(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
2016 年 3 月 17 日 (17.03.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/037573 A1

(51) 国际专利分类号:
C07C 237/28 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/089286

(22) 国际申请日: 2015 年 9 月 9 日 (09.09.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201410456500.6 2014 年 9 月 9 日 (09.09.2014) CN

(71) 申请人: **香港理工大学 (THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: **黄国贤 (WONG, Kwok-Yin)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **陈德恒 (CHAN, Tak-Hang)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **陈建辉 (CHAN, Kin-Fai)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **陈声 (CHEN, Sheng)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **吕学乔 (LUI, Hok-Kiu)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **鄞荣耀 (KAN, Jason Wing-Yiu)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **邱家琪 (CHIOU, Jia-Chi)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。 **叶康坚 (YAP, Hong-Kin)**; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。

(74) 代理人: **深圳市瑞方达知识产权事务所（普通合伙） (SHENZHEN REFINED INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE (GENERAL PARTNERSHIP))**; 中国广东省深圳市南山区科兴路 11 号深南花园裙楼 B 区 208 室, Guangdong 518057 (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

[见续页]

(54) Title: 3-AMINO BENZAMIDE DERIVATIVE SERVING AS B-LACTAM AUXILIARY ANTIBIOTIC, PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称 : 作为β-内酰胺辅助抗生素的3-氨基苯甲酰胺衍生物、制备方法及应用

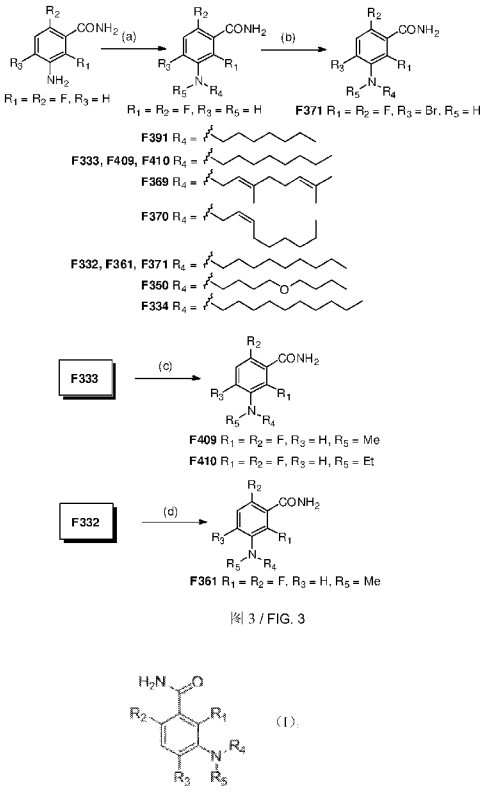


图 3 / FIG. 3

(I)

(57) **Abstract**: A 3-amino benzamide derivative serving as a β-lactam auxiliary antibiotic, preparation method and use thereof; and the derivative is a compound of chemical formula (I), and can serve as a β-lactam auxiliary antibiotic to treat methicillin-resistant staphylococcal infections.

(57) **摘要**: 一种作为β-内酰胺辅助抗生素的3-氨基苯甲酰胺衍生物、制备方法及应用，衍生物为化学式（I）的化合物。该衍生物能作为β-内酰胺辅助抗生素，用于治疗耐甲氧西林葡萄球菌感染。

WO 2016/037573 A1

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

作为β-内酰胺辅助抗生素的3-氨基苯甲酰胺衍生物、制备方法及应用

技术领域

本发明属于医药技术领域，涉及一种 3-氨基苯甲酰胺衍生物、制备方法及在制备 β-内酰胺辅助抗生素中的应用，该衍生物可以用于治疗耐甲氧西林葡萄球菌感染。

背景技术

金黄葡萄球菌是世界发达国家最普遍的细菌性病原体。这类病原体导致的严重的细菌感染，尤其是多药耐药金黄葡萄球菌（MRSA）已经在世界上造成大量病人死亡。目前，金黄葡萄球菌中有超过三分之二的菌种对甲氧西林（即第二代 β-内酰胺抗生素）具有耐药性。令人担忧的是，近来已经出现了对治疗 MRSA 的终极药物盐酸万古霉素（vancomycin ）具有耐药性的临床菌株。2005 年，在美国约有 95,000 人感染 MRSA，其中接近 19,000 死亡。在香港，MRSA 也成为最重要的一种病原体，尤其是社区感染的多药耐药金黄葡萄球菌（CA-MRSA）。所通报的 CA-MRSA 感染病例从 2007 年 的 82 例到 2013 年的 988 例一直在迅速飙升，七年内大约增加了 12 倍。在这些通报的各类传染病例中，CA-MRSA 是香港最严重的四种传染病之一。更为重要的是，根据香港特别行政区卫生署卫生防护中心 2007 年发布的报告称，两名病人因感染 CA-MRSA 死亡。鉴于 MRSA 的出现和临床上用以治疗的抗生素种类有限，迫切需要开发新药品治疗 MRSA 感染。

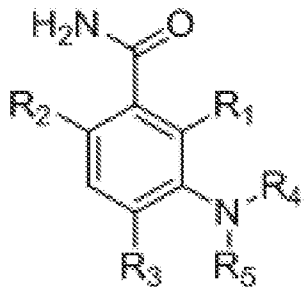
发明内容

本发明要解决的技术问题在于，针对现有技术中缺少高效治疗 MRSA 感染药物的缺陷，提供一种用于作为 β-内酰胺辅助抗生素的 3-氨基苯甲酰胺衍生物。

本发明进一步要解决的问题就是提供一种工艺简单、高效的 3-氨基苯甲酰胺衍生物的制备方法。

本发明另外要解决的问题就是提供一种上述衍生物在制备一种 β -内酰胺辅助抗生素中的应用。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种作为 β-内酰胺辅助抗生素的 3-氨基苯甲酰胺衍生物，为具以下化学式(I)的化合物:



(I)，

其中，R_1、R_2 和 R_3 各自分别为氢、氟或溴；

R4 与 R5 不同时，R_4 为氢、甲基、乙基或氟代苄基，R_5 为 C_4-C_{10} 的烷基、烷氧基烷基、C_4-C_{10} 的烯基、氟代苄基、烷氧基取代的苄基或酰基；

R_4 和 R_5 相同时， R_4 和 R_5 都为 CH_2-$(CH_2)_n$-CH_2，n=2 或 3。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1、R_2、R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为辛基。所述衍生物为 3-(辛基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1、R_2、R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为壬基。所述衍生物为 3-(壬基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1、R_2 和 R_3 各自分别为氢，R_4 为甲基，R_5 为辛基。所述衍生物为 3-(甲基(辛基)氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1、R_2 和 R_3 各自分别为氢，R_4 为甲基，R_5 为壬基。所述衍生物为 3-(甲基(壬基)氨基)苯甲酰胺。

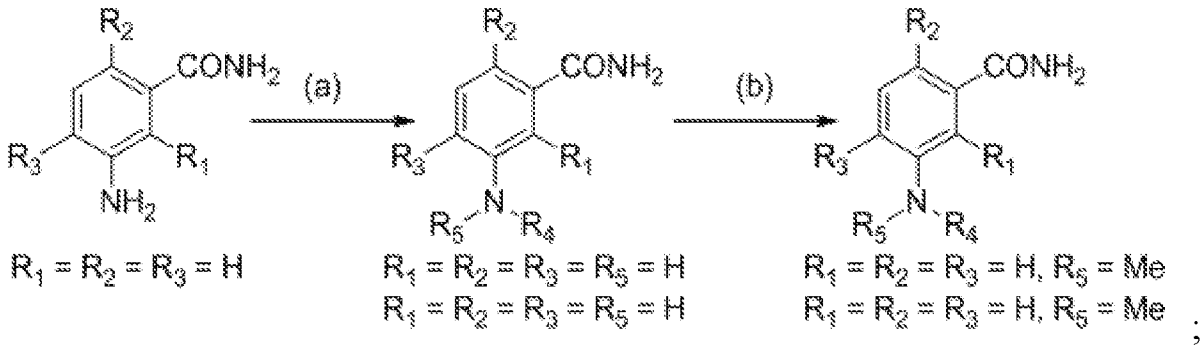
所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 和 R_3 各自分别为氢，R_2 为 F，R_4 为氢，R_5 为壬基。所述衍生物为 2-氟-5-(壬基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 和 R_3 各自分别为氢，R_2 和 R_4 各自为 F，R_5 为壬基。所述衍生物为 2,4-二氟-5-(壬基氨基)苯甲酰胺。

第一种制备方法的技术方案：上述衍生物的制备方法，包括以下步骤：

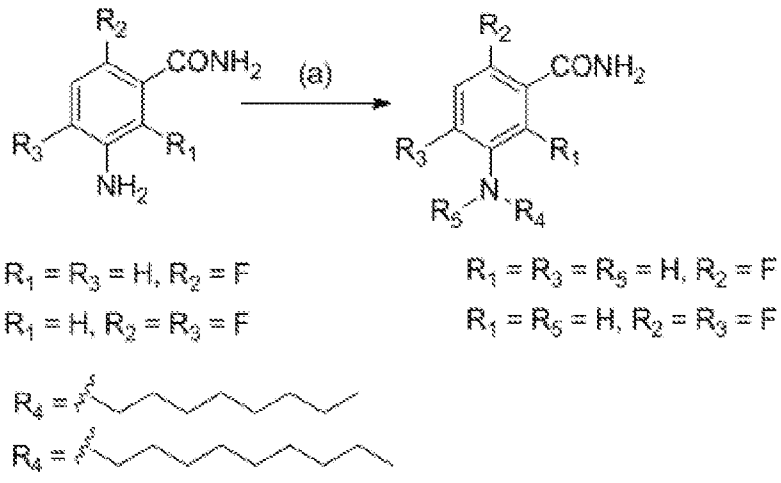
（a）将原料 A 与原料 B、碳酸钾和乙腈均匀搅拌形成反应混合液，加热回流反应 4 小时，再精制后得到产物；原料 A 为 3-氨基苯甲酰胺、2-氟-5-氨基苯甲酰胺或 2,4-二氟-5-氨基苯甲酰胺；原料 B 为溴代壬烷或溴代辛烷；

（b）在步骤（a）得到的产物为 3-(壬基氨基)苯甲酰胺或 3-(辛基氨基)苯甲酰胺时，再将其分别与硫酸二甲酯、碳酸钾、和乙腈均匀搅拌，并加热回流 12 小时，再精制后得到产物。上述制备方法如下所示：



;

或



所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为辛基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(辛基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为壬基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为庚基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(庚基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3,7-二甲基-2,6-辛二烯基。所述衍生物为(E)-3-((3,7-二甲基-2,6-辛二烯)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 2-壬烯基。所述衍生物为(Z)-2,6-二氟-3-(2-壬烯基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为(4’-丁氧基)丁基。所述衍生物为 3-((4’-丁氧基)丁基氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为癸基。所述衍生物为 3-(癸氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F，R_3 为溴，R_4 为氢，R_5 为壬基。所述衍生物为 4-溴-2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F，R_3 为氢，R_4 为甲基，R_5 为辛基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(甲基(辛基)氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F，R_3 为氢，R_4 为乙烷基，R_5 为辛基。所述衍生物为 3-(乙烷基(辛基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F，R_3 为氢，R_4 为甲基，R_5 为壬基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(甲基(壬基)氨基)苯甲酰胺。

第二种制备方法的技术方案：上述衍生物的制备方法，包括以下步骤：

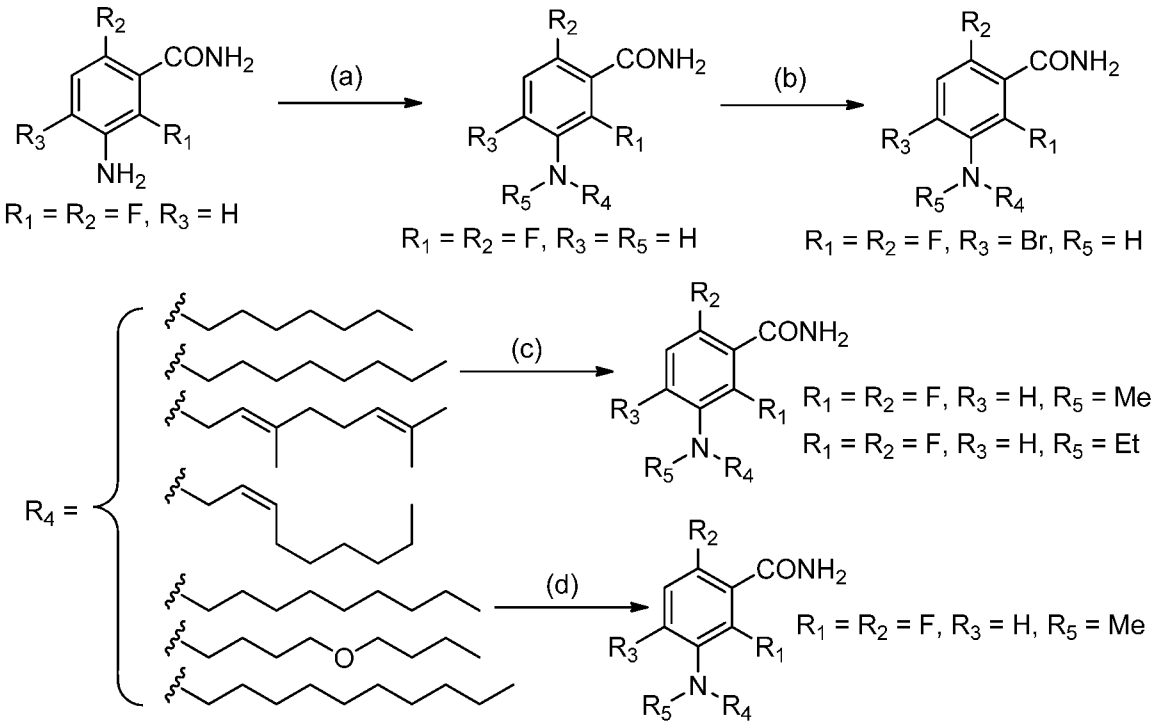
(a)将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与溴代烷烃、碳酸钾及乙腈均匀搅拌

形成反应混合液，并加热回流 4 小时，再精制后得到产物；所述溴代烷烃为溴代壬烷、溴代辛烷、溴代癸烷、溴化香叶醇、(Z)-1-溴-2-壬烯或溴代庚烷；

(b)将步骤(a)反应得到的 2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺进行溴化处理并在室温下搅拌 12 小时，精制得到 4-溴-2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺；

(c)使用碘甲烷或溴乙烷对从步骤(a)得到的 2,6-二氟-3-(辛基氨基)苯甲酰胺，进一步烷基化处理，并与碳酸钾和乙腈均匀搅拌回流 14 小时，精制得到 2,6-二氟-3-(甲基(辛基)氨基)苯甲酰胺或 3-(乙烷基(辛基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺；

(d)使用硫酸二甲酯对从步骤(a)得到的 2,6-二氟-3-(壬基胺基)苯甲酰胺进行烷基化处理，并与碳酸钾和乙腈均匀搅拌回流 12 小时，精制得到 2,6-二氟-3-(甲基(壬基)氨基)苯甲酰胺。上述制备方法如下所示：



所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为壬酰胺基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-壬酰胺基苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为吡咯烷。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(吡咯烷-1-氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为哌啶。所述衍生物为 2,6-二氟-3-(哌啶-1-氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3’,4’-二氟苄基。所述衍生物为 3-(3’,4’-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 为氢，R_4 为 3’,4’-二氟苄基，R_5 为 3’,4’-二氟苄基。所述衍生物为 3-(双(3’,4’-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 2’,4’-二氟苄基。所述衍生物为 3-(2’,4’-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 为氢，R_4、R_5 各自分别为 2’,4’-二氟苄基。所述衍生物为 3-(双(2’,4’-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 2’,6’-二氟苄基。所述衍生物为 3-(2’,6’-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 为氢，R_4、R_5 各自分别为 2’,6’-二氟苄基。所述衍生物为 3-(双(2’,6’-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

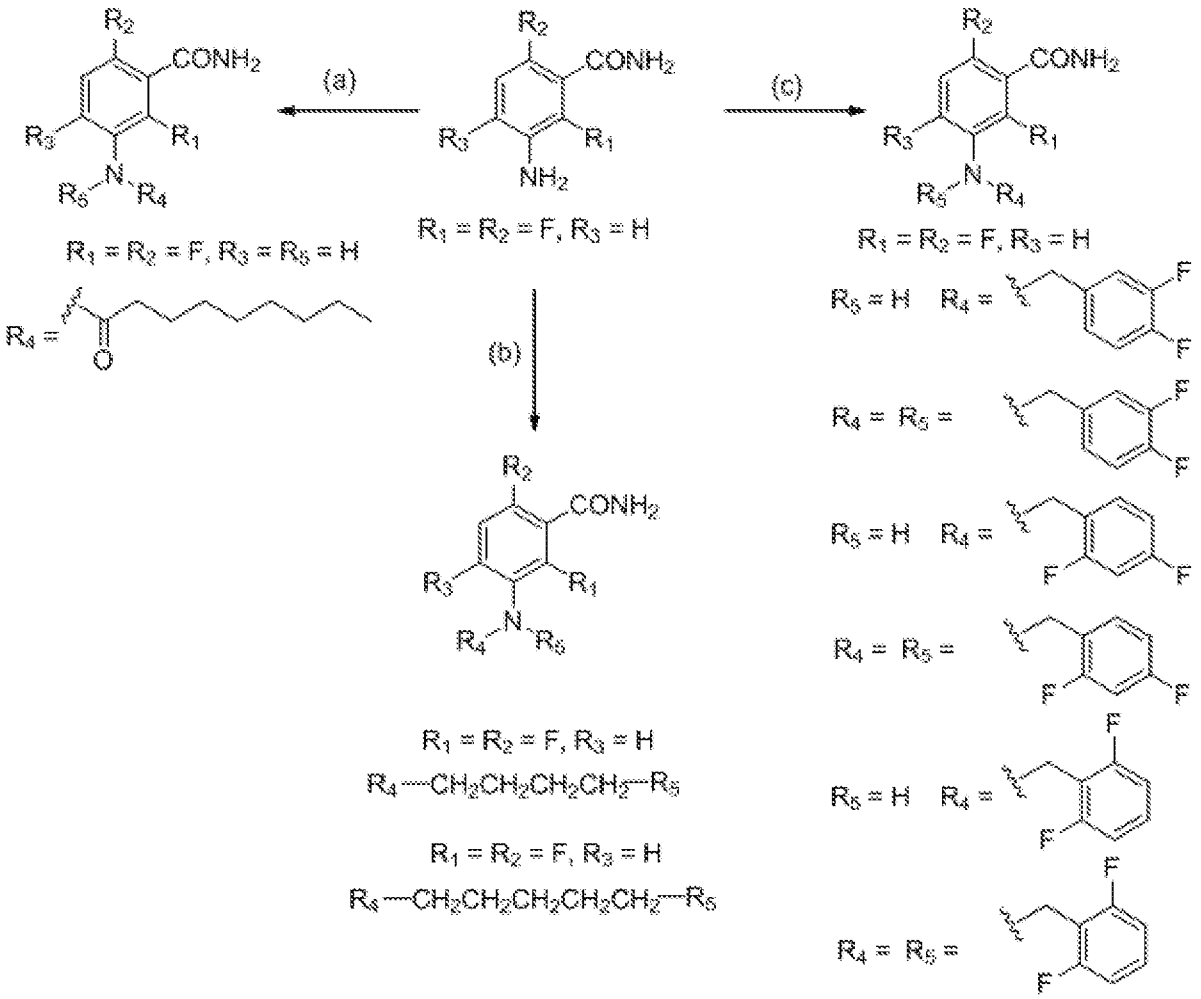
第三种制备方法的技术方案：上述衍生物的制备方法，包括以下步骤：

(a) 将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺和壬酰氯在 0°C 下溶入吡啶和二氯甲烷反应 4 小时，精制得到 2,6-二氟-3-壬基氨基苯甲酰胺；

(b)将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与 1,4-二溴丁烷或 1,5-二溴代戊烷分别加入碳酸钾在乙腈中均匀搅拌 4 小时反应，精制分别得到 2,6-二氟-3-(吡咯

烷-1-氨基)苯甲酰胺和 2,6-二氟-3-(哌啶-1-氨基)苯甲酰胺；

(c)将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与原料 C 以及碳酸钾，在乙腈中加热回流 4 小时，精制分别得到 3-(3',4'-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺或 3-(双(3',4'-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺、3-(2',4'-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺或 3-(双(2',4'-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺、以及 3-(2',6'-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺或 3-(双(2',6'-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺；原料 C 为 3,4-二氟溴苄、2,4-二氟溴苄或 2,6-二氟溴苄。上述制备方法如下所示：



所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3'-丁氧基苄基。所述衍生物为 3-((3'-丁氧基苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别

为氢，R_5 为 3'-(仲丁氧基)苄基。所述衍生物为 3-((3'-(仲丁氧基)苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺。

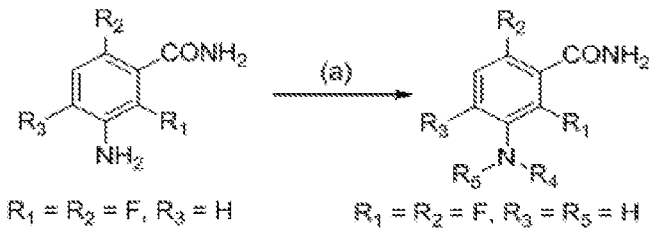
所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3'-(戊氧基)苄基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-((3'-(戊氧基)苄基)氨基)苯甲酰胺。

所述 3-氨基苯甲酰胺衍生物中，优选所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3'-((4"-(三氟甲基)苄基)氧)苄基。所述衍生物为 2,6-二氟-3-((3'-((4"-(三氟甲基)苄基)氧)苄基)氨基)苯甲酰胺。

第四种制备方法的技术方案：上述衍生物的制备方法，包括以下步骤：

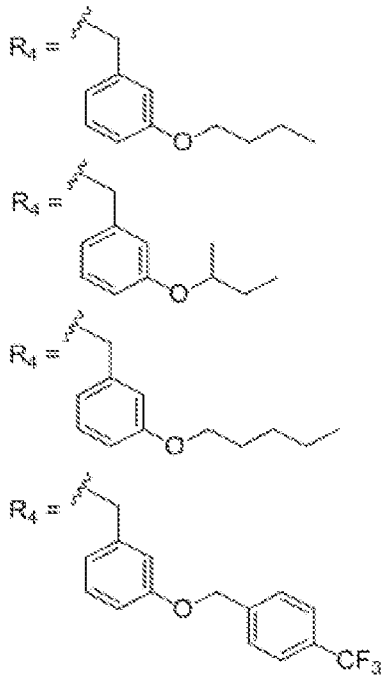
(a) 将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺分别与相应的苯甲醛以及催化剂对甲苯磺酸(*p*TsOH)和甲醇进行还原胺化，在室温下混合液搅拌 2 小时；

(b) 然后分部分加入氰基硼氢化钠，再混合搅拌 12 小时，反应精制分别得到上述的衍生物；所述苯甲醛为 3-丁氧基苯甲醛、3-(戊氧基)苯甲醛、3-(仲丁氧基)苯甲醛或 3-((4'-(三氟甲基)苄基)氧)苯甲醛。上述制备方法如下所示：



$R_1 = R_2 = F$, $R_3 = H$

$R_1 = R_2 = F$, $R_3 = R_5 = H$



本发明另外公开的技术方案为：上述衍生物在制备一种β-内酰胺辅助抗生素中的应用。

所述衍生物的用量与人体体重的比例为 50 毫克/千克体重，衍生物在口服后的生物兼容性为 12%。

近来，细菌细胞分裂机制在学术界和医疗产业引起了极大关注，旨在探寻新型抗菌药物的药物靶标。在目前这些已知选项中，长丝的温度敏感突变体 Z（FtsZ）是最有希望和最具特色的一种。 FtsZ 是一种鸟苷三磷酸酶（guanosine triphosphatase），在多种细菌中具有高度保守性。为使细菌进行细胞分裂， FtsZ 单体首先定位于细胞中部，以鸟苷三磷酸酶(GTP)的独立方式与直线单链原纤维头尾相连进行聚合。单链 FtsZ 原纤维之间的侧部接触首先形成 FtsZ 束，最终形成 Z 环。随后引入其它下行蛋白质形成细胞膜和细胞壁，从而完成细胞分裂过程。正因为 FtsZ 在细菌细胞分裂过程中发挥了如此重要的作用，它在开发新型抗菌药物中被认为是一种备受关注的药物靶标。 几种高清晰度的 X 光晶体机构分解为若干 FtsZ 同系物，呈现出一种如图 1a 所示的重要的稳定组织，该组织由两个独立的可折叠域组成。N-终端域形成三磷酸鸟苷结合位点（GTP binding site），C-终端域包括弹性环（T7 环）。两域通过一条长的中心螺旋线 7（H7）相互连接。据已有报告称，多种 FtsZ 互动化合物与三磷酸鸟苷结合位点或 T7 环绑定连接，一些化合物具有强大的抗菌活性，在微摩尔级水平上达到最低抑菌浓度（MIC）。

本发明公开一种衍生自 3-氨基苯甲酰胺（3-aminobenzamide）（图 1b，式 4）的新型化合物（I），该化合物在抗菌敏感性试验中对金黄葡萄球菌具有最低的最小抑菌浓度（MIC），在细胞毒性测试中对小鼠成纤维细胞具有低毒性。并且本发明进一步对这两种具有强大的抗菌活性的衍生物进行生物测定，例如

光散射检测、GTPase 活性分析、细胞形态学分析、显微镜下荧光分析。所有结果均清楚表明这两种衍生物与细胞分裂蛋白 FtsZ 有相互作用。本发明也证明该类衍生物与临床应用的 β-内酰胺抗生素合成后表现出对临床分离而社区感染的金黄葡萄球菌（USA300）和其它 MRSA 菌株具有高度的合成抗菌活性。在药代动力学研究结果中，F332 的口服用量为 50 毫克/千克体重，口服的生物兼容性约为 12%，从而支持其用于 β-内酰胺辅助抗生素制备上，通过口服途径治疗耐甲氧西林葡萄球菌感染药物上，即在临床上，本发明化合物可用作 β-内酰胺辅助抗生素通过口服途径治疗耐甲氧西林葡萄球菌感染。

附图说明

下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明，附图中：

图 1a 是金黄葡萄球菌 FtsZ 的晶体结构；

图 1b 是 PC190723 的化学结构式、其衍生物（式 1，2，3）以及 3-氨基苯甲酰胺（式 4）的基本结构；

图 2 是本发明实施例公开的第一种制备方法；

图 3 是本发明实施例公开的第二种制备方法；

图 4 是本发明实施例公开的第三种制备方法；

图 5 是本发明实施例公开的第四种制备方法；

图 6 是本发明实施例枯草杆菌 168 细胞在二甲亚砜溶液中生长 4 小时电镜图；

图 7 是枯草杆菌 168 细胞在 1.56 μM F332 溶液中生长 4 小时电镜图；

图 8 是枯草杆菌 168 细胞在 0.78 μM F361 溶液中生长 4 小时电镜图；

图 9 是金黄葡萄球菌 FtsZ (轨迹 4-8)的 SDS-page 凝胶图；

图 10 a 是枯草杆菌 FtsZ-eGFP 融合蛋白的表达质粒结构图；

图 10 b 是枯草杆菌 168 经 FtsZ-eGFP 融合蛋白的表达质粒转化后并在没有任何本发明的衍生物影响的情况下培养 4 小时后荧光显微镜图；

图 10 c 是相差显微镜图；

图 10 d 是枯草杆菌 168 经 FtsZ-eGFP 融合蛋白的表达质粒转化后并在 3μM F332 下培养 4 小时后荧光显微镜图，图 10 e 是相差显微镜图。

图 11 是 F332 在金黄葡萄球菌 FtsZ (5 μM)中对 FtsZ 聚合的影响趋势图；

图 12 是 F361 在金黄葡萄球菌 FtsZ (5 μM)中对 FtsZ 聚合的影响趋势图。

图 13 是 F332 对金黄葡萄球菌 FtsZ 的 GTPase 活性的影响。

图 14 是 F361 对金黄葡萄球菌 FtsZ 的 GTPase 活性的影响。

图 15 是 FtsZ 聚合物的电子显微图。

图 16 是 FtsZ 聚合物的电子显微图。

图 17 是 F332 的药代动力学参数。

具体实施方式

为了对本发明的技术特征、目的和效果有更加清楚的理解，现对照附图详细说明本发明的具体实施方式。

本发明根据不同的原料和产物将 3-氨基苯甲酰胺衍生物的制备分为四种情况，分别列出如下四种制备方法：

第一种制备方法：合成化合物 F411，F412，F413，F414，F342 及 F345（见附图 2 对应标号的化合物），这些化合物对应以下实施例 1-6。其合成步骤如图 2 所示。

利用市场上可买到的 3-氨基苯甲酰胺与溴代壬烷（1-bromooctane）或溴代

辛烷（1-bromooctane）在乙腈（ACN）中混合，满足回流温度的基本条件可以分别合成 F411 和 F412。

通过使用硫酸二甲酯（dimethyl sulphate ）并满足基本条件，这两种化合物被进一步烷基化为三级胺（tertiary amine），从而产生 F413 和 F414。

同样，利用市售成品 2-氟-5-氨基苯甲酰胺(2-fluoro-5-aminobenzamide)或 2,4- 二氟-5-氨基苯甲酰胺（2,4-difluoro-5-aminobenzamide）与溴代壬烷在乙腈中混合，满足回流温度的基本条件可以分别合成 F342 和 F345。

实验程序如图 2 所示，具体包括以下步骤：

（a）将原料 A 与原料 B、碳酸钾和乙腈均匀搅拌形成反应混合液，加热回流反应 4 小时得到产物；原料 A 为 3-氨基苯甲酰胺、2-氟-5-氨基苯甲酰胺或 2,4-二氟-5-氨基苯甲酰胺；原料 B 为溴代壬烷或溴代辛烷；

（b）在步骤（a）得到的产物为 3-(壬基氨基)苯甲酰胺或 3-(辛基氨基)苯甲酰胺时，再将其分别与硫酸二甲酯、碳酸钾、和乙腈均匀搅拌，并加热回流 12 小时，得到产物。

实施例 1：3-(壬基氨基)苯甲酰胺(F411)

将 3-氨基苯甲酰胺(0.20 g, 1.4 mmol)和溴代壬烷(0.32 g, 1.5 mmol)溶液在乙腈（20 mL）中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.23 g, 1.6 mmol)中。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，该反应混合液将通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.15 g)的产率为 39%：1H NMR（400 MHz，氯仿-d） (t, J = 7.83 Hz, 1H), 7.11 (t, J = 1.96 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 7.34 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 2.20, 7.58 Hz, 1H), 6.15 (br. s., 1H), 5.99 (br. s., 1H), 3.15 (t, J = 7.09 Hz, 2H), 1.63 (quin, J = 7.21 Hz, 2H), 1.25 - 1.45 (m, 12H), 0.84 - 0.95 (m, 3H); ^{13}C NMR

(101 MHz, 氯仿-d) 170.2, 148.8, 134.4, 129.3, 116.1, 115.3, 111.6, 43.9, 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 27.1, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 263 (M^+ + H, 100), 285 (M^+ + Na, 8); HRMS (ESI) $C_{16}H_{27}N_2O$ (M^+ + H) 计算值 263.2123，实验值 263.2112。

实施例 2：3-(辛基氨基)苯甲酰胺(F412)

将 3-氨基苯甲酰胺(0.20 g, 1.4 mmol)和溴代辛烷(0.29 g, 1.5 mmol)溶液在乙腈（20 mL）中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3 (0.23 g, 1.6 mmol)中。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，该反应混合液将通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.18 g)的产率为 47%： 1H NMR （400 MHz，氯仿-d） 7.23 (t, *J* = 7.83 Hz, 1H), 7.07 - 7.18 (m, 1H), 6.97 - 7.07 (m, 1H), 6.75 (dd, *J* = 2.20, 7.58 Hz, 1H), 6.15 (br. s., 1H), 5.98 (br. s., 1H), 3.15 (t, *J* = 7.09 Hz, 2H), 1.64 (quin, *J* = 7.21 Hz, 2H), 1.22 - 1.47 (m, 10H), 0.91 (t, *J* = 6.85 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 170.1, 148.8, 134.4, 129.3, 116.1, 115.3, 111.6, 43.9, 31.8, 29.4, 29.4, 29.3, 27.1, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 249 (M^+ + H, 100), 271 (M^+ + Na, 10); HRMS (ESI) $C_{15}H_{25}N_2O$ (M^+ + H) 计算值 249.1967，实验值 249.1957。

实施例 3：3-(甲基(壬基)氨基)苯甲酰胺(F413)

将 3-(壬基氨基)苯甲酰胺(0.09 g, 0.3 mmol)和硫酸二甲酯(dimethyl sulphate) (0.06 g, 0.5 mmol)溶液在乙腈(10 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.06 g, 0.4 mmol)中。将该反应混合液加热回流 12 小时，在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，用乙酸乙酯(ethyl acetate) (20 mL)对该反应混合液进行稀释，

使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.04 g)的产率为 42%： 1H NMR （400 MHz，氯仿-d） 7.23 - 7.32 (m, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.34 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.45, 8.31 Hz, 1H), 6.15 (br. s., 1H), 5.95 (br. s., 1H), 3.30 - 3.41 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 1.53 - 1.64 (m, 2H), 1.22 - 1.37 (m, 12H), 0.83 - 0.95 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 170.5, 149.5, 134.3, 129.2, 115.3, 113.8, 111.1, 52.7, 38.4, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 27.1, 26.7, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 277 (M^+ + H, 100), 299 (M^+ + Na, 7); HRMS (ESI) $C_{17}H_{29}N_2O$ (M^+ + H) 计算值 277.2280，实验值 277.2271。

实施例 4：3-(甲基(辛基)氨基)苯甲酰胺(F414)

将 3-(辛基氨基)苯甲酰胺 (0.08g, 0.3mmol)和硫酸二甲酯(dimethyl sulfate)(0.05g, 0.4 mmol)溶液在乙腈(10mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.06g, 0.4 mmol)中。将该反应混合液加热回流 12 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，用乙酸乙酯(ethyl acetate) (20 mL)对该反应混合液进行稀释，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.04 g)的产率为 47%：1H NMR （400 MHz，氯仿-d） 7.23 - 7.32 (m, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.82 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.45, 8.31 Hz, 1H), 6.14 (br. s., 1H), 5.97 (br. s., 1H), 3.29 - 3.41 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 1.52 - 1.66 (m, 2H), 1.23 - 1.39 (m, 10H), 0.85 - 0.96 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 170.5, 149.5, 134.3, 129.2, 115.3, 113.8, 111.1, 52.7, 38.4, 31.8, 29.5, 29.3, 27.2, 26.7, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 263 (M^+ + H, 100), 285 (M^+ + Na, 10); HRMS (ESI) $C_{16}H_{27}N_2O$ (M^+ + H) 计算值 263.2123，实验值 263.2113。

实施例 5：2-氟-5-(壬基氨基)苯甲酰胺(F342)

将 2-氟-5-氨基苯甲酰胺[2-fluoro-5-aminobenzamide](0.20 g, 1.3 mmol)和溴代壬烷(0.30 g, 1.4 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3 (0.25 g, 1.8 mmol)中。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.11 g)的产率为 30%：1H NMR （400 MHz，氯仿-d） 7.23 - 7.34 (m, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.80 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.62 - 6.71 (m, 1H), 6.28 (br. s., 1H), 3.70 (br. s., 1H), 3.11 (t, *J* = 7.09 Hz, 2H), 1.61 (quin, *J* = 7.09 Hz, 2H), 1.22 - 1.44 (m, 12H), 0.89 (t, *J* = 6.60 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 165.6, 154.8, 152.5, 145.4, 145.4, 120.2, 120.0, 117.5, 117.4, 116.7, 116.4, 114.3, 44.4, 31.9, 29.5, 29.4, 29.3, 27.1, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 281 (M^+ + H, 100), 303 (M^+ + Na, 50); HRMS (ESI) $C_{16}H_{26}N_2OF$ (M^+ + H) 计算值 281.2029，实验值 281.2033。

实施例 6：2,4-二氟-5-(壬基氨基)苯甲酰胺(F345)：

将 2,4-二氟-5-氨基苯甲酰胺(2,4-difluoro-5-aminobenzamide) (0.20 g, 1.1 mmol)和溴代壬烷(0.28 g, 1.4 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.23 g, 1.7 mmol)中。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原材料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。将得到的滤液在对比压力下进行蒸发脱水，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.09 g)的产出率为 26%： 1H NMR （400 MHz，氯仿-d） 7.54 - 7.34 (m, 1H), 6.75 - 6.92 (m, 1H), 6.60 - 6.75 (m, 1H), 6.23 (br. s., 1H), 3.79 (br. s., 1H), 3.45 - 3.09 (m, 2H), 1.56 - 1.71 (m, 2H), 1.19 - 1.44 (m, 14H), 0.80 - 0.96 (m, 3H); LRMS

(ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 85); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 164.9, 162.7, 154.1, 153.5, 151.5, 151.1, 134.3, 134.1, 131.7, 131.6, 118.6, 115.9, 113.4, 113.3, 104.0, 103.9, 103.6, 103.6, 103.3, 77.4, 77.2, 77.1, 76.7, 43.8, 40.1, 31.9, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 27.0, 27.0, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 85); HRMS (ESI) $C_{16}H_{25}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 299.1935，实验值 299.1939。

第二种制备方法：合成化合物 F332, F333, F334, F350, F361, F369, F370, F371, F391, F409 和 F410（见附图 3 对应标号的化合物），具体如下实施例 7-18：

图 3 示出本发明化合物 F332, F333, F334, F350, F361, F369, F370, F371, F391, F409 和 F410 的合成流程。

2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-Difluoro-3-aminobenzamide)的大规模合成是利用市场上可买到的 2,6-二氟-3- 硝基苯甲酸（2,6-difluoro-3-nitrobenzonic acid），分为两个步骤进行。

首先，将 2,6-二氟-3-硝基苯甲酸和氯化亚砜(thionyl chloride)溶入氨水溶液产生 2,6-二氟-3-硝基苯甲酰胺（2,6-difluoro-3-nitrobenzamide），随后通过使用氯化亚锡（tin (II) chloride）溶入浓盐酸进一步转化为 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺（2,6-difluoro-3-aminobenzamide）。

然后将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与各种烷基卤化物混合, 例如溴代壬烷, 溴代辛烷，溴代癸烷, 1-溴-4-丁氧基丁烷（1-bromo-4-butoxybutane），溴化香叶酯（geranyl bromide）, (Z)-1-溴-2-壬烯[*trans*-1-bromonon-2-ene]，溴代庚烷（1-bromoheptane），满足基本条件在乙腈（ACN）中混合 4 小时，分别合成 F332, F333, F334, F350, F369, F370, F391。

对 F332 进行溴化处理产生 F371。

使用硫酸二甲酯(dimethyl sulphate)或溴乙烷(bromoethane)对 F332 和 F333 进行进一步烷化处理产生 F409, F410 和 F361。

具体实验程序如图 3 所示：(a) 各种溴代烷烃, 碳酸钾, 乙腈, 回流, 4 小时; (b) Br_2, DCM, 室温, 12 小时; (c) 碘甲烷（methyl iodide）或溴乙烷(bromoethane), 碳酸钾, 乙腈，回流，14 小时; (d) 硫酸二甲酯, 碳酸钾, 乙腈，回流，12 小时。

实施例 7：2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺

将 2,6-二氟-3- 硝基苯甲酸(44 g, 216 mmol)和氯化亚砜(thionyl chloride ，100 mL)加热回流 2 小时。通过蒸发除去多余的氯化亚砜，产生 2,6-二氟-3- 硝基苯甲酰氯（2,6-difluoro-3-nitrobenzonic acid chloride），在下一步骤的使用中无需进一步提纯。将 2,6-二氟-3-硝基苯甲苯甲酰氯物逐滴滴入搅拌均匀的 30% 氨水溶液 (300 mL) ，温度为 0°C 。之后，将形成的沉淀物进行过滤和收集，得到 2,6-二氟-3-硝基苯甲酰胺 (40 g, 91%),在下一步骤的使用中无需进一步提纯。将均匀搅拌的氯化亚锡(80 g, 421 mmol)在 0°C 溶入浓盐酸 (200 mL) ，分部分加入 2,6-二氟-3-硝基苯甲酰胺。随后，将反应混合液在室温下搅拌 12 小时。通过向反应混合液中加入多余的氢氧化钾溶液(potassium hydroxide solution)使化学反应淬灭，直至在 0°C 时 pH 值大于 12。用乙酸乙酯(200 mL x 4)萃取水溶液。用无水硫酸镁（$MgSO_4$）将混合有机层进行干燥、过滤並蒸除溶剂，产生 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(18 g, 53%): ^{1}H NMR (400 MHz, 丙酮) 7.36 (br. s., 1H), 7.14 (br. s., 1H), 6.87 (dt, J = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 6.77 (t, J = 9.05 Hz, 1H), 4.67 (br. s., 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, 丙酮) 162.3, 151.7, 151.7,

149.3, 148.2, 148.1, 145.8, 145.7, 133.0, 132.9, 132.8, 132.8, 116.4, 116.4, 116.3, 116.3, 115.5, 115.3, 115.3, 115.1, 111.0, 110.9, 110.7, 110.7。

实施例 8：2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺(F332)

将2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(0.74 g, 4.3 mmol)和溴代壬烷(1.20 g, 5.8 mmol)溶液在乙腈(50 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3 (1.20 g, 8.7 mmol)和碘化钠 NaI (0.08 g，催化量)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.49 g)的产率为 38%： 1H NMR (400 MHz，氯仿-d) 6.77 - 6.94 (m, 1H), 6.69 (dt, *J* = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 6.12 (br. s., 1H), 6.05 (br. s., 1H), 3.82 (br. s., 1H), 3.12 (t, *J* = 7.09 Hz, 2H), 1.58 - 1.73 (m, 2H), 1.23 - 1.46 (m, 12H), 0.90 (t, *J* = 6.85 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 162.8, 151.9, 149.5, 149.2, 146.8, 134.2, 134.1, 113.1, 113.0, 111.4, 111.4, 111.2, 111.2, 43.9, 31.9, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 27.0, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 97), 321 (M^+ + Na, 100); HRMS (ESI) $C_{16}H_{24}N_2OF_2Na$ (M^+ + Na) 计算值 321.1754，实验值 321.1756。

实施例 9：2,6-二氟-3-(辛基氨基)苯甲酰胺(F333)

将2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(0.40 g，2.3 mmol)和溴代辛烷(0.45 g, 2.3 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.40 g,2.9 mmol)和碘化钠 NaI (0.04 g，催化量)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.26 g)的产率为 39%：^{1}H NMR (400 MHz, 氯

仿-d) 6.83 (t, *J* = 9.29 Hz, 1H), 6.68 (dt, *J* = 5.38, 9.05 Hz, 1H), 6.36 (br. s., 1H), 6.09 (br. s., 1H), 3.81 (br. s., 1H), 3.06 - 3.17 (m, 2H), 1.59 - 1.69 (m, 2H), 1.23 - 1.43 (m, 10H), 0.90 (t, *J* = 6.60 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.0, 151.9, 149.5, 149.5, 149.2, 149.1, 146.7, 134.2, 134.2, 134.1, 134.1, 113.1, 113.1, 113.0, 113.0, 112.5, 111.4, 111.4, 111.2, 111.2, 43.9, 31.9, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 27.0, 22.6, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 285 (M^+ + H, 100), 307 (M^+ + Na, 20); HRMS (ESI) $C_{15}H_{23}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 285.1778，实验值 285.1773。

实施例 10：3-(癸氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F334)

将2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(0.40 g，2.3 mmol)和溴代癸烷(0.56 g，2.5 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.40 g，2.9 mmol)和碘化钠 NaI (0.04 g，催化量)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.27 g)的产率为 37%：^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.77 - 6.89 (m, 1H), 6.68 (dt, *J* = 5.14, 9.17 Hz, 1H), 6.29 (br. s., 1H), 6.10 (br. s., 1H), 3.75 - 3.89 (m, 1H), 3.12 (q, *J* = 6.52 Hz, 2H), 1.59 - 1.68 (m, 2H), 1.21 - 1.49 (m, 14H), 0.90 (t, *J* = 6.36 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.3, 162.9, 134.2, 134.1, 113.1, 113.0, 113.0, 112.9, 111.4, 111.4, 111.2, 111.1, 57.9, 43.9, 42.3, 31.9, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 27.7, 27.3, 27.0, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 313 (M^+ + H, 28), 335 (M^+ + Na, 95); HRMS (ESI) $C_{17}H_{26}N_2OF_2Na$ (M^+ + Na) 计算值 335.1911，实验值 335.1923。

实施例 11：3-((4'-丁氧基)丁基氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F350):

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(0.17g，1.0 mmol)和 1-溴-4-丁氧基丁烷（1-bromo-4-butoxybutane）(0.21g，1.0 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3（0.15g，1.1 mmol）。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.05 g)的产率为 17%: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.75 - 6.93 (m, 1H), 6.68 (dt, *J* = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 6.32 (br. s., 1H), 6.09 (br. s., 1H), 3.95 (br. s., 1H), 3.44 (td, *J* = 6.17, 12.59 Hz, 4H), 3.16 (br. s., 2H), 1.65 - 1.76 (m, 4H), 1.53 - 1.61 (m, 2H), 1.32 - 1.44 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.34 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.0, 151.9, 146.7, 134.1, 113.1, 113.0, 113.0, 112.9, 111.4, 111.4, 111.1, 70.8, 70.3, 43.7, 31.8, 27.2, 26.2, 19.4, 13.9; LRMS (ESI) *m/z* 301 (M^+ + H, 40); HRMS (ESI) $C_{15}H_{23}N_2O_2F_2$ (M^+ + H) 计算值 301.1728，实验值 301.1716。

实施例 12：2,6-二氟-3-(甲基(壬基)氨基)苯甲酰胺(F361):

将 2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-(nonylamino)benzamide) (0.15g，0.5 mmol)和硫酸二甲酯(0.15g，1.2 mmol)溶液在丙酮(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.15g，1.1 mmol)。将该反应混合液加热回流 14 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.03 g)的产率为 19%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.90 - 7.02 (m, 1H), 6.79 - 6.90 (m, 1H), 6.39 (br. s., 1H), 6.05 (br. s., 1H), 3.00 - 3.08 (m, 2H), 2.79 (s, 3H), 1.53 (br. s., 2H), 1.27 (br. s., 12H), 0.89 (t, *J* = 6.60 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.0, 154.9, 153.5, 152.4, 137.6, 121.2, 121.1, 116.9, 111.2, 111.2, 111.0, 55.6, 55.5, 40.0, 40.0,

31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 27.2, 27.0, 22.7, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 313 (M^+ + H, 100); HRMS (ESI) $C_{17}H_{27}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 313.2091，实验值 313.2083。

实施例 13：(E)-3-((3,7-二甲基-2,6-辛二烯)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F369)

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)(0.34g, 2.0 mmol)和溴化香叶醇（geranyl bromide）(0.42 g, 2.0 mmol）溶液在乙腈（20 mL）中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3（0.29g，2.1 mmol）。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物（0.29 g）的产率为 48%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.83 (dt, *J* = 1.47, 9.29 Hz, 1H), 6.68 (dt, *J* = 5.38, 9.05 Hz, 1H), 6.48 (br. s., 1H), 6.11 (br. s., 1H), 5.30 (t, *J* = 6.11 Hz, 1H), 5.03 - 5.13 (m, 1H), 3.83 (br. s., 1H), 3.72 (d, *J* = 6.85 Hz, 2H), 2.02 - 2.16 (m, 4H), 1.66 - 1.75 (m, 6H), 1.62 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.1, 152.1, 149.7, 146.8, 146.8, 139.9, 134.1, 133.9, 131.8, 123.8, 120.7, 113.4, 113.4, 113.3, 113.3, 111.4, 111.2, 111.1, 41.8, 39.5, 26.3, 25.7, 17.7, 16.4; LRMS (ESI) *m/z* 309 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 6); HRMS (ESI) $C_{17}H_{23}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 309.1778，实验值 309.1779。

实施例 14：(Z)-2,6-二氟-3-(2-壬烯基氨基)苯甲酰胺(F370)

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(0.17g，1.0 mmol)和(Z)-1-溴代壬烷-2-烯[(Z)-1-bromonon-2-ene] (0.21 g, 1.0 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3（0.15g，1.1 mmol）。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸

除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.13 g)的产率为 44%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.84 (dt, *J* = 1.47, 9.29 Hz, 1H), 6.70 (dt, *J* = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 6.28 (br. s., 1H), 6.08 (br. s., 1H), 5.52 - 5.61 (m, 1H), 5.32 - 5.43 (m, 1H), 3.88 (br. s., 1H), 3.09 - 3.18 (m, 2H), 2.40 (q, *J* = 6.85 Hz, 2H), 2.06 (q, *J* = 7.17 Hz, 2H), 1.24 - 1.41 (m, 6H), 0.90 (t, *J* = 6.85 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 162.9, 159.0, 152.0, 149.6, 149.2, 133.9, 133.4, 125.4, 113.3, 113.2, 113.2, 113.1, 111.4, 111.2, 111.2, 43.4, 31.5, 29.3, 27.3, 27.2, 27.0, 22.5, 14.0, 14.0; LRMS (ESI) *m/z* 297 (M^+ + H, 100), 319 (M^+ + Na, 35); HRMS (ESI) $C_{16}H_{23}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 297.1778，实验值 297.1768。

实施例 15：4-溴-2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺(F371)

将 2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-(nonylamino) benzamide)(0.3g，1.0 mmol)和二氯甲烷(dichloromethane）(20 mL)溶液中加入多余的液溴 (1 mL)，在室温下搅拌 12 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，将该反应混合液倒进装有饱和硫代硫酸钠溶液(sodium thiosulfate solution)(30 mL)的分液漏斗中，用乙酸乙酯(ethyl acetate)(20 mL x 3)萃取。用硫酸镁（$MgSO_4$）将混合有机层进行干燥、过滤并蒸除溶剂，对得到的粗制品进行快速柱层析，所得化合物（0.28 g）的产率为 74%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.11 (dd, *J* = 1.96, 8.80 Hz, 1H), 6.76 (br. s., 1H), 6.19 (br. s., 1H), 3.74 (br. s., 1H), 3.28 (t, *J* = 6.11 Hz, 2H), 1.52 - 1.61 (m, 2H), 1.24 - 1.38 (m, 12H), 0.83 - 0.92 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 162.4, 152.9, 152.8, 150.9, 150.9, 150.4, 150.3, 148.3, 133.0, 133.0, 132.9, 132.9, 115.8, 115.7, 115.5, 115.5, 114.9, 114.9, 114.8, 114.7, 113.9, 113.7, 113.5, 47.3, 47.2, 31.9, 31.6, 30.7, 29.5,

29.3, 29.2, 26.8, 22.7, 14.2, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 377 (M^+ + H, 96), 399 (M^+ + Na, 16); HRMS (ESI) $C_{16}H_{24}N_2OF_2Br$ (M^+ + H) 计算值 377.1040，实验值 377.1049。

实施例 16：2,6-二氟-3-(庚基氨基)苯甲酰胺(F391):

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(0.70g，4.1 mmol)和溴代庚烷(1-bromoheptane)(0.80 g, 4.4 mmol)溶液在乙腈(50 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3（0.60 g, 4.4 mmol）和 NaI (0.08 g，催化量)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物（0.40 g）的产率为 36%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.85 (dt, *J* = 1.96, 9.29 Hz, 1H), 6.69 (dt, *J* = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 6.14 (br. s., 1H), 6.05 (br. s., 1H), 3.12 (t, *J* = 7.09 Hz, 2H), 1.59 - 1.69 (m, 2H), 1.27 - 1.45 (m, 8H), 0.86 - 0.96 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 166.4, 154.2, 149.6, 145.8, 140.8, 134.2, 113.1, 111.5, 111.2, 105.2, 43.9, 31.8, 29.3, 29.1, 27.0, 22.6, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 271 (M^+ + H, 100), 293 (M^+ + Na, 60); HRMS (ESI) $C_{14}H_{21}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 271.1622，实验值 271.1612。

实施例 17：2,6-二氟-3-(甲基(辛基)氨基)苯甲酰胺(F409)

将 2,6-二氟-3-（辛基氨基）苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-(octylamino)benzamide) (0.12 g, 0.4 mmol)和碘甲烷(methyl iodide)(0.30 g, 2.1 mmol)溶液在乙腈（10 mL）中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3（0.30 g, 2.1 mmol）。将该反应混合液加热回流 14 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小

段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物（0.03 g）的产率为 24%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.95 (dt, J = 5.62, 9.17 Hz, 1H), 6.80 - 6.90 (m, 1H), 6.63 (br. s., 1H), 6.11 (br. s., 1H), 2.99 - 3.07 (m, 2H), 2.79 (s, 3H), 1.47 - 1.58 (m, 2H), 1.22 - 1.35 (m, 10H), 0.89 (t, J = 6.85 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.2, 154.9, 154.9, 153.6, 152.4, 151.0, 137.5, 121.2, 121.1, 121.1, 114.1, 113.9, 111.2, 111.2, 111.0, 111.0, 55.6, 55.5, 40.0, 31.8, 29.5, 29.3, 27.2, 27.0, 22.6, 14.1; LRMS (ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 26); HRMS (ESI) $C_{16}H_{25}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 299.1935，实验值 299.1928。

实施例 18：3-(乙烷基(辛基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F410):

将 2,6-二氟-3-（辛基氨基）苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-(octylamino)benzamide) (0.12 g, 0.4 mmol)和溴代乙烷(bromoethane)(0.30 g, 2.7 mmol)溶液在乙腈(10 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3（0.30 g, 2.1 mmol）。将该反应混合液加热回流 14 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.04 g)的产率为 30%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.95 (dd, J = 5.62, 9.05 Hz, 2H), 6.76 - 6.86 (m, 1H), 6.20 (br. s., 1H), 3.12 (q, J = 7.01 Hz, 2H), 3.03 (t, J = 7.58 Hz, 2H), 1.43 (br. s., 2H), 1.24 (br. s., 10H), 1.02 (t, J = 7.09 Hz, 3H), 0.86 (t, J = 6.60 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.4, 155.3, 154.7, 152.8, 152.8, 152.1, 135.5, 123.6, 123.5, 114.3, 114.1, 113.9, 111.1, 111.0, 110.8, 110.8, 52.3, 52.3, 47.2, 47.2, 31.8, 29.4, 29.2, 27.3, 27.1, 22.6, 14.0, 12.4; LRMS (ESI) *m/z* 313 (M^+ + H, 100), 335 (M^+ + Na, 16); HRMS (ESI) $C_{17}H_{27}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 313.2091，实验值 313.2097。

第三种制备方法：合成化合物 F357, F358, 以及 F362 到 F368（见附图 4 对应标号的化合物），具体如实施例 19-24：

图 4 示出本发明化合物 F357, F358, 以及 F362 至 F368 的化学合成途径。化合物 F368 是通过将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)和壬酰氯(nonanoyl chloride)在 0°C 下溶入吡啶(pyridine)和二氯甲烷(dichloromethane)4 小时，如图 4 所示。

F357 和 F358 通过 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)合成, 将 1,4-二溴代戊烷(1,5-bromopentane)、1,5-二溴丁烷(1,4-dibromobutane)分别加入碳酸钾在乙腈中均匀搅拌 4 小时。F362, F363, F364, F365, F366, F367 也由 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)合成, 分别通过与 3,4-二氟溴苄(3,4-difluorobenzyl bromide)、2,4-二氟溴苄(2,4-difluorobenzyl bromide)、2,6-二氟溴苄(2,6-difluorobenzyl bromide)一起加入碳酸钾，在乙腈中加热回流 4 小时。

具体实验程序如图 4 所示：(a) 壬酰氯(nonanoyl chloride)，Py/DCM, 0°C, 4 小时； (b) 1,5-二溴戊烷(1,5-dibromopentane)或 1,4-二溴丁烷(1,4-dibromobutane), 碳酸钾, 乙腈, 回流, 4 小时; (c) 各种二氟溴苄(difluorobenzyl bromides), 碳酸钾, 乙腈, 回流, 4 小时。

实施例 19：2,6-二氟-3-(吡咯烷-1-氨基)苯甲酰胺(F357)

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)(0.17 g, 1.0 mmol)和 1,4-二溴丁烷(1,4-dibromobutane)(0.23 g, 1.1 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.18 g, 1.3 mmol)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶

层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.11 g)的产率为 46%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.82 (t, *J* = 8.80 Hz, 1H), 6.69 (dt, *J* = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 6.13 (br. s., 1H), 5.99 (br. s., 1H), 3.30 - 3.41 (m, 4H), 1.97 (td, *J* = 3.48, 6.24 Hz, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.5, 156.9, 155.9, 152.4, 150.9, 138.2, 121.6, 116.5, 116.3, 111.3, 50.0, 50.0, 25.1; LRMS (ESI) *m/z* 227 (M^+ + H, 100), 249 (M^+ + Na, 57); HRMS (ESI) $C_{11}H_{13}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 227.0996，实验值 227.1005。

实施例 20：2,6-二氟-3-(哌啶-1-氨基)苯甲酰胺(F358)

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)(0.17 g, 1.0 mmol)和 1,5-二溴丁烷(1,5-dibromopentane)(0.25 g, 1.1 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3(0.18 g, 1.3 mmol)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。所得化合物(0.10 g)的产率为 38%:^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.00 (dt, *J* = 5.87, 9.05 Hz, 1H), 6.80 - 6.94 (m, 1H), 6.36 (br. s., 1H), 6.08 (br. s., 1H), 2.91 - 3.02 (m, 4H), 1.69 - 1.80 (m, 4H), 1.49 - 1.64 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 162.9, 153.2, 151.6, 138.4, 121.1, 121.1, 114.0, 111.3, 111.2, 52.5, 52.4, 26.1, 24.0; LRMS (ESI) *m/z* 241 (M^+ + H, 100), 263 (M^+ + Na, 30); HRMS (ESI) $C_{12}H_{15}N_2OF_2$ (M^+ + H) 计算值 241.1152，实验值 241.1149。

实施例 21：3-((3',4'-二氟苄)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F362)和 3-(双(3',4'-二氟苄)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F363)

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide) (0.40 g, 2.3 mmol)和 3,4-二氟溴苄(3,4-difluorobenzyl bromide)(0.60 g, 2.9 mmol)溶液在乙腈(20 mL)中均匀搅拌，加入碳酸钾 K_2CO_3 (0.42 g, 3.0 mmol)。将该反应混合液加热回流 4 小时。在薄层色谱法（TLC）显示原料完全消失后，使其通过一小段硅凝胶层。减压蒸除溶剂，使用硅凝胶进行快速柱层析。化合物 F362 (0.25 g)从 F363 中提取, 产率为 36%，F363 (0.19 g) 产率为 19% 。

F362: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.04 - 7.22 (m, 3H), 6.77 (t, *J* = 9.29 Hz, 1H), 6.55 (dt, *J* = 5.14, 9.17 Hz, 1H), 6.50 (br. s., 1H), 6.17 (br. s., 1H), 4.44 (br. s., 1H), 4.34 (d, *J* = 5.87 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 162.8, 162.6, 152.4, 151.9, 150.8, 150.1, 146.8, 135.6, 135.5, 133.2, 133.1, 122.9, 122.8, 122.8, 122.8, 117.6, 117.5, 116.0, 115.8, 113.5, 113.4, 113.4, 113.4, 111.5, 111.4, 111.3, 111.2, 46.9; LRMS (ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 20); HRMS (ESI) $C_{14}H_{11}N_2OF_4$ (M^+ + H) 计算值 299.0808，实验值 299.0794；

F363: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 6.94 - 7.15 (m, 7H), 6.88 (dd, *J* = 3.18, 9.05 Hz, 1H), 6.68 - 6.78 (m, 1H), 6.39 (br. s., 1H), 4.15 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.0, 156.2, 154.9, 153.6, 152.5, 151.6, 151.5, 150.9, 150.7, 149.2, 149.0, 148.4, 148.3, 134.6, 134.6, 134.6, 134.5, 124.8, 124.5, 124.2, 124.2, 124.1, 124.1, 117.7, 117.6, 117.3, 117.1, 117.0, 116.9, 116.7, 114.7, 114.5, 114.3, 111.4, 111.4, 111.2, 111.1, 55.6; LRMS (ESI) *m/z* 425 (M^+ + H, 100), 447 (M^+ + Na, 28); HRMS (ESI) 计算值 $C_{21}H_{15}N_2OF_6$ (M^+ + H) 425.1089，实验值 425.1082。

实施例 22：3-((2',4'-二氟苄)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F364)和 3-(双(2',4'-二氟

苄)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺 (F365)

F364 (0.29 g, 42%) 和 F365 (0.21 g, 21 %) 是通过分别将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)(0.40 g, 2.3 mmol)和 2,4-二氟溴苄(2,4-difluorobenzyl bromide) (0.60 g, 2.9 mmol), 加入乙腈(20 mL)和碳酸钾 K_2CO_3 (0.42 g, 3.0 mmol) 后按照上述 F362 和 F363 的制配程序所得。

F364: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.25 - 7.36 (m, 1H), 6.74 - 6.90 (m, 3H), 6.64 (dt, J = 5.38, 9.05 Hz, 2H), 6.20 (br. s., 1H), 4.38 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.7, 163.5, 163.0, 162.6, 162.1, 161.9, 161.2, 161.1, 159.5, 152.4, 150.1, 150.0, 149.3, 133.1, 133.1, 133.0, 133.0, 130.0, 130.0, 129.9, 129.9, 121.3, 121.3, 121.2, 121.1, 113.5, 113.4, 113.4, 113.3, 112.9, 112.7, 111.6, 111.5, 111.5, 111.4, 111.4, 111.3, 111.3, 111.2, 104.3, 104.0, 103.8, 41.1; LRMS (ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 20); HRMS (ESI) calcd for $C_{14}H_{11}N_2OF_4$ (M^+ + H) 299.0808，实验值 299.0793。

F365: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.25 - 7.38 (m, 2H), 6.90 (dt, J = 5.87, 9.05 Hz, 1H), 6.72 - 6.85 (m, 5H), 6.56 (br. s., 1H), 6.08 (br. s., 1H), 4.27 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.5, 163.4, 162.6, 162.2, 162.1, 161.1, 161.0, 159.8, 159.7, 134.5, 131.4, 131.3, 131.3, 131.2, 124.9, 120.3, 120.3, 120.2, 114.0, 111.5, 111.4, 111.3, 111.2, 111.2, 104.0, 103.7, 103.4, 49.3; LRMS (ESI) *m/z* 425 (M^+ + H, 100), 447 (M^+ + Na, 25); HRMS (ESI) calcd for $C_{21}H_{15}N_2OF_6$ (M^+ + H) 425.1089，实验值 425.1080。

实施例 23：3-((2',6'-二氟苄)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F366)和 3-(双(2',6'-二氟苄)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F367)

F366 (0.29 g, 42%) 和 F367 (0.21 g, 21 %) 是通过分别将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺 (0.40 g, 2.3 mmol)和 2,6-二氟溴苄(2,6-difluorobenzyl bromide) (0.60 g, 2.9 mmol), 加入乙腈(20 mL)和碳酸钾 K_2CO_3 (0.42 g, 3.0 mmol) 后按照上述 F362 和 F363 的制配程序所得。

F366: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.22 - 7.31 (m, 1H), 6.78 - 6.95 (m, 4H), 6.38 (br. s., 1H), 6.12 (br. s., 1H), 4.45 (d, *J* = 6.36 Hz, 2H), 4.34 (br. s., 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 162.8, 162.5, 160.4, 160.3, 152.6, 150.1, 149.6, 132.9, 129.8, 129.7, 129.6, 114.2, 114.0, 113.8, 111.7, 111.6, 111.5, 111.5, 111.5, 111.4, 111.3, 111.3, 35.8, 35.7; LRMS (ESI) *m/z* 299 (M^+ + H, 100), 321 (M^+ + Na, 30); HRMS (ESI) $C_{14}H_{11}N_2OF_4$ (M^+ + H) 计算值 299.0808，实验值 299.0800。

F367: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.10 - 7.20 (m, 2H), 7.08 (br. s., 1H), 6.96 (dt, *J* = 6.11, 8.93 Hz, 1H), 6.77 (t, *J* = 7.82 Hz, 4H), 6.65 (t, *J* = 9.05 Hz, 1H), 6.19 (br. s., 1H), 4.38 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.1, 163.0, 160.6, 160.5, 157.4, 157.3, 154.9, 154.8, 133.3, 133.3, 133.2, 133.2, 129.5, 129.4, 129.3, 127.8, 114.1, 113.9, 113.8, 113.7, 113.6, 113.4, 111.3, 111.2, 111.1, 111.0, 110.8, 110.8, 44.8; LRMS (ESI) *m/z* 425 (M^+ + H, 100), 447 (M^+ + Na, 40); HRMS (ESI) $C_{21}H_{15}N_2OF_6$ (M^+ + H) 计算值 425.1089，实验值 425.1082。

实施例 24：2,6-二氟-3-壬酰胺基苯甲酰胺(F368)

将 2,6-二氟-3- 氨基苯甲酰胺(0.17 g, 1.0 mmol)、二氯甲烷(DCM) (5 mL)、吡啶(5 mL)在 0°C 下均匀混合搅拌，逐滴滴入壬酰氯(nonanoyl chloride)(0.23 g, 1.3 mmol)，将该反应混合液在 0°C 下混合搅拌 4 小时。将该反应混合液倒进装有 1 M HCl (50 mL)的分液漏斗中，使化学反应淬灭，用二氯甲烷（DCM）

(20 mL x 3)萃取。用碳酸氢钠（$NaHCO_3$）对该混合有机层进行清洗，用硫酸镁（$MgSO_4$）进行干燥、过滤並减压蒸除溶剂，得到反应物粗品，进行快速柱层析，所得化合物(0.11 g)的产率为 36%: ^{1}H NMR (400 MHz,丙酮-d_6) 8.95 (br. s., 1H), 8.16 (dt, *J* = 6.36, 8.80 Hz, 1H), 7.51 (br. s., 1H), 7.19 (br. s., 1H), 7.02 (dt, *J* = 1.71, 8.93 Hz, 1H), 2.47 (t, *J* = 7.58 Hz, 2H), 1.70 (quin, *J* = 7.34 Hz, 2H), 1.25 - 1.43 (m, 10H), 0.81 - 0.98 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz,丙酮-d_6) 171.7, 161.2, 124.3, 123.6, 110.9, 110.7, 110.6, 36.3, 31.7, 25.3, 22.4, 19.1, 18.5, 13.4; LRMS (ESI) *m/z* 313 (M^+ + H, 100); HRMS (ESI) $C_{16}H_{22}N_2O_2F_6$ (M^+ + H) 计算值 313.1728，实验值 313.1716。

第四种制备方法：合成化合物 F373, F376, F377 和 F378（具体对应附图 5 中相同标号的化合物），具体如实施例 25-28：

图 5 示出本发明化合物 F373, F376, F377 和 F378 的合成途径。这些化合物是通过 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide)与相应的苯甲醛(benzaldehyde)进行还原胺化反应所得，产率较高。具体实验程序如图 5 所示：(a) 各类醛，催化剂(cat.) 对甲苯磺酸(*p*TsOH)，甲醇(MeOH)，室温(r.t.)，2 小时, 氰基硼氢化钠($NaBH_3CN$)，12 小时。

实施例 25：3-((3'-丁氧基苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F373)

将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide) (0.17 g, 1.0 mmol）和 3-丁氧基苯甲醛(3-butoxybenzaldehyde)(0.17 g, 1.0 mmol）在 0°C 下与甲醇 (10 mL)均匀搅拌， 加入对甲苯磺酸一水合物(*p*-toluenesulfonic acid monohydrate) (0.02 g, 0.11 mmol）, 将 该反应混合液搅拌 2 小时。之后，将

氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride) (0.63 g, 10.0 mmol)分部分加入该反应混合物，然后再混合搅拌 12 小时。将该反应混合液倒进装有 50 mL 水的分液漏斗中，使化学反应淬灭，用乙酸乙酯(ethyl acetate) (20 mL x 3）萃取。用硫酸镁（$MgSO_4$）在对比压力下进行干燥、过滤並减压蒸除溶剂，得到反应粗品，进行快速柱层析，所得化合物(0.15 g)的产率为 45%: ^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.26 (t, *J* = 7.82 Hz, 1H), 6.86 - 6.97 (m, 2H), 6.73 - 6.86 (m, 2H), 6.63 (dt, *J* = 5.38, 9.05 Hz, 1H), 6.56 (br. s., 1H), 6.16 (br. s., 1H), 4.27 - 4.40 (m, 3H), 3.96 (t, *J* = 6.36 Hz, 2H), 1.71 - 1.81 (m, 2H), 1.44 - 1.57 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.34 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.1, 159.6, 152.2, 149.2, 146.7, 140.0, 133.7, 133.5, 129.8, 119.2, 113.5, 113.5, 113.4, 113.4, 111.4, 111.4, 111.2, 111.2, 67.7, 47.9, 31.3, 19.2, 13.9; LRMS (ESI) *m/z* 335 (M^+ + H, 60), 357 (M^+ + Na, 50); HRMS (ESI) $C_{18}H_{21}N_2O_2F_2$ (M^+ + H) 计算值 335.1571，实验值 335.1568。

实施例 26：2,6-二氟-3-((3'-(戊氧基)苄基)氨基)苯甲酰胺(F376)

该化合物(0.13 g, 38%) 是通过将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺 (0.17 g, 1.0 mmol)、3-(戊氧基)苯甲醛(3-(pentyloxy)benzaldehyde) (0.19 g, 1.0 mmol)], 对甲苯磺酸一水合物(*p*-toluenesulfonic acid monohydrate) (0.02 g, 0.11 mmol）、甲醇(10 mL)和 氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride) (0.63 g, 10 mmol) 混合后按照上述 F373 的制配程序所得。^{1}H NMR (400 MHz, 丙酮-d_6) 7.37 (br. s., 1H), 7.24 (t, *J* = 7.82 Hz, 1H), 7.10 (br. s., 1H), 6.93 - 7.01 (m, 2H), 6.72 - 6.85 (m, 2H), 6.65 (dt, *J* = 5.38, 9.29 Hz, 1H), 5.54 (br. s., 1H), 4.42 (d, *J* = 5.87 Hz, 2H), 3.92 - 4.02 (m, 2H), 1.71 - 1.82 (m, 2H), 1.34 - 1.49 (m, 4H), 0.87 - 0.97 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) 159.6, 141.3, 129.4, 119.1, 113.3, 112.7, 112.2,

110.4, 67.5, 46.9, 22.2, 13.4; LRMS (ESI) *m/z* 349 (M^+ + H, 100), 371 (M^+ + Na, 50); HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{23}N_2O_2F_2$ (M^+ + H) 349.1728，实验值 349.1739.

实施例 27：3-((3'-(仲丁氧基)苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺(F377)

该化合物(0.12 g, 36%) 是通过将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺(2,6-difluoro-3-aminobenzamide) (0.17 g, 1.0 mmol)、3-(仲丁氧基)苯甲醛(3-(sec-butoxy)benzaldehyde) (0.17 g, 1.0 mmol)、对甲苯磺酸一水合物(*p*-toluenesulfonic acid monohydrate) (0.02 g, 0.11 mmol)、甲醇(10 mL)和氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride) (0.63 g, 10 mmol) 混合后按照上述 F373 的制配程序所得。^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.24 (t, *J* = 8.07 Hz, 1H), 6.85 - 6.93 (m, 2H), 6.71 - 6.85 (m, 3H), 6.61 (dt, *J* = 5.14, 9.17 Hz, 1H), 6.27 (br. s., 1H), 4.38 (br. s., 1H), 4.27 - 4.34 (m, 3H), 1.68 - 1.79 (m, 1H), 1.57 - 1.67 (m, 1H), 1.25 - 1.31 (m, 3H), 0.97 (t, *J* = 7.58 Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 163.3, 158.7, 152.2, 149.8, 149.7, 149.2, 149.1, 146.7, 146.6, 140.1, 133.7, 133.6, 133.6, 133.5, 129.8, 119.1, 114.8, 114.6, 113.5, 113.4, 113.4, 113.3, 112.9, 112.8, 112.6, 111.4, 111.4, 111.2, 111.1, 75.0, 47.9, 29.2, 19.2, 9.8; LRMS (ESI) *m/z* 335 (M^+ + H, 40), 357 (M^+ + Na, 40); HRMS (ESI) $C_{18}H_{21}N_2O_2F_2$ (M^+ + H) 计算值 335.1571，实验值 335.1580。

实施例 28：2,6-二氟-3-((3'-((4"-(三氟甲基)苄基)氧)苄基)氨基)苯甲酰胺(F378)

该化合物(0.16 g, 37%) 是通过将 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺 (0.17 g, 1.0 mmol)、3-((4-(三氟甲基)苄基)氧)苯甲醛 (3-((4-(trifluoromethyl)benzyl)oxy)benzaldehyde) (0.28 g, 1.0 mmol)、对甲苯磺酸一水合物(*p*-toluenesulfonic

acid monohydrate) (0.02 g, 0.11 mmol)、甲醇(10 mL)和氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride) (0.63 g, 10 mmol) 混合后按照上述 F373 的制配程序所得。^{1}H NMR (400 MHz, 氯仿-d) 7.66 (d, *J* = 8.31 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.82 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 6.85 Hz, 1H), 6.94 - 7.03 (m, 2H), 6.88 - 6.93 (m, 1H), 6.72 - 6.83 (m, 1H), 6.62 (td, *J* = 4.59, 8.93 Hz, 1H), 6.25 (br. s., 1H), 6.09 (br. s., 1H), 5.13 (s, 2H), 4.36 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, 氯仿-d) 158.9, 141.0, 140.3, 130.0, 127.4, 125.6, 125.5, 125.5, 120.0, 113.7, 113.6, 111.4, 69.1, 47.8; LRMS (ESI) *m/z* 437 (M^+ + H, 56), 459 (M^+ + Na, 50); HRMS (ESI) $C_{22}H_{18}N_2O_2F_5$ (M^+ + H) 计算值 437.1288，实验值 437.1292。

本发明的衍生物进行如下生物测试：

(A) 菌株和细胞株

微生物敏感性试验中使用的菌株是大肠杆菌，金黄葡萄球菌 29213 和枯草杆菌 168。其中，大肠杆菌和金黄葡萄球菌 29213 是通过香港理工大学的实验室获得，枯草杆菌 168 购自美国标准菌库。哺乳动物细胞株 L929 (小鼠腹膜成纤维细胞)、LCC6 (一种原株乳腺癌细胞)、LCC6MDR (P-gp 高表达乳腺癌细胞株) 是从理工大学的库存中获得。营养琼脂(Nutrient Agar)、胰蛋白胨(tryptone)和酵母提取物购自 Oxoid Limited 公司(加拿大安大略省尼平)。LB 液体培养基（Luria-Bertani）通过将 2g 胰蛋白胨、1 g 酵母提取物和 2 g 氯化钠溶入 200 ml 去离子水杀菌后获得。用于微生物敏感性试验的 Müller-Hinton 液体培养基(MHB)、正离子调节 Müller-Hinton 液体培养基(MHB)和胰酶解酪蛋白大豆培养基(TSB) 购自美国 BD 公司 (美国新泽西州)。需用酶标仪(Bio-Rad Laboratories 公司 680 型) 测量细菌生长和细胞毒性。使用奥林巴斯

FSX100® 生物成像导航显微镜观察枯草杆菌细胞。

(B) 抗菌敏感性试验

每种化合物的最小抑菌浓度 (MIC) 是依据美国国家临床实验室标准化委员会(CLSI)标准通过微量液体稀释法测定的。所有化合物在二甲基亚砜(DMSO)溶解，以双倍稀释。将 TSB 琼脂板的单菌落菌株溶入 5 mL MHB 或 CA-MHB。菌细胞在 37°C 下进行培养，直至生长细胞的最适密度 (OD_{600}) 达到 1.0。然后将其稀释到最终浓度约为 5 x 10^5 CFU/mL，在 96-微量滴定板(日本易威奇公司)双倍稀释。化合物 3 和 PC190723 用作阳性对照。在 37°C 下培养 18 小时后, 使用酶标仪测量 OD_{600} 值，计算抑菌浓度百分比。如果 MIC 值等于或高于 90%，该化合物应测定为活性，是指该化合物造成的抑制细菌生长比例高于 90%。表 1 对所有合成化合物的 MIC 进行了概述。

表 1. 每种化合物对不同菌株的 MIC 值

菌株 / 化合物		枯草杆菌 168 (μM)	大肠杆菌 (μM)	金黄葡萄球菌 29213 (μM)
PC190723		0.5	>2	0.5
式 3		0.25	>100	6.25
第一种制备方法所得的化合物	F411	6.25	>100	>100
	F412	25	>100	>100
	F413	>100	>100	>100
	F414	>100	>100	>100
	F342	25	>100	>100
	F345	100	>100	>100
第二种制备方法所得的化合物	F391	50	>100	50
	F333	6.25	>100	50
	F369	50	>100	>100
	F370	6.25	>100	25
	F332	3.13	>100	12.5
	F371	6.25	>100	>100
	F350	>100	>100	>100

	F334	>100	>100	>100
	F409	25	>100	12.5
	F410	25	>100	50
	F361	1.57	>100	3.13
第三种制备方法所得的化合物	F368	>100	>100	>100
	F357	>100	>100	>100
	F358	>100	>100	>100
	F362	>100	>100	>100
	F363	>100	>100	50
	F364	>100	>100	>100
	F365	<50	>100	>100
	F366	>100	>100	>100
	F367	>100	>100	>100
第四种制备方法所得的化合物	F373	25	>100	50
	F377	>100	>100	>100
	F376	12.5	>100	50
	F378	>100	>100	>100

(C) 细胞毒性试验

细胞毒性试验中使用的细胞株是从理工大学的库存中取得的。在本试验中，将小鼠成纤维细胞(L929)、一种原株乳腺癌细胞线(LCC6) 和 P-gp-高表达乳腺癌细胞株(LCC6MDR) 与各种浓度化合物混合，在 96-微量滴定板的最终容积达到 100 μL。细胞在 37°C 下培养 3 天。化合物的最大半数抑制值 (IC_{50}) 的确定是通过 CellTiter 96 AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(普洛麦格)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-氧基)-5-(3-羧基-甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)(2 mg/mL,MTS, 普洛麦格) 和吩嗪硫酸甲酯 (phenzaine methosulfate)(0.92 mg/mL PMS, 西格玛奥德里奇) 以 20:1 的比例混合。将 MTS/PMS 混合液 (10 μL) 加入每个井洞，在滴定板上培养 2 小时，温度为 37°C。然后用酶标仪(Bio-Rad)测试 490 nm 吸光度。IC_{50} 值通过使用 GraphPad (Prism 4.0) 绘图软件进行计算。每种化合物的选择性指标通过 L929 毒性等级

和金黄葡萄球菌 29213 的 MIC 值的比率计算。如果选择性指标大于 10，化合物定义为潜在抗生素。F332 和 F361 被选作测试三种哺乳动物细胞株。结果如表 2 所示。

表 2. F332 和 F361 对不同哺乳动物细胞株的 IC_{50} 值。

哺乳动物细胞株 / 化合物	LCC6 (IC_{50}, μM)	LCC6MDR (IC_{50}, μM)	L929 (IC_{50}, μM)
F332	78	>100	>100
F361	60	52	60

(D) 对枯草杆菌细胞形态的影响

作为最有潜力的两种化合物，选择测试 F332 和 F361 对枯草杆菌 168 细胞形态的影响。 使用两种化合物对枯草杆菌进行对数期培育测试 ，使终浓度达到 MIC 半数值。使用 1% DMSO 溶液进行控制。结果显示，两种化合物能使枯草杆菌细胞产生丝状形态。如图 6 所示，枯草杆菌细胞的平均长度为 3.5 ± 0.7 μm。如图 7 所示，F332 使枯草杆菌细胞长度延长三倍。 F332 使枯草杆菌细胞的平均长度从 3.5 ± 0.7 μm 延长至 11.7 ± 4.5 μm。另一方面，如图 8 所示，F361 使枯草杆菌细胞长度延长六倍，从 3.5 ± 0.7 μm 延长至 21.1 ± 1.8 μm。研究发现，F332 和 F361 能使枯草杆菌 168 细胞在亚致死浓度下产生丝状形态。结果显示，两种化合物都可以通过阻塞胞质细胞分裂蛋白质从而抑制细菌繁殖。

(E) 荧光显微镜分折

通过使用绿荧光蛋白标识的细胞分裂蛋白 FtsZ 对 F332 在枯草杆菌中所产

生的成丝作用在荧光显微镜下进行定位分折以。一种 FtsZ-eGFP 融合蛋白表达质粒的建构如下（质粒结构示于图 10a）：

根据一个革兰氏阳性菌（G+）的质粒 pGK12 的 DNA 序列，设计引物对：

序列 1 5’-TTTCCCTCTAGACCGGCAATAGTTACCCTTATT-3’

序列 2 5’-TGACAGAGATCTCATTTTGTTTATTGCAATTG-3’

扩增 PCR 片断，长约 4,000 个碱基对，内含氯霉素抗性基因、G+复制原点和大部分 pGK12 序列。

为了引入革兰氏阴性菌（G-）的复制原点及使氯霉素抗性基因能在大肠杆菌有效表达，根据 G-质粒 pRSET-A（Invitrogen 公司）的 DNA 序列，设计引物对： 序列 3 5’-AAAATGAGATCTCTGTCAGACCAAGTTTACTC-3’

序列 4 5’-TGCCGGTCTAGAGGGAAACCGTTGTGGTCT-3’

扩增长约 1,000 个碱基对的 PCR 片断，内含 pBR322 的复制原点和 T7 启动子。两个 PCR 片断经限制性内切酶 XbaI 和 BglII 消化后连接并转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)，在氯霉素平板上进行筛选，获得质粒 pFZ1.0。

通过引入乳糖操纵子机制，可有效地控制枯草杆菌 FtsZ 基因的过量表达所引起宿主的致死效应。根据 pFZ1.0 的 DNA 序列，设计引物对：

序列 5 5’-AAGTAAGAATTCTGCTAGCAGAAGCTTCG-3’

序列 6 5’-GGGGCACTCGAGGGGTTAGTGACATTAGAAAAC-3’

扩增 PCR 片断，长约 3,800 个碱基对，去除多余的 pGK12 部分。

根据 pMAL-c2（NEB 公司）的 DNA 序列，设计引物对：

序列 7 5’-ATCCTACTCGAGTGCCCCGTTAGTTGAAGAAG-3’

序列 8 5’-TAGCATGAATTCAAACGATCCCGCGAAATTAATAC-3’

扩增长约 1,200 个碱基对的 PCR 片断，内含 lacA 基因及其 lacI 启动子。

两个 PCR 片断经限制性内切酶 XhoI 和 EcoRI 消化后连接并转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)，在氯霉素平板上进行筛选，获得质粒 pFZ1.1。

根据 pFZ1.1 的 DNA 序列，设计引物对：

序列 9　5’-AAGTAAGAATTCTGCTAGCAGAAGCTTCG-3’

序列 10　5’-AGATCTGGATCCAAACGATCCCGCGAAATTAATAC-3’

扩增 PCR 片断，长约 5,000 个碱基对，用限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 进行消化。再根据 G+载体 pHT43（MoBiTec 公司）的 DNA 序列，设计引物对：

序列 11　5’-GGATCCAGATCTGAATATTTCAGCTTGGTTTTCC-3’

序列 12　5’- AGCTAAGAATTCGCTACGATGGATCCTTCCTCCTTTAATTGG -3’

扩增长约 450 个碱基对的 PCR 片断，内含 groE 启动子和 lacO 序列，用限制性内切酶 EcoRI 和 BglII 进行消化。两个片断连接后转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)，在氯霉素平板上进行筛选，获得质粒 pFZ2.0。

根据枯草杆菌 168 的 FtsZ 基因序列，设计引物对：

序列 13　5’- GAGGAAGGATCCATGTTGGAGTTCGAAACAAAC-3’

序列 14　5’- ACTGCCCGAACCGCTTCCGCCGCGTTTATTACGG- 3’

扩增 PCR 片断，长约 1,200 个碱基对。

此外根据 pEGFP 的 DNA 序列，设计引物对：

序列 15　5’- GGAAGCGGTTCGGGCAGTATGGTGAGCAAGGGCGA-3’

序列 16　5’- CTAGCAGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3’

扩增长约 700 个碱基对的 eGFP 基因片断，通过重叠延伸 PCR 方法连接两个片断，再用内切酶 EcoRI 和 BamHI 消化并连接到 pFZ2.0 的对应内切位点

上，转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)，在氯霉素平板上进行筛选，获得质粒 pFZ-FtsZ-eGFP。提取质粒转化到枯草杆菌 168，在含氯霉素的 LB 培养液内生长，加入不同浓度的乳糖或 IPTG 观察 FtsZ-eGFP 基因的表达。

图 10b 和 10c 所示的枯草杆菌是在没有 F332 的情况下培养，在荧光显微镜下图 10b 的枯草杆菌细胞中间部分出现了较强的绿色荧光，表示 FtsZ-eGFP 融合蛋白的表达质粒被定位并整合于细胞中间以形成细胞分裂的 Z 环（Z-ring）。

图 10d 和 10e 所示的枯草杆菌是在 F332 的情况下培养，在荧光显微镜下图 10d 的枯草杆菌细胞多个部分出现了绿色荧光，并使细胞增长，反映 FtsZ-eGFP 融合蛋白的表达质粒在细胞中的定位被 F332 影响。因此，该蛋白的表达不只于在进行细胞分裂的位置。

(F) 金黄葡萄球菌 FtsZ 蛋白质（*S. aureus* FtsZ protein）的表达和提纯

携带金黄葡萄球菌 *ftsz* 基因的大肠杆菌 BL21 细胞是从理工大学实验室菌库中获得的。将菌库中提取的大肠杆菌菌株在 5 mL LB 培养液和 100 μg/mL 氨苄青霉素（ampicillin）中培养 14-16 小时，温度为 37°C。隔夜培养的细胞培养液(2 mL) 转至 200 mL 的 2 X TY 培养液中，其中含 100 μg/mL 氨苄青霉素，使细胞在 37°C 下生长，直至光学吸收率(OD_{600}) 达到 0.8。 蛋白质表达在添加 0.4 mM 异丙基 -β-D-1- 硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) (IPTG) 后再过 4 小时被诱发。细菌细胞在 20 分钟 9000 rpm 离心分离力作用下得以聚集，温度为 4°C。然后细胞团块在 20 mL 起始缓冲液(0.02 M 磷酸钠, 0.5 M 氯化钠, pH 7.4)中再次悬浮。通过声波降解法将细胞均质化，增幅为 50%，30 秒带脉冲，30 秒无脉冲，进行

5 个循环。不能溶解的细胞残骸在 1.5 小时 13,000 rpm 离心分离力作用下排除，温度为 4°C。浮层通过 0.22 μm 无菌过滤器进行收集和过滤。

浮层中的 FtsZ 蛋白质通过快速蛋白质液相层析法(Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC))进行提纯。在 FPLC 中，用硫酸镍(II) 溶液激活 5 mL HiTrap 螯合层，捕获金黄葡萄球菌 FtsZ 蛋白质。然后用起始缓冲液使其平衡。包含目标蛋白质的可溶性蛋白质溶液和起始缓冲液一起通过该螯合层。然后用洗提缓冲液 (0.02 M 磷酸钠, 0.5 M 氯化钠, 0.5 M 异吡唑, pH 7.4)对目标蛋白质 (Peak A)进行洗提。通过 SDS-PAGE 法 (图 9)进行收集和分析, 然后用 50 mM MOPS 缓冲液渗析，储存温度为-80°C。

(G) 光散射试验

光散射试验可以确定 FtsZ 聚合的程度，通过使用荧光光谱仪(Perkin-Elmer, USA)测量 90° 光散射信号。激发和发射波长设定为 600 nm，狭缝宽度为 5 nm。金黄葡萄球菌 FtsZ (12 μM)在 50 mM MOPS 缓冲液(pH 6.8)中连续稀释条件下培养 10 分钟，温度为 25°C。对照样品只包括 1% 的二甲基亚砜。然后将 KCl (终浓度: 50 mM) 和 $MgCl_2$ (终浓度: 10 mM) 加入混合液中，在 37°C 下培养 8 分钟，建立一个基线。然后加入终浓度 1 mM GTP，对光散射信号测量 1,500 秒。试验装置中的相关光散射信号的计算是参照对比试验。对每种化合物浓度分别进行三次试验。选择 F332 和 F361 这两种化合物进行测试，结果分别在图 11 和图 12 显示。两种化合物都能抑制 FtsZ 聚合的光散射。减少的光散射信号显示，两种化合物都能在剂量依赖性方式下减少 FtsZ 原纤维的聚合物质。

(H) GTP 酶（GTPase）活性测试

金黄葡萄球菌 FtsZ 的 GTPase 活性是通过 96 孔微型板块确定，使用 CytoPhosTM 磷酸盐荧光检测试剂盒（CytoPhosTM phosphate assay Biochem KitTM） (Cytoskeleton, USA)， 对 GTP 水解过程中的释放的无机磷酸盐浓度进行测试。重组的金黄葡萄球菌 FtsZ (7.5 μM) 在 50 mM MOPS 缓冲液(pH 6.5)中连续稀释条件下培养 10 分钟，温度为 25°C。对照样品只包括 1% 的二甲亚砜。然后将 KCl (终浓度: 200 mM) 和 $MgCl_2$ (终浓度: 5 mM) 加入混合液中，加入 GTP (终浓度: 500 mM)，在 37°C 下培养 30 分钟。不能溶解的聚合物在室温下经过 1 分钟 13,500 rpm 离心分离力排除。80 μL 浮层转至 96 孔微型板块的一孔中，用 120 μL Cytophos 试剂在室温下培养 10 分钟。混合液中的无机磷酸盐通过 96 孔微型板块读写器(BioRad 680)测试 650 nm 的吸收率确定。样品的测试结果是参照对比试验。对每种化合物浓度分别进行三次试验。选择 F332 和 F361 这两种化合物进行测试，结果分别在图 13 和图 14 显示。如图 13 及 14 所示，加入两种化合物后，没有观察到金黄葡萄球菌 FtsZ 的 GTPase 活性有显著变化。基于光散射试验结果和 GTPase 活性测试，两种化合物很可能有能力在不影响 GTPase 活性前提下抑制 FtsZ 的聚合作用。

(I) 透射电子显微镜法 (TEM)

TEM 提供了一种对 FtsZ 聚合形态的直接观察法。选择 F332 和 F361 这两种化合物进行测试。金黄葡萄球菌 FtsZ (12 μM) 在不同浓度的化合物中培养，在 50 mM MOPS 缓冲液(pH 6.5)中培养 10 分钟，温度为 25°C。对照样品只包括 1% 的二甲亚砜。然后将 KCl (终浓度: 50 mM) 和 $MgCl_2$ (终浓度: 5 mM) 加入混合液中，加入 GTP (终浓度: 1 mM)，在 37°C 下培养 15 分钟。在辉光

放电涂碳铜载网 (400 网格)上加入 10 μL 反应混合液，在 25°C 下培养 10 分钟。在铜载网上加入 10 μL 0.5%磷钨酸(PTA) 将蛋白质染色。对铜载网进行通宵风干。用透射式电子显微镜(JEOL 型 JEM 2010，工作电压 200 kV，配置 Gutan MSC 794 CCD 摄像机) 观察 FtsZ 聚合形态。F332 和 F361 的电子显微图分别见图 15 和图 16。FtsZ 原纤维形成的宽大厚束网可以通过添加抑制剂进行观察。比较添加抑制剂后得到的原纤维和加入 100 μM F332 或 F361 聚合产生的相对短小的直线单链 FtsZ 原纤维。这一现象与光散射试验不谋而合，因为 F332 和 F361 这两种化合物都表现出在剂量依赖性方式下抑制 FtsZ 聚合作用。

(J) 确定分级抑制浓度指数(FICI)

本发明使用的菌株是在临床上分离的 MRSA 菌株 USA300#757 和 #2960，都是从理工大学的实验室获得的。之前所述 Müller-Hinton 液体培养基 (MHB) 稀释法采用的即是确定分级抑制浓度指数(FICI)[23]。对 PC190723 进行 12 轮连续的双倍稀释, 用 96 孔微型板块制配 F332 和 F361，浓度从 512 μg/mL 变为 0.25 μg/mL。用同样的程序进行对氨苄青霉素、氯唑西林(cloxacillin)和头孢呋辛(cefuroxime)进行一系列的双倍稀释。最后，将化合物与 β-内酰胺(β-lactams)按照 1:1 比例进行混合，再依照上述程序进行双倍稀释。每个微型板块孔洞包含 100 μL MHB 培养基，单独用化合物增补，单独用 β-内酰胺(β-lactams)增补，或用化合物和 β-内酰胺混合液增补。将 Müller-Hinton 液体培养基中过夜培养的金黄葡萄球菌在盐水中稀释至 OD_{595} 值为 0.08-0.1，添加进每个微型板块孔洞，在 37°C 下培养 20 小时。所有测试都重复做一次，通过视觉判断对细菌生长的抑制程度。化合物和 β-内酰胺的 FICI 计算公式如

下：FICI = (化合物和β-内酰胺混合液的 MIC /化合物的 MIC) + (化合物和β-内酰胺混合液的 MIC /β-内酰胺的 MIC)。结果见表 3。

表 3. PC190723, F332 和 F361 对两种 MRSA 菌株（USA300#757；USA300#2960）的 FICI 值：

USA300#757					
抗菌素 / 化合物	头孢噻肟	美罗培南	氨苄青霉素	氯唑西林	头孢呋辛
PC190723	1.02	0.31	无	无	无
F332	0.13	1.06	0.52	1.02	0.09
F361	0.38	1.13	无	无	无
USA300#2960					
PC190723	1.03	0.63	无	无	无
F332	0.38	0.28	0.28	1.02	0.38
F361	1.00	0.28	无	无	无

为了进一步证明可应用在不同菌株上，其中，F332 分别与五种抗生素联合施用在表 4 中的菌株，不同的 FICI 值示于表 4：

表 4 F332 与以下抗生素联合施用对不同菌株的 FICI 值

MRSA 菌株	F332 与以下抗生素联合施用对不同菌株的 FICI 值：				
	阿莫西林	甲氧西林	氯唑西林	头孢呋辛	美罗培南
2490	0.56	0.25	0.56	0.19	2.25
254	0.56	0.25	0.19	0.25	1.50
231	0.52	0.50	0.28	0.50	0.63
417	0.27	0.06	0.09	0.06	0.19
1344	1.13	0.27	0.13	0.27	2.00
2901	0.06	0.01	0.25	0.13	4.01
3589	1.06	0.52	0.31	0.25	1.50
256	0.08	0.04	0.13	0.01	4.01
3332	0.63	0.28	0.38	0.13	2.25
3411	2.02	1.02	0.53	1.00	3.00
1136	1.03	0.31	0.38	0.13	4.50

2895	1.06	0.31	0.38	0.31	2.13
2516	0.38	0.19	0.19	0.07	0.38
3267	0.25	0.07	0.25	0.01	4.01
757	0.27	0.09	0.13	0.08	1.06
#1749	1.03	1.06	1.25	1.13	10.0
1402	1.02	0.56	0.75	0.63	5.00
2919	0.51	0.38	0.31	0.25	4.25
2728	0.08	0.16	1.01	0.14	2.03
#1717	1.06	1.13	2.50	1.13	3.00
2224	0.19	0.13	0.25	0.25	4.01
358	0.27	0.25	1.06	1.13	129.0
3580	0.28	0.19	0.53	0.06	1.25
774	0.03	0.26	0.50	0.01	0.13
200	0.02	0.25	1.00	1.00	8.01
2973	0.08	0.28	0.07	0.53	4.03
85	0.04	0.50	1.00	0.25	4.01
1449	0.38	0.75	0.63	1.50	33.0

#ATCC 菌株

(J)药代动力学参数研究及其在药物制备在的应用

化合物 F332 需要进一步进行体内药代动力学研究。UPLC-MS/MS 系统包括沃特世公司超高压液相色谱（Acquity Waters UPLC），与质谱计(Micromass 型 Quattro Ultima)相连，使用正离子模式电喷雾电离法。对 ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μM (2.1 x 50 mm) 层进行层析分离。（色谱分析）流动相包括甲醇+ 0.1% 甲酸(溶剂 B) 和 Milli-Q 超纯水 + 0.1% 甲酸(溶 A)。设置多重反应监测模式 (MRM) 对 F332 $[M + H]^+$ 在 299>142 *m/z* 情况下进行监测。碰撞能量、进样锥电压、源温度、退溶温度和毛细管电压分别为 25, 30, 150°C, 350°C 和 3Kv。锥孔气量和退溶气量分别为 150L/Hr 和 600L/Hr。

雄性 Sprague–Dawley (SD) 小鼠 (体重 250-280 g) 从香港理工大学动物设施中心获得。将动物在特别控制的温度和湿度环境下饲养，保持 12 小时正常光照，喂养标准量的食物和水。香港理工大学动物主体伦理小组委员会认同

动物实验协定。在进行实验的前一天进行右颈静脉穿刺术。头天晚上对动物禁食，在实验过程中可以喂水。F332 是用 5%蓖麻油聚氧乙烯醚（CremophorEL）、5%乙醇、 90%盐水在 2mg/ml 浓度下现配的。F332 在使用当天制配，在半小时内用于动物研究。在当前研究中，F332 的使用是通过口部喂食和静脉注射 (IV) 。血样(大约 500 μL) 通过在颈静脉穿插肝素管(20u nits)，在使用后 5, 10, 30, 45, 60, 120, 240 和 420 分钟后进行静脉注射研究。对于口部喂食研究，则在 2, 10, 30, 45, 60, 120, 240, 480 和 600 分钟采集血浆样品，在 16,100G 离心分离力作用下采集 10 分钟。所有的血浆样品需添加 3 倍容量的甲醇进行蛋白质沉淀。在进行 UPLC-MS/MS 分析前通过注射器式滤器对浮层进行过滤。血浆中的药动学参数通过 Pharmacokinetics Solutions 2.0 软件(美国蒙特罗斯 Summit Research Services 公司生产)进行非分割性药物动力学数据分析。所确定的药动学参数包括最大血浆浓度(Cmax)、达到最大血浆浓度时间 (Tmax)、平均滞留时间(MRT)、吸收/分布半衰期(t1/2α), 消除半衰期(t1/2β)、分布容量(Vd)、总清除率(CL) 以及浓度曲线下面积(AUC)。结果如图 17 和表 5 所示。

表 5 体内药代动力学参数

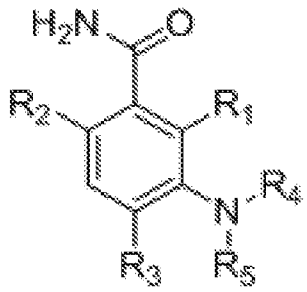
参数	单位	口服	静脉注射
剂量	mg/kg	50	1
AUC -（面积）[辛普森法则]	ng-分钟/ml	621868	104639
AUC（0-t）（绝对面积）	ng-分钟/ml	539033	41934
Vd（面积）/ kg	mL/kg	20916	4812

CL（面积）/ kg	mL/分钟/kg	80	10
消除半衰期	分钟	180	349
吸收/分布半衰期	分钟	21	15
MRT	分钟	289	485
Cmax	ng/mL	1922	-
Tmax	分钟	120	-
生物兼容性	%	11.89%	-

通过上述测试结果可以看出：本发明的制备方法从 3-氨基苯甲酰胺（3-aminobenzamide）衍生出的新型衍生物，对多种菌株例如（革兰氏阳性和革兰氏阴性）、癌细胞（LCC6 和 LCC6MDR）以及小鼠腹膜成纤维细胞（L929）具细胞毒性/强大的抗菌活性；对小鼠成纤维细胞具有低毒性；其与细胞分裂蛋白 FtsZ 起相互作用；其与临床应用的 β-内酰胺抗生素合成后表现出对临床分离而社区感染的金黄葡萄球菌（USA300）和其它 MRSA 菌株具有高度的合成抗菌活性，抑菌浓度指数更低至 0.01；药效动力学研究结果显示，其中一种名为 F332 的衍生物，其口服用量为 50 毫克/千克体重，口服的生物兼容性约为 12%；本发明的衍生物应用于治疗耐甲氧西林葡萄球菌感染的药物制备中，可在临床上用作 β-内酰胺辅助抗生素通过口服途径治疗耐甲氧西林葡萄球菌感染。

权 利 要 求 书

1. 一种作为β-内酰胺辅助抗生素的3-氨基苯甲酰胺衍生物，其特征在于，为具以下化学式(I)的化合物:



(I)，

其中，R_1、R_2和R_3各自分别为氢、氟或溴；

R_4与R_5不同时，R_4为氢、甲基、乙基或氟代苄基，R_5为C_4-C_{10}的烷基、烷氧基烷基、C_4-C_{10}的烯基、氟代苄基、烷氧基取代的苄基或酰基；

R_4和R_5相同时， R_4和R_5都为CH_2-$(CH_2)_n$-CH_2，n=2或3。

2. 根据权利要求1所述的衍生物，其特征在于，所述R_1、R_2、R_3 和R_4各自分别为氢，R_5为辛基。

3. 根据权利要求1所述的衍生物，其特征在于，所述R_1、R_2、R_3 和R_4各自分别为氢，R_5为壬基。

4. 根据权利要求1所述的衍生物，其特征在于，所述R_1、R_2和R_3各自分别为氢，R_4为甲基，R_5为辛基。

5. 根据权利要求1所述的衍生物，其特征在于，所述R_1、R_2和R_3各自分别为氢，R_4为甲基，R_5为壬基。

6. 根据权利要求1所述的衍生物，其特征在于，所述R_1和R_3各自分别为氢，R_2为F，R_4为氢，R_5为壬基。

7. 根据权利要求1所述的衍生物，其特征在于，所述R_1和R_3各自分别为氢，R_2和R_4各自为F，R_5为壬基。

8．一种权利要求 1-7 任一项的所述衍生物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

（a）将原料 A 与原料 B、碳酸钾和乙腈均匀搅拌形成反应混合液，加热回流反应 4 小时，再精制后得到产物；所述原料 A 为 3-氨基苯甲酰胺、2-氟-5-氨基苯甲酰胺或 2,4-二氟-5-氨基苯甲酰胺；所述原料 B 为溴代壬烷或溴代辛烷；

（b）在步骤（a）得到的产物为 3-(壬基氨基)苯甲酰胺或 3-(辛基氨基)苯甲酰胺时，再将其分别与硫酸二甲酯、碳酸钾、和乙腈均匀搅拌，并加热回流 12 小时，再精制后得到产物。

9．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为辛基。

10．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为壬基。

11．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为庚基。

12．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3,7-二甲基-2,6-辛二烯基。

13．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 2-壬烯基。

14．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为(4’-丁氧基)丁基。

15．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为癸基。

16．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F，R_3 为溴，R_4 为氢，R_5 为壬基。

17. 根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F，R_3

为氢，R_4为甲基，R_5为辛基。

18．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2为 F，R_3为氢，R_4为乙烷基，R_5为辛基。

19．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2为 F，R_3为氢，R_4为甲基，R_5为壬基。

20. 一种权利要求 1 或 9-19 中任一项的所述衍生物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a)将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与溴代烷烃、碳酸钾及乙腈均匀搅拌形成反应混合液，并加热回流 4 小时，再精制后得到产物；所述溴代烷烃为溴代壬烷、溴代辛烷、溴代癸烷、溴化香叶醇、(Z)-1-溴-2-壬烯或溴代庚烷；

(b)将步骤(a)反应得到的2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺进行溴化处理并在室温下搅拌 12 小时，精制得到 4-溴-2,6-二氟-3-(壬基氨基)苯甲酰胺；

(c)使用碘甲烷或溴乙烷对从步骤(a)得到的2,6-二氟-3-(辛基氨基)苯甲酰胺，进一步烷基化处理，并与碳酸钾和乙腈均匀搅拌回流 14 小时，精制得到 2,6-二氟-3-(甲基(辛基)氨基)苯甲酰胺或 3-(乙烷基(辛基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺；

(d)使用硫酸二甲酯对从步骤(a)得到的 2,6-二氟-3-(壬基胺基)苯甲酰胺进行烷基化处理，并与碳酸钾和乙腈均匀搅拌回流12小时，精制得到2,6-二氟-3-(甲基(壬基)氨基)苯甲酰胺。

21．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2为 F；R_3和 R_4各自分别为氢，R_5为壬酰胺基。

22．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2为 F；R_3和 R_4各自分别为氢，R_5为吡咯烷。

23．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2为 F；R_3和 R_4各自分别为氢，R_5为哌啶。

24．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2为 F；R_3和 R_4各自分别为氢，R_5为 3’,4’-二氟苄基。

25．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 为氢，R_4 为 3’,4’-二氟苄基，R_5 为 3’,4’-二氟苄基。

26．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 2’,4’-二氟苄基。

27．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 为氢，R_4、R_5 各自分别为 2’,4’-二氟苄基。

28．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 2’,6’-二氟苄基。

29．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 为氢，R_4、R_5 各自分别为 2’,6’-二氟苄基。

30．一种权利要求 1 或 21-29 中任一项的所述衍生物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a) 将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺和壬酰氯在 0°C 下溶入吡啶和二氯甲烷反应 4 小时，精制得到 2,6-二氟-3-壬基氨基苯甲酰胺；

(b)将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与 1,4-二溴丁烷或 1,5-二溴代戊烷分别加入碳酸钾在乙腈中均匀搅拌 4 小时反应，精制分别得到 2,6-二氟-3-(吡咯烷-1-氨基)苯甲酰胺和 2,6-二氟-3-(哌啶-1-氨基)苯甲酰胺；

(c)将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺与原料 C 以及碳酸钾，在乙腈中加热回流 4 小时，精制分别得到 3-(3’,4’-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺或 3-(双(3’,4’-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺、3-(2’,4’-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺或 3-(双(2’,4’-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺、以及 3-(2’,6’-二氟苄氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺或 3-(双(2’,6’-二氟苄基)氨基)-2,6-二氟苯甲酰胺；所述原料 C 为 3,4-二氟溴苄、2,4-二氟溴苄或 2,6-二氟溴苄。

31．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3

和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3’-丁氧基苄基。

32．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3’-(仲丁氧基)苄基。

33．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3’-(戊氧基)苄基。

34．根据权利要求 1 所述的衍生物，其特征在于，所述 R_1 、R_2 为 F；R_3 和 R_4 各自分别为氢，R_5 为 3’-((4”-(三氟甲基)苄基)氧)苄基。

35．一种权利要求 1 或 31-34 中任一项的所述衍生物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a) 将原材料 2,6-二氟-3-氨基苯甲酰胺分别与相应的苯甲醛以及催化剂对甲苯磺酸(*p*TsOH)和甲醇进行还原胺化，在室温下混合液搅拌 2 小时；

(b)然后分部分加入氰基硼氢化钠，再混合搅拌 12 小时，反应精制分别得到权利要求 31 到 34 任一项所述的衍生物；所述苯甲醛为 3-丁氧基苯甲醛、3-(戊氧基)苯甲醛、3-(仲丁氧基)苯甲醛或 3-((4’-(三氟甲基)苄基)氧)苯甲醛。

36．权利要求 1、10 或 19 中所述的衍生物在制备 β-内酰胺辅助抗生素中的应用。

37．根据权利要求 36 所述的应用，其特征在于，所述衍生物的用量与人体体重的比例为 50 毫克/千克体重，所述衍生物在口服后的生物兼容性为 12%。

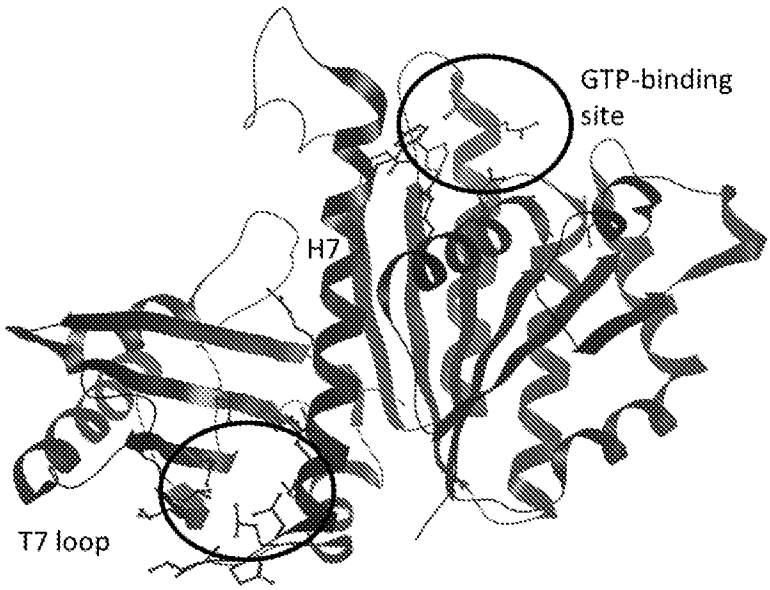


图 1a

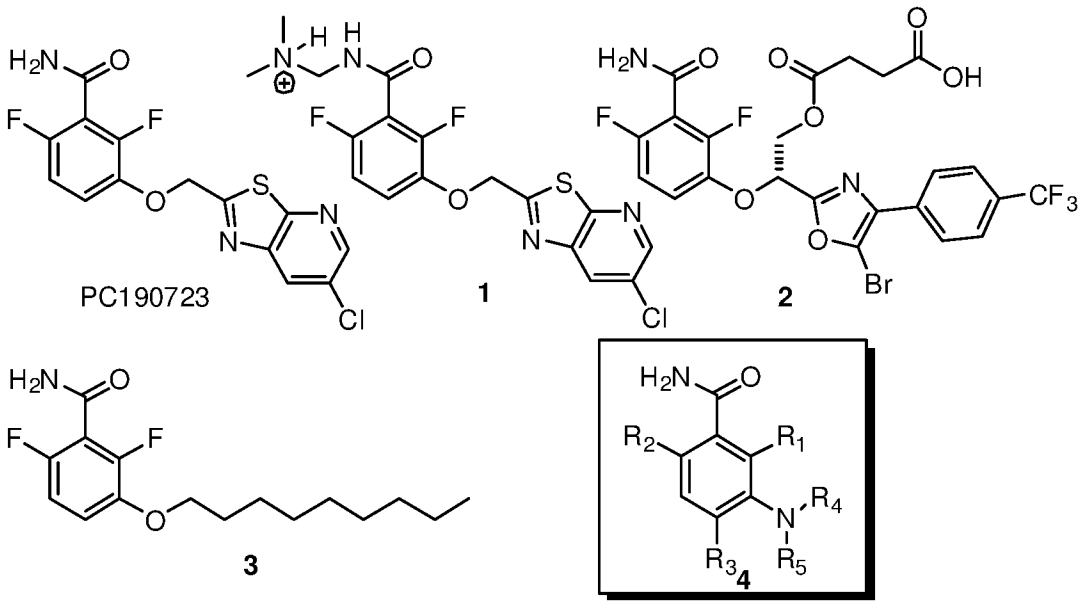
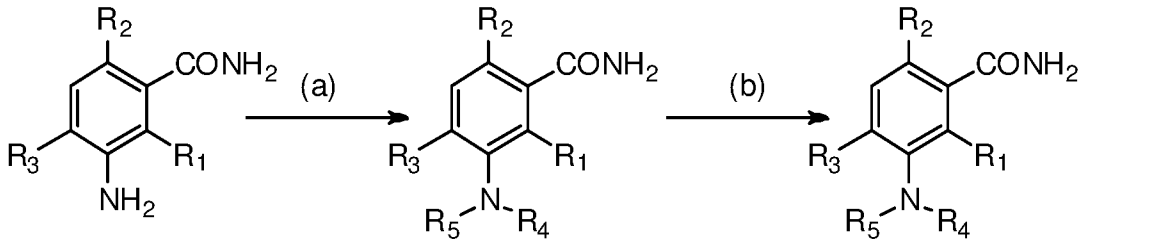


图 1b



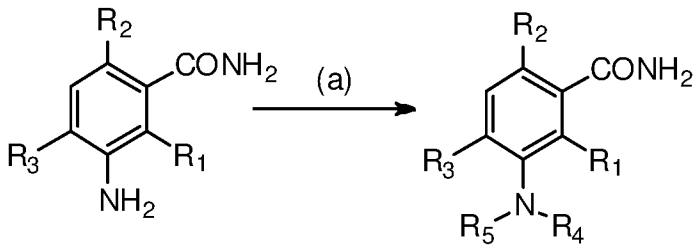
$R_1 = R_2 = R_3 = H$

F411 $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = H$

F412 $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = H$

F413 $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_5 = Me$

F414 $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_5 = Me$

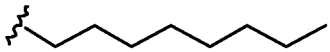


$R_1 = R_3 = H$, $R_2 = F$

$R_1 = H$, $R_2 = R_3 = F$

F342 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = F$

F345 $R_1 = R_5 = H$, $R_2 = R_3 = F$

F412, F414 $R_4 =$ 

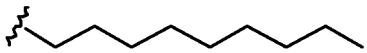
F411, F413, F342, F345 $R_4 =$ 

图 2

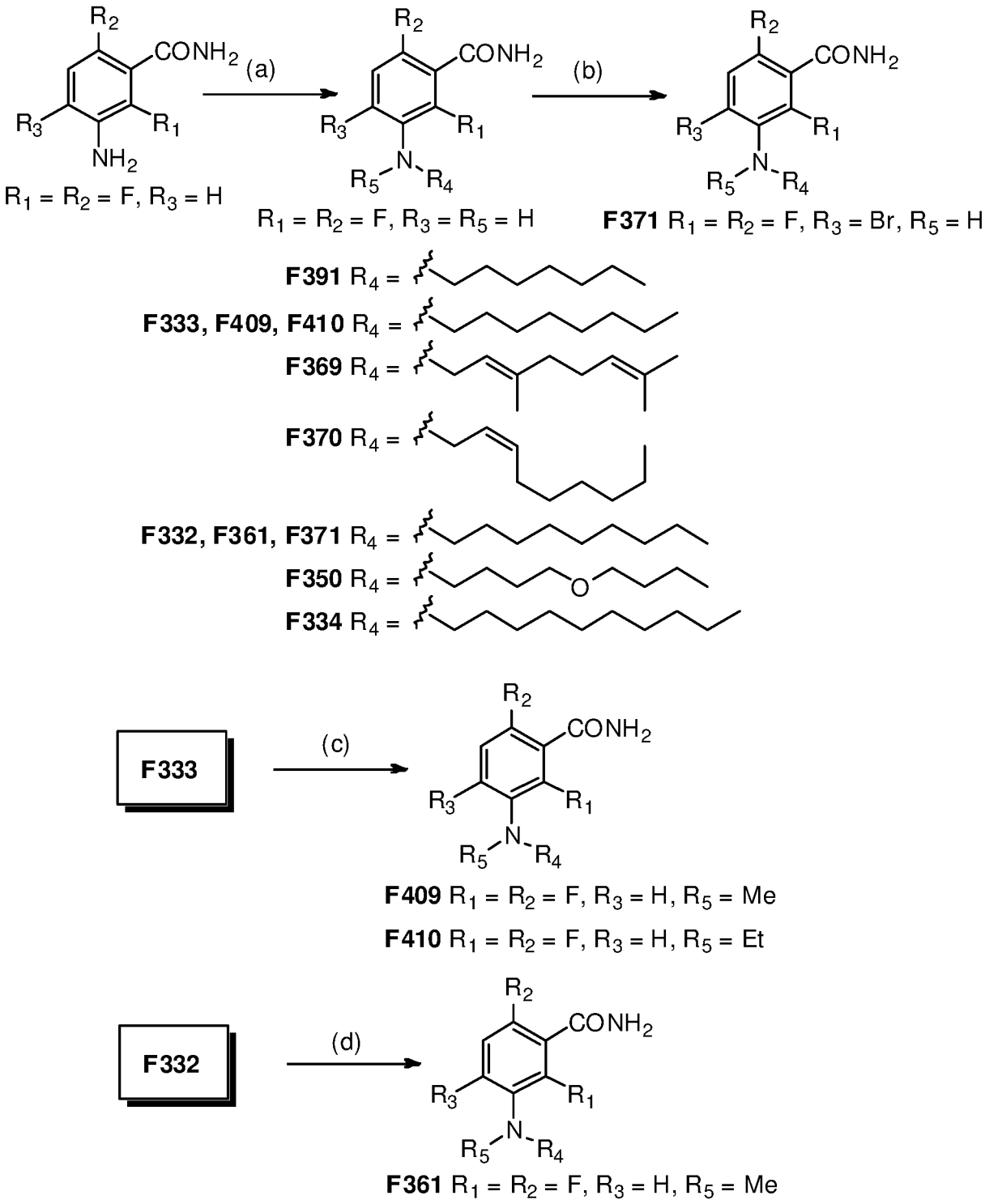

R2
CONH2
(a)
R3
R1
NH2
R1 = R2 = F, R3 = H
N
R5
R4
R1 = R2 = F, R3 = R5 = H
(b)
F371 R1 = R2 = F, R3 = Br, R5 = H
F391 R4 =
F333, F409, F410 R4 =
F369 R4 =
F370 R4 =
F332, F361, F371 R4 =
F350 R4 =
O
F334 R4 =
F333
(c)
F409 R1 = R2 = F, R3 = H, R5 = Me
F410 R1 = R2 = F, R3 = H, R5 = Et
F332
(d)
F361 R1 = R2 = F, R3 = H, R5 = Me

图 3

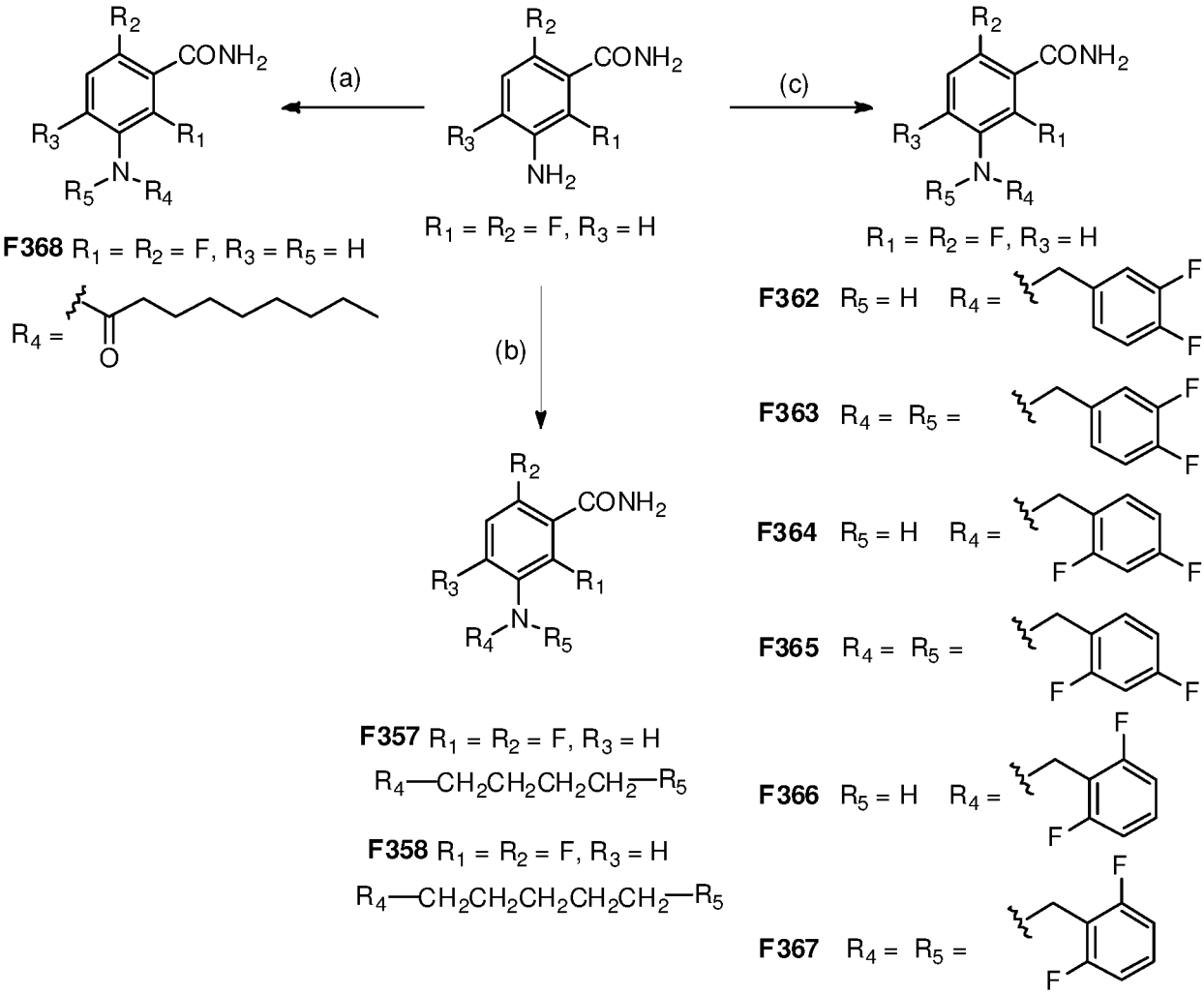

(a)
(b)
(c)
F368 R1 = R2 = F, R3 = R5 = H
R4 =
R1 = R2 = F, R3 = H
F362 R5 = H R4 =
F363 R4 = R5 =
F364 R5 = H R4 =
F365 R4 = R5 =
F366 R5 = H R4 =
F367 R4 = R5 =
F357 R1 = R2 = F, R3 = H
R4—CH2CH2CH2CH2—R5
F358 R1 = R2 = F, R3 = H
R4—CH2CH2CH2CH2CH2—R5

图 4

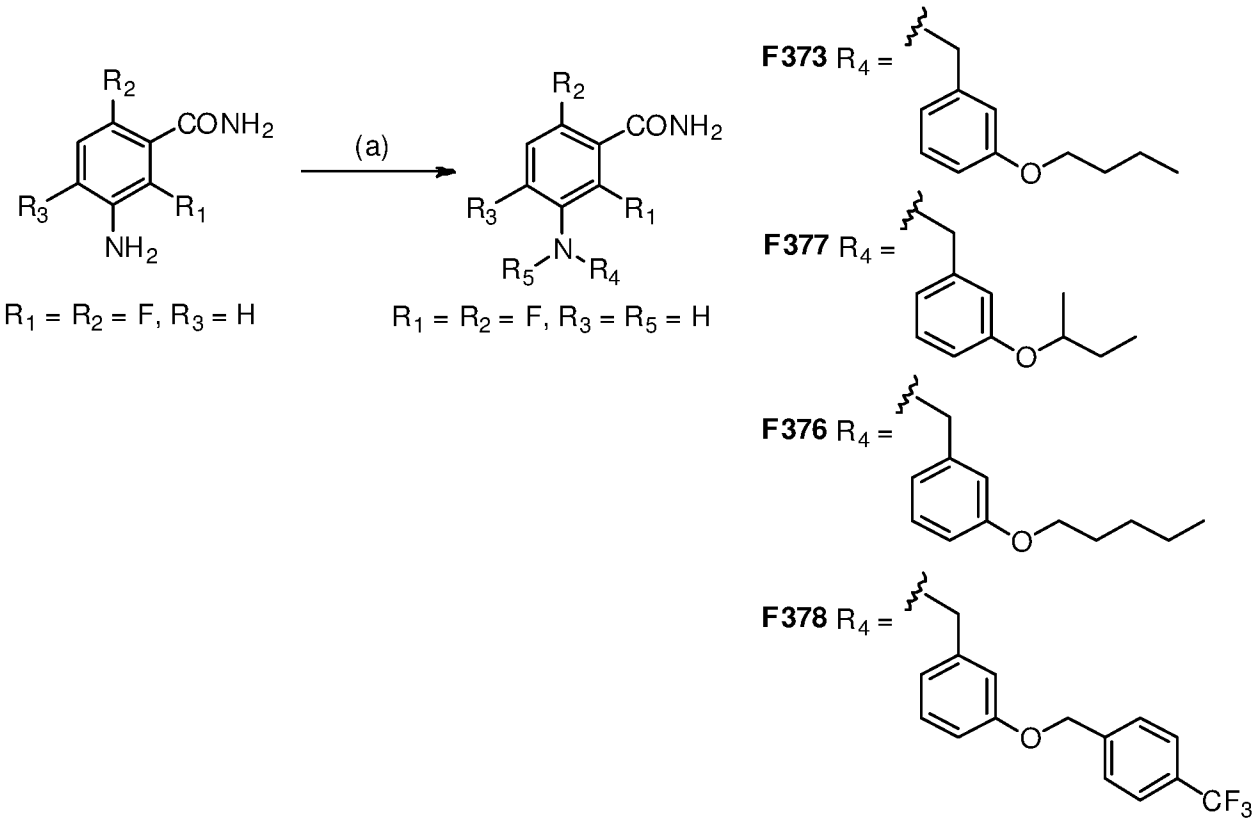

R2
CONH2
R3
R1
NH2
(a)
R2
CONH2
R3
R1
R5
N
R4
R1 = R2 = F, R3 = H
R1 = R2 = F, R3 = R5 = H
F373 R4 =
O
F377 R4 =
O
F376 R4 =
O
F378 R4 =
O
CF3

图 5

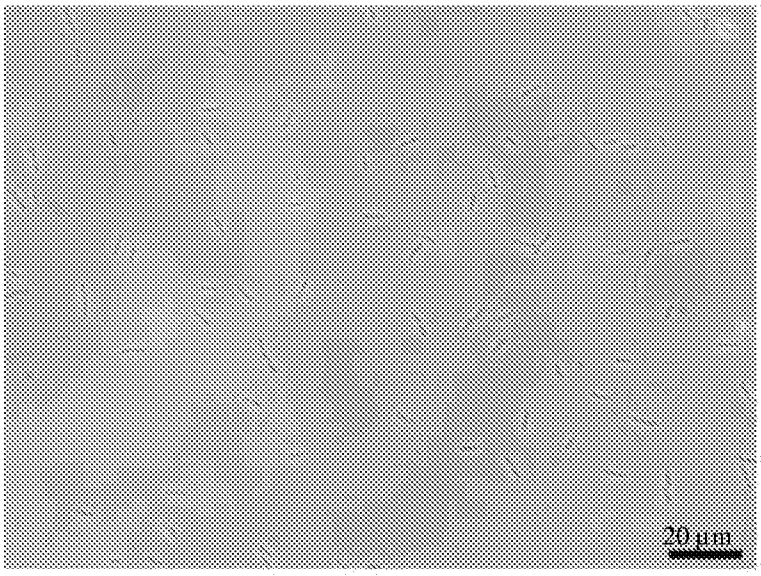

20 μm

图 6

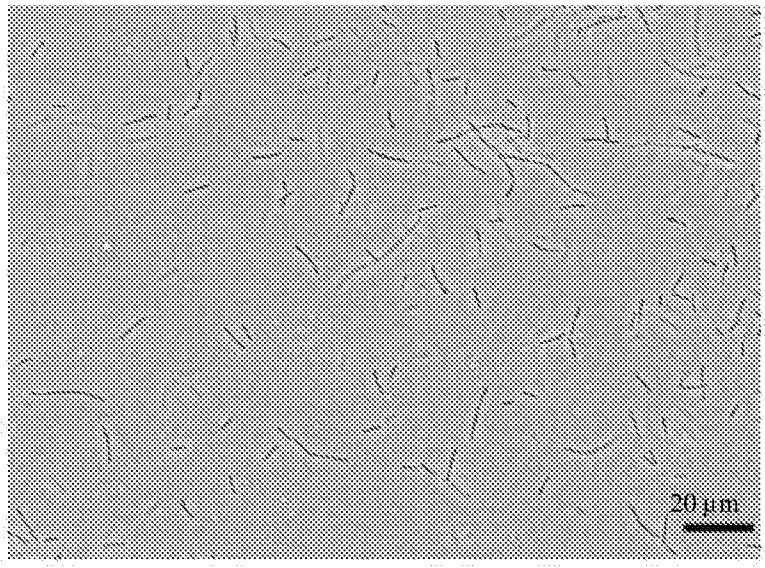


图 7

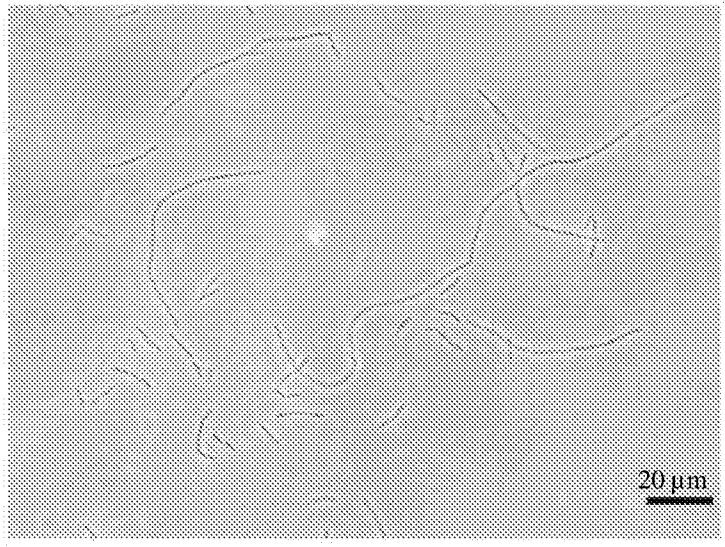


图 8

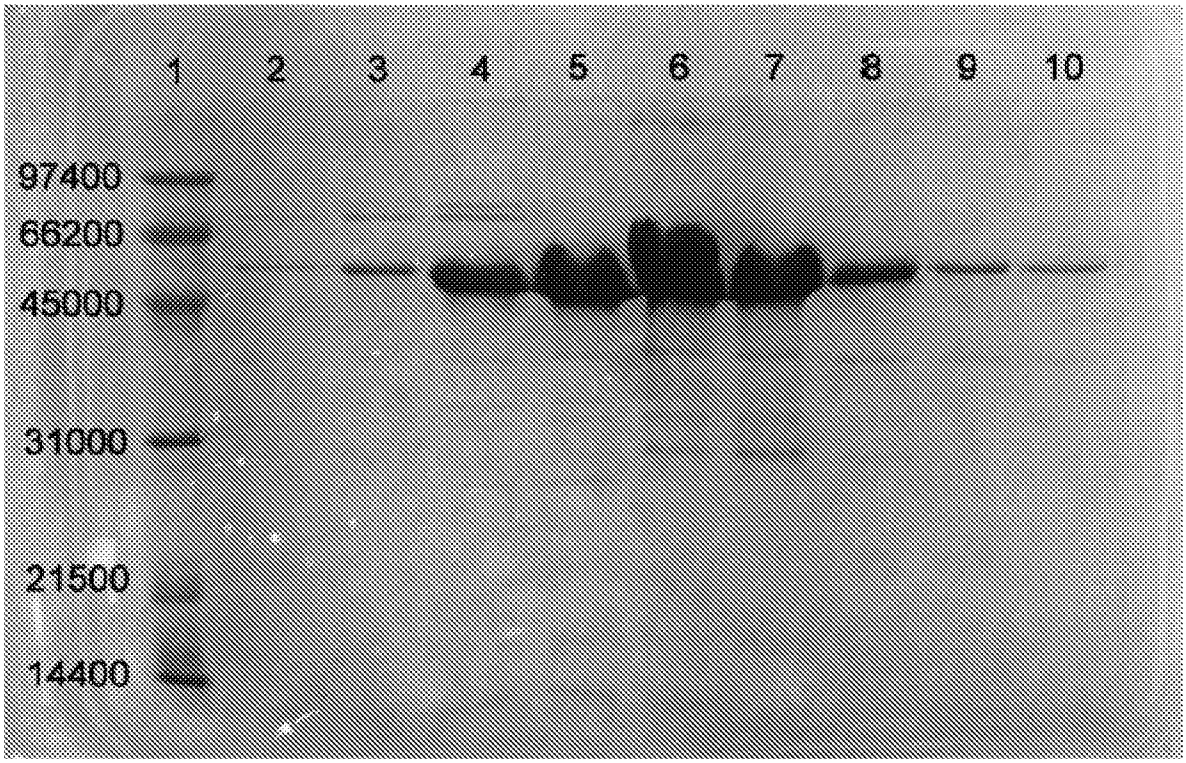

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
97400
66200
45000
31000
21500
14400

图 9

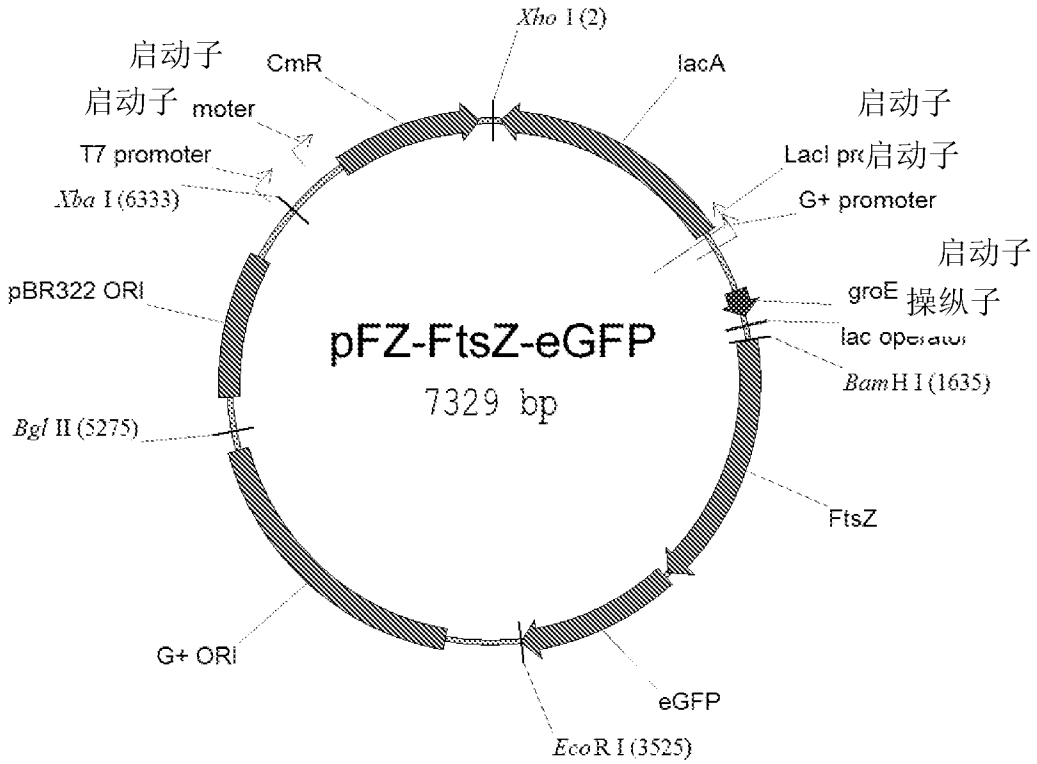

Xho I (2)
启动子
CmR
lacA
启动子
moter
T7 promoter
Xba I (6333)
G+ promoter
pBR322 ORI
groE
操纵子
pFZ-FtsZ-eGFP
7329 bp
BamH I (1635)
Bgl II (5275)
FtsZ
G+ ORI
eGFP
EcoR I (3525)

图 10a

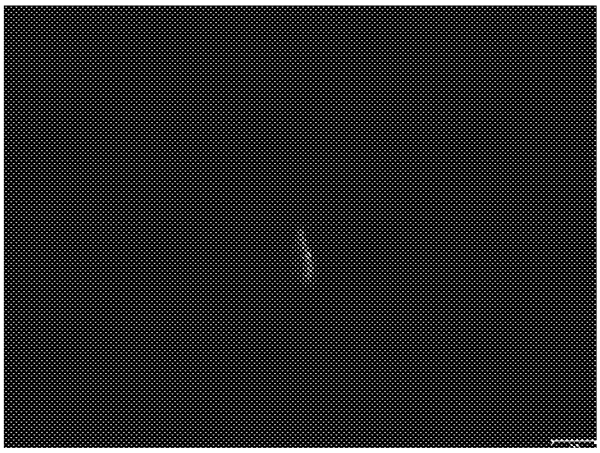


图 10b

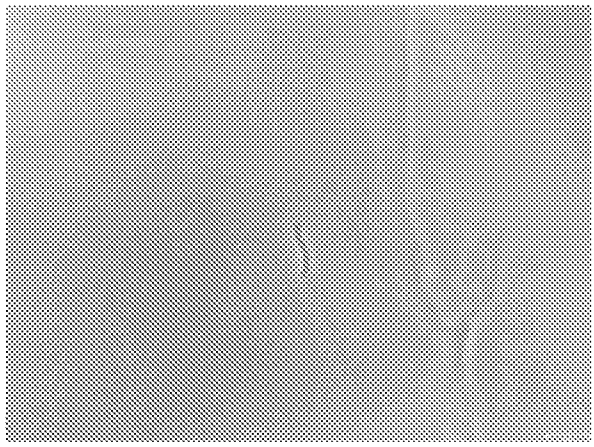


图 10c

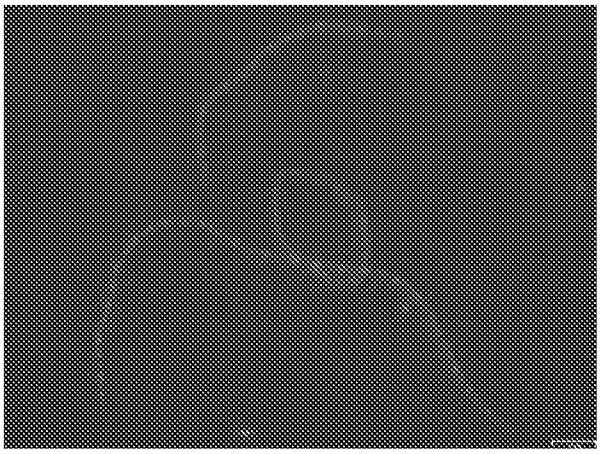


图 10d

图 10e

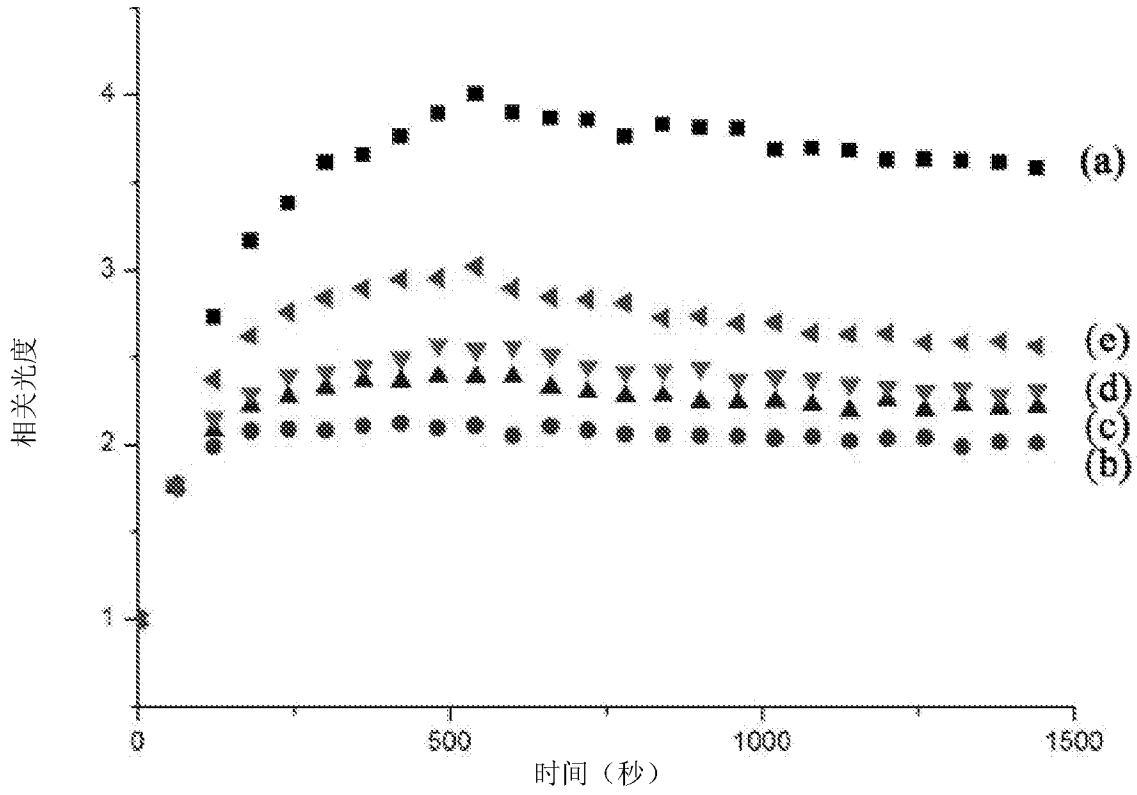

相关光度
4
3
2
0
500
1000
1500
时间（秒）
(a)
(e)
(d)
(c)
(b)

图 11

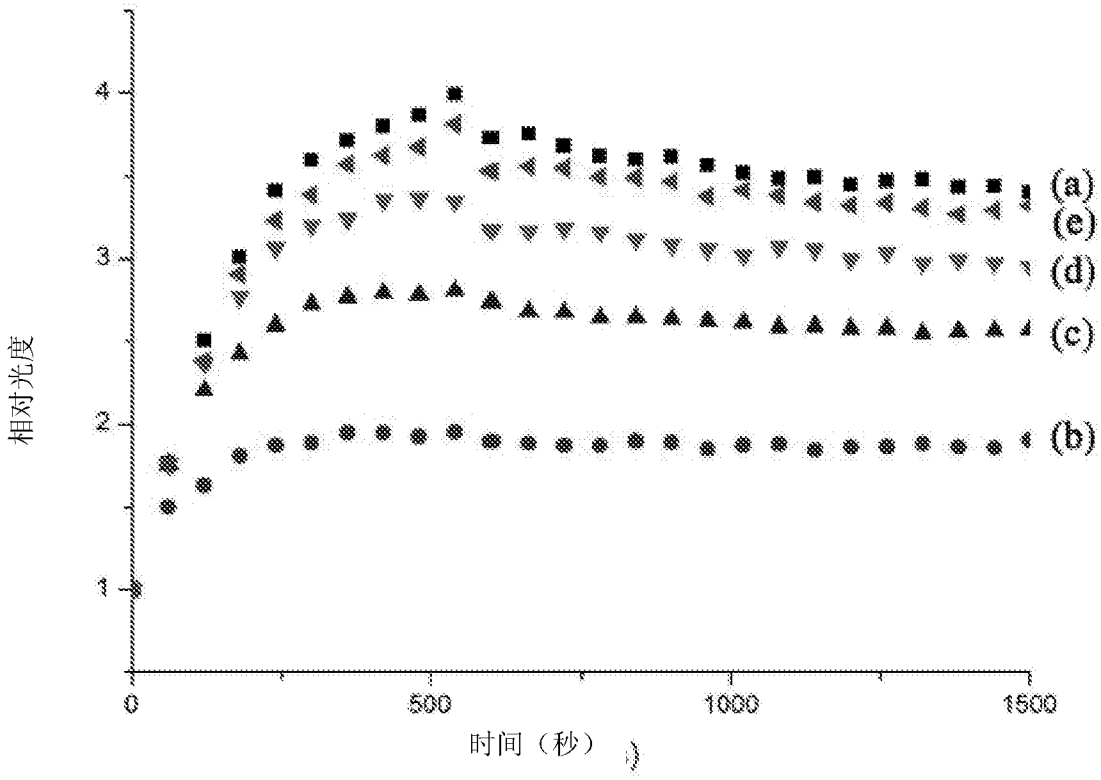

相对光度
4
3
2
1
0
500
1000
1500
时间（秒）
(a)
(e)
(d)
(c)
(b)

图 12

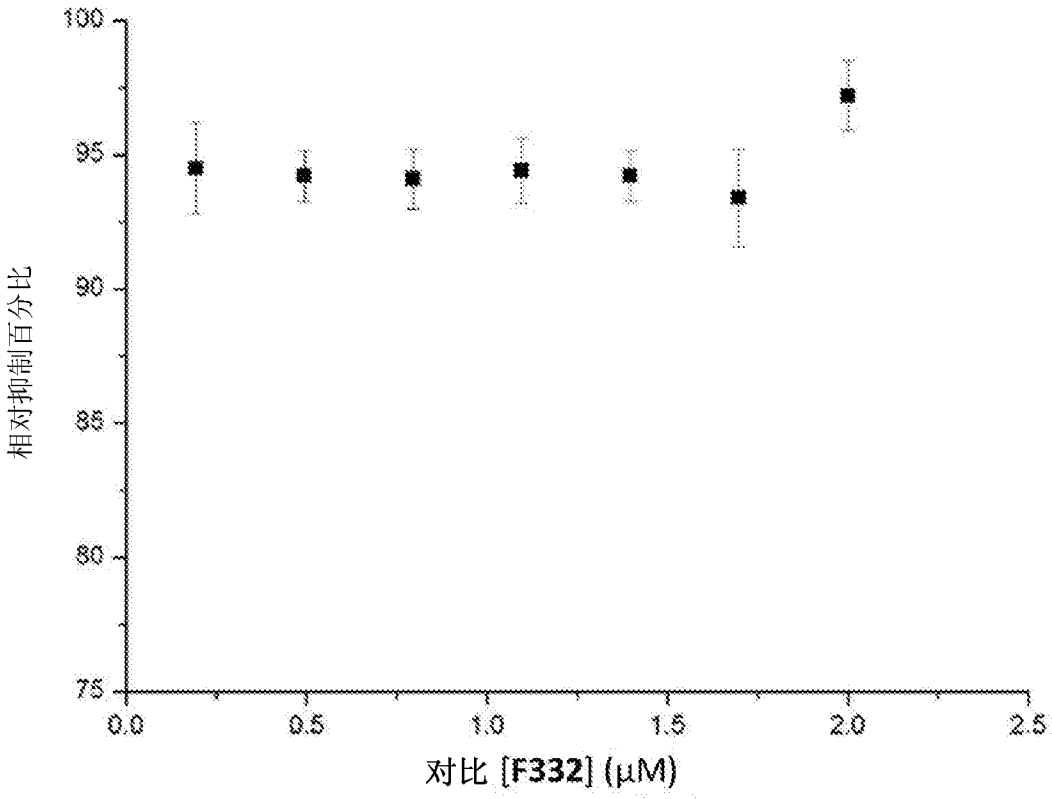

100
95
90
85
80
75
相对抑制百分比
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
对比 [F332] (μM)

图 13

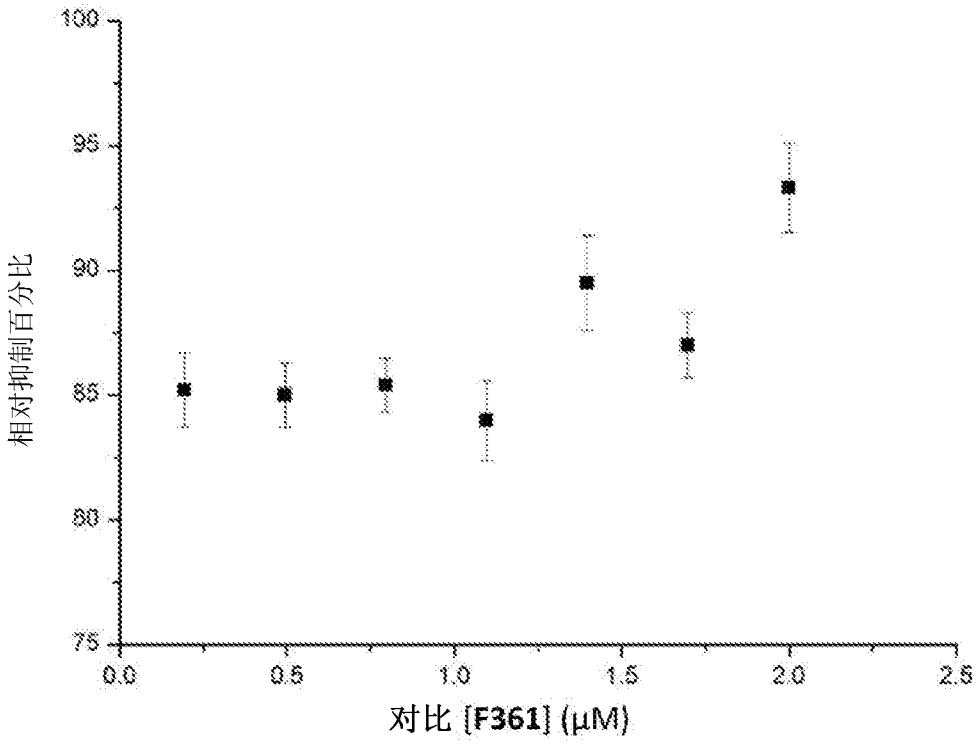

100
95
90
85
80
75
相对抑制百分比
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
对比 [F361] (μM)

图 14

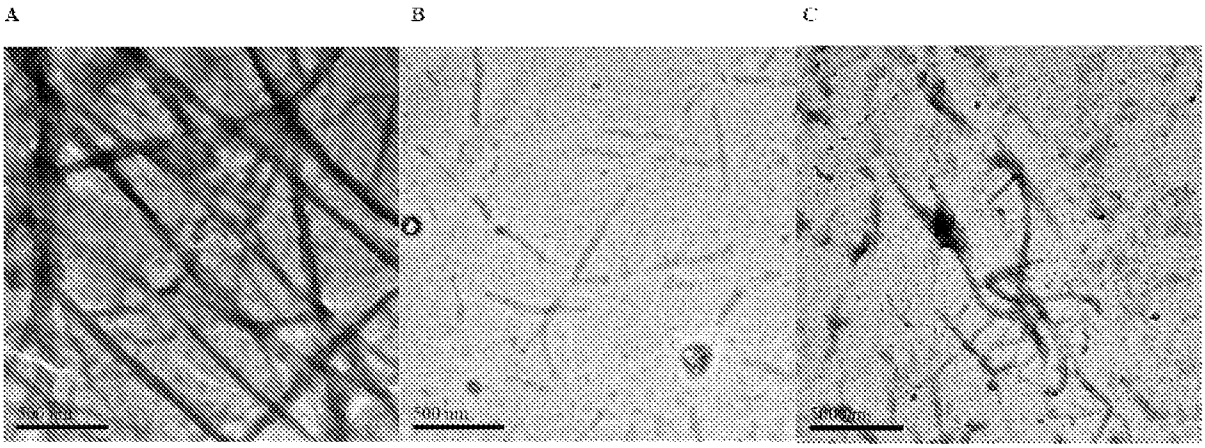


图 15

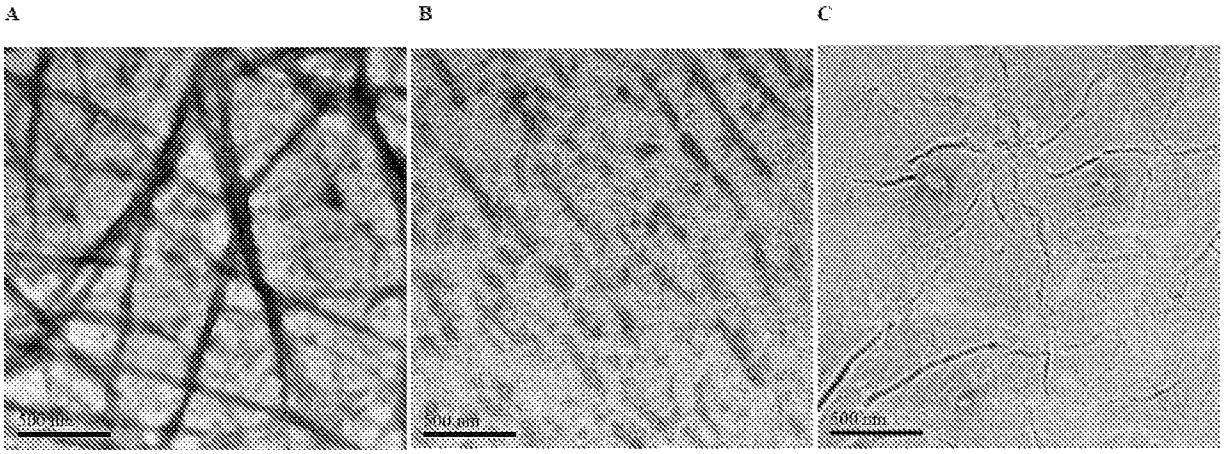


图 16

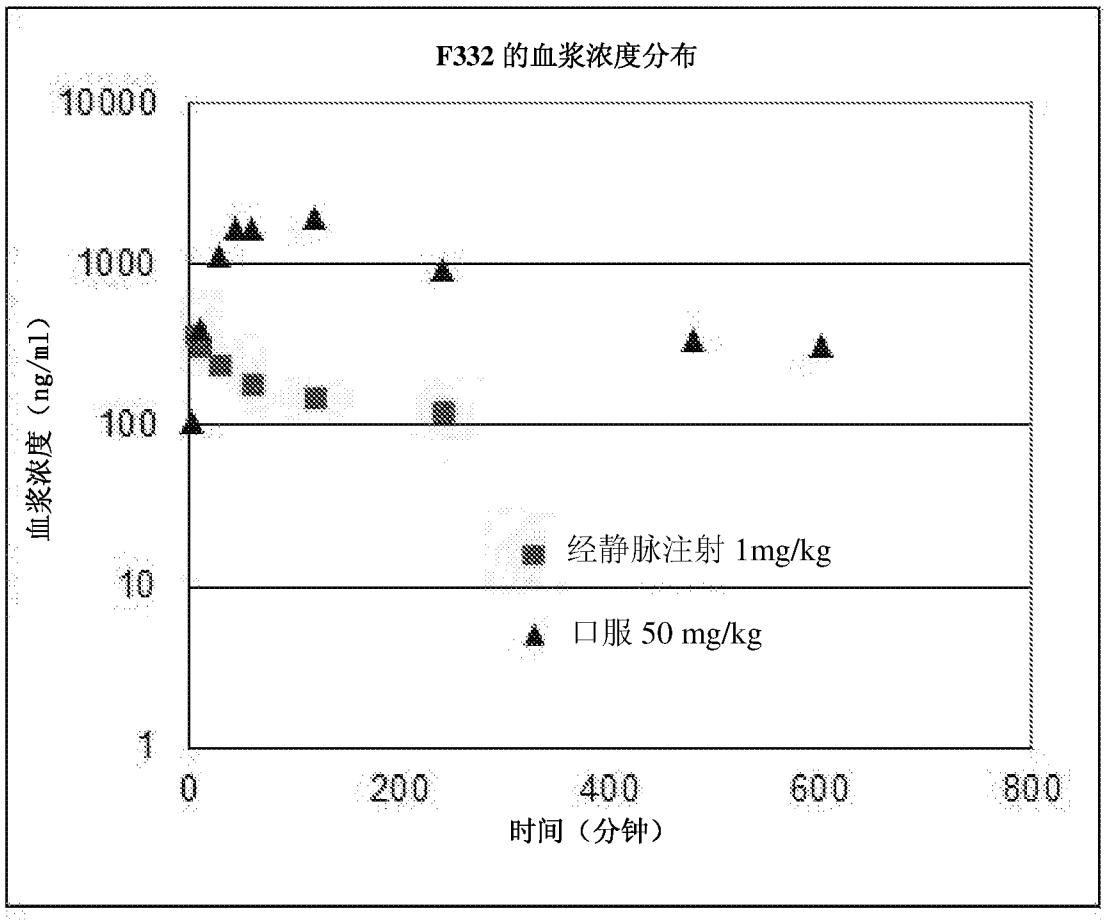

F332 的血浆浓度分布
10000
1000
100
10
1
血浆浓度（ng/ml）
0
200
400
600
800
时间（分钟）
经静脉注射 1mg/kg
口服 50 mg/kg

图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/089286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C 237/28 (2006.01) i; A61K 31/16 (2006.01) i; A61P 31/04 (2006.01) i

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)

C07C 237/; A61K 31/-; A61P31/-

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, REGISTRY: benzamide, amino, phenyl, antibacterial, bacterium

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007107758 A1 (PROLYSIS LTD et al.) 27 September 2007 (27.09.2007) see description, embodiment, compound, especially embodiments 5, 9, 79-82, 116, 147, 195, 331, 332, and description, page 167, table 4	1-37
X	"RN: 1409283-72-2" REGISTRY, 02 December 2012 (02.12.2012),	1
X	"RN: 155883-27-4" REGISTRY, 11 June 2009 (11.06.2009),	1
X	"RN: 1155657-54-7" REGISTRY, 11 June 2009 (11.06.2009),	1
X	"RN: 1154289-95-8" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 October 2015	24 November 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Ning Telephone No. (86-10) 82246737

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/089286

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"RN: 1153934-73-6" REGISTRY, 08 June 2009 (08.06.2009),	1
X	"RN: 1154121-90-0" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1
X	"RN: 1154120-26-9" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1
X	"RN: 1154119-82-0" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1
X	"RN: 1154119-76-2" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1
X	"RN: 1154119-71-7" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1
X	"RN: 1154119-41-1" REGISTRY, 09 June 2009 (09.06.2009),	1
X	"RN: 1153947-40-0" REGISTRY, 08 June 2009 (08.06.2009),	1
X	"RN: 1153942-96-1" REGISTRY, 08 June 2009 (08.06.2009),	1
X	"RN: 1153942-17-6" REGISTRY, 08 June 2009 (08.06.2009),	1
X	"RN: 1153934-94-1" REGISTRY, 08 June 2009 (08.06.2009),	1
X	"RN: 1039967-91-3" REGISTRY, 10 August 2008 (10.08.2010)	1, 2
X	CZAPLEWSKI, L. G. et al. "Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein FtsZ" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 19, 13 November 2008 (13.11.2008) pages 524-527, see page 526, tables 2-4	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/089286

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/089286

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2007107758 A1	27 September 2007	EP 1996180 B1	03 August 2011
		DK 1996180 T3	31 October 2011
		US 8865736 B2	21 October 2014
		MY 148430 A	30 April 2013
		MX 2008011857 A	15 December 2008
		AT 518564 T	15 August 2011
		CA 2648785 A1	27 September 2007
		NZ 571271 A	28 October 2011
		BR PI0709110 A2	28 June 2011
		AU 2007228539 A1	27 September 2007
		US 2015191420 A1	09 July 2015
		EP 1996180 A1	03 December 2008
		JP 2009531322 A	03 September 2009
		US 2012122918 A1	17 May 2012
		AU 2007228539 B2	10 January 2013
		US 2010173933 A1	08 July 2010
		CN 102008459 A	13 April 2013
		EA 200802036 A1	28 April 2009
		KR 20090017483 A	18 February 2009
		CN 102008459 B	29 May 2013
		EA 015198 B1	30 June 2011
		US 2013072520 A2	21 March 2013
		US 8088791 B2	03 January 2012
		IL 193834 D0	03 August 2009

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/089286

A. 主题的分类

C07C 237/28(2006.01)i; A61K 31/16(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i

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)

C07C237/; A61K31/-; A61P31/-

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）)

WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; REGISTRY：benzamide, amino, phenyl, antibacterial, 苯甲酰胺，菌，氨基

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
X	WO 2007107758 A1 (PROLYSIS LTD等) 2007年 9月 27日 (2007-09-27) 参见说明书实施例化合物，尤其是实施例5、19、79-82、116、147、195、331-332以及说明书第167页表4	1-37
X	"RN: 1409283-72-2" REGISTRY, 2012年 12月 2日 (2012-12-02),	1
X	"RN: 1155883-27-4" REGISTRY, 2009年 6月 11日 (2009-06-11),	1
X	"RN: 1155657-54-7" REGISTRY, 2009年 6月 11日 (2009-06-11),	1
X	"RN: 1154289-95-8" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009-06-09),	1
X	"RN: 1153934-73-6" REGISTRY, 2009年 6月 8日 (2009-06-08),	1
X	"RN: 1154121-90-0" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009-06-09),	1

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2015年 10月 30日	2015年 11月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	陈宁 电话号码 (86-10)82246737

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

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
X	"RN: 1154120-26-9" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009 - 06 - 09),	1
X	"RN: 1154119-82-0" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009 - 06 - 09),	1
X	"RN: 1154119-76-2" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009 - 06 - 09),	1
X	"RN: 1154119-71-7" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009 - 06 - 09),	1
X	"RN: 1154119-41-1" REGISTRY, 2009年 6月 9日 (2009 - 06 - 09),	1
X	"RN: 1153947-40-0" REGISTRY, 2009年 6月 8日 (2009 - 06 - 08),	1
X	"RN: 1153942-96-1" REGISTRY, 2009年 6月 8日 (2009 - 06 - 08),	1
X	"RN: 1153942-17-6" REGISTRY, 2009年 6月 8日 (2009 - 06 - 08),	1
X	"RN: 1153934-94-1" REGISTRY, 2009年 6月 8日 (2009 - 06 - 08),	1
X	"RN: 1039967-91-3" REGISTRY, 2008年 8月 10日 (2008 - 08 - 10),	1-2
X	CZAPLEWSKI, L. G. et al. "Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein FtsZ" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 第19卷, 2008年 11月 13日 (2008 - 11 - 13), 第524-527页 参见第526页表2-4	1-37

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/089286

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☑ 电子形式

b. (提交时间)

☐ 含在申请提交时的国际申请中

☑ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/089286

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利	公布日（年/月/日）
WO 2007107758 A1	2007年 9月 27日	EP 1996180 B1	2011年 8月 3日
		DK 1996180 T3	2011年 10月 31日
		US 8865736 B2	2014年 10月 21日
		MY 148430 A	2013年 4月 30日
		MX 2008011857 A	2008年 12月 15日
		AT 518564 T	2011年 8月 15日
		CA 2648785 A1	2007年 9月 27日
		NZ 571271 A	2011年 10月 28日
		BR PI0709110 A2	2011年 6月 28日
		AU 2007228539 A1	2007年 9月 27日
		US 2015191420 A1	2015年 7月 9日
		EP 1996180 A1	2008年 12月 3日
		JP 2009531322 A	2009年 9月 3日
		US 2012122918 A1	2012年 5月 17日
		AU 2007228539 B2	2013年 1月 10日
		US 2010173933 A1	2010年 7月 8日
		CN 102008459 A	2011年 4月 13日
		EA 200802036 A1	2009年 4月 28日
		KR 20090017483 A	2009年 2月 18日
		CN 102008459 B	2013年 5月 29日
		EA 015198 B1	2011年 6月 30日
		US 2013072520 A2	2013年 3月 21日
		US 8088791 B2	2012年 1月 3日
		IL 193834 D0	2009年 8月 3日