

Tổng hợp và thử tác dụng ức chế tế bào ung thư của một số dẫn chất benzamid mới

Nguyễn Thị Thuận*, Dương Tiến Anh
 Trường Đại học Dược Hà Nội

* Tác giả liên hệ: thuanvnk@yahoo.ca

(Ngày gửi đăng: 25/4/2019 – Ngày duyệt đăng: 24/6/2019)

SUMMARY

Five new benzamide derivatives (**4a-e**), designed based on the structural features of nexturastat A and belinostat, were synthesized. Biological evaluation showed that these hydroxamic acids were generally cytotoxic against three human cancer cell lines (SW620, colon; PC-3, prostate; NCI-H23, lung cancer). Of these, the compound **4b** – substituted by a Cl at the ortho-position of benzamid in structure were the most potent, both in the HDAC inhibition and cytotoxicity, displaying a cytotoxicity up to 3-fold as potent as that of SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, vorinostat). Also, these compounds comparably inhibited HDACs with IC50 values in sub-micromolar range.

Từ khóa: Ức chế histone deacetylase, HDAC, acid hydroxamic, N-hydroxybenzamide, N-hydroxycinnamamid

Đặt vấn đề

Trong quá trình tìm kiếm các chất có tác dụng ngăn cản sự phát triển của tế bào ung thư, nhóm nghiên cứu bộ môn Hóa Dược, Trường Đại học Dược Hà Nội đã thiết kế, tổng hợp được một số dẫn chất của acid hydroxamic và benzamid mang nhân thơm khác nhau với đích tác dụng là HDAC, nhóm enzym xúc tác cho quá trình tách nhóm acetyl từ các protein histon [3], [4]. Phát triển theo hướng này, chúng tôi tiếp tục tổng hợp được một số dẫn chất của benzamid kết hợp với các nhân thơm có cấu trúc kết hợp giữa nexturastat A và belinostat. Nội dung dưới đây công bố một phần các kết quả nghiên cứu này.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Dung môi, hóa chất và thiết bị

Các hóa chất, dung môi được nhập từ công ty Merck hoặc Sigma-Aldrich được sử dụng trực

tiếp không tinh chế thêm. Nhiệt độ nóng chảy được đo bằng máy Gallenkamp Melting Point Apparatus (Anh). Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel GF-254. Phổ hồng ngoại được ghi bằng máy GX-Perkin-Elmer (Mỹ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi bằng máy Bruker AV-500 với DMSO-d₆ làm dung môi. Phổ khối lượng được ghi bằng máy đo khối phổ PE Biosystems API2000 (Perkin Elmer, Mỹ) và Mariner® (Azco Biotech, Mỹ).

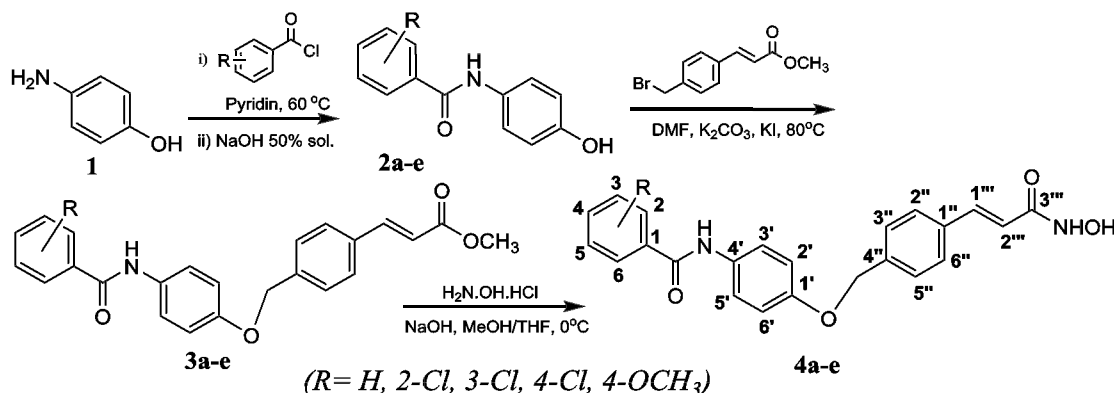
Các enzym HDAC (chiết từ tế bào Hela) được mua của Enzo Life Sciences Inc. (Mỹ). Các dòng tế bào thử nghiệm được mua từ Ngân hàng Tế bào Ung thư của Viện nghiên cứu khoa học sinh học và công nghệ Hàn Quốc (KRIBB). Môi trường nuôi cấy và các hóa chất để thử tác dụng sinh học khác được mua của GIBCO Co. Ltd. (Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp hóa học



Các *N*-hydroxypropenamid được tổng hợp theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp các dẫn chất benzamid (**4a-e**)

Xác định cấu trúc

Sử dụng các phương pháp phổ bao gồm: Phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR, ¹³C-NMR).

Thử hoạt tính kháng tế bào ung thư *in vitro*

Thử hoạt tính kháng tế bào ung thư *in vitro* được thực hiện tại Khoa Dược, Trường Đại học Chungbuk, Chonju, Hàn Quốc trên 3 dòng tế bào ung thư người là SW620 (ung thư đại tràng), PC3 (ung thư tuyến tiền liệt) và NCI-H23 (ung thư phổi) bằng phương pháp đo màu cải tiến [5]. IC₅₀ được tính theo phương pháp Probits [6] và lấy kết quả trung bình của 3 lần thực nghiệm độc lập (SD ≤ 10 %). LogP được xác định dựa trên phần mềm *KowWin 10.0*.

Thử tác dụng ức chế enzym HDAC

Thử tác dụng ức chế enzym HDAC trên hỗn hợp HDAC tổng tách từ tế bào Hela được thực hiện tại Khoa Dược, Trường Đại học Chungbuk, Chonju, Hàn Quốc và Viện nghiên cứu sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc (KRIBB). Định lượng enzym được thực hiện bằng phương pháp huỳnh quang với bộ Fluorogenic HDAC Assay Kit (Enzo Life Sciences Inc.) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tác dụng ức chế HDAC của các dẫn chất được tính bằng phần mềm GraphPad Prism (Mỹ) [2].

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Tổng hợp hóa học

Khuấy dung dịch 4-aminophenol (**1**)

(1 mmol) và 5 mL pyridin trong 10 phút rồi thêm một lượng dư benzoyl clorid (2,2 mmol) vào hỗn hợp. Gia nhiệt và giữ hỗn hợp ở 60 °C cho đến khi phản ứng xảy ra hoàn toàn (khoảng 5 giờ), sau đó làm lạnh rồi chuyển vào 10 mL nước. Điều chỉnh từ từ pH đến 11 bằng dung dịch natri hydroxyd 50 % và khuấy ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút, sau đó điều chỉnh pH đến 7 bằng dung dịch acid hydrocloric 5 %. Lọc và sấy khô tủa (dẫn chất **2a-e** thô) rồi hòa tan vào 5 mL dimethylformamid (DMF). Thêm 165,5 mg kali carbonat (1,2 mmol), khuấy ở 80 °C trong vòng 1 giờ, sau đó thêm 8,3 mg kali iodid (0,05 mmol), khuấy tiếp 15 phút nữa rồi thêm từ từ methyl 4-bromomethylcinnamat (1 mmol trong 0,5 mL DMF). Tiếp tục khuấy ở 80 °C trong 3 giờ, sau đó chuyển toàn bộ hỗn hợp vào 10 mL nước đá. Tủa tạo thành (chất trung gian tương ứng **3a-e** thô) được lọc, rửa bằng nước và sấy khô rồi hòa tan vào 5 mL hỗn hợp methanol-tetrahydrofuran (1:1). Thêm 685 mg hydroxylamin hydroclorid (10 mmol), rồi tiếp tục thêm từ từ dung dịch natri hydroxyd (400 mg trong 1 mL nước). Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng cho đến khi phản ứng xảy ra hoàn toàn (khoảng 1-2 giờ, kiểm tra bằng sắc kí lớp mỏng), sau đó chuyển toàn bộ hỗn hợp vào khoảng 10 mL nước đá, điều chỉnh đến pH ~ 7 bằng dung dịch acid hydrocloric 5 %. Lọc tủa và kết tinh lại trong methanol thu được sản phẩm mong muốn **4a-e**.



Như vậy, tương tự như với các dẫn chất benzamid khác, các dẫn chất **4a-e** đã được tổng hợp qua 3 bước theo sơ đồ hình 1. Bước đầu tiên 4-aminophenol (1) phản ứng với một lượng dư các benzoyl clorid khác nhau trong pyridin, sau đó thủy phân chức ester để giải phóng nhóm chức phenol trong môi trường kiềm để thu được các dẫn chất amidophenol trung gian **2a-e**. Bước 2 là phản ứng thế ái nhân giữa amidophenol trung gian **2a-e** và methyl 4-bromomethylcinnamat trong DMF ở môi trường kiềm kali carbonat với xúc tác kali iodid để tạo các ester trung gian **3a-e**. Bước cuối cùng là phản ứng thế ái nhân của hydroxylamin hydroclorid vào ester **3a-e** trong môi trường kiềm tạo các acid hydroxamic **4a-e** mong muốn với hiệu suất không cao lắm (65-73 %).

Cấu trúc của các chất tổng hợp được **4a-e** đã được khẳng định trên cơ sở phân tích các dữ liệu phổ IR, MS, ^1H và ^{13}C NMR.

(E)-N-(4-((4-(3-(hydroxyamino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzyl)oxy)phenyl)benzamid (4a)

Chất rắn màu xám; Hiệu suất tổng thể: 68 %, t_{nc} : 209-210 °C, R_f = 0,43 (DCM : MeOH : AcOH = 90 : 5 : 1); IR (KBr, cm^{-1}): 3347 (NH); 3242 (OH); 3048 (CH, aren); 2789 (CH, CH_2); 1647 (C=O); 1599, 1512 (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10,15 (1H, s, OH), 7,95 (2H, dd, J = 7,50 Hz, J' = 3,00 Hz, H-2, H-6), 7,72-7,67 (3H, m, H-2'', H-6'', H-4), 7,61-7,45 (7H, m, H-3''', H-3'', H-5'', H-3', H-5', H-3, H-5), 7,02 (2H, d, J = 9,00 Hz, H-2', H-6'), 6,55 (1H, dd, J = 16,00 Hz, J' = 3,00 Hz, H-2'''), 5,13 (2H, s, H-7''a, H-7''b); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 168,07, 165,60, 154,94, 154,90, 143,96, 139,89, 139,04, 138,37, 135,49, 134,81, 134,20, 133,01, 131,86, 128,82, 128,76, 128,56, 128,44, 128,26, 128,03, 127,22, 122,43, 119,83, 119,70, 115,25, 69,44, 69,37; ESI-MS m/z : 389,0 [M+H] $^+$

(E)-2-chloro-N-(4-((4-(3-(hydroxyamino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzyl)oxy)phenyl)benzamid (4b)

Chất rắn màu xám; Hiệu suất tổng thể: 72 %, t_{nc} : 214-215 °C, R_f = 0,46 (DCM : MeOH : AcOH = 90 : 5 : 1); IR (KBr, cm^{-1}): 3244 (OH); 3047 (CH,

aren); 2857 (CH, CH_2); 1655 (C=O); 1695, 1510 (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10,37 (1H, s, OH), 7,64 (2H, d, J = 7,50 Hz, H-2'', H-6''), 7,56 (3H, d, J = 7,00 Hz, H-3', H-5', H-6), 7,52-7,47 (4H, m, H-3'', H-5'', H-3, H-4), 7,42-7,34 (2H, m, H-3''', H-5), 7,01 (2H, d, J = 8,00 Hz, H-2', H-6'), 6,55 (1H, m, H-2'''), 5,12 (2H, s, H-7''a, H-7''b); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 164,96, 163,39, 155,00, 138,51, 137,58, 136,71, 135,29, 132,85, 131,44, 130,41, 130,09, 129,38, 128,53, 127,82, 127,70, 121,52, 120,98, 115,43, 69,50; ESI-MS m/z : 423,0 [M+H] $^+$

(E)-3-chloro-N-(4-((4-(3-(hydroxyamino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzyl)oxy)phenyl)benzamid (4c)

Chất rắn màu xám; Hiệu suất tổng thể: 73 %, t_{nc} : 214-215 °C, R_f = 0,47 (DCM : MeOH : AcOH = 90 : 5 : 1); IR (KBr, cm^{-1}): 3352 (NH); 3069 (CH, aren); 2862 (CH, CH_2); 1649 (C=O); 1599, 1508 (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10,25 (1H, s, OH), 8,00 (1H, s, H-2), 7,91 (1H, d, J = 8,00 Hz, H-6), 7,68-7,65 (4H, m, H-2'', H-6'', H-3', H-5'), 7,59 (1H, d, J = 8,50 Hz, H-4), 7,57 (1H, t, J = 8,00 Hz, H-5), 7,49 (2H, d, J = 8,00 Hz, H-3'', H-5''), 7,47 (1H, d, J = 15,50 Hz, H-3'''), 7,03 (2H, d, J = 9,00 Hz, H-2', H-6'), 6,48 (1H, d, J = 15,50 Hz, H-2'''), 5,13 (2H, s, H-7''a, H-7''b); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 164,09, 155,13, 139,00, 138,34, 137,46, 134,82, 133,66, 132,68, 131,71, 130,86, 128,56, 128,44, 128,04, 127,77, 126,85, 122,48, 119,67, 115,29, 69,45; ESI-MS m/z : 423,0 [M+H] $^+$

(E)-4-chloro-N-(4-((4-(3-(hydroxyamino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzyl)oxy)phenyl)benzamid (4d)

Chất rắn màu xám; Hiệu suất tổng thể: 71 %, t_{nc} : 216-217 °C, R_f = 0,47 (DCM : MeOH : AcOH = 90 : 5 : 1); IR (KBr, cm^{-1}): 3347 (NH); 3229 (OH); 3019 (CH, aren); 2862 (CH, CH_2); 1645 (C=O); 1597, 1512 (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10,21 (1H, s, OH), 7,98 (2H, d, J = 8,50 Hz, H-2, H-6), 7,67 (2H, d, J = 9,00 Hz, H-2'', H-6''), 7,61 (2H, d, J = 8,00 Hz, H-3', H-5'), 7,59 (2H, d, J = 7,00 Hz, H-3, H-5), 7,49 (2H, d, J = 8,00 Hz, H-3'', H-5''), 7,43 (1H, d, J = 15,50 Hz, H-3'''), 7,02 (2H, d, J =



9,00 Hz, H-2', H-6'), 6,48 (1H, d, $J = 15,50$ Hz, H-2'''), 5,13 (2H, s, H-7''a, H-7''b); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 164,48, 163,11, 162,79, 155,06, 139,01, 138,36, 136,69, 134,81, 134,17, 132,77, 130,00, 128,90, 128,56, 128,26, 128,04, 127,22, 122,48, 119,68, 115,27, 69,44; ESI-MS m/z : 423,0 [M+H]⁺

(E)-4-methoxy-N-(4-((4-(3-(hydroxyamino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzyl)oxy)-phenyl)benzamid (4e)

Chất rắn màu xám; Hiệu suất tổng thể: 65 %, t_{nc} : 212-213 °C, $R_f = 0,44$ (DCM : MeOH : AcOH = 90 : 5 : 1); IR (KBr, cm^{-1}): 3343 (NH); 3065 (CH, aren); 2839 (CH, CH₂); 1641 (C=O); 1605, 1510 (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 9,99 (1H, s, OH), 7,95 (2H, d, $J = 8,50$ Hz, H-2, H-6), 7,71 (2H, d, $J = 8,00$ Hz, H-2'', H-6''), 7,67 (2H, d, $J = 8,50$ Hz, H-3', H-5'), 7,58 (1H, d, $J = 16,50$ Hz, H-3'''), 7,49 (2H, d, $J = 7,50$ Hz, H-3'', H-5''), 7,06 (2H, d, $J = 8,50$ Hz, H-3, H-5), 7,01 (2H, d, $J = 9,00$ Hz, H-2', H-6'), 6,55 (1H, d, $J = 16,00$ Hz, H-2'''), 5,14 (2H, s, H-7''a, H-7''b), 3,84 (3H, s, 4-OCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 168,20, 164,99, 162,23, 154,76, 143,57, 139,80, 134,31, 133,18,

129,92, 128,94, 128,70, 128,55, 128,44, 128,03, 127,53, 122,39, 115,21, 114,03, 69,44, 69,38, 55,88; ESI-MS m/z : 419,0 [M+H]⁺

Trên phổ $^1\text{H NMR}$ của tất cả các chất đều có 2 pic đôi với J khá lớn (khoảng 16 Hz) ở các vị trí dịch chuyển khoảng 7,5 và 6,5 ppm tương ứng với cấu hình trans (E) của cặp proton 2 và 3 (hoàn toàn tương tự như trong cấu hình của methyl 4-bromomethylcinnamat). Cả 5 chất đều có 1 pic đơn 2 proton ở khoảng 5,15 ppm thể hiện sự có mặt của các proton metylen trong cấu trúc. Ở vùng nhân thơm tất cả các chất (4a-e) đều có 4 pic đôi 2 proton của các cặp proton đối xứng 2'-6', 3'-5', 2''-6'' và 3''-5''. Vị trí thế của Cl và OCH₃ trên R cũng tương tự được khẳng định dựa trên các pic khác tại vùng nhân thơm (2 pic đôi 2 proton chứng thực vị trí thế para; 1 pic đơn, 2 pic đôi, 1 pic đa xác nhận vị trí thế meta; 2 pic đơn, 2 pic đa cho biết vị trí thế ortho). Ngoài ra, công thức phân tử của các chất thu được cũng được khẳng định dựa vào 1 pic phân tử có số khối phù hợp với khối lượng phân tử của chất dự kiến.

Bảng 1. Kết quả thử tác dụng ức chế HDAC và độc tính tế bào của các chất tổng hợp được

Các chất	R	KLPT	LogP ¹	Ức chế HDAC (IC ₅₀ , ² μM)	Độc tính tế bào (IC ₅₀ , ² μM)/Dòng tế bào ³		
					SW620	PC3	NCI-H23
					4a	H	388,42
4b	2-Cl	422,86	3,84	0,50±0,15	0,52±0,08	0,59±0,07	0,37±0,01
4c	3-Cl	422,86	3,84	0,63±0,17	- ⁵	- ⁵	- ⁵
4d	4-Cl	422,86	3,84	1,21±0,59	>10	>10	6,03±0,94
4e	4-OCH ₃	418,44	3,27	1,58±0,73	0,94±0,07	1,46±0,14	0,79±0,08
SAHA ⁴		264,32	1,44	0,15±0,04	1,19±0,12	1,04±0,05	1,01±0,04

¹Tính bằng phần mềm KowWin 10.0; ²Nồng độ (mM) chất thử gây giảm 50 % hoạt tính enzym hoặc sự phát triển tế bào. Số liệu là trung bình của 3 lần thực nghiệm; ³Dòng tế bào thử: SW620 (ung thư đại tràng); PC3 (ung thư tiền liệt tuyến); NCI-H23 (ung thư phổi); ⁴SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid, chất đối chứng dương tính; ⁵Không xác định



Kết quả thử tác dụng ức chế enzym HDAC và độc tính tế bào

Sau khi đã khẳng định cấu trúc, các chất mới tổng hợp được thử tác dụng ức chế hoạt tính của HDAC chiết từ tế bào Hela và tác dụng ức chế sự phát triển của 3 dòng tế bào ung thư người là SW620, PC3 và NCI-H23 với chất chứng dương tính là SAHA. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Kết quả trên đã cho thấy các chất tổng hợp được đều có tác dụng ức chế HDAC với IC₅₀ từ 0,17 μ M đến 1,58 μ M, tuy nhiên đều yếu hơn SAHA (IC₅₀ = 0,15 μ M). Ngoài 2 chất (**4a**, **4c**) không thể tính toán được độc tính tế bào do độ tan trong dung môi quá thấp, độc tính tế bào của 2 trong 3 chất còn lại đều mạnh hơn SAHA. Điều đó có thể một phần là do khả năng thấm qua màng của các chất này tốt hơn, thể hiện ở log P cao hơn so với SAHA. Tuy nhiên, logP không phải là yếu tố quyết định. Với cùng một giá trị logP tính toán được, dẫn chất Cl thế ở vị trí ortho (**4b**) có độc tính tế bào mạnh hơn

4d – có Cl thế ở vị trí para. Ngoài ra, bản chất của nhóm thế cũng làm thay đổi hoạt tính của chất. So sánh hoạt tính của **4d** và **4e** có thể nhận thấy ở cùng một vị trí, nhóm thế đẩy điện tử mạnh hơn (OCH₃ so với Cl) sẽ cho độc tính mạnh hơn trên tế bào ung thư. Đây cũng là kết luận rút ra ở một số dẫn chất acid hydroxamic khác[1].

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp được 5 dẫn chất mới của *N*-hydroxypropenamid (**4a-e**) và thử tác dụng ức chế HDAC cũng như độc tính tế bào trên các dòng tế bào ung thư người SW620, PC-3, và NCI-H23. Cả 5 chất mới tổng hợp đều thể hiện hoạt tính ức chế HDAC kém SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, vorinostat). Tuy nhiên, ngoài 2 chất không xác định được kết quả thì 2/3 chất còn lại có độc tính cao hơn SAHA đối với các dòng tế bào thử nghiệm, trong đó chất **4b** với nhóm thế Cl ở vị trí *ortho* trên khung benzamid có hoạt tính mạnh nhất, mạnh hơn SAHA khoảng 2-3 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thi Thuận, Nguyễn Hải Nam, Dương Tiến Anh (2019), "Tổng hợp và thử tác dụng ức chế tế bào ung thư của một số dẫn chất 3/4-((benzamidophenoxy)methyl)-*N*-hydroxybenzamid". *Tạp chí Dược học*, 514: p. 19 - 24.
2. *One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (2015)*, GraphPad Software: La Jolla California, USA.
3. Dokmanovic, M.,P.A. Marks (2005), "Prospects: histone deacetylase inhibitors". *J Cell Biochem*, 96(2): p. 293-304.
4. Glaser, K.B. (2007), "HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential". *Biochem Pharmacol*, 74(5): p. 659-71.
5. Skehan, P., R. Storeng, et al. (1990), "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". *J Natl Cancer Inst*, 82(13): p. 1107-12.
6. Wu, L., A.M. Smythe, et al. (1992), "Multidrug-resistant phenotype of disease-oriented panels of human tumor cell lines used for anticancer drug screening". *Cancer Res*, 52(11): p. 3029-34.