



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11)   
**1-0012278**

(51)<sup>7</sup> **C07D 493/00, C07B 63/00**

(13) **B**

(21) 1-2011-01267

(22) 17.05.2011

(45) 25.02.2014 311

(43) 25.09.2011 282

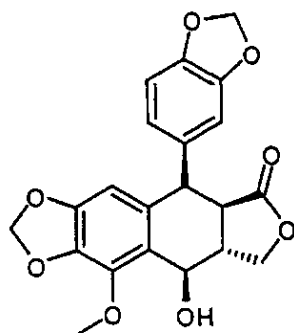
(73) **VIỆN HÓA SINH BIỂN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

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

(72) **Châu Văn Minh (VN), Phạm Văn Cường (VN), Nguyễn Văn Hùng (VN), Đoàn Thị Mai Hương (VN), Trịnh Thị Thanh Vân (VN)**

(54) **HỢP CHẤT 7-HYDROXY-6-METOXY-4,5:3',4'-BIS(METYLENĐIOXY)-2,7'-XYCLOLIGNAN-9,9'-OLIT VÀ PHƯƠNG PHÁP TÁCH HỢP CHẤT NÀY TỪ QUẢ CÂY CÁCH HOA ĐÔNG DƯƠNG CLEISTANTHUS INDOCHINENSIS MERR. EX CROIZ**

(57) **Sáng chế đề cập đến hợp chất mới 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xyclo lignan-9,9'-olit có công thức 1**



**Công thức 1**

trong đó hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào đối với 4 dòng tế bào bao gồm dòng tế bào ung thư biểu mô KB, dòng tế bào ung thư vú MCF-7, dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc MCF-7R và dòng tế bào ung thư đại tràng HT29. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tách hợp chất này từ quả cây Cách hoa đông dương *Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xylolignan-9,9'-olit (Cleistanxin) có công thức 1 và phương pháp tách hợp chất này từ quả cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz).

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

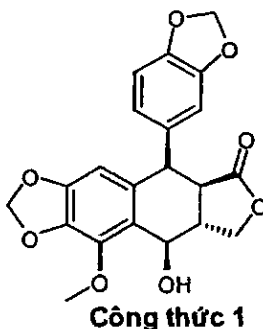
Cây Cách hoa đông dương có tên La tinh là *Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz, thuộc họ thầu dầu (Euphorbiaceae), là loài cây tiểu mộc, thường phân bố nơi ẩm thấp. Ở Việt Nam, *Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz phân bố chủ yếu ở miền Bắc và miền Trung (Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, NXB trẻ, quyển 2, tr. 232, 2000).

Chi *Cleistanthus* là nguồn giàu các hợp chất lignan với các hoạt tính sinh học thú vị. Các hợp chất lignan như cleistanthin A và B được tách từ loài *Cleistanthus collinus* có khả năng chống ung thư khá mạnh (Lakshmi T. G. et al., *Curr. Sci.*, 1970, 39, 395-396 và Ramesh C. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, 51, 1299-1300). Hợp chất cleistanthin A ức chế sự phát triển của tế bào ung thư mạnh hơn so với tế bào thường, đặc biệt là cleistanthin A tỏ ra hiệu quả hơn các thuốc chống ung thư hiện hành như *cis*-platin hay etoposit (Pradheepkumar C. P. et al., *Oncol. Res.*, 1999, 11, 225-232 và Pradheepkumar C. P. et al., *Mutation Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutat.*, 2000, 464, 185-193). Hiện 2 hợp chất này đang được nghiên cứu sâu hơn và rất có triển vọng trở thành tác nhân chữa trị một số bệnh ung thư.

Cho đến nay, chưa có công trình nghiên cứu khoa học nào công bố về các hợp chất lignan có hoạt tính của loài *Cleistanthus indochinensis*.

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất mới Cleistantoxin có công thức 1 thu được từ quả cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz). Hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào đối với 4 dòng tế bào là dòng tế bào ung thư biểu mô KB, dòng tế bào ung thư vú MCF-7, dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc MCF-7R và dòng tế bào ung thư đại tràng HT29.



Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp tách hợp chất 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xyclo lignan-9,9'-olit có công thức 1 từ quả cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz).

### Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Bảng dữ liệu phổ NMR của hợp chất Cleistantoxin (công thức 1) ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$ : 500.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125.76 MHz)

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp tách hợp chất mới 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xyclo lignan-9,9'-olit có công thức 1 từ quả cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz) bao gồm các công đoạn:

i) Tạo bột khô: Sấy khô quả của cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz.) ở nhiệt độ  $50^\circ\text{C}$  trong 2 ngày, nghiền nhỏ để thu được bột khô.

ii) Thu cặn chiết: Ngâm chiết bột khô thu được trong công đoạn (i) với diclometan theo tỉ lệ khối lượng nguyên liệu (g)/thể tích dung môi (ml) là  $\frac{1}{4}$  trong 24 giờ, công đoạn này được thực hiện 6 lần. Dịch chiết thu được sau 6 lần ngâm

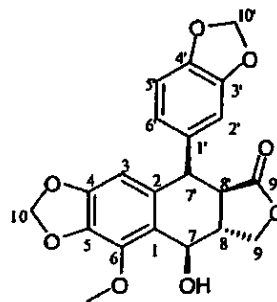
chiết được cô cất trong chân không dưới áp suất giảm để loại bỏ hoàn toàn dung môi và thu cặn chiết.

iii) Sắc ký cặn chiết: Sắc ký cột silica gel cặn chiết thu được ở công đoạn (ii) với hệ dung môi n-hexan/axeton theo tỉ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 100/0 đến 50/50 để thu được 8 phân đoạn chính F1-F8 (Bảng 1).

**Bảng 1: Các phân đoạn thu được từ sắc ký cặn chiết**

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi n-hexan/axeton
1	F1	100/0
2	F2	95/5
3	F3	90/10
4	F4	85/15
5	F5	từ 80/20 đến 75/25
6	F6	từ 70/30 đến 65/35
7	F7	từ 60/40 đến 55/45
8	F8	50/50

iv) Thu hợp chất cleistantoxin: kết tinh phân đoạn F8 trong hệ dung môi n-hexan/diclorometan với tỉ lệ thể tích là 4/6 để thu được hợp chất ở dạng tinh thể hình kim màu trắng. Đây là một hợp chất mới có tên khoa học theo IUPAC là 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xyclo lignan-9,9'-olit, có công thức 1, có điểm nóng chảy 195-196 °C, độ quay cực  $[\alpha]_D^{32} = -148^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>). Hợp chất mới được đặt tên là cleistantoxin.



**Công thức 1**

Hợp chất có công thức 1 được thử hoạt tính gây độc tế bào đối với 4 dòng tế bào là dòng tế bào ung thư biểu mô KB, dòng tế bào ung thư vú MCF-7, dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc MCF-7R và dòng tế bào ung thư đại tràng HT29. Thử nghiệm được thực hiện lặp lại 2 lần. Kết quả cho thấy hợp chất cleistantoxin (hợp chất có công thức 1) có hoạt tính rất tốt đối với cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ 0,014 đến 0,042  $\mu$ M.

Đặc biệt điều thú vị là hợp chất này tỏ ra hiệu quả hơn đối với dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc (MCF-7R:  $IC_{50}$ , 14 nM) so với dòng tế bào ung thư vú thường (MCF-7:  $IC_{50}$ , 36 nM). Cấu trúc hóa học của hợp chất cleistantoxin gần giống với dẫn xuất của podophylotoxin hiện đang được sử dụng làm thuốc chống ung thư như etoposid, teniposit và gần đây là hợp chất tafluposit. Đây là tiền đề cho việc nghiên cứu tổng hợp các dẫn chất có cấu trúc bền hơn và có hoạt tính cao hơn, nhằm phát triển và sử dụng hợp chất mới cleistantoxin như là tiền chất để tạo ra các thuốc chống ung thư.

#### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Điểm nóng chảy được đo trên máy đo điểm nóng chảy hiệu Boetius. Phổ hồng ngoại (IR) được ghi trên máy đo hồng ngoại biến đổi Fourier hiệu FTIR Impact- 410 bằng phương pháp nén viên KBr hoặc Film. Phổ tử ngoại khả kiến (UV- VIS) được đo trên máy Cintra 40. Phổ khối phun mù electron (ESI-MS) được đo trên máy ghi phổ khối Agilent 1100. Các phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân hiệu Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Độ quay cực được đo trên máy Polax-21 của hãng Atago.

Sắc ký cột được thực hiện trên chất mang là silica gel (hệ dung môi rửa giải với độ phân cực tăng dần). Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254, dày 0,25 mm.

Dòng tế bào ung thư biểu mô KB, ung thư vú MCF-7, ung thư vú kháng thuốc MCF-7R, ung thư đại tràng HT29 được cung cấp bởi ATCC.

**Ví dụ 1 :** Tách và xác định cấu trúc của hợp chất cleistantoxin (hợp chất có công thức 1) từ quả cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz)

300g quả tươi của cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz) thu hái được tại Quỳnh Châu - Nghệ An được sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 50°C trong 2 ngày, nghiền nhỏ để thu được 80g nguyên liệu bột khô. Sau đó, nguyên liệu bột quả này được ngâm chiết với điclorometan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng theo tỉ lệ ¼ (số g nguyên liệu/số ml dung môi). Công đoạn ngâm chiết được thực hiện 6 lần. Dịch chiết thu được từ 6 lần ngâm chiết được cô cất chân không dưới áp suất giảm để thu được 4,02g cặn chiết.

Từ cặn thu được, bằng phương pháp sắc ký cột silica gel với hệ dung n-hexan/axeton với tỉ lệ thể tích từ 100/0 đến 50/50 thu được 8 phân đoạn chính (Bảng 2).

**Bảng 2: Các phân đoạn thu được từ sắc ký cặn chiết**

STT	Phân đoạn	Tỉ lệ thể tích hệ dung môi n-hexan/axeton	Khối lượng các phân đoạn (mg)
1	F1	100/0	478
2	F2	95/5	362
3	F3	90/10	279
4	F4	85/15	54
5	F5	từ 80/20 đến 75/25	140
6	F6	từ 70/30 đến 65/35	213
7	F7	từ 60/40 đến 55/45	142
8	F8	50/50	150

Phân đoạn F8 (150mg) được kết tinh trong 10ml hệ dung môi n-hexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> với tỉ lệ thể tích là 4/6 để thu được 85mg chất mới có tên khoa học là 7-hydroxy-6-metoxi-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xyclo lignan-9,9'-olit và công thức phân tử là C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub> được thể hiện bằng công thức 1, có điểm nóng chảy là 195-196°C, độ quay cực  $[\alpha]_D^{32} = -148^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>). Hợp chất này kết tinh dưới

dạng tinh thể hình kim màu trắng và được đặt tên là cleistantoxin. Cấu trúc hóa học của hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR 1D và 2D, phổ khối phân giải cao HR-MS, phổ hồng ngoại IR và phổ tử ngoại UV.

HR-ESI-MS  $m/z$  421,0899  $[M + Na]^+$  (Theo tính toán  $C_{21}H_{18}O_8Na$ ;  $m/z$  421,0899);

IR (KBr):  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ): 3565; 3466; 2931; 1773; 1617; 1483; 1297, 1047.

**Ví dụ 2:** Thử nghiệm về hoạt tính của các dịch chiết và hợp chất có công thức 1

Thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào của các dịch chiết, các phân đoạn và chất có công thức 1 trên các dòng tế bào ung thư ở nồng độ 1  $\mu g/ml$  và 10  $\mu g/ml$  với số thử nghiệm lặp lại  $N=2$ . Phương pháp thử nghiệm về độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư quốc gia Hoa kỳ (NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro* (Mosmann T. R. et al., *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63, 1983). Tế bào ung thư được duy trì liên tục ở các điều kiện tiêu chuẩn. Sau khi tế bào phát triển đến pha log, sẽ được sử dụng để tiến hành thử nghiệm với các chất thử đã được chuẩn bị ở các thang nồng độ khác nhau trên đĩa 96 giếng. Đĩa thử nghiệm bao gồm: tế bào + môi trường nuôi cấy + chất thử, được ủ trong tủ ấm  $CO_2$ , ở nhiệt độ  $37^\circ C$  trong 3 -5 ngày để tế bào tiếp tục phát triển. Sau đó tế bào được cố định vào đáy giếng bằng axit tricloaxetic (TCA) 20% trong 30 phút ở nhiệt độ  $4^\circ C$  và nhuộm bằng sulfochloramin B (SRB) 0,4% (w/v) trong 1 giờ ở nhiệt độ  $37^\circ C$ . Sau đó lượng SRB dư được gạn bỏ và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng axit axetic 1% và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng sử dụng dung dịch Tris base để hoà tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, lắc nhẹ trong 10 phút. Hàm lượng màu của chất nhuộm SRB được xác định qua phổ hấp phụ ở bước sóng 515nm.

Cặn chiết và 8 dịch chiết phân đoạn của cột sắc ký đầu tiên của cặn chiết, cùng hợp chất mới cleistantoxin (hợp chất có công thức 1) được thử hoạt tính gây độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư biểu mô KB. Kết quả cho thấy cặn chiết và các phân đoạn F6, F7, F8 có hoạt tính rất tốt đối với dòng tế bào ung thư biểu mô KB với giá trị % ức chế từ 64% đến 95% ở nồng độ 1  $\mu g/mL$ . Hợp chất mới Cleistantoxin được tách từ phân đoạn có hoạt tính F8 thể hiện hoạt tính gây độc tế

bào đối với dòng tế bào ung thư biểu mô KB với giá trị % ức chế là 97% ở cả 2 nồng độ 10 µg/mL và 1 µg/mL (Bảng 3).

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

STT	Mẫu thử	Trị số % ức chế đối với dòng tế bào ung thư biểu mô KB	
		Nồng độ 10 µg/ml	Nồng độ 1 µg/ml
1	Cận chiết	95%	90%
2	F1	0%	10%
3	F2	0%	0%
4	F3	25%	2%
5	F4	27%	4%
6	F5	14%	5%
7	F6	92%	84%
8	F7	95%	64%
9	F8	96%	95%
10	Cleistantoxin	97%	97%

Hợp chất cleistantoxin tiếp tục được thử hoạt tính đối với 4 dòng tế bào ung thư như ung thư biểu mô KB, ung thư vú MCF-7, ung thư vú kháng thuốc MCF-7R và ung thư đại tràng HT29. Phép thử được thực hiện 2 lần, kết quả cho thấy hợp chất cleistantoxin có hoạt tính rất tốt đối với cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng 0,014 đến 0,042 µM (Bảng 4).

**Bảng 4: Kết quả thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào của cleistantoxin**

TT	Mẫu thử	Tên dòng tế bào ung thư			
		KB $IC_{50}$ (µM)	MCF-7 $IC_{50}$ (µM)	MCF-7R $IC_{50}$ (µM)	HT29 $IC_{50}$ (µM)
1	Lần 1	0,018	0,038	0,014	0,029
2	Lần 2	0,027	0,035	0,015	0,042

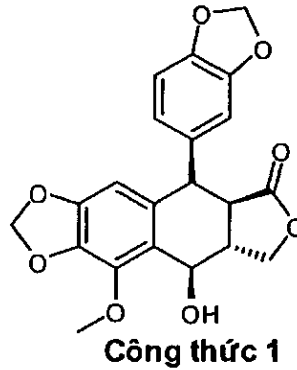


**Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Từ quả cây Cách hoa đông dương (*Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz), các tác giả sáng chế đã tách và xác định được cấu trúc hóa học của hợp chất 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xycloignan-9,9'-olit (cleistantoxin). Đây là một hợp chất có hoạt tính rất tốt đối với cả 4 dòng tế bào ung thư biểu mô KB, ung thư vú MCF-7, ung thư vú kháng thuốc MCF-7R và ung thư đại tràng HT29 với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng 0,014 đến 0,042  $\mu$ M. Đặc biệt điều thú vị là đối với dòng tế bào ung thư vú, hợp chất này tỏ ra hiệu quả hơn trên dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc (MCF7R:  $IC_{50}$ , 14 nM) so với dòng tế bào ung thư vú thường (MCF7:  $IC_{50}$ , 36 nM). Cấu trúc hóa học của hợp chất cleistantoxin gần giống với dẫn xuất của podophylotoxin hiện đang được sử dụng làm thuốc chống ung thư như etoposid, teniposid và gần đây là hợp chất tafluposid. Đây là tiền đề cho việc nghiên cứu tổng hợp các dẫn chất có cấu trúc bền hơn và có hoạt tính cao hơn, nhằm phát triển và sử dụng hợp chất mới cleistantoxin như là tiền chất để tạo ra các thuốc chống ung thư.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất 7-hydroxy-6-metoxy-4,5:3',4'-bis(metylendioxy)-2,7'-xycloolignan-9,9'-olit có công thức 1 tách được từ quả cây Cách hoa đông dương *Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz



trong đó hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào đối với 4 dòng tế bào ung thư bao gồm dòng tế bào ung thư biểu mô KB, dòng tế bào ung thư vú MCF-7, dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc MCF-7R và dòng tế bào ung thư đại tràng HT29.

2. Phương pháp tách hợp chất theo điểm 1 bao gồm các công đoạn:

i) tạo bột khô bằng cách sấy khô quả của cây Cách hoa đông dương *Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz. ở nhiệt độ 50°C trong 2 ngày, nghiền nhỏ để thu được bột khô;

ii) thu cặn chiết bằng cách ngâm chiết bột khô thu được trong công đoạn (i) với điclorometan trong 24 giờ theo tỉ lệ khối lượng nguyên liệu (g)/thể tích dung môi (ml) là 1/4, công đoạn này được lặp lại 6 lần, sau đó tổng dịch chiết được cô cất trong chân không dưới áp suất giảm để loại bỏ hoàn toàn dung môi và thu cặn chiết;

iii) sắc ký cặn chiết bằng cách sắc ký cột silica gel cặn chiết thu được ở công đoạn (ii) với hệ dung môi n-hexan/axeton theo tỉ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 100/0 đến 50/50 để thu được 8 phân đoạn chính F1-F8; và

iv) thu hợp chất theo điểm 1 bằng cách kết tinh phân đoạn F8 thu được ở công đoạn (iii) với hệ dung môi n-hexan/axeton có tỷ lệ thể tích là 50/50 trong hệ dung môi n-hexan/điclorometan có tỉ lệ thể tích là 4/6 để thu được hợp chất theo điểm 1.

Hình 1: Bảng dữ liệu phổ NMR của hợp chất Cleistantoxin (1) (CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H: 500.13 MHz, <sup>13</sup>C: 125.76 MHz)

No	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm), J (Hz)
1	124,08	
2	132,95	
3	104,14	6,22 (s, 1H)
4	149,39	
5	134,86	
6	141,52	
7	70,45	5,00 (d, J=9,0 Hz, 1H)
8	38,66	2,86 (m, 1H)
9	71,77	4,02 (dd, J=8,5; 10,0 Hz, 1H) 4,57 (t, J=8,5 Hz, 1H)
10	101,25	5,88 (d, J=1,5 Hz, 1H) 5,91 (d, J=1,5 Hz, 1H)
1'	133,01	
2'	111,13	6,71 (d, J=1,5 Hz, 1H)
3'	146,53	
4'	147,23	
5'	107,59	6,65 (d, J=8,0 Hz, 1H)
6'	124,66	6,63 (dd, J=1,5; 8,0 Hz, 1H)
7'	43,91	4,46 (d, J=4,5 Hz, 1H)
8'	44,61	2,71 (dd, J=4,5; 15,0 Hz, 1H)
9'	174,18	
10'	100,87	5,86 (dd, J=1,5; 3,0 Hz, 2H)
OCH <sub>3</sub>	59,80	4,12 (s, 3H)