



สัญญาเลขที่ 062/2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม
ไอโซควิโนลีนอัลคาลอยด์เป็นสารโปร-ดรักส์ที่มีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงต่อ
เซลล์มะเร็ง

Synthesis and Structure Modification of Isoquinoline Alkaloids
as Targeted Anticancer Prodrugs

สิริธร สโมสร

กรกฎาคม 2555

 <p>คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร</p> <p> <input type="checkbox"/> การประดิษฐ์ <input type="checkbox"/> การออกแบบผลิตภัณฑ์ <input checked="" type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร </p> <p>ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่2) พ.ศ.2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่3) พ.ศ.2542</p>		สำหรับเจ้าหน้าที่	
		วันรับคำขอ 16 ก.ย. 2554	เลขที่คำขอ
		วันยื่นคำขอ	1103000985
		สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
		ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์	
		ประเภทผลิตภัณฑ์	
		วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
		วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
		ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์	
สารอนุพันธ์ 13-เอริลอัลคิลีนออกซีเบอร์เบอร์ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งเต้านม	
2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่	
ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน	
3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)	
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	
114 ซอยสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110	
3.1 สัญชาติ ไทย	
3.2 โทรศัพท์ 0-2649-5000 ต่อ 5654, 5729	
3.3 โทรสาร 0-2259-1822	
3.4 อีเมล research@swu.ac.th	
4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
<input type="checkbox"/> ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ <input checked="" type="checkbox"/> ผู้รับโอน <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น	
5. ตัวแทน (ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)	
5.1 ตัวแทนเลขที่	
5.2 โทรศัพท์ 0-2649-5000 ต่อ 5654, 5729	
5.3 โทรสาร 0-2259-1822	
5.4 อีเมล research@swu.ac.th	
6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)	
นางสิริธร สโมสร	
ที่อยู่ 110 ซอย วัฒนาใน ถนนสรรพาวุธ เขตบางนา กรุงเทพมหานคร 10260 โทรศัพท์ 0-2398-6780 โทรสาร 0-2398-6780	
โทรศัพท์มือถือ 081-447-8216 อีเมล siritron@swu.ac.th	
7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม	
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร	
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ	
<input type="checkbox"/> คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง <input type="checkbox"/> ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ <input type="checkbox"/> ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ	

8.การยื่นคำขออนุญาตออกอากาศ				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย <input type="checkbox"/> ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ <input type="checkbox"/> ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้				
9.การแสดงผลการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ได้แสดงผลการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด				
10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ				
10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ		
11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันที่ยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร นี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอขึ้นเป็นภาษา <input type="checkbox"/> อังกฤษ <input type="checkbox"/> ฝรั่งเศส <input type="checkbox"/> เยอรมัน <input type="checkbox"/> ญี่ปุ่น <input type="checkbox"/> อื่น ๆ				
12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุ สิทธิบัตรนี้หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ. <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา				
13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย ก.แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า ข.รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 8 หน้า ค.ข้อถ้อยสิทธิ 1 หน้า ง.รูปเขียน 5 รูป 3 หน้า จ.ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> รูปเขียน รูป หน้า <input type="checkbox"/> ภาพถ่าย รูป หน้า ฉ.บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า			14.เอกสารประกอบด้วย <input type="checkbox"/> เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> หนังสือรับรองการแสดงผลการประดิษฐ์/การออกแบบ ผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> หนังสือมอบอำนาจ <input type="checkbox"/> เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ <input type="checkbox"/> เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่น คำขอในประเทศไทย <input type="checkbox"/> เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ <input type="checkbox"/> เอกสารอื่น ๆ	
15.ข้าพเจ้าขอรับรองว่า <input checked="" type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน <input type="checkbox"/> การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....				
16.ลายมือชื่อ (<input checked="" type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> ตัวแทน) (ศาสตราจารย์วิรุณ ตั้งเจริญ) X				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่
 เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารอนุพันธ์ 13-เอริธอัลคิลีนออกซีเบอร์เบอร์ินที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งเต้านม

5 13-Arylalkyleneoxyberberine Derivatives as Anti-Breast Cancer Agents

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้อยู่ในสาขาเคมีอินทรีย์ โดยเฉพาะเคมีทางยาที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ด้าน
เซลล์มะเร็ง

10

ภูมิหลังของศิลปวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยเพศหญิง และเป็นสาเหตุการตายสูงสุดของ
ผู้ป่วยมะเร็ง โดยคิดเป็น 23% ของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด และคิดเป็น 14 % ของผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง
ทั่วโลก (Jemal, A. et al., CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011; 61: 69-90.) ในการรักษามะเร็ง
15 เต้านมใช้การรักษาแบบผสมผสานระหว่าง การผ่าตัด การฉายรังสี และเคมีบำบัด ซึ่งเคมีบำบัดที่มี
ประสิทธิภาพสูงคือการใช้ยาต้านมะเร็งที่มีความเจาะจงกับเซลล์มะเร็งอย่างเดี่ยว (targeted therapy)
เพื่อลดปัญหาข้างเคียงในการทำลายเซลล์ปกติ

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เบอร์เบอร์ิน (Berberine หรือ 9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-
1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium) เป็นสารในกลุ่ม isoquinoline alkaloids พบมากในพืช
20 สมุนไพรจีน อเมริกัน และไทย เช่น ขมิ้นเครือ แห้ว และพืชในวงศ์ Berberidaceae, Menispermaceae,
Papaveraceae และ Rutaceae มีรายงานว่า เบอร์เบอร์ินไม่มีความเป็นพิษต่อคน (Jantova, S. et al.,
The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2003; 55: 1143–1149.) แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต
ของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้อย่างเฉพาะเจาะจง ที่ค่า
ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (IC₅₀) เท่ากับ 11.9 μ M สามารถยับยั้งการ
25 เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ มะเร็งช่องปาก และ มะเร็งเต้านมได้ที่ค่า IC₅₀ มากกว่า 59.5 μ M
(Tin-Wa, M., US Patent 0298132 A1, 2007.) และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่ดื้อต่อ anoikis
(anoikis-resistant cells) ได้ดีกว่ายาต้านมะเร็ง doxorubicin (Kim, J.B. et al., Phytomedicine, 2010; 17:
436-440.)

30



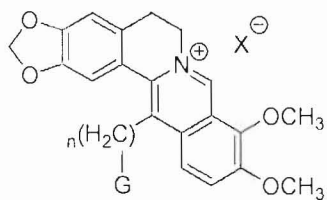
Berberine

รูปที่ 1 โครงสร้างของเบอร์เบอร์ิน

ดังนั้น จึงได้มีการรายงานการสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเบอร์เบอร์ินให้เป็นสารอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง เช่น

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ $-(CH_2)_nG$ แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 (รูปที่ 2) เมื่อ G คือหมู่ $O(CH_2)_mAr$, $CONH(CH_2)_mAr$, $NHCO(CH_2)_mAr$, $O(CH_2)_mCHAr_2$, $CONAr_2$, $CONH(CH_2)_mCHAr_2$ หรือ $NHCO(CH_2)_mCHAr_2$ และ Ar คือ หมู่เอริล และ เฮทเทอโรเอริล ค่า n และ m คือ เลขจำนวนเต็ม เมื่อ $n = 1-5$ และ $m = 0-3$ X⁻ คือ inorganic acid anion, organic acid anion และ halide พบว่าสารอนุพันธ์เหล่านี้มีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด รวมถึงเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา (WO 2011/009714 A2) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ arylalkyleneoxy $[O(CH_2)_nAr]$ แทนที่ที่ตำแหน่ง 13

10

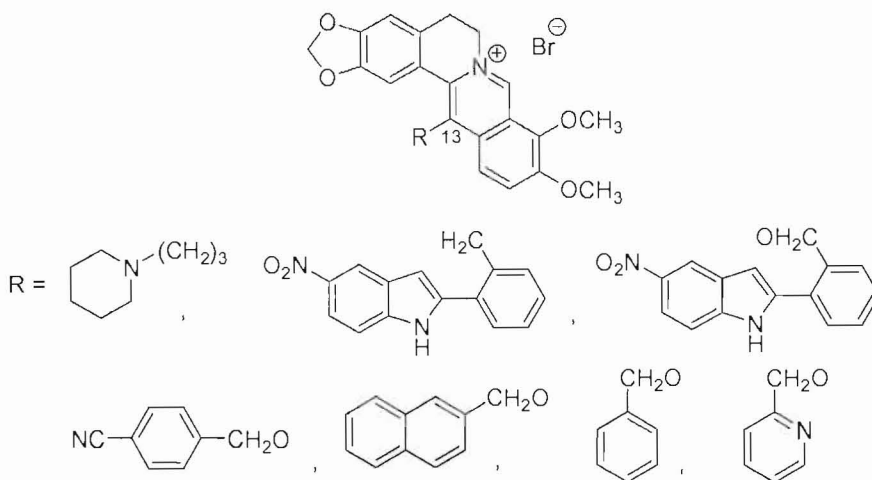


รูปที่ 2 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ $-(CH_2)_nG$ แทนที่ที่ตำแหน่ง 13

15

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ piperidinopropyl, indolyl, arylmethyleneoxy และ heteroaryl methyleneoxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 (รูปที่ 3)

20



25

รูปที่ 3 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ piperidinopropyl, indolyl, arylmethyleneoxy และ heteroaryl methyleneoxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13

30

พบว่าสารอนุพันธ์ในกลุ่มนี้สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างแบบ G-quadruplex ของเทโลเมียร์ (Franceschin, M. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2006; 16: 1707-1711.; Gornall, K. C. et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007; 21, 1759-1766; Samosorn, S. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009; 17: 3866-3872.; Gornall, K. C. et al.,

Chemical Communication, 2010; 46: 6602–6604.) มีผลทำให้ขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเทโลเมียร์กับเอนไซม์เทโลเมอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมากในเซลล์มะเร็งแต่มีจะไม่พบในเซลล์ปกติ พบว่าสารที่สามารถรักษาเสถียรภาพของดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างแบบ G-quadruplex สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสได้ และกระตุ้นกระบวนการที่ทำให้เซลล์มะเร็งตาย (Izbicka, E. et al., Cancer Research, 1999; 59: 639.; Riou, J. F. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002; 99: 2672.) แต่ยังไม่เคยมีรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของสารดังกล่าว

ดังนั้นการประดิษฐ์นี้เป็นการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 13-(ether-substituted)berberine ที่มีหมู่ $O(CH_2)_nAr$ แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 ของเบอร์เบอร์ริน เมื่อ Ar คือหมู่ naphthyl, benzyl และ substituted benzyl derivatives และ n เป็นเลขจำนวนเต็มมีค่าเท่ากับ 1-2 (สูตรโครงสร้าง 1) เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์ดังกล่าว

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวกับสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์รินที่มีหมู่ arylalkyleneoxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13 เพื่อให้มีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งที่ดีกว่าเบอร์เบอร์รินซึ่งเป็นสารตั้งต้น

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 โครงสร้างของเบอร์เบอร์ริน

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ริน ที่มีหมู่ $-(CH_2)_nG$ แทนที่ที่ตำแหน่ง 13

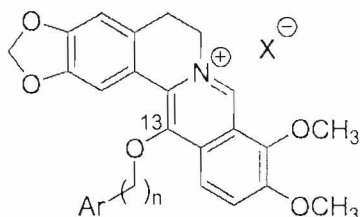
รูปที่ 3 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ริน ที่มีหมู่ piperidinopropyl, indolyl, arylmethyleneoxy และ heteroaryl methyleneoxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13

รูปที่ 4 การสังเคราะห์สาร 1 เมื่อ Ar คือ หมู่ aryl และ X⁻ คือ halide ค่า n คือเลขจำนวนเต็ม มีค่าเท่ากับ 1-2

รูปที่ 5 โครงสร้างและชื่อของสารอนุพันธ์เบอร์เบอร์ริน (6) – (11)

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาและปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเบอร์เบอร์ริน ให้เป็นสาร 13-arylalkyleneoxyberberine ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง สารอนุพันธ์ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง ได้แก่สูตรโครงสร้าง (1) ดังนี้

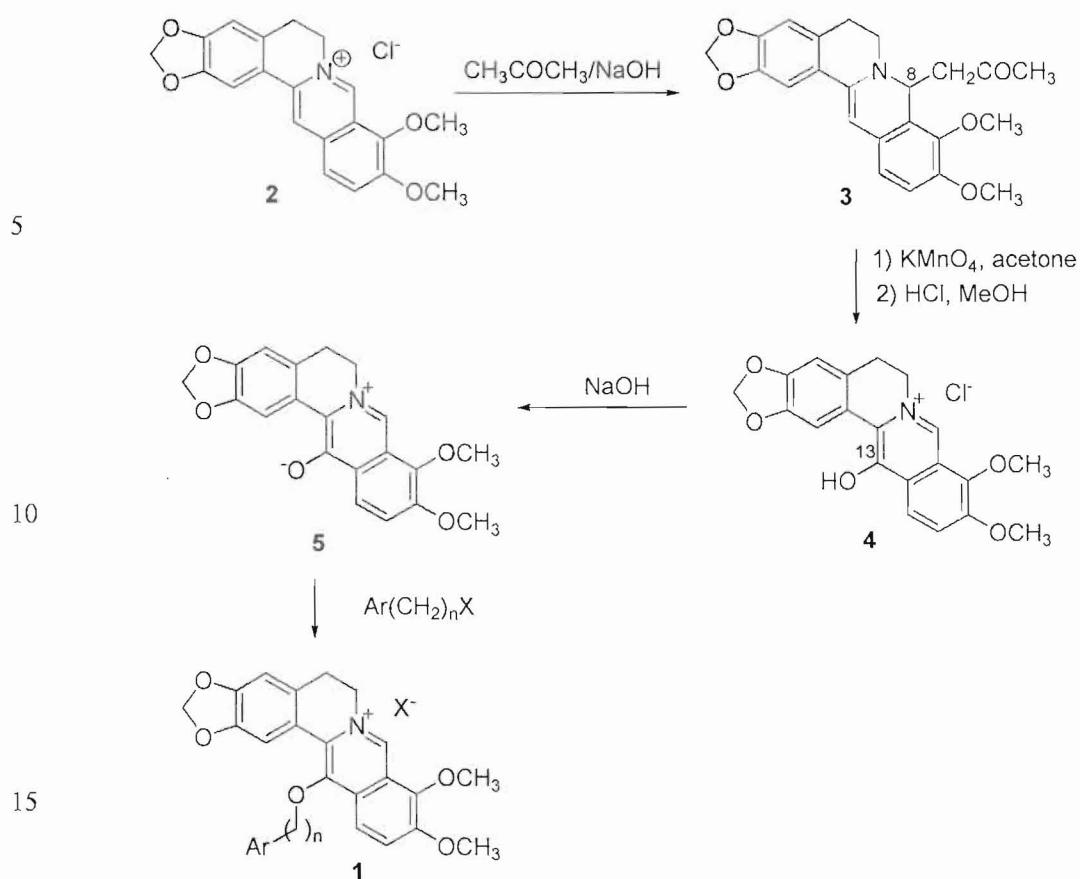


เมื่อ Ar เป็นหมู่ aryl และ X⁻ คือ halide ค่า n คือเลขจำนวนเต็ม เท่ากับ 1-2

ตัวอย่างของสาร 13- arylalkyleneoxyberberine ที่แสดงฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งในการประดิดยั้งนี้ได้แก่ สารอนุพันธ์ 6- 11 ตามสูตร โครงสร้าง 1 ดังนี้

- 5 13-Benzyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (6)
- 9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethyleneoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (7)
- 13-(4-Fluorobenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (8)
- 10 13-(4-Trifluoromethylbenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (9)
- 9,10-Dimethoxy-13-(4-methylbenzyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (10)
- 9,10-Dimethoxy-13-(4-methylphenethyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (11)
- 15

- วิธีการเตรียมสารอนุพันธ์ 6 – 11 ดังแสดงในรูปที่ 4 เริ่มต้นจากการสังเคราะห์ 8-acetonyldihydroberberine (3) โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง berberine กับ acetone และสารละลาย sodium hydroxide ตามวิธีที่เคยมีรายงานไว้ (Park, K. D. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16 2006; 16: 3913-3916.) ตัวอย่างเช่น สาร 3 สามารถเตรียมได้โดยใช้ 5N NaOH และกวนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. แต่ในการประดิดยั้งนี้ใช้สารละลาย 30% NaOH และ reflux ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ 3 ไปทำปฏิกิริยา oxidation กับสารละลาย potassium permanganate ตามด้วย deprotonation ของสาร 4 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide ให้เป็นสารประกอบ phenol betaine 5 และทำปฏิกิริยาต่อกับ alkylating agent (RX) (Naruto, S. et al., Chemical Pharmaceutical Bulletin, 1975; 23: 1271.; Iwasa, K. et al., Planta Medica, 1998; 64: 748-751.) ให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ arylalkyleneoxy ที่ตำแหน่ง 13 ของเบอร์เบอร์ินตามสูตร โครงสร้าง 1
- 20
- 25
- 30



รูปที่ 4 การสังเคราะห์สาร 1 เมื่อ Ar คือ หมู่ aryl และ X^- คือ halide ค่า n คือเลขจำนวนเต็ม มีค่าเท่ากับ 1-2

ตัวอย่างการสังเคราะห์ สาร 13-arylalkyleneoxyberberine

ตัวอย่างที่ 1. การสังเคราะห์สาร 13-Benzoyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (6)

25 ละลายสาร berberine hydrochloride (5 g, 14.70 mmol) ใน acetone 200 mL เติมน้ำ 30% sodium hydroxide 100 mL reflux ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที ระเหยตัวทำละลายออก เติมน้ำละลายทั้งหมดลงในน้ำผสมน้ำแข็ง (1 L) ได้ของแข็งสีเหลือง กรอง และนำไปทำให้แห้งได้ 8-acetyldihydroberberine (3) (4.2 g, 72%)

30 ละลายสาร 3 (0.8 g, 2.02 mmol) ใน acetone 50 mL ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ -20°C เติมน้ำละลาย KMnO_4 (370 mg ในน้ำ 33 mL) และคนที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 4 ชม. กรองสารละลายที่ได้ และนำไประเหยจนแห้ง ตกลึกของแข็งที่ได้ด้วย dichloromethane และ methanol ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน กรอง ละลายของแข็งด้วย methanol (15 mL) และ กรด hydrochloric เข้มข้น 0.75 mL นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชม. ทิ้งสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองของสาร 4 (0.3 g, 42%)

นำสาร 4 (20 mg) มาเติมสารละลายสารละลาย 5% NaOH (10 mL) จากนั้นสกัดด้วย CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) รวมชั้น CH_2Cl_2 ล้างด้วยน้ำ และเติม anhyd. Na_2SO_4 กรอง นำสารละลายไประเหยจนแห้ง ตกผลึกของแข็งที่ได้ด้วย MeOH ได้ของแข็งสีเหลืองของสาร 5 (15 mg, 75%)

ละลายสาร 5 (1 mmol) ใน acetonitrile 3 mL เติม benzyl chloride (10 mmol) และ sodium bromide (10 mmol) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C ภายใต้บรรยากาศของ N_2 (g) เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก แยกสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography (SiO_2 , 3-5% MeOH/ CH_2Cl_2) ให้สาร 13-Benzoyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide 29 % ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 10.39 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.34–7.37 (m, 3H), 7.27–7.30 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.09 (s, 2H), 5.24 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.35 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 3.26 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H) (Samosorn, S. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009; 17: 3866-3872.)

ตัวอย่างที่ 2. การสังเคราะห์สาร 9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethyleneoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinoliziniumbromide (7)

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1. แต่ใช้ 2-naphthylmethyl bromide (3 mmol) แทน benzyl chloride และ sodium bromide ได้สารผลิตภัณฑ์ 9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethyleneoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinoliziniumbromide 34% ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ : 10.11 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.80–7.88 (m, 3H), 7.81 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.42–7.58 (m, 2H), 7.36 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.02 (s, 2H), 6.00 (s, 2H), 5.08 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.32 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 3.17 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H) (Samosorn, S. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009; 17: 3866-3872.)

ตัวอย่างที่ 3. การสังเคราะห์สาร 13-(4-Fluorobenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (8)

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1. แต่ใช้ 4-fluorobenzyl bromide (3 mmol) แทน benzyl chloride และ sodium bromide ได้สารผลิตภัณฑ์ 13-(4-Fluorobenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide 60% ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 10.16 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.25-7.32 (m, 2H), 7.01-7.06 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.10 (s, 2H), 5.12 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.33 (s, 3H), 4.08 (s, 3H), 3.28 (t, $J = 6$ Hz, 2H)

ตัวอย่างที่ 4. การสังเคราะห์สาร 13-(4-Trifluoromethylbenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (9)

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1. แต่ใช้ 4-trifluoromethylbenzyl bromide แทน 4-trifluoromethylbenzyl bromide (3 mmol) แทน benzyl chloride และ sodium bromide ได้สาร 13-(4-Trifluoromethylbenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide 44% ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ: 10.27 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 5.15 (br t, 2H), 4.34 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 3.29 (br t, 2H)

ตัวอย่างที่ 5. การสังเคราะห์สาร 9,10-Dimethoxy-13-(4-methylbenzyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**10**)
ใช้วิธีการเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1. แต่ใช้ 4-methylbenzyl bromide (3 mmol) แทน benzyl chloride และ sodium bromide ได้สารผลิตภัณฑ์ 9,10-Dimethoxy-13-(4-methylbenzyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide 58 % ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.85 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.13 (s, 4H), 6.78 (s, 1H), 6.02 (s, 2H), 4.91 (br s, 2H), 4.79 (s, 1H), 4.18 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.10 (br s, 2H), 2.26 (s, 3H)

ตัวอย่างที่ 6. การสังเคราะห์สาร 9,10-Dimethoxy-13-(4-methylphenethyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (**11**)
ใช้วิธีการเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1. แต่ใช้ 4-methylbenzyl bromide (3 mmol) แทน benzyl chloride และ sodium bromide ได้สารผลิตภัณฑ์ 9,10-Dimethoxy-13-(4-methylphenethyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide 50 % ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ: 9.72 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 5.98 (s, 2H), 4.85 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.12 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.90-4.10 (m, 2H), 3.10 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และความเป็นพิษกับเซลล์ปกติ

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187 Small cell lung cancer) มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) และ มะเร็งเต้านม (MCF7-Breast cancer) ทำการทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate Assay (REMA) (Brien, J. O. et al., European Journal of Biochemistry, 2000; 267: 5421-5426.) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 1

ความเป็นพิษกับเซลล์ปกติโดยใช้เซลล์ไตลิงเป็นเซลล์ทดสอบ (Vero cells: African green monkey kidney) ทดสอบด้วยวิธี Green Fluorescent Protein (GFP) Detection (Hunt, L. et al., Biotechnology and Bioengineering, 1999; 65: 201-205.) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 1

ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ใช้ทดสอบคือ 50 µg/mL ค่า IC₅₀ ได้จากความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 50% เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม

- 5 Selectivity Index ของสารอนุพันธ์ 13-เอริธัลคีนออกซีเบอร์เบอร์ิน 6-11 คืออัตราส่วน ค่า IC₅₀ ของสารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษกับเซลล์ปกติ ต่อ ค่า IC₅₀ ของสารบริสุทธิ์ตัวเดียวกันที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งค่า SI ยังมีค่ามาก หมายถึงสารชนิดนั้นยังมีความเฉพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดนั้นมากเช่นเดียวกัน (Badisa, R. B. et al., Anticancer Research, 2009; 29: 2993-2996.)

- 10 ตารางที่ 1 แสดงค่า IC₅₀ (µg/mL) และ Selectivity Index (SI) ของ เบอร์เบอร์ิน และสารอนุพันธ์ 13-เอริธัลคีนออกซีเบอร์เบอร์ิน 6-11 ในการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187 Small cell lung cancer) มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) มะเร็งเต้านม (MCF7-Breast cancer) และความเป็นพิษกับเซลล์ปกติ (Vero cells) โดยใช้ Ellipticine และ Doxorubicine เป็น positive control

สารประกอบ	IC ₅₀ (µg/mL)				Selectivity Index		
	NCI-H187 Small cell lung cancer	KB-Oral cavity cancer	MCF7- Breast cancer	Vero cells	NCI-H187 Small cell lung cancer	KB-Oral cavity cancer	MCF7- Breast cancer
Berberine	0.164	1.630	37.900	>50	> 304.8	> 30.7	> 1.3
6	0.366	3.660	2.030	16.35	44.6	4.5	8.1
7	0.011	1.910	8.460	>50	> 4545.5	>26.2	< 5.9
8	0.018	0.410	3.710	>50	> 2777.8	>122.0	>13.5
9	0.285	0.445	7.370	23.53	82.6	53.4	3.2
10	0.022	0.520	0.005	>50	> 2272.7	>96.2	>10,000.0
11	0.343	4.770	1.965	11.79	34.4	2.5	6.0
Ellipticine	0.684	0.448	>50	0.829	1.21	1.9	<0.02
Doxorubicine	0.035	0.249	0.573	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

- 30 เหมือนกับที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

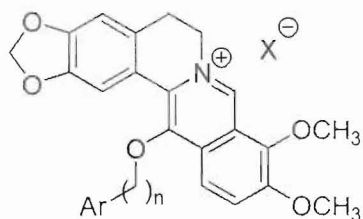
บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับ สารอนุพันธ์ 13-เอริธัลคิโนออกซีเบอร์เบอร์ิน ที่แสดงฤทธิ์ด้าน
มะเร็ง โดยการสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้นเบอร์เบอร์ินเพื่อให้มีฤทธิ์ด้าน
เซลล์มะเร็งปอด มะเร็งช่องปาก และ มะเร็งเต้านม พบว่าสารอนุพันธ์ 13-เอริธัลคิโนออกซีเบอร์
เบอร์ินบางตัว มีประสิทธิภาพสูงกว่าเบอร์เบอร์ินในการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งปอด และ มะเร็งช่อง
5 ปาก สำหรับฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งเต้านม สารอนุพันธ์ 13-เอริธัลคิโนออกซีเบอร์เบอร์ินทุกตัว มี
ประสิทธิภาพสูงกว่าเบอร์เบอร์ิน 4-7580 เท่า และสูงกว่ายาต้านมะเร็ง doxorubicine โดยเฉพาะ
สารประกอบ 10 มีค่า selectivity index เท่ากับ 10,000 ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสาร 10 ที่สามารถต้าน
เซลล์มะเร็งเต้านมได้มีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณของสาร 10 ที่มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์
ปกติ ดังนั้น สาร 10 จึงจัดเป็นสารต้านมะเร็งที่เฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม และมีความปลอดภัย
10 สูงต่อเซลล์ปกติ

ข้อถ้อยสัญญา

1. สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์นที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง ได้แก่สูตรโครงสร้าง (1)

ดังนี้



เมื่อ Ar คือหมู่เบนซิลที่มีหมู่แทนที่ X⁻ คือ เฮไลด์ อินอร์แกนิก แอซิด แอนไอออน หรือ ออร์แกนิก แอซิด แอนไอออน และ n เป็นเลขจำนวนเต็มมีค่าเท่ากับ 1-2

2. การใช้สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์น ตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 ในรูปของเกลือเฮไลด์ เกลือของกรดอินทรีย์ และเกลือของกรดอินทรีย์

3. ตัวอย่างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์น ตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1 เช่น

13-(4-Fluorobenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (8)

- 13-(4-Trifluoromethylbenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (9)

9,10-Dimethoxy-13-(4-methylbenzyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (10)

9,10-Dimethoxy-13-(4-methylphenethyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]

- quinolizinium bromide (11)

4. การใช้สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์น ตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1-3 ร่วมกับสารอื่นที่มีฤทธิ์ด้านมะเร็ง

5. การใช้สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์น ตามข้อถ้อยสัญญาที่ 4 ร่วมกับการฉายรังสีรักษา

6. การใช้สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์น ตามข้อถ้อยสัญญาที่ 1-3 เป็นสารออกฤทธิ์ในส่วนผสมของยา ผลิตภัณฑ์ และ สารต้านมะเร็ง

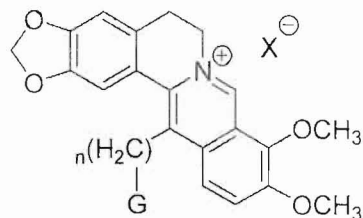
7. การใช้สารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์น ตามข้อถ้อยสัญญาที่ 4 และ 6 ในรูปของโปร-ดรัก รูปของครีม เจล ยาผง ยาเม็ด ยาน้ำ ยาเหน็บ และยาฉีดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

รูปเขียน

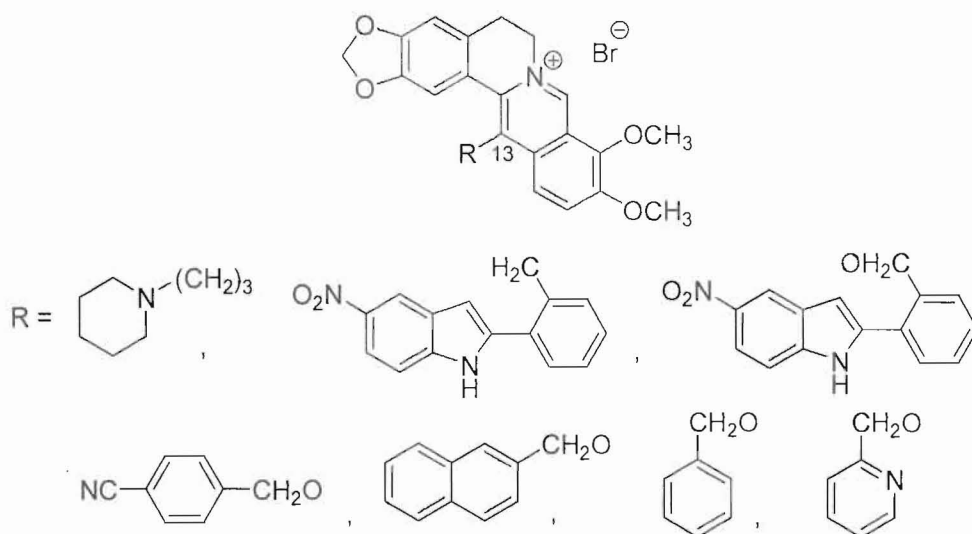


Berberine

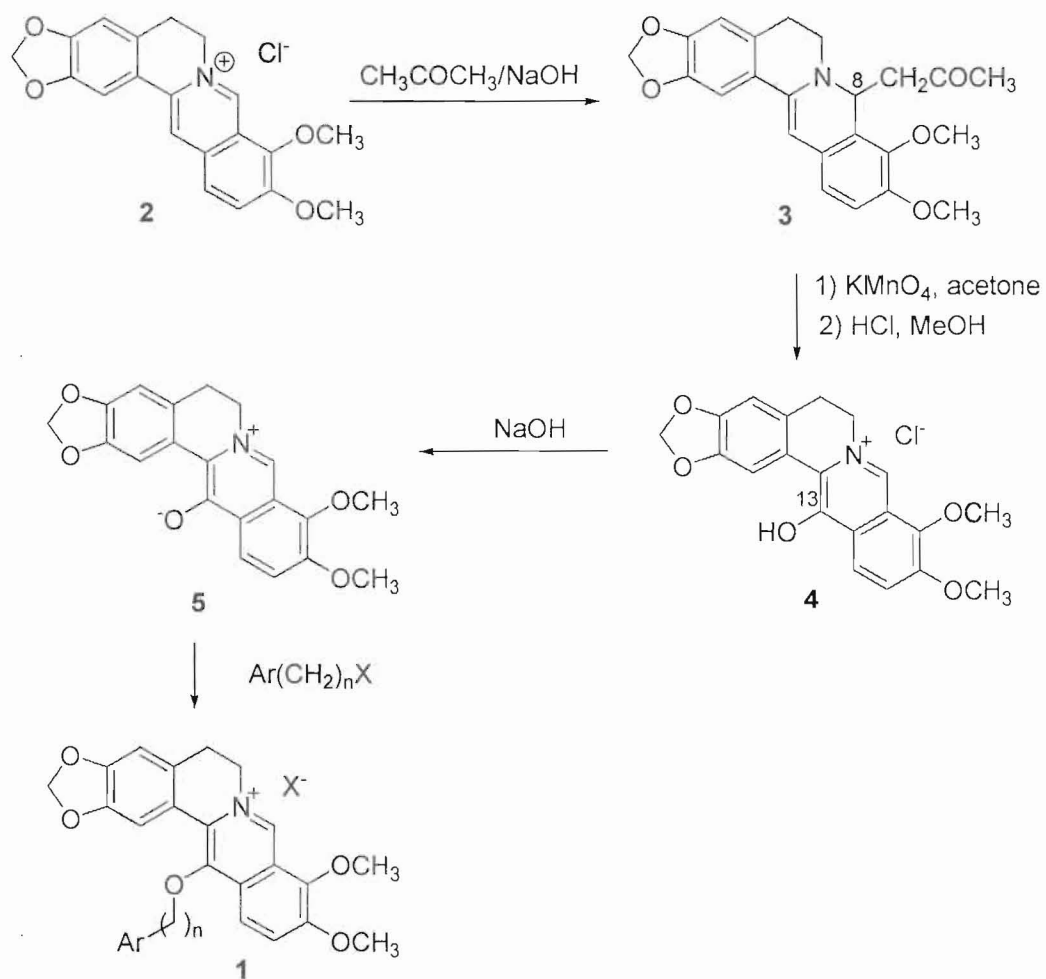
รูปที่ 1 โครงสร้างของเบอร์เบอร์ิน



รูปที่ 2 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ $-(CH_2)_nG$ แทนที่ที่ตำแหน่ง 13



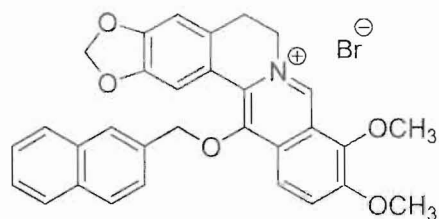
รูปที่ 3 โครงสร้างของสารอนุพันธ์ของเบอร์เบอร์ิน ที่มีหมู่ piperidinopropyl, indolyl, arylmethylenedioxy และ heteroaryl methylenedioxy แทนที่ที่ตำแหน่ง 13



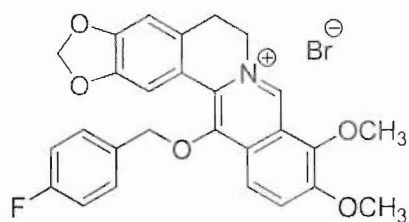
รูปที่ 4 การสังเคราะห์สาร **1** เมื่อ Ar คือ หมู่ aryl และ X^- คือ halide ค่า n คือเลขจำนวนเต็ม มีค่าเท่ากับ 1-2



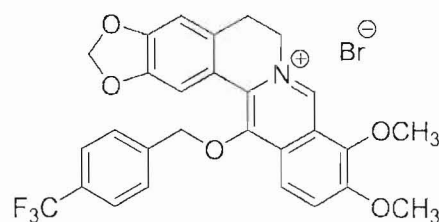
13-Benzoyloxy-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (6)



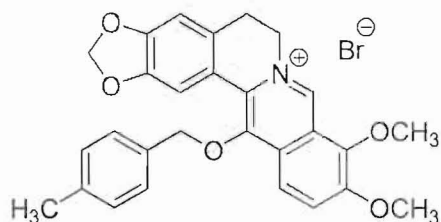
9,10-Dimethoxy-13-(2-naphthylmethyleneoxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (7)



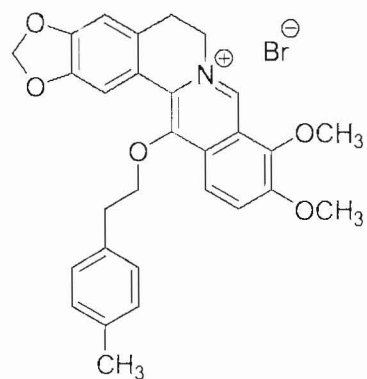
13-(4-Fluorobenzoyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (8)



13-(4-Trifluoromethylbenzyloxy)-9,10-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (9)



9,10-Dimethoxy-13-(4-methylbenzyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (10)



9,10-Dimethoxy-13-(4-methylphenethyloxy)-5,6-dihydrobenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]quinolizinium bromide (11)

รูปที่ 5 โครงสร้างและชื่อของสารอนุพันธ์เบอร์เบอรีน (6) – (11)

Berberine Derivatives as Telomerase Inhibitors

Christina Wörmann,^{a,b} Siritron Samosorn,^c Michael Kelso,^b Karina Porter,^d Tracy Bryan,^d Thomas Drewello,^a and Jennifer L. Beck^{b,*}

^aDepartment of Chemistry and Pharmacy, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nuremberg, 91058 Erlangen, Germany

^bSchool of Chemistry, University of Wollongong, NSW 2522 Australia

^cDepartment of Chemistry, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

^dChildren's Medical Research Institute, Westmead, NSW 2145, Australia

Abstract

G-quadruplex structures have gained increasing attention in recent years, owing to their proposed *in vivo* existence at telomeres. Telomeres are the protective ends of our chromosomes and are maintained by telomerase in 85% of cancer cells, giving cancer cells an eternal life span. Telomerase is thought to be inhibited by G-quadruplex structures. G-quadruplex stabilizing ligands are therefore considered as a possible approach in cancer therapy. Two novel Q-quadruplex ligands, SST31 and *N*-methyl-pSS14, and their relative binding affinities to G-quadruplex DNA were analysed and compared with two established G-quadruplex binding ligands, BT80 and pSS14. BT80 and SST31 showed substantial binding to G-quadruplex forming sequences, whereas pSS14 and *N*-methyl-pSS14 only bound weakly. All ligands tested showed selectivity to G-quadruplex DNA over double-stranded DNA. A telomerase assay was carried out and showed that linear 7mer was the preferred substrate of telomerase over the G-quadruplex 7mer. Addition of BT80 inhibited telomerase activity. The results suggest that BT80 and SST31 can serve as lead compounds in anticancer drug design.

Keywords: Berberine, G-quadruplex, G-quadruplex ligands, Telomerase inhibitors, Telomeres

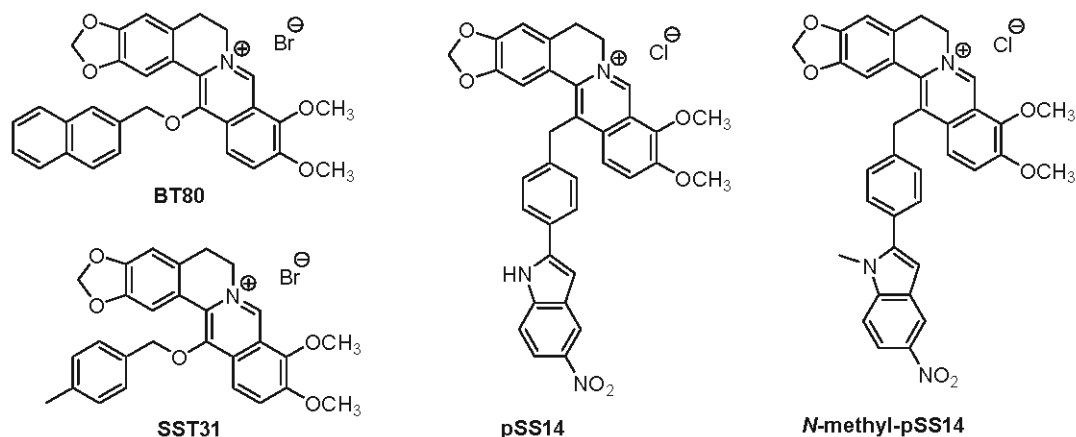
1. Introduction

In 85% of cancer cells telomeres are maintained by telomerase [1]. Normal somatic cells, on the other hand, express no or negligible amounts of telomerase. Hence, killing or inhibiting its enzymatic activity would induce apoptosis in cancer cells due to shortened telomeres, while other cells would stay unaffected. Telomerase might be particularly promising target in regard to long term cure, as telomerase is also expressed in cancer stem cells, which are often associated with tumor growth relapse [2]. For these reasons, telomerase has been extensively studied as an objective in cancer therapy and different strategies have evolved to target telomerase, such as immunotherapy, direct telomerase inhibition and G-quadruplex stabilizing ligands. In this study, the focus is on the latter. Most G-quadruplex ligands are chemically characterized by a large, flat aromatic surface, which interacts via $\pi - \pi$ interactions with the G-tetrad, and cationic side chains, which interact electrostatically with the loops and grooves of the G-quadruplex [3]. Generally, G-quadruplex stabilizing ligands are expected to bind in an end-stacking mode, but other binding modes such as intercalation and interactions with grooves and loops have been found [4]. Some bind specifically to one G-quadruplex structure, whereas others do not show selectivity and bind to several subclasses of G-quadruplexes. Owing to the polymorphism of G-quadruplex structures, the rational design of ligands is complicated and interactions between the G-quadruplex and ligand need to be further investigated. A wide range of compounds have been identified as G-quadruplex interacting molecule and include porphyrins [5], perylenes [6], pentacyclic or trisubstituted acridines [7, 8], ethidium derivatives [9], and berberine derivatives [10]. So far, no G-quadruplex ligands has progressed into clinical studies. The aims of this

study are to investigate the stoichiometries and stabilities of different G-quadruplex-ligand complexes, and to test whether the ligands could serve as fluorescence markers for G-quadruplex structures in cells.

2. Result and Discussion

Six different G-quadruplex forming oligonucleotides, 7mer, 12mer, 18mer, 22mer, Q1 and Q2 were investigated using ESI-MS. Four 13-substituted berberine derivatives, BT80, SST31, pSS14 and *N*-methyl-pSS14 and their relative binding affinities to these sequences were examined.



2.1 ESI mass spectra of 7mer titrated with BT80, SST31, pSS14 and *N*-methyl-pSS14

At the first glance, no ligand binding is observed in the spectra for different DNA-ligand solutions, but on closer inspection ions of very low abundances can be identified as ions, which are accordance with the calculated values for various ligand adducts to the tetrameric complex. However, as there is only very little binding and binding did not increase at higher ligand concentrations, a comparison between binding affinities of the different ligands is not possible.

2.2 ESI mass spectra of 12mer titrated with BT80, SST31, pSS14 and *N*-methyl-pSS14

Upon addition of BT80 at a ratio of 1:1, three new ions appeared at m/z 1606.7, 1705.1 and 1709.1 in agreement with the calculated values for $[2 \times 12\text{mer} + 2\text{NH}_4^+ + x\text{BT80} - 7\text{H}]^{5-}$ where $x = 1, 2$ or 3 (Figure 1). At a ratio of 1:3 the most abundant ion of the spectrum was at m/z 1705.0 for the dimeric G-quadruplex structure with two BT80 molecules bound. At a ratio of 1:6 and 1:9 the most abundant ion was at m/z 1803.3, which complies with the calculated value for the ion $[2 \times 12\text{mer} + 2\text{NH}_4^+ + 3\text{BT80} - 7\text{H}]^{5-}$. Some G-quadruplex binding ligands are proposed to bind in an end-stacking mode, with two ligand molecules bound per molecule.

In this case, predominantly complexes with three BT80 molecules are present, indicating that addition binding sites apart from the G-tetrad may exist. Ion at m/z 568.2 and 1161.5 originate from BT80 and were also observed at high concentrations of BT80 in other spectra. The intensity of peaks for single-strands 12mer in 3⁻ and 4⁻ charge states decreased substantially upon BT80 addition. These results imply that BT80 has a substantial capability to stabilize the dimeric 12mer G-quadruplex structure. In the spectra of the 12mer itself, hardly and G-quadruplex ions were present at 97%. This was calculated by summing up the intensities of all ions in the structure. In the 12mer spectrum no ammonium ions were bound to the G-quadruplex, whereas the predominant ions of BT80 adducts contained two ammonium ions in agreement with the $n-1$ rule.

In the 1:1 oligonucleotide:ligand mixture, one additional ion, $[2 \times 12\text{mer} + 2\text{NH}_4^+ + 1\text{SST31} - 7\text{H}]^{5-}$ at 1599.3, was detected compared to the spectrum of the 12mer. In the 1:1 DNA-ligand mixture, only 4% of all ions were G-quadruplex-ligand complexes. When the concentration of

SST31 was increased up to a ratio of 1:9 the predominant ion in the spectrum was $[2 \times 12\text{mer} + 2\text{NH}_4^+ + 2\text{SST31} - 7\text{H}]^{5+}$ with a relative abundance of 42%.

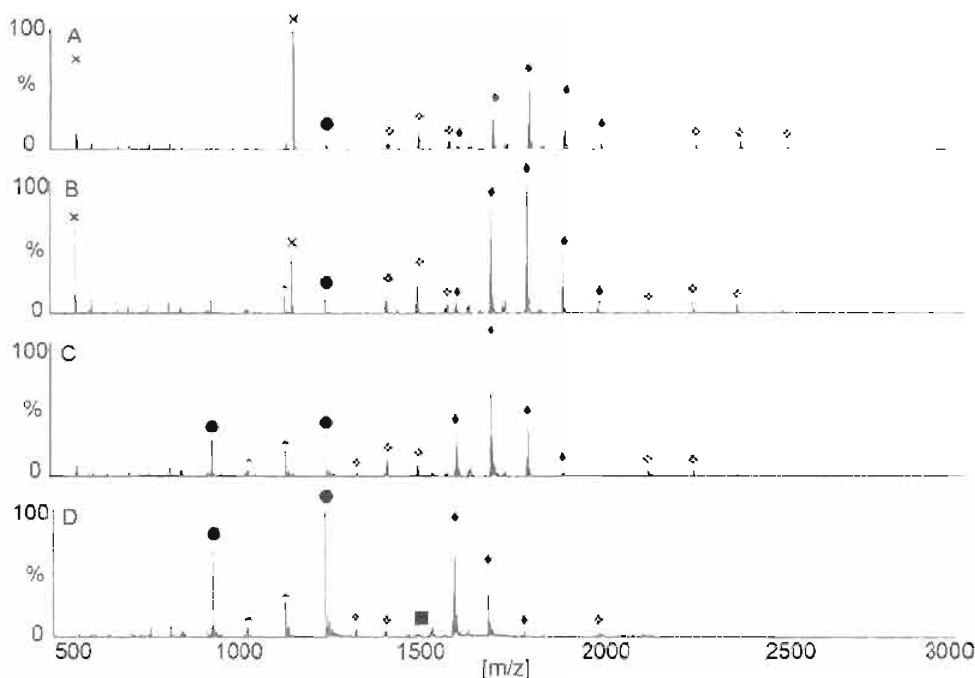


Figure 1. ESI mass spectra of **A:** 1:9 **B:** 1:6 **C:** 1:3 and **D:** 1:1 12mer:BT80 mixtures in 150 mM NH_4OAc . Single-stranded 12mer is marked by a circle, G-quadruplex 12mer by a square, fragment ion by a triangle, DNA-ligand complexes by a diamond and ions arising from BT80 by an "x".

Upon titration of the 12mer with N-methyl-pSS14 no new ions were detected suggesting that N-methyl-pSS14 does not bind to the 12mer. pSS14 bound to the 12mer, but only weakly: in all DNA:ligand mixtures only one ion of low abundance was present at m/z 1625.6 corresponding to the 12mer in the 5⁺ charge state with one bound pSS14 molecule. Even in the 1:9 DNA:ligand mixture only 4% of all DNA was present as a DNA-pSS14 complex, highlighting the low binding affinity of pSS14 to the 12mer.

2.3 ESI mass spectra of 18mer titrated with BT80, SST31, pSS14 and N-methyl-pSS14

An unusual phenomenon was observed upon addition of BT80. The spectrum of the 1:1 DNA:ligand mixture looks quite normal and an ion at m/z 2000.6 for one bound BT80 molecule

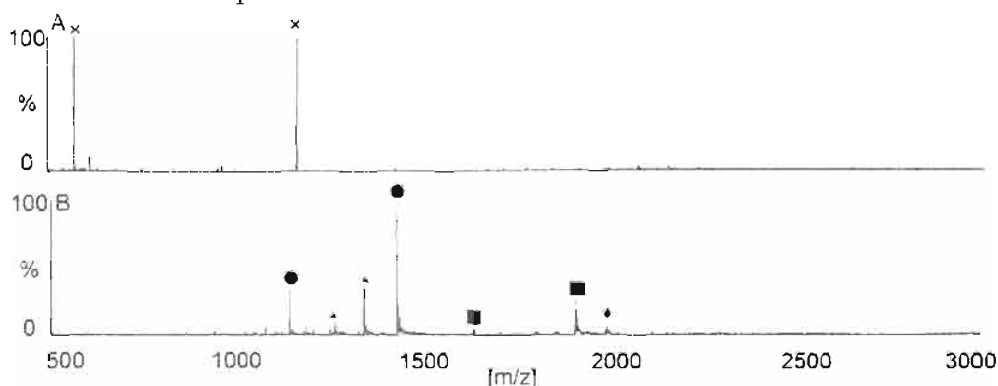


Figure 2. ESI mass spectra of **A:** 1:9 and **B:** 1:1 mixtures of 18mer and BT80 in 150 mM NH_4OAc . Ions for single-stranded 18mer are marked by a circle, ions for G-quadruplex 18mer by a square, fragment ions by a triangle, ions of DNA-ligand complexes by a diamond and ions arising from BT80 by an "x".

was observed, but at a ratio of 1:3 the quality of the spectrum was poor, with a low signal-to-noise ratio. At higher DNA:ligand ratios no DNA signal was detected in the mass range from 500 to 3000 Da (Figure 2.). It is possible that BT80 could induce the formation of higher mass structures that were not detected under these conditions.

A similar behaviour was observed for SST31: at low concentrations of SST31, an ion of low abundance corresponding to the G-quadruplex 18mer with one bound molecule SST31 was observed, but in 1:9 mixture no DNA was detected in the mass range from 500 to 3000 Da. Therefore, SST31 might induce a structure change of 18mer G-quadruplex structure, as proposed for BT80. The spectra of 18mer:pSS14 mixtures did not show this behaviour and an ion of low abundance at m/z 2013.0 for one bound pSS14 molecule was present in all spectra. For *N*-methyl-pSS14 the signal-to-noise ratio was also very poor at high ligand concentrations and generally ions of 18mer:*N*-methyl-pSS14 complexes were of low abundance.

2.4 ESI mass spectra of 22mer titrated with BT80, SST31, pSS14 and *N*-methyl-pSS14

BT80 was the best ligand; in 1:9 DNA:ligand mixture, an ion corresponding to the 22mer with three BT80 molecules bound was present at a relative abundance of 48%. This suggests that in addition to an end-stacking binding mode, other binding sites are present. SST31 also substantially bound to the 22mer. The most abundant ion in the 1:9 DNA:ligand mixture was the 22mer with 2 molecules of SST31 bound indicating that SST31 had a lower binding affinity than BT80. *N*-methyl-pSS14 and pSS14 were poor ligands. The most abundant ion in the 1:9 mixture 22mer:pSS14 was the 22mer with one bound of pSS14 at a relative abundance of 13%. For *N*-methyl-pSS14, the ion with one bound ligand to 22mer was present at a relative abundance of 27.2%, indicating the *N*-methyl-pSS14 bound better to the 22mer than pSS14.

2.5 ESI mass spectra of Q2 titrated with BT80, SST31, pSS14 and *N*-methyl-pSS14

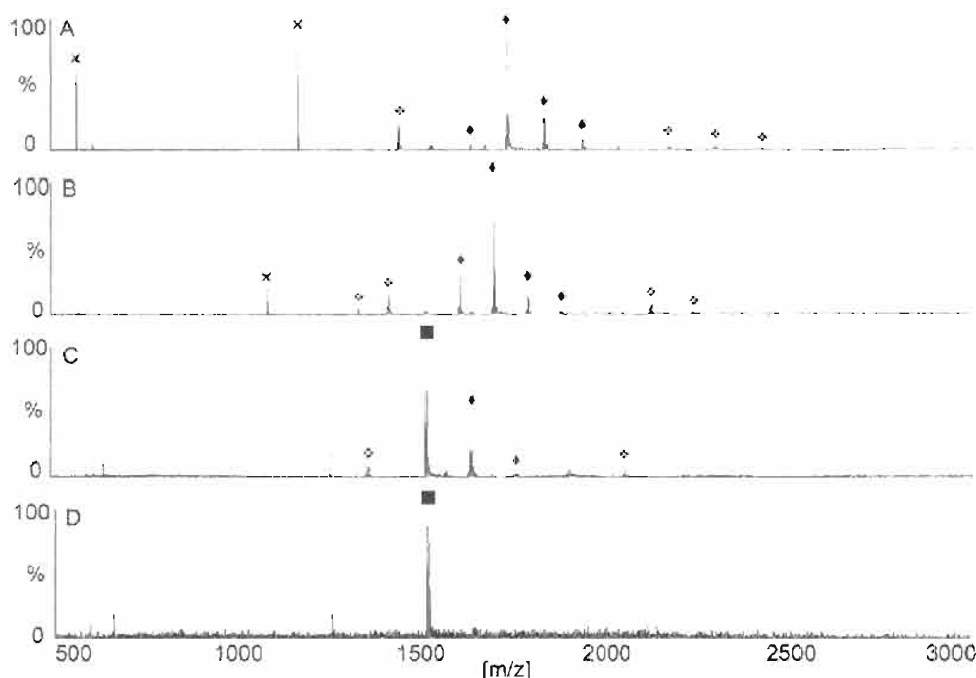


Figure 3. ESI mass spectra of 1:9 mixtures of Q2 with **A:** BT80, **B:** SST31, **C:** pSS14, **D:** *N*-methy-pSS14. Proposed ions for G-quadruplex Q2 are marked by a square, ions of DNA-ligand complexes by diamonds and ions arising from the ligands by an “x”.

BT80 was titrated in different ratios to Q2. A well-defined maximum for two bound molecules of BT80 can be observed. This suggest that an end-stacking mode for BT80 binding

to Q2. SST31 showed a substantial binding affinity for Q2. A maximum can be observed for two bound molecules of BT in the 1:6 and 1:9 mixtures. In the 1:3 mixture, no clear maximum is present. This is due to similar abundance of Q2 with one and two SST31 molecules bound. This suggests a lower binding affinity of SST31 for Q2 compared with BT80, but a similar binding mode. Compared to BT80 and SST31, the binding affinity of pSS14 and *N*-methyl-pSS14 was low, as can be seen from Figure 3. The capillary became blocked at high concentration of *N*-methyl-pSS14, indicating solubility problems of *N*-methyl-pSS14.

2.6 ESI mass spectra of Q1 titrated with BT80, SST31, pSS14 and *N*-methyl-pSS14

Upon addition of BT80, several additional ions were observed in the spectra of Q1. These were in 5⁺ charge state: an ion at m/z 1428.1 for $[Q1+1BT80-5H]^{5+}$, at 1529.80 for $[Q1+2BT80-1NH_4^+-6H]^{5+}$ and at 1628.17 for $[Q1+3BT80+1NH_4^+-6H]^{5+}$. The titration curves display a maximum at Q1+2BT80. This is in agreement with an end-stacking binding mode, which has been proposed to be typical for G-quadruplex ligands [11]. At the 1:1 DNA:SST31 mixture no binding was observed and 98% of Q1 was present with no bound SST31 molecules. Upon increasing the DNA:ligand ratio, the predominant ions in the ratios 1:6 and 1:9 DNA:ligand mixtures were Q1 with one SST31 molecule bound. The ligands pSS14 and *N*-methyl-pSS14 showed negligible binding, as can be seen from the spectra (Figure 4). For pSS14, the total relative abundance Q1+*x*pSS14 is below 10%, even in the 1:9 DNA:ligand mixture. This is in agreement with results from Gornall et al.¹⁰⁸ *N*-methyl-pSS14 exhibited a slightly higher binding affinity to Q1, but Q1 with no *N*-methyl-pSS14 bound was still present at more than 80% in the 1:9 DNA:ligand mixtures.

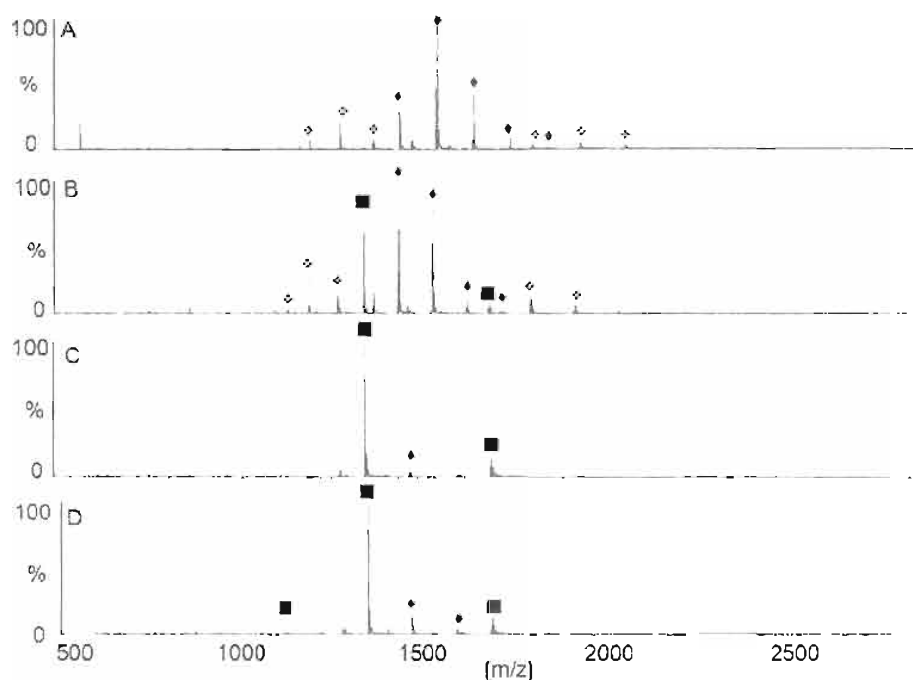


Figure 4. ESI mass spectra of 1:9 mixtures of Q1 with **A:** BT80, **B:** SST31, **C:** pSS14, **D:** *N*-methy-pSS14. Proposed ions for G-quadruplex Q1 are marked by a square and ions of DNA-ligand complexes by different diamonds for different charge states.

3. Pharmacology

3.1 Telomerase activity assay

Direct telomerase assay was performed using the following substrates: linear 7mer, G-quadruplex 7mer titrated with BT80. A characteristic banding pattern with periodicity

corresponding to the telomeric repeat is displayed on the sequencing gel (Figure 5). The distribution of dark bands equals the distribution of molecular weights of extension products, that were presented when the reaction was terminated. Generally, three dark bands can be observed, where one of them is darker than the other. This banding pattern most likely arises from pausing during the telomerase reaction cycle before translocation [12]. Hence, when terminating the reaction, the chance of capturing certain molecular weight products is higher than capturing others. Low molecular weight products migrate the faster on the gel and are therefore found towards the bottom, whereas high molecular weight products are located in the upper region of the gel.

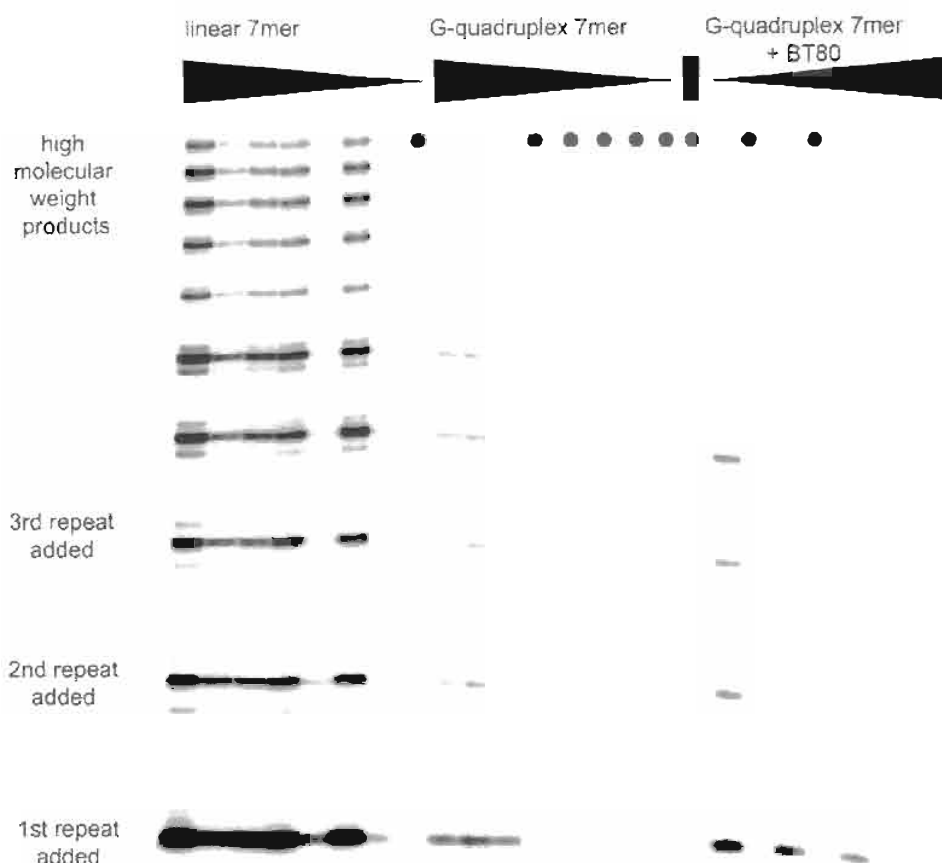


Figure 5. Telomerase sequencing gel: Triangles indicate the concentration gradient of 1.00 μM to 0.01 μM of linear 7mer and G-quadruplex 7mer, respectively. The third triangle indicated increasing concentration of BT80 ranging from 0.5 to 300 μM . The lane with a rectangle was loaded with an ethanol control to test whether ethanol itself has an effect on telomerase activity. Lanes with circles are proposed to be affected by ribonuclease contamination.

Unfortunately some lanes of the gel are blank. This is most likely due to ribonuclease contamination, which is a common problem in biological laboratories. Ribonucleases are ubiquitous enzymes which catalyse the degradation of RNA [13]. As telomerase is dependent on its RNA component, the degradation of the latter is disastrous for the assay. Nevertheless, from intact samples it can be clearly seen, as judged by the dark bands, that the linear 7mer was extended the most. The bands on the three intact quadruplex lanes are much fainter; demonstrating that G-quadruplex 7mer had been extended to a lesser extent and that linear 7mer is a better substrate than G-quadruplex 7mer. For samples titrated with BT80 a lower abundance

of extension products were present at G-quadruplex titrated with higher concentrations of BT80 compared to G-quadruplex 7mer titrated with low concentrations of BT80.

3.2 Fluorescence staining of ligands

In order to prove the existence of G-quadruplex structures *in vivo*, a method to visualize these structures needs to be established. The fluorescence properties of BT80, SST31, pSS14, and N-methyl-pSS14 and their capability to enter cells were examined. All ligands used were fluorescent, but only BT80 exhibited fluorescence within the range of excitation and emission wavelengths available on Zeiss Axio Imager M1 microscope. 5 μ L Ligand solution was added and ALT+ IICF/c cells were fixed after 24 hours and visualized using the Zeiss Axio Imager M1 microscope (Figure 6). The obtained pictures show that BT80 was able to enter the cells, but was not found in the nucleus.



Figure 6. ALT⁺ IICF/c cells stained with BT80 and propidium iodide. A: propidium iodide B: BT80 C: merged pictures from BT80 and propidium iodide. BT80 has entered cells, but not the nucleus.

4. Conclusions

The binding affinities of the four ligands, BT80, SST31, pSS14, and N-methyl-pSS14, to the 7mer and to 18mer could not be determined. The stability of the 7mer in the mass spectrometer was very low, and only negligible amount of G-quadruplex DNA was detected. For 18mer, ligands seemed to induce a structural change or aggregation to higher mass complexes since no DNA was detected in the mass range for the dimeric 18mer upon ligand addition at high concentrations. The relative binding affinities of the ligands to the 12mer, 22mer, Q1, Q2, and D2 are summarised in Figure 7.

Generally, BT80 had the highest binding affinity to all sequences. SST31 showed also substantial binding to G-quadruplex DNA. Comparing different G-quadruplex structures, SST31 and BT80 seemed to bind preferentially to the dimeric Q2. The binding of pSS14 was only weak, but it exhibited a slight preference to the monomeric complexes, 22mer and Q1, over the dimeric complexes, 12mer and Q2. The binding affinities of N-methyl-pSS14 to the G-quadruplex structures were low and comparable with those of pSS14 except that N-methyl-pSS14 did not bind to the 12mer. Surprisingly, while pSS14 showed a slightly higher affinity to Q1 over the 22mer, N-methyl-pSS14 exhibited a slightly higher binding affinity to the 22mer. The spectra of SST31 and N-methyl-pSS14 in mixtures with the double-stranded DNA, D2, were obtained to compare binding affinities between G-quadruplex DNA and double-stranded DNA. N-methyl-pSS14 did not bind to D2, SST31 bound to D2, but it bound only weakly compared with its binding affinity to G-quadruplex DNA. Gornall et al. have previously shown that BT80 and pSS14 exhibit negligible binding to duplex DNA. Thus, all ligands can be termed G-quadruplex selective. Owing to their high binding affinities to G-quadruplex DNA, BT80 and SST31 could serve as lead compounds in anticancer drug design.

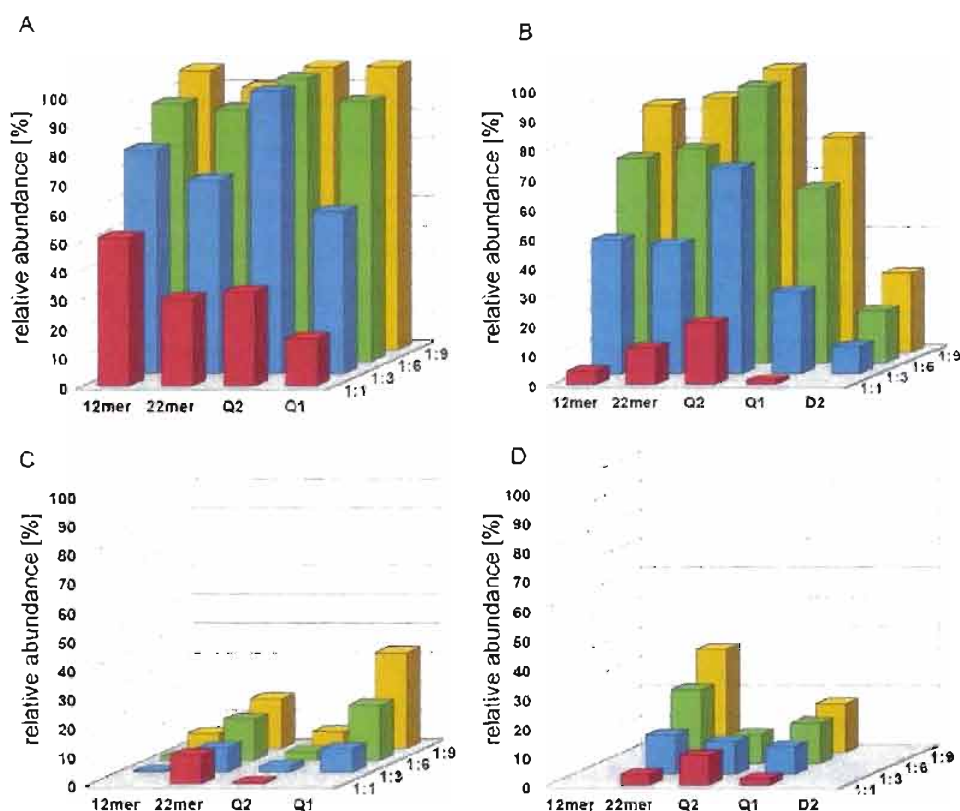


Figure 7. Relative abundances of the total amount of different G-quadruplex-ligand complexes with ligands **A:** BT80, **B:** SST31, **C:** pSS14, **D:** N-methy-pSS14.

A telomerase assay was carried out and showed that linear 7mer was the preferred substrate of telomerase over G-quadruplex 7mer. Addition of BT80 inhibited telomerase activity.

The four ligands might serve as fluorescent probes for G-quadruplex DNA in cells, since they are all fluorescent. A preliminary experiment was carried out to determine whether the ligand BT80 could enter cells, after 24 hours with ALT+ IIIICF/c cells, BT80 was found inside cells, but outside the nucleus.

5. Experimental

5.1 Materials

Acetonitrile, ammonium acetate, magnesium chloride, methanol and potassium chloride were purchased from Ajax Finechem (Seven Hills, Australia). Acrylamide, ethylenediaminetetraacetic acid, sodium dodecyl sulfate, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, and urea were obtained from Amresco (Soho, Ohio, USA). GlycoBlue was purchased from Ambion (Austin, USA). Phenol/chloroform solution (pH 8.0) was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Ammonium persulfate, dATP, dGTP, dTTP, dithiothreitol, tetramethylethylenediamine and Berberine chloride were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). α^{32} P-dGTP was purchased from Perkin-Elmer (Melbourne, Australia). All reagents and solvents were of the highest grade commercially available. MilliQTM water (Millipore, Bedford, USA) was used in all experiments.

5.2 Ligands

Compounds BT80, SST31, pSS14 and N-methyl-pSS14 were prepared as described elsewhere [10, 14, 15].

5.3 Oligonucleotides

Synthetic deoxyribooligonucleotides were purchased from GeneWorks (South Australia) as 'trityl-off' derivatives in sequencing/PCR grade. The oligonucleotides base sequences (5'-3') are listed: (TTAGGGT, 7mer, Mr 2151.5 Da; TTAGGGGT, 7-4mer, Mr 2489.7 Da; TAGGGTTAGGGT, 12mer, Mr 3756.5 Da; TAGGGGTAGGGGT, 12-4mer, Mr 4414.9 Da; TGGGGG(TTAGGG)₂, 18mer, Mr 5706.8 Da; AGGG(TTAGGG)₃, 22mer, Mr 6966.6 Da; GGG(TTAGGG)₃, Q1, Mr 6653.4 Da; GGGGTTTTGGGG, Q2, Mr 3788.5 Da; GCTGCCAAATACCTCC, D2a, Mr 4786.2 Da; GGAGGTATTTGGCAGC, D2b, Mr 4977.3 Da). The 7mer and 7-4mer are expected to form a four-stranded quadruplex DNA; the 12mer, 12=4mer, 18mer, and Q2 are expected to form quadruplex DNA from two strands and the 22mer and Q1 form intramolecular quadruplex DNA. D2a and D2b are complementary single strand that form the double-stranded DNA, D2.

5.4 Annealing procedures

5.4.1 Preparation of double strand DNA

Appropriate volumes of D2a and D2b solutions were mixed together and dried using a Savant SpeedVac. The sample was then redissolved in NH₄OAc solution (0.1 M) to give a DNA concentration of 1 mM. The solution was heated to 70 °C for 15 min using a Techne DB-2A heating block set. The inner heating block was taken out and the sample was allowed to slowly equilibrate to room temperature overnight.

5.4.2 Preparation of quadruplex DNA

An appropriate volume of the oligonucleotide stock solution was dried and redissolved in NH₄OAc solution (0.15M) to give a solution with a DNA concentration of 1 mM. The sample was heated to 90 °C for 5 minutes and then allowed to equilibrate to room temperature. The samples remained at room temperature for three days before using in experiments.

5.5 Preparation of ligand stock solutions

Stock solutions (1 mM) of BT80, SST31, pSS14, and *N*-methyl-pSS14 were prepared by dissolving the compounds in 40:60 NH₄OAc solution (0.15 M): MeOH and stored at -20 °C.

5.6 Preparation of DNA-ligand solutions

An appropriate volume of annealed DNA solution was titrated with stock solution of BT80, SST31, pSS14, and *N*-methyl-pSS14 to give solutions with DNA:ligand ratios of 1:1, 1:3, 1:6 and 1:9. The solutions were diluted with NH₄OAc solution (0.15 M) to give final DNA concentrations of 20 μM and ligand concentrations of 20, 60, 120, and 180 μM, respectively. The samples were allowed to equilibrate for 15 min before they were used in experiment.

5.7 Electrospray ionization mass spectrometry

All spectra were obtained using either a Water Q-TOF UltimaTM or a HDMSTM SynaptTM ESI mass spectrometer (Manchester, UK) in negative ion mode. The instrument was calibrated using cesium iodide solution (1mg/mL) over the same mass range used to acquire spectra. Samples were injected at a flow rate of 20 μL/min with a Harvard Model 22 syringe pump (Natick, USA). Different conditions were required to give optimal spectra for each type of DNA. The parameters used for the DNA were also used in titration experiments. Spectra for the 7mer, 12mer, 18mer, Q1, Q2 and Q4 were recorded using the Q-TOF UltimaTM and the RF lens (50V), collision energy (2.0 V), source temperature (50 °C), desolvation temperature (150 °C), desolvation gas flow (300L/h) and TOF voltage (9.1 kV) remained the same. Twenty acquisitions were combined and the resulting spectrum was baseline subtracted and smoothed using a Savitzky Golay algorithm.

5.8 Telomerase activity assay

Telomerase reaction mix (10% 10 x hTel buffer, glycerol, 0.5 mM aTTP, 0.5 mM dATP, dGTP and $\alpha^{31}\text{P}$ -dGTP) (5 μM , 198 Ci/mmol) and telomerase (5 μL , 12 fM) was added to all samples. The reaction mixture was incubated at 30 °C for 60 min and terminated by adding TES buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.02 M EDTA, 2% SDS). A ^{32}P labeled 100mer was added as a recovery and loading control. The DNA was extracted with phenol/chloroform solution and ethanol precipitated by adding GlycoBlue, NH_4OAc and EtOH. The samples were stored at -20 °C. The supernatant was removed and the blue DNA pellet was washed with EtOH (50 μL , 70%), air-dried and redissolved in TE buffer (5 μL , 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M EDTA) and formamide loading dye buffer (5 μL , 90% deionized formamide, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, TBE-buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA). Next, samples were denatured by heating to 70 °C. The reaction mixture was electrophoresed on a denaturing 12% polyacrylamide/8M urea sequencing type gel at 80 W for 1.5 h. The gel was transferred to a Whatman Paper and dried for 1 h at 80 °C and exposed to a phosphorimaging screen for 1 h and analyzed using ImageQuant TL software.

5.9 Fluorescence experiments

Fluorescence experiments were carried out using a Hitachi F-4500 fluorimeter in a 1 cm quartz cell with a 0.2 μM solution in MilliQTM water:methanol (2%) of BT80, SST31, pSS14, and *N*-methyl-pSS14, respectively. Excitation wavelengths were chosen according to wavelength with highest absorbance in UV/vis spectra.

5.10 Fluorescence staining of cells

ALT⁺ IICF/c cells in growth medium were seeded on 22 mm sterile glass coverslips and cultured for 24 h. Then different amounts of BT80, SST31, pSS14, and *N*-methyl-pSS14 (2 mM in EtOH) were added to the cells. The cells were cultured for at least 24 h, and then washed twice with 1 x PBS and fixed with 1 x PBS with 4% formaldehyde. Cells were stained with propidium iodide and image using a Zeiss Axio Imager M1 microscope with a Plan-Apochromat x 63 oil objective (numerical aperture 1.4), appropriate filter sets and an AxioCam Mrm digital camera (Carl Zeiss). Images were processed with the AxioVision software.

Acknowledgments

We wish to thank the University of Wollongong, Australia; the German Academic Exchange Service (DAAD), Germany; Srinakharinwirot University Research Grant, Thailand and Children's Medical Research Institute at Westmead, Australia for supporting this work.

References

- [1] J.W. Shay, S. Bacchetti. Eur. J. Cancer. 33 (1997) 787-91.
- [2] P. Dalerba, R.W. Cho, M.F. Clarke. Ann. Rev. Med. 58 (2007) 267-84.
- [3] M. Franceschin. Eur. J. Org. Chem. (2009) 2225-38.
- [4] D. Monchaud, M.P. Teulade-Fichou. Org. Biomol. Chem. 6 (2008) 627-36.
- [5] R. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F. Han, L. Hurley. J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 3621-262.
- [6] L. Rossetti, M. Franceschin, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15 (2005) 413-20.
- [7] R. Heald, C. Modi, J. Coojson, I. Hutchinson, C. Laughton, S. Gowan, L. Kelland, M. Stevens. J. Med. Chem. 45 (2002) 590-97.

- [8] S. Gowan, J. Harrison, L. Patterson, M. Valenti, M. Read, S. Neidle, L. Kelland. *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1154-62.
- [9] F. Koepfel, J. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Helene, J. Mergny. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 1087-96.
- [10] K.C. Gornall, S. Samosorn, B. Tanwirat, A. Suksamrarn, J.B. Bremner, M.J. Kelso, J.L. Beck. *ChemComm.* 46 (2010) 6602-04.
- [11] S. Neidle, G.N. Parkinson. *Biochemie.* 90 (2008) 1184-96.
- [12] C. Greider. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4572-80.
- [13] D.L. Nelson, C.M.M. Lehninger, *Principles of Biochemistry.* 5 ed. Freeman; 2008.
- [14] S. Samosorn, B. Tanwirat, N. Muhamad, G. Casadei, D. Tomkiewicz, K. Lewis, A. Suksamrarn, T. Prammananan, K.C. Gornall, J.L. Beck, J.B. Bremner. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17 (2009) 3866-72.
- [15] S. Samosorn. Thai Petty Patent Application Number 1103000985. (16 September 2011).