

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 019554

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.04.30

(21) Номер заявки
201170831

(22) Дата подачи заявки
2009.12.08

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/5025 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) АМИНОПИРАЗОЛЬНОЕ СОЕДИНЕНИЕ

(31) 61/122,854

(32) 2008.12.16

(33) US

(43) 2011.12.30

(86) PCT/US2009/067056

(87) WO 2010/074947 2010.07.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Беркхолдер Тимоти Пол, Клэйтон
Джошуа Райан, Ма Ляньдун (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A-2007044426
US-A1-2007083044
WO-A-2007009773

(57) В изобретении предложены аминопиразольные соединения, подходящие для лечения хронических миелопролиферативных нарушений и различных видов рака, например глиобластомы, рака груди, множественной миеломы, рака простаты и лейкоemий.

019554 B1

019554 B1

019554

B1

Янус-киназа 2 (JAK2) является представителем семейства тирозинкиназ, участвующих в передаче цитокиновых сигналов. JAK2 играет ключевую роль в сигнальном пути эритропоэтина (ЕРО), включающем дифференциацию эритроцитов и активацию Stat5. Недавние исследования показали, что у пациентов, страдающих хроническими миелопролиферативными нарушениями, такими как истинная полицитемия, первичный тромбоцитоз и миелосклероз с миелоидной метаплазией и тромботическими нарушениями, такими как резистентность к активированному протеину С, тромбоз вен внутренних органов, синдром Бадда-Киари и тромбоз воротной вены, часто имеются приобретенные активирующие мутации в JAK2. Мутация, а именно замена аминокислоты валин на фенилаланин в положении 617, приводит к конститутивному возросшему уровню фосфорилирования тирозина согласно неизвестному механизму. Конститутивная активность мутантной JAK2 приводит к увеличению уровней транскрипционной активности фосфорилированной JAK2, pSTAT5 и STAT5, что приводит к патогенезу миелопролиферативных нарушений и лейкозий, таких как атипичная хроническая миелоидная лейкозия. Кроме того, JAK2 активируется интерлейкин-6-зависимой аутокринной петлей или другими генетическими изменениями в солидных и гематологических опухолях, например, при глиобластоме, раке груди, множественной миеломе, раке простаты, первичной и вторичной острой миелоидной лейкозии, Т-линейной и В-линейной острой лимфобластной лейкозии и миелодиспластическом синдроме.

Были описаны различные аминокипразольные ингибиторы тирозинкиназ. См., например, WO06087538 и WO2007064797.

Тем не менее, по-прежнему существует потребность в дополнительных соединениях, ингибирующих тирозинкиназы, такие как JAK2. В настоящем изобретении предложено новое аминокипразольное соединение, которое, как считается, может быть клинически применено для лечения миелопролиферативных нарушений, при которых активируется сигнальный путь JAK2 или происходят нарушения регуляции сигнального пути JAK/STAT.

В настоящем изобретении предложен 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

В настоящем изобретении предложен способ лечения хронических миелопролиферативных нарушений, выбранных из группы, состоящей из истинной полицитемии, первичного тромбоцитоза и миелосклероза с миелоидной метаплазией у млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в указанном лечении, эффективного количества 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения глиобластомы, рака груди, множественной миеломы, рака простаты и лейкозий, таких как атипичная хроническая миелоидная лейкозия, первичная и вторичная острая миелоидная лейкозия, Т-линейная и В-линейная острая лимфобластная лейкозия, миелодисплазия, а также миелопролиферативных нарушений у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в указанном лечении, эффективного количества 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

В настоящем изобретении также предложен 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель в комбинации с другим терапевтическим ингредиентом. В настоящем изобретении также предложен 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения для применения в качестве лекарственного средства. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложено применение 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения для получения лекарственного средства для лечения хронических миелопролиферативных нарушений. В частности, указанные хронические миелопролиферативные нарушения выбраны из группы, состоящей из истинной полицитемии, первичного тромбоцитоза и миелосклероза с миелоидной метаплазией. Далее, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для лечения хронических миелопролиферативных нарушений, выбранных из группы, состоящей из истинной полицитемии, первичного тромбоцитоза и миелосклероза с миелоидной метаплазией, содержащая 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения в качестве активного ингредиента.

Специалисту в данной области техники понятно, что соединение согласно настоящему изобретению способно образовывать соли. Соединение согласно настоящему изобретению представляет собой

амин и, соответственно, реагирует с любой из числа неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты. Такие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот и общая методика получения указанных солей известны в данной области техники. См., например, 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, в "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.

Следующие соединения примеров получения и примеров названы при помощи ChemDraw Ultra, Версия 10.0.

Схема 1

Пример получения. 1-(4-Метоксибензил)-5-метил-1H-пиразол-3-амин.

Способ 1.

В круглодонной колбе вместимостью 1 л смешивали 5-амино-3-метилпиразол (22,8 г, 234,8 ммоль) и N-метилпирролидон (200 мл). Колбу охлаждали до 0°C и помещали в атмосферу азота. К содержимому колбы добавляли гидроксид натрия (9,39 г, 1,0 экв.) и перемешивали в течение 30 мин. Затем к содержимому колбы по каплям добавляли раствор альфа-хлор-4-метокситолуола (31 мл, 1,0 экв.) в N-метилпирролидоне (100 мл). Реакционную смесь оставляли на ночь для медленного нагревания до комнатной температуры. Затем реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водным раствором хлорида натрия. Концентрировали под вакуумом. Очищали на колонке с силикагелем (гексан → 2:1 гексан:этилацетат → 3:2 гексан:этилацетат → 1:1 гексан:этилацетат → 1:2 гексан:этилацетат → этилацетат). Концентрировали требуемые фракции, получая соединение, указанное в заголовке (10,8 г, 21%). Жидкостная хроматомакс-спектрометрия (4 мин.) = 218,0 (M+1).

Способ 2.

А. (Е)-трет-Бутил-2-(4-метоксибензилиден)-гидразинкарбоксилат.

В течение 20 мин добавляли 4-метоксибензальдегид (400 г, 2,94 моль) к раствору трет-бутилкарбазата (400 г, 2,94 моль) в толуоле (750 мл) при 50°C. Нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч, собирая воду в азеотропную смесь с толуолом. После того, как сбор воды прекращался, охлаждали смесь до 60°C. Добавляли гексаны до тех пор, пока продукт не выпадал в осадок. Сосуд охлаждали до 20°C. Твердые вещества собирали путем фильтрования и высушивали в атмосфере азота, получая соединение, указанное в заголовке (750,5 г, 91%). ¹H ЯМР [400 МГц, диметилсульфоксид-d6 (ДМСО-d6)] δ 10,6-10,8 (ушир.с, 1H), 7,88-8,0 (с, 1H), 7,5-7,55 (д, 2H), 6,95-7,0 (д, 2H), 1,45 (с, 9H). ES/MS (m/z): 249 [M-H].

В. трет-Бутил-2-(4-метоксибензил)гидразинкарбоксилат.

В герметичный реактор, работающий под давлением, вносили 10% палладиевый катализатор на углеродном носителе (смоченный водой, 20 г), суспендированный в этилацетате (100 мл), при помощи вакуум-пересасывающего устройства. Промывали переходную линию минимальным количеством этилацетата. Вносили (Е)-трет-бутил-2-(4-метоксибензилиден)гидразинкарбоксилат (320 г, 1,28 моль), растворенный в тетрагидрофуране (ТГФ, 1000 мл), при помощи вакуум-пересасывающего устройства, и промывали линию минимальным количеством ТГФ. Повышали давление в реакторе до 50 фунтов на квадратный дюйм (344737,85 Па) при помощи H₂ и смешивали содержимое реактора при 20±10°C. Продолжали проведение реакции, поддерживая водородное давление на уровне 50 psi (345 кПа) до тех пор, пока не наблюдалось прекращение поглощения водорода. Фильтровали реакционный раствор для удаления катализатора и промывали фильтрационный осадок катализатора ТГФ (500 мл). Промытый фильтрационный осадок катализатора добавляли к фильтрату реакции. Концентрировали раствор под вакуумом, получая соединение, указанное в заголовке (337 г, 86%) в виде масла. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) δ 8,1-8,3 (с, 1H), 7,1-7,3 (д, 2H), 6,8-6,9 (д, 2H), 4,4-4,6 (ушир.с, 1H), 3,7-3,8 (с, 2H), 3,6-3,7 (с, 3H), 1,3-1,5 (с, 9H).

С. Дигидрохлорид (4-метоксибензил)гидразина.

К раствору 4н. хлорида водорода в диоксане (2000 мл, 8,00 моль HCl) медленно добавляли трет-бутил 2-(4-метоксибензил)гидразинкарбоксилат (324 г, 1,09 моль), растворенный в минимальном количестве диоксана, в течение 1 ч. Постепенно формировался осадок. Раствор оставляли для перемешивания на 16 ч при 20±5°C. Собирали твердые вещества с помощью фильтрования. Суспендировали твердые вещества в гептане (2000 мл) и выделяли путем фильтрования. Высушивали твердые вещества в атмосфере азота, получая соединение, указанное в заголовке (242,3 г, 1,08 моль, 98%). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) δ 8,2-9,0 (ушир.с, 5H), 7,3-7,4 (д, 2H), 6,8-7,0 (д, 2H), 4,0 (с, 2H), 3,7 (с, 3H).

Д. 1-(4-Метоксибензил)-5-метил-1H-пиразол-3-амин и 1-(4-метоксибензил)-3-метил-1H-пиразол-5-амин.

Смешивали трет-бутоксид калия (191,89 г, 1,71 моль) и ТГФ (2000 мл) при 22°C. Перемешивали до получения однородной смеси. Охлаждали до 5°C. Добавляли предварительно приготовленный раствор

ацетонитрила (84,25 г, 2,05 моль) и метилацетата (126,7 г, 1,71 моль) к раствору трет-бутоксид калия в течение 45 мин, поддерживая температуру ниже 10°C. После завершения добавления смесь оставляли для нагревания до 20±5°C и перемешивали в течение примерно 2 ч. К реакционной смеси порциями добавляли дигидрохлорид (4-метоксибензил)гидразина (250 г) в течение 5 мин, затем добавляли 4н. гидрохлорид в диоксане (262,5 г, 1,00 моль) с такой скоростью, чтобы температура оставалась на отметке <30°C. После завершения добавления смесь оставляли для перемешивания при 25±5°C на примерно 16 ч. Выделяли твердые вещества с помощью фильтрования и промывали ТГФ (500 мл). Перемешивали сырые твердые вещества в дихлорметане (ДХМ, 4 л) и воде (2 л), доводя pH до значения >10 при помощи 5н. NaOH. Оставляли слои для осаждения и собирали органическую фазу. Водную фазу промывали ДХМ (2 л). Органические слои объединяли и высушивали над безводным сульфатом натрия, затем концентрировали раствор до твердого состояния в вакууме, получая 165 г сырого вещества. Сырое вещество нагревали с обратным холодильником в изопропилацетате (660 мл) для растворения как можно большего числа твердых веществ. Охлаждали до 33°C и медленно добавляли гексан (600 мл) в течение 1 ч. Охлаждали до 10°C и оставляли при температуре 10°C на 10 мин. Твердые вещества отделяли при помощи фильтрования, промывали гексаном (200 мл) и высушивали в атмосфере азота с получением смеси соединений, указанных в заголовке (91,5 г, 0,4 моль, 47%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,2-7,3 (д, 2H), 6,7-6,9 (д, 2H), 5,1 (ушир.с, 2H), 5,0 (с, 1H), 4,9 (с, 2H), 3,6-3,8 (с, 3H), 1,9 (с, 3H).

Примечание: указанные промежуточные соединения можно разделить с помощью хроматографии, однако в данном случае их выделяют в виде смеси; их можно использовать в конечной последовательности, приведенной ниже, включающей удаление бензильной защитной группы, что приводит к получению того же продукта.

Пример получения 2. 2-Хлор-1-(4-хлор-2-фторфенил)этанол.

В круглодонной колбе вместимостью 1 л смешивали 4'-хлор-2'-фторацетофенон (40 г, 231,8 ммоль), гептан (120 мл) и метанол (16 мл). Смесь охлаждали до 0°C и помещали в атмосферу азота. Растворяли сульфурилхлорид (21,5 мл, 1,15 экв.) в гептане (120 мл) и помещали в капельную воронку, и затем добавляли по каплям к реакционной смеси в течение 60 мин. Перемешивали 2,5 ч при 0°C; за это время формировался белый осадок. В капельную воронку помещали 1 М бикарбонат натрия (400 мл), затем добавляли к реакционной смеси по каплям. После того как прекращалось газовыделение, двухфазную суспензию фильтровали, получая соединение, указанное в заголовке (38,18 г, 80%) в виде игольчатых кристаллов. ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 5,00 (д, 2H, J=2,5 Гц), 7,43 (м, 1H), 7,63 (м, 1H), 7,89 (т, 1H, J=8,4 Гц).

Пример получения 3. (E)-N'-(6-Хлорпиридазин-3-ил)-N,N-диметилацетимидаид.

В круглодонной колбе вместимостью 2 л смешивали 3-хлор-6-пиридазинамин (43,2 г, 333,5 ммоль), толуол (500 мл) и N,N-диметидацетамид диметилацеталь (67,8 мл, 1,25 экв.). К колбе присоединяли обратный холодильник и нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Оставляли для охлаждения до комнатной температуры. Концентрировали под вакуумом. Измельчали неочищенное вещество в порошок с гексанами и фильтровали, получая соединение, указанное в заголовке (60,4 г, 91%) в виде светло-коричневого твердого соединения. MS = 199,0 (M+1).

Пример получения 4. (4-Хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-3-ил)метанол.

В круглодонной колбе смешивали (E)-N'-(6-хлорпиридазин-3-ил)-N,N-диметилацетимидаид (36,61 г, 184,3 ммоль), 2-хлор-1-(4-хлор-2-фторфенил)этанол (38,15 г, 1 экв.) и диметилформамид (150 мл). Помещали в атмосферу азота, затем нагревали до 120°C в течение 4 ч. Оставляли для охлаждения до комнатной температуры и затем для перемешивания в течение ночи. Разбавляли этилацетатом (1 л) и водой (500 мл). Три раза экстрагировали органические вещества при помощи воды, затем при помощи насыщенного водного раствора хлорида натрия. Органические вещества высушивали над безводным сульфатом магния. Фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очищали на колонке с силикагелем (гексан → 4:1 гексан:этилацетат → 3:1 гексан:этилацетат → 2:1 гексан:этилацетат → 1:1 гексан:этилацетат), получая соединение, указанное в заголовке (33,8 г, 57%) в виде светло-зеленого твердого вещества. Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (4 мин. = 324,0, 326,0, M+1).

Пример получения 5. 2-((6-Хлор-3-(4-хлор-2-фторбензоил)-2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-8-ил)метил)изоиндолин-1,3-дион.

Смешивали (4-хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-3-ил)метанол (5,6 г, 17,3 ммоль), N-фталойлглицин (6,0 г, 1,7 экв.), ацетонитрил (60 мл), воду (15 мл), трифторуксусную кислоту (0,26 мл, 0,2 экв.) и нитрат серебра (294 мг, 0,1 экв.) в круглодонной колбе с присоединенной капельной воронкой и помещали смесь в атмосферу азота. Нагревали до 70°C и оставляли при этой температуре на 15 мин. Растворяли персульфат аммония (7,1 г, 1,8 экв.) в воде (15 мл) и помещали в капельную воронку. Добавляли по каплям в реакционную колбу в течение примерно 20 минут. Нагревали реакционную смесь при 70°C в течение 1 ч. За это время формировался осадок; фильтровали при помощи воронки Бюхнера, получая неочищенное соединение, указанное в заголовке (7,3 г, 87%), в виде грязно-белого твердого соединения. Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (4 мин) = 483,0, 485,0, M+1.

Пример получения 6. (8-(Аминометил)-6-хлор-2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-3-ил)(4-хлор-2-фторфенил)метанол.

Смешивали 2-((6-хлор-3-(4-хлор-2-фторбензоил)-2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-8-ил)метил)изоиндолин-1,3-дион (7,30 г, 15,1 ммоль), этанол (200 мл) и гидразин (1,45 мл, 3 экв.) в круглодонной колбе и помещали в атмосферу азота. Перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре. Нагревали в течение 2 ч при 50°C, затем концентрировали реакционную смесь под вакуумом. Разбавляли этилацетатом. Промывали органические вещества 1н. HCl (вод.) для того, чтобы происходила вытяжка продукта в водный слой. Затем водный слой делали основным, добавляя 1н. NaOH (вод.), и экстрагировали продукт этилацетатом. Промывали этилацетат насыщенным водным раствором хлорида натрия и высушивали над безводным сульфатом магния. Фильтровали и концентрировали под вакуумом, получая неочищенное соединение, указанное в заголовке (1,2 г, 23%) в виде светло-зеленого твердого вещества. МС = 355,0, 353,0 (M+1).

Пример получения 7. (4-Хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метил-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)метанол.

Смешивали (8-(аминометил)-6-хлор-2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)(4-хлор-2-фторфенил)метанол (1,15 г, 3,3 ммоль), воду (12 мл), карбонат калия (495 мг, 1,1 экв.) и 2-бромэтиловый эфир (0,47 мл, 1,1 экв.) в 20 мл микроволновом реакторе. Закрывали винтовой крышкой, затем нагревали в микроволновом реакторе при 120°C в течение 20 мин. Охлаждали до комнатной температуры и разделяли между этилацетатом и водой. Этилацетатный слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия и высушивали над безводным сульфатом натрия. Фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очищали на колонке с силикагелем (4:1 гексан:этилацетат → 2:1 гексан:этилацетат → 1:1 гексан:этилацетат), получая соединение, указанное в заголовке (0,43 г, 31%), в виде светло-желтой пены. Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (4 мин) = 423,0, 425,0, M+1.

Пример получения 8. (4-Хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метил-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)метанол.

Смешивали (4-хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метил-8-(морфолинометил)-имидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)метанол (0,43 г, 1,0 ммоль) и метанол (15 мл) в круглодонной колбе. Помещали в атмосферу азота и охлаждали до 0°C. Добавляли одну порцию боргидрида натрия (58 мг, 1,5 экв.). Перемешивали в течение 5 мин при указанной температуре, затем удаляли охлаждающую ванну и оставляли для нагревания до комнатной температуры. Спустя 15 мин гасили реакционную смесь водой, затем экстрагировали этилацетатом. Органические вещества промывали водой, затем насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органические вещества высушивали над безводным сульфатом магния. Фильтровали и концентрировали под вакуумом, получая соединение, указанное в заголовке (0,4 г, 93%). Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (4 мин) = 425,0, 427,0, M+1.

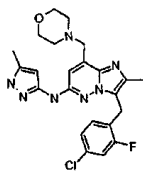
Пример получения 9. 4-((6-Хлор-3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-8-ил)метил)морфолин.

Смешивали (4-хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метил-8-(морфолинометил)-имидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)метанол (0,4 г, 0,94 ммоль), 1,2-дихлорэтан (25 мл), триэтилсилан (0,45 мл, 3 экв.) и трифторуксусную кислоту (0,57 мл, 8 экв.) в круглодонной колбе и помещали в атмосферу азота. Нагревали при 70°C в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь под вакуумом. Загружали 10-граммовый SCX ионообменный картридж (предварительно промытый метанолом) в Varian MegaElut®. Элюировали метанолом для удаления неосновных примесей. Элюировали 2 М аммиаком в метаноле. Концентрировали под вакуумом, получая соединение, указанное в заголовке (0,36 г, 94%). Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (4 мин) = 409,0, 411,0, M+1.

Пример получения 10. 3-(4-Хлор-2-фторбензил)-N-(1-(4-метоксибензил)-5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-2-метил-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-амин.

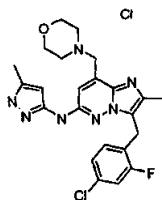
Смешивали 4-((6-хлор-3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-8-ил)метил)морфолин (0,36 г, 0,88 ммоль), 1-(4-метоксибензил)-5-метил-1Н-пиразол-3-амин (0,248 г, 1,3 экв.), карбонат калия (0,30 г, 2,5 экв.), 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен (0,076 г, 0,15 экв.), воду (2 мл) и 1,4-диоксан (20 мл) в круглодонной колбе. Тщательно дегазировали азотом, затем добавляли бис(дибензилиденацетон)палладий (0,10 г, 0,2 экв.). К колбе присоединяли обратный холодильник и помещали в атмосферу азота. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение ночи, затем пропускали через цеолитовый фильтр. Фильтр промывали этилацетатом. Реакционную смесь переносили в делительную воронку и промывали водой. Органический слой промывали водным хлоридом натрия, затем высушивали над безводным сульфатом магния. Фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очищали на колонке с силикагелем (этилацетат → 10% метанол:этилацетат), получая соединение, указанное в заголовке (0,447 г, 86%), в виде бледно-желтого твердого вещества. Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (4 мин) = 590,2, 591,2, M+1.

Пример 1. 3-(4-Хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-амин



Смешивали 3-(4-хлор-2-фторбензил)-N-(1-(4-метоксибензил)-5-метил-1H-пиразол-3-ил)-2-метил-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-амин (0,447 г, 0,76 ммоль) и трифторуксусную кислоту (10 мл) в 20 мл трубе микроволнового реактора. Закрывали винтовой крышкой, затем нагревали в микроволновом реакторе при 120°C в течение 20 мин. Разделяли реакционную смесь между этилацетатом и водой, которая приобрела основную реакцию при избытке водного NaOH. Три раза отмывали органическую фазу водным NaOH, затем насыщенным водным раствором хлорида натрия. Высушивали над безводным сульфатом магния. Фильтровали и концентрировали под вакуумом. Очищали на колонке с силикагелем (этилацетат → 10% метанол:этилацетат), получая соединение, указанное в заголовке (0,246 г, 0,52 ммоль) в виде бледно-желтого твердого вещества. Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (8 мин) = 470,0, M+1.

Пример 2. Гидрохлорид 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-амин



Смешивали 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-амин (0,1 г, 0,21 ммоль) и 1,4-диоксан (10 мл) в грушевидной колбе и помещали в атмосферу азота. Добавляли гидрохлорид (4М в 1,4-диоксане, 0,053 мл, 1,0 экв.) и оставляли для перемешивания при комнатной температуре на 1,5 ч. Концентрировали под вакуумом, затем дважды выпаривали под вакуумом из абсолютного этанола. Высушивали в течение ночи в вакуумной печи (60°C), получая соединение, указанное в заголовке (0,11 г, 102%). Жидкостная хроматомасс-спектрометрия (8 мин) = 470,0, M+1.

Схема 2

Пример получения 11. (Е)-N'-(6-хлорпиридазин-3-ил)-N,N-диметилацетимидамид.

Смешивали 6-хлорпиридазин-3-амин (1,500 кг, 11,58 моль), 1,1-диметокси-N,N-диметилацетамин (2,313 кг, 17,37 моль) и циклопентилметилэфир (8,25 л), затем нагревали смесь до 98°C, отгоняя получающийся побочный продукт метанола. Через 4 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли к реакционному раствору гептаны (11,2 л) для кристаллизации продукта. Соединение, указанное в заголовке, собирали при помощи фильтрации и высушивали. (1,494 кг, 64,95%; т.пл. = 73°C).

Пример получения 12. 2-Хлор-1-(4-хлор-2-фторфенил)этанон.

Перемешивали смесь гептанов (1,5 л), метанола (0,4 л) и 1-(4-хлор-2-фторфенил)этанона (1 кг, 5,81 моль), охлаждая при этом до <5°C. В смесь по каплям вносили сульфурилхлорид (0,608 л, 1,02 кг, 7,55 моль) в виде раствора гептанов (1,5 л), поддерживая при этом температуру реакции <15°C. Спустя 2 ч реакционную смесь гасили гидроксидом натрия (5н, 2,0 л) до pH, равного 6, при комнатной температуре. Экстрагировали реакционную смесь метиленхлоридом (2 л) и концентрировали экстракт, получая белое твердое вещество. Фильтровали и высушивали твердое вещество.

Пример получения 13. (4-Хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)метанон.

Смешивали 2-хлор-1-(4-хлор-2-фторфенил)этанон (1,5 кг, 5,44 моль) и (Е)-N'-(6-хлорпиридазин-3-ил)-N,N-диметилацетимидамид (1,19 кг, 5,72 моль) в диметилформамиде (ДМФ) (10,14 л) и нагревали при 120°C в течение 5 ч. После охлаждения добавляли воду (30 л) и перемешивали для кристаллизации продукта. Продукт собирали путем фильтрования и промывали осадок водой (2×12 л) и гептанами (2×10 л), затем высушивали под вакуумом, получая соединение, указанное в заголовке (1,490 кг, 84,44%; т.пл. = 160°C, M+ = 324).

Пример получения 14. (4-Хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метил-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил)метанон.

В реакционный сосуд в атмосфере азота вносили этанол (12 л), (4-хлор-2-фторфенил) (6-хлор-2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-3-ил) метанон (897,70 г, 2,77 моль) и бис(2,4-пентандионат)оксованадий (IV) (146,81 г, 553,67 ммоль). По каплям добавляли этанольный раствор (6 л) 4-метилморфолин-4-оксида (3,89 кг, 33,21 моль) в течение 150 мин, поддерживая температуру реакции на уровне 22-23°C, затем на-

гревали реакционную смесь при 40°C в течение 48 ч. Охлаждали реакционную смесь и концентрировали ее путем удаления растворителя (13 л). Получившуюся смесь фильтровали, промывали остаток на фильтре гексаном (1 л) и высушивали его. (728 г, 66,25%; т.пл. 145-147°C; M+ = 423).

Пример получения 15. Гидрохлорид 4-((6-хлор-3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-8-ил)метил)морфолина.

При 26°C смешивали триэтилсилан (110 г, 946 ммоль) и (4-хлор-2-фторфенил)(6-хлор-2-метил-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-3-ил)метанон (50,1 г, 117,06 ммоль) с получением раствора. К реакционной смеси добавляли трифторуксусную кислоту (150 мл, 1,98 моль), затем нагревали смесь при 78°C в течение 24 ч. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и разделяли смесь, удаляя верхний слой. Нижний слой растворяли в этилацетате (1 л) и доводили pH до 11 при помощи гидроксида натрия (4н, 500 мл). Отделяли органический слой и добавляли к нему HCl (4М в этиловом эфире), получая соль соляной кислоты, которую затем фильтровали и высушивали. (100 г (96%); т.пл. = 237-238°C; M+ = 409).

Пример получения 16. Гидрохлорид и свободное основание 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин.

Получали активный катализатор путем смешивания хлорида палладия (160 мг, 0,90 ммоль) и 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантена (1,10 г, 1,84 ммоль) в ДМФ (25 мл) и нагревания с образованием раствора. Заранее приготовленный катализатор добавляли к раствору 3-метил-1Н-пиразол-5-амин (3,0 г, 29,65 ммоль), гидрохлорида 4-((6-хлор-3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-8-ил)метил)морфолина (9,0 г, 20,19 ммоль), бикарбоната калия (6,0 г, 59,93 ммоль) в ДМФ (65 мл) и нагревали до 150°C в течение 1 ч. Охлаждали реакционную смесь до 60°C, и добавляли диоксид кремния, функционализированный меркаптопропилом (500 мг), и перемешивали в течение 1 ч, затем фильтровали для удаления диоксида кремния. Охлаждали до комнатной температуры, добавляли 2-метилтетрагидрофуран (125 мл) и экстрагировали водой для удаления ДМФ. Добавляли к органическому раствору HCl для получения гидрохлоридной соли 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин. Добавляли гидрохлоридную соль (1,1 г) к гидроксиду натрия (10 мл, 1н) в н-бутаноле (10 мл) и перемешивали. Получившуюся смесь фильтровали, получая 0,22 г свободного основания, имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин, 3-[(4-хлор-2-фторфенил)метил]-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(4-морфолинометил), (выход 22%, M+1 = 470).

Пример 3. Композиция 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин. Необязательно пропускали 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин и наполнители через подходящее сито. Соединяли и смешивали 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин, прежелатинизированный крахмал и прежелатинизированный крахмал с 5% содержанием диметикона с использованием подходящей емкости для смешивания (с устройством для интенсификации перемешивания или без него) или другого подходящего оборудования для смешивания. В другом варианте добавляли диметикон во время смешивания с помощью системы ввода жидких добавок. Смешанным порошком наполняли капсулы с использованием подходящего оборудования для инкапсуляции. Контролировали однородность по массе и соответствующие технологические параметры во время процесса наполнения. Необязательно удаляли пыль из конечных капсул или полировали вручную или автоматически. Клеточный анализ JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 - Cellomics ArrayScan® HCS.

Клеточный анализ JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 имитирует конститутивную активацию JAK2-STAT5 в эритроидных клетках-предшественниках, запускающую избыточное производство красных кровяных телец, что является характерным признаком истинной полицитемии (PV).

Клетки TF-1 (эритроидная лейкемия человека) культивировали в среде RPMI 1640 (среда RPMI-1640 была разработана Муром с соавторами (Moore et. al.) в Мемориальном институте Розуэлла Парка (Roswell Park Memorial Institute). Композиция основана на серии сред RPMI-1630, в которых применяется бикарбонатная буферная система и меняющиеся количества аминокислот и витаминов) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 0,075% бикарбонатом натрия, 1 мМ пируватом натрия, 1-крат. антибиотиком/фунгицидом (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,45% глюкозой. Среду дополняли GM-CSF (гранулоцитарно-моноцитарный колоннестимулирующий фактор) в конечной концентрации 2 нг/мл. Клетки содержали при 37°C с 5% содержанием CO₂. Клетки выращивали на бессывороточной среде для устранения внутренних факторов роста. Производили подсчет клеток TF-1, затем их сбор для высевания в количестве 2×10⁷ на 96-луночные планшеты с плотностью 2×10⁵ клеток на лунку. Клетки дважды промывали средой RPMI 1640 без добавок (RPMI 1640 с 0,075% бикарбонатом натрия, 1 мМ пируватом натрия, 1-крат. антибиотиком/фунгицидом и 0,45% глюкозой) перед тем как суспендировать клетки в конечной концентрации 5×10⁵ клеток/мл в RPMI с 0,6% FBS. Разбавленные клетки помещали обратно в колбы с тканевой культурой и инкубировали в течение ночи при 37°C. Исследуемые соединения приготавливали в 100% ДМСО при концентрации 10 мМ.

Соединения серийно разбавляли 100% ДМСО в пропорции 1:3 в диапазоне концентрация-ответ 10-

крат. - 200-крат. (4 мМ-200 нМ). В отдельном 96-луночном планшете с глубокими лунками добавляли 2,5 мкл 200-крат. раствора соединения к 125 мкл полной среды RPMI 1640 с 10% FBS на 4-крат. концентрацию соединения в планшете.

Для проведения исследования производили сбор клеток, выращенных на бессывороточной среде, и один раз промывали средой RPMI 1640 без добавок. Клетки суспендировали в полной среде RPMI с 10% FBS до конечной концентрации 8×10^5 клеток/мл. Аликвоту 250 мкл разбавленных клеток (2×10^5 клеток) добавляли в каждую лунку в концентрации, в 4 раза превышающей концентрацию соединения в планшете. Клетки перемешивали с использованием вортекса, и планшеты инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 10 мин. Готовили свежий 4-крат. рабочий раствор эритропоэтина (EPO) в пропорции 6,4 ед./мл с использованием заранее нагретой полной среды RPMI 1640 с 10% FBS. После того как клетки обрабатывали соединением в течение 10 мин, в каждую лунку добавляли 125 мкл среды EPO, после чего содержимое планшета перемешивали с использованием вортекса. Клетки инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 20 мин и перемешивали каждые 5 мин за время инкубации. Конечный 10-кратный диапазон концентрация-ответ составлял 20 мМ-1 нМ при конечной концентрации ДМСО 0,5% и EPO 1,6 ед./мл. После обработки клеток в каждую лунку добавляли 500 мкл 1% раствора формальдегида (свежеприготовленного с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS) и содержащегося при 37°C). Лунки запечатывали и переворачивали 8-10 раз для перемешивания. Планшеты помещали в 37°C водяную баню на 10 мин. После инкубации планшеты с клетками центрифугировали на 1200 об./мин. в течение 5 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отделяли с помощью аспиратора, получая 100 мкл клеток (2×10^5 клеток). Клетки перемешивали с использованием вортекса и дважды промывали 800 мкл PBS, повторяя центрифугирование, и получая в итоге 100 мкл жидкости, содержащей $\sim 2 \times 10^5$ клеток, после последнего промывания. Аликвоту 800 мкл холодного 90% метанола добавляли к клеткам и оставляли при -20°C на ночь. Планшеты центрифугировали и удаляли из них метанол. Клетки промывали буфером FACS (PBS с 5% FBS и 0,02% азида натрия). К клеткам добавляли аликвоту 200 мкл 1-10-кратно разбавленного anti-pSTAT5 (pY694) Alexa Fluor 647® мыши в буфере флуоресцентной сортировки клеток (FACS). Клетки тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч. Клетки один раз промывали PBS, в результате чего оставалось 100 мкл клеток. Готовили рабочий раствор 2 мкг/мл Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) с помощью PBS. Аликвоту 200 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали клетки при комнатной температуре в темноте в течение 10 минут. Клетки промывали PBS, после чего добавляли к ним 50 мкл Cytofix (BD Biosciences, San Jose, CA). Клетки перемещали в 96-луночные черные планшеты для культур тканей и запечатывали. Планшеты центрифугировали. Производили сбор приблизительных данных о средней интенсивности флуоресценции и анализировали их при помощи Cellomics Arrayscan® VTi. Результаты обработки соединением сравнивали с результатами для носителя для определения процента ингибирования. Минимально значимое соотношение (MSR) между двумя тестовыми соединениями с разными значениями IC₅₀ составило 2,2. Для получения относительных значений IC₅₀ использовали четырехпараметрический логистический подбор кривой при помощи программного обеспечения ActivityBase 4.0. Для 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин IC₅₀=0,033 мкмоль, n=4. Результаты анализа показали, что 3-(4-хлорфторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1Н-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин является мощным ингибитором JAK2.

Клеточный анализ JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 - Cellomics ArrayScan® HCS

IL-2 активирует путь JAK3 в натуральных клетках-киллерах (NK), запуская пролиферацию NK и CD8-лимфоцитов. Таким образом, клеточный анализ IL-2-стимулированного NK92/pSTAT5 позволяет оценить клеточную активность JAK3 у JAK2-соединений *in vitro*.

Клетки NK-92 (натуральные киллеры) (ATCC, Manassas, VA) культивировали в минимально обогащенной среде (MEM) Alpha с 15% фетальной бычьей сывороткой, 15% лошадиной сывороткой и 1-крат. антибиотиком/фунгицидом (Invitrogen, Carlsbad, CA). Среду дополняли IL-2 (R&D systems, Minneapolis, MN) до конечной концентрации 4 нг/мл. Клетки содержали при 37°C с 5% содержанием CO₂. Клетки выращивали на бессывороточной среде для устранения внутренних факторов роста. Производили подсчет клеток NK-92, затем их сбор для высевания в количестве 2×10^7 на 96-луночные планшеты с плотностью 2×10^5 клеток на планшет. Клетки дважды промывали средой MEM Alpha без добавок (MEM Alpha) перед тем, как суспендировать клетки в конечной концентрации 8×10^5 клеток/мл в среде MEM Alpha с 0,6% сывороткой (0,3% FBS, 0,3% лошадиной сыворотки). Разбавленные клетки помещали обратно в колбы с тканевой культурой и инкубировали в течение ночи при 37°C. Исследуемые соединения готовили в 100% ДМСО при концентрации 10 ммоль. Соединения серийно разбавляли в пропорции 1:3 100% ДМСО в диапазоне концентрация-ответ 10-крат. - 200-крат. (4 ммоль -200 нмоль). В отдельном 96-луночном планшете с глубокими лунками добавляли 2,5 мкл 200-крат. раствора соединения к 125 мкл полной среды RPMI 1640 с 10% FBS на 4-крат. концентрацию соединения в планшете.

Для проведения исследования производили сбор клеток, выращенных на бессывороточной среде, и один раз промывали их средой RPMI 1640 без добавок. Клетки суспендировали в полной среде RPMI с 10% FBS до конечной концентрации 8×10^5 клеток/мл. Аликвоту 250 мкл разбавленных клеток (2×10^5

клеток) добавляли в каждую лунку в концентрации, в 4 раза превышающей концентрацию соединения в планшете. Клетки перемешивали с использованием вортекса, и планшеты инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 10 минут. Готовили свежий 4-крат. рабочий раствор IL-2 в пропорции 2 нг/мл с использованием заранее нагретой полной среды RPMI 1640 с 10% FBS. После того как клетки обрабатывали соединением в течение 10 мин, в каждую лунку добавляли 125 мкл среды IL-2. Клетки перемешивали с использованием вортекса. Затем клетки инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 20 минут, перемешивая их каждые 5 мин за время инкубации. Конечный 10-кратный диапазон концентрация-ответ составлял 20 мкмоль - 1 нмоль при конечной концентрации ДМСО 0,5% и IL-2 0,5 нг/мл. После обработки клеток в каждую лунку добавляли 500 мкл 1% раствора формальдегида (свежеприготовленного с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS) и содержавшегося при 37°C). Планшеты запечатывали и переворачивали 8-10 раз для перемешивания. Планшеты помещали в 37°C водяную баню на 10 мин. После инкубации планшеты с клетками центрифугировали на 1200 об./мин. в течение 5 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отсасывали с помощью аспиратора, получая 100 мкл клеток (2×10^5 клеток). Клетки перемешивали с использованием вортекса и дважды промывали 800 мкл PBS, повторяя центрифугирование, и получая в итоге 100 мкл жидкости, содержащей $\sim 2 \times 10^5$ клеток, после последнего промывания. Аликвоту 800 мкл холодного 90% метанола добавляли к клеткам и оставляли при -20°C на ночь. Планшеты центрифугировали и удаляли из них метанол. Клетки промывали буфером FACS (PBS с 5% FBS и 0,02% азида натрия). К клеткам добавляли аликвоту 200 мкл 1-10-кратно разбавленного anti-pSTAT5 (pY694) Alexa Fluor 647® мыши в буфере флуоресцентной сортировки клеток (FACS). Клетки тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч. Клетки один раз промывали PBS, в результате чего оставалось 100 мкл клеток. Готовили рабочий раствор 2 мкг/мл Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) с помощью PBS. Аликвоту 200 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали клетки при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Клетки промывали PBS, после чего добавляли к ним 50 мкл Cytofix® (BD Biosciences, San Jose, CA). Клетки перемещали в 96-луночные черные планшеты для культур тканей и запечатывали. Планшеты центрифугировали. Производили сбор приблизительных данных о средней интенсивности флуоресценции и анализировали их при помощи Cellomics Arrayscan® VTi. Сравнивали результаты обработки соединением с результатами для осителя для определения процента ингибирования. Минимально значимое соотношение (MSR) составило 2,06. Для получения относительных значений IC₅₀ использовали четырехпараметрический логистический подбор кривой при помощи программного обеспечения ActivityBase 4.0. Для 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин IC₅₀=0,94 мкМ, n=4. Результаты клеточного анализа JAK3 IL-2-NK-92-pSTAT5 показали, что 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин является менее мощным ингибитором JAK3 (при сравнении с результатами клеточного анализа JAK2 EPO-TFI/pSTAT5 со значением IC₅₀=0,033 мкмоль). Исходя из этих результатов, для соотношения JAK3/JAK2 значение IC₅₀ было определено как 28,5-кратное, что показывает, что 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо-[1,2-b]пиридазин-6-амин является селективным ингибитором JAK2, а не JAK3.

Клеточный анализ Ba/F3.JAK2V617F Cellomics ArrayScan® HCS

Целевое ингибирование JAK2 было оценено в клетках Ba/F3, экспрессирующих JAK2 V617F, путем вестерн-блоттинга, как сообщалось Вернигом с соавторами (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). Для оценивания целевого ингибирования JAK2 в клетках Ba/F3, экспрессирующих JAK2V617F, был проведен анализ производительности среды Cellomics. Данный анализ сделал возможным открытие эффективного терапевтического агента для лечения нарушений, связанных с мутацией JAK2V617F.

Клетки Ba/F3 (мышинные pro-B клетки), экспрессирующие JAK2V617F, культивировали в среде RPMI 1640 с 10% FBS, 0,07% бикарбонатом натрия, 1 mM пирувата натрия, 1-крат. антибиотиком/фунгицидом (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,45% глюкозой (Sigma, St Louis, MO). Клетки содержали при 37°C с 5% содержанием CO₂. Исследуемое соединение приготавливали в 100% ДМСО при концентрации 10 ммоль. Соединения серийно разбавляли в пропорции 1:3 100% ДМСО в диапазоне концентрация-ответ 10-крат. - 200-крат. (4 мМ - 200 нМ). В отдельном 96-луночном планшете с глубокими лунками добавляли 2,5 мкл 200-крат. раствора соединения к 125 мкл полной среды RPMI 1640 с 10% FBS на 4-крат. концентрацию соединения в планшете.

Для проведения исследования производили сбор клеток и один дважды промывали средой RPMI 1640 без добавок. Клетки суспендировали в полной среде RPMI с 10% FBS до конечной концентрации 4×10^5 клеток/мл. Далее, 500 мкл клеток (2×10^5 клеток) переносили в 96-луночные планшеты. Наконец, к клеткам добавляли 2,5 мкл (разбавление 1:200) исходного раствора соединения и инкубировали вместе с клетками в водяной бане при 37°C в течение 60 мин.

После обработки клеток в каждую лунку добавляли 500 мкл 1% раствора формальдегида (свежеприготовленного с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS) и содержавшегося при 37°C).

Планшеты запечатывали и переворачивали 8-10 раз для перемешивания. Планшеты помещали в 37°C водяную баню на 10 мин. После инкубации планшеты с клетками центрифугировали на 1200 об./мин. в течение 5 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отсасывали с помощью аспиратора, получая 100 мкл клеток (2×10^5 клеток). Клетки перемешивали с использованием вортекса и дважды промывали 800 мкл PBS, повторяя центрифугирование, и получая в итоге 100 мкл жидкости, содержащей $\sim 2 \times 10^5$ клеток, после последнего промывания. Аликвоту 800 мкл холодного 90% метанола добавляли к клеткам и оставляли при -20°C на ночь. Планшеты центрифугировали и удаляли из них метанол. Клетки промывали буфером FACS (PBS с 5% FBS и 0,02% азида натрия). К клеткам добавляли аликвоту 200 мкл 1-10-кратно разбавленного anti-pSTAT5 (pY694) Alexa Fluor 647® мыши в буфере флуоресцентной сортировки клеток (FACS). Клетки тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч. Клетки один раз промывали PBS, в результате чего оставалось 100 мкл клеток. Готовили рабочий раствор 2 мкг/мл Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) с помощью PBS. Аликвоту 200 мкл добавляли в каждую лунку и инкубировали клетки при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Клетки промывали PBS, после чего добавляли к ним 50 мкл Cytotfix® (BD Biosciences, San Jose, CA). Клетки перемещали в 96-луночные черные планшеты для культур тканей и запечатывали. Планшеты центрифугировали. Производили сбор приблизительных данных о средней интенсивности флуоресценции и анализировали их при помощи Cellomics Arrayscan® VTi. Сравнивали результаты обработки соединением с результатами для носителя для определения процента ингибирования. Для получения относительных значений IC_{50} использовали четырехпараметрический логистический подбор кривой при помощи программного обеспечения ActivityBase 4.0. Для 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин $IC_{50}=0,03$ мкМ. Результаты данного анализа демонстрируют, что 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин эффективно ингибирует мишень JAK2V617F в клетках Ba/F3, экспрессирующих ген JAK2V617F.

Соединения согласно настоящему изобретению предпочтительно входят в состав фармацевтических композиций, подходящих для введения различными путями. Наиболее предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, et al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995).

Соединения согласно настоящему изобретению эффективны в широких пределах дозирования. Например, суточные дозировки обычно составляют от примерно 1 мг до примерно 1000 мг общей суточной дозы, предпочтительно от 500 мг до 1000 мг общей суточной дозы, более предпочтительно от 600 мг до 1000 мг общей суточной дозы. В некоторых случаях более чем достаточными могут быть уровни дозирования ниже нижней границы вышеуказанного диапазона, тогда как в других случаях можно применять еще более высокие дозы. Вышеуказанный диапазон дозирования никоим образом не ограничивает объем настоящего изобретения. Следует понимать, что фактически вводимое количество соединения будет определять лечащий врач с учетом соответствующих обстоятельств, включая состояние, лечение которого проводят, выбранный путь введения, конкретное вводимое соединение или соединения, возраст, массу тела и ответ конкретного пациента, а также степень тяжести симптомов заболевания у пациента.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 3-(4-Хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

2. Соединение по п.1, представляющее собой 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин.

3. Соединение по п.1, представляющее собой гидрохлорид 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин.

4. Способ лечения хронических миелопролиферативных нарушений, выбранных из группы, состоящей из истинной полицитемии, первичного тромбоцитоза и миелосклероза с миелоидной метаплазией, у млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в указанном лечении, эффективного количества 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения.

5. Способ лечения глиобластомы, рака груди, множественной миеломы, рака простаты и лейкоемий, таких как атипичная хроническая миелоидная лейкомия, первичная и вторичная острая миелоидная лейкомия, Т-линейная и В-линейная острая лимфобластная лейкомия, миелодиспластического синдрома и миелопролиферативных нарушений у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в указанном лечении, эффективного количества 3-(4-хлор-2-фторбензил)-2-метил-N-(5-метил-1H-пиразол-3-ил)-8-(морфолинометил)имидазо[1,2-b]пиридазин-6-амин или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по пп.1, 2 или 3, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

7. Применение соединения по пп.1, 2 или 3 в качестве лекарственного средства.
8. Применение соединения по пп.1, 2 или 3 для лечения глиобластомы, рака груди, множественной миеломы, рака простаты и лейкозиев, Т-линейной и В-линейной острой лимфоцитарной лейкозиев, миелодиспластического синдрома и миелолиферативных нарушений.
9. Применение по п.8 для лечения хронических миелолиферативных нарушений.
10. Способ лечения патологических состояний, связанных с активностью мутантной JAK2, у пациента, который в этом нуждается, включающий введение указанному пациенту соединения по п.1, 2 или 3.

