铜绿假单胞菌 PAO1 III 型分泌系统新型抑制剂的合成和生物活性研究

张成芳^a 吴小刚^b 李 燕^c 梁翠荣^a 车亦舟^b 顾玲玲^a
任 杰^a 胡 昆^a 孙小强^d Ching-Hong Yang^{*,b} 陈 新^{*,a}

(^a 常州大学制药与生命科学学院 常州 213164)

(^b Department of Biological Sciences, University of Wisconsin-Milwaukee, Wisconsin 53211, USA)

(^c 中国农业大学植物病理系 北京 100193)

(^d 常州大学石油化工学院 常州 213164)

摘要 铜绿假单胞菌 PAO1 是一种革兰氏阴性机会性人类病原菌, 易感染免疫受损的人群. III 型分泌系统(Type three secretion system, T3SS)是其主要的致病因子. T3SS 抑制剂的策略是抑制铜绿假单胞菌表达及分泌毒力蛋白, 阻止其对宿主细胞的侵染. 在一种已知 T3SS 抑制剂的结构基础上, 设计和合成了 20 种 α -苯氧基酰胺新衍生物, 系统研究了它们的构效关系, 研究表明有 5 种新衍生物对铜绿假单胞菌的一个效应子编码基因 *exoS* 的表达具有明显抑制作用. 其中 *N*-(2-吡啶基甲基)-2-(2,4-二氯苯氧)-丁酰胺(**5r**)的活性强于已知的抑制剂 MBX1641, 并具有很好的水溶性.

关键词 铜绿假单胞菌; III 型分泌系统; 抑制剂; 合成

Synthesis and Bioactivity of Novel Inhibitors for Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Zhang, Chengfang^a Wu, Xiaogang^b Li, Yan^c Liang, Cuirong^a Che, Yizhou^b
Gu, Lingling^a Ren, Jie^a Hu, Kun^a Sun, Xiaoqiang^d
Yang, Ching-Hong^{*,b} Chen, Xin^{*,a}

(^a School of Pharmaceutical and Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164)

(^b Department of Biological Sciences, University of Wisconsin-Milwaukee, Wisconsin 53211, USA)

(^c Department of Plant Disease, China Agricultural University, Beijing 100193)

(^d School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164)

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is a Gram-negative, opportunistic bacterial human pathogen which infects immunocompromised individuals. The bacterium carries a type III secretion system (T3SS) as a major virulence determinant. The strategy of T3SS inhibitors is to prevent the bacterium from injecting effector proteins into the host, and causing a change in the pathophysiology of the host cells. Based on the structure of a known T3SS inhibitor of *P. aeruginosa*, 20 new α -phenoxyacetamide derivatives have been designed and synthesized, and the structure-activity relationship results for these new derivatives have been discussed. Five derivatives have shown strong inhibitory effect against *exoS* gene expression of *P. aeruginosa*, and among them, *N*-(2-pyridylmethyl)-2-(2,4-dichlorophenoxy)-butanamide (**5r**) has not only exhibited stronger potency than the known T3SS inhibitor, but also better solubility in aqueous solution.

Keywords *Pseudomonas aeruginosa*; type III secretion system; inhibitors; synthesis

抗生素治疗是目前普遍应用的、针对病原细菌感染的
的治疗手段. 大多数抗生素的工作原理是抑制细菌重要
的细胞生理功能, 如通过抑制肽聚糖的交联从而阻止细

胞壁的合成, 最后杀死细菌. 但是抗生素的错误使用以
及过量的使用抗生素导致细菌产生了严重的耐药性问
题. 为避免如“超级细菌”NDM-1^[1]这类对人类健康和

* E-mail: xinchen@cczu.edu.cn; chyang@uwm.edu

Received February 26, 2013; revised April 1, 2013; published online April 8, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21272029) and the “333 High-level talent training program” of Jiangsu Province.

国家自然科学基金(No. 21272029)和江苏省“333 高层次人才培养工程”资助项目.

生命构成直接威胁的强耐药性细菌的产生, 科学家们对细菌的致病机制进行了更深入的研究, 以开发更为有效的新型抗生素. 细菌分泌系统的发现是近年来细菌致病机制研究的重要进展^[2]. 分泌系统是由一些具有特殊功能的蛋白质和多肽组成的管状通道^[3]. 其中, III 型分泌系统(Type III secretion system, T3SS)存在于许多革兰氏阴性病原菌中, 该系统可使病原细菌将致病因子(或称效应因子)穿过细菌周质而直接注入寄主细胞内部, 通过抑制细胞的免疫功能, 干扰宿主细胞的信号传导和其它细胞过程, 从而引起感染发病^[4]. 大部分病原性肠杆菌中, 如人和动物病原菌中的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、伤寒沙门氏菌和鼠疫杆菌, 以及植物病原细菌中的菊欧文氏菌、梨火疫病和丁香假单胞菌等, T3SS 是其重要的致病机制^[5].

图1 文献报道的 T3SS 抑制剂
Figure 1 Some known T3SS inhibitors

近年来, 国际学术界和工业界很重视 T3SS 抑制剂的研究和开发. 2005 年 Hung 等^[6]报道小分子化合物 Virstatin(图 1)可有效抑制霍乱弧菌的转录调节因子 ToxT 的表达, 从而抑制毒性因子基因的表达. 小鼠试验进一步表明 Virstatin 作为毒力抑制剂能有效抑制霍乱弧菌的传染. 2006 年 Muschiol 等^[7]报道 T3SS 抑制剂 INP0400(图 1)对不同周期的沙眼衣原体有不同程度的抑制效果. 其中在细胞周期的晚期, INP0400 能抑制 RB (reticulate body, 网纹体)向传染性 EB (elementary body, 基本体)转变, 从而明显降低沙眼衣原体的传染^[8]. 另外, 与 INP0400 结构相近的两种小分子化合物 INP0007 和 INP0403(图 1)虽不影响细菌的生长, 但可有效抑制沙门氏菌 T3SS 效应蛋白的分泌. 体内进一步试验表明这两个化合物能够抑制沙门氏菌的 T3SS 效应子的分泌和炎症反应.

铜绿假单胞菌 PAO1 是一种革兰氏阴性机会性人类病原细菌, 是医院内感染的常见病原菌. 该菌对囊性纤维化、肺炎、尿路感染和烧伤的病人构成了生命的威

胁. 然而, 铜绿假单胞菌 PAO1 对抗生素的敏感性很差, 除了其天然的耐药性外, 该细菌还很容易获得后天耐药性^[9]. 研究发现, T3SS 是该菌引起和传播急性感染的致病因子^[10], 它可以将 3 种效应分子蛋白 ExoS, ExoT 和 ExoY 注入到寄主细胞内部. 在这 3 种效应分子蛋白中, ExoS 是最主要的细胞毒素, 它可以抑制细胞迁移、阻止细胞交联, 以及破坏上皮细胞内的细胞骨架^[11]. 前期研究表明, 化合物 MBX1641(图 1)可抑制铜绿假单胞菌 PAO1 的 T3SS 效应因子 ExoS 的分泌^[12]. 然而该化合物抑制活性的重现性较差、水溶性不好, 直接限制了它的进一步开发应用. 本文设计并合成了 MBX1641 的一系列新衍生物, 系统研究了它们的构效关系, 发现了活性高而且水溶性较好的铜绿假单胞菌 PAO1 的 T3SS 抑制剂.

1 结果与讨论

1.1 化合物合成

在 MBX1641 的结构基础上, 我们设计了一系列 α -苯氧基酰胺新衍生物, 主要是改变 2,4-二氯苯氧基(左侧部分)上的取代基、酰胺侧链(中间部分)的长度以及 3,4-(次甲基二氧)苄基(右侧部分)的取代基. 新衍生物的合成是通过三步简便的反应(Scheme 1): 取代苯酚 **1** 与 α -溴代酸甲酯 **2** 在碳酸钾存在下反应, 得到 α -苯氧基酸甲酯 **3a~3n** (**3f** 和 **3h** 是 α -苯氧基酸乙酯); 后者经过氢氧化锂水解, 产生相应的羧酸 **4a~4n**; 在 EDC/HOBt^[13] 作用下, **4a~4n** 分别同相应的胺缩合, 则得到一系列 α -苯氧基酰胺 **5a~5m** 和 **5o~5s**. 当用 2,4-二氯苯氧基取代 2,4-二氯苯氧基后, 相应的产物 *N*-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-丁酰胺(**5u**, 表 1)可以用同样的合成路线得到. 另外, MBX1641 的酯类似物 **5t** 是由 2-(2,4-二氯苯氧)-丁酸(**4e**)与 3,4-(次甲基二氧)苄醇缩合得到.

Scheme 1

1.2 抑制剂的筛选

本文以铜绿假单胞菌 PAO1 的 T3SS 为研究对象, 将 T3SS 其中一个效应子编码基因 *exoS* 的启动子区域克

隆到启动子活性检测载体 pPROBE-AT, 获得质粒 pAT-*exoS*, 测试结果见表 1.

表 1 化合物 5a~5u 的结构及活性测试结果
Table 1 Structures and bioactivity of compounds 5a~5u

Compd.	Structure	Avg MFI $\pm$ SD	Precipitate in LB medium ^a
None	—	192.56 $\pm$ 3.97	—
5a		93.64 $\pm$ 0.7	Yes
5b		272.3 $\pm$ 4.18	Yes
5c		265.45 $\pm$ 9.23	Yes
5d		286.07 $\pm$ 8.45	Yes
5e		52.07 $\pm$ 0.75	Yes
5f		269.74 $\pm$ 13.53	Yes
5g		235.67 $\pm$ 7.68	Yes
5h		285.14 $\pm$ 4.34	Yes
5i		181.42 $\pm$ 2.43	No
5j		244.46 $\pm$ 2.33	Yes
5k		241.42 $\pm$ 5.82	Yes

续表

Compd.	Structure	Avg MFI $\pm$ SD	Precipitate in LB medium ^a
5l		234.89 $\pm$ 3.36	Yes
5m		181.56 $\pm$ 4.18	Yes
5n		165.98 $\pm$ 2.34	No
5o		77.2 $\pm$ 5.98	Yes
5p		71.41 $\pm$ 5.43	Yes
5q		146.68 $\pm$ 3.98	Yes
5r		28.56 $\pm$ 6.54	No
5s		271.13 $\pm$ 7.5	Yes
5t		269.36 $\pm$ 2.46	Yes
5u		183.35 $\pm$ 3.65	Yes

^a 在测试介质中被测化合物(250 μ mol/L)是否有沉淀生成。

从表 1 中的筛选数据,可以得到以下几点结果: (1) 苯氧基(左侧部分)上取代基的电负性对新衍生物活性的影响: 改变 MBX1641 (**5a**, 表 1)中 2,4-二氯苯氧基上的取代基,无论是吸电子基团溴(**5c**)和氟(**5d**),还是给电子基团甲基(**5b**),新衍生物都没有抑制活性。(2) 酰胺侧链(中间部分)的长度对新衍生物活性的影响: 当酰胺侧链的长度增加 1 个碳原子(共 3 个碳原子)时,所生成化合物 **5e** 对 *exoS* 基因表达具有明显抑制活性。并且, **5e** 抑制活性的重现性很好。然而当酰胺侧链的长度增加到 4 个碳原子(**5f**), 5 个碳原子(**5g**),或改变成支链(**5h**),或加入杂原子(**5i**)时,新衍生物都没有抑制活性。值得注

意的是, **5i** 的水溶性明显改善。在保持酰胺侧链的长度为 3 个碳原子的情况下,改变 2,4-二氯苯氧基上的取代基,所得的衍生物 **5j**~**5n** 都没有抑制活性。(3) 3,4-(次甲基二氧)苄基(右侧部分)上取代基对新衍生物活性的影响: 当将 3,4-(次甲基二氧)苄基改变为 3,4-二氯苄基(**5o**)、糠基(**5p**)和吡啶甲基(**5r**)后,新衍生物都表现出对 *exoS* 基因表达的明显抑制活性。特别是 **5r** 具有很好的活性,其对 *exoS* 基因表达的抑制活性强于 MBX1641,且具有很好的水溶性。(4) 将 **5e** 中左侧的 2,4-二氯苯基与右侧的 3,4-(次甲基二氧)苯基位置对调,所生成的衍生物 **5s** 没有抑制活性。(5) 当将 **5e** 中的酰胺键改变成酯键,

或将 2,4-二氯苯氧基变成 2,4-二氯苄氧基后, 所得到的衍生物 **5t** 和 **5u** 也都失去了抑制活性(表 1)。

1.3 Western 杂交结果

为进一步验证这些化合物对 T3SS 效应子的抑制效果, 本文选取其中一些化合物用 Western 杂交的方法检测 ExoS 蛋白的表达水平。与转录水平影响 *exoS* 基因表达的结果一样, 在培养基中添加化合物 **5a**, **5e**, **5o** 和 **5r** 可显著抑制 ExoS 蛋白的表达(图 2), 而其它化合物则并不影响 ExoS 蛋白的表达。

图 2 T3SS 抑制剂影响 ExoS 蛋白的表达

Figure 2 Alteration of the production of T3SS effector ExoS by T3SS inhibitors

P. aeruginosa PAO1 cells were grown in LB broth supplemented with 10 mmol/L NTA, and 250 μ mol/L inhibitors. The same volume of DMSO was added to the culture as a negative control (lane 1). The Western blot was performed using an anti-ExoS antibody. (A) The results for derivatives **5a**~**5f**, **5h** and **5o**; (B) results for **5r**

2 结论

本文在已知 T3SS 抑制剂 MBX1641 的结构基础上, 设计和合成了 20 种 α -苯氧基酰胺新衍生物, 系统研究了它们的构效关系, 发现了新衍生物 **5e**, **5o**, **5p** 和 **5r** 表现出对 *exoS* 基因表达的明显抑制活性, 特别是 **5r** 具有很好的活性, 不仅对 *exoS* 基因表达的抑制活性强于 MBX1641, 而且具有很好的水溶性。此结果为设计和合成性能更好的铜绿假单胞菌 PAO1 的 T3SS 抑制剂提供了有益的信息。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

实验中用到的主要仪器有: RE-522A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); AL204 型分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); ZF-I 型三用紫外分析仪(上海顾林电光仪器厂); 安捷伦 1260 型 HPLC; 岛津 2020 型 LC-MS; Bruker AVANCE 300/400 MHz 核磁共振仪

(TMS 为内标)。

实验所用化学试剂的生产厂家包括: Sigma-Aldrich, 安耐吉和阿拉丁; 无水四氢呋喃经过金属钠处理, 其余溶剂(石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、二甲基亚砜和甲醇)均为分析纯。

3.2 化合物的合成方法

3.2.1 3a~3n 的合成通法

称取苯酚 **1** (5 mmol) 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入无水碳酸钾(1.73 g, 12.5 mmol)、丙酮(30 mL)和 2-溴代酸甲酯(5.5 mmol), 加热回流 8~12 h(薄层色谱 TLC 监测反应进程)。反应物冷却至室温, 抽滤去除固体, 再将滤液蒸干后加入水(30 mL), 用乙酸乙酯萃取(30 mL $\times$ 3), 合并萃取液分别用水(20 mL $\times$ 2)和饱和食盐水(20 mL)洗涤, 无水硫酸镁干燥。减压浓缩, 粗产物经过硅胶柱层析分离纯化[V(乙酸乙酯): V(石油醚)=1:8~1:3] 得 **3a**~**3n**。

2-(2,4-二氯苯氧)-丙酸甲酯(**3a**)^[14] ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 92%。¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, $J=3$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J=3.0$, 9.0 Hz, 1H), 6.78 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.73 (q, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.68 (d, $J=9.0$ Hz, 3H)。

2-(2,4-二甲基苯氧)-丙酸甲酯(**3b**) ($R^1=2\text{-CH}_3$, $R^2=4\text{-CH}_3$, $R^3=\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 93%。¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.96 (s, 1H), 6.87 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.70 (q, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.24 (s, 6H), 1.61 (d, $J=6.0$ Hz, 3H)。

2-(2,4-二溴苯氧)-丙酸甲酯(**3c**)^[15] ($R^1=2\text{-Br}$, $R^2=4\text{-Br}$, $R^3=\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 94%。¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.69 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J=2.4$, 9.0 Hz, 1H), 6.68 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.73 (q, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.68 (d, $J=6.9$ Hz, 3H)。

2-(2,4-二氟苯氧)-丙酸甲酯(**3d**) ($R^1=2\text{-F}$, $R^2=4\text{-F}$, $R^3=\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 91%。¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.96~6.76 (m, 3H), 4.70 (q, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.65 (d, $J=6.9$ Hz, 3H)。

2-(2,4-二氯苯氧)-丁酸甲酯(**3e**) ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 93%。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J=2.4$, 8.8 Hz, 1H), 6.72 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.56 (q, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.08~2.01 (m, 2H), 1.11 (t, $J=7.2$ Hz, 3H)。

2-(2,4-二氯苯氧)-戊酸乙酯(**3f**) [$R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$]: 黄色液体, 产率 95%。¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J=2.4$, 8.7 Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 4.61 (dd, $J=$

4.8, 7.8 Hz, 1H), 4.27~4.19 (m, 2H), 2.09~1.97 (m, 2H), 1.65~1.55 (m, 2H), 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.01 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苯氧)-己酸甲酯(**3g**) [$R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$]: 黄色液体, 产率 94%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.37 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J=2.8, 8.8$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.59 (dd, $J=4.8, 7.2$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.05~1.97 (m, 2H), 1.53~1.49 (m, 2H), 1.41~1.34 (m, 2H), 0.93 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苯氧)-异戊酸乙酯(**3h**)^[6] ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$): 黄色液体, 产率 52%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J=2.4, 8.7$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.24 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.43~2.32 (m, 1H), 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.13 (dd, $J=6.0, 6.9$ Hz, 6H).

2-(2,4-二氟苯氧)-丁酸甲酯(**3j**) ($R^1=2\text{-F}$, $R^2=4\text{-F}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 94%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.95~6.83 (m, 2H), 6.78~6.72 (m, 1H), 4.52 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.04~1.97 (m, 2H), 1.10 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

2-(2,4-二溴苯氧)-丁酸甲酯(**3k**) ($R^1=2\text{-Br}$, $R^2=4\text{-Br}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 92%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.68 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J=2.0, 6.4$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.56 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.09~2.02 (m, 2H), 1.11 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

2-(4-氯苯氧)-丁酸甲酯(**3l**)^[17] ($R^1=\text{H}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 93%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.53 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.02~1.95 (m, 2H), 1.07 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

2-(4-硝基苯氧)-丁酸甲酯(**3m**) ($R^1=\text{H}$, $R^2=4\text{-NO}_2$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 94%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.19 (dd, $J=2.4, 7.2$ Hz, 2H), 6.93 (dd, $J=2.4, 7.2$ Hz, 2H), 4.69 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.09~2.00 (m, 2H), 1.09 (t, $J=6.0$ Hz, 3H).

2-[3,4-(次甲基二氧)苯基]-丁酸甲酯(**3n**) ($R^1, R^2=3,4\text{-次甲基二氧}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 黄色液体, 产率 86%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.67 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 4.45 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 1.99~1.91 (m, 2H), 1.06 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

3.2.2 4a~4n 的合成通法

将酯**3a**~**3n** (3 mmol)溶于甲醇(10 mL)和水(10 mL)

中, 加入氢氧化锂(15 mmol), 室温搅拌 5 h. 蒸除甲醇后, 用稀盐酸调节溶液 pH 至 2~3, 有固体析出, 抽滤, 水洗, 干燥, 得白色固体**4a**~**4n**.

2-(2,4-二氯苯氧)-丙酸(**4a**)^[14] ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 80%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.40 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J=2.0, 8.5$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.78 (q, $J=5.0$ Hz, 1H), 1.71 (d, $J=5.0$ Hz, 3H).

2-(2,4-二甲苯基氧)-丙酸(**4b**)^[18] ($R^1=2\text{-CH}_3$, $R^2=4\text{-CH}_3$, $R^3=\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 73%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.98 (s, 1H), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.73 (q, $J=8.0$ Hz, 1H), 2.24 (d, $J=4.0$ Hz, 6H), 1.64 (d, $J=4.0$ Hz, 3H).

2-(2,4-二溴苯氧)-丙酸(**4c**)^[19] ($R^1=2\text{-Br}$, $R^2=4\text{-Br}$, $R^3=\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 79%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.71 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.78 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 1.72 (d, $J=7.2$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氟苯氧)-丙酸(**4d**)^[20] ($R^1=2\text{-F}$, $R^2=4\text{-F}$, $R^3=\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 91%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.01~6.95 (m, 1H), 6.91~6.85 (m, 1H), 6.81~6.76 (m, 1H), 4.74 (q, $J=7.2$ Hz, 1H), 1.67 (d, $J=6.8$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苯氧)-丁酸(**4e**)^[21] ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 85%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.39 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=2.5, 9.0$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.63 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.12~2.06 (m, 2H), 1.14 (t, $J=7.5$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苯氧)-戊酸(**4f**)^[21] ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 90%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.39 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.67 (dd, $J=4.8, 7.2$ Hz, 1H), 2.09~1.95 (m, 2H), 1.64~1.56 (m, 2H), 0.99 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苯氧)-己酸(**4g**)^[21] [$R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$]: 白色固体, 产率 93%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.39 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.66 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.08~2.01 (m, 2H), 1.59~1.51 (m, 2H), 1.43~1.36 (m, 2H), 0.93 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苯氧)-异戊酸(**4h**)^[16] [$R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]: 白色固体, 产率 65%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.38 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 7.14 (dd, $J=2.4, 8.7$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 2.45~2.34 (m, 1H), 1.14 (dd, $J=2.7, 6.9$ Hz,

6H).

2-(2,4-二氯苯氧)-3-甲氧基丙酸(**4i**) ($R^1=2\text{-Cl}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_2\text{OCH}_3$): 白色固体, 产率 78%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.39 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J=2.4, 8.7$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.81 (t, $J=3.9$ Hz, 1H), 4.02~3.93 (m, 2H), 3.50 (s, 3H).

2-(2,4-二氟苯氧)-丁酸(**4j**) ($R^1=2\text{-F}$, $R^2=4\text{-F}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 89%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.00~6.95 (m, 1H), 6.90~6.85 (m, 1H), 6.78 (t, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.58 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.08~2.01 (m, 2H), 1.13 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

2-(2,4-二溴苯氧)-丁酸(**4k**) ($R^1=2\text{-Br}$, $R^2=4\text{-Br}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 93%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.70 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J=2.4, 6.4$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.64 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.11~2.08 (m, 2H), 1.14 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

2-(4-氯苯氧)-丁酸(**4l**)^[17] ($R^1=\text{H}$, $R^2=4\text{-Cl}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 79%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.25 (d, $J=11.2$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.57 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.04~2.01 (m, 2H), 1.10 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

2-(4-硝基苯氧)-丁酸(**4m**) ($R^1=\text{H}$, $R^2=4\text{-NO}_2$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 78%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.20 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.74 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 2.11~2.06 (m, 2H), 1.13 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

2-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-丁酸(**4n**) ($R^1, R^2=3,4\text{-次甲基二氧}$, $R^3=\text{CH}_2\text{CH}_3$): 白色固体, 产率 94%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.69 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.33 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.50 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 2.04~1.96 (m, 2H), 1.09 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

3.2.3 5a~5m 和 5o~5s 的合成通法

酸 **4a**~**4n** (1.1 mmol), HOBT (1.2 mmol), EDCI (1.2 mmol)溶于 DMF (6 mL)中, 加入相应的胺(1.3 mmol), 室温搅拌 30 min 后, 冰浴冷却, 再加入二异丙基乙基胺 (3.3 mmol), 20 min 后移去冰浴, 室温搅拌过夜. 将反应液倒入饱和氯化铵溶液(30 mL), 乙酸乙酯萃取(30 mL $\times$ 3), 合并的萃取液用水(15 mL $\times$ 2)和饱和食盐水(15 mL)分别洗涤, 无水硫酸镁干燥. 蒸除乙酸乙酯. 粗产物经过硅胶柱层析分离纯化[$V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{石油醚})=1 : 5$], 得到 **5a**~**5m** 和 **5o**~**5s**.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-丙酰胺(**5a**)^[14]: 白色固体, 产率 53%. m.p. 120~123 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.37 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J=2.5, 8.5$ Hz, 1H), 6.92 (br, 1H), 6.85 (d, $J=9.0$ Hz,

1H), 6.75~6.68 (m, 3H), 5.95 (s, 2H), 4.72 (q, $J=6.5$ Hz, 1H), 4.43~4.34 (m, 2H), 1.63 (d, $J=7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.90, 151.26, 147.93, 147.04, 131.52, 130.28, 127.95, 127.47, 124.50, 120.89, 116.11, 108.31, 108.14, 101.11, 76.75, 42.95, 18.49; ESI-MS m/z : 366 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二甲基苯氧)-丙酰胺(**5b**): 白色固体, 产率 75%. m.p. 97~99 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.97 (s, 1H), 6.92 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.73~6.68 (m, 5H), 5.94 (s, 2H), 4.65 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 4.44~4.32 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.58 (d, $J=6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 172.42, 153.03, 147.94, 146.98, 131.91, 131.85, 131.23, 127.31, 126.98, 120.80, 113.05, 108.29, 108.13, 101.06, 76.62, 42.80, 20.44, 18.91, 16.34; ESI-MS m/z : 328 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二溴苯氧)-丙酰胺(**5c**): 白色固体, 产率 71%. m.p. 136~138 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.67 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J=2.4, 8.8$ Hz, 1H), 6.96 (br, 1H), 6.77~6.69 (m, 4H), 5.95 (s, 2H), 4.73 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 4.44~4.34 (m, 2H), 1.64 (d, $J=6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.78, 152.60, 147.95, 147.07, 135.81, 131.59, 131.53, 120.92, 116.04, 114.68, 113.87, 108.33, 108.19, 101.11, 76.59, 43.01, 18.42; ESI-MS m/z : 458 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氟苯氧)-丙酰胺(**5d**): 白色固体, 产率 50%. m.p. 68~71 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.96~6.70 (m, 6H), 5.95 (s, 2H), 4.63 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 4.44~4.34 (m, 2H), 1.59 (d, $J=6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.24, 159.29, 159.15, 155.91, 154.92, 154.76, 151.62, 151.46, 147.94, 147.05, 141.32, 141.22, 131.63, 120.98, 118.72, 118.69, 118.60, 118.57, 111.17, 111.12, 110.87, 110.82, 108.31, 108.21, 105.58, 105.28, 105.22, 104.93, 101.11, 77.97, 42.93, 18.58; ESI-MS m/z : 358 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-丁酰胺^[22](**5e**): 白色固体, 产率 60%. m.p. 115~117 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.37 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J=2.5, 9$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 6.73~6.66 (m, 3H), 5.94 (s, 2H), 4.61 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 4.39~4.36 (m, 2H), 2.06~2.01 (m, 2H), 1.05 (t, $J=7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.29, 151.66, 147.91, 147.03, 131.57, 130.26, 127.92, 127.25, 124.27, 120.91, 115.76, 108.30, 108.15, 101.12, 81.43, 42.92, 25.74, 9.04; ESI-MS m/z : 380 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-戊酰胺^[22] (**5f**): 白色固体, 产率 63%. m.p. 103~106 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.36 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J*=2.4, 8.8 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.77 (br, 1H), 6.73~6.64 (m, 3H), 5.94 (s, 2H), 4.63 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 4.36 (d, *J*=6 Hz, 2H), 2.00~1.94 (m, 2H), 1.56~1.49 (m, 2H), 0.95 (t, *J*=7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.54, 151.78, 147.94, 147.07, 131.57, 130.28, 127.93, 127.26, 124.21, 120.91, 115.63, 108.30, 108.15, 101.12, 80.58, 42.95, 34.72, 18.17, 13.77; ESI-MS *m/z*: 396 [M+H]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-己酰胺 (**5g**): 白色固体, 产率 65%. m.p. 101~103 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.36 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J*=2.4, 8.8 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 6.78 (br, 1H), 6.73~6.64 (m, 3H), 5.94 (s, 2H), 4.62 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 4.35 (t, *J*=6.0 Hz, 2H), 2.01~1.96 (m, 2H), 1.51~1.43 (m, 2H), 1.39~1.30 (m, 2H), 0.90 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.53, 151.79, 147.95, 147.07, 131.60, 130.28, 127.93, 127.27, 124.24, 120.92, 115.69, 108.29, 108.17, 101.11, 80.77, 42.95, 32.39, 26.89, 22.39, 13.88; ESI-MS *m/z*: 432 [M+Na]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-异戊酰胺^[22] (**5h**): 白色固体, 产率 55%. m.p. 71~75 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.36 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J*=2.7, 9.0 Hz, 1H), 6.79 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.73~6.61 (m, 4H), 5.94 (s, 2H), 4.43 (d, *J*=3.9 Hz, 1H), 4.36~4.28 (m, 2H), 2.41~2.30 (m, 1H), 1.08 (d, *J*=6.9 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 169.93, 152.25, 147.88, 147.02, 131.54, 130.22, 127.92, 127.08, 124.08, 120.99, 115.42, 108.27, 108.21, 101.11, 85.32, 42.91, 31.81, 18.93, 17.13; ESI-MS *m/z*: 418 [M+Na]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苯氧)-3-甲氧基丙酰胺 (**5i**): 白色固体, 产率 61%. m.p. 105~107 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.36 (d, *J*=0.9 Hz, 1H), 7.18 (d, *J*=4.2 Hz, 1H), 7.14 (br, 1H), 7.02 (d, *J*=5.4 Hz, 1H), 6.74~6.69 (m, 3H), 5.94 (s, 2H), 4.75 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 4.39 (d, *J*=1.5 Hz, 2H), 3.95~3.84 (m, 2H), 3.43 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.96, 152.03, 147.92, 147.02, 131.35, 130.10, 128.06, 127.97, 124.64, 120.92, 117.66, 108.29, 108.21, 101.10, 81.36, 72.70, 59.59, 43.11; ESI-MS *m/z*: 420 [M+Na]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氟苯氧)-丁酰胺 (**5j**): 白色固体, 产率 67%. m.p. 74~76 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.94~6.68 (m, 7H), 5.94 (s, 2H),

4.52 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 4.42~4.36 (m, 2H), 2.03~1.96 (m, 2H), 1.05 (t, *J*=7.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.61, 157.48 (dd, *J*_{F-C}=243, 10 Hz), 153.03 (dd, *J*_{F-C}=248, 12 Hz), 147.97, 147.07, 141.94 (dd, *J*_{F-C}=11, 4 Hz), 131.73, 120.99, 118.26 (dd, *J*_{F-C}=10, 3 Hz), 110.97 (dd, *J*_{F-C}=22, 4 Hz), 108.30, 108.22, 105.23 (dd, *J*_{F-C}=26, 22 Hz), 101.10, 82.88, 42.95, 25.93, 9.04; ESI-MS *m/z*: 350 [M+H]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二溴苯氧)-丁酰胺 (**5k**): 白色固体, 产率 47%. m.p. 134~136 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.67 (s, 1H), 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.88 (br, 1H), 6.83~6.65 (m, 4H), 5.95 (s, 2H), 4.63 (t, *J*=5.2 Hz, 1H), 4.42~4.33 (m, 2H), 2.07~2.01 (m, 2H), 1.04 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.15, 152.97, 147.96, 147.08, 135.82, 131.61, 131.56, 120.94, 115.75, 114.50, 113.62, 108.33, 108.20, 101.13, 81.23, 42.99, 25.62, 8.99; ESI-MS *m/z*: 472 [M+H]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(4-氯苯氧)-丁酰胺 (**5l**): 白色固体, 产率 81%. m.p. 96~98 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.23 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.82 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.72~6.61 (m, 3H), 6.54 (br, 1H), 5.94 (s, 2H), 4.51 (t, *J*=6.4 Hz, 1H), 4.41~4.29 (m, 2H), 2.04~1.91 (m, 2H), 1.03 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 171.01, 155.98, 147.97, 147.08, 131.70, 129.69, 127.11, 120.90, 116.84, 108.28, 108.17, 101.12, 80.48, 42.88, 26.11, 9.32; ESI-MS *m/z*: 348 [M+H]⁺.

N-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(4-硝基苯氧)-丁酰胺 (**5m**): 白色固体, 产率 78%. m.p. 118~120 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.19 (dd, *J*=2.4, 7.2 Hz, 2H), 6.97 (dd, *J*=2.4, 7.2 Hz, 2H), 6.70~6.56 (m, 3H), 6.39 (br, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.66 (t, *J*=5.0 Hz, 1H), 4.34 (d, *J*=6.0 Hz, 2H), 2.06~1.99 (m, 2H), 1.05 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.02, 162.09, 148.00, 147.17, 142.50, 131.46, 126.07, 120.99, 115.44, 108.28, 108.07, 101.19, 80.70, 42.98, 26.09, 9.31; ESI-MS *m/z*: 359 [M+H]⁺.

N-(3,4-二氯苄基)-2-(2,4-二氯苯氧)-丁酰胺 (**5o**): 白色固体, 产率 78%. m.p. 123~125 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.40~7.36 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.19 (dd, *J*=2.7, 9.0 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J*=2.1, 8.1 Hz, 1H), 6.96 (br, 1H), 6.83 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 4.65 (t, *J*=5.4 Hz, 1H), 4.51~4.36 (m, 2H), 2.09~2.00 (m, 2H), 1.05 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 170.59, 151.51, 138.10, 132.75, 131.60, 130.63, 130.37, 129.34,

128.03, 127.51, 126.77, 124.25, 115.73, 81.29, 41.91, 25.68, 8.99; ESI-MS m/z : 406 $[M-H]^-$.

N-(2-糠基)-2-(2,4-二氯苄氧)-丁酰胺(**5p**): 白色固体, 产率 64%. m.p. 83~86 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.38 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.33~7.32 (m, 1H), 7.16 (dd, $J=2.7, 9.0$ Hz, 1H), 6.90 (br, 1H), 6.81 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J=2.1, 3.3$ Hz, 1H), 6.19~6.17 (m, 1H), 4.60 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 4.55~4.42 (m, 2H), 2.07~1.98 (m, 2H), 1.03 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.30, 151.70, 150.73, 142.33, 130.26, 127.91, 127.27, 124.35, 115.82, 110.40, 107.42, 81.45, 36.12, 25.65, 8.89; ESI-MS m/z : 350 $[M+Na]^+$.

N-(2-噻吩基甲基)-2-(2,4-二氯苄氧)-丁酰胺(**5q**): 白色固体, 产率 87%. m.p. 100~102 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.37 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.22~7.20 (m, 1H), 7.16 (dd, $J=2.4, 8.7$ Hz, 1H), 6.95~6.92 (m, 3H), 6.81 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 4.66 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 4.60 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 2.08~1.99 (m, 2H), 1.04 (t, $J=7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.22, 151.67, 140.41, 130.26, 127.93, 127.27, 126.87, 125.95, 125.33, 124.31, 115.82, 81.40, 37.92, 25.69, 8.97; ESI-MS m/z : 366 $[M+Na]^+$.

N-(2-吡啶基甲基)-2-(2,4-二氯苄氧)-丁酰胺(**5r**): 白色固体, 产率 85%. m.p. 74~77 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.5 (dd, $J=0.9, 3.3$ Hz, 1H), 7.67~7.62 (m, 2H), 7.38 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 7.22~7.12 (m, 3H), 6.84 (d, $J=9$ Hz, 1H), 4.64 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 4.60 (t, $J=5.1$ Hz, 2H), 2.11~2.02 (m, 2H), 1.06 (t, $J=7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 171.28, 156.70, 152.44, 149.77, 137.43, 130.88, 128.40, 127.65, 125.07, 123.08, 122.44, 116.26, 81.90, 44.78, 26.38, 9.68; ESI-MS m/z : 339 $[M+H]^+$.

N-[2-(2,4-二氯苄基)-2-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-丁酰胺(**5s**): 白色固体, 产率 78%. m.p. 75~77 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.34 (s, 1H), 7.22~7.16 (m, 2H), 6.81 (br, 1H), 6.66 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J=2$ Hz, 1H), 6.29 (dd, $J=2, 8.4$ Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.55~4.45 (m, 2H), 4.42 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 2.00~1.86 (m, 2H), 1.00 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 171.73, 152.67, 148.49, 142.71, 134.17, 134.03, 130.72, 129.34, 127.28, 108.09, 107.16, 101.44, 98.94, 81.09, 40.44, 26.07, 9.29; ESI-MS m/z : 404 $[M+Na]^+$.

3.2.4 *N*-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(4-胺基苄氧)-丁酰胺(**5n**)的合成

将 **5m** (200 mg) 溶于甲醇(20 mL)中, 加入 10%

Pd/C (10 mg), 在氢气条件下室温搅拌 5 h. 用硅藻土抽滤, 去除催化剂, 然后, 将滤液蒸干, 粗产物经过硅胶柱层析分离纯化 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1:4], 得到 **5n**, 黄色液体, 产率 69%. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.75~6.71 (m, 4H), 6.66~6.60 (m, 4H), 5.93 (s, 2H), 4.45~4.38 (m, 2H), 4.34~4.27 (m, 1H), 2.03~1.85 (m, 2H), 1.02 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 171.89, 150.41, 147.87, 146.92, 141.20, 131.86, 120.88, 116.86, 116.35, 108.25, 108.20, 101.05, 80.84, 42.76, 26.10, 9.35; ESI-MS m/z : 370 $[M+Na]^+$.

3.2.5 *N*-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苄氧)-丁酯(**5t**)的合成

2-(2,4-二氯苄氧)-丁酸(**4e**) (1.1 mmol), HOBt (1.2 mmol), EDCI (1.2 mmol) 溶于 DMF (6 mL) 中, 加入 3,4-(次甲基二氧)苄醇(1.3 mmol), 室温搅拌 30 min 后, 冰浴冷却, 再加入二异丙基乙基胺(3.3 mmol), 20 min 后移去冰浴, 室温搅拌过夜. 将反应液倒入饱和氯化铵溶液(30 mL), 乙酸乙酯萃取(30 mL $\times$ 3), 合并的萃取液用水(15 mL $\times$ 2)和饱和食盐水(15 mL)分别洗涤, 无水硫酸镁干燥. 蒸除乙酸乙酯. 粗产物经过硅胶柱层析分离纯化 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1:5], 得白色固体 **5t**, 产率 80%. m.p. 46~49 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.35 (s, 1H), 7.04 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.78~6.73 (m, 3H), 6.64 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.074 (q, $J=12$ Hz, 2H), 4.56 (t, $J=6$ Hz, 2H), 2.07~1.99 (m, 2H), 1.08 (t, $J=7.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.63, 152.32, 147.84, 147.79, 130.23, 128.88, 127.37, 126.70, 124.51, 122.60, 115.34, 109.11, 108.21, 101.27, 78.96, 66.98, 26.06, 9.52; ESI-MS m/z : 405 $[M+Na]^+$.

3.2.6 *N*-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苄氧)-丁酰胺(**5u**)的合成

以 2,4-二氯苄醇和 2-溴丁酸甲酯为原料, 采用合成 **3a~3n** 的方法, 得 2-(2,4-二氯苄氧)-丁酸甲酯, 黄色液体, 未经纯化, 直接用于下步反应.

上步得到的粗产物用氢氧化锂水解, 方法类似于 **4a~4n**, 得 2-(2,4-二氯苄氧)-丁酸, 白色固体, 产率 97%. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.46 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J=2.1, 8.4$ Hz, 1H), 4.67 (q, $J=12$ Hz, 2H), 4.02 (t, $J=5.7$ Hz, 1H), 1.99~1.83 (m, 2H), 1.04 (t, $J=7.5$ Hz, 3H).

2-(2,4-二氯苄氧)-丁酸与 3,4-(次甲基二氧)苄胺偶联, 反应条件类似于 **5a~5m**, 得 *N*-[3,4-(次甲基二氧)苄基]-2-(2,4-二氯苄氧)-丁酰胺(**5u**), 白色固体, 产率 61%. m.p. 80~83 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.37 (s, 1H), 7.31 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.82

(br, 1H), 6.76~6.69 (m, 3H), 5.95 (s, 2H), 4.57 (q, $J=12.0$ Hz, 2H), 4.36 (d, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.89 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 1.96~1.77 (m, 2H), 0.97 (t, $J=7.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 170.82, 146.93, 146.01, 133.60, 133.14, 132.52, 130.98, 129.64, 128.43, 126.25, 120.02, 107.28 ($2\times\text{C}$), 100.06, 80.78, 68.40, 41.79, 24.82, 8.19; ESI-MS m/z : 418 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.3 菌株、质粒和培养条件

本实验以铜绿假单胞菌 PAO1 为实验对象, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 在添加有 NTA 的 LB 培养基中培养; GFP 转录融合质粒 pAT-exoS 的构建参照文献[23]. GFP 的检测方法参照文献[23].

3.4 Western Blot 实验

将过夜培养的铜绿假单胞菌 PAO1 细胞按 1 : 1000 稀释到新鲜的含有终浓度为 10 mmol/L NTA 和 250 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂的 LB 培养液中, 培养 6 h 后取样. Western Blot 实验方法参照文献[23].

References

- [1] Gould, I. M. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, 34(Suppl. 3), S2.
- [2] Keyser, P.; Elofsson, M.; Rosell, S.; Wolf-Watz, H. *J. Intern. Med.* **2008**, 264, 17.
- [3] Ghosh, P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, 68, 771.
- [4] Engel, J.; Balachandran, P. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, 12, 61.
- [5] Izore, T.; Job, V.; Dessen, A. *Structure* **2011**, 19, 603.
- [6] Hung, D. T.; Shakhnovich, E. A.; Pierson, E.; Mekalanos, J. J. *Science* **2005**, 310, 670.
- [7] Muschiol, S.; Bailey, L.; Gylfe, A.; Sundin, C.; Hultenby, K.; Bergstrom, S.; Elofsson, M.; Wolf-Watz, H.; Normark, S.; Henriques-Normark, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 14566.
- [8] Hudson, D. L.; Layton, A. N.; Field, T. R.; Bowen, A. J.; Wolf-Watz, H.; Elofsson, M.; Stevens, M. P.; Galyov, E. E. *An. Agents Chemother.* **2007**, 51, 2631.
- [9] Poole, K. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, 10, 12.
- [10] Hauser, A. R. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 654.
- [11] Engel, J.; Balachandran, P. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, 12, 61.
- [12] Aiello, A.; Williams, J. D.; Majgier-Baranowska, H.; Patel, I.; Peet, N. P.; Huang, J.; Lory, S.; Bowlin, T. L.; Moir, D. T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 1988.
- [13] Pu, Y. J.; Vaid, R. K.; Boini, S. K.; Towsley, R. W.; Doecke, C. W.; Mitchell, D. *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 13, 310.
- [14] Moir, D. T.; Aiello, D.; Peet, N. P.; Williams, J. D.; Torham, M. *WO 2013010089*, **2013** [*Chem. Abstr.* **2013**, 158, 205450].
- [15] Grabouska, E.; Arct, J.; Eckstein, Z. *Rocz. Chem.* **1969**, 43, 715.
- [16] Winternitz, P. *DE 2635327*, **1977** [*Chem. Abstr.* **1977**, 87, 67967].
- [17] Akhtar, T.; Hameed, S.; Al-Masoudi, N. A.; Loddio, R.; La Colla, P. *Acta Pharm.* **2008**, 58, 135.
- [18] Duintjier, E.; Jonsson, A. *Acta Chem. Scand.* **1954**, 8, 1493.
- [19] Tarasiuk, B. *Chemia* **2006**, 61, 171.
- [20] Rao, V. R.; Reddy, G. V.; Yadla, R.; Narsaiah, B.; Rao, P. S. *ARKIVOC* **2005**, 3, 211.
- [21] Hayashi, K.; Tan, X.; Zheng, N.; Hatate, T.; Kimura, Y.; Kepinski, S.; Nozaki, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 5632.
- [22] Moir, D. T.; Aiello, D.; Peet, N. P.; Williams, J. D.; Torham, M. *WO 2013010082*, **2013** [*Chem. Abstr.* **2013**, 158, 205446].
- [23] Yamazaki, A.; Li, J.; Zeng, Q.; Khokhani, D.; Hutchins, W.; Yost, A.; Biddle, E.; Toone, E. T.; Chen, X.; Yang, C. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, 56, 36.

(Qin, X.)