



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 34552 B1** (51) Cl. internationale : **C07D 401/14; A61K 31/4439; A61P 35/00**
- (43) Date de publication : **02.09.2013**

(21) N° Dépôt : **35780**

(22) Date de Dépôt : **27.03.2013**

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/US2011/053798 29.09.2011**

(71) Demandeur(s) : **ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center, Indianapolis Indiana (US)**

(72) Inventeur(s) : **DISEROAD, Benjamin Alan**

(74) Mandataire : **H & H CONSULTING LAW FIRM**

(54) Titre : **CRYSTALLINE (R) - (E) -2- (4- (2- (5- (1- (3, 5 -DICHLOROPYRIDIN-4 -YL) ETHOXY) - 1H - INDAZOL - 3 - YL) VINYL) -1 H- PYRAZOL- 1 -YL) ETHANOL AND ITS USE AS FGFR INHIBITOR**

(57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION PORTE SUR DU (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-DICHLOROPYRIDIN-4- YL)ÉTHOXY)-1H- INDAZOL-3-YL) VINYL) - 1H-PYRAZOL-1-YL) ÉTHANOL CRISTALLIN UTILE DANS LE TRAITEMENT DU CANCER.

ABREGE

La présente invention fournit du (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol cristallin utile dans le traitement du cancer.

02 SEPT 2013¹

5 (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-DICHLOROPYRIDIN-4-YL)ÉTHOXY)-1H-INDAZOL-3-YL)VINYL)-1H-PYRAZOL-1-YL)ÉTHANOL CRISTALLIN ET SON UTILISATION COMME INHIBITEUR DU FGFR

Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) a été reconnu comme étant un médiateur important de nombreux processus physiologiques, tels que la morphogenèse durant le développement et l'angiogenèse. La famille des récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) est constituée de quatre membres (FGFR1-FGFR4), qui sont des glycoprotéines composées de domaines extracellulaires du type immunoglobuline (Ig), d'une région transmembranaire hydrophobe et d'une partie cytoplasmique contenant un domaine tyrosine kinase. La liaison FGF conduit à la dimérisation du FGFR, suivie de l'autophosphorylation du récepteur et de l'activation des voies de signalisation en aval. L'activation du récepteur est suffisante pour le recrutement et l'activation des partenaires spécifiques de signalisation en aval qui participent à la régulation de divers processus tels que le développement des cellules, le métabolisme cellulaire et la survie des cellules. Ainsi, la voie de signalisation FGF/FGFR a des effets pléiotropes sur de nombreux processus biologiques critiques pour la prolifération, la migration, l'invasion des cellules tumorales et l'angiogenèse.

Les indazoles vinyliques sont connus dans l'art pour le traitement du cancer. Voir par exemple, WO200210137 et WO2003101968. Les inhibiteurs du FGFR sont également connus dans l'art. Voir, par exemple le brevet WO2002022598. Le brevet PCT/US2010/033487 mentionne une forme amorphe du (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyloxy)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol qui est peu cristallin et qui est utile comme inhibiteur du FGFR.

La présente invention fournit un (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyloxy)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol cristallin qui est un inhibiteur puissant du FGFR et qui peut offrir des propriétés avantageuses par rapport à la forme antérieure des propriétés supérieures de manipulation des matières solides à grande échelle, la facilité de purification par la cristallisation et la stabilité thermodynamique sous des conditions de transformations

pharmaceutiques et de stockage. Dans un mode de réalisation, le (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol cristallin est la forme monohydratée.

La présente invention fournit également du (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol
5 cristallin caractérisé par le profil de diffraction sur poudre des rayons X (rayonnement Cu $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$) comprenant un pic à 14,65 et un ou plusieurs pic(s) à 3,54, 12,51 ou 19,16 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

La présente invention fournit un procédé de traitement du cancer dans lequel le
10 cancer est sélectionné parmi le groupe constitué du cancer du sein, du cancer du poumon non à petites cellules (NSCL), du cancer de la vessie, du cancer de l'estomac, du cancer du pancréas, du cancer de la prostate, du cancer du colon, du myélome multiple, du cancer du foie, du mélanome, du cancer de la tête et du cou, du cancer de la thyroïde, du cancer des cellules rénales, du
15 glioblastome, et du cancer des testicules chez un mammifère comprenant l'administration à un mammifère ayant besoin d'un tel traitement d'une quantité efficace d'un composé ou d'un sel de la présente invention.

Cette invention fournit également des compositions pharmaceutiques comprenant un composé ou un sel de la présente invention en combinaison
20 avec un ou plusieurs support(s) diluant(s) ou excipient(s) pharmaceutiquement acceptable(s). Dans un mode de réalisation particulier, la composition comprend en outre un ou plusieurs autre(s) agent(s) thérapeutique(s).

Cette invention fournit également un composé ou un sel de la présente invention pour l'utilisation en thérapie. De manière supplémentaire, cette
25 invention fournit l'utilisation d'un composé ou d'un sel de la présente invention dans la fabrication d'un médicament pour le traitement du cancer. De manière supplémentaire, cette invention fournit l'utilisation d'un composé ou d'un sel de la présente invention pour l'utilisation dans le traitement du cancer. En particulier ces cancers sont sélectionnés parmi le groupe constitué du cancer
30 du sein, du cancer du poumon, du cancer de la vessie, du cancer de l'estomac, du cancer du pancréas, du cancer de la prostate, du cancer du colon, du myélome multiple AML, du cancer du foie, du mélanome, du cancer de la tête et

du cou, du cancer de la thyroïde, du cancer des cellules rénales, du glioblastome, et du cancer des testicules. Plus particulièrement, les cancers sont sélectionnés parmi le groupe constitué du cancer du sein, du cancer du poumon non à petites cellules, du cancer de la vessie, du cancer de l'estomac, 5 du cancer du pancréas, du cancer de la prostate, du cancer du colon, du myélome multiple, du cancer du foie, du mélanome, du cancer de la tête et du cou, du cancer de la thyroïde, du cancer des cellules rénales, du glioblastome, et du cancer des testicules. De manière particulièrement préférée, le cancer est le cancer du poumon non à petites cellules. De manière surtout particulière, le cancer est le cancer de l'estomac. De manière particulièrement préférable, le cancer est le myélome multiple. En outre, cette invention fournit une composition pharmaceutique pour traiter le cancer sélectionné parmi le groupe 10 constitué du cancer du sein, du cancer du poumon non à petites cellules, du cancer de la vessie, du cancer de l'estomac, du cancer du pancréas, du cancer de la prostate, du cancer du colon, du myélome multiple, du cancer du foie, du mélanome, du cancer de la tête et du cou, du cancer de la thyroïde, du cancer des cellules rénales, du glioblastome, et du cancer des testicules comprenant un composé ou un sel de la présente invention comme ingrédient actif.

Il sera compris par le lecteur expérimenté que tous les composés de la présente inventions sont capables de former des sels. Les composés de la présente invention sont des amines, et en conséquence, réagissent avec n'importe lequel de nombreux acides inorganiques et organiques pour former des sels d'additions acides pharmaceutiquement acceptables. De tels sels d'additions acides pharmaceutiquement acceptables et la méthodologie 25 courante pour les préparer sont bien connus dans l'art. *Voir, par exemple* P.Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS : PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCH/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, *et al.*, « Pharmaceutical Salts », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, Janvier 1977.

30 Tel qu'utilisé si inclus, le terme « isolé » signifie (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol cristallin à 99 % pur.

Les composés de la présente invention peuvent être préparés essentiellement tel qu'illustrés dans les préparations et les exemples ci-dessous. La dénomination des préparations et des exemples suivants est effectuée en utilisant la caractéristique d'appellation Struct = Name dans ChemDraw[®] Ultra
5 10.0.

Préparation 1

1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthanol

À un flacon à fond rond de 12 L à 3 cols, on ajoute du tétrahydrofurane (THF,
10 3 L) et de la diisopropylamine (DIPA, 315 mL, 2,24 mol) et on refroidit à -78 °C. On ajoute lentement du n-butyllithium (1,6 M dans des hexanes, 1400 mL, 2,24 mol). Après que l'addition soit terminée et que la température soit revenue lentement à -78 °C, on ajoute une solution de 3,5-dichloropyridine (296,7 g, 2,00 mol) qui forme immédiatement une solution jaune qui change en une
15 suspension colorée rouille. Après que l'addition soit terminée et que la température soit lentement revenue à -78 °C, on ajoute de l'acétaldéhyde (230 mL, 4,05 mol) dans du THF (600 mL). On poursuit l'agitation à -78 °C. Après 3 heures, on retire le bain de glace sèche et on commence l'extinction de la réaction par l'addition goutte à goutte de chlorure d'ammonium aqueux saturé
20 (1 L). On laisse lentement le mélange réactionnel réchauffer à la température ambiante (Ta) durant la nuit avec agitation. On dilue le mélange avec de l'éther de méthyl-*tert*-butyle (MTBE, 2 L), du chlorure d'ammonium aqueux saturé (1 L) et de l'eau (2 L). On sépare et on lave les matières organiques avec du chlorure de sodium aqueux saturé (saumure). On extrait la phase aqueuse avec du
25 MTBE (1,5 L). On combine les couches organiques, on sèche sur du sulfate de sodium, on filtre et on concentre *in vacuo*. On purifie le résidu par chromatographie sur du gel de silice [acétate d'éthyle à 25 % (EA) dans des hexanes] pour fournir le composé du titre sous la forme d'une huile rouge. Rendement : 352 g (90 %). MS (ES) *m/z* 192 [M+1]⁺.

30

Préparation 2

(S)-1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthanol

On sépare le mélange de stéréoisomères obtenus dans la Préparation 1 sur une colonne CHIRALPAK[®] AD-H en éluant avec des heptanes à 90 %/éthanol à 10 %. Le pic 2 est l'énantiomère souhaité. Pour établir la configuration absolue, on dissout un échantillon du produit dans du CDCl₃ (concentration finale de 100 mg/mL). On obtient les spectres de dichroïsme circulaire vibrationnel (DCV) et infra rouge (IR) avec une résolution de 4 cm⁻¹ en utilisant un spectromètre Chiral IR FT VCD (BioTools Inc[®]) avec une cellule IR équipée de fenêtres BaF₂ et une longueur de trajet de 100 mm. On recueille les DCV et IR durant 6 heures avec 150 µL de l'échantillon. Les données sont présentées sans lissage ni traitement supplémentaires. On obtient les intensités des fréquences vibratoires et d'absorption et DCV en optimisant le conformatteur d'énergie la plus basse selon Gauss au niveau B3PW91/6-31G** sur une grappe de calculs Linux et on simule les spectres correspondants en utilisant une bande passante lorentzienne de dichroïsme circulaire vibrationnel de 6 cm⁻¹. Les analyses ci-dessus indiquent que le produit est l'isomère S. Rendement : 84,37 g (27 %). MS (ES) *m/z* 192 [M+1]⁺.

Préparation 3

Méthane sulfonate de (S)-1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthyle.

On dissout du (S)-1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthanol (5,02 g, 26,14 mmol) dans du dichlorométhane (DCM, 100 mL) et on refroidit le flacon dans un bain de glace. On ajoute de la triéthylamine (TEA, 3,5 mL, 25,11 mmol) suivie de l'addition goutte à goutte de chlorure de méthane sulfonyle (2,2 mL, 28,42 mmol). On retire le bain de glace et on laisse le mélange réactionnel réchauffer à la Ta. Après 4 heures, on éteint la réaction avec de l'eau (100 mL) et on sépare les couches. On extrait la couche aqueuse avec du DCM (50 mL) suivi d'alcool d'isopropyle à 20% (IPA)/chloroforme (50 mL). On combine les extraits organiques, on sèche sur du sulfate de sodium anhydre, on filtre et on concentre *in vacuo*. Rendement : 7,15 g, (100 %). MS (ES) *m/z* 270 [M+1]⁺.

30

Préparation 4

4-iodo-1-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)-1H-pyrazole.

Dans un flacon à 3 cols de 1 L équipé d'un barreau d'agitation magnétique, d'un manteau d'azote et d'une sonde interne de température, on dissout du 2-(2-bromoethoxy)tétrahydro-2H-pyrane (34 g, 156 mmol) dans de l'acétonitrile (ACN, 400 mL). On ajoute du 4-iodopyrazole (29,34 g, 149,74 mmol) suivi de carbonate de césium (73,4 g, 223,02 mmol). On agite le mélange à la Ta durant 18 heures. On filtre le mélange réactionnel à travers de la CELITE[®], on lave le tourteau de filtration avec de l'ACN et on concentre le filtrage jusqu'à l'obtention d'une huile dorée. On utilise sans purification supplémentaire. Rendement : 47,819 g (99 %). MS (ES) m/z 323 [M+1]⁺.

10

Préparation 5

5-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-1H-indazole

On charge un récipient réactionnel de 10 L avec du N,N-diméthylformamide (DMF, 2,50 L), du 5-hydroxyindazole (150,20 g, 1,12 mol) et du 1H-imidazole (114,35 g, 1,68 mol). On refroidit le mélange à 0 °C et on ajoute du *tert*-butyldiméthylchlorosilane (253,16 g, 1,68 mol) durant 0,5 heure. On agite le mélange à 18 °C durant 3 heures. On ajoute de l'eau (2,5 L) au mélange réactionnel lentement avec un bain de glace à 5 °C pour maintenir une température interne autour de 20 °C. On transfère le mélange vers une ampoule à décanter et on extrait avec EA (2 x 2,5 L). On combine les extraits et on lave avec de l'eau (3 x 2,5 L) et de la saumure. On sèche les solutions organiques sur du sulfate de sodium anhydre, on filtre et on évapore jusqu'à l'obtention d'une huile rose. On fait passer l'huile à travers un tampon de gel de silice et on élue avec de l'éluant (EA de 0 % à 30 % dans de l'hexane) pour fournir le composé du titre sous la forme d'une huile orange qui cristallise. Rendement : 300 g (100 %). MS (ES) m/z 249 [M+1]⁺.

15

20

25

Préparation 6

5-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3-iodo-1H-indazole

On refroidit une solution de 5-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-1H-indazole (300,00 g, 1,21 mol) dans du DCM (4,00 L) jusqu'à 10 °C dans un récipient réactionnel chemisé de 10 L. À la solution résultante, on ajoute du N-iodosuccinimide

30

(298,89 g, 1,33 mol) par portions durant 0,5 heure. On agite le mélange à la Ta durant 3 heures pour donner la conversion complète telle qu'indiquée par spectrométrie de masse-chromatographie liquide (LC-MS) et chromatographie sur couche mince (CCM). On refroidit le mélange jusqu'à 10 °C et on éteint avec de l'eau (2,5 L). On transfère le mélange vers une ampoule à décanter et on extrait la couche aqueuse dans du DCM (2,5 L). On lave les extraits organiques combinés avec une solution aqueuse à 10 % de thiosulfate de sodium (5 L) et de la saumure. On sèche la solution organique sur du sulfate de magnésium, on filtre et on concentre *in vacuo* pour fournir le composé du titre sous la forme d'un solide orange. Rendement : 388 g (90 %). MS (ES) *m/z* 375 [M+1]⁺.

Préparation 7

5-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3-iodo-1-(tétrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazole.
On refroidit une solution de 5-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3-iodo-1H-indazole (387,00 g, 1,08 mol) dans du DCM (2,50 L) et du THF (1,00 L) à 10 °C dans un récipient réactionnel chemisé de 10 L. Au mélange résultant, on ajoute de l'acide méthanesulfonique (14,0 mL, 216,02 mmol), suivi de 3,4-dihydro-2H-pyrane (296 mL, 3,24 mol) durant 0,5 heure, en observant une légère exothermie. On agite le mélange à la Ta durant 3 heures. On refroidit le mélange réactionnel jusqu'à 10 °C et on éteint avec du bicarbonate de sodium aqueux saturé (2 L). On dilue le mélange avec de l'eau (2 L) et on extrait la couche aqueuse avec du DCM (2 L). On lave les extraits organiques combinés avec de l'eau (2 L) et de la saumure. On sèche le mélange organique sur du sulfate de sodium anhydre, on filtre et on concentre *in vacuo*. On élue le résidu à travers un tampon de gel de silice avec de l'éluant (0 à 10 % d'EA/hexanes) pour donner le composé du titre. Rendement : 150 g (31 %). MS (ES) *m/z* 459 [M+1]⁺.

30 Préparation 8

(E)-1-(tétrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-(2-(1-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)-1H-pyrazol-4-yl)vinyl)-1H-indazol-5-ol

On fait barboter avec de l'azote un mélange de 5-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-3-iodo-1-(tétrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-indazole (14 g, 30,54 mmol) dans du DMF (150 mL) dans un flacon à fond rond à 3 cols de 500 mL équipé d'un dispositif d'agitation magnétique, d'une sonde de température et d'un dispositif réfrigérant à cloison durant 10 minutes. À la solution résultante, on ajoute de la tributylamine (TBA, 6,7 g, 36,1 mmol) et du 4,4,5,5-tétraméthyl-2-vinyl-1,3,2-dioxaborolane (7,0 g, 43,18 mmol) et on poursuit le barbotage durant 10 minutes. Au mélange résultant, on ajoute du chlorure de bis(triphénylphosphine) palladium (II) (0,45 g, 0,63 mmol) et on poursuit le barbotage durant 0,5 heure supplémentaire. On chauffe le mélange à 95 à 100 °C durant 18 heures. On refroidit le mélange réactionnel en dessous de 40 °C et on charge avec du 4-iodo-1-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)-1H-pyrazole (9,8 g, 30,42 mmol). Au mélange résultant, on ajoute de l'hydroxyde de baryum octahydraté (19,3 g, 60,3 mmol) et de l'eau (13 mL) et on continue le barbotage durant 10 minutes. On ajoute du chlorure de 1,1'-bis(diphénylphosphino) ferrocène palladium (II) complexe dans du DCM (1,3 g, 1,56 mmol) au mélange réactionnel et on poursuit le barbotage durant 0,5 heure. On chauffe le mélange à 95 °C sous azote durant 3 heures. On dilue le mélange avec EA et on filtre à travers un tampon de Celite®. On lave le tampon avec de la saumure (400 mL) et on sépare les couches de filtrat. On lave la couche organique avec de la saumure et on extrait les couches aqueuses combinées avec EA. On combine les solutions organiques et on concentre jusqu'à l'obtention d'une huile marron. On dissout l'huile dans du DCM (100 mL) et on ajoute un tampon de gel de silice. On élue le tampon avec de l'éluant (EA à 50 % dans des hexanes suivi d'EA à 70 % dans des hexanes) pour fournir une huile marron claire. On triture avec du MTBE (100 mL) pour fournir le composé du titre sous la forme d'une matière solide. Rendement : 5 g (37 %). MS (ES) m/z 439 $[M+1]^+$.

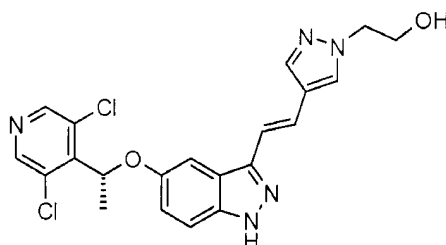
30 Préparation 9

5-((R)-1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1-(tétrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-((E)-2-(1-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)-1H-pyrazol-4-yl)vinyl)-1H-indazole

Dans un flacon à fond rond de 250 mL à 3 cols équipé d'une sonde interne de température, d'un dispositif réfrigérant à reflux, d'un manteau d'azote et d'un barreau d'agitation magnétique, on suspend du (E)-1-(tétrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-(2-(1-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)-1H-pyrazol-4-yl)vinyl)-1H-indazol-5-ol (10,0 g, 22,83 mmol) et du carbonate de césium (7,88 g, 23,94 mmol) dans de l'ACN (92 ml) et on chauffe à 60 °C. À la suspension, on ajoute du méthane sulfonate de (S)-1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthyle (7,03 g, 26,02 mmol) et on agite durant la nuit. On refroidit le mélange réactionnel à Ta, on filtre et on lave les matières solides avec de l'ACN. On concentre les filtrats et on purifie le résidu par chromatographie sur du gel de silice (ammoniac 2 M dans du méthanol) 2 à 4 %/DCM. On combine les fractions de produits et on concentre *in vacuo* jusqu'à l'obtention d'une mousse blanche. Rendement : 12.5 g (86 %). MS (ES) *m/z* 612 [M+1]⁺.

15 Préparation 10 (la forme amorphe)

(R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol



On charge un flacon à fond rond, de 250 mL à 3 cols équipé d'une ampoule de coulée, d'un dispositif d'entrée d'azote, d'une sonde interne de température et d'un agitateur magnétique avec du méthanol (57 ml) et on refroidit dans un bain de glace. À la solution résultante, on ajoute du chlorure d'acétyle (20 mL, 281,03 mmol) lentement à travers une ampoule de coulée. À la solution, on ajoute du 5-((R)-1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1-(tétrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-((E)-2-(1-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)-1H-pyrazol-4-yl)vinyl)-1H-indazole (7,1 g, 11,59 mmol) dissout dans du méthanol (40 mL) *via* une ampoule de coulée. Après que l'addition soit terminée, on retire le bain de glace, on réchauffe à la Ta et on agite le mélange durant 4 heures. On

concentre le mélange réactionnel *in vacuo* jusqu'à l'obtention d'une mousse jaune. On dissout la mousse jaune dans du méthanol (10 ml) et on ajoute lentement à une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (120 mL). On agite le mélange à la Ta durant 30 minutes. On filtre le mélange, on lave la
5 matière solide avec de l'eau (100 mL), et on sèche sous vide. On recristallise le solide à partir du EA/méthanol/hexanes chaud pour donner le composé du titre sous la forme d'un solide blanc. Rendement : 2,1 g (41 %). MS (ES) m/z 444 $[M+1]^+$.

10 Exemple 1

(R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol monohydraté forme 1 :

On purge un récipient réactionnel avec de l'azote et on charge avec (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol et un mélange de solvants constitué d'eau à 11 %/acétonitrile. On
15 chauffe la suspension résultante jusqu'à une température interne de 66 à 68 °C pour produire une solution. On refroidit lentement la solution jusqu'à 56 à 58 °C, puis on l'ensemence avec une suspension de cristaux d'ensemencement dans un mélange d'eau à 11 %/acétonitrile et on agite lentement. On refroidit tout
20 d'abord le mélange réactionnel jusqu'à 48 à 50 °C et ensuite à 19 à 20 °C. On isole le produit par filtration en présence d'un écoulement d'azote avec une humidité relative d'au moins 80 % passant à travers le tourteau solide. Le niveau d'humidité dans l'écoulement d'azote est ensuite modifié en conséquence jusqu'à 40 % et on poursuit le séchage, résultant en la production
25 du composé du titre. Veuillez noter que le cristal d'ensemencement est obtenu de manière similaire comme suit : on purge un récipient réactionnel avec de l'azote et on charge avec du (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol et un mélange de solvants constitué d'eau à 11 %/acétonitrile. On chauffe la suspension
30 résultante jusqu'à l'obtention d'une température interne de 70 °C produisant une solution. On refroidit ensuite lentement la solution, on laisse cristalliser, on filtre et on sèche. Ce composé est un inhibiteur puissant du FGFR et peut avoir

les propriétés avantageuses par rapport à la forme antérieure de propriétés supérieures de manipulation des matières solides à grande échelle, la facilité de purification par cristallisation, et la stabilité thermodynamique sous des conditions de transformation pharmaceutique et de stockage.

5

Composé de l'Exemple 1, XRPD

On recueille le profil XRPD en utilisant un diffractomètre PANalytical X'Pert™ Pro MPDPW3040 Pro, fournissant une irradiation CuKa ($\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$ (tension : 45kV et intensité : 40 mA)) produite
10 en utilisant une source Optix à très longue focale et mise au point fine. L'échantillon était pris en sandwich entre des films épais de 3 microns analysés en géométrie de mesure et tournant à une révolution par seconde pour optimiser les statistiques en fonction de l'orientation. Avant l'analyse, un échantillon de silicium (matériau de référence standard NIST 640c) est étudié
15 pour vérifier la position du pic de silicium 111. Un profil d'analyse est examiné pour ce matériau, et l'orientation préférée et les effets statistiques des particules sont évalués par comparaison du profil XRPD simulé à partir de l'analyse du cristal unique. Un miroir multicouche de type elliptique est utilisé pour la mise au point des rayons X Cu Ka de la source à travers l'échantillon et sur le
20 détecteur. On recueille les profils de diffraction en utilisant un détecteur sensible à la position de balayage (X'Ceerator) localisé à 240 mm de l'échantillon. On recueille les données de 1,01 à 39,99 degrés 2Θ avec une taille d'incrément de 0,017 degré 2Θ et une vitesse de balayage de 1,2 degré/min et avec une fente de divergence de 0,5 degré et une fente de dispersion de 0,25 degré. Un
25 diaphragme est utilisé pour minimiser la référence produite par la diffusion de l'air. On utilise des fentes Soller pour les faisceaux incidents et diffractés afin de réduire la divergence axiale. Les pics observés sont présentés dans le Tableau 1. On utilise un seuil d'intensité de 5 %.

30

Tableau 1. Pics observés pour le composé de l'Exemple 1, XRPD.

2θ	espace d (Å)	Intensité (%)
3,54 ± 0,10	24,975 ± 0,726	45
7,08 ± 0,10	12,485 ± 0,179	10
10,62 ± 0,10	8,328 ± 0,079	9
12,51 ± 0,10	7,075 ± 0,057	78
13,00 ± 0,10	6,812 ± 0,053	37
13,60 ± 0,10	6,512 ± 0,048	16
14,18 ± 0,10	6,245 ± 0,044	13
14,65 ± 0,10	6,046 ± 0,041	100
14,97 ± 0,10	5,919 ± 0,040	29
15,49 ± 0,10	5,722 ± 0,037	16
16,24 ± 0,10	5,459 ± 0,034	35
16,59 ± 0,10	5,344 ± 0,032	24
17,06 ± 0,10	5,198 ± 0,030	26
17,76 ± 0,10	4,995 ± 0,028	20
18,49 ± 0,10	4,798 ± 0,026	9
19,16 ± 0,10	4,632 ± 0,024	68
20,37 ± 0,10	4,361 ± 0,021	44
21,67 ± 0,10	4,101 ± 0,019	8
21,89 ± 0,10	4,061 ± 0,018	8
22,17 ± 0,10	4,010 ± 0,018	22
23,02 ± 0,10	3,863 ± 0,017	54
24,33 ± 0,10	3,659 ± 0,015	15
25,25 ± 0,10	3,528 ± 0,014	27
25,93 ± 0,10	3,436 ± 0,013	49
26,16 ± 0,10	3,406 ± 0,013	16
26,77 ± 0,10	3,331 ± 0,012	10
27,23 ± 0,10	3,275 ± 0,012	15
28,25 ± 0,10	3,159 ± 0,011	10
28,59 ± 0,10	3,123 ± 0,011	11
29,56 ± 0,10	3,022 ± 0,010	13

Ainsi, un échantillon correctement préparé de l'Exemple 1 peut être caractérisé par un profil de diffraction des rayons X utilisant des radiations CuK_α comme ayant des pics de diffraction (valeurs 2-thêta) tels que décrits dans le tableau 1, et en particulier ayant des pics à 14,65 en combinaison avec un ou plusieurs
5 des pics à 3,54, 12,51, et 19,16 ; et plus particulièrement ayant un pic à 14,65 ; avec une tolérance pour les angles de diffraction de 0,1 degré, plus préférablement de 0,01 degré.

La régulation aberrante de la voie FGF/FGFR a été impliquée dans de nombreuses formes de malignités humaines. Les FGFR et FGF sont souvent
10 surexprimés dans de nombreux cancers et leur expression est souvent corrélée à un pronostic médiocre. Les mutations qui s'activent dans le domaine FGFR kinase ont été découvertes dans plusieurs types de tumeurs, dont celles du sein, le NSCLC, celui de la vessie, de l'estomac, de la prostate, du colon et du myélome multiple. L'amplification génomique du locus FGFR est également
15 détectée chez de nombreux patients atteints de cancer du sein, de l'estomac, et du poumon. La surexpression des FGFR ou FGF a également été découverte dans de nombreux types différents de tumeurs tels que celles de la vessie, le myélome multiple, les cancers de la prostate et du poumon. D'autres cancers qui pourraient bénéficier de la thérapie avec l'inhibiteur de la voie de la famille
20 des FGFR incluent l'AML, le cancer du foie, le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le cancer de la thyroïde, le cancer du pancréas, le cancer des cellules rénales, le glioblastome, et le cancer des testicules. En plus de leurs rôles dans la formation et la progression des tumeurs, les FGF et FGFR sont également des régulateurs clés de l'angiogenèse, spécialement durant la croissance
25 tumorale. L'axe FGF/FGFR joue également un rôle important dans l'augmentation d'autres cellules stromales tumorales telles que les fibroblastes associés au cancer. La régulation à la hausse des FGF conduit également à la résistance aux chimiothérapies anti-angiogéniques et autres chimiothérapies. Enfin, les inhibiteurs à petites molécules des FGFR ont démontré des activités
30 anti-tumorales dans plusieurs modèles tumoraux pré-cliniques et ont été explorés dans le domaine clinique. Globalement, la voie FGF/FGFR est essentielle pour plusieurs processus cellulaires importants dans les cellules

cancéreuses. Pour ces raisons, les thérapies basées sur le ciblage des FGFR et/ou la signalisation FGF peuvent affecter à la fois directement les cellules tumorales et l'angiogenèse des tumeurs.

La préparation 10 est essentiellement testée tel que décrit ci-dessous dans les
5 essais suivants : Essai d'Enzyme FGFR1 (liaison sur filtre), Essai d'Enzyme FGFR3 (liaison sur filtre), p-ERK induite par le FGF9 dans l'essai à base de cellules RT112 (en la présence de BSA), et la détection AlphaScreen SureFire de la phosphorylation ERK (Thr202/Tyr204) dans l'essai à base de Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine (HUVEC). Ces essais
10 démontrent que la préparation 10 est un inhibiteur de la famille des FGFR et a une activité anti-cancéreuse. Ainsi, les résultats avec la forme amorphe du (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dychloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol sont indicateurs des résultats obtenus avec le composé de la présente invention. Les formes cristallines du composé sont encore
15 avantageuses du fait qu'elles peuvent offrir les propriétés par rapport à la forme antérieure de propriétés supérieures de manipulation des matières solides sur une grande échelle, la facilité de purification par cristallisation, et la stabilité thermodynamique sous des conditions de transformation pharmaceutique et de
20 stockage.

20

Essai d'enzyme FGFR1 et FGFR3 (liaison sur filtre)

On incube de la FGFR 1 ou FGFR 3 kinase (0,15 ng/μL de FGFR1 humaine ou 0,32 ng/μL de FGFR3 humaine) dans 50 μL d'un tampon contenant de l'acide
4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthane-sulfonique (HEPES) 10 mM au pH 7,5,
25 du tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris-HCl) 8 mM, pH 7,5, du dithioythrèitol(DTT) 5,0 mM, de l'adénosine triphosphate (ATP) 10,0 μM, du MnCl₂ 10 mM, du NaCl de 150 mM, du TRITON[®] X-100 0,01 %, du ³³P-ATP à 0,5 μCi et du Poly(Glu-Tyr) 0,05 μG/μL. On conduit la réaction dans un volume de 50 μL à Ta durant 30 minutes et on éteint ensuite en ajoutant 130 μL de
30 H₃PO₄ à 10 %. On transfère le mélange réactionnel (120 μL) vers une plaque filtre en fibre de verre 1,0 μm de 96 puits, on incube à la Ta durant 20 à 30 minutes et on lave ensuite 3x sur un Zoom TITERTEK[®] avec du H₃PO₄ à

0,5 %. On sèche les puits à l'air avant l'addition de 40 μ L de MicroScintTM20 (Packard) et on compte ensuite sur un compteur Wallac Microbeta[®]. Pour l'inhibition du composé, on propose le composé sous la forme de réserves de 10 mM dans du sulfoxyde du diméthyle (DMSO). On dilue le composé en série 5 1:3 dans du DMSO à 20 % pour créer une courbe de concentration-réponse à 10 points et on dilue 1:5 (20 μ M jusqu'à 0,001 μ M final dans une concentration finale de DMSO de 4 %) dans la plaque réactionnelle avant l'addition du mélange réactionnel dans la plaque filtre pour déterminer l'activité du composé. Les puits témoins contiennent 4 % de DMSO uniquement alors que la ligne de 10 référence est définie par les puits témoins contenant de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 0,1 M. Les valeurs d'inhibition en pourcentage pour chacune des 10 concentrations sont calculées pour les puits témoins sur chaque plaque et les données de concentration-réponse sur 10 points sont par la suite analysées en utilisant le logiciel ActivityBase (IDBS) en utilisant une 15 équation logistique à 4 paramètres et des valeurs absolues de CI_{50} estimées à partir de l'ajustement de la courbe résultante. Les essais d'enzyme FGFR1 et FGFR3 ont des rapports significatifs minimums (MSR) respectivement de 1,38 et 1,47 pour les CI_{50} estimées. Les résultats de CI_{50} pour la préparation 10 pour FGFR1 et FGFR3 dans ces essais sont estimés comme étant respectivement 20 de 0,0077 et 0,0064 μ M. Ces données démontrent que la préparation 10 est un inhibiteur puissant des enzymes FGFR1 et FGFR3.

p-ERK induite par FGF9 avec de la BSA

On ensemence des cellules de carcinome de vessie humaine RT-112 à une 25 densité de 5 000 cellules par puits dans 100 μ L de RPMI 1640 (Gibco 11875-085) enrichi de 10 % de sérum foetal bovin (FBS, Gibco 10082-147) et 1 % d'une solution de pénicilline/streptomycine (Gibco 15140-122) dans des plaques de 96 puits CELLBIND[®] (Corning 3340) et on incube durant la nuit à 37 °C. Le jour suivant, on retire le milieu de croissance et remplace par 100 μ L 30 de RPMI 1640 enrichi avec 20 mg/mL d'albumine sérique bovine (BSA). Après 3 heures d'incubation à 37 °C, on ajoute à chaque puits 20 μ L de 3x composés dilués en série dans du RPMI 1640 avec 20 mg/mL de BSA dans 6 % de

DMSO. Ceci produisait une courbe de dose-réponse à 10 points s'étendant de 10 à 0,005 μM dans du DMSO à 1 %. On poursuit l'incubation durant 1 heure à 37 °C. On stimule les cellules avec 50 μL d'une solution de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FGF9 (R&D Systems 273-F9) dans du sérum sans RPMI pour donner une concentration finale de 500 ng/mL de FGF9. On fixe les cellules par l'addition de 30 μL d'une solution à 25 % de formaldéhyde dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (concentration finale de 3,7 % de formaldéhyde), et on incube 30 minutes à la Ta. On lave les cellules 3x avec de la PBS, suivie de l'addition de 100 μL de méthanol froid et on incube durant 30 minutes à -20 °C. On retire le méthanol et on traite les cellules avec du PBS contenant 0,1 % de TRITON[®] X-100 (PBST), on lave 3x avec du PBS, et on incube 15 minutes à la Ta. On fait ensuite incuber les cellules durant la nuit à 4 °C avec agitation douce dans 50 μL d'une dilution 1:400 d'anticorps primaire p-p44/42 MAPK (Cell Signaling 9101S) dans de la PBS enrichie de BSA à 2 %, un Cocktail d'Inhibition de Phosphatase à 0,01 % 1 (Sigma P2850), un cocktail d'Inhibition de Phosphatase à 0,01 % 2 (Sigma P5726), et un Cocktail d'Inhibition de Protéase à 0,01 % (Sigma P8340). Le matin suivant, on lave les plaques 2x avec PBST et 2x avec PBS, suivi d'une heure d'incubation à la Ta à l'obscurité dans 80 μL d'une dilution 1:1000 de l'anticorps secondaire IgG H+L anti-lapin de chèvre Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034) dans de la PBS avec de la BSA à 1 % et 0,1 % du Cocktail d'Inhibition de Phosphatase 1, 0,01 % du Cocktail d'Inhibition de Phosphatase 2, et 0,1 % du Cocktail d'Inhibition de Protéase. On lave les cellules 3x avec de la PBS, suivie de l'addition de 100 μL d'une dilution 1:200 d'iodure de propidium (PI) (sonde moléculaire P-3566) dans de la PBS et on incube ensuite à l'obscurité durant 1 heure. On identifie les cellules positives p-ERK et les cellules totales par puits grâce à ACUMEN EXPLORER[™] (TTP Lab Tech Ltd) en utilisant le filtre optique de respectivement 500-530 nm 575-640 nm pour Alexa 488 et PI. L'intensité moyenne totale pour pERK/puits en utilisant les valeurs Alexa 488 est par la suite convertie en inhibition en pourcentage en utilisant les valeurs obtenues à partir des témoins MIN (composé témoin positif 10 μM dans du DMSO) et MAX (DMSO seul) conduit sur la même plaque. Les valeurs d'inhibition en

pourcentage et les données de concentration-réponse à 10 points sont par la suite analysées en utilisant une équation de dose-réponse sigmoïdale à 4-paramètres et les valeurs relatives de la CI_{50} sont estimées à partir de la courbe résultante. La p-ERK induite par FGF9 avec l'essai BSA a un rapport significatif minimum (MSR) pour la CI_{50} estimée de 2,7. La CI_{50} pour la préparation 10 dans cet essai est estimée comme étant de 0,004 μ M. Ces données démontrent que la préparation 10 est un inhibiteur puissant de la phosphorylation ERK induite par FGF9 dans les cellules cancéreuses humaines.

10

Détection AlphaScreen SureFire pour la phosphorylation (Thr202/Tyr204) dans des Cellules Endothéliales de Veines Ombilicales Humaines (HUVEC)

On mesure l'effet du composé sur l'inhibition du récepteur FGF 1 par la surveillance de la phosphorylation de l'ERK (pERK) en réponse ou sur stimulation du facteur de croissance des fibroblastes-basiques (b-FGF) dans les Cellules Endothéliales Ombilicales Humaines (HUVEC). On mesure les niveaux de pERK formé en utilisant le système ALPHASCREEN[®] SUREFIRE[®] (TGR Biosciences, TGRES50K). Ceci est un format homogène d'essai utilisant la capture immuno-sandwich de l'analyte phosphorylé suivie de la détection utilisant des billes ALPHASCREEN[®] enrobées d'anticorps (Perkin Elmer) pour générer un signal amplifié.

On récupère les cellules HUVEC et on les maintient dans du milieu de croissance constitué du milieu basal pour cellules endothéliales (Clonetics, CC-3132) enrichi de 10 % de FBS, 0,4 % d'extrait de cerveau de boeuf, 0,1 % d'hydrocortisone, 0,1 % de sulfate de gentamicine amphotéricine-B, et de 0,1% du facteur de croissance épidermique, recombinaison humaine jusqu'au passage 7. Pour l'essai, on récolte les cellules selon des procédures standard et ensuite on les compte. Les cellules (20 000/puits) sont mises en plaque dans 100 μ L du milieu de croissance dans des plaques revêtues de Poly-D-Lysine de 96 puits (BD, 354640). Les plaques sont incubées durant la nuit à 37° C, CO₂ à 5 %.

Le jour de l'essai, les cellules sont privées de sérum dans 100 μ L de milieu EBM (basal pour cellules endothéliales) contenant 1,5 % de FBS et 20 mg/mL de BSA durant 3 heures à 37° C, 5 % de CO₂, puis traitées avec 20 μ M de 3x composé dilué en série dans du milieu de jeûne durant 1 heure à 37° C. Ceci
5 produisait une courbe de concentration-réponse à 10 points s'étendant de 10 à 0,005 μ M dans 1 % DMSO. Après 1 heure de traitement par le composé, on stimule les cellules avec 50 μ L de b-FGF (Sigma, F0291, concentration finale b-FGF 50 ng/mL) à 37° C durant 15 minutes. Dans les puits contenant les cellules et 50 μ L de stimulateur, le b-FGF produit un signal MAX, et les cellules avec
10 10 μ M de composé témoin positif et 50 μ L de stimulateur, le b-FGF produit un signal MIN. Le milieu est ensuite retiré et on ajoute 50 μ L 1x de tampon de lyse SUREFIRE® (composant de la Trousse SUREFIRE® de TGR Biosciences)/puits et l'incubation est poursuivie à Ta durant 10 minutes avec agitation modérée. Pour la détection de la pERK, on transfère 6 μ L de lysat et 10 μ L de
15 mélange réactionnel (tampon réactionnel 60 parties/tampon d'activation 10 parties/0,6 partie de chaque des billes donneurs et accepteurs, Perkin Elmer, 6760617R) vers une proxipla de 384 puits (Perkin Elmer, 6006280). On ferme hermétiquement la plaque et on incube à Ta durant 2 heures avec agitation modérée et on effectue ensuite la lecture sur le lecteur de plaque
20 Perkin Elmer EnVision équipé d'un TurboModule en utilisant les paramètres standards ALPHASCREEN® (Ex_{680nm} et Em_{520-650nm}). Les données d'émission sont converties en pourcentage d'inhibition déterminé à partir de MAX (DMSO seul) et MIN (10 μ M de composé témoin positif dans du DMSO) sur chaque plaque et on ajuste ensuite la concentration de composé sur 10 points par
25 rapport à une équation logique à 4 paramètres en utilisant ACTIVITYBASE® et la CI₅₀ est estimée. La détection ALPHASCREEN® SUREFIRE® de l'effet de phosphorylation ERK ((Thr202/Tyr204) a un rapport significatif minimum (MSR) pour la CI₅₀ de 2,1.

La CI₅₀ de la préparation 10 dans cet essai est estimée comme étant de
30 0,0006 μ M. Ces données démontrent que la préparation 10 est un puissant inhibiteur de la phosphorylation de l'ERK induite par bFGF dans les cellules endothéliales ombilicales humaines.

Le composé de la présente invention est de préférence formulé sous la forme d'une composition pharmaceutique administrée par une variété de voies. De manière préférée entre toutes, de telles compositions sont destinées à l'administration par voie orale ou intraveineuse. De telles compositions pharmaceutiques et procédés de préparation de celles-ci sont bien connus 5 dans l'art. *Voir, par exemple*, REMINGTON : THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (D. Troy, *et al.*, eds., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins 2005).

Le composé de la présente invention est généralement efficace sur une large 10 plage de doses. Par exemple, les doses par jour tombent normalement dans la plage d'environ 0,5 à environ 100 mg/kg de poids corporel. Dans certains cas, les niveaux de doses en dessous de la limite inférieure de la plage précédemment mentionnée peuvent être plus qu'adéquats, tandis que dans d'autres cas, des doses encore plus grandes peuvent être utilisées sans 15 provoquer de quelconque effet secondaire nuisible, et par conséquent, la plage de doses ci-dessus n'est pas prévue comme limitant la portée de l'invention en aucune manière. Il sera compris que la quantité du composé réellement administré sera déterminée par un médecin, à la lumière des circonstances pertinentes, incluant l'état à traiter, la voie d'administration choisie, le ou les 20 composé(s) administré(s), l'âge, le poids et la réponse du patient individuel, et la sévérité des symptômes du patient.

REVENDEICATIONS

1. Composé qui est le ((R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol cristallin.
- 5 2. Composé selon la revendication 1, qui est le ((R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dichloropyridin-4-yl)éthoxy)-1H-indazol-3-yl)vinyl)-1H-pyrazol-1-yl)éthanol monohydraté cristallin.
- 10 3. Composé selon la revendication 1 ou la revendication 2, qui est isolé.
4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le composé est caractérisé par le profil de diffraction sur poudre des rayons X (irradiation Cu, $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$) comprenant un pic à 14,65
15 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
5. Composé selon la revendication 4, comprenant en outre un pic à 3,54
20 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
6. Composé selon la revendication 4 ou la revendication 5, comprenant en outre un pic à 12,51 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
- 25 7. Composé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, comprenant en outre un pic à 19,16 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
8. Composé pharmaceutique comprenant le composé selon l'une quelconque des revendications précédentes en combinaison avec un
30 support, un diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.