

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 617**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 09795842 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2379557**

54 Título: **Compuesto amino pirazol**

30 Prioridad:

16.12.2008 US 122854 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2013

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BURKHOLDER, TIMOTHY, PAUL;
CLAYTON, JOSHUA, RYAN y
MA, LIANDONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 617 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuesto amino pirazol

La janus quinasa 2 (JAK2) es un miembro de la familia tirosina quinasa que está implicada en la señalización de citoquinas. La JAK2 tiene un papel fundamental en la vía de señalización de la eritropoyetina (EPO), incluyendo la diferenciación de eritrocitos y la activación de Stat5. Estudios recientes han demostrado que los pacientes con trastornos mieloproliferativos crónicos como la policitemia vera, trombocitosis esencial y mieloesclerosis con metaplasia mieloide y trastornos trombóticos, tales como la resistencia a la proteína C activada, la trombosidad de la vena esplénica, el síndrome de Budd-Chiari y la trombosidad venosa portal con frecuencia han adquirido mutaciones activantes en JAK2. La mutación, una sustitución de valina por fenilalanina en la posición del aminoácido 617, conduce a la actividad de la fosforilación de la tirosina constitutiva por un mecanismo desconocido. La actividad constitutiva de la JAK2 mutante conduce a un aumento de los niveles de actividad transcripcional de la JAK2 fosforilada, pSTAT5 y STAT5, lo que conduce a la patogénesis de los trastornos mieloproliferativos y leucemias, tales como la leucemia mieloide crónica atípica. Además, JAK2 se activa por el bucle autocrino dependiente de interleucina 6 u otras alteraciones genéticas en tumores sólidos y hematológicos, por ej., glioblastoma, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda primaria y secundaria, leucemia linfoblástica aguda de estirpe T y estirpe B, síndrome mielodisplásico.

Se han descrito varios inhibidores de tirosina quinasa amino pirazol. Véase, por ejemplo, los documentos WO06087538 y WO2007064797.

Sin embargo, todavía hay una necesidad de compuestos adicionales que inhiben las tirosina quinasa, tales como JAK2. La presente invención proporciona un nuevo compuesto amino pirazol que se cree que tiene uso clínico para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos en los que se activa la ruta de señalización de JAK2 o en los que se desregula la señalización de JAK2/STAT.

La presente invención proporciona 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención divulga un procedimiento de tratamiento de trastornos mieloproliferativos crónicos seleccionados del grupo que consiste en policitemia vera, trombocitosis esencial y mieloesclerosis con metaplasia mieloide en un mamífero que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención también divulga un procedimiento de tratamiento del glioblastoma, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de próstata y leucemias, tales como leucemia mieloide crónica atípica, leucemia mieloide aguda primaria y secundaria, leucemia linfoblástica aguda de estirpe T y estirpe B, síndrome mielodisplásico y trastornos mieloproliferativos en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable en combinación con otro ingrediente terapéutico.

La presente invención también proporciona 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso como un medicamento. Además, esta invención proporciona el uso de 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos crónicos. En particular, estos trastornos mieloproliferativos crónicos se seleccionan del grupo que consiste en policitemia vera, trombocitosis esencial y mieloesclerosis con metaplasia mieloide. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos crónicos seleccionados del grupo que consiste en policitemia vera, trombocitosis esencial y mieloesclerosis con metaplasia mieloide que comprende 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo.

El lector experto entenderá que el compuesto de la presente invención es capaz de formar sales. El compuesto de la presente invención es una amina y en consecuencia reacciona con cualquiera de varios ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables. Tales sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables y la metodología común para su preparación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND

USE, (VCHA/ Wiley-VCH, 2002); L.D. Bighley, S.M. Berge, D.C. Monkhouse, in "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick and 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, January 1977.

5 Las siguientes preparaciones y ejemplos se nombran usando ChemDraw Ultra, versión 10,0.

Esquema 1:

Preparación 1

1-(4-Metoxibencil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina

Procedimiento 1:

- 10 En un matraz de fondo redondo de 1 l, combinar 5-amino-3-metilpirazol (22,8 g, 234,8 mmol) y N-metilpirrolidona (200 ml). Enfriar el matraz hasta 0°C y colocar en atmósfera de nitrógeno. Añadir hidróxido sódico (9,39 g, 1,0 equivalentes (equiv.)) al matraz y agitar durante 30 minutos (min). Añadir gota a gota al matraz una solución de alfa-cloro-4-metoxitolueno (31 ml, 1,0 equiv.) en N-metilpirrolidona (100 ml). Dejar que la reacción se caliente hasta temperatura ambiente (TA) lentamente durante la noche. Diluir la reacción con agua y extraer con acetato de etilo (AE). Lavar los extractos orgánicos con cloruro sódico acuoso saturado. Concentrar al vacío. Purificar sobre un tapón de sílice (hexano → 2:1 hexano:AE → 3:2 hexano:AE → 1:1 hexano:AE → 1:2 hexano:AE → AE). Concentrar las fracciones deseadas para dar el compuesto del título (10,8 g, 21%). LCMS (4 min) = 218,0 (M + 1).
- 15

Procedimiento 2:

A. 2-(4-Metoxibenciliden)hidrazina-carboxilato de (E)-terc-butilo

- 20 Añadir 4-metoxibenzaldehído (400 g, 2,94 mol) durante 20 min a una solución de carbazato de terc-butilo (400 g, 2,94 mol) en tolueno (750 ml) a 5°C. Calentar a reflujo durante un período de 1 hora (h), recoger el agua en un azeótropo con el tolueno. Cuando ya no se recoge más agua, enfriar hasta 60°C. Añadir hexanos hasta que el producto precipita de la solución. Enfriar el baño más hasta 20°C. Recoger los sólidos por filtración y secar utilizando una prensa de nitrógeno para producir el compuesto del título (750,5 g, 91%). ¹H-RMN [400 MHz, dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO-d₆)] δ 10,6-10,8 (sa, 1H), 7,88-8,0 (S, 1H), 7,5-7,55 (d, 2H), 6,95-7,0 (d, 2H), 1,45 (s, 9H). ES/MS (m/z): 249 [M-H].
- 25

B. 2-(4-Metoxibencil)hidrazina-carboxilato de terc-butilo

- Añadir paladio sobre carbono al 10% (agua para humectar, 20 g) en suspensión en AE (100 ml) a un reactor a presión cerrado herméticamente a través de transferencia al vacío. Enjuagar la línea de transferencia con una cantidad mínima de AE. Cargar carboxilato de 2-(4-metoxibenciliden)hidrazina-carboxilato de (E)-terc-butilo (320 g, 1,28 mol) disuelto en tetrahidrofurano (THF, 1000 ml) a través de transferencia al vacío y enjuagar la línea con una cantidad mínima de THF. Presurizar el reactor a 50 PSI con H₂ y mezclar el contenido del reactor a 20 ± 10°C. Continuar la reacción, manteniendo la presión de hidrógeno a 50 PSI, hasta que ya no se observe más absorción de hidrógeno. Filtrar la solución de reacción para eliminar el catalizador y lavar la torta de filtro del catalizador con THF (500 ml). Añadir el lavado al filtrado de la reacción. Concentrar la solución al vacío para obtener el compuesto del título (337 g, 86%) como un aceite. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,1 a 8,3 (s, 1H), 7,1-7,3 (d, 2H), 6,8-6,9 (d, 2H), 4,4-4,6 (sa, 1H), 3,7-3,8 (s, 2H), 3,6-3,7 (s, 3H), 1,3-1,5 (s, 9H).
- 30
- 35

C. Diclorhidrato de (4-metoxibencil)hidrazina

- A una solución de cloruro de hidrógeno 4 N en dioxano (2000 ml, 8,00 mol de HCl), añadir 2-(4-metoxibencil)hidrazina-carboxilato de terc-butilo (324 g, 1,09 mol) disuelto en una cantidad mínima de dioxano, lentamente durante un período de 1 h. Se forma gradualmente un precipitado. Dejar en agitación la solución 16 horas a 20 ± 5°C. Recoger los sólidos por filtración. Suspender los sólidos en heptano (2000 ml) y aislar los sólidos por filtración. Secar los sólidos usando una prensa de nitrógeno para dar el compuesto del título (242,3 g, 1,08 mol, 98%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,2-9,0 (s a, 5H), 7,3-7,4 (d, 2H), 6,8-7,0 (d, 2H), 4,0 (s, 2H), 3,7 (s, 3H).
- 40

- 45 D. 1-(4-Metoxibencil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina y 1-(4-metoxibencil)-3-metil-1H-pirazol-5-amina

- Combinar terc-butóxido potásico (191,89 g, 1,71 mol) y THF (2000 ml) a 22°C. Mezclar hasta obtener una solución homogénea. Enfriar hasta 5°C. Añadir una solución premezclada de acetonitrilo (84,25 g, 2,05 mol) y acetato de metilo (126,7 g, 1,71 mol) a la solución de terc-butóxido potásico durante 45 min manteniendo una temperatura inferior a 10°C. Después de completar la adición, dejar que la reacción se caliente a 20 ± 5°C y agitar durante aproximadamente 2 h. Añadir diclorhidrato de (4-metoxibencil)hidrazina (250 g) en porciones a la reacción durante aproximadamente 5 min, seguido por cloruro de hidrógeno 4 N en dioxano (262,5 g, 1,00 mol) a una velocidad que mantiene la temperatura <30°C. Cuando se completa la adición, dejar en agitación a 25 ± 5°C durante aproximadamente 16 h. Aislar los sólidos por filtración y lavar con THF (500 ml). Suspender los sólidos en bruto en diclorometano (DCM, 4 l) y agua (2 l) ajustando el pH hasta >10 con NaOH 5 N. Dejar que las capas sedimenten y
- 50

recoger la fase orgánica. Lavar la fase acuosa con DCM (2 l). Combinar las fases orgánicas y secar sobre sulfato sódico anhidro y concentrar la solución al vacío hasta obtener un sólido para dar 165 g del producto en bruto. Calentar a reflujo el producto en bruto en acetato de isopropilo (660 ml) para disolver los sólidos lo máximo posible. Enfriar hasta 33°C y añadir hexano (600 ml) lentamente durante 1 h. Enfriar hasta 10°C y mantener la temperatura a 10°C durante 10 min. Aislar los sólidos por filtración, lavar con hexano (200 ml) y secar usando una prensa de nitrógeno para dar una mezcla de los compuestos del título (91,5 g, 0,4 mol, 47%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,2-7,3 (d, 2H), 6,7-6,9 (d, 2H), 5,1 (s a, 2H), 5,0 (s, 1H), 4,9 (s, 2H), 3,6-3,8 (s, 3H), 1,9 (s, 3H).

Nota: estos productos intermedios se pueden separar por cromatografía, sin embargo en este caso, se aíslan como una mezcla y pueden utilizarse en la secuencia final más adelante, lo que implica la eliminación del grupo de protección de bencilo resultante en el mismo producto.

Preparación 2

2-Cloro-1-(4-cloro-2-fluorofenil)etanona

Combinar en un matraz de fondo redondo de 1 l 4'-cloro-2'-fluoroacetofenona (40 g, 231,8 mmol), heptano (120 ml) y metanol (16 ml). Enfriar hasta 0°C y colocar en atmósfera de nitrógeno. Disolver cloruro de sulfurilo (21,5 ml, 1,15 equiv.) en heptano (120 ml) y cargar en un embudo de adición. Añadir gota a gota a la reacción durante 60 min. Agitar durante 2,5 horas a 0°C; durante este tiempo se forma un precipitado blanco. Cargar el embudo de adición con bicarbonato sódico 1 M (400 ml) y añadir a continuación gota a gota a la reacción. Después de que se detiene el desprendimiento de gas, filtrar la suspensión bifásica para recoger el compuesto del título (38,18 g, 80%) en forma de agujas blancas. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 5,00 (d, 2H, J = 2,5 Hz), 7,43 (m, 1H), 7,63 (m, 1H), 7,89 (t, 1H, J = 8,4 Hz).

Preparación 3

(E)-N'-(6-cloropiridazin-3-il)-N,N-dimetilacetimidamida

Combinar en un matraz de fondo redondo de 2 litros 3-cloro-6-piridazinamina (43,2 g, 333,5 mmol), tolueno (500 ml), y N,N-dimetilacetamida dimetil acetal (67,8 ml, 1,25 equiv.). Conectar un condensador de reflujo y después calentar a reflujo durante 2 h. Dejar enfriar a TA. Concentrar al vacío. Triturar el material en bruto con hexanos y filtrar para aislar el compuesto del título (60,4 g, 91%) en forma de sólido de color canela claro. MS = 199,0 (M + 1).

Preparación 4

(4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona

Combinar en un matraz de fondo redondo (E)-N'-(6-cloropiridazin-3-il)-N,N-dimetilacetimidamida (36,61 g, 184,3 mmol), 2-cloro-1-(4-cloro-2-fluorofenil)etanona (38,15 g, 1 equiv.) y dimetilformamida (150 ml). Colocar en atmósfera de nitrógeno y a continuación calentar a 120°C durante 4 h. Dejar enfriar a TA y agitar durante la noche. Diluir con AE (1 l) y agua (500 ml). Extraer las fases orgánicas tres veces con agua seguido de cloruro sódico acuoso saturado. Secar las fases orgánicas sobre sulfato de magnesio anhidro. Filtrar y concentrar al vacío. Purificar mediante un tapón de sílice (hexano → 4:1 hexano:AE → 3:1 hexano:AE → 2:1 hexano:AE → 1:1 hexano:AE) y aislar el compuesto del título (33,8 g, 57%) en forma de un sólido verde claro. LCMS (4 min = 324,0, 326,0, M + 1).

Preparación 5

2-((6-Cloro-3-(4-cloro-2-fluorobenzoil)-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)metil)isoindolin-1,3-diona

Combinar (4-cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona (5,6 g, 17,3 mmol), N-ftaloilglicina (6,0 g, 1,7 equiv.), acetonitrilo (60 ml), agua (15 ml), ácido trifluoroacético (0,26 ml, 0,2 equiv.) y nitrato de plata (294 mg, 0,1 equiv.) en un matraz de fondo redondo, con embudo de adición conectado y colocar bajo atmósfera de nitrógeno. Calentar a 70°C y mantener a esta temperatura durante 15 min. Disolver persulfato de amonio (7,1 g, 1,8 equiv.) en agua (15 ml) y cargar a un embudo de adición. Añadir gota a gota al matraz de reacción durante aproximadamente 20 min. Calentar la reacción a 70°C durante 1 h. Se forma un precipitado durante este tiempo; filtrar a través de un embudo Buchner para aislar el compuesto del título en bruto (7,3 g, 87%) como un sólido blanco. LCMS (4 min) = 483,0, 485,0, M + 1).

Preparación 6

(8-(Aminometil)-6-cloro-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-3-il)(4-cloro-2-fluorofenil)metanona

Combinar 2-((6-cloro-3-(4-cloro-2-fluorobenzoil)-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)metil)isoindoline-1,3-diona (7,30 g, 15,1 mmol), etanol (200 ml) e hidrazina (1,45 ml, 3 equiv.) en un matraz de fondo redondo y colocar bajo atmósfera de nitrógeno. Agitar durante 2 días a TA. Calentar durante 2 horas a 50°C, a continuación concentrar la reacción al vacío. Diluir con AE. Lavar los extractos orgánicos con HCl (ac) para extraer el producto en la capa acuosa. Alcalinizar la capa acuosa con NaOH 1 N (acuoso) y extraer con AE. Lavar la capa de AE con cloruro sódico acuoso saturado y secar sobre sulfato de magnesio anhidro. Filtrar y concentrar al vacío para dar el compuesto del título en

bruto (1,2 g, 23%) como un sólido verde claro. MS = 355,0, 353,0 (M +1).

Preparación 7

(4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metil-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona

5 Combinar (8-(aminometil)-6-cloro-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-3-il)(4-cloro-2-fluorofenil)metanona (1,15 g, 3,3 mmol), agua (12 ml), carbonato potásico (495 mg, 1,1 equiv.) y 2-bromoetil éter (0,47 ml, 1,1 equiv) en un recipiente de reacción de microondas de 20 ml. Sellar con un tapón con reborde, calentar a continuación en un recipiente de reacción de microondas a 120°C durante 20 min. Enfriar hasta temperatura ambiente y repartir entre AE y agua. Lavar la capa de AE con cloruro sódico acuoso saturado y secar sobre sulfato de magnesio anhidro. Filtrar y concentrar al vacío. Purificar sobre gel de sílice (4:1 hexano:AE → 2:1 hexano:AE → 1:1 hexano:AE) para dar el compuesto del título (0,43 g, 31%) como una espuma de color amarillo claro. LCMS (4 min) = 423,0, 425,0, M +1.

Preparación 8

(4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metil-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanol

15 Combinar (4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metil-8-(morfolinometil)-imidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona (0,43 g, 1,0 mmol) y metanol (15 ml) en un matraz de fondo redondo. Colocar en atmósfera de nitrógeno y enfriar hasta 0°C. Añadir borohidruro sódico (58 mg, 1,5 equiv.) en una porción. Agitar durante 5 min a esta temperatura y luego eliminar el baño de enfriamiento y dejar calentar a TA. Después de 15 min, neutralizar la reacción con agua y después extraer con AE. Lavar los extractos orgánicos con agua seguido de cloruro sódico acuoso saturado. Secar los extractos orgánicos sobre sulfato de magnesio anhidro. Filtrar y concentrar al vacío para dar el compuesto del título (0,4 g, 93%). LCMS (4 min) = 425,0, 427,0, M+1.

20 Preparación 9

4-((6-Cloro-3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)metil)morfolina

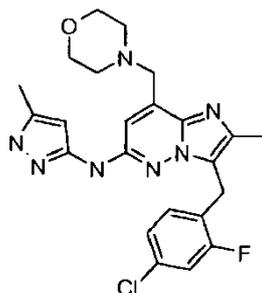
25 Combinar (4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metil-8-(morfolinometil)-imidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanol (0,4 g, 0,94 mmol), 1,2-dicloroetano (25 ml), trietilsilano (0,45 ml, 3 equiv.) y ácido trifluoroacético (0,57 ml, 8 equiv.) en un matraz de fondo redondo y colocar bajo atmósfera de nitrógeno. Calentar a 70°C durante la noche. Concentrar la reacción al vacío. Cargarla en un cartucho de intercambio iónico SCX Varian MegaElut® 10 gramos (prelavado con metanol). Eluir con metanol para eliminar las impurezas no básicas. Eluir con amoníaco 2 M en metanol. Concentrar al vacío para dar el compuesto del título (0,36 g, 94%). LCMS (4 min) = 409,0, 411,0, M+1.

Preparación 10

30 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-N-(1-(4-metoxibencil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-2-metil-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina

35 Combinar 4-((6-cloro-3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)metil)morfolina (0,36 g, 0,88 mmol), 1-(4-metoxibencil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina (0,248 g, 1,3 equiv.), carbonato potásico (0,30 g, 2,5 equiv.), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (0,076 g, 0,15 equiv.), agua (2 ml) y 1,4-dioxano (20 ml) en un matraz de fondo redondo. Desgasificar a fondo con nitrógeno, añadir a continuación (dibencilidenacetona)paladio (0,10 g, 0,2 equiv.). Adjuntar un condensador de reflujo y colocar bajo atmósfera de nitrógeno. Calentar la reacción a reflujo durante la noche. Pasar la reacción a través de un tapón de Celite. Lavar el tapón con AE. Transferir a un embudo de decantación y lavar con agua. Lavar la capa orgánica con cloruro sódico acuoso y secar sobre sulfato de magnesio anhidro. Filtrar y concentrar al vacío. Purificar sobre gel de sílice (AE → metanol 10%:AE) para dar el compuesto del título (0,447 g, 86%) como un sólido de color amarillo pálido. LCMS (4 min) = 590,2, 591,2, M+1.

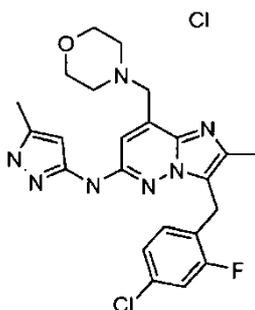
40 Ejemplo 1



3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1Hpirazol-3-il)-8-(morfolinometil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina

- Combinar 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-N-(1-(4-metoxibencil)-5-metil-1H-pirazol-3-il)-2-metil-8-(morfolinmetil)imidazo [1,2-b] piridazin-6-amina (0,447 g, 0,76 mmol) y ácido trifluoroacético (10 ml) en un tubo de reactor de microondas de 20 ml. Sellar con un tapón con reborde, calentar a continuación en un recipiente de reacción de microondas a 120°C durante 20 min. Repartir entre AE y agua alcalinizada con un exceso de NaOH acuoso. Lavar la fase orgánica tres veces con NaOH acuoso seguido de cloruro sódico acuoso saturado. Secar sobre sulfato de magnesio anhidro. Filtrar y concentrar al vacío. Purificar sobre gel de sílice (AE → metanol 10%: AE) para dar el compuesto del título (0,246 g, 0,52 mmol) como un sólido de color amarillo pálido. LCMS (8 min) = 470,0, M +1.

Ejemplo 2



- 10 Clorhidrato de 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina

- Combinar 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina (0,1 g, 0,21 mmol) y 1,4-dioxano (10 ml) en un matraz de pera y colocar bajo atmósfera de nitrógeno. Añadir cloruro de hidrógeno (4 M en 1,4-dioxano, 0,053 ml, 1,0 equiv.) y dejar agitar a TA en una atmósfera de nitrógeno durante 1,5 h. Concentrar al vacío y a continuación evaporar bajo vacío con etanol absoluto dos veces. Secar durante la noche en un horno de vacío (6°C) para dar el compuesto del título (0,11 g, 102%). LCMS (8 min) = 470,0, M +1.

Esquema 2:

Preparación 11

- 20 (E)-N'-(6-cloropiridazin-3-il)-N,N-dimetilacetimidamida

- Combinar 6-cloropiridazin-3-amina (1,500 kg, 11,58 mol); 1,1-dimetoxi-N,N-dimetiletanamina (2,313 kg, 17,37 mol) y éter metil ciclopentilo (8,25 l), calentar a continuación a 98°C mientras se destila el subproducto metanol resultante. Después de 4 h, enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y añadir heptanos (11,2 l) a la solución de reacción para cristalizar el producto. El compuesto del título se recoge por filtración y se seca. (1,494 kg, 64,95%; pf = 73°C)

Preparación 12

2-cloro-1-(4-cloro-2-fluorofenil)etanona

- 30 Agitar una mezcla de heptanos (1,5 l), metanol (0,4 l) y 1-(4-cloro-2-fluorofenil)etanona (1 kg, 5,81 mol) con enfriamiento hasta <5°C. Añadir gota a gota cloruro de sulfuro (0,608 l, 1,02 kg, 7,55 moles) como una solución de heptanos (1,5 l) a la mezcla de reacción manteniendo la temperatura de la reacción <15°C durante la adición. Después de 2 h neutralizar la reacción a temperatura ambiente a un pH de 6 con hidróxido sódico (5 N, 2,0 l). Extraer la mezcla de reacción con cloruro de metileno (2 l) y concentrar el extracto para formar un sólido blanco. Filtrar y secar el sólido.

Preparación 13

- 35 (4-cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona

- Combinar 2-cloro-1-(4-cloro-2-fluorofenil)etanona (1,5 kg, 5,44 mol) y (E)-N'-(6-cloropiridazin-3-il)-N,N-dimetilacetimidamida (1,19 kg, 5,72 mol) en DMF (10,14 l) y calentar a 120°C durante 5 h. Después de enfriar, añadir agua (30 l) y agitar para cristalizar el producto. Recoger el producto por filtración y lavar la torta con agua (2x12 l) y heptanos (2x10 l) y a continuación secar al vacío para obtener el compuesto del título. (1,490 kg, 84,44%; pf = 160°C, M+ = 324).

Preparación 14

(4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metil-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona

Añadir etanol (12 l), (4-cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona (897,70 g, 2,77 mol) y bis(2,4-pentanodionato)-oxovanadio (IV) (146,81 g, 553,67 mmol) a un recipiente de reacción bajo una atmósfera de nitrógeno. Añadir gota a gota una solución en etanol (6 l) de 4-óxido de 4-metilmorfolina (3,89 kg, 33,21 mol) durante 150 min, manteniendo la temperatura de reacción a 23-33°C y calentar a continuación la reacción a 40°C durante 48 h. Enfriar la reacción y concentrar por eliminación del disolvente (13 l). Filtrar la mezcla resultante, lavar la torta del filtro con hexano (1 l) y secar a continuación (728 g, 66,25%, pf 145-147°C; M + = 423).

Preparación 15

Clorhidrato de 4-((6-cloro-3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)metil)morfolina

Combinar a 26°C trietilsilano (110 g, 946 mmol) y (4-Cloro-2-fluorofenil)(6-cloro-2-metil-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-3-il)metanona (50,1 g, 117,06 mmol) para formar una solución. Añadir ácido trifluoroacético (150 ml, 1,98 mol) a la mezcla de reacción y calentar a continuación a 78°C durante 24 h. Enfriar la reacción hasta temperatura ambiente y separar la mezcla para eliminar la capa superior. Disolver la capa inferior con acetato de etilo (1 l) y ajustar el pH a 11 con hidróxido sódico (4 N, 500 ml). Separar la capa orgánica y agregar HCl (4 M en éter etílico) a la capa orgánica para formar la sal HCl. Filtrar y secar la sal HCl (100 g (96%), pf = 237-238°C; M+ = 409).

Preparación 16

Clorhidrato y base libre de 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina

Preparar el catalizador activo combinando cloruro de paladio (160 mg, 0,90 mmol) y 4,5-bis (difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (1,10 g, 1,84 mmol) en DMF (25 ml) y calentando para formar una solución. Añadir el catalizador preformado a una solución de 3-metil-1H-pirazol-5-amina (3,0 g, 29,65 mmol), clorhidrato de 4-((6-cloro-3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)metil)morfolina (9,0 g, 20,19 mmol), bicarbonato potásico (6,0 g, 59,93 mmol) en DMF (65 ml) y calentar a 150°C durante 1 h. Enfriar la reacción hasta 60°C y añadir sílice funcionalizado con mercaptopropilo (500 mg) y agitar durante 1 h y a continuación filtrar para eliminar el sílice. Enfriar a temperatura ambiente, añadir 2-metiltetrahidrofurano (125 ml) y extraer con agua para eliminar la DMF. Añadir HCl a la solución orgánica para formar la sal clorhidrato 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina. Añadir la sal HCl (1,1 g) a hidróxido sódico (10 ml, 1 N) en n-butanol (10 ml) y agitar. Filtrar la mezcla resultante para obtener 0,22 g de la base libre, imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina, 3-[(4-cloro-2-fluorofenil)metil]-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(4-morfolinilmetil), (22% de rendimiento, M+1. = 470).

Ejemplo 3

Formulación de 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina

Pasar opcionalmente 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina y excipientes a través de un tamiz apropiado. Combinar y mezclar 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina, almidón pregelatinizado y almidón pregelatinizado con dimeticona al 5% usando un compartimento de tambor apropiado (con o sin barra intensificadora) u otro equipo adecuado de mezcla. Alternativamente, añadir dimeticona durante la mezcla a través de un sistema de adición de líquidos. Llenar el polvo mezclado en cápsulas utilizando equipos de encapsulación adecuados. Controlar la uniformidad de peso y los parámetros del proceso adecuados durante el proceso de llenado. Opcionalmente despolvar las cápsulas finales o pulir ya sea mediante procesos manuales o automatizados.

Ensayo basado en células JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 - Cellomics ArrayScan® HCS

El ensayo basado en células JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 imita la activación constitutiva de JAK2-STAT5 en células progenitoras eritroides, lo que conduce a la sobreproducción de eritrocitos, un marcador de la policitemia vera (PV).

Se mantienen células TF-1 (leucemia eritroide humana) en medio RPMI 1640 (RPMI-1640 desarrollado por Moore et. Al. en el Roswell Park Memorial Institute. La formulación se basa en la serie RPMI-1630 de medios que utilizan un sistema tampón bicarbonato y modificaciones en las cantidades de aminoácidos y vitaminas) suero bovino fetal (FBS) 10%, bicarbonato sódico 0,075%, piruvato sódico 1 mM, 1x antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA) y glucosa 0,45%. El medio está suplementado con GM-CSF (factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos) a una concentración final de 2 ng/ml. Las células se mantienen a 37°C con 5% de CO₂. Las células se dejan en medio libre de suero para eliminar los factores de crecimiento endógenos. Se cuentan las células TF-1 y las células se recogen para sembrar 2x10⁷ células por placa de 96 pocillos a una densidad de 2 x10⁵ células por pocillo. Las células se lavan dos veces con RPMI 1640 sin suplementar (RPMI 1640 con bicarbonato sódico 0,075%, piruvato sódico 1 mM, 1x antibiótico/antimicótico y glucosa 0,45%) antes de suspender las células a una concentración final de 5x10⁵ células/ml en RPMI con FBS 0,6%. Las células diluidas se vuelven a añadir a matraces de cultivo de tejidos y se incuban durante la noche a 37°C. Los compuestos de ensayo se preparan en 100% de DMSO a una concentración de 10 mM. Los compuestos se diluyen en serie 1:3 con 100% de DMSO en un intervalo de concentración-respuesta 200x-10 puntos (4 mM-200 nM). En otra placa profunda de 96 pocillos se añaden 2,5 µl

de solución de compuesto de 200x a 125 μ l de medios RPMI 1640 completos con FBS al 10% para una placa con compuesto a una concentración 4x.

5 Para realizar el ensayo, se recogen células privadas de suero y se lavan una vez con medio RPMI 1640 sin suplementar. Las células se suspenden en medio RPMI completo con FBS 10% para una concentración final de 8×10^5 células/ml. Se añade una parte alícuota de 250 μ l de células diluidas (2×10^5 células) a cada pocillo de la placa con compuesto en una concentración de 4x. Las células se mezclan en vórtice y la placa se incuba en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Se prepara una solución de trabajo 4x fresca de eritropoyetina (EPO) en 6,4 unidades/ml utilizando medio RPMI 1640 completo con FBS 10% pre-calentado. A continuación las células se tratan con compuesto durante 10 min, se añaden 125 μ l de medio de EPO a cada pocillo y la placa se agita en vórtice. Las células se incuban en un baño de agua a 37°C durante 20 min y se mezclan cada 5 minutos durante el tiempo de incubación. El intervalo de concentración-respuesta final de punto 10 es 20 μ M-1 nM a una concentración final de DMSO 0,5% y EPO 1,6 U/ml. Después del tratamiento de las células, se añade a cada pocillo 500 μ l de solución de formaldehído 1% (recién preparada con solución salina con tampón (PBS) y mantenida caliente a 37°C). Las placas se sellan y se invierten 8-10 veces para mezclar. Las placas se colocan en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Después de la incubación, las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se aspira, dejando 100 μ l de células (2×10^5 células). Las células se mezclan en vórtice y se lavan dos veces con 800 μ l de PBS repitiendo los pasos de centrifugación y dejando 100 μ l que contenían $\sim 2 \times 10^5$ células después del lavado final. Se añade a las células una parte alícuota de 800 μ l de metanol frío al 90% y se colocan a -20°C durante la noche. Las placas se centrifugan y el metanol se elimina. Las células se lavan con tampón FACS (PBS con FBS 5% y azida sódica 0,02%). Se añade a las células una parte alícuota de 200 μ l de dilución 1 a 10 de anti-pSTAT5 (pY694) de ratón Alexa Fluor 647[®] en tampón para clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células se mezclan bien y se incuban a TA en la oscuridad durante 2 h. Las células se lavan una vez con PBS y se dejan 100 μ l de células. Se prepara con PBS una solución de trabajo de Hoechst 2 μ g/ml (Acros Organics, Morris Plains, NJ). Se añade una parte alícuota de 200 μ l a cada pocillo y las células se incuban a TA en la oscuridad durante 10 min. Las células se lavan con PBS y se añaden a las células 50 μ l de Cytofix[®] (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se transfieren a placas de cultivo negro de tejido de 96 pocillos y se sellan. Las placas se centrifugan. Se recogen los datos de la media de la intensidad fluorescente y se analizan mediante Cellomics ArrayScan[®] VTi. El tratamiento con el compuesto se compara con el vehículo para determinar los datos de porcentaje de inhibición. Se determina que la relación mínima significativa (MSR) entre dos compuestos de ensayo con diferentes CI_{50} es 2,2. La CI_{50} relativa se calcula utilizando un análisis logístico con ajuste de curva de 4 parámetros con ActivityBase 4,0. Para la 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina, la $CI_{50} = 0,033 \mu$ M, $n = 4$. Los resultados de este ensayo demuestran que la 3-(4-cloro-fluorobenzil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina es un potente inhibidor de JAK2.

35 Ensayo basado en células JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 - Cellomics ArrayScan[®] HCS

La IL-2 activa la vía de JAK3 en células asesinas naturales (NK) para dirigir la proliferación de NK y linfocitos CD8. Por lo tanto, el ensayo basado en células de NK92/ pSTAT5 estimuladas por IL-2 permite la evaluación de la actividad celular de JAK3 de los compuestos de JAK2 *in vitro*.

40 Se mantienen células NK-92 (asesinas naturales) (ATCC, Manassas, VA) en medio mínimo esencial (MEM) Alpha con suero fetal bovino 15%, suero de caballo 15% y 1x antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio está suplementado con IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) para una concentración final de 4 ng/ml. Las células se mantienen a 37°C con 5% de CO₂. Las células se dejan en medio libre de suero para eliminar los factores de crecimiento endógenos. Se cuentan las células NK-92 y las células se recogen para sembrar 2×10^7 células por placa de 96 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Las células se lavan dos veces con MEM alfa (MEM Alpha) sin suplementar antes de suspender las células a una concentración final de 8×10^5 células/ml en MEM Alpha con suero 0,6% (FBS 0,3%, suero de caballo 0,3%). Las células diluidas se vuelven a añadir a matraces de cultivo de tejidos y se incuban durante la noche a 37°C. Los compuestos de ensayo se preparan en 100% de DMSO a una concentración de 10 mM. Los compuestos se diluyen en serie 1:3 con 100% de DMSO en un intervalo de concentración-respuesta 200x-10 puntos (4 mM-200 nM). En otra placa profunda de 96 pocillos se añaden 2,5 μ l de solución de compuesto de 200x a 125 μ l de medios RPMI 1640 completos con FBS 10% para una placa con compuesto a una concentración 4x.

55 Para realizar el ensayo, se recogen células privadas de suero y se lavan una vez con medio RPMI 1640 sin suplementar. Las células se suspenden en medio RPMI 1640 completo con FBS 10% para una concentración final de 8×10^5 células/ml. Se añade una parte alícuota de 250 μ l de células diluidas (2×10^5 células) a cada pocillo de la placa con compuesto en una concentración de 4x. Las células se mezclan en vórtice y la placa se incuba en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Se prepara una solución de trabajo 4x fresca de IL-2 en 2 ng/ml utilizando medio RPMI completo con FBS 10% pre-calentado. A continuación las células se tratan con compuesto durante 10 min, se añaden 125 μ l de medio de IL-2 a cada pocillo. Las células se mezclan en vórtice. Las células se incuban en un baño de agua a 37°C durante 20 min y se mezclan cada 5 minutos durante el tiempo de incubación. El intervalo de concentración-respuesta final de punto 10 es 20 μ M-1 nM a una concentración final de DMSO 0,5% e IL-2 0,5 ng/ml. Después del tratamiento de las células, se añade a cada pocillo 500 μ l de solución de formaldehído 1% (recién preparada con solución salina con tampón (PBS) y mantenida caliente a 37°C). Las placas se sellan y se

5 invierten 8-10 veces para mezclar. Las placas se colocan en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Después de la incubación, las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se aspira, dejando 100 µl de células (2×10^5 células). Las células se mezclan en vórtice y se lavan dos veces con 800 µl de PBS repitiendo los pasos de centrifugación y dejando 100 µl que contenían $\sim 2 \times 10^5$ células después del lavado final. Se añade a las células una parte alícuota de 800 µl de metanol frío al 90% y se colocan a -20°C durante la noche. Las placas se centrifugan y el metanol se elimina. Las células se lavan con tampón FACS (PBS con FBS 5% y azida sódica 0,02%). Se añade a las células una parte alícuota de 200 µl de dilución 1 a 10 de anti-pSTAT5 (pY694) de ratón Alexa Fluor 647® en tampón para clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células se mezclan bien y se incuban a TA ambiente en la oscuridad durante 2 h. Las células se lavan una vez con PBS y se dejan 100 µl de células. Se prepara con PBS una solución de trabajo de Hoechst 2 µg/ml (Acros Organics, Morris Plains, NJ). Se añade una parte alícuota de 200 µl a cada pocillo y las células se incuban a TA en la oscuridad durante 10 min. Las células se lavan con PBS y se añaden a las células 50 µl de Cytifix® (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se transfieren a placas de cultivo negro de tejido de 96 pocillos y se sellan. Las placas se centrifugan. Se recogen los datos de la media de la intensidad fluorescente y se analizan mediante Cellomics ArrayScan® VTi. El tratamiento con el compuesto se compara con el vehículo para determinar los datos de porcentaje de inhibición. Se determina que la MSR es 2,06. La CI_{50} relativa se calcula utilizando un análisis logístico con ajuste de curva de 4 parámetros con ActivityBase 4,0. Para la 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina, la $CI_{50} = 0,94 \mu\text{M}$, $n = 4$. Los resultados del ensayo basado en células JAK3 IL2-NK92-pSTAT5 demuestran que la 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo-[1,2-b]piridazin-6-amina es un inhibidor menos potente de JAK3 (cuando se compara con los resultados del ensayo basado en células JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 con un $CI_{50} = 0,033 \mu\text{M}$). A partir de estos resultados, la relación JAK3/JAK2, la CI_{50} se determinó que era 28,5 veces, lo que demuestra que la 3-(4-cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina es un inhibidor selectivo de JAK2 respecto a JAK3.

25 Ensayo basado en células Ba/F3JAK2V617F - Cellomics ArrayScan® HCS

La inhibición de la diana JAK2 se ha evaluado en células Ba/F3 que expresan JAK2 V617F por transferencia Western como se describe en 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). Se estableció un rendimiento medio del ensayo Cellomis para evaluar la inhibición de la diana JAK2 en células Ba/F3 que expresan JAK2V617F. Este ensayo permite el descubrimiento de un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de trastornos asociados con la mutación JAK2V617F.

35 Las células Ba/F3 (pro-B murina) que expresan JAK2V617F se mantuvieron en medio RPMI 1640 con FBS 10%, bicarbonato sódico 0,07%, piruvato sódico 1 mM, 1x antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA) y glucosa 45% (Sigma, St Louis, MO). Las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO_2 . El compuesto de ensayo se prepara con 100% de DMSO a una concentración de 10 mM. El compuesto se diluye en serie 1:3 con 100% de DMSO en un intervalo de concentración-respuesta 200x-10 puntos (4 mM-200 nM). En otra placa profunda de 96 pocillos se añaden 2,5 µl de solución de compuesto de 200x a 125 µl de medios RPMI 1640 completos con FBS 10% para una placa con compuesto a una concentración 4x.

40 Para realizar el ensayo, se recogen las células y se lavan dos veces con medio RPMI 1640 sin suplementar. Las células se suspenden en medio RPMI completo con FBS al 10% para una concentración final de 4×10^5 células/ml. A continuación, se transfieren 500 µl de células (2×10^5 células) a placas de 96 pocillos profundos. Finalmente se añaden a las células 2,5 µl (dilución 1:200) de solución madre del compuesto y se incuban con las células en un baño a 37°C durante 60 min.

45 Después del tratamiento de las células, se añade a cada pocillo 500 µl de solución de formaldehído al 1% (recién preparada con solución salina con tampón (PBS) y mantenida caliente a 37°C). Las placas se sellan y se invierten 8-10 veces para mezclar. Las placas se colocan en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Después de la incubación, las placas se centrifugan a 1200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se aspira, dejando 100 µl de células (2×10^5 células). Las células se mezclan en vórtice y se lavan dos veces con 800 µl de PBS repitiendo los pasos de centrifugación y dejando 100 µl que contenían $\sim 2 \times 10^5$ células después del lavado final. Se añade a las células una parte alícuota de 800 µl de metanol frío al 90% y se colocan a -20°C durante la noche. Las placas se centrifugan y el metanol se elimina. Las células se lavan con tampón FACS (PBS con FBS 5% y azida sódica 0,02%). Se añade a las células una parte alícuota de 200 µl de dilución 1 a 10 de anti-pSTAT5 (pY694) de ratón Alexa Fluor 647® en tampón para clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células se mezclan bien y se incuban a TA ambiente en la oscuridad durante 2 h. Las células se lavan una vez con PBS y se dejan 100 µl de células. Se prepara con PBS una solución de trabajo de Hoechst 2 µg/ml (Acros Organics, Morris Plains, NJ). Se añade una parte alícuota de 200 µl a cada pocillo y las células se incuban a TA en la oscuridad durante 10 min. Las células se lavan con PBS y se añaden a las células 50 µl de Cytifix® (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se transfieren a placas de cultivo negro de tejido de 96 pocillos y se sellan. Las placas se centrifugan. Se recogen los datos de la media de la intensidad fluorescente y se analizan mediante Cellomics ArrayScan® VTi. El tratamiento con el compuesto se compara con el vehículo para determinar los datos de porcentaje de inhibición. La CI_{50} relativa se calcula utilizando un análisis logístico con ajuste de curva de 4 parámetros con ActivityBase 4,0. Para la 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-

(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina, la $CI_{50} = 0,03 \mu\text{M}$. Los resultados de este ensayo demuestran que la 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina inhibe eficazmente la diana JAK2V617F en células Ba/F3 que expresan el gen JAK2V617F.

5 Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por una variedad de vías. Más preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procedimientos para la preparación de las mismas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, et al, eds, 19^a ed, Mack Publishing Co., 1995).

10 Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg de dosis diaria total, preferiblemente de 500 mg a 1000 mg de dosis diaria total, más preferiblemente de 600 mg a 1000 mg de dosis diaria total. En algunos casos, niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden utilizar dosis aún mayores. El intervalo de dosis anterior no se pretende que limite el alcance de la invención de ninguna manera. Se entenderá que la cantidad del compuesto realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso y respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es la 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es el clorhidrato de 3-(4-Cloro-2-fluorobencil)-2-metil-N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)-8-(morfolinmetil)imidazo[1,2-b]piridazin-6-amina.
4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del glioblastoma, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de próstata y leucemias, leucemia linfoblástica aguda de estirpe T y estirpe B, síndrome mielodisplásico y trastornos mieloproliferativos.
- 15 7. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos crónicos.