.

20 9. Composé selon la revendication 8, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables, à utiliser dans le traitement de troubles myéloprolifératifs chroniques.

25 10. Procédé de traitement d'affections associées à l'activité de la JAK2 mutante dans un patient qui en manifeste le besoin, qui comprend l'administration audit patient d'un composé selon la revendication 1, 2 ou 3.