

Tổng hợp và đánh giá hoạt tính sinh học của hai dẫn xuất tương tự belinostat chứa fluorine ở vị trí CAP

Nguyễn Cường Quốc¹, Lê Đăng Quang^{2,3}, Đặng Huy Phúc¹, La Thị Kim Tú⁴, Bùi Thị Bửu Huệ¹, Nguyễn Trọng Tuấn¹, Trần Thanh Mến⁴, Trần Quang Đệ^{1,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Bộ môn Hoá học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Liên hệ

Trần Quang Đệ, Bộ môn Hoá học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Email: tqde@ctu.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 03-10-2022
- Ngày chấp nhận: 30-3-2023
- Ngày đăng: 05-4-2023

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v7i1.1238>



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

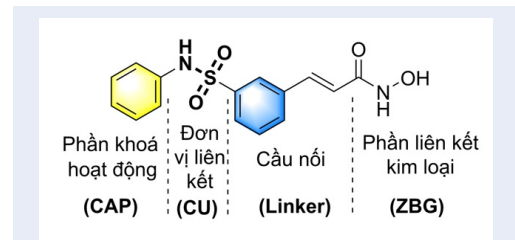
Hoạt động quá mức của enzyme histone deacetylase (HDAC) là nguyên nhân dẫn đến hình thành các khối u ác tính về huyết học (như bệnh bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính, bệnh xơ tủy, u lympho tế bào T ở da và u lympho Hodgkin); việc ức chế HDAC có thể dẫn đến ức chế sự tăng sinh tế bào và cảm ứng quá trình chết theo chương trình. Do đó, các chất ức chế các HDAC là đối tượng để phát triển các loại thuốc tiềm năng điều trị bệnh ung thư. Belinostat là chất ức chế HDAC, đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ phê duyệt vào năm 2014 để điều trị ung thư hạch tế bào lympho T và điều trị các khối u rắn. Bài báo trình bày tổng hợp hai dẫn xuất tương tự belinostat (bao gồm một dẫn xuất mới lần đầu tiên được tổng hợp) bằng cách đưa các nguyên tử fluorine vào nhóm CAP của belinostat, thực hiện docking phân tử và đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá, chống ung thư của các dẫn xuất bằng các thử nghiệm in vitro. Hợp chất mới 8a cho thấy hoạt tính cao đối với dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) và dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2) với giá trị EC50 1,5–4,0 $\mu\text{g/mL}$. Hai hợp chất này cũng cho thấy khả năng kháng oxy hoá khá tốt với EC50 8,30–13,60 $\mu\text{g/mL}$. Các kết quả này cho thấy hai dẫn xuất được tổng hợp có tiềm năng chống ung thư đáng được nghiên cứu thêm.

Từ khoá: belinostat, docking, histone deacetylase (HDAC), ung thư gan, ung thư vú

MỞ ĐẦU

Enzyme histone deacetylase (HDAC) là mục tiêu đầy hứa hẹn cho các can thiệp trị liệu, do hoạt động bất thường của enzyme HDAC có liên quan đến nhiều loại bệnh ung thư, tiểu đường và các bệnh khác ở người^{1,2}. Trong cơ thể con người, sự cân bằng của quá trình acetyl hóa được duy trì bởi hai loại enzyme là histone acetyltransferase (HAT) và HDAC³. HDAC xúc tác cho quá trình deacetyl hoá nhóm ϵ -N acetyl lysine amino acid ở phần đuôi của histone, làm đóng xoắn chromatin, do đó ức chế quá trình phiên mã⁴. Sự cân bằng giữa hoạt động của HAT và HDAC là điều kiện để các tế bào hoạt động bình thường⁴. Trong các tế bào tiền ung thư, sự deacetyl hóa chiếm ưu thế dẫn đến các thay đổi, biệt hóa, tăng sinh, chết của tế bào, hay nói cách khác là biến chúng thành các tế bào ác tính. Đồng thời, sự gia tăng quá trình deacetyl cũng dẫn đến sự di chuyển mất trật tự của các tế bào và hình thành mạch máu, từ đó dẫn đến sự hình thành và phát triển của bệnh ung thư^{4,5}. Chính vì vậy, các hoạt chất ức chế HDAC dần trở thành các tác nhân mới trong điều trị các bệnh ung thư. Belinostat là hợp chất ức chế HDAC phổ rộng, đã được FDA Hoa Kỳ chấp thuận cho điều trị u lympho tế bào T ngoại vi (một dạng bệnh ung thư về huyết học)⁶ (Hình 1).

Ngoài ra, belinostat còn ngăn chặn sự tăng sinh các tế bào ung thư bằng cách bất hoạt con đường Wnt/ β -catenin và thúc đẩy quá trình chết rụng thông qua việc điều chỉnh con đường PKC trong ung thư vú⁷.



Hình 1: Cấu trúc của hợp chất belinostat (surface recognition domain-CAP; zinc-binding group -ZBG; connective unit-CU).

Belinostat còn được sử dụng để điều trị cho các bệnh như ung thư nội tiết thần kinh, ung thư tế bào nội tiết ở phổi, ung thư tế bào vảy ở phổi và ung thư vú...^{8,9}. Mang hoạt tính phổ rộng và đa dạng trên nhiều loại ung thư, nên việc bào chế, thử nghiệm, tìm ra các dẫn xuất có cấu trúc sườn tương tự belinostat là việc cần thiết, góp phần bổ sung vào kho dữ liệu và làm phong phú thêm hoạt tính sẵn có của belinos-

Trích dẫn bài báo này: Quốc N C, Quang L D, Phúc D H, Tú L T K, Huệ B T B, Tuấn N T, Mến T T, Đệ T Q. **Tổng hợp và đánh giá hoạt tính sinh học của hai dẫn xuất tương tự belinostat chứa fluorine ở vị trí CAP.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2023, 7(1):2538-2547.

tat. Nhiều nghiên cứu đã tiến hành tổng hợp các dẫn xuất tương tự belinostat bằng cách biến đổi phần khoá hoạt động^{10,11}, thay đổi phần đơn vị liên kết¹², thay đổi nhóm liên kết kim loại¹⁰, kết quả cho thấy có một số dẫn xuất cho hoạt tính vượt trội hơn belinostat. Bài báo trình bày việc tổng hợp một số dẫn xuất tương tự belinostat bằng cách làm thay đổi tại phần khoá hoạt động, tiếp theo các dẫn xuất được đánh giá hoạt tính *in vitro* trên các dòng tế bào ung thư, ngoài ra các dẫn xuất cũng đã được nghiên cứu tiếp cận mô hình gắn kết trên enzyme HDAC1.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thí nghiệm

Phổ NMR được đo trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance 500 NMR Spetrometer (độ dịch chuyển hóa học δ được tính theo ppm, hằng số tương tác J tính bằng Hz) tại Viện Hóa học, Viện Hàn Lâm Khoa học Việt Nam, máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker 400 NMR tại Hàn Quốc và Bruker 300 NMR tại Đà Loan. Phổ HR-ESI-MS được đo trên máy SCIEX X500R-QTOF tại trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh. Các hóa chất và dung môi sử dụng có nguồn gốc từ Merck, Ấn Độ, Trung Quốc và Việt Nam. Sắc ký bản mỏng sử dụng bản nhôm silica gel 60 F₂₅₄ trắng sẵn độ dày 0,2 mm (Merck). Sắc ký cột sử dụng silica gel 60 Merck (0.040–0.063 mm).

Tổng hợp (E)-3-nitrocinnamic acid (2)

Cho malonic acid (1,04 g, 10 mmol) vào bình cầu 100 mL, thêm vào 3 mL pyridine và lắc đều. Sau đó thêm tiếp *m*-nitrobenzaldehyde (1,51 g, 10 mmol), đun hoàn lưu ở nhiệt độ 110°C, trong vòng 2 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, trung hòa acid dư bằng NaOH bão hòa, acid hóa lại bằng HCl 1 N, có kết tủa trắng mịn xuất hiện. Làm lạnh và lọc lấy kết tủa, sau đó sấy khô. Thu được sản phẩm 2 dạng bột mịn có màu trắng (1,83 g hiệu suất 95,0 %).

Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) (J , Hz): 12,56 (s, 1H –COOH) 8,46 (s, 1H >CH–) 8,19 (*d* 8,0 1H >CH–) 8,12 (*d* 7,6 1H >CH–) 7,68 (*d* 16,4 1H =CH–) 7,66 (*t* 8,0 1H >CH–) 6,69 (*d* 16,0 1H =CH–).

Tổng hợp methyl (E)-3-nitrocinnamate (3)

Sản phẩm 2 (1,93 g, 10 mmol) và 40 mL CH₃OH được thêm vào bình cầu 100 mL, sau đó thêm ba giọt H₂SO₄ đậm đặc. Hỗn hợp được đun hoàn lưu ở nhiệt độ 80°C. Sau 4 giờ hạ nhiệt độ xuống nhiệt độ phòng và để yên phản ứng. Sau 24 giờ, thu được kết tủa trắng, cô quay đuổi bớt dung môi, trung hòa bằng NaHCO₃

10%. Lọc kết tủa, rửa kết tủa với 100 mL H₂O thu được chất rắn 3 màu trắng (1,86 g hiệu suất 90,0 %). Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) (J , Hz): 8,37 (*d* 1,8 1H >CH–) *t* 7,95 1H >CH–) 6,55 (*d* 15,9 1H =CH–) 3,83 (*s* 3H –OCH₃).

Tổng hợp methyl (E)-3-aminocinnamate (4)

Hoà tan 3 (2,07 g, 10 mmol) và SnCl₂.2H₂O (7,9 g, 35 mmol) vào 300 mL EtOH khan trong bình cầu 500 mL. Đun hồi lưu hỗn hợp ở nhiệt độ 90°C. Sau 3 giờ, theo dõi phản ứng bằng TLC đến khi không còn xuất hiện 3, ngưng phản ứng, để nguội, trung hoà bằng dung dịch Na₂CO₃ bão hòa, hỗn hợp được chiết với EtOAc, cô đuổi dung môi thu được sản phẩm là dạng dầu màu vàng, kết tinh sản phẩm trong hệ dung môi Hex:EtOAc = 1:2 (lạnh) thu được chất rắn màu vàng nhạt (1,66 g). Hiệu suất 93,5 %.

Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) (J , Hz): 7,60 (*d* 15,9 1H =CH–) 7,17 (*t* 7,65 1H >CH–) 6,92 (*d* 7,8 1H >CH–) 6,83–6,81 (*m* 1H >CH–) 6,68–6,72 (*m* 1H >CH–) 6,37 (*d* 15,9 1H =CH–) 3,79 (1H –CH₃) 3,73 (*s* 2H –NH₂).

Tổng hợp chất trung gian methyl (E)-3-(3-chlorosulfonylphenyl)acrylate (6)

Hoà tan 4 (2,55 g, 15 mmol) trong hỗn hợp 15 mL HCl đậm đặc và 3 mL acetic acid, làm lạnh hỗn hợp trên. Sau khoảng 5 phút thêm từ từ 5 mL dung dịch NaNO₂ 50% giữ nhiệt độ phản ứng không vượt quá 5°C, khuấy phản ứng trong 45 phút. Sản phẩm thu được là muối diazonium 5 có màu vàng nâu, sản phẩm được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo. Trong một bình cầu khác, 2 mL SOCl₂ được cho vào 0,5 mL acetic acid trong 10 mL nước ở nhiệt độ nhỏ hơn 5°C, khuấy trong 10 phút. Thêm tiếp (150 mg, 1,5 mmol) CuCl vào, khuấy đến khi dung dịch từ màu xanh nhạt chuyển sang màu xanh lục, bắt đầu thêm từ từ dung dịch muối diazonium ban đầu vào hỗn hợp. Sau 2 giờ, thấy có kết tủa vàng nâu, thu lấy kết tủa vàng sau đó hoà tan trong EtOAc và chiết với nước cất, lớp hữu cơ được rửa lại nhiều lần bằng NaHCO₃ 5% và làm khan bằng Na₂SO₄. Cô đuổi dung môi, thu được sản phẩm ở dạng rắn màu vàng nâu (6), sản phẩm được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế. Lưu ý nên giữ nhiệt độ của bể cô quay không vượt quá 40 °C và hạn chế tiếp xúc với không khí do sản phẩm dễ phân huỷ, hóa đen ngoài không khí sau một thời gian.

Tổng hợp các sulfonamide-cinnamate ester (7a-b)

Hợp chất rắn trung gian vàng nâu (6) phía trên được hoà tan vào 5 mL 1,4-dioxane và thêm từ từ vào

hỗn hợp 4-fluoroaniline hoặc 2,4-difluoroaniline (4 mmol) trong 2 mL 1,4-dioxane và 5 mL dung dịch NaHCO₃ bão hoà, phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ. Sau khi cô đuổi hết dung môi thêm tiếp vào 25 mL nước khuấy trong 1 giờ. Chiết sản phẩm với EtOAc và rửa dịch chiết nhiều lần với dung dịch HCl 1N. Cô đuổi dung môi, tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silica gel, hệ dung môi hexane : EtOAc (5:1 đến 2:1). Thu được sản phẩm dạng dầu. Hoà tan sản phẩm trong EtOAc và tiến hành kết tinh lại sản phẩm nhiều lần.

Hợp chất **7a**: Chất rắn màu trắng, 497 mg. Hiệu suất 9,8 %. Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) (*J*, Hz): 10,22 (1H >NH) 7,99 (1H >CH-) 7,95 (*d* 8,0 1H >CH-) 7,70 (*d* 7,2 1H >CH-) 7,67 (*d* 15,6 1H =CH-) 7,57 (*t* 7,8 1H >CH-) 7,08-7,03 (*m* 4H >CH-) 6,65 (*d* 16,0 1H =CH-) 3,72 (3H -CH₃).

Hợp chất **7b**: Chất rắn màu trắng, 545 mg. Hiệu suất 10,3 %. Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) (*J*, Hz): 10,15 (1H >NH) 8,00 (*d* 7,6 1H >CH-) 7,97 (1H >CH-) 7,69 (*d* 8,0 1H >CH-) 7,69 (*d* 16,0 1H =CH-) 7,25-7,19 (*m* 2H >CH-) 7,02 (*t* 8,6 1H, >CH-) 6,66 (*d* 16,4 1H =CH-) 3,72 (3H -CH₃).

Tổng hợp các sulfonamide-hydroxamic acid (8a-b):

Hoà tan (784 mg, 14 mmol) KOH và (973 mg, 14 mmol) NH₂OH.HCl trong 4 mL EtOH khan, hỗn hợp được giữ lạnh dưới 5°C sau đó lọc phần không tan. Hỗn hợp KOH (135 mg, 2,4 mmol) và sulfonamide (0,2 mmol) trong EtOH khan, được thêm vào dịch lọc trên, tiếp tục khuấy và làm lạnh dưới 5°C. Sau 1 giờ, thêm vào 25 mL nước, trung hoà hỗn hợp bằng dung dịch HCl 2N. Tiến hành chiết nhiều lần với EtOAc, làm khan bằng MgSO₄, cô đuổi dung môi và tinh chế sản phẩm bằng sắc ký điều chế silica gel được tráng trên thuỷ tinh (preTLC) với hệ dung môi giải hấp Hex:EtOAc = 1:2.

Hợp chất **8a**: Chất rắn màu trắng, 49 mg. Hiệu suất 73,8 %. Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm) (*J*, Hz): 10,81 (1H -OH) 10,25 (1H >NH) 9,12 (1H >NH) 7,88 (1H >CH-) 7,78 (*d* 7,5 1H >CH-) 7,65 (*d* 7,5 1H >CH-) 7,57 (*t* 7,8 1H, >CH-) 7,46 (*d* 16,0 1H =CH-) 7,08 (*d* 6,5 4H 4 >CH-) 6,50 (*d* 16,0 1H =CH-). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 167,57 160,86 158,47 142,32 141,12 140,45 136,36 134,14 132,50 130,49 127,56 125,19 123,63 123,55 121,84 116,52 116,29 113,20 HR-MS (ESI) *m/z* tính toán cho C₁₅H₁₃FN₂O₄S: 336,0580; tìm thấy: 336,0582 [M]⁺.

Hợp chất **8b**: Chất rắn màu trắng, 50 mg. Hiệu suất 72,0 %. Dữ liệu phổ: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆,

δ ppm) (*J*, Hz): 10,80 (1H -OH) 10,17 (1H >NH) 9,10 (1H, >NH), 7,85 (1H, >CH-), 7,82 (*d*, 7,5, 1H, >CH-), 7,64 (*d*, 8,0, 1H, >CH-), 7,59 (*t*, 7,8 1H >CH-) 7,48 (*d* 16,0 1H =CH-) 7,25-7,20 (*m* 2H 2 >CH-) 7,06-7,02 (*m* 1H >CH-) 6,50 (*d* 15,5 1H =CH-). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 162,54 144,63 141,12 137,03 136,29 132,62 130,43 127,54 124,96 121,75 112,32 105,38 105,14 105,11 104,88 HR-MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ tính toán cho C₁₅H₁₂F₂N₂O₄S: 354,0486; tìm thấy: 354,0488 [M]⁺.

Tổng hợp sulfonamide-cinnamate ester (7) từ phản ứng Heck

Thêm từng giọt 3-bromobenzenesulfonyl chloride **9** (50 mg, 0,2 mmol) vào dung dịch có chứa sẵn 4-fluoroaniline hoặc 2,4-difluoroaniline (0,44 mmol) và DMAP (0,5% mmol) trong toluene khan (15 mL) ở 50-60°C trong 5 phút, phản ứng được theo dõi bởi TLC. Sau khi tác chất ban đầu biến mất (20-24 h), hỗn hợp được làm lạnh ở 0°C và sau đó dung dịch 20 mL HCl 2 N được thêm vào. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc, sau đó cô đuổi dung môi và kết tinh sản phẩm trong EtOH lạnh, thu được sản phẩm là tinh thể màu trắng. Sản phẩm được sử dụng trực tiếp cho quá trình tiếp theo.

Hỗn hợp gồm **10** (0,2 mmol), tri(*o*-tolyl)phosphine (2% mmol), palladium (II) acetate (1% mmol) và triethylamine (0,3 mmol) trong toluene khan được loại bỏ khí oxygen (4 lần bằng khí argon hay nitrogen). Hỗn hợp được đun nóng ở 45-55°C trong 20 phút. Xúc tác palladium (0) được hình thành trong quá trình này. Sau đó, phản ứng được làm nóng đến 80-90°C, ethyl acrylate (0,22 mmol) được thêm vào từng giọt trong 5 phút. Phản ứng được theo dõi bằng TLC đến khi xuất hiện sản phẩm. Sau đó, nhiệt độ được hạ xuống 45-55°C và khuấy qua đêm. Sau khi tác chất ban đầu biến mất, hỗn hợp được thêm nước và làm lạnh về nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được chiết bằng EtOAc, lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch NaCl bão hoà, làm khan bằng Na₂SO₄, cô đuổi dung môi và tinh chế bằng sắc ký cột, thu được sản phẩm **7**. Hiệu suất sản phẩm **7** từ hai quá trình là 72,0% (**7a**) và 67,8% (**7b**), hệ dung môi hexane : EtOAc (5:1-2:1).

Mô hình docking phân tử

Các ligand được vẽ bằng GaussView và tối ưu hóa năng lượng trong Gaussian bằng hàm DFT (B3LYP/6-31g (d, p))¹³. Cấu trúc 3D của enzyme HDAC1 (ID: 4BKX)¹⁴ được tải về từ ngân hàng cơ sở dữ liệu protein RCSB (<https://www.rcsb.org/>). Tất cả các phân tử nhỏ, nước và các phối tử đồng kết tinh có trong các enzyme được xóa bằng Discovery Studio Visualizer,

riêng các phân tử nước ở trong trung tâm hoạt động của các enzyme được xem xét, phân tích và giữ lại. Quá trình docking được thực hiện bằng phần mềm GOLD 5.3^{15,16}. Vùng không gian docking được chọn ở trong khoảng 10 Å tính từ tâm của chất ức chế đồng kết tinh tại trung tâm hoạt động. Sử dụng thuật toán di truyền (GA) để gắn các phối tử linh hoạt vào các vị trí liên kết với protein được cài đặt với 100 lần chạy độc lập. Giá trị giới hạn của khoảng cách được cài đặt là 2,5 Å cho liên kết hydro và 4,0 Å cho tương tác van der Waals. Hàm tính điểm và xếp hạng sử dụng là ChemPLP. Các tham số còn lại được giữ nguyên giống với các tham số mặc định. Cấu trúc xếp hạng cao nhất của mỗi phối tử được chọn và phân tích bằng Discovery Studio.

Đánh giá hoạt tính kháng oxi hoá

Khảo sát hoạt tính kháng oxi hoá được thực hiện dựa trên khả năng khử gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). DPPH được pha trong ethanol với nồng độ 1 mg/mL và được bảo quản ở nhiệt độ dưới 5°C. Các hợp chất được khảo sát khả năng khử gốc tự do tại dãy nồng độ từ 1,56-100 µg/mL và được ủ với DPPH trong tủ tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi đo độ hấp thụ quang tại 517 nm. Quercetin được sử dụng làm đối chứng dương và ethanol được sử dụng làm đối chứng âm. Giá trị EC₅₀ được xác định thông qua đường cong phi tuyến tính của giá trị % hoạt động thu dợn gốc DPPH* bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT. Các dòng tế bào ung thư vú MCF-7 (HTB-22TM) và ung thư gan Hep-G2 (HB-8065TM) có nguồn gốc từ ATCC. Các tế bào được nuôi trong các điều kiện tiêu chuẩn (5% CO₂, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37°C, vô trùng tuyệt đối) và được bổ sung chất dinh dưỡng MEME, 7-10% FBS và một số thành phần thiết yếu khác. Mẫu thử được hòa tan bằng dung môi DMSO thành các dãy nồng độ lần lượt là 1; 4; 16; 64 và 256 µg/mL. Chất đối chứng được sử dụng là Ellipticine. Khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím) được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm. Các thí nghiệm được làm độc lập và lặp lại ba lần. Giá trị EC₅₀ được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Giá trị EC₅₀ ≤ 4,0 µg/mL được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào.

KẾT QUẢ

Tổng hợp

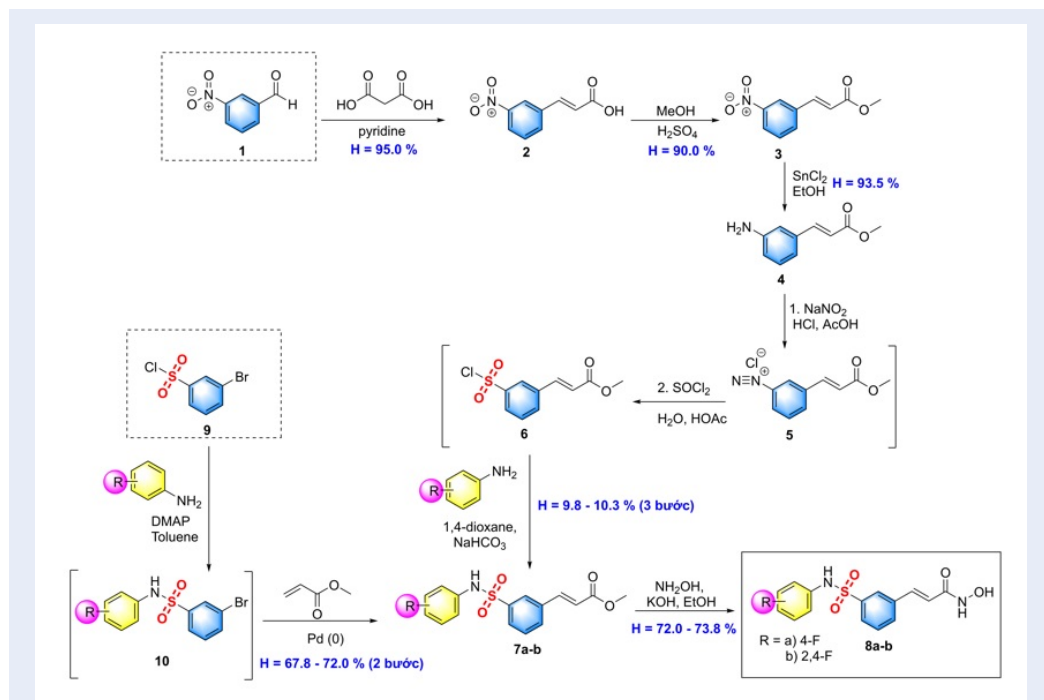
Hai dẫn xuất có cấu trúc tương tự belinostat đã được tổng hợp thông qua quy trình gồm 6 bước với tác chất ban đầu là *m*-nitrobenzaldehyde (Hình 2), quy trình thông qua phản ứng ngưng tụ Knoevenagel để tạo phần cầu nối >C=C< với sự chọn lọc đồng phân *trans* cao. Hiệu suất tổng hợp toàn phần của hợp chất **8a** là 5,8% và **8b** là 5,92%. Ngoài ra, cả hai hợp chất cũng được tổng hợp dễ dàng thông qua quy trình bao gồm 3 bước xuất phát từ tác chất ban đầu là 3-bromobenzenesulfonyl chloride. Quy trình tổng hợp sử dụng phản ứng Heck để tạo mạch >C=C< dạng *trans*, hiệu suất toàn phần tổng hợp cao hơn 42,7 % (**8a**) và 39,0 % (**8b**).

Các hợp chất được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Kết quả các dữ liệu đặc trưng từ phổ proton của hai hợp chất **8a** và **8b** cho thấy có sự xuất hiện hai peak tín hiệu *singlet* tại vùng từ trường thấp, lần lượt ở 10,80–10,81 ppm và 9,10–9,12 ppm với cường độ tích phân bằng 1, đặc trưng cho các tín hiệu của proton nhóm hydroxamic acid (–NHOH). Hai tín hiệu *doublet* với cường độ tích phân bằng 1, có hằng số ghép cặp $J = 16,0$ Hz lần lượt ở 7,46–7,48 ppm và 6,50 ppm, được quy kết cho hai proton alkene sp^2 tại vùng cầu nối. Do chịu ảnh hưởng từ hai nhóm rút điện tử kế cận dẫn đến mật độ điện tử tại các proton này thấp và giảm chấn nên các proton này dịch chuyển về vùng từ trường thấp hơn so với các proton của các alkene thông thường, dữ liệu này cho thấy tương ứng với cấu hình *E* trên cấu trúc sườn của belinostat (Hình 3). Ngoài ra, kết hợp với các dữ liệu từ phổ ¹³C-NMR và HR-MS cho thấy cấu trúc của các hợp chất đã tổng hợp phù hợp với cấu trúc như đã định hướng ban đầu (xem dữ liệu phổ chi tiết tại phần Vật liệu và Phương pháp).

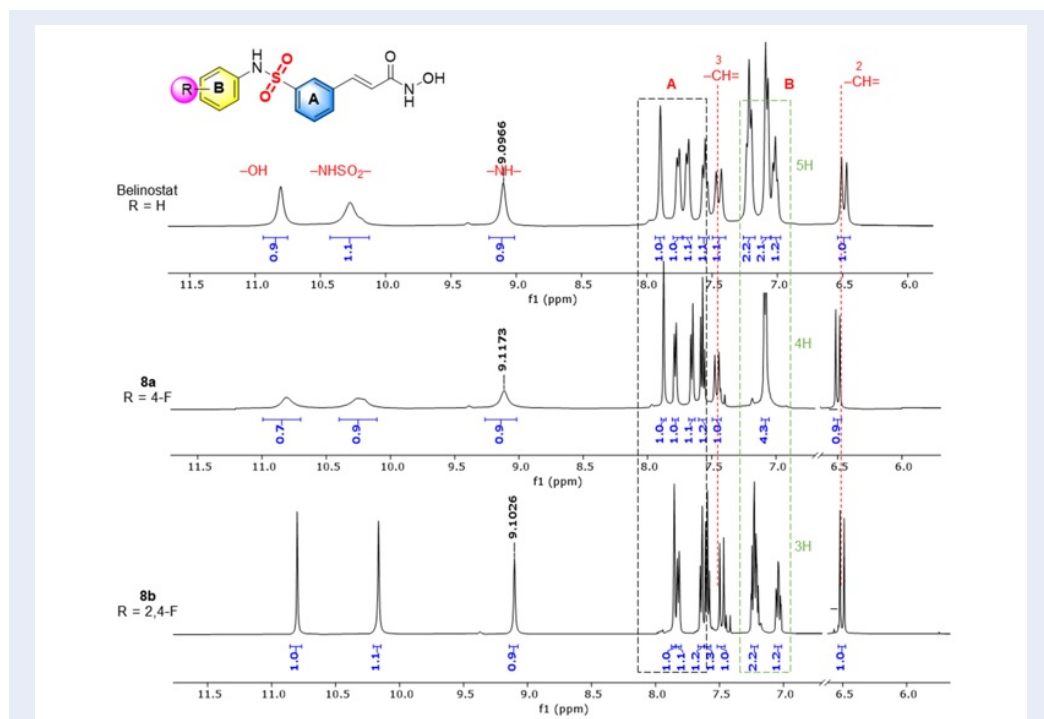
Mô hình docking phân tử trên enzyme HDAC1

Kết quả docking cho thấy hai dẫn xuất tương tác với nhiều amino acid quan trọng tại trung tâm hoạt động của enzyme HDAC1, nhóm hydroxamic acid hình thành chelate với ion Zn²⁺, vùng cầu nối, nhóm khoá hoạt động đều tham gia tương tác với nhiều amino acid quan trọng khác tại trung tâm hoạt động HDAC1 bằng các loại tương tác như van der Waals, alkyl, π -alkyl, π - π (Hình 4).

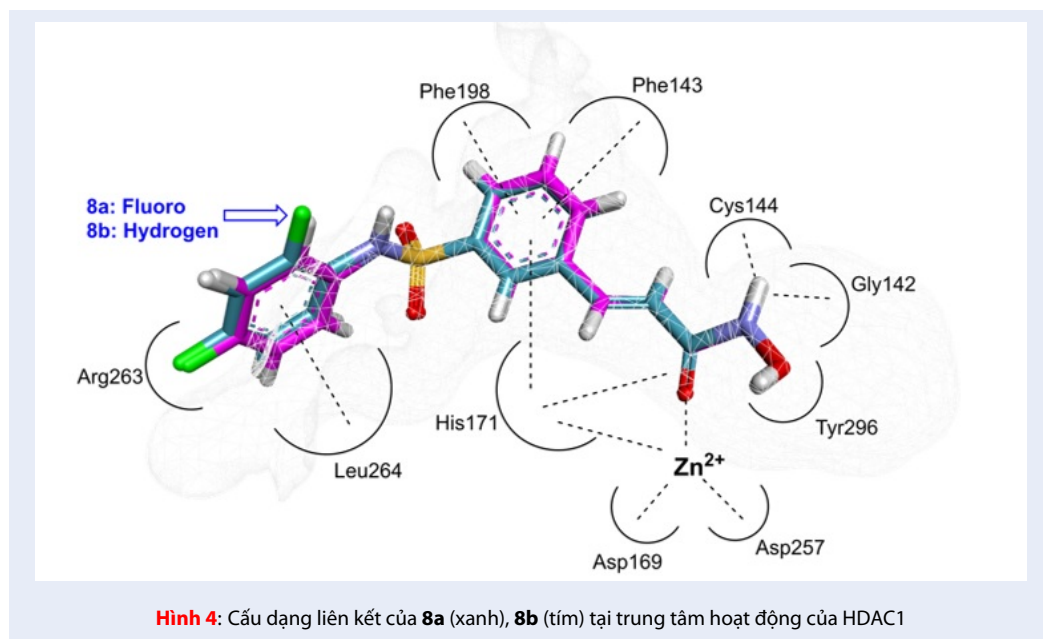
Vòng phenyl A tại cầu nối cho thấy tương tác với hai amino acid Phe143 và Phe198 ở gần miệng túi, các nhóm phenyl của phenylalanine định hướng song song với vòng phenyl A tạo nên các tương tác xếp chồng π - π . Nhóm hydroxamic acid còn tham gia



Hình 2: Quy trình tổng hợp các dẫn xuất tương tự belinostat



Hình 3: So sánh phổ ¹H-NMR (500 MHz) của hai dẫn xuất 8a và 8b và hợp chất belinostat



tương tác với Tyr296, Gly142, His171 và Cys144. Hai phenylalanine (Phe143, Phe198) và tyrosine (Tyr296) là ba yếu tố cần thiết giúp cho sự chelate giữa các hợp chất hydroxamic acid với ion kẽm được ổn định. Ngoài ra, vòng phenyl B tại phần khoá hoạt động tương tác π -alkyl với Leu264. Nguyên tử fluorine tại vị trí *para* cho thấy hình thành tương tác với Arg263, nhưng nguyên tử fluorine tại vị trí *ortho* (trên dẫn xuất **8b**) lại không cho thấy hình thành tương tác với các amino acid xung quanh.

Khả năng kháng oxi hoá

Cả hai hợp chất **8a** và **8b** đều cho thấy khả năng kháng oxi hoá khá tốt với nồng độ gây ra khả năng bắt gốc tự do DPPH• dưới 15 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 1). Các hợp chất được khảo sát khả năng bắt gốc tự do ở nồng độ 1,56–100 $\mu\text{g/mL}$, tại nồng độ được khảo sát là 12,5 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất **8a** cho thấy khả năng bắt gốc DPPH• đạt 47,90% và 73,24% đối với hợp chất **8b**. Tại nồng độ khảo sát 50 $\mu\text{g/mL}$ cả hai hợp chất đều cho thấy khả năng bắt gốc tự do đạt trên 76,0%.

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (Hep-G2)

Hai hợp chất 8a-b được đánh giá độc tính trên tế bào ung thư vú và ung thư gan tại các dãy nồng độ 1–256 $\mu\text{g/mL}$ bằng phương pháp MTT. Hợp chất 8a cho thấy hoạt tính tốt trên cả hai dòng tế bào ung thư Hep-G2 và MCF-7 với giá trị $\text{EC}_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$, hợp chất 8b thể hiện hoạt tính yếu trên dòng tế bào ung thư gan (Bảng 2).

Trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7, hợp chất **8a** cho kết quả tốt nhất với phần trăm ức chế lần lượt là 98,0%, 71,0%, 59,0%, 55,0%, 49,0% tại các nồng độ tương ứng là 256; 64; 16; 4 và 1 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 5). Hợp chất **8b** cho thấy hoạt tính yếu hơn gần 3,5 lần so với **8a**. Trên dòng tế bào ung thư gan Hep-G2, hợp chất **8a** ($\text{EC}_{50} = 4,0 \mu\text{g/mL}$) cho thấy hoạt tính mạnh hơn 4 lần so với **8b** ($\text{EC}_{50} = 16,0 \mu\text{g/mL}$). Tại nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ hợp chất **8a** gây ra sự ức chế 42% trong khi đó hợp chất **8b** là 17%.

THẢO LUẬN

Sự hiện diện của nguyên tử fluorine trong các phân tử hữu cơ có ảnh hưởng mạnh đến các đặc tính hóa lý và sinh học¹⁷. Vì vậy, bài báo trình bày việc đã tổng hợp hai dẫn xuất có cấu trúc tương tự belinostat có chứa các nguyên tử fluorine trong cấu trúc, với mục tiêu nhằm tìm ra các hợp chất tiềm năng cho hoạt tính sinh học cao. Đặc biệt, theo kết quả lược khảo tài liệu, hợp chất 8a là hợp chất mới, lần đầu tiên được tổng hợp (theo kết quả được tra cứu trên hệ thống SciFinder-CAS, Hoa Kỳ, ngày truy cập 09/09/2022). Các dẫn xuất được tổng hợp bằng cách thay đổi phần khoá hoạt động (nhóm phenyl) của cấu trúc sườn belinostat bằng một nhóm phenyl khác chứa fluorine tại các vị trí khác nhau. Quy trình tổng hợp dễ thực hiện bao gồm 3 đến 6 bước. Trong đó, để các hợp chất tổng hợp được có phần cấu nối là đồng phân dạng *E* thì phản ứng ngưng tụ Knoevenagel và Heck đã được sử dụng. Các dẫn xuất tương tự belinostat là đồng phân *Z* thường cho hoạt tính rất kém hoặc không mang

Bảng 1: Khả năng kháng oxy hoá của các hợp chất

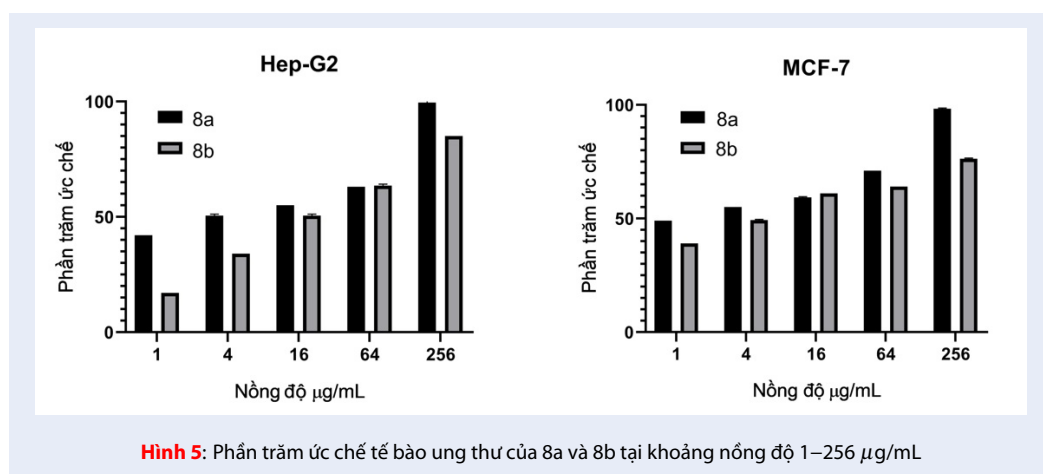
Hợp chất	EC ₅₀ (µg/mL)
8a	13,69±1,77
8b	8,30±0,95
Quercetin	5,55±0,65

Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn)

Bảng 2: Kết quả gây độc tế bào ung thư vú và ung thư gan của các hợp chất

Hợp chất	EC ₅₀ (µg/mL)	
	Hep-G2	MCF-7
8a	4,0±0,36	1,5±0,18
8b	16,0±0,82	5,0±0,36
Ellipticine	0,32±0,05	0,41±0,05

Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SD (độ lệch chuẩn)



Hình 5: Phần trăm ức chế tế bào ung thư của 8a và 8b tại khoảng nồng độ 1–256 µg/mL

hoạt tính¹⁸. Nhận thấy enzyme HDAC1 là nguyên nhân liên quan dẫn đến nhiều bệnh ung thư như ung thư gan¹⁹, ung thư vú²⁰, ung thư tuyến tiền liệt¹⁹, ung thư ruột kết¹⁹,... nên đã mô phỏng định hướng ức chế của hai dẫn xuất tại vùng trung tâm hoạt động của HDAC1. Hai dẫn xuất đã tổng hợp được cho thấy tương tác và ổn định tại trung tâm hoạt động của HDAC1. Kết quả docking cho thấy hai dẫn xuất tham gia tương tác với tám amino acid. Cấu hình liên kết dạng xếp chồng khi hai phenylalanine (Phe143/198) liên kết tại vùng cầu nối của hai dẫn xuất, góp phần chặn lối vào túi liên kết và ngăn các phân tử nước đi vào. Ngoài ra, trong cấu hình liên kết với HDAC1, các hợp chất còn thể hiện sự tương tác với His171, amino acid này đóng một vai trò quan trọng, vì phối trí của Zn²⁺ được tạo bởi Asp169, His171 và Asp257. Tất cả các phối tử tương tác với Gly142, Cys144, Arg263 và Leu264. Mặc dù chưa có thông tin về vai trò của bốn

amino acid này, nhưng dựa trên vị trí của chúng, có thể thấy chúng góp phần định hình thành túi có hình dạng đặc thù cho phối tử tác kích vào. Đánh giá về tiềm năng kháng oxy hoá của hai hợp chất cũng cho kết quả khá tốt, cụ thể cả hai hợp chất đều cho thấy khả năng bắt gốc tự do DPPH• trong các thí nghiệm *in vitro* với EC₅₀ < 15 µg/mL. Kết quả đánh giá *in vitro* trên hai dòng tế bào ung thư vú và ung thư gan bằng phương pháp MTT cho thấy dẫn xuất 8a mang một nguyên tử fluorine tại vị trí *para* giúp mang lại hoạt tính mạnh trên dòng tế bào ung thư vú MCF-7 với giá trị EC₅₀ bằng 1,5 µg/mL. Ở dòng tế bào ung thư gan Hep-G2, dẫn xuất 8a cho giá trị EC₅₀ bằng 4,0 µg/mL. Dẫn xuất 8b, mang hai nguyên tử fluorine tại vị trí *ortho* và *para* cho thấy hoạt tính yếu trên hai dòng tế bào với giá trị EC₅₀ lần lượt là 5,0 và 16,0 µg/mL. Kết quả cho thấy tiềm năng phong phú về hoạt tính sinh học của các dẫn xuất tương tự belinostat, là

tiện để để phát triển các hợp chất có hoạt tính cho điều trị ung thư sau này, đặc biệt là thay đổi các nhóm thế tại vị trí CAP.

KẾT LUẬN

Bài báo trình bày việc tổng hợp các hợp chất có cấu trúc tương tự belinostat với sự hiện diện của nguyên tử fluorine tại phần khoá hoạt động, với đối tượng nghiên cứu ban đầu là belinostat được biết đến là một hợp chất dùng điều trị ung thư với cơ chế nhắm mục tiêu là enzyme HDAC. Docking phân tử để dự đoán cơ chế tương tác của hai dẫn xuất tại trung tâm hoạt động của HDAC1 đã được sử dụng và kết quả docking cho thấy hai dẫn xuất đều tạo phối trí với ion Zn^{2+} và tương tác với một số amino acid quan trọng. Đánh giá *in vitro* trên hai dòng tế bào ung thư MCF-7 và Hep-G2 cho thấy hai dẫn xuất có hoạt tính tương đối tốt. Dẫn xuất **8a** cho hoạt tính tốt nhất trên cả hai dòng tế bào ung thư với các giá trị EC_{50} đều dưới $4 \mu g/mL$. Tuy nhiên, cần có thêm thực nghiệm so sánh với biệt dược gốc là belinostat và tác dụng ức chế trên HDAC. Kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về các chất ức chế HDAC, hỗ trợ cho sự phát triển của các phân tử điều trị bệnh ung thư mạnh hơn sau này.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ cơ sở vật chất để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

1H -NMR: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của 1H .
 ^{13}C -NMR: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của ^{13}C .
 brs: Mũi đơn bầu rộng (broad singlet)
 CAP: capping group
 CU: connective unit
 d: Mũi đôi (doublet)
 DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
 EtOAc: Ethyl acetate
 FDA: Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ
 GA: Genetic Algorithm
 HAT: histone acetyltransferase
 HDAC: histone deacetylase
 Hep-G2: dòng tế bào ung thư gan ở người
 MCF-7: Dòng tế bào ung thư vú ở người
 MeOH: Methanol
 m: Mũi đa (multilet)
 PKC: Protein kinase C
 RCSB: Ngân hàng dữ liệu Protein
 s: Mũi đơn (singlet)
 ZBG: zinc-binding group

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý, không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Nguyễn Cường Quốc, Lê Đăng Quang, Trần Quang Đệ định hướng, lên kế hoạch, thực hiện các thí nghiệm, đánh giá, xử lý các dữ liệu, chỉnh sửa và viết bản thảo.

Đặng Huy Phúc, La Thị Kim Tú, Bùi Thị Bửu Huệ, Nguyễn Trọng Tuấn, Trần Thanh Mến thực hiện các thí nghiệm, hỗ trợ xử lý các dữ liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gantt SML, Decroos C, Lee MS, Gullett LE, Bowman CM, Christianson DW, General base-general acid catalysis in human histone deacetylase 8. *Biochemistry*. 2016;55(5):820-32;PMID: 26806311. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01327>.
- Huang Y xin, Zhao J, Song Q hang, Zheng L hua, Fan C, Liu T ting. Virtual screening and experimental validation of novel histone deacetylase inhibitors. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2016;17(1):32;PMID: 27443303. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0075-8>.
- Li Y, Seto E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(10):a026831;PMID: 27599530. Available from: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>.
- Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(4):287-99;PMID: 12120280. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd772>.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(9):769-84;PMID: 16955068. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd2133>.
- Poole RM. Belinostat: First Global Approval. *Drugs*. 2014;74(13):1543-54;PMID: 25134672. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0275-8>.
- Lu P, Gu Y, Li L, Wang F, Yang X, Yang Y. Retracted article: Belinostat suppresses cell proliferation by inactivating Wnt/ β -catenin pathway and promotes apoptosis through regulating PKC pathway in breast cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019;47(1):3955-60;PMID: 31571495. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1671855>.
- Balasubramaniam S, Redon CE, Peer CJ, Bryla C, Lee MJ, Treppel JB, Phase I trial of belinostat with cisplatin and etoposide in advanced solid tumors, with a focus on neuroendocrine and small cell cancers of the lung. *Anticancer Drugs*. 2018;29(5):457-65;PMID: 29420340. Available from: <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000596>.
- Kong LR, Tan TZ, Ong WR, Bi C, Huynh H, Lee SC. Belinostat exerts antitumor cytotoxicity through the ubiquitin-proteasome pathway in lung squamous cell carcinoma. *Molecular Oncology*. 2017;11(8):965-80;PMID: 28397399. Available from: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12064>.
- Bouchain G, Leit S, Frechette S, Khalil EA, Lavoie R, Moradei O. Development of Potential Antitumor Agents. Synthesis and Biological Evaluation of a New Set of Sulfonamide Derivatives as Histone Deacetylase Inhibitors. *J Med Chem*. 2003;46(5):820-30;PMID: 12593661. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm020377a>.
- Wang C, Eessalu TE, Barth VN, Mitch CH, Wagner FF, Hong Y. Design, synthesis, and evaluation of hydroxamic acid-based molecular probes for in vivo imaging of histone deacetylase (HDAC) in brain. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;4(1):29-38;

12. Zhang JH, Mottamal M, Jin HS, Guo S, Gu Y, Wang G. Design, synthesis and evaluation of belinostat analogs as histone deacetylase inhibitors. *Future Med Chem.* 2019;11(21):2765-78;PMID: 31702394. Available from: <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0587>.
13. Frisch M, Trucks G, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Gaussian 09, Revision d.01, Gaussian, Inc, Wallingford CT. 2009;201;.
14. Millard CJ, Watson PJ, Celardo I, Gordiyenko Y, Cowley SM, Robinson CV Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates. *Molecular Cell.* 2013;51(1):57-67;.
15. Jones G, Willett P, Glen RC. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology.* 1995;245(1):43-53;PMID: 7823319. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(95\)80037-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(95)80037-9).
16. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology.* 1997;267(3):727-48;PMID: 9126849. Available from: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.
17. Wang J, Sánchez-Roselló M, Aceña JL, del Pozo C, Sorochinsky AE, Fustero S, Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001-2011). *Chem Rev.* 2014;114(4):2432-506;PMID: 24299176. Available from: <https://doi.org/10.1021/cr4002879>.
18. Fischer J, Childers WE. *Successful Drug Discovery.* John Wiley & Sons; 2017. 293 p; Available from: <https://doi.org/10.1002/9783527800315>.
19. Ganai SA. *Histone Deacetylase Inhibitors in Combinatorial Anticancer Therapy.* 1st ed. 2020 edition. Singapore: Springer; 2020. 275 p; Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-15-8179-3_1.
20. Kawai H, Li H, Avraham S, Jiang S, Avraham HK. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor α . *International Journal of Cancer.* 2003;107(3):353-8;PMID: 14506733. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.11403>.

Synthesis and evaluation of biological activities of two belinostat analogs bearing fluorine at the CAP

Nguyen Cuong Quoc¹, Le Dang Quang^{2,3}, Dang Huy Phuc¹, La Thi Kim Tu⁴, Bui Thi Buu Hue¹,
Nguyen Trong Tuan¹, Tran Thanh Men⁴, Tran Quang De^{1,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Histone deacetylase enzymes are overexpressed in many types of hematologic malignancies (acute myelogenous leukemia, myelofibrosis, cutaneous T-cell lymphoma, and Hodgkin lymphoma) and their inhibition of HDACs could result in the inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. Thus, HDAC inhibitors are candidates of anticancer drug development. Belinostat is a histone deacetylase inhibitor which was approved by the US FDA in 2014 for the treatment of refractory T-cell lymphoma and solid tumor. This paper reported the synthesis of two belinostat analogues (including a firstly synthesized compound) by introducing fluorine atoms at the hydrophobic capping group (CAP) of belinostat. The resulted compounds were then tested by molecular docking analysis and in vitro evaluation of their antioxidant and anti-cancer activities. The new compound **8a** displayed the highest anti-cancer efficacy against human breast (MCF-7) and liver (Hep-G2) cancer cell lines with EC_{50} values of 1.5–4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Two compounds showed the antioxidant activity with an EC_{50} value of 8.30–13.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results suggested that the synthesized belinostat analogs might have anti-cancer potential for further investigation.

Key words: belinostat, breast cancer, docking, histone deacetylase (HDAC), liver cancer

¹Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Can Tho University

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

³Institute for Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

⁴Department of Biology, College of Natural Sciences, Can Tho University

Correspondence

Tran Quang De, Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Can Tho University

Email: tqde@ctu.edu.vn

History

- Received: 03-10-2022
- Accepted: 30-3-2023
- Published: 05-4-2023

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjns.v7i1.1238>



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Quoc N C, Quang L D, Phuc D H, Tu L T K, Hue B T B, Tuan N T, Men T T, De T Q. **Synthesis and evaluation of biological activities of two belinostat analogs bearing fluorine at the CAP.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2023, 7(1):2538-2547.