



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารต้านมะเร็งจากอนุพันธ์ชนิดใหม่ของเรนีอีราไมซินและ
การศึกษากลไกต้านมะเร็งด้วยสารเคมีจากเตตราไฮโดรไอโซควิโนลีน

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ และคณะ

พฤษภาคม 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการสารต้านมะเร็งจากอนุพันธ์ชนิดใหม่ของเรนีอีราไมซินและการศึกษากลไกต้าน
มะเร็งด้วยสารเคมีจากเตตราไฮโดรไอโซควิโนลีน

ผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ
2. อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	2
Abstract.....	3
Executive summary	4
วัตถุประสงค์.....	7
วิธีทดลอง.....	8
1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงิน <i>Xestospongia</i> sp.	8
2. การเตรียมสารสกัดหยาบ.....	8
3. การแยกสารบริสุทธิ์ renieramycin M.....	8
4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ renieramycin M ด้วยกระบวนการทางเคมี.....	10
5. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด 292 และ H460 ด้วยเทคนิค MTT assay	12
ผลการทดลอง	13
1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงิน <i>Xestospongia</i> sp.	13
2. การเตรียมสารสกัดหยาบ.....	14
3. การแยกสารบริสุทธิ์ renieramycin M.....	15
4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ ของ renieramycin M ด้วยกระบวนการทางเคมี	17
5. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์	19
6. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H292 และ H460 ด้วยเทคนิค MTT assay	24
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	26
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	26
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.....	28
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	28
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์.....	28
อื่นๆ.....	28
ภาคผนวก.....	29

1. Chemistry of Renieramycins. 17. A New Generation of Renieramycins: Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells, Chamni, S.; Sirimangkalakitti, N.; Chanvorachote, P; Saito, N.; Suwanborirux, K. J. Nat. Prod., 2017, 80, 1541–1547.
2. Supakarn Chamni, Natchanun Sirimangkalakitti, Pithi Chanvorachote, Naoki Saito, and Khanit Suwanborirux; Structure-activity Relationship (SAR) Study of Renieramycin and Ester Derivatives as New Anti-cancer Agents from Marine Bistertrahydro isoquinolinequinone Alkaloids; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 43; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; วันที่ 17-19 ตุลาคม 2560 (Oral presentation)
3. Supakarn Chamni, Natchanun Sirimangkalakitti, Pithi Chanvorachote, Naoki Saito, and Khanit Suwanborirux; Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents Against Non-small-cell Lung Cancer Cells; การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 17 ระหว่างวันที่ 10 – วันศุกร์ที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2561 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอัมบีซีรีส์อร์ท จังหวัดเพชรบุรี (Oral presentation)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980175

ชื่อโครงการ: สารต้านมะเร็งจากอนุพันธ์ชนิดใหม่ของเรนีอีราไมซินและการศึกษากลไกต้านมะเร็งด้วยสารเคมีจากเตตราไฮโดรไอโซควิโนลีน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภกาญจน์ ชำนิ

อีเมล: supakarn.c@pharm.chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

เรนีอีราไมซิน เอ็ม คือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลในกลุ่มบิสเตราไฮโดรไอโซควิโนลีนควิโนแอลคาลอยด์ สามารถสกัดแยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงินสกุลเซสโทสปองเจียซึ่งพบบริเวณหมู่เกาะสิลัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย ในโครงการวิจัยอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสารเรนีอีราไมซิน เอ็มได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นหลายกลุ่มประกอบด้วย 22-O-อะมิโน เอสเตอร์, 5-O-อะมิโน เอสเตอร์ และ 5-O-เอซิล เอสเตอร์ ของเรนีอีราไมซิน เอ็ม และ 5-O-เอซิล เอสเตอร์ ของเรนีอีราไมซิน ที่ สารอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นจำนวนมากกว่า 20 โครงสร้าง และมีหมู่แทนที่เอสเตอร์ที่มีโครงสร้างหลากหลายในตำแหน่งคาร์บอน 5 และ 22 นั้น พบว่ามีผลผลิตการสังเคราะห์ที่ดีในระดับปานกลางจนถึงระดับดีมาก การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H292 และ H460 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่กระจายของเซลล์ได้อย่างรุนแรงนั้น ทำได้โดยวิเคราะห์การตายของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT ซึ่งพบว่าสารอนุพันธ์แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด H292 และ ชนิด H460 ได้ในระดับนาโนโมลาร์ และเป็นที่น่าสนใจว่าสารอนุพันธ์ 22-O-เอสเตอร์ สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้รุนแรงกว่าสารอนุพันธ์ 5-O-เอสเตอร์ สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดสูงสุด คือ สารอนุพันธ์ 22-O-เอซิล-N-Boc-L-ไกลซีน เอสเตอร์ ของเรนีอีราไมซิน เอ็ม (IC_{50} 3.56 nM) ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด H292 ได้รุนแรงกว่าเรนีอีราไมซิน เอ็มถึง 6 เท่า (IC_{50} 24.56 nM) และสารอนุพันธ์ 5-O-เอเซทิล เอสเตอร์ ของเรนีอีราไมซิน ที่ (IC_{50} 1.69 nM) ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ได้รุนแรงกว่าเรนีอีราไมซิน เอ็มถึง 6 เท่า (IC_{50} 6.50 nM) ดังนั้น สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กได้ถูกพัฒนาขึ้นจากสารต้นแบบเรนีอีราไมซิน เอ็ม ในอนาคตจะมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองและศึกษาทางคลินิก เพื่อพัฒนาอนุพันธ์ชนิดใหม่ของสารเรนีอีราไมซินเป็นสารต้านมะเร็งต่อไป

คำหลัก : เตตราไฮโดรไอโซควิโนลีนควิโนน, เรนีอีราไมซิน เอ็ม, ฟองน้ำสีน้ำเงิน, ความเป็นพิษต่อเซลล์, มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

Abstract

Project Code : MRG5980175

Project Title : Anticancer from a novel series of renieramycin derivatives and study of anticancer mechanism of tetrahydroisoquinoline

Investigator : Assistant Prof. Supakarn Chamni, Ph.D.

E-mail Address : supakarn.c@pharm.chula.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract:

Renieramycin M is a marine bistetrahydroisoquinolinequinone alkaloid, which is isolated from the Thai blue sponge *Xestospongia* sp. found in the Si-chang Island of Thailand. In this work, the new series of renieramycin M derivatives were synthesized including 22-O-amino ester, 5-O-amino ester and 5-O-acyl-ester of renieramycin M and 5-O-acetyl ester of renieramycin T. More than 20 compounds with different ester substituents at carbon 5 and 22 positions were obtained in moderate to high yields. The evaluation of non-small-cell lung cancer cell cytotoxicity against aggressively metastatic H292 and H460 cell lines were analyzed by the anti-proliferative MTT assay. All renieramycin derivatives exhibited cytotoxicity toward H292 and H460 lung cancer cell lines in nanomolar concentrations. Interestingly, 22-O-ester derivative was possessed more cytotoxic activity than that of 5-O-ester derivative. The most toxic candidates in these series were 22-O-acyl-N-Boc-L-glycine ester of renieramycin M (IC₅₀ 3.56 nM), which showed 6 folds more toxic than that of renieramycin M (IC₅₀ 24.56 nM) toward H292 cells and 5-O-acetyl ester renieramycin T (IC₅₀ 1.69 nM), which showed 6 folds more toxic than that of renieramycin M (IC₅₀ 6.50 nM) toward H460 cells. Thus, the more potent non-small-cell lung cancer cell cytotoxic agents have been developed by using renieramycin M as a lead compound. The new renieramycin derivatives will be further studies and developed as potential anti lung cancer candidates for animal and clinical study.

Keywords : Tetrahydroisoquinolinequinone, renieramycin M, blue sponge, cytotoxicity, non-small-cell lung cancer cell

Executive summary

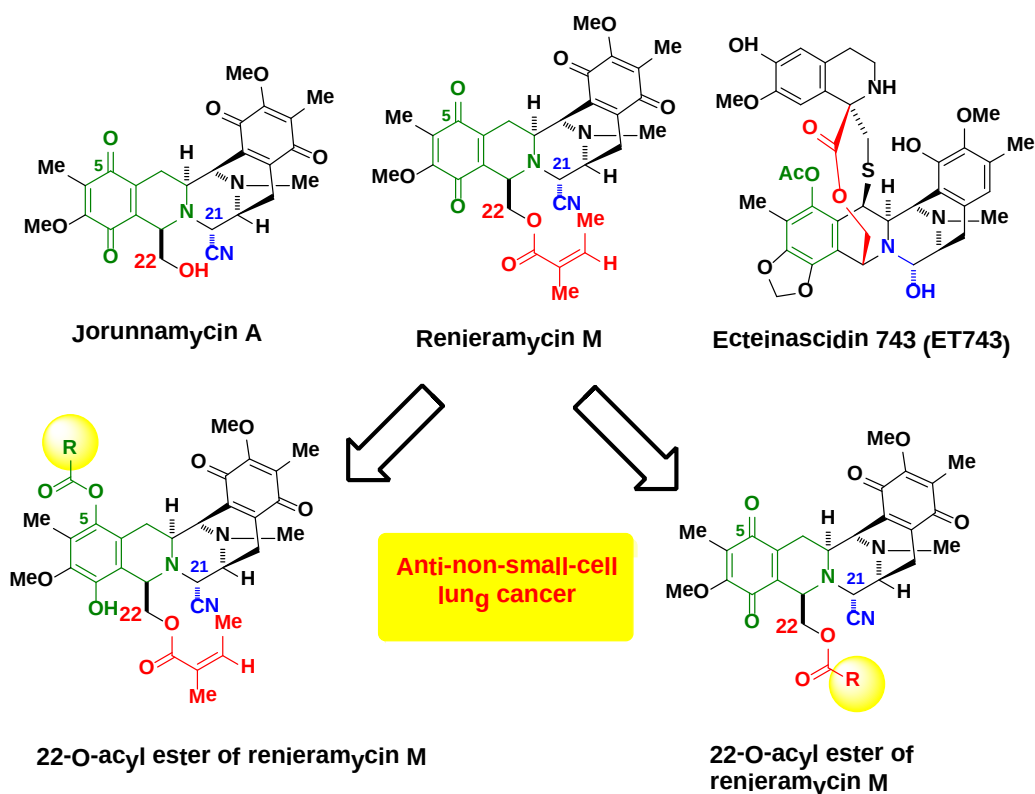
สาร renieramycin M เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม tetrahydroisoquinolinequinone alkaloid และเป็นสารสำคัญที่พบมากในฟองน้ำสีน้ำเงิน สกุล *Xestospongia* sp. ซึ่งพบการเติบโตตามธรรมชาติที่บริเวณหมู่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย โดยการสกัดแยกสาร renieramycin M จากฟองน้ำสีน้ำเงิน จะต้องใช้กระบวนการที่มีความจำเพาะ คือ การนำฟองน้ำมาบดในสารละลาย 10 mM โพแทสเซียมไฮยาไนด์ (KCN) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มี pH 7 เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม renieramycin และได้สาร renieramycin M ที่มีหมู่แทนที่ไฮยาไนด์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 21 เป็นสารหลัก¹ จากข้อมูลรายงานการวิจัยพบว่าสาร renieramycin M และสารอนุพันธ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอสเทอร์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 22 สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด² และสามารถต่อต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กได้ดีโดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านการกระตุ้น p53-dependent pathway³ ดังนั้น renieramycin M จึงถูกใช้สารต้นแบบในการศึกษาฤทธิ์และกลไกการต้านมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก โดยการพัฒนายาอนุพันธ์ทางเคมีที่มีโครงสร้างใหม่และศึกษากลไกการต้านมะเร็งปอดของสารอนุพันธ์ที่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์รุนแรงกว่าสารต้นแบบ^{4,5} เพื่อการพัฒนาสารต้านมะเร็งปอดในอนาคต

ในโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงินจำนวน 2 ครั้ง คือ ในเดือนพฤษภาคมและตุลาคม 2560 ได้ตัวอย่างฟองน้ำรวมทั้งสิ้น 36 กิโลกรัม (น้ำหนักสด หรือ 6 กิโลกรัม น้ำหนักแห้ง) และสกัดแยกสาร renieramycin M ได้ทั้งสิ้น 784.1 mg คิดเป็นร้อยละ 0.01% เมื่อเทียบกับน้ำหนักฟองน้ำแห้ง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.002 เมื่อเทียบกับน้ำหนักฟองน้ำเปียก ซึ่งทำให้ได้ปริมาณสาร renieramycin M น้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ แต่มีปริมาณของสารในกลุ่ม renieramycins อื่นๆ มากขึ้น เนื่องจากความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมในการเติบโตของฟองน้ำตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงปรับกระบวนการทดลองโดยเน้นการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ด้วยกระบวนการเคมีในรูปแบบที่หลากหลาย แทนการสังเคราะห์ renieramycin probe ตามที่ได้เสนอแผนการทดลองไว้ก่อนหน้านี้

สาร renieramycin M ที่เตรียมได้จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยทำปฏิกิริยา aluminium hydride reduction เพื่อสังเคราะห์สาร jorunnamycin A ทำปฏิกิริยา palladium catalyzed hydrogenation เพื่อสังเคราะห์สาร bishydroquinone ทำปฏิกิริยา photo reaction เพื่อสังเคราะห์สาร renieramycin T และทำปฏิกิริยา esterification เพื่อสังเคราะห์ 22-O-acyl-ester และ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M ได้ผลผลิตเป็นสารอนุพันธ์ใหม่ที่มีหมู่แทนที่เอสเทอร์บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 22 ที่มีความหลากหลาย เช่น amino ester, cinamoyl ester และ benzoyl ester เป็นต้น จากการทดลองทางเคมีสามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ใหม่ได้ทั้งสิ้นมากกว่า 20 โครงสร้าง และได้ผลผลิตการสังเคราะห์ในระดับปานกลางถึงดีมาก

อนุพันธ์ของ renieramycin M ที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมด ถูกนำไปศึกษา cytotoxicity ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H290 และ H460 และพบว่าอนุพันธ์ใหม่ทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดทั้ง 2 ชนิดในระดับนาโนโมลาร์ และสารอนุพันธ์ที่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ได้รุนแรงที่สุดคือ 22-O-acyl-N-Boc-L-glycine ester of renieramycin M (IC₅₀ 3.56 nM) เมื่อศึกษาในเซลล์ H292 และ 5-O-acetyl ester renieramycin T (IC₅₀ 1.69 nM) เมื่อศึกษาในเซลล์ H460 จากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดทั้ง 2 ชนิด นำไปสู่การสรุปแนวโน้มของฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดได้ว่าหมู่แทนที่ตำแหน่ง 5-acyl ester มีความสำคัญต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์จะลดลงเมื่อ

หมู่แทนที่ตำแหน่ง 5-acyl ester มีขนาดใหญ่ขึ้น และอนุพันธ์กลุ่ม 22-O-acyl-ester แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่ากลุ่ม 5-O-acyl-ester จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาสารกลุ่มนี้เพื่อใช้ต้านเซลล์มะเร็งปอดในอนาคต และเป็นที่น่าสนใจว่าอนุพันธ์ของ renieramycin T แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดได้ดี เนื่องจากมีหมู่ dioxmethylene ring ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 ซึ่งทำให้มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับ trabectedin (ET743) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งเต้านมและมีโครงสร้างทางเคมีอยู่ในกลุ่ม tristetrahydroisoquinoline alkaloid การพัฒนาสารต้านมะเร็งจากสารเคมีกลุ่ม tetrahydroisoquinolinequinone alkaloid โดยใช้ renieramycin M เป็นสารต้นแบบจึงมีความน่าสนใจศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต ตัวอย่างเช่น ศึกษาสารอนุพันธ์ใหม่ของ renieramycin T ทั้งทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสาร renieramycins เนื่องจากมีโครงสร้างของ quinone ซึ่งคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ atovaquone ศึกษากลไกการต้านมะเร็งด้วย DNA alkylation เนื่องจากสาร renieramycin M มีโครงสร้างคล้ายกับ ecteinascidin 743 ซึ่งเป็นยาเคมีที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม การใช้กระบวนการเคมีในการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อช่วยเพิ่ม selectivity กับมะเร็ง และลดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เช่น การเชื่อมต่อกับ vitamin บางชนิด ศึกษาและพัฒนา antibody drug conjugate (ADC) โดยใช้สาร renieramycin เป็นสารออกฤทธิ์ (payload) เป็นต้น เพื่อให้มีข้อมูลวิจัยทั้งทางเคมีและชีววิทยาที่มากเพียงพอต่อการศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารในกลุ่ม renieramycin เพื่อต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิก



เอกสารอ้างอิง

1. Suwanborirux K, Amnuoypol S, Plubrukarn A, Pummangura S, Kubo A, Tanaka C, et al. Chemistry of renieramycins. Part 3. isolation and structure of stabilized renieramycin type derivatives possessing antitumor activity from Thai sponge *Xestospongia* species, pretreated with potassium cyanide. *Journal of natural products*. 2003;66(11):1441-6.
2. Charupant K, Daikuhara N, Saito E, Amnuoypol S, Suwanborirux K, Owa T, et al. Chemistry of renieramycins. Part 8: synthesis and cytotoxicity evaluation of renieramycin M-jorunnamycin A analogues. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(13):4548-58.
3. Halim H, Chunhacha P, Suwanborirux K, Chanvorachote P. Anticancer and antimetastatic activities of Renieramycin M, a marine tetrahydroisoquinoline alkaloid, in human non-small cell lung cancer cells. *Anticancer research*. 2011;31(1):193-201.
4. Sirimangkalakitti N, Chamni S, Charupant K, Chanvorachote P, Mori N, Saito N, et al. Chemistry of Renieramycins. 15. Synthesis of 22-O-Ester Derivatives of Jorunnamycin A and Their Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Journal of natural products*. 2016;79(8):2089-93.
5. Cheun-Arom T, Chanvorachote P, Sirimangkalakitti N, Chuanasa T, Saito N, Abe I, et al. Replacement of a quinone by a 5-O-acetylhydroquinone abolishes the accidental necrosis inducing effect while preserving the apoptosis-inducing effect of renieramycin M on lung cancer cells. *Journal of natural products*. 2013;76(8):1468-74.

วัตถุประสงค์

1. ศึกษากระบวนการเคมีในการสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของสารกลุ่มเรโนอิราไมซิน
2. ศึกษาฤทธิ์และกลไกการต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H290 และ H460

วิธีทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.

เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. จากเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ที่ความลึก 3-5 เมตร จากระดับน้ำทะเล ทำความสะอาดโดยการล้างด้วยน้ำทะเลและกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น เปลือกหอย ปลาตาเปาะ และหนอนทะเล จากนั้นนำฟองน้ำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ หนาประมาณ 2 เซนติเมตร บรรจุลงในถุงเก็บตัวอย่าง ถุงละ 1 กิโลกรัม และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำฟองน้ำออกตู้แช่แข็งและรอให้มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงทำการเตรียมสารสกัดหยาบด้วยกระบวนการ ดังต่อไปนี้

- 2.1 บั่นฟองน้ำกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 7.0 โดยผสมในอัตราส่วน ฟองน้ำ: phosphate buffer เท่ากับ 3:2
- 2.2 เติม 10% KCN-phosphate buffer จนมีความเข้มข้นของ KCN เท่ากับ 10 mM คนทุกๆ 30 นาที จนครบ 5 ชั่วโมง
- 2.3 เติม methanol ในอัตราส่วน 1:1 คนให้เข้ากัน
- 2.4 แช่สกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator เพื่อกำจัด methanol จะได้สารสกัดเข้มข้นที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ แช่สกัดซ้ำทั้งหมด 4 รอบ จะได้สารสกัดเข้มข้น 1-4
- 2.5 นำสารสกัดเข้มข้นมากำจัดไขมันด้วยกระบวนการ solvent extraction กับ hexane ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง
- 2.6 นำสารสกัดเข้มข้นที่กำจัดไขมันแล้ว มากำจัดน้ำด้วยกระบวนการ solvent extraction กับ ethyl acetate ปริมาตร 250 มิลลิลิตร สกัดซ้ำทั้งหมด 4 รอบ
- 2.7 นำสารละลาย ethyl acetate ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ 1-4
- 2.8 ตรวจสอบหาสาร renieramycin M ในสารสกัดหยาบ 1-4 โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography โดยใช้ ethyl acetate:hexane ในอัตราส่วน 1:1 เป็น mobile phase
- 2.9 นำสารสกัดหยาบที่คาดว่าจะมีปริมาณสาร renieramycin M มากที่สุด โดยพิจารณาจากการทดสอบด้วย TLC ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทาง chromatography ได้แก่ quick column chromatography และ flash column chromatography

3. การแยกสารบริสุทธิ์ renieramycin M

3.1 การแยกสารด้วย quick column chromatography

การแยกสารด้วยเทคนิค quick column chromatography คือการแยกสารผ่าน silica gel ซึ่งทำหน้าที่เป็น stationary phase และบรรจุใน column ที่มีลักษณะกว้างและสั้น ทำให้สารเคลื่อนที่ผ่านซิลิกาเจลอย่างรวดเร็วได้ผลเป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ เทคนิคนี้เหมาะกับการแยกสารสกัดที่มีปริมาณมาก มีรายละเอียดวิธีการทดลอง ดังนี้

3.1.1 นำสารสกัดหยาบบดผสมกับ kieselguhr ในสัดส่วน 1:3 จนได้ผงร่วนซุย

- 3.1.2 เตรียม slurry ของ silica gel ใน hexane 500 มิลลิลิตร โดยใช้ silica gel ในสัดส่วน 1:100 เท่าของปริมาณสารสกัดหยาบ และควรมีความสูงของ silica gel ประมาณ 4 เซนติเมตร
- 3.1.3 ทำการบรรจุ slurry ของ silica gel ลงใน column ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้สักครู่ให้ silica gel เริ่มอัดตัวแน่น จากนั้นใช้ aspirator pump ดูด hexane ออกให้ silica gel แห้ง และมีผิวหน้าเรียบสม่ำเสมอ
- 3.1.4 บรรจุสารสกัดหยาบที่บดผสมกับ kieselguhr ไว้ด้านบนซิลิกาเจล ปิดทับผิวหน้าด้วยสำลี
- 3.1.5 ชะสารสกัดให้เคลื่อนตัวผ่าน silica gel ด้วย mobile phase ที่เหมาะสม ได้แก่ สารละลาย ethyl acetate:hexane ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 โดยปริมาตร และสารละลาย methanol:ethyl acetate ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 50 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยใช้ mobile phase ความเข้มข้นละ 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 รอบ เก็บส่วนสกัดที่ได้ในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.1.6 นำสารละลายไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator
- 3.1.7 ตรวจสอบหาสาร renieramycin M ในส่วนสกัดด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ ethyl acetate:hexane ในอัตราส่วน 1:1 เป็น mobile phase จากนั้นรวมส่วนสกัดที่มีสาร renieramycin M ไว้ด้วยกัน จะได้สารกึ่งบริสุทธิ์

3.2 การแยกสารด้วย flash column chromatography

นำส่วนสกัดที่มีสาร renieramycin M ซึ่งได้จากการแยกด้วย quick column chromatography มาแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย flash column chromatography โดยสารจะเคลื่อนที่ผ่าน silica gel ที่บรรจุใน column ที่มีลักษณะแคบและยาว และใช้ความดันจาก air pump ในการชะสารตัวอย่างผ่าน silica gel ทำให้สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้ มีรายละเอียดวิธีการทดลอง ดังนี้

- 3.2.1 เตรียม slurry ของ silica gel ใน hexane 100 มิลลิลิตร โดยใช้ silica gel ในสัดส่วน 1:30 เท่าของปริมาณสารกึ่งบริสุทธิ์
- 3.2.2 บรรจุ silica gel ลงใน column ให้มีส่วนสูงประมาณ 30 เซนติเมตร และบรรจุทรายละเอียดปิดทับลงบนผิวหน้าของคอลัมน์
- 3.2.3 ชะ silica gel ด้วย hexane จนไม่มีฟองอากาศเหลืออยู่
- 3.2.4 ละลายสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วย ethyl acetate โดยใช้ ethyl acetate ให้มีปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถละลายสารตัวอย่างได้ทั้งหมด
- 3.2.5 บรรจุสารตัวอย่างลงใน column และชะด้วย mobile phase ที่เหมาะสม ได้แก่ สารละลาย ethyl acetate:hexane ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 โดยปริมาตร และสารละลาย methanol:ethyl acetate ความเข้มข้นร้อยละ 20, 50 ตามลำดับ โดยใช้ mobile phase ความเข้มข้นละ 150 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดขวดละ 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร
- 3.2.6 ตรวจสอบหาสาร renieramycin M ในส่วนสกัดด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ ethyl acetate:hexane ในอัตราส่วน 1:1 เป็น mobile phase จากนั้นรวมส่วนสกัดที่มีสาร renieramycin M ไว้ด้วยกัน
- 3.2.7 นำส่วนสกัดไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จนได้ renieramycin M บริสุทธิ์
- 3.2.8 ตรวจสอบโครงสร้างของ renieramycin M ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy

3.3 การตกผลึก

สาร renieramycin M สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการตกผลึกด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ซึ่งจะให้ผลึกเป็นเหลี่ยม มีสีส้ม

4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ renieramycin M ด้วยกระบวนการทางเคมี

4.1 สังเคราะห์อนุพันธ์ 22-O-acyl-ester ของ renieramycin M

ละลายสาร renieramycin M จำนวน 100 มิลลิกรัม ใน ethyl acetate ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 20% Pd(OH)₂/C จำนวน 50.0 มิลลิกรัม ประกอบลูกโป่งบรรจุแก๊ส hydrogen เข้ากับ reaction flask กักอากาศใน reaction flask ด้วยการเป่าด้วย แก๊ส hydrogen และกวนสารละลายอย่างรุนแรง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่ความดันบรรยากาศ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นกรอง suspension ผ่าน celite และชะด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และ chloroform ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวมสารละลายทั้งหมดและระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สาร bishydroquinone ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนต่อไป โดยไม่ต้องผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์

ละลายสาร bishydroquinone จำนวน 80 มิลลิกรัม ใน tetrahydrofuran ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องภายใต้สภาวะเฉื่อยด้วยแก๊ส Argon จากนั้นเติม 0.5 M AlH₃ ใน tetrahydrofuran ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร โดยเติมอย่างช้า ๆ ใช้เวลาเติม 10 นาที กวนสารละลายที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ chloroform ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ อุ้มนสารละลายด้วยอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น 20 นาที เติม sodium sulfate ปริมาตร 10 กรัม และประกอบลูกโป่งบรรจุแก๊ส oxygen เข้ากับ reaction flask กักอากาศใน reaction flask ด้วยการเป่าด้วย แก๊ส oxygen และกวนสารละลายอย่างรุนแรง เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเพื่อกำจัดของแข็ง นำสารละลายมาสกัดด้วย chloroform ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวมสารละลายทั้งหมดและระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จนได้สารละลายปริมาตร 20 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายอิ่มตัวของ sodium carbonate ในน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ sodium chloride ในน้ำ ตามลำดับ จากนั้นแยกของเหลวชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทำให้น้ำด้วย sodium sulfate กรองสารละลายอีกครั้ง และทำให้แห้งด้วย rotary evaporator จะได้ crude product ซึ่งจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกสารด้วยเทคนิค flash column chromatography โดยใช้ 30% - 90% ethyl acetate:hexane เป็น mobile phase จะได้สาร jorunnamycin A ที่บริสุทธิ์ ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง

ละลายสาร jorunnamycin A 10 มิลลิกรัม ใน dichloromethane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องภายใต้สภาวะเฉื่อยด้วยแก๊ส Argon เติมสาร 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (ECDI) จำนวน 5.5 มิลลิกรัม และ N, N'-4-dimethylaminopyridine (DMAP) 3.5 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสาร acylating agent ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา esterification อย่างสมบูรณ์ และกวนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายมาสกัดด้วย chloroform ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวมของเหลวชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ล้างด้วยสารละลายอิ่มตัวของ sodium chloride ในน้ำ และนำของเหลวชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทำให้น้ำด้วย sodium sulfate กรองสารละลายและทำให้แห้งด้วย rotary evaporator จะได้ crude product ซึ่งจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกสารด้วยเทคนิค flash column chromatography โดยใช้ 40% - 90% ethyl acetate:hexane เป็น mobile phase จะได้สารอนุพันธ์ 22-O-acyl-ester ของ

renieramycin M ตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy

4.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M

ละลายสาร renieramycin M จำนวน 40 มิลลิกรัม ใน ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 20% Pd(OH)₂/C จำนวน 20.0 มิลลิกรัม ประกอบลูกโป่งบรรจุแก๊ส hydrogen เข้ากับ reaction flask กำจัดอากาศใน reaction flask ด้วยการเป่าด้วย แก๊ส hydrogen และกวนสารละลายอย่างรุนแรง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่ความดันบรรยากาศ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นกรอง suspension ผ่าน celite และชะด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และ chloroform ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวมสารละลายทั้งหมดและระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สาร bishydroquinone ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนต่อไป โดยไม่ต้องผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์

ละลายสาร bishydroquinone 10 มิลลิกรัม ใน dichloromethane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส กวนสารละลายอย่างต่อเนื่องภายใต้สภาวะเฉื่อยด้วยแก๊ส Argon เติมสาร 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (ECDI) จำนวน 5.5 มิลลิกรัม และ *N,N*-4-dimethylaminopyridine (DMAP) 3.5 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสาร acylating agent ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา esterification อย่างสมบูรณ์ และกวนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายมาสกัดด้วย chloroform ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง รวมของเหลวชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ล้างด้วยสารละลายอิ่มตัวของ sodium chloride ในน้ำ และนำของเหลวชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากำจัดน้ำด้วย sodium sulfate กรองสารละลายและทำให้แห้งด้วย rotary evaporator จะได้ crude product ซึ่งจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกสารด้วยเทคนิค flash column chromatography โดยใช้ 40% - 90% ethyl acetate:hexane เป็น mobile phase จะได้สารอนุพันธ์ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M ตรวจสอบโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy

4.3 การสังเคราะห์สาร 5-O-acetyl renieramycin T

ละลายสาร renieramycin M 10 มิลลิกรัม ด้วย CH₂Cl₂ 150 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่ภาชนะด้วยแก๊สไนโตรเจน และกวนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer เปิดคอมไฟฟลูออเรสเซนซ์ 18 วัตต์ ส่องที่ขวดก้นกลม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทดสอบผลด้วย TLC (ethyl acetate:hexane 2:3) จากนั้นระเหยแห้งสารละลายและทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไปโดยไม่ต้องผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์

เติมสารละลาย pyridine 2 มิลลิลิตร และ Ac₂O 15 ไมโครลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกยาง กวนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทดสอบผลด้วย TLC (ethyl acetate:hexane 2:3) โดยเมื่อจุดสารละลายลงบนแผ่น TLC แล้ว ให้นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง high vacuum pump ประมาณ 15 นาที เพื่อระเหย pyridine ก่อนจุ่มลงใน TLC tank หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม กวนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer เป็นเวลา 5 นาที

แยกสารให้บริสุทธิ์โดยนำสารละลายไป partition ใน separatory funnel ด้วย dichloromethane ไซเก็บชั้น dichloromethane (ชั้นล่าง) ทำซ้ำ 3 รอบ รวมชั้น dichloromethane เข้าด้วยกันในขวดรูปชมพู่ เติมผง magnesium sulfate 3 ช้อนชา หากผง magnesium sulfate จับกันเป็นก้อน ให้เติมเพิ่มลงไปอีกจนไม่จับกัน จากนั้นกรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วรองด้วยสำลี ชะด้วย dichloromethane ทดสอบด้วย TLC แล้ว

เติม hexane ลงในขวดกันกลมจนเกิดการตกตะกอน นำไปประเหยแห้งได้สาร 5-O-acetyl renieramycin T ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย เทคนิค flash column chromatography โดยใช้ 30% ethyl acetate:hexane เป็น mobile phase จะได้สาร 5-O-acetyl renieramycin T ที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบโครงสร้าง ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy

5. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด 292 และ H460 ด้วยเทคนิค MTT assay

5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กชนิด H292 และ H460

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดชนิด H292 และ H460 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีองค์ประกอบของ fetal bovine serum ร้อยละ 10 L-alanyl-L-glutamine dipeptide 2 มิลลิโมล/ลิตร penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร streptomycin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ amphotericin B 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.2 ทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่างโดยใช้วิธี MTT assay

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด H292 และ H460 จำนวน 10,000 เซลล์/หลุม ใน microplate เพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well plate) บ่มในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 และ 500 นาโนโมลาร์ และอาหารที่มี DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (กลุ่มควบคุม) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว จึงเติมสารละลาย 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ในที่มืด หลังจากนั้นเติม DMSO 100 ไมโครลิตร/หลุม เพื่อละลายผลึก formazan เนื่องจากวิธี MTT คือ การวัดการทำงานของเอนไซม์ mitochondrial reductase ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีชีวิต เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็นผลึกของ formazan ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังนั้นความเข้มของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิต จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate reader) ค่าที่ได้ถูกนำมาคำนวณหาความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ตามสมการด้านล่าง และนำค่าร้อยละความสามารถในการมีชีวิตไปสร้างกราฟหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาร เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (IC₅₀) ต่อไป

$$\text{ร้อยละความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับสาร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

5.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการทดสอบความเป็นพิษของสาร renieramycin M และอนุพันธ์ ต่อเซลล์มะเร็งปอดทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ทดสอบด้วย doxorubicin โดยข้อมูลของงานวิจัยจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งสถิติที่ใช้คือ one-way ANOVA โดยอาศัยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22 และกำหนดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า p -value < 0.05

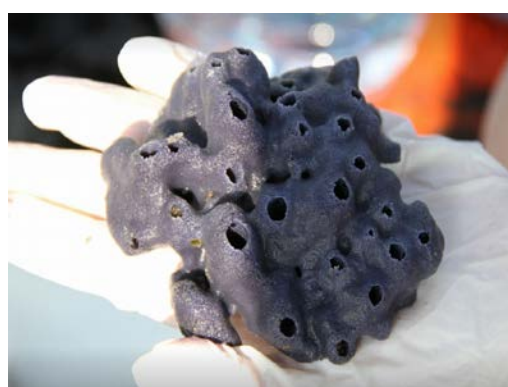
ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.

เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. จากเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จำนวน 2 ครั้ง คือ พฤษภาคม พ.ศ. 2560 และตุลาคม พ.ศ. 2560 ได้ฟองน้ำรวมทั้งสิ้น 36 กิโลกรัม



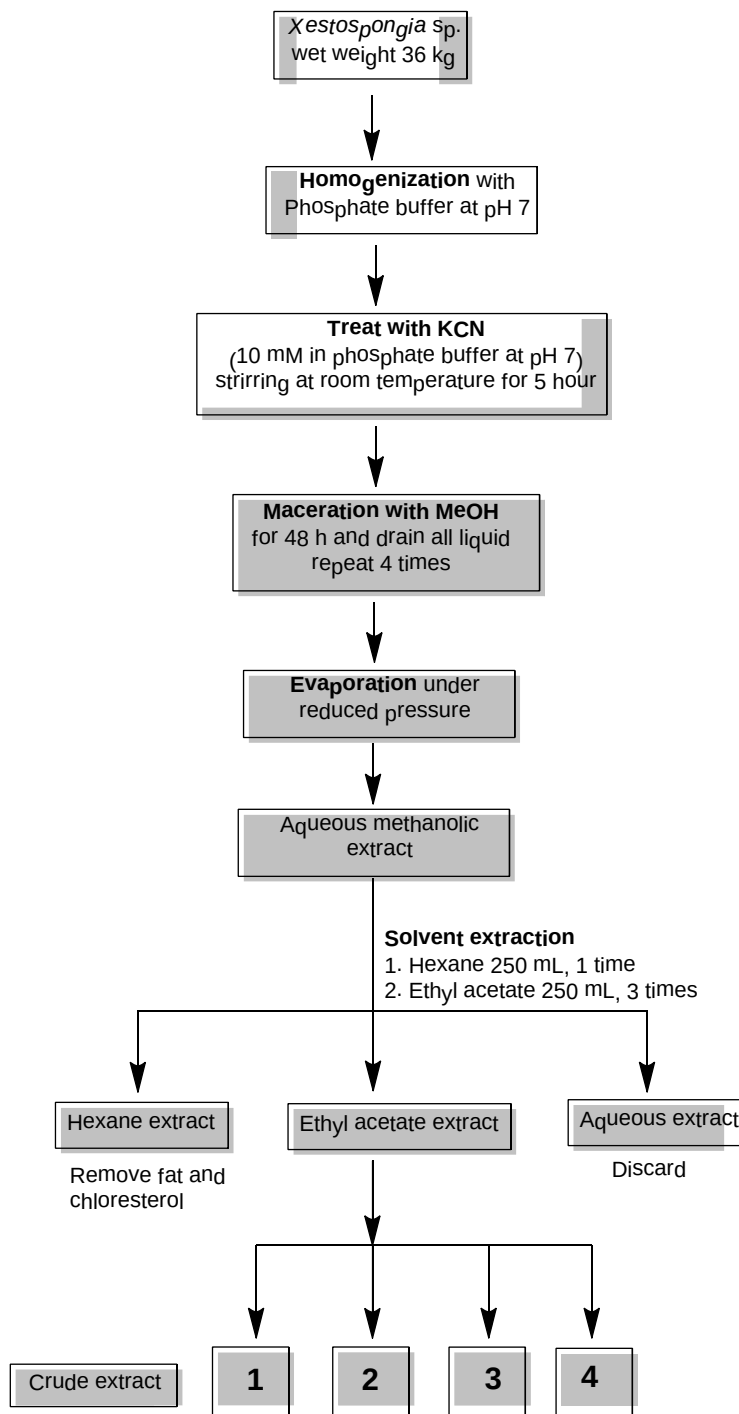
รูปที่ 1 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงินจากกระชังเพาะเลี้ยง ในเดือนพฤษภาคม 2560 ให้ความอนุเคราะห์ในการดำเนินการเก็บตัวอย่างโดย รศ. ภก. ดร. อนุชิต พลับรูการ



รูปที่ 2 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงินจากธรรมชาติที่ความลึก 3-5 เมตร ในเดือนตุลาคม 2560

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ

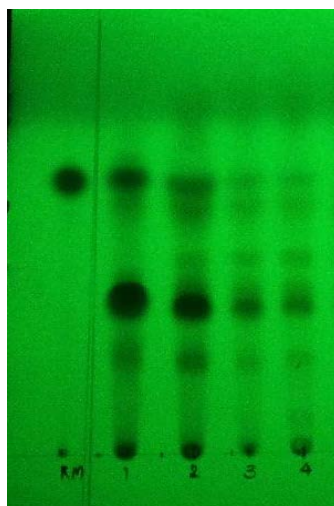
การเตรียมสารสกัดหยาบประกอบด้วยการปั่นฟองน้ำใน phosphate buffer (pH 7) จากนั้นทำปฏิกิริยากับสารละลาย potassium cyanide (KCN) และแช่สกัดใน methanol จากนั้นทำการระเหย methanol และสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบ เพื่อนำไปแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค chromatography ต่อไป



แผนภาพ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.

ตารางที่ 1 น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน

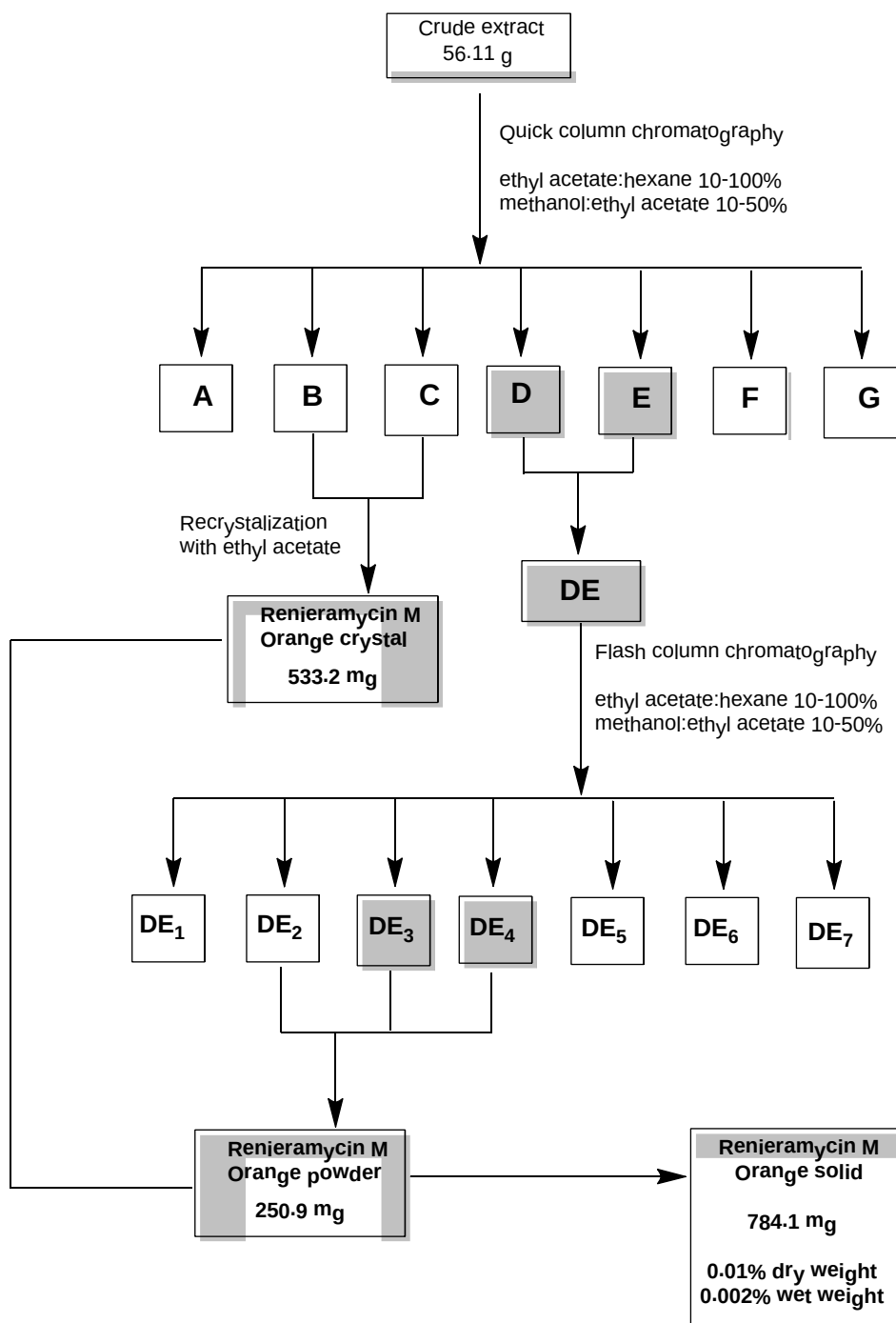
สารสกัดหยาบ (Crude extract)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)
1	14.42
2	41.69
3	14.05
4	108.58



รูปที่ 3 ผล TLC (ethyl acetate:hexane = 1:1) ของสารสกัดหยาบ 1-4 จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. เทียบกับสาร renieramycin M (RM)

3. การแยกสารบริสุทธิ์ renieramycin M

จากผล TLC สารสกัดหยาบ 1 และ 2 มีสาร renieramycin M จึงรวมสารสกัดหยาบทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ได้สารสกัดหยาบทั้งสิ้น 56.11 กรัม ทำการแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ด้วย quick column และ flash column chromatography ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ renieramycin M จากเทคนิค chromatography และ recrystallization ได้รวมทั้งสิ้น 784.1 mg จากนั้นนำสาร renieramycin M ไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยการวิเคราะห์ ^1H และ ^{13}C NMR spectroscopy พบว่าได้ NMR spectrum สอดคล้องกับข้อมูลที่เคยรายงานมาก่อนหน้า

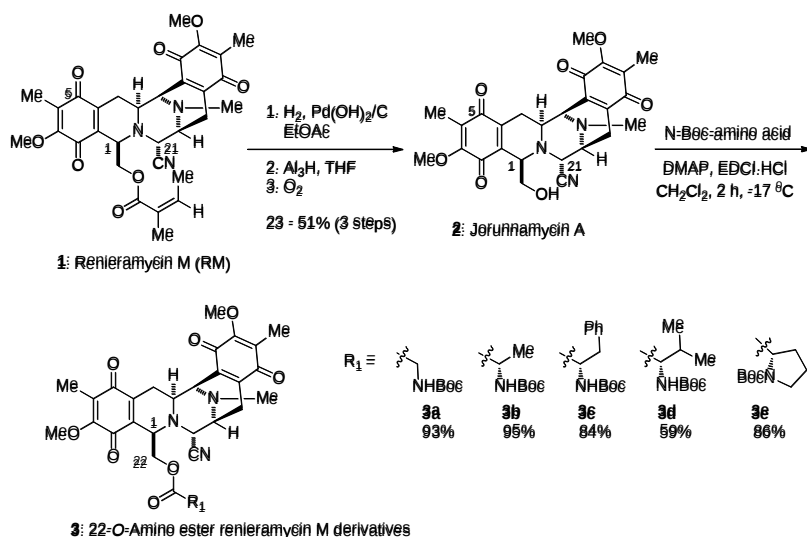


แผนภาพ 2 การแยกสารบริสุทธิ์ renieramycin M

4. การสังเคราะห์อนุพันธ์ ของ renieramycin M ด้วยกระบวนการทางเคมี

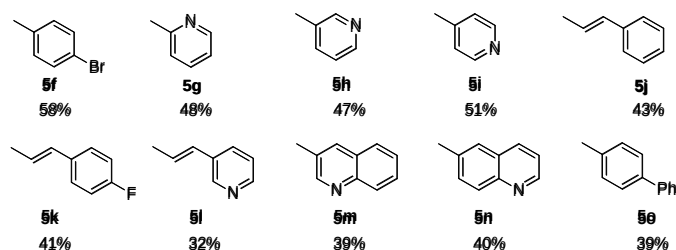
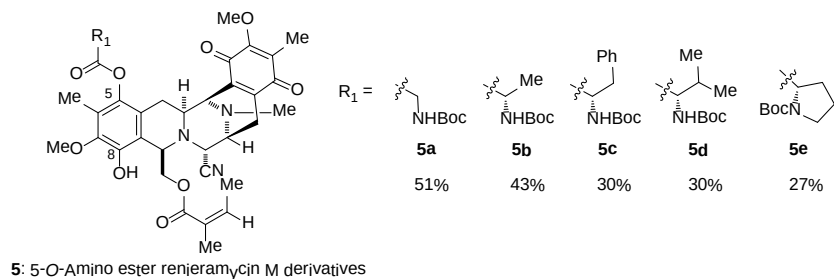
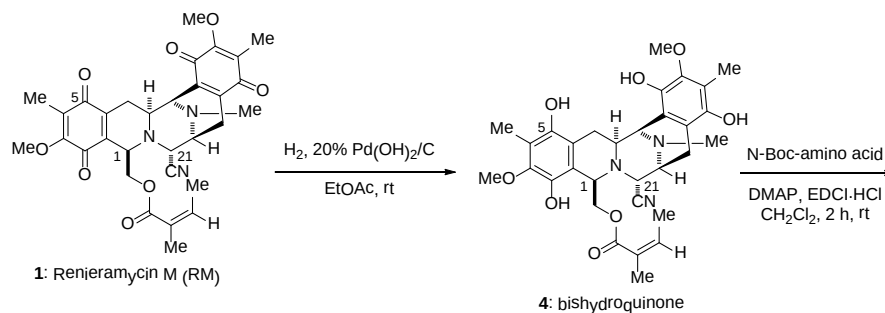
สังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดใหม่ของ renieramycin M ด้วยกระบวนการทางเคมี โดย renieramycin M ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์อนุพันธ์ทางเคมี โดยได้ทำการทดลองดังต่อไปนี้

4.1 สังเคราะห์อนุพันธ์ 22-O-acyl-N-Boc-amino ester ของ renieramycin M ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนทางเคมีที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ การกำจัดหมู่แทนที่ agelate และการเติมหมู่ aminoester โดยในขั้นตอนแรก renieramycin M (1) จะถูก reduce ด้วย $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ เพื่อเปลี่ยนหมู่ quinone ให้เป็น hydroquinone จากนั้น agelyl ester จะถูก reduce ด้วย AlH_3 ได้ผลผลิตเป็น alcohol 2 ซึ่งมีโครงสร้างเหมือนกับ jorunnamycin A ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติ จากนั้น จึงนำ alcohol 2 ไปทำปฏิกิริยา esterification กับ N-Boc-amino acid ที่สนใจ คือ N-Boc-L-glycine, N-Boc-L-alanine, N-Boc-L-phenylalanine, N-Boc-L-valine, และ N-Boc-L-proline จากผลการทดลองพบว่า อนุพันธ์ 22-O-acyl-N-Boc-amino ester ของ renieramycin M สามารถสังเคราะห์ได้และมีผลผลิตการสังเคราะห์ในเกณฑ์สูง (yield 59-95%)



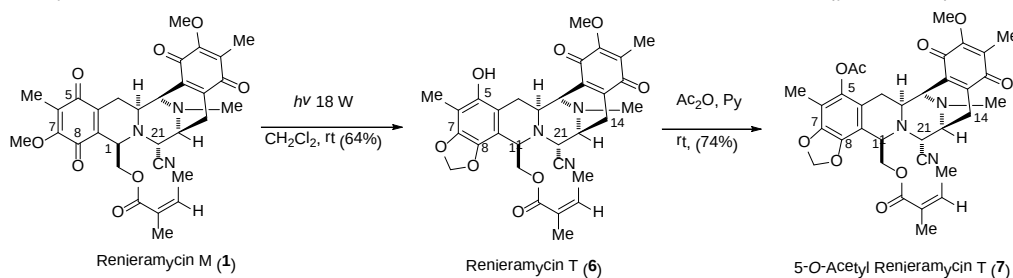
รูปที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 22-O-acyl-N-Boc-amino ester ของ renieramycin M

4.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนทางเคมีที่สำคัญ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรก renieramycin M (1) จะถูก reduce ด้วย $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ เพื่อเปลี่ยนหมู่ quinone ให้เป็น hydroquinone (4) จากนั้นจึงทำปฏิกิริยา esterification กับ acylating agent ที่สนใจ ได้แก่ N-Boc-amino acid และ heterocyclic aromatic acid chloride จากผลการทดลองพบว่า อนุพันธ์ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M สามารถสังเคราะห์ได้และมีผลผลิตการสังเคราะห์ในเกณฑ์ปานกลาง (yield 27-51%)



รูปที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M

4.3 การสังเคราะห์สาร 5-O-acetyl renieramycin T ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนทางเคมีที่สำคัญ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรก renieramycin M (1) จะถูก reduce ด้วย พลังงานจากแสงฟลูออเรสเซน 18 W เพื่อเปลี่ยนหมู่ quinone ให้เป็น dioxymethylene ring (6) จากนั้นจึงทำปฏิกิริยา esterification กับ acylating agent ที่สนใจ ได้แก่ acetic anhydride จากผลการทดลองพบว่า อนุพันธ์ 5-O-acetyl renieramycin T สามารถสังเคราะห์ได้และมีผลผลิตการสังเคราะห์ในเกณฑ์ปานกลาง (yield 47%)



รูปที่ 6 การสังเคราะห์สาร 5-O-acetyl renieramycin T

5. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์

การวิเคราะห์ ^1H และ ^{13}C NMR spectra ใช้เครื่องวิเคราะห์ คือ JEOL-JNM AL 300 และ JEOL-JNM XL 500 FT-NMR spectrometer โดย NMR spectra ของสาร **5f-o** แสดงรายละเอียดใน supporting information ของผลงานวิจัยซึ่งแสดงข้อมูลในส่วนภาคผนวก และ NMR spectra **3a-e** และสาร **5a-e** มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

22-O-acyl-N-Boc-L-glycine derivative of renieramycin M: 11.6 mg (93%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +161.7$ (c 0.0035, CHCl_3); CD $\Delta \epsilon$ (c: 9 μM , methanol, 20 $^\circ\text{C}$) +0.02 (371), -0.3 (314), -0.2 (315), -1.0 (300), -2.4 (283), -1.3 (269), -0.3 (257), -0.9 (242), -1.3 (227); IR (KBr) 3414, 2978, 2943, 2855, 1751, 1717, 1655, 1616, 1508, 1452, 1369, 1310, 1281, 1236, 1161 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4.84 (1H, br s, 3'-NH), 4.47 (1H, dd, J = 10.8, 2.4 Hz, 22-Ha), 4.06 (1H, br d, J = 2.4 Hz, 21-H), 4.03 (3H, s, 7-OCH₃), 4.03 (1H, overlapped, 11-H), 4.01 (3H, s, 17-OCH₃), 4.01 (1H, overlapped, 1-H), 3.95 (1H, br d, J = 2.4 Hz, 22-Hb), 3.78 (1H, dd, J = 18.6, 6.0 Hz, 2'-Ha), 3.49 (1H, dd, J = 18.6, 6.0 Hz, 2'-Hb), 3.37 (1H, br d, J = 7.2 Hz, 13-H), 3.10 (1H, dt, J = 12.0, 2.8 Hz, 3-H), 2.94 (1H, dd, J = 17.3, 2.4 Hz, 4-H α), 2.73 (1H, dd, J = 20.7, 7.6 Hz, 14-H α), 2.31 (1H, d, overlapped, 14-H β), 2.30 (3H, s, NCH₃), 1.99 (1H, d, J = 6.4 Hz, 4-H β), 1.96 (3H, s, 6-CH₃), 1.95 (3H, s, 16-CH₃), 1.42 (9H, s, 6'-H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 186.6 (C-15), 185.2 (C-5), 182.4 (C-18), 181.1 (C-8), 169.8 (C-1'), 155.5 (C-4'), 155.4 (C-7), 155.3 (C-17), 142.1 (C-10), 142.0 (C-20), 135.1 (C-9), 135.0 (C-19), 128.9 (C-6), 128.3 (C-16), 116.9 (CN), 80.2 (C-5'), 64.1 (C-22), 61.1 (17-OCH₃), 61.1 (7-OCH₃), 59.0 (C-21), 55.7 (C-1), 54.6 (C-3), 54.2 (C-13), 54.1 (C-11), 42.3 (C-2'), 41.5 (NCH₃), 28.3 (C-6'), 25.2 (C-4), 21.2 (C-14), 8.9 (6-CH₃), 8.6 (16-CH₃)

22-O-acyl-N-Boc-L-alanine derivative of renieramycin M: 12.3 mg (95%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -75.8$ (c 0.0024, CHCl_3); CD $\Delta \epsilon$ (c: 9 μM , methanol, 20 $^\circ\text{C}$) -4.8 (355), -3.5 (333), -2.1 (313), -2.8 (299), -9.3 (289), -16.1 (280), -5.0 (270), +8.9 (257), +5.4 (244), +0.2 (234); IR (KBr) 3393, 2978, 2940, 2855, 1765, 1717, 1653, 1616, 1506, 1456, 1369, 1306, 1234, 1155, 1058 cm^{-1} ; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.23 (1H, s, 3'-NH), 4.99 (1H, br d, J = 6.8 Hz, 2'-H), 4.45 (1H, br d, J = 11.2 Hz, 22-Ha), 4.08 (1H, br d, J = 12.0 Hz, 22-Hb), 4.01 (1H, d, J = 2.4 Hz, 21-H), 3.96 (3H, s, 7-OCH₃), 3.96 (1H, overlapped, 11-H), 3.94 (3H, s, 17-OCH₃), 3.92 (1H, br d, overlapped, 1-H), 3.33 (1H, br d, J = 7.6 Hz, 13-H), 3.02 (1H, dt, J = 11.6, 3.2 Hz, 3-H), 2.82 (1H, br d, J = 16.8 Hz, 4-H α), 2.67 (1H, dd, J = 20.7, 7.2 Hz, 14-H α), 2.30 (1H, d, J = 21.1 Hz, 14-H β), 2.22 (3H, s, NCH₃), 1.87 (3H, s, 6-CH₃), 1.37 (1H, d, J = 7.2 Hz, 4-H β), 1.87 (3H, s, 16-CH₃), 1.31 (9H, s, 6'-H), 1.03 (3H, d, J = 7.6 Hz, 7'-H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 186.5 (C-15), 185.2 (C-5), 182.4 (C-18), 181.1 (C-8), 172.6 (C-1'), 155.6 (C-4'), 155.4 (C-7), 154.7 (C-17), 141.9 (C-10), 141.9 (C-20), 135.1 (C-9), 134.8 (C-19), 128.7 (C-6), 128.1 (C-16), 116.8 (CN), 79.9 (C-5'), 63.1 (C-22), 61.1 (17-OCH₃), 61.0 (7-OCH₃), 58.4 (C-21), 56.5 (C-1), 54.5 (C-3), 54.3 (C-13), 54.1 (C-11), 48.7 (C-2'), 41.5 (NCH₃), 28.2 (C-6'), 25.2 (C-4), 21.0 (C-14), 18.3 (C-7'), 8.8 (6-CH₃), 8.5 (16-CH₃)

22-O-acyl-N-Boc-L-phenylalanine derivative of renieramycin M: 12.4 mg (84%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} +29.7$ (c 0.0017, CHCl₃); CD $\Delta \epsilon$ (c: 9 μ M, methanol, 20 °C) -6.7 (356), -4.4 (327), -4.0 (300), -9.5 (292), -23.1 (281), -3.5 (269), $+11.4$ (256), $+5.4$ (244), -2.8 (234); IR (KBr) 3387, 2963, 2928, 2855, 1719 (br), 1655, 1612, 1560, 1508, 1499, 1458, 1368, 1306, 1261, 1234, 1159, 1107, 1084, 1049, 1030, 957, 801, 700 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.36 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, 11'-H), 7.29 (2H, d, $J = 6.3$ Hz, 9'-H), 7.05 (2H, d, $J = 6.3$ Hz, 10'-H), 4.71 (1H, br d, $J = 8.1$ Hz, 2'-H), 4.30 (2H, dd, $J = 11.4, 3.0$ Hz, 22-H), 4.24 (1H, br d, $J = 7.8$ Hz, 21-H), 4.08 (1H, overlapped, 1-H), 4.00 (6H, s, 17 and 7-OCH₃), 3.87 (1H, br d, $J = 14.7$ Hz, 11-H), 3.34 (1H, br d, $J = 6.9$ Hz, 13-H), 3.07 (1H, dt, $J = 11.4, 3.8$ Hz, 3-H), 2.91 (1H, br d, $J = 18.0$ Hz, 4-H α), 2.84 (2H, d, $J = 5.7$ Hz, 7'-H), 2.45 (1H, dd, $J = 21.0, 7.2$ Hz, 14-H α), 2.33 (1H, d, overlapped, 14-H β), 2.28 (3H, s, NCH₃), 1.99 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, 4-H β), 1.92 (3H, s, 6-CH₃), 1.86 (3H, s, 16-CH₃), 1.32 (9H, s, 6'-H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.4 (C-15), 185.1 (C-5), 182.4 (C-18), 181.1 (C-8), 171.7 (C-1'), 155.5 (C-4'), 155.3 (C-7), 154.7 (C-17), 142.2 (C-10), 141.9 (C-20), 135.7 (C-9), 134.9 (C-19), 129.3 (C-8'), 129.1 (C-9'), 128.7 (C-10'), 128.6 (C-6), 128.0 (C-16), 127.2 (C-11'), 116.8 (CN), 80.0 (C-5'), 64.3 (C-22), 62.0 (C-2'), 61.1 (17-OCH₃), 61.0 (7-OCH₃), 58.6 (C-21), 55.9 (C-1), 54.6 (C-3), 54.3 (C-13), 54.2 (C-11), 41.4 (NCH₃), 38.3 (C-7'), 28.1 (C-6'), 25.0 (C-4), 21.4 (C-14), 8.8 (6-CH₃), 8.6 (16-CH₃)

22-O-acyl-N-Boc-L-valine derivative of renieramycin M: 8.1 mg (59%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} +135.4$ (c 0.0023, CHCl₃); CD $\Delta \epsilon$ (c: 6 μ M, methanol, 20 °C) -1.2 (353), -0.8 (326), -2.0 (301), -5.1 (289), -8.1 (281), -2.9 (270), $+2.3$ (257), -0.2 (240), -1.2 (224); IR (KBr) 3404, 2969, 2940, 1741, 1717, 1655, 1616, 1506, 1456, 1371, 1310, 1236, 1157 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 4.73 (1H, br d, $J = 9.6$ Hz, 2'-H), 4.29 (2H, d, $J = 2.7$ Hz, 22-H), 4.08 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, 21-H), 4.06 (3H, s, 7-OCH₃), 4.04 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, 1-H), 4.03 (1H, overlapped, 11-H), 4.00 (3H, s, 17-OCH₃), 3.40 (1H, dt, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 13-H), 3.08 (1H, dt, $J = 11.4, 3.0$ Hz, 3-H), 2.90 (1H, dd, $J = 16.8, 1.8$ Hz, 4-H α), 2.77 (1H, dd, $J = 21.0, 7.8$ Hz, 14-H α), 2.30 (1H, d, $J = 21.0$ Hz, 14-H β), 2.28 (3H, s, NCH₃), 1.95 (3H, s, 6-CH₃), 1.93 (3H, s, 16-CH₃), 1.43 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, 4-H β), 1.36 (9H, s, 6'-H), 1.26 (1H, m, 7'-H), 0.80 & 0.73 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 8'-H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.5 (C-15), 185.1 (C-5), 182.4 (C-18), 181.1 (C-8), 171.8 (C-1'), 155.6 (C-4'), 155.5 (C-7), 155.2 (C-17), 141.9 (C-10), 141.8 (C-20), 135.1 (C-9), 134.8 (C-19), 128.5 (C-6), 127.8 (C-16), 116.7 (CN), 79.8 (C-5'), 63.7 (C-22), 61.1 (17-OCH₃), 61.1 (7-OCH₃), 58.6 (C-2'), 58.4 (C-21), 56.4 (C-1), 54.6 (C-3), 54.5 (C-13), 54.1 (C-11), 41.5 (NCH₃), 30.8 (C-7'), 28.2 (C-6'), 25.1 (C-4), 21.2 (C-14), 18.9 & 17.5 (C-8'), 8.8 (6-CH₃), 8.7 (16-CH₃)

22-O-acyl-N-Boc-L-proline derivative of renieramycin M: 11.6 mg (86%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} +161.1$ (c 0.0044, CHCl₃); CD $\Delta \epsilon$ (c: 14 μ M, methanol, 20 °C) +1.6 (417), -1.3 (389), -3.8 (358), -2.6 (328), -2.5 (300), -12.5 (282), -3.1 (270), +6.8 (258), +2.8 (243), -1.1 (222), +2.5 (212), +7.3 (207); IR (KBr) 2974, 2955, 2940, 1749, 1695, 1655, 1616, 1450, 1400, 1373, 1312, 1236, 1188, 1159, 1084 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.30 (1H, m, *J* = 21.9, 11.6, 1.6 Hz, 2'-H), 4.05 (2H, br d, *J* = 12.8 Hz, 22-H), 4.03 (1H, d, overlapped, 21-H), 4.01 (1H, overlapped, 1-H), 4.02 (3H, s, 7-OCH₃), 3.99 (3H, s, 17-OCH₃), 3.94 (1H, td, *J* = 5.2, 8.4 Hz, 11-H), 3.40 (2H, m, 9'-H), 3.30 (1H, br d, *J* = 5.6 Hz, 13-H), 3.09 (1H, br d, *J* = 11.6 Hz, 3-H), 2.95 (1H, td, *J* = 26.0, 17.2, Hz, 4-H α), 2.76 (1H, dd, *J* = 20.3, 7.6 Hz, 14-H α), 2.33 (1H, d, *J* = 21.1 Hz, 14-H β), 2.28 (3H, s, NCH₃), 2.03 (1H, d, *J* = 15.2 Hz, 4-H β), 1.93 (3H, s, 6-CH₃), 1.91 (3H, s, 16-CH₃), 1.75 (2H, m, 8'-H), 1.34 (9H, s, 6'-H), 1.26 (2H, d, *J* = 2.4 Hz, 7'-H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.4 (C-15), 185.3 (C-5), 182.4 (C-18), 181.1 (C-8), 172.5 (C-1'), 155.7 (C-4'), 155.5 (C-7), 154.0 (C-17), 142.0 (C-10), 141.8 (C-20), 135.3 (C-9), 134.7 (C-19), 128.4 (C-6), 127.8 (C-16), 117.0 (CN), 79.7 (C-5'), 65.2 (C-22), 63.7 (C-2'), 61.0 (17-OCH₃ & 7-OCH₃), 58.5 (C-21), 58.6 (C-4), 56.4 (C-1), 54.6 (C-3), 54.3 (C-11), 54.2 (C-13), 46.5 (C-9'), 41.5 (NCH₃), 31.6 (C-7'), 29.8, (C-8'), 28.3 (C-6'), 25.2 (C-4), 21.2 (C-14), 8.8 (6-CH₃), 8.6 (16-CH₃)

5-O-acyl-N-Boc-L-glycine derivatives of renieramycin M: 2.5 mg (26%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} +161.7$ (c 0.0007, CHCl₃); CD $\Delta \epsilon$ (c: 11 μ M, methanol, 20 °C) +1.8 (420), 0.0 (384), -1.0 (353), -0.4 (323), 0.0 (298), +1.9 (282), +3.1 (264), +2.0 (244), +1.5 (229), +2.6 (217); IR (KBr) 3393, 2961, 2926, 2855, 1775, 1717, 1653, 1616, 1462, 1369, 1261, 1234, 1153, 1094, 1059, 1030, 802 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.93 (1H, qq, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 26-H), 5.70 (1H, s, 8-OH), 5.00 (1H, br s, 3'-H), 4.44 (1H, br d, *J* = 10.8 Hz, 22-Ha), 4.24 (2H, t, *J* = 4.4 Hz, 2'-H), 4.16 (1H, br d, *J* = 5.2 Hz, 1-H), 4.04 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, 21-H), 3.98 (1H, dd, *J* = 11.2, 4.8 Hz, 22-Hb), 3.90 (3H, s, 17-OCH₃), 3.88 (1H, br d, *J* = 2.0 Hz, 11-H), 3.71 (3H, s, 7-OCH₃), 3.29 (1H, br d, *J* = 8.0 Hz, 13-H), 3.12 (1H, dt, *J* = 12.0, 2.4 Hz, 3-H), 2.68 (1H, dd, *J* = 21.6, 8.0 Hz, 14-H α), 2.40 (1H, dd, *J* = 15.2, 2.0 Hz, 4-H α), 2.22 (1H, d, *J* = 21.2 Hz, 14-H β), 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.86 (3H, s, 16-CH₃), 1.80 (3H, dd, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 27-H), 1.61 (3H, s, 28-H), 1.55 (1H, br d, *J* = 12.4 Hz, 4-H β), 1.42 (9H, s, 6'-H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.1 (C-15), 182.8 (C-18), 180.9 (C-1'), 167.1 (C-24), 155.4 (C-4'), 155.4 (C-17), 143.8 (C-7), 143.3 (C-8), 141.9 (C-20), 140.1 (C-26), 138.7 (C-5), 135.4 (C-19), 129.7 (C-16), 126.8 (C-25), 124.1 (C-10), 122.5 (C-6), 117.5 (CN-21), 117.2 (C-9), 80.2 (C-5'), 64.3 (C-22), 61.2 (17-OCH₃), 60.8 (7-OCH₃), 59.4 (C-21), 56.5 (C-1), 55.2 (C-3), 54.8 (C-13), 54.8 (C-11), 42.2 (C-2'), 41.5 (NCH₃), 28.3 (C-6'), 27.9 (C-4), 21.1 (C-14), 20.6 (C-28), 15.8 (C-27), 10.0 (16-CH₃), 8.7 (6-CH₃)

5-O-acyl-N-Boc-L-alanine derivative of renieramycin M: 7.8 mg (44%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} +34.1$ (c 0.0039, CHCl₃); CD $\Delta \epsilon$ (c: 11 μ M, methanol, 20 °C) +1.7 (401), -0.4 (381), -1.7 (357), -0.5 (331), +0.8 (307), +1.9 (294), +5.2 (282), +7.0 (267), +5.4 (250), +2.4 (236); IR (KBr) 3393, 2976, 2938, 1765, 1717, 1653, 1616, 1458, 1369, 1304, 1234, 1153, 1059, 1059 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.01 (1H, qq, J = 7.2, 1.6 Hz, 26-H), 5.78 (1H, s, 8-OH), 5.00 (1H, br d, J = 9.6 Hz, 3'-H), 4.59 (1H, t, J = 7.2 Hz, 2'-H), 4.48 (1H, dd, J = 11.2, 2.8 Hz, 22-Ha), 4.31 (1H, dd, J = 2.8, 5.2 Hz, 1-H), 4.11 (1H, d, J = 2.4 Hz, 21-H), 4.02 (1H, dd, J = 11.2, 5.6 Hz, 22-Hb), 3.97 (3H, s, 17-OCH₃), 3.94 (1H, br d, J = 2.8 Hz, 11-H), 3.78 (3H, s, 7-OCH₃), 3.35 (1H, br d, J = 7.2 Hz, 13-H), 3.20 (1H, dt, J = 12.4, 2.4 Hz, 3-H), 2.75 (1H, dd, J = 21.1, 7.6 Hz, 14-H α), 2.54 (1H, br d, J = 15.2 Hz, 4-H α), 2.27 (3H, s, NCH₃), 2.28 (1H, d, J = 21.1 Hz, 14-H β), 2.11 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-CH₃), 1.88 (3H, dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 27-H), 1.72 (3H, s, 7'-H), 1.71 (3H, s, 28-H), 1.64 (1H, dd, J = 15.2, 12.0 Hz, 4-H β), 1.47 (9H, s, 6'-H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.1 (C-15), 182.8 (C-18), 171.6 (C-1'), 167.1 (C-24), 155.2 (C-17), 155.0 (C-4'), 143.8 (C-7), 143.3 (C-8), 142.0 (C-20), 140.0 (C-26), 138.7 (C-5), 135.4 (C-19), 129.0 (C-16), 126.8 (C-25), 124.1 (C-10), 122.7 (C-6), 117.5 (CN-21), 117.1 (C-9), 80.1 (C-5'), 64.8 (C-22), 61.2 (17-OCH₃), 60.8 (7-OCH₃), 59.7 (C-21), 56.4 (C-1), 55.4 (C-3), 54.8 (C-13), 54.8 (C-11), 49.3 (C-2'), 41.5 (NCH₃), 28.3 (C-6'), 27.5 (C-4), 21.2 (C-14), 20.6 (C-28), 18.7 (C-7'), 15.8 (C-27), 10.1 (16-CH₃), 8.7 (6-CH₃)

5-O-acyl-N-Boc-L-valine derivative of renieramycin M: 4.0 mg (30%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} -11.5$ (c 0.0026, CHCl₃); CD $\Delta \epsilon$ (c: 10 μ M, methanol, 20 °C) -1.8 (400), -1.8 (386), -1.7 (369), -1.3 (348), -0.5 (325), -0.4 (298), -0.6 (288), -1.8 (273), -4.0 (251), -3.5 (240), -3.0 (229); IR (KBr) 3393, 2972, 2940, 1761, 1717, 1653, 1616, 1462, 1369, 1306, 1234, 1153 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.01 (1H, qq, J = 7.6, 1.6 Hz, 26-H), 5.76 (1H, s, 8-OH), 4.97 (1H, d, J = 8.8 Hz, 3'-H), 4.51 (1H, dd, J = 9.6, 4.8 Hz, 2'-H), 4.39 (1H, dd, J = 9.6, 3.2 Hz, 22-Ha), 4.33 (1H, dd, J = 2.8, 5.6 Hz, 1-H), 4.07 (1H, d, J = 2.4 Hz, 21-H), 3.99 (1H, overlapped, J = 4.8 Hz, 22-Hb), 3.96 (3H, s, 17-OCH₃), 3.95 (1H, overlapped, 11-H), 3.77 (3H, s, 7-OCH₃), 3.34 (1H, d, J = 8.0 Hz, 13-H), 3.20 (1H, dt, J = 12.4, 2.0 Hz, 3-H), 2.74 (1H, dd, J = 20.7, 7.6 Hz, 14-H α), 2.66 (1H, d, J = 16.0 Hz, 4-H α), 2.45 (1H, q, J = 5.2 Hz, 7'-H), 2.31 (1H, overlapped, 14-H β), 2.26 (3H, s, NCH₃), 2.08 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-CH₃), 1.85 (3H, dd, J = 11.2, 1.3 Hz, 27-H), 1.71 (3H, br s, 28-H), 1.67 (1H, d, J = 16.0 Hz, 4-H β), 1.47 (9H, s, 6'-H), 1.19 (3H, d, J = 5.2 Hz, 8'-Ha), 1.08 (3H, d, J = 5.1 Hz, 8'-Hb); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.2 (C-15), 182.5 (C-18), 178.1 (C-1'), 167.1 (C-24), 155.8 (C-4'), 155.2 (C-17), 143.9 (C-7), 143.3 (C-8), 142.0 (C-20), 140.0 (C-26), 138.9 (C-5), 135.4 (C-19), 128.9 (C-16), 126.8 (C-25), 124.3 (C-10), 123.1 (C-6), 117.5 (CN-21), 117.2 (C-9), 80.1 (C-5'), 65.4 (C-22), 61.2 (17-OCH₃), 60.9 (7-OCH₃), 60.1 (C-2'), 58.8 (C-21), 56.3 (C-1), 55.9 (C-3), 54.9 (C-13), 54.9 (C-11), 41.5 (NCH₃), 30.7 (C-7'), 28.3 (C-6'), 27.3 (C-4), 21.4 (C-14), 20.6 (C-28), 19.9 (C-8'), 15.8 (C-27), 10.3 (16-CH₃), 8.7 (6-CH₃)

5-O-acyl-N-Boc-L-phenylalanine derivative of renieramycin M: 5.5 mg (30%); yellow amorphous solid. $[\alpha]_D^{25}$ -28.1 (c 0.0031, CHCl_3); CD $\Delta \epsilon$ (c: 5 μM , methanol, 20 °C) -6.1 (358), -3.4 (330), $+0.2$ (299), $+3.9$ (288), $+15.6$ (271), $+11.7$ (254), $+3.5$ (235), $+18.6$ (227), $+30.7$ (219), $+24.9$ (209); IR (KBr) 3393, 2934, 1763, 1717, 1653, 1616, 1499, 1456, 1368, 1303, 1234, 1161, 1078, 1059, 770, 700 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.38 (4H, overlapped, 9'-H & 10'-H), 7.30 (1H, dt, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 11'-H), 6.01 (1H, qq, $J = 7.2, 1.3$ Hz, 26-H), 5.78 (1H, s, 8-OH), 4.87 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz, 3'-H), 4.81 (1H, dd, $J = 9.6, 4.0$ Hz, 2'-H), 4.48 (1H, dd, $J = 10.8, 2.0$ Hz, 22-Ha), 4.32 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, 1-H), 4.10 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 21-H), 4.03 (1H, dd, $J = 10.8, 5.2$ Hz, 22-Hb), 3.94 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, 11-H), 3.90 (3H, s, 17- OCH_3), 3.78 (3H, s, 7- OCH_3), 3.56 (1H, dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz, 7'-Ha), 3.35 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, 13-H), 3.20 (1H, dt, $J = 12.0, 2.8$ Hz, 3-H), 3.08 (1H, dd, $J = 13.6, 10.8$ Hz, 7'-Hb), 2.74 (1H, dd, $J = 20.7, 7.6$ Hz, 14-H α), 2.62 (1H, br d, $J = 13.6$ Hz, 4-H α), 2.29 (1H, $J = 20.7$ Hz, 14-H β), 2.26 (3H, s, NCH_3), 2.09 (3H, s, 6- CH_3), 1.92 (3H, s, 16- CH_3), 1.88 (3H, dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 27-H), 1.71 (3H, t, $J = 1.6$ Hz, 28-H), 1.67 (1H, dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 4-H β), 1.38 (9H, s, 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 186.1 (C-15), 182.8 (C-18), 170.1 (C-1'), 167.1 (C-24), 155.2 (C-4'), 155.2 (C-17), 143.8 (C-7), 143.3 (C-8), 142.0 (C-20), 140.0 (C-26), 138.8 (C-5), 136.3 (C-19), 135.4 (C-8'), 129.3 (C-10'), 128.7 (C-16), 128.7 (C-9'), 127.1 (C-11'), 126.8 (C-25), 124.1 (C-10), 123.1 (C-6), 117.6 (CN-21), 117.6 (C-9), 80.1 (C-5'), 64.9 (C-22), 61.2 (17- OCH_3), 60.8 (7- OCH_3), 59.7 (C-2'), 59.7 (C-21), 56.4 (C-1), 55.5 (C-3), 54.9 (C-13), 54.9 (C-11), 41.5 (NCH_3), 38.3 (C-7'), 28.2 (C-6'), 27.1 (C-4), 21.2 (C-14), 20.6 (C-28), 15.9 (C-27), 10.1 (16- CH_3), 8.7 (6- CH_3)

6. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H292 และ H460 ด้วยเทคนิค MTT assay

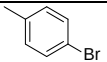
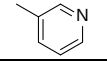
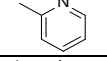
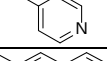
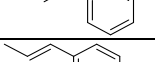
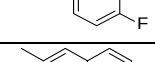
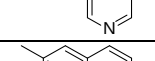
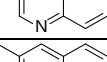
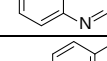
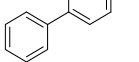
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H292 และ H460 ของสาร renieramycin M อนุพันธ์ใหม่ 22-O-acyl-N-Boc-amino ester ของ renieramycin M (**3a-3e**) อนุพันธ์ใหม่ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M (**5a-5o**) และ 5-O-acetyl renieramycin T (**7**) โดยเก็บข้อมูลที่ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT assay และใช้ cisplatin และ doxorubicin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งปอด เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าอนุพันธ์ใหม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H292 และ H460 ดังข้อมูล IC₅₀ ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กของสาร renieramycin M และอนุพันธ์

Entry	Compound	R	H292	H460
			IC ₅₀ ± S.D. (nM)	IC ₅₀ ± S.D. (nM)
1	RM, 1	-	24.54 ± 1.12	6.50 ± 0.39
2	JA, 2	-	217.43 ± 21.67	164.30 ± 11.07
3	decyano JA	-	4.04 x 10 ³ ± 0.34 x 10 ³	7.42 x 10 ³ ± 0.58 x 10 ³
4	RT, 6	-	60.96 ± 1.67	35.76 ± 1.24
5	RTOAc, 7	-	4.16 ± 0.45	1.69 ± 0.31
6	3a	Boc-L-Gly	3.56±0.62	9.94±0.82
7	3b	Boc-L-Ala	10.32±1.95	19.75±2.38
8	3c	Boc-L-Phe	110.50±2.53	51.43±5.67
9	3d	Boc-L-Val	32.39±3.33	20.95±3.53
10	3e	Boc-L-Pro	66.55±9.47	45.91±6.94
11	5a	Boc-L-Gly	10.24±0.94	6.14±0.68
12	5b	Boc-L-Ala	24.03±2.61	15.94±1.32
13	5c	Boc-L-Phe	57.35±5.36	42.72±4.91
14	5d	Boc-L-Val	127.20±2.65	200.53±29.27
15	5e	Boc-L-Pro	85.00±8.62	43.28±0.68

H460 and H292: human non-small cell lung cancer cell lines

ตารางที่ 2 (ต่อ) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กของสาร renieramycin M และอนุพันธ์

Entry	Compound	R	H292	H460
			IC50 $\pm$ S.D. (nM)	IC50 $\pm$ S.D. (nM)
16	5f		20.89 $\pm$ 1.58	13.95 $\pm$ 1.12
17	5g		59.03 $\pm$ 4.10	19.76 $\pm$ 0.85
18	5h		103.40 $\pm$ 7.88	26.22 $\pm$ 0.27
19	5i		19.99 $\pm$ 2.49	11.32 $\pm$ 0.27
20	5j		11.70 $\pm$ 0.72	10.86 $\pm$ 0.13
21	5k		63.11 $\pm$ 3.28	17.04 $\pm$ 1.17
22	5l		56.75 $\pm$ 5.30	52.33 $\pm$ 0.65
23	5m		110.78 $\pm$ 9.57	22.17 $\pm$ 0.15
24	5n		53.57 $\pm$ 1.81	45.21 $\pm$ 0.59
25	5o		71.19 $\pm$ 2.25	53.51 $\pm$ 0.52
26	cisplatin	-	12.13 $\times 10^3 \pm 1.12 \times 10^3$	8.15 $\times 10^3 \pm 0.64 \times 10^3$
27	doxorubicin	-	350.70 $\pm$ 32.94	33.70 $\pm$ 4.56

H460 and H292: human non-small cell lung cancer cell lines

จากผลการทดลองพบว่า สารอนุพันธ์ใหม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H292 และ H460 ในระดับนาโนโมลาร์ โดยอนุพันธ์กลุ่ม 22-O-acyl-ester แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่ากลุ่ม 5-O-acyl-ester และสาร 22-O-acyl-N-Boc-L-glycine ester ของ renieramycin M แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ H292 ได้สูงสุด และมากกว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ renieramycin M ถึง 6 เท่า และ 5-O-acetyl ester renieramycin T แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ H460 ได้สูงสุด และมากกว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ renieramycin M ถึง 6 เท่า

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สาร renieramycin M ซึ่งเป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน สกุล *Xestospongia* sp. ซึ่งพบการเติบโตตามธรรมชาติที่บริเวณหมู่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยสาร renieramycin M จัดอยู่ในกลุ่ม tetrahydroisoquinolinequinone alkaloid ซึ่งมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ว่าสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งหลายชนิด ในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำและสกัดแยกสาร renieramycin M ได้ทั้งสิ้น 784.1 mg คิดเป็นร้อยละ 0.01% เมื่อเทียบกับน้ำหนักฟองน้ำแห้ง หรือคิดเป็นร้อยละ 0.002 เมื่อเทียบกับน้ำหนักฟองน้ำเปียก จากผลการทดลองพบว่าการสกัดฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. เพื่อแยกสาร renieramycin M นั้น ได้ปริมาณสาร renieramycin M น้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ แต่มีปริมาณของสารในกลุ่ม renieramycins อื่นๆ มากขึ้น เนื่องมาจากความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมในการเติบโตของฟองน้ำตามธรรมชาติ

สาร renieramycin M ที่เตรียมได้จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ 4 กลุ่ม คือ (1) 22-O-amino ester ของ renieramycin M (2) 5-O-amino ester ของ renieramycin M (3) 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M และ (4) 5-O-acetyl-ester ของ renieramycin T รวมทั้งสิ้นประมาณ 20 อนุพันธ์ ซึ่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์จะประกอบด้วย (1) aluminium hydride reduction เพื่อสังเคราะห์สาร jorunnamycin A ได้ผลการผลิต 23-51% (2) palladium catalyzed hydrogenation เพื่อสังเคราะห์สาร bishydroquinone ได้ผลการผลิต 100% (3) photo reaction เพื่อสังเคราะห์สาร renieramycin T ได้ผลการผลิต 64% และ (4) esterification เพื่อสังเคราะห์ 22-O-acyl-ester และ 5-O-acyl-ester ของ renieramycin M ซึ่งพบว่ากระบวนการสังเคราะห์ให้ผลการผลิตสารได้ดี ได้ร้อยละของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์แยกตามประเภทของ acylation agent และตำแหน่งการเกิด esterification ได้ดังนี้ (1) 22-O-amino ester ได้ผลการผลิต 95-86% (2) 5-O-amino ester ได้ผลการผลิต 27-50% (3) 5-O-acyl-ester ได้ผลการผลิต 32-74% จะเห็นได้ว่าผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ ester ของ renieramycin M ควบคุมโดยคุณสมบัติด้านโครงสร้างทางเคมีซึ่งที่ตำแหน่ง 22-hydroxyl group จะมี sterically hindrance น้อยกว่าที่ตำแหน่ง 5-hydroxyl group ปฏิกิริยาเคมีจึงเกิดได้ดีกว่า และเมื่อเปรียบเทียบกับ hydroxyl group ที่ตำแหน่ง 5, 8, 15 และ 18 พบว่า 5-hydroxyl group จะมี sterically hindrance น้อยกว่าที่ตำแหน่งอื่นๆ จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีจึงเกิดได้ดี นอกจากนั้นกระบวนการ esterification ยังถูกควบคุมด้วยความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาและปริมาณที่ใช้ (equivalent) ของ acylation agent อีกด้วย

อนุพันธ์ของ renieramycin M ที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมด ถูกนำไปศึกษา cytotoxicity ในเซลล์มะเร็งปอด เพื่อค้นหาโครงสร้างที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H290 และ H460 ได้ดีที่สุด และพบว่าอนุพันธ์ใหม่ทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H290 และ H460 ในระดับนาโนโมลาร์ และมีแนวโน้มว่าหมู่แทนที่ตำแหน่ง 5-acyl ester มีความสำคัญต่อฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์จะลดลงเมื่อหมู่แทนที่ตำแหน่ง 5-acyl ester มีขนาดใหญ่ขึ้น

ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้พัฒนาสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ ของสาร renieramycin M ที่มีฤทธิ์ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ชนิด H290 และ H460 ในระดับนาโนโมลาร์และสารอนุพันธ์บางชนิดมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สูงกว่าสารต้นแบบ โดยอนุพันธ์กลุ่ม 22-O-acyl-ester แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่ากลุ่ม 5-O-acyl-ester จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาสารกลุ่มนี้เพื่อใช้ต้านเซลล์มะเร็งปอดในอนาคต

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ศึกษาสารอนุพันธ์ใหม่ของ renieramycin T ทั้งทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสาร renieramycins ที่พบว่าแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ เช่น jorunnamycin A เนื่องจากมีโครงสร้างของ quinone ซึ่งคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ atovaquone
3. ศึกษากลไกการต้านมะเร็งด้วย DNA alkylation เนื่องจากสาร renieramycin M มีโครงสร้างคล้ายกับ ecteinascidin 743 ซึ่งเป็นยาเคมีที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม
4. การใช้กระบวนการเคมีในการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อช่วยเพิ่ม selectivity กับมะเร็ง และลดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เช่น การเชื่อมต่อกับ vitamin บางชนิด
5. ศึกษาและพัฒนา antibody drug conjugate (ADC) โดยใช้สาร renieramycin เป็นสารออกฤทธิ์ (payload)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

Chemistry of Renieramycins. 17. A New Generation of Renieramycins: Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells, Chamni, S.; Sirimangkalakitti, N.; Chanvorachote, P; Saito, N.; Suwanborirux, K. J. Nat. Prod., 2017, 80, 1541–1547.

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

ต่อยอดผลงานวิจัยโดยการร่วมวิจัยกับรองศาสตราจารย์ ภก. ดร.ปิติ จันวรโชติ เพื่อศึกษา กลไกต้านมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กแบบ apoptosis โดยใช้สาร bishydroquinone renieramycin M และ hydroquinone 5-O-cinnamoyl renieramycin M ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ชนิดใหม่ที่ศึกษาในโครงการนี้ และได้ผลงานวิจัยเพิ่มเติม 2 เรื่อง คือ

1.1 Bishydroquinone Renieramycin M Induces Apoptosis of Human Lung Cancer Cells Through a Mitochondria-dependent Pathway, Pinkhien, T.; Maiuthed, A.; Chamni, S.; Suwanborirux, K.; Saito, N.; Chanvorachote, P. Anticancer Res. 2016, 12, 6327-6333.

1.2 Apoptosis-inducing Effect of Hydroquinone 5-O-Cinnamoyl Ester Analog of Renieramycin M on Non-small Cell Lung Cancer Cells. Maiuthed, A.; Pinkhien, T.; Chamni, S.; Suwanborirux, K.; Saito, N.; Petpiroon, N.; Chanvorachote, P. Anticancer Res. 2017, 37, 6259-6267.

อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

Supakarn Chamni, Natchanun Sirimangkalakitti, Pithi Chanvorachote, Naoki Saito, and Khanit Suwanborirux; Structure-activity Relationship (SAR) Study of Renieramycin and Ester Derivatives as New Anti-cancer Agents from Marine Bistertrahydro isoquinolinequinone Alkaloids; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 43; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; วันที่ 17-19 ตุลาคม 2560 (Oral presentation)

ภาคผนวก

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

Chemistry of Renieramycins. 17. A New Generation of Renieramycins: Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells, Chamni, S.; Sirimangkalakitti, N.; Chanvorachote, P; Saito, N.; Suwanborirux, K. J. Nat. Prod., 2017, 80, 1541–1547.

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Supakarn Chamni, Natchanun Sirimangkalakitti, Pithi Chanvorachote, Naoki Saito, and Khanit Suwanborirux; Structure-activity Relationship (SAR) Study of Renieramycin and Ester Derivatives as New Anti-cancer Agents from Marine Bistertrahydro isoquinolinequinone Alkaloids; การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 43; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; วันที่ 17-19 ตุลาคม 2560 (Oral presentation)

Supakarn Chamni, Natchanun Sirimangkalakitti, Pithi Chanvorachote, Naoki Saito, and Khanit Suwanborirux; Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents Against Non-small-cell Lung Cancer Cells; การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 17 ระหว่างวันที่ 10 – วันศุกร์ที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2561 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี (Oral presentation)

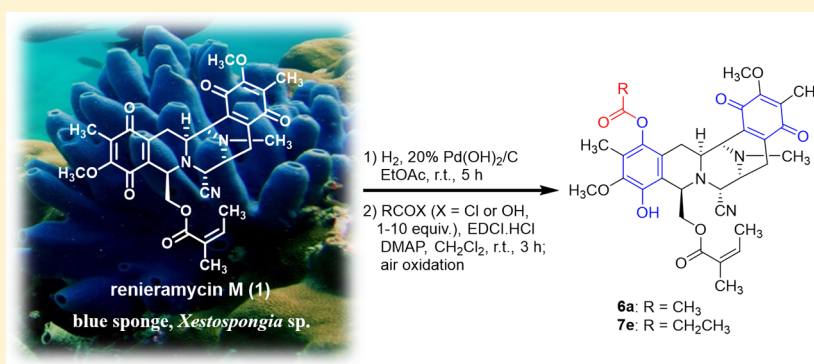
Chemistry of Renieramycins. 17. A New Generation of Renieramycins: Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells

Supakarn Chamni,[†] Natchanun Sirimangkalakitti,[†] Pithi Chanvorachote,[‡] Naoki Saito,^{*,§} and Khanit Suwanborirux^{*,†}

[†]Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, and [‡]Cell-Based Drug and Health Product Development Research Unit and Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

[§]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

S Supporting Information



ABSTRACT: A series of hydroquinone 5-O-monoester analogues of renieramycin M were semisynthesized via bishydroquinonerenieramycin M (5) prepared from renieramycin M (1), a major cytotoxic bistetrahydroisoquinolinequinone alkaloid isolated from the Thai blue sponge *Xestospongia* sp. All 20 hydroquinone 5-O-monoester analogues possessed cytotoxicity with IC₅₀ values in nanomolar concentrations against the H292 and H460 human non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines. The improved cytotoxicity toward the NSCLC cell lines was observed from the 5-O-monoester analogues such as 5-O-acetyl ester 6a and 5-O-propanoyl ester 7e, which exhibited 8- and 10-fold increased cytotoxicity toward the H292 NSCLC cell line (IC₅₀ 3.0 and 2.3 nM, respectively), relative to 1 (IC₅₀ 24 nM). Thus, the hydroquinone 5-O-monoester analogues are a new generation of the renieramycins to be further developed as potential marine-derived drug candidates for lung cancer treatment.

Marine natural products have been documented as fascinating sources of potential anticancer agents. Regarding their structural complexity and diversity, these marine-derived molecules are capable of interacting with numerous biomolecular targets to either inhibit or promote specific biological functions against various types of cancer cell lines.^{1–8} Renieramycins, marine alkaloids classified into the tetrahydroisoquinoline family,⁹ have been isolated from various marine organisms, including sponges in the genera *Reniera*,^{10,11} *Xestospongia*,^{12–16} *Cribrochalina*,^{17,18} and *Neopetrosia*.¹⁹ Moreover, several renieramycin-type alkaloids have also been obtained from a sponge-eating nudibranch, *Jorunna funebris*.^{20–23} To date, renieramycins A–Y isolated from such sponges have been characterized and become target molecules of interest for synthetic studies^{24–37} and biological investigations as the promising anticancer agents.^{6,8,9,14,24,34,38} Renieramycin M (1), the most prominent compound in this

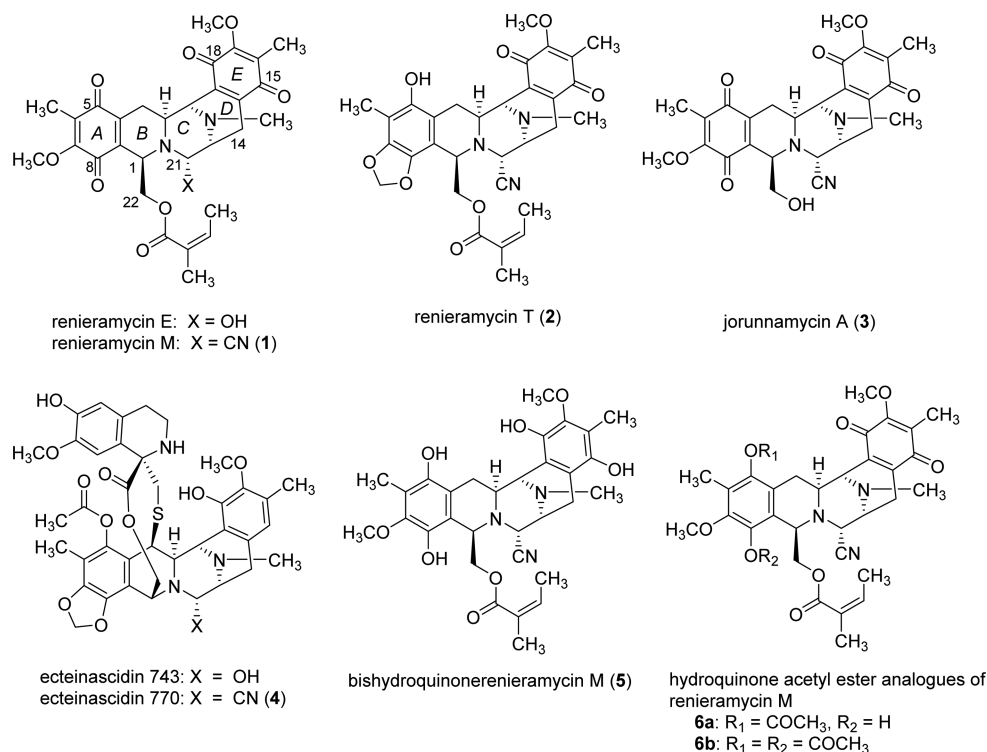
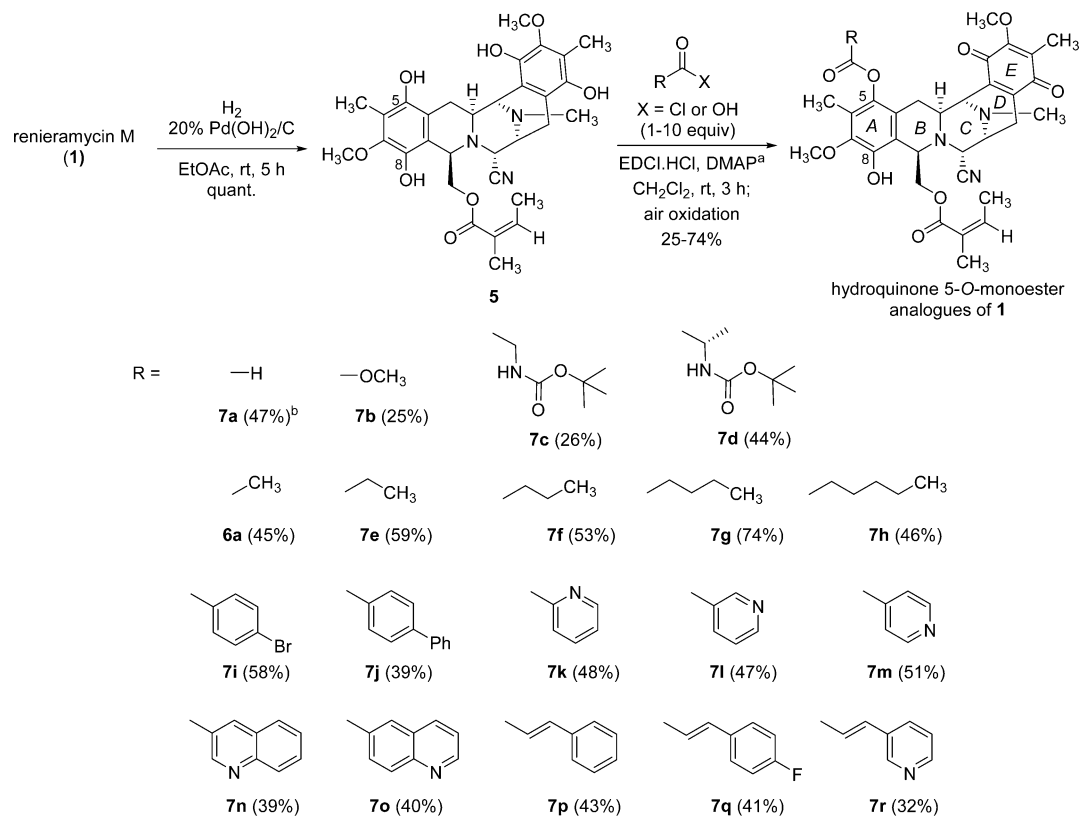
category, is a bistetrahydroisoquinolinequinone that was isolated as a preeminent alkaloid from the potassium cyanide-pretreated methanolic extract of the blue sponge *Xestospongia* sp., which has been collected in Thailand¹³ and the Philippines.¹⁵

Regarding our ongoing research toward the development of new anticancer agents from marine tetrahydroisoquinoline alkaloids, including renieramycins and ectinascidins, the naturally derived renieramycins such as renieramycin M (1), renieramycin E, and renieramycin T (2), a renieramycin–ectinascidin hybrid structure, showed strong cytotoxicity with IC₅₀ values in the nanomolar range toward various cancer cell lines, including breast (T47D), colon (HCT116 and DLD1), lung (QG56 and H460), pancreatic (AsPC1), and prostate

Received: January 23, 2017

Published: May 1, 2017

Chart 1

Scheme 1. Preparation of Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of Renieramycin M^{a,b}

^aAnalogues 7e–h were prepared by esterification of 5 with the corresponding acid anhydrides (1.5 equiv) in pyridine (see Supporting Information).

^bValues in parentheses refer to the isolated yields.

(DU145) human carcinomas.^{13,14,24,39} Thus, a series of 22-O-ester bistetrahydroisoquinolinequinone derivatives of 1 were

prepared via jorunnamycin A (3) for initial cytotoxicity evaluation. The resulting derivatives were found to exhibit

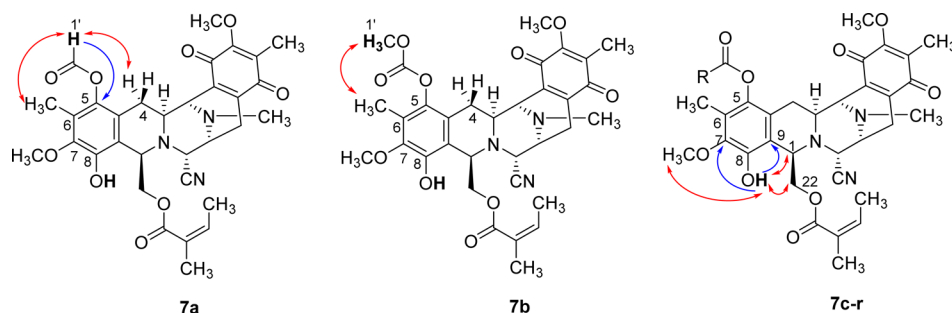


Figure 1. HMBC (blue $\rightarrow$) and NOESY (red $\leftrightarrow$) correlations of hydroquinone 5-*O*-monoester analogues of renieramycin M.

antiproliferative activities against breast (MDA-MB-435), colon (HCT116),⁴⁰ and non-small-cell lung (H292 and H460) cancer (NSCLC)⁴¹ cell lines at nanomolar concentrations.

Mechanistic studies of the *in vitro* cytotoxicity revealed that **1** displayed antimetastatic activity against NSCLC cells via the apoptosis programmed cell death pathway involving a *p*53-dependent mechanism.⁴² Furthermore, **1** sensitized the anoikis-resistant H460 NSCLC cell line to anoikis by suppressing the survival proteins p-ERK and p-AKT and the antiapoptotic proteins BCL2 and MCL1.⁴³ To further explore the cytotoxicity mechanisms and to also increase its solubility, the left-handed quinone ring A of **1** was reduced to obtain bishydroquinonerenieramycin M (**5**) and acetylated to afford 5-*O*-acetyl hydroquinone renieramycin M (**6a**). Both **1** and **6a** exhibited a similar cytotoxic potency, but **6a** selectively destroyed lung cancer H23 cells via only the apoptosis pathway, while **1** inhibited cancer cells via a combination of the apoptosis and unwanted necrosis mechanisms.⁴⁴ Recently, **5** was reported as a potent cytotoxic agent against the H292 NSCLC cell line and exhibited greater cytotoxicity than **1**. Interestingly, compound **5** induced mitochondria-dependent apoptosis via the suppressions of the antiapoptotic proteins BCL2 and MCL1 and the expression of the pro-apoptotic protein BAX.⁴⁵ On the basis of the cytotoxic profile of **6a**, it is suggested that the hydroquinone moiety at ring A, which resembles a partial structure of the approved anticancer drug trabectedin (ecteinascidin 743)⁴⁶ and the more stable ecteinascidin 770 (**4**), is important for its cytotoxicity.

Using **6a** as a lead compound, we are interested in discovery and development of a new generation of the renieramycins containing the hydroquinone moiety, which might be employed as highly potent and apoptosis-inducing anti-NSCLC therapeutic agents. Herein, we report the preparation of the first series of hydroquinone 5-*O*-monoester analogues of **1** having various substituents, including the small electron-withdrawing substituents such as formate and methyl carbonate, amino esters with *tert*-butyl-carbamate, aliphatic acyl, benzoyl, *trans*-cinnamoyl, and nitrogen-heterocyclic aroyl moieties. All hydroquinone 5-*O*-monoester analogues of renieramycin M were prepared from **1** by Pd-catalyzed hydrogenation followed by regioselective esterification. The *in vitro* cytotoxicity profiles of each prepared analogue were then evaluated against the H292 and H460 NSCLC cell lines.

RESULTS AND DISCUSSION

Renieramycin M (**1**) was isolated from its natural source, the blue *Xestospongia* sp. sponge collected from the Gulf of Thailand. According to our published protocol, the unwanted autodecomposition of the alkaloids was diminished by pretreatment of the fresh blue sponge mash with potassium

cyanide.¹³ Then, the potassium cyanide-pretreated methanolic extract was purified to successfully deliver gram quantities of **1**. The new series of **1** analogues were prepared by a two-step strategy involving hydrogenation of **1** using Pearlman's catalyst ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) for the selective reduction of four quinone carbonyls at atmospheric pressure to quantitatively yield **5**, followed by a mild regiospecific esterification to obtain the desired hydroquinone 5-*O*-monoester analogues (**7a–r**) in acceptable yields (Scheme 1). The esters **7a–d** and **7i–r** were obtained from the corresponding acids and acid chlorides in the presence of standard coupling reagents (EDCI/DMAP), while **6a**, **6b**, and **7e–h** were prepared from the related acid anhydrides in pyridine. After esterification, the hydroquinone at ring E was subjected to air oxidation to regenerate the quinone moiety.¹⁴

From the results shown in Scheme 1, the acylation yields of **5** varied (25–74%) based on the reactivity of the acylating agents and could be optimized by adding more acylating reagents. Moreover, the 5,8-*O*-diacyl analogues were also observed as minor products in some cases. In the cases of **7c** and **7d**, *N*-Boc-L-glycine and *N*-Boc-L-alanine (5 equiv), respectively, were employed to construct the esters at the 5-hydroxy group of **5**. Deprotection of the *tert*-butyl-carbamate was performed using tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF), which was reported as a mild and efficient deprotection protocol.⁴⁷ However, our attempts failed to deliver the desired free amine due to decomposition. Therefore, **7c** and **7d**, containing a carbamate moiety adjacent to the 5-*O*-ester group, were further used for the cytotoxicity evaluation.

All synthetic hydroquinone 5-*O*-monoester analogues **7a–r** were structurally characterized fully by extensive spectroscopic analyses of NMR data in conjunction with high-resolution MS, IR, and electronic circular dichroism (ECD) data (see Supporting Information). The ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of all synthetic analogues were assigned and were in agreement with **6a**⁴⁴ except for the signals of the additional acyl substituents. All new analogues showed two quinone carbonyl carbons at δ_{C} 186.0 $\pm$ 0.1 (C-15) and 182.7 $\pm$ 0.1 (C-18) ppm along with two oxygenated aromatic carbons of the newly formed hydroquinone at δ_{C} 143.2 $\pm$ 0.2 (C-8) and 138.9 $\pm$ 0.4 (C-5) ppm. The additional proton and carbon signals of the 5-*O*-ester substituents were assigned based on COSY, HMQC, and HMBC data. The formation of hydroquinone 5-*O*-monoester analogues at ring A was unambiguously confirmed by the presence of a free phenolic hydroxy proton signal at C-8 in the range δ_{H} 5.70–5.95 ppm. Interestingly, the 8-OH proton signals of **7a** and **7b** were not observed. However, the placement of the formyl ester of **7a** at C-5 was confirmed by correlations of the formyl proton (H-1') to the oxygenated aromatic carbon C-5 via HMBC measurement and to 4-*H* α and

Table 1. Cytotoxicity of Renieramycin M (**1**) and Hydroquinone 5-*O*-Monoester Analogues of **1** against the H292 and H460 Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines

entry	compound	5- <i>O</i> -substituent	cytotoxicity IC ₅₀ ± SD (nM)	
			H292	H460
1	1	5,8-dicarbonyl	24 ± 1	6.5 ± 0.4
2	2	H	61 ± 2	36 ± 1
3	3	5,8-dicarbonyl	217 ± 22	164 ± 11
4	4	acetyl	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1
5	5	H	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1
6	6a	acetyl	3.0 ± 0.6	3.6 ± 0.4
7	6b	5,8- <i>O</i> -diacetyl	28 ± 1	25 ± 1
8	7a	formyl	12 ± 1	9.7 ± 0.5
9	7b	methylcarbonyl	11 ± 1	14 ± 1
10	7c	<i>N</i> -(Boc)-L-glycinoyl	10 ± 1	6 ± 1
11	7d	<i>N</i> -(Boc)-L-alaninoyl	24 ± 3	16 ± 1
12	7e	<i>n</i> -propanoyl	2.3 ± 0.4	5.1 ± 0.5
13	7f	<i>n</i> -butanoyl	6.7 ± 0.7	5.6 ± 0.9
14	7g	<i>n</i> -pentanoyl	36 ± 2	26 ± 3
15	7h	<i>n</i> -hexanoyl	16 ± 3	15 ± 3
16	7i	4-bromobenzoyl	21 ± 2	14 ± 1
17	7j	4-phenylbenzoyl	71 ± 2	54 ± 1
18	7k	2-pyridinecarbonyl	103 ± 8	26 ± 1
19	7l	3-pyridinecarbonyl	59 ± 4	20 ± 1
20	7m	4-pyridinecarbonyl	20 ± 3	11 ± 1
21	7n	3-quinolinecarbonyl	111 ± 10	22 ± 1
22	7o	6-quinolinecarbonyl	54 ± 2	45 ± 1
23	7p	cinnamoyl	12 ± 1	11 ± 1
24	7q	4-fluorocinnamoyl	63 ± 3	17 ± 1
25	7r	3-pyridineacryloyl	57 ± 5	52 ± 1
26	doxorubicin		351 ± 33	34 ± 5
27	cisplatin		12 ± 1 μM	8.2 ± 0.6 μM

6-CH₃ via NOESY measurement (Figure 1). The formation of the methyl carbonate ester of **7b** was assured by NOESY correlation of the methyl carbonate protons (H₃-1') to 6-CH₃. In general, the phenolic proton (8-OH) of **7c–r** showed HMBC correlations to C-7 and C-9 along with NOESY correlations to H-1, 7-OCH₃, and H-22b. This information consequently implied the 5-*O*-acyl substitution. According to our recent report, NOESY correlations of the 22-*O*-ester derivatives of **3** among the 22-*O*-ester side chains and the quinone ring E protons suggested their respective proximity alignment;⁴¹ however, these correlations were not observed in **7a–r** and the parental **1**.¹³ The results implied the different structural alignment between the hydroquinone 5-*O*-monoester analogues of **1** and the 22-*O*-ester derivatives of **3**.

The cytotoxicity of the new hydroquinone 5-*O*-monoester analogues **7a–r** along with their synthetic precursors **1** and **5** was evaluated against the metastatic and drug-resistant H292 and H460 NSCLC cell lines using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.⁴⁸ The resulting IC₅₀ values of the synthetic analogues were also compared with the bistetrahydroisoquinolines **2**, **3**, **6a** and **6b**, and the structurally related potent cytotoxic ecteinascidin 770 (**4**). Noticeably, **2** and **4** have a similar structural feature at ring A as a highly oxygenated aromatic ring containing a methylenedioxy bridge. Cisplatin and doxorubicin, commonly used medications in cancer chemotherapy, were employed as the positive controls. The newly synthesized 5-*O*-ester analogues **7a–r** exhibited an impressive cytotoxicity, with IC₅₀ values in the nanomolar concentration range against the H292 (IC₅₀ 2.3–111 nM) and H460 (IC₅₀ 5.1–54 nM) cell

lines, as shown in Table 1. Notably, most 5-*O*-ester analogues were more cytotoxic than the positive controls. The bistetrahydroisoquinolines **1**, **2**, **3**, and **6a** (entries 1, 2, 3, and 6, respectively) exhibited a similar cytotoxic potency against the NSCLC cells to that previously observed against other human cancer cell lines.^{39–41,45} The trend in potency based on the IC₅₀ values (Table 1) is **6a** > **1** > **2** > **3**, with **6a** being the most potent. According to these results, we speculated that the 5-*O*-ester hydroquinone and 22-*O*-ester motifs are essential pharmacophores for improving the cytotoxicity. Interestingly, we initially evaluated the cytotoxicity profiles of **4** and **5**, which belong to the tetrahydroisoquinoline type, regarding their common oxygenated aromatic moieties at rings A and E. To our surprise, both **4** and **5** displayed equal cytotoxic potencies, which were about 15- and 6-fold more potent than **1** toward the H292 and H460 cell lines, respectively (entries 4 and 5, Table 1). The presence of two hydroquinone moieties with four free phenolic hydroxy groups in **5** significantly improved the cytotoxic potency, presumably regarding its improved solubility compared to the lead **1**, for which precipitation was observed at a concentration of 1 μM in the aqueous medium during the *in vitro* cytotoxicity. In addition, the hydroquinone motif might mimic the aromatic pharmacophore of **4**, leading to the enhanced structure–cytotoxicity relationship toward the NSCLC cells. However, the unstable bishydroquinone moiety of **5** is gradually oxidized to the original bisquinone **1** during storage.

The small electron-withdrawing substituents represented by the formate and carbonate groups in **7a** and **7b** (entries 8 and 9, respectively) resulted in an approximate 2-fold increase in

cytotoxicity against the H292 cell line, while having slightly less toxicity to the H460 cell line, relative to **1**. Importantly, the steric footprint of the new generation renieramycin analogues might play a role in cytotoxicity. On the basis of the overall IC_{50} values in Table 1 (entries 6 and 10–25), the smaller steric substituents generally possessed a higher cytotoxic potency than the larger substituents. For example, the IC_{50} values of **6a** < **7e** < **7f** < **7g**, **7c** < **7d**, and **7i** < **7j** were observed from cytotoxicity evaluation against both H292 and H460 cell lines. Among the aliphatic acyl substituents (entries 6 and 8–15), 5-*O*-acetyl (**6a**, entry 6) and 5-*O*-propanoyl (**7e**, entry 12) analogues were the most potent cytotoxic compounds, exhibiting an approximate 8- to 10-fold more potent cytotoxicity than **1** against the H292 cell line, but only slightly increased cytotoxicity toward the H460 cell line. In contrast, the 5-*O*-ester analogues containing the large bulky aryl substituents such as the benzoyl (**7i** and **7j**, entries 16 and 17), nitrogen-heterocyclic (**7k–o**, entries 18–22), cinnamoyl (**7p** and **7q**, entries 23 and 24), and 3-pyridineacryloyl (**7r**, entry 25) moieties had decreased cytotoxicity against the H292 cells, except for **7i** and **7m**, having similar IC_{50} values, and **7p**, having a 2-fold increase in cytotoxicity compared to **1**. All of these bulkier analogues were approximately 2- to 8-fold less potent toward the H460 cell line compared to **1**. It is noteworthy that 5-*O*-(2-pyridinecarbonyl) ester (**7k**, entry 18) and 5-*O*-(3-quinolinecarbonyl) ester (**7n**, entry 21) were 4-fold more toxic against the H460 cell line than the H292 cell line. Finally, it is noted that the 5,8-*O*-diacetyl ester (**6b**, entry 7) possessed a much lower cytotoxicity than the 5-*O*-acetyl ester (**6a**, entry 6), suggesting that a free phenolic hydroxy group at ring A is required for elevating the cytotoxicity, probably due to improved solubility. Although a structure–cytotoxicity relationship could not be completely concluded from the present report, it is suggested that a hydroquinone 5-*O*-monoester at ring A with a less sterically demanding ester at C-5 and a free phenolic hydroxy group at C-8 is an additional important pharmacophore responsible for the improved cytotoxic potency of the new generation renieramycin analogues.

In conclusion, 20 hydroquinone 5-*O*-monoester analogues of renieramycin **1** were synthesized from the naturally derived **1** isolated from the Thai blue sponge *Xestospongia* sp., involving a two-step hydrogenation and selective esterification process. Our current finding revealed that the development of **1** as the hydroquinone 5-*O*-monoester analogues by modifying the quinone ring A may deliver more effective antiproliferative agents against lung cancer cell lines. Among these new generation analogues, 5-*O*-acetyl ester **6a** and 5-*O*-propanoyl ester **7e** expressed the most prominent cytotoxicity, exhibiting 8- and 10-fold increases in cytotoxicity against the metastatic H292 NSCLC cell line, respectively, relative to **1**. Further cancer cell based studies to identify the cellular mechanism and the corresponding protein targets will provide more understanding of the antiproliferative activity and may encourage the clinical applications of renieramycin analogues as new potential anti-lung cancer drug candidates.

■ EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a Horiba-SEPA-200 polarimeter in a 1 dm cell, unless otherwise stated. ECD spectra were obtained on a Jasco J-820 spectropolarimeter. Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were measured on a Shimadzu IRAffinity-1 FT-IR spectrophotometer. 1H and ^{13}C NMR spectra were obtained from a JEOL-JNM XL 500 FT-

NMR spectrometer, unless otherwise stated. Tetramethylsilane and deuteriochloroform ($CDCl_3$) served as internal standards at 0.00 ppm for 1H NMR and 77.0 ppm for ^{13}C NMR, respectively. 2D NMR experiments including COSY, DEPT, HMQC, HMBC, and NOESY techniques were performed to assign bond and space connectivity of protons and carbons. Mass spectra were recorded on a JEOL-JMS 700 mass spectrometer. Reactions were performed in oven-dried glassware and magnetically stirred under an argon atmosphere using a calcium chloride U-tube equipped with an argon balloon, unless otherwise noted. Room-temperature (rt) was 25 °C, unless otherwise stated. Commercial solvents and reagents were used as received, unless otherwise explained. Anhydrous solvents were dried over 4 Å molecular sieves. All reactions were monitored by thin-layer chromatography (silica gel GF₂₅₄) examined under UV light (254 nm). Yields refer to chromatographically and spectroscopically pure compounds unless otherwise stated.

Sponge Material and Isolation of 1. The blue sponge *Xestospongia* sp. was collected by scuba diving in the vicinity of Sichang Island, the Gulf of Thailand, at a depth of 3–5 m in June 2013. The fresh sponges were treated with KCN in pH 7 buffer solution and purified as explained in previous publications.^{13,41}

Preparation of 5. Compound **5** was freshly prepared prior to being used as the starting material for each desired esterification reaction. Each time, **1** (37.0 mg, 0.065 mmol) was dissolved in dry EtOAc (20 mL). The resulting orange solution was treated with 20% Pd(OH)₂ on carbon (19.0 mg, 50% w/w). A hydrogen balloon was attached to the reaction flask. Air was removed, and the reaction mixture was blanketed with hydrogen gas. The heterogeneous reaction was stirred vigorously at rt for 5 h. After completion, the reaction mixture was filtered through a short pad of Celite and washed with EtOAc (20 mL, 3 times) and $CHCl_3$ (20 mL, 3 times). The filtrates were combined and concentrated *in vacuo* to yield **5** as a colorless, amorphous solid in quantitative yield. The product was employed in the next step without further purification.

General Synthetic Procedure of 7a–d and 7i–r. Compound **5** (10.0 mg, 0.017 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (2 mL). To the colorless reaction mixture was added 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)-propyl)carbodiimide hydrochloride (EDCI-HCl, 3.3 mg, 0.017 mmol) and *N,N*-4-dimethylaminopyridine (DMAP, 2.1 mg, 0.017 mmol) to afford a light brown solution. Then, the corresponding acid or acid chloride (1–10 equiv, 0.017–0.17 mmol) was added, and the reaction was stirred at rt under an argon atmosphere for 3 h. After completion, the bright yellow reaction mixture was quenched by the addition of H₂O (5 mL). The organic layer was separated by separatory funnel, and the aqueous layer was extracted with $CHCl_3$ (10 mL, 3 times). The organic layers were combined, washed with brine (30 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo*. Purification of the residue by silica gel flash column chromatography eluting with hexane/EtOAc (3:1) gave the corresponding hydroquinone 5-*O*-monoester analogue of **1** as a yellow, amorphous solid. Formic acid (10 equiv) was used for the preparation of **7a**. Methyl chloroformate (1 equiv) was used for the preparation of **7b**. *N*-Boc-L-glycine and *N*-Boc-L-alanine (5 equiv) were employed for the preparation of **7c** and **7d**, respectively. 4-Bromobenzoyl chloride, 4-phenylbenzoyl chloride, picolinoyl chloride-HCl, nicotinoyl chloride-HCl, isonicotinoyl chloride-HCl, 3-quinolinecarboxylic acid, 6-quinolinecarboxylic acid, cinamoyl chloride, 4-fluorocinamoyl chloride, and 3-(3-pyridyl)acrylic acid (1 equiv) were employed for the preparations of **7i–r**, respectively.

General Synthetic Procedure of 6a, 6b, and 7e–h. Compound **5** (20.0 mg, 0.034 mmol) was dissolved in pyridine (1.2 mL). The corresponding acid anhydride (1.5 equiv, 0.051 mmol) was added to the reaction mixture, which was then stirred at rt under an argon atmosphere for 12 h. Then, the reaction mixture was poured into H₂O and extracted with $CHCl_3$ (10 mL, 3 times). The combined organic layer was washed with brine (10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and evaporated under reduced pressure to give a residue. The residue was purified by silica gel column chromatography using an appropriate ratio of eluent (hexane/EtOAc) to give the corresponding hydroquinone 5-*O*-acetylc ester analogue of **1** as a yellow, amorphous

solid. Acetic anhydride was employed for the preparation of **6a** and **6b**. Propionic anhydride, butyric anhydride, valeric anhydride, and *n*-hexanoic anhydride were used for the preparations of **7e–h**, respectively.

The physical and spectroscopic characterizations of **7a–r** are provided in the [Supporting Information](#). The physical and spectroscopic data of **5**, **6a**, and **6b** were previously described.¹⁴

Cytotoxicity MTT Assay. The cytotoxicity was evaluated against the metastatic H292 and H460 human NSCLC cell lines (American Type Culture Collection) employing the MTT assay.⁴⁸ The experimental details were previously described.⁴¹ Cisplatin and doxorubicin were used as the positive controls.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the [ACS Publications website](#) at DOI: [10.1021/acs.jnatprod.7b00068](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00068).

Physical and spectroscopic data and ¹H and ¹³C NMR spectra of hydroquinone 5-O-monoester analogues of renieramycin M ([PDF](#))

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Tel and Fax (N. Saito): +81 42 495 8794. E-mail: naoki@my-pharm.ac.jp.

*Tel (K. Suwanborirux): +668 9107 4069. Fax: +66 2218 8357. E-mail: khanit.s@pharm.chula.ac.th.

ORCID

Supakarn Chamni: 0000-0002-8941-1046

Pithi Chanvorachote: 0000-0003-1700-0640

Khanit Suwanborirux: 0000-0002-8134-4993

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Thai Research Fund, Thailand (MRG 5980175), to S.C., the Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS) Grant-in Aid for Scientific Research (C) (No. 15K07873) to N.Sa., and the Meiji Pharmaceutical University Asia/Africa Center for Drug Discovery, Japan (MPU-AACDD), to N.Sa.

■ REFERENCES

- (1) Munro, M. H.; Blunt, J. W.; Dumdei, E. J.; Hickford, S. J.; Lill, R. E.; Li, S.; Battershill, C. N.; Duckworth, A. R. *J. Biotechnol.* **1999**, *70*, 15–25.
- (2) Mayer, A. M. S.; Gustafson, K. R. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 2241–2270.
- (3) Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 69–85.
- (4) Mayer, A. M. S.; Glaser, K. B.; Cuevas, C.; Jacobs, R. S.; Kem, W.; Little, R. D.; McIntosh, J. M.; Newman, D. J.; Potts, B. C.; Shuster, D. E. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 255–265.
- (5) Thomas, T. R. A.; Kavlekar, D. P.; LokaBharathi, P. A. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1417–1468.
- (6) Essack, M.; Bajic, V. B.; Archer, J. A. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1580–1606.
- (7) Montaser, R.; Luesch, H. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1475–1489.
- (8) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 160–258.
- (9) Scott, J. D.; Williams, R. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669–1730.
- (10) Frincke, J. M.; Faulkner, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 265–269.
- (11) He, H. Y.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5822–5824.
- (12) Davidson, B. S. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3721–3724.
- (13) Suwanborirux, K.; Amnuoypol, S.; Plubrukarn, A.; Pummangura, S.; Kubo, A.; Tanaka, C.; Saito, N. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1441–1446.
- (14) Amnuoypol, S.; Suwanborirux, K.; Pummangura, S.; Kubo, A.; Tanaka, C.; Saito, N. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1023–1028.
- (15) Tatsukawa, M.; Punzalan, L. L. C.; Magpantay, H. D. S.; Villaseñor, I. M.; Concepcion, G. P.; Suwanborirux, K.; Yokoya, M.; Saito, N. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7422–7428.
- (16) Saito, N.; Hiramatsu, A.; Hirade, H.; Kubota, M.; Toyoshima, R.; Fujino, A.; Sirimangkalakitti, N.; Suwanborirux, K.; Concepcion, G. P. *Heterocycles* **2017**, *95*, 74810.3987/COM-16-S(S)77.
- (17) Parameswaran, P. S.; Naik, C. G.; Kamat, S. Y.; Pramanik, B. N. *Indian J. Chem.* **1998**, *37B*, 1258–1263.
- (18) Pettit, G. R.; Knight, J. C.; Collins, J. C.; Herald, D. L.; Pettit, R. K.; Boyd, M. R.; Young, V. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 793–798.
- (19) Oku, N.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1136–1139.
- (20) Fontana, A.; Cavaliere, P.; Wahidulla, S.; Naik, C. G.; Cimino, G. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7305–7308.
- (21) Charupant, K.; Suwanborirux, K.; Amnuoypol, S.; Saito, E.; Kubo, A.; Saito, N. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 81–86.
- (22) He, W. F.; Li, Y.; Feng, M. T.; Gavagnin, M.; Mollo, E.; Mao, S. C.; Guo, Y. W. *Fitoterapia* **2014**, *96*, 109–114.
- (23) Huang, R. Y.; Chen, W. T.; Kurtan, T.; Mandi, A.; Ding, J.; Li, J.; Li, X. W.; Guo, Y. W. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 17–27.
- (24) Saito, N.; Tanaka, C.; Koizumi, Y.-i.; Suwanborirux, K.; Amnuoypol, S.; Pummangura, S.; Kubo, A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3873–3881.
- (25) Lane, J. W.; Chen, Y.; Williams, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12684–12690.
- (26) Magnus, P.; Matthews, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12476–12477.
- (27) Chen, X.; Zhu, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 3962–3965.
- (28) Vincent, G.; Williams, R. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1517–1520.
- (29) Wu, Y. C.; Zhu, J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5558–5561.
- (30) Avendaño, C.; de la Cuesta, E. *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 9722–9734.
- (31) Liu, W.; Dong, W.; Liao, X.; Yan, Z.; Guan, B.; Wang, N.; Liu, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1419–1421.
- (32) Yokoya, M.; Ito, H.; Saito, N. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 787–792.
- (33) Yokoya, M.; Shinada-Fujino, K.; Yoshida, S.; Mimura, M.; Takada, H.; Saito, N. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4166–4181.
- (34) Nakai, K.; Yokoya, M.; Saito, N. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 853–869.
- (35) Yokoya, M.; Kobayashi, K.; Sato, M.; Saito, N. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4915–4933.
- (36) Jia, J.; Chen, R.; Liu, H.; Li, X.; Jia, Y.; Chen, X. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7334–7344.
- (37) Yokoya, M.; Toyoshima, R.; Suzuki, T.; Le, V. H.; Williams, R. M.; Saito, N. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4039–4047.
- (38) Lane, J. W.; Estevez, A.; Mortara, K.; Callan, O.; Spencer, J. R.; Williams, R. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3180–3183.
- (39) Daikuhara, N.; Tada, Y.; Yamaki, S.; Charupant, K.; Amnuoypol, S.; Suwanborirux, K.; Saito, N. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4276–4278.
- (40) Charupant, K.; Daikuhara, N.; Saito, E.; Amnuoypol, S.; Suwanborirux, K.; Owa, T.; Saito, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4548–4558.
- (41) Sirimangkalakitti, N.; Chamni, S.; Charupant, K.; Chanvorachote, P.; Mori, N.; Saito, N.; Suwanborirux, K. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2089–2093.
- (42) Halim, H.; Chunhacha, P.; Suwanborirux, K.; Chanvorachote, P. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 193–201.
- (43) Sirimangkalakitti, N.; Chamni, S.; Suwanborirux, K.; Chanvorachote, P. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 1665–1672.

- (44) Cheun-Arom, T.; Chanvorachote, P.; Sirimangkalakitti, N.; Chuanasa, T.; Saito, N.; Abe, I.; Suwanborirux, K. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1468–1474.
- (45) Pinkhien, T.; Maiuthed, A.; Chamni, S.; Suwanborirux, K.; Saito, N.; Chanvorachote, P. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 6327–6334.
- (46) In U.S. Food and Drug Administration. *FDA approves new therapy for certain types of advanced soft tissue sarcoma*; Silver Spring: MD, USA, 2015.
- (47) Routier, S.; Saugé, L.; Ayerbe, N.; Coudert, G.; Mérour, J.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 589–591.
- (48) Riss, T. L. M. R. A.; Niles, A. L.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. In *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, 2004.

**Chemistry of Renieramycins. 17. A New Generation of
Renieramycins: Hydroquinone 5-O-Monoester Analogues of
Renieramycin M as Potential Cytotoxic Agents against Non-Small-
Cell Lung Cancer Cells**

Supakarn Chamni,[†] Natchanun Sirimangkalakitti,[†] Pithi Chanvorachote,[‡] Naoki Saito,^{,§} Khanit
Suwanborirux^{*,†}*

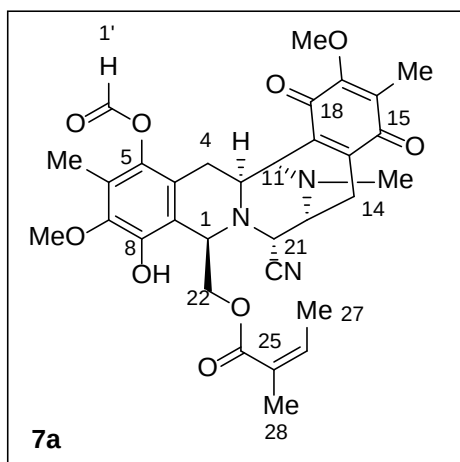
[†]Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME),
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, and [‡]Cell-Based Drug and Health Product
Development Research Unit and Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

[§]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose,
Tokyo 204-8588, Japan

Table of Contents	Page
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(formyl) ester analogue of renieramycin M, 7a	5
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(methylcarbonyl) ester analogue of renieramycin M, 7b	6
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(<i>N</i> -(Boc)-L-glycinoyl) ester analogue of renieramycin M, 7c	7
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(<i>N</i> -(Boc)-L-alaninoyl) ester analogue of renieramycin M, 7d	8
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(<i>n</i> -propanoyl) ester analogue of renieramycin M, 7e	9
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(<i>n</i> -butanoyl) ester analogue of renieramycin M, 7f	10
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(<i>n</i> -pentanoyl) ester analogue of renieramycin M, 7g	11
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(<i>n</i> -hexanoyl) ester analogue of renieramycin M, 7h	12
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(4-bromobenzoyl) ester analogue of renieramycin M, 7i	13
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(4-phenylbenzoyl) ester analogue of renieramycin M, 7j	14
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(2-pyridinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, 7k	15
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(3-pyridinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, 7l	16
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(4-pyridinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, 7m	17
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(3-quinolinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, 7n	18
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(6-quinolinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, 7o	19
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(cinnamoyl) ester analogue of renieramycin M, 7p	20
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(4-fluorocinnamoyl) ester analogue of renieramycin M, 7q	21
Spectroscopic data of hydroquinone 5- <i>O</i> -(3-pyridineacryloyl) ester analogue of renieramycin M, 7r	22

Table of Figures	Page
Figure S1. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7a in CDCl_3	23
Figure S2. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7a in CDCl_3	24
Figure S3. COSY (500 MHz) spectrum of 7a in CDCl_3	25
Figure S4. HMQC (500 MHz) spectrum of 7a in CDCl_3	26
Figure S5. HMBC (500 MHz) spectrum of 7a in CDCl_3	27
Figure S6. NOESY (500 MHz) spectrum of 7a in CDCl_3	28
Figure S7. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7b in CDCl_3	29
Figure S8. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7b in CDCl_3	30
Figure S9. ^1H NMR (400 MHz) spectrum of 7c in CDCl_3	31
Figure S10. ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum of 7c in CDCl_3	32
Figure S11. ^1H NMR (400 MHz) spectrum of 7d in CDCl_3	33
Figure S12. ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum of 7d in CDCl_3	34
Figure S13. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7e in CDCl_3	35
Figure S14. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7e in CDCl_3	36
Figure S15. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7f in CDCl_3	37
Figure S16. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7f in CDCl_3	38
Figure S17. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7g in CDCl_3	39
Figure S18. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7g in CDCl_3	40
Figure S19. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7h in CDCl_3	41
Figure S20. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7h in CDCl_3	42
Figure S21. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7i in CDCl_3	43
Figure S22. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7i in CDCl_3	44
Figure S23. COSY (500 MHz) spectrum of 7i in CDCl_3	45
Figure S24. HMQC (500 MHz) spectrum of 7i in CDCl_3	46
Figure S25. HMBC (500MHz) spectrum of 7i in CDCl_3	47
Figure S26. NOESY (500 MHz) spectrum of 7i in CDCl_3	48

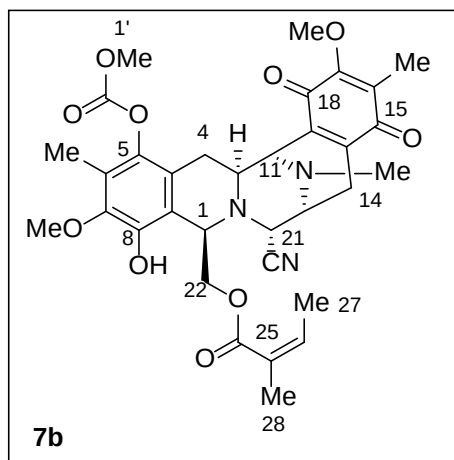
Table of Figures	Page
Figure S27. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7j in CDCl_3	49
Figure S28. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7j in CDCl_3	50
Figure S29. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7k in CDCl_3	51
Figure S30. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7k in CDCl_3	52
Figure S31. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7l in CDCl_3	53
Figure S32. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7l in CDCl_3	54
Figure S33. ^1H NMR (400 MHz) spectrum of 7m in CDCl_3	55
Figure S34. ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum of 7m in CDCl_3	56
Figure S35. ^1H NMR (300 MHz) spectrum of 7n in CDCl_3	57
Figure S36. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7n in CDCl_3	58
Figure S37. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7o in CDCl_3	59
Figure S38. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7o in CDCl_3	60
Figure S39. ^1H NMR (400 MHz) spectrum of 7p in CDCl_3	61
Figure S40. ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum of 7p in CDCl_3	62
Figure S41. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of 7q in CDCl_3	63
Figure S42. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of 7q in CDCl_3	64
Figure S43. COSY (500 MHz) spectrum of 7q in CDCl_3	65
Figure S44. HMQC (500 MHz) spectrum of 7q in CDCl_3	66
Figure S45. HMBC (500 MHz) spectrum of 7q in CDCl_3	67
Figure S46. NOSEY (500 MHz) spectrum of 7q in CDCl_3	68
Figure S47. ^1H NMR (300 MHz) spectrum of 7r in CDCl_3	69
Figure S48. ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum of 7r in CDCl_3	70



hydroquinone 5-O-(formyl) ester analogue of renieramycin M,

7a: yield 47%; yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -1.8$ (c 0.001, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 9.9 μM , MeOH, 25 $^\circ\text{C}$) +0.6 (438), 0.0 (392), -0.7 (357), -0.5 (332), -0.2 (308), -0.3 sh (292), +0.5 (274), +1.2 (257), +0.6 (237); IR (KBr) ν_{max} 3406 (br), 2961, 2924, 2853, 1740, 1716, 1653, 1618, 1460, 1261, 1234, 1150, 1096, 1043, 802 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500

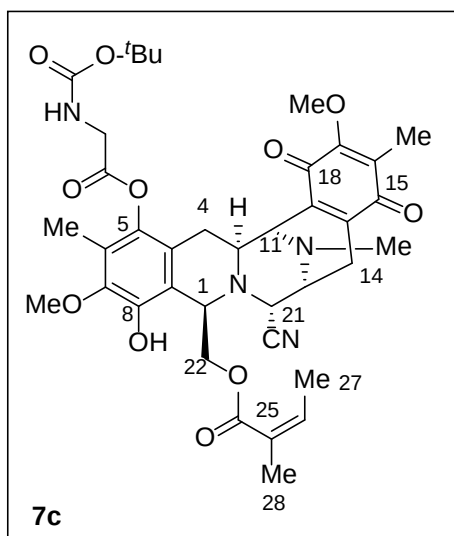
MHz) δ 8.19 (1H, s, H-1'), 5.93 (1H, qq, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-26), 4.41 (1H, dd, $J = 11.5, 3.2$ Hz, H-22b), 4.25 (1H, dd, $J = 5.2, 3.2$ Hz, H-1), 4.03 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-21), 3.98 (1H, dd, $J = 11.5, 5.2$ Hz, H-22a), 3.92 (1H, overlapped, H-11), 3.90 (3H, s, 17-OCH₃), 3.72 (3H, s, 7-OCH₃), 3.29 (1H, dt, $J = 8.9, 2.6$ Hz, H-13), 3.14 (1H, dt, $J = 12.3, 2.6$ Hz, H-3), 2.68 (1H, dd, $J = 21.2, 8.9$ Hz, H-14 α), 2.50 (1H, dd, $J = 15.5, 2.6$ Hz, H-4 α), 2.22 (1H, d, $J = 21.2$ Hz, H-14 β), 2.20 (3H, s, 12-NCH₃), 2.04 (3H, s, 6-CH₃), 1.85 (3H, s, 16-CH₃), 1.80 (3H, dq, $J = 7.5, 1.6$ Hz, H₃-27), 1.62 (3H, dq, $J = 1.6, 1.5$ Hz, H₃-28), 1.60 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 158.3 (C, 5-OC=O), 155.4 (C, C-17), 143.8 (C, C-7), 143.4 (C, C-8), 141.9 (C, C-20), 140.1 (CH, C-26), 138.0 (C, C-5), 135.4 (C, C-19), 128.9 (C, C-16), 126.7 (C, C-25), 124.1 (C, C-10), 122.3 (C, C-6), 117.5 (C, 21-CN), 117.4 (C, C-9), 64.5 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.8 (CH₃, 17-OCH₃), 59.6 (CH, C-21), 56.4 (CH, C-1), 55.4 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.7 (CH, C-11), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 27.7 (CH₂, C-4), 21.2 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HREIMS m/z 605.2375 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9$, 605.2373).



hydroquinone 5-*O*-(methylcarbonyl) ester analogue of renieramycin *M*, **7b**: yield 25%; yellow amorphous powder;

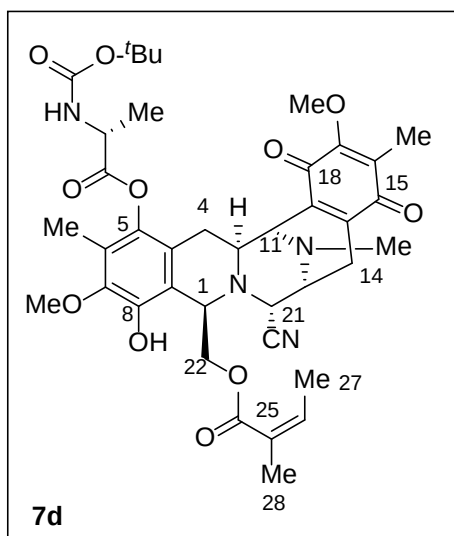
$[\alpha]_D^{25} -3.9$ (*c* 0.001, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (*c* 9.4 μ M, MeOH, 25 °C) +1.2 (433), -1.3 (392), -3.8 (359), -2.7 (333), -1.1 (310), -0.2 sh (290), +1.0 (281), +3.3 (273), +5.2 (260), +3.2 (247), +0.3 (237); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3433, 2959, 2926, 2855, 1768, 1740, 1715, 1653, 1618, 1458, 1385, 1261, 1231, 1153, 1098,

1038, 802 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.98 (1H, qq, *J* = 7.5, 1.5 Hz, H-26), 4.44 (1H, dd, *J* = 11.5, 2.9 Hz, H-22b), 4.29 (1H, dd, *J* = 5.2, 2.9 Hz, H-1), 4.08 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-21), 4.02 (1H, dd, *J* = 11.5, 5.2 Hz, H-22a), 3.96 (1H, overlapped, H-11), 3.95 (3H, s, 17-OCH₃), 3.87 (3H, s, H₃-1'), 3.76 (3H, s, 7-OCH₃), 3.34 (1H, dt, *J* = 7.5, 2.6 Hz, H-13), 3.20 (1H, dt, *J* = 12.6, 2.3 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, *J* = 20.9, 7.5 Hz, H-14 α), 2.62 (1H, dd, *J* = 15.5, 2.3 Hz, H-4 α), 2.27 (1H, d, *J* = 20.9 Hz, H-14 β), 2.25 (3H, s, 12-NCH₃), 2.11 (3H, s, 6-CH₃), 1.90 (3H, s, 16-CH₃), 1.85 (3H, dq, *J* = 7.5, 1.6 Hz, H₃-27), 1.68 (3H, dq, *J* = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.60 (1H, overlapped, H-4 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 155.4 (C, C-17), 153.8 (C, 5-OC=O), 143.7 (C, C-7), 143.3 (C, C-8), 141.8 (C, C-20), 140.0 (CH, C-26), 139.3 (C, C-5), 135.5 (C, C-19), 128.9 (C, C-16), 126.7 (C, C-25), 124.4 (C, C-10), 122.5 (C, C-6), 117.5 (C, 21-CN), 117.2 (C, C-9), 64.7 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.7 (CH₃, 17-OCH₃), 59.7 (CH, C-21), 56.4 (CH, C-1), 55.5 (CH, C-3), 55.4 (CH₃, C-1'), 54.8 (CH, C-13), 54.7 (CH, C-11), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 27.2 (CH₂, C-4), 21.2 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 9.8 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HREIMS *m/z* 635.2477 [M]⁺ (calcd for C₃₃H₃₇N₃O₁₀, 635.2479).



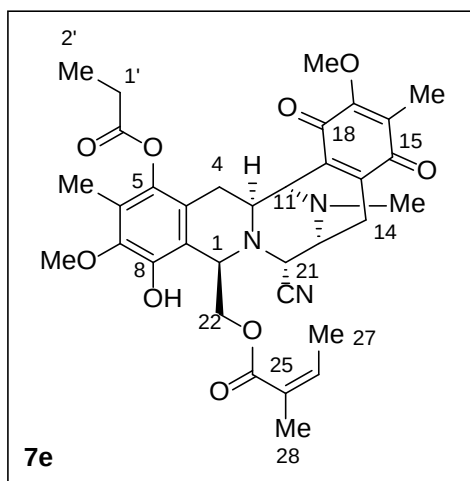
hydroquinone 5-*O*-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-glycinoyl) ester analogue of renieramycin *M*, **7c**: yield 26%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +161.7$ (*c* 0.001, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (*c* 11.0 μ M, MeOH, 20 °C) +1.8 (420), 0.0 (384), −1.0 (353), −0.4 (323), 0.0 (298), +1.9 (282), +3.1 (264), +2.0 (244), +1.5 (229), +2.6 (217); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3393, 2961, 2926, 2855, 1775, 1717, 1653, 1616, 1462, 1369, 1261, 1234, 1153, 1094, 1059, 1030, 802 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.93 (1H, qq, *J* = 7.6, 1.5 Hz,

H-26), 5.70 (1H, s, 8-OH), 5.00 (1H, br s, NH), 4.44 (1H, br d, *J* = 10.8 Hz, H-22a), 4.24 (2H, d, *J* = 4.4 Hz, NHCH₂), 4.16 (1H, br d, *J* = 5.2 Hz, H-1), 4.04 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-21), 3.98 (1H, dd, *J* = 10.8, 5.2 Hz, H-22b), 3.90 (3H, s, 17-OCH₃), 3.88 (1H, br d, *J* = 2.0 Hz, H-11), 3.71 (3H, s, 7-OCH₃), 3.29 (1H, dt, *J* = 8.0, 2.8 Hz, H-13), 3.12 (1H, dt, *J* = 12.0, 2.4 Hz, H-3), 2.68 (1H, dd, *J* = 21.6, 8.0 Hz, H-14 α), 2.40 (1H, ddd, *J* = 15.2, 12.0, 2.0 Hz, H-4 α), 2.22 (1H, d, *J* = 21.6 Hz, H-14 β), 2.20 (3H, s, 12-NCH₃), 2.02 (3H, s, 6-CH₃), 1.86 (3H, s, 16-CH₃), 1.80 (3H, dq, *J* = 7.6, 1.6 Hz, H₃-27), 1.61 (3H, dq, *J* = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.55 (1H, dd, *J* = 15.2, 12.0 Hz, H-4 β), 1.42 (9H, s, H₉-*t*Bu); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.8 (C, C-18), 180.9 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-24), 155.4 (C, NC=O), 155.4 (C, C-17), 143.8 (C, C-7), 143.3 (C, C-8), 141.9 (C, C-20), 140.1 (CH, C-26), 138.7 (C, C-5), 135.4 (C, C-19), 129.7 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.1 (C, C-10), 122.5 (C, C-6), 117.5 (C, 21-CN), 117.2 (C, C-9), 80.2 (C, *t*Bu), 64.3 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.8 (CH₃, 17-OCH₃), 59.4 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.2 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.8 (CH, C-11), 42.2 (CH₂, NHCH₂), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 28.3 (CH₃, *t*Bu), 27.9 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 10.0 (CH₃, 6-CH₃), 8.7 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS *m/z* 735.3250 [M+H]⁺ (calcd for C₃₈H₄₇N₄O₁₁, 735.3242).



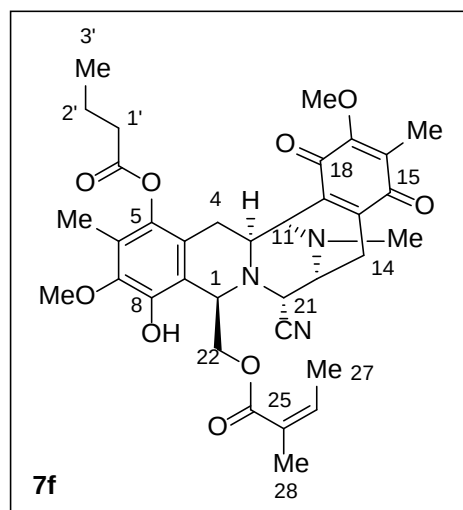
hydroquinone 5-*O*-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-alaninoyl) ester analogue of renieramycin M, **7d**: yield 44%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +34.1$ (c 0.004, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 11.0 μM , MeOH, 20 $^\circ\text{C}$) +1.7 (401), -0.4 (381), -1.7 (357), -0.5 (331), +0.8 (307), +1.9 (294), +5.2 (282), +7.0 (267), +5.4 (250), +2.4 (236); IR (KBr) ν_{max} 3393, 2976, 2938, 1765, 1717, 1653, 1616, 1458, 1369, 1304, 1234, 1153, 1059, 1059 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6.01 (1H, qq, J = 7.6, 1.5 Hz, H-26), 5.78

(1H, s, 8-OH), 5.00 (1H, br d, J = 9.6 Hz, NH), 4.59 (1H, t, J = 7.2 Hz, NHCH), 4.48 (1H, dd, J = 11.2, 2.8 Hz, H-22b), 4.31 (1H, dd, J = 2.8, 5.6 Hz, H-1), 4.11 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-21), 4.02 (1H, dd, J = 11.2, 5.6 Hz, H-22a), 3.97 (3H, s, 17-OCH₃), 3.94 (1H, br d, J = 2.8 Hz, H-11), 3.78 (3H, s, 7-OCH₃), 3.35 (1H, dt, J = 7.6, 2.4 Hz, H-13), 3.20 (1H, dt, J = 12.0, 2.4 Hz, H-3), 2.75 (1H, dd, J = 21.1, 7.6 Hz, H-14 α), 2.54 (1H, ddd, J = 15.2, 12.0, 2.8 Hz, H-4 α), 2.27 (3H, s, 12-NCH₃), 2.28 (1H, d, J = 21.1 Hz, H-14 β), 2.11 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-CH₃), 1.88 (3H, dq, J = 7.6, 1.6 Hz, H₃-27), 1.72 (3H, br s, NHCHCH₃), 1.71 (3H, dq, J = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.64 (1H, dd, J = 15.2, 12.0 Hz, H-4 β), 1.47 (9H, s, H₉-*t*Bu); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.8 (C, C-18), 171.6 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-24), 155.2 (C, C-17), 155.0 (C, NC=O), 143.8 (C, C-7), 143.3 (C, C-8), 142.0 (C, C-20), 140.0 (CH, C-26), 138.7 (C, C-5), 135.4 (C, C-19), 129.0 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.1 (C, C-10), 122.7 (C, C-6), 117.5 (21-CN), 117.1 (C, C-9), 80.1 (C, *t*Bu), 64.8 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.8 (CH₃, 17-OCH₃), 59.7 (CH, C-21), 56.4 (CH, C-1), 55.4 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.8 (CH, C-11), 49.3 (CH₂, NHCH₂), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 28.3 (CH₃, *t*Bu), 27.5 (CH₂, C-4), 21.2 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 18.7 (CH₃, NHCHCH₃), 15.8 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.7 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 749.3392 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for C₃₉H₄₉N₄O₁₁, 749.3398).



hydroquinone 5-*O*-(*n*-propanoyl) ester analogue of renieramycin M, **7e**: yield 59%; yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +41.0$ (c 0.400, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 12.6 μM , MeOH, 26 $^\circ\text{C}$) 0 (233), -4.8 (235), 0 (236), $+35.5$ (264), 0 (291), -44.1 (357), 0 (407); IR (KBr) ν_{max} 3429, 2943, 2855, 1759, 1713, 1653, 1616, 1460, 1304, 1233, 1153 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.00 (1H, qq, $J = 7.4, 1.5$ Hz, H-

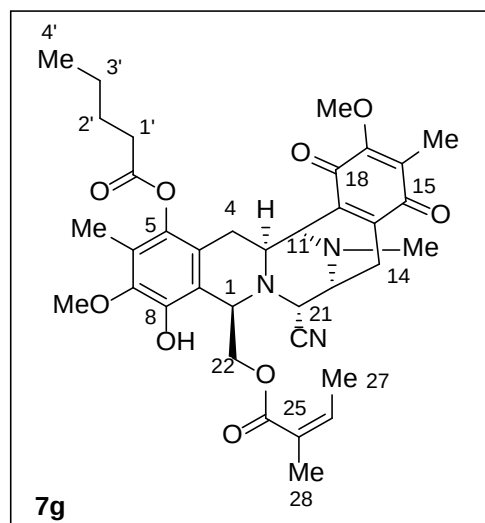
26), 5.79 (1H, s, 8-OH), 4.50 (1H, br d, $J = 10.8$ Hz, H-22b), 4.32 (1H, ddd, $J = 4.2, 3.2, 2.1$ Hz, H-1), 4.11 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-21), 4.04 (1H, dd, $J = 10.8, 4.2$ Hz, H-22a), 3.96 (1H, overlapped, H-11), 3.96 (3H, s, 17-OCH₃), 3.77 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, ddd, $J = 7.7, 2.5, 1.9$ Hz, H-13), 3.20 (1H, ddd, $J = 12.1, 2.6, 2.3$ Hz, H-3), 2.75 (1H, dd, $J = 21.0, 7.7$ Hz, H-14 α), 2.62 (2H, q, $J = 7.6$ Hz, H₃-1'), 2.52 (1H, br d, $J = 14.9$ Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, $J = 21.0$ Hz, H-14 β), 2.27 (3H, s, 12-NCH₃), 2.08 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-CH₃), 1.88 (3H, dq, $J = 7.4, 1.6$ Hz, H₃-27), 1.70 (3H, dq, $J = 1.6, 1.5$ Hz, H₃-28), 1.63 (1H, ddd, $J = 14.9, 12.1, 2.1$ Hz, H-4 β), 1.32 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H₂-2'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 172.1 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-24), 155.4 (C, C-17), 143.7 (C, C-7), 143.0 (C, C-8), 141.8 (C, C-20), 140.0 (CH, C-26), 139.0 (C, C-5), 135.5 (C, C-19), 128.8 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.3 (C, C-10), 122.3 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.1 (C, C-9), 64.6 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.7 (CH₃, 17-OCH₃), 59.6 (CH, C-21), 56.4 (CH, C-1), 55.3 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.7 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.7 (CH₂, C-4), 27.3 (CH₂, C-1'), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 9.9 (CH₃, 6-CH₃), 9.4 (CH₃, C-2'), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HREIMS m/z 633.2688 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_9$, 633.2686).



hydroquinone 5-O-(*n*-butanoyl) ester analogue of renieramycin

M, **7f**: yield 53%; yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +233.0$ (*c* 0.500, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (*c* 12.4 μ M, MeOH, 27 °C) 0.0 (232), -0.5 (234), 0 (238), +2.5 sh (247), +4.0 (267), 0 (293), -4.5 (357), 0 (401); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3435, 2963, 2940, 1757, 1715, 1653, 1616, 1460, 1304, 1233, 1153 cm⁻¹; ¹H- NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.00 (1H, qq, *J* = 7.3, 1.5 Hz, H-26), 5.79 (1H, s, 8-OH), 4.49 (1H, br d, *J* = 11.0 Hz, H-22b), 4.32 (1H,

ddd, *J* = 5.0, 3.3, 2.5 Hz, H-1), 4.11 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-21), 4.04 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, H-22a), 3.96 (1H, overlapped, H-11), 3.96 (3H, s, 17-OCH₃), 3.77 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, ddd, *J* = 7.7, 2.5, 1.4 Hz, H-13), 3.20 (1H, ddd, *J* = 12.4, 2.6, 2.3 Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, *J* = 21.0, 7.7 Hz, H-14 α), 2.57 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H₂-1'), 2.54 (1H, dd, *J* = 15.8, 1.5 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, *J* = 21.0 Hz, H-14 β), 2.27 (3H, s, 12-NCH₃), 2.07 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-CH₃), 1.87 (3H, dq, *J* = 7.3, 1.6 Hz, H₃-27), 1.81 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz, H₂-2'), 1.70 (3H, dq, *J* = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.63 (1H, ddd, *J* = 15.8, 12.4, 2.5 Hz, H-4 β), 1.10 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H₃-3'); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 171.4 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-24), 155.3 (C, C-17), 143.7 (C, C-7), 143.0 (C, C-8), 141.8 (C, C-20), 140.0 (CH, C-26), 139.0 (C, C-5), 135.5 (C, C-19), 128.8 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.3 (C, C-10), 122.4 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.1 (C, C-9), 64.7 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.7 (CH₃, 17-OCH₃), 59.6 (CH, C-21), 56.4 (CH, C-1), 55.4 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-11), 54.7 (CH, C-13), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 35.8 (CH₂, C-1'), 27.6 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 18.6 (CH₂, C-2'), 15.8 (CH₃, C-27), 13.9 (CH₃, C-3'), 10.0 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HREIMS *m/z* 647.2840 [M]⁺ (calcd for C₃₅H₄₁N₃O₉, 647.2843).



hydroquinone 5-*O*-(*n*-pentanoyl) ester analogue of

renieramycin M, **7g**: yield 74%; yellow amorphous powder;

$[\alpha]_D^{25} +148.1$ (*c* 0.600, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (*c* 12.1 μ M,

MeOH, 27 °C) +31.6 (203), +3.8 sh (227), 0 (234), -0.4

(236), 0 (241), +0.7 (265), 0 (281), -0.7 (286), -2.2 (359), 0

(396); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3426, 2959, 2936, 1757, 1715, 1653,

1616, 1462, 1306, 1233, 1152, 1109, 1059 cm⁻¹; ¹H NMR

(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.00 (1H, qq, *J* = 7.4, 1.6 Hz, H-26),

5.80 (1H, s, 8-OH), 4.49 (1H, br d, *J* = 11.1 Hz, H-22b), 4.32 (1H, ddd, *J* = 5.0, 3.2, 2.9 Hz, H-1), 4.11

(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-21), 4.04 (1H, dd, *J* = 11.1, 5.0 Hz, H-22a), 3.96 (1H, overlapped, H-11), 3.96 (3H,

s, 17-OCH₃), 3.77 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, ddd, *J* = 7.6, 2.2, 1.7 Hz, H-13), 3.20 (1H, ddd, *J* = 12.4,

2.9, 2.4 Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, *J* = 21.0, 7.6 Hz, H-14 α), 2.59 (2H, t, *J* = 7.7, 3.7 Hz, H₂-1'), 2.53 (1H, m,

H-4 α), 2.28 (1H, d, *J* = 21.0 Hz, H-14 β), 2.27 (3H, s, 12-NCH₃), 2.07 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-

CH₃), 1.87 (3H, dq, *J* = 7.4, 1.5 Hz, H₃-27), 1.78 (2H, quint, *J* = 7.7 Hz, H₂-2'), 1.70 (3H, dq, *J* = 1.6, 1.5

Hz, H₃-28), 1.63 (1H, overlapped, H-4 β), 1.50 (2H, sext, *J* = 7.6 Hz, H₂-3'), 1.02 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H₃-

4'); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 171.5 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-

24), 155.3 (C, C-17), 143.7 (C, C-7), 143.0 (C, C-8), 141.8 (C, C-20), 139.9 (CH, C-26), 139.0 (C, C-5),

135.5 (C, C-19), 128.8 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.3 (C, C-10), 122.4 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN),

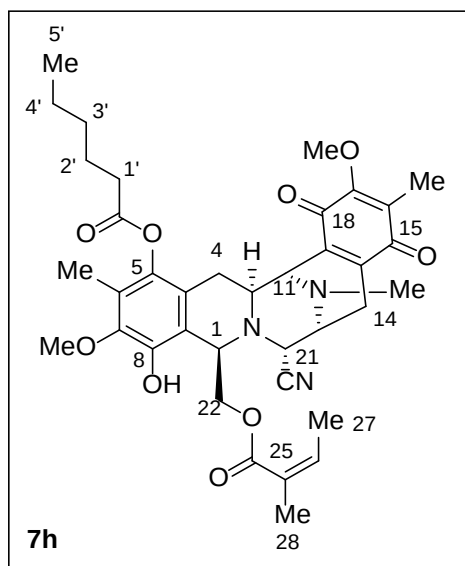
117.1 (C, C-9), 64.7 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.6 (CH₃, 17-OCH₃), 59.6 (CH, C-21), 56.4 (CH,

C-1), 55.4 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.7 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 33.7 (CH₂, C-1'), 27.6

(CH₂, C-4), 27.2 (CH₂, C-2'), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 22.5 (CH₂, C-3'), 15.8 (CH₃, C-27),

13.7 (CH₃, C-4'), 10.0 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS *m/z* 662.3072 [M+H]⁺ (calcd for

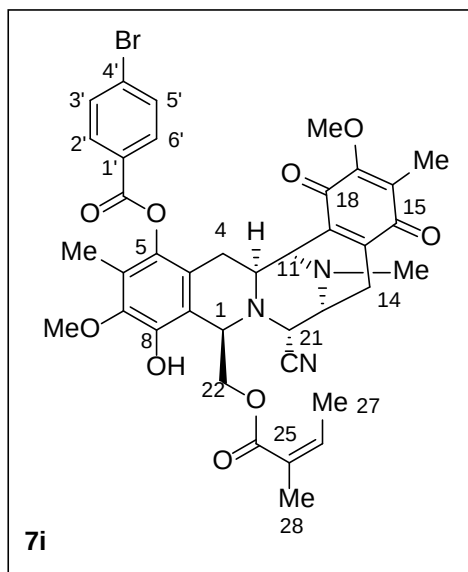
C₃₆H₄₄N₃O₉, 662.3078).



hydroquinone 5-O-(*n*-hexanoyl) ester analogue of renieramycin

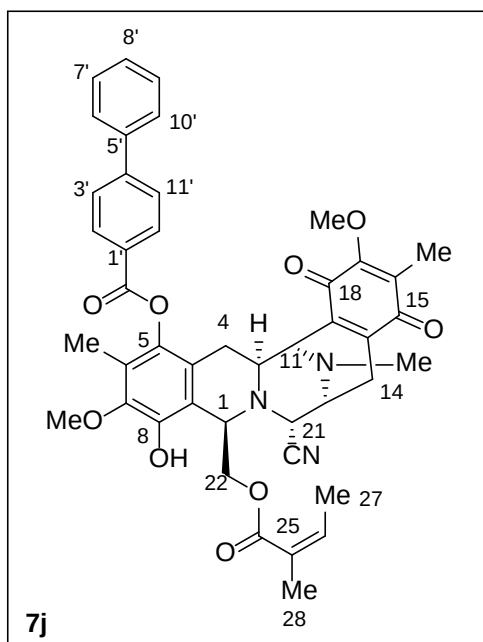
M, **7h**: yield 46%; yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +87.8$ (*c* 0.300, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (*c* 8.9 μ M, MeOH, 27 °C) +18.1 (202), +2.6 sh (227), 0 (234), -0.1 (236), 0 (241), -0.3 (252), 0 (257), +1.0 (274), 0 (288), -1.1 (340), 0 (386); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3429, 2934, 2859, 1757, 1717, 1653, 1616, 1460, 1304, 1233, 1153, 1109, 1059 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.00 (1H, qq, *J* = 7.4, 1.7 Hz, H-26), 5.79 (1H, s, 8-OH), 4.49 (1H, br d, *J* = 11.1 Hz, H-22b), 4.32 (1H, dd, *J* = 5.1, 3.2 Hz, H-1),

4.11 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-21), 4.04 (1H, dd, *J* = 11.1, 5.1 Hz, H-22a), 3.96 (1H, overlapped, H-11), 3.96 (3H, s, 17-OCH₃), 3.77 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, ddd, *J* = 7.5, 2.3, 1.4 Hz, H-13), 3.20 (1H, ddd, *J* = 12.2, 2.7, 2.3 Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, *J* = 21.0, 7.5 Hz, H-14 α), 2.58 (2H, m, H₂-1'), 2.52 (1H, br d, *J* = 16.1 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, *J* = 21.0 Hz, H-14 β), 2.27 (3H, s, 12-NCH₃), 2.07 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, s, 16-CH₃), 1.87 (3H, dq, *J* = 7.4, 1.4 Hz, H₃-27), 1.79 (2H, m, H₂-2'), 1.70 (3H, dq, *J* = 1.7, 1.4 Hz, H₃-28), 1.63 (1H, overlapped, H-4 β), 1.44 (4H, m, H₂-3' and H₂-4'), 0.97 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H₃-5'); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 171.5 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-24), 155.4 (C, C-17), 143.7 (C, C-7), 143.0 (C, C-8), 141.7 (C, C-20), 140.0 (CH, C-26), 139.0 (C, C-5), 135.5 (C, C-19), 128.8 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.3 (C, C-10), 122.3 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.1 (C, C-9), 64.7 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.6 (CH₃, 17-OCH₃), 59.6 (CH, C-21), 56.4 (CH, C-1), 55.4 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-11), 54.7 (CH, C-13), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 33.9 (CH₂, C-1'), 31.5 (CH₂, C-3'), 27.6 (CH₂, C-4), 24.8 (CH₂, C-2'), 22.3 (CH₂, C-4'), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 13.9 (CH₃, C-5'), 10.0 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS *m/z* 676.3240 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₄₆N₃O₉, 676.3234).



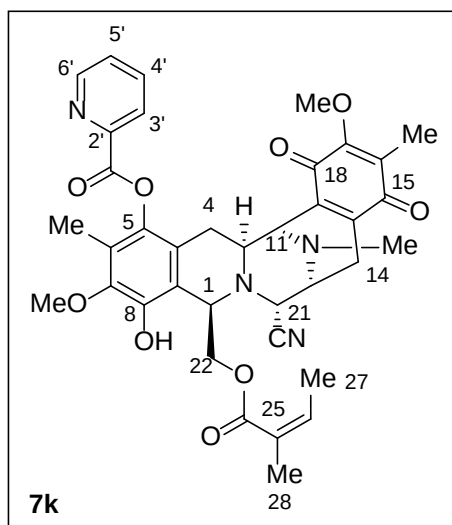
hydroquinone 5-O-(4-bromobenzoyl) ester analogue of renieramycin M, **7i**: yield 58%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +7.5$ (c 0.007, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 5.3 μM , MeOH, 25 °C) +1.1 (425), 0.0 (401), -1.6 (380), -2.5 (357), -1.1 (321), +0.6 (292), +5.4 (273), +9.9 (253), +6.0 (239), +0.3 (226), -6.7 (211); IR (KBr) ν_{max} 3433, 2957, 2918, 2849, 1736, 1717, 1653, 1462, 1304, 1260, 1234, 1152, 1070, 1011, 845, 800, 955 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.02 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2' and H-6'), 7.70 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3'

and H-5'), 6.01 (1H, qq, J = 7.4, 1.4 Hz, H-26), 5.89 (1H, s, OH-8), 4.54 (1H, dd, J = 11.8, 2.9 Hz, H-22b), 4.35 (1H, br t, J = 4.6 Hz, H-1), 4.13 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-21), 4.08 (1H, dd, J = 11.8, 4.6 Hz, H-22a), 3.92 (1H, br d, J = 2.0 Hz, H-11), 3.80 (3H, s, 17-OCH₃), 3.80 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, dt, J = 7.5, 2.6 Hz, H-13), 3.22 (1H, br d, J = 12.0 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 20.9, 7.5 Hz, H-14 α), 2.56 (1H, dd, J = 15.5, 2.0 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, J = 20.9 Hz, H-14 β), 2.23 (3H, s, 12-NCH₃), 2.12 (3H, s, 6-CH₃), 1.89 (3H, dq, J = 7.4, 1.5 Hz, H₃-27), 1.88 (3H, s, 16-CH₃), 1.71 (3H, dq, J = 1.5, 1.4 Hz, H₃-28), 1.69 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 185.9 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 171.2 (C, 5-OC=O), 167.1 (C, C-24), 163.7 (C, C-1'), 155.3 (C, C-17), 143.8 (C, C-7), 143.2 (C, C-8), 141.5 (C, C-20), 140.1 (CH, C-26), 139.0 (C, C-5), 135.5 (C, C-19), 132.1 (CH, C-3' and C-5'), 131.4 (CH, C-2' and C-6'), 129.1 (C, C-16), 127.7 (C, C-4'), 126.7 (C, C-25), 124.4 (C, C-10), 122.5 (C, C-6), 117.5 (C, 21-CN), 117.3 (C, C-9), 64.5 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.4 (CH₃, 17-OCH₃), 59.4 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.1 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.5 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.8 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.5 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 760.1876 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{BrN}_3\text{O}_9$, 760.1870).



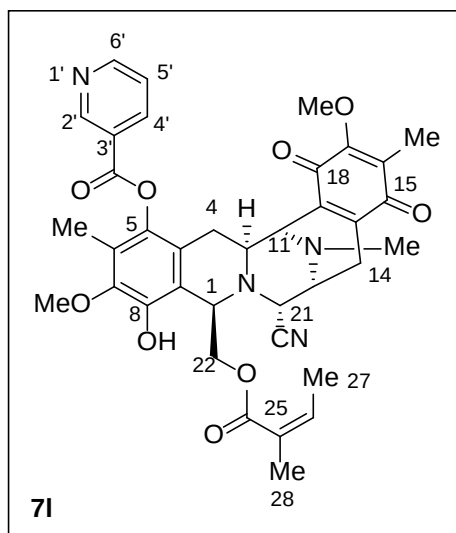
hydroquinone 5-*O*-(4-phenylbenzoyl) ester analogue of renieramycin M, **7j**: yield 39%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +67.2$ (c 0.004, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 6.0 μM , MeOH, 25 $^\circ\text{C}$) +6.5 (429), +4.2 (409), 0.0 (384), -2.5 (367), -3.0 (352), -2.3 (334), +0.3 (310), +8.5 (294), +17.9 (279), +12.2 (269), +5.0 (259), -0.7 (237); IR (KBr) ν_{max} 3374, 2957, 2918, 2851, 1734, 1717, 1653, 1609, 1558, 1462, 1310, 1260, 1234, 1152, 1078, 800, 748, 698 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.15 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2' and H-12'), 7.70 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3' and H-11'), 7.61 (2H, dd, J

= 8.6, 1.4 Hz, H-6' and H-10'), 7.45 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-7' and H-9'), 7.37 (H, dt, J = 7.5, 1.2 Hz, H-8'), 5.94 (1H, qq, J = 7.5, 1.4 Hz, H-26), 5.76 (1H, s, OH-8), 4.52 (1H, br d, J = 11.5 Hz, H-22b), 4.29 (1H, br t, J = 4.9 Hz, H-1), 4.08 (1H, br d, J = 2.0 Hz, H-21), 4.07 (1H, dd, J = 11.5, 4.9 Hz, H-22a), 3.89 (1H, br s, H-11), 3.74 (3H, s, 17-OCH₃), 3.74 (3H, s, 7-OCH₃), 3.30 (1H, dt, J = 7.5, 2.0 Hz, H-13), 3.17 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-3), 2.67 (1H, dd, J = 20.9, 7.5 Hz, H-14 α), 2.56 (1H, dd, J = 15.2, 1.8 Hz, H-4 α), 2.22 (1H, d, J = 20.9 Hz, H-14 β), 2.17 (3H, s, 12-NCH₃), 2.08 (3H, s, 6-CH₃), 1.83 (3H, dq, J = 7.5, 1.5 Hz, H₃-27), 1.81 (3H, s, 16-CH₃), 1.66 (3H, dq, J = 1.5, 1.4 Hz, H₃-28), 1.64 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 185.9 (C, C-15), 182.5 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 164.3 (C, 5-OC=O), 155.4 (C, C-17), 146.6 (C, C-4'), 143.8 (C, C-7), 143.1 (C, C-8), 141.4 (C, C-20), 140.1 (CH, C-26), 139.8 (C, C-5'), 139.2 (C, C-5), 135.6 (C, C-19), 130.5 (CH, C-2' and C-12'), 129.0 (CH, C-7' and C-9'), 128.4 (CH, C-8'), 127.5 (C, C-16), 127.4 (CH, C-3' and C-11'), 127.3 (CH, C-6' and C-10'), 127.3 (C, C-1'), 126.8 (C, C-25), 124.5 (C, C-10), 122.7 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.2 (C, C-9), 64.2 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.4 (CH₃, 17-OCH₃), 59.4 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.2 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.5 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.9 (CH₂, C-4), 21.0 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.9 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, CH₃-6), 8.5 (CH₃, CH₃-16); HRFABMS m/z 758.3075 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_9$, 758.3078).



hydroquinone 5-O-(2-pyridinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, **7k**: yield 48%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +33.8$ (c 0.001, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 2.9 μM , MeOH, 25 °C) +1.5 (425), +0.5 (400), -0.7 (380), -1.6 (357), -0.9 (325), -0.6 (311), -0.4 (299), 0.0 (290), +2.9 (277), +6.3 (255), +3.9 (239); IR (KBr) ν_{max} 3429, 2957, 2918, 2849, 1736, 1717, 1653, 1464, 1261, 1234, 1152, 1117, 1078, 802 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.88 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-6'), 8.24 (1H,

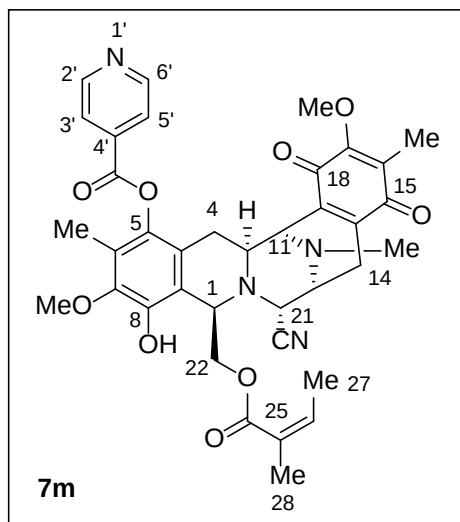
d, J = 7.8 Hz, H-3'), 7.97 (1H, td, J = 7.8, 1.2 Hz, H-4'), 7.61 (1H, ddd, J = 6.0, 4.9, 1.2 Hz, H-5'), 6.00 (1H, qq, J = 7.5, 1.5 Hz, H-26), 5.84 (1H, s, OH-8), 4.59 (1H, br d, J = 11.8 Hz, H-22b), 4.35 (1H, br t, J = 3.7 Hz, H-1), 4.13 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-21), 4.10 (1H, dd, J = 11.8, 3.7 Hz, H-22a), 3.93 (1H, br d, J = 3.4 Hz, H-11), 3.81 (3H, s, 17-OCH₃), 3.81 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, ddd, J = 7.7, 2.5, 1.7 Hz, H-13), 3.22 (1H, dd, J = 12.9, 3.4 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 21.2, 7.7 Hz, H-14 α), 2.63 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-4 α), 2.29 (1H, dd, J = 21.2, 7.7 Hz, H-14 β), 2.23 (3H, s, 12-NCH₃), 2.16 (3H, s, 6-CH₃), 1.90 (3H, dq, J = 7.5, 1.6 Hz, H₃-27), 1.88 (3H, s, 16-CH₃), 1.71 (3H, dq, J = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.68 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 164.8 (C, 5-OC=O), 155.4 (C, C-17), 150.3 (CH, C-6'), 146.9 (C, C-2'), 143.8 (C, C-7), 143.3 (C, C-8), 141.5 (C, C-20), 140.2 (CH, C-26), 139.2 (C, C-5), 137.2 (CH, C-4'), 135.6 (C, C-19), 128.6 (C, C-16), 127.6 (CH, C-5'), 126.7 (C, C-25), 125.6 (CH, C-3'), 124.2 (C, C-10), 122.5 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.3 (C, C-9), 63.9 (CH₂, C-22), 61.3 (CH₃, 7-OCH₃), 60.5 (CH₃, 17-OCH₃), 59.3 (CH, C-21), 56.6 (CH, C-1), 55.1 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.5 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.8 (CH₂, C-4), 21.0 (CH₂, C-14), 20.7 (CH₃, C-28), 15.9 (CH₃, C-27), 10.2 (CH₃, 6-CH₃), 8.5 (CH₃, 16-CH₃); HREIMS m/z 682.2641 $[\text{M}]^+$ (calcd for C₃₇H₃₈N₄O₉, 682.2639).



hydroquinone 5-O-(3-pyridinecarbonyl) ester analogue of

renieramycin M, **7l**: yield 47%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25}$ +4.0 (c 0.003, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 2.1 μ M, MeOH, 25 °C) +1.7 (421), 0.0 (388), -9.5 (373), -1.4 (352), -1.1 (337), -0.7 (322), -0.5 sh (307), 0.0 (290), +2.3 (275), +3.5 (257), +2.5 (247), +1.6 (235); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3422, 2957, 2918, 2849, 1742, 1717, 1653, 1464, 1262, 1234, 1152, 1111, 1078, 1022, 800 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9.28 (1H, s, H-2'), 8.85

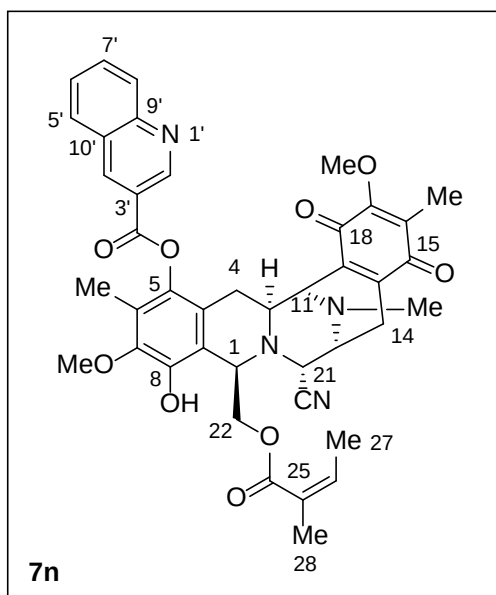
(1H, dd, J = 4.9, 1.7 Hz, H-6'), 8.37 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4'), 7.47 (1H, dd, J = 8.0, 4.9 Hz, H-5'), 5.95 (1H, qq, J = 7.5, 1.2 Hz, H-26), 5.84 (1H, s, OH-8), 4.47 (1H, dd, J = 11.8, 2.9 Hz, H-22b), 4.29 (1H, br t, J = 4.3 Hz, H-1), 4.06 (1H, d, J = 2.6 Hz, H-21), 4.02 (1H, dd, J = 11.8, 4.3 Hz, H-22a), 3.85 (1H, br d, J = 2.0 Hz, H-11), 3.74 (3H, s, 17-OCH₃), 3.74 (3H, s, 7-OCH₃), 3.29 (1H, dt, J = 7.5, 2.6 Hz, H-13), 3.16 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3), 2.66 (1H, dd, J = 20.9, 7.5 Hz, H-14 α), 2.47 (1H, dd, J = 15.5, 2.0 Hz, H-4 α), 2.20 (1H, d, J = 20.9 Hz, H-14 β), 2.17 (3H, s, 12-NCH₃), 2.07 (3H, s, CH₃-6), 1.83 (3H, dq, J = 7.5, 1.4 Hz, H₃-27), 1.82 (3H, s, CH₃-16), 1.65 (3H, dq, J = 1.4, 1.2 Hz, H₃-28), 1.60 (1H, overlapped, H-4 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 163.1 (C, 5-OC=O), 155.3 (C, C-17), 154.1 (CH, C-6'), 151.2 (CH, C-2'), 143.9 (C, C-7), 143.4 (C, C-8), 141.6 (C, C-20), 140.2 (CH, C-26), 138.8 (C, C-5), 137.5 (CH, C-4'), 135.4 (C, C-19), 128.6 (C, C-16), 126.7 (C, C-25), 124.7 (C, C-3'), 124.4 (C, C-10), 123.7 (CH, C-5'), 122.5 (C, C-6), 117.5 (C, 21-CN), 117.3 (C, C-9), 64.2 (CH₂, C-22), 61.3 (CH₃, 7-OCH₃), 61.3 (CH₃, 17-OCH₃), 59.4 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.2 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.6 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.9 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 683.2723 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₃₉N₄O₉, 683.2717).



hydroquinone 5-O-(4-pyridinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, **7m**: yield 51%; yellow amorphous solid;

$[\alpha]_D^{25} +92.1$ (c 0.004, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 4.4 μM , MeOH, 25 °C) +1.0 (428), 0.0 (399), -0.9 (383), -1.7 (364), -1.0 (331), -0.4 (306), -0.3 (293), 0.0 (288), +1.6 (277), +3.2 (261), +1.0 (239); IR (KBr) ν_{max} 3435, 2918, 2849, 1748, 1715, 1653, 1616, 1462, 1252, 1234, 1152, 1113, 1061 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.92 (2H, dd, J = 4.5, 2.0 Hz,

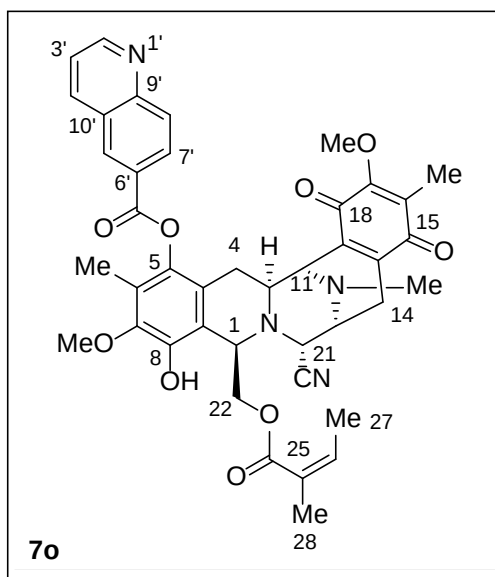
H-2' and H-6'), 7.98 (2H, dd, J = 4.5, 1.2 Hz, H-3' and H-5'), 6.01 (1H, qq, J = 7.2, 1.2 Hz, H-26), 5.95 (1H, s, OH-8), 4.55 (1H, br d, J = 11.2 Hz, H-22b), 4.36 (1H, br t, J = 5.2 Hz, H-1), 4.13 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-21), 4.09 (1H, dd, J = 11.2, 5.2 Hz, H-22a), 3.91 (1H, br d, J = 2.4 Hz, H-11), 3.81 (3H, s, 17-OCH₃), 3.74 (3H, br s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, dt, J = 8.0, 2.0 Hz, H-13), 3.23 (1H, dt, J = 12.4, 2.0 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 21.2, 8.0 Hz, H-14 α), 2.55 (1H, dd, J = 15.2, 2.4 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, J = 21.2 Hz, H-14 β), 2.24 (3H, s, 12-NCH₃), 2.14 (3H, s, 6-CH₃), 1.89 (3H, dq, J = 7.2, 1.4 Hz, H₃-27), 1.88 (3H, s, 16-CH₃), 1.71 (3H, dq, J = 1.4, 1.2 Hz, H₃-28), 1.65 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 163.1 (C, 5-OC=O), 155.3 (C, C-17), 151.0 (CH, C-2' and C-6'), 143.9 (C, C-7), 143.6 (C, C-8), 141.7 (C, C-20), 140.2 (CH, C-26), 138.8 (C, C-5), 136.2 (C, C-4'), 135.4 (C, C-19), 128.7 (C, C-16), 126.7 (C, C-25), 124.3 (C, C-10), 123.0 (CH, C-3' and C-5'), 122.4 (C, C-6), 117.5 (C, 21-CN), 117.5 (C, C-9), 64.4 (CH₂, C-22), 61.3 (CH₃, 7-OCH₃), 60.4 (CH₃, 17-OCH₃), 59.5 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.2 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.6 (CH, C-11), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 27.9 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.9 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HREIMS m/z 682.2632 [M]⁺ (calcd for C₃₇H₃₈N₄O₉, 682.2639).



hydroquinone 5-O-(3-quinolinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, **7n**: yield 39%; yellow amorphous powder;

$[\alpha]_D^{25} +64.9$ (c 0.001, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 9.6 μ M, MeOH, 25 °C) +0.4 (425), +0.2 (400), 0.0 (384), -0.3 (356), -0.2 (337), 0.0 sh (314), 0.0 sh (289), +0.4 (278), +0.9 (269), +1.1 (259), +1.4 (247), +1.1 (241), +0.7 (236), 0.0 (226); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3435, 2955, 2918, 2851, 1740, 1717, 1653, 1620, 1462, 1375, 1306, 1287, 1261, 1234, 1151, 1090, 1111, 791, 778 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ

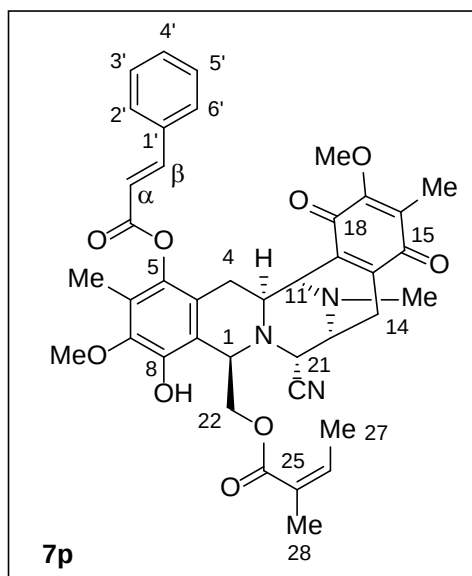
9.52 (1H, s, H-2'), 9.03 (1H, s, H-4'), 8.25 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-8'), 8.05 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-5'), 7.93 (1H, t, J = 8.1 Hz, H-7'), 7.71 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-6'), 6.03 (1H, qq, J = 7.0, 1.2 Hz, H-26), 5.85 (1H, s, OH-8), 4.57 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-22b), 4.37 (1H, br d, J = 4.2 Hz, H-1), 4.14 (1H, br s, H-21), 4.09 (1H, dd, J = 10.5, 4.2 Hz, H-22a), 3.91 (1H, br s, H-11), 3.83 (3H, s, 17-OCH₃), 3.83 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-13), 3.25 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, J = 20.7, 7.2 Hz, H-14 α), 2.63 (1H, d, J = 14.1 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, J = 20.7 Hz, H-14 β), 2.22 (3H, s, 12-NCH₃), 2.18 (3H, s, 6-CH₃), 1.92 (3H, qq, J = 7.2, 1.4 Hz, H₃-27), 1.88 (3H, s, 16-CH₃), 1.74 (3H, dq, J = 1.4, 1.2 Hz, H₃-28), 1.65 (1H, overlapped, H-4 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 162.5 (C, 5-OC=O), 155.8 (C, C-17), 147.8 (CH, C-2'), 144.0 (C, C-7), 143.7 (C, C-8), 142.0 (C, C-9'), 141.3 (C, C-10'), 140.5 (C, C-20), 140.2 (CH, C-26), 138.7 (CH, C-4'), 137.9 (C, C-5), 135.7 (C, C-19), 134.2 (CH, C-7'), 129.5 (CH, C-5' and C-8'), 128.6 (C, C-16), 127.5 (CH, C-6'), 126.7 (C, C-25), 124.6 (C, C-10), 122.2 (C, C-6), 122.3 (C, C-3'), 117.6 (C, 21-CN), 117.4 (C, C-9), 64.5 (CH₂, C-22), 61.3 (CH₃, 7-OCH₃), 60.9 (CH₃, 17-OCH₃), 58.5 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 54.8 (CH, C-3), 54.6 (CH, C-13), 54.2 (CH, C-11), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 27.9 (CH₂, C-4), 21.0 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 10.2 (CH₃, 6-CH₃), 8.5 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 733.2872 [M+H]⁺ (calcd for C₄₁H₄₁N₄O₉, 733.2874).



hydroquinone 5-O-(6-quinolinecarbonyl) ester analogue of renieramycin M, **7o**: yield 40%; yellow amorphous powder;

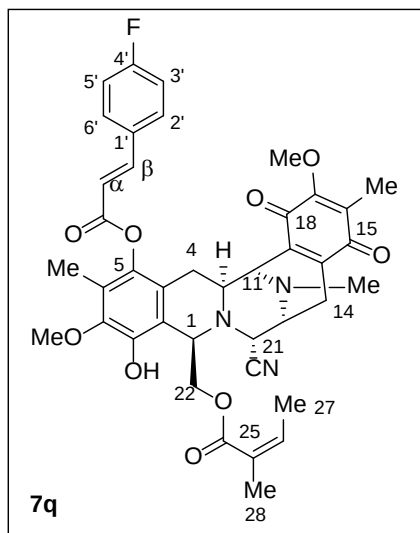
$[\alpha]_D^{25} +10.6$ (c 0.006, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 9.6 μM , MeOH, 25 °C) +0.4 (425), 0.0 (394), -0.3 (375), -0.5 (355), -0.2 (325), -0.1 sh (312), 0.0 (292), +0.9 (279), +1.9 (267), +2.5 (255), +2.8 (247), +1.5 (234), 0.0 (223); IR (KBr) ν_{max} 3420, 2957, 2918, 2849, 1738, 1717, 1653, 1616, 1462, 1263, 1232, 1177, 1152, 1090, 802 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.09 (1H, dd, J = 4.3, 1.7 Hz, H-2'), 8.77 (1H,

br d, J = 1.5 Hz, H-5'), 8.38 (1H, overlapped, H-4'), 8.38 (1H, dd, J = 8.9, 1.5 Hz, H-7'), 8.25 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-8'), 7.57 (1H, dd, J = 8.3, 4.3 Hz, H-3'), 6.04 (1H, qq, J = 7.2, 1.2 Hz, H-26), 5.87 (1H, s, OH-8), 4.59 (1H, br d, J = 11.2 Hz, H-22b), 4.37 (1H, t, J = 4.8 Hz, H-1), 4.14 (1H, br d, J = 2.3 Hz, H-21), 4.10 (1H, dd, J = 11.2, 4.8 Hz, H-22a), 3.92 (1H, br s, H-11), 3.82 (3H, s, 17-OCH₃), 3.82 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, dt, J = 7.5, 2.3 Hz, H-13), 3.24 (1H, br d, J = 12.3 Hz, H-3), 2.72 (1H, dd, J = 20.9, 7.5 Hz, H-14 α), 2.64 (1H, dd, J = 15.5, 2.3 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, J = 20.9 Hz, H-14 β), 2.22 (3H, s, 12-NCH₃), 2.17 (3H, s, 6-CH₃), 1.90 (3H, dq, J = 7.2, 1.4 Hz, H₃-27), 1.87 (3H, s, 16-CH₃), 1.74 (3H, dq, J = 1.4, 1.2 Hz, H₃-28), 1.66 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 164.0 (C, 5-OC=O), 155.3 (C, C-17), 153.0 (CH, C-2'), 150.4 (C, C-9'), 143.9 (C, C-7), 143.3 (C, C-8), 141.4 (C, C-20), 140.2 (CH, C-26), 139.2 (C, C-5), 137.5 (CH, C-7'), 135.5 (C, C-19), 131.7 (CH, C-5'), 131.7 (C, C-6'), 130.3 (CH, C-8'), 129.0 (CH, C-4'), 127.6 (C, C-16), 126.7 (C, C-10'), 126.7 (C, C-25), 124.6 (C, C-10), 122.8 (C, C-6), 122.2 (CH, C-3'), 117.6 (C, CN), 117.3 (C, C-9), 64.5 (CH₂, C-22), 61.3 (CH₃, 7-OCH₃), 61.3 (CH₃, 17-OCH₃), 59.5 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.2 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.5 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.9 (CH₂, C-4), 21.0 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.9 (CH₃, C-27), 10.2 (CH₃, 6-CH₃), 8.5 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 733.2879 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for C₄₁H₄₁N₄O₉, 733.2874).



hydroquinone 5-O-(cinnamoyl) ester analogue of renieramycin M, **7p**: yield 43%; yellow amorphous solid;

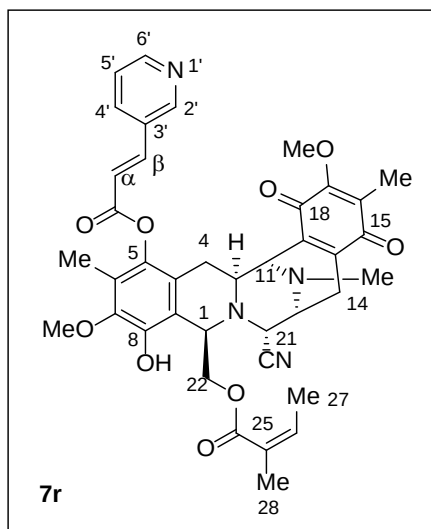
$[\alpha]_D^{25} +30.7$ (c 0.001, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 9.9 μM , MeOH, 25 $^\circ\text{C}$) +0.5 (417), -0.2 (392), -1.1 (355), -0.5 (325), +1.1 (302), +2.8 (278), +2.0 (260), +1.4 (248), +0.4 (238), -0.8 (225); IR (KBr) ν_{max} 3435, 2957, 2918, 2849, 1717, 1653, 1616, 1462, 1308, 1261, 1234, 1150, 1057, 802, 768 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.81 (1H, d, J = 16.0 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_\beta$), 7.62 (2H, m, H-3' and H-5'), 7.46 (3H, m, H-2', H-6', and H-4'), 6.67 (1H, d, J = 16.0 Hz, $\text{CH}_\alpha=\text{CH}$), 6.01 (1H, qq, J = 7.4, 1.2 Hz, H-26), 5.79 (1H, s, OH-8), 4.54 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-22b), 4.34 (1H, br t, J = 4.0 Hz, H-1), 4.13 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-21), 4.07 (1H, dd, J = 11.2, 4.0 Hz, H-22a), 3.99 (1H, br d, J = 3.6 Hz, H-11), 3.85 (3H, s, 17-OCH₃), 3.80 (3H, s, 7-OCH₃), 3.36 (1H, dt, J = 7.2, 2.0 Hz, H-13), 3.22 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, J = 20.8, 7.2 Hz, H-14 α), 2.60 (1H, dd, J = 14.0, 2.0 Hz, H-4 α), 2.29 (1H, d, J = 20.8 Hz, H-14 β), 2.25 (3H, s, 12-NCH₃), 2.12 (3H, s, 6-CH₃), 1.89 (3H, dq, J = 7.2, 1.4 Hz, H₃-27), 1.90 (3H, s, 16-CH₃), 1.72 (3H, dq, J = 1.4, 1.2 Hz, H₃-28), 1.66 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 164.7 (C, 5-OC=O), 155.5 (C, C-17), 146.8 (CH, $\text{CH}=\text{CH}_\beta$), 143.8 (C, C-7), 143.1 (C, C-8), 141.5 (C, C-20), 140.0 (CH, C-26), 139.1 (C, C-5), 135.7 (C, C-19), 134.1 (C, C-1'), 131.0 (CH, C-4'), 129.1 (CH, C-2' and C-6'), 128.8 (C, C-16), 128.4 (CH, C-3' and C-5'), 126.8 (C, C-25), 124.5 (C, C-10), 122.6 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.2 (C, C-9), 116.4 (CH, $\text{CH}_\alpha=\text{CH}$), 64.5 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.6 (CH₃, 17-OCH₃), 59.5 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.3 (CH, C-3), 54.9 (CH, C-13), 54.6 (CH, C-11), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 27.8 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.9 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 708.2930 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_9$, 708.2921).



hydroquinone 5-O-(4-fluorocinnamoyl) ester analogue of

renieramycin M, **7q**: yield 41%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25}$ -80.5 (c 0.003, CHCl_3); ECD $\Delta\epsilon$ nm (c 1.4 μM , MeOH, 25 $^\circ\text{C}$) -0.1 (404), -8.5 (386), -16.2 (359), -10.4 (336), $+0.6$ (320), $+21.6$ (306), $+40.5$ (293), $+57.7$ (285), $+66.5$ (277), $+52.9$ (271), $+35.3$ (266), $+28.2$ (252), $+13.3$ (242), -16.2 (228); IR (KBr) ν_{max} 3433, 2959, 2918, 2851, 1721, 1653, 1601, 1510, 1462, 1310, 1261, 1233, 1144, 1059, 833, 800 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500

MHz) δ 7.70 (1H, d, J = 16.0 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_\beta$), 7.55 (2H, dd, J = 8.5, 5.5 Hz, H-2' and H-6'), 7.08 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-3' and H-5'), 6.52 (1H, d, J = 16.0 Hz, $\text{CH}_\alpha=\text{CH}$), 5.94 (1H, qq, J = 7.2, 1.5 Hz, H-26), 5.72 (1H, s, OH-8), 4.47 (1H, d, J = 11.8, 2.9 Hz, H-22b), 4.27 (1H, br t, J = 4.9 Hz, H-1), 4.06 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-21), 3.99 (1H, dd, J = 11.8, 4.9 Hz, H-22a), 3.91 (1H, br d, J = 3.2 Hz, H-11), 3.78 (3H, s, 17-OCH₃), 3.73 (3H, s, 7-OCH₃), 3.29 (1H, dt, J = 7.5, 2.9 Hz, H-13), 3.15 (1H, d, J = 12.1 Hz, H-3), 2.67 (1H, dd, J = 20.9, 7.5 Hz, H-14 α), 2.53 (1H, dd, J = 15.5, 2.3 Hz, H-4 α), 2.20 (1H, d, J = 20.9 Hz, H-14 β), 2.19 (3H, s, 12-NCH₃), 2.05 (3H, s, 6-CH₃), 1.83 (3H, s, 16-CH₃), 1.82 (3H, dq, J = 7.2, 1.6 Hz, H₃-27), 1.65 (3H, dq, J = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.62 (1H, overlapped, H-4 β); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 186.0 (C, C-15), 182.6 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 165.3 (C, 5-OC=O), 164.5 (C, C-4'), 155.4 (C, C-17), 145.5 (CH, $\text{CH}=\text{CH}_\beta$), 143.8 (C, C-7), 143.1 (C, C-8), 141.6 (C, C-20), 140.1 (CH, C-26), 139.1 (C, C-5), 135.6 (C, C-19), 130.3 (C, C-1'), 130.3 (CH, C-2' and C-6'), 128.7 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.4 (C, C-10), 122.6 (C, C-6), 117.6 (C, 21-CN), 117.1 (C, C-9), 116.4 (CH, $\text{CH}_\alpha=\text{CH}$), 116.2 (CH, C-3' and C-5'), 64.5 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.5 (CH₃, 17-OCH₃), 59.5 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.3 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.6 (CH, C-11), 41.4 (CH₃, 12-NCH₃), 27.7 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.9 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS m/z 726.2833 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{41}\text{FN}_3\text{O}_9$, 726.2827).



hydroquinone 5-O-(3-pyridineacryloyl) ester analogue of

renieramycin M, **7r**: yield 32%; yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25}$ +252.4 (*c* 0.001, CHCl₃); ECD $\Delta\epsilon$ nm (*c* 7.1 μ M, MeOH, 25 °C) +0.6 (425), +0.4 (406), +0.1 (386), -0.1 (367), -0.2 (350), -0.1 (325), +0.5 (299), +1.5 (278), +1.9 (258), +0.8 (240), -1.0 (225); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3412, 2963, 2918, 2849, 1732, 1653, 1464, 1304, 1261, 1234, 1152, 1094, 1028, 802 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.77 (1H, s, H-2'), 8.60 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-6'), 7.91

(1H, br d, *J* = 8.4 Hz, H-4'), 7.74 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, CH=CH _{β}), 7.35 (1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz, H-5'), 6.68 (1H, dd, *J* = 16.2, 3.6 Hz, CH _{α} =CH), 5.93 (1H, qq, *J* = 6.9, 1.5 Hz, H-26), 5.74 (1H, s, OH-8), 4.46 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-22b), 4.26 (1H, br s, H-1), 4.05 (1H, br s, H-21), 3.99 (1H, d, *J* = 10.2, H-22a), 3.93 (1H, t, *J* = 3.9 Hz H-11), 3.78 (3H, s, 17-OCH₃), 3.72 (3H, s, 7-OCH₃), 3.28 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-13), 3.15 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-3), 2.67 (1H, dd, *J* = 20.2, 6.0 Hz, H-14 α), 2.50 (1H, d, *J* = 15.3 Hz, H-4 α), 2.28 (1H, d, *J* = 20.2 Hz, H-14 β), 2.17 (3H, s, 12-NCH₃), 2.04 (3H, s, 6-CH₃), 1.83 (3H, dq, *J* = 6.9, 1.6 Hz, H₃-27), 1.83 (3H, s, 16-CH₃), 1.64 (3H, dq, *J* = 1.6, 1.5 Hz, H₃-28), 1.62 (1H, overlapped, H-4 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 186.1 (C, C-15), 182.7 (C, C-18), 167.1 (C, C-24), 164.2 (C, 5-OC=O), 155.5 (C, C-17), 151.5 (CH, C-6'), 149.9 (CH, C-2'), 143.8 (C, C-7), 143.2 (C, C-8), 142.8 (CH, CH=CH _{β}), 141.7 (C, C-20), 140.1 (CH, C-26), 138.8 (C, C-5), 135.5 (C, C-19), 134.4 (CH, C-4'), 129.9 (C, C-3'), 128.9 (C, C-16), 126.8 (C, C-25), 124.4 (C, C-10), 123.9 (CH, C-5'), 123.7 (C, C-6), 118.7 (CH, CH _{α} =CH), 117.5 (C, 21-CN), 117.2 (C, C-9), 64.5 (CH₂, C-22), 61.2 (CH₃, 7-OCH₃), 60.5 (CH₃, 17-OCH₃), 59.5 (CH, C-21), 56.5 (CH, C-1), 55.3 (CH, C-3), 54.8 (CH, C-13), 54.7 (CH, C-11), 41.5 (CH₃, 12-NCH₃), 27.7 (CH₂, C-4), 21.1 (CH₂, C-14), 20.6 (CH₃, C-28), 15.8 (CH₃, C-27), 10.1 (CH₃, 6-CH₃), 8.6 (CH₃, 16-CH₃); HRFABMS *m/z* 709.2874 [M+H]⁺ (calcd for C₃₉H₄₁N₄O₉, 709.2874).

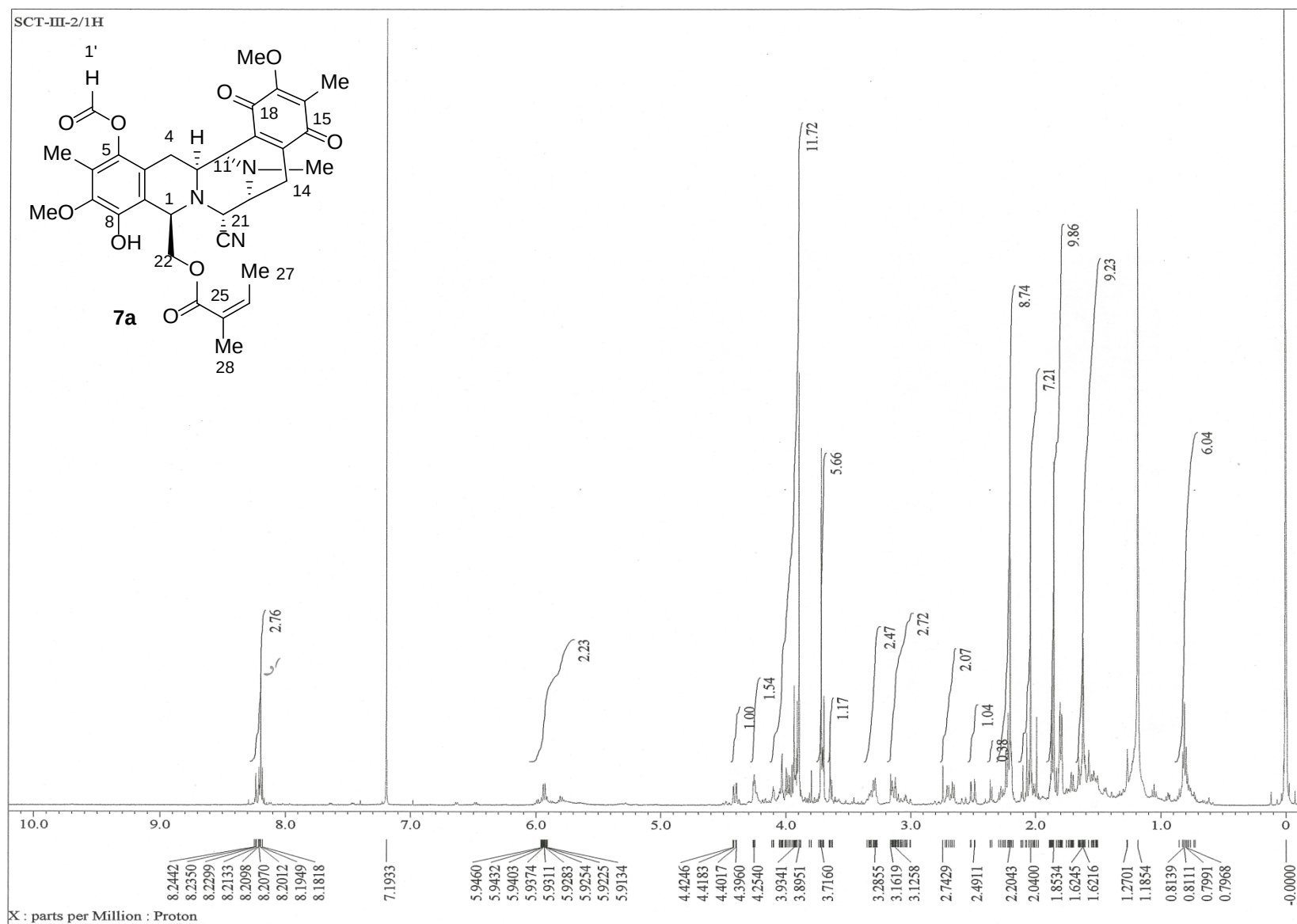


Figure S1. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **7a** in CDCl_3

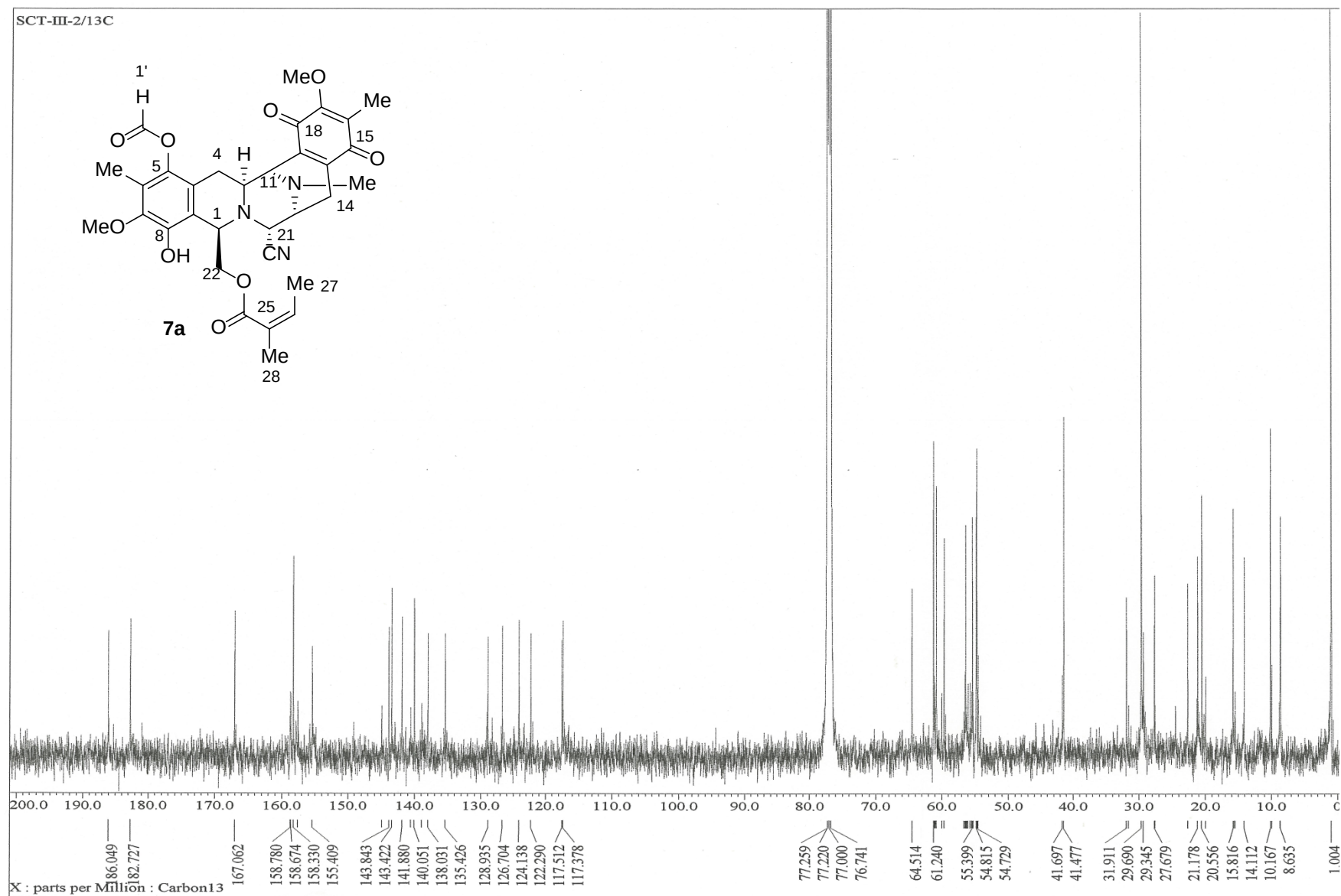


Figure S2. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7a** in CDCl_3

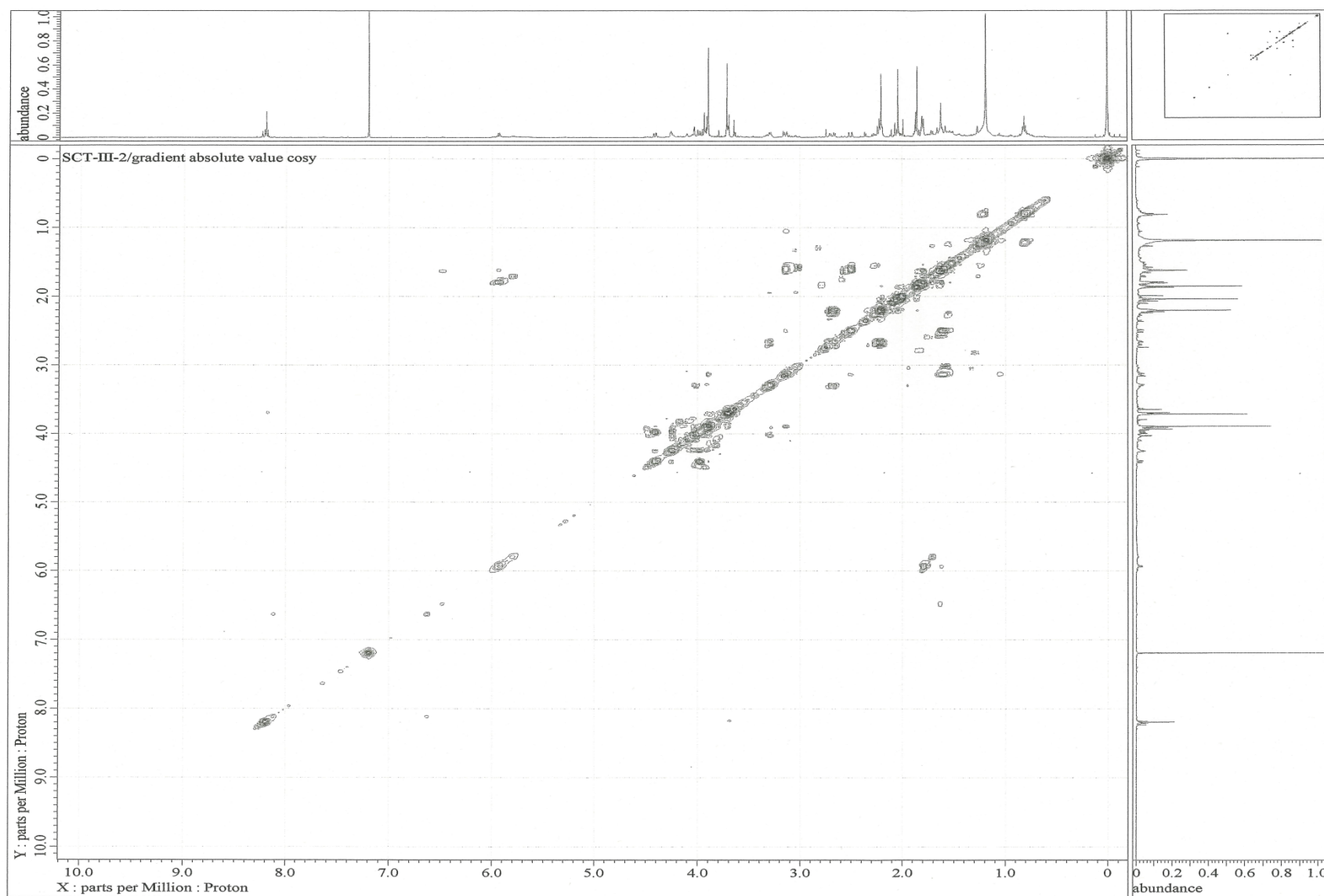


Figure S3. COSY (500 MHz) spectrum of **7a** in CDCl_3

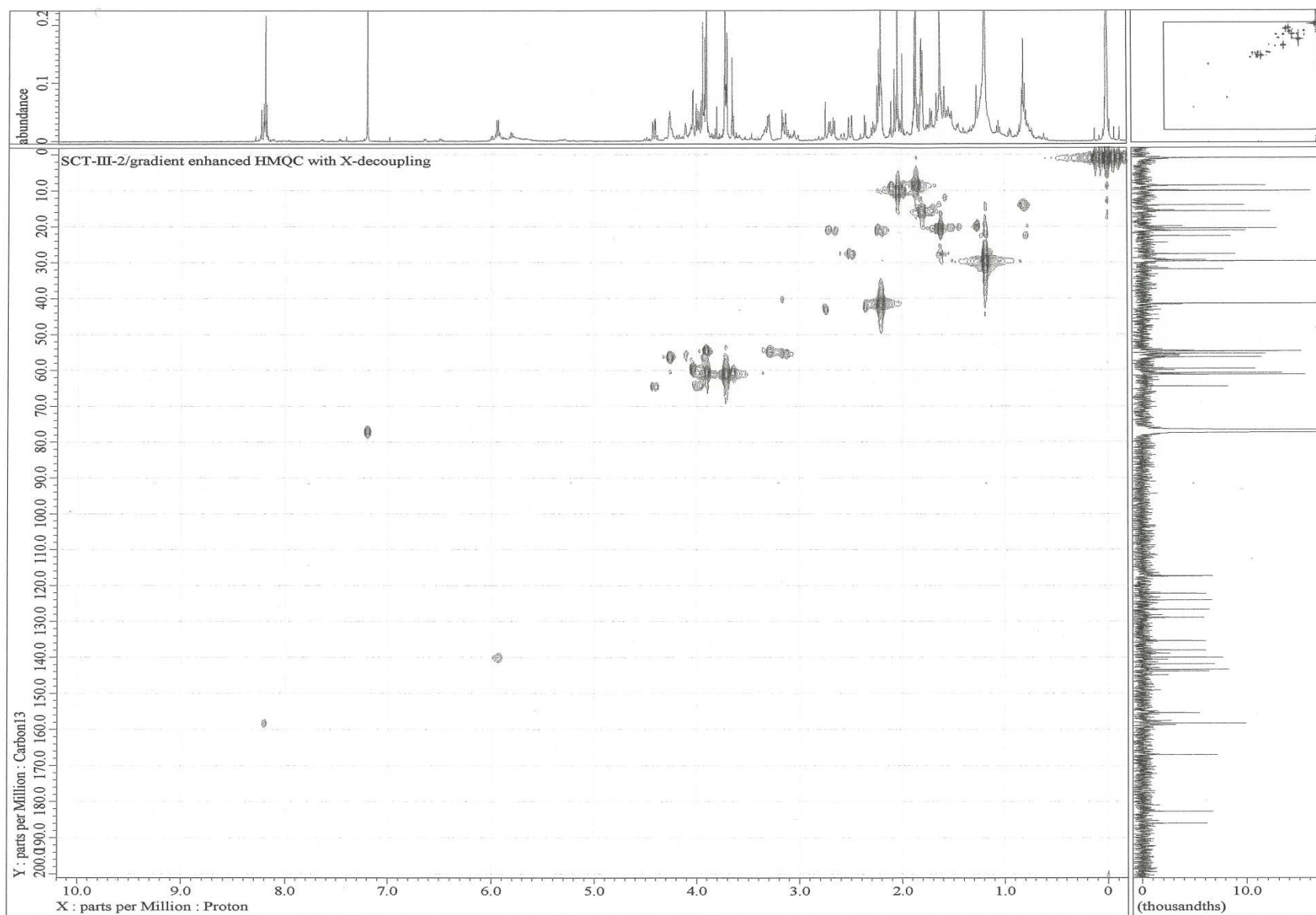


Figure S4. HMQC (500 MHz) spectrum of **7a** in CDCl_3

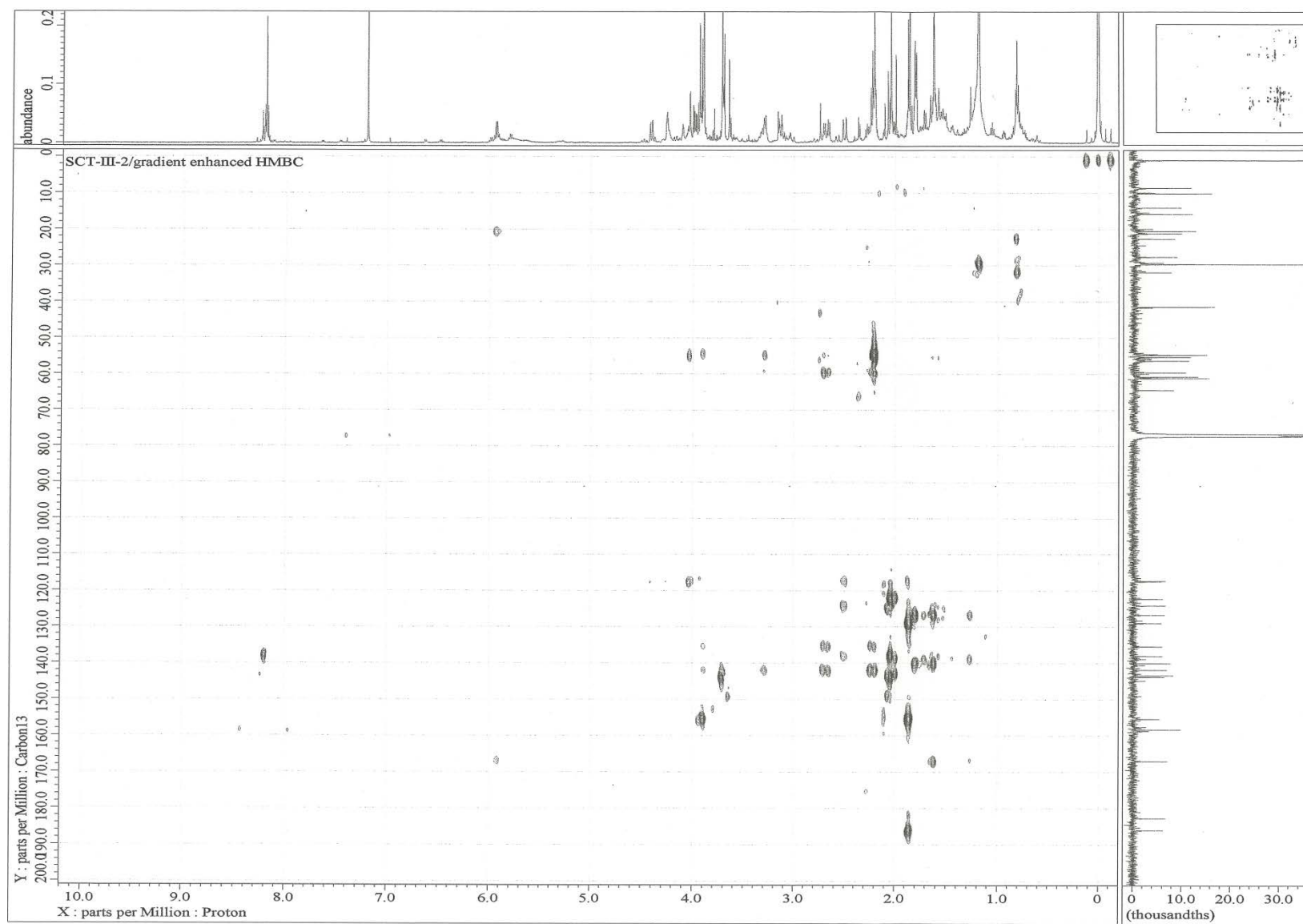


Figure S5. HMBC (500 MHz) spectrum of **7a** in CDCl_3

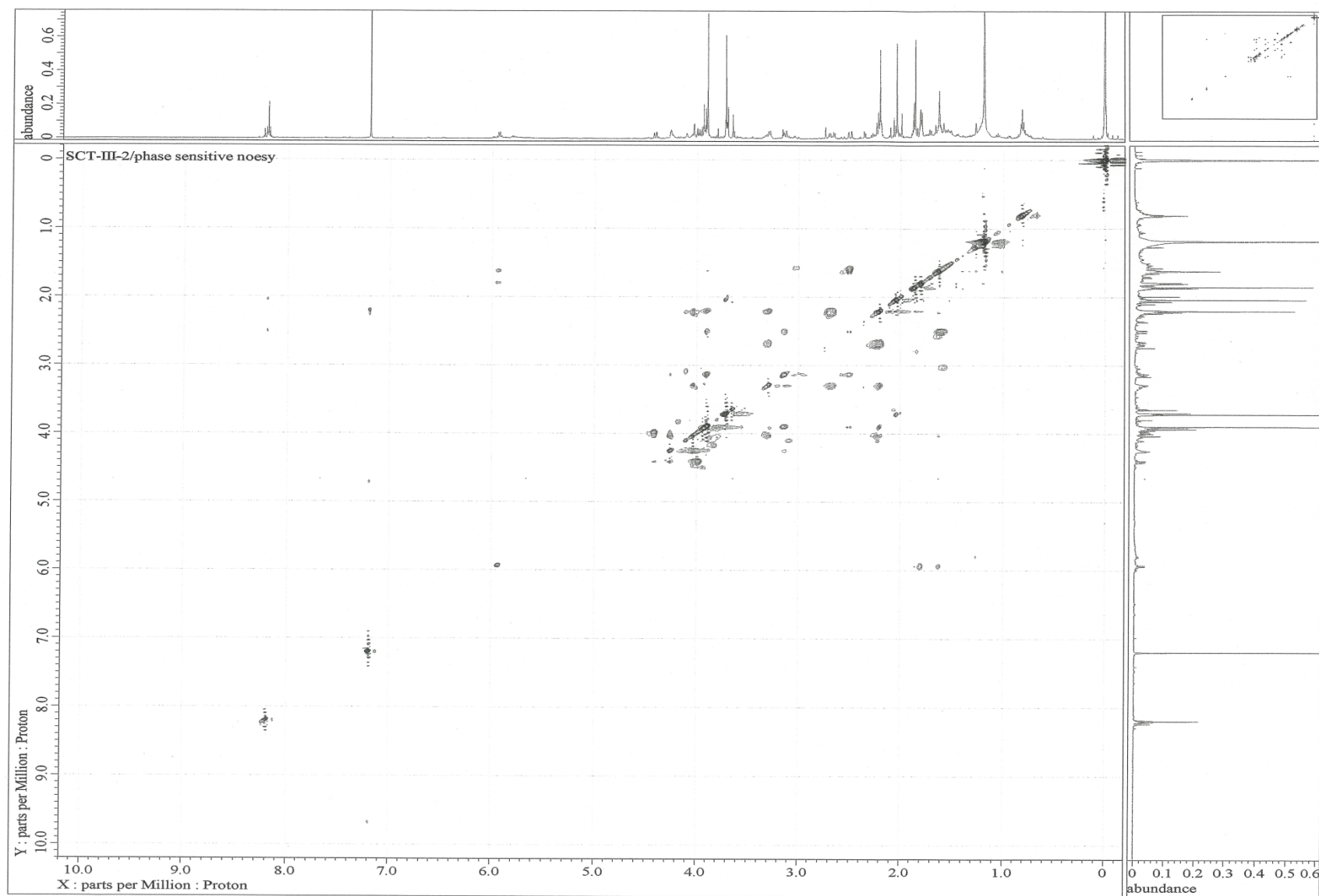


Figure S6. NOESY (500 MHz) spectrum of **7a** in CDCl_3

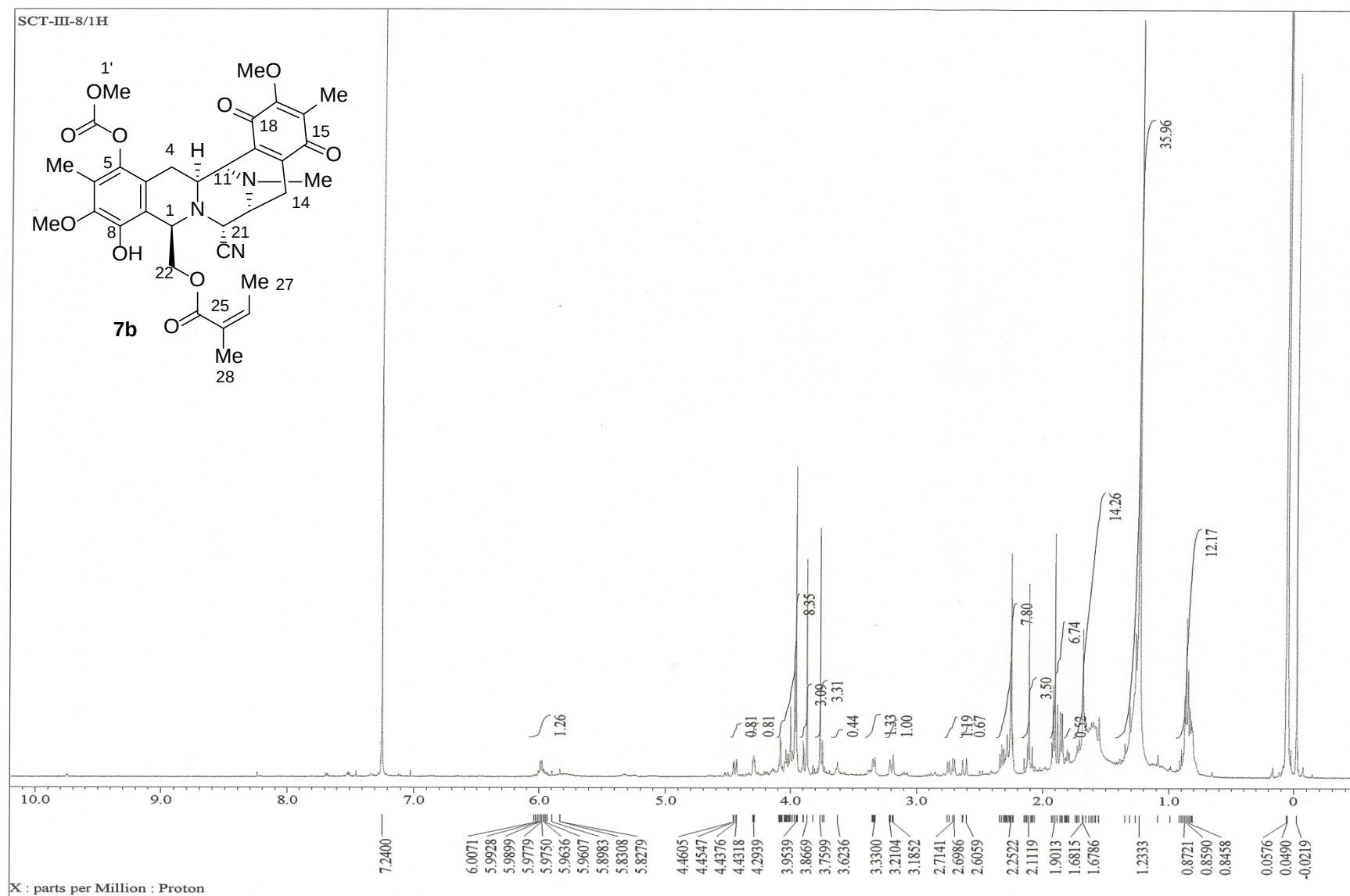


Figure S7. ¹H NMR (500 MHz) spectrum of **7b** in CDCl₃

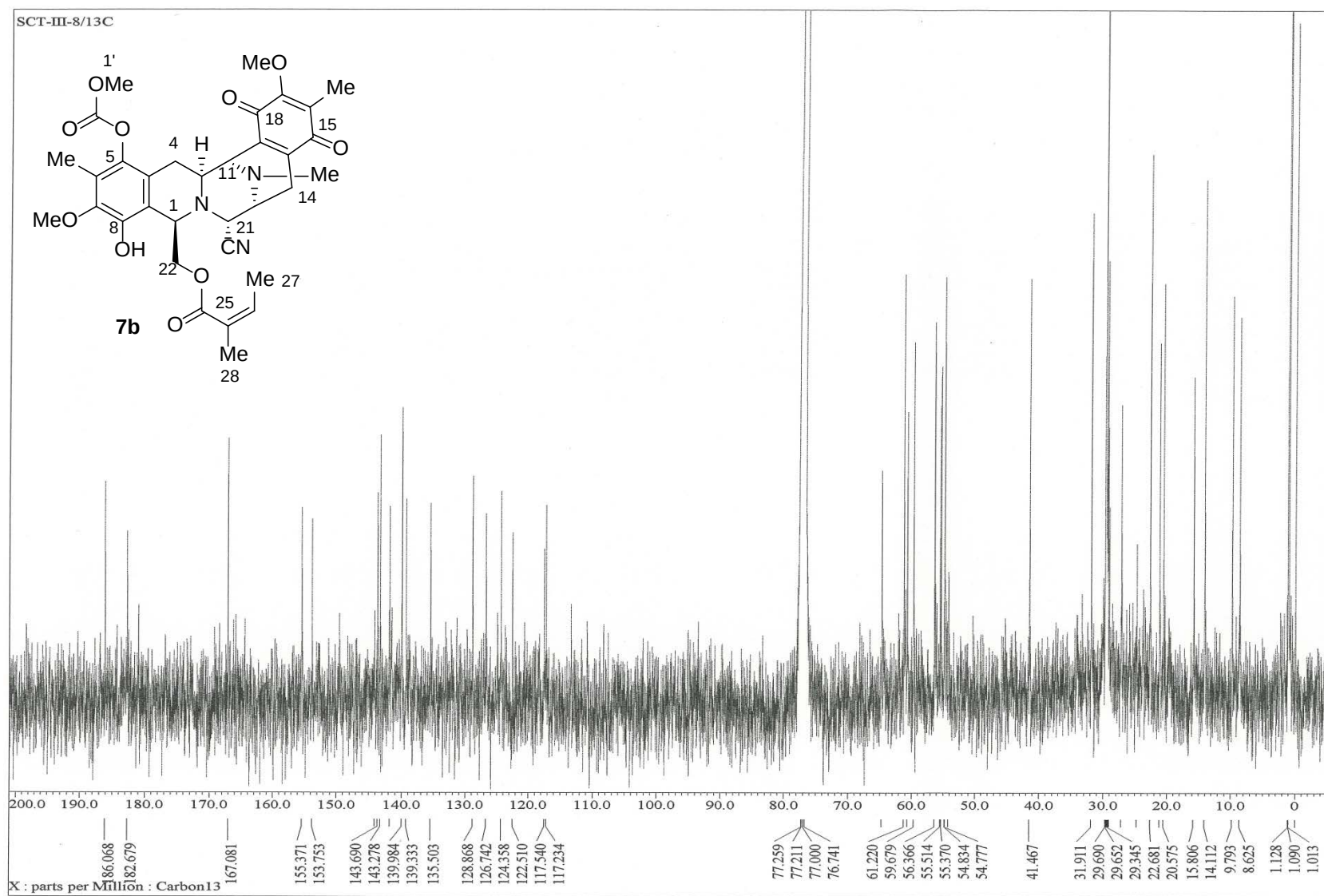
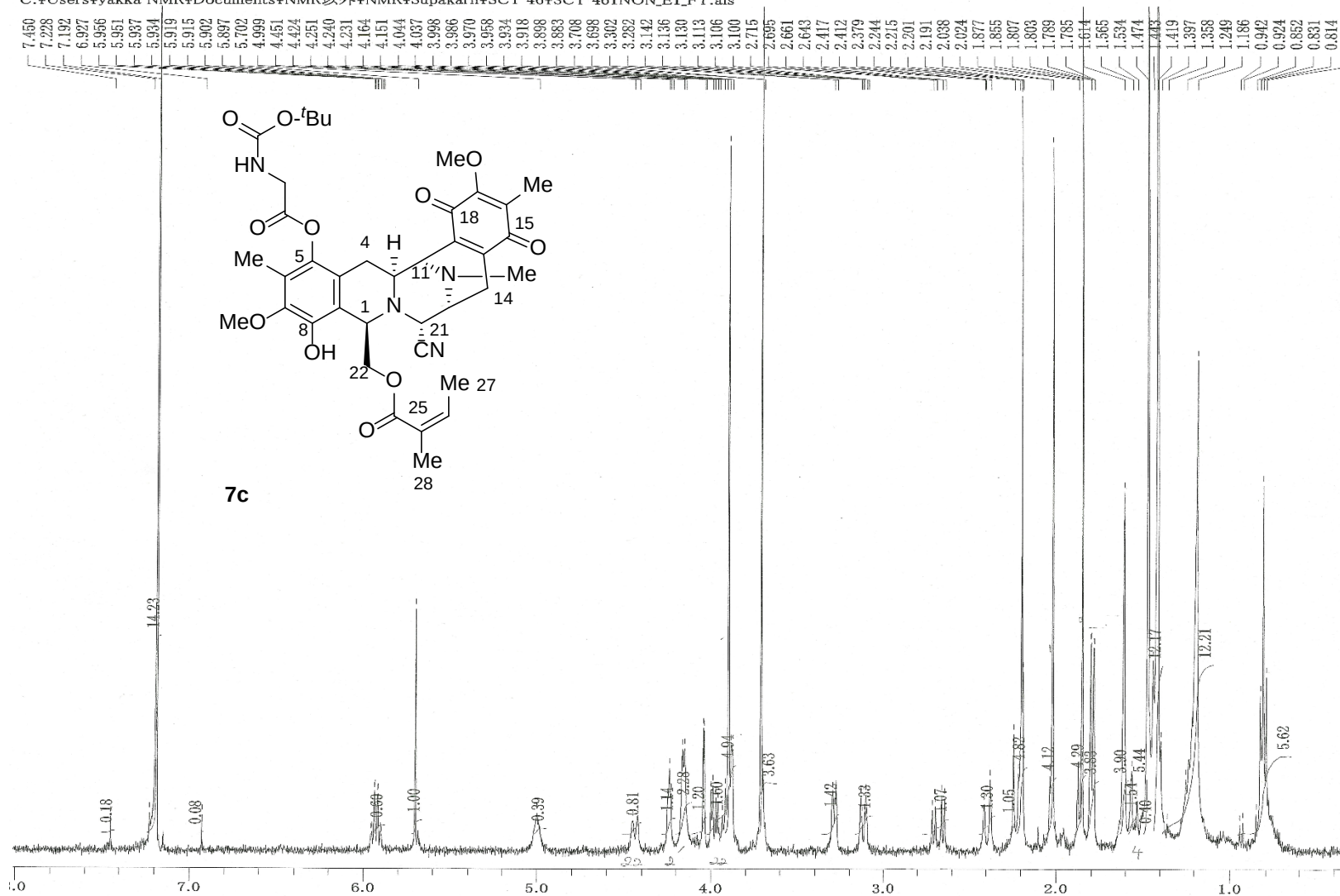


Figure S8. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7b** in CDCl_3

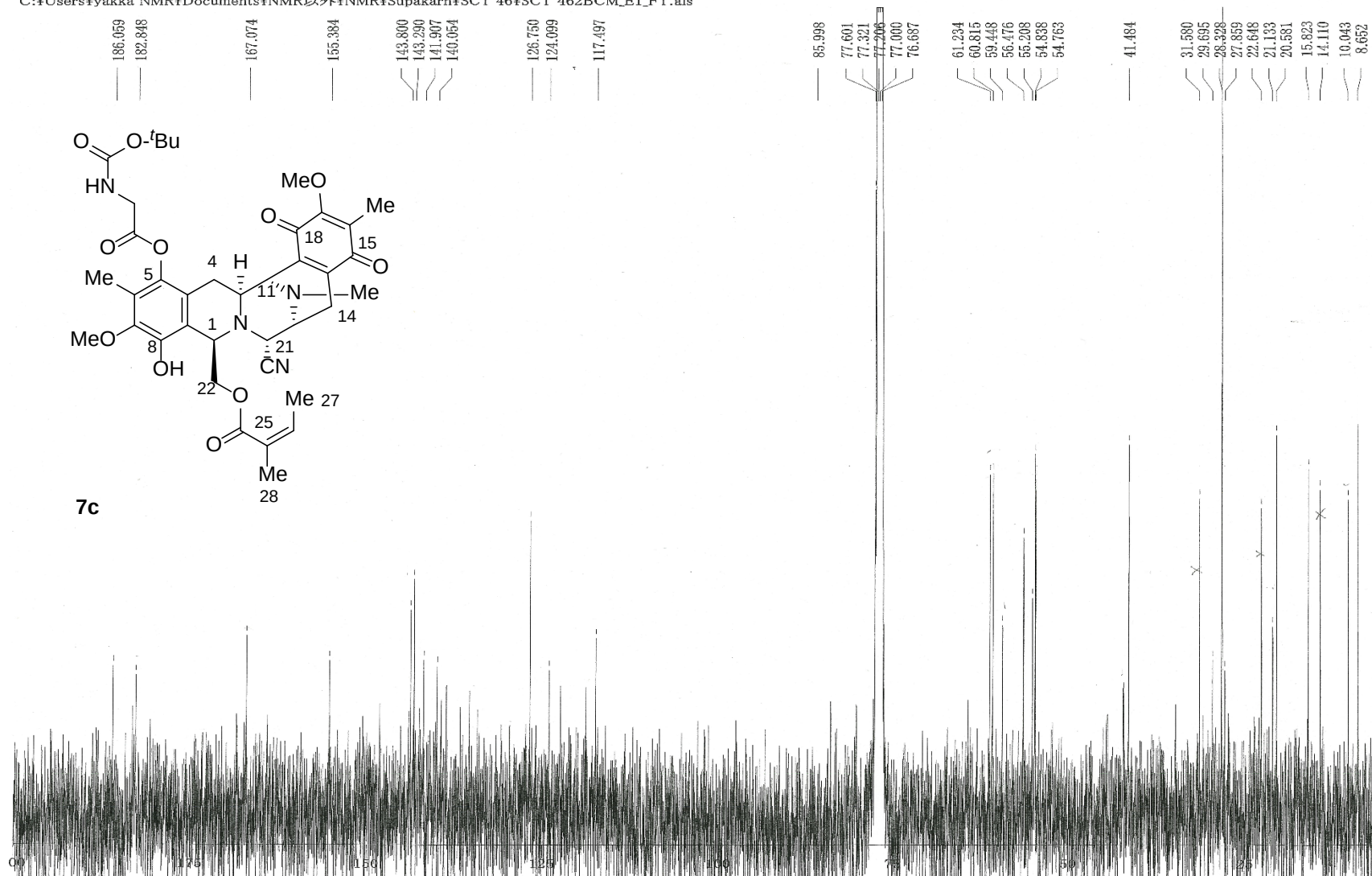
SCT 46

C:\Users\yakka\NMR\Documents\NMR以外\NMR\Supakarn\SCT 46\SCT 461NON_E1_FT.als

Figure S9. ^1H NMR (400 MHz) spectrum of **7c** in CDCl_3

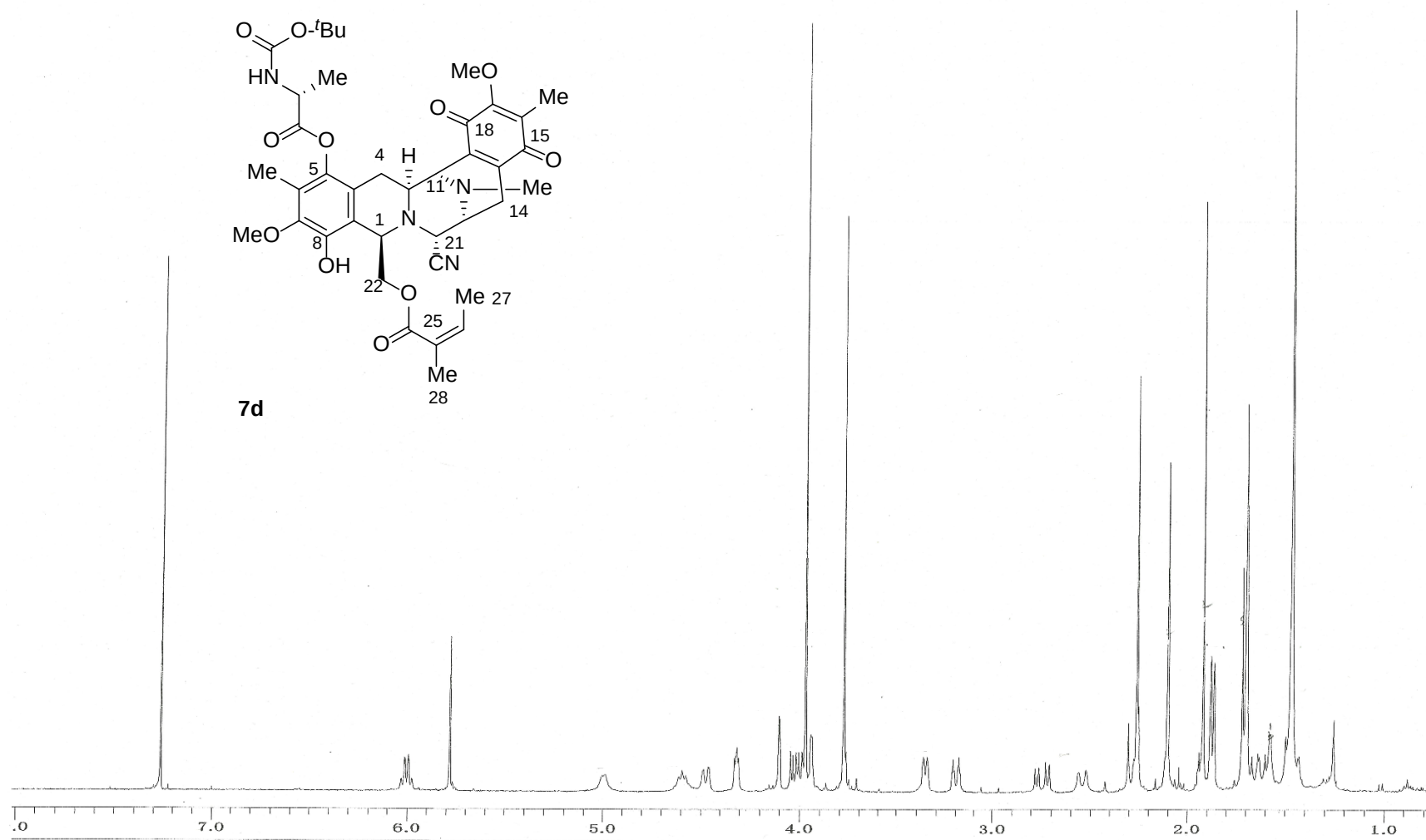
SCT 46

C:\Users\yakka\NMR\Documents\NMR以外\NMR\Supakarn\SCT 46\SCT 462BCM_E1_FT.als

Figure S10. ¹³C NMR (100 MHz) spectrum of 7c in CDCl₃

SCT 28

E:\SCT 28\H SSCT 28 S.als

**Figure S11.** ^1H NMR (400 MHz) spectrum of **7d** in CDCl_3

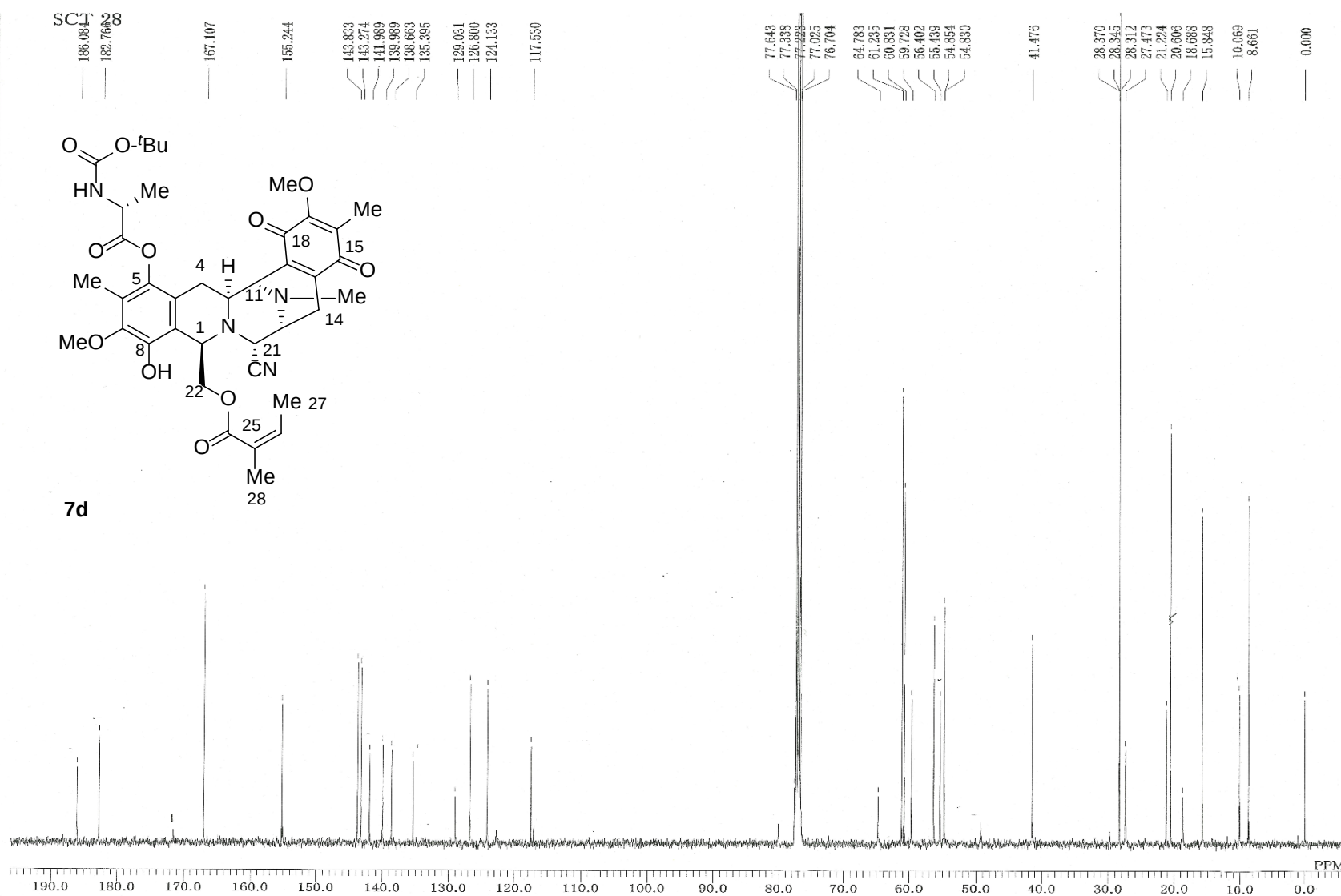


Figure S12. ¹³C NMR (100 MHz) spectrum of **7d** in CDCl₃

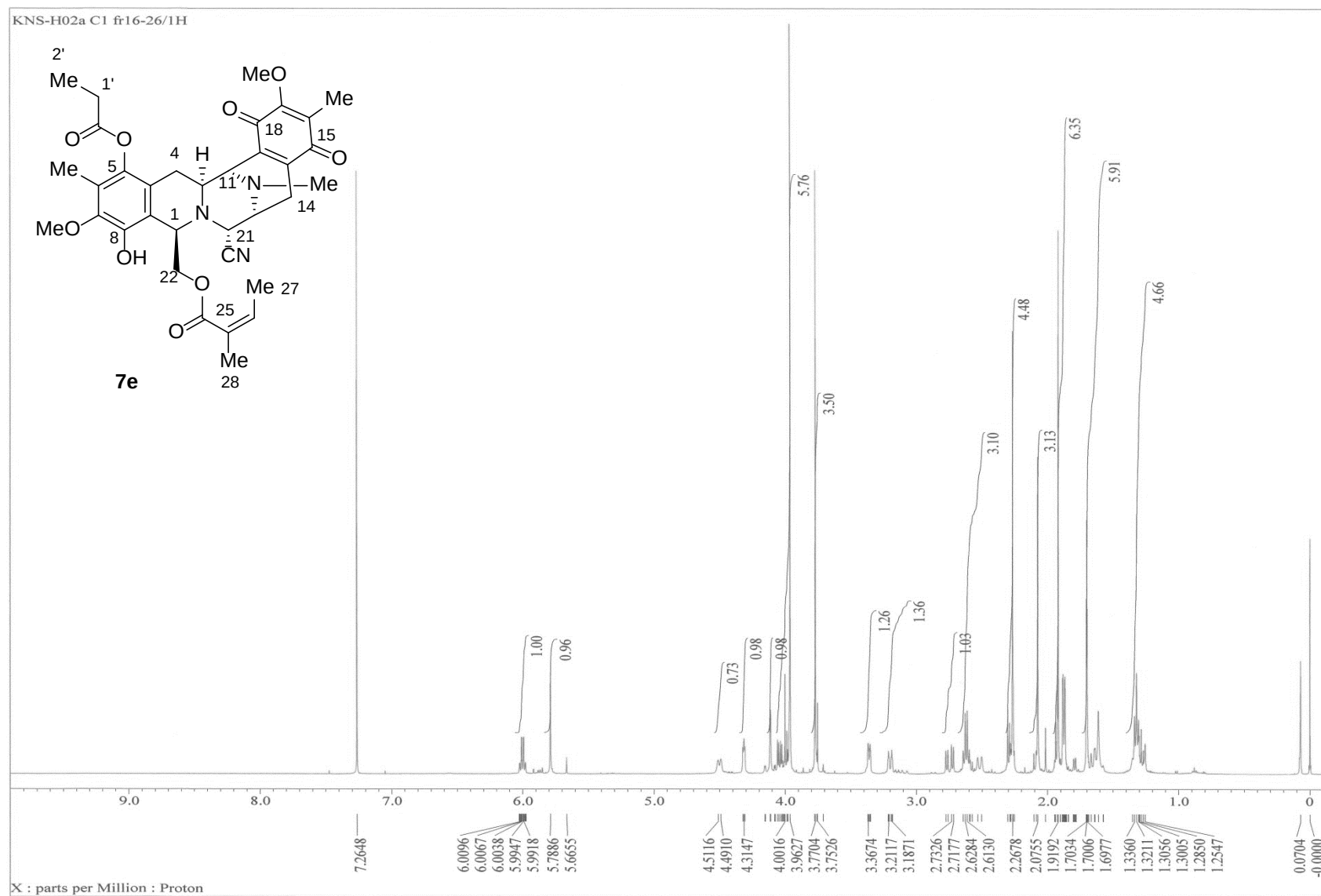


Figure S13. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **7e** in CDCl_3

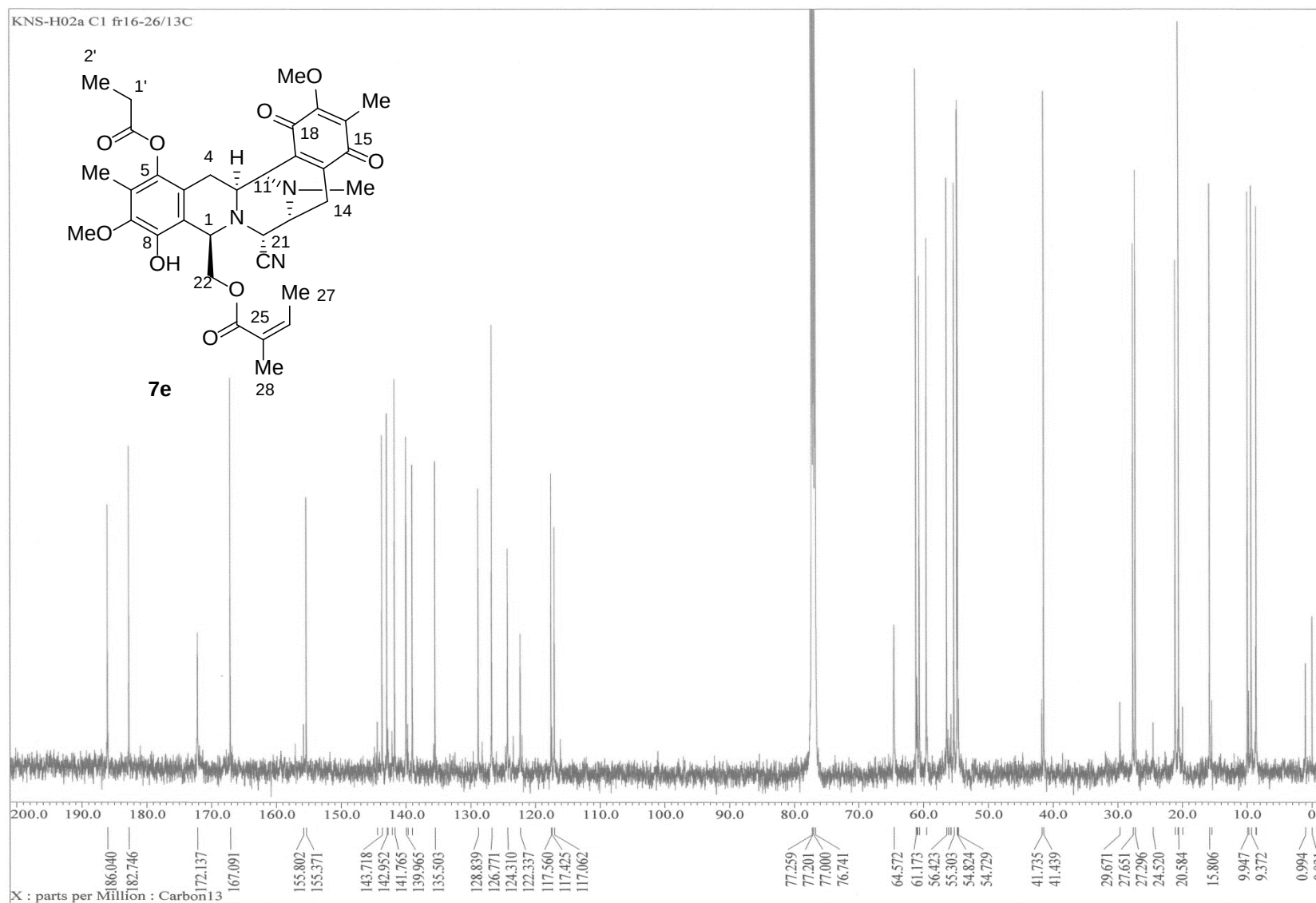


Figure S14. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7e** in CDCl_3

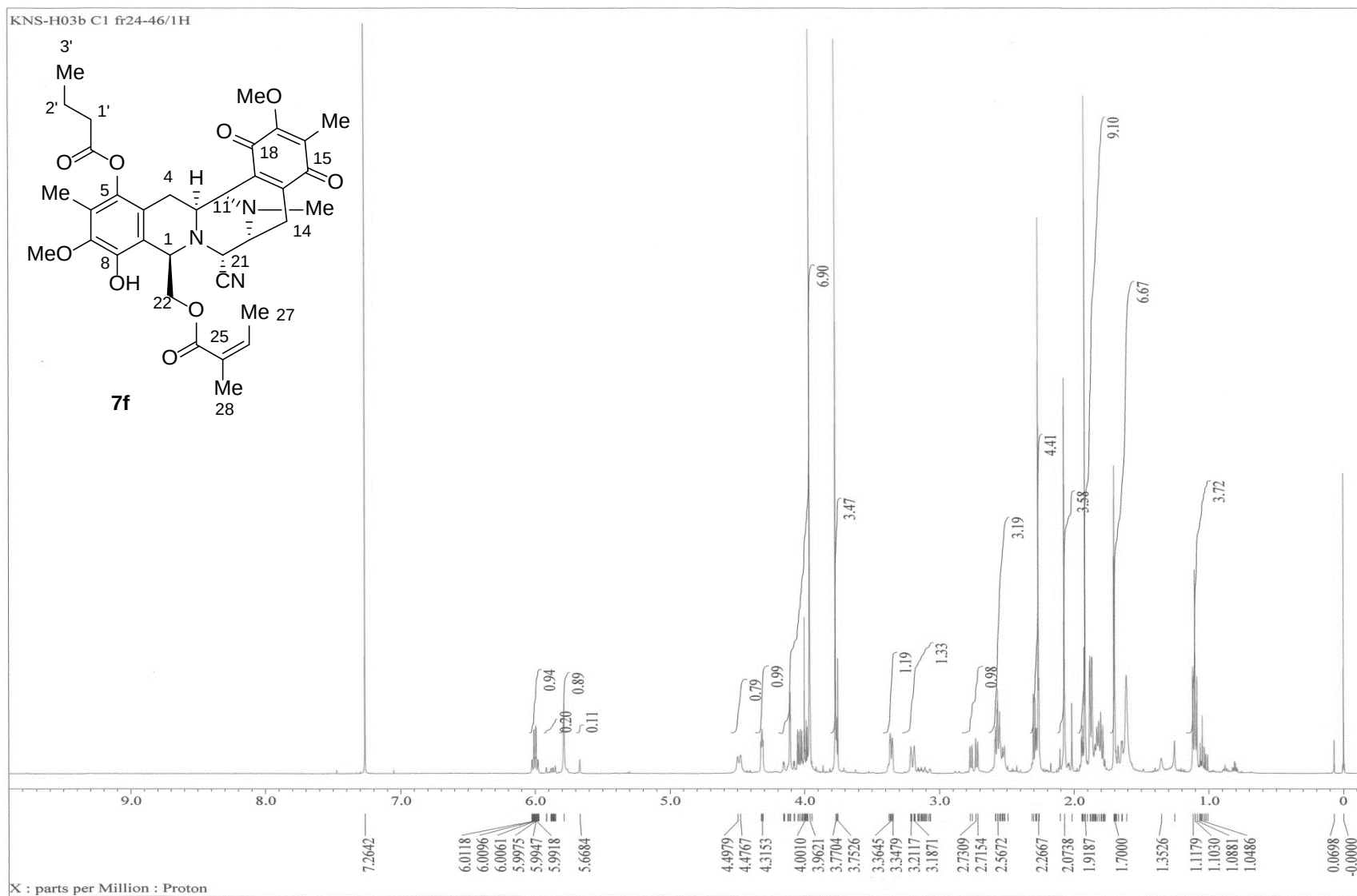


Figure S15. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **7f** in CDCl_3

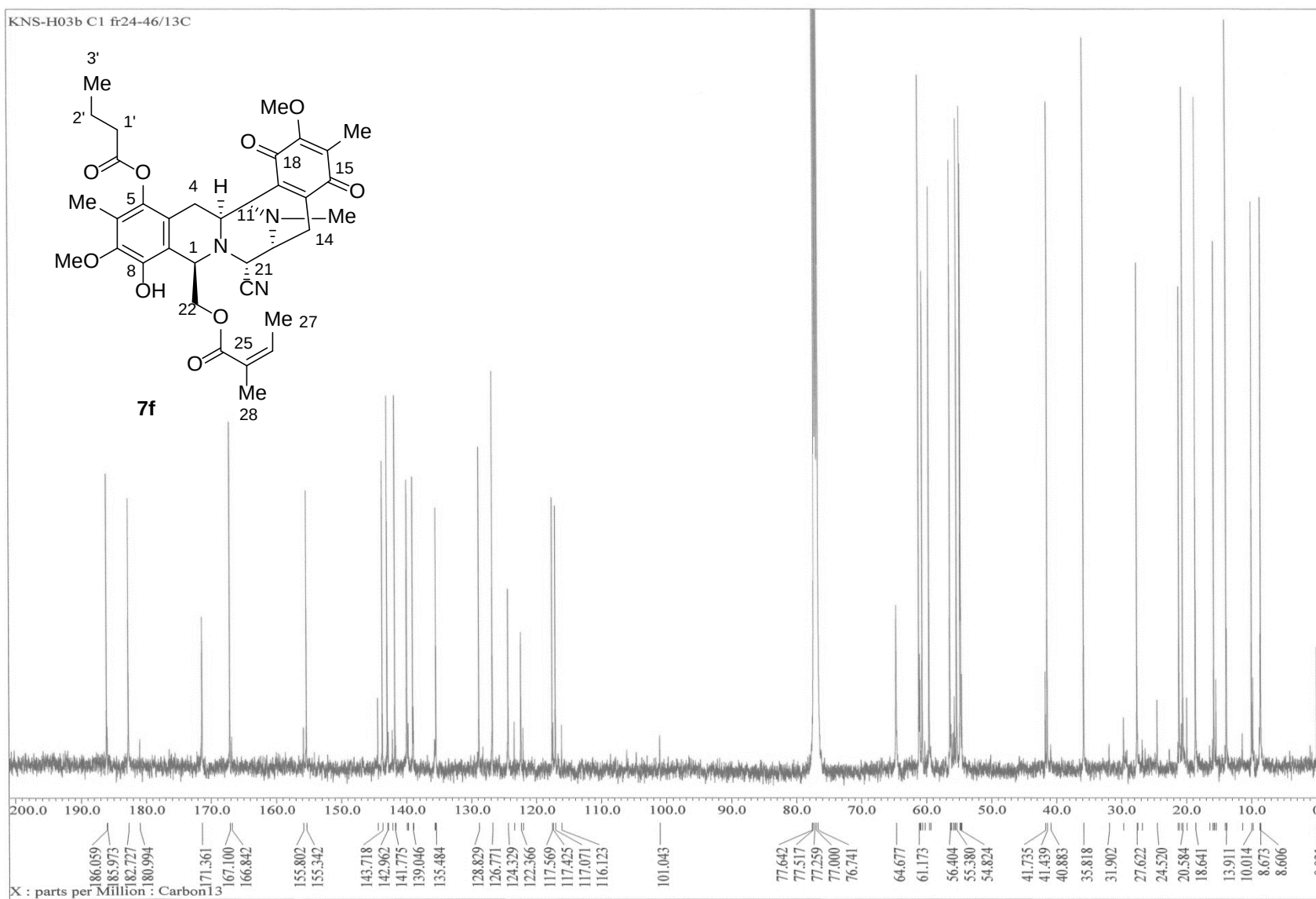


Figure S16. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7f** in CDCl_3

Figure S17. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **7g** in CDCl_3

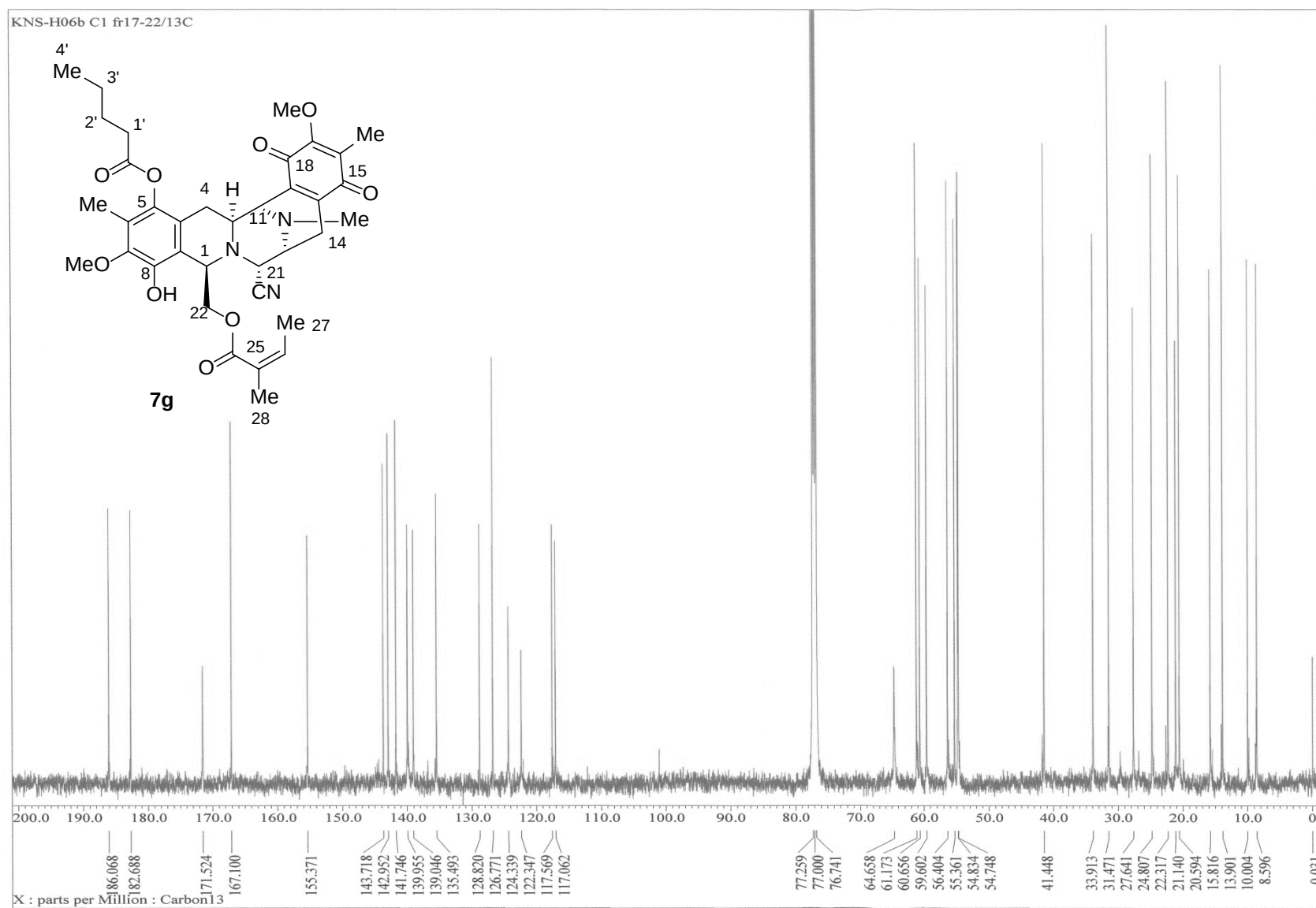


Figure S18. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7g** in CDCl_3

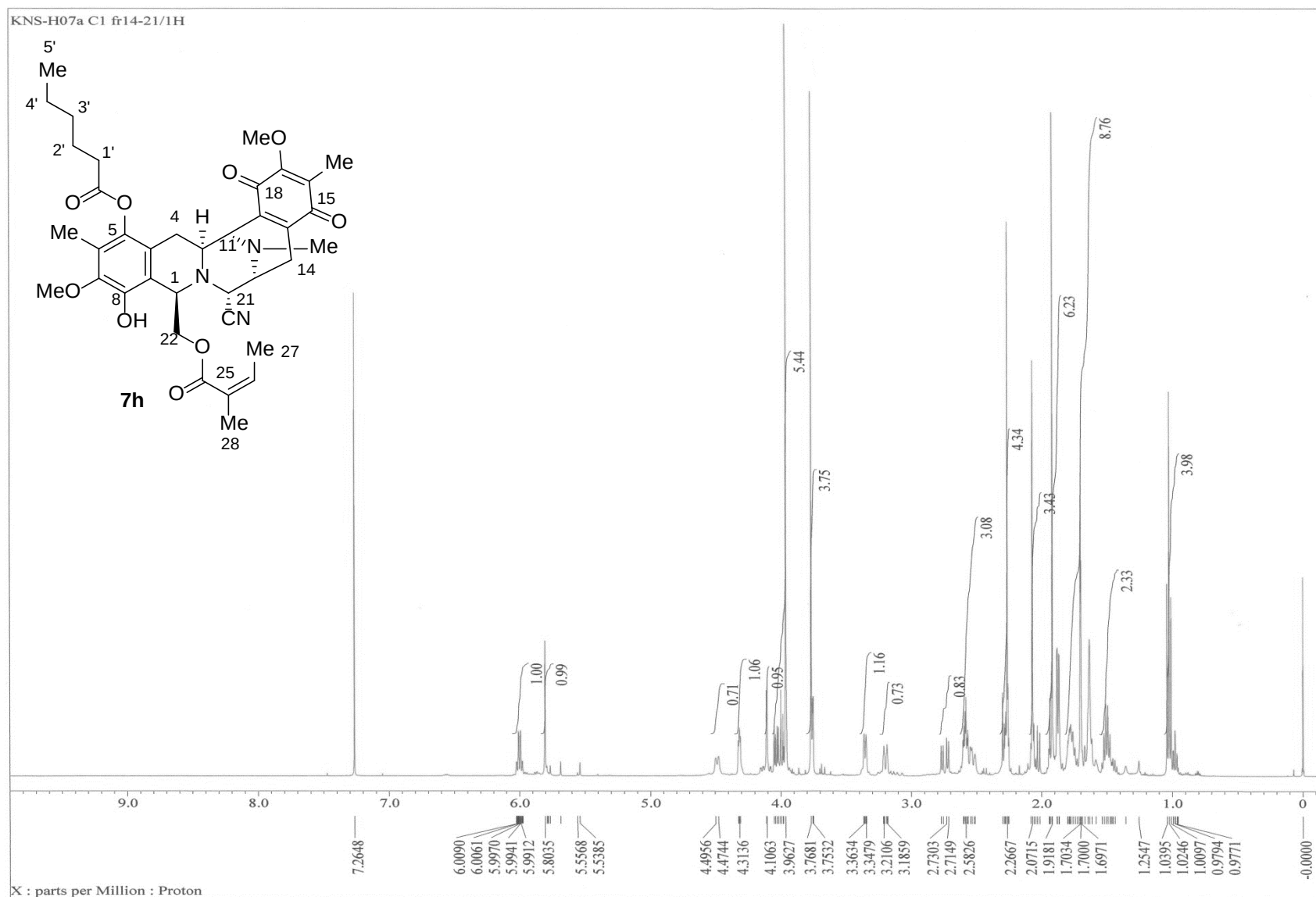


Figure S19. ¹H NMR (500 MHz) spectrum of **7h** in CDCl₃

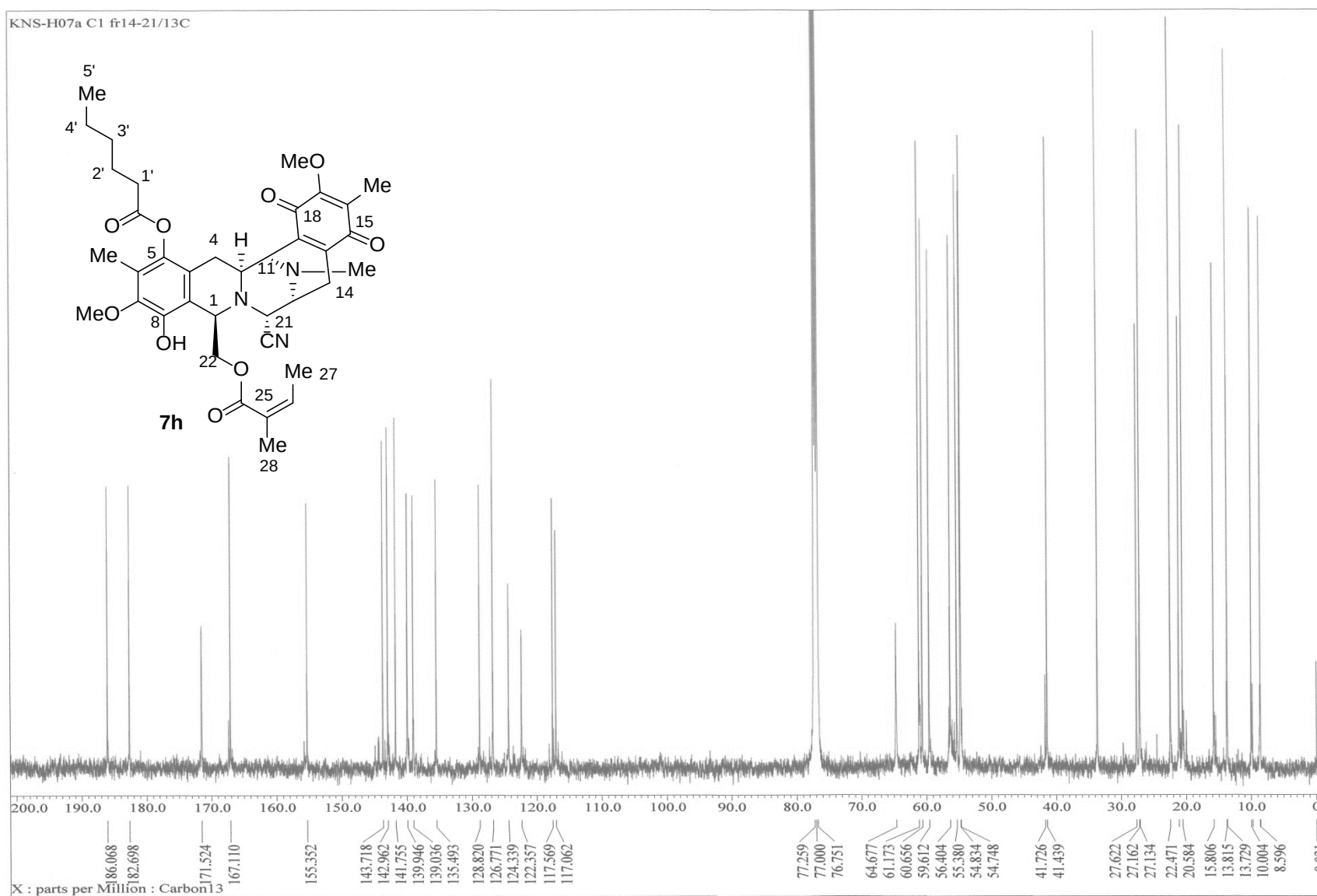


Figure S20. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7h** in CDCl_3

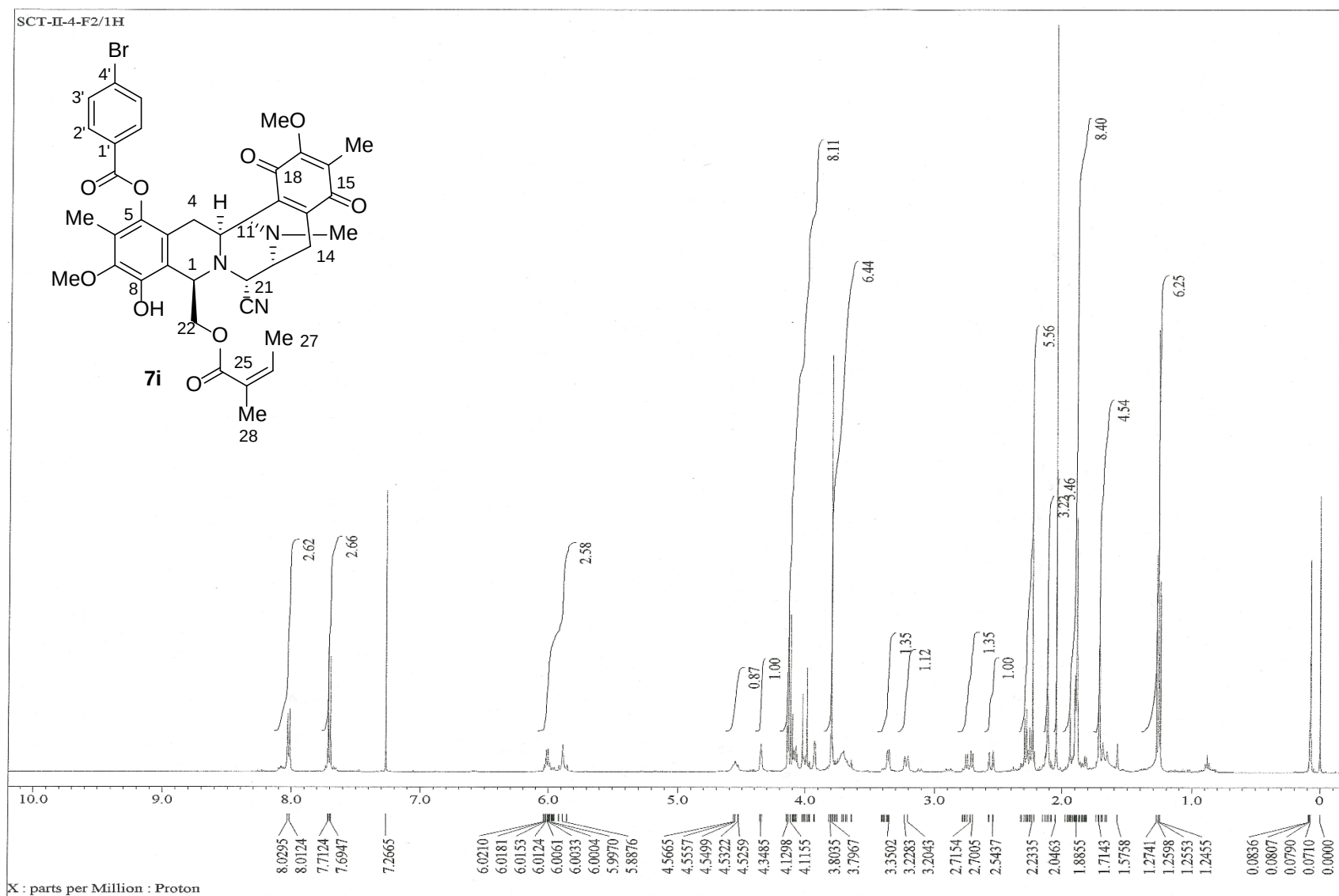


Figure S21. ¹H NMR (500 MHz) spectrum of **7i** in CDCl₃

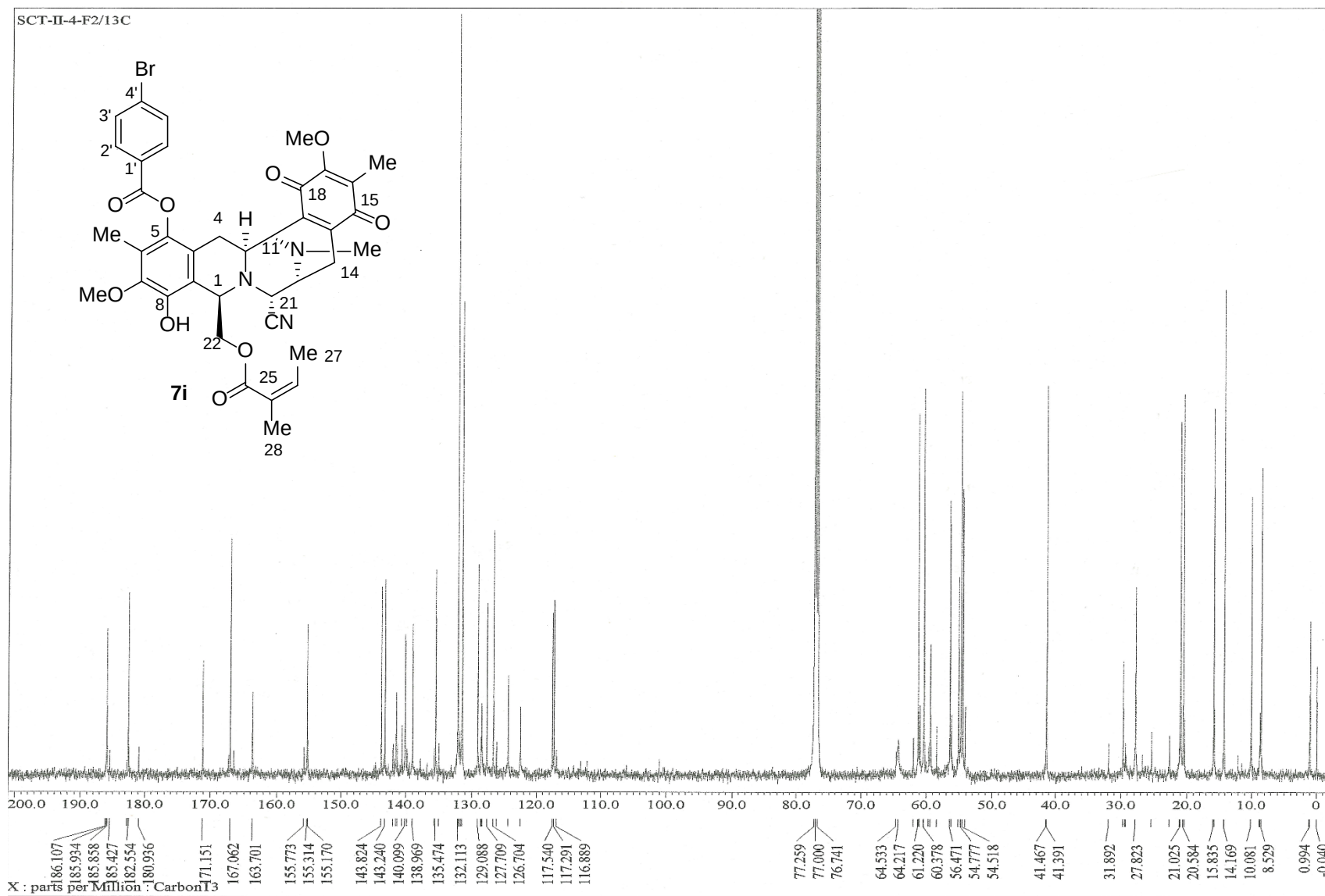


Figure S22. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7i** in CDCl_3

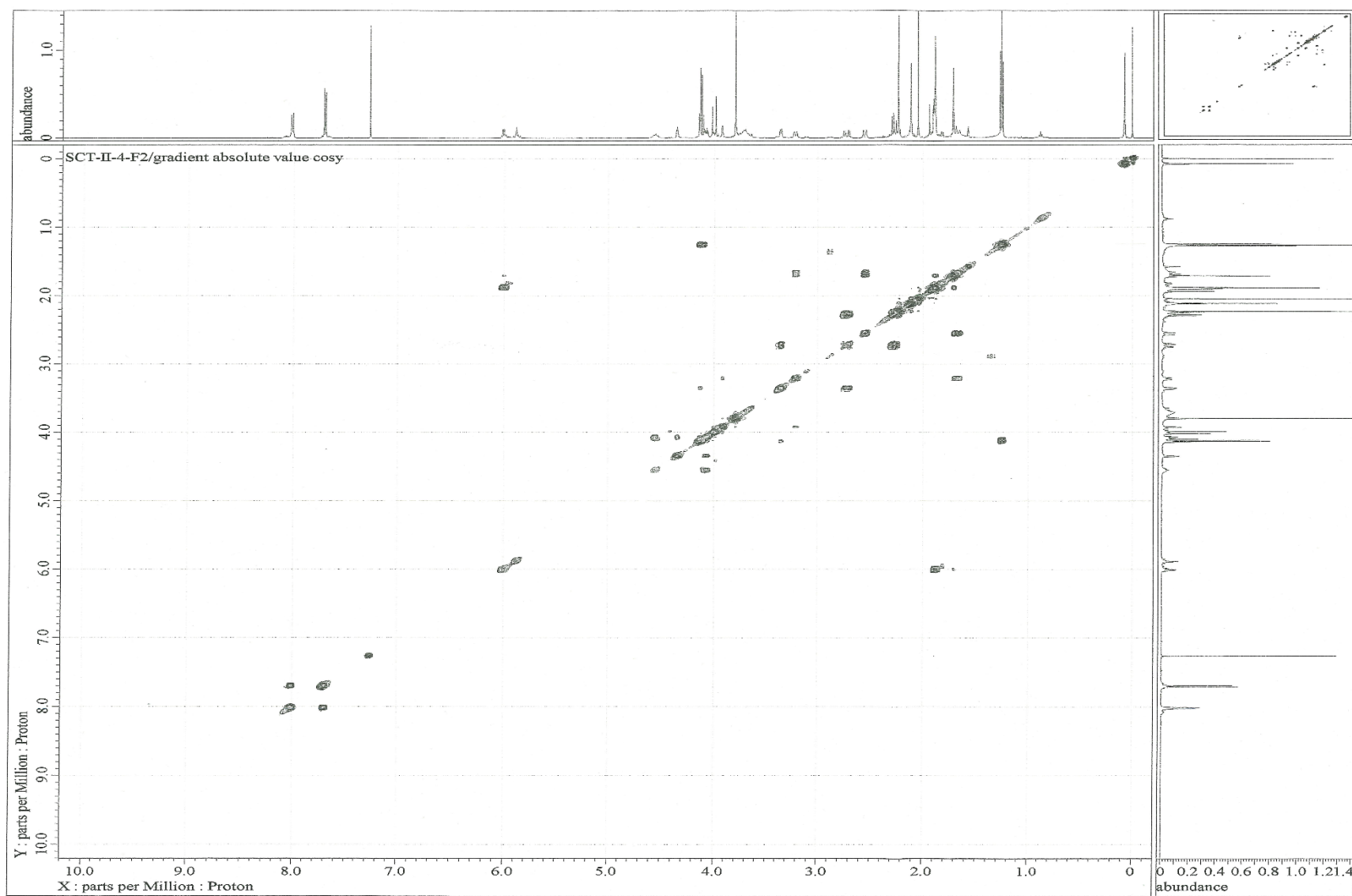


Figure S23. COSY (500 MHz) spectrum of **7i** in CDCl_3

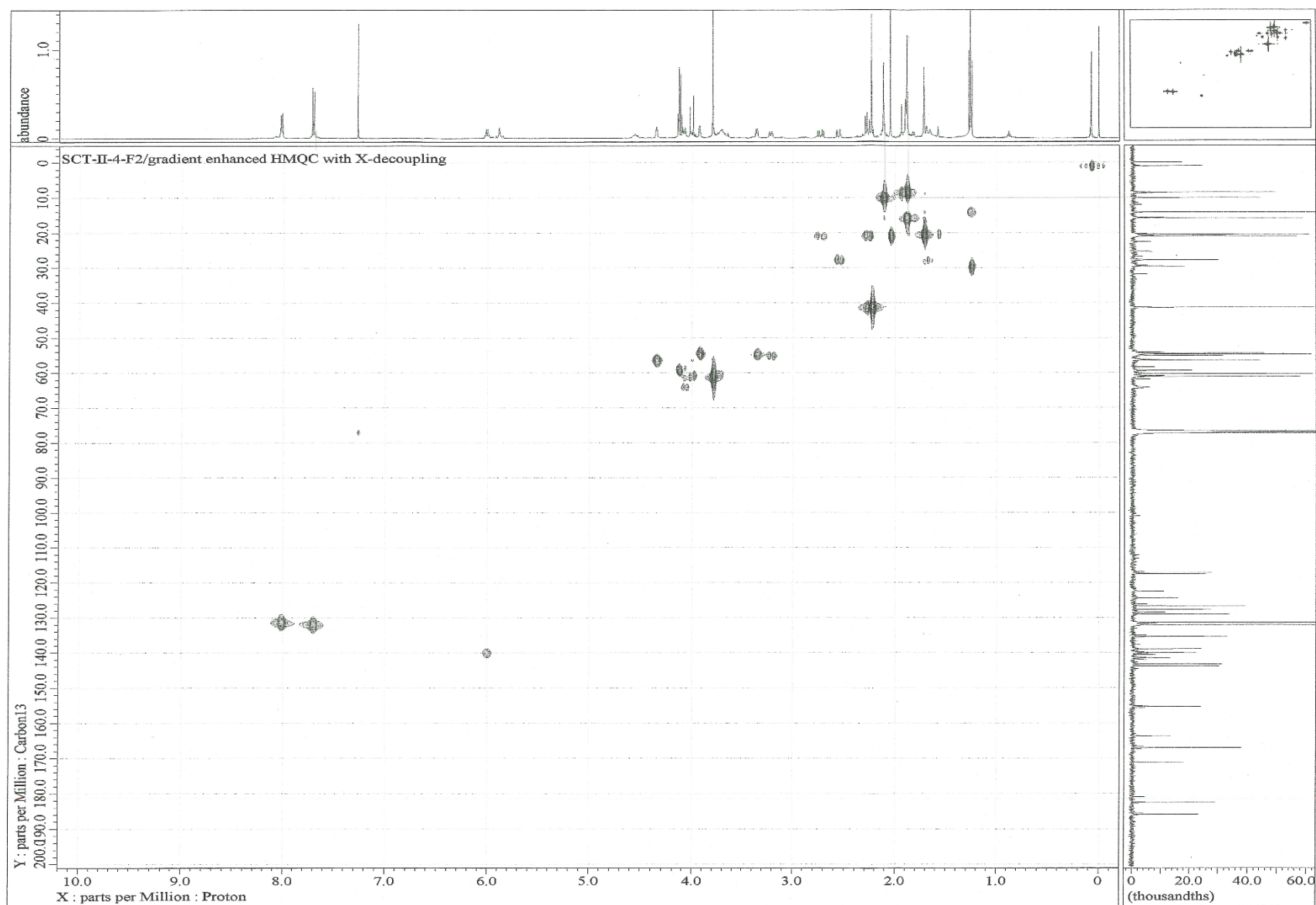


Figure S24. HMQC (500 MHz) spectrum of **7i** in CDCl_3

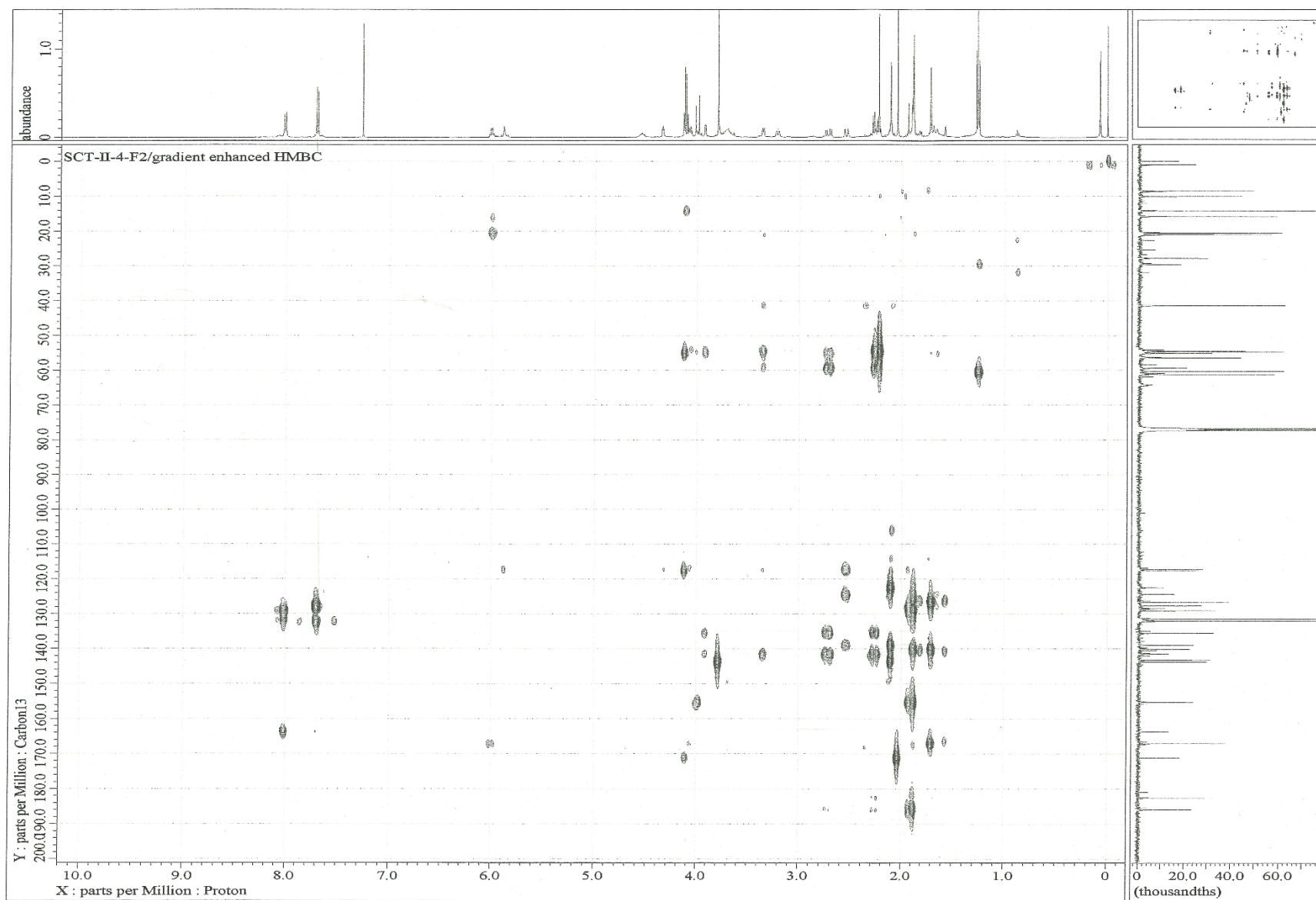


Figure S25. HMBC (500MHz) spectrum of **7i** in CDCl₃

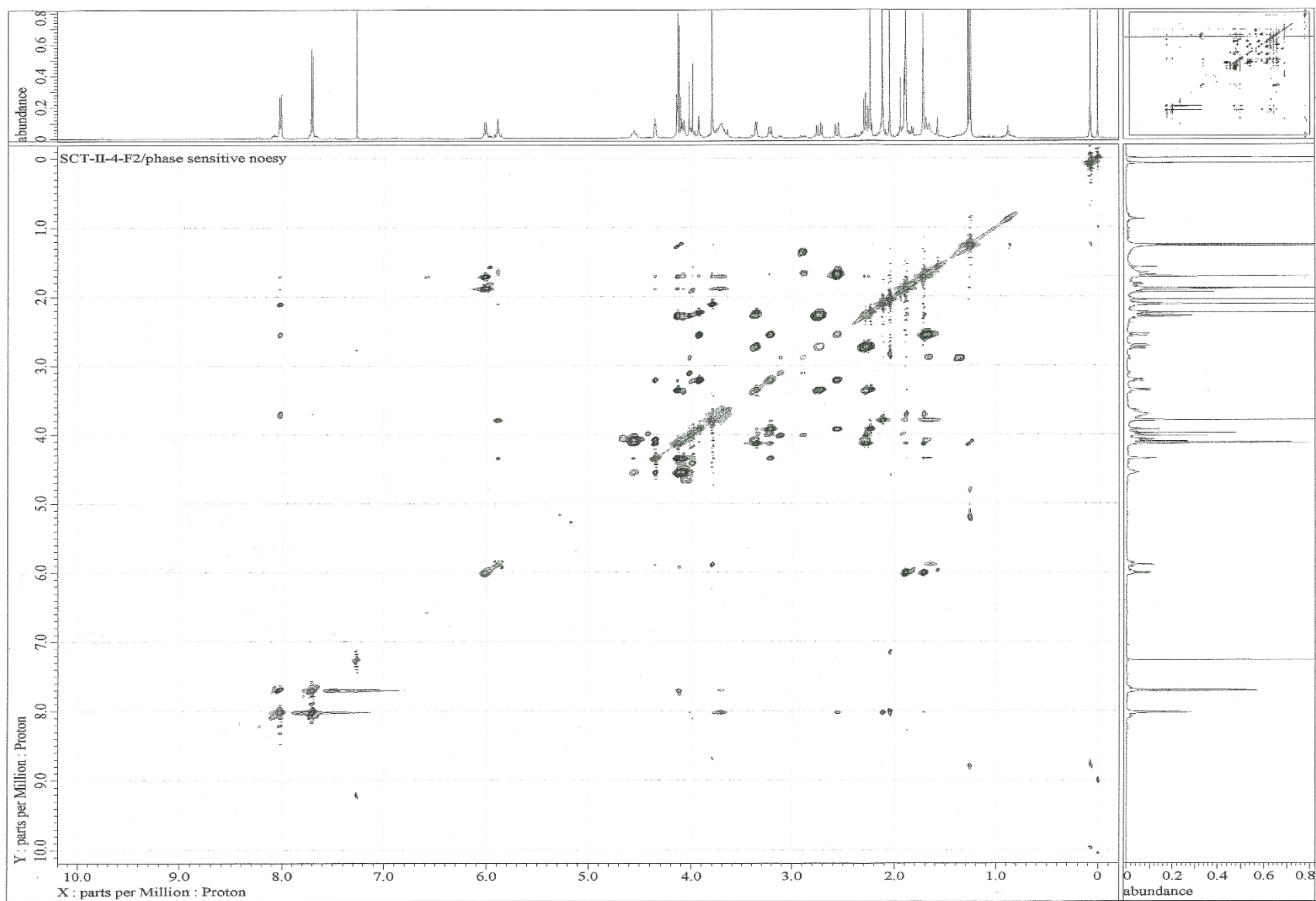


Figure S26. NOESY (500 MHz) spectrum of **7i** in CDCl_3

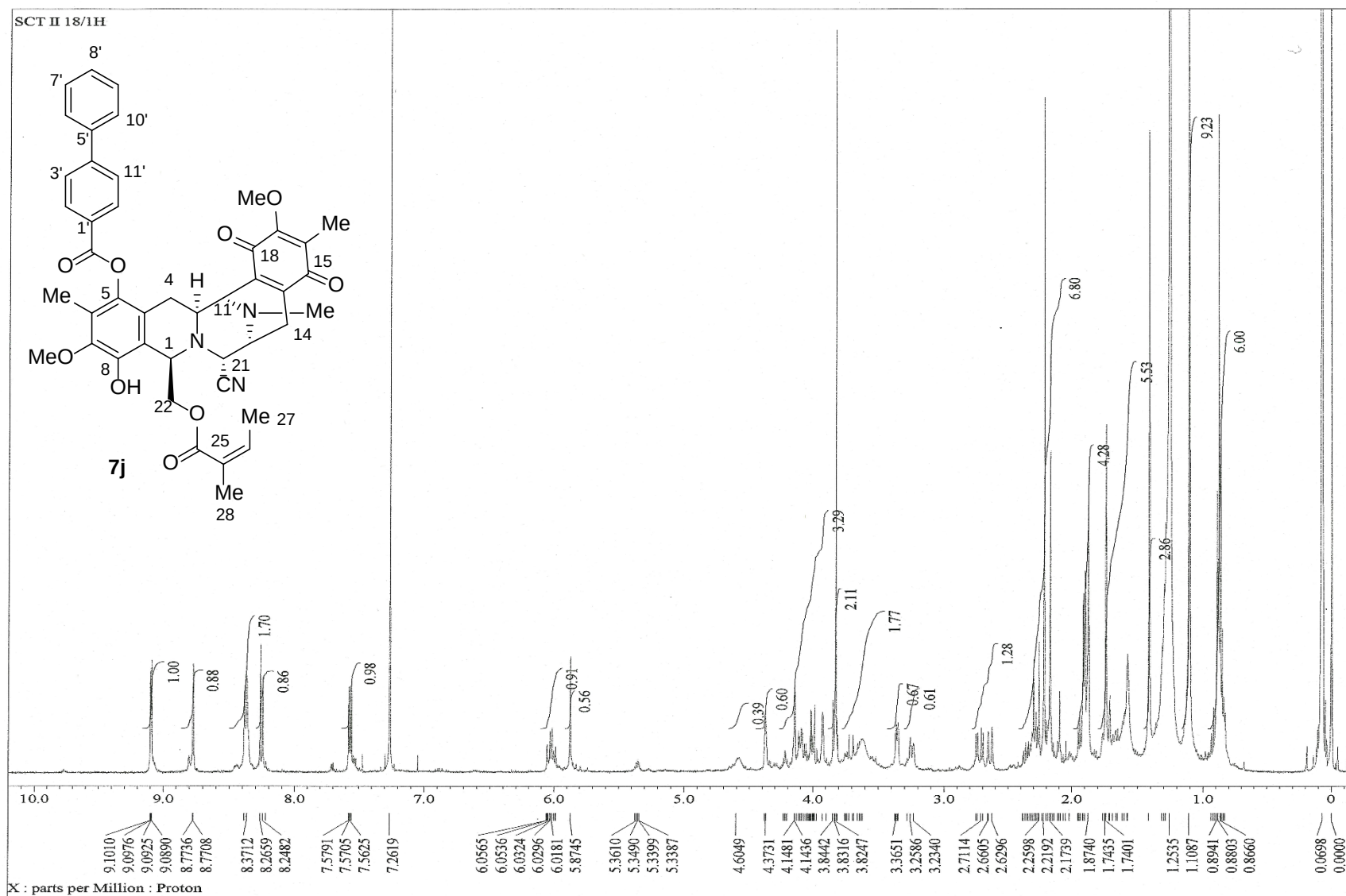


Figure S27. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **7j** in CDCl_3

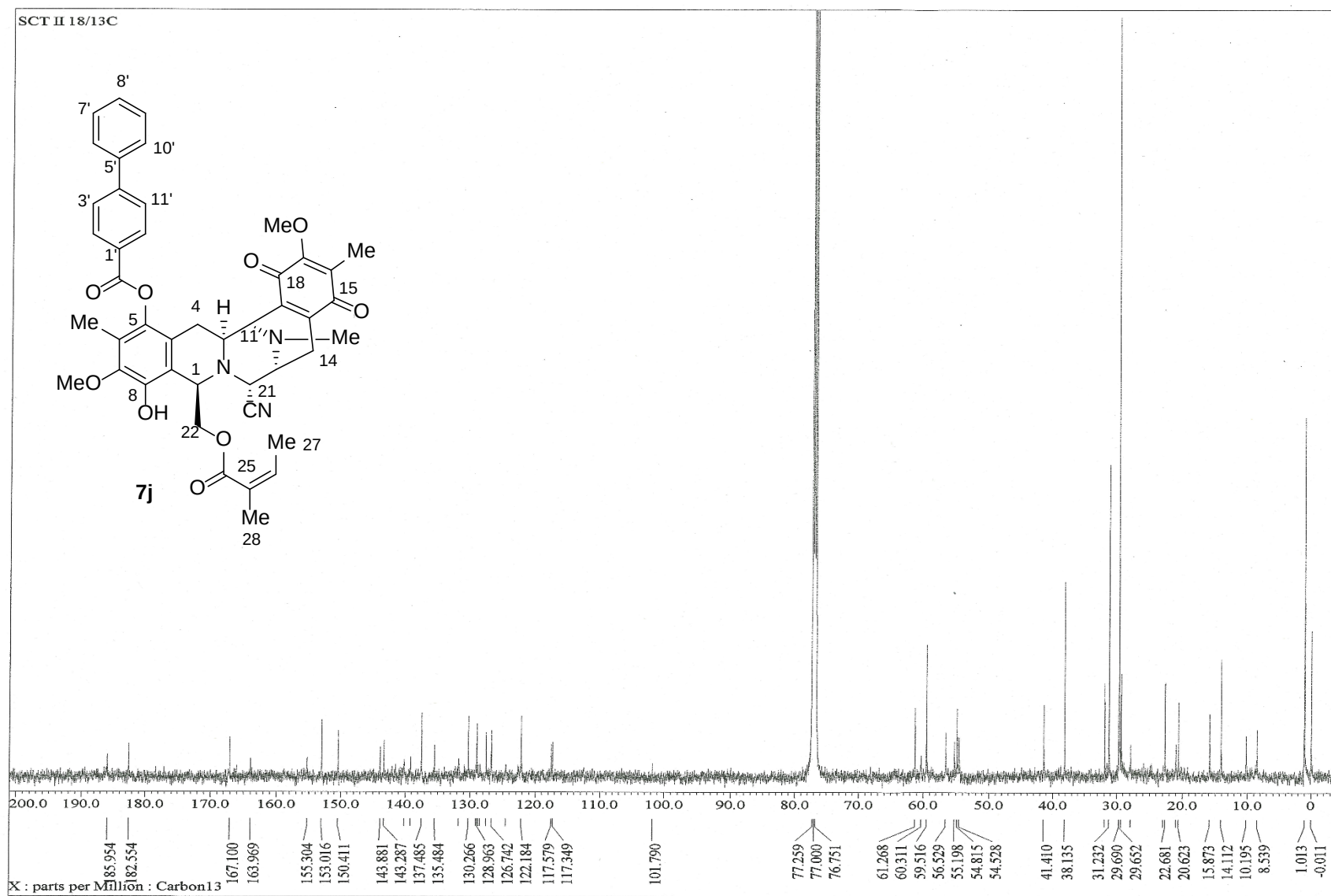


Figure S28. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7j** in CDCl_3

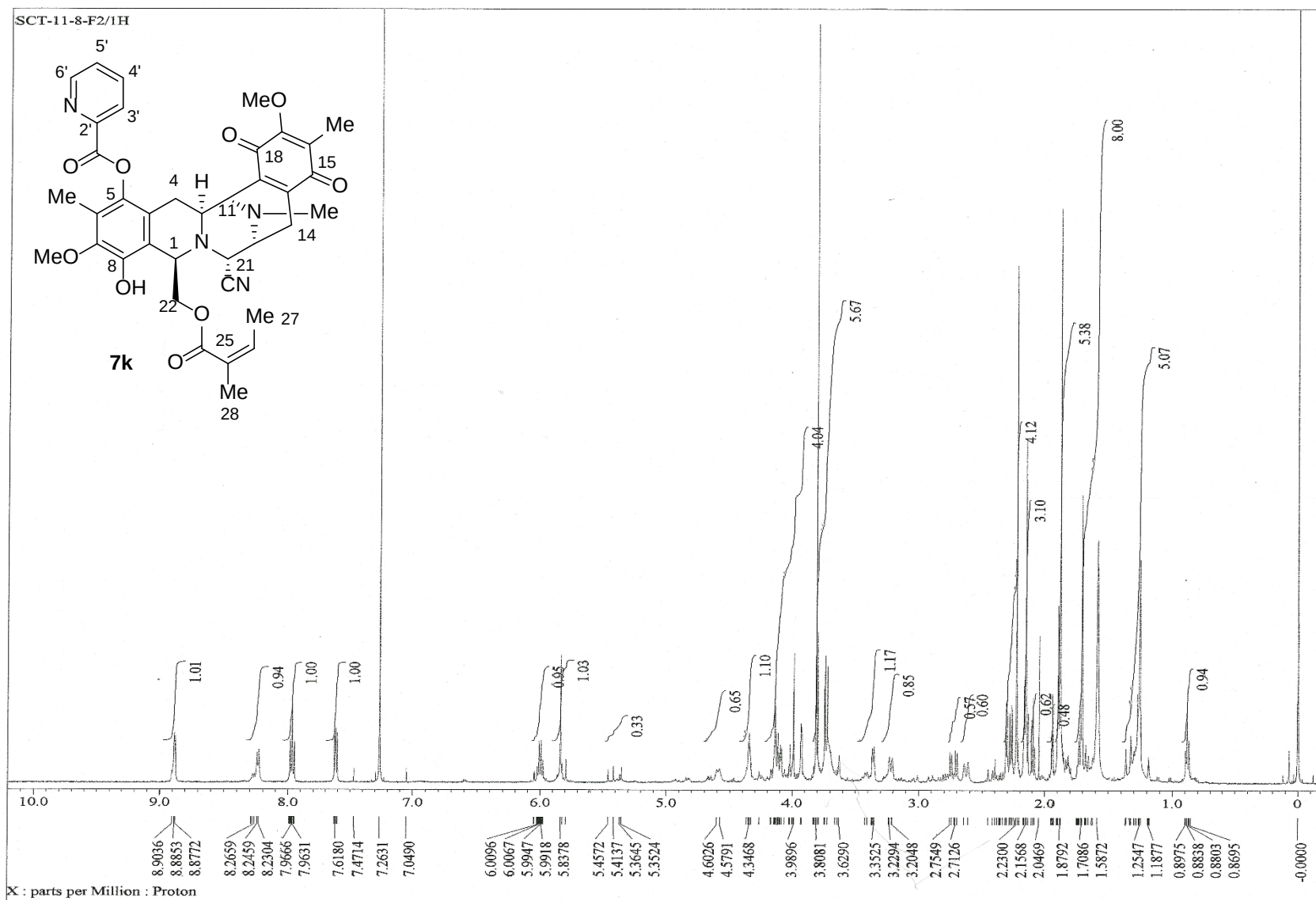


Figure S29. ¹H NMR (500 MHz) spectrum of **7k** in CDCl₃

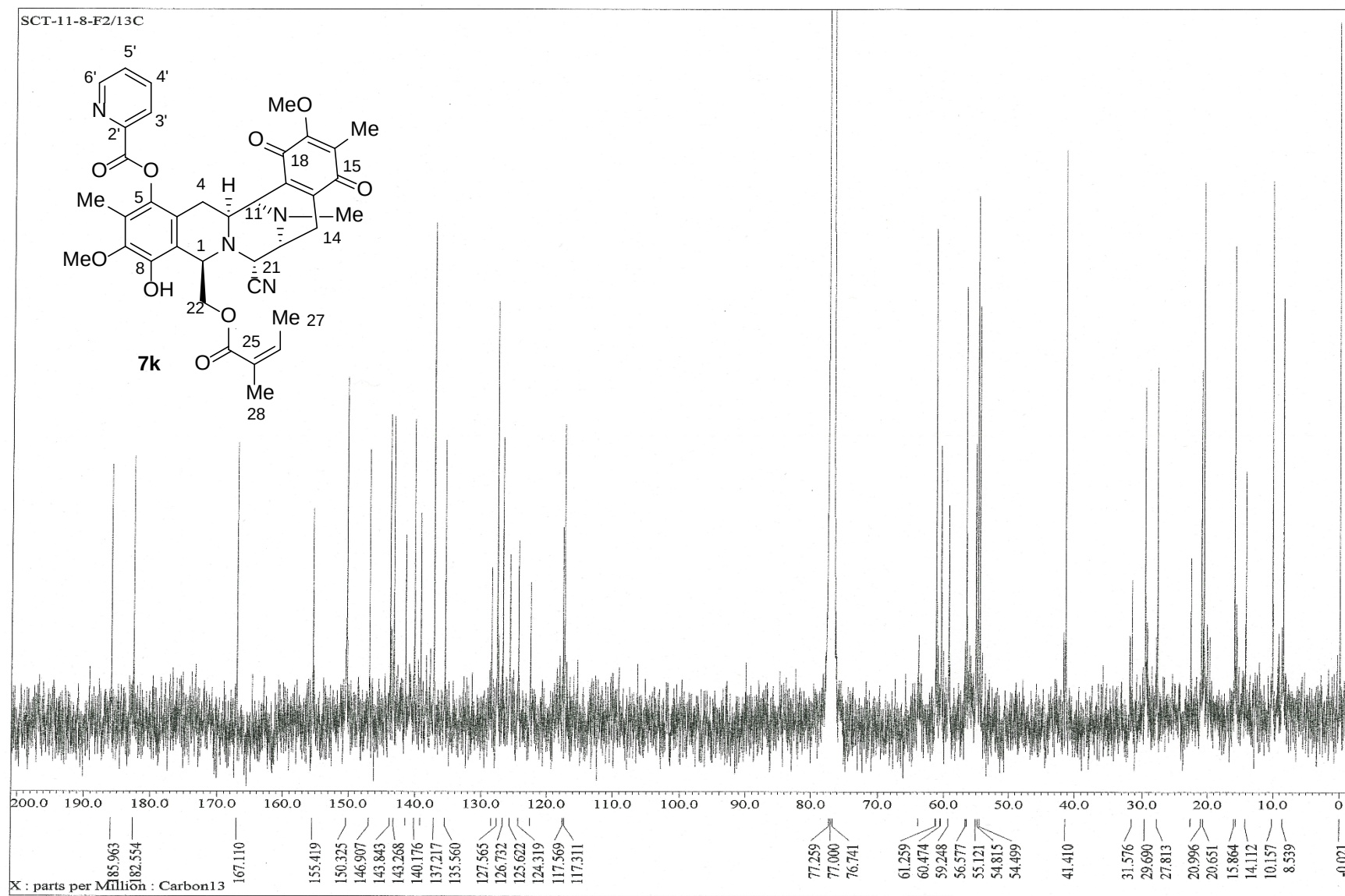


Figure S30. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7k** in CDCl_3

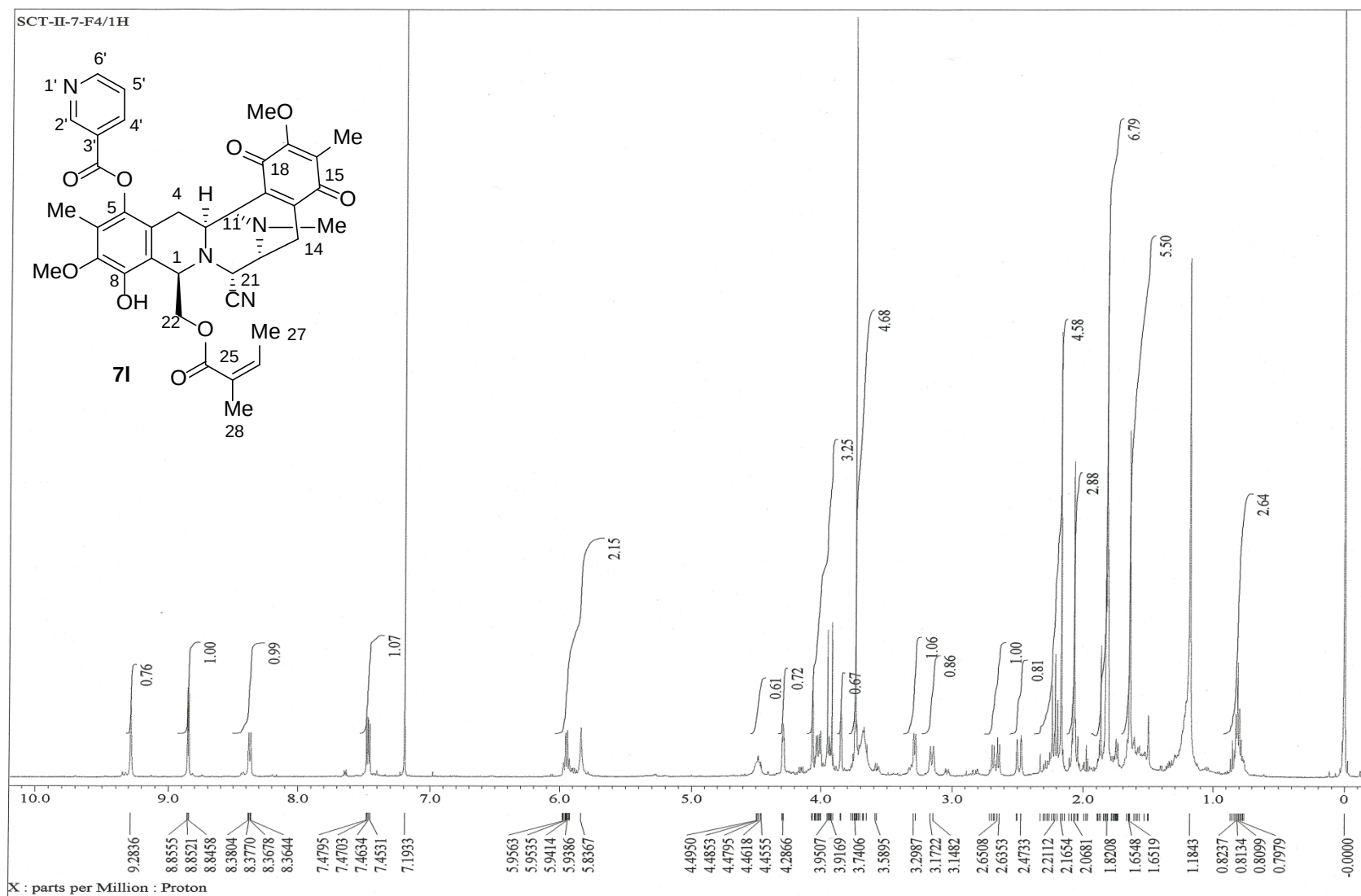


Figure S31. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **71** in CDCl_3

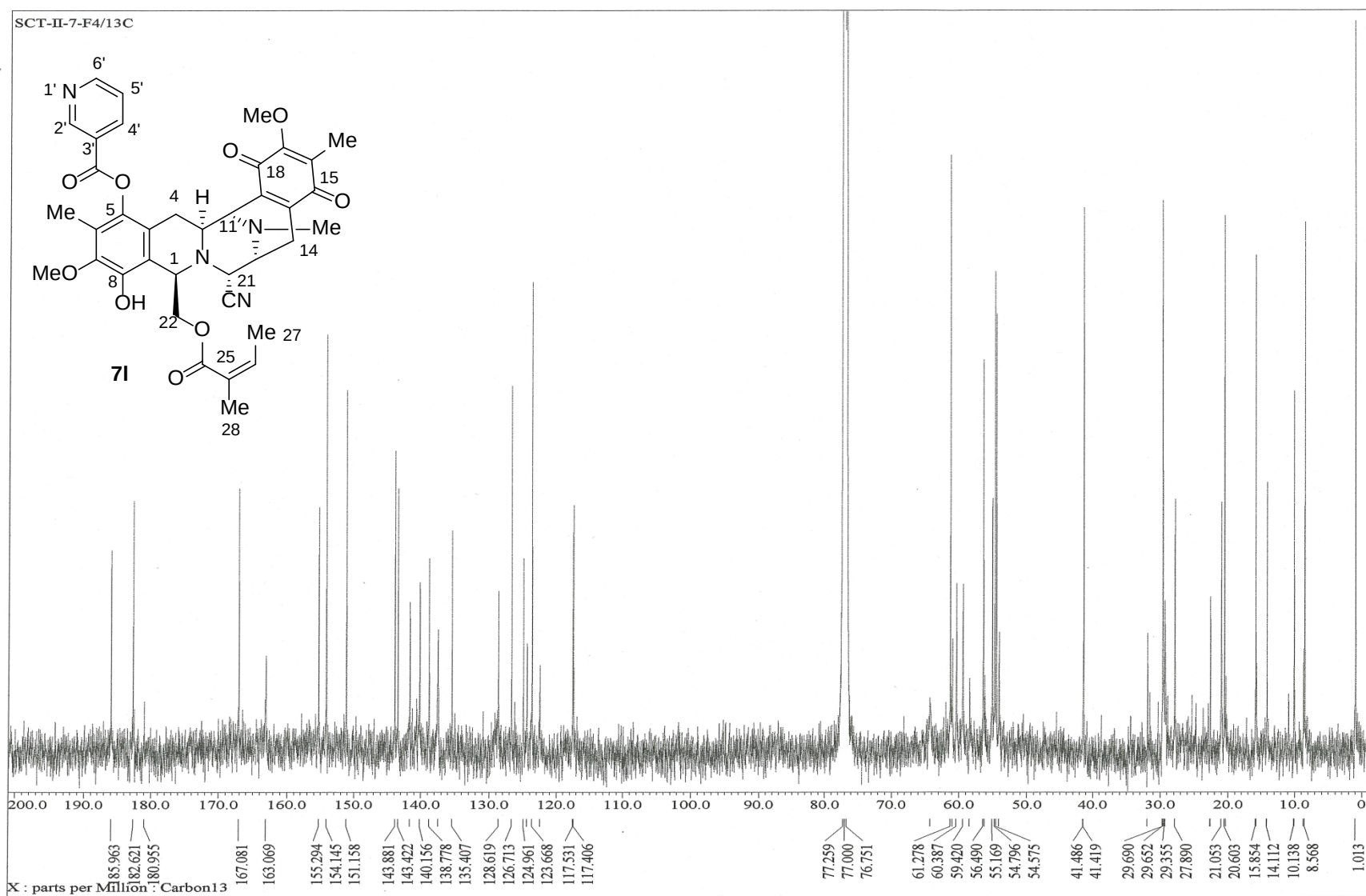


Figure S32. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7I** in CDCl_3

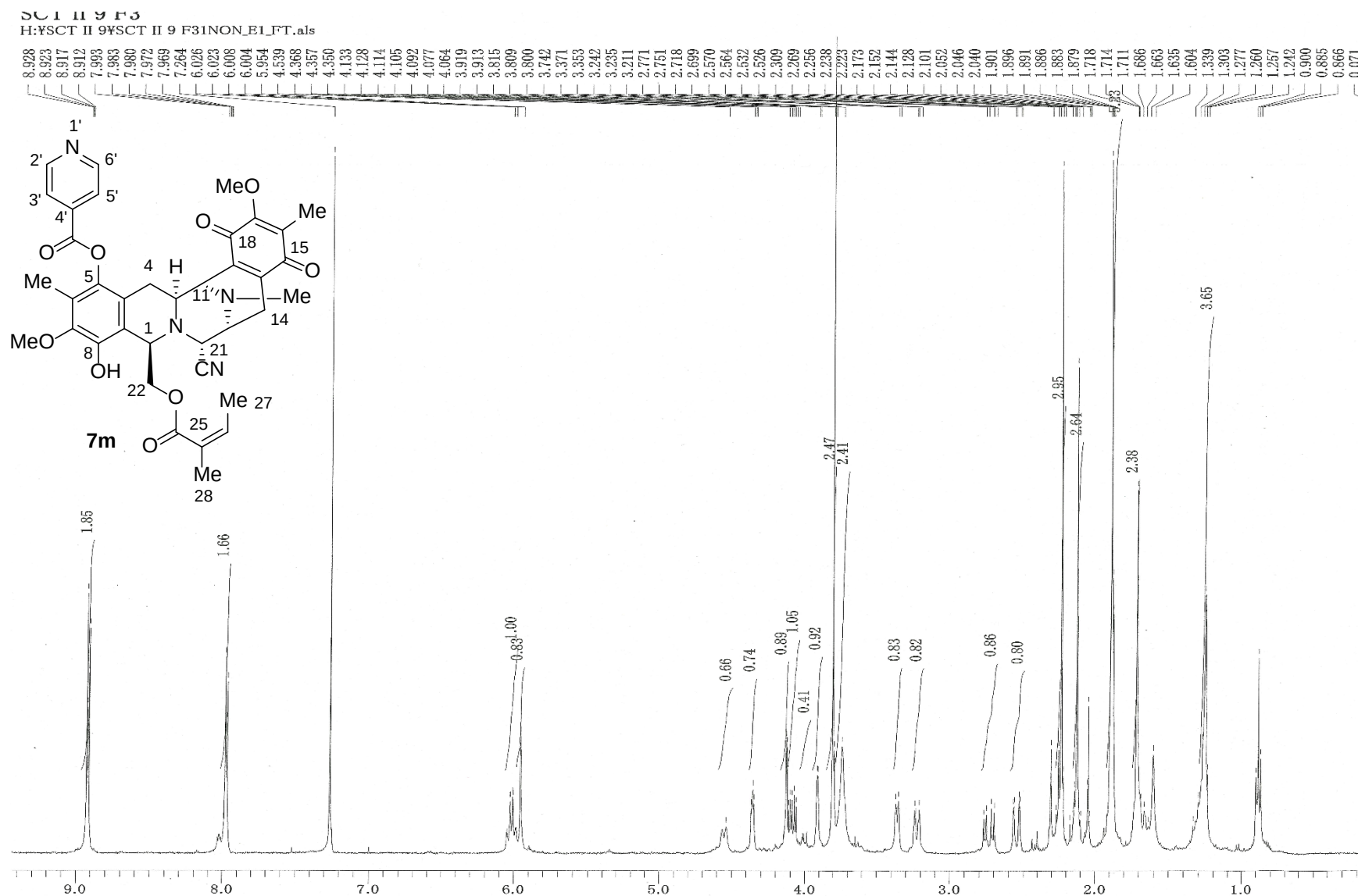
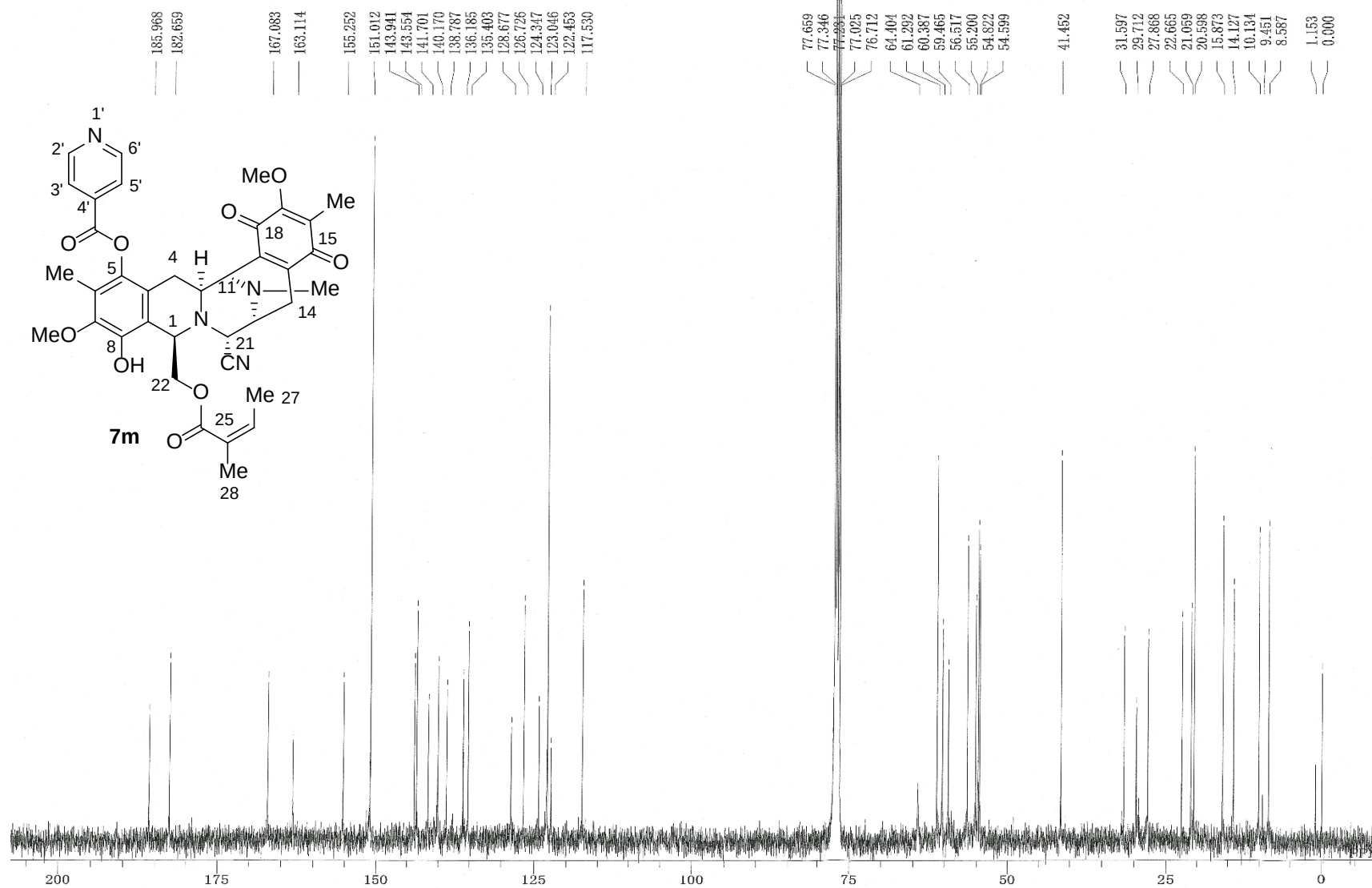


Figure S33. ¹H NMR (400 MHz) spectrum of **7m** in CDCl₃

SCT II 9 F3

H:\SCT II 9\F32BCM_E1_FT.als

Figure S34. ¹³C NMR (100 MHz) spectrum of **7m** in CDCl₃

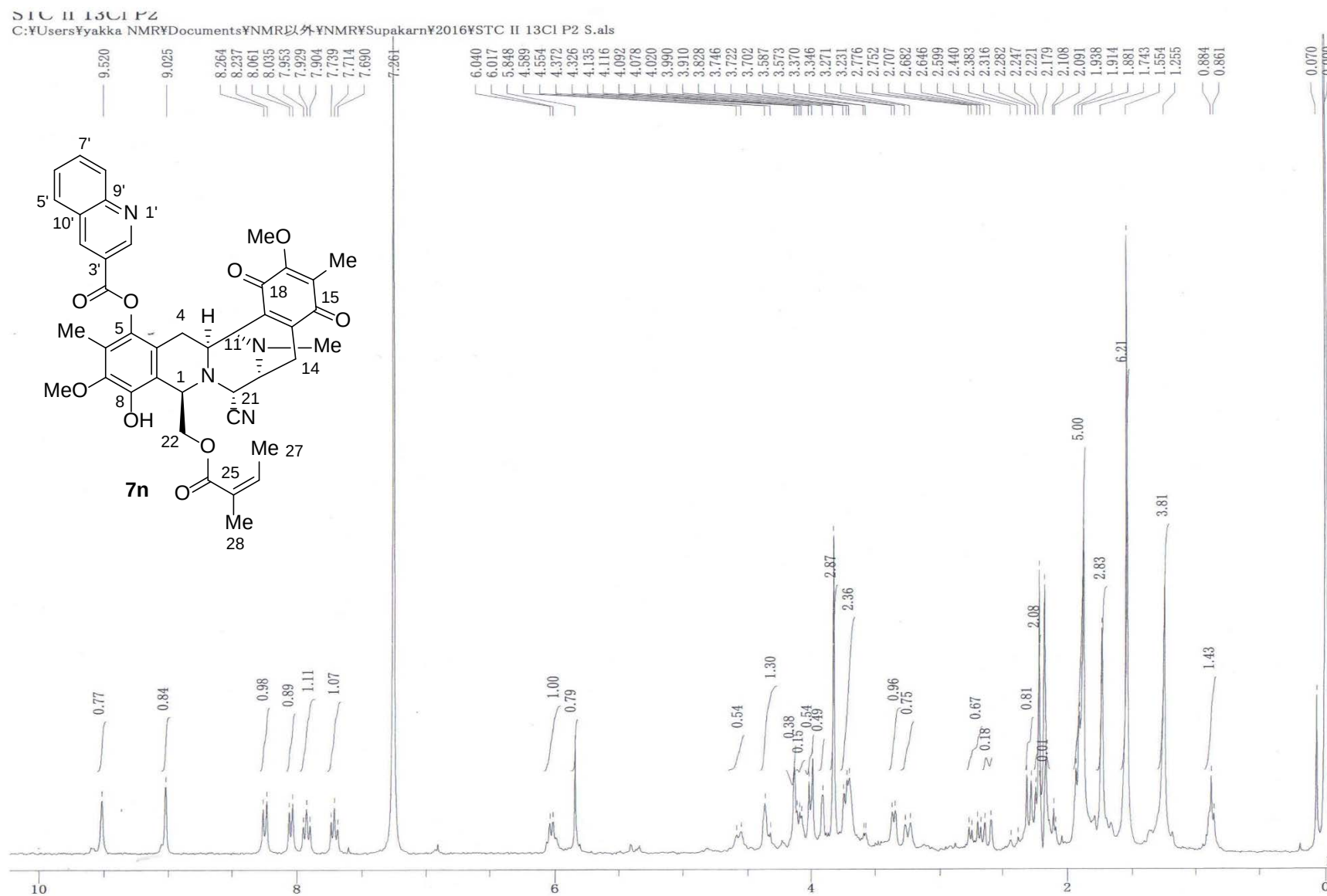


Figure S35. ^1H NMR (300 MHz) spectrum of **7n** in CDCl_3

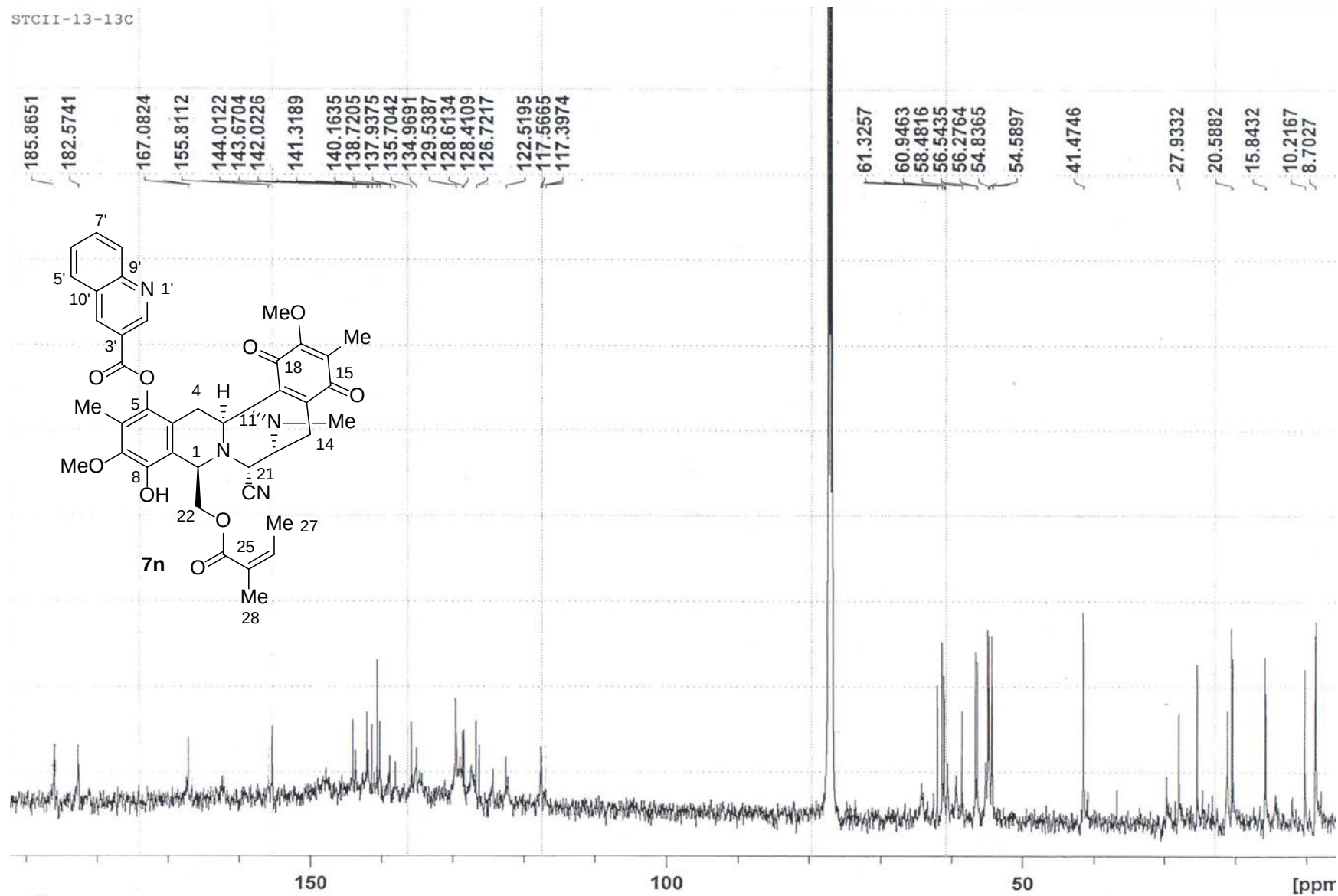


Figure S36. ¹³C NMR (125 MHz) spectrum of **7n** in CDCl₃

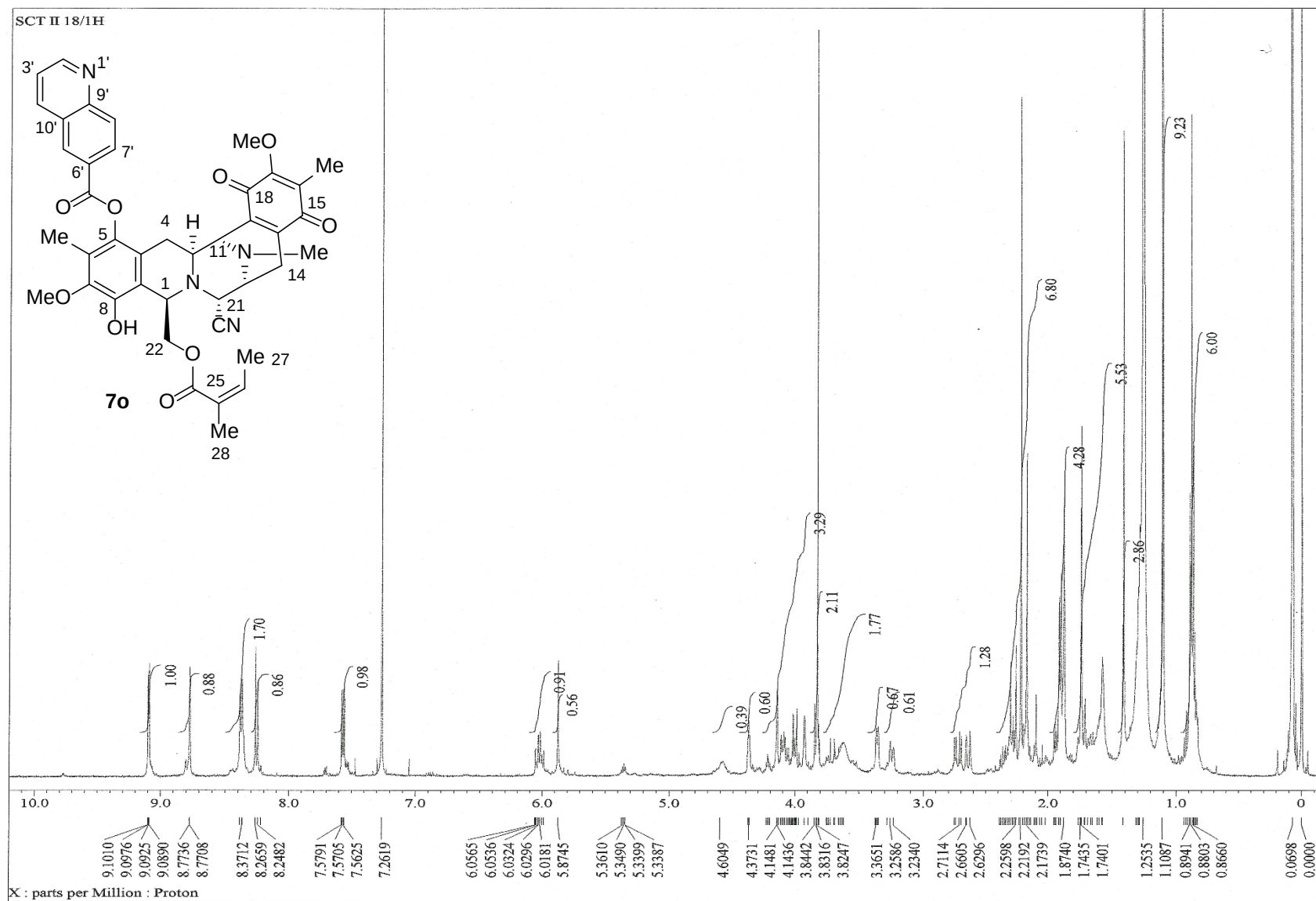


Figure S37. ^1H NMR (500 MHz) spectrum of **7o** in CDCl_3

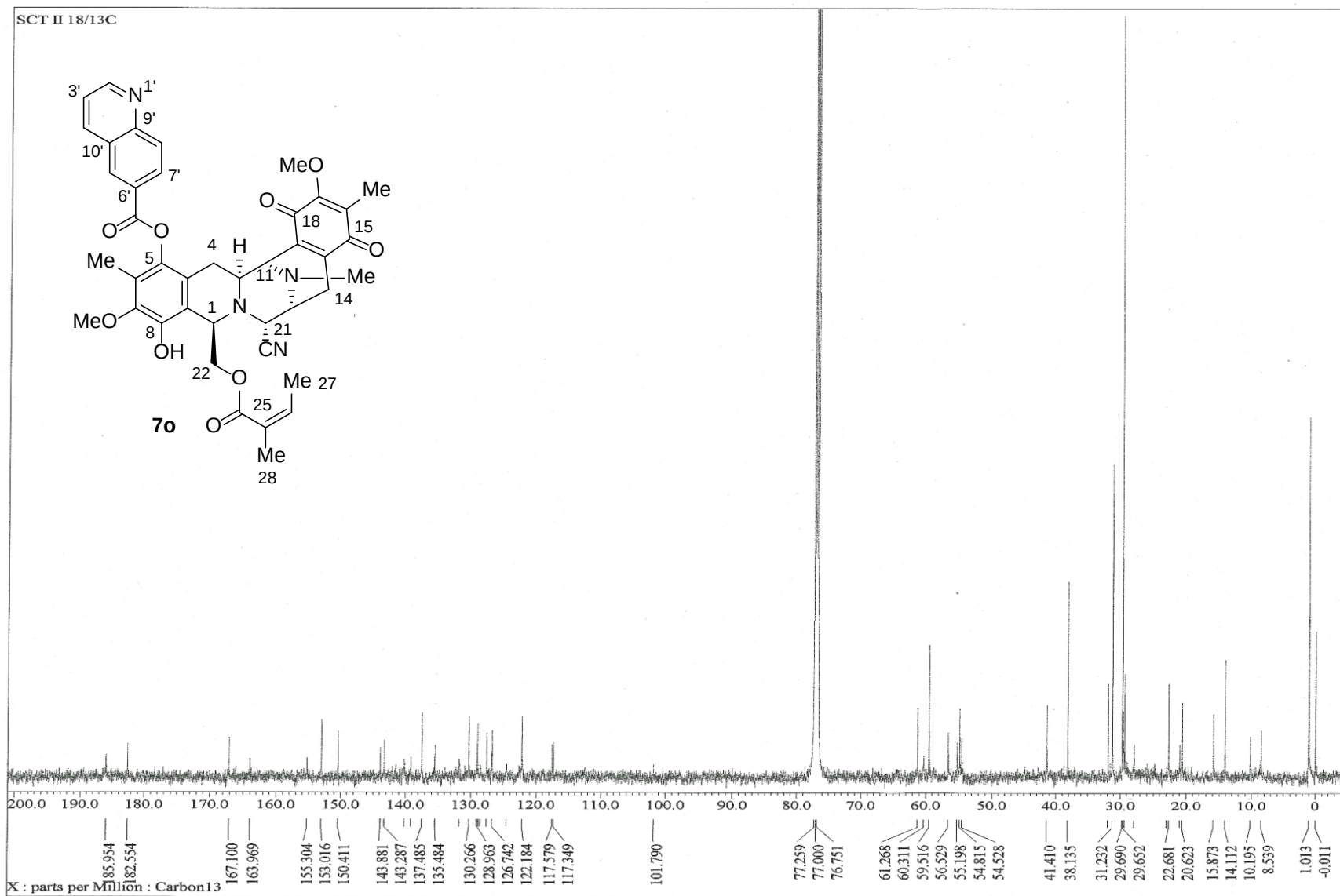


Figure S38. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7o** in CDCl_3

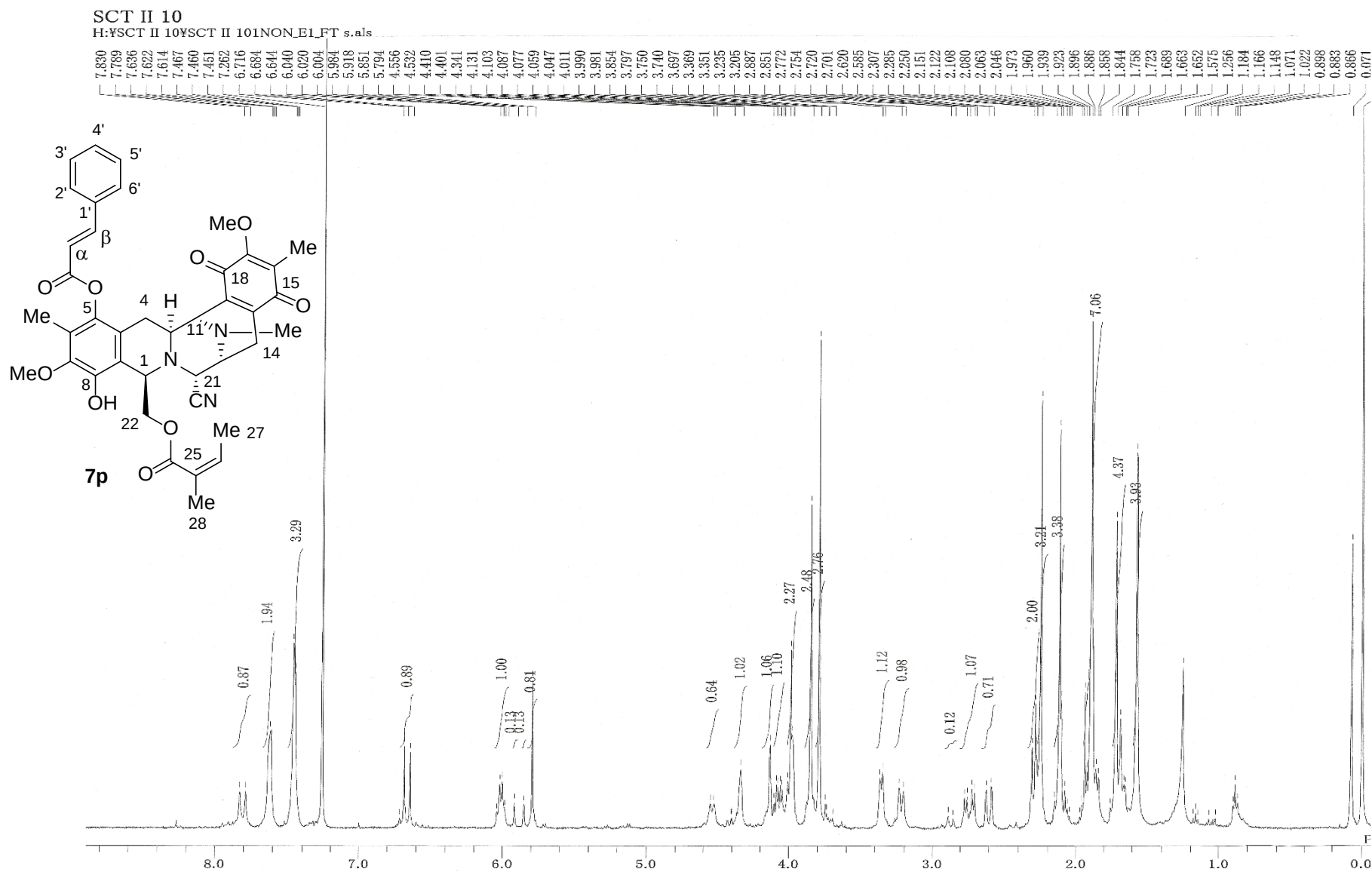
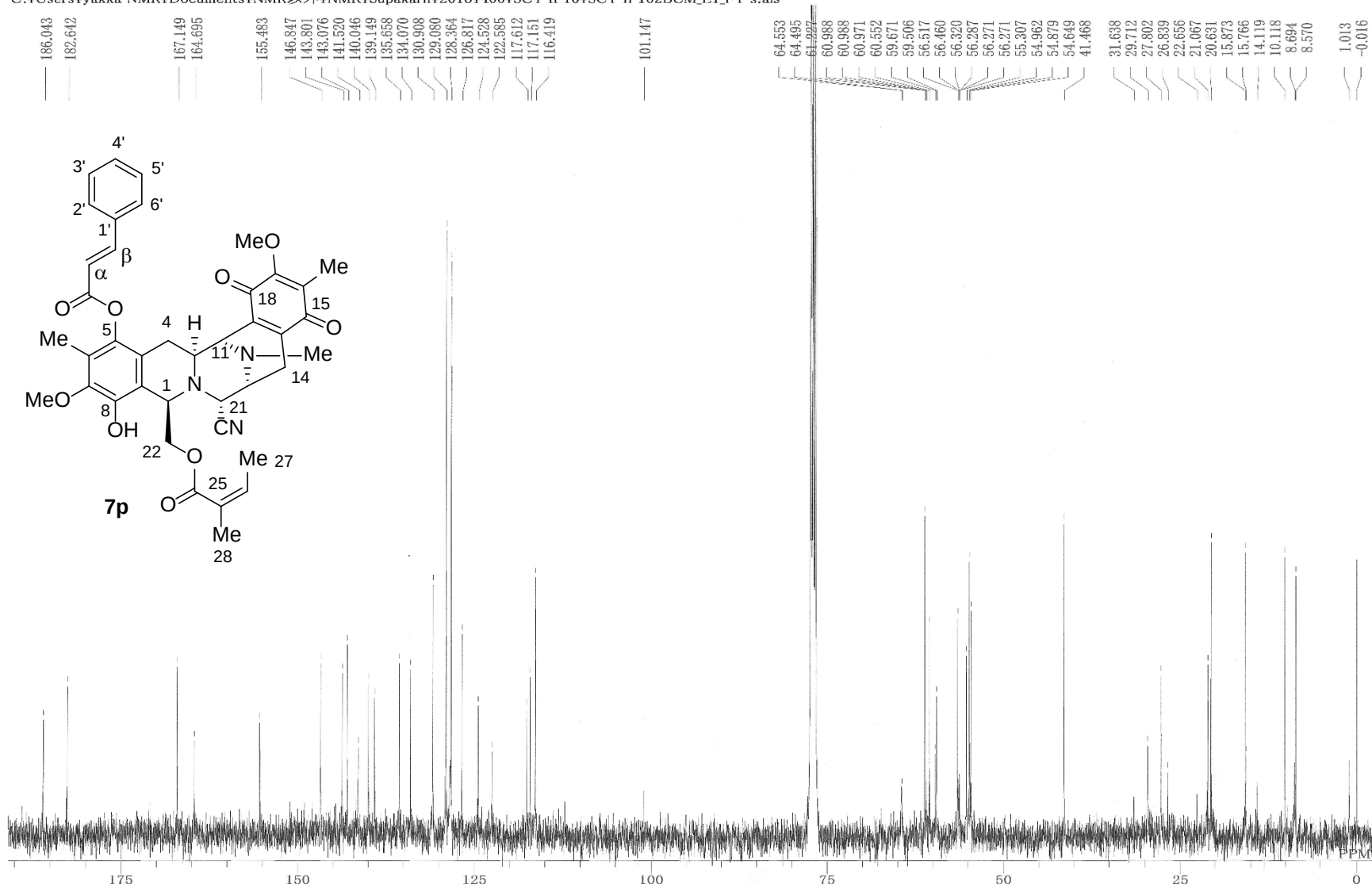


Figure S39. ^1H NMR (400 MHz) spectrum of **7p** in CDCl_3

SCT II 10

C:\Users\yakka\NMR\Documents\NMR以外\NMR\Supakarn\2016\400\SCT II 10\SCT II 102BCM_E1_FT s.als

Figure S40. ^{13}C NMR (100 MHz) spectrum of **7p** in CDCl_3

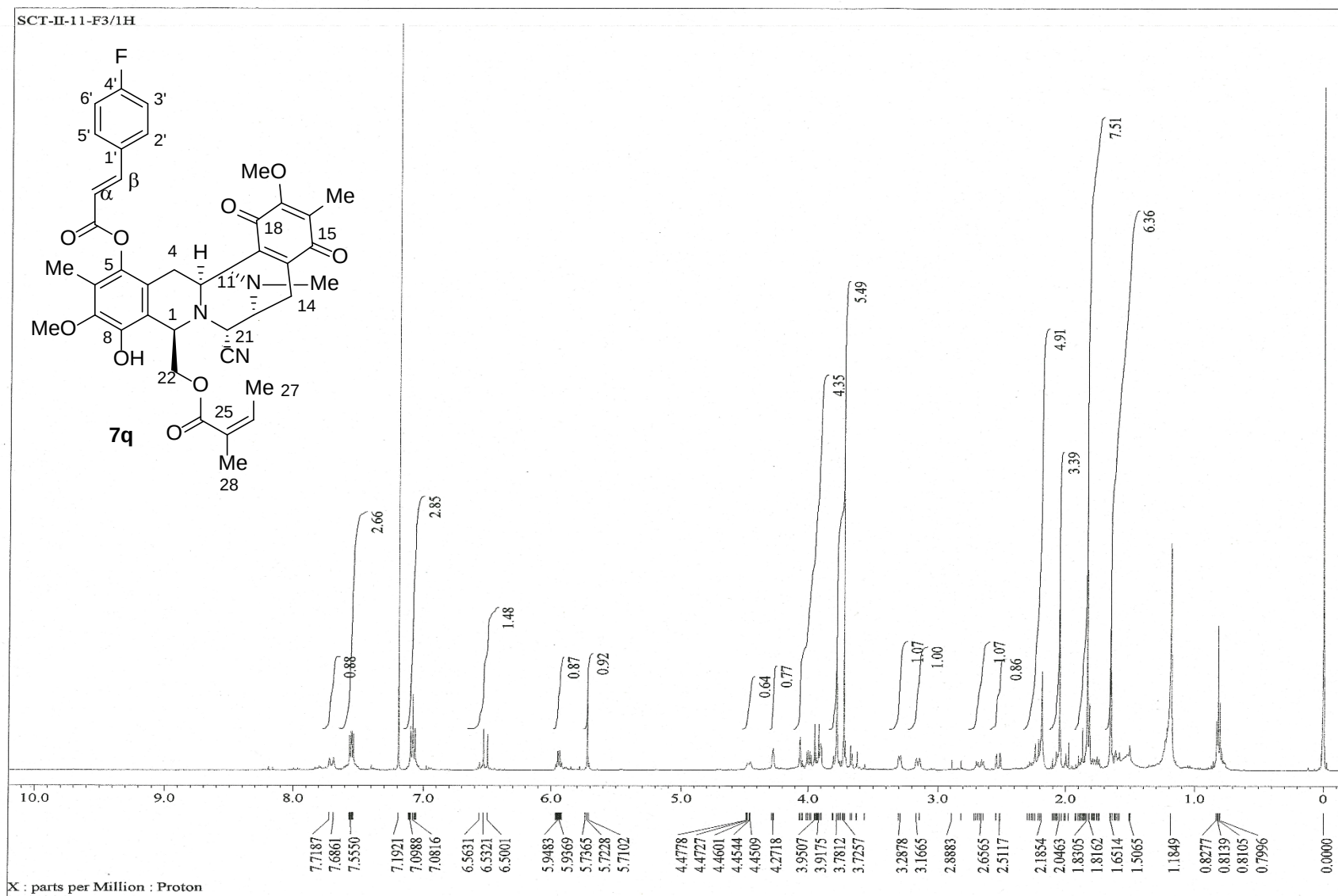


Figure S41. ¹H NMR (500 MHz) spectrum of **7q** in CDCl₃

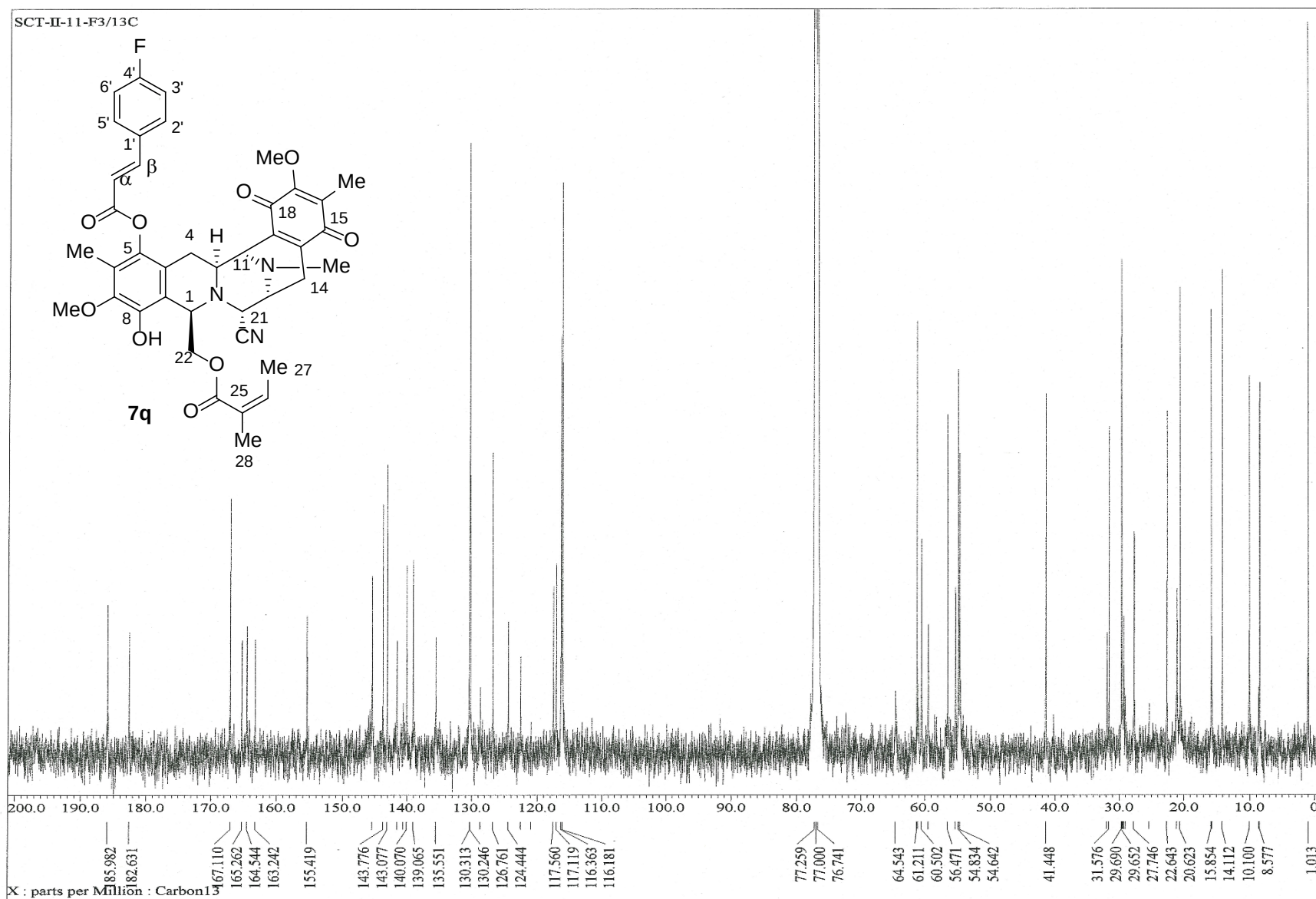


Figure S42. ^{13}C NMR (125 MHz) spectrum of **7q** in CDCl_3

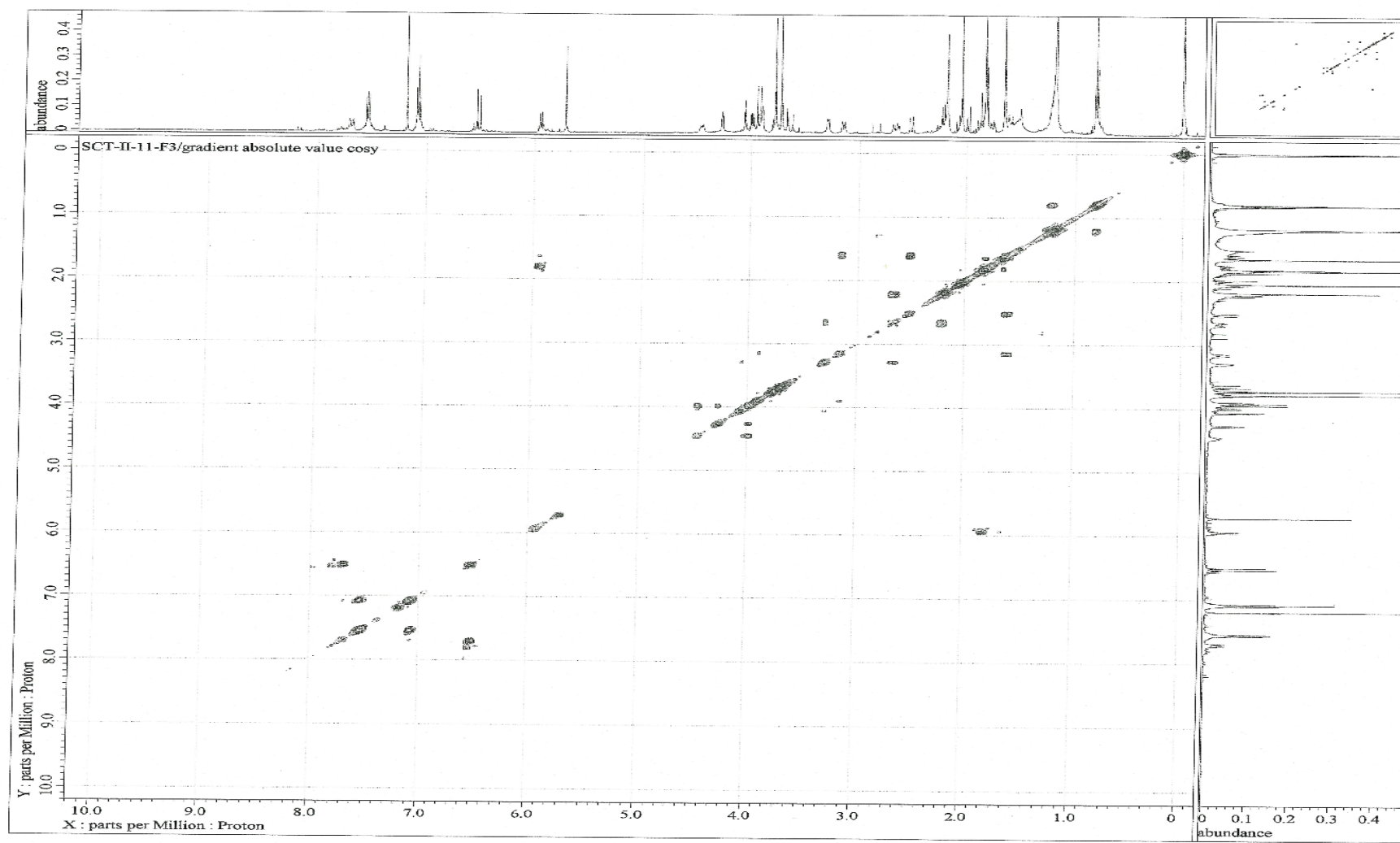


Figure S43. COSY (500 MHz) spectrum of **7q** in CDCl_3

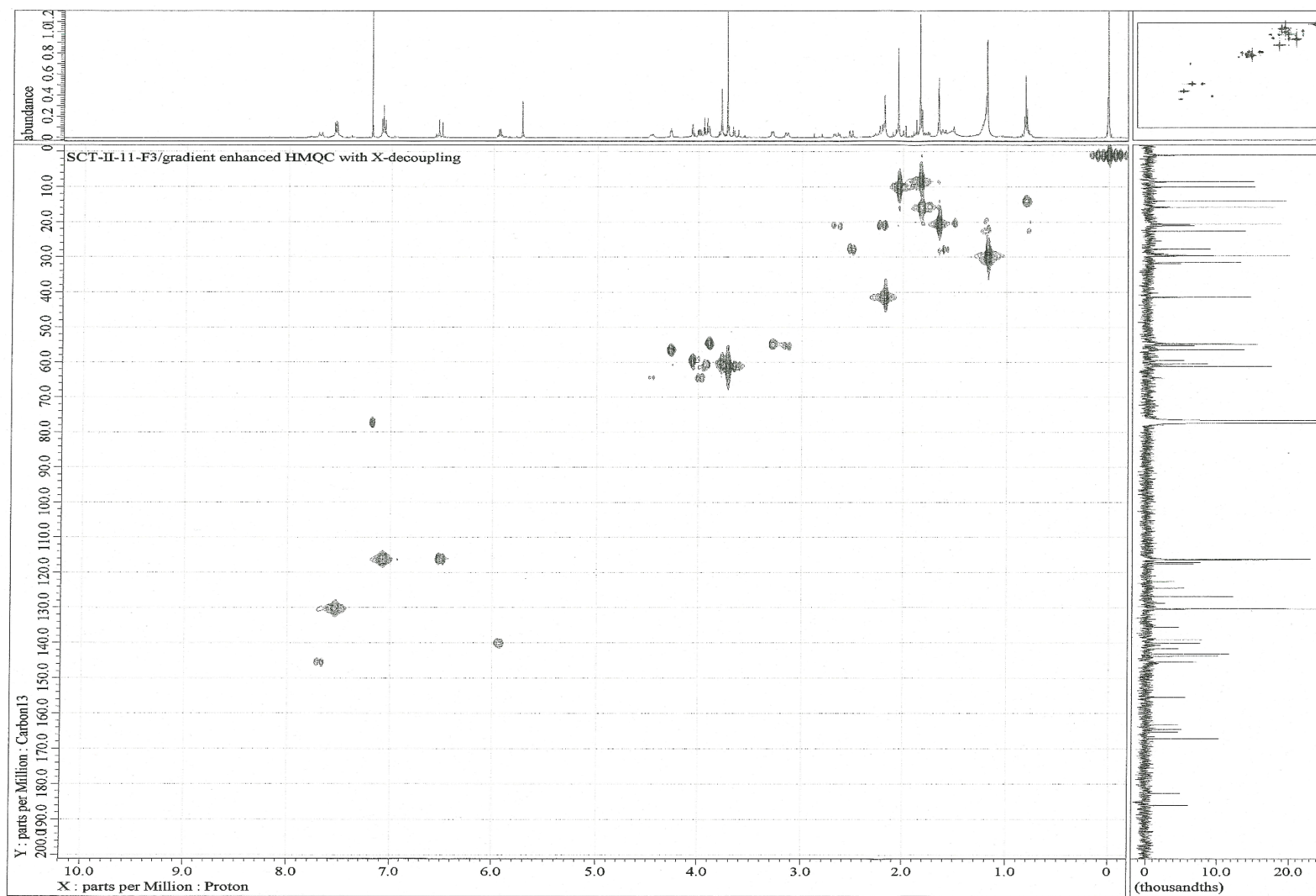


Figure S44. HMQC (500 MHz) spectrum of **7q** in CDCl_3

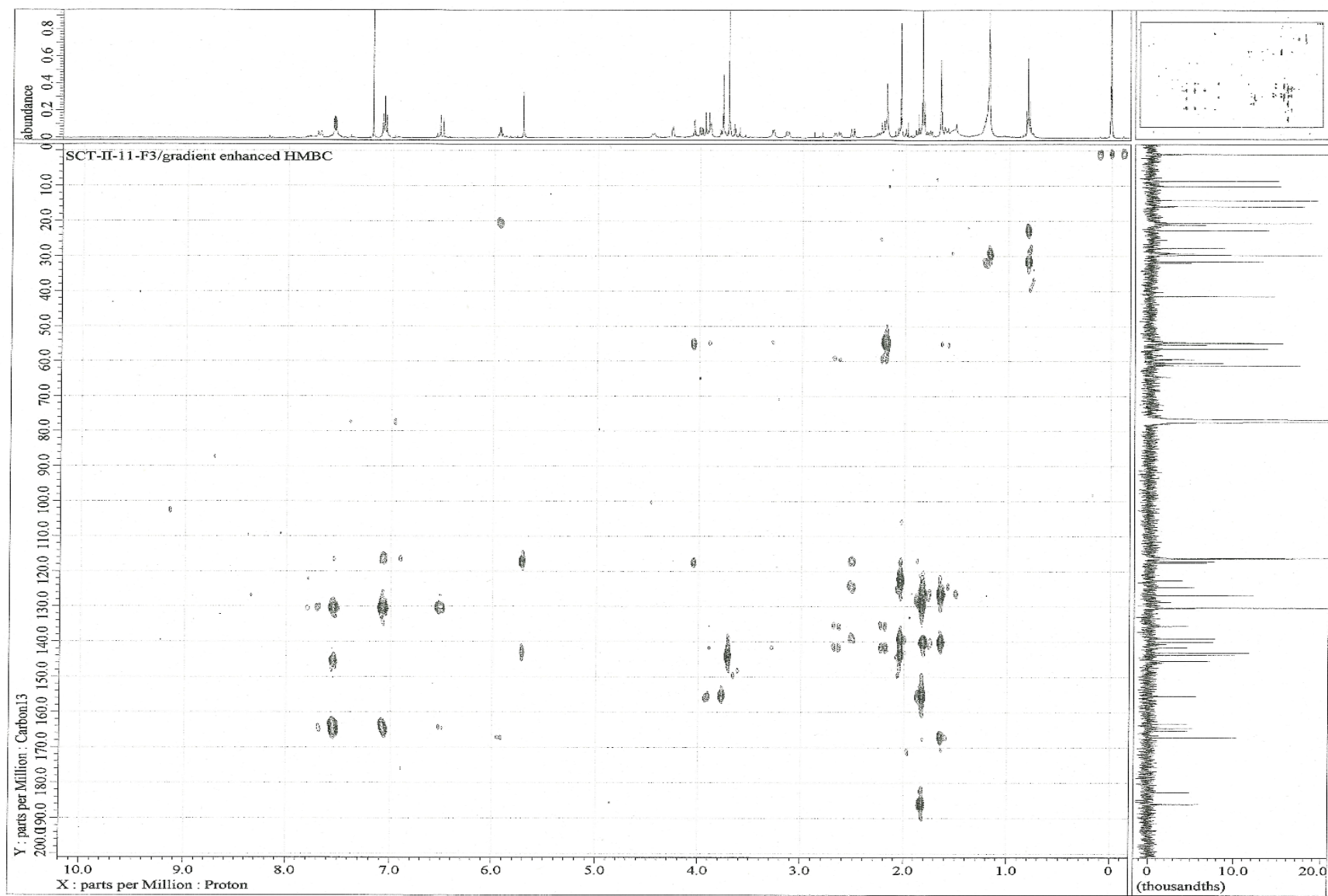


Figure S45. HMBC (500 MHz) spectrum of **7q** in CDCl_3

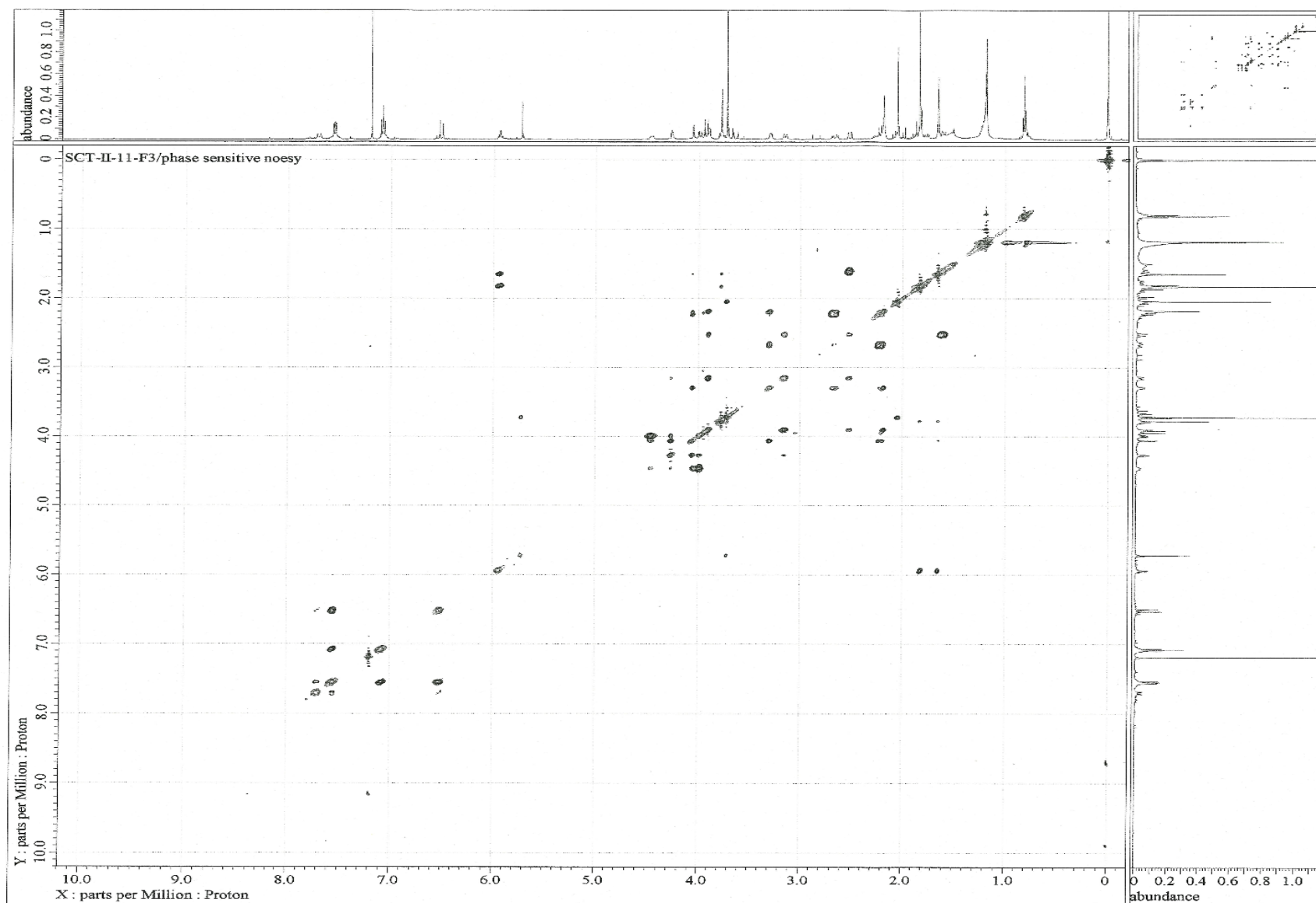


Figure S46. NOESY (500 MHz) spectrum of **7q** in CDCl_3

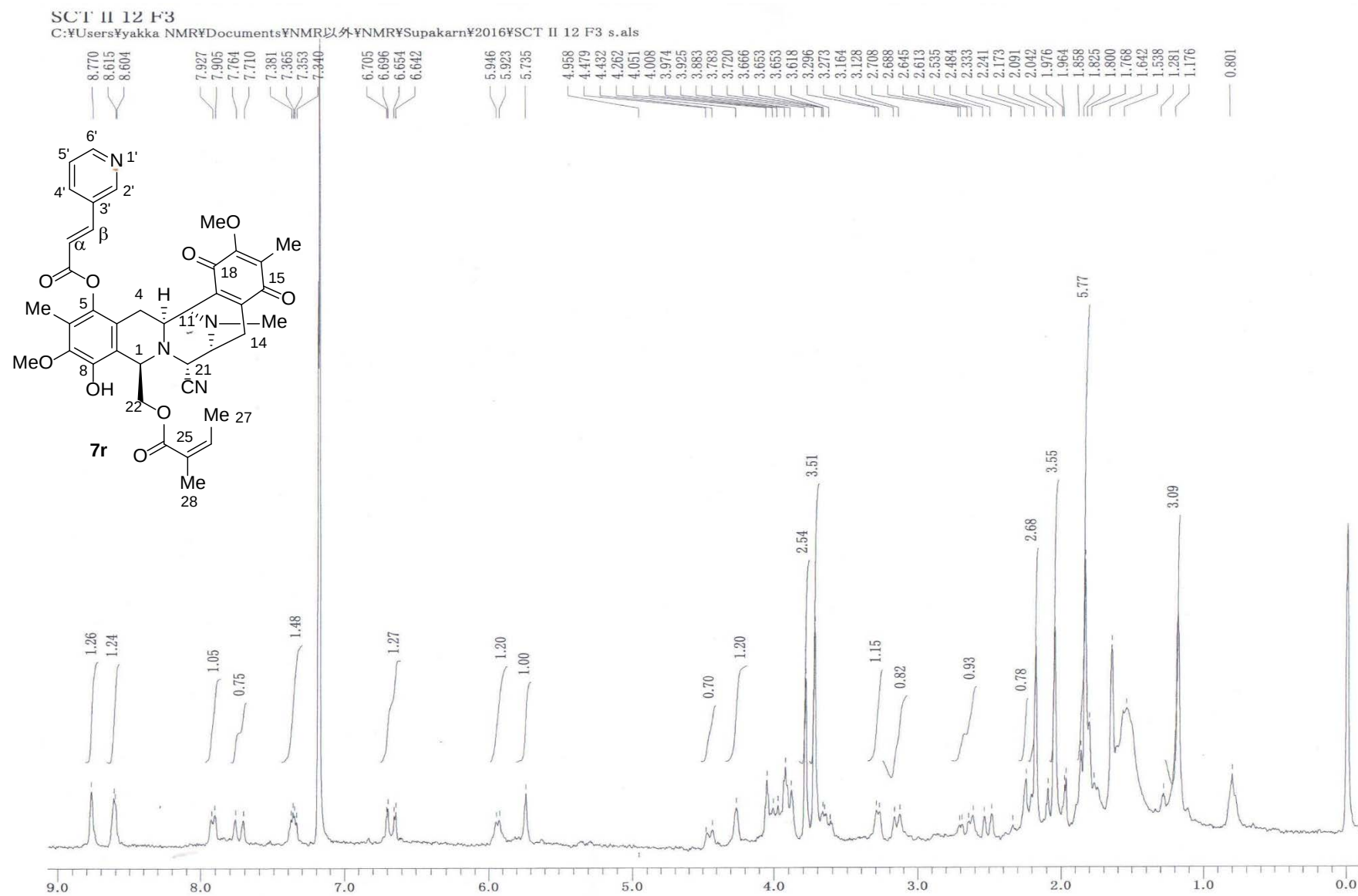


Figure S47. ^1H NMR (300 MHz) spectrum of **7r** in CDCl_3

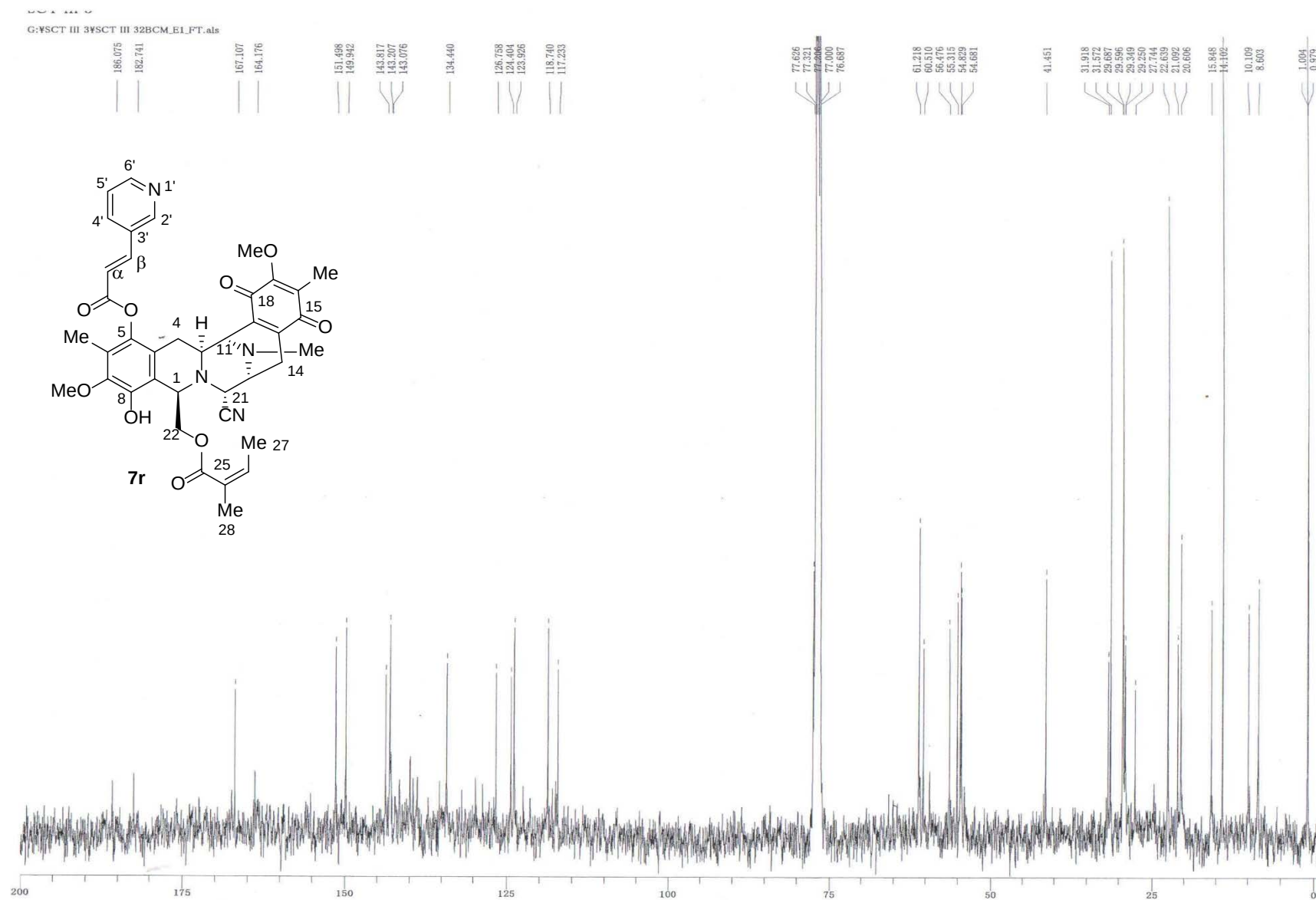


Figure S48. ¹³C NMR (100 MHz) spectrum of **7r** in CDCl₃

C3_004_OA: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP (SAR) STUDY OF RENIERAMYCIN AND ESTER DERIVATIVES AS NEW ANTI-CANCER AGENTS FROM MARINE BISTETRAHYDROISOQUINOLINEQUINONE ALKALOIDS

Supakarn Chamni,^{1,*} Natchanun Sirimangkalakitti,¹ Pithi Chanvorachote,² Naoki Saito,³ and Khanit Suwanborirux¹

¹Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

²Cell-Based Drug and Health Product Development Research Unit and Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

*e-mail: supakarn.c@pharm.chula.ac.th

Abstract: Renieramycin M, a bistetrahydroisoquinolinequinone marine alkaloid isolated from the Thai blue sponge *Xestospongia* sp., has been reported as a highly potent anti-lung cancer agent. To explore structure-cytotoxicity relationship, the series of renieramycin derivatives has been prepared by semi-synthesis from natural renieramycin M focusing on structural modification at C-5 and C-22. All synthetic renieramycin derivatives were subjected to non-small cell lung cancer cells (NSLCC) based anti-proliferative assay for cytotoxic evaluation. We observed that most of renieramycin derivatives possessed nanomolar cytotoxic level. The additional ester motifs either at C-5 or C-22 individually played significant role toward cytotoxic activity against non-small cell lung cancer H290 and H460 cell lines. The structure-cytotoxicity relationships of renieramycin M and derivatives were discussed and compared with a chemotherapeutic drug, Yondelis[®], which shares a similar structural framework for tetrahydroisoquinoline alkaloids. In this research, the key pharmacophores corresponding to cytotoxicity were elucidated and new renieramycin derivatives as potential cytotoxic agents with 5-20 folds more potent than renieramycin M were reported.

