



(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)



1-0037998

(51)^{2020.01} C07D 309/00; C07J 17/00; A61K 31/00; (13) B
A61P 35/00

(21) 1-2021-05955

(22) 24/09/2021

(45) 25/12/2023 429

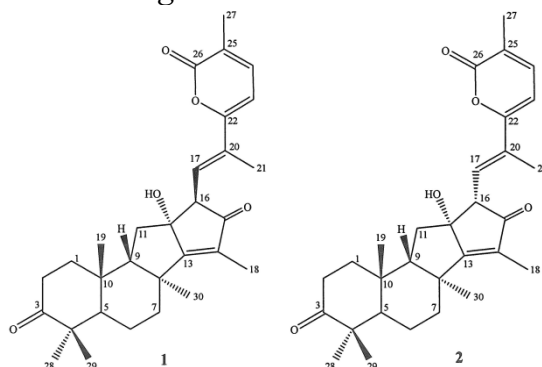
(43) 27/12/2021 405

(73) Viện Hóa sinh biển- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Đường Hoàng Quốc Việt, Phường Nghĩa Đô, Quận Cầu Giấy, Thành phố Hà Nội

(72) Phan Văn Kiệm (VN); Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Châu Văn Minh (VN); Phạm Văn Cường (VN); Nguyễn Hoài Nam (VN); Đỗ Thị Trang (VN); Đan Thị Thuý Hằng (VN); Phạm Hải Yến (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Dương Thị Dung (VN).

(54) HỢP CHẤT 6/6/5/5-TETRAXYCLIC TRITERPEN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI HẢI MIỀN RHABDASTRELLA GLOBOSTELLATA

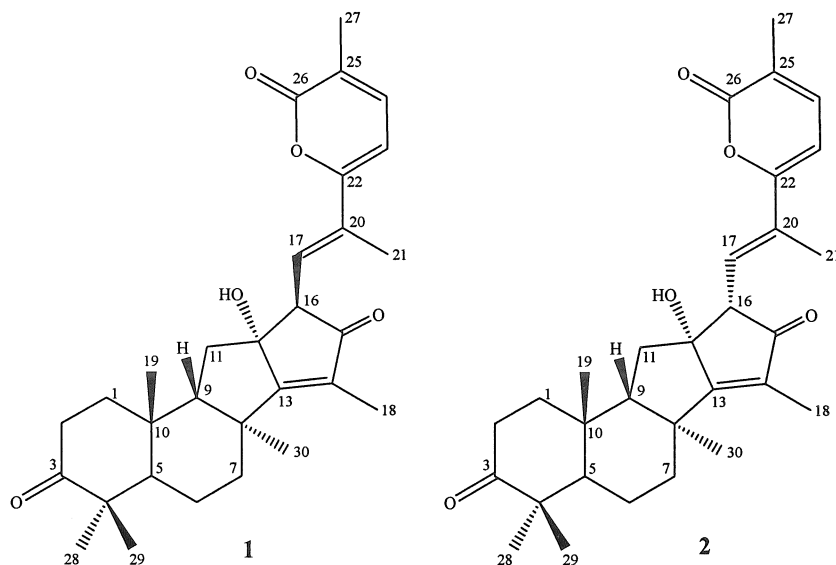
(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen (6/6/5/5-tetracyclic triterpene) có công thức (1) và (2) sau đây và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*.



Hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen theo sáng chế có tác dụng gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (SK-LU-1), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel-2), do đó hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho những nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các dược phẩm điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ sinh vật biển có hoạt tính gây độc tế bào nhằm nghiên cứu ứng dụng điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen (tetracyclic triterpene), mà còn được gọi là hợp chất rhabdaglostelon A và rhabdaglostelon B, lần lượt có công thức (1) và (2):



và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*. Hợp chất theo sáng chế có hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư SK-LU-1, MCF-7, Hep-G2 và SK-Mel-2.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong vòng 50 năm kể từ năm 1963 đến nay, các đối tượng sinh vật biển như hải miên, động vật ruột khoang, nấm, tảo biển, động vật da gai, rong nâu, động vật thân mềm, v.v, đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới tập trung nghiên cứu. Từ các đối tượng này, các lớp chất steroid, terpenoit, axit amin, các hợp chất phenol, các axit béo và một số dạng khác đã được phát hiện. Điểm đặc biệt là các hợp chất này có những cấu trúc đặc thù và hoạt tính sinh học rất lý thú. Những nghiên cứu về hoạt tính sinh học cho thấy các hợp chất chiết xuất từ sinh vật biển thể hiện các hoạt tính sinh học, ví dụ như các nhóm chất chống viêm, diệt tế bào ung thư, ức chế miễn dịch, chống vi rút, chống sốt rét, v.v. các hợp chất này được định hướng vào các nghiên cứu

sâu hoạt tính sinh học nhằm tìm kiếm các tác nhân hỗ trợ hoặc điều trị các bệnh hiểm nghèo như ung thư, Alzheimer, các bệnh viêm nhiễm, các bệnh gây nên do kí sinh trùng như sốt rét, bệnh lao. Nhiều hợp chất trong số đó đã được nghiên cứu phát hiện và đang được sử dụng làm thuốc, được Bộ Y tế cấp phép lưu hành trên thị trường như thuốc Ara-C và Trabectedin (điều trị ung thư), Ara-C (điều trị Herpes), Ziconotide (thuốc giảm đau), v.v.

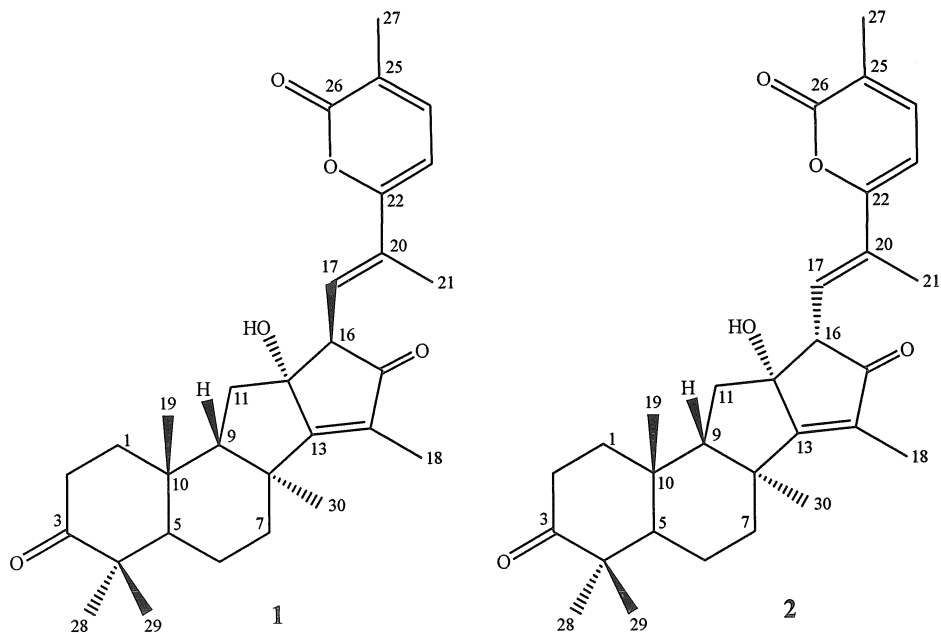
Việt Nam là quốc gia có ba mặt tiếp giáp biển với bờ biển dài 3.260 km chạy dọc từ Bắc vào Nam, hàng nghìn hòn đảo ven biển. Thêm vào đó, Việt Nam có bốn mùa khí hậu chủ yếu. Các điều kiện này đã tạo ra nguồn tài nguyên sinh vật biển phong phú. Theo thống kê, Việt Nam có gần 12.000 loài sinh vật biển bao gồm 2.000 loài cá, 6.000 loài động vật đáy, 635 loài tảo, 5 loài rùa, 12 loài rắn biển và hàng ngàn loài động thực vật phù du, v.v. Tuy nhiên, biển Việt Nam chủ yếu chỉ quan tâm tới những loài sinh vật biển có giá trị thực phẩm mà ít chú ý tới giá trị cung cấp các chất có hoạt tính sinh học cao để làm thuốc. Hòa chung với sự phát triển của ngành hóa học các hợp chất thiên nhiên trên thế giới, có nhu cầu về việc nghiên cứu các chất có hoạt tính sinh học từ nguồn sinh vật biển Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

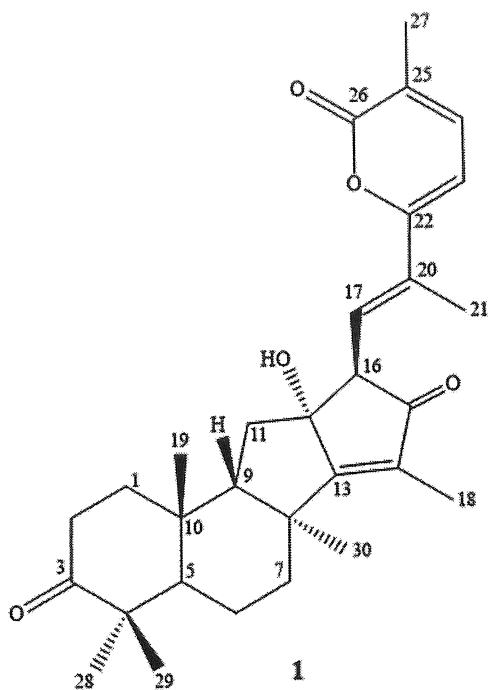
Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen có khả năng gây độc tế bào ung thư và do đó hữu ích để sử dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*.

Để đạt được mục đích trên đây, các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu sâu rộng theo định hướng hoạt tính diệt tế bào ung thư nhằm tạo ra sản phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh ung thư, với việc tập trung chuyên sâu nghiên cứu thành phần hóa học của loài hải miên *Rhabdastrella globostellata* và đã phân lập được các hợp chất có cấu trúc hóa học mới là rhabdaglostelon A và rhabdaglostelon B

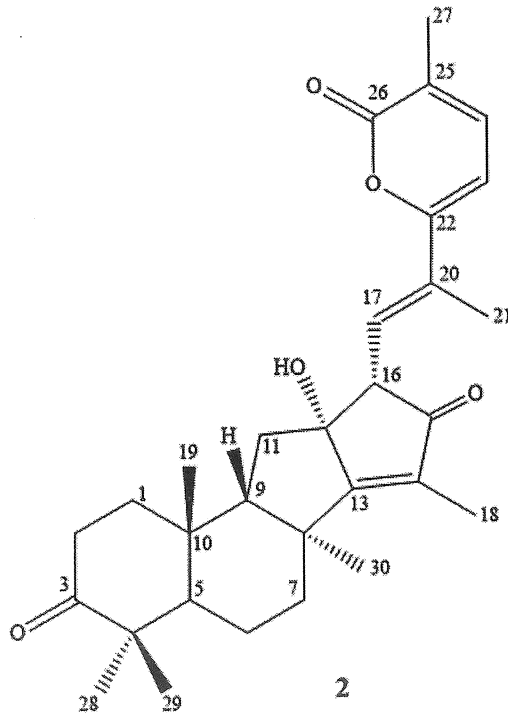
Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức (1) và (2) sau đây:



Theo một phương án, hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen là hợp chất rhabdaglostelon A có công thức (1).



Theo một phương án khác, hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen là hợp chất rhabdaglostelon B có công thức (2).



Các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen theo sáng chế bao gồm rhabdaglostelon A có công thức (1) và rhabdaglostelon B có công thức (2) đều thể hiện khả năng gây độc các dòng tế bào ung thư SK-LU-1, MCF-7, Hep-G2 và SK-Mel-2 và hữu dụng để phát triển thành các sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập các hợp chất trên đây từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) rửa sạch mẫu hải miên tươi *Rhabdastrella globostellata* để loại bỏ muối, thái nhỏ sau đó ngâm chiết 3 lần với metanol ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần ít nhất 60 phút;

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol;

(iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất, sau đó chiết phân bố bằng dung môi diclometan 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết diclometan, được ký hiệu là RGD;

(iv) tiến hành phân tách cặn chiết RGD trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel loại Kiesegel 60, cỡ hạt từ 230 đến 400 mesh (hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan là diclometan/metanol tỷ lệ 100/0→0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD1 đến RGD4;

(v) tiếp tục phân tách phân đoạn RGD2 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel loại Kieselgel 60, cỡ hạt từ 230 đến 400 mesh (hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/1 → 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD2A đến RGD2D;

(vi) tiếp tục phân tách phân đoạn RGD2C trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo loại RP-18, cỡ hạt từ 30 đến 50 μm (hãng sản xuất Fuji Silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 3/2 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu là RGD2C1 đến RGD2C2;

(vii) phân lập các hợp chất, trong đó hợp chất rhabdaglostelon A và rhabdaglostelon B thu được ở dạng gel màu vàng từ phân đoạn RGD2C1 sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), sử dụng dung môi axetonitril 65% trong nước.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề xuất đến phương pháp phân lập các hợp chất mới từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata* với đặc tính dược học hữu ích. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất các hợp chất có cấu trúc lần lượt là rhabdaglostelon A, rhabdaglostelon B và phương pháp phân lập hợp chất này từ loài *Rhabdastrella globostellata*. Các hợp chất theo sáng chế có tác dụng gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (SK-LU-1), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel-2). Cụ thể, các hợp chất này thuộc lớp chất terpenoid có dạng khung isomalabarican (isomalabaricane). Đây là một phát hiện hoàn toàn mới, các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen này lần đầu tiên được công bố trên thế giới.

Tất cả các hợp chất này đã được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng ung thư thử nghiệm SK-LU-1, MCF-7, Hep-G2 và SK-Mel-2 và cho giá trị IC_{50} trong khoảng từ 15.91 ± 1.21 đến $23.21 \pm 1.89 \mu\text{M}$. Ngoài ra, phương pháp phân lập các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata* theo sáng chế là dễ dàng thực hiện và cho độ tinh khiết cao, có thể phát triển thực hiện để tạo sản phẩm có tính ứng dụng trong điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

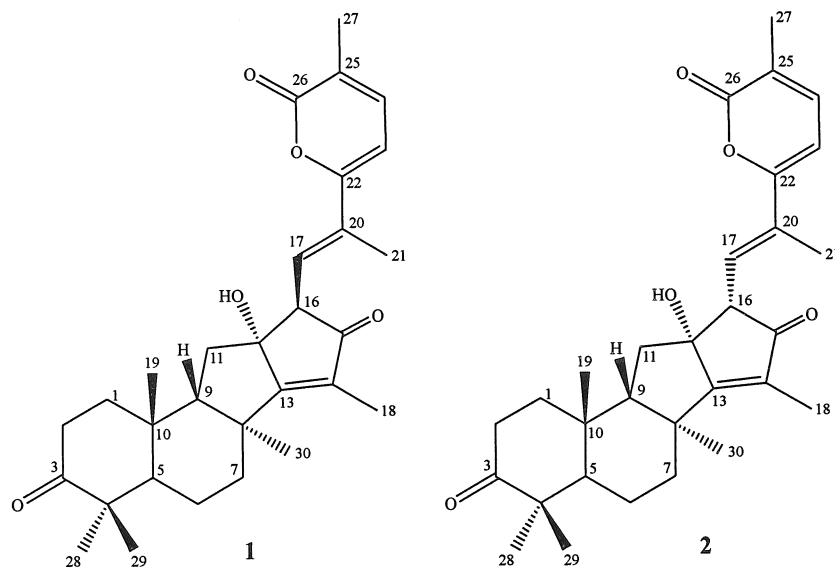
Sáng chế này tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có hoạt tính gây độc tế bào dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu biển, sẵn có trong nước vào phục vụ cuộc sống.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế còn được mô tả thông qua các phương án cụ thể minh họa và mô tả chi tiết hơn nữa cho sáng chế. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng, các phương án cụ thể sau đây được mô tả chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể này. Rõ ràng là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, trên cơ sở các nội dung mô tả trong bản mô tả này, có thể thực hiện các phương án tương đương mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế như được mô tả trong yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây.

Trong bản mô tả này, các giá trị số nên được hiểu là bao gồm cả nghĩa “khoảng”, cụ thể là 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 0% của giá trị số đó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất có công thức sau:



Các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen trên đây được xác định đặc trưng cấu trúc và được xác định là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa-lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất rhabdaglostelon A (rhabdaglostelone A) có công thức (1)

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{38}O_5$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 478$;

Các thông số vật lý:

+ Chất gel màu vàng;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 479,2795 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{39}O_5]^+$, 479.2797;

Hợp chất rhabdaglostelon B (rhabdaglostelone B) có công thức (2)

+ Công thức phân tử: $C_{30}H_{38}O_5$;

+ Khối lượng phân tử: $M = 478$;

Các thông số vật lý:

+ Chất gel màu vàng;

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 479,2791 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{39}O_5]^+$, 479.2797;

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen có công thức (1) và (2) từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata* như sau:

(i) mẫu hải miên tươi *Rhabdastrella globostellata* được rửa sạch để loại bỏ muối, thái nhỏ sau đó ngâm chiết 3 lần với metanol ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần ít nhất 60 phút;

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol;

(iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất rồi chiết phân bố bằng dung môi diclometan 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết diclometan, ký hiệu là dịch cô RGD;

(iv) tiến hành phân tách cặn chiết RGD trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan là diclometan/metanol tỷ lệ 100/0 → 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD1 đến RGD4;

(v) tiếp tục phân tách phân đoạn RGD2 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ (100/1-0/1) thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD2A đến RGD2D;

(vi) phân đoạn RGD2C được phân tách sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fujisilysia Chemical

Ltd.) với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 3/2 về thể tích, tạo ra bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu là RGD2C1 đến RGD2C2;

(vii) phân lập các hợp chất, trong đó hợp chất rhabdaglostelon A và rhabdaglostelon B thu được ở dạng gel màu vàng từ phân đoạn RGD2C1 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), điều kiện dung môi axetonitril 65% trong nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*

Mẫu hải miên tươi *Rhabdastrella globostellata* thu thập ở Nha Trang được rửa sạch để loại bỏ muối, thái nhỏ sau đó ngâm chiết 3 lần với metanol ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần ít nhất 60 phút, rồi lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol (420 g).

Hòa tan cặn chiết metanol với nước cất (2 lít) rồi chiết phân bố bằng dung môi diclometan 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclometan (RGD, 320 g) và dịch chiết nước (RGW).

Cặn chiết RGD được tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 12 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan là diclometan/metanol tỷ lệ 100/0 → 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD1 đến RGD4.

Phân đoạn RGD2 (200,0 g) tiếp tục được phân tách trên cột sắc ký ái lực (Φ 12 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là silica gel (Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/0 → 0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD2A đến RGD2D.

Phân đoạn RGD2C được tiến hành phân lập trên sắc ký cột (Φ 8 cm, L 50 cm) với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), hệ dung môi rửa giải axeton/nước tỷ lệ 3/2 về thể tích, tạo ra hai phân đoạn nhỏ ký hiệu từ RGD2C1 đến RGD2C2.

Các hợp chất: rhabdaglostelon A (5,9 mg) có công thức (1) và rhabdaglostelon B (11,5 mg) có công thức (2) thu được từ phần RGD2C1 khi sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), dung môi axetonitril 65% trong nước.

Các hợp chất thu được còn được tiến hành xác định các đặc tính hóa-lý. Kết quả được thể hiện sau đây.

Hợp chất rhabdaglostelon A có công thức (1):

- + Chất gel màu vàng;
- + Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 479,2795 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{39}O_5]^+$, 479,2797;
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được mô tả trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Số liệu phổ 1H - NMR và ^{13}C -NMR (δ , ppm) của hợp chất rhabdaglostelon A

C	$^{a,b}\delta_C$	$^{a,c}\delta_H$ (dạng píc $J = \text{Hz}$)
1	33.1	1.58 (m)/ 2.32 (m)
2	34.5	2.34 (m)/ 2.89 (m)
3	222.3	-
4	48.1	-
5	46.8	2.57 (dd, 2.5, 13.0)
6	20.1	1.66 (m)/ 1.70 (m)
7	33.8	1.99 (m)/ 2.35 (m)
8	45.1	-
9	54.7	1.64 (dd, 8.0, 13.5)
10	37.3	-
11	31.4	1.78 (dd, 13.5, 13.5)
12	85.8	2.10 (dd, 8.0, 13.5)
13	186.1	-
14	129.7	-
15	212.1	-
16	63.8	-
17	127.6	3.59 (d, 10.5)
18	8.9	5.88 (d, 10.5)
19	23.6	1.82 (s)
20	131.3	0.81 (s)
21	13.1	-
22	159.7	2.06 (s)
23	103.8	-
24	142.2	6.39 (d, 7.0)
25	125.1	7.34 (d, 7.0)
26	164.9	-
27	16.4	-

28	29.4	2.05 (s)
29	19.8	1.16 (s)
30	23.4	1.07 (s)

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Hợp chất rhabdaglostelon B có công thức (2):

- + Chất gel màu vàng;
- + Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 479.2791 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₀H₃₉O₅]⁺, 479.2797;
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được mô tả trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Số liệu phổ ¹H- NMR và ¹³C-NMR (δ, ppm) của hợp chất rhabdaglostelon B

C	^{a,b} δ _C	^{a,c} δ _H (dạng píc $J = \text{Hz}$)
1	32.0	1.58 (m)/ 2.28 (m)
2	33.5	2.38 (m)/ 2.75 (m)
3	219.1	-
4	46.9	-
5	45.6	2.47 (dd, 2.5, 13.0)
6	19.2	1.49 (m)/ 1.66 (m)
7	32.7	1.94 (m)/ 2.23 (m)
8	43.8	-
9	52.8	1.63 (dd, 8.5, 13.5)
10	36.0	-
11	33.5	1.88 (dd, 13.5, 13.5)
12	84.5	2.10 (dd, 8.5, 13.5)
13	182.6	-
14	128.8	-
15	207.5	-
16	59.6	-
17	125.4	3.21 (d, 9.0)
18	9.0	6.65 (d, 9.0)
19	23.3	1.81 (s)
20	131.5	0.82 (s)
21	13.7	-
22	159.0	1.94 (s)
23	101.8	-
24	139.8	6.17 (d, 7.0)
25	124.0	7.13 (d, 7.0)
26	163.2	-
27	16.6	-
28	29.2	2.09 (s)
29	19.3	1.13 (s)
30	23.5	1.04 (s)

^aĐo trong CDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen theo sáng chế

Các hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào như sau:

Phương pháp thử độ độc tế bào *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 tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng sulforhodamin B (sulforhodamine B - SRB). Giá trị OD máy đo được tỷ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- + Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.
- + Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (190 μ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng axit trichloroacetic – TCA 20%.
- + Ủ trong tủ ẩm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng axit axetic rồi để khô ở nhiệt độ phòng.
- + 10 mM Tris base không đệm (unbuffered Tris base) để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).
- + Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày 0})}{OD(DMSO) - OD(\text{ngày 0})}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticin (Ellipticine) ở các nồng độ 10 μ g/ml; 2 μ g/ml; 0,4 μ g/ml; 0,08 μ g/ml được sử dụng như là chất đối chứng dương;

- DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)			
	LU1	HepG2	MCF7	SKMel2
1	22,44 ± 1,98	22,20 ± 2,74	21,28 ± 1,03	20,37 ± 1,84
2	23,21 ± 1,89	17,26 ± 1,92	19,27 ± 1,75	15,91 ± 1,21
Ellipticin*	2,20 ± 0,20	2,07 ± 0,24	1,95 ± 0,16	1,18 ± 0,16

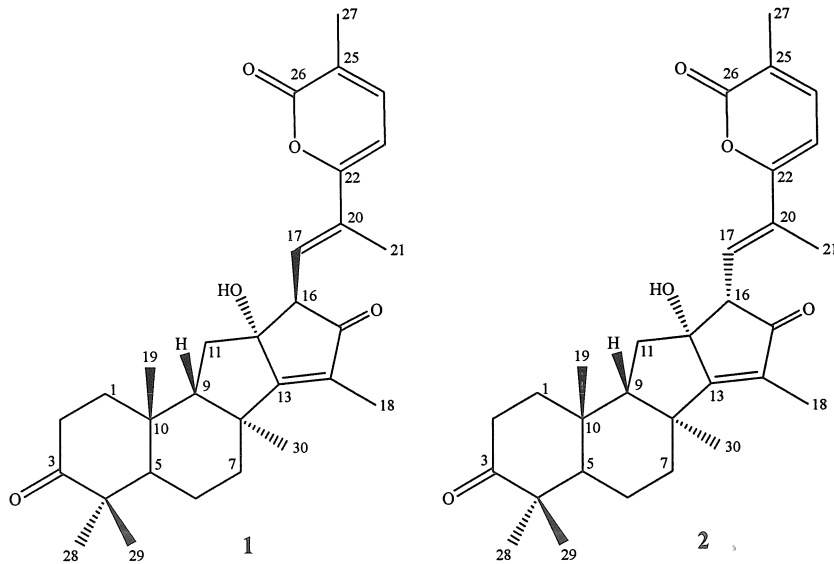
*Ellipticin là chất đối chứng dương

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

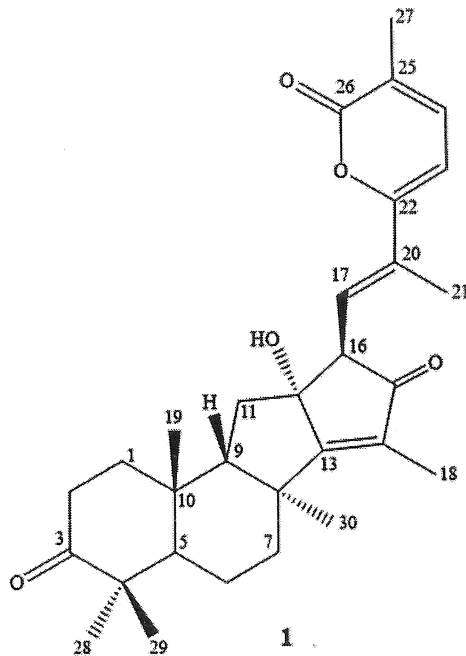
Sáng chế đề xuất hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (SK-LU-1), ung thư vú (MCF-7), ung thư gan (Hep-G2) và ung thư da (SK-Mel-2). Sáng chế tạo cơ sở khoa học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*.

Yêu cầu bảo hộ

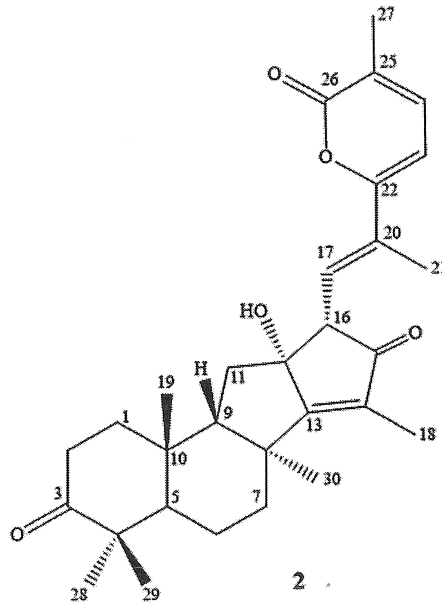
1. Hợp chất 6/6/5/5-tetracyclic triterpen, trong đó hợp chất này là hợp chất được chọn từ các hợp chất công thức (1) và (2) sau đây:



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



3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là hợp chất rhabdaglostelon B có công thức (2):



4. Phương pháp phân lập hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 từ loài hải miên *Rhabdastrella globostellata*, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) rửa sạch mẫu hải miên tươi *Rhabdastrella globostellata* để loại bỏ muối, thái nhỏ, sau đó ngâm chiết 3 lần với metanol (MeOH) ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần ít nhất 60 phút;

(ii) gộp các dịch chiết trong metanol thu được ở bước (i), lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được cặn chiết metanol;

(iii) hòa tan cặn chiết metanol với nước cất, sau đó chiết phân bố bằng dung môi diclometan 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết diclometan, được ký hiệu là RGD;

(iv) tiến hành phân tách cặn chiết RGD trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel loại Kiesegel 60, cỡ hạt từ 230 đến 400 mesh (hãng sản xuất Merck), với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ metanol trong diclometan là diclometan/metanol tỷ lệ 100/0→0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD1 đến RGD4;

(v) tiếp tục phân tách phân đoạn RGD2 trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel loại Kiesegel 60, cỡ hạt từ 230 đến 400 mesh (hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton với tỷ lệ 100/0→0/1 thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là RGD2A đến RGD2D;

(vi) tiếp tục phân tách phân đoạn RGD2C trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo loại RP-18, cỡ hạt từ 30 đến 50 μm (hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với

hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất với tỷ lệ 3/2 về thể tích để thu được bốn phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu là RGD2C1 đến RGD2C2;

(vii) phân lập các hợp chất, trong đó hợp chất rhabdaglostelon A và rhabdaglostelon B thu được ở dạng gel màu vàng từ phân đoạn RGD2C1 sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với cột J'sphere H-80 (150 × 200 mm), sử dụng dung môi axetonitril 65% trong nước.