



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103130686 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201110395963.2

A61P 31/04(2006.01)

(22)申请日 2011.12.02

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103130686 A

WO 2007061640 A1,2007.05.31,
JP 特開2009-221266 A,2009.10.01,
US 20040259875 A1,2004.12.23,
CN 101945869 A,2011.01.12,
CN 101516379 A,2009.08.26,
CN 1463965 A,2003.12.31,
JP 特開昭51-103145 A,1976.09.11,
Sandip N. Gavade等.Microwave

(43)申请公布日 2013.06.05

(73)专利权人 天津市国际生物医药联合研究院
地址 300457 天津市滨海新区经济技术开
发区洞庭路220号
专利权人 天津科技大学

assisted, ligand free, copper catalyzed
reaction of aryl halides with phenyl
urea.《Chinese Chemical Letters》.2011,第22
卷第292-295页.

(72)发明人 杨诚 路支超 刘伟 陈卫强
傅晟 张炜程

缪方明等.苯基脲类衍生物的抑菌活性和量
子化学计算.《计算机与应用化学》.2002,第19卷
(第3期),第302页. (续)

(74)专利代理机构 北京德恒律师事务所 11306
代理人 陆鑫 房岭梅

(51)Int.Cl.

- C07C 275/28(2006.01)
- C07C 275/30(2006.01)
- C07C 275/38(2006.01)
- C07D 295/135(2006.01)
- C07D 213/75(2006.01)
- A61K 31/17(2006.01)
- A61K 31/44(2006.01)
- A61K 31/5375(2006.01)

审查员 韩文

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

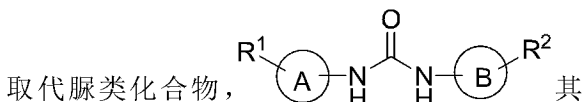
(54)发明名称

N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物及其制
备方法和用途

法,以及该化合物为活性成分的药物组合物,以
及本发明化合物在制备抑制产新德里金属β-内
酰胺酶(NDM-1)耐药细菌的药物中的应用。

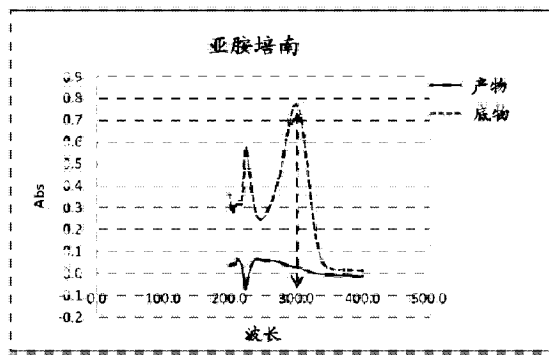
(57)摘要

本发明涉及通式(I)的N,N'-不对称二芳基



(I)

中,A和B独立地代表芳基、一取代或多取代的芳
基、杂芳基、一取代或多取代的杂芳基;R¹和R²独
立地代表氢、C₁-C₈的烷基、C₁-C₈的烷氧基、芳烷
氧基、酰基、非芳族杂环取代基、卤素、硝基、三氟
甲基或氰基。本发明还涉及该类化合物的制备方



CN 103130686 B

[接上页]

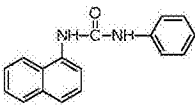
(56)对比文件

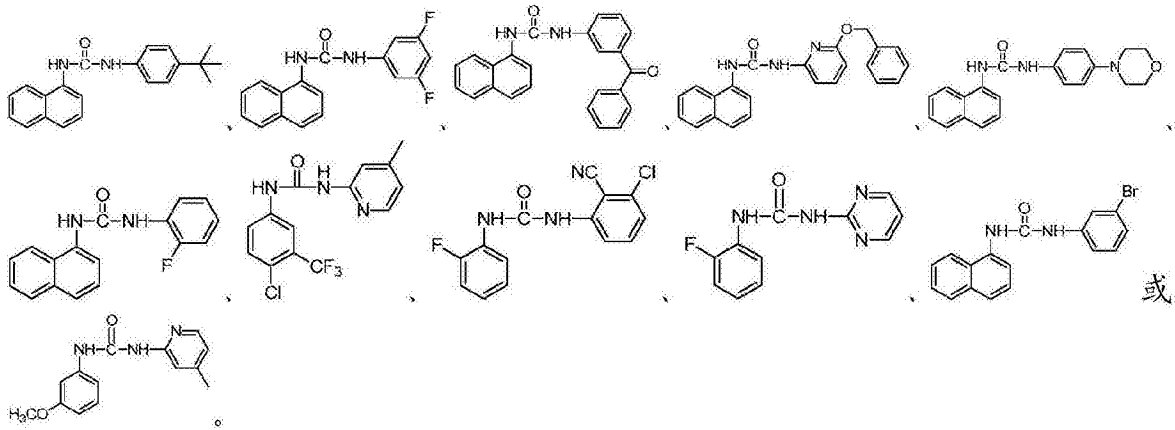
缪方明等.苯基脲类衍生物的抑菌活性和量子化学计算.《计算机与应用化学》.2002,第19卷(第3期),第302页.

A. Ricci等.Weakly cytokinin-active

diphenylurea derivatives influence adventitious rooting in M26 Malus pumila microcuttings.《Plant Growth Regulation》.2003,第39卷第19-26页.

1. 具有通式 R^1 - A -NH-C(=O)-NH- B - R^2 的 N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物在制备抑制产新德里金属β-内酰胺酶(NDM-1)耐药细菌的药物组合物方面的应用,

其中,所述 N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物为 



N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种N,N'-二取代脲类化合物、该类化合物的制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 在被称为抗生素“黄金时代”的20世纪五六十年代,全世界每年死于感染性疾病的人数约为700万,这一数字到1999年上升到了2000万。病死率升高的主要原因是耐药菌带来的用药困难。

[0003] 目前,细菌耐药性问题已经非常严重。在发达国家,有5%~10%的住院病人发生过一次或更多的感染。美国每年发生医院感染的患者约为200万,死亡90000人,经济损失达45亿~57亿美元。在发展中国家,发生医院感染的危险要高出发达国家2倍~20倍。我国医院感染发生率为6%左右,但漏报率很高,可达50%以上,致死率尚不清楚。主要感染部位依次为下呼吸道、泌尿道及手术切口感染等。

[0004] 2010年8月,著名医学杂志《柳叶刀》报道了一例对所有 β -内酰胺类抗菌药物耐药、对环丙沙星也不敏感、仅对粘菌素敏感的病例,深入研究发现其携带肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)编码的一种新型金属 β -内酰胺酶,并根据患者可能感染地点(印度新德里)将这种酶命名为新德里金属 β -内酰胺酶(NDM-1, New Delhi metallo- β -lactamase-1)。

[0005] 根据上述研究结果,英国、印度等国研究人员在印度、巴基斯坦、英国等开展了较大范围的流行病学调查,产NDM-1肠杆菌科细菌占所检测细菌的1.2%~13%,主要菌种为大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和肺炎克雷伯菌,其它细菌还有阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、变形杆菌(*Proteus species*)、弗劳地枸橼酸菌(*Citrobacter freundii*)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)、摩根摩根菌(*Morganella morganii*)、普罗威登菌(*Providencia Ewing*)等;这些细菌主要引起尿路、血流、伤口、肺部和导管相关感染等。不到一个月的时间内,在美国、加拿大、日本、韩国、澳大利亚、比利时以及我国大陆、香港、台湾地区等都已经有了感染病例报道。

[0006] 由于产NDM-1细菌的蔓延十分迅速,有关产NDM-1细菌感染治疗的临床和基础研究还较少。目前已经阐明NDM-1属于B类 β -内酰胺酶超家族中的一员,在其活性部位结合有锌离子,因此又称为金属 β -内酰胺酶。其水解底物包括青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类等,表现为产酶细菌对这些药物广泛耐药。与之前发现的其他B类 β -内酰胺酶相比,NDM-1具有能够水解几乎所有的 β -内酰胺类抗生素,且耐受大多数 β -内酰胺酶抑制剂等特点。NDM-1的存在是导致NDM-1超级细菌几乎对所有 β -内酰胺抗菌药物耐药的分子基础,同时由于细菌具有其它耐药机制,对氨基糖苷类、喹诺酮类等也多耐药,目前只对多粘菌素和替加环素具有较高体外敏感性。

[0007] NDM-1能轻易地从一种细菌跳到另一种上面,科学家忧虑NDM-1跟危险性病毒接合,变成无法医治的人传人病毒,并且NDM-1是一种多重抗药性细菌,一旦在全球散播,抗生素作废的时期将拉开序幕,因此开发能够抑制产NDM-1耐药细菌的活性的药物迫在眉睫。

[0008] 脲类化合物在农业化学品,石油化学品及药物治疗等方面具有广泛的应用。比如:脲类化合物可作为染发剂,碳氢燃料添加剂,防腐剂,高分子聚合物,洗涤剂,脲类化合物也可作为植物生长调节剂,其显示了重要的生物活性。

[0009] 最近,脲类衍生物作为各种酶抑制剂被报道,这其中包括HIV-1蛋白酶抑制剂、p38丝裂原活化蛋白(p38MAP)激酶抑制剂、酪氨酸激酶(PTK)抑制剂等。因此,开发新的作为酶抑制剂的脲类衍生物是非常有意义的。

[0010] 目前,合成脲类衍生物的方法主要是通过异腈酸酯与胺反应来完成的,异腈酸酯经常由光气在高温通入胺溶液或室温通入胺的碱溶液中来制备。这种制备脲的方法需要预先制备异氰酸酯,而且需要分离得到纯净的异氰酸酯,这就增加了反应步骤。而且有些异氰酸酯不稳定,易分解,为最后合成脲带来麻烦。

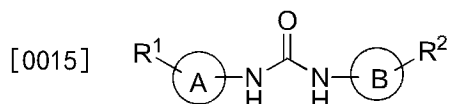
[0011] 作为对上述方法的改进,溶于甲苯的光气可以先与其中一种胺反应,然后在原位加入第二种胺反应得到目标脲化合物。但是光气是一种无色剧毒气体,因此光气的使用是不被鼓励的。

[0012] 作为对以上方法的改进,可以使用三光气代替光气来合成脲类化合物,与光气相比,三光气具有运输、使用安全,毒性低等优点。但是当使用三光气作为反应物时,理论上1摩尔的三光气会分解为3摩尔的光气,因此常规反应中往往使用三分之一摩尔的三光气与胺反应制备脲类化合物,这导致三光气在与某些底物胺反应中,收率下降。而且如果反应条件控制不好,使用三光气代替光气时容易在反应中生成副产物。因此,需要一种不需要预先制备异氰酸酯、不使用毒性高的光气并且收率高的方法。

发明内容

[0013] 本发明提供了一类新的具有药用价值的N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物和一种合成该类化合物的新方法,以及一种抑制产新德里金属β-内酰胺酶(NDM-1)耐药细菌的药物组合物。

[0014] 本发明提供的N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物具有以下结构:



[0016] 其中,

[0017] A和B独立地代表芳基、一取代或多取代的芳基、杂芳基、一取代或多取代的杂芳基;其中所述一取代或多取代的芳基例如被卤素、硝基、三氟甲基或氰基中的一种或几种所取代,所述一取代或多取代的杂芳基例如被卤素、硝基、三氟甲基或氰基中的一种或几种所取代。

[0018] R¹和R²独立地代表氢、C₁-C₈的烷基、C₁-C₈的烷氧基、芳烷氧基、酰基、非芳族杂环取代基、卤素、硝基、三氟甲基或氰基。

[0019] 根据本发明的一个方面,其中所述A和所述B独立地代表苯基、1-萘基、2-萘基、一取代的苯基、二取代的苯基、含1~3个氮原子的杂芳基。

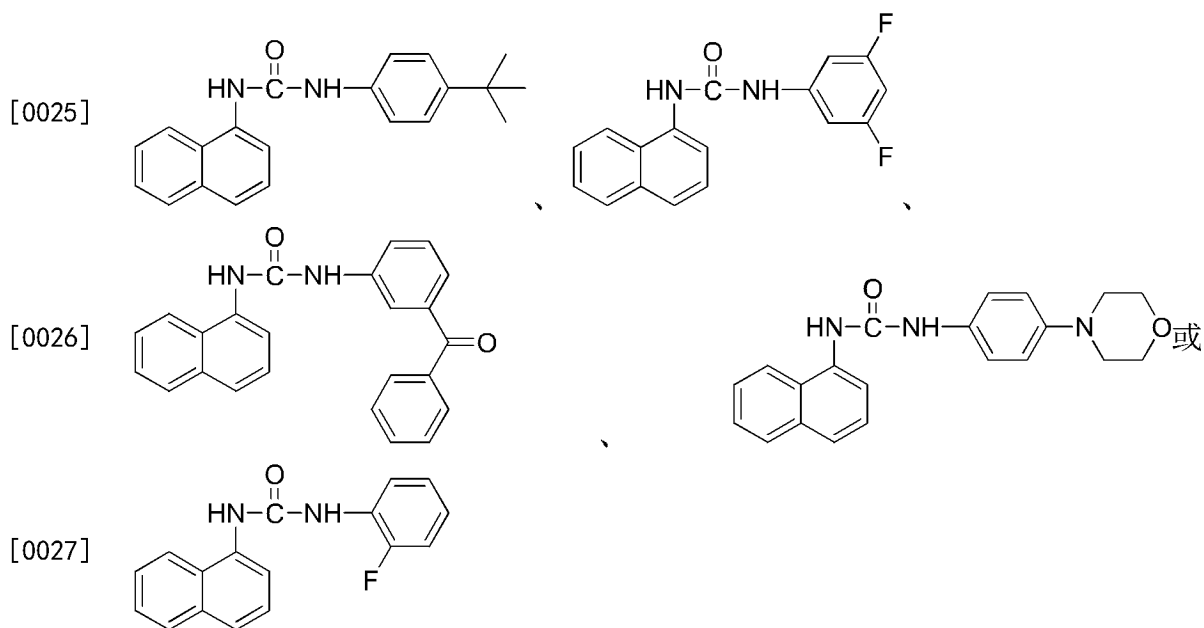
[0020] 根据本发明的另一方面,其中R¹和R²独立地代表氢、C₁-C₄的烷基、C₁-C₄的烷氧基、烷基为C₁-C₄烷基的芳烷氧基、芳酰基、含1~3个选自氧原子、硫原子和氮原子的杂原子作为成环原子的碳原子数为2~6的非芳族杂环取代基、卤素、硝基、三氟甲基或氰基。

[0021] 根据本发明的又一方面,其中所述A和所述B独立地代表苯基、1-萘基、2-萘基、一取代的苯基、二取代的苯基、含1~3个氮原子的杂芳基;并且其中 R^1 和 R^2 独立地代表氢、 C_1 - C_4 的烷基、 C_1 - C_4 的烷氧基、烷基为 C_1 - C_4 烷基的芳烷氧基、芳酰基、含1~3个选自氧原子、硫原子和氮原子的杂原子作为成环原子的碳原子数为2~6的非芳族杂环取代基、卤素、硝基、三氟甲基或氰基。

[0022] 根据本发明的又一方面,其中所述A和所述B独立地代表苯基、一取代的苯基、二取代的苯基、1-萘基、喹啉基、吡啶基、嘧啶基;并且其中 R^1 和 R^2 独立地代表氢、甲基、叔丁基、甲氧基、苄氧基、苯甲酰基、吗啉基、氟原子、氯原子、溴原子、硝基、三氟甲基或氰基。

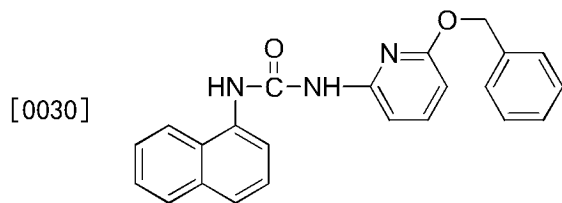
[0023] 根据本发明的又一方面,其中所述A代表1-萘基,所述B代表苯基、一取代的苯基或二取代的苯基,且 R^1 代表氢, R^2 代表氢、叔丁基、甲氧基、苄氧基、苯甲酰基、吗啉基、氟原子、氯原子、溴原子、硝基、三氟甲基或氰基。

[0024] 根据本发明的又一方面,其中所述化合物是:



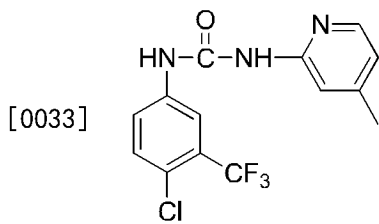
[0028] 根据本发明的又一方面,其中所述A代表1-萘基,所述B代表取代或未取代的吡啶基、嘧啶基、喹啉基或咪啶基,且 R^1 代表氢, R^2 代表氢、叔丁基、甲氧基、苄氧基、苯甲酰基、吗啉基、氟原子、氯原子、硝基、氰基或羟基。

[0029] 根据本发明的又一方面,其中所述化合物是:



[0031] 根据本发明的又一方面,其中所述A代表苯基或一取代的苯基,所述B代表苯基、一取代的苯基、嘧啶基或一取代的吡啶基,且 R^1 代表氢、氟原子或甲氧基, R^2 代表氢、甲基或氟。

[0032] 根据本发明的又一方面,其中所述化合物是:



[0034] 上文所述的芳基是苯基、1-萘基、2-萘基等。优选是苯基和1-萘基。

[0035] 上文所述的杂芳基是含1~3个选自氮原子、氧原子、硫原子的杂原子的单环性或双环性杂芳基。例如：噻吩、呋喃、吡咯、咪唑、吡唑、噻唑、恶唑、异噻唑、异恶唑等单环性五元环杂芳基，吡啶、嘧啶、吡嗪、哒嗪、三嗪等单环性六元环杂芳基，吡啶、异吡啶、中氮茛、吡啶、嘌呤、4-H-喹啉、喹啉、异喹啉、2,3-二氮杂萘、1,5-二氮杂萘、喹啉、喹啉、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并恶唑、苯并呋喃、苯并噻吩等双环性杂芳基等。优选含1~3个氮原子的单环性或双环性杂芳基，特别优选嘧啶基、吡啶基。

[0036] 上文所述的烷基是指具有1~8个碳原子的直链或支链的烷基，例如：甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、叔丁基、仲丁基、戊基、新戊基、己基、庚基、辛基等。优选具有1~4个碳原子的直链或支链的烷基，特别优选甲基和叔丁基。

[0037] 上文所述的烷氧基是指具有1~8个碳原子的直链或支链的烷氧基，例如：甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、戊氧基、新戊氧基、己氧基、庚氧基、辛氧基等。优选具有1~4个碳原子的直链或支链的烷氧基，特别优选甲氧基。

[0038] 上文所述的芳烷氧基是指苯基-(C₁-C₄烷基)氧基，优选苯氧基。

[0039] 上文所述的酰基是C₁-C₈烷基(例如甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、叔丁基等)或者芳基(例如苯基等)与羰基结合的基团。优选芳酰基，特别优选苯甲酰基。

[0040] 上文所述的非芳族杂环是指除碳原子之外还含有1-3个选自氧原子、硫原子和氮原子的杂原子作为成环原子的碳原子数为2-6的环，例如：吗啉基、硫代吗啉基、哌啶基、吡咯烷-1-基、4-甲基-1-哌嗪-1-基等，优选吗啉基。

[0041] 上文所述的卤素是指氟、氯、溴或碘原子。优选氯原子，特别优选氟原子。

[0042] 根据本发明的又一方面，提供了一种利用三光气法合成N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物的方法，包括：

[0043] a. 将三光气溶液加入到第一芳香胺溶液中，其中三光气与第一芳香胺的摩尔比为1:1，然后加入三乙胺溶液，蒸干；

[0044] b. 溶解残渣，加入第二芳香胺溶液，其中三光气与第二芳香胺的摩尔比为1:1，回流，蒸干；

[0045] c. 溶解b步骤所得残渣，加入水，过滤沉淀。

[0046] 在该方法中，第一芳香胺与第二芳香胺不相同。

[0047] 本发明的化合物显示出抑制产新德里金属β-内酰胺酶(NDM-1)耐药细菌活性作用。

[0048] 本发明的药物组合物含有治疗有效量的N,N'-不对称二芳基取代脲类化合物为活性成分，以及含有一种或多种药学上可接受的载体。

[0049] 本发明的化合物和药物组合物可用于制备抑制产新德里金属β-内酰胺酶(NDM-1)耐药细菌的药物。

[0050] 上述药学上可接受的载体是指药学领域常规的药物载体,例如:稀释剂、赋形剂如水等,填充剂如淀粉、蔗糖等;粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂如季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂粘土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁和聚乙二醇等。另外还可以再组合物中加入其他辅剂如香味剂、甜味剂等。

[0051] 本发明药物组合物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如使活性成分与一种或多种载体混合,然后将其制成所需的剂型。

[0052] 本发明直接选用三光气作为光气的替代物,一锅法合成N,N'-不对称二芳基取代脲,省略了预先制备相应的异氰酸酯步骤。本发明提供的合成方法将两种反应底物芳香胺与三光气的摩尔比提高到1:1,从而提高了收率。而且本发明提供的合成方法对底物芳香胺的结构要求比较低,芳环上无论给电子取代基还是拉电子取代基都能很好的反应,最终生成芳基脲产物。

附图说明

[0053] 图1示出了药筛酶活体系底物亚安培南一水合物的化学结构式及其与NDM-1的作用位点。

[0054] 图2示出了底物亚安培南一水合物反应前后全波长扫描的紫外吸收光谱图的比较结果。

具体实施方式

[0055] 下面对本发明的各个方面和特点作进一步的描述。

[0056] 本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。本文所用的缩略语通常为本领域技术人员所熟知的,或者可以根据基础知识易于理解的。所用的缩略语及其含义如下所示:

[0057] NDM-1 新德里金属 β -内酰胺酶-1

[0058] HEPES 4-羟乙基哌嗪乙磺酸

[0059] DMSO 二甲基亚砷

[0060] ddH₂O 双蒸水

[0061] ep管 Eppendorf微量离心管

[0062] BSA 小牛血清蛋白

[0063] IC₅₀ 半数抑制浓度

[0064] Cbz 苄氧羰基

[0065] CbzCl 氯甲酸苄酯

[0066] PE 石油醚

[0067] EA 乙酸乙酯

[0068] 本发明的活性测试方法以亚胺培南一水合物作为NDM-1的底物进行活性检测,亚胺培南一水合物的结构式见图1,其中“ \otimes ”表示NDM-1裂解底物的反应部位。其酶活机制是:底物亚胺培南一水合物的母核部分具有O=C-N-C=C共轭结构,表明底物可产生紫外吸收。

由于NDM-1可以水解 β -内酰胺环酰胺键,因此NDM-1与底物反应时可以水解底物的酰胺键,导致共轭结构被破坏,从而使紫外吸收消失。通过对比NDM-1与底物反应前后的全波长扫描紫外吸收光谱图发现,底物在300nm处有最强紫外吸收,如图2所示。如果化合物对NDM-1具有抑制作用,则阻止了NDM-1对底物的水解,导致底物的紫外吸收值降低减慢,由此可以判断化合物对NDM-1是否具有抑制效果,从而进行NDM-1抑制剂药物的筛选。

[0069] 药理活性测试方法包括以下6个步骤:

[0070] 步骤1.NDM-1底物储备液的制备

[0071] 将亚胺培南一水合物(Imipenem monohydrate,购自Sigma公司)溶于50mM HEPES(购自BioBasic公司)中,配制成10mM的底物储备液备用。

[0072] 步骤2.化合物的处理

[0073] 将化合物在95%DMSO+5% ddH₂O中溶解,配制成100mM浓度的溶液,然后将配制好的化合物溶液放置在1.5ml ep管中,于4℃下保存备用。

[0074] 步骤3.NDM-1蛋白缓冲液的配制

[0075] 将NDM-1(由本实验室MDC蛋白纯化组提供,制备方法参见Yu Guo,Jing Wang等,A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug. *Protein & Cell*,2011,2(5):384-394)溶解在蛋白缓冲液(pH=6.8)中,配制成50nM的NDM-1蛋白缓冲液,其中蛋白缓冲液含有50mM HEPES、5 μ M ZnCl₂(购于BioBasic公司)、10 μ g/ml BSA(购于上海生工工程有限公司)。

[0076] 步骤4.NDM-1药筛酶活体系的建立

[0077] NDM-1药筛酶活体系中包含的成分,其体积和浓度见表1。

[0078] 表1 NDM-1的药筛酶活体系

[0079]

体系	体积	浓度
NDM-1	100 μ l	50nM
底物	50 μ l	600 μ M
化合物	2 μ l	100mM
总计	152 μ l	

[0080] 检测体系设置阴性对照,阴性对照体系中加入2 μ l 95%DMSO取代化合物,用于检测NDM-1的活性。

[0081] 步骤5.化合物的初步筛选

[0082] 向96微孔板中的每孔中加入100 μ l的浓度为50nM的NDM-1蛋白缓冲液。然后向每孔中加入2 μ l的浓度为100mM的化合物溶液。振荡,室温孵育1分钟后,每孔加入50 μ l的600 μ M的底物进行反应。每隔8秒用光谱扫描多功能读数仪(Varioskan Flash,Thermo scientific)检测一次,共测20次。

[0083] 绘制曲线,取阴性对照曲线斜率的最大处值为 V_0 ,化合物曲线斜率的最大处值为 V_i ,则NDM-1的剩余活性分数= V_i/V_0 。剩余活性越低,表示化合物对NDM-1的活性抑制越强。当NDM-1的剩余活性分数在0.2以内时,将进一步测定该化合物的IC₅₀值。

[0084] 步骤6.化合物的IC₅₀值的测定

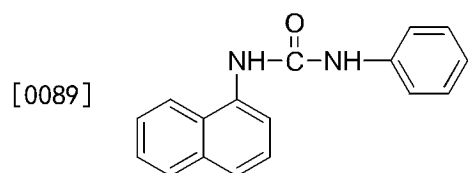
[0085] 将原始浓度为100mM的化合物溶液用95%DMSO按1:2(体积比)的比例进行等比稀

释,共稀释11个浓度梯度。最终浓度依次为1316、658、329、164.5、82.2、41.1、20.6、10.3、5.1、2.6、1.3 μ M。接着进行化合物的IC₅₀值检测,向96微孔板中的每孔中加入100 μ l的浓度50nM的NDM-1蛋白缓冲液。然后向每孔中加入2 μ l的上面配置的11个浓度的化合物溶液。振荡,室温孵育1分钟后,每孔加入50 μ l的600 μ M的底物进行反应。每隔8秒用光谱扫描多功能读数仪检测一次,共测20次。然后绘制曲线,计算NDM-1的剩余活性分数。最后以化合物浓度对数为横坐标,NDM-1的剩余活性为纵坐标绘制曲线。根据曲线,采用GraphPad Prism version 5.0软件(GraphPad software公司)计算IC₅₀值。

[0086] 下面的实施例可以使本领域技术人员更全面地理解本发明,但不以任何方式限制本发明。

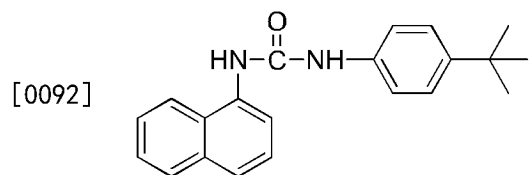
[0087] 在以下具体实施方式中,熔点由X-4数字式熔点仪测定,NMR数据由布鲁克Avance-400MHz核磁设备测定,质谱数据由布鲁克ESQUIRELCTM电喷雾离子阱质谱仪测定。

[0088] 实施例11-苯基-3-萘基脲的制备



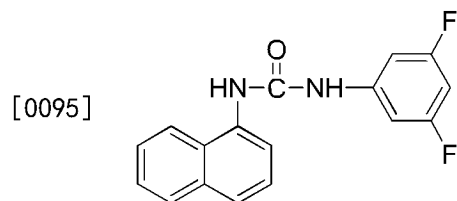
[0090] 将溶于20ml二氯甲烷的三光气(10mmol)逐滴加入到溶于20ml二氯甲烷的1-氨基萘(10mmol)中,然后逐滴加入溶于10ml二氯甲烷的三乙胺(3ml),室温搅拌30分钟;溶液转移至旋转蒸发仪中,旋转蒸干,将所得残渣溶于20ml二氯甲烷中,加入溶于20ml二氯甲烷的苯胺(10mmol),混合物回流30min;溶液转移至旋转蒸发仪中,所得残渣用30ml丙酮溶解,并加入30ml水,沉淀物抽滤,用水-丙酮(1:1,4 \times 5ml)冲洗,得到产物。收率为88%。灰色粉末,M.P.223-224 $^{\circ}$ C。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆, δ in ppm):9.07(s,1H),8.78(s,1H),8.14(d,J=8.4Hz,1H),8.03(d,J=7.2Hz,1H),7.94(d,J=8.4Hz,1H),7.55(m,6H),7.32(t,J=8.4Hz,2H),7.00(t,J=7.2Hz,1H);ESI-MS m/z:263.15([M+H⁺])。

[0091] 实施例21-(4-叔丁基苯基)-3-(1-萘基)脲的制备



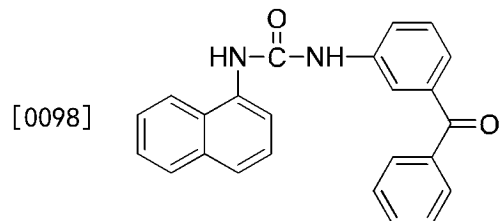
[0093] 将实施例1中的苯胺用对叔丁基苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为88%。灰色粉末,M.P.239-241 $^{\circ}$ C。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆, δ in ppm):8.99(s,1H),8.74(s,1H),8.14(d,J=8.4Hz,1H),8.04(d,J=8.4Hz,1H),7.95(d,J=7.8Hz,1H),7.60(m,3H),7.50(t,J=7.8Hz,1H),7.43(d,J=9Hz,2H),7.33(d,J=9Hz,2H),1.29(s,9H);ESI-MS m/z:319.20([M+H⁺])。

[0094] 实施例31-(3,5-二氟苯基)-3-(1-萘基)脲的制备



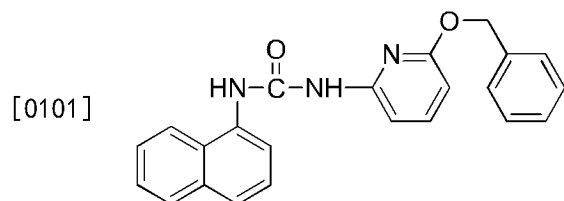
[0096] 将实施例1中的苯胺用3,5-二氟苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为83%。灰色粉末, M.P. 218-220°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 9.42(s, 1H), 8.90(s, 1H), 8.09(d, J=8.4Hz, 1H), 7.95(t, J=6.8Hz, 2H), 7.69(d, J=8.4Hz, 1H), 7.59(m, 2H), 7.50(t, J=8Hz, 1H), 7.24(m, 2H), 6.81(m, 1H); ESI-MS m/z: 299.18([M+H⁺])。

[0097] 实施例41-(3-苯甲酰基苯基)-3-(1-萘基)脲的制备



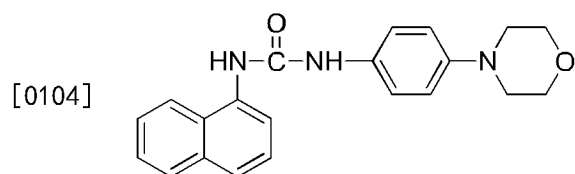
[0099] 将实施例1中的苯胺用3-苯甲酰基苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为86%。灰色粉末, M.P. 169-171°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 9.34(s, 1H), 9.19(s, 1H), 8.80(s, 1H), 8.26(d, J=9Hz, 1H), 8.11(m, 2H), 7.96(m, 4H), 7.78(m, 3H), 7.68(m, 4H), 7.59(m, 5H), 7.51(m, 3H), 7.37(d, J=7.8Hz, 1H); ESI-MS m/z: 367.16([M+H⁺])。

[0100] 实施例51-(6-苄氧基吡啶-2-基)-3-(1-萘基)脲的制备



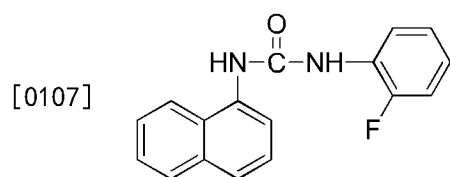
[0102] 将实施例1中的苯胺用6-苄氧基吡啶-2-胺替代,其余步骤同实施例1。收率为80%。淡黄色粉末, M.P. 212-214°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 12.44(s, 1H), 8.35(s, 1H), 8.23(d, J=7.2Hz, 1H), 8.18(d, J=8.4Hz, 1H), 8.07(dd, J=0.8, 4.8Hz, 1H), 7.97(d, J=8Hz, 1H), 7.69(m, 2H), 7.57(m, 4H), 7.52(t, J=8Hz, 1H), 7.43(m, 2H), 7.37(m, 1H), 7.10(m, 1H), 5.31(s, 2H); ESI-MS m/z: 370.18([M+H⁺])。

[0103] 实施例61-(4-吗啉基苯基)-3-(1-萘基)脲的制备



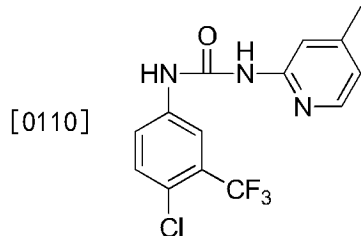
[0105] 将实施例1中的苯胺用4-吗啉基苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为83%。灰色粉末, M.P. 260-261°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 8.82(s, 1H), 8.68(s, 1H), 8.13(d, J=8.4Hz, 1H), 8.03(d, J=7.2Hz, 1H), 7.93(d, J=7.6Hz, 1H), 7.58(m, 3H), 7.47(t, J=8Hz, 1H), 7.39(d, J=9.2Hz, 2H), 6.92(d, J=9.2Hz, 2H), 3.75(t, J=4.8Hz, 4H), 2.51(t, J=2Hz, 4H); ESI-MS m/z: 348.19([M+H⁺])。

[0106] 实施例71-(2-氟苯基)-3-(1-萘基)脲的制备



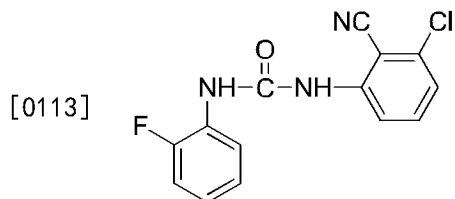
[0108] 将实施例1中的苯胺用2-氟苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为91%。粉色粉末, M.P. 231-233°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 9.18(s, 1H), 9.08(s, 1H), 8.25(m, 1H), 8.19(d, J=8.4Hz, 1H), 8.07(m, 1H), 7.95(d, J=7.8Hz, 1H), 7.66(d, J=8.4Hz, 1H), 7.62(m, 1H), 7.57(m, 1H), 7.50(t, J=7.8Hz, 1H), 7.28(m, 1H), 7.17(t, J=7.2Hz, 1H), 7.03(m, 1H); ESI-MS m/z: 281.14([M+H⁺])。

[0109] 实施例81-(3-三氟甲基-4-氯苯基)-3-(4-甲基吡啶-2-基)脲的制备



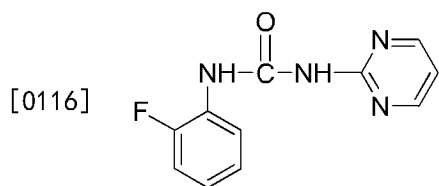
[0111] 将实施例1中的1-萘胺用4-氯-3-三氟甲基苯胺替代,将苯胺用4-甲基吡啶-2-胺替代,其余步骤同实施例1。收率为82%。白色粉末, M.P. 246-247°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 11.06(s, 1H), 9.56(s, 1H), 8.19(m, 2H), 7.73(dd, J=2.4, 9.0Hz, 1H), 7.65(d, J=9Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 6.90(d, J=4.8Hz, 1H), 2.31(s, 3H); ESI-MS m/z: 330.11([M+H⁺])。

[0112] 实施例91-(2-氟苯基)-3-(2-氰基-3-氯苯基)脲的制备



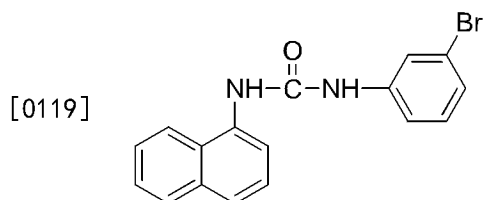
[0114] 将实施例1中的1-萘胺用2-氟苯胺替代,将苯胺用2-氰基-3-氯苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为81%。灰色粉末, M.P. 182-184°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 9.51(s, 1H), 8.66(s, 1H), 8.11(m, 2H), 7.62(m, 2H), 7.26(m, 1H), 7.16(t, J=7.8Hz, 1H), 7.06(m, 1H); ESI-MS m/z: 290.12([M+H⁺])。

[0115] 实施例101-(2-氟苯基)-3-(2-咪啶基)脲的制备



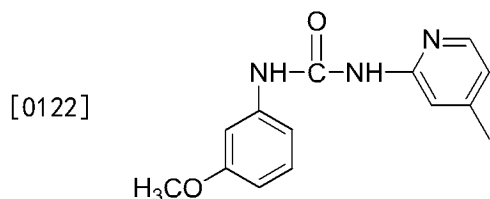
[0117] 将实施例1中的1-萘胺用2-氟苯胺替代,将苯胺用2-氨基咪啶替代,其余步骤同实施例1。收率为88%。白色粉末, M.P. 222-223°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 11.74(s, 1H), 10.40(s, 1H), 8.69(dd, J=1.2, 4.8Hz, 2H), 8.25(t, J=2.4Hz, 1H), 7.30(m, 1H), 7.17(m, 2H), 7.10(m, 1H); ESI-MS m/z: 233.10([M+H⁺])。

[0118] 实施例111-(3-溴苯基)-3-(1-萘基)脲的制备



[0120] 将实施例1中的苯胺用3-溴苯胺替代,其余步骤同实施例1。收率为87%。白色粉末, M.P. 256-257°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 9.26(s, 1H), 8.84(s, 1H), 8.12(d, J=8.4Hz, 1H), 7.96(m, 3H), 7.67(d, J=8Hz, 1H), 7.57(m, 2H), 7.51(t, J=8Hz, 1H), 7.34(m, 1H), 7.27(t, J=8Hz, 1H), 7.18(m, 1H); ESI-MS m/z: 341.12([M+H⁺])。

[0121] 实施例121-(3-甲氧基苯基)-3-(4-甲基吡啶-2-基)脲的制备



[0123] 将实施例1中的1-萘胺用3-甲氧基苯胺替代,将苯胺用4-甲基吡啶-2-胺替代,其余步骤同实施例1。收率为84%。白色粉末, M.P. 138-140°C。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆, δ in ppm): 10.63(s, 1H), 9.37(s, 1H), 8.15(d, J=5.4Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 7.27(t, J=2.4Hz, 1H), 7.22(t, J=7.8Hz, 1H), 7.01(dd, J=1.2, 8.4Hz, 1H), 6.86(d, J=4.8Hz, 1H), 6.61(m, 1H), 3.76(s, 3H), 2.30(s, 3H); ESI-MS m/z: 258.16([M+H⁺])。

[0124] 实施例13药理活性测试

[0125] 利用上述药理活性测试方法对上述实施例中的部分化合物进行新德里金属β-内酰胺酶NDM-1酶活体系筛选。

[0126] 向96微孔板中的每孔中加入100μl的浓度为50nM的NDM-1蛋白缓冲液。然后向每孔中加入2μl的浓度为100mM的化合物溶液。振荡,室温孵育1分钟后,每孔加入50μl的600μM的底物进行反应。每隔8秒用光谱扫描多功能读数仪(Varioskan Flash, Thermo scientific)检测一次,共测20次。

[0127] 而且,检测体系设置阴阳对照,阴性对照体系中加入2μl 95%DMSO取代化合物,用于检测NDM-1的活性;阳性对照体系中加入2μl 100mM的D-Captopril(NDM-1已知抑制剂)取代化合物,进行阳性对照。

[0128] 绘制曲线,取阴性对照曲线斜率的最大处值为V₀,化合物曲线斜率的最大处值为V_i,则NDM-1的剩余活性分数=V_i/V₀。剩余活性越低,表示化合物对NDM-1的活性抑制越强。化合物的抑制率=1-剩余活性分数。表2示出上述实施例中的部分化合物的抑制率和IC₅₀值。

[0129] 表2实施例中化合物的活性测定结果

[0130]

编号	结构	抑制率(% , 1mM)	IC ₅₀ (μM)
1	实施例1	14.70	
2	实施例2	28.50	
3	实施例3	86.50	48.6

4	实施例4	108.80	78.2
5	实施例5	46.70	
6	实施例6	77.00	
7	实施例8	16.90	
8	实施例10	70.65	
9	实施例11	94.98	
10	实施例12	11.00	

[0131] 如表2所示,本发明对实施例1~实施例12中的各个化合物进行了活性测试。通过初步高通量筛选,发现其中很多化合物对NDM-1具有一定的抑制作用,其中实施例3和实施例4中的化合物是优选化合物,根据活性测试方法中的步骤6对实施例3和实施例4中的化合物进行IC₅₀值测试,其IC₅₀值分别为48.6和78.2 μ M。

[0132] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

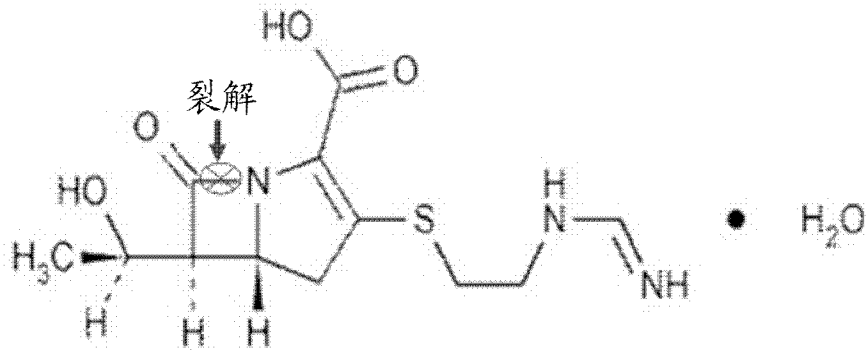


图1

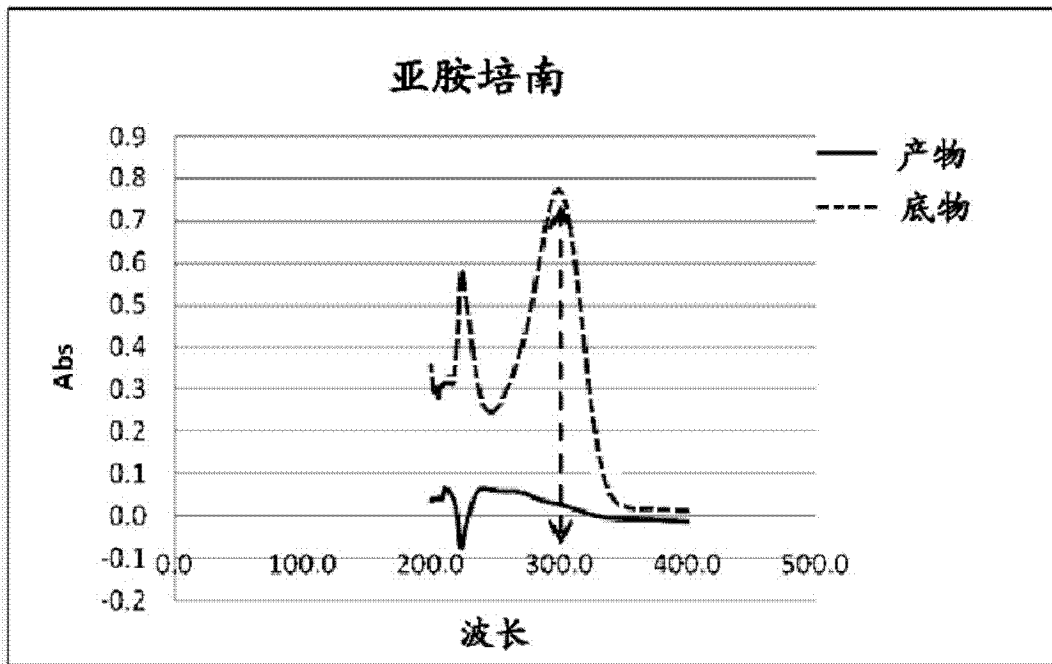


图2