คาบิเรไมด์ สารกลุ่มทริสออกซาโซลมาโครไลด์ที่ยึดเหนี่ยวแอกตินจากฟองน้ำทะเล *Pachastrissa nux* ของไทย และอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ชนิดเรืองแสงของคาบิเรไมด์ ซี

นางสาวชุติมา เพ็ชรประยูร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-2125-7

KABIRAMIDES, THE ACTIN-BINDING TRISOXAZOLE MACROLIDES FROM THE THAI MARINE SPONGE *PACHASTRISSA NUX*, AND SEMISYNTHETIC FLUORESCENT DERIVATIVES OF KABIRAMIDE C

Miss Chutima Petchprayoon

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-2125-7

Thesis Title	KABIRAMIDES, THE ACTIN-BINDING TRISOXAZOLE MACROLIDES FROM THE THAI MARINE SPONGE *PACHASTRISSA NUX*, AND SEMISYNTHETIC FLUORESCENT DERIVATIVES OF KABIRAMIDE C.
By	Miss Chutima Petchprayoon
Filed of Study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Khanit Suwanborirux, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Sumphan Wongseripipatana, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Anuchit Plubrukarn, Ph.D.)

ชุติมา เพ็ชรประยูร : คาบิเรไมด์ สารกลุ่มทริสออกซาโซลมาโครไลด์ที่ยึดเหนี่ยวแอกตินจากฟองน้ำทะเล *Pachastrissa nux* ของไทย และอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ชนิดเรืองแสงของคาบิเรไมด์ ซี. (KABIRAMIDES, THE ACTIN-BINDING TRISOXAZOLE MACROLIDES FROM THE THAI MARINE SPONGE *PACHASTRISSA NUX*, AND SEMISYNTHETIC FLUORESCENT DERIVATIVES OF KABIRAMIDE C)
อ. ที่ปรึกษา: ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์, จำนวนหน้า 188 หน้า. ISBN 974-53-2125-7.

จากการศึกษาทางเคมีของฟองน้ำทะเล *Pachastrissa nux* ที่พบในบริเวณเกาะสีชัง อ่าวไทย สามารถแยกสารกลุ่มทริสออกซาโซลมาโครไลด์ที่เคยพบแล้วได้ 2 ชนิด คือ kabiramide C และ D และสารใหม่ 1 ชนิด คือ kabiramide F การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้เหล่านี้ ทำได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปคโตรสโคปีจาก MS UV IR และ NMR ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลกับเอกสารต่างๆ จากนั้นได้นำสาร kabiramide C (KabC) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้ในปริมาณสูงมาทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น 7-(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)kabiramide C (AMT-KabC) โดยใช้ปฏิกิริยา Mitsunobu และ 1,3 dipolar cycloaddition เพื่อใช้เป็นสารมัธยันต์ในการสังเคราะห์อนุพันธ์เรืองแสงของ kabiramide C จำนวน 5 ชนิด คือ อนุพันธ์ tetramethylrhodamine (TMR-KabC), rhodol green (RG-KabC), IC5 (IC5-KabC), dapoxyl (DAP-KabC), and fluorescein diester (FDE-KabC) จากปฏิกิริยาของสาร AMT-KabC กับอนุพันธ์ *N*-succinimidyl ester ของสารเรืองแสง

ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ kabiramide ที่แยกได้ และอนุพันธ์เรืองแสงที่สังเคราะห์ ในการยึดเหนี่ยวกับแอกติน โดยใช้เทคนิคต่างๆ ทางฟลูออเรสเซนต์ ได้แก่ การวิเคราะห์สเปคตรัมการเรืองแสง การวัด fluorescence resonance energy transfer (FRET) การวัด fluorescence anisotropy (FA) และ การวัด iodide quenching พบว่า อนุพันธ์ kabiramide ทุกชนิด ยึดเหนี่ยวกับแอกตินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วน 1:1 ได้ทดสอบอนุพันธ์เรืองแสงที่สังเคราะห์กับเซลล์ NIH 3T3 พบว่าเฉพาะอนุพันธ์ TMR-KabC และ FDE-KabC เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ และแสดงการเรืองแสงที่ชัดเจนในบริเวณขอบเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ นอกจากนี้ สาร kabiramide C, D และ F แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยให้บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

4476952533 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEY WORDS: KABIRAMIDE / TRISOXAZOLE MACROLIDE / ACTIN-BINDING / SEMISYNTHETIC FLUORESCENCE / *PACHASTRISSA NUX* SPONGE

CHUTIMA PETCHPRAYOON: KABIRAMIDES, THE ACTIN-BINDING TRISOXAZOLE MACROLIDES FROM THE THAI MARINE SPONGE *PACHASTRISSA NUX*, AND SEMISYNTHETIC FLUORESCENT DERIVATIVES OF KABIRAMIDE C. THESIS ADVISOR: KHANIT SUWANBORIRUX, Ph.D., 188 pp. ISBN 974-53-2125-7.

Three trisoxazole macrolides, including two known kabiramides C and D, and a new kabiramide F were isolated from the marine sponge *Pachastrissa nux*, collected from Sichang Island in the Gulf of Thailand. Their identification and structure elucidation were achieved by analyses of MS, UV, IR, 1D-NMR, and 2D-NMR spectral data as well as comparison with the literatures. The major compound, kabiramide C (KabC), was structurally modified to give the key intermediate 7-(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)kabiramide C (AMT-KabC) by using Mitsunobu reaction and 1,3-dipolar cycloaddition reaction. Furthermore, five fluorescent conjugates of kabiramide C, including derivatives of tetramethylrhodamine (TMR-KabC), rhodol green (RG-KabC), IC5 (IC5-KabC), dapoxyl (DAP-KabC), and fluorescein diester (FDE-KabC) were synthesized by coupling AMT-KabC with *N*-succinimidyl esters of the fluorescence dyes.

The steady state fluorescence techniques, including fluorescence emission spectral analysis, fluorescence resonance energy transfer (FRET), fluorescence anisotropy (FA), and iodide quenching were used to determine the actin binding properties of these kabiramide derivatives. All of the isolated and semisynthetic fluorescent kabiramide derivatives bound stoichiometrically to G-actin in 1:1 complex. Five fluorescent kabiramides were further separately introduced to living NIH 3T3 cells. Only TMR-KabC and FDE-KabC showed good permeability through plasma membrane of the cells and expressed intense fluorescence at the protrusion sites. Additionally, kabiramides C, D, and F exhibited equal antifungal activity against *Candida albicans* with inhibition zone of 22 mm at the concentration of 100 µg/disc.

Field of Study Pharmaceutical Chemistry and Natural Products Student's signature .....

Advisor's signature .....

Academic year 2004

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my appreciation to those who encouraged and assisted me in my research as follows:

Dr. Khanit Suwanborirux, my thesis advisor, of Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his valuable advice, guidance, kindness, and encouragement throughout my research study.

Professor Dr. Gerard Marriott of Department of Physiology, University of Wisconsin-Madison, USA for his warm support, providing research experiences, valuable discussions and suggestions during my residence in USA.

The thesis committee for their suggestions and critical review of my thesis.

The Thailand Research Fund for the 2001 Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program Scholarship (PHD/0115/2544). Chulalongkorn University for providing a grant for Center of Excellence to Bioactive Marine Natural Product Chemistry Research Unit (BMNCU), and University of Wisconsin at Madison for partial support during my residence in USA.

Associate Professor Dr. Surattana Amnuoypol of Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for her kind suggestions, helps, and encouragement.

Dr. Prasat Kittakoop of the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for his assistance in ESI-TOF MS experiment.

The members in GM's Laboratory, Department of Physiology, University of Wisconsin-Madison, USA for their kind friendship and helps; Dr. Tomoyo Sakata for NMR measurements, discussion on structure elucidation and suggestion in organic synthesis; Mrs. Subhra Bhattacharya, Mr. Hui Wang, and Ms. Shu Mao for assistance in actin experiments. Ms. Reagan Miller of Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison, USA for her help in NMR, IR, and [α] measurements.

Teachers and members in Department of Pharmacognosy and Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and help.

The Pharmaceutical Research Instrument Center and Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their support providing equipments during my research study.

Finally, my family, for their love, understanding, encouragement, and support.

CONTENTS

LIST OF FIGURES

LIST OF SCHEME

LIST OF TABLES

ABBREVIATIONS

%	=	percent or part per hundred
δ	=	chemical shift
τ	=	excited-state lifetime
ε	=	molar absorptivity or molar extinction coefficient
λ_{max}	=	wave length at maximum absorption
ν_{max}	=	wave number at maximum absorption
$[\alpha]^{23}_{D}$	=	specific rotation at 23 °C and sodium D line (589 nm)
°C	=	degree Celsius
µg	=	microgram
µl	=	micro liter
µM	=	micro molar
µm	=	micrometer
^{13}C NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
^{1}H NMR	=	proton nuclear magnetic resonance
2D NMR	=	two dimensional nuclear magnetic resonance
Å	=	angstrom
ADP	=	adenosine diphosphate
Al_2O_3	=	aluminum oxide
Ala	=	alanine
ATCC	=	American Type Culture Collection (Maryland, USA)
ATP	=	adenosine triphosphate
br s	=	broad singlet
c	=	concentration
Ca	=	calcium
CaH_2	=	calcium hydride
cald	=	calculated
$CDCl_3$	=	deuterated chloroform
CH_2Cl_2	=	dichloromethane

$CHCl_3$	=	chloroform
cm	=	centimeter
CO_2	=	carbon dioxide
Cys	=	cysteine
d	=	doublet
dd	=	doublet of doublets
ddd	=	doublet of doublets of doublets
DEPT	=	distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	=	dimethyl sulphoxide
DMSO-d_6	=	deuterated dimethyl sulphoxide
dt	=	doublet of triplets
DTT	=	dithiothreitol
EI	=	electron impact ionization
em	=	emission
ESI-TOF	=	electrospray ionization-time of flight
Et_3N	=	triethylamine
EtOAc	=	ethyl acetate
EtOH	=	ethanol
ex	=	excitation
FA or r	=	fluorescence anisotropy
FBS	=	fetal bovine serum
Fmoc	=	*N*-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)
FRET	=	fluorescence resonance energy transfer
g	=	gram or earth's gravitational field
Gly	=	glycine
H,H COSY	=	homonuclear (proton-proton) correlation spectroscopy
H_2O	=	water
HeLa	=	human cervix carcinoma cells
HMBC	=	proton-detected heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	=	proton-detected heteronuclear multiple quantum coherence

HN_3	=	hydrazoic acid
Hz	=	hertz
I or FI	=	fluorescence intensity
IC_{50}	=	50% inhibition concentration
Ile	=	isoleucine
IR	=	infrared
J	=	coupling constant
K_2HPO_4	=	potassium phosphate dibasic
KCl	=	potassium chloride
KH_2PO_4	=	potassium phosphate monobasic
KI	=	potassium iodide
km	=	kilometer
L	=	liter
Leu	=	leucine
M	=	molar
m	=	multiplet
m/z	=	mass to charge ratio
M^+	=	molecular ion
MeOH	=	methanol
Met	=	methionine
mg	=	milligram
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
$MgSO_4$	=	magnesium sulphate
MHz	=	megahertz
MIC	=	minimum inhibitory concentration
min	=	minute
mL	=	milliliter
mm	=	millimeter
MS	=	mass spectroscopy
NaCl	=	sodium chloride
$NaHCO_3$	=	sodium bicarbonate

NaN_3	=	sodium azide
ng	=	nanogram
NIH 3T3	=	mouse fibroblast cells
nM	=	nano molar
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
NSS	=	normal saline solution
Phe	=	phenylalanine
PPh_3	=	triphenylphosphine
ppm	=	part per million
R^2	=	correlation coefficient
RP18	=	reversed phase carbon eighteen
rt	=	room temperature
s	=	singlet
SDA	=	Sabouraud dextrose agar
Ser	=	serine
Si gel	=	silica gel
sp.	=	species
t	=	triplet
THF	=	tetrahydrofuran
Thr	=	threonine
TLC	=	thin layer chromatography
Tyr	=	tyrosine
UV	=	ultraviolet
w or wt	=	weight