



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย “การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารผลิตภัณฑ์
ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสตีลปีน”
ในชุดโครงการวิจัยแบบมุ่งเป้า สมุนไพร
ยารักษาโรคและสารเสริมสุขภาพ

โดย ดร. มณฑกานต์ จิตต์แจ้ง
สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ และ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

มิถุนายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย “การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารผลิตภัณฑ์
ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสตีลปีน”
ในชุดโครงการวิจัยแบบมุ่งเป้า สมุนไพร
ยารักษาโรคและสารเสริมสุขภาพ

โดย ดร. มณฑาทิ จิตต์แจ้ง
สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ และ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สัญญาเลขที่ DBG5180015

โครงการ “การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์
ที่เป็นอนุพันธ์ของสตีลปีน”

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ช่วงระยะเวลาดำเนินการ:	30 มิถุนายน 2551 ถึง 29 มิถุนายน 2553
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน:	ดร. มณฑกานต์ จิตต์แจ้ง
นักวิจัยที่ปรึกษาโครงการ:	ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ รุจิวัฒน์
หน่วยงาน:	สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ และ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

บทคัดย่อ

เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลในกลุ่มลาเมลลาริน เป็นสารอนุพันธ์ของสตีลปีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ผู้วิจัยจึงได้เลือกศึกษาสารในกลุ่มนี้โดยเริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 11 ชนิด ซึ่งสารลาเมลลารินหลายชนิดแสดงความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบโดยมีค่า IC_{50} ระดับนาโนโมลาร์ และเมื่อนำผลที่ได้ไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (structure-activity relationship หรือ SAR) อย่างเป็นระบบก็พบว่า มี 4 ตำแหน่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ประเมินความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นยา (drug-likeness) ของสารในกลุ่มลาเมลลาริน โดยพิจารณาจากคุณสมบัติทางเคมีกายภาพต่างๆ เมื่อเทียบกับยาและสารที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาเป็นยาอีกด้วย ซึ่งพบว่าสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติอยู่ในเกณฑ์ที่ยังสามารถปรับปรุงได้โดยการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้าง เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย และมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

Project Number DBG5180015
“Investigation of Anticancer Activity of Natural and Synthetic Compounds
Containing Stilbene Motif”
Final Report

Project Period:	30 June 2008 – 29 June 2010
Principal Investigator:	Dr. Montakarn Chittchang
Mentor:	Professor Dr. Somsak Ruchirawat
Affiliations:	Chulabhorn Graduate Institute and Chulabhorn Research Institute

Abstract

Lamellarins were selected as representatives of stilbene-containing natural products. These compounds have been shown to exhibit promising biological activities. In this study, twenty-two naturally occurring and three unnatural lamellarins synthesized in our laboratory were evaluated for their cytotoxic activity against eleven cancer cell lines derived from six different cancer types. The IC₅₀ values of these compounds ranged from sub-nanomolar (0.08 nM) to micromolar (>97.0 μM). Structure-activity relationship (SAR) studies were then performed using matched molecular pairs analysis, by comparing the IC₅₀ values of several pairs of lamellarin structures that differ in selected substitution patterns. Our results not only reveal the importance of specific hydroxylation or methoxylation patterns around the lamellarin core for the first time, but also confirm prior findings and clarify some previous uncertainties. Additionally, drug-likeness of these compounds was also assessed using a range of physicochemical parameters in comparison with oral marketed drugs, drug molecules in development, as well as natural product derivatives in development and on the market. The results indicated that even though lamellarins are not particularly drug-like in the conventional sense, they still remain a good starting point for structural optimization to obtain lamellarin analogs that are more suitable for further development.

Executive Summary

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสตีโลบีนที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ โดยเริ่มจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลในกลุ่มลาเมลลาริน เนื่องจากกลุ่มนักอินทรีย์เคมีของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ของสารในกลุ่มนี้ จนกระทั่งมีจำนวนและปริมาณสารมากพอที่จะทำการศึกษาวิจัยโดยละเอียดและเป็นระบบ สารลาเมลลารินที่สังเคราะห์ขึ้นจำนวน 25 ชนิดได้ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อและอวัยวะที่สำคัญต่างๆ 11 ชนิดและเซลล์ปกติ 1 ชนิด ด้วยวิธี colorimetric method เพื่อวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังจากที่ได้รับสารลาเมลลารินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบพบว่า สารลาเมลลารินหลายชนิดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันในสูตรโครงสร้างของสารในกลุ่มนี้เพียงเล็กน้อย ยังส่งผลให้ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเปลี่ยนไปอย่างเห็นได้ชัด โดยที่สารบางชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารบางชนิดมีความเฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดมากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

หลังจากนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (structure-activity relationship หรือ SAR) ของสารลาเมลลารินอย่างเป็นระบบด้วยวิธี matched molecular pairs analysis โดยทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันเฉพาะตำแหน่งที่พิจารณาเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณทำให้สามารถสรุปได้ว่ามี 4 ตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มลาเมลลาริน กล่าวคือ พันธะคู่ระหว่าง C5–C6 รวมทั้งหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C7, C8 และ C20 ส่วนความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C9, C13 และ C14 นั้นยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนและจะต้องทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพิ่มเติมเพื่อทำการศึกษาต่อไป

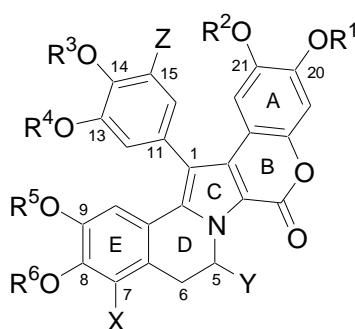
นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ประเมินความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นยา (drug-likeness) ของสารในกลุ่มลาเมลลาริน เมื่อเทียบกับยาที่ให้โดยการรับประทาน ยาที่ได้จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาเป็นยา โดยการประยุกต์ใช้เคมีเชิงคำนวณ (computational chemistry) ร่วมกับการทดสอบความชอบไขมัน (lipophilicity) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญและส่งผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพอื่นๆ ที่จะปัจจัยกำหนดคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (ได้แก่ การดูดซึม การกระจาย การเปลี่ยนแปลง และการขับออก) ของยาเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จากผลการศึกษาพบว่า สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติอยู่ในเกณฑ์ที่ยังสามารถปรับปรุงได้โดยการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้าง เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย และมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

ผลงานวิจัยจากโครงการนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ได้แก่ ChemMedChem ฉบับเดือนมีนาคม 2552 และ European Journal of Medicinal Chemistry ฉบับเดือนมิถุนายน 2553 รวม 2 บทความ อีกทั้งยังได้ถูกนำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 2 ครั้งด้วย

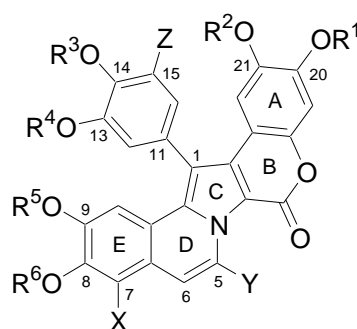
ผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการค้นหารสชาติและสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสติลบินที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ โดยสารกลุ่มแรกที่เลือกมาศึกษาวิจัยคือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มลามेलลาริน (รูปที่ 1) เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ นอกจากนี้กลุ่มนักอินทรีย์เคมีของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ยังได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ของสารในกลุ่มลามेलลาริน จนกระทั่งสามารถสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้ได้เป็นจำนวนมากพอสำหรับการศึกษาวิจัยโดยละเอียดและเป็นระบบเพื่อค้นหารสชาติที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

รูปที่ 1 โครงสร้างของสารในกลุ่มลามेलลารินที่ใช้ในการศึกษาวิจัย



Group 1
with a saturated D-ring



Group 2
with an unsaturated D-ring

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์

ในระยะแรกของโครงการนี้ ผู้วิจัยโดยความร่วมมือกับนักวิจัยในหน่วยทดสอบทางชีวภาพ (Bioassay Unit) ของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารในกลุ่มลามेलลารินที่สังเคราะห์ขึ้นจำนวน 25 ชนิด (ตารางที่ 1) ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง 11 ชนิดและเซลล์ปกติ 1 ชนิด โดยสารลามेलลารินที่ใช้ในการศึกษาวิจัยมีทั้งสารที่มีโครงสร้างเหมือนกับสารที่พบในธรรมชาติ (natural lamellarins) จำนวน 22 ชนิด และสารที่มีโครงสร้างคล้ายสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (unnatural lamellarins) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ dehydrolamellarin J, dehydrolamellarin Y และ dihydrolamellarin η

สำหรับเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนั้น ครอบคลุมโรคมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทยและเกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อและอวัยวะที่สำคัญต่างๆ ดังต่อไปนี้

- เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก 1 ชนิด คือ KB (human oral epidermoid carcinoma)
- เซลล์มะเร็งปอด 2 ชนิด คือ A549 (human non-small cell lung carcinoma) และ H69AR (human multidrug-resistant, small cell lung carcinoma)
- เซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิด คือ T47D (human hormone-dependent breast cancer) และ MDA-MB-231 (human hormone-independent breast cancer 231)

- เซลล์มะเร็งตับ 2 ชนิด คือ HepG2 (human hepatocellular carcinoma) และ S102 (human hepatocellular carcinoma)
- เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 1 ชนิด คือ HuCCA-1 (human cholangiocarcinoma)
- เซลล์มะเร็งปากมดลูก 1 ชนิด คือ HeLa (human cervical adenocarcinoma)
- เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด 2 ชนิด คือ HL-60 (human promyelocytic leukemia) และ P388 (mouse lymphoid neoplasm)

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความเป็นพิษของสารลาเมลลารินต่อเซลล์ปกติชนิด MRC-5 (human fetal/embryonic lung fibroblast) ด้วย เพื่อค้นหาสารที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติค่อนข้างต่ำ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ของสารลาเมลลารินที่มีต่อเซลล์ H69AR นั้นยังสามารถใช้ในการค้นหาสารที่มีศักยภาพเป็นยาต้านมะเร็งที่มีการดื้อยาแบบไม่เฉพาะเจาะจง (multidrug resistance) ได้อีกด้วย

ตารางที่ 1 หมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งต่างๆ ของสารลาเมลลารินในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2

Group 1 (with C5–C6)	Group 2 (with C5=C6)	Substituents								
		OR ¹	OR ²	Z	OR ³	OR ⁴	OR ⁵	OR ⁶	X	Y
Lamellarin A ^a	-	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin C	Lamellarin B	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin χ	Lamellarin D	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OH	H	H
Lamellarin E	Lamellarin X	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin F	Lamellarin ϵ	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin G	-	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	OH	H	H
-	Lamellarin H ^a	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	H	H
Lamellarin I	Lamellarin ζ	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin J	Dehydrolam J ^b	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OH	H	H
Lamellarin K	Lamellarin M	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin L	Lamellarin N	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin S ^a	-	OH	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin T	Lamellarin W	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin U	Lamellarin α	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	H	H
Lamellarin V ^a	-	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin Y	Dehydrolam Y ^b	OH	OMe	H	OMe	OH	OH	OMe	H	H
Lamellarin Z ^a	-	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin β ^a	-	OH	OH	H	OMe	OH	OH	OH	H	H
Lamellarin γ ^a	-	OH	OMe	OMe	-	OMe	OMe	OMe	OH	H
-	Lamellarin ϕ ^a	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	OMe	H
Dihydrolam η ^{b,c}	Lamellarin η ^c	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H

^a อยู่ในระหว่างการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์

^b สารในกลุ่มลาเมลลารินที่มีโครงสร้างคล้ายสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (unnatural lamellarins)

^c มีปัญหาการละลายใน DMSO จึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ได้

ทั้งนี้ การศึกษาความเป็นพิษของสารลาเมลลารินที่มีต่อทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ นั้น อาศัยวิธี colorimetric method เพื่อวัดจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและยังคงยึดเกาะกับพื้นผิวหลังจากที่ได้รับสารลาเมลลารินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยอาศัยเทคนิคการย้อมผนังเซลล์ด้วยสี crystal violet ก่อนที่จะวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก อย่างไรก็ตาม วิธีการย้อมด้วยสี crystal violet ไม่สามารถใช้กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดอย่างเซลล์ P388 และ HL-60 ได้ เพราะเซลล์ประเภทนี้ไม่ยึดเกาะกับพื้นผิวแต่จะแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงจำเป็นต้องใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี XTT assay ที่อาศัยการเปลี่ยนจากสีเหลืองของสาร XTT เป็นสีส้มของสาร formazan ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เฉพาะในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น สำหรับการวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดของเซลล์ทำได้โดยการวัดปริมาณสาร formazan ที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่ได้รับสารลาเมลลารินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นระหว่าง 450-500 นาโนเมตร เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ (negative control)

จากตารางที่ 2 ซึ่งแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของสารลาเมลลารินที่มีต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และเซลล์ปกติ ในรูปของค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ลงได้ 50% ภายใน 48 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าสารลาเมลลารินหลายชนิดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ นอกจากนี้ความแตกต่างของสูตรโครงสร้างเพียงเล็กน้อย (ไม่ว่าจะเป็นชนิดของพันธะระหว่าง C5 กับ C6 ในส่วนของ D-ring หรือชนิดของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งต่างๆ ดังรายละเอียดตามตารางที่ 1) ยังส่งผลให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัด โดยที่สารบางชนิด เช่น ลาเมลลาริน E และลาเมลลาริน F มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารบางชนิด เช่น ลาเมลลาริน D และลาเมลลาริน N มีความเฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งบางชนิดโดยเฉพาะเซลล์ T47D มากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

จากนั้น ผู้วิจัยได้นำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ถึงความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (structure-activity relationship หรือ SAR) ของสารลาเมลลารินอย่างเป็นระบบด้วยวิธี matched molecular pairs analysis โดยทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันเฉพาะตำแหน่งที่พิจารณาเพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น เพื่อจำกัดจำนวนตัวแปรในการวิเคราะห์ผลแต่ละครั้งให้น้อยที่สุด ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารลาเมลลารินเป็นคู่ๆ ในรูปของ $\log(IC_{50} \text{ ratio})$ ซึ่งค่าที่เป็นบวกแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างที่กำลังพิจารณาส่งผลให้สารลาเมลลารินมีค่า IC_{50} สูงขึ้นหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลดลง ในทางตรงกันข้าม ค่า $\log(IC_{50} \text{ ratio})$ ที่เป็นลบแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างดังกล่าวช่วยลดค่า IC_{50} หรือเพิ่มความเป็นพิษของสารลาเมลลารินต่อเซลล์มะเร็ง โดยจะถือว่าการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างใดๆ มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารลาเมลลารินก็ต่อเมื่อทำให้ค่า IC_{50} เปลี่ยนไปอย่างน้อย 10 เท่าหรือมีค่า $|\log(IC_{50} \text{ ratio})|$ มากกว่า 1 เพื่อชดเชยความแปรปรวนของค่า IC_{50} ที่อาจเกิดขึ้นได้ในการทดลอง

ตารางที่ 2 ความเป็นพิษของสารลามลารินที่มีต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

Compound	IC ₅₀ [μM]											
	Oral	Lung		Breast		Liver			Cervix	Blood cell		Fibroblast
	KB	A549	H69AR	T47D	MDA-MB-231	HuCCA-1	HepG2	S102	HeLa	P388	HL-60	MRC-5
Lamellarin C	5.7	3.6	12.1	7.7	8.3	11.5	18.3	4.4	7.9	4.2	5.7	ND
Lamellarin B	4.4	5.4	6.4	0.2	4.4	5.3	0.8	5.9	4.8	6.1	6.2	68.1
Lamellarin χ	2.6	2.0	38.9	3.8	4.8	49.9	0.1	3.4	6.6	1.6	1.8	ND
Lamellarin D	0.04	0.06	0.4	0.00008	0.4	0.08	0.02	3.2	0.06	0.1	0.04	9.2
Lamellarin E	4.0	2.2	7.2	5.3	3.4	9.4	1.0	2.8	5.3	2.6	4.5	ND
Lamellarin X	0.08	0.3	0.3	0.006	0.08	0.04	0.2	1.6	0.09	0.3	0.2	10.1
Lamellarin F	4.2	4.4	10.1	4.6	3.7	8.8	0.5	2.7	6.4	3.1	3.6	ND
Lamellarin ε	0.3	0.3	2.3	0.006	0.3	0.07	0.1	2.1	0.3	0.3	0.1	25.8
Lamellarin G	3.0	4.0	7.4	8.6	15.0	49.9	1.5	9.6	4.2	1.6	7.5	ND
Lamellarin I	6.3	10.6	18.1	9.5	8.6	11.2	1.3	12.4	11.2	3.8	6.9	ND
Lamellarin ζ	4.7	10.6	23.3	0.09	4.7	6.3	0.3	7.9	8.3	7.2	12.3	> 89.7
Lamellarin J	> 97.0	1.1	> 97.0	13.0	7.4	> 97.0	0.4	19.4	> 97.0	0.8	0.9	ND
Dehydrolam J	0.08	0.04	0.3	0.0001	0.4	0.006	0.01	2.1	0.08	0.08	0.04	> 97.4
Lamellarin K	0.9	4.2	4.3	0.09	0.4	3.4	1.0	4.4	2.8	3.4	3.8	ND
Lamellarin M	0.2	0.04	0.3	0.009	0.1	0.06	0.02	1.9	0.3	0.1	0.06	13.4
Lamellarin L	3.0	0.8	3.0	4.4	1.8	21.9	0.3	1.4	2.8	0.5	1.9	ND
Lamellarin N	0.06	0.04	0.06	0.0006	0.6	0.008	0.02	2.3	0.04	0.08	0.04	> 100.1
Lamellarin T	6.4	2.9	13.2	13.2	8.6	14.7	0.6	5.5	9.9	4.8	6.4	ND
Lamellarin W	5.3	5.2	4.4	4.2	5.2	4.2	0.9	5.8	5.0	5.6	6.7	28.5
Lamellarin U	3.9	0.9	8.7	10.3	4.5	44.6	0.6	3.0	5.0	1.8	4.5	ND
Lamellarin α	9.4	1.6	8.0	0.6	3.9	5.8	0.06	5.6	7.6	1.7	10.5	> 97.4
Lamellarin Y	5.0	0.9	14.8	7.2	8.0	37.9	0.6	4.3	29.9	1.0	5.0	ND
Dehydrolam Y	0.8	1.3	7.6	0.08	0.6	1.4	0.4	6.2	1.6	0.9	3.4	31.0
Dihydrolam η	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Lamellarin η	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Etoposide	0.5	1.1	45.9	0.08	0.2	6.8	0.2	1.5	0.4	0.4	2.3	> 85.0

ND = not determined as these group 1 lamellarins are generally less cytotoxic than their group 2 counterparts, and thus, are less likely to be toxic to normal cells. N/A = not available due to the insolubility of the compounds in DMSO.

รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างผลการศึกษา SAR ในส่วนของความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C7 ที่มีต่อความเป็นพิษของสารลามลารินต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และเซลล์ปกติ โดยแบ่งเป็น 3 กรณีคือ

a) การเปลี่ยนธาตุไฮโดรเจนเป็นหมู่ไฮดรอกซี ทำให้สารลามลารินในกลุ่มที่ 2 (ซึ่งมีพันธะระหว่าง C5–C6 เป็นพันธะคู่) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

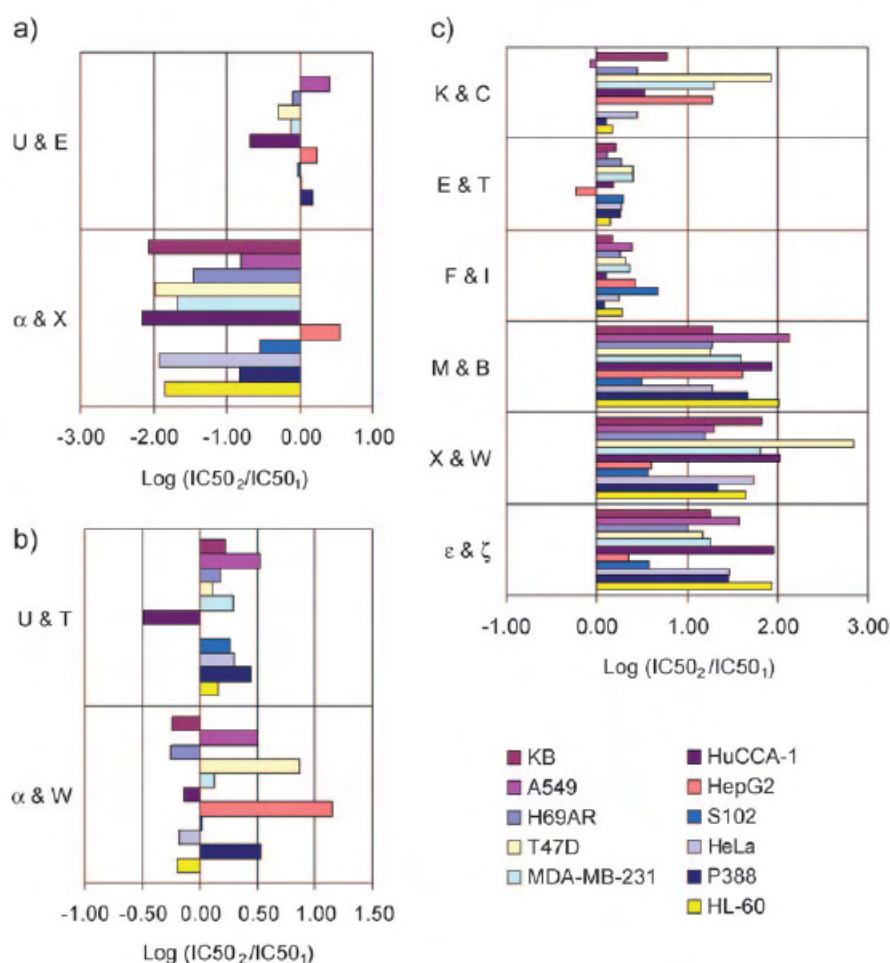
b) การเปลี่ยนธาตุไฮโดรเจนเป็นหมู่เมธอกซี ส่งผลให้ความเป็นพิษของสารลามลารินต่อเซลล์มะเร็งลดลงแต่ไม่มากเท่าในกรณีที่ 3 (รูปที่ 2 c)

c) การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีเป็นหมู่เมธอกซี ส่งผลให้สารลามลาริน โดยเฉพาะสารในกลุ่มที่ 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลดลงอย่างชัดเจน

จากผลทั้งหมดทำให้สรุปได้ว่าการมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C7 ในสูตรโครงสร้างของสารลามลารินมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ซึ่งนับเป็นการรายงานครั้งแรกถึงความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งนี้

รูปที่ 2 ความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C7 ที่มีต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารลาเมลลาริน

a) H vs. OH, b) H vs. OMe, c) OH vs. OMe

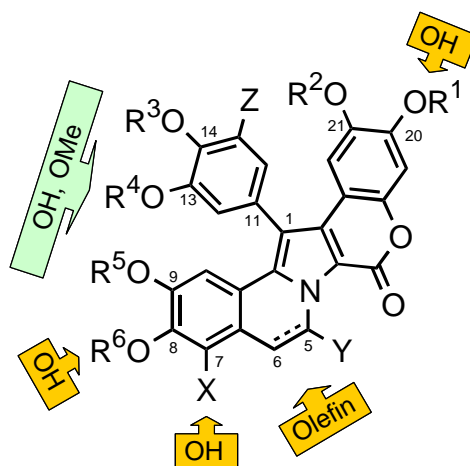


นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งอื่นๆ ด้วยวิธีเดียวกับที่ตำแหน่ง C7 ซึ่งทำให้สามารถสรุปได้ว่ามี 4 ตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มลาเมลลาริน กล่าวคือ พันธะคู่ระหว่าง C5–C6 รวมทั้งหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C7, C8 และ C20 ดังแสดงในรูปที่ 3 ส่วนความสำคัญของหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C9, C13 และ C14 นั้น ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน และจะต้องทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพิ่มเติมเพื่อทำการศึกษาต่อไป ทั้งนี้ ผลการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร ChemMedChem ฉบับเดือนมีนาคม 2552 อีกทั้งยังได้รับเกียรติจากกองบรรณาธิการคัดเลือกเป็นบทความเด่นบนปกใน (inside cover) ของวารสารฉบับดังกล่าวด้วย ดังรายละเอียดในภาคผนวก

ผลที่ได้จากโครงการวิจัยเชิงบูรณาการนี้ จะถูกนำไปใช้ในปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างของสารลาเมลลาริน (โดยความร่วมมือกับ ดร. พูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์ หัวหน้าโครงการ BRG5180013 “การสังเคราะห์และประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มลาเมลลารินและอนุพันธ์ที่มีการปรับเปลี่ยนทาง

โครงสร้าง”) โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งแบบเฉพาะเจาะจงมากขึ้นต่อไปในอนาคต

รูปที่ 3 หมู่ฟังก์ชันที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารลาเมลลาริน



การประเมินความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นยา

ถึงแม้ว่าสารในกลุ่มลาเมลลารินบางชนิดจะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติค่อนข้างต่ำ แต่สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติที่อาจก่อให้เกิดปัญหาในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง โดยเฉพาะปัญหาการละลายในตัวทำละลายมีขั้วหลายชนิด รวมทั้ง dimethyl sulfoxide (DMSO) และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเริ่มดำเนินการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารในกลุ่มลาเมลลาริน ควบคู่ไปกับการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างของสารในกลุ่มนี้ เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย และมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งในอนาคต

ในระยะแรกผู้วิจัยได้ร่วมมือกับ Dr. M. Paul Gleeson จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการประยุกต์ใช้เคมีเชิงคำนวณ (computational chemistry) เพื่อประเมินความเหมาะสมของสารในกลุ่มนี้ในการพัฒนาเป็นยา โดยทำการคำนวณคุณสมบัติระดับโมเลกุลที่มีรายงานว่ามีความสำคัญต่อคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาเมื่อเข้าสู่ร่างกาย (ตารางที่ 3) จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับคุณสมบัติของทั้งยาที่ให้โดยการรับประทาน ยาที่ได้จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมทั้งสารสังเคราะห์และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาเป็นยา ด้วยวิธี principal components analysis (PCA) ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีหลายตัวแปร (multivariate analysis) จากการศึกษาคพบว่า ถึงแม้สารในกลุ่มลาเมลลารินจะมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาเป็นยา แต่ก็มีน้ำหนักโมเลกุล (MWT) และความชอบไขมัน (OE-xlogP) ที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารในกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติของสารในกลุ่ม

ลามेलลารินยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยังสามารถปรับปรุงเพื่อพัฒนาเป็นยาได้ โดยอาจปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้าง (เช่น การเพิ่มหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวหรือสร้างพันธะไฮโดรเจนได้) ในตำแหน่งที่ไม่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของสารในกลุ่มลามेलลารินเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มอื่นๆ

Properties	Lamellarins	Oral Drugs	Natural Product Drugs	Drugs in Development	Natural Products in Development
MWT	521.68 ± 27.02	333.10 ± 121.09	568.20 ± 318.98	502.53 ± 485.41	711.87 ± 454.03
OE-xlogP	3.40 ± 0.91	2.48 ± 2.20	1.39 ± 3.51	2.40 ± 3.78	3.50 ± 3.07
PSA	124.67 ± 12.56	70.55 ± 45.22	176.07 ± 128.62	131.49 ± 209.37	178.88 ± 152.85
CHARGE	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.85	-0.30 ± 1.05	0.17 ± 1.26	0.34 ± 1.04
NEG	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.41	0.48 ± 0.51	0.28 ± 0.45	0.22 ± 0.42
POS	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.50	0.28 ± 0.46	0.46 ± 0.50	0.53 ± 0.51
HBA	1.06 ± 0.24	2.77 ± 2.23	8.17 ± 5.00	4.90 ± 7.49	7.22 ± 5.96
HBD	2.67 ± 1.14	1.90 ± 1.68	4.57 ± 5.19	3.87 ± 8.51	5.09 ± 6.15
CHIRAL	0.06 ± 0.24	1.61 ± 2.73	7.39 ± 5.30	2.85 ± 5.65	7.44 ± 6.55
ROT	4.88 ± 1.41	5.48 ± 3.82	9.96 ± 7.28	11.03 ± 20.35	10.88 ± 12.18
RINGS	2.00 ± 0.00	1.84 ± 0.94	2.11 ± 1.14	2.44 ± 1.32	2.47 ± 1.29
N	33	1791	46	2125	32

MWT = molecular weight; OE-xlogP = logP prediction by OpenEye Scientific Software; PSA = polar surface area; CHARGE = net charge; NEG = number of negative charges; POS = number of positive charges; HBA = number of H-bond acceptors; HBD = number of H-bond donors; CHIRAL = number of chiral centers; ROT = number of rotatable bonds; RINGS = number of rings; N = number of compounds

นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบคุณสมบัติความชอบไขมัน (lipophilicity) ของสารในกลุ่มลามेलลาริน เนื่องจากเป็นคุณสมบัติที่ไม่เพียงแต่ทำนายได้ยาก แล้วยังมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติอื่นๆ เช่น การละลาย ความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยกำหนดคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (ได้แก่ การดูดซึม การกระจาย การเปลี่ยนแปลง และการขับออก) ของยาเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้ความชอบไขมันเป็นตัวชี้วัดผลของการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างที่มีต่อคุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้ โดยผู้วิจัยได้ทำการวัดค่า n-octanol/water partition coefficient (logP) ของสารลามेलลารินที่สังเคราะห์ขึ้นจำนวน 25 ชนิด ด้วยวิธี reversed-phase HPLC ตามที่ระบุใน OECD Test Guideline 117 (<http://www.sourceoecd.org>) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล และใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากผลการศึกษาพบว่าค่า logP ของสารในกลุ่มนี้ที่ได้จากการวัดมีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากการคำนวณอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) โดยอาจเกิดจากการที่สารในกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่เป็นเอกลักษณ์และแตกต่างจากสารในฐานข้อมูลที่ใช้พัฒนาวิธีคำนวณ อีกทั้งยังมีความแตกต่างในรายละเอียดของวิธีคำนวณที่ใช้โดยแต่ละโปรแกรมด้วย ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบผลการคำนวณด้วยโปรแกรมทั้งหมดที่ผู้วิจัยเลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่า MI-xlogP ที่คำนวณโดย Molinspiration Property Engine มีความสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวัดมากที่สุด โดยพิจารณาจากค่า coefficient of determination (r^2) และ standard error (SE) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า logP ของสารในกลุ่มลามาเมลลารินที่วัดได้ เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณ

ID	Mean	Min	Max	SD	RMSE	r^2 (slope/intercept/SE)
Experimental logP	3.66	2.59	5.19	0.71	-	-
MI-xlogP	4.16	3.57	4.94	0.40	0.62	0.83 (1.61/-3.02/0.30)
OE-xlogP	3.75	2.87	4.99	0.65	0.44	0.62 (0.86/0.44/0.44)
FAF-xlogP	4.23	3.61	4.84	0.42	0.85	0.19 (0.73/0.57/0.65)
ACD LogP	4.99	4.08	6.32	0.59	1.57	0.02 (0.16/2.85/0.71)
ClogP	4.65	3.96	5.59	0.41	1.15	0.29 (0.93/-0.68/0.61)
CSlogP	3.91	3.65	4.32	0.20	0.66	0.27 (1.89/-3.74/0.61)
AlogP	5.11	4.71	5.62	0.27	1.64	0.00 (-0.13/4.30/0.72)

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับความชอบไขมัน (ในรูปของค่า logP) ของสารในกลุ่มลามาเมลลารินด้วยวิธี matched molecular pairs analysis เช่นเดียวกับในการศึกษา SAR แต่ในกรณีนี้เป็นการเปรียบเทียบค่า logP ของสารลามาเมลลารินเป็นคู่ๆ ในรูปของ logP increment (Δ logP) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างที่กำลังพิจารณา ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบค่า Δ logP ที่ได้จากการวัดกับค่าที่แต่ละโปรแกรมใช้ในการคำนวณด้วย (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างที่มีต่อค่า logP ของสารในกลุ่มลามาเมลลาริน

Transformation	No. of Pairs	Δ logP (log unit)							
		Experimental logP	MI-xLogP	OE-xlogP	FAF-xlogP	ACD LogP	ClogP	CSlogP	AlogP
C5-C6 \rightarrow C5=C6	12	+0.70 \pm 0.11	+0.58	+0.56	+0.78	-0.71	+0.41	+0.02	-0.44
5-H \rightarrow 5-OH	2	^a	-0.66	-0.55	-0.47	-1.30	-1.23	-0.25	-0.60
7-H \rightarrow 7-OH	4	-0.20 \pm 0.04	-0.09	-0.66	-0.41	-0.83	-0.77	-0.39	-0.24
7-H \rightarrow 7-OMe	4	+0.77 \pm 0.10	+0.19	+0.08	-0.22	-0.30	-0.38	-0.13	-0.01
7-OH \rightarrow 7-OMe	6	+0.98 \pm 0.14	+0.28	+0.74	+0.19	+0.53	+0.39	+0.26	+0.23
8-OH \rightarrow 8-OMe	4	+0.60 \pm 0.03	+0.31	+0.74	+0.05	+0.77	+0.41	+0.27	+0.23
9-OH \rightarrow 9-OMe	2	+0.75 \pm 0.04	+0.30	+0.74	+0.05	+0.77	+0.42	+0.27	+0.22
13-OH \rightarrow 13-OMe	8	+0.34 \pm 0.01	+0.31	+0.74	+0.05	+0.62	+0.47	+0.26	+0.23
14-OH \rightarrow 14-OMe	6	+0.29 \pm 0.04	+0.30	+0.74	+0.05	+0.70	+0.47	+0.26	+0.22
20-OH \rightarrow 20-OMe	1	^a	+0.31	+0.74	-0.11	+0.51	+0.15	+0.26	+0.22
8-OMe, 9-OH \rightarrow 8-OH, 9-OMe	2	+0.16 \pm 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13-OMe, 14-OH \rightarrow 13-OH, 14-OMe	6	-0.05 \pm 0.03	0.00	0.00	0.00	+0.08	0.00	0.00	0.00
14-OMe, 15-H \rightarrow 14-H, 15-OMe	1	^a	+0.39	-0.22	+0.27	-0.07	+0.35	0.00	0.00
20-OH, 21-OMe \rightarrow 20-OMe, 21-OH	1	-0.11 ^b	0.00	0.00	0.00	-0.09	0.00	0.00	0.00

^a ไม่สามารถวัดค่าได้ เนื่องจากสารอยู่ในระหว่างการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์

^b ไม่สามารถคำนวณค่า standard deviation (SD) ได้เนื่องจากมีสารลามาเมลลารินให้พิจารณาเพียง 1 คู่

จากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าค่า Δ logP ที่ได้จากการวัดสำหรับการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างที่ตำแหน่งต่างๆ ส่วนใหญ่จะมีความแตกต่างจากค่าที่แต่ละโปรแกรมใช้ในการคำนวณอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างชนิดเดียวกันที่คนละตำแหน่งในโมเลกุลก็ยังส่งผลต่อค่า logP

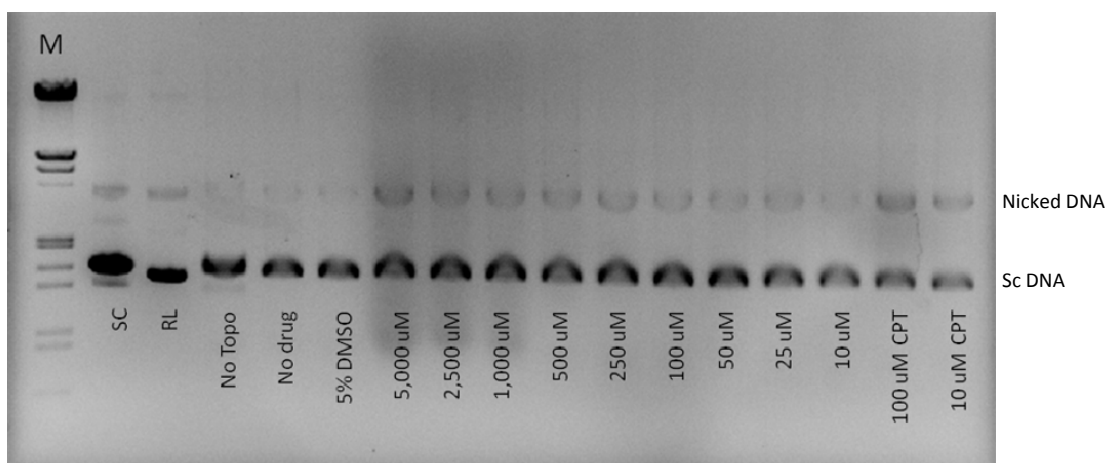
ของสารลาเมลลารินแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่า $\log P$ ของสารในกลุ่มนี้ที่ได้จากการวัด มีความแตกต่างจากค่าที่ได้จากการคำนวณอย่างมีนัยสำคัญดังที่กล่าวข้างต้น ค่า $\Delta \log P$ ที่ได้จากการศึกษานี้จะถูกนำไปใช้ทำนายผลของการปรับเปลี่ยนสูตรโครงสร้างที่มีต่อคุณสมบัติความชอบไขมันของสารในกลุ่มนี้ เพื่อให้สามารถออกแบบอนุพันธ์ของสารลาเมลลารินที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นยาได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ทั้งนี้ ผลการศึกษาในส่วนของการประเมินความเหมาะสมของสารในกลุ่มลาเมลลารินในการพัฒนาเป็นยา ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร European Journal of Medicinal Chemistry ฉบับเดือน มิถุนายน 2553 แล้ว ดังรายละเอียดในภาคผนวก

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase I

นอกเหนือจากการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารในกลุ่มลาเมลลารินแล้ว ผู้วิจัยยังได้ร่วมมือกับ ดร. รจนา สุขขวลิต จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase I ที่มีความสำคัญต่อเซลล์มะเร็ง และมีรายงานว่าเปปไทด์หนึ่งในการออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มนี้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารลาเมลลาริน 6 ชนิด (lamellarin D, lamellarin N, dehydrolamellarin J, lamellarin M, lamellarin X และ lamellarin ε) ที่ผู้วิจัยเลือกใช้ในการศึกษาเบื้องต้น มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase I ไม่ให้สามารถคลายเกลียวสาย supercoiled DNA ได้ และทำให้เกิด nicked DNA แทน (รูปที่ 4) ถึงแม้จะมีความแรงน้อยกว่าสาร camptothecin และ topotecan ที่ใช้เป็นสารควบคุมก็ตาม อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการทดสอบฤทธิ์นี้ให้แล้วเสร็จภายในระยะเวลาของโครงการนี้ได้ เนื่องจากปัญหาเรื่องการสั่งซื้อและราคาของเอนไซม์ human topoisomerase I

รูปที่ 4 ตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร dehydrolamellarin J ในการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase I



Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Chittchang M**, Batsomboon P, Ruchirawat S, Ploypradith P. Cytotoxicities and Structure-Activity Relationships of Natural and Unnatural Lamellarins toward Cancer Cell Lines. *ChemMedChem* **2009**; 4: 457-465. (ISI Impact Factor = 3.232 in 2009)

หมายเหตุ บทความนี้ได้รับเกียรติจากกองบรรณาธิการคัดเลือกให้เป็นบทความเด่นบนปกใน (inside cover) ของวารสาร *ChemMedChem* ฉบับเดือนมีนาคม 2552

2. **Chittchang M**, Gleeson MP, Ploypradith P, Ruchirawat S. Assessing the Drug-likeness of Lamellarins, a Marine-derived Natural Product Class with Diverse Oncological Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**; 45: 2165-2172. (ISI Impact Factor = 3.269 in 2009)

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ

1. **Chittchang M**, Ploypradith P, Ruchirawat S. Synthetic Development and Cytotoxic Evaluations of Natural and Unnatural Lamellarins. The 3rd International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-3), Hangzhou, People's Republic of China, October 19-23, 2008.

หมายเหตุ จากการนำเสนอผลงานในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้รับรางวัล ACP Lectureship Award ภายใต้โครงการ Asian CORE Program (ACP): Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia สำหรับเดินทางไปบรรยายที่สถาบันการศึกษาและสถาบันวิจัยชั้นนำในประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในระหว่างวันที่ 28 กุมภาพันธ์-7 มีนาคม 2552 ดังรายละเอียดในภาคผนวก

2. **Chittchang M**, Gleeson MP, Ploypradith P, Ruchirawat S. Structural Modification of Lamellarins to Optimize Their Cytotoxic Activity and Drug-like Properties. The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-4), Bangkok, Thailand, November 29-December 3, 2009.

หมายเหตุ จากการนำเสนอผลงานในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้รับรางวัล ACP Lectureship Award ภายใต้โครงการ Asian CORE Program (ACP): Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia สำหรับเดินทางไปบรรยายที่สถาบันการศึกษาและสถาบันวิจัยชั้นนำในประเทศจีน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในเดือนตุลาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับโครงการวิจัยนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ รุจิวัฒน์ นักวิจัยที่ปรึกษาโครงการ สำหรับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้เป็นอย่างยิ่ง อีกทั้งยังได้ให้ความสนับสนุนอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณนักวิจัยในห้องปฏิบัติการต่างๆ ของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ สถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ และหน่วยงานอื่นๆ ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยเชิงบูรณาการนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ดังรายนามต่อไปนี้

- ดร. พูนศักดิ์ พลอยประดิษฐ์ และกลุ่มนักอินทรีย์เคมีในห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ สำหรับการสังเคราะห์สารในกลุ่มลาเมลลาริน

- นางสาวผกามาส อินทโชติ นางสาวขจีลักษณ์ เจียบแหลม นางสาวสุชาดา เสี่ยงใส และนางสาวบุษกร สายมณี นักวิจัยในหน่วยทดสอบทางชีวภาพ (Bioassay Unit) สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ สำหรับความร่วมมือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มลาเมลลาริน

- ดร. รจนา สุขขวลิต จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และนายศักรินทร์ ภูพานิล นักศึกษาสถาบันบัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์ สำหรับความร่วมมือในการพัฒนาวิธีทดสอบฤทธิ์ของสารในกลุ่มลาเมลลารินในการยับยั้งเอนไซม์ human topoisomerase I

- ดร. M. Paul Gleeson จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับความร่วมมือในการประยุกต์ใช้เคมีเชิงคำนวณในการประเมินความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นยาของสารในกลุ่มลาเมลลาริน

- Professor Dr. Richard K. Haynes จาก The Hong Kong University of Science and Technology (HKUST) ประเทศฮ่องกง ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านเภสัชเคมีที่ได้รับรางวัล ACP Lectureship Award ภายใต้โครงการ Asian CORE Program: Cutting Edge Organic Chemistry in Asia สำหรับเดินทางมายังประเทศไทยและได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้เป็นอย่างยิ่ง

APPENDIX

ภาคผนวก

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

a) **Chittchang M**, Batsomboon P, Ruchirawat S, Ploypradith P. Cytotoxicities and Structure-Activity Relationships of Natural and Unnatural Lamellarins toward Cancer Cell Lines. *ChemMedChem* **2009**; 4: 457-465. (ISI Impact Factor = 3.232 in 2009)

หมายเหตุ บทความนี้ได้รับเกียรติจากกองบรรณาธิการคัดเลือกให้เป็นบทความเด่นบนปกใน (inside cover) ของวารสาร *ChemMedChem* ฉบับเดือนมีนาคม 2552

b) **Chittchang M**, Gleeson MP, Ploypradith P, Ruchirawat S. Cytotoxicities and Assessing the Drug-likeness of Lamellarins, a Marine-derived Natural Product Class with Diverse Oncological Activities. *Eur J Med Chem.* **2010**; 45: 2165-2172. (ISI Impact Factor = 3.269 in 2009)

2. การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ

a) **Chittchang M**, Ploypradith P, Ruchirawat S. Synthetic Development and Cytotoxic Evaluations of Natural and Unnatural Lamellarins. The 3rd International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-3), Hangzhou, People's Republic of China, October 19-23, 2008.

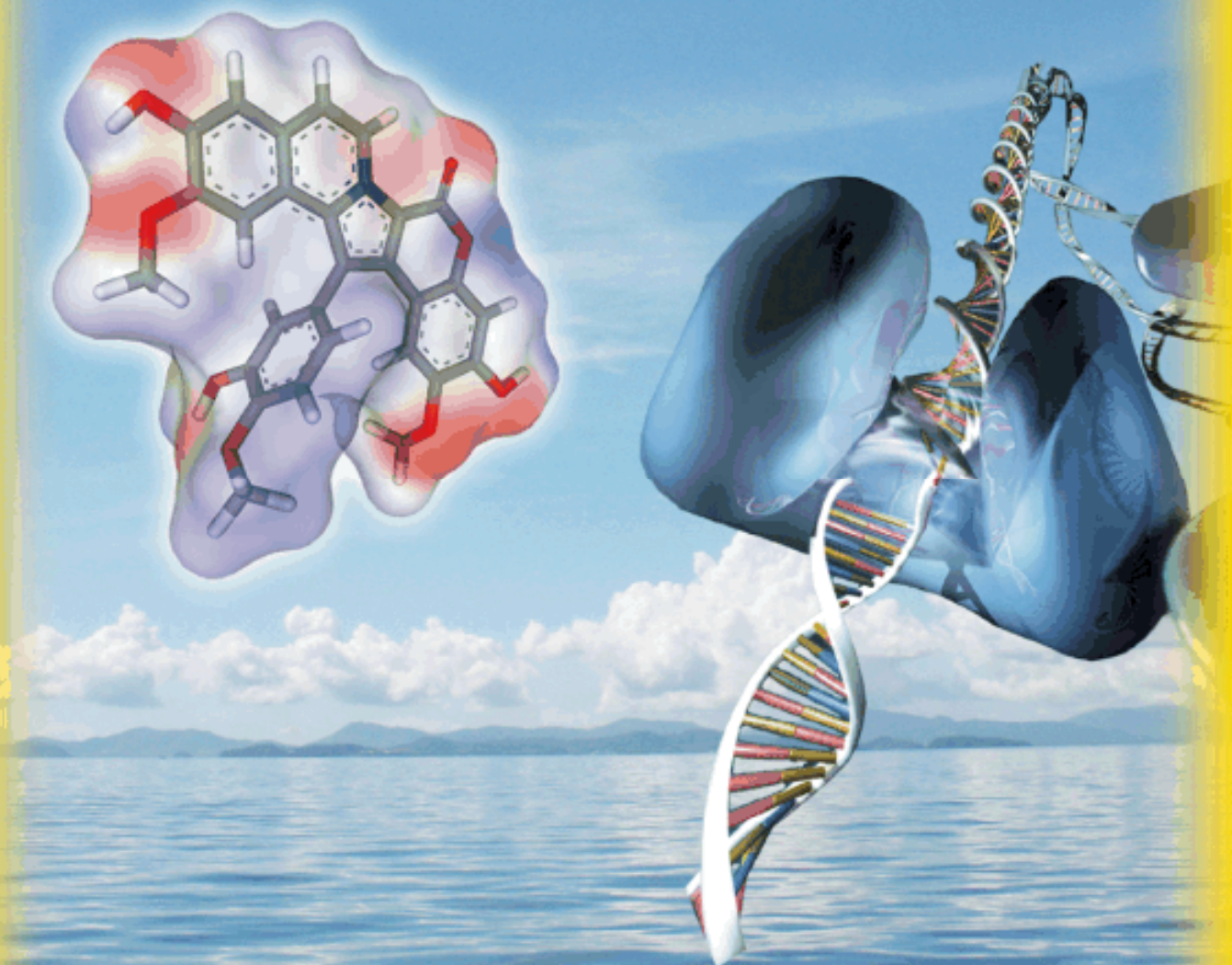
หมายเหตุ จากการนำเสนอผลงานในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้รับรางวัล ACP Lectureship Award ภายใต้โครงการ Asian CORE Program (ACP): Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia สำหรับเดินทางไปบรรยายที่สถาบันการศึกษาและสถาบันวิจัยชั้นนำในประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในปี 2552

b) **Chittchang M**, Gleeson MP, Ploypradith P, Ruchirawat S. Structural Modification of Lamellarins to Optimize Their Cytotoxic Activity and Drug-like Properties. The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-4), Bangkok, Thailand, November 29-December 3, 2009.

หมายเหตุ จากการนำเสนอผลงานในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้รับรางวัล ACP Lectureship Award ภายใต้โครงการ Asian CORE Program (ACP): Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia สำหรับเดินทางไปบรรยายที่สถาบันการศึกษาและสถาบันวิจัยชั้นนำในประเทศจีน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในปี 2553

CHEM**MED**CHEM

CHEMISTRY ENABLING DRUG DISCOVERY



3/2009



The inside cover picture shows the structure of lamellarin N as a representative of cytotoxic marine lamellarin alkaloids, together with a potential molecular target, the topoisomerase I-DNA complex. Systematic SAR studies revealed the importance of the substituents for potent cytotoxicity. For more details, see the Full Paper by P. Ploypradith et al. on p. 457 ff.

www.chemmedchem.org

 **WILEY-VCH**

Cytotoxicities and Structure–Activity Relationships of Natural and Unnatural Lamellarins toward Cancer Cell Lines

Montakarn Chittchang,^[a, b] Paratchata Batsomboon,^[b] Somsak Ruchirawat,^[a, b] and Poonsakdi Ploypradith^{*[a, b]}

Twenty-two naturally occurring and three unnatural lamellarins were synthesized and evaluated for their cytotoxicities against cancer cells. Across eleven cancer cell lines derived from six different cancer types, the IC_{50} values of these compounds ranged from sub-nanomolar (0.08 nM) to micromolar (> 97.0 μ M). About one-fourth (6/25) and one-half (11/25) of these lamellarins are more potent than the positive control, etoposide, against at least six different cell lines and three different cell types, respectively. In

general, lamellarins D, X, ϵ , M, N, and dehydrolamellarin J are significantly more potent than the other lamellarins. The IC_{50} values were used to perform structure–activity relationship (SAR) studies by comparing the cytotoxic activities of several pairs of lamellarin structures that differ in selected substitution patterns. Our results not only reveal the importance of specific hydroxylation or methoxylation patterns for the first time, but also confirm prior findings and clarify some previous uncertainties.

Introduction

Lamellarins are a group of marine natural products initially isolated from mollusks and subsequently found in ascidians and sponges. Their discovery in 1985 by Faulkner and co-workers^[1] prompted research groups worldwide to screen their biological activities, conduct total or partial syntheses, and, more recently, investigate molecular mechanism(s) of their anticancer action. Interestingly, some lamellarins have been found to exhibit a wide array of promising biological activities, which include cytotoxicity, multi-drug resistance (MDR) reversal in some cancer cell lines, HIV-1 integrase inhibition, and immunomodulation.^[2,3]

Since 1985, over 35 of these polyaromatic pyrrole alkaloids have been isolated (Figure 1 and Table 1).^[1,4] Despite the lack

of other crucial information such as toxicity toward normal cell lines, chemical stability, and related pharmacological properties, considerable effort has been expended on the synthesis, biological evaluation, and the study of other biochemical properties on lamellarin D. This compound exhibits potent anticancer activity at nanomolar concentrations.^[5,6] Interactions between regions of lamellarin D and specific amino acid residues of the topoisomerase I–DNA ternary complex have been identified from molecular modeling studies.^[6] Additionally, the proapoptotic activity of lamellarin D has been correlated with its ability to promote DNA cleavage through stabilization of topoisomerase I–DNA covalent complexes and inhibition of the enzyme.^[7] Unlike lamellarin D and its structural analogues, the biological profiles—particularly the anticancer activities—of other lamellarins have been studied, but to a lesser extent.

Even though a majority of lamellarins (except lamellarins O–R) contain the same pentacyclic 2-pyrrolo(dihydro)isoquinoline lactone core and only differ in the substituents present on each ring (Figure 1 and Table 1), many exhibit rather diverse cytotoxic activities.^[8] Owing to their low natural abundance, total synthesis of the lamellarins is a pivotal alternative for pro-

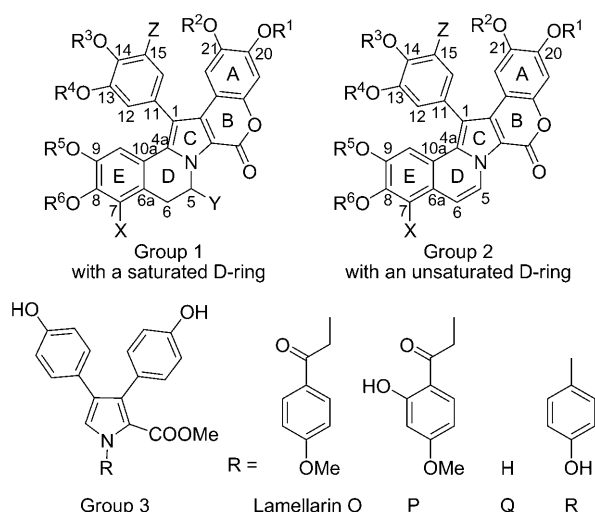


Figure 1. Structure of the lamellarins.

[a] Dr. M. Chittchang, Prof. Dr. S. Ruchirawat, Dr. P. Ploypradith
Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute
54 Moo 4, Vibhavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210 (Thailand)
Fax: (+66) 2-574-2027
E-mail: poonsakdi@cri.or.th

[b] Dr. M. Chittchang, P. Batsomboon, Prof. Dr. S. Ruchirawat, Dr. P. Ploypradith
Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute and
Center for Environmental Health, Toxicology and Management of
Chemicals
54 Moo 4, Vibhavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210 (Thailand)

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200800339>.

Table 1. Substituents around the lamellarin core.

Group 1	Group 2	Substituents								
		R ¹	R ²	Z	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	X	Y
Lamellarin A ^[a]	–	H	Me	H	H	Me	Me	Me	OMe	OH
Lamellarin C	Lamellarin B	H	Me	H	H	Me	Me	Me	OMe	H
Lamellarin χ	Lamellarin D	H	Me	H	H	Me	Me	H	H	H
Lamellarin E	Lamellarin X	H	Me	H	Me	H	Me	Me	OH	H
Lamellarin F	Lamellarin ϵ	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	OH	H
Lamellarin G	–	Me	H	H	Me	H	Me	H	H	H
–	Lamellarin H ^[a]	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Lamellarin I	Lamellarin ζ	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	OMe	H
Lamellarin J	Dehydrolam. J ^[b]	H	Me	H	Me	Me	Me	H	H	H
Lamellarin K	Lamellarin M	H	Me	H	H	Me	Me	Me	OH	H
Lamellarin L	Lamellarin N	H	Me	H	Me	H	Me	H	H	H
Lamellarin S ^[a]	–	H	H	H	H	H	Me	H	H	H
Lamellarin T	Lamellarin W	H	Me	H	Me	H	Me	Me	OMe	H
Lamellarin U	Lamellarin α	H	Me	H	Me	H	Me	Me	H	H
Lamellarin V ^[a]	–	H	Me	H	Me	H	Me	Me	OMe	OH
Lamellarin Y	Dehydrolam. Y ^[b]	H	Me	H	Me	H	H	Me	H	H
Lamellarin Z ^[a]	–	Me	H	H	H	H	Me	H	H	H
Lamellarin β ^[a]	–	H	H	H	Me	H	H	H	H	H
Lamellarin γ ^[a]	–	H	Me	OMe	–	Me	Me	Me	OH	H
–	Lamellarin ϕ ^[a]	H	Me	H	H	Me	H	Me	OMe	H
Dihydrolam. η ^[b,c]	Lamellarin η ^[c]	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	H	H

[a] Synthesis in progress. [b] Unnatural lamellarins. [c] Not tested due to insolubility in DMSO.

viding sufficient quantities for further detailed biological evaluation. Because of their diverse biological activities, it is necessary to establish a comprehensive structure–activity relationship (SAR) for these compounds. Thus, a number of convergent and flexible synthetic routes have been designed and developed for the lamellarin framework.^[5,9]

Our research program on the total synthesis and medicinal aspects of lamellarins has focused on the design and execution of efficient synthetic routes.^[9f,j,m,o,s] Accordingly, natural and unnatural lamellarins with either a saturated or an unsaturated D-ring have been synthesized.^[9s] Herein, we report the evaluation of the cytotoxicities of these lamellarins against 11 cancer cell lines and disclose our observations on SARs that highlight the importance of the C5=C6 double bond in the D-ring and the substitution pattern on the periphery of the lamellarin core in relation to their cytotoxicity toward cancer cells.

Results and Discussion

Chemistry

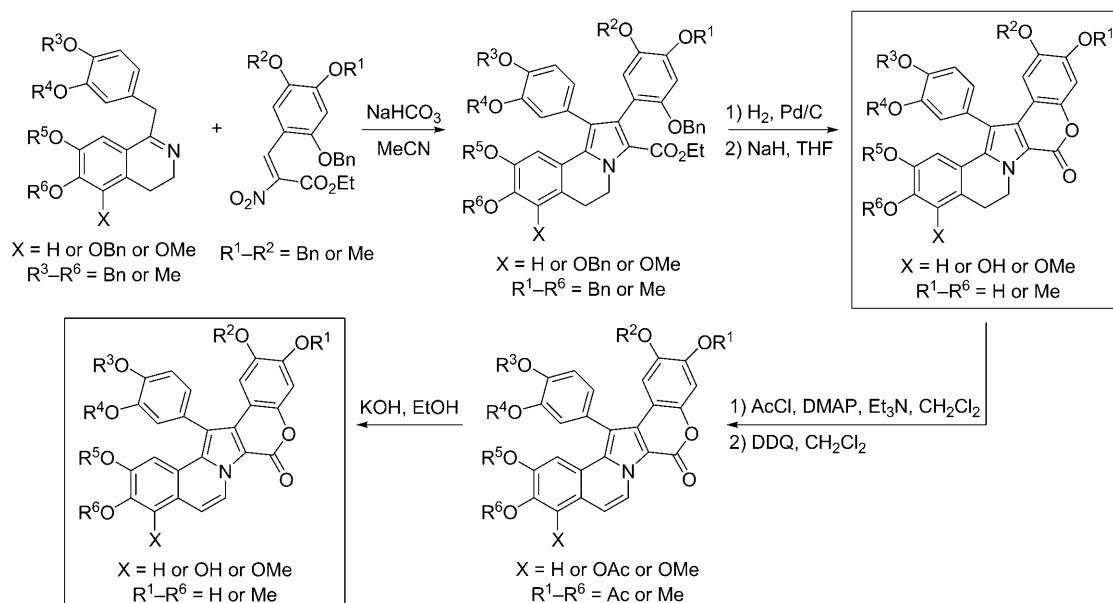
Lamellarins are classified into three structural groups, two of which possess either a “fused” saturated or unsaturated D-ring (groups 1 and 2, respectively; Figure 1). The third group, lamellarins O–R, on the other hand, contain an open structure lacking the B-, D-, and E-rings, and can be classified as 3,4-diaryl-2-carbomethoxypyrrole derivatives. Our modular synthetic strategies^[9s] have focused on the preparation of lamellarins with a saturated D-ring, which can then be converted directly into the corresponding lamellarins with an unsaturated D-ring via oxidation, as shown in Scheme 1. The key features of our synthetic strategies are: 1) the efficient Michael addition/ring clo-

sure (Mi-RC) condensation between the benzyldihydroisoquinoline and α -nitrocinnamate derivatives to form directly the 3,4-diaryl pyrrole core, 2) the sole use of benzyl and acetate as phenoxy protecting groups, 3) the stability of intermediates under the reaction conditions and to storage, and 4) minimal requirement of purification for each intermediate.

Cytotoxic activities

The cancer cell lines used in this study represent various types of cancer commonly found in a number of major tissues and organs. These include the hepatocellular carcinoma (HepG2 and S102) and cholangiocarcinoma (HuCCA-1) frequently found in Thailand. A multi-drug-resistant small-cell lung carcinoma (SCLC) cell line, H69AR, was also included in order to screen for potential candidates that may help circumvent the problem of multi-drug resistance. The use of human embryonic lung fibroblasts (MRC-5) serves to demonstrate the toxicity of selected lamellarins toward normal cells.

As shown in Table 2, a number of lamellarins exhibit potent anticancer activities, with IC₅₀ values in the nanomolar or low-micromolar range. While lamellarins D, K, and M are usually classified among the most cytotoxic molecules in the series,^[2] the results show that lamellarin N and dehydrolamellarin J are also promising candidates. These compounds are significantly more potent than the other lamellarins and the positive control, etoposide, in most cancer cell lines. Moreover, both of them exhibit relatively low toxicity toward MRC-5 cells, in contrast to the other compounds tested, especially lamellarins D, M, X, and ϵ , that have similar cytotoxic activities toward cancer cells.



Scheme 1. Synthetic route used for the preparation of natural and unnatural lamellarins with either a saturated or an unsaturated D-ring.

Table 2. Cytotoxic activities of lamellarins.^[a]

Compound	IC ₅₀ [μM]											
	Oral	Lung		Breast		Liver			Cervix	Blood cell		Fibroblast
	KB	A549	H69AR	T47D	MDA-MB-231	HuCCA-1	HepG2	S102	HeLa	P388	HL-60	MRC-5
Lamellarin C	5.7	3.6	12.1	7.7	8.3	11.5	18.3	4.4	7.9	4.2	5.7	ND
Lamellarin B	4.4	5.4	6.4	0.2	4.4	5.3	0.8	5.9	4.8	6.1	6.2	68.1
Lamellarin χ	2.6	2.0	38.9	3.8	4.8	49.9	0.1	3.4	6.6	1.6	1.8	ND
Lamellarin D	0.04	0.06	0.4	0.00008	0.4	0.08	0.02	3.2	0.06	0.1	0.04	9.2
Lamellarin E	4.0	2.2	7.2	5.3	3.4	9.4	1.0	2.8	5.3	2.6	4.5	ND
Lamellarin X	0.08	0.3	0.3	0.006	0.08	0.04	0.2	1.6	0.09	0.3	0.2	10.1
Lamellarin F	4.2	4.4	10.1	4.6	3.7	8.8	0.5	2.7	6.4	3.1	3.6	ND
Lamellarin ε	0.3	0.3	2.3	0.006	0.3	0.07	0.1	2.1	0.3	0.3	0.1	25.8
Lamellarin G	3.0	4.0	7.4	8.6	15.0	49.9	1.5	9.6	4.2	1.6	7.5	ND
Lamellarin I	6.3	10.6	18.1	9.5	8.6	11.2	1.3	12.4	11.2	3.8	6.9	ND
Lamellarin ζ	4.7	10.6	23.3	0.09	4.7	6.3	0.3	7.9	8.3	7.2	12.3	> 89.7
Lamellarin J	> 97.0	1.1	> 97.0	13.0	7.4	> 97.0	0.4	19.4	> 97.0	0.8	0.9	ND
Dehydrolam. J	0.08	0.04	0.3	0.0001	0.4	0.006	0.01	2.1	0.08	0.08	0.04	> 97.4
Lamellarin K	0.9	4.2	4.3	0.09	0.4	3.4	1.0	4.4	2.8	3.4	3.8	ND
Lamellarin M	0.2	0.04	0.3	0.009	0.1	0.06	0.02	1.9	0.3	0.1	0.06	13.4
Lamellarin L	3.0	0.8	3.0	4.4	1.8	21.9	0.3	1.4	2.8	0.5	1.9	ND
Lamellarin N	0.06	0.04	0.06	0.0006	0.6	0.008	0.02	2.3	0.04	0.08	0.04	> 100.1
Lamellarin T	6.4	2.9	13.2	13.2	8.6	14.7	0.6	5.5	9.9	4.8	6.4	ND
Lamellarin W	5.3	5.2	4.4	4.2	5.2	4.2	0.9	5.8	5.0	5.6	6.7	28.5
Lamellarin U	3.9	0.9	8.7	10.3	4.5	44.6	0.6	3.0	5.0	1.8	4.5	ND
Lamellarin α	9.4	1.6	8.0	0.6	3.9	5.8	0.06	5.6	7.6	1.7	10.5	> 97.4
Lamellarin Y	5.0	0.9	14.8	7.2	8.0	37.9	0.6	4.3	29.9	1.0	5.0	ND
Dehydrolam. Y	0.8	1.3	7.6	0.08	0.6	1.4	0.4	6.2	1.6	0.9	3.4	31.0
Dihydrolam. η	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Lamellarin η	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Etoposide	0.5	1.1	45.9	0.08	0.2	6.8	0.2	1.5	0.4	0.4	2.3	> 85.0

[a] ND = not determined, as these group 1 lamellarins are generally less cytotoxic than their group 2 counterparts, and are therefore less likely to be toxic to normal cells. NA = not available due to insolubility of the compounds in DMSO. Cell lines used (in alphabetical order): A549, human non-small-cell lung carcinoma; H69AR, human multi-drug-resistant small-cell lung carcinoma; HeLa, human cervical adenocarcinoma; HepG2, human hepatocellular carcinoma; HL-60, human promyelocytic leukemia; HuCCA-1, human cholangiocarcinoma; KB, human oral epidermoid carcinoma; MDA-MB-231, human hormone-independent breast cancer 231; MRC-5, human fetal/embryonic lung fibroblast; P388, mouse lymphoid neoplasm; S102, human hepatocellular carcinoma; T47D, human hormone-dependent breast cancer.

Interestingly, lamellarin N and dehydrolamellarin J also demonstrate appreciable cytotoxic activity against the multi-drug-resistant H69AR cell line, relative to etoposide. It has been shown that some lamellarins effectively reverse multi-drug resistance by inhibiting P-glycoprotein.^[8] However, this might not be the case for H69AR cells, which, unlike most multi-drug-resistant cell lines, do not overexpress P-glycoprotein.^[10] In fact, the alternative resistance mechanisms in this cell line have been shown to involve decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II,^[11,12] as well as overexpression of multi-drug-resistance-associated protein (MRP).^[13,14]

Additionally, some lamellarins show selective cytotoxicities toward certain cancer cell lines, whereas some are broadly toxic against all cell lines under evaluation. The most prominent selectivity is observed with the human breast cancer T47D and MDA-MB-231 cells, which differ mainly in the presence and absence of estrogen receptors (ER), respectively. One plausible explanation is that these lamellarins may also act as anti-estrogens in inhibiting the proliferation of ER-positive T47D cells, whereas this mechanism may not be possible for ER-negative MDA-MB-231 cells. Nevertheless, the actual reasons for the selectivity remain to be investigated.

SAR studies

In an early attempt to correlate the structures of lamellarins with their cytotoxic activities, Quesada et al.^[8] observed that an increase in the number of methylations and/or methoxylations appears to cause a decrease in the antitumor activities of the 13 lamellarins tested in their studies. Most subsequent SAR studies have been directed at derivatives of lamellarin D by using their mechanism-based (i.e., topoisomerase I inhibition) activities in relation to their cytotoxicities against cancer cell lines. It has been demonstrated that the full pentacyclic structure of lamellarins is important for their biological activity. Simplification of the lamellarin D structure by opening the lactone ring results in a significant decrease in cytotoxicity toward certain human tumor cell lines.^[9a] Another general observation made from these limited studies focusing on the lamellarin D series is that the planarity of the pharmacophore conferred by the C5=C6 double bond is also essential for cytotoxicity and topoisomerase I inhibition.^[6,15] Unfortunately, as reported by Quesada et al.,^[8] such a relationship does not hold for lamellarins K and M. These compounds contain the same substituents, but differ in the nature of the C5–C6 bond (see Table 1). However, they possess roughly the same cytotoxicity, and furthermore, lamellarin K triacetate is even more cytotoxic than lamellarin M triacetate.

Additionally, Ishibashi et al.^[5] have demonstrated that the hydroxy groups at the C8 and C20 positions of lamellarin D are important structural requirements for cytotoxic activity, whereas neither the hydroxy group at C14 nor the two methoxy groups at C13 and C21 are necessary. However, it was subsequently reported by Tardy et al.^[15] that all of the phenolic hydroxy groups at each of the C8, C14, and C20 positions of lamellarin D are important for maintaining the activity against

topoisomerase I and potent cytotoxic action. It was also found that these groups could be substituted with positively charged amino acid derivatives without loss of activity. Furthermore, it was pointed out in a review article that almost any modifications of the substitution pattern on lamellarin D decrease the cytotoxicity of the molecule.^[2]

The discrepancies of the previous findings observed with lamellarin D derivatives have prompted us to execute a more comprehensive SAR investigation of the lamellarins in groups 1 and 2, beyond the lamellarin D series, to clarify the importance of each substituent on the lamellarin skeleton. The number and diversity of the substitution patterns of the lamellarins investigated in this study allow us to compare the cytotoxic activities of several pairs of lamellarins, which differ only in substitution at the positions of interest.

The first structural element considered was the C5=C6 double bond in the D-ring. The importance of this functionality for the cytotoxic activities of these compounds was studied by comparing the IC₅₀ values of 11 pairs of lamellarins, each of which contains exactly the same substituents and differs only in the nature of the C5–C6 bond. As shown in Figure 2, the results unequivocally indicate that, in most cases, the presence of the C5=C6 double bond significantly decreases the IC₅₀

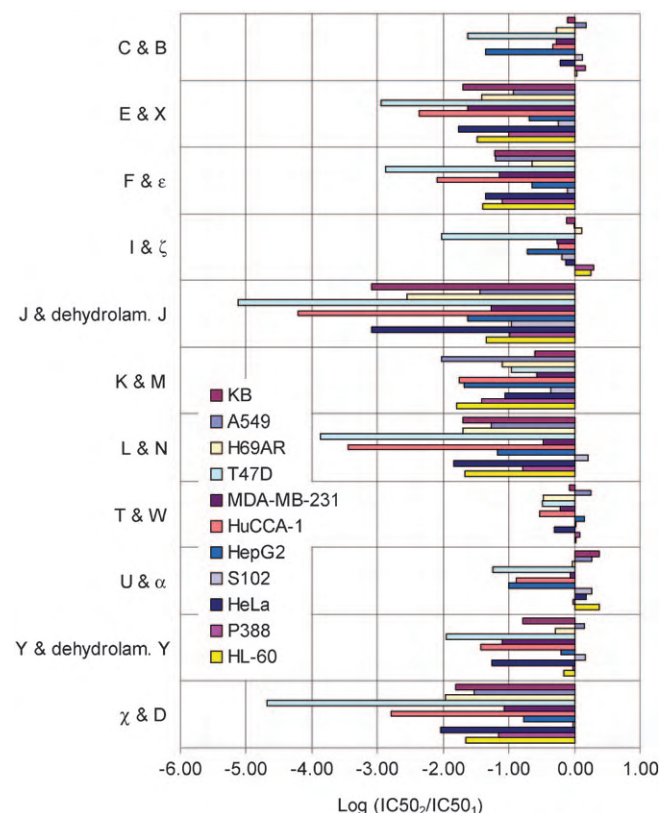


Figure 2. Contributions of the C5=C6 double bond in the D-ring to the cytotoxic activities of various lamellarins toward cell lines (indicated by color). The IC₅₀ values of two structures differing in one given position were compared, and the logarithm of the IC₅₀ ratio was subsequently determined with the IC₅₀ values of the compounds after and before the modification in the numerator and denominator, respectively. Positive log (IC₅₀ ratio) values indicate a loss of cytotoxic activity, whereas negative values show an increase in the activity upon the structural modification being considered.

values, that is, increases the cytotoxic activities of the lamellarins.

It has been pointed out previously that, in the case of lamellarin D, the planarity of the pentacyclic lamellarin core is essential for intercalation into DNA and topoisomerase I inhibition.^[6] On the other hand, replacement of the C5=C6 double bond in lamellarin D by a single bond in lamellarin 501, subsequently isolated from natural sources and named lamellarin χ , introduces a large kink into the core structure and abolishes the capacity of the molecule to insert between two consecutive base pairs in the DNA.

Among all the lamellarins investigated, the substituent at C7 may be a hydrogen atom, a hydroxy group, or a methoxy group. To our knowledge, the contribution of the substituent at this particular position to the cytotoxic activities of lamellarins has not been reported previously. As shown in Figure 3a, substitution of the hydrogen atom at C7 with a hydroxy group significantly increases the cytotoxicities of lamellarins with a C5=C6 double bond (compare lamellarin α and lamellarin X). On the other hand, methoxylation at this position may only slightly affect the cytotoxic activities of these compounds (Figure 3b). However, it is difficult to evaluate any trend conclusively in this case, as only two pairs of lamellarins were available for comparison.

Interestingly, the effect is significantly more pronounced if the C7 hydroxy group is replaced by a methoxy group. This clearly decreases the cytotoxic activities of the lamellarins, especially those containing a C5=C6 double bond (Figure 3c). These results indicate that the hydroxy group at this position is an important structural element that may also feature in an interaction with the putative biological target(s).

In the case of the substituent at C8 in the two pairs of the lamellarins examined in this study, the results clearly show that methylation of the hydroxy group at this position decreases cytotoxic activity (Figure 4). The effect is much more prominent if the C5=C6 single bond in lamellarin L and lamellarin U is replaced by a double bond in lamellarin N and lamellarin α , respectively. However, due to the rather limited number of lamellarins for direct comparison at this position, additional lamellarins that differ from the others exclusively at C8 are targets of our future investigations.

On the other hand, methylation of the hydroxy group at C9, C13, or C14 induces rather more subtle changes in cytotoxic activity (Supporting Information figures S1 and S2). Whereas the significance of the C9 hydroxy group has not been reported before, the relative lack of influence that substituents at C13 and C14 have toward cytotoxic activity agrees well with observations of the lamellarin D derivatives reported by Ishibashi et al.^[5] More importantly, switching the hydroxy and methoxy groups between these two positions does not significantly affect cytotoxicity in most cases (Supporting Information figure S3). Nevertheless, additional lamellarin derivatives with

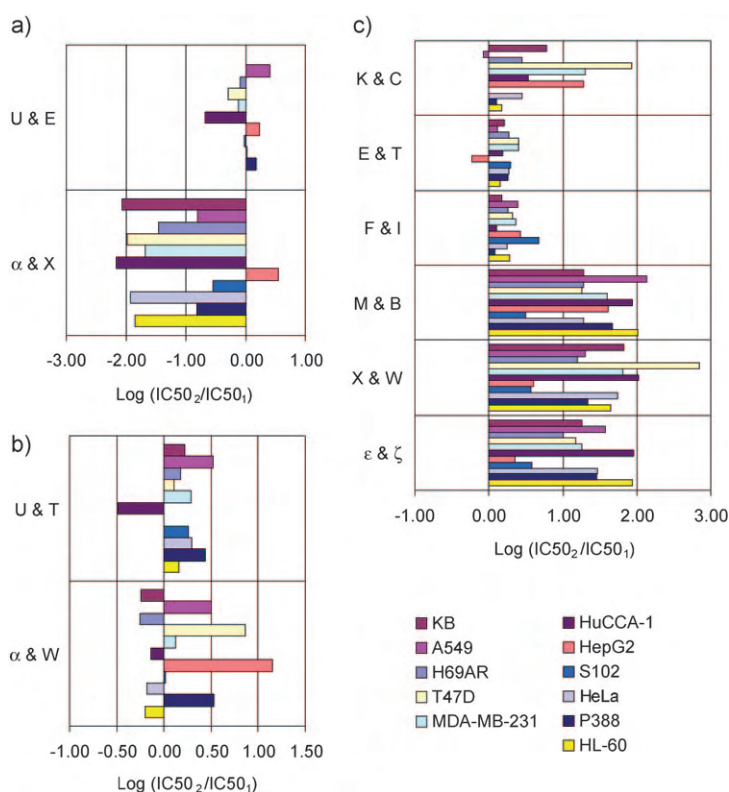


Figure 3. Contributions of the hydroxylation/methoxylation pattern at the C7 position of lamellarins to their cytotoxic activities: a) H vs. OH, b) H vs. OMe, c) OH vs. OMe. Increases or decreases in cytotoxicity were determined as described in Figure 2.

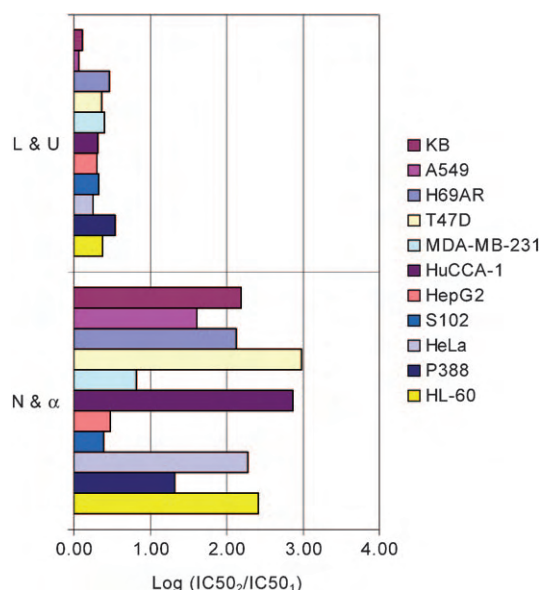


Figure 4. Contributions of the hydroxylation/methoxylation pattern (OH vs. OMe) at the C8 position of lamellarins to their cytotoxic activities. Changes in cytotoxicity were determined as described in Figure 2.

modified C13 and C14 substituents are currently being synthesized by our research group for further investigations.

Even though most naturally occurring lamellarins contain a hydroxy group at C20 and a methoxy group at C21, there is

one pair of lamellarins, lamellarin L and lamellarin G, in which these two substituents are reversed. As shown in Table 2, interchange of the C20 hydroxy and C21 methoxy groups of lamellarin L to provide lamellarin G results in a substantial decrease in cytotoxic activity against most of the cell lines tested in this study (Supporting Information figure S4). These results agree well with all previous findings, including the observation that the C20-sulfated form of lamellarins usually show little or no cytotoxicity, in contrast to the non-sulfated analogues with a free C20 hydroxy group. Instead, the presence of a sulfate group at this position appears to be a key structural element for HIV-1 integrase inhibition by lamellarins.^[9g]

According to all the results from our SAR studies, there appear to be four important structural elements that determine the cytotoxic activities of lamellarins toward cancer cells. These include the C5=C6 double bond as well as the C7, C8, and C20 hydroxy groups (Figure 5). Based on their cytotoxic activities, the lamellarins with an unsaturated D-ring may be subdivided into two categories (Table 3): those with lower cytotoxicities all contain only the C5=C6 double bond and a C20 hydroxy group, whereas the more potent compounds also contain a hydroxy group at either C7 or C8. Such a group may provide additional interactions with the target biological macromolecules. Notably, the other substituents that play a less

important role are located toward the inner part of the lamellarin molecule.

Molecular modeling studies

The results from our preliminary molecular modeling studies using HyperChem 7.5 show that the C5=C6 double bond ensures planarity of the molecule and also affects the spatial array of the substituents around the periphery of the lamellarin skeleton, especially those on the E-ring (C7, C8, and C9). The group 1 lamellarins bearing a C5=C6 single bond are twisted, as most clearly observed if the molecules are viewed side-on from the E-ring (Figure 6a and 6c compared with Figure 6b and 6d, respectively), resulting in the spatial displacement of the substituents, most notably on the E-ring. As summarized in Table 4, the E-ring of group 1 lamellarins assumes a dihedral angle θ about C6a–C10a–C4a–C1 of much less than 180° (164.7–166.7°), significantly different from the planarity otherwise present in the group 2 lamellarins (θ = 179.0–180.0°).

The orientation of the E-ring may be the factor that accounts for the more pronounced and more easily distinguished effects generally observed in the group 2 lamellarins as substituents are varied. These compounds with the unsaturated D-ring possess a more rigid framework and better alignments of the substituents around the pyrrole core than those in the group 1 lamellarins. Therefore, the C5=C6 double bond may exert its effect not only by making the molecule planar and thus suitable for intercalating the topoisomerase I–DNA complex, but also by spatially aligning the substituents, especially those on the E-ring, to their respective amino acid residues of the enzyme. It has been reported that the hydroxy groups at C8 and C20 are within hydrogen-bonding distance from Asn 722 and Glu 356 of the enzyme, respectively, whereas the ester carbonyl group interacts with the Arg 364 residue.^[6]

Conclusions

We have disclosed herein a comprehensive evaluation of the cytotoxic activities of the lamellarins against a number of

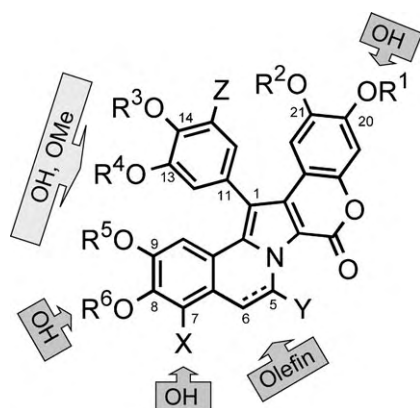


Figure 5. Important structural elements in the lamellarin skeleton.

Table 3. Classification of the lamellarins with an unsaturated D-ring, according to their cytotoxicities to cancer cells.^[a]

Group	Lamellarin	IC ₅₀ [μ M] to MRC-5	Substituents								
			OR ¹ (C20)	OR ⁶ (C8)	X (C7)	OR ² (C21)	Z (C15)	OR ³ (C14)	OR ⁴ (C13)	OR ⁵ (C9)	Y (C5)
Less cytotoxic	Lamellarin B	68.1	OH	OMe	OMe	OMe	H	OH	OMe	OMe	H
	Lamellarin W	28.5	OH	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OH	OMe	H
	Lamellarin ζ	> 89.7	OH	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe	OMe	H
	Lamellarin α	> 97.4	OH	OMe	H	OMe	H	OMe	OH	OMe	H
	Dehydrolam. Y ^[b]	31.0	OH	OMe	H	OMe	H	OMe	OH	OH	H
Highly cytotoxic	Lamellarin D	9.2	OH	OH	H	OMe	H	OH	OMe	OMe	H
	Lamellarin N	> 100.1	OH	OH	H	OMe	H	OMe	OH	OMe	H
	Dehydrolam. J ^[b]	> 97.4	OH	OH	H	OMe	H	OMe	OMe	OMe	H
	Lamellarin M	13.4	OH	OMe	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	H
	Lamellarin X	10.1	OH	OMe	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	H
	Lamellarin ϵ	25.8	OH	OMe	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	H

[a] See Table 2. [b] Unnatural lamellarins.

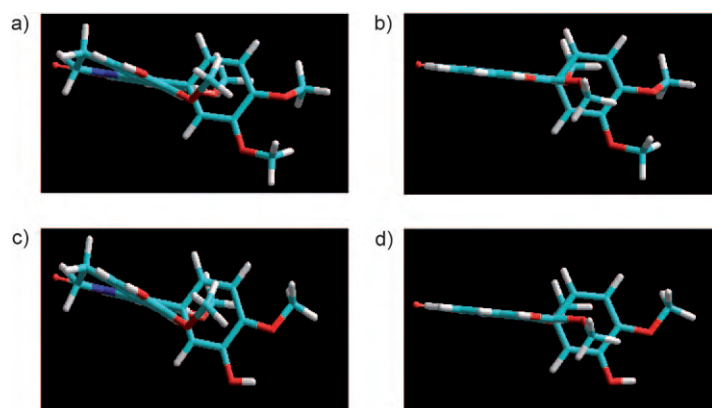


Figure 6. Energy-minimized structures of selected lamellarins calculated by using the AM1 method in HyperChem 7.5: a) lamellarin J (with a dihedral angle θ about C6a–C10a–C4a–C1 of 164.7°), b) dehydrolamellarin J ($\theta = 179.9^\circ$), c) lamellarin L ($\theta = 164.8^\circ$), d) lamellarin N ($\theta = 179.8^\circ$).

Table 4. Dihedral angles in various lamellarins (AM1 method).

Lamellarin	Dihedral angle θ [°]	
	6a–10a–4a–1	4a–1–11–12
Lamellarin C	166.6	88.3
Lamellarin B	180.0	91.8
Lamellarin χ	165.1	89.4
Lamellarin D	180.0	91.6
Lamellarin E	164.9	89.5
Lamellarin X	179.0	90.4
Lamellarin F	164.9	89.3
Lamellarin ϵ	179.8	91.8
Lamellarin I	166.7	88.6
Lamellarin ζ	179.9	97.4
Lamellarin J	164.7	90.2
Dehydrolam. J	179.9	92.2
Lamellarin K	165.2	88.8
Lamellarin M	179.8	92.3
Lamellarin L	164.8	89.7
Lamellarin N	179.8	90.6
Lamellarin T	166.4	87.8
Lamellarin W	179.9	91.8
Lamellarin U	164.8	89.8
Lamellarin α	179.9	91.0
Lamellarin Y	165.5	86.9
Dehydrolam. Y	179.9	89.1
Dihydrolam. η	165.2	90.0
Lamellarin η	179.9	93.4

cancer cell lines. This study reveals that some of these compounds may be potential candidates for anticancer drug development. In addition, the results of the SAR studies have helped delineate the important structural elements in the lamellarin skeleton that contribute to cytotoxicity. These data will be employed for the structure optimization of these compounds in order to improve their efficacy, safety, as well as their physicochemical and pharmacokinetic properties.

The contributions from the C5=C6 double bond as well as the C8 and C20 hydroxy groups toward the overall anticancer activity are in good agreement with previously reported data. Importantly, this study reveals for the first time a significant contribution from the C7 substituent. Previous SAR studies

have focused on lamellarin D and its derivatives that only possess a hydrogen atom at C7. It is noted that because the point-to-point comparisons of substituents at C13 and C14 give unclear results, possibly due to their flexibility, the importance of these positions toward anticancer activity remains to be evaluated.

Information from our current and planned SAR studies is critical for streamlining structural requirements for good anticancer activity. Further structural modifications that increase aqueous solubility or lower toxicity toward normal cells can then be made at those positions known not to have a marked effect on the anticancer activity.

Experimental Section

Syntheses of lamellarins

Two series of natural and unnatural lamellarins, containing either a saturated or an unsaturated D-ring, were previously synthesized and fully characterized using our established methodologies.^[9a] All compounds were purified by crystallization from appropriate solvent systems, and the purified lamellarins were stored at 4 °C without solvent until use.

Spectroscopic data (¹H NMR, ¹³C NMR, and HRMS-TOF) were used to confirm the identity of the compounds by comparing them with previously reported data. For unnatural lamellarins, their spectroscopic data were correlated with those of the natural lamellarins for structure elucidation. The purity of compounds was estimated based on their melting point ranges, the cleanliness of both ¹H NMR and ¹³C NMR spectra, as well as their HPLC traces. Only trace amounts of impurities, if any, could be detected by HPLC analyses (Supporting Information table S1).

Cell culture

Four commercially available cancer cell lines (A549, H69AR, HepG2, and T47D) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Additionally, KB and P388 cell lines were obtained from the University of Illinois at Chicago (Chicago, IL, USA), whereas HeLa, HL-60, and MDA-MB-231 cell lines were obtained from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center (Houston, TX, USA). Human cholangiocarcinoma (HuCCA-1) and human hepatocellular carcinoma (S102) cells were obtained from Thai patients as previously reported.^[16,17] The human lung fibroblast (MRC-5) cells were generously provided by the Armed Force Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS, Bangkok, Thailand).

All cell lines were maintained using standard procedures in the appropriate culture media supplemented with the nutrients essential for each cell line (Supporting Information table S2). All culture media and fetal bovine serum (FBS) were obtained from HyClone Laboratories (Logan, UT, USA), whereas L-glutamine, dimethyl sulfoxide (DMSO), glucose, sodium pyruvate, non-essential amino acids, bovine insulin, crystal violet, 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide (XTT) sodium, phenazine methosulfate (PMS), and etoposide were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All materials were used as received.

Cytotoxicity assays

All lamellarins were solubilized in DMSO and tested for their cytotoxic activities against a panel of 11 cancerous and one normal (MRC-5) cell lines. Briefly, the cells suspended in the corresponding culture medium (100 μL for adherent cells and 75 μL for suspended cells, i.e., P388 and HL-60 cells) were inoculated in 96-well microtiter plates (Corning Inc., NY, USA) at a density of 10 000–20 000 cells per well, and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 95% air and 5% CO_2 . After 24 h, an equal volume of additional medium containing either the serial dilutions of the test compounds, positive control (etoposide), or negative control (DMSO) was added to the desired final concentrations, and the microtiter plates were further incubated for an additional 48 h.

The number of surviving cells in each well was determined using either crystal violet staining (for adherent cells) or XTT assay (for suspended cells), as described below, in order to determine the IC_{50} , which is defined as the concentration that inhibits cell growth by 50% (relative to negative control) after 48 h of continuous exposure to each test compound. Within each experiment, determinations were done in triplicate, and each compound was tested in at least two separate experiments. Any experiments with a variation greater than 10% were excluded from the analysis. The results are expressed as the mean IC_{50} value; standard deviations are omitted for visual clarity.

For the crystal violet staining, supernatants were discarded, and the cells were washed twice with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS; 100 μL well⁻¹), fixed with 95% ethanol (100 μL well⁻¹) for at least 5 min, and then stained with a solution of crystal violet (0.5%) in 25% methanol (50 μL well⁻¹) for 10 min. Afterward, the cells were air dried and subsequently lysed with a solution of HCl (0.1 N) in absolute methanol (100 μL well⁻¹). The absorbance at 540 nm was measured using a Multiskan Ascent microtiter plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). The percentage of surviving cells was then calculated for each concentration of the test compounds by comparing the absorbance of each sample well to the average absorbance of the negative control wells.

For the XTT assay, 75 μL of the mixture prepared from 1 mg mL⁻¹ XTT sodium (5 mL) and 0.383 mg mL⁻¹ PMS (100 μL) was added to each well, and the microtiter plates were further incubated for 4 h. The absorbance of the orange formazan compounds formed was measured at both 492 and 690 nm (reference absorbance) using a SPECTRA max PLUS 384 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The absolute absorbance ($\Delta A = A_{492} - A_{690}$) was then calculated for each well, and the percentage of surviving cells compared with control was determined by comparing ΔA_{sample} with $\Delta A_{\text{control}}$.

SAR studies

The mean IC_{50} values obtained from the cytotoxicity assays were used to perform SAR studies in a systematic manner. To determine the importance of a particular structural component for the cytotoxic activity of lamellarins, the IC_{50} values of the two structures differing only in that particular position were compared, and the logarithm of the IC_{50} ratio was subsequently determined with the IC_{50} values of the compounds after and before the modification in the numerator and denominator, respectively. Positive log (IC_{50} ratio) values indicate a loss of cytotoxic activity, whereas negative values show an increase in the activity upon the structural modification being considered. To account for experimental variation, the contribution from the position of interest to the cytotoxic

activity was deemed significant only when $|\log(\text{IC}_{50} \text{ ratio})| > 1$, meaning that the IC_{50} value either increased or decreased by at least 10-fold upon modification at that particular position.

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF; DBG5180015 to M.C., BRG5180013 to P.P.) is gratefully acknowledged. The authors are thankful to Dr. Sumalee Tangpradabkul (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand) and Dr. Stitaya Sirisinha's research group (Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand) for providing the S102 and HuCCA-1 cells, respectively. Special thanks go to Ms. Pakamas Intachote (Laboratory of Immunology, Chulabhorn Research Institute), Ms. Khajeelak Chiablaem (Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute), and Ms. Busakorn Saimanee (Integrated Research Unit, Chulabhorn Research Institute) for conducting the cytotoxicity assays. The authors are also grateful to Dr. Prasat Kittakooop and Mr. Surasak Prachya (Laboratory of Natural Products, Chulabhorn Research Institute) for their kind assistance with HPLC analyses.

Keywords: antitumor agents • lamellarins • marine alkaloids • nitrogen heterocycles • structure–activity relationships

- [1] R. J. Andersen, D. J. Faulkner, C.-H. He, G. D. Van Duyne, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5492–5495.
- [2] C. Bailly, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, 4, 363–378.
- [3] H. Fan, J. Peng, M. T. Hamann, J.-F. Hu, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 264–287.
- [4] a) N. Lindquist, W. Fenical, G. D. Van Duyne, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4570–4574; b) A. R. Carroll, B. F. Bowden, J. C. Coll, *Aust. J. Chem.* **1993**, 46, 489–501; c) S. Urban, M. S. Butler, R. J. Capon, *Aust. J. Chem.* **1994**, 47, 1919–1924; d) S. Urban, L. Hobbs, J. N. A. Hooper, R. J. Capon, *Aust. J. Chem.* **1995**, 48, 1491–1494; e) S. Urban, R. J. Capon, *Aust. J. Chem.* **1996**, 49, 711–713; f) M. V. R. Reddy, D. J. Faulkner, Y. Venkateswarlu, M. R. Rao, *Tetrahedron* **1997**, 53, 3457–3466; g) R. A. Davis, A. R. Carroll, G. K. Pierens, R. J. Quinn, *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 419–424; h) J. Ham, H. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23, 163–166; i) P. Krishnaiah, V. L. N. Reddy, G. Venkataramana, K. Ravinder, M. Srinivasulu, T. V. Raju, K. Ravikumar, D. Chandrasekar, S. Ramakrishna, Y. Venkateswarlu, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1168–1171; j) S. M. Reddy, M. Srinivasulu, N. Satyanarayana, A. K. Kondapi, Y. Venkateswarlu, *Tetrahedron* **2005**, 61, 9242–9247.
- [5] F. Ishibashi, S. Tanabe, T. Oda, M. Iwao, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 500–504.
- [6] M. Facompré, C. Tardy, C. Bal-Mahieu, P. Colson, C. Perez, I. Manzanares, C. Cuevas, C. Bailly, *Cancer Res.* **2003**, 63, 7392–7399.
- [7] M. Vanhuyse, J. Kluzza, C. Tardy, G. Otero, C. Cuevas, C. Bailly, A. Lansiaux, *Cancer Lett.* **2005**, 221, 165–175.
- [8] A. R. Quesada, M. D. García Grávalos, J. L. Fernández Puentes, *Br. J. Cancer* **1996**, 74, 677–682.
- [9] a) M. Banwell, B. Flynn, D. Hockless, *Chem. Commun.* **1997**, 2259–2260; b) A. Heim, A. Terpin, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 158–159; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 155–156; c) F. Ishibashi, Y. Miyazaki, M. Iwao, *Tetrahedron* **1997**, 53, 5951–5962; d) D. L. Boger, C. W. Boyce, M. A. Labroli, C. A. Sehon, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 54–62; e) C. Peschko, C. Winkhofer, W. Steglich, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1147–1152; f) S. Ruchirawat, T. Mutarapat, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1205–1208; g) C. P. Ridley, M. V. R. Reddy, G. Rocha, F. D. Bushman, D. J. Faulkner, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 3285–3290; h) P. Cironi, I. Manzanares, F. Albericio, M. Álvarez, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2959–2962; i) M. Iwao, T. Takeuchi, N. Fujikawa, T. Fukuda, F. Ishibashi, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 4443–4446; j) P. Ploypradith, W. Jinaglueng, C. Pavaro, S. Ruchirawat, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1363–1366; k) S. T. Handy, Y. Zhang, H. Breg-

- man, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2362–2366; l) M. Marfil, F. Albericio, M. Álvarez, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8659–8668; m) P. Ploypradith, C. Mahidol, P. Sahakitpichan, S. Wongbundit, S. Ruchirawat, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 884–886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 866–868; n) D. Pla, A. Marchal, C. A. Olsen, F. Albericio, M. Álvarez, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8231–8234; o) P. Ploypradith, R. K. Kagan, S. Ruchirawat, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5119–5125; p) Y.-C. You, G. Yang, A.-L. Wang, D.-P. Li, *Curr. Appl. Phys.* **2005**, *5*, 535–537; q) N. Fujikawa, T. Ohta, T. Yamaguchi, T. Fukuda, F. Ishibashi, M. Iwao, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 594–604; r) D. Pla, A. Marchal, C. A. Olsen, A. Francesch, C. Cuevas, F. Albericio, M. Álvarez, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3257–3268; s) P. Ploypradith, T. Petchmanee, P. Sahakitpichan, N. D. Litvinas, S. Ruchirawat, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9440–9448; t) T. Yamaguchi, T. Fukuda, F. Ishibashi, M. Iwao, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3755–3757; u) J. C. Liermann, T. Opatz, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4526–4531.
- [10] S. E. L. Mirski, J. H. Gerlach, S. P. C. Cole, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2594–2598.
- [11] S. P. C. Cole, E. R. Chanda, F. P. Dicke, J. H. Gerlach, S. E. L. Mirski, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3345–3352.
- [12] C. D. Evans, S. E. L. Mirski, M. K. Danks, S. P. C. Cole, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *34*, 242–248.
- [13] S. P. C. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. V. Duncan, R. G. Deeley, *Science* **1992**, *258*, 1650–1654.
- [14] D. R. Hipfner, S. D. Gauldie, R. G. Deeley, S. P. C. Cole, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5788–5792.
- [15] C. Tardy, M. Facompré, W. Laine, B. Baldeyrou, D. García-Gravalos, A. Francesch, C. Mateo, A. Pastor, J. A. Jiménez, I. Manzanares, C. Cuevas, C. Bailly, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1697–1712.
- [16] S. Sirisinha, T. Tengchaisri, S. Boonpucknavig, N. Prempracha, S. Ratana-rapee, A. Pausawasdi, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **1991**, *9*, 153–157.
- [17] K. Laohathai, N. Bhamarapravati, *Am. J. Pathol.* **1985**, *118*, 203–208.

Received: October 14, 2008

Revised: November 14, 2008

Published online on January 16, 2009



Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2009

Supporting Information

Cytotoxicities and structure-activity relationships of natural and unnatural lamellarins towards cancer cells

Montakarn Chittchang,^[a,b] Paratchata Batsomboon,^[b] Somsak Ruchirawat,^[a,b]
and Poonsakdi Ploypradith^{*[a,b]}

^[a] *Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute*

^[b] *Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, and the Center for Environmental Health, Toxicology and Management of Chemicals*

54 Moo 4, Vibhavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210, Thailand

Table of Contents

- p. 2 **Figure S1.** Contributions of the hydroxylation/methoxylation pattern (OH vs. OMe) at the C9 position of lamellarins to their cytotoxic activities.
- p. 2 **Figure S2.** Contributions of the hydroxylation/methoxylation pattern (OH vs. OMe) at the (a) C13 and (b) C14 position of lamellarins to their cytotoxic activities.
- p. 3 **Figure S3.** Relative contributions of C13 and C14 methylations (C13-OMe, C14-OH vs. C13-OH, C14-OMe) to the cytotoxic activities of lamellarins.
- p. 3 **Figure S4.** Relative contributions of C20 and C21 methylations (C20-OH, C21-OMe vs. C20-OMe, C21-OH) to the cytotoxic activities of lamellarins.
- p. 4 **Table S1.** Purity of lamellarins determined by HPLC analyses.
- p. 5 **Table S2.** Culture medium used for each cell line.

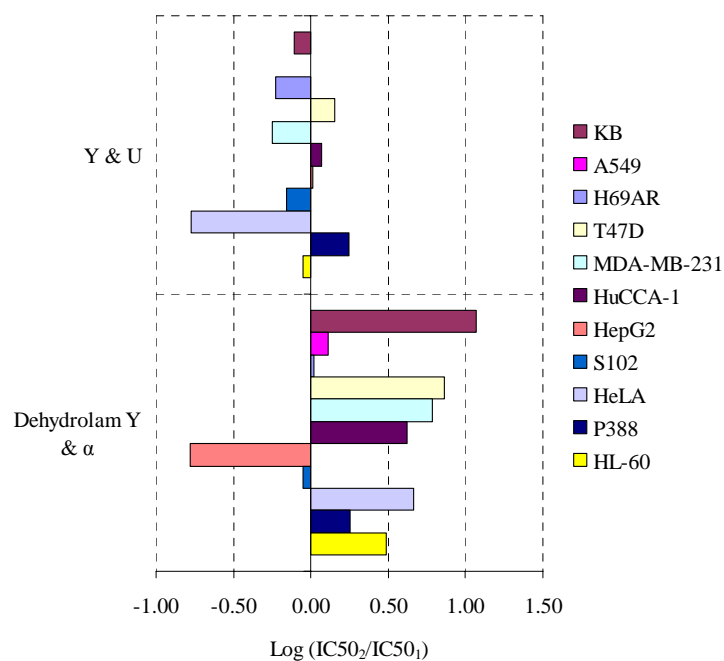


Figure S1. Contributions of the hydroxylation/methoxylation pattern (OH vs. OMe) at the C9 position of lamellarins to their cytotoxic activities.

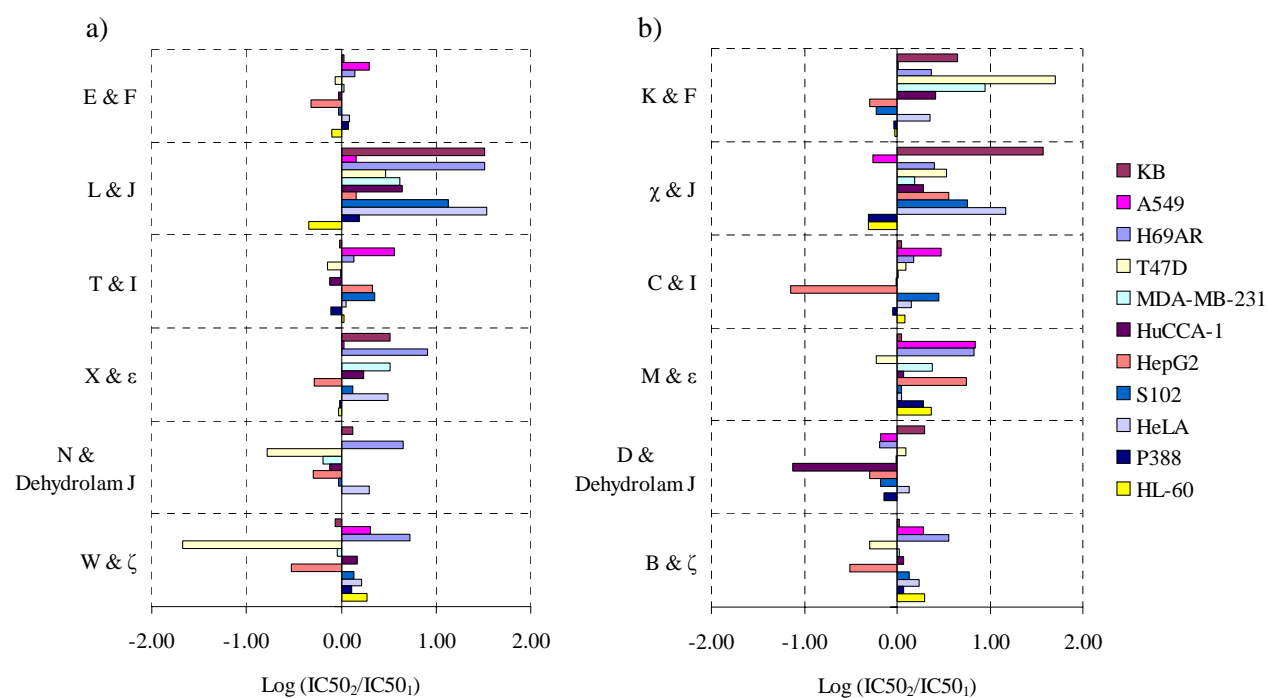


Figure S2. Contributions of the hydroxylation/methoxylation pattern (OH vs. OMe) at the (a) C13 and (b) C14 position of lamellarins to their cytotoxic activities.

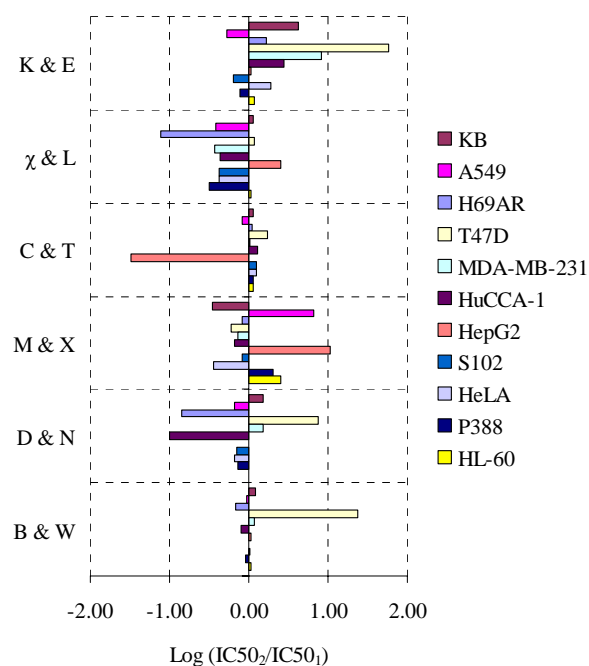


Figure S3. Relative contributions of C13 and C14 methylations (C13-OMe, C14-OH vs. C13-OH, C14-OMe) to the cytotoxic activities of lamellarins.

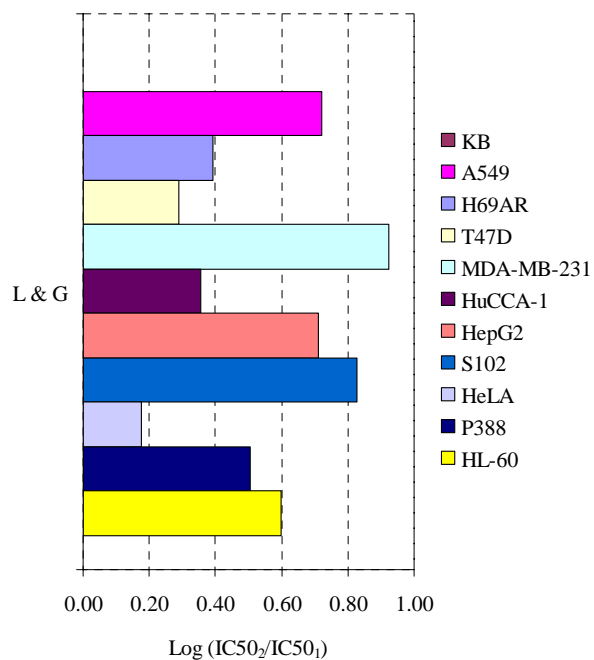


Figure S4. Relative contributions of C20 and C21 methylations (C20-OH, C21-OMe vs. C20-OMe, C21-OH) to the cytotoxic activities of lamellarins.

Table S1. Purity of lamellarins determined by HPLC analyses^[a]

Lamellarin	Solvent system 1 ^[b]		Solvent system 2 ^[c]	
	Retention time (min)	% Purity	Retention time (min)	% Purity
Lamellarin C	10.018	98.59	22.021	99.19
Lamellarin B	18.868	96.27	8.553 ^[d]	100.00
Lamellarin χ	5.264	92.33	7.977	92.07
Lamellarin D	7.933	97.66	11.290	99.56
Lamellarin E	6.231	96.64	11.810	99.38
Lamellarin X	9.328	97.79	18.086	98.98
Lamellarin F	8.079	97.68	18.359	99.30
Lamellarin ε	12.493	98.83	29.278	98.81
Lamellarin G	5.200	96.91	9.704	97.33
Lamellarin I	12.985	93.39	39.673	100.00
Lamellarin ζ	25.543	94.54	13.368 ^[d]	100.00
Lamellarin J	6.608	97.72	12.906	98.35
Dehydrolam J	10.234	99.46	19.684	100.00
Lamellarin K	6.437	100.00	11.146	100.00
Lamellarin M	10.000	99.41	16.902	100.00
Lamellarin L	5.469	92.71	8.634	91.64
Lamellarin N	7.738	99.47	11.812	99.30
Lamellarin T	10.231	97.73	25.018	99.73
Lamellarin W	19.877	95.71	48.479	98.52
Lamellarin U	7.755	96.61	16.540	99.49
Lamellarin α	13.292	99.63	28.289	100.00
Lamellarin Y	5.144	93.56	9.708	97.92
Dehydrolam Y	7.447	94.52	13.884	94.46
Dihydrolam η ^[e]	9.253	92.03	24.200	97.58
Lamellarin η ^[e]	16.075	90.58	41.919	93.38

[a] Analysis were done using a C18 column and two solvent systems at a flow rate of 1 mL/min.
 [b] Solvent system 1: 75% of methanol and 25% of water.
 [c] Solvent system 2: 45% of acetonitrile (with 0.045% TFA) and 55% of water (with 0.045% TFA).
 [d] The solvent system was changed to 65% of acetonitrile (with 0.045% TFA) and 45% of water (with 0.045% TFA) due to the very high lipophilicity of the compounds.
 [e] Not tested for cytotoxicity due to the insolubility in DMSO.

Table S2. Culture medium used for each cell line.

Cell line	Culture medium
A549 (ATCC No. CCL-185)	RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 125 ng/mL amphotericin B
H69AR (ATCC No. CRL-11351)	RPMI 1640 supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, and 1 mM sodium pyruvate
HeLA (ATCC No. CCL-2)	DMEM supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine
HepG2 (ATCC No. HB-8065)	DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 125 ng/mL amphotericin B
HL-60	RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine
HuCCA-1	Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS
KB (NEC)	DMEM supplemented with 10% FBS
MDA-MB-231	DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 1% non-essential amino acid
MRC-5	DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 125 ng/mL amphotericin B
P388	RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine
S102	RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 125 ng/mL amphotericin B
T47D (ATCC No. HTB-133)	RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, 1 mM sodium pyruvate, and 0.2 U/mL bovine insulin (80 µL/100 mL)



Original article

Assessing the drug-likeness of lamellarins, a marine-derived natural product class with diverse oncological activities

Montakarn Chittchang^{a,b,*}, M. Paul Gleeson^{a,c}, Poonsakdi Ploypradith^{a,b}, Somsak Ruchirawat^{a,b}^a Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, 54 Moo 4, Vibhavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210, Thailand^b Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute and the Center for Environmental Health, Toxicology and Management of Chemicals, 54 Moo 4, Vibhavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210, Thailand^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Phaholyothin Road, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2009

Received in revised form

18 January 2010

Accepted 20 January 2010

Available online 28 January 2010

Keywords:

Lamellarins

Lipophilicity

Drug-likeness

Physicochemical profiling

In silico descriptors

Principal components analysis (PCA)

ABSTRACT

Natural products currently represent an underutilized source of leads for the pharmaceutical industry, especially when one considers that almost 50% of all drugs were either derived from such sources or are very closely related. Lamellarins are a class of natural products with diverse biological activities and have entered into preclinical development for the treatment of multidrug-resistant tumors. Although these compounds demonstrated good cell penetration, as observed by their low μM activity in whole cell models, they have not been extensively profiled from a physicochemical point of view, and this is the goal of this study.

For this study, we have determined the experimental logP values of a set of 25 lamellarins, given it is the single most important parameter in determining multiple ADMET parameters. We also discuss the relationship between this natural product class, natural product derivatives in development and on the market, oral marketed drugs, as well as drug molecules in development, using a range of physicochemical parameters in conjunction with principal components analysis (PCA). The impact of this systematic analysis on our ongoing medicinal chemistry strategy is also discussed.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Natural products currently represent an underutilized source of leads for the pharmaceutical industry due to the current dominance of high throughput screening (HTS) lead generation processes. Even if identified from alternative cell based models, their often unknown mode of action makes biological characterization and structure-activity relationship (SAR) expansion difficult using the favored *in vitro* assays. Coupled with their often low abundance in nature, or complex structures posing synthetic challenges, mean the progression of natural products in a modern development cascade is limited. Despite these hurdles, natural products, or molecules derived from natural products, represent ~50% of all drugs coming to market over the last 2 decades [1], which appears to add weight to arguments that naturally derived molecules are inherently better tolerated in the body than synthetically derived molecules [2–4].

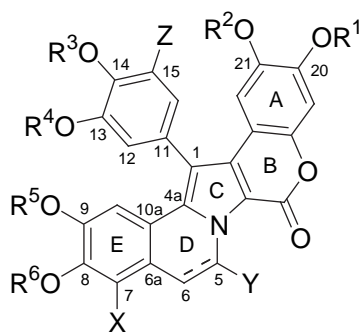
Lamellarins are a class of marine-derived natural products isolated from mollusks [5], ascidians [6–13], and marine sponges [14,15]. The majority of naturally-occurring lamellarins contain the same pentacyclic 2-pyrrolo(dihydro)isoquinoline lactone core, and only differ in the nature of the C5–C6 bond in the D-ring, as well as the substitution pattern on each ring (Table 1). Lamellarins have been the focus of considerable scientific research due to their diverse biological activities [16,17], demonstrating cytotoxic activities and multidrug resistance (MDR) reversal in a number of cancer cell lines [18–25], as well as being confirmed inhibitors of HIV-1 integrase [19,21], a number of kinases [26], and topoisomerase I [22–24]. Recognition of the biological potential of this compound class can be found in recent reports of lamellarins entering into preclinical development for the treatment of multidrug-resistant tumors [27–32].

Key to the success of any clinical candidate is their absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) characteristics, and these are known to depend heavily on their overall molecular properties, in particular lipophilicity (logP), molecular weight (MWT), ionization state, as well as the number of H-bond donors and acceptors [33–35]. However, as with most natural products, lamellarins are not particularly drug-like in the conventional sense (although these compounds demonstrated good cell

* Corresponding author at: Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, 54 Moo 4, Vibhavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210, Thailand. Tel.: +66 2 574 0622; fax: +66 2 574 2027.

E-mail address: montakarn@cri.or.th (M. Chittchang).

Table 1
Structures of lamellarins in group 1 and group 2.



Group 1 (with a C5–C6)	Group 2 (with a C5=C6)	Substituents								
		OR ¹	OR ²	Z	OR ³	OR ⁴	OR ⁵	OR ⁶	X	Y
Lamellarin A ^a	–	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin C	Lamellarin B	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin χ	Lamellarin D	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OH	H	H
Lamellarin E	Lamellarin X	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin F	Lamellarin ϵ	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin G	–	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	OH	H	H
–	Lamellarin H ^a	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	H	H
Lamellarin I	Lamellarin ζ	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin J	Dehydrolam J ^b	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OH	H	H
Lamellarin K	Lamellarin M	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin L	Lamellarin N	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin S ^a	–	OH	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin T	Lamellarin W	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin U	Lamellarin α	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	H	H
Lamellarin V ^a	–	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin Y	Dehydrolam Y ^b	OH	OMe	H	OMe	OH	OH	OMe	H	H
Lamellarin Z ^a	–	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin β ^a	–	OH	OH	H	OMe	OH	OH	OH	H	H
Lamellarin γ ^a	–	OH	OMe	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OH	H
–	Lamellarin ϕ ^a	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	OMe	H
Dihydrolam η ^b	Lamellarin η	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H

^a Synthesis in progress.

^b Unnatural lamellarins.

penetration, as observed by their low μ M activity in whole cell models [25], but a number of them showed poor solubility under assay conditions). As a class, they have not been extensively profiled from a physicochemical point of view, and this is the goal of this study.

In this study, we experimentally determined logP values of 25 lamellarins synthesized in our laboratory since it is the single most important parameter affecting multiple ADMET parameters [35]. It is also one of the most difficult molecular properties to predict *in silico*. Given the importance of maintaining logP values in the range of oral drugs (~ 2.5) [36–38], we also investigated the structure–logP relationships of lamellarins and the validity of *in silico* methods. We subsequently assessed the relationship between this natural product class, natural product derivatives in development and on the market, oral marketed drugs, as well as drug molecules in development. Principal components analysis (PCA), in conjunction with computed and experimental molecular properties, was used for this purpose.

2. Results and discussion

2.1. Measured and predicted logP values of lamellarins

The results obtained from our experimental and theoretical efforts are given in Table 2. In Table 3, we summarize the results

further, listing the mean, standard deviation, minimum, and maximum obtained for 25 synthesized lamellarins from each logP method. We also report the root mean square error (RMSE) and a number of line of best fit statistics (r^2 , slope, intercept, and standard error (SE)) to allow for a meaningful inter-comparison of the values, both in terms of their absolute predictions and correlation with experimental data. See the [Supplementary Material and reference \[39\]](#) for more details regarding the statistics used here.

The mean experimental logP value for the 25 lamellarins tested here was 3.66. The standard deviation of data set was 0.71 log unit, with only one compound having a logP value > 5 putting the set in a reasonable area of logP space. However, not all calculation methods predicted the lamellarins as a class to have moderate lipophilicity. The most popular lipophilicity calculators, AlogP, ACD LogP, and ClogP, performed worst, predicting mean logP values of 5.11, 4.99, and 4.65, respectively. Their root mean square errors were therefore found to be large at 1.64, 1.57, and 1.15 log units, respectively. The best prediction was obtained from the OpenEye implementation of xlogP, displaying a mean value for the set of only 0.09 log unit from the experimental mean and the smallest RMSE of 0.44. Surprisingly, the three xlogP based methods used here, OE-xlogP, MI-xlogP, FAF-xlogP, showed predictions that varied considerably, displaying mean logP values of the set at 3.75, 4.16, and 4.23, respectively, with RMSEs of 0.44, 0.62, and 0.85, respectively. These variations arise from the subtle difference in the way

Table 2

Experimentally determined and calculated logP values of lamellarins.

Lamellarin	Experimental logP values (HPLC Method)	Calculated logP Values						
		MI-xlogP	OE-xlogP	FAF-xlogP	ACD LogP	ClogP	CSlogP	AlogP
Lamellarin A ^a	–	3.40	3.14	3.33	4.02	3.17	3.66	4.78
Lamellarin C	4.02 ± 0.001	4.06	3.69	3.80	5.32	4.39	3.91	5.38
Lamellarin B	4.93 ± 0.001	4.64	4.25	4.57	4.61	4.72	3.93	4.94
Lamellarin χ	2.78 ± 0.003	3.57	2.87	3.96	4.85	4.28	3.77	5.17
Lamellarin D	3.45 ± 0.001	4.15	3.43	4.74	4.14	4.76	3.79	4.73
Lamellarin E	3.14 ± 0.002	3.78	2.95	3.61	4.87	3.96	3.65	5.15
Lamellarin X	3.75 ± 0.001	4.36	3.51	4.38	4.16	4.38	3.67	4.71
Lamellarin F	3.49 ± 0.002	4.09	3.69	3.66	5.49	4.43	3.91	5.38
Lamellarin ϵ	4.10 ± 0.001	4.67	4.25	4.44	4.78	4.85	3.93	4.94
Lamellarin G	2.63 ± 0.002	3.57	2.87	3.96	4.84	4.28	3.77	5.17
Lamellarin H ^a	–	3.22	1.20	5.06	3.07	3.88	3.00	4.05
Lamellarin I	4.33 ± 0.002	4.36	4.43	3.85	6.02	4.87	4.17	5.60
Lamellarin ζ	5.19 ± 0.003	4.94	4.99	4.62	5.32	5.19	4.19	5.16
Lamellarin J	3.07 ± 0.002	3.87	3.61	4.01	5.55	4.75	4.04	5.39
Dehydrolam J	3.69 ± 0.004	4.45	4.17	4.79	4.85	5.24	4.06	4.95
Lamellarin K	3.15 ± 0.005	3.78	2.95	3.61	4.79	3.96	3.65	5.15
Lamellarin M	3.79 ± 0.004	4.36	3.51	4.38	4.08	4.38	3.67	4.71
Lamellarin L	2.74 ± 0.001	3.57	2.87	3.96	4.93	4.28	3.77	5.17
Lamellarin N	3.37 ± 0.007	4.15	3.43	4.74	4.22	4.76	3.79	4.73
Lamellarin S ^a	–	2.95	1.39	4.18	4.08	3.70	3.25	4.72
Lamellarin T	3.99 ± 0.005	4.06	3.69	3.80	5.40	4.39	3.91	5.38
Lamellarin W	4.83 ± 0.006	4.64	4.25	4.57	4.69	4.72	3.93	4.94
Lamellarin U	3.31 ± 0.007	3.87	3.61	4.01	5.69	4.75	4.04	5.39
Lamellarin α	3.98 ± 0.004	4.45	4.17	4.79	4.99	5.12	4.06	4.95
Lamellarin V ^a	–	3.40	3.14	3.33	4.10	3.17	3.66	4.78
Lamellarin Y	2.59 ± 0.005	3.57	2.87	3.96	4.93	4.28	3.77	5.17
Dehydrolam Y	3.21 ± 0.002	4.15	4.74	3.43	4.22	4.76	3.79	4.73
Lamellarin Z ^a	–	3.26	2.13	4.07	4.59	3.85	3.51	4.94
Lamellarin β^a	–	2.95	1.38	4.18	4.02	3.70	3.25	4.72
Lamellarin γ^a	–	4.48	3.47	3.93	5.42	4.78	3.91	5.38
Lamellarin ϕ^a	–	4.33	3.51	4.38	4.08	4.38	3.67	4.71
Dihydrolam η	3.65 ± 0.001	4.18	4.35	4.07	6.32	5.22	4.30	5.62
Lamellarin η	4.33 ± 0.004	4.76	4.91	4.84	5.61	5.59	4.32	5.18

^a Synthesis in progress. Used in the *in silico* profiling exercises only.

each method is implemented in practice. For example, the OpenEye has implemented a variant of xlogP, which utilizes a 2D approach rather than 3D, neglects the internal hydrogen bond term, and corrects subtle atom-type inconsistencies, with performance comparable to the original version [40]. The logP method implemented in ChemBioDraw Ultra, CSlogP, performed moderately well, with a mean predicted logP of 3.91 and an RMSE of 0.66.

While it is important to be able to accurately benchmark the lipophilicity of a given chemotype, it may be acceptable if a prediction method correlates well with the experimental parameter, even if the absolute values are not well predicted, potentially proving useful for SAR rationalization. Should a particular series be consistently under or over predicted, it may also be

possible to correct the absolute value to give results closer to the expected value. This we can assess using linear regression (Table 3). The line of best fit results showed that MI-xlogP ($r^2 = 0.83$), rather than OE-xlogP ($r^2 = 0.62$), correlated better with experimental logP values. The lower prediction error of the latter method is due to the fact that the un-regressed slope and intercept (Table 3) are closer to the line of unity than the former, but correcting all methods to remove any prediction bias, revealed that MI-xlogP would perform better than OE-xlogP. The line of best fit standard error, which can be considered as being analogous to the RMSE associated with the $Y = X$ line (see Supplementary Material Table S1), was 0.30 log unit, compared to 0.44 for OE-xlogP. The lower prediction error was because MI-xlogP was intrinsically better correlated with the experimental logP of the lamellarins. However, it was predicted with a greater bias than OE-xlogP, as can be seen from the slope and intercept in Table 3. Note while correcting the ACD LogP, ClogP, and AlogP values dramatically lowered their overall error, it was almost comparable to the standard deviation of the data, indicating they are still of limited utility.

To assess the value of corrected logP predictions further, we performed a leave-one out (LOO) cross-validation exercise for the two best performing methods: MI-xlogP and OE-xlogP. In this procedure, each compound was left out in turn and subsequently predicted using the line of best fit equation obtained from the other compounds. From the LOO results, we found that MI-xlogP displayed an r^2 of 0.80 and an SE of 0.32, compared to an r^2 of 0.54 and an SE of 0.49 for OE-xlogP, respectively, suggesting such an approach could have predictive potential. However, while correcting a prediction for a given series may be advantageous in the short term, care should be taken since such relationships have a tendency

Table 3

Summary of the experimental and theoretical logP results. Reported are the mean, minimum (Min) and maximum (Max) logP values for 25 synthesized lamellarins obtained from each method, as well as the standard deviation (SD) and the root mean square error (RMSE). Also given is the correlation coefficient obtained from the line of best fit between the experimental and theoretical logP measures, along with the corresponding slope, intercept, and standard error (SE).

ID	Mean	Min	Max	SD	RMSE	r^2 (slope/intercept/SE)
Experimental logP	3.66	2.59	5.19	0.71	–	–
MI-xlogP	4.16	3.57	4.94	0.40	0.62	0.83 (1.61/–3.02/0.30)
OE-xlogP	3.75	2.87	4.99	0.65	0.44	0.62 (0.86/0.44/0.44)
FAF-xlogP	4.23	3.61	4.84	0.42	0.85	0.19 (0.73/0.57/0.65)
ACD LogP	4.99	4.08	6.32	0.59	1.57	0.02 (0.16/2.85/0.71)
ClogP	4.65	3.96	5.59	0.41	1.15	0.29 (0.93/–0.68/0.61)
CSlogP	3.91	3.65	4.32	0.20	0.66	0.27 (1.89/–3.74/0.61)
AlogP	5.11	4.71	5.62	0.27	1.64	0.00 (–0.13/4.30/0.72)

to break down as more compounds in the series are synthesized, with markedly different functional groups or dramatic changes to the scaffold, leading them away from the so called model space [41,42].

2.2. Effects of structural modifications on logP

Apart from the correction factors for intramolecular interactions, the logP increments assigned for various atoms or fragments form the fundamental basis of most currently available calculation methods. As a result, the deviations between the calculated and measured logP values are partly governed by the reliability of those atomic and fragmental values which, in turn, depends on the methods and the classes of compounds from which these values have been derived. Additionally, a key problem with most logP software packages is that they typically assume almost constant logP increments associated with related substituent changes, even though equivalent substitutions at different positions can have dramatically different effects [43–46].

Since at least five of the currently available logP calculators did not appear applicable to lamellarins, a possible source of disparities between the calculated and experimental logP values of these compounds was investigated. The systematically diversified substitution patterns of the lamellarins used in this study enabled us to determine the logP increments resulting from various structural modifications around the lamellarin core. Those determinations were performed using the matched molecular pairs analysis [47] by comparing the logP values of any two lamellarin structures that differ only in each structural component being considered. The results are reported as the Δ logP values in Table 4.

The first structural modification considered was the conversion of the C5–C6 bond to a double bond. Interestingly, our HPLC determinations demonstrated that the introduction of a C5–C6 double bond into the D-ring of a lamellarin molecule consistently increased the logP value by an average of +0.70 log unit (Table 4). In contrast, the logP increments applied by various calculators for changing the C5–C6 bond to an olefin moiety widely ranged from only +0.02 log unit in CSlogP to –0.71 and +0.78 log unit in ACD LogP and FAF-xlogP, respectively.

Such a significant increase in the chromatographic logP values upon the introduction of the C5–C6 olefin is not likely to solely result from the modification of a particular bond which, theoretically, induces minimal changes in molecular weight, molecular volume, and polar surface area. However, the geometry of

lamellarin molecules is constrained to be more planar in the presence of the C5–C6 double bond [22,25]. This molecular planarity enhances intermolecular stacking interactions, which has been demonstrated to significantly increase lipophilicity of some compounds [48].

In contrast, all but two software programs consistently predicted a decrease in the logP values, albeit to different extents, of these compounds upon hydroxylation at either C5 or C7, as well as methoxylation at C7. Such predictions are conceivable since these oxygen-containing functional groups are capable of hydrogen bonding with water molecules. However, HPLC determinations demonstrated a relatively small decrease in the experimental logP values by –0.20 log unit upon hydroxylation at the C7 position (Table 4). On the contrary, substitution of the hydrogen atom at the C7 position with a methoxy group actually led to a substantial increase (by +0.77 log unit) in the experimental logP values.

These observations suggest that, when attached to the pentacyclic core structure of lamellarins, the oxygen atom in either a hydroxy group or a methoxy group becomes less accessible to interact with water molecules than when present in smaller compounds. Nonetheless, when C7 is hydroxylated, the H-bond donor property of the resulting aromatic OH group still remains to interact with water, leading to a small decrease in the logP values of lamellarins upon C7-hydroxylation. In contrast, methoxylation at the C7 position results in an aromatic ether, which is considered as an exceptionally poor H-bond acceptor [47,49]. As a result, the overall increase in the logP values experimentally observed upon C7-methoxylation was probably due to the hydrophobic interactions between the methyl component and the chromatographic stationary phase.

Another series of structural modifications investigated in this study involve methylation of various hydroxy groups around the lamellarin core. An increase in the logP values was observed for this transformation, as expected from both the removal of an H-bond donor and the increased hydrophobic interactions through the methyl group. Most of the logP calculators used in this study tend to predict very similar logP increments for this type of modifications at various positions (Table 4). Interestingly, our experimental results clearly indicated that the logP values of lamellarins were remarkably increased upon methylation of the hydroxy groups at C7, C8, or C9 positions on the pentacyclic lactone core. In contrast, a smaller effect was observed in the case of the same modification at either C13 or C14 residing on the aromatic ring orthogonal to the core structure.

Table 4
Effects of structural modifications on the logP values for the key lamellarin substitution positions.

Transformation	Pairs	Δ logP (log unit)							
		Experimental logP	MI-xlogP	OE-xlogP	FAF-xlogP	ACD LogP	ClogP	CSlogP	AlogP
C5–C6 \rightarrow C5=C6	12	+0.70 \pm 0.11	+0.58	+0.56	+0.78	–0.71	+0.41	+0.02	–0.44
5-H \rightarrow 5-OH	2	^a	–0.66	–0.55	–0.47	–1.30	–1.23	–0.25	–0.60
7-H \rightarrow 7-OH	4	–0.20 \pm 0.04	–0.09	–0.66	–0.41	–0.83	–0.77	–0.39	–0.24
7-H \rightarrow 7-OMe	4	+0.77 \pm 0.10	+0.19	+0.08	–0.22	–0.30	–0.38	–0.13	–0.01
7-OH \rightarrow 7-OMe	6	+0.98 \pm 0.14	+0.28	+0.74	+0.19	+0.53	+0.39	+0.26	+0.23
8-OH \rightarrow 8-OMe	4	+0.60 \pm 0.03	+0.31	+0.74	+0.05	+0.77	+0.41	+0.27	+0.23
9-OH \rightarrow 9-OMe	2	+0.75 \pm 0.04	+0.30	+0.74	+0.05	+0.77	+0.42	+0.27	+0.22
13-OH \rightarrow 13-OMe	8	+0.34 \pm 0.01	+0.31	+0.74	+0.05	+0.62	+0.47	+0.26	+0.23
14-OH \rightarrow 14-OMe	6	+0.29 \pm 0.04	+0.30	+0.74	+0.05	+0.70	+0.47	+0.26	+0.22
20-OH \rightarrow 20-OMe	1	^a	+0.31	+0.74	–0.11	+0.51	+0.15	+0.26	+0.22
8-OMe, 9-OH \rightarrow 8-OH, 9-OMe	2	+0.16 \pm 0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13-OMe, 14-OH \rightarrow 13-OH, 14-OMe	6	–0.05 \pm 0.03	0.00	0.00	0.00	+0.08	0.00	0.00	0.00
14-OMe, 15-H \rightarrow 14-H, 15-OMe	1	^a	+0.39	–0.22	+0.27	–0.07	+0.35	0.00	0.00
20-OH, 21-OMe \rightarrow 20-OMe, 21-OH	1	–0.11 ^b	0.00	0.00	0.00	–0.09	0.00	0.00	0.00

^a Pair(s) not available for experimental determination.

^b SD not determined as only one matched pair of lamellarins were available for comparison.

These findings suggest that similar substituents located on the orthogonal ring of lamellarins exhibit different physicochemical properties from those on the pentacyclic core. However, this is not unexpected given their distinctly different degrees of flexibility. In contrast, the two substituents located at C13 and C14 are more comparable in their physicochemical nature, considering that switching the hydroxy and methoxy groups between these two positions causes minimal changes in both the calculated and experimentally determined logP values (Table 4). All these findings demonstrate that not only the chemical nature, but also the position, of substituents could affect the lipophilicity of the molecules, as previously reported for smaller compounds [43–46].

In addition to the positional dependency, the experimental logP increments upon each modification were examined separately for the two groups of lamellarins (see Table 1), and then compared using *t*-test with unequal variances. Interestingly, no statistically significant ($p > 0.05$) differences were observed for any particular modifications in these two series of compounds, except for C7 substituent modifications. The logP increments for lamellarins in groups 1 and 2 were as follows: (a) -0.17 ± 0.01 vs. -0.23 ± 0.00 ($p = 0.049$) upon C7-hydroxylation, (b) $+0.68 \pm 0.00$ vs. $+0.86 \pm 0.01$ ($p = 0.018$) for C7-methoxylation, and (c) $+0.85 \pm 0.02$ vs. $+1.10 \pm 0.03$ ($p = 0.002$) for C7-OH methylation. These results provide additional evidence that the C7 substituents in these two series of compounds must be oriented differently, as predicted by our previously reported molecular modeling studies [25].

In summary, even though some of the logP increments used by certain software programs coincide with the values experimentally obtained for lamellarins in this study, most of them significantly deviate. This could be one of the reasons for the discrepancies between the calculated and experimental logP values of these compounds. Additional analogs with more diverse substitution patterns would be required to allow for the reliable estimation of the logP values of lamellarins. Nevertheless, the Δ logP values determined for each structural modification around the lamellarin core can be used to predict the lipophilicity of certain lamellarin analogs from the experimental logP values of their parent compounds.

2.3. Lamellarins vs. drugs, natural products, and compounds in development

The importance of benchmarking compounds to known areas of chemical space is evident from many publications in the area, including: Proudfoot et al. [50], who assessed the evolution of oral drugs over time; Oprea et al. [51], who compared drugs, candidates, lead-like and pub-like compounds; Wenlock et al. [52], who assessed the relationship between drugs and candidates in different stages of development; Ritchie et al. [53], who compared the relationship between inhaled, intranasal, and oral drugs; as well as O'Shea et al. [54], who assessed the overlap between antibacterials and a literature derived data set.

In this section, we compared the lamellarin chemotype to a set of relevant drug data sets from literature in order to understand the differences and devise the most effective way of developing this chemotype into one with more drug-like properties. To this end, we have compared the lamellarin molecules to other natural product derivatives in development and on the market, to oral marketed drugs, as well as to molecules in drug development. The comparison was performed using a range of fundamental physicochemical parameters, in conjunction with multivariate PCA (Fig. 1) and univariate statistical methods (Table 5).

The PCA based model of chemical space described 80% of the total variation in the data set analyzed, with component 1 describing the largest portion of information at 49%, followed by

14% by component 2, 10% by component 3, and 7% by component 4. This means that the descriptors used here have a high degree of correlation. To aid comprehension, we briefly explain how to interpret Fig. 1. Components 1 and 2 collectively described 63% of the total variation, and the molecular significance of the location of compounds on the scores plot (Fig. 1a) can be understood by considering the corresponding loadings plot (Fig. 1b). Descriptors with a large positive loading on the X-axis of Fig. 1b, such as MWT, have larger values for compounds with positive loadings on the scores plot (Fig. 1a), such as lamellarins, and smaller values for compounds with negative loadings. In contrast to MWT, the values of ABS have a negative loading on Fig. 1b so are thus inversely correlated with MWT (*i.e.*, decrease as MWT increases). This means lamellarins have lower ABS scores than oral drugs, but higher molecular weight. Finally, descriptors, such as MWT, PSA, and LIPINSKI, have comparable loadings on the X-axis of Fig. 1b, meaning they are highly correlated with each other.

Thus, we can relate the PCA components in a relatively crude way to aid interpretation: component 1 primarily separates large molecules (those with +ve coefficients on the X-axis of Fig. 1a) from smaller ones (–ve coeff.), component 2 separates basic molecules (+ve coeff.) from acidic molecules (–ve coeff.), component 3 separates lipophilic (–ve coeff.) from hydrophilic molecules (+ve coeff.), and component 4 separates chiral (–ve coeff.) from achiral molecules (+ve coeff.). Analysis of Fig. 1 shows that lamellarins as a class occupy a position towards the edge of drug-like chemical space, as defined by the two most important components (Fig. 1a). While lamellarins occupy a central position on component 2 due to their lack of ionizable functionality, their size related characteristics result in them being located at the edge of component 1, and thus, oral drug space. On the components 3 and 4 (Fig. 1c), lamellarins occupy a more central position due in part to their reasonable lipophilicity and due to the lack of a chiral center, respectively.

However, lamellarins as a class do not have particularly extreme properties when compared to natural product treatments, either on the market or in development (note that 26% of these compounds are not shown in Fig. 1 as they have a loading > 9 on component 1), which suggests they still represent a good starting point for a lead optimization campaign, given their diverse oncological activities. For example, while the mean MWT of lamellarins at 522 Da is above the Lipinski cut-off, that of natural products in development is 712 Da, and 568 Da for those compounds on the market (Table 5). In addition, the mean logP for lamellarins is 3.4 log units, almost 1 log unit higher than oral drugs, and 2 log units higher than natural product drugs. However, the mean number of H-bond donors and acceptors are low, 2.7 and 1.1, respectively, suggesting there is considerable scope to increase the polarity of the molecules and reduce the logP further.

In recent years, a number of modifications by others have been made to the lamellarin skeleton, aiming to increase the polarity of these compounds. Most recently, the conjugation of lamellarin D with poly(ethylene) glycol (PEG) has been undertaken to address the physicochemical properties of lamellarins [55,56]. However, such conjugations, while potentially providing groups which increase aqueous solubility, inevitably increase molecular weight, molecular volume, and the number of H-bond donors/acceptors of the PEG-lamellarin adducts, pushing the molecules further from drug-like chemical space. From our physicochemical profiling exercise, we believe an approach is required to move the lamellarins towards a more optimal area of physicochemical parameter space that in conjunction will allow us to explore wider SAR space. To this end, we are virtually assessing synthetic derivatives of lamellarins that incorporate additional functionality in the form of alternative HBD, HBA, and ionizable groups at the various positions

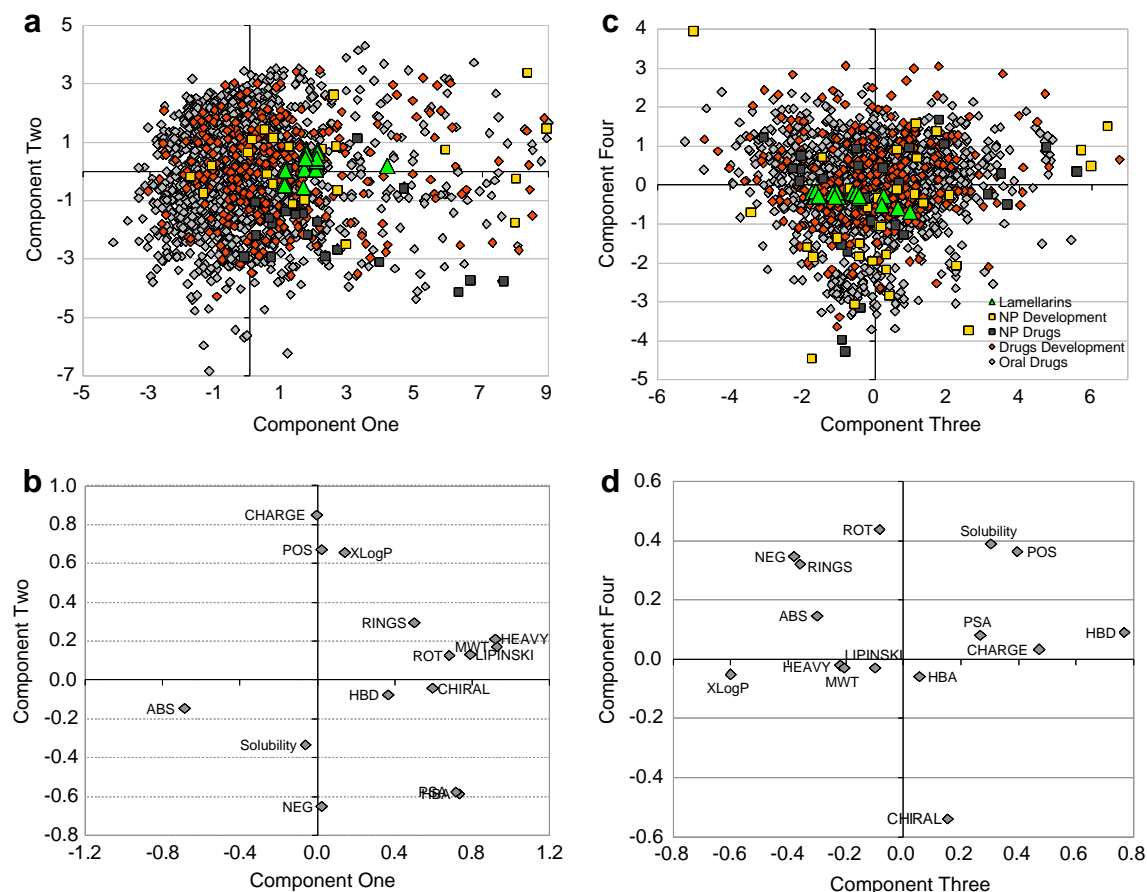


Fig. 1. PCA scores plot (top) and loadings plot (bottom) showing the relationship between the 3 natural product and 2 small molecule drug data sets using a range of computed molecular descriptors. Components 1 to 4 cumulatively described 49%, 63%, 73%, and 80% of the total variance, respectively. Lamellarin A is an outlier on component 1 due to its dramatically higher MWT and PSA, with lower ABS and Solubility scores. Note that 26% of NP drugs (12) and NP Development (9) compounds are excluded as they lie beyond 9 on component 1.

of substitution, as well as subtle changes to the lamellarin core. By virtually synthesizing and screening these molecules for both structural diversity and optimal physicochemical properties, we hope to efficiently explore the SAR of these compounds, while simultaneously making more developable molecules.

3. Conclusion

We have reported experimental and theoretical studies that help to increase our overall understanding of the physicochemical characteristics of lamellarins and how they compare to oral drugs, natural product drugs currently on the market, and new drugs in

development. We have put particular focus on lipophilicity, given it has widespread implications for multiple ADMET parameters, and because it is a difficult parameter to predict *in silico*. Thus, the experimental logP values of 25 lamellarins were determined using an industry standard HPLC method and correlated with the values calculated by different prediction methods. While most software assumes constant increments associated with related substituent changes, we show that this is not the case for these molecules, and that an equivalent substitution at different positions can have dramatically different effects. The discrepancies observed with theoretical methods emphasize the necessity of early experimental assessments to determine the lipophilicity characteristics of a given

Table 5
Mean and standard deviation of the molecular properties used in the profiling exercises.

ID	Oral drugs	NP drugs	Drugs in development	NP in development	Lamellarins
MWT	333.10 ± 121.09	568.20 ± 318.98	502.53 ± 485.41	711.87 ± 454.03	521.68 ± 27.02
OE-xlogP	2.48 ± 2.20	1.39 ± 3.51	2.40 ± 3.78	3.50 ± 3.07	3.40 ± 0.91
PSA	70.55 ± 45.22	176.07 ± 128.62	131.49 ± 209.37	178.88 ± 152.85	124.67 ± 12.56
CHARGE	0.26 ± 0.85	−0.30 ± 1.05	0.17 ± 1.26	0.34 ± 1.04	–
NEG	0.21 ± 0.41	0.48 ± 0.51	0.28 ± 0.45	0.22 ± 0.42	–
POS	0.48 ± 0.50	0.28 ± 0.46	0.46 ± 0.50	0.53 ± 0.51	–
HBA	2.77 ± 2.23	8.17 ± 5.00	4.9 ± 7.49	7.22 ± 5.96	1.06 ± 0.24
HBD	1.90 ± 1.68	4.57 ± 5.19	3.87 ± 8.51	5.09 ± 6.15	2.67 ± 1.14
Chiral centers	1.61 ± 2.73	7.39 ± 5.30	2.85 ± 5.65	7.44 ± 6.55	0.06 ± 0.24
ROT	5.48 ± 3.82	9.96 ± 7.28	11.03 ± 20.35	10.88 ± 12.18	4.88 ± 1.41
RINGS	1.84 ± 0.94	2.11 ± 1.14	2.44 ± 1.32	2.47 ± 1.29	2.00 ± 0.00
N	1791	46	2125	32	33

lead series. Having profiled a number of matched molecular pairs here, we have determined a set of more reliable logP increments (Table 4) which, if combined with logP increments determined for the core template or new templates, may be used to more reliably predict the lipophilicity of new lamellarin analogs. Our strategy moving forward is to use the corrected *in silico* logP estimates to help rationalize SAR, only benchmarking compounds that differ in terms of the template or introduce new functionality, saving material, operator time, and expense.

Lamellarins as a class lie towards the edge of drug-like chemical space. However, lamellarins do not have particularly extreme properties when compared to natural product treatments, either on the market or in development, which suggests they still represent a good starting point for a lead optimization campaign, given their diverse oncological activities. Considering their high MWT, moderate logP, along with low HBD and HBA counts, our strategy to move to more optimal area of chemical space involves the incorporation of additional polar functionality in the form of alternative HBD, HBA, and ionizable groups at the various positions of substitution, as well as larger changes to the lamellarin core to reduce their overall size.

In summary, the research work discussed herein is being used to more effectively direct our medicinal chemistry effort, with additional virtual studies being instigated to assess synthetic derivatives of lamellarins, to enable us to more efficiently explore the SAR of these compounds, while simultaneously making more developable, drug-like molecules.

4. Experimental protocol

4.1. Data sets

Natural sources of lamellarins are not sufficient to supply the quantities of compound required for comprehensive analytical or biological studies. Thus, all compounds which underwent experimental characterization in this study have been synthesized in our laboratory (Table 1). The details of the individual syntheses have been reported elsewhere [57].

The structures of oral marketed drugs [50] and compounds in development [51] were obtained from original quoted sources. The IDs of natural product drugs [4] and natural product compounds in development [3] were taken from the literature references they were reported in. The natural product structures were sourced from PubChem [58]. Compounds were excluded if they failed to calculate molecular descriptors. The full list of compounds used here can be found in the Supplementary Material.

4.2. Experimental methods

Twenty-two naturally-occurring and three unnatural lamellarins, in groups 1 and 2 (Table 1), have been profiled in this study. Their logP values were experimentally determined using an industry standard reversed-phase HPLC method [59,60]. Briefly, the HPLC method entails analyzing each compound on an Agilent 1200 Series LC System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) installed with a C18 column, using an isocratic elution (75% methanol/25% water) for up to 30 min.

The system was calibrated daily by determining the retention times (t_R) of 7 reference compounds with known logP values. Their retention factors (k) were then calculated, and the log k values were regressed against their corresponding literature logP values to generate a calibration curve. Subsequently, the retention factor of each lamellarin was determined using the same chromatographic conditions, and their logP value was then assessed from the

Table 6

Molecular descriptors computed in the study.

ID	Description	Ref.
HEAVY	No. of heavy atom count	[62]
CHIRAL	No. of chiral centers	[62]
HBA	No. of H-bond acceptors	[62]
HBD	No. of H-bond donors	[62]
MWT	Molecular weight	[62]
CHARGE	Net charge	[62]
NEG	No. of negative charges	[62]
POS	No. of positive charges	[62]
RINGS	No. of rings	[62]
ROT	No. of rotatable bonds	[62]
PSA	Polar surface area	[62]
LIPINSKI	No. of Lipinski failures	[33,62]
ABS	Absorption score	[34,62]
Solubility	Solubility score	[62]
OE-xlogP	logP prediction	[62]
MI-xlogP	logP prediction	[64]
FAF-xlogP	logP prediction	[65,66]
ACD LogP	logP prediction	[67]
ClogP	logP prediction	[68]
CSlogP ^a	logP prediction	[69]
AlogP	logP prediction	[70]

^a Crippen's fragmentation scheme used.

calibration curve constructed on the same day. Please refer to the [Supplementary Material](#) for further details.

4.3. Theoretical methods

Twenty-one commonly used molecular descriptors were computed for this study, consisting of 7 different logP predictions and 14 other molecular properties known to be important in defining drug-like property space (Table 6). These descriptors govern the key bulk property characteristics of molecules, and thus, are frequently used in compound profiling exercises [33,35,38,50].

The correlation between experimental and theoretical logP methods was investigated using linear regression in Microsoft Excel 2007 and SPSS 16.0 [61]. The relationship between lamellarins, oral drugs, natural product drugs, and compounds in development was assessed using PCA and OpenEye descriptors [62] only. The PCA model was also generated on oral drugs in SIMCA-P 10.0 [63], using standard settings (*i.e.*, mean centered and scaled descriptors, with the auto-fitting of components).

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF; DBG5180015 to M.C., BRG5180013 to P.P.) is gratefully acknowledged. We also thank Dr. Prasat Kittakoop and Mr. Surasak Prachya (Laboratory of Natural Products, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand) for their generous assistance with the reproducibility studies.

Appendix. Supplementary data

The supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.053](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.053).

References

- [1] J.W.-H. Li, J.C. Vederas, *Science* 325 (2009) 161–165.
- [2] M.S. Butler, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 2141–2153.
- [3] M.S. Butler, *Nat. Prod. Rep.* 25 (2008) 475–516.
- [4] A. Ganesan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 306–317.
- [5] R.J. Andersen, D.J. Faulkner, C.-H. He, G.D. Van Duyne, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5492–5495.

- [6] N. Lindquist, W. Fenical, G.D. Van Duyne, J. Clardy, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 4570–4574.
- [7] A.R. Carroll, B.F. Bowden, J.C. Coll, *Aust. J. Chem.* 46 (1993) 489–501.
- [8] S. Urban, R.J. Capon, *Aust. J. Chem.* 49 (1996) 711–713.
- [9] M.V.R. Reddy, D.J. Faulkner, Y. Venkateswarlu, M.R. Rao, *Tetrahedron* 53 (1997) 3457–3466.
- [10] R.A. Davis, A.R. Carroll, G.K. Pierens, R.J. Quinn, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 419–424.
- [11] J. Ham, H. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 163–166.
- [12] P. Krishnaiah, V.L.N. Reddy, G. Venkataramana, K. Ravinder, M. Srinivasulu, T.V. Raju, K. Ravikumar, D. Chandrasekar, S. Ramakrishna, Y. Venkateswarlu, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 1168–1171.
- [13] S.M. Reddy, M. Srinivasulu, N. Satyanarayana, A.K. Kondapi, Y. Venkateswarlu, *Tetrahedron* 61 (2005) 9242–9247.
- [14] S. Urban, M.S. Butler, R.J. Capon, *Aust. J. Chem.* 47 (1994) 1919–1924.
- [15] S. Urban, L. Hobbs, J.N.A. Hooper, R.J. Capon, *Aust. J. Chem.* 48 (1995) 1491–1494.
- [16] C. Bailly, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 4 (2004) 363–378.
- [17] H. Fan, J. Peng, M.T. Hamann, J.-F. Hu, *Chem. Rev.* 108 (2008) 264–287.
- [18] A.R. Quesada, M.D. García Grávalos, J.L. Fernández Puentes, *Br. J. Cancer* 74 (1996) 677–682.
- [19] M.V.R. Reddy, M.R. Rao, D. Rhodes, M.S.T. Hansen, K. Rubins, F.D. Bushman, Y. Venkateswarlu, D.J. Faulkner, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 1901–1907.
- [20] F. Ishibashi, S. Tanabe, T. Oda, M. Iwao, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 500–504.
- [21] C.P. Ridley, M.V.R. Reddy, G. Rocha, F.D. Bushman, D.J. Faulkner, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 3285–3290.
- [22] M. Facompré, C. Tardy, C. Bal-Mahieu, P. Colson, C. Perez, I. Manzanares, C. Cuevas, C. Bailly, *Cancer Res.* 63 (2003) 7392–7399.
- [23] C. Tardy, M. Facompré, W. Laine, B. Baldeyrou, D. García-Grávalos, A. Francesch, C. Mateo, A. Pastor, J.A. Jiménez, I. Manzanares, C. Cuevas, C. Bailly, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 1697–1712.
- [24] E. Marco, W. Laine, C. Tardy, A. Lansiaux, M. Iwao, F. Ishibashi, C. Bailly, F. Gago, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 3796–3807.
- [25] M. Chittchang, P. Batsomboon, S. Ruchirawat, P. Ploypradith, *ChemMedChem* 4 (2009) 457–465.
- [26] D. Baunbæk, N. Trinklér, Y. Ferandin, O. Lozach, P. Ploypradith, S. Ruchirawat, F. Ishibashi, M. Iwao, L. Meijer, *Mar. Drugs* 6 (2008) 514–527.
- [27] J.L.F. Puentes, D. García Grávalos, A. Rodríguez Quesada, *World Patent WO/1997/001336* (1997).
- [28] J.L.F. Puentes, D. García Grávalos, A. Rodríguez Quesada, *U.S. Patent* 5,852,033 (1998).
- [29] J.L.F. Puentes, D. García Grávalos, A. Rodríguez Quesada, *U.S. Patent* 6,087,370 (2000).
- [30] A PharmaMar's report on <http://www.pharmamar.com/ElementoPrensa.aspx?prensa=247> (Presentations at AACR-NCI-EORTC International Conference demonstrate breadth and depth of PharmaMar's product pipeline, November 2003).
- [31] A PharmaMar's report on <http://www.pharmamar.com/ElementoPrensa.aspx?prensa=239> (PharmaMar presents preclinical data affirming the potential of its main compounds in sarcomas and leukaemias at the AACR Annual Meeting, April 2004).
- [32] A PharmaMar's report on <http://www.pharmamar.com/ElementoPrensa.aspx?prensa=145> (PharmaMar presents 13 posters at AACR highlighting clinical and preclinical development pipeline, April 2005).
- [33] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25.
- [34] Y.C. Martin, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 3164–3170.
- [35] M.P. Gleeson, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 817–834.
- [36] T.I. Oprea, A.M. Davis, S.J. Teague, P.D. Leeson, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41 (2001) 1308–1315.
- [37] M.M. Hann, T.I. Oprea, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 255–263.
- [38] M.S. Lajiness, M. Vieth, J. Erickson, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 7 (2004) 470–477.
- [39] M.P. Gleeson, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 101–112.
- [40] FILTER Manual version 2.0.1 on <http://www.eyesopen.com>.
- [41] Y.-J. Xu, H. Gao, *QSAR Comb. Sci.* 22 (2003) 422–429.
- [42] S. Weaver, M.P. Gleeson, *J. Mol. Graph. Model.* 26 (2008) 1315–1326.
- [43] F. Hollósy, J. Sepródi, L. Örfi, D. Erős, G. Kéri, M. Idei, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 355–363.
- [44] B. Hallgas, T. Patonay, A. Kiss-Szikszai, Z. Dobos, F. Hollósy, D. Erős, L. Örfi, G. Kéri, M. Idei, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 229–235.
- [45] B. Hallgas, Z. Dobos, E. Ösz, F. Hollósy, R.E. Schwab, E.Z. Szabó, D. Erős, M. Idei, G. Kéri, T. Lóránd, *J. Chromatogr. B* 819 (2005) 283–291.
- [46] B. Hallgas, Z. Dobos, A. Agócs, M. Idei, G. Kéri, T. Lóránd, G. Mészáros, *J. Chromatogr. B* 856 (2007) 148–155.
- [47] A.G. Leach, H.D. Jones, D.A. Cosgrove, P.W. Kenny, L. Ruston, P. MacFaul, J.M. Wood, N. Colclough, B. Law, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6672–6682.
- [48] M. Vrecl, M. Uršič, A. Pogačnik, L. Zupančič-Kralj, J. Jan, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204 (2005) 170–174.
- [49] M.H. Abraham, P.P. Duce, D.V. Prior, D.G. Barratt, J.J. Morris, P.J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1989) 1355–1375.
- [50] J.R. Proudfoot, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1087–1090.
- [51] T.I. Oprea, T.K. Allu, D.C. Fara, R.F. Rad, L. Ostopovici, C.G. Bologna, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (2007) 113–119.
- [52] M.C. Wenlock, R.P. Austin, P. Barton, A.M. Davis, P.D. Leeson, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1250–1256.
- [53] T.J. Ritchie, C.N. Luscombe, S.J.F. Macdonald, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 1025–1032.
- [54] R. O'Shea, H.E. Moser, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2871–2878.
- [55] D. Pla, A. Francesch, P. Calvo, C. Cuevas, R. Aligué, F. Albericio, M. Álvarez, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1100–1111.
- [56] D. Pla, M. Martí, J. Farrera-Sinfreu, D. Pulido, A. Francesch, P. Calvo, C. Cuevas, M. Royo, R. Aligué, F. Albericio, M. Álvarez, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1112–1121.
- [57] P. Ploypradith, T. Petchmanee, P. Sahakitpichan, N.D. Litvinas, S. Ruchirawat, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 9440–9448.
- [58] PubChem on <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [59] K. Valko, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1137–1146.
- [60] OECD Guidelines for Testing of Chemicals on http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html.
- [61] SPSS; 16.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA, (2008).
- [62] FILTER; 2.0.1. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM, USA, (2007) on <http://www.eyesopen.com>.
- [63] SIMCA-P; 10.0. Umetrics AB, Umeå, Sweden, (2002) on <http://www.umetrics.com>.
- [64] Molinspiration Property Engine; 2009.01. Molinspiration Cheminformatics, Slovensky Grob, Slovak Republic, (2009) on <http://www.molinspiration.com>.
- [65] FAF-Drugs: Free ADME/tox Filtering. Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale (RPBS), Paris, France, (2006) on <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/Help/FAFDrugs.html>.
- [66] M.A. Miteva, S. Violas, M. Montes, D. Gomez, P. Tuffery, B.O. Villoutreix, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) W738–744.
- [67] ACD/ChemSketch; 12.01. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, (2009) on <http://www.acdlabs.com>.
- [68] Bio-Loom; 1.5. BioByte Corporation, Claremont, CA, USA, (2005) on <http://www.biobyte.com>.
- [69] ChemBioDraw Ultra; 11.0.1. CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, USA, (2007).
- [70] Accelrys® Discovery Studio®; 2.0. Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA, (2007).

Supplementary Material:

Assessing the Drug-likeness of Lamellarins, a Marine-derived Natural Product Class with Diverse Oncological Activities

Montakarn Chittchang, M. Paul Gleeson, Poonsakdi Ploypradith, Somsak Ruchirawat

1. Experimental procedures

Twenty-five lamellarins were synthesized and fully characterized using our established methodologies [1]. All compounds were purified by crystallization, and their structural identity was confirmed by ^1H NMR and ^{13}C NMR techniques, as well as mass spectrometry. The purity of compounds was estimated based on their HPLC traces, the cleanliness of both ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra, as well as their melting point ranges. Only trace amount of impurities, if any, could be detected by HPLC-UV analyses. The purified lamellarins were stored refrigerated at 4°C until use.

Formamide and benzonitrile were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). On the other hand, benzyl alcohol, methyl benzoate, benzophenone, naphthalene, and diphenyl ether were obtained from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland), whereas benzyl benzoate was acquired from BDH Chemical (Poole, England). Additionally, methanol (HPLC grade) was obtained from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain). All chemicals were at least 98% pure and used as received.

The water used to prepare samples and mobile phase for HPLC analyses was purified to achieve a resistivity of 18.2 M Ω -cm using a Milli-Q[®] Nanopure Water Purification System (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

1.1. Experimental determination of logP

Chromatographic logP values of 25 synthesized lamellarins were experimentally determined using reversed-phase HPLC commonly used by pharmaceutical industry [2]. The method employed in this study follows the OECD Test Guideline 117 entitled “Partition Coefficient (*n*-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method” [3]. Briefly, the logP value of each test compound was determined from its retention time, in relation to the calibration curve generated using a set of reference substances with known logP values. In this study, 7 unionized compounds were selected from the list of recommended reference substances in the OECD Guideline to cover a range of logP values between 1.1 and 4.2, including benzyl alcohol, benzonitrile, methyl benzoate, benzophenone, naphthalene, benzyl benzoate, and diphenyl ether.

Each lamellarin sample, as well as a mixture of formamide and 7 reference compounds, were freshly prepared at a concentration of either 0.25 mg·mL⁻¹ (for lamellarins) or 1 mg·mL⁻¹ (for formamide and all the reference compounds) in the mobile phase, containing methanol (75%) and water (25%). Tetrahydrofuran (THF; 25% v/v) was used at a final concentration of 25% v/v as a cosolvent for lamellarins due to their very low solubility in the mixture of methanol and water.

HPLC analyses were performed using an Agilent 1200 Series LC System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), consisting of a quaternary pump, a vacuum degasser, a thermostatted autosampler, a thermostatted column compartment, and a diode array detector. All samples (10 µL each) were separately injected, using an autosampler maintained at 25°C, into a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), which was also maintained at 25°C. The particle size of the stationary phase was 5 µm, and the column dimensions were 4.6 mm I.D. x 250 mm. All compounds were eluted isocratically with a mixture of methanol and water (75:25) at a flow rate of 1

mL·min⁻¹ for up to 30 min. UV detections were performed at 210 nm for formamide, 254 nm for the reference compounds, and 276 nm for lamellarins.

To study the reproducibility of the method, another series of HPLC analyses were performed at ambient temperature using a Waters[®] 600E Multisolvent Delivery System (Waters Corporation, Milford, MA, USA), consisting of a quaternary pump, a vacuum degasser, a controller, and a photodiode array detector. In this case, the samples (10 µL each) were manually injected, through a Rheodyne 7725i analytical injector valve fitted with a 100 µL loop, into a C18 column obtained from Hichrom (Berkshire, England). The stationary phase was Exsil 100-5ODS with a particle size of 5 µm, and the column dimensions were 4.6 mm I.D. x 250 mm. Compound elution and detections were performed as mentioned above.

In both cases, the retention time was determined in duplicate for each compound, and the capacity factor (also called retention factor), k , was then calculated using **Equation 1**.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Eq. (1)}$$

where t_R is the retention time of the test substance, and t_0 is the dead time (i.e., the average time a solvent molecule needs to pass through the column, which was determined using an unretained compound, formamide).

Calibration curves were established once daily by plotting the published logP values of the selected reference compounds as a function of their experimental log k values. The chromatographic logP values of lamellarins were then determined by substituting their experimental log k values into the calibration equation obtained on the same day.

1.2. Experimental reproducibility

As shown in **Table 3** of the main manuscript, the chromatographic logP values of lamellarins could be successfully obtained with very small standard deviations. The

repeatability of the HPLC method used in this study was also confirmed by comparing the logP values obtained using the same HPLC system on five different days. The values of each lamellarin fell within a range of ± 0.03 log unit. This is well below the limit of ± 0.1 log unit, as suggested in the OECD Test Guideline 117 [3] for the logP values derived from repeated HPLC measurements, giving us confidence in our implementation.

To further explore the reproducibility of this method, HPLC analyses of a different batch of twenty-five lamellarins were performed by another analyst using a totally different HPLC system (see Section 1.1 for details). The logP values of fourteen lamellarins showed a variation within ± 0.10 log unit, seven within ± 0.16 log unit, and four within ± 0.26 log unit. These deviations are comparable to those displayed by other *in vitro* determinations.

References

- [1] P. Ploypradith, T. Petchmanee, P. Sahakitpichan, N.D. Litvinas, S. Ruchirawat, J. Org. Chem. 71 (2006) 9440-9448.
- [2] K. Valkó, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 299-310.
- [3] OECD Guidelines for Testing of Chemicals on http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html.

List of Tables

Table S1 Basic statistics were computed in Microsoft Excel 2007 using the following functions or equations.

Statistic	EXCEL Function
Line of best fit slope	=SLOPE(...)
Line of best fit intercept	=INTERCEPT(...)
Minimum value (Min)	=MIN(...)
Maximum value (Max)	=MAX(...)
Standard deviation (SD)	=STDEV(...)
Correlation coefficient squared associated with the line of best fit (r^2)	=RSQ(...) =STEYX(...)
Standard error associated with the line of best fit (SE)	$SE = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left[\sum (y - \hat{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right]}$
Root mean square error (RMSE)	Non-standard function $RMSE = \sqrt{\frac{\sum (x - \hat{y})^2}{n}}$

Table S2 PCA model results. Assessing the relationship between 5 different data sets using a range of computed molecular descriptors (**Table 6** of the main manuscript).

Model 2	R ² X	Q ²
Component 1	0.49	0.45
Component 2	0.63	0.51
Component 3	0.73	0.56
Component 4	0.80	0.60

Table S3 Correlation matrix (r^2 given) for the logP methods investigated here.

Method	Expt. logP	MI-xlogP	OE-xlogP	FAF-xlogP	ACD LogP	ClogP	CSlogP	AlogP
Expt. logP	1.00	-	-	-	-	-	-	-
MI-xlogP	0.83	1.00	-	-	-	-	-	-
OE-xlogP	0.62	0.75	1.00	-	-	-	-	-
FAF-xlogP	0.19	0.46	0.36	1.00	-	-	-	-
ACD LogP	0.02	0.00	0.06	0.17	1.00	-	-	-
ClogP	0.29	0.51	0.67	0.50	0.11	1.00	-	-
CSlogP	0.27	0.28	0.52	0.08	0.57	0.74	1.00	-
AlogP	0.00	0.07	0.00	0.45	0.89	0.00	0.26	1.00

3rd International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia

Organized by

Shanghai Institute of Organic Chemistry, CAS & Department of Chemistry, Zhejiang University



October 19-23, 2008
Hangzhou, China



KAIST



Synthetic development and cytotoxic evaluations of natural and unnatural lamellarins

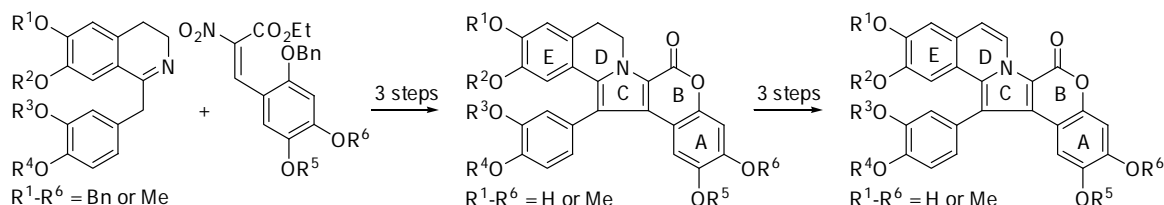
Montakarn Chittchang,* Poonsakdi Ploypradith, Somsak Ruchirawat

Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, and Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand.
E-mail: montakarn@cri.or.th

Our research group has been involved with the synthetic development of lamellarins, a group of marine-derived natural products. Syntheses of the fused pentacyclic lamellarins have been successfully developed. The key features of our convergent synthesis are (1) the highly efficient Michael addition-ring closure (Mi-RC) Grob-type condensation between the benzyldihydroisoquinoline derivatives and the α -nitrocinnamates, (2) the DDQ-mediated benzylic oxidation of the saturated D-rings to the corresponding unsaturated ones, and (3) the minimal use of protecting groups (only the benzyl and acetate). Lamellarins with the saturated D-rings were prepared in good overall yields (45%-71%) over 3 steps from the α -nitrocinnamates, while those with the unsaturated D-rings were obtained in good to excellent overall yields (54%-95%) over 3

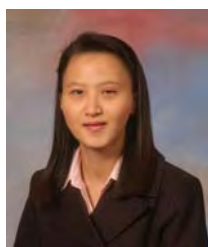
steps from their corresponding precursors with the saturated D-rings.

Twenty-two natural and three unnatural lamellarins were chosen for the cytotoxic evaluations against a panel of cancer cell lines, as well as for the toxicity against a normal cell line. In general, lamellarins with the unsaturated D-rings are more cytotoxic than those with the saturated D-rings. Certain substituents on the aromatic rings of the lamellarin skeleton contribute significantly toward the cytotoxicity. Interestingly, while some lamellarins are broadly cytotoxic against the cancer cell lines under current investigation, some exhibit selective cytotoxicity. In addition, when evaluated against a normal cell line, some of these cytotoxic lamellarins showed only minimal toxicity.



Ploypradith, P.; Petchmanee, T.; Sahakitpichan, P.; Litvinas, N. D.; Ruchirawat, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9440-9448.

Ploypradith, P.; Mahidol, C.; Sahakitpichan, P.; Wongbundit, S.; Ruchirawat, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 866-868.



Montakarn Chittchang (มนทกานต์ จิตต์แจ้ง), b 1975 in Bangkok, Thailand. Chulalongkorn University, Thailand (B.Sc. 1996), University of Missouri-Kansas City, USA (Ph.D. 2004, Prof. Thomas P. Johnston), Pharmacist, Thailand Food and Drug Administration (1996-1999), Research Scientist, Chulabhorn Research Institute (2005-present), Lecturer, Chulabhorn Graduate Institute (2007-present). Research fields: pharmaceuticals, biopharmaceuticals, drug delivery, medicinal chemistry.

Synthetic Development and Cytotoxic Evaluations of Natural and Unnatural Lamellarins



Montakarn Chittchang,^{a,b} Poonsakdi Ploypradith,^{a,b} Somsak Ruchirawat^{a,b,c}

^a Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

^b Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, and the Center of Excellence on Environmental Health, Toxicology and Management of Chemicals (ETM), Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

^c Programme on Research and Development of Synthetic Drugs, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Introduction

Lamellarins are a group of over 35 marine natural products isolated from mollusks, ascidians, and sponges. These compounds have been shown to exhibit promising biological activities, especially their cytotoxicity and multidrug-resistance reversing capability in some cancer cell lines.¹

Due to their low natural abundance, total synthesis of the lamellarins is a pivotal alternative for providing sufficient quantities for further detailed biological evaluation. Our research group has been involved with designing and executing efficient convergent synthetic routes that generate the first group of lamellarins with a saturated D-ring (Figure 1), which can be subsequently converted to their corresponding analogs with an unsaturated D-ring.

The resulting natural and unnatural lamellarins were then tested for their cytotoxic activities against various types of cancers commonly occurring in major tissues and organs to identify potential candidates for further development.

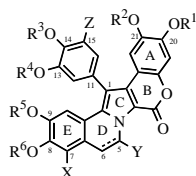


Figure 1: Structures of lamellarins (excluding lamellarins O-R)

R₁-R₆ = H or Me

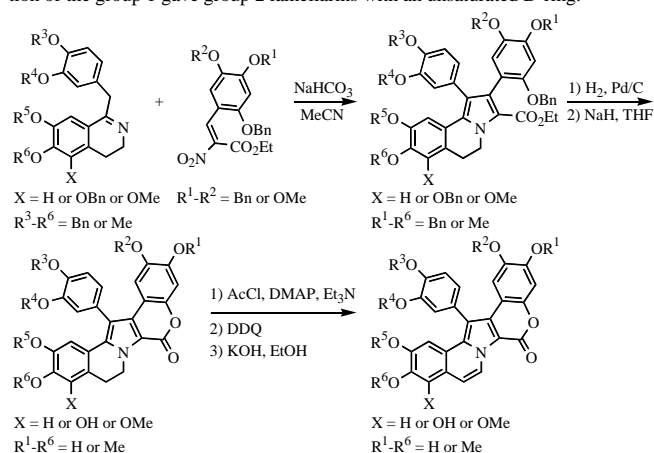
X, Y, Z = H or OH or OMe

Group 1 (with a C5-C6)	Group 2 (with a C5=C6)	Substituents							
		OR ¹	OR ²	Z	OR ³	OR ⁴	OR ⁵	OR ⁶	X
Lamellarin A ^a	-	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe
Lamellarin C	Lamellarin B	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe
Lamellarin γ	Lamellarin D	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin E	Lamellarin X	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin F	Lamellarin ε	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin G	-	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	OH	H
-	Lamellarin H ^a	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	H
Lamellarin I	Lamellarin ζ	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin J	Dehydrolam J ^b	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin K	Lamellarin M	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin L	Lamellarin N	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OH	H
Lamellarin S ^a	-	OH	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H
Lamellarin T	Lamellarin W	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	H
Lamellarin U	Lamellarin α	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	H
Lamellarin V ^a	-	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe
Lamellarin Y	Dehydrolam Y ^b	OH	OMe	H	OMe	OH	OH	OMe	H
Lamellarin Z ^a	-	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H
Lamellarin β ^a	-	OH	OH	H	OMe	OH	OH	OH	H
Lamellarin γ ^a	-	OH	OMe	OMe	-	OMe	OMe	OMe	OH
-	Lamellarin φ ^a	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	H
Dihydrolam η ^{a,c}	Lamellarin η ^c	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	H

^a In the process of synthesis; ^b Unnatural lamellarins; ^c Not tested due to the insolubility in DMSO

Synthetic Development

The synthetic strategy primarily relied on the Grob-type reaction between benzylidenedihydroisoquinoline and α-nitrocinnamate to furnish the pyrrole core. Hydrogenolysis followed by NaH-mediated lactonization provided the group 1 lamellarins. Acetylation, DDQ oxidation, followed by KOH-mediated deacetylation of the group 1 gave group 2 lamellarins with an unsaturated D-ring.²



Scheme 1: Synthetic route for group 1 and group 2 lamellarins

Cytotoxicity Studies

The synthesized lamellarins containing either a saturated or an unsaturated D-ring were tested for their cytotoxicities against 11 cancerous and 1 normal cell lines using standard techniques. The IC₅₀ values obtained were then utilized to perform SAR studies by comparing the cytotoxic activities of several pairs of lamellarin structures that differ only in each structural component being explored.

Our studies indicated that a few lamellarins with an unsaturated D-ring are potential candidates for anticancer agents, in terms of their cytotoxic potency, selectivity, and relatively low toxicity towards normal cells (MRC-5).

The results from our SAR studies indicated that there appear to be four important structural elements that determine the cytotoxic activity of lamellarins to cancer cells (Figure 2). Interestingly, the less cytotoxic group of lamellarins with an unsaturated D-ring all contain only a C5-C6 double bond and a C20 hydroxyl group. On the other hand, the more potent compounds also contain another hydroxyl group at either C7 or C8 towards the other end of the molecule.

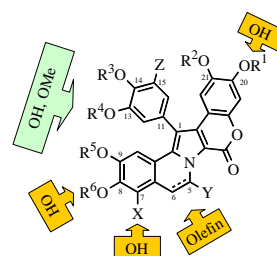
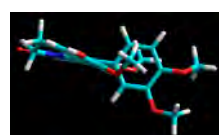


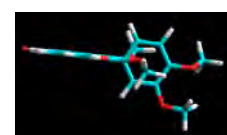
Figure 2: Important structural elements in the lamellarin skeleton

Molecular Modeling

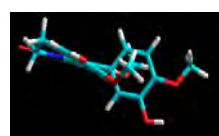
Hyperchem 7.5 was employed and showed that C5-C6 double bond is important for ensuring the planarity of the molecule and aligning substituents around the periphery of the lamellarin skeleton, especially those on the E-ring. The group 1 lamellarins are twisted, while those in group 2 are planar. The planarity was inferred from the dihedral angle θ about C6a-C10a-C4a-C1.



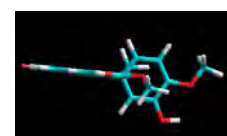
Lamellarin J; θ = 164.7°



Dehydrolam J; θ = 179.9°



Lamellarin L; θ = 164.8°



Lamellarin N; θ = 179.8°

Figure 3: Energy-minimized structures of selected lamellarins with dihedral angle (θ)

Conclusion

A general synthetic route for both group 1 and group 2 lamellarins has been successfully developed. In addition, the results from our SAR studies helped verify the important structural elements in the lamellarin skeleton, and could be employed for the structure optimization of these compounds.

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF) and the National Research Council of Thailand (NRCT) is gratefully acknowledged.

References

- Reviews: a) Bailly, C. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2004**, *4*, 363-378; b) Fan, H.; Peng, J.; Hamann, M. T.; Hu, J.-F. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 264-287.
- Ploypradith, P.; Petchmanee, T.; Sahakitpichan, P.; Litvinas, N. D.; Ruchirawat, S. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 9440-9448.



Asian Core Program Lectureship Award

Chittchang, Montakarn

(Chulabhorn Research Institute, Thailand)

PB2

Synthetic development and cytotoxic evaluations
of natural and unnatural lamellarins

This is to certify that you have been selected to receive the Lectureship Award of Asian Core Program, "Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia". You will be invited as a one-week lecturer from a member country/region in the next academic year.

Coordinator (Japan)

Toshio Nishikawa

October 22, 2008

Asian CORE Program Lectureship Tour in Japan
(February 28th – March 7th, 2010)

Montakarn Chittchang, Ph.D.

Chulabhorn Research Institute & Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok, Thailand

Lecture Title: Medicinal Chemistry Research on Lamellarin Natural Products

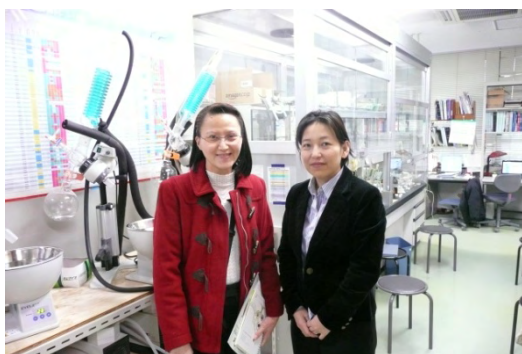
Host: Prof. Hidenori Watanabe (The University of Tokyo)

Institutions Visited: Osaka University, Nagoya University, The University of Tokyo, and Tohoku University

Feb 28 (Sun): - Arrival at the Kansai International Airport (KIX), Osaka
- City tour, visit to the Osaka Castle, and dinner with Dr. Sarah Goretta from Prof. Michio Murata's group



Mar 1 (Mon): - Visit to Osaka University (**Host:** Prof. Michio Murata)
- Discussion and lunch with Prof. Michio Murata
- Discussions with Prof. Yasuhiro Kajihara and Prof. Yukari Fujimoto
- Lecture, followed by dinner with Prof. Michio Murata, Prof. Yasuhiro Kajihara, and Prof. Yukari Fujimoto



Mar 2 (Tue): - Travel to Nagoya by Shinkansen
- Visit to Nagoya University (**Host:** Prof. Makoto Ojika)
- Discussion with Prof. Kumi Yoshida
- Lunch with Prof. Makoto Ojika and Prof. Kumi Yoshida

- Discussions with Prof. Toshio Nishikawa and his group (Prof. Atsuo Nakazaki, Dr. Masaatsu Adachi, and Dr. Sarin Tadtong)
- Lecture, followed by dinner with Prof. Makoto Ojika, Prof. Kumi Yoshida, Prof. Toshio Nishikawa, Prof. Atsuo Nakazaki, Dr. Masaatsu Adachi, and Dr. Masaki Kuse



- Mar 3 (Wed):**
- Visit to the Toyota Commemorative Museum of Industry and Technology, followed by lunch with Dr. Masaki Kuse and his students
 - Visit to the Nagoya Castle, guided by Dr. Masaki Kuse
 - Travel to Tokyo by Shinkansen
 - Dinner with Prof. Hidenori Watanabe



- Mar 4 (Thu):**
- Visit to The University of Tokyo (**Host:** Prof. Hidenori Watanabe)
 - Discussions with Prof. Kyoko Nozaki and Prof. Motomu Kanai
 - Campus tour and lunch with Prof. Hidenori Watanabe's graduate students
 - Discussions with Prof. Masayuki Inoue, Prof. Shohei Sakuda, and Prof. Hidenori Watanabe
 - Lecture, followed by dinner with Prof. Watanabe and Prof. Ken Ishigami



- Mar 5 (Fri):**
- Travel to Sendai by Shinkansen
 - Visit to Tohoku University (**Host:** Prof. Hidetoshi Tokuyama)
 - Discussion with Prof. Yoshiharu Iwabuchi
 - Lunch with Prof. Hidetoshi Tokuyama's graduate students
 - Discussions with Prof. Hiroyuki Isobe, Prof. Naoki Kanoh, and Dr. Masahito Yoshida
 - Lecture, followed by discussions with Prof. Hidetoshi Tokuyama and his group (Dr. Kentaro Okano and Dr. Kenji Sugimoto)
 - Dinner with Prof. Hidetoshi Tokuyama, Prof. Hiroyuki Isobe, Dr. Waka Nakanishi, and Dr. Kentaro Okano



- Mar 6 (Sat):**
- Visit to Matsushima Bay and Zuiganji Temple, followed by lunch with Dr. Kenji Sugimoto and Ms. Shiori Nonaka
 - Visit to Kyogamine Cemetery of the DATE family and the Aoba Castle, followed by dinner with Dr. Kenji Sugimoto and Ms. Shiori Nonaka



- Mar 7 (Sun):**
- Travel to Tokyo by Shinkansen
 - Departure from the Narita International Airport (NRT), Tokyo

Acknowledgements:

This lectureship tour was truly beneficial for me, both scientifically and culturally. I would like to express my gratitude to all the host professors, especially Prof. Hidenori Watanabe, for their warm hospitality and kind arrangement during my visit to their institution. I also would like to thank the Japan Society for Promotion of Sciences (JSPS) and the National Research Council of Thailand (NRCT) for their generous financial support for my trip.

The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-4)

Organized by

Chulabhorn Research Institute (CRI), Chulabhorn Graduate Institute (CGI), and
The National Research Council of Thailand (NRCT)



November 29–December 3, 2009

Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand



Structural Modification of Lamellarins to Optimize Their Cytotoxic Activities and Drug-like Properties

Montakarn Chittchang^{1,*} M. Paul Gleeson,² Poonsakdi Ploypradith,¹ Somsak Ruchirawat¹

¹Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, and Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand.

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Phaholyothin Road, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

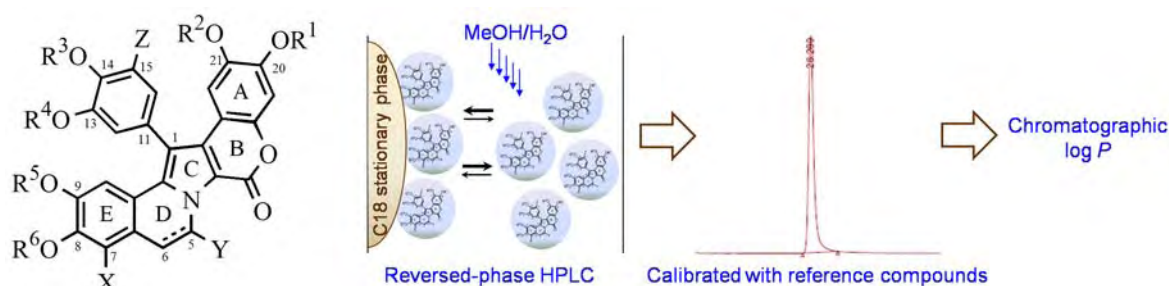
E-mail: montakarn@cri.or.th

Lamellarins are marine natural products with diverse biological activities. Our group has previously synthesized a series of natural and unnatural lamellarins¹, and evaluated their cytotoxic activity against a panel of cancer cell lines.² The contribution of various substituents on the lamellarin skeleton to the overall anticancer activity was also determined by structure-activity relationship (SAR) studies.²

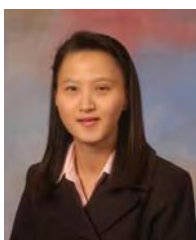
A major drawback of lamellarins is their poor aqueous solubility and high lipophilicity. Therefore, while optimizing the cytotoxicity of these compounds, we also evaluated the effect of structural modification on their physico-chemical properties, by chromatographically determining their octanol/water partition coefficient ($\log P$), which is one of the key molecular descriptors in

drug development. The correlation between the experimental $\log P$ data and the values predicted *in silico* was also evaluated.

Our results indicate that the structural complexity of lamellarins makes it rather difficult to reliably predict their $\log P$ values using most currently available calculators, and thus, necessitate experimental assessments of the lipophilicity characteristic of these compounds. Additionally, structural modification of the substituents around the pentacyclic core has a larger effect on the $\log P$ values, when compared the same modification on the orthogonal ring. The $\log P$ increments determined for each modification can be used along with the experimental $\log P$ values of the parent compounds to design lamellarin analogs with more drug-like properties.



1. Ploypradith, P.; Petchmanee, T.; Sahakitpichan, P.; Litvinas, N. D.; Ruchirawat, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9440-9448.
2. Chittchang, M.; Batsomboon, P.; Ruchirawat, S.; Ploypradith, P. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 457-465.



Montakarn Chittchang (มณฑกานต์ จิตต์แจ้ง), b 1975 in Bangkok, Thailand. Chulalongkorn University, Thailand (B.Sc. 1996), University of Missouri-Kansas City, USA (Ph.D. 2004, Prof. T. P. Johnston), Pharmacist, Thailand Food and Drug Administration (1996-1999), Research Scientist, Chulabhorn Research Institute (2005-present), Lecturer, Chulabhorn Graduate Institute (2007-present). Research Fields: Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Drug Delivery, Medicinal Chemistry.

Structural Modification of Lamellarins to Optimize Their Cytotoxic Activity and Drug-like Properties



Montakarn Chittchang,^{a,b} M. Paul Gleeson,^c Poonsakdi Ploypradith,^{a,b} Somsak Ruchirawat^{a,b,d}

^a Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

^b Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, and the Center of Excellence on Environmental Health,

Toxicology and Management of Chemicals (ETM), Vibhavadee-Rangsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Phaholyothin Road, Bangkok 10900, Thailand

^d Programme on Research and Development of Synthetic Drugs, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand



Introduction

Lamellarins are marine natural products with diverse biological activities. Our group has previously synthesized a series of natural and unnatural lamellarins (Figure 1 & Table 1),¹ and evaluated their cytotoxic activity against a panel of cancer cell lines.² The contribution of various substituents on the lamellarin skeleton to the overall anticancer activity was also determined by structure-activity relationship studies.²

Major drawbacks of lamellarins are their poor aqueous solubility and high lipophilicity. Therefore, while optimizing the cytotoxicity of these compounds, it is also important to assess their drug-like properties. We particularly focused on their octanol/water partition coefficient (logP) as it is one of the key molecular descriptors in drug development. Chromatographic logP values of lamellarins were determined and correlated with the values predicted *in silico*. Additionally, the effects of structural modifications on their logP values were also evaluated.

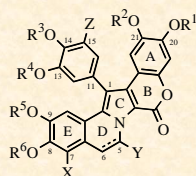


Figure 1: Structures of lamellarins (excluding lamellarins O-R)

R₁-R₆ = H or Me

X, Y, Z = H or OH or OMe

Table 1: Substituents around the lamellarin core

Group 1 (with a C5–C6)	Group 2 (with a C5–C6)	Substituents								
		OR ¹	OR ²	Z	OR ³	OR ⁴	OR ⁵	OR ⁶	X	Y
Lamellarin A ^a	-	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin C	Lamellarin B	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin χ	Lamellarin D	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OH	H	H
Lamellarin E	Lamellarin X	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin F	Lamellarin ε	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin G	-	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	OH	H	H
-	Lamellarin H ^a	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	H	H
Lamellarin I	Lamellarin ζ	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin J	Dehydrolam J ^b	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OH	H	H
Lamellarin K	Lamellarin M	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	OMe	OH	H
Lamellarin L	Lamellarin N	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin S ^a	-	OH	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin T	Lamellarin W	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	H
Lamellarin U	Lamellarin α	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	H	H
Lamellarin V ^a	-	OH	OMe	H	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	OH
Lamellarin Y	Dehydrolam Y ^b	OH	OMe	H	OMe	OH	OH	OMe	H	H
Lamellarin Z ^a	-	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	OH	H	H
Lamellarin β ^a	-	OH	OH	H	OMe	OH	OH	OH	H	H
Lamellarin γ ^a	-	OH	OMe	OMe	-	OMe	OMe	OMe	OH	H
-	Lamellarin φ ^a	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	OMe	H
Dihydrolam η ^b	Lamellarin η	OH	OMe	H	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H

^a Synthesis in progress; ^b Unnatural lamellarins

Determination of Molecular Properties

A range of commonly used molecular descriptors were first computed. These molecular properties govern the key bulk property characteristics of molecules, and thus, are known to be important in defining drug-like property space. The results indicated that lamellarins do not have particularly extreme molecular properties so these compounds still represent a good starting point for further optimization towards a more optimal area of physicochemical parameter space.

Table 2: Selected molecular properties of lamellarins and other product classes

Properties	Lamellarins	Oral Drugs	Natural Product Drugs	Drugs in Development	Natural Products in Development
MWt	521.68 ± 27.02	333.10 ± 121.09	568.20 ± 318.98	502.53 ± 485.41	711.87 ± 454.03
OE-xlogP	3.40 ± 0.91	2.48 ± 2.20	1.39 ± 3.51	2.40 ± 3.78	3.50 ± 3.07
PSA	124.67 ± 12.56	70.55 ± 45.22	176.07 ± 128.62	131.49 ± 209.37	178.88 ± 152.85
CHARGE	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.85	-0.30 ± 1.05	0.17 ± 1.26	0.34 ± 1.04
NEG	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.41	0.48 ± 0.51	0.28 ± 0.45	0.22 ± 0.42
POS	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.50	0.28 ± 0.46	0.46 ± 0.50	0.53 ± 0.51
HBA	1.06 ± 0.24	2.77 ± 2.23	8.17 ± 5.00	4.90 ± 7.49	7.22 ± 5.96
HBD	2.67 ± 1.14	1.90 ± 1.68	4.57 ± 5.19	3.87 ± 8.51	5.09 ± 6.15
Chiral Centers	0.06 ± 0.24	1.61 ± 2.73	7.39 ± 5.30	2.85 ± 5.65	7.44 ± 6.55
ROT	4.88 ± 1.41	5.48 ± 3.82	9.96 ± 7.28	11.03 ± 20.35	10.88 ± 12.18
RINGS	2.00 ± 0.00	1.84 ± 0.94	2.11 ± 1.14	2.44 ± 1.32	2.47 ± 1.29
N	33	1791	46	2125	32

Assessment of Drug-likeness

Principal components analysis (PCA) was also used in conjunction with the computed physicochemical parameters to evaluate the relationship between lamellarin natural products with the other four product classes. As illustrated in Figure 2, lamellarins as a class occupy a position towards the edge of drug-like chemical space, as defined by the two most important components.

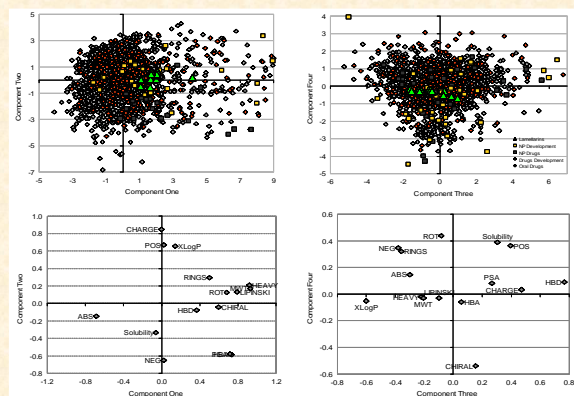


Figure 2: PCA scores plot (top) and loadings plot (bottom)

Determination of logP Values

The logP value is one of the molecular properties that are most difficult to predict *in silico*, especially for compounds with complicated structure. Therefore, we experimentally determined the logP values of 25 lamellarins using an industry standard HPLC method, and subsequently evaluated their correlation with the values predicted by 7 different logP calculators. The results are listed in Table 3. In addition, the effects of structural modifications on the logP values were also evaluated, as shown in Table 4.

Table 3: Summary of the experimental and calculated logP values of 25 lamellarins

ID	Mean	Min	Max	SD	RMSE	r ² (slope/intercept/SE)
Experimental logP	3.66	2.59	5.19	0.71	-	-
MI-xlogP	4.16	3.57	4.94	0.40	0.62	0.83 (1.61/-3.02/0.30)
OE-xlogP	3.75	2.87	4.99	0.65	0.44	0.62 (0.86/0.44/0.44)
FAF-xlogP	4.23	3.61	4.84	0.42	0.85	0.19 (0.73/0.57/0.65)
ACD LogP	4.99	4.08	6.32	0.59	1.57	0.02 (0.16/2.85/0.71)
ClogP	4.65	3.96	5.59	0.41	1.15	0.29 (0.93/-0.68/0.61)
CSlogP	3.91	3.65	4.32	0.20	0.66	0.27 (1.89/-3.74/0.61)
AlogP	5.11	4.71	5.62	0.27	1.64	0.00 (-0.13/4.30/0.72)

Table 4: Effects of key structural modifications on the logP values of lamellarins

Modification	# of cpds (pairs)	Δ logP (log unit)							
		Experimental logP	MI-xlogP	OE-xlogP	FAF-xlogP	ACD LogP	ClogP	CSlogP	AlogP
C5-C6 → C5=C6	12	+0.70 ± 0.11	+0.58	+0.56	+0.78	-0.71	+0.41	+0.02	-0.44
5-H → 5-OH	2	N/A	-0.66	-0.55	-0.47	-1.30	-1.23	-0.25	-0.60
7-H → 7-OH	4	-0.20 ± 0.04	-0.09	-0.66	-0.41	-0.83	-0.77	-0.39	-0.24
7-H → 7-OMe	4	+0.77 ± 0.10	+0.19	+0.08	-0.22	-0.30	-0.38	-0.13	-0.01
7-OH → 7-OMe	6	+0.98 ± 0.14	+0.28	+0.74	+0.19	+0.53	+0.39	+0.26	+0.23
8-OH → 8-OMe	4	+0.60 ± 0.03	+0.31	+0.74	+0.05	+0.77	+0.41	+0.27	+0.23
9-OH → 9-OMe	2	+0.75 ± 0.04	+0.30	+0.74	+0.05	+0.77	+0.42	+0.27	+0.22
13-OH → 13-OMe	8	+0.34 ± 0.01	+0.31	+0.74	+0.05	+0.62	+0.47	+0.26	+0.23
14-OH → 14-OMe	6	+0.29 ± 0.04	+0.30	+0.74	+0.05	+0.70	+0.47	+0.26	+0.22
20-OH → 20-OMe	1	N/A	+0.31	+0.74	-0.11	+0.51	+0.15	+0.26	+0.22

Conclusion

In this study, we assessed drug-likeness, with particular focus on lipophilicity, of lamellarins. The results can be used as a guide for structural optimization of these compounds, aiming for more potent, developable, and drug-like molecules.

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund (TRF) and the National Research Council of Thailand (NRCT) is gratefully acknowledged.

References

- Ploypradith, P.; Petchmanee, T.; Sahakitpichan, P.; Litvinas, N. D.; Ruchirawat, S. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9440-9448.
- Chittchang, M.; Batsonboon, P.; Ruchirawat, S.; Ploypradith, P. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 457-465.



Asian Core Program Lectureship Award

Montakarn Chittchang

(Chulabhorn Research Institute, Thailand)

PB-34

**Structural Modification of Lamellarins to Optimize Their Cytotoxic Activities
and Drug-like Properties**

This is to certify that the aforementioned person has been selected by the coordinator of China to receive a Lectureship Award under the Asian Core Program. The awarded person is invited to deliver a series of lectures during the one-week visit to the member country/region in the next academic year.

Coordinator (China)

December 2, 2009