α -咔啉类 GSK-3 β 抑制剂的合成、活性评价和分子对接研究

王媛^a 蒋勇军^{*,b} 张美青^a 沈银^a

(^a 浙江大学化学系 杭州 310027)

(^b 浙江大学宁波理工学院生化分院 宁波 315104)

摘要 糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)是神经退化性疾病如早老性痴呆、II 型糖尿病、癌症等多种重复复杂性疾病的药物靶标, α -咔啉类化合物具有多种生物活性. 以 GSK-3 β 为作用靶点, 利用 Graebe-Ullmann 反应合成了 α -咔啉, 并采用 Buchwald-Hartwig 偶联反应合成了 9 个 4 位取代的 α -咔啉胺类衍生物. 体外的 GSK-3 β 激酶抑制活性测试表明其中 4 个化合物具有一定的抑制活性, 其中化合物 **3c** 的 IC₅₀ 值达到了 5.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 同时采用了分子对接方法分别研究了化合物 **2**, **3c** 与大分子蛋白的作用模式, 初步探讨了影响抑制活性的原因, 为进一步的研究提供了依据.

关键词 糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β); 分子对接; α -咔啉; 合成; GSK-3 抑制剂

Synthesis, Biological Activity and Molecular Docking Research of α -Carbolines as GSK-3 β Inhibitors

Wang, Yuan^a Jiang, Yongjun^{*,b} Zhang, Meiqing^a Shen, Yin^a

(^a Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(^b Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315104)

Abstract Glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) is an important drug target of neurodegenerative diseases including Alzheimer's, diabetes type II, cancer. α -Carboline derivatives have many biological activities such as anti-anxiolytic effect, anti-inflammatory, and central nervous system stimulating activities. In this work, a series of 4-N substituted α -carbolines derivatives were discussed as GSK-3 β inhibitors. The modified Graebe-Ullmann reaction was optimized to synthesize α -carboline, and polyphosphoric acid was used as cyclizing agent and solvent. After oxidation and chlorination, an important intermediate 4-chloro- α -carboline was obtained. Buchwald-Hartwig coupling reaction was chosen to be the appropriate route for 4-N substituted α -carboline, tris(dibenzylideneacetone) dipalladium(0) and 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl were used as catalyst and ligand respectively. All the compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and ESI-MS techniques. 9 compounds were screened by Caliper Mobility Shift Assay on kinase GSK-3 β *in vitro* and staurosporine was used as the reference compound. Four new inhibitors with moderate inhibitory activities were found and the smallest IC₅₀ value of compound **3c** was 5.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Moreover, the molecular docking method was used to study the interaction modes of the inhibitors and GSK-3 β . Our results will be helpful in the future designing of GSK-3 β inhibitors.

Keywords glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β); molecular docking; α -carboline; synthesis; GSK-3 inhibitor

1 引言

糖原合成酶激酶 3 β (Glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸类激酶, 它在胰岛素信号通路、Wnt 和 Hedgehog 信号通路传导中扮演重要的角色, 通过磷酸化多种蛋白底物来参与糖原合成、细胞生长增殖、细胞分化、多种蛋白的转录激活等生理过程^[1,2]. 其中, GSK-3 β 的过度激活导致 tau 蛋白异常磷酸化, 从而引起阿尔茨海默病(AD)^[3,4]. 此外, 该激酶还与肿瘤、II 型糖尿病的发生发展密切相关. 目前 GSK-3 β 已成为备受人们关注的药物靶标之一.

GSK-3 β 晶体结构衍射研究结果表明: 该酶由 β 折叠的 N 端和 α 螺旋的 C 端组成^[5](图 1). 其中 ATP 结合

口袋在这两个区域之间, 主要包括 Lys85, Asp133, Val135, Thr138 和 Gln185 等氨基酸残基. 而另一个活性区域是非 ATP 结合的底物作用位点, 它是由 Arg96, Arg180, Lys205 和 Tyr216 组成的正电性口袋.

目前已有的 GSK-3 β 抑制剂绝大多数均为 ATP 竞争型, 其共性有: 分子量小(<600), 多为平面、疏水性的多环化合物, 通过疏水和氢键作用和酶结合, 一般与 Asp133 和/或 Val135 形成氢键^[6,7].

α -咔啉结构的化合物具有多种生物活性, 如抗炎抗菌、抗动脉粥样硬化以及良好的抗肿瘤活性, 还被发现为 CDK^[7,8], Aurora^[9], VEGFR^[10]等多种激酶的抑制剂, 但其作为激酶抑制剂母核结构的文献报道屈指可数, 也

* E-mail: yjjiang@nit.zju.edu.cn

Received June 18, 2012; published August 6, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20803063) and the Natural Science Foundation of Ningbo (No. 2010A610024).

项目受国家自然科学基金(No. 20803063)和宁波市自然科学基金(No. 2010A610024)资助.

图1 GSK-3β的结构示意图
Figure 1 Structure of GSK-3β

几乎没有专门的文献研究 α -咔啉对 GSK-3β 激酶的抑制作用. 因此, 我们以 GSK-3β 为靶点, 整合计算机辅助药物设计、药物合成与生物活性评价方法, 对 α -咔啉类化合物进行结构修饰和优化, 发现了四个具有一定抑制活性的化合物. 此外, 我们采用分子对接技术探讨了代表性化合物的可能结合模式.

据研究表明, 3-酰胺取代的 4-苯基-1-氮杂-9-氧杂苻 **1** 是一种对 GSK-3β 有较好选择性和中等抑制活性的抑制剂^[3]. 由图 2 可知, 我们所设计的 α -咔啉类化合物具有与其相类似的骨架结构, 同时也证明在 α -咔啉的 3、4 号位可以引入大的取代基团, 综合考虑计算机分子对接的评价结果与合成的可行性, 我们合成了 9 个 4 号位取代的 α -咔啉胺类衍生物.

图2 化合物 1~3 的结构式
Figure 2 Structures of compounds 1~3

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的合成

以苯并三氮唑和 2-氯吡啶为原料, 通过改良的 Graebe-Ullmann 反应, 在多聚磷酸(PPA)催化下成环得到 **2**^[11]. 然后经过一系列的氧化、氯代得到了重要的中间体 **5**^[12]. 目标化合物 **3a~3i** 的合成, 我们最初尝试了传统的高温加热方法, 将 **5** 与胺直接混合加热回流, TLC 监测反应终点. 结果发现, 该方法不仅需要很高的反应温度($>150\text{ }^{\circ}\text{C}$), 而且反应时间也很长($>24\text{ h}$), 产率也较低($<50\%$), 大大增加了分离提纯的难度. 故我们改用 Buchwald-Hartwig 偶联反应. Buchwald 偶联需要一系列比较严格的条件. 以亲电底物 **5** 来说, 它上面有一个自由的氨基, 会与亲核试剂的氨基形成竞争反

应^[13], 而吡啶环上的 N 具有络合能力, 与配体形成竞争, 会使催化剂失活^[14]. 而亲核底物胺的电子效应和位阻都会影响配位^[15]/去质子化的速率, 脂肪族二级胺易发生 β -H 消除^[16], 生成副产物. 另外, 碱的选择要考虑到底物中官能团的稳定性, 溶剂的选择也要考虑其对底物和碱的溶解度. 综上考虑, 我们最终采用了 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 作为催化剂, X-Phos 为配体, 对带有亲电基团的 **3c**, **3d** 采用弱碱 K_2CO_3 /叔丁醇的碱/溶剂组合^[17], 其余对强碱不敏感的胺采用 $t\text{-BuOK}$ /甲苯的碱/溶剂组合^[18], 在氩气保护以及无水条件下成功合成了 9 个目标产物. 该方法不仅具有中等甚至较高的产率, 而且反应时间短(10 h 左右), 温度仅需 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. 合成路线如图式 1 所示.

图式1 目标化合物 **3a~3i** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of the target compounds **3a~3i**

2.2 化合物对 GSK-3β 的抑制活性

化合物 **3a~3i** 和 **2** 对 GSK-3β 激酶体外抑制活性的测试结果见表 1, 其中 **3c**, **3d**, **3f** 和 **2** 的 IC_{50} 值分别为 5.1, 10.0, 47.6, 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 均达到了 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的级别. **3c**, **3d** 的抑制活性均比母环 **2** 高出了数倍. 从它们的构效关系可以看出, 在氨基取代芳环的邻位或者间位上都有可以作为氢键受体的基团存在, 可以与激酶小分子结合位

点的一个重要作用残基 Arg141 形成氢键. **3b**, **3g**, **3i** 作为脂肪胺类衍生物, 其 IC_{50} 值均大于 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 几乎没有抑制活性, 从反面论证了对 GSK-3 β 抑制活性有贡献的应该是 4 位上的芳香环存在合适的氢键给(受体), 为今后进一步分子修饰提供了线索和方向.

表 1 化合物 **3a**~**3i** 对 GSK-3 β 激酶抑制活性 IC_{50} 值^a

Table 1 IC_{50} values of **3a**~**3i** for GSK-3 β

Entry	Compound	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
1	3a	>200
2	3b	>200
3	3c	5.1
4	3d	10
5	3e	>200
6	3f	47.64
7	3g	>200
8	3h	>200
9	3i	>200
10	2	32
11	Staurosporine	0.0012

^a ATP 浓度为 $4.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 阳性对照物为 staurosporine, 目标化合物起始浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3 分子对接结果

为了探讨化合物对 GSK-3 β 体外抑制活性结果, 我们利用 Autodock 软件^[21]分别对母环 **2**、活性最好的化合物 **3c** 做了与 GSK-3 β ATP 结合口袋的分子对接(方法见实验部分), 对接结果见图 3. 由图 3a 可知, 母环 **2** 中吡啶环上的 N 原子与 Asp133 残基形成一个氢键, 吡啶环上的 N 原子与 Val135 形成氢键, 此结合模式与 GSK-3 β 小分子抑制剂的传统结合模式相吻合, 预测其结合能量为 $-5.09 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. 而 **3c** 除了保留了吡啶环中的 N 与 Val135 的氢键外, 新增 4 位取代氨基上的 H 与 Ile62 形成了氢键, 苯胺邻位硝基上的两个氧原子作为氢键受体与 Arg141 形成两个氢键(如图 3b), 这些氢键在 GSK-3 β 中起到稳定抑制剂的结合, 提高抑制活性. 预测其结合能量为 $-6.23 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. 比较所得的对接结果, 化合物 **3c** 具有较负结合能和较多的氢键, 这与生物活性检测的结果相一致.

3 结论

通过体外 GSK-3 β 激酶抑制活性测试和分子对接实验的结果可知, α -吡啶类化合物是一类对 GSK-3 β 具有潜在抑制活性的新型小分子抑制剂. 其 4 位上的芳香族胺类取代基可能使母环的抑制活性有一定提高. 特别是在芳香胺邻、间位取代基是可以作为氢键受(给)体的基团, 值得进一步深入研究, 以期发现更为高效的 GSK-3 β 激酶小分子抑制剂, 用于筛选治疗与 GSK-3 β 激酶相关的疾病如糖尿病、AD 的药物候选化合物.

图 3 化合物 **2**, **3c** 与 GSK-3 β ATP 结合区域的分子对接图

Figure 3 Docking confirmation of **2**, **3c** at GSK-3 β ATP binding site. Yellow sticks represent the small molecules. The protein backbone is displayed as ribbon. Hydrogen bonds are shown as red dashed lines only relevant amino acids are displayed.

4 实验部分

4.1 主要仪器与试剂

WRS-1B 熔点仪(温度计未经校正); Esquire6000 质谱仪; Bruker AVANCE III 核磁共振仪(TMS 为内标); ZF-20C 暗箱式紫外分析仪分析; 薄层及柱层析所用硅胶为烟台江友硅胶开发有限公司生产; 试剂和原料均为市售分析纯或化学纯, 用前按常法处理.

4.2 化合物的合成

4.2.1 α -吡啶(**2**)的合成

500 mL 三口圆底烧瓶中, 加入 7.8 mL (80 mmol) 2-氯吡啶, 加热至 160°C , 机械搅拌 12 h. 中间体不经分离直接往其中缓慢加入 80 g (238 mmol) PPA, 继续保温反应 12 h. 待反应冷却至室温后加入冰水, 并用 10% NaOH 溶液调 pH 8~9, 析出白色沉淀, 放置冰箱冷却 15~30 min, 抽滤水洗得粗产物. 用乙醇重结晶, 真空干燥得白色粉末状固体 6.8 g, 产率 50.5%, m.p. $205.3\sim 207.1^\circ\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.80 (s, 1H),

8.50 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J=3.5$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.31~7.09 (m, 2H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 151.87, 146.01, 138.76, 128.32, 126.52, 121.09, 120.34, 119.33, 115.13, 114.90, 111.19; MS (70 eV) m/z (%): 168.8 ($[\text{M}+1]$, 100).

4.2.2 α -咔啉- N -氧化物(4)的合成

取 α -咔啉 3 g (18 mmol), 加入 15 mL 冰醋酸, 滴加 30% 的双氧水 2.4 mL, 110 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌回流 4 h. 之后再加入 0.9 mL 双氧水, 继续反应 2.5 h. 待反应冷却至室温后, 旋蒸除去溶剂, 用饱和 K_2CO_3 溶液调 $\text{pH}>8$, 搅拌过夜, 抽滤水洗得粗产物. 用乙醇重结晶, 真空干燥得棕黄色晶体 2.5 g, 产率 76.6%, m.p. 234.5~238.6 $^{\circ}\text{C}$ (lit. $^{[11]}$ 234~239 $^{\circ}\text{C}$).

4.2.3 4-氯- α -咔啉(5)的合成

取 α -咔啉- N -氧化物 3 g (16.3 mmol), 加入 30 mL DMF, 将 3.6 mL POCl_3 缓慢滴入反应瓶中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌回流 6 h. 待反应冷却至室温后, 滴加冰水使反应猝灭, 并用饱和 K_2CO_3 溶液调 $\text{pH}>8$, 析出白色固体, 抽滤水洗得粗产物. 硅胶柱层析纯化, 粗产物进行柱层析分离 [洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=6:1$], 得到淡黄色粉末状固体 2.6 g, 产率 78.7%, m.p. 230.3~230.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 12.20 (s, 1H), 8.39 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.60~7.50 (m, 2H), 7.36~7.25 (m, 2H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 153.14, 147.10, 139.34, 136.93, 127.84, 122.97, 120.55, 119.46, 116.03, 113.05, 112.00; MS (70 eV) m/z (%): 202.9 ($[\text{M}+1]$, 100).

4.2.4 目标化合物 3a~3i 的合成

取 4-氯- α -咔啉 100 mg (0.498 mmol) 于带有磁力搅拌子的 Schlenk 管内, 加入 $[\text{Pd}_2(\text{dba})_3]$ 37 mg (0.04 mmol), X-Phos 38 mg (0.08 mmol), 无水 K_2CO_3 或 $t\text{-BuOK}$ 190 mg (1.37 mmol), 反应瓶抽真空并用氩气保护(抽三次). 氩气保护下加入 5 mL 脱气过的叔丁醇或甲苯和 0.647 mmol 胺类衍生物, 100 $^{\circ}\text{C}$ 密封反应 TLC 跟踪反应. 待反应完毕后, 反应物倾入冰水中, 用乙酸乙酯萃取三次, 饱和食盐水洗涤后, 有机相用 Na_2SO_4 干燥, 抽滤(用硅藻土做助滤剂)并旋干溶剂, 得粗产物. 经柱层析分离后得目标产物.

4-苯基氨基- α -咔啉(3a): 乳白色粉末状固体, 产率 70.1%, m.p. 241.6~243.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.65 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.23~7.98 (m, 2H), 7.46 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.42~7.25 (m, 5H), 7.14 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J=5.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 153.71, 146.74, 146.24, 141.32, 137.57, 129.15, 124.75, 122.68, 121.21, 120.03, 118.74, 110.39, 103.29, 101.70; MS (70 eV) m/z (%): 260.1 ($[\text{M}+1]$, 100).

4-苯乙基氨基- α -咔啉(3b): 白色粉末状固体, 产率 81.2%, m.p. 257.1~258.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.48 (s, 1H), 8.21 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.39~7.27 (m, 6H), 7.24 (d, $J=6.3$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 6.42 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J=12.8, 6.4$ Hz, 2H), 3.02 (t, $J=7.1$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 153.07, 149.10, 147.19, 139.48, 136.87, 128.76, 128.39, 126.14, 123.87, 121.08, 120.51, 118.68, 110.28, 100.09, 97.29, 43.94, 34.79; MS (70 eV) m/z (%): 288.3 ($[\text{M}+1]$, 100).

4-(2-硝基苯基)氨基- α -咔啉(3c): 红色粉末状固体, 产率 65.2%, m.p. 222.3~223.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.93 (s, 1H), 9.72 (s, 1H), 8.32 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.50~7.42 (m, 2H), 7.22~7.14 (m, 2H), 7.11 (d, $J=4.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 154.11, 147.53, 142.72, 138.81, 138.67, 137.12, 136.29, 126.82, 126.38, 122.26, 121.55, 120.46, 119.98, 119.67, 111.59, 106.65, 106.32; MS (70 eV) m/z (%): 304.9 ($[\text{M}+1]$, 100).

4-(3-硝基苯基)氨基- α -咔啉(3d): 红色粉末状固体, 产率 71.7%, m.p. 262.6~263.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.81 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.23 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.02 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J=7.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 154.30, 149.07, 147.44, 144.72, 143.93, 138.41, 130.93, 125.84, 125.42, 123.42, 120.06, 119.45, 116.27, 113.56, 111.16, 105.38, 103.95; MS (70 eV) m/z (%): 304.9 ($[\text{M}+1]$, 100).

4-(2-噻啉基)氨基- α -咔啉(3e): 乳白色粉末状固体, 产率 88.6%, m.p. 294.7~296.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 500 MHz, DMSO) δ : 11.79 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.54 (d, $J=5.0$ Hz, 2H), 8.30 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J=5.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 160.56, 158.87, 153.81, 146.78, 142.30, 138.58, 125.99, 123.39, 120.17, 119.44, 114.17, 111.19, 108.92, 107.45; MS (70 eV) m/z (%): 262.0 ($[\text{M}+1]$, 100).

4-(2-吡啉基)氨基- α -咔啉(3f): 红色粉末状固体, 产率 74.2%, m.p. >300 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.73 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.28~8.21 (m, 2H), 8.07 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J=13.9, 3.7$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J=6.7, 5.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz) δ : 155.08, 153.48, 147.50, 146.40, 143.31, 137.83, 137.82, 125.15, 122.86,

119.75, 118.79, 116.35, 112.31, 110.56, 105.98, 105.01; MS (70 eV) m/z (%): 261.0 ([M+1], 100).

4-丁基氨基- α -咔啉(**3g**): 白色粉末状固体, 产率 83.7%, m.p. 194.1~194.4 °C; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.40 (s, 1H), 8.26 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.36 (dd, $J=13.5, 5.7$ Hz, 2H), 3.37 (dd, $J=13.5, 6.7$ Hz, 2H), 1.76~1.54 (m, 2H), 1.53~1.29 (m, 2H), 0.95 (t, $J=7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz) δ : 153.55, 149.80, 147.57, 137.27, 124.27, 121.62, 121.07, 119.13, 110.67, 100.42, 97.65, 42.35, 31.23, 20.19, 14.33; MS (70 eV) m/z (%): 240.1 ([M+1], 100).

4-(4-乙氧基苯基)氨基- α -咔啉(**3h**): 棕色粉末状固体, 产率 91.2%, m.p. >300 °C; ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ : 11.58 (s, 1H), 8.28 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.02 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 4.04 (q, $J=6.4$ Hz, 1H), 1.35 (t, $J=6.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (DMSO, 101 MHz) δ : 155.25, 153.57, 147.79, 146.72, 137.32, 133.41, 125.11, 124.42, 122.23, 120.23, 118.72, 114.96, 110.29, 101.77, 99.97, 63.17, 14.70; MS (70 eV) m/z (%): 304.1 ([M+1], 100).

4-吗啡啉基- α -咔啉(**3i**): 白色粉末状固体, 产率 65.0%, m.p. >300 °C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ : 11.80 (s, 1H), 8.27 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.25 (t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 3.93 (t, $J=7.5$ Hz, 4H), 3.22 (t, $J=7.5$ Hz, 4H); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz) δ : 154.38, 153.53, 147.34, 137.89, 125.19, 122.54, 119.48, 119.41, 110.93, 105.94, 103.92, 66.13, 50.39; MS (70 eV) m/z (%): 254.1 ([M+1], 100).

4.3 体外 GSK-3 β 激酶抑制活性测试

采用商业 GSK-3 β 激酶试剂盒测定合成小分子的抑制活性, 检测的阴性对照为不加化合物(blank)组, 阳性对照为 EDTA 组和阳性药物 Staurosporine 组, ATP 为 Km 浓度, 化合物的生物活性筛选在 10 个梯度浓度下重复测定。

4.4 分子对接实验

用 Autodock 4.0 将 **2**, **3c** 分别与 GSK-3 β 的 ATP 活性口袋进行对接。

对接所用实验方法: 选取 GSK-3 β 晶体(PDB ID 1uv5). 先在 Autodock tools 中删去 GSK-3 β 的水分子, 然后添加极性氢并加载 Kollman 电荷. 设置 Grid box 大小为 60 $\times$ 60 $\times$ 60, 格点间距为 0.375 Å, 盒子中心坐标为(93.675, 67.706, 9.872). 对抑制剂分子添加所有的极性与非极性氢原子, 并加上 Gasteiger 电荷. 对接采用 Lamarckian 遗传算法, 其常数设置如下: 对接运行次数为 50, 最多能量评价次数为 250000, 最大迭代次数为 27000. 运用局部搜寻算法 Solis 和 Wets 对能量进行优化, 每次搜索使用 300 次迭代。

以上所用参数除特别指明外均为默认参数。

致谢

感谢上海睿智化学研究有限公司提供激酶活性筛选实验。

References

- [1] Grimes, C. A.; Jope, R. S. *Prog. Neurobiol.* **2001**, *65*, 391.
- [2] Cohen, P.; Frame, S. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 769.
- [3] Voigt, B.; Krug, M.; Schachte, C.; Totzke, F.; Hilgeroth, A. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 120.
- [4] Martinez, A.; Castro, A.; Dorronsoro, I.; Alonso, M. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 373.
- [5] Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. *Cell* **2001**, *105*, 721.
- [6] Zhang, N.; Jiang, Y.-J.; Yu, Q.-S.; Zou, J.-W. *Prog. Chem.* **2007**, *19*, 614. (张娜, 蒋勇军, 俞庆森, 邹建卫, 化学进展, **2007**, *19*, 614.)
- [7] Joseph, J.; Laurent, M.; Francois, L. *FR 2876377*, **2006** [*Chem. Abstr.* **2006**, *144*, 390900].
- [8] Sennhenn, P.; Mantoulidis, A.; Treu, M.; Tontsch-Grunt, U.; Spevak, W.; McConnell, D.; Schoop, A.; Bruckner, R.; Jacobi, A.; Guertler, U.; Schnapp, G.; Klein, C.; Himmelsbach, F.; Pautsch, A.; Betzemeier, B.; Herfurth, L.; Mack, J.; Wiedenmayer, D.; Bader, G.; Reiser, U. *WO 131552*, **2006** [*Chem. Abstr.* **2006**, *146*, 62695].
- [9] Brown, J. W.; Dong, Q.; Gangloff, A. R.; Paraselli, B. R.; Stafford, J. A.; Scoria, N.; Salisbury, J.; Das, S. *WO 129401*, **2009** [*Chem. Abstr.* **2009**, *151*, 491106].
- [10] Krug, M.; Wichapong, K.; Erlenkamp, G.; Sippl, W.; Schachte, C.; Totzke, F.; Hilgeroth, A. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 63.
- [11] Vera-Luque, P.; Alajarin, R.; Alvarez-Builla, J.; Vaquero, J. J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 415.
- [12] Wang, Y.; Wu, Z.; Guida, B. F.; Lawrence, S. K.; Neeb, M. J.; Rivero, R. A.; Douglas, S. A.; Jin, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4936.
- [13] Thutewohl, M.; Schirok, H.; Bennabi, S.; Figueroa-Pérez, S. *Synthesis* **2006**, 629.
- [14] Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. *Organometallics* **1995**, *14*, 3030.
- [15] Biscoe, M. R.; Barder, T. E.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7232.
- [16] Wolfe, J. P.; Wagaw, S.; Marcoux, J.-F.; Buchwald, S. L. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 805.
- [17] Schneider, C.; Goyard, D.; Gueyrard, D.; Joseph, B.; Goekjian, P. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6665.
- [18] Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1348.

(Zhao, C.)