

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2010 年 11 月 11 日 (11.11.2010)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2010/127558 A1

(51) 国际专利分类号:

C07C 275/54 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
C07C 273/18 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
C07D 311/88 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2010/000628

(22) 国际申请日: 2010 年 5 月 4 日 (04.05.2010)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200910050646.X 2009 年 5 月 5 日 (05.05.2009) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院上海药物研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号, Shanghai 200031 (CN)。华东理工大学 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。北京大学 (PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 蒋华良 (JIANG, Hualiang) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号,

Shanghai 200031 (CN)。李剑 (LI, Jian) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号, Shanghai 200031 (CN)。来鲁华 (LAI, Luhua) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号, Shanghai 200031 (CN)。裴剑锋 (PEI, Jian-feng) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号, Shanghai 200031 (CN)。黄瑾 (HUANG, Jin) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号, Shanghai 200031 (CN)。沈旭 (SHEN, Xu) [CN/CN]; 中国上海市太原路 294 号, Shanghai 200031 (CN)。

(74) 代理人: 北京金信立方知识产权代理有限公司 (KINGSOUND & PARTNERS); 中国北京市海淀区紫竹院路 116 号嘉豪国际中心 B 座 11 层, Beijing 100097 (CN)。

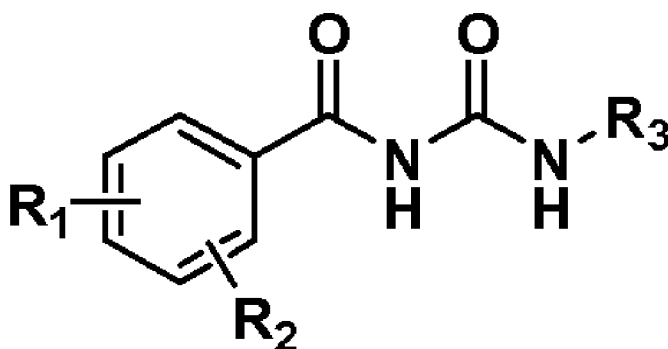
(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

[见续页]

(54) Title: SUBSTITUTED BENZOYL UREA COMPOUNDS, PREPARATION METHODS AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 取代苯甲酰脲类化合物及其制备方法和用途



I

(57) Abstract: Substituted benzoyl urea compounds, preparation methods and pharmaceutical uses thereof are disclosed. The compounds are shown by general structure formula (I), wherein R₁, R₂ and R₃ are defined as those in the description. The compounds can be used as small molecule inhibitors of Cyclophilin A (CypA). CypA is a kind of protein with peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity, involved in protein folding, assembly and transportation in vivo. CypA takes part in diverse biological processes, such as autoimmunity inhibition, HIV-1 invasive infection, and so on. Therefore, the compounds of the present application are promising to be developed into novel immunosuppressants or anti-HIV-1 drugs.

[见续页]



WO 2010/127558 A1



NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) 摘要:

本申请公开了取代的苯甲酰脲化合物及其制备方法和药学用途。所述化合物如结构通式(I)所示, 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 如说明书中所定义。该化合物可用作亲环素 A(CypA)的小分子抑制剂。CypA 是一种具有肽基脯氨酸顺反异构酶(PPIase)活性的蛋白质, 与体内蛋白质折叠、组装和转运相关。CypA 参与多种生理过程, 如自身免疫抑制、HIV-1 入侵感染等。因此, 本申请的化合物有望开发成为新的免疫抑制剂或抗 HIV-1 药物。

取代苯甲酰脲类化合物及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及药物化学和药物治疗学领域，具体涉及一类作为亲环素 A 的小分子非肽类抑制剂的取代苯甲酰脲类化合物及其制备方法和药理用途，该类化合物可作为免疫抑制剂和抗 HIV-1 药物。

背景技术

亲环素(Cyclophilin, CyP)的发现与命名起源于它对环孢素(Cyclosporin A, CsA)的高度亲合性，CsA 是临床上广泛使用的一种免疫抑制药物(Handschumacher RE 等. *Science*, 1984, **226**: 544-547)。CyP 是一个保守的蛋白质家族(Gothel SF, Marahiel MA. *Cell Mo. Life Sci*, 1999, **55**: 423-436)，从低等原核生物到哺乳动物都有这类蛋白。该组蛋白的共同特征是具有肽脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, PPIase)活性(Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. *Nature*, 1989, **337**: 473-475)。依据相对分子量以及亚细胞定位等特征，目前已知人 CyP 家族有 CypA、CypB、CypC 和 CypD 等 16 种成员，人亲环素 A(hCypA)是最重要的，也是研究最广泛的成员(Braaren D, Luban J. *EMBO J*, 2001, **20**: 1300-1309)，它由 165 个氨基酸组成，相对分子量 18,000，约占细胞蛋白总量的 0.1%~0.4%，主要位于胞质内。除了作为 CsA 的体内结合蛋白，在体内外，hCypA 都能结合蛋白质并催化加速它们的折叠、装配和转运，起分子伴侣的作用(Freskgard PO 等. *Science*, 1992, **258**: 466)。

CypA 包含八股反平行 β 片层，这些 β 片层组成一个桶状结构，在桶的上下口各有一段 α 螺旋将桶的两端封闭，CypA 的配体结合口袋则位于该桶状结构的侧面(Kallen J 等. *Nature*, 1991, **353**: 276-279)，主要由两个大的亚口袋组成：亚口袋 A 和亚口袋 B。亚口袋 A 主要由 Thr73、Gly74、Asn102、Ala103、Thr107、Gly109、Ser110 和 Gln111 等残基组成，它们大部分为亲水性残基；亚口袋 B 为一深的疏水性凹槽，主要由 Phe60、Met61、Phe113 和 Leu122 等残基组成。

CypA 与多种疾病密切相关，1993 年，Luban 等人发现 CypA 和 CypB 可以与 I 型爱滋病毒(HIV-1)的 Gag 蛋白特异性地结合，而 CsA 可以有效地抑制 Gag-CypA 之间的相互作用(Luban J 等. *Cell*, 1993, **73**: 1067-1078)；1994 年，

Franke(Franke EK, Yuan HE. *Nature*, 1994, **372**: 359-362)和 Thali 等人(Thali M 等. *Nature*, 1994, **372**: 363-365)分别在 *Nature* 上发表论文报道发现 CypA 特异性地掺入到 HIV-1 病毒颗粒中, 阻断 CypA 的掺入, 抑制 HIV-1 的复制, 这说明 CypA 与 Gag 蛋白的结合是功能相关的(Luban J. *Cell*, 1996, **87**: 1157-1159)。HIV-1 的 Gag 蛋白为一个多蛋白, 它在病毒组装、成熟和出芽过程中起着决定性作用(Gamble TR 等. *Cell*, 1996, **87**: 1285-1294)。CypA 与 Gag 蛋白中的衣壳蛋白(Capsid, CA; 231 residues)区域相结合, 通过这一作用, CypA 被特异性地包裹进 HIV-1 病毒颗粒中。但 CypA 的缺失并不影响病毒的组装、出芽和成熟, 它在 HIV-1 生命周期的早期(病毒逆转录开始之前)是必需的。因此, CypA 可能在病毒进入宿主细胞后的脱壳(Uncoating)过程中发挥作用, 帮助病毒核心发生解装配(Viral CA core disassembly)。

中国科学院上海药物研究所蒋华良等人(Luo C 等. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321**: 557-565)通过生物信息学的手段发现: 虽然 SARS-CoV 并不编码 CA 蛋白, 但 SARS-CoV N 蛋白的 Val235~Pro369 片断与 HIV-1 CA 蛋白的 N 端结构域(残基 1~151)具有较高的序列相似性(36.7%), 因此推测 SARS-CoV N 蛋白可能也与 CypA 发生相互作用。之后, 蛋白-蛋白结合活性实验证实了这一假设: SARS-CoV N 蛋白和 CypA 具有很高的亲和性, KD 值约为 6~160 nM; 接下来的定点突变实验初步地确定了 SARS-CoV N 蛋白的 Trp302~Pro310 片断为与 CypA 结合的区域。以上结果说明 CypA 很有可能参与 SARS-CoV 的生命活动过程。

hCypA 与配体形成的复合物对多重神经元具有保护作用, 对于损伤后的轴突、髓鞘均有显著的促再生作用(Yoshimoto T, Siesjo BK. *Brain Res*, 1999, **839**: 283-291)。Andreeva 等证实 CypA 是一种氧化应激诱导分泌的生长因子, 介导活性氧介质对细胞外信号调节激酶(ERK1/2)的激活和血管平滑肌细胞增殖, 表明 CypA 在血管疾病发病机制中发挥重要作用(Andreeva L, Heads R, Green CJ. *Int J Exp Path*, 1999, **80**: 305-315)。

除了具有上述生理效应, hCypA 关于免疫抑制方面的作用是研究的最深入的。目前公认的免疫抑制作用机制是: hCypA 与胞浆内的配体结合, 形成的复合物然后与钙调磷酸酶(Calcineurin, CaN)结合并抑制 CaN 的磷酸化活性(Liu J 等. *Cell*, 1991, **66**: 807-815)。CaN 在淋巴细胞的活化过程中具有非常重要的作用, 它通过脱磷酸化活化 T 细胞核因子(Nuclear factor of activated T cell,

NF-AT), 使之活化而移位进入核内, 然后参与 IL-2 和其它一些因子的转录过程。抑制了 CaN 的磷酸化活性就抑制了具有免疫作用的细胞因子的释放, 从而发挥免疫抑制作用。

鉴于 CypA 在多个生理途径中都发挥作用, 因此有关它的抑制剂研究一直是个热点。按结构划分, CypA 抑制剂分为三大类: 天然产物及其类似物、肽类及拟肽化合物和有机合成小分子化合物。为了克服天然产物的毒副作用, 以及肽类化合物的易代谢性, 寻找选择性高、活性强的有机合成小分子 CypA 抑制剂成为必然。

活性分子从头设计法是指分子在合适的算法控制下, 在受体结合位点内自动生长, 最终形成完整的配体结构。与基于分子对接的虚拟筛选不同, 活性分子从头设计法能够在更大的化合物空间进行取样, 因此可获得结构全新的化合物结构。活性分子从头设计法在上世纪九十年代得到较大发展, 如日本科学家于 1992 年开发出了 LEGEND 程序, 中国科技大学刘海燕教授等于 1999 年发表了 DycoBlock 程序(*Proteins* 1999, 36, 462-470), 北京大学来鲁华教授课题组分别于 1996 年和 2000 年发表了用于全新结构设计的 RASSE 程序(*J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1996, 36, 1187 -1194)和 LigBuilder 程序(*J. Mol. Model.* 2000, 6, 498-516), 并在此基础上, 开发了 LigBuilder2.0 程序。新版本功能更齐全, 完善了结合部位探测功能, 并能对药物靶标进行初步的可设计性预测, 增加了结构优化模块、锁钥匹配模块和可合成性分析模块, 形成了完整的基于蛋白质结构的药物从头设计流程。特别是该程序加入了内置的化学反应数据库(目前包含 465 个反应), 可以在分子的产生及输出过程中用逆向合成原理对分子的可合成性进行分析, 降低了从头药物设计得到的新化学实体的合成难度, 突破了从头药物设计程序带来的分子难以合成这一瓶颈。

综上所述, 以 CypA 作为靶标, 结合从头药物设计方法和各种水平的生物活性测试试验, 设计并合成小分子化合物, 对开发靶向 CypA 的免疫抑制药物或抗 HIV-1 药物具有重要的现实意义。

综合运用从头药物设计方法和酶抑制活性实验, 发明人已经找到了一个取代苯甲酰脲化合物, 运用合理药物设计方法针对此化合物进行结构修饰得到一类化合物, 并测试了此类化合物在体外酶水平实验测试中抑制 CypA 的活性。结果证明本申请的化合物具有较强的 CypA 抑制活性。

发明内容

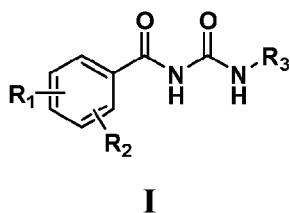
本发明的一个目的是提供具有抑制 CypA 作用的新型取代苯甲酰脲类化合物，其结构通式如式(I)所示。

本发明的另一个目的是提供上述取代苯甲酰脲类化合物的制备方法。

本发明的再一个目的是提供作为 CypA 抑制剂的取代苯甲酰脲类化合物在制备预防或治疗 CypA 介导的相关疾病(如移植排斥反应、由移植引起的宿主疾病、自身免疫疾病和 HIV-1 入侵感染)方面的药物组合物中的应用。

本发明还提供包含治疗有效量的一种或多种上述取代苯甲酰脲类化合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的药物组合物。其中，上述取代苯甲酰脲类化合物占所述药物组合物总重量的 0.001-99.9%，更优选占总重量的 0.1-90%。

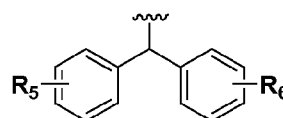
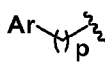
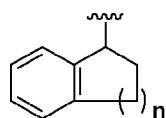
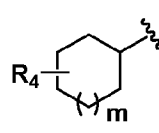
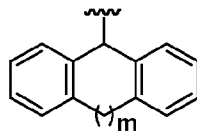
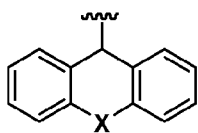
本发明提供具有如下通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物：



其中：

R₁ 和 **R₂** 各自独立地选自氢，C₁-C₆ 直链或支链的烷基、烷氧基和烷硫基，羟基，硝基，氨基，卤素，氰基，三氟甲基和苄氧基。

R₃ 选自以下结构 II, III, IV, V, VI 和 VII:



其中，X 选自 N、O 和 S；m 是 0~2 的整数；n 是 1~3 的整数；p 是 0~3 的整数；

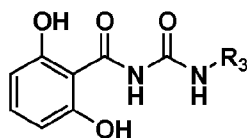
R₄、**R₅** 和 **R₆** 各自独立地选自氢，C₁-C₆ 直链或支链的烷基，C₁-C₄ 烷氧基，

卤素, 氰基, 硝基, 氨基, 羟基, 三氟甲基, 羧基, 巯基和 C_1 - C_4 酰基;

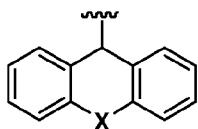
芳香基 **Ar** 选自取代或未取代的苯基或萘基, 其取代基是 1 ~ 4 个选自卤素、 C_1 - C_6 直链或支链烃基、羟基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 不饱和烃氧基、羧基、羧基取代的 C_1 - C_6 烷氧基、氰基、硝基、氨基、三氟甲基、三氟甲氧基、巯基和 C_1 - C_4 酰基的基团。

优选地, 通式(I)中, **R**₃ 选自咕吨基, 茱基, 2,3-二氢-茱-1-基, **R**₄ 取代的环己基, **R**₅ 和 **R**₆ 取代的二苯甲基以及未取代或被 1 ~ 2 个选自卤素、 C_1 - C_6 直链或支链烷基、羟基、 C_1 - C_4 烷氧基、羧基、氰基、硝基、氨基、三氟甲基、三氟甲氧基和巯基的基团取代的萘基、苯基、苯甲基和苯乙基; 其中, **R**₄、**R**₅ 和 **R**₆ 各自独立地选自氢, C_1 - C_6 直链或支链的烷基, C_1 - C_4 烷氧基, 卤素, 氰基, 硝基, 氨基, 羟基, 三氟甲基, 羧基, 巯基和 C_1 - C_4 酰基中。

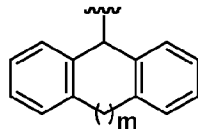
本发明式(I)化合物的第一个优选实施方案是化合物(I_A):

I_A

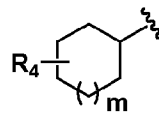
其中, **R**₃ 选自以下结构:



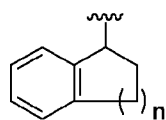
II



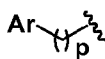
III



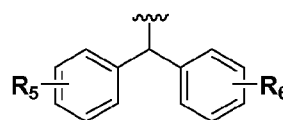
IV



V



VI

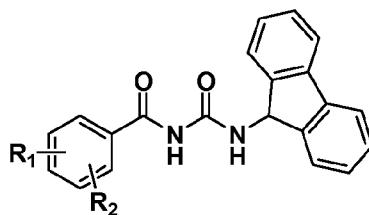


VII

其中, X 选自 N、O 和 S; m 是 0 ~ 2 的整数; n 是 1 ~ 3 的整数; p 是 0 ~ 3 的整数; **R**₄、**R**₅ 和 **R**₆ 各自独立地选自氢, C_1 - C_6 直链或支链的烷基, C_1 - C_4 烷氧基, 卤素, 氰基, 硝基, 氨基, 羟基, 三氟甲基, 羧基, 巯基和 C_1 - C_4 酰基; 芳香基 **Ar** 选自取代或未取代的苯基或萘基, 其取代基是 1 ~ 4 个选自卤素、 C_1 - C_6 直链或支链烃基、羟基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 不饱和烃氧基、羧基、羧基取代的 C_1 - C_6 烷氧基、氰基、硝基、氨基、三氟甲基、三氟甲氧基、

巯基和 C₁-C₄ 酰基的基团。

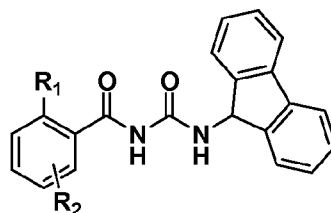
本发明式(I)化合物的第二个优选实施方案是化合物(I_B):



I_B

其中, **R₁** 和 **R₂** 各自独立地选自氢, C₁-C₆ 直链或支链的烷基、烷氧基和烷硫基, 羟基, 硝基, 氨基, 卤素, 氰基, 三氟甲基和苄氧基。

本发明式(I)化合物的第三个优选实施方案是化合物(I_C):



I_C

其中, **R₁** 为氨基或硝基; **R₂** 选自氢, C₁-C₆ 直链或支链的烷基、烷氧基和烷硫基, 羟基, 硝基, 氨基, 卤素, 氰基, 三氟甲基和苄氧基。

具体地, 所述的取代苯甲酰脲类化合物为:

1-(1-咕吨基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-萘-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苯甲基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苄乙基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-环己基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苯基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-(4-氟苯基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-(2,3-二氢-茚-1-基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-二苯甲基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氯苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氰基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氟苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-甲氧基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-甲基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-三氟甲基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2,6-二氟苯甲酰)脲、1-苄-3-(2,6-二氯苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氯-6-氟苯甲酰)脲、1-苄-3-(苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氟-6-甲巯基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氟-6-甲氧基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氯-6-甲巯基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氯-6-甲氧基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-氟-6-苄氧基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-甲巯基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-苄氧基苯甲酰)脲、1-苄-3-(2-硝基苯甲酰)脲或 1-苄-3-(2-胺基苯甲酰)脲。

本发明还提供本申请要求保护的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合

物(具体为 **I_A**、**I_B** 和 **I_C**)及其中间体化合物 **VIII**、**IX**、**X**、**XI**、**XII**、**XIII**、**XIV** 和 **XV** 的制备方法, 具体合成方法如下。

方法一: **I_A** 的合成:

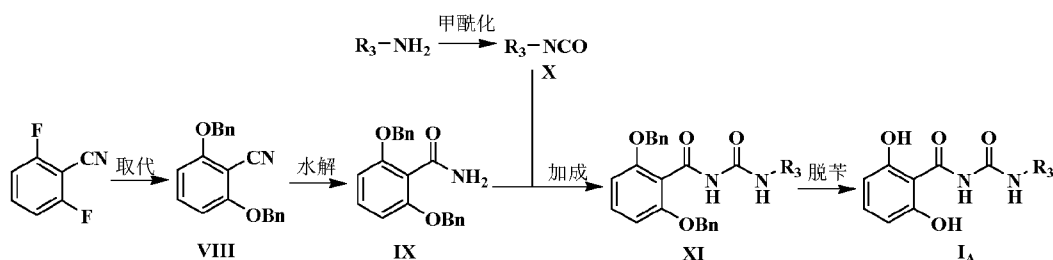
1)将苄醇钠和 2,6-二氟苯腈溶于二甲亚砜中, 快速升温至 110 ~ 130 °C 后搅拌 5 ~ 10 小时。冷至室温, 向反应液中加入冰水, 搅拌 30 分钟, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥, 得白色固体。用乙醇重结晶得白色片状晶体 2,6-二苄氧基苯腈(**VIII**)。

2)将步骤 1)得到的化合物 **VIII** 溶于苄醇中, 并加入氢氧化钾和少量水, 120 ~ 140 °C 下搅拌 10 ~ 15 小时。减压蒸馏除去溶剂, 向残余物中加入冰水, 搅拌 30 分钟, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥, 得白色固体。将其用硅胶柱层析分离纯化, 得到白色粉末状固体 2,6-二苄氧基苯甲酰胺(**IX**)。

3)将三光气溶于 1,2-二氯乙烷中, 冰浴冷却至 0 ~ 5 °C, 将溶于 1,2-二氯乙烷的 **R₃** 取代胺类化合物(**R₃-NH₂**)缓慢滴加入含有三光气的反应液中, 加毕, 继续冰浴冷却下搅拌反应 30 分钟, 后升温至室温反应 1 小时, 然后加热至回流, 当反应液呈无色透明状时, 将三乙胺加入反应液中, 继续回流 30 分钟。减压蒸馏除去溶剂, 加入甲苯, 抽滤, 滤液蒸干得到淡黄色固体, 为 **R₃** 取代的异氰酸酯(**X**)。

4)将步骤 2)和步骤 3)得到的化合物 **IX** 和 **X** 溶于甲苯中, 加热至回流反应 10 ~ 15 小时。减压蒸除反应溶剂得到淡黄色固体, 将其用硅胶柱层析分离纯化, 得到 1-**R₃** 取代-3-(2,6-二苄氧基苯甲酰基)脲(**XI**)。

5)将步骤 4)得到的化合物 **XI** 加入 45%的溴化氢醋酸溶液中, 控温 50 ~ 70 °C 下搅拌 5 ~ 10 小时。将反应液倾入冰水中, 搅拌 30 分钟, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥, 得 1-**R₃** 取代-3-(2,6-二羟基苯甲酰基)脲(**I_A**)。



其中, **R₃** 的定义同上。优选地, **R₃** 是咕吨基、萘基、苯甲基、苯乙基、环己基、苯基、4-氟苯基、2,3-二氢-茚-1-基或二苯甲基。

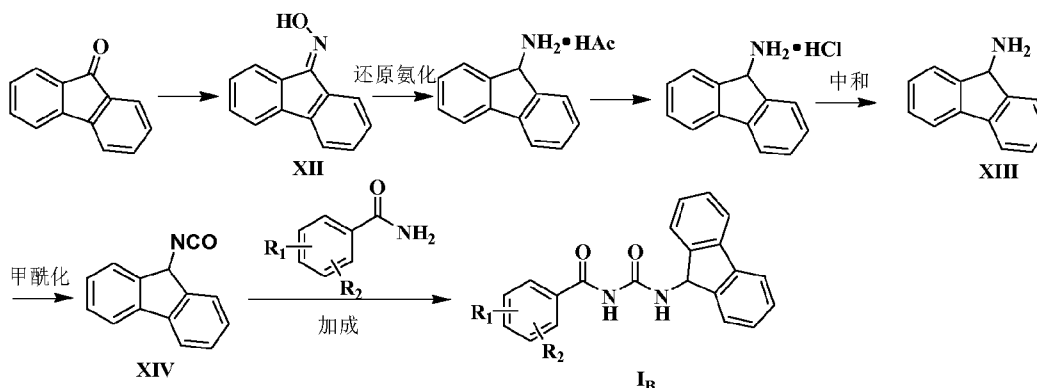
方法二：I_B的合成：

1)将 9-茚酮与盐酸羟胺加入 70%乙醇水溶液中，回流搅拌 2~5 小时。将反应液倾入冰水中，析出大量黄色固体，抽滤，水洗，干燥，得黄色固体 9-茚肟(XII)。

2)将步骤 1)得到的化合物 XII 加入含少量水的醋酸溶液中，加热至回流。将 Zn 粉缓慢加入反应液中，继续反应 1~3 小时。将反应液趁热过滤，滤液经减压蒸馏除去大部分溶剂，抽滤，得 9-茚胺醋酸盐。将其加入稀盐酸中，冰浴冷却下搅拌 10~15 小时。抽滤，得 9-茚胺盐酸盐。将 9-茚胺盐酸盐加入氨水中搅拌 1~3 小时，抽滤，氨水洗涤并干燥。用石油醚重结晶，得白色针状结晶 9-茚胺(XIII)。

3)将三光气溶于 1,2-二氯乙烷中，冰浴冷却至 0~5 °C，将溶于 1,2-二氯乙烷的 9-茚胺 XIII 缓慢滴加入含有三光气的反应液中，加毕，继续冰浴冷却下搅拌反应 30 分钟，后升温至室温反应 1 小时，然后加热至回流，当反应液呈无色透明状时，将三乙胺加入反应液中，继续回流 30 分钟。减压蒸馏除去溶剂，加入甲苯，抽滤，滤液蒸干得到淡黄色固体，为 9-茚异氰酸酯(XIV)。

4)将步骤 3)得到的化合物 XIV 和 R₁,R₂-二取代苯甲酰胺溶入甲苯中，加热至回流反应 10~15 小时。减压蒸除反应溶剂得到淡黄色固体，将其用硅胶柱层析分离纯化，得到 1-茚-3-(R₁,R₂-二取代苯甲酰基)脲(I_B)。



其中，R₁和R₂的定义同上。

优选地，R₁为氢时，R₂为2-氯、2-氰基、2-氟、2-甲氧基、2-甲基、2-三氟甲基、氢、2-甲巯基或2-苄氧基；

R₁为2-氟时，R₂为6-氟、6-甲巯基、6-甲氧基或6-苄氧基；

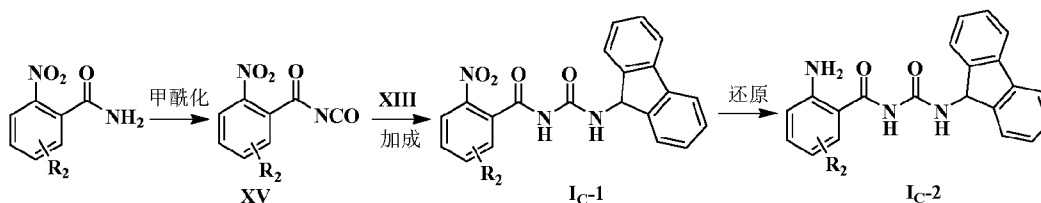
R₁为2-氯时，R₂为6-氯、6-氟、6-甲巯基或6-甲氧基。

方法三：I_C的合成：

1)将 2-硝基-R₂ 取代-苯甲酰胺溶于干燥甲苯中，控温 20 ~ 30 °C，慢慢滴加草酰氯，待反应放热结束后，加热回流 3-5 小时，使悬浮固体全部溶解，反应液变澄清且无氯化氢气体放出，结束反应，将反应液减压蒸馏除去过量的甲苯和草酰氯，得 2-硝基-R₂ 取代-苯甲酰异氰酸酯(XV)。

2)将步骤 1)得到的化合物 XV 和 I_B 合成中步骤 3)得到的 9-芴胺(XIII)溶入甲苯中，加热至回流反应 10 ~ 15 小时。减压蒸除反应溶剂，将残余物用硅胶柱层析分离纯化，得到 1-芴-3-(2-硝基-R₂ 取代-苯甲酰基)脲(I_{C-1})。

3)将步骤 2)得到的化合物 I_{C-1}，氯化铵和 Fe 粉投入到 THF 中，回流反应 1 ~ 3 小时。冷至室温，抽滤，滤液被减压蒸除溶剂，将残余物用硅胶柱层析分离纯化，得 1-芴-3-(2-氨基-R₂ 取代-苯甲酰基)脲(I_{C-2})。



其中，R₂ 的定义同上。优选地，R₂ 是氢。

附图说明

图 1 为化合物 I_{A-3} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 2 为化合物 I_{A-5} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 3 为化合物 I_{B-1} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 4 为化合物 I_{B-2} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 5 为化合物 I_{B-3} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 6 为化合物 I_{B-6} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 7 为化合物 I_{B-7} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 8 为化合物 I_{B-8} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 9 为化合物 I_{B-9} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 10 为化合物 I_{B-11} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

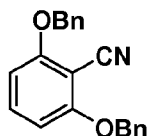
图 11 为化合物 I_{B-17} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

图 12 为化合物 I_{C-1} 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图。

具体实施方式

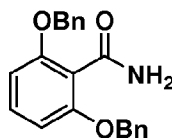
在以下的实施例中将进一步举例说明本发明。这些实施例仅用于说明本发明，但不以任何方式限制本发明。实施例中的所有参数以及其余的说明，除另有说明外，都是以质量(克)为单位。

实施例 1 2,6-二苄氧基苯腈(中间体 VIII)



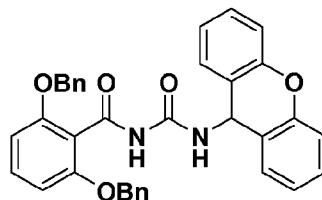
将 0.5 克苄醇钠溶于 10 毫升二甲亚砜中，搅拌下加入 2,6-二氟苯腈。快速升温至 115 °C 后继续搅拌 8 小时。冷至室温，将 100 毫升冰水倾入反应液中，搅拌 30 分钟，析出大量固体，抽滤，水洗，干燥，得白色固体。用乙醇重结晶得白色片状晶体中间体 VIII。¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.19 (4H, s, -CH₂), 6.60 (2H, d, Ar-H), 7.30-7.35 (3H, m, Ar-H), 7.38 (4H, t), 7.45 (4H, d)。

实施例 2 2,6-二苄氧基苯甲酰胺(中间体 IX)



将 0.4 克 2,6-二苄基苯腈(VIII)溶于 7 毫升苄醇中，并加入 0.6 克 KOH 和 0.1 毫升水，130 °C 下搅拌 12 小时。减压蒸馏除去溶剂，将 100 毫升冰水倾入反应液中，搅拌 30 分钟，析出大量固体，抽滤，水洗，干燥，得白色固体。硅胶柱层析分离(石油醚/乙酸乙酯=12/1)，得到白色粉末状固体中间体 IX。¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.15 (4H, s, -CH₂), 6.60 (2H, d, Ar-H), 7.18-7.48 (12H, m, Ar-H); EI-MS *m/z* 333.2 (*M*⁺), 91.1 (100%)。

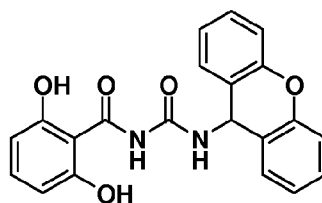
实施例 3 1-(1-咕吨基)-3-(2,6-二苄氧基苯甲酰)脲(中间体 XI-1)



将 0.5 克三光气溶于 3 毫升 1,2-二氯乙烷中，冰浴搅拌至溶解。将 0.25 克咕吨胺溶于 10 毫升 1,2-二氯乙烷中，并缓慢滴加入含有三光气的反应液中，

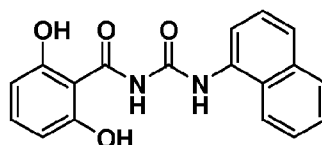
反应液呈白色混浊。继续冰浴 0.5 小时后, 升温至 25 °C 反应 1 小时, 然后回流加热至反应液呈无色透明状时, 将 1 毫升三乙胺加入反应液中继续回流 0.5 小时。减压蒸馏除去溶剂, 加入 10 毫升甲苯, 抽滤, 滤液不经后处理, 向其中加入 0.25 克 2,6-二苄氧基苯甲酰胺(**IX**), 回流反应 10 小时。减压蒸除溶剂, 加水析出固体, 将其用硅胶柱层析分离纯化, 洗脱剂为乙酸乙酯/石油醚=1/4, 得到白色固体产物中间体 **XI-1**。收率 44%; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.13 (4H, s, -CH), 6.39 (1H, d, Ar-H), 6.56 (2H, t, Ar-H), 6.81 (2H, d, Ar-H), 7.03 (2H, d, Ar-H), 7.19 (2H, t, Ar-H), 7.29 (3H, t, Ar-H), 7.39-7.50(10H, m, Ar-H), 9.13(1H,d, -NH)。

实施例 4 1-(1-咕吨基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **I_A** 的一种(**I_A-1**))



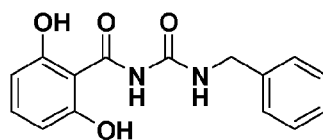
将 0.3 克 1-(1-咕吨基)-3-(2,6-二苄氧基苯甲酰)脲(**XI-1**)加入 4 毫升 45%溴化氢醋酸溶液中, 60 °C 下搅拌 6 小时。反应液倾入 150 毫升冰水中, 搅拌 30 分钟, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥得灰白色固体, 少量乙醚清洗, 得白色固体化合物 **I_A-1**。收率 40%; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.23 (1H, d, Ar-H), 6.60 (2H, t, Ar-H), 6.86 (2H, d, Ar-H), 7.05 (2H, d, Ar-H), 7.24 (2H, t, Ar-H), 7.29 (3H, t, Ar-H), 9.34(1H,d, -NH); EI-MS m/z 376.1 (M^+), 180.1 (100%)。

实施例 5 1-萘-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **I_A** 的一种(**I_A-2**))



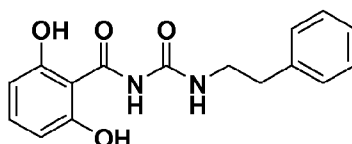
将实施例 3 中的咕吨胺替换成 1-萘胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1 ~ 4, 得灰白色固体化合物 **I_A-2**。收率 50%; Mp 203-208 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.46 (1H, d, -CH), 7.26 (1H, s, Ar-H), 7.47-7.64 (5H, m, Ar-H), 7.66 (1H, d, Ar-H), 7.93-8.08 (3H, m, Ar-H), 8.21 (1H, d, Ar-H); EI-MS m/z 322 (M^+), 169.1 (100%)。

实施例 6 1-苯甲基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **I_A** 的一种(**I_A-3**))



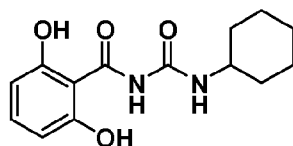
将实施例 3 中的咕吨胺替换成苄胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1~4, 得灰白色固体化合物 **IA-3**。收率 52%; Mp 210-215 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 4.42 (2H, d, -CH₂), 6.42 (2H, d, Ar-H), 7.18-7.33 (6H, m, Ar-H), 8.34 (1H, br, Ar-H), 10.54 (1H, s, -NH), 11.74 (2H, s, -OH); EI-MS *m/z* 286.1 (*M*⁺), 136.0 (100%)。

实施例 7 1-苯乙基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **IA** 的一种(**IA-4**))



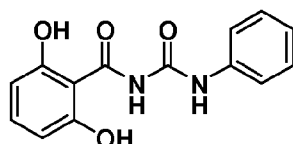
将实施例 3 中的咕吨胺替换成苯乙胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1~4, 得土黄色固体化合物 **IA-4**。收率 67%; Mp 208-212 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 2.80 (2H, t, -CH₂), 3.44 (2H, q, -CH₂), 6.41 (2H, d, Ar-H), 7.21-7.30 (6H, m, Ar-H), 8.34 (1H, br, Ar-H), 10.54 (1H, s, -OH), 11.74 (2H, s, -OH); EI-MS *m/z* 300.1 (*M*⁺), 136.0 (100%)。

实施例 8 1-环己基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **IA** 的一种(**IA-5**))



将实施例 3 中的咕吨胺替换成环己胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1~4, 得灰白色固体化合物 **IA-5**。收率 41%; Mp > 300 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 1.52-1.68 (10H, m, -CH₂), 3.60 (1H, d, -CH), 6.42 (2H, d, Ar-H), 7.22 (1H, s, Ar-H), 8.214 (1H, br, Ar-H), 10.52 (1H, s, N-H), 11.68 (2H, s, -OH); EI-MS *m/z* 278.1 (*M*⁺), 136.0 (100%)。

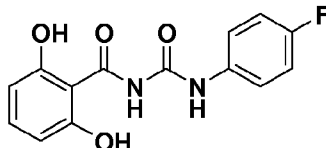
实施例 9 1-苯基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **IA** 的一种(**IA-6**))



将实施例 3 中的咕吨胺替换成苯胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同

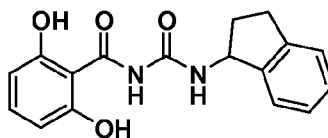
实施例 1 ~ 4, 得白色固体化合物 **I_A-6**。收率 40%; Mp 251-255 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 7.02 (2H, d, Ar-H), 7.10 (2H, d, Ar-H), 7.38(2H, t, Ar-H), 7.34 (1H, t, Ar-H), 7.34-7.53 (7H, m, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.78 (1H, d, Ar-H), 7.81(2H, d, Ar-H), 8.69(1H, d, Ar-H), 11.23 (1H, s, -OH)。EI-MS m/z 272.1 (M⁺), 136.0 (100%)。

实施例 10 1-(4-氟苯基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **I_A** 的一种(**I_A-7**))



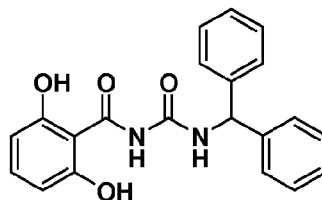
将实施例 3 中的咕吨胺替换成 4-氟苯胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1 ~ 4, 得灰白色固体化合物 **I_A-7**。收率 49%; Mp 192-195 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 7.15 (3H, t, Ar-H), 7.35 (3H, dd, Ar-H), 8.8 (1H, d, Ar-H); EI-MS m/z 290.1 (M⁺), 136.0 (100%)。

实施例 11 1-(2,3-二氢-茚-1-基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **I_A** 的一种(**I_A-8**))



将实施例 3 中的咕吨胺替换成 2,3-二氢-茚-1-胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1 ~ 4, 得浅褐色固体化合物 **I_A-8**。收率 82%; Mp 250-252 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 1.65 (2H, m, -CH₂), 2.38 (2H, m, -CH₂), 2.76-2.87 (4H, m, -CH₂), 5.13 (1H, dd, -CH), 6.15(1H, d, -CH), 6.38 (1H, d, Ar-H), 7.17-7.30 (7H, m, Ar-H), 8.54 (1H, d, Ar-H), 11.65 (1H, s, Ar-H); EI-MS m/z 312.1 (M⁺), 132.1 (100%)。

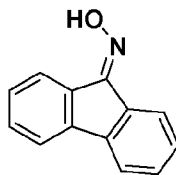
实施例 12 1-二苯甲基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲(化合物 **I_A** 的一种(**I_A-9**))



将实施例 3 中的咕吨胺替换成二苯甲胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 1 ~ 4, 得土黄色固体化合物 **I_A-9**。收率 70%; Mp 222-224 °C;

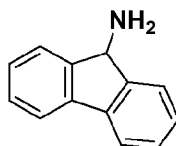
$^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.08 (1H, d, -CH), 6.24 (2H, d, Ar-H), 7.11 (1H, t, Ar-H), 7.10-7.12 (2H, m, Ar-H), 7.32-7.37 (8H, m, Ar-H), 9.19 (1H, d, Ar-H); EI-MS m/z 361.1 (M^+), 302.1 (100%)

实施例 13 9-茛茀(中间体 XII)



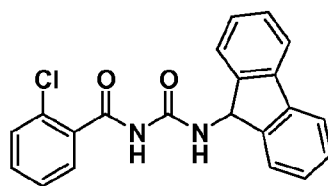
将 5 克 9-茛茀酮与 5 克盐酸羟胺加入到 50 毫升 70%乙醇溶液中, 回流搅拌 3 小时。将反应液倾入 100 毫升冰水中, 析出大量黄色固体, 抽滤, 水洗, 干燥得黄色固体产物中间体 XII(4.9g, 90%)。EI-MS m/z 195.1 (M^+), 179.1(100%)。

实施例 14 9-茛茀胺(中间体 XIII)



将 3 克 9-茛茀(XII)加入到 50 毫升 95%醋酸水溶液中, 加热至回流。将 6 克 Zn 粉缓慢加入反应液中, 继续反应 1 小时。将反应液乘热过滤, 滤液经减压蒸馏除去大部分溶剂, 抽滤, 得晶状醋酸盐固体。继续加入 60 毫升 5 N 盐酸, 于冰浴下搅拌 12 小时。将反应液过滤, 得白色 9-茛茀胺盐酸盐固体。将 9-茛茀胺盐酸盐加入 100 毫升氨水中搅拌 2 小时, 抽滤, 氨水洗涤并干燥。用石油醚重结晶, 得白色针状结晶中间体 XIII。 $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 4.91 (d, 2H, Ar-H), 7.32 (t, 2H), 7.45(t, 2H, Ar-H), 7.71 (d, 2H, Ar-H), 7.79(d, 2H, Ar-H), 7.71 (m, 1H); EI-MS m/z 180.1 (M^+), 180.1(100%)。

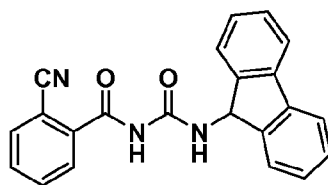
实施例 15 1-茛茀-3-(2-氯苯甲酰)脲(化合物 I_B 的一种(I_B-1))



将 0.5 克三光气溶于 3 毫升 1,2-二氯乙烷中, 冰浴搅拌至溶解。将 0.25 克 9-茛茀胺(XIII)溶于 10 毫升 1,2-二氯乙烷中, 并缓慢滴加入含有三光气的反应液中, 反应液呈白色混浊。继续冰浴 0.5 小时后升温至 25 °C 反应 1 小时,

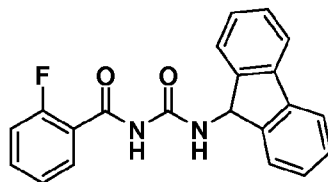
然后加热回流至反应液呈无色透明状时, 将 1 毫升三乙胺加入反应液中后继续回流 0.5 小时。减压蒸馏除去溶剂, 加入 10 毫升甲苯过滤。向滤液中加入 0.15 克 2-氯苯甲酰胺, 回流反应 12 小时。减压蒸除溶剂, 将其用硅胶柱层析分离纯化, 洗脱剂为乙酸乙酯/石油醚=1/2, 干燥。得到白色固体产物化合物 **I_B-1**。收率 41%; Mp 203-205 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.97 (1H, d, C-H), 7.37-7.57 (8H, m, Ar-H), 7.64 (2H, d, Ar-H), 7.88 (1H, d, Ar-H), 8.66 (1H, d, N-H), 11.61 (1H, s, N-H); EI-MS m/z 362.2 (M⁺), 180.1(100%)。

实施例 16 1-芴-3-(2-氰基苯甲酰)脒(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-2**))



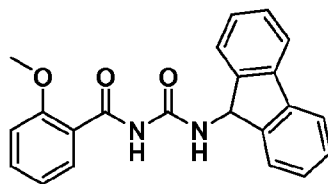
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氰基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-2**。收率 45%; Mp 224-226 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.97 (1H, d, C-H), 7.29-7.47 (4H, m, Ar-H), 7.56-7.71 (3H, m, Ar-H), 7.75-7.91 (5H, m, N-H), 8.55 (1H, d, N-H), 11.47 (1H, s, Ar-H); EI-MS m/z 353.2 (M⁺), 207.1 (100%)。

实施例 17 1-芴-3-(2-氟苯甲酰)脒(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-3**))



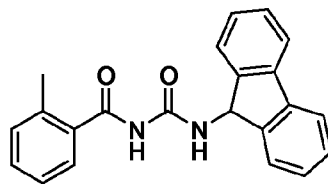
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氟苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-3**。收率 49%; Mp 272-275 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 6.19 (1H, d, C-H), 7.22 (1H, q, Ar-H), 7.28-7.36 (3H, m, Ar-H), 7.41-7.45 (2H, t, Ar-H), 7.58 (1H, m, Ar-H), 7.70 (2H, d, Ar-H), 7.73(2H, d, Ar-H), 8.02 (1H, td, Ar-H), 8.71-8.75 (2H, m, N-H); EI-MS m/z 346.2 (M⁺), 180.1 (100%)。

实施例 18 1-芴-3-(2-甲氧基苯甲酰)脒(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-4**))



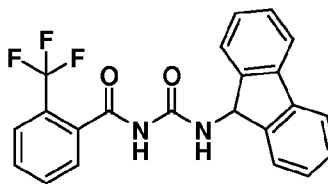
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-甲氧基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-4**。收率 37%; Mp 206-209 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 3.92(3H, s, -OCH₃), 6.00 (1H, d, C-H), 7.03 (1H, q, Ar-H), 7.19 (1H, d, Ar-H), 7.34-7.38 (2H, d, Ar-H), 7.40-7.47 (2H, m, Ar-H), 7.57 (2H, t, Ar-H), 7.63(2H, d, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.88 (1H, s, N-H), 10.43(1H, d, N-H); EI-MS m/z 358.2 (M⁺), 180.1 (100%)。

实施例 19 1-苄-3-(2-甲基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-5**))



将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-甲基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-5**。收率 47%; Mp 206-209 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 2.43(3H, s, -CH₃), 5.99 (1H, d, C-H), 7.27 (2H, d, Ar-H), 7.38 (3H, m, Ar-H), 7.46 (3H, t, Ar-H), 7.65 (2H, m, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), , 8.86 (1H, d, N-H) , 11.25 (1H, s, N-H); EI-MS m/z 342.2 (M⁺), 180.1 (100%)。

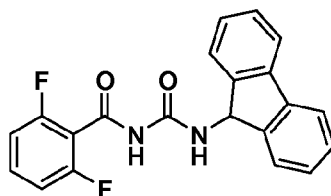
实施例 20 1-苄-3-(2-三氟甲基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-6**))



将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-三氟甲基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得土黄色固体化合物 **I_B-6**。收率 44%; Mp 272-275 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.97 (1H, d, C-H), 7.37-7.46 (4H, m, Ar-H), 7.60 (2H, d, Ar-H), 7.69 (2H, d, Ar-H), 7.70-7.82 (2H, m, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.60 (1H, d, N-H), 11.25 (1H, s, N-H) ; EI-MS m/z 396.2 (M⁺),

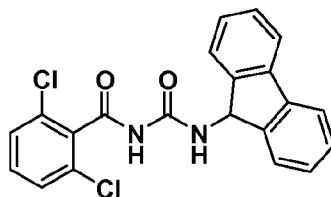
180.1 (100%)。

实施例 21 1-芴-3-(2,6-二氟苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-7**))



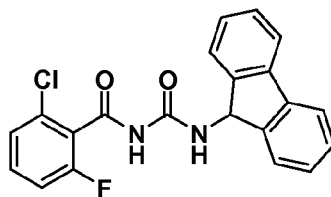
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2,6-二氟苯甲酰胺,其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得土黄色固体化合物 **I_B-7**。收率 68%; Mp 252-255 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.94 (1H, d, C-H), 7.20 (2H, d, Ar-H), 7.36-7.60 (4H, m, Ar-H), 7.87(3H, m, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.54 (1H, d, N-H), 11.44 (1H, s, N-H); EI-MS *m/z* 464.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

实施例 22 1-芴-3-(2,6-二氯苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-8**))

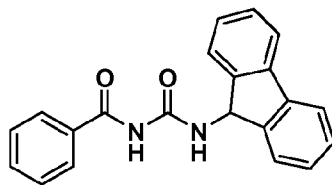


将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2,6-二氯苯甲酰胺,其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得浅黄色固体化合物 **I_B-8**。收率 42%; Mp 240-242 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.99 (1H, d, C-H), 7.27-7.50 (6H, m, Ar-H), 7.50-7.72 (3H, m, Ar-H), 7.38 (2H, t, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.58 (1H, d, N-H), 11.51 (1H, s, N-H); EI-MS *m/z* 396.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

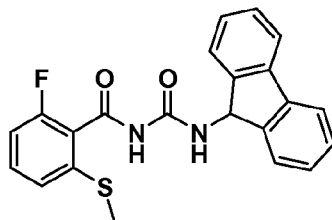
实施例 23 1-芴-3-(2-氯-6-氟苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-9**))



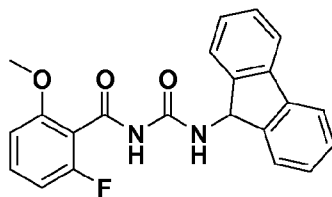
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氯-6-氟苯甲酰胺,其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得浅黄色固体化合物 **I_B-9**。收率 46%; Mp 236-238 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.99 (1H, d, C-H), 7.27-7.50 (6H, m, Ar-H), 7.50-7.72 (3H, m, Ar-H), 7.38 (2H, t, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.58 (1H, d, N-H), 11.51 (1H, s, N-H); EI-MS *m/z* 380.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

实施例 24 1-苄-3-(苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-10**))

将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-10**。收率 80%; Mp 241-243 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.97 (1H, m), 6.40 (4H, m, Ar-H), 7.22 (1H, t, Ar-H), 7.35 (3H, t, Ar-H), 7.45 (3H, t, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.68 (1H, dd, Ar-H); EI-MS *m/z* 328.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

实施例 25 1-苄-3-(2-氟-6-甲巯基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-11**))

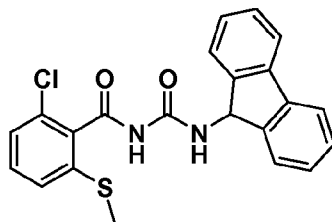
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氟-6-甲巯基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得灰白色固体化合物 **I_B-11**。收率 32%; Mp 241-243 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 2.9 (3H, s, -SCH₃), 5.99 (1H, d, C-H), 7.13 (1H, t, Ar-H), 7.24 (1H, d, Ar-H), 7.38(2H, t, Ar-H), 7.43-7.52 (3H, m, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.78 (1H, d, N-H) , 11.03 (1H, s, N-H) ;EI-MS *m/z* 392.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

实施例 26 1-苄-3-(2-氟-6-甲氧基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-12**))

将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氟-6-甲氧基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-12**。收率 45%; Mp 112-114 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 3.75 (3H, s, -OCH₃), 5.89 (1H, d, C-H), 6.87 (1H, t, Ar-H), 6.97 (1H, d, Ar-H), 7.38(2H, t, Ar-H), 7.41-7.48 (3H, m, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.89 (2H, d, Ar-H), 8.78 (1H, d, N-H) , 11.03 (1H, s, N-H) ;EI-MS *m/z* 368.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

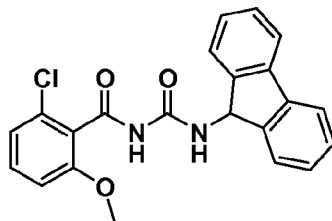
N-H); EI-MS m/z 376.2 (M^+), 180.1 (100%)。

实施例 27 1-芴-3-(2-氯-6-甲巯基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-13**))



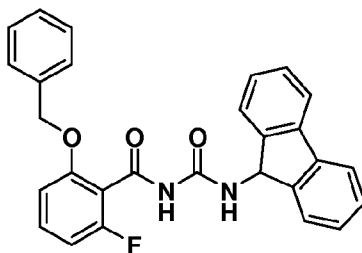
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氯-6-甲巯基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得类白色固体化合物 **I_B-13**。收率 56%; Mp 230-235 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.34 (3H, s, -SCH₃), 5.99 (1H, d, C-H), 7.30-7.51 (9H, m, Ar-H), 7.58-7.62 (2H, d, Ar-H), 7.92 (2H, d, Ar-H), 8.68 (1H, d, N-H), 11.33 (1H, s, N-H); EI-MS m/z 408.2 (M^+), 180.1 (100%)。

实施例 28 1-芴-3-(2-氯-6-甲氧基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-14**))



将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氯-6-甲氧基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得类白色固体化合物 **I_B-14**。收率 44%; Mp 258-260 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.75 (3H, s), 5.89 (1H, d, C-H), 7.02 (2H, d, Ar-H), 7.10 (2H, d, Ar-H), 7.38 (2H, t, Ar-H), 7.34 (1H, t, Ar-H), 7.34-7.53 (7H, m, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.78 (1H, d, Ar-H), 7.81 (2H, d, Ar-H), 8.69 (1H, d, N-H), 11.23 (1H, s, N-H); EI-MS m/z 392.2 (M^+), 180.1 (100%)。

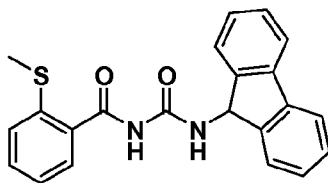
实施例 29 1-芴-3-(2-氟-6-苄氧基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-15**))



将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-氟-6-苄氧基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得类白色固体化合物 **I_B-15**。收率

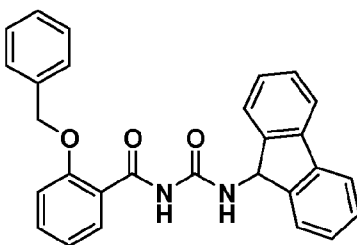
36%; Mp 242-244 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.15 (2H, s, $-\text{OCH}_2$), 5.97 (1H, d, C-H), 6.95 (2H, d, Ar-H), 7.24-7.73 (13H, m, Ar-H), 7.42-7.50 (3H, m, Ar-H), 7.54 (1H, d, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.78 (1H, d, N-H), 11.03 (1H, s, N-H); EI-MS m/z 542.3 (M^+), 206.1 (100%)。

实施例 30 1-芴-3-(2-甲巯基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-16**))



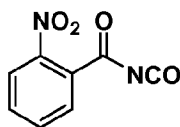
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-甲巯基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得白色固体化合物 **I_B-16**。收率 46%; Mp 204-207 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.40 (3H, s, $-\text{SCH}_3$), 5.99 (1H, d, C-H), 7.22 (2H, d, Ar-H), 7.35-7.40 (3H, m, Ar-H), 7.42-7.50 (3H, m, Ar-H), 7.54 (1H, d, Ar-H), 7.62 (2H, d, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.78 (1H, d, N-H), 11.03 (1H, s, N-H); EI-MS m/z 374.2 (M^+), 180.1 (100%)。

实施例 31 1-芴-3-(2-苄氧基苯甲酰)脲(化合物 **I_B** 的一种(**I_B-17**))



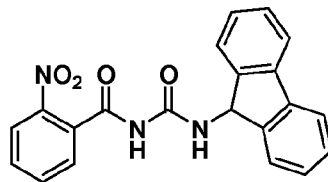
将实施例 15 中的 2-氯苯甲酰胺替换成 2-苄氧基苯甲酰胺, 其余所需原料、试剂及制备方法同实施例 13 ~ 15, 得浅黄色固体化合物 **I_B-17**。收率 43%; Mp 204-207 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.27 (2H, s, $-\text{CH}_2$), 5.98 (1H, d, $-\text{CH}$), 7.06 (1H, q, Ar-H), 7.28 (1H, d, Ar-H), 7.32-7.46 (7H, m, Ar-H), 7.53 (3H, d, Ar-H), 7.63 (2H, d, Ar-H), 7.65 (2H, dd, Ar-H), 7.88 (2H, d, Ar-H), 8.79 (1H, s, N-H), 10.54 (1H, d, N-H); EI-MS m/z 434.3 (M^+), 180.1 (100%)。

实施例 32 邻硝基苯甲酰异氰酸酯(中间体 **XV**)



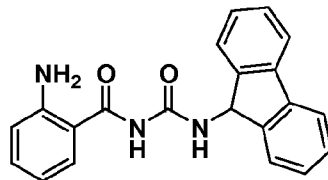
将 1.66 克邻硝基苯甲酰胺溶于 10 毫升干燥甲苯中, 室温下慢慢滴加 2.52 克草酰氯, 待反应放热结束后, 加热回流 5 小时, 使悬浮固体全部溶解, 反应液变澄清且无氯化氢气体放出, 结束反应, 将反应液减压蒸馏除去过量的甲苯和草酰氯, 得淡黄色油状液体中间体 **XV**, 无须进一步纯化, 立即用于下一步反应或密封保存备用。

实施例 33 1-芴-3-(2-硝基苯甲酰)脲(化合物 **I_C** 的一种(**I_{C-1}**))



将 0.2 克邻硝基苯甲酰异氰酸酯(**XV**)和 0.18 克 9-芴胺(**XIII**)加入到 10 毫升甲苯中, 回流反应 10 小时。减压蒸除溶剂, 残余物用硅胶柱层析分离(乙酸乙酯/石油醚=1/1), 得到黄色固体产物化合物 **I_{C-1}**。收率 37%; Mp 230-232 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 5.96 (1H, d, C-H), 7.36 (2H, t, Ar-H), 7.43 (2H, t, Ar-H), 7.60 (2H, d, Ar-H), 7.84-8.16 (3H, m, Ar-H), 8.16 (1H, d, Ar-H), 8.53 (1H, d, N-H), 11.28 (1H, s, N-H); EI-MS *m/z* 373.2 (*M*⁺), 180.1 (100%)。

实施例 34 1-芴-3-(2-氨基苯甲酰)脲(化合物 **I_C** 的一种(**I_{C-2}**))



在 25 毫升茄型瓶中加入 35 毫克的 1-芴-3-(2-硝基苯甲酰)脲(**I_{C-1}**), 0.75 毫克氯化铵, 50 毫克 Fe 粉, 在 10 毫升 THF 中回流反应 1 小时。反应完过滤, 滤液蒸干, 用少量乙醚洗涤, 得淡黄色固体化合物 **I_{C-2}**。收率 90%; Mp 194-197 °C; ¹H-NMR (400Hz, DMSO-*d*₆) δ: 6.02 (1H, d, C-H), 6.49 (1H, t, Ar-H), 6.72 (1H, d, Ar-H), 7.18 (1H, t, Ar-H), 7.21 (2H, t, Ar-H), 7.35 (2H, d, Ar-H), 7.63 (2H, d, Ar-H), 7.70 (1H, d, Ar-H), 7.87 (2H, d, Ar-H), 8.95 (1H, d, N-H), 10.56 (1H, s, N-H); EI-MS *m/z* 353.2 (*M*⁺), 207.1 (100%)。

实施例 35 本发明化合物对 CypA 肽基脯氨酰顺反异构酶百分抑制活性的测定

(1)CypA 蛋白的表达和纯化

将构建好的质粒 PET15b-CypA 转入大肠杆菌 BL21 中得到表达工程菌，将工程菌培养于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 10 mL LB 培养基中培养过夜(蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，氯化钠 10 g/L)。然后按 1: 100 转接入 1 L 含氨苄青霉素的新鲜 LB 培养基中，37 °C 220 转/分培养。当 OD₆₀₀ 达到约 0.8 时，加入 IPTG(异丙基 β -D 硫代半乳糖苷，1 M 溶液)至终浓度 0.5 mM，同时将温度降到 25 °C 培养 5 小时进行蛋白的诱导表达。4000 转/分离心 30 分钟收集菌体，收集好后放于 -80 °C 超低温冰箱保存过夜。将菌体用 20 mL 的结合缓冲液(20 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, pH8.0)悬起，将悬浮液冰浴上超声波破碎(300W，工作 30 分钟，一次 5 秒，中间间隔 10 秒)。破碎后得到的细胞匀浆在 4 °C 以 10000 转/分离心 30 分钟，保留上清。之后该蛋白粗提液注入预先用结合缓冲液平衡好的 Ni-NTA 树脂中，在 4 °C 充分结合 1 小时，再分别用 10 倍柱体积的结合缓冲液和 10 倍柱体积的清洗缓冲液(20 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 60 mM 咪唑, pH8.0)冲洗树脂，去除与树脂有非特异性吸附的杂蛋白，最后用洗脱缓冲液(20 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 100 mM 咪唑, pH 8.0)10 mL 洗脱树脂，收集洗脱的 hCypA。用 SDS-PAGE 检测蛋白的分子量和纯度。透析好的蛋白即可进行酶活测定。

(2) 本发明化合物对 CypA 抑制活性的测定

依据标准糜蛋白酶偶联试验(*Biochemistry* 1991, 30 (25): 6127-6134)，测定目标物的肽脯氨酸顺反异构酶(PPIase)活性。整个试验在恒温 4 °C 下进行，酶作用底物为 Suc-Ala-Ala-cis-Pro-Phe-pNA，用含有 400 mM LiCl 的四氢呋喃溶解成 3.8 mM 的母液。糜蛋白酶溶解到 1 mM 的 HCl 溶液中，配成 3 mg/mL 的母液。首先向 519 μL 反应缓冲液(50 mM HEPES, 100 mM NaCl)中加入 30 μL hCyPA 蛋白母液(终浓度 10 $\mu\text{g/mL}$)和溶于 DMSO 的待测化合物溶液(终浓度为 10 μM)，在冰上预冷，将它们加到石英杯中，再加入 15 μL 糜蛋白酶，最后加入 12 μL 底物起始反应。4 °C 下 390 nm 处通过 U-2010 分光光度计每隔 0.1 秒检测光吸收强度的变化并收集数据，1 分钟之后，反应结束。每个反应重复 3 次。利用反应前 6 秒的线性增长的斜率(K)来表示 CypA 酶的活力大小。用下列公式得出待测化合物在 10 μM 下百分抑制率，

计算公式为：

(阳性对照组 K 值 - 实验组 K 值) / (阳性对照组 K 值 - 阴性实验组 K 值) $\times$ 100 %

其中阳性对照组 K 值为不加待测化合物所测值，阴性对照组 K 值为不加待测化合物和 CypA 所测值。

(3) 化合物活性测试结果

表 1 取代苯甲酰脲类化合物对 CypA 抑制率数据

序号	编号	百分抑制率 (10 μ M)	序号	编号	百分抑制率 (10 μ M)
1	I _A -1	18.2%	15	I _B -6	91.6%
2	I _A -2	22.4%	16	I _B -7	95.0%
3	I _A -3	100%	17	I _B -8	95.4%
4	I _A -4	0	18	I _B -9	100%
5	I _A -5	81.5%	19	I _B -10	0
6	I _A -6	0	20	I _B -11	59.6%
7	I _A -7	35.4%	21	I _B -12	0
8	I _A -8	12.4%	22	I _B -13	16.5%
9	I _A -9	36.2%	23	I _B -14	13.9%
10	I _B -1	60.5%	24	I _B -15	0
11	I _B -2	79.5%	25	I _B -16	14.6%
12	I _B -3	90.0%	26	I _B -17	88.6%
13	I _B -4	18.6%	27	I _C -1	78.1%
14	I _B -5	0	28	I _C -2	34.6%

由表 1 可以看出，本发明的具有结构通式(I)的取代苯甲酰脲类化合物大部分具有较强的 CypA 抑制活性，说明本发明的化合物为 CypA 抑制剂。

实施例 36 本发明部分化合物对 CypA 半数有效抑制浓度(IC₅₀)的测定

选取 10 μ M 抑制率在 50 %以上的化合物测 IC₅₀，选择合适的化合物浓度梯度，实验方法和体系如实施例 35。根据化合物在不同浓度下对 CypA 酶活的反应速率 K，计算化合物在不同浓度下对 CypA 酶活的抑制率，使用 Sigmoidal 公式用 origin 软件进行拟合得到化合物的 IC₅₀ 值，结果见表 2 和附图。

表 2 取代苯甲酰脲类化合物对 CypA 酶活抑制 IC₅₀ 值

序号	编号	IC ₅₀ (nM)	序号	编号	IC ₅₀ (nM)
1	I _A -3	370	7	I _B -7	263
2	I _A -5	136	8	I _B -8	2.59
3	I _B -1	103	9	I _B -9	1.52
4	I _B -2	72.1	10	I _B -11	1910
5	I _B -3	159	11	I _B -17	12.1
6	I _B -6	364	12	I _C -1	620

由表 2 可以看出, 本发明的具有结构通式(I)的部分取代苯甲酰脲类化合物具有纳摩级(nM)的 CypA 蛋白酶抑制活性, 说明本发明的化合物为 CypA 抑制剂。

化合物 I_A-3、I_A-5、I_B-1、I_B-2、I_B-3、I_B-6、I_B-7、I_B-8、I_B-9、I_B-11、I_B-17 和 I_C-1 对 CypA 酶活抑制的量效曲线图见图 1 ~ 图 12。由量效曲线图可以看出, 这 12 个抑制剂对 CypA 酶的抑制活性具有较好的浓度依赖性。

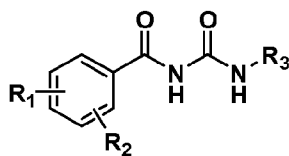
产业上利用的可能性

本发明的取代苯甲酰脲类化合物的制备方法具有反应条件温和、原料丰富易得、操作及后处理简单等优点。

本发明的取代苯甲酰脲类化合物在从头药物设计以及在 CypA 抑制试验中均显示了阳性结果, 印证了其药理作用机制。因此, 本发明的化合物可用于制备 CypA 抑制剂并发展为免疫抑制药物或抗 HIV-1 药物。

权 利 要 求

1、一种具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物:

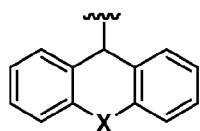


I

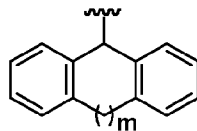
其中:

R₁ 和 **R₂** 各自独立地选自氢, C₁-C₆ 直链或支链的烷基、烷氧基和烷硫基, 羟基, 硝基, 氨基, 卤素, 氰基, 三氟甲基和苄氧基;

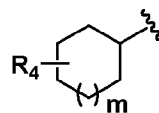
R₃ 选自以下结构:



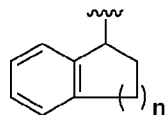
II



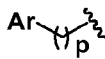
III



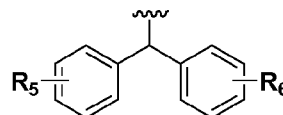
IV



V



VI



VII

其中, **X** 选自 N、O 和 S; **m** 是 0~2 的整数; **n** 是 1~3 的整数; **p** 是 0~3 的整数;

R₄、**R₅** 和 **R₆** 各自独立地选自氢, C₁-C₆ 直链或支链的烷基, C₁-C₄ 烷氧基, 卤素, 氰基, 硝基, 氨基, 羟基, 三氟甲基, 羧基, 巯基和 C₁-C₄ 酰基;

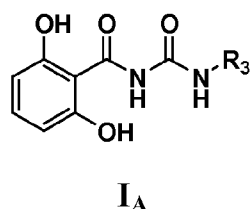
芳香基 **Ar** 选自取代或未取代的苯基或萘基, 其取代基是 1~4 个选自卤素、C₁-C₆ 直链或支链烃基、羟基、C₁-C₄ 烷氧基、C₁-C₄ 不饱和烃氧基、羧基、羧基取代的 C₁-C₆ 烷氧基、氰基、硝基、氨基、三氟甲基、三氟甲氧基、巯基和 C₁-C₄ 酰基的基团。

2、根据权利要求 1 所述的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物, 其特征在于, 通式(I)中,

R₃ 选自咕吨基, 苄基, 2,3-二氢-茚-1-基, **R₄** 取代的环己基, **R₅** 和 **R₆** 取

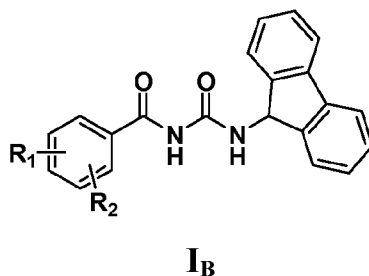
代的二苯甲基以及未取代或被 1 ~ 2 个选自卤素、C₁-C₆ 直链或支链烷基、羟基、C₁-C₄ 烷氧基、羧基、氰基、硝基、氨基、三氟甲基、三氟甲氧基和巯基的基团取代的萘基、苯基、苯甲基和苯乙基；其中，**R**₄、**R**₅ 和 **R**₆ 各自独立地选自氢，C₁-C₆ 直链或支链的烷基，C₁-C₄ 烷氧基，卤素，氰基，硝基，氨基，羟基，三氟甲基，羧基，巯基和 C₁-C₄ 酰基中。

3、根据权利要求 1 所述的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物，其特征在于，为下述化合物 **I**_A：



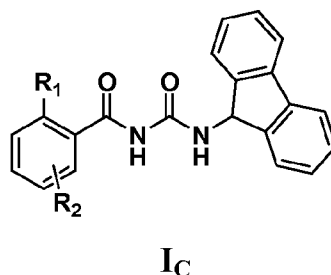
其中，**R**₃ 的定义同权利要求 1。

4、根据权利要求 1 所述的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物，其特征在于，为下述化合物 **I**_B：



其中，**R**₁ 和 **R**₂ 的定义同权利要求 1。

5、根据权利要求 1 所述的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物，其特征在于，为下述化合物 **I**_C：



其中，**R**₁ 为氨基或硝基；**R**₂ 的定义同权利要求 1。

6、根据权利要求 1 所述的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物，其特征在于，所述化合物为：

1-(1-咕吨基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-萘-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-

苯甲基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-环己基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苯基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-(4-氟苯基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-(2,3-二氢-茚-1-基)-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-二苯甲基-3-(2,6-二羟基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氯苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氰基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氟苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-甲氧基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-甲基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-三氟甲基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2,6-二氟苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2,6-二氯苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氯-6-氟苯甲酰)脲、1-苄基-3-(苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氟-6-甲巯基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氟-6-甲氧基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氯-6-甲巯基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氯-6-甲氧基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-氟-6-苄氧基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-甲巯基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-苄氧基苯甲酰)脲、1-苄基-3-(2-硝基苯甲酰)脲或1-苄基-3-(2-胺基苯甲酰)脲。

7、一种权利要求1所述的具有通式(I)结构的取代苯甲酰脲类化合物的制备方法，其特征在于，采用以下三种方法中的任意一种：

方法一：

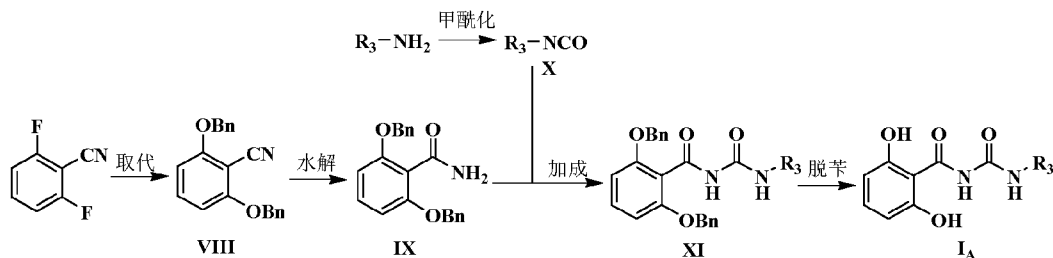
1)将苄醇钠和2,6-二氟苯腈溶于二甲亚砜中，快速升温至110~130℃后搅拌5~10小时；冷至室温，向反应液中加入冰水，搅拌30分钟，析出大量固体，抽滤，水洗，干燥，得白色固体；用乙醇重结晶得白色片状晶体2,6-二苄氧基苯腈 **VIII**；

2)将步骤1)得到的化合物 **VIII** 溶于苄醇中，并加入氢氧化钾和少量水，120~140℃下搅拌10~15小时；减压蒸馏除去溶剂，向残余物中加入冰水，搅拌30分钟，析出大量固体，抽滤，水洗，干燥，得白色固体；将其用硅胶柱层析分离纯化，得到白色粉末状固体2,6-二苄氧基苯甲酰胺 **IX**；

3)将三光气溶于1,2-二氯乙烷中，冷却至0~5℃，将溶于1,2-二氯乙烷的 **R₃** 取代胺类化合物 **R₃-NH₂** 缓慢滴加入含有三光气的反应液中，加毕，继续冰浴冷却下搅拌反应30分钟，后升温至室温反应1小时，然后加热至回流，当反应液呈无色透明状时，将三乙胺加入反应液中，继续回流30分钟；减压蒸馏除去溶剂，加入甲苯，抽滤，滤液蒸干得到淡黄色固体，为 **R₃** 取代的异氰酸酯 **X**；

4)将步骤2)和步骤3)得到的化合物 **IX** 和 **X** 溶入甲苯中，加热至回流反应10~15小时；减压蒸除反应溶剂得到淡黄色固体，将其用硅胶柱层析分离纯化，得到1-**R₃** 取代-3-(2,6-二苄氧基苯甲酰基)脲 **XI**；

5)将步骤 4)得到的化合物 **XI** 加入 45%的溴化氢醋酸溶液中,控温 50 ~ 70 °C 下搅拌 5 ~ 10 小时; 将反应液倾入冰水中, 搅拌 30 分钟, 析出大量固体, 抽滤, 水洗, 干燥, 得 1- R_3 取代-3-(2,6-二羟基苯甲酰基)脲 **I_A**;



其中, R_3 的定义同权利要求 1; 或

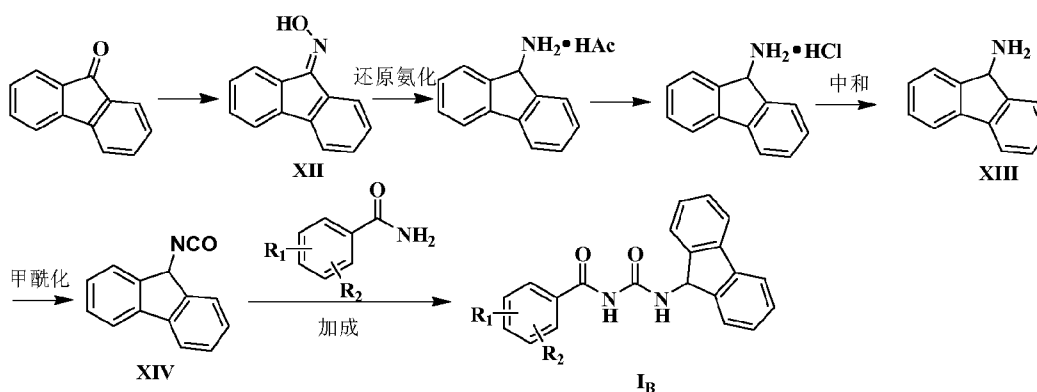
方法二:

1)将 9-茚酮与盐酸羟胺加入 70%乙醇水溶液中, 回流搅拌 2 ~ 5 小时; 将反应液倾入冰水中, 析出大量黄色固体, 抽滤, 水洗, 干燥, 得黄色固体 9-茚肟 **XII**;

2)将步骤 1)得到的化合物 **XII** 加入含少量水的醋酸溶液中, 加热至回流; 将 Zn 粉缓慢加入反应液中, 继续反应 1 ~ 3 小时; 将反应液乘热过滤, 滤液经减压蒸馏除去大部分溶剂, 抽滤, 得 9-茚胺醋酸盐; 将其加入稀盐酸中, 冰浴冷却下搅拌 10 ~ 15 小时; 抽滤, 得 9-茚胺盐酸盐; 将 9-茚胺盐酸盐加入氨水中搅拌 1 ~ 3 小时, 抽滤, 氨水洗涤并干燥; 用石油醚重结晶, 得白色针状结晶 9-茚胺 **XIII**;

3)将三光气溶于 1,2-二氯乙烷中, 冰浴冷却至 0 ~ 5 °C, 将溶于 1,2-二氯乙烷的 9-茚胺 **XIII** 缓慢滴加入含有三光气的反应液中, 加毕, 继续冰浴冷却下搅拌反应 30 分钟, 后升温至室温反应 1 小时, 然后加热至回流, 当反应液呈无色透明状时, 将三乙胺加入反应液中, 继续回流 30 分钟; 减压蒸馏除去溶剂, 加入甲苯, 抽滤, 滤液蒸干得到淡黄色固体, 为 9-茚异氰酸酯 **XIV**;

4)将步骤 3)得到的化合物 **XIV** 和 R_1, R_2 -二取代苯甲酰胺溶入甲苯中, 加热至回流反应 10 ~ 15 小时; 减压蒸除反应溶剂得到淡黄色固体, 将其用硅胶柱层析分离纯化, 得到 1-茚-3-(R_1, R_2 -二取代苯甲酰基)脲 **I_B**;

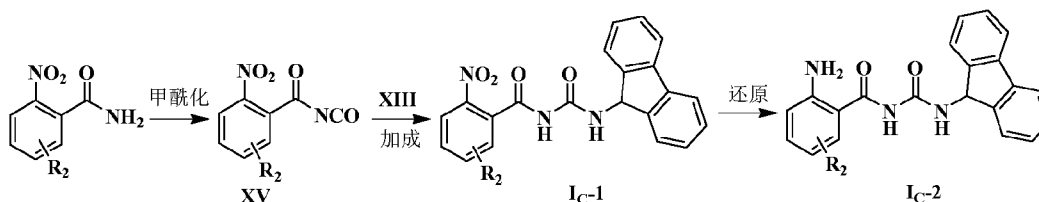


其中, R_1 和 R_2 的定义同权利要求 1; 或
方法三:

1) 将 2-硝基- R_2 取代-苯甲酰胺溶于干燥甲苯中, 控温 $20 \sim 30^\circ\text{C}$, 慢慢滴加草酰氯, 待反应放热结束后, 加热回流 3-5 小时, 使悬浮固体全部溶解, 反应液变澄清且无氯化氢气体放出, 结束反应, 将反应液减压蒸馏除去过量的甲苯和草酰氯, 得 2-硝基- R_2 取代-苯甲酰异氰酸酯 XV;

2) 将步骤 1) 得到的化合物 XV 和 I_B 合成中步骤 3) 得到的 9-芴胺 XIII 溶入甲苯中, 加热至回流反应 $10 \sim 15$ 小时; 减压蒸除反应溶剂, 将残余物用硅胶柱层析分离纯化, 得到 1-芴-3-(2-硝基- R_2 取代-苯甲酰基)脲 I_C-1 ;

3) 将步骤 2) 得到的化合物 I_C-1 , 氯化铵和 Fe 粉投入到 THF 中, 回流反应 $1 \sim 3$ 小时; 冷至室温, 抽滤, 滤液被减压蒸除溶剂, 将残余物用硅胶柱层析分离纯化, 得 1-芴-3-(2-氨基- R_2 取代-苯甲酰基)脲 I_C-2 ;



其中, R_2 的定义同权利要求 1。

8、权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的取代苯甲酰脲类化合物作为 CypA 抑制剂的应用。

9、权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的取代苯甲酰脲类化合物在制备预防或治疗 CypA 介导的疾病的药物中的应用。

10、根据权利要求 9 所述的应用, 其特征在于, 所述 CypA 介导的疾病包括移植排斥反应、由移植引起的宿主疾病、自身免疫疾病和 HIV-1 入侵感染。

11、一种药物组合物，其特征在于，该药物组合物包含治疗有效量的一种或多种权利要求 1~6 中任一项所述的取代苯甲酰脲类化合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

12、根据权利要求 11 所述的药物组合物，其特征在于，所述的取代苯甲酰脲类化合物占该药物组合物总重量的 0.001-99.9%。

附图

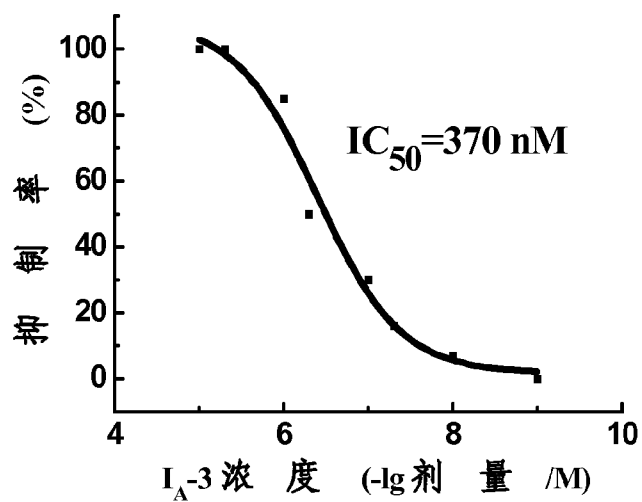


图 1

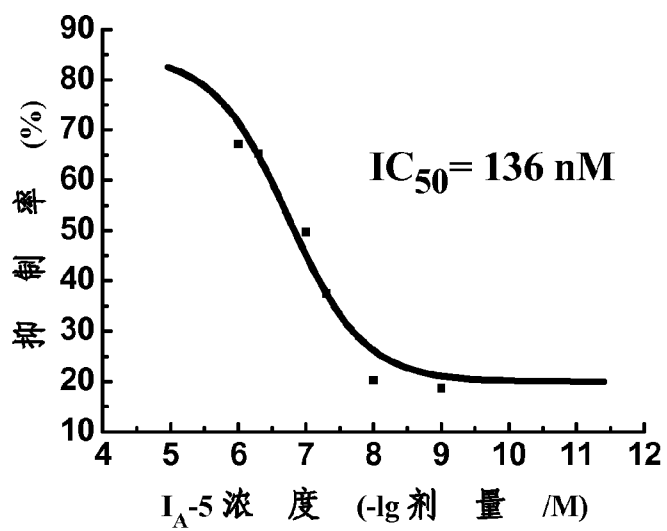


图 2

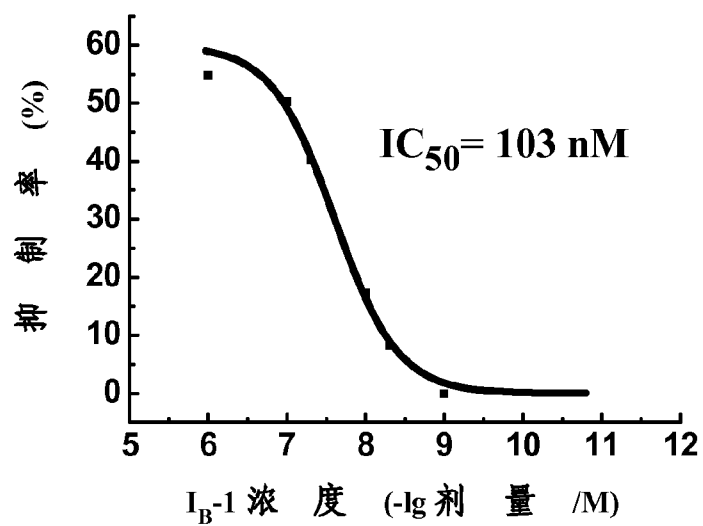


图 3

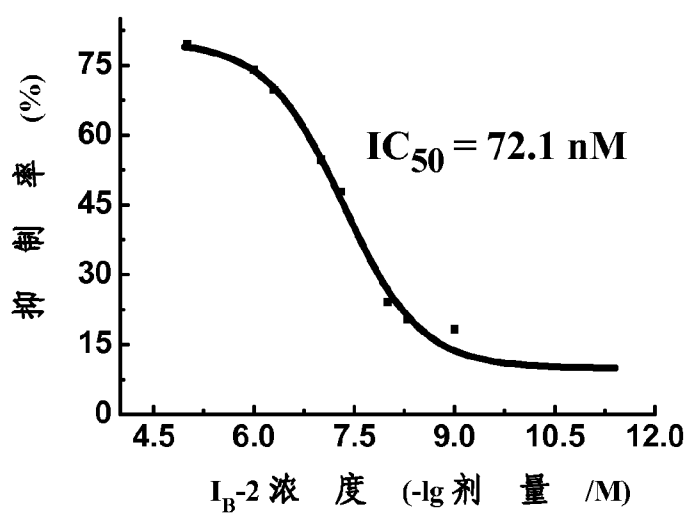


图 4

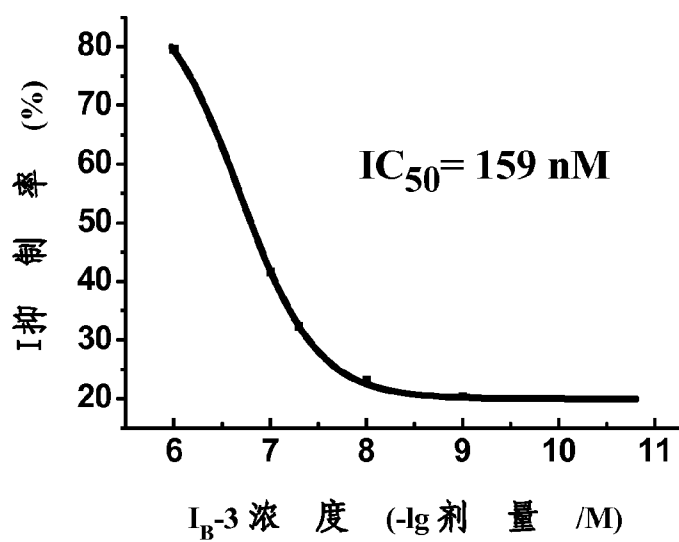


图 5

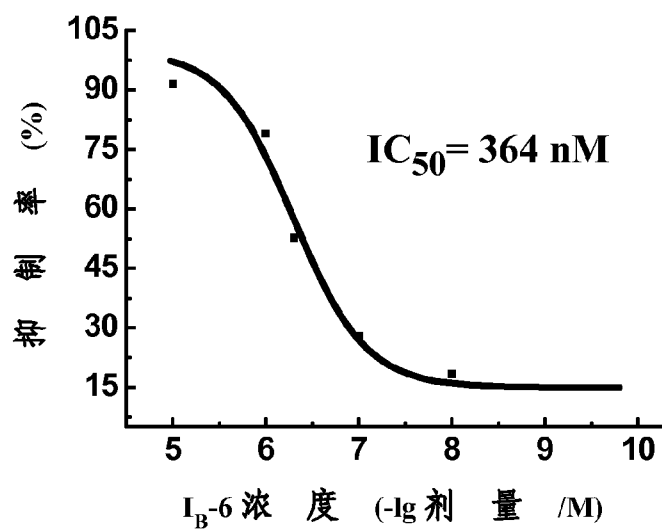


图 6

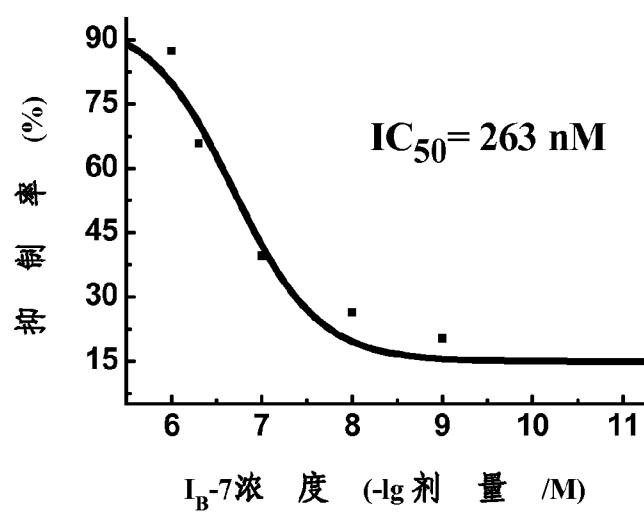


图 7

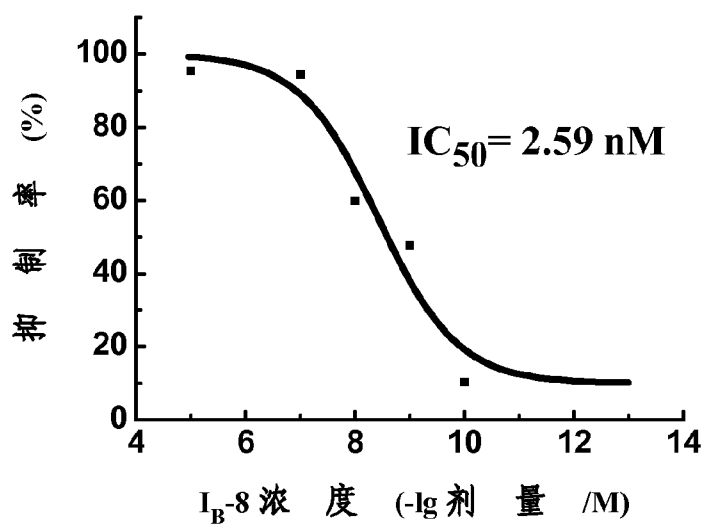


图 8

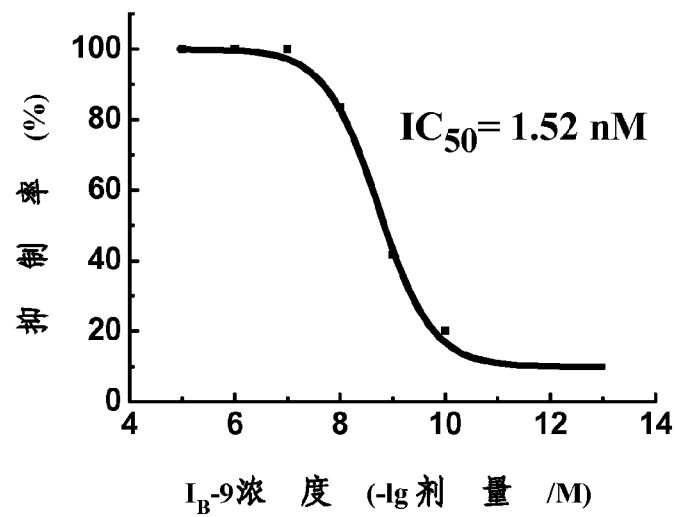


图 9

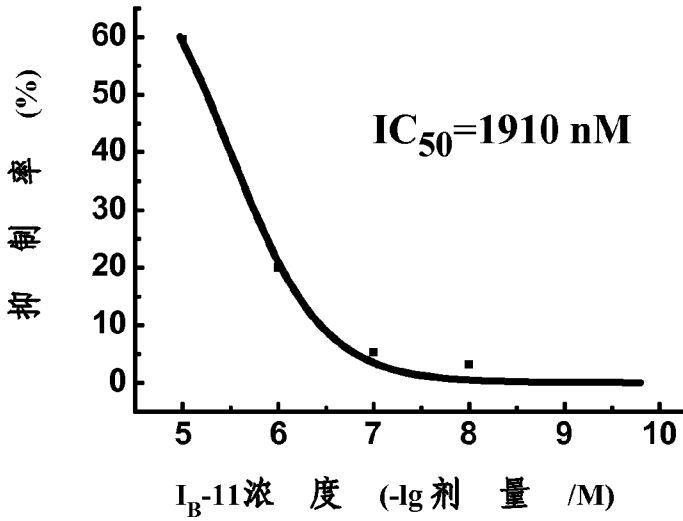


图 10

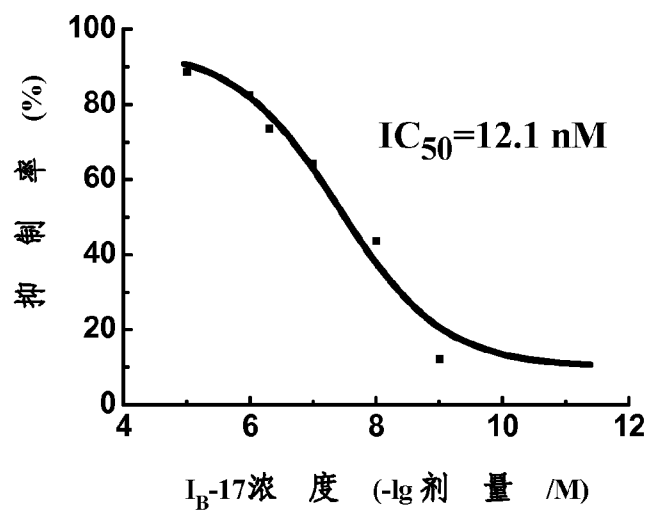


图 11

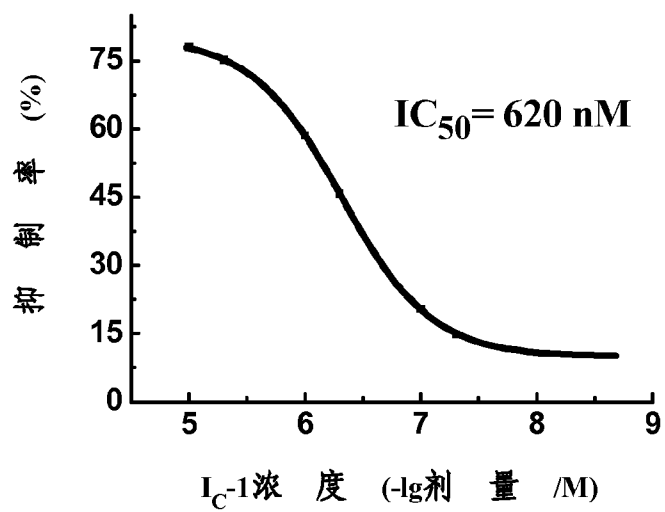


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07C 275, C07C 273, C07D 311, A61K 31, A61P 37, A61P 31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, REGISTRY, CAPLUS(STN), BENZOYL, UREA, BENZOYLUREA, CYCLOPHILIN, CYCLOSPORIN, CYPA, CYP, HIV, AIDS, IMMUNOSUPPRES+, SEARCH ACCORDING TO THE STRUCTURES OF THE REASONABLE ANTICIPATED COMPOUNDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	NI, Shuaishuai et al., Discovering Potent Small Molecule Inhibitors of Cyclophilin A Using de Novo Drug Design Approach, J. Med. Chem., 19 Aug. 2009 (19.08.2009), Vol. 52, No. 17, pages 5295-5298, the whole document	1-7, 9-12
A	CN101108187A (FUDAN UNIVERSITY), 23 Jan. 2008 (23.01.2008), claim 1	1-7, 9-12
A	EP0136745A2 (DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B.V.), 10 Apr. 1985 (10.04.1985), compounds No. 11 and 13 in page 7 of the description	1-7, 9-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
02 June 2010 (02.06.2010)

Date of mailing of the international search report
12 Aug. 2010 (12.08.2010)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LIN Lin

Telephone No. (86-10)62084382

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000628

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 seeks to protect the use of a compound as described in any of claims 1-6 as a CypA inhibitor. Therefore, claim 8 is directed to a method of treatment of the human/animal body by therapy and does not comply with the requirement of Rule 39.1.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/000628

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101108187A	23.01.2008	CN100502869C	24.06.2009
EP0136745A2	10.04.1985	AT43788T	15.06.1989
		AU572549B2	12.05.1988
		AU3250484A	07.03.1985
		CA1252791A1	18.04.1989
		DK412084A	02.03.1985
		EP0136745A3	22.01.1986
		EP0136745B1	07.06.1989
		ES8505338A1	01.09.1985
		GR80221A1	14.12.1984
		JP60120847A	28.06.1985
		NZ209365A	27.07.1989
		PH23038A	10.03.1989
		ZA8406767A	24.04.1985
		DE3478573G	07.13.1989

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C 275/54 (2006.01) i

C07C 273/18 (2006.01) i

C07D 311/88 (2006.01) i

A61K 31/17 (2006.01) i

A61K 31/352 (2006.01) i

A61P 37/06 (2006.01) i

A61P 31/18 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

The reasonable anticipation to the search:

Claims 1-6 are not supported by the description and do not comply with the requirement of Article 6 PCT, as their scopes are broader than that justified by the description. The reasons are the following: According to the description, the technical problem to be solved by the present invention is to provide new compounds which can be used as small molecule inhibitors of Cyclophilin A (CypA). However, the CypA-inhibition% data of compounds I_A-4, I_A-6, I_B-5, I_B-10, I_B-12, and I_B-15 are 0% (see table 1 in the description), one or more among these compounds fall within the scopes of claims 1-6. Furthermore, the structure difference between compound I_A-3 and compound I_A-4 is only one “-CH₂-”, the structure difference between compound I_B-9 and compound I_B-10 is substituents on the phenyl ring (the substituents on the phenyl ring of compound I_B-9 are -Cl and -F, while the phenyl ring of compound I_B-10 is unsubstituted), but the CypA-inhibition% data of compounds I_A-3 and I_B-9 are 100%, while the CypA-inhibition% data of compounds I_A-4 and I_B-10 are 0% (see table 1 in the description), this shows that the CypA inhibition activity of the substituted benzoyl urea compounds strongly depends on their structures, and a slight change in the structures of the compounds makes their CypA inhibition activity change remarkably and even disappear. It is difficult for the person skilled in the art to anticipate that all specific compounds falling within the scopes of claims 1-6 would have CypA inhibition activity upon the disclosure of the description. Therefore, Claims 1-6 are not supported by the description and do not comply with the requirement of Article 6 PCT.

Claim 7 seeks to protect the methods for preparing compounds of claim 1. Claims 9-10 seek to protect the uses of a compound according to any of claims 1-6 in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of CypA mediated diseases. Claims 11-12 seek to protect the pharmaceutical compositions comprising therapeutically effective amount of one or more compounds according to any of claims 1-6 and a pharmaceutically acceptable vehicle, carrier or diluent. As described above, the compounds of claims 1-6 are not supported by the description, therefore claims 7 and 9-12 are not supported by the description either and do not comply with the requirement of Article 6 PCT.

Consequently, the search of claims 1-6 was restricted to the specifically disclosed compounds having CypA inhibition activity, i.e. compounds I_A-1, I_A-2, I_A-3, I_A-5, I_A-7, I_A-8, I_A-9, I_B-1, I_B-2, I_B-3, I_B-4, I_B-6, I_B-7, I_B-8, I_B-9, I_B-11, I_B-13, I_B-14, I_B-16, I_B-17, I_C-1 and I_C-2 recorded in table 1 of the description. The search of claim 7 was restricted to the methods for preparing these compounds having CypA inhibition activity. The search of claims 9-10 was restricted to the uses of any of these compounds having CypA inhibition activity in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of CypA mediated diseases. And, the search of claims 11-12 was restricted to the pharmaceutical compositions comprising therapeutically effective amount of one or more among these compounds having CypA inhibition activity and a pharmaceutically acceptable vehicle, carrier or diluent.

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/000628

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07C 275, C07C 273, C07D 311, A61K 31, A61P 37, A61P 31

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, REGISTRY, CAPLUS(STN), 亲环素, 环孢素, 艾滋, 爱滋, 免疫抑制, 苯甲酰, 脲, 上海药物研究所, 华东理工大学, 北京大学, 蒋华良, 李剑, 来鲁华, 裴剑锋, 黄瑾, 沈旭, BENZOYL, UREA, BENZOYLUREA, CYCLOPHILIN, CYCLOSPORIN, CYPA, CYP, HIV, AIDS, IMMUNOSUPPRES+, 根据合理预期的化合物的结构检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	NI, Shuaishuai 等, Discovering Potent Small Molecule Inhibitors of Cyclophilin A Using de Novo Drug Design Approach, J. Med. Chem., 19.8 月 2009 (19.08.2009), 第 52 卷, 第 17 期, 第 5295-5298 页, 全文	1-7, 9-12
A	CN101108187A (复旦大学), 23.1 月 2008 (23.01.2008), 权利要求 1	1-7, 9-12
A	EP0136745A2 (杜菲尔国际开发有限公司), 10.4 月 1985 (10.04.1985), 说明书第 7 页中的化合物 11 和 13	1-7, 9-12

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
02.6 月 2010 (02.06.2010)

国际检索报告邮寄日期
12.8 月 2010 (12.08.2010)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员
林琳
电话号码: (86-10) **62084382**

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/000628

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：8

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求8请求保护权利要求1-6任一项所述化合物作为CypA抑制剂的应用，因此，权利要求8涉及治疗人类/动物的方法，不符合细则39.1的规定。

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/000628

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101108187A	23.01.2008	CN100502869C	24.06.2009
EP0136745A2	10.04.1985	AT43788T	15.06.1989
		AU572549B2	12.05.1988
		AU3250484A	07.03.1985
		CA1252791A1	18.04.1989
		DK412084A	02.03.1985
		EP0136745A3	22.01.1986
		EP0136745B1	07.06.1989
		ES8505338A1	01.09.1985
		GR80221A1	14.12.1984
		JP60120847A	28.06.1985
		NZ209365A	27.07.1989
		PH23038A	10.03.1989
		ZA8406767A	24.04.1985
		DE3478573G	07.13.1989

A. 主题的分类

C07C 275/54 (2006.01) i

C07C 273/18 (2006.01) i

C07D 311/88 (2006.01) i

A61K 31/17 (2006.01) i

A61K 31/352 (2006.01) i

A61P 37/06 (2006.01) i

A61P 31/18 (2006.01) i

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

对于检索的合理预期:

权利要求 1-6 得不到说明书的支持, 不符合 PCT 条约第 6 条的规定, 因为它们的范围超出了说明书所公开的范围, 理由如下: 根据说明书, 本发明所要解决的技术问题是提供可用作环亲素(CypA)小分子抑制剂的新化合物。然而, 化合物 I_A-4、I_A-6、I_B-5、I_B-10、I_B-12 和 I_B-15 的 CypA-抑制%数据为 0% (参见说明书中表 1), 这些化合物中的一个或多个落入权利要求 1-6 的范围内。而且, 化合物 I_A-3 和化合物 I_A-4 的结构差异仅是一个“-CH₂-”, 化合物 I_B-9 和化合物 I_B-10 的结构差异为所述苯基环上的取代基(化合物 I_B-9 的苯基环上的取代基为-Cl 和-F, 而化合物 I_B-10 的苯基环是未取代的), 但是, 化合物 I_A-3 和 I_B-9 的 CypA-抑制%数据为 100%, 而化合物 I_A-4 和 I_B-10 的 CypA-抑制%数据为 0% (参见说明书中表 1), 这表明所述取代苯甲酰胺化合物的 CypA 抑制活性强烈地依赖于它们的结构, 所述化合物结构上微小的变化使得它们的 CypA 抑制活性显著变化, 甚至消失。本领域技术人员基于说明书所公开的内容难以预期落入权利要求 1-6 范围内的所有具体化合物都会具有 CypA 抑制活性。因此, 权利要求 1-6 得不到说明书的支持, 不符合 PCT 条约第 6 条的规定。

权利要求 7 请求保护制备权利要求 1 化合物的方法。权利要求 9-10 请求保护根据权利要求 1-6 任一项的化合物在制备治疗或预防 CypA 介导的疾病的药物中的应用。权利要求 11-12 请求保护包含治疗有效量的一种或多种根据权利要求 1-6 任一项的化合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的药物组合物。如上所述, 权利要求 1-6 的化合物得不到说明书的支持, 因此, 权利要求 7 和 9-12 也得不到说明书的支持, 不符合 PCT 条约第 6 条的规定。

因此, 对权利要求 1-6 的检索限于具体公开的具有 CypA 抑制活性的化合物, 即, 记录于说明书表 1 的化合物 I_A-1、I_A-2、I_A-3、I_A-5、I_A-7、I_A-8、I_A-9、I_B-1、I_B-2、I_B-3、I_B-4、I_B-6、I_B-7、I_B-8、I_B-9、I_B-11、I_B-13、I_B-14、I_B-16、I_B-17、I_C-1 和 I_C-2。对权利要求 7 的检索限于制备这些具有 CypA 抑制活性的化合物的方法。对权利要求 9-10 的检索限于这些具有 CypA 抑制活性的化合物中的任一在制备治疗或预防 CypA 介导的疾病的药物中的应用。以及, 对权利要求 11-12 的检索限于包含治疗有效量的这些具有 CypA 抑制活性的化合物中的一种或多种以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的药物组合物。