



(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)



1-0037306

(51)^{2019.01} A61K 36/00; A61K 36/48

(13) B

(21) 1-2021-02941

(22) 24/05/2021

(45) 25/10/2023 427

(43) 26/07/2021 400

(76) 1. Phạm Thị Lý (VN)

Nhà số 63, Cao Lỗ, Phan Xá, Đông Anh, Hà Nội

2. Nguyễn Việt Anh (VN)

Nhà số 63, Cao Lỗ, Phan Xá, Đông Anh, Hà Nội

3. Nguyễn Trung Hiếu (VN)

Nhà số 63, Cao Lỗ, Phan Xá, Đông Anh, Hà Nội

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP ỨNG CHẾ TẾ BÀO UNG THƯ GAN TỪ CÂY GONIOTHALAMUS SP. HTHP-2020

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ứng chế tế bào ung thư gan từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020, bằng cách chiết chọn lọc, các tác giả đã thu được 8 hoạt chất bao gồm goniothalamine, 4-Deoxyanomonotacin, (2,4-*cis/trans*)-anomonotacin, gigantransenin A, gigantransenin B, goniothalamine, annonacin và altholacton có khả năng ứng chế sự phát triển của tế bào ung thư gan. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến hỗn hợp ứng chế tế bào ung thư gan thu được từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa học các hợp chất thiên nhiên, cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 và hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trung bình hàng năm tại Việt Nam có khoảng 10.000 ca ung thư gan mới phát hiện, và khoảng 22.000 ca tử vong, trong đó, ung thư tế bào gan HCC chiếm tỷ lệ gây tử vong lên tới 80% tổng số các ca ung thư gan. Có nhiều dược phẩm đã được phát triển nhằm ức chế tế bào ung thư gan, kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân ung thư gan. Ví dụ về các loại dược phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư gan bao gồm Cabometyx (Cabozantinib-S-Malate), Cyramza (Ramucirumab), Keytruda (Pembrolizumab), Levima (Lenvatinib Mesylate), Nexavar (Sorafenib Tosylate), Opdivo (Nivolumab), Stivarga (Regorafenib). Tuy nhiên, những dược phẩm này chủ yếu là các hoạt chất tổng hợp, có nhiều tác dụng phụ mà ảnh hưởng đến gan, thận, và do đó, gây ra sự quá tải cho việc đào thải chất độc vốn đã yếu của người bệnh.

Đã có nhiều nghiên cứu nhằm phát triển các loại thuốc ngăn ngừa và điều trị bệnh ung thư gan. Tuy nhiên, ung thư gan vẫn là bệnh mà y học chưa có liệu pháp điều trị triệt để. Các phương pháp điều trị phụ trợ như hóa trị hoặc xạ trị kết hợp với các loại thuốc ức chế cũng chỉ nhằm kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân. Mặc dù vậy, bệnh ung thư gan vẫn có thời gian tử vong nhanh nhất, thường bệnh nhân cũng chỉ kéo dài thời gian sống từ 3 đến 6 tháng kể từ khi phát hiện tế bào ung thư.

Trong tự nhiên có nhiều loài thực vật từ lâu đã được sử dụng như những thảo dược nhằm bồi bổ sức khỏe và nâng cao khả năng chống chịu bệnh. Có nhiều nỗ lực nhằm phát triển những sản phẩm có từ tự nhiên để phát triển các hoạt chất trên cơ sở tri thức truyền thống để làm cơ sở phát triển dược phẩm. Một trong số đó là những chi thực vật được người bản địa sử dụng như những bài thuốc bí truyền. Một trong số những cây thuốc mới được tìm kiếm là phát triển đó là cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020. Đây là một loài thực vật có hoa thuộc chi Giác đế (*Goniothalamus*) thuộc họ Na

(Annonaceae) được đề cập đến với tên Nhất Dương Sinh và được một số đồng bào miền núi sử dụng như những bài thuốc bảo vệ sức khỏe, bảo vệ gan khỏi tác hại của rượu, cây này thường được sử dụng để ngâm rượu như một sản phẩm tăng cường sinh lý, giảm mệt mỏi. Cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 được tìm kiếm và phát triển bởi nhóm tác giả sáng chế và đã xác định được rằng đây là một loài mới. Cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 thường bị nhầm với cây *Goniothalamus vietnamensis* Ban (bồ bèo đen), tuy nhiên, lá cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 nhỏ hơn và phần rễ có mùi thơm hơn cây bồ bèo đen. Cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 ra hoa từ tháng giêng đến tháng 4 âm lịch, hoa màu xanh cốm, quả khi non có màu xanh đậm rồi chuyển dần sang nâu đen, khi chín có màu vàng. Quả *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 mọc thành từng chùm nhỏ, mỗi chùm có khoảng từ 10 đến 20 quả nhỏ, mỗi quả có từ một đến hai hạt. Trong những quả có hai hạt thì một hạt hình chóp, một hạt hình tứ giác. Hạt được thu từ quả chín từ tháng 10 đến tháng 12 âm lịch hằng năm để làm giống.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu phân lập các thành phần hoạt chất từ chi *Goniothalamus*, ví dụ Muhammad Shahzad Aslam et al., *Goniothalamus*: Phytochemical and Ethnobotanical Review, Recent Advances in Biology and Medicine, Vol. 2, Pages 34-47, 2016 đã tổng hợp các nghiên cứu với một danh sách các loài thuộc chi *Goniothalamus*, trong đó đã phân tách ra khoảng 70 các chất khác nhau. Christophe Wiart et al, *Goniothalamus* Species: A Source of Drugs for the Treatment of Cancers and Bacterial Infections?, School of Pharmacy, The University of Nottingham (Malaysia Campus), Jalan Broga, 43500 Semenyih, Selangor, Malaysia đã đề cập đến một số hoạt chất có khả năng chống ung thư từ cây *Goniothalamus scortechinii*. Tuy nhiên, các kết quả thử nghiệm từ hai tài liệu này cho thấy việc phân lập từng hoạt chất có trong cây *Goniothalamus* rất phức tạp do cây có nhiều chất khác nhau, đồng thời kết quả thử nghiệm cho thấy hiệu quả ức chế khối u không cao.

Mặc dù cây *Goniothalamus* đã được chứng minh có tác dụng điều trị bệnh ung thư dựa trên một số thành phần hoạt chất được phân lập, tuy nhiên, các nghiên cứu chi tiết, cụ thể về khả năng tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư hiệp đồng của các nhóm hoạt chất có trong cây *Goniothalamus* vẫn chưa được nghiên cứu cụ thể.

Ngoài ra, cũng có nhiều nghiên cứu về các hoạt chất thiên nhiên cho thấy rằng, đặc tính của một số chất trong tự nhiên có tác dụng kìm hãm hoặc cũng có tác dụng hiệp đồng. Do đó, dựa vào kinh nghiệm dân gian, các cách chế biến, xử lý theo truyền thống sẽ loại bỏ một số thành phần bất lợi để thu được tác dụng mong muốn từ thảo dược. Tác dụng hỗ trợ và kìm hãm này có liên quan đến hoạt tính của một số hoạt chất có trong cây. Do đó, cần có những nghiên cứu dựa trên kinh nghiệm dân gian và tri thức hiện đại để có thể đưa ra những thành phần cho phép tăng cường tác dụng để phát triển được phẩm điều trị ung thư hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 và hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 thu được từ cây này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái phần rễ của cây *Goniothalamus* sp.HTHP-2020, loại bỏ tạp chất, thái lát rồi phơi khô, xay thành bột thu được nguyên liệu bột rễ cây *Goniothalamus* sp.HTHP-2020 khô;

b) ngâm chiết nguyên liệu bằng cách chuyển phần bột rễ cây *Goniothalamus* sp.HTHP-2020 vào thiết bị ngâm chiết chứa polyoxyetylen (23) lauryl ete theo tỷ lệ 1/5 (trọng lượng/thể tích) và siêu âm với tần số 1500 Hz trong 30 phút, tiếp đó ngâm chiết ở nhiệt độ 80°C trong bình kín trong 2 ngày, lặp lại quá trình ngâm chiết 2 lần, sau đó lọc thu riêng phần dịch chiết và phần bã;

c) chiết phân đoạn dịch chiết bằng cách lọc phần dịch chiết và loại dung môi dưới áp suất giảm còn đến khoảng 1% thể tích, sau đó nhồi cao chiết lên cột silica gel, tiến hành rửa giải với hệ dung môi là ete dầu hỏa (EP) và etyl axetat (EtOAc) theo các tỷ lệ EP=100%; EP/EtOAc=70/30; EP/EtOAc=60/40; EP/EtOAc=50/50; EP/EtOAc=40/60; EP/EtOAc=30/70 và EtOAc=100% thu ba phân đoạn

EP/EtOAc=70/30, EP/EtOAc=60/40 và EP/EtOAc=40/60, sau đó tinh chế các hoạt chất bằng cách:

+ nhồi phân đoạn EP/EtOAc=70/30 lên cột silica gel và ổn định bằng dung môi CHCl_3 :MeOH (metanol) tỷ lệ 98/2, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất goniothalamycin dạng bột màu vàng nhạt;

+ nhồi phân đoạn EP/EtOAc=60/40 lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 95/5, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CH_3OH /MeOH tỷ lệ 9/1 và CH_3OH /MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi loại bỏ dung môi thu hai hợp chất 4-deoxyanomotacin và (2,4-*cis/trans*)- anomontacinon dạng bột màu vàng nhạt; và

+ nhồi phân đoạn EP:EtOAc=40/60 lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 90/10, tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi CH_3OH /MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất gigantransenin B dạng bột màu vàng;

d) chiết phần bã bằng cách chiết tiếp phần bã bằng hệ dung môi etanol/axit axetic 50:50 theo tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1/10 (trọng lượng/thể tích) trong thời gian 24 giờ, sau khi lọc, thu phần dịch, sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 1%, sau đó bổ sung NH_4OH đến pH=9, lọc bỏ kết tủa, trung hòa và loại dung môi, phần cao đặc được hấp phụ lên cột silica gel rồi rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH với tỷ lệ MeOH tăng dần từ 1 đến 15%, thu phân đoạn MeOH nồng độ 3%, 5%, 7% và 10%, các phân đoạn này được cô loại dung môi thu được bốn hợp chất bao gồm goniothalamine, altholacton, annonacin và gigantransenin A, tương ứng;

e) thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bằng cách phối trộn các hoạt chất thu được ở trên theo tỷ lệ % sau:

Goniothalamine	5-15
4-Deoxyanomotacin	25-35
(2,4- <i>cis/trans</i>)- anomontacinon	10-20
Gigantransenin A	5-15
Gigantransenin B	1-10
Goniothalamycin	10-20

Annonacin	1-10
Altholacton	5-15

sau khi trộn đều, thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan ở dạng bột màu vàng nhạt.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan thu được từ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020 bằng quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % sau:

Goniiothalamine	5-15
4-Deoxyanomonotacin	25-35
(2,4- <i>cis/trans</i>)- anomonotacinon	10-20
Gigantransenin A	5-15
Gigantransenin B	1-10
Goniiothalamine	10-20
Annonacin	1-10
Altholacton	5-15

Hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan thu được từ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020 cho thấy có khả năng ức chế tế bào ung thư gan, có khả năng phát triển thuốc điều trị ung thư gan. Ngoài ra chế phẩm này cho thấy có hoạt tính kháng viêm hiệu quả.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thỏ thu được từ Ví dụ 2 ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thỏ bình thường được nhuộm bằng Hematoxylin-Eosin, (B) Hình thái vi thể gan thỏ đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) Hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử (D) Hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử với tế bào gan thoái hóa vừa.

Hình 2 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột thu được từ Ví dụ 2 ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) Hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) Hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có

thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) Hình thái vi thể thận thỏ của lô thử nghiệm sau 4 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Hình 3 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thỏ thu được từ Ví dụ 2 sau thử nghiệm 2, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thỏ bình, (B) Hình thái vi thể gan thỏ đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) Hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm có tế bào thoái hóa vừa (D) Hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau khi điều trị 2 tuần với tế bào gan thoái hóa nhẹ.

Hình 4 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột thu được từ Ví dụ 2 sau 2 tuần ngừng thử nghiệm, trong đó (A) Hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) Hình thái vi thể thận thỏ của lô đối chứng có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) Hình thái vi thể thận thỏ của lô thử nghiệm sau 2 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Hình 5 là ảnh chụp kết quả thử nghiệm khả năng ức chế khối u của các hợp chất thử nghiệm trên tế bào ung thư gan HEP-G2 sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch. (A) Hình thái của tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung DMSO 1% (ĐC). (B) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp A (CT1), (C) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp B (CT2), (D) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp C (CT3), (E) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hoạt chất Ramucirumab (CT4).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm minh họa để hiểu rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 là dạng cây bụi thuộc họ Na (Annonaceae). Cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 đã được tác giả Phạm Thị Lý và cộng sự phát triển và đăng ký là giống cây trồng. Cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được xác định là một loài mới thuộc chi Giác đế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu; b) ngâm chiết nguyên liệu; c) chiết phân đoạn dịch chiết; d) chiết phần bã bột rễ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020; và e) thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu, tiến hành thu hái phần rễ của cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020. Phần rễ của cây có màu đen, dạng rễ cọc, mùi thơm. Sau khi loại bỏ tạp chất, phần rễ được thái lát rồi phơi khô trong bóng râm. Quá trình phơi không được để nhiệt độ cao quá 80°C để tránh mất mùi thơm đặc trưng của nguyên liệu cũng như tránh ánh sáng chiếu trực tiếp làm oxy hóa hoạt chất. Sau đó, tiến hành xay nguyên liệu thành bột thu được nguyên liệu bột rễ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020 khô. Bột nguyên liệu tốt nhất được xay qua cỡ sàng 1mm để thuận lợi cho việc ngâm chiết và tăng hiệu quả, rút ngắn thời gian chiết.

Trong bước ngâm chiết nguyên liệu, dung môi được sử dụng để ngâm chiết là polyoxyetylen (23) lauryl ete. Quá trình ngâm chiết được tiến hành bằng cách chuyển phần bột rễ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020 vào thiết bị ngâm chiết chứa polyoxyetylen (23) lauryl ete theo tỷ lệ 1/5 (trọng lượng/thể tích). Tiếp đó tiến hành siêu âm với tần số 1500 Hz trong 30 phút. Quá trình siêu âm giúp tăng hiệu quả ngấm dung môi vào nguyên liệu nhằm giảm thời gian chiết. Cần lưu ý rằng, do rễ cây *Goniiothalamus* sp. HTHP-2020 khá cứng nên việc ngấm dung môi thường kéo dài. Việc siêu âm giúp giảm thời gian ngấm và do đó rút được thời gian chiết. Quá trình ngâm chiết được thực hiện ở nhiệt độ 80°C trong bình kín trong 2 ngày. Sau khi ngâm chiết, phần dung môi được rút kiệt và tiến hành lặp lại quá trình ngâm chiết như trên. Sau khi kết thúc, phần dịch được lọc, thu riêng phần dịch và phần bã để tiếp tục các công đoạn sau.

Trong bước chiết phân đoạn dịch chiết, tiến hành lọc phần dịch để loại tạp chất còn lại. Tiếp đó tiến hành cô loại dung môi dưới áp suất giảm còn đến khoảng 1% thể tích. Quá trình này lưu ý không được để nhiệt độ quá 80°C để tránh biến tính các hoạt chất có trong dịch chiết. Sau khi cô, sản phẩm thu được ở dạng cao đặc màu nâu. Tiếp đó, tiến hành sắc ký bằng cách nhồi cao chiết lên cột silica gel và tiến hành rửa giải với hệ dung môi là ete dầu hỏa (EP) và etyl axetat (EtOAc) với các tỷ lệ khác nhau nhằm

thu được các phân đoạn mong muốn. Các hệ dung môi được sử dụng bao gồm các tỷ lệ EP=100%; EP/EtOAc=70/30; EP/EtOAc=60/40; EP/EtOAc=50/50; EP/EtOAc=40/60; EP/EtOAc=30/70 và EtOAc=100%. Sau khi rửa giải, thu ba phân đoạn EP/EtOAc=70/30, EP/EtOAc=60/40 và EP/EtOAc=40/60, sau đó tinh chế các hoạt chất mong muốn theo từng phân đoạn thu được.

Phân đoạn EP/EtOAc=70/30 được nhồi lên cột silica gel và ổn định bằng dung môi CHCl₃:MeOH tỷ lệ 98/2. Tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH tỷ lệ 8/2. Sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất dạng bột màu vàng nhạt.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung C₃₅H₆₄O₇ và có trọng lượng phân tử (MW) là 596,89g. Hợp chất này được xác định là goniiothalamycin có tên theo IUPAC là (2S)-2-methyl-4-[(2R,8R,11R)-2,8,11-trihydroxy-11-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxypentadecyl]oxolan-2-yl]undecyl]-2H-furan-5-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Phân đoạn EP/EtOAc=60/40 được nhồi lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH tỷ lệ 95/5. Tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CH₃OH/MeOH tỷ lệ 9/1 và CH₃OH/MeOH tỷ lệ 8/2. Sau khi loại bỏ dung môi thu hai hợp chất dạng bột màu vàng nhạt.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung C₃₇H₆₈O₆ và có trọng lượng phân tử (MW) là 608,9g. Hợp chất này được xác định là 4-deoxyanmontacin có tên theo IUPAC là 2S)-4-[(8R,15R)-8,15-dihydroxy-15-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]pentadecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung C₃₇H₆₈O₇ và có trọng lượng phân tử (MW) là 624,9g. Hợp chất này được xác định là (2,4-*cis/trans*)- anomontacinon có tên theo IUPAC là (5R)-5-[(6S,13R)-6,13-dihydroxy-13-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]tridecyl]-3-(2-oxopropyl)oxolan-2-on. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Phân đoạn EP/EtOAc=40/60 được nhồi lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH tỷ lệ 90/10. Tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CH₃OH/MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất dạng bột màu vàng.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung C₃₇H₆₆O₇ và có trọng lượng phân tử (MW) là 622,93g. Hợp chất này được xác định là gigantransenin B có tên theo IUPAC là (2S)-4-[(8R,11R)-11-[(2R,5R)-5-[(E,1R,6S)-1,6-dihydroxyheptadec-4-enyl]oxolan-2-yl]-8,11-dihydroxyundecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Phân bã của bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 được ngâm chiết tiếp bằng hệ dung môi etanol/axit axetic 50:50. Nguyên liệu bã được bổ sung vào hệ dung môi etanol/axit axetic theo tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1/10 (trọng lượng/thể tích). Quá trình chiết này được thực hiện trong thời gian 24 giờ. Sau khi chiết, tiến hành lọc, thu phần dịch. Phần dịch được loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 1% thể tích. Tiến hành kiểm hóa dung môi bằng NH₄OH 2M đến pH=9. Phần kết tủa xuất hiện được lọc bỏ. Tiếp đó, tiến hành trung hòa và loại dung môi. Phần cao đặc được hấp phụ lên cột silica gel rồi rửa giải bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH với tỷ lệ MeOH tăng dần từ 1 đến 15%. Sau khi rửa giải, tiến hành thu các phân đoạn MeOH nồng độ 3%, 5%, 7% và 10%. Các phân đoạn này được cô loại dung môi thu được bốn hợp chất bao màu vàng nhạt, tương ứng.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung C₁₃H₁₂O₇ và có trọng lượng phân tử (MW) là 200,2g. Hợp chất này được xác định là goniothalamine có tên theo IUPAC là (2R)-2-[(E)-2-phenylethenyl]-2,3-dihydropyran-6-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung C₁₃H₁₂O₄ và có trọng lượng phân tử (MW) là 232,2g. Hợp chất này được xác định là altholacton có tên theo IUPAC là (2R,3R,3aS,7aS)-3-hydroxy-2-phenyl-2,3,3a,7a-tetrahydrofuro[3,2-b]pyran-5-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung $C_{35}H_{67}O_7$ và có trọng lượng phân tử (MW) là 596,98g. Hợp chất này được xác định là annonacin có tên theo IUPAC là (2S)-2-methyl-4-[(2R,8R,13R)-2,8,13-trihydroxy-13-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]tridecyl]-2H-furan-5-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Hợp chất thu được này được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả cho thấy hợp chất thu được này có công thức chung $C_{37}H_{66}O_7$ và có trọng lượng phân tử (MW) là 622,93g. Hợp chất này được xác định là gigantransenin A có tên theo IUPAC là (2S)-4-[(8R,11R)-11-[(2R,5R)-5-[(E,1R,6R)-1,6-dihydroxyheptadec-4-enyl]oxolan-2-yl]-8,11-dihydroxyundecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one. Đây được xác định là hợp chất được biết đến với tác dụng kháng viêm, chống nấm.

Trong bước thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan, tiến hành phối trộn các hoạt chất thu được ở trên theo tỷ lệ % sau:

Goniothalamín	5-15
4-Deoxyanomotacin	25-35
(2,4- <i>cis/trans</i>)- anomotacinon	10-20
Gigantransenin A	5-15
Gigantransenin B	1-10
Goniothalamicin	10-20
Annonacin	1-10
Altholacton	5-15

sau khi trộn đều, thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan ở dạng bột màu vàng nhạt.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan thu được từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 bằng quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % sau:

Goniothalamín	5-15
4-Deoxyanomotacin	25-35
(2,4- <i>cis/trans</i>)- anomotacinon	10-20

Gigantransenin A	5-15
Gigantransenin B	1-10
Goniothalamycin	10-20
Annonacin	1-10
Altholacton	5-15

Hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan thu được từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 cho thấy có khả năng ức chế tế bào ung thư gan, có khả năng phát triển thuốc điều trị ung thư gan. Ngoài ra chế phẩm này cho thấy có hoạt tính kháng viêm hiệu quả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây Goniothalamus sp.HTHP-2020

Phần rễ của cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 được thu hái, sau khi loại bỏ tạp chất, rễ cây được thái lát rồi phơi khô đến hàm ẩm còn khoảng 5%. Tiến hành xay rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 khô thành bột với cỡ sàng 1mm, thu được nguyên liệu bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 khô.

Cân 10kg bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 khô và chuyển vào bình ngâm kiệt chứa 50 lít polyoxyetylen (23) lauryl ete. Tiến hành siêu âm với tần số 1500 Hz trong 30 phút. Sau khi gia nhiệt và ngâm chiết ở nhiệt độ 80°C trong bình ngâm kiệt kín trong 2 ngày, phần dịch được gom lại. Quá trình chiết được lặp lại, phần dịch chiết được tách ra khỏi phần bã, thu được phần bã (10 kg) và phần dịch chiết (100 lít).

Phần dịch chiết được lọc và cất loại dung môi thu được khoảng 1 kg cao đặc. Tiếp đó nhồi cao chiết lên cột silica gel, tiến hành rửa giải với hệ dung môi là ete dầu hỏa (EP) và etyl axetat (EtOAc). Các dung môi rửa giải được thực hiện theo tỷ lệ EP/EtOAc khác nhau với mỗi phân đoạn 250 ml. EP=100%; EP/EtOAc=70/30; EP/EtOAc=60/40; EP/EtOAc=50/50; EP/EtOAc=40/60; EP/EtOAc=30/70 và EtOAc=100%. Các phân đoạn EP/EtOAc=70/30, EP/EtOAc=60/40 và EP/EtOAc=40/60 được thu hồi, loại dung môi và tiến hành tinh chế các phân đoạn để thu hoạt chất mong muốn.

Phân đoạn EP/EtOAc=70/30 được nhồi lên cột silica gel và ổn định bằng 50ml hệ dung môi CHCl_3 :MeOH tỷ lệ 98/2. Tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 8/2. Sau khi cô loại dung môi thu được 2,5 g hợp chất goniothalamycin dạng bột màu vàng nhạt.

Phân đoạn EP/EtOAc=60/40 được nhồi lên cột silicagel và ổn định bằng 50 ml hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 95/5. Tiếp đó lần lượt rửa giải bằng hệ dung môi CH_3OH /MeOH tỷ lệ 9/1 và 8/2. Sau khi loại bỏ dung môi thu được 4,42g hợp chất 4-deoxyanomotacin và 4,35g hợp chất (2,4-*cis/trans*)- anomontacinon dạng bột màu vàng nhạt, tương ứng.

Phân đoạn EP:EtOAc=40/60 được nhồi lên cột silicagel và ổn định bằng 50 ml hệ dung môi CHCl_3 /MeOH tỷ lệ 90/10. Tiếp đó hành rửa giải bằng hệ dung môi CH_3OH /MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi loại bỏ dung môi thu được 7,32g hợp chất gigantransenin B dạng bột màu vàng.

Phần bã bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 thu được ở trên được ngâm chiết tiếp bằng cách bổ sung vào 5 lít dung môi etanol/axit axetic 50:50 và ngâm chiết trong 24 giờ. Sau khi lọc, thu phần dịch, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 0,5 lít. Chỉnh pH bằng NH_4OH đến pH=9, sau khi kết tủa xảy ra, phần kết tủa được lọc bỏ và trung hòa đến pH=7. Sau khi loại bỏ dung môi, phần cao đặc được hấp phụ lên cột silica gel rồi rửa giải bằng hệ dung môi CHCl_3 /MeOH với tỷ lệ MeOH tăng dần từ 1 đến 15%. Thu bốn phân đoạn tương ứng với MeOH nồng độ 3%, 5%, 7% và 10%. Các phân đoạn này được cô loại dung môi thu được 2,18g hợp chất goniothalamine, 7,15g hợp chất altholacton, 1,53g annonacin và 1,87g gigantransenin A ở dạng bột màu vàng nhạt, tương ứng.

Để thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan, tiến hành phối trộn các thành phần hoạt chất thu được ở trên theo tỷ lệ % sau:

Thành phần	Hàm lượng (mg)
Goniothalamine	1000
4-Deoxyanomotacin	3000
(2,4- <i>cis/trans</i>)- anomontacinon	1500
Gigantransenin A	1000

Gigantransenin B	500
Goniothalamycin	150
Annonacin	500
Altholacton	1000

sau khi trộn đều và nghiền mịn, thu được 10g hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan ở dạng bột màu vàng nhạt.

Ví dụ 2. Xác định cấu trúc của thành phần hỗn hợp

Để kiểm tra nhằm xác định được chính xác thành phần và cấu trúc từng thành phần hóa học của hỗn hợp bột thu được từ Ví dụ 1, các mẫu hợp chất tinh sạch và mẫu hỗn hợp thu được ở trên được gửi đi để xác định cấu trúc. Các hợp chất tinh sạch được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ khối và phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton và cacbon 13 (^1H -, ^{13}C NMR). Hàm lượng của các chất được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả xác định được tổng hợp trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các hoạt chất thu được từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020

stt	Tên theo IUPAC	Tên thông thường	Hàm lượng (mg/g)
1	(2R)-2-[(E)-2-phenylethenyl]-2,3-dihydropyran-6-one	Goniothalamine	100
2	2S)-4-[(8R,15R)-8,15-dihydroxy-15-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]pentadecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one	4-Deoxyanomonatin	300
3	(5R)-5-[(6S,13R)-6,13-dihydroxy-13-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]tridecyl]-3-(2-oxopropyl)oxolan-2-one	(2,4-cis/trans)-anomonatinon	150
4	(2S)-4-[(8R,11R)-11-[(2R,5R)-5-[(E,1R,6R)-1,6-dihydroxyheptadec-4-enyl]oxolan-2-yl]-8,11-dihydroxyundecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one	Gigantransenin A	10
5	(2S)-4-[(8R,11R)-11-[(2R,5R)-5-[(E,1R,6S)-1,6-dihydroxyheptadec-4-enyl]oxolan-2-yl]-8,11-dihydroxyundecyl]-2-methyl-2H-furan-5-one	Gigantransenin B	50
6	(2S)-2-methyl-4-[(2R,8R,11R)-2,8,11-trihydroxy-11-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxypentadecyl]oxolan-2-yl]undecyl]-2H-furan-5-one	Goniothalamycin	15
7	(2S)-2-methyl-4-[(2R,8R,13R)-2,8,13-trihydroxy-	Annonacin	50

	13-[(2R,5R)-5-[(1R)-1-hydroxytridecyl]oxolan-2-yl]tridecyl]-2H-furan-5-one		
8	(2R,3R,3aS,7aS)-3-hydroxy-2-phenyl-2,3,3a,7a-tetrahydrofuro[3,2-b]pyran-5-one	Altholacton	100

Các dữ liệu phổ cho các chất goniothalamine, 4-Deoxyanomonotacin, (2,4-*cis/trans*)- anomonotacinon, gigantransenin A, gigantransenin B, goniothalamine, annonacin và altholacton không phải là hợp chất mới và đều là các hoạt chất đã được công bố trước đây.

Ví dụ 3. Thử nghiệm độc tính cấp và độc tính bán trường diễn

Chế phẩm thử nghiệm:

Chế phẩm thử nghiệm bao gồm hỗn hợp bột thu được từ dịch chiết polyoxyetylen (23) lauryl ete (hỗn hợp TNA, bao gồm goniothalamine; 4-deoxyanomonotacin; (2,4-*cis/trans*)- anomonotacinon; gigantransenin B) và hỗn hợp bột thu được từ phần bã (hỗn hợp TNB, bao gồm goniothalamine, altholacton, annonacin và gigantransenin A) và hỗn hợp thu được từ Ví dụ 1 (hỗn hợp TN, bao gồm goniothalamine; 4-deoxyanomonotacin; (2,4-*cis/trans*)- anomonotacinon; gigantransenin B, goniothalamine, altholacton, annonacin và gigantransenin A). Liều thử nghiệm dự kiến được áp dụng cho chuột với lượng từ 0,3 g/kg đến 7 g/kg thể trọng tùy theo từng lô thử nghiệm.

Động vật thử nghiệm:

Động vật được dùng để đánh giá là chuột nhắt trọng lượng khoảng 20g và thọ trọng lượng khoảng 2kg. Thỏ và chuột thử nghiệm được nuôi nhốt riêng 5 ngày trước khi nghiên cứu. Mẫu được chia ngẫu nhiên thành các lô, mỗi con nhốt riêng một chuồng, được ăn bằng thức ăn dành riêng cho động vật thử nghiệm, nước được uống nước tự do. Hàng ngày theo dõi ghi chép diễn biến kết quả thử nghiệm.

Thử nghiệm độc tính cấp và xác định liều chết 50% (LD₅₀)

Chuột thử nghiệm được chia ngẫu nhiên thành các lô khác nhau (09 lô), mỗi lô 10 con.

Các mẫu bột TNA, bột TNB được pha trong dung môi là nước cất, mẫu bột TN được ngâm trong nước nóng để tan chảy và hòa với dầu oliu thành các nồng độ khác

nhau để có thể tích cho mỗi lần uống 0,25 mL/10g chuột, 3 lần trong 24 giờ, mỗi lần cách nhau ít nhất 2 giờ.

Cho chuột uống thuốc thử với liều tăng dần. Xác định liều cao nhất không gây chết chuột (0 %), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100 %) và các liều trung gian.

Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, v/v.) và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong vòng 72 giờ sau khi cho chuột uống chất thử nghiệm lần cuối. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột (hoạt động, ăn uống, bài tiết, v/v.) ở mỗi lô cho đến hết 7 ngày sau khi uống thuốc.

Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc. Số liệu được xử lý theo toán thống kê T-test Student bằng phần mềm Excell.

Đối với mẫu bột TNA, sau khi uống thuốc thử với liều từ 1 g/kg đến liều cao nhất có thể cho uống (tối đa 31,44 g/kg) ở tất cả các lô, chuột vẫn hoạt động bình thường. Không quan sát thấy có chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử, không quan sát thấy dấu hiệu ngộ độc sau 7 ngày theo dõi. Như vậy chưa xác định được độc tính cấp và LD₅₀ của mẫu bột TNA.

Đối với mẫu bột TNB, kết quả thử nghiệm độc tính cấp được đưa ra và đánh giá trong khoảng an toàn đến khoảng gây độc, các số liệu dưới ngưỡng này hoặc trên ngưỡng này không được xem xét. Kết quả đánh giá, tổng hợp về độc tính cấp của nhóm chuột thử nghiệm với mẫu bột TNB được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Độc tính cấp theo đường uống của bột TNB trên chuột

Lô NC	Liều sử dụng (g/kg)	Số chuột bị chết/tổng	% chuột bị chết
1	3,3	0/10	0,0
2	4,0	1/10	10,0
3	4,3	2/10	20,0
4	4,7	4/10	40,0
5	5,0	5/10	50,0
6	5,3	6/10	60,0

7	5,7	8/10	80,0
8	6,0	9/10	90,0
9	6,8	10/10	100,0

Kết quả cho thấy, sau khi uống thuốc thử, chuột ở lô 1 (3,3 g/kg) không có biểu hiện gì đặc biệt, chuột hoạt động bình thường, không có chuột chết sau 72 giờ thử nghiệm. Chuột ở các lô từ lô 2 đến lô 9 với các liều tăng dần từ 4,0 đến 6,8 g/kg có biểu hiện yếu mệt, nằm bất động hoặc ít hoạt động, ít phản ứng với kích thích, không ăn uống và khó thở. Với các lô thử nghiệm ở liều cao, chuột yếu dần rồi chết trong vòng 6 giờ thử nghiệm. Sau khi uống, những con chuột không chết được hồi tỉnh dần dần và không có chuột nào bị chết tiếp. Theo phương pháp đánh giá của Litchfield-Wilcoxon, LD₅₀ của mẫu bột TNB thử nghiệm được xác định là 5,0 g/kg thể trọng.

Đối với mẫu bột TN, chuột được phân thành 5 lô, mỗi lô 10 con, tiến hành hòa mẫu bột TN với nước theo nồng độ với nồng độ cao nhất là 332 mg/ml (tương ứng 2,5 g/kg). Cho chuột uống với liều từ thấp nhất đến cao nhất, tương đương từ 0,5 g/kg đến 2,5 g/kg, liều uống 0,25 ml/10g, 3 lần trong 24 giờ. Tiến hành theo dõi trong 72 giờ uống thuốc thử.

Bảng 3: Độc tính cấp theo đường uống của hỗn hợp bột (bột TN) trên chuột

Lô thử nghiệm	Liều sử dụng(ml/kg)	Liều bột khô g/kg	Tỷ lệ chết
1	15	0,5	0
2	30	1,0	0
3	45	1,5	0
4	60	2,0	0
5	75	2,5	0

Kết quả cho thấy, với liều dự kiến sử dụng cho người, quy đổi tương đương cho chuột từ khoảng từ 0,5 g/kg đến 25,0 g/kg không có biểu hiện độc tính cấp. Điều này cho thấy mẫu bột TN an toàn cho người trong khoảng liều lượng dự kiến quy đổi tối đa 3,8 g/kg (liều lượng gấp 30,8 lần liều dự kiến dùng cho người).

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn:

Để đánh giá độc tính bán trường diễn, tiến hành đánh giá độc tính đối với mẫu bột TN thu được từ Ví dụ 1. Thử nghiệm được tiến hành với 30 con thỏ, được chia

ngẫu nhiên thành 3 lô, mỗi lô 10 con, mỗi con nhốt riêng một chuồng. Thử nghiệm được tiến hành trong 4 tuần.

- ĐC: uống nước lọc 3 ml/kg/ngày vào buổi sáng.

- CT1: uống bột TN với lượng 228 mg/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dùng trên người, tính theo hệ số 3) vào buổi sáng.

- CT2: uống bột TN với lượng 1140 mg/kg/ngày (gấp 5 lần lô thử nghiệm 1).

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm đánh giá chức năng tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu. Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần. Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào 4 thời điểm trước lúc uống mẫu thử, sau 2 tuần và sau 4 tuần uống mẫu thử và sau 2 tuần ngừng uống.

Sau 8 tuần uống mẫu thử, thỏ được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 30% số thỏ ở mỗi lô.

Xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê y sinh học theo phương pháp t-test Student và test “trước - sau”. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn.

Thỏ được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Những con thỏ ở cả lô đối chứng và các lô thử nghiệm đều hoạt động bình thường. Thỏ lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân khô thành khuôn. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 3 lô thỏ trong suốt thời gian nghiên cứu. Ảnh hưởng của ATP thử nghiệm lên thỏ được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của bột TN thử nghiệm đối với cân nặng thỏ

Thời gian	ĐC		CT1		CT2	
	Trọng lượng (kg)	% tăng trọng	Trọng lượng (kg)	% tăng trọng	Trọng lượng (kg)	% tăng trọng
Ngày 0	2,05		2,06		2,04	

Sau 14 ngày	2,25	9,75	2,26	9,70	2,26	10,78
Sau 28 ngày	2,42	18,04	2,43	17,968	2,43	19,11
Sau 14 ngày kết thúc	2,58	25,85	2,60	26,21	2,56	25,49

So sánh giữa các thời điểm sau so với trước thấy cân nặng của thỏ ở cả ba lô nghiên cứu đều tăng, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Cân nặng của thỏ ở lô uống bột chiết với cân nặng của thỏ ở lô đối chứng tại tất cả các thời điểm đo không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy bột chiết với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu chưa thấy gây ra các thay đổi trên sự phát triển cân nặng của thỏ.

Các kết quả đánh giá theo dõi số lượng hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu, chức năng gan (ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol toàn phần), chức năng thận (creatinin huyết thanh) đều không thấy có sự bất thường liên quan đến chức năng sinh lý của thỏ thử nghiệm.

Các kết quả đánh giá chức năng máu của thỏ thử nghiệm được thể hiện trong các bảng từ Bảng 5 đến Bảng 11 sau:

Bảng 5. Ảnh hưởng của bột TN đến số lượng hồng cầu trong máu thỏ

Thời gian	Số lượng hồng cầu (T/l)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	5,18	5,21	5,13
Sau 14 ngày	5,20	5,20	5,29
Sau 28 ngày	5,39	5,40	5,44
Sau 14 ngày kết thúc	5,41	5,38	5,42

Bảng 6. Ảnh hưởng của bột TN đến hàm lượng huyết tố trong máu thỏ

Thời gian	Hàm lượng huyết sắc tố (g/dl)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	10,23	10,19	10,15
Sau 14 ngày	10,27	10,39	10,32
Sau 28 ngày	10,46	10,41	10,42
Sau 14 ngày kết thúc	10,43	10,44	10,44

Bảng 7. Ảnh hưởng của bột TN đến hematocrit trong máu thỏ

Thời gian	Hematocrit (%)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	31,23	31,19	31,25
Sau 14 ngày	31,67	31,98	31,92
Sau 28 ngày	32,25	31,16	31,22
Sau 14 ngày kết thúc	32,13	32,21	32,54

Bảng 8. Ảnh hưởng của bột TN đến thể tích trung bình hồng cầu trong máu thỏ

Thời gian	Thể tích trung bình hồng cầu (fl)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	61,45	61,90	61,85
Sau 14 ngày	62,45	63,00	61,62
Sau 28 ngày	62,16	62,81	61,92
Sau 14 ngày kết thúc	61,03	62,54	61,44

Bảng 9. Ảnh hưởng của bột TN đến số lượng bạch cầu trong máu thỏ

Thời gian	Số lượng bạch cầu (g/l)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	7,85	7,59	7,25
Sau 14 ngày	7,47	7,79	7,52
Sau 28 ngày	7,36	7,31	7,32
Sau 14 ngày kết thúc	7,33	7,93	7,24

Bảng 10. Ảnh hưởng của bột TN đến số lượng bạch cầu trong máu thỏ

Thời gian	Công thức bạch cầu					
	ĐC		CT1		CT2	
	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)	Lympho (%)	Trung tính (%)
Ngày 0	81,55	18,45	82,90	17,10	83,70	16,30
Sau 14 ngày	77,18	22,82	83,30	16,70	82,20	17,80
Sau 28 ngày	78,18	20,82	84,00	16,00	79,60	20,40
Sau 14 ngày kết thúc	77,18	27,82	87,00	19,29	80,60	19,40

Bảng 11. Ảnh hưởng của bột TN đến số lượng tiểu cầu trong máu thỏ

Thời gian	Số lượng tiểu cầu (g/l)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	321,8	300,6	325,8
Sau 14 ngày	298,8	270,8	290,6
Sau 28 ngày	294,4	270,8	290,6
Sau 14 ngày kết thúc	294,4	267,7	288,6

Các kết quả thể hiện trong Bảng 5 đến Bảng 11 cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống bột TN cũng như sau 2 tuần ngừng uống, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu (số lượng hồng cầu, hàm lượng huyết sắc tố, hematorit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu ở cả lô ĐC cũng như các lô CT1 và CT2 không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời điểm trước, trong và sau khi uống thuốc thử ($p>0,05$)

Các kết quả đánh giá chức năng gan của thỏ thử nghiệm được thể hiện trong các bảng từ Bảng 12 đến Bảng 16 sau:

Bảng 12. Ảnh hưởng của bột TN đến hoạt độ ATS trong máu thỏ

Thời gian	Hoạt độ ADT (UI/L)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	28,57	30,20	28,15
Sau 14 ngày	33,26	31,92	32,16
Sau 28 ngày	33,92	32,33	29,45
Sau 14 ngày kết thúc	31,43	32,63	29,59

Bảng 13. Ảnh hưởng của bột TN đến hoạt độ ALT trong máu thỏ

Thời gian	Hoạt độ ALT (UI/l)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	43,23	41,09	43,67
Sau 14 ngày	46,18	44,91	45,52
Sau 28 ngày	48,51	47,47	43,78
Sau 14 ngày kết thúc	48,36	43,30	47,16

Bảng 14. Ảnh hưởng của bột TN đến nồng độ bilirubin toàn phần trong máu thỏ

Thời gian	Bilirubin toàn phần (mmol/l)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	12,19	12,15	12,23
Sau 14 ngày	12,17	12,23	12,20
Sau 28 ngày	12,17	12,23	12,20
Sau 14 ngày kết thúc	12,15	12,13	12,28

Bảng 15. Ảnh hưởng của bột TN đến nồng độ albumin trong máu thỏ

Thời gian	Albumin (g/dl)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	6,14	6,16	6,26
Sau 14 ngày	5,98	6,05	6,13
Sau 28 ngày	6,05	5,99	6,06
Sau 14 ngày kết thúc	6,03	6,07	6,11

Bảng 16. Ảnh hưởng của bột TN đến nồng độ cholesteron trong máu thỏ

Thời gian	Cholesterpol (m mol/l)		
	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	2,15	2,05	2,15
Sau 14 ngày	2,16	2,13	2,10
Sau 28 ngày	2,04	2,17	2,07
Sau 14 ngày kết thúc	2,07	2,13	2,19

Kết quả từ Bảng 12 đến 16 cho thấy sau 2 tuần và 4 tuần uống thử nghiệm bột TN, cũng như sau khi dừng uống 2 tuần, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (hoạt độ AST, ALT, nồng độ bilirubin toàn phần, albumin và cholesterol) trong máu thỏ ở cả lô CT1 và CT2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐC và so sánh giữa hai thời điểm giữa và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$)

Các kết quả đánh giá chức năng thận của thỏ thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 17 sau:

Bảng 17. Ảnh hưởng của bột TN đến creatinin trong máu thỏ

Thời gian	Creatinin (mg/dl)
-----------	-------------------

	ĐC	CT1	CT2
Ngày 0	1,06	1,04	1,06
Sau 14 ngày	1,05	1,07	1,05
Sau 28 ngày	1,05	1,05	1,05
Sau 14 ngày kết thúc	1,06	1,06	1,04

Kết quả trên bảng 17 cho thấy sau 2 tuần uống hỗn hợp thử nghiệm ở cả lô CT1 và CT2, nồng độ của creatinin trong máu thử không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐC và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p>0,05$).

Ngoài ra, các đánh giá về mô bệnh học được thực hiện đối với tế bào gan, các hình ảnh giải phẫu được thể hiện trong các hình từ Hình 1 đến Hình 4. Các kết quả cho thấy, nhìn chung mô tan và thận chuột có cấu trúc bình thường, không có sự thay đổi bệnh lý liên quan đến tế bào gan và thận của thử nghiệm.

Hình 1 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thử ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thử bình thường được nhuộm bằng Hematoxylin-Eosin, (B) Hình thái vi thể gan thử đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) Hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử (D) Hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau 4 tuần uống thuốc thử với tế bào gan thoái hóa vừa.

Hình 2 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột ở mức phóng đại 400 lần, trong đó (A) Hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) Hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) Hình thái vi thể thận thử của lô thử nghiệm 4 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Hình 3 là ảnh chụp giải phẫu tế bào gan của thử sau thử nghiệm, trong đó (A) là hình ảnh chụp hình thái vi thể gan thử bình, (B) Hình thái vi thể gan thử đối chứng có tế bào gan thoái hóa vừa. (C) Hình thái của tế bào gan lô thử nghiệm có tế bào thoái hóa vừa (D) Hình thái của của tế bào gan lô thử nghiệm sau khi điều trị 2 tuần với tế bào gan thoái hóa nhẹ.

Hình 4 là ảnh chụp giải phẫu tế bào thận chuột thu được từ Ví dụ 2 sau 2 tuần ngừng thử nghiệm, trong đó (A) Hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có cầu thận bình thường và ống thận bình thường, (B) Hình thái vi thể thận thử của lô đối chứng có

thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần, (C) và (D) Hình thái vi thể thận thỏ của lô thử nghiệm sau 2 tuần có thoái hóa nhẹ tế bào ống lượn gần.

Kết luận: Không thấy có độc tính bán trường diễn ảnh hưởng đến thử nghiệm liên quan đến các thay đổi chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận, hình thái đại thể các cơ quan và cấu trúc vi thể gan, thận của thỏ. Tất cả các chỉ số theo dõi đều nằm trong giới hạn bình thường, không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng. Điều đó chứng tỏ hỗn hợp bột TN thử nghiệm an toàn với thử nghiệm.

Ví dụ 3. Thử nghiệm ức chế dòng tế bào ung thư gan

Để đánh giá hiệu quả ức chế dòng tế bào ung thư gan, các thử nghiệm được tiến hành với tế bào Hep-G2 với các mẫu chế phẩm bột TNA, bột TNB và bột TN thu được từ Ví dụ 1.

Tế bào Hep-G2 được nuôi trong môi trường MEM bổ sung 10% FBS ở 37°C trong tủ ẩm CO₂ (5% CO₂). Tế bào phát triển trong bình nuôi cấy 1 lớp, đạt đến pha log. Tế bào được tách khỏi bình và tách rời nhau bằng trypsin. Tiếp đó đếm và cấy lại vào môi trường thạch loãng (0,35 % với thạch mặt và 0,5% với thạch nền) với nồng độ tế bào $3,33 \times 10^3/\text{mL}$.

Các mẫu thử được trộn với nồng độ đầu 5-25 µg/mL. Thử nghiệm được tiến hành trên phiên 12 giếng, lặp lại 3 lần.

ĐC: Bổ sung DMSO 1%.

CT1: Bổ sung dịch pha bột TNA.

CT2: Bổ sung dịch pha bột TNB.

CT3: Bổ sung dịch pha bột TN.

CT4: Bổ sung chế phẩm thương mại chứa hoạt chất Ramucirumab.

Các hợp chất thử nghiệm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 500 µg/ml. Tế bào được nhân, nuôi cấy trong điều kiện chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau 15 ngày nuôi cấy, tế bào được lấy ra và nhuộm bằng tím kết tinh 0,005%, đọc kết quả dưới kính hiển vi đảo pha có gắn camera và nối ra máy tính. Hoạt tính ức chế hình thành khối u trên thạch được tính lặp lại 3 lần so sánh % số lượng khuẩn lạc hình thành khối u, kích thước khối u so với đối chứng (DMSO 1%).

Bảng 18. Hiệu quả ức chế khối u mật độ khối u

Kí hiệu mẫu	Nồng độ mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)	Kích thước trung bình của khối u		Mật độ hình thành khối u giảm so với đối chứng (%)
		Đường kính (μm)	% giảm so với đối chứng	
ĐC		27,45	0	0
CT1	400	18,24	33,55	42,32
CT2	400	22,18	19,20	32,21
CT3	400	8,84	67,80	70,31
CT4	400	12,14	55,77	45,27

Kết quả trên Bảng 18 cho thấy, so với nhóm ĐC, các nhóm CT1 và CT2 đều thể hiện khả năng ức chế khối u cũng như giảm được mật độ hình thành khối u. Tuy nhiên, hoạt tính này khi so với nhóm CT4, là nhóm sử dụng Ramucirumab, tỷ lệ ức chế khối u và ức chế sự hình thành khối u đều kém hơn. Tuy nhiên, bất ngờ thấy rằng, với hỗn hợp TN (CT3), với cùng nồng độ, hiệu quả ức chế khối u và ức chế sự hình thành khối u đều tăng, lên tới 67,80 và 70,31%, tương ứng. Nếu so sánh với CT1 và CT2, tỷ lệ giảm kích thước khối u của của CT3 ở cùng nồng độ thử nghiệm tăng tới 39,80 và 54,18%, tương ứng, mật độ hình thành khối u giảm 50,51% và 71,68%, tương ứng.

Kết quả này còn được xác nhận trên hình ảnh nuôi cấy. Hình 5 là ảnh chụp kết quả thử nghiệm khả năng ức chế khối u của các hợp chất thử nghiệm trên tế bào ung thư gan HEP-G2 sau 15 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch. (A) Hình thái của tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung DMSO 1% (ĐC). (B) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp A (CT1), (C) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp B (CT2), (D) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hỗn hợp C (CT3), (E) Hình thái tế bào ung thư phát triển trên môi trường bổ sung hoạt chất Ramucirumab (CT4).

Cả 4 mẫu thử đều biểu hiện hoạt tính ức chế hình thành khối u trên thạch mềm *in vitro* với dòng tế Hep-G2 ở mức độ khác nhau: mật độ hình thành khối u của các mẫu CT1, CT2, CT3 và CT4 giảm lần lượt là 42,32%; 32,21%; 70,31% và 45,27% so với đối chứng. Kích thước trung bình của khối u trong các thử nghiệm này giảm lần lượt là 33,55; 19,19; 67,79 và 55,77% so với đối chứng. Đặc biệt CT3 có hiệu quả vượt trội, lên tới 67,79% so với đối chứng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế cho phép chiết chọn lọc hoạt chất có hoạt tính sinh học từ rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 với hiệu suất cao, lên tới 3,13% với độ tinh khiết của từng hoạt chất lên tới 98%. Quy trình cho phép mở ra hướng phát triển dược chất từ thảo dược, cho phép cạnh tranh được với các quy trình sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học, nhằm phát triển được nguồn hoạt chất phục vụ cho công nghiệp dược.

Hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan theo sáng chế được phối trộn chọn lọc từ 8 thành phần hoạt chất được chiết từ rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 cho thấy khoảng an toàn độc tính cho người được quy đổi tương đương 3800 mg/kg (gấp 30,8 lần liều thường dùng cho người). Qua thử nghiệm, hỗn hợp theo sáng chế còn thấy không gây độc tính bán trường diễn trên động vật thử nghiệm. Việc thử nghiệm thành công và chứng minh hiệu quả của hỗn hợp trên tế bào ung thư gan cho phép mở ra hướng phát triển nguồn dược chất trên cơ sở các hợp chất từ tự nhiên để phát triển thuốc điều trị bệnh ung thư. Hỗn hợp này còn thể hiện hiệu quả tác dụng trên tế bào ung thư gan theo cách hiệp đồng. Bằng thực nghiệm đã chứng tỏ rằng, khi kết hợp hai nhóm chất được chiết từ phần bã và chiết từ phần dịch chiết từ bột của rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 với tỷ lệ nhất định cho phép tá dụng hiệp đồng lên tế bào Hep-G2 thử nghiệm. Hiệu quả cho thấy có tác dụng ức chế và làm giảm mật độ phát triển của tế bào ung thư Hep-G2 trên môi trường MEM lên tới 50,51% và 71,68%, tương ứng. Hỗn hợp theo sáng chế cho thấy có hiệu quả hiệp đồng tác dụng kìm hãm sự phát triển của khối u của hỗn hợp theo sáng chế so với hai nhóm hợp chất riêng lẻ là 67,80 và 70,31%, tương ứng. Tương tự tỷ lệ giảm kích thước khối u hợp chất thử nghiệm có tác dụng hiệp đồng lên tới 39,80 và 54,18%, tương ứng, và mật độ hình thành khối u giảm 50,51% và 71,68%, tương ứng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị nguyên liệu bằng cách thu hái phần rễ của cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020, loại bỏ tạp chất, thái lát rồi phơi khô, xay thành bột thu được nguyên liệu bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 khô;

b) ngâm chiết nguyên liệu bằng cách chuyển phần bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 vào thiết bị ngâm chiết chứa polyoxyetylen (23) lauryl ete theo tỷ lệ 1/5 (trọng lượng/thể tích) và siêu âm với tần số 1500 Hz trong 30 phút, tiếp đó ngâm chiết ở nhiệt độ 80°C trong bình kín trong 2 ngày, lặp lại quá trình ngâm chiết 2 lần, sau đó lọc thu riêng phần dịch chiết và phần bã;

c) chiết phân đoạn dịch chiết bằng cách lọc phần dịch chiết và loại dung môi dưới áp suất giảm còn đến khoảng 1% thể tích, sau đó nhồi cao chiết lên cột silica gel, tiến hành rửa giải với hệ dung môi là ete dầu hỏa (EP) và etyl axetat (EtOAc) theo các tỷ lệ EP=100%; EP/EtOAc=70/30; EP/EtOAc=60/40; EP/EtOAc=50/50; EP/EtOAc=40/60; EP/EtOAc=30/70 và EtOAc=100% thu ba phân đoạn EP/EtOAc=70/30, EP/EtOAc=60/40 và EP/EtOAc=40/60, sau đó tinh chế các hoạt chất bằng cách:

+ nhồi phân đoạn EP/EtOAc=70/30 lên cột silica gel và ổn định bằng dung môi CHCl₃:MeOH (metanol) tỷ lệ 98/2, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi cô loại dung môi thu được hợp chất goniothalamicin dạng bột màu vàng nhạt;

+ nhồi phân đoạn EP/EtOAc=60/40 lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH tỷ lệ 95/5, tiếp đó rửa giải bằng hệ dung môi CH₃OH/MeOH tỷ lệ 9/1 và CH₃OH/MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi loại bỏ dung môi thu hai hợp chất 4-deoxyanomontacin và (2,4-*cis/trans*)- anomontacinon dạng bột màu vàng nhạt; và

+ nhồi phân đoạn EP:EtOAc=40/60 lên cột silicagel và ổn định bằng hệ dung môi CHCl₃/MeOH tỷ lệ 90/10, tiến hành rửa giải bằng hệ dung môi CH₃OH/MeOH tỷ lệ 8/2, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất gigantransenin B dạng bột màu vàng;

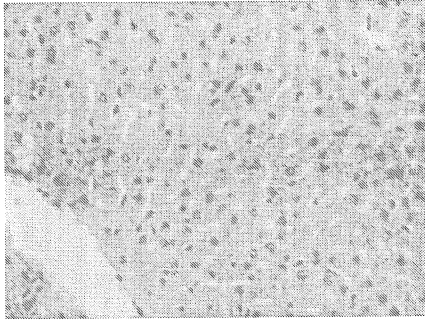
d) chiết phần bã bột rễ cây *Goniothalamus* sp. HTHP-2020 bằng cách ngâm chiết tiếp phần bã bằng hệ dung môi etanol/axit axetic 50:50 theo tỷ lệ nguyên liệu: dung môi là 1/10 (trọng lượng/thể tích) trong thời gian 24 giờ, sau khi lọc, thu phần dịch, sau khi loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm đến khi còn 1%, sau đó bổ sung NH_4OH đến $\text{pH}=9$, lọc bỏ kết tủa, trung hòa và loại dung môi, phần cao đặc được hấp phụ lên cột silica gel rồi rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ với tỷ lệ MeOH tăng dần từ 1 đến 15%, thu phân đoạn MeOH nồng độ 3%, 5%, 7% và 10%, các phân đoạn này được cô loại dung môi thu được bốn hợp chất bao gồm goniothalamin, altholacton, annonacin và gigantransenin A, tương ứng;

e) thu hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan bằng cách phối trộn các hoạt chất thu được ở trên theo tỷ lệ % sau:

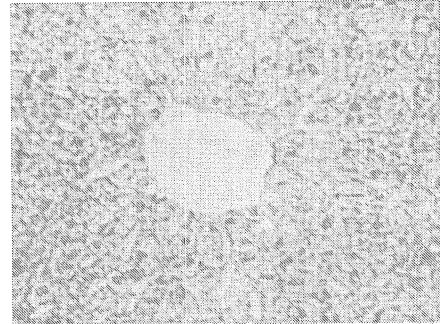
Goniothalamin	5-15
4-Deoxyanomotacin	25-35
(2,4- <i>cis/trans</i>)- anomotacinon	10-20
Gigantransenin A	5-15
Gigantransenin B	1-10
Goniothalamycin	10-20
Annonacin	1-10
Altholacton	5-15

sau khi trộn đều, thu được hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan ở dạng bột màu vàng nhạt.

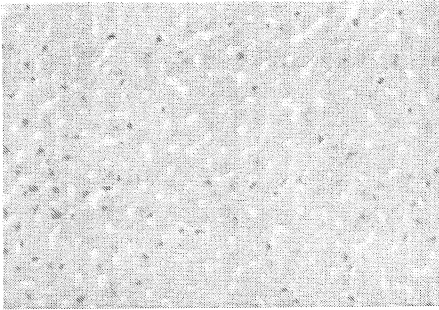
HÌNH 1



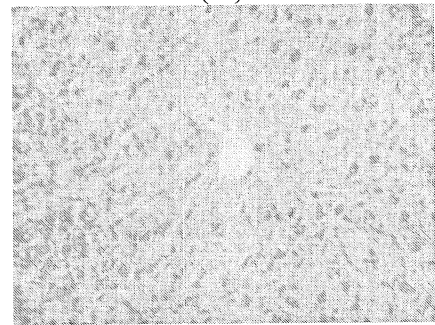
(A)



(B)

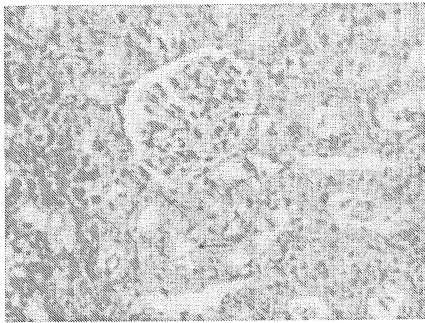


(C)

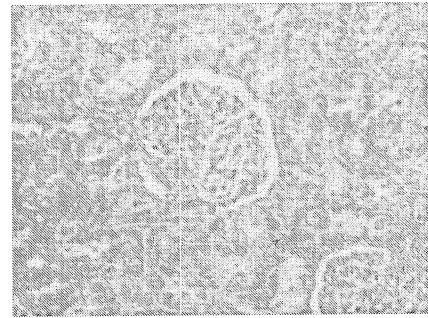


(D)

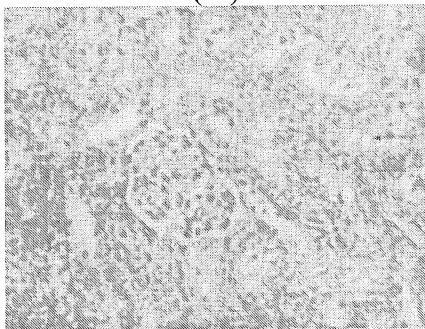
HÌNH 2



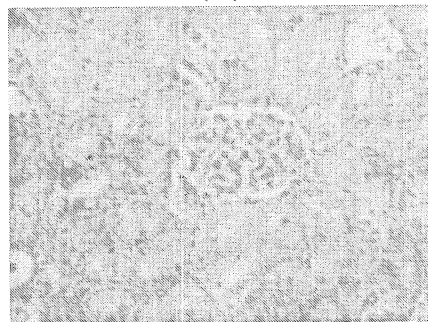
(A)



(B)

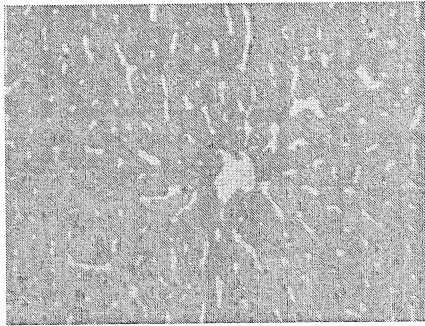


(C)

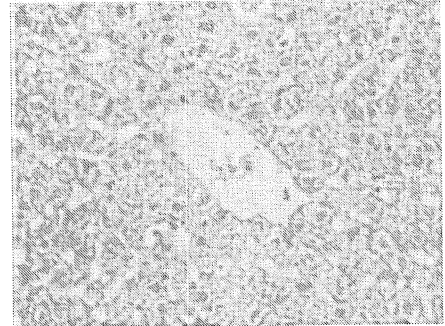


(D)

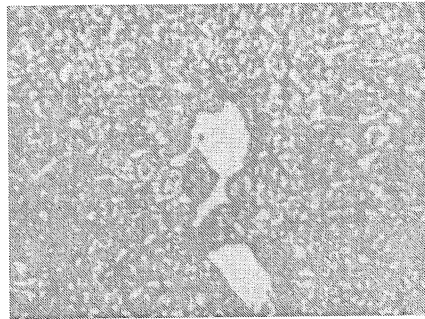
HÌNH 3



(A)



(B)

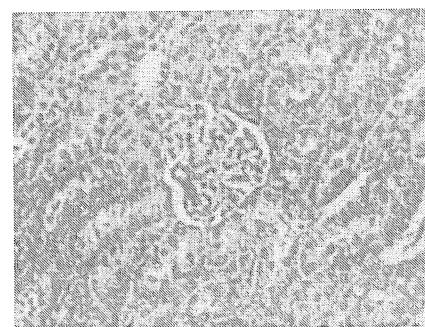


(C)

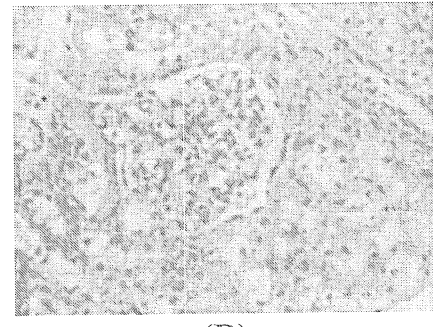


(D)

HÌNH 4



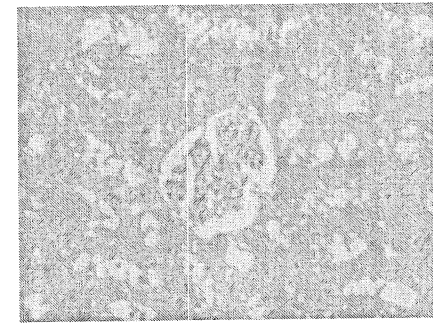
(A)



(B)

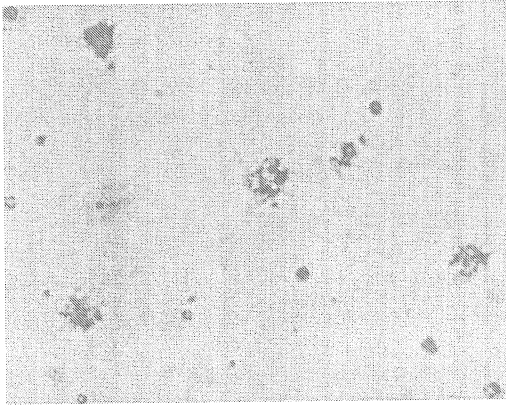


(C)

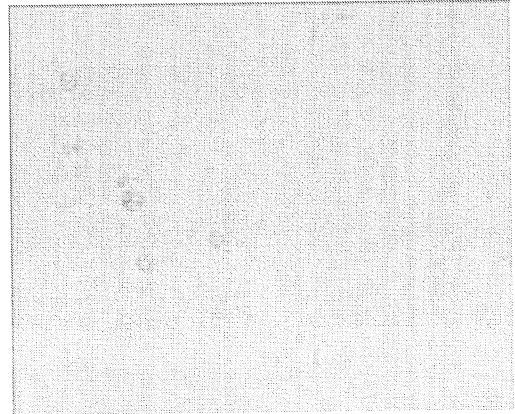


(D)

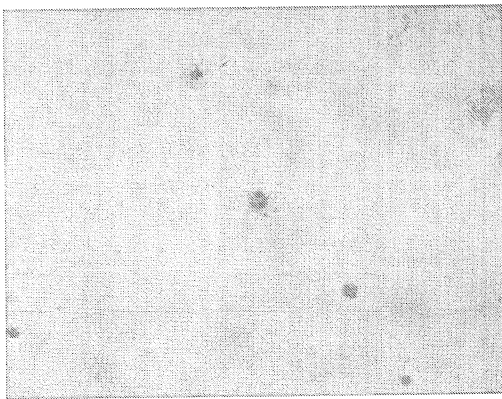
HÌNH 5



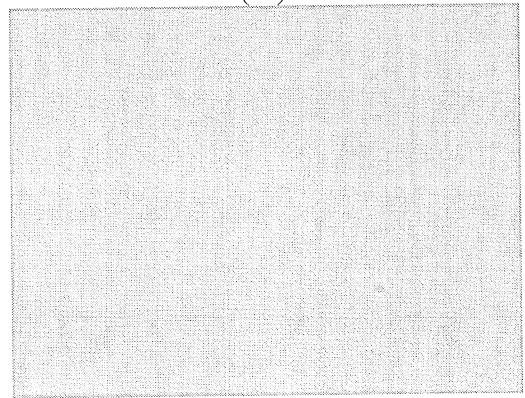
(A)



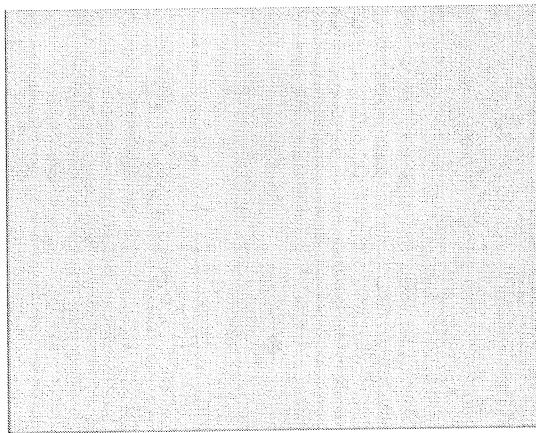
(B)



(C)



(D)



(E)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Phạm Thị Lý, Nguyễn Việt Anh, Nguyễn Trung Hiếu

<120> Quy trình sản xuất hỗn hợp ức chế tế bào ung thư gan từ cây
Goniothalamus sp. HTHP-2020

<130>

<160> 1

<170>

<210> 1

<211> 549

<212> ADN

<213> Goniothalamus sp. HTHP-2020

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

ggatatctag gctctcgcat cgatgaagaa cgtagcgaaa tgcgatactt ggtgtgaatt	60
gcagaatccc gcgagccatc gagtctttga acgcaagttg cgcccgaggc cactaggcgcg	120
agggcacgcc tgcttggggc tcacgcaccg cgctgcccgc acccccagca tggatgggct	180
gcgggcgaaa attggccgac cgtgcgccta ggcgcgcggc gggctgaaag ctaggcagcg	240
ccctcggagg ggcattctga cggcgttggg tggtcagac ggcgcatgga gcctctccaa	300
tcggacgcgc cgctggctgc cctcccggg ggcacaaggc cgcaccgcga tcgcgtcgcg	360
acccttggtc aggcggggcc acccgctgag tttaagcata taaataagcg gaggagaaga	420
aacttacaag gattccccta gtaacgacga gcgaaccggg aagtgccag cttgagaatc	480
gtgcggcagc gccgctcgaa ttgtagtctg cagaagcgtc ctcagcgacg gaccggggccc	540
aagtccact	549