



รายงานฉบับสมบูรณ์

การหาโมเลกุลเป้าหมายและการศึกษากลไกการทำงานของยารักษาโรคมาลาเรีย

Antimalarial drug targets: Target identification and mechanistic investigation

รองศาสตราจารย์ ดร. พลังพล คงเสรี และคณะ

ภาควิชาเคมี และศูนย์เพื่อความเป็นเลิศด้านโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานฉบับสมบูรณ์

การหาโมเลกุลเป้าหมายและการศึกษากลไกการทำงานของยารักษาโรคมาลาเรีย
Antimalarial drug targets: Target identification and mechanistic investigation

รองศาสตราจารย์ ดร. พลังพล คงเสรี
ภาควิชาเคมี และศูนย์เพื่อความเป็นเลิศด้านโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณ สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับงบประมาณสนับสนุน ในโครงการวิจัยเรื่อง “การหาโมเลกุลเป้าหมายและการศึกษากลไกการทำงานของยารักษาโรคมะเร็ง”

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการโดย นายสำราญ ปราบภัย นายคมสัน เทียนสมจิตร นายพุทธิพล คงสุข และนางสาว ศรีสุดา ติรกาญจน์ นักศึกษาหลักสูตรดุขุภักดิ์บัณฑิต ที่ร่วมทำงานวิจัยด้วยความมุ่งมั่น ทุ่มเท อดทน ไม่ท้อถอย ต่อปัญหาและอุปสรรคที่ท้าทาย ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ และศาสตราจารย์ ดร. รัชนี อุดมแสงเพชร ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านการทดสอบการออกฤทธิ์ และอนุเคราะห์เชื้อมาลาเรียที่ใช้ศึกษา ในโครงการนี้ ขอขอบคุณ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง tandem mass spectrometer

ขอบคุณหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านหน้าที่การทำงานของโปรตีน และศูนย์นวัตกรรมทางเคมี สำหรับการสนับสนุนด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ รวมทั้งพื้นที่ดำเนินการวิจัย

บทคัดย่อ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรง เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลก มีผู้กักตุนเป็นพาหะ นำเชื้อพลาสโมเดียมมาสู่มนุษย์ ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อนี้ เป็นจำนวนหลายร้อยล้านคน และมีการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากกว่าล้านคนทั่วโลก การรักษาโรคมาลาเรียด้วยยาในกลุ่มอาร์ทีมิซินิน (artemisinin) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก สารนี้ได้จากสารสกัดจากต้น *Artemisia annua* มีกลุ่ม endoperoxide เป็นส่วนสำคัญในการแสดงฤทธิ์ แม้ว่ายังไม่พบว่าเชื้อมาลาเรียติดต่อยาในกลุ่มนี้ แต่การตอบสนองต่อยาลดลง และเวลาที่ใช้ในการกำจัดเชือนานขึ้น ทำให้สถานการณ์ของโรคน่าเป็นกังวลเป็นอย่างยิ่ง แม้ว่าจะมีความพยายามในการหากลไกการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของ artemisinin เพื่ออธิบายถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย แต่ข้อมูลยังมีความสับสนและขัดแย้งกันอยู่มาก ความรู้ที่มีอยู่ในปัจจุบันคือ Fe(II) จะทำให้วง endoperoxide แตกออก เกิดเป็น free radical ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แล้วเกิดปฏิกิริยา alkylation กับโมเลกุลเป้าหมายในเชื้อมาลาเรีย

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายของ artemisinin โดยใช้เทคนิค chemical proteomics โดยนำ synthetic chemical probe ทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียจากนั้นจึง conjugation กับ magnetic nanomaterials เพื่อแยก artemisinin-binding protein ออกจากโปรตีนส่วนใหญ่ที่ไม่ทำปฏิกิริยา chemical probe ที่ใช้ เป็นสารอนุพันธ์ของ artemisone มีค่า IC_{50} ต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* K-1 (multi-drug resistance strain) ประมาณ 1 nM เมื่อนำ chemical probe นี้ไปทำปฏิกิริยากับเชื้อ *P. falciparum* ในระยะ late trophozoite/early schizont แล้วแยกออกด้วย magnetic nanobeads ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/tandem mass spectrometry พบว่า chromatogram ที่ได้มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้สามารถได้โปรตีนที่จับกับ artemisinin probe (artemisinin-binding protein) จำนวนประมาณ 10 ชนิด แม้ว่าจะยังไม่ทราบรายละเอียดการออกฤทธิ์ของ artemisinin อย่างชัดเจน ข้อมูลที่ได้เป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญ ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของยา ในวงจรชีวิตที่ซับซ้อนของเชื้อมาลาเรีย นอกจากนี้การพัฒนาเทคนิคทางเคมีเชิงชีววิทยา (chemical biology) เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับโมเลกุลได้มีความก้าวหน้า และมีความสำเร็จอย่างน่าพอใจ

Abstract

Malaria, one of the most serious infectious diseases, is a major public health problem. Female anopheles mosquitoes are a carrier for human malaria. Almost half of the world's population is at risk with over a million deaths reported annually. Chemotherapy for malaria has become less effective due to drug-resistance problem except with artemisinin. However, with its prolonged parasitic clearance time, a serious concern for its resistance has been raised. Artemisinin (qinghaosu) is a bioactive sesquiterpene lactone isolated from the Chinese herb *Artemisia annua*. The endoperoxide moiety is critical for its potent antimalarial activity. It has been known that a cleavage of the endoperoxide by Fe(II) is necessary to generate reactive radical intermediates. Its exact mechanism of antimalarial action as well as its binding molecular receptors has remained elusive.

The aim of this investigation was to identify biomolecules that interact with artemisinin that could become its potential molecular targets. Synthesis of artemisinin derivatives as reactive chemical probes led to an artemisone-typed compound with an IC_{50} of 1 nM against multi-drug resistance *Plasmodium falciparum* K-1 strain. This chosen chemical probe was incubated with parasite-infected red blood cells in the late trophozoite/early schizont stage. Upon the hemolysis, the parasite proteome was reacted with functionalized magnetic nanoparticles to enrich the reacted proteomes. Comparative MS chromatogram of the trypsinized peptide fragments with control experiments gave additional peaks of the enriched proteomic samples. Further *de Novo* sequencing results suggested about 10 artemisinin-binding proteins with good ranking scores. Among the identified protein, hemoglobin and SERCA have been known to interact with artemisinin but they are not directly related to its antimalarial action. Other molecules will be investigated for its relevance. Validation of these biomolecules as artemisinin's molecular target will be further carried out and their biological relevance in the killing mechanism of artemisinin will be evaluated. Although the exact mechanism of action of artemisinin has yet to be confirmed, the information provided from this chemical biology investigation has narrowed down the list of its potential molecular targets. The information will be useful to malarial researchers and will greatly benefit the development of antimalarial chemotherapy.

แบบสรุปโครงการวิจัย Executive Summary

สัญญาเลขที่	BRG5080008		
ชื่อโครงการ	การหาโมเลกุลเป้าหมายและการศึกษากลไกการทำงานของยารักษาโรคมาลาเรีย		
หัวหน้าโครงการ	นายพลังพล คงเสรี	หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์	02-201-5190	อีเมล	scpks@mahidol.ac.th

ความสำคัญ/ความเป็นมา

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรง เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลก โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน ส่งผลกระทบอย่างมากทั้งทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศกำลังพัฒนา โรคมาลาเรียมียุงก้นปล่องเป็นพาหะ นำเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) มาสู่มนุษย์ ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อนี้ เป็นจำนวนหลายร้อยล้านคน และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากกว่าล้านคนทั่วโลก ยารักษาโรคมาลาเรียชื่ออาร์ทีมิซินิน (*artemisinin*) เป็นสารจากธรรมชาติได้มาจากการสกัดสมุนไพร *Artemisia annua* อาร์ทีมิซินินเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene lactone มีกลุ่ม endoperoxide เป็นส่วนสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ แม้ว่ายังไม่พบว่ามีฤทธิ์ของเชื้อมาลาเรียต่อยาในกลุ่มนี้ แต่มีการรายงานว่าเชื้อมีการตอบสนองต่อยาลดลง และใช้เวลากำจัดเชื้อมานานขึ้น กลไกการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของ artemisinin เริ่มต้นจากการแตกออกของวง endoperoxide หลังจากทำปฏิกิริยากับ Fe(II) ใน heme หรืออาจเป็น non-heme Fe(II) เกิดเป็น free radical ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยเชื่อว่าจะเกิดการ alkylation กับโมเลกุลเป้าหมายในเชื้อมาลาเรีย แม้ว่าจะมีความพยายามในการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงฤทธิ์ของยา artemisinin แต่ข้อมูลยังมีความสับสนและขัดแย้งกันอยู่มาก

จุดประสงค์ของโครงการ

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายของยารักษาโรคมาลาเรียในกลุ่ม endoperoxide artemisinin โดยใช้เทคนิค chemical proteomics โดยนำ synthetic chemical probe ทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียจากนั้นจึง conjugation กับ fluorescent dye หรืออาจจะแยกโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ chemical probe ออกมาด้วย magnetic nanomaterials โดยใช้ปฏิกิริยาเคมี bioorthogonal conjugation ที่มีความจำเพาะสูง

ผลการวิจัย

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์ของ artemisinin ที่ถูกออกแบบและสังเคราะห์ chemical probe ของ artemisinin ที่นำไปใช้ศึกษาต่อในระดับเซลล์เป็นสารอนุพันธ์ของ artemisone ที่มีกลุ่มอัลไคน์ เนื่องจากมีความคงตัวดีกว่าสารในกลุ่ม azide โดยสารที่เลือกใช้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* K-1 (multi-drug resistance strain) ดีกว่า artemisinin ประมาณ 10 เท่า และมี

คุณสมบัติการละลายน้ำดี เหมาะกับการนำไปใช้ในการทดลองกับเซลล์ จากการศึกษาโครงสร้างของสารอนุพันธ์ที่สนใจด้วยเทคนิค single-crystal X-ray crystallography พบว่ากลุ่มที่เพิ่มเข้าไปจะไม่เกาะกับกลุ่ม endoperoxide ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบกับสารอนุพันธ์ที่มีกลุ่มแทนที่อยู่ใกล้กับกลุ่ม endoperoxide จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำลงอย่างมาก

Chemical probe ที่เลือกใช้ ได้ทดสอบในการทำปฏิกิริยา conjugation กับ fluorogenic compound ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ดี และมีศักยภาพในการนำไปศึกษาต่อในระดับเซลล์ อนุพันธ์เรืองแสงของ artemisinin ที่ได้จากการ conjugation ระหว่าง alkynated artemisinin กับ 3-azidocoumarin มี emission wavelength ประมาณ 480 nm ข้อมูล nuclear magnetic resonance (NMR) แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม endoperoxide ของ artemisinin ไม่ได้ถูกทำลายในสภาวะของการเกิดปฏิกิริยาที่มี copper(II) ions และแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะติดตาม artemisinin probe ในระดับเซลล์ การศึกษาเบื้องต้นในการติดตามโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ chemical probe ด้วยสารเรืองแสงพบว่า โปรตีนที่ถูกติดฉลากคือฮีโมโกลบินที่เป็น primary target มีปริมาณมาก ทำให้ไม่สามารถติดตามโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้เนื่องจากข้อจำกัดของ dynamic range ในการวัด แผนการวิจัยถูกปรับปรุงโดยการนำ nanomaterial มาประยุกต์ใช้

Iron-oxide functionalized magnetic nanoparticles จะใช้ในการแยกโปรตีน (trapping) ที่ทำปฏิกิริยากับ artemisinin chemical probe ออกจาก unreacted proteome และทำให้โปรตีนที่มีปริมาณน้อยเข้มข้นขึ้น (enrichment) เพื่อเรียนรู้เกี่ยวกับเทคโนโลยีด้าน nanoparticles จึงได้สังเคราะห์ magnetic nanoparticles ที่ตรึงด้วย methotrexate และนำไปทดสอบด้วยการจับกับเอนไซม์ dihydrofolate reductase ได้สำเร็จ

เมื่อนำ chemical probe ไปทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ในระยะ late trophozoite/early schizont แล้วแยกออกด้วย magnetic nanobeads หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/tandem mass spectrometry พบว่า chromatogram ที่ได้ต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน เป็นผลจากชนิดของโปรตีนที่จับได้ การวิเคราะห์ต่อเนื่องด้วยเทคนิค MudPIT (multidimensional protein identification technology) เพื่อจำแนกชนิดของโปรตีน ได้ข้อมูลจำนวนมาก และเมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้สามารถได้โปรตีนที่จับกับ artemisinin probe (artemisinin-binding protein) จำนวนประมาณ 10 ชนิด

โดยสรุป การศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายของ artemisinin เพื่อที่จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ ที่ซับซ้อนในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย โครงการวิจัยนี้ได้ประสบความสำเร็จในการแยก และวิเคราะห์โปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ artemisinin probe ได้ประมาณ 10 ชนิด ซึ่งจะเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญ ในการทำให้จำกัดกรอบของความเป็นไปได้ที่จะเข้าใจถึงการออกฤทธิ์ของยาในวงจรชีวิตที่ซับซ้อนของเชื้อมาลาเรีย แม้ว่าโครงการวิจัยนี้จะยังไม่สามารถอธิบายได้ ถึงกลไกการออกฤทธิ์อย่างชัดเจน หรือได้โมเลกุลเป้าหมายของ artemisinin อย่างเจาะจง การพัฒนาเทคนิคทางเคมีเชิงชีววิทยา (chemical biology) เพื่อศึกษากลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้มีความก้าวหน้า และมีความสำเร็จที่น่าพอใจ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์/หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และใช้ประโยชน์ด้านใด

-ทางวิชาการ ความรู้เกี่ยวกับโมเลกุลเป้าหมายของยานี้ จะสามารถต่อยอดด้วยการศึกษาโครงสร้าง สามมิติของ artemisinin-binding protein และอาจนำไปสู่ structure-based drug design และ target-based assay ต่อไป

การประชาสัมพันธ์

1. สิ่งพิมพ์ทั่วไป -
2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องจำนวน 4-5 เรื่อง ดังเอกสารแนบท้าย

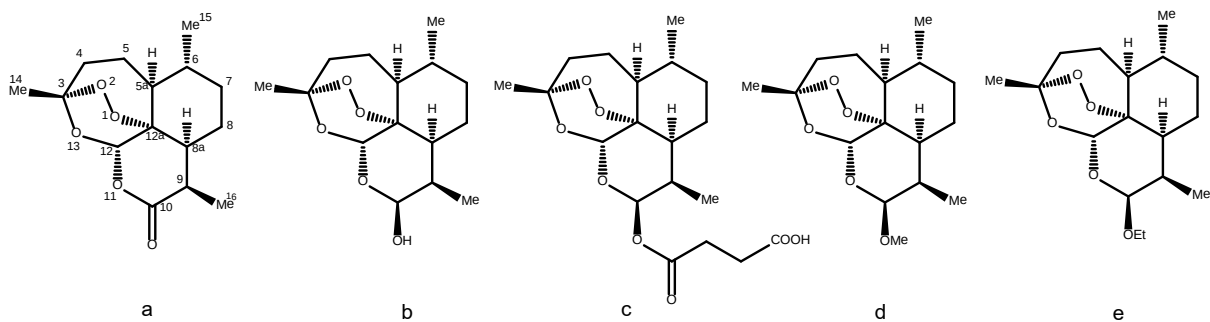
สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทสรุปผู้บริหาร	iv
สารบัญเรื่อง	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ผลการวิจัย	4
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของอาร์ทีมิซินิน	4
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	10
การสังเคราะห์สารเรืองแสงเพื่อใช้ในการติดตาม	11
การสังเคราะห์อนุพันธ์เรืองแสงของอาร์ทีมิซินิน	13
การสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กระดับนาโนเมตร และการทดสอบการนำไปใช้	14
อนุภาคนาโนที่มีคุณสมบัติแม่เหล็ก และมีผิวตรึงด้วย methotrexate	15
ปฏิกิริยา: artemisinin probe และ <i>P. falciparum</i> -infected erythrocytes	18
สรุปและวิจารณ์ผล	21
เอกสารอ้างอิง	23
ผลผลิตและกิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง	25

1. บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่ร้ายแรง เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลกที่แพร่ระบาดมากโดยเฉพาะประเทศในเขตร้อน โรคนี้มีผู้กักกันป้องกันเป็นพาหะนำเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) มาสู่มนุษย์ ในแต่ละปีมีการประมาณว่าในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อนี้เป็นจำนวนหลายร้อยล้านคนและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากกว่าล้านคนทั่วโลก (โดยเฉพาะอย่างยิ่งเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีในทวีปแอฟริกา) (1, 2) ดังนั้นโรคมาลาเรียจึงก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากทั้งทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศกำลังพัฒนาในเขตร้อนที่มีฐานะยากจนอยู่แล้ว การดื้อของเชื้อมาลาเรียต่อยาคลอโรควิน (chloroquine) และไพริเมธามีน (pyrimethamine) ทำให้ปัญหาของโรคมาลาเรียรุนแรงขึ้น (3, 4) ในขณะที่การรักษาจากการสังเคราะห์รวมถึงวัคซีนป้องกันโรค ส่วนใหญ่ยังอยู่ระหว่างการศึกษาพัฒนาและอยู่ในขั้นตอนทดสอบทางคลินิก (5, 6)

ยารักษาโรคมาลาเรียชื่อว่า อาร์ทีมิซินิน (artemisinin) หรือ ชิงเฮาซู (qinghaosu) เป็นสารจากธรรมชาติได้มาจากการสกัดสมุนไพรจีน *Artemisia annua* (Qinghao หรือ sweet wormwood) (7) มีบันทึกนานกว่า 2000 ปีว่าได้นำต้นชิงเฮาซูมาใช้ในการลดไข้ แต่การแยกสารที่ออกฤทธิ์และการศึกษาพิสูจน์โครงสร้างเพิ่งจะประสบความสำเร็จในปี ค.ศ. 1972 และ 1979 ตามลำดับ โครงสร้างของ artemisinin เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene lactone มีกลุ่ม endoperoxide ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ artemisinin เป็นยาที่ออกฤทธิ์เร็ว ในการฆ่าเชื้อมาลาเรียที่ดื้อยา โดยสามารถลดปริมาณเชื้อในกระแสเลือดได้กว่า 10^4 เท่า ภายในเวลาเพียง 24-36 ชั่วโมง (8, 9) artemisinin เป็นยาที่มีการละลายไม่ดี ดังนั้นจึงต้องให้ยาโดยการรับประทาน สำหรับ artesunate และ artelinate เป็นอนุพันธ์ที่ละลายน้ำดีขึ้น artemeter และ arteether เป็นอนุพันธ์ที่ละลายได้ใน oil ด้วยยาเหล่านี้เมื่อเข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็น dihydroartemisinin (DHA) ซึ่งเป็นสารที่แสดงฤทธิ์หลัก จนถึงปัจจุบันไม่พบว่ามีกรณีการดื้อของเชื้อมาลาเรียต่อยาในกลุ่มนี้ แม้จะมีการรายงานว่าการดื้อของเชื้อมาลาเรียต่อยาลดลงซึ่งอาจเกิดจากการเกิด mutation (3, 10-12) ยาในกลุ่ม artemisinins นี้มีครึ่งชีวิต (half-life) ที่สั้น ดังนั้นการรักษาจึงมักจะต้องใช้ควบคู่กับยาที่ออกฤทธิ์ได้นานกว่าเช่น mefloquine โดยจะกำจัดเชื้อมาลาเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย (13)

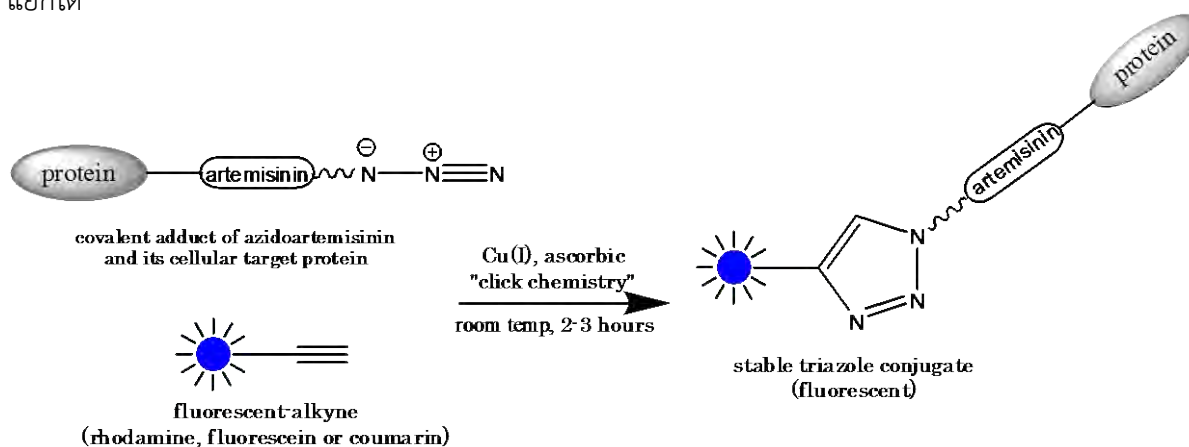


รูปที่ 1 โครงสร้างของ a) artemisinin และสารอนุพันธ์ ได้แก่ b) dihydroartemisinin, c) artesunate, d) artemether, และ e) arteether

กลไกการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความเฉพาะตัวของ artemisinin เกี่ยวข้องกับการแตกออกของวง endoperoxide หลังจากที่เกิดปฏิกิริยากับ Fe(II) ใน heme หรืออาจเป็น non-heme Fe(II) เกิดเป็น free radical ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยในที่สุดเชื่อว่าจะเกิดการ alkylation กับโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์มาลาเรีย (14, 15) ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของยา artemisinin มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะถ้าคำนึงถึงความเป็นไปได้ที่จะเกิดการดื้อยาในกลุ่มนี้ของเซลล์มาลาเรีย ซึ่งอาจเกิดจากการที่เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลที่เป็นเป้าหมาย ทำให้ยามีประสิทธิภาพลดลง หรือเกิดจากการเพิ่มอัตราการขับยาออกนอกตัวเชื้อ แม้ว่าจะมีความพยายามในการศึกษาโปรตีนที่น่าจะมีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแสดงฤทธิ์ของยา artemisinin แต่ข้อมูลยังมีความสับสนและขัดแย้งกันอยู่มาก ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับโมเลกุลเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยามีประโยชน์อย่างมากในการที่จะติดตามและทำนายกลไกการดื้อยาของเซลล์มาลาเรีย นอกจากนี้ความรู้นี้จะยังเป็นประโยชน์ในการออกแบบและพัฒนาการรักษาโรคมาลาเรียที่มีคุณสมบัติในการเอาชนะการดื้อยาของเซลล์มาลาเรียที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในอนาคต

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพิสูจน์หาโมเลกุลเป้าหมาย (cellular drug targets) ของยา artemisinin ในเซลล์มาลาเรีย โดยจะประยุกต์ใช้เทคนิค bioconjugation ที่มีประสิทธิภาพ (efficient) และจำเพาะเจาะจง (selective) เช่น Staudinger ligation (16) หรือ Huisgen reaction (17, 18) ที่เกิดการสร้างพันธะเอไมด์ หรือกลุ่ม triazole ที่เสถียรตามลำดับ ในปัจจุบันเทคนิคการติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ สามารถที่จะติดตามการจับของยากับโมเลกุลเป้าหมาย (receptor) ในแต่ละเซลล์ได้ (19, 20) หลังจากที่เกิดปฏิกิริยาชนิด irreversible ระหว่างสารอนุพันธ์ของ artemisinin กับโมเลกุลของเซลล์มาลาเรีย

alkylated molecules จะถูกติดฉลากด้วย fluorescent dye หรือ biotin เพื่อประโยชน์ในการจำแนก แยก (isolation) และทำการวิเคราะห์พิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) โมเลกุลเป้าหมายของของ artemisinin ที่แยกได้



รูปที่ 2 แสดงปฏิกิริยา Huisgen ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะ เพื่อใช้ในการต่อ fluorescent dye กับกลุ่ม azidoartemisinin หลังจากการเกิดปฏิกิริยาและจับกับ cellular target (หรืออาจใช้ปฏิกิริยา Staudinger ligation ด้วย fluorescent phosphine) โดยโมเลกุลเป้าหมายที่เกิดการ alkylation จะมีเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่นเหมาะสม ทำให้สามารถตรวจสอบ ติดตามและแยกโมเลกุลเหล่านี้เพื่อนำมาวิเคราะห์พิสูจน์ โดยสามารถติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้ถึงต่ำระดับ 10^{-12} mole (picomole)

2. วัตถุประสงค์

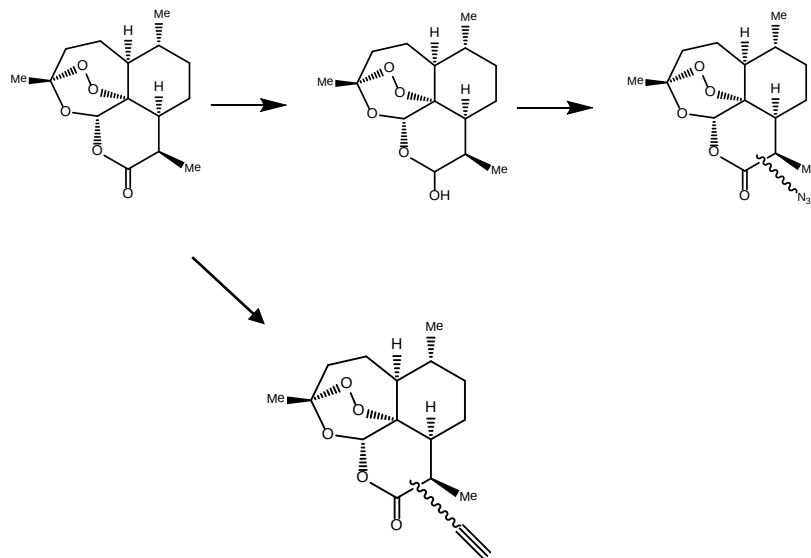
จุดประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือการหาชีวโมเลกุลเป้าหมายในระดับเซลล์ของยา artemisinin โดยใช้เทคนิค bioconjugation ด้วยสารเรืองแสง โดยมีจุดประสงค์เชิงกิจกรรมดังนี้

- 2.1 สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ artemisinin เพื่อใช้เป็น chemical probe
- 2.2 สังเคราะห์สารเรืองแสงที่ใช้สำหรับติดฉลากด้วยเทคนิค bioconjugation โดยจะเป็นกลุ่มของ fluorescein, rhodamine หรือ coumarin
- 2.3 ศึกษาปฏิกิริยาของสารที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 2.1 กับเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย และติดฉลากด้วยสารที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 2.2
- 2.4 วิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากเชื้อมาลาเรียหลังการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง
- 2.5 หาตำแหน่งบนโปรตีนที่เกิดปฏิกิริยากับ artemisinin
- 2.6 สังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กระดับนาโนเมตรเพื่อใช้ในการแยกโปรตีนหลังจากที่ทำปฏิกิริยากับ chemical probe

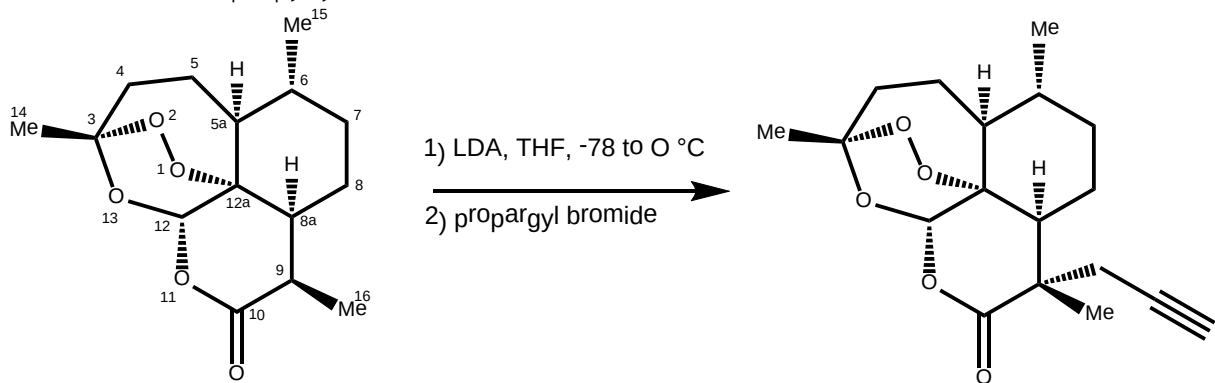
3. ผลการทดลอง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ artemisinin เพื่อใช้เป็น chemical probe

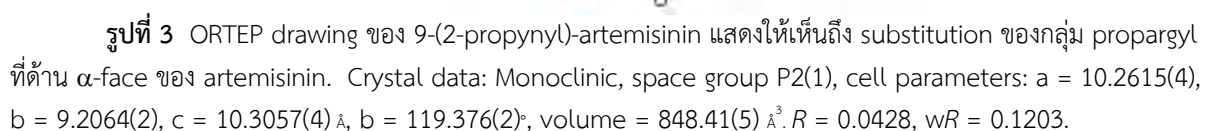
อนุพันธ์ของ artemisinin ซึ่งจะใช้เป็น chemical probe ในการศึกษาในระดับเซลล์นั้น จะออกแบบให้มีกลุ่ม azido หรือ acetylene อยู่ด้วย โดยจากการออกแบบและดำเนินการสังเคราะห์นั้น ได้สารอนุพันธ์ที่จะกล่าวถึงดังนี้



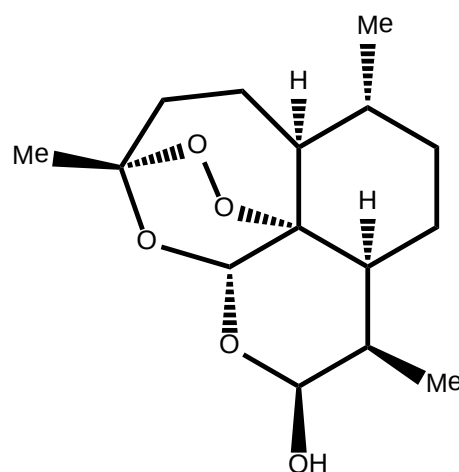
การสังเคราะห์ 9-(2-propynyl)-artemisinin



เมื่อ artemisinin ทำปฏิกิริยากับ lithium diisopropylamide (LDA) ใน tetrahydrofuran ได้ carbanion ที่ตำแหน่ง C-9 แล้วเติม propargyl bromide ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น 9-(2-propynyl)-artemisinin โดยพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR และ X-ray crystallography โครงสร้างผลึกแสดงให้เห็นว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดจากการ alkylation ทางด้าน alpha (endoperoxide face) ของวง artemisinin



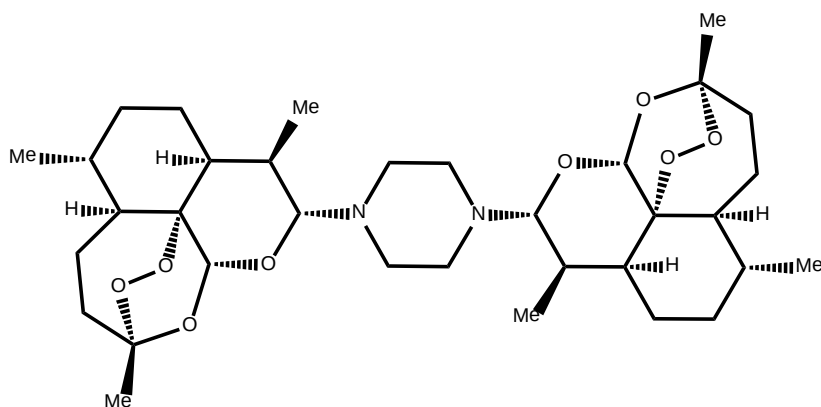
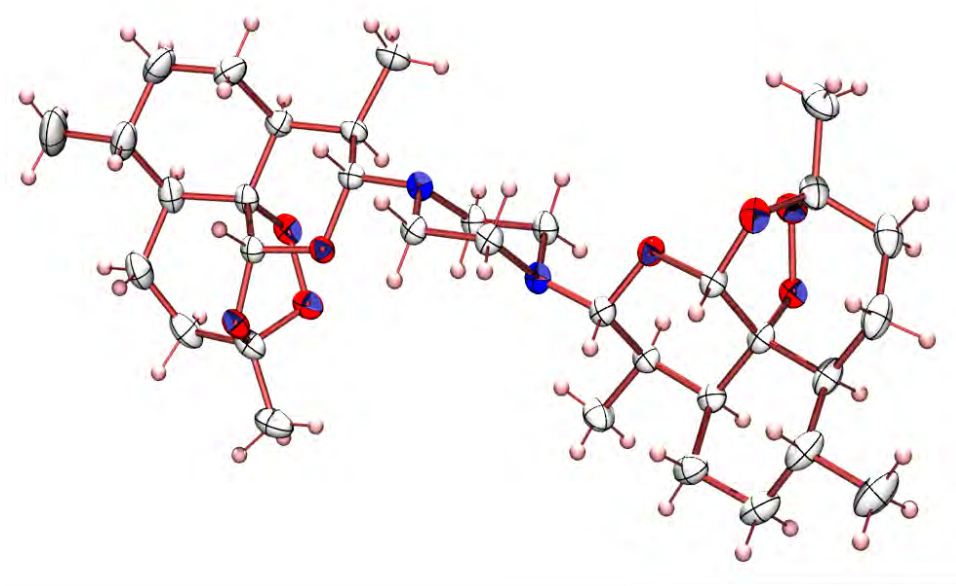
Dihydroartemisinin (DHA) เตรียมได้ด้วยปฏิกิริยารีดักชันจาก artemisinin ด้วย NaBH_4 ใน MeOH หลังจากนั้นทำการตกผลึก DHA ด้วย $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexane}$ เพื่อให้ได้ DHA ที่บริสุทธิ์ และทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR และ X-ray crystallographic analysis



รูปที่ 4 ORTEP drawing ของ β -dihydroartemisinin

Piperazine-bridged DHA dimer

เมื่อ dihydroartemisinin ถูก activated ด้วย TsCl หรือ MsCl และใช้ 1.0 equivalent piperazine เป็น nucleophile พบว่าได้สารผลิตภัณฑ์หลักเป็น dimer ของ DHA โครงสร้างถูกพิสูจน์ทราบด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และการศึกษาโครงสร้างผลึกด้วยเทคนิค X-ray crystallography X-ray crystal data: Orthorhombic. space group $C222_1$, unit-cell parameters: $a = 11.430(3)$, $b = 17.547(14)$, $c = 34.480(11)$ Å. $V = 6916.6(6)$ Å³. Stereochemistry ที่ตำแหน่ง C-10 พบว่าเป็น alpha-anomeric ทั้งสองตำแหน่ง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดผ่าน S_N2 pathway ที่เป็น inversion of configuration displacement ตำแหน่งของ DHA อยู่ในระนาบ equatorial ของวง piperazine และกลุ่ม endoperoxide ของ DHA หันไปในทิศทางเดียวกัน



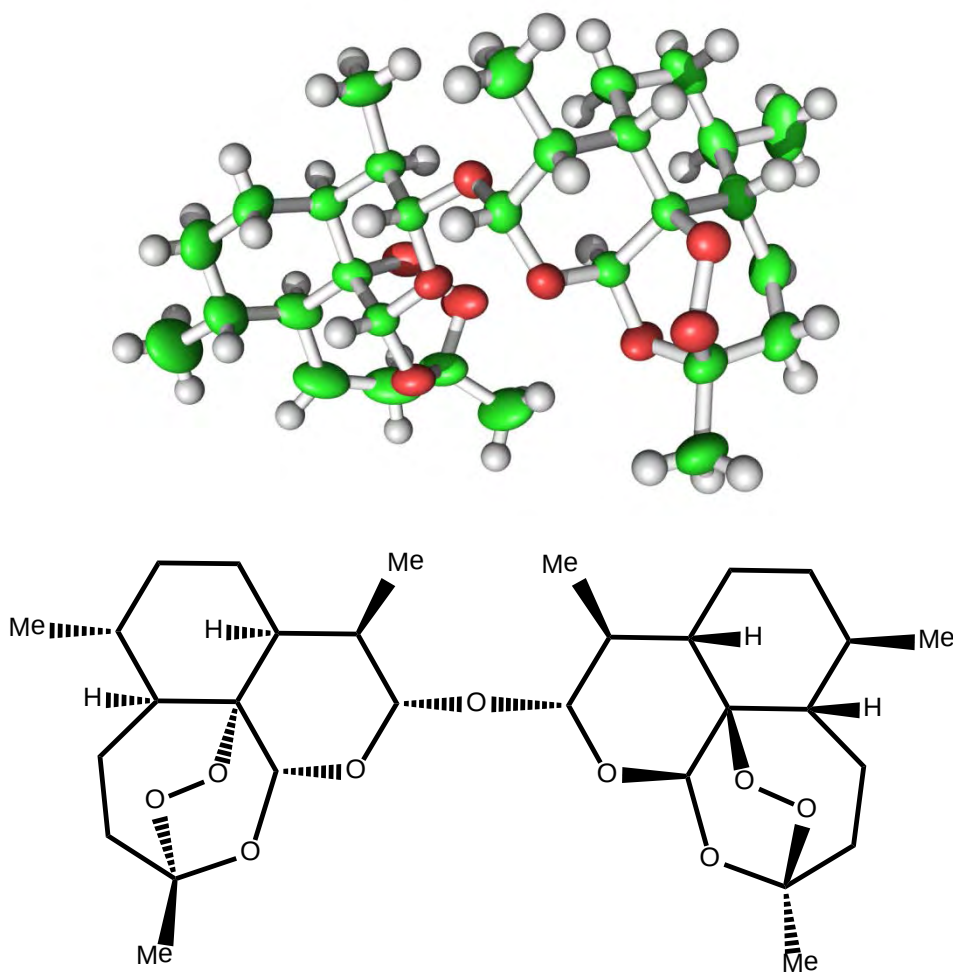
รูปที่ 5 ORTEP drawing of Bis-DHA-piperazine.

การทำปฏิกิริยาโดยใช้ primary amine จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็น dimeric artemisinin ขึ้น โดยมีอนุพันธ์ของ artemisinin ต่อกับกลุ่มอะมิโน เกิดจากปฏิกิริยา dialkylation ได้เป็น tertiary amine

การสังเคราะห์ dimer of α - and β -dihydroartemisinin ether

Dihydroartemisinin เมื่อทำปฏิกิริยากับ Lewis acid เพื่อที่จะทำปฏิกิริยากับ nucleophile ปรากฏว่าสามารถแยกได้ dimer ของ α - and β -dihydroartemisinin ether ดังแสดง X-ray crystal data:

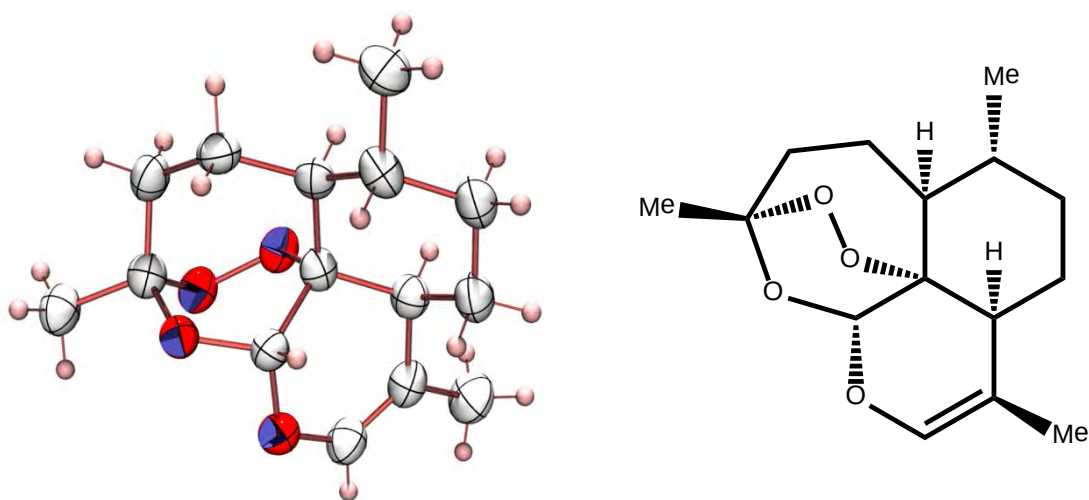
$C_{30}H_{44}O_9$, Monoclinic. space group $P2_1$, unit-cell parameters: $a = 10.3520(3)$, $b = 12.0290(3)$, $c = 12.0800(4)\text{\AA}$, $\beta = 93.413(2)^\circ$, $V = 6916.(6)\text{\AA}^3$, $R = 0.0482$.



รูปที่ 6 ORTEP drawing ของ α - and β -dihydroartemisinin ether dimer

การสังเคราะห์ 9,10-Anhydro-10-deoxoartemisinin

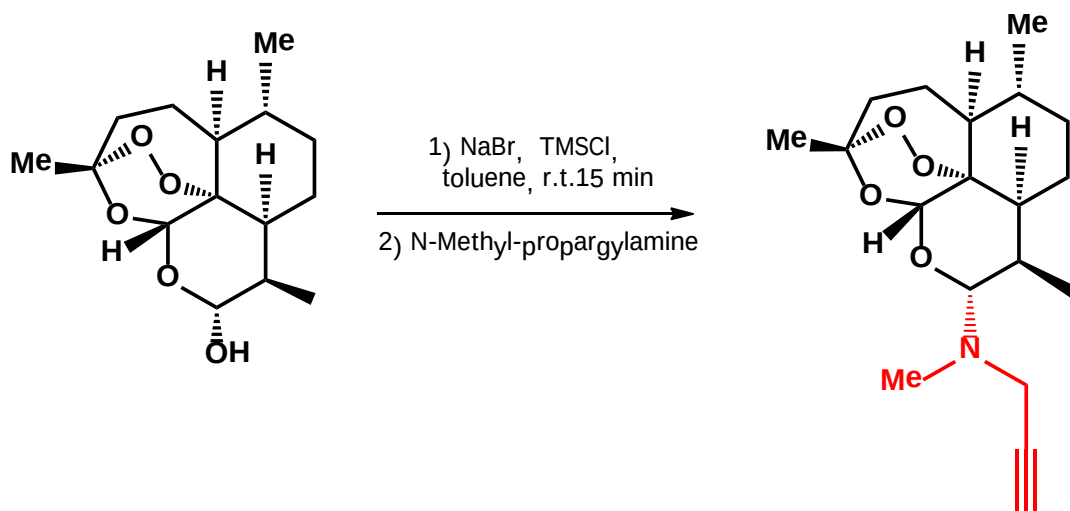
ในสถานะที่ dihydroartemisinin ทำปฏิกิริยากับ TMSCl ในสถานะที่เป็นเบส/nucleophile พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลมาจากปฏิกิริยา dehydration ขึ้น โดยสามารถตกผลึกและศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค X-ray crystallography ดังแสดง. Crystal data: $C_{15}H_{22}O_4$, $M_r = 266.337$, Orthorhombic, space group $P2(1)2(1)2(1)$, cell parameters: $a = 9.021(4)$, $b = 6.234(2)$, $c = 25.146(8)$ Å, $Z = 4$, $V = 1414.1(9)$ Å³



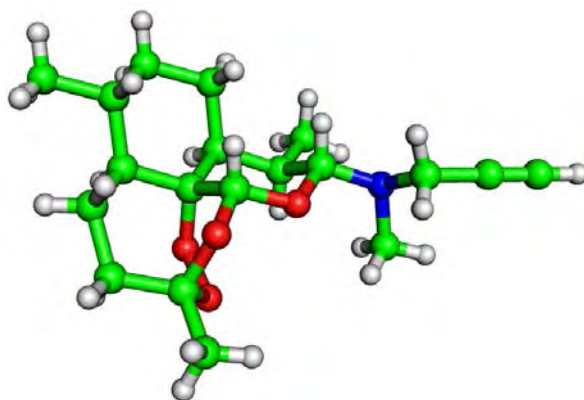
รูปที่ 7 ORTEP drawing of 9,10-Anhydro-10-deoxoartemisinin

การสังเคราะห์ 10-N-methylpropargyl-10-deoxoartemisinin

อนุพันธ์ของ artemisinin ในกลุ่ม artemesone (21) ถูกสังเคราะห์โดย double nucleophilic displacement โดยทำปฏิกิริยาระหว่าง dihydroartemisinin กับ sodium bromide และ trimethylsilylchloride ในโทลูอีน ซึ่งจะได้ 10-bromo-desoxoartemisinin ขึ้น ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยากับ secondary amine ที่ใช้คือ N-methylpropargylamine ได้สารผลิตภัณฑ์ประมาณ 30% yield ในกรณีที่ใช้ primary amine พบว่าสารผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จะได้เป็น dimeric compound



โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยข้อมูล NMR สามารถตกผลึกเพื่อศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค X-ray crystallography ดังแสดง Crystal Data: $C_{19}H_{29}NO_4$, $M_r = 335.4444$, Symmetry Monoclinic, space group C2 , $a = 18.2648(13) \text{ \AA}$, $b = 10.0453(7) \text{ \AA}$, $c = 13.3871(10) \text{ \AA}$, $\beta = 131.642(3)^\circ$, $V = 1835.5(2) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $R = 0.0347$

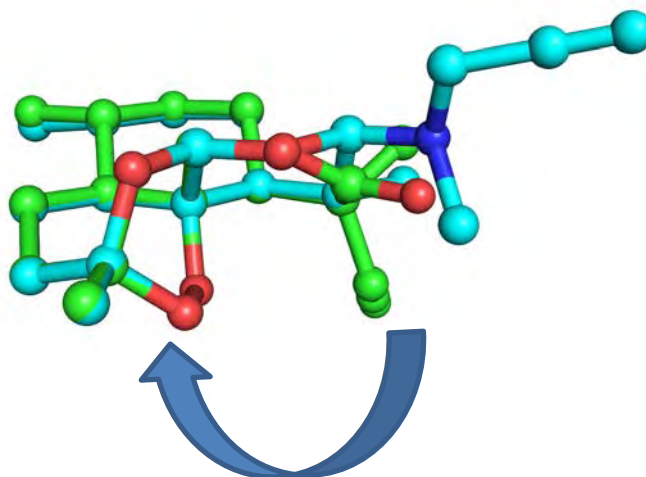


รูปที่ 8 ORTEP แสดงโครงสร้างผลึกของ 10-N-methylpropargyl-10-deoxyartemisinin

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อ *P. falciparum* เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง 9-(2-propynyl)-artemisinin และ 10-*N*-methylpropargyl-10-deoxyartemisinin มีผลดังนี้

Compound	IC ₅₀ (nM)
9-(2-propynyl)-artemisinin	100 ± 7.8
10- <i>N</i> -methylpropargyl-10-deoxyartemisinin	1.1 ± 0.02
dihydroartemisinin	4.2



รูปที่ 9 โครงสร้างของ 9-(2-propynyl)-artemisinin และ 10-*N*-methylpropargyl-10-deoxyartemisinin แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแทนที่ที่ C-9 ทำให้เกิดความเกะกะและลด reactivity ของ endoperoxide

จากข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงให้เห็น alkynated probe ที่เป็นสารอนุพันธ์ของ artemesone มีการออกฤทธิ์ที่ดีกว่า dihydroartemisinin ประมาณ 4 เท่า และดีกว่า 9-(2)-propargyl-artemisinin ประมาณ 100 เท่า เมื่อนำเอาโครงสร้างผลึกของทั้งสองอนุพันธ์มาเปรียบเทียบกันทำให้เห็นว่า จากโครงสร้างที่เป็น chair-like ของวง lactol กลุ่มแทนที่ที่ตำแหน่ง 10 จะอยู่ในตำแหน่งของ equatorial แต่ที่ตำแหน่ง 9 จะอยู่ใน axial conformation และไปอยู่ใกล้กับกลุ่ม endoperoxide ซึ่งอาจทำให้เกิด steric effect ในการที่จะเกิดปฏิกิริยากับ target หรือ receptor ได้ โดยสรุป สาร 10-*N*-methylpropargyl-10-deoxyartemisinin เหมาะสมกับการนำไปใช้เป็น chemical probe ในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อมาลาเรียต่อไป

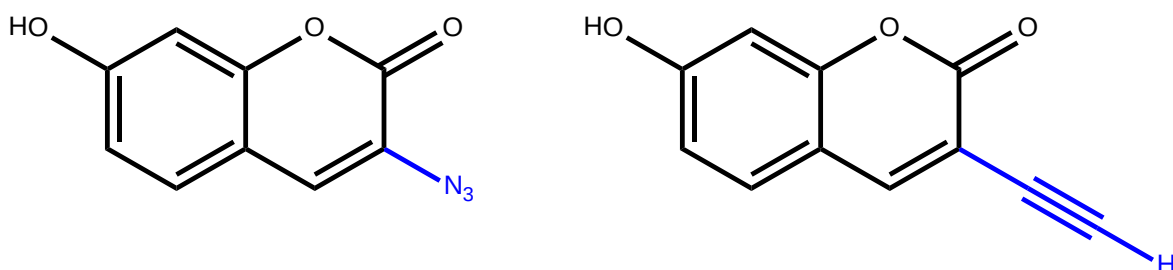
การสังเคราะห์สารเรืองแสงเพื่อใช้ในการติดตาม

เพื่อจุดประสงค์ในการติดตามชีวโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยากับ chemical probe เทคนิคการตรวจวัด/ติดตามด้วยสารเรืองแสงเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง โดยหลังจากที่ chemical probe ทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลแล้ว จึงใช้สารเรืองแสง (fluorescent probe) ที่มี functional group ที่ compliment กับ chemical probe ทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไป เพื่อให้ชีวโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยาเกิดการเรืองแสงและสามารถตรวจวัดได้ต่อไป

ในขั้นนี้ได้เตรียม fluorescent probe จำนวน 2 ชนิด โดยสังเคราะห์ในมีกลุ่ม azide ที่ปลายหนึ่งได้แก่

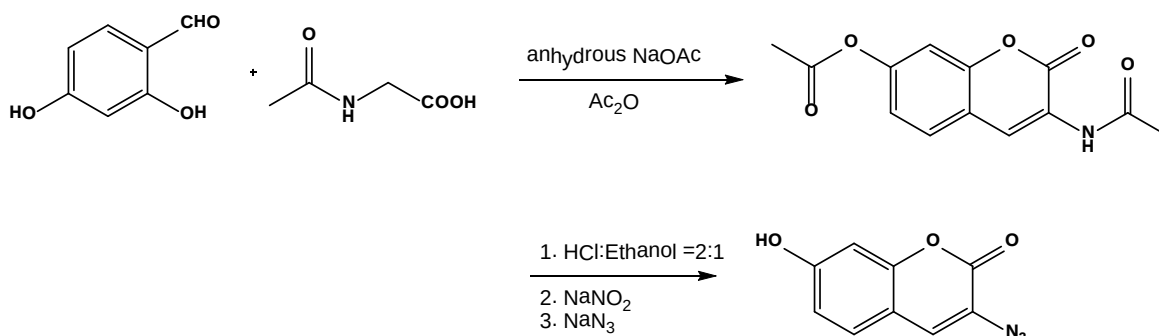
Coumarin-based fluorogenic probe

ได้วางแผนว่า coumarin-based probe ที่จะใช้จะติดด้วยกลุ่ม $-N_3$ หรือ acetylene โดยในขั้นนี้ได้สังเคราะห์ 3-azido-8-hydroxycoumarin เพื่อใช้ในการติดตาม chemical probe ที่มีกลุ่ม acetylene อยู่



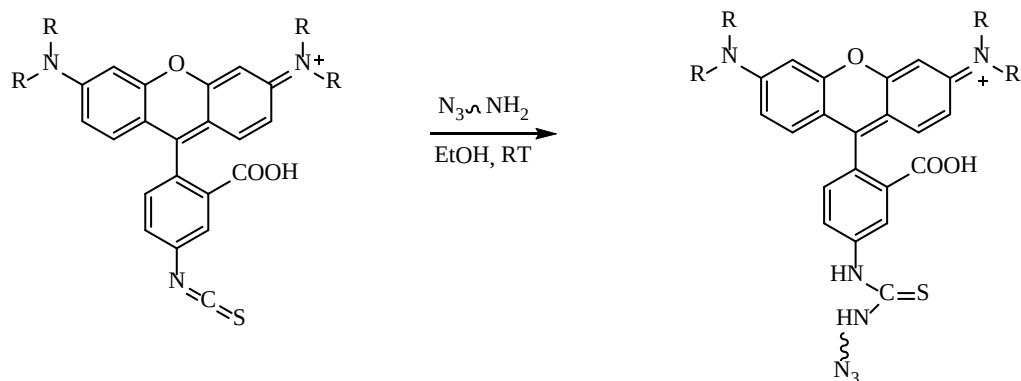
รูปที่ 10 โครงสร้างของ coumarin ที่จะนำไปใช้ (ซ้าย) 3-azido-8-hydroxycoumarin (ขวา) 3-ethynyl-8-hydroxycoumarin

โดยการสังเคราะห์ 3-azido-8-hydroxycoumarin ได้ดังวิธีต่อไปนี้

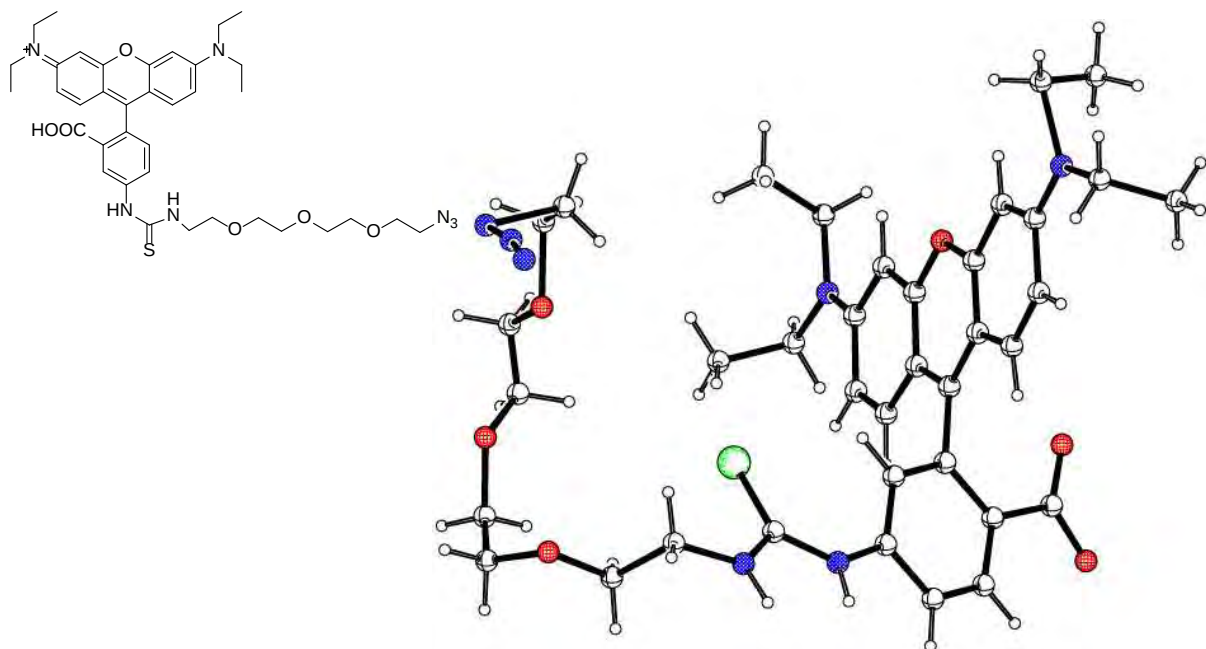


การสังเคราะห์ azido-rhodamine

Azido-rhodamine และ azido-fluorescein สามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่าง thiocyanate derivative ของ fluorescent dye และ azidoamine ที่เหมาะสมดังสมการ



ในกรณีของ azido-rhodamine โครงสร้างได้ถูกพิสูจน์โดยเทคนิค HR-MS (ESI-TOF) โดยมีค่า $m/z = 718.3344$ (M^+) (calculated 718.3381, Chemical Formula: $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}^+$) และ X-ray crystallographic analysis ดังภาพ

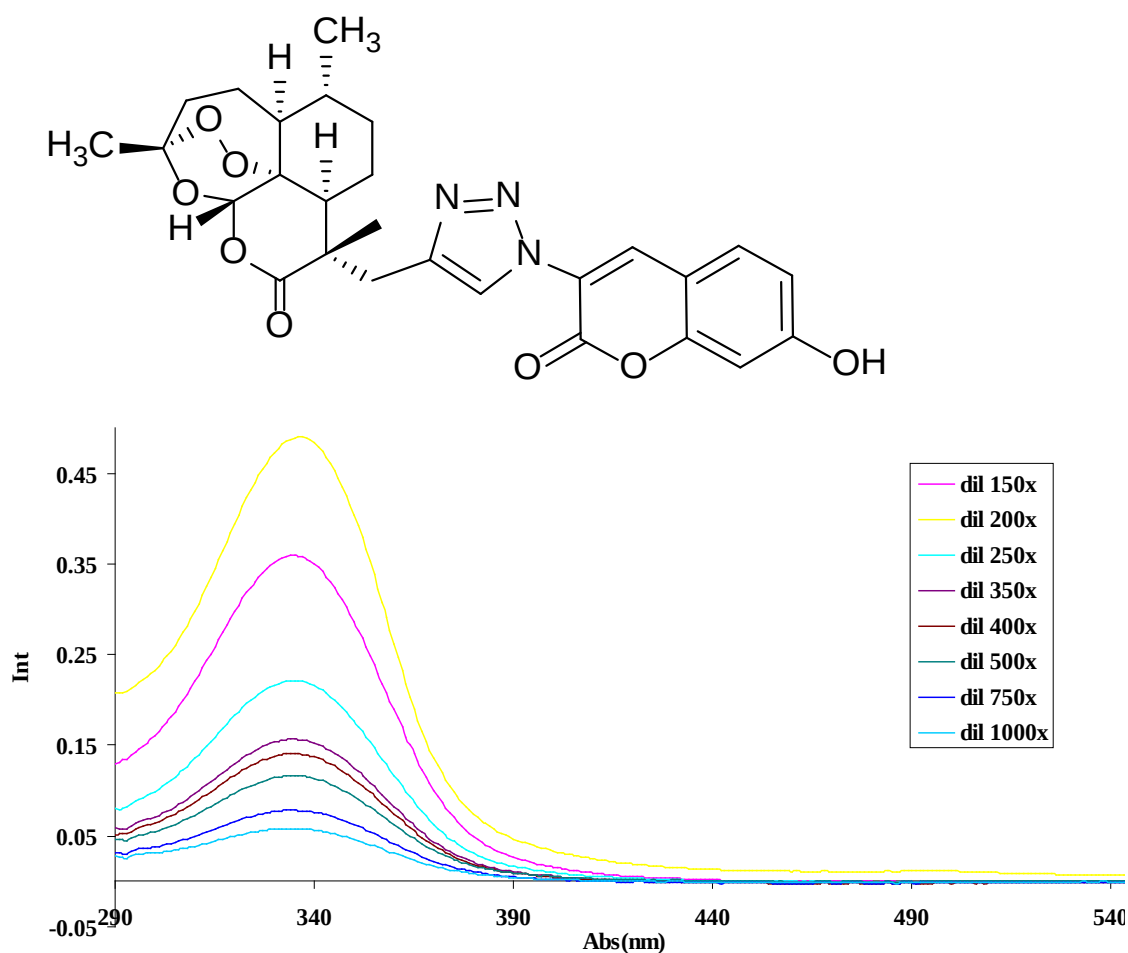


รูปที่ 11 ORTEP drawing ของ azido-rhodamine-EtOH solvate ที่สังเคราะห์ได้ Crystal data: Monoclinic, space group $P2(1)/c$. Unit-cell parameters: $a = 16.5640(6)$, $b = 18.6060(7)$, $c = 15.5990(6)$ Å, $\beta = 105.100(2)^\circ$, $V = 4641.46$ Å³, $R = 0.1506$.

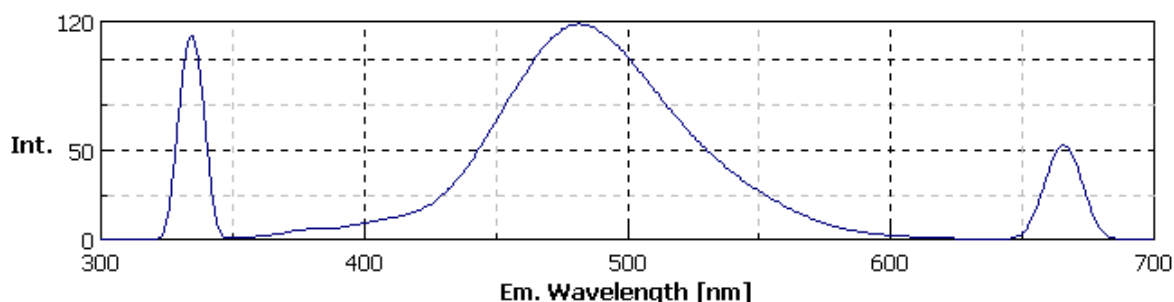
การสังเคราะห์ fluorescent artemisinin

ปฏิกิริยา cycloaddition ระหว่าง 9-ethynyl-artemisinin และ 3-azido-7-hydroxycoumarin (22) ที่สังเคราะห์ได้ ในสภาวะที่มี copper(I) เป็น catalyst ได้ถูกทดสอบ เพื่อยืนยันให้เห็นถึงความเป็นไปได้ ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง chemical probe และ fluorescent dye ด้วยปฏิกิริยา bioorthogonal conjugation Cu(I)-catalyzed Huisgen cycloaddition (17, 18)

อนุพันธ์ของ artemisinin ไม่มี chromophore จึงไม่เรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet จึงไม่สามารถวิเคราะห์ติดตามบน thin-layer chromatography ภายใต้ UV lamp ได้ แต่หลังจากที่ทำปฏิกิริยากับ azido-coumarin จะเกิดเป็นอนุพันธ์ของ artemisinin ที่เรืองแสงภายใต้ UV lamp (366 nm) UV-Vis spectrum แสดงให้เห็นถึง absorption peak ประมาณ 340 nm และให้ fluorescent signal ที่ 490 nm โครงสร้างของ fluorescent coumarin-artemisinin ได้ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR



รูปที่ 12 แสดงโครงสร้างของ fluorescent artemisinin ที่เกิดจาก Cu(I)-catalyzed Huisgen cycloaddition และ UV-Vis spectrum



รูปที่ 13 Fluorescent spectrum ของ coumarin-artemisinin แสดงให้เห็น emission ที่ประมาณ 490 nm (excitation wavelength: 340 nm)

การสังเคราะห์สารอนุพันธ์เรืองแสงของ artemisinin ด้วยปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม azide และ alkyne ด้วยปฏิกิริยา click chemistry ยืนยันถึงปฏิกิริยาที่จะใช้ในกระบวนการ bioorthogonal conjugation ในขั้นตอนต่อไปด้วย

การสังเคราะห์อนุภาคแม่เหล็กระดับนาโนเมตร และการทดสอบการนำไปใช้

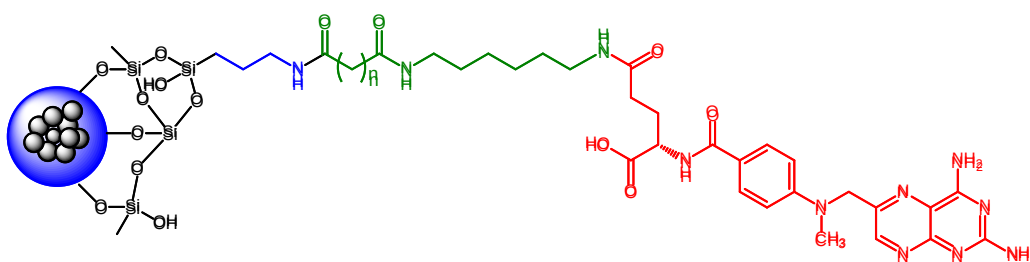
จากผลการศึกษาเบื้องต้น ในการแยกโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ chemical probe หลังจากแยกด้วย SDS-PAGE gel electrophoresis และติดตามด้วยเทคนิคการเรืองแสง พบว่า band ที่ได้คือ hemoglobin ซึ่งเป็น primary target ของ artemisinin โดยไม่เห็น band อื่นที่ชัดเจน แม้ว่าการติดตามปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสงเป็นวิธีที่ sensitive มาก แต่ในกรณีที่มีโปรตีนปริมาณน้อย ยังเป็นปัญหาที่ไม่สามารถสังเกตได้ชัดเจน เนื่องจากจะถูกรบกวนโดยโปรตีนที่มีการจับตัวไม่แน่น แต่มีปริมาณมากทำให้มีการเรืองแสงชัดเจนกว่า ในกรณีนี้ความเข้มข้นของ hemoglobin ในเลือดมีค่าประมาณ 5 mM เทียบกับโปรตีนอื่นที่มีปริมาณน้อยกว่ามากในระดับ pico- (10^{-12}) หรือ femtomolar (10^{-15}) ซึ่งเป็นประเด็นข้อจำกัดเกี่ยวกับ dynamic range ของการตรวจวัด ดังนั้นแผนการวิจัยจึงต้องมีการปรับปรุงวิธีที่จะแยกโปรตีนที่ต้องการศึกษาออกมาจากปฏิกิริยา โดยจะเป็นการประยุกต์ใช้ nanotechnology ของอนุภาคนาโนเมตรที่มีคุณสมบัติแม่เหล็ก เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกโปรตีนที่ต้องการออกมา (capture/ enrichment) อนุภาคนาโนเมตรมีข้อดีกว่า solid support ขนาดไมครอนที่ใช้โดยทั่วไป

เพราะขนาดเล็กกว่ามาก จะมี specific surface area มากกว่า และจะจับกับโปรตีนแบบ non-specific น้อยกว่าด้วย ทำให้มี background ต่ำกว่า (23, 24)

เพื่อเป็นการศึกษาความเป็นไปได้และเพื่อเป็นการเรียนรู้เทคนิคที่จะเป็น ในการนำ nanoparticles technology มาใช้ จึงได้ดำเนินการศึกษาห้วงข้อ้อยู่ในการสร้าง magnetic nanoparticles ที่มี methotrexate (ซึ่งเป็น inhibitor ของเอนไซม์ dihydrofolate reductase -DHFR ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการอยู่แล้ว) โดยจะนำมาทดสอบการจับกับเอนไซม์ DHFR ที่ติดด้วยสารเรืองแสง

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเมตรที่มีคุณสมบัติแม่เหล็ก และมีผิวตรึงด้วย methotrexate

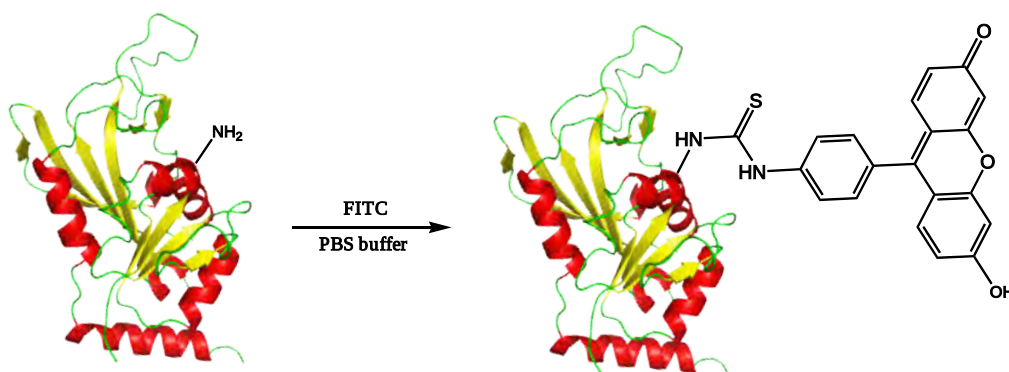
อนุภาคแม่เหล็กระดับนาโนเมตรถูกเตรียมโดยเทคนิค co-precipitation โดยมีอนุภาคของ Fe_3O_4 เป็นแกนที่ถูกเคลือบด้วยชั้นบางของซิลิกาออกไซด์ ที่มีขนาดประมาณ 8-10 นาโนเมตร (จากการศึกษาด้วยเทคนิค powder X-ray diffraction) หลังจากที่ได้เพิ่มกลุ่มที่ใช้เป็น linker หรือ spacer ผิวนอกสุดของ functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) ถูกตรึงด้วย methotrexate (MNP@MTX) ซึ่งเป็น specific inhibitor ของเอนไซม์ dihydrofolate reductase ด้านของ 2,4-diamino-pteridine เป็นกลุ่มที่จับตัวกับ active site ของเอนไซม์ จึงสามารถใช้กลุ่ม carboxylic ในการตรึงกับ nanoparticles ได้ โดยที่ยังคงความสามารถในการจับกับเอนไซม์เป้าหมาย



การวิเคราะห์ปริมาณของ methotrexate (MTX) บนผิวของ magnetic nanoparticles พบว่ามีประมาณ 1.8 ไมโครกรัม (หรือประมาณ 4 นาโนโมล) ต่อมิลลิกรัมของ MNP@MTX โดยใช้เอนไซม์ proteinase K ในการไฮโดรไลซิสพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมระหว่าง MTX กับ MNPs วัดปริมาณ MTX ที่ถูกปล่อยออกมาในสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

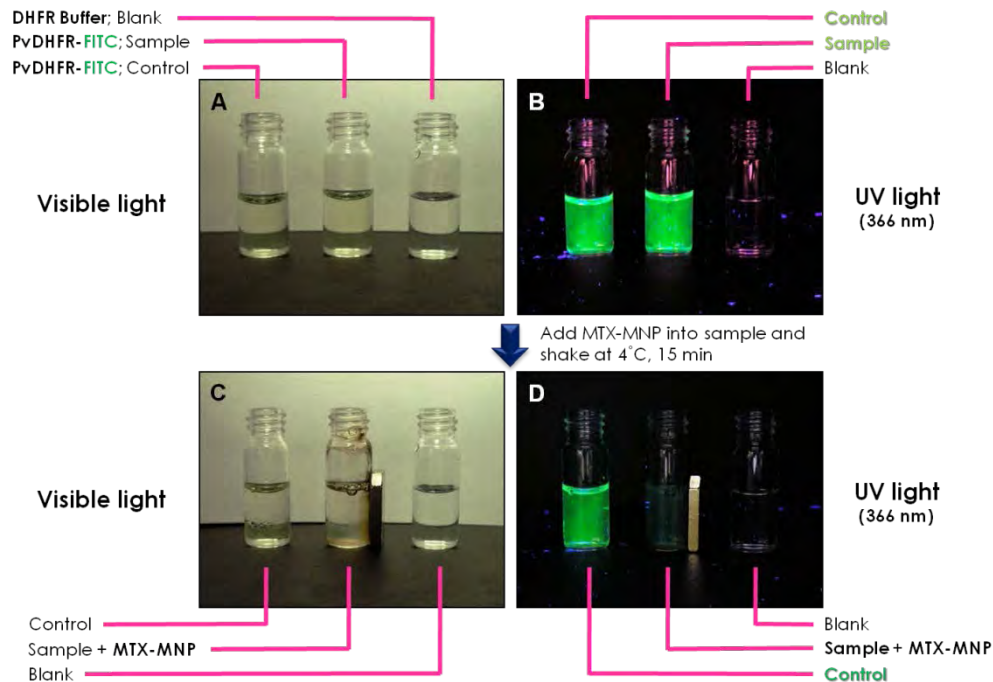
การทดสอบการจับกับเอนไซม์ DHFR ของ MNP@MTX

การทดสอบความสามารถในการจับกับเอนไซม์เป้าหมาย (dihydrofolate reductase, DHFR) ของ methotrexate-functionalized magnetic nanoparticles (MNP@MTX) เพื่อเป็นการทดสอบอย่างชัดเจนที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นการใชเอนไซม์ *Plasmodium vivax* DHFR ที่ติดด้วย fluorescein โดยใช้ *P. vivax* DHFR ทำปฏิกิริยากับ fluorescein isothiocyanate (FITC) โดยจะเกิดปฏิกิริยากับกลุ่ม lysine ที่อยู่บนผิวนอกของโมเลกุล เกิดพันธะ thiourea ขึ้น สำหรับ fluorescent dye ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาแยกออกโดยใช้ P-10 desalting column ด้วยหลักการ size exclusion chromatography



รูปที่ 14 การติดสารเรืองแสงกับโปรตีน dihydrofolate reductase โดยการใช้ fluorescein isothiocyanate PvdHFR-FITC conjugate มี emission ที่ประมาณ 520 nm (excitation wavelength: 495 nm)

โปรตีน DHFR-FITC เรืองแสง ให้แสงที่ความยาวคลื่น 518-520 นาโนเมตร ($\lambda_{\text{emission}}$) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร ($\lambda_{\text{excitation}}$) PvdHFR-FITC ที่ได้มีการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (หรือสามารถใช้หลอด black light) ได้โดยเรืองแสงเป็นสีเขียว โดยด้วยตาเปล่า ภายใต้แสงปกติขาว จะเห็นเป็นสารละลายใสไม่มีสี โปรตีนที่เรืองแสงที่ได้นี้จะสามารถใช้แสดงให้เห็นการจับตัวกันกับโมเลกุลของ methotrexate ที่อยู่บนผิวของ magnetic nanoparticles ได้สะดวก และชัดเจน



รูปที่ 15 การทดลองใช้ MNP@MTX ในการศึกษา affinity binding กับโปรตีน PvDHFR-FITC ที่เรืองแสง ภาพ A+C เป็นภาพถ่ายภายใต้แสงปกติ และภาพ B+D เป็นภาพถ่ายภายใต้แสงยูวี (λ 366 nm)

จากภาพด้านบนแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความสามารถในการจับโปรตีน DHFR ของอนุภาคนาโนเมตรที่มีคุณสมบัติแม่เหล็กที่มีผิวนอกเป็นกลุ่ม methotrexate ภายใต้แสงสีม่วงที่กระตุ้นให้สารละลายที่มีโปรตีน DHFR-FITC (30 ไมโครกรัม) อยู่มีการเรืองแสงทำให้สารละลายเป็นสีเขียว และเมื่อนำ MNP@MTX ประมาณ 5 มิลลิกรัม ไปผสม เขย่าเบาๆ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 15-30 นาที หลังจากที่น่าแม่เหล็กแรงสูงชนิด neodymium มาวางไว้ที่ข้างขวด ภายในเวลา 1 นาที จะเป็นอนุภาคสีเข้มของ MNP@MTX ถูกดูดติดกับข้างขวด และเมื่อสังเกตสีของสารละลายภายใต้แสงยูวี พบว่าการเรืองแสงของสารละลายที่เกิดจากโปรตีนหายไป ไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าชัดเจน การทดลองนี้ใช้ magnetic nanoparticles ที่มีผิวเป็น $-NH_2$ เป็น negative control และไม่พบการเรืองแสงหายไป

การทดลองขั้นนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถสร้าง magnetic nanoparticles และสามารถตรึงกลุ่มที่ต้องการบนผิวของวัสดุได้ เทคนิคนี้จะประยุกต์ใช้กับการสร้างผิวของ nanoparticles ที่สามารถใช้จับกับ chemical probe หลังจากที่ทำปฏิกิริยากับเชื้อที่ต้องการศึกษา เพื่อจุดประสงค์ในการแยกเอาโมเลกุลที่ต้องการออกจากส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งจะช่วยลดผลจากโปรตีนที่มีปริมาณมากในเซลล์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry ในการทำ protein identification

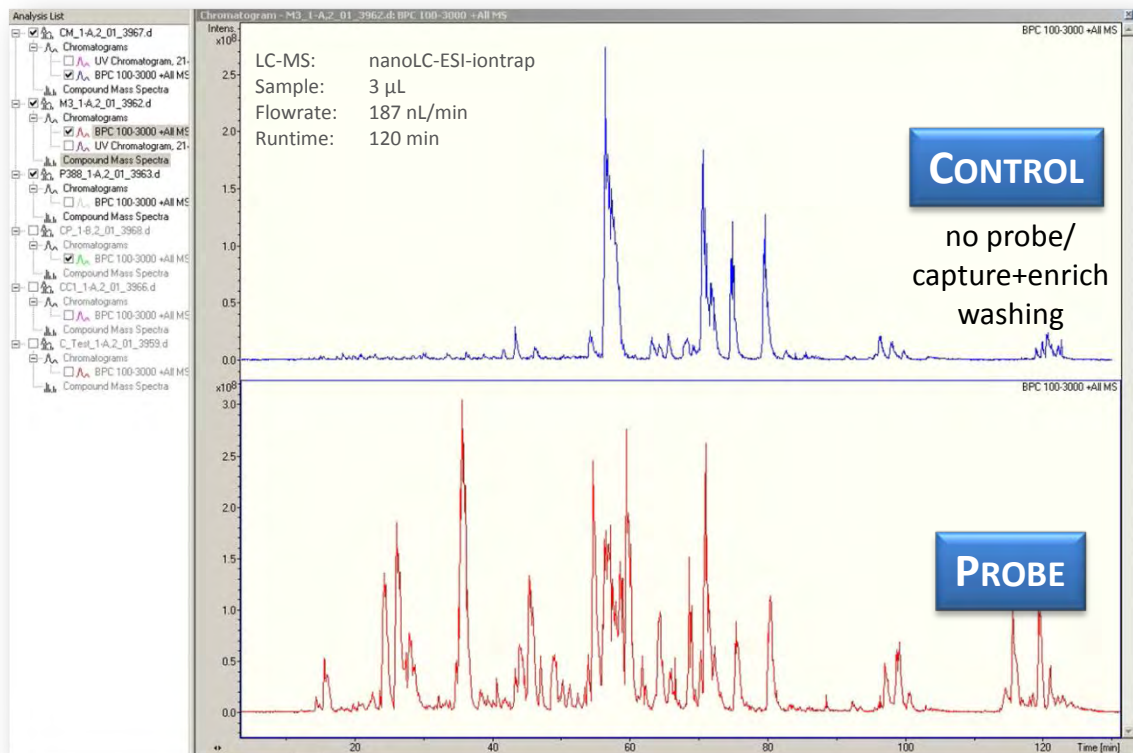
ปฏิกิริยาระหว่าง artemisinin chemical probe และ *P. falciparum*-infected erythrocytes

แยกเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อในระยะ late trophozoite (*P. falciparum*-infected erythrocytes) โดยหลังจากการทำ hemolysis แล้วจึงแยกส่วนของโปรตีนจากเม็ดเลือดแดงออกด้วยวิธีปั่นแยก (centrifuge) ส่วนของเชื้อมาลาเรียที่ได้นำมาทำให้แตกด้วยวิธี freeze-and-thaw โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ส่วนของ protein lysate จะถูกนำไปใช้ทำปฏิกิริยากับ artemisinin chemical probe (10-*N*-methylpropargyl-10-deoxoartemisinin) ต่อไป

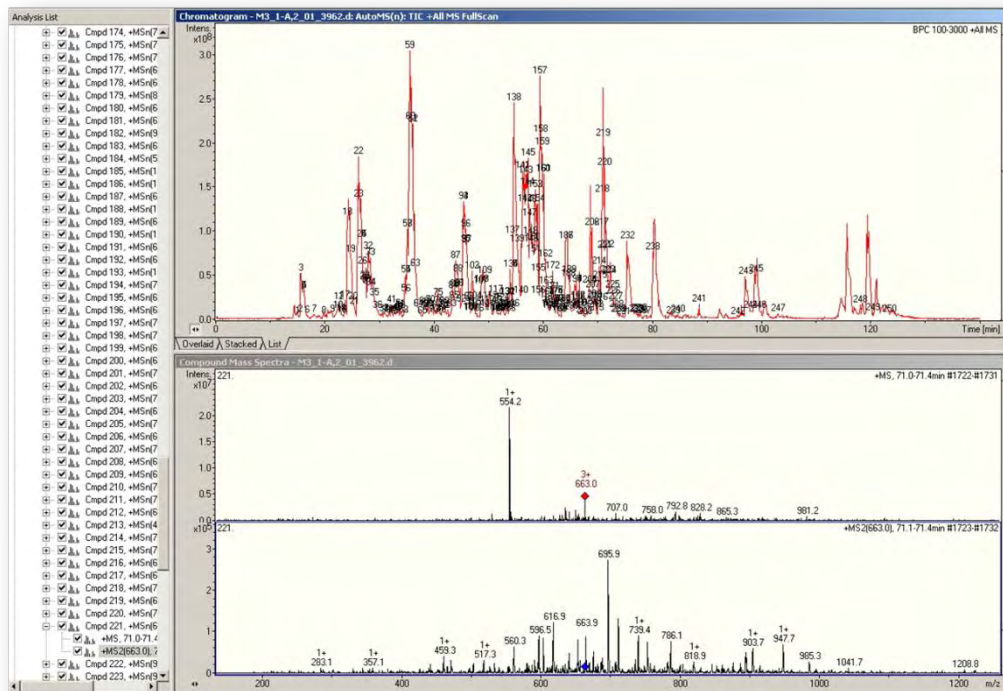
		Control-1	Control-2
Experiment		Bead control	Ligand control
Dihydroartemisinin		x	X (10 เท่า)
Chemical probe	x		x
MNP@N ₃	x	x	x

ในการทดลองใช้ artemisinin chemical probe ที่ความเข้มข้น 100 nanomolar โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยาประมาณ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำปฏิกิริยา conjugation กับ magnetic nanoparticles ด้วย Cu(1)-catalyzed Huisgen reaction จากนั้นจึงล้าง MNPs ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี sodium dodecyl sulfate (SDS) อยู่ด้วย เพื่อชะเอาโปรตีนที่ไม่ได้ติดอยู่กับ nanobeads แบบ covalent ออก เนื่องจากสมมติฐานเริ่มต้นที่ว่า artemisinin ทำปฏิกิริยากับ protein target แบบ irreversible เพื่อเป็นการเปรียบเทียบและพิสูจน์ถึง specific interaction โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม control-1 ที่นำ MNP@N₃ ทำปฏิกิริยากับ protein lysate หลังจากล้างออก ไม่ควรมีโปรตีนติดอยู่ หรือที่ติดอยู่จะเป็น non-specific protein ส่วนกลุ่ม control-2 นั้น ใช้ dihydroartemisinin ที่ 1 micromolar ทำปฏิกิริยากับ protein lysate ประมาณ 60 นาที ก่อนที่จะเติม artemisinin chemical probe ลงไป ในกรณีนี้ สัญญาณที่ได้จะแสดงถึง specific binding protein ซึ่งต้องสัสัญญาณลดลงหรือหายไป

ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นเปรียบเทียบกับ HPLC chromatogram กับกลุ่มควบคุม พบว่าในกรณีที่ใช้ chemical probe สามารถแยกได้โปรตีนที่ติดตามสัญญาณได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มควบคุมมีสัญญาณน้อย ชนิดกว่ามาก ผลการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนในกลุ่มควบคุมพบว่าเป็นโปรตีนที่ปนเปื้อนจากการทดลองเช่น keratin และ trypsin ที่ใช้ สัญญาณที่ได้จาก base-peak chromatogram น่าจะเป็นผลจาก artemisinin-binding protein โดยจะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MudPIT ต่อไป (25, 26)

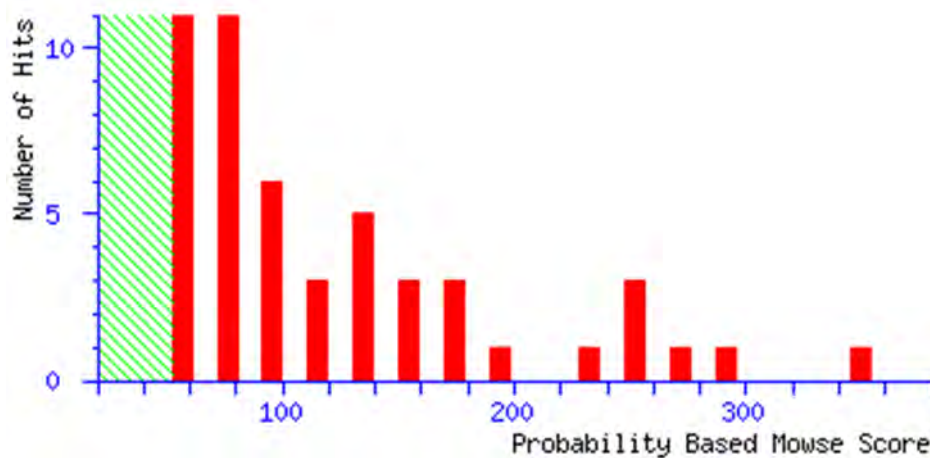


รูปที่ 16 Base-peak chromatogram (all MS) ของ enriched malarial proteome ที่ติดบน functionalized magnetic nanoparticles โดยกลุ่มควบคุม (บน) มีสัญญาณชนิดของสายเปปไทด์น้อยกว่า การทดลองที่ใช้ artemisinin chemical probe เป็นอย่างมาก สายเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้ จะแสดงถึงชนิดของโปรตีนที่จับกับ artemisinin



รูปที่ 17 Base-peak chromatogram (all MS) ของ enriched malarial proteome ในการทดลองที่ใช้ artemisinin chemical probe ได้สัญญาณชนิดของสายเปปไทด์หลายร้อยชนิด

ข้อมูลที่ได้เมื่อทำ de Novo sequencing โดยใช้โปรแกรม Mascot (27-30) พบว่าได้โปรตีนหลายชนิด หนึ่งในนั้นมี score สูงที่สุดได้แก่ hemoglobin (11% sequence coverage) ซึ่งทราบอยู่แล้วว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับ artemisinin ได้ (31, 32) (แต่ไม่พบใน control experiment) ในการทดลองต่อมาจึงใช้สัญญาณของ hemoglobin ในการเป็น internal standard ไปในตัว และเพื่อ validate วิธีและ parameter ที่เกี่ยวข้อง



รูปที่ 18 จากการทำ de novo sequencing ของข้อมูลจากเทคนิค MudPIT ได้โปรตีนประมาณ 30-40 ชนิด ที่มีค่า scoring function สูงกว่าค่า threshold

จากข้อมูลจากเทคนิค tandem mass spectrometric analysis ได้โปรตีน 10 ชนิดที่วิเคราะห์ได้ โดยมี sequence coverage ดี โปรตีนทั้งหมดมี 10 ชนิด ได้แก่ haemoglobin, EF-1 α , HSP70, knob protein, glycophorin-binding protein, actin, erythrocyte membrane protein, helicase-45 SERCA ATPase, Ser/Thr kinase ที่มีข้อมูลยืนยันชัดเจน เป็นที่น่าสังเกตว่า มีโปรตีน SERCA รวมอยู่ด้วย (33, 34) โดยโปรตีนนี้ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าเป็น artemisinin-binding protein แต่ไม่มี direct evidence ที่แสดงการจับตัวของ artemisinin กับ SERCA และภายหลังได้ถูกพิสูจน์ว่า artemisinin ไม่ได้ยับยั้งการทำงานของ SERCA (35) โปรตีนบางชนิดเป็นโปรตีนที่มีปริมาณสูงอยู่แล้ว เช่น elongation factor, haemoglobin, actin เป็นต้น

การศึกษานี้ แม้ว่าจะยังไม่สามารถเข้าใจได้ถึงกลไกการแสดงฤทธิ์ของอาร์ทีมิซินินอย่างชัดเจน แต่มีโปรตีนที่มีการจับตัวกับ artemisinin probe อยู่เป็นจำนวนไม่มากนัก การทำความเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของโปรตีนที่จำแนกชนิดได้ รวมถึงการหา direct evidence ของการจับตัวของ artemisinin และโปรตีนเหล่านี้ นอกจากนี้เทคนิคของการศึกษาเช่นนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาในอนาคต ถึงกลไกการฆ่าเชื้อมะเร็งของด้วยตัวยานี้ได้

สรุปและวิจารณ์ผล

เป้าหมายของโครงการนี้ที่ต้องการหาโมเลกุลเป้าหมายของ artemisinin โดยใช้เทคนิคทางเคมีเชิงชีววิทยา สามารถที่จะบรรลุผลโดยสามารถวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนประมาณ 10 ชนิดที่จับกับ artemisinin chemical probe ได้ โปรตีนหลายชนิดเช่น hemoglobin, SERCA, หรือ translationally-controlled tumor protein (TCTP) ที่มีการรายงานมาก่อนหน้าว่าเป็นโมเลกุลเป้าหมายของ artemisinin แต่ไม่มีหลักฐานยืนยันในความสัมพันธ์กับกลไกการออกฤทธิ์ ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันถึงประสิทธิภาพและศักยภาพของเทคนิคที่ใช้ในการศึกษานี้

สำหรับ artemisinin-binding protein อื่นๆ ที่ได้จากการอาจจะนำไปสู่ความเข้าใจในการทำงานของ artemisinin ที่ดีขึ้น แม้ว่าจะทราบชนิดของโมเลกุลที่จับกับ artemisinin แต่การเข้าใจถึงความสัมพันธ์ในทางชีววิทยา (biorelevance) เป็นสิ่งที่ต้องดำเนินการวิเคราะห์ต่อไป ในเบื้องต้นด้วยข้อจำกัดด้านเทคนิค จึงวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน ได้จากจำนวนของเปปไทด์จำนวนจำกัด การวิเคราะห์เพิ่มเติมจากข้อมูล tandem MS/MS ของเปปไทด์ที่มีประมานน้อย อาจจะทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องเพิ่มเติมได้ มี

ข้อสังเกตว่าการศึกษาการทำงานของ artemisinin ในเชื้อพลาสโมเดียม มีความท้าทายเป็นพิเศษ เนื่องจากโปรตีนที่มีปริมาณน้อย และทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากเพราะจะมีผลจากโปรตีนที่มีปริมาณมาก โดยจะเห็นได้จากการใช้ fluorescence detection ก่อนหน้านี้ จะได้เพียง hemoglobin ที่ถูกติดตามได้ ทั้งๆ ที่มีโปรตีนชนิดอื่นอยู่ด้วย

ความสำเร็จเบื้องต้นในการบูรณาการความรู้ทางเคมีในการศึกษาทางชีววิทยาของ artemisinin ทำให้ได้ artemisinin-binding protein จำนวนหนึ่ง แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ยังไม่มีความชัดเจนในขณะนี้ การวิเคราะห์และศึกษาเพิ่มเติม เพื่อจะเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรีย ยังจะเป็นสิ่งที่ต้องดำเนินการต่อไป ความเข้าใจในการทำงานของ artemisinin ที่แน่นอน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัยโรคมาลาเรีย ทั้งการพัฒนายา กลไกการออกฤทธิ์จะนำไปสู่ความเข้าใจในการทำงานของเชื้อมาลาเรียที่ซับซ้อนและมีประโยชน์ในการหายารักษาโรคมาลาเรียด้วยเทคนิค target-oriented drug development ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. World Malaria Report 2005. Geneva: WHO; 2005.
2. Marsh K. Malaria disaster in Africa. Lancet. 1998; 924.
3. White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest. 2004; 113(8):1084-92.
4. Farooq U, Mahajan RC. Drug resistance in malaria. J Vector Borne Dis. 2004; 41(3-4):45-53.
5. Enserink M. Source of new hope against malaria is in short supply. Science 2005, 33.
6. Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu FCK, Chollet J, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. Nature 2004, 900-4.
7. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science. 1985; 228(4703):1049-55.
8. Kumar N, Zheng H. Stage-specific gametocytocidal effect in vitro of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res. 1990;76(3):214-8.
9. ter Kuile F, White NJ, Holloway P, Pasvol G, Krishna S. *Plasmodium falciparum*: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. Exp Parasitol. 1993; 76(1):85-95.
10. Yeung S, Pongtavornpinyo W, Hastings IM, Mills AJ, White NJ. Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71(2 Suppl):179-86.
11. Duffy PE, Sibley CH. Are we losing artemisinin combination therapy already? Lancet. 2005; 366(9501):1908-9.
12. van Aghtmael MA, Eggelte TA, van Boxtel CJ. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. Trends Pharmacol Sci. 1999;20(5):199-205.
13. Olliaro PL, Taylor WR. Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant falciparum malaria: A review. J Postgrad Med. 2004; 50(1):40-4.
14. Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. Trends Parasitol. 2001 Mar;17(3):122-6.
15. Bhisutthibhan J, Pan XQ, Hossler PA, Walker DJ, Yowell CA, Carlton J, et al. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. J Biol Chem. 1998;273(26):16192-8.
16. Vocadlo DJ, Hang HC, Kim EJ, Hanover JA, Bertozzi CR. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(16):9116-21.
17. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angew Chem Int Ed Engl. 2001;40(11):2004-21.
18. Kolb HC, Sharpless KB. The growing impact of click chemistry on drug discovery. Drug Discov Today. 2003; 8(24):1128-37.
19. Hegener O, Jordan R, Haberlein H. Dye-labeled benzodiazepines: development of small ligands for receptor binding studies using fluorescence correlation spectroscopy. J Med Chem. 2004; 47(14):3600-5.
20. Hess ST, Huang S, Heikal AA, Webb WW. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. Biochemistry. 2002; 41(3):697-705.
21. Haynes RK, Fugmann B, Stetter J, Rieckmann K, Heilmann HD, Chan HW, et al. Artemisone--a highly active antimalarial drug of the artemisinin class. Angew Chem Int Ed Engl. 2006; 45(13):2082-8.

22. O'Reilly RK, Joralemon MJ, Hawker CJ, Wooley KL. Fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition within the hydrophobic core of a shell cross-linked nanoparticle. *Chemistry*. 2006; 12(26):6776-86.
23. Frimpong RA, Hilt JZ. Magnetic nanoparticles in biomedicine: synthesis, functionalization and applications. *Nanomedicine*. 2010; 5(9):1401-14.
24. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26(18):3995-4021.
25. Schirmer EC, Yates JR, 3rd, Gerace L. MudPIT: A powerful proteomics tool for discovery. *Discov Med*. 2003; 3(18):38-9.
26. Delahunty CM, Yates JR, 3rd. MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques*. 2007; 43(5):563
27. Ramos-Fernandez A, Paradela A, Navajas R, Albar JP. Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. *Molecular & cellular proteomics*. 2008; 7(9):1748-54.
28. Elias JE, Haas W, Faherty BK, Gygi SP. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat Methods*. 2005; 2(9):667-75.
29. Zhen Y, Xu N, Richardson B, Becklin R, Savage JR, Blake K, et al. Development of an LC-MALDI method for the analysis of protein complexes. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004; 15(6):803-22.
30. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999; 20(18):3551-67.
31. Selmeczi K, Robert A, Claparols C, Meunier B. Alkylation of human hemoglobin A0 by the antimalarial drug artemisinin. *FEBS letters*. 2004; 556(1-3):245-8.
32. Zhang S, Gerhard GS. Heme activates artemisinin more efficiently than hemin, inorganic iron, or hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008; 16(16):7853-61.
33. Uhlemann AC, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, Fischbarg J, Iserovich P, Zuniga FA, et al. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol*. 2005; 12(7):628-9.
34. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2003;424(6951):957-61.
35. Valderramos SG, Scanfeld D, Uhlemann AC, Fidock DA, Krishna S. Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54(9):3842-52.

ผลผลิตและกิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยนี้ BRG5080008

1. Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05. *Tetrahedron*, 2008, 64, 9636-9645.
2. Fluoride-Catalyzed Addition of PhSCF₂SiMe₃ to *N*-Substituted Cyclic Imides Followed by Radical Cyclization: General Synthetic Strategy of gem-Difluoromethylenated 1-Azabicyclic Compounds. *Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(10), 3798-3805
3. Diterpenes, sesquiterpenes, and a sesquiterpene-coumarin conjugate from *Jatropha integerrima* *Journal of Natural Products*, 2009, 72 (11), 2024-2027.
4. Crystal structure of 9-propagyl-artemisinin. *Acta Cryst., Section E*. Submitted.
5. Lanostane and Hopane Triterpenes from the Entomopathogenic Fungus *Hypocrella* sp. BCC 14524. *Journal of Natural Products*, Submitted.
6. Artemisinin targets hemoglobin at tyrosine-35 on the β -globin chain. Manuscript in preparation. To be submitted to *Chem. Comm.*

การผลิตนักศึกษา

- ดร.จาริวัฒน์ สมานชาติ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาเคมีอินทรีย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- ดร.ศรีสุดา ตีรกาญจน์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาเคมีอินทรีย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- น.ส.ไพลิน ศรีสุรัสสี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาเคมีอินทรีย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- น.ส.อัมพร แซ่กี้ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาเคมีอินทรีย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

จำนวนและรายละเอียดการได้รับเชิญเป็นวิทยากร

- วิทยากรบรรยายเรื่อง "รางวัลโนเบลสาขาเคมีปี 2551 จากโปรตีนเรืองแสง...สู่วิทยาการล้ำยุคทางการแพทย์" สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) 21 ตุลาคม 2551 <http://www.nstda.or.th/hrd/permanentcamp/activity/special/nobel/news/newsnobel.html>
- วิทยากรบรรยายในหัวข้อ ความร่วมมือทางด้านการวิจัยและพัฒนา ระหว่างประเทศไทยและจีน การประชุมวิชาการประจำปี สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 16-18 ตุลาคม 2551 โรงแรมฮอติเคย์อินน์ รีเจนท์ ซะอำ จังหวัดเพชรบุรี
- Structural biology and chemical biology of bioactive compounds: Antifolate action and resistance in malaria & activity-based protein profiling. Chinese-Thailand Joint

Workshop for Natural Products and Drug Discovery. 14-19 September, 2008. Chengdu Institute of Biology, Cheng-du, China.

- การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง Antimalarial Drug Targets: Methotrexate-Functionalized Superparamagnetic Nanoparticles. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 โรงแรมฮอเลียดอินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
- S. Prabpai, P. Khongsuk, S. Tirakan & P. Kongsaree. Metrotexate-immobilized superparamagnetic nanoparticles and *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase: Fabrication and binding study. Poster presentation. Keystone symposium. "Pathogenesis and Control of Emerging Infections and Drug-Resistant Organisms" held October 22-27, 2008 at the Royal Orchid Sheraton Hotel in Bangkok, Thailand.
- P. Khongsuk, U. Leartsakunpanich, Y. Yuthavong & P. Kongsaree. Crystal structure of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase for elucidation of antifolate drug-resistance. Poster presentation. Keystone symposium. "Pathogenesis and Control of Emerging Infections and Drug-Resistant Organisms" held October 22-27, 2008 at the Royal Orchid Sheraton Hotel in Bangkok, Thailand.
- S. Tirakarn, U. Leartsakulpanich, P. Kongsaree. Cloning and overexpression of dihydrofolate reductase from *Plasmodium ovale*. Poster presentation. Keystone symposium. "Pathogenesis and Control of Emerging Infections and Drug-Resistant Organisms" held October 22-27, 2008 at the Royal Orchid Sheraton Hotel in Bangkok, Thailand.
- S. Tirakarn, U. Leartsakulpanich, P. Kongsaree. Cloning and overexpression of dihydrofolate reductase from *Plasmodium ovale*. Poster presentation. The Third Annual Symposium of Protein Society of Thailand "Frontiers in Protein Research", August 28-29, 2008, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, Thailand. "
- Palangpon Kongsaree. Chemical Biology of Natural Products: Chemical Tools in Biology Study. Invited Lecture. NRCT-CPS Conference IV. Drug Discovery: Drug Targeting and Drug Delivery. 21-23 สิงหาคม 2552 โรงแรมวรบุรี อโยธยา คอนเวนชั่น รีสอร์ท จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

บทความตีพิมพ์ที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยนี้ BRG5080008

1. Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05. *Tetrahedron*, 2008, 64, 9636-9645.
2. Fluoride-Catalyzed Addition of $\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ to *N*-Substituted Cyclic Imides Followed by Radical Cyclization: General Synthetic Strategy of gem-Difluoromethylenated 1-Azabicyclic Compounds. *Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(10), 3798-3805
3. Diterpenes, sesquiterpenes, and a sesquiterpene-coumarin conjugate from *Jatropha integerrima* *Journal of Natural Products*, 2009, 72 (11), 2024-2027.
4. Crystal structure of 9-propagyl-artemisinin. *Acta Cryst.*, Section E. Submitted.
5. Lanostane and Hopane Triterpenes from the Entomopathogenic Fungus *Hypocrella sp.* BCC 14524. *Journal of Natural Products*, Submitted.
6. Artemisinin targets hemoglobin at tyrosine-35 on the β -globin chain. Manuscript in preparation. To be submitted to *Chem. Comm.*



Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05

Nutchanat Phonkerd^a, Somdej Kanokmedhakul^{a,*}, Kwanjai Kanokmedhakul^a, Kasem Soyong^b, Samran Prabpai^c, Palangpon Kongsearee^{c,d}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^b Department of Plant Pest Management, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^d Center for Excellence in Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2008

Accepted 10 July 2008

Available online 16 July 2008

Dedicated to Professor Dr. Yodhathai Thebtaranonth in honor of his 65th birthday

Keywords:

Cochliodone
Bis-spiro-azaphilones
Atropisomer
Antimalaria
Antimycobacteria
Anticancer
Chaetomium
Chaetomium cochliodes

ABSTRACT

Four new dimeric spiro-azaphilones, cochliodones A–D (1–4), two new azaphilones, chaetoviridines E and F (5 and 6), a new *epi*-chaetoviridin A (7), together with five known compounds, chaetoviridin A (8), ergosterol (9), chaetochalasin A (10), 24(*R*)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6-22-diene-3 β -ol (11), and ergosterol- β -D-glucoside (12) were isolated from the fungi *Chaetomium cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05. Structures and stereochemistry of the atropisomers 1–3 were determined by single-crystal X-ray diffraction analysis. Compounds 5, 10, and 11 exhibited antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*, while 3, 5, 6, 10, and 11 showed antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. In addition, 5 and 6 also showed cytotoxicity against the KB, BC1, and NCI-H187 cell lines.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chaetomium is the largest genera of saprophytic ascomycetes. It belongs to the Chaetomiaceae family and comprises ca. 92 species¹ of which about 20 species have been found in Thailand.^{2,3} Previous investigation on secondary metabolites from the *Chaetomium* species resulted in the isolation of numerous types of compounds such as benzoquinone derivatives,⁴ tetra-S-methyl derivatives,⁵ azaphilones,^{6,7} indol-3-yl-[13]cytochalasans, and chaetoglobosin analogs. Many of these are mycotoxins.^{8–14} In addition, anthraquinone-chromanone,¹³ orsellinic acid, and globosumones¹⁵ have also been reported. Apart from the above mentioned compounds, investigation of other strains of *Chaetomium cochliodes* have led to the isolation of other types of chemical structure.^{4,16–18} As part of our work on bioactive constituents from microorganisms, we noted that hexane and EtOAc extracts of the fungus *C. cochliodes* VTh01

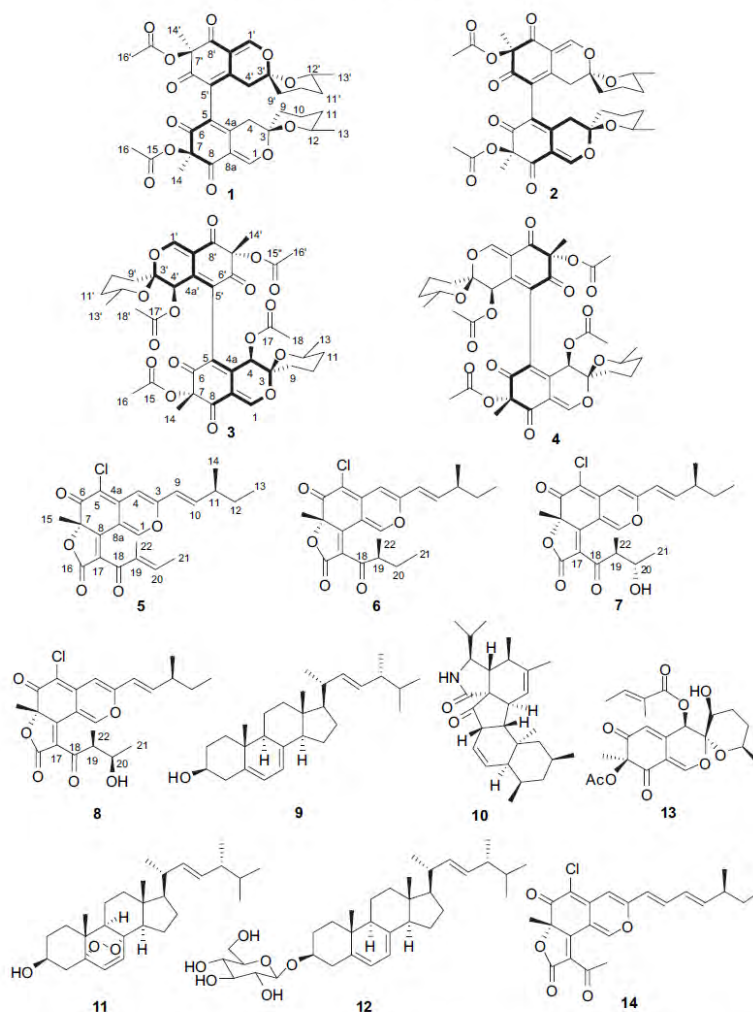
showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ 5.1 and 4.2 μ g/mL, respectively) and antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* (MIC 100 μ g/mL of both). In addition, the hexane, EtOAc, and MeOH extracts of the fungus *C. cochliodes* CTh05 showed anti-TB activity against *M. tuberculosis* (MIC 50, 0.39, and 1.56 μ g/mL, respectively). The EtOAc extract showed antimalarial activity against *P. falciparum* (IC₅₀ 3.8 μ g/mL). Besides, EtOAc and MeOH extracts exhibited cytotoxicity against cancer cell lines, KB and NCI-H187 (IC₅₀ range 0.44–10.5 μ g/mL). We report herein the isolation, characterization, and bioactivity of four new dimeric spiro-azaphilones, 1–4, two new azaphilones, 5 and 6, a new *epi*-chaetoviridin A (7), together with five known compounds, 8–12.

2. Results and discussion

C. cochliodes strains VTh01 and CTh05 were isolated from soils of the northeastern and northern parts of Thailand, respectively. Both of them showed activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing tomato wilt, while the *C. cochliodes* CTh05 also

* Corresponding author. Tel.: +66 43 202222–41x12243, 12370–4; fax: +66 43 202373.

E-mail address: somdej@kku.ac.th (S. Kanokmedhakul).



showed activity against *Phytophthora parasitica* causing citrus root rot. Colonies of both strains showed a daily growth rate of 5 mm on potato dextrose agar with pale aerial mycelia. The mycelia turned to yellow and then to grayish green. The fruiting bodies become mature within 30 days, having ovate shape with ostiolate of an average size $120 \times 84 \mu\text{m}$ (for *C. cochliodes* VTh01) and $138\text{--}378 \times 229\text{--}293 \mu\text{m}$ (for *C. cochliodes* CTh05). The walls of the fruiting bodies are brown, surrounded with numerous unbranched hairs, undulate, flexuous, broad at the base, tapering at the end, and $300 \mu\text{m}$ long. Asci develop inside fruiting bodies with clavate shape of an average size $25 \times 10 \mu\text{m}$. There are eight spores per ascus with evanescent walls. Spores are lemon shape, biapiculate, thick walled with an apical germ pore, averaging $4 \times 3 \mu\text{m}$ (for *C. cochliodes* VTh01) and $10 \times 7 \mu\text{m}$ (for *C. cochliodes* CTh05) and brown when mature. These characteristics are similar to those reported by Skolko and Grove.¹⁹

Cochliodone A (**1**) was assigned the molecular formula $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$, as deduced from the HRESITOFMS (observed m/z 639.2437 $[\text{M}+\text{H}]^+$). The UV spectrum displayed an absorption maximum due to $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -conjugated ketone at 312 nm. The IR spectrum showed characteristic ester (1738 cm^{-1}), α,β -

unsaturated ketone (1708 cm^{-1}), and $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -conjugated ketone (1665 cm^{-1}) bands. The ^{13}C NMR and DEPT spectra contained only 17 signals attributable to 3 carbonyl (δ 192.2, 191.8, 170.0), 3 sp^2 quaternary (δ 145.0, 122.6, 111.2), 1 sp^2 methine (δ 157.6), 2 sp^3 quaternary (δ 102.9, 84.7), 1 sp^3 methine (δ 68.7), 4 sp^3 methylene, and 3 methyl carbons. Since the ^1H and ^{13}C NMR spectra (Tables 1 and 2) showed only half the number of resonance signals expected for 38 protons and 34 carbons, the structure must be a symmetrical dimer. The monomeric unit exhibited the presence of an olefinic proton at δ 7.78 (s, H-1/H-1'), nonequivalent methylene protons at δ 2.70 (d, $J=16.2 \text{ Hz}$, H-4 β /H-4 β') and 2.42 (d, $J=16.2 \text{ Hz}$, H-4 α /H-4 α'), C-7 methyl protons at δ 1.58 (s, H₃-14/H₃-14'), and a methyl of acetoxy groups at δ 2.16 (s, H₃-16/H₃-16') in the azaphilone unit. The tetrahydropyran unit was indicated by three sets of methylene groups, at δ 1.88 (m, H-9_{eq}/H-9'_{eq}) and 1.46 (dt, $J=4.6, 14.4 \text{ Hz}$, H-9_{ax}/H-9'_{ax}), 1.70 (m, H-10/H-10'), 1.62 (m, H-11_{eq}/H-11'_{eq}), and 1.25 (dq, $J=3.3, 12.3 \text{ Hz}$, H-11_{ax}/H-11'_{ax}) together with an oxymethine proton at δ 3.85 (m, H-12/H-12') and C-12 methyl protons at δ 1.08 (d, $J=6.4 \text{ Hz}$, H₃-13/H₃-13'). The structure of **1** was then elucidated to be a bis-spiro-azaphilone by analysis of

Table 1
¹H NMR data for compounds 1–4 (CDCl₃)^a

Position	1	2	3	4
1,1'	7.78 (s)	7.75 (s)	8.04 (s)	7.84 (s)
4β,4β'	2.70 (d, 16.2)	2.71 (d, 16.2)	5.41 (s)	5.87 (s)
4α,4α'	2.42 (d, 16.2)	2.52 (d, 16.2)		
9 _{eq} ,9' _{eq}	1.88 (m)	1.92 (m)	2.10 (m)	2.36 (m)
9 _{ax} ,9' _{ax}	1.46 (dt, 4.6, 14.4)	1.45 (dt, 4.6, 14.4)	1.40 (m)	1.39 (m)
10,10'	1.70 (m)	1.71 (m)	1.75 (m)	1.78 (m)
11 _{eq} ,11' _{eq}	1.62 (m)	1.90 (m)	1.80 (m)	1.74 (m)
11 _{ax} ,11' _{ax}	1.25 (dq, 3.3, 12.3)	1.23 (dq, 3.2, 12.2)	1.35 (m)	1.25 (m)
12 _{ax} ,12' _{ax}	3.85 (m)	3.82 (m)	4.22 (m)	4.19 (m)
13,13'	1.08 (d, 6.4)	1.08 (d, 6.4)	1.25 (d, 6.4)	1.16 (d, 6.24)
14,14'	1.58 (s)	1.53 (s)	1.90 (s)	1.60 (s)
16,16'	2.16 (s)	2.11 (s)	2.22 (s)	2.13 (s)
18,18'			2.15 (s)	1.95 (s)

^a Figures in parentheses are coupling constants in hertz.

Table 2
¹³C NMR data for compounds 1–4 (CDCl₃)

Position	1	2	3	4
1,1'	157.6 (d) ^a	157.2 (d)	159.8 (d)	158.2 (d)
3,3'	102.9 (s)	102.1 (s)	104.7 (s)	103.2 (s)
4,4'	37.6 (t)	37.2 (t)	68.2 (d)	66.5 (d)
4a,4a'	145.0 (s)	143.9 (s)	109.0 (s)	109.3 (s)
5,5'	122.6 (s)	122.6 (s)	123.0 (s)	124.5 (s)
6,6'	192.2 (s)	192.2 (s)	194.0 (s)	193.4 (s)
7,7'	84.7 (s)	83.8 (s)	84.5 (s)	84.7 (s)
8,8'	191.8 (s)	191.1 (s)	191.1 (s)	190.6 (s)
8a,8a'	111.2 (s)	111.3 (s)	143.8 (s)	140.0 (s)
9,9'	32.0 (t)	32.4 (t)	27.4 (t)	28.6 (t)
10,10'	18.2 (t)	18.1 (t)	18.1 (t)	18.0 (t)
11,11'	31.4 (t)	31.7 (t)	31.4 (t)	31.7 (t)
12,12'	68.7 (d)	68.5 (d)	69.5 (d)	69.0 (d)
13,13'	21.6 (q)	21.8 (q)	21.5 (q)	21.2 (q)
14,14'	22.4 (q)	22.9 (q)	22.1 (q)	22.1 (q)
15,15'	170.0 (s)	169.1 (s)	169.8 (s)	168.8 (s)
16,16'	20.2 (q)	19.9 (q)	19.9 (q)	19.6 (q)
17,17'			169.3 (s)	168.2 (s)
18,18'			20.8 (q)	19.7 (q)

^a Multiplicities were determined by analysis of the DEPT and HSQC spectra.

the 2D NMR spectra including COSY, HSQC, HMBC, NOESY, and by comparison with the spectral data for spiro-azaphilone, daldinin C (**13**).²⁰ In addition, the absence of proton signals at C-5 and C-5' indicated that the bridge in **1** was connected via C-5 and C-5'. The HMBC spectrum confirmed the above observations by showing correlations of H-1 to C-3, C-4a, and C-8; H-4 to C-5, C-8a, and C-9; H-9 to C-3 and C-11; H-10 to C-3 and C-11; H-11 to C-9 and C-13; H-12 to C-10 and C-13; H-13 to C-11 and C-12; H-14 to C-6, C-7, and C-8; and H-16 to C-15. The COSY spectrum also supported the tetrahydropyran ring with methyl attached to carbon adjacent to the oxygen atom from the correlations between H-9 and H-10, H-10 and H-11, H-11 and H-12, and H-12 and H-13. Thus, X-ray crystallographic analysis was performed to confirm the structure and configuration of **1** (Fig. 1). Finally, the structure of **1** was defined as a new dimeric bis-spiro-azaphilone, which we named cochliodone A.

Cochliodone B (**2**) possessed the same molecular formula (C₃₄H₃₈O₁₂) as cochliodone A (**1**) as determined by HRESITOFMS and ¹H and ¹³C NMR spectra. The IR, UV, ¹H, and ¹³C NMR spectra (Tables 1 and 2) of **2** were similar to those of **1**, except for the difference of the proton chemical shifts of H-4α (**1**, δ 2.42; **2**, δ 2.52) and H-11_{eq} (**1**, δ 1.62; **2**, δ 1.90). Determination of the ¹H and ¹³C NMR spectra including COSY, HSQC, and HMBC experiments led to the elucidation of the structure analogous to that of **1**. However, the different physicochemical and specific rotations [**1**, −226 (c 0.14, CHCl₃); **2**, −42 (c 0.14, CHCl₃)] between the two suggested an

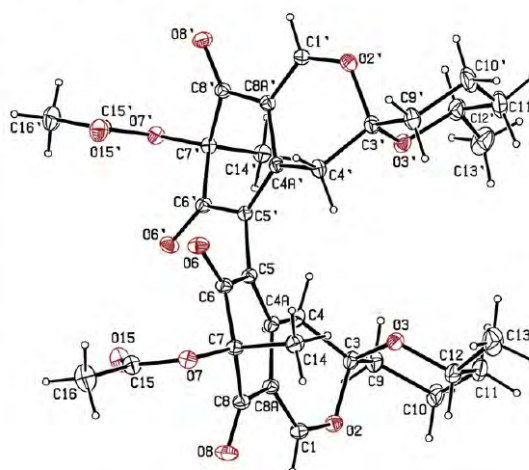


Figure 1. ORTEP drawing of the crystal structure of cochliodone A (**1**).

atropisomeric relationship to each other. The structure and configuration of **2** were finally confirmed by X-ray crystallographic analysis (Fig. 2). Crystals of compounds **1** and **2** were obtained as tetragonal and orthorhombic, respectively, by crystallization from EtOAc/hexane.

Cochliodone C (**3**) was obtained as pale yellow crystals and was assigned the molecular formula C₃₈H₄₂O₁₆ as deduced from the HRESITOFMS (observed *m/z* 777.2369 [M+Na]⁺). The UV spectrum displayed an absorption maximum due to α,β,γ,δ-conjugated ketone at 230 and 345 nm. The IR spectrum showed the presence of esters (1756, 1738 cm^{−1}), α,β-unsaturated ketone (1706 cm^{−1}), and α,β,γ,δ-conjugated ketone (1672 cm^{−1}). The ¹³C NMR and DEPT spectra contained only 19 signals attributable to 4 carbonyl (δ 194.0, 191.1, 169.8, 169.3), 3 sp² quaternary (δ 143.8, 123.0, 109.0), 1 sp² methine (δ 159.8), 2 sp³ quaternary (an acetal, δ 104.7 and 84.5), 2 sp³ methine (oxymethine, δ 69.5, 68.2), 3 sp³ methylene, and 4 methyl carbons. Since the ¹H and ¹³C NMR spectrum (Tables 1 and

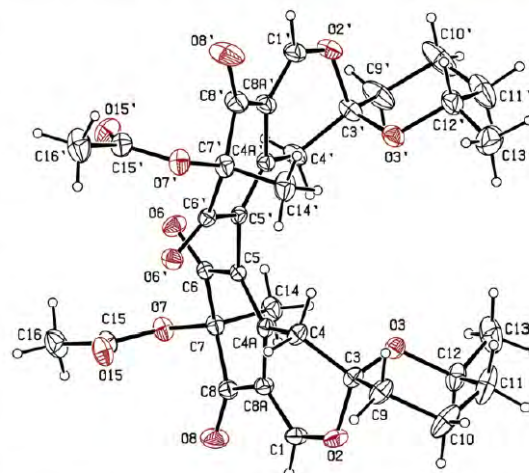


Figure 2. ORTEP drawing of the crystal structure of cochliodone B (**2**).

2) showed only half the number of resonance signals expected for 42 protons and 38 carbons, the structure must be a symmetrical dimer. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **3** were similar to those of bis-spiro-azaphilone, cochliodone A (**1**), except for the presence of two more acetoxy groups (δ_{H} 2.15, δ_{C} 20.8, 169.3) in **3** than in **1**. The singlet signal at δ_{H} 5.41 (H-4/H-4') correlated to the acetate carbonyl C-17 (δ_{C} 169.3) in the HMBC experiment revealing that the acetoxy group was located at C-4. The structure of **3** was then elucidated to be a bis-spiro-azaphilone by analysis of the 2D NMR spectra including COSY, HSQC, HMBC, and NOESY. Thus, X-ray crystallographic analysis was performed to confirm the structure and relative configuration of **3** (Fig. 3). Finally, the structure of **3** was defined as a new dimeric bis-spiro-azaphilone, which we named cochliodone C.

Cochliodone D (**4**) possessed the same molecular formula ($\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_{16}$) as cochliodone C (**3**) as determined by HRESITOFMS and ^1H and ^{13}C NMR spectra. The IR, UV, ^1H , and ^{13}C NMR spectra of **4** were similar to those of **3**, except for the difference of their proton chemical shifts of H-1 (**3**, δ 8.04; **4**, 7.84), H-4 (**3**, δ 5.41; **4**, 5.87), H-9 (**3**, δ 2.10 and 1.40; **4**, 2.36 and 1.39), H-14 (**3**, δ 1.90; **4**, 1.60), and H-18 (**3**, δ 2.15; **4**, δ 1.95). Determination of the ^1H and ^{13}C NMR spectra (Tables 1 and 2) including 2D NMR techniques (COSY, HSQC, and HMBC) supported the structure being analogous to that of **3**. However, the different physicochemical and specific rotations [**3**, -42 (c 0.22, CHCl_3); **4**, -276 (c 0.22, CHCl_3)] suggested an atropisomeric relationship between these two compounds.

Slow rotation about C–C single bonds resulting in the structural conversion of compounds **1** and **2**, and **3** and **4** were also performed to support the proposed architectural features of these two pairs of atropisomers. Heating a solution of each compound in MeCN at 65°C for varying periods of time resulted in the interconversion of **1** $\rightleftharpoons$ **2** and **3** $\rightleftharpoons$ **4** (determined by HPLC). For the first pair, compound **1** gave a mixture ratios of **1/2**=100:0 at 0 h, 59:41 at 10 h, 40:60 at 24 h, 37:63 at 48 h, and 36:64 at 72 h, whereas compound **2** provided a mixture ratios of **1/2**=0:100 at 0 h, 21:79 at 10 h, 33:67 at 24 h, 37:63 at 48 h, and 36:64 at 72 h (Fig. 4). For the second pair, compound **3** gave a mixture ratios of **3/4**=100:0 at 0 day, 79:21 at 8 days, 77:23 at 10 days, 74:26 at 12 days, 72:28 at 14 days, and 71:29 at 16 days, while compound **4** provided a mixture ratios of **3/4**=0:100 at 0 day, 45:54 at 8 days, 52:48 at 10 days, 57:43 at 12 days, 60:40 at 14 days, and 63:37 at 16 days (Fig. 5).

During the purity check by HPLC analysis of the stock solutions of both **1** and **2** in MeCN at room temperature, slow interconversion was observed with the ratios of **1/2**=64:36 (for **1**) and 14:86 (for **2**) at 30 days; 53:47 (for **1**) and 19:81 (for **2**) at 40 days; and 49:51 (for

1) and 22:78 (for **2**) at 50 days. In order to clarify that **1** and **2** were naturally occurring compounds and not artifacts produced during the isolation process, controlled fermentation–extraction of the fungus *C. cochliodes* VTH01 was performed. After quick extraction of dried mycelial mat with hexane at room temperature for 1 h, the crude residue was then dissolved in MeCN and subjected to HPLC determination. The chromatogram showed the presence of **1** and a trace of **2** at a ratio of 93:7 (Fig. 6). Thermal conversions of this crude residue were also observed. Heating the solution at 65°C for 72 h resulted in a mixture of **1/2** with a ratio of 36:64 (Fig. 6). On the basis of the above experimental evidence, it was concluded that compounds **1** and **2** were atropisomers, which could be converted in solution, both at room and high temperatures. It is most likely, though not absolutely certain, that compound **2** isolated in our experiment was not a naturally occurring product but rather the artifact of compound **1**.

In comparison with the cochliodones A and B (**1** and **2**), cochliodones C and D (**3** and **4**) were stored in MeCN at room temperature for 60 days, and no interconversion occurred. This suggests the steric interference of the acetoxy groups at C-4 and C-4'. Clarification that compounds **3** and **4** are naturally occurring substances from *C. cochliodes* CTH05 by using the method described above for **1** and **2** provided a mixture ratio of **3/4**=7:93. In addition, heating a solution of **3** or **4** in DMSO at 110°C for 48 h provided the same mixture ratio of **3/4**=70:30 on HPLC analysis. Unfortunately, both compounds started to decompose after heating for 3 h. On the basis of this evidence, it was concluded that compounds **3** and **4** were atropisomers, which could be converted in solution at high temperatures. It is not unreasonable to conclude that **3** and **4** are naturally occurring compounds.

Chaetoviridin E (**5**) was assigned the molecular formula $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClO}_5$, as deduced from the HRESITOFMS (observed m/z 415.1327 $[\text{M}+\text{H}]^+$) indicating the presence of 12 degrees of unsaturation in the molecule. The IR spectrum showed γ -lactone (1760 cm^{-1}) and α,β -unsaturated ketone ($1645, 1626\text{ cm}^{-1}$) bands. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **5** (Tables 3 and 4) showed five olefinic protons, five methyls, two conjugated carbonyls (δ 183.7, 190.3), and one conjugated ester (δ 167.4). The structure could then be elucidated as being of azaphilone type by analysis of the data obtained by 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, and ROESY) and by comparison with that of the closely related compound, chaetoviridin A (**8**).⁶ The spectral data of **5** were similar to **8**, except that **5** showed an olefinic proton at δ 6.55 (q, $J=7.6\text{ Hz}$), which was connected to sp^2 carbon at δ_{C} 146.7 (C-20) in the HSQC experiment, instead of two methine protons (H-19 and H-20). The specific rotation of **5** [-385 (c 0.02, CHCl_3)] showed the same sign as that of rubrorotiorin (**14**) [-368 (c 0.019, CHCl_3)],^{21,22} which has *S* absolute configuration at the C-7 position, implying that **5** possessed the same stereochemistry at C-7 as that of **14**. However, the specific rotation of **5** showed the opposite sign to that of chaetoviridin A (**8**) [$+98$ (c 0.05, CHCl_3)],⁶ suggesting the loss of two stereogenic centers at C-19 and C-20 in **5**.

Treating compound **8** with H_3PO_4 in acetone and heating for 24 h yielded a product (25%) that was identical (mp, IR, NMR, specific rotation, and behavior on TLC) to the isolated compound **5**. Compound **5** and the dehydration product of **8** displayed negative specific rotation values of -385 and -390 , respectively, which supported the *S* configuration at C-7 of **5** and **8** as in the reference compound **14**. Also, the stereochemistry of C-11 in the side chain at C-3 was assigned to be *S* similar to those reported for azaphilones.⁶ On the basis of the above data, the structure of **5** was deduced as a dehydrated derivative of chaetoviridin A (**8**), which we named chaetoviridin E.

Chaetoviridin F (**6**) was assigned the molecular formula $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClO}_5$, as deduced from the HRESITOFMS (observed m/z 417.1467 $[\text{M}+\text{H}]^+$) indicating the presence of 11 degrees of

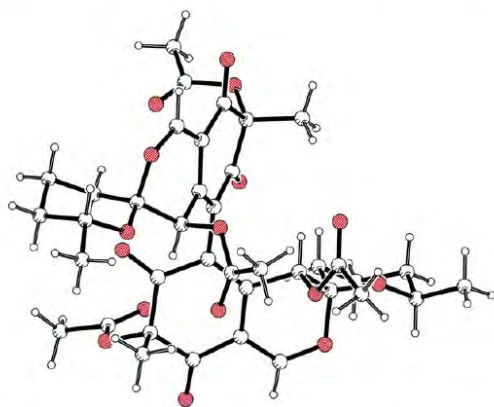


Figure 3. A perspective drawing of the crystal structure of cochliodone C (**3**).

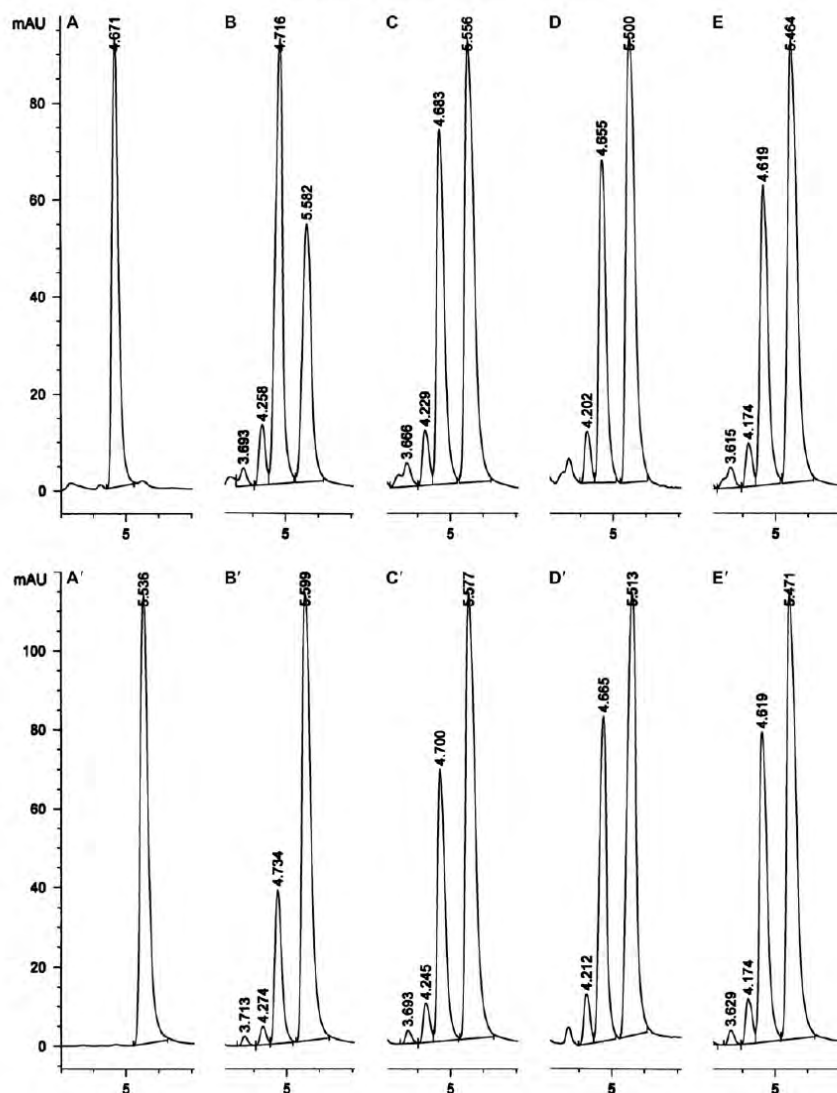


Figure 4. HPLC chromatogram of thermal conversions of **1** and **2** in MeCN solution at 65 °C. Compound **1**: A at 0 h, B at 10 h, C at 24 h, D at 48 h, and E at 72 h. Compound **2**: A' at 0 h, B' at 10 h, C' at 24 h, D' at 48 h, and E' 72 h.

unsaturation in the molecule. The IR spectrum showed γ -lactone (1769 cm^{-1}) and α,β -unsaturated ketone (1684 and 1620 cm^{-1}) bands. Comparison of the ^1H and ^{13}C NMR spectral data (Tables 3 and 4) indicated that **6** was similar to **8**, except for the absence of an oxymethine proton at C-20, which was displaced by methylene protons [δ_{H} 1.51 (m), 1.25 (m); δ_{C} 26.5]. The specific rotation of **6** [$+\text{40}$ (c 0.02, CHCl_3)] showed the same sign as that of chaetoviridin A (**8**) [$+\text{98}$ (c 0.05, CHCl_3)]⁶ suggesting the loss of a stereogenic center at C-20 in **6**. On the basis of the above data, the structure of **6** was assigned as a desoxy form of chaetoviridin A (**8**), which we named chaetoviridin F.

epi-Chaetoviridin A (**7**) was obtained as a red solid, and had molecular formula $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClO}_6$, as deduced from the HRESITOFMS (observed m/z 455.1237 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) indicating the presence of 11

degrees of unsaturation in the molecule. The IR spectrum of **7** indicated hydroxyl (3436 cm^{-1}), γ -lactone (1769 cm^{-1}), and α,β -unsaturated ketone (1682 and 1619 cm^{-1}) groups. The ^1H and ^{13}C NMR data (Tables 3 and 4) and 2D NMR techniques (COSY, HSQC, HMBC, and NOESY) of **7** indicated a structure similar to chaetoviridin A (**8**). However, there were some differences in chemical shifts between compounds **7** and **8**. Differences in the ^1H and ^{13}C NMR spectra were noted at δ_{H} 4.29 and 3.89 (for H-20), 1.23 and 1.18 (for H₃-21), and 0.98 and 1.18 (for H₃-22), while the carbon signals differed at δ_{C} 48.7 and 50.9 (for C-19), 67.2 and 70.9 (for C-20), 19.5 and 13.5 (for C-21), and 9.8 and 21.4 (for C-22) of **7** and **8**, respectively. This suggested an opposite configuration at C-20 between the two compounds. The absolute configurations of C-7, C-19, and C-20 in chaetoviridin A (**8**) have been reported as *S*, *S*, and

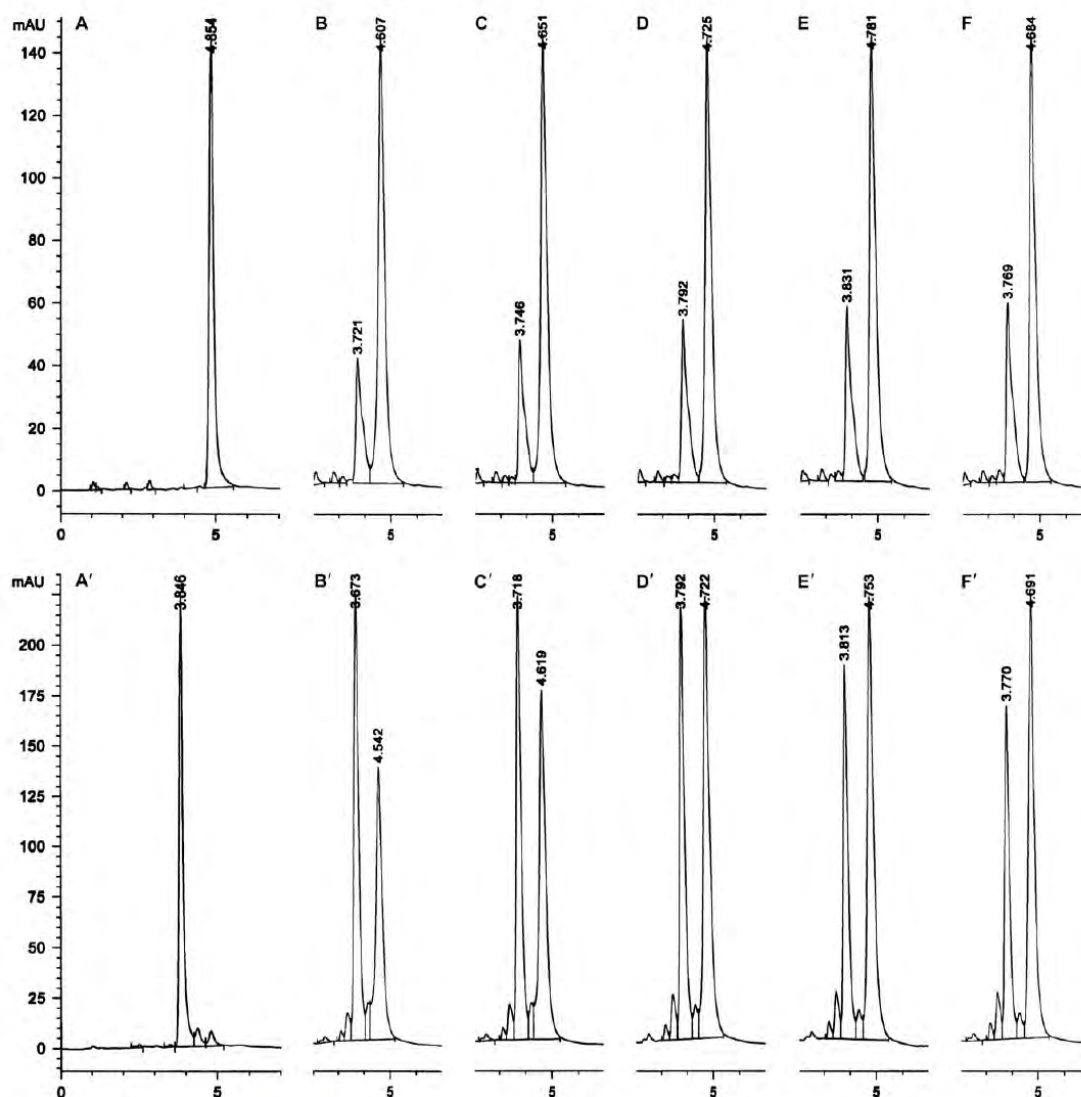


Figure 5. HPLC chromatogram of thermal conversions of **3** and **4** in MeCN solution at 65 °C. Compound **3**: A at 0 day, B at 8 days, C at 10 days, D at 12 days, E at 14 days, and F at 16 days. Compound **4**: A' at 0 day, B' at 8 days, C' at 10 days, D' at 12 days, E' at 14 days, and F' at 16 days.

R, respectively.⁶ The stereochemistry at C-7 of **7** was assigned to S configuration by comparison of the chemical shift in the NMR data with that of **8**. The NOESY spectrum of **7** showed no correlation between H-19 and H-20, which has been observed in **8**, indicating S configuration at C-20. Besides, compound **7** showed an opposite sign of specific optical rotation [-44 (c 0.03, CHCl₃)] to the analogue **8** [$+98$ (c 0.05, CHCl₃)]⁶ suggesting a difference in stereogenic center at C-20. Thus, **7** was deduced to be *epi*-chaetoviridin A.

The five known compounds were identified by spectroscopic methods as well as by comparison with those of literature data or authentic samples, as chaetoviridin A (**8**),⁶ ergosterol (**9**),²³ chaetochalasin A (**10**),²⁴ 24(R)-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6-22-diene-3 β -ol (**11**),^{23,25} and ergosterol- β -D-glucoside (**12**).²³

Compounds **1–6**, **8**, **10**, and **11** were evaluated for their bioactivities (Table 5). Compounds **5**, **10**, and **11** showed antimalarial

activity against *P. falciparum* with IC₅₀ values of 2.9, 3.7, and 3.1 μ g/mL, respectively. Compounds **3**, **5**, **6**, **10**, and **11** showed antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* with MIC values of 200, 50, 100, 100, and 200 μ g/mL, respectively. In addition, **5** and **6** had respective IC₅₀ values against KB of 10.7 and 12.3 μ g/mL, BC1 of 5.6 and 13.4 μ g/mL, and NCI-H187 of 3.5 and 4.5 μ g/mL.

3. Experimental

3.1. General

Melting points were determined using a Gallenkamp melting point apparatus and were uncorrected. Optical rotations were obtained using a JASCO DIP-1000 digital polarimeter. UV spectra were measured on an Agilent 8453 UV–visible spectrophotometer.

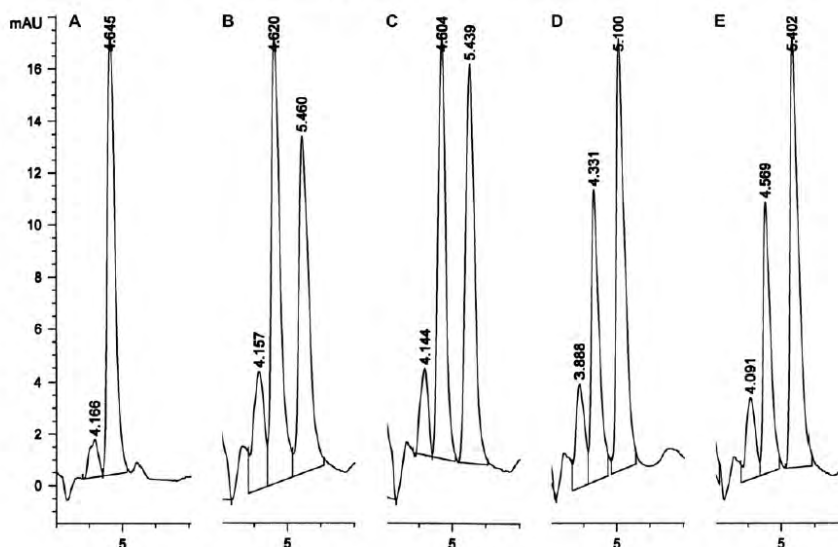


Figure 6. HPLC chromatogram of thermal conversions of hexane extract of *C. cochliodes* VTh01 in MeCN solution at 65 °C. A at 0 h, B at 10 h, C at 24 h, D at 48 h, and E at 72 h. Co-injections with standard samples were performed to confirm compound identities.

IR spectra were taken on a Perkin–Elmer Spectrum One spectrophotometer. NMR spectra were recorded in CDCl_3 on a Varian Mercury Plus 400 spectrometer, using residual CHCl_3 as an internal standard. HRESITOFMS spectra were obtained using a Micromass LCT mass spectrometer and the lock mass calibration was applied for the determination of accurate masses. Column chromatography and preparative TLC were carried out on silica gel 60 (230–400 mesh) and PF₂₅₄, respectively. HPLC was carried out on an Agilent 1100 series instrument with an analytical C18 column (Agilent, 5 μm , 3.2 $\times$ 150 mm).

3.2. Fungi material

The fungi *C. cochliodes* VTh01 and *C. cochliodes* CTh05 were collected from Ubon Rajathane and Chiangrai provinces, respectively, and were identified by Assoc. Prof. K. Soyong. Voucher specimens CcoVTh01 and CcoCTh05 were deposited at the Department of Plant Pest Management, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. The fungi were cultivated in Potato Dextrose Broth (PDB) at 25–28 °C for 4 weeks.

3.3. Extraction and isolation

3.3.1. *C. cochliodes* VTh01

Air-dried mycelial mat (200 g) was ground and extracted successively with hexane (500 mL $\times$ 3), EtOAc (500 mL $\times$ 3), and MeOH (500 mL $\times$ 3) to yield the crude hexane (7.1 g), EtOAc (10.3 g), and MeOH extracts (31 g), respectively. EtOAc (50 mL) and hexane (300 mL) were added to the hexane extract to give a solid (1.4 g), which was further recrystallized from EtOAc/hexane to yield yellowish crystals of **1** (37 mg). The filtrate was evaporated to yield a residue, which was recrystallized from EtOAc/hexane to give **2** (50 mg). The filtrate was further separated by preparative TLC using 50% EtOAc/hexane as eluent to give an additional amount of **1** (R_f =0.52, 51 mg) and **2** (R_f =0.22, 17 mg). The residue was then separated over a silica gel column, eluted with a gradient system of EtOAc/hexane followed by MeOH/EtOAc. Each fraction (100 mL) was monitored by TLC; fractions with similar TLC patterns were combined to yield fractions F₁–F₅. Fraction F₃ was chromatographed on silica gel and eluted with a gradient system of EtOAc/hexane to give **9** (36.1 mg), **10** (39.3 mg), and **11** (33.6 mg). Fraction F₄ was

Table 3
¹H NMR data (δ , ppm) for compounds 5–8 in CDCl_3 ^a

Position	5	6	7	8
1	8.04 (s)	8.74 (s)	8.70 (s)	8.79 (s)
4	6.55 (s)	6.50 (s)	6.57 (s)	6.58 (s)
9	6.07 (d, 15.6)	6.04 (d, 15.6)	6.09 (d, 15.6)	6.10 (d, 15.7)
10	6.56 (dd, 15.6, 8.0)	6.57 (dd, 15.6, 7.8)	6.62 (dd, 15.6, 7.5)	6.62 (dd, 15.7, 8.0)
11	2.28 (septet, 6.9)	2.23 (septet, 7.0)	2.29 (septet, 7.0)	2.30 (septet, 6.9)
12	1.44 (quint, 7.3)	1.39 (quint, 7.2)	1.45 (quint, 7.2)	1.42 (quint, 7.4)
13	0.91 (t, 7.4)	0.85 (t, 7.5)	0.83 (t, 7.4)	0.92 (t, 7.4)
14	1.08 (d, 6.7)	1.03 (d, 6.8)	1.09 (d, 7.0)	1.10 (d, 6.7)
15	1.72 (s)	1.64 (s)	1.71 (s)	1.70 (s)
19		3.46 (sextet, 6.2)	3.69 (dq, 7.4, 3.0)	3.62 (quint, 7.4)
20	6.55 (q, 7.6)	1.51 (m), 1.25 (m)	4.29 (dq, 6.2, 3.0)	3.89 (quint, 6.6)
21	1.90 (d, 7.1)	0.72 (t, 7.6)	1.23 (d, 6.6)	1.18 (d, 6.5)
22	1.87 (s)	1.06 (d, 6.4)	0.98 (d, 7.0)	1.18 (d, 6.5)

^a Figures in parentheses are multiplicity and coupling constants in hertz.

Table 4
¹³C NMR data (δ, ppm) for compounds **5–8** in CDCl₃

Position	5	6	7	8
1	148.3 (d) ^a	151.8 (d)	151.9	151.5
3	157.1 (s)	157.5 (s)	157.1	157.1
4	105.1 (d)	105.5 (d)	105.3	105.4
4a	139.3 (s)	140.0 (s)	139.7	139.7
5	109.5 (s)	109.0 (s)	109.0	108.9
6	183.7 (s)	183.9 (s)	183.1	183.4
7	87.6 (s)	87.8 (s)	87.8	87.6
8	159.1 (s)	164.0 (s)	165.1	162.7
8a	110.8 (s)	110.5 (s)	110.2	110.4
9	119.9 (d)	119.9 (d)	119.7	119.7
10	147.9 (d)	148.3 (d)	148.3	148.1
11	38.9 (d)	39.1 (d)	38.9	38.9
12	29.1 (t)	29.3 (t)	29.1	29.1
13	11.6 (q)	11.9 (q)	11.7	11.7
14	19.2 (q)	19.4 (q)	19.2	19.2
15	25.6 (q)	26.3 (q)	26.2	26.2
16	167.4 (s)	167.9 (s)	167.8	167.9
17	126.2 (s)	124.5 (s)	123.0	125.1
18	190.3 (s)	201.2 (s)	201.0	201.2
19	137.7 (s)	45.1 (d)	48.7	50.9
20	146.7 (d)	26.5 (t)	67.2	70.9
21	15.4 (q)	11.7 (q)	19.5	13.5
22	10.8 (q)	14.3 (q)	9.8	21.4

^a Multiplicities were determined by analysis of the DEPT and HSQC spectra.**Table 5**
Biological activities of the isolated compounds

Compound	Antimalarial (IC ₅₀ , μg/mL)	Antimycobacterial (MIC, μg/mL)	Cytotoxicity (IC ₅₀ , μg/mL)		
			KB ^a	BC1 ^b	NCI-H187 ^c
3		200			
5	2.9	50	10.7	5.6	3.5
6		100	12.3	13.4	4.5
10	3.7	100			
11	3.1	200			
Artemisinin	0.001				
Isoniazid		0.05			
Kanamycin sulfate		2.5			
Ellipticine			0.36	0.26	0.32

^a Human epidermoid carcinoma in the mouth.^b Human breast cancer cells.^c Human lung cancer cells.

separated on silica gel CC eluted with a gradient system of hexane/EtOAc to yield additional **11** (16.4 mg). The EtOAc extract (10.0 g) was separated on a silica gel column and eluted with increasing EtOAc in hexane followed by MeOH in EtOAc to yield five fractions, F₁'–F₅'. Fraction F₃' gave additional **9** (69.7 mg). Fractions F₅' afforded additional **11** (35.6 mg). Fraction F₄' was further purified by CC using MeOH/CH₂Cl₂ (10:90) as eluent to yield **8** (100.6 mg). Fraction F₉' was recrystallized from MeOH/CH₂Cl₂ to give colorless needles of **12** (5.3 mg). The MeOH extract was partitioned between EtOAc and water. The EtOAc residue was subjected to silica gel CC, gradually eluted with MeOH/CH₂Cl₂ to give four fractions, F₁'–F₄'. Fraction F₂' gave additional **11** (11.2 mg) and **12** (24.4 mg).

3.3.2. *C. cochliodes* CTh05

Air-dried mycelial mat (735 g) was ground into powder and extracted successively with hexane (3 L×3), EtOAc (3 L×3), and MeOH (3 L×3) at room temperature. Filtrates were combined and the solvents were removed in vacuo to yield crude hexane (7.8 g), EtOAc (17.4 g), and MeOH (23.4 g) extracts. CH₂Cl₂ (100 mL) was added to the hexane extract (7.8 g) to afford a pale yellow solid of **3** (34.4 mg). The filtrate was evaporated in vacuo and the residue was subjected to silica gel column chromatography, eluted with a gradient system of EtOAc in hexane followed by MeOH in CH₂Cl₂.

Each fraction (75 mL) was monitored by TLC; fractions with similar TLC patterns were combined to yield fractions, F₁–F₈. Fraction F₂ was further separated by silica gel column eluted with a gradient solvent system of EtOAc in hexane to obtain five subfractions designated as F_{2/1}–F_{2/5}. Subfraction F_{2/3} gave a red solid of **8** (92.5 mg). Fraction F₃ was purified by preparative TLC using 5% EtOAc/CH₂Cl₂ as eluent to yield a yellow solid of **5** (66.4 mg). Fraction F₄ was separated on silica gel column eluted with a gradient solvent system of EtOAc in hexane to yield seven subfractions designated as F_{4/1}–F_{4/7}. Subfraction F_{4/2} afforded **8** (48.7 mg). Fraction F₇ was further separated by silica gel column eluted with a gradient system of EtOAc in hexane to yield seven subfractions, F_{7/1}–F_{7/7}. Subfraction F_{7/3} was further purified by preparative TLC using 50% EtOAc/hexane as eluent to give an additional amount of **3** (R_f=0.49, 4 mg) and a pale yellow solid of **4** (R_f=0.41, 242.9 mg). Fraction F₈ was rechromatographed on a silica gel column, gradually eluted with EtOAc in CH₂Cl₂ to obtain five subfractions, F_{8/1}–F_{8/5}. Subfraction F_{8/3} gave an additional amount of **3** (7.3 mg).

The crude EtOAc extract (17.4 g) was redissolved with EtOAc and filtered. The filtrate was evaporated in vacuo, and the residue was chromatographed on a silica gel column eluted with the same gradient system as the hexane extract above to give 10 fractions, F₁'–F₁₀'. Fraction F₅' was separated by silica gel column eluted with EtOAc and hexane by increasing polarity of solvents to give five subfractions designated as F_{5/1}'–F_{5/5}'. Subfraction F_{5/2}' was purified by PLC using 20% EtOAc/CH₂Cl₂ as eluent to give an additional amount of **5** (91.3 mg). Fraction F₆' was recrystallized with MeOH to yield an additional amount of **8** (1.5 g). Fraction F₇' was chromatographed on silica gel column eluted with a gradient solvent system of EtOAc in hexane to obtain 10 subfractions designated as F_{7/1}'–F_{7/10}'. Subfraction F_{7/3}' gave an additional amount of **8** (41.9 mg). Subfraction F_{7/5}' was further purified by preparative TLC using 40% EtOAc/hexane as eluent to yield a red solid of **7** (R_f=0.38, 13 mg).

3.3.3. *Cochliodone A* (**1**)

Yellow crystals; mp 225–226 °C (decomp.); [α]_D²⁶ –226 (c 0.14, CHCl₃); UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 217 (3.97), 312 (4.34); IR (KBr) ν_{max}: 3080, 2982, 2941, 1738, 1708, 1665, 1598, 1577, 1448, 1407, 1347, 1251, 1088 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 1 and 2; HRESITOFMS m/z [M+H]⁺ 639.2437 (calcd for C₃₄H₃₈O₁₂+H⁺, 639.2441).

3.3.4. *Cochliodone B* (**2**)

Yellow crystals; mp 223–225 °C (decomp.); [α]_D²⁶ –42 (c 0.14, CHCl₃); UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 218 (4.0), 311 (4.30); IR (KBr) ν_{max}: 3080, 2982, 2941, 1738, 1708, 1665, 1598, 1577, 1448, 1407, 1347, 1251, 1088 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 1 and 2; HRESITOFMS m/z [M+H]⁺ 639.2439 (calcd for C₃₄H₃₈O₁₂+H⁺, 639.2441).

3.3.5. *Cochliodone C* (**3**)

Pale yellow crystals; mp 273–274 °C (decomp.); [α]_D³¹ –42 (c 0.22, CHCl₃); UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 230 (4.06), 345 (4.42); IR (KBr) ν_{max}: 3057, 2936, 2871, 1756, 1738, 1706, 1672, 1597, 1559, 1455, 1371, 1328, 1240, 1083 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 1 and 2; HRESITOFMS m/z 777.2369 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₈H₄₂O₁₆+Na, 777.2365).

3.3.6. *Cochliodone D* (**4**)

Pale yellow crystals; mp 158–160 °C; UV (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε): 230 (3.81), 334 (4.26); [α]_D²⁹ –276 (c 0.22, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max}: 3059, 2975, 2940, 2877, 1764, 1746, 1713, 1676, 1604, 1582, 1446, 1411, 1372, 1345, 1243, 1219, 1084 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 1 and 2; HRESITOFMS m/z 777.2371 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₈H₄₂O₁₆+Na, 777.2365).

3.3.7. Chaetoviridin E (5)

A yellow solid; mp 108–109 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –385 (c 0.02, CHCl₃); UV (CH₂Cl₂) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 230 (4.03), 302 (4.11), 365 (3.97); IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3083, 2960, 2925, 2872, 1760, 1645, 1626, 1565, 1514, 1456, 1407, 1349, 1160, 1017 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 3 and 4; HRESITOFMS m/z 415.1327 [M+H]⁺ (calcd for C₂₃H₂₃ClO₅+H, 415.1307).

3.3.8. Chaetoviridin F (6)

A red solid; mp 84–86 °C; $[\alpha]_D^{27}$ +40 (c 0.02, CHCl₃); UV (CH₂Cl₂) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 229 (3.97), 305 (4.27), 365 (4.12); IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3107, 2962, 2927, 2873, 1769, 1684, 1620, 1509, 1458, 1402, 1348, 1325, 1163, 1014 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 3 and 4; HRESITOFMS m/z 417.1467 [M+H]⁺ (calcd for C₂₃H₂₅ClO₅+H, 417.1463).

3.3.9. epi-Chaetoviridin A (7)

A red solid; $[\alpha]_D^{30}$ –44 (c 0.03, CHCl₃); UV (CH₂Cl₂) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 229 (3.99), 306 (4.16), 365 (4.04); IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3436, 3079, 2962, 2925, 2873, 2836, 1769, 1682, 1619, 1511, 1452, 1406, 1376, 1350, 1259; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 3 and 4; HRESITOFMS m/z 455.1237 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₃H₂₅ClO₆+Na, 455.132).

3.3.10. Chaetoviridin A (8)

Red crystals; mp 157–158 °C (lit.⁶ 121–124 °C); UV (CH₂Cl₂) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 229 (3.95), 306 (4.32), 366 (4.15); $[\alpha]_D^{27}$ +97 (c 0.05, CHCl₃) {lit.⁶ $[\alpha]_D^{30}$ +98 (c 0.05, CHCl₃)}; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3436, 3108, 2968, 2930, 2875, 1774, 1678, 1619, 1516, 1453, 1402, 1375, 1358, 1248, 1016 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 3 and 4; ESITOFMS m/z 455 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₃H₂₅ClO₆+Na, 455).

3.4. X-ray crystallographic analyses of 1–3

Yellowish crystals of **1–3** were obtained in the mixture of EtOAc/hexane by slow evaporation. X-ray diffraction data were measured on a Bruker–Nonius kappaCCD diffractometer with graphite monochromated Mo K α radiation (λ =0.71073 Å) at 298(2) K. The structure was solved by direct methods by SIR97²⁶ and refined with full-matrix least-squares calculations on F^2 using SHELXL-97.²⁷ All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. The hydrogen atom positions were geometrically idealized and allowed to ride on their parent atoms. Crystallographic data of cochlidone A (**1**), cochlidone B (**2**), and cochlidone C (**3**) have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre under the reference numbers CCDC 672198, CCDC 672199, and CCDC685491, respectively.

3.4.1. X-ray data of 1

C₃₄H₃₈O₁₂, M =638.37, tetragonal, dimensions: 0.10×0.15×0.20 mm, D =1.130 g/cm³, space group $P4_12_12$, Z =8, a = b =13.264(1), c =42.672(7) Å, V =7508(2) Å³, reflections collected/unique: 11,634/5853 (R_{int} =0.026), number of observation [$>2\sigma(I)$] 4457, final R indices [$I>2\sigma(I)$]: R_1 =0.0690, wR_2 =0.1948.

3.4.2. X-ray data of 2

C₃₄H₃₈O₁₂, M =638.37, orthorhombic, dimensions: 0.15×0.15×0.25 mm, D =1.246 g/cm³, space group $P2_12_12_1$, Z =4, a =12.3511(2), b =12.8552(4), c =21.4484(4) Å, V =3405.5(1) Å³, reflections collected/unique: 18,077/3594 (R_{int} =0.046) number of observation [$>2\sigma(I)$]: 3262, final R indices [$I>2\sigma(I)$]: R_1 =0.0433, wR_2 =0.1166.

3.4.3. X-ray data of 3

C₃₈H₄₂O₁₆, M _r=754.74, orthorhombic, dimensions: 0.30×0.10×0.10 mm, D =1.153 g/cm³, space group $P2_12_12_1$, Z =4, a =9.2189(2), b =21.3464(9), c =22.0889(10) Å, V =4346.9(3) Å³, reflections collected/unique: 18,742/3328 (R_{int} =0.051), number of

observation [$>2\sigma(I)$]: 2833, final R indices [$I>2\sigma(I)$]: R_1 =0.0605, wR_2 =0.1624.

3.5. Bioassays

3.5.1. Antimalarial assay

Antimalarial activity was evaluated against the parasite *P. falciparum* (K1, multidrug resistant strain), using the method of Trager and Jensen.²⁸ Quantitative assessment of malarial activity in vitro was determined by means of the microculture radioisotope technique based upon the method described by Desjardins et al.²⁹ The inhibitory concentration (IC₅₀) represents the concentration, which causes 50% reduction in parasite growth as indicated by the in vitro uptake of [³H]-hypoxanthine by *P. falciparum*. The standard compound, artemisinin, exhibited an IC₅₀ value of 1.0 ng/mL.

3.5.2. Antimycobacterial assay

Antimycobacterial activity was assessed against *M. tuberculosis* H37Ra using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA).³⁰ The standard drugs, isoniazid and kanamycin sulfate, showed respective MIC values of 0.04–0.09 and 2.0–5.0 µg/mL.

3.5.3. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assays against human epidermoid carcinoma (KB), human breast cancer (BC1), and human small cell lung cancer (NCI-H187) cell lines were performed employing the colorimetric method as described by Skehan et al.³¹ The reference substance was ellipticine, which showed IC₅₀ values of 0.36, 0.32, and 0.26 µg/mL, respectively.

Acknowledgements

Financial support from the Thailand Research Fund (Grant no. RMU4980029) for S.K. and the Thailand Research Fund via the Royal Golden Jubilee Ph.D. program (PHD/0058/2548) and the Center for Innovation in Chemistry Postgraduate Education and Research in Chemistry (PERCH-CIC), Ministry of Education, Thailand for N.P. are acknowledged. P.K. thanks for [BRC50080008](#). S.K. is grateful to Khon Kaen University and the Bioresources Research Network (BRN) of the National Center for Genetic Engineering Biotechnology (BIOTEC) for a research grant.

References and notes

- Von Arx, J. A.; Guarro, J.; Figueras, M. J. *Nova Hedwigia* **1986**, *84*, 1–162.
- Soytong, K. *Thai Phytopathol.* **1991**, *11*, 86–94.
- Petcharat, V.; Soyotong, K. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **1991**, *13*, 129–132.
- Brewer, D.; Jerram, W. A.; Taylor, A. *Can. J. Microbiol.* **1968**, *14*, 861–866.
- Safe, S.; Taylor, A. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1972**, 472–479.
- Takahashi, M.; Koyama, K.; Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 625–628.
- Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K.; Nasomjai, P.; Soyotong, K.; Isobe, M.; Kongsaree, P.; Prabpai, S.; Suksamrarn, A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 891–895.
- Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1351–1354.
- Udagawa, S.; Muroi, T.; Kurata, H.; Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S.; Umeda, M. *Can. J. Microbiol.* **1979**, *25*, 170–177.
- Probst, A.; Tamm, C. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2056–2064.
- Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S.; Kuwano, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1629–1638.
- Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 490–498.
- Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K.; Phonkerd, N.; Soyotong, K.; Kongsaree, P.; Suksamrarn, A. *Planta Med.* **2002**, *68*, 834–836.
- Ding, G.; Song, Y. C.; Chen, J. R.; Xu, C.; Ge, H. M.; Wang, X. T.; Tan, R. X. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 302–304.
- Bashyal, B. P.; Wijeratne, E. M. K.; Faeth, S. H.; Gunatilaka, A. A. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 724–728.
- Brewer, D.; Jerram, W. A.; Leach, C. K.; Safe, S.; Taylor, A.; Vining, L. C.; Archibald, R.; McGStevenson, R. G. *Can. J. Microbiol.* **1972**, *18*, 1129–1137.
- Abraham, W. R.; Arfmann, H. A. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2405–2408.
- Kang, J. G.; Kim, K. K.; Kang, K. Y. *Agric. Chem. Biotechnol.* **1999**, *42*, 146–150.
- Skolko, A. J.; Grove, J. W. *Can. J. Bot.* **1953**, *31*, 779–809.

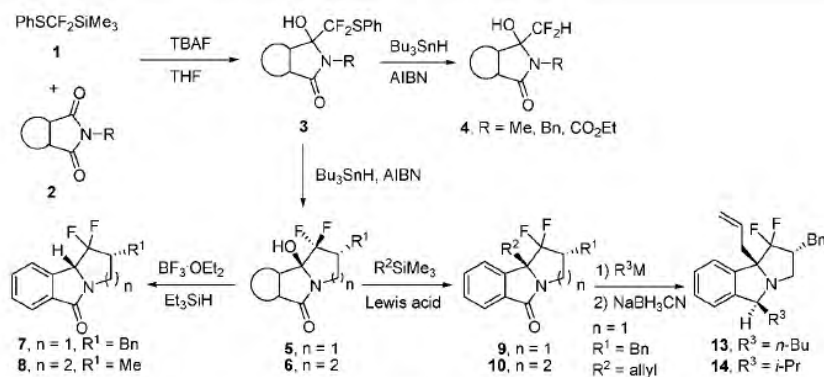
Fluoride-Catalyzed Addition of $\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ to *N*-Substituted Cyclic Imides Followed by Radical Cyclization: General Synthetic Strategy of *gem*-Difluoromethylenated 1-Azabicyclic Compounds

Teerawut Bootwicha,[†] Duanghathai Panichakul,[†] Chutima Kuhakarn,[†] Samran Prabpai,^{†,‡} Palangpon Kongsaree,^{†,‡} Patoomratana Tuchinda,[†] Vichai Reutrakul,[†] and Manat Pohmakotr^{*,†}

Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Center for Excellence in Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

scmpk@mahidol.ac.th

Received December 23, 2008



$\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ (**1**) was found, for the first time, to undergo fluoride-catalyzed nucleophilic difluoro-(phenylsulfanyl)methylation reaction to cyclic imides **2**, affording the corresponding adducts **3** in moderate to good yields. Reductive cleavage of the phenylsulfanyl group of *N*-alkylated adducts **3** with Bu_3SnH /AIBN yielded *gem*-difluoromethylated products **4**. Under the same reduction conditions, *N*-alkenylated and *N*-alkynylated adducts **3** afforded the corresponding *gem*-difluoromethylenated 1-azabicyclic compounds **5** and **6** with *trans* stereoselectivity. These compounds were employed as precursors for preparing substituted *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidinones and indolizidinones **7** and **8** by treatment with $\text{Et}_3\text{SiH}/\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, and compounds **9** and **10** by nucleophilic displacement of the hydroxyl group, using organosilanes in the presence of $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$. The synthesis of highly substituted *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidines **13** and **14** was also demonstrated.

Introduction

gem-Difluoromethylene moiety has been incorporated into bioactive compounds due to its properties as an isopolar and isosteric substituent for an oxygen.¹ The presence of the *gem*-difluoromethylene group can enhance the biological properties

of drug molecules.² Therefore, syntheses of *gem*-difluoromethylenated analogs of natural products have been extensively investigated.³ Few general synthetic methods for constructing

[†] Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC).

[‡] Center for Excellence in Protein Structure and Function.

(1) (a) Hiyama, T., Ed. *Organofluorine Compounds, Chemistry and Applications*; Springer: New York, 2000. (b) Hiyama, T.; Shimizu, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 214–231, and references cited.

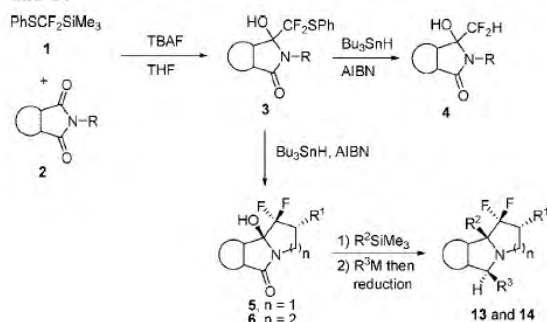
(2) See for examples: (a) Welch, J. T., Ed.; *Selective Fluorination in Organic and Bioorganic Chemistry*; American Chemical Society: Washington, D.C., 1991. (b) Fried, J.; Mitra, D. K.; Nagarajan, M.; Mehrotra, M. M. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 234–237. (c) Nakano, T.; Makino, M.; Morizawa, Y.; Matsumura, Y. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1019–1021. (d) Chang, C.-S.; Negishi, M.; Nakano, T.; Morizawa, Y.; Matsumura, Y.; Ichikawa, A. *Prostaglandins* **1997**, *53*, 83–90.

(3) Soloshonok, V. A., Ed. *Enantiocontrolled Synthesis of Fluoro-organic Compounds, Stereochemical Challenges and Biomedical Targets*; John Wiley and Sons, Ltd.: New York, 1999.

gem-difluoromethylenated compounds were previously reported.⁴ It is still desirable to develop new flexible and facile strategies for the preparation of these compounds. Recently, $\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ (**1**) has been demonstrated as a useful gem-difluoromethylene building block.⁵ Compound **1** reacts extensively with carbonyl derivatives,⁶ γ -ketoesters,⁷ imines,⁸ and alkyl bromides,⁹ providing convenient routes for the preparation of the corresponding gem-difluoromethylated alcohols, γ -lactones, amines, and alkanes, respectively. Furthermore, the stereoselective difluoromethylation of chiral imines using $\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ (**1**) and the synthesis of chiral disubstituted gem-difluoromethylenated pyrrolidines have been recently reported.^{10a} In addition, alternative new entries to assemble various fluorinated S-, O-, and N-heterocycles have also been developed.^{10b-d}

As a part of our ongoing research interest in developing methodologies for the preparation of 1-azabicyclic derivatives,¹¹ we sought for a general method to synthesize gem-difluoromethylenated 1-azabicyclic analogs, employing **1** as a gem-difluoromethylene building block. It has been demonstrated that cyclic imides can undergo fluoride-catalyzed trifluoromethylation, using (trifluoromethyl)trimethylsilane (CF_3SiMe_3).¹² Hence, it is anticipated that fluoride-catalyzed nucleophilic difluoro-

SCHEME 1. Fluoride-Catalyzed Nucleophilic Difluoro(phenylsulfanyl)methylation of **1** with Imides **2** and Synthetic Conversion of the Resulting Adducts **3** into Compounds **4**, **5**, and **6** and Subsequently to Compounds **13** and **14**



(phenylsulfanyl)methylation of **1** to cyclic imides **2** would generate the corresponding adducts **3**. When R groups of adducts **3** are allylic and homoallylic, reductive cleavage of the corresponding phenylsulfanyl moiety could afford radical intermediate that should then undergo intramolecular radical cyclization, providing gem-difluoromethylenated 1-azabicyclic compounds **5** and **6**, respectively (Scheme 1). Furthermore, nucleophilic displacement of the hydroxyl group and subsequent organometallic addition to carbonyl group followed by reduction would lead to highly substituted difluoromethylenated 1-azabicyclic compounds **13** and **14**. The proposed synthetic operations are summarized in Scheme 1.

Results and Discussion

The initial investigation involved fluoride-catalyzed nucleophilic difluoro(phenylsulfanyl)methylation of imide **2a** with $\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ (**1**). The expected adduct **3a** was obtained in 95% yield when the reaction was carried out using 10 mol % of anhydrous tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in dry THF at -78°C to room temperature overnight followed by acidic workup (2 M HCl; Table 1, entry 1). To demonstrate the generality of the reaction, the reactions of **1** with N-substituted phthalimide and succinimide derivatives, which were prepared by base-catalyzed N-alkylation of imides¹³ with alkylating agents (Table 1, entries 1–6, 8, 10–13, 15 and 17), Mitsunobu reaction of imides with alcohols¹⁴ (Table 1, entries 7, 14 and 16), and cross-olefin metathesis¹⁵ of N-alkenylated imides with alkenes (Table 1, entries 9 and 18), were investigated. The results are summarized in Table 1. Except for some cases, the reactions of **1** with imide derivatives conducted under the standard conditions as for **3a** readily gave the corresponding adducts; yields range from moderate to good (Table 1). In case of imide **2l**, under the standard conditions, adduct with double bond transposition was obtained as a major product (33% yield). Gratifyingly, the reaction employing tetrabutylammonium triphenyldifluorosilicate (TBAT) in place of TBAF gave adduct **3l** in moderate yield

- (4) See for examples: (a) Guo, Y.; Fujiwara, K.; Amii, H.; Uneyama, K. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8523–8526. (b) Arimitsu, S.; Hammond, G. B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8559–8561. (c) Fustero, S.; Fernández, B.; Sanz-Cervera, J. F.; Mateu, N.; Mosulén, S.; Carbajo, R. J.; Pineda-Lucena, A.; Ramírez de Arellano, C. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8716–8723. (d) Niida, A.; Mizumoto, M.; Narumi, T.; Inokuchi, E.; Oishi, S.; Ohno, H.; Otake, A.; Kitaura, K.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4118–4129. (e) You, Z.-W.; Zhang, X.; Qing, F.-L. *Synthesis* **2006**, 2535–2542. (f) You, Z.-W.; Jiang, Z.-X.; Wang, B.-L.; Qing, F.-L. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7261–7267. (g) Fustero, S.; Sánchez-Roselló, M.; Rodrigo, V.; del Pozo, C.; Sanz-Cervera, J. F.; Simón, A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4129–4132. (h) Arimitsu, S.; Hammond, G. B. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8665–8668. (i) Zheng, F.; Zhang, X.-H.; Qiu, X.-L.; Zhang, X.; Qing, F.-L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6083–6086. (j) Wang, R.-W.; Qing, F.-L. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2189–2192. (k) Crowley, P. J.; Fawcett, J.; Griffith, G. A.; Moralee, A. C.; Percy, J. M.; Salafia, V. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3297–3310. (l) De Kimpe, N.; Van Brabant, W. *Synlett* **2006**, 2039–2042. (m) Qin, Y.-Y.; Yang, Y.-Y.; Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *Synthesis* **2006**, 1475–1479. (n) Sato, K.; Tanai, A.; Matsuda, S.; Omote, M.; Ando, A.; Kumadaki, I. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7679–7681. (o) Yue, X.; Zhang, X.; Qing, F.-L. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 73–76. (p) Diab, S. A.; Sene, A.; Pfund, E.; Lequeux, T. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3895–3898. (q) Xu, W.; Dolbier, W. R., Jr.; Salazar, J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3535–3538. (r) Jakowiecki, J.; Loska, R.; Makosza, M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5436–5441. (s) Hang, X.-C.; Chen, Q.-Y.; Xiao, J.-C. *Synlett* **2008**, 1989–1992. (t) Huguenot, F.; Billac, A.; Brigand, P. J.; Portella, C. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2564–2569. (u) Beier, P.; Alexandrova, A. V.; Zibinsky, M.; Prakash, G. K. S. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10977–10985. (v) Ramachandran, V. P.; Chatterjee, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1195–1198. (w) Uneyama, K. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 550–576.

- (5) (a) Prakash, G. K. S.; Hu, J. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 921–930, and references cited. (b) Prakash, G. K. S.; Hu, J.; Olah, G. A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4457–4463.

- (6) (a) Prakash, G. K. S.; Hu, J.; Wang, Y.; Olah, G. A. *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 529–534. (b) Pohmakotr, M.; Boonkitpattarakul, K.; Ieawsuwan, W.; Jarussophon, S.; Duangdee, N.; Tuchinda, P.; Reutrakul, V. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5973–5985. (c) Mizuta, S.; Shibata, N.; Ogawa, S.; Fujimoto, H.; Nakamura, S.; Toru, T. *Chem. Commun.* **2006**, 2575–2577.

- (7) Pohmakotr, M.; Panichakul, D.; Tuchinda, P.; Reutrakul, V. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9429–9436.

- (8) Li, Y.; Hu, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5882–5886.

- (9) Li, Y.; Hu, J. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 382–385.

- (10) (a) Li, Y.; Hu, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2489–2492. (b) Verniest, G.; Surmont, R.; Hende, E. V.; Deweyre, A.; Deroose, F.; Thuring, J. W.; De Kimpe, N. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5458–5461. (c) Kishi, Y.; Nagura, H.; Inagi, S.; Fuchigami, T. *Chem. Commun.* **2008**, 3876–3878. (d) Hende, E. V.; Verniest, G.; De Kimpe, N. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2250–2253.

- (11) (a) Pohmakotr, M.; Numechai, P.; Prateetongkum, S.; Tuchinda, P.; Reutrakul, V. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3495–3497. (b) Pohmakotr, M.; Prateetongkum, S.; Chooprayoon, S.; Tuchinda, P.; Reutrakul, V. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2339–2347. (c) Pohmakotr, M.; Seubsai, A.; Numechai, P.; Tuchinda, P. *Synthesis* **2008**, 1733–1736.

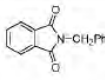
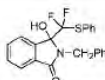
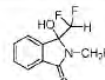
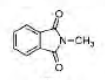
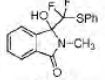
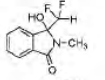
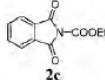
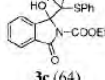
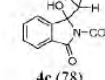
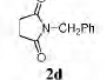
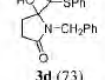
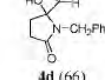
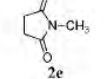
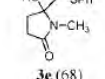
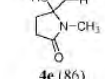
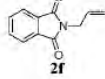
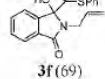
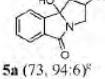
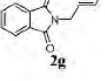
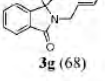
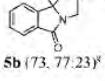
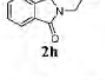
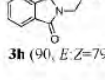
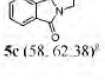
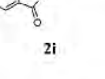
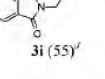
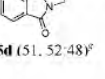
- (12) (a) Hoffmann-Röder, A.; Seiler, P.; Diederich, F. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2267–2269, and references cited. (b) Hoffmann-Röder, A.; Schweizer, E.; Egger, J.; Seiler, P.; Obst-Sander, U.; Wagner, B.; Kansy, M.; Banner, D. W.; Diederich, F. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 1205–1215.

- (13) Marson, C. M.; Khan, A.; Porter, R. A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4771–4775.

- (14) (a) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1–28. (b) Mitsunobu, O.; Wada, M.; Sano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 679–680. (c) Martin, S. F.; Chen, H. J.; Courtney, A. K.; Liao, Y.; Pätzelt, M.; Ramser, M. N.; Wagman, A. S. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7251–7264.

- (15) (a) Blechert, S.; Connon, S. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1900–1923. (b) McElhinney, A. D.; Marsden, S. P. *Synlett* **2005**, 2528–2530.

TABLE 1. Preparation of Adducts 3, *gem*-Difluoromethylated Lactams 4, and *gem*-Difluoromethylenated 1-Azabicyclic Compounds 5 or 6

entry	imides 2	3 (% yield) ^{a,b}	4, 5 or 6 (% yield ^a , <i>trans</i> : <i>cis</i>)	entry	imides 2	3 (% yield) ^{a,b}	4, 5 or 6 (% yield ^a , <i>trans</i> : <i>cis</i>)
1		 3a (95)	 4a (80)	10		 3j (62)	 5e (81, 90:10) ^f
2		 3b (70)	 4b (70)	11		 3k (68)	 5f (87, 66:34) ^f
3		 3c (64)	 4c (78)	12		 3l (83)	 5g (85, 64:36) ^f
4		 3d (73)	 4d (66)	13		 3m (68) ^f	 5h (73, <i>E</i> : <i>Z</i> =80:20) ^f
5		 3e (68)	 4e (86)	14		 3n (45) ^f	 5i (60, <i>E</i> : <i>Z</i> =85:15) ^f
6		 3f (69)	 5a (73, 94:6) ^f	15		 3o (50) ^f	 5j (45, 50:50) ^f
7		 3g (68)	 5b (73, 77:23) ^f	16		 3p (76)	 6a (63, 77:23) ^f
8		 3h (90, <i>E</i> : <i>Z</i> =79:21) ^f	 5c (58, 62:38) ^f	17		 3q (62)	 6b (63, 72:28) ^f
9		 3i (55) ^f	 5d (51, 52:48) ^f	18		 3r (77)	 6c (61, 70:30) ^f

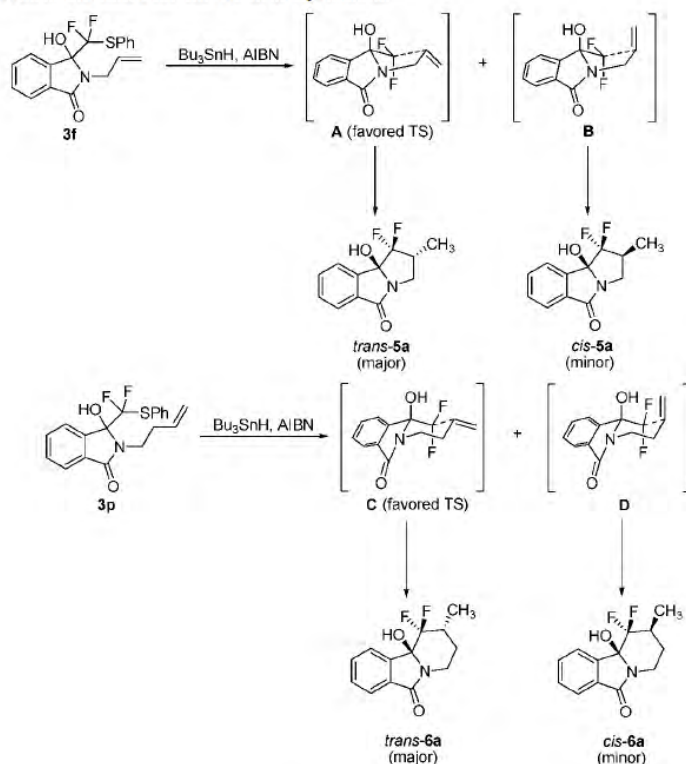
^a Isolated yields. ^b Unless otherwise noted, all reactions were carried out employing 10 mol % TBAF/THF, -78°C to rt. ^c By using 10 mol % TBAT/DMF, -78°C to rt. ^d By using 10 mol % TBAT/THF, -78 to 15°C , 5 h. ^e By using 10 mol % TBAT/THF, -78°C to rt. ^f Ratio of *E*- and *Z*-isomers was determined by ^1H NMR integration of the crude product. ^g Ratios of isomers (*trans*/*cis*) were determined by ^1H NMR integration of the crude products.

(55%) and the double bond transposition adduct was not observed (Table 1, entry 9). It is also worth mentioning that the reaction of 1 with *N*-trimethylsilylpropargyl succinimide 2n under the standard conditions furnished the expected product 3n in only 2% yield, but the desilylated adduct 3o was obtained as a major product (30% yield). However, the reaction employing 10 mol % of TBAT in dry DMF at -78°C to room temperature gave the desired product 3n in 45% yield together with 3o (10% yield; Table 1, entry 14). Similar results, that is, 3n (40% yield) and 3o (8% yield) were obtained when the

reaction was carried out using THF as the solvent. Interestingly, treatment of 1 with *N*-propargylphthalimide 2m employing 10 mol % TBAT in DMF at -78°C to room temperature unexpectedly provided trimethylsilylated derivative 3m in 68% yield (Table 1, entry 13).

The reductive desulfenylation of adducts 3a–e was achieved by treating with Bu_3SnH and a catalytic amount of AIBN in refluxing toluene. The *gem*-difluoromethylated products 4a–e were obtained in moderate to good yields (66–86%; Table 1,

SCHEME 2. Proposed Transition States for the Radical Cyclization



entries 1–5).^{6b,16} The *gem*-difluoromethyl radical intermediate, generated by CF₂–SPh bond cleavage of the adducts **3** containing the *N*-unsaturated substituents, could be trapped intramolecularly by an unsaturated functional moiety,¹⁷ affording *gem*-difluoromethylenated 1-azabicyclic compounds **5**. Thus, under similar radical conditions, intramolecular radical cyclization of **3f** readily proceeded to provide **5a** in 73% yield as a 94:6 mixture of *trans*- to *cis*-isomers together with a small amount of the corresponding reduced product. A single *trans*-**5a** was obtained in pure form after purification by either preparative thin-layer chromatography on silica gel or crystallization. Its relative stereochemistry was established by X-ray crystallography (see Supporting Information).

To demonstrate the efficiency and viability of our methodology, series of *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidine derivatives **5b–g**, as mixtures of isomers, were synthesized, in moderate to good yields, by treatment of adducts **3g–l** under standard radical conditions (Table 1, entries 7–12). Based on the X-ray crystallographic data of the major *trans*-isomer of **5a**, we

assumed that the *trans*-isomers of **5b–g** were the major isomers. Notably, similar radical cyclization of *N*-propargyl substituted adducts proceeded smoothly, providing the cyclized products in moderate yields (Table 1, entries 13–15). Cyclization of silylated alkynyl derivatives **3m** and **3n** afforded compounds **5h** and **5i** as a mixture of *E*- and *Z*-isomers. The *E*-isomer was obtained as a major isomer, of which the stereochemistry was established by NOE experiments (see Supporting Information). Irradiation of the olefinic proton of **5h** or **5i** led to no enhancement of the allylic protons. The formation of tributylstannylated product **5j** (Table 1, entry 15) presumably resulted from consecutive addition of the tributylstannyl group to the triple bond followed by *gem*-difluoromethyl radical addition to the resulting vinylstannane derivative.¹⁸ The presence of the exocyclic methylene moiety in compounds of types **5h** and **5i** should be valuable for further synthetic modification.

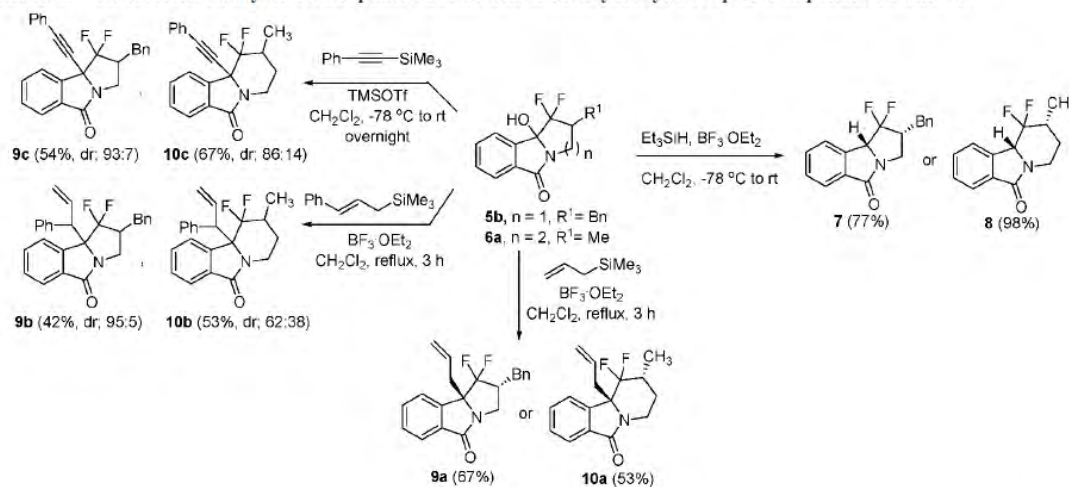
Having established an efficient access to *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidine derivatives **5**, we further demonstrated that our method could be used as a general route for the synthesis of *gem*-difluoromethylenated indolizidine derivatives **6**. Thus, *N*-homoallylated adducts **3p–r** were treated with Bu₃SnH/AIBN in refluxing toluene, yielding the corresponding *gem*-difluoromethylenated indolizidines **6a–c** as a mixture of *trans*- and *cis*-isomers (Table 1, entries 16–18). The relative stereochemistry of the major *trans*-**6a** was confirmed by X-ray crystallography (see Supporting Information).

(16) Buttle, L. A.; Motherwell, W. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3995–3998.

(17) Radical mediated the construction of 1-azabicyclic compounds, see for examples: (a) Zard, S. Z. *Radical Reactions in Organic Synthesis*; Oxford University Press: New York, 2003. (b) Chen, M.-J.; Tsai, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 6271–6274. (c) Bryans, J. S.; Large, J. M.; Parsons, A. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2905–2910. (d) Keusenkothen, P. F.; Smith, M. B. *Tetrahedron* **1992**, 48, 2977–2992. (e) Knapp, S.; Gibson, F. S. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4802–4809. (f) Knapp, S.; Gibson, F. S.; Choe, Y. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5397–5400. (g) Burnett, D. A.; Choi, J.-K.; Hart, D. J.; Tsai, Y.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 8201–8209. (h) Hart, D. J.; Tsai, Y.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 8209–8217. (i) Choi, J.-K.; Hart, D. J.; Tsai, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4765–4768.

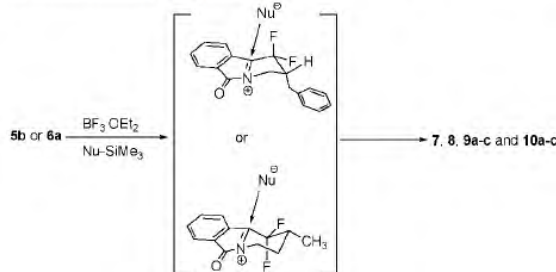
(18) (a) Huang, J.-M.; Hong, S.-C.; Wu, K.-L.; Tsai, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3047–3050. (b) Lee, E.; Tae, J. S.; Lee, C.; Park, C. M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 4831–4834. (c) Capella, L.; Montecchi, P. C.; Nanni, D. J. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3368–3374.

SCHEME 3. Lewis Acid-Catalyzed Nucleophilic Substitution of the Hydroxyl Group of Compounds 5b and 6a



The stereochemical outcomes of compounds 5 and 6 can be rationalized as shown in Scheme 2. The radical mediated cyclization was proposed to proceed via 5-*exo* or 6-*exo* cyclization mode.¹⁹ Transition states A and C are energetically more favorable due to minimized steric interaction between the pseudoaxial hydroxyl group and the vinylic double bond, resulting in the formation of thermodynamically more stable *trans*-isomer of pyrrolidine or piperidine heterocycles.

Having a general route to synthesize derivatives 5 and 6, we subsequently focused on the synthetic utilities of these adducts as precursors for the preparation of substituted *gem*-difluoromethyleneated pyrrolizidines and indolizidines. It is anticipated that the presence of hydroxyl group in adducts 5 and 6 should provide a convenient access to an iminium intermediate,^{20,21} which, in principle, can be trapped by an appropriate nucleophile. The results are summarized in Scheme 3. The adducts 5b (*trans/cis*; 77:23) and 6a (*trans/cis*; 88:12) were reduced with BF₃·OEt₂ and Et₃SiH²² in CH₂Cl₂ at -78 °C to room temperature, generating the corresponding lactams 7 (77% yield) and 8 (98% yield) as a single isomer, as confirmed by the NOE experiments (see Supporting Information). Alkylation of 5b with Grignard reagents (MeMgBr or *i*-PrMgCl in THF in the presence of BF₃·OEt₂ at 0 °C to rt, overnight) or organocoppers (*n*-Bu₂CuLi or *n*-Bu₂Cu(CN)Li₂ in THF in the presence of BF₃·OEt₂ at -30 °C to rt overnight) was unsuccessful, and only

SCHEME 4. Proposed Transition States for the Formation of *trans*-Isomers of Products 7–10

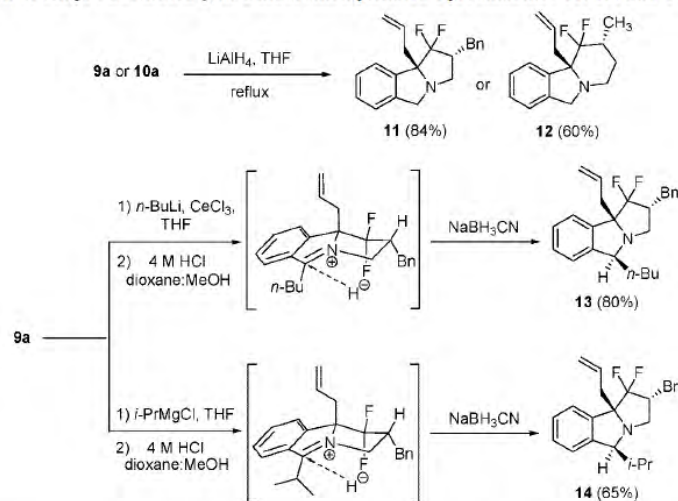
starting material was recovered. However, allylation reaction of 5b, employing allyltrimethylsilane with BF₃·OEt₂ in CH₂Cl₂ at -78 °C to rt overnight, led to 9a in low yield (10% yield) together with recovery of 5b. Gratifyingly, when the reaction was performed under refluxing conditions for 3 h, 9a was obtained in moderate yield (67% yield). Similarly, under the same conditions, 10a was synthesized in 53% yield from the corresponding compound 6a. Both compounds 9a and 10a were obtained as a single isomer (see Supporting Information). Similarly, treatment of 5b and 6a with cinnamyltrimethylsilane afforded adducts 9b and 10b, respectively, as a mixture of diastereomers, as shown in Scheme 3. The reactions of 5b and 6a with phenyltrimethylsilylacetylene employing trimethylsilyl triflate (TMSOTf) as the Lewis acid at -78 °C to rt overnight provided the respective adducts 9c (54% yield as a 93:7 mixture of isomers) and 10c (67% yield as a 86:14 mixture of isomers). The use of BF₃·OEt₂, SnCl₄, and TiCl₄ did not furnish to the desired products but led to the recovery of the starting material 5b and phenylacetylene. This result may be due to extensive decomposition of phenyltrimethylsilylacetylene to phenylacetylene prior to its addition to iminium ion intermediate. The relative *trans* stereochemistries of adducts 7 and 9 could be rationalized based on the fact that the nucleophiles (hydride or organosilanes) attack the initially formed iminium ion intermediate from the face opposite to the benzyl group to avoid steric interaction (Scheme 4). In addition, attack of nucleophiles to the iminium ion derived from 6a from the pseudoaxial direction

(19) (a) Beckwith, A. L. *J. Tetrahedron* **1981**, *37*, 3073–3100. (b) Spellmeyer, D. C.; Houk, K. N. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 959–974.

(20) For reviews on *N*-acyliminium ion chemistry, see: (a) de Koning, H.; Speckamp, W. N. In *Houben-Weyl, Stereoselective Synthesis*; Helmchen, G.; Hoffmann, R. W.; Mulzer, J.; Schaumann, E., Eds.; Thieme Medical Publishers: New York, 1995; Vol. E21, p 1953. (b) Speckamp, W. N.; Moolenaar, M. J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3817–3856. (c) Maryanoff, B. E.; Zhang, H.-C.; Cohen, J. H.; Turchi, I. J.; Maryanoff, C. A. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1431–1628.

(21) For some recent examples on the reactions of *N*-acyliminium ions with carbon nucleophiles, see: (a) Raheem, I. T.; Thiara, P. S.; Jacobsen, E. N. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1577–1580. (b) Vieira, A. S.; Ferreira, F.; Fiorante, P. F.; Guadagnin, R. C.; Stefani, H. A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3306–3314. (c) Morgan, I. R.; Yazici, A.; Pyne, S. G. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1409–1419. (d) Yu, D.-S.; Xu, W.-X.; Liu, L.-X.; Huang, P.-Q. *Synlett* **2008**, 1189–1192. (e) Zhang, F.; Simpkins, N. S.; Wilson, C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5942–5947. (f) Tranchant, M.-J.; Moine, C.; Othman, R. B.; Bousquet, T.; Othman, M.; Dalla, V. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4477–4480. (g) Osante, I.; Lete, E.; Sotomayor, N. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1253–1256. (h) Ollero, L.; Mentink, G.; Ruijs, F. P. J. T.; Speckamp, W. N.; Hiemstra, H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1331–1334.

(22) For an example, see Chen, M.-D.; Zhou, X.; He, M.-Z.; Ruan, Y.-P.; Huang, P.-Q. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1651–1657.

SCHEME 5. Preparation of Alkyl-Substituted *gem*-Difluoromethylenated Pyrrolizidines 11, 13, and 14 and Indolizidine 12

could be further explained by stereoelectronic principle, leading preferably to the *trans*-isomers of adducts 8 and 10.

The conversions of compounds 9a and 10a to alkyl-substituted *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidines and indolizidines proceeded smoothly (Scheme 5). Reduction of compounds 9a and 10a using LiAlH_4 in refluxing THF provided the corresponding *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidine 11 (84% yield) and indolizidine 12 (60% yield), respectively (Scheme 5). The reaction of 9a with $n\text{-BuLi/CeCl}_3$ in THF²³ followed by acidification generating in situ iminium ion intermediate, which was subsequently reduced by sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN) to afford butyl-substituted *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidine 13 in 80% yield as a single diastereomer. Similarly, a single diastereomer of isopropyl-substituted *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidine 14 was produced in 65% yield. The relative stereochemistries of compounds 11–14 were established by NOE experiments (see Supporting Information). The observed stereochemical outcomes of the reactions can be explained that the addition of organometallic reagents followed by acidification afforded iminium ions which were preferably reduced from the less sterically hindered face opposite to the allyl substituent (Scheme 5). It is worth mentioning that compound 10a did not react with either $n\text{-BuLi/CeCl}_3$ or $i\text{-PrMgCl}$ in THF under the same conditions as for 9a.

Conclusion

In conclusion, we have successfully developed for the novel fluoride-catalyzed nucleophilic difluoro(phenylsulfanyl)methylation reactions of $\text{PhSCF}_2\text{SiMe}_3$ to succinic and phthalimide derivatives. The resulting adducts were employed as useful precursors for the preparation of *gem*-difluoromethylenated pyrrolizidines and indolizidines. The synthetic operation involves sequential intramolecular radical cyclization, nucleophilic displacement of the hydroxyl functionality using Lewis acid/allyltrimethylsilanes or trimethylsilylacetylenes, organometallic addition employing $n\text{-BuLi/CeCl}_3$ and $i\text{-PrMgCl}$ onto the

carbonyl group of the γ -lactam moiety, followed by reduction of the resulting adducts with NaBH_3CN . The synthetic application of our method for preparation of *gem*-difluoromethylenated analogs of some polyhydroxylated natural products is currently being investigated.

Experimental Section

General Procedure for the Preparation of Compounds 3. 2-Benzyl-3-(difluoro(phenylsulfanyl)methyl)-3-hydroxy-isindolin-1-one (3a). To a mixture of compound 1 (0.928 g, 4 mmol) and 2-benzylisindoline-1,3-dione (2a; 0.470 g, 2 mmol) in THF (5 mL), was added 10 mol % TBAF (0.4 mL, 0.4 mmol, 1 M solution in THF). The reaction mixture was stirred at -78°C followed by slowly warming up to room temperature overnight. The solution was quenched with 1 M HCl (3 mL) and extracted with EtOAc (3 $\times$ 25 mL). The organic phase was washed successively with water and brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After solvent removal, the crude product was purified by radial chromatography (SiO_2 , 10–20% EtOAc in hexanes) to give a white crystal of 3a (0.753 g, 95% yield, mp = $142\text{--}144^\circ\text{C}$). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.86–7.83 (m, 1H, ArH), 7.72–7.68 (m, 1H, ArH), 7.60–7.58 (m, 2H, ArH), 7.35–7.25 (m, 3H, ArH), 7.20–7.10 (m, 7H, ArH), 4.95 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CHH), 4.45 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CHH), 3.85 (br s, 1H, OH). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 168.3 (C=O), 141.9 (C), 137.5 (2 $\times$ C), 136.7 (2 $\times$ CH), 132.8 (CH), 131.5 (C), 131.0 (2 $\times$ CH), 130.1 (CH), 129.24 (t, J = 187.5 Hz, CF_2), 129.0 (2 $\times$ CH), 128.5 (3 $\times$ CH), 127.4 (CH), 124.2 (CH), 123.8 (CH), 91.2 (t, J = 25.0 Hz, C), 43.5 (CH_2). ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3): δ -80.48 (d, J = 211.0 Hz, 1F), -81.57 (d, J = 211.0 Hz, 1F). IR (nujol): ν_{max} 3207br, 1682s, 1612s, 1612m, 1497m, 1471s, 1456s, 1455s, 1427m, 1397s, 1361s, 1163s, 1137m, 1108m, 1073m, 1061s, 1027m, 1012m, 974m, 945m, 907m, 897m, 886m, 845m, 823m, 770s, 752s, 709s, 700s, 690s cm^{-1} . MS: m/z (%) relative intensity 398 (M^+ , 10), 380 (7), 250 (6), 238 (47), 161 (11), 160 (100), 91 (20), 65 (7). HRMS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{F}_2\text{NO}_2\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 420.0846; found, 420.0851.

General Procedure for the Reductive Cyclization of Compounds 3 to Compounds 5. Preparation of 1,1-Difluoro-9b-hydroxy-2-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolo[2,1-a]isindol-5(9bH)-one (5a). Argon was bubbled through a solution of 3f (0.374 g, 1 mmol) in toluene (2 mL) for 30 min, and a mixture of Bu_3SnH (0.47 mL, 1.75 mmol) and AIBN (25 mg, 0.15 mmol) in toluene

(23) Nukui, S.; Sodeoka, M.; Sasai, H.; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 398–404.

(8 mL) was added dropwise at reflux over a 1 h period followed by refluxing for an additional 4 h. Volatiles were evaporated and the tin byproduct were removed by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ then EtOAc) to give a crude product, which was purified by column chromatography (SiO₂, 20% EtOAc in hexanes) to afford white crystals of **5a** (0.191 g, 73% yield, mp = 122–125 °C) as a 94:6 mixture of *trans*- and *cis*-isomers. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, *cis*-isomer marked*): δ 7.68–7.64 (m, 6H, ArH of *trans*- and *cis*-isomers), 7.57–7.55 (m, 2H, ArH of *trans*- and *cis*-isomers), 4.12* (dd, *J* = 12.0, 9.3 Hz, 1H, CHH), 3.72 (br s, 2H, OH of *trans*- and *cis*-isomers), 3.68–3.63 (m, 1H, CHH), 3.39–3.27 (m, 3H, CHH of the *trans*-isomer and CH of *trans*- and *cis*-isomers), 3.13* (dd, *J* = 12.0, 4.9 Hz, 1H, CHH), 1.50* (d, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (C=O), 141.4 (C), 133.2 (CH), 132.9 (C), 130.9 (CH), 123.9 (CH), 123.2 (CH), 122.9 (t, *J* = 258.2 Hz, CF₂), 93.1 (t, *J* = 25.1 Hz, C), 46.4 (d, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 39.3 (t, *J* = 22.7 Hz, CH), 9.5 (d, *J* = 7.1 Hz, CH₃). ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃, *cis*-isomer marked*): δ –101.16* (dd, *J* = 232.2, 23.5 Hz, 1F), –126.86* (d, *J* = 232.2 Hz, 1F), –127.82 (dd, *J* = 220.9, 24.9 Hz, 1F), –129.60 (dd, *J* = 220.9, 6.8 Hz, 1F). IR (nujol): ν_{max} 3237br, 1681s, 1616s, 1469s, 1378m, 1239m, 1147m, 1123m, 1958m, 1003m, 759s, 709m, 701m, 604m cm^{–1}. MS: *m/z* (%) relative intensity 239 (M⁺, 33), 203 (22), 201 (62), 200 (100), 188 (66), 172 (23), 161 (34), 160 (42), 145 (27), 133 (48), 132 (22), 125 (25), 117 (59), 91 (28), 77 (41). HRMS (ESI-TOF) Calcd for C₁₂H₁₁F₂N₂O₂Na [M + Na]⁺, 262.0656; found, 262.0634.

General Procedure for the Preparation of Compounds 9 and 10. Preparation of (2*R**,9*bR**)-9*b*-Allyl-2-benzyl-1,1-difluoro-2,3-dihydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*a*]isoindole-5(9*bH*)-one (**9a**). BF₃·OEt₂ (0.6 mL, 4.93 mmol) and allyltrimethylsilane (2.6 mL, 16.5 mmol) were added to a stirred solution of **5b** (1.04 g, 3.3 mmol) in CH₂Cl₂ (12 mL) at room temperature and the mixture was heated at reflux for 3 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous sodium hydrogen carbonate and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). The combined extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Filtration followed by evaporation gave a crude product, which was purified by preparative thin-layer chromatography (SiO₂, 10% EtOAc in hexanes) to give a white solid of **9a** as a *trans*-isomer (0.75 g, 67% yield, mp = 91–93 °C). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.63 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.54 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, ArH), 7.50 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.30–7.25 (m, 3H, ArH), 5.31 (ddt, *J* = 17.1, 10.1, 7.1 Hz, 1H, CH), 5.03 (dd, *J* = 17.1, 1.4 Hz, 1H, CHH), 4.97 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, CHH), 3.73 (dd, *J* = 12.1, 8.7 Hz, 1H, CHH), 3.56 (dd, *J* = 12.1, 9.5 Hz, 1H, CHH), 3.39–3.29 (m, 1H, CH), 3.11 (dd, *J* = 13.9, 5.3 Hz, 1H, CHH), 2.91 (dd, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 1H, CHH), 2.75 (dd, *J* = 13.9, 9.4 Hz, 2H, CHH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.1 (C=O), 142.8 (d, *J* = 4.3 Hz, C), 137.9 (C), 133.8 (C), 132.4 (CH), 129.7 (CH), 129.4 (CH), 128.74 (2 × CH), 128.67 (2 × CH), 126.8 (CH), 124.9 (dd, *J* = 263.4, 255.4 Hz, CF₂), 124.2 (CH), 122.5 (CH), 120.2 (CH₂), 74.5 (t, *J* = 25.3 Hz, C), 48.3 (t, *J* = 22.6 Hz, CH), 45.1 (d, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 37.0 (d, *J* = 2.4 Hz, CH₂), 32.9 (d, *J* = 7.8 Hz, CH₂). ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃): δ –118.14 (dd, *J* = 226.5, 23.0 Hz, 1F), –121.05 (dd, *J* = 226.5, 7.1 Hz, 1F). IR (KBr): ν_{max} 1703s, 1643w, 1612w, 1491w, 1467m, 1363s, 1220s, 1049s, 751m, 704s cm^{–1}. MS: *m/z* (%) relative intensity 340 (M⁺ + 1, 11), 339 (M⁺, 2), 298 (100), 249 (20), 91 (64), 65 (11). HRMS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₁₉F₂NONa [M + Na]⁺, 362.1319.

Preparation of (2*R,9*bR**)-9*b*-Allyl-2-benzyl-1,1-difluoro-2,3,5,9*b*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*a*]isoindole (**11**).** To a suspension of LiAlH₄ (4.3 mg, 1.13 mmol) in THF (3 mL) was added a solution of **9a** (0.153 g, 0.45 mmol) in THF (4 mL). The mixture was heated at reflux overnight and quenched at 0 °C by careful addition of water (0.5 mL) followed by 1 M NaOH (0.5 mL). The resulting mixture was filtered through a Celite pad and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Purification of the crude

product by column chromatography (SiO₂, 5% EtOAc in hexanes) gave a pale yellow oil of **11** (0.123 g, 84% yield). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.30–7.25 (m, 5H, ArH), 7.21–7.15 (m, 4H, ArH), 5.50 (ddt, *J* = 17.2, 10.1, 7.0 Hz, 1H, CH), 4.95 (dd, *J* = 17.2, 1.8 Hz, 1H, CHH), 4.91 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, CHH), 4.23 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, CHH), 3.76 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, CHH), 3.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CHH), 3.02 (dd, *J* = 13.9, 5.1 Hz, 1H, CHH), 2.90–2.86 (m, 1H, CH), 2.63–2.58 (m, 2H, CHH, CHH), 2.46 (dd, *J* = 13.9, 7.4 Hz, 1H, CHH), 2.42 (ddd, *J* = 11.2, 9.1, 1.7 Hz, 1H, CHH). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 140.7 (C), 139.1 (C), 138.8 (d, *J* = 7.5 Hz, C), 132.8 (d, *J* = 1.4 Hz, CH), 128.6 (2 × CH), 128.5 (2 × CH), 127.9 (CH), 127.0 (CH), 126.9 (t, *J* = 261.0 Hz, CF₂), 126.3 (CH), 123.9 (CH), 122.5 (CH), 118.4 (CH₂), 81.5 (t, *J* = 22.8 Hz, C), 60.2 (CH₂), 57.3 (d, *J* = 9.1 Hz, CH₂), 46.6 (t, *J* = 21.6 Hz, CH), 43.1 (t, *J* = 3.0 Hz, CH₂), 31.0 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₂). ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃): δ –109.23 (dd, *J* = 224.2, 23.0 Hz, 1F), –115.08 (dd, *J* = 223.7, 6.1 Hz, 1F). IR (neat): ν_{max} 1641m, 1456s, 1218s, 724s cm^{–1}. MS: *m/z* (%) relative intensity 278 (9), 236 (100), 216 (7), 194 (18), 176 (7), 130 (6). HRMS (ESI-TOF) Calcd for C₂₁H₂₂F₂N [M + H]⁺, 326.1722; found, 326.1767.

Preparation of (2*R,5*S**,9*bR**)-9*b*-Allyl-2-benzyl-5-butyl-1,1-difluoro-2,3,5,9*b*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*a*]isoindole (**13**).** To a solution of CeCl₃ (0.65 g, 1.75 mmol) in THF (5 mL) was added *n*-BuLi (1.2 mL, 1.74 mmol, 1.46 M solution in hexane) at –78 °C. After stirring at –78 °C for 1 h, a solution of **9a** (0.12 g, 0.35 mmol) in THF (5 mL) was added. The mixture was stirred at –78 °C for 10 h and then gradually warmed to –20 °C, and quenched by the addition of 4 M HCl-dioxane in MeOH (4 M HCl-dioxane/MeOH, 1:29, 5 mL) followed by excess NaBH₃CN. The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and 10% aqueous NaOH solution (5 mL) was then added. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). The combined extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. Filtration followed by evaporation gave a crude product, which was purified by radial chromatography (SiO₂, 5% EtOAc in hexanes) to afford a colorless oil of **13** (0.094 g, 80% yield). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.31–7.18 (m, 8H, ArH), 7.13–7.11 (m, 1H, ArH), 5.59 (ddt, *J* = 17.3, 10.4, 7.1 Hz, 1H, CH), 4.96–4.92 (m, 2H, CH₂), 3.83 (dd, *J* = 9.1, 3.4 Hz, 1H, CH), 3.40 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, CHH), 3.04 (dd, *J* = 13.7, 4.9 Hz, 1H, CHH), 2.97–2.90 (m, 1H, CH), 2.63 (dd, *J* = 13.7, 9.7 Hz, 1H, CHH), 2.57–2.53 (m, 2H, CHH, CHH), 2.47 (dd, *J* = 13.9, 7.3 Hz, 1H, CHH), 1.72–1.68 (m, 1H, CHH), 1.52–1.26 (m, 5H, CHH, 2 × CH₂), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 144.9 (C), 139.2 (C), 138.2 (d, *J* = 6.8 Hz, C), 133.9 (CH), 128.7 (2 × CH), 128.5 (2 × CH), 127.9 (CH), 127.0 (dd, *J* = 263.5, 251.9 Hz, CF₂), 127.0 (CH), 126.3 (CH), 123.0 (CH), 122.3 (CH), 118.0 (CH₂), 80.5 (t, *J* = 22.0 Hz, C), 73.5 (CH), 58.4 (d, *J* = 9.6 Hz, CH₂), 46.3 (t, *J* = 22.0 Hz, CH), 43.0 (d, *J* = 3.8 Hz, CH₂), 38.1 (CH₂), 31.7 (d, *J* = 5.5 Hz, CH₂), 29.1 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.1 (CH₃). ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃): δ –113.12 (dd, *J* = 222.3, 24.4 Hz, 1F), –120.03 (d, *J* = 222.3 Hz, 1F). IR (neat): ν_{max} 1642w, 1496m, 1455m, 1220s, 760m, 700s cm^{–1}. MS: *m/z* (%) relative intensity 382 (M⁺ + 1, 14), 340 (100), 324 (9), 284 (7), 117 (12), 91 (16). HRMS (ESI-TOF) Calcd for C₂₅H₃₀F₂N [M + H]⁺, 382.2348; found, 382.2322.

Preparation of (2*R,5*S**,9*bR**)-9*b*-Allyl-2-benzyl-1,1-difluoro-5-isopropyl-2,3,5,9*b*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*a*]isoindole (**14**).** *i*-Propylmagnesium chloride (0.3 mL, 0.6 mmol, 2 M solution in THF) was slowly added to a solution of **9a** (0.04 g, 0.12 mmol) in THF (1 mL) at 0 °C. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 4 h. The reaction mixture was cooled to 0 °C and 4 M HCl-dioxane in MeOH (4 M HCl-dioxane/MeOH, 1:29, 5 mL) was added, followed by the addition of excess NaBH₃CN. After removal of the ice-bath, the reaction mixture was stirred for an additional 1 h and 10% aqueous NaOH solution (5 mL) was then added. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). The combined extracts were

washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Filtration followed by evaporation gave a crude product, which was purified by radial chromatography (SiO_2 , hexanes then 5% EtOAc in hexanes) to afford a pale yellow solid of **14** (0.029 g, 65% yield, mp = 87–89 °C). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.31–7.14 (m, 9H, ArH), 5.88–5.80 (m, 1H, CH), 5.06 (d, J = 17.2 Hz, 1H, CHH), 5.02 (d, J = 10.1 Hz, 1H, CHH), 3.79 (d, J = 4.7 Hz, 1H, CH), 3.41 (dd, J = 9.3, 7.7 Hz, 1H, CHH), 3.03 (dd, J = 13.8, 4.7 Hz, 1H, CHH), 3.03–2.93 (m, 1H, CH), 2.65–2.59 (m, 2H, CHH, CHH), 2.55 (t, J = 9.9 Hz, 1H, CHH), 2.49–2.45 (m, 1H, CHH), 1.97–1.90 (m, 1H, CH(CH_3)₂), 1.04 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3), 0.76 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 143.3 (C), 139.4 (d, J = 6.8 Hz, C), 139.3 (C), 134.3 (CH), 128.7 (2 $\times$ CH), 128.5 (2 $\times$ CH), 127.8 (CH), 127.0 (dd, J = 264.0, 251.8 Hz, CF_2), 126.9 (CH), 126.3 (CH), 122.8 (CH), 122.7 (CH), 118.0 (CH_2), 80.0 (t, J = 22.0 Hz, C), 79.8 (CH), 59.2 (d, J = 9.8 Hz, CH_2), 46.5 (t, J = 21.1 Hz, CH), 43.0 (d, J = 4.3 Hz, CH_2), 34.0 (CH), 31.9 (d, J = 5.9 Hz, CH_2), 20.6 (CH_3), 18.0 (CH_3). ^{19}F

NMR (470 MHz, CDCl_3): δ –112.35 (dd, J = 222.8, 24.9 Hz, 1F), –120.23 (d, J = 222.3 Hz, 1F). IR (KBr): ν_{max} 3074br, 1458m, 1210s, 1017s, 761s, 699s cm^{-1} . MS: m/z (%) relative intensity 368 ($\text{M}^+ + 1$, 7), 326 (100), 284 (26), 117 (14), 91 (14). HRMS (ESI-TOF) Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 368.2192; found, 368.2243.

Acknowledgment. Financial support from the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Commission on Higher Education (CHE-RES-RG), Ministry of Education, and the Thailand Research Fund (to M.P., BRG49800005; and to P.K., BRG50080008) is gratefully acknowledged.

Supporting Information Available: Experimental details and characterization data for all compounds and CIF data for single-crystal X-ray analyses of *trans*-**5a** and *trans*-**6a**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JO802794U

Diterpenes, Sesquiterpenes, and a Sesquiterpene–Coumarin Conjugate from *Jatropha integerrima*

Somyote Sutthivaiyakit,^{*,†} Wantana Mongkolvisut,[‡] Samran Prabpai,[§] and Palangpon Kongsaree[§]

Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Krungthep, Bangkok 10120, Thailand, and Department of Chemistry and Center for Excellence in Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Received June 7, 2009

Five new compounds, 2 α -hydroxyjatropholone (1), 2 β -hydroxyjatropholone (2), 1,5-dioxo-2,3-dihydroxyrharnnofola-4(10),6,11(18),15-tetraene (3), 2-keto-5-hydroxyguaia-3,11-diene (4), and a sesquiterpene–coumarin conjugate, jatrophadioxan (5), and nine known compounds have been isolated from the roots of *Jatropha integerrima*. The structures were established from spectroscopic data, and the relative configuration of 1 was confirmed by X-ray crystallography. Six diterpenes were evaluated for their antiparasitic, antituberculosis, and cytotoxic activities.

In continuation of our recent studies of biologically active compounds from *Jatropha integerrima* Jacq. (Euphorbiaceae),^{1,2} we herein report the isolation of five new compounds (1–5), three diterpenes, one sesquiterpene, and a sesquiterpene–coumarin conjugate. Nine known compounds, 1 β -hydroxy-10 β H-guaia-4,11-dien-3-one,³ 4-hydroxy-10-epirotundone,⁴ citralitrone,⁵ stigmast-4-en-6 β -ol-3-one,⁶ jatropholone A (6),⁷ jatropholone B (7),⁷ caniojane,⁸ and 1,11-bisepi-caniojane,⁸ were also isolated from a hexane extract of the roots.

Compound 1 was obtained as pale yellow plates with mp 208–210 °C. The HRESIMS spectrum gave an [M + H]⁺ ion at *m/z* 313.1719, corresponding to the molecular formula C₂₀H₂₄O₃. The FTIR spectrum had absorption maxima indicating OH (3225 cm⁻¹), carbonyl (1693 cm⁻¹), and aromatic (1595 cm⁻¹) groups. The presence of an exocyclic methylene group was revealed by methylene proton signals at δ 5.17 and 4.63 (1H each) and ¹³C NMR signals at δ 115.1 (CH₂) and 135.3 (qC). The ¹³C NMR signals at δ 150.3 (qC), 146.0 (qC), 138.1 (qC), 134.3 (qC), 132.1 (qC), and 129.7 (qC) as well as signals of a methyl group at δ 2.25 (s) and δ 13.3 (CH₃) indicated a fully substituted aromatic ring with one OH and one methyl substituent group. Two mutually coupled methine proton signals [δ 1.55 (1H, d, *J* = 8.1 Hz) and 0.94] both showed HMBC correlations to the carbon resonances of two quaternary methyl groups [δ 28.1 (C-18) and 16.1 (C-19)] and to the aromatic carbon resonance at δ 138.1 (C-12), indicating connectivity between a cyclopropane moiety and an aromatic nucleus as found in jatropholones A (6) and B (7),⁷ also isolated in the present study. The differences were a methyl proton singlet at δ 1.40 instead of a doublet at approximately δ 1.27, as well as two sets of AB doublets (benzylic methylene protons) at δ 3.10 and 2.99 (both with *J* = 16.3 Hz) instead of two sets of doublets of doublets at ca. δ 3.25 and 2.50, as reported for 6 and 7, indicating the presence of an additional OH group at C-2. Long-range ¹H, ¹³C correlations were observed from δ 3.10 (H-1) and 1.40 (H-16) to δ 207.1 (C-3). Thus, compound 1 was identified as 2-hydroxyjatropholone. Full assignments of the ¹H and ¹³C NMR resonances (see Experimental Section) were based on ¹H–¹H COSY, HMQC, and HMBC experiments. The relative configuration of 1 was established from an X-ray single-crystal analysis (Figure 1), indicating an α -oriented 2-OH group.

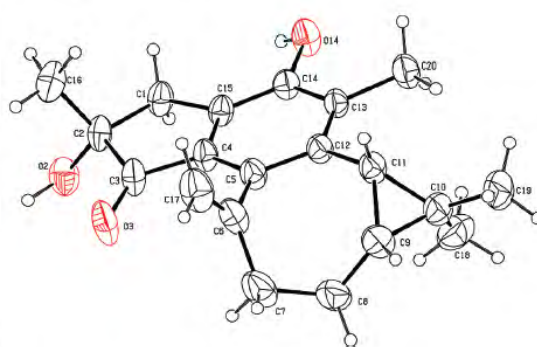
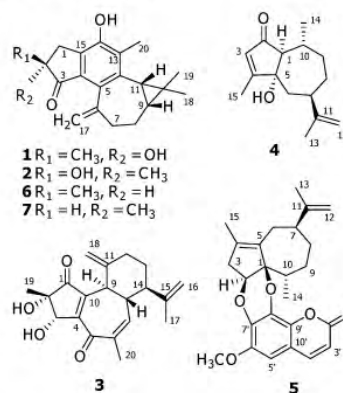


Figure 1. ORTEP drawing of 1.



* To whom correspondence should be addressed. Tel: (662) 319-0931. Fax: (662) 319-1900. E-mail: s_somyote@ru.ac.th.

[†] Ramkhamhaeng University.

[‡] Rajamangala University of Technology Krungthep.

[§] Mahidol University.

Compound 2 was a colorless oil having the molecular formula C₂₀H₂₄O₃ (HRESIMS). The FTIR and ¹H and ¹³C NMR spectra of 2 were similar to those of compound 1. The difference in the ¹H NMR spectrum of 2 was the two benzylic methylene protons (H₂-1) found as an obscured triplet at δ 3.07 with a coupling constant of 17.1 Hz instead of AB doublets (δ 3.10 and 2.99) as found in 1. Full assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances are given in the Experimental Section. Compound 2 was thus 2 β -hydroxyjatropholone, the C-2-epimer of 1.

Compound 3 was isolated as a colorless solid, mp 144–146 °C, with molecular formula C₂₀H₂₄O₄ (HRESIMS). The FTIR spectrum

indicated absorption maxima for OH (3434 cm^{-1}) and conjugated carbonyl (1732 and 1651 cm^{-1}) groups. The ^{13}C NMR spectrum showed 20 signals indicating three methyl, four methylene, five methine, and eight quaternary carbons including two keto carbons (see Experimental Section). The ^1H - ^1H COSY spectrum indicated connectivity from H-7 (δ 5.82) to H-9 (δ 3.19) and from H-8 (δ 2.60) to H-12 (δ 2.40 and 2.24). Two exocyclic double bonds were evident from ^1H NMR signals at δ 4.75 and 4.14 and ^{13}C NMR signals at δ 148.1 (qC) and 108.3 (CH_2), in conjunction with the ^1H NMR chemical shifts at δ 4.84 and 4.80 and the ^{13}C NMR resonances at δ 146.5 (qC) and 113.3 (CH_2). HMBC correlations of H-3/C-1, C-4, C-10, and C-19 and of H-7/C-5, C-14, and C-20, in combination with the HMBC correlations between H-9/C-4, C-8, C-10, and C-18, led to the establishment of a rhamnopholane skeleton with double bonds at C-4(10), C-6(7), C-15(16), and C-11(18), together with keto groups at C-1 and C-5 and OH groups at C-2 and C-3. Relative configurations at C-8, C-9, and C-14 were deduced from coupling constants and were consistent with those reported for curcusones A–D.⁹ The 3-OH group had an α -orientation due to the presence of homoallylic coupling between H-3 and H-9 ($J = 1.6\text{ Hz}$), as found in 2-epijatrogrossidione.⁸ The NOESY spectrum showed a cross-peak between H-3/H₃-19, implying that both H-3 and H₃-19 were β -oriented. Compound 3 was thus proposed to be 1,5-dioxo-2,3-dihydroxyrhamnopholane-4(10),6,11(18),15-tetraene.

Compound 4 was obtained as colorless needles ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$). The IR spectrum showed absorption maxima for OH (3435 cm^{-1}) and α,β -unsaturated carbonyl (1688 and 1622 cm^{-1}) groups. The ^{13}C NMR spectrum indicated the presence of three methyl, four methylene, four methine, and four quaternary carbons including one carbonyl, two olefinic, and an oxygenated quaternary carbon. The ^1H - ^1H COSY spectrum indicated cross-peaks between H-3/H-15 and between H-12 and H-13/H-7 and sequential connectivities from H-1 to H-6. A guaiane sesquiterpene skeleton with a keto group at C-2, an OH at C-5, and double bonds at C-3(4) and C-11(12) was indicated on the basis of HMBC correlations of H-3/C-1, C-2, C-5, and C-15 and of H-7/C-5, C-11, C-12, and C-13. Compound 4 was proposed to be 2-keto-5-hydroxyguaia-3,11-diene. Relative configurations at C-1, C-10, and C-7 were deduced from NOE effects and coupling constants between related protons. The NOESY spectrum showed a cross-peak between H-1 and H₃-14. The $J_{1,10}$ and $J_{6,7}$ values of ca. 10 and 12 Hz, respectively, indicated that H-1 and H-10 were both α -oriented and that the isopropenyl group was β -oriented.¹⁰ The ^1H and ^{13}C NMR assignments are as given in the Experimental Section.

Compound 5 was isolated as a yellow solid. The HRESIMS indicated a molecular formula of $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_5$, and the FTIR spectrum showed absorption maxima consistent with conjugated carbonyl (1732 cm^{-1}) and olefinic (1614 and 983 cm^{-1}) groups. The ^1H NMR spectrum exhibited signals indicating an α,β -unsaturated carbonyl moiety as two sets of doublets at δ 7.54 and 6.22, both with coupling constants of 9.4 Hz, as well as ^{13}C NMR signals at δ 160.9 (qC), 144.9 (qC), 143.7 (CH), 140.6 (qC), 140.0 (qC), 129.1 (qC), 113.2 (CH), 110.6 (qC), and 100.4 (CH) that indicated the presence of a coumarin nucleus (see Experimental Section). NOE interactions between H-3'/H-4', H-4'/H-5', and 6'-OCH₃/H-5' were detected in the NOESY spectrum. The guaiane sesquiterpene skeleton was established from the ^1H - ^1H COSY spectrum, which indicated connectivity of an oxymethine proton (H-2, δ 4.96) to H-3 and sequentially from H-6 to H₃-14, in combination with the long-range ^1H , ^{13}C correlations between H-6/C-1, C-4, C-8, and C-11, as well as between H-14/C-1 and C-9 and H-12/C-7, C-11, and C-13 in its HMBC spectrum. The key long-range ^1H - ^{13}C correlations between H-2/C-3, C-10, and C-7' required an ether linkage between C-2 and C-7'. An NOE effect between H-2/H₃-14 indicated the C-10 methyl group and H-2 to be in close proximity. The relative configuration at C-7, although it could not be obtained

Table 1. Antiplasmodial, Antituberculosis, and Cytotoxic Activities of the Isolates

compound	antiplasmodial ^a	anti-TB ^b	cytotoxicity ^a
compound 1	4.1 $\pm$ 0.2	inactive ^d	noncytotoxic ^f
compound 2	inactive ^c	inactive ^d	49.4
caniojane	3.3 $\pm$ 0.6	25	12.9
1,11-bisepi-caniojane	7.9	nd ^e	nd ^e
jatropholone A (6)	5.4 $\pm$ 1.7	inactive ^d	noncytotoxic ^f
jatropholone B (7)	inactive ^c	inactive ^d	noncytotoxic ^f
dihydroartemisinin ^g	(4.0 nM)		
isoniazide ^g		0.1	
kanamycin ^g		2.5	
ellipticine ^g			0.7 $\pm$ 0.2

^a IC₅₀ in $\mu\text{g/mL}$. ^b MIC in $\mu\text{g/mL}$. ^c Inactive at 10 $\mu\text{g/mL}$. ^d Inactive at 200 $\mu\text{g/mL}$. ^e nd = not determined. ^f Noncytotoxic at 50 $\mu\text{g/mL}$. ^g Positive control substance.

from the NOESY spectrum, was deduced from the $J_{6,7}$ value of ca. 13 Hz, which revealed that the dihedral angle between one of the H₂-6 protons and H-7 was close to 180°, thus indicating a β -oriented isopropenyl group.¹⁰ The presence of an additional ether linkage between C-1 and C-8' was expected from the molecular formula. Accordingly, the structure of 5 was assigned as shown, and this compound has been given the name jatrophadioxan.

Compounds 1, 2, 6, 7, caniojane, and 1,11-bisepi-caniojane were evaluated for their *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*, K-1 strain. Caniojane exhibited the greatest inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 3.3 $\pm$ 0.6 $\mu\text{g/mL}$. Compounds 1 and 6 showed weaker activity, with IC₅₀ values 4.1 $\pm$ 0.2 and 5.4 $\pm$ 1.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1). Compound 2, the C-2 epimer of 1, and compound 7 were not active at 10 $\mu\text{g/mL}$. Only caniojane showed moderate inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with an MIC value of 25 $\mu\text{g/mL}$. Compound 2 and caniojane showed mild to marginal cytotoxicity against Vero cells, whereas compounds 1, 6, and 7 were noncytotoxic at 50 $\mu\text{g/mL}$.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were measured using an Electrothermal melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were recorded on a JASCO DIP 1020 polarimeter. IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 1760x FTIR spectrophotometer. The ^1H and ^{13}C spectra were recorded with a Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are referenced to the residual solvent signals (CDCl_3 : δ_{H} 7.24 and δ_{C} 77.0 ppm). The HRESIMS was recorded on a Bruker Daltonics microTOF instrument.

Plant Material. Roots of *J. integririma* were collected from plants growing within the Ramkhamhaeng University area during May 2004. Botanical identification was achieved by morphological comparison with a voucher specimen (Nos. SN 239681–239682) kept in the herbarium collections of the Sirindhorn Museum (Bangkok Herbarium), Botanical Section, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. A voucher specimen (SJI 1/04) is kept at the Department of Chemistry, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand.

Extraction and Isolation. Dried pulverized roots (5 kg) were extracted successively using hexane, CH_2Cl_2 , and MeOH using Soxhlet apparatus to obtain hexane (38.6 g), CH_2Cl_2 (29.8 g), and MeOH (155.0 g) extracts, respectively.

Column chromatographic fractionation of the hexane extract (16.2 g) using a gradient of hexane– CH_2Cl_2 (100:0) to CH_2Cl_2 –MeOH (90:10) gave seven fractions. Fraction 3 (2.52 g) was chromatographed (silica gel, hexane–EtOAc, 97:3 to 90:10) to give five subfractions (3.1–3.5). Subfraction 3.2 was further purified using column chromatography (CC) (silica gel, hexane–EtOAc, 97:3 to 90:10) to give compounds 6 (176 mg) and 7 (223 mg). Subfraction 3.3 after CC (silica gel, hexane– CH_2Cl_2 , 50:50 to 0:100) gave four fractions (3.3.1–3.3.4). Subfraction 3.3.2, after separation using reversed-phase CC (C_{18} , H_2O –MeOH, 50:50 to 0:100), gave compound 5 (6 mg) and citalitriene (10.5 mg), respectively. Fraction 4 (1.22 g) was fractionated using CC (silica gel, hexane–EtOAc, 94:6 to 92:8) to give four subfractions (4.1–4.4). Subfraction 4.3 was chromatographed (silica gel, hexane–EtOAc, 97:3 to 90:10) to give four subfractions (4.3.1–4.3.4), and subfraction 4.3.3 (32 mg) after purification using silica gel CC (hexane– CH_2Cl_2 ,

75:25 to 0:100) gave compound **4** (2 mg). Subfraction 4.3.4 after further CC (2 $\times$, silica gel, hexane-CH₂Cl₂, 30:70 to 0:100, then hexane-EtOAc, 93:7) yielded 1,11-bisepi-caniojane (2.6 mg) and caniojane (2.5 mg). Subfraction 4.4 (122 mg) yielded additional **4** (17 mg) after repeated CC (silica gel, hexane-EtOAc, 93:7 to 90:10) followed by reversed-phase CC (C₁₈, H₂O-MeOH, 50:50 to 0:100). Fraction 5 (6.31 g) was subjected to CC (silica gel, hexane-EtOAc, 75:25 to 0:100) and gave four subfractions (5.1-5.4). Subfraction 5.2 (2.86 g) was further purified using silica gel CC (hexane-EtOAc, 90:10 to 85:15) to give six subfractions (5.2.1-5.2.6). Subfraction 5.2.3 yielded 1 β -hydroxy-10 β -guaia-4,11-dien-3-one (5.1 mg), and subfraction 5.2.4 (133 mg) gave 4-hydroxy-10-epirotundone (17.2 mg) and stigmast-4-en-6 β -ol-3-one (6.5 mg) after CC (silica gel, hexane-EtOAc, 9:91). Subfraction 5.3 was chromatographed (silica gel, CH₂Cl₂-MeOH, 100:0 to 85:15) to give four subfractions. Subfraction 5.3.3 (345 mg) after reversed-phase CC (C₁₈, H₂O-MeOH, 20:80 to 0:100) gave five subfractions. Subfraction 5.3.3.3 yielded compounds **1** (9.4 mg) and **2** (10.6 mg) after further CC (silica gel, hexane-EtOAc, 88:12 to 87:13). Fraction 6 (3.25 g) was purified using silica gel CC (hexane-EtOAc, 88:12 to 85:15) to obtain three subfractions. Subfraction 6.2 (178.5 mg) was fractionated using CC (reversed-phase C₁₈, H₂O-MeOH, 20:80 to 0:100, then silica gel, CH₂Cl₂-MeOH, 99:1) to obtain compound **3** (3.0 mg).

2 α -Hydroxyjatropholone (1): pale yellow plates; mp 208-210 °C; [α]_D²⁵ +37.2 (c 0.47, CHCl₃); FTIR (KBr) $\nu_{\max}$ 3563, 3225, 3082, 2946, 2921, 2857, 1693, 1635, 1595, 1573, 1455, 1420, 1403, 1340, 1308, 1288, 1220, 1167, 1110, 1087, 965, 893, 867, 784, 760, 677, 646, 523 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} 5.17 (1H, t, J = 1.8 Hz, H-17), 4.63 (1H, t, J = 2.1 Hz, H-17), 3.10 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-1), 2.99 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-1), 2.71 (1H, ddd, J = 15.0, 6.3, 2.3 Hz, H-7), 2.62 (1H, ddd, J = 15.0, 7.0, 5.0 Hz, H-7), 2.25 (3H, s, H₃-20), 1.82 (1H, m, H-8), 1.55 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-11), 1.40 (3H, s, H₃-16), 1.22 (3H, s, H₃-18), 0.94 (1H, ddd, J = 12.5, 8.1, 5.5 Hz, H-9), 0.80 (3H, s, H₃-19); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 207.1 (C, C-3), 150.3 (C, C-14), 146.0 (C, C-6), 138.1 (C, C-12), 135.3 (C, C-5), 134.3 (C, C-4), 132.1 (C, C-13), 129.7 (C, C-15), 115.1 (CH₂, C-17), 77.7 (C, C-2), 37.6 (CH₂, C-1), 33.3 (CH₂, C-7), 28.3 (CH, C-11), 28.1 (CH₃, H-18), 26.1 (CH₃, C-16), 26.0 (CH, C-9), 21.4 (CH₂, C-8), 19.6 (C, C-10), 16.1 (CH₃, C-19), 13.3 (CH₃, C-20); EIMS m/z (%) 312 (M⁺, 69), 294 (63), 284 (26), 279 (47), 252 (100), 251 (63), 238 (49), 213 (40), 209 (78), 199 (38), 195 (49), 185 (62), 181 (51); HRESIMS [M + H]⁺ m/z 313.1791 (calcd for C₂₀H₂₅O₃, 313.1803).

2 β -Hydroxyjatropholone (2): yellow gum; [α]_D²⁵ +119.5 (c 0.53, CHCl₃); FTIR (KBr) $\nu_{\max}$ 3391, 3079, 2925, 2862, 2735, 1705, 1636, 1577, 1456, 1404, 1376, 1355, 1338, 1310, 1286, 1218, 1166, 1125, 1104, 1082, 1034, 986, 969, 894, 865, 799, 756, 668, 628, 522, 465 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} 5.27 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-17), 4.73 (1H, brs, H-17), 3.07 (1H, t, J = 17.1 Hz, H-1), 2.60 (2H, obs dd, J = 10.4, 4.7 Hz, H-7), 2.26 (3H, s, H-20), 1.81 (1H, ddd, J = 10.0, 7.9, 3.5 Hz, H-8), 1.56 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-11), 1.37 (3H, s, H₃-16), 1.22 (3H, s, H₃-18), 0.93 (1H, ddd, J = 11.1, 8.6, 3.9 Hz, H-9), 0.87 (1H, m, H-8), 0.81 (3H, s, H₃-19); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 206.1 (C, C-3), 150.1 (C, C-14), 144.4 (C, C-6), 137.9 (C, C-12), 135.7 (C, C-5), 134.6 (C, C-4), 132.4 (C, C-13), 128.7 (C, C-15), 116.2 (CH₂, C-17), 77.5 (C, C-2), 37.2 (CH₂, C-1), 33.4 (CH₂, C-7), 28.3 (CH, C-11), 28.1 (CH₃, H-18), 25.9 (CH, C-9), 25.7 (CH₃, C-16), 21.4 (CH₂, C-8), 19.6 (C, C-10), 16.2 (CH₃, C-19), 13.4 (CH₃, C-20); EIMS m/z (%) 312 (M⁺, 21), 294 (29), 279 (26), 269 (40), 256 (65), 252 (87), 251 (76), 241 (63), 239 (46), 238 (89), 237 (59), 227 (44), 226 (32), 225 (34), 223 (61), 213 (48), 211 (43), 210 (44), 209 (100), 199 (62), 197 (40), 195 (60), 185 (99), 181 (48), 171 (31), 165 (23); HRESIMS [M + H]⁺ m/z 313.1791 (calcd for C₂₀H₂₅O₃, 313.1803).

1,5-Dioxo-2,3-dihydroxyrhannofola-4(10),6,11(18),15-tetraene (3): colorless needles; mp 144-146 °C; [α]_D²⁵ -312.5 (c 0.13, CHCl₃); FTIR (KBr) $\nu_{\max}$ 3434, 2929, 2857, 1732, 1651, 1447, 1374, 1187, 1149, 1119, 1046, 893, 836, 801, 605, 544, 499 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} 5.82 (1H, dq, J = 5.2, 1.6 Hz, H-7), 4.84 (1H, brs, H-16), 4.83 (1H, t, J = 1.6 Hz, H-3), 4.80 (1H, brs, H-16), 4.75 (1H, brs, H-18), 4.14 (1H, brs, H-18), 3.19 (1H, brd, J = 12.3 Hz, H-9), 2.60 (1H, tdd, J = 12.3, 5.2, 1.5 Hz, H-8), 2.40 (1H, ddd, J = 12.6, 4.4, 2.7 Hz, H-12), 2.32 (1H, dt, J = 11.9, 4.1 Hz, H-14), 2.24 (1H, brdt, J = 12.6, 4.5 Hz, H-12), 1.89 (1H, m, H-13), 1.84 (3H, t, J = 1.6 Hz, H-20), 1.57 (3H, s, H-17), 1.45 (1H, dt, J = 12.9, 4.4 Hz, H-13), 1.43 (3H, s, H-19); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 209.5 (C, C-1), 198.2 (C, C-5), 157.9 (C, C-4), 148.1 (C, C-11), 146.8 (C, C-10), 146.5 (C, C-15), 142.0 (C, C-6), 136.0 (CH, C-7), 113.3 (CH₂, C-16), 108.3 (CH₂,

C-18), 74.0 (C, C-2), 51.9 (CH, C-14), 45.0 (CH, C-9), 43.6 (CH, C-8), 36.5 (CH₂, C-12), 34.3 (CH₂, C-13), 24.0 (CH₃, H-19), 18.7 (CH₃, C-20), 18.6 (CH₃, C-17); HRESIMS found [M + Na]⁺ ion at m/z 351.1575 (calcd for C₂₀H₂₄O₄Na, 351.1566).

2-Keto-5-hydroxyguaia-3,11-diene (4): colorless needles, mp 92-94 °C; [α]_D²⁵ +9.5 (c 0.90, CHCl₃); FTIR (KBr) $\nu_{\max}$ 3435, 2921, 2852, 1688, 1622, 1447, 1374, 1312, 1246, 1218, 1154, 1072, 936, 892, 849, 782, 674, 618, 550, 500 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} 5.80 (1H, s, H-3), 4.67 (1H, brs, H-12), 4.65 (1H, brs, H-12), 2.53 (1H, dt, J = 11.9, 2.7 Hz, H-7), 2.16 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-1), 2.01 (3H, s, H-15), 1.92 (1H, brd, J = 14.1 Hz, H-6), 1.86 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, obs dd, J = 10.3, 6.4, 1.7 Hz, H-10), 1.68 (3H, s, H-13), 1.63 (1H, t, J = 12.1, 2.0 Hz, H-9), 1.56 (1H, obs ddt, J = 12.5, 5.8, 1.7 Hz, H-9), 1.37 (1H, dd, J = 14.1, 11.8 Hz, H-6), 1.04 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-14); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 205.8 (C, C-2), 177.6 (C, C-4), 150.8 (C, C-11), 128.7 (CH, C-3), 109.1 (CH₂, C-12), 82.5 (C, C-5), 67.2 (CH, C-1), 41.1 (CH, C-7), 40.7 (CH₂, C-6), 36.3 (CH₂, C-8), 35.2 (CH₂, C-9), 34.3 (CH, C-10), 23.8 (CH₃, C-14), 20.6 (CH₃, C-13), 12.8 (CH₃, C-15); HRESIMS found [M + Na]⁺ ion at m/z 257.1541 (calcd for C₁₅H₂₂O₂Na, 257.1512).

Jatrophaedioxan (5): pale yellow solid; [α]_D²⁵ +437.1 (c 0.30, CHCl₃); FTIR (KBr) $\nu_{\max}$ 3442, 2922, 2852, 1732, 1614, 1574, 1499, 1446, 1417, 1377, 1303, 1195, 1138, 1072, 983, 915, 840, 748, 606, 563 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} 7.54 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-4'), 6.44 (1H, s, H-5'), 6.22 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3'), 4.96 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-2), 4.71 (1H, brs, H-12), 4.68 (1H, brs, H-12), 2.50 (2H, brd, J = 7.6 Hz, H-3), 2.45 (1H, brd, J = 13.4 Hz, H-6), 2.33 (1H, obs dq, J = 9.2, 7.3 Hz, H-10), 2.18 (1H, t, J = 12.7 Hz, H-6), 1.82 (2H, m, H-7 and H-8), 1.73 (3H, s, H-13), 1.64 (3H, s, H-15), 1.46 (2H, m, H-8, H-9), 1.35 (1H, dd, J = 12.9, 9.7 Hz, H-9), 1.04 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-14); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ_{C} 160.9 (C, C-2'), 150.4 (C, C-11), 144.9 (C, C-6'), 140.6 (C, C-8'), 140.0 (C, C-9'), 137.4 (C, C-6), 136.3 (C, C-4), 129.1 (C, C-7'), 113.2 (CH, C-3'), 110.6 (C, C-10'), 108.9 (CH₂, C-12), 100.4 (CH, C-5'), 90.8 (C, C-1), 73.7 (CH, C-2), 56.4 (CH₃, 6'-OCH₃), 49.6 (CH, C-7), 42.3 (CH, C-10), 39.4 (CH₂, C-3), 36.3 (CH₂, C-8), 32.5 (CH₂, C-9), 29.8 (CH₂, C-6), 20.4 (CH₃, C-13), 16.9 (CH₃, C-14), 14.1 (CH₃, C-15); HRESIMS [M + H]⁺ ion m/z 409.2002 (calcd for C₂₅H₂₉O₅, 409.2010).

X-ray Crystallographic Data of Compound 1. Crystal data for compound **1** at 298(2) K: C₂₀H₂₄O₃, M_r = 312.41, tetragonal, space group $P4_12_12$ (No. 92) with a = 13.2026(3) Å, b = 13.2026(3) Å, c = 19.8568(5) Å, V = 3461.21(14) Å³, Z = 8, D_{calc} = 1.199 Mg/m³; F_{000} = 1344, μ = 0.079 mm⁻¹. Data collection and reduction: crystal size 0.10 $\times$ 0.15 $\times$ 0.20 mm, θ range 1.02-27.48°, 13 323 reflection collected, 3918 independent reflections (R_{int} = 0.020), final R indices [$I > 2\sigma(I)$]: 0.0589, wR_2 = 0.1713 for 209 parameters, GOF = 1.053. Intensity data were measured on a Bruker-Nonius kappaCCD diffractometer. Crystallographic data for the structure **1** in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC-728465. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK [fax: +44-(0)-1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk].

Bioassays. Antiplasmodial activity was evaluated against *Plasmodium falciparum* (K1 multidrug-resistant strain) cultured continuously according to Trager and Jensen.¹¹ Quantitative determination of activity *in vitro* was conducted by means of the microculture radioisotope technique based on the method of Desjardins et al.¹¹ The antimycobacterial activity (anti-TB) assay was performed against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra using an Alamar Blue microplate assay.¹² Cytotoxicity assay was determined using African green monkey kidney fibroblasts by the colorimetric method described by Skehan and co-workers.¹³

Acknowledgment. We are grateful to Ramkhamhaeng University, Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education, and the Thailand Research Fund (BRG 5080008 and DBG 5180018) for financial support. S.P. acknowledges PERCH-CIC for a scholarship. We acknowledge Mr. N. Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, and Ms. S. Chaichana, Mahidol University, for HRMS measurements and the Bioassay Laboratory of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani, Thailand, for bioassays.

Supporting Information Available: ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds 1–5 (Figures S1–S10), HMBC correlations of 1–5, and cif files of the X-ray data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Sutthivaiyakit, S.; Mongkolvisut, W.; Ponsitipiboon, P.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Ruchirawat, S.; Mahidol, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3637–3640.
- (2) Mongkolvisut, W.; Sutthivaiyakit, S.; Leutbecher, H.; Mika, S.; Klaiber, I.; Moeller, W.; Roesner, H.; Beifuss, U.; Conrad, J. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1435–1441.
- (3) (a) Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1201–1206. (b) Xu, F.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Ninomiya, K.; Yoshikawa, M. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 569–576.
- (4) Achenbach, H.; Benirschke, G. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 149–157.
- (5) Villarreal, A. M.; Dominguez, X. A.; Williams, H. J.; Scott, A. I.; Reibenspies, J. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 749–753.
- (6) Greca, M. D.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1430–1435.
- (7) Purushothaman, K. K.; Chandrasekharan, S.; Cameron, A. F.; Connolly, J. D.; Labbe, C.; Maltz, A.; Rycroft, D. S. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *11*, 979–980.
- (8) Jakupovic, J.; Grenz, M.; Schmeda-Hirschmann, G. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2997–2998.
- (9) Naengchomnong, W.; Thebtaranonth, Y.; Wiriyaichitra, P.; Okamoto, K. T.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2439–2442.
- (10) (a) Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1201–1206. (b) Xu, F.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Minomiya, K.; Yoshikawa, M. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 569–576.
- (11) (a) Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673–675. (b) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710–718.
- (12) Collins, L. A.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004–1009.
- (13) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.

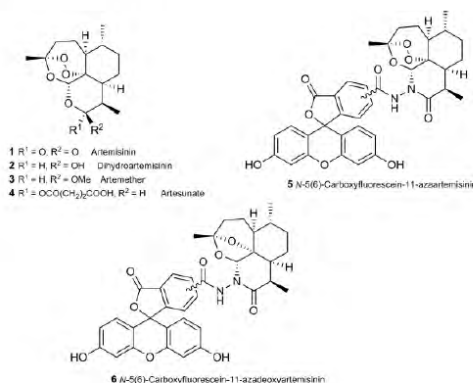
NP900342B

Artemisinin targets hemoglobin at tyrosine-35 on the β -globin chain

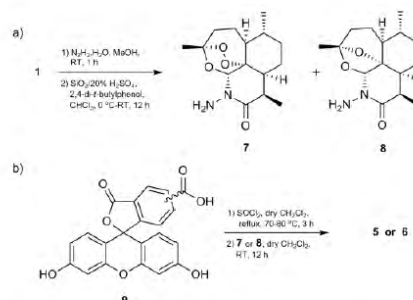
Khomsan Tiensomjitir, Samran Prabpai, and Palangpon Kongsaree*

Artemisinin (Qinghaosu) **1** and its hemisynthetic derivatives, a sesquiterpene antimalarial drug containing unusual endoperoxide, are the most widely used to treat multidrug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*, which kill 1-3 million people each year.^[1] The major agreement among the hypotheses about the mechanism of action of artemisinin, which has been the object of much debate for last two decade,^[2] involves an importance of endoperoxide bridge for antimalarial activity.^[1a] One approach concerns the iron-mediated homolytic cleavage of peroxide to produce an alkoxide which readily abstracts a proton to generate an active carbon radical specie alkylating other biomolecules.^[3] Intra-parasite heme, whose covalent adduct with artemisinin in vitro was firstly characterized in 1997,^[4] is believed as primary target of the carbon radical specie.^[5] Although heme-artemisinin adduct is doubt that it can decrease detoxification of iron(II)-heme in *Plasmodia* by inhibiting heme polymerization or hemozoin synthesis,^[3e, 6] or not,^[7] but many works of the adduct characterization by mass spectrometry or NMR has been addressed; direct reaction with heme,^[3b, 3c, 8] hemoglobin,^[3a, 9] and in infected mice.^[10] The alkylation of artemisinin on protein was also observed when the protein was incubated with drug,^[11] in addition, it was found that heme-containing protein significantly interact with artemisinin.^[12] The protein-artemisinin adduct, however, has not been characterized nowadays. Herein we report the first characterization of protein-artemisinin adduct by utilization of fluorescent spectroscopy and mass spectrometry.

N-5(6)-Carboxyfluorescein-11-azaartemisinin **5**, which was used as fluorescent artemisinin in fluorescent spectroscopy, was synthesized via coupling reaction between 5(6)-carboxyfluorescein **7** and *N*-amino-11-azaartemisinin **7** prepared from aza derivatization of **1** reported by Singh et al.^[13] (Scheme 1a). The selected condition was the one producing also its deoxyanalogue which was further used for negative controlled experiment. The amide formation was started by activation of carboxy group in compound **9** using thionyl chloride to generate an active acid chloride which was then reacted with amino group of compound **7** or **8**, in separated reaction, to furnish fluorescein artemisinin analogue **5** or **6**, respectively (Scheme 1b).



To study alkylation of artemisinin on protein, human hemoglobin, a heme-containing protein, as the amino acid source in *Plasmodia* food vacuole used to built its own protein,^[14] was chosen to be a protein model either ferrous hemoglobin (Hb) or ferric hemoglobin (methb). The reaction was done in a non-denaturing medium, 10 mM ammonium acetate at neutral pH additional with 10% of ethanol, which reported to stabilize the Hb tetramer, linkage of heme to globin chain, and could be compatible with mass spectrometry.^[3a]



Scheme 1. Synthesis of fluorescein artemisinin analogues

For investigation of the adduct between artemisinin and protein, Hb or methb was incubated with various artemisinin derivatives: artemisinin, dihydroartemisinin **2** (DHA), compound **5**, and compound **6** in described condition for 2 hour at 37°C. The absorption at 491 nm, characteristic of fluorescein chromophore, was determined for the percentage of mole binding after removal of an excess drug (Figure 1), which approximate to % yield of the reaction, and the fluorescent signal of globin chains of human

[*] K. Tiensomjitir, S. Prabpai, Assoc. Prof. Dr P. Kongsaree
 Department of Chemistry and Center for Excellence in
 Protein Structure and Function
 Faculty of Science, Mahidol University
 Rama 6 Road, Bangkok 10400 (Thailand)
 Fax: (+66)2201-5843
 E-mail: scpks@mahidol.ac.th

[**] ((Acknowledgements))

Supporting information for this article is available on the
 WWW under <http://www.angewandte.org> or from the
 author. ((Please delete if not appropriate))

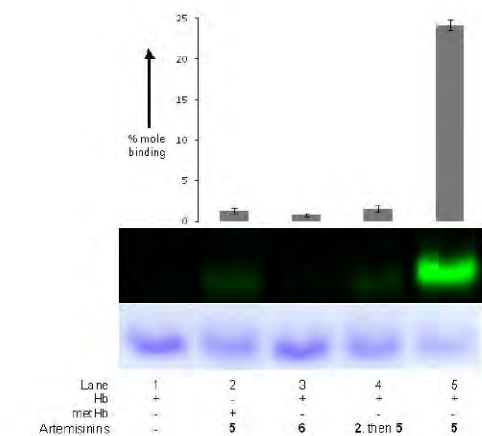


Figure 1. Binding determination of covalent adduct between Hb and artemisinin analogues. The percentage of mole binding, measured from absorption at 491nm, are shown at the top. Fluorescent visualization (upper, λ_{exc} = 488 nm, λ_{em} = 526 nm) and coomassie blue staining (lower) of denaturing globin chain are shown for various artemisinins used in the reaction.

hemoglobin were also visualized on denaturing SDS-PAGE. For Hb, the reaction with compound **5** showed a strong fluorescent band (lane 5, Figure 1) indicating the formation of protein-drug adduct due to reactivity of endoperoxide toward iron (II) of Hb, whereas the reaction with compound **6** did not (lane 3, Figure 1). Moreover, treating Hb with DHA prior to react with compound **5** resulted no fluorescent adduct because almost site reactions on protein would be saturated by DHA (lane 4, Figure 1). metHb, of which iron (III) inert toward endoperoxide, was not accomplish to form fluorescent adduct even incubated with compound **5**. All fluorescent monitoring upon SDS-PAGE were good agreement with %yield determined by absorption at 491 nm of the adduct, which was rise up to 25%.

Artemisinin and DHA, as the two simplest structure of their derivatives and a facile metabolite of artemeter **3** and artesunate **4** for the latter,^[15] were represented to investigate corresponding adduct with protein utilizing high resolution mass spectrometry (HRMS). The covalent globin-drug adducts of DHA, both alpha-DHA and beta-DHA, were observed utilizing LC-ESIMS (Figure 2).

Deconvoluted mass spectrum of alpha-DHA exhibited at molecular mass (M_r) = 15349.41, 224 mass shift from native alpha globin chain (M_r = 15125.86) which was responsible for DHA structure lacking of CH_3COOH moiety, and the corresponding sodium adduct was also detected at M_r = 15372.48 (Figure 2a). Mass shift of that from native beta globin chain found in other retention time (Table S3 in the Supporting Information) and shown in dash line, was likewise displayed at M_r = 16090.84 (Figure 2a). The errors of all detected adducts, which were calculated against globin chains sequence, were not exceed 83 ppm. In contrast, reaction of Hb with artemisinin resulted no protein adduct, that might due to its lower solubility in aqueous. This attribute clearly exhibited in alkylation of heme part by artemisinin in the same reaction, which is favorable in polar organic solvent,^[3a, 3e] by the

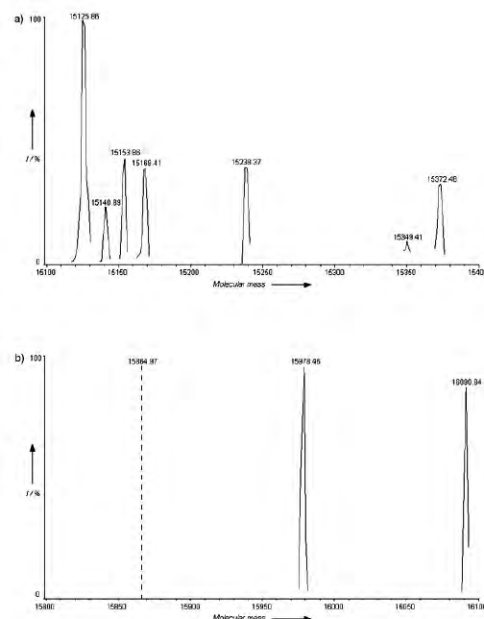


Figure 2. Deconvoluted electrospray mass spectra of a) alpha and b) beta globin containing one molecule of DHA derived from the reaction between Hb and DHA.

observation of four monoalkylated analogues and previous reported dialkylated product of heme (Table S1 in the Supporting Information),^[3e] while only one monoalkylated heme was detected in reaction between Hb and DHA (Table S2 in the Supporting Information).

To characterize the modification site on protein, Hb-DHA adduct along with unreacted Hb was digested with trypsin, and the resulting peptides were then subjected to tandem mass spectrometry. The analysis was done using deacetylated DHA as a modifier searching against either alpha or beta globin chain sequence at a time and the processed data pointed out mass increases of 224 at tyrosine residue 35 on beta globin chain ($\beta\text{Tyr } 35$) (Figure 3b) compared with an unmodified peptide (Figure 3a).

The adduct between artemisinin and tyrosine (Tyr) was also found in the reaction of DHA and L-tyrosine in the presence of iron (II) by using reported condition.^[3f] HRMS was utilized to detect the adduct in the elution from reverse phase HPLC even in very low yield of the product, undetectable on TLC. Mass spectrum clearly exhibited DHA-Tyr adduct at 406.2204 m/z and 388.2121 m/z for lacking of CH_3COOH moiety and combination with neutral loss of water molecule in high accuracy, respectively (Table S5 in the Supporting Information). The mechanism may mimic tyrosine nitration via radical chemistry.^[16] The labile proton of phenolic group would be abstracted by dihydroartemisinin radicals (DHA•) generated from iron (II) and then subsequence tyrosyl radical acted as a radical scavenger toward DHA• at position 3 of the aromatic ring (Figure 4).

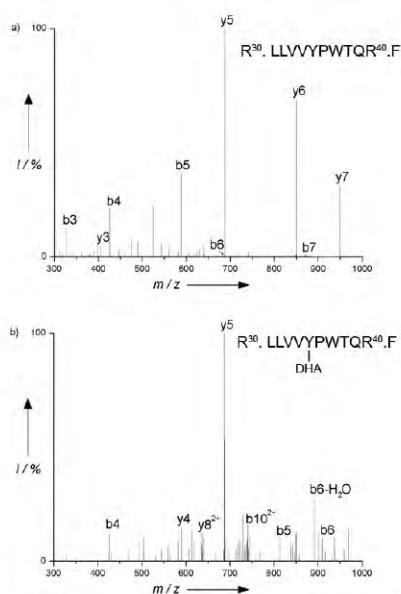


Figure 3. Fragmentation assignment of tryptic peptide obtained from residue 31 to 40 (LLVVPWTQR) on beta globin chain : a) the unmodified fragment : b) the DHA-modified fragment carrying on Y35

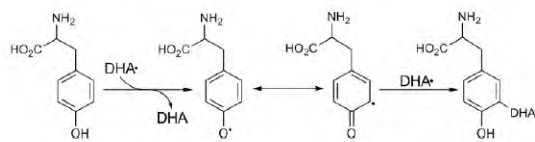


Figure 4. Proposed mechanism of radical alkylation of DHA on tyrosine

In summary, with HRMS, we have explored the covalent adduct between artemisinin and hemoglobin either alpha or beta globin chain in high accuracy. These results pointed out that not only heme but also globin chain of hemoglobin can be alkylated by artemisinin and might explain for deactivation of artemisinin effectiveness in erythrocytes by heme and heme-containing proteins.^[12b] The adduct of tyrosine and DHA indicated that the mechanism occur via combination of tyrosyl radical and DHA• in the presence of iron (II) with good agreement to the importance of iron (II) in artemisinin activation.^[17] Although HRMS was utilized to confirm a covalent Tyr-DHA adduct but yield of reaction would be further improved for NMR characterization and to answer how tyrosine play an important role in artemisinin activity.

Experimental Section

The standard condition for the reaction between Hb A and artemisinin derivatives was modified from previous description^[16]. Hb A (1.3 mg, 0.021 μ mole = 0.084 μ mole of heme) was dissolved in 10 mM ammonium acetate buffer, pH 7.43. Artemisinin derivative (0.8 μ mole in ethanol) was then added. The final hemoglobin concentration was 20 μ M, heme/artemisinin derivative = 1/10, and the co-solvent was 5% ethanol in buffer. The reaction was stirred at 37°C for 2 hr. For yield determination of the reaction between Hb A and *N*-FAM-11-azaartemisinin, non-reacted drugs in the reaction mixture were separated from protein part by spinning through Nanosep membrane 10K cutoff. Both small molecule and protein part were made volume up to 2.0 mL and measured the absorption at 491 nm for the

concentration of fluorescein using Agilent 8453 diode array UV-visible spectrophotometer.

The condition for the reaction between DHA and L-tyrosine was modified from previous report.^[30] DHA (40.0 mg, 0.140 mole) and L-tyrosine (12.8 mg, 0.070 mole) was dissolved in a co-solvent of dimethyl sulfoxide and H₂O (2:1) 12 mL. FeSO₄·7H₂O (3.9 mg, 0.140 mole) was then added. The reaction was stirred at 37°C for 12 hr. The mixture was then diluted with H₂O 30mL. The aqueous layer was extracted with CHCl₃ (3x30 mL) to remove nonpolar byproducts. LC-ESI-MS was used to monitor the adduct.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: artemisinin · antimalarial · alkylation · hemoglobin · tyrosine

- [1] a) D. L. Klayman, *Science* **1985**, 228, 1049; b) N. J. White, F. Nosten, S. Looareesuwan, W. M. Watkins, K. Marsh, R. W. Snow, G. Kokwaro, J. Ouma, T. T. Hien, M. E. Molyneux, T. E. Taylor, C. I. Newbold, T. K. Ruebush II, M. Danis, B. M. Greenwood, R. M. Anderson, P. Olliaro, *Lancet* **1999**, 353, 1965; c) N. J. White, *Science* **2008**, 320, 330.
- [2] a) S. R. Meshnick, T. E. Taylor, S. Kamchonwongpaisan, *Microbiol. Rev.* **1996**, 60, 301; b) P. L. Olliaro, R. K. Haynes, B. Meunier, Y. Yuthavong, *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 122; c) G. H. Posner, S. R. Meshnick, P. L. Olliaro, R. K. Haynes, B. Meunier, Y. Yuthavong, *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 266; d) P. L. Olliaro, R. K. Haynes, B. Meunier, Y. Yuthavong, *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 267; e) P. L. Olliaro, *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 268; f) A. Robert, O. Dechy-Cabaret, J. Cazelles, B. Meunier, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 167; g) U. Ekstein-Ludwig, R. J. Webb, I. D. A. Van Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, P. G. Bray, S. A. Ward, S. Krishna, *Nature* **2003**, 424, 957; h) P. M. O'Neill, G. H. Posner, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2945.
- [3] a) K. Selmeczi, A. Robert, C. Claparols, B. Meunier, *FEBS Lett.* **2004**, 556, 245; b) A. Robert, Y. Coppel, B. Meunier, *Chem. Commun.* **2002**, 414; c) A. Robert, J. Cazelles, B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1954; d) S. A. L. Laurent, A. Robert, B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2060; e) R. Kannan, K. Kumar, D. Sahal, S. Kukreti, V. S. Chauhan, *Biochem. J.* **2005**, 385, 409; f) R. K. Haynes, W. Y. Ho, H. W. Chan, B. Fugmann, J. Stetter, S. L. Croft, L. Vivas, W. Peters, B. L. Robinson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1381.
- [4] A. Robert, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5968.
- [5] a) S. R. Meshnick, A. Thomas, A. Ranz, C. M. Xu, H. Z. Pan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, 49, 181; b) Y. L. Hong, Y. Z. Yang, S. R. Meshnick, *Molecular and Biochemical Parasitology* **1994**, 63, 121.
- [6] a) D. Monti, B. Vodopivec, N. Basilio, P. Olliaro, D. Taramelli, *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38, 8858; b) A. V. Pandey, B. L. Tekwani, R. L. Singh, V. S. Chauhan, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 19383; c) R. Kannan, D. Sahal, V. S. Chauhan, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 321.
- [7] a) W. Asawamasakda, I. Ittarat, C. C. Chang, P. McElroy, S. R. Meshnick, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1994**, 67, 183; b) R. K. Haynes, D. Monti, D. Taramelli, N. Basilio, S. Parapini, P. Olliaro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 1175; c) S. Parapini, N. Basilio, M. Mondani, P. Olliaro, D. Taramelli, D. Monti, *FEBS Lett.* **2004**, 575, 91.
- [8] a) J. Cazelles, A. Robert, B. Meunier, *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Serie IIc: Chimie* **2001**, 4, 85; b) A. Robert, Y. Coppel, B. Meunier, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 339, 488; c) L. Messori, F. Piccioli, B. Eitler, M. C. Bergonzi, A. R. Bilia, F. F. Vincieri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4055.
- [9] a) R. Kannan, K. Kumar, D. Sahal, S. Kukreti, V. S. Chauhan, *Biochem. J.* **2005**, 385, 409; b) A. Robert, C. Bonduelle, S. A. L. Laurent, B. Meunier, *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, 19, 562.
- [10] a) A. Robert, F. Benoit-Vical, C. Claparols, B. Meunier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 13676; b) A. Robert, F. Benoit-Vical, C. Claparols, B. Meunier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 3943; c) F. B. E. Garah, C. Claparols, F. Benoit-Vical, B. Meunier, A. Robert, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 2966.
- [11] a) Y. Z. Yang, W. Asawamasakda, S. R. Meshnick, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 336; b) Y. Z. Yang, B. Little, S. R. Meshnick, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 569.

- [12] a) D. J. Creek, E. Ryan, W. N. Charman, F. C. K. Chiu, R. J. Pranker, J. L. Vennerstrom, S. A. Charman, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3496; b) N. Pongmee, T. Chuchue, P. Wilairat, Y. Yuthavong, S. Kamchonwongpaisan, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 153; c) L. Messori, C. Gabbiani, A. Casini, M. Siragusa, F. F. Vincieri, A. R. Bilia, *Biorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2972; d) P. Vattanaviboon, P. Wilairat, Y. Yuthavong, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 492; e) T. J. Egan, D. C. Ross, P. A. Adams, *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 54.
- [13] A. S. Singh, V. P. Verma, M. Hassam, N. N. Krishna, S. K. Puri, C. Singh, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5461.
- [14] A. Robert, F. Benoit-Vical, B. Meunier, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1927.
- [15] V. Navaratnam, S. M. Mansor, N. W. Sit, J. Grace, Q. Li, P. Olhary, *Clin. Pharmacokinet.* **2000**, *39*, 255.
- [16] D. Pietraforte, A. M. Salzano, G. Marino, M. Minetti, *Amino Acids* **2003**, *25*, 341.
- [17] P. M. O'Neill, V. E. Barton, S. A. Ward, *Molecules* **2010**, *15*, 1705.
- [18] K. Selmezi, A. Robert, C. Claparols, B. Meunier, *FEBS Letters* **2003**, *556*, 245.