



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032137

(51)⁷ C07D 209/00; A61K 31/00

(13) B

(21) 1-2019-05968

(22) 28/10/2019

(45) 25/06/2022 411

(43) 25/12/2019 381A

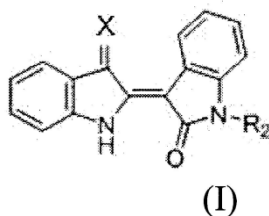
(73) Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1H, 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lưu Văn Chính (VN); Vũ Tiến Chính (VN); Nguyễn Mạnh Cường (VN); Trương Ngọc Hùng (VN); Vũ Thị Hà (VN).

(54) HỢP CHẤT INDIRUBIN VÀ PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP HỢP CHẤT NÀY

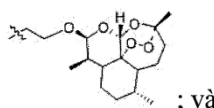
(57) Sáng chế đề xuất dẫn xuất của indirubin, hợp chất được phân lập và tổng hợp từ lá của cây chàm mèo *strobilanthes cusia*, và phương pháp tổng hợp các hợp chất này. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I) và phương pháp tổng hợp các hợp chất này:



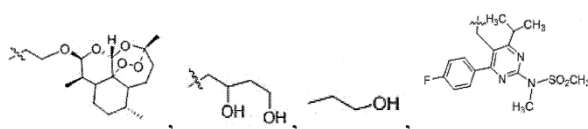
trong đó:

X là O hoặc N-OR₁, và trong đó R₁ được chọn từ H,

trong đó:



R₂ được chọn từ H,



Các hợp chất theo sáng chế có hoạt tính gây độc tế bào đối với bốn dòng tế bào như ung thư phổi ở người (Human lung carcinoma, LU), ung thư biểu mô vú (Human breast adenocarcinoma, MCF7), ung thư gan ở người (Human hepatocellular carcinoma, HepG2) và ung thư cổ tử cung ở người (Human cervix carcinoma, Hela). Ngoài ra, một số hợp chất này còn có khả năng chống đông máu hoặc chống tập kết tiểu cầu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

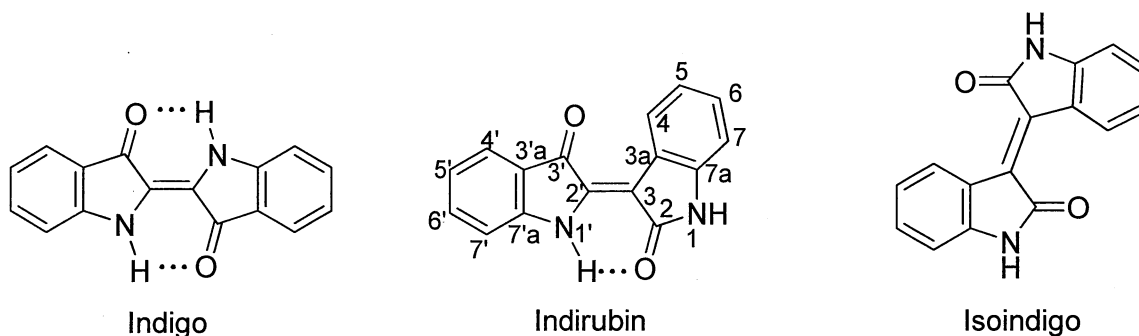
Sáng chế liên quan đến lĩnh vực tổng hợp hữu cơ và tìm kiếm các hợp chất có phổ hoạt tính rộng có nguồn gốc từ thiên nhiên. Cụ thể hơn sáng chế xuất các dẫn xuất của indirubin, là hợp chất được phân lập và tổng hợp từ lá của cây chàm mèo *strobilanthes cusia*, có hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính chống đông máu và phương pháp tổng hợp các dẫn xuất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư là một trong những căn bệnh nguy hiểm, gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới cũng như tại Việt Nam. Thống kê cho thấy mỗi năm ở Việt Nam có thêm ít nhất 150.000 trường hợp mắc ung thư mới, đứng đầu là ung thư trực tràng, dạ dày, tiền liệt tuyến và phổi ở nam giới và ung thư vú, ung thư cổ tử cung, trực tràng và thực quản ở nữ giới. Việc tìm kiếm các phương thuốc mới để phòng và điều trị bệnh ung thư trên thế giới cũng như tại Việt Nam đang được đẩy mạnh, trong đó việc phát hiện các dược chất mới có nguồn gốc từ thiên nhiên đang là một nghiên cứu đầy tiềm năng.

Các hợp chất khung indol luôn thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học do các hợp chất chứa khung này luôn hiện diện nhiều trong cơ thể sống với những vai trò sinh học quan trọng (serotonin, tryptophan). Nhiều hợp chất dùng để điều trị các bệnh khác nhau cũng chứa khung indol, như các hợp chất chống ung thư viblastin, vincristine, cediranib, thuốc tăng cường miễn dịch oglufanide, thuốc chống virus arbidol hay thuốc chẹn thụ thể beta bucindol. Trong thực vật, động vật, các hợp chất khung indol được sinh ra từ chorismate qua nhiều bước để tạo thành khung indol và chuyển hóa thành nhiều các hợp chất quý mang khung này (xem, *Q.Ma, X. Zhang, Y. Qu (2018). "Biotransformation of indole advances and perspectives", Frontier in Microbiology, 9, articles 2625*).

Một trong những hợp chất khung indol đang thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu là indirubin. Hợp chất này có thể tìm thấy ở một số loài thực vật họ chàm hoặc các nhuyễn thể thuộc họ ốc biển (Muricidae). Cùng với indigo, isoindigo chúng là những đồng phân vị trí nhóm chức của nhau với cấu trúc sau:



Mặc dù các chất này có cùng công thức phân tử và dạng cấu tạo bisindol, nhưng do sự khác nhau cả về không gian và vị trí các nhóm thế xung quanh nối đôi thuộc cả hai

vòng nên chúng có những tính chất khác nhau mà dễ nhận nhất là màu sắc. Về cấu trúc phân tử, indigo có cấu trúc đối xứng và phân tử của nó bị khóa chặt bởi hai liên kết hydro của nhóm C=O vị trí 2 và N1'-H cũng như liên kết hydro N1-H và C=O vị trí 3. Ở indirubin chỉ tồn tại một liên kết hydro N1'-H và C=O ở vị trí 2, đặc biệt hai mặt phẳng chứa khung indol bị lệch nhau 4° do sức căng lập thể. Ngoài ra, ở dạng tinh thể, cũng đã phát hiện ra dạng liên kết hydro liên phân tử, đây là nguyên nhân chính khiến indirubin có nhiệt độ nóng chảy cao, độ tan kém trong tất cả dung môi đã biết, cũng như màu của nó ở trạng thái tinh thể (xem, H. Pandraud (1961). "Structure cristalline de l'indirubine. *Acta Crystallographica*", 14, 901-908).

Indirubin là một alkanoid, với tên gọi theo hệ thống IUPAC: (3Z)-3-(3-Oxo-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on, là hợp chất được xác định là có trong lá chàm mèo khô *strobilanthes cusia* có tác dụng chữa bệnh ung thư. Ngoài ra, chất này còn có thể gây ra hiện tượng tự chết của nhiều loại tế bào ung thư khác như và có tác dụng ứng chế quá trình di căn của ung thư, giúp bệnh ung thư nhân kéo dài thời gian sống mà không hề gây ra các tác dụng phụ nào như điều trị bằng xạ trị, hóa chất.

Ở Việt Nam, indirubin được Nguyễn Mạnh Cường và các cộng sự phân lập lần đầu năm 2007 từ loài chàm mèo *strabilanthes cusia*, một loài thực vật thân thuộc được bà con dân tộc trên khắp cả nước sử dụng làm nguyên liệu để nhuộm quần áo, vải vóc với thành phần chính là chàm indigo. Do indirubin chỉ là sản phẩm phụ trong quá trình sinh tổng hợp chàm indigo, nên để có thể thu lượng lớn phục vụ cho các mục đích nghiên cứu và ứng dụng, nhóm tác giả đã tổng hợp indirubin ở quy mô lớn bằng phản ứng của indoxyl axetat thu được từ dịch chiết lá loài *strabilanthes cusia* bằng nước nóng với isatin trong môi trường kiềm (xem, NM Cuong, P.N. Khanh, V.T. Ha, T.T. Huong, N.T. Tung, N.T. Cuc, D.T. Thao (2016). "Semi-synthesis of indirubin-3'-oxime from *strobilanthes cusia* leaves, its acute and sub-chronic toxicity, in vitro and in vivo antitumor activity in Lewis lung carcinoma bearing mice", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 292-301).

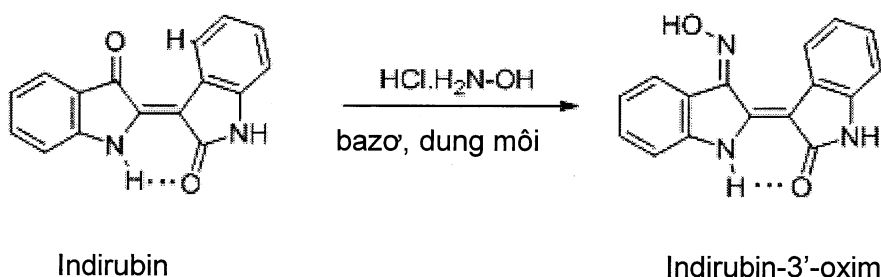
Trong tự nhiên, indirubin cũng là các thuốc nhuộm được chiết tách từ các loài thực vật chứa indigo như *Isatis sp.* (họ Brassicaceae); *Polygonum sp.* (họ polygonaceae) và *Indigofera sp.* (họ Fabaceae) hoặc từ tuyến mang của một số nhuyễn thể của các loài như *Hexaplex trunculus*; *Bolinus brandacis*; *Nucella lapillus*; *Rapana venosa* và *Plicopurpura sp.* (họ Muricidea). Nhìn chung, quá trình chiết tách indirubin được tiến hành bằng cách ngâm chiết mẫu thực vật; nhuyễn thể trong các dung môi hữu cơ phân cực như metanol, axeton, DMSO, DMF ở nhiệt độ cao. Ngoài ra, các phương pháp được hỗ trợ bởi siêu âm phương pháp chiết dòng siêu tới hạn (SFE) cũng được sử dụng nhất là ở quy mô công nghiệp và cho thấy hiệu quả tốt.

Indirubin có cấu trúc khá đặc biệt và sở hữu nhiều hoạt tính mong muốn như như hoạt tính chống ung thư, hoạt tính chống virus, hoạt tính kháng viêm, v.v., nhưng quan trọng nhất và cũng đáng quan tâm nhất là hoạt tính chống ung thư máu và một số dòng ung thư khác. Chính hoạt tính này làm cho các nghiên cứu khai thác sử dụng theo các hoạt tính khác ít được quan tâm hơn. Nghiên cứu hoạt tính chống ung thư của indirubin đã chỉ ra rằng tác dụng chống ung thư của indirubin có được là do sự ức chế quá trình sinh tổng hợp ADN trong tế bào ung thư mà ít ảnh hưởng đến tổng hợp protein. Ngoài

ra, indirubin còn tác động tích cực đến tế bào tủy của bệnh nhân ung thư. Đánh giá tác động của indirubin đến các enzym quan trọng liên quan đến pha cuối quá trình phân chia tế bào cho thấy indirubin và một số dẫn xuất của nó có thể ngăn chặn sự hoạt hóa của các enzym kinaza phụ thuộc phức enzym còn gọi là CDK1/cyclin B và CDK5/P25. Một trong những tác dụng đáng quan tâm khác của indirubin cũng được đề cập là tác động tích cực lên hệ miễn dịch ở những bệnh nhân bị rối loạn hệ miễn dịch khi sử dụng nó trong thời gian dài.

Mặc dù indirubin sở hữu nhiều hoạt tính mong muốn có thể khai thác đặc biệt là hoạt tính chống ung thư đã được biết rất sớm trong bài thuốc cổ truyền Đại Thanh, nhưng trở ngại lớn nhất của nó khi sử dụng trong lĩnh vực y dược chính là độ tan kém trong tất cả các dung môi thông dụng đã biết, đặc biệt là nước. Do đó, việc mở rộng ứng dụng của hợp chất này trước hết phải cải thiện được độ tan của chúng và hướng được các nhà khoa học quan tâm và thực tế nhất là can thiệp hóa học vào phân tử indirubin. Mục đích của các nhà hóa học là tạo ra các dẫn xuất có hoạt tính tốt, dễ tan hơn trong nước hoặc làm thay đổi hệ liên hợp phân tử cũng như liên kết hydro trong phân tử indirubin. Dẫn xuất điển hình nhất và cũng là dẫn xuất khởi đầu được cho là thành công nhất đến thời điểm hiện tại đáp ứng các tiêu chí trên là indirubin-3'-oxim.

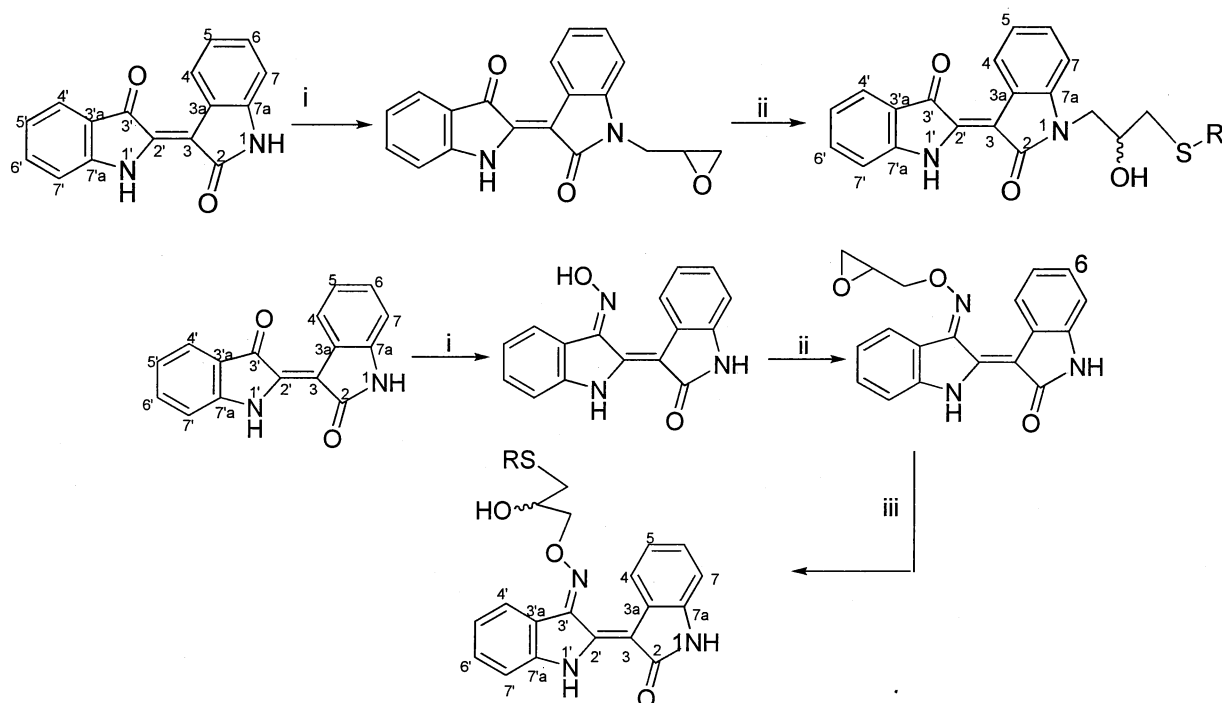
Cụ thể hơn, dẫn xuất này được Farbwerke Hoechst tổng hợp thành công năm 1913 bằng phản ứng của indirubin với hydroxylamin trong pyridin. Sự xuất hiện của nhóm oxim trong phân tử indirubin giúp cho độ tan của nó trong các dung môi và hoạt tính sinh học tăng lên đáng kể.



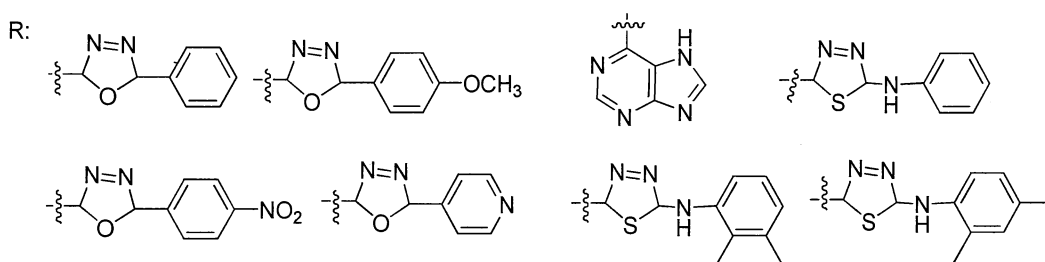
Năm 2010, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Cường đã sử dụng ethanol làm dung môi thay cho pyridin để thu được indirubin-3'-oxim với độ sạch hơn 98% (xem, NM Cuong, P.N. Khanh, V.T. Ha, T.T. Huong, N.T. Tung, N.T. Cuc, D.T. Thao (2016). "Semi-synthesis of indirubin-3'-oxime from *Strobilanthes cusia* leaves, its acute and sub-chronic toxicity, in vitro and in vivo antitumor activity in Lewis lung carcinoma bearing mice", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 292-301).

Tiếp tục nghiên cứu chuyển hóa hợp chất này, nhóm đã tổng hợp được N1-acetylindirubin bằng phản ứng của indirubin với anhydrit axetic trong pyridin cùng với dẫn xuất alkyl hóa ở vị trí OH của nhóm oxim từ indirubin-3'-oxim (xem, N.M. Cuong, B.H. Tai, D.H. Hoan (2010). "Studies on acetylation and NMR reassignment of indirubin derivatives", *Natural Product Research*, 24(2), 99-105; N.M. Cuong, B.H. Tai, D.H. Hoan, P.Q. Long, E.M. Choi, Y.H. Kim (2010). "Synthesis and anti-osteoporosis of two new indirubin-3'-oxime derivatives", *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(1), 22-26).

Một chuyển hóa khác cũng được nhóm này báo cáo năm 2018, theo đó phản ứng tạo vòng epoxy ở vị trí N1 của indirubin và OH của oxim nhận được khi sử dụng epichlorhydrin trong môi trường kiềm trong sự có mặt của xúc tác chuyển pha (xem, *N.T. Dan, N.T. Giang, V.V. Truong, N.V. Tai, N.M. Cuong, T.D. Cuong, L.V. Chinh, T.K. Vu (2018). "Synthesis of New Indirubin Derivatives and Their In Vitro Anticancer Activity", Chemical Papers, 73(5), 1083-1092*). Việc mở vòng các hợp chất này với các thiadiazol để tạo ra các sản phẩm của indirubin có chứa hợp phần thiadiazol.



trong đó:



Các dẫn xuất trên đây được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, kết quả cho thấy chỉ có 4 trong số 8 dẫn xuất thu được bằng phản ứng mở vòng epoxy ở nhóm oxim với các thiadiazol thể hiện hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư SW480, LU, HepG2 và HL60, tuy nhiên khá yếu với các giá trị IC_{50} trong khoảng từ 9,52 – 19,24 μM . Trong cùng điều kiện thử nghiệm như vậy, các dẫn xuất được tạo ra bằng phản ứng mở vòng epoxy ở vị trí N1 của indirubin với cùng các thadiazol thể hiện hoạt tính tốt hơn, đặc biệt có 2 dẫn xuất thể hiện độc tính với cả 4 dòng tế bào ung thư LU, HepG2 với các giá trị IC_{50} trong khoảng từ 1,35–4,53 μM .

Ngoài các dẫn xuất thu được bằng cách can thiệp hóa học vào vị trí N1 của indirubin hay OH của oxim, nhiều các dẫn xuất khác của indirubin cũng được tổng hợp. Tuy vậy hầu hết các dẫn xuất này đều thu được bằng cách tổng hợp hóa học thuần túy từ các dẫn xuất của indoxyl và isatin (xem, *S. Nam, R. Buettner, J. Turkson, D. H. Kim, J.*

Q. Cheng, S. Muehlbeyer, F. Hippe, S. Vatter, K. H. Merz, G. Eisenbrand, R. Jove (2005). "Indirubin derivatives inhibit stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17, 5998-6003; G. Karapetyan; K. Chakrabarty; M. Hein, and P. Langer (2011). "Synthesis and Bioactivity of carbohydrate derivatives of indigo, its isomers and heteroanalogues", *MedChemMed*, 6, 25-37; M. E. Jung; B. J. Byun; H. M. Kim; J. Y. Lee; J. H. Park; N. Lee; Y. H. Son; S. U. Choi; K. M. Yang; S. J. Kim; K. H. Lee; Y. C. Kim; G. Choi (2016). "Discovery of indirubin derivatives as new class of DRAK2 inhibitors from high throughput screening", *Biorganic Medicinal Chemistry Letters*, 26, 2719-2723; M. Sano, Y. Ichimaru, M. Kurita, E. Hayashi, T. Homma, H. Saito; S. Masuda; N. Nemoto, A. Hemmi; T. Suzuki; S. Miyairi, H. Hao (2017). "Induction of cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma by indirubin 3'-oxime and 5-methoxyindirubin 3'-oxime in vitro and in vivo". *Cancer Letters*, 397, 72-82).

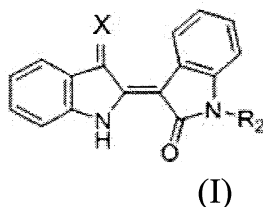
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất có phổ hoạt tính rộng có nguồn gốc từ thiên nhiên, cụ thể hơn là đề xuất các dẫn xuất của indirubin, mà được phân lập và tổng hợp từ lá của cây chàm mè *strobilanthes cusia*, có hoạt tính gây độc tế bào và phương pháp tổng hợp các dẫn xuất này.

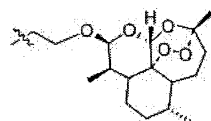
Các hợp chất này thể hiện hoạt tính hoạt tính gây độc tế bào, tốt hơn là hoạt tính gây độc tế bào đối với bốn dòng tế bào như ung thư phổi ở người (Human lung carcinoma, LU), ung thư biểu mô vú (Human breast adenocarcinoma, MCF7), ung thư gan ở người (Human hepatocellular carcinoma, HepG2) và ung thư cổ tử cung ở người (Human cervix carcinoma, Hela). Ngoài ra, một số hợp chất theo sáng chế còn có khả năng chống đông máu hoặc chống tập kết tiểu cầu.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp tổng hợp các chất này đơn giản, hiệu suất ổn định, thực hiện ở điều kiện êm dịu thân thiện với môi trường. Phương pháp này không cần phải tiến hành bước phân lập các hợp chất trung gian, tiết kiệm hóa chất dung môi.

Để đạt được mục đích nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):

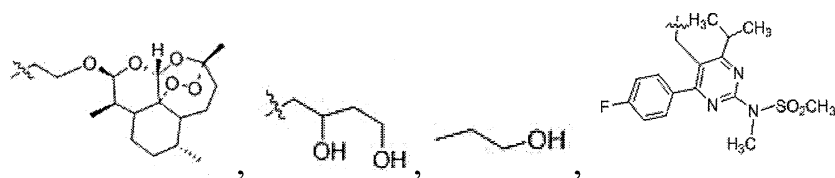


trong đó:

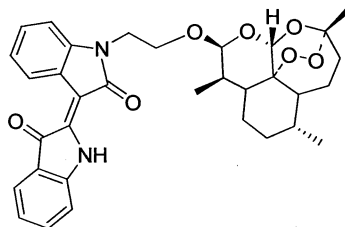


X là O hoặc N-OR₁, và trong đó R₁ được chọn từ H, trong đó:

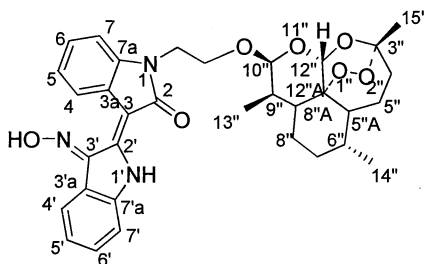
R₂ được chọn từ H,



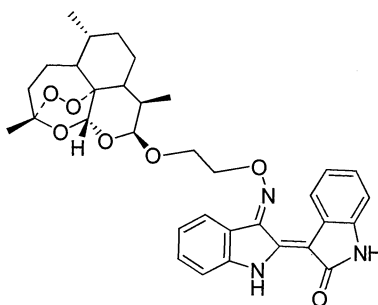
Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



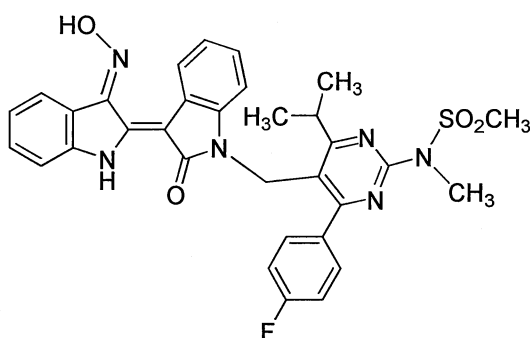
Theo một phương án được ưu tiên khác, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



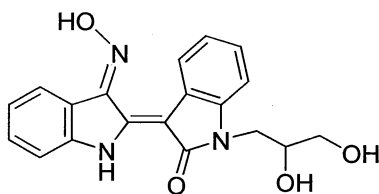
Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



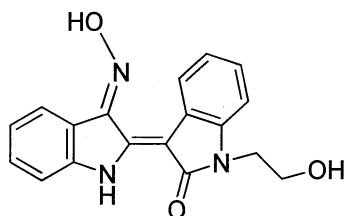
Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:

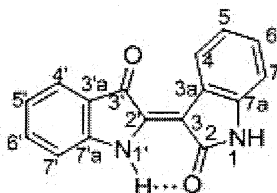


Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp hợp chất có công thức (I), phương pháp này bao gồm các bước:

i) cho hợp chất indirubin có công thức:



phản ứng với dẫn xuất halogen trong DMF khan với sự có mặt của chất xúc tác chuyển pha, tốt hơn là tetrabutylamoni bromua, và chất xúc tác kiềm được chọn từ nhóm Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , KI, NaOH và NaH;

ii) chuyển hóa bằng cách ngưng tụ các chất trung gian thành oxim sử dụng *N*-dimethylaminopyridin (DMAP).

Theo một phương án được ưu tiên, trong đó chất xúc tác sử dụng bao gồm tetrabutylamoni bromua và KI.

Theo một phương án được ưu tiên khác, trong đó phản ứng được thực hiện trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 50°C.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả thông qua các phương án cụ thể được ưu tiên với sự tham chiếu đến hình vẽ, trong đó:

Fig.1 là hình vẽ mô tả sơ đồ tổng hợp các hợp chất theo một phương án cụ thể được ưu tiên theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn nữa thông qua các phương án được ưu tiên chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế. Do đó, sáng chế không bị giới hạn chỉ ở các phương án cụ thể được ưu tiên này.

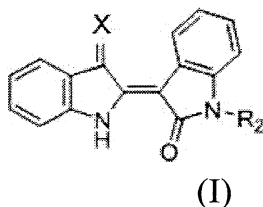
Ngoài ra, rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở nội dung bộc lộ trong bản mô tả này, có thể biến đổi sáng chế theo các cách tương đương khác nhau như thay đổi các thành phần/nguyên liệu với đặc tính/chức năng tương đương với thành phần/nguyên liệu, v.v., được mô tả trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” trước các giá trị số được dùng để chỉ chính giá trị số đó cũng như các giá trị số nằm trong khoảng $\pm 10\%$, tốt hơn là $\pm 5\%$, và tốt nhất là chỉ chính giá trị số đó.

Hợp chất theo sáng chế

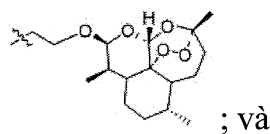
Sáng chế sử dụng hợp chất indirubin để tổng hợp các dẫn xuất có phổ hoạt tính rộng như tác dụng gây độc in vitro một số dòng tế bào ung thư người như ung thư phổi LU, ung thư gan HepG2, ung thư vú MCF7 và ung thư cổ tử cung Hela và tác dụng tác dụng chống đông máu invitro.

Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức (I):

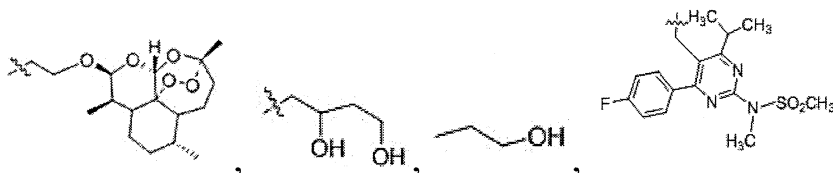


trong đó:

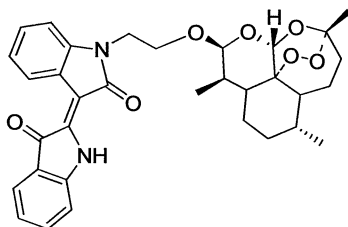
X là O hoặc N-OR₁, và trong đó R₁ được chọn từ H, trong đó:



R₂ được chọn từ H,

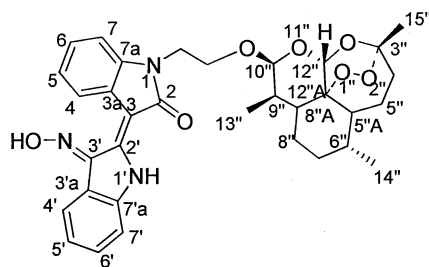


Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



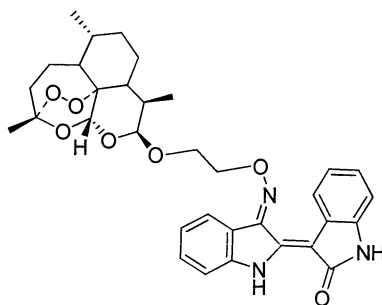
(sau đây còn được gọi là **THHC1**).

Theo một phương án được ưu tiên, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



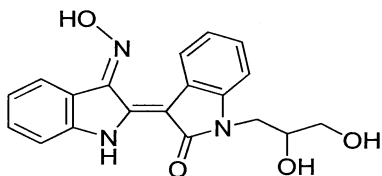
(sau đây còn được gọi là **THHC2**).

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



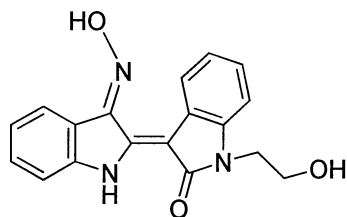
(sau đây còn được gọi là **THHC3**).

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



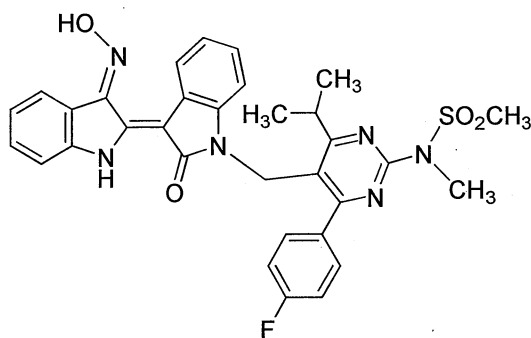
(sau đây còn được gọi là **THHC4**).

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



(sau đây còn được gọi là **THHC5**).

Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, hợp chất có công thức (I) là hợp chất có công thức:



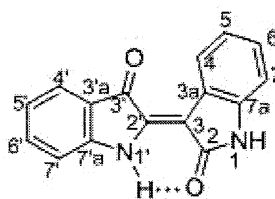
(sau đây còn được gọi là **THHC6**).

Hợp chất có công thức (I) và các hợp chất được ưu tiên **THHC1-6** theo sáng chế thể hiện hoạt tính gây độc tế bào và hoạt tính chống tập kết tiểu cầu (mà sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn dưới đây). Các hợp chất **THHC2** và **THHC6** có hoạt tính gây độc tế bào cao trên cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm bao gồm ung thư phổi ở người (Human lung carcinoma, LU), ung thư biểu mô vú (Human Breast adenocarcinoma, MCF7), ung thư gan ở người (Human hepatocellular carcinoma, HepG2) và ung thư cổ tử cung ở người (Human cervix carcinoma, Hela). Hai hợp chất này còn thể hiện khả năng chống tập kết tiểu cầu tốt thông qua thử nghiệm chống đông máu, trong đó hợp chất **THHC6** thể hiện hoạt tính này rất tốt ở cả hai nồng độ 100 và 50 $\mu\text{g/mL}$ và đều tốt hơn so với chất chuẩn aspirin (xem, phần mô tả sau đây). Các thử nghiệm này cho thấy các hợp chất theo sáng chế có tiềm năng phát triển thành thuốc chống ung thư và đột quy.

Phương pháp tổng hợp

Theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất phương pháp tổng hợp hợp chất có công thức (I) trên đây, phương pháp này bao gồm các bước:

i) cho hợp chất indirubin có công thức:



phản ứng với dẫn xuất halogen trong DMF khan với sự có mặt của chất xúc tác chuyển pha tetrabutylamoni bromua và chất xúc tác kiềm được chọn từ nhóm Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , KI, NaOH và NaH;

ii) chuyển hóa bằng cách ngưng tụ các chất trung gian thành oxim sử dụng *N*-dimethylaminopyridin (DMAP).

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên và như được mô tả trong Fig. 1, phương pháp tổng hợp các dẫn xuất mới trên đây chứa các nhóm thế khác nhau của indirubin và indirubin-3'-oxim ở vị trí N1 theo sáng chế bằng các phản ứng N-alkyl hóa sử dụng xúc tác chuyển pha, tốt hơn là tetrabutylamoni bromua (TBAB), và các xúc tác kiềm mà tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , KI, NaOH và NaH, trong DMF khan hoặc DMF-EtOH, và sau đó ngưng tụ tạo oxim.

Theo một phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp các dẫn xuất như được mô tả trên đây, đặc trưng ở chỗ:

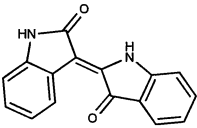
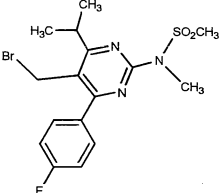
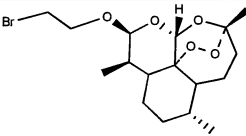
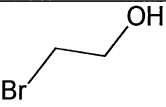
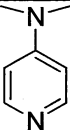
chất xúc tác được sử dụng bao gồm chất xúc tác chuyển pha tetrabutylamoni bromua và chất xúc tác bazơ được chọn từ nhóm bao gồm natri hydrua, kali cacbonat và natri hydroxit.

dung môi: DMF và etanol

hiệu suất phản ứng: từ nhiệt độ phòng (sau đây, còn gọi là RT) đến 50°C

Theo một phương án cụ thể đặc biệt được ưu tiên, hợp chất ban đầu và các chất dùng để tổng hợp các dẫn xuất của indirubin theo sáng chế được mô tả trong Bảng 1 sau đây.

Bảng 1: Hợp chất ban đầu để tổng hợp các hợp chất theo sáng chế

STT	Hợp chất ban đầu	Công thức tổng quát	Ghi chú
1	Indirubin		Phân lập từ cây chàm mèo <i>strobilanthes cusia</i>
2	PBr		Tổng hợp từ PBr theo các tài liệu đã biết trong lĩnh vực này
3	DHA-Br		Tổng hợp từ DHA-Br theo tài liệu đã biết trong lĩnh vực này
4	DMF, DMSO, DMAP	$(\text{CH}_3)_2\text{N-CHO}$	Sản phẩm thương mại từ công ty Sigma
4	Hydroxylamin hydro clorua	$\text{HO-NH}_2.\text{HCl}$	Sản phẩm thương mại từ Trung Quốc
5	Kali cacbonat, NaH, NaOH	K_2CO_3	Sản phẩm thương mại từ Trung Quốc
6	Epibromhydrin		Sản phẩm thương mại từ công ty Sigma
7	Bromoetanol		Sản phẩm thương mại từ công ty Sigma
8	N-Dimetylaminopyridin		Sản phẩm thương mại từ công ty Sigma

Sau đó, các hợp chất thu được được xác định đặc trưng đầy đủ bởi các hằng số vật lý, các dữ kiện phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối MS.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ chỉ với mục đích minh họa hơn nữa cho sáng chế.

Quy trình N-alkyl hóa indirubin bằng hỗn hợp kiềm-xúc tác chuyển pha.

Ví dụ 1: Tổng hợp hợp chất **THHC1**

Hòa tan 262 mg (1 mmol) indirubin trong 5 mL DMF, thêm vào hỗn hợp 586 mg (1,5 mmol) DHA-Br (hợp chất được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp được mô tả trong tài liệu *Y. Liu, Z. Liu, J. Shi, H. Chen, B. Mi, P. Li, P. Gong (2013). "Synthesis and cytotoxicity of novel 10-substituted dihydroartemisinin derivatives containing N-arylphenyl-ethenesulfonamide groups, Molecules, 18: 2864-287", 276 mg (2 mmol) K₂CO₃, 166 mg (1 mmol) KI và 32,2 mg (0,1 mmol) tetrabutylamoni bromua (TBAB) và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 35-40 độ trong 48 giờ. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, khuấy đều hỗn hợp 15 phút. Lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước, làm khô trong chân không thu được hợp chất **THHC1** thô. Chất **THHC1** được tinh chế bằng sắc kí cột/silica gel rửa giải bằng hệ n-Hexan (n-H):Axeton thu được **THHC1**, hiệu suất 67%.*

Ví dụ 2: Tổng hợp hợp chất **THHC3**

Hòa tan 277 mg (1 mmol) indirubin-3'-oxim (sau đây còn được gọi là **TG3** hoặc **THHC7**), mà được tổng hợp từ indirubin với hydroxylamin trong pyridin theo phương pháp đã biết được mô tả trên đây, trong 5 mL DMF, thêm vào hỗn hợp 586 mg (1,5 mmol) DHA-Br, 276 mg (2 mmol) K₂CO₃, 166 mg (1 mmol) KI và 32,2 mg (0,1 mmol) tetrabutylamoni bromua và khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng 36 giờ. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, khuấy đều hỗn hợp 15 phút. Lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước, làm khô trong chân không thu được hợp chất 4 thô. Chất **THHC3** được tinh chế bằng sắc kí cột/silica gel rửa giải bằng hệ n-H:Axeton thu được sản phẩm, hiệu suất 73%.

Tổng hợp hợp chất trung gian **TG4**

Hòa tan 262 mg (1 mmol) indirubin trong 5 mL DMF, thêm vào hỗn hợp thêm vào hỗn hợp 0,1 ml (1,1 mmol) epibromohydrin, 276 mg (2 mmol) K₂CO₃, 166 mg (1 mmol) KI và 32,2 mg (0,1 mmol) tetrabutylamoni bromua và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 35-40°C trong 36 giờ. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, khuấy đều hỗn hợp 15 phút, lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước, làm khô trong chân không thu được hợp chất **TG4** thô. Chất **TG4** được chuyển hóa ngay thành oxim **THHC 4** mà không cần tinh chế.

Tổng hợp hợp chất trung gian **TG5**

Hòa tan 262 mg (1 mmol) indirubin trong 5 mL DMF, thêm vào hỗn hợp 186 mg (1,5 mmol) bromoetanol, 52 mg (1,3) mmol NaOH, 166 mg (1 mmol) KI và 32,2 mg (0,1 mmol) tetrabutylamoni bromua và khuấy hỗn hợp phản ứng 2 ngày ở 50°C. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, trung hòa hỗn hợp bằng HCl loãng, lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước,

làm khô trong chân không thu được hợp chất **TG5** thô. Chất **TG5** được chuyển hóa ngay thành oxim **TTHC5** mà không cần tinh chế

Ví dụ 3: Tổng hợp chất **TG6**

Hòa tan 262 mg (1 mmol) indirubin trong 5 mL DMF, thêm vào hỗn hợp thêm vào hỗn hợp 624 mg (1,5 mmol) PBr (hợp chất được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp được mô tả trong tài liệu *P.D. Nam, V.V. Trường, N.T. Dân (2012). "Nghiên cứu quy trình tổng hợp muối canxi rosuvastatin dùng bào chế thuốc hạ cholesterol máu". Tạp chí hóa học, 50(4A), 81-83*), 276 mg (2 mmol) K₂CO₃, 166 mg (1 mmol) KI và 32,2 mg (0,1 mmol) tetrabutylamoni bromua và khuấy hỗn hợp phản ứng ở 35-40°C trong 36 giờ. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, khuấy đều hỗn hợp 15 phút, lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước, làm khô trong chân không thu được hợp chất **TG6** thô. Chất **TG6** được chuyển hóa ngay thành oxim **TTHC6** mà không cần tinh chế.

Quy trình chung cho tổng hợp các chất trung gian sử dụng NaH/DMF khan

Hòa tan 1 mmol indirubin trong 5 mL DMF khan dưới khí quyển nitơ, tiếp theo 1,1 mmol NaH được thêm vào. Thêm từ từ 1,3 mmol các chất alkyl bromua vào và khuấy hỗn hợp dưới khí quyển nitơ qua đêm. Đổ hỗn hợp vào nước lạnh, khuấy đều và lọc tủa, rửa kỹ với nước, sấy khô trong chân không để thu các sản phẩm tương ứng.

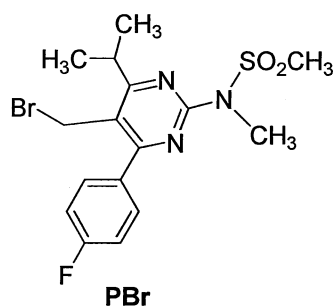
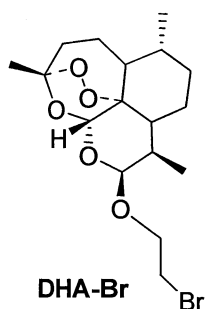
Quy trình chung chuyển hóa các dẫn xuất của indirubin thành các oxim tương ứng

Hòa tan các dẫn xuất của indirubin ở trên thu được từ 1 mmol indirubin ban đầu trong 6 ml dimetyl sulfoxit (DMSO), thêm vào hỗn hợp 245 mg (5 mmol) N,N-dimetylaminopyridin (DMAP) và 347,5 mg hydroxylamin hydroclorua, khuấy hỗn hợp phản ứng ở 50 độ từ 24 đến 48 giờ. Kết thúc phản ứng, hỗn hợp được đổ vào nước đá, khuấy đều 15 phút, lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước, làm khô trong chân không thu được các oxim thô. Các oxim thô được tinh chế bằng sắc kí cột/silica gel rửa giải bằng hệ n-H:Axeton 2:1

Mô tả phản ứng điều chế oxim **TTHC2**

Hòa tan toàn bộ hợp chất trung gian **TTHC1** trong 6 ml DMSO, thêm vào hỗn hợp 610 mg (5 mmol) DMAP và 347,5 mg hydroxylamin hydroclorua, khuấy hỗn hợp phản ứng ở 50 độ qua đêm. Hỗn hợp được đổ vào nước đá, khuấy đều 15 phút, lọc kết tủa, rửa kỹ bằng nước, làm khô trong chân không thu được oxim **TTHC2** thô. Oxim **TTHC2** được tinh chế bằng sắc kí cột/silica gel rửa giải bằng hệ n-H:Axeton 2:1

Trong phần mô tả trên đây và như được liệt kê trong Bảng 1, các hợp chất DHA-Br, PBr lần lượt có công thức sau:



Các đặc tính hóa lý và dữ liệu phổ khối

Các hợp chất thu được sau quá trình tổng hợp được xác định các đặc trưng bởi các hằng số vật lý, các dữ kiện phổ NMR và MS. Kết quả được tổng hợp trong Bảng 2 sau đây.

Bảng 2 - Đặc tính hóa lý và dữ liệu phổ khối của các hợp chất thu được

Kí hiệu chất (màu)	Công thức phân tử	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	R _f	Hiệu suất	Dữ liệu phổ khối [M+H] ⁺
THHC1 (Đỏ)	C ₃₃ H ₃₆ N ₂ O ₇	195-197	0,45	57%**	573,2601
THHC2 (Đỏ cờ)	C ₃₃ H ₃₇ N ₃ O ₇	182-184	0,4	80%	588,2710
THHC3 (Đỏ)	C ₃₃ H ₃₇ N ₃ O ₇	119-121*	0,4	63%**	588,2710
THHC4 (Đỏ)	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	227-229	0,37	51%**	352,38
THHC5 (Đỏ)	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₃	248-250	0,3	44%**	322,41
THHC6 (Đỏ đậm)	C ₃₂ H ₂₉ FN ₆ O ₄ S	279-281	0,45	67%**	613,2028

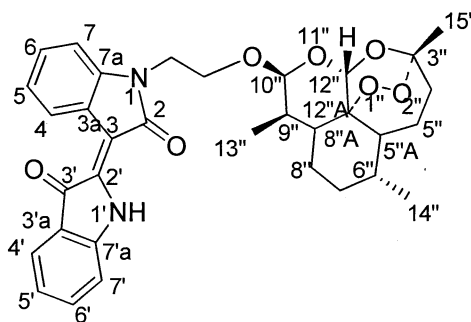
Hệ dung môi *n*-hexan:axeton 3:1;

* phân hủy

** hiệu suất tổng

Các đặc trưng phổ NMR của các hợp chất

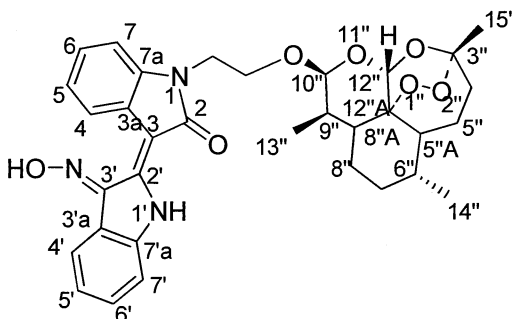
THHC1



Hiệu suất 57%; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 11,10 (s, 1H, N¹-H), 8,82 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4); 7,63 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4'); 7,57 (dt, *J*₁ = 1Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 1H, H-6'); 7,44 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-7'); 7,32 (dt, *J*₁ = 1Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 1H, H-6); 7,19 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-7); 7,07 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-5), 7,02 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-5'), 4,63 (s, 2H, H-12', H-10''); 4,29 (m, 1H, N1-CH_{2a}-); 4,21 (m, 1H, 10''-CH_{2a}-); 3,89 (m, 1H, N1-CH_{2b}-); 3,52 (m, 1H, 10''-CH_{2b}-); 2,23 (m, 1H, H-9''); 2,00 (m, 1H, H-4''a); 1,79 (m, 1H, H-4''b); 1,55 (m, 1H, H-5''a); 1,17 (m, H-8''), 1,13 (s, 3H, H-15''); 1,00 (m, 1H, H-8''A); 0,94 (m, 1H, H-5''b); 0,85 (m, 2H, H-5''a, H-7''a); 0,68 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H, H-13''); 0,54 (s, 3H, H-14''); 0,48-0,59 (m, 2H, H-6'', H-7''b). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 188,5 (C-3'); 169,2 (C-2); 152,5 (C-7'a); 141,2 (C-7a); 138,4 (C-2'); 137,5 (C-7'a); 137,4 (C-7'a); 137,3 (C-7'a); 137,2 (C-7'a); 137,1 (C-7'a); 137,0 (C-7'a); 136,9 (C-7'a); 136,8 (C-7'a); 136,7 (C-7'a); 136,6 (C-7'a); 136,5 (C-7'a); 136,4 (C-7'a); 136,3 (C-7'a); 136,2 (C-7'a); 136,1 (C-7'a); 136,0 (C-7'a); 135,9 (C-7'a); 135,8 (C-7'a); 135,7 (C-7'a); 135,6 (C-7'a); 135,5 (C-7'a); 135,4 (C-7'a); 135,3 (C-7'a); 135,2 (C-7'a); 135,1 (C-7'a); 135,0 (C-7'a); 134,9 (C-7'a); 134,8 (C-7'a); 134,7 (C-7'a); 134,6 (C-7'a); 134,5 (C-7'a); 134,4 (C-7'a); 134,3 (C-7'a); 134,2 (C-7'a); 134,1 (C-7'a); 134,0 (C-7'a); 133,9 (C-7'a); 133,8 (C-7'a); 133,7 (C-7'a); 133,6 (C-7'a); 133,5 (C-7'a); 133,4 (C-7'a); 133,3 (C-7'a); 133,2 (C-7'a); 133,1 (C-7'a); 133,0 (C-7'a); 132,9 (C-7'a); 132,8 (C-7'a); 132,7 (C-7'a); 132,6 (C-7'a); 132,5 (C-7'a); 132,4 (C-7'a); 132,3 (C-7'a); 132,2 (C-7'a); 132,1 (C-7'a); 132,0 (C-7'a); 131,9 (C-7'a); 131,8 (C-7'a); 131,7 (C-7'a); 131,6 (C-7'a); 131,5 (C-7'a); 131,4 (C-7'a); 131,3 (C-7'a); 131,2 (C-7'a); 131,1 (C-7'a); 131,0 (C-7'a); 130,9 (C-7'a); 130,8 (C-7'a); 130,7 (C-7'a); 130,6 (C-7'a); 130,5 (C-7'a); 130,4 (C-7'a); 130,3 (C-7'a); 130,2 (C-7'a); 130,1 (C-7'a); 130,0 (C-7'a); 129,9 (C-7'a); 129,8 (C-7'a); 129,7 (C-7'a); 129,6 (C-7'a); 129,5 (C-7'a); 129,4 (C-7'a); 129,3 (C-7'a); 129,2 (C-7'a); 129,1 (C-7'a); 129,0 (C-7'a); 128,9 (C-7'a); 128,8 (C-7'a); 128,7 (C-7'a); 128,6 (C-7'a); 128,5 (C-7'a); 128,4 (C-7'a); 128,3 (C-7'a); 128,2 (C-7'a); 128,1 (C-7'a); 128,0 (C-7'a); 127,9 (C-7'a); 127,8 (C-7'a); 127,7 (C-7'a); 127,6 (C-7'a); 127,5 (C-7'a); 127,4 (C-7'a); 127,3 (C-7'a); 127,2 (C-7'a); 127,1 (C-7'a); 127,0 (C-7'a); 126,9 (C-7'a); 126,8 (C-7'a); 126,7 (C-7'a); 126,6 (C-7'a); 126,5 (C-7'a); 126,4 (C-7'a); 126,3 (C-7'a); 126,2 (C-7'a); 126,1 (C-7'a); 126,0 (C-7'a); 125,9 (C-7'a); 125,8 (C-7'a); 125,7 (C-7'a); 125,6 (C-7'a); 125,5 (C-7'a); 125,4 (C-7'a); 125,3 (C-7'a); 125,2 (C-7'a); 125,1 (C-7'a); 125,0 (C-7'a); 124,9 (C-7'a); 124,8 (C-7'a); 124,7 (C-7'a); 124,6 (C-7'a); 124,5 (C-7'a); 124,4 (C-7'a); 124,3 (C-7'a); 124,2 (C-7'a); 124,1 (C-7'a); 124,0 (C-7'a); 123,9 (C-7'a); 123,8 (C-7'a); 123,7 (C-7'a); 123,6 (C-7'a); 123,5 (C-7'a); 123,4 (C-7'a); 123,3 (C-7'a); 123,2 (C-7'a); 123,1 (C-7'a); 123,0 (C-7'a); 122,9 (C-7'a); 122,8 (C-7'a); 122,7 (C-7'a); 122,6 (C-7'a); 122,5 (C-7'a); 122,4 (C-7'a); 122,3 (C-7'a); 122,2 (C-7'a); 122,1 (C-7'a); 122,0 (C-7'a); 121,9 (C-7'a); 121,8 (C-7'a); 121,7 (C-7'a); 121,6 (C-7'a); 121,5 (C-7'a); 121,4 (C-7'a); 121,3 (C-7'a); 121,2 (C-7'a); 121,1 (C-7'a); 121,0 (C-7'a); 120,9 (C-7'a); 120,8 (C-7'a); 120,7 (C-7'a); 120,6 (C-7'a); 120,5 (C-7'a); 120,4 (C-7'a); 120,3 (C-7'a); 120,2 (C-7'a); 120,1 (C-7'a); 120,0 (C-7'a); 119,9 (C-7'a); 119,8 (C-7'a); 119,7 (C-7'a); 119,6 (C-7'a); 119,5 (C-7'a); 119,4 (C-7'a); 119,3 (C-7'a); 119,2 (C-7'a); 119,1 (C-7'a); 119,0 (C-7'a); 118,9 (C-7'a); 118,8 (C-7'a); 118,7 (C-7'a); 118,6 (C-7'a); 118,5 (C-7'a); 118,4 (C-7'a); 118,3 (C-7'a); 118,2 (C-7'a); 118,1 (C-7'a); 118,0 (C-7'a); 117,9 (C-7'a); 117,8 (C-7'a); 117,7 (C-7'a); 117,6 (C-7'a); 117,5 (C-7'a); 117,4 (C-7'a); 117,3 (C-7'a); 117,2 (C-7'a); 117,1 (C-7'a); 117,0 (C-7'a); 116,9 (C-7'a); 116,8 (C-7'a); 116,7 (C-7'a); 116,6 (C-7'a); 116,5 (C-7'a); 116,4 (C-7'a); 116,3 (C-7'a); 116,2 (C-7'a); 116,1 (C-7'a); 116,0 (C-7'a); 115,9 (C-7'a); 115,8 (C-7'a); 115,7 (C-7'a); 115,6 (C-7'a); 115,5 (C-7'a); 115,4 (C-7'a); 115,3 (C-7'a); 115,2 (C-7'a); 115,1 (C-7'a); 115,0 (C-7'a); 114,9 (C-7'a); 114,8 (C-7'a); 114,7 (C-7'a); 114,6 (C-7'a); 114,5 (C-7'a); 114,4 (C-7'a); 114,3 (C-7'a); 114,2 (C-7'a); 114,1 (C-7'a); 114,0 (C-7'a); 113,9 (C-7'a); 113,8 (C-7'a); 113,7 (C-7'a); 113,6 (C-7'a); 113,5 (C-7'a); 113,4 (C-7'a); 113,3 (C-7'a); 113,2 (C-7'a); 113,1 (C-7'a); 113,0 (C-7'a); 112,9 (C-7'a); 112,8 (C-7'a); 112,7 (C-7'a); 112,6 (C-7'a); 112,5 (C-7'a); 112,4 (C-7'a); 112,3 (C-7'a); 112,2 (C-7'a); 112,1 (C-7'a); 112,0 (C-7'a); 111,9 (C-7'a); 111,8 (C-7'a); 111,7 (C-7'a); 111,6 (C-7'a); 111,5 (C-7'a); 111,4 (C-7'a); 111,3 (C-7'a); 111,2 (C-7'a); 111,1 (C-7'a); 111,0 (C-7'a); 110,9 (C-7'a); 110,8 (C-7'a); 110,7 (C-7'a); 110,6 (C-7'a); 110,5 (C-7'a); 110,4 (C-7'a); 110,3 (C-7'a); 110,2 (C-7'a); 110,1 (C-7'a); 110,0 (C-7'a); 109,9 (C-7'a); 109,8 (C-7'a); 109,7 (C-7'a); 109,6 (C-7'a); 109,5 (C-7'a); 109,4 (C-7'a); 109,3 (C-7'a); 109,2 (C-7'a); 109,1 (C-7'a); 109,0 (C-7'a); 108,9 (C-7'a); 108,8 (C-7'a); 108,7 (C-7'a); 108,6 (C-7'a); 108,5 (C-7'a); 108,4 (C-7'a); 108,3 (C-7'a); 108,2 (C-7'a); 108,1 (C-7'a); 108,0 (C-7'a); 107,9 (C-7'a); 107,8 (C-7'a); 107,7 (C-7'a); 107,6 (C-7'a); 107,5 (C-7'a); 107,4 (C-7'a); 107,3 (C-7'a); 107,2 (C-7'a); 107,1 (C-7'a); 107,0 (C-7'a); 106,9 (C-7'a); 106,8 (C-7'a); 106,7 (C-7'a); 106,6 (C-7'a); 106,5 (C-7'a); 106,4 (C-7'a); 106,3 (C-7'a); 106,2 (C-7'a); 106,1 (C-7'a); 106,0 (C-7'a); 105,9 (C-7'a); 105,8 (C-7'a); 105,7 (C-7'a); 105,6 (C-7'a); 105,5 (C-7'a); 105,4 (C-7'a); 105,3 (C-7'a); 105,2 (C-7'a); 105,1 (C-7'a); 105,0 (C-7'a); 104,9 (C-7'a); 104,8 (C-7'a); 104,7 (C-7'a); 104,6 (C-7'a); 104,5 (C-7'a); 104,4 (C-7'a); 104,3 (C-7'a); 104,2 (C-7'a); 104,1 (C-7'a); 104,0 (C-7'a); 103,9 (C-7'a); 103,8 (C-7'a); 103,7 (C-7'a); 103,6 (C-7'a); 103,5 (C-7'a); 103,4 (C-7'a); 103,3 (C-7'a); 103,2 (C-7'a); 103,1 (C-7'a); 103,0 (C-7'a); 102,9 (C-7'a); 102,8 (C-7'a); 102,7 (C-7'a); 102,6 (C-7'a); 102,5 (C-7'a); 102,4 (C-7'a); 102,3 (C-7'a); 102,2 (C-7'a); 102,1 (C-7'a); 102,0 (C-7'a); 101,9 (C-7'a); 101,8 (C-7'a); 101,7 (C-7'a); 101,6 (C-7'a); 101,5 (C-7'a); 101,4 (C-7'a); 101,3 (C-7'a); 101,2 (C-7'a); 101,1 (C-7'a); 101,0 (C-7'a); 100,9 (C-7'a); 100,8 (C-7'a); 100,7 (C-7'a); 100,6 (C-7'a); 100,5 (C-7'a); 100,4 (C-7'a); 100,3 (C-7'a); 100,2 (C-7'a); 100,1 (C-7'a); 100,0 (C-7'a); 99,9 (C-7'a); 99,8 (C-7'a); 99,7 (C-7'a); 99,6 (C-7'a); 99,5 (C-7'a); 99,4 (C-7'a); 99,3 (C-7'a); 99,2 (C-7'a); 99,1 (C-7'a); 99,0 (C-7'a); 98,9 (C-7'a); 98,8 (C-7'a); 98,7 (C-7'a); 98,6 (C-7'a); 98,5 (C-7'a); 98,4 (C-7'a); 98,3 (C-7'a); 98,2 (C-7'a); 98,1 (C-7'a); 98,0 (C-7'a); 97,9 (C-7'a); 97,8 (C-7'a); 97,7 (C-7'a); 97,6 (C-7'a); 97,5 (C-7'a); 97,4 (C-7'a); 97,3 (C-7'a); 97,2 (C-7'a); 97,1 (C-7'a); 97,0 (C-7'a); 96,9 (C-7'a); 96,8 (C-7'a); 96,7 (C-7'a); 96,6 (C-7'a); 96,5 (C-7'a); 96,4 (C-7'a); 96,3 (C-7'a); 96,2 (C-7'a); 96,1 (C-7'a); 96,0 (C-7'a); 95,9 (C-7'a); 95,8 (C-7'a); 95,7 (C-7'a); 95,6 (C-7'a); 95,5 (C-7'a); 95,4 (C-7'a); 95,3 (C-7'a); 95,2 (C-7'a); 95,1 (C-7'a); 95,0 (C-7'a); 94,9 (C-7'a); 94,8 (C-7'a); 94,7 (C-7'a); 94,6 (C-7'a); 94,5 (C-7'a); 94,4 (C-7'a); 94,3 (C-7'a); 94,2 (C-7'a); 94,1 (C-7'a); 94,0 (C-7'a); 93,9 (C-7'a); 93,8 (C-7'a); 93,7 (C-7'a); 93,6 (C-7'a); 93,5 (C-7'a); 93,4 (C-7'a); 93,3 (C-7'a); 93,2 (C-7'a); 93,1 (C-7'a); 93,0 (C-7'a); 92,9 (C-7'a); 92,8 (C-7'a); 92,7 (C-7'a); 92,6 (C-7'a); 92,5 (C-7'a); 92,4 (C-7'a); 92,3 (C-7'a); 92,2 (C-7'a); 92,1 (C-7'a); 92,0 (C-7'a); 91,9 (C-7'a); 9

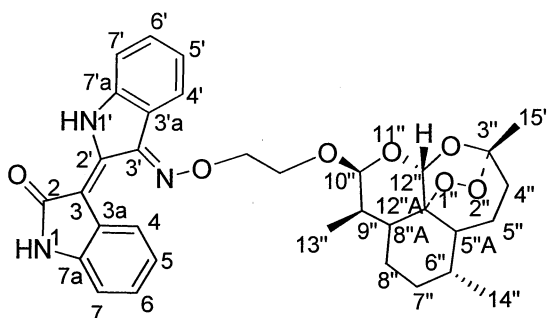
137,2 (C-6'); 129,0 (C-6); 124,4 (C-4'); 124,3 (C-4); 121,6 (C-3a); 121,3 (C-5'); 120,6 (C-5); 119,0 (C-3'a); 113,4 (C-7'); 108,9 (C-7); 105,7 (C-3); 103,0 (C-3''); 100,1 (C-10''); 86,6 (C-12''); 80,1 (C-12A); 62,5 (10''-CH₂-); 51,7 (C-5''A); 43,4 (C-8''A); 39,4 (N1-CH₂-); 36,3 (C-6''); 35,8 (C-4''); 33,9 (C-7''); 25,4 (C-9''); 23,9 (C-15''); 23,9 (C-5''), 23,5 (C-8''); 19,7 (C-14''); 12,4 (C-13''). ESI-HRMS được tính cho C₃₃H₃₇N₂O₇: [M+H]⁺ 573,2601, thực nghiệm: 573.25953.

THHC2



Hiệu suất 80%; chất rắn màu đỏ cờ. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 13, 45 (s, 1H, H-oxim); 11,78 (s, 1H, N1'-H); 8,72 (dd, *J*₁ = 1,0 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 1H, H-4); 8,23 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4'); 7,40 (m, 2H, H-6', H-7'); 7,19 (dt, *J*₁ = 1,0 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 1H, H-6); 7,15 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-7); 7,02 (m, 2H, H-5', H-5); 4,62 (s, 2H, H-12'', H-10''); 4,33 (m, 1H, N1-CH_{2a}-), 4,24 (m, 1H, 10''-CH_{2a}-); 3,92 (m, 1H, N1-CH_{2b}-); 3,52 (m, 1H, 10''-CH_{2b}-); 2,23 (m, 1H, H-9''); 1,99 (m, 1H, H-4''a); 1,77 (m, 1H, H-4''b); 1,53 (m, 1H, H-5''a); 1,13 (s, 3H, H-15''); 1,14 (m, 3H, H-8'', H-8''A); 1,01 (m, 1H, H-7''a); 0,93 (m, 1H, H-5''b); 0,84 (m, 1H, H-5''A); 0,68 (d, *J* = 7,5 Hz, 3H, H-13''); 0,58 (m, 1H, H-6''); 0,53 (d, *J* = 6,0 Hz, 3H, H-14''); 0,49 (m, 1H, H-7''b). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 169,3 (C-2); 151,2 (C-3'); 145,4 (C-2'); 144,8 (C-7'a); 138,7 (C-7a); 131,9 (C-6'); 127,9 (C-4'); 125,6 (C-6); 122,8 (C-4); 121,8 (C-3a); 121,4 (C-5'); 120,6 (C5); 116,5 (C-3'a); 111,4 (C-7'); 108,1 (C-7); 102,9 (C-3''); 100,0 (C-10''); 98,2 (C-3); 62,7 (10''-CH₂-); 51,8 (C-5''A); 43,5 (C-8''A); 38,7 (N1-CH₂-); 36,2 (C-6''); 35,8 (C-4''); 33,9 (C-7''); 30,2 (C-9''); 25,4 (C-15''); 23,9 (C-5''); 23,4 (C-8''); 19,8 (C-14''); 12,5 (C-13''). ESI-HRMS được tính cho C₃₃H₃₈N₃O₇: [M+H]⁺ 588,2710, thực nghiệm: 588,27043.

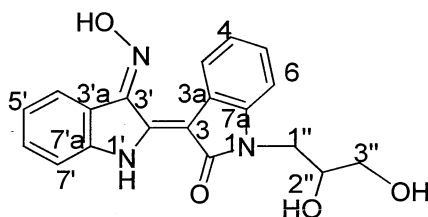
THHC3



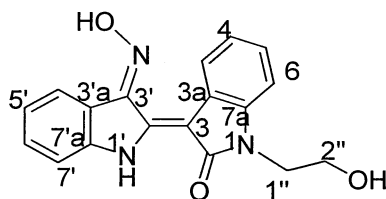
Hiệu suất 63%; chất rắn màu đỏ. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 11,68 (s, 1H, N1'-H); 10,70 (s, 1H, N1-H); 8,62 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4); 8,15 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4'); 7,41 (m, 2H, H-6', H-7'); 7,13 (dt, *J*₁ = 1,0 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 1H, H-6);

6,99 (m, 2H, H-5, H-5'); 6,90 (d, $J = 7, 5$ Hz, 1H, H-7); 5,11 (s, 1H, H-12"); 4,80 (m, 2H, 3'=N-O-CH₂-); 4,74 (d, , $J = 3,0$ Hz, 1H, H-10"); 4,24 (m, 1H, 10"-O-CH_{2a}-); 3,77 (m, 1H, 10"-O-CH_{2b}-); 2,31 (m, 1H, H-9"); 2,03 (m, 1H, H-4"a); 1,80 (m, 1H, H-4"b); 1,62 (m, 1H; H-5"a); 1,52 (m, 1H, H-8"a); 1,36 (m, 1H, H-8"b); 1,19 (m, 1H, H-8"A); 1,16 (s, 3H, H-15"); 0,97 (m, 1H, H-7"a); 0,87 (m, 2H, H-5"b, H-5"A); 0,77 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H, H-13"), 0,58 (s, 3H, H-14"); 0,55 (m, 2H, H-6", H-7"b). **¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm):** 171,0 (C-2); 151,1 (C-3'), 145,5 (C-2'); 144,1 (C-7'a); 138,6 (C-7a); 132,7 (C-6'); 128,2 (C-4'); 126,3 (C-6); 123,4 (C-4); 122,4 (C-3a); 121,3 (C-5'); 120,6 (C-5); 116,3 (C-3'a); 111,6 (C-7'); 108,9 (C-7); 103,1 (C-3); 100,7 (C-3"); 100,3 (C-10"); 86,7 (C-12"); 80,4 (C-12"A); 76,1 (3'=N-O-CH₂-); 65,7 (10"-O-CH₂-); 51,8 (C-5"A); 43,7 (C-8"A); 36,5 (C-6"); 35,9 (C-4"); 33,9 (C-7"); 30,5 (C-9"); 25,5 (C-15"); 23,9 (C-5", C-8"); 19,8 (C-14"); 12,6 (C-13"). ESI-HRMS được tính cho C₃₃H₃₈N₃O₇: [M+H]⁺ 588,2710, thực nghiệm: 588,27043.

THHC4



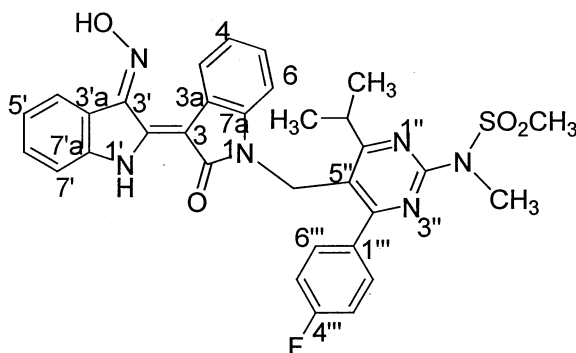
Hiệu suất 51%; chất rắn màu đỏ. **¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm):** 13,53 (s, 1H, H-oxim); 11,76 (s, 1H, N¹-H); 8,71 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4); 8,24 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4); 7,41 (m, 2H, H-6', H-7'); 7,21 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-6); 7,15 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-7); 7,03 (m, 2H, H-5, H-5'); 5,53 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, 2''-OH; 4,07 (m, 1H, H-2''); 3,99 (dd, *J*₁ = 5,0 Hz, *J*₂ = 14,25 Hz, 1H, H-1''a); 3,88 (dd, *J*₁ = 7,0 Hz, *J*₂ = 14,25 Hz, 1H, H-1''b); 3,69 (dd, *J*₁ = 4,5 Hz, *J*₂ = 11,0 Hz, 1H, H-3''a); 3,60 (dd, *J*₁ = 5,75 Hz, *J*₂ = 11,0 Hz, 1H, H-3''b). **¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm):** 169,3 (C-2); 151,3 (C-3'); 145,5 (C-2'); 144,8 (C-7'a); 139,3 (C-7a); 132,0 (C-6'); 127,9 (C-4'); 125,7 (C-6); 122,7 (C-3a); 121,9 (C-4); 121,6 (C-5); 120,8 (C-5'); 116,5 (C-3'a); 111,6 (C-7'a); 108,3 (C-7); 97,9 (C-3); 68,6 (C-2''); 47,7 (C-3''); 43,4 (C-1').

THHC5

Hiệu suất 44%; chất rắn màu đỏ. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm): 13,50 (s, 1H, H-oxim); 11,76 (s, 1H, N¹-H); 8,71 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-4); 8,24 (*J* = 7,5 Hz, 1H, H-4); 7,41 (m, 2H, H-6', H-7'); 7,20 (dt, *J*₁ = 1,0 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 1H, H-6); 7,12 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-7); 7,02 (m, 2H, H-5, H-5'); 4,86 (t, *J* = 5,25 Hz, 1H, 2''-OH); 3,92 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, H-1''); 3,66 (m, 2H, H-2''). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm): 169,1 (C-2); 151,3 (C-3'); 145,4 (C-2''); 144,8 (C-7'a); 139,3 (C-7a); 132,0 (C-6'); 131,8 (C-7'a); 131,7 (C-7a); 131,6 (C-6'); 131,5 (C-7'a); 131,4 (C-7a); 131,3 (C-6'); 131,2 (C-7'a); 131,1 (C-7a); 131,0 (C-6'); 130,9 (C-7'a); 130,8 (C-7a); 130,7 (C-6'); 130,6 (C-7'a); 130,5 (C-7a); 130,4 (C-6'); 130,3 (C-7'a); 130,2 (C-7a); 130,1 (C-6'); 130,0 (C-7'a); 129,9 (C-7a); 129,8 (C-6'); 129,7 (C-7'a); 129,6 (C-7a); 129,5 (C-6'); 129,4 (C-7'a); 129,3 (C-7a); 129,2 (C-6'); 129,1 (C-7'a); 129,0 (C-7a); 128,9 (C-6'); 128,8 (C-7'a); 128,7 (C-7a); 128,6 (C-6'); 128,5 (C-7'a); 128,4 (C-7a); 128,3 (C-6'); 128,2 (C-7'a); 128,1 (C-7a); 128,0 (C-6'); 127,9 (C-7'a); 127,8 (C-7a); 127,7 (C-6'); 127,6 (C-7'a); 127,5 (C-7a); 127,4 (C-6'); 127,3 (C-7'a); 127,2 (C-7a); 127,1 (C-6'); 127,0 (C-7'a); 126,9 (C-7a); 126,8 (C-6'); 126,7 (C-7'a); 126,6 (C-7a); 126,5 (C-6'); 126,4 (C-7'a); 126,3 (C-7a); 126,2 (C-6'); 126,1 (C-7'a); 126,0 (C-7a); 125,9 (C-6'); 125,8 (C-7'a); 125,7 (C-7a); 125,6 (C-6'); 125,5 (C-7'a); 125,4 (C-7a); 125,3 (C-6'); 125,2 (C-7'a); 125,1 (C-7a); 125,0 (C-6'); 124,9 (C-7'a); 124,8 (C-7a); 124,7 (C-6'); 124,6 (C-7'a); 124,5 (C-7a); 124,4 (C-6'); 124,3 (C-7'a); 124,2 (C-7a); 124,1 (C-6'); 124,0 (C-7'a); 123,9 (C-7a); 123,8 (C-6'); 123,7 (C-7'a); 123,6 (C-7a); 123,5 (C-6'); 123,4 (C-7'a); 123,3 (C-7a); 123,2 (C-6'); 123,1 (C-7'a); 123,0 (C-7a); 122,9 (C-6'); 122,8 (C-7'a); 122,7 (C-7a); 122,6 (C-6'); 122,5 (C-7'a); 122,4 (C-7a); 122,3 (C-6'); 122,2 (C-7'a); 122,1 (C-7a); 122,0 (C-6'); 121,9 (C-7'a); 121,8 (C-7a); 121,7 (C-6'); 121,6 (C-7'a); 121,5 (C-7a); 121,4 (C-6'); 121,3 (C-7'a); 121,2 (C-7a); 121,1 (C-6'); 121,0 (C-7'a); 120,9 (C-7a); 120,8 (C-6'); 120,7 (C-7'a); 120,6 (C-7a); 120,5 (C-6'); 120,4 (C-7'a); 120,3 (C-7a); 120,2 (C-6'); 120,1 (C-7'a); 120,0 (C-7a); 119,9 (C-6'); 119,8 (C-7'a); 119,7 (C-7a); 119,6 (C-6'); 119,5 (C-7'a); 119,4 (C-7a); 119,3 (C-6'); 119,2 (C-7'a); 119,1 (C-7a); 119,0 (C-6'); 118,9 (C-7'a); 118,8 (C-7a); 118,7 (C-6'); 118,6 (C-7'a); 118,5 (C-7a); 118,4 (C-6'); 118,3 (C-7'a); 118,2 (C-7a); 118,1 (C-6'); 118,0 (C-7'a); 117,9 (C-7a); 117,8 (C-6'); 117,7 (C-7'a); 117,6 (C-7a); 117,5 (C-6'); 117,4 (C-7'a); 117,3 (C-7a); 117,2 (C-6'); 117,1 (C-7'a); 117,0 (C-7a); 116,9 (C-6'); 116,8 (C-7'a); 116,7 (C-7a); 116,6 (C-6'); 116,5 (C-7'a); 116,4 (C-7a); 116,3 (C-6'); 116,2 (C-7'a); 116,1 (C-7a); 116,0 (C-6'); 115,9 (C-7'a); 115,8 (C-7a); 115,7 (C-6'); 115,6 (C-7'a); 115,5 (C-7a); 115,4 (C-6'); 115,3 (C-7'a); 115,2 (C-7a); 115,1 (C-6'); 115,0 (C-7'a); 114,9 (C-7a); 114,8 (C-6'); 114,7 (C-7'a); 114,6 (C-7a); 114,5 (C-6'); 114,4 (C-7'a); 114,3 (C-7a); 114,2 (C-6'); 114,1 (C-7'a); 114,0 (C-7a); 113,9 (C-6'); 113,8 (C-7'a); 113,7 (C-7a); 113,6 (C-6'); 113,5 (C-7'a); 113,4 (C-7a); 113,3 (C-6'); 113,2 (C-7'a); 113,1 (C-7a); 113,0 (C-6'); 112,9 (C-7'a); 112,8 (C-7a); 112,7 (C-6'); 112,6 (C-7'a); 112,5 (C-7a); 112,4 (C-6'); 112,3 (C-7'a); 112,2 (C-7a); 112,1 (C-6'); 112,0 (C-7'a); 111,9 (C-7a); 111,8 (C-6'); 111,7 (C-7'a); 111,6 (C-7a); 111,5 (C-6'); 111,4 (C-7'a); 111,3 (C-7a); 111,2 (C-6'); 111,1 (C-7'a); 111,0 (C-7a); 110,9 (C-6'); 110,8 (C-7'a); 110,7 (C-7a); 110,6 (C-6'); 110,5 (C-7'a); 110,4 (C-7a); 110,3 (C-6'); 110,2 (C-7'a); 110,1 (C-7a); 110,0 (C-6'); 109,9 (C-7'a); 109,8 (C-7a); 109,7 (C-6'); 109,6 (C-7'a); 109,5 (C-7a); 109,4 (C-6'); 109,3 (C-7'a); 109,2 (C-7a); 109,1 (C-6'); 109,0 (C-7'a); 108,9 (C-7a); 108,8 (C-6'); 108,7 (C-7'a); 108,6 (C-7a); 108,5 (C-6'); 108,4 (C-7'a); 108,3 (C-7a); 108,2 (C-6'); 108,1 (C-7'a); 108,0 (C-7a); 107,9 (C-6'); 107,8 (C-7'a); 107,7 (C-7a); 107,6 (C-6'); 107,5 (C-7'a); 107,4 (C-7a); 107,3 (C-6'); 107,2 (C-7'a); 107,1 (C-7a); 107,0 (C-6'); 106,9 (C-7'a); 106,8 (C-7a); 106,7 (C-6'); 106,6 (C-7'a); 106,5 (C-7a); 106,4 (C-6'); 106,3 (C-7'a); 106,2 (C-7a); 106,1 (C-6'); 106,0 (C-7'a); 105,9 (C-7a); 105,8 (C-6'); 105,7 (C-7'a); 105,6 (C-7a); 105,5 (C-6'); 105,4 (C-7'a); 105,3 (C-7a); 105,2 (C-6'); 105,1 (C-7'a); 105,0 (C-7a); 104,9 (C-6'); 104,8 (C-7'a); 104,7 (C-7a); 104,6 (C-6'); 104,5 (C-7'a); 104,4 (C-7a); 104,3 (C-6'); 104,2 (C-7'a); 104,1 (C-7a); 104,0 (C-6'); 103,9 (C-7'a); 103,8 (C-7a); 103,7 (C-6'); 103,6 (C-7'a); 103,5 (C-7a); 103,4 (C-6'); 103,3 (C-7'a); 103,2 (C-7a); 103,1 (C-6'); 103,0 (C-7'a); 102,9 (C-7a); 102,8 (C-6'); 102,7 (C-7'a); 102,6 (C-7a); 102,5 (C-6'); 102,4 (C-7'a); 102,3 (C-7a); 102,2 (C-6'); 102,1 (C-7'a); 102,0 (C-7a); 101,9 (C-6'); 101,8 (C-7'a); 101,7 (C-7a); 101,6 (C-6'); 101,5 (C-7'a); 101,4 (C-7a); 101,3 (C-6'); 101,2 (C-7'a); 101,1 (C-7a); 101,0 (C-6'); 100,9 (C-7'a); 100,8 (C-7a); 100,7 (C-6');

127,9 (C-4'); 125,8 (C-6); 122,7 (C-3a); 121,8 (C-4); 121,5 (C-5); 120,7 (C-5'); 116,5 (C-3'a); 111,5 (C-7'); 108,1 (C-7); 98,1 (C-3); 58,5 (C-2''); 42,0 (C-1'').

THHC6



Hiệu suất 67%; chất rắn màu đỏ đậm. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz), δ (ppm):** 13,55 (s, 1H, H-oxim); 11,68 (s, 1H, N'1-H); 8,68 (dd, $J_1 = 0,75$ Hz, $J_2 = 7,75$ Hz, 1H, H-4); 8,23 (d, $J = 7,75$ Hz, 1H, H-4'); 7,80 (m, 2H, H-2'', H-6''); 7,46 (d, $J = 7,75$ Hz, 1H, H-7'), 7,41 (dt, $J_1 = 0,75$ Hz, $J_2 = 7,75$ Hz, 1H, H-6'); 7,34 (t, $J = 8,75$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7,06 (m, 2H, H-6, H-5'); 6,96 (dt, 1H, H-5); 6,57 (d, $J = 7,75$ Hz); 5,20 (s, 2H, N₁-CH₂-5''); 3,55 (s, 3H, 2''-N-CH₃); 3,45 (s, 3H, -SO₂CH₃); 3,40 (m, 1H, 6''-CH (CH₃)₂); 1,04 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H, 6''-CH (CH₃)₂). **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), δ (ppm):** 175,9 (C-6''); 168,6 (C-2); 165,7 (C-4''); 162,7 (d, $J = 246,25$ Hz, C-4''); 157,0 (C-2''); 151,2 (C-3'); 145,7 (C-2'); 144,7 (C-7'a); 138,2 (C-7a); 134,4 (d, $J = 2,5$ Hz, C-1''); 132,0 (C-6'); 131,6 (d, $J = 8,75$ Hz, C-2'', C-6''); 127,9 (C-4'); 125,5 (C-6); 122,8 (C-4); 122,0 (C-3a); 121,7 (C-5'); 121,0 (C-5); 118,6 (C-5''); 116,4 (C-3'a); 115,4 (d, $J = 21,25$ Hz, C-3'', C-5''); 111,8 (C-7'); 107,6 (C-7); 97,4 (C-3); 41,6 (2''-N-CH₃); 37,7 (N₁-CH₂-5''); 33,1 (-SO₂CH₃); 31,1 (6''-CH (CH₃)₂); 21,4 (6''-CH (CH₃)₂). ESI-HRMS được tính cho C₃₂H₃₀FN₆O₄S: [M+H]⁺ 613,20278, thực nghiệm: 613,2028

Ví dụ 4: Thử nghiệm hoạt tính sinh học

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*.

Phép thử này được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13):1107-1112].

Kết quả hoạt tính gây độc tế bào

Các dẫn xuất mới theo sáng chế được thử khả năng gây độc trên các tế bào ung thư người bao gồm:

A, LU: Ung thư phổi ở người (Human lung carcinoma)

MCF7: Ung thư biểu mô vú (Human breast adenocarcinoma)

HepG2: Ung thư gan ở người (Human hepatocellular carcinoma)

Hela: Ung thư cổ tử cung ở người (Human cervix carcinoma)

Kết quả về hoạt tính gây độc tế bào trên đây được tổng hợp trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

STT	Hợp chất	IC ₅₀ (µg/mL)			
		LU	MCF-7	Hep-G2	Hela
1	THHC1	12,34	5,71	6,59	8,31
2	THHC2	3,05	1,72	1,53	3,41
3	THHC3	28,23	19,39	12,68	12,29
4	THHC4	56,57	49,55	57,22	45,64
5	THHC5	10,14	11,90	10,39	11,92
6	THHC6	1,73	1,45	1,81	2,47
7	Indirubin	69,81	70,65	61,17	49,97
8	Indirubin-3'-oxim	15,73	21,26	20,01	12,29
9	Ellipticin	0,38	0,49	0,46	0,40

Từ kết quả trên đây, có thể thấy rằng hợp chất **THHC2** và **THHC6** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào mạnh trên đối với cả bốn dòng tế bào thử nghiệm và mạnh hơn rất nhiều so với hợp chất đối chứng indirubin và indirubin-3'-oxim.

Thử nghiệm hoạt tính chống tập kết tiểu cầu

Thời gian aPTT (activated partial thromboplastin time) còn gọi là thời gian cephalin-kaolin. Cụ thể hơn, xét nghiệm aPTT là xét nghiệm đo thời gian đông của huyết tương từ khi phục hồi canxi sau khi cho huyết tương ủ với kaolin (hoạt hoá yếu tố tiếp xúc) và cephalin (có chức năng như yếu tố 3 tiểu cầu). Xét nghiệm này loại được ảnh hưởng của yếu tố tiếp xúc và tiểu cầu cho nên đánh giá được chính xác hơn các yếu tố đông máu nội sinh. Kết quả so với đối chứng (khoảng 30-35 giây). Đây là yếu tố quan trọng nhất để đánh giá hoạt tính chống đông của mẫu nghiên cứu. Thử nghiệm chống đông máu được tiến hành theo tài liệu *Davie, E. W., Fujikawa, K. and Kisiel, W. (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. Biochemistry 30, 10363-10370*). Kết quả được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Kết quả hoạt tính chống tập kết tiểu cầu

STT	Hợp chất	Nồng độ	aTPP (s)
-----	----------	---------	----------

1	THHC1	100µg/mL	82,4
		50µg/mL	79,2
2	THHC2	100µg/mL	137,0
		50µg/mL	90,8
3	THHC3	100µg/mL	96,5
		50µg/mL	71,9
4	THHC4	100µg/mL	86,7
		50µg/mL	75,5
5	THHC5	100µg/mL	105,7
		50µg/mL	79,1
6	THHC6	100µg/mL	128,2
		50µg/mL	107,6
7	Indirubin	100µg/mL	103,1
		50µg/mL	91,2
8	Indirubin-3'-oxim	100µg/mL	91,2
		50µg/mL	73,5

Chất chuẩn aspirin: thời gian đông máu là 77 giây tại nồng độ: 33,33%

Từ kết quả trên đây, có thể thấy rằng hai hợp chất **THHC2** và **THHC6** thể hiện hoạt tính chống đông khá tốt với thời gian đông máu ở nồng độ 100µg/mL lần lượt là 137,0 giây và 128,2 giây trong khi aspirin ở nồng độ 33,33% có thời gian đông là 77 giây, còn các chất đầu indirubin và indirubin-3'-oxim có thời gian đông máu ở 100µg/mL lần lượt là 103 và 91,2 giây. Đặc biệt hợp chất THHC6 thể hiện hoạt tính này khá mạnh ngay cả ở nồng độ 50µg/mL với thời gian đông là 107,6 giây

Hiệu quả có lợi của sáng chế

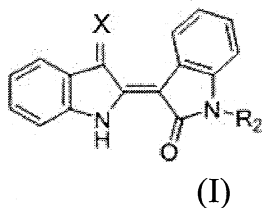
Sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp các dẫn xuất mới của indirubin có hoạt tính gây độc tế bào và hoạt tính chống tập kết tiểu cầu. Các hợp chất THHC2 và THHC6 có hoạt tính gây độc tế bào cao trên cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm bao gồm Ung thư phổi ở người (Human lung carcinoma, LU), MCF7: Human Breast adenocarcinoma (ung thư biểu mô vú), HepG2: Human hepatocellular carcinoma (Ung thư gan ở người) và Hela: Ung thư cổ tử cung ở người (human cervix carcinoma. 2 hợp chất này cũng thể hiện khả năng chống tập kết tiểu cầu tốt thông qua thử nghiệm chống đông máu trong đó hợp chất 6 thể hiện hoạt tính này ấn tượng ở cả 2 nồng độ 100 và 50 µg/mL và đều tốt hơn so với chất chuẩn aspirin. Các thử nghiệm ban đầu cho thấy hai hoạt chất này có tiềm năng phát triển thành thuốc chống ung thư và đột quỵ.

Ngoài ra, phương pháp tổng hợp theo sáng chế được tạo ra trên cơ sở nghiên cứu hoàn thiện quy trình tổng hợp, tối ưu hóa các hóa chất, điều kiện thực hiện nhằm đơn giản hóa để rút ngắn thời gian thực hiện, hiệu suất ổn định, thực hiện ở điều kiện êm dịu thân thiện với môi trường. Phương pháp này không cần phải tiến hành bước phân lập các hợp chất trung gian, tiết kiệm hóa chất dung môi, đồng thời tạo ra hiệu suất tổng hợp cao với chi phí sản xuất thấp, sản phẩm thu được với độ tinh khiết cao ổn định để có thể thực hiện việc sản xuất ở quy mô công nghiệp và phù hợp với điều kiện tại Việt Nam.

Hơn nữa, phương pháp theo sáng chế được cho là không chỉ hoàn toàn khác biệt với các phương pháp đã biết xét về các bước thực hiện, điều kiện thực hiện, thành phần tham gia và lượng tương ứng, mà quy trình theo sáng chế còn có thể dùng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong lĩnh vực tổng hợp hóa học. Nói cách khác, sáng chế giải quyết được vấn đề cả về tính thực tiễn và học thuật. Cụ thể là, quy trình theo sáng chế phù hợp với điều kiện chế tạo và ứng dụng tại Việt Nam và còn được sử dụng làm cơ sở tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo liên quan trong lĩnh vực kỹ thuật này.

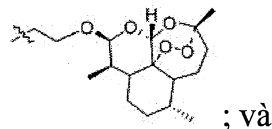
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức (I):

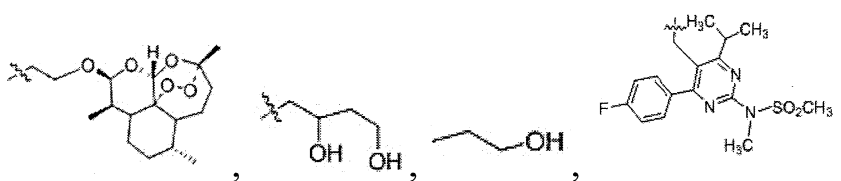


trong đó:

X là O hoặc N-OR₁, và trong đó R₁ được chọn từ H, trong đó:

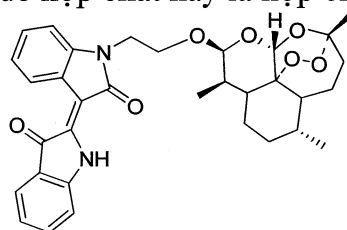


R₂ được chọn từ H, trong đó hợp chất nêu trên không bao gồm các hợp chất sau:

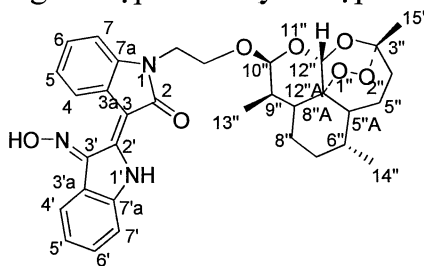


- 1) hợp chất với X là O, R₂ là H và,
- 2) hợp chất với X là N-OR₁ trong đó R₁ là H và R₂ là H.

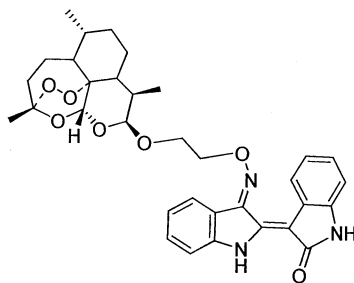
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức:



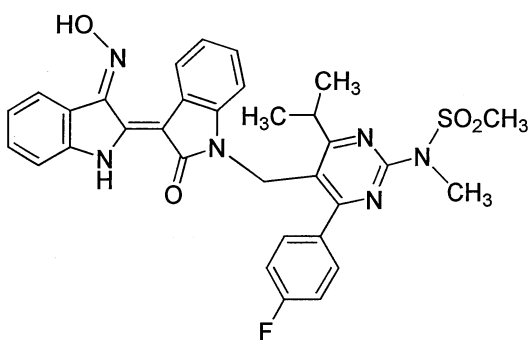
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức:



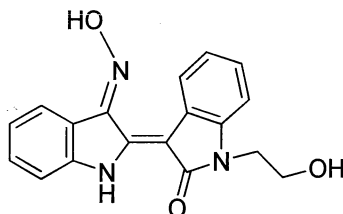
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức:



5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức:

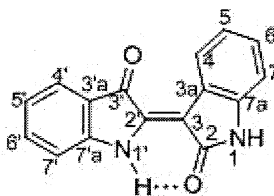


6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất có công thức:



7. Phương pháp tổng hợp hợp chất có công thức (I) theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

i) cho hợp chất indirubin có công thức:



phản ứng với dẫn xuất halogen trong DMF khan với sự có mặt của chất xúc tác chuyển pha tetrabutylamoni bromua và chất xúc tác kiềm được chọn từ nhóm Cs_2CO_3 , K_2CO_3 , KI , NaOH và NaH ;

ii) chuyển hóa bằng cách ngưng tụ các chất trung gian thành oxim sử dụng *N*-dimethylaminopyridin (DMAP).

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chất xúc tác sử dụng bao gồm tetrabutylamoni bromua và KI .

9. Phương pháp theo điểm 7 hoặc điểm 8, trong đó phản ứng được thực hiện trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 50°C.

Fig. 1

