การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารต้านมะเร็ง อัลคาลอยด์เอคเตนาสซิดิน จากเพรียงหัวหอมไทย *Ecteinascidia thurstoni*

นางสาวเพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2340-3

CHEMICAL STRUCTURE MODIFICATION OF ANTICANCER ECTEINASCIDIN ALKALOIDS FROM THE THAI TUNICATE *ECTEINASCIDIA THURSTONI*

Miss Ploenthip Puthongking

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-2340-3

Thesis Title	CHEMICAL STRUCTURE MODIFICATION OF ANTICANCER ECTEINASCIDIN ALKALOIDS FROM THE THAI TUNICATE ECTEINASCIDIA THURSTONI
By	Miss Ploenthip Puthongking
Field of Study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Khanit Suwanborirux, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

Pompen Pramyothin .....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pompen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Mitr Pathipvanich, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

Naoki Saito ..... Member

(Professor Naoki Saito, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.)

S. Amnuoypol ..... Member

(Associate Professor Surattana Amnuoypol, Ph.D.)

เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง: การดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารต้านมะเร็ง อัลคาลอยด์เอคเตนาสซิดินจากเพรียงหัวหอมไทย *Ecteinascidia thurstoni* (CHEMICAL STRUCTURE MODIFICATION OF ANTICANCER ECTEINASCIDIN ALKALOIDS FROM THE THAI TUNICATE *ECTEINASCIDIA THURSTONI*) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์, 169 หน้า. ISBN 974-14-2340-3

เอคเตนาสซิดิน 743 (Et 743; **1**) เป็นสารกลุ่มทริสเตตราไฮโดรไอโซควินโนลีนอัลคาลอยด์ที่เคยแยกได้จากเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia turbinata* เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านมะเร็ง และในปัจจุบันกำลังศึกษาสารต้านมะเร็งชนิดนี้ทางคลินิกขั้นที่ II/III ต่อมาได้มีการแยกสาร Et 770 (**2**) และ Et 786 (**4**) ในปริมาณสูงจากเพรียงหัวหอมไทย *E. thurstoni* ที่ผ่านกระบวนการแช่สกัดด้วยสารละลาย KCN จึงได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเอคเตนาสซิดินที่แยกได้ทั้งสิ้น 21 ชนิด ได้แก่ อนุพันธ์ diacetate ของสาร Et 743, Et 770 และ Et 786 **(18-20)** โดยเป็นการแทนที่หมู่ฟังก์ชั่น phenolic hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-18 และ C-6' ของ *A*-subunit และ *C*-subunit ตามลำดับ และ อนุพันธ์ monoacyl ของสาร Et 770 **(21-37)** โดยเป็นการแทนที่หมู่ฟังก์ชั่น phenolic hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-6' ของ *C*-subunit โดยใช้ acid anhydrides, acid chlorides หรือ acids ร่วมกับ *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ในทางตรงกันข้ามเมื่อสาร Et 770 ทำปฏิกิริยากับ indole-3-carboxylic acid ร่วมกับ DCC จะได้อนุพันธ์ amide **39** ซึ่งเป็นการแทนที่ที่ตำแหน่ง N-2' ของ *C*-subunit

ได้นำอนุพันธ์ที่เตรียมได้ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดได้แก่ HCT116 (เซลล์มะเร็งลำไส้) QG56 (เซลล์มะเร็งปอด) และ DU145 (เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก) พบว่า หมู่ฟังก์ชัน cyano และ hydroxyl ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 21 มีความจำเป็นต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้การออกซิไดส์หมู่ซัลไฟด์มีผลทำให้ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลงอย่างมาก อนุพันธ์ ester ของ benzoyl ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสารตั้งต้น (**2**) ในขณะที่อนุพันธ์ ester ของ 4"-nitrobenzoyl (**22**) และ 4"-methoxybenzoyl (**28**) แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ใกล้เคียงกับสารตั้งต้น (**2**) เช่นเดียวกับอนุพันธ์ ester ที่มีอะตอมไนโตรเจนอยู่ในวงแหวน (**30-31** และ **34-37**) และพบว่าอนุพันธ์ amide ของ indole-3-carbonyl (**39**) เป็นอนุพันธ์ชนิดเดียวที่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ดีกว่าสารตั้งต้น (**2**)

เมื่อศึกษาวิธีการ *N*-demethylation ของโมเลกุลจำลอง ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน ABC ที่คล้ายคลึงกับ *A*-subunit ของสารเอคเตนาสซิดิน โดยใช้สาร cerium (IV) ammonium nitrate (CAN) พบสภาวะที่เหมาะสมคือ สารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ CAN จำนวน 5 เท่าในสารละลายของ acetonitrile อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้อจำกัดคือ ต้องเปลี่ยนหมู่ cyanoamine เป็นหมู่ amide carbonyl และปกป้องหมู่ฟังก์ชัน phenolic hydroxyl ก่อนจึงจะทำให้การสังเคราะห์ตามวิธีดังกล่าวได้ผล

สาขาวิชา เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4576965833: MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS

KEYWORD: ECTEINASCIDIN 770 / ACYL DERIVATIVES / CYTOTOXICITY / ABC RING SYSTEM

PLOENTHIP PUTHONGKING: CHEMICAL STRUCTURE MODIFICATION OF ANTICANCER ECTEINASCIDIN ALKALOIDS FROM THE THAI TUNICATE *ECTEINASCIDIA THURSTONI*: THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: KHANIT SUWANBORIRUX, Ph.D., 169 pp. ISBN 974-14-2340-3

Ecteinascidin 743 (Et 743; **1**), a member of the tristetrahydroisoquinoline alkaloids previously isolated from the tunicate, *Ecteinascidia turbinata*, is a potent anticancer agent and is currently undergoing in phase II/III clinical trials. Et 770 (**2**) and Et 786 (**4**), two anticancer agents from the Thai tunicate, *E. thurstoni*, were efficiently isolated with the KCN pretreated process. Three diacetate esters of Ets 743, 770, and 786 (**18-20**) were prepared and the acetylation was reacted to the phenolic hydroxyls at C-18 and C-6' of the ecteinascidins. Seventeen acyl esters were prepared on the phenolic hydroxyl at C-6' of Et 770 with the corresponding acid anhydrides or acid chlorides or acids in the presence of *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) as the coupling reagent to yield the monoacyl derivatives (**21-37**). In contrast, the reaction of indole-3-carboxylic acid with Et 770 in the presence of DCC provided the amide derivative **39**, which was substituted at N-2' of the C'-subunit.

The synthesized derivatives were evaluated for cytotoxicity against HCT116 (human colon carcinoma), QG56 (human lung carcinoma), and DU145 (human prostate carcinoma) and exhibited excellent cytotoxic activities at nanomolar concentration. The cytotoxic data supported that the cyano or the hydroxy groups at C-21 position are essential for the cytotoxic activity. Moreover, oxidation of the sulfide bridge of ecteinascidins resulted in dramatically diminished activity. Most benzoyl ester derivatives exhibited dramatically decreased cytotoxicity while 4"-nitrobenzoyl (**22**) and 4"-methoxybenzoyl (**28**) ester derivatives as well as the *N*-containing heterocyclic ester derivatives (**30-31** and **34-37**) possessed cytotoxicity similar to the precursor (**2**). Interestingly, only the indole-3-carbonyl amide derivative (**39**) exhibited higher cytotoxicity than the parent compound (**2**).

The selective *N*-demethylation with cerium (IV) ammonium nitrate (CAN) was worked on the structural models containing the ABC ring system, which included the *A*-subunit of Ets. The optimal condition was achieved in 5 equimolars of CAN in the presence of aqeous-acetonitrile. However, this investigation revealed that the protection at the phenolic hydroxyl and the transformation of cyanoamine to amide carbonyl group are the key steps for the oxidative *N*-demethylation using CAN for those model compounds.

Field of Study Pharmaceutical Chemistry and Natural Products Student's signature.....

Academic Year 2005 Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my appreciation to my thesis advisors, Assistant Professor Chamnan Patarapanich and Dr. Khanit Suwanborirux and my Japanese teachers, Professor Naoki Saito and Professor Akinori Kubo, of Meiji Pharmaceutical University, than whom no-one could have been more helpful and courteous, for their valuable advice, continual guidance, kindness, and understanding throughout this research study.

I would like to thank the Pharmaceutical Research Instrument Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences for providing a 300 MHz NMR spectrometer and other scientific equipments, Ms. T. Kozeki and S. Kubota of the Analytical Center of Meiji Pharmaceutical University, for recording 500 MHz NMR and mass spectra, and Dr. N. Shimma, Chugai Pharmaceutical Company Research Center, Japan for cytotoxic assay.

I would like to thank Mr. Sombat Poovachiranon (Phuket Marine Biological Center) for supporting the collection of the Thai tunicate.

Financial supports for this work were provided by a Grant (BRT R646004) from the Biodiversity Research and Training Program (BRT), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, and a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (No. 1437025) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan. The Bioactive Marine Ntural Product Chemistry Research Unit (BMNCU) is supported by a Grant for Centers of Excellence, Chulalongkorn University. Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS) and the National Research Cooperation of Thailand (NRCT) supported the collaboration between Thai and Japanese researchers. The partial supports by Onda Foundation, Meiji Pharmaceutical University, Japan, the Graduate School of Chulalongkorn University and Khon Kaen University were acknowledged.

I would like to thank all staff of the Department of Pharmaceutical Chemistry for their supporting during my study.

My sincere appreciation is conveyed to Associate Professor Surattana Amnuoypol, Miss Emi Saito and all my friends at Chulalongkorn University, Khon Kaen University and Meiji Pharmaceutical University who have shared happy time together.

Finally, I would like to express my special and deepest appreciation to my family, for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

CHAPTER Page

CHAPTER Page

LIST OF FIGURES

Figure Page

Figure Page

Figure Page

Figure Page

Figure Page

Figure Page

Figure Page

Figure Page

LIST OF SCHEMES

Scheme Page

LIST OF TABLES

Table Page

ABBREVIATIONS

%	=	percent
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
$[\alpha]_D^{25}$	=	specific rotation at 25 °C and sodium D line (589 nm)
Å	=	angstrom
°C	=	degree Celsius
^{1}H-NMR	=	proton nuclear magnetic resonance
^{13}C-NMR	=	carbon-13-nuclear magnetic resonance
2D NMR	=	two dimensional nuclear magnetic resonance
A357	=	malignant melanoma cell line
B16	=	melanoma cell line
br s	=	broad singlet
c	=	concentration
cm	=	centrimeter
cald	=	calculated
d	=	doublet (for NMR spectra)
dd	=	doublet of doublets (for NMR spectra)
dt	=	doublet of triplets (for NMR spectra)
DEPT	=	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DU145	=	human prostrate cancer cell line
eq.	=	equation or equivalent
ESI	=	Electrospray Ionization
g	=	gram
h	=	hour
HCT116	=	human colon cancer cell line
^{1}H-^{1}H COSY	=	^{1}H-^{1}H correlation sprectroscopy
HMBC	=	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	=	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HT29	=	colon cancer cell line
Hz	=	hertz

IC_{50}	=	50% inhibition concentration
IR	=	infrared spectrometry
J	=	coupling constant (for NMR spectra)
Kg	=	kilogram
L, l	=	liter
L1210	=	leukemia cell line
m	=	multiplet (for NMR spectra)
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
m/z	=	mass to charge
M	=	molar
M^+	=	molecular ion
MEL-28	=	melanoma cell line
MHz	=	megahertz
nM	=	nanomolar
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	=	Nuclear Overhauser Effect
ppm	=	part(s) per million
P388	=	murine leukemia cell
PC-3	=	prostrate carcinomar
q	=	quartet
QC56	=	human carcinomar cell line
rt	=	room temperature
s	=	singlet (for NMR spectra)
t	=	triplet (for NMR spectra)
w, wt	=	weight