

Tổng hợp và thử tác dụng ức chế tế bào ung thư của một số dẫn chất acetohydrazid mới mang khung quinazolin

Dương Tiến Anh, Đào Thị Kim Oanh, Nguyễn Thị Thuận*
 Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hà Nội
 *Tác giả liên hệ: thuanvkn@yahoo.co
 (Ngày gửi đăng: 10/12/2019 - Ngày duyệt đăng: 10/4/2020)

SUMMARY

5 new acetohydrazide (**5a-e**), contained quinazoline moiety, designed based on the structural features of PAC-1, were synthesized. Biological evaluation on three human cancer cell lines (SW620, colon; PC-3, prostate; NCI-H23, lung cancer) was realised. It was found that the leader compound **5a** was active against the tested cell lines. The cytotoxicity of this compound could be destroyed by substitution of halogene at any position of quinazoline. The same influence was observed with 7-methyl substitution. However, methyl substitution at position 6 of quinazoline gave a compound whose activity was comparable to PAC-1 (better than 5-fluorouracil). The role of methyl group in this case could be determined by analysing other derivatives.

Từ khóa: acetohydrazid, quinazolin, hoạt hóa procaspase-3

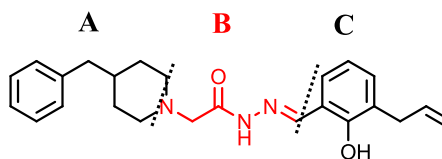
Đặt vấn đề

Để khai thác các khiếm khuyết nhất định trong tế bào ung thư nhằm tìm kiếm các thuốc điều trị mới, các nhà khoa học đã xác định được một số mục tiêu phân tử, trong đó có procaspase - một nhóm enzym có nhiều trong các tế bào ung thư. Các nghiên cứu đã cho thấy một hợp chất có tác dụng kích hoạt procaspase-3 có thể gây ra cái chết theo chu trình của tế bào ung thư nuôi cấy trong ống nghiệm và tế bào ung thư trong mô hình cấy ghép trên chuột [1], [3]. Cấu trúc của PAC-1 (Hình 1) - chất đầu tiên được thấy có tác dụng hoạt hóa procaspase-3 - đã được công bố [4]. Mặt khác, có thể gặp nhân quinazolin trong cấu trúc của nhiều chất có hoạt tính sinh học. Chính vì vậy, dựa trên cấu trúc của PAC-1, chúng tôi đã tổng hợp thành công các chất tương tự có khung quinazolin-4(3H)-on acetohydrazid với phần A là dẫn chất oxoquinazolin và phần C vẫn là dẫn chất phenyl nhưng với các nhóm thế khác. Tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư người của các chất này cũng đã được xác định. Dưới đây là một phần các kết quả nghiên cứu.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Dung môi, hóa chất và thiết bị

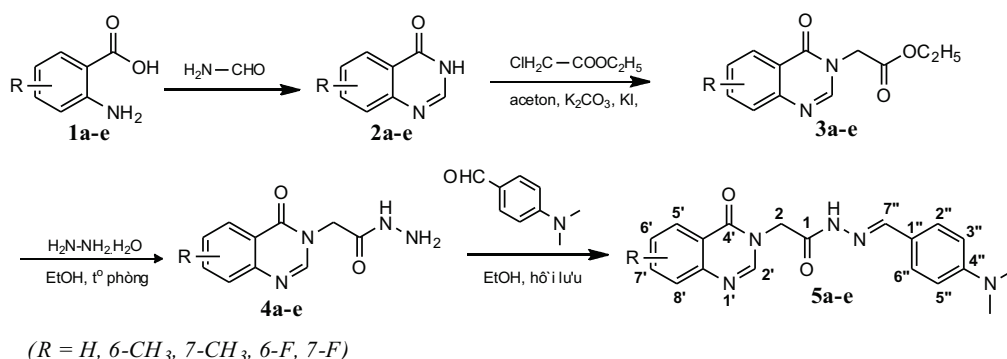
Các hóa chất, dung môi thông thường được nhập từ công ty Merck hoặc Sigma-Aldrich và được sử dụng



Hình 1. Cấu trúc của PAC-1

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 silica gel 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- d_6 làm dung môi, độ dịch chuyển hóa học (δ) được biểu thị bằng đơn vị phần triệu (ppm), lấy mốc là pic của chất chuẩn nội tetramethylsilan (TMS). Phổ khối lượng được ghi bằng máy khối phổ PE Biosystems API2000 (Perkin Elmer, Mỹ) và Mariner® (Azco Biotech, 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).



Sơ đồ 1. Tổng hợp các dẫn chất acetohydrazid (5a-e)

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp hóa học

Các acetohydrazid được tổng hợp theo sơ đồ 1.

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 [7] 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.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Tổng hợp hóa học

Các dẫn chất quinazolin-4(3H)-on acetohydrazid (**5a-e**) được tổng hợp qua 4 bước theo sơ đồ 1. Bước đầu tiên là phản ứng ngưng tụ Niemannowski giữa 1 acid anthranilic (**1a-e**) (1 mmol) và một lượng dư formamid (10 mmol) ở 120 °C trong 3-7 giờ (theo dõi và xác định thời gian dừng phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng) tạo ra quinazolin-4(3H)-on (**2a-e**) với hiệu suất (tho) cao (89-90 %). Sau khi kết thúc phản ứng (không còn nguyên liệu ban đầu), toàn bộ hỗn hợp phản ứng được đổ vào nước đá rồi lọc lấy tủa. Tủa (**2a-e**) được rửa 3 lần bằng nước lạnh rồi sấy khô và được dùng trực tiếp cho phản ứng tiếp theo mà không tinh chế thêm.

Ở bước thứ 2, phản ứng giữa quinazolin-4(3H)-on (**2a-e**) với ethyl cloroacetat (1,2 mmol) trong acetone ở môi trường kiềm (K₂CO₃, 1,5 mmol) với xúc tác KI (0,1 mmol) ở 60 °C cho phép thu được ester trung gian **3a-e**. Kết thúc phản ứng, sau khi cất thu hồi dung môi thì hòa hỗn hợp trong nước lạnh và lọc lấy tủa.

Phản ứng thế ái nhân tiếp theo của hydrazin monohydrat (5 mmol) vào ester **3a-e** trong môi trường ethanol ở nhiệt độ phòng cho sản phẩm là các hydrazid tương ứng **4a-e** dưới dạng kết tủa trắng. Cuối cùng, sản phẩm mong muốn **5a-e** đã thu được nhờ phản ứng ngưng tụ aldol giữa hydrazid **4a-e** tương ứng và 4-dimethylamino benzaldehyd (2 mmol) trong ethanol (hồi lưu) với hiệu suất chung ở mức trung bình (khoảng 60-65%). Sản phẩm cuối cùng (**5a-e**) được tinh chế qua sắc ký cột silica (dung môi: dicloromethan-methanol với tỉ lệ khác nhau) hoặc kết tinh lại trong ethanol.

Cấu trúc của các chất tổng hợp được **5a-e** đã được khẳng định trên cơ sở phân tích các dữ liệu phổ IR, MS, ¹H và ¹³C-NMR [6].

(E)-N'-(4''-Dimethylamino benzyliden)-2-(4'-oxoquinazolin-3'(4'H)-yl)acetohydrazid (**5a**)

Chất rắn, trắng; Hiệu suất: 63 %, t_{m/c}: 190-191 °C, R_f = 0,62 (DCM : MeOH = 14 : 1), IR (KBr, cm⁻¹): 3210 (NH); 3069 (CH aren); 2972, 2899, 2816 (CH, CH₂); 1668 (C=N); 1603 (C=N); 1504 (C=C), ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,57, 11,53 (~25 %, 75 %) (s, 1H, NH); 8,64, 8,34 (~75 %, 25 %) (s, 1H, H_{7'}); 8,33 (d, J = 7,0 Hz, 1H, H_{5'}); 8,04 (s, 1H, H_{2'}); 7,75 (m, 1H, H_{7''}); 7,53 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H₂; H_{6'}); 7,50 (m, 2H, H₆; H₈); 6,70 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H₃; H₅); 5,24, 4,77 (~25%, 75 %) (s, 2H, H₂); 3,04 (s, 6H, 4''-N(CH₃)₂); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 168,1, 163,2, 160,8, 152,1, 152,0, 149,2, 149,1, 148,6, 145,6, 135,0, 134,9, 129,0, 128,7, 127,7, 127,6, 127,5, 126,5, 122,0, 121,7, 112,3, 48,0, 47,4, HR-MS (ESI) m/z 348,1456 [M-H]⁻.

(E)-N'-(4''-(Dimethylamino)benzyliden)-2-(6'-methyl-4'-oxoquinazolin-3'(4'H)-yl)acetohydrazid (**5b**)

Chất rắn màu nâu nhạt; Hiệu suất: 62 %, t_{m/c}: 186,0-187,0 °C, R_f = 0,68 (DCM : MeOH = 9 : 1), IR (KBr, cm⁻¹): 3439 (NH); 3348 (OH); 3122 (CH, aren); 2791 (CH, CH₂); 1735 (C=O); 1610, 1537 (C=C), ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,54, 11,49 (~27%, 73 %) (s, 1H, NH); 8,29



(s, 1H, H_{2'}); 8,07, 7,91 (~23 %, 77 %) (s, 1H, H_{7''}); 7,94 (s, 1H, H_{5'}); 7,67 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_{7'}); 7,61 (d, 1H, J=8,0 Hz, H₈); 7,53 (d, 2H, J=8,5 Hz, H₂; H_{6'}); 6,74 (d, 2H, J=8,5 Hz, H₃; H_{5'}); 5,16, 4,72 (~77 %, 23 %) (s, 2H, 2H₂); 3,97 (s, 6H, 4''-N(CH₃)₂); 2,42 (s, 3H, 6'-CH₃), ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 167,6; 160,2; 151,4; 148,8; 146,1; 145,0; 136,8; 135,7; 128,5; 128,2; 127,0; 125,3; 121,3; 111,8; 46,8; 20,8; MS (ESI) m/z 364,0 [M+H]⁺.

(E)-N'-(4''-(Dimethylamino)benzyliden)-2-(7'-methyl-4'-oxoquinazolin-3'(4'H)-yl)acetohydrazid (**5c**)

Chất rắn, trắng; Hiệu suất: 63 %, t_{n/c}: 197-198 °C, R_f = 0,63 (DCM : MeOH = 14 : 1), IR (KBr, cm⁻¹): 3177 (OH); 3063 (CH aren); 2963, 2907 (CH, CH₂); 1668 (C=N); 1603, 1533 (C=C), ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,56, 11,51 (~25 %, 75 %) (s, 1H, NH); 8,33 (s, 1H, H_{2'}); 8,33, 8,09 (~25 %, 75 %) (s, 1H, H_{7'}); 8,09-8,03 (m, 1H, H₅); 7,55-7,51 (m, 3H, H_{2''}, H_{6''}, H_{8'}); 7,40 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H_{6'}); 6,76-6,74 (m, 2H, H₃; H_{5'}); 5,17, 4,73 (~75 %, 25 %) (s, 2H, 2H₂), 2,98 (m, 6H, 4''-N(CH₃)₂); 2,49 (m, 3H, 7'-CH₃), ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 168,1; 160,6; 152,0; 149,2; 148,7; 145,5; 145,4; 130,0; 129,0; 128,9; 128,7; 127,3; 126,4; 121,7; 119,6; 112,3; 112,2; 47,8; 47,3; 21,8; HR-MS (ESI) m/z 364,1780 [M+H]⁺.

(E)-N'-(4''-(Dimethylamino)benzyliden)-2-(6'-fluoro-4'-oxoquinazolin-3'(4'H)-yl)acetohydrazid (**5d**)

Chất rắn, trắng; Hiệu suất: 63 %, t_{n/c}: 191-192 °C, R_f = 0,66 (DCM : MeOH = 14 : 1), IR (KBr, cm⁻¹): 3175 (OH); 3067 (CH aren); 2965, 2901 (CH, CH₂); 1667 (C=N); 1535 (C=C), ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,57, 11,54 (~20 %, 80 %) (s, 1H, NH); 8,38, 8,37 (~20 %, 80%) (s, 1H, H₂); 8,09, 7,93 (~20 %, 80 %) (s, 1H, H_{7''}); 7,85-7,75 (m, 3H, H₅; H₇; H₈); 7,56, 7,51 (~20%, 80 %) (s, 2H, H₂; H₆); 6,77, 6,74 (~20%, 80 %) (s, 2H, H_{3''}, H_{5''}); 5,20, 4,76 (~80 %, 20 %) (2s, 2H, 2H₂); 2,98 (s, 6H, 4''-N(CH₃)₂), ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 167,9; 163,0; 161,7; 160,1; 159,7; 152,1; 152,0; 148,6; 148,6; 145,6; 145,5; 130,7; 130,6; 129,0; 128,7; 123,5; 123,3; 123,2; 123,1; 121,7; 112,3; 112,2; 111,3; 111,1; 48,0; 47,5; HR-MS (ESI) m/z 368,1520 [M+H]⁺.

(E)-N'-(4''-(Dimethylamino)benzyliden)-2-(7'-fluoro-4'-oxoquinazolin-3'(4'H)-yl)acetohydrazid (**5e**)

Chất rắn, trắng; Hiệu suất: 65 %, t_{n/c}: 190-191 °C,

R_f = 0,67 (DCM : MeOH = 14 : 1), IR (KBr, cm⁻¹): 3123 (OH); 3067 (CH aren); 2968, 2897, 2814 (CH, CH₂); 1668 (C=O); 1605, 1504 (C=C), ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 11,56, 11,52 (~25 %, 75%) (s, 1H, NH); 8,42 (s, 1H, H₂); 8,25-8,22 (m, 1H, H₈); 8,09, 7,94 (~25%, 75 %) (s, 1H, H_{7'}); 7,56-7,43 (m, 4H, H₂; H₆; H₅; H₆); 6,77-6,74 (m, 2H, H₃; H_{5'}); 5,19, 4,75 (~75 %, 25 %) (s, 2H, 2H₂); 2,98 (s, 6H, 4''-N(CH₃)₂), ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 167,9; 167,1; 165,1; 163,1; 160,1; 152,1; 152,0; 150,8; 150,7; 150,6; 150,5; 148,6; 145,6; 129,8; 129,7; 129,0; 128,7; 121,7; 119,0; 116,3; 116,1; 112,9; 112,8; 112,3; 47,9; 47,4; HR-MS (ESI) m/z 366,1359 [M-H]⁺.

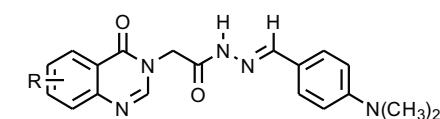
Trên phổ ¹H NMR của tất cả các chất đều thể hiện sự có mặt của 2 đồng phân với tỉ lệ khác nhau. Theo sự phân tích Lê Công Huân và cộng sự, 2 đồng phân đó là E-anti và E-syn [2]. Chính sự có mặt của các đồng phân này mà ở một số phổ ¹³C-NMR xuất hiện số C lớn hơn so với số lượng C trong cấu trúc phân tử.

Mặc dù tất cả các chất đều có đồng phân nhưng trên phổ ¹H-NMR của chúng đều có thể nhận thấy 1 pic đơn ở vùng từ trường thấp (khoảng 11,5 ppm) tương ứng với proton của nhóm CO-NH. Sự có mặt của nhóm NH được khẳng định khi pic này không xuất hiện sau khi lắc mẫu với D₂O. Nhóm CH₂ ở vị trí 2 xuất hiện dưới dạng 1 pic đơn 2 proton ở khoảng 4,7-5,2 ppm. Cả 5 chất đều có 1 pic đơn 6 proton ở khoảng 3 ppm thể hiện sự có mặt của 2 nhóm methyl của nhóm thế 4''-N(CH₃)₂. Ở vùng nhân thơm, tất cả các chất (**5a-e**) đều có các pic đôi 2 proton của các cặp proton đối xứng 2''-6'' và 3''-5''. Ngoài ra, công thức phân tử của các chất thu được cũng được khẳng định dựa vào 1 pic phân tử trên phổ khối lượng (MS) có số khối phù hợp với khối lượng phân tử của chất dự kiến.

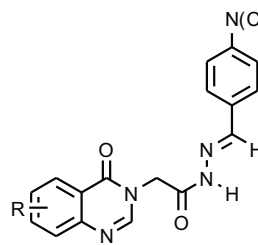
Kết quả thử tác dụng ức chế tế bào ung thư

Sau khi đã khẳng định cấu trúc, các chất mới tổng hợp được thử tác dụng ức chế sự phát triển của 3 dòng tế bào ung thư người là SW620 (ung thư đại tràng), PC3 (ung thư tiền liệt tuyến) và NCI-H23 (ung thư phổi) với 2 chất chứng dương tính là 5-fluorouracil (5-FU) và PAC-1. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Kết quả trên cho thấy nhóm thế flo dù ở vị trí 6 hay 7 (chất **5d**, **5e**) trên nhân quinazolin cũng làm mất hoạt



Đồng phân E-anti



Đồng phân E-syn



Bảng 1: Kết quả thử tác dụng ức chế tế bào của các chất tổng hợp được

R	KLPT	LogP ¹	Độc tính tế bào (IC ₅₀ , ² μM)/Dòng tế bào ³			
			SW620	PC3	NCI-H23	
5a	H	349,39	1,05	5,91±1,41	4,73±0,83	3,01±0,11
5b	6-CH ₃	363,41	1,60	4,68±0,30	4,60±0,33	3,58±0,11
5c	7-CH ₃	363,41	1,60	>10	>10	>10
5d	6-F	367,38	1,25	>10	>10	>10
5e	7-F	367,38	1,25	>10	>10	>10
5-FU⁴		130,08	-0,81	8,84±1,92	13,61±0,46	13,45±3,92
PAC-1⁵		392,49	3,43	4,32±0,34	3,98±0,46	4,09±0,10

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); ⁴5-FU, 5-fluorouracil, chất đối chứng dương tính; ⁵PAC-1, chất đối chứng dương tính

tính ức chế tế bào ung thư của chất đầu dây **5a**. Kết hợp với các kết quả nghiên cứu khác (thế clo, brom - không được đưa ra trong bài báo này), chúng tôi cho rằng thế halogen làm mất hoạt tính của dây này.

Với nhóm thế methyl, trong khi vị trí 7 (**5c**) cho kết quả tương tự như thế halogen (làm mất hoạt tính), thì vị trí 6 (**5b**) lại cho kết quả tương đối khả quan, không làm mất hoạt tính của chất đầu dây, tuy nhiên cũng không làm tăng mạnh tác dụng của chất này. Hoạt tính của **5b** có vẻ mạnh hơn **5a** một chút trên 2 dòng tế bào SW620 và PC3, nhưng lại hơi yếu hơn trên dòng tế bào NCI-H23. Tuy tác dụng ức chế tế bào ung thư của cả 2 chất này (**5a, 5b**) đều mạnh hơn 5-FU nhưng cũng chỉ tương tự hoặc yếu hơn PAC-1. Kết hợp với sự mất hoạt tính khi thế F ở cả 2 vị trí 6 và 7 (**5d, 5e**) và khi thế methyl ở vị trí 7 (**5c**), chúng tôi cho rằng khả năng giữ được tác dụng của nhóm thế methyl có thể là do tương tác của một alkyl ở vị trí 6 chứ không phải là do hiệu ứng đẩy điện tử của nhóm này. Giả thiết này còn cần được kiểm chứng thêm bằng các thực

th nghiệm trên các dẫn chất khác.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp được 5 dẫn chất mới có cấu trúc tương tự PAC-1 (**5a-e**) và thử độc tính tế bào trên các dòng tế bào ung thư người SW620, PC-3, và NCI-H23. Trong 5 chất tổng hợp được, chỉ có dẫn chất không thế 5a và dẫn chất 6-methyl (5b) là có độc tính đáng kể với các dòng tế bào thử nghiệm (mạnh hơn chứng dương 5-FU nhưng không mạnh hơn PAC-1). Kết quả này cho thấy nhóm thế 4"-N(CH₃)₂ có thể thay thế cho nhóm thế 2"-OH 3"-CH₂CH=CH₂ của phần C trong cấu trúc PAC-1. Nhân quinazolin có thể thay thế phần A, tuy nhiên để có tác dụng mạnh hơn cần có các nghiên cứu sâu hơn về các nhóm thế cả trên khung quinazolin và nhân benzen (phần C).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hoàn thành với sự hỗ trợ tài chính của đề tài Nafosted số 104.01-2018.01 và của chính phủ Hàn Quốc (NRF, 2017R1A5A2015541).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Elvas, F., Vanden Berghe, T., et al., (2019). "Caspase-3 probes for PET imaging of apoptotic tumor response to anticancer therapy". *Org Biomol Chem*, **17** (19): 4801-4824.
- Lê Công Huân, Trần Phương Thảo, Nguyễn Thị Thuận, (2019). "Tổng hợp và thử tác dụng ức chế tế bào ung thư của một số dẫn chất acetohydrazid có khung 3,4-dihydro-4-oxoquinazolin". *Tạp chí Dược học*, **59** (522): 18-21.
- Peterson, Q.P., Hsu, D.C., et al., (2009). "Procaspase-3 activation as an anti-cancer strategy: structure-activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and its cellular co-localization with caspase-3". *J Med Chem*, **52** (18): 5721-31.
- Peterson, Q.P., Goode, D.R., et al., (2009). "PAC-1 activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition". *J Mol Biol*, **388** (1): 144-58.
- Skehan, P., Storeng, R., et al., (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". *J Natl Cancer Inst*, **82** (13): 1107-12.
- Špulák, M., Novák, Z., et al., (2013). "The unambiguous synthesis and NMR assignment of 4-alkoxy and 3-alkylquinazolines". *Tetrahedron*, **69** (6): 1705-1711.
- Wu, L., Smythe, A.M., et al., (1992). "Multidrug-resistant phenotype of disease-oriented panels of human tumor cell lines used for anticancer drug screening". *Cancer Res*, **52** (11): 3029-34.