

# Tổng hợp và thử tác dụng kháng tế bào ung thư của một số dẫn chất chứa nhân thơm ở vị trí số 6 của indazol

Trương Cao Minh, Lê Thiên Bảo Long, Cao Quỳnh Anh  
Trần Phương Thảo\*, Đinh Thị Thanh Hải, Ngô Xuân Hoàng  
Trường Đại học Dược Hà Nội

## Summary

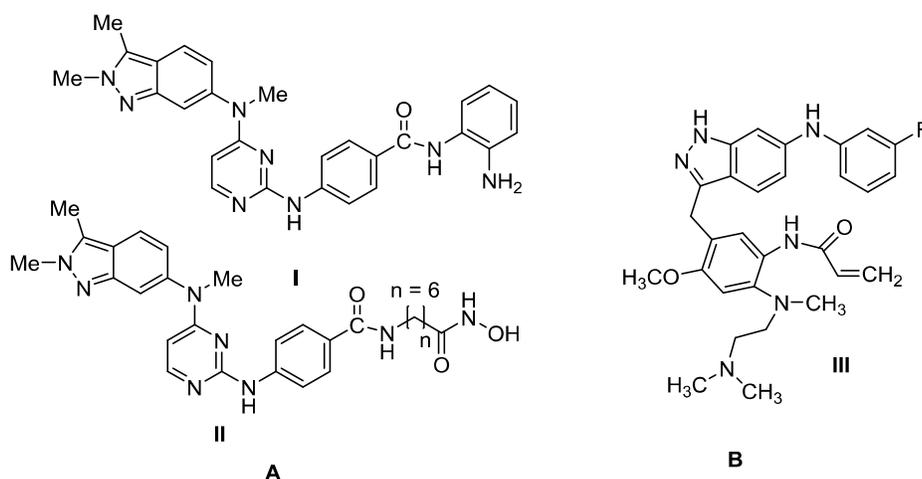
Four indazole derivatives were synthesized and evaluated their anti-cancer activity. Compound 5 and 6 showed average effect on HCT116 cell line, while compound 6 and 7 have good anticancer potent on SNU-638 cell line with  $IC_{50}$  value 1.2  $\mu M$  and 1.3  $\mu M$  respectively. Notably, compound 6 exposed the remarkable activity on A549 cell line with  $IC_{50}$  value of 0.7  $\mu M$ .

**Keywords:** Indazole, anti-cancer,  $IC_{50}$ .

## Đặt vấn đề

Indazol là cấu trúc dị vòng có mặt trong nhiều thuốc điều trị ung thư như axitinib, pazopanib và niraparib. Nhiều nghiên cứu cho thấy cấu trúc indazol có khả năng tác dụng

trên nhiều enzym đích liên quan đến cơ chế bệnh sinh ung thư như tyrosin kinase, serine/threonine kinase; phosphatidyinoitol-3-kinases (PI3Ks) và HIF-1<sup>[1, 2]</sup>.



**Hình 1.** Các dẫn chất indazol chứa nhân thơm ở vị trí số 6:  
(A) Các dẫn chất ức chế HDAC và VEGFR, (B) Chất ức chế EGFR

Chịu trách nhiệm: Trần Phương Thảo  
Email: thaotp119@gmail.com  
Ngày nhận: 19/02/2021  
Ngày phản biện: 23/3/2021  
Ngày duyệt bài: 22/7/2021

Một nghiên cứu gần đây cho thấy hai dẫn chất indazol chứa nhân thơm ở vị trí số 6 (chất I và II) có khả năng ức chế cả HDAC và VEGFR (hình 1A). Đặc biệt, khả năng ức chế HDAC của chất II mạnh gấp 40 lần SAHA- chất ức chế HDAC đã được cấp phép sử dụng trong lâm sàng (II,  $IC_{50}$  = 0,0033  $\mu M$ ; SAHA,

IC<sub>50</sub> = 0,13 μM). Trong khi đó, chất I cho thấy khả năng ức chế VEGFR tương đương pazopanib (pazopanib, VEGFR IC<sub>50</sub> = 34 nM; I, VEGFR IC<sub>50</sub> = 37 nM). Đặc biệt, độc tính trên tế bào ung thư đại trực tràng HT29 của chất I tốt hơn cả SAHA (I, HT29 IC<sub>50</sub> = 1,07 μM; SAHA, HT29 IC<sub>50</sub> = 1,51 μM). Thử nghiệm trên chuột cũng cho thấy chất này có sinh khả dụng đường uống lên tới 72% [3].

Năm 2017, Wang và đồng nghiệp đã tìm ra chất III là một dẫn chất indazol có nhóm thế amin ở vị trí số 6 gắn với nhân thơm, có khả năng ức chế EGFR ở ngưỡng dưới nM (IC<sub>50</sub> < 1 nM). Chất này cũng ức chế hai dòng tế bào ung thư phổi là H1975 và HCC827 với giá trị EC<sub>50</sub> lần lượt là 191 và 22 nM (hình 1B) [4]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế, tổng hợp các hợp chất mới với các nhóm thế khác nhau ở vị trí số 6 trên khung indazol và thử tác dụng ức chế sự phát triển một số dòng tế bào ung thư của các chất tổng hợp được nhằm tìm kiếm các ứng viên tiềm năng trong điều trị ung thư.

## Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

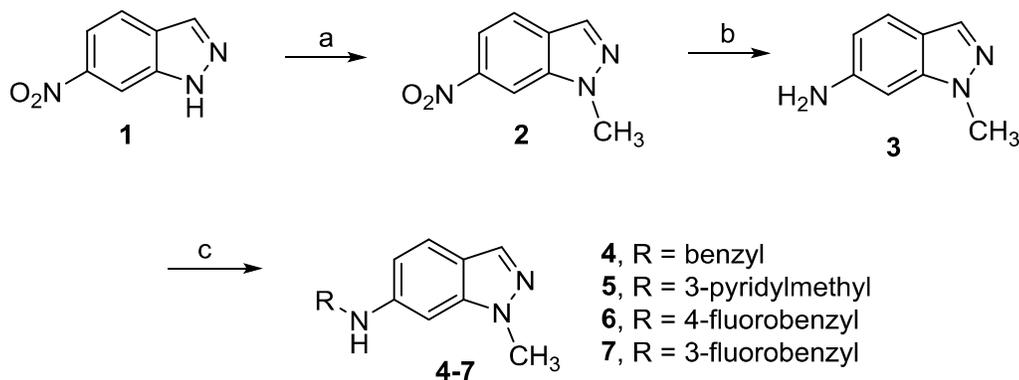
### Dung môi, hóa chất, dụng cụ

Dung môi, hóa chất được mua từ các nhà cung cấp Aldrich, TCI hay Alfa Aesa với độ tinh khiết trên 95% và được sử dụng trực tiếp không qua tinh chế. Độ tinh khiết được triển khai trên sắc ký lớp mỏng (TLC) 60F254 của Hãng Merck. Nhiệt độ nóng chảy được xác định bằng máy Bruchi-540. Phổ khối được đo bằng chế độ ion hóa phun điện tử ESI. Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân gồm có máy thử nhất là Bruker Avance 500 MHz với Tetramethylsilan (TMS) làm chất chuẩn nội Hãng Bruker BioSpin (Thụy Sĩ) tại Khoa Hóa học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội. Máy thử hai là JEOL JNM-LA 300 tại Đại học Quốc gia Seoul, Hàn Quốc, tại tần số 300 MHz, 125 MHz với chất chuẩn nội trimethylsilan, độ dịch chuyển hóa học (δ) được báo cáo theo số liệu ppm.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Tổng hợp các dẫn chất

Các chất thiết kế được tổng hợp theo sơ đồ tương ứng minh họa ở hình 2:



Hình 2. Sơ đồ tổng hợp dẫn chất chứa nhân thơm của 1H-indazol-6-amin.

Tác nhân và điều kiện phản ứng: (a) CH<sub>3</sub>I, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 60°C, 4 giờ. (b) H<sub>2</sub>, Pd/C, THF, nhiệt độ phòng, 2 giờ, (c) dẫn chất aldehyd, NaBH<sub>3</sub>CN, AcOH, MeOH, 40 °C, 4 giờ.

### Thử hoạt tính kháng tế bào ung thư

Hoạt tính kháng tế bào ung thư của 4 dẫn chất 1-methyl-1H-indazol (4-7) được tiến hành thử nghiệm trên các dòng tế bào: ung thư phổi A549, ung thư trực tràng HCT116, ung thư dạ dày SNU638, ung thư vú MDA-MB-231 và ung thư gan SK-HEP-1 tại Khoa Dược, Đại học Quốc gia Seoul theo phương pháp Sulforhodamin B [5].

### Thực nghiệm và kết quả

#### Tổng hợp các dẫn chất

##### Tổng hợp chất trung gian 1-methyl-6-nitro-1H-indazol (2)

Một hỗn hợp gồm 652 mg (4 mmol) 6-nitro-1H-indazol và 1106 mg (8 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> trong 20 ml *N,N*-dimethylformamid (DMF) được khuấy trộn đều trong 5 phút, sau đó đun nóng duy trì ở nhiệt độ 60 °C, tiếp tục khuấy trộn

trong 1 giờ. Thêm 0,5 ml (8 mmol) CH<sub>3</sub>I vào bình phản ứng, tiếp tục khuấy trộn ở 60 °C trong vòng 3 giờ. Hỗn hợp sau phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ phòng, thêm 25 ml nước lạnh và chiết tách 3 lần (mỗi lần 40 ml) với ethyl acetat (EA). Dịch EA được làm khan bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan, cô quay loại bỏ dung môi. Chất rắn còn lại được tinh chế nhanh bằng cột silica gel với pha động EA/n-hexan (1/2) thu được 389 mg (55%) chất rắn màu vàng **2**. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8,31 (s, J = 1,00 Hz, 1H); 8,03 (d, J = 0,50 Hz, 1H); 7,96 (dd, J = 9,00; 2,00 Hz, 1H); 7,77 (d, J = 8,50 Hz, 1H); 4,12 (s, 3H).

#### Tổng hợp chất trung gian 1-methyl-1H-indazol-6-amin (3)

Hòa tan 354 mg chất rắn **2** (2 mmol) vào 10 ml methanol. Thêm 50 mg Pd/C 10% vào dung dịch. Hỗn hợp trên được tiến hành loại bỏ không khí và khuấy trộn với khí hydro trong 4 giờ tại nhiệt độ phòng. Lọc loại bỏ chất rắn không tan trên phễu lọc chứa Celite. Dịch lọc được cô quay loại bỏ dung môi, tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với pha động EA/n-hexan (1/1) thu được 268 mg (91%) chất rắn màu nâu **3**. T<sub>nc</sub>: 87-89 °C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 7,79 (s, 1H); 7,47 (d, J = 8,50 Hz, 1H); 6,56 (dd, J = 8,50; 1,50 Hz, 1H); 6,51 (d, J = 0,50 Hz, 1H); 3,92 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 145,7; 141,5; 132,7; 121,8; 117,9; 112,4; 91,61; 35,1. ESI-MS: m/z 147,8 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Tổng hợp N-benzyl-1-methyl-1H-indazol-6-amin (4)

Hòa tan 147 mg (1 mmol) chất **3** và 106 mg benzaldehyd vào 10,0 ml MeOH và 0,28 ml AcOH trong bình cầu đáy tròn dung tích 100 ml. Khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó thêm tiếp 314 mg NaBH<sub>3</sub>CN. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 40 °C trong 4 giờ, theo dõi phản ứng bằng TLC với hệ dung môi EA/n-hexan (1/1, v/v). Sau khi kết thúc phản ứng, thêm 25 ml dicloromethan (DCM), chiết với dung dịch NaHCO<sub>3</sub> bão hòa (3 lần, mỗi lần 30 ml), làm khan bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tiếp tục tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi EA/n-hexan (6/4, v/v) thu được 223 mg chất **4** là chất rắn màu hồng, hiệu suất 94,0%. T<sub>nc</sub>: 106-108 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3414 (NH amin); 3290 (CH

aromatic); 1625 (C=N); 1571, 1436 (C=C aromatic). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 7,70 (s, 1H); 7,39 (d, J = 8,79 Hz, 1H); 7,36-7,20 (m, 5H); 6,47 (dd, J = 8,58; 1,83 Hz, 1H); 6,30 (s, 1H); 4,33 (s, 2H); 4,21 (br, 1H); 3,84 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 147,3; 141,8; 138,7; 132,7; 128,8; 127,7; 127,5; 121,7; 117,3; 112,2; 88,1; 48,6; 35,2. ESI-MS: m/z 238,17 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Tổng hợp 1-methyl-N-(pyridin-3-ylmethyl)-1H-indazol-6-amin (5)

Chất **5** được tổng hợp theo quy trình tương tự chất **4** từ 147 mg chất **3** và 107 mg pyridin-3-carbaldehyd hòa tan trong 10 ml MeOH và 0,28 ml AcOH. Sản phẩm **5** thu được là chất rắn màu hồng với khối lượng 225 mg, hiệu suất phản ứng đạt 94,4 %. T<sub>nc</sub>: 117-119 °C. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8,61 (s, 1H); 8,49 (d, J = 3,66 Hz, 1H); 7,71 (s, 1H); 7,67 (d, J = 7,89 Hz, 1H); 7,41 (d, J = 8,61 Hz, 1H); 7,22 (dd, J = 7,68; 4,77 Hz, 1H); 6,48 (dd, J = 8,61; 1,83 Hz, 1H); 6,25 (s, 1H); 4,37 (s, 2H); 4,26 (br, 1H); 3,83 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 149,0; 148,7; 146,9; 141,6; 135,3; 134,5; 132,7; 123,7; 121,8; 117,4; 112,0; 88,1; 45,9; 35,2. ESI-MS: m/z 239,17 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Tổng hợp N-(4-fluorobenzyl)-1-methyl-1H-indazol-6-amin (6)

Chất **6** được tổng hợp theo quy trình tương tự chất **4** từ 147 mg chất **3** và 124 mg 4-fluorobenzaldehyd hòa tan trong 10 ml MeOH và 0,28 ml AcOH. Sản phẩm **6** thu được là chất rắn màu trắng với khối lượng 243 mg, hiệu suất phản ứng đạt 95,2 %. T<sub>nc</sub>: 118-120 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3414 (NH amin); 3300 (CH aromatic); 1625 (C=N); 1571, 1436 (C-C aromatic); 1226 (C-F). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 7,71 (s, 1H); 7,39 (d, J = 8,61 Hz, 1H); 7,30 (dd, J = 8,43; 5,49 Hz, 2H); 6,98 (t, J = 8,61 Hz, 2H); 6,46 (dd, J = 8,61; 1,86 Hz, 1H); 6,25 (s, 1H); 4,30 (s, 2H); 4,19 (br, 1H); 3,84 (s, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 163,2-161,2 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 243,8 Hz); 146,8; 141,5; 133,8; 132,6; 129,4-129,4 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 7,5 Hz); 121,8; 115,6-115,5 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 21,3 Hz); 112,4; 92,0; 48,4; 35,2. ESI-MS: m/z 256,20 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Tổng hợp N-(3-fluorobenzyl)-1-methyl-1H-indazol-6-amin (7)

Chất **7** được tổng hợp theo quy trình tương

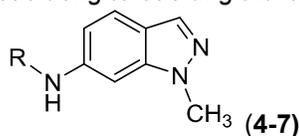
tự chất **4** từ 147 mg chất **3** và 124 mg 3-fluorobenzaldehyd hòa tan trong 10 ml MeOH và 0,28 ml AcOH. Sản phẩm **7** thu được là chất rắn màu trắng với khối lượng 244 mg, hiệu suất phản ứng đạt 95,6 %.  $T_{nc}^{\circ}$ : 115-118 °C. **IR** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3414 (NH amin); 2985 (CH aromatic); 1627 (C=N); 1575, 1481 (C-C aromatic); 1226 (C-F).  **$^1H-NMR$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  7,76 (d,  $J = 0,72$  Hz, 1H); 7,44 (d,  $J = 8,61$  Hz, 1H); 7,30 (dt,  $J = 5,85; 7,86$  Hz, 1H); 7,17 (d,  $J = 7,50$  Hz, 1H); 7,10 (d,  $J = 9,69$  Hz, 1H); 6,96 (td,  $J = 8,61; 2,58$  Hz, 1H); 6,52 (dd,  $J = 8,79; 2,04$  Hz, 1H); 6,29 (s, 1H); 4,40 (s, 2H), 4,32 (br, 1H); 3,80 (s, 3H).  **$^{13}C-NMR$**  (125 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):

$\delta$  164,1-162,2 (d,  $^1J_{C-F} = 245$  Hz); 146,8; 141,5-141,4 (d,  $^2J_{C-F} = 7,5$  Hz); 132,7; 130,2-130,2 (d,  $^3J_{C-F} = 8,8$  Hz); 122,9-122,9 (d,  $^4J_{C-F} = 2,5$  Hz); 121,8; 117,4; 114,4-114,2 (d,  $^2J_{C-F} = 22,5$  Hz, 2C); 112,1; 48,1; 35,2. **ESI-MS**:  $m/z$  256,20  $[M+H]^+$ .

#### Thử hoạt tính kháng tế bào ung thư

Bốn hợp chất mới tổng hợp được tiến hành thử tác dụng ức chế sự phát triển trên 5 dòng tế bào ung thư người (ung thư phổi A549, ung thư trực tràng HCT116, ung thư dạ dày SNU638, ung thư vú MDA-MB-231 và ung thư gan SK-HEP-1) và kết quả được trình bày ở bảng 1 với etoposid là chất chứng dương.

**Bảng 1.** Tác dụng ức chế các dòng tế bào ung thư của các chất tổng hợp được



Chất	R	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )*				
		A549	SK-HEP-1	SNU-638	MDA-MB-231	HCT116
<b>4</b>		> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>5</b>		19,8 ± 6,1	> 100	> 100	> 100	47,2 ± 12,9
<b>6</b>		0,7 ± 0,1	> 100	1,2 ± 1,2	> 100	34,9 ± 21,3
<b>7</b>		19,9 ± 10,6	> 100	1,3 ± 1,0	> 100	> 100
<b>Etoposid</b>		0,27 ± 0,1	0,30 ± 0,1	0,61 ± 0,2	7,35 ± 2,3	1,27 ± 0,8

\*  $IC_{50}$ : nồng độ tối thiểu ức chế 50% sự phát triển của tế bào. Các thí nghiệm được tiến hành độc lập 3 lần.

#### Bàn luận

Sử dụng phản ứng alkyl hóa với tác nhân methyl iodid, nhóm nghiên cứu thu được 2 đồng phân thể tại vị trí N1 và N2. Sử dụng sắc ký cột silica gel chúng tôi phân tách được đồng phân thể tại vị trí N1 (đồng phân kém phân cực hơn) **2**. Khử hóa hợp chất này trong môi trường khí hydro với xúc tác Pd/C thu được các amin **3** với hiệu suất cao. Cuối cùng hợp chất amin **3** được

gắn thêm các nhóm thế chứa nhân thơm thông qua phản ứng amin hóa khử với các aldehyd thơm khác nhau, sử dụng chất khử chọn lọc  $NaBH_3CN$  trong môi trường acid yếu.

Các hợp chất tổng hợp được kiểm tra độ tinh khiết thông qua nhiệt độ nóng chảy và sắc ký lớp mỏng. Các chất đều có điểm chảy dao động từ 1 đến 2 độ và cho 1 vết gọn, rõ khi khảo sát sắc ký lớp mỏng với các hệ dung môi khác

n nhau. Như vậy, có thể khẳng định các chất chúng tôi tổng hợp được là tinh khiết. Phổ <sup>1</sup>H-NMR đều cho các pic đặc trưng của các vòng thơm, của mạch nhánh. Kết hợp với kết quả phổ khối luôn cho pic giả phân tử m/z [M+H]<sup>+</sup> có thể khẳng định các chất tổng hợp được có cấu trúc đúng như thiết kế.

Cả ba chất **5**, **6**, **7** đều có tác dụng trên dòng tế bào ung thư phổi A549, trong đó chất **6** có tác dụng tốt nhất (IC<sub>50</sub> = 0,7 μM), tương đương chất chứng dương etoposid. Cả ba hợp chất trên đều chứa các nguyên tố cho điện tử (nguyên tử nitơ và fluor) trong gốc R, điều này đưa ra gợi ý về cơ chế tác dụng liên quan đến khả năng tạo liên kết hydro với đích tác dụng liên quan cơ chế bệnh sinh ung thư. Hai hợp chất **4**, **5** không có tác dụng trên dòng tế bào ung thư dạ dày, trong khi đó hai hợp chất **6**, **7** có tác dụng khá tốt với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 1,2 μM và 1,3 μM. Điều này cho thấy vai trò quan trọng của nguyên tử fluor đối với tác dụng trên dòng tế bào này. Hai chất **5**, **6** có tác dụng trung bình trên dòng tế bào ung thư trực tràng.

#### Kết luận

Các dẫn chất indazol chứa nhân thơm ở vị trí số 6 đã được tổng hợp, khẳng định độ tinh khiết thông qua sắc ký lớp mỏng, nhiệt độ nóng chảy và xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ khối lượng cùng phổ cộng hưởng từ hạt nhân. Kết quả thử hoạt tính kháng tế bào ung thư trên 5 dòng tế bào ung thư người cho thấy chất **5**, **6** có tác dụng trung bình trên dòng tế bào HCT116, chất **6**, **7** có tác dụng tốt trên dòng tế bào SNU-638 với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 1,2 μM và 1,3 μM, chất **6** còn có tác dụng tốt trên dòng tế bào A549 với giá trị IC<sub>50</sub> là 0,7 μM.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2020.01.

#### Tài liệu tham khảo

1. Zhang S. G., Liang C. G., Zhang W. H. (2018) "Recent in indazole-containing derivatives: synthesis and biological perspectives", *Molecules*, 23, pp. 2783-2823.
2. J. Dong, Q. Zhang, Z. Wang, G. Huang, S. Li (2018), "Recent advances in the development of indazole-based anticancer agents", *Chem. Med. Chem.*, 13, pp. 1490-1507.
3. Zang Jie, Liang Xuewu et al. (2018), "Discovery of novel pazopanib-based HDAC and VEGFR dual inhibitors targeting cancer epigenetics and angiogenesis simultaneously", *Journal of Medicinal Chemistry*, 61 (12), pp. 5304-5322.
4. Wang Aoli, Li Xixiang et al. (2017), "Discovery of (R)-1-(3-(4-amino-3-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy) phenyl)-1 H-pyrazolo [3, 4-d] pyrimidin-1-yl) piperidin-1-yl) prop-2-en-1-one (CHMFL-EGFR-202) as a Novel Irreversible EGFR Mutant Kinase Inhibitor with a Distinct Binding Mode", *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (7), pp. 2944-2962.
5. D. H. Bach, S. H. Kim, J. Y. Hong, H. J. Park, D. C. Oh, S. K. Lee (2015), "Salternamide suppresses hypoxia-induced accumulation of HIF-1 and induces apoptosis in human colorectal cancer cells", *Marine Drugs*, 13, pp. 6962-6976.