ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับแอกติวิตีต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบโรทีนอยด์

นางสาวปิติพร ฉิมสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ON CYTOTOXICITY OF ROTENOID COMPOUNDS

Miss Pitiporn Chimsook

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511975

Thesis Title	STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ON CYTOTOXICITY OF RETENOID COMPOUNDS
By	Miss Pitiporn Chimsook
Field of Study	Biotechnology
Thesis Principal Advisor	Associate Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Deputy Dean for Administrative Affairs,

(Associate Professor Vimolvan Pimpan, Ph.D.) Acting Dean, The Faculty of Science

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D.)

..... Thesis Principal Advisor

(Associate Professor Nongnuj Muangsin, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

..... External Member

(Professor Apichart Suksamrarn, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Thawatchai Tuntulani, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Orawon Chailapakul, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

ปิติพร ฉิมสุข : ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับแอกติวิตีต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบโรทีนอยด์ (STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ON CYTOTOXICITY OF ROTENOID COMPOUNDS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพันธ์หลัก: รศ. ดร. นงนุช เหมืองสิน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์, 150 หน้า.

6-ดีออกซิไคลโทไรอะซิทาล (สาร **1**) และสเตโมนอล (สาร **2**) เป็นสารประกอบโรทีนอยด์ที่สกัดจากรากแห้งของพืช *Stemona collinse* Craib หรือหนอนตายหยาก เป็นที่ทราบว่าสาร **1** มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของมนุษย์หลายชนิด และที่น่าสนใจคือ ถึงแม้สาร **1** ไม่ได้เป็นอนุพันธ์ของดอกซอรูบิซิน แต่ก็มีความคล้ายคลึงกันทางด้านโครงสร้างกับดอกซอรูบิซิน ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่มีกลไกผ่านการแทรกตัวเข้าในระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในทางตรงข้ามกลับไม่พบว่าสาร 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองเหล่านี้ จึงนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเสนอเป็นสมมติฐานว่า สารประกอบใด ๆ มีโอกาสที่จะเป็นยารักษาโรคมะเร็งที่มีกลไกผ่านการแทรกตัวเข้าในระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอ ถ้าประกอบไปด้วยสามลักษณะที่สำคัญคือ 1. โมเลกุลมีรูปร่างแบบโค้งงอ 2. โมเลกุลมีส่วนที่แบนราบซึ่งสามารถแทรกตัวเข้าในดีเอ็นเอ 3. โมเลกุลมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลได้ดี ซึ่งเพิ่มเสถียรภาพของการยึดจับกับดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสาร **1** และ สาร **2** กับคลาฟไธมัสดีเอ็นดีโดยใช้เทคนิค ยูวีสเปคโตรสโครปี, การศึกษาอุณหภูมิในการสลายตัว และเทคนิคเซอร์คูลา ไดโครอิซึม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการยึดจับระหว่างสาร **1** และสาร **2** กับสายดีเอ็นเอที่มีหกคู่เบสคือ $d(CGTACG)_2$ พบว่าสารทั้งสองสามารถเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ เนื่องจากมีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในยูวีสเปคตรัม มีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิการสลายตัวของเกลียวดีเอ็นเอ มีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซอร์คูลาไดโครอิซึมสเปคตรา และการเลื่อนตำแหน่งและลดต่ำลงของสัญญาณโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์นิวเคลียร์แมคนีติกเรโซแนนท์บอกถึงว่าเมื่อเกิดการยึดจับกับสายดีเอ็นเอโมเลกุลที่แบนราบของสาร **1** และ 2 เข้าไปแทรกระหว่างสายดีเอ็นเอที่เบส CG สาร **1** ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส II ที่ 75.22 % ซึ่งดีกว่าอีทอปอไซด์ที่ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส II ที่ 68.94 %

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร **1** และนำไปทดสอบหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส II เพื่อที่จะศึกษาผลของหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรกับดีเอ็นเอ ในบรรดาอนุพันธ์อะมิโนเอซิดของ 1 (A1 ถึง A5) สารอนุพันธ์ของอาจีนีน (A5) ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีมากกับ KB ที่ค่า IC_{50} 1.45 μg/ml ในบรรดาอนุพันธ์ไพริมิดีนเบสของ 1 (B1 ถึง B3) อนุพันธ์ยูเรซิล (B3) ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีมากกับ KB และ NCI-H187 ที่ค่า IC_{50} 1.45 และ 0.255 μg/ml ตามลำดับ ในบรรดาอนุพันธ์คาร์บอกซิลิกอะโรมาติกเอสเทอร์ของ 1 (C ถึง G) สาร G ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีมากกับ KB และ NCI-H187 ที่ค่า IC_{50} 2.64 และ 8.28 μg/ml ตามลำดับ สารประกอบ A1 ถึง A5 ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส II ที่ 50.10, 35.60, 31.50, 30.20 และ 39.50 % ตามลำดับ ผลการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส II ของสาร A1 ถึง A5 สอดคล้องกับผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยสรุปแล้ว ผลการทดลองยืนยันสมมติฐานที่ได้ตั้งขึ้น

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา ..... 2551..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพันธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4673848623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ROTENOID / CYTOTOXICITY / STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP

PITIPORN CHIMSOOK: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ON CYTOTOXICITY OF ROTENOID COMPOUNDS. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. NONGNUJ MUANGSIN, ASSOC. PROF. NATTAYA NGAMROJANAVANICH, 150 pp.

6-Deoxyclitoriacetal (**1**) and stemonal (**2**) are rotenoid substances extracted from the dried root of *Stemona collinse* Craib. Only **1** has been known to have cytotoxic activity against various types of human carcinoma. Interestingly, although **1** is not a derivative of doxorubicin, it shares structural similarities with doxorubicin. In contrast, **2** has no cytotoxic acitivity against anticancer cell lines. These lead to the study of structure-activity relationship and the proposed hypothesis that a substance has a good chance to be a DNA-intercalating anticancer drug if it possesses three characteristics: (i) the molecule has a bent shape, (ii) a part of the molecule is planar and (iii) it has functional groups that have intermolecular interactions. The interaction between **1** and **2** to calf thymus DNA has been studied in detailed by means of UV - spectroscopy, denaturation temperature (T_m) and circular dichroism (CD). In addition, both **1** and **2** were studied for the binding with hexamer $d(CGTACG)_2$. They are found to interact with base pairs of DNA as evidenced by (1) induced UV spectra; (2) increased denaturation temperature of the DNA helix; (3) induced circular dichroism spectra; (4) broadened and shifted ^1H NMR signals. The nuclear magnetic resonance experiment shows that the planar aromatic ring of **1** and **2** intercalates between CG base pairs of DNA when it is bound to DNA. Compound **1** showed strong inhibitory topoisomerase II, giving 75.22 % inhibition that was better than etoposide (68.94 % inhibition). The derivatives of **1** have been synthesized and investigated for their cytotoxic activities and also topoisomerase II inhibition, to study the effect of the functional groups on the ability to stabilize the DNA complexes. Among the amino acid derivatives of **1** (**A1** to **A5**), arginine derivative of **1** (**A5**) showed strong selective cytotoxic activity with KB with IC_{50} of 1.45 μg/ml. Among the pyrimidine base derivatives of **1** (**B1** to **B3**), the uracil derivative (**B3**) showed strong cytotoxic activities against KB and NCI-H187 with IC_{50} of 1.45 and 0.255 μg/ml, respectively. Among the carboxylic aromatic ester derivatives of **1** (**C** to **G**), **G** showed strong cytotoxic activities against KB and NCI-H187 with IC_{50} of 2.64 and 8.28 μg/ml, respectively. Compound **A1** to **A5** showed moderate inhibitory topoisomerase II, giving 50.10, 35.60, 31.50, 30.20, 39.50 % inhibition, respectively. The results of topoisomerase II inhibition of **A1** to **A5** are consistent with the cytotoxicity activity. The results have confirmed the hypothesis.

Field of study:.....Biotechnology... Student's signature:.....Pitiporn Chimsook.....

Academic year:.....2008..... Principal Advisor's signature:.....N. Muangsin.....

Co-advisor's signature:.....N. Ngamrojanavanich.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to sincerely thank and express my deepest gratitude to Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin, my thesis advisor, for her kindness, guidance, suggestions and assistance throughout the course of this research. I am also grateful to thesis examiners: Associate Professor Dr. Sirirat Kokpol, Professor Apichart Suksamrarn, Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojnavanich, Associate Professor Dr. Thawatchai Tuntulani, Associate Professor Dr. Orawon Chailapakul and Associate Professor Dr. Polkit Sangvanich for their valuable comments and suggestions. I would like to thank the Research Centre for Bioorganic Chemistry (RCBC); Department of Chemistry, Chulalongkorn University for the use of facilities, equipment, glassware, and chemicals; the Supramolecular Chemistry Research Unit (SMRU) and the Organic Synthesis Research Unit (OSRU) for a generous use of UV-visible Spectrophotometer; the Halal Science Center, Chulalongkorn University for initiating a generous support of the gel electrophoresis equipment. I would like to thank the RGJ for financial support during my study. Finally, I would like to thank my parents who had encouraged me with sincere and my best friends for their love, understanding encouragement and social support throughout my study period.

CONTENTS

Page

Abstract in Thai.....iv

Abstract in English.....v

Acknowledgements..... vi

List of Tables.....ix

List of Figures.....xi

List of Illustrations.....xiv

List of Abbreviations.....xvii

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

1.1 Structure-Activity Relationship 1

1.2 Rotenoid compounds 2

1.3 Drug-DNA interaction 3

1.4 DNA binding studies 7

1.4.1.1 UV-vis spectroscopy 7

1.4.1.2 Melting temperature (*Tm*).....7

1.4.1.3 Circular dichroism (CD) spectroscopy.....8

1.4.1.4 Nuclear magnetic resonance (NMR).....8

1.5 Objectives of this research 9

CHAPTER II EXPERIMENTAL.....10

2.1 Materials.....10

2.2 Extraction of 6-deoxyclitoriacetal from the dried roots of *Stemona collinsae* Craib. 10

2.3 Cytotoxic activity of the obtained rotenoid compounds.....10

2.4 Drug-DNA binding studies.....11

2.4.1 Spectral measurements.....11

2.4.1.1 UV-titration experiments 11

2.4.1.2 DNA melting studies 11

2.4.1.3 Circular dichroism spectroscopy (CD).....12

2.4.1.4 NMR studies.....12

Page

2.5 Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues 13
2.5.1 Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal – amino acid analogues.....13
2.5.2 Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal – pyrimidine analogues.....20
2.5.4 Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal – aromatic carboxylic analogues.....23
2.6 Cytotoxic activity of the 6-deoxyclitoriacetal analogues.....27
2.7 Assay of topoisomerases II activity.....27

CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSION.....29
3.1 Extraction of 6-deoxyclitoriacetal from the dried roots of *Stemona collinsae* Craib.....29
3.2 Cytotoxic activities of obtained rotenoid compounds.....31
3.3 Drug-DNA binding studies.....33
3.4 Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues.....61
3.5 Cytotoxic activities of 6-deoxyclitoriacetal analogues.....81
3.6 Effect of 1, 2 and analogues of 1 on the Relaxation Activity of Topoisomerase II.....94

CHAPTER IV CONCLUSION.....97
REFERENCES.....100
APPENDIX.....107
VITA.....150

LIST OF TABLES

Page

Table 1	Crystal data and summary of data collection and structure refinement of **1** and **2**	30
Table 2	Cytotoxic activities of 6-deoxyclitoriacetal and stemonal	31
Table 3	Compared structure of Doxorubicin HCl, 6-deoxyclitoriacetal and stemonal	33
Table 4	^{1}H-NMR Chemical shifts (ppm) of d(CGTACG)$_2$, and 6-deoxyclitoriacetal (**1**) at 300 K	46
Table 5	^{1}H-NMR Chemical shifts (ppm) of d(CGTACG)$_2$, and stemonal (**2**) at 300 K	54
Table 6	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A**)	63
Table 7	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A1**)	64
Table 8	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A2**)	65
Table 9	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A3**)	66
Table 10	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A4**)	67
Table 11	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A5**)	68
Table 12	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**B**)	71
Table 13	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**B1**)	72
Table 14	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**B2**)	73
Table 15	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**B3**)	74
Table 16	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**C**)	76
Table 17	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**D**)	77
Table 18	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**E**)	78
Table 19	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**F**)	79
Table 20	Synthesis of 6-deoxyclitoriacetal analogues (**G**)	80
Table 21	Cytotoxic activities of the 6-deoxyclitoriacetal (**1**), stemonal (**2**) and 6-deoxyclitoriacetal analogues (**A, A1-A5, B, B1-B3, C-G**) against KB (Human mouth carcinoma), MCF7 (Breast cancer) and NCL-H187 (Human small lung cancer) cell lines	82

Page

Table 22 Topoisomerase II inhibition rate (%) of 6-deoxyclitoriacetal, stemonal and 6-deoxyclitoriacetal analogues, **A1-A5**.....94

Table 23 The summary of the characteristics, cytotoxic activities and % inhibition topoisomerases II of all compounds.....99

LIST OF FIGURES

Page

Fig. 1 Chemical structure of doxorubicin HCl (a) Intercalation binding of doxorubicin- d(CGATCG).....2

Fig. 2 Chemical structure of (a) rotenoid structure, (b) 6-deoxyclitoriacetal (c) doxorubicin hydrochloride.....3

Fig. 3 Deoxyribonucleic acid (DNA) and hydrogen bonding of nitrogenous bases.....4

Fig. 4 Intercalation of a planar ligand in the double helix.....5

Fig. 5 Chemical structures of doxorubicin hydrochloride (a) daunorubicin hydrochloride (b) and ethidium bromide (c).....6

Fig. 6 Chemical structure of Hoechst 33258.....6

Fig. 7 Chemical structure of 6-deoxyclitoriacetal (a), stemonal (b) ORTEP structure showed top view of 6-deoxyclitoriacetal (c) and stemonal (d).....29

Fig. 8 ORTEP drawing of doxorubicin HCl (a), **1** (b), **2** (c) showing 50 % probability displacement ellipsoids.....32

Fig. 9 Absorption spectra of **1** (2.5×10^{-5} M) in the absence and presence of calf thymus-DNA ($\times 10^{-4}$ M): a, 0.0; b, 1.1; c, 2.2; d, 4.5; e, 6.7 in phosphate buffer pH 7.0. Arrow shows that the absorbance changes upon increasing DNA concentration.....34

Fig. 10 Absorption spectra of **2** (2.8×10^{-5} M) in the absence and presence of calf thymus-DNA ($\times 10^{-4}$ M): a, 0.0; b, 1.1; c, 2.2; d, 4.5; e, 6.7 in phosphate buffer pH 7.0. Arrow shows that the absorbance changes upon increasing DNA concentration.....35

Fig. 11 Melting profiles of (a) ct-DNA, (b) ct-DNA with **2** and (c) ct-DNA with **1**.....36

Fig. 12 Changes in absorbance (dA) with respect to increasing temperature (dT) at 260 nm for (a) ct-DNA, (b) ct-DNA with **2** and (c) ct-DNA with **1**.....37

Page

Fig. 13 Circular dichroism spectra of ct-DNA (0.12 mM) with increasing concentrations of **1** in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). Curves a to g denote ct-DNA treated with **1** ($x10^{-5}$ M) 0, 0.25, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 5, respectively.....38

Fig. 14 Circular dichroism spectra of ct-DNA (0.12 mM) with increasing concentrations of **2** in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). Curves a to g denote ct-DNA treated with **2** ($x10^{-5}$ M) 0, 0.25, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 5, respectively.....39

Fig. 15 One-dimensional ^{1}H-NMR titration of the free DNA, 1:0.5, 1:1, 1:2 and 1:3 of d(CGTACG)$_2$: 6-deoxyclitoriacetal complexes and free 6-deoxyclitoriacetal in the range of 2.0 to 8.0 ppm. The spectra were recorded at 300 K.....40

Fig. 16 Expanded one-dimensional ^{1}H-NMR titration in the range of 2-6 ppm of **1** with DNA.....42

Fig. 17 2D COSY spectra of complexation of **1** with d(CGTACG)$_2$ in the range of 1-8 ppm which provided information in the assignments of resonances. The sequential assignment pathway is indicated.....43

Fig. 18 Expanded one-dimensional ^{1}H-NMR titration in the range of 5.75-6.75 ppm of **1** with DNA.....44

Fig. 19 Expanded one-dimensional ^{1}H-NMR titration in the range of 7-8 ppm of **1** with DNA.....45

Fig. 20 Expanded aromatic to H1' region (5-8.5 ppm) of 2D NOESY spectra of complexation of **1** with d(CGTACG)$_2$ which provided information in the assignments of resonances. The sequential assignment pathway is indicated.....48

Fig. 21 Expanded aromatic to H1' region (5-8.5 ppm) of 2D NOESY spectra of d(CGTACG)$_2$ which provided information in the assignments of resonances. The sequential assignment pathway is indicated.....49

Page

Fig. 22 One-dimensional ^{1}H-NMR titration of the free DNA, 1:0.5, 1:1, 1:2 and 1:3 of d(CGTACG)$_2$: stemonal complexes and free stemonal in the range of 2.0 to 8.0 ppm. The hydroxyl group at C11 (12.77 ppm) were omitted for clarify. The spectra were recorded at 300 K.....50

Fig. 23 Expanded one-dimensional ^{1}H-NMR titration in the range of 2-4 ppm of **2** with DNA.....51

Fig. 24 Expanded one-dimensional ^{1}H-NMR titration in the range of 6-8 ppm of **2** with DNA.....52

Fig. 25 2D NOESY spectra of complexation of **2** with d(CGTACG)$_2$ in the range of 0-8 ppm which provided information in the assignments of resonances. The sequential assignment pathway is indicated.....56

Fig. 26 One-dimensional ^{1}H-NMR titration of the free DNA in D_2O with DMSO-d_6 The d(CGTACG)$_2$ - 1 to - 3 referred to increase the DMSO-d_6 at ratio 1:0.5, 1:1 and 1:2, respectively.....60

Fig. 27 Chemical structure of doxorubicin HCl (a) and ellipticine (b).....83

Fig. 28 Chemical structures of (a) 6-deoxyclitoriacetal (**1**) and (b) stemonal (**2**).....84

Fig. 29 The chemical structures of compound (a) **A**, (b) **A1**.....85

Fig. 30 The chemical structures of compound (a) **A2**, (b) **A3**.....86

Fig. 31 The chemical structures of compound (a) **A4**, (b) **A5**.....87

Fig. 32 The chemical structures of compound (a) **1**, (b) **B**.....88

Fig. 33 The chemical structures of compound (a) **B1**, (b) **B2**, (c) **B3**.....89

Fig. 34 The chemical structure of compound (a) **C**, (b) **D**, (c) **E**.....91

Fig. 35 The chemical structures of compound (a) **F**, (b) **G**.....92

Fig. 36 The chemical structure of Tamoxifen.....93

Fig. 37 Topoisomerase II inhibition test of compounds. Lane 1: pBR322 only, Lane 2: Topo II + pBR322, Lane 3: etoposide, 100 μM, Lane 4: stemonal at concentration of 100 μM, Lane 5: 6-deoxyclitoriacetal at concentration of 100 μM, Lane 6-10: **A1-A5** at concentration of 100 μM, respectively.....95

LIST OF ILLUSTRATIONS

Page

Scheme 1 Synthesis of 12a-Hydroxy-2,3,9-trimethyl-11-oxiranylmethoxy-6a,12a-dihydro-6*H*-chromeno[3,4-*b*] chromen-12-one. (**A**).....14

Scheme 2 Synthesis of [2-Hydroxy-3-(12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yloxy)-propylamino]-acetic acid (**A1**).....15

Scheme 3 Synthesis of 2-[2-Hydroxy-3-(12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yloxy)-propylamino]-propionic acid (**A2**).....16

Scheme 4 Synthesis of 2-[2-Hydroxy-3-(12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yloxy)-propylamino]-3-methyl-pentanoic acid (**A3**).....17

Scheme 5 Synthesis of 2-[2-Hydroxy-3-(12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydro-chromeno[3,4-*b*] chromen-11-yloxy)-propylamino]-3-mercapto-propionic acid (**A4**).....18

Scheme 6 Synthesis of 5-Guanidino-2-[2-Hydroxy-3-(12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yloxy)-propylamino]-pentanoic acid (**A5**).....19

Scheme 7 Synthesis of Toluene-4-sulfonic acid 12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydrochromeno[3,4-*b*] chromen-11-yl ester (**B**).....20

Scheme 8 Synthesis of 4-Amino-1-(12a-hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a,12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yl)-1*H*-pyridine-2-one (**B1**) 21

Page

Scheme 9 Synthesis of 1-(12a-Hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a, 12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yl)-5-methyl-1*H*-pyrimidine-2,4-dione (**B2**)..... 22

Scheme 10 Synthesis of 1-(12a-Hydroxy-2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,6a, 12,12a-tetrahydro-chromeno [3,4-*b*] chromen-11-yl)-1*H*-pyridine-2,4-dione (**B3**).....22

Scheme 11 Synthesis of Carbonic acid 4-chloro-phenyl ester 2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,12-dihydro-chromeno[3,4-*b*] chromen-11-yl ester (**C**).....23

Scheme 12 Synthesis of Carbonic acid 4-chloro-phenyl ester 2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,12-dihydro-chromeno[3,4-*b*] chromen-11-yl ester (**D**).....24

Scheme 13 Synthesis of Carbonic acid 4-chloro-phenyl ester 2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,12-dihydro-chromeno[3,4-*b*] chromen-11-yl ester (**E**).....25

Scheme 14 Synthesis of Carbonic acid 4-hydroxy-phenyl ester 2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,12-dihydro-chromeno[3,4-*b*] chromen-11-yl ester (**F**).....26

Scheme 15 Synthesis of Carbonic acid 4-amino-phenyl ester 2,3,9-trimethyl-12-oxo-6,12-dihydro-chromeno[3,4-*b*] chromen-11-yl ester (**G**).....27

Scheme 16 Synthesis method for compound **A, A1-A5**.....62

Scheme 17 Synthesis method for compound **B, B1-B3**.....70

Scheme 18 Synthesis method for compound **C-G**.....75

LIST OF ABBREVIATIONS

δ	chemical shift
μL	microliter
μmol	micromole
$[\alpha]_D$	specific rotation
A	adenine
aq	aqueous
br	broad
c	concentration
C	cytosine
calcd	calculated
$CDCl_3$	deuterated chloroform
d	doublet
D_2O	deuterium oxide
DCM	dichloromethane
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	N,N′-dimethylformamide
DMSO-d_6	deuterated dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
equiv	equivalent (s)
g	gram
G	guanine
h	hour
J	coupling constant
Lys	lysine
M	multiplet
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
MeOH	methanol
mg	milligram
MHz	megahertz
min	minute
mL	milliliter

mM	millimolar
mmol	millimole
mp.	melting point
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
°C	celcius degress
ppm	part per million
R_f	retention factor
s	singlet
t	triplet
T	thymine
TLC	thin layer chromatography
T_m	melting temperature
Ts	*p*-toluenesulfonyl (=tosyl)
UV	ultraviolet