

THIẾT KẾ, TỔNG HỢP VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH SINH HỌC CÁC HỢP CHẤT PHENOL VÀ DỊ VÒNG MỚI ỨC CHẾ TƯƠNG TÁC PROTEIN-PROTEIN CỦA HỌ PROTEIN BCL-2, ÁP DỤNG VÀO VIỆC HỒI PHỤC TIẾN TRÌNH TỰ CHẾT CỦA TẾ BÀO UNG THƯ

Võ Đức Duy

Đại học Umea, Thụy Điển

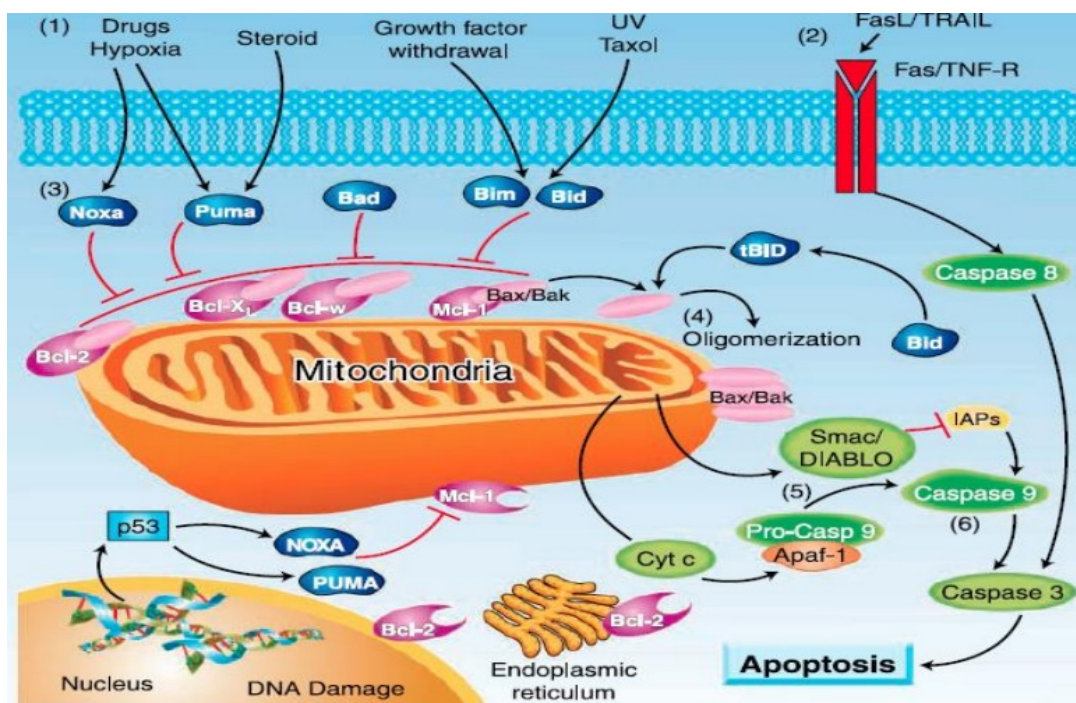
Tóm tắt. Tế bào tăng sinh bất thường, thoát khỏi sự tự chết, di căn và tiếp tục phát triển là một trong những nguyên nhân chính tạo thành bệnh ung thư. Các protein chống lại sự tự chết trong họ protein Bcl-2 (đặc biệt là Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) thường tăng sinh với tỉ lệ cao trong các tế bào ung thư và các tế bào gốc của tế bào ung thư (cancer stem cells) góp phần giúp tế bào ung thư thoát khỏi sự tự chết, kháng thuốc và tiếp tục phát triển. Do đó, đây là một đích sinh học đặc biệt hấp dẫn trong nghiên cứu liệu pháp hóa trị mới điều trị ung thư. Các hợp chất có khả năng ức chế các protein chống lại sự chết có tiềm năng khôi phục lại sự tự chết của tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày việc thiết kế, tổng hợp và thử nghiệm hoạt tính sinh học của các hợp chất phenol và dị vòng mới có khả năng ức chế protein Bcl-xL và gây chết ở tế bào ung thư.

Từ khóa: hợp chất phenol, hợp chất dị vòng, tương tác protein-protein, họ protein Bcl-2, tiến trình tự chết của tế bào, ung thư.

1. GIỚI THIỆU

Bệnh ung thư là một trong những bệnh gây tử vong cao. Cùng với xạ trị và phẫu thuật, hóa trị là liệu pháp không thể thiếu để điều trị. Nhất là đối với các trường hợp di căn. Liệu pháp hóa trị cổ điển sử dụng các chất gây độc tế bào không có tính chọn lọc và phân biệt giữa tế bào thường với tế bào ung thư tuy có hiệu quả cao nhưng gây nhiều tác dụng phụ, thậm chí nguy hiểm. Gần đây nghiên cứu thuốc trị ung thư hướng đến các đích sinh học, đặc biệt phân biệt tế bào ung thư với tế bào thường cho hiệu quả cao và ít tác dụng phụ. Dẫn đầu là sự thành công của hợp chất imatinib [1] (tên thương mại là Gleevec, Novartis) - chất ức chế enzyme tyrosine-kinase BCR-Abl – enzyme chỉ tồn tại trong tế bào ung thư mà không tồn tại trong tế bào bình thường. Imatinib ức chế enzyme dẫn đến tế bào ung thư không phát triển được và tự chết đi (apoptosis). Sau thành công của imatinib, các thuốc tương tự với sự tác động gần giống với imatinib đồng loạt ra đời hay đang được thử nghiệm lâm sàng [2]. Tuy nhiên sự phức tạp của tế bào ung thư và bệnh ung thư vẫn đòi hỏi các con đường nghiên cứu thuốc mới vì sự kháng thuốc và kém hiệu quả của các loại thuốc hiện hành để thay đổi hay hỗ trợ điều trị trong những trường hợp khác nhau. Apoptosis là một dạng của tiến trình tự chết của tế bào (programmed cell death), một quá trình nội sinh và tự kiểm soát của tế bào để duy trì sự cân bằng về số lượng tế bào trong cơ thể ở các giai đoạn phát triển khác

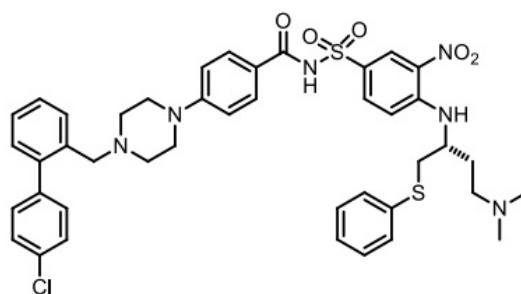
nhau. Có hai con đường chính dẫn đến apoptosis (Hình 1). Con đường ngoại (extrinsic pathway) thông qua chuỗi tín hiệu tác động trước tiên lên death receptor dẫn đến sự hoạt hóa các enzyme caspase-8 rồi caspase-3 nhằm thực hiện tiến trình tự hủy của tế bào và con đường nội (intrinsic pathway) thông qua sự kiểm soát của họ protein Bcl-2 ở ti thể (mitochondria) [3]. Khi tín hiệu tự hủy xảy ra, các protein chống lại sự chết như Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 (antiapoptotic protein) sẽ bị ức chế trực tiếp hoặc gián tiếp, đồng thời các protein thúc đẩy sự chết Bax, Bak (proapoptotic protein) sẽ được hoạt hóa. Chúng tạo thành các oligomer rồi hình thành các lỗ trống trên ti thể để giải phóng cytochrome c sau đó chuỗi tín hiệu tiếp tục với sự hoạt hóa các protein caspase-9 rồi caspase-3, cuối cùng dẫn đến sự tự hủy của tế bào.



Hình 1. Hai con đường chính dẫn đến apoptosis.

Gần 20 năm nay, họ protein Bcl-2 là một trong những đích sinh học hấp dẫn được nhắm đến trong việc phát triển thuốc mới trị ung thư. Dẫn đầu là sự thành công của hợp chất ABT-737 1 (Abbott) (Hình 2) [4, 5]. Các chất tương tự ABT-737 hay một số chất có cấu trúc khác ức chế protein chống lại sự chết hiện đang được thử nghiệm lâm sàng và đã mang lại một số kết quả hứa hẹn [5]. Ở rất nhiều loại tế bào ung thư (kể cả một số tế bào gốc của tế bào ung thư) các protein chống lại sự chết này tăng sinh với tỉ lệ cao, chúng tương tác và ghép cặp với các protein thúc đẩy sự chết làm cho các protein này mất tự do và bị bất hoạt không tham gia được chuỗi tín hiệu thúc đẩy tiến trình tự hủy của tế bào ung thư [4, 5]. Do đó, cùng với các chuỗi tín hiệu khác trong tế bào ung thư, các protein antiapoptotic này góp phần làm tăng sinh tế bào ung thư, vượt qua sự chết và kháng thuốc. Một hợp chất ức chế hoạt động của các protein antiapoptotic này trực tiếp hoặc gián tiếp được xem là có tiềm năng để giải phóng các protein proapoptotic

nhằm tham gia thúc đẩy và khôi phục lại quá trình apoptosis ở tế bào ung thư.



1 (ABT-737)

IC₅₀ for Bcl-2=0.12 μ M; Bcl-xL=0.064;
Bcl-W=0.024; Mcl-1>20
phase I/II

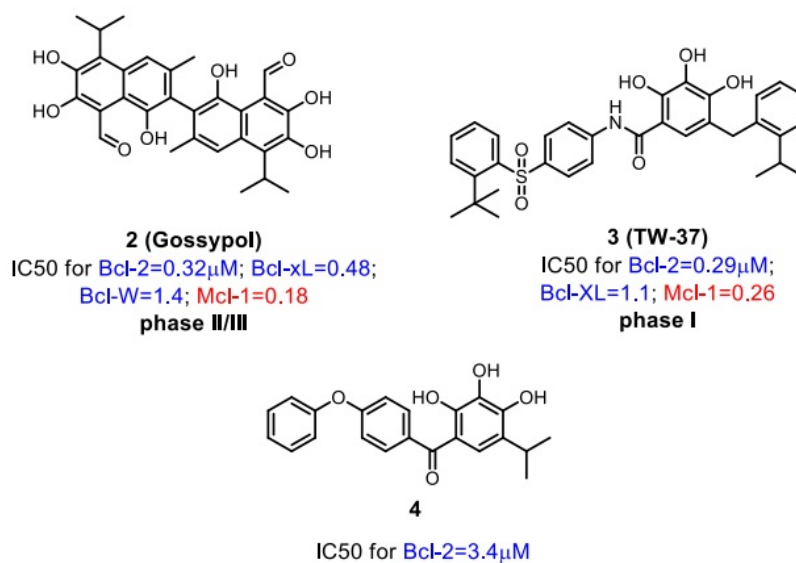
Hình 2. Cấu trúc của hợp chất ABT-737.

Trong nghiên cứu này, sử dụng thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc (structure-based design) chúng tôi trình bày kết quả tổng hợp các hợp chất phenol và dị vòng mới. Các hợp chất này sau đó được thử nghiệm khả năng ức chế sự ghép cặp của protein Bcl-xL đối với protein Bax (thử nghiệm BRET - bioluminescence resonance energy transfer, tương tác Bax/Bcl-xL) và khả năng gây độc tế bào đối với tế bào ung thư HeLa và tế bào ung thư da B16F10 của chuột. Chúng tôi cũng sử dụng mô hình hóa (docking) để thiết lập sự tương tác của các hợp chất đối với protein Bcl-xL.

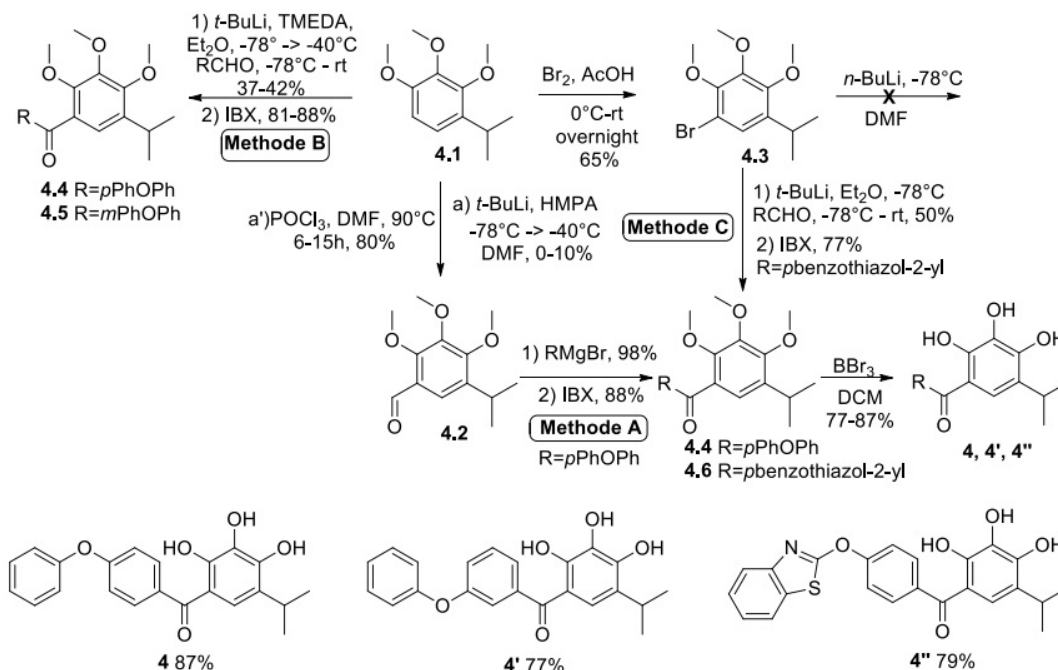
2. THIẾT KẾ VÀ TỔNG HỢP CÁC CHẤT PHENOL VÀ DỊ VÒNG MỚI

Chúng tôi dựa vào cấu trúc các hợp chất để thiết kế là Gossypol **2** và TW37 **3** hay gần hơn là hợp chất **4** có cấu trúc đơn giản của **2** và **3**. Gossypol là hợp chất tự nhiên với nhiều hoạt tính sinh học hấp dẫn. Nhóm giáo sư S. Wang của trường đại học Michigan (hiện là đồng chủ biên tập tạp chí Journal of Medicinal Chemistry, một trong những tạp chí hàng đầu thế giới về hóa dược) đã khám phá đồng phân R-(-)- của gossypol ức chế khá mạnh đối với các protein antiapoptotic (Hình 3), đặc biệt là đối với Mcl-1, một protein antiapoptotic trong họ Bcl-2, cũng thường tăng sinh cao trong các tế bào ung thư mà ABT737 không ức chế được [4]. Nhóm này cũng đã sử dụng thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc và mô hình hóa để tổng hợp các chất tương tự gossypol. Ví dụ kết quả cho ra hợp chất TW37 có hoạt tính tương đương gossypol [4]. Hợp chất acylpyrogallol **4** được cho là hợp chất tối giản của gossypol mà nhóm này thiết kế và tổng hợp được [6].

Tiến hành tổng hợp lại hợp chất **4** để làm chất tham khảo đối chứng trong các thử nghiệm sinh học. Hình 4 mô tả tổng hợp hợp chất **4**. Phương pháp tổng hợp được sử dụng gần với phương pháp được sử dụng trước đó bởi nhóm của giáo sư S. Wang [6]. Một cách ngắn gọn về mặt tổng hợp hợp chất **4**, đầu tiên chất trung gian **4.1** được tổng hợp dựa theo [6]; chúng tôi không thành công chuyển hóa hợp chất **4.1** thành



Hình 3. Cấu trúc của hợp chất gossypol **2**, TW37 **3** và hợp chất **4**.



Hình 4. Tổng hợp hợp chất **4** và các chất tương tự **4'**, **4''**.

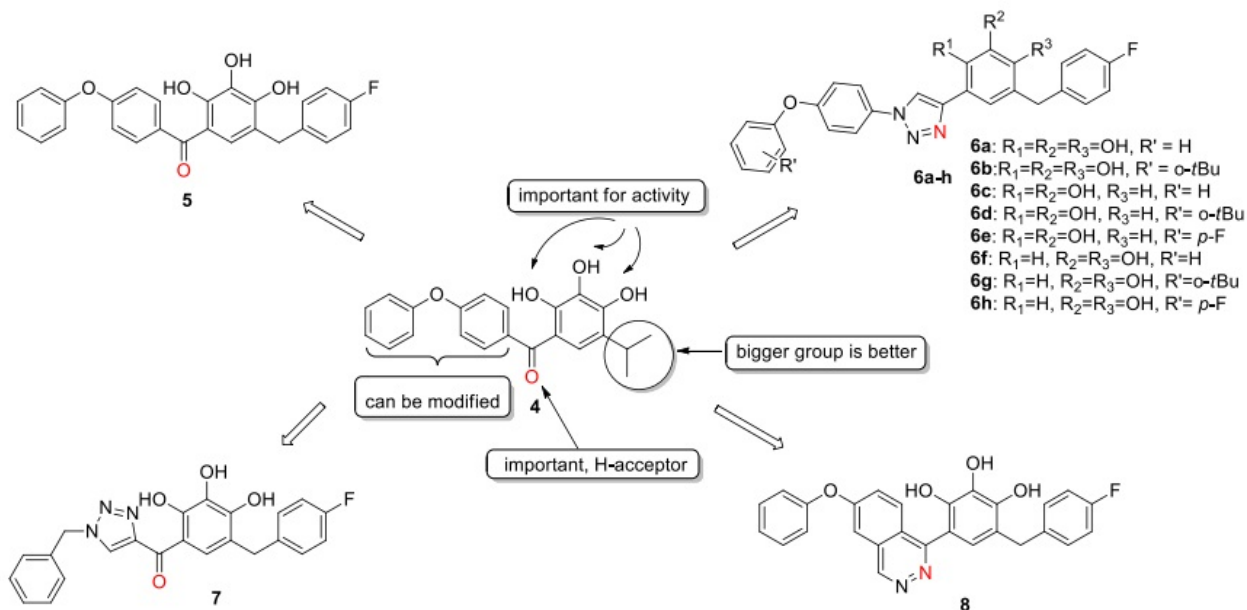
aldehyde **4.2** theo phương pháp trong [6], thay vào đó chúng tôi sử dụng phản ứng cổ điển Vilmeimer-Haack với hệ tác chất POCl₃/DMF để điều chế aldehyde **4.2** với hiệu suất khá cao (80%). Tiếp theo, phản ứng cộng hợp chất Grignard vào **4.2** tạo thành ancol trung gian và bị oxid hóa bởi tác chất IBX tạo thành trimethylacylpyrogallol **4.4** mong muốn (phương pháp A). Mặt khác, theo phương pháp B, phản ứng trực tiếp tách proton của **4.1** với hệ tác nhân *t*-BuLi/TMEDA tạo thành hợp chất cơ Li trung gian, sau khi thêm aldehyde sẽ tạo thành alcohol trung gian và alcohol này bị oxid hóa bởi IBX tạo thành trimethylacylpyrogallol **4.4** mong muốn. Ngoài ra theo phương pháp C, chất

trung gian **4.1** được gắn một nguyên tử Br chọn lọc vị trí tạo thành chất **4.3** bằng phản ứng với Br₂ cho hiệu suất 65%. Sử dụng phản ứng trao đổi halogen-metal bằng tác chất t-BuLi trên **4.3** sẽ tạo thành hợp chất cơ Li trung gian để sử dụng như phương pháp B. Cuối cùng phản ứng chuyển hóa các nhóm OMe thành các nhóm phenol được thực hiện với tác chất BBr₃ cho hiệu suất cao 77 – 87%. Sơ đồ chuyển hóa này khá đa dạng, có thể áp dụng để tổng hợp nhiều hợp chất tương tự của **4**, bổ sung cho các phương pháp đã được công bố trước đây trong việc điều chế các hợp chất này. Chúng tôi đã chứng minh thêm tính hiệu quả của phương pháp C bằng việc tổng hợp hai hợp chất tương tự **4** là **4'** và **4''** cho hiệu suất cao. Chú ý rằng, hai hợp chất **4'** và **4''** chưa từng được công bố trước đây.

Từ hợp chất **4**, sử dụng hợp lý hóa thiết kế thuốc, chúng tôi đã tổng hợp thành công các hợp chất **6**, **6a-6h**, **7** và **8** (Hình 5). Về nguyên tắc thiết kế được trình bày trong Hình 5 thì các nghiên cứu trong [6] đã được chứng minh:

- Các nhóm phenol đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính sinh học của các chất này;
- Nhóm isopropyl có thể được thay thế bằng nhóm cồng kềnh hơn để tăng hoạt tính (ví dụ trường hợp TW37 nêu trên);
- Nhóm carbonyl hay cụ thể là nguyên tử oxy đóng vai trò quan trọng là chất nhận trong liên kết hydro với các hydro linh động của protein;
- Phần diphenyl (diaryl) ether có thể được thay đổi.

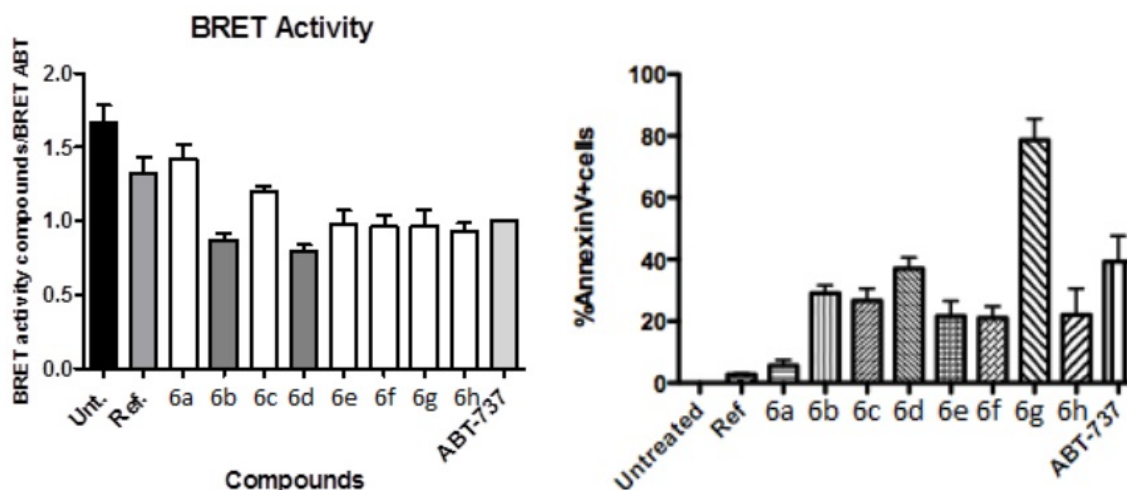
Dựa vào kết quả trên, cùng với hỗ trợ của mô hình hóa, chúng tôi đã tổng hợp được các chuỗi hợp chất mới có tiềm năng tăng hoạt tính so với chất tham khảo **4**. Trong



Hình 5. Cấu trúc các hợp chất được thiết kế và tổng hợp.

bốn nhóm hợp chất trình bày chúng tôi chọn nhóm para-fluorobenzyl để thay thế nhóm isopropyl. Nhóm các chất có cấu trúc giống **5** về cơ bản gần giống hợp chất **4**, chúng tôi giữ lại cả nhóm carbonyl và biphenylether. Nhóm các hợp chất **6a-6g** là một thiết kế độc đáo của chúng tôi trong việc thay thế nhóm carbonyl bằng vòng triazole. Nguyên tử nitrogen trên vòng triazole được cho là có khả năng tạo liên kết hydro với các hydro linh động như nguyên tử oxy của nhóm carbonyl trong cấu trúc của **4**. Nhóm các hợp chất **7** chủ yếu sự khác biệt với **5** là thay thế vòng benzene bằng vòng triazole. Cuối cùng nhóm các hợp chất **8** có cấu trúc độc đáo chứa vòng phthalazine thay thế cho phenylacetyl trong cấu trúc của **5**.

3. HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC HỢP CHẤT ĐƯỢC TỔNG HỢP



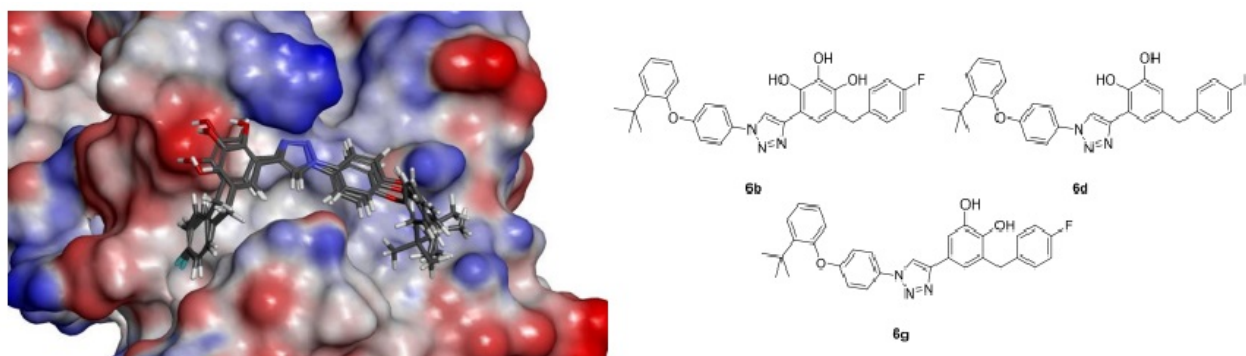
Hình 6. a: Kết quả thử nghiệm BRET. b: Kết quả thử nghiệm độc tính tế bào, cột đứng: phần trăm số tế bào chết đi. Thực hiện ở nồng độ 10 microM các chất, Ref = hợp chất **4**.

Các thử nghiệm sinh học chính được tiến hành để đánh giá hoạt tính sinh học của các chất được tổng hợp trong nghiên cứu này là BRET, thử nghiệm khả năng gây độc tế bào đối với tế bào ung thư HeLa và tế bào ung thư da B16F10 của chuột. Chất **4** và ABT737 được sử dụng là chất tham khảo trong thử nghiệm BRET và độc tính trên tế bào HeLa. Hầu hết các hợp chất được thiết kế và tổng hợp trong các chuỗi hợp chất **5**, **6a-h**, **7** và **8** đều có hoạt tính tốt hơn so với chất tham khảo **4** ([7, 8, 9, 10, 11]). Nhiều chất có hoạt tính tương đương thậm chí cao hơn so với ABT737. Cụ thể ở đây chúng tôi muốn đề cập đại diện hoạt tính của các hợp chất **6a-6h**. Kết quả thử nghiệm hoạt tính (thử nghiệm BRET, Hình 6(a)) cho thấy ở nồng độ 10 microM, các hợp chất này thể hiện hoạt tính ức chế mạnh hơn hợp chất tham khảo **4** (trừ **6a** yếu hơn). **6c** mạnh hơn **4** nhưng lại yếu hơn ABT. Các hợp chất **6e-6h** cho hoạt tính tương đương ABT. Đặc biệt là **6b** và **6d** thể hiện hoạt tính mạnh hơn ABT. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào HeLa (Hình 6(b)) cho thấy, ở nồng độ 10 microM, các hợp chất này ức chế 10 – 40% sự sinh trưởng của tế bào, hơn hẳn chất tham khảo **1** (hầu như không

ức chế ở nồng độ này) và gần với hợp chất ABT737 (40%). Đặc biệt là hợp chất **6g** ức chế 80% sự sinh trưởng của tế bào gấp 2 lần ABT737 cho thấy **6g** là một hợp chất rất hứa hẹn để tiếp tục phát triển. Mặc khác, hoạt tính gây độc tế bào của một số hợp chất chọn lọc được thử nghiệm trên tế bào ung thư da của chuột B16F10 cho thấy các chất có khả năng ức chế sự sinh trưởng của tế bào ở nồng độ $IC_{50} = 1-12 \text{ microM}$ [12].

4. MÔ HÌNH HÓA

Sử dụng mô hình hóa (docking) trên protein Bcl-xL đối với các hợp chất tổng hợp được, ví dụ trong Hình 7 cho thấy các chất **6b**, **6d** và **6g** chiếm và hợp với vị trí hoạt động của protein Bcl-xL (occupies and fix well to binding/active site of Bcl-xL protein). Điều này bổ sung cho giải thích về hoạt tính tốt của hợp chất X đối với sự ức chế tương tác Bcl-xL/Bax và khả năng gây độc tế bào ung thư của nó trên tế bào HeLa và B16F10.



Hình 7. Docking các hợp chất 6b, 6d và 6g ở active site của protein Bcl-xL.

5. KẾT LUẬN

Sử dụng thiết kế thuốc hợp lý dựa trên cấu trúc (structure-based design) kết hợp với mô hình hóa chúng tôi đã tổng hợp được các hợp chất phenol và dị vòng mới. Các hợp chất này thể hiện khả năng ức chế tốt đối với tương tác protein-protein của Bax/Bcl-xL. Các hợp chất mới được tổng hợp có nhiều tiềm năng, cần được thử nghiệm hoạt tính sinh học nhiều hơn nữa trên các dòng tế bào ung thư khác cũng như phối hợp với các loại thuốc hiện hành để tăng hiệu quả gây chết ở tế bào ung thư. Một vài hợp chất trong các chất này là những chất dẫn tốt (new good hits) để tiếp tục phát triển thành thuốc trị ung thư thể hệ mới thông qua cơ chế ức chế các protein antiapoptotic của họ protein Bcl-2 và khôi phục lại tiến trình tự chết (apoptosis) của tế bào ung thư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. M. Goldman and J. V. Melo, “Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment,” *New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 15, pp. 1451–1464, 2003.
- [2] A. Quintás-Cardama, H. Kantarjian, and J. Cortes, “Flying under the radar: the new wave of bcr-abl inhibitors,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 6, no. 10, pp. 834–848, 2007.
- [3] M. H. Kang and C. P. Reynolds, “Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy,” *Clinical cancer research*, vol. 15, no. 4, pp. 1126–1132, 2009.
- [4] G. Lessene, P. E. Czabotar, and P. M. Colman, “Bcl-2 family antagonists for cancer therapy,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, no. 12, pp. 989–1000, 2008.
- [5] P. Juin, O. Geneste, F. Gautier, S. Depil, and M. Campone, “Decoding and unlocking the bcl-2 dependency of cancer cells,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 13, no. 7, pp. 455–465, 2013.
- [6] G. Tang, Z. Nikolovska-Coleska, S. Qiu, C.-Y. Yang, J. Guo, and S. Wang, “Acylpyrogallols as inhibitors of antiapoptotic bcl-2 proteins,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 51, no. 4, pp. 717–720, 2008.
- [7] D. D. Vo, *Design, synthèse et évaluation de l’activité biologique d’analogues de polyphénols biaryliques bioactifs*. PhD thesis, Rennes 1, 2011.
- [8] D. D. Vo, F. Gautier, P. Juin, and R. Grée, “Structure–activity relationship of selected polyphenol derivatives as inhibitors of bax/bcl-xl interaction,” *European journal of medicinal chemistry*, vol. 51, pp. 286–293, 2012.
- [9] D. D. Vo, F. Gautier, S. Barillé-Nion, P. Juin, N. Levoine, and R. Grée, “Synthesis of new mixed phenol/heterocyclic derivatives and studies of their activity as inhibitors of bax/bcl-xl interaction,” *Tetrahedron*, vol. 70, no. 2, pp. 301–311, 2014.
- [10] D. D. Vo, F. Gautier, S. Barillé-Nion, P. Juin, N. Levoine, and R. Grée, “Design, synthesis and biological evaluation of new inhibitors of bax/bcl-xl interaction in cancer cells,” *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 24, no. 7, pp. 1758–1761, 2014.
- [11] N. Levoine, D. D. Vo, F. Gautier, S. Barillé-Nion, P. Juin, O. Tasseau, and R. Grée, “A combination of in silico and sar studies to identify binding hot spots of bcl-xl inhibitors,” *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 23, no. 8, pp. 1747–1757, 2015.
- [12] D. D. Vo, F. Gautier, and N. Levoine, “Preliminary studies on the activity of mixed polyphenol-heterocyclic systems against b16-f10 melanoma cancer cells.” Submitted.

DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATIONS OF NEW PHENOLIC AND HETEROCYCLIC COMPOUNDS WHICH HAVE POTENTIAL TO INHIBIT PROTEIN-PROTEIN INTERACTION OF BCL-2 PROTEIN FAMILY – APPLIED TO RESTORE APOPTOSIS IN CANCER CELLS

Abstract. Cells which abnormally growth, escape from apoptosis, metastasize and continue to proliferate is one of principal causes to form cancer. Many antiapoptotic proteins of Bcl-2 protein family (especially Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) are usually overexpressed with high ratio in cancer cells and cancer stem cells, and help cancer cells to escape from apoptosis, resist to current chemotherapies and continue to proliferate. Thus, it is a new and particularly interesting biological target in research of new chemotherapies to treat cancer. Compounds which are capable to inhibit antiapoptotic protein function have potential to restore apoptosis in cancer cells. In this research, we present the design, synthesis and biological evaluations of new phenolic and heterocyclic compounds which are Bcl-xL inhibitors and induce cell death in cancer cells.

Keywords: phenolic compound, heterocyclic compound, protein-protein interaction (PPI), Bcl-2 family, apoptosis, cancer.