



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003686

(51) **A61K 31/00**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00488

(22) 30/08/2023

(67) 1-2021-00276

(45) 25/09/2024 438

(43) 25/05/2021 398

(73) Trường Đại học Văn Lang (VN)

45 Nguyễn Khắc Nhu, phường Cô Giang, quận 1, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Hữu Hùng (VN); Dương Thúc Huy (VN); Nguyễn Thị Phương (VN).

(54) **HỢP CHẤT COMBRETANONE H GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ PHÂN LẬP
TỪ CÂY TRÂM BẦU (COMBRETUM QUADRANGULARE KURZ)**

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất Combretanone H gây độc tế bào ung thư phân lập từ cây Trâm bầu (*Combretum Quadrangulare* Kurz). Hợp chất này có hoạt tính gây độc đối với tế bào ung thư gan HepG2, tế bào ung thư máu K562 và tế bào ung thư vú MCF7.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất Combretanone H gây độc tế bào ung thư phân lập từ cây Trâm bầu (*Combretum Quadrangulare* Kurz).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây Trâm bầu hay còn gọi là Chum bầu, Tim bầu, sang kê, song re. Tên khoa học là *Combretum quadrangulare* Kurz. thuộc ngành Magnoliophyta; lớp Magnoliopsida; bộ Myrtales; họ Combretaceae (họ Bàng); chi *Combretum*; loài *Combretum quadrangulare* Kurz. Cây gỗ nhỏ, cao 5 - 9 m. Lá thường mọc đối nhau có hình trứng ngược, đầu lá nhọn hoặc có khi tròn, gốc lá thuôn, nhẵn và sần sùi ở mặt trên. Hoa nhỏ, màu vàng, mọc thành cụm ở ngọn hoặc nách lá, dài 4 - 5 cm. Quả dài khoảng 2 cm, rộng 8 - 9 mm, có 4 cánh mỏng màu xanh. Hạt có hình thoi. Cây trâm bầu từ lúc nảy mầm đến khoảng 1 năm sau thì có quả, đến năm thứ 3 thì quả rộ.

Theo kinh nghiệm dân gian và các bài thuốc y học cổ truyền, cây trâm bầu được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc trong dân gian để điều trị bệnh viêm gan, sốt rét, nhiễm trùng đường hô hấp. Hạt, lá, vỏ của cây được sử dụng trong y học cổ truyền Việt Nam như một phương thuốc hạ sốt và trị giun sán.

Năm 1998, có 07 hợp chất cycloartane triterpene mới được phân lập từ cây trâm bầu và 2 trong số các hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào ung thư đại tràng 26-L5 ở chuột (Banskota AH et al., Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Bioorg Med Chem Lett* 1998, 8(24):3519-3524). Năm 2000, có 13 hợp chất cycloartane triterpene mới được phân lập từ cây trâm bầu (Banskota AH et al., Thirteen novel cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *J Nat Prod* 2000, 63(1):57-64). Cùng năm này, có thêm 15 hợp chất cycloartane triterpene mới khác được phân lập từ cây trâm bầu và tất cả đều có hoạt tính lên tế bào ung thư đại tràng 26-L5 ở chuột ở nhiều mức độ khác nhau (Banskota AH et al., Metyl quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000, 48(4):496-504).

Năm 2011, có 17 hợp chất được phân lập từ chiết xuất metanol của lá cây trâm bầu, trong đó có 9 hợp chất mới thuộc nhóm cycloartane triterpene. Có 05 hợp chất trong số các chất này có khả năng tăng cường biểu hiện của thụ thể chết 5 (DR5) và 01 hợp chất có hoạt

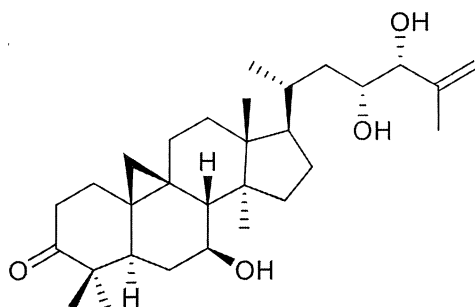
tính bài trừ tính kháng đối với phối tử kích hoạt quá trình chết của tế bào liên quan đến yếu tố hoại tử khối u (TRAIL) (Toume K et al., Cycloartane triterpenes isolated from *Combretum quadrangulare* in a screening program for death-receptor expression enhancing activity. *J Nat Prod* 2011, 74(2):249-255).

Qua khảo cứu tài liệu năm 2014 cho thấy có 97 hợp chất được phát hiện từ cây trám bầu, trong đó hầu hết các hợp chất này thuộc nhóm triterpenoid và flavonoid. Các hoạt chất có hoạt tính sinh học đa dạng gồm kháng khuẩn, kháng vi rút HIV, gây độc tế bào ung thư, bảo vệ gan (Roy R et al., *Combretum quadrangulare* (Combretaceae): Phytochemical Constituents and Biological activity. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* 2014, 4(8):3416-3427).

Việc tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính sinh học luôn là nhu cầu cấp thiết hiện nay. Do đó, sáng chế đề xuất một hợp chất mới Combretanone H có hoạt tính kháng một số dòng tế bào ung thư có thể được ứng dụng làm thuốc hoặc thực phẩm chức năng. Ngoài ra sáng chế cũng đề xuất phương pháp cô lập hợp chất này từ lá cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Sáng chế đề cập đến hợp chất Combretanone H gây độc tế bào ung thư, được phân lập từ cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz có cấu trúc hóa học thể hiện như sau:

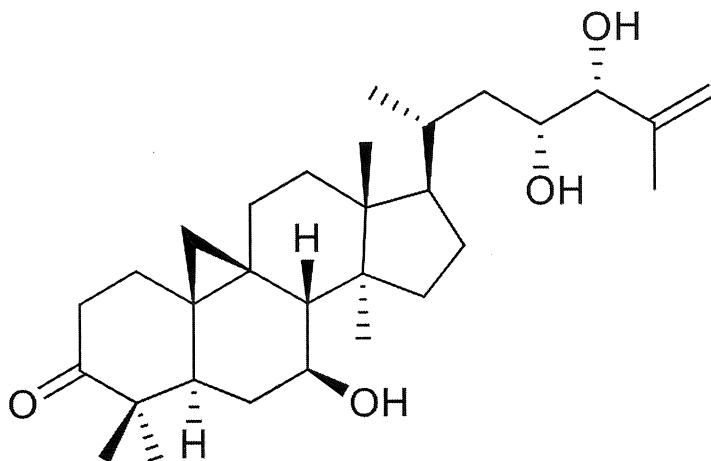


Mô tả vắn tắt hình vẽ

FIG.1 thể hiện cấu trúc hóa học của hợp chất Combretanone H gây độc tế bào ung thư phân lập từ cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Theo FIG.1 thể hiện cấu trúc hóa học của hợp chất Combretanone H gây độc tế bào ung thư phân lập từ lá cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz.



Combretanone H là chất bột màu trắng vô định hình, có công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_4$ -H, và có đặc điểm và dữ liệu phổ cụ thể như sau:

1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H 5.02 (1H, s, H-26a), 4.94 (1H, H-26b), 3.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-24), 3.86 (1H, ddd, $J = 10.9, 8.5, 2.0$ Hz, H-23), 3.65 (1H, ddd, $J = 10.5, 9.5, 4.0$ Hz, H-7), 2.70 (1H, td, $J = 13.5, 6.5$ Hz, H-2a), 2.32 (1H, ddd, $J = 14.0, 4.5, 2.5$ Hz, H-2b), 1.96 (1H, m, H-16a), 1.90 (2H, m, H-5, H-11a), 1.85 (2H, m, H-12a, H-1a), 1.77 (3H, s, H-27), 1.73 (1H, m, H-6a), 1.72 (1H, m, H-20), 1.69 (1H, m, H-8), 1.68 (1H, m, H-17), 1.66 (1H, m, H-22a), 1.64 (1H, m, H-12b), 1.60 (1H, m, H-1b, H-15a), 1.49 (1H, m, H-15b), 1.37 (1H, m, H-16b), 1.32 (1H, m, H-11b), 1.15 (2H, m, H-6b, H-22b), 1.10 (3H, s, H-29), 1.05 (3H, s, H-28), 1.03 (3H, s, H-18), 0.95 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-19a), 0.94 (3H, s, H-30), 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.56 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-19b).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C 215.9 (C-3), 141.9 (C-25), 114.3 (C-26), 85.7 (C-24), 76.4 (C-23), 70.8 (C-7), 54.8 (C-8), 53.4 (C-17), 49.8 (C-4), 48.6 (C-14), 46.8 (C-5), 46.1 (C-13), 39.6 (C-22), 37.4 (C-15), 37.2 (C-2), 33.5 (C-20), 33.0 (C-12), 32.7 (C-1), 31.3 (C-6), 28.4 (C-16), 27.7 (C-19), 27.0 (C-11), 26.7 (C-10), 22.3 (C-28), 21.0 (C-9), 20.8 (C-29), 19.0 (C-30), 18.4 (C-21), 17.6 (C-18), 17.6 (C-27)

HRESIMS m/z : $[M-H]^-$ 471.3472 tính toán lý thuyết cho $C_{30}H_{48}O_4$ -H (calcd. 471.3474).

Hợp chất Combretanone H được dùng để thử nghiệm hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư gồm tế bào ung gan HepG2, tế bào ung thư máu K562 và tế bào ung thư vú MCF7. Phương pháp thực hiện như sau:

Đầu tiên, chuẩn bị vật liệu và hóa chất: môi trường DMEM và huyết thanh bào thai bò FBS được mua của Biowest. Môi trường RPMI 1640 được mua của Sigma. Kháng sinh Penicillin được mua của Mekophar. Kháng sinh Streptomycin được mua của Shandong

Reyoung. MTT (3- (4, 5- dimethylthiazol - 2- yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromid) và DMSO (dimethyl sulfoxide) được mua của Thermo Fisher. Doxorubicin 2mg/ml (tên thương mại Adrim) được mua của Fresenius Kabi. Dodecyl Sulfate Sodium (SDS) và HCl được mua của Merck. Đĩa nhựa nuôi tế bào được mua của Corning. Máy đọc đĩa ELISA của Sunrise. Tủ cấy an toàn sinh học cấp 2 của Labtech. Tủ ấm nuôi tế bào của ESCO. Tế bào ung thư HepG2, tế bào ung thư máu K562 và tế bào ung thư vú MCF7 được cung cấp bởi Viện tế bào gốc và Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Tiếp theo, tiến hành nuôi cấy tế bào ung thư. Các dòng tế bào ung thư gan HepG2 và ung thư vú MCF-7 được nuôi cấy với mật độ ban đầu là 10^4 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy DMEM được bổ sung 10% FBS, penicillin (100 IU/ml) và streptomycin (100 μ g/ml). Dòng tế bào ung thư máu dòng lympho K562 được nuôi cấy ở mật độ ban đầu là 10^4 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy RPMI 1640 được bổ sung 10% FBS, penicillin (100 IU/ml) và streptomycin (100 μ g/ml). Tế bào được nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂.

Tiếp theo, tiến hành thử nghiệm hợp chất MTT đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của Combretanone H. Hợp chất MTT tham gia phản ứng oxy hoá khử với ti thể của tế bào và tạo thành các formazan dạng tinh thể. Có thể dùng một số dung dịch khác nhau để vừa phá huỷ màng tế bào và hoà tan các tinh thể formazan, sau đó đo độ hấp thụ quang học của các dung dịch này ở bước sóng 595 nm. Phương pháp thử nghiệm này đánh giá sức sống của tế bào thông qua hoạt động hô hấp của chúng.

Combretanone H được pha trong dung môi DMSO ở nồng độ 10 mg/ml. Dung dịch chứa Combretanone H này và dung dịch Doxorubicin (chất đối chứng dương, 2mg/ml) được dùng để pha với môi trường nuôi cấy DMEM hoặc RPMI 1640 sao cho nồng độ cuối đạt 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 và 0 μ g/ml.

Sau 24 giờ nuôi cấy (đối với tế bào HepG2) và 48 giờ nuôi cấy (đối với tế bào K562 và MCF7), môi trường nuôi tế bào được loại bỏ và thay thế bằng 100 μ l môi trường nuôi cấy mới chứa nồng độ khác nhau của Combretanone H và Doxorubicin được nêu trên. Ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 72 giờ. Thêm 10 μ l MTT (5 mg/ml) vào mỗi giếng nuôi tế bào. Tiếp tục ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 3,5 giờ. Thêm 70 μ l dung dịch ly giải tế bào (chứa 10% SDS và 0,01 M HCl) vào mỗi giếng và ủ tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 16 giờ. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 595 nm. Vẽ đồ thị thể hiện phần trăm số tế bào chết bằng phần mềm Prism v5.0. Tỷ lệ tế bào chết được tính theo công thức sau:

$$I (\%) = 100 - 100 * (A_{595nm \text{ mẫu}} - A_{595nm \text{ nền}}) / (A_{595nm \text{ DMSO}} - A_{595nm \text{ nền}})$$

Trong đó:

I (%): phần trăm tế bào chết.

$A_{595nm \text{ mẫu}}$: giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm của tế bào đã được thử nghiệm với Combretanone H hoặc Doxorubicin.

$A_{595nm \text{ nền}}$: giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm của đối chứng trắng.

$A_{595nm \text{ DMSO}}$: giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm của tế bào nuôi trong môi trường nuôi cấy chứa DMSO (ở nồng độ tương ứng với các giếng chứa mẫu thử nghiệm).

Giá trị IC_{50} được tính bằng phương pháp đồ thị, giá trị được thể hiện là giá trị trung bình kèm theo độ lệch chuẩn. Phương pháp thống kê được sử dụng là Unpaired T-test with Welch's correction. Số liệu coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Tiếp theo, tiến hành phân tích kết quả độc tính của hợp chất Combretanone H có hoạt tính trung bình so với chất đối chứng Doxorubicin trên ba dòng tế bào ung thư gồm tế bào ung gan HepG2, tế bào ung thư máu K562 và tế bào ung thư vú MCF7 với giá trị IC_{50} được nêu trong Bảng 1.

Kết quả thử nghiệm cho thấy Combretanone H có hoạt tính trung bình trên các dòng tế bào ung thư này so với chất đối chứng Doxorubicin (Bảng 1).

Bảng 1. Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) của Combretanone H. Số liệu thể hiện giá trị trung bình \pm sai số chuẩn của thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Hợp chất	K562	HepG2	MCF-7
Combretanone H	21,0 \pm 1,2	37,3 \pm 2,0	70,3 \pm 0,7
Doxorubicin	2.2 \pm 0.7	2.4 \pm 0.2	13.9 \pm 2.2

Theo một phương án cụ thể, hợp chất Combretanone H phân lập từ lá cây trâm bầu thực hiện theo phương pháp bao gồm các bước:

- i) (i) thu gom nguyên liệu lá trâm bầu *Combretum quadrangulare* Kurz, phơi khô trong phòng bằng quạt;
- ii) nghiền nhỏ lá trâm bầu khô và chiết xuất với etanol ở 70°C trong 8 giờ; dịch lọc sau đó được cô quay làm khô ở điều kiện áp suất thấp để thu hồi cao thô;
- iii) tiến hành nạp cao thô lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động lần lượt với dung môi bao gồm n-hexan, hỗn hợp n-hexan:etyl axetat với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 1:1, etyl

acetat và n-butanol; và cô quay các phân đoạn thu được tương ứng cao n-hexan, cao n-hexan:etyl axetat, cao etyl axetat và cao n-butanol;

iv) tiến hành nạp cao n-hexan:etyl axetat lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa hỗn hợp dung môi bao gồm n-hexan:etyl axetat:axeton với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 5:1:1, và thu được 14 phân đoạn gồm phân đoạn P1, phân đoạn P2, phân đoạn P3, phân đoạn P4, phân đoạn P5, phân đoạn P6, phân đoạn P7, phân đoạn P8, phân đoạn P9, phân đoạn P10, phân đoạn P11, phân đoạn P12, phân đoạn P13, phân đoạn P14;

v) tiến hành nạp phân đoạn P12 lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa hỗn hợp dung môi bao gồm n-hexan:etyl axetat:axeton với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 5:1:1, và thu được 8 phân đoạn gồm phân đoạn T1, phân đoạn T2, phân đoạn T3, phân đoạn T4, phân đoạn T5, phân đoạn T6, phân đoạn T7, phân đoạn T8;

vi) tiến hành nạp phân đoạn T5 lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa hỗn hợp dung môi bao gồm n-hexan : cloroform : etyl axetat : axeton : nước với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 3 : 1 : 2 : 2 : 0,01 thu được các phân đoạn T5.1, phân đoạn T5.2, và phân đoạn T5.3; và

vii) tiến hành nạp phân đoạn T5.1 lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa hỗn hợp dung môi bao gồm n-hexan:etyl axetat:axeton với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 5:1:1, và thu được hợp chất Combretanone H.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phương pháp phân lập hợp chất Combretanone H từ 3,5 kg lá trâm bầu khô *Combretum quadrangulare* Kurz.

Đầu tiên, tiến hành thu gom nguyên liệu lá trâm bầu *Combretum quadrangulare* Kurz, phơi khô trong phòng bằng quạt và thu được 3,5 kg lá trâm bầu khô.

Tiếp theo, tiến hành nghiền nhỏ lá trâm bầu khô và chiết xuất với 10 lít etanol ở 70°C trong 8 giờ. Dịch lọc sau đó được cô quay làm khô ở điều kiện áp suất thấp và thu hồi được 118,4 g cao thô.

Tiếp theo, cao thô sau đó được phân đoạn bằng các dung môi n-hexan, hỗn hợp n-hexan:etyl axetat với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 1:1, etyl axetat và n-butanol. Cô quay các phân đoạn thu được tương ứng bao gồm cao n-hexan với khối lượng 6,1 g, cao n-hexan:etyl axetat với khối lượng 54,5 g, cao etyl axetat với khối lượng 30 g và cao n-butanol với khối lượng 12 g.

Tiếp theo, tiến hành nạp 54,5 g cao n-hexan:etyl axetat lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa hỗn hợp bao gồm n-hexan: etyl axetat : axeton với tỷ lệ thể tích/ thể tích là 5:1:1 thu được 14 phân đoạn gồm phân đoạn P1 với khối lượng 2,95 g, phân đoạn P2 với

khối lượng 0,72 g, phân đoạn P3 với khối lượng 0,94 g, phân đoạn P4 với khối lượng 0,82 g, phân đoạn P5 với khối lượng 0,69 g, phân đoạn P6 với khối lượng 0,23 g, phân đoạn P7 với khối lượng 0,2 g, phân đoạn P8 với khối lượng 0,15 g, phân đoạn P9 với khối lượng 0,3 g, phân đoạn P10 với khối lượng 0,1 g, phân đoạn P11 với khối lượng, phân đoạn P12 với khối lượng 6 g, phân đoạn P13 với khối lượng 13,1 g, phân đoạn P14 với khối lượng 20,1 g.

Tiếp theo, tiếp hành nạp 6 g phân đoạn P12 lên sắc ký cột silica gel sử dụng pha động chứa n-hexan:etyl axetat:axeton tỷ lệ thể tích/ thể tích là 5:1:1, và thu được 8 phân đoạn gồm phân đoạn T1 với khối lượng 1,3 g, phân đoạn T2 với khối lượng 0,2 g, phân đoạn T3 với khối lượng 0,3 g, phân đoạn T4 với khối lượng 1,0 g, phân đoạn T5 với khối lượng 1,2 g, phân đoạn T6 với khối lượng 0,3 g, phân đoạn T7 với khối lượng 0,12 g, phân đoạn T8 với khối lượng 0,5 g.

Tiếp theo, tiến hành nạp 1,2 g phân đoạn T5 lên sắc ký cột (CC-Column chromatography) sử dụng hệ dung môi chứa n-hexan : cloroform: etyl axetat : axeton : nước với tỷ lệ thể tích/thể tích là 3:1:2:2:0,01 thu được các phân đoạn T5.1 với khối lượng 130 mg, phân đoạn T5.2 với khối lượng 60 mg và phân đoạn T5.3 với khối lượng 30 mg.

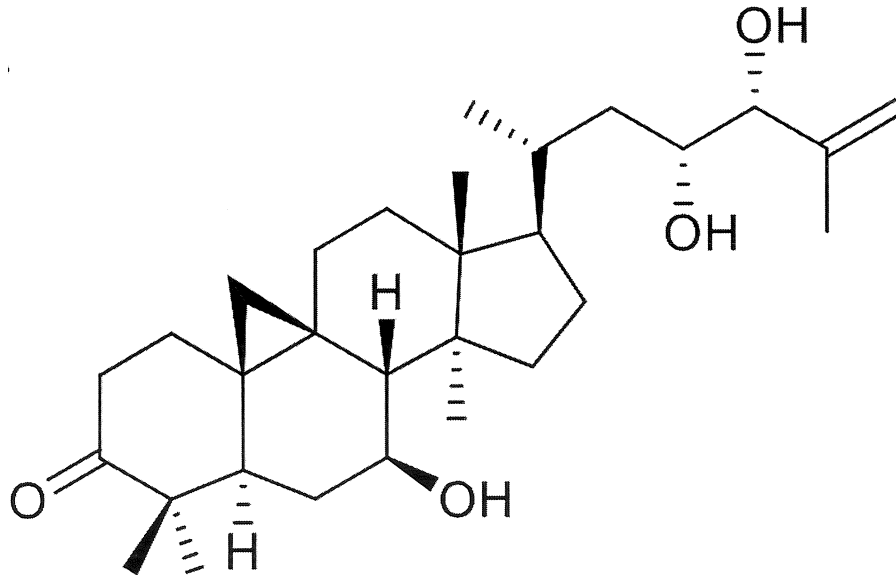
Cuối cùng, tiến hành nạp phân đoạn T5.1 lên sắc ký cột (CC) sử dụng hệ dung môi bao gồm hỗn hợp n-hexan:etyl axetat:axeton với tỷ lệ thể tích/thể tích là 5:1:1, và thu được hợp chất Combretanone H với khối lượng 1,4 mg.

Những lợi ích có thể đạt được

Combretanone H là một hợp chất mới được phát hiện và cô lập lần đầu tiên từ lá cây trám bầu *Combretum quadrangulare* Kurz. Chất này có khả năng gây độc tế bào ung thư và cần được tiếp tục nghiên cứu hoạt tính sinh học để ứng dụng làm sản phẩm điều trị hoặc hỗ trợ điều trị ung thư trong tương lai.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất Combretanone H gây độc tế bào ung thư phân lập từ cây Trâm bầu (*Combretum Quadrangulare* Kurz) có công thức:



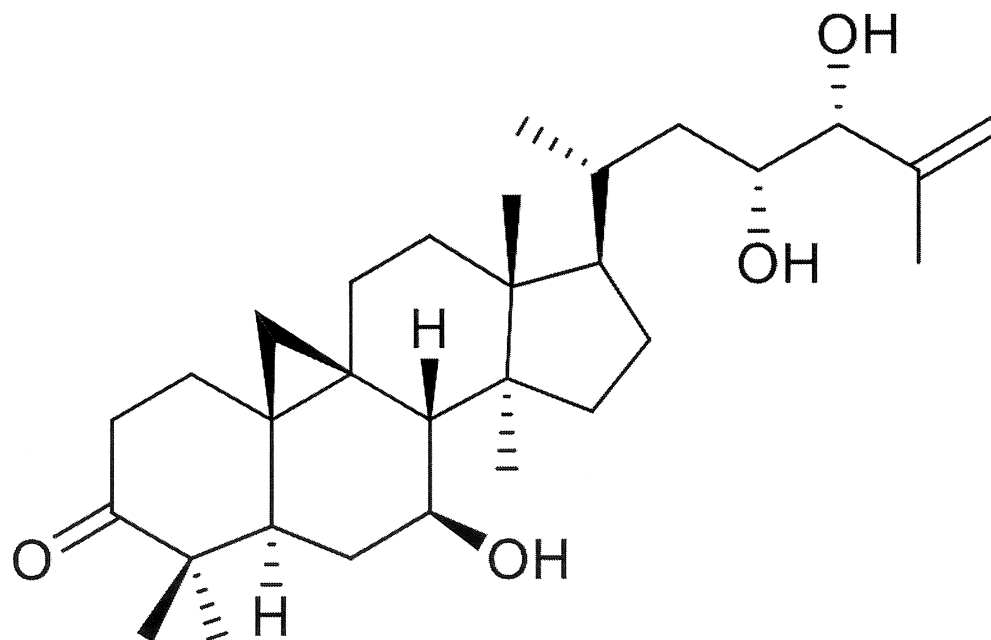


FIG.1