

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480006570.6

[51] Int. Cl.

A61K 31/4725 (2006.01)

A61K 31/472 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 4 月 12 日

[11] 公开号 CN 1758910A

[22] 申请日 2004.3.10

[21] 申请号 200480006570.6

[30] 优先权

[32] 2003.3.11 [33] US [31] 60/453,624

[86] 国际申请 PCT/EP2004/002460 2004.3.10

[87] 国际公布 WO2004/080464 英 2004.9.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.12

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 D·B·巴特 G·博尔德 S·金

T·M·拉姆齐 M·L·萨比奥

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

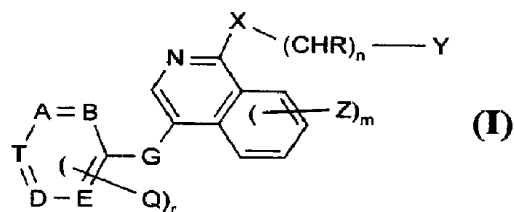
权利要求书 9 页 说明书 60 页 序列表 6 页

[54] 发明名称

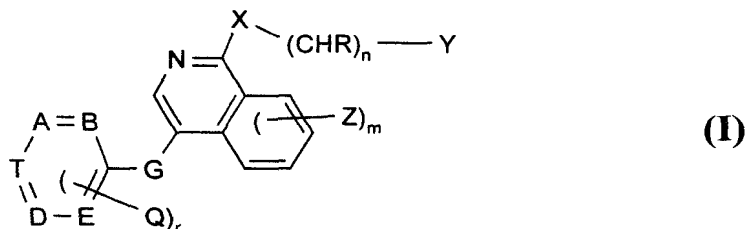
异喹啉衍生物治疗癌症和 MAP 激酶相关疾病的用途

[57] 摘要

本发明涉及通过对需要此种治疗的病人施用式 (I) 化合物来治疗由异常 MAP 激酶信号传导途径所表征的疾病, 其中可变的取代基为本文所定义的取代基。本发明方法对于治疗具有突变 RAF 激酶的癌症(特别是黑素瘤)特别有用。



1. 治疗患有 MAP 激酶信号传导途径信号过强所表征疾病的病人的方法，所述方法包括对病人施用有效抑制 RAF 激酶的量的式(I)化合物或其 N-氧化物或可药用盐，



其中

r 是 0-2;

n 是 0-2;

m 是 0-4;

A、B、D、E 和 T 相互独立的为 N 或者 CH，附加条件是 A、B、D、E 和 T 中至少一个但最多三个为 N;

G 是低级亚烷基、-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-SO₂-、氧杂 (-O-)、硫杂 (-S-) 或者 -NR-，或者是被酰氧基、氧、卤素或者羟基取代的低级亚烷基;

Q 是低级烷基，特别是甲基;

R 是 H 或者低级烷基;

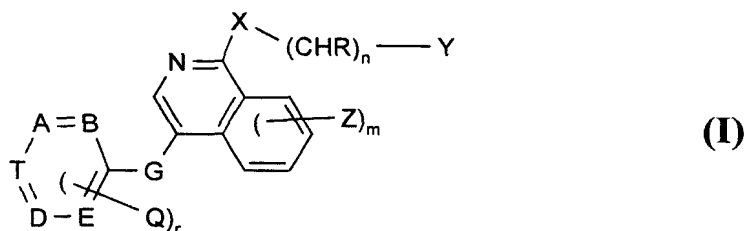
X 是 Y、-N(R)-、氧杂或硫代; 优选为 -NH-;

Y 是 H、非取代或者取代的低级烷基、芳香基、杂芳香基或者非取代或取代环烷基; 和

Z 是氨基、单取代或者二取代氨基、卤素、烷基、取代烷基、羟基、醚化或酯化羟基、硝基、氰基、羧基、酯化羧基、烷酰基、氨基甲酰基、N-单或 N,N-二取代氨基甲酰基、脒基、胍基、巯基、磺基、苯硫基、苯低级烷基硫基、烷基苯硫基、苯亚磺酰基、苯低级烷基亚磺酰基、烷基苯亚磺酰基、苯磺酰基、苯低级烷基磺酰基或者烷基苯磺酰基，并且如果存在

不止一个 Z 基 ($m \geq 2$), 则取代基 Z 可以是相同的或者不同的。

2. 式(I)化合物或其 N-氧化物或可药用盐的用途, 用于制备治疗 MAP 激酶信号传导途径信号过强所表征疾病的药物,



其中

r 是 0-2;

n 是 0-2;

m 是 0-4;

A、B、D、E 和 T 相互独立的为 N 或者 CH, 附加条件是 A、B、D、E 和 T 中至少一个但最多三个为 N;

G 是低级亚烷基、 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、氧杂 ($-\text{O}-$)、硫杂 ($-\text{S}-$) 或者 $-\text{NR}-$, 或者是被酰氧基、氧、卤素或者羟基取代的低级亚烷基;

Q 是低级烷基, 特别是甲基;

R 是 H 或者低级烷基;

X 是 Y、 $-\text{N}(\text{R})-$ 、氧杂或硫代; 优选为 $-\text{NH}-$;

Y 是 H、非取代或者取代的低级烷基、芳香基、杂芳香基或者非取代或取代环烷基; 和

Z 是氨基、单取代或者二取代氨基、卤素、烷基、取代烷基、羟基、醚化或酯化羟基、硝基、氰基、羧基、酯化羧基、烷酰基、氨基甲酰基、N-单或 N,N-二取代氨基甲酰基、脒基、胍基、巯基、磺基、苯硫基、苯低级烷基硫基、烷基苯硫基、苯亚磺酰基、苯低级烷基亚磺酰基、烷基苯亚磺酰基、苯磺酰基、苯低级烷基磺酰基或者烷基苯磺酰基并且如果存在不止一个 Z 基 ($m \geq 2$) 则取代基 Z 可以是相同的或者不同的。

3. 分别根据权利要求 1 或 2 的方法或用途, 其中

r 是 0-2;

n 是 0 或 1;

m 是 0 或 1;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N, 或者 A、D 和 E 各是 CH 并且 B 和 T 是 N, 或者 A、B、E 和 T 是 CH 并且 D 是 N, 或者 A、T、D 和 E 是 CH 并且 B 是 N; 特别是其中 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N, 或者 A、D 和 E 各是 CH 并且 B 和 T 是 N;

G 是低级亚烷基、-CH₂-NH-、-CH₂-O-、羟基亚甲基或者苯甲酰氧基亚甲基;

Q 是甲基;

R 是 H 或者低级烷基;

X 是-NR-、氧杂或者硫杂;

Y 是非取代的或者用一个或两个相同或者不同的选自氨基、低级烷酰基氨基、卤素、非取代或者取代低级烷基、羟基、低级烷氧基、苯基低级烷氧基、氰基、低级链烯基、C₈-C₁₂ 烷氧基、低级烷氧基羰基、氨基甲酰基、低级烷基氨基甲酰基、低级烷酰基、苯氧基、卤代低级烷氧基、低级烷氧基羰基、低级烷基巯基、卤代低级烷基巯基、羟基低级烷基、低级链烷磺酰基、卤代低级链烷磺酰基、苯基磺酰基和低级亚烷基二氧的取代基结合到两个相邻碳原子上进行取代的苯基, 或者其中两个相临近位置被亚烷基或者亚链烯基取代以形成融合到芳基环的 5-7 成员环的苯基;

Z 是氨基、N-低级烷基氨基、羟基低级烷基氨基、苯基低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、N-苯基低级烷基-N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基苯氨基、低级烷酰基氨基、苯甲酰氨基和苯基低级烷氧基羰基氨基, 其中在每种情况下的苯基是非取代的或者被硝基、氨基、卤素、氨基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基、低级烷酰基、氨基甲酰基、2-羟乙基氨基、苄氧基羰基氨基或溴。

4. 分别根据权利要求 1 或 2 的方法或用途, 其中

r 是 0;

n 是 0;

m 是 0;

B、D、E 和 T 是 CH 并且 A 是 N, 或者 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是低级亚烷基;

X 是-NH-;

Y 是非取代的或者被一个或两个相同或不同的选自卤素和低级烷基的取代基取代的苯基。

5. 分别根据权利要求 1 或 2 的方法或用途, 其中

r 是 0;

n 是 0-2;

m 是 0;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是亚甲基;

R 是 H;

X 是-NR; 和

Y 是非取代或者被卤素、低级烷基、低级烷氧基或非取代或者被低级烷基取代的环己基取代的苯基。

6. 分别根据权利要求 1 或 2 的方法或用途, 其中

r 是 0;

n 是 0;

m 是 0;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是亚甲基;

X 是-NH-; 和

Y 是被一个或两个相同或不同的选自卤素和低级烷基的取代基取代的苯基。

7. 根据权利要求 6 的方法或用途, 其中 Y 是在第 4 位被叔丁基取代的

苯基。

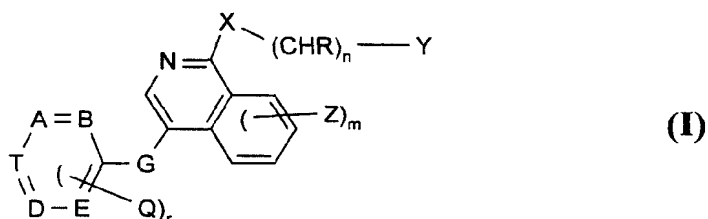
8. 根据权利要求6的方法或用途,其中Y是在第4位被三氟甲基取代的苯基。

9. 分别根据权利要求1或2的方法或用途,其中所述的由MAP激酶信号传导途径信号过强所表征的疾病是癌症。

10. 根据权利要求9的方法或用途,其中所述癌症是黑素瘤、结肠直肠癌、卵巢癌、神经胶质瘤、腺癌、肉瘤、乳腺癌和肝癌。

11. 根据权利要求10的方法或用途,其中所述癌症是黑素瘤。

12. 治疗病人黑素瘤的方法,其中包括(a)测试来自病人的黑素瘤组织以确定黑素瘤组织是否表达突变型RAF激酶或者过表达野生型RAF激酶和(b)如果发现黑素瘤组织过表达野生型RAF激酶或者表达活化了的突变型B-RAF激酶,则用有效抑制RAF激酶的量的式(I)化合物或者其N-氧化物或可药用盐治疗病人,



其中

r 是 0-2;

n 是 0-2;

m 是 0-4;

A、B、D、E 和 T 相互独立的为 N 或者 CH, 条件是 A、B、D、E 和 T 中至少一个但最多三个为 N;

G 是低级亚烷基、-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-SO₂-、氧杂(-O-)、硫杂(-S-)或者-NR-, 或者是被酰氧基、氧、卤素或者羟基取代的低级亚烷基;

Q 是低级烷基, 特别是甲基;

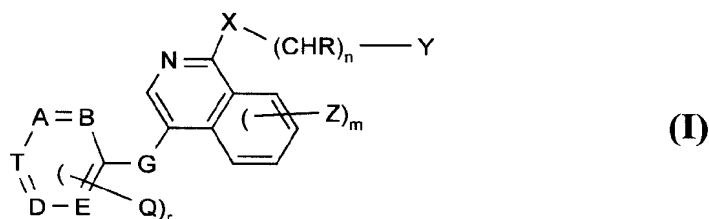
R 是 H 或者低级烷基;

X 是 Y、-N(R)-、氧杂或硫代；优选地为-NH-；

Y 是 H、非取代或者取代的低级烷基、芳香基、杂芳香基或者非取代或取代环烷基；和

Z 是氨基、单取代或者二取代氨基、卤素、烷基、取代烷基、羟基、醚化或酯化羟基、硝基、氰基、羧基、酯化羧基、烷酰基、氨基甲酰基、N-单或 N,N-二取代氨基甲酰基、脒基、胍基、巯基、磺基、苯硫基、苯低级烷基硫基、烷基苯硫基、苯亚磺酰基、苯低级烷基亚磺酰基、烷基苯亚磺酰基、苯磺酰基、苯低级烷基磺酰基或者烷基苯磺酰基并且如果存在不止一个 Z 基 ($m \geq 2$)，则取代基 Z 可以是相同的或者不同的。

13. 式(I)化合物或者其 N-氧化物或可药用盐用于制备治疗黑素瘤的药物的用途，所述用途包括(a)测试来自病人的黑素瘤组织以确定黑素瘤组织是否表达突变型 RAF 激酶或者过表达野生型 RAF 激酶和(b)如果发现黑素瘤组织过表达野生型 RAF 激酶或者表达活化了的突变型 B-RAF 激酶，则用有效的 RAF 激酶抑制量的式(I)化合物治疗病人，



其中

r 是 0-2；

n 是 0-2；

m 是 0-4；

A、B、D、E 和 T 相互独立的为 N 或者 CH，附加条件是 A、B、D、E 和 T 中至少一个但最多三个为 N；

G 是低级亚烷基、-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-SO₂-、氧杂(-O-)、硫杂(-S-)或者-NR-，或者是被酰氧基、氧、卤素或者羟基取代的低级亚烷基；

Q 是低级烷基，特别是甲基；

R 是 H 或者低级烷基;

X 是 Y、-N(R)-、氧杂或硫代; 优选为-NH-;

Y 是 H、非取代或者取代的低级烷基、芳香基、杂芳香基或者非取代或取代环烷基; 和

Z 是氨基、单取代或者二取代氨基、卤素、烷基、取代烷基、羟基、醚化或酯化羟基、硝基、氰基、羧基、酯化羧基、烷酰基、氨基甲酰基、N-单或 N,N-二取代氨基甲酰基、脒基、胍基、巯基、磺基、苯硫基、苯低级烷基硫基、烷基苯硫基、苯亚磺酰基、苯低级烷基亚磺酰基、烷基苯亚磺酰基、苯磺酰基、苯低级烷基磺酰基或者烷基苯磺酰基, 并且如果存在不止一个 Z 基 ($m \geq 2$) 则取代基 Z 可以是相同的或者不同的。

14. 分别根据权利要求 12 或 13 的方法或用途, 其中

r 是 0-2;

n 是 0 或 1;

m 是 0 或 1;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N, 或者 A、D 和 E 各是 CH 并且 B 和 T 是 N, 或者 A、B、E 和 T 是 CH 并且 D 是 N, 或者 A、T、D 和 E 是 CH 并且 B 是 N; 特别是其中 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N, 或者 A、D 和 E 各是 CH 并且 B 和 T 是 N,

G 是低级亚烷基、-CH₂-NH-、-CH₂-O-、羟基亚甲基或者苯甲酰氧基亚甲基;

Q 是甲基;

R 是 H 或者低级烷基;

X 是-NR-、氧杂或者硫杂;

Y 是非取代的或者用一个或两个相同或者不同的选自氨基、低级烷酰基、卤素、非取代或者取代低级烷基、羟基、低级烷氧基、苯基低级烷氧基、氰基、低级链烯基、C₈-C₁₂ 烷氧基、低级烷氧基羰基、氨基甲酰基、低级烷基氨基甲酰基、低级烷酰基、苯氧基、卤代低级烷氧基、低级烷氧基羰基、低级烷基巯基、卤代低级烷基巯基、羟基低级烷基、低级链烷磺

酰基、卤代低级链烷磺酰基、苯基磺酰基和低级亚烷基二氧的取代基结合到两个相邻碳原子上进行取代的苯基，或者其中两个相临近位置被亚烷基或者亚链烯基取代以形成融合到芳基环的 5-7 成员环的苯基；

Z 是氨基、N-低级烷基氨基、羟基低级烷基氨基、苯基低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、N-苯基低级烷基-N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基苯氨基、低级烷酰基氨基、苯甲酰氨基和苯基低级烷氧基羰基氨基，其中在每种情况下的苯基是非取代的或者被硝基、氨基、卤素、氨基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基、低级烷酰基、氨基甲酰基、2-羟乙基氨基、苄氧基羰基氨基或溴取代的苯基。

15. 分别根据权利要求 12 或 13 的方法或用途，其中

r 是 0；

n 是 0；

m 是 0；

B、D、E 和 T 是 CH 并且 A 是 N，或者 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N；

G 是低级亚烷基；

X 是-NH-；

Y 是非取代的或者被一个或两个相同或不同的选自卤素和低级烷基的取代基取代的苯基。

16. 分别根据权利要求 12 或 13 的方法或用途，其中

r 是 0；

n 是 0-2；

m 是 0；

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N；

G 是亚甲基；

R 是 H；

X 是-NR； 和

Y 是非取代或者被卤素、低级烷基、低级烷氧基或非取代或者被低级烷基取代的环己基取代的苯基。

17. 分别根据权利要求 12 或 13 的方法或用途, 其中

r 是 0;

n 是 0;

m 是 0;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是亚甲基;

X-NH-; 和

Y 是被一个或两个相同或不同的选自卤素和低级烷基的取代基取代的苯基。

18. 根据权利要求 17 的方法或用途, 其中 Y 是第 4 位被叔丁基取代的苯基。

19. 分别根据权利要求 12 或 13 的方法或用途, 其中所述黑素瘤表达突变型 RAF 激酶。

20. 根据权利要求 19 的方法或用途, 其中所述突变型 RAF 激酶对应选自 G1388A、G1388T、G1394C、G1394A、G1394T、G1403C、G1403A、G1753A、T1782G、G1783C、C1786G、T1787G、T1796A 和 TG1796-97AT 的 B-RAF 激酶基因中的突变。

21. 根据权利要求 18 的方法或用途, 其中所述的黑素瘤表达突变型 RAF 激酶。

22. 根据权利要求 21 的方法或用途, 其中所述的突变型 RAF 激酶是 V599E 突变。

异喹啉衍生物治疗癌症和 MAP 激酶相关疾病的用途

发明概述

本发明涉及某些化合物能够抑制在 MAP 激酶信号传导途径中起作用的丝氨酸 / 苏氨酸激酶——RAF 激酶的这一发现，以及涉及化合物用于治疗以 MAP 激酶信号传导途径中信号过强为特征的疾病（例如像某些癌症一样的增殖性疾病）的用途。

背景技术

细胞通过使用多种信号转导途径，使其核与细胞外环境进行多方面的交流。许多此种信号是通过能够以转移磷酸基团而活化多种因子的蛋白激酶传递的。如 bcr-abl 激酶抑制剂 imatinib 所表明的，由抑制适当的激酶活性所导致的信号转导的破坏具有临床利益，所述抑制剂的甲磺酰基盐以商标 GLEEVEC（在美国）或者 GLIVEC 投放市场。

MAP 激酶信号传导途径是本领域已知的生长因子从细胞外环境向细胞核传递其增殖信号的途径之一。生长因子激活位于细胞表面的跨膜受体，接着活化的受体启动了信号级联，由此 RAS 被活化并招募 RAF 激酶到活化激酶的细胞膜处，并依次激活 MEK 激酶，然后 MEK 激酶激活 ERK 激酶。活化的 ERK 激酶可以移动进入细胞核并在细胞核内激活多种转录因子。该途径的异常能够导致基因转录、细胞生长的改变并通过负调节细胞凋亡和传递增殖和生血管信号而助于肿瘤的发生。已经证明 RAF 激酶抑制剂能够阻断 MAP 激酶信号传导途径中的信号。

已知 RAF 激酶家族有三个成员，命名为 C-RAF（也叫做 RAF-1）、B-RAF 和 A-RAF。据报道，在包括 59% 的所测试的黑素瘤细胞系在内的人类癌症中，B-RAF 激酶的激活常常是通过几个体细胞点突变之一实现。

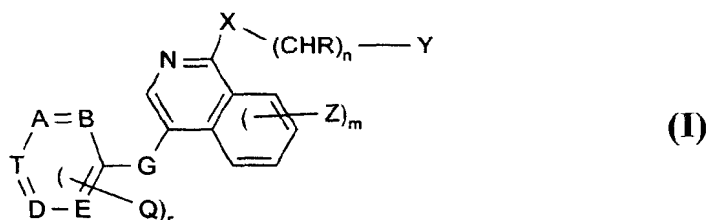
见 Davies, H.等, Nature 417, 949-954 (2002)。令人惊奇地,现在已经发现在本文所述方法中使用的化合物是 RAF 激酶的有效抑制剂,特别是 C-RAF 激酶和野生型和突变型 B-RAF 激酶,特别是 B-RAF 激酶的 V599E 突变体。

由于抑制血管内皮生长因子的能力而作为抗血管生成剂在本发明治疗方法中使用的化合物描述于如此处全文引入为参考的 WO 00/94495、美国公开申请 2002-0010191 和 WO 01/58899。然而,这些出版物没有提出异喹啉化合物具有抑制 RAF 激酶的特性并且也没有提出该化合物具有与 RAF 激酶抑制特性相关的治疗上的利益。

这些化合物的 RAF 激酶抑制特性使得它们可用作治疗增殖性疾病的治疗剂,所述的增殖性疾病的特征在于异常的 MAP 激酶信号传导途径,特别是由 RAF 激酶过量表达和 RAF 激酶激活型突变所表征的许多癌症,例如具有突变 B-RAF,特别是带有 V599E 突变体的突变 B-RAF 的黑素瘤。本发明还提供了使用所述化合物治疗其它由异常的激酶信号传导途径所表征疾病的方法,特别是 B-RAF 发生了突变,例如具有突变 B-RAF 的良性 Nevi 痣。

发明详述

本发明涉及治疗具有 MAP 激酶途径信号过强所表征疾病的病人的方法,其包括给病人施用有效抑制 RAF 激酶的量的式(I)化合物或者式 I 化合物的 N-氧化物或其可药用盐。



其中

r 是 0-2;

n 是 0-2;

m 是 0-4;

A、**B**、**D**、**E** 和 **T** 相互独立的为 **N** 或 **CH**，条件是 **A**、**B**、**D**、**E** 和 **T** 中至少一个但不多于三个为 **N**;

G 是低级亚烷基、**-CH₂-O-**、**-CH₂-S-**、**-CH₂-NH-**、**-SO₂-**、氧杂 (**-O-**)、硫杂 (**-S-**) 或者 **-NR-**，或者是被酰氧基、氧、卤素或者羟基取代的低级亚烷基。

Q 是低级烷基，特别是甲基;

R 是 **H** 或者低级烷基;

X 是 **Y**、**-N(R)-**、氧杂或硫代; 优选地为 **-NH-**;

Y 是 **H**、非取代或者取代的低级烷基、芳基、杂芳基或非取代或取代环烷基; 和

Z 是氨基、单取代或者二取代氨基、卤素、烷基、取代烷基、羟基、醚化或酯化羟基、硝基、氰基、羧基、酯化羧基、烷酰基、氨基甲酰基、**N**-单或 **N,N**-二取代氨基甲酰基、脒基、胍基、巯基、磺基、苯硫基、苯低级烷基硫基、烷基苯硫杂基、苯亚磺酰基、苯低级烷基亚磺酰基、烷基苯亚磺酰基、苯磺酰基、苯低级烷基磺酰基或者烷基苯磺酰基，并且如果存在不止一个 **Z** 基团 ($m \geq 2$) 则取代基 **Z** 是相同的或者不同的。

本发明还涉及式 **I** 化合物在制备药物上的用途，所述的药物用于治疗由 **MAP** 激酶信号传导途径中信号过强所表征的疾病。

患者是患有由 **MAP** 激酶信号传导途径中信号过强所表征的疾病的哺乳动物，通常是人。这可以通过诸如 **Western** 印迹分析或者免疫组织化学的方法使用针对途径中成员的活化状态特异抗体来测定。此类方法对于本领域的技术人员是已知的。

通常，由 **MAP** 激酶信号传导途径信号过强所表征的疾病是增殖性疾病，特别是由增强的 **RAF** 激酶活性所表征的癌症，例如过表达野生型 **B-RAF** 激酶或者 **C-RAF** 激酶的癌症或者表达活化的突变型 **RAF** 激酶(例

如突变型 B-RAF 激酶) 的癌症。已经检测到突变型 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、乳腺癌以及肝癌。在许多黑素瘤中突变的 B-RAF 激酶特别普遍。

依照本发明, 从病人获取疾病组织样本, 例如作为活组织检查和切除术的结果, 并且检测组织是否产生突变型的 RAF 激酶, 例如突变型的 B-RAF 激酶, 或者组织是否过表达野生型的 RAF 激酶, 例如野生型 B-或 C-RAF 激酶。如果测试结果表明在疾病组织中过量产生突变型的 RAF 激酶或者 RAF 激酶, 则可以通过给病人施用 RAF 抑制有效量的本文所述 RAF 抑制剂化合物来进行治疗。

根据本发明, 本文所述式 I 化合物还有的用途是制备治疗黑素瘤的药物, 其中包括(a)测试来自病人的黑素瘤组织, 以确定黑素瘤组织是否表达突变型 RAF 激酶或者过表达野生型 RAF 激酶和(b)如果发现黑素瘤组织过表达野生型 RAF 激酶或者表达活化的突变型 B-RAF 激酶, 则用有效抑制 RAF 激酶的量的式 I 化合物治疗病人。

然而, 如果信号级联中另外的激酶是导致信号途径信号过强的原因, 则用 RAF 激酶抑制化合物下调 MAP 激酶信号传导途径也是可能的。因此, 本发明还涉及治疗由 RAF 激酶的激活突变或过表达以外的原因引起的 MAP 激酶信号传导途径信号过强所表征的疾病。

通过本领域普遍已知的方法将组织样本进行测试。例如, 通过等位基因特异的 PCR、DHPLC、质谱检测 B-RAF 突变, 和通过免疫组织化学、免疫荧光或者 Western 印迹分析检测野生型 B-RAF 或 C-RAF。用于检测 B-RAF 突变特别有用的方法是基于实施例 D1 所述方法的聚合酶链式反应。使用相似的方法确定信号级联中其它的激酶是否突变或者过表达。

本发明特别重要的方面涉及治疗黑素瘤的方法, 所述方法包括(a)测试来自病人的黑素瘤组织, 以确定黑素瘤组织是否表达突变型 RAF 激酶或者过表达野生型 RAF 激酶和(b)如果发现黑素瘤组织过表达野生型 RAF 激酶或者表达活化的突变型 B-RAF 激酶, 则用有效抑制 RAF 激酶的量的本文所述化合物治疗病人。

该实施方案的一个重要方面涉及治疗黑素瘤的方法，所述方法包括(a)测试来自病人的黑素瘤组织，以确定黑素瘤组织是否过表达 B-RAF 激酶或者 C-RAF 激酶活性和(b)如果发现黑素瘤组织过表达 B-RAF 激酶或者 C-RAF 激酶活性，则用有效抑制 RAF 激酶的量的本文所述 RAF 抑制化合物治疗病人。

该实施方案的另一个重要方面涉及治疗黑素瘤的方法，所述方法包括(a)测试来自病人的黑素瘤组织，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，则用有效抑制 RAF 激酶的量的本文所述 RAF 抑制化合物治疗病人。

通常，B-RAF 激酶突变是所引用的 Davies 等的文章中所描述的那些突变中的一种。将这些突变总结于表 1。

表 1

B-RAF 突变	蛋白质改变
G1388A	G463E
G1388T	G463V
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

因此,本发明具体涉及治疗由活化的突变型 B-RAF 激酶所表征的疾病的方法,所述方法包括检测来自病人的组织样本中 B-RAF 激酶基因或蛋白质的突变并用有效 B-RAF 激酶抑制化合物,特别是本文所述化合物来治疗病人。

本发明的重要方面包括这些情况,其中突变 B-RAF 激酶表现为表 1 所述的突变,特别是 V599E 突变。

本发明特别重要的方面包括这些情况,其中疾病是黑素瘤并且突变 B-RAF 激酶表现为表 1 所述的突变,特别是 V599E 突变。

因此,本发明包括治疗由突变 B-RAF 激酶所表征的疾病的方法,所述方法包括在来自病人的组织中检测选自 G1388A、G1388T、G1394C、G1394A、G1394T、G1403C、G1403A、G1753A、T1782G、G1783C、C1786G、T1787G、T1796A 和 TG1796-97AT 的 B-RAF 激酶基因突变或者检测 RAF 激酶蛋白质中相应的突变并用本文所述有效 B-RAF 激酶抑制化合物治疗病人。

除非另外指出,本文所使用的用于描述式(I)化合物的一般术语在本文的公开内容中具有下面的意思。

术语“低级”意思是指基团具有最多 7 个,特别是最多 4 个碳原子,所述基团是不分支的或者一次或多次分支。

提到的任何化合物、盐等的复数形式通常理解为包括一种化合物、一种盐等。

可能存在的不对称碳原子(例如式 I 化合物(或其 N-氧化物),其中 $n=1$ 并且 R 是低级烷基)可以具有(R)、(S)或者(R, S)构型,优选(R)或者(S)构型。在双键或者环上的取代基可以是顺式(=Z)或者反式(=E)形式。因此,本发明化合物可以是同分异构体混合物的形式或者纯的同分异构体形式,优选以对应异构的纯非对映异构体形式。

指数 r 优选 0 或 1。

指数 n 优选 0 或 1,特别是 0。也可以是 2。

指数 m 优选 0、1 或 2，特别是 0 或 1。

在式 I 的环成员 A、B、D、E 和 T 中，不超过 3 个为 N 并且其它的是 CH 或 CQ。优选地，环成员 A、B、D 和 E 分别是 CH 或 CQ 并且 T 是 N。

当 G 是二价基团 $-\text{CH}_2\text{-O-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-}$ 或者 $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ 时，每种情况下，亚甲基结合到具有环成员 A、B、D、E 和 T 的环上，同时杂原子 (O、S 或 NH) 结合到式 I 的异喹啉环上。

低级亚烷基 G 可以是分支的或者优选不分支的，特别是分支的或者优选不分支的 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 低级亚烷基，特别是亚甲基 ($-\text{CH}_2-$)、乙烯基 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$)、三亚甲基 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$)、四亚甲基 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$)。优选 G 是亚甲基。低级亚烷基 G 优选为非替代的，但可以由酰氧基、氧、卤素或者羟基取代。

在酰氧基取代的低级亚烷基 G 的取代基中，酰基优选芳羰基氧，其中酰基如下所定义，特别是苯甲酰氧基或低级烷酰氧基，更特别是苯甲酰氧基；酰氧基取代的低级亚烷基特别是苯甲酰氧基取代的亚甲基。

作为羟基取代低级亚烷基 G 优选是羟亚甲基 ($-\text{CH}(\text{OH})-$)。

优选的氧取代的低级亚烷基 G 取代基是羰基 ($-\text{C}(\text{O})-$)。

卤素取代的低级亚烷基 G 的取代基是单卤至全卤取代的亚烷基，例如二氟亚甲基。

低级烷基特别是 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 烷基，例如正丁基、仲丁基、叔丁基、正丙基、异丙基或者特别是甲基或乙基，或者在 Y 是低级烷基的情况下，特别为异戊基。

芳基优选是具有 6-14 个碳原子的芳香基，例如苯基、联苯基、萘基、蒽基或菲基，特别是苯基，芳基是非取代的或者是一个或多个优选最多三个特别是一个或两个取代基取代的，特别是被选自氨基、单或二取代氨基、卤素、烷基、取代烷基、羟基、醚化或者酯化羟基、硝基、氰基、羧基、酯化羧基、烷酰基、氨基甲酰基、N-单或者 N,N-二取代氨基甲酰基、脒基、胍基、巯基、磺基、苯硫基、苯低级烷基硫、烷基苯硫基、苯亚硫酰基、

苯低级烷基亚硫酸基、烷基苯基亚硫酸基、苯磺酰基、苯低级烷基磺酰基、烷基苯磺酰基、低级基烷（例如乙烯基）、苯基、芳烷基（例如苯甲基或1-甲基-1-苯乙基）、低级烷基硫（例如甲硫基）、低级烷基甲硅烷基（例如三甲基甲硅烷基）、低级烷酰基（例如乙酰基）、非取代或者取代的环烷基、低级烷基巯基（例如甲基巯基(-S-CH₃)）、卤代低级烷基巯基（例如三氟甲基巯基(-S-CF₃)）、低级链烷磺酰基、卤代低级链烷磺酰基（例如特别是三氟甲烷磺酰基、二羟基硼(-B(OH)₂)）、杂环基和低级亚烷基二氧基（例如亚甲二氧基）的结合环上相邻碳原子的取代基取代，或者其中两个相邻位置被亚烷基或者亚链烯基取代以形成融合到芳基环的5-7个成员的环；芳基优选非取代苯基或者被一个或两个相同或不同的来自以上基团取代的苯基，取代基尤其是卤素（特别是氟或氯）、低级烷基（特别是甲基、乙基、丙基或叔丁基）、卤代低级烷基（特别是三氟甲基）、羟基、低级烷氧基（特别是甲氧基或乙氧基）、苯基（低级烷氧基）、低级烷酰基（例如乙酰基）、苯氧基、卤代低级烷氧基（如三氟甲氧基或1,1,2,2-四氟乙氧基）、低级烷氧基羰基（如乙氧基羰基）、低级烷基巯基（如甲基巯基）、卤代低级烷基巯基（如三氟甲基巯基）、羟基低级烷基（如羟甲基）、低级烷磺酰基（如甲烷磺酰基）、卤代低级烷磺酰基（如三氟甲烷磺酰基）、苯基磺酰基；更特别是被一个或两个相同的或不同的选自非取代或取代低级烷基（优选甲基、叔丁基或三氟甲基）和卤素（特别是氟或氯）的取代基取代。

杂芳基优选结合环为非饱和杂环基团并且优选是单、双或三环；其中在结合到式I分子的基团的环中，至少一个或多个（优选1到4）碳原子，特别是一或两个相应芳基的碳原子被选自氮、氧和硫的杂原子取代，结合环优选具有4-12（特别是5-7）个环原子；其中杂芳基是非取代的或者被一个或者多个特别是一到三个相同或不同取代基取代，其中所述的取代基选自上面提到的作为芳基取代基的取代基；并且特别是选自咪唑基、噻吩基、呋喃基、吡喃基、噻蒎基(thianthrenyl)、异苯并呋喃基、苯并呋喃基、苯并吡喃基(chromenyl)、2H-吡咯基、吡咯基、低级烷基取代的咪唑基、苯并咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、

吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、indoliziny、异吲哚基、3H-吲哚基、吲哚基、吲唑基、三唑基、四唑基、puriny、4H-喹嗪基、异喹啉基、喹啉基、2,3-二氮杂萘基、1,5-二氮杂萘基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、喋啶基(pteridiny)、呋唑基、菲啶基、吡啶基、perimidiny、菲咯啉基和 furazany 的杂芳基, 这些基团各自通过具有至少一个杂原子的环连接到式 I 分子的基团上; 特别优选吡啶基。

单或二取代的氨基特别被一个或者两个相同或者不同的低级烷基(例如甲基)、羟基低级烷基(例如 2-羟基乙基)、苯基低级烷基、低级烷酰基(例如乙酰基)、苯甲酰基、取代苯甲酰基取代的氨基, 其中苯基是非取代的或者特别是被一个或多个(优选一个或两个)取代基取代的, 其中所述取代基选自硝基和氨基, 或者也选自卤素、氨基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基、低级烷酰基和氨基甲酰基; 苯基低级烷氧基羰基, 其中苯基是非取代的或者特别是被一个或者多个优选一个或者两个取代基取代的, 其中所述取代基选自硝基和氨基, 或者也选自卤素、氨基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基、低级烷酰基和氨基甲酰基; 并且优选 N-低级烷基氨基, 例如 N-甲基氨基、羟基低级烷基氨基(例如 2-羟基乙氨基)、苯低级烷基氨基(例如苯氨基)、N,N-二低级烷基氨基、N-苯低级烷基-N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基苯氨基、低级烷酰基氨基(例如乙酰氨基)或者选自苯甲酰基氨基和苯低级烷氧基羰基氨基的取代基, 其中在每一种情况下, 苯基是非取代的或者特别是被硝基和氨基, 或者也被卤素、氨基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基、低级烷酰基、或者被氨基甲酰基所取代、或者备选地或除前述的基团之外还有氨基羰基氨基。

卤素特别是氟、氯、溴或碘, 更特别是氟、氯或溴, 特别是氟和氯。

烷基优选最多 12 个碳原子并且特别是低级烷基, 更特别是甲基, 或者也是乙基、正丙基、异丙基或者叔丁基。

取代烷基特别是低级烷基, 优选甲基, 其可以包含一个或多个特别是

最多 3 个取代基，其中所述取代基特别是选自卤素，特别是氟例如通常是三氟甲基或者全氟烷基，还选自氨基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、N-低级烷酰基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基和苯低级烷氧基羰基。三氟甲基是重要的取代烷基。

醚化羟基特别是 C_8-C_{20} 的烷氧基例如正癸氧基、低级烷氧基（优选）例如甲氧基、乙氧基、异丙氧基或正戊氧基、苯低级烷氧基例如苄氧基，或者也是苯氧基，或者备选地或除上述的 C_8-C_{20} 烷氧基之外还有例如正癸氧基、卤代低级烷氧基，例如三氟甲氧基或者 1,1,2,2-四氟乙氧基。

酯化羟基特别是低级烷酰基氧基、苯甲酰氧基、低级烷氧基羰基氧基（例如叔丁氧基羰基氧基）、或者苯低级烷氧基羰基氧基（例如苄氧基羰基氧基）。

酯化羧基特别是低级烷氧基羰基（例如叔丁氧基羰基或者乙氧基羰基）、苯低级烷氧基羰基或者苯氧基羰基。

烷酰基特别是烷基羰基，更特别是低级烷酰基，例如乙酰基。

N-单取代或 N,N-二取代氨基甲酰基特别是在末端氮上被一个或者两个低级烷基、苯低级烷基或者羟基低级烷基取代基取代的氨基甲酰基。

烷基苯硫基特别是低级烷基苯硫基。

烷基苯基亚硫酰基特别是低级烷基苯基亚硫酰基。

烷基苯基磺酰基特别是低级烷基苯基磺酰基。

吡啶基 Y 优选 3-或者 4-吡啶基。

非取代或者取代的环烷基优选 C_3-C_8 环烷基，所述的 C_3-C_8 环烷基是非取代的或者是以与芳基（特别限定的是苯基）相同的方式进行取代。优选环己基或者还是环戊基或环丙基。还优选 4-低级烷基环己基，例如 4-叔丁基环己基。

如果 Z 存在的话，则 Z 优选是氨基、羟基低级烷基氨基（例如 2-羟基氨基）、低级烷酰基氨基（例如乙酰氨基）、硝基苯甲酰氨基（例如 3-硝基苯甲酰氨基）、氨基苯甲酰氨基（例如 4-氨基苯甲酰氨基）、苯基低级烷氧基羰基氨基（例如苄氧基羰基氨基）、或者卤素（例如溴）；优选只存在

一个取代基 ($m=1$), 特别是最后提到的取代基中之一, 特别是卤素。非常特别优选式 I 化合物 (或其 N-氧化物), 其中 Z 不存在 ($m=0$)。

杂环基特别是具有 1 个或者两个选自氮、氧和硫的杂原子的 5 或者 6 元杂环, 其中杂环可以是不饱和的或者完全或部分饱和的, 并且是非取代的或者特别是被低级烷基 (例如甲基) 取代的; 优选选自 2-甲基-嘧啶-4-基、唑-5-基、2-甲基-1,3-二氧戊环-2-基、1H-吡唑-3-基和 1-甲基-吡唑-3-基。

以能够被低级亚烷基二氧 (例如亚甲二氧) 取代的苯基形式的、连接到两个相邻的碳原子上的芳基优选是 3,4-亚甲基二氧苯基。

式 I 化合物的 N-氧化物优选这样的 N-氧化物, 即异喹啉环氮或者在具有环原子 A、B、D 和 E 的环中的氮携带有氧原子, 或者不止一个上述的氮原子携带有一个氧原子。

盐特别是式 I 化合物 (或其 N-氧化物) 的可药用盐。

作为酸加成盐的这类盐 (特别是可药用盐) 通过例如具有碱性氮原子的式 I 化合物 (或其 N-氧化物) 与优选有机或者无机酸反应形成。适宜的无机酸有例如氢卤酸 (诸如盐酸)、硫酸、或者磷酸。适宜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、甘醇酸(glycolic acid)、乳酸、2-羟基丁酸、葡萄糖酸、葡庚糖酸、反丁烯二酸、琥珀酸、脂肪酸、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 (诸如谷氨酸、天门冬氨酸、N-甲基甘氨酸、乙酰氨基乙酸、N-乙酰天冬酰胺、N-乙酰半胱氨酸、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、环己烷羧酸、苯甲酸、水杨酸、1-或 3-羟基萘基-2-羧酸、3,4,5-三甲氧基苯甲酸、2-苯氧基苯甲酸、2-乙酰基苯甲酸、4-氨基水杨酸、苯二甲酸、苯乙酸、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甲磺酸或者乙磺酸、2-羟基乙磺酸、乙烷-1,2-二磺酸、苯磺酸、2-萘磺酸、1,5-萘二磺酸、N-环己氨基磺酸、N-甲基磺酸、N-乙基磺酸、N-丙基磺酸或者其它有机质子酸, 例如抗坏血酸。

当存在带负电荷的基团 (例如羧基或者磺基) 时, 也可以形成具有碱

基的盐（例如金属盐或者铵盐），例如碱金属或者碱土金属盐（诸如钠盐、钾盐、镁盐或者钙盐），或者具有氨或适当有机胺的铵盐，如叔一元胺（例如三乙胺或者三（2-羟乙基）胺），或者具有环碱的铵盐，如 N-乙基哌啶或者 N,N'-二甲基-哌嗪。

当在同一个分子中存在碱性基团和酸性基团时，式 I 化合物（或其 N-氧化物）也可以形成内盐。

为了分离或纯化，也可以使用非药用盐，例如苦味酸盐或者高氯酸盐。只有可药用盐或者游离化合物（任选地以药物组合物的形式）可以用于治疗，因此优选可药用盐或者游离化合物。

考虑到新化合物游离形式与盐形式之间的密切关系，其中所述的盐也包括那些如在纯化新化合物或者对它们的鉴定中作为中间物所使用的盐，在上文和下本文提到的任何游离化合物也应当适当和有利地理解为包括相应的盐。

本发明还涉及抑制 RAF 激酶的方法，其中包括将 RAF 激酶与式 I(I) 化合物相接触。优选地，RAF 激酶是 B-RAF 激酶或者 C-RAF 激酶，或者突变型 RAF 激酶，特别是突变型 B-RAF 激酶，特别是 V599E 突变体。RAF 激酶可以是分离的或者处于细胞环境中。

如上所述，式 I 化合物（或其 N-氧化物）具有有价值的药理学特性。

式 I 化合物（或其 N-氧化物）可以单独或者与一种或多种其它治疗剂组合施用，可以使用固定组合或者以一段时间内交错方式或者相互独立地方式施用本发明的化合物和一种或多种治疗试剂，或者可以组合施用固定组合和一种或多种其它治疗试剂。具体而言，用于肿瘤治疗的式 I 化合物（或其 N-氧化物）的施用可以单独进行或者另外与化学疗法（与一种或多种其它化学治疗剂特别是细胞抑制剂或者与激素或者具有激素样活性的化合物组合）、放射疗法、免疫疗法、外科手术治疗或它们的组合一起组合进行。长期治疗也是可能的，作为与其它治疗方法（如刚刚提到的那些）联合的辅助治疗。也可以是对维持肿块消退后，甚至化学预防治疗后病人（例如处于危险之中的病人）状态的治疗。

已经考虑将本发明的化合物与一种或多种抗增殖的、细胞生长抑制的或者毒害细胞的化合物联合使用而作为治疗剂，其中所述的抗增殖的、细胞生长抑制的或者毒害细胞的化合物例如一种或多种选自多胺生物合成抑制剂、不同蛋白激酶特别是蛋白激酶 C 或酪氨酸蛋白激酶（如表皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶）的抑制剂、生长因子（如血管内皮生长因子）抑制剂、细胞因子、负性生长调节物（如 TGF- β 或者 IFN- β ）、芳化酶抑制剂、激素或者激素类似物、和常规细胞生长抑制剂中的化学治疗剂。

本发明的化合物旨在不但用于（预防性并且优选地为治疗性）治疗人类，而且还用于治疗其它温血动物，例如具有商业用途的动物，如小鼠、兔或者大鼠、或者豚鼠之类的啮齿类。

通常，本发明还涉及式 I 化合物（或其 N-氧化物）在抑制 RAF 激酶活性上的用途。

式 I 化合物（或其 N-氧化物）还可以用于诊断目的，例如在加入此种化合物后，检查从作为原始“宿主”的温血动物（优选人类）得到并移植入小鼠的瘤块是否为减少性生长，从而研究它们对所述化合物的敏感性，以允许更好的确定和测定治疗原始宿主内的肿瘤疾病的可能的办法。

在下面提到的优选的式 I 化合物中，来自上述一般定义的取代基的定义可以方便地被使用，例如为了用更加特异的定义或者特别是用所标明的优选定义替换更加一般的定义；在每种情况下优选的是上面作为优选标明的或通过实例方式提及的定义。

优选以下式 I 化合物或其盐或 N-氧化物，其中

r 是 0-2，优选 0；

n 是 0 或 1；

m 是 1 或特别是 0；

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N，或者 A、D 和 E 各是 CH 并且 B 和 T 是 N，或者 A、B、E 和 T 是 CH 并且 D 是 N，或者 A、T、D 和 E 是 CH 并且 B 是 N；其中优选 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N，或者 A、D 和 E 各是 CH 并且 B 和 T 是 N。

G 是低级亚烷基，特别是亚甲基或者乙烯(-CH₂-CH₂-)、-CH₂-NH-、-CH₂-O-、羟基亚甲基或者苯甲酰氧基亚甲基；

Q 是连接到 A、D 或者 A 和 D 的甲基；

R 是 H 或者低级烷基，特别是 H 或者甲基；

X 是-NR-、氧杂或者硫杂，特别是-NH-；

Y 是非取代的或者一个或两个相同或者不同的、结合到两个相邻碳原子上的取代基取代的苯基，所述取代基选自氨基、低级烷酰基氨基（特别是乙酰氨基）、卤素（特别是氟、氯或者溴）、非取代或者取代低级烷基（特别是甲基、乙基、丙基、叔丁基）或者卤代低级烷基（特别是三氟甲基）、羟基、低级烷氧基（特别是甲氧基或者乙氧基）、苯低级烷氧基（特别是苄氧基）、氰基、低级链烯基（如乙烯基）、C₈-C₁₂ 烷氧基（特别是正癸氧基）、低级烷氧基羰基（如叔丁氧基羰基）、氨基甲酰基、低级烷基氨基甲酰基（如 N-甲基-或 N-叔丁基-氨基甲酰基）、低级烷酰基（如乙酰基）、苯氧基、卤代低级烷氧基（如三氟甲氧基或 1,1,2,2-四氟乙氧基）、低级烷氧基羰基（如乙氧基羰基）、低级烷基巯基（如甲基巯基）、卤代低级烷基巯基（如三氟甲基巯基）、羟基低级烷基（如羟甲基或者 1-羟甲基）、低级链烷磺酰基（如甲基磺酰基）、卤代低级链烷磺酰基（如三氟甲基磺酰基）、苯基磺酰基和低级亚烷基二氧（如亚甲二氧基），或者其中两个相临近位置被亚烷基或者亚链烯基取代以形成融合到芳基环的 5-7 个原子数的环，Y 特别是被一种或者两种选自卤素（如氯或溴）、非取代低级烷基（如甲基）和卤取代低级烷基（如三氟甲基）的取代基取代的苯基，Y 特别是苯基或者被一种或者两种相同或不同的取代基取代的苯基，所述取代基特别是卤素（特别是氟或氯）和/或非取代或取代低级烷基；

Z 是氨基、N-低级烷基氨基（如 N-甲基氨基）、羟基低级烷基氨基（如 2-羟基乙氨基）、苯基低级烷基氨基（如苄氨基）、N,N-二低级烷基氨基、N-苯基低级烷基-N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基苯氨基、低级烷酰基氨基（如乙酰氨基），或选自苯甲酰氨基和苯低级烷氧基羰基氨基的取代基，其中苯基在每种情况下是非取代的或者特别是被硝基或氨基或者卤素、氨

基、N-低级烷基氨基、N,N-二低级烷基氨基、羟基、氰基、羧基、低级烷氧基羰基、低级烷酰基取代或者被氨基甲酰基取代的,或者Z是卤素(特别是溴),更特别地是氨基、乙酰氨基、硝基苯甲酰氨基、氨基苯甲酰氨基、2-羟乙基氨基、苄氧基羰基氨基或溴;和

特别优选以下式I化合物或其盐,其中

r 是 0;

n 是 0;

m 是 0;

B、D、E 和 T 是 CH 并且 A 是 N (3-吡啶基),或者特别地其中 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N (4-吡啶基);

G 是低级亚烷基,特别是亚甲基;

X 是-NR-,特别是-NH-;

Y 是非取代的或者被一个或两个相同或不同取代基取代的苯基,其中所述的取代基选自卤素(特别是氟或更特别是氯或溴)、低级烷基(特别是甲基)和卤代低级烷基(特别是三氟甲基),特别是 4-氯苯基、2,3-或 4-甲基苯基、4-氯-5-三氟甲基苯基、3-溴-5-三氟甲基苯基、或者更加特别地是 3,5-二甲基苯基,还可以是 4-甲基-3-碘苯基、3,4-二(三氟甲基)苯基或者 3-溴-4-乙基苯基;

特别优选以下式I化合物或其盐(前提是存在形成盐的基团),其中

r 是 0;

n 是 0-2;

m 是 0;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是亚甲基;

R 是 H;

X 是-NR-,特别是-NH-;和

Y 是非取代苯基或者被取代的苯基,其中所述的取代基是卤素(特别是氟或氯)或者低级烷基(如甲基或者三氟甲基)、低级烷氧基(特别是甲

氧基), 如 4-氟苯基、4-甲氧基苯基或者 4-三氟甲氧基苯基、萘基、非取代或者被低级烷基 (特别是叔丁基) 取代的环己基 (如 4-叔丁基环己基)、非取代或者被卤素 (特别是氟) 取代的吡啶基 (特别是 6-氟吡啶-3-基)、或者低级烷基 (特别是异戊基)。

具体而言, 优选以下式 I 化合物, 其中

r 是 0;

n 是 0;

m 是 0;

B、D、E 和 T 是 CH 并且 A 是 N, 或者 A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是低级亚烷基;

X 是 -NH-;

Y 是非取代或者被一种或者两种相同或者不同的选自卤素和低级烷基的取代基取代的苯基。

还可以优选以下式 I 化合物, 其中

r 是 0;

n 是 0-2;

m 是 0;

A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是亚甲基;

R 是 H;

X 是 -NR; 和

Y 是非取代的苯基或者被卤素、低级烷基、低级烷氧基或非取代或被低级烷基取代的环己基取代的苯基。

具体而言, 特别有用的化合物包括如下化合物, 其中

r 是 0;

n 是 0;

m 是 0;

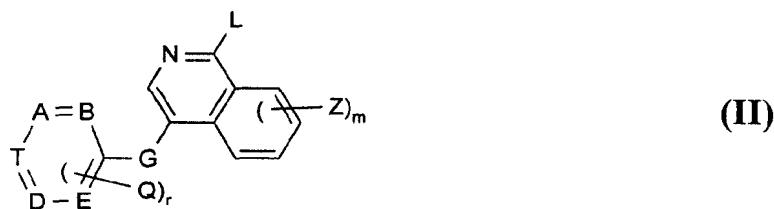
A、B、D 和 E 各是 CH 并且 T 是 N;

G 是亚甲基;

X 是 -NH-; 和

Y 是被一个或两个相同或者不同的选自卤素和低级烷基的取代基取代的苯基。特别优选给定的此类化合物, 其中 Y 是在第 4 位被叔丁基或者三氟甲基取代的苯基。

可以通过本身已知用于其它化合物的方法特别地是通过式 II 化合物与式 III 化合物的反应来制备本发明的化合物。



其中 r、m、A、B、D、E、T、G、Q 和 Z 如式 I 化合物中的定义并且 L 是离核的离去基团。



其中 n、R、X 和 Y 如式 I 化合物中的定义, 式 II 和式 III 化合物中的不参加反应的功能基团处于被保护的形式并且如果需要的话可除去存在的任何保护基团, 其中当存在形成盐的基团并且可以以盐形式反应时, 在方法 a) 中提到的起始化合物也可以是盐的形式; 并且, 如果需要, 将所得的式 I 化合物或其 N-氧化物转变成不同的式 I 化合物或其 N-氧化物, 将游离的式 I 化合物或其 N-氧化物转化成盐, 将所得的式 I 化合物或其 N-氧化物的盐转化成游离的化合物或者不同的盐和/或将式 I 化合物或其 N-氧化物的同分异构体混合物分离成单独的同分异构体。

方法改变的详述:

除非另外指出, 在下面对制备方法更加详细的描述中 r、n、m、A、B、D、E、G、Q、R、X、Y 和 Z 如式 I 化合物中的定义。

方法 a)

在式 II 化合物中，离核的离去基团 L 特别是卤素，更特别是溴、碘或者非常特别是氯。

式 II 化合物和式 III 化合物之间的反应可以在惰性的极性溶剂中进行，溶剂特别是醇例如低级链烷醇，如甲醇、丙醇或特别是乙醇或者正丁醇，或在没有添加溶剂的熔化物中进行，特别是当反应物中的一种是液体形式时。反应在提高的温度下进行，优选从大约 60℃ 至回流温度，例如在回流温度下或者在从大约 90 到大约 110℃ 的温度。式 III 化合物也可以以盐的形式使用，例如以与强酸（如卤化氢）形成的酸加成盐的形式，例如盐酸盐的形式，或者将相应的酸（例如盐酸）加入到适当的溶剂（例如二氧杂环己烷之类的醚）中。

式 II 和/或 III 化合物中的一个或多个其它功能基团例如羧基、羟基、氨基或者巯基是以被保护形式存在的或者必须是以被保护形式存在的，因为它们不参加反应，保护基团是在肽化合物的合成，还有头孢菌素和青霉素以及核酸衍生物及糖的合成中通常使用的基团。保护基团可以已经存在于前体中并且保护所述功能基团不进行不必要的副反应，如酰化、醚化、酯化、氧化、溶剂分解等等。在原材料中的避免发生反应的功能基团（特别是羧基、氨基、羟基和巯基）的保护基团（常规保护基团）特别包括那些在肽化合物、头孢菌素、青霉素或者核酸衍生物及糖的合成中通常使用的保护基团。保护基团可以已经存在于前体中并且保护所述功能基团不进行不必要的副反应，如酰化、醚化、酯化、氧化、溶剂分解等等。在一些情况下，保护基团能够导致反应具有选择性，例如立体选择性。保护基团的特性是它能够通过例如溶剂分解、还原、光分解或者酶容易地去除，还可以在例如类似于生理条件下的条件下容易地去除，也就是说没有不利的副反应，并且它不存在于终产物中。本领域技术人员已知或者能够容易地发现在上下文提到的反应中哪些保护基团是合适的。

通过此种保护基团进行的功能基团的保护、保护基团本身和去除它们的反应描述于标准著作，例如 J. F. W. McOmie, 《Protective Groups in

Organic Chemistry》, Plenum Press, London and New York 1973、Th. W. Greene,《**Protective Groups in Organic Synthesis**》, Wiley, New York 1981、**“The Peptides”**, 第 3 卷(E. Gross 和 J. Meienhofer 著), Academic Press, London and New York 1981、《**Methoden der organischen Chemie**》, Houben Weyl, 第 4 版, 第 15/I 卷, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974、H.-D. Jakubke 和 H. Jescheit,《**Aminosäuren, Peptide, Proteine**》, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach and Basle 1982、以及 Jochen Lehmann,《**Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate**》, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974。

优选介绍实施例中提到的保护基团并且,需要的话,用与提到的方法类似的方法去除。

额外的操作步骤

在必要时进行的额外操作步骤中,起始化合物中不参与反应的功能基团可以以未保护的形式或者保护的形式存在,例如通过一种或多种上面方法 a)提到的保护基团保护。然后通过方法 a)提到的方法之一将全部或者部分保护基团去除。

可以以本身已知的方式制备含有形成盐基团的式 I 化合物(或其 N-氧化物)的盐。例如可以通过用如酸或适当的阴离子交换试剂进行处理而得到式 I 化合物或其 N-氧化物的酸加成盐。也可以将具有两个酸分子的盐(例如式 I 化合物(或其 N-氧化物)的二卤化物)转变成式 I 化合物(或其 N-氧化物)每个分子具有一个酸分子的盐(例如转变成一卤化物);这可以通过例如加热到熔化状态,例如通过在高真空条件下以提高的温度(如 130-170℃)加热固体形式,从而每分子式 I 化合物(或其 N-氧化物)放出一分子酸来实现。

以常规的方法可以将盐转化成游离的化合物,如用适当的碱试剂如碱金属碳酸盐、碳酸氢盐或氢氧化物(如碳酸钾或氢氧化钠)处理。

使用适当的分离操作可以以本身已知的方式将立体异构混合物(例如

非对映异构体混合物)分离成相应的同分异构体。例如通过分级结晶、层析、溶剂分配(solvent partitioning)等等将非对映异构体的混合物分离成为单独的非对映异构体。分离可以在原材料之一的阶段进行或者在式 I 化合物自身的情况下进行。通过形成非对映异构盐例如通过具对映异构纯度的手性酸形成盐或者通过层析法(例如 HPLC 层析),在具有手性配体的层析载体材料上分离对映异构体。

可以将式 I 化合物转变成相应的 N-氧化物。是用适当的氧化试剂(优选如间氯过苯甲酸之类的过氧化物),在适宜的溶剂中进行反应,溶剂例如卤化烃(例如氯仿)或者亚甲基氯或者在低级烷羧酸(如乙酸),优选的反应温度为 0℃至反应混合物的沸腾温度,特别是近似室温。

例如通过在能够加入额外溶剂的水溶液中、优选地在提高的温度例如在回流温度下、通过无机酸特别是盐酸(HCl)的水解可以将 Z 为低级烷酰氨基的式 I 化合物(或其 N-氧化物)水解成相应的氨基化合物(Z=氨基)。

当式 I 化合物(或其 N-氧化物)中 Z 为被一个或两个相同或者不同的选自低级烷基、羟基低级烷基和苯基低级烷基取代的氨基时,可以通过与低级烷基卤素、羟基低级烷基卤素(如有必要其羟基被保护,见方法 a))或者苯基低级烷基卤素在与方法 a)所提到的相似条件下反应,将式 I 化合物(或其 N-氧化物)转变成氨基基团被相应取代的化合物。对于在氨基基团 Z 上引入 2-羟基低级烷基取代基,也可以从环氧化物(例如环氧乙烷)起始添加。添加特别是在水溶液和/或在极性溶剂存在的条件下进行,极性溶剂例如诸如甲醇、乙醇、异丙醇或者 1,2-乙烯基二醇的醇、诸如二氧杂环己烷的醚、诸如二甲基甲酰胺的酰胺或者诸如酚的酚类,添加也可以在水条件下在非极性溶液(例如苯和甲苯)或者在苯/水乳浊液中进行,添加任选地在酸或碱催化剂(例如诸如氢氧化钠溶液)的碱溶液存在的条件下或者含胂的固相催化剂(诸如氧化铝)存在的条件下,在醚(例如乙醚)中进行,温度通常约 0℃至所述反应混合物的沸腾温度,优选在 20℃至回流温度下,其中压力处于适当提高了的压力下,例如在弹管中,由此温度也超过了沸腾温度和/或在惰性气体例如氮或氩存在条件下进行反应。对具

有低级烷基醛、苯基低级烷基醛或者羟基低级烷基醛（如有必要其羟基是被保护的）的氨基基团 Z 也可进行还原烷基化。还原烷基化优选地在常规溶剂例如诸如甲醇或乙醇的醇或者诸如环醚（例如四氢呋喃）的醚中，在水缺乏或者存在的条件下，在催化剂特别是结合到诸如碳的支持材料上的贵金属催化剂（如铂）或者特别是钯，或者重金属催化剂（如阮内镍）存在下，在正常压力或者 0.1-10 兆帕(MPa)的氢化作用中进行，或者在适当的酸，优选相对弱的酸，如低级烷基羧酸或者特别是甲苯磺酸之类的磺酸存在的条件下，依靠复杂氢化物（例如氢化硼），特别是碱金属氰基氢化硼（例如氰基硼氢钠）的还原作用进行。常用的溶剂如甲醇或乙醇之类的醇或醚（例如四氢呋喃之类的环醚），可以存在或不存在水。

在式 I 化合物（或其 N-氧化物）中，通过酰化作用可以将氨基基团 Z 转变成被低级烷酰基、苯甲酰基、取代苯甲酰或者苯基低级烷氧基羰基取代的氨基基团，其中所述的苯基低级烷氧基羰基中的苯基是非取代的或取代的。相应的酸包含游离羧基或者是其反应性酸衍生物的形式，例如衍生的活化酯或反应性酐的形式，也可以是反应性环酰胺的形式。反应酸衍生物也可以在原位(*in situ*)形成。活化酯特别是在欲被酯化的基团的连接碳原子上是不饱和的酯，例如乙烯基酯类型，诸如乙烯基酯（可通过例如由乙烯基乙酸盐与相应酯进行酯交换得到；活化乙烯基酯方法）、氨基甲酰基酯（可通过例如用 isoxazolium 试剂处理相应的酸得到；1,2-oxazolium 或者 Woodward 方法）、或者 1-低级烷氧基乙烯基酯（可通过例如用低级烷氧基乙炔处理相应的酸得到；乙氧基乙炔方法），或者脒基酯类型（诸如 N,N'-二取代脒基酯）（可通过例如用适当的 N,N'-二取代碳二亚胺（例如 N,N'-二环己基碳二亚胺）或者特别是 N-（3-二甲氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺处理相应的酸得到；碳二亚胺方法）或者 N,N-二取代脒基酯（可通过例如用 N,N-二取代氨基脒处理相应的酸得到；氨基脒方法）、适当的芳基酯类（特别是被亲电子取代基适当取代的苯基酯类）（可通过例如在缩合剂如 N,N'-二环己基碳二亚胺存在的条件下用适当的取代酚诸如 4-硝基酚、4-甲基磺酰酚、2,4,5-三氯苯酚、2,3,4,5,6-五氯苯酚或者 4-苯基氧化重氮苯酚处理相

应的酸得到；活化芳基酯方法）、氰甲基酯（可通过例如在碱存在的情况下用氯乙氰处理相应的酸得到；氰甲基酯方法）、硫酯（特别是非取代或者取代如硝基取代的苯硫基酯）（可根据例如酞或者碳二亚胺方法用非取代或取代（例如硝基取代）的苯硫酚及其它处理相应的酸得到；活化硫酯方法）或者特别是氨基或酰氨基酯（可根据例如酞或者碳二亚胺方法用 N-羟基氨基或 N-羟基酰氨基化合物如 N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基吡啶、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二羧酸亚胺、1-羟基丁基苯基(benzotriazole)或者 3-羟基-3,4-二氢-1,2,3-benzotriazin-4-酮处理相应的酸得到；活化 N-羟基酯方法）。还可以使用内酯，如 γ -内酯。酸酐可以是对称的或优选这些酸的混合酸酐，例如无机酸的酐，如酰基卤，特别是酰基氯（可通过例如用亚硫酸氯、五氯化磷、碳酰氯或者草酰氯处理相应的酸得到；酰基氯方法）、叠氮化物（可经由例如相应的酰肼并且用亚硝酸对其进行处理从相应的酸性酯得到；叠氮化物方法）、具有碳酸半酯（例如碳酸低级烷基半酯）的酐（特别是氯甲酸甲酯）（可通过例如用氯甲酸低级烷基酯或 1-低级烷氧基羰基-2-低级烷氧基-1,2-二氢喹啉处理相应的酸得到；混合的 O-烷基碳酸酐方法），或者具有二卤化特别是二氯化磷的酐（可通过例如用磷酰氯处理相应的酸得到；磷酰氯方法）、具有其它磷酸衍生物的酐（例如在磺酸酐和/或外消旋化还原添加物（如 N-羟基苯并三唑）存在的条件下，或者在氰基膦酸二乙基酯存在的条件下，通过苯基 N-苯基磷酰胺氯化物或者通过烷基磷酸酰胺的反应得到的那些）或者具有亚磷酸衍生物的酐，或者具有有机酸的酐（例如具有有机羧酸的混合酐）（可用例如非取代或取代低级烷基羧酸卤化物或苯基低级烷基羧酸卤化物例如苯基乙酸、新戊酸、三氟乙酸氯处理相应的酸得到；混合羧酸酐方法）或具有有机磺酸的混合酐（可用例如适当的有机磺酸卤化物例如低级烷基磺酸氯或者芳基磺酸氯如甲磺酸氯或对甲苯磺酸氯处理相应的酸的盐如碱金属盐得到；混合磺酸酐方法）以及对称酐（可在例如碳二亚胺或 1-二乙基氨基丙炔存在的条件下通过缩合相应的酸得到；对称酐方法）。适宜的环酰胺，特别是具有芳香性质的 5 个原子数的二氮杂环的酰胺例如具有咪唑类如咪唑的酰

胺（例如通过用 N,N'-羰基二咪唑处理相应的酸得到；咪唑方法），或者吡唑（如 3,5-二甲基吡唑）的酰胺（可通过例如用乙酰丙酮处理经由酰基肼得到；吡唑烷(pyrazolide)方法）。如所提到的，作为酰化剂使用的羧酸衍生物也可以在原位形成。例如，在适宜的 N,N'-二取代碳二亚胺，例如 N,N'-二环己基碳二亚胺或特别是 N-(3-二甲胺基丙基)-N'-乙基碳二亚胺存在的条件下，可以通过将式 I 的原材料的混合物和作为酰化试剂使用的酸进行反应而在原位形成 N,N'-二取代脒基酯。此外，在欲被酰化的式 I 的原材料存在的条件下，通过相应酸的混合物与氨基原材料在 N,N'-二取代碳二亚胺（例如 N,N'-二环己基碳二亚胺）和 N-羟基胺或 N-羟基酰胺（例如羟基琥珀酰亚胺）存在的条件下，任选地在适当碱（例如 4-二甲氨基吡啶）存在的条件下进行反应可以形成作为酰化剂使用的酸的氨基酯或酰氨基酯。此外，通过与 N,N,N',N'-四烷基 uronium 化合物如 O-benzotriazol-1-基-N,N,N',N'-四甲基-uronium 六氟磷酸、O-(1,2-二氢-2-氧-1-吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基 uronium 四氟硼酸（在 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯-(1,5,5)缺乏或存在条件下）或 O-(3,4-二氢-4-氧-1,2,3-benzotriazolin-3-基)-N,N,N',N'-四甲基 uronium 四氟硼酸进行反应在原位实现活化。最后，通过烷基磷酸酰胺（例如六甲基磷酸三酰胺）在磺酸酐如 4-甲苯磺酸酐存在条件下与盐（例如四氟硼酸钠之类的四氟硼酸盐）或与六甲基磷酸三酰胺的不同衍生物（如苯并三唑-1-基-氧-三(二甲氨基)六氟化磷）优选在外消旋化还原添加物如 N-羟基丁基苯基存在条件下反应来原位制备羧酸的磷酸酐。如果需要可以加入有机碱，优选叔胺，例如三低级烷基胺，特别是乙基二异丙胺或更加特别地是三乙胺和/或杂环碱，例如 4-二甲氨基吡啶或优选 N-甲基吗啉或吡啶。优选在惰性的、质子惰性的、优选无水溶剂或溶剂混合物中进行缩合，例如在羧酸酰胺（如甲酰胺或者二甲基酰胺）、卤代烃（如亚甲基氯、四氯化碳或者氯苯）、酮（例如丙酮）、环醚（例如四氢呋喃或二氧杂环己烷）、酯（例如乙酸乙酯）、或腈（例如乙腈），或它们混合物中进行缩合，其中温度为适当降低的或升高的温度，例如从大约 -40℃ 到大约 +100℃，优选从大约 -10℃ 到大约 +70℃ 范围内的温度，其中芳

基磺酰基酯也可以在大约+100℃-+200℃，特别是 10-30℃ 的温度，并且在恰当的情性气体如氮或氩气环境中。也可以是水性（如醇性溶剂），如乙醇，或者芳香溶剂（如苯或者甲苯）。

式 I 化合物中的硝基基团 Z 可以被还原成氨基基团，例如通过金属还原或者选择性氢化；例如通过在水/醇混合物（如甲醇/水）中，在提高的温度（例如 30-60℃）下与镁/硫酸铵反应（见 *Synth. Commun.* **25** (2), 4025-4028 (1995)）；通过在酰胺（如二甲基甲酰胺）中，在低于室温（如在大约 0℃）条件下与锌/硼氢化物进行反应；通过在水/卤代烃混合物（如水/亚甲基氯混合物）中，在提高的温度（如 25-35℃）条件下与 1,1'-二辛烷基-4,4'-二吡啶二溴化物/连四硫酸钠/碳酸钾反应（见 *Tetrahedron Lett.* **34** (46), 7445-7446 (1993)）；在醇如甲醇/水中，在优选 0-40℃ 的温度，以氯的形式与 Amberlyte IRA-400 离子交换剂上的硼氢化钠反应（见 *Synthetic Commun.* **19** (5/6), 805-811 (1989)）；在卤代烃/醇混合物（例如亚甲基氯/甲醇）中，在优选 10-35℃ 的温度下，与硼氢化钾进行反应（见 *Synthetic Commun.* **19** (17), 3047-3050 (1989)）；在二氧杂环己烷中与硼氢化钠反应；在四氢呋喃中与硼烷反应；通过在醇中，在 Pd/C 存在产优选 0-35℃ 的温度下并且甲酸铵存在下的氢化（见 *Tetrahedron Lett.* **25** (32), 3415-3418 (1989)）；在醚（如四氢呋喃）中与四氯化钛/氢化锂铝或者四氯化钛/镁反应（见 *Bull. Chem. Soc. Belg.* **97** (1), 51-53 (1988)）；或者在提高的温度下（优选回流温度下）与氯化铁铵/水进行反应（*Synth. Commun.* **22**, 3189-3195 (1992)）。

当式 I 化合物中 G 是酰氧基取代的低级烷基并且其它基团如按式 I 所定义时，可以通过水解作用将酰基去除，得到 G 是羟基取代的低级亚烷基的式 I 的相应化合物。水解优选在常规条件下进行，例如在酸或碱（如 HCl 或者 NaOH）存在条件下在水溶液中或者在适当的溶剂或溶剂混合物中进行。

也可以从 G 是酰氧基取代的低级烷基的式 I 化合物制备 G 是低级亚烷基的式 I 化合物。在该种情况下，反应优选在常规溶剂或溶剂混合物中通

过催化的氢化（在适当催化剂存在下的氢化）进行。

一般过程条件

本本文提到的所有过程步骤可以在本身已知的反应条件下进行，优选那些特别是提到的缺乏或通常存在溶剂或稀释剂的条件，优选那些在催化剂、缩合剂或者中和剂（例如离子交换剂，如以 H^+ 形式的阳离子交换剂）缺乏或者存在条件下，依赖于反应或反应物的性质在降低、正常或者提高的温度下（如大约 $-100^{\circ}C$ 至大约 $190^{\circ}C$ ，优选地在 $-80^{\circ}C$ 至大约 $150^{\circ}C$ ，例如 -80 至 $-60^{\circ}C$ 、室温、 -20 至 $40^{\circ}C$ ，或者所使用溶剂的沸点）、在大气压下或者在压力恰当的闭合容器中和/或在惰性气体如氩气或氮气中对所使用溶剂而言是惰性的并且因此成为溶剂的溶剂。

当形成盐的基团存在时，所有原材料和中间化合物可以以盐存在。在此种化合物反应过程中也可以存在盐，其前提是反应不会因此而受损。

在反应的所有阶段，例如通过与下面“额外过程步骤”中描述的方法相似的方法，所形成的同分异构混合物可以分离成为单独的同分异构体例如非对映异构体或对映异构体，或者分离成为同分异构体的目的混合物如外消旋化合物或非对映异构体混合物。

在一些情况下，例如在氢化作用的情况下，可以实现立体选择性反应，以致于例如可以容易地得到单独的同分异构体。

除非在过程的描述中另外指出，可以从中选择适于具体反应的试剂包括例如水、酯（例如低级烷基低级酸酯，如二乙基乙酸）、醚（例如脂肪醚，如乙醚），或环醚（如四氢呋喃）、液态芳香烃（例如苯或甲苯）、醇（例如甲醇）、乙醇或 1-丙醇或 2-丙醇、腈（例如乙腈）、卤代烃（例如亚甲基氯）、酰胺（例如二甲基甲酰胺）、碱（例如杂环氮碱，如吡啶）、羧酸（例如低级羧酸，如乙酸）、羧酸酐（例如低级酸酐，如乙酸酐）、环烃、直链烃或支链烃（例如环己烷、己烷或异戊烷），或者这些溶剂的混合物（如水溶液）。在进行如层析或分配中也可以用到此种溶剂混合物。

本发明还涉及以下形式的方法，其中将在任何阶段作为中间物得到的化合物用作原材料并开展剩余步骤，或者那些在任何阶段将过程打断的方

法形式，或者那些原材料在反应条件下形成或者原材料以反应衍生物或盐的形式使用的方法形式，或者那些根据本发明过程得到的化合物在过程条件下产生并且在原位进一步加工的方法形式。优选使用那些能够导致上述化合物成为优选，特别是成为特别优选、更加特别优选和/或非常特别优选的原材料。

优选以相似于实施例中提到的方法和过程步骤制备式 I 化合物（或其 N-氧化物）。

可以以水合物的形式获得式 I 化合物（或其 N-氧化物）（包括它们的盐），或者它们的晶体可以包括例如用于结晶的溶剂（以溶剂合物形式存在）。

药物组合物、方法和用途

本发明还涉及包含作为活性成分的式 I 化合物（或其 N-氧化物）的并且特别是能够用于治疗在开始时提到的疾病的药物组合物。特别优选用于肠内（如鼻、口、直肠）或者特别是口腔和肠胃外（如静脉内、肌肉或皮下）施用于温血动物（特别是人）的组合物。组合物只包含活性成分或者优选地包含活性成分和可药用载体。活性成分的剂量取决于欲被治疗的疾病并且取决于物种、年龄、体重和个体状况、个体药物代谢动力学数据和施用模式。

本发明还涉及在预防性特别是治疗性治疗人或者动物体的方法中使用的药物组合物，制备药物组合物的方法（特别是制备用于治疗肿瘤的组合物形式），还涉及治疗上述疾病，特别是肿瘤疾病，更特别是上面提到的那些疾病的方法。

本发明还涉及制备含有作为活性组分（活性成分）的式 I 化合物（或其 N-氧化物）的药物组合物的方法和式 I 化合物作为活性成分在药物组合物中的用途。

优选适于以有效抑制 RAF 激酶（特别是突变型 RAF 激酶）的量与至少一种药用载体一起施用于患有由异常 MAP 激酶信号传导途径所表征的

疾病，特别是肿瘤疾病，最优选黑素瘤的温血动物，特别是人或者有商业用途的哺乳动物，并包含式 I 化合物（或其 N-氧化物）或其可药用盐（前提是存在形成盐的基团）的药物组合物。

还优选用于预防性，特别是治疗性治疗温血动物（特别是人或商业用途的哺乳动物）中肿瘤疾病和其它增殖性疾病并含有有效预防或特别是治疗所提到疾病的量的作为活性成分的新式 I 化合物（或其 N-氧化物）或其可药用盐的药用组合物，其中所述的人或有商业用途的哺乳动物需要此种治疗，特别患有此种疾病。

药物组合物包含约 1% 至约 95% 的活性成分，一次给药的剂量形式优选包含约 20% 至约 90% 的活性成分，不是一次给药的剂量形式优选包含约 5% 至约 20% 的活性成分。单位剂形是例如糖锭剂、片剂、安瓿剂、药水瓶、栓剂或胶囊剂。其它剂形是例如软膏剂、乳膏剂、糊剂、泡沫剂、酊剂、唇膏剂、滴剂、喷雾剂、分散剂等等。实例为含有约 0.05g 至约 1.0g 活性成分的胶囊。

以本身已知的方式制备本发明药物组合物，例如通过常规混合、粒化、成型(confection)、溶解或者冻干法。

此外，活性成分的溶液优选地还使用悬浮液或分散液，特别是等渗水溶液、分散液或悬浮液，其中就例如包含单独的或与载体（例如甘露醇）一起的活性物质的冻干组合物而言，可以在使用前制备。药用组合物是无菌的和/或包含赋形剂，如防腐剂、稳定剂、湿润剂和/或乳化剂、溶解剂、调节渗透压的盐和/或缓冲液，并且以本身已知的方式来制备，例如通过常规的溶解或冻干方法制备。提到的溶液或悬浮液可以包含增加粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮或白明胶，或者溶解剂例如 Tween 80 [聚氧乙烯(20)山梨聚糖一油酸；ICI Americas, Inc, USA 的商标]。

油中的悬浮液包含常规用于注射目的的作为油性成分的植物油、合成或半合成油。这里可能提及的是如特别的液态脂肪酸酯，其中所述的脂肪酸酯包含作为酸成分的具有 8-22 特别是 12-22 个碳原子的长链脂肪酸例如

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、山嵛酸或相应的不饱和酸，例如油酸、反油酸、芥子酸、巴西烯酸或亚油酸，并任意地加入抗氧化剂，如维生素 E、 β -胡萝卜素或 3,5-二叔丁基-4-苯甲醇。这些脂肪酸酯的醇成分具有最多 6 个碳原子并且是一或多羟基的，例如一、二或三羟基的醇，例如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇或它们的同分异构体，但特别是乙二醇和甘油。因此可能提到的脂肪酸酯的实例是油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、“Labrafil M 2375”（来自 Gattefossé, Paris 的聚氧乙二醇甘油三油酸酯）、“Labrafil M 1944 CS”（通过杏仁油醇解作用制备、并且由甘油酯和聚乙烯乙二醇酯组成的不饱和聚氧乙二醇甘油酯；Gattefossé, France）、“Labrasol”（通过 TCM 醇解作用制备并且由甘油酯和聚乙烯乙二醇酯组成的饱和聚氧乙二醇甘油酯；Gattefossé, France）和/或 “Miglyol 812”（来自 Hüls AG, Germany 的链长度为 C_8 - C_{12} 的饱和脂肪酸的甘油三酯），但是特别是植物油，例如棉籽油、杏仁油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、大豆油和更特别是花生油。

在无菌的条件下以常规的方式制备注射组合物，在将其装入例如安瓿或者药水瓶并且将容器密封也同样如此。

可以通过例如将活性成分与一种或多种固体载体相混合，适当粒化所得混合物，并且如有必要通过加入额外的赋形剂至片剂或者糖锭剂核中来适当加工混合物或者颗粒而得到用于经口施用的药物组合物。

适当的载体，特别是充填剂，例如糖（如乳糖、蔗糖）、甘露醇或山梨醇、纤维素制剂和/或磷酸钙（如磷酸三钙或磷酸氢钙），以及粘合剂，例如淀粉（如玉米、小麦、水稻或者马铃薯淀粉）、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/或如有必要的崩解剂，例如上面提到的淀粉、羧甲基淀粉、交联的聚乙烯吡咯烷酮、藻酸及其盐（如藻酸钠）。额外的赋形剂特别是流动调节剂和润滑剂，例如硅酸、滑石粉、硬脂酸或其盐（如硬脂酸镁或钙）和/或聚乙二醇或其衍生物。

糖锭剂核可以与适当的、任选的肠溶衣一起提供，除此之外可以使用的有包含阿拉伯树胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和/或二氧化钛

的浓缩糖溶液，或者在适当有机溶剂或溶剂混合物中的包衣溶液、或者用于制备肠溶衣的适当纤维素制剂，如乙酰纤维素邻苯二甲酸或羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸的溶液。例如为了鉴定的目的或者为了指示活性成分的不同剂量可以将颜料或色素加到片剂或者糖锭剂包衣中。

用于经口施用的药物组合物还可以是硬白明胶胶囊和由白明胶和增塑剂（如甘油或山梨醇）组成的软密封胶囊。硬白明胶胶囊可以含有例如与填充剂（如玉米淀粉）、粘合剂和/或助流剂（如滑石粉或硬脂酸镁）和任选地稳定剂相混合的颗粒形式的活性成分。在软胶囊中，活性成分优选地溶解在或悬浮于在适当的液体赋形剂，例如脂肪油、石蜡油或液态聚乙二醇或 1,2-乙烷基二醇或丙二醇的脂肪酸酯，同样也可以加入稳定剂和去污剂，如聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯类型。

适于经直肠施用的药物组合物有例如由活性成分和栓剂基质组合组成的栓剂。适宜的栓剂基质有例如天然或合成的甘油三酯、链烷烃、聚乙二醇或高级烷醇。

对于肠胃外施用，水溶形式的活性成分的水溶液形式，如水溶盐形式，或者包含增加粘度物质如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖和如有必要的稳定剂的水性注射悬浮液是特别适合的。活性成分任选地与赋形剂一起还可以是冻干的形式，并且可以在肠胃外施用之前通过加入适当的溶剂而配制成溶液。

用于例如经肠胃外施用的溶液也可以用作灌注溶液。

优选的防腐剂有例如抗氧化剂（如抗坏血酸）或者杀微生物剂（如山梨酸或者苯甲酸）。

本发明特别涉及治疗由异常 MAP 激酶信号传导途径所表征的病理状况中之一，特别是能够对 RAF 激酶抑制作出反应的疾病，特别是相应的肿瘤疾病的过程或方法。式 I 化合物（或其 N-氧化物）可以以药物组合物的形式、优选以有效抑制所提到疾病的量、预防性或者治疗性地施用于需要此种治疗的温血动物（如人），化合物特别是以药物组合物的形式进行使用。在体重为大约 70kg 的情况下，所施用的本发明化合物的日剂量约 0.1g

至约 5g, 优选约 0.5g 至约 2g.

在每一个具体案例中使用的药物制剂(药剂)的优选的剂量、组合物和制备在上面有所描述。

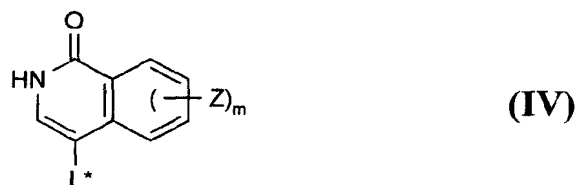
原材料

优选所使用的原材料和所选择的反应条件能得到作为优选而提及的化合物。

式 II 和 III 的原材料是已知的, 能够通过本身已知的过程制备, 或者是商业可得的; 具体而言, 它们可以通过与实施例中所提到的那些过程相类似的过程来制备。

在原材料的制备中, 如有必要则所存在的不应该参加反应的任何功能基团是被保护的形式。在方法 a) 或者实施例中描述了优选的保护基团、它们的引入和它们的去除。可以用所述原材料和中间物的盐代替原材料和中间物来进行反应, 前提是存在形成盐的基团, 并且也可以使用盐进行所述反应。因此, 上下文提及的任何原材料也旨在包括它们的盐, 只要是有利并可能的。

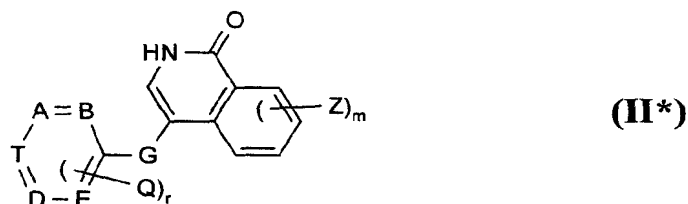
对于 G 是 $-\text{CH}_2\text{-O-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ 、氧杂、硫杂或 $-\text{NR-}$ 并且其它符号如式 I 中所定义的式 II 化合物的制备, 可以通过例如式 IV 化合物与式 V 化合物的反应优选地在与用于式 II 化合物和式 III 化合物的反应方法 a) 中所提到的条件相类似的条件下, 或者利用具有 Pd^0 钯复合催化, 例如与四(三苯膦基)钯复合物、钯(0)-P(邻甲苯基)₃复合物、具有螯合二(膦)的钯(0)复合物(见, 例如 J. Org. Chem. 61, 7240-7241 (1996)) 等等, 优选在碱金属碳酸盐(如 K_2CO_3) 存在条件下, 在适当的溶剂(如甲苯)中, 在提高的温度(优选回流温度)下用 Pd^0 催化,



其中 L^* 是离核的离去基团, 特别是卤素 (如溴), 并且 m 和 Z 及波浪线所指示的键如式 I 化合物中所定义 (特别地 $m=0$ (即 Z 不存在) 时 L^* 是溴的式 IV 相应化合物可以从 SPECS & BIOSPECS, Rijswijk, Holland 商业性得到)。



其中 G 是 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, 或者是氧杂、硫杂或 $-\text{NR}-$, 并且 A 、 B 、 D 、 E 、 T 、 Q 和 r 如式 I 化合物中所定义。从而得到了式 II* 化合物。



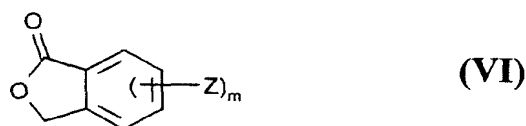
其中 m 和 Z 及波浪线所指示的键以及 A 、 B 、 D 、 E 、 T 、 Q 和 r 如式 I 化合物中所定义, 并且 G 是 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, 或者是氧杂、硫杂或 $-\text{NR}-$ 。

通过使用相应的酸酐 (例如为引入 $L=\text{Cl}$ 所使用的磷酸氯(POCl_3)) 或者使用下面提到的用于将式 XII 化合物转变成式 II 化合物的不同试剂, 引入如式 II 中所定义的离核基团 L , 以制备式 II 相应的化合物。

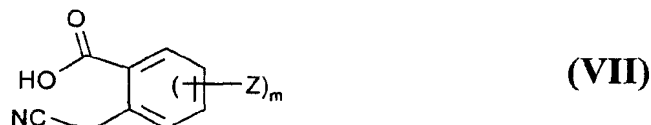
式 IV 和 V 的原材料是已知的, 可通过本身已知的方法制备, 或者是商业获得。

通过将式 VI 的内酯与碱金属氰化物 (特别是氰化钾), 在提高的温度 (例如 100°C - 200°C) 条件下反应来制备 G 是亚甲基并且其它符号如式 I

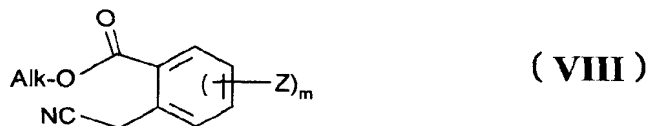
化合物中所定义的式 II 的化合物 (见 Org. Synthesis, Coll. 第 3 卷, 174), 得到了式 VII 的氰甲基苯甲酸。



其中 Z 和 m 如式 I 化合物中所定义。



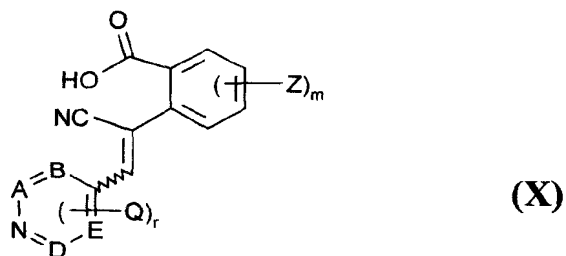
其中基团如式 VI 中所定义; 然后通过例如在适当的溶剂例如卤代低级 (如二氯甲烷) 中向式 VII 化合物中加入适当的二低级烷基甲酰胺二低级烷基乙酰例如二甲基甲酰胺二甲基乙酰, 并且搅动混合物至完全反应、优选在温度 0-60°C (如大约室温) 的条件下, 将式 VII 化合物转变成低级烷基酯。得到了式 VIII 的相应的低级烷基酯。



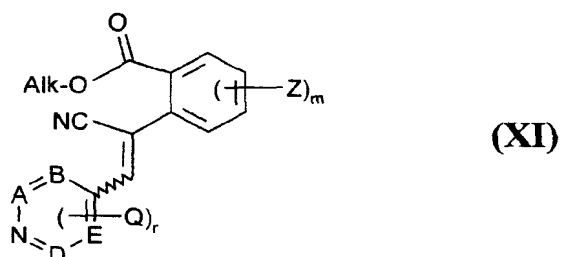
其中 Alk 是低级烷基 (特别是甲基), 并且其它基团如式 VI 中所定义。然后, 在适当的溶剂, 例如醚 (如四氢呋喃) 或酯 (如丙酸乙酯) 或其混合物中, 在醇 (例如甲醇) 和相应的醇化物 (例如碱金属甲醇化物, 如甲醇钠) 存在的条件下, 在优选 0°C 至回流温度, 优选大约 5-30°C 的温度下, 将酯与式 IX 的醛进行反应, 得到式 X 化合物。



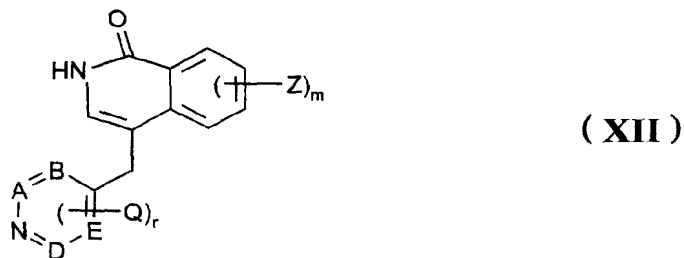
其中 A、B、D、E、Q 和 r 如式 I 化合物中所定义。



其中基团 A、B、D、E、Q 和 Z 和指数 r 及 m 如式 I 化合物中所定义；此化合物被转变成（在与制备式 VIII 的低级烷基酯的条件相类似下）式 XI 的相应的低级烷基酯。



其中 Alk 是低级烷基（特别是甲基），并且其它基团如式 X 中所定义。随后在适当的溶剂（例如醚，如四氢呋喃）或者醇（如甲醇）或者它们的混合物中，在适当催化剂（特别是结构催化剂，如阮内钴或者特别是阮内镍）存在条件下、在优选的 10-80°C 温度下、在 0.5-100 巴压力（特别是在大约正常压力下）进行氢化，得到式 XII 异喹啉化合物。



其中基团 A、B、D、E、Q 和 Z 以及指数 r 和 m 如式 I 化合物中所定义。

然后，通过用于引入离核的离去基团的适当试剂，例如磷酰卤化物或者磷酰五卤化物，特别是磷酰氯(POCl_3)或者磷酰五氯，在没有溶剂存在下或者在适当的溶剂（例如乙腈）中，在缺乏或者优选存在相应的酸（例如

氢卤酸, 如盐酸) 的条件下, 在从 40°C 到回流温度 (优选在大约 40-60°C) 的优选温度下将式 XII 化合物转变成式 II 的相应化合物或其盐。

以相似的方式使用其中 -CHO- 基团被相应的低级醛基取代的类似于式 IX 化合物, 经由其中次甲基(methyldene) (式 X, XI) 或亚甲基 (式 XII) 被相应的低级亚烷基或者低级亚烷基取代的类似于式 X-XII 的化合物可以制备其中 G 是低级亚烷基的式 II 的相应化合物。

其它的原材料是已知的, 可以通过本身已知的方法制备或者是商业获得, 或者具体而言可以通过与实施例中提到的过程相类似的过程来制备。

下面的实施例用来阐明本发明而不对其范围进行限制。

合成实施例

实施例 S1: 1-(3,5-二甲基苯胺基)-4-[(吡啶-4-基)-甲基]-异喹啉 (= N-(3,5-二甲基苯基)-[4-(吡啶-4-基甲基)-异喹啉-1-基]-胺)

在无水条件下, 将 100 mg (0.825 mmol) 3,5-二甲基苯胺溶解于 4 ml 乙醇, 并加入 196 μ l (0.784 mmol) HCl (以 4N 的浓度存在于二氧杂环己烷中)。在加入 200 mg (0.785 mmol) 1-氯-4-[(吡啶-4-基)-甲基]-异喹啉后, 将混合物在 90°C 加热 8 小时。然后蒸发浓缩; 将剩余物置于 4 ml 水、1 ml 饱和氨溶液和 20 ml CH_2Cl_2 中, 并且将有机相分开, 用 Na_2SO_4 (无水) 干燥并再次蒸发浓缩。经过柱层析 (SiO_2 ; 乙酸乙酯/己烷 3:1) 和从乙酸乙酯/己烷中结晶得到标题化合物: m.p. 156-158 °C; FAB-MS: $(\text{M}+\text{H})^+=340$; Anal. calc. ($\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3 \cdot 0.1 \text{ H}_2\text{O}$) C 80.95 %, H 6.26 %, N 12.31 %; found C 80.9 %, H 6.2 %, N 12.4 %。

原材料制备如下:

S1a) 2-氟甲基-苯甲酸甲酯

通过温和加热将 175 g (1.08 mol) 2-氟甲基苯甲酸 (对于制备见: Org. Synthesis, Coll, 第 3 卷, 174) 溶于 1.7 升 CH_2Cl_2 ; 在室温下滴加 242 ml ($\approx 90\%$, 1.6 mol) 二甲基甲酰胺二甲基缩醛, 并且搅动 38 小时直至完全反应。

用 1.2 升饱和 NaHCO_3 溶液和盐水洗涤反应混合物 2 次。使用 2 份 CH_2Cl_2 抽提水相，干燥有机相(Na_2SO_4)并蒸发浓缩。柱层析(SiO_2 ; 乙酸乙酯/己烷 1:4, 在乙酸乙酯/己烷/ CH_2Cl_2 中使用)得到标题化合物: m.p. 49-50°C Anal. calc. ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$) C 68.56 %, H 5.18 %, N 8.00 %; *found* C 68.5 %, H 5.1 %, N 7.9 %。

S1b) 2-[(1-氟-2-(吡啶-4-基)-乙烯基)-苯甲酸

在隔绝空气的条件下，将 127.7 ml (1.35 mol) 吡啶-4-甲醛(Fluka, Buchs, Switzerland)加入到 1.8 升 THF 中的 215.6 g (1.23 mol) 2-氟甲基苯甲酸甲酯溶液中。将混合物冷却至 8-9°C，在 20 分钟内滴加 297 ml (1.6 mol) 5.4M 的甲醇钠甲醇溶液，并且在 10-15°C 将混合物搅动 1.5 小时。然后用大约 350 ml 4N HCl 将混合物调至 pH 6.0 并且在 5°C 将混合物搅动 1 小时。结晶标题化合物并且抽吸过滤并用 THF/水(2:1)和 THF 彻底洗涤: m.p. 218-219°C; FAB-MS: $(\text{M}+\text{H})^+=251$; Anal. calc. ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$) C 71.99 %, H 4.03 %, N 11.19 %; *found* C 71.9 %, H 4.1 %, N 11.1 %。

S1c) 2-[(1-氟-2-(吡啶-4-基)-乙烯基)-苯甲酸甲酯

在无水的条件下，将 211 g (0.843 mol) 2-[(1-氟-2-(吡啶-4-基)-乙烯基)-苯甲酸悬浮于 3.3 升 CH_2Cl_2 ; 在室温下加入 169 ml ($\approx 90\%$, 1.1 mol) 二甲基甲酰胺二甲基缩醛(Fluka, Buchs, Switzerland)并搅动 22 小时直至完全反应。过滤反应混合物并用 CH_2Cl_2 彻底洗涤剩余物并丢弃。通过蒸发、层析(SiO_2 ; 乙酸乙酯)和从乙酸乙酯/己烷中进行结晶浓缩过滤液得到标题化合物: m.p. 102-104°C; FAB-MS: $(\text{M}+\text{H})^+=265$; Anal. calc. ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) C 72.72 %, H 4.58 %, N 10.60 %; *found* C 72.7 %, H 4.8 %, N 10.5 %。

S1d) 4-(吡啶-4-基-甲基)-2H-异喹啉-1-酮

在存在 5×40 g 阮内镍(间隔加入)的条件下，将 163 g (617 mmol)

2-[(1-氟-2- (吡啶-4-基) -乙烯基) -苯甲酸甲酯在 3 升 THF 中于 40℃ 下反应 90 小时进行氢化。过滤反应混合物并且通过蒸发和从乙腈/乙酸乙酯中结晶浓缩过滤液 (得到标题中的化合物)。进一步的产物可以通过层析 (SiO_2 ; 乙酸乙酯 $\rightarrow$ 丙酮) 从母液中获得: m.p. 189-190℃; FAB-MS: $(\text{M}+\text{H})^+=237$; Anal. calc. ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O} \cdot 0.05 \text{ H}_2\text{O}$) C 75.96 %, H 5.14 %, N 11.81 %; *found* C 75.8 %, H 5.2 %, N 11.9 %。

S1e) 1-氟-4- (吡啶-4-基甲基) -异喹啉

在隔绝空气的条件下, 将 32.7 g (139 mmol) 4- (吡啶-4-基甲基) -2H-异喹啉-1-酮在 560 ml 乙腈中制成浆并且加入 69.2 ml (277 mmol) 溶于二氧杂环己烷的 4N HCl 和 31.7 ml (346 mmol) POCl_3 。在 50℃ 下将混合物搅动 22 小时, 然后在冰浴中冷却, 并且在 30 分钟内加入溶于 1.64 升水中的 128.6 g NaHCO_3 的溶液。在加入的过程中, 首先形成了澄清的溶液, 然后沉降标题化合物, 并且在 15 分钟之后过滤出化合物, 并用水和醚彻底洗涤, 并且在 60℃ 的高真空条件下干燥: m.p. 119-120℃; FAB-MS: $(\text{M}+\text{H})^+=255$ 。

实施例 S2: 1- (3-氟苄氨基) -4- [(吡啶-4-基) -甲基] -异喹啉

在无水条件下, 将 1.6 ml (13.1 mmol) 3-氟苄氨基和 800 mg (3.14 mmol) 1-氟-4- (吡啶-4-基甲基) -异喹啉 (实施例 1e) 在 150℃ 下搅动 2 小时。将混合物悬浮于乙酸乙酯中, 加入 1 ml 浓缩氨溶液, 用水和盐水洗涤并且干燥有机相 (Na_2SO_4) 并蒸发浓缩。柱层析 (SiO_2 ; 乙酸乙酯) 后得到标题中的化合物: m.p. 141-142℃; FAB-MS: $(\text{M}+\text{H})^+=360$; Anal. calc. ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{Cl}$) C 73.43 %, H 5.04 %, N 11.68 %, Cl 9.85 %; *found* C 73.2 %, H 5.1 %, N 11.6 %, Cl 9.9 %。

实施例 S3: 1- (4-叔丁基苯胺基) -4- [(吡啶-4-基) -甲基] -异喹啉

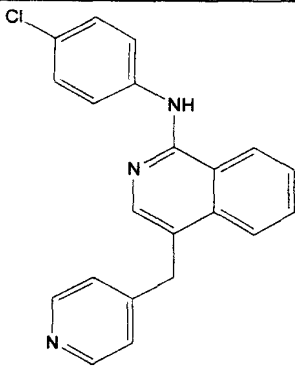
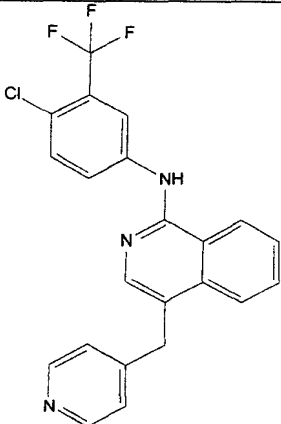
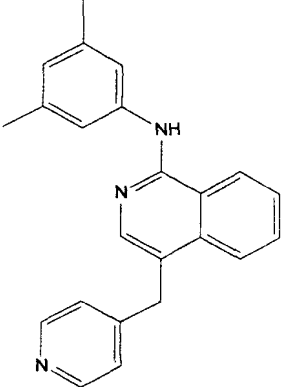
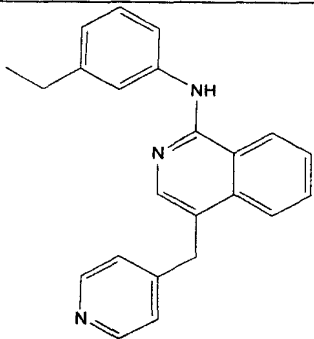
在无水条件下, 在氮气层下将 27.5 ml (172.7 mmol) 4-叔丁基苯胺基和 7.0 g (27.5 mmol) 1-氟-4- (吡啶-4-基甲基) -异喹啉 (实施例 1e) 于 80℃

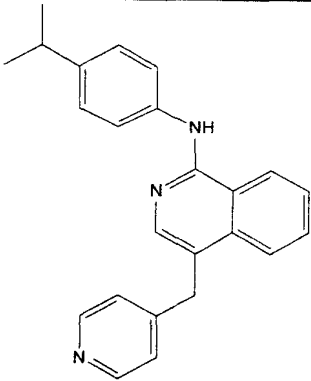
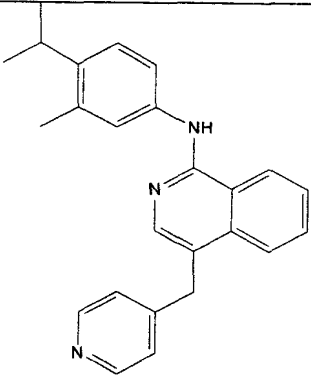
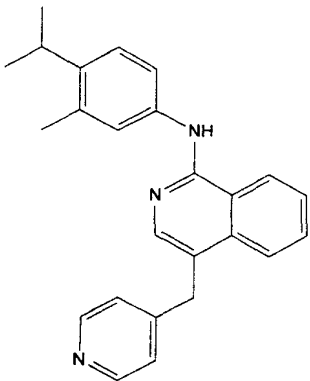
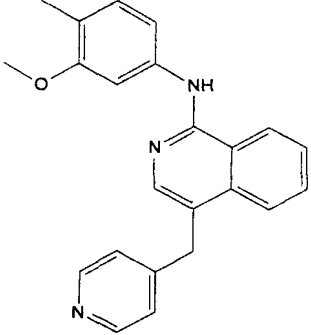
下搅动 3 小时。然后将混合物冷却并在 5% (w/v) NaHCO_3 (水溶液) 和乙酸乙酯中进行分配。经 MgSO_4 干燥乙酸乙酯相并蒸发。通过快速层析(硅胶, 50% (v/v) 乙酸乙酯/己烷) 和随后从干冰/异丙基醇浴中的己烷结晶得到 8.6 g 浅黄色粉末, m.p. 157-159°C; Anal. calc. C 81.71 %, H 6.86 %, N 11.43 %; *found* C 81.88 %, H 6.85 %, N 11.43 %。

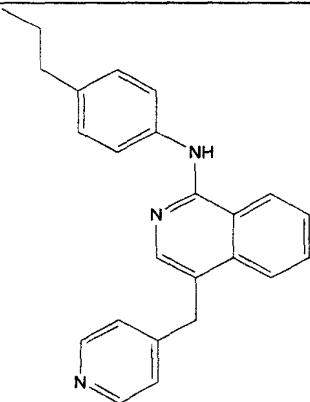
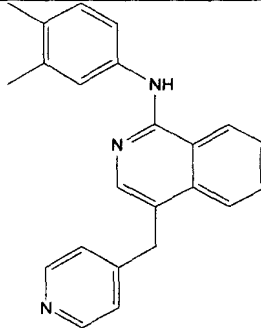
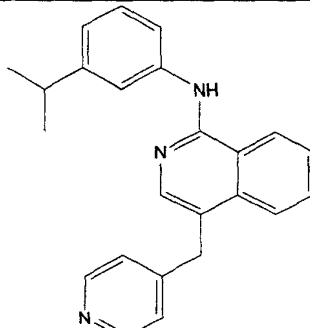
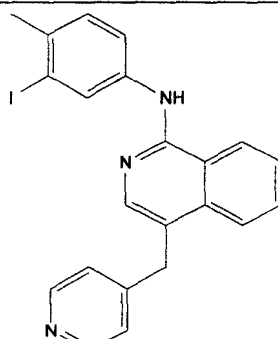
生物学实施例

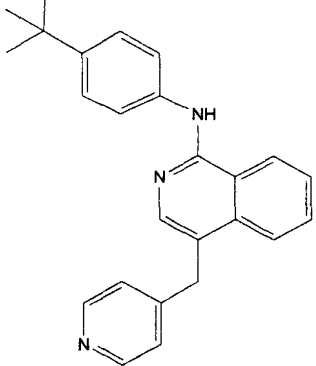
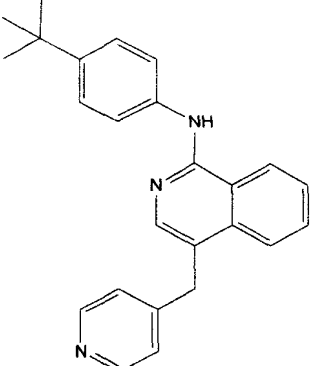
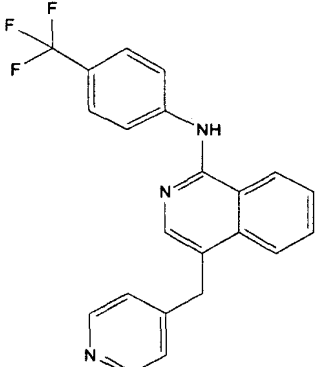
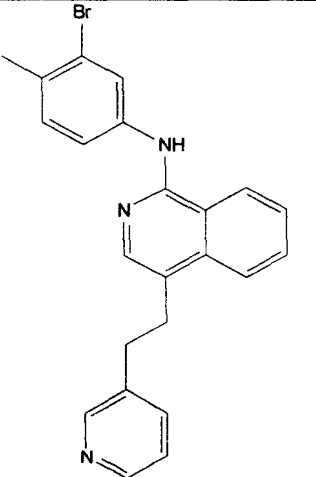
使用杆状病毒表达系统从昆虫细胞中纯化具有人序列的活性 B-Raf、C-Raf 和 V599E B-Raf 蛋白质。在用 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 包被并用 Superblock 封闭的 96 孔微孔板中测试 Raf 的抑制。使用磷酸化 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 特异抗体(Cell Signaling #9246)、偶联有碱性磷酸酶的抗小鼠 IgG 二级抗体(Pierce # 31320)和碱性磷酸酶底物 ATTOPHOS (Promega, #S101)可以检测 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 在第 36 位丝氨酸上的磷酸化。

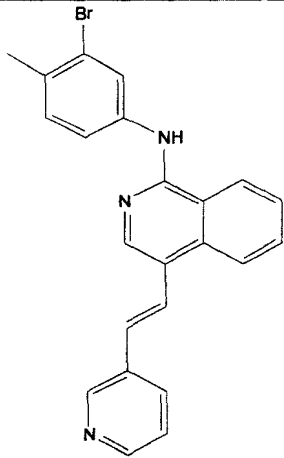
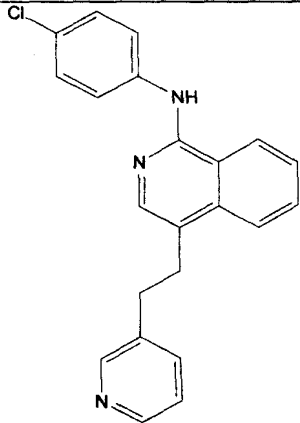
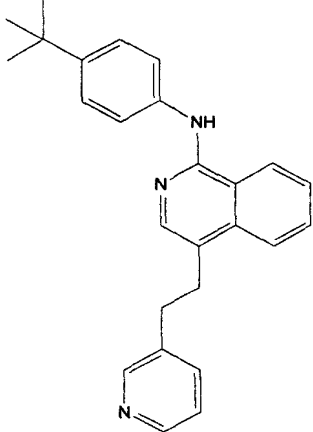
下面各化合物能够以 0.01-3.5 μM 的 IC_{50} 抑制野生型 C-RAF 和/或以 0.03-3.7 μM 的 IC_{50} 抑制野生型 B-RAF 和/或以 0.01-3.4 μM 的 IC_{50} 抑制突变型 B-RAF (V599E)。

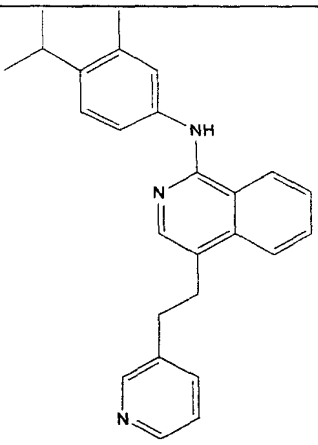
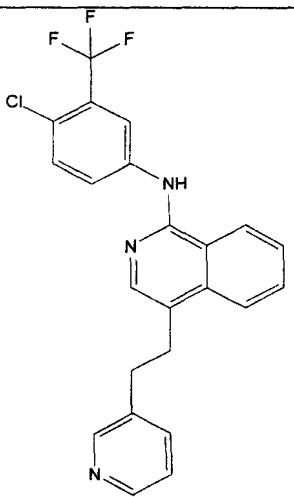
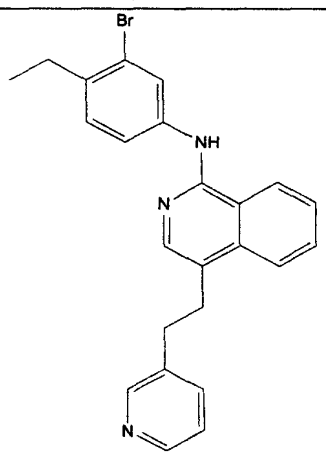
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
1.		182-183	346
2.		205-206	441
3.		144-145	340
4.		146-148	340

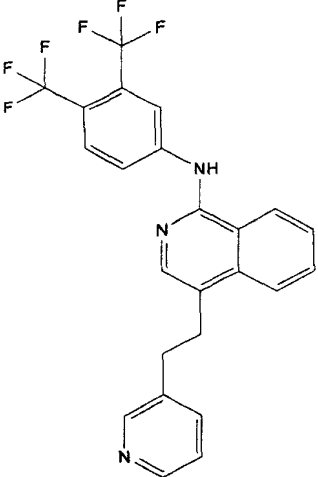
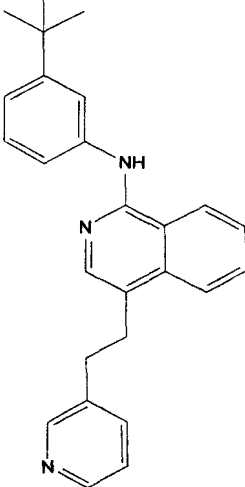
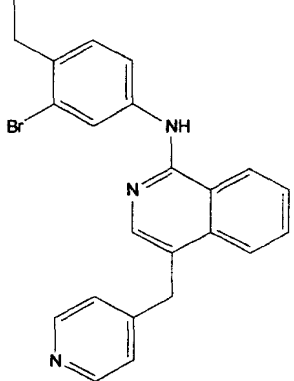
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
5.		158-159	354
6.			368
7.			368
8.			356

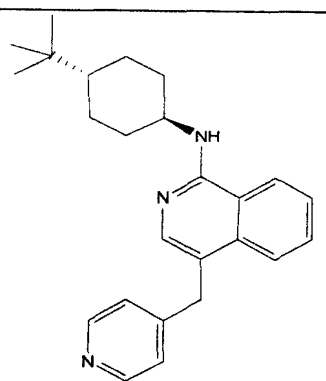
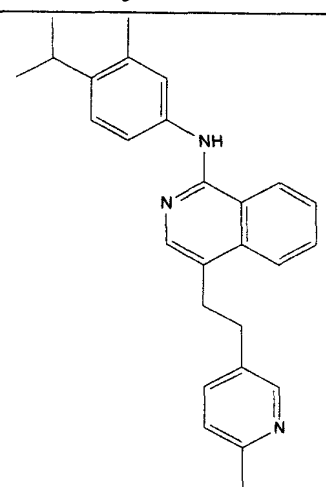
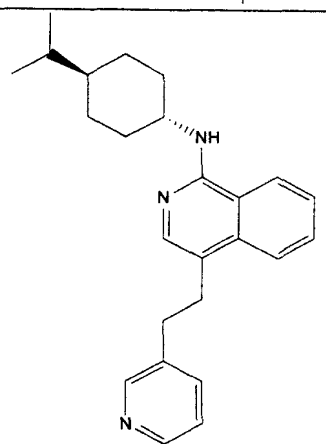
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
9.		118-119	354
10.		144-145	340
11.		143-145	354
12.		149-150	452

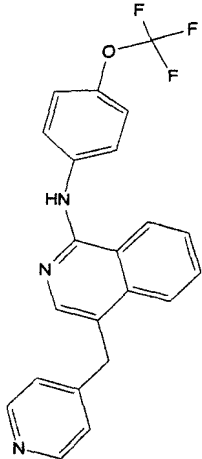
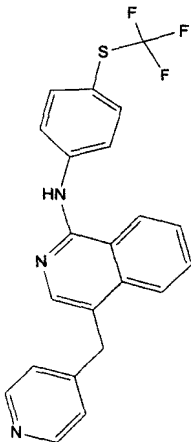
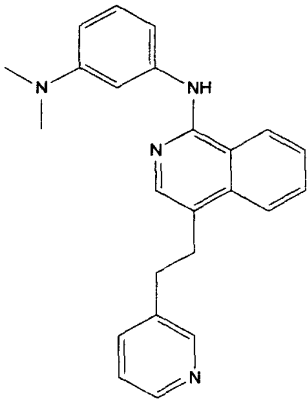
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
13.		-	-
14.		158-159	368
15.		160-161	380
16.		167-168	404/406

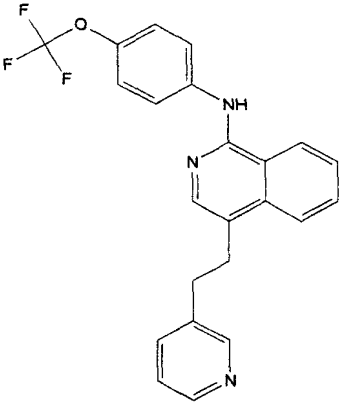
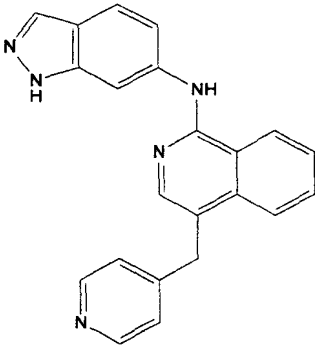
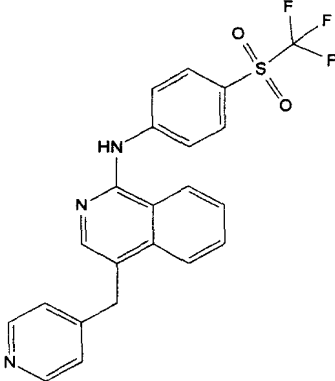
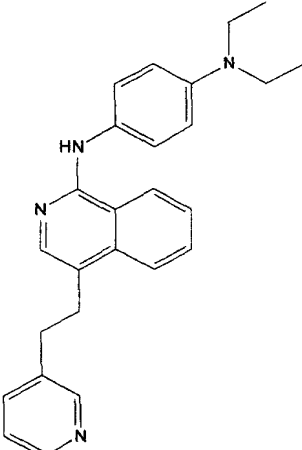
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
17.			416
18.			359
19.		81	

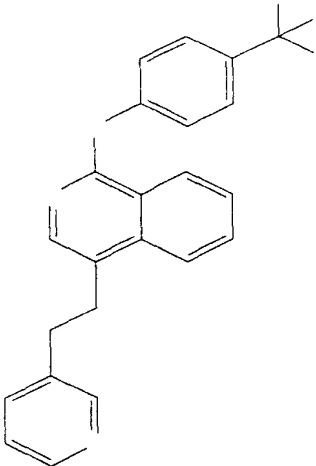
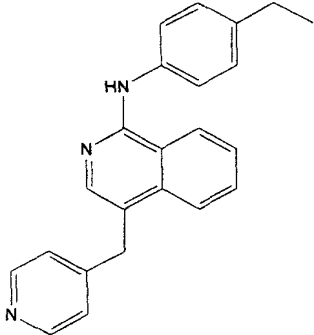
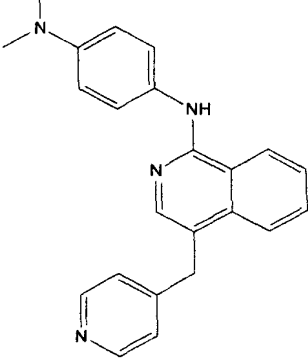
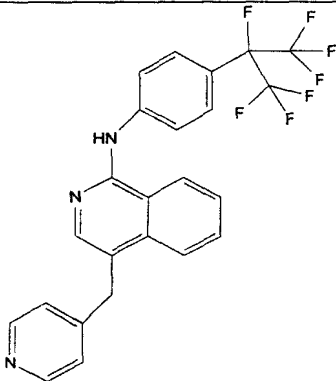
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
20.		133-134	
21.			159
22.			119

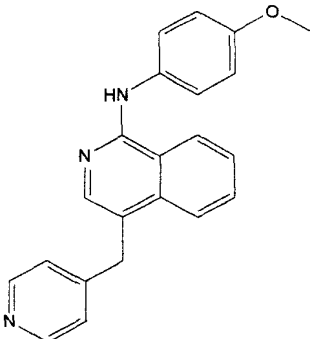
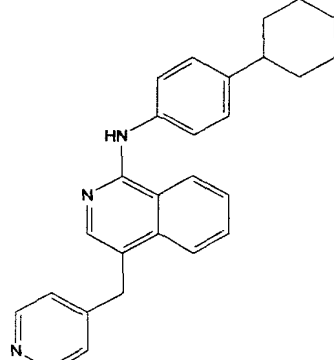
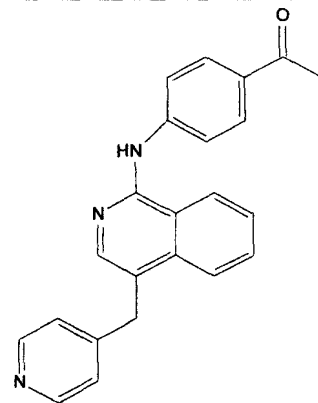
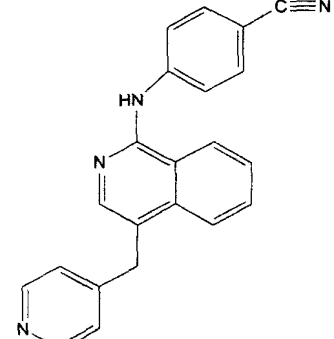
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
23.		124-125	
24.		133-134	
25.			418/420

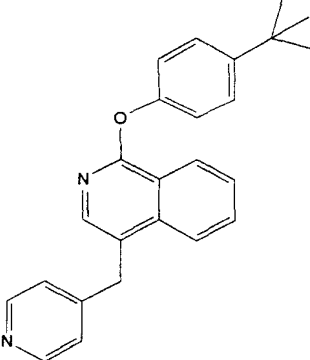
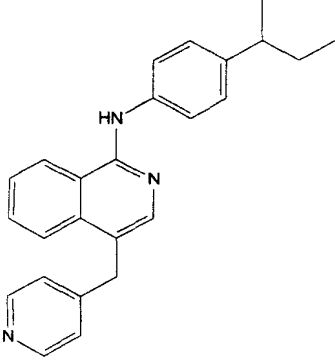
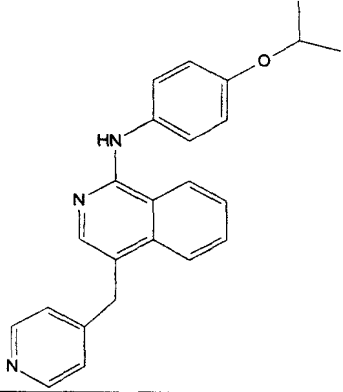
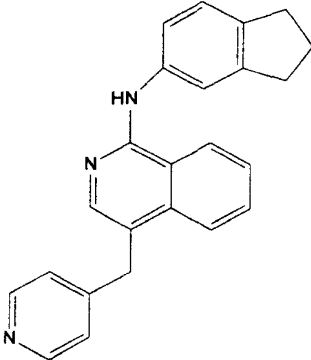
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
26.			374
27.			oil
28.		89-92	

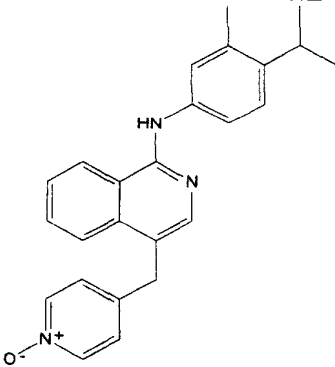
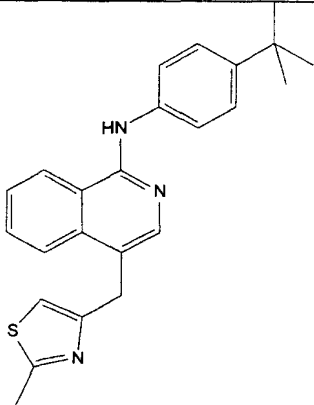
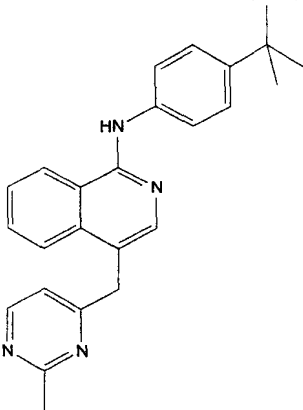
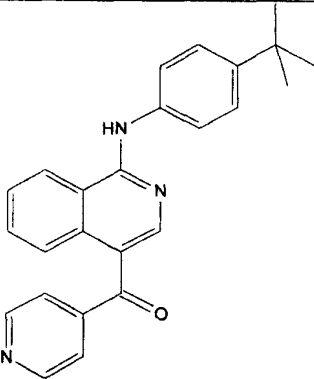
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
29.			396
30.			412
31.			369

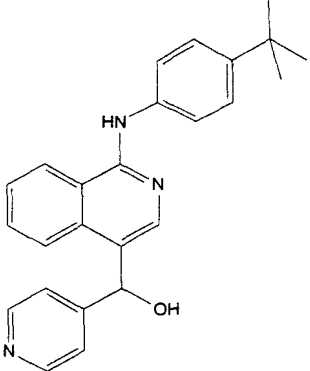
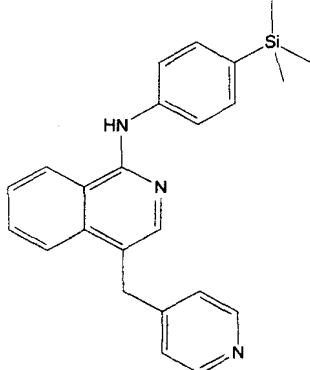
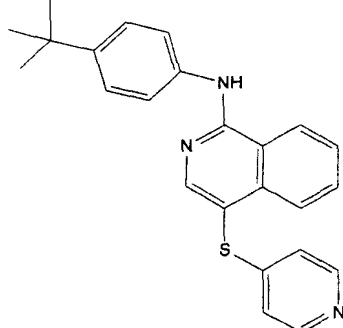
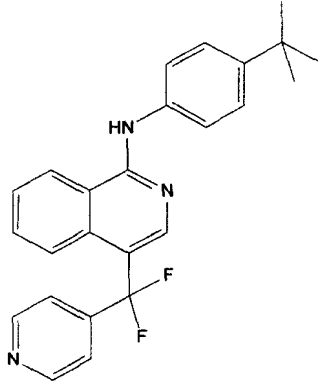
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
32.			410
33.			332
34.			444
35.			397

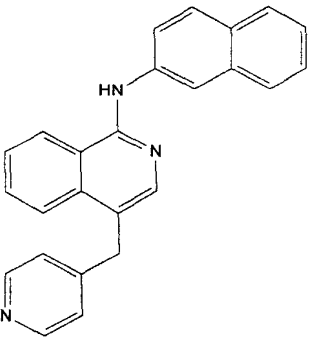
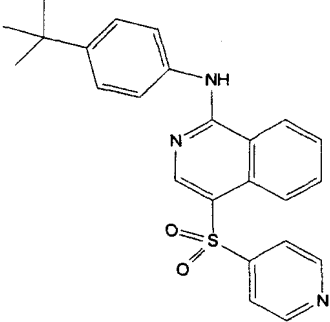
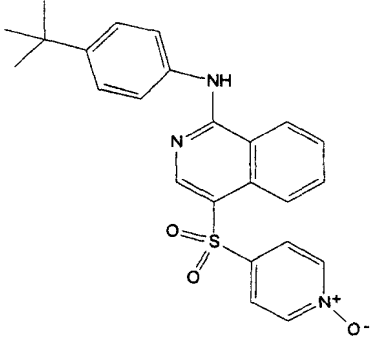
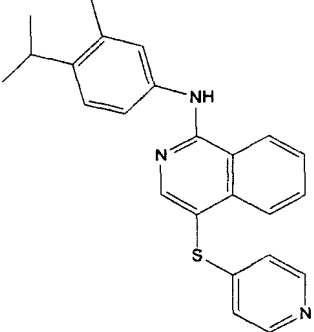
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
36.			394
37.			340
38.			355
39.			480

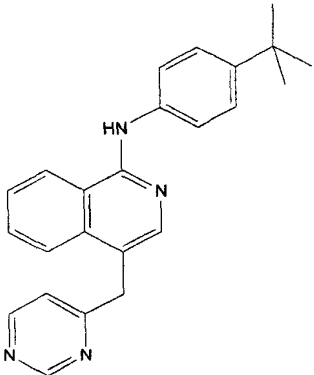
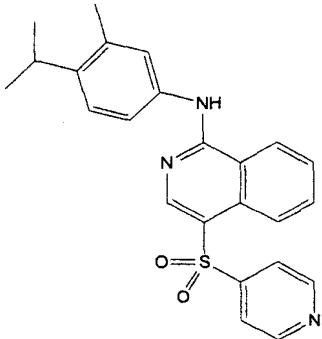
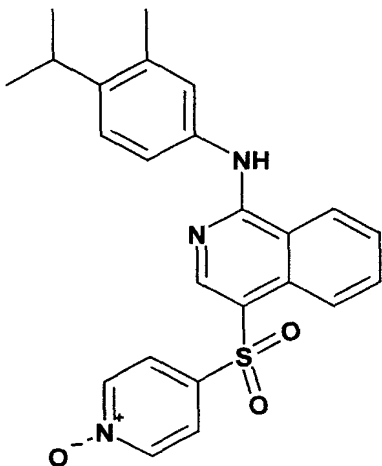
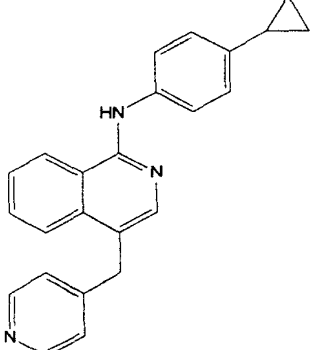
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
40.			342
41.			394
42.			354
43.			337

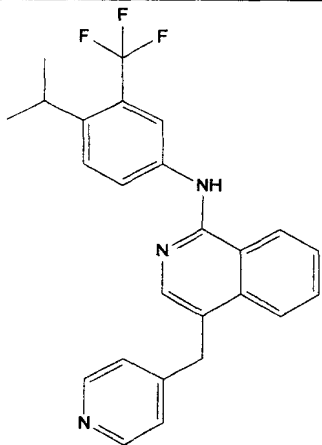
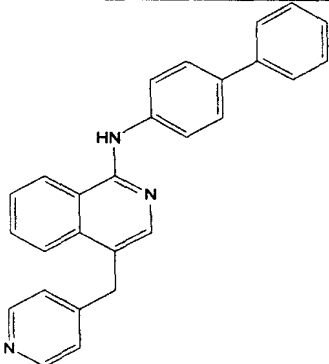
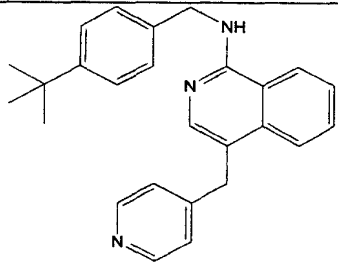
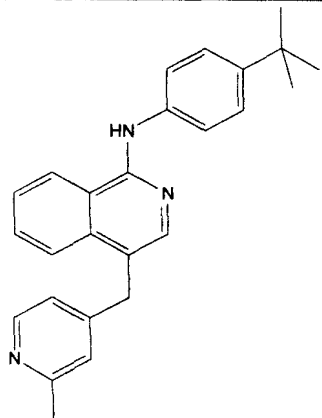
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
44.			369
45.			368
46.			370
47.			352

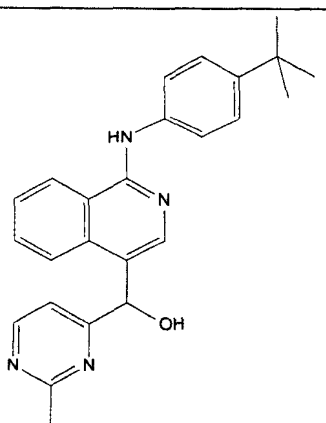
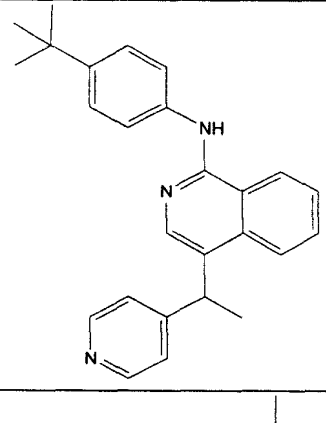
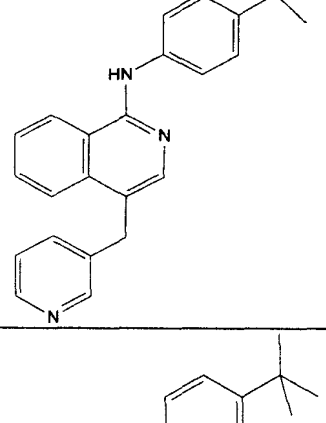
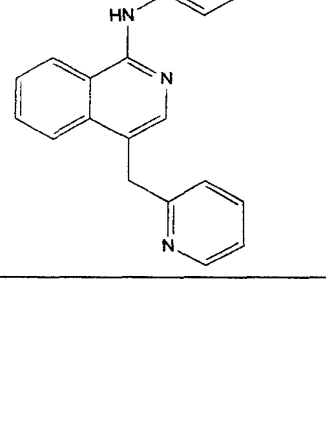
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
48.			384
49.			388
50.			383
51.			382

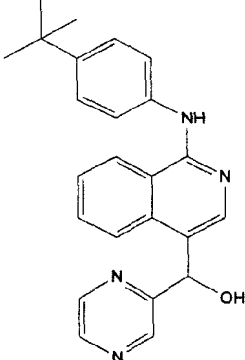
实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
52.			384
53.			384
54.			386
55.			404

实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
56.			362
57.			418
58.			434
59.			386

实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
60.			369
61.			418
62.			433
63.			351

实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
64.			422
65.			387
66.			382
67.			382

实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
68.			399
69.			382
70.			368
71.			368

实例号		熔点(°C)	MS (M+H) ⁺
72.			384

实施例 D1

A) 人 B-Raf 基因中 T1796A 突变的检测

检测引物: GATTTTGGTCTAGCTACAGA

二级引物: GACTTTCTAGTAACTCAGCAG

使用 GENELUTE 哺乳动物基因组 DNA 试剂盒 (Sigma 目录号 # G1N 350) 从来自黑素瘤细胞系的人细胞中分离基因组 DNA。在 PCR 仪 (MJ Research, Model PTC100) 上使用 Roche 的 PCR Core 试剂盒 (目录号 #1578 553) 在 50 μ l 总体积中进行 PCR 反应。PCR 反应混合物包含 5 μ l 10 $\times$ 反应缓冲液, 1 μ l 10 mM dNTPs, 100-1000ng 模板 DNA, 0.5 μ l Taq 聚合酶 (2.5-5 单位)、1 μ l 每种引物的 31 uM 贮存液。

PCR 条件如下:

95°C 3 分钟

94°C 1 分钟	35 循环
50°C 30 秒	
72°C 1 分钟	

72℃ 10 分钟、
4℃

在扩增后，将 8 µl PCR 反应混合物与 2 µl 核酸上样缓冲液[BioRad 目录号#161-0767]混合。将 10 µl 样品加到包含 0.3 µg/ml 溴化乙锭[Pierce 目录号#17898]的 1.5%琼脂糖[GIBCO-BRL 目录号 #15510-027]凝胶上。在相邻的泳道中加上分子量标准[100 bp DNA ladder 购自 Invitrogen，目录号 #10380-012]。通过在 TAE 缓冲液（0.04 M Tris-乙酸，0.01 M EDTA，0.02 M 冰醋酸 pH8.4）[Roche 目录号#1666690]中的电泳分离 DNA。电泳条件是 120 伏电泳 30-40 分钟。在分离后将胶暴露于紫外线下并用 AlphaImager2000 取证(documentation)系统进行拍照。

一般而言，在胶中可检测到 2 条带。跑到 100 bp 分子量标准前面的迁移较快条带代表引物。T1796A 突变体特异的 PCR 扩增产物 DNA 具有 152 bp 的预期大小并且如所期望迁移在 100 bp 标准和 200bp 标准之间。通过测序证实 PCR 扩增产物。PCR 扩增产物的存在表明在模板 DNA 中存在 T1796A 突变。缺乏 PCR 扩增产物证明组织样品中缺乏突变。

通过使用指示下表所示突变的检测引物和二级引物的方法来检测其它 B-RAF 突变。

SEQ ID NO:	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	CAGTAAAAATAGGTGATTG	T1782G
10	CAGTAAAAATAGGTGATTTTC	G1783C
11	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTG	C1786G
12	GTAAAAATAGGTGATTTTGGTCG	T1787G
13	GATTTTGGTCTAGCTACAGA	T1796A
14	GATTTTGGTCTAGCTACAGAT	TG1796-97AT

SEQ ID NO:	二级引物 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

这些实施例旨在进一步描述但非限制本发明。

<110> 诺瓦提斯公司

<120> 治疗方法

<130> 4-32905A

<160> 28

<170> PatentIn 版本 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

acagtgggac aaagaattga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

acagtgggac aaagaattgt

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

ggacaaagaa ttgatctgc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4
ggacaaagaa ttggatctga 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
ggacaaagaa ttggatctgt 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 6
attggatctg gatcatttgc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
attggatctg gatcatttga 20

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8
gagtaataat atatttcttc ata 23

<210> 9
<211> 20
<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

cagtaaaaat aggtgatttg

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 10

cagtaaaaat aggtgatttt c

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

gtaaaaatag gtgattttgg tg

22

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 12

gtaaaaatag gtgattttgg tcg

23

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

gattttggtc tagctacaga

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 14

gattttggtc tagctacaga t 21

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

tgtcaccaca ttacatactt acc 23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 16

tgtcaccaca ttacatactt acc 23

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 17

tgtcaccaca ttacatactt acc 23

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 18

tgtcaccaca ttacatactt acc 23

<210> 19

<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 19

tgtcaccaca ttacatactt acc

23

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 20

tgtcaccaca ttacatactt acc

23

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 21

tgtcaccaca ttacatactt acc

23

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 22

gactttctag taactcagca g

21

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 23

gactttctag taactcagca g

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 24

gactttctag taactcagca g

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 25

gactttctag taactcagca g

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 26

gactttctag taactcagca g

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 27

gactttctag taactcagca g

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 28

gactttctag taactcagca g

21