

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Xuân Tứ

TỔNG HỢP VÀ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH SINH HỌC
CỦA CÁC BIARYL PEPTIDOMIMETIC

Chuyên ngành: Hóa Hữu cơ
Mã số: 9440112.02

DỰ THẢO TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2024

Công trình được hoàn thành tại:
Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Mạc Đình Hùng
2. TS. Phạm Văn Phong

Phản biện:
Phản biện:
Phản biện:

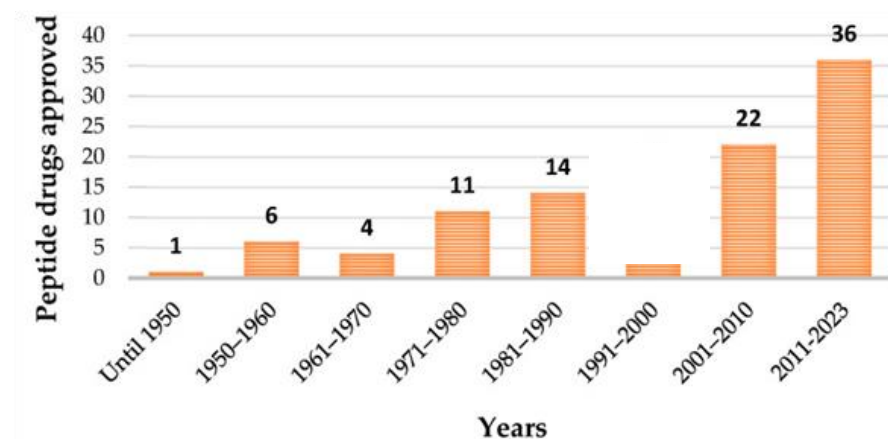
Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá Luận án tại trường
Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội vào hồi giờ
....., ngày tháng năm 2024.

Có thể tìm hiểu luận án tại:
- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà nội

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Insulin là một peptide hormone, được sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường lần đầu tiên năm 1922, mở ra kỷ nguyên sử dụng peptide hay protein trong điều trị bệnh. Hiện nay có hơn 100 loại thuốc peptide và peptidomimetic đã được FDA phê duyệt, phần lớn được phê duyệt trong giai đoạn từ năm 2000 đến nay. Điều này cho thấy việc nghiên cứu phát triển các loại thuốc dựa trên peptide đang là một xu hướng lớn trong những thập niên gần đây và những năm tiếp theo.



Hình 1.1. Biểu thị số lượng peptide và peptide-base được phê duyệt là thuốc theo từng giai đoạn (Trích dẫn từ công trình của Lia Costa, 2023).

Những ưu điểm nổi bật như tương tác tốt với đích sinh học, an toàn cao nên peptide hay protein tự nhiên là đối tượng đặc biệt quan trọng trong việc phát triển thuốc điều trị bệnh nói riêng cũng như trong nghiên cứu y sinh nói chung. Tuy nhiên các peptide tự nhiên dễ bị phân hủy trong cơ thể, khả năng di chuyển qua màng tế bào kém, những yếu điểm này dẫn tới thời gian bán hủy *in vivo* thấp làm hạn chế ứng dụng của peptide tự nhiên.

Việc phát triển các hợp chất peptidomimetic, dựa vào việc thay đổi cấu trúc peptide tự nhiên tuy nhiên không làm thay đổi hoạt tính sinh học là hướng nghiên cứu được nhiều nhà khoa học trên thế giới đang thực hiện. Các

peptidomimetic có các tính chất sinh học giống các peptid mục tiêu, đồng thời có khả năng ức chế cùng đích sinh học, tuy nhiên chúng đã được biến đổi một số liên kết để tăng tính bền trong các quá trình sinh học khi được đưa vào cơ thể.

Cùng xu hướng đó, tôi lựa chọn đề tài: “**Tổng hợp và nghiên cứu hoạt tính sinh học của các biaryl peptidomimetic**” trong đó sẽ tiến hành khảo sát phương pháp tổng hợp một số peptidomimetic có chứa macrocyclic hoặc khung biaryl và bước đầu khảo sát hoạt tính sinh học của một số hợp chất tổng hợp được.

2. Mục đích và nhiệm vụ của luận án

- Mục đích:

Nghiên cứu tổng hợp, xác định cấu trúc, thử nghiệm hoạt tính sinh học của một số macrocyclic β -peptidomimetic và biphenyl peptidomimetic mới, nhằm tìm kiếm những hợp chất có hoạt tính sinh học cao hoặc có ứng dụng khác.

- Nhiệm vụ:

+ Tổng hợp β -amino acid từ amino acid tự nhiên với sản phẩm thu được vẫn giữ trung tâm bất đối. Các β -amino acid tổng hợp được là chất đầu cho các chuyển hóa tiếp theo để tổng hợp các dẫn xuất bis-N-ankylate peptidomimetic. Khảo sát và tối ưu điều kiện phản ứng RCM (Ring-Closing Metathesis) các dẫn xuất bis-N-ankylate peptidomimetic để tạo thành các macrocyclic β -peptidomimetic.

+ Tổng hợp các dẫn xuất [1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylic acid, rồi chuyển hóa thành các biphenyl peptidomimetic với 2 chuỗi peptid đối xứng ở vị trí 2,2' vòng phenyl có chứa 1 hoặc 3 amino acid mỗi chuỗi.

+ Nghiên cứu tính chất và xác định cấu trúc của các hợp chất mới bằng phương pháp phổ NMR, HRMS, nhiễu xạ tia X đơn tinh thể.

+ Thăm dò hoạt tính kháng tế bào ung thư nhằm tìm kiếm các hợp chất peptidomimetic có hoạt tính sinh học cao.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

- Đối tượng: Một số macrocyclic β -peptidomimetic và biphenyl peptidomimetic mới.

- Phạm vi nghiên cứu: Nghiên cứu tổng hợp, xác định cấu trúc và thăm dò hoạt tính sinh học của các hợp chất tổng hợp được.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

- Đã hoàn thiện 02 quy trình tổng hợp các dẫn xuất peptidomimetic đó là:

i) Chuyển hóa amino acid tự nhiên thành β -amino acid, tổng hợp các dẫn xuất bis-N-ankylate peptidomimetic từ các β -amino acid, sử dụng phản ứng RCM (Ring-Closing Metathesis) đóng vòng các dẫn xuất bis-N-ankylate peptidomimetic tạo thành các macrocyclic β -peptidomimetic.

ii) Tổng hợp các dẫn xuất [1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylic acid, chuyển hóa thành các biphenyl peptidomimetic với 2 chuỗi peptid đối xứng ở vị trí 2,2' vòng phenyl có chứa 1 hoặc 3 amino acid mỗi chuỗi.

- Cung cấp dữ liệu về phổ NMR, HRMS, X-Ray của một số hợp chất macrocyclic β -peptidomimetic và biphenyl peptidomimetic tổng hợp được, phục vụ cho nghiên cứu khoa học và đào tạo nguồn nhân lực chất lượng cao cho xã hội.

- Kết quả thử hoạt tính sinh học các hợp chất macrocyclic β -peptidomimetic tổng hợp được cho thấy hoạt tính ức chế tế bào ung thư vú MDA-MB-231, MCF-7, đặc biệt hoạt tính ức chế tốt với hợp chất vòng 11-13 cạnh, điều này giúp định hướng cho việc tìm kiếm những hợp chất mới có tiềm năng ứng dụng vào thực tế.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Peptid và Peptidomimetic

1.1.1. Khái niệm peptid và peptidomimetic

Peptid là phân tử gồm các amino acid được liên kết với nhau bởi ít nhất một liên kết amide. Cấu trúc của peptid rất đa dạng từ phân bố mạch thẳng, mạch vòng hoặc các peptid được làm thay đổi với sự xuất hiện của các nhóm phosphoryl hoặc các khung đường và terpenoid. Peptid hay các cấu trúc giả peptid đã được sử dụng trong việc phát triển thuốc điều trị ung thư vú, HIV hoặc các tác nhân chống huyết áp cao, các bệnh liên quan đến tim mạch và nhiều bệnh khác. Gần đây một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng các peptid không những nổi bật trong ứng dụng làm thuốc như các kháng sinh peptid, vaccine có sử dụng peptid, peptid sử dụng trong ức chế sự phát triển của tế bào ung thư, mà các peptid còn có tiềm năng lớn trong việc phát triển các ứng dụng mới như vaccine sử dụng dẫn

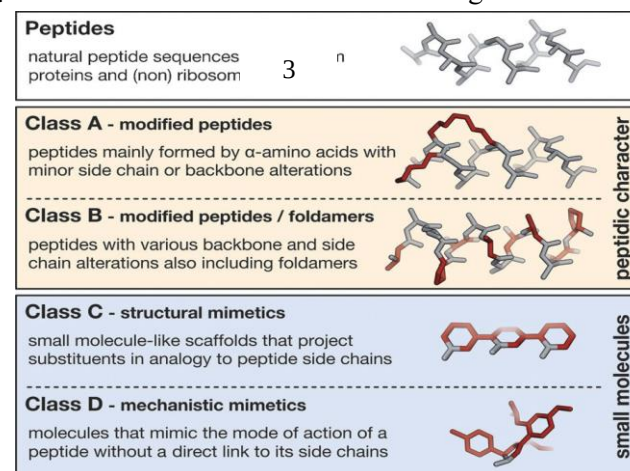
xuất peptid bán tổng hợp, liệu pháp phân phối thuốc, các chất đánh dấu phóng xạ gắn trên peptid....

Peptidomimetic được định nghĩa là các phân tử giả peptid được thiết kế để bắt chước các tính chất của các peptid tự nhiên hoặc protein. Do đó, peptidomimetic có tác dụng được lý giống peptid tự nhiên, chúng có khả năng ức chế protein giống với các peptid tự nhiên. Vì vậy các peptidomimetic có khả năng tương tác tốt, chọn lọc với các protein và hơn nữa có thể được điều chế nhiều dạng khác nhau, tạo ra sự đa dạng về cấu trúc và độ bền sinh học.

1.1.2. Phân loại peptidomimetic

Theo quan điểm trước đây, peptidomimetic có thể được chia thành ba nhóm tùy thuộc vào đặc điểm cấu trúc và chức năng của chúng:

- Loại I-bắt chước về cấu trúc: thể hiện sự tương đồng về hình dạng với các chất tự nhiên và mang tất cả các chức năng đáp ứng cho sự tương tác với enzyme hoặc thụ thể trong một sự định hướng không gian nhất định.
- Loại II-bắt chước chức năng: tương tự với các chất tự nhiên dựa trên sự tương tác với thụ thể đích hoặc enzyme mà không cần thể hiện sự giống nhau về cấu trúc.
- Loại III- bắt chước cả cấu trúc và chức năng.



Hình 1.2: Minh họa cách phân loại peptidomimetic theo bốn lớp A-D trong việc thiết kế mô phỏng cấu trúc xoắn α , phân biến đổi được biểu thị bằng màu đỏ (Trính dẫn từ công trình của Pelay Gimeno, 2015)

1.1.3. Một số peptid và peptidomimetic ứng dụng trong y dược

1.2. Macrocyclic peptid và peptidomimetic

1.2.1. Một số macrocyclic peptid và peptidomimetic ứng dụng trong y dược

1.2.2. Phương pháp đóng vòng metathesis tổng hợp cyclic peptidomimetic

1.2.3. Phương pháp tổng hợp β -aminoacid từ α -amino acid

1.3. Biphenyl peptid và biphenyl peptidomimetic

1.3.1. Ứng dụng của một số biphenyl peptid tự nhiên

1.3.2. Ứng dụng của một số biphenyl peptidomimetic và phương pháp tổng hợp

CHƯƠNG 2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, nguyên vật liệu và trang thiết bị

Tất cả các phản ứng được thực hiện trong phòng thí nghiệm Hóa dược - Khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các hóa chất và dung môi đều được nhập từ các công ty hóa chất, hầu hết khi làm phản ứng không cần tinh chế lại. Trừ một số hóa chất như *n*-hexan và ethylacetate đã được cất lại trước khi sử dụng, dichloromethane tinh khiết được làm khan bằng P_2O_5 trước khi sử dụng, pentane được cất lại và làm khan bằng sodium, THF được làm khan bằng sodium và benzophenone, được sử dụng ngay khi vừa cất lại. Phổ 1H NMR và phổ ^{13}C NMR được đo trên máy BRUKER 500 MHz Asend tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN, sử dụng TMS là chất chuẩn nội, $CDCl_3$ và DMSO (d_6) làm dung môi. Phản ứng được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng (TLC), được quan sát bằng đèn UV tại bước sóng 254nm hoặc 366nm và chất phản ứng được phát hiện bởi dung dịch $KMnO_4$.

Phổ khối được đo trên máy LC/MS LTQ Orbitrap XL của hãng Thermo Scientific tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN.

Máy đo nhiễu xạ tia X Bruker D8 Advance tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN.

2.2. Phương pháp nghiên cứu và thực nghiệm

2.2.1. Các quy trình chung

Quy trình chung tạo nhóm bảo vệ Cbz: 10 mmol của aminoacid được hòa tan trong 20 ml dioxan và 20 ml dung dịch K_2CO_3 bão hòa, hỗn hợp được làm lạnh ở $0^\circ C$. 11 mmol benzyl chloroformate được thêm từng giọt trong 1 giờ. Hỗn hợp khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được trung hòa bằng HCl 1M, chiết lại với ethyl acetate, rửa pha hữu cơ bằng dung dịch NaCl bão hòa, làm khan bằng Na_2SO_4 rồi làm bay hơi dưới áp suất thấp thu được sản phẩm.

Quy trình chung phá bảo vệ N-Cbz: các dẫn xuất được bảo vệ bằng Cbz được hòa tan trong dung môi EtOAc: MeOH (4:1), 5% mol Pd/C được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được dẫn khí H_2 trong 6 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch được lọc qua phễu lọc celite và làm bay hơi dung môi dưới áp suất thấp thu sản phẩm thô. Sản phẩm được sử dụng trực tiếp cho bước chuyển hóa tiếp theo mà không cần tinh chế lại bằng sắc ký cột.

Quy trình chung cho phản ứng tổng hợp amide (phương pháp 1): các acid amin được hòa tan trong DCM dưới điều kiện khí N_2 . Thêm vào dung dịch Et_3N khô (1,5 đương lượng) rồi làm lạnh tới $0^\circ C$ trong 30 phút. 1,2 đương lượng DCC và 20% DMAP (tính theo trọng lượng của DCC) được thêm vào. Phản ứng được giữ ở $0^\circ C$ trong 1 giờ và khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau khi phản ứng kết thúc, dung dịch được rửa bằng HCl 0,01N, chiết lại bằng DCM và nước, làm khô bằng Na_2SO_4 rồi làm bay hơi dưới áp suất thấp. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải ethyl acetate/ *n*-hexane.

Quy trình chung tổng hợp N-alkylation: Bột K_2CO_3 (3 equiv) được thêm vào hỗn hợp của β -glycine methyl ester (1.5 equiv) trong acetonitrile. Hỗn hợp sau đó được khuấy 15 phút, rồi thêm bromide alkenyl vào hỗn hợp huyền phù nêu trên. Tiếp tục khuấy hỗn hợp phản ứng thêm 16h ở nhiệt độ phòng, sau đó cho thêm 30 ml nước, chiết bằng diethyl ether (3 x 50 mL), gộp pha hữu cơ và rửa bằng nước (50 mL), rồi dung dịch NaCl bão hòa (50 mL)...

Quy trình chung tổng hợp macrocyclic peptid bằng RCM: Grubbs-2 catalyst (5 mol%) được thêm vào hỗn hợp phản ứng đã được sục khí N_2

của các dẫn xuất N-alkyl diene trong DCM. Hỗn hợp được đun hồi lưu trong 4h, rồi thêm 5 mol% xúc tác rồi tiếp tục đun hồi lưu qua đêm. Sau khi cô quay chân không hỗn hợp phản ứng, cần thu được sẽ được tinh chế bằng sắc kí cột, pha tĩnh là silica gel (40-60 mesh), rửa giải bằng hexane: ethyl acetate (1:1 to 1:9).

2.2.2. Quy trình tổng hợp beta-amino ester

Tổng hợp (S)-2-amino-4-methylpentan-1-ol từ L - Leucine (2).

Tổng hợp (S)-benzyl-(1-hydroxy-4- methylpentan-2-yl)carbamate (3).

Tổng hợp (S)-benzyl-(1-iodo-4-methylpentan-2-yl)carbamate (4).

Tổng hợp (S) - benzyl (1-cyano-4- methylpentan-2-yl) carbamate (5).

2.2.3. Tổng hợp macrocyclic peptidomimetic

Các dẫn xuất mono và diene N-alkyl được tổng hợp theo qui trình chung tổng hợp N-alkylation, các hợp chất cần tạo liên kết amide được tổng hợp theo qui trình chung tổng hợp amide, các dẫn xuất macrocyclic peptid được tổng hợp theo qui trình chung RCM được nêu tại mục 2.2.1.

3-(allyl((benzyloxy)carbonyl) amino) propanoic acid (11a).

3-(((benzyloxy)carbonyl) (but-3-en-1-yl) amino) propanoic acid (11b).

3-(((benzyloxy)carbonyl) (pent-4-en-1-yl) amino) propanoic acid (11c).

Methyl 3-(N-allyl-3-(allyl((benzyloxy)carbonyl) amino) propanamido) propanoate(12a).

Methyl 3-(3-(allyl((benzyloxy)carbonyl) amino)-N-(but-3-en-1 yl) propanamido)propanoate (12b).

Methyl 3-(3-(allyl((benzyloxy)carbonyl) amino)-N-(pent-4-en-1-yl) propanamido)propanoate (12c).

Methyl 3-(3-(((benzyloxy)carbonyl) (but-3-en-1-yl) amino)-N-(but-3-en-1-yl)propanamido) propanoate (12d).

Methyl 3-(3-(((benzyloxy)carbonyl) (pent-4-en-1-yl) amino)-N-(but-3-en-1-yl)propanamido) propanoate (12e).

Methyl 3-(3-(((benzyloxy)carbonyl) (pent-4-en-1-yl) amino)-N-(pent-4-en-1-yl)propanamido) propanoate (12f).

Benzyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxo-2,3,4,5,6,9-hexahydro-1H-1,5-diazonine-1-carboxylate (13a).

Benzyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxo-3,4,5,6,7,10-hexahydro-1,5-diazecine-1(2H)-carboxylate (13b).

Benzyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxo-1,5-diazacycloundec-9-ene-1-carboxylate (13c).

Benzyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxo-1,5-diazacycloundec-8-ene-1-carboxylate(13d).

Benzyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxo-1,5-diazacyclododec-8-ene-1-carboxylate(13e).

Benzyl 5-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxo-1,5-diazacyclotridec-9-ene-1-carboxylate (13f).

Benzyl allyl(3-oxo-3-(pent-4-en-1-ylamino)propyl)carbamate (14)

Benzyl 4-oxo-1,5-diazacycloundec-9-ene-1-carboxylate (15)

2.2.4. Tổng hợp các peptidomimetic chứa khung biaryl

2.2.4.1. Tổng hợp các peptidomimetic chứa khung 2,2'-biphenyl diacid

Tổng hợp [1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylic acid (16).

Tổng hợp [1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylic dichloride (17).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-((1,1'-biphenyl)-2,2'- dicarbonyl) bis (azanediyl)) diacetate (18a).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-((1,1'-biphenyl)-2,2'- dicarbonyl)bis(azanediyl)) (2S, 2S')-dipropanoate (18b).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-((1,1'-biphenyl)-2,2'- dicarbonyl) bis (azanediyl)) (2S,2'S)-bis(4-methylpentanoate) (18c).

ổng hợp Methyl (2'-(((2S,3R)-3-hydroxy-1- methoxy-1-oxobutan-2-yl)carbamoyl)-[1,1'- biphenyl]-2-carbonyl)-L-allothreoninate (18d).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-((1,1'-biphenyl)-2,2'- dicarbonyl) bis(azanediyl))(2S,2'S)-bis(3- phenylpropanoate) (18e).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-([1,1'-biphenyl]-2,2'- dicarbonyl)(2S,2'S)-bis(pyrrolidine-2-carboxylate) (18f).

2.2.4.2. Tổng hợp các peptidomimetic chứa khung 6,6'-dimethyl-2,2'-biphenyl diacid

Tổng hợp 6,6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylic acid (19): .

Tổng hợp 6,6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarbonyl dichloride (20).

Tổng hợp N-benzyloxycarbonyl-L-proline (21).

Tổng hợp benzyl 2-((1-methoxy-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate (22).

Tổng hợp 2-(1-((benzyloxy)carbonyl)-1H-pyrrole-2-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid (23).

Tổng hợp benzyl 2-(((1-((R)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl)-1H-pyrrole-1-carboxylate (24).

Tổng hợp (2R)-methyl 2-(3-phenyl-2-(1H-pyrrole-2-carboxamido)propanamido)propanoate (25).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-(((2S,2'S)-2,2'-(((2S,2'S)-1,1'-([1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarbonyl)bis(pyrrolidine-1,2-diyl-2-carbonyl))bis(azanediyl))bis(3-phenylpropanoyl))bis(azanediyl))(2S,2'S)-dipropionate (26).

Tổng hợp Dimethyl 2,2'-(((2S,2'S)-2,2'-(((2S,2'S)-1,1'-(6,6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarbonyl)bis(pyrrolidine-1,2-diyl-2-carbonyl))bis(azanediyl))bis(3-phenylpropanoyl))bis(azanediyl))(2S,2'S)-dipropionate (27).

2.2.5. Khảo sát hoạt tính sinh học các hợp chất tổng hợp được

Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư

a. Các dòng tế bào được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào gồm:

- MCF7 (*Human breast invasive ductal carcinoma*): Ung thư biểu mô ống dẫn sữa xâm lấn

- MDA-MB-231 (*Human breast adenocarcinoma*): Ung thư biểu mô tuyến vú

b. Phương pháp thực nghiệm xác định hoạt tính gây độc tế bào

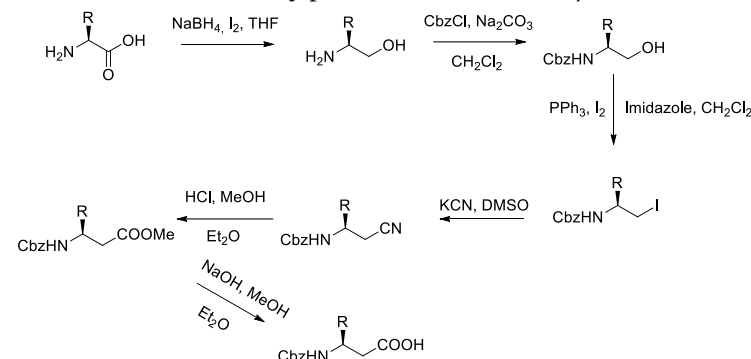
Nuôi tế bào ung thư *in vitro* theo Skehan và cộng sự. Xác định hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư theo phương pháp SRB của Likhawitayawuid và các cộng sự đang được tiến hành tại Viện Nghiên cứu Ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tổng hợp β -amino acid

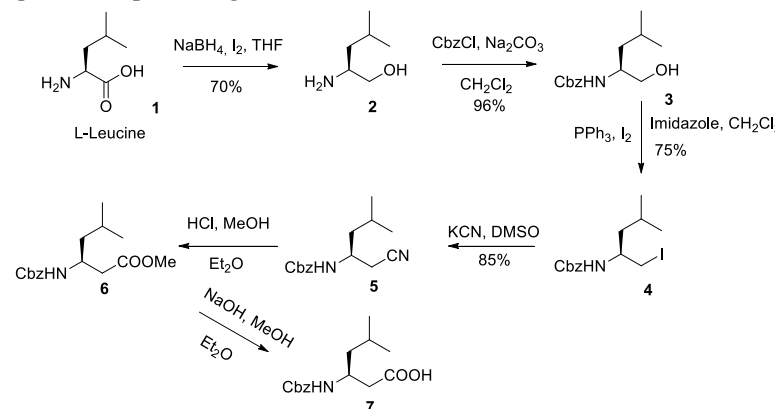
Quy trình tổng hợp chung β -amino acid từ α -amino acid

Tổng hợp các dẫn xuất β -amino acid. Các hợp chất β -amino acid được tổng hợp từ việc chuyển hóa dẫn xuất của các α -amino acid tự nhiên qua phản ứng thế S_N2 thành dẫn xuất nitrile, rồi thủy phân nhóm nitrile thành β -amino acid.



Sơ đồ 3.1: Sơ đồ chung tổng hợp β -amino acid

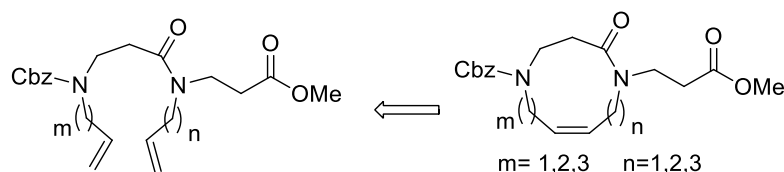
Để có thể chuyển hóa amino acid tự nhiên L-(-) Leucine thành dạng beta-Leucine, với sự xuất hiện của thêm một đơn vị CH_2 chúng tôi tiến hành thông qua chuỗi phản ứng như sơ đồ sau.



Sơ đồ 3.2: Tổng hợp β -amino acid từ L-Leucine

3.2. Tổng hợp macrocyclic beta-peptidomimetic

Trong nội dung luận án chúng tôi tổng hợp các dẫn xuất vòng peptidomimetic có chứa dipetid β -amino acid với việc kích thước vòng thay đổi. Để thiết kế kích thước vòng khác nhau ở sản phẩm cuối, chúng tôi sẽ tổng hợp các dẫn xuất N-alkenyl có chuỗi mạch khác nhau. Bằng việc sử dụng phản ứng đóng vòng trao đổi (RCM - Ring-Closing Metathesis) sử dụng xúc tác Grubbs để ghép vòng dẫn xuất N-alkenyl tạo các sản phẩm cuối (**Sơ đồ 3.3**)



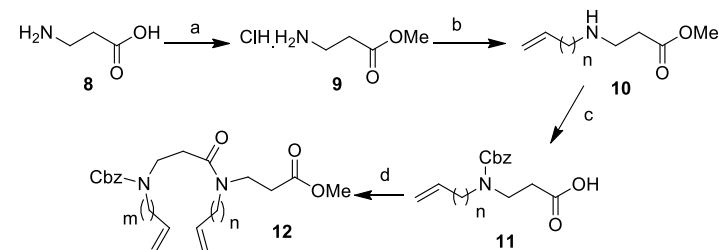
Sơ đồ 3.3: Chiến lược tổng hợp β -macrocyclic peptidomimetic

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu:

1, Tối ưu điều kiện đóng vòng RCM từ các dẫn xuất N-alkenyl chứa 2 beta amino acid.

2, Mối liên quan giữa khả năng phản ứng và kích thước vòng.

Để thực hiện mục tiêu trên chúng tôi đã tổng hợp các bis-N-alkenylate peptides chứa 2 liên kết đôi đầu và cuối mạch (terminal alkene chains) từ β -glycine. Bước đầu tiên amino acid beta-glycine được chuyển hóa thành methyl ester (**9**), sau đó dẫn xuất methyl ester được phản ứng với alkenyl bromide tạo thành mono-N-alkylate (**10**). Dẫn xuất amine bậc 2 này sau đó được lần lượt phản ứng với benzyl chloroformate, rồi thủy phân nhóm methyl ester bằng NaOH trong methanol để thu được acid (**11**). Cuối cùng những beta-amino acid (**11**) này được ghép cặp với N-alkenyl methyl ester (**10**) bằng phản ứng tạo amide sử dụng EDCI-HOBt-Et₃N để tạo các dipeptid mong muốn (**12**) với hiệu suất cao (hơn 80%) (**Sơ đồ 3.4**).

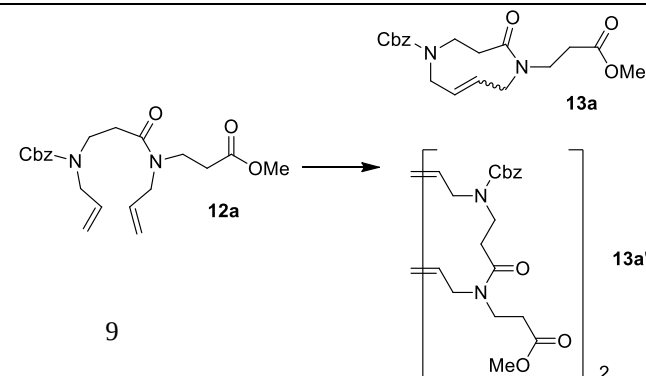


Sơ đồ 3.4: Tổng hợp bis-N-alkenyl

a) SOCl₂, MeOH, r.t., overnight; b) allyl bromide, K₂CO₃, DMF for **10a** (68 %), 4-bromobut-1-ene, K₂CO₃, DMF for **10b** (72 %), 5-bromopent-1-ene, K₂CO₃, DMF for **10c** (65 %); c) Cbz-Cl, CH₂Cl₂, Et₃N, r.t, 4h then MeOH/NaOH 2M, 2h r.t; d) EDCI, HOBt, CH₂Cl₂, Et₃N and 4, r.t, **12a** (80%), **12b** (83%), **12c** (85%), **12d** (80%), **12e** (86%).

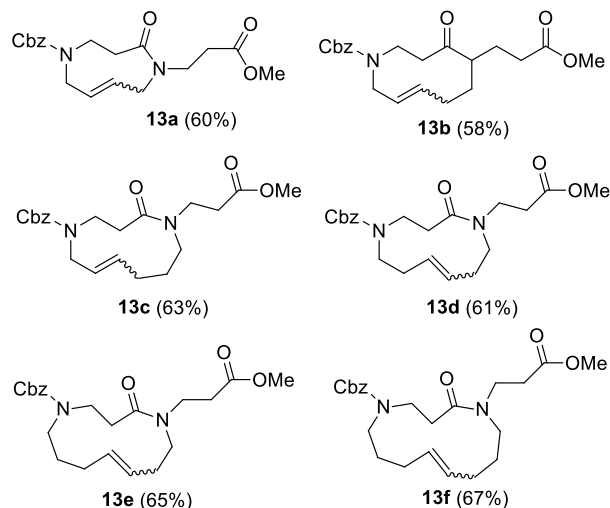
Bảng 3.1: Khảo sát phản ứng đóng vòng metathesis

Entry	Solvent	Catalyst	T [°C]	Yield %]
1	Toluene ^[a]	Grubbs 2 (5 %)	110 °C	25
2	Toluene ^[a]	Grubbs 2 (10 %)	110 °C	45
3	Toluene ^[a]	Grubbs 1 (20 %)	110 °C	42
4	Toluene ^[a]	Grubbs-Hoveyda (10 %)	45 °C	43
5	CH ₂ Cl ₂ ^[a]	Grubbs 2 (10 %)	reflux	60
6	CH ₂ Cl ₂ ^[b]	Grubbs 2 (10 %)	reflux	n.d (not detected)
[a] 10 ^{<M->3} M reaction concentration. [b] 10 ^{<M->2} M reaction concentration.				



Sơ đồ 3.5: Phản ứng đóng vòng RCM

Khi sử dụng 5% xúc tác Grubbs-2, tỷ lệ sản phẩm đóng vòng và chất đầu chưa phản ứng khoảng 2:1 (hiệu suất tách 25% - hàng 1 **Bảng 3.1**). Hiện tượng này thường xảy ra trong phản ứng RCM đóng vòng lớn do xúc tác Grubbs bị phân hủy ở nồng độ thấp. Do vậy để phản ứng chuyển hóa hoàn toàn, một lượng xúc tác Grubbs-2 được thêm vào, theo khảo sát của chúng tôi thì tổng lượng xúc tác Grubbs-2 là 10%, nhiệt độ phản ứng 110°C (nhiệt độ toluen hồi lưu), điểm kết thúc phản ứng được xác định bằng TLC, hiệu suất tách 45% (hàng 2 **Bảng 3.1**).



Hình 3.1: Các sản phẩm macrocyclic peptidomimetic

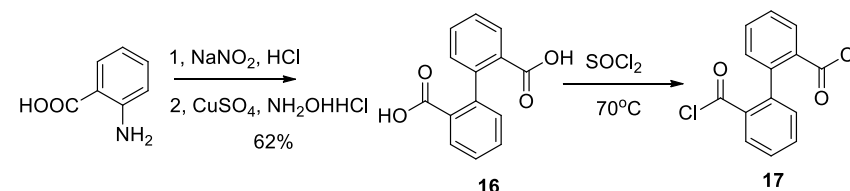
Trong trường hợp sử dụng xúc tác Grubbs-1 (hàng 3 **Bảng 3.1**), để đạt chuyển hóa hoàn toàn cần dùng 20% lượng xúc tác trong khi để đạt kết quả tương tự chỉ cần dùng 10% xúc tác Grubbs-2 hoặc 10% xúc tác Grubbs-Hoveyda (hàng 2 và hàng 4 **Bảng 3.1**).

3.3. Tổng hợp các peptidomimetic chứa khung biaryl

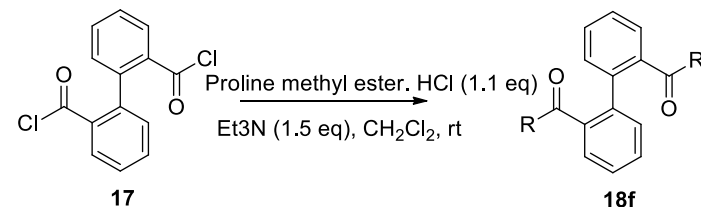
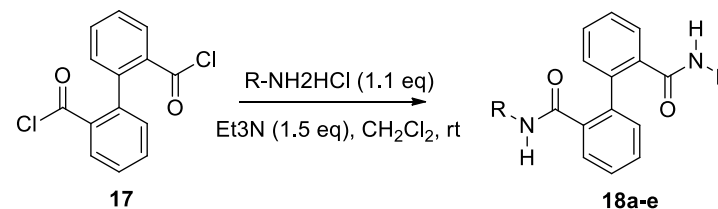
3.3.1. Tổng hợp các peptidomimetic chứa khung 2,2'-biphenyl diacid

Việc tổng hợp khung 2,2-biphenyl diacid được thực hiện dễ dàng từ chất đầu là acid anthranilic. Bằng phản ứng cộng hợp của muối diazoni chúng tôi đã tổng hợp được biphenyl acid (**16**) với hiệu suất 62%. Có rất nhiều phương pháp để tổng hợp vòng biphenyl diacid như phản ứng Ulman hay một số phản ứng sử

dụng xúc tác kim loại chuyển tiếp như phản ứng Suzuki-Miyaura, phản ứng Stille, phản ứng Negishi ... nhưng phương pháp đi từ chất đầu acid anthranilic được thực hiện khá dễ dàng và cho hiệu suất tốt. Trong quá trình tổng hợp chúng tôi bắt đầu bằng phản ứng tổng hợp biphenic diacid bằng phản ứng diazo hóa amin trong sự có mặt của NaNO_2 và dung dịch HCl đặc tại nhiệt độ 0°C sau 30 phút thu được muối diazonium. Các muối diazonium ngay sau đó được chuyển thành biphenic biacid bằng dung dịch khử $\text{Cu}^{2+}/\text{NH}_2\text{OH}$ tại 10°C, sau khi tinh chế chúng tôi thu được chất (**16**) với hiệu suất 62 %. Để có thể thực hiện phản ứng amide hóa, acid (**16**) được chuyển hóa thành dạng chlorua acid của nó bằng việc đun hồi lưu trong SOCl_2 trong vòng 8 giờ rồi làm bay hơi dưới áp suất thấp. Chlorua acid (**17**) được dùng trực tiếp cho chuyển hóa tiếp theo mà không cần tinh chế lại.



Sơ đồ 3.6: Tổng hợp biphenyl diacid



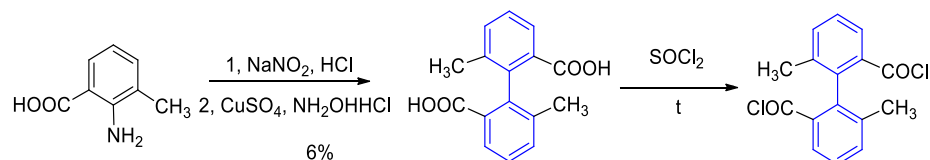
Sơ đồ 3.7: Tổng hợp các biphenyl peptid

Các peptid-2,2'-biphenyl (**18a-18f**) được tổng hợp thành công bằng việc ghép cặp các acid amin và chloride acid (**17**) trong dung môi CH₂Cl₂ và triethylamine ở nhiệt độ phòng cho hiệu suất trung bình khoảng 50-70%, riêng chỉ có phản ứng với threonin thu được hiệu suất thấp (16%).

Bảng 3.2: Hiệu suất phản ứng

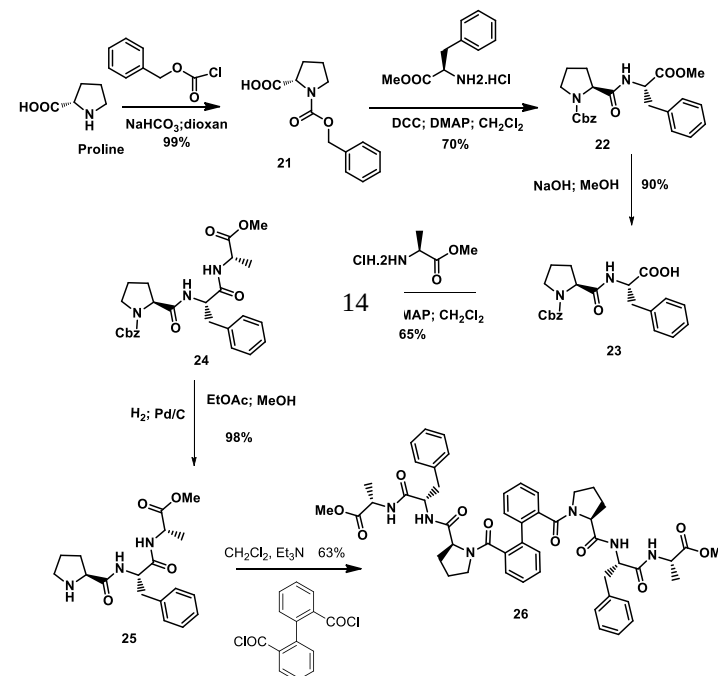
STT	Dẫn xuất	R	Hiệu suất (%)
1	18a		55
2	18b		60
3	18c	13	63
4	18d		16
5	18e		53
6	18f		67

3.3.2. Tổng hợp các peptidomimetic chứa khung 6,6'-dimethyl-2,2'-biphenyl diacid



Sơ đồ 3.8: Tổng hợp dẫn xuất chứa khung 6,6'-dimethyl-2,2'-biphenyl
Chuỗi peptid mục tiêu được thiết kế bằng việc thực hiện ghép cặp ba

acid amin cơ bản là Proline, Phenylalanine và Alanine. Chúng tôi lựa chọn Prolin làm acid amin đầu tiên trong chuỗi peptid nhằm giảm các cấu hình của chuỗi do cấu trúc vòng đặc biệt của Prolin giúp cản trở sự quay xung quanh chuỗi peptid.

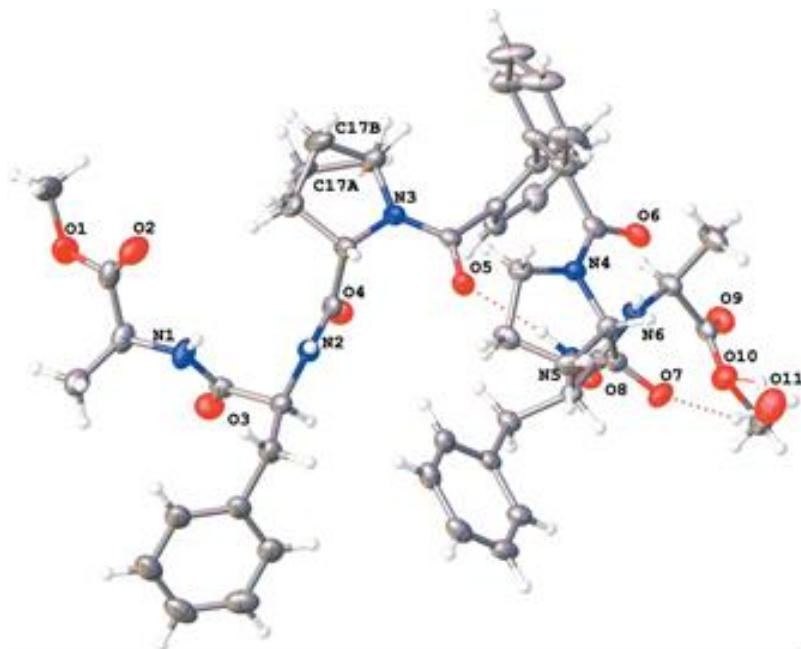


Sơ đồ 3.9: Tổng hợp chuỗi peptid

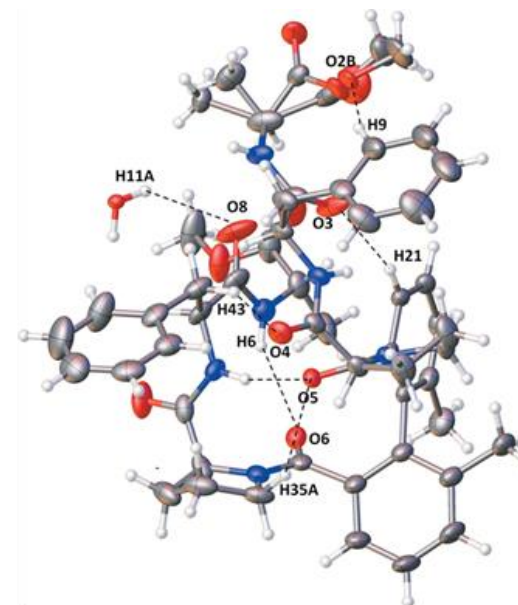
Từ Proline tự nhiên, nhóm chức amin được bảo vệ dưới dạng cacbamat bằng nhóm bảo vệ Cbz trong sự có mặt của NaHCO₃, dung môi dioxan, phản ứng thu được acid (**19**) với hiệu suất cao 98%. Từ acid (**21**) thực hiện phản ứng amide hóa với HCl.L-PheAla-OMe theo điều kiện phản ứng được phát triển bởi Steglich (DCC/DMAP) thu được sản phẩm (**22**) với hiệu suất 70%. Nhóm chức ester của phenylalanine (**22**) được phá bảo vệ dễ dàng trong môi trường kiềm (NaOH/MeOH) sau đó tiếp tục thực hiện phản ứng amide hóa với HCl.Ala.OMe trong sự có mặt của DCC/DMAP/, dung môi DCM tại nhiệt độ phòng thu được chuỗi 3 acid amin (**24**) với hiệu suất 65%. Phá bảo vệ chọn lọc nhóm N-Cbz thu được chuỗi peptid ngắn có chứa ba acid amin (**25**) với hiệu suất (98%) (**Sơ đồ 3.9**).

3.3.3. Cấu trúc tinh thể của biphenyl peptid

Đơn tinh thể của các hợp chất (26-27) thu được bằng cách làm bay hơi chậm tại nhiệt độ phòng trong dung môi methanol. Cấu trúc phân tử của peptid-2,2'-biphenyl (26-27) được xác định bằng phương pháp phân tích nhiễu xạ tia X đơn tinh thể (*single X-ray diffraction*). Cả hai cấu trúc đều cho thấy sự xuất hiện của liên kết hydro nội phân tử (Hình 3.2 và 3.3).

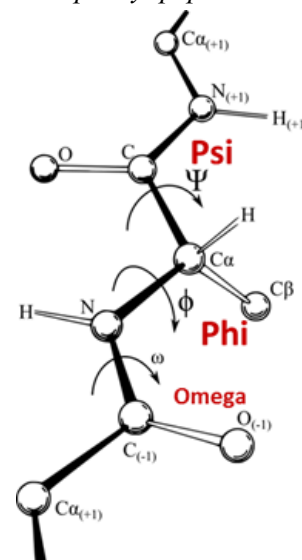


Hình 3.2: Cấu trúc tinh thể hợp chất 26



Hình 3.3: Cấu trúc tinh thể hợp chất 27

3.3.3.1. Cấu trúc tinh thể của biphenyl peptid 26



Hình 3.4: Hình minh họa các loại góc xoắn ϕ , ψ , ω trong peptid

Phi (Φ) là góc xoắn tạo bởi liên kết Ca-N, **Psi (ψ)** là góc xoắn tạo bởi liên kết C-Ca, **omega (ω)** là góc xoắn tạo bởi liên kết N-C

Bình luận về cấu trúc (Structural commentary)

Dữ liệu nhiễu xạ tia X đơn tinh thể cho thấy cấu trúc của hợp chất 2,2'-[[(2S,2'S)-2,2'-{[(2S,2'S)-1,1'-([1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarbonyl)bis(pyrrolidine-1,2-diyl-2-carbonyl)]bis(azanediyl)}bis(3-phenylpropanoyl)]bis(azane-diyl)](2S,2'S)-dipropionate) liên kết với $\frac{1}{2}$ phân tử H₂O.

Một trong hai vòng proline được cho thay đổi theo hai dạng cấu hình và nguyên tử C17 được chọn để chuẩn hóa dữ liệu bằng cách sử dụng mô hình phân tách với tỷ lệ sử dụng là 0,746 (11) và 0,254 (11). Một liên kết hydro nội phân tử được hình thành giữa các nhóm NH và CO của hai tripeptide với khoảng cách 2,04 Å (N5-H5...O5=C19, xem **Bảng 3.3, Hình 3.2**), ngắn hơn một chút so với báo cáo trước đây (Ranganathan và cộng sự). Các vòng benzen C20–C25 và C26–C31 gần như vuông góc với nhau, với góc lưỡng diện giữa chúng là 84,4 (4)°. Một đặc điểm thú vị là tính không đồng phẳng giữa mỗi vòng phenyl và nhóm CO của liên kết peptid gắn vào. Góc xoắn tạo bởi C26-C31-C32=O6, C26-C31-C32-N4 và C25-C20-C19=O5, C25-C20-C19-N3 lần lượt là 59,8 (4)°, -123,0 (3)° và -85,9 (4)°, -96,8 (4)°. Góc xoắn ω , Φ , ψ dọc theo hai mạch trục tripeptide được cho ở **Bảng 3.3**. Góc xoắn Φ , ψ của các amino acid Phe2, Pro4, Phe6 (như được trình bày **Bảng 3.3**) tương ứng với vùng α trong biểu đồ Ramachandran, trong khi đối với các amino acid Pro1 và Ala3 thì vùng β được quan sát thấy.

3.3.3.2. Cấu trúc tinh thể của biphenyl peptid 27

Bình luận về cấu trúc

Hợp chất dimetyl 2,2'-[[(2S,2'S)-2,2'-{[(2S,2'S)-1,1'-(6,6'-dimetyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarbonyl)bis(pyrrolidine-1,2-diyl-2-carbonyl)]bis(azanediyl)}bis(3-phenylpropanoyl)]bis(azanediyl)](2S,2'S)-dipropionat (**Hình 3.3**) kết tinh trong cùng với một phần tư phân tử nước.

Hai nhóm methyl đã được đưa vào các vòng biphenyl ở vị trí 6,6' để hạn chế sự quay của hai vòng phenyl trung tâm trong dung dịch. Ở trạng thái rắn, góc lưỡng diện giữa hai vòng biphenyl C20–C25 và C27–C32 là

73,8 (3)°. Giá trị này tương tự với giá trị của hợp chất (26) trước đó không mang nhóm methyl và của dẫn xuất biphenyl peptid do Mann và các cộng sự công bố. Sự thay đổi của nhóm methyl và methoxycarbonyl của alanine được quan sát thấy trong cấu trúc tinh thể với tỷ lệ chiếm chỗ là 0,502 (6): 0,498 (6). Cấu trúc khung của hai đoạn tripeptide được đặc trưng bởi các góc xoắn ω , Φ , ψ (**Bảng 3.3**)....

Đặc tính của siêu phân tử

Hình dạng không gian của sản phẩm biphenyl peptid tinh thể còn được đặc trưng bởi liên kết hydro ngoại phân tử N-H...O, O-H...O và C-H...O (**Bảng 3.4, Hình 3.10**). Tương tác liên phân tử mạnh nhất được hình thành giữa các nhóm NH và CO của hai gốc peptid lân cận N1-H1...O4, với d = 2,01 Å. Ngoài ra, có thêm sáu liên kết hydro liên phân tử. Hai liên kết được thiết lập giữa phân tử nước và hai tripeptide (O11-H11A...O8; C13-H13...O11). Bốn liên kết giữa C-H...O=C với độ dài H...O từ 2,39 đến 2,60 Å củng cố thêm việc định hình hình dạng không gian tinh thể. Một yếu tố cần quan tâm nữa là các phân tử được liên kết bởi hai tương tác liên phân tử C-H... π , một tương tác giữa nguyên tử H vòng proline và vòng phenyl của amino acid phenylalanine, tương tác còn lại giữa nguyên tử H của nhóm methyl và vòng phenyl của nhóm biphenyl trung tâm.

Bảng 3.3: Góc xoắn ω , Φ , ψ của hợp chất 27

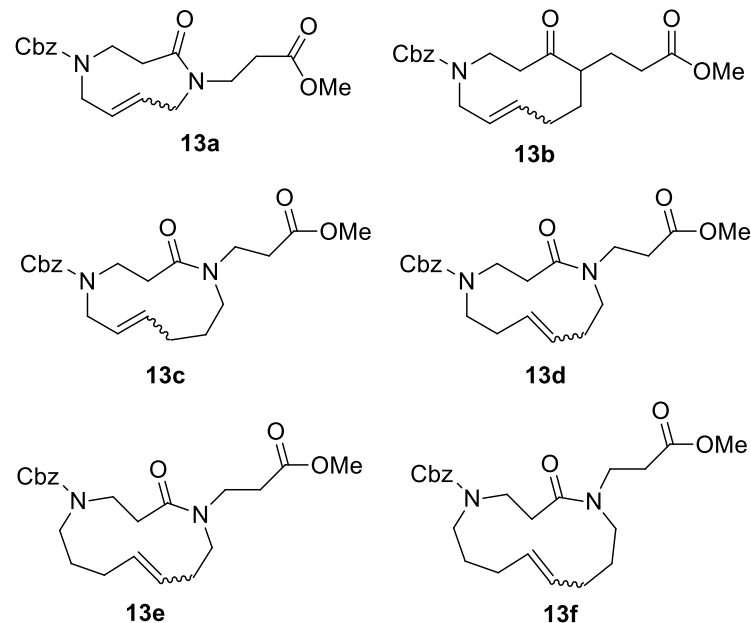
Các nguyên tử tạo góc xoắn	Góc (Å, chuẩn không xác định)	Các nguyên tử tạo góc xoắn	Góc (Å, chuẩn không xác định)
C20-C19-N3-C15	178.3 (2)	C32-C34-N4-C38	-164.6 (2)
C19-N3-C15-C14	-73.4 (3)	C34-N4-C38-C39	-69.1 (3)
N3-C15-C14-N2	-17.5 (3)	N4-C38-C39-N5	-14.4 (4)
C15-C14-N2-C6	176.5 (2)	C38-C39-N5-C40	-177.2 (2)
C14-N2-C6-C5	-163.0 (2)	C39-N5-C40-C48	-106.8 (3)

Các nguyên tử tạo góc xoắn	Góc (Å, chuẩn không xác định)	Các nguyên tử tạo góc xoắn	Góc (Å, chuẩn không xác định)
N2-C6-C5-N1	171.4 (2)	N5-C40-C48-N6	18.6 (3)
C6-C5-N1-C3	-174.8 (3)	C40-C48-N6-C49	179.1 (2)
C5-N1-C3-C2B	-58.0 (5)	C48-N6-C49-C51	-60.9 (3)
N1-C3-C2B-O2B	-39.6 (13)	N6-C49-C51-O9	-35.0 (4)

Bảng 3.4: Hình học của liên kết hydro (Å) hợp chất 27

<i>D</i> -H... <i>A</i>	<i>D</i> -H (Å)	H... <i>A</i> (Å)	<i>D</i> ... <i>A</i> Å (Chuẩn không xác định)	<i>D</i> -H... <i>A</i> (Å)
N5-H5...O5	0.88	2.07	2.923 (3)	162
N6-H6...O6	0.88	2.42	3.233 (3)	154
C9-H9...O2B	0.95	2.35	3.270 (18)	164
C21-H21...O3	0.95	2.44	3.352 (4)	161
C35-H35A...O5	0.99	2.51	3.171 (4)	124
C43-H43...O4	0.95	2.59	3.443 (4)	149
N1-H1...O4 ⁱ	0.88	2.01	2.865 (3)	163
C1B-H1BB...O10 ⁱⁱ	0.98	2.46	2.913 (16)	108
C30-H30...O8 ⁱⁱⁱ	0.95	2.46	3.222 (4)	137
C35-H35...O7 ^{iv}	0.99	2.39	3.228 (4)	142
C52-H52B...O10 ^v	0.98	2.60	3.559 (5)	166
O11-H11A...O8	0.87	2.48	3.136 (6)	133
C13-H13...O11 ^{vi}	0.95	2.52	3.155 (7)	124
C36-H36B...Cg3 ^{vi}	0.99	2.94	3.845 (4)	152
C4A-H4AC...Cg5 ^{vii}	1.05 (8)	2.93 (7)	3.770 (8)	135 (5)

3.4. Thử nghiệm hoạt tính sinh học



Bảng 3.5. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư theo IC₅₀

Dòng tế bào	13a (μM)	13b (μM)	13c (μM)	13d (μM)	13e (μM)	13f (μM)	Doxorubicin (μM)
MCF-7	15.26 ± 0.5	8.76 ± 0.4	8.21 ± 0.3	7.81 ± 0.1	20.06 ± 1.2	22.78 ± 1.3	4.17 ± 0.2
MDA-MB-231	12.21 ± 0.6	16.68 ± 0.5	10.25 ± 0.2	9.85 ± 0.1	17.86 ± 1.3	18.67 ± 1.2	3.18 ± 0.1

Giá trị IC₅₀ của các hợp chất peptide tổng hợp được và chất đối chứng Doxorubicin được so sánh hiệu quả trên 1 dòng tế bào ung thư vú MDA-MB-231, MCF-7 (**Bảng 3.5**), (Doxorubicin: IC₅₀ = 3.18 ± 0.1 μM đối với dòng tế bào MDA-MB-231 và 4.17 ± 0.2 μM với dòng tế bào MCF-7).

KẾT LUẬN

1. Đã tổng hợp β -amino acid từ amino acid tự nhiên với hiệu suất cao, điều kiện đơn giản phù hợp với phòng thí nghiệm Hóa Dược và đặc biệt là sản phẩm thu được vẫn giữ được trung tâm bất đối. Các β -amino acid tổng hợp được là chất đầu cho các chuyển hóa tiếp theo để tổng hợp macrocyclic peptidomimetic.

2. Đã khảo sát và tối ưu điều kiện phản ứng RCM tạo thành macrocyclic peptidomimetic, phản ứng có độ chọn lọc tốt và hiệu suất cao. Áp dụng tổng hợp thành công 07 macrocyclic peptidomimetic chứa từ 9-13 cạnh bằng phản ứng RCM sử dụng xúc tác Grubbs-2.

3. Đã tổng hợp thành công các dẫn xuất biphenyl peptid với 2 chuỗi peptid đối xứng ở vị trí 2,2' vòng phenyl có chứa 1 hoặc 3 amino acid, trong đó gồm 6 hợp chất chứa 1 amino acid mỗi chuỗi và 2 hợp chất chứa 3 amino acid mỗi chuỗi. Dữ liệu nhiễu xạ tia X đơn tinh thể của 2 biphenyl peptidomimetic 26 và 27, cho thấy cả hai cấu trúc đều xuất hiện liên kết hydro nội phân tử, liên kết hydro liên phân tử. Các số liệu về góc xoắn giữa các amino acid của cả hai phân tử biphenyl peptidomimetic nằm trong vùng đồ thị Ramachandran cho xoắn α , hoặc phiến β , điều này cho phép thiết kế các chuỗi peptid tương tự mô phỏng cấu trúc bậc 2 của protein.

4. Đã tiến hành thử nghiệm hoạt tính sinh học của một số peptidomimetic tổng hợp được trên tế bào ung thư vú MDA-MB-231, MCF-7, kết quả cho thấy các peptidomimetic thử nghiệm đều ức chế tế bào ung thư vú với mức độ khác nhau, hợp chất 13d (với độ lớn 11 nguyên tử trong vòng) thể hiện khả năng ức chế tốt nhất, trong khi 13e và 13f có hoạt tính yếu rõ rệt so với các hợp chất khác trên cả 2 dòng tế bào.

KIẾN NGHỊ VỀ CÁC NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Tối ưu hóa cấu trúc macrocyclic peptidomimetic các hợp chất có cỡ vòng 9-12 nhằm thu được hoạt tính tốt hơn.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC
CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Lê Thúy Quỳnh, **Nguyễn Xuân Tứ**, Mạc Đình Hùng (2018), “Tổng hợp các dẫn xuất peptid chứa khung biaryl”, *Tạp chí Hóa học* Tập 56(6E1), tr. 108-111.
2. **Nguyễn Xuân Tứ**, Cao Thị Thương Thương, Nguyễn Thị Xuyên, Phan Phùng Huyền Uyên, Mạc Đình Hùng (2019), “Tổng hợp beta-amino acid từ amino acid tự nhiên”, *Tạp chí Phân tích Lý Hóa Sinh*, Tập 24(3).
3. Thuy Quynh Le, **Xuan Tu Nguyen**, Hung Huy Nguyen, Dinh Hung Mac and Thai Thanh Thu Bui (2020), “Crystal structure of a tripeptide biphenyl hybrid $C_{50}H_{56}N_6O_{10} \cdot 0.5H_2O$ ”, *Acta Cryst.* Vol. E76, pp.257-260.
4. Dinh Hieu Tran, **Xuan Tu Nguyen**, Thi Minh Chau Tran, Thuy Quynh Le, Chang Ho Oh, and Dinh Hung Mac (2020), “Synthesis of Macrocyclic β -Peptidomimetics by Ring-Closing Metathesis”, *ChemistrySelect* Vol. 5, pp.12232– 12235.
5. **Xuan Tu Nguyen**, Thuy Quynh Le, Tra My Bui Thi, Dinh Hung Mac and Thai Thanh Thu Bui (2020), “Synthesis and crystal structure of peptide dimethyl biphenyl hybrid $C_{52}H_{60}N_6O_{10} \cdot 0.25H_2O$ ”, *Acta Cryst.* Vol. E76, pp.1675–1678.