



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1805748 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 200480016328.7

C07D 239/42 (2006.01)

(22) 申请日 2004.06.11

C07D 401/04 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07D 401/14 (2006.01)

60/478,709 2003.06.13 US

C07D 403/04 (2006.01)

C07D 417/04 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 31/506 (2006.01)

2005.12.12

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/EP2004/006317 2004.06.11

WO 02093164 A2, 2002.11.21, 第41页第1

(87) PCT申请的公布数据

行-第56页最后一行, 化合物8, 16-18, 21, 22, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 39, 46, 51-53, 55, 56, 73.

W02004/110452 EN 2004.12.23

WO 03022833 A1, 2003.03.20, 全文.

(73) 专利权人 诺瓦提斯公司

US 6180631 B1, 2001.01.30, 全文.

地址 瑞士巴塞尔

WO 0222597 A1, 2002.03.21, 第13页第3

(72) 发明人 D·B·巴特 T·M·拉姆齐

行-第21页倒数第8行, 第46页倒数第3行-第50页最后一行.

M·L·萨比奥

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

审查员 俞可嘉

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 31/505 (2006.01)

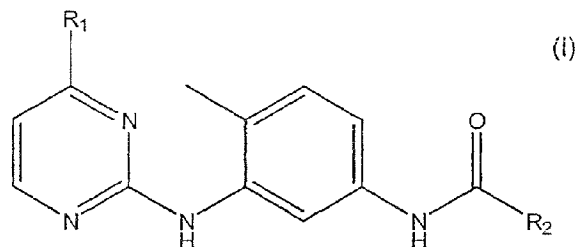
权利要求书 6 页 说明书 36 页

(54) 发明名称

作为 RAF 激酶抑制剂的 2-氨基嘧啶衍生物

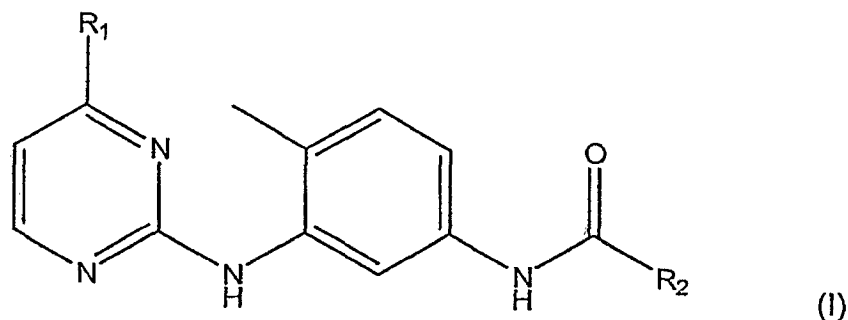
(57) 摘要

本发明公开了抑制 Raf 激酶的式 (I) 的化合物:



其中 R₁ 为苯基或杂芳基; 且 R₂ 为苯基; 或者其 N-氧化物或可药用的盐。所述化合物可用于治疗增殖性疾病, 例如癌症。

1. 式 (I) 的化合物：



其中：

R_1 选自被 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 或 $-S-R_8$ 取代的噻唑基、嘧啶基或吡啶基；

且

R_2 为苯基；

其中

R_5 、 R_6 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、 C_{1-7} 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基- C_{1-7} 亚烷基、被羟基、 C_{1-7} 烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基氨基取代的 C_{1-7} 烷基，或者 R_5 和 R_6 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

或者其 N-氧化物或可药用的盐。

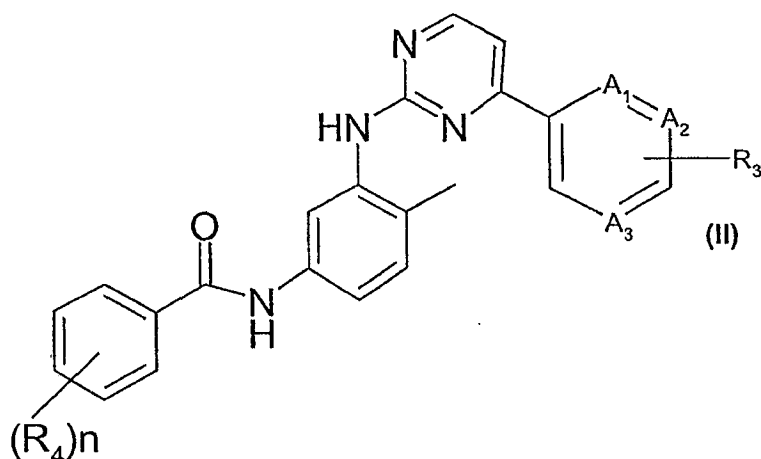
2. 权利要求 1 的化合物，其中 R_2 为至少在 3-位被以下基团取代的苯基：卤素，单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基； C_{1-7} 烷基；卤素- C_{1-7} 烷基； C_{1-7} 烷氧基；卤素- C_{1-7} 烷氧基； C_{1-7} 烷基硫基；或卤素- C_{1-7} 烷基硫基。

3. 权利要求 2 的化合物，其中 R_2 为至少在 3-位被氟、卤素- C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷氧基或卤素- C_{1-7} 烷基硫基取代的苯基。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R_1 为 2-噻唑基、5-嘧啶基或 3-吡啶基。

5. 权利要求 4 的化合物，其中 R_2 为至少在 3-位被氟、卤素- C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷氧基或卤素- C_{1-7} 烷基硫基取代的苯基。

6. 权利要求 1 的化合物，其为式 II 的化合物：



其中：

n 为 0、1 或 2；

A_1 和 A_2 为 C 且 A_3 为 N，或 A_1 为 C 且 A_2 和 A_3 为 N；

R_3 为 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 或 $-S-R_8$ ；

R_4 为氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或 C_{1-7} 烷氧基取代；卤素、 C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷基、 C_{1-7} 烷氧基、卤素- C_{1-7} 烷氧基、羟基、 C_{1-7} 烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、 C_{1-7} 烷硫基或卤素- C_{1-7} 烷硫基；

R_5 、 R_6 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、 C_{1-7} 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基- C_{1-7} 亚烷基、被羟基、 C_{1-7} 烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基氨基取代的 C_{1-7} 烷基，或者 R_5 和 R_6 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

或者其N-氧化物或可药用的盐。

7. 权利要求6的化合物，其中 R_2 为至少在3-位被以下基团取代的苯基：卤素，单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基； C_{1-7} 烷基；卤素- C_{1-7} 烷基； C_{1-7} 烷氧基；卤素- C_{1-7} 烷氧基； C_{1-7} 烷硫基；或卤素- C_{1-7} 烷硫基。

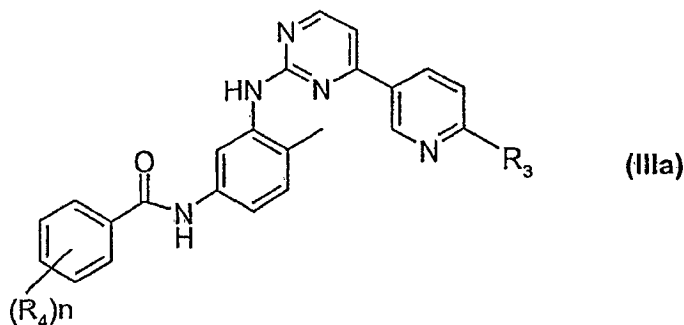
8. 权利要求1的化合物，其为式(III)的化合物：

14. 权利要求13的化合物，其中 $-NR_5R_6$ 为杂芳基或杂环基。

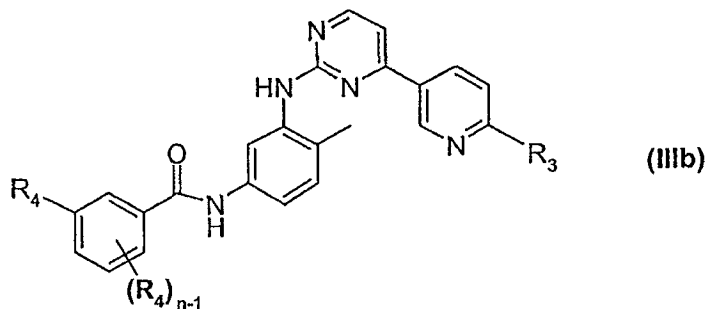
15. 权利要求14的化合物，其中 $-NR_5R_6$ 为选自哌嗪基、4-甲基哌嗪基、哌啶基、4-羟基哌啶基、吗啉代和硫吗啉代的杂芳基或杂环基。

16. 权利要求8的化合物，其中 R_8 为 C_{1-7} 烷基、被羟基或 C_{1-7} 烷氧基取代的 C_{1-7} 烷基或者杂芳基或杂环基。

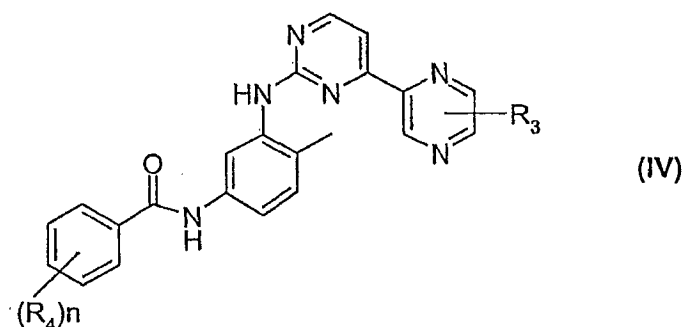
17. 权利要求8的化合物，其为式(IIIa)的化合物：



18. 权利要求8的化合物，其为式(IIIb)的化合物：



19. 权利要求6的化合物，其为式IV的化合物：



其中：

n 为 0、1 或 2；

R_3 为氢、 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 或 $-S-R_8$ ；

R_4 为氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或 C_{1-7} 烷氧基取代；卤素、 C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷基、 C_{1-7} 烷氧基、卤素- C_{1-7} 烷氧基、羟基、 C_{1-7} 烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或 N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、 C_{1-7} 烷硫基或卤素- C_{1-7} 烷硫基；

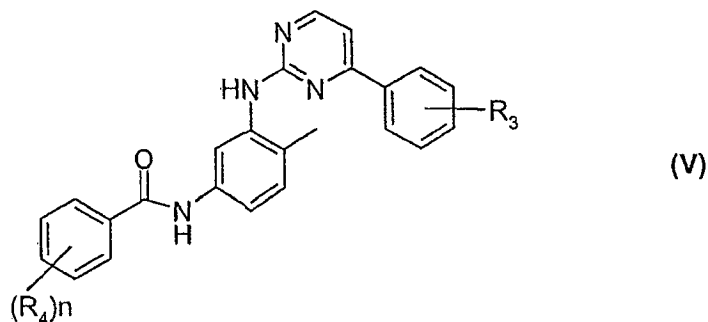
R_5 、 R_6 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、 C_{1-7} 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基- C_{1-7} 亚烷基、被羟基、 C_{1-7} 烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基氨基取代的 C_{1-7} 烷基，或者 R_5 和 R_6 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

或者其可药用的盐。

20. 权利要求 19 的化合物，其中 R_4 为卤素，单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基； C_{1-7} 烷基；卤素- C_{1-7} 烷基； C_{1-7} 烷氧基；卤素- C_{1-7} 烷氧基； C_{1-7} 烷硫基；或卤素- C_{1-7} 烷硫基。

21. 权利要求 20 的化合物，其中至少一个 R_4 取代基相对于羰基在间位。

22. 权利要求 6 的化合物，其为式 (V) 的化合物：

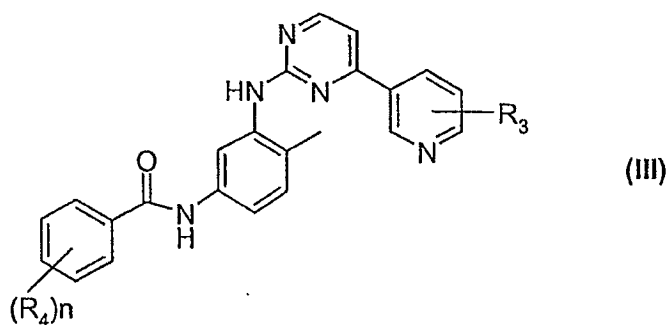


其中：

n 为 0、1 或 2；

R_3 为 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 或 $-S-R_8$ ；

R_4 为氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或 C_{1-7} 烷氧基取代；卤素、 C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷基、 C_{1-7} 烷氧基、卤素- C_{1-7} 烷氧基、羟基、 C_{1-7} 烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或 N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、 C_{1-7} 烷硫基或卤素- C_{1-7} 烷硫基；



其中：

n 为 0、1 或 2；

R_3 为 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 或 $-S-R_8$ ；

R_4 为氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或 C_{1-7} 烷氧基取代；卤素、 C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷基、 C_{1-7} 烷氧基、卤素- C_{1-7} 烷氧基、羟基、 C_{1-7} 烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或 N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、 C_{1-7} 烷硫基或卤素- C_{1-7} 烷硫基；

R_5 、 R_6 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、 C_{1-7} 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基- C_{1-7} 亚烷基、被羟基、 C_{1-7} 烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基氨基取代的 C_{1-7} 烷基，或者 R_5 和 R_6 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

或者其 N-氧化物或可药用的盐。

9. 权利要求 8 的化合物，其中 R_4 为卤素，单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基； C_{1-7} 烷基；卤素- C_{1-7} 烷基； C_{1-7} 烷氧基；卤素- C_{1-7} 烷氧基； C_{1-7} 烷硫基；或卤素- C_{1-7} 烷硫基。

10. 权利要求 9 的化合物，其中 R_4 为卤素- C_{1-7} 烷基、卤素- C_{1-7} 烷氧基或卤素- C_{1-7} 烷硫基。

11. 权利要求 8 的化合物，其中 R_4 为三氟甲基。

12. 权利要求 8 的化合物，其中 R_3 为 $-NR_5R_6$ ， R_5 和 R_6 之一为被 $-NR_7R_8$ 取代的 C_{1-7} 烷基，且 R_7 和 R_8 与氮一起形成杂芳基或杂环基。

13. 权利要求 12 的化合物，其中杂芳基或杂环基选自吗啉代、硫吗啉代、哌嗪基、哌啶基和吡啶基。

R_5 、 R_6 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、 C_{1-7} 烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基- C_{1-7} 亚烷基、被羟基、 C_{1-7} 烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二- C_{1-7} 烷基氨基取代的 C_{1-7} 烷基，或者 R_5 和 R_6 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

或者其可药用的盐。

23. 权利要求 22 的化合物，其中 R_4 为卤素，单-或二- C_{1-7} 烷基取代的氨基； C_{1-7} 烷基；卤素- C_{1-7} 烷基； C_{1-7} 烷氧基；卤素- C_{1-7} 烷氧基； C_{1-7} 烷硫基；或卤素- C_{1-7} 烷硫基。

24. 权利要求 23 的化合物，其中至少一个 R_4 取代基相对于羰基在间位。

25. 权利要求 1 所述的式 I 化合物在制备用于治疗患有以通过 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病的药物中的用途。

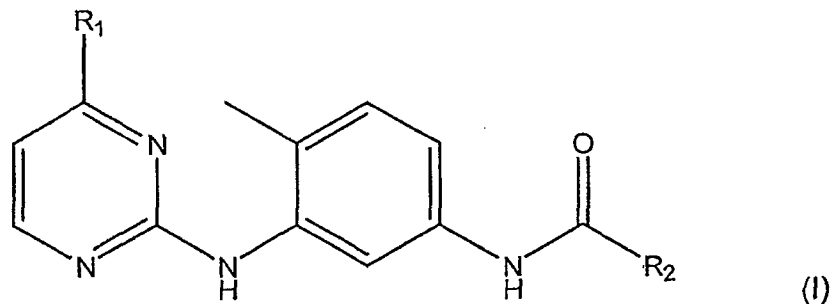
26. 权利要求 6 所述的式 II 化合物在制备用于治疗患有以通过 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病的药物中的用途。

27. 权利要求 8 所述的式 III 化合物在制备用于治疗患有以通过 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病的药物中的用途。

28. 权利要求 19 所述的式 IV 化合物在制备用于治疗患有以通过 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病的药物中的用途。

29. 权利要求 22 所述的式 V 化合物在制备用于治疗患有以通过 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病的药物中的用途。

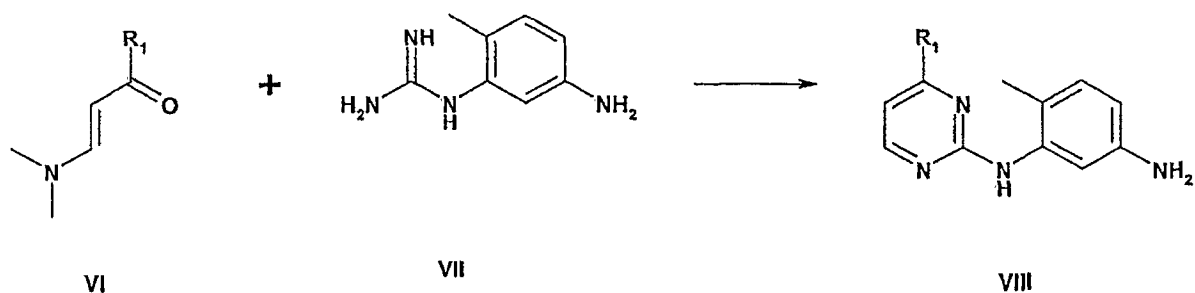
30. 制备权利要求 1 所定义的式 (I) 化合物或者其 N-氧化物或可药用盐的方法：



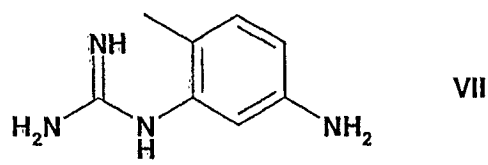
其中：

R₁ 和 R₂ 如权利要求 1 中所定义；

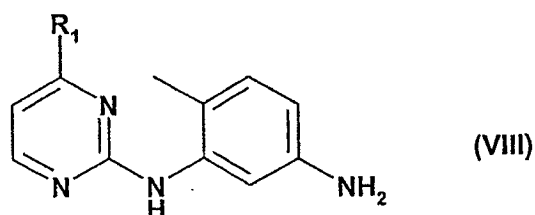
该方法包括按照以下流程图通过使式 VI 化合物与式 VII 化合物反应制备式 VIII 化合物：



31. 式 VII 的化合物：

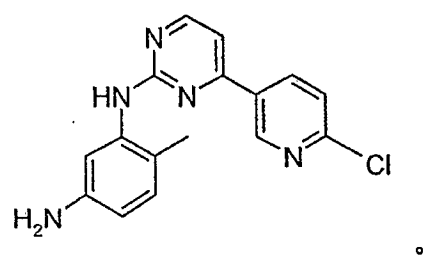


32. 式 VIII 的化合物：



其中 R_1 如权利要求 1 中所定义。

33. 下式的化合物：



作为 RAF 激酶抑制剂的 2- 氨基嘧啶衍生物

[0001] 概述

[0002] 本发明涉及某些化合物抑制 RAF 激酶、即在 MAP 激酶信号通路中发挥作用的丝氨酸 / 苏氨酸激酶的发现, 涉及所述化合物用于治疗疾病的用途, 所述疾病以 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征, 例如增殖性疾病如某些癌症。

[0003] 背景

[0004] 细胞通过使用各种信号转导通路将其细胞外环境的各个方面传递给细胞核。这些信号中的许多信号是通过蛋白激酶进行传递的, 所述蛋白激酶通过磷酸基团的转移激活各种因子。通过抑制适当的激酶活性中断信号转导可能具有临床益处, 这已经用伊马替尼证明, 伊马替尼是 bcr-abl 激酶的抑制剂, 其以商标名 GLEEVEC (在美国) 或 GLIVEC 以其甲磺酸盐形式被上市销售。

[0005] MAP 激酶信号通路是本领域公知的生长因子将它们的增殖信号从细胞外环境传递到细胞核的通路之一。生长因子激活位于细胞表面的跨膜受体, 该跨膜受体转而又引发级联反应, 由此 RAS 被激活并将 RAF 激酶募集至细胞膜, 在细胞膜上 RAF 激酶被激活并转而激活 MEK 激酶, 然后 MEK 激酶激活 ERK 激酶。激活的 ERK 激酶可以移动至细胞核, 在细胞核中其激活各种基因转录因子。该通路的异常可导致基因转录、细胞生长的改变并通过负性调节细胞凋亡和传递增殖与血管生成信号而促进肿瘤生成。已经证明 RAF 激酶抑制剂可阻断通过 MAP 激酶信号通路的信号转导。

[0006] 已知 RAF 激酶家族有三个成员, 被称为 C-RAF (也称作 RAF-1)、B-RAF 和 A-RAF。据报道, B-RAF 激酶通常被人癌症的多种体细胞点突变之一所激活, 包括 59% 受试的黑素瘤细胞系。参见, Davies, H. 等, Nature 417, 949-954 (2002)。本发明涉及一类可有效抑制一种或多种 RAF 激酶家族成员的化合物的发现。

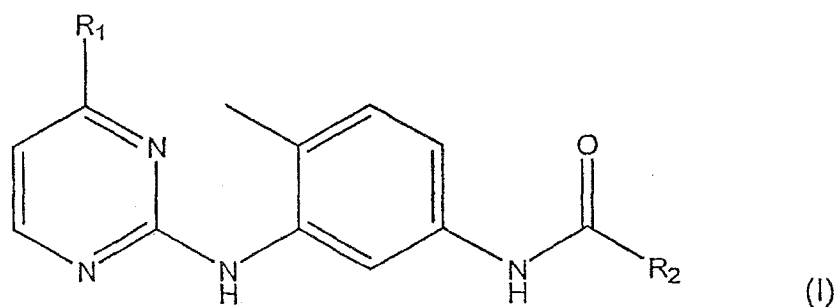
[0007] 所述化合物的 RAF 激酶抑制性质使得它们可用作治疗剂, 用于治疗以 MAP 激酶信号通路异常为特征的增殖性疾病, 特别是许多以 RAF 激酶过量表达或 RAF 激酶的激活突变为特征的癌症, 例如具有突变的 B-RAF 的黑素瘤, 尤其是其中突变的 B-RAF 为 V599E 突变体的黑素瘤。本发明还提供了用所述化合物治疗其它以 MAP 激酶信号通路异常为特征的病症、特别是其中 B-RAF 突变的病症、例如具有突变的 B-RAF 的良性痣 (Nevimoles) 的方法。

发明内容

[0008] 本发明涉及式 (I) 化合物和治疗患者的方法, 所述患者患有以通过 MAP 激酶通路的过量信号转导为特征的疾病, 该方法包括向患者施用抑制 RAF 激酶有效量的式 (I) 化合物。

[0009] 本发明的化合物是式 (I) 所描述的化合物:

[0010]



[0011] 其中：

[0012] R_1 为苯基或杂芳基；

[0013] R_2 为苯基；

[0014] 或者其 N-氧化物或可药用的盐。

[0015] 在本发明内容的上下文中，除非另外说明，否则本文中用于描述式 (I) 化合物的通用术语具有以下含义。

[0016] 当提及取代基例如烷基、烷氧基、烷基胺、烷硫基等时，术语“低级”表示具有至多 7 个且包括最大值 7 个、尤其是 1 至至多 4 个且包括最大值 4 个碳原子的基团，所述基团是无支链的或被支化一次或多次。

[0017] 低级烷基、低级烷氧基、单-或二-低级烷基氨基、低级烷硫基和其它带有烷基部分的取代基中的烷基部分尤其是 C_1 - C_4 烷基，例如正丁基、仲丁基、叔丁基、正丙基、异丙基、甲基或乙基。除非另外指明，否则所述的烷基取代基是未取代的或被卤素、羟基、硝基、氰基、低级烷氧基、 C_3 - C_7 环烷基、氨基或单-或二-低级烷基氨基所取代。

[0018] 卤素-低级烷基、卤素-低级烷氧基、卤素-低级烷硫基等是指具有烷基部分、其中烷基部分被卤素单取代至完全取代的取代基。卤素-低级烷基、卤素-低级烷氧基、卤素-低级烷硫基等包括在取代的低级烷基、取代的低级烷氧基、取代的低级烷硫基等之内。

[0019] 卤素尤其是氟、氯、溴或碘，更尤其是氟、氯或溴，特别是氟。

[0020] 任何所提及的复数形式的化合物、盐等总是应理解为也包括一种化合物、一种盐等。

[0021] 苯基一般是未取代的苯基或被 1-5 个、优选 1 或 2 个取代基取代的苯基。适当的取代基包括但不限于氨基、单-或二-低级烷基取代的氨基（其中低级烷基取代基可以是未取代的或进一步被如上对烷基所列出的那些取代基所取代）、卤素、低级烷基、取代的低级烷基、羟基、低级烷氧基、取代的低级烷氧基、硝基、氰基、硫基、低级烷硫基、卤素-低级烷硫基、杂环基、杂芳基、杂环基烷基、杂芳基烷基、低级烷酰基、氨基甲酰基和 N-单-或 N,N-二-低级烷基取代的氨基甲酰基，其中低级烷基取代基可以是未取代的或被进一步取代。

[0022] 为苯基的 R_1 尤其是未取代的苯基或被一个或多个取代基、优选至多三个、尤其是一个取代基取代的苯基。对 R_1 苯基而言尤其重要的取代基包括氨基、单-或二-低级烷基氨基（其中烷基是未取代的或被取代的）、卤素、低级烷基、取代的低级烷基、羟基、低级烷氧基、取代的低级烷氧基、硝基、氰基、硫基、低级烷硫基和取代的低级烷硫基。

[0023] 为苯基的 R_1 尤其是未取代的苯基或被一个或两个相同或不同的取代基取代的苯基，所述取代基选自卤素，尤其是氟或氯；低级烷基，尤其是甲基、乙基、丙基或叔丁基；卤素-低级烷基，尤其是三氟甲基；羟基；低级烷氧基，尤其是甲氧基或乙氧基；卤素-低级烷

氧基,例如三氟甲氧基或 1,1,2,2- 四氟乙氧基;更尤其是被一个取代基取代的苯基,所述取代基选自未取代的或取代的低级烷基,尤其是甲基、卤素 - 低级烷基,例如三氟甲基、未取代的或取代的低级烷氧基,尤其是甲氧基和卤素 - 低级烷氧基,尤其是三氟甲氧基。

[0024] 在一个实施方案中,取代基位于与嘧啶环键合位置的间位或对位。

[0025] 重要的 R_1 苯基包括未取代的苯基和低级烷氧基取代的苯基,尤其是其中低级烷氧基取代基位于与嘧啶环键合位置的间位或对位的取代的苯基。

[0026] 为苯基的 R_2 一般是未取代的苯环或优选地被一个或多个取代基、优选至多三个、尤其是一个或两个取代基取代的苯环。取代基尤其是氨基、单 - 或二 - 低级烷基取代的氨基(其中烷基是未取代的或被进一步取代,尤其是被卤素或低级烷氧基取代)、卤素、未取代的或取代的低级烷基、未取代的或取代的低级烷氧基、羟基、硝基、氰基、低级烷酰基、氨基甲酰基、N- 单 - 或 N, N- 二 - 低级烷基取代的氨基甲酰基、巯基、低级烷硫基和卤素 - 低级烷硫基。

[0027] 为苯基的 R_2 优选为被一个或两个相同或不同的取代基取代的苯基,所述取代基选自卤素,尤其是氟或氯;单 - 或二 - 低级烷基取代的氨基,尤其是二甲基氨基或二乙基氨基;低级烷基,尤其是甲基或乙基;卤素 - 低级烷基,尤其是二氟甲基、三氟甲基、2,2,2- 三氟乙基或 1,1,2,2- 四氟乙基;低级烷氧基,尤其是甲氧基或乙氧基;卤素 - 低级烷氧基,尤其是二氟甲氧基、三氟甲氧基、2,2,2- 三氟乙氧基或 1,1,2,2- 四氟乙氧基;低级烷硫基,例如甲硫基;卤素 - 低级烷硫基,例如二氟甲硫基、三氟甲硫基、2,2,2- 三氟乙硫基或 1,1,2,2- 四氟乙硫基。

[0028] 为苯基的 R_2 更尤其是被一个或两个相同或不同的取代基取代的苯基,所述取代基选自未取代的或卤素取代的低级烷基、未取代的或卤素取代的低级烷氧基、未取代的或卤素取代的低级烷硫基和卤素,尤其是氟或氯。

[0029] R_2 尤其是三氟甲基苯基,特别是 3- 三氟甲基苯基。

[0030] 优选地, R_2 苯基在氨基羰基连接位置的间位被取代。

[0031] 杂芳基尤其是包含 1 至 3 个选自 N、O 和 S 的杂原子的 5 至 7 元芳族环。杂芳基是未取代的或被一个或多个、尤其是一个至三个、例如一个相同或不同的取代基所取代。杂芳基上的重要取代基是那些选自以下的取代基:卤素,例如氟或氯;单 - 或二 - 低级烷基取代的氨基,其中烷基是未取代的或被卤素、羟基、硝基、氰基、低级烷氧基、 C_3 - C_7 环烷基、杂环基或杂芳基取代;低级烷基,例如甲基或乙基;卤素 - 低级烷基,例如三氟甲基;低级烷氧基,例如甲氧基或乙氧基;卤素 - 低级烷氧基,例如三氟甲氧基;低级烷硫基,例如甲硫基;卤素 - 低级烷硫基,例如三氟甲硫基;杂芳基;杂芳基 - 低级亚烷基;杂环基或杂环基 - 低级亚烷基。

[0032] 杂芳基 - 低级亚烷基和杂环基 - 低级亚烷基是式 $\text{het-C}_1\text{-C}_4\text{- 亚烷基 -}$ 的取代基,其中 het 为杂芳基或杂环基。

[0033] 为杂芳基的 R_1 尤其是噻唑基、吡嗪基、嘧啶基或吡啶基,尤其是 2- 噻唑基、2- 吡嗪基、5- 嘧啶基或 3- 吡啶基。

[0034] 优选地,为杂芳基的 R_1 是吡啶基,尤其是 3- 吡啶基,更特别是 6- 取代的 -3- 吡啶基。

[0035] 杂环基尤其是具有 1 或 2 个选自氮、氧和硫的杂原子的五元或六元非芳族环,该杂

环可以是完全或部分饱和的,且是未取代的或被取代的,尤其是被未取代的或取代的低级烷基所取代。杂环基包括吗啉代、硫吗啉代、哌啶基、哌嗪基等。

[0036] 盐尤其是式 I 化合物的可药用的酸加成盐。这类盐是例如通过具有碱性氮原子的式 I 化合物形成的,例如酸加成盐,优选与有机或无机酸形成的酸加成盐,尤其是可药用盐。合适的无机酸有例如氢卤酸如盐酸、硫酸或磷酸。合适的有机酸有例如羧酸、膦酸、磺酸或氨基磺酸,例如乙酸、丙酸、辛酸、癸酸、十二烷酸、羟基乙酸、乳酸、2-羟基丁酸、葡萄糖酸、葡庚糖酸 (glucosemonocarboxylic acid)、富马酸、丁二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、葡萄糖二酸、半乳糖二酸、氨基酸,例如谷氨酸、天冬氨酸、N-甲基甘氨酸、乙酰氨基乙酸、N-乙酰基天冬酰胺、N-乙酰基半胱氨酸、丙酮酸、乙酰乙酸、磷酸丝氨酸、2-或 3-甘油磷酸、马来酸、羟基马来酸、甲基马来酸、环己烷甲酸、苯甲酸、水杨酸、1-或 3-羟基萘-2-甲酸、3,4,5-三甲氧基苯甲酸、2-苯氧基苯甲酸、2-乙酰氧基苯甲酸、4-氨基水杨酸、邻苯二甲酸、苯基乙酸、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甲烷-或乙烷-磺酸、2-羟基乙烷磺酸、乙烷-1,2-二磺酸、苯磺酸、2-萘磺酸、1,5-萘二磺酸、N-环己基氨基磺酸、N-甲基-、N-乙基-或 N-丙基-氨基磺酸,或其它有机质子酸,例如抗坏血酸。

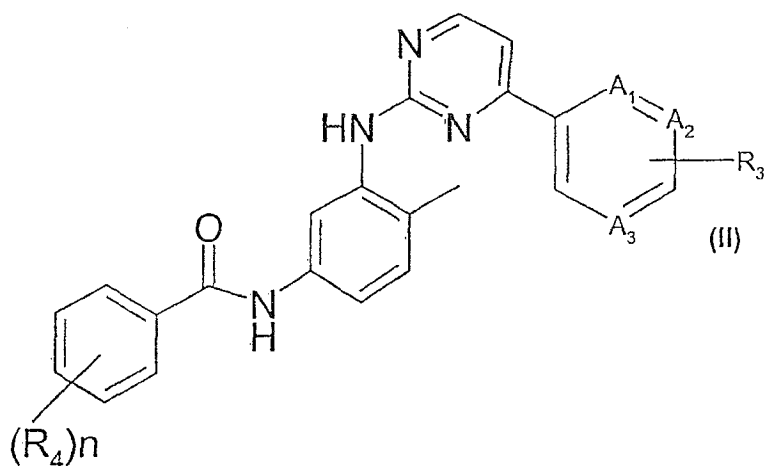
[0037] 对于分离或纯化,还可能使用不可药用的盐,例如苦味酸盐或高氯酸盐。只有可药用的盐或游离化合物(任选地以药物组合物的形式)可在治疗上使用,因此它们是优选的。

[0038] 考虑到游离形式与其盐形式(还包括那些可以用作中间体的盐,例如在新化合物的纯化或它们的鉴定中用作中间体的盐)的新化合物之间的密切关系,当适当和合适时,上下文中任何提及的游离化合物也应理解为包括相应的盐。

[0039] 式 I 化合物的一个重要实施方案是那些其中 R_1 选自苯基、噻唑基、吡嗪基、嘧啶基或吡啶基的化合物;尤其是那些其中 R_2 为卤素-苯基(被卤素取代的苯基)、卤素-低级烷基苯基、卤素-低级烷氧基苯基或卤素-低级烷硫基苯基的化合物;最特别地是那些其中卤素-低级烷基苯基、卤素-低级烷氧基苯基或卤素-低级烷硫基苯基取代基的烷基部分是被氟单取代的至完全取代的,例如 2-氟乙基、三氟甲基或五氟乙基。

[0040] 本发明的一个重要实施方案是式 II 的化合物:

[0041]



[0042] 其中:

[0043] n 为 0、1 或 2;

[0044] A_1 、 A_2 和 A_3 为 C, 或 A_1 和 A_2 为 C 且 A_3 为 N, 或 A_1 和 A_3 为 N 且 A_2 为 C, 或 A_1 为 C 且

A_2 和 A_3 为 N；

[0045] R_3 为 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 、 $-S-R_8$ 或低级烷基，其是未取代的或被卤素、羟基、低级烷氧基、 $-NR_7R_8$ 或在环碳上连接的杂芳基或杂环基取代；

[0046] R_4 为氨基、单-或二-低级烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或低级烷氧基取代；卤素、低级烷基、卤素-低级烷基、低级烷氧基、卤素-低级烷氧基、羟基、低级烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、低级烷硫基或卤素-低级烷硫基；

[0047] R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、低级烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基-低级亚烷基、被羟基、低级烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二-低级烷基氨基取代的低级烷基，或者 R_5 和 R_6 和 / 或 R_7 和 R_8 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

[0048] R_8 为杂环基、杂芳基、杂芳基-低级亚烷基、杂环基-低级亚烷基、低级烷基或被羟基、低级烷氧基或 $-NR_7R_8$ 取代的低级烷基；

[0049] 或者其 N-氧化物或可药用的盐。

[0050] 当 R_3 为被在环碳上连接的杂芳基或杂环基取代的低级烷基时，该低级烷基键合在杂芳基或杂环基的环碳上，例如 3-(4-吡啶基)丙基或 4-哌啶基甲基。

[0051] 当 R_5-R_8 为在环碳上连接的杂芳基或杂环基时，氨基氮直接键合在杂芳基或杂环基的环碳上，例如当 $-NR_5R_6$ 为 4-吡啶基氨基或 4-哌啶基氨基时。

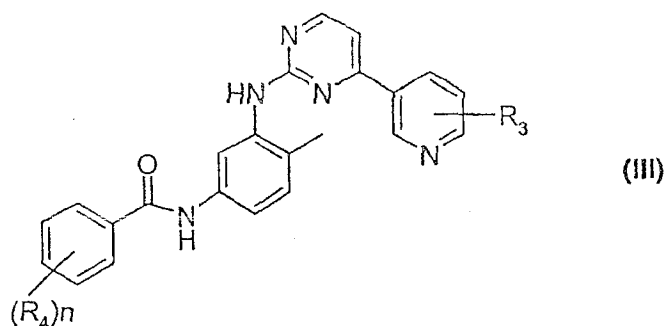
[0052] 至少一个 R_4 取代基优选地位于羰基的间位。

[0053] R_4 取代基尤其选自卤素，尤其是氟或氯，最特别是氟；单-或二-低级烷基取代的氨基，尤其是二甲基氨基或二乙基氨基；低级烷基，尤其是甲基或乙基；卤素-低级烷基，尤其是二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基或 1,1,2,2-四氟乙基；低级烷氧基，尤其是甲基或乙氧基；卤素-低级烷氧基，尤其是二氟甲氧基、三氟甲氧基、2,2,2-三氟乙氧基和 1,1,2,2-四氟乙氧基；低级烷硫基，例如甲硫基；卤素-低级烷硫基，例如二氟甲硫基、三氟甲硫基、2,2,2-三氟乙硫基或 1,1,2,2-四氟乙硫基。

[0054] R_4 尤其是一个或两个相同或不同的取代基，所述取代基选自未取代的或卤素取代的低级烷基、未取代的或卤素取代的低级烷氧基、未取代的或卤素取代的低级烷硫基和卤素，尤其是氟或氯。

[0055] 本发明的一个优选实施方案是式 (III) 的化合物：

[0056]



[0057] 其中：

[0058] n 为 0、1 或 2；

[0059] R_3 为 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 、 $-S-R_8$ 或低级烷基，其是未取代的或被卤素、羟基、低级烷

氧基、 $-NR_7R_8$ 或在环碳上连接的杂芳基或杂环基取代；

[0060] R_4 为氨基、单-或二-低级烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或低级烷氧基取代；卤素、低级烷基、卤素-低级烷基、低级烷氧基、卤素-低级烷氧基、羟基、低级烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、低级烷硫基或卤素-低级烷硫基；

[0061] R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、低级烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基-低级亚烷基、被羟基、低级烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二-低级烷基氨基取代的低级烷基，或者 R_5 和 R_6 或 R_7 和 R_8 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

[0062] R_8 为杂环基、杂芳基、杂芳基-低级亚烷基、杂环基-低级亚烷基、低级烷基或被羟基、低级烷氧基或 $-NR_7R_8$ 取代的低级烷基；

[0063] 或者其 N-氧化物或可药用的盐。

[0064] 在式 III 的化合物中，重要的实施方案包括那些其中 R_4 为卤素-低级烷基例如三氟甲基、卤素-低级烷氧基例如三氟甲氧基或卤素-低级烷硫基例如三氟甲硫基的化合物，尤其是那些其中一个 R_4 取代基相对于羰基键合位置位于 3-位的化合物。在一个尤其重要的实施方案中， R_4 取代基选自 3-三氟甲基、3-三氟甲氧基和 3-三氟甲硫基，尤其是 3-三氟甲基。

[0065] 式 III 化合物的其它重要的实施方案包括那些其中 R_3 为 $-NR_5R_6$ 且 R_5 和 R_6 之一为被 $-NR_7R_8$ 取代的低级烷基且 R_7 和 R_8 与氮一起形成杂芳基或杂环基的化合物；尤其是其中杂芳基或杂环基选自吗啉代、硫吗啉代、哌嗪基、哌啶基和吡啶基的化合物。

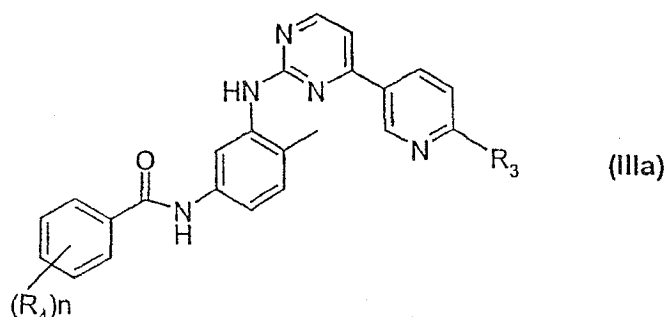
[0066] 式 III 化合物的其它重要的实施方案包括那些其中 $-NR_5R_6$ 为杂芳基或杂环基、尤其是哌嗪基、4-甲基哌嗪基、哌啶基、4-羟基哌啶基、吗啉代和硫吗啉代的化合物。

[0067] 式 III 化合物的其它重要的实施方案包括那些其中 R_8 为低级烷基或被羟基或低级烷氧基取代的低级烷基、尤其是甲氧基或乙氧基的化合物；例如那些其中 R_3 为 2-甲氧基乙氧基、3-甲氧基丙氧基、3-乙氧基丙氧基、3-甲氧基丙硫基或 2-羟基丙硫基的化合物。

[0068] 式 III 化合物的其它重要的实施方案包括那些其中 R_8 为杂芳基或杂环基的化合物，例如那些其中 R_3 为 3-吡啶基氧基或 1-甲基-哌啶-4-基氧基的化合物。

[0069] 在式 III 化合物的一个特别优选的实施方案中， R_3 取代基位于其所连接的吡啶环的 6-位。因此，本发明尤其包括式 (IIIa) 的化合物：

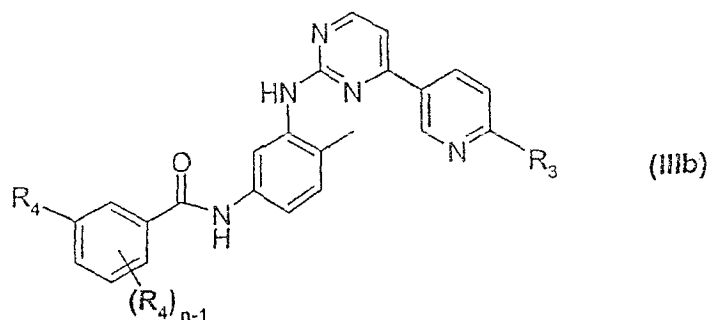
[0070]



[0071] 其中的取代基和优选含义与以上式 III 化合物中所给出的相同。

[0072] 在另一个特别优选的实施方案中， R_3 取代基位于其所连接的吡啶环的 6-位，且 R_4 取代基连接在苯环的 3-位。因此，本发明尤其包括式 (IIIb) 的化合物：

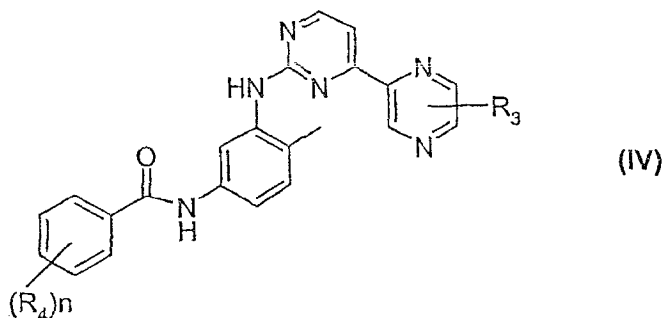
[0073]



[0074] 其中的取代基和优选含义与以上式 III 化合物中所给出的相同。

[0075] 本发明的另一个重要的实施方案包括式 IV 的化合物：

[0076]



[0077] 其中：

[0078] n 为 0、1 或 2；

[0079] R₃ 为氢、-NR₅R₆、卤素、-O-R₈、-S-R₈ 或低级烷基，其是未取代的或被卤素、羟基、低级烷氧基、-NR₇R₈ 或在环碳上连接的杂芳基或杂环基取代；[0080] R₄ 为氨基、单-或二-低级烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或低级烷氧基取代；卤素、低级烷基、卤素-低级烷基、低级烷氧基、卤素-低级烷氧基、羟基、低级烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或 N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、低级烷硫基或卤素-低级烷硫基；[0081] R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、低级烷基、C₃-C₈ 环烷基、C₃-C₈ 环烷基-低级亚烷基、被羟基、低级烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二-低级烷基氨基取代的低级烷基，或者 R₅ 和 R₆ 或 R₇ 和 R₈ 与氮一起形成杂芳基或杂环基；[0082] R₈ 为杂环基、杂芳基、杂芳基-低级亚烷基、杂环基-低级亚烷基、低级烷基或被羟基、低级烷氧基或 -NR₇R₈ 取代的低级烷基；

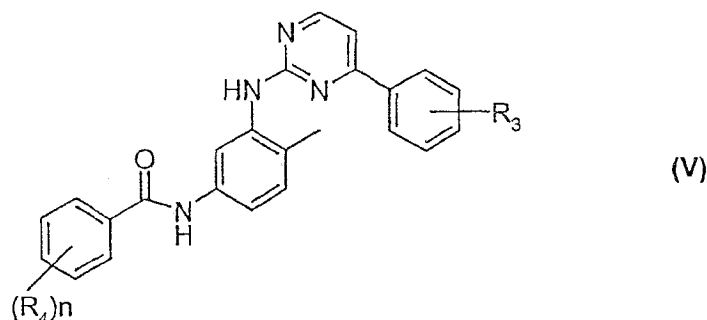
[0083] 或者其可药用的盐。

[0084] 在式 (IV) 的化合物中，至少一个 R₄ 取代基优选地位于苯环上羰基的间位。R₄ 优选为低级烷基，尤其是甲基或乙基；卤素-低级烷基，尤其是二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基或 1,1,2,2-四氟乙基；低级烷氧基，尤其是甲氧基或乙氧基；卤素-低级烷氧基，尤其是二氟甲氧基、三氟甲氧基、2,2,2-三氟乙氧基和 1,1,2,2-四氟乙氧基；低级烷硫基，例如甲硫基；卤素-低级烷硫基，例如二氟甲硫基、三氟甲硫基、2,2,2-三氟乙硫基或 1,1,2,2-四氟乙硫基。[0085] 在式 IV 化合物的一个重要的实施方案中，R₃ 为低级烷基，优选为位于吡啶环 3-位

的低级烷基。

[0086] 本发明还涉及式 (V) 的化合物：

[0087]



[0088] 其中：

[0089] n 为 0、1 或 2；

[0090] R_3 为 $-NR_5R_6$ 、卤素、 $-O-R_8$ 、 $-S-R_8$ 或低级烷基，其是未取代的或被卤素、羟基、低级烷氧基、 $-NR_7R_8$ 或在环碳上连接的杂芳基或杂环基取代；

[0091] R_4 为氨基、单-或二-低级烷基取代的氨基，其中烷基是未取代的或被卤素或低级烷氧基取代；卤素、低级烷基、卤素-低级烷基、低级烷氧基、卤素-低级烷氧基、羟基、低级烷酰基、氨基甲酰基、N-单-或 N,N-二-取代的氨基甲酰基、巯基、低级烷硫基或卤素-低级烷硫基；

[0092] R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 独立地为氢、在环碳上连接的杂芳基或杂环基、低级烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 环烷基-低级亚烷基、被羟基、低级烷氧基、杂芳基、杂环基、氨基、单-或二-低级烷基氨基取代的低级烷基，或者 R_5 和 R_6 或 R_7 和 R_8 与氮一起形成杂芳基或杂环基；

[0093] R_8 为杂环基、杂芳基、杂芳基-低级亚烷基、杂环基-低级亚烷基、低级烷基或被羟基、低级烷氧基或 $-NR_7R_8$ 取代的低级烷基；

[0094] 或者其可药用的盐。

[0095] 在式 (V) 的化合物中，至少一个 R_4 取代基优选位于苯环上羰基的间位。 R_4 优选为低级烷基，尤其是甲基或乙基；卤素-低级烷基，尤其是二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基或 1,1,2,2-四氟乙基；低级烷氧基，尤其是甲氧基或乙氧基；卤素-低级烷氧基，尤其是二氟甲氧基、三氟甲氧基、2,2,2-三氟乙氧基和 1,1,2,2-四氟乙氧基；低级烷硫基，例如甲硫基；卤素-低级烷硫基，例如二氟甲硫基、三氟甲硫基、2,2,2-三氟乙硫基或 1,1,2,2-四氟乙硫基。

[0096] 在式 (V) 化合物的一个重要的实施方案中， R_3 为低级烷基或低级烷氧基，尤其是其中取代基位于嘧啶环连接位置的间位或对位。

[0097] 所述患者为患有以通过 MAP 激酶通路的过量信号转导为特征的疾病的哺乳动物，一般为人。这可以采用例如蛋白质印迹分析或免疫组织化学等方法通过针对通路成员的激活状特定抗体来测定。这样的方法是本领域技术人员已知的。

[0098] 一般而言，以通过 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病是增殖性疾病，特别是以 RAF 激酶活性增加为特征的癌症，例如其中过量表达野生型 B- 或 C-RAF 激酶或表达激活的突变型 RAF 激酶例如突变型 B-RAF 激酶的癌症。其中已经检测到突变的 RAF

激酶的癌症包括黑素瘤、结肠直肠癌、卵巢癌、神经胶质瘤、腺癌、肉瘤、乳腺癌和肝癌。突变的 B-RAF 激酶尤其普遍存在于许多黑素瘤中。

[0099] 根据本发明,可以由患者获取患病组织的样品,例如作为活组织检查或切除术的结果,并对样品进行检验以确定该组织是否产生突变型 RAF 激酶、例如突变型 B-RAF 激酶或者过量表达野生型 RAF 激酶、例如野生型 B- 或 C-RAF 激酶。如果该检验显示在患病组织中产生突变型 RAF 激酶或过量产生 RAF 激酶,则通过向患者施用抑制 RAF- 有效量的本文所述的 RAF 抑制剂化合物对患者进行治疗。

[0100] 但是,如果级联中的另一个激酶是通路中过量信号转导的原因,则也可能用抑制 RAF 激酶的化合物下调 MAP 激酶信号通路。因此,本发明还涉及以 MAP 激酶信号通路的过量信号转导为特征的疾病的治疗,所述的过量信号转导归因于 RAF 激酶的激活突变或过量表达以外的原因。

[0101] 组织样品是通过本领域众所周知的方法进行检验的。例如,通过等位基因特异性 PCR、DHPLC、质谱法检测 B-RAF 突变,通过免疫组织化学、免疫荧光法或蛋白质印迹分析检测野生型 B- 或 C-RAF 的过量表达。检测 B-RAF 突变的一种特别有用的方法是实施例 D1 中所述的基于聚合酶链反应的方法。类似的方法被用于确定级联中的其它激酶是否突变或过量表达。

[0102] 本发明的一个特别重要的方面涉及治疗黑素瘤的方法,其包括 (a) 对来自患者的黑素瘤组织进行检验以确定黑素瘤组织是否表达突变型 RAF 激酶或过量表达野生型 RAF 激酶和 (b) 如果发现黑素瘤组织过量表达野生型 RAF 激酶或表达激活的突变型 B-RAF 激酶,用抑制 RAF 激酶有效量的本文所述的抑制 RAF 的化合物治疗患者。

[0103] 该实施方案的一个重要方面涉及治疗黑素瘤的方法,其包括 (a) 对来自患者的黑素瘤组织进行检验以确定黑素瘤组织是否过量表达 B-RAF 激酶或 C-RAF 激酶活性和 (b) 如果发现黑素瘤组织过量表达 B-RAF 激酶或 C-RAF 激酶活性,用抑制 RAF 激酶有效量的本文所述的抑制 RAF 的化合物治疗患者。

[0104] 该实施方案的另一个重要方面涉及治疗黑素瘤的方法,其包括 (a) 对来自患者的黑素瘤组织进行检验以确定黑素瘤组织是否表达突变型 B-RAF 激酶和 (b) 如果发现黑素瘤组织表达突变型 B-RAF 激酶,用抑制 RAF 激酶有效量的本文所述的抑制 RAF 的化合物治疗患者。

[0105] 一般而言,B-RAF 激酶突变是所引用的 Davies 等的文章中所述的那些突变中的一种。这些突变总结于表 1 中。

[0106] 表 1

[0107]

B-RAF 突变	蛋白质变化
G1388A	G463E
G1388T	G463V

B-RAF 突变	蛋白质变化
G1394C	G465A
G1394A	G465E
G1394T	G465V
G1403C	G468A
G1403A	G468E
G1753A	E585K
T1782G	F594L
G1783C	G595R
C1786G	L596V
T1787G	L596R
T1796A	V599E
TG1796-97AT	V599D

[0108] 因此,本发明特别涉及治疗以激活的突变型 B-RAF 激酶为特征的疾病的方法,其包括在来自患者的组织样品中检测 B-RAF 激酶基因或蛋白质的突变和用有效的抑制 B-RAF 激酶的化合物、尤其是本文所述的化合物治疗患者。

[0109] 本发明的一个重要方面包括那些其中突变型 B-RAF 激酶表现出表 1 中所述的突变、尤其是 V599E 突变的例子。

[0110] 本发明的一个特别重要的方面包括那些其中疾病为黑素瘤和突变型 B-RAF 激酶表现出表 1 中所述的突变、尤其是 V599E 突变的例子。

[0111] 因此,本发明包括治疗以突变型 B-RAF 激酶为特征的疾病的方法,其包括在来自患者的组织样品中检测选自 G1388A、G1388T、G1394C、G1394A、G1394T、G1403C、G1403A、G1753A、T1782G、G1783C、C1786G、T1787G、T1796A 和 TG1796-97AT 的 B-RAF 激酶基因的突变或 RAF 激酶蛋白的相应的突变和用本文所述的有效的抑制 B-RAF 激酶的化合物治疗患者。

[0112] 本发明还涉及抑制 RAF 激酶的方法,其包括使 RAF 激酶与式 (I)、(II)、(III)、(IV) 或 (V) 的化合物接触。优选地,RAF 激酶是 B- 或 C-RAF 激酶,或突变型 RAF 激酶,尤其是突变型 B-RAF 激酶,特别是 V599E 突变体。RAF 激酶可以被分离或处于细胞环境中。

[0113] 式 I 化合物（或其 N-氧化物）具有如上所述的有价值的药理学性质。

[0114] 本发明的化合物可以单独施用或与其它抗癌药组合施用，例如抑制肿瘤血管生成的化合物，例如蛋白酶抑制剂、表皮生长因子受体激酶抑制剂、血管内皮生长因子受体激酶抑制剂等；细胞毒性药物，例如抗代谢物，如嘌呤和嘧啶类似物抗代谢物；抗有丝分裂药如微管稳定药和抗有丝分裂生物碱；铂配位复合物；抗肿瘤抗生素；烷化剂，例如氮芥和亚硝基脲；内分泌物，例如肾上腺类皮质激素类、雄激素类、抗雄激素类、雌激素类、抗雌激素类、芳香酶抑制剂、促性腺激素释放激素激动剂和促生长素抑制素类似物，以及靶向于被过量表达和 / 或在其它方面与肿瘤细胞中被上调的特定代谢通路有关的酶或受体的化合物，例如 ATP 和 GTP 磷酸二酯酶抑制剂、蛋白激酶抑制剂，例如丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸激酶抑制剂，例如 Abelson 蛋白酪氨酸激酶和各种生长因子、它们的受体和其激酶抑制剂，例如表皮生长因子受体激酶抑制剂、血管内皮生长因子受体激酶抑制剂、成纤维细胞生长因子抑制剂、胰岛素样生长因子受体抑制剂和血小板源生长因子受体激酶抑制剂等；甲硫氨酸氨基肽酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、环加氧酶抑制剂，例如环加氧酶 -1 或 -2 抑制剂，和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。

[0115] 本发明的化合物还可以与放射疗法、免疫疗法、手术治疗或其组合一起施用。用于在肿瘤减轻或甚至化学预防治疗后维持患者状态的治疗（例如在危险中的患者的情况）也是可能的。

[0116] 本发明的化合物不仅用于（预防性地和优选治疗性地）治疗人，而且用于治疗其它温血动物，例如商业上有用的温血动物，例如啮齿类动物，如小鼠、兔或大鼠，或豚鼠。

[0117] 一般而言，本发明还涉及式 I 化合物（或其 N-氧化物）在抑制 RAF 激酶活性中的用途。

[0118] 本发明的化合物优选作为活性成分在药物组合物中被施用。优选的是这样的药物组合物，其适合施用于患有以 MAP 激酶信号通路异常为特征的疾病、尤其是肿瘤疾病、最特别是黑素瘤的温血动物，尤其是人或商业上有用的哺乳动物，其包含抑制 RAF 激酶、特别是突变型 RAF 激酶有效量的式 I 化合物（或其 N-氧化物）或其可药用的盐（当存在成盐基团时）以及至少一种可药用的载体。

[0119] 还优选这样的药物组合物，其用于在需要这类治疗、尤其是患有所述疾病的温血动物、尤其是人或商业上有用的哺乳动物中预防性地或尤其是治疗性地治疗肿瘤疾病或其它增殖性疾病，其包含预防或尤其是治疗所述疾病有效量的新的式 I 化合物（或其 N-氧化物）或其可药用的盐作为活性成分。

[0120] 药物组合物包含约 1% 至约 95% 的活性成分，单剂量形式的剂型优选包含约 20% 至约 90% 的活性成分，非单剂量形式的剂型优选包含约 5% 至约 20% 的活性成分。单位剂量形式有例如糖衣丸、片剂、安瓿、小瓶、栓剂或胶囊剂。其它剂型有例如软膏剂、乳膏剂、糊剂、泡沫剂（foam）、酏剂、唇膏、滴剂、喷雾剂、分散体等。例子有包含约 0.05g 至约 1.0g 活性成分的胶囊剂。

[0121] 本发明的药物组合物以本身已知的方法制备，例如通过常规的混合、制粒、成型、溶解或冻干方法制备。

[0122] 优选使用活性成分的溶液，另外还可使用混悬液或分散体，尤其是等张的水溶液、分散体或混悬液，例如在仅含有活性物质或含有活性物质与载体例如甘露醇的冻干组合物

的情况下,这些剂型可以在使用前制备。药物组合物可以被灭菌和 / 或包含赋形剂,例如防腐剂、稳定剂、湿润剂和 / 或乳化剂、增溶剂、调节渗透压的盐和 / 或缓冲剂,并以本身已知的方法制备,例如通过常规的溶解或冻干方法制备。所述的溶液或混悬液可以包含增粘物质例如羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮或明胶或增溶剂例如 Tween 80 [聚氧乙烯 (20) 脱水山梨醇单油酸酯 ;ICI Americas, Inc, USA 的商标名]。

[0123] 在油中的混悬液包含常规用于注射目的的植物油、合成油或半合成油作为油性组分。可提及的如尤其是液体脂肪酸酯,其包含具有 8 至 22 个、尤其是 12 至 22 个碳原子的长链脂肪酸作为酸组分,例如月桂酸、十三烷酸、肉豆蔻酸、十五烷酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、花生酸、二十二烷酸或相应的不饱和酸,例如油酸、反油酸、芥酸、巴西烯酸或亚油酸,任选地加入抗氧化剂,例如维生素 E、 β -胡萝卜素或 3,5-二-叔丁基-4-羟基甲苯。这些脂肪酸酯的醇组分具有最多 6 个碳原子,为单-或多-元醇,例如单-、二-或三-元醇,例如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇或它们的异构体,但是尤其是乙二醇和甘油。因此,可以提及的脂肪酸酯的例子有:油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、“Labrafil M 2375”(聚氧乙烯甘油三油酸酯,来自 Gattefossé, 巴黎)、“Labrafil M 1944 CS”(通过杏仁油醇解制备的不饱和的聚乙二醇化的甘油酯,由甘油酯和聚乙二醇酯组成;Gattefossé, 法国)、“Labrasol”(通过 TCM 醇解制备的饱和的聚乙二醇化的甘油酯,由甘油酯和聚乙二醇酯组成;Gattefossé, 法国)和 / 或“Miglyol 812”(具有 C_8 至 C_{12} 链长的饱和脂肪酸的甘油三酯,来自 Huls AG, 德国),但是尤其是植物油,例如棉子油、杏仁油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、豆油和更尤其是花生油。

[0124] 注射组合物的制备在无菌条件下以常规方法进行,将其引入到例如安瓿或小瓶中和容器的密封也是在无菌条件下以常规方法进行的。

[0125] 用于口服施用的药物组合物可以例如通过以下方法获得:将活性成分与一种或多种固体载体混合,将得到的混合物制粒,如果合适,将混合物或颗粒加工(如果需要,酌情加入另外的赋形剂)成片剂或糖衣丸的芯。

[0126] 合适的载体尤其是填充剂,例如糖如乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇、纤维素制品和 / 或磷酸钙例如磷酸三钙或磷酸氢钙,还有粘合剂,例如淀粉如玉米、小麦、米或马铃薯淀粉、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯吡咯烷酮,和 / 或如果需要,崩解剂,例如以上提到的淀粉,还有羧甲基淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、海藻酸或其盐,例如藻酸钠。另外的赋形剂尤其是流动性调节剂和润滑剂,例如硅酸、滑石粉、硬脂酸或其盐,例如硬脂酸镁或硬脂酸钙,和 / 或聚乙二醇或其衍生物。

[0127] 糖衣丸芯可以具有合适的包衣,任选肠溶衣,尤其是使用浓糖溶液,所述浓糖溶液可以含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和 / 或二氧化钛,或使用在合适有机溶剂或溶剂混合物中的包衣溶液,或者对于肠溶衣的制备,使用合适的纤维素制品的溶液,例如醋酸纤维素邻苯二甲酸酯或羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯。可以向片剂或糖衣丸包衣中加入着色剂或色素,例如为了鉴别目的或为了显示活性成分的不同剂量。

[0128] 用于口服施用的药物组合物还有硬明胶胶囊和由明胶和增塑剂例如甘油或山梨醇组成的软密封胶囊。硬明胶胶囊可以含有颗粒形式的活性成分,例如混合有填充剂如玉米淀粉、粘合剂和 / 或助流剂如滑石粉或硬脂酸镁以及任选地稳定剂的颗粒形式的活性成分。在软胶囊中,活性成分优选溶解或混悬在合适的液体赋形剂中,例如脂肪油、石蜡油或

液体聚乙二醇或者乙二醇或丙二醇的脂肪酸酯,同样可以加入稳定剂和清洁剂,例如聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯类的清洁剂。

[0129] 合适的可直肠施用的药物组合物有例如栓剂,其由活性成分与栓剂基质的混合物组成。合适的栓剂基质有例如天然或合成的甘油三酯、链烷烃、聚乙二醇或高级链烷醇。

[0130] 对于胃肠外施用,尤其适合的是水溶性形式、例如水溶性盐形式的活性成分的水性溶液,或水性注射混悬液,其包含增粘物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和 / 或葡聚糖,以及如果需要,还含有稳定剂。任选地与赋形剂一起的活性成分也可以是冻干物的形式,其可以在胃肠外施用前通过加入合适的溶剂被制成溶液。

[0131] 用于例如胃肠外施用的溶液也可以以输液形式被使用。

[0132] 优选的防腐剂有例如抗氧化剂如抗坏血酸或杀微生物剂如山梨酸或苯甲酸。

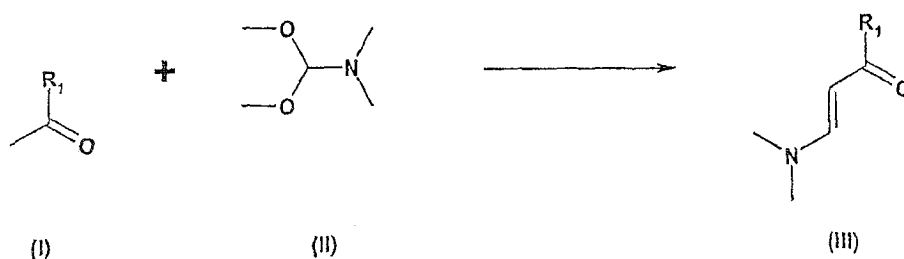
[0133] 本发明尤其涉及一种治疗病理状态之一的程序或方法,所述病理状态以 MAP 激酶信号通路异常为特征,尤其是对抑制 RAF 激酶有响应的疾病,尤其是相应的肿瘤疾病。式 I 化合物 (或其 N-氧化物) 可以以其本身或以药物组合物的形式被预防性地或治疗性地施用于需要这类治疗的温血动物例如人,优选用量为对抗所述疾病的有效量,所述化合物尤其是以药物组合物的形式被应用。在体重约 70kg 的情况下,本发明化合物所施用的日剂量为约 0.1g 至约 5g,优选约 0.5g 至约 2g。

[0134] 在每种特定情况下所用的优选的剂量、组合物和药物制剂 (药物) 的制备如上所述。

[0135] 本发明的化合物是利用本领域普通技术人员已知的方法根据如下所述的通用反应流程图制备的。

[0136] 步骤 1

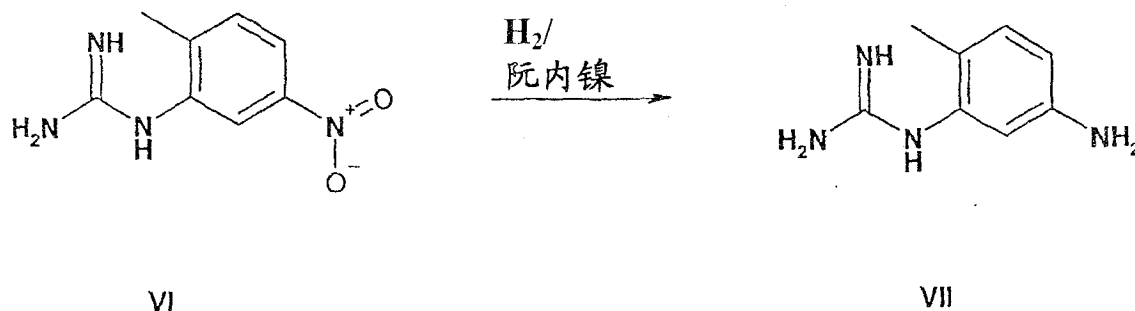
[0137]



[0138] 将 I 和 II 的混合物加热至 85°C。在搅拌过夜后,将混合物首先在空气中冷却,然后在冰 / 水浴中冷却并过滤。将得到的固体用乙醚充分洗涤并干燥,得到 III。

[0139] 共同中间体 VII 的制备

[0140]

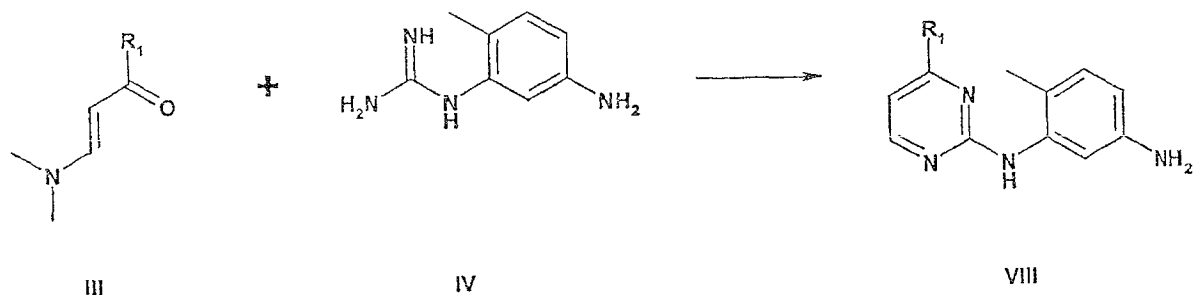


[0141] 将阮内镍加入到脱气的 VI 在甲醇 (100mL) 中的溶液中并用氢气 (60psi.) 覆盖。

将混合物振摇过夜并过滤。在真空下浓缩,得到 VII,为棕色固体。

[0142] III 和 VII 的反应

[0143]



[0144] 在约 85°C 加热下将 III 和 IV 溶解在 2- 丙醇中。在搅拌 24 小时后,将混合物冷却并过滤。将得到的固体用乙醚充分洗涤并干燥,得到 V。

[0145] 最终步骤

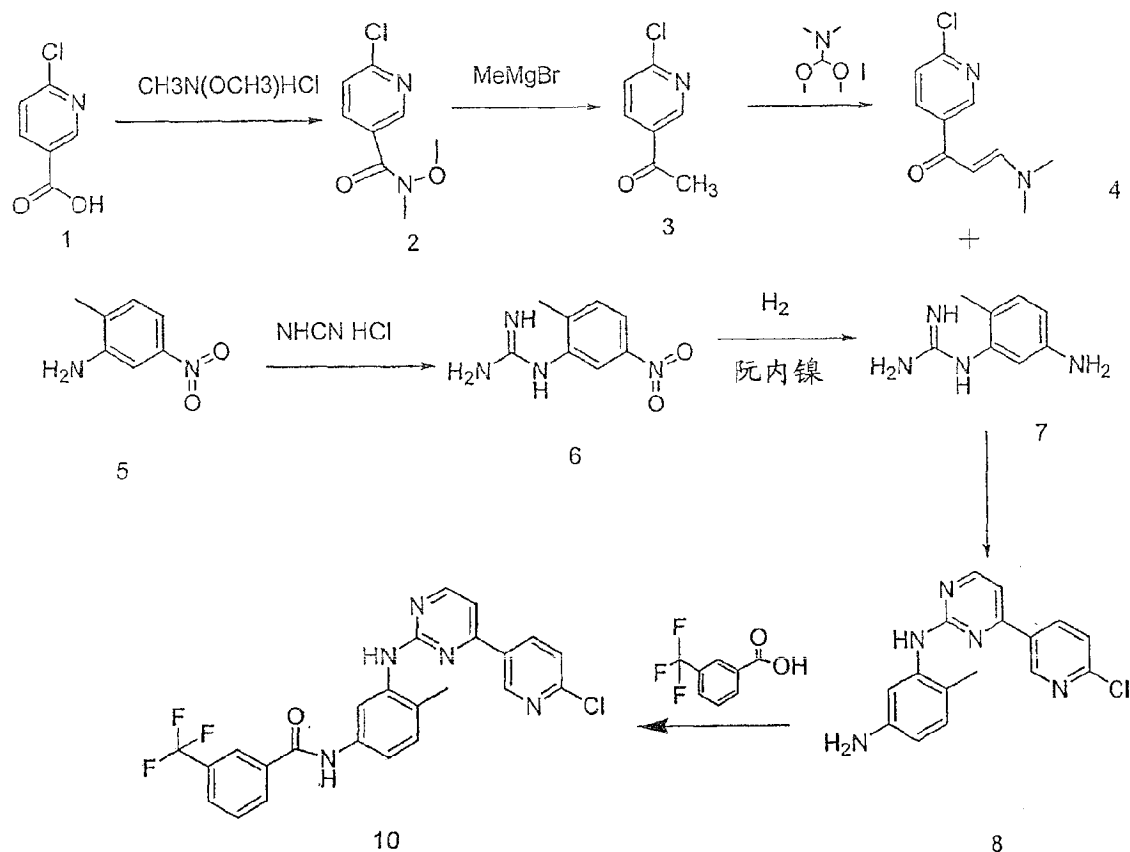
[0146] 在标准条件下使 V 与适当取代的苯甲酸或苯甲酰卤反应,得到最终的苯甲酰胺。

[0147] 本发明还涉及式 VII 和 VIII 的化合物,它们是用于制备式 (I)、II、II、III、III(a)、III(b)、IV 和 V 化合物的中间体。

[0148] 可供选择的合成流程图

[0149] 可供选择的合成流程图公开了一种共同中间体的合成,所述中间体用于制备其中 R_4 为 3- 三氟甲基的式 III 的化合物。本领域技术人员具有替换各种起始原料以制备本发明化合物的能力。

[0150]



[0151] 本发明还涉及式 8 的化合物,其是用于制备式 III、III(a) 和 III(b) 化合物的中

间体。

[0152] 以下实施例用于举例说明本发明,但不限制其范围。

[0153] 实施例 1

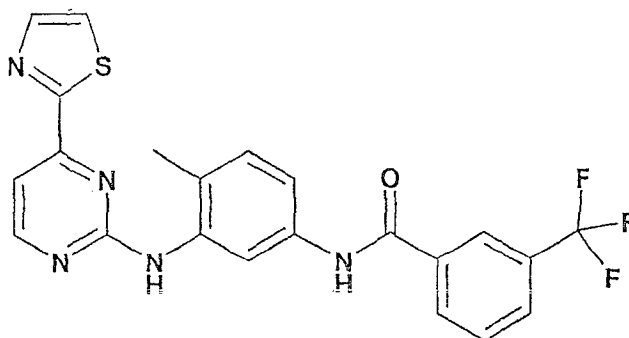
[0154] N-[4-甲基-3-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0155] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.17g, 0.60mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.12g, 0.63mmol)、BOP (0.32g, 0.72mmol) 和 DIEA (0.4mL, 2.16mmol) 的混合物在 2.5mL DMF 中于室温、氮气氛下搅拌过夜。在搅拌 17.5 小时后,向沉淀中加入 20mL 去离子水。将产物和混合物在室温下搅拌 45 分钟。然后将其通过布氏漏斗过滤,用 10.0mL CH₃OH 研磨,搅拌 15 分钟,再次过滤,用 10.0mL CH₃OH 洗涤并干燥。得到 0.11g N-[4-甲基-3-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺,为黄色固体。

[0156] ¹H NMR (DMSO, 500MHz) : δ (ppm) 10.41 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.64 (d, 1H, J = 5.05Hz), 8.29 (br m, 1H), 8.26 (d, 1H, J = 7.88Hz), 8.06 (d, 1H, J = 3.15Hz), 7.96 (br m, 1H), 7.94 (d, 1H, J = 3.16Hz), 7.91 (1H, d, J = 2.27Hz), 7.77 (t, 1H, J = 7.88Hz), 7.56 (dd, 1H, J₁ = 8.35Hz, J₂ = 2.45Hz), 7.39 (d, 1H, J = 4.39Hz), 7.24 (d, 1H, J = 8.79Hz), 2.22 (s, 3H)。

[0157] API-MS m/z 456.1 ([M+H]⁺, 计算值 456.1)

[0158]



[0159] 实施例 2

[0160] N-[4-甲基-3-(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺

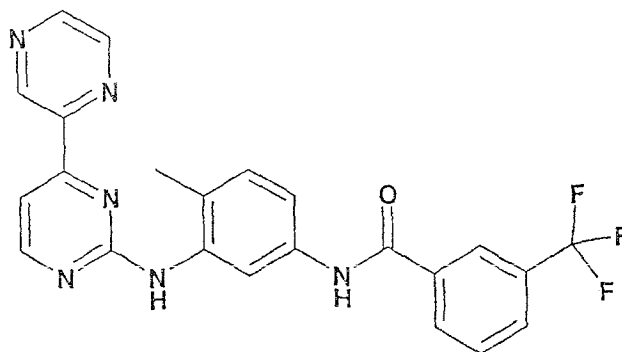
[0161] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.36g, 1.30mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.26g, 1.36mmol)、BOP (0.69g, 1.56mmol) 和 DIEA (0.8mL, 4.68mmol) 的混合物在 5.0mL DMF 中于室温、氮气氛下搅拌过夜。向得到的沉淀中加入 50mL 去离子水。将混合物在室温下搅拌 45 分钟,然后通过布氏漏斗过滤,用 25.0mL CH₃OH 研磨,搅拌 15 分钟,再次过滤,用 25.0mL CH₃OH 洗涤并干燥。得到 0.41g N-[4-甲基-3-(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺,为浅黄色固体。

[0162] ¹H NMR (DMSO, 500MHz) : δ (ppm) 10.45 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.79 (s, 2H), 8.63 (d, 1H, J = 5.39Hz), 8.31 (br m, 1H), 8.28 (d, 1H, J = 8.08Hz), 8.16 (d, 1H, J = 2.37Hz), 7.96 (d, 1H, J = 8.08Hz), 7.79 (t, 1H, J = 8.08Hz), 7.63 (d, 1H, J = 4.87Hz),

7.50 (dd, 1H, $J_1 = 8.67\text{Hz}$, $J_2 = 2.17\text{Hz}$), 7.26 (d, 1H, $J = 7.59\text{Hz}$), 2.26 (s, 3H)。

[0163] API-MS m/z 451.1 ($[M+H]^+$, 计算值 451.1)

[0164]



[0165] 实施例 3

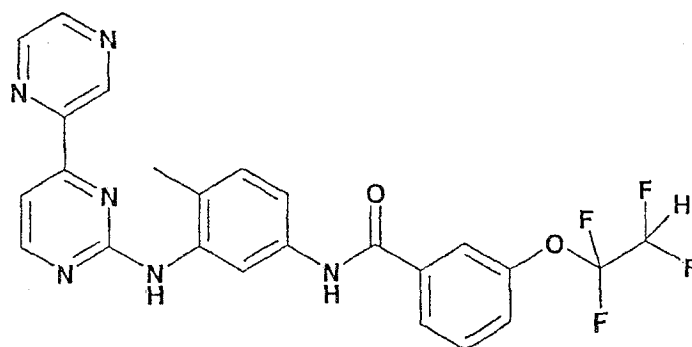
[0166] N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-(1,1,2,2-四氟-乙氧基)-苯甲酰胺

[0167] 将 4-甲基-N*3*-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-(1,1,2,2-四氟-乙氧基)-苯甲酸 (0.50g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.25mL, 7.14mmol) 的混合物在 10.0mL DMF 中于室温下搅拌 20 小时。向得到的沉淀中加入 50mL 去离子水。将得到的混悬液在室温下搅拌 45 分钟。然后将混合物通过布氏漏斗过滤,用 20.0mL CH₃OH 研磨,搅拌 15 分钟,再次过滤,用 20.0mL CH₃OH 洗涤并干燥。得到 0.71g N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-(1,1,2,2-四氟-乙氧基)-苯甲酰胺,为浅黄色固体。

[0168] ¹H NMR (DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.36 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.79 (s, 2H), 8.62 (d, 2H, $J = 5.13\text{Hz}$), 8.15 (br m, 1H), 7.99 (d, 2H, $J = 8.33\text{Hz}$), 7.86 (br m, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.25 (d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$), 6.86 (t, 1H, $J = 52.4\text{Hz}$), 2.26 (s, 3H)。

[0169] API-MS m/z 499.4 ($[M+H]^+$, 计算值 499.4)

[0170]



[0171] 实施例 4

[0172] 3-二氟甲氧基-N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-苯甲酰胺

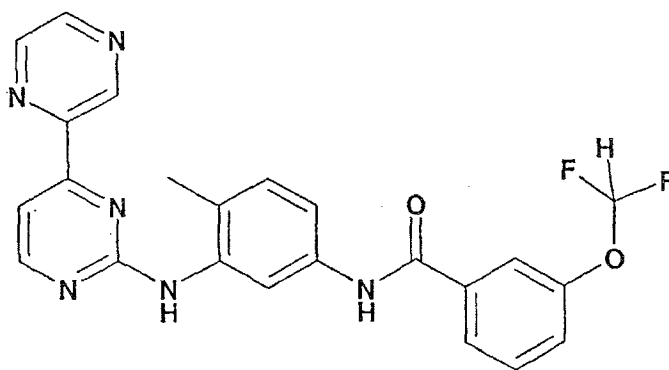
[0173] 将 4-甲基-N*3*-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-(2,2-二氟-乙氧基)-苯甲酸 (0.39g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和

DIEA (1.25mL, 7.14mmol) 的混合物在 10.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 去离子水。将得到的混悬液在室温下搅拌 45 分钟。然后将其通过布氏漏斗过滤, 用 20.0mL CH₃OH 研磨, 搅拌 15 分钟, 再次过滤, 用 20.0mL CH₃OH 洗涤并干燥。得到 0.79g 3-3-二氟甲氧基-N-[4-甲基-3-(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-苯甲酰胺, 为浅黄色固体。

[0174] ¹H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.29(s, 1H), 9.47(s, 1H), 9.09(s, 1H), 8.79(s, 1H), 8.61(d, 1H, J₁ = 5.45Hz, J₂ = 1.82Hz), 8.14(m, 1H), 7.85(d, 1H, J = 7.61Hz), 7.64-7.56(m, 2H), 7.51-7.46(m, 1H), 7.40(dd, 1H, J₁ = 7.62Hz, J₂ = 2.77Hz), 7.33(t, 1H, J = 74.2Hz), 7.24(d, 1H, J = 8.32Hz), 2.25(s, 3H)。

[0175] API-MS m/z 449.3 ([M+H]⁺, 计算值 449.4)

[0176]



[0177] 实施例 5

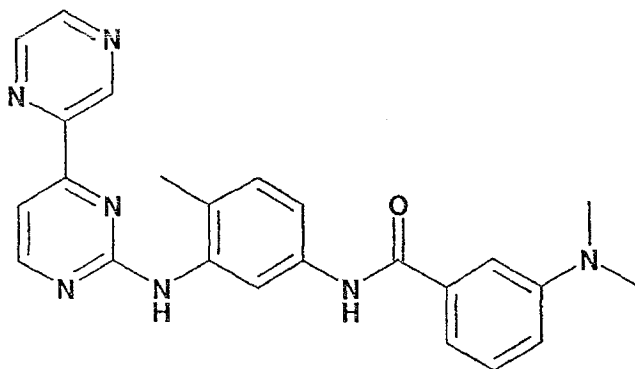
[0178] 3-二甲基氨基-N-[4-甲基-3-(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-苯甲酰胺

[0179] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-二甲基氨基-苯甲酸 (0.34g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.25mL, 7.14mmol) 的混合物在 10.0mL DMF 中于室温下搅拌 20 小时。向沉淀中加入 50mL 去离子水。将得到的混悬液在室温下搅拌 45 分钟。然后将其通过布氏漏斗过滤, 用 20.0mL CH₃OH 研磨, 搅拌 15 分钟, 再次过滤, 用 20.0mL CH₃OH 洗涤并干燥。得到 0.64g 3-二甲基氨基-N-[4-甲基-3-(4-吡嗪-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-苯甲酰胺, 为灰白色固体。

[0180] ¹H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.09(s, 1H), 9.47(s, 1H), 9.07(s, 1H), 8.79(s, 1H), 8.61(d, 1H, J = 5.45Hz,), 8.14(m, 1H), 7.62(d, 1H, J = 5.52Hz), 7.50(dd, 1H, J₁ = 8.47Hz, J₂ = 2.31Hz), 7.31(dd, 1H, J = 8.08Hz, J = 8.08Hz), 7.24(m, 2H), 7.21(m, 1H), 6.92(dd, 1H, J₁ = 8.48Hz, J₂ = 2.31Hz), 2.97(s, 6H), 2.25(s, 3H)。

[0181] API-MS m/z 426.1 ([M+H]⁺, 计算值 426.2)

[0182]



[0183] 实施例 6

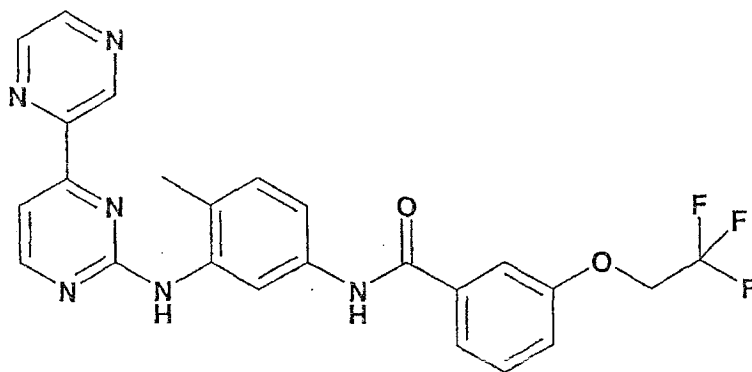
[0184] N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-(2,2,2-三氟-乙氧基)-苯甲酰胺

[0185] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol) 3-(2,2,2-三氟-乙氧基)-苯甲酸 (0.46g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.25mL, 7.14mmol) 的混合物在 10.0mL DMF 中于室温下搅拌 20 小时。向沉淀中加入 50mL 去离子水。将得到的混悬液在室温下搅拌 45 分钟。然后将其通过布氏漏斗过滤, 用 25.0mL CH₃OH 研磨, 搅拌 15 分钟, 再次过滤, 用 25.0mL CH₃OH 洗涤并干燥。得到 0.63g N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-(2,2,2-三氟-乙氧基)-苯甲酰胺, 为浅黄色固体。

[0186] ¹H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.21 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.79 (s, 2H), 8.62 (d, 1H, J = 4.82Hz), 8.15 (br m, 1H), 7.63 (m, 3H), 7.50 (m, 2H), 7.29 (dd, 1H, J₁ = 8.05Hz, J₂ = 2.15Hz), 7.24 (d, 1H, J = 8.58Hz), 4.86 (q, 2H, J = 8.8Hz), 2.25 (s, 3H)。

[0187] API-MS m/z 481.3 ([M+H]⁺, 计算值 481.1)

[0188]



[0189] 实施例 7

[0190] N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲硫基-苯甲酰胺

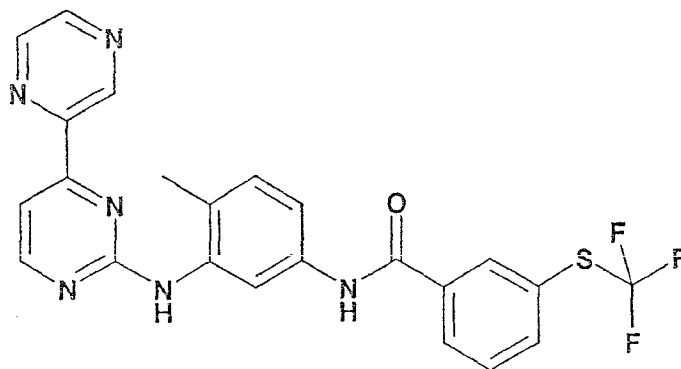
[0191] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-三氟甲硫基-苯甲酸 (0.46g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.25mL, 7.20mmol) 的混合物在 6.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将产物和混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 10.0mL CH₃OH 研磨 45 分钟并干燥。得到 0.78g N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲硫基-苯甲酰胺。

基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺,为黄色固体。

[0192] ^1H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.40(s, 1H), 9.48(s, 1H), 9.10(s, 1H), 8.79(s, 2H), 8.62(d, 1H, $J = 5.38\text{Hz}$), 8.30(br m, 1H), 8.20(d, 1H, $J = 7.68\text{Hz}$), 8.15(m, 1H), 7.94(d, 1H, $J = 7.68\text{Hz}$), 7.72(t, 1H, $J = 8.06\text{Hz}$), 7.63(d, 1H, $J = 5.38\text{Hz}$), 7.50(dd, 1H, $J_1 = 8.44\text{Hz}$, $J_2 = 2.29\text{Hz}$), 7.25(d, 1H, $J = 8.44\text{Hz}$), 2.26(s, 3H)。

[0193] API-MS m/z 483.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 483.1)

[0194]



[0195] 实施例 8

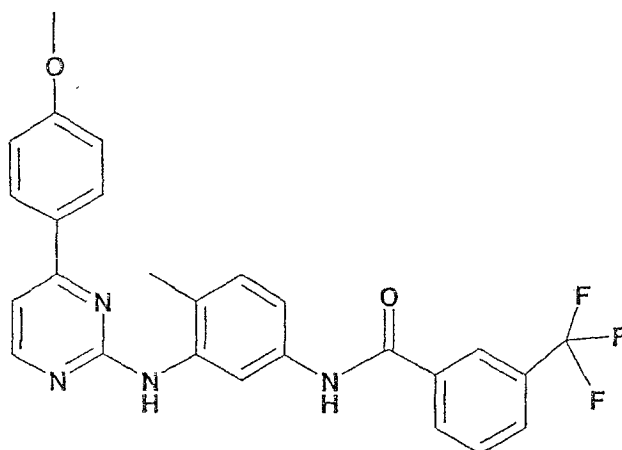
[0196] N-{3-[4-(4-甲氧基-苯基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0197] 将 $\text{N} \times 3 \times$ -[4-(4-甲氧基-苯基)-吡啶-2-基]-4-甲基-苯-1,3-二胺 (0.29g, 0.95mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.19g, 0.99mmol)、BOP (0.50g, 1.14mmol) 和 DIEA (0.6mL, 3.42mmol) 的混合物在 5.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将产物和混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 6.0mL CH_3OH 研磨 45 分钟并干燥。得到 0.38g N-{3-[4-(4-甲氧基-苯基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺, 为黄色固体。

[0198] ^1H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.43(s, 1H), 8.40(d, 2H, $J = 5.21\text{Hz}$), 8.31(s, 1H), 8.28(d, 1H, $J = 7.89\text{Hz}$), 8.13(s, 1H), 8.11(m, 2H, br), 7.96(d, 1H, $J = 8.35\text{Hz}$), 7.79(t, 1H, $J = 7.72\text{Hz}$), 7.50(d, 1H, $J = 8.20\text{Hz}$), 7.28(d, 1H, $J = 5.21\text{Hz}$), 7.23(d, 1H, $J = 8.35\text{Hz}$), 7.02(d, 1H, $J = 8.99\text{Hz}$), 3.81(s, 3H), 2.26(s, 3H)。

[0199] API-MS m/z 479.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 479.2)

[0200]



[0201] 实施例 9

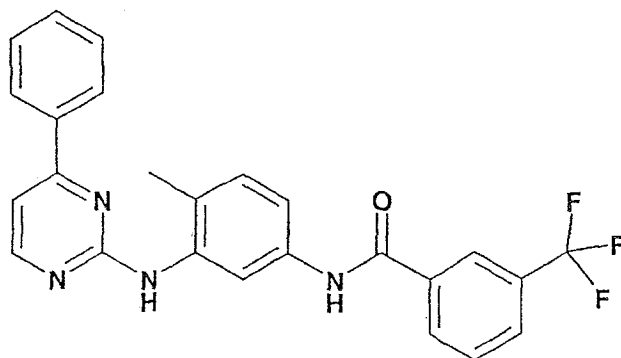
[0202] N-[4-甲基-3-(4-苯基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0203] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-苯基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.50g, 1.81mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.36g, 1.90mmol)、BOP (0.96g, 2.17mmol) 和 DIEA (1.25mL, 6.51mmol) 的混合物在 6.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将产物和混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 10.0mL CH₃OH 研磨 45 分钟并干燥。得到 0.27g 黄色固体。将该产物再次用 5.0mL CH₃OH 研磨 1 小时, 过滤并干燥。得到 0.12g N-[4-甲基-3-(4-苯基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺, 为浅黄色固体。

[0204] ¹H NMR (DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.43 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.48 (d, 1H, J = 4.94Hz), 8.30 (m, 1H), 8.27 (d, 1H, J = 7.40Hz), 8.13-8.16 (m, 2H), 8.09 (d, 1H, J = 2.19), 7.97 (d, 1H, J = 7.11Hz), 7.79 (t, 1H, J = 7.66Hz), 7.48-7.52 (m, 2H), 7.36 (d, 1H, J = 5.47Hz), 7.24 (d, 1H, J = 8.20Hz), 2.26 (s, 3H)。

[0205] API-MS m/z 449.3 ([M+H]⁺, 计算值 449.4)

[0206]



[0207] 实施例 10

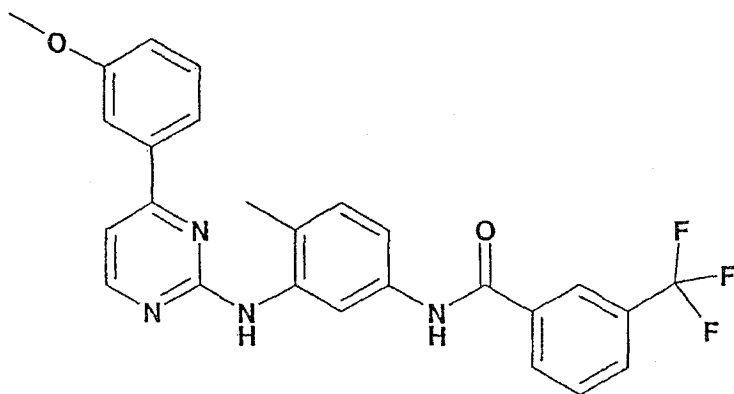
[0208] N-{3-[4-(3-甲氧基-苯基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0209] 将 N * 3 * -[4-(3-甲氧基-苯基)-嘧啶-2-基]-4-甲基-苯-1,3-二胺 (0.40g, 1.30mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.26g, 1.36mmol)、BOP (0.69g, 1.56mmol) 和 DIEA (0.8mL, 4.68mmol) 的混合物在 5.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将混合物在室温下搅拌 1 小时。然后将其通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 10.0mL CH₃OH 研磨 45 分钟并干燥。得到 0.34g N-{3-[4-(3-甲氧基-苯基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺, 为灰白色固体。

[0210] ¹H NMR (DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.43 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.48 (d, 1H, J = 4.94Hz), 8.30 (m, 1H), 8.27 (d, 1H, J = 8.40Hz), 8.11 (m, 1H), 7.97 (d, 1H, J = 7.39Hz), 7.79 (t, 1H, J = 8.02Hz), 7.71-7.67 (br m, 2H), 7.51 (dd, 1H, J₁ = 8.41Hz, J₂ = 2.00Hz), 7.40 (t, 1H, J = 8.20Hz), 7.36 (d, 1H, J = 5.21Hz), 7.07 (d, 1H, J₁ = 8.40Hz, J₂ = 2.40Hz), 3.74 (s, 3H), 2.26 (s, 3H)。

[0211] API-MS m/z 479.2 ([M+H]⁺, 计算值 479.2)

[0212]



[0213] 实施例 11

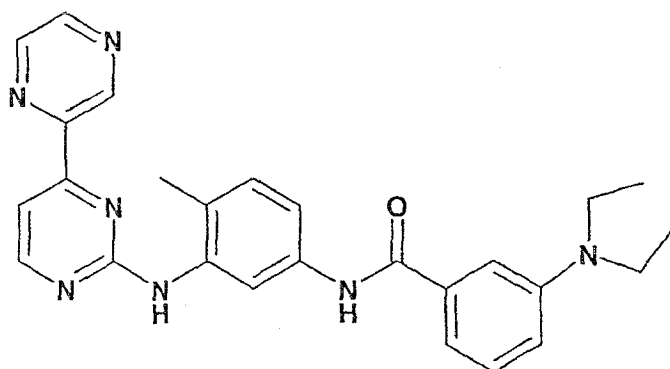
[0214] 3-二乙基氨基-N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-苯甲酰胺

[0215] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-二乙基氨基-苯甲酸 (0.48g, 2.08mmol)、HCl、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.7mL, 9.50mmol) 的混合物在 6.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将得到的混悬液在室温下搅拌 1 小时。然后将反应混合物通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 10.0mL CH₃OH 研磨 1 小时并干燥。得到 0.87g 3-二乙基氨基-N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-苯甲酰胺, 为浅黄色固体。

[0216] ¹H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.07(s, 1H), 9.50(s, 1H), 9.07(s, 1H), 8.78(s, 2H), 8.62(d, 1H, J = 4.78Hz), 8.17(m, 1H), 7.62(d, 1H, J = 5.76Hz), 7.50(dd, 1H, J₁ = 8.19Hz, J₂ = 2.16Hz), 7.29-7.21(br m, 2H), 7.17-7.11(br m, 2H), 6.84(dd, 1H, J₁ = 7.8Hz, J₂ = 2.44Hz), 3.39(q, 4H, J = 5.99Hz), 2.25(s, 3H), 1.11(t, 6H, J = 6.99Hz)。

[0217] API-MS m/z 454.1 ([M+H]⁺, 计算值 454.2)

[0218]



[0219] 实施例 12

[0220] N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲氧基-苯甲酰胺

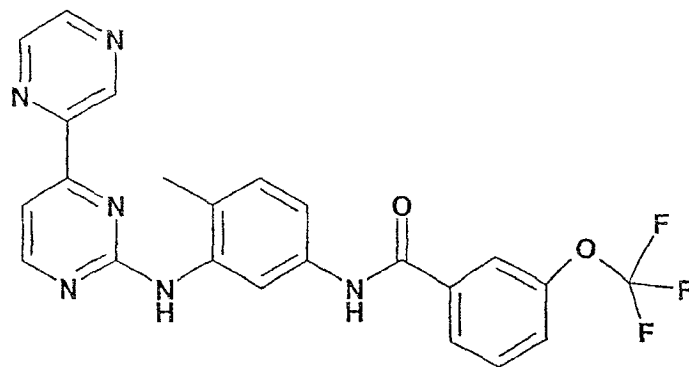
[0221] 将 4-甲基-N * 3 * -(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-三氟甲氧基-苯甲酸 (0.43g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.25mL, 7.20mmol) 的混合物在 6.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将混合物在室温下搅拌 1 小时。然后将混合物通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 10.0mL CH₃OH 研磨 45 分钟并干燥。得到 0.91g N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-3-三氟甲氧基-苯甲酰胺。

基]-3-三氟甲氧基-苯甲酰胺,为浅黄色固体。

[0222] ^1H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.37(s, 1H), 9.49(s, 1H), 9.10(s, 1H), 8.79(s, 2H), 8.62(d, 1H, $J = 5.24\text{Hz}$), 8.16(m, 1H), 8.03(d, 1H, $J = 8.09$), 7.93(br s, 1H), 7.69(t, 1H, $J = 8.02\text{Hz}$), 7.63(d, 1H, 5.15Hz), 7.60(br d, 1H, $J = 8.48\text{Hz}$), 7.50(dd, 1H, $J_1 = 8.17\text{Hz}$, $J_2 = 2.12\text{Hz}$), 7.25(d, 1H, $J = 8.48\text{Hz}$), 2.26(s, 3H)。

[0223] API-MS m/z 467.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 467.1)

[0224]



[0225] 实施例 13

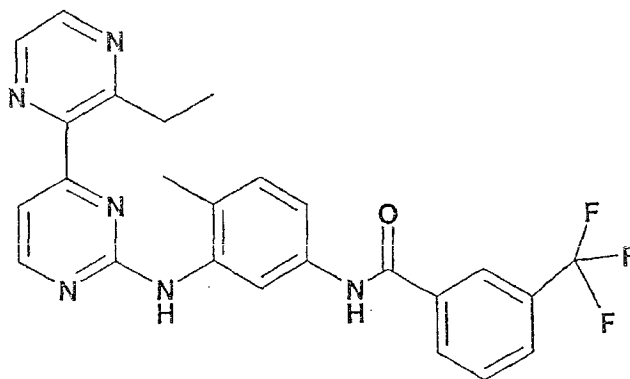
[0226] N-{3-[4-(3-乙基-吡嗪-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0227] 将 $\text{N} \times 3 \times$ -[4-(3-乙基-吡嗪-2-基)-嘧啶-2-基]-4-甲基-苯-1,3-二胺 (0.25g, 0.82mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.16g, 0.86mmol)、BOP (0.43g, 0.98mmol) 和 DIEA (0.5mL, 2.95mmol) 的混合物在 3.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 50mL 水。将得到的混悬液在室温下搅拌 1 小时。然后将其通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 2.0mL CH_3OH 研磨 1 小时并干燥。得到 0.18g N-{3-[4-(3-乙基-吡嗪-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺, 为灰白色固体。

[0228] ^1H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.40(s, 1H), 9.05(s, 1H), 8.64(d, 1H, $J = 2.34\text{Hz}$), 8.56(m, 2H), 8.28(m, 1H), 8.25(d, 1H, $J = 8.47\text{Hz}$), 7.96(d, 1H, $J = 8.09\text{Hz}$), 7.87(d, 1H, $J = 2.30\text{Hz}$), 7.78(t, 1H, $J = 7.36\text{Hz}$), 7.53(dd, 1H, $J_1 = 8.82\text{Hz}$, $J_2 = 2.30\text{Hz}$), 7.23(m, 2H), 2.97(q, 2H, $J = 5.8\text{Hz}$), 2.22(s, 3H), 1.01(t, 3H, $J = 8.7\text{Hz}$)。

[0229] API-MS m/z 479.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 479.5)

[0230]



[0231] 实施例 14

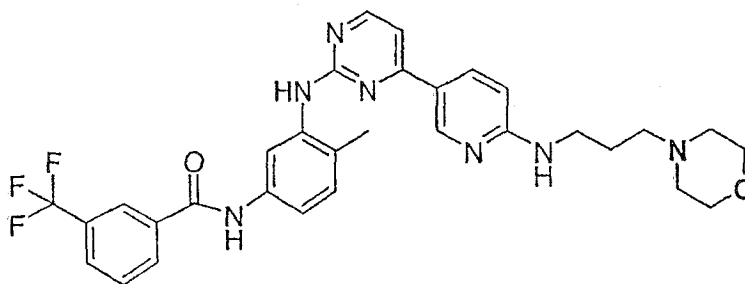
[0232] N-(4-甲基-3-{4-[6-(3-吗啉-4-基-丙基氨基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0233] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (500mg, 1.03mmol) 在 5mL 3-吗啉-4-基-丙胺中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。过滤收集黄色沉淀, 用二氯甲烷和乙醚研磨并在真空下干燥。得到白色固体 (275mg, 产率 45.2%)。

[0234] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.43 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.76 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.27 (d, $J = 9.80, 2\text{H}$), 8.10 (d, $J = 2.26, 1\text{H}$), 8.07 (m, 1H), 7.96 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.47 (dd, $J = 2.02, 8.29\text{Hz}$, 1H), 7.21 (d, $J = 13.19\text{Hz}$, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.12 (t, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 6.50 (d, $J = 9.04\text{Hz}$, 1H), 3.57-3.54 (m, 4H), 3.35-3.25 (m, 2H), 2.40-2.25 (m, 6H), 2.23 (s, 3H), 1.68 (m, 2H)

[0235] API-MS m/z 592.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 592.3)

[0236]



[0237] 实施例 15

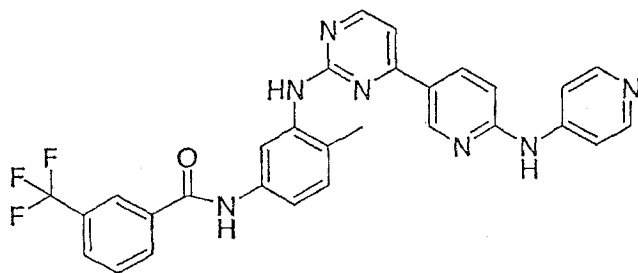
[0238] N-(4-甲基-3-{4-[6-(吡啶-4-基氨基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0239] 在室温下将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 和吡啶-4-基胺 (0.5g, 5.3mmol) 溶解在 1mL DMSO 中, 然后加热至 110℃ 并搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。通过过滤收集沉淀, 用二氯甲烷和甲醇研磨, 在真空下干燥。得到白色固体 (8.5mg, 产率 15.2%)。

[0240] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.49 (s, 1H), 9.33 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.91 (d, $J = 7.54\text{Hz}$, 2H), 8.875-8.80 (m, 3H), 8.59 (d, $J = 4.90, 1\text{H}$), 8.29 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 2H), 8.15 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 8.08 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 7.97 (t, $J = 7.53\text{Hz}$, 1H), 7.79 (t, $J = 7.54\text{Hz}$, 1H), 7.56 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 7.49 (dd, $J = 8.29, 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.25 (d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 7.02 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 2H), 2.23 (s, 3H)。

[0241] API-MS m/z 542.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 542.5)

[0242]



[0243] 实施例 16

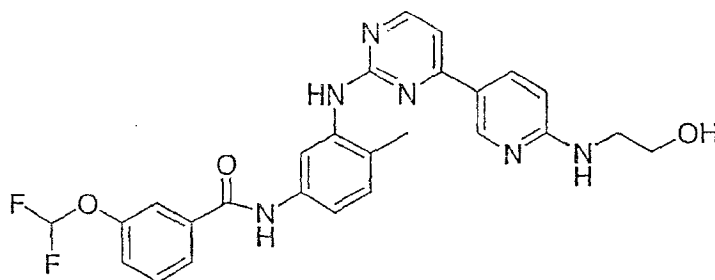
[0244] 3-二氟甲氧基-N-(3-{4-[6-(2-羟基-乙基氨基)-吡啶-3-基]-咪唑-2-基氨基}-4-甲基-苯基)-苯甲酰胺

[0245] 将N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-咪唑-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-二氟甲氧基-苯甲酰胺(160mg, 0.331mmol)在2ml 2-氨基-乙醇中于110℃下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取。浓缩合并的有机相。将深色残余物用二氯甲烷和乙醚的混合物和甲醇研磨并在真空下干燥。得到淡黄色固体(66mg, 产率39.3%)。

[0246] ^1H NMR(DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.31(s, 1H), 8.75(d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.69(s, 1H), 8.32(d, $J = 5.65\text{Hz}$, 1H), 8.09(dd, $J = 9.61, 2.64\text{Hz}$, 2H), 7.86(d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.65-7.55(m, 1H), 7.45(ddd, $J = 27.97, 8.01, 1.79\text{Hz}$, 1H), 7.38(m, 1H), 7.23-7.12(m, 3H), 6.56(d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 4.80(t, $J = 4.71\text{Hz}$, 1H), 4.15(q, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 3.53(q, $J = 5.77\text{Hz}$, 2H), 3.16(d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 2.21(s, 3H)

[0247] API-MS m/z 507.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 507.2)

[0248]



[0249] 实施例 17

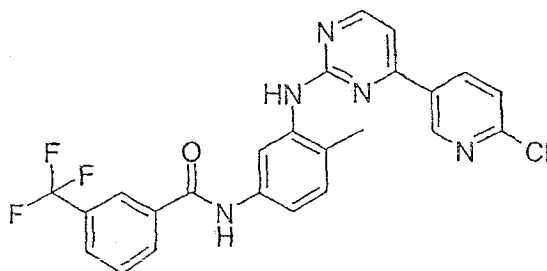
[0250] N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-咪唑-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0251] 将N*3*-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-咪唑-2-基]-4,N*1*-二甲基-苯-1,3-二胺(1.34g, 4.298mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸(0.8575g, 4.51mmol)、BOP(2.28g, 5.16mmol)溶解在10mL DMF中。然后将DIEA(2.8ml, 15.47mmol)加入到上述混合物中,将混合物在室温下搅拌过夜。用水稀释该深色反应混合物。将沉淀用水、饱和碳酸钠、水和冷甲醇洗涤。得到的产物为黄色固体(1.66g, 产率80%)。

[0252] ^1H NMR(DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44(s, 1H), 9.13(d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 9.05(s, 1H), 8.57-8.50(m, 2H), 8.28(d, $J = 11.68\text{Hz}$, 2H), 8.10(d, $J = 1.89\text{Hz}$, 1H), 7.97(d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.79(t, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.66(d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 7.51-7.42(m, 2H), 7.24(d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 2.23(s, 3H)

[0253] API-MS m/z 484.37, 486.45 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $[(\text{M}+2)+\text{H}]^+$, 计算值 483.12, 486.12)

[0254]



[0255] 实施例 18

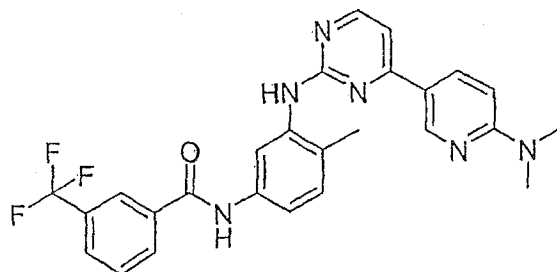
[0256] N-{3-[4-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0257] 将 N * 3 * -[4-(6-二甲基氨基-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基]-4-甲基-苯-1,3-二胺 (0.2g, 0.6242mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸 (0.1246g, 0.655mmol)、BOP (0.331g, 0.749mmol) 溶解在 5mL DMF 中。加入 DIEA (0.4mL, 2.247mmol) 并将混合物在室温下搅拌过夜。用水稀释该深色反应混合物。将沉淀进行硅胶色谱法处理, 用 80% 乙酸乙酯己烷洗脱。得到的产物为黄色固体 (180mg, 产率 61%)。

[0258] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.28 (d, $J = 9.42\text{Hz}$, 2H), 8.21 (dd, $J = 9.04, 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.09 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.10, 2.07\text{Hz}$, 1H), 7.28-7.19 (m, 2H), 6.68 (d, $J = 9.04\text{Hz}$, 1H), 3.09 (s, 6H), 2.23 (s, 3H)

[0259] API-MS m/z , 493.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 493.5)

[0260]



[0261] 实施例 19

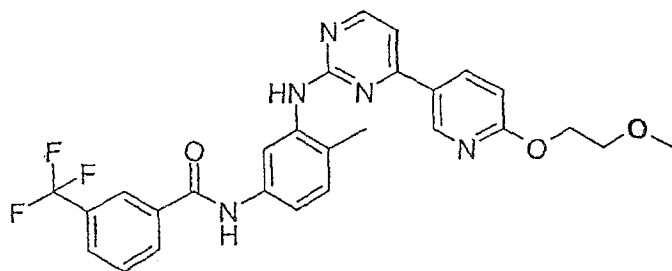
[0262] N-(3-{4-[6-(2-甲氧基-乙氧基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-4-甲基-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0263] 在室温下将 NaH (90.9mg, 2.27mmol, 60%) 加入到 2-甲氧基-乙醇 (78.6mg, 1.033mmol) 的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 30 分钟, 之后加入 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.1033mmol)。将反应混合物进一步在室温下再搅拌 4 小时。将反应混合物用水稀释并过滤沉淀, 得到白色固体 (64mg, 100%)。

[0264] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.95-8.85 (m, 2H), 8.55-8.35 (m, 2H), 8.30-8.24 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 7.92\text{Hz}$, 1H), 7.79 (t, $J = 7.54\text{Hz}$, 1H), 7.45 (d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 7.36 (d, $J = 4.90\text{Hz}$, 1H), 7.23 (d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 6.93 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 4.43 (t, $J = 4.52\text{Hz}$, 2H), 3.66 (t, $J = 4.52\text{Hz}$, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.23 (s, 3H)

[0265] API-MS m/z 524.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 524.5)

[0266]



[0267] 实施例 20

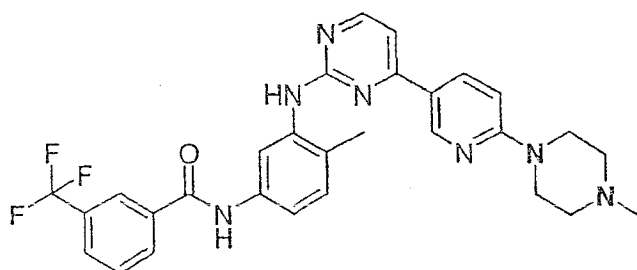
[0268] N-(4-甲基-3-[4-[6-(4-甲基-吡嗪-1-基)-吡啶-3-基]-吡啶-2-基氨基]-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0269] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1g 1-甲基-吡嗪中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释, 通过过滤收集黄色沉淀。在真空下干燥后, 得到白色固体 (55mg, 产率 97.2%)。

[0270] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.95-8.85 (m, 2H), 8.55-8.35 (m, 2H), 8.30-8.24 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 7.92\text{Hz}$, 1H), 7.79 (t, $J = 7.54\text{Hz}$, 1H), 7.45 (d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 7.36 (d, $J = 4.90\text{Hz}$, 1H), 7.23 (d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 6.93 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 4.43 (t, $J = 4.52\text{Hz}$, 2H), 3.66 (t, $J = 4.52\text{Hz}$, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.23 (s, 3H)

[0271] API-MS m/z 524.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 524.5)

[0272]



[0273] 实施例 21

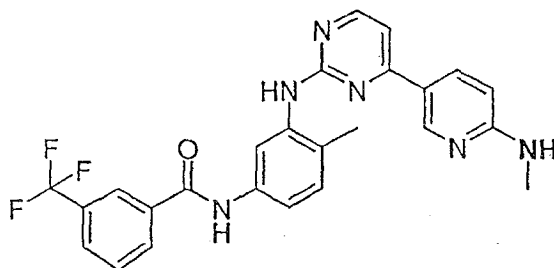
[0274] N-{4-甲基-3-[4-(6-甲基氨基-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0275] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 2ml 甲胺 (2M, 在 THF 中) 中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释, 通过过滤收集黄色沉淀。在真空下干燥后, 得到白色固体 (31mg, 产率 63%)。

[0276] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.78 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.35-8.24 (m, 3H), 8.15-8.05 (m, 2H), 7.97 (d, $J = 1.87\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.10, 2.07\text{Hz}$, 1H), 7.24-7.18 (m, 2H), 7.10-7.00 (m, 1H), 6.49 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 2.81 (d, $J = 4.52\text{Hz}$, 3H), 2.23 (s, 3H)

[0277] API-MS m/z 479.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 479.2)

[0278]



[0279] 实施例 22

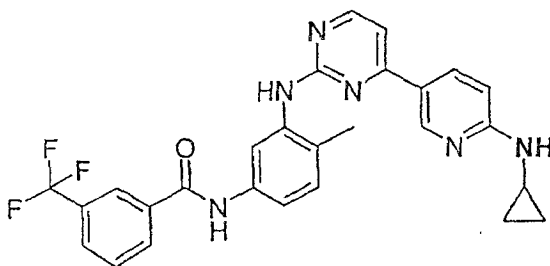
[0280] N-{3-[4-(6-环丙基氨基-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0281] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1ml 环丙基胺中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。通过过滤收集沉淀, 在乙醚中重结晶。在真空下干燥后, 得到白色固体 (6mg, 产率 11.5%)。

[0282] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.78 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.35-8.24 (m, 3H), 8.19 (dd, $J = 8.85, 2.45\text{Hz}$, 1H), 8.08 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.10, 1.70\text{Hz}$, 1H), 7.33 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 7.50-7.40 (m, 2H), 6.63 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 2.60-2.53 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 0.76-0.68 (m, 2H), 0.48-0.40 (m, 2H)

[0283] API-MS m/z 505.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 505.2)

[0284]



[0285] 实施例 23

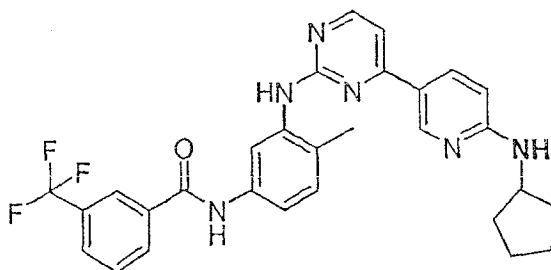
[0286] N-{3-[4-(6-环戊基氨基-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0287] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-吡啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1ml 环戊基胺中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。通过过滤收集沉淀, 在乙醚中重结晶。在真空下干燥后, 得到白色固体 (27mg, 产率 49.2%)。

[0288] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.76 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.36-8.24 (m, 3H), 8.13-8.04 (m, 2H), 7.97 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.28, 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.25-7.15 (m, 2H), 7.11-7.04 (m, 1H), 6.48 (d, $J = 9.04\text{Hz}$, 1H), 4.21-4.05 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.00-1.85 (m, 2H), 1.75-1.35 (m, 6H)

[0289] API-MS m/z 533.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 533.2)

[0290]



[0291] 实施例 24

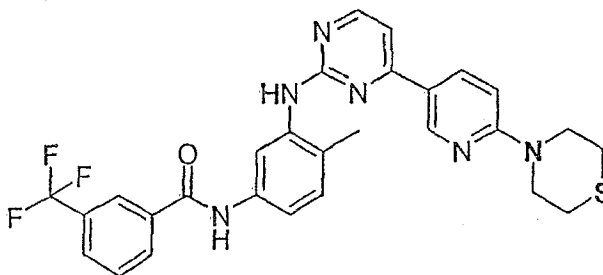
[0292] N-{4-甲基-3-[4-(6-硫吗啉-4-基-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0293] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1ml 硫吗啉中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释并通过过滤收集沉淀。在真空下干燥后, 得到白色固体 (50mg, 产率 87.9%)。

[0294] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.87 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.32-8.20 (m, 3H), 8.07 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.16\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.10, 2.07\text{Hz}$, 1H), 7.28-7.18 (m, 2H), 7.11-7.04 (m, 1H), 6.91 (d, $J = 9.04\text{Hz}$, 1H), 4.25-3.94 (m, 4H), 2.65-2.56 (m, 4H), 2.23 (s, 3H)

[0295] API-MS m/z 551.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 551.3)

[0296]



[0297] 实施例 25

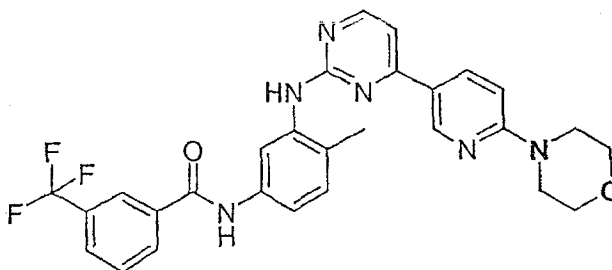
[0298] N-{4-甲基-3-[4-(6-吗啉-4-基-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0299] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1ml 吗啉中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释并通过过滤收集沉淀。在真空下干燥后, 得到白色固体 (46mg, 产率 83.3%)。

[0300] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.89 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.32-8.20 (m, 3H), 8.08 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.53\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.29, 2.26\text{Hz}$, 1H), 7.28-7.18 (m, 2H), 6.90 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 3.75-3.65 (m, 4H), 3.60-3.5 (m, 4H), 2.23 (s, 3H)

[0301] API-MS m/z 535.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 535.3)

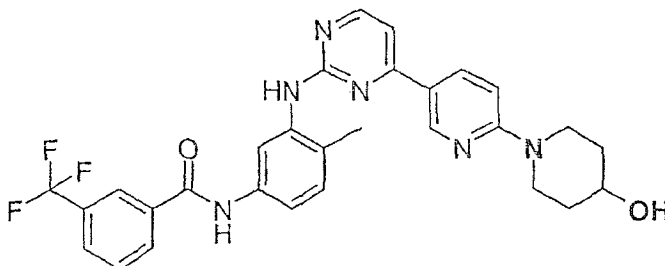
[0302]



[0304] N-{3-[4-(4-羟基-3,4,5,6-四氢-2H-[1,2'-]联吡啶-5'-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0306] ^1H NMR (DMSO, 300MHz) : δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.86 (d, J = 1.88Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.43–8.18 (m, 4H), 8.10 (s, 1H), 7.96 (d, J = 7.91Hz, 1H), 7.78 (t, J = 7.53Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 8.47, 0.94Hz, 1H), 7.28–7.18 (m, 2H), 6.90 (d, J = 9.04Hz, 1H), 4.75–4.69 (m, 1H), 4.15–4.00 (m, 2H), 3.79–3.66 (m, 1H), 3.29–3.15 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.84–1.71 (m, 2H), 1.42–1.20 (m, 2H) ;

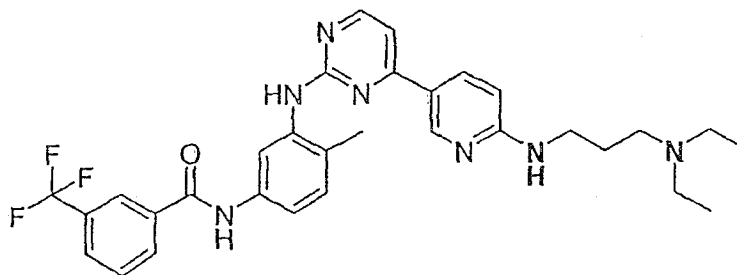
[0308]



[0310] N-(3-{4-[6-(3-二乙基氨基-丙基氨基)-吡啶-3-基]}-嘧啶-2-基氨基)-4-甲基-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0312] ^1H NMR (DMSO, 300MHz) : δ (ppm) 10.50 (s, 1H), 8.76 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.32–8.25 (m, 3H), 8.13–8.05 (m, 2H), 7.96 (d, $J = 7.53\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 8.10\text{Hz}$, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.10, 1.70\text{Hz}$, 1H), 7.25–7.18 (m, 2H), 6.50 (d, $J = 9.04\text{Hz}$, 1H), 3.33–3.23 (m, 2H), 2.5–2.35 (m, 6H), 2.23 (s, 3H), 1.03–0.85 (m, 6H) ;

[0314]



[0315] 实施例 28

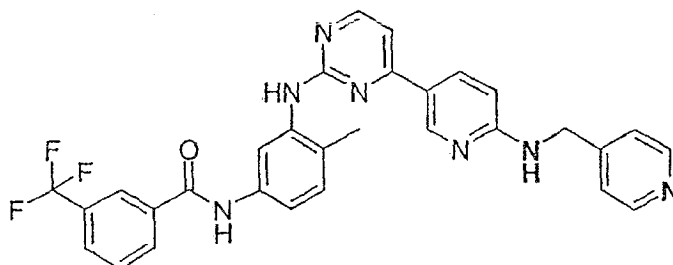
[0316] N-[4-甲基-3-(4-{6-[(吡啶-4-基甲基)-氨基]-吡啶-3-基}-嘧啶-2-基氨基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺]

[0317] 将 N-[3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1mL C-吡啶-4-基-甲胺中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。通过过滤收集沉淀并用乙醚洗涤。在真空下干燥后, 得到白色固体 (30mg, 产率 52.4%)。

[0318] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.42 (s, 1H), 8.73 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 6.03\text{Hz}$, 2H), 8.32 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.31-8.23 (m, 2H), 8.13 (dd, $J = 8.67, 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.05 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.82-7.69 (m, 2H), 7.46 (dd, $J = 8.29, 2.26\text{Hz}$, 1H), 7.28 (d, $J = 5.65$, 2H), 7.24-7.15 (m, 2H), 6.61 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 4.57 (d, $J = 5.65\text{Hz}$, 2H), 2.23 (s, 3H)

[0319] API-MS m/z 556.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 556.5)

[0320]



[0321] 实施例 29

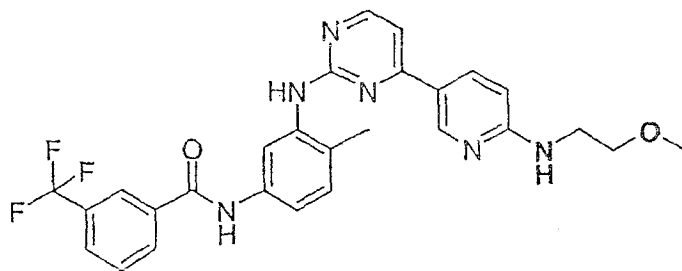
[0322] N-(3-{4-[6-(2-甲氧基-乙基氨基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-4-甲基-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0323] 将 N-[3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1ml 2-甲氧基-乙胺中于 110℃ 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释, 通过过滤收集沉淀并用乙醚洗涤。在真空下干燥后, 得到黄色固体 (65mg, 产率 66.9%)。

[0324] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.42 (s, 1H), 8.76 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.35-8.25 (m, 3H), 8.13-8.05 (m, 2H), 7.96 (d, $J = 7.96\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.10, 2.07\text{Hz}$, 1H), 7.25-7.13 (m, 3H), 6.56 (d, $J = 9.04\text{Hz}$, 1H), 3.48-3.43 (m, 4H), 3.26 (s, 3H), 3.17 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 2H), 2.23 (s, 3H)

[0325] API-MS m/z 523.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 523.5)

[0326]



[0327] 实施例 30

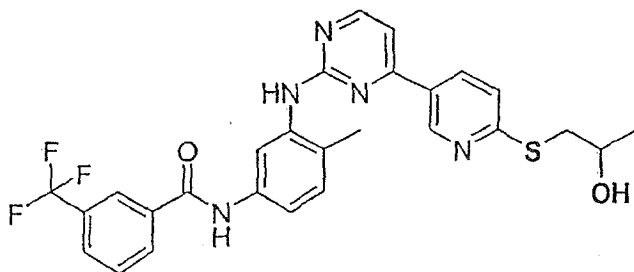
[0328] N-(3-{4-[6-(2-羟基-丙硫基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-4-甲基-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0329] 在室温下将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol) 在 1ml 1-巯基-丙-2-醇中于碳酸钾存在下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。通过过滤收集沉淀并用乙醚洗涤。在真空下干燥后, 得到固体 (11mg, 产率 20%)。

[0330] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 9.12 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.47 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.35-8.25 (m, 3H), 8.08 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.28, 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.45-7.35 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.28\text{Hz}$, 1H), 4.99 (br, 1H), 3.90-3.80 (m, 1H), 3.22 (d, $J = 6.02\text{Hz}$, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.14 (d, $J = 6.02\text{Hz}$, 3H)

[0331] API-MS m/z 540.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 540.5)

[0332]



[0333] 实施例 31

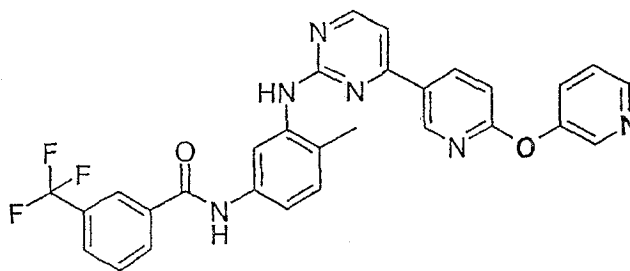
[0334] N-(4-甲基-3-{4-[6-(吡啶-3-基氧基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0335] 将 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺 (50mg, 0.103mmol)、吡啶-3-醇 (98.7mg, 1.03mmol)、18-冠-6 (20mg)、KOH (56mg) 在 1ml 甲苯中于 110°C 下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释。通过过滤收集沉淀, 用制备-TLC (100% 乙酸乙酯) 进一步纯化。在真空下干燥后, 得到白色固体 (11.3mg, 产率 26.2%)。

[0336] ^1H NMR (DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.59 (dd, $J = 8.67, 2.64\text{Hz}$, 1H), 8.53-8.45 (m, 3H), 8.30-8.22 (m, 2H), 8.08 (d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.69 (dq, $J = 8.38, 1.38\text{Hz}$, 1H), 7.53-7.44 (m, 2H), 7.37 (d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 7.27-7.20 (m, 2H), 2.23 (s, 3H)

[0337] API-MS m/z 543.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 543.3)

[0338]



[0339] 实施例 32

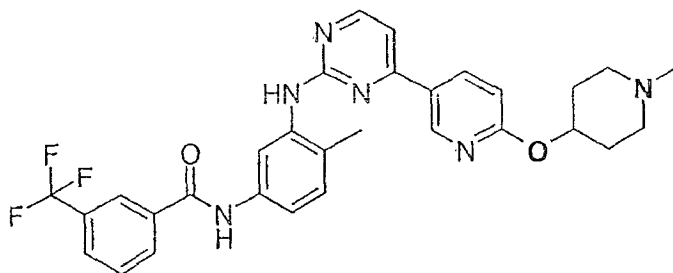
[0340] N-(4-甲基-3-{4-[6-(1-甲基-吡啶-4-基氧基)-吡啶-3-基]-嘧啶-2-基氨基}-苯基)-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0341] 在室温下将 NaH(90.9mg, 2.27mmol, 60%) 加入到 1-甲基-吡啶-4-醇(119mg, 1.033mmol) 在 2mL DMF 中的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 30 分钟, 之后加入 N-{3-[4-(6-氯-吡啶-3-基)-嘧啶-2-基氨基]-4-甲基-苯基}-3-三氟甲基-苯甲酰胺(50mg, 0.1033mmol)。将反应混合物进一步在室温下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释, 过滤得到沉淀, 将其用制备 TLC(60% 乙酸乙酯/己烷) 进一步纯化。在真空下干燥后, 得到固体产物(50mg, 产率 86.3%)。

[0342] ^1H NMR(DMSO, 300MHz): δ (ppm) 10.44(s, 1H), 8.90(d, $J = 2.26\text{Hz}$, 1H), 8.88(s, 1H), 8.46(d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 8.39(dd, $J = 8.85, 2.45\text{Hz}$, 1H), 8.48-8.24(m, 2H), 8.11(d, $J = 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.96(d, $J = 7.91\text{Hz}$, 1H), 7.78(t, $J = 7.72\text{Hz}$, 1H), 7.48(dd, $J = 8.28, 1.88\text{Hz}$, 1H), 7.34(d, $J = 5.27\text{Hz}$, 1H), 7.23(d, $J = 8.29\text{Hz}$, 1H), 6.87(d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H), 5.1-5.0(m, 1H), 2.71-2.59(m, 2H), 2.23(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.3-2.1(m, 2H), 2.02-1.91(m, 2H), 1.75-1.59(m, 2H)

[0343] API-MS m/z 563.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 563.5)

[0344]



[0345] 实施例 33

[0346] N-[3-([4,5'] 联嘧啶-2-基氨基)-4-甲基-苯基]-3-三氟甲基-苯甲酰胺

[0347] 将 N * 3 * -[4,5'] 联嘧啶-2-基-4-甲基-苯-1,3-二胺(0.23g, 0.83mmol)、3-三氟甲基-苯甲酸(0.16g, 0.87mmol)、BOP(0.44g, 1.00mmol) 和 DIEA(0.5mL, 3.00mmol) 的混合物在 3.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 40mL 水。将得到的混悬液在室温下搅拌 1 小时。然后将其通过布氏漏斗过滤, 用 5.0mL CH_3OH 研磨两次并干燥。得到棕色固体。

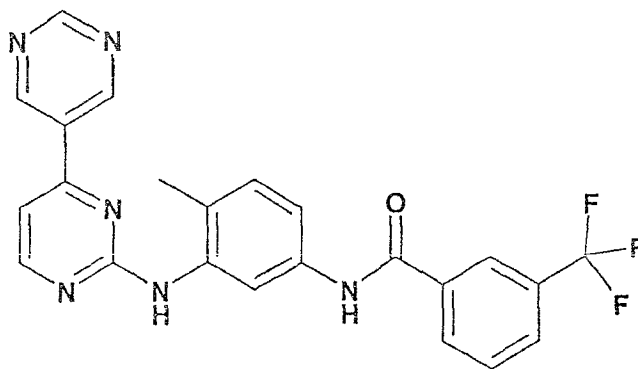
[0348] 将溶液通过快速色谱法纯化, 用 1 : 5 EtOAc : 己烷 $\rightarrow$ 1 : 1 EtOAc : 己烷洗脱。在真空下除去溶剂。得到 0.14g N-[3-([4,5'] 联嘧啶-2-基氨基)-4-甲基-苯基]-3-三

氟甲基-苯甲酰胺,为黄色固体。

[0349] ^1H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.50(s, 1H), 9.40(s, 1H), 9.18(s, 1H), 9.05(d, 1H, $J = 3.78\text{Hz}$), 8.71(d, 1H, $J = 4.16\text{Hz}$), 8.46-8.27(m, 3H), 8.17(s, 1H), 8.00(d, 1H, $J = 7.14\text{Hz}$), 7.83(dd, 1H, $J = 6.7\text{Hz}$), 7.75(d, 1H, $J = 3.96\text{Hz}$), 7.64-7.43(m, 2H), 7.36-7.20(m, 1H), 2.29(s, 3H)。

[0350] API-MS m/z 451.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 451.1)

[0351]



[0352] 实施例 34

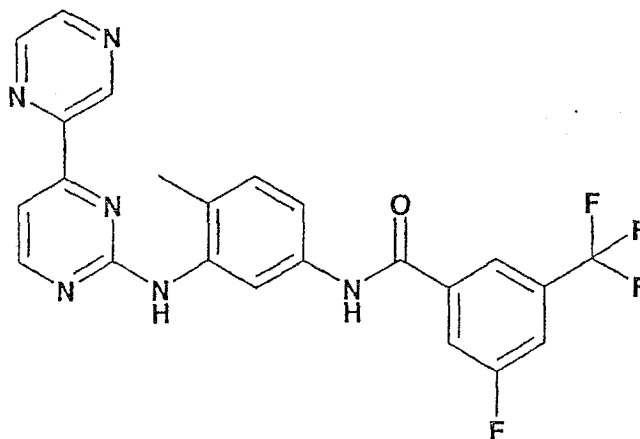
[0353] 3-氟-N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-5-三氟甲基-苯甲酰胺

[0354] 将 4-甲基-N*3*(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基)-苯-1,3-二胺 (0.55g, 1.98mmol)、3-氟-5-三氟甲基-苯甲酸 (0.43g, 2.08mmol)、BOP (1.05g, 2.38mmol) 和 DIEA (1.25mL, 7.20mmol) 的混合物在 9.0mL DMF 中于室温下搅拌过夜。向沉淀中加入 25mL 水。将得到的混悬液在室温下搅拌 1 小时。然后将其通过布氏漏斗过滤, 风干, 用 10.0mL CH_3OH 研磨 1 小时并干燥。得到 0.80g 3-氟-N-[4-甲基-3-(4-吡啶-2-基-嘧啶-2-基氨基)-苯基]-5-三氟甲基-苯甲酰胺, 为浅黄色固体。

[0355] ^1H NMR(DMSO, 500MHz): δ (ppm) 10.49(s, 1H), 9.49(s, 1H), 9.10(s, 1H), 8.79(s, 2H), 8.62(d, 2H, $J = 4.81\text{Hz}$), 8.10-8.20(m, 3H), 7.96(d, 1H, $J = 8.66\text{Hz}$), 7.63(d, 1H, $J = 4.78\text{Hz}$), 7.48(dd, 1H, $J_1 = 8.46\text{Hz}$, $J_2 = 2.05\text{Hz}$), 7.26(d, 1H, $J = 8.09\text{Hz}$), 2.26(s, 3H)。

[0356] API-MS m/z 469.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 计算值 469.1)

[0357]



[0358] 生物学活性

[0359] 使用杆状病毒表达系统纯化来自昆虫细胞的人序列的活性 B-Raf、C-Raf 和 V599E B-Raf 蛋白质。在用 I κ B- α 包被并且用 Superblock 封闭的 96-孔微量培养板上试验 Raf 抑制作用。使用磷酸-I κ B- α 特异性抗体 (CellSignaling #9246)、抗小鼠 IgG 碱性磷酸酶缀合的二级抗体 (Pierce #31320) 和碱性磷酸酶底物 ATTOPHOS (Promega, #S101) 检测 I κ B- α 在丝氨酸 36 处的磷酸化。

[0360] 实施例 1-34 的化合物中的每一种均以 0.01 至 0.7 微摩尔/升的 IC₅₀ 抑制野生型 C-RAF 和/或以 0.04 至 1.5 微摩尔/升的 IC₅₀ 抑制野生型 B-RAF 和/或以 0.006 至 1.6 微摩尔/升的 IC₅₀ 抑制突变型 B-RAF (V599E)。

[0361] 实施例 D1

[0362] 检测在人 B-Raf 基因中 T1796A 突变。

[0363] 检测引物 :GATTTTGGTCTAGCTACAGA

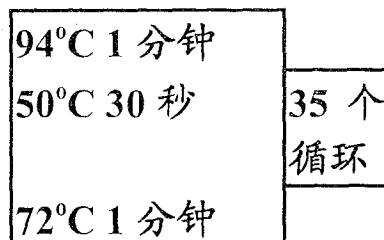
[0364] 第二引物 :GACTTTCTAGTAACTCAGCAG

[0365] 使用 GENELUTE 哺乳动物基因组 DNA 试剂盒 (Sigma cat#G1N 350) 从来自黑素瘤细胞系的人细胞分离基因组 DNA。PCR 反应使用来自 Roche 的 PCR Core 试剂盒 (cat # 1578 553) 以 50 微升的总体积在 PCR 机 (MJResearch, Model PTC100) 上进行。PCR 反应混合物含有 5 微升 10X 反应缓冲液、1 微升 10mM dNTPs、100-1000ng 模板 DNA、0.5 微升 Taq 聚合酶 (2.5-5 单位)、1 微升每种引物的 31 μ M 贮备液。

[0366] PCR 条件如下：

[0367] 95°C 3 分钟

[0368]



[0369] 72°C 10 分钟

[0370] 4°C

[0371] 在扩增后,将 8 微升 PCR 反应混合物与 2 微升核酸样品加样缓冲液 [BioRad cat#161-0767] 混合。将 10 微升样品加在 1.5% 琼脂糖 [GIBCO-BRL cat # 15510-027] 凝胶上,该凝胶含有 0.3 μ g/ml 溴化乙锭 [Pierce cat #17898]。将分子量标准 [来自 Invitrogen cat # 10380-012 的 100bp DNA 梯] 加到相邻的泳道中。通过在 TAE 缓冲液 (0.04M Tris-乙酸, 0.01M EDTA, 0.02M 冰醋酸 pH8.4) [Roche cat #1666690] 中进行电泳分离 DNA。电泳条件为 120 伏特 30-40 分钟。在分离后,将凝胶暴露于紫外光,在 AlphaImager2000 记录系统上照相。

[0372] 一般而言,在凝胶中检测到两个条带。较快迁移的条带移动至 100bp 标志物之前,其代表引物。从 T1796A 突变体特异性 PCR 扩增得到的 DNA 预计大小为 152bp,预计迁移到 100bp 标准和 200bp 标准之间。通过序列测定来确证 PCR 扩增产物。存在 PCR 扩增产物证明在模板 DNA 中存在 T1796A 突变。不存在 PCR 扩增产物表明在组织样品中不存在突变。

[0373] 通过该方法利用下表中适用于各突变的检测引物和第二引物检测了其它 B-RAF 突变：

[0374]

SEQID 编号：	检测引物 寡核苷酸片段 (5' → 3')	B-RAF 突变
1	ACAGTGGGACAAAGAATTGA	G1388A
2	ACAGTGGGACAAAGAATTGT	G1388T
3	GGACAAAGAATTGGATCTGC	G1394C
4	GGACAAAGAATTGGATCTGA	G1394A
5	GGACAAAGAATTGGATCTGT	G1394T
6	ATTGGATCTGGATCATTTC	G1403C
7	ATTGGATCTGGATCATTGA	G1403A
8	GAGTAATAATATATTTCTTCATA	G1753A
9	CAGTAAAAATAGGTGATTTG	T1782G
10	CAGTAAAAATAGGTGATTTTC	G1783C
11	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTG	C1786G
12	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCG	T1787G
13	GATTTTGGTCTAGCTACAGA	T1796A
14	GATTTTGGTCTAGCTACAGAT	TG1796-97AT

[0375]

SEQID 编号：	第二引物 寡核苷酸片段 (5' → 3')	B-Raf 突变
15	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1388A
16	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1388T
17	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1394C
18	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1394A
19	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1394T
20	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1403C
21	TGTCACCACATTACATACTTACC	G1403A
22	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	G1753A
23	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	T1782G
24	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	G1783C
25	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	C1786G
26	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	T1787G
27	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	T1796A
28	GACTTTCTAGTAACTCAGCAG	TG1796-97AT