

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRẦN VĂN KẾT

**ỨNG DỤNG PHẢN ỨNG DOMINO VÀO TỔNG
HỢP CÁC DẪN XUẤT PODOPHYLLOTOXIN,
PYRIMIDINE VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH
HỌC CỦA CÁC CHẤT TỔNG HỢP ĐƯỢC**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

TRẦN VĂN KẾT

ỨNG DỤNG PHẢN ỨNG DOMINO VÀO TỔNG
HỢP CÁC DẪN XUẤT PODOPHYLLOTOXIN,
PYRIMIDINE VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH
HỌC CỦA CÁC CHẤT TỔNG HỢP ĐƯỢC

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 9.44.01.14

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

GS. TS. Nguyễn Văn Tuyên TS. Vũ Ngọc Doãn

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: " Ứng dụng phản ứng Domino vào tổng hợp các dẫn xuất Podophyllotoxin, pyrimidine và đánh giá hoạt tính sinh học của các chất tổng hợp được" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể giáo viên hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

NCS. Trần Văn Kết

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc và chân thành, đầu tiên em xin gửi lời cảm ơn tới Tập thể cán bộ hướng dẫn GS.TS. Nguyễn Văn Tuyên - Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, TS. Vũ Ngọc Doãn - Học viện Kỹ thuật quân sự, Bộ Quốc phòng; đã trực tiếp giao đề tài và hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ em trong thời gian học tập và thực hiện các nội dung của luận án.

Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn đến các cán bộ, nghiên cứu viên của Phòng Hoá dược, Phòng Hoá sinh, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; các cán bộ, giáo viên Bộ môn Phòng Hoá, Khoa Hoá - Lý kỹ thuật, Học viện Kỹ thuật quân sự đã quan tâm, tạo mọi điều kiện tốt nhất cho cá nhân tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin được chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, các cán bộ, giáo viên của Học viện Khoa học và Công nghệ, Ban lãnh đạo, các cán bộ phụ trách đào tạo của Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ, tạo điều kiện về thời gian, thủ tục trong quá trình học tập tại Học viện.

Cuối cùng, xin được gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn ủng hộ, cổ vũ, động viên, đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

Trần Văn Kết

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC SƠ ĐỒ	vii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Quinoline quinone, dẫn xuất và tổng hợp	3
1.1.1. Hoạt tính sinh học của lớp chất quinolinequinone	3
1.1.2. Tổng hợp các dẫn xuất của quinolinequinone bằng phản ứng domino	6
1.1.3. Sử dụng phản ứng domino tổng hợp lớp chất 4-aza-podophyllotoxin	8
1.2. Tổng hợp các dẫn xuất của pyrano pyrimidine bằng phản ứng domino	11
1.3. Isatin, dẫn xuất và hoạt tính sinh học	15
1.3.1. Hoạt tính chống ung thư của các dẫn xuất chứa khung indole	15
1.3.2. Tổng hợp các dẫn xuất chứa khung indole bằng phản ứng domino	17
1.4. Các phương pháp tổng hợp thân thiện với môi trường	25
1.4.1. Áp dụng siêu âm trong tổng hợp hữu cơ	25
1.4.2. Tổng hợp hữu cơ bằng vi sóng	26
Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM	28
2.1. Hóa chất, thiết bị	28
2.2. Tổng hợp các dẫn xuất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng (161a-m)	28
2.3. Quy trình tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin (174a-n)	36
2.3.1. Tổng hợp các dẫn xuất isatin bằng phản ứng ankylation	36
2.3.2. Thực hiện phản ứng domino	37
2.4. Quy trình tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin với AZT (182a-p)	46
2.5. Quy trình tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin với Erlotinib (184a-e)	59
2.6. Tổng hợp các dẫn xuất indole-pyrano[2,3-d] pyrimidine (188a-l)	62
2.7. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học	70
2.7.1. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư in vitro	70
2.7.2. Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase	71
2.7.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE)	72
2.7.4. Phương pháp phân tích chu kỳ tế bào	72
2.7.5. Xét nghiệm đo lưu lượng tế bào Annexin-V FITC và PI (apoptosis)	72

2.8. Phương pháp nghiên cứu docking phân tử	73
2.9. Nghiên cứu đặc tính “giống thuốc” và dự đoán ADMET	73
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	74
3.1. Mục tiêu của đề tài	74
3.2. Tổng hợp các dẫn xuất 4-aza podophyllotoxin chứa dị vòng (161a-m)	75
3.3. Kết quả tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin (174a-p)	83
3.3.1. Tổng hợp các dẫn xuất của isatin bằng phản ứng ankylation	83
3.3.2. Thực hiện phản ứng domino	87
3.4. Tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin-AZT (182a-p)	97
3.5. Tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin-Erlotinib (184a-e)	103
3.6. Kết quả tổng hợp các dẫn xuất indole-pyrano[2,3- <i>d</i>] pyrimidine (188a-l)	107
3.7. Đánh giá, thử nghiệm hoạt tính sinh học của các chất tổng hợp được	114
3.7.1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các dẫn xuất (161a-m)	115
3.7.2. Hoạt tính gây độc tế bào của lớp chất (182a-p)	117
3.7.3. Hoạt tính gây độc tế bào của lớp chất (184a-e)	118
3.7.4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào các dẫn xuất (174a-n)	119
3.7.5. Phân tích chu kỳ tế bào hợp chất (174f) đối với dòng tế bào A549	120
3.7.6. Quá trình kích hoạt apoptosis của hợp chất (174f)	121
3.7.7. Đánh giá hoạt tính ức chế α -Glucosidase (188a-l)	123
3.7.8. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase (188a-l)	124
3.8. Kết quả nghiên cứu docking phân tử	125
3.8.1. Nghiên cứu docking phân tử hợp chất (174f)	125
3.8.2. Dẫn xuất hợp chất 4-aza-podophyllotoxin chứa các dị vòng (161a-m)	130
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	135
TÀI LIỆU THAM KHẢO	138

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Diễn giải tiếng Việt
A549	Dòng tế bào ung thư phổi A549
AchE	Enzyme acetylcholinesterase
AcOH	Axit Acetic
AIDS	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải do virus HIV
ATPase	Enzyme Adenosine 5'-TriPhosphatase
br s	Tín hiệu broad singlet
[bmim ⁺][Br ⁻]	Hợp chất 1-Butyl-3-methylimidazolium bromide
cAMP	Vòng Cyclic adenosine monophosphate-Adenosine monophosphate
CAN	Xúc tác Ceric ammonium nitrate
d	Tín hiệu doublet
DABCO	Hợp chất 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU	Hợp chất 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Dung môi Dichloromethane
dd	Tín hiệu doublet, doublet
DMF	Dung môi <i>N,N</i> -Dimethylformamide
DNA	Axit Deoxyribonucleic - Phân tử mang thông tin di truyền
EDDA	Axit Ethylene diamine diacetic
Et ₃ N	Hợp chất Triethylamine
EtOAc	Dung môi Ethyl acetate
HepG2	Dòng tế bào ung thư gan HepG2
HetAr	Hợp chất Aldehyde chứa dị vòng
HL-60	Dòng tế bào ung thư máu HL-60
HMBC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
HRMS	Phổ khối lượng phân giải cao
HT-29	Tế bào ung thư biểu mô trực tràng
IC ₅₀	Nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào
IR	Phổ hồng ngoại
KB	Dòng tế bào ung thư biểu mô KB
LDA	Hợp chất Lithium diisopropylamide
Lu-1	Dòng tế bào ung thư phổi Lu-1
m	Tín hiệu multiplet
MCF-7	Dòng tế bào ung thư vú MCF-7
MDA-MB-231	Tế bào màng phổi của bệnh nhân ung thư vú

MeCN	Dung môi Acetonitrile
Mn(OAc) ₃	Hợp chất Manganese(III) acetate
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
N/A	Giá trị Không xác định được
P388	Dòng tế bào ung thư bạch cầu ở chuột
PBS	Hợp chất Phosphate-buffered saline
PC-3	Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt
PC-3 Pd(OAc) ₂	Xúc tác Palladium (II) acetate
Ph ₃ P	Hợp chất Triphenylphosphine
p-TsOH	Axit <i>p</i> -Toluenesulfonic
q	Tín hiệu quartet
Rnase	Enzyme thủy phân liên kết của phân tử RNA (Ribonuclease)
rt	Nhiệt độ phòng
reflux	Đun hồi lưu
s	Tín hiệu singlet
SRB	Hợp chất sulforhodamine B
t	Tín hiệu triplet
td	Tín hiệu triplet, doublet
<i>t</i> -BuOH	Dung môi <i>tert</i> -Butanol
THF	Dung môi Tetrahydrofuran
TLC	Sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography)
¹³ C NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon ¹³ C
¹ H NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ¹ H

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 1.1. Quinoline và các thuốc chữa ung thư có chứa khung quinoline	3
Sơ đồ 1.2. Khung quinolinequinone và dẫn xuất 1-aza-anthraquinone	4
Sơ đồ 1.3. Các quinolinequinone được phân lập từ tự nhiên	4
Sơ đồ 1.4. Các dòng Marcanine được phân lập từ các cây họ măng cầu, xiêm.....	5
Sơ đồ 1.5. Cleitopholine và các dẫn xuất được phân lập từ <i>Porcelia macrocarpa</i>	6
Sơ đồ 1.6. Tổng hợp các dẫn chất benzo[h]pyrazolo[3,4-b] quinoline-5,10-dione	6
Sơ đồ 1.7. Tổng hợp các dẫn xuất benzo[g]quinoline-5,10-dione	7
Sơ đồ 1.8. Tổng hợp các chất benzo[g]quinoline-5,10-dione dùng xúc tác L-proline.....	7
Sơ đồ 1.9. Tổng hợp các dẫn xuất của benzo[g]quinoline-5,10-dione	7
Sơ đồ 1.10. Sử dụng phản ứng domino tổng hợp các dẫn xuất 1-aza-anthraquinone	8
Sơ đồ 1.11. Cấu trúc của Podophyllotoxin và lớp chất 4-aza-podophyllotoxin.....	8
Sơ đồ 1.12. Tổng hợp 4-azaphodophyllotoxin theo Takeya và Giorgi.....	9
Sơ đồ 1.13. Tổng hợp các hợp chất 4-aza- theo phản ứng Husson-3CR.....	9
Sơ đồ 1.14. Tổng hợp các hợp chất 4-aza-podophyllotoxin – acridinedione	9
Sơ đồ 1.15. Tổng hợp các dẫn xuất thiazolo[4,5-f]quinolin-9(6H)-one	10
Sơ đồ 1.16. Tổng hợp các hợp chất tetracyclic dihydropyridopyrazole	10
Sơ đồ 1.17. Sử dụng phản ứng domino tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin	11
Sơ đồ 1.18. Tổng hợp 4-aza-podophyllotoxin sử dụng xúc tác L-proline.....	11
Sơ đồ 1.19. Tổng hợp các dẫn xuất của Tetrahydro-2H -pyranopyrimidine.....	12
Sơ đồ 1.20. Tổng hợp các dẫn xuất của hexahydro- pyranopyrimidine.	13
Sơ đồ 1.21. Tổng hợp hệ 2 vòng trong điều kiện sử dụng xúc tác CAN.....	13
Sơ đồ 1.22. Tổng hợp dihydropyrano[2,3- d]pyrimidine-dione	14
Sơ đồ 1.23. Tổng hợp dẫn xuất 5H -chromenopyrimidinol	14
Sơ đồ 1.24. Cơ chế hình thành sản phẩm 5H -chromenopyrimidinol.....	14
Sơ đồ 1.25. Các dạng tautomer của indole.	15
Sơ đồ 1.26. Isatin và các thuốc chống ung thư chứa khung isatin.....	16
Sơ đồ 1.27. Tổng hợp các hợp chất hybrid của isatin 3-benzylidene-1,2,3-triazole.....	18
Sơ đồ 1.28. Tổng hợp hybrid isatin và coumarin bằng phản ứng click	18
Sơ đồ 1.29. Tổng hợp hybrid isatin-hydrazone-1,2,3 triazole.	19
Sơ đồ 1.30. Các dẫn xuất của Indole với với các hợp phần chống ung thư.....	20
Sơ đồ 1.31. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của indole-coumarine	20

Sơ đồ 1.32. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid indole-pyrimidine	21
Sơ đồ 1.33. Tổng hợp hybrid của isatin với các chalcone.....	22
Sơ đồ 1.34. Tổng hợp hybrid isatin bằng phản ứng ba thành phần	22
Sơ đồ 1.35. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của isatin với acetonephenone.....	23
Sơ đồ 1.36. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của isatin với xúc tác ion [bmim]Br	23
Sơ đồ 1.37. Tổng hợp các hybrid giữa isatin, chalcone và piperazin.....	24
Sơ đồ 1.38. Tổng hợp các dẫn xuất của Thiazolo-pyrrolidine-spirooxindole.....	24
Sơ đồ 1.39. Tổng hợp các hybrid của isatin với vòng pyrano[3,2-c]	25
Sơ đồ 1.40. Tổng hợp các dẫn xuất của spiro-acridine.....	25
Sơ đồ 3.1. Mục tiêu, chiến lược tổng hợp của đề tài.....	74
Sơ đồ 3.2. Tổng hợp chất 161a bằng phản ứng domino.....	75
Sơ đồ 3.3. Cơ chế hình thành sản phẩm 161 từ phản ứng domino bốn thành phần	80
Sơ đồ 3.4. Tổng hợp các dẫn xuất 161a-m bằng phản ứng domino bốn thành phần.....	81
Sơ đồ 3.5. Tổng hợp các hợp chất 161a-m bằng phản ứng domino ba thành phần	82
Sơ đồ 3.6. Cơ chế đề xuất hình thành hợp chất (161a-m) từ ba thành phần	83
Sơ đồ 3.7. Tổng hợp các dẫn xuất N- azidobut-2-en-isatin.....	83
Sơ đồ 3.8. Phản ứng alkyl hoá giữa isatin và bromide	85
Sơ đồ 3.9. Tổng hợp dẫn xuất 174m podophyllotoxin-isatin	87
Sơ đồ 3.10. Tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin.....	96
Sơ đồ 3.11. Cơ chế hình thành các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin	97
Sơ đồ 3.12. Tổng hợp dẫn xuất podophyllotoxin-isatin -AZT	98
Sơ đồ 3.13. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của podophyllotoxin-isatin với Erlotinib....	104
Sơ đồ 3.14. Cơ chế của phản ứng click sử dụng xúc tác Cu(I).....	106
Sơ đồ 3.15. Tổng hợp dẫn xuất hybrid 188a của indole-pyrano[2,3-d] pyrimidine.....	107
Sơ đồ 3.16. Tổng hợp các hợp chất hybrid 188a-l indole-pyrano[2,3-d]pyrimidine.....	113
Sơ đồ 3.17. Cơ chế đề xuất hình thành hợp chất 188	114

ix
DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 161a	77
Bảng 3.2. Các hợp chất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng 161a-m	81
Bảng 3.3. Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng theo các phương pháp khác nhau.....	86
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 174m	93
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất tổng hợp chất 174m	95
Bảng 3.6. Các dẫn xuất hybrid podophyllotoxin-isatin-naphthoquinone	95
Bảng 3.7. Kết quả qui kết và các tương tác chính của hợp chất 182a	100
Bảng 3.8. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid podophyllotoxin-isatin-AZT 182a-p	102
Bảng 3.9. Kết quả tổng hợp các hợp chất 184a-e	106
Bảng 3.10. Khảo sát dung môi, xúc tác và nhiệt độ cho tổng hợp dẫn xuất 188a	112
Bảng 3.11. Các hợp chất indole-pyrano[2,3-d]pyrimidine 188a-l	112
Bảng 3.12. Kết quả đánh giá gây độc tế bào của các dẫn xuất 161a-m	115
Bảng 3.13. Chỉ số SI thể hiện độc tính của các dẫn xuất 161a-m	116
Bảng 3.14. Kết quả thử hoạt tính độc tế bào của lớp chất 182a-p	117
Bảng 3.15. Kết quả gây độc tế bào của lớp chất 184a-e	118
Bảng 3.16. Kết quả thử nghiệm độc tính gây độc tế bào của lớp chất 174a-n	119
Bảng 3.17. Tỷ lệ tế bào A549 theo pha khi thử nghiệm với hợp chất 174f	121
Bảng 3.18. Tỷ lệ (%) tế bào apoptosis.....	122
Bảng 3.19. Kết quả ức chế enzym α -Gls của các dẫn xuất 188a-l	123
Bảng 3.20. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym AChE.....	124
Bảng 3.21. Dự đoán độc tính của hợp chất 174f sử dụng ADMETlab 2.0	129
Bảng 3.22. Năng lượng liên kết của các dẫn xuất với các cấu tử tương tác	132
Bảng 3.23. Dự đoán độc tính của hợp chất 161h, k sử dụng ADMETlab 2.0.....	134

DANH MỤC HÌNH

Hình 3.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 161a	76
Hình 3.2. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất 161a	77
Hình 3.3: Cấu trúc của hợp chất 161a và các tương tác chính trong phổ HMBC	77
Hình 3.4. Phổ HSQC của hợp chất 161a	78
Hình 3.5. Phổ HMBC của hợp chất 161a	79
Hình 3.6. Phổ HRMS của hợp chất 161a	79
Hình 3.7. Phổ IR của hợp chất N-but-2-en-isatin 169a	84
Hình 3.8. Phổ ^1H -NMR của hợp chất N- azidobut-2-en-isatin 169a	85
Hình 3.9. Phổ IR của hợp chất 174m	88
Hình 3.10. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 174m	89
Hình 3.11. Phổ giãn ^1H -NMR của hợp chất 174m	90
Hình 3.12. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 174m	90
Hình 3.13. Phổ dẫn ^{13}C -NMR của hợp chất 174m	91
Hình 3.14. Phổ HSQC của hợp chất 174m	91
Hình 3.15. Phổ HMBC của hợp chất 174m	92
Hình 3.16. Các tương tác chính trong phổ HMBC của hợp chất 174m	93
Hình 3.17. Phổ HR-MS của hợp chất 174m	94
Hình 3.18. Phổ IR của hợp chất 182a	99
Hình 3.19. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 182a	99
Hình 3.20. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 182a	100
Hình 3.21. Cấu trúc của hợp chất 182a và các tương tác chính trong phổ HMBC	102
Hình 3.22. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 184a	104
Hình 3.23. Phổ giãn ^1H -NMR của hợp chất 184a	105
Hình 3.24. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 184a	105
Hình 3.25. Phổ giãn ^{13}C -NMR của hợp chất 184a	106
Hình 3.26. Phổ ^1H -NMR và phổ giãn của hợp chất 187a	108
Hình 3.27. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 188a	108
Hình 3.28. Phổ IR của hợp chất 188a	109
Hình 3.29. Phổ ^1H -NMR của hợp chất 188a	110
Hình 3.30. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất 188a	110
Hình 3.31. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất 188a	111

Hình 3.32. Ảnh hưởng của nồng độ hợp chất 174f tới phân bố chu kỳ tế bào A549	121
Hình 3.33. Phân bố tập hợp apoptosis các tế bào A549 khi nhuộm Annexin-V/PI	122
Hình 3.34. Kết quả docking phân tử của hợp chất (174f) và ATP với CDK2/cyclin A	126
Hình 3.35. Docking phân tử của hợp chất 174f và roscovitine với CDK5/p25	127
Hình 3.36. Kết quả hoạt hoá quá trình apoptosis của hợp chất 174f và PAC-1	128
Hình 3.37. Các đặc tính lý, hoá dự đoán của hợp chất 174f	129
Hình 3.38. Vị trí xác lập trên tubulin và gắn kết các hợp chất	130
Hình 3.39. Tương tác của các hợp chất (161b, c, h, h) với các vị trí tại miền α , β -tubulin	131
Hình 3.40. Tỷ lệ (%) của năng lượng thành phần ở liên kết giữa phối tử với tubulin....	132
Hình 3.41. Biểu đồ ra đa biểu thị các đặc tính hoá lý của hợp chất (161h) và (161k) ...	134

MỞ ĐẦU

Thống kê của Bộ Y tế đã ghi nhận: các bệnh không lây nhiễm là nguyên nhân của hơn 70% các trường hợp tử vong, trong đó ung thư là nguyên nhân tử vong hàng đầu và trực tiếp gây ra gánh nặng bệnh tật lớn, chiếm 18,8% tổng số năm sống bị mất do bệnh tật (báo cáo Tại Hội nghị phòng, chống ung thư lần thứ 5 năm 2023 do Bộ Y tế tổ chức tại Đà Nẵng). Trong các phương pháp điều trị ung thư, hoá trị luôn là lựa chọn hiệu quả, do phương pháp này có khả năng giúp làm chậm sự phát triển của khối u, giảm nhẹ các triệu chứng của bệnh cũng như kiểm soát tốt tình trạng bệnh lý [1]. Tuy nhiên phương pháp điều trị này cũng có những hạn chế, nhất là đối với những bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối khi sức đề kháng của cơ thể giảm dần tới các tác động tiêu cực, ảnh hưởng trực tiếp tới chất lượng cuộc sống của bệnh nhân [2]. Do đó đòi hỏi các nhà khoa học cần tiếp tục nghiên cứu, thử nghiệm các loại thuốc mới có độc tính thấp, chọn lọc nhằm đáp ứng tốt nhất cho quá trình điều trị ung thư.

Các hợp chất có cấu trúc dị vòng chiếm hơn 85% trong số các loại thuốc có hoạt tính chống ung thư, trong đó hợp chất dị vòng chứa nitrogen chiếm tỷ lệ lớn, do chúng là những lớp chất phổ biến, được tìm thấy nhiều trong tự nhiên và trong tổng hợp. Hơn nữa với sự xuất hiện của các nguyên tử nitrogen trong cấu trúc phân tử cho phép các hợp chất này tương tác tốt hơn với các đại phân tử như enzym, protein và DNA, điều này đóng vai trò quan trọng giúp cải thiện đáng kể các tính chất dược lý của chúng [3].

Các hợp chất 4-azapodophyllotoxin là các dẫn xuất mà ở đó một nguyên tử nitrogen đã thay thế một nguyên tử carbon của khung podophyllotoxin, chúng được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu do có khả năng ức chế sự phát triển của nhiều dòng tế bào ung thư thông qua các cơ chế như: gây ra quá trình apoptosis, ngừng chu kỳ tế bào ở pha G2/M, ức chế quá trình polymer hoá tubulin [4-6], đặc biệt có độc tính giảm và ít tác dụng phụ hơn so với podophyllotoxin ban đầu [7]. Bên cạnh đó các dẫn xuất chứa khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine là các dị vòng của nitrogen được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học nổi trội như: khả năng chống ung thư, kháng lao, kháng khuẩn, kháng nấm và đặc biệt là khả năng chống oxi hoá mạnh, ức chế nhiều loại enzym khác nhau, bao gồm α -amylase, α -glucosidase, xanthine oxidase, AchE [8, 9].

Trong số các phương pháp tổng hợp xanh, thân thiện với môi trường đang được áp dụng trong nghiên cứu, tổng hợp các hợp chất hữu cơ hiện nay, phương pháp tổng hợp bằng phản ứng domino có nhiều ưu điểm vượt trội như: tăng tính chọn lọc và độ phức tạp của sản phẩm, giảm các bước tổng hợp trung gian, giúp cải thiện hiệu

suất của phản ứng, sử dụng ít dung môi, hóa chất...[10]

Xuất phát từ những lý do trên, tôi đã lựa chọn đề tài “***Ứng dụng phản ứng domino vào tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin, pyrimidine và đánh giá hoạt tính sinh học của các chất tổng hợp được***” làm nội dung nghiên cứu trong thời gian học nghiên cứu sinh, nhằm mục đích nghiên cứu, tổng hợp, thử nghiệm tìm ra các dẫn xuất mới của podophyllotoxin, pyrimidine có tiềm năng về hoạt tính sinh học. Đề tài được đánh giá có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, thiết thực, phù hợp với năng lực và điều kiện nghiên cứu tại Việt Nam. Nội dung của luận án sẽ tập trung nghiên cứu, khảo sát, áp dụng phản ứng domino, kết hợp cùng phản ứng click trong các điều kiện khác nhau để tổng hợp các dẫn xuất mới có chứa dị vòng nitrogen; tiến hành đánh giá, thử nghiệm hoạt tính sinh học đối với các chất tổng hợp được, kết hợp nghiên cứu docking phân tử nhằm xác lập cơ chế gây ra hoạt tính sinh học của các lớp chất này

Mục tiêu luận án

1. Sử dụng phản ứng domino:

Nghiên cứu tổng hợp và xác định cấu trúc các dẫn xuất của 4-azapodophyllotoxin chứa các dị vòng

Tổng hợp và xác định cấu trúc của các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin

Nghiên cứu, khảo sát, tổng hợp các dẫn chất của indole-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine

2. Áp dụng phản ứng domino kết hợp với phản ứng click tổng hợp các dẫn xuất của podophyllotoxin-isatin-AZT, podophyllotoxin-isatin-Erlotinib

3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư, hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và enzym acetylcholinesterase của các hợp chất tổng hợp được.

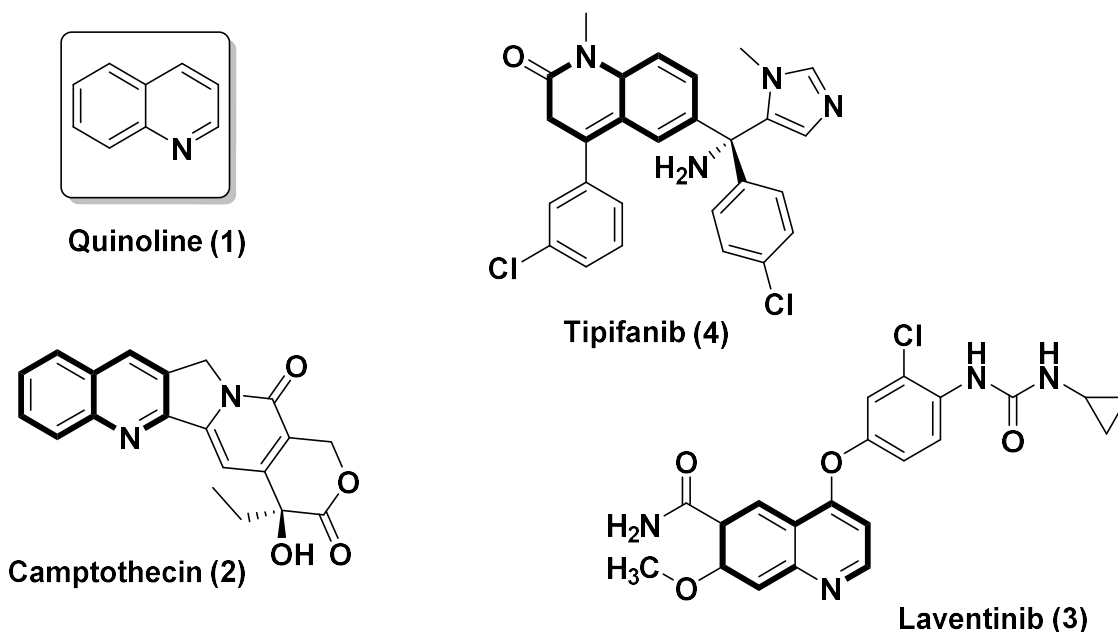
4. Tiến hành phân tích chu kỳ tế bào và đánh giá ức chế quá trình apoptosis

5. Nghiên cứu docking phân tử, dự đoán tính chất dược động học của một số hợp chất tiêu biểu, có hoạt tính ức chế tăng sinh mạnh một số dòng tế bào ung thư.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Quinoline quinone, dẫn xuất và tổng hợp

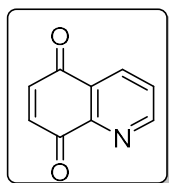
Khung quinoline (1) hay còn có tên gọi khác là 1-aza-naphthalene hoặc benzo[*b*]pyridine, cấu trúc gồm hai vòng benzen và pyridine được hợp nhất ở hai nguyên tử carbon lân cận, tạo thành cấu trúc vòng kép [11]. Hoạt tính sinh học của các dẫn xuất chứa khung quinoline khá phong phú và đa dạng như: khả năng kháng khuẩn, chống lao, sốt rét, kháng nấm - vi sinh vật và chống HIV... [12-14]. Đặc biệt các hợp chất chứa khung quinoline đóng vai trò quan trọng trong phát triển các loại thuốc chống ung thư do các dẫn xuất này có khả năng ức chế sự tăng trưởng kích thước của khối u thông qua quá trình ức chế enzym topoisomerase, protein kinase, ngăn chặn sự hình thành các mạch máu dẫn tới khối u hoặc điều chỉnh khả năng đáp ứng của thụ thể hạt nhân; tiêu biểu như các loại thuốc đang được sử dụng trong điều trị lâm sàng gồm: Camptothecin (2), Laventinib (3) và Tipifanib (4), (Sơ đồ 1.1) [15].



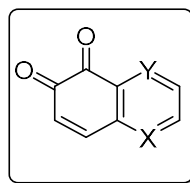
Sơ đồ 1.1. Quinoline và các thuốc chữa ung thư có chứa khung quinoline

1.1.1. Hoạt tính sinh học của lớp chất quinolinequinone

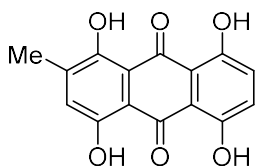
Các dẫn xuất của quinolinedione từ lâu đã được biết đến và sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu trong các ngành công nghiệp dược phẩm, hóa chất nông nghiệp và thuốc nhuộm... Trong số đó quinolinequinone hay quinoline-5,8-dione được đánh giá là ổn định và phổ biến nhất, xuất hiện nhiều trong tự nhiên và tổng hợp, so với các đồng phân khác của quinolinedione như: quinoline-5,6-dione hay quinoline-5,7-dione [16]. So với các hợp chất chứa khung quinoline, các loại thuốc chứa khung quinolinequinone thể hiện hoạt tính sinh học vượt trội do được bổ sung thêm các dị tố oxi, có khả năng tương tác về mặt hoá học và sinh học với các protein mục tiêu thông qua các liên kết hydro, nhờ đó giúp cải thiện khả năng chọn lọc và nâng cao hiệu lực, hiệu quả của thuốc [17].



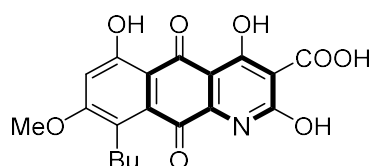
**Quinolinequinone
(5,8-quinolinedione)**



**X=N, Y=CH, quinoline-5,6-dione
X=CH, Y=N, quinoline-7,8-dione**



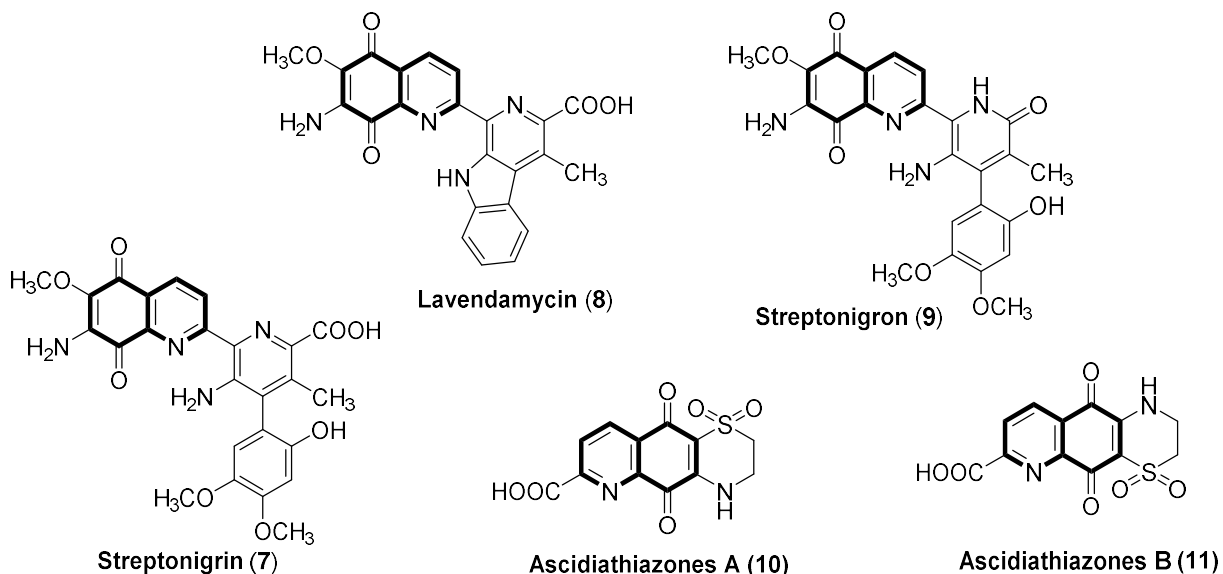
Cynodotin (5)



**Quinolinequinone
(1-aza-anthraquinone (6))**

Sơ đồ 1.2. Khung quinolinequinone và dẫn xuất 1-aza-anthraquinone

Năm 1940 Kogl và các cộng sự lần đầu tiên công bố phân lập được hai chất màu từ sợi nấm *Phoma terrestris* Hansen (sợi nấm gây ra bệnh rết hồng ở hành tây) trong đó có một hợp chất anthraquinone đã biết trước đó là Cynodontin (5), (Sơ đồ 1.2) chất thứ hai có chứa khung quinolinequinone (6) màu cam tương ứng với công thức $C_{19}H_{17}NO_8$ được nhóm của Kogl đề xuất là hợp chất 1-aza-anthraquinone và đây được coi là công bố đầu tiên về lớp chất dạng này [18].



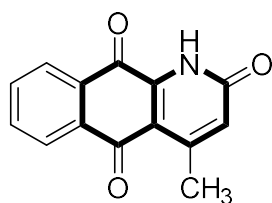
Sơ đồ 1.3. Các quinolinequinone được phân lập từ tự nhiên

Đến năm 1957 quinolinequinone tiếp theo là 7-aminoquinone (Streptonigrin 7), (Sơ đồ 1.3) được phân lập từ một loại xạ khuẩn có trong đất có tên *Streptomyces*. Alkaloid này cũng được tìm thấy trong các dòng vi khuẩn như: *Actinomyces*, *Streptomyces rufochromogenes* và *Streptomyces echinatus* [19, 20]. Gần đây một loạt các dẫn xuất có chứa khung quinolinequinone cũng đã được phát hiện và phân lập như Lavendamycin (8) và Streptonigrin (9), được phân lập từ loài *Streptomyces* [21, 22]. Hai hợp chất khác của quinolinequinone có tên là

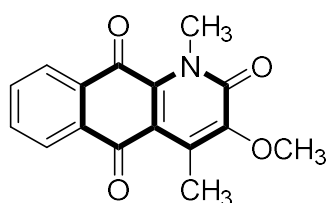
Ascidiathiazones A (10) và B (11) đã được phân lập từ loài *Ascidian aplidium* của New Zealand vào năm 2005 [23-25].

Hoạt tính sinh học của các quinolinequinone này đa dạng và phong phú như: khả năng chống ung thư, kháng khuẩn, kháng virus, chống sốt rét và chống viêm, chống HIV, kháng vi khuẩn lao [16, 26]. Tuy nhiên các nghiên cứu *in vitro* và tiền lâm sàng cho thấy chúng có độc tính cao, do đó các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng cho thuốc chống ung thư đã phải dừng lại ở giai đoạn II [17].

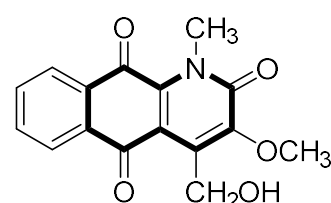
Trong các nghiên cứu sâu rộng hơn về hoạt tính sinh học của các dẫn xuất quinolinequinone, cụ thể là 1-aza anthraquinone cho thấy: các dẫn xuất này còn được phân lập, tách chiết từ các bộ phận của các cây thuộc họ măng cầu, xiêm (*họ Annonaceae*) phân bố rộng rãi ở các nước Đông Nam Á và đều cho thấy hoạt tính gây độc tế bào khối u ở người trên các hợp chất thuộc dòng Marcanine A, B, C, D và E, Sơ đồ 1.4 [27].



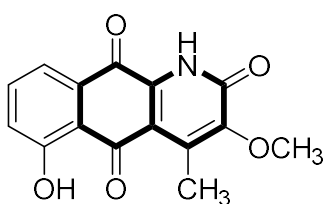
Marcanine A (12)



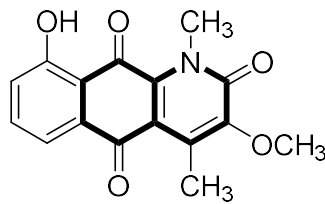
Marcanine B (13)



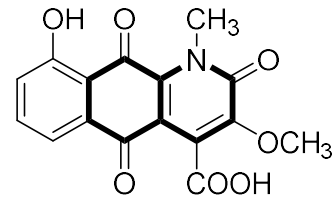
Marcanine C (14)



Marcanine D (15)



Marcanine E (16)

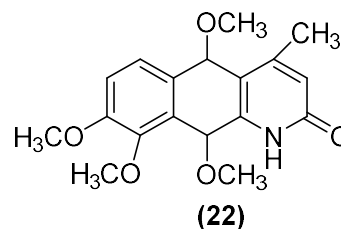
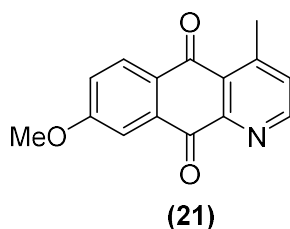
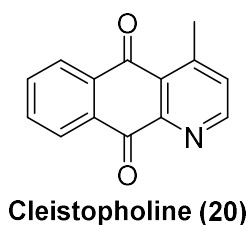


Marcanine G (17)

Sơ đồ 1.4. Các dòng Marcanine được phân lập từ các cây họ măng cầu, xiêm

Đến năm 2018, nhóm của Soonthornchareonnon đã chiết xuất và phân lập được Marcanine G và tiến hành đánh giá độc tính gây độc tế bào được thiết lập trên xét nghiệm SRB sử dụng doxorubicin làm đối chứng dương tính. Marcanine G được coi là hợp chất hoạt động mạnh nhất, cho thấy giá trị IC_{50} lần lượt là 14,87 và 15,18 μM đối với tế bào ung thư phổi (A549) và ung thư vú ở người (MCF-7) [28].

Ngoài khả năng chống khối u của các lớp chất thuộc dòng Marcanine đã được công bố rộng rãi. Các nhà khoa học tiếp tục tìm kiếm và phân lập được Cleistopholine (Sơ đồ 1.5), một loại azaanthraquinone từ rễ cây *Cleistopholis patens* ở Ghana [29]. Cleistopholine cho thấy hoạt tính gây độc đối với *Candida albicans* và *Cryptococcus neoformans*, các loài nấm ký sinh trên bệnh nhân AIDS, đặc biệt alkaloid này là tác nhân ức chế quá trình apoptosis trong ung thư buồng trứng ở người (CAOV-3) [30]. Cleistopholine cũng được tìm thấy trong dịch chiết từ *Porcelia macrocarpa* cùng với 6-methoxycleistopholine [31].

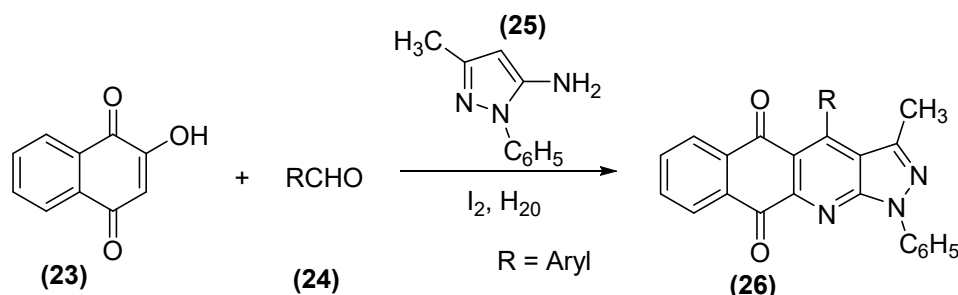


Sơ đồ 1.5. Cleitopholine và các dẫn xuất được phân lập từ *Porcelia macrocarpa*

1.1.2. Tổng hợp các dẫn xuất của quinolinequinone bằng phản ứng domino

Quy trình tổng hợp các hợp chất quinolinequinone có cấu trúc tương tự 1-aza-anthraquinone đã được biết đến thông qua các con đường khác nhau như sử dụng phản ứng Diels -Alder, phản ứng Friedel - Crafts, phản ứng cộng Michael kết hợp với quá trình mở rộng vòng hay quá trình vòng hóa gốc 6- *exo-trig* của enamine thay thế *N*- (2-alkenylaryl). Mặc dù các phương pháp này có nhiều tiện lợi, nhưng việc sử dụng các tác nhân kim loại độc hại và khả năng chọn lọc kém cùng với hiệu suất thấp, đòi hỏi cần tìm kiếm các phương pháp tổng hợp mới hiệu quả hơn [32].

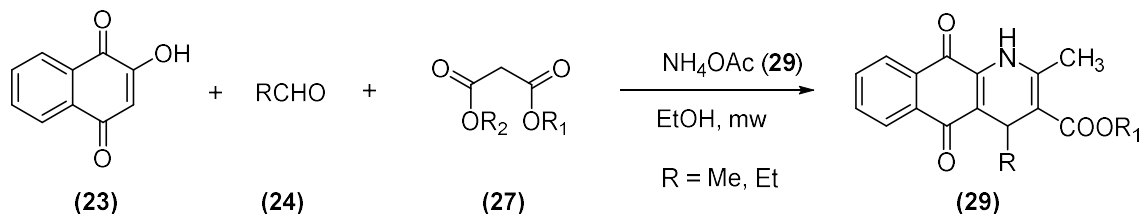
Phản ứng domino được biết đến lần đầu tiên vào năm 1996 xuất phát từ những nghiên cứu của Tietze và các cộng sự, đây là loại phản ứng xảy ra liên tục trong cùng một điều kiện nhất định, ở đó các nhóm chức mới được hình thành từ kết quả của các phản ứng trước đó theo dạng chuỗi cho đến khi hình thành sản phẩm đích, chuỗi mới dừng lại. Trong phản ứng domino, các phản ứng thành phần được kết hợp với nhau một cách đa dạng và liên hoàn như cộng hợp, đóng vòng, mở vòng, oxi hoá khử, ngưng tụ...do đó sản phẩm thu được sẽ có cấu trúc phức tạp nhất định, từ đó làm phong phú hơn so với các phương pháp tổng hợp truyền thống. Hơn nữa phản ứng domino còn góp phần tối ưu hoá các điều kiện phản ứng thông qua việc sử dụng ít hơn lượng dung môi, hoá chất; rút ngắn thời gian do không cần phải tinh chế, loại bỏ các hợp chất trung gian [33].



Sơ đồ 1.6. Tổng hợp các dẫn chất benzo[h]pyrazolo[3,4-b] quinoline-5,10-dione

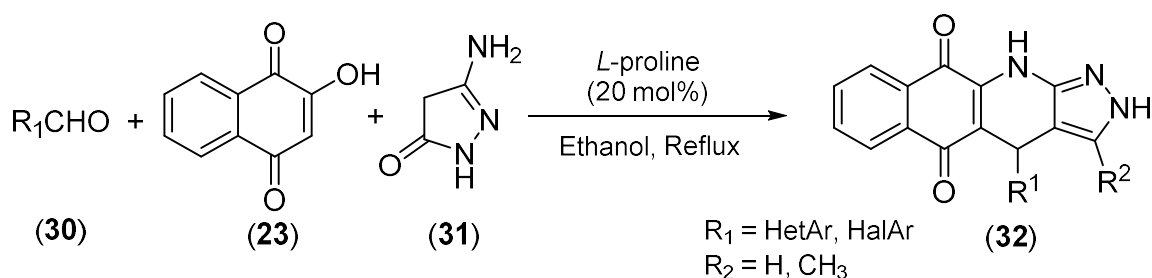
Năm 2010 Fang và nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp tổng hợp green, với xúc tác là I_2 trong dung môi nước (Sơ đồ 1.6) đã tổng hợp thành công dẫn xuất benzo[h]pyrazolo[3,4-b] quinoline-5,10-dione (**26**) bằng phản ứng domino 3 thành phần gồm: 2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone (**23**), aldehyde thơm (**24**) và amine (**25**) có chứa vòng pyrazolo; phản ứng có hiệu suất cao, thân thiện với môi trường [34].

Tương tự các dẫn xuất của benzo[g]quinoline-5,10-dione (**29**) cũng được Balasubramanian Devi và các cộng sự báo cáo tổng hợp thành công thông qua phản ứng domino 4 thành phần gồm: 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**23**); aldehyde thơm (**24**); methyl/ethyl acetoacetate (**27**) và ammonium acetate (**29**) trong thiết bị microwave với dung môi là ethanol (Sơ đồ 1.7) [35].



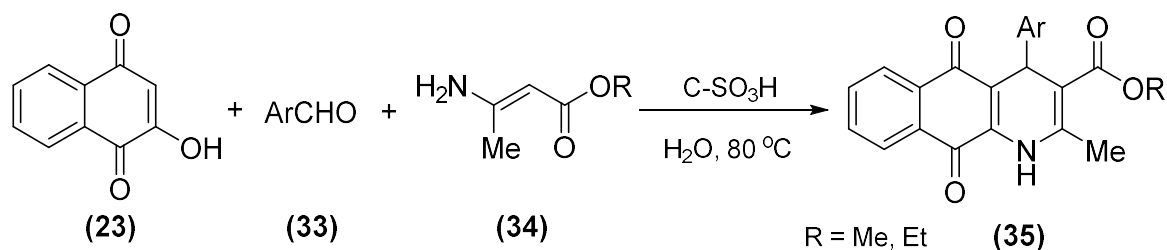
Sơ đồ 1.7. Tổng hợp các dẫn xuất benzo[g]quinoline-5,10-dione

Nhóm nghiên cứu này cũng đã sử dụng hợp chất *L*-proline làm xúc tác cho phản ứng tổng hợp các dẫn xuất 2*H*-benzo[g]pyrazolo[3,4-*b*] quinoline-5,10(4*H*,11*H*)-dione (**32**) từ 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**23**), aldehyde (**30**) và aminopyrazole (**31**). Quá trình phản ứng được biểu diễn theo Sơ đồ 1.8.



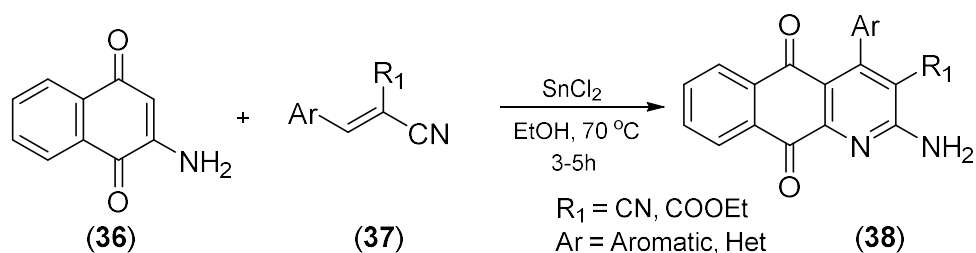
Sơ đồ 1.8. Tổng hợp các chất benzo[g]quinoline-5,10-dione dùng xúc tác L-proline

Bằng cách thay đổi dẫn xuất amin có chứa liên kết đôi chưa bão hòa ở vị trí carbon số 2, Chunmei Li và các cộng sự đã tổng hợp thành công hợp chất dihydrobenzo[g]quinoline-5,10-dione (**35**) từ 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**23**), aldehyde thơm (**33**) và (*E*)-3-amino-but-2-enoate (**34**) theo sơ đồ phản ứng 1.9 [36].



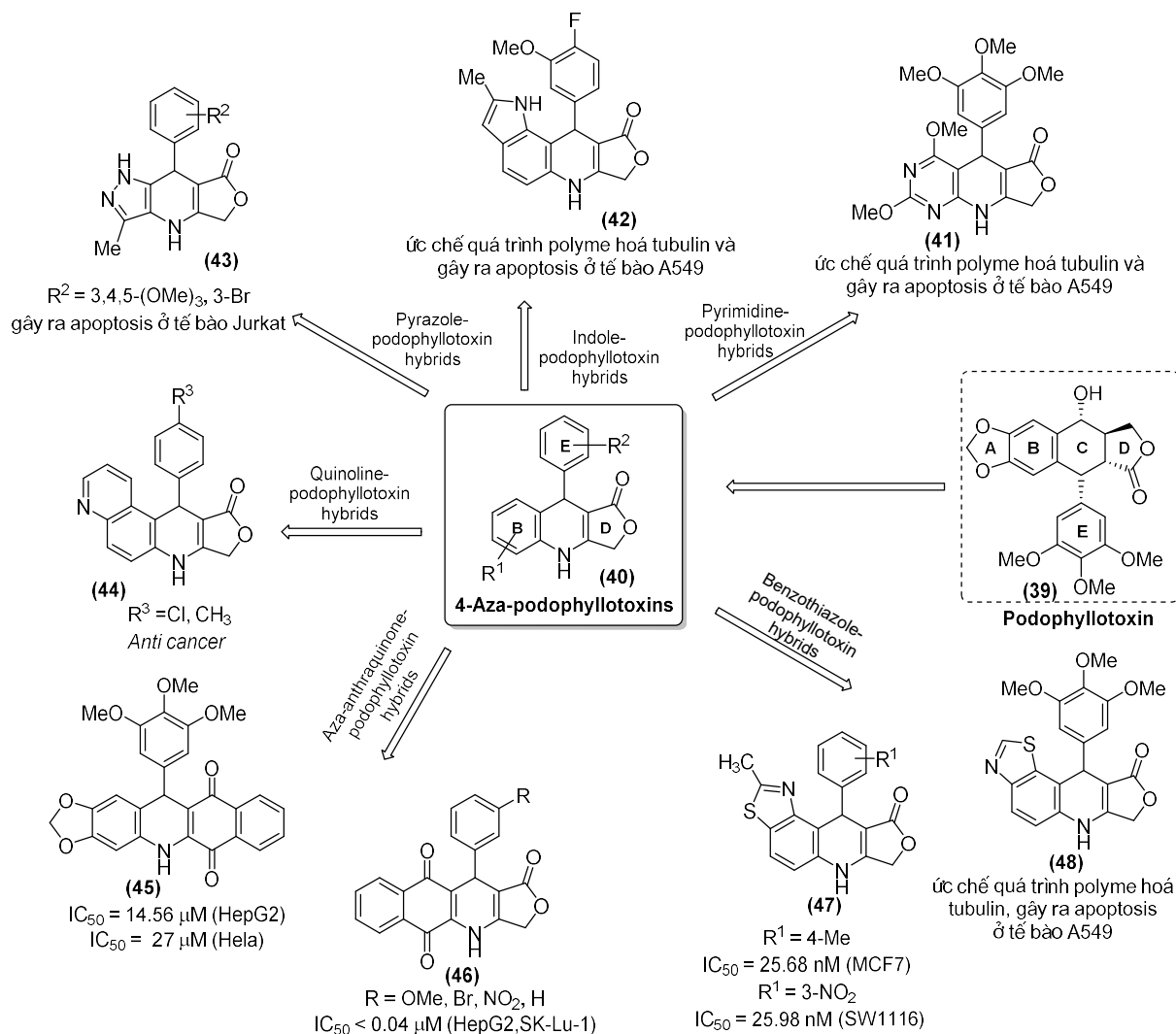
Sơ đồ 1.9. Tổng hợp các dẫn xuất của benzo[g]quinoline-5,10-dione

Sử dụng xúc tác là muối SnCl_2 Nampally và các cộng sự đã tổng hợp thành công các dẫn xuất của quinolinequinone từ 2-amino-1,4-naphthoquinone (**36**) và 2-benzylidenemalononitrile (**37**) thông qua phản ứng cộng Michael kết hợp quá trình đóng vòng nội phân tử (Sơ đồ 1.10). Quá trình phản ứng xảy ra êm dịu trong dung môi EtOH ở nhiệt độ 70 °C, sản phẩm thu được có hiệu suất tốt, dễ phân lập [37].



Sơ đồ 1.10. Sử dụng phản ứng domino tổng hợp các dẫn xuất 1-aza-anthraquinone

1. 1. 3. Sử dụng phản ứng domino tổng hợp lớp chất 4-aza-podophyllotoxin

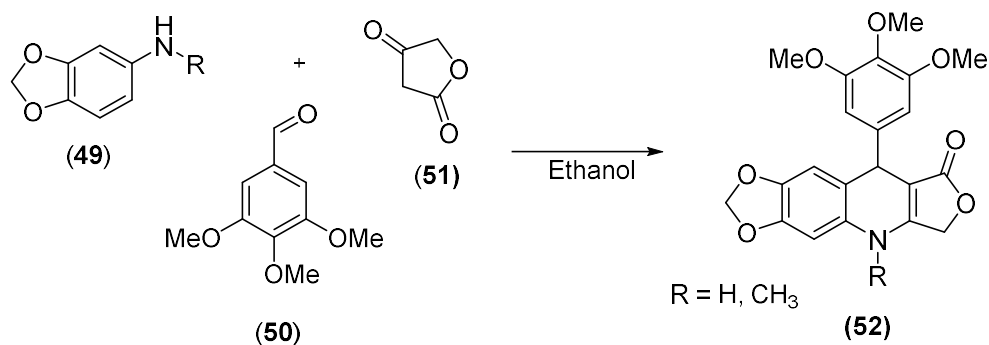


Sơ đồ 1.11. Cấu trúc của podophyllotoxin và lớp chất 4-aza-podophyllotoxin

Lớp chất 4-aza-podophyllotoxin (40) là các dẫn xuất của podophyllotoxin (39), trong đó nguyên tử carbon ở vị trí số 4, được thay thế bằng dị tố nitrogen. Từ chỗ podophyllotoxin có 4 nguyên tử carbon bất đối trên vòng C và hai vòng thơm với hệ thống 1,2-cis-2,3-trans tương ứng, sau khi chuyển hoá thành các dẫn xuất 4-aza-podophyllotoxin chỉ còn xuất hiện một trung tâm bất đối của nguyên tử carbon tại vị trí carbon C1. Đặc biệt khi thay thế các vòng A, B của lớp chất này bằng các dị vòng như: pyrimidine, indole, pyrazole, quinoline, anthraquinone hay benzothiazole... theo Sơ đồ 1.11, đã làm gia tăng đáng kể hoạt tính chống ung thư thông qua các cơ chế: ức

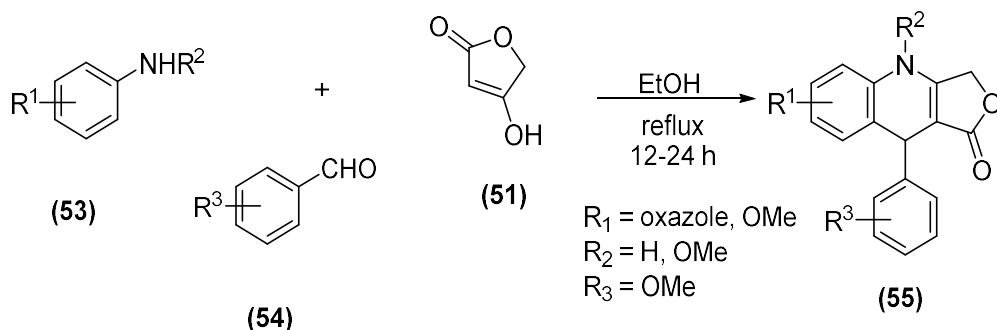
chế quá trình polyme hoá tubulin, ngăn chặn chu kỳ tế bào tại pha G2/M, ức chế quá trình apoptosis phụ thuộc caspase-3 hay ức chế sự hình thành vi ống và tác động gây rối loạn mạch máu...[4-6, 38-40].

Năm 2002 Giorgi-Renault và các đồng nghiệp đã tổng hợp thành công các dẫn xuất tương tự 4-azapodophyllotoxin (**52**) với hiệu suất cao (Sơ đồ 1.12) [41]. Đặc biệt nghiên cứu cũng chỉ ra rằng khi thay đổi nhóm methylenedioxy trên vòng A, B đều không ảnh hưởng đến hoạt tính chống ung thư của các dẫn xuất thu được [38, 39]

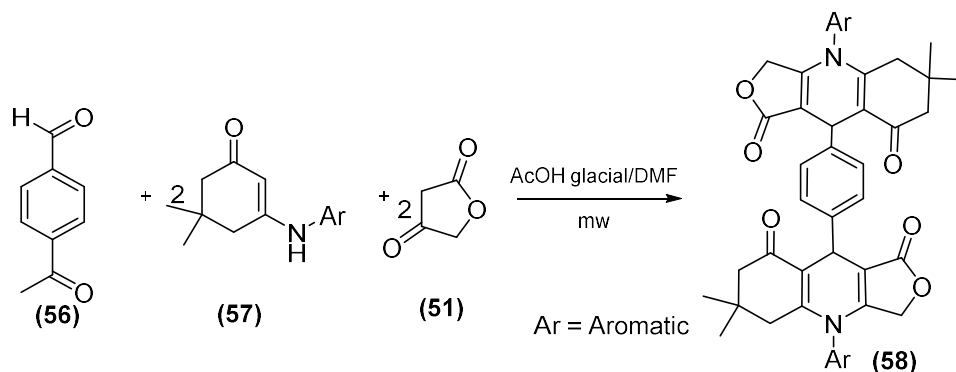


Sơ đồ 1.12. Tổng hợp 4-azapodophyllotoxin theo Takeya và Giorgi

Phản ứng Husson-3CR (Sơ đồ 1.13) được ứng dụng thành công vào việc tổng hợp các hợp chất 4-aza-2,3-didehydropodophyllotoxin (**55**) [41]. Dựa trên phản ứng Husson-3CR, khoảng 40 dẫn xuất 4-aza-2,3-didehydropodophyllotoxin đã được tổng hợp thành công [42].



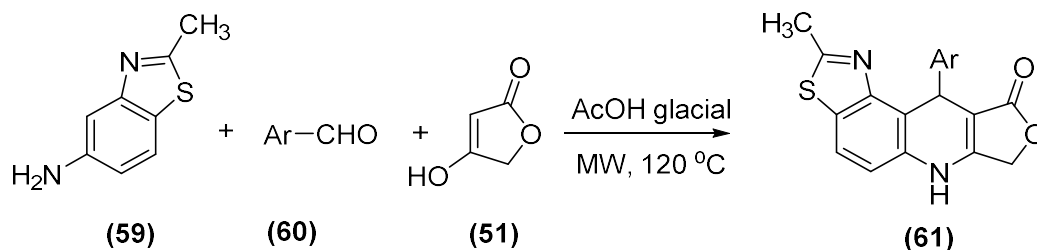
Sơ đồ 1.13. Tổng hợp các hợp chất 4-aza- theo phản ứng Husson-3CR



Sơ đồ 1.14. Tổng hợp các hợp chất 4-aza-podophyllotoxin – acridinedione

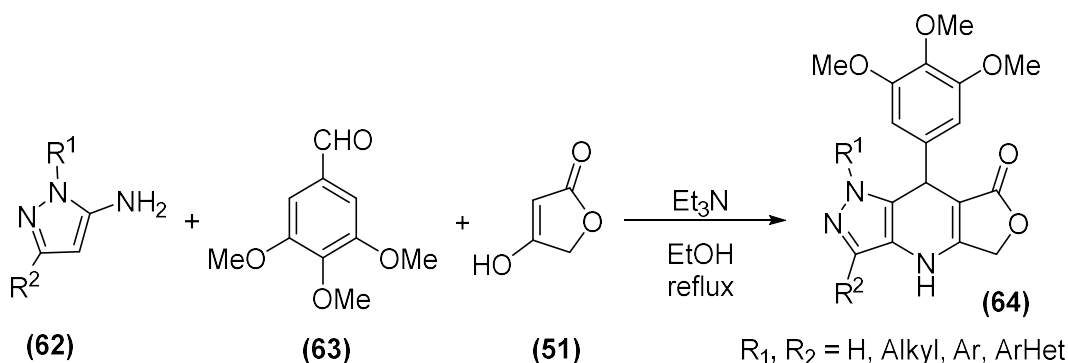
Năm 2009, Wang và cộng sự đã tổng hợp thành công hợp chất kép có chứa hai khung furo [3,4-*b*]quinoline và acridinedione (**58**) bằng phản ứng domino ba

thành phần giữa aldehyde thơm với *N*-aryl-enaminon và các hợp chất cyclic-1,3-dicarbonyl (acid tetronic (**51**) hoặc cyclohexan-1,3-dione) trong dung môi hỗn hợp của acid acetic băng và *N,N*-dimethylamide dưới chiếu xạ vi sóng không có chất xúc tác (Sơ đồ 1.14). Phương pháp này có ưu điểm hiệu suất tốt, quy trình thực hiện đơn giản [43].



*Sơ đồ 1.15. Tổng hợp các dẫn xuất thiazolo[4,5-*f*]quinolin-9(6*H*)-one*

Một loạt các dẫn xuất thiazolo[4,5-*f*]quinolin-9(6*H*)-one (**61**) cũng đã được tổng hợp bằng phản ứng domino giữa aldehyde, tetronic acid (**51**) và các dẫn xuất 2-methylbenzo[*d*]thiazole-5-amine (**59**) trong dung môi acetic acid băng ở điều kiện vi sóng, theo Sơ đồ 1.15. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư biểu mô hắc tố ác tính M14, dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến vú MCF-7 và dòng tế bào ung thư biểu mô ruột kết SW1116 [44].

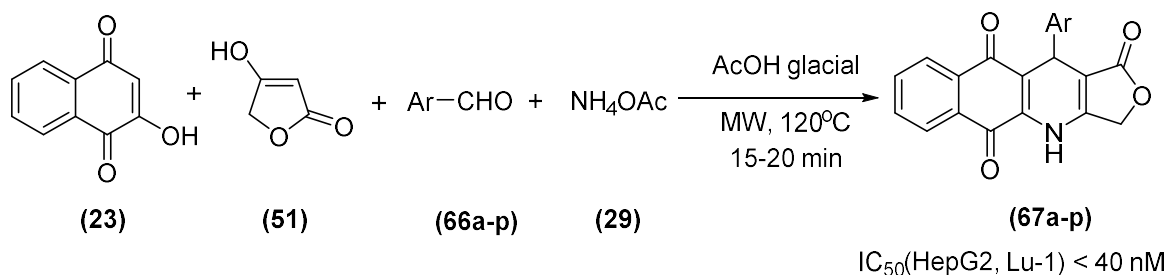


Sơ đồ 1.16. Tổng hợp các hợp chất tetracyclic dihydropyridopyrazole

Khi thay thế nhóm benzo[*d*]thiazole bằng các dị vòng chứa nitrogen như pyrimidine, indole nhận được các dẫn xuất furo[3,4-*b*]pyrrolo[2,3-*f*]quinolin-9-one hoặc furo[3,4-*b*]pyrazolo[3,4-*f*]quinoline-9-one có khả năng ức chế tubulin tương tự podophyllotoxin ngoại trừ sự gián đoạn của tổ chức vi ống bên trong tế bào. Hơn nữa, phân tích cho thấy các hợp chất furo[3,4-*b*]pyrrolo[2,3-*f*]quinolin-9-one hoặc furo[3,4-*b*]pyrazolo[3,4-*f*]quinoline-9-one dừng chu kỳ tế bào tại pha G2/M, dẫn đến quá trình apoptosis phụ thuộc caspase-3 [6]. Trong khi đó, khi đưa vòng pyrazole vào thay thế cho vòng B của podophyllotoxin nhận được các dẫn xuất tetracyclic dihydropyridopyrazole (**64**) (Sơ đồ 1.16) có khả năng ức chế một số dòng tế bào ung thư Hela, MCF-7/AZ, Jurkat ở nồng độ 50 μM [5]. Các hợp chất dị vòng này gây ra quá trình apoptosis của tế bào Jurkat trong vòng 24 giờ.

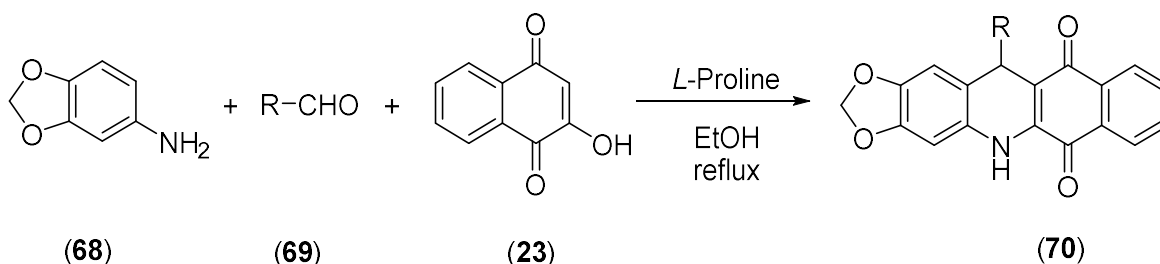
Áp dụng phản ứng domino nhóm nghiên cứu của GS Nguyễn Văn Tuyên và

cộng sự đã tổng hợp thành công 16 dẫn xuất của 4-aza-podophyllotoxin có khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư, tiêu biểu như các hợp chất (**67a**, **d**, **h** và **k**) có giá trị IC_{50} cỡ nM đối với dòng tế bào ung thư HepG2, Lu-1 (Sơ đồ 1. 17) [45].



Sơ đồ 1.17. Sử dụng phản ứng domino tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin

Năm 2010, lần đầu tiên *L*-proline được sử dụng làm xúc tác cho phản ứng tổng hợp 4-aza-podophyllotoxin [46] với hiệu suất đạt trên 90%. Xúc tác *L*-proline cũng được áp dụng cho phản ứng tổng hợp các hợp chất lai *p*-naphthoquinone-4-aza-podophyllotoxin (**70**) theo Sơ đồ 1.18.



Sơ đồ 1.18. Tổng hợp 4-aza-podophyllotoxin sử dụng xúc tác L-proline

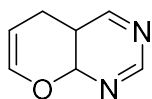
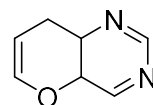
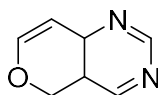
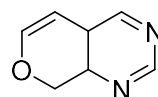
Như vậy có thể khẳng định, các dẫn xuất 4-aza-podophyllotoxin chủ yếu được tổng hợp bằng phản ứng domino ba thành phần giữa aldehyde thơm, tetronic acid và các amine khác nhau sử dụng dung môi ethanol hoặc acetic acid, tuy nhiên hiệu suất phản ứng cao nhất chỉ khoảng 80-85%, một số ít đạt khoảng 90%. Các hợp chất hybrid giữa naphthoquinone và podophyllotoxin cho giá trị ức chế các dòng tế bào ung thư trong khoảng IC_{50} từ: 20-200 μM . Điều này cho thấy, việc thay thế vòng γ -lactone (vòng D) trong cấu trúc của podophyllotoxin làm giảm hoạt tính của các chất tổng hợp được, do đó trong các nghiên cứu hầu hết không đề cập đến khả năng biến đổi hoặc thay thế vòng γ -lactone [46].

1.2. Tổng hợp các dẫn xuất của pyrano pyrimidine bằng phản ứng domino

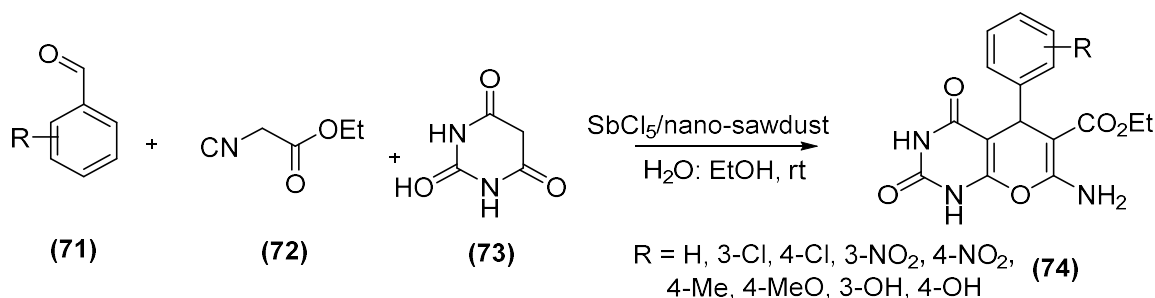
Pyrano pyrimidine là một lớp hợp chất dị vòng bao gồm một vòng pyrimidin với hai nguyên tử nitrogen ở các vị trí số 1 và số 3 của vòng uracil, hợp nhất với một vòng pyran có một nguyên tử oxy. Nhiều đồng phân khác nhau của lớp chất này đã được tìm thấy, nhưng phổ biến hơn cả là bốn khung chính bao gồm: 5*H*-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine, 8*H*-pyrano[3,2-*d*]pyrimidine, 8*H*-pyrano[3,4-*d*]pyrimidine và 5*H*-pyrano[4,3-*d*]pyrimidine [47].

Trong đó 5*H*-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine chứa đựng nhiều hoạt tính sinh học

vượt trội như: khả năng chống lại vi khuẩn lao H37Rv, kháng khuẩn, chống khối u, kháng vi sinh, chống viêm, chống oxy hóa, chống đái tháo đường, ức chế phosphatase tyrosine, chống tăng huyết áp, ức chế AChE, kháng virus và chống sốt rét [47, 48]

5*H*-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine8*H*-pyrano[3,2-*d*]pyrimidine5*H*-pyrano[4,3-*d*]pyrimidine8*H*-pyrano[3,4-*d*]pyrimidine

Phương pháp tiếp cận chung để tổng hợp các hợp chất dị vòng chứa bộ khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine đó là sử dụng các phản ứng đa thành phần của acid barbituric (**73**), malononitrile (**81**) và các aldehyde thơm trong môi trường bazơ [49-51]. Phần lớn các nghiên cứu tập trung vào việc tối ưu hoá các điều kiện phản ứng, rút ngắn thời gian, lựa chọn các chất xúc tác phù hợp, sản phẩm thu được dễ tinh chế, chọn lọc, sử dụng các loại dung môi thân thiện với môi trường.... Con đường tổng hợp các dẫn xuất chứa khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine thường sử dụng các phản ứng tạo hệ hai vòng, ba vòng, đa vòng hoặc tạo hệ vòng spiro; trong đó sử dụng phương pháp đóng vòng pyran dựa trên các phản ứng như: ngưng tụ Knoevenagel, phản ứng cộng Michael và ngưng tụ, đóng vòng nội phân tử là phổ biến và cho thấy hiệu quả cao nhất [52].

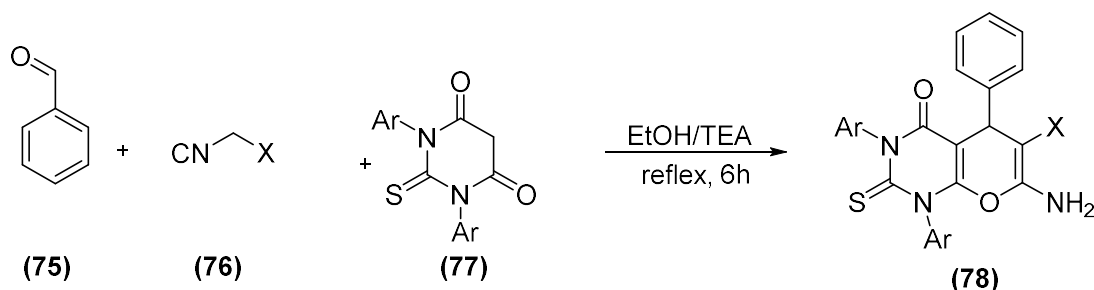


Sơ đồ 1.19. Tổng hợp các dẫn xuất của Tetrahydro-2*H*-pyranopyrimidine.

Oftadeh và các cộng sự đã tiến hành tổng hợp thành công 10 sản phẩm với hiệu suất tốt từ 92 - 98% trong đó có chứa hai vòng uracil và pyran bằng phản ứng domino 3 thành phần bao gồm ethyl cyanoacetat (**72**), acid barbituric (**73**) và các aldehyde thơm (**71**) sử dụng xúc tác là các hạt nano SbCl₅ phân tán trong mùn cưa theo sơ đồ 1.19 [53].

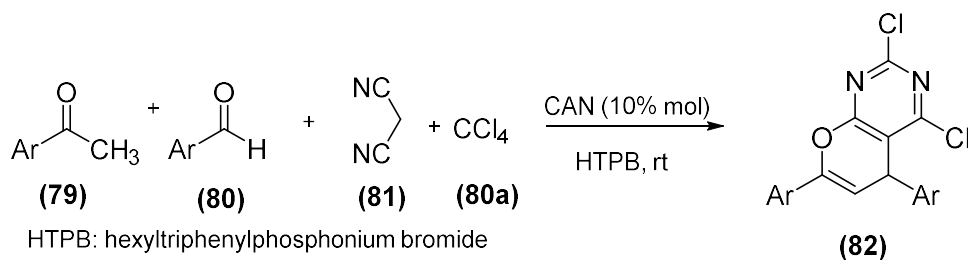
Khi thay thế acid barbituric bằng acid *N*, *N*-diaryl-thiobarbituric (**77**) và ethyl cyanoacetat (**72**) bằng malononitrile (**81**), sử dụng xúc tác là ethanol/TEA (Sơ đồ 1.20); Abd-Elaziz và các cộng sự đã thu được các dẫn xuất của tetrahydro-2*H*-

pyranopyrimidine với nhiều hoạt tính sinh học nổi trội. Cụ thể kháng khuẩn mạnh đối với các dòng vi khuẩn *Bacillus pumilis*, *Streptococcus faecalis* và *Enterobacter cloacae*, hoạt tính kháng nấm đối với các loại nấm *Candida albicans* và *Aspergillus niger*. Ngoài ra, các dẫn xuất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên các dòng tế bào ung thư ruột kết (Caco -2) cùng với tỷ lệ phần trăm khả năng sống của tế bào thấp nhất ở nồng độ mẫu cao hơn khi áp dụng xét nghiệm MTT [54].



Sơ đồ 1.20. Tổng hợp các dẫn xuất của hexahydro- pyranopyrimidine.

Bằng cách không cần sử dụng acid barbituric hoặc thiobarbituric, năm 2023 Bahrami và nhóm nghiên cứu đã sử dụng phản ứng domino 4 thành phần bao gồm: malononitrile (**81**), aryl aldehyde (**80**), carbon tetrachloride (**80a**) và acetophenone (**79**), sử dụng xúc tác CAN ở nhiệt độ phòng tạo để tạo ra các dẫn xuất hai vòng của pyranopyrimidine (**82**) theo Sơ đồ 1.21 [55].

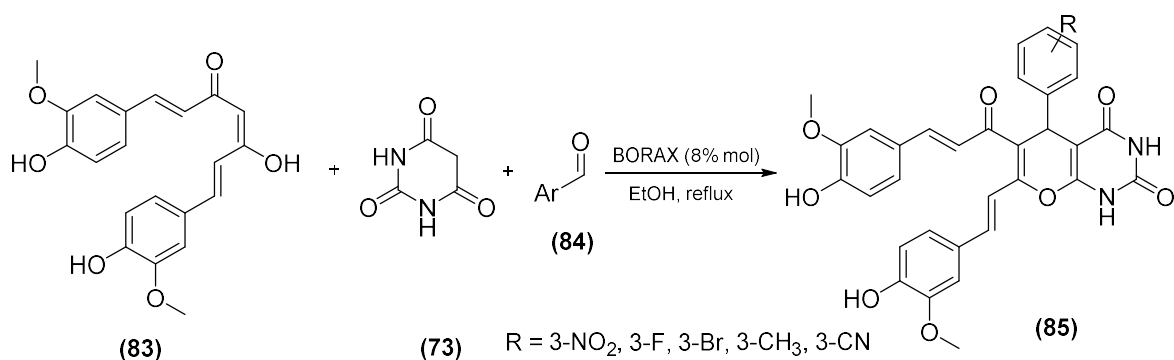


HTPB: hexyltriphenylphosphonium bromide
CAN: ceric ammonium nitrat

Sơ đồ 1.21. Tổng hợp hệ 2 vòng trong điều kiện sử dụng xúc tác CAN

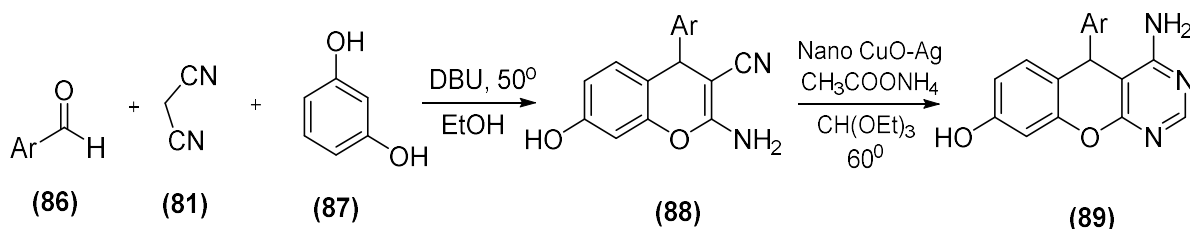
Cơ chế của phản ứng này được thực hiện bằng cách kích hoạt ban đầu nhóm methylene linh động trên acetophenone và aryl aldehyde bởi xúc tác CAN, sau đó tiến hành ngưng tụ Knoevenagel để tạo ra các hợp chất trung gian arylidene, chất trung gian được hình thành tương tác với malononitrile, vòng pyran nội phân tử và phản ứng với carbon tetrachlorua tạo ra chất trung gian chứa dichloro. Cuối cùng tạo thành sản phẩm thông qua quá trình loại bỏ HCl.

Năm 2020, Hasaninezhad và nhóm nghiên cứu đã báo cáo quá trình tổng hợp các dẫn xuất của dihydropyrano-pyrimidine-dione hai vòng thông qua phản ứng của curcumin với các aldehyde thơm và acid barbituric (**73**) bằng phản ứng domino (Sơ đồ 1.22) [56]. Các phản ứng được phát triển bằng cách sử dụng borax làm xúc tác với 10% mol trong ethanol. Các sản phẩm thu được thể hiện hoạt tính chọn lọc đối với bệnh đái tháo đường thông qua thử nghiệm ức chế enzym α -Glucoside, so với curcumin ban đầu.

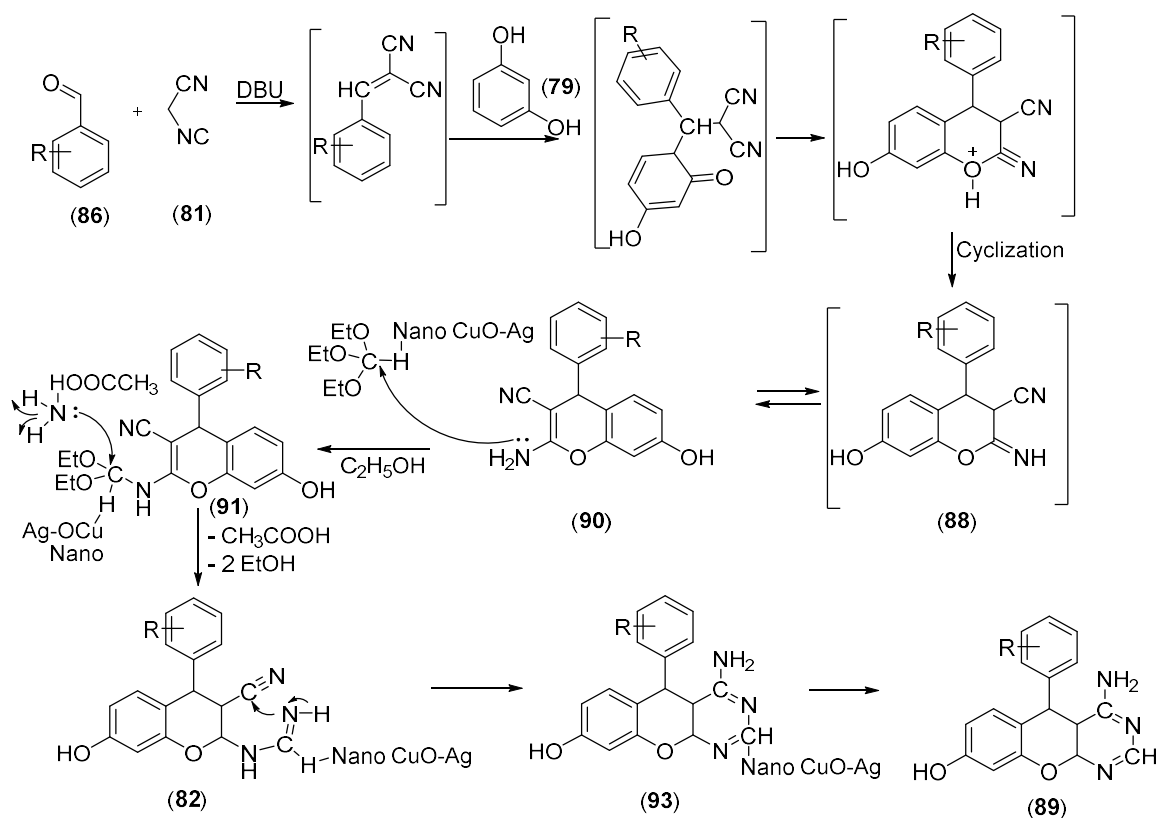


Sơ đồ 1.22. Tổng hợp dihydropyrano[2,3-*d*]pyrimidine-dione

Nhằm tạo ra các dẫn xuất của pyrano-pyrimidine có chứa nhiều hơn 2 dị vòng pyran và pyrimidine ban đầu, các nghiên cứu tập trung lựa chọn, thay thế các hợp chất dicarbonyl bằng các chất có ái lực tương tự, phản ứng xảy ra qua 2 hoặc 3 bước khác nhau. Poola và nhóm nghiên cứu đã tổng hợp được các dẫn xuất của 5*H*-chromenopyrimidinol (**89**) bằng cách kết hợp giữa phản ứng domino 3 thành phần và phản ứng ngưng tụ, đóng vòng sử dụng hệ xúc tác nano CuO-Ag (Sơ đồ 1.23) [57]



Sơ đồ 1.23. Tổng hợp dẫn xuất 5*H*-chromenopyrimidinol



Sơ đồ 1.24. Cơ chế hình thành sản phẩm 5*H*-chromenopyrimidinol

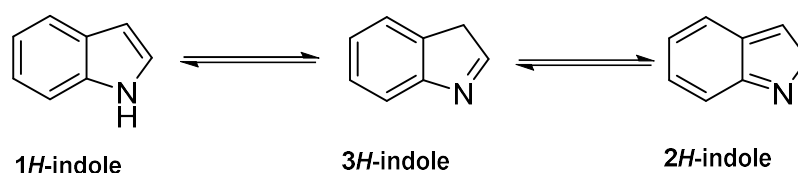
Cơ chế hình thành sản phẩm (Sơ đồ 1.24) được giải thích như sau: đầu tiên, các dẫn xuất của pyran nhận được thông qua phản ứng domino ba thành phần, trải qua lần lượt các phản ứng ngưng tụ Knoevenagel, cộng hợp Michael, đóng vòng nội phân tử; từ ba nguyên liệu ban đầu gồm: các aldehyde thơm (**86**), malanonitrile (**81**) và resorcinol (**87**); với sự có mặt của xúc tác DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) trong dung môi là ethanol ở 50 °C. Tiếp theo các dẫn xuất của pyran này được vòng hoá với sự tham gia của triethyl orthoformate ($\text{CH}(\text{OEt})_3$), amoni acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) và chất xúc tác nano CuO - Ag (4 mol %), sản phẩm cuối kết tinh dễ dàng mà không cần phải phân lập.

1.3. Isatin, dẫn xuất và hoạt tính sinh học

1.3.1. Hoạt tính chống ung thư của các dẫn xuất chứa khung indole

Trong tự nhiên, các hợp chất dị vòng chứa nitrogen phân bố rộng rãi và xuất hiện trong nhiều bộ khung của các hợp chất khác nhau như: alkaloid, vitamin, hormone, thuốc nhuộm, kháng sinh, thuốc diệt cỏ và dược phẩm. Trong đó các alkaloid được các nhà khoa học quan tâm vì chúng thể hiện nhiều đặc tính sinh học nổi trội, tiêu biểu như: morphin, isatin, caffeine, nicotine, thiamin và atropin...[58].

Khung indole được tạo thành từ một vòng pyrrole liên kết với một vòng benzen và phân tử có tính bazơ yếu, nó được biết đến với bản chất thơm do sự dịch chuyển của mười electron π trong phân tử. Indole có thể tồn tại ở ba dạng tautomer là: 1*H*-indole, 2*H*-indole và 3*H*-indole, chúng khác nhau ở vị trí của nguyên tử hydro trong cấu trúc (Sơ đồ 1.25). Các tautomer này có thể ảnh hưởng đến khả năng phản ứng hóa học và tương tác sinh học của các dẫn xuất chứa indole [59].



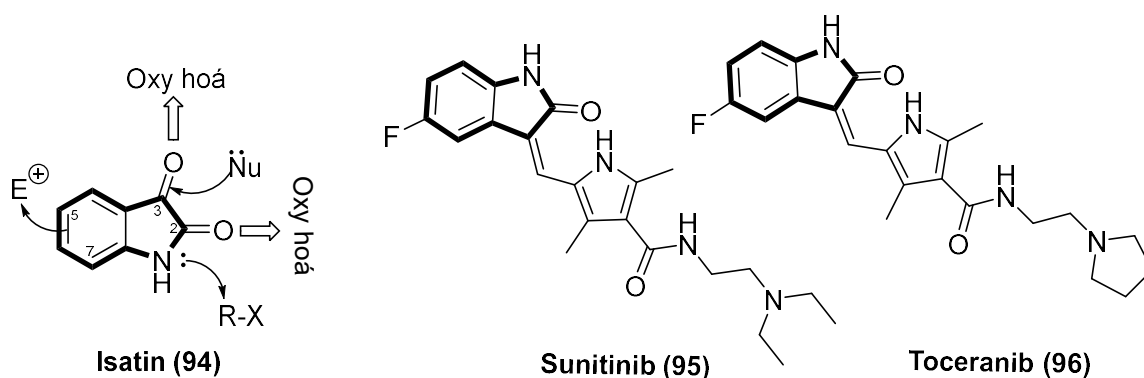
Sơ đồ 1.25. Các dạng tautomer của indole.

Các dẫn xuất chứa khung indole là những tác nhân chống ung thư tiềm năng do chúng có khả năng tác động lên các mục tiêu sinh học quan trọng khác nhau như: chất ức chế quá trình trùng hợp tubulin, ức chế protein kinase, histone deacetylase (HDAC), Carbonic Anhydrase IX và XII...[60].

Isatin (hay 1*H*-indole-2,3-dione) (**94**) là một dẫn xuất của indole xuất hiện ở nhiều loài thực vật như: *Isatis tinctoria*, *Couroupita guianensis* Aubl, *Melochia tomentosa* *Boronia koniamboensis* và *Melochia tomentosa*, có trong nấm *Streptomyces albus* [61, 62]. Ở động vật các dẫn xuất của isatin có mặt trong dịch tiết tại tuyến mang tai của ếch Bufo, hay ở động vật thân mềm *Dicathais orbita* [63]. Trên người, nó được xác định là chất chuyển hóa của tryptophan hoặc epinephrine và phân bố chủ yếu trong hệ thần kinh trung ương (CNS), ở các mô ngoại

vi cũng như dịch tiết của cơ thể [64].

Về mặt hoá học, isatin có chứa ba trung tâm hoạt động tương ứng với ba nhóm chức bao gồm: các phản ứng thế xảy ra trên vòng benzen tại các vị trí C-5, C-6, C-7; tương tác của nhóm carbonyl tại vị trí C-3 (đặc trưng cho phản ứng cộng nucleophil, spiro, phản ứng mở vòng, phản ứng Friedel-Crafts, phản ứng tự Aldol, phản ứng oxy hoá...); trên nguyên tử nitrogen như phản ứng thế hydro, *N*-alkyl, *N*-aryl và *N*-acyl... riêng tại vị trí C-2 do kém hoạt động về mặt hoá học do đó chỉ có thể tham gia phản ứng khi có các nhóm thế hút electron trên vòng benzen hoặc trên nguyên tử nitrogen, để tạo thành các hợp chất của indigo, indiribine và spiro [65-67].



Sơ đồ 1.26. Isatin và các thuốc chống ung thư chứa khung isatin

Hoạt tính sinh học của isatin và các dẫn xuất rất đa dạng và phong phú như khả năng chống ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế tiểu đường, chống co giật, HIV, chống sốt rét, chống viêm, giảm đau và chống lo âu, trầm cảm...[68-71]. Đặc biệt khả năng chống ung thư của lớp chất này được các nhà khoa học chú ý quan tâm bởi chúng có khả năng ức chế nhiều loại enzym chuyển hoá như: histone deacetylase (HDAC), carbonic anhydrase, tyrosine kinase cũng như ức chế quá trình trùng hợp tubulin trong các tổ chức sống của tế bào ung thư [62].

Hiện nay có 2 dẫn xuất của isatin đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận đưa vào sử dụng trong điều trị lâm sàng chống lại khối u: Sunitinib (95) điều trị khối u mô đệm đường tiêu hóa và ung thư biểu mô tế bào thận còn Toceranib (96), một hợp chất tương tự như Sunitinib, đã được FDA chấp thuận để điều trị khối u tế bào nhỏ từ năm 2009 [72]. Hiện nay nhiều loại thuốc chứa khung isatin tiếp tục được nghiên cứu, phát triển, sàng lọc, đưa vào thử nghiệm trên lâm sàng về khả năng ức chế tế bào khối u như: Nintedanib, Orantinib, Semaxinib [73] Methisazone, Hesperadin, Indolidan, Adibendan [74]. Kết quả nghiên cứu cho thấy các dẫn xuất của isatin có khả năng làm chậm, ngăn chặn sự phát triển của khối u thông qua quá trình ức chế sự phát triển, tăng sinh, di cư của các dòng tế bào ung thư với nhiều cơ chế phong phú và đa dạng. Tuy nhiên các dẫn xuất này cũng xuất hiện nhiều tác dụng phụ như: gây tăng huyết áp, nôn mửa, tiêu chảy, bệnh tay - chân - miệng và đặc biệt là khả năng suy giảm bạch cầu trung tính [73, 75]. Do đó hướng

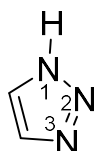
nghiên cứu lai tạo isatin với các dược chất có sẵn khả năng chống ung thư như: imin, azol, quinoline, quinazolin, sulfonamid, coumarin... được các nhà nghiên cứu quan tâm, phát triển nhằm tạo ra các hợp chất mới có cấu trúc đa dạng, phức tạp, tương tác chọn lọc và ít độc tính hơn [75].

1.3.2. Tổng hợp các dẫn xuất chứa khung indole bằng phản ứng domino

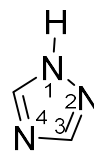
Lai hoá phân tử (hybird) đó là sự ghép nối, kết hợp hai hoặc nhiều dược chất có các đặc tính sinh học nổi trội lại với nhau tạo thành phân tử lớn, có những hoạt tính sinh học ưu việt hơn, bằng cách tạo ra các cầu nối liên kết hoặc tích hợp các khung chứa dị vòng với nhau [76]. Phương pháp này mang lại những lợi thế to lớn so với liệu pháp kết hợp trộn lẫn thông thường như: cải thiện dược động học và dược lực học, giảm tác dụng phụ của tương tác thuốc, làm giảm hiện tượng kháng thuốc, tăng cường hiệu lực, hiệu quả của thuốc và giảm độc tính [16, 74].

1.3.2.1. Tổng hợp các dẫn xuất của isatin với cầu liên kết 1,2,3-triazole

Triazole có công thức hóa học $C_2H_3N_3$, bao gồm một vòng dị vòng có ba nguyên tử nitrogen và hai nguyên tử carbon, nó còn có tên gọi khác là pyrrodiazole. Hợp chất này có tính thơm vì tất cả các nguyên tử của nó đều ở trạng thái lai hóa sp^2 và các electron π còn lại ở trạng thái linh hoạt, không cố định. Chúng được tổng hợp chủ yếu thông qua phương pháp Huisgen bằng cách đóng vòng 1,3-dipolar giữa các azide hữu cơ với alkyne, nhất là khi có mặt của xúc tác Cu(I), điều này giải thích vì sao lớp chất này không tồn tại trong tự nhiên. Chúng có 2 dạng đồng phân là 1H-1,2,3-triazole hoặc 1H-1,2,4-triazole [77, 78].



1H-1,2,3 triazole



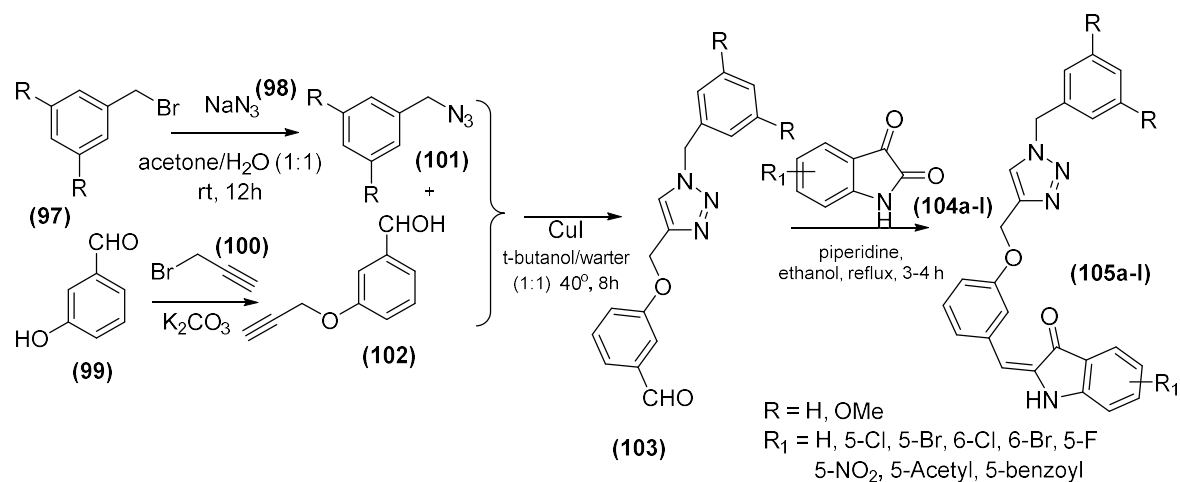
1H-1,2,4 triazole

1,2,3-triazoles thường được sử dụng làm tiền chất vì chúng ổn định trong nhiều phản ứng hóa học như phản ứng oxy hóa khử, phản ứng thủy phân acid-bazơ, khó bị phân huỷ khi gặp độ ẩm, ánh sáng...[79], ngoài ra chúng có khả năng hình thành liên kết hydro dễ dàng và có mô men lưỡng cực vừa phải, dễ tổng hợp, đặc biệt chúng có khả năng liên kết tốt với một số mục tiêu sinh học như: dihydrofolate reductase, DNA gyrase, sterol 14α -demethylase và DNA polymerase; điều này cho thấy tiềm năng sinh học vô cùng nổi trội của các lớp chất dạng này [80, 81].

Với mong muốn tạo ra các hợp chất có ít tác dụng phụ, khắc phục tình trạng kháng thuốc, giảm độc tính so với thuốc gốc ban đầu. Nhiều báo cáo cho thấy việc tạo ra các hợp chất hybrid giữa isatin với các thực thể chống khối u khác qua cầu liên kết 1,2,3-triazole đã góp phần giải quyết được những yêu cầu trên.

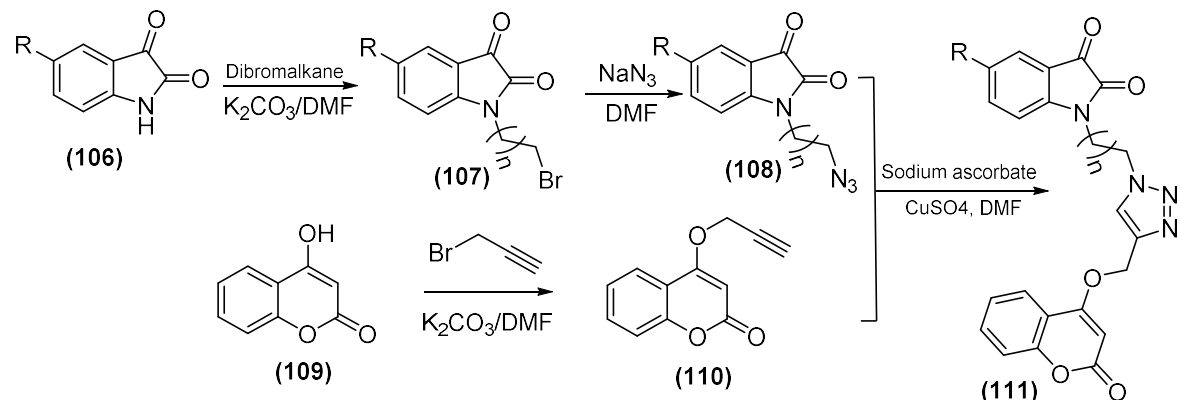
Năm 2016, Nagarsenkar và cộng sự đã tổng hợp thành công các hợp chất

hybrid giữa isatin với 3-benzylidene thông qua cầu nối liên kết vòng 1,2,3-triazole. Sản phẩm thu được qua 4 bước tổng hợp khác nhau từ các nguyên liệu cơ bản ban đầu theo Sơ đồ 1.27. Kết quả thử nghiệm cho thấy, giá trị ức chế đối với dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến (DU145) của hợp chất (**105I**) tương ứng với giá trị IC_{50} là 3,7 μ M, đồng thời hợp chất này an toàn với các tế bào tuyến tiền liệt bình thường (RWPE-1) trong cùng điều kiện thử nghiệm, ngoài ra nó còn cho thấy khả năng làm ngừng chu kỳ tế bào ở pha G2/M và gây ra sự sụp đổ của điện thế màng ty thể trên dòng tế bào thử nghiệm DU145 [82].



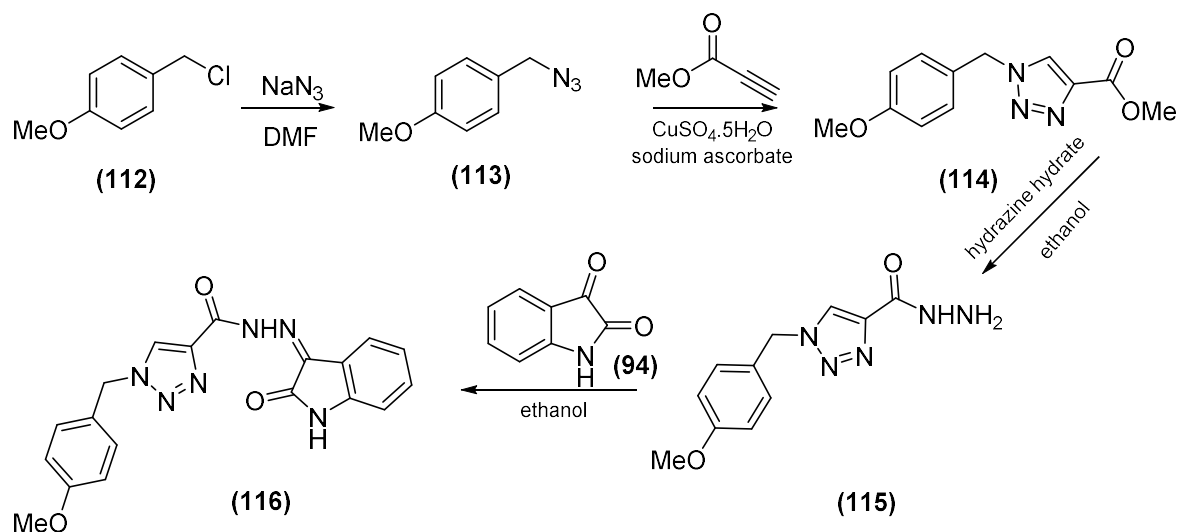
Sơ đồ 1.27. Tổng hợp các hợp chất hybrid của isatin 3-benzylidene-1,2,3-triazole

Trong nỗ lực tìm kiếm các hợp chất có khả năng kháng tubulin mạnh, chống lại các bệnh ung thư. Năm 2017, Sing và nhóm nghiên cứu đã phát triển lớp chất hybrid giữa isatin và coumarin thông qua cầu nối là 1,2,3-triazole bằng phản ứng click. Các lớp chất này có khả năng ức chế sự trùng hợp đối với tubulin ở giá trị IC_{50} tốt nhất là 1.06 μ M. Các nghiên cứu về tương tác của cấu trúc đến hoạt tính sinh học (SAR) cũng chỉ ra rằng: ảnh hưởng của các nhóm thế ở vị trí số C-5 cũng như độ dài dây alkane trong cầu kết nối isatin-1,2,3-triazole, tác động trực tiếp đến hoạt động chống tăng sinh của các dẫn xuất, chiều dài của mạch alkane sẽ làm tăng độ giãn cách và tương tác của nhóm thế halogen trên isatin chính là điều kiện tiên quyết để gia tăng hoạt tính chống ung thư đối với các hybrid dạng này (Sơ đồ 1.28) [83, 84].



Sơ đồ 1.28. Tổng hợp hybrid isatin và coumarin bằng phản ứng click

Quá trình thiết kế, lai hoá trực tiếp giữa isatin với hydrazone thông qua cầu nối 1,2,3-triazole đã giúp Anena và các cộng sự thu được lớp chất có khả năng ức chế protein kinase điều hòa ái lực vi ống 4 (MARK4), đây là một trong những kinase thường xuất hiện quá mức ở các tổ chức tế bào ung thư, do đó ức chế protein này sẽ góp phần giảm thiểu sự phát triển và di căn của khối u [85, 86]. Kết quả nghiên cứu, thử nghiệm cho thấy: lớp chất mới này có ái lực liên kết với albumin, vì vậy nó dễ dàng được vận chuyển ở trong hệ thống huyết thanh và xuất hiện tiềm năng ức chế đối với enzym thử nghiệm ở nồng độ thấp ($< 1 \mu\text{M}$), đồng thời chúng còn gây ra quá trình apoptosis ở các tế bào ung thư thử nghiệm MCF-7, MDA-MB-435 và HepG2 với các giá trị IC_{50} lần lượt là 6.22, 9.94 và $8.14 \mu\text{M}$. Cầu nối hydrazone được hình thành thông qua quá trình ngưng tụ giữa hydrazin với isatin trong ethanol theo Sơ đồ 1.29. [87].



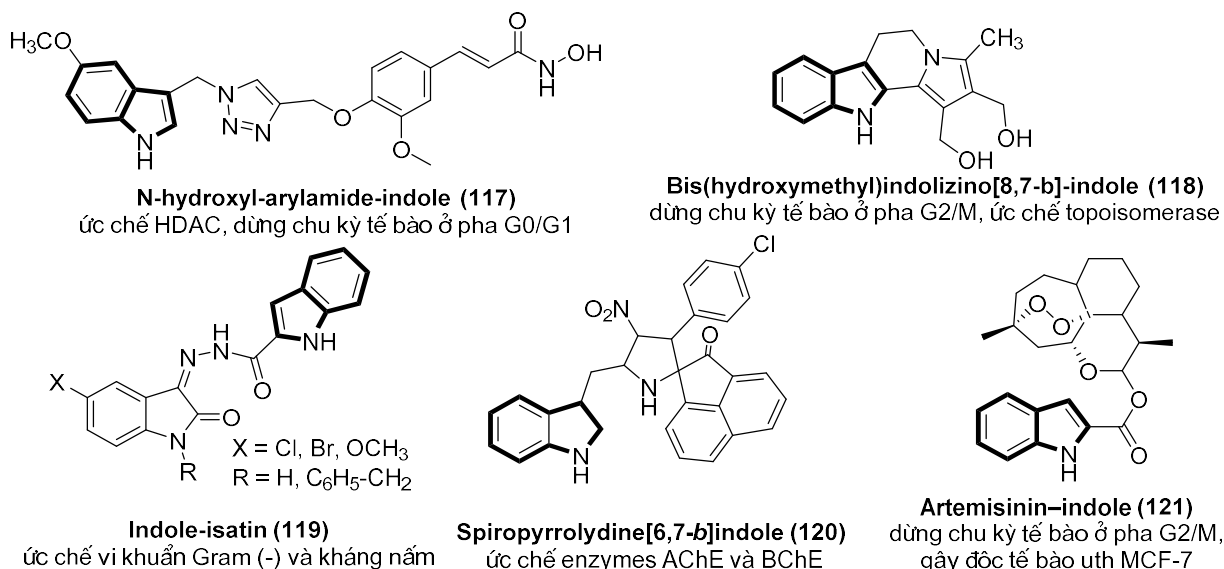
Sơ đồ 1.29. Tổng hợp hybrid isatin-hydrazone-1,2,3 triazole.

Trên cơ sở của phản ứng click, vòng 5 cạnh của 1,2,3-triazole dễ dàng được tạo ra với sự tham gia của xúc tác Cu(I) cho sản phẩm đồng thể chọn lọc 1,4. Nhiều hợp chất hybrid giữa isatin và các hợp chất dị vòng khác mang hoạt tính chống ung thư đã được các nhà hoá học tổng hợp thành công, trong đó 1,2,3-triazole đóng vai trò là cầu nối, có thể kể đến như: quinoline, thiosemicarbazone, nitroimidazole, dihydroartermisinin, curcumin, uracil... [88]

1.3.2.2. Tổng hợp các dẫn xuất chứa khung Indole

Khung indole là một trong những dị vòng đa dạng và phổ biến với hơn 4100 hợp chất đã được xác nhận, chúng xuất hiện trong nhiều sản phẩm tự nhiên từ thực vật, nấm, vi khuẩn, bọt biển đến động vật có giáp xác, động vật thân mềm hay trong các sản phẩm của quá trình tổng hợp, lớp chất này có các hoạt tính sinh học nổi trội như: khả năng chống ung thư, oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, chống nấm, chống sốt rét, kháng cholinesterase, kháng virus, giảm đau, hấp thụ glucose, điều hoà miễn dịch...[89] Với mục đích cải thiện khả năng hoạt động, tăng tính chọn lọc và giảm

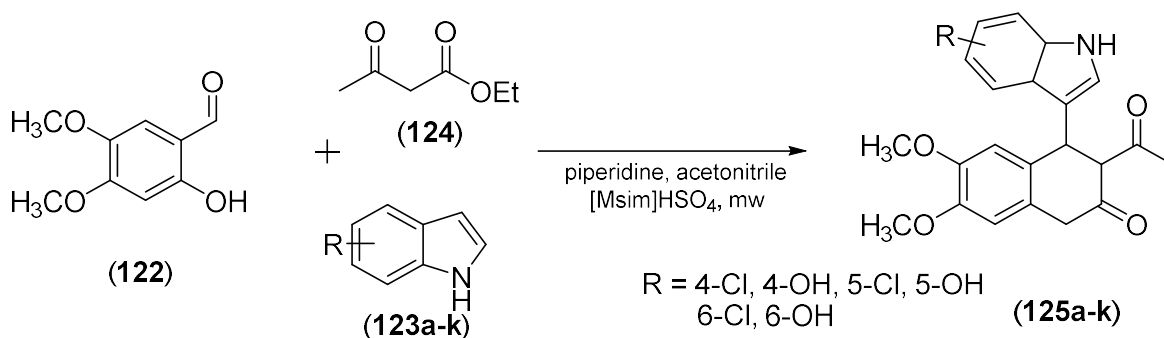
thiếu các tác dụng phụ của thuốc, nhiều hợp chất hybrid giữa khung indole với các hợp phần chứa đựng các hoạt tính sinh học nổi trội khác nhau đã được nghiên cứu, tổng hợp, đánh giá hoạt tính sinh học của chúng, điều này sẽ giúp ích rất nhiều trong việc khám phá và phát triển thuốc. Việc kết hợp giữa khung indole với các hợp phần có hoạt tính sinh học khác nhau đã được các nhà nghiên cứu tập trung quan tâm trong những năm qua. Tiêu biểu như các hợp phần hydroxyl arylamide, bis indolizino, benzimidazole, artemisin, pyrroludine, chalcone, isatin... Sơ đồ 1.30. [90]



Sơ đồ 1.30. Các dẫn xuất của indole với các hợp phần chống ung thư.

Các hợp chất hybrid indole-coumarin đã được Ismael và các cộng sự nghiên cứu, tổng hợp từ ethyl acetoacetate (**124**), 4,5-dimethoxysalicylaldehyde (**122**) và các dẫn xuất của indole trong dung môi là piperidine và acetonitrile, sử dụng xúc tác là [Msim]HSO₄, dưới điều kiện tổng hợp vi sóng theo Sơ đồ 1.31 [91].

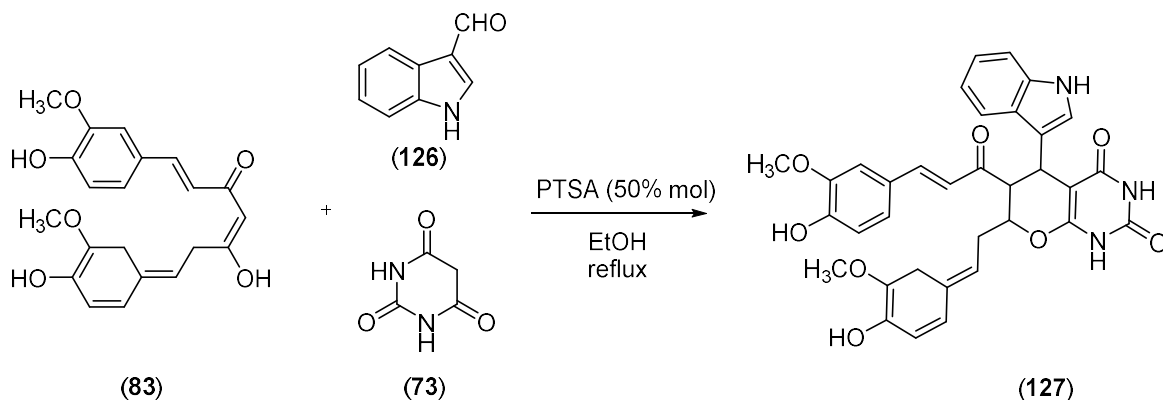
Kết quả đánh giá khả năng gây độc tế trên các dòng tế bào ung thư vú và ung thư buồng trứng cho thấy các dẫn xuất hybrid này ức chế mạnh mẽ đối với các dòng tế bào ung thư vú, trong đó hợp chất (**125i**, R = 6-F) chứa đựng nhiều tiềm năng để phát triển thành thuốc điều trị.



Sơ đồ 1.31. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của indole-coumarine

Năm 2015, Yousefi và các cộng sự đã tổng hợp thành công (theo Sơ đồ 1.32) và tiến hành thử nghiệm khả năng ức chế hai enzym đóng vai trò quan trọng làm tăng

đường huyết sau khi ăn ở các bệnh nhân tiểu đường đó là: α -amylase (α -Amy) và α -glucosidase (α -Gls) bằng phản ứng domino ba thành phần gồm: curcumin (**83**), acid barbituric (**73**) và aldehyde chứa indole (**126**) [9].

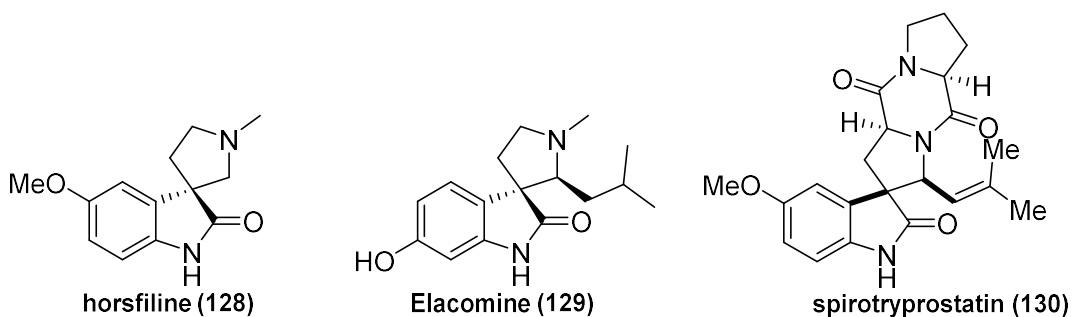


Sơ đồ 1.32. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid indole-pyrimidine

Kết quả thử nghiệm cho thấy hợp chất (**127**) có khả năng ức chế hiệu quả và chọn lọc đối với enzyme α -Gls (đặc trưng cho khả năng chống oxy hóa) cao hơn curcumin và chất đối chứng acarbose thể hiện ở các giá trị IC_{50} lần lượt tương ứng là: 35.3 ± 1.3 , 44.8 ± 1.4 và $365.4 \pm 8.4 \mu M$

1.3.2.3. Tổng hợp các hợp chất của spiroisatin

Hợp chất dị vòng spiro là lớp hợp chất mà ở đó hai hay nhiều dị vòng cùng có chung một nguyên tử, phổ biến nhất là các dị vòng spiro loại 2 vòng có chung một nguyên tử (thường là nguyên tử C), nguyên tử chung này gọi là nguyên tử spiro (đối với C nguyên tử spiro là một nguyên tử C bậc 4) [92, 93].

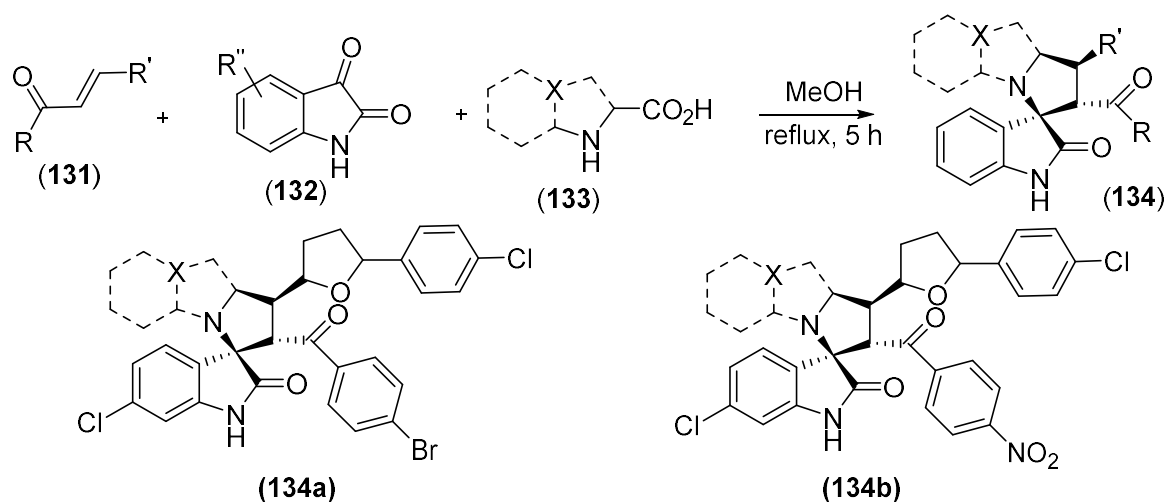


Các hợp chất dị vòng spiro là tác nhân chống ung thư tiềm năng đã được ghi nhận trong thời gian qua, trong đó có spiroisatin. Các hợp chất dạng này được biết đến trong tự nhiên như horsifiline (**128**), elacomine (**129**) hay spirotryprostatin (**130**), chúng ức chế sự phát triển của khối u bằng cách tác động lên các phosphodiesterase (PDE), một họ enzyme phổ biến kiểm soát các giai đoạn dẫn truyền tín hiệu trong tế bào, do đó chúng điều chỉnh các con đường dẫn truyền tín hiệu có chức năng kiểm soát nhiều con đường nội bào khác nhau như tăng sinh tế bào, cô lập biệt hóa, apoptosis và co mạch [94, 95].

Dựa trên những đặc tính sinh học quý giá của các hợp chất spiroisatin có sẵn trong tự nhiên, nhiều công trình nghiên cứu về tổng hợp lớp chất này đã được công

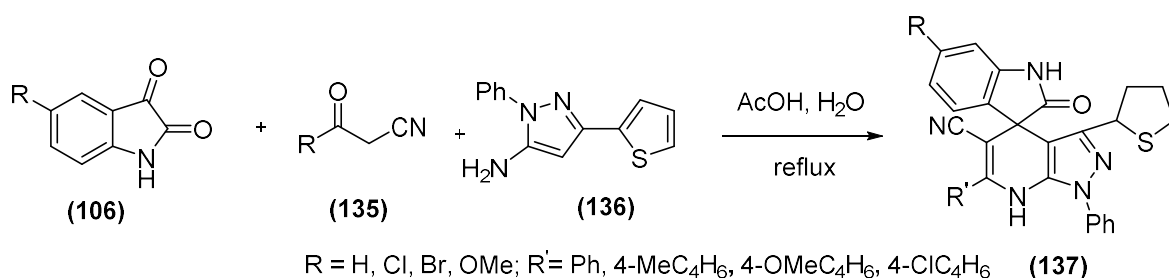
bổ trong thời gian qua bằng cách hybrid chúng với các tiểu phần có các hoạt tính sinh học chống khối u khác nhau. Cụ thể:

Khi sử dụng các chalcone chứa furyl hybrid với isatin Altowyan và các cộng sự thu được một số tác nhân thể hiện đặc tính chống khối u mạnh đối với các dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) và ung thư gan (HepG2). Hai tác nhân (**134a** và **134b**) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với các giá trị lần lượt là IC_{50} : 4.3, 6.9 và 4.7, 11.8 μ M. Giá trị này hiệu quả hơn nhiều với khả năng ức chế của Staurosporine được xác định làm đối chứng với IC_{50} tương ứng: 17,8, 10,3 μ M [96].



Sơ đồ 1.33. Tổng hợp hybrid của isatin với các chalcone

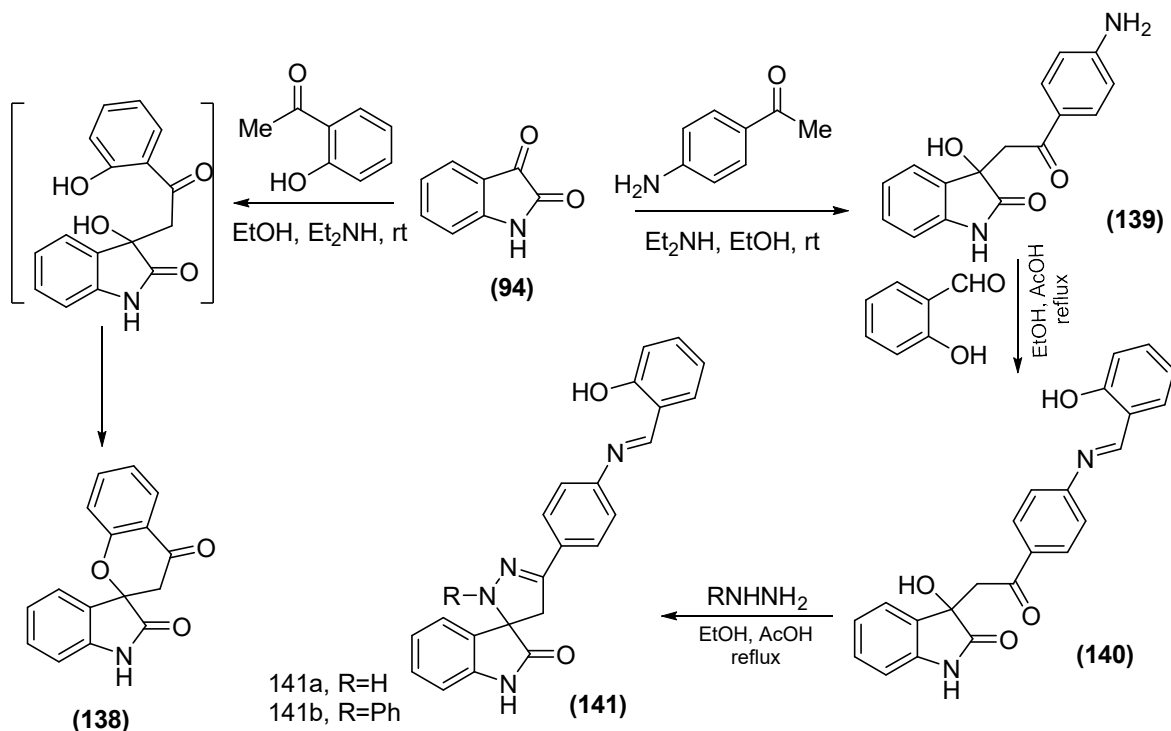
Sử dụng phản ứng 3 thành phần gồm: aroylacetonitriles (**135**), 5-aminopyrazole (**136**) và dẫn xuất của isatin (**106**) trong AcOH/H₂O (1:1). Nhóm nghiên cứu của Eldehna thu được một loạt các spiroisatin (**137**). Sản phẩm đều có khả năng chống tăng sinh với các dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và tiền liệt tuyến (PC3) với các giá trị IC_{50} ở ngưỡng < 10 μ M, ức chế Bcl-2 cũng như có ái lực tốt với caspase-3/9 và protein p53 hỗ trợ khả năng gây apoptosis ở tế bào ung thư [97, 98].



Sơ đồ 1.34. Tổng hợp hybrid isatin bằng phản ứng ba thành phần

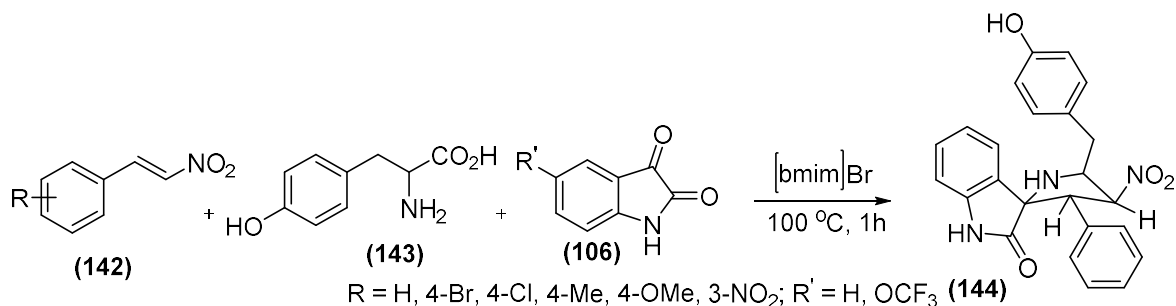
Năm 2021, Fayed và nhóm nghiên cứu đã báo cáo tổng hợp các dẫn xuất của spiro[chroman-2,3'-indoline] (**138**) thông qua phản ứng của isatin với 2'-hydroxyacetophenone trong EtOH và Et₂NH tạo môi trường base. Trong khi đó, dẫn xuất 3-hydroxyindoline-2-one (**139**) thu được khi đưa 4'-aminoacetophenone thay thế, tạo ra imine tương ứng (**140**) bằng cách ngưng tụ với salicylaldehyde. Spiro[indoline-3,3'-pyrazols] (**141**) thu được thông qua phản ứng của (**140**) với

hydrazin trong EtOH/AcOH (Sơ đồ 1.35). Các hợp chất (**138**) và (**141b**) thể hiện các đặc tính chống tăng sinh nổi trội khi được thử nghiệm với các dòng tế bào ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (HepG2) và ung thư ruột kết (HCT116) tương ứng với giá trị IC_{50} được ghi nhận lần lượt là: 0.68, 0.95, 0.74; 1.28, 1.30, 0.76 μM , so với chất đối chứng Imatinib (IC_{50} : 2,87, 2,95, 4,76 μM), mà lại không gây độc với các dòng tế bào thường WI-38 (IC_{50} : 204.36 và 202.08 μM) trong cùng điều kiện thử nghiệm [99].



Sơ đồ 1.35. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của isatin với acetonephenone

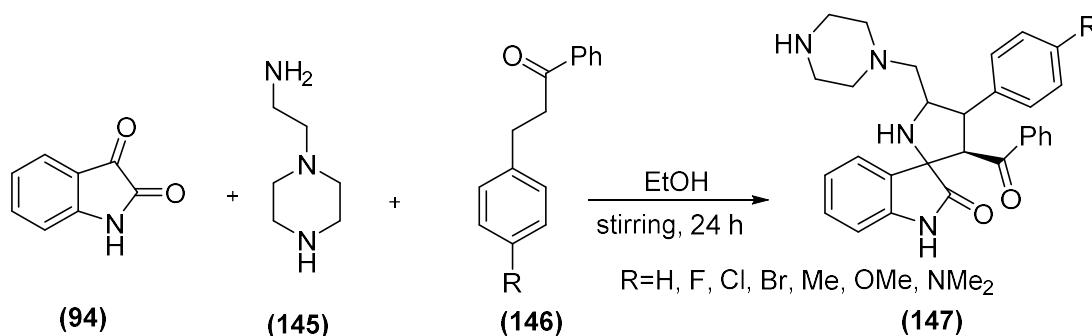
Phản ứng cộng đóng vòng với ion [bmim]Br ở (100°C) giữa azomethine (hình thành từ quá trình ngưng tụ của tyrosine và isatin) với β -nitrostyren (**142**) tạo ra spiroindole-pyrrolidine (**144**) theo Sơ đồ 1.36. Các tác nhân tổng hợp được cho thấy đặc tính chống tăng sinh nhẹ đối với các dòng tế bào ung thư A549 (biểu mô đáy phế nang) và Jurkat (u lympho tế bào T cấp tính) khi được thử nghiệm [100].



Sơ đồ 1.36. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của isatin với xúc tác ion [bmim]Br

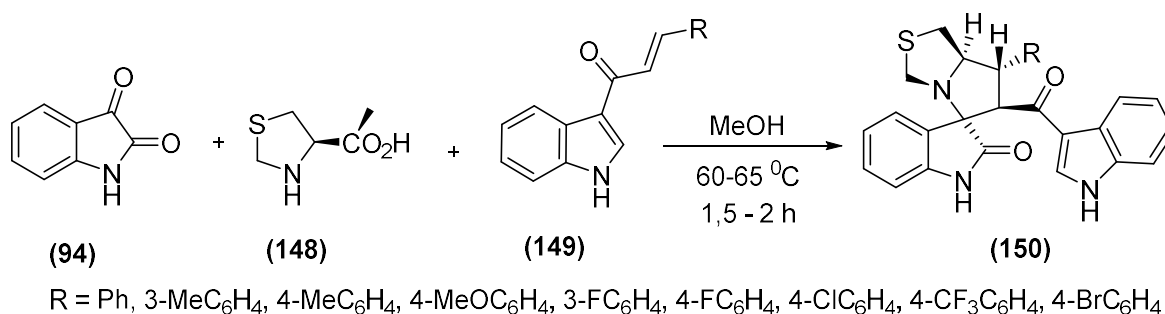
Hoạt tính chống ung thư, chống oxy hoá của các hợp chất hybrid giữa isatin với các chalcone đã được Rajaraman và các cộng sự nghiên cứu, tổng hợp bằng cách sử dụng phản ứng cộng đóng vòng azomethine giữa các chalcone (**146**) với 2-(piperazin-1-yl)ethanamine (**145**) và isatin (**94**) trong ethanol. Các sản phẩm

spiro[indoline -3,2'-pyrrolidin] (**147**) đã được thử nghiệm khả năng chống tăng sinh với các dòng tế bào ung thư biểu mô (KB) với IC_{50} 6.5 μ M (R=Me) [101].



Sơ đồ 1.37. Tổng hợp các hybrid giữa isatin, chalcone và piperazin

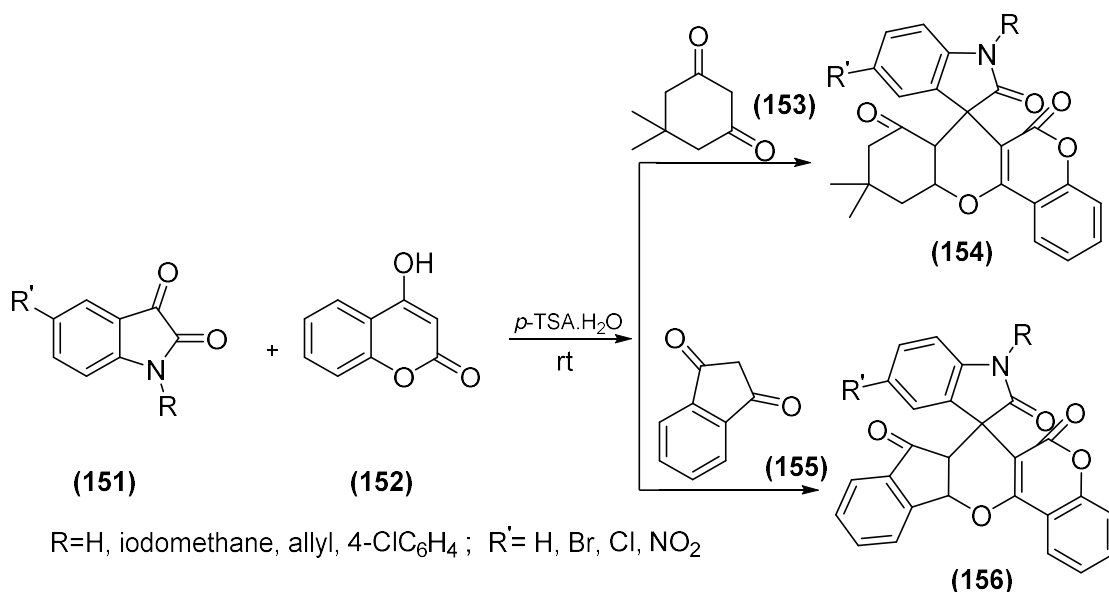
Thiazolo-pyrrolidine-spirooxindole (**150**) cũng thu được tương tự với hiệu suất tốt (71 - 89%) thông qua phản ứng đa thành phần giữa isatin, *L*-thioprolin với các chalcone (**149**) chứa indolyl trong MeOH ở nhiệt độ 60 - 65 °C (Sơ đồ 1.38). Kết quả thử nghiệm đối với hai dòng tế bào ung thư ruột kết (HCT116) và ung thư gan (HepG2), sử dụng Cisplatin làm đối chứng; các dẫn xuất này có khả năng chống tăng sinh hiệu quả, đặc biệt ở dẫn xuất R = 4- $\text{CF}_3\text{C}_6\text{H}_4$ cho giá trị IC_{50} tương ứng: 7.0 và 5.5 μ M, so với chất chuẩn Cisplatin là 12.6 và 5.5 μ M trong cùng điều kiện [102].



Sơ đồ 1.38. Tổng hợp các dẫn xuất của Thiazolo-pyrrolidine-spirooxindole

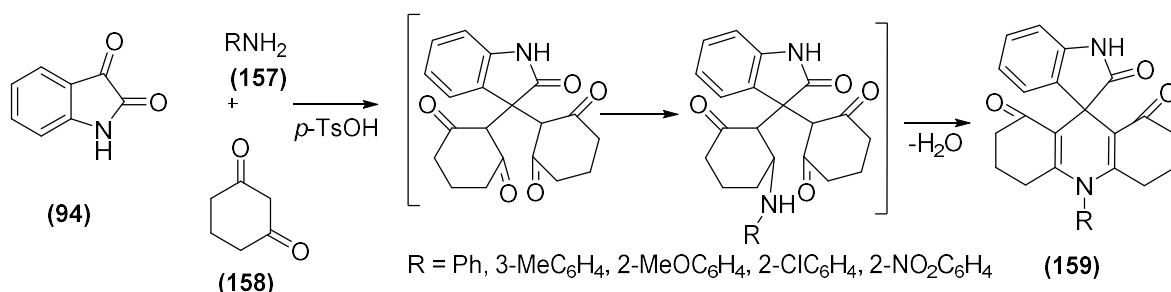
Sử dụng xúc tác là acid *p*-toluenesulfonic (*p*-TSA.H₂O) nhóm nghiên cứu của Kumar đã tổng hợp thành công một loạt các dẫn xuất của spiro[chromeno[4,3-*b*]chromene-7,3'-indoline] (**154**) và spiro[indeno[2',1':5,6]pyrano[3,2-*c*]chromene-7,3'-indoline] (**156**) thông qua phương pháp tổng hợp thân thiện với môi trường từ 3 nguyên liệu ban đầu là: các dẫn xuất isatin (**106**), 4-hydroxycoumarin (**152**) và 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (**153**) hoặc 1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**155**), trong dung môi H₂O. Một số tác nhân tổng hợp được cho thấy đặc tính chống tăng sinh đối với các dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt (PC-3 và LNCaP). Hai hợp có khả năng ức chế tốt nhất các dòng tế bào loại này có nguồn gốc từ 5-bromoisatine (R = H, R' = Br; IC_{50} = 0,025 μ M) và *N*-allylisatin (R = allyl, R' = H; IC_{50} = 0,25 μ M) so với Bicalutamide (tham chiếu chuẩn, IC_{50} = 1,25, 1,50 μ M) chống lại các dòng tế bào

PC3 và LNCaP [103].



Sơ đồ 1.39. Tổng hợp các hybrid của isatin với vòng pyrano[3,2-c]

Tương tự các hợp chất spiro[acridine-9,3'-indoline]-1,2',8-trione (159) được tổng hợp bằng phản ứng domino đa thành phần gồm isatin (94), 1,3-cyclohexanedione (158) và các amin (157) thơm sử dụng xúc tác là acid p -toluene sulfonic. Các hợp chất hybrid spiro-acridine này ức chế có hiệu quả với dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) trong đó hợp chất có $R = 4-MeOC_6H_4$ thể hiện hoạt tính tốt hơn so với Doxorubicin được sử dụng làm đối chứng (Sơ đồ 1.40) [104].



Sơ đồ 1.40. Tổng hợp các dẫn xuất của spiro-acridine

1.4. Các phương pháp tổng hợp thân thiện với môi trường

Tổng hợp thân thiện với môi trường trong hóa học hữu cơ đang dần là một xu thế tất yếu, nó bao gồm các phương pháp như: nghiền bi, chiếu xạ vi sóng, quang xúc tác, phản ứng thủy nhiệt, hỗ trợ tổng hợp siêu âm, tổng hợp bằng từ trường, tổng hợp không dung môi... Các phương pháp này giúp giảm thiểu việc sử dụng hoặc sản sinh ra các chất độc hại, nguy hiểm không cần thiết và cung cấp phản ứng trong môi trường "xanh". Bên cạnh đó những phương pháp này có thể giúp tiết kiệm năng lượng và tiết kiệm tài nguyên, nhờ sử dụng ít hơn lượng dung môi và hoá chất [105, 106]

1.4.1. Áp dụng siêu âm trong tổng hợp hữu cơ

Các phương pháp tổng hợp truyền thống thường xuất hiện các hạn chế như: thời gian phản ứng dài, hiệu suất thấp, nhiệt độ duy trì cao, sử dụng nhiều dung môi... Những hạn chế trên có thể xuất phát từ những nguyên nhân cơ bản như: việc phân tán giữa các pha rắn-lỏng của chất phản ứng với dung môi thường không xảy ra ngay lập tức, dẫn đến ngăn cản quá trình truyền nhiệt và chuyển khối xảy ra trong lòng chất lỏng. Kết quả lượng nhiệt nhận được giữa các cấu tử không đồng đều, từ đó dẫn tới hiện tượng kết tụ, lắng đọng, làm giảm diện tích tiếp xúc hoặc quá trình sản phẩm mới tạo thành sẽ ngăn cản sự tiếp xúc của các cấu tử tiếp theo... và cuối cùng làm chậm tốc độ phản ứng. Do đó tổng hợp bằng phương pháp siêu âm ra đời giúp khắc phục các vấn đề trên một cách hiệu quả, giảm chi phí, đặc biệt làm tăng tính đa dạng các loại phản ứng tổng hợp hữu cơ khác nhau như phản ứng đồng thể, phản ứng dị thể, phản ứng chuyển pha, phản ứng của các enzyme sinh học... [107, 108].

Đa số các phản ứng tổng hợp bằng phương pháp siêu âm được tiến hành ở tần số từ 20 đến 100 kHz. Với mức năng lượng này đủ để gây ra hiện tượng kích thích va chạm giữa các cấu tử trong môi trường lỏng. Chính hiện tượng này cung cấp năng lượng động học thúc đẩy quá trình biến đổi, kết hợp giữa các hiệu ứng hóa học (như phản ứng phá vỡ liên kết và hình thành liên kết mới) và hiện tượng cơ học (làm sạch, phân tán, ma sát, thoát khí, khử bọt...) [109]. Đồng thời năng lượng động học cũng tạo ra các lỗ rỗng hoặc các khoang rỗng siêu nhỏ khi chất lỏng chịu một áp lực đủ lớn làm phá vỡ các lực liên kết giữa chúng và kèm theo đó là giải phóng một năng lượng lớn dưới dạng nhiệt. Bản chất của hiện tượng này đã được xác định thông qua quang phổ phát xạ ánh sáng và tương ứng với các điều kiện hình thành trạng thái plasma của vật chất [110, 111].

1.4.2. Tổng hợp hữu cơ bằng vi sóng

Tổng hợp hữu cơ hỗ trợ bằng vi sóng (MAOS) được coi là một công nghệ "xanh" vì nó đã cho thấy các ứng dụng rộng rãi như một cách rất hiệu quả để tăng hiệu suất của nhiều phản ứng hữu cơ như: không cần gia nhiệt kéo dài, tạo ra năng suất cao và độ chọn lọc cao hơn, hình thành các sản phẩm sạch hơn và nhiều phản ứng hữu cơ có thể được thực hiện trong điều kiện không cần dung môi [112].

Trong quá trình gia nhiệt bằng vi sóng, bức xạ vi sóng đi qua thành bình, chỉ làm nóng chất phản ứng và dung môi, không làm nóng thiết bị, do đó nhiệt độ sẽ tăng đồng đều trên toàn bộ mẫu, hạn chế quá trình tăng nhiệt cục bộ, dẫn tới phản ứng xảy ra nhanh hơn và chọn lọc hơn. Do các bức xạ vi sóng chỉ tương tác với các ion phân cực, vì vậy các dung môi phân cực thường được sử dụng trong tổng hợp vi sóng như: nước, metanol, etanol, amoniac, acid fomic, DMF, DMSO...

Tốc độ phản ứng được tăng cường bằng vi sóng nhanh hơn nhiều vì có thể dễ dàng đạt được nhiệt độ cao hơn, điều này khó có thể đạt được khi sử dụng phương

pháp gia nhiệt truyền thống. Trong lò phản ứng vi sóng, không có tiếp xúc trực tiếp giữa nguồn năng lượng vi sóng và mẫu được gia nhiệt, dẫn đến phản ứng hoàn thành trong thời gian rất ngắn, tức là trong vài phút thay vì vài giờ. Kỹ thuật gia nhiệt bằng vi sóng là một quy trình hiệu quả cao giúp tiết kiệm đáng kể năng lượng. Điều này là do vi sóng chỉ làm nóng các phân tử mẫu và cung cấp cho chúng năng lượng tức thời để vượt qua rào cản năng lượng hoạt hóa và do đó hoàn thành phản ứng nhanh chóng với năng suất sản phẩm tốt hơn [112].

Ngày nay, tổng hợp hữu cơ hỗ trợ bằng vi sóng đã trở thành một công cụ quan trọng đối với các nhà hóa học để tổng hợp nhanh chóng và hiệu quả và vi sóng đang được sử dụng phổ biến trong tổng hợp hóa học, do nó phù hợp với cả quy mô thí nghiệm và sản xuất [113].

Qua nghiên cứu tổng quan, có thể rút ra những nhận xét quan trọng sau:

- Lớp chất 4-aza podophyllotoxin sau khi được biến đổi ở vòng A,B đã có nhiều cải thiện về mặt hoạt tính, đặc biệt khả năng chống ung thư. Tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về biến đổi trên vòng E, nhất là các hợp chất chứa các dị vòng khác nhau.

- Bằng cách lai hoá, tích hợp tạo ra các dẫn xuất spiro giữa isatin và 4-aza podophyllotoxin, hứa hẹn sẽ tạo ra những dẫn xuất mới có khả năng ức chế nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau cũng như giảm được độc tính so với podophyllotoxin.

- Khi kết hợp với các hợp phần chống khối u đã được áp dụng trong điều trị lâm sàng như AZT, Erlotinib thông qua cầu liên kết 1,2,3-triazole bằng phản ứng click các hợp chất thu được hy vọng sẽ giúp cải thiện độ chọn lọc và giảm các tác dụng phụ của thuốc.

- Sàng lọc, thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính ức chế các enzym α -glucosidase, acetylcholinesterase của các dẫn xuất tổng hợp được, cùng với các đánh giá chuyên sâu như phân tích chu kỳ tế bào, apoptosis, kết hợp với nghiên cứu docking phân tử sẽ giúp xác nhận cơ chế hoạt động ức chế tế bào ung thư được thử nghiệm.

- Sử dụng phương pháp tổng hợp bằng vi sóng giúp nâng cao hiệu suất, rút ngắn thời gian, giảm chi phí do sử dụng ít dung môi, hoá chất

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị

- Hoá chất sử dụng cho các phản ứng đều là hóa chất được đặt mua từ các nhà cung cấp hóa chất Merck, AKSci, Sigma Aldrich, ... với hàm lượng trên 98 %.

- Dung môi dùng trong sắc ký cột là loại dung môi có tinh khiết > 99 %, mua từ hãng Aldrich, được cất lại và làm khan trước khi sử dụng.

- Sử dụng bột silica gel dung trong sắc ký cột là loại silica gel có kích cỡ hạt từ 240 - 400 mesh do hãng Merck cung cấp, sắc ký bản mỏng sử dụng loại Alufolien Kiesel 60 F₂₅₄ được mua từ nhà phân phối của Merck.

- Hệ phản ứng vi sóng

Các phản ứng được thực hiện bằng thiết bị microwave Monowave 400 được trang bị tại Phòng Hoá Dược, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam. Các phản ứng đun hồi lưu được thực hiện trong các ampul chịu nhiệt, sử dụng chất ổn nhiệt là silicone, thiết bị gia nhiệt và kiểm soát nhiệt độ của hãng Bruker

- Phổ hồng ngoại (IR)

Thiết bị dùng để ghi, đo quang phổ hồng ngoại (FT-IR), do hãng Perkin Elmer cung cấp, được trang bị tại Phòng Hoá Dược, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam .

- Phổ (NMR) - cộng hưởng từ hạt nhân

Thiết bị ghi, đo phổ NMR hoạt động trên dải tần 500 MHz và 600 MHz (¹H-NMR) và 125MHz và 150 MHz (¹³C-NMR) do hãng Bruker Avance III cung cấp, dung môi pha đo dùng DMSO-*d*₆ và tetramethylsilane làm chất nội chuẩn, các phép đo được thực hiện tại Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Ghi, đo phổ (HRMS) khối lượng phân giải cao

Phương pháp ghi đo phổ khối được thực hiện trên thiết bị X500R QTOF, do hãng SCIEX cung cấp, ở chế độ ESI⁺ hoặc ESI⁻ tại Phòng Nghiên cứu phát triển dược phẩm, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Thiết bị đo nhiệt độ nóng chảy

Kết quả đo nhiệt độ nóng chảy của các dẫn xuất, được tiến hành trên thiết bị Buchi B-545, trang bị tại Phòng Hoá dược, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Tổng hợp các dẫn xuất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng (161a-m)

Quá trình tổng hợp các dẫn xuất của 4-aza-podophyllotoxin, luận án đã sử dụng hai con đường khác nhau: sử dụng phản ứng domino bốn cấu tử và phản ứng domino ba cấu tử, trong đó giữ nguyên các cấu tử khác, chỉ thay thế 2-amino-1,4-naphthoquinone bằng 2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone và ammonium acetat.

a. Sử dụng phản ứng domino 4 thành phần

Quy trình tổng hợp chung: Hỗn hợp các chất phản ứng gồm: 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**23**) (1 mmol), aldehyde thơm chứa dị tố (**160**) (1 mmol), tetronic acid (**51**) (1 mmol), ammonium acetate (**29**) (3 mmol) và *p*-TsOH (0,02 mmol) trong dung môi acid acetic khan (3 ml). Phản ứng được thực hiện trong thiết bị vi sóng Anton Paar Monowave 400 ở điều kiện nhiệt độ 110 °C với thời gian 30 phút. Kết thúc phản ứng, đưa hỗn hợp phản ứng về nhiệt độ phòng, sau đó thêm 20 (ml) nước cất. Sử dụng dichloromethane khan (3 lần, mỗi lần 20 ml) tiến hành chiết hỗn hợp sau phản ứng. Dịch chiết được làm khan bằng Na₂SO₄ hoặc CaCl₂. Sản phẩm thô thu được bằng cách loại bỏ dung môi trong thiết bị quay chân không. Sử dụng sắc ký cột silica gel pha thuận với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane - ethyl acetate (tỉ lệ 6: 4 về thể tích), thu được sản phẩm tinh khiết **161a-m** với hiệu suất 20 - 34 %.

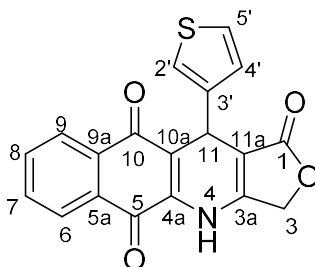
b. Áp dụng phản ứng domino 3 thành phần

Quy trình chung: Trộn đều hỗn hợp các chất bao gồm: 2-amino-1,4-naphthoquinone (**36**) (1 mmol), aldehyde thơm chứa dị tố (**160**) (1 mmol), tetronic acid (**51**) (1 mmol) và xúc tác *p*-TsOH (0,02 mmol) trong 3 ml dung môi acid acetic khan. Phản ứng được tiến hành trong thiết bị phản ứng vi sóng ở nhiệt độ 110 °C, thời gian 30 phút. Phản ứng kết thúc đưa hỗn hợp về nhiệt độ phòng, sau đó thêm 20 ml nước cất. Hỗn hợp sau phản ứng được chiết bằng CH₂Cl₂ (3x20 ml). Sử dụng Na₂SO₄ khan loại bỏ nước trong dịch chiết, sau đó cất quay chân không dưới áp suất thấp loại bỏ dung môi thu được sản phẩm thô. Sử dụng sắc ký cột silica gel pha thuận, hệ dung môi *n*-hexane - ethyl acetate (tỉ lệ 6: 4) thu được các sản phẩm sạch (**161a-m**), với hiệu suất đạt từ 60 - 74 %.

Kết quả thu được 13 dẫn xuất có cấu trúc và các tín hiệu phổ IR, NMR và HRMS tương ứng như sau:

Hợp chất 161a: 11-(Thiophen-3-yl)-4,11-dihydrobenzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinolin- 1,5,10(3*H*)-trione.

Sản phẩm là chất rắn dạng bột màu cam, nhiệt độ nóng chảy (mp): 298 - 299 °C.



IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3238, 3086, 2967, 2930, 2890, 1709, 1657, 1636 1606, 1589, 1500, 1395, 1351, 1334, 1303, 1240, 1191, 1070, 1015, 932, 838, 783, 727.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_{H} : 10.60 (1H, s, -NH), 8.05 (1H, dd, *J* =

1.2, 7.8 Hz, H-6), 7.93 (1H, dd, $J = 0.6, 7.8$ Hz, H-9), 7.85 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-8), 7.81 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-7), 7.38 (1H, dd, $J = 3.0, 4.8$ Hz, H-5'), 7.24 (1H, dd, $J = 0.6, 3.0$ Hz, H-2'), 7.07 (1H, dd, $J = 1.2, 4.8$ Hz, H-4'), 5.11 (1H, s, H-11), 4.97 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, Ha-3), 4.87 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, Hb-3).

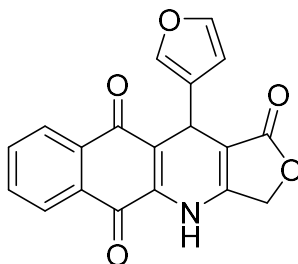
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.1 (C-10), 179.6 (C-5), 171.2 (C-1), 156.1 (C-3a), 145.0 (C-3'), 139.2 (C-4a), 134.9 (C-8), 133.4 (C-7), 131.9 (C-9a), 130.3 (C-5a), 127.7 (C-4'), 126.0 (C-6), 125.8 (C-9), 125.8 (C-5'), 122.4 (C-2'), 118.0 (C-10a), 101.6 (C-11a), 66.1 (C-3), 29.7 (C-11).

HR-ESI-MS: m/z 350.0484 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{S}]^+$: 350.0482

Hợp chất 161b: 11-(Furan-3-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Chất rắn dạng bột màu vàng nâu, mp: 345-346 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3199, 3118, 2961, 2927, 2857, 1712, 1658, 1628, 1604, 1590, 1503, 1396, 1357, 1335, 1303, 1194, 1071, 1014, 934, 874, 794, 727.



^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.57 (1H, s, -NH), 8.06 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-6), 7.93 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-9), 7.86 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-8), 7.82 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-7), 7.49 (1H, t, $J = 1.2$ Hz), 7.47 (1H, t, $J = 0.6$ Hz), 6.40 (1H, dd, $J = 0.6, 1.8$ Hz), 4.98 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, Ha-3), 4.94 (1H, s, H-11), 4.87 (1H, dd, $J = 1.2, 16.2$ Hz, Hb-3).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.1 (C-10), 179.5 (C-5), 171.2 (C-1), 156.3 (C-3a), 143.0, 140.2, 139.2 (C4a), 134.9 (C8), 133.3 (C-7), 131.9 (C-9a), 130.2 (C-5a), 128.5, 125.9 (C6), 125.7 (C9), 117.6 (C-10a), 110.5, 101.0 (C-11a), 66.1 (C-3), 25.3 (C-11).

HR-ESI-MS: m/z 334.0693 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{NO}_5]^+$: 334.0710.

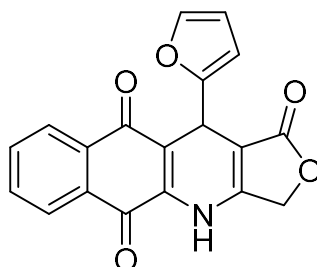
Hợp chất 161c: 11-(Furan-2-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Sản phẩm thu được chất rắn dạng bột màu cam, nhiệt độ nóng chảy: 304 - 305 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3202, 3153, 2965, 2932, 1716, 1659, 1631, 1604, 1590, 1504, 1396, 1352, 1335, 1303, 1195, 1070, 1014, 933, 727.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.70 (1H, s, NH), 8.06 (1H, dd, $J = 1.2,$

7.2 Hz, H-6), 7.96 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-9), 7.87 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-8), 7.83 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-7), 7.46 (1H, dd, $J = 0.6, 1.8$ Hz), 6.32 (1H, q, $J = 1.8$ Hz), 6.19 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.14 (1H, s, H-11), 4.99 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, Ha-3), 4.88 (1H, dd, $J = 1.2, 16.8$ Hz, Hb-3).

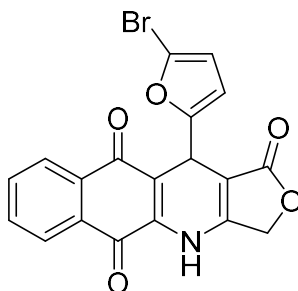


^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.0, 179.5, 170.9, 156.6, 155.5, 141.9, 139.3, 135.1, 133.5, 131.8, 130.1, 126.1, 125.8, 115.9, 110.7, 106.6, 99.6, 66.1, 28.5.

HR-ESI-MS: m/z 356.0513 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{NNaO}_4]^+$: 356.0529.

Hợp chất 161d: 11-(5-Bromofuran-2-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Thu được chất rắn dạng bột màu vàng cam, nhiệt độ nóng chảy: 371 - 372°C.



IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3249, 1726, 1662, 1599, 1592, 1499, 1476, 1459, 1439, 1400, 1332, 1298, 1192, 1159, 1134, 1114, 1068, 1012, 960, 926, 779, 727.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.74 (1H, s, NH), 8.06 (1H, dd, $J = 0.8, 7.8$ Hz, H-6), 7.96 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz, H-9), 7.87 (1H, td, $J = 1.2, 7.8$ Hz, H-8), 7.83 (1H, td, $J = 1.8, 7.8$ Hz, H-7), 6.42 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 6.28 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.11 (1H, s, H-11), 5.02 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, Ha-3), 4.91 (1H, dd, $J = 1.2, 16.8$ Hz, Hb-3).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.9, 179.4, 170.8, 158.0, 156.6, 139.5, 135.0, 133.5, 131.7, 130.2, 126.1, 125.8, 119.6, 115.2, 112.7, 109.8, 99.1, 66.2, 28.9.

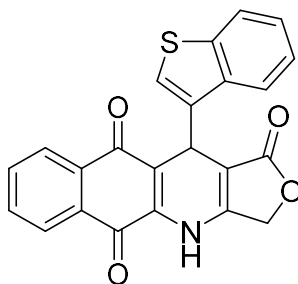
HR-ESI-MS: m/z 411.9832 and 413.9772 $[\text{M}+\text{H}]^+$, kết quả tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{BrNO}_5]^+$: 411.9816 and 413.9795.

Hợp chất 161e: 11-(Benzo[b]thiophen-3-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Chất rắn dạng bột màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 295 - 296°C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3445, 3212, 3070, 2923, 2853, 1728, 1661, 1595, 1501,

1397, 1332, 1299, 1194, 1135, 1068, 1010, 922, 786, 762, 722.



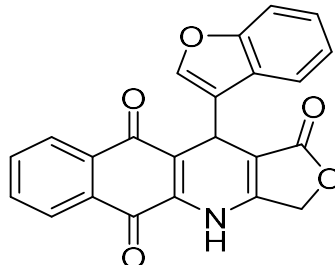
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.72 (1H, s, NH), 8.24 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.08 - 8.06 (1H, m), 7.91 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.84 - 7.79 (3H, m), 7.55 (1H, s), 7.46 (1H, td, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.38 (1H, td, $J = 0.6, 7.8$ Hz), 5.40 (1H, s), 4.97 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 4.91 (1H, d, $J = 16.8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.0, 179.6, 171.1, 155.6, 141.21, 139.4, 139.2, 137.5, 134.8, 133.4, 131.8, 130.3, 126.4, 126.0, 125.7, 124.3, 124.0, 122.8, 122.5, 118.3, 102.0, 66.1, 27.9.

HR-ESI-MS: Tìm thấy m/z 422.0429 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{NNaO}_4\text{S}]^+$: 422.0458.

Hợp chất 161f: 11-(Benzofuran-3-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Sản phẩm thu được dạng bột màu nâu, nhiệt độ nóng chảy: 295 - 296°C.



IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3215, 3097, 1749, 1734, 1664, 1640, 1597, 1506, 1451, 1399, 1341, 1301, 1196, 1110, 1066, 1009, 750, 725.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.77 (1H, s), 8.08 - 8.05 (1H, m), 7.91 (1H, s), 7.90 - 7.89 (1H, m), 7.83 (1H, td, $J = 1.8, 7.2$ Hz), 7.80 (1H, td, $J = 1.8, 7.2$ Hz), 7.78 (1H, d, $J = 1.2, 6.6$ Hz), 7.50 (1H, d, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 7.28 (1H, td, $J = 1.8, 7.2$ Hz), 7.26 (1H, td, $J = 1.8, 7.2$ Hz), 5.24 (1H, s), 4.99 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 4.92 (1H, dd, $J = 1.2, 16.8$ Hz), 3.73 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.1, 179.5, 171.1, 156.4, 154.7, 144.4, 139.5, 134.9, 133.4, 131.9, 130.3, 126.3, 126.0, 125.7, 124.2, 123.9, 122.7, 120.3, 117.1, 111.2, 100.9, 66.1, 24.6.

HR-ESI-MS: Tìm thấy m/z 384.0846 $[\text{M}+\text{H}]^+$, kết quả tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{NO}_5]^+$: 384.0866.

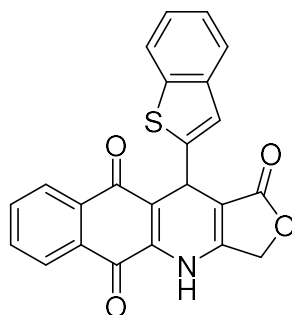
Hợp chất 161g: 11-(Benzo[b]thiophen-2-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Chất rắn dạng bột màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 302-303°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3466, 3050, 2924, 2853, 2263, 2126, 1773, 1740, 1667, 1637, 1591, 1495, 1431, 1394, 1341, 1296, 1192, 1157, 1137, 1066, 999, 927, 822, 788, 770, 748, 719.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.84 (1H, s), 8.08 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 7.97 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.87 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 7.85 – 7.81 (2H, m), 7.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.30 (1H, d, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 7.25 (1H, d, $J = 1.2, 8.4$ Hz), 7.24 (1H, s), 5.38 (1H, s), 5.06 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 4.96 (1H, dd, $J = 1.2, 16.2$ Hz).

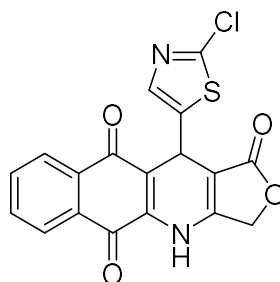


$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.0, 179.4, 170.9, 156.5, 148.1, 139.4, 139.0, 138.9, 135.0, 133.5, 131.8, 130.2, 126.1, 125.9, 124.3, 124.0, 123.4, 122.3, 121.7, 117.2, 100.9, 66.2, 30.3.

HR-ESI-MS: Tìm thấy m/z 400.0623 $[\text{M}+\text{H}]^+$, kết quả tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{S}]^+$: 400.0638

Hợp chất 161h: 11-(2-Chlorothiazol-5-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Sản phẩm dạng bột màu vàng nâu, có nhiệt độ nóng chảy: 383-384°C.



IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3341, 3092, 2922, 2852, 1774, 1734, 1660, 1602, 1525, 1507, 1478, 1443, 1414, 1397, 1335, 1300, 1267, 1240, 1199, 1159, 1140, 1044, 1019, 927, 878, 826, 776, 721, 705.

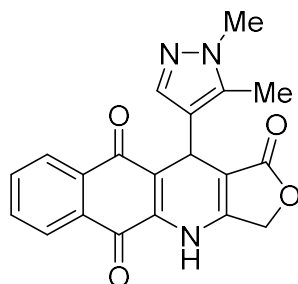
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.86 (1H, s), 8.06 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.99 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.88 (1H, td, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.83 (1H, td, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.48 (1H, d, $J = 0.6$ Hz), 5.29 (1H, s), 5.06 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 4.94 (1H, dd, $J = 1.2, 16.8$ Hz).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.1, 179.3, 170.9, 169.7, 157.1, 143.9, 139.7, 139.5, 135.1, 133.6, 131.7, 130.3, 127.0, 125.9, 116.3, 99.9, 66.4, 27.7.

HR-ESI-MS: m/z 385.0026 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}]^+$: 385.0044

Hợp chất 161i: *11-(1,5-Dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione*

Chất rắn dạng bột màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 262-263°C.



IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3439, 3290, 3163, 3077, 2925, 2854, 1722, 1660, 1596, 1490, 1428, 1393, 1331, 1298, 1267, 1191, 1134, 1108, 1065, 1037, 1011, 929, 884, 828, 792, 723.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.52 (1H, s), 8.04 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.89 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.82 (1H, td, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.79 (1H, td, $J = 1.2, 7.8$ Hz), 7.11 (1H, s), 4.94 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 4.85 (1H, dd, $J = 1.2, 16.2$ Hz), 4.79 (1H, s), 3.63 (3H, s), 2.30 (3H, s).

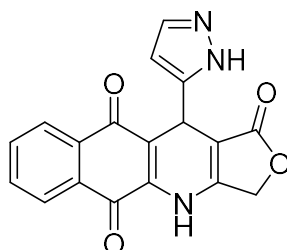
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.2, 179.7, 171.3, 155.3, 138.6, 137.2, 134.9, 134.7, 133.3, 131.9, 130.2, 126.0, 125.7, 122.4, 118.5, 102.0, 66.0, 36.0, 24.7, 9.1.

HR-ESI-MS: m/z 362.1118 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4]^+$: 362.1135.

Hợp chất 161j: *11-(1H-pyrazol-5-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione*

Sản phẩm thu được là chất rắn dạng bột màu đỏ nhạt, nhiệt độ nóng chảy: 310-311°C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3337, 3249, 3207, 3148, 2960, 2927, 1725, 1664, 1630, 1590, 1499, 1398, 1354, 1304, 1199, 1167, 1054, 1011, 933, 784 725.

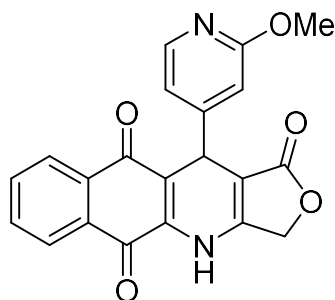


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.39 (1H, br. s, NH), 10.55 (1H, s), 8.05 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.94 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.86 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.81 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.52 (1H, br. s), 6.13 (1H, br. s), 5.11 (1H, br. s), 4.93 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 4.87 (1H, d, $J = 16.8$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.1, 179.6, 171.2, 156.0, 135.0, 133.4, 131.9, 130.1, 126.0, 125.8, 103.2, 66.0, 29.8.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z 334.0808 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4]^+$: 334.0822

Hợp chất 161k: 11-(2-Methoxypyridin-4-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-*b*]quinolin-1,5,10(3*H*)-trione



Sản phẩm là chất rắn dạng bột màu nâu đỏ, có nhiệt độ nóng chảy: 245 - 246°C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3455, 3044, 3014, 2984, 2941, 2893, 2740, 1739, 1665, 1630, 1601, 1561, 1505, 1478, 1396, 1341, 1300, 1192, 1167, 1147, 1068, 1045, 1021, 1004, 940, 786, 728.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.69 (1H, s), 8.07 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 8.04 (1H, dd, $J = 1.2, 5.4$ Hz), 7.90 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 7.86 – 7.81 (2H, m), 6.99 (1H, dd, $J = 1.2, 5.4$ Hz), 6.74 (1H, s), 4.99 (1H, s), 4.98 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 4.90 (1H, dd, $J = 16.8$ Hz), 3.79 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 182.0, 179.3, 170.9, 163.8, 156.5, 155.2, 146.6, 140.1, 134.8, 133.4, 131.8, 130.3, 126.0, 125.7, 117.1, 116.9, 109.7, 100.8, 66.2, 53.0, 34.7.

HR-ESI-MS: có m/z : 375.0960 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 375.0976.

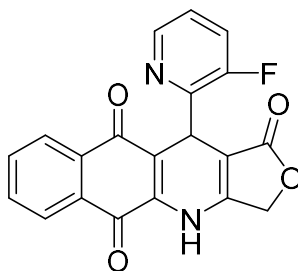
Hợp chất 161l: 11-(3-Fluoropyridin-2-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-*b*]quinolin-1,5,10(3*H*)-trione

Chất rắn dạng bột màu đỏ đậm, nhiệt độ nóng chảy: 288 - 289°C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3349, 3221, 3081, 2928, 2857, 1747, 1671, 1660, 1630, 1607, 1497, 1442, 1397, 1343, 1303, 1194, 1066, 1005, 803, 724.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.48 (1H, s), 8.25 – 8.23 (1H, m), 8.07 (1H, dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz), 7.88 – 7.84 (1H, m), 7.83 – 7.78 (2H, m), 7.63 – 7.58

(1H, m), 7.27 (1H, quint, $J = 5.4$ Hz), 5.51 (1H, s), 4.92 (2H, t, $J = 16.2$ Hz).



^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.6, 179.3, 170.4, 156.4, 155.3 (1C, d, $J = 256.3$ Hz), 149.8 (1C, d, $J = 15$ Hz), 145.0 (1C, d, $J = 6.3$ Hz), 139.9, 134.8, 133.2, 131.5, 129.8, 125.8, 125.5, 123.5 (1H, d, $J = 3.8$ Hz), 122.4 (1H, d, $J = 20$ Hz), 118.0, 100.3, 65.9, 30.7.

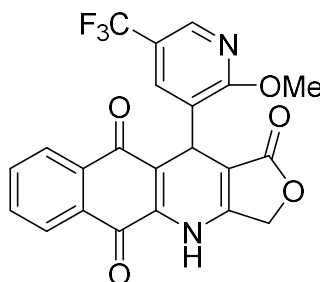
HR-ESI-MS: có m/z 363.0760 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_4]^+$: 363.0776

Hợp chất 161m: 11-(2-Methoxy-5-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin-1,5,10(3H)-trione

Sản phẩm dạng bột màu vàng cam, nhiệt độ nóng chảy: 289 – 290 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3285, 3079, 3027, 2997, 2950, 1725, 1663, 1603, 1577, 1495, 1437, 1400, 1322, 1297, 1246, 1195, 1144, 1116, 1093, 1072, 1015, 940, 724.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.63 (1H, s), 8.41 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 8.05 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 8.00 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.85 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 7.84 – 7.78 (2H, m), 5.34 (1H, s), 4.95 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 4.89 (1H, dd, $J = 0.6, 16.2$ Hz), 3.96 (3H, s).



^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.9, 179.4, 170.7, 163.2, 156.8, 142.9 (1C, d, $J = 4.5$ Hz), 140.5, 135.3, 134.9, 133.3, 131.8, 130.1, 127.3, 125.9, 125.7, 124.1 (1C, q, $J = 270$ Hz), 118.8 (1C, q, $J = 31.5$ Hz), 117.0, 100.2, 66.0, 54.2, 30.6.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z 443.0836 $[\text{M}+\text{H}]^+$, kết quả tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 443.0849.

2.3. Quy trình tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin (174a-n)

2.3.1. Tổng hợp các dẫn xuất isatin bằng phản ứng ankylation

a. Tổng hợp các dẫn xuất N-azidobut-2-en-isatin (169a-e)

Hỗn hợp phản ứng gồm (1 mmol) của 1,4-dichloro-but-2-en (**165**) và 1,2 mmol NaN_3 (**166**). Thêm 5 ml dung môi DMF khan, tiến hành phản ứng trong thời gian 20 phút ở 80°C bằng thiết bị vi sóng. Sau khi phản ứng kết thúc, đưa hệ về nhiệt độ phòng, bổ sung lần lượt các dẫn xuất tương ứng của isatin (**168a-e**) và 207 mg K_2CO_3 (1 mmol), 2 mg KI (0,012 mol%). Tiếp tục thực hiện phản ứng trong thời gian 20 phút ở 80°C . Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký bản mỏng, sau khi phản ứng kết thúc, chiết hỗn hợp bằng EtOAc (3x30 ml) sau đó làm khan bằng Na_2SO_4 . Cất quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô. Phân lập sản phẩm bằng sắc ký cột, sử dụng hệ *n*-hexane:ethyl acetate (tỷ lệ 8:2) thu được sản phẩm sạch đủ điều kiện cho phép thực hiện các phản ứng domino tiếp theo.

b. Tổng hợp các dẫn chất N-propargyl-isatin (172a-p)

Cho 1mmol các dẫn xuất isatin (**170a-p**) tương ứng vào trong 1,5 mmol Propargyl bromide (**171**) (0,167 ml). Tiếp theo thêm 207 mg kali carbonate khan (1,5 mmol) và 2mg kali iodide (0,012 mol%) cùng 3 ml DMF khan. Thực hiện phản ứng trên thiết bị vi sóng Anton Parr ở 75°C trong 20 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, hỗn hợp được chiết 3 lần với EtOAc trong phễu chiết có chứa sẵn 20 ml nước cất (3x20 ml). Dịch chiết được làm khô bằng Na_2SO_4 khan và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm. Tiến hành sắc ký cột với hệ dung môi *n*-hexane - ethyl acetate (tỉ lệ 6:4 về thể tích) thu được sản phẩm là các *N*-propargyl-isatin tương ứng đủ điều kiện để thực hiện các phản ứng tiếp theo.

2.3.2. Thực hiện phản ứng domino

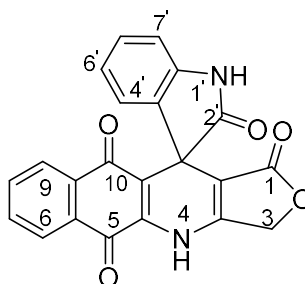
Trộn hỗn hợp gồm: 2-amino-1,4-naphthoquinone (1 mmol) (**36**), acid tetronic (1 mmol) (**51**) và các dẫn xuất thế của isatin (**173a-n**) (1 mmol), thêm 3 ml acid acetic khan và 20mol% của *p*-TsOH (0.02 mmol). Thực hiện phản ứng trong thiết bị gia nhiệt vi sóng Anton Parr, duy trì nhiệt độ ở 110°C , thời gian phản ứng 30 phút. Phản ứng kết thúc, đưa hệ về nhiệt độ phòng, thêm 20 ml nước cất, chiết 3 lần với dichloromethan (3x20 ml). Dịch chiết được làm khan bằng CaCl_2 hoặc Na_2SO_4 khan, cất quay loại bỏ dung môi thu được sản phẩm thô. Tiến hành phân lập bằng sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải dichloromethan - acetone (tỷ lệ 9:1) thu được sản phẩm sạch có hiệu suất từ 72 - 87%.

Kết quả phổ IR, NMR, HRMS của các dẫn xuất thu được cụ thể như sau:

Hợp chất 174a: *3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4*H*)-tetraone*

Chất đỏ màu nâu, nhiệt độ nóng chảy: $356\text{--}357^\circ\text{C}$.

IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3133, 3081, 3032, 2840, 1756, 1708, 1663, 1617, 1592, 1498, 1473, 1394, 1335, 1302, 1265, 1202, 1180, 1143, 1082, 1020, 970, 789, 753, 723, 621.

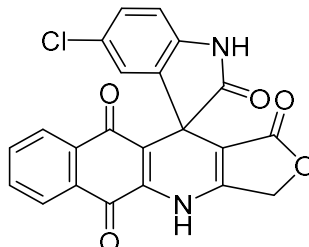


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.90 (1H, s, NH), 10.51 (1H, s, NH), 8.08 (1H, dd, $J = 6.6, 1.8$ Hz, H-6), 7.86 - 7.80 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.15 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, H-4'), 7.10 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 6.83 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7'), 4.99 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3), 4.97 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.1 (C-10), 179.1 (C-5), 177.9 (C-2'), 169.2 (C-1), 156.1, 141.9, 140.7, 135.5, 135.1, 133.6, 131.5, 129.9, 128.4, 126.1, 125.9, 124.1, 121.3, 117.5, 108.8, 101.0, 66.1 (C-3), 48.0 (C-11).

HR-ESI-MS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 385.0804, tính toán theo lý thuyết: $[\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 385.0819 và m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 407.0631, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_5]^+$: 407.0639.

Hợp chất 174b: 5'-Chloro-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Chất rắn dạng bột màu đỏ đậm, nhiệt độ nóng chảy: 365-366°C.

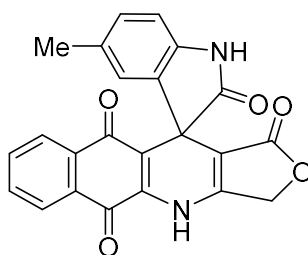
IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3153, 3115, 3048, 2859, 1757, 1713, 1686, 1665, 1638, 1619, 1590, 1496, 1475, 1395, 1337, 1302, 1266, 1198, 1085, 1041, 1021, 1007, 973, 812, 725, 642, 554.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.96 (1H, s, NH), 10.67 (1H, s, NH), 8.10 - 8.07 (1H, m, H-6), 7.86 - 7.81 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.24 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4'), 7.20 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 5.00 (2H, s, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.4 (C-10), 179.1 (C-5), 177.8 (C-2'), 169.3 (C-1), 156.6, 141.0, 140.9, 137.1, 135.2, 133.7, 131.5, 130.0, 128.3, 126.2, 126.0, 125.4, 124.5, 116.9, 110.3, 100.5, 66.3 (C-3), 48.3 (C-11).

HR-ESI-MS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 419.0434, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}_5]^+$: 419.0429.

Hợp chất 174c: 5'-Methyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Sản phẩm là chất rắn dạng bột màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 361-362°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3328, 3031, 2915, 2862, 2796, 2735, 1753, 1730, 1669, 1631, 1588, 1494, 1396, 1336, 1310, 1266, 1203, 1072, 1042, 1020, 999, 820, 722, 691, 601.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.89 (1H, s, NH), 10.41 (1H, s, NH), 8.07 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.85 – 7.80 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 6.95 (2H, d, $J = 10.8$ Hz, H-4', H-6'), 6.70 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 4.99 (2H, s, H-3), 2.14 (3H, s, CH₃).

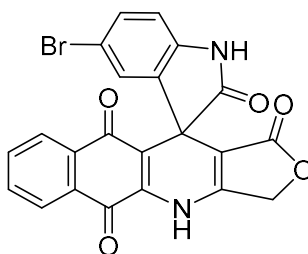
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.1 (C-10), 179.1 (C-5), 177.9 (C-2'), 169.2 (C-1), 156.1, 140.6, 139.4, 135.6, 135.1, 133.6, 131.5, 130.2, 129.9, 128.6, 126.1, 125.9, 124.8, 117.6, 108.6, 101.1, 66.0 (C-3), 48.1 (C-11), 20.5 (CH₃).

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z của $[\text{M}+\text{H}]^+$: 399.0964, tính toán theo lý thuyết cho $[\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 399.0976 và m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 421.0788, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{NaO}_5]^+$: 421.0795.

Hợp chất 174d: 5'-Bromo-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột màu đỏ, có nhiệt độ nóng chảy 310-311 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3112, 3045, 2976, 2856, 2255, 1757, 1713, 1663, 1637, 1616, 1590, 1495, 1475, 1395, 1337, 1303, 1265, 1197, 1085, 1022, 1004, 809, 724, 640, 535.



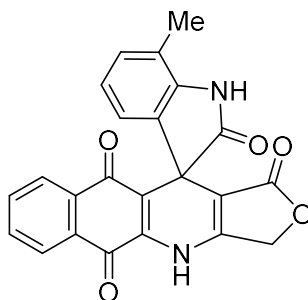
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 10.96 (1H, s, NH), 10.68 (1H, s, NH), 8.07 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.87 – 7.81 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.36 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4'), 7.33 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7'), 5.00 (2H, s, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 179.0 (C-5), 177.6 (C-2'),

169.2 (C-3), 156.5, 141.3, 141.0, 137.5, 135.1, 133.6, 131.5, 131.1, 130.0, 127.1, 126.1, 125.9, 116.8, 113.0, 110.7, 100.5, 66.2 (C-3), 48.2 (C-11).

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[M+H]^+$: 462.9936 và 464.9912, tính toán theo lý thuyết cho $[C_{22}H_{12}BrN_2O_5]^+$: 462.9924 và 464.9904, tìm thấy m/z $[M+Na]^+$: 484.9749 và 486.9726, tính toán theo lý thuyết cho $[C_{22}H_{11}BrN_2NaO_5]^+$: 484.9744 và 486.9724.

Hợp chất 174e: 7'-Methyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Chất rắn dạng bột dạng bột, màu vàng cam, nhiệt độ nóng chảy: 367-368°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3153, 2854, 1721, 1667, 1625, 1595, 1490, 1396, 1331, 1296, 1269, 1214, 1084, 1041, 1028, 839, 767, 721, 569.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H : 10.89 (1H, s, NH), 10.55 (1H, s, NH), 8.08 – 8.06 (1H, m, H-6), 7.86 – 7.80 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 6.97 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-4'), 6.92 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-6'), 6.75 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 4.99 (1H, dd, $J = 16.8$ Hz, H-3), 4.97 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3), 2.27 (3H, s, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_C : 181.1 (C-10), 179.1 (C-5), 178.4 (C-2'), 169.2 (C-1), 156.0, 140.5, 140.4, 135.2, 135.1, 133.6, 131.5, 129.9, 129.8, 126.1, 125.9, 121.6, 121.3, 117.8, 117.6, 101.1, 66.0 (C-3), 48.3 (C-11), 16.4 (CH₃).

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[M+H]^+$: 399.0967, tính toán theo lý thuyết: $[C_{23}H_{15}N_2O_5]^+$: 399.0976, tìm thấy m/z $[M+Na]^+$: 421.0780, tính toán theo lý thuyết cho: $[C_{23}H_{14}N_2NaO_5]^+$: 421.0795.

Hợp chất 174f: 5',7'-Dibromo-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

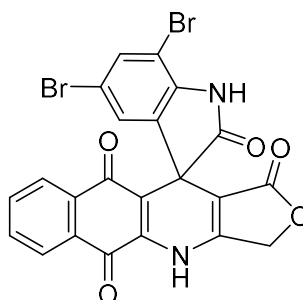
Sản phẩm là chất bột màu cam, nhiệt độ nóng chảy: 364-365°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3164, 3084, 2860, 1724, 1667, 1645, 1593, 1501, 1463, 1400, 1336, 1299, 1183, 1078, 1043, 1022, 1003, 979, 803, 725, 560.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H : 11.05 (1H, s, NH), 11.03 (1H, s, NH), 8.09 (1H, dd, $J = 6.6, 1.8$ Hz, H-6), 7.86 – 7.82 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.59 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-4'), 5.04 (1H, dd, $J = 16.8$ Hz, H-3), 5.02 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3).

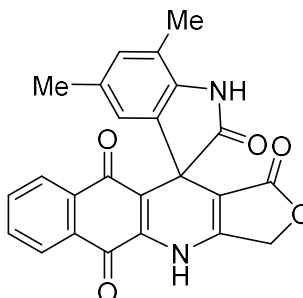
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_C : 181.4 (C-10), 179.0 (C-5), 177.6 (C-2'),

169.3 (C-1), 156.8, 141.2, 141.1, 138.2, 135.2, 133.8, 133.1, 131.4, 130.1, 126.5, 126.2, 126.1, 116.6, 113.6, 102.1, 100.3, 66.4 (C-3), 49.4 (C-11).



HR-ESI-MS: tìm thấy m/z của $[M+H]^+$ các giá trị: 542.9003; 540.9027; 544.9012, tính toán theo lý thuyết $[C_{22}H_{11}Br_2N_2O_5]^+$: 542.9009; 540.9030; 544.8989), và m/z $[M+Na]^+$: 564.8824; 562.8872; 566.8793, tính toán theo lý thuyết $[C_{22}H_{10}Br_2N_2NaO_5]^+$: 564.8829; 562.8849; 566.8809.

Hợp chất 174g: 4',6'-Dimethyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Chất rắn dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy: 372-373°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3353, 3183, 1749, 1725, 1666, 1592, 1488, 1396, 1333, 1298, 1269, 1183, 1075, 1040, 1020, 752, 725.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H : 10.87 (1H, s, NH), 10.45 (1H, s, NH), 8.08 (1H, m, H-6), 7.84 – 7.80 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 6.76 (2H, d, $J = 17.4$ Hz, H-4', H-6'), 4.98 (2H, s, H-3), 2.23 (3H, s, CH₃-5'), 2.11 (3H, s, CH₃-7').

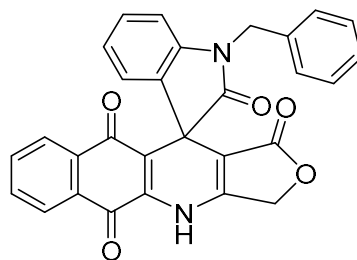
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_C : 181.1 (C-10), 179.1 (C-5), 178.3 (C-2'), 169.2 (C-1), 155.9, 140.5, 138.0, 135.3, 135.1, 133.5, 131.5, 130.3, 130.1, 129.9, 126.1, 125.9, 122.2, 117.8, 117.5, 101.2, 66.0 (C-3), 48.3 (C-11), 20.4 (CH₃-5'), 16.3 (CH₃-7').

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[M+H]^+$: 413.1131, tính toán theo lý thuyết $[C_{24}H_{17}N_2O_5]^+$: 413.1132 và m/z $[M+Na]^+$: 435.0948, tính toán theo lý thuyết $[C_{24}H_{16}N_2NaO_5]^+$: 435.0952.

Hợp chất 174h: 1'-Benzyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Sản phẩm thu được là chất rắn dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 320-321 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3431, 3061, 1752, 1712, 1667, 1608, 1497, 1333, 1300, 1267, 1181, 1075, 1041, 1018, 961, 747, 721.

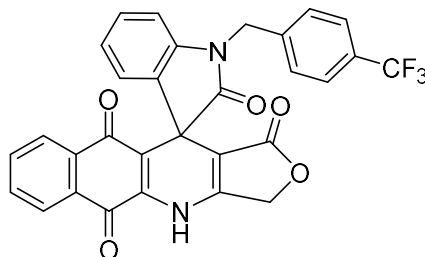


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 11.03 (1H, s, NH), 8.11 – 8.08 (1H, m, H-6), 7.85 – 7.81 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.63 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.36 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.21 (1H, dd, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.14 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.69 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.05 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 5.04 (2H, d, $J = 3.6$ Hz), 4.94 (1H, d, $J = 16.2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.2 (C-10), 179.0 (C-5), 176.7 (C-2'), 169.2 (C-1), 156.5, 142.5, 140.8, 136.3, 135.1, 134.5, 133.6, 131.4, 129.9, 128.5, 128.3 (2C), 127.2 (2C), 127.0, 126.2, 126.0, 124.1, 122.2, 117.2, 108.4, 100.8, 66.2 (C-3), 47.7 (C-11), 43.7 (C-7'').

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 475.1281, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 475.1289 và m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 497.1094, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{29}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_5]^+$: 497.1108.

Hợp chất 174i: 1'-(4-(Trifluoromethyl)benzyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Chất rắn dạng bột dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy: 335-336°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3314, 3066, 1763, 1708, 1671, 1611, 1505, 1421, 1371, 1323, 1300, 1268, 1163, 1124, 1067, 1015, 907, 803, 751, 726.

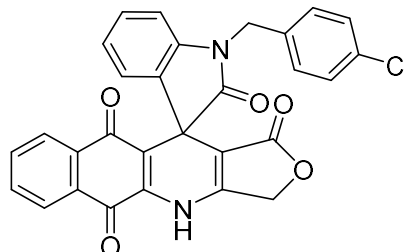
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 11.05 (1H, s, NH), 8.11 – 8.08 (1H, m, H-6), 7.86 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.85 – 7.82 (3H, m), 7.73 (2H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.16 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.93 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.15 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 5.07 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 5.05 (2H, d, $J = 3.6$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 179.0 (C-5), 176.7 (C-2'), 169.4 (C-1), 156.6, 142.2, 141.4, 140.9, 135.2, 134.5, 133.7, 131.4, 130.0, 128.6, 128.0 (3C), 126.2, 126.1, 125.2 (2C, d, $J = 3.8$ Hz), 124.3 (1C, q, $J = 271.3$ Hz, CF_3),

124.3, 122.5, 117.1, 108.3, 100.8, 66.3 (C-3), 47.7 (C-11), 43.2 (C-7'').

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[M+H]^+$: 543.1137, tính toán theo lý thuyết $[C_{30}H_{18}F_3N_2O_5]^+$: 543.1162 và m/z $[M+Na]^+$: 565.0952, tính toán theo lý thuyết $[C_{30}H_{17}F_3N_2NaO_5]^+$: 565.0982.

Hợp chất 174j: *1'-(4-Chlorobenzyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*



Sản phẩm là chất rắn dạng bột, màu nâu vàng, nhiệt độ nóng chảy: 292-293°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3164, 3061, 1760, 1708, 1671, 1645, 1595, 1504, 1490, 1400, 1370, 1331, 1299, 1268, 1188, 1176, 1070, 1042, 1010, 907, 800, 748, 726, 572, 476.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_H : 11.04 (1H, s, NH), 8.11 – 8.07 (1H, m, H-6), 7.85 – 7.81 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.65 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.42 (2H, dt, $J = 8.4, 2.4$ Hz), 7.21 (1H, d, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.15 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.91 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.73 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.04 (1H, d, $J = 16.2$ Hz'), 5.03 (2H, d, $J = 3.6$ Hz), 4.95 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7'').

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 179.0 (C-5), 176.7 (C-2'), 169.3 (C-1), 156.5, 142.3, 140.9, 135.4, 135.2, 134.5, 133.7, 131.8, 131.4, 130.0, 129.3 (2C), 128.6, 128.3 (2C), 126.2, 126.1, 124.2, 122.4, 117.1, 108.4, 100.8, 66.3 (C-3), 47.7 (C-11), 43.0 (C-7'').

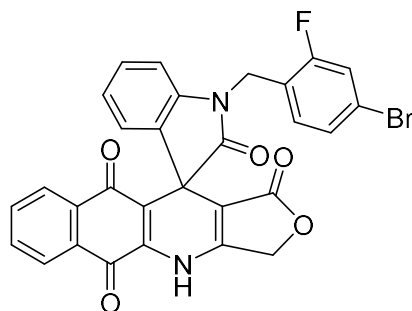
HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[M+H]^+$: 509.0895, tính toán theo lý thuyết $[C_{29}H_{18}ClN_2O_5]^+$: 509.0899 và m/z $[M+Na]^+$: 531.0694, tính toán theo lý thuyết $[C_{29}H_{17}ClN_2NaO_5]^+$: 531.0719.

Hợp chất 174k: *1'-(4-Bromo-2-fluorobenzyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Thu được chất rắn dạng bột, màu cam, nhiệt độ nóng chảy: 350-351°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3440, 1760, 1708, 1673, 1648, 1611, 1505, 1488, 1370, 1332, 1299, 1269, 1176, 1070, 1042, 1012, 873, 747, 727.

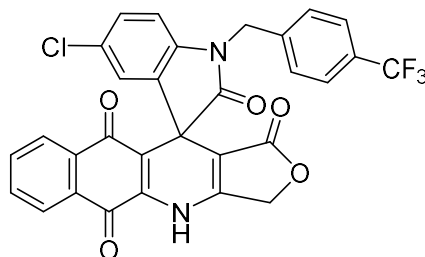
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H : 11.05 (1H, s, NH), 8.10 – 8.08 (1H, m), 7.85 – 7.82 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.68 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 7.61 (1H, dd, $J = 9.6, 1.8$ Hz), 7.40 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.24 (1H, dd, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.20 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.94 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.04 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.02 (1H, dd, $J = 16.2, 2.4$ Hz), 4.93 (1H, d, $J = 16.2$ Hz).



^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 179.0 (C-5), 176.7 (C-2'), 169.4 (C-1), 159.9 (1C, d, $J = 248.8$ Hz, C-F), 156.6, 142.0, 140.9, 135.2, 134.5, 133.7, 131.4, 130.9, 130.0, 128.8, 127.5, 126.2 (1C, d, $J = 18.75$ Hz, C-1''), 124.4, 122.8 (1C, d, $J = 13.8$ Hz), 122.6, 120.6 (1C, d, $J = 8.8$ Hz, C-4''), 118.6 (1C, d, $J = 25$ Hz, C-3''), 117.0, 108.0, 100.7, 66.4 (C-3), 47.6 (C-11), 39.83 (C-7'').

HR-ESI-MS: tìm thấy các giá trị m/z của $[\text{M}+\text{H}]^+$ tương ứng: 571.0284 và 573.0271, theo tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{29}\text{H}_{17}\text{BrFN}_2\text{O}_5]^+$: 571.0300 và 573.0279. Tìm thấy m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 593.0107 và 595.0093, tính toán theo lý thuyết cho $[\text{C}_{29}\text{H}_{16}\text{BrFN}_2\text{NaO}_5]^+$: 593.0119 và 595.0099.

Hợp chất 174l: 5'-Chloro-1'-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Chất rắn dạng bột dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 354-355°C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3442, 3303, 1762, 1705, 1670, 1595, 1503, 1485, 1431, 1323, 1301, 1268, 1160, 1121, 1067, 1042, 1014, 824, 808, 729, 695, 553.

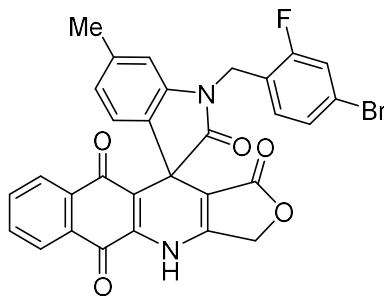
^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 11.10 (1H, s, NH), 8.12 – 8.08 (1H, m, H-6), 7.88 - 7.84 (3H, m, H-7, H-8, H-9), 7.84 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.74 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 5.07 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 5.06 (2H, s).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.4 (C-10), 179.0 (C-5), 176.5 (C-2'), 169.4 (C-1), 156.9, 141.2, 141.2, 141.0, 136.1, 135.1, 133.7, 131.4, 130.1, 128.5, 128.0 (3C), 126.6, 126.2, 126.1, 125.2 (2C, d, $J = 3.8$ Hz), 124.7, 124.3 (1C, q, $J = 270.0$ Hz, CF_3), 116.4, 109.7, 100.2, 66.5 (C-3), 47.9 (C-11), 43.3 (C-7'').

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z 577.0772 tương ứng với $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết cho $[\text{C}_{30}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 577.0773 và tìm thấy m/z 599.0593 tương ứng với $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán theo lý thuyết cho $[\text{C}_{30}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{NaO}_5]^+$: 599.0593.

Hợp chất 174m: 1'-(4-Bromo-2-fluorobenzyl)-6'-methyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone



Chất rắn dạng bột dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 337-338°C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3314, 2970, 1761, 1725, 1685, 1655, 1595, 1496, 1451, 1396, 1341, 1301, 1267, 1242, 1174, 1077, 1027, 875, 800, 743, 726.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 11.06 (1H, s, NH), 8.09 (1H, m, H-6), 7.89 – 7.88 (1H, m, H-9), 7.86-7.83 (2H, m, H7, H8), 7.81 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-6''), 7.64 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H-3''), 7.44 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H-5''), 7.09 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8'), 6.99 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7'), 5.18 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-7''), 5.13 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-7''), 5.05 (2H, d, $J = 16.8$ Hz, H-3), 2.23 (3H, s, H-9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 178.9 (C-5), 177.8 (C-2'), 169.4 (C-1), 158.9 (1C, d, $J = 247.5$ Hz, C-F), 156.4 (C-3a), 140.8 (C-4a), 139.98 (C-4'), 135.5 (C-6'), 135.1 (C-8), 133.7 (C-7), 132.5 (C-5'), 131.4 (C-9a), 129.98 (C-5a), 129.8 (1C, d, $J = 4.5$ Hz, C-6''), 127.8 (C-5''), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 125.2 (1C, d, $J = 15.0$ Hz, C-1''), 122.6 (C-7', C-8'), 120.4 (1C, d, $J = 9.0$ Hz, C-4''), 118.6 (1C, d, $J = 24$ Hz, C-3''), 118.3 (C-3'), 117.3 (C-10a), 100.9 (C-11a), 66.4 (C-3), 47.1 (C-11), 39.92 (C-7''), 17.3 (C-9').

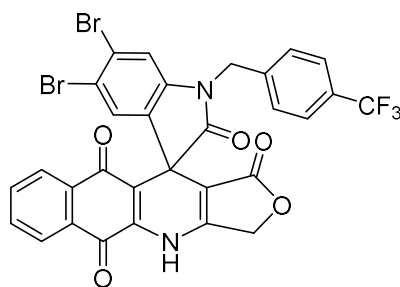
HR-ESI-MS: tìm thấy m/z 585.04564 và 587.0436 tương ứng với $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết cho $[\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{BrFN}_2\text{O}_5]^+$: 585.0456 và 587.0436. Tìm thấy m/z 607.0273 và 609.0256 tương ứng với $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tính toán theo lý thuyết cho thấy $[\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{BrFN}_2\text{NaO}_5]^+$: 607.0276 và 609.0255.

Hợp chất 174n: 5',6'-Dibromo-1'-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Sản phẩm chất rắn dạng bột màu đỏ cam có nhiệt độ nóng chảy: 278-279 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3431, 3067, 2957, 2926, 1751, 1728, 1668, 1645, 1596, 1501, 1456, 1397, 1324, 1267, 1161, 1127, 1067, 1039, 1023, 1010, 974, 804, 739, 727, 551.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 11.19 (1H, s, NH), 8.11 (1H, dd, $J = 6.6$, 2.4 Hz, H-6), 7.93 (1H, dd, $J = 6.6$, 2.4 Hz, H-9), 7.89 – 7.85 (2H, m, H-7, H-8), 7.79 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'', H-5''), 7.73 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'', H-6''), 7.63 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8'), 7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5'), 5.42 (2H, s), 5.08 (2H, s).



^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 181.6 (C-10), 178.8 (C-5), 177.4 (C-2'), 169.5 (C-1), 157.1, 143.0, 141.4, 139.3, 139.2, 135.5, 135.2, 133.9, 131.3, 130.2, 127.2, 127.0 (2C), 126.3, 126.2, 125.2 (2C, d, $J = 3.8$ Hz), 124.3 (1C, q, $J = 270.0$ Hz, CF_3), 116.1, 115.1, 101.6, 100.0, 66.7 (C-3), 47.7 (C-11), 44.9 (C-7').

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z 700.9359 và 698.9366 và 702.9299 tương ứng với $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết cho $[\text{C}_{30}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5]^+$: 700.9353 và 698.9373 và 702.9332.

2.4. Quy trình tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin với AZT (182a-p)

Quy trình chung thực hiện phản ứng domino: Hỗn hợp phản ứng gồm: 2-amino-1,4-naphthoquinone (1 mmol) (**36**), acid tetronic (1 mmol) (**51**) và (1 mmol) lần lượt với các dẫn xuất của isatin bao gồm các hợp chất (**172a-p**), thêm 3 ml acid acetic khan và 20 mol% của p -TsOH (0.02 mmol). Thực hiện phản ứng trong thiết bị gia nhiệt vi sóng AntonParr, duy trì nhiệt độ ở 110 °C trong thời gian 30 phút. Phản ứng kết thúc, đưa hệ về nhiệt độ phòng, thêm 20 ml nước cất, chiết 3 lần với dichloromethan (3x20 ml). Dịch chiết được làm khan bằng CaCl_2 hoặc Na_2SO_4 , cất quay loại bỏ dung môi thu được sản phẩm thô. Tiến hành phân lập bằng sắc ký bản mỏng với hệ dung môi rửa giải dichloromethan - acetone (tỷ lệ 9:1) thu được sản phẩm sạch đủ điều kiện để thực hiện bước phản ứng tiếp theo

Quy trình chung thực hiện phản ứng click:

Trộn hỗn hợp phản ứng gồm: 1 mmol lần lượt các sản phẩm thu được ở trên với 1 mmol AZT, thêm 5ml hỗn hợp t -BuOH/ H_2O (1:1), thêm 20% mol (0.02 mol) CuI cùng xúc tác DIPEA. Thực hiện phản ứng trong thiết bị vi sóng, thời gian 1,5 - 2h, sau khi phản ứng kết thúc, tách, chiết, phân lập sắc bằng ký cột bằng hệ dung môi n -hexan/ EtOAc (6:4) thu được sản phẩm sạch, có hiệu suất từ 62 - 83%.

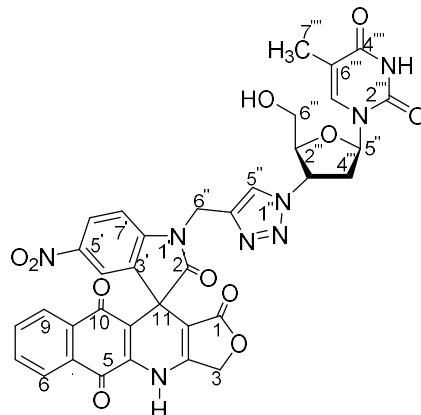
Hợp chất 182a: 1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-5'-nitro-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4- b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu cam, nhiệt độ nóng chảy 272 - 273 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3227, 1668, 1606, 1498, 1332, 1301, 1270, 1180, 1041, 1018, 947, 914, 827 770, 724, 696, 553

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 11.32 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.2 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.25 - 8.23 (2H, m, H-5', H-5''), 8.21-8.20 (1H, m, H-6), 8.10 - 8.09

(1H, m, H-6'), 7.85 - 7.77 (4H, m, H-9, H-8, H-7, H-6'''), 7.35 (1H, dd, $J=9.0, 1.8$ Hz, H-8'), 6.41 - 6.38 (1H, m, H-5'''), 5.39 - 5.35 (1H, m, H-3'''), 5.23 - 5.20 (1H, dd, $J=15.6, 3.6$ Hz, H_a-6''), 5.18 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H_b-6''), 5.08 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.21 - 4.19 (1H, m, H-2'''), 3.71 - 3.69 (1H, m, H_a-6'''), 3.64 - 3.60 (1H, m, H_b-6'''), 2.77 - 2.73 (1H, m, H_a-4'''), 2.70 - 2.65 (1H, m, H_b-4'''), 1.80 (3H, d, $J=0.6$ Hz, CH₃)

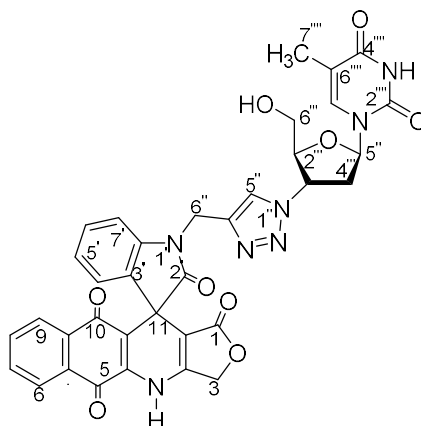


¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.5 (C-10), 178.8 (C-5), 176.7 (C-2'), 169.3 (C-1), 163.7 (C-4'''), 157.2 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 147.9 (C-4'), 143.0 (C-7'), 141.5 (C-4a), 136.2 (C-6'''), 135.0 (C-8), 134.8 (C-4''), 133.7 (C-7), 131.3 (C-9a), 130.1 (C-5a), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 126.0 (C-6'), 123.1 (C-5'), 123.0 (C-3'), 120.1 (C-5''), 115.9 (C-10a), 109.5 (C-11a), 108.6 (C-8'), 108.6 (C-5'''), 84.5 (1C, d, $J = 5$ Hz, C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.7 (C-3), 60.5 (1C, d, $J=7.5$ Hz, C-6'''), 59.1 (1C, d, $J=5$ Hz, C-3'''), 47.6 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.9 (C-6''), 12.2 (C-7''')

Hợp chất 182b: 1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn màu nâu đen, nhiệt độ nóng chảy 230 - 231 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3148, 1662, 1488, 1300, 1269, 1180, 1041, 1015, 723, 558



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 11.31 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.06 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.20 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-5''), 8.07 - 8.09 (1H, m, H-6), 7.83 - 7.79 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.23 - 7.19 (2H, m, H-7', H-8'), 7.00 - 6.98 (1H,

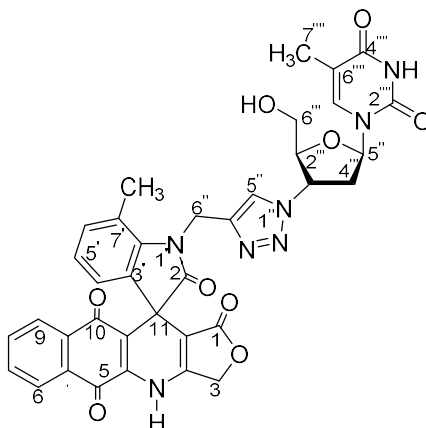
m, H-6'), 6.91 - 6.94 (1H, m, H-5'), 6.40 - 6.37 (1H, m, H-5'''), 5.37 - 5.33 (1H, m, H-3'''), 5.26 (1H, dd, $J = 4.8$ Hz, 11.4 Hz, -OH), 5.10 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H_a-6''), 5.04 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H_b-6''), 4.99 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.20 - 4.17 (1H, m, H-2'''), 3.71 - 3.60 (2H, m, H_{ab} - 6'''), 2.78 - 2.61 (2H, m, H_{a,b}-4'''), 1.80 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 179.1 (C-5), 176.2 (C-1'), 169.5 (C-1), 163.8 (C-4'''), 156.8 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 142.8, 142.7, 141.8, 141.1, 136.3, 135.2 (C-8), 134.5 (C-7), 131.3 (C-9a), 130.0 (C-5a), 128.8, 126.3 (C-6), 126.1 (C-9), 124.3, 123.1, 123.0, 122.5, 117.1 (C-10a), 109.6 (C-11a), 108.3 (C-5'''), 84.6 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.4 (C-3), 60.7 (C-6'''), 59.2 (C-3'''), 47.6 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.7 (C-6''), 12.3 (C-7''').

Hợp chất 182c: 1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-7'-methyl-3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy 282 - 283 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2923, 1664, 1594, 1497, 1477, 1332, 1300, 1268, 1179, 1041, 1011, 769, 724, 663, 559



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 11.33 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.06 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.22 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-5''), 8.09 - 8.07 (1H, m, H-6), 7.86 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.05 (1H, t, $J = 4.2, 7.2$ Hz, H-7'), 6.98 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 6.85 - 6.82 (1H, m, H-5'), 6.40 (1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-5'''), 5.37 - 5.33 (1H, m, H-3'''), 5.32 - 5.24 (3H, m, H_{ab}-6'', -OH), 5.03 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.20 (1H, td, $J = 2.4, 9.0$ Hz, H-2'''), 3.73 - 3.69 (1H, m, H_a - 6'''), 3.69 - 3.63 (1H, m, H_b - 6'''), 2.79 - 2.73 (1H, m, H_a-4'''), 2.70 - 2.64 (1H, m, H_b-4'''), 2.46 (3H, d, $J = 9.0$ Hz, CH₃-isatin). 1.80 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃-thymind).

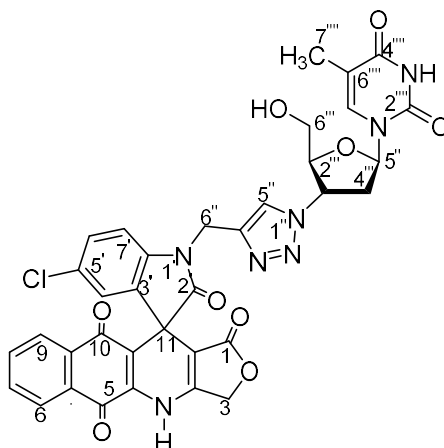
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 179.1 (C-5), 177.2 (C-1'), 169.4 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.5 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 144.6 (C-4a), 139.6, 136.2 (C-6'''), 135.4, 135.2 (C-8), 133.7 (C-7), 132.5, 131.4 (C-9a), 129.9 (C-5a), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9a), 123.0, 122.5, 122.4, 118.5, 117.3 (C-10a), 109.6 (C-11a), 101.0 (C-5'''), 84.6 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.3 (C-3), 60.7 (C-6'''), 59.25 (C-3'''), 47.1 (C-11),

37.9 (C-4'''), 37.3 (C-6''), 18.2 (-CH₃ isatin), 12.3 (C-7''').

Hợp chất 182d: 5'-chloro-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy 320 - 321 °C

IR (KBr) $\nu_{\max/\text{cm}^{-1}}$: 3374, 1667, 1595, 1503, 1480, 1429, 1334, 1330, 1043, 964, 792, 725, 695, 553, 439.



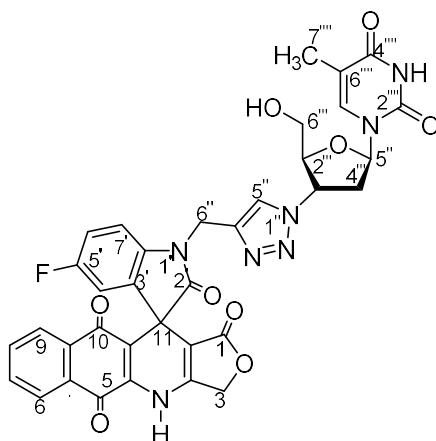
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_{H} : 11.32 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.06 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.21 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 8.10 (1H, dd, $J = 3.6, 6.6$ Hz, H-5''), 7.85 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.05 (1H, t, $J = 4.2, 7.2$ Hz, H-8'), 6.98 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 6.85 - 6.82 (1H, m, H-5'), 6.41-6.38 (1H, m, H-5'''), 5.37 - 5.35 (1H, m, H-3'''), 5.28 - 5.25 (1H, dd, $J = 5.4, 12.0$ Hz, -OH), 5.12 - 5.04 (2H, m, H-6''), 5.03 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.20 (1H, td, $J = 2.4, 9.0$ Hz, H-2'''), 3.72 - 3.69 (1H, m, H_a - 6'''), 3.64 - 3.61 (1H, m, H_b - 6'''), 2.76 - 2.74 (1H, m, H_a-4'''), 2.69 - 2.62 (1H, m, H_b-4'''), 1.81 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃-thymind).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 179.1 (C-5), 177.2 (C-1'), 169.4 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.5 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 142.3, 141.2, 140.8, 136.2 (C-6'''), 136.1, 135.2 (C-8), 133.7 (C-7), 131.4 (C-9a), 130.8, 128.5, 126.5, 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 124.6, 123.1, 123.0, 116.5 (C-10a), 109.7 (C-5'''), 109.6 (C-11a), 84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.3 (C-3), 60.7 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.1 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.82 (C-6''), 12.2 (C-7''').

Hợp chất 182e: 5'-fluoro-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy 276 - 277 °C

IR (KBr) $\nu_{\max/\text{cm}^{-1}}$: 3240, 2924, 1666, 1593, 1489, 1452, 1334, 1330, 1267, 1171, 1097, 1076, 1041, 1016, 976, 953, 816, 789, 722, 698, 558.



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_H : 11.32 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.06 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.21 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-5''), 8.10 - 8.08 (1H, m, H-6), 7.86 - 7.67 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.19 - 7.10 (1H, dd, $J=3, 8.4$ Hz, H-8'), 7.17 - 7.00 (2H, m, H-5', H-6'), 6.41 - 6.38 (1H, m, H-5'''), 5.37 - 5.35 (1H, dd, $J = 4.2, 9.0$ Hz, H-3'''), 5.26 (1H, dd, $J = 5.4$ Hz, 11.4 Hz, -OH), 5.11 - 5.03 (2H, m, H-6''), 5.00 (2H, s, $\text{H}_{a,b-3}$), 4.20 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-2'''), 3.71 - 3.69 (1H, m, H_a-6''), 3.64 - 3.61 (1H, m, H_b-4''), 2.77 - 2.74 (1H, m, H_a-4''), 2.69 - 2.62 (1H, m, H_b-4''), 1.81 (3H, s, CH_3).

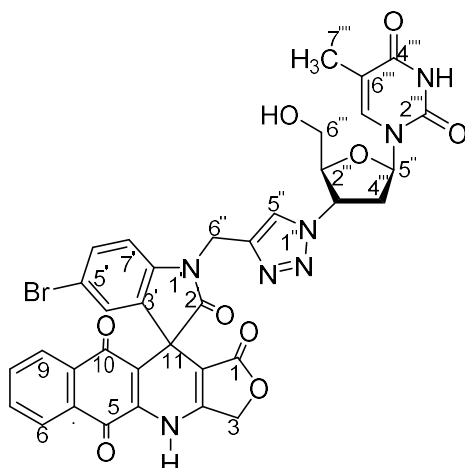
$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 178.9 (C-5), 176.0 (C-1'), 169.3 (C-1), 163.7 (C-4'''), 159.4 (1C, $J=197.5$ Hz, C-F), 156.8 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 142.4, 141.1, 138.1, 136.2, 135.8 (C-8), 135.1 (C-7), 131.6 (C-9a), 130.0 (C-5a), 128.6, 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 123.0, 122.9, 116.5 (C-10a), 114.8, 112.4, 109.5 (C-11a), 109.1 (C-5'''), 84.6 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.5 (C-3), 60.5 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.9 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.8 (C-6'''), 12.3 (C-7''').

Hợp chất 182f: 5'-bromo-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy 295 - 296 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 2924, 1664, 1602, 1498, 1477, 1333, 1299, 1269, 1178, 1041, 1016, 965, 769, 723, 693, 552.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_H : 11.26 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.01 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.14 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-6), 8.03 - 8.01 (1H, dd, $J = 3.6, 9.0$ Hz, H-5''), 7.71 - 7.73 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.39 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, H-8'), 7.35 - 7.34 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-6'), 6.94 - 6.92 (1H, dd, $J = J = 1.2, 8.4$ Hz, H-5'), 6.34 - 6.31 (1H, m, H-5'''), 5.30 - 5.28 (1H, dd, $J = 5.4, 9.0$ Hz, H-3'''), 5.21 (1H, dd, $J = 5.4$ Hz, 11.4 Hz, -OH), 5.04 - 4.96 (2H, m, H-6''), 4.95 (2H, s, $\text{H}_{a,b-3}$), 4.13 - 4.11 (1H, dd, $J = 3.6, 9.0$ Hz, H-2'''), 3.65 - 3.61 (1H, m, H_a-6''), 3.57 - 3.52 (1H, m, H_a-6''), 2.69 - 2.66 (1H, m, H_a-4''), 2.61 - 2.58 (1H, m, H_b-4''), 1.73 (3H, s, CH_3).

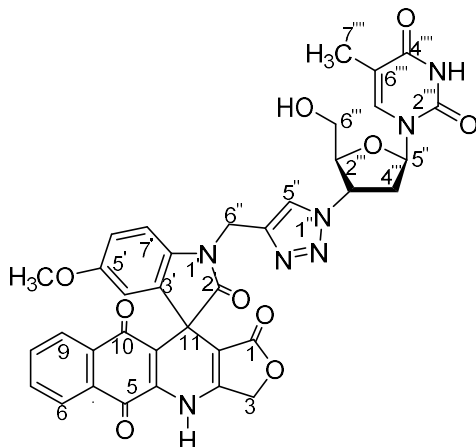


^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.4 (C-10), 178.9 (C-5), 175.7 (C-1'), 169.4 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.9 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 142.3, 142.2, 141.2, 141.1, 136.4, 136.2, 135.1 (C-8), 133.7 (C-7), 131.4 (C-9a), 130.0 (C-5a), 127.8, 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 123.0, 122.9, 116.4 (C-10a), 114.3 (C-Br), 110.3 (C-11a), 109.5 (C-5'''), 84.6 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.5 (C-3), 60.5 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.9 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.7 (C-6''), 12.2 (C-7''').

Hợp chất 182g: 1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-5'-methoxy-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2,5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy 285 - 286 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3211, 2925, 1664, 1600, 1492, 1434, 1398, 1333, 1298, 1269, 1040, 1012, 972, 883, 785, 722, 698, 558.



^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.32 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.06 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.20 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 8.10 - 8.08 (1H, m, H-5''), 7.84 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 6.89 - 6.87 (1H, m, H-5'), 6.79 - 6.77 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-8'), 6.41-6.38 (1H, m, H-5'), 5.35 - 5.33 (1H, dd, $J = 3.0, 8.4$ Hz, H-3'''), 5.29 - 5.26 (1H, m, -OH), 5.08 - 5.02 (2H, m, H-6''), 5.01 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.20 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-2'''), 3.72 - 3.68 (1H, m, H_a - 6'''), 3.68 - 3.62 (1H, m, H_a - 6''), 3.62 (3H, s, -OCH₃), 2.78 - 2.73 (1H, m, H_a-4'''), 2.70 - 2.61 (1H, m, H_b-4'''), 1.81

(3H, s, CH₃).

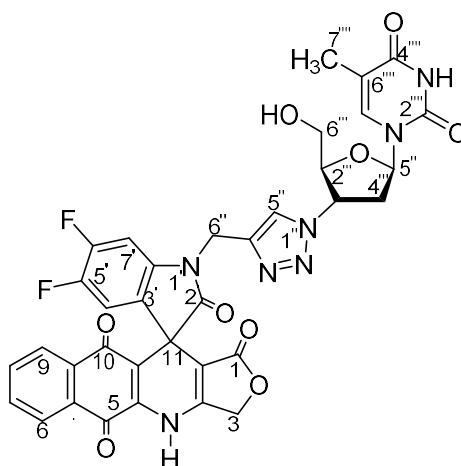
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 179.0 (C-5), 175.7 (C-1'), 169.4 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.6 (C-3a), 155.6, 150.4 (C-2'''), 142.7, 140.8, 136.2, 135.6, 135.3 (C-8), 135.1, 133.6 (C-7), 131.5 (C-9a), 129.9 (C-5a), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 122.9, 122.8, 117.0 (C-10a), 112.8, 111.8 (C-11a), 109.5 (C-5'''), 108.5, 84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.3 (C-3), 60.6 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 55.4 (-OCH₃), 48.0 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.8 (C-6''), 12.2 (C-7''').

Hợp chất 182h: 5',6'-difluoro-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu nâu cam, nhiệt độ nóng chảy 246 - 247 °C

IR (KBr) $\nu_{\max/\text{cm}^{-1}}$: 3242, 2925, 1666, 1624, 1594, 1497, 1455, 1397, 1334, 1300, 1269, 1096, 1079, 1041, 1011, 956, 770, 723, 615, 560.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 11.32 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.06 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.23 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-6), 8.10 - 8.08 (1H, m, H-5''), 7.84 - 7.79 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.44 - 7.41 (1H, m, H-5'), 7.25 - 7.22 (1H, m, H-8'), 6.41 - 6.38 (1H, m, H-5'''), 5.38 - 5.35 (1H, m, H-3'''), 5.29 - 5.26 (1H, m, -OH), 5.12 - 5.03 (2H, m, H-6''), 5.01 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.22 - 4.19 (1H, m, H-2'''), 3.71 - 3.69 (1H, m, H_a-6'''), 3.65 - 3.60 (1H, m, H_b-6'''), 2.78 - 2.74 (1H, m, H_a-4'''), 2.68 - 2.65 (1H, m, H_b-4'''), 1.81 (3H, s, CH₃).



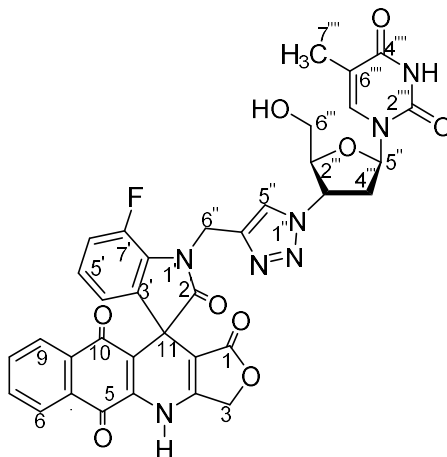
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 178.9 (C-5), 176.1 (C-1'), 169.3 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.8 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 149.2, 142.1, 141.2, 138.7, 136.2, 135.2 (C-8), 133.7 (C-7), 131.6 (C-9a), 130.1, 130.0 (C-5a), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 123.1, 123.0, 116.3 (C-10a), 114.3, 109.5 (C-11a), 109.1 (C-5'''), 84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.5 (C-3), 60.5 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.9 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.8 (C-6''), 12.3 (C-7''').

Hợp chất 182i: 7'-fluoro-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-

spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy 239 - 240 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3242, 2924, 1705, 1663, 1587, 1508, 1475, 1335, 1240, 1181, 1095, 1041, 1022, 1003, 861, 763, 719, 669, 575.



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.31 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.12 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.1 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-6), 8.10 - 8.08 (1H, m, H-5"), 7.86 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6""), 7.15 - 7.09 (1H, m, H-6', H-8'), 6.98 - 6.94 (1H, m, H-7'), 6.41 - 6.38 (1H, m, H-5""), 5.37 - 5.35 (1H, m, H-3""), 5.28 - 5.25 (1H, td, $J = 5.4$ Hz, 11.4 Hz, -OH), 5.20 - 5.15 (2H, m, H-6"), 5.13 - 5.02 (2H, m, H_{a,b}-3), 4.21 - 4.19 (1H, m, H-2""), 3.72 - 3.69 (1H, m, H_a - 6""), 3.65 - 3.62 (1H, m, H_b-4""), 2.78 - 2.74 (1H, m, H_a-4""), 2.70 - 2.65 (1H, m, H_b-4""), 1.81 (3H, s, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.4 (C-10), 178.9 (C-5), 176.0 (C-1'), 169.3 (C-1), 163.7 (C-4""), 156.8 (C-3a), 150.4 (C-2""), 147.04 (1C, d, $J = 246.5$ Hz, C-F) 143.5, 140.9, 137.1, 136.2, 135.2 (C-8), 133.8 (C-7), 131.3 (C-9a), 129.9 (C-5a), 128.3, 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 123.4, 122.5, 122.4, 120.7, 116.7 (C-10a), 116.6 (C-11a), 109.5 (C-5""), 84.6 (C-2""), 83.9 (C-5""), 66.5 (C-3), 60.6 (C-6""), 59.1 (C-3""), 47.8 (C-11), 37.9 (C-4""), 37.0 (C-6"), 12.2 (C-7"").

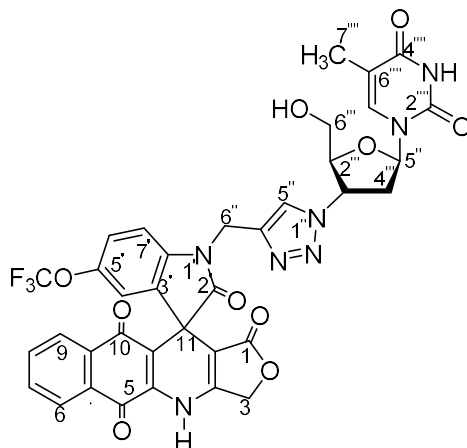
Hợp chất 182j: *1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-5'-(trifluoromethoxy)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Chất rắn dạng bột, màu nâu đen, nhiệt độ nóng chảy 131 - 132 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3227, 1663, 1594, 1491, 1398, 1334, 1301, 1250, 1215, 1168, 1097, 1041, 1015, 955, 880, 791, 723, 698, 663, 554.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.32 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.09 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.21 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6), 8.10 - 8.09 (1H, dd, $J = 3.0, 7.8$ Hz, H-5"), 7.84 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6""), 7.34 (1H, s, H-5'), 7.25 (1H, t, $J =$

0.6, 7.8 Hz, H- 8'), 7.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H- 6'), 6.41 – 6.38 (1H, m, H-5'''), 5.37 - 5.35 (1H, dd, $J = 5.4, 8.4$ Hz, H-3'''), 5.28 - 5.25 (1H, dd, $J = 5.4, 12.0$ Hz, -OH), 5.11 (2H, dd, $J = 3.0, 16.2$ Hz, H-6''), 5.04 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.21 - 4.19 (1H, m, H-2'''), 3.72 - 3.68 (1H, m, H_a - 6'''), 3.65 - 3.60 (1H, m, H_b - 6'''), 2.78 - 2.74 (1H, m, H_a-4'''), 2.68 - 2.65 (1H, m, H_b-4'''), 1.81 (3H, s, CH₃).

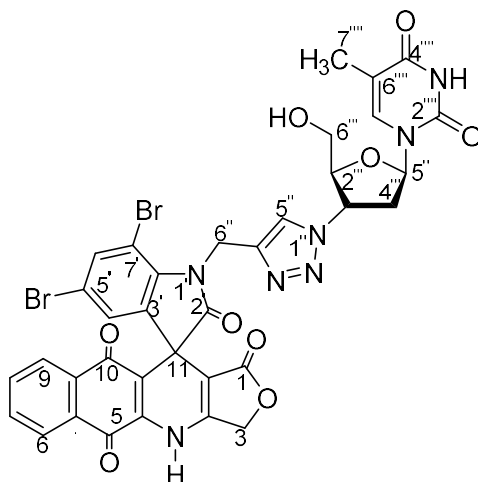


^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 178.9 (C-5), 176.1 (C-1'), 169.3 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.9 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 143.9, 142.3, 141.2, 141.0 (C-9), 136.2, 135.8 (C-8), 135.2 (C-7), 133.7, 131.3 (C-9a), 130.0 (C-5a), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 123.1, 123.0, 121.6, 119.2, 118.1 (C-10a), 116.4 (C-11a), 109.5 (C-5'''), 109.1, 84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.5 (C-3), 60.6 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.9 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.8 (C-6''), 12.2 (C-7''').

Hợp chất 182k: 5',7'-dibromo-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy 160 - 161 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3147, 1666, 1593, 1497, 1398, 1332, 1300, 1269, 1180, 1158, 1078, 1096, 1041, 1016, 973, 861, 770, 724, 597, 552



^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.37 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.20 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.25 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-6), 8.16 - 8.15 (1H, m, H-5''), 7.95 -

7.86 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.70 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-8'), 7.62-7.61 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-6'), 6.46 - 6.43 (1H, m, H-5'''), 5.50 (2H, dd, $J = 16.2, 33.6$ Hz, -OH, H-3'''), 5.43 - 5.40 (1H, m, H_a-6''), 5.35 - 5.32 (1H, m, H_b-6''), 5.12 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.26 - 4.23 (1H, m, H-2'''), 3.79 - 3.74 (1H, m, H_a-6'''), 3.71 - 3.67 (1H, m, H_b-6'''), 2.81 - 2.78 (1H, m, H_a-4'''), 2.74 (1H, dd, $J = 7.2, 14.4$ Hz, H_b-4'''), 1.86 (3H, s, CH₃).

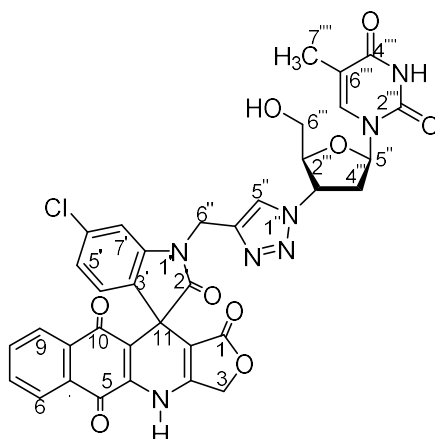
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.6 (C-10), 178.8 (C-5), 176.7 (C-1'), 169.5 (C-1), 163.7 (C-4'''), 157.2 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 144.2, 141.3, 139.2, 138.8, 136.2, 135.6 (C-8), 135.2 (C-7), 133.9, 131.4 (C-9a), 130.1 (C-5a), 127.2, 126.3 (C-6), 126.2 (C-9), 122.7, 122.6, 116.1 (C-10a), 115.0 (C-11a), 109.6 (C-5'''), 101.7, 84.6 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.7 (C-3), 60.6 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.6 (C-11), 37.8 (C-4'''), 37.1 (C-6''), 12.2 (C-7''').

Hợp chất 182l: 4',6'-dichloro-1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu nâu, nhiệt độ nóng chảy 280 - 281 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3199, 1666, 1599, 1497, 1476, 1435, 1332, 1300, 1269, 1180, 1093, 1041, 1012, 960, 911, 888, 776, 721, 688, 600, 544.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 11.32 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.32 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.23 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-6), 8.09 (1H, dd, $J = 3.0, 4.8$ Hz, H-5''), 7.86 - 7.81 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.31 (1H, t, $J = 1.2, 3.0$ Hz, H-5'), 7.12 (1H, t, $J = 2.4, 3.6$ Hz, H-7'), 6.41-6.39 (1H, m, H-5'''), 5.39 - 5.37 (1H, m, H-3'''), 5.28 - 5.25 (1H, m, -OH), 5.14 - 5.09 (2H, m, H-6''), 5.07 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.22 (1H, m, H-2'''), 3.73 - 3.68 (1H, m, H_a-6'''), 3.65 - 3.59 (1H, m, H_b-6'''), 2.79 - 2.74 (1H, m, H_a-4'''), 2.70 - 2.51 (1H, m, H_b-4'''), 1.81 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃-thymind).



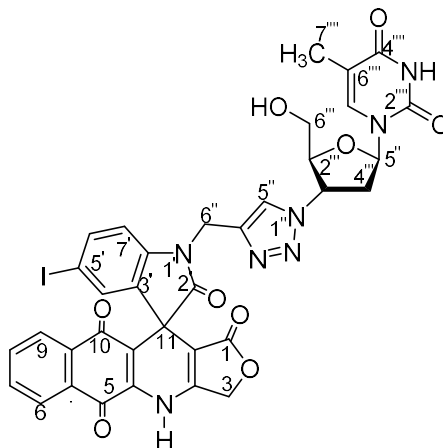
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.2 (C-10), 178.5 (C-5), 175.3 (C-1'), 169.0 (C-1), 163.7 (C-4'''), 158.1 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 144.9, 141.8, 141.7, 136.2 (C-6'''), 135.2 (C-8), 134.3, 133.9 (C-7), 131.0 (C-9a), 130.5, 129.7, 127.3, 126.4 (C-6), 126.2 (C-9), 123.1, 123.0, 122.1, 114.7 (C-10a), 109.5 (C-5'''), 108.4 (C-11a),

84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.4 (C-3), 60.5 (C-6'''), 59.0 (C-3'''), 47.7 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.8 (C-6''), 12.1 (C-7''').

Hợp chất 182m: *1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-5'-iodo-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Chất rắn dạng bột, màu cam, nhiệt độ nóng chảy: 206 - 207 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3210, 1666, 1599, 1497, 1477, 1398, 1333, 1300, 1269, 1178, 1078, 1041, 1017, 964, 880, 813, 768, 722, 693, 550, 528.



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.32 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.06 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.20 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-6), 8.10 - 8.08 (1H, m, H-5''), 7.84 - 7.81 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.57 (2H, t, $J = 1.2, 7.8$ Hz, H-5', H-8'), 6.89 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-6'), 6.41 - 6.38 (1H, m, H-5'''), 5.36 (1H, dd, $J = 5.4, 8.4$ Hz, H-3'''), 5.26 (1H, br, -OH), 5.09 (1H, dd, $J = 15.6, 8.4$ Hz, H_a -6''), 5.04 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H_b -6''), 5.02 (2H, s, $\text{H}_{a,b}$ -3), 4.20 (1H, dd, $J = 3.6, 8.4$ Hz, H-2'''), 3.70 (1H, dd, $J = 3.0, 9.6$ Hz, H_a -6'''), 3.64 - 3.60 (1H, m, H_b -6'''), 2.75 (1H, dd, $J = 6.6, 13.8$ Hz, H_a -4'''), 2.68 (1H, dd, $J = 6.0, 13.8$ Hz, H_b -4'''), 1.81 (3H, s, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.3 (C-10), 178.9 (C-5), 175.5 (C-1'), 169.3 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.8 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 142.3, 141.7, 141.1, 137.2, 136.6, 136.2, 135.1 (C-8), 133.7 (C-7), 132.5, 131.4 (C-9a), 130.0 (C-5a), 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 123.0, 122.9, 116.4 (C-10a), 110.8 (C-11a), 109.5 (C-5'''), 109.5, 84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.5 (C-3), 60.5 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 47.5 (C-11), 37.0 (C-4'''), 35.7 (C-6''), 12.2 (C-7''').

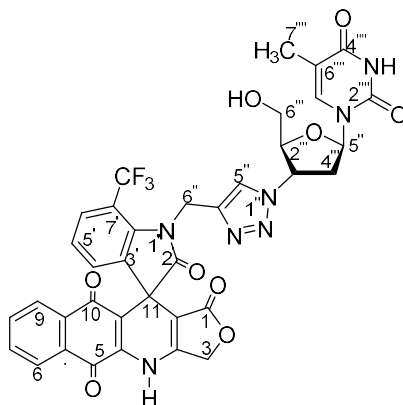
Hợp chất 182n: *1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-7'-trifluoromethyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Chất rắn dạng bột, màu nâu xám, nhiệt độ nóng chảy: 250 - 251 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3418, 1668, 1593, 1500, 1478, 1454, 1330, 1304, 1271,

1161, 1097, 1043, 1020, 976, 764, 726, 698, 558, 505.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.30 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.19 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{podophyllotoxin})}$), 8.11 (2H, m, H-6, H-5''), 7.88 - 7.79 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.61 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6', H-8'), 7.16 (1H, t, $J = 7.8$, H-7'), 6.38 - 6.35 (1H, dd, $J = 6.0, 9.6$ Hz, H-5'''), 5.32 - 5.30 (1H, dd, $J = 4.2, 7.8$ Hz, H-3'''), 5.25 (1H, br, $-\text{OH}$), 5.22 - 5.07 (2H, m, H-6''), 5.04 (2H, m, H_{a,b}-3), 4.16 (1H, br, H-2'''), 3.69 (1H, br, H_a - 6'''), 3.61 (1H, br, H_b-4'''), 2.73 - 2.65 (2H, m, H - 4'''), 1.80 (3H, s, CH_3).

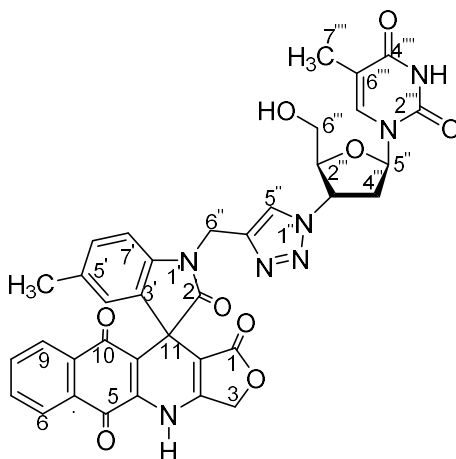


$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.4 (C-10), 178.7 (C-5), 177.8 (C-1'), 169.4 (C-1), 163.6 (C-4'''), 156.9 (C-3a), 150.3 (C-2'''), 141.2, 139.5, 137.3, 136.1, 135.1 (C-8), 133.8 (C-7), 131.2 (C-9a), 130.0 (C-5a), 129.0 (CF_3), 126.3, 126.2 (C-6), 126.1 (C-9), 124.6, 122.5, 122.4, 122.0, 116.5 (C-10a), 109.8 (C-11a), 109.4, 109.4 (C-5'''), 84.5 (C-2'''), 83.8 (C-5'''), 66.6 (C-3), 60.6 (C-6'''), 59.1 (C-3'''), 46.1 (C-11), 36.9 (C-4'''), 36.9 (C-6''), 12.1 (C-7''').

Hợp chất 182o: 1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-5'-methyl-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu đỏ nhạt, nhiệt độ nóng chảy 355 - 356 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3386, 2924, 1665, 1599, 1495, 1333, 1300, 1300, 1268, 1182, 1041, 1016, 789, 723, 697, 555.



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.32 (1H, s, $-\text{NH}_{(\text{Thymidine})}$), 11.06 (1H, s,

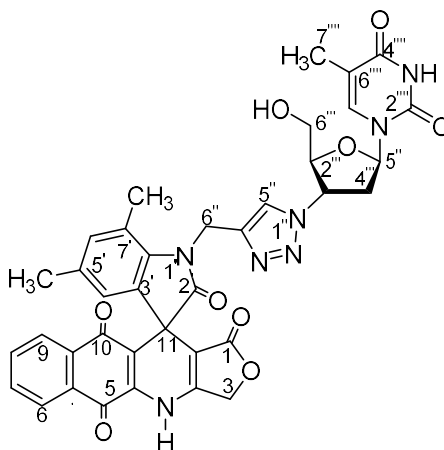
-NH_(podophyllotoxin)), 8.20 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-6), 8.10 - 8.08 (1H, m, H-5''), 7.84 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 7.02 (2H, t, $J = 4.0, 7.8$ Hz, H-6', H-8'), 6.87 (1H, dd, $J = 2.4, 7.8$ Hz, H-5'), 6.40 - 6.38 (1H, m, H-5'''), 5.36 - 5.33 (1H, m, H-3'''), 5.27 - 5.25 (1H, m, -OH), 5.09 - 5.64 (2H, m, H-6''), 5.03 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.19 (1H, dd, $J = 3.0, 8.4$ Hz, H-2'''), 3.69 (1H, t, $J = 2.4, 4.8$ Hz, H_a - 6'''), 3.62 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H_b - 6'''), 2.75 - 2.68 (1H, m, H_a-4'''), 2.67 - 2.61 (1H, m, H_b-4'''), 2.16 (3H, s, CH₃-isatin). 1.80 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃-thymind).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.3 (C-10), 179.0 (C-5), 175.9 (C-1'), 169.4 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.5 (C-3a), 150.4 (C-2'''), 142.7 (C-4a), 140.8, 139.5, 136.2 (C-6'''), 135.1 (C-8), 134.5 (C-7), 133.7, 131.4 (C-9a), 129.9 (C-5a), 128.8, 126.2 (C-6), 126.1 (C-9a), 124.9, 122.9, 122.8, 117.1 (C-10a), 109.6 (C-11a), 108.1 (C-5'''), 84.5 (C-2'''), 83.9 (C-5'''), 66.3 (C-3), 60.6 (C-6''), 59.1 (C-3'''), 47.6 (C-11), 37.1 (C-4'''), 36.98 (C-6''), 20.5 (-CH₃ isatin), 12.2 (C-7''').

Hợp chất 182p: 1'-((1-(2-(hydroxymethyl)-5-(5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-5',7'-dimethyl-3H-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy 268 - 269 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2923, 1664, 1594, 1497, 1477, 1332, 1300, 1268, 1179, 1041, 1011, 769, 722, 663, 559.



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 11.31 (1H, s, -NH_(Thymidine)), 11.05 (1H, s, -NH_(podophyllotoxin)), 8.22 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-6), 8.10 - 8.08 (1H, dd, $J = 3.0, 7.2$, H-5''), 7.85 - 7.80 (4H, m, H-7, H-8, H-9, H-6'''), 6.87 (1H, s, H-8'), 6.78 (1H, s, H-6'), 6.39 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-5'''), 5.36 - 5.33 (1H, m, H-3'''), 5.28 - 5.26 (1H, m, -OH), 5.26 - 5.22 (2H, m, H-6''), 5.03 (2H, s, H_{a,b}-3), 4.20 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, H-2'''), 3.72 - 3.69 (1H, m, H_a - 6'''), 3.65 - 3.63 (1H, m, H_b - 6'''), 2.77 - 2.74 (1H, m, H_a-4'''), 2.70 - 2.65 (1H, m, H_b-4'''), 2.40 (3H, d, $J = 10.2$ Hz, CH₃ -isatin), 2.14 (3H, s, CH₃-isatin). 1.80 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, CH₃-thymind).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 181.2 (C-10), 179.0 (C-5), 177.0 (C-1'),

169.4 (C-1), 163.7 (C-4'''), 156.5 (C-3a), 144.8 (C-2'''), 144.7 (C-4a), 137.2, 136.2 (C-6'''), 135.6 (C-8), 133.7 (C-7), 132.8, 131.4 (C-9a), 131.3, 129.8 (C-5a), 126.1 (C-6), 123.0 (C-9a), 122.9, 118.1, 117.4 (C-10a), 109.5 (C-11a), 101.0 (C-5'''), 84.5 (C-2''), 83.9 (C-5'''), 66.3 (C-3), 60.6 (C-6'''), 59.2 (C-3'''), 47.1 (C-11), 39.0 (C-4'''), 37.0 (C-6''), 20.2, (-CH₃ isatin), 18.0 (-CH₃ isatin), 12.2 (C-7''').

2.5. Quy trình tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin với Erlotinib (184a-e)

Quy trình chung thực hiện phản ứng domino: Hỗn hợp phản ứng gồm: 2-amino-1,4-naphthoquinone (1 mmol) (**36**), acid tetronic (1 mmol) (**51**) và (1 mmol) lần lượt với các dẫn xuất của isatin bao gồm các hợp chất (**169a-e**) thêm 3 ml acid acetic khan và 20 mol% của *p*-TsOH (0.02 mmol). Thực hiện phản ứng trong thiết bị gia nhiệt vi sóng AntonParr, duy trì nhiệt độ ở 110 °C trong thời gian 30 phút. Phản ứng kết thúc, đưa hệ về nhiệt độ phòng, thêm 20 ml nước cất, chiết 3 lần với dichloromethan (3x20 ml). Sử dụng CaCl₂ hoặc Na₂SO₄ loại nước trong dịch chiết, cất quay loại dung môi thu được sản phẩm thô. Tiến hành phân lập bằng sắc ký cột pha thuận, sử dụng hệ dung môi CH₂Cl₂ - CH₃COOC₂H₅ (tỷ lệ 8:2) thu được sản phẩm sạch đủ điều kiện để thực hiện bước phản ứng tiếp theo

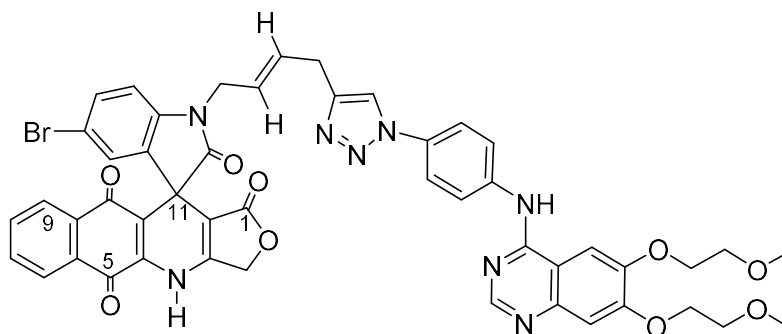
Quy trình chung thực hiện phản ứng click:

Trộn hỗn hợp phản ứng gồm: 1 mmol lần lượt các sản phẩm thu được ở trên với 1 mmol Erlotinib, thêm 5ml hỗn hợp *t*-BuOH/H₂O (1:1), thêm 20% mol (0.02 mol) CuI cùng xúc tác DIPEA. Thực hiện phản ứng sử dụng thiết bị vi sóng, thời gian từ 1,5 - 2h, sau khi phản ứng kết thúc, tách, chiết, phân lập sắc bằng ký cột bằng hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc (6:4) thu được sản phẩm sạch, hiệu suất từ 32 - 55%

Hợp chất 184a: (*E*)-1'-(4-(1-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)but-2-en-1-yl)-5'-bromo-3*H*-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4*H*)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu đỏ cam, nhiệt độ nóng chảy 261 - 262 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3428, 2958, 2928, 1726, 1668, 1636, 1602, 1505, 1480, 1458, 1383, 1334, 1299, 1274, 1123, 1072, 1041, 1023, 725.



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 11.06 (1H, s, -NH_{podophyllotoxin}), 9.50 (1H, s, -NH_{erlotinib}), 8.46 (1H, s), 8.46 (1H, s), 8.26 (1H, t, *J* = 1.8, 3.6 Hz), 7.99 (1H, d, *J* = 0.6 Hz), 7.89 (1H, s), 7.86 - 7.85 (1H, m), 7.73 - 7.66 (3H, m), 7.52 - 7.50 (1H, m),

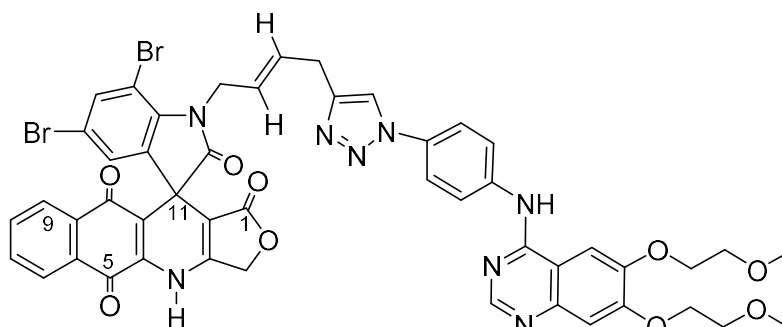
7.44 - 7.43 (1H, m), 7.42 - 7.40 (2H, m), 7.21 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.32 (1H, $J = 15.6$ Hz), 5.91 (1H, $J = 15.6$ Hz), 5.12 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.99 (2H, s), 4.45 (2H, d, $J = 3.6$ Hz), 4.39 - 4.29 (4H, m), 3.80 - 3.78 (2H, m), 3.77 - 3.75 (2H, m), 3.37 (3H, s), 3.36 (3H, s).

¹³C-NMR (*DMSO-d₆*, 150 MHz) δ_C : 181.3, 178.2, 175.9, 169.3, 156.8, 156.3, 152.9, 148.1, 146.9, 146.4, 141.6, 141.6, 140.3, 136.5, 134.9, 133.5, 131.3, 131.2, 130.9, 129.9, 128.9, 128.3, 127.1, 126.2, 126.0, 125.9, 121.6, 121.0, 120.2, 120.2, 118.7, 116.4, 114.1, 110.4, 108.9, 108.2, 103.3, 100.3, 70.1, 70.0, 68.4, 68.0, 66.4, 58.3, 58.3, 50.9, 47.7, 40.1.

Hợp chất 184b: *(E)-1'-(4-(1-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)but-2-en-1-yl)-5',7'-dibromo-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Chất rắn dạng bột, màu nâu đỏ, nhiệt độ nóng chảy: 242 - 243 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 2927, 1720, 1668, 1622, 1591, 1498, 1480, 1452, 1427, 1395, 1330, 1299, 1269, 1127, 1076, 1041, 1020, 972, 926, 860, 787, 770, 723, 550.



¹H-NMR (*DMSO-d*₆, 600 MHz) δ H: 11.06 (1H, s, -NH_{podophyllotoxin}), 9.51 (1H, s, -NH_{erlotinib}), 8.48 (1H, d), 8.45 (1H, d), 8.26 (1H, s), 7.97 (1H, dd, *J* = 4.2, 7.2 Hz), 7.89 (1H, s), 7.86 - 7.84 (1H, m), 7.73 - 7.71 (2H, m), 7.67 - 7.63 (2H, m), 7.52 - 7.51 (2H, m), 7.43 (1H, t, *J* = 7.8, 15.6 Hz), 7.21 (1H, s), 6.29 (1H, *J* = 15.6 Hz), 6.05 (1H, *J* = 15.6 Hz), 5.13 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 5.01 (2H, s), 4.75 (2H, d, *J* = 13.2 Hz), 4.32 - 4.29 (4H, m), 3.80 - 3.77 (2H, m), 3.77 - 3.76 (2H, m), 3.38 (3H, s), 3.36 (3H, s).

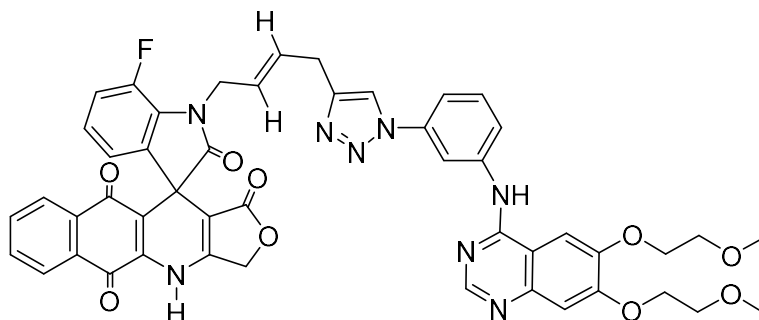
^{13}C -NMR (*DMSO-d*₆, 150 MHz) δ_{C} : 181.4, 178.6 176.6, 169.2, 156.9, 156.2, 153.7, 152.9, 148.0, 146.8, 146.3, 141.2, 140.0, 139.2, 139.2, 135.4, 134.9, 133.6, 131.2, 130.9, 130.5, 130.0, 128.9, 127.0, 126.1, 125.9, 125.1, 121.6, 120.9, 120.1, 120.1, 118.6, 116.1, 114.7, 108.9, 108.2, 103.3, 101.5, 100.8, 70.1, 70.0, 68.4, 68.0, 66.4, 58.3, 58.3, 51.2, 47.6, 42.2.

Hợp chất 184c: *(E)-1'-(4-(1-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)but-2-en-1-yl)-7'-fluoro-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Chất rắn dạng bột, màu nâu xám, nhiệt độ nóng chảy: 224 - 225 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 2933, 1716, 1668, 1625, 1586, 1498, 1427, 1395, 1332, 1300, 1269, 1239, 1122, 1075, 1041, 1023, 927, 859, 785, 772, 722, 553.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 11.05 (1H, s, $-\text{NH}_{\text{podophyllotoxin}}$), 9.50 (1H, s, $-\text{NH}_{\text{erlotinib}}$), 8.45 (1H, s), 8.44 (1H, s), 8.23 (1H, t, $J = 1.8, 3.6$ Hz), 7.98 - 7.96 (1H, dd, $J = 2.4, 6.6$ Hz), 7.90 (1H, s), 7.85 - 7.84 (1H, dd, $J = 1.8, 7.2$ Hz), 7.72 - 7.70 (2H, m), 7.67 - 7.65 (2H, m), 7.52 - 7.51 (1H, m), 7.42 (1H, t, $J = 7.8, 15.6$ Hz), 7.20 (1H, s), 7.14 - 7.11 (1H, m), 7.05 (1H, dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz), 6.95 - 6.91 (1H, m), 6.31 (1H, t, $J = 9.0, 15.6$ Hz), 6.01 (1H, $J = 4.8, 15.6$ Hz), 5.13 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.00 (2H, dd, $J = 4.2, 16.8$ Hz), 4.52 (2H, t, $J = 4.2, 9.6$ Hz), 4.31 - 4.29 (4H, m), 3.80 - 3.75 (4H, m), 3.37 (3H, s), 3.36 (3H, s).

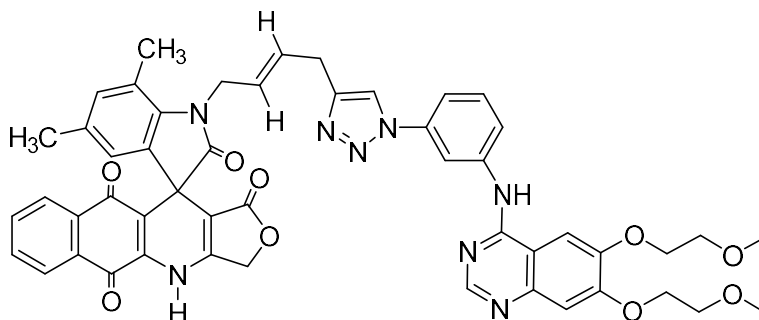


$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.3, 178.7, 175.9, 169.2, 156.6, 156.2, 148.0, 146.9, 146.8, 146.3 (2C), 145.3, 140.9, 140.0, 137.2, 134.9, 133.6, 131.2, 130.9, 129.8, 129.6, 128.9, 128.7, 128.7, 126.0, 125.9, 123.2, 121.6, 120.9, 120.6, 120.1, 118.6, 116.7, 116.5, 108.9, 108.2, 103.3, 100.5, 70.1, 70.0, 68.4, 68.0, 66.4, 58.3, 58.3, 50.9, 47.8, 42.9.

Hợp chất 184d: (*E*)-1'-(4-(1-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)but-2-en-1-yl)-5',7'-dimethyl-3*H*-spiro[benzo[*g*]furo[3,4-*b*]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4*H*)-tetraone

Chất rắn dạng bột, màu xám, nhiệt độ nóng chảy 290 - 291 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3383, 2931, 1751, 1668, 1626, 1594, 1502, 1446, 1393, 1332, 1300, 1240, 1206, 1123, 1072, 1040, 1025, 926, 858, 786, 721.



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 10.92 (1H, s, $-\text{NH}_{\text{podophyllotoxin}}$), 9.58 (1H, s, $-\text{NH}_{\text{erlotinib}}$), 8.49 (1H, t, $J = 4.2, 7.2$ Hz), 8.48 (1H, s), 8.25 - 8.23 (1H, m), 7.97 - 7.94 (1H, m), 7.91 (1H, s), 7.85 - 7.83 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.72 - 7.67 (2H, m), 7.66

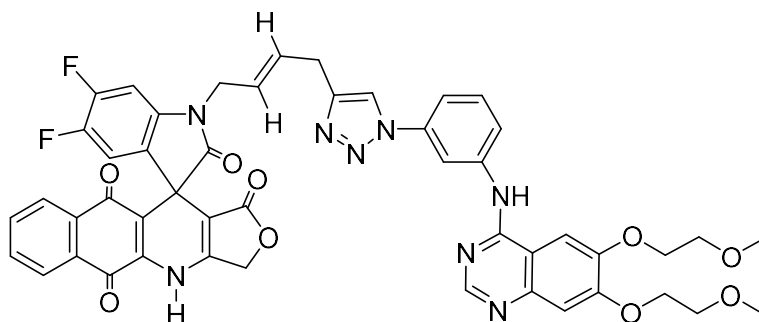
- 7.64 (1H, m), 7.54 - 7.53 (1H, dd, $J = 0.6, 7.8$ Hz), 7.43 (1H, t, $J = 7.8, 15.6$ Hz), 7.22 (2H, s), 6.82 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 6.79 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 6.39 - 6.35 (1H, m), 6.06 - 6.03 (1H, m), 5.12 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.97 (2H, s), 4.58 (2H, br), 4.32 - 4.29 (4H, m), 3.80 - 3.76 (4H, m), 3.37 (3H, s), 3.36 (3H, s), 2.49 (3H, $-\text{CH}_3$ isatin), 2.10 (3H, $-\text{CH}_3$ isatin).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.1, 178.9, 177.0, 169.3, 156.3, 156.1, 153.6, 152.7, 148.1, 146.3, 140.6, 139.9, 137.9, 135.6, 134.9, 134.0, 133.5, 132.8, 131.3, 131.2, 131.2, 131.0, 129.8, 129.0, 126.0, 125.9, 124.8, 122.9, 121.7, 121.1, 120.2, 118.8, 118.7, 118.0, 117.4, 107.9, 103.3, 101.2, 70.1, 70.0, 68.4, 68.0, 66.4, 58.4, 58.3, 51.0, 47.1, 42.9, 20.1, 17.7.

Hợp chất 184e: *(E)-1'-(4-(1-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)but-2-en-1-yl)-5',6'-difluoro-3H-spiro[benzo[g]furo[3,4-b]quinoline-11,3'-indoline]-1,2',5,10(4H)-tetraone*

Chất rắn dạng bột màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy: 266 - 267 °C

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 2934, 1720, 1668, 1622, 1585, 1497, 1427, 1395, 1332, 1299, 1269, 1239, 1122, 1076, 1040, 1023, 927, 859, 787, 770, 721, 544.



^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz): δ_{H} 11.05 (1H, s, $-\text{NH}_{\text{podophyllotoxin}}$), 9.54 (1H, s, $-\text{NH}_{\text{erlotinib}}$), 8.48 (2H, s), 8.26 (1H, s), 8.00 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.91 (1H, br), 7.85 (1H, t, $J = 1.8, 6.0$ Hz), 7.74 - 7.69 (2H, m), 7.51 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.44 - 7.38 (2H, m), 7.22 - 7.17 (2H, m), 6.33 (1H, t, $J = 1.8, 14.4$ Hz), 5.90 (1H, dd, $J = 4.8, 9.6$ Hz), 5.13 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.00 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 4.45 (2H, br), 4.31 (4H, dd, $J = 4.8, 6.0$ Hz), 3.80 - 3.76 (4H, m), 3.38 (3H, s), 3.36 (3H, s).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 181.3, 178.8, 176.20, 169.3, 156.7, 156.3, 153.6, 152.8, 148.1, 146.4, 141.0, 139.9, 139.1, 134.9, 134.9, 134.0, 133.5, 131.3, 130.9, 130.1, 128.9, 128.2, 126.0 (2C), 125.9, 121.6, 121.1, 120.0, 118.8, 118.7, 116.3, 114.2, 114.0, 108.1, 103.3, 100.1, 70.1, 70.0, 68.4, 68.0, 66.4, 58.4, 58.3, 50.8, 47.6, 41.0, 20.1, 17.7.

2.6. Tổng hợp các dẫn xuất indole-pyrano[2,3-d] pyrimidine (188a-l)

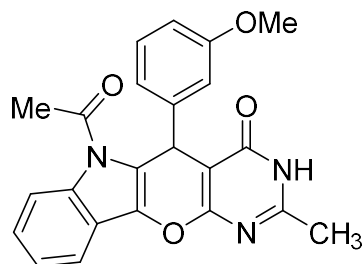
Hỗn hợp gồm: *N*-acetylindoxyl (**185**) (1.0 mmol), malononitrile (**81**) (1.0 mmol), NH_4OAc (**29**) (0.2 mmol) và lần lượt các aldehyde thơm tương ứng (**186a-l**). Thêm 10 ml ethanol, tiến hành phản ứng trong thiết bị vi sóng ở 78 °C, trong thời

gian 40 phút. Sau khi phản ứng kết thúc, tiếp tục cho thêm anhydride acetic (3.0 mmol) và 0.4 mmol H_2SO_4 , sau đó nâng nhiệt độ phản ứng lên $120\text{ }^\circ\text{C}$ trong thời gian 15 phút. Kết thúc phản ứng, thêm 20 ml nước cất, lắc đều. Sử dụng dichloromethane (3 lần x 20ml) để chiết hỗn hợp sau phản ứng. Dịch chiết hữu cơ được làm khan bằng Na_2SO_4 , sử dụng thiết bị cất quay chân không loại bỏ dung môi thu được sản phẩm thô. Tách chất bằng sắc ký cột silicagel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane- acetone (tỷ lệ 1: 1 về thể tích) thu được các dẫn xuất của indole-pyrano[2,3-*d*] pyrimidine tương ứng (**188a-l**), hiệu suất phản ứng đạt: 65-78 %

Hợp chất 188a: *6-Acetyl-5-(3-methoxyphenyl)-2-methyl-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-b]indole-4(3H)-one*

Chất rắn dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy: $370 - 371\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 2832, 1704, 1658, 1637, 1605, 1578, 1483, 1458, 1437, 1417, 1388, 1370, 1321, 1300, 1247, 1214, 1154, 1106, 1053, 1036, 1001, 955, 788, 744, 700, 602.

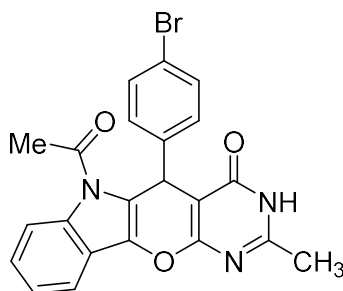


$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ_{H} : 12.53 (1H, s, NH), 8.04 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.73 (1H, dd, $J = 7.2, 1.2$ Hz), 7.44 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz), 7.40 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz), 7.14 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.80 (1H, t, $J = 2.4$ Hz), 6.74 (1H, dd, $J = 7.8, 2.4$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.78 (1H, s), 3.66 (3H, s, OCH_3), 2.62 (3H, s, CH_3CO), 2.29 (3H, s, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ_{C} : 169.5, 162.5, 160.3, 158.9, 158.4, 144.2, 136.0, 133.5, 129.3, 125.9, 123.7, 120.2, 119.7, 119.1, 116.9, 115.9, 114.8, 111.5, 101.0, 54.9, 37.0, 26.6, 20.8.

HR-ESI-MS: m/z 402.1450 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4]^+$: 402.1448.

Hợp chất 188b: *6-Acetyl-5-(4-bromophenyl)-2-methyl-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-b]indole-4(3H)-one*



Sản phẩm chất rắn dạng bột màu trắng, có nhiệt độ nóng chảy: 374 - 375 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2956, 2925, 2855, 1727, 1707, 1657, 1637, 1604, 1572, 1481, 1460, 1420, 1373, 1297, 1268, 1214, 1137, 1071, 1035, 1009, 951, 831, 795, 746, 706, 601, 583, 487.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.55 (1H, s, NH), 7.98 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.74 (1H, dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz), 7.45 (1H, td, $J = 8.4, 1.2$ Hz), 7.42 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.41 – 7.39 (1H, m), 7.16 – 7.13 (2H, m), 5.78 (1H, s), 2.63 (3H, s, CH_3CO), 2.29 (3H, s, CH_3).

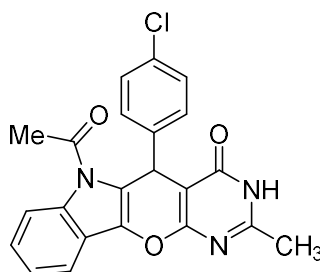
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_{C} : 169.4, 162.4, 160.3, 158.5, 142.1, 135.9, 133.3, 130.9 (2C), 130.6 (2C), 125.9, 123.6, 119.8, 119.8, 118.9, 117.0, 115.7, 100.7, 36.9, 26.7, 20.8.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z 450.0447 và 452.0429 tương ứng với $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{BrN}_3\text{O}_3]^+$: 450.0448 và 452.0428.

Hợp chất 188c: 6-Acetyl-5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-b]indole-4(3H)-one

Chất rắn dạng bột màu trắng xám, nhiệt độ nóng chảy: 372 -373 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2991, 2845, 2764, 2707, 2641, 1705, 1654, 1637, 1604, 1572, 1484, 1460, 1421, 1389, 1373, 1325, 1318, 1300, 1267, 1247, 1212, 1192, 1161, 1142, 1104, 1088, 1015, 1000, 949, 832, 798, 760, 751, 746, 712, 704, 671, 645, 602, 583, 557.



^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.37 (1H, s, NH), 7.98 (1H, dd, $J = 8.4, 0.6$ Hz), 7.74 (1H, dd, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.43 (1H, td, $J = 7.8, 1.8$ Hz), 7.39 (1H, td, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.26 (2H, dt, $J = 9.0, 2.4$ Hz), 7.22 (2H, dt, $J = 9.0, 2.4$ Hz), 5.80 (1H, s), 2.61 (3H, s, CH_3CO), 2.30 (3H, s, CH_3).

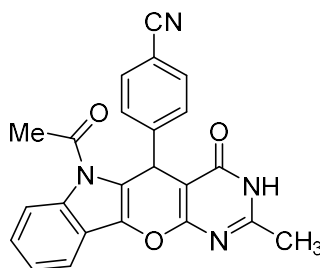
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 168.8, 162.0, 160.1, 158.0, 141.4, 135.8, 133.2, 131.0, 129.7 (2C), 127.6 (2C), 125.4, 123.2, 119.6, 118.6, 116.6, 115.2, 100.4, 36.5, 26.0, 20.4.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 406.0956, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_3]^+$: 406.0953.

Hợp chất 188d: 4-(6-Acetyl-2-methyl-4-oxo-3,4,5,6-tetrahydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-b]indole-5-yl)benzonitrile

Sản phẩm chất rắn dạng bột màu vàng sáng, nhiệt độ nóng chảy: 382 - 383 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2999, 2923, 2850, 2778, 2705, 2639, 2225, 1705, 1655, 1635, 1603, 1574, 1499, 1484, 1459, 1420, 1388, 1370, 1318, 1301, 1249, 1215, 1162, 1140, 1104, 1031, 1001, 801, 761, 747, 602, 586.

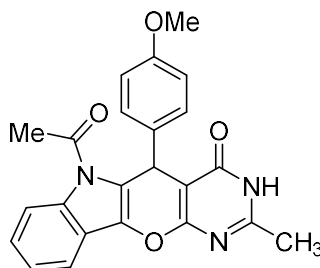


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.57 (1H, s, NH), 7.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.73 (1H, dd, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.69 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.43 (1H, td, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.40 (1H, td, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.38 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.84 (1H, s), 2.62 (3H, s, CH_3CO), 2.28 (3H, s, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 169.4, 162.4, 160.5, 158.8, 148.2, 136.0, 133.1, 131.9 (2C), 129.6 (2C), 125.9, 123.6, 119.8, 118.7, 118.5, 117.1, 115.6, 109.4, 100.3, 37.7, 26.7, 20.9.

HR-ESI-MS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 397.1294, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 397.1295.

Hợp chất 188e: 6-Acetyl-5-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-b]indole-4(3H)-one



Sản phẩm là chất rắn dạng bột màu nâu, nhiệt độ nóng chảy: 376 - 377 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2934, 2836, 2218, 1705, 1658, 1639, 1606, 1508, 1460, 1423, 1389, 1370, 1300, 1247, 1215, 1193, 1171, 1158, 1108, 1032, 1002, 953, 837, 801, 764, 751, 603, 584.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.51 (1H, s, NH), 8.05 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.72 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.43 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.40 (1H, td, $J = 7.8, 0.6$ Hz), 7.09 (2H, dt, $J = 8.4, 2.4$ Hz), 6.78 (2H, dt, $J = 8.4, 2.4$ Hz), 5.73 (1H, s), 3.67 (3H, s, CH_3O), 2.61 (3H, s, CH_3CO), 2.28 (3H, s, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 169.4, 162.5, 160.0, 158.2, 158.0, 135.8, 134.7, 133.5, 129.3 (2C), 125.8, 123.7, 119.8, 119.5, 116.8, 115.9, 113.5, 101.4 (2C), 55.0, 36.3, 26.5, 20.8.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 402.1436, tính toán theo lý thuyết

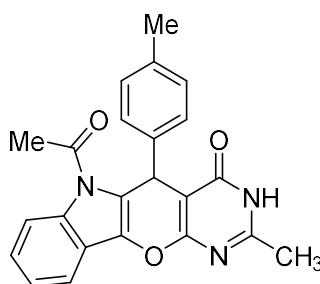
[C₂₃H₂₀N₃O₄]⁺: 402.1448).

Hợp chất 188f: 6-Acetyl-2-methyl-5-(*p*-tolyl)-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3*H*)-one

Thu được chất rắn dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy: 388 – 389 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2995, 2932, 2851, 2759, 2705, 2639, 1706, 1657, 1638, 1604, 1574, 1506, 1484, 1459, 1420, 1388, 1372, 1325, 1316, 1301, 1248, 1213, 1160, 1141, 1104, 1033, 1001, 951, 827, 798, 746, 602, 584.

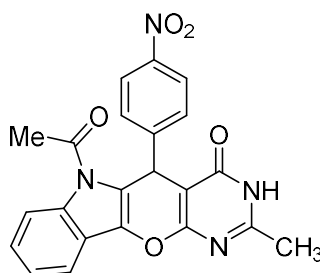
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_{H} : 12.50 (1H, s, NH), 8.03 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.72 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.43 (1H, td, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.40 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.06 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.02 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.75 (1H, s), 2.60 (3H, s, CH₃CO), 2.28 (3H, s, CH₃), 2.20 (3H, s, CH₃).



¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_{C} : 168.8, 162.0, 159.9, 157.7, 139.4, 135.7, 135.5, 133.4, 128.3 (2C), 127.6 (2C), 125.3, 123.2, 119.5, 119.0, 116.4, 115.4, 100.9, 36.4, 25.9, 20.4, 20.1.

HR-ESI-MS: tìm thấy *m/z* [M+H]⁺ : 386.1505, tính toán theo lý thuyết: [C₂₃H₂₀N₃O₃]⁺: 386.1499).

Hợp chất 188g: 6-Acetyl-2-methyl-5-(4-nitrophenyl)-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3*H*)-one



Chất rắn dạng bột màu nâu, nhiệt độ nóng chảy: 383 - 384 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2923, 2852, 2750, 2703, 2637, 1703, 1657, 1636, 1603, 1574, 1527, 1457, 1423, 1392, 1368, 1348, 1327, 1297, 1253, 1213, 1157, 1108, 1032, 999, 960, 850, 821, 752, 697, 667, 601, 583.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_{H} : 12.58 (1H, s, NH), 8.09 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.76 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.47 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.46 (1H, td, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 7.42 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 5.91 (1H, s), 2.63 (3H, s, CH₃CO), 2.29 (3H, s, CH₃).

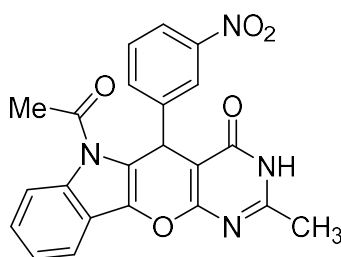
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 169.4, 162.4, 160.5, 158.9, 150.2, 146.2, 139.0, 133.2, 129.9 (2C), 126.0, 123.7, 123.2 (2C), 119.8, 118.5, 117.1, 115.6, 100.2, 37.7, 26.8, 20.9.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.1210, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5]^+$: 417.1194).

Hợp chất 188h: 6-Acetyl-2-methyl-5-(3-nitrophenyl)-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3*H*)-one

Chất rắn dạng bột màu vàng xám, nhiệt độ nóng chảy: 382 - 383 °C.

IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 2774, 1707, 1658, 1601, 1576, 1527, 1459, 1415, 1390, 1366, 1346, 1306, 1252, 1241, 1217, 1145, 1000, 823, 768, 747, 691, 602.

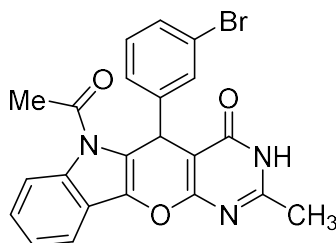


^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.57 (1H, s, NH), 8.06 (1H, t, $J = 1.8$ Hz), 8.02 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz), 7.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.77 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.61 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.53 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 7.47 (1H, td, $J = 7.8, 1.8$ Hz), 7.43 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 5.91 (1H, s), 2.63 (3H, s, CH_3CO), 2.29 (3H, s, CH_3).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_{C} : 169.5, 162.5, 160.5, 159.0, 147.4, 145.0, 136.0, 135.2, 133.1, 129.5, 126.0, 123.7, 123.1, 121.8, 119.8, 118.5, 117.2, 115.7, 100.4, 37.5, 26.8, 20.9

HR-ESI-MS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.1197, tính toán theo lý thuyết $[\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5]^+$: 417.1194.

Hợp chất 188i: 6-Acetyl-2-methyl-5-(3-bromophenyl)-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3*H*)-one



Chất rắn dạng bột màu đen.

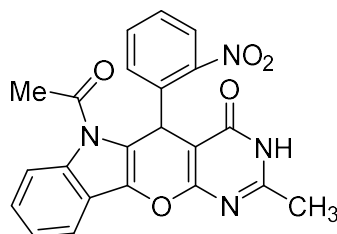
IR (KBr) $\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3411, 2925, 2854, 2775, 1701, 1657, 1636, 1603, 1576, 1460, 1427, 1372, 1321, 1301, 1248, 1215, 1162, 1106, 1071, 1034, 1001, 950, 787, 740, 696, 671, 602.

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_{H} : 12.57 (1H, s, NH), 7.97 (1H, d, $J = 8.4$

(Hz), 7.75 (1H, dd, $J = 7.2, 0.6$ Hz), 7.46 (1H, td, $J = 7.2, 1.2$ Hz), 7.42 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.41 (1H, s), 7.35 (1H, dt, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.19 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.11 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.79 (1H, s), 2.64 (3H, s, CH₃CO), 2.29 (3H, s, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 169.6, 162.6, 160.6, 158.9, 145.5, 136.1, 133.4, 131.2, 130.5, 129.8, 127.4, 126.1, 123.9, 121.3, 119.9, 119.0, 117.2, 115.8, 100.8, 37.3, 26.8, 21.0

Hợp chất 188j: 6-Acetyl-2-methyl-5-(3-nitrophenyl)-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3H)-one



Chất rắn dạng bột màu nâu đen, nhiệt độ nóng chảy: 386 – 387 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3396, 3005, 2864, 1708, 1657, 1634, 1603, 1575, 1535, 1461, 1416, 1367, 1339, 1320, 1308, 1246, 1217, 1160, 1146, 1107, 1027, 1001, 824, 793, 735, 698, 60, 584.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 12.47 (1H, s, NH), 7.96 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.92 (1H, dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz), 7.74 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.51 (1H, d, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.46 (1H, td, $J = 8.4, 1.2$ Hz), 7.41 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.38 (1H, td, $J = 8.4, 1.2$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.72 (1H, s), 2.62 (3H, s, CH₃CO), 2.27 (3H, s, CH₃).

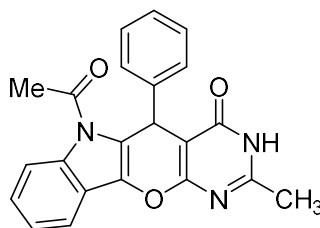
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 169.2, 162.3, 160.2, 158.8, 148.6, 136.7, 133.2, 133.0, 131.3, 127.7, 126.1, 124.5, 123.6, 119.6, 117.3, 117.1, 115.6, 100.2, 33.4, 26.5, 20.8.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z [M+H]⁺: 417.1205, tính toán theo lý thuyết: [C₂₂H₁₇N₄O₅]⁺: 417.1194.

Hợp chất 188k: 6-Acetyl-2-methyl-5-phenyl-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3H)-one

Sản phẩm là chất rắn dạng bột màu nâu, nhiệt độ nóng chảy: 384 – 385 °C.

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2998, 2932, 2845, 2768, 2700, 2637, 1705, 1656, 1636, 1603, 1575, 1492, 1453, 1417, 1371, 1316, 1301, 1250, 1214, 1194, 1160, 1105, 1031, 1001, 772, 741, 702, 663, 601, 582.



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 12.34 (1H, s, NH), 8.02 (1H, dd, $J = 7.8$,

1.2 Hz), 7.72 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.42 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.39 (1H, td, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 7.23 – 7.19 (4H, m), 7.15 – 7.12 (1H, m), 5.81 (1H, s), 2.59 (3H, s, CH₃CO), 2.29 (3H, s, CH₃).

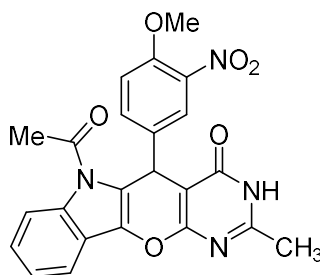
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 169.4, 162.5, 160.2, 158.3, 142.6, 135.9, 133.4, 128.3 (2C), 128.1 (2C), 126.8, 125.8, 123.7, 119.8, 119.3, 116.9, 115.8, 101.1, 37.2, 26.6, 20.8.

HR-ESI-MS: tìm thấy m/z [M+H]⁺: 372.1333, tính toán theo lý thuyết: [C₂₂H₁₈N₃O₃]⁺: 372.1343.

Hợp chất 188l: 6-Acetyl-5-(4-methoxyl-3-nitrophenyl)-2-methyl-5,6-dihydropyrimido[5',4':5,6]pyrano[3,2-*b*]indole-4(3H)-one

Chất rắn dạng bột màu trắng xám, nhiệt độ nóng chảy: 381 – 382 °C.

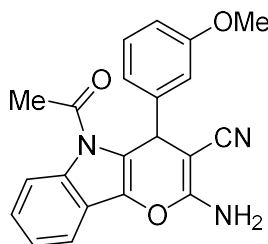
IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2959, 2925, 2853, 2759, 1706, 1655, 1633, 1599, 1577, 1525, 1458, 1418, 1391, 1368, 1325, 1303, 1263, 1214, 1154, 1105, 1081, 1021, 998, 958, 900, 830, 804, 738, 672, 600.



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ_H : 12.35 (1H, s, NH), 7.97 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.74 (1H, dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz), 7.68 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.45 (1H, td, $J = 7.0, 1.0$ Hz), 7.42 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.41 (1H, t, $J = 8.5$ Hz), 7.21 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.83 (1H, s), 3.86 (3H, s, OCH₃), 2.64 (3H, s, CH₃CO), 2.31 (3H, s, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_C : 168.9, 162.1, 160.1, 158.2, 150.6, 138.6, 135.8, 135.2, 133.6, 133.1, 125.5, 124.1, 123.2, 119.6, 118.3, 116.7, 115.2, 113.9, 100.2, 56.4, 36.2, 26.1, 20.4.

Hợp chất 187a: 5-Acetyl-2-amino-4-(3-methoxyphenyl)-4,5-dihydropyran[3,2-*b*]indole-3-carbonitrile



IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3393, 3325, 3210, 2831, 2207, 1696, 1664, 1598, 1487, 1459, 1401, 1373, 1322, 1306, 1260, 1214, 1169, 1144, 1076, 1042, 1005, 978, 841, 795, 739, 700, 654, 609.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ_H : 8.08 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.60 (1H, d, $J =$

7.8 Hz), 7.44 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.40 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.02 (2H, s, NH₂), 6.81 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.60 (1H, s), 6.57 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.27 (1H, s), 3.70 (3H, s, CH₃), 2.52 (3H, s, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ_C : 169.4, 159.5, 159.4, 145.2, 135.3, 133.4, 130.0, 125.9, 123.7, 120.1, 119.3, 119.0, 117.6, 116.5, 116.0, 113.3, 111.7, 58.9, 55.0, 26.4 (2C).

2.7. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học

2.7.1. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro*

a) Nguyên tắc xác định

Phương pháp MTT (tên viết tắt của hợp chất 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) là phương pháp lần đầu tiên được Tim Mosman sử dụng để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào dựa trên khả năng chuyển từ màu vàng ban đầu của MTT sang màu tím (một dạng phức formazan) khi có mặt enzym dehydrogenase trong ty thể [114]. Sau đó sử dụng DMSO hoà tan mẫu formazan và đo OD (mật độ quang) ở bước sóng 540 nm, qua đó đánh giá được số lượng sống, chết của mẫu tế bào thử nghiệm. Hoạt tính gây độc tế bào được thể hiện bằng giá trị IC₅₀ (the half - maximal inhibitory concentration: nồng độ của chất thử ức chế 50% sự phát triển của các tế bào được thử nghiệm) [115, 116].

b) Chuẩn bị tiến hành thí nghiệm

Các dòng tế bào thử nghiệm bao gồm: tế bào ung thư biểu mô KB (CCL - 17TM), tế bào ung thư gan HepG2 (HB - 8065TM), tế bào ung thư phổi A549 (CCL - 185TM), và tế bào ung thư vú MCF-7 (HTB - 22TM), cùng tế bào lành Hek-293 (ATCC® CRL - 1573TM), được đặt mua từ các nhà cung cấp có nguồn gốc từ Bảo tàng giống chuẩn của Hoa kỳ (ATCC)

Các dòng tế bào được bảo quản trong môi trường nitơ lỏng, sử dụng môi trường dinh dưỡng DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) hay MEME (Minimum essential medium with Eagle's salt) để kích hoạt và duy trì chúng và bổ sung thêm 7 - 10% FBS (Fetal bovine serum) cùng một số thành phần thiết yếu khác. Tế bào được nuôi cấy trong điều kiện vô trùng tuyệt đối cùng quá trình kiểm soát nghiêm ngặt các thông số về môi trường như: độ ẩm (98%), nhiệt độ (37 °C) và hàm lượng CO₂ (5%). Các tế bào được sử dụng để thử độc tính là các dòng tế bào phát triển ở pha log.

Sử dụng dung môi DMSO để hoà tan các mẫu thử ở nồng độ ban đầu là 20 mg/ml. Sau đó pha loãng thành 5 dãy có nồng độ theo thứ tự từ cao xuống thấp: 2564, 640, 160, 40 và 10 µg/ml, trên đĩa 96 giếng, tương ứng với nồng độ chất thử trong đĩa thử nghiệm là 128, 32, 8, 2 và 0.5 µg/ml. Sử dụng chất tham chiếu là Ellipticine được pha trong dung môi DMSO ở nồng độ 0.01 mM [117].

c) Tiến hành thí nghiệm

Thực hiện Trypsin hóa mẫu tế bào thí nghiệm mục đích làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Tiếp theo, pha loãng tế bào bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với quy mô thí nghiệm (số lượng tế bào dao động từ $1 - 3 \times 10^4$ tế bào/ml căn cứ vào từng loại tế bào).

Lấy lần lượt cho vào mỗi giếng: 10 μ l chất thử và 190 μ l dung dịch tế bào. Đối chứng dương là môi trường có chứa tế bào, ngược lại đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy. Tất cả các đĩa thí nghiệm đều được ủ trong điều kiện tiêu chuẩn.

Sau thời gian 72 giờ, các giếng thí nghiệm tiếp tục được ủ với 10 μ l MTT (tương đương 5 mg/ml) trong vòng 4h. Sau đó tiến hành loại bỏ môi trường, thu sản phẩm là các tinh thể formaran rồi hòa tan bằng 100 μ l dung môi DMSO. Giá trị OD (mật độ quang) được xác định ở bước sóng 540 nm trên thiết bị quang phổ Biotek, đây chính là kết quả của thí nghiệm.

Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần trong cùng điều kiện

d) Xử lý kết quả

Giá trị IC_{50} được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính chuyên dụng Rawdata.

$$\% \text{ ức chế} = (\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) / (\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{chứng (-)}}) \times 100\%$$

$$IC_{50} = High_{Conc} - \frac{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})}{High_{Inh\%} - Low_{In\%}}$$

(Trong đó:

$High_{Conc}/Low_{Conc}$: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp;

$High_{Inh\%}/Low_{Inh\%}$: % ức chế ở nồng độ cao /% ức chế ở nồng độ thấp).

e) Kết quả đánh giá hoạt tính

Thông thường giá trị $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ được đánh giá là có hoạt tính gây độc yếu hoặc không có hoạt tính gây độc các tế bào ung thư. Các kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* được trình bày ở phần chương 3, mục 3.7.

2.7.2. Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện trên đĩa 96 giếng theo tài liệu [118]. Mẫu thử được pha loãng bằng DMSO và Na_3PO_4 đến nồng độ cuối cùng trong phản ứng là 256; 64; 16; 4; 1 $\mu\text{g/ml}$. Lấy vào mỗi giếng 40 μ l đệm phosphat 100mM pH 6,8, 25 μ l α -glucosidase (EC 3.2.1.20) 0,4 U/ml và 10 μ l chất thử. Hỗn hợp được ủ ở 37 °C trong 15 phút rồi thêm 25 μ l p-nitrophenyl glucopyranosidse 2,5mM rồi tiếp tục ủ ở 37 °C trong 30 phút. Dừng phản ứng bằng Na_2CO_3 và độ hấp thụ của phản ứng được xác định trên máy BIOTEK với bước sóng 410 nm (A). Acarbose được sử dụng làm chất tham khảo. Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu thử được xác định bằng công thức: Độ ức chế (%) = $[A(\text{đối chứng âm}) - A(\text{mẫu thử})] / A(\text{đối chứng âm}) \times 100\%$

2.7.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE)

Xác định hoạt tính của enzyme acetylcholinesterase được tiến hành dựa trên phương pháp đo quang của tác giả Ellman, phương pháp này được mô tả lần đầu tiên vào năm 1961 [119].

Quy trình thí nghiệm thực hiện trên đĩa 96 giếng với tổng thể tích 200 μ l. Cho lần lượt từng dung dịch bao gồm: dung dịch đệm tris-HCl (pH = 8), các mẫu thử (**188a-l**) được hoà tan bằng dung môi DMSO (nồng độ 20 mg/mL) và Na_3PO_4 thu được các mẫu ở các nồng độ 128, 32, 8 và 2 μ g/ml. Sau đó chuyển các mẫu đã chuẩn bị và dung dịch enzym acetylcholinesterase 0,25 IU/ml vào từng giếng. Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ 15 phút ở 25 °C. Tiếp theo, dung dịch thuốc thử DTNB 2,4 mM và dung dịch cơ chất ATCI 2,4 mM lần lượt được thêm vào hỗn hợp và trộn đều. Sau đó tiếp tục ủ hỗn hợp trong 15 phút ở 25 °C và tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm. Các mẫu thử được tiến hành lặp lại 3 lần. Sử dụng chất tham chiếu là Donepezil. Kết quả thực nghiệm được tổng hợp và xử lý bằng phương pháp thống kê dùng trong y sinh cùng sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel.

2.7.4. Phương pháp phân tích chu kỳ tế bào

Tế bào A549 (tế bào ung thư phổi) nuôi cấy trong bình Corning 25 cm² (Hoa Kỳ) với mật độ 3×10^5 tế bào, sau đó được ủ với các mẫu thử ở các nồng độ tăng dần từ: 0,08 μ M, 0,16 μ M đến 0,32 μ M cùng tham chiếu âm là dung môi DMSO 0,05% và các dung dịch đối chứng dương trong vòng 24h gồm: Ellipticine 1,3 μ M, Vincristine 0,4 μ M và 4 μ M. Sử dụng dung dịch đệm phosphate (PBS) rửa 2 lần với các tế bào thu được, cố định bằng $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 70% lạnh ở -20 °C trong 2 giờ, tiến hành ly tâm 2000 vòng/phút trong 5 phút. Tiếp theo các tế bào được rửa sạch, pha loãng cùng 0,45 ml PBS, ủ với RNase A (1 mg/ml) trong 15 phút ở 37 °C, nhuộm 25 μ l PI (propidium iodide) (1 mg/ml) trong 30 phút và cuối cùng pha loãng với 500 μ l PBS. Các dữ liệu được phân tích cho quá trình chết theo chương trình được thực hiện với sự hỗ trợ của phần mềm NovoExpress của ACEA's (Hoa Kỳ)

2.7.5. Xét nghiệm đo lưu lượng tế bào Annexin-V FITC và PI (apoptosis)

Sử dụng Kit xét nghiệm Annexin V và PI/dead cell apoptosis[®] do hãng Invitrogen cung cấp để đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất nghiên cứu đối với tỷ lệ tế bào chết theo chương trình trên dòng tế bào ung thư phổi ở người (A549).

Tế bào ung thư phổi ở người (A549) được chuẩn bị tương tự như trong phép thử phân tích chu kỳ tế bào và được ủ với các mẫu thử ở các nồng độ khác nhau bao gồm: DMSO 0,5%, ellipticine 1,3 μ M, vincristine 0,4 μ M và 4 μ M trong 24 giờ sau đó được chuyển vào các ống falcon. Hết thời gian ủ tế bào được ly tâm, rửa bằng PBS lạnh. Sau đó tế bào được ly tâm lại lần nữa, sử dụng 100 μ l dung dịch 1X annexin - binding buffer tạo huyền phù rồi tiến hành loại bỏ phần nổi phía trên, tiếp tục thêm 5

μl dung dịch FITC annexin V và 1 μl propidium iodide (PI) 100 μg/ml. Việc ủ các tế bào được thực hiện trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng thêm 400 μl dung dịch 1X annexin - binding buffer. Các tế bào nhuộm màu được phân tích bằng hệ thống tế bào dòng chảy Novocyte.

2.8. Phương pháp nghiên cứu docking phân tử

Phương pháp nghiên cứu Docking phân tử được sử dụng để tìm hiểu cơ chế kích hoạt kháng tubulin và procaspase/caspase, cyclin-dependent kinase (CDK) trên các hợp chất nghiên cứu. Các cấu trúc tinh thể (ID PDB: 4O2B) [99] và Procaspase-6 (ID PDB: 4FXO) [100] của complex giữa tubulin-colchicine, được cung cấp từ ngân hàng dữ liệu protein. Sử dụng công cụ MOE 2015.10 xây dựng các cấu trúc phối tử theo hình dạng 3D, quy trình docking được thực hiện thống nhất theo một quy trình xác định [101, 102].

Khi tiến hành docking với tubulin, công cụ MOE giúp tạo ra proton dựa trên các dị vòng $\alpha1/\beta1$. Tại các vị trí liên kết colchicine trên dimer - tubulin các túi liên kết được hình thành, sử dụng giả thuyết ba vùng của Massaroti để xác định các giao diện hình thành và colchicine làm chất đối chứng [103].

Trong quá trình nghiên cứu kích hoạt procaspase/caspase, các ligand được thử nghiệm phải có khả năng hình thành phức chống lại ion Zn. Sử dụng hợp chất PAC-1 kích hoạt Procaspase-1 làm chất đối chứng trong toàn bộ quy trình thử nghiệm này. Công cụ GBVI/WSA được tích hợp trên phần mềm MOE giúp dự đoán năng lượng liên kết tính theo (kcal/mol) của các ligand và của chất đối chứng với các phối tử mục tiêu

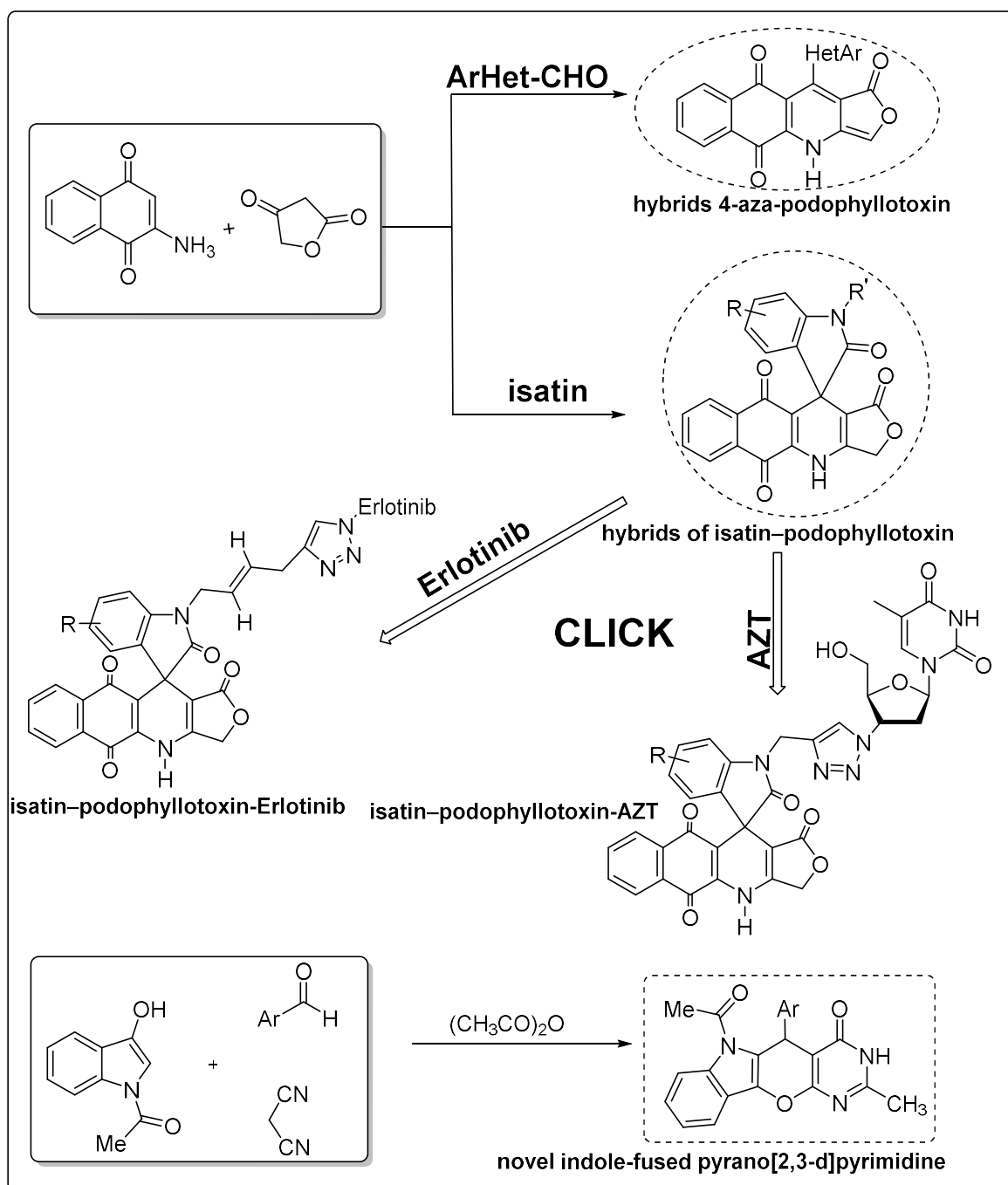
2.9. Nghiên cứu đặc tính “giống thuốc” và dự đoán ADMET

Tiến hành dự đoán các thông số ADMET và đặc tính “giống thuốc” bằng cách sử dụng công cụ dự đoán pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>). Dữ liệu đầu vào là công thức SMILES của các hợp chất. Kết quả phân tích các tiêu chí và dự đoán các thông số được động học bao gồm hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mục tiêu của đề tài

Đề tài đặt mục tiêu thiết kế, tổng hợp các dẫn xuất mới của podophyllotoxin và pyrimidine bằng phản ứng domino, đi từ những nguyên liệu ban đầu có chứa nhóm hydro linh động (2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone, 2-amino-1,4-naphthoquinone, *N*-acetylindoxyl) và các hợp chất ketone (aldehyde thơm, dẫn xuất của isatin, acid tetronic) trong điều kiện vi sóng. Kết hợp với phản ứng click hình thành cầu nối 1,2,3-triazole với các hợp phần như AZT và Erlotinib. Thử nghiệm, đánh giá hoạt tính sinh học và nghiên cứu docking phân tử của các chất tổng hợp được.



Sơ đồ 3.1. Mục tiêu, chiến lược tổng hợp của đề tài

3.2. Tổng hợp các dẫn xuất 4-aza podophyllotoxin chứa dị vòng (161a-m)

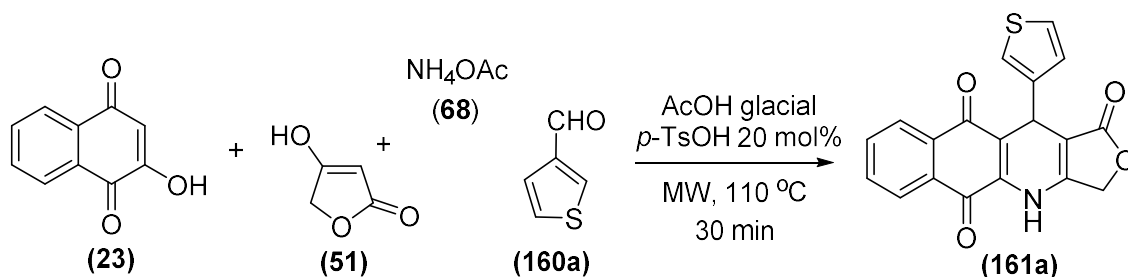
Podophyllotoxin là hợp chất lignan tự nhiên chứa gốc γ -butyrolacton, được phân lập từ các loài thuộc chi *Podophyllum* - họ *Berberidaceae* (Sơ đồ 1.11). Cấu trúc của Podophyllotoxin là một hệ thống gồm có năm vòng (A,B,C,D,E) đặc trưng, trong đó nổi bật là khung gồm nhóm 4 vòng thơm, phẳng liên tiếp từ vòng dioxole (A) đến vòng lacton (D) [120]. Các đặc tính dược lý nổi bật của Podophyllotoxin về cơ bản đều do bộ khung gồm 4 vòng thơm này quy định; vòng A đặc trưng cho khả năng kháng khuẩn, vòng C tiêu biểu cho tính thơm và tương tác mạnh với vòng E để tạo ra đặc tính gây độc tế bào, vòng γ -lacton (vòng D) đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính chống ung thư thông qua khả năng ức chế quá trình trùng hợp Tubulin [121, 122].

Như đã trình bày trong phần tổng quan, đối với hợp chất 4-azapodophyllotoxin, khi tiến hành thay thế vòng A, B và giữ nguyên vòng D các nghiên cứu thu được đều cho thấy hoạt tính chống ung thư đã được cải thiện đáng kể, đặc biệt đối với trường hợp naphthoquinone. Tuy nhiên những biến đổi ở vòng E chưa được ghi nhận nhiều do các tương tác giữa vòng E với vòng C sẽ tác động trực tiếp tới hoạt tính gây độc tế bào [122]. Khi thay thế vòng E của podophyllotoxin bằng các dị vòng chứa các dị tố O, S, N có độ âm điện lớn, hy vọng sẽ tạo ra các tương tác mạnh hơn giữa các dị vòng này với vòng C, qua đó làm tăng hoạt tính gây độc tế bào của lớp chất này.

Để thực hiện quá trình tổng hợp, luận án tiến hành khảo sát hai con đường khác nhau đó là: sử dụng phản ứng domino 4 thành phần (Sơ đồ 3.2) và phản ứng domino 3 thành phần (Sơ đồ 3.5).

a. Áp dụng phản ứng domino bốn thành phần

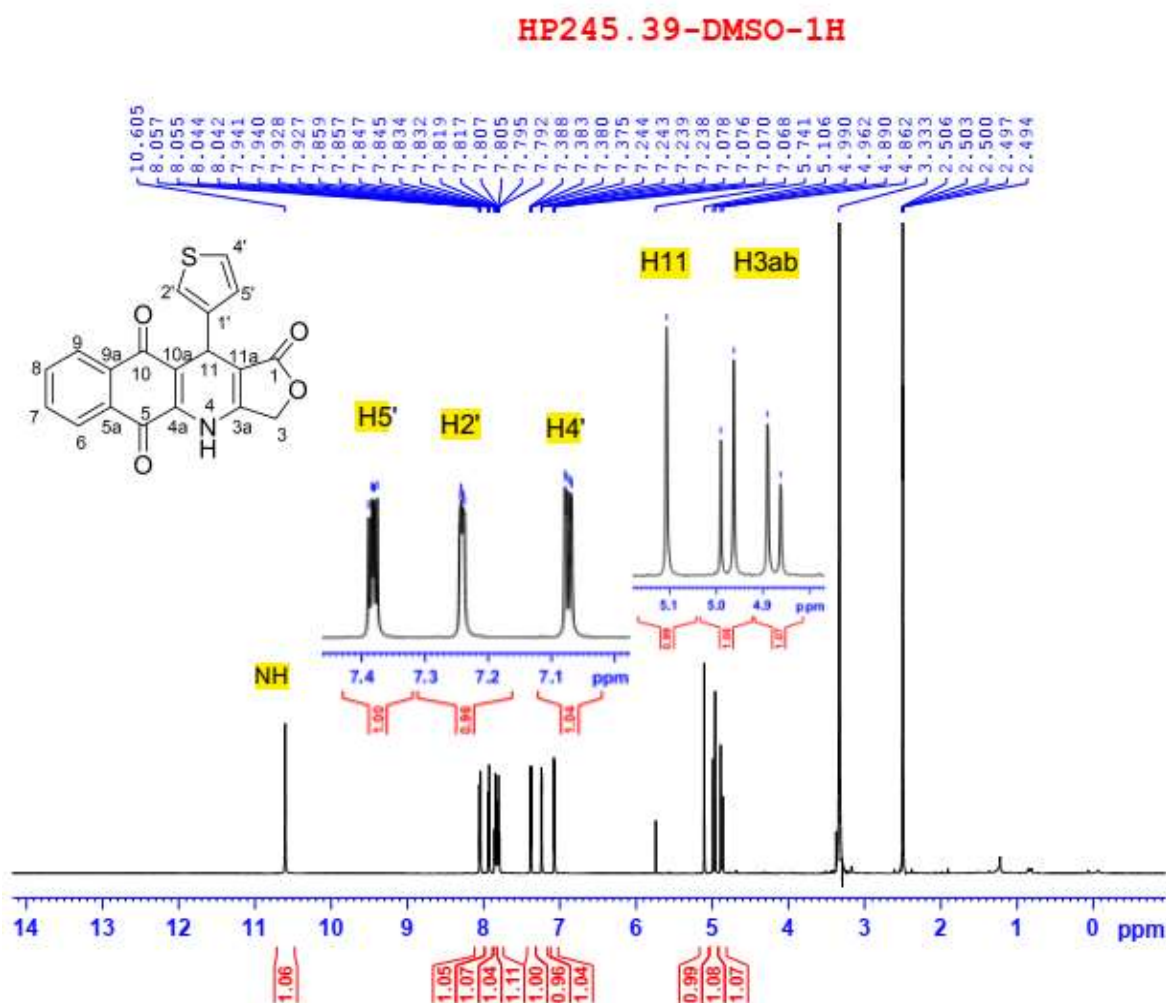
Từ các nguyên liệu ban đầu: 2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone (**23**) (1 mmol), 3-thiophen aldehyde (**160**) (1 mmol), acid tetronic (**51**) (1 mmol), và ammonium acetate (**29**) (3,0 mmol) với sự hỗ trợ của thiết bị phản ứng vi sóng, luận án đã tổng hợp thành công hợp chất 11-(thiophen-3-yl)-4,11-dihydrobenzo[g]furo[3,4-b]quinolin- 1,5,10(3*H*)-trione (**161a**) theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 3.2. Tổng hợp chất **161a** bằng phản ứng domino

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **161a** (hình 3.1) xuất hiện đầy đủ các tín hiệu

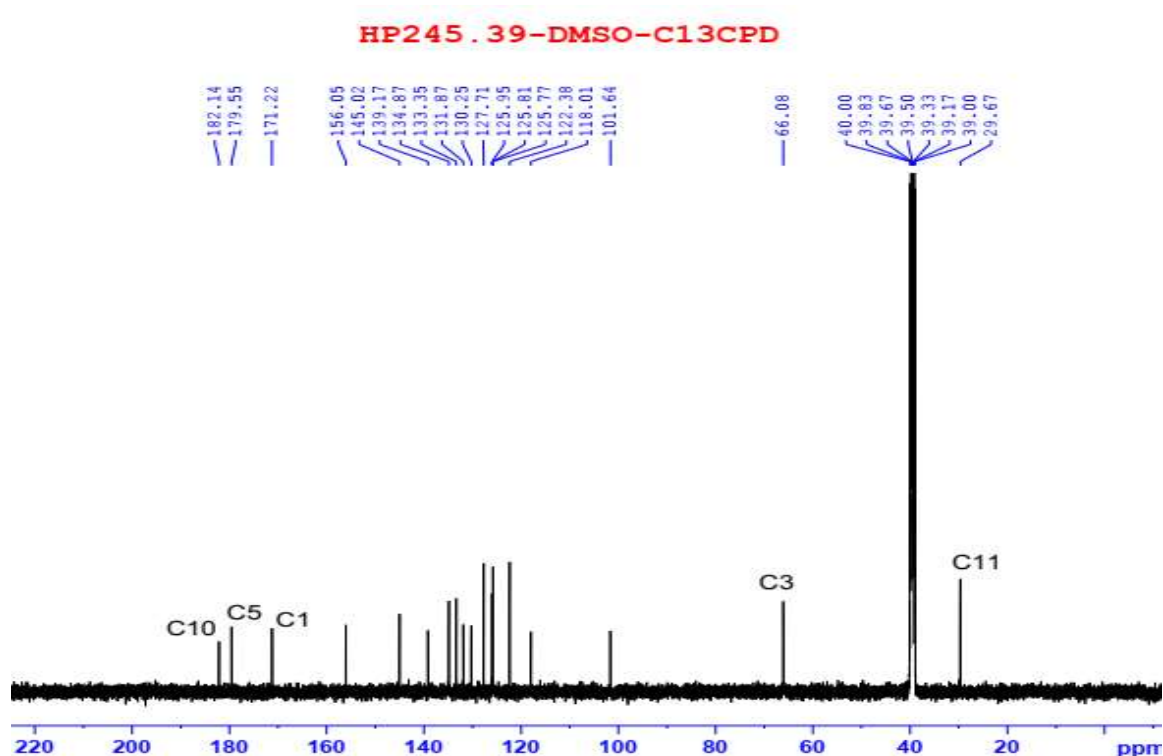
proton đặc trưng có mặt trong phân tử như: tín hiệu singlet của proton trong nhóm NH tại vị trí δ_H : 10,60 ppm, các proton của vòng naphthoquinone tại vị trí δ_H 8,05 (1H, dd, $J = 1.2, 7.8$ Hz, H-6), 7,93 (1H, dd, $J = 0.6, 7.8$ Hz, H-9); 7,85 (1H, td, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-8); 7,81 (td, 1H, $J = 1.2, 7.2$ Hz, H-7). Đặc biệt các tín hiệu đặc trưng cho vòng thiophen cũng dễ dàng được quan sát tại δ_H 7.38 (1H, dd, $J = 3.0, 4.8$ Hz, H-5'); 7.24 (1H, dd, $J = 0.6, 3.0$ Hz, H-2') và 7.07 (1H, dd, $J = 1.2, 4.8$ Hz, H-4') và tín hiệu singlet của proton trên vòng dihydropyridine tại δ_H 5,11 (s, 1H, H-11). Hai proton CH₂ của vòng γ -lactone cho tín hiệu tại δ_H 4,97 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H_a-3),



Hình 3.1. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **161a**

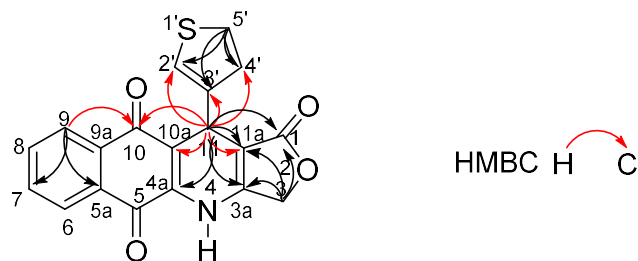
4,87 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H_b-3).

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **161a** (Hình 3.2) xuất hiện tín hiệu của 19 nguyên tử carbon có mặt trong phân tử, với các tín hiệu đặc trưng của nhóm carbonyl tại δ_C (ppm): 182.1 (C-10), 179.6 (C-5), 171.2 (C-1). Nguyên tử carbon no trong vòng dihydropyridine cho tín hiệu tại 29.7 (C-11), nguyên tử carbon no trong vòng γ -lactone cho tín hiệu tại 66.1 (C-3). Các tín hiệu còn lại của các nguyên tử carbon vòng thơm, vòng thiophen và không no xuất hiện từ 156.1 đến 101.6



Hình 3.2. Phổ ^{13}C - NMR của hợp chất **161a**

Trên Bảng 3.1 là các tương tác trong phổ HSQC và HMBC của hợp chất (**161a**). Kết quả này giúp quy kết đầy đủ các tín hiệu proton, carbon trên phổ NMR và qua đó xác định chính xác cấu trúc của hợp chất.

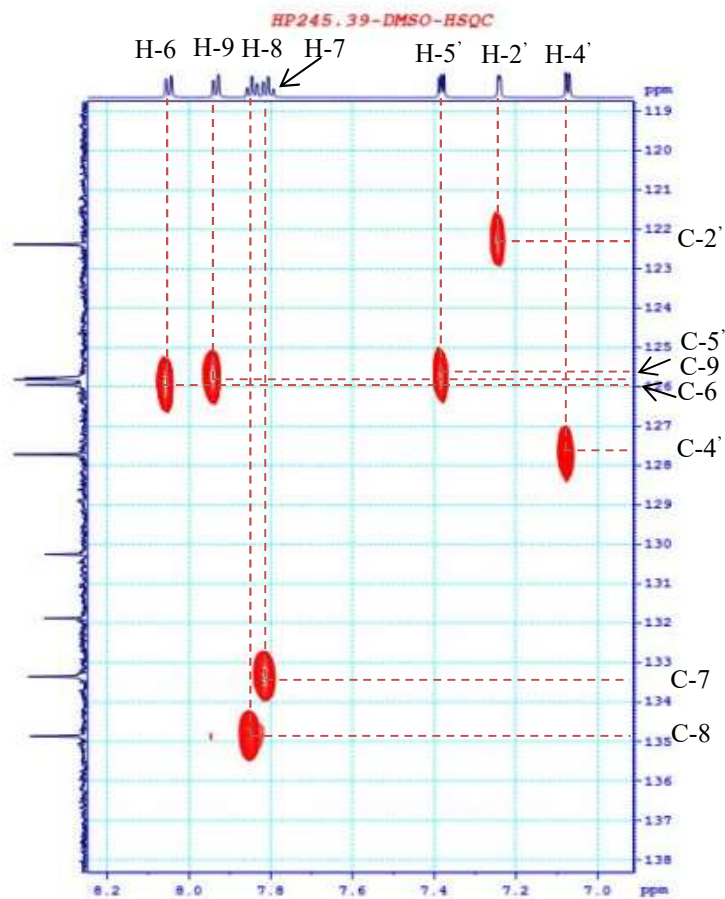


Hình 3.3: Cấu trúc của hợp chất **161a** và các tương tác chính trong phổ HMBC

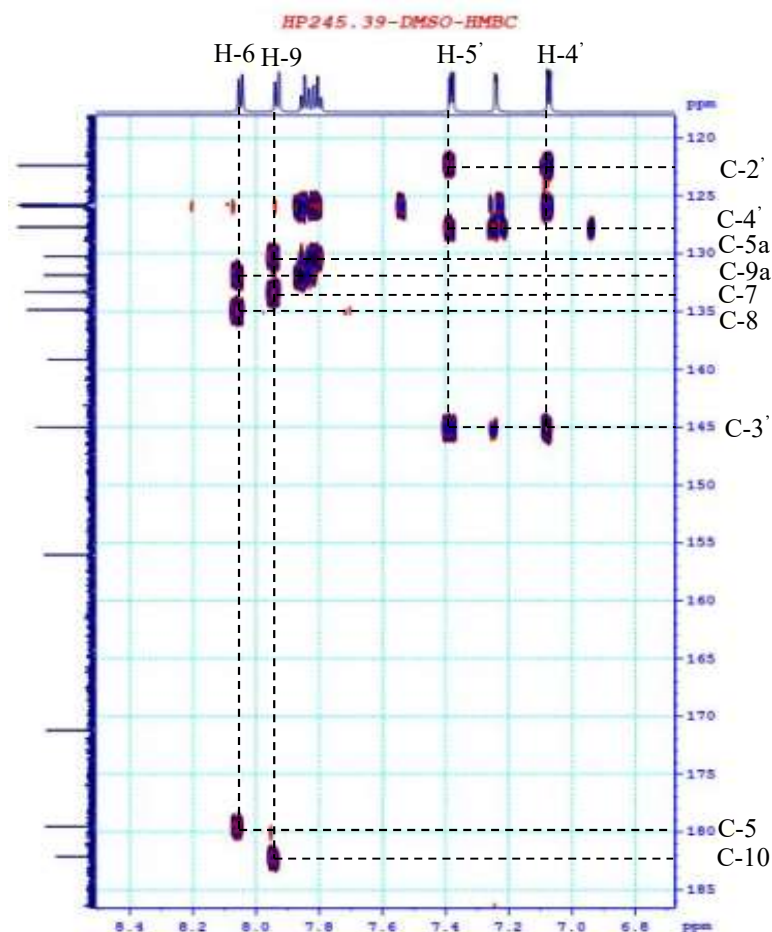
Bảng 3.1. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **161a**

C	δ_{C}	Loại C	δ_{H} (ppm); mult,	Tương tác chính HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	182.1	C=O		
3	66.1		4,97 (1H, d, $J = 16.8$ Hz) 4,87 (1H, dd, $J = 16.8$ Hz)	1, 3a, 11a
3a	156.1	Cq		
4a	139.2	Cq		
5	179.6	C=O		
5a	130.3	Cq		

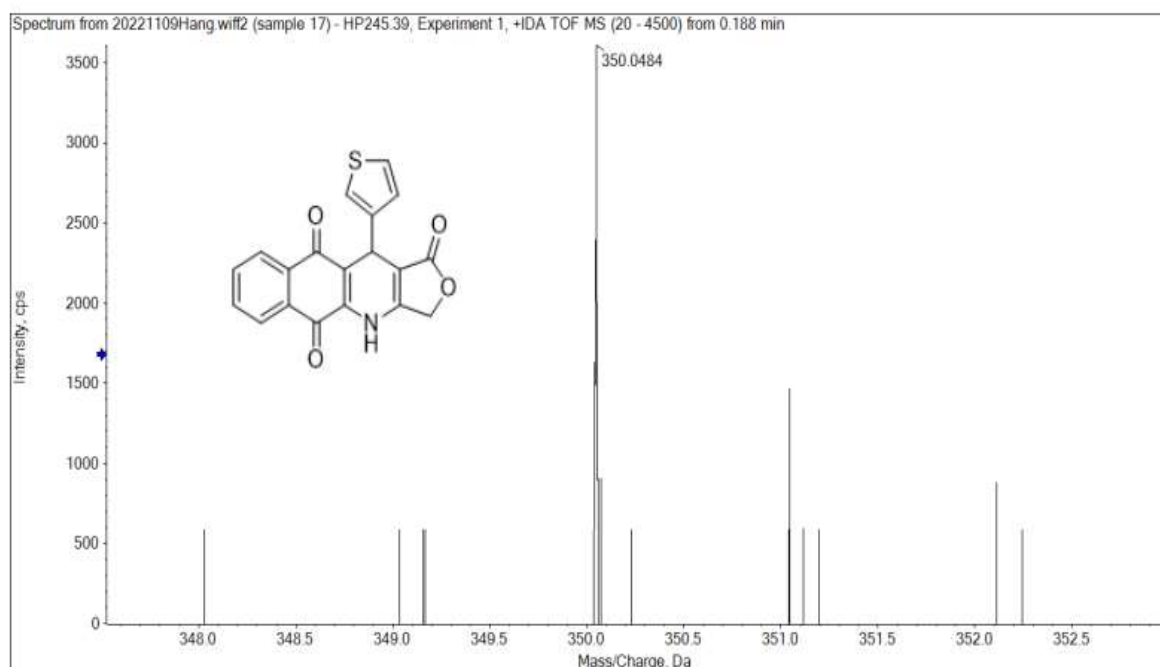
C	δ_C	Loại C	δ_H (ppm); mult,	Tương tác chính HMBC (H $\rightarrow$ C)
6	126.0		8.05 (1H, dd, J=1.2, 7.8 Hz)	
7	133.4		7.81 (1H, td, J = 1.2, 7.2 Hz)	
8	134.9		7.85 (1H, td, J=1.2, 7.2 Hz)	
9	125.8		7,93 (1H, dd, J=0.6, 7.8 Hz)	5a, 7, 10
9a	131.9	Cq		
10	182.1	C=O		
10a	118.0	Cq		
11	29.7		5,11 (1H, s)	2', 3', 4' 3a, 4a, 10, 10a, 11a
11a	101.6	Cq		
2'	122.4	C-S	7.24, (1H, dd, J =0.6, 3.0 Hz)	
3'	145.0			
4'	127.7		7.07 (1H, dd, J = 1.2, 4.8 Hz)	
5'	125.8	C-S	7.38 (dd, 1H, J = 3.0, 4.8 Hz, H-5'),	2', 3', 4'



Hình 3.4. Phổ HSQC của hợp chất **161a**



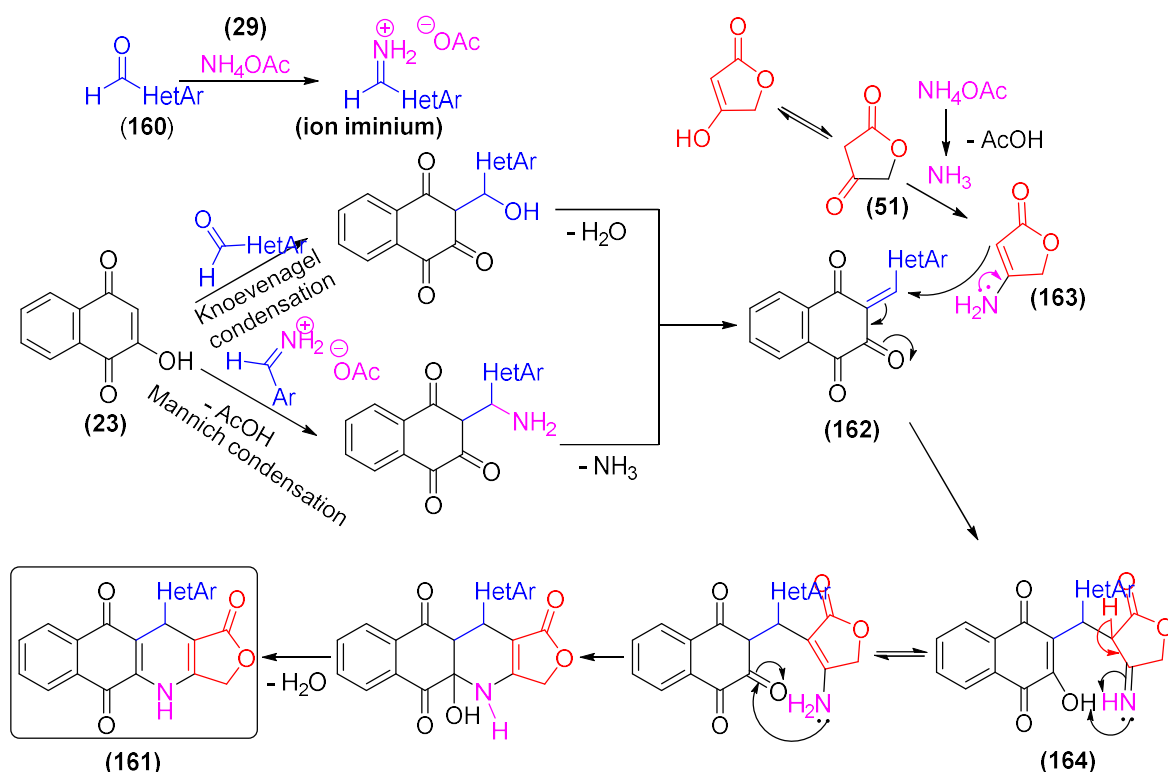
Hình 3.5. Phổ HMBC của hợp chất **161a**



Hình 3.6. Phổ HRMS của hợp chất **161a**

Trên phổ khối phân giải cao của hợp chất (**161a**) (hình 3.6) xuất hiện mảnh ion giả phân tử có m/z $[M+H]^+$: 350.0484 phù hợp với khối lượng tính toán theo lý thuyết cho công thức phân tử $[C_{19}H_{12}NO_4S]^+$ là 350.0482. Như vậy các dữ liệu phổ

NMR và HRMS đã xác nhận cấu trúc của hợp chất (**161a**) là chính xác.



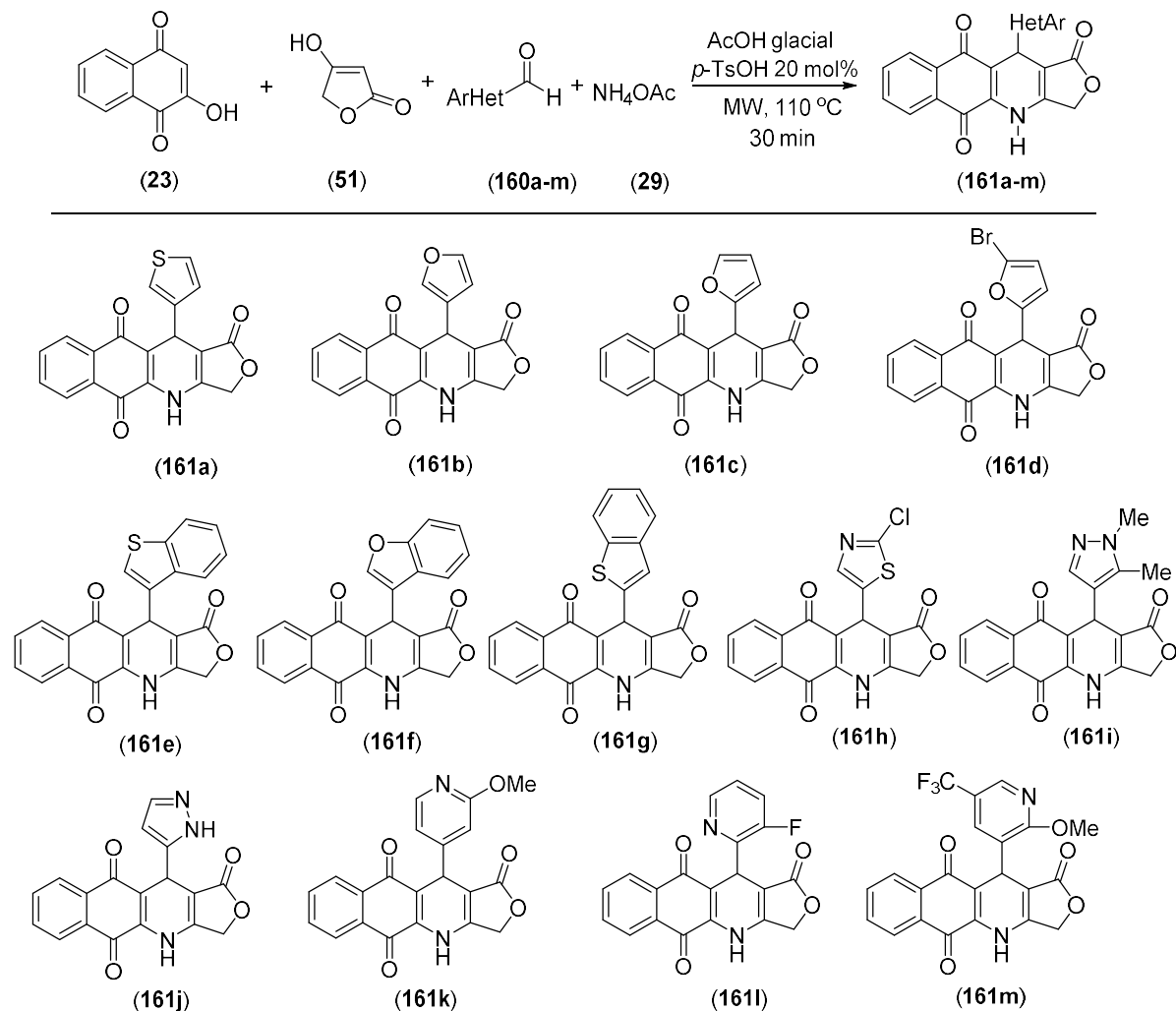
*Sơ đồ 3.3. Cơ chế hình thành sản phẩm **161** từ phản ứng domino bốn thành phần*

Cơ chế hình thành sản phẩm (**161**) được đề xuất theo Sơ đồ 3.3. Đầu tiên tạo thành hợp chất trung gian (**162**) bằng một trong hai con đường: một là nhờ quá trình ngưng tụ Knoevenagel của (**23**) trực tiếp với các aldehyde thơm, rồi loại nước; hai là các aldehyde thơm phản ứng với ammoni acetate tạo thành ion iminium, sau đó các ion này tham gia phản ứng ngưng tụ Mannich với hợp chất (**23**) rồi tách loại NH_3 (ammoniac). Bước tiếp theo hợp chất trung gian (**162**) tham gia phản ứng cộng Michael với hợp chất 4-aminofuran-2(5H)-one (**163**) (được tạo ra từ phản ứng của acid tetronic (**51**) với ammoni acetat (**29**)) tạo ra hợp chất (**164**), hợp chất này kém bền dễ tham gia phản ứng đóng vòng nội phân tử, sau đó tách H_2O tạo thành sản phẩm 4-aza- podophyllotoxin chứa dị vòng (**161**).

Như vậy, từ các dữ liệu phổ NMR, HRMS đã được bàn luận ở trên cho thấy cấu trúc của các hợp chất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng (**161**) tổng hợp được hoàn toàn phù hợp với công thức cấu tạo dự kiến như định hướng nghiên cứu ban đầu.

Để lựa chọn các điều kiện tối ưu khi tổng hợp các hợp chất (**161**), luận án đã tiến hành nghiên cứu, khảo sát tổng hợp với các dung môi hữu cơ khác nhau, sử dụng được trong thiết bị vi sóng như ethanol, *t*-butanol, DMF và acid acetic khan; nhiệt độ phản ứng được khảo sát từ 80 - 130 °C. Kết quả cho thấy phản ứng tiến hành trong acid acetic khan ở 110 °C, thời gian 30 phút là khả quan nhất, cho hiệu suất tổng hợp sản phẩm (**161**) từ 20 - 33 %.

Sử dụng các điều kiện được khảo sát chi tiết ở trên, luận án đã tiến hành tổng hợp được 13 dẫn chất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng (**161a-m**) với các aldehyde chứa các dị tố khác nhau. Kết quả tổng hợp được đưa ra trong Sơ đồ 3.4 và bảng 3.2.



Sơ đồ 3.4. Tổng hợp các dẫn xuất **161a-m** bằng phản ứng domino bốn thành phần

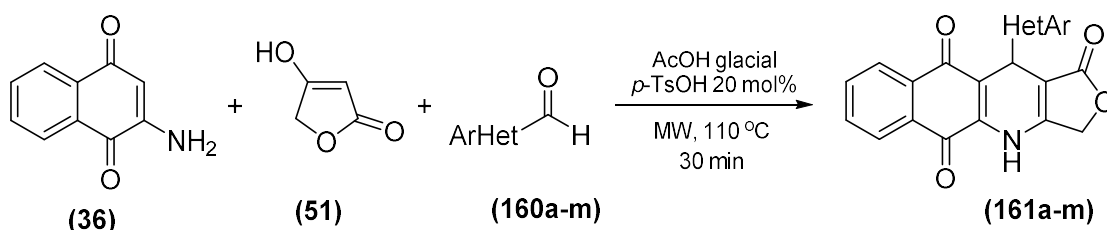
Bảng 3.2. Các hợp chất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng **161a-m**

STT	Hợp chất	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Hiệu suất của phản ứng domino (%)	
			Loại 4 thành phần	Loại 3 thành phần
1	161a	298 - 299	29	64
2	161b	345 - 346	25	62
3	161c	304 - 305	20	60
4	161d	371 - 372	20	62
5	161e	295 - 296	33	70
6	161f	295 - 296	32	68
7	161g	302 - 303	33	69

STT	Hợp chất	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Hiệu suất của phản ứng domino (%)	
			Loại 4 thành phần	Loại 3 thành phần
8	161h	383 - 384	28	64
9	161i	262 - 263	27	63
10	161j	310 - 311	20	61
11	161k	245 - 246	34	74
12	161l	288 -289	32	72
13	161m	289 - 290	33	72

*b. Tổng hợp các dẫn xuất **161a-m** bằng phản ứng domino ba thành phần*

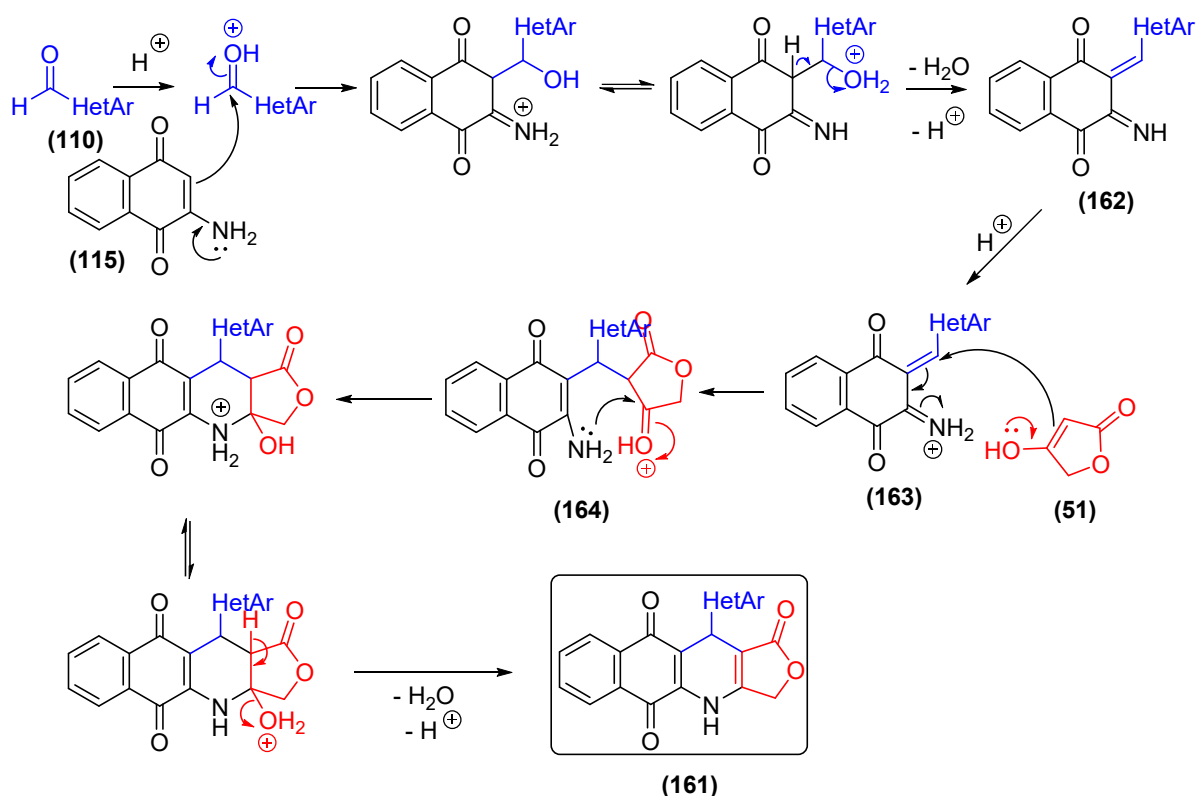
Nhằm nâng cao hiệu suất trong quá trình tổng hợp, tiếp theo luận án thực hiện phản ứng domino với ba thành phần đi từ các nguyên liệu ban đầu là: 2-amino-1,4-naphthoquinone (**36**), tetronic acid (**51**) và các aldehyde thơm chứa dị vòng (**160a-m**) như Sơ đồ 3.5. Phản ứng sử dụng acid *p*-toluenesulfonic làm xúc tác, trong dung môi acid acetic khan ở 110 °C bằng thiết bị phản ứng vi sóng với thời gian phản ứng 30 phút.



*Sơ đồ 3.5. Tổng hợp các hợp chất **161a-m** bằng phản ứng domino ba thành phần*

Kết quả thực nghiệm được trình bày ở bảng 3.2 cho thấy việc sử dụng phản ứng domino ba thành phần để tổng hợp các hợp chất 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng (**161a-m**) cho hiệu suất cao hơn gấp 2 lần so với phương pháp sử dụng 4 tác nhân phản ứng, trong cùng điều kiện thực hiện.

Cơ chế hình thành sản phẩm (**161a-m**) từ phản ứng domino ba thành phần được đề xuất theo Sơ đồ 3.6. Quá trình bắt đầu bằng phản ứng ngưng tụ Knoevenagel của 2-amino-1,4-naphthoquinone (**36**) với aldehyde thơm (**160a-m**), sau đó là quá trình tách nước nội phân tử để tạo ra hợp chất trung gian (**167**). Tiếp theo là phản ứng cộng Michael giữa hợp chất (**168**) với tetronic acid (**51**) tạo ra hợp chất trung gian (**169**). Cuối cùng hợp chất (**169**) đóng vòng nội phân tử và tách nước tạo thành sản phẩm 4-aza-podophyllotoxin chứa dị vòng (**161a-m**).



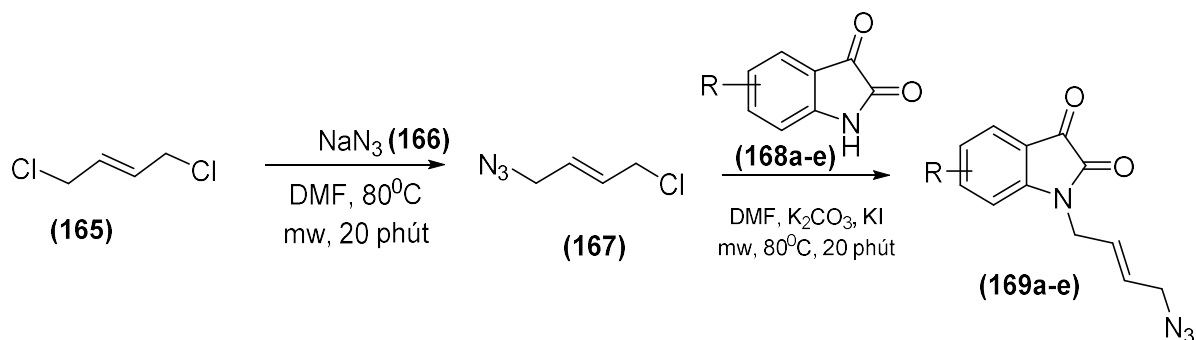
Sơ đồ 3.6. Cơ chế đề xuất hình thành hợp chất (161a-m) từ ba thành phần

3.3. Kết quả tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin (174a-p)

3.3.1. Tổng hợp các dẫn xuất của isatin bằng phản ứng ankyl hoá

Các dẫn xuất *N*-azidobut-2-en-isatin (169a-e) được tổng hợp thông qua hai bước từ *trans* 1,4-dichloro-but-2-en (165) và tác nhân natri azide (166) cùng các isatin có chứa các nhóm thế trên vòng benzen ban đầu (168a-e) theo Sơ đồ 3.7.

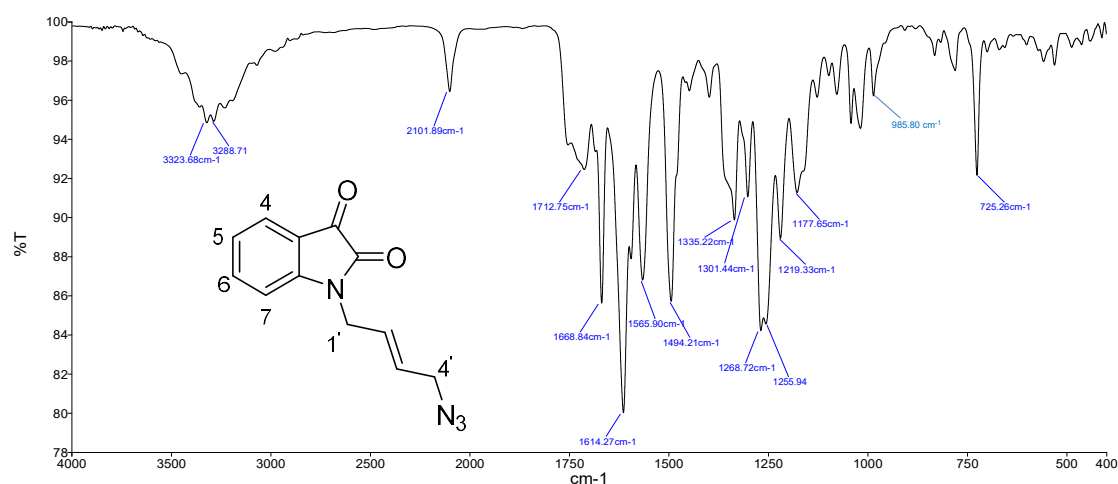
Để tạo ra các dẫn xuất (169a-e) có hai con đường có thể áp dụng từ các nguyên liệu ban đầu. Thứ nhất cho các dẫn xuất (168a-e) phản ứng trước với (165) sau đó phân lập và cho phản ứng tiếp với tác nhân natri azide (166) ở bước tiếp theo. Phương pháp này phù hợp với cách thức tổng hợp theo thứ tự lần lượt các dẫn xuất (169) từ (a-n) và có thể sử dụng NaH để xúc tác, đẩy nhanh quá trình phản ứng. Tuy nhiên sản phẩm thu được sẽ không chọn lọc do NaH ngoài đóng vai trò base nó còn là nguồn ion hydride (vai trò là tác nhân khử hoá) và khi gặp các tác nhân electrophile như các dẫn xuất halogen thì sẽ xảy ra các phản ứng phụ không mong muốn [123].



Sơ đồ 3.7. Tổng hợp các dẫn xuất *N*-azidobut-2-en-isatin

Ngược lại nếu đi bằng con đường theo sơ đồ 3.7, tổng hợp ra (**167**) trước, bằng cách kiểm soát tỷ lệ số mol phản ứng giữa (**165**) và natri azide (**166**) (1:1,2) sau đó cho thêm các dẫn xuất (**168a-e**), sản phẩm thu được sẽ chọn lọc và chỉ cần phân lập ở bước cuối ta sẽ thu được sản phẩm mong muốn. Dựa trên các tài liệu tham khảo luận án đã lựa chọn thực hiện tổng hợp các dẫn xuất (**169a-n**) theo con đường thứ 2 với các điều kiện được chỉ ra trong Sơ đồ 3.7, lý do lựa chọn là vì mỗi phản ứng đều diễn ra tuần tự trong cùng điều kiện nhiệt độ và dung môi là DMF, phản ứng ở bước sau không cần phải phân lập tách chiết, chỉ cần bổ sung thêm xúc tác là các base K_2CO_3 và KI. Các sản phẩm sẽ được tinh chế, phân lập sẵn sàng cho các phản ứng tiếp theo

Để khẳng định sản phẩm đã tổng hợp thành công, luận án lựa chọn một dẫn xuất tiêu biểu của dãy là isatin làm nguyên liệu ban đầu, sau quá trình tinh chế, phân lập, sản phẩm được đánh giá, kiểm tra sơ bộ bằng phổ IR và 1H -NMR.

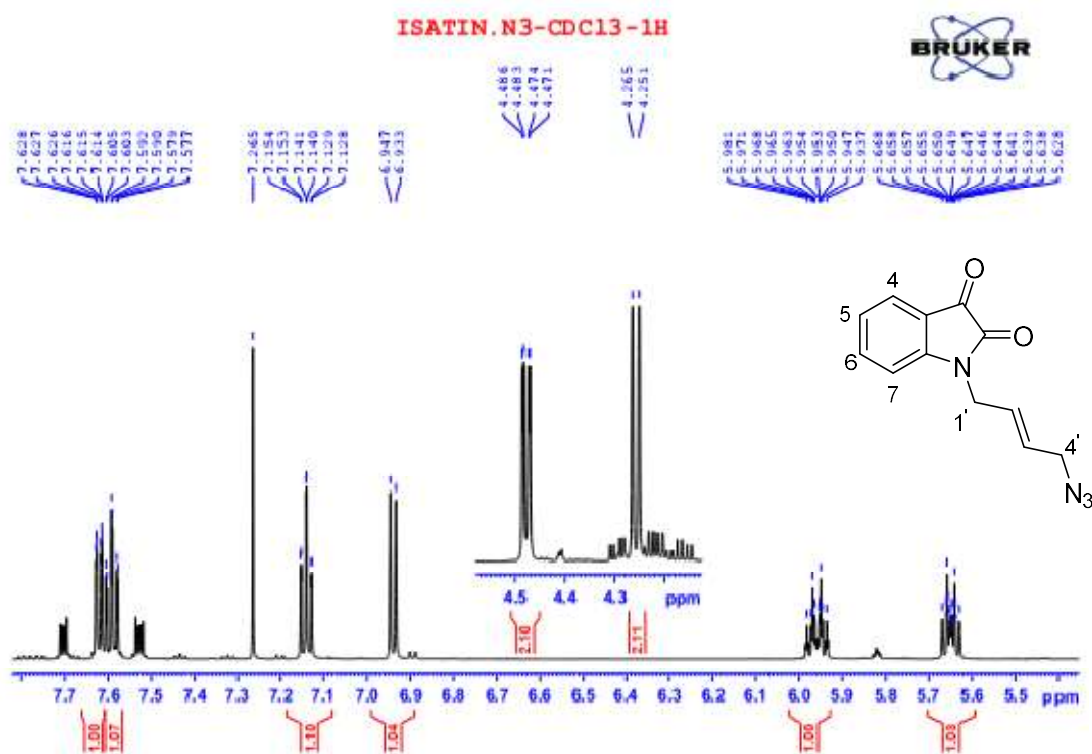


Hình 3.7. Phổ IR của hợp chất *N*-but-2-en-isatin **169a**

Trên phổ IR của *N*-azido-but-2-en-isatin (**169a**) (Hình 3.7) xuất hiện các băng sóng hấp thụ đặc trưng của các nhóm chức có mặt trong phân tử như nhóm ketone và azido tương ứng. Cụ thể ở vị trí 2101 cm^{-1} đặc trưng cho azide (dao động hóa trị của liên kết $N\equiv N$). Tại vị trí 1614 cm^{-1} xuất hiện một dao động hoá trị có cường độ mạnh, đặc trưng của nhóm chức γ -lactam ($C=O$) bên cạnh một dao động có cường độ trung bình tại vị trí 1712 cm^{-1} được gán cho nhóm chức ketone ($C=O$), điều này có thể giải thích do hai nhóm chức này ở gần nhau trên phân tử isatin, do đó có sự chồng lấn lên nhau của các băng sóng hấp thụ [124]. Bên cạnh đó cũng xuất hiện một dao động biến dạng tại vị trí 985 cm^{-1} , đặc trưng cho liên kết $C=C$ của *trans* của but-2-en.

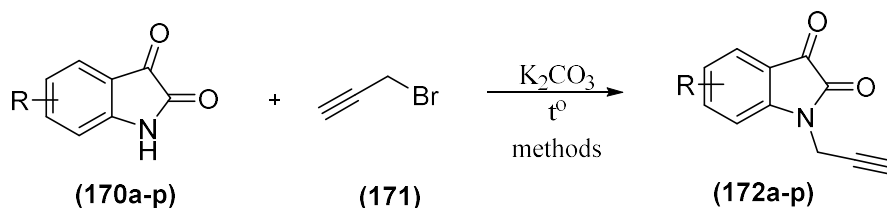
Kiểm tra phổ 1H -NMR thấy xuất hiện tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của các proton vòng thơm xuất hiện tại độ dịch chuyển trong khoảng từ δ_H 7.62 - 6.93 ppm với 4 vị trí rõ ràng. Cụ thể: proton H-6 xuất hiện tín hiệu cộng hưởng tại δ_H 7.62 - 7.61 ppm (1H, m) ngay cạnh tín hiệu cộng hưởng được quy kết cho H-4 tại δ_H 7.60 -

7.57 ppm (1H, m), tiếp theo cụm tín hiệu có hình dạng triplet tách vạch tại độ dịch chuyển từ 7.15 - 7.12 ppm (1H, m) được gán cho proton H-5 và tín hiệu doublet mạnh tại δ_H 6.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz) là của proton H-7. Hai proton của *trans*-but-2-en xuất hiện với các cụm tín hiệu multiplet đặc trưng tại vị trí có độ dịch chuyển trong khoảng δ_H 5.5 - 6.0 (5.98 - 5.93 (1H, m, H-3')); 5.66 - 6.62 (1H, m, H-2')), cùng với 4 proton của hai nhóm chức -CH₂ có dạng tín hiệu doublet gắn với nguyên tử nitrogen trên mạch thẳng but-2-en (4.48 (2H, dd, $J = 1.8, 7.2$ Hz, -CH₂N₃; 4.26 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, -CH₂N=).



Hình 3.8. Phổ ¹H-NMR của hợp chất *N*-azidobut-2-en-isatin **169a**

Quy trình alkyl hoá tổng hợp các dẫn xuất của isatin đã được biết đến trên cơ sở các dẫn chất của isatin với các tác nhân có chứa nhóm Halogen ở đầu mạch, sử dụng các xúc tác base như K₂CO₃, Na₂CO₃, trong các dung môi: acetone, acetonitrile, DMSO hay DMF với các điều kiện gia nhiệt khác nhau bao gồm: đun hồi lưu, siêu âm hoặc vi sóng [125-128]. Trên cơ sở tham khảo tài liệu luận án đã tiến hành, khảo sát các điều kiện khác nhau của quá trình alkyl hoá và lựa chọn phản ứng giữa isatin (**170a**) với propagyl (**171**) là đối tượng để nghiên cứu theo Sơ đồ 3.8.



Sơ đồ 3.8. Phản ứng alkyl hoá giữa isatin và bromide

Do K₂CO₃ có khả năng hoà tan tốt và là xúc tác base có tính êm dịu, vì vậy

luận án đã lựa chọn xúc tác này làm đối tượng khảo sát trong bình phản ứng có chứa 3 ml dung môi mỗi loại. Nhiệt độ tiến hành phản ứng được lựa chọn ở các mức là 25 °C, 50 °C và 75 °C và 100 °C để phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Các phương pháp tiến hành bao gồm: đun hồi lưu, siêu âm, vi sóng được nghiên cứu, khảo sát độc lập.

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng theo các phương pháp khác nhau

Nhiệt độ phản ứng (°C)		Thời gian (phút)	Hiệu suất (%)	Màu sắc	Dung môi
Phương pháp tổng hợp vi sóng	25	60	14.3	Màu nhạt	Acetone
	50	40	62.8	Màu nhạt	Acetonitrile
	75	20	90.7	Màu đậm	DMF
	100	15	N/A	Màu đen	DMSO
Phương pháp đun hồi lưu	25	120	5.0	Rất nhạt	Acetone
	50	90	20.6	Màu nhạt	Acetonitrile
	75	45	67.9	Màu đậm	DMF
	100	20	N/A	Màu đen	DMSO
Phương pháp siêu âm	25	120	11.2	Màu nhạt	Acetone
	50	90	34.6	Màu nhạt	Acetonitrile
	75	45	78.4	Màu đậm	DMF
	100	20	26.2	Màu sẫm	DMSO

Thông qua bảng 3.3 rõ ràng nhiệt độ phản ứng quyết định trực tiếp đến hiệu suất, chất lượng của sản phẩm và nhiệt độ phù hợp để phản ứng cho hiệu quả tốt nhất trong khoảng 75-80 °C, điều này có thể giải thích: khi nhiệt độ thấp phản ứng xảy ra chậm, kéo dài, hiệu suất thấp, ngược lại khi tiến hành ở nhiệt độ cao có thể dẫn tới sự phân huỷ chất (chất đa phần bị cháy và chuyển sang màu đen, đóng vón cục) hoặc hình thành các sản phẩm phụ không mong muốn.

Song song với việc khảo sát tối ưu hoá nhiệt độ phản ứng, luận án cũng tiến hành khảo sát ảnh hưởng của dung môi đến thời gian và hiệu suất. Phản ứng alkyl hoá đặc trưng với cơ chế thế S_N2 , do đó các dung môi phù hợp cho phản ứng loại này được lựa chọn bao gồm: DMSO, acetone, acetonitrile và DMF tương ứng với nhiệt độ bay hơi của mỗi dung môi được chỉ ra trong Bảng 3.3.

Kết quả khảo sát cho thấy dung môi acetone có nhiệt độ bay hơi thấp, không phù hợp cho phản ứng alkyl hoá giữa isatin và các tác nhân chứa nhóm Halogen đầu mạch, điều này có thể lý giải là do acetone nhẹ, dễ bay hơi ở nhiệt độ phòng, do đó dung môi dễ bị thoát ra khỏi mặt thoáng của dung dịch. Với acetonitrile đây là dung môi có nhiệt độ sôi thấp, do đó khoảng nhiệt độ phù hợp để thực hiện phản ứng trong khoảng 25 - 40 °C. Còn đối với dung môi DMSO, đây là dung môi có khoảng nhiệt độ hoạt động rộng, tuy nhiên nó rất khó loại bỏ khi cất quay dưới áp suất thấp. Như

vậy có thể khẳng định lựa chọn dung môi DMF cho phản ứng alkyl hoá là lựa chọn phù hợp nhất, do đây là dung môi có độ hoà tan tốt trong nước, thuận lợi cho quá trình phân lập, tách, chiết sản phẩm sau phản ứng, hơn nữa phân tử lưỡng cực phù hợp cho gia nhiệt trong thiết bị vi sóng.

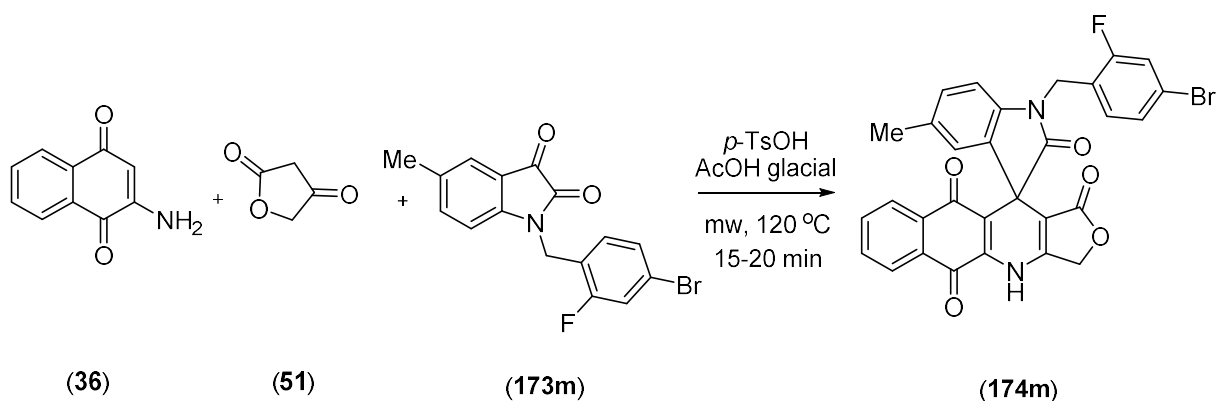
Từ dữ liệu trong Bảng 3.3 nhận thấy trong các phương pháp tổng hợp, phương pháp vi sóng cho hiệu quả rõ rệt hơn cả do tốc độ gia nhiệt nhanh và đồng đều, qua đó giúp rút ngắn thời gian phản ứng, nâng cao hiệu suất. Ngược lại phương pháp siêu âm có thời gian gia nhiệt dài hơn, sản phẩm thu được không chọn lọc (sản phẩm có nhiều vết), còn phương pháp đun hồi lưu sản phẩm thu được có hiệu suất thấp và không đồng đều.

Các sản phẩm của quá trình ankylation thu được đều tồn tại ở dạng rắn, có màu vàng, đỏ hoặc cam, dễ dàng phân lập bằng sắc ký cột, không tan trong nước, tan tốt trong các dung môi hữu cơ như: methanol, ethanol, acetone, toluene, acid acetic, DMF hoặc DMSO... Do đây là những nguyên liệu cho thực hiện phản ứng ở bước sau, vì thế việc đánh giá, xác định cấu trúc của các dẫn xuất này sẽ được thực hiện cùng với các sản phẩm sau khi hoàn thành phản ứng domino.

3.3.2. Thực hiện phản ứng domino

Xu hướng kết hợp hai dược chất để tăng cường hiệu lực sinh học và dược lý, được các nhà khoa học tập trung, quan tâm nghiên cứu trong thời gian gần đây, nó hiện trở thành phương pháp phổ biến trong sàng lọc, tìm kiếm các hợp chất mới, trong đó có các hợp chất spiro [129].

Phản ứng domino đa thành phần là một phương pháp tổng hợp hiệu quả giúp tạo ra các hợp chất có cấu trúc phức tạp, đa dạng với nhiều trung tâm lập thể khác nhau từ các hợp phần có hoạt tính sinh học riêng rẽ [130, 131].



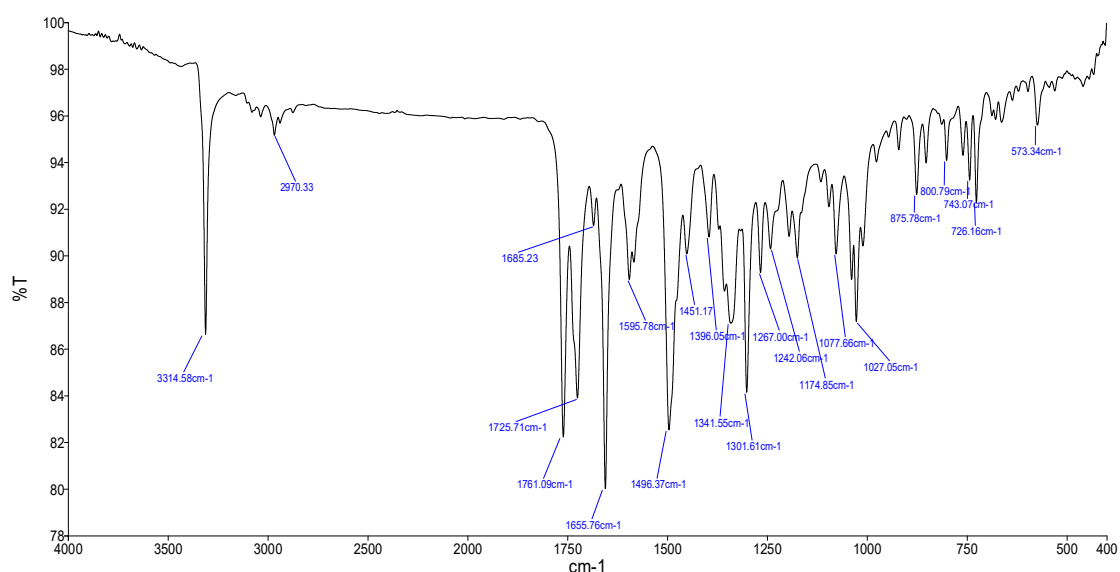
Sơ đồ 3.9. Tổng hợp dẫn xuất **174m** podophyllotoxin-isatin

Tiếp tục hướng nghiên cứu về tổng hợp các hợp chất hybrid bằng phản ứng domino đa thành phần đã được áp dụng rộng rãi trong những năm gần đây. Luận án đã tiến hành tổng hợp các dẫn xuất của isatin với podophyllotoxin-naphthoquinone (**174m**) từ 2-amino-naphthoquinone (**36**), acid tetronic (**51**) và dẫn xuất isatin (**173m**)

theo sơ đồ phản ứng 3.9

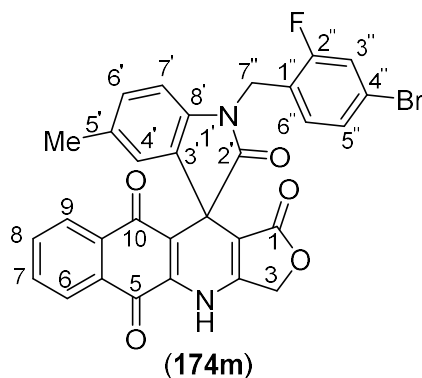
Cấu trúc của hợp chất (**174m**) được xác nhận bằng các phương pháp phổ IR, NMR và HRMS. Đây là hợp chất đại diện, do có chứa các nhóm thế tiêu biểu cho các dẫn xuất của isatin.

Phổ IR (đo theo phương pháp ép viên với KBr) của hợp chất (**174m**) (Hình 3.9) cho thấy sự xuất hiện của băng sóng hấp thụ đặc trưng cho các nhóm chức có mặt trong phân tử. Băng sóng hấp thụ ở vị trí 3314 cm^{-1} chứng tỏ có sự xuất hiện của liên kết NH trong hợp chất, các nhóm carbonyl của vòng γ -butyrolacton và vòng naphthoquinone đều được ghi nhận lần lượt tại các băng sóng hấp thụ ở 1761 và 1725 cm^{-1} hay tại vị trí 1655 cm^{-1} xuất hiện dao động hoá trị đặc trưng của nhóm carbonyl gắn với amit trong isatin tương ứng.



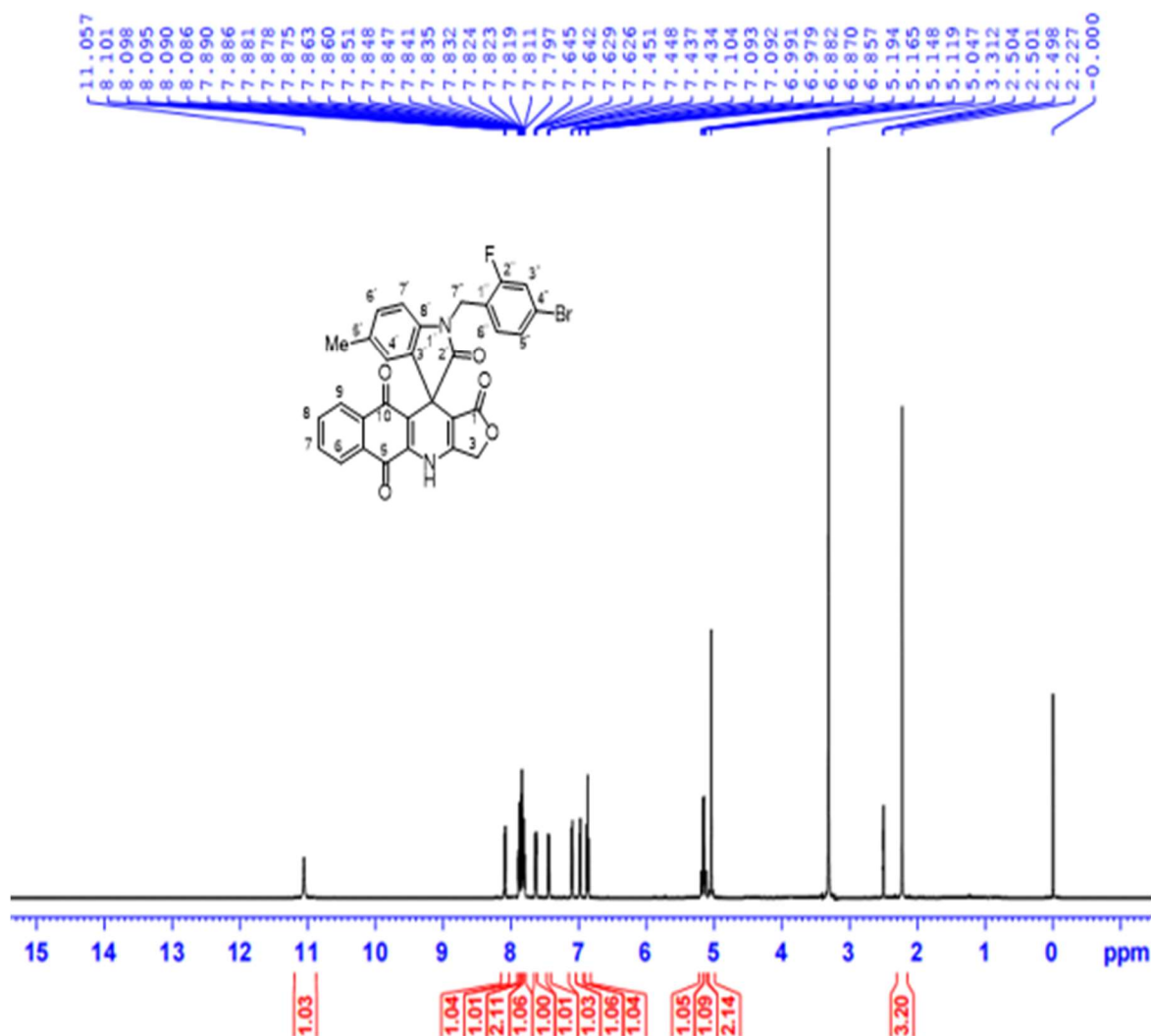
Hình 3.9. Phổ IR của hợp chất **174m**

Các phổ 1D-NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) và phổ 2D-NMR (HSQC, HMBC) được chỉ ra trong các Hình 3.10 - 3.13, phổ HR-MS ở Hình 3.17. Để phân tích phổ NMR, khung phân tử của hợp chất (**174m**) được đánh số như sau:



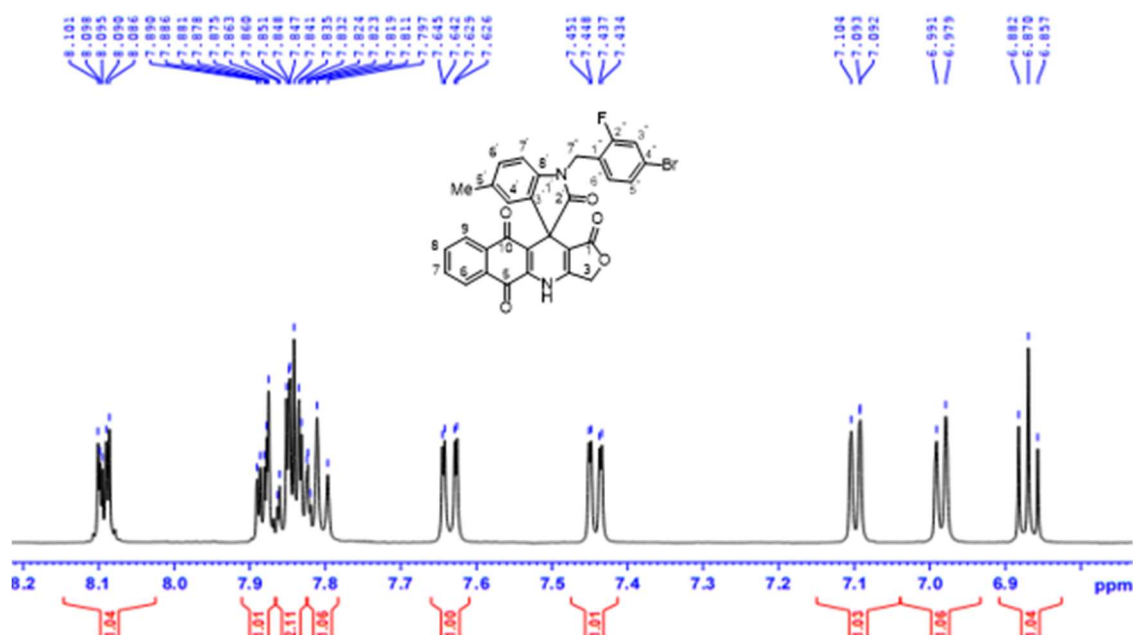
Phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR (được ghi đo trong dung môi $\text{DMSO}-d_6$) của hợp chất (**174m**) cho thấy có sự phân vùng rõ rệt, đặc trưng cho các tín hiệu của proton

và carbon ứng với từng cấu tử là nguyên liệu ban đầu như vùng phổ NMR của các dẫn xuất thể isatin, naphthoquinone và vòng γ -butyrolacton. Phổ 2D-NMR dùng để quy kết các tín hiệu cộng hưởng giữa proton và carbon-13, được đưa ra trong các Hình 3.14 - 3.15.

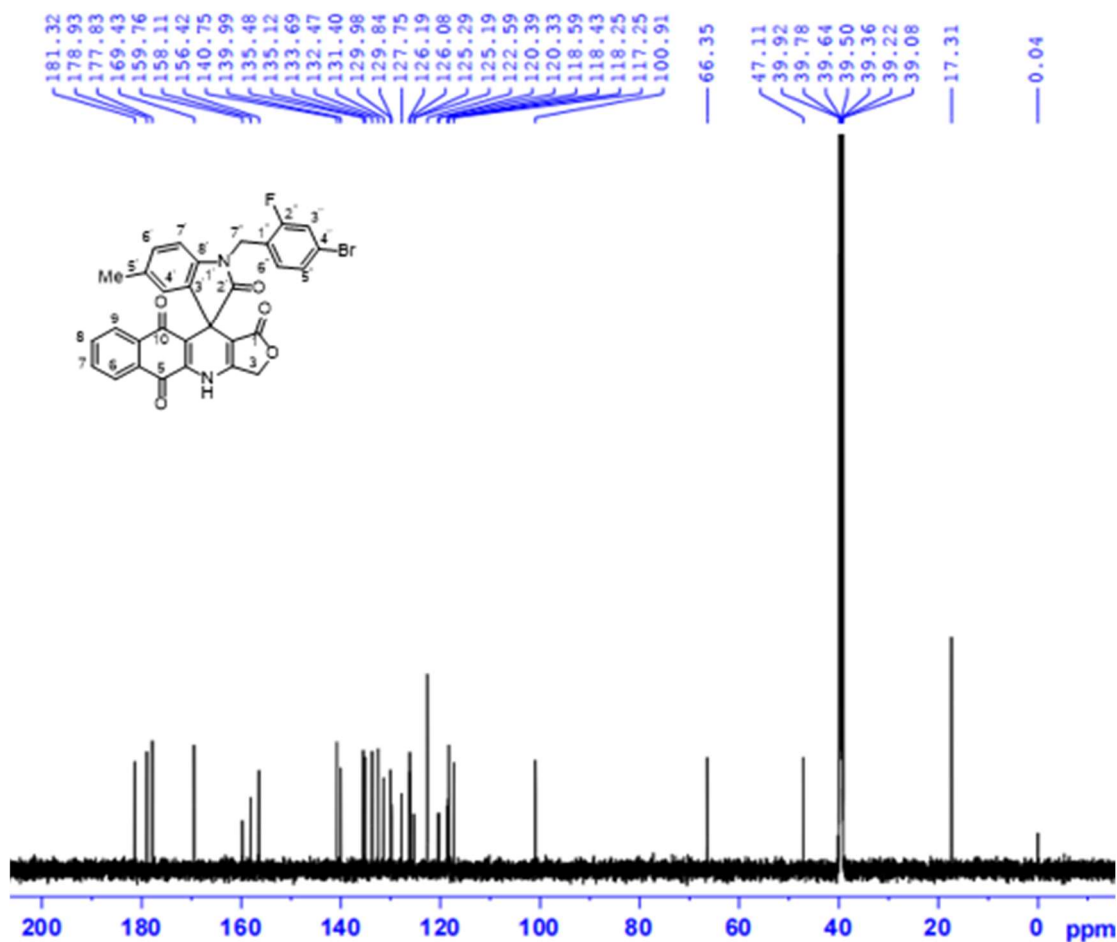


Hình 3.10. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **174m**

Trên phổ ^1H -NMR xuất hiện đầy đủ các tín hiệu của 18 proton có mặt trong phân tử của hợp chất (**174m**). Ngoài các tín hiệu đặc trưng cho khung podophyllotoxin-naphthoquinone như đã trình bày trong mục 3.2, còn có sự xuất hiện của 3 proton trong nhóm benzyl lần lượt với các độ dịch chuyển tương ứng δ_{H} 7.81 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-6''), 7.64 (1H, dd, $J = 9.6, 1.8$ Hz, H-3'') và 7.44 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H-5''); cùng với cụm 3 proton của vòng benzen trong hợp phần isatin xuất hiện với các tín hiệu triplet và doublet tương ứng tại các vị trí có δ_{H} 7.09 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8'), 6.99 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7'); cũng như 4 proton của hai nhóm methylen (5.18 (1H, dd, $J = 17.4$ Hz), 5.13 (1H d, $J = 17.4$ Hz)) và tín hiệu singlet của nhóm $-\text{CH}_3$ trên vòng isatin cũng được ghi nhận đầy đủ trên Hình 3.10 và phổ giãn tương ứng ở Hình 3.11



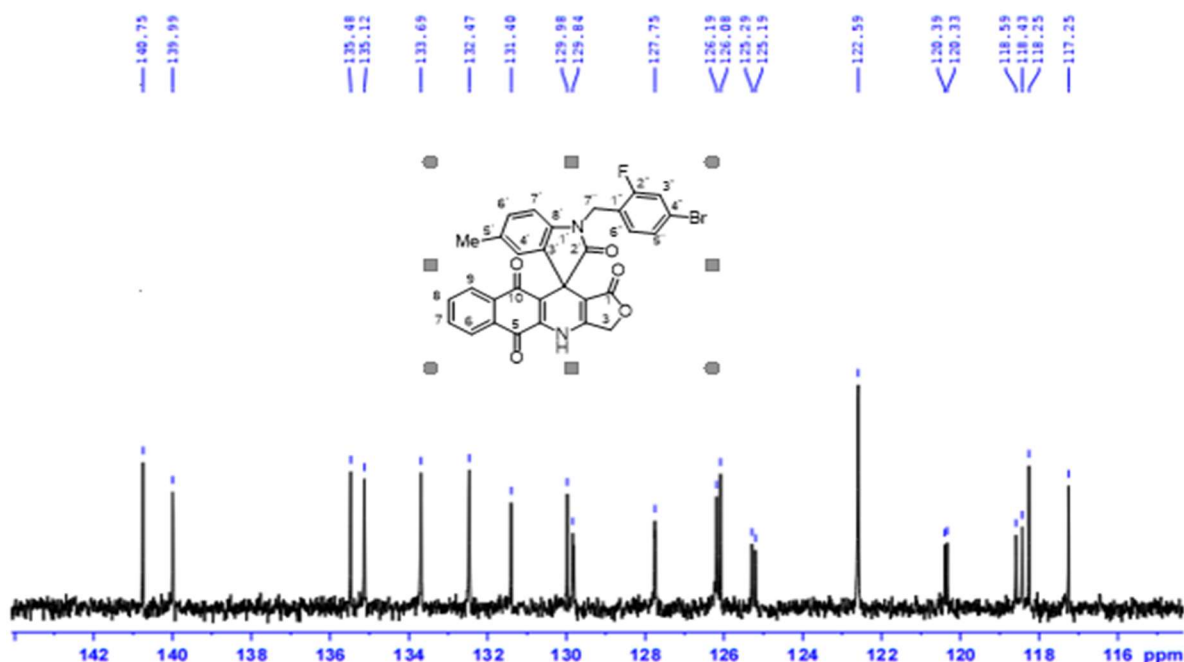
Hình 3.11. Phổ giãn ^1H -NMR của hợp chất **174m**



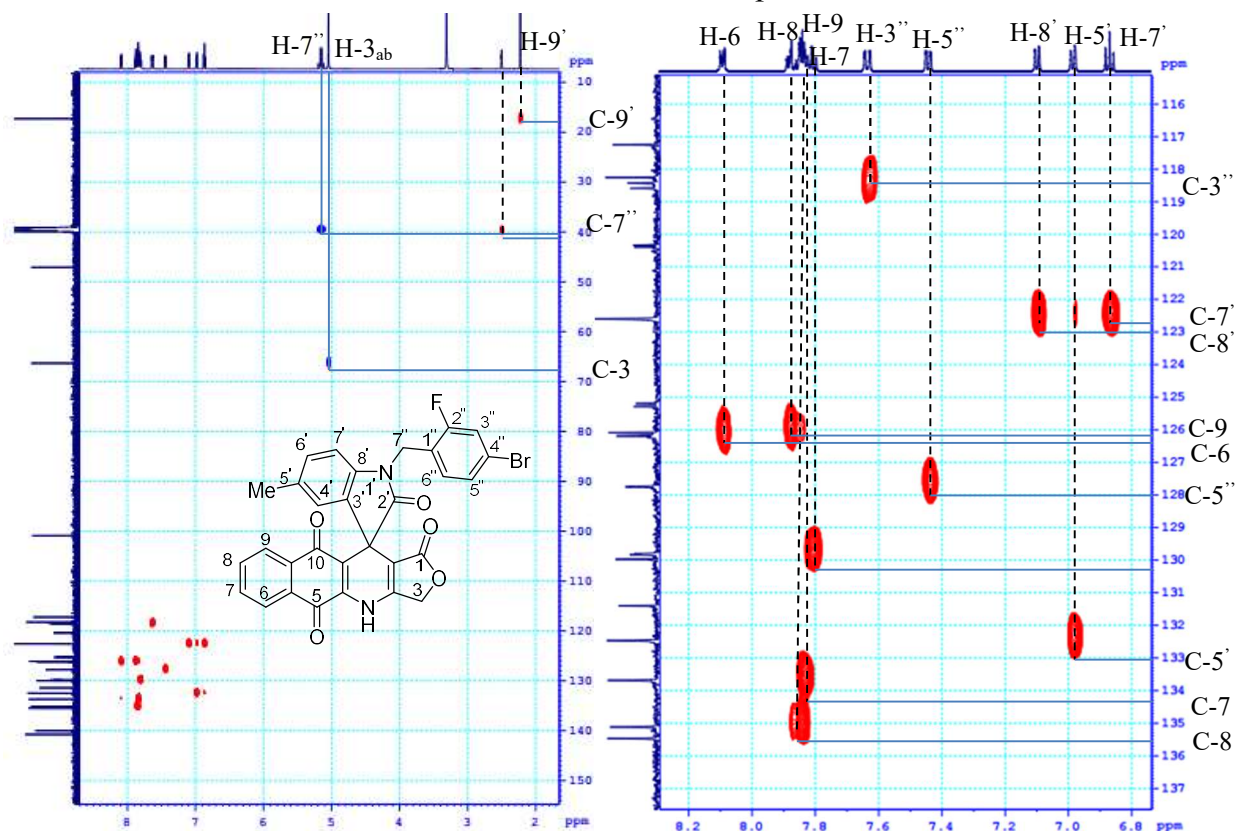
Hình 3.12. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **174m**

Trên phổ ^{13}C -NMR, ngoài các tín hiệu carbon đặc trưng cho cấu trúc của khung podophyllotoxin-naphthoquinone (tham khảo mục 3.2), còn thấy sự có mặt của các tín hiệu đặc trưng cho isatin δ_{C} của nhóm carbonyl (177.8 (C-2')), các tín hiệu của vòng thơm (139.98 (C-4'), 135.5 (C-6'), 132.5 (C-5'), 122.6 (C-7', C-8'), 118.3

(C-3''), nhóm methyl (17.3 (C-9'')) và C_{spiro} (100.9 (C-9'')); bên cạnh tín hiệu của nhóm 4-bromo-2-flu-benzyl (158.9 (1C, d, $J = 247.5$ Hz, C-F), 129.8 (1C, d, $J = 4.5$ Hz, C-6''), 127.8 (C-5''), 125.2 (1C, d, $J = 15.0$ Hz, C-1''), 120.4 (1C, d, $J = 9.0$ Hz, C-4''), 118.6 (1C, d, $J = 24$ Hz, C-3'')) và C_{methylene} (39.92 (C-7'')).



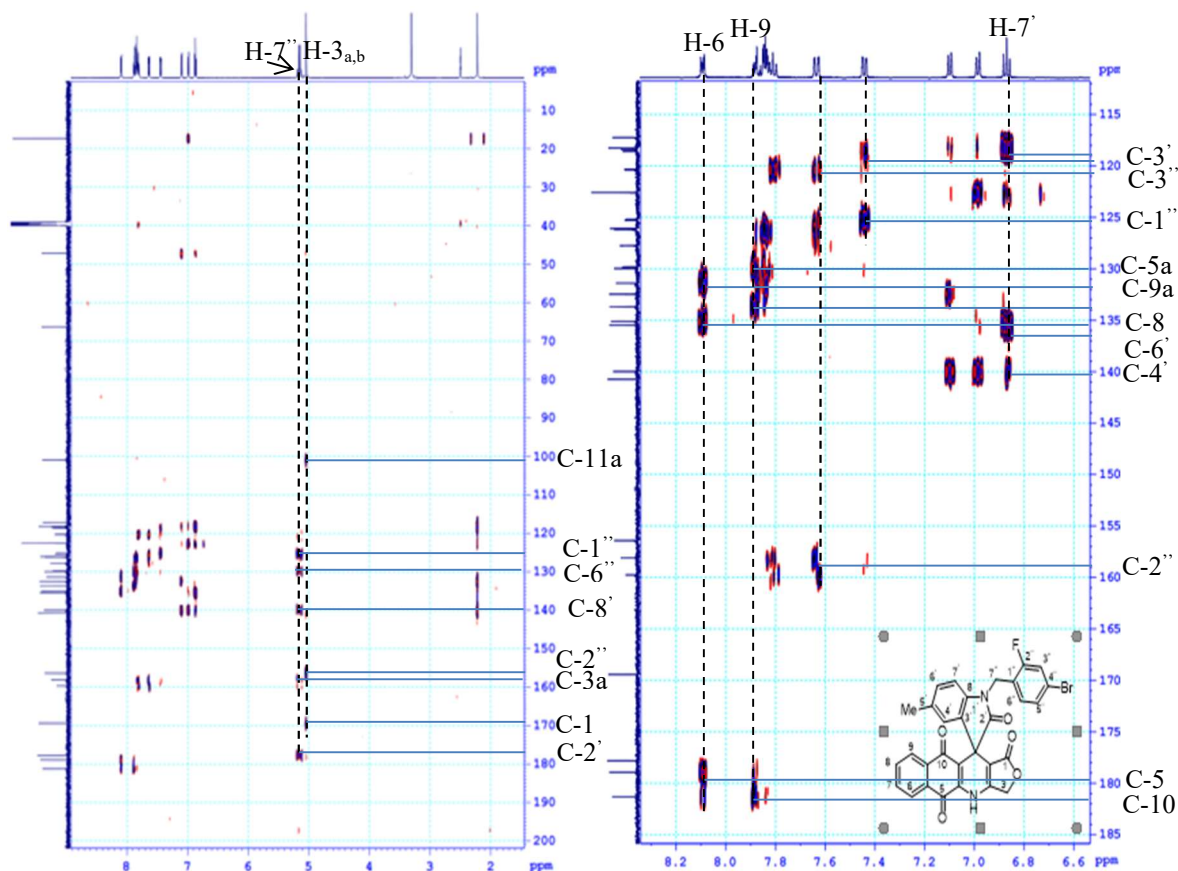
Hình 3.13. Phổ dẫn ^{13}C -NMR của hợp chất **174m**



Hình 3.14. Phổ HSQC của hợp chất **174m**

Cấu trúc của của hợp chất (**174m**) càng được xác thực, khi xem xét mối tương quan giữa H và C trong các phổ tương tác gần HSQC và phổ tương tác xa HMBC.

Trên phổ HSQC, bên cạnh các tương tác gần giữa H và C trong các vòng thơm, còn xuất hi các cặp tương tác δ_H/δ_C : 5.05/66.4 là của H-3/C-3 hay 5.18, 5.13/39.92 tương ứng với H-7"/C-7" (Hình 3.14)

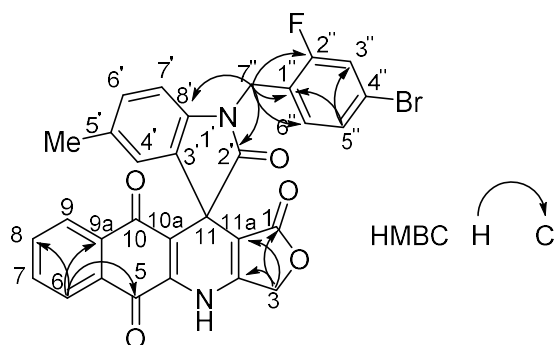


Hình 3.15. Phổ HMBC của hợp chất **174m**

Cấu trúc này được xác định qua phổ HMBC (Hình 3.15), thông qua các tương tác xa giữa H và C giúp khẳng định sự kết nối của vòng spiro vào khung podophyllotoxin và nhóm benzyl. Cụ thể xuất hiện các tương xa từ H-3 đến C-1, C-11a và C-3a, cũng như từ H-7" đến C-2', C-8', C-1'', C-2'' và C-6'', hay từ H-6 đến C-9a, C-8 và C-5. Chứng tỏ đã hình thành liên kết giữa hợp phần isatin với nhóm benzyl cũng như quá trình tạo đóng vòng spiro với khung podophyllotoxin thành công.

Như vậy từ các tín hiệu của nhóm carbonyl trong phổ ^{13}C -NMR, ta có thể gán các proton và carbon ở các phần di vòng tương ứng, dựa vào tương tác xa của carbon này với các proton lân cận. Từ phổ HSQC ta xác định được mối tương tác gần giữa $^1\text{H} \leftrightarrow ^{13}\text{C}$, các nguyên tử carbon còn lại được quy kết dựa vào các tương tác xa với các proton trên phổ HMBC.

Kết quả phân tích phổ HMBC và HSQC của hợp chất **174m** được trình bày trong bảng 3.4 giúp khẳng định chính xác cấu trúc của hợp chất dự kiến và qui kết đầy đủ các tín hiệu proton, carbon. Các tương tác chính trong phổ HMBC được đưa ra trong hình 3.16.



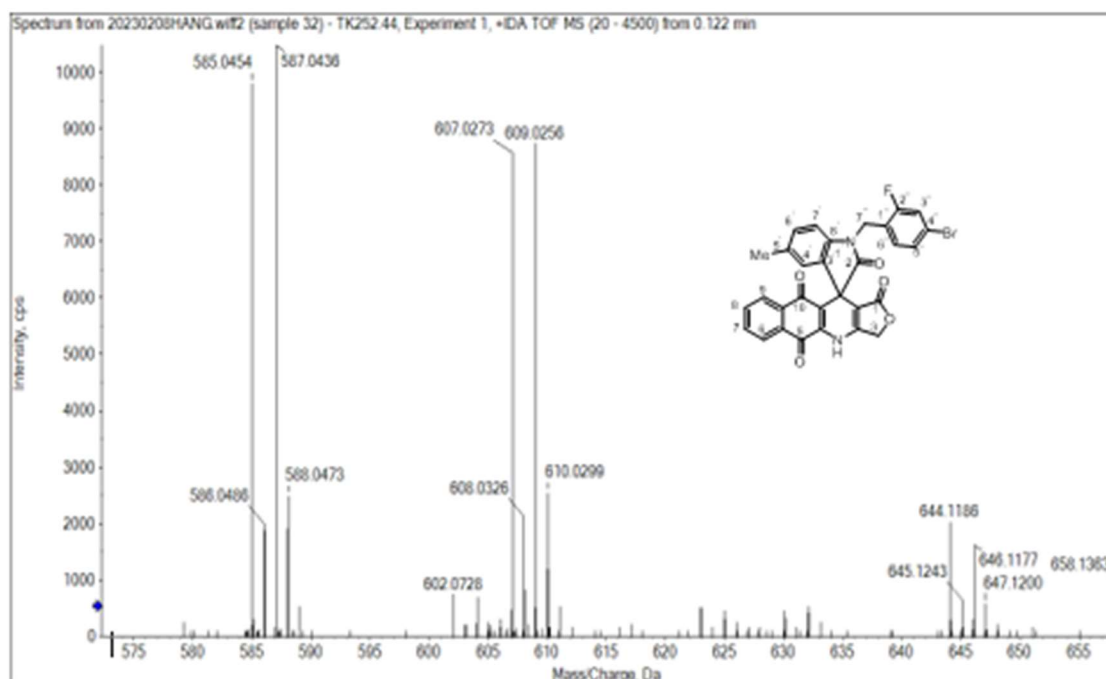
Hình 3.16. Các tương tác chính trong phổ HMBC của hợp chất **174m**

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **174m**

C	δ_C	Loại C	δ_H (ppm); mult	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	169.4	C=O		
3	66.35		5.05 (2H, s)	1, 3a, 11a
3a	156.4	Cq		
4a	140.8	Cq		
5	178.9	C=O		
5a	129.98	Cq		
6	126.2		8.09 (1H, m)	5, 8, 9a
7	133.7		7.86 -7.83 (1H, m)	
8	135.1		7.86 -7.83 (1H, m)	6, 9a
9	126.1		7.89 - 7.88 (1H, m)	5a, 7, 10
9a	131.4	Cq		
10	181.3	C=O		
10a	117.3	Cq		
11	47.11	Cq		
11a	100.9	Cq		
2'	177.8	C=O		
3'	118.3			
4'	122.6			
5'	122.6		6.99 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	
6'	135.5	Cq		
7'	132.5		6.87 (1H, t, $J = 7.2$ Hz)	3', 4', 6'
8'	139.98		7.09 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	
9'	17.31	CH ₃	2.23 (3H, s, CH ₃)	
1''	125.2 (d, $J = 15.0$ Hz)	Cq		
2''	158.9 (d, $J = 247.5$ Hz)	C-F		

C	δ_C	Loại C	δ_H (ppm); mult	HMBC (H $\rightarrow$ C)
3''	118.6 (d, $J = 24$ Hz)		7.64 (1H, dd, $J = 9.6, 1.8$ Hz)	2'', 4''
4''	120.4 (d, $J = 9.0$ Hz)	C-Br		
5''	127.8		7.44 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz)	1'', 3'',
6''	129.8 (d, $J = 4.5$ Hz)		7.81 (1H, t, $J = 8.4$ Hz)	
7''	39.92		5.18 (1H, d, $J = 17.4$ Hz) 5.13 (1H, d, $J = 17.4$ Hz)	8', 2'', 1'', 2'', 6''
			11.06 (1H, s, NH)	

Trên phổ HRMS của hợp chất **174m**, các pic ion “giả-phân tử” hoặc ion phân tử xuất hiện với số khối phù hợp với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết của mỗi hợp chất. Trên hình 3.17 xuất hiện giá trị số khối của các pic ion giả-phân tử $[M+H]^+$ tương ứng với các giá trị m/z : 585.0454 và 587.0436 phù hợp tính toán theo lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{19}BrFN_2O_5]^+$: 585.0456 và 587.0436. Pic ion giả-phân tử thứ hai của $[M+Na]^+$ với các giá trị m/z : 607.0273 và 609.0256, tương ứng với tính toán theo lý thuyết cho công thức phân tử $[C_{30}H_{18}BrFN_2NaO_5]^+$: 607.0276 và 609.0255.



Hình 3.17. Phổ HR-MS của hợp chất **174m**

Thông qua các số liệu phổ IR, 1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất (**174m**) đã được bàn luận ở trên, có thể khẳng định cấu trúc của hợp chất này hoàn toàn phù hợp với định hướng, dự kiến ban đầu. Trên cơ sở đó luận án đã tiến hành khảo sát các thông số cho quá trình tối ưu hoá phản ứng, nhằm lựa chọn được điều kiện tối ưu nhất để tiến hành phản ứng tổng hợp các dẫn xuất của lớp chất này.

Để lựa chọn điều kiện tối ưu cho thực hiện phản ứng domino 3 thành phần ở

trên, luận án chọn hợp chất (**174m**) để tiến hành khảo sát. Đầu tiên cho (1mmol) 2-amino-1,4-naphthoquinone (**36**) trộn với 1 mmol acid tetronic (**51**) và 1 mmol của hợp chất (**173m**), thời gian phản ứng là 30 phút trong thiết bị vi sóng, với 2 loại xúc tác là acid tosylic (*p*-TsOH) và acid *L*-proline; sử dụng các dung môi khác nhau như: CH₃CN, toluene, xylen, dioxane và CH₃COOH khan ở các mức nhiệt độ tương ứng như trong bảng 3.5

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất tổng hợp chất **174m**

TT	Dung môi	Nhiệt độ (°C)	Hiệu suất (%)	
			<i>p</i> -TsOH	<i>L</i> -proline
1	CH ₃ CN	80	45	50
2	Toluene	110	30	35
3	Xylen	120	40	35
4	Dioxan	100	35	30
5	CH ₃ COOH	110	85	80

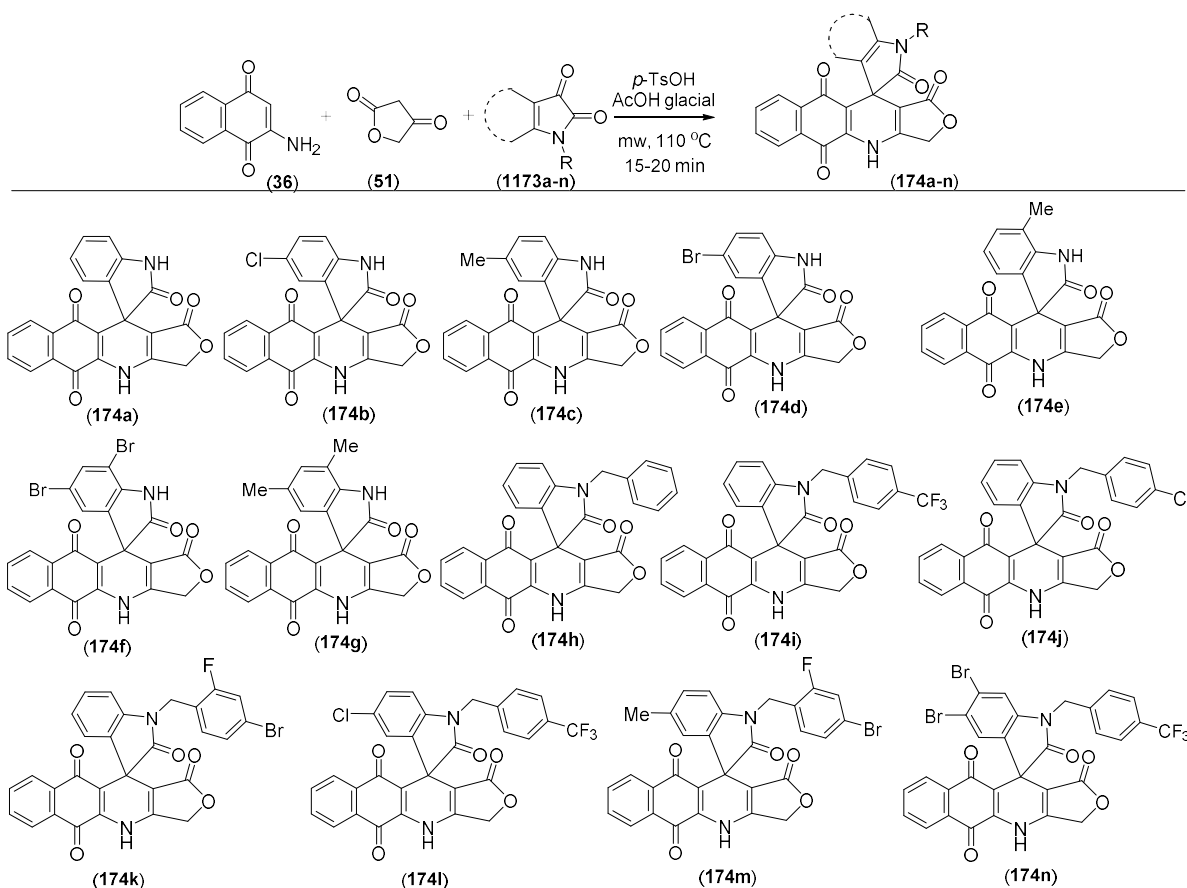
Từ kết quả của bảng 3.5 có thể nhận thấy thực hiện phản ứng trong dung môi CH₃COOH khan với xúc tác là *p*-TsOH là phù hợp hơn cả, hơn nữa CH₃COOH tan tốt trong nước, vì vậy thuận lợi cho quá trình tách, chiết phân lập sản phẩm sau phản ứng. Hai loại xúc tác acid được khảo sát cho thấy không có sự khác biệt nhiều, trong khi *p*-TsOH xúc tác chọn lọc cho phản ứng ghép nối giữa các keton và aniline [132], còn *L*-proline là một chất xúc tác đa năng hỗ trợ cho nhiều loại phản ứng như: ngưng tụ Aldol, Mannich, cộng Michael, ngưng tụ Knoevenagel, phản ứng Hantzsch, Ullmann...[133].

Bằng cách sử dụng dung môi là CH₃COOH khan và xúc tác là acid *p*-TsOH ở điều kiện nhiệt độ 110 °C, luận án đã tổng hợp được 14 dẫn xuất (**174a-n**) là các chất rắn dạng bột, có màu từ đỏ nhạt đến đỏ đậm, tan tốt trong CH₂Cl₂, MeOH theo Sơ đồ 3.10. Các thông số vật lý và thuộc tính của sản phẩm được trình bày trong bảng 3.6

Bảng 3.6. Các dẫn xuất hybrid podophyllotoxin-isatin-naphthoquinone

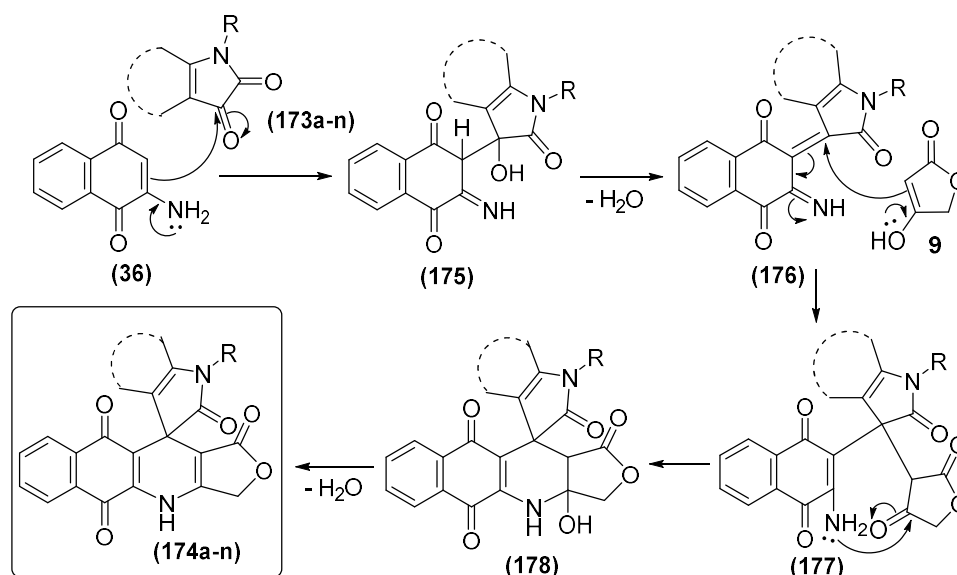
TT	Hợp chất	R	R'	Màu sắc	Nhiệt độ nóng chảy(°C)	Hiệu suất (%)
1	174a	H	H	Màu đỏ đậm	356 - 357	85
2	174b	5-Cl	H	Màu đỏ đậm	365 -366	70
3	174c	5-Me	H	Màu đỏ	361 - 362	83
4	174d	5-Br	H	Màu đỏ	310 - 311	82
5	174e	7-Me	H	Màu đỏ cam	367 - 368	74
6	174f	5,7-dibromo	H	Màu đỏ cam	364 - 365	73
7	174g	5,7-dimethyl	H	Màu đỏ cam	372 - 373	75
8	174h	H	benzyl	Màu đỏ đậm	320 - 321	76

9	174i	H	4-CF ₃ -benzyl	Màu đỏ cam	335 - 336	87
10	174j	H	4-Cl-benzyl	Màu đỏ cam	292 - 293	78
11	174k	H	4-bromo-2-flo-benzyl	Màu cam	350 - 351	76
12	174l	5-Cl	4-CF ₃ -benzyl	Màu đỏ	354 - 355	85
13	174m	5-CH ₃	4-bromo-2-flo-benzyl	Màu đỏ	337 - 338	80
14	174n	5,6-dibromo	4-CF ₃ -benzyl	Màu đỏ cam	278 - 279	72



Sơ đồ 3.10. Tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin

Cơ chế hình thành các hợp chất hybrid của lớp chất này được đưa ra trong sơ đồ 3.11 và được giải thích như sau: đầu tiên các hợp chất trung gian (**175**) được hình thành dựa trên quá trình ngưng tụ Knoevenagel giữa 2-amino-1,4-naphthoquinone (**36**) và các dẫn xuất của isatin (**173a-n**), sau đó là quá trình tách nước để tạo ra các hợp chất trung gian (**176**), tiếp theo là phản ứng cộng Michael của hợp chất (**176**) với acid tetronic (**51**) để tạo thành hợp chất trung gian (**177**). Cuối cùng là quá trình đóng vòng nội phân tử, tách nước tạo sản phẩm (**174a-n**)

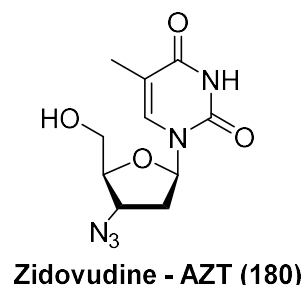
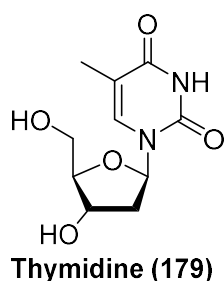


Sơ đồ 3.11. Cơ chế hình thành các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin

3.4. Tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin-AZT (182a-p)

AZT (3'-azido-2',3'- dideoxythymidine) là loại thuốc được FDA chấp thuận điều trị cho các bệnh nhân mắc HIV. Trước khi được FDA chấp thuận nó đã được chứng minh là có tác dụng ức chế sự phát triển của nhiều loại tế bào ung thư ở người, đặc biệt khi kết hợp với các tác nhân hoá trị liệu khác cho thấy hiệu quả tích cực trong điều trị lâm sàng giai đoạn I và giai đoạn II đối với các bệnh nhân mắc bệnh ung thư đại tràng, bạch cầu, u lympho và các bệnh ác tính tiến triển khác [134-136]. Tuy nhiên nhược điểm khi sử dụng AZT đó là độc tính, các tác dụng phụ được ghi nhận là buồn nôn, tiêu chảy, đau đầu và ức chế tủy xương... Do đó để giảm độc tính, tăng hiệu lực, hiệu quả của thuốc, cần biến đổi, lai ghép với các tác nhân khác có hoạt tính sinh học đặc hiệu, nhằm cải thiện tính chất dược lý của loại thuốc này [137, 138].

Cấu trúc của AZT (**180**) được biến đổi về mặt hóa học, nó có cấu trúc tương tự với base thymidine (**179**), chỉ khác ở chỗ có nhóm azide thay thế nhóm hydroxyl ở vị trí C-3' trong vòng deoxyribose [100].

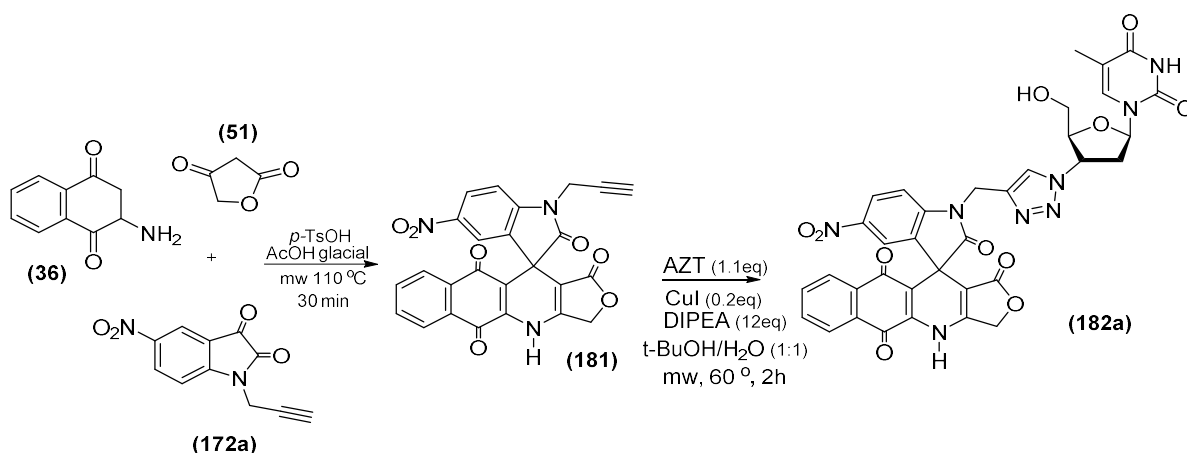


Các nghiên cứu về sự kết hợp giữa hợp phần AZT với các tác nhân chống ung thư khác như quinoline, coumarin và sunfocoumarin qua cầu liên kết 1,2,3-triazole đều thu nhận được các kết quả tích cực (cho giá trị IC_{50} từ 9-100 μM) [139]. Đặc biệt các hợp chất lai này còn có khả năng kìm hãm sự phát triển của các khối u ác tính và ngăn chặn quá trình di căn bằng cách ức chế hoạt động của enzym telomerase (EC

2.7.7.49), là enzym có chức năng điều hòa phiên mã của con đường truyền tín hiệu Wnt/ β -catenin trong tế bào [140].

Phản ứng click cổ điển là sự cộng hợp vòng hoá azide-alkyne được xúc tác bằng kim loại đồng, từ Cu(0) đến các oxide của chúng hoặc ở dạng tự do, phức chất được mang trên các chất mang khác nhau giữa azide và alkyne để tạo thành một dị vòng 5 cạnh. Khi sử dụng chất xúc tác Cu(I) trong các dung môi như *tert*-BuOH/H₂O, EtOH, DMF, THF, DCM, CHCl₃, CH₃CN... sản phẩm thu được chỉ có đồng phân thể -1,4; trong khi không sử dụng xúc tác hoặc sử dụng xúc tác khác cho phản ứng click theo phương pháp cộng hợp vòng hoá 1,3-lưỡng cực của Huisgen cho cả hai loại sản phẩm là đồng phân thể -1,4 và -1,5 [141].

Trên cơ sở tổng hợp thành công các dẫn xuất giữa isatin và podophyllotoxin như đã trình bày trong mục 3.3.2, luận án tiếp tục thiết kế, tổng hợp các dẫn xuất của podophyllotoxin-isatin với AZT bằng cách kết hợp giữa phản ứng domino và phản ứng click theo sơ đồ 3.12



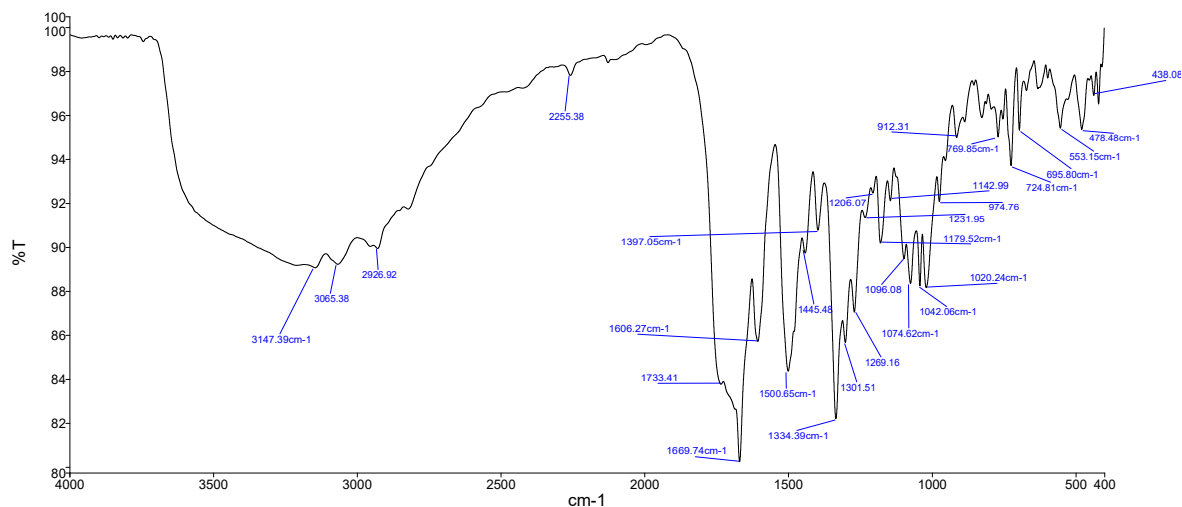
Sơ đồ 3.12. Tổng hợp dẫn xuất podophyllotoxin-isatin -AZT

Quá trình được thực hiện qua 3 giai đoạn. Đầu tiên thực hiện phản ứng alkyl hoá giữa isatin và propargyl để thu được hợp chất (172a) (mục 3.3.1), sau đó tiến hành phản ứng domino giữa 2-amino-1,4-naphthoquinone (36), dẫn xuất (172a) của isatin với acid tetronic (51) trong acid acetic khan, sử dụng xúc tác là *p*-TsOH. Cuối cùng thực hiện phản ứng click trong *tert*-BuOH/H₂O (1:1), sử dụng xúc tác Cu(I) ở nhiệt độ 60 °C với sự hỗ trợ của thiết bị vi sóng. Phản ứng xảy ra nhanh, cho hiệu suất tốt, sản phẩm được phân lập một cách dễ dàng bằng sắc ký cột, thời gian phản ứng được theo dõi bằng TLC với hệ dung môi *n*-hexane:EtOAc=1:1.

Cấu trúc của hợp chất (182a) được xác nhận bằng các phương pháp phổ IR, NMR và HRMS.

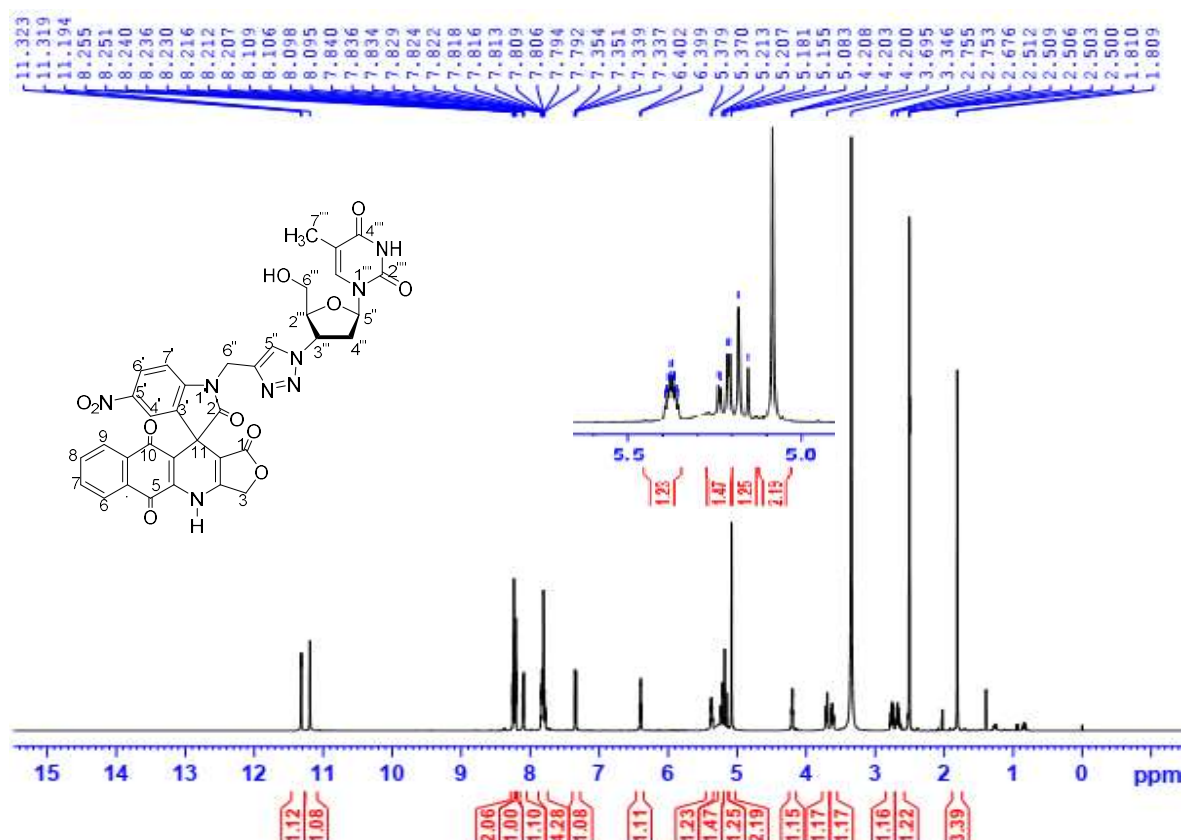
Phổ IR (đo bằng phương pháp ép viên KBr) của hợp chất 182a (Hình 3.18) cho thấy có sự xuất hiện của băng sóng hấp thụ mạnh dạng broad trong khoảng 3200 cm⁻¹ đặc trưng cho nhóm -OH cùng cường độ dao động hoá trị mạnh tại vị trí

1669 cm^{-1} của nhóm chức carbonyl (=NCONH-) trong vòng thymidine, bên cạnh các dao động được ghi nhận trên bộ khung của podophyllotoxin-naphthoquinone và isatin.



Hình 3.18. Phổ IR của hợp chất **182a**

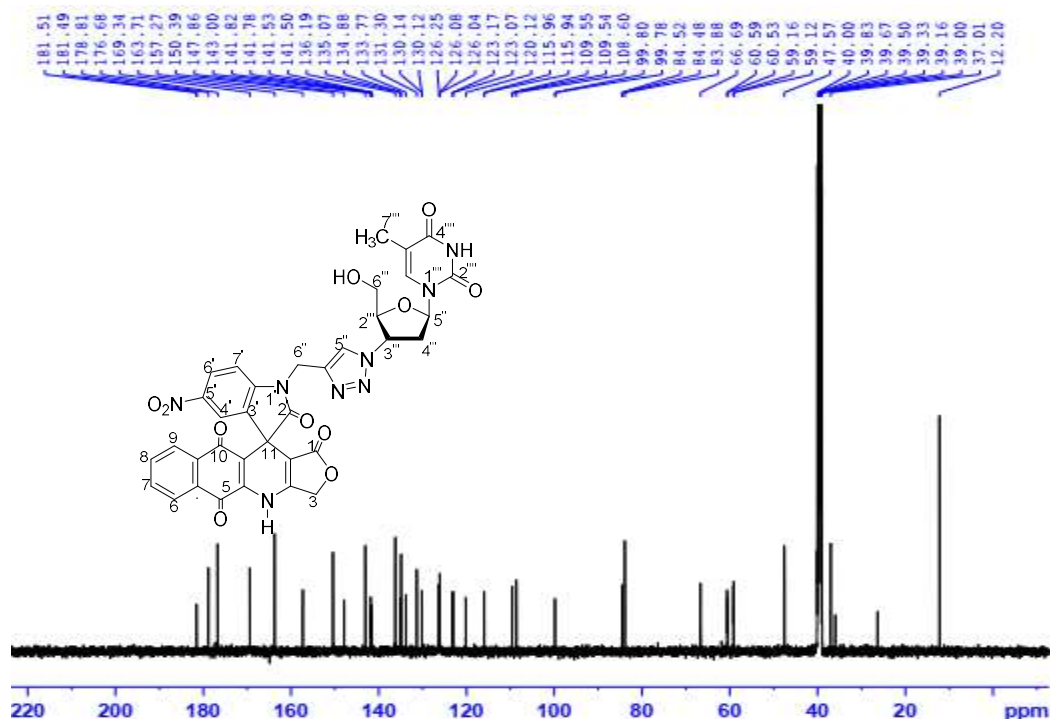
Các hình 3.19 - 3.20 là phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR của hợp chất (**182a**) cũng như các tương tác chính $\text{H} \rightarrow \text{C}$ được chỉ ra trên phổ HMBC trên Hình 3.21



Hình 3.19. Phổ ^1H -NMR của hợp chất **182a**

Trên phổ ^1H -NMR, hai tín hiệu cộng hưởng xuất hiện ở trường yếu nhất tại $\delta=11.32$ ppm (1H, s) và 11.19 (1H, s) được qui kết cho proton ở hai vị trí $\text{NH}_{\text{thymidine}}$ và $-\text{NH}_{\text{podophyllotoxin}}$ dựa vào phổ HMBC. Các dạng tín hiệu proton của vòng isatin và khung podophyllotoxin-naphthoquinone có thể được xác nhận trong vùng thơm cùng

với sự chồng lấn của hai proton H-5'' (vòng 1,2,3-triazole) và H-6'''. Các tín hiệu proton còn lại của vòng oxolane và các nhóm methylene cũng được ghi nhận tại trường thấp hơn, đặc biệt 3 proton của nhóm methyl trên vòng thymidine xuất hiện tại trường cao nhất. Riêng tín hiệu của proton trong nhóm -OH không được tách vạch rõ ràng trong hợp chất nghiên cứu này, nhưng trong các hợp chất khác của dãy có sự tách vạch ở dạng multiplet trong khoảng 5.30 - 5.20 ppm, trong trường hợp này có thể do sự chồng lấn của các proton trong khoảng 5.50-5.00 ppm dẫn tới tín hiệu proton của nhóm -OH không được ghi nhận một cách rõ ràng.



Hình 3.20. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **182a**

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất (**182a**) có các tín hiệu nằm ở trường thấp trong phổ này (δ_{C} 180.0 - 170 ppm) thuộc về nguyên tử carbon (C=O) của các nhóm chức ketone có mặt ở vòng quinone, γ -lactam, isatin và thymidine. Các tín hiệu này cũng được coi là các tín hiệu chìa khoá để giúp cho việc qui kết các tín hiệu proton và carbon khác của các khung podophyllotoxin-naphthoquinone, isatin và thymidine tương ứng. Kết hợp với phổ HSQC và HMBC, các tín hiệu cộng hưởng của các nguyên tử carbon có tương tác gần, xa với proton sẽ được xác lập chính xác, từ đó giúp xác định cấu trúc hoàn chỉnh của hợp chất (**182a**).

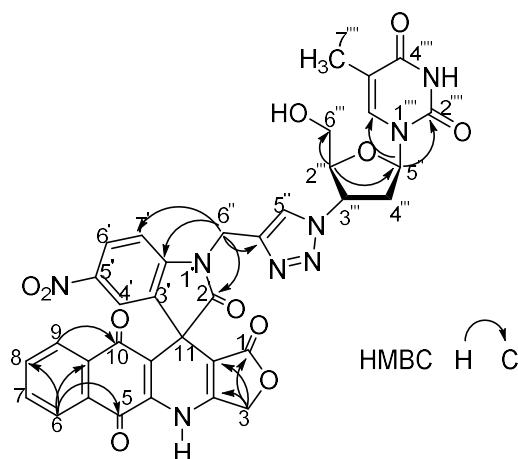
Kết quả phân tích phổ HMBC, HSQC của hợp chất **182a** được liệt kê chi tiết trong bảng 3.7

Bảng 3.7. Kết quả qui kết và các tương tác chính của hợp chất **182a**

TT	C	δ_{C}	Loại C	δ_{H} (mult., J = Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	1	169.3	C=O		
2	3	66.7		5.08 (2H, s)	3a, 1, 11a

TT	C	δ_C	Loại C	δ_H (mult., J = Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
3	3a	157.2	Cq		
4	4a	141.5	Cq		
5	5	178.8	C=O		
6	5a	130.1	Cq		
7	6	126.2		8.21-8.20 (1H, m)	8, 9a, 5
8	7	133.7		7.85 - 7.77 (m)	
9	8	135.0		7.85 - 7.77 (m)	
10	9	126.1		7.85 - 7.77 (m)	10
11	9a	131.3	Cq		
12	10	181.5 (d, J =2.5 Hz)	C=O		
13	10a	115.9	Cq		
14	11	47.6	Cq		
15	11a	109.5	Cq		
16	2'	176.7	C=O		
17	3'	123.0			
18	4'	147.9	Cq		
19	5'	123.1		8.25 - 8.23 (2H, m)	
20	6'	126.0	Cq	8.10-8.09 (1H, m)	
21	7'	143.0			
22	8'	108.6		7.35 (1H, dd, J = 1.8, 9.0Hz)	
23	4''	134.8	Cq		
24	5''	120.1		8.25-8.23 (2H, m)	
25	6''	35.9		5.23-5.20 (1H, dd, J = 15.6, 3.6 Hz) 5.18 (1H, d, J =15.6 Hz)	4', 6', 2', 4''
26	2'''	84.5 (d, J =5 Hz)		4.21 - 4.19 (1H, m)	6''', 5'''
27	3'''	59.1 (d, J =5.0 Hz)		5.39 - 5.35 (1 H, m)	6'', 3''', 5'''
28	4'''	37.0		2.77 - 2.73 (1H, m) 2.70 - 2.65 (1H, m)	
29	5'''	83.9		6.41 - 6.38 (1H, m)	2''', 6'''
30	6'''	60.5 (d, J =7.5 Hz)		3.71 - 3.69 (1H, m) 3.64 - 3.60 (1H, m)	
31					
32	2''''	150.4	C=O		
33					

TT	C	δ_C	Loại C	δ_H (mult., J = Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
34	4''''	163.7	C=O		
35	5''''	108.6	Cq		
36	6''''	136.2		7.85 - 7.77 (m)	2''''', 4''''
37	7''''	12.2	CH ₃	1.81 (3H, s, CH ₃)	
38				11.32 (1H, d, J = 2.4 Hz, NH Thymidine)	
39				11.19 (1H, s, NH)	



Hình 3.21. Cấu trúc của hợp chất **182a** và các tương tác chính trong phổ HMBC

Trên phổ khối phân giải cao của hợp chất (**182a**) (Hình 4.118, phụ lục) xuất hiện các mảnh ion giả phân tử có m/z của $[M+H]^+$: 735.1721 phù hợp với khối lượng tính toán theo lý thuyết cho công thức phân tử $[C_{35}H_{27}N_8O_{11}]^+$ là 735.1793 và $[M+Na]^+$: 757.1512 tương ứng tính toán theo lý thuyết của công thức $[C_{35}H_{26}N_8O_{11}Na]^+$: 757.1613. Các dữ liệu phổ NMR và HRMS đã quy kết chính xác cấu trúc của hợp chất (**182a**).

Trên cơ sở kết quả tổng hợp dẫn xuất (**182a**), luận án đã tiến hành tổng hợp thành công 16 dẫn xuất (**182a-p**) của lớp chất này với hiệu suất đạt từ 62 - 83%.

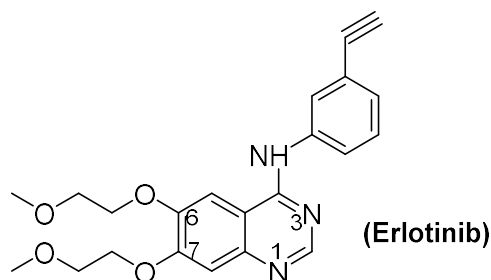
Bảng 3.8. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid podophyllotoxin-isatin-AZT **182a-p**

TT	Hợp chất	R	Màu sắc	Nhiệt độ nóng chảy ($^{\circ}C$)	Hiệu suất (%)
1	182a	5-NO ₂	Màu cam	272 - 273	62
2	182b	H	Màu nâu đen	230 - 231	71
3	182c	7-Me	Màu nâu đỏ	282 - 283	74
4	182d	5-Cl	Màu đỏ cam	320 - 321	68
5	182e	5-F	Màu đỏ cam	276 - 277	77
6	182f	5-Br	Nâu đỏ	295 - 296	81
7	182g	5-OCH ₃	Màu nâu đỏ	285 - 286	78

8	182h	5,6-diflour	Màu nâu cam	246 - 247	66
9	182i	7-F	Màu đỏ cam	239 - 240	82
10	182j	5-OCF ₃	Màu nâu đen	131 - 132	65
11	182k	5,7-dibromo	Màu nâu đỏ	160 - 161	72
12	182l	4,6-dichloro	Màu nâu	280 - 281	83
13	182m	5-iodua	Màu cam hồng	206 - 207	67
14	182n	7-CF ₃	Màu nâu xám	250 - 251	74
15	182o	5-CH ₃	Màu đỏ nhạt	355 - 356	71
16	182p	5,7-dimethyl	Màu đỏ cam	268 - 269	69

3.5. Tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin-Erlotinib (184a-e)

Erlotinib là một dẫn xuất của 4-anilinoquinazoline, có tên hóa học là *N*-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)-4-quinazolinamine, trong đó có chứa nhóm 2-methoxyethoxyl tại các vị trí 6 và 7. [142].



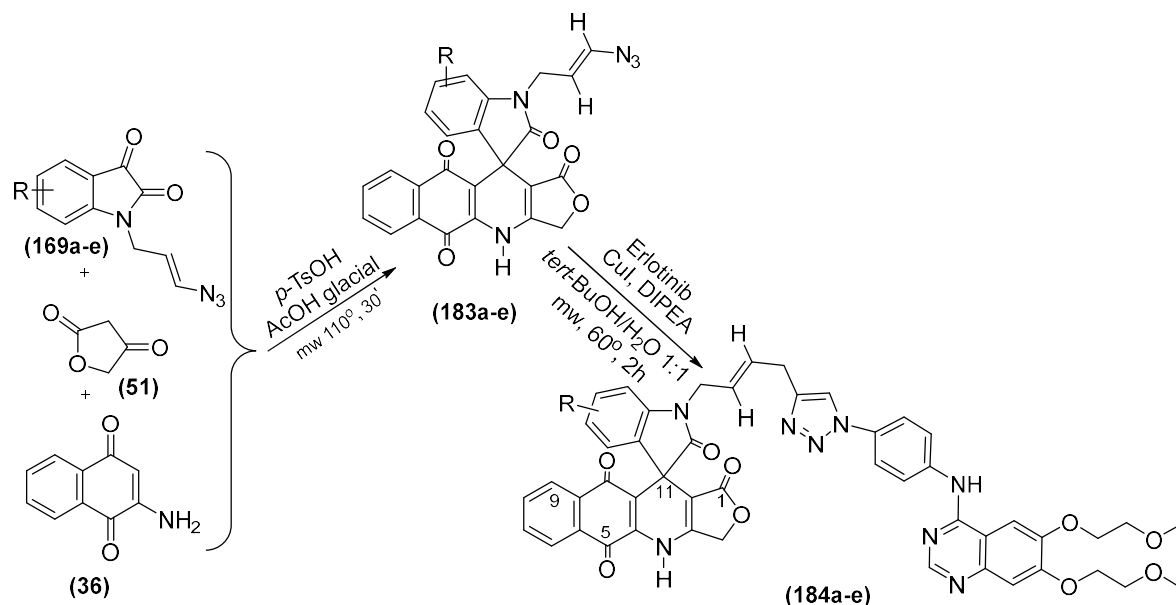
Erlotinib là chất ức chế protein tyrosine kinase được FDA chấp thuận để điều trị ung thư phổi không phải tế bào nhỏ di căn (NSCLC), ung thư tuyến tụy và ung thư thực quản [143]. Bằng cách chiếm chọn lọc các vị trí liên kết adenosine triphosphate (ATP) của thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), phân tử này ức chế ngược lại quá trình hoạt hóa EGFR, dẫn đến ức chế các quá trình truyền tín hiệu hạ lưu tiếp theo, chủ yếu thông qua các con đường phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) và protein kinase hoạt hóa mitogen (MAPK), do đó dẫn tới ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư, giảm hình thành mạch máu và di căn [144]. Tuy nhiên tình trạng kháng thuốc và các phản ứng phụ khi dùng thuốc có chứa erlotinib ngày càng có xu hướng tăng do đó cần phải có các giải pháp hữu hiệu hơn [145, 146]

Khi đưa nhóm nhóm 1,2,3-triazole gắn vào erlotinib đã làm tăng đáng kể hiệu lực của thuốc chống khối u, do vòng 1,2,3-triazole có mô men lưỡng cực lớn, có thể tạo ra nhiều tương tác không cộng hoá trị với các nhóm thế khác nhau, từ đó làm giảm tình trạng kháng thuốc và hạn chế các tác dụng phụ do erlotinib gây ra [143, 147].

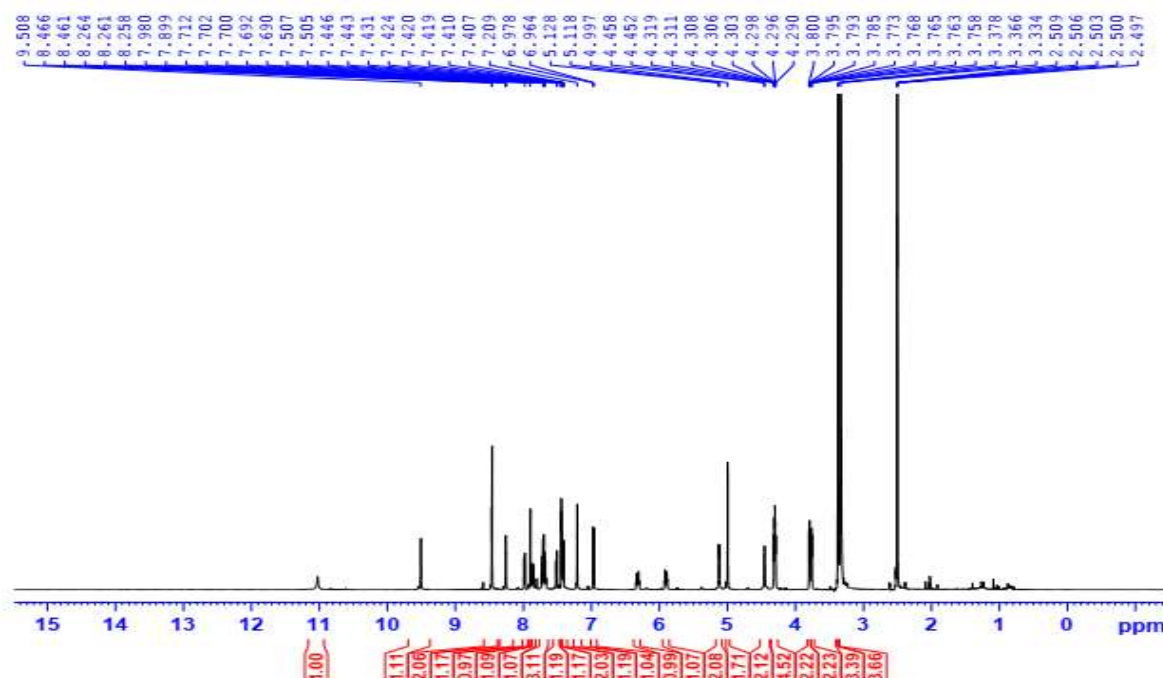
Xuất phát từ những cơ sở thực tiễn nêu trên, luận án tiến hành thiết kế, tổng hợp các dẫn xuất mới của podophyllotoxin-isatin với Erlotinib theo sơ đồ 3.13, nhằm mục đích tạo ra hợp chất vừa có khả năng ức chế tubulin vừa có khả năng ức chế protein tyrosine kinase thông qua các đánh giá, thử nghiệm của lớp chất này với các

dòng tế bào ung thư ở cấp độ *in vitro*.

Phương pháp tổng hợp được tiến hành qua các bước, đầu tiên các dẫn xuất của isatin -azido-but-2-en (**169a-n**) tổng hợp theo quy trình đã được chỉ ra ở Sơ đồ 3.7. Tiếp theo luận án thực hiện phản ứng domino giữa các hợp chất (**36**), (**51**) để tổng hợp các dẫn xuất của podophyllotoxin-isatin chứa nhóm chức azide. Cuối cùng thực hiện phản click với Erlotinib trong dung môi *tert*-BuOH/H₂O (1:1).



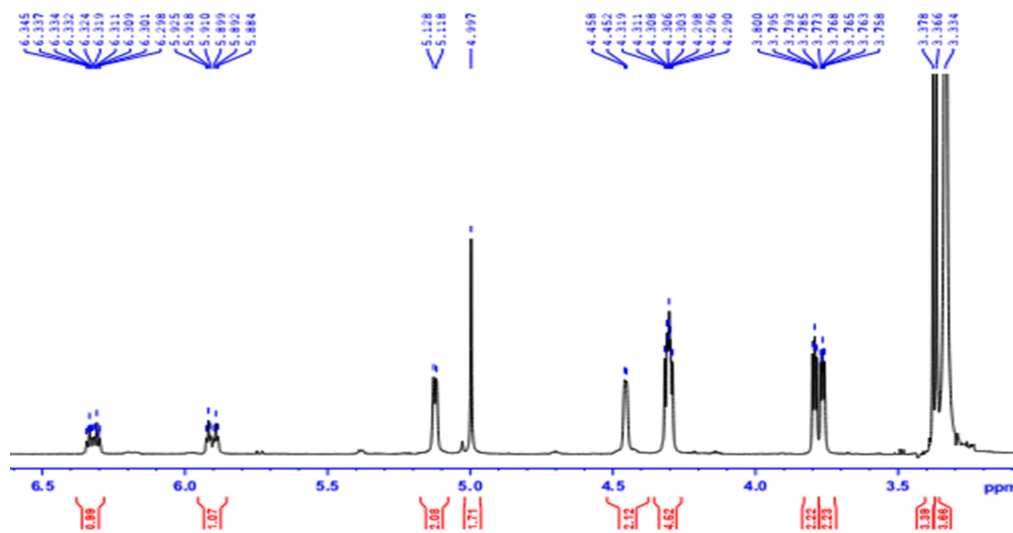
Sơ đồ 3.13. Tổng hợp các dẫn xuất hybrid của podophyllotoxin-isatin với Erlotinib
Cấu trúc của các sản phẩm (**184a-e**) được xác định bằng các phổ IR, NMR



Hình 3.22. Phổ ¹H-NMR của hợp chất **184a**

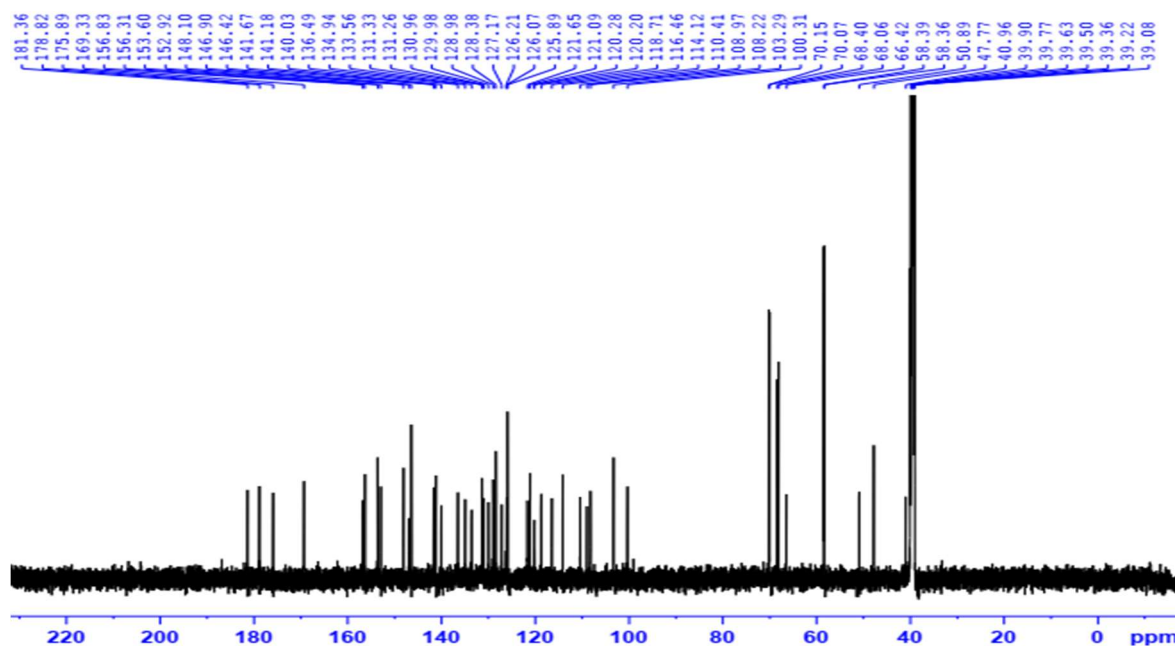
Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất (**184a**) (hình 3.22) có sự xuất hiện đầy đủ của 39 tín hiệu các proton có mặt trong phân tử. Cụ thể ngoài các tín hiệu đặc trưng của khung podophyllotoxin đã được bàn luận ở các mục 3.2 (cặp tín hiệu singlet của 2

proton vòng lacton, các tín hiệu vòng thơm của quinone, isatin), còn có sự xuất hiện của các proton thuộc hợp phần erlotinib như: 6 proton của 2 nhóm methoxyl tương ứng với 2 tín hiệu singlet mạnh được ghi nhận ở độ dịch chuyển lần lượt là δ_H 3.37 và 3.36, có 2 cụm tín hiệu tương ứng với 8 proton của 4 nhóm metylene oxit cộng hưởng tại độ dịch chuyển δ_H 3.5 - 4.5 và một tín hiệu singlet tại trường thấp, có độ dịch chuyển 9.50 ppm (nhóm -NH). Đặc biệt cặp tín hiệu của proton *trans* trên hợp chất but-2-en cũng được ghi nhận trong khoảng từ 5.5 - 6.5 ppm ($J=15.6$ Hz) cùng sự xuất hiện của 4 proton tương ứng với 2 nhóm methyl bên cạnh.

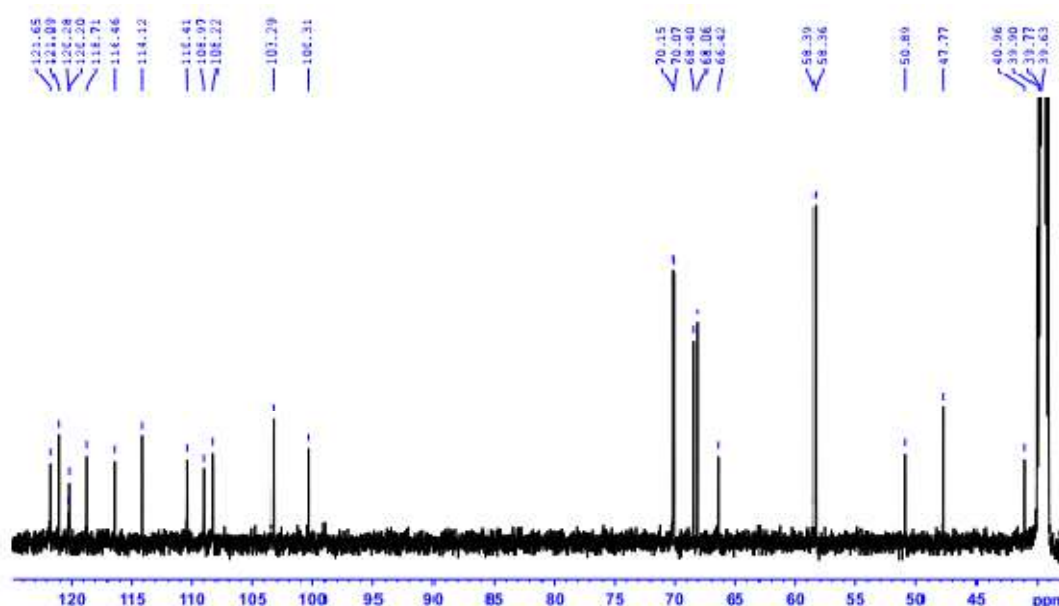


Hình 3.23. Phổ giãn 1H -NMR của hợp chất **184a**

Tương tự phổ ^{13}C -NMR cũng ghi nhận đầy đủ 48 tín hiệu carbon có mặt trong hợp chất. Bốn tín hiệu carbon của nhóm keton được ghi nhận đầy đủ trên khu vực trường thấp tương ứng với vòng quinone, lacton và isatin (170 - 180 ppm) bên cạnh các tín hiệu của liên kết C-O (60-70 ppm) cũng được ghi nhận đầy đủ...



Hình 3.24. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **184a**



Hình 3.25. Phổ giãn ^{13}C -NMR của hợp chất **184a**

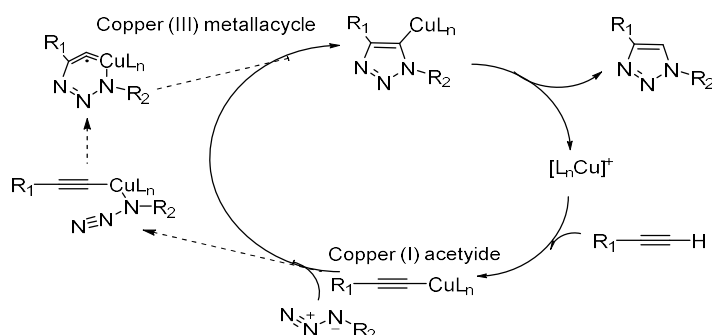
Trên phổ HRMS (Hình 4. 196, phụ lục) xuất hiện giá trị số khối của các pic ion giả-phân tử $[\text{M}+\text{H}]^+$ tương ứng với các giá trị m/z : 951.2047 và 953.2043 phù hợp tính toán theo lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{48}\text{H}_{40}\text{BrN}_8\text{O}_9]^+$: 951.2096 và 953.2052.

Như vậy với các tín hiệu phổ đã được ghi nhận, có thể khẳng định cấu trúc của sản phẩm thu được phù hợp với định hướng ghép nối ban đầu. Trên cơ sở đó luận án tiến hành tổng hợp được 05 (năm) dẫn xuất mới của podophyllotoxin-isatin-Erlotinib, kết quả được trình bày trong Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kết quả tổng hợp các hợp chất **184a-e**

TT	Hợp chất	R	Màu sắc	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Hiệu suất (%)
1	184a	5-Br	Màu vàng cam	261 - 262	41
2	184b	5,7-dibromo	Màu đỏ nâu	242 -243	36
3	184c	7-F	Màu nâu xám	224 – 225	48
4	184d	5, 7-dimethyl	Màu xám	290 - 291	55
5	184e	4,6-diflour	Màu vàng nhạt	266 - 267	32

Cơ chế của phản ứng click với xúc tác Cu (I) được chỉ ra trong sơ đồ 3. 14.



Sơ đồ 3.14. Cơ chế của phản ứng click sử dụng xúc tác Cu(I)

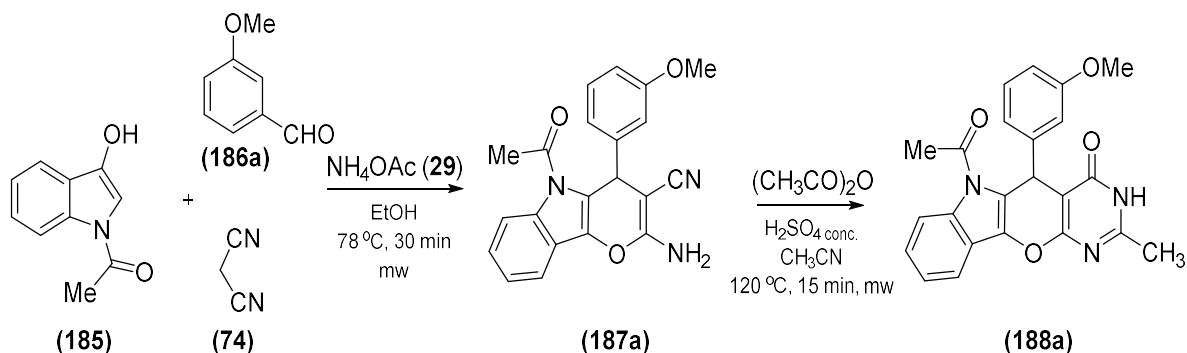
Đầu tiên tạo ra các ion copper (I) acetylide, tiếp theo cộng hợp với tác nhân azide và sau đó đóng vòng tạo thành hợp chất trung gian copper (III) metallacycle, sau cùng là giai đoạn proton hoá và thu nhỏ vòng hình thành sản phẩm thế 1,4 của 1,2,3-triazole [141]. Vai trò của ligan DIPEA hoạt động như một base, khử proton vòng triazole mới hình thành, giải phóng sản phẩm cuối cùng và tái tạo chất xúc tác đồng [148]

3.6. Kết quả tổng hợp các dẫn xuất indole-pyrano[2,3-*d*] pyrimidine (188a-l)

Các nghiên cứu về sự cộng hợp của pyrano và pyrimidine thành khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine đã chỉ ra rằng chúng có hoạt tính sinh học phổ rộng như khả năng chống sốt rét, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng vi-rút, chống ung thư, chống khối u, ức chế α -glucosidase, ức chế acetylcholinesterase (AChE) và gây độc tế bào [149-151]. Bên cạnh đó các hợp chất chứa khung indole có ứng dụng tiềm năng trong việc kiểm soát bệnh tiểu đường type 2, bằng cách liên kết với các vị trí hoạt động của enzym α -glucosidase, các hợp chất này ngăn chặn enzyme phân hủy carbohydrate phức hợp thành đường đơn, dẫn đến lượng đường trong máu tăng chậm hơn sau bữa ăn, qua đó làm chậm quá trình hấp thụ glucose từ ruột non [152].

Với mục tiêu thiết kế, tổng hợp các dẫn xuất mới có khả năng ức chế chọn lọc các enzym α -glucosidase và acetylcholinesterase (AChE), luận án đã tiến hành tích hợp indole vào vào khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine bằng phản ứng domino.

Tiếp tục khai thác triệt để hướng nghiên cứu chuyên sâu về phản ứng domino đa thành phần, luận án đã tổng hợp thành công các dẫn xuất mới của pyrano[2,3-*d*]pyrimidine liên hợp với indole (**188a**) bằng phản ứng domino ba thành phần qua 2 bước phản ứng theo Sơ đồ 3.15

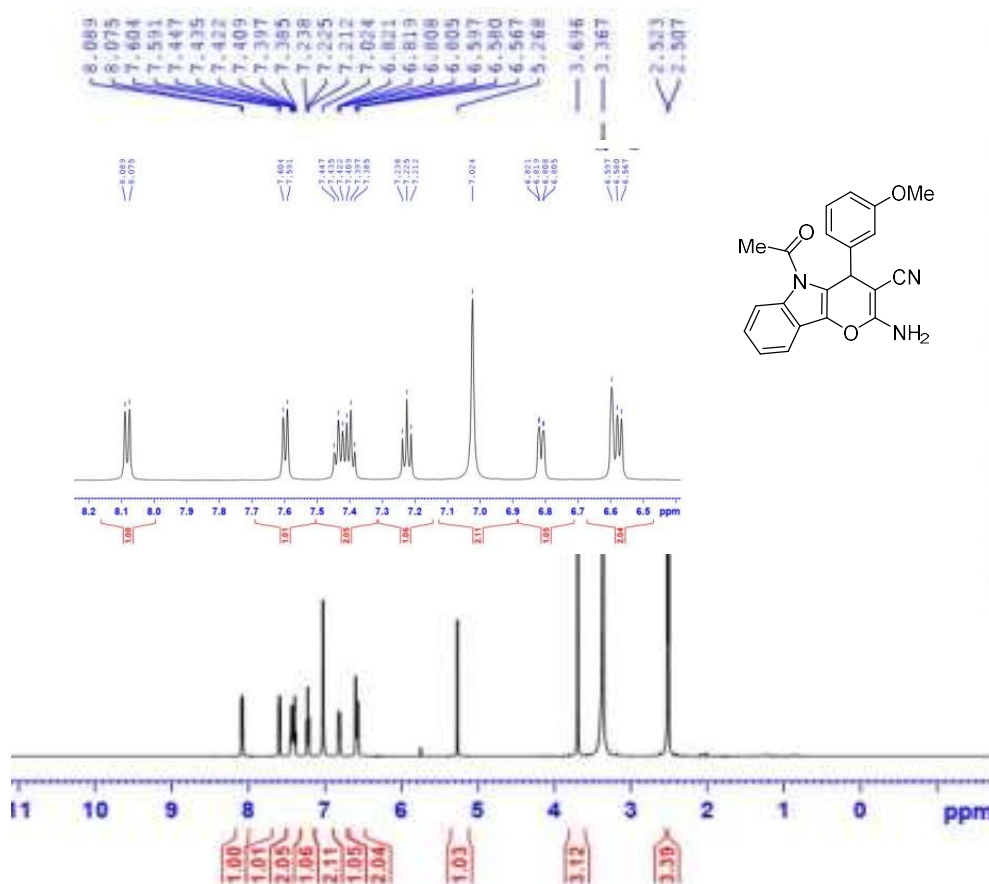


Sơ đồ 3.15. Tổng hợp dẫn xuất hybrid **188a** của indole-pyrano[2,3-*d*] pyrimidine

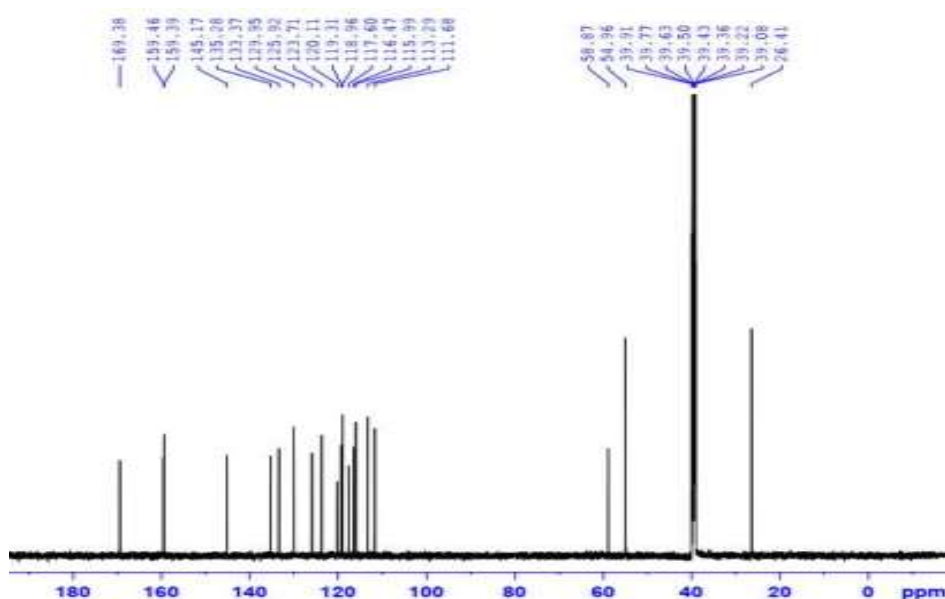
Bằng cách tinh chế, phân lập hợp chất (**187a**), luận án đã tiến hành chụp phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR để xác định sơ bộ cấu trúc của hợp chất trung gian này, làm tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo.

Trên phổ ^1H -NMR của hợp chất (**187a**) (Hình 3.26), 8 tín hiệu proton của hai vòng thơm được xuất hiện trong khoảng có độ dịch chuyển hoá học δ_H từ 6.57 - 8.08 ppm, với các hằng số tương tác J đặc trưng cho vòng thơm trong khoảng từ 7.8 - 8.4

Hz (δ_H : 8.08 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.44 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.39 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.81 (1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz), 6.60 (1H, s), 6.57 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)), xen giữa một tín hiệu singlet có cường độ mạnh tại vị trí có độ dịch chuyển hoá học 7.02 ppm, được gán cho 2 proton của nhóm $-NH_2$ gắn với vòng thơm. Proton duy nhất của vòng pyrano cũng được ghi nhận tại δ_H 5.26 với tín hiệu singlet mạnh cùng hai nhóm methyl của gốc methoxy và acetyl tương ứng.



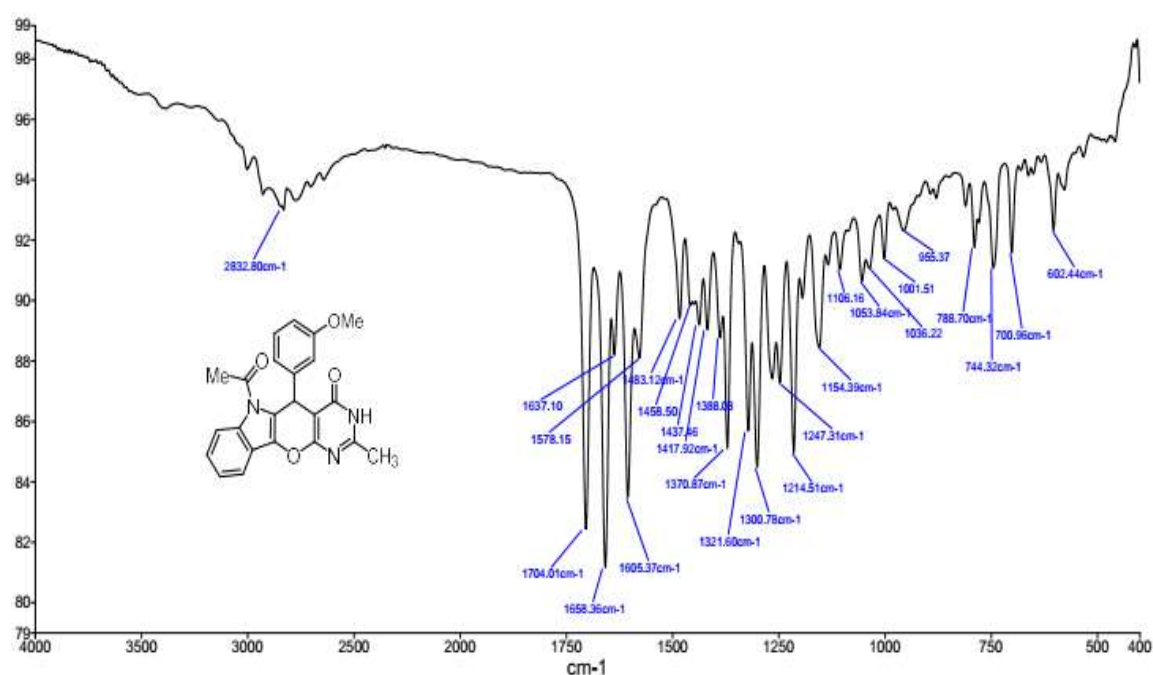
Hình 3.26. Phổ 1H -NMR và phổ giãn của hợp chất **187a**



Hình 3.27. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **188a**

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **187a** cũng xác nhận đầy đủ tín hiệu của 21 nguyên tử C có mặt trong hợp chất tổng hợp được, trong đó có một số tín hiệu tương ứng với độ dịch chuyển hoá học đặc trưng của các nhóm chức như: δ_{C} 169.4 (C=O), 117.6 (-CN), 55.0 (-OCH₃).

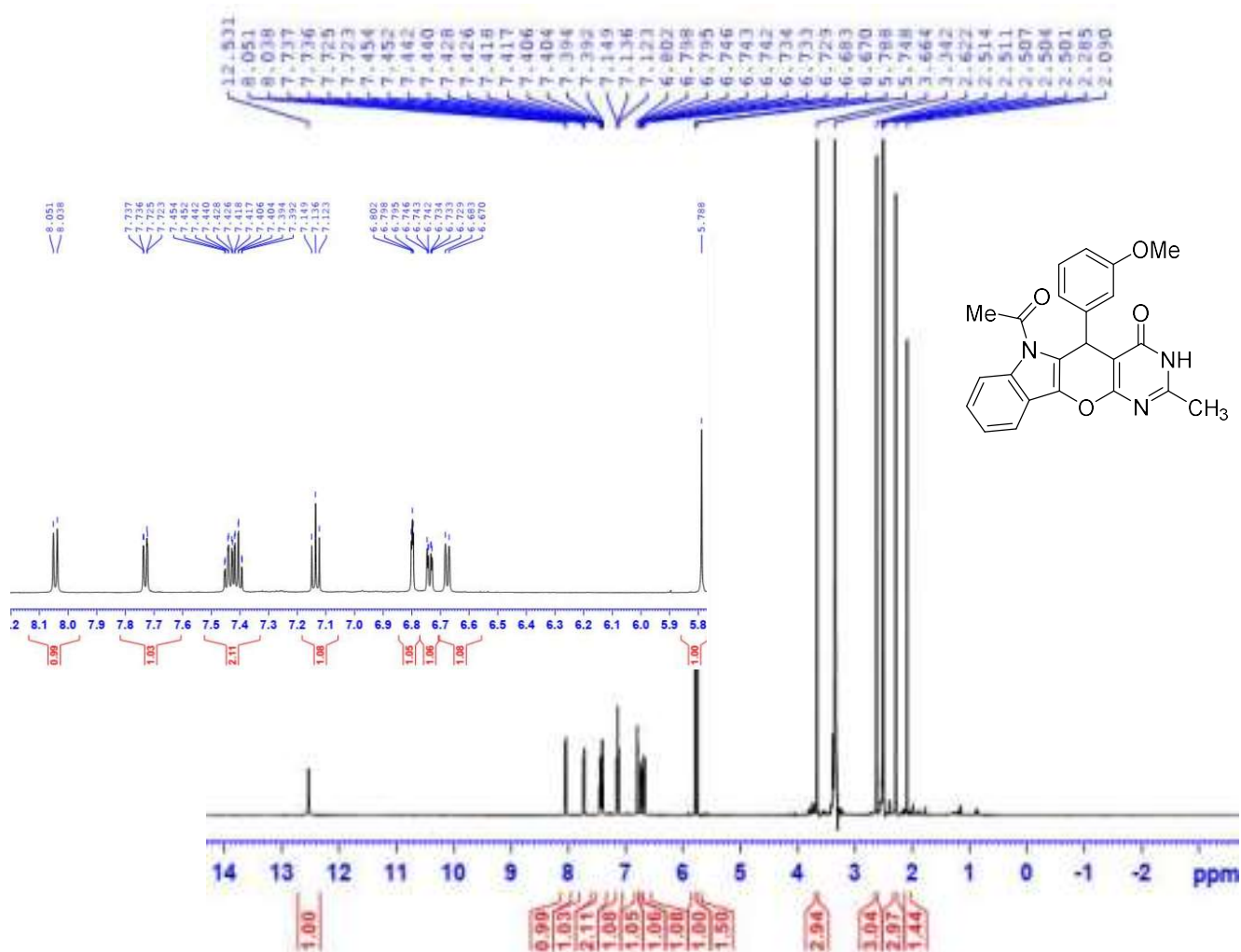
Sau khi tiến hành đánh giá sơ bộ cấu trúc của hợp chất trung gian (**187a**), luận án thực hiện phản ứng cộng nucleophile trong môi trường acid, qua quá trình cộng đóng vòng nội phân tử, tách nước để tạo thành sản phẩm. Cấu trúc của hợp chất (**188a**) được xác định thông qua các tín hiệu phổ IR, NMR và HRMS.



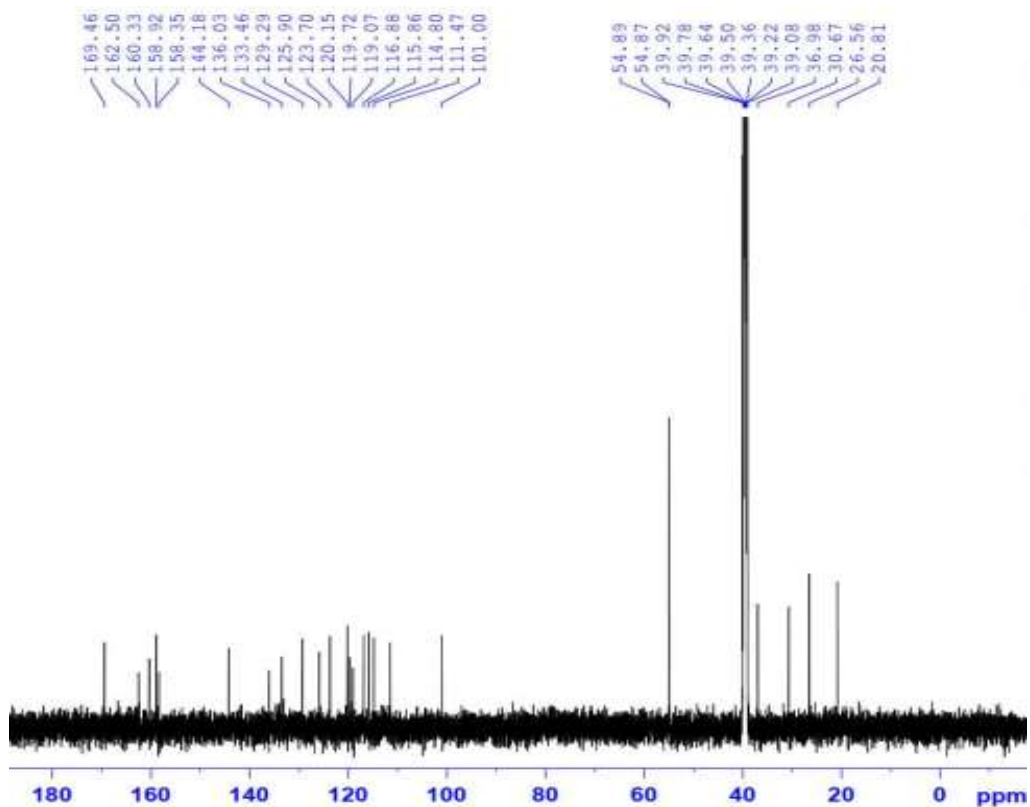
Hình 3.28. Phổ IR của hợp chất **188a**

Trên phổ IR của hợp chất **188a** (Hình 3.28) xuất hiện tín hiệu đặc trưng của các nhóm chức có mặt trong phân tử. Cụ thể: tín hiệu tại 1704 cm⁻¹ đặc trưng cho dao động hoá trị của nhóm chức ketone gắn với nguyên tử carbon của vòng thơm trong phân tử, tại 1658 cm⁻¹ xuất hiện tín hiệu hấp thụ mạnh đặc trưng cho nhóm carbonyl (C=O) khi gắn với amin. Ngoài ra trên phổ IR còn xuất hiện các dao động hóa trị của liên kết C=C trong vòng thơm tại các vị trí 1605 và 1483 cm⁻¹, cùng các dao động trong vùng vân ngón tay (955-602 cm⁻¹), đặc trưng cho các dao động biến dạng của liên kết C-H; và các dao động biến dạng của liên kết C-O tại 1300 cm⁻¹...

Trong Phổ ^1H -NMR của hợp chất (**188a**) (Hình 3.29) ngoài các tín hiệu tương ứng cho cấu trúc của hợp chất (**187a**) (đã bàn luận ở trên), còn có sự xuất hiện của các tín hiệu proton đặc trưng cho nhóm -NH trên vòng pyrimidine cộng hưởng tại vị trí δ_{H} 12.53 (1H, s, NH) và một nhóm chức methyl (-CH₃) gắn vào vòng pyrimidine xuất hiện tại vị trí có độ dịch chuyển δ_{H} : 2.28 (3H, s, -CH₃) ppm.



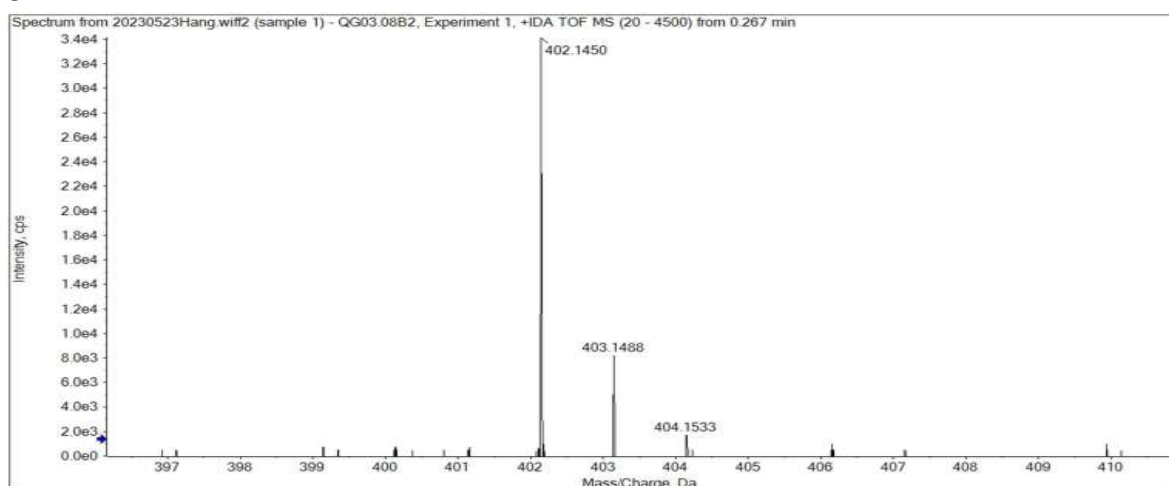
Hình 3.29. Phổ ¹H-NMR của hợp chất 188a



Hình 3.30. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất 188a

Hình 3.30 là phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **188a** sau khi kết tinh lại, loại bỏ dung môi, nhận thấy sự xuất hiện đầy đủ tín hiệu của 23 nguyên tử carbon có trong phân tử bao gồm: 2 nguyên tử carbon của nhóm carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) cộng hưởng tại δ_{C} 169.4 ($\text{C}=\text{O}$); 162.5 ($\text{C}=\text{O}$). Tín hiệu của 6 nguyên tử carbon bậc bốn C_{quart} cộng hưởng tại các vị trí δ_{C} (ppm): 160.3; 136.0; 133.5; 129.3; 120.2; 101.0. Bên cạnh đó, các tín hiệu còn lại của các nguyên tử carbon có mặt trong vòng thơm của indole và aldehyde thơm cũng được xác nhận tại các δ_{C} 158.9; 144.2; 125.9; 123.7; 119.7, 119.1, 116.9, 115.9, 114.8, 111.5. Ngoài ra các tín hiệu xuất hiện của nguyên tử C trên nhóm methoxyl và methyl cũng lần lượt được ghi nhận tại các vị trí có độ dịch chuyển hoá học tương ứng δ_{C} 54.9; 37.0; và 26.6.

Cấu trúc của hợp chất **188a** được xác nhận bằng phổ khối lượng phân giải cao HRMS.



Hình 3.31. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **188a**

Phổ khối lượng phân giải cao HRMS (Hình 3.31) phát hiện pic ion giả phân tử m/z : 402.1450 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4]^+$: 402.1448. Như vậy, từ các kết quả phân tích của phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và HRMS, cho phép khẳng định cấu trúc của hợp chất (**188a**) hoàn toàn phù hợp với định hướng nghiên cứu ban đầu.

Để đưa ra được điều kiện tối ưu cho phản ứng tổng hợp dãy chất này, luận án lựa chọn chất đầu dãy **188a** khảo sát và lựa chọn 2 phương pháp tiến hành: đun hồi lưu (trong 3h) và thực hiện trong thiết bị vi sóng AntonParr 400 ở trong khoảng nhiệt độ từ 70 - 140 °C với bước tăng nhiệt là 10 °C; dung môi được lựa chọn là: CH_3CN , t -BuOH, EtOH, dioxan, toluene, AcOH, cùng với các chất xúc tác được khảo sát. Đầu tiên hỗn hợp gồm: 1 mmol N-acetylindoxyl (**185**), 1mmol 3-methoxybenzaldehyde (**186a-I**) và 1mmol malononitrile (**81**) với 0.15 mmol amoni axetat (NH_4OAc) (**60**) làm chất xúc tác. Sau khi kết thúc bước 1 cho thêm 3 mmol acetic anhydride ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$) cùng với 0.04 mmol H_2SO_4 làm xúc tác, nâng nhiệt độ phản ứng lên 120 °C trong thời gian 15 phút. Kết quả khảo sát được trình bày chi tiết trong bảng 3.4

Từ kết quả nghiên cứu thực nghiệm cho thấy phản ứng sử dụng các dung môi có mô men phân cực thấp như toluen (0.36D), dioxan (0.45D), không thích hợp với quá trình gia nhiệt trong thiết bị vi sóng hoặc đun hồi lưu ở nhiệt độ cao, ngược lại các dung môi có mô men phân cực cao phù hợp với quá trình gia nhiệt bằng thiết bị vi sóng ở nhiệt độ từ 80 - 120 °C. Hai dung môi phù hợp với nhiệt độ của bước 1 (80 °C) và bước 2 (120 °C) lần lượt là EtOH và CH₃CN; tương ứng với xúc tác NH₄OAc, xúc tác cho phản ứng ngưng tụ Knoevenagel ở bước 1 và H₂SO₄ tạo môi trường acid cho quá trình thủy phân, đóng vòng ở bước 2.

Bảng 3.10. Khảo sát dung môi, xúc tác và nhiệt độ cho tổng hợp dẫn xuất 188a

TT	Dung môi		Xúc tác (20% mol)		Nhiệt độ (°C)		Hiệu suất (%)	
	Bước 1	Bước 2	Bước 1	Bước 2	Bước 1	Bước 2	Hồi lưu	mw
1	EtOH	EtOH	DMAP	p-TsOH	70	100	N/A	
2	CH ₃ CN	EtOH	Et ₃ N	H ₂ SO ₄	80	110		30
3	EtOH	CH ₃ CN	NH ₄ OAc	H ₂ SO ₄	80	120		68
4	CH ₃ CN	<i>t</i> -BuOH	AcOH	H ₂ SO ₄	90	130		35
5	<i>t</i> -BuOH	Toluene	p-TsOH	H ₂ SO ₄	90	140		N/A
6	Toluene	Dioxane	NH ₄ OAc	p-TsOH	100	100	nhiều vết	
7	AcOH	CH ₃ CN	DMAP	Et ₃ N	110	110		N/A
8	Dioxane	AcOH	p-TsOH	NH ₄ OAc	120	120	N/A	

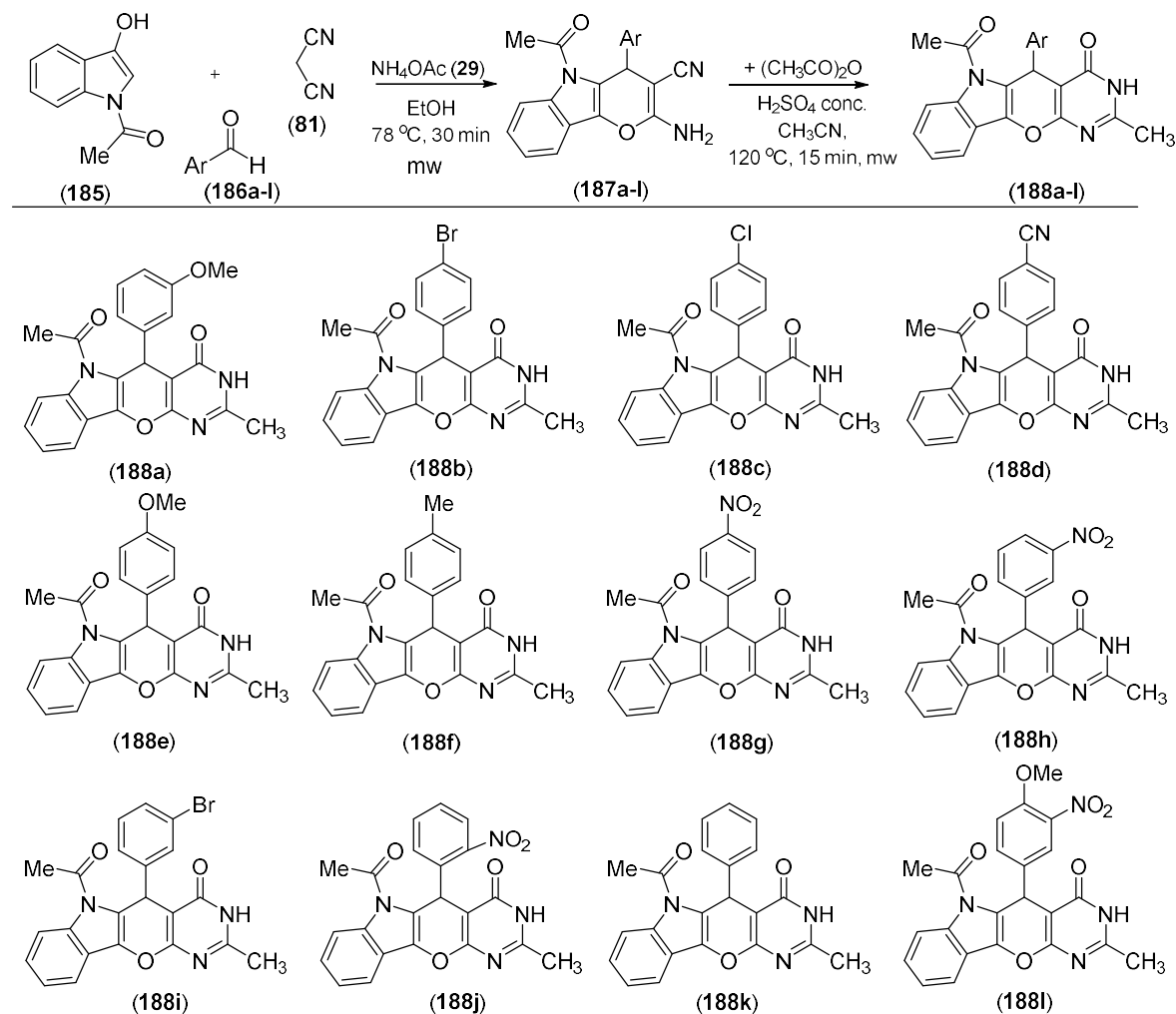
Căn cứ điều kiện phản ứng đã được xác lập ở trên, luận án đã tiến hành tổng hợp được 12 dẫn xuất hybrid của indole-pyrano[2,3-*d*]pyrimidone (**188a-l**) theo Sơ đồ 3.16. Kết quả tổng hợp và hiệu suất của các dẫn xuất được đưa ra trong Bảng 3.11

*Bảng 3.11. Các hợp chất indole-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine 188a-l*

TT	Hợp chất	Màu sắc	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Hiệu suất (%)
1	188a	Màu trắng	370 - 371	68
2	188b	Màu trắng	374 - 375	72
3	188c	Màu trắng đục	372 - 373	75
4	188d	Màu vàng sáng	382 - 383	78
5	188e	Màu nâu	376 - 377	70
6	188f	Màu trắng	388 - 389	70
7	188g	Màu nâu	383 - 384	65
8	188h	Màu nâu xám	382 - 383	66
9	188i	Màu đen	385 - 386	68

TT	Hợp chất	Màu sắc	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Hiệu suất (%)
10	188j	Màu nâu đen	386 - 387	65
11	188k	Màu nâu	384 - 385	68
12	188l	Màu trắng xám	381 - 382	75

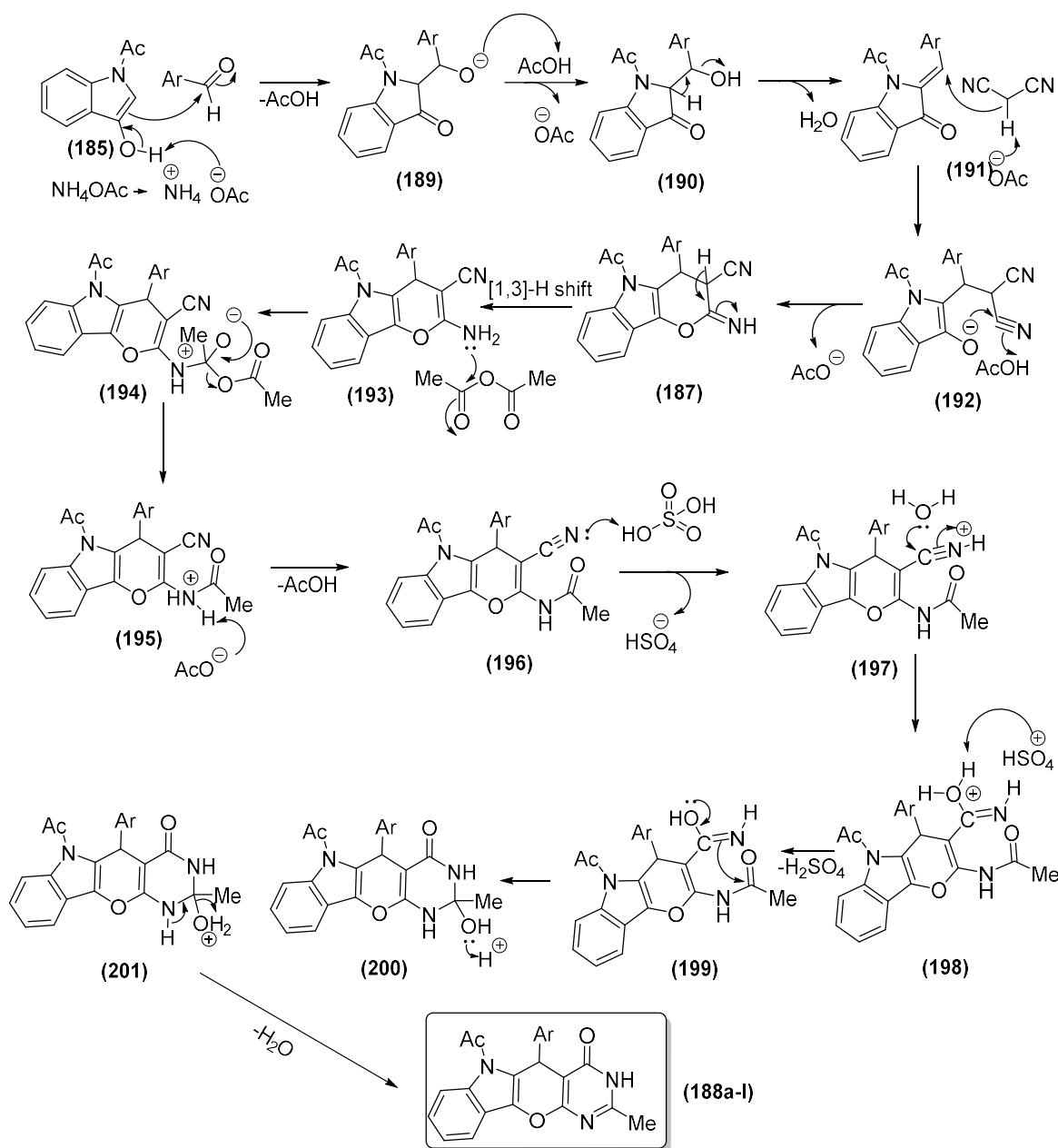
Từ Bảng 3.11 có thể thấy, vai trò của các nhóm thế hút điện tử (-Hal, -NO₂, -CN) và các nhóm thế đẩy điện tử (-OCH₃, -CH₃) trên các aldehyde thơm cũng không tác động nhiều đến hiệu suất của phản ứng.



Sơ đồ 3.16. Tổng hợp các hợp chất hybrid **188a-l** indole-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine

Cơ chế hình thành sản phẩm (**188**) được đề xuất theo sơ đồ 3.16. Ở giai đoạn 1 (bước 1), đầu tiên dưới tác nhân xúc tác là NH₄OAc, các dẫn xuất của benzaldehyde và *N*-acetylindoxyl (**185**) cùng tham gia phản ứng ngưng tụ Knoevenagel tạo thành sản phẩm trung gian (**190**) sau đó tách nước, tham gia phản ứng cộng Michael với tác nhân malononitrile, đóng vòng và tạo đồng phân với vòng pyran trong phản ứng domino 3 thành phần, thu được hợp chất trung gian (**187**). Tiếp theo ở giai đoạn 2 (bước 2), hợp chất trung gian (**187**) tham gia phản ứng cộng nucleophin với anhydride axetic hình thành hợp chất (**195**), sau đó thủy phân trong môi trường acid tạo thành

hợp chất (199). Cuối cùng thực hiện chuỗi đóng vòng nội phân tử, tách nước thu được sản phẩm (188a-l).



Sơ đồ 3.17. Cơ chế đề xuất hình thành hợp chất 188

Như vậy, với việc khai thác triệt để lợi thế của phản ứng domino trong tổng hợp các hợp chất dị vòng, luận án đã tiến hành tổng hợp thành công 12 dẫn xuất mới của lớp chất indole-pyrano[2,3-*d*] pyrimidine thông qua hai bước từ các nguyên liệu đầu là *N*-acetylindoxyl (185), các aldehyde thơm (186a-l), malononitrile (81) và anhydride axetic $((\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O})$; trong dung môi EtOH và CH_3CN với các chất xúc tác là NH_4OAc và H_2SO_4 tương ứng; hiệu suất phản ứng thu được từ 65 - 78%.

3.7. Đánh giá, thử nghiệm hoạt tính sinh học của các chất tổng hợp được

Với định hướng mục tiêu thiết kế, tổng hợp các dẫn xuất dị vòng mới của podophyllotoxin có khả năng ức chế chọn lọc các dòng tế bào ung thư khác nhau thông qua tương tác của các dị vòng chứa O, N, S với bộ khung của podophyllotoxin

hay sử dụng cơ chế ức chế các protein kinase của isatin, luận án đã sử dụng phản ứng domino, kết hợp với phản ứng click để tổng hợp các dẫn xuất mới của podophyllotoxin và thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ở cấp độ *in vitro* trên các dòng ung thư ở người bao gồm: KB (tế bào ung thư biểu mô), A549 (ung thư phổi), HepG2 (ung thư gan), MCF-7 (ung thư vú) và tế bào lành tính Hek-293, sử dụng chất chuẩn ellipticine. Ngoài ra những thử nghiệm về khả năng ức chế các enzym α -glucosidase và AchE đối với lớp chất indole pyrano[2,3-*d*]pyrimidine cũng được luận án nghiên cứu nhằm tìm kiếm, sàng lọc các hợp chất có tiềm năng để phát triển thành thuốc điều trị các bệnh tiểu đường và Alzheimer.

3.7.1. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các dẫn xuất (161a-m)

Bảng 3.12. Kết quả đánh giá gây độc tế bào của các dẫn xuất 161a-m

TT	Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)				
		KB	A549	HepG2	MCF-7	Hek-293
1	161a	1.43 $\pm$ 0.14	0.48 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.15	2.06 $\pm$ 0.66	22.90 $\pm$ 2.18
2	161b	10.05 $\pm$ 1.17	3.09 $\pm$ 0.39	12.36 $\pm$ 1.29	12.63 $\pm$ 1.14	13.80 $\pm$ 1.41
3	161c	14.22 $\pm$ 1.23	3.06 $\pm$ 0.27	3.75 $\pm$ 0.69	12.15 $\pm$ 1.14	14.55 $\pm$ 1.35
4	161d	2.81 $\pm$ 0.32	2.06 $\pm$ 0.22	0.30 $\pm$ 0.06	10.36 $\pm$ 1.29	37.12 $\pm$ 3.30
5	161e	10.94 $\pm$ 1.40	9.94 $\pm$ 0.73	10.42 $\pm$ 1.18	13.07 $\pm$ 1.60	11.17 $\pm$ 0.85
6	161f	1.10 $\pm$ 0.09	7.02 $\pm$ 0.91	1.30 $\pm$ 0.13	12.65 $\pm$ 1.20	19.69 $\pm$ 1.70
7	161g	9.94 $\pm$ 0.65	3.13 $\pm$ 0.20	12.67 $\pm$ 1.40	11.27 $\pm$ 1.78	13.07 $\pm$ 1.70
8	161h	1.12 $\pm$ 0.10	0.16 $\pm$ 0.02	0.81 $\pm$ 0.11	1.07 $\pm$ 0.10	1.38 $\pm$ 0.18
9	161i	10.74 $\pm$ 1.27	2.27 $\pm$ 0.22	7.80 $\pm$ 0.53	10.41 $\pm$ 0.80	12.26 $\pm$ 1.13
10	161j	6.00 $\pm$ 0.63	5.43 $\pm$ 0.39	4.35 $\pm$ 0.57	3.24 $\pm$ 0.36	3.75 $\pm$ 0.69
11	161k	0.27 $\pm$ 0.24	0.27 $\pm$ 0.21	0.23 $\pm$ 0.02	1.34 $\pm$ 0.16	2.48 $\pm$ 0.32
12	161l	4.69 $\pm$ 0.58	2.15 $\pm$ 0.25	5.52 $\pm$ 0.86	7.34 $\pm$ 0.94	10.21 $\pm$ 1.24
13	161m	4.63 $\pm$ 1.04	2.83 $\pm$ 0.54	5.83 $\pm$ 0.86	7.26 $\pm$ 1.29	16.73 $\pm$ 1.94
Ellipticine		1.95 $\pm$ 0.12	1.42 $\pm$ 0.08	2.11 $\pm$ 0.16	2.09 $\pm$ 0.16	5.60 $\pm$ 0.37

Qua số liệu thử nghiệm có thể thấy tất cả các dẫn xuất đều cho thấy hoạt tính gây độc tế bào cao và trung bình đối với tất cả các dòng tế bào ung thư được thử nghiệm với giá trị IC₅₀ từ: 0,16 - 14,22 μ M. Trong đó hoạt tính gây độc tế bào của 3 hợp chất (**161a, h, k**) tốt hơn hoạt tính của ellipticine đối với cả 4 dòng tế bào ung

thư đã thử nghiệm. Ngoài ra hợp chất **161f** có kết quả gây độc đối với 2 dòng tế bào KB và HepG2, cao hơn 1,8 lần so với ellipticine. Đặc biệt hợp chất **161k** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh và chọn lọc đối với các dòng tế bào KB, A549 và HepG2 với giá trị IC_{50} từ 0.23 - 0.27 μM và cao hơn khoảng 10 lần so với tế bào lành tính Hek-293. Hợp chất **161h** thể hiện hoạt tính ức chế tăng trưởng cao nhất đối với các dòng tế bào ung thư A549 và MCF-7 và các tế bào Hek-293 bình thường với giá trị IC_{50} lần lượt 0.16; 1.07 và 1.38 μM . Bên cạnh đó hai dẫn xuất **161a** và **161d** đều có khả năng ức chế chọn lọc đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau (**161a** ức chế A549, **161d** ức chế HepG2) nhưng lại thể hiện độc tính thấp với dòng tế bào lành tính Hek-293 với các giá trị IC_{50} lần lượt là: 22.90 và 37.12 μM , điều này mở ra triển vọng cho quá trình phát triển thuốc để ức chế chọn lọc đối với các dòng tế bào ung thư phổi và gan riêng rẽ.

Bảng 3.13. Chỉ số SI thể hiện độc tính của các dẫn xuất **161a-m**

TT	Hợp chất	Chỉ số SI			
		KB	A549	HepG2	MCF-7
1	161a	16.00	47.90	16.00	11.12
2	161b	1.37	4.47	1.12	1.09
3	161c	1.02	4.75	3.88	1.20
4	161d	13.19	18.00	122.40	3.58
5	161e	1.02	1.12	1.07	0.85
6	161f	17.98	2.81	15.10	1.56
7	161g	1.31	4.18	1.03	1.16
8	161h	1.23	8.55	1.71	1.29
9	161i	1.14	5.40	1.57	1.18
10	161j	0.63	0.69	0.86	1.16
11	161k	9.30	9.30	10.81	1.86
12	161l	2.18	4.74	1.85	1.39
13	161m	3.61	5.92	2.87	2.31
Ellipticine		2.88	3.94	2.65	2.68

Chỉ số SI ($IC_{50} \text{ Hek-293} / IC_{50} \text{ hợp chất}$) giúp các nhà nghiên cứu có thể đánh giá sơ bộ về chỉ số chọn lọc của các hợp chất. Trên bảng 3.13 có thể thấy: hợp chất **161d** có giá trị SI cao nhất (122.40), đồng nghĩa với việc, hợp chất này có chỉ số chọn lọc đối với tế bào ung thư gan HepG2 ($IC_{50} = 0.3 \mu M$) cao hơn 122 lần so với tế bào lành tính thông thường Hek-293 ($IC_{50} = 37.12$). Bên cạnh đó hợp chất (**161a**) cũng thể hiện độ chọn lọc gấp 47 lần so với tế bào lành khi thử nghiệm với tế bào ung thư phổi A549. Ngoài ra hợp chất (**161k**) cũng có chỉ số SI gấp gần 10 lần so với tế bào thông

thường ở các dòng tế bào ung thư KB, A549, HepG2.

3.7.2. Hoạt tính gây độc tế bào của lớp chất (182a-p)

Kết quả thể hiện trong bảng 3.14 cho thấy: 15/16 hợp chất của lớp chất này đều không ghi nhận được giá trị IC_{50} khi tiến hành phép thử đến nồng độ 16 ($\mu\text{g/ml}$) trên bốn dòng tế bào ung thư người gồm: KB, A549, HepG2, MCF-7 và tế bào phôi thận người lành tính Hek-293. Riêng hợp chất (**182n**) thể hiện hoạt tính gây độc yếu ở 2 dòng tế bào ung thư KB và MCF-7 với các giá trị IC_{50} tương ứng: 15.82 ± 0.02 và $15.64 \pm 0.11 \mu\text{M}$. Chứng tỏ lớp chất này được coi là các hợp chất có khả năng ức chế kém hoặc không có hoạt tính gây độc tế bào ung thư (theo Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI)). So sánh với các dẫn xuất của podophyllotoxin-isatin (mục 3.7.4) rõ ràng khi ghép nối thêm hợp phần AZT đã làm giảm đi rõ rệt khả năng gây độc tế bào của các dẫn xuất thu được, mặc dù AZT cũng được đánh giá là hợp chất có khả năng gây độc tế bào tiềm năng. Điều này có thể giải thích khi thực hiện ghép nối các hợp phần riêng rẽ thành một hợp chất có khối lượng phân tử lớn, công kênh (cỡ 1000 Da), đã phần nào hạn chế sự tương tác với các thụ thể khác nhau của tế bào ung thư, dẫn tới làm giảm hiệu quả, hiệu lực của các hợp chất.

Bảng 3.14. Kết quả thử hoạt tính độc tế bào của lớp chất **182a-p**

TT	Hợp chất	IC ₅₀ (μM)				
		KB	A549	HepG2	MCF-7	Hek-293
1	182a	23.20	23.20	23.20	23.20	23.20
2	182b	22.74	22.74	22.74	22.74	22.74
3	182c	22.29	22.29	22.29	22.29	22.29
4	182d	22.74	22.74	22.74	22.74	22.74
5	182e	22.10	22.10	22.10	22.10	22.10
6	182f	22.61	22.61	22.61	22.61	22.61
7	182g	22.82	22.82	22.82	22.82	22.82
8	182h	21.78	21.78	21.78	21.78	21.78
9	182i	22.23	22.23	22.23	22.23	22.23
10	182j	22.05	22.05	22.05	22.05	22.05
11	182k	22.61	22.61	22.61	22.61	22.61
12	182l	20.68	20.68	20.68	20.68	20.68

TT	Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)				
		KB	A549	HepG2	MCF-7	Hek-293
13	182m	18.88	18.88	18.88	18.88	18.88
14	182n	15.82 $\pm$ 0.02	18.56 $\pm$ 0.04	17.73 $\pm$ 0.03	15.64 $\pm$ 0.11	19.56 $\pm$ 0.03
15	182o	19.62	19.62	19.62	19.62	19.62
16	182p	21.12	21.12	21.12	21.12	21.12
Ellipticine		1.87 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.08	6.25 $\pm$ 0.16

3.7.3. Hoạt tính gây độc tế bào của lớp chất (184a-e)

Quy trình đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của lớp chất (**184a-e**) được thực hiện tương tự như các thử nghiệm ở mục 3.7.1-3.7.2. Kết quả gây độc tế bào được trình bày trong bảng 3.15

Bảng 3.15. Kết quả gây độc tế bào của lớp chất **184a-e**

TT	Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)				
		KB	A549	HepG2	MCF-7	Hek-293
1	184a	16.30	16.30	16.30	16.30	16.30
2	184b	17.37	17.37	17.37	17.37	17.37
3	184c	16.30	16.30	16.30	16.30	16.30
4	184d	17.19	17.19	17.19	17.19	17.19
5	184e	0.70 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.03	3.08 $\pm$ 0.11	3.32 $\pm$ 0.03
Ellipticine		1.87 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.08	6.25 $\pm$ 0.16

Qua bảng 3.15 có thể thấy: cũng tương tự như lớp chất (**182a-p**), hầu hết các hợp chất đều không ghi nhận được giá trị IC₅₀ ở nồng độ phép thử tăng đến 16 (μ g/ml). Trừ trường hợp dẫn xuất **184e** thể hiện giá trị ức chế mạnh đối với dòng tế bào KB và A549, HepG2 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 0.70 $\pm$ 0.02 và 0.91 $\pm$ 0.04 và 1.00 $\pm$ 0.03 μ M. Giá trị này cao gấp 2 lần so với giá trị IC₅₀ của Ellipticine được thử nghiệm đối chứng trong cùng phép đo (1.87 $\pm$ 0.08), trong khi đó khả năng gây độc đối với dòng tế bào lành tính Hek-293 có giá trị IC₅₀ = 3.32 μ M, chỉ bằng ½ so với Ellipticine.

Như vậy có thể thấy khi lai hoá với Erlotibib qua cầu liên kết 1,2,3-triazole, lớp chất (**184**) không làm tăng khả năng ức chế tăng sinh đối với các dòng tế bào thử nghiệm so với các dẫn xuất podophyllotoxin-isatin, trừ trường hợp dẫn xuất 5,7-

dibromo (**184e**), điều này có thể là do giới hạn về không gian dẫn tới các liên kết trên vòng 1,2,3-triazole và Erlotinib với protein mục tiêu chưa được thực hiện như định hướng ban đầu.

3.7.4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào các dẫn xuất (**174a-n**)

Bốn dòng tế bào ung thư ở người gồm: KB, HepG2, A549 và MCF-7 cùng với tế bào lành tính Hek-293 tiếp tục được lựa chọn để tiến hành thử nghiệm độc tính gây độc tế bào của lớp chất (**174a-n**). Kết quả thử nghiệm được đưa ra trong bảng 3.16.

Bảng 3.16. Kết quả thử nghiệm độc tính gây độc tế bào của lớp chất **174a-n**

TT	Hợp chất	IC ₅₀ μM				
		KB	A549	HepG2	MCF-7	Hek-293
1	174a	5.33 ± 0.62	1.98 ± 0.16	5.33 ± 0.62	1.95 ± 0.21	4.89 ± 0.44
2	174b	3.15 ± 0.21	1.41 ± 0.12	2.32 ± 0.31	4.20 ± 0.50	3.32 ± 0.33
3	174c	3.46 ± 0.33	1.91 ± 0.20	4.02 ± 0.45	4.17 ± 0.48	3.89 ± 0.40
4	174d	4.75 ± 0.41	1.62 ± 0.17	4.34 ± 0.41	2.07 ± 0.26	3.52 ± 0.37
5	174e	10.04 ± 0.93	2.28 ± 0.20	6.80 ± 0.63	18.83 ± 1.71	10.04 ± 1.08
6	174f	1.99 ± 0.22	0.90 ± 0.09	3.28 ± 0.39	1.84 ± 0.17	6.70 ± 0.57
7	174g	4.85 ± 0.41	1.67 ± 0.17	6.74 ± 0.68	2.62 ± 0.22	7.27 ± 0.78
8	174h	3.96 ± 0.34	1.71 ± 0.19	4.24 ± 0.38	3.73 ± 0.38	2.72 ± 0.19
9	174i	4.65 ± 0.44	7.37 ± 0.83	4.50 ± 0.48	3.72 ± 0.35	4.04 ± 0.42
10	174j	5.60 ± 0.49	6.54 ± 0.69	5.78 ± 0.61	4.09 ± 0.41	10.34 ± 1.06
11	174k	27.30 ± 2.15	14.00 ± 1.59	20.90 ± 2.36	15.09 ± 1.59	> 28.00
12	174l	17.75 ± 1.68	5.93 ± 0.64	15.05 ± 1.70	13.40 ± 1.23	> 27.73
13	174m	51.68 ± 1.78	13.28 ± 0.70	47.50 ± 2.15	19.85 ± 0.89	> 64.96
14	174n	4.36 ± 0.40	1.03 ± 0.13	6.74 ± 0.73	2.11 ± 0.24	22.85 ± 2.20
Ellipticine		1.99 ± 0.16	1.34 ± 0.08	2.07 ± 0.12	2.07 ± 0.16	5.64 ± 0.32

Kết quả thử nghiệm cho thấy tất cả các dẫn xuất của lớp chất (**174a-n**) đều thể hiện hoạt tính ức chế từ trung bình đến mạnh đối với bốn dòng tế bào ung thư, với giá trị IC₅₀ từ 0.90 đến 51.68 μM. Các hợp chất từ **174a-d, g-h** thể hiện giá trị ức chế mạnh đối với dòng tế bào ung thư phổi A549, tương ứng với giá trị IC₅₀ dao động từ 1,41 - 1,98 μM, tương đương với giá trị của ellipticine tham chiếu (IC₅₀ = 1,34 ± 0,08 μM). Khả năng ức chế đối với tế bào A549 của các sản phẩm **174f** (IC₅₀ = 0,90 ± 0,09 μM) và **174n** (IC₅₀ = 1,03 ± 0,13 μM) tốt hơn ellipticine. Đối với dòng tế bào MCF-

7, các dẫn xuất **174a** ($IC_{50} = 1,95 \pm 0,21 \mu M$), **174d** ($IC_{50} = 2,07 \pm 0,26 \mu M$), **174f** ($IC_{50} = 1,84 \pm 0,17 \mu M$) và **174n** ($IC_{50} = 2,11 \pm 0,24 \mu M$) cho giá trị ức chế tương đương với ellipticine ($IC_{50} = 2,07 \pm 0,16 \mu M$). Kết quả thử nghiệm với dòng tế bào lành tính Hek-293 cũng cho thấy hầu hết các dẫn xuất đều thể hiện khả năng ức chế đối với dòng tế bào này, đặc biệt các hợp chất **174f** và **174n** có độc tính thấp hơn khoảng 7 và 22 lần so với tế bào Hek-293 khi tiến hành thử nghiệm trên tế bào gây ung thư phổi A549, còn khi thử nghiệm với dòng tế bào ung thư vú MCF-7 giá trị này thấp hơn 11 lần.

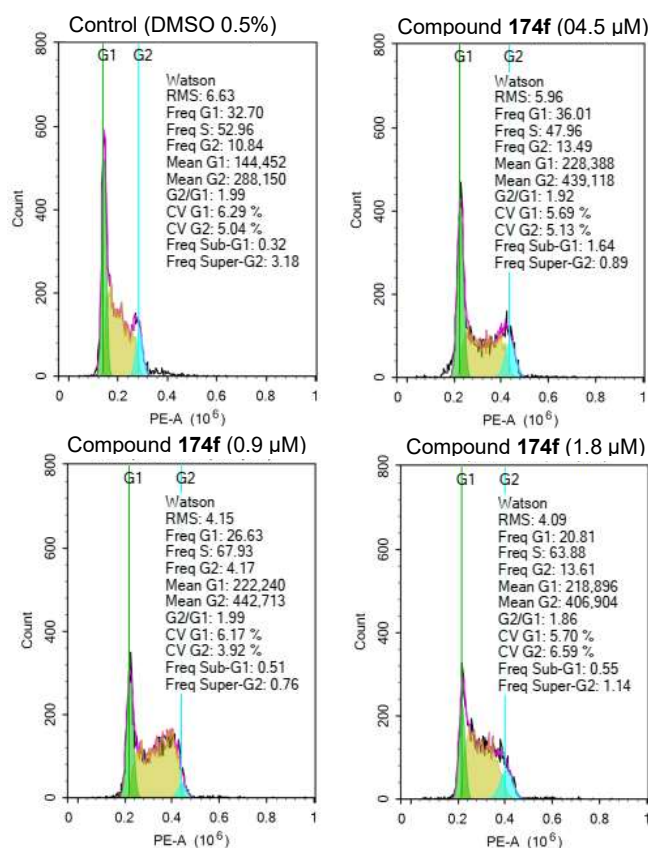
Căn cứ vào kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, có thể nhận xét như sau: khi đưa nhóm thế bromo vào các vị trí trong vòng thơm của isatin mà không thực hiện phản ứng alkyl hoá tại vị trí N-1, đã làm tăng khả năng ức chế đối với các dòng tế bào ung thư được thử nghiệm (thể hiện ở các hợp chất **174d, f, n**), nhưng khi tiến hành phản ứng alkyl hoá, các dẫn xuất thu được lại thể hiện hoạt tính kém hơn (hợp chất **174k, m**), điều này phần nào khẳng định vai trò của nhóm -NH trong các tương tác sinh học của lớp chất này.

Trong số tất cả các hợp chất thử nghiệm, hợp chất **174f** có hoạt tính chống tăng sinh với nhiều dòng tế bào khác nhau, do đó nó được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo bao gồm: phân tích chu kỳ tế bào, thử nghiệm apoptosis và nghiên cứu docking phân tử.

3.7.5. Phân tích chu kỳ tế bào hợp chất (174f) đối với dòng tế bào A549

Chu kỳ tế bào là một tập hợp các quá trình dẫn tới sự hình thành hai tế bào từ một tế bào mẹ. Nó bao gồm bốn pha chính; G1 (pha tăng trưởng 1), S (pha tổng hợp DNA), G2 (pha tăng trưởng 2) và M (nguyên phân). Ở các tế bào ung thư, chu kỳ tế bào thường bị mất kiểm soát dẫn đến các tế bào phân chia không theo lịch trình. Vì vậy ức chế chu kỳ tế bào là cơ hội can thiệp hiệu quả để điều trị các bệnh về ung thư. Cơ chế tương tác của hầu hết các loại thuốc chống ung thư là làm nhiễu loạn chu kỳ tăng sinh của các tế bào khối u bằng cách ức chế gây ra gián đoạn ở các chu trình tại kỳ trung gian (G0/G1, S, G2/M) qua đó kích hoạt các điểm kiểm soát, ngăn chặn tế bào và gây ra apoptosis [153]

Kết quả thử nghiệm gây độc tế bào cho thấy: hợp chất (**174f**) thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất đối với các tế bào ung thư phổi A549 ($IC_{50} = 0.9 \pm 0.09 \mu M$), do đó luận án tiến hành theo dõi sự phân bố của các tế bào trên các giai đoạn riêng biệt của kỳ trung gian (G0/G1, S, G2/M), ở các nồng độ tương ứng: 0.45; 0.9 và 1.8 μM đối với dòng tế bào thử nghiệm. Quá trình được thực hiện bằng phương pháp đo lưu lượng tế bào [154].



Hình 3.32. Ảnh hưởng của nồng độ hợp chất **174f** tới phân bố chu kỳ tế bào A549

Bảng 3.17. Tỷ lệ tế bào A549 theo pha khi thử nghiệm với hợp chất **174f**

Mẫu thử	Tỷ lệ tế bào theo pha (%)		
	% G0/G1	% S	% G2/M
DMSO (0.5%)	32.70	52.96	10.84
174f (0.45 μM)	36.01	47.96	13.49
174f (0.9 μM)	26.63	67.93	4.17
174f (1.8 μM)	20.81	63.88	13.61

Từ bảng 3.17 và Hình 3.32 có thể thấy, hợp chất (**174f**) gây ra sự gia tăng đáng kể quá trình tích tụ tế bào trong pha S, kèm theo quá trình giảm các tế bào trong pha G0/G1. Chứng tỏ hợp chất này có hoạt tính chống tăng sinh thông qua việc bắt giữ tế bào ở pha S dẫn tới làm ngừng chu kỳ tế bào thử nghiệm (A549).

3.7.6. Quá trình kích hoạt apoptosis của hợp chất (**174f**)

Apoptosis là một quá trình chết theo chương trình của tế bào được lập trình xảy ra trong các sinh vật đa bào. Tốc độ chết của tế bào giảm do sự ức chế apoptosis là nguyên nhân gây ra các bệnh như: ung thư, miễn dịch, vi rút, sưng viêm..., do đó luận án tiếp tục nghiên cứu quá trình kích hoạt apoptosis của hợp chất (**174f**) đối với tế bào ung thư phổi A549. Quá trình được thực hiện dựa trên xét nghiệm đo lưu lượng tế bào FITC và PI của annexin V. Các liên hợp huỳnh quang của annexin V có thể xác

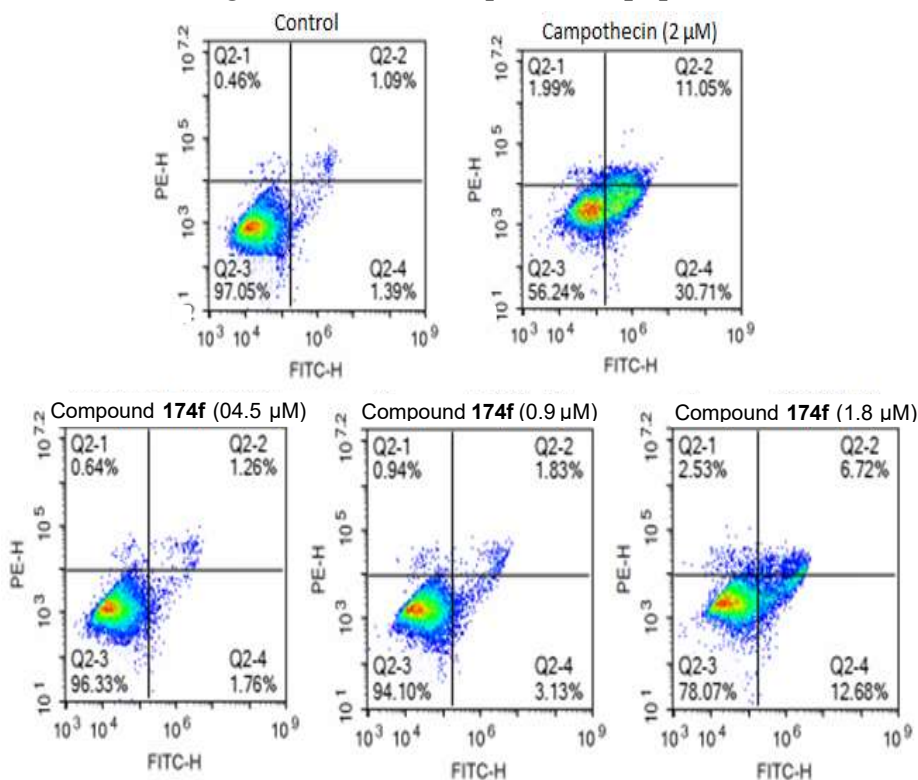
định các tế bào apoptosis bằng cách liên kết với phosphatidylserine (PS) được định vị trên lớp ngoài của màng huyết tương [155, 156].

Dẫn xuất (**174f**) được tiến hành thử nghiệm trên dòng tế bào A549 tại các nồng độ tương ứng: 0.45; 0.9 và 1.8 μM , khi kết hợp với annexin V trong vòng 48 giờ

Bảng 3.18. Tỷ lệ (%) tế bào apoptosis

Mẫu thử	% tế bào hoại tử	% tế bào Apoptosis sớm	% tế bào Apoptosis muộn	% tổng số tế bào apoptosis
Đối chứng	0.46	1.39	1.09	2.48
Camptothecin (2 μM)	1.99	30.71	11.05	41.76
174f (0.45 μM)	0.64	1.76	1.26	3.02
174f (0.9 μM)	0.94	3.13	1.83	8.09
174f (1.8 μM)	2.53	12.68	6.72	19.4

Kết quả trên hình 3.33 và bảng 3.18 cho thấy việc ức chế tế bào ung thư A549 bằng dẫn xuất (**174f**) ở các nồng độ 0.45 μM ; 0.9 μM và 1.8 μM dẫn đến sự gia tăng tế bào chết theo chương trình khi tăng liều lượng từ 2,48% lên 3,02%, 8,09% và 19,4%. Chứng tỏ dẫn xuất (**174f**) ức chế sự phát triển của tế bào ung thư phổi A549 thông qua quá trình apoptosis và quá trình này tăng dần khi thử nghiệm ở các nồng độ cao hơn, đặc biệt là ở giai đoạn đầu của quá trình apoptosis.



Hình 3.33. Phân bố tập hợp apoptosis các tế bào A549 khi nhuộm Annexin-V/PI (Các giai đoạn tế bào khác nhau: tế bào sống (Q3), apoptosis sớm (Q4), apoptosis muộn (Q2) và tế bào hoại tử (Q1))

3.7.7. Đánh giá hoạt tính ức chế α -Glucosidase (188a-l)

Các hợp chất chứa khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine có nhiều hoạt tính sinh học lý thú như: chống sốt rét, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống ung thư, gây độc tế bào đặc biệt chúng còn là tác nhân ức chế enzym α -glucosidase (α -Gls), nguyên nhân gây ra bệnh đái tháo đường ở người. Do đó bên cạnh các thử nghiệm gây độc tế bào, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng ức chế enzym α -Glucosidase đối với các dẫn xuất (**188a-l**)

Sử dụng chất đối chứng là acarbose (một loại thuốc chống tiêu đường phổ biến), các dẫn xuất (**188a-l**) được tiến hành thử nghiệm ức chế enzym α -glucosidase theo quy trình đã được Ellman công bố [119].

Kết quả từ bảng 3.19 cho thấy: hầu hết các sản phẩm đều thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase đáng kể với giá trị IC_{50} dao động từ 2.49 ± 0.02 đến 202.09 ± 15.72 μ M, trừ hợp chất **188h** (Ar = 3-NO₂C₆H₄), không có hoạt tính. Các sản phẩm **188d** (Ar = 4-CNC₆H₄), **188e** (Ar = 4-CH₃OC₆H₄) và **188l** (Ar = 4-CH₃O-3-NO₂C₆H₃) là các dẫn xuất tiêu biểu nhất với các giá trị IC_{50} lần lượt là 2.52 ± 0.24 , 2.49 ± 0.02 , và 8.76 ± 0.65 μ M, tương ứng, mạnh gấp 93 đến 27 lần so với chất đối chứng acarbose ($IC_{50} = 231.30 \pm 6.55$ μ M).

Bảng 3.19. Kết quả ức chế enzym α -Gls của các dẫn xuất **188a-l**

TT	Hợp chất	Ar	α -Glucosidase IC_{50} (μ M)
1	188a	3 - Methoxybenzaldehyde	36.35 ± 2.67
2	188b	4 - Bromobenzaldehyde	23.16 ± 1.73
3	188c	4 - Chlorobenzaldehyde	115.81 ± 9.81
4	188d	4 - Xyanuabenzaldehyde	2.52 ± 0.24
5	188e	4 - Methoxybenzaldehyde	2.49 ± 0.02
6	188f	4 - Methylbenzaldehyde	31.13 ± 2.15
7	188g	4 - Nitrobenzaldehyde	24.78 ± 1.87
8	188h	3 - Nitrobenzaldehyde	> 614.81
9	188i	3 - Bromobenzaldehyde	202.09 ± 15.72
10	188j	2 - Nitrobenzaldehyde	61.48 ± 4.76
11	188k	Benzaldehyde	140.01 ± 12.82
12	188l	3 - Nitro - 4 - Methoxy benzaldehyde	8.76 ± 0.65
13	Acarbose		231.30 ± 6.55

Đánh giá mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính (SAR) cho thấy: khả năng ức chế của các dẫn xuất đối với enzym α -glucosidase phần lớn bị ảnh hưởng bởi các nhóm thế trên vòng phenyl, gắn với vòng furan. Thông qua cách so sánh các giá trị IC_{50} của dẫn xuất phenyl 4-cyanophenyl (**188d**) và dẫn xuất phenyl 4-methoxyphenyl (**188e**) với các dẫn xuất khác, cho thấy rằng sự xuất hiện của 4-MeO và 4-CN trên vòng phenyl đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase. Hơn nữa các nhóm thế ở vị trí *para* của vòng phenyl đã giúp cải thiện đáng kể hoạt tính ức chế của loại enzym này. Chẳng hạn khi dịch chuyển nhóm nitro từ vị trí *para* sang vị trí *meta* và *ortho* (các sản phẩm **188k**, **188h** và **188j**) đã dẫn đến sự giảm hoạt tính ức chế. Điều này càng nhận thấy rõ khi so sánh khả năng ức chế của hai dẫn xuất (**188l**) và (**188h**), trong khi hợp chất (**188l**) thể hiện hoạt tính mạnh, ngược lại dẫn xuất (**188h**) lại không có hoạt tính, mặc dù cấu trúc của hai hợp chất chỉ khác nhau ở chỗ: hợp chất (**188l**) được bổ sung thêm nhóm thế methoxyl ở vị trí *para* của vòng phenyl

3.7.8. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase (AChE) (**188a-l**)

Bệnh Alzheimer được biết đến là một bệnh lý thần kinh suy giảm trí nhớ thường gặp ở những người cao tuổi. Nguyên nhân của bệnh có liên quan đến thiếu hụt các chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine (ACh) trong não. Enzym AChE có tác dụng thủy phân ACh thành thành choline và acid acetic. Do đó ức chế enzym AChE có tác dụng làm tăng lượng ACh, điều này có tác dụng cải thiện các bệnh lý của Alzheimer [157].

Với mục tiêu tìm các tương tác khi tích hợp thêm các dẫn xuất chứa vòng indole vào khung pyrano[2,3-*d*]pyrimidine, luận án tiến hành đánh giá thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym AChE đối với các hợp chất (**188a-l**) trong ống nghiệm theo phương pháp đo quang của Ellman sử dụng chất đối chứng là Donepezil [119]. Kết quả thử nghiệm được trình bày trong Bảng 3. 20.

Bảng 3.20. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym AChE

TT	Hợp chất	Ar	AChE IC_{50} (μ M)
1	188a	3 - Methoxybenzaldehyde	16.99 ± 1.12
2	188b	4 - Bromobenzaldehyde	113.70 ± 10.57
3	188c	4 - Chlorobenzaldehyde	> 315.40
4	188d	4 - Xyanuabenzaldehyde	> 322.90
5	188e	4 - Methoxybenzaldehyde	204.08 ± 19.66
6	188f	4 - Methylbenzaldehyde	276.76 ± 23.51

TT	Hợp chất	Ar	AchE IC ₅₀ (μM)
7	188g	4 - Nitrobenzaldehyde	> 307.40
8	188h	3 - Nitrobenzaldehyde	> 307.40
9	188i	3 - Bromobenzaldehyde	> 284.26
10	188j	2 - Nitrobenzaldehyde	48.03 ± 4.27
11	188k	Benzaldehyde	5.39 ± 0.51
12	188l	3 - Nitro - 4 - Methoxy benzaldehyde	91.24 ± 8.71
13	Donepezil		0.08 ± 0.01

Kết quả thử nghiệm (Bảng 3.20) cho thấy chỉ có 2 dẫn xuất là (**188a**) và (**188k**) thể hiện khả năng ức chế trung bình đối với AchE tương ứng với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 16.99 ± 1.12 và 5.39 ± 0.51 μM, còn lại các dẫn xuất đều thể hiện hoạt tính yếu hoặc không có hoạt tính. Rõ ràng khi đưa thêm các nhóm thế vào vòng phenyl đã góp phần làm giảm hoạt tính ức chế enzym AchE so với vòng phenyl ban đầu (**188k**).

3.8. Kết quả nghiên cứu docking phân tử

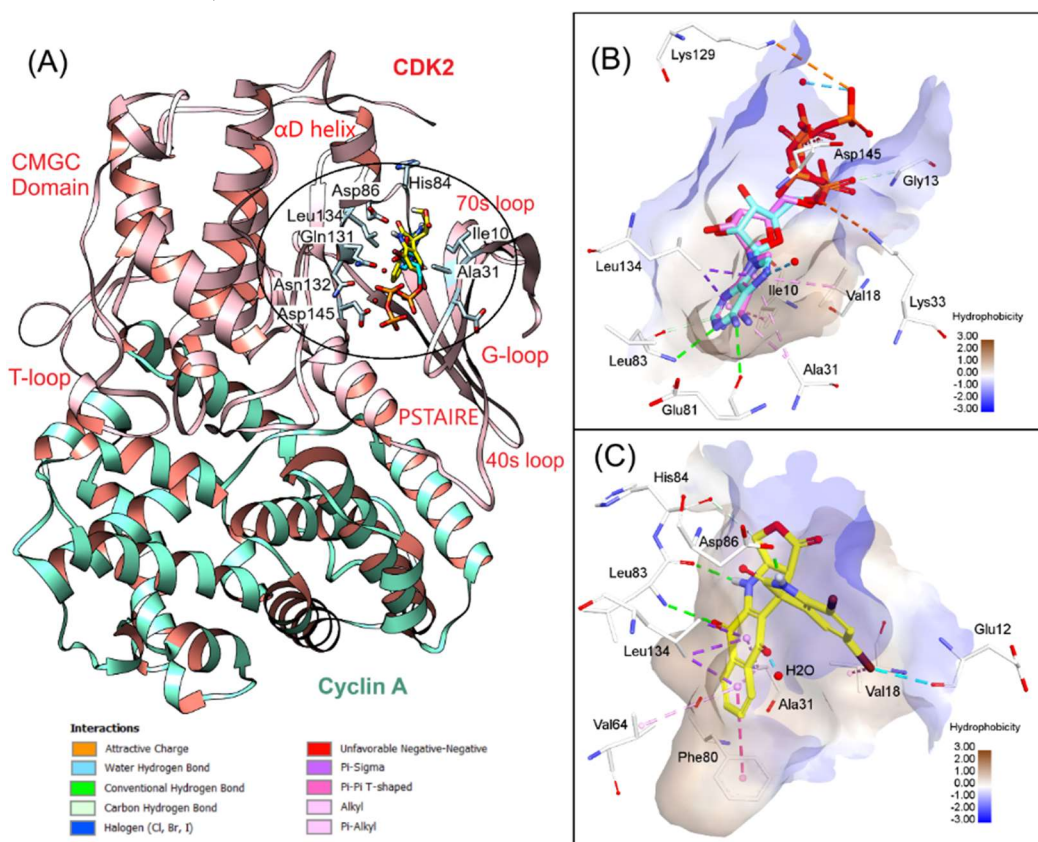
3.8.1. Nghiên cứu docking phân tử hợp chất (174f)

Căn cứ kết quả thử nghiệm phân tích chu kỳ tế bào và ức chế quá trình apoptosis, hợp chất (**174f**) được đánh giá là ứng viên có tiềm năng khi bắt giữ chu kỳ tế bào và gây ra quá trình apoptosis sớm ở pha S đối với tế bào thử nghiệm A549.

Hai nhân tố then chốt trong điều tiết chu kỳ tế bào là, cyclin và kinase phụ thuộc vào cyclin (*cyclin-dependent kinase* - CDK); chúng quyết định đến tiến trình hoạt động của tế bào trong suốt chu kỳ. Mỗi phức hợp cyclin-CDK phosphoryl hóa một nhóm protein khác nhau, do đó chúng điều hoà các hoạt động khác nhau trong tế bào, bản thân một loại phức hợp cũng có hiệu quả hoạt tính khác nhau tùy thời điểm trong chu kỳ. Trong đó phức hợp CDK2/cyclin A (hoặc cyclin E) đóng vai trò quan trọng trong tiến trình chuyển từ pha G1 sang pha S [158] và CDK5/p25 (hoặc p35/p39) có chức năng điều tiết hoạt động của chu kỳ tế bào tại pha S [159]. Do đó luận án tiến hành nghiên cứu docking phân tử CDK2/cyclin A và CDK/p25 nhằm tìm hiểu cơ chế tương tác giữa hợp chất (**174f**) với phức hợp của các CDK này cùng với một tác nhân gây ra quá trình apoptosis là procaspase/caspase 6.

Cũng giống như các kinase khác, CDK2 và CDK5 có hai miền hình cầu, bao gồm miền đầu N chủ yếu được cấu thành từ β-sheet và miền đầu C chủ yếu là α-helix. Theo cấu trúc 3D được công bố bởi Jeffrey và cộng sự [160], luận án xác định rằng khe xúc tác của CDK2/cyclin A bao gồm một vòng giàu Gly (vòng G) nằm phía trên túi liên kết ATP. α-helix còn lại, được gọi là xoắn PSTAIRE (Pro-Ser-Thr-Ala-Isoleu-

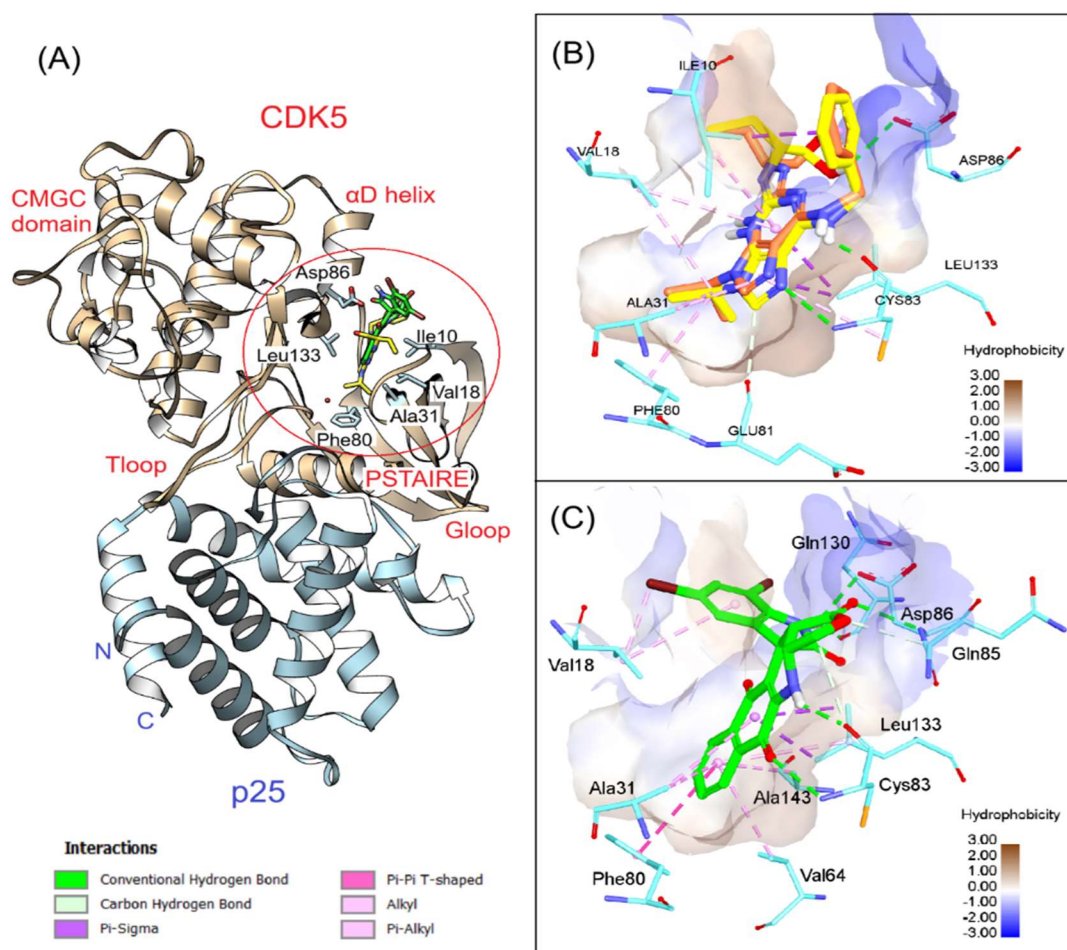
Arg-Glu), trải qua quá trình sắp xếp lại và hỗ trợ định vị lại các gốc chính trong vị trí hoạt động (Hình 3.34A). Vòng T, nằm ở giao giữa CDK2 và cyclin A, linh hoạt hơn vòng G và đóng vai trò trong quá trình phosphoryl hóa. Do đó, luận án chỉ tập trung vào vị trí gắn kết ATP, vì hợp chất này được cho là sẽ phá vỡ sự tương tác giữa CDK2 và cyclin A. Ban đầu luận án thực hiện docking lại phân tử ATP và so sánh nó với phối tử đồng tinh thể để xác nhận quy trình. Kết quả là phù hợp, vì các đồng dạng được xác định cho thấy độ lệch bình phương trung bình (RMDS) là 1,02 Å với năng lượng gắn kết được xác định là -35,84 kcal/mol và bảo toàn các tương tác chính. Sau đó áp dụng phương pháp gắn kết đã được xác thực để ước tính khả năng gắn kết của hợp chất (**174f**) với CDK2/cyclin A. Kết quả cho thấy hợp chất này liên kết với túi thứ cấp kỵ nước như các chất ức chế kinase giống với Gleevec (loại II) thường hoạt động. Trên Hình 3.34C, dẫn xuất podophyllotoxin-isatin được phát hiện có liên quan đến nhiều tương tác xếp chồng với thụ thể Ala31, Val64, Leu134 và đặc biệt là Phe80. Ngoài ra, liên kết hydro từ nhóm NH và CO, cũng như nhóm 5,7-dibromoisatin hướng tới xương sống O của Glu12, Leu83 và chuỗi bên O của Asp86, ổn định đáng kể khả năng tương thích của (**174f**) tại vị trí liên kết ATP với CDK2/cyclin A. Năng lượng gắn kết được tính toán cho (**174f**) là -27,35 kcal/mol, thấp hơn so với của phối tử ATP (-35,84 kcal/mol).



Hình 3.34. Kết quả docking phân tử của hợp chất (**174f**) và ATP với CDK2/cyclin A. Hình ảnh 3D vị trí gắn kết của ATP và (**174f**); B. Kết quả gắn kết ATP và (**174f**) khi docking; C. Tương tác chính của (**174f**) với các gốc chính

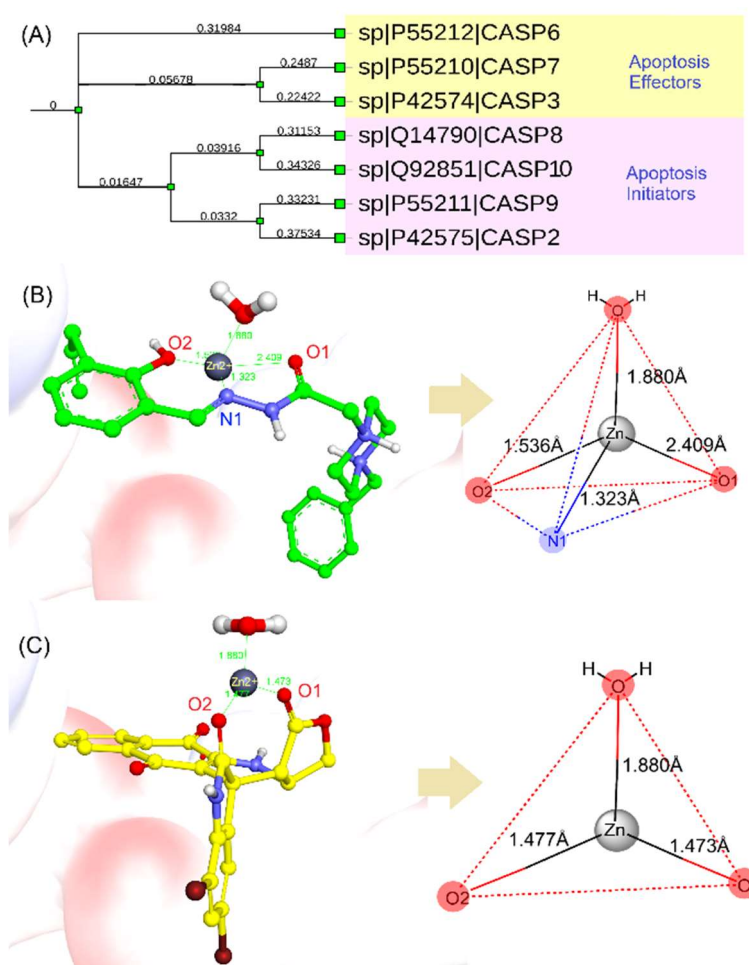
Tương tự khi tiến hành docking hợp chất (**174f**) với cấu trúc của phức hợp CDK5/p25 theo quy trình được Mapelli và các cộng sự đã công bố [161]. Nhìn chung khá giống với CDK2/cyclin A, tuy nhiên có một số khác biệt được ghi nhận ở vòng T hoạt hoá, nhưng điều này không ảnh hưởng đến sự gắn kết của roscovitine (chất tham chiếu ức chế sự phát triển tế bào, với miền đầu N của CDK5). Sau khi docking lại, roscovitine cho thấy sự trùng khớp độ sai lệch bình phương là 0,791 Å và năng lượng ghép nối được xác định là -23,14 kcal/mol. Các tương tác quan trọng bao gồm: liên kết hydro từ mảnh purine với các thụ thể Glu81, Cys83, Asp86; tương tác giữa vòng pyrazole và vòng isopropyl với Leu10, Val18, Ala31 và Phe80 đều được ghi nhận, cho thấy tính hợp lệ của quy trình docking đối với hệ thống này.

Sau đó thực hiện docking hợp chất (**174f**) vào vị trí gắn kết ATP của CDK5/p25 và phát hiện thấy rằng hợp chất này thậm chí còn gắn kết tốt hơn so với hợp chất tham chiếu roscovitine. Nhiều liên kết hydro được quan sát thấy giữa hợp chất này và các gốc vùng đệm như Cys83, Gln85, Cys86 và Gln130. Các tương tác xếp chồng được bổ sung hình thành giữa (**174f**) và túi liên kết kỵ nước trong vòng G. Năng lượng liên kết được ước tính bằng hàm GBSA/MM là -26,02 kcal/mol, cho thấy ái lực tốt của (**174f**) đối với CDK5 (Hình 3.35)



Hình 3.35. Docking phân tử của hợp chất **174f** và roscovitine với CDK5/p25
A. Hình ảnh ghép nối 3D; B. Vị trí docking của **174f** và roscovitine; C. Các tương tác chính của (**174f**)

Tiếp theo hoạt động kích hoạt quá trình apoptosis của hợp chất (**174f**) đã được kiểm tra bằng cách sử dụng mô phỏng ghép nối với procaspase 6/caspase 6 gắn kết với PAC-1 (thuốc ức chế procaspase đã được FDA chứng nhận) [162]. Bằng cách sử dụng phần mềm Clustal Omega kết hợp và kết hợp với phân tích phổ hệ của 7 dữ liệu caspase, xác định caspase 3, 6 và 7 là các tác nhân gây ra apoptosis (Hình 3.37A). Các nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng dẫn xuất podophyllotoxin - naphthoquinone có thể tạo ra phức bidentate ổn định với ion Zn [163]. Các hoạt động ức chế của các tác nhân này bị chặn bởi ion Zn, khi tương tác với Lys36, Glu244, His287 và một phân tử nước [164]. Bằng cách gắn PAC-1 vào vị trí xác lập trên procaspase 6, luận án xác định hợp chất này có thể tạo phức ổn định với ion Zn, ức chế và cô lập Zn liên kết với procaspase [165, 166].



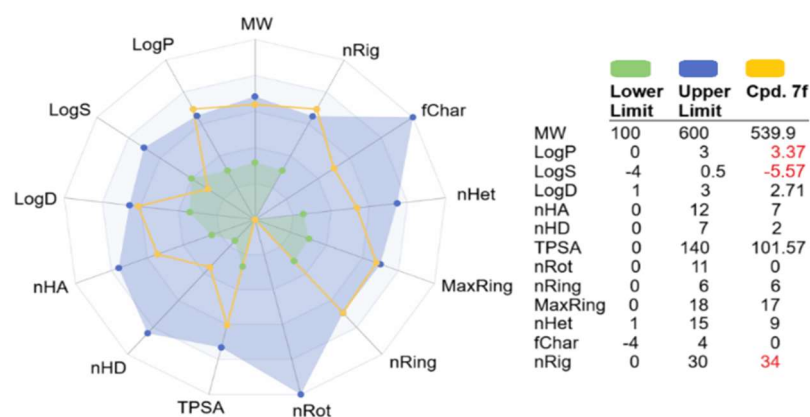
Hình 3.36. Kết quả hoạt hoá quá trình apoptosis của hợp chất **174f** và PAC-1

Sau khi gắn hợp chất (**174f**) vào cùng vị trí và phát hiện ra rằng dẫn xuất này cũng tạo phức bidentate với ion Zn thông qua hai nhóm C=O của isatin và vòng lactone cùng các nhóm 5,7-dibromoisatin (Hình 3.36C). Những kết quả này chỉ ra rằng hợp chất tổng hợp có thể hoạt hoá procaspase theo cách mà PAC-1 đã thực hiện. Tuy nhiên, có một sự khác biệt giữa hình dạng phối trí của hợp chất (**174f**) và PAC-1 khi cùng tạo phức với ion Zn và hợp chất (**174f**) có mức năng lượng gắn kết thấp hơn (-19.10 kcal/mol) so với PAC-1 (-23.81 kcal/mol).

Dự đoán các tính chất dược động học của hợp chất **174f**

Các tính chất dược động học bao gồm: hấp thụ, phân phối, chuyển hóa, bài tiết và độc tính (ADMET) là các thông số quan trọng và song hành cùng với hoạt tính sinh học. Việc dự đoán này được thực hiện dựa trên một số phần mềm chuyên dụng cho phép tính toán theo lý thuyết các tính chất lý hóa cùng các đặc tính liên quan đến hấp phụ, phân phối, chuyển hóa và bài tiết (ADMET) của hợp chất (**174f**) [167, 168]. Các kết quả được tóm tắt trong Hình 3.37 và Bảng 3.22.

Dựa trên một số quy tắc giống thuốc, hợp chất này đáp ứng các quy tắc Lipinski và Pfizer nhưng không tuân theo quy tắc GSK. Trong số các tính chất lý hóa được tính toán theo lý thuyết, tính ưa béo (LogP), độ hòa tan (LogS) và số vòng (nRig) nằm ngoài phạm vi giống thuốc. Ngoài ra, nó được phân loại tạm thời là BCS loại II, có thể cần một số sửa đổi để cải thiện độ hòa tan trong nước.



Hình 3.37. Các đặc tính lý, hoá dự đoán của hợp chất **174f**

Bảng 3.21. Dự đoán độc tính của hợp chất **174f** sử dụng ADMETlab 2.0

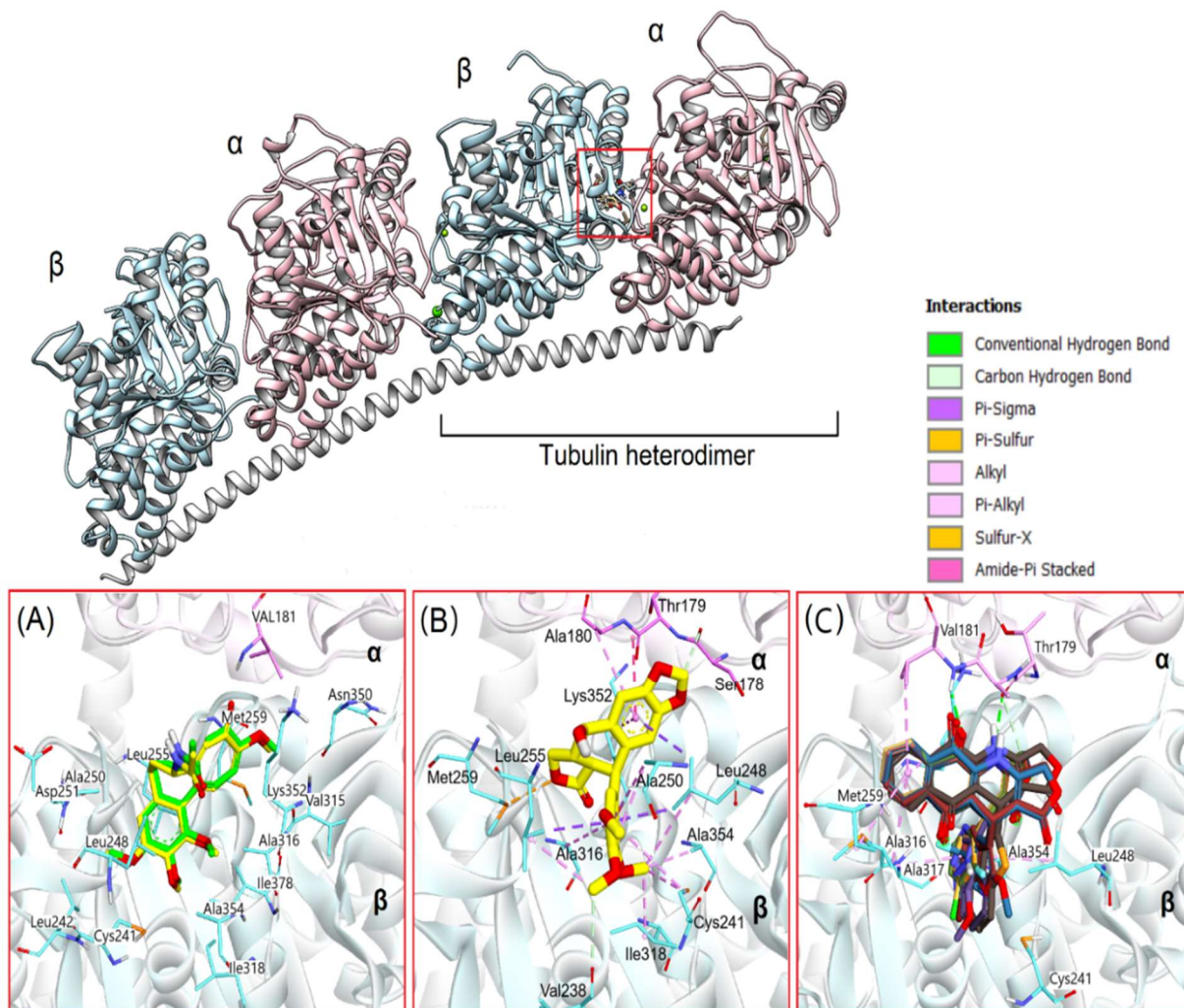
TT	Độc tính	174f	Ghi chú
1	Độc tính AMES	Không	
2	Ức chế hERG	Không	
3	Độc tính với gan	Có	
4	Nhạy cảm với da	Không	
5	Độc tính cấp tính đường uống	0.832	độc tính thấp > 500 mg/kg

Các tính chất liên quan đến ADMET đã được đánh giá, cho thấy mối quan tâm chính sẽ là quá trình chuyển của cytochrome P450. Hợp chất (**174f**) được dự đoán là chất nền cho một số enzyme chuyển hóa lần đầu như: CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9 và các enzyme khác. Do đó hợp chất này sẽ có sinh khả dụng đường uống thấp. Về mặt độc tính theo bảng 3.21 rõ ràng (**174f**) không cho thấy tương tác với gen liên quan đến hERG của con người, gen này là nguyên nhân chính gây độc tính cho tim. Ngoài ra, hợp chất này cho thấy độc tính thấp đối với da, hệ hô hấp nhưng lại gây ra độc tính cho gan. Độc tính cấp tính đường uống của nó ở chuột được xác định là thấp với liều gây chết > 500 mg/kg [167].

3.8.2. Dây hợp chất 4-aza-podophyllotoxin chứa các dị vòng (161a-m)

Podophyllotoxin từ lâu đã được coi là tác nhân làm mất ổn định vi ống liên kết với vị trí colchicine trong tubulin, qua đó ức chế quá trình trùng hợp tubulin và ngăn chặn việc sản xuất các vi ống [163, 169]. Do đó luận án đã sử dụng phương pháp ghép nối phân tử để đánh giá sự tương tác của các hợp chất (**161a-m**) với tubulin, sử dụng chất đối chứng dương là Colchicine.

Quy trình docking được thực hiện bằng cách: đầu tiên luận án tiến hành gắn Colchicine vào vị trí của phức 4O2B trong tubulin và so sánh với các phối tử cùng tinh thể. Kết quả cho thấy: colchicine được gắn có mức độ trùng lặp cao với phối tử gốc ở độ lệch bình phương trung bình (RMSD) là 0,3339 Å. Các tương tác với phối tử ban đầu được sắp xếp lại tại các vị trí để dàng được quan sát thấy như: liên kết hydro giữa vòng methoxytropone với Ala180a và Val181a ở vùng 1 và các tương tác kỵ nước với Leu248b, Ala250b, Leu255b, Met259b và Ala316b ở vùng 2. Năng lượng liên kết của Colchicine có giá trị là -19.18 kcal/mol.



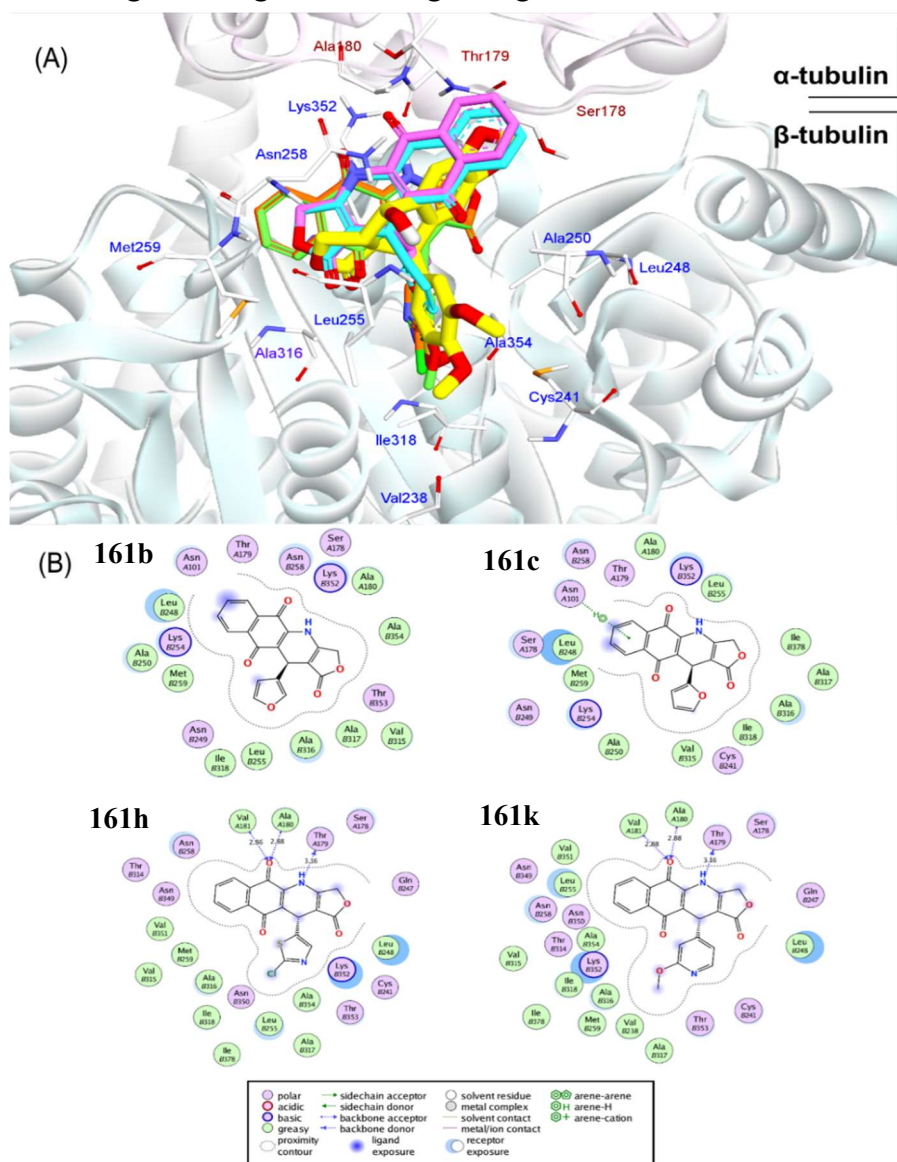
Hình 3.38. Vị trí xác lập trên tubulin và gắn kết các hợp chất

A. định vị colchicine trên tubulin; B. vị trí định vị podophyllotoxin

C. vị trí định vị 13 dẫn xuất khác nhau

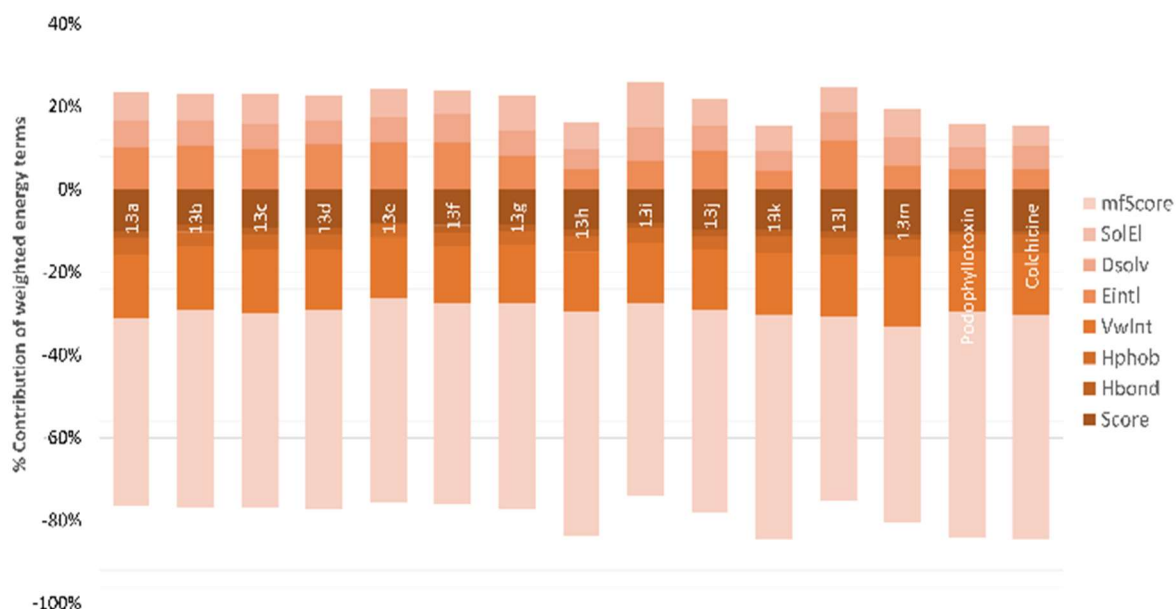
Tiếp theo, podophyllotoxin là hợp chất tham chiếu, cũng được gắn vào vị trí gắn kết của tubulin. Một số tương tác chính được ghi nhận là: các liên kết hydro với Val178, Ala180... của tiểu đơn vị α và nhiều tương tác kỵ nước với Cys241, Ala250, Leu248, Leu255, Ala354 và Ala316 của tiểu đơn vị β (Hình 3.38). Năng lượng gắn kết được xác định là $-18.68 \text{ kcal mol}^{-1}$ do các liên kết hydro và các tương tác kỵ nước tạo ra. Kết quả này giúp xác nhận tính tương đồng và độ chính xác của quy trình dock.

Sau khi gắn 13 dẫn xuất của dãy (**161a-m**) vào vị trí của tubulin, nhận thấy tất cả các hợp chất này đều có khả năng gắn vào vị trí hoạt động của colchicine trong tubulin. Hầu hết các hợp chất đều giữ nguyên các tương tác chính như liên kết hydro giữa nhóm carbonyl của vòng quinone và Val181, Ala180 hay các tương tác kỵ nước chủ yếu là pi-alkyl với hầu hết các amino acid trong vùng 2 như Lys352, Ala317, Ala316, Leu255, Ala250 và nhiều amino acid khác. Ngoài ra còn xuất hiện các liên kết hydro giữa nguyên tử N và Thr179 ở tất cả các hợp chất, điều này không quan sát thấy ở colchicine, chứng tỏ chúng có khả năng tương tác với tubulin tốt hơn colchicine.



Hình 3.39. Tương tác của các hợp chất (**161b, c, h, h**) với các vị trí tại miền α , β -tubulin

Trên Hình 3.39, hai hợp chất (**161b**) và (**161c**) xuất hiện ít tương tác hơn trong tiểu đơn vị β , như Asn101, Ala250, Leu248, và Ala316 so với hai hợp chất (**161k**) và (**161h**), mặc dù chúng đều có chung bộ khung podophyllotoxin. Chứng tỏ các HetAr trong các hợp chất (**161b**) và (**161c**) đã định hướng tạo ra ít tương tác hơn so với các HetAr của hai hợp chất (**161k**) và (**161h**), điều này chứng tỏ vai trò của các các HetAr là vô cùng quan trọng.



Hình 3.40. Tỷ lệ (%) của năng lượng thành phần ở liên kết giữa phối tử với tubulin

Năng lượng gắn kết tương đối được xác định dựa trên hàm GBSA/MM sử dụng phần mềm ICM pro (Hình 3.40 và Bảng 3.22). Theo đó, hợp chất (**161k**) có năng lượng gắn kết cao nhất là $-18.45 \text{ kcal mol}^{-1}$. Ngoài các tương tác chung, nó cũng hình thành các liên kết hydro giữa vòng lactone và Asn101 của vùng 1, và giữa nhóm carbonyl của vòng quinone và Leu255 của vùng 2. Thêm vào đó, nó tương tác tốt hơn với nhiều amino acid của vùng 2 trong vị trí gắn colchicine thông qua các nhóm thế của nó. Hợp chất (**161h**) có năng lượng gắn kết xếp thứ 2 là $-17.86 \text{ kcal mol}^{-1}$ nhờ vào các liên kết hydro chính với các amino acid của vùng 1 và các tương tác kỵ nước tương tự như hợp chất (**161k**).

Bảng 3.22. Năng lượng liên kết của các dẫn xuất với các cấu tử tương tác

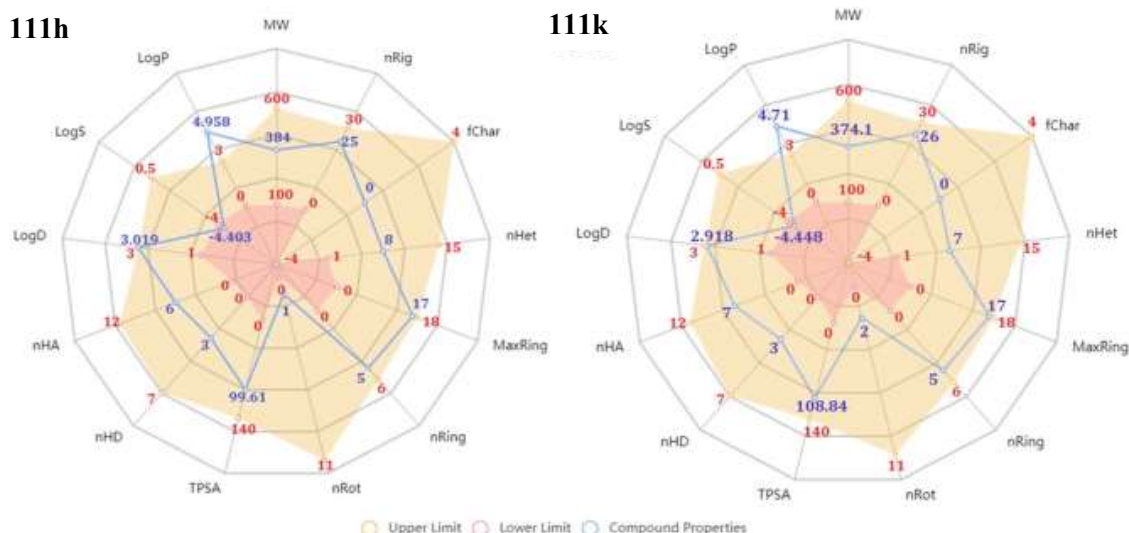
Hợp chất	N.lượng liên kết kcal mol^{-1}	Các tương tác chính
161a	-16.38	H-bond: Val181a, Thr179a, Ala180a Hydrophobic: Ala354b, Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b
161b	-13.79	H-bond: Val181a, Thr179a, Ala180a, Ala354b, Ala317b Hydrophobic: Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b
161c	-14.55	H-bond: Val181a, Thr 179a, Ala180a Hydrophobic: Ala354b, Leu 248b, Ala316b, Lys 352b, Met259b

161d	-15.29	H-bond: Val181a, Thr 179a, Ala180a Hydrophobic: Ala354b, Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b, Ile 318b, Cys 241b
161e	-14.09	H-bond: Val181a, Thr 179a, Ala180a Hydrophobic: Ala354b, Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b, Leu255b, Cys241b
161f	-16.45	H-bond: Val181a, Thr179a, Ala180a, Asn101a, Leu255b, Ala250b Hydrophobic: Ala354b, Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b, Leu255b, Asn258b, Ala250b
161g	-15.08	H-bond: Val181a, Thr 179a, Ala180a, Leu255b, Lys352b Hydrophobic: Ala354b, Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b, Leu255b, Asn258b, Ala250b, Cys241b
161h	-17.86	H-bond: Val181a, Thr179a, Ala180a Hydrophobic: Ala354b, Leu248b, Ala316b, Lys352b, Met259b, Ile 318b, Cys241b
161i	-13.83	H-bond: Val181a, Ala 180a, Asn 101a, Ala 317b Hydrophobic: Ala354b, Leu 248b, Leu 255b, Ala 316b, Lys 352b, Met 259b, Ile318b
161j	-15.64	H-bond: Val 181a, Thr 179a, Ala 180a, Ala 317b, Lys 352b Hydrophobic: Ala 354b, Leu 248b, Ala 316b, Lys 352b, Met 259b
161k	-18.45	H-bond: Val 181a, Thr 179a, Ala 180a, Ala 317b Hydrophobic: Ala 354b, Leu 248b, Ala 316b, Lys 352b, Met 259b, Ile 318b, Cys 241b
161l	-15.78	H-bond: Val181a, Thr179a, Ala 180a, Ala 317b, Lys 352b Hydrophobic: Ala 354b, Leu 248b, Ala 316b, Lys 352b, Met 259b
161m	-16.8	H-bond: Val 181a, Ala 180a, Ala 317b, Ala 316b, Asn 101a, Asp251b, Ala 250b Hydrophobic: Ala 354b, Leu 248b, Ala 316b, Lys 352b, Met 259b, Leu255b, Thr 353b
podophyllotoxin	-18.68	H-bond: Ser178a, Ala180a, Ala317b, Ala316b, Asn101a, Asp251b, Ala 250b Hydrophobic: Val238b, Cis241b, Leu248b, Ala316b, Ala318b, Lys 352b, Met 259b, Leu255b, Thr353b
Colchicin	-19.18	H-bond: Val181a, Ala180a, Ala250b, Asp251b, val 315b, asn 350b Hydrophobic: Leu255b, Leu248b, Leu242b, Cys241b, Ile318b, Ala354b, Ile378b, Ala316b, Met359b, Lys352b

Như vậy các hợp chất được gắn kết với tubulin đều tạo ra khả năng kỵ nước và nhờ lực tương tác Van der Waal làm tăng khả năng liên kết với tubulin của các hợp chất thử nghiệm. Kết quả docking của lớp chất (**161a-m**) phù hợp với kết quả thử nghiệm gây độc tế bào đã được bàn luận ở mục 3.7.2

Kết quả dự đoán về đặc tính hoá lý và dược động học của hai hợp chất (**161h**) và (**161k**) (Hình 3.41 và Bảng 3.2.) cho thấy các tính chất lý hóa của cả hai hợp chất đều đáp ứng hầu hết các tiêu chí, ngoại trừ logP và logS (các thông số liên quan đến khả năng thẩm thấu) và tuân thủ đầy đủ các quy tắc về tính tương đồng với thuốc [170]. Khi dự báo các đặc tính liên quan đến hấp phụ, phân phối, chuyển hoá và bài tiết (ADMET), các kết quả cho thấy cả hai hợp chất đều có khả năng hấp thụ cao ở

đường ruột của người và ít thấm qua da, đồng thời có thời gian bán hủy ngắn.



Hình 3.41. Biểu đồ radar đa chiều thể hiện các đặc tính hóa lý của hợp chất (**161h**) và (**161k**)

Độc tính của hai dẫn xuất (**161h**) và (**161k**) cũng được dự đoán dựa trên phần mềm ADMETlab 2.0. Kết quả được đưa ra trong bảng 3.23

Bảng 3.23. Dự đoán độc tính của hợp chất **161h, k** sử dụng ADMETlab 2.0

TT	Độc tính	161h (xác suất)	161k (xác suất)
1	Khoá hERG	Không tác động (0.002)	Không tác động (0.009)
2	Độc tính với gan	Không có (0.425)	Không có (0.12)
3	Độc tính AMES	Không (0.324)	Không (0.273)
4	Độc tính cấp đường uống	Không (0.413)	Không (0.436)
5	Nhạy cảm với da	Không (0.497)	Có (0.747)
6	Độc tính hô hấp	Có (0.687)	Có (0.893)
7	Kích ứng mắt	Không (0.263)	Không (0.135)

Kết quả mô phỏng từ bảng 3. 23 cho thấy: cả hai hợp chất đều không phải là thuốc khoá hERG, có tác dụng gây độc tim thấp, không xuất hiện độc tính với gan, không gây đột biến gene và ăn mòn mắt. Hợp chất (**161k**) có thể gây phản ứng với da và đường hô hấp, còn hợp chất (**161h**) hầu như không có biểu hiện tương tác với các cơ quan của cơ thể, ngoại trừ hệ hô hấp.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Đã đề xuất 04 quy trình tổng hợp thành công 48 dẫn xuất mới của podophyllotoxin, các sản phẩm này được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại như: IR, NMR, HRMS. Cụ thể:

- 27 hợp chất được tổng hợp bằng phản ứng domino gồm
 - + 13 dẫn xuất 4-aza-podophyllotoxin (**161a-m**), hiệu suất đạt 60 - 74%
 - + 14 dẫn xuất podophyllotoxin-isatin (**174a-n**), hiệu suất: 70 - 85%.
- 21 hợp chất sử dụng kết hợp giữa phản ứng domino với phản ứng click:
 - + 16 dẫn xuất podophyllotoxin-isatin-AZT (**182a-p**), hiệu suất: 62 - 85%
 - + 05 dẫn xuất podophyllotoxin-isatin-Erlotinib (**184a-e**), hiệu suất: 32 - 55%
- Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư người: KB, HepG2, A549, MCF-7 và tế bào Hek-293 cho thấy: 29/48 hợp chất thể hiện khả năng gây độc tế bào ung thư, tiêu biểu là 05 hợp chất: (**161h**), (**161k**), (**174f**), (**174n**) và (**184e**) có các giá trị IC₅₀ thấp hơn hoặc tương đương với chất đối chứng trong phép thử cùng điều kiện.

- Lựa chọn hợp chất (**174f**), thử nghiệm, đánh giá khả năng ức chế chu kỳ tế bào và kích hoạt quá trình apoptosis đối với tế bào ung thư phổi A549. Kết quả hợp chất này làm ngừng hoạt động chu kỳ tế bào ở pha S và gây ra quá trình apoptosis sớm ở tế bào được thử nghiệm.

2. Áp dụng phản ứng domino tổng hợp thành công 12 hợp chất indole-pyrano[2,3-*d*]pyrimidine (**188a-l**) với hiệu suất đạt từ: 65 - 78%. Cấu trúc của các sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại (IR, NMR, HRMS). Kết quả thử nghiệm khả năng ức chế với 02 enzyme α -glucosidase và Acetylcholinesterase (AChE) cho thấy: nhóm lớp chất này có khả năng ức chế tốt enzyme α -glucosidase (11/12 hợp chất, tiêu biểu như các hợp chất **188i**; **188e**; **188d**, đồng thời thể hiện khả năng ức chế từ trung bình đến yếu đối với enzyme AChE (2/12 dẫn xuất ức chế trung bình).

3. Tiến hành nghiên cứu mô phỏng ADMET, docking phân tử đối với hợp chất (**174f**) và lớp chất (**161a-m**), qua đó giúp hiểu rõ hơn cơ chế tác động của các hợp chất với enzyme đích, cũng như giúp hỗ trợ thiết kế thuốc hiệu quả hơn. Kết quả cho thấy:

- Hợp chất (**174f**) gây ra quá trình apoptosis ở tế bào thử nghiệm (A549) bằng cách hoạt hoá procaspase/caspase và các phức hợp CDK2/cyclinA và CDK5/p25.

- Hai hợp chất (**161h**, **161k**) có khả năng ức chế quá trình trùng hợp tubulin và ngăn chặn việc sản xuất vi ống tương tự cơ chế của podophyllotoxin.

Kiến nghị

Hợp chất (**174f**) có khả năng ức chế chu kỳ tế bào ở pha S, kích hoạt quá trình apoptosis sớm, có độc tính thấp, phù hợp với các quy tắc của thuốc, do đó nó có tiềm năng phát triển thành thuốc điều trị ung thư. Vì vậy rất cần những nghiên cứu, thử nghiệm chuyên sâu tiếp theo.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã đề xuất 5 quy trình mới và các cơ chế hình thành, để tổng hợp các hợp chất của podophyllotoxin, pyrimidine từ phản ứng domino; kết hợp giữa phản ứng domino với phản ứng click
2. Tổng hợp thành công 60 dẫn xuất mới, chưa từng được công bố trong các tài liệu trước đó, bao gồm:
 - 13 hợp chất hybrid của podophyllotoxin **161a-m**.
 - 14 hợp chất podophyllotoxin - isatin **174a-n**.
 - 16 hợp chất của podophyllotoxin - isatin - AZT **182a-p**.
 - 05 hợp chất hybrid của podophyllotoxin - isatin - Erlotinib **184a-e**
 - 12 hợp chất indole pyrano[2,3-d] pyrimidine **188a-l**.
3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào phát hiện 05 hợp chất gồm: **161h**, **161k**, **174f**, **174n**, **184e** có giá trị IC_{50} thấp hơn hoặc tương đương với chất đối chứng và 03 hợp chất: **188l**; **188e**; **188d** có giá trị IC_{50} cao hơn chất đối chứng từ 27 đến 93 lần trong phép thử ức chế enzym α -glucosidase
4. Kết quả nghiên cứu docking phân tử và ức chế chu kỳ tế bào, apoptosis, phát hiện hợp chất (**174f**) có khả năng ức chế chu kỳ tế bào ở pha S, kích hoạt quá trình apoptosis sớm và có độc tính thấp, có tiềm năng phát triển thành thuốc điều trị. 02 hợp chất (**161h**) và (**161k**) có độc tính thấp và khả năng ức chế tubulin tương tự podophyllotoxin.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Ha Thanh Nguyen, Anh Nguyen Tuan, Tuyet Anh Dang Thi, **Ket Tran Van**, Giang Le-Nhat-Thuy, Phuong Hoang Thi, Quynh Giang Nguyen Thi, Cham Ba Thi, Hung Tran Quang, Tuyen Van Nguyen, 2024, Synthesis, in vitro A-Glucosidase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of novel Indol-Fused Pyrano[2,3-D]Pyrimidine compounds, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 98, p 129566. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129566>
2. Ha Thanh Nguyen, **Ket Tran Van**, Hai Pham-The, Julien Braire, Phuong Hoang Thi, Tuan Anh Nguyen, Quynh Giang Nguyen Thi, Tuyet Anh Dang Thi, Giang Le-Nhat-Thuy, Tu Anh Le Thi, Doan Vu Ngoc, and Tuyen Nguyen Van, 2024, Synthesis, molecular docking analysis and in vitro evaluation of new heterocyclic hybrids of 4-azapodophyllotoxin as potent cytotoxic agents, *RSC Advances*, 14(3), pp 1838-1853. <https://doi.org/10.1039/d3ra07396c>
3. Ha Thanh Nguyen, **Ket Tran Van**, Hai Pham-The, Quang-Bao Le, Giang Le-Nhat-Thuy, Tuyet Anh Dang Thi, Phuong Hoang Thi, Quynh Giang Nguyen Thi, Anh Nguyen Tuan, Doan Vu Ngoc, and Tuyen Van Nguyen, 2025, Synthesis, cytotoxicity, apoptosis-inducing activity and molecular docking studies of novel isatin-podophyllotoxin hybrids, *RSC Advances*, 15(4), pp.2825-2839 <https://doi.org/10.1039/d4ra08691k>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mahmoud, Omar, Tunceroglu, Ahmet, Chokshi, Ravi, et al., 2017, Overall survival advantage of chemotherapy and radiotherapy in the perioperative management of large extremity and trunk soft tissue sarcoma; a large database analysis, *Radiotherapy and oncology*, 124(2), 277-284.
2. Akhlaghi, Elham, Lehto, Rebecca H, Torabikhah, Mohsen, et al., 2020, Chemotherapy use and quality of life in cancer patients at the end of life: an integrative review, *Health and Quality of Life Outcomes*, 18(1-9).
3. Biswas, Tanya, Mittal, Ravi K, Sharma, Vikram, et al., 2024, Nitrogen-fused heterocycles: Empowering anticancer drug discovery, *Medicinal Chemistry*, 20(4), 369-384.
4. Jeedimalla, Nagalakshmi, Flint, Madison, Smith, Lyndsay, et al., 2015, Multicomponent assembly of 4-aza-podophyllotoxins: A fast entry to highly selective and potent anti-leukemic agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 106(167-179).
5. Magedov, Igor V, Manpadi, Madhuri, Van Slambrouck, Severine, et al., 2007, Discovery and investigation of antiproliferative and apoptosis-inducing properties of new heterocyclic podophyllotoxin analogues accessible by a one-step multicomponent synthesis, *Journal of medicinal chemistry*, 50(21), 5183-5192.
6. Kamal, Ahmed, Suresh, Paidakula, Mallareddy, Adla, et al., 2011, Synthesis of a new 4-aza-2, 3-didehydropodophyllotoxin analogues as potent cytotoxic and antimitotic agents, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(7), 2349-2358.
7. Botes, MG, Pelly, SC, Blackie, MAL, et al., 2014, Synthesis of 4-azapodophyllotoxins with anticancer activity by multicomponent reactions, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(119-138).
8. Kaur, Manroopraj, Kaur, Amandeep, Mankotia, Suhani, et al., 2017, Synthesis, screening and docking of fused pyrano [3, 2-d] pyrimidine derivatives as xanthine oxidase inhibitor, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 131(14-28).
9. Yousefi, Afsoon, Yousefi, Reza, Panahi, Farhad, et al., 2015, Novel curcumin-based pyrano [2, 3-d] pyrimidine anti-oxidant inhibitors for α -amylase and α -glucosidase: Implications for their pleiotropic effects against diabetes complications, *International journal of biological macromolecules*, 78(46-55).
10. Pellissier, Helene, 2013, Stereocontrolled domino reactions, *Chemical Reviews*, 113(1), 442-524.
11. Patel, Ashish, Patel, Stuti, Mehta, Meshwa, et al., 2022, A review on synthetic investigation for quinoline-recent green approaches, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(2), 337-372.
12. Chu, Xue-Mei, Wang, Cong, Liu, Wen, et al., 2019, Quinoline and quinolone dimers and their biological activities: An overview, *European journal of medicinal chemistry*, 161, 101-117.

13. Bouzian, Younos, Karrouchi, Khalid, Sert, Yusuf, et al., 2020, Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure, DFT, molecular docking and in vitro antibacterial potential of novel quinoline derivatives, *Journal of Molecular Structure*, 1209(127940).
14. Zhang, Gui-Fu, Liu, Xiaofeng, Zhang, Shu, et al., 2018, Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities, *European journal of medicinal chemistry*, 146(599-612).
15. Afzal, Obaid, Kumar, Suresh, Haider, Md Rafi, et al., 2015, A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(871-910).
16. Mancini, Ines, Vigna, Jacopo, Sighel, Denise, et al., 2022, Hybrid molecules containing naphthoquinone and quinolinedione scaffolds as antineoplastic agents, *Molecules*, 27(15), 4948.
17. Pereyra, Carolina Escardó, Dantas, Rafael Ferreira, Ferreira, Sabrina Baptista, et al., 2019, The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones, *Cancer Cell International*, 19(1-20).
18. Kögl, F and Sparenburg, J, 1940, Untersuchungen über Pilzfarbstoffe XIII: Über Phomazarin, den Farbstoff von *Phoma terrestris* Hansen. I, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 59(12), 1180-1197.
19. Rao, Koppaka V and Cullen, Walter P, 1960, E-73: An antitumor substance. Part I. isolation and characterization1, *Journal of the American Chemical Society*, 82(5), 1127-1128.
20. Kudrina, ES, Ol'khovtova, OL, Murav'eva, LI, et al., 1966, Systematic position and variability of the producent of antitumor antibiotic bruneomycin, *Antibiotiki*, 11(5), 400-405.
21. Bringmann, Gerhard, Reichert, Yanina, and Kane, Vinayak V, 2004, The total synthesis of streptonigrin and related antitumor antibiotic natural products, *Tetrahedron*, 60(16), 3539-3574.
22. Balitz, DM, Bush, JA, Bradner, WT, et al., 1982, Isolation of lavendamycin a new antibiotic from *Streptomyces lavendulae*, *The Journal of Antibiotics*, 35(3), 259-265.
23. Herlt, AJ, Rickards, RW, and Wu, J-P, 1985, The structure of streptonigrone, and a comment on the biosynthesis of the streptonigrin antibiotics, *The Journal of Antibiotics*, 38(4), 516-518.
24. Pearce, A Norrie, Chia, Elizabeth W, Berridge, Michael V, et al., 2007, Anti-inflammatory thiazine alkaloids isolated from the New Zealand ascidian *Aplidium* sp.: Inhibitors of the neutrophil respiratory burst in a model of gouty arthritis, *Journal of Natural Products*, 70(6), 936-940.
25. Lam, Cary FC, Pearce, A Norrie, Tan, Shen H, et al., 2013, Discovery and evaluation of thiazinoquinones as anti-protozoal agents, *Marine drugs*, 11(9), 3472-3499.

26. Ciftci, Halil I, Bayrak, Nilüfer, Yıldız, Mahmut, et al., 2021, Design, synthesis and investigation of the mechanism of action underlying anti-leukemic effects of the quinolinequinones as LY83583 analogs, *Bioorganic Chemistry*, 114, 105160.
27. Soonthornchareonnon, Noppamas, Suwanborirux, Khanit, Bavovada, Rapepol, et al., 1999, New cytotoxic 1-azaanthraquinones and 3-aminonaphthoquinone from the stem bark of *Goniothalamus marcanii*, *Journal of natural products*, 62(10), 1390-1394.
28. Thanuphol, Pongpol, Asami, Yukihiro, Shiomi, Kazuro, et al., 2018, Marcanine G, a new cytotoxic 1-azaanthraquinone from the stem bark of *Goniothalamus marcanii* Craib, *Natural product research*, 32(14), 1682-1689.
29. Waterman, Peter G and Muhammad, Ilias, 1985, Sesquiterpenes and alkaloids from *Cleistopholis patens*, *Phytochemistry*, 24(3), 523-527.
30. Noraziah Nordin, Noraziah Nordin, Nazia Abdul Majid, Nazia Abdul Majid, Syam Mohan, Syam Mohan, et al., 2016, Cleistopholine isolated from *Enicosanthellum pulchrum* exhibits apoptogenic properties in human ovarian cancer cells.
31. Lago, João Henrique G, Chaves, Mariana H, Ayres, Mariane Cruz C, et al., 2007, Evaluation of antifungal and DNA-damaging activities of alkaloids from branches of *Porcelia macrocarpa*, *Planta medica*, 73(03), 292-295.
32. Yuan, Jiaqi, He, Qian, Song, Shanshan, et al., 2019, One pot and metal-free approach to 3-(2-hydroxybenzoyl)-1-aza-anthraquinones, *Molecules*, 24(16), 3017.
33. Tietze, LF, 1995, Domino reactions in organic synthesis, *Chemistry and industry*(12), 453-457.
34. Wu, Liqiang, Yang, Limin, Yan, Fulin, et al., 2010, Molecular iodine: A versatile catalyst for the synthesis of 4-aryl-3-methyl-1-phenyl-1H-benzo [H] pyrazolo [3, 4-b] quinoline-5, 10-diones in water, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(4), 1051-1054.
35. Bala, Balasubramanian Devi, Balamurugan, Kamaraj, and Perumal, Subbu, 2011, Facile, four-component, domino reactions for the regioselective synthesis of tetrahydrobenzo [g] quinolines, *Tetrahedron letters*, 52(35), 4562-4566.
36. Lin, Jialing, Chen, Jiameng, Ji, Hongfu, et al., 2017, Synthesis of Tetrahydrobenzo [g] Quinoline Derivatives Using Recoverable Carbonaceous Material as Heterogeneous Catalyst, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 54(3), 2022-2028.
37. Nampally, Umarani, Banoji, Venkateswarlu, and Anisetti, Ravindernath, 2023, Efficient Synthesis of Substituted Aza-Anthraquinones via Michael Addition–Elimination and Intramolecular Cyclization Reactions under Mild Conditions and Their Fluorescent Properties, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 43(4), 3557-3567.

38. Chernysheva, Natalia B, Tsyganov, Dmitry V, Philchenkov, Alex A, et al., 2012, Synthesis and comparative evaluation of 4-oxa-and 4-azapodophyllotoxins as antiproliferative microtubule destabilizing agents, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(7), 2590-2593.
39. Hatti, Islavathu, Sreenivasulu, Reddymasu, Jadav, Surender Singh, et al., 2015, Synthesis, cytotoxic activity and docking studies of new 4-azapodophyllotoxin derivatives, *Medicinal Chemistry Research*, 24(3305-3313).
40. Kumar, A, Kumar, V, E Alegria, A, et al., 2011, Synthetic and application perspectives of azapodophyllotoxins: alternative scaffolds of podophyllotoxin, *Current medicinal chemistry*, 18(25), 3853-3870.
41. Tratrat, Christophe, Giorgi-Renault, Sylviane, and Husson, Henri-Philippe, 2002, A multicomponent reaction for the one-pot synthesis of 4-aza-2, 3-didehydropodophyllotoxin and derivatives, *Organic Letters*, 4(19), 3187-3189.
42. Frackenhohl, Jens, Adelt, Isabelle, Antonicek, Horst, et al., 2009, Insecticidal heterolignans—Tubuline polymerization inhibitors with activity against chewing pests, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4160-4184.
43. Wang, Xing-Han, Hao, Wen-Juan, Tu, Shu-Jiang, et al., 2009, Microwave-assisted multicomponent reaction for the synthesis of new and significative bisfunctional compounds containing two furo [3, 4-b] quinoline and acridinedione skeletons, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 46(4), 742-747.
44. Shi, Feng, Zeng, Xiao-Ning, Zhang, Ge, et al., 2011, Facile synthesis of new 4-aza-podophyllotoxin analogs via microwave-assisted multi-component reactions and evaluation of their cytotoxic activity, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(23), 7119-7123.
45. Thi, Quynh Giang Nguyen, Le-Nhat-Thuy, Giang, Thi, Tuyet Anh Dang, et al., 2021, Synthesis of novel potent cytotoxicity podophyllotoxin-naphthoquinone compounds via microwave-assited multicomponent domino reactions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 37(127841).
46. Yang, Xiaojuan, Zhang, Chong, and Wu, Liqiang, 2015, l-Proline catalyzed three-component synthesis of para-naphthoquinone-4-aza-podophyllotoxin hybrids as potent antitumor agents, *RSC Advances*, 5(24), 18945-18951.
47. Pooja, G Sathya and Banupriya, S, 2024, Pyranopyrimidine: A promising scaffold with various biological activities, *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(1), 67-70.
48. Mohamadpour, Farzaneh, 2022, Catalyst-Free Three-Component Tandem Green Synthesis of Pyrano [2, 3-d] Pyrimidine Scaffolds in Ethylene Glycol (EG) as a Recyclable Reaction Medium, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 42(6), 3008-3018.
49. Sadeghi, B, Bouslik, M, Shishehbore, et al., 2015, Nano-sawdust-OSO 3 H as a new, cheap and effective nanocatalyst for one-pot synthesis of pyrano [2, 3-d] pyrimidines, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 12(1801-1808).

50. Sabour, Behrouz, Peyrovi, Mohammah Hassan, and Hajimohammadi, Mahdi, 2015, Al-HMS-20 catalyzed synthesis of pyrano [2, 3-d] pyrimidines and pyrido [2, 3-d] pyrimidines via three-component reaction, *Research on Chemical Intermediates*, 41(1343-1350).
51. Azarifar, Davood, Nejat-Yami, Razieh, Sameri, Fatemeh, et al., 2012, Ultrasonic-promoted one-pot synthesis of 4H-chromenes, pyrano [2, 3-d] pyrimidines, and 4H-pyrano [2, 3-c] pyrazoles, *Letters in Organic Chemistry*, 9(6), 435-439.
52. El-Khateeb, Ayman Y, Hamed, Sahar E, and Elattar, Khaled M, 2022, Recent advancements in the multicomponent synthesis of heterocycles integrated with a pyrano [2, 3-d] pyrimidine core, *RSC advances*, 12(19), 11808-11842.
53. Oftadeha, Tayebbeh, Sadeghi, Bahareh, and Zavarb, Saleheh, 2020, Synthesis and characterization of SbCl₅/nano-sawdust as a novel nano catalyst for synthesis of pyrano [2, 3-d] pyrimidines, *IranJOC*, 12(2), 2831-2837.
54. Abd-Elaziz, Arwa M, Aly, Hala M, Saleh, Nashwa M, et al., 2022, Synthesis and characterization of the novel pyrimidine's derivatives, as a promising tool for antimicrobial agent and in-vitro cytotoxicity, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 1-18.
55. Arulvani, K, Venkateswaramoorthi, R, Gunavathi, S, et al., 2023, Synthesis, crystal structure, Hirshfeld surface, biological evaluation, DFT and molecular docking studies of unsymmetrical 3-allyl-5-ethyl-1, 4-dihydro-2, 6-dimethyl-4-phenyl pyridine-3, 5-dicarboxylate derivatives, *Molecular Physics*, 121(6), e2200845.
56. Hasaninezhad, Fatemeh, Tavaf, Zohreh, Panahi, Farhad, et al., 2020, The assessment of antidiabetic properties of novel synthetic curcumin analogues: α -amylase and α -glucosidase as the target enzymes, *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19(1505-1515).
57. Poola, Sreelakshmi, Shaik, Mahammad S, Sudileti, Murali, et al., 2020, Nano CuO–Ag-catalyzed synthesis of some novel pyrano [2, 3-d] pyrimidine derivatives and evaluation of their bioactivity, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 67(5), 805-820.
58. Kijewska, Monika, Sharfalddin, Abeer A, Jaremko, Łukasz, et al., 2021, Lossen rearrangement of p-toluenesulfonates of N-oxyimides in basic condition, theoretical study, and molecular docking, *Frontiers in Chemistry*, 9(662533).
59. Smith, BJ and Liu, R, 1999, A theoretical investigation of indole tautomers, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 491(1-3), 211-222.
60. Mo, Xingyou, Rao, Devendra Pratap, Kaur, Kirandeep, et al., 2024, Indole derivatives: a versatile scaffold in modern drug discovery—an updated review on their multifaceted therapeutic applications (2020–2024), *Molecules*, 29(19), 4770.
61. Organization, World Health (2010), *WHO Report on Neglected Tropical Diseases*, WHO.

62. Kakkar, Rita, 2019, Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications, *MedChemComm*, 10(3), 351-368.
63. Esmaeelian, Babak, Abbott, Catherine A, Le Leu, Richard K, et al., 2013, 6-bromoisatin found in muricid mollusc extracts inhibits colon cancer cell proliferation and induces apoptosis, preventing early stage tumor formation in a colorectal cancer rodent model, *Marine Drugs*, 12(1), 17-35.
64. Kumar, Gajendra, Singh, Netra Pal, and Kumar, Kaushal, 2021, Recent advancement of synthesis of isatins as a versatile pharmacophore: A review, *Drug Research*, 71(03), 115-121.
65. Gandhi, Priyanka V, Burande, Shubham R, Charde, Manoj S, et al., 2021, A review on isatin and its derivatives: synthesis, reactions and applications, *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(04), 1-11.
66. Guo, Hua, 2019, Isatin derivatives and their anti-bacterial activities, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164(678-688).
67. Kumar, Sunil, Nair, Aathira Sujathan, Abdelgawad, Mohamed A, et al., 2022, Exploration of the detailed structure–activity relationships of isatin and their isomers as monoamine oxidase inhibitors, *ACS omega*, 7(19), 16244-16259.
68. Medvedev, A, Buneeva, O, Gnedenko, O, et al., 2006, Isatin interaction with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative target of neuroprotective drugs: partial agonism with deprenyl, *Oxidative Stress and Neuroprotection*, 97-103.
69. Andreani, Aldo, Burnelli, Silvia, Granaiola, Massimiliano, et al., 2010, New isatin derivatives with antioxidant activity, *European journal of medicinal chemistry*, 45(4), 1374-1378.
70. Sharma, Pramod K, Balwani, Sakshi, Mathur, Divya, et al., 2016, Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of novel triazolyl-isatin hybrids, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1520-1526.
71. Prakash, Chinnasamy Rajaram, Raja, Sundararajan, and Saravanan, Govindaraj, 2012, Design and synthesis of 4-(1-(4-chlorobenzyl)-2, 3-dioxindolin-5-yl)-1-(4-substituted/unsubstituted benzylidene) semicarbazide: Novel agents with analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic properties, *Chinese Chemical Letters*, 23(5), 541-544.
72. Roskoski Jr, Robert, 2007, Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor, *Biochemical and biophysical research communications*, 356(2), 323-328.
73. Ferraz de Paiva, Raphael Enoque, Vieira, Eduardo Guimarães, Rodrigues da Silva, Daniel, et al., 2021, Anticancer compounds based on isatin-derivatives: Strategies to ameliorate selectivity and efficiency, *Frontiers in molecular biosciences*, 7(627272).
74. Kumar, Vijay, Singh, Madhur Babu, Singh, Prashant, et al., 2024, Isatin based 1, 2, 3-triazole derivatives as antimicrobial agents: Synthesis, in silico docking

- and molecular dynamics simulations, *Journal of Molecular Structure*, 1312(138378).
75. Ansari, Jawaher, Fatima, Arfeen, Fernando, Kieran, et al., 2010, Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: Birmingham experience, *Oncology reports*, 24(2), 507-510.
 76. Kumar, Vijay, Parveen, Rabea, and Ahmad, Sayeed (2023), "Pharmacokinetics of nanomedicine", *Nanotechnology Principles in Drug Targeting and Diagnosis*, Elsevier, pp. 127-142.
 77. Santiago, João Victor and Burtoloso, Antonio CB, 2019, Synthesis of Fused Bicyclic [1, 2, 3]-Triazoles from γ -Amino Diazoketones, *ACS omega*, 4(1), 159-168.
 78. Da Forezi, LSM, Lima, CGS, and Amaral, AAP, 2021, de C. da Silva, F.; Ferreira, VF Bioactive 1, 2, 3-Triazoles: An Account on their Synthesis, Structural Diversity and Biological Applications, *Chem. Rec*, 21(2782-2807).
 79. Chen, Zili, Jiang, Yu, Xu, Chen, et al., 2022, Oleanane-type triterpene conjugates with 1 H-1, 2, 3-triazole possessing of fungicidal activity, *Molecules*, 27(15), 4928.
 80. Kumar, Aman, Lal, Kashmiri, Poonia, Nisha, et al., 2022, Synthesis, antimicrobial evaluation and docking studies of fluorinated imine linked 1, 2, 3-triazoles, *Research on Chemical Intermediates*, 48(7), 2933-2948.
 81. Kumar, Lokesh, Lal, Kashmiri, Kumar, Aman, et al., 2021, Synthesis, antimicrobial evaluation and docking studies of oxazolone-1, 2, 3-triazole-amide hybrids, *Research on Chemical Intermediates*, 47(5079-5097).
 82. Nagarsenkar, Atulya, Guntuku, Lalita, Guggilapu, Sravanthi Devi, et al., 2016, Synthesis and apoptosis inducing studies of triazole linked 3-benzylidene isatin derivatives, *European journal of medicinal chemistry*, 124(782-793).
 83. Singh, Harbinder, Singh, Jatinder V, Gupta, Manish K, et al., 2017, Triazole tethered isatin-coumarin based molecular hybrids as novel antitubulin agents: Design, synthesis, biological investigation and docking studies, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(17), 3974-3979.
 84. Kumar, Sumit, Saha, Sourav Taru, Gu, Liang, et al., 2018, 1 H-1, 2, 3-Triazole Tethered Nitroimidazole–Isatin Conjugates: Synthesis, Docking, and Anti-Proliferative Evaluation against Breast Cancer, *ACS omega*, 3(9), 12106-12113.
 85. Naz, Farha, Anjum, Farah, Islam, Asimul, et al., 2013, Microtubule affinity-regulating kinase 4: structure, function, and regulation, *Cell biochemistry and biophysics*, 67(485-499).
 86. Drewes, Gerard, Ebneith, Andreas, Preuss, Ute, et al., 1997, MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption, *Cell*, 89(2), 297-308.
 87. Aneja, Babita, Khan, Nashrah Sharif, Khan, Parvez, et al., 2019, Design and development of Isatin-triazole hydrazones as potential inhibitors of

- microtubule affinity-regulating kinase 4 for the therapeutic management of cell proliferation and metastasis, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163(840-852).
88. Alam, Mohammad Mahboob, 2022, 1, 2, 3-Triazole hybrids as anticancer agents: A review, *Archiv der Pharmazie*, 355(1), 2100158.
 89. Umer, Syed Muhammad, Solangi, Mehwish, Khan, Khalid Mohammed, et al., 2022, Indole-containing natural products 2019–2022: isolations, reappraisals, syntheses, and biological activities, *Molecules*, 27(21), 7586.
 90. Mahmoud, Esraa, Hayallah, Alaa M, Kovacic, Suzana, et al., 2022, Recent progress in biologically active indole hybrids: A mini review, *Pharmacological Reports*, 74(4), 570-582.
 91. Ismael, Sarah S, Waheed, Noor Ahmed M, Kasim, Seema Mahmood, et al., 2023, Novel coumarin-indole hybrids as cytotoxic candidates: synthesis and antiproliferative activity, *Pharmacognosy Journal*, 15(6).
 92. Moss, GP, 1999, Extension and revision of the nomenclature for spiro compounds, *Pure and applied chemistry*, 71(3), 531-558.
 93. Hellwich, Karl-Heinz, 2002, Erweiterung und Revision der Nomenklatur der Spiroverbindungen, *Angewandte Chemie*, 114(20), 4073-4089.
 94. Ahmed, Muhammad Bilal, Alghamdi, Abdullah AA, Islam, Salman Ul, et al., 2022, cAMP signaling in cancer: a PKA-CREB and EPAC-centric approach, *Cells*, 11(13), 2020.
 95. Stratakis, CA, 2012, Cyclic AMP, protein kinase A, and phosphodiesterases: Proceedings of an international workshop, *Hormone and metabolic research*, 44(10), 713-715.
 96. Altowyan, Mezna Saleh, Soliman, Saied M, Haukka, Matti, et al., 2022, Synthesis, characterization, and cytotoxicity of new spirooxindoles engrafted furan structural motif as a potential anticancer agent, *ACS omega*, 7(40), 35743-35754.
 97. Al-Rashood, Sara T, Hamed, Ahmed R, Hassan, Ghada S, et al., 2020, Antitumor properties of certain spirooxindoles towards hepatocellular carcinoma endowed with antioxidant activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 831-839.
 98. Eldehna, Wagdy M, El-Naggar, Dina H, Hamed, Ahmed R, et al., 2018, One-pot three-component synthesis of novel spirooxindoles with potential cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 33(1), 309-318.
 99. Fayed, Eman A, Eldin, Rogy R Ezz, Mehany, Ahmed BM, et al., 2021, Isatin-Schiff's base and chalcone hybrids as chemically apoptotic inducers and EGFR inhibitors; design, synthesis, anti-proliferative activities and in silico evaluation, *Journal of Molecular Structure*, 1234(130159).
 100. Kumar, Raju Suresh, Almansour, Abdulrahman I, Arumugam, Natarajan, et al., 2019, Spirooxindole-pyrrolidine heterocyclic hybrids promotes apoptosis

- through activation of caspase-3, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(12), 2487-2498.
101. Rajaraman, D, Anthony, L Athishu, Sundararajan, G, et al., 2022, Synthesis, NMR, anti-oxidant, anti-cancer activity, Molecular docking, DFT Calculations and in silico ADME analysis of 3'-benzoyl-4'-phenyl-5'-(piperazin-1-ylmethyl) spiro [indoline-3, 2'-pyrrolidin]-2-one derivatives, *Journal of Molecular Structure*, 1267(133551).
 102. Islam, Mohammad Shahidul, Ghawas, Hussien Mansur, El-Senduny, Fardous F, et al., 2019, Synthesis of new thiazolo-pyrrolidine–(spirooxindole) tethered to 3-acylindole as anticancer agents, *Bioorganic chemistry*, 82(423-430).
 103. Kumar, M Rajesh, Manikandan, A, Sivakumar, A, et al., 2018, An eco-friendly catalytic system for multicomponent, one-pot synthesis of novel spirochromeno indoline-triones and their anti-prostate cancer potentials evaluated via alkaline phosphatase inhibition mechanism, *Bioorganic chemistry*, 81(44-54).
 104. Gobinath, Perumal, Packialakshmi, Ponnusamy, Daoud, Ali, et al., 2020, Grindstone Chemistry: Design, One-Pot Synthesis, and Promising Anticancer Activity of Spiro [acridine-9, 2'-indoline]-1, 3, 8-trione Derivatives against the MCF-7 Cancer Cell Line, *Molecules*, 25(24), 5862.
 105. Zuin, Vânia G, Eilks, Ingo, Elschami, Myriam, et al., 2021, Education in green chemistry and in sustainable chemistry: perspectives towards sustainability, *Green Chemistry*, 23(4), 1594-1608.
 106. Kharissova, Oxana V, Kharisov, Boris I, Oliva González, César Máximo, et al., 2019, Greener synthesis of chemical compounds and materials, *Royal Society open science*, 6(11), 191378.
 107. Pokhrel, Nimesh, Vabbina, Phani Kiran, and Pala, Nezih, 2016, Sonochemistry: science and engineering, *Ultrasonics sonochemistry*, 29(104-128).
 108. Kadam, Abhijit, Jangam, Sampada, and Oswal, Rajesh, 2011, Application of green chemistry principle in synthesis of phenytoin and its biological evaluation as anticonvulsant agents, *Journal of Chemistry*, 8(S47-S52).
 109. Cravotto, Giancarlo and Cintas, Pedro, 2006, Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications, *Chemical Society Reviews*, 35(2), 180-196.
 110. Flannigan, David J and Suslick, Kenneth S, 2010, Inertially confined plasma in an imploding bubble, *Nature Physics*, 6(8), 598-601.
 111. Suslick, Kenneth S, Eddingsaas, Nathan C, Flannigan, David J, et al., 2018, The chemical history of a bubble, *Accounts of chemical research*, 51(9), 2169-2178.
 112. Katre, Sangita Dayanand, 2024, Microwaves in Organic Synthetic Chemistry- A Greener Approach to Environmental Protection: An Overview.

113. Fardood, Saeid Taghavi, Hosseinzadeh, Zahra, and Ramazani, Ali, 2024, Synthesis of 3, 4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-ones Using a Hydrogel as a Green and Reusable Catalyst.
114. Mosmann, Tim, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
115. Scudiero, Dominic A, Shoemaker, Robert H, Paull, Kenneth D, et al., 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer research*, 48(17), 4827-4833.
116. Jorgensen, James H and Turnidge, John D, 2015, Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, *Manual of clinical microbiology*, 1253-1273.
117. Malacrida, Alessio, Cavalloro, Valeria, Martino, Emanuela, et al., 2019, Anti-multiple myeloma potential of secondary metabolites from hibiscus sabdariffa, *Molecules*, 24(13), 2500.
118. Chen, Haimin, Yan, Xiaojun, Lin, Wei, et al., 2004, A new method for screening α -glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms, *Pharmaceutical biology*, 42(6), 416-421.
119. Ellman, George L, Courtney, K Diane, Andres Jr, Valentino, et al., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
120. You, Youngjae, 2005, Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents, *Current pharmaceutical design*, 11(13), 1695-1717.
121. Beers, Scott A, Imakura, Yasuhiro, Dai, Hua-Juan, et al., 1988, Antitumor agents, 99. Synthetic ring C aromatized podophyllotoxin analogues as potential inhibitors of human DNA topoisomerase II, *Journal of Natural products*, 51(5), 901-905.
122. Shah, Zinnia, Gohar, Umar Farooq, Jamshed, Iffat, et al., 2021, Podophyllotoxin: history, recent advances and future prospects, *Biomolecules*, 11(4), 603.
123. Wang, Hg (2010), *Comprehensive Organic Name Reactions*, Vol. 2, Wiley New York, NY, USA:.
124. Tri, Nguyen Minh, Toan, Vu Ngoc, Linh, Hoang Mai, et al., 2021, Reaction of Some Substituted (Un) Substituted Isatins with 1, ω -Alkanes and Their Products with Sodium Azide, *Chemistry Proceedings*, 8(1), 11.
125. Garden, Simon J, Torres, José C, da Silva, Leonardo E, et al., 1998, A convenient methodology for the N-alkylation of isatin compounds, *Synthetic Communications*, 28(9), 1679-1689.
126. Shaikh, Mubarak H, Subhedar, Dnyaneshwar D, Khan, Firoz A Kalam, et al., 2017, Synthesis of novel triazole-incorporated isatin derivatives as antifungal,

- antitubercular, and antioxidant agents and molecular docking study, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 54(1), 413-421.
127. Rambabu, D, Kumar, S Kiran, Sreenivas, B Yogi, et al., 2013, Ultrasound-based approach to spiro-2, 3-dihydroquinazolin-4 (1H)-ones: their in vitro evaluation against chorismate mutase, *Tetrahedron Letters*, 54(6), 495-501.
 128. Kahar, Nilesh, Jadhav, Pankaj, Reddy, RV Ramana, et al., 2020, A rhodium (ii) catalysed domino synthesis of azepino fused diindoles from isatin tethered N-sulfonyl-1, 2, 3-triazoles and indoles, *Chemical Communications*, 56(8), 1207-1210.
 129. Morais, Tânia S, 2024, Recent Advances in the Development of Hybrid Drugs, *Pharmaceutics*, 16(7), 889.
 130. Jia, Huihui, Feng, Huangdi, and Sun, Zhihua, 2015, Multicomponent domino reactions of hydrazinecarbodithioates: concise access to 3-substituted 5-thiol-1, 3, 4-thiadiazolines, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(30), 8177-8181.
 131. Mani, Suresh, Raju, Rajesh, Raghunathan, Raghavacharry, et al., 2022, Environmentally friendly domino multicomponent strategy for the synthesis of pyrroloquinolinone hybrid heterocycles, *RSC advances*, 12(24), 15440-15446.
 132. Hajare, Anil K, Jagdale, Arun R, Shenoy, G Gautham, et al., 2016, The p-toluenesulfonic acid catalyzed single pot synthesis of tetracyclic 1, 2-dihydroquinolines: a metal free approach, *New Journal of Chemistry*, 40(6), 4888-4890.
 133. Thorat, Bapu R, Mali, Suraj N, Wavhal, Swati S, et al., 2023, L-Proline: A versatile organo-catalyst in organic chemistry, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 26(6), 1108-1140.
 134. Olivero, Ofelia A, Tejera, Agueda M, Fernandez, Juan J, et al., 2005, Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells, *Mutagenesis*, 20(2), 139-146.
 135. Humer, Johannes, Ferko, Boris, Waltenberger, Andrea, et al., 2008, Azidothymidine inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo, *Melanoma Research*, 18(5), 314-321.
 136. Fang, Jia-Long and Beland, Frederick A, 2009, Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes, *Toxicological Sciences*, 111(1), 120-130.
 137. Enomoto, Laura, Anderson, Peter L, Li, Shaobing, et al., 2011, Effect of nucleoside and nucleotide analog reverse transcriptase inhibitors on cell-mediated immune functions, *AIDS research and human retroviruses*, 27(1), 47-55.
 138. Santos, Cledir, Morais, José, Gouveia, Luís, et al., 2008, Dipeptide derivatives of AZT: synthesis, chemical stability, activation in human plasma, hPEPT1

- affinity, and antiviral activity, *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 3(6), 970-978.
139. Giang, Le Nhat Thuy, Nga, Nguyen Thi, Van, Dinh Thuy, et al., 2018, Design, Synthesis and Cytotoxic Evaluation of 4-Anilinoquinazoline–triazole–AZT Hybrids as Anticancer Agents, *Natural Product Communications*, 13(12), 1934578X1801301215.
 140. Berrino, Emanuela, Angeli, Andrea, Zhdanov, Dmitry D, et al., 2020, Azidothymidine “Clicked” into 1, 2, 3-triazoles: first report on carbonic anhydrase–telomerase dual-hybrid inhibitors, *Journal of medicinal chemistry*, 63(13), 7392-7409.
 141. Rostovtsev, Vsevolod V, Green, Luke G, Fokin, Valery V, et al., 2002, A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes, *Angewandte Chemie*, 114(14), 2708-2711.
 142. Hirte, H, Oza, A, Swenerton, K, et al., 2010, A phase II study of erlotinib (OSI-774) given in combination with carboplatin in patients with recurrent epithelial ovarian cancer (NCIC CTG IND. 149), *Gynecologic oncology*, 118(3), 308-312.
 143. Mao, Long-fei, Wang, Zhen-Zhen, Wu, Qiong, et al., 2022, Design, synthesis, and antitumor activity of erlotinib derivatives, *Frontiers in Pharmacology*, 13(849364).
 144. Thomas, Fabienne, Rochaix, Philippe, White-Koning, Melanie, et al., 2009, Population pharmacokinetics of erlotinib and its pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships in head and neck squamous cell carcinoma, *European Journal of Cancer*, 45(13), 2316-2323.
 145. Whitley, AC, Jackson, J, Trummell, H, et al., 2012, Erlotinib Induces Synthetic Lethality with the Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor ABT-888 in Esophageal Cancer, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 84(3), S165-S166.
 146. Sutter, Andreas P, Höpfner, Michael, Huether, Alexander, et al., 2006, Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva™) for the treatment of esophageal cancer, *International journal of cancer*, 118(7), 1814-1822.
 147. Mao, Longfei, Sun, Ge, Zhao, Jie, et al., 2020, Design, synthesis and antitumor activity of icotinib derivatives, *Bioorganic Chemistry*, 105(104421).
 148. Dwivedi, Pratibha, Mishra, Kunj B, Mishra, Bhuwan B, et al., 2015, Click inspired synthesis of antileishmanial triazolyl O-benzylquercetin glycoconjugates, *Glycoconjugate Journal*, 32(127-140).
 149. Maddila, Suresh, Nagaraju, Kerru, and Jonnalagadda, Sreekantha B, 2020, Synthesis and antimicrobial evaluation of novel pyrano [2, 3-d]-pyrimidine bearing 1, 2, 3-triazoles, *Chemical Data Collections*, 28(100486).

150. El-Agrody, Ahmed M, Fouda, Ahmed M, and Al-Dies, Al-Anood M, 2014, Studies on the synthesis, in vitro antitumor activity of 4 H-benzo [h] chromene, 7 H-benzo [h] chromene [2, 3-d] pyrimidine derivatives and structure–activity relationships of the 2-, 3-and 2, 3-positions, *Medicinal Chemistry Research*, 23(3187-3199).
151. Thanh, Nguyen Ha, Giang, Nguyen Thi Quynh, Ha, Nguyen Van, et al., 2023, Synthesis and evaluation of acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities of pyrano [2, 3-d] pyrimidines, *Natural Product Communications*, 18(9), 1934578X231201037.
152. Taha, Muhammad, Imran, Syahrul, Salahuddin, Mohammed, et al., 2021, Evaluation and docking of indole sulfonamide as a potent inhibitor of α -glucosidase enzyme in streptozotocin–induced diabetic albino wistar rats, *Bioorganic chemistry*, 110(104808).
153. Jackson, Jeffrey R, Patrick, Denis R, Dar, Mohammed M, et al., 2007, Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?, *Nature Reviews Cancer*, 7(2), 107-117.
154. Thanh, Nguyen Ha, Thu Ha, Nguyen Thi, Tra, Nguyen Thanh, et al., 2021, Bannaxanthone E induced cell-cycle arrest and apoptosis in human lung cancer cell line, *Natural Product Communications*, 16(11), 1934578X211059010.
155. Fadok, Valerie A, Bratton, Donna L, Frasch, S Courtney, et al., 1998, The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes, *Cell Death & Differentiation*, 5(7), 551-562.
156. Andree, HA, Reutelingsperger, CP, Hauptmann, Rudolf, et al., 1990, Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers, *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 4923-4928.
157. Krall, Wanda J, Sramek, John J, and Cutler, Neal R, 1999, Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease, *Annals of Pharmacotherapy*, 33(4), 441-450.
158. Rath, Soumya Lipsa and Senapati, Sanjib, 2013, Molecular basis of differential selectivity of cyclobutyl-substituted imidazole inhibitors against CDKs: insights for rational drug design, *PloS one*, 8(9), e73836.
159. Nigg, Erich A, 1995, Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle, *Bioessays*, 17(6), 471-480.
160. Jeffrey, Philip D, Russo, Alicia A, Polyak, Kornelia, et al., 1995, Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex, *Nature*, 376(6538), 313-320.
161. Mapelli, Marina, Massimiliano, Lucia, Crovace, Claudia, et al., 2005, Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors, *Journal of medicinal chemistry*, 48(3), 671-679.

162. Velázquez-Delgado, Elih M and Hardy, Jeanne A, 2013, Zinc-mediated allosteric inhibition of caspase-6, *The Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11508.
163. Nguyen, Ha Thanh, Thi, Quynh Giang Nguyen, Thi, Thu Ha Nguyen, et al., 2022, Synthesis and biological activity, and molecular modelling studies of potent cytotoxic podophyllotoxin-naphthoquinone compounds, *RSC advances*, 12(34), 22004-22019.
164. De Vivo, Marco, Bottegoni, Giovanni, Berteotti, Anna, et al., 2011, Cyclin-dependent kinases: bridging their structure and function through computations, *Future medicinal chemistry*, 3(12), 1551-1559.
165. Dung, Do TM, Park, Eun J, Anh, Duong Tien, et al., 2022, Design, Synthesis and Evaluation of Novel (E)-N'-((1-(4-chlorobenzyl)-1H-indol-3-yl)methylene)-2-(4-oxoquinazolin-3 (4H)-yl) acetohydrazides as Antitumor Agents, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 22(14), 2586-2598.
166. Huan, Le Cong, Anh, Duong Tien, Truong, Bui Xuan, et al., 2020, New Acetohydrazides Incorporating 2-Oxoindoline and 4-Oxoquinazoline: Synthesis and Evaluation of Cytotoxicity and Caspase Activation Activity, *Chemistry & Biodiversity*, 17(3), e1900670.
167. Fu, Li, Shi, Shaohua, Yi, Jiakai, et al., 2024, ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support, *Nucleic Acids Research*, gkae236.
168. Barigye, Stephen J, 2017, A simple method to predict blood–brain barrier permeability of drug-like compounds using classification trees, *Med. Chem*, 13, 1-6.
169. Loike, John D and Horwitz, Susan B, 1976, Effects of podophyllotoxin and VP-16-213 on microtubule assembly in vitro and nucleoside transport in HeLa cells, *Biochemistry*, 15(25), 5435-5443.
170. Pham-The, Hai, Cabrera-Perez, Miguel A, Nam, Nguyen-Hai, et al., 2018, In silico assessment of ADME properties: advances in Caco-2 cell monolayer permeability modeling, *Current topics in medicinal chemistry*, 18(26), 2209-2229.

