31 ต.ค. 2546

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

1 สิงหาคม 2545 – 31 กรกฎาคม 2546

โครงการ การคัดหาและการหาโครงสร้างทางเคมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทย

Screening and characterization of bioactive compounds from Thai microorganisms

รหัสโครงการ BRT R_645004

โดย ศ. ดร. ยอดหทัย เทพธรานนท์ และ คณะ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

1 สิงหาคม 2545 – 31 กรกฎาคม 2546

โครงการ การคัดหาและการหาโครงสร้างทางเคมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทย

Screening and characterization of bioactive compounds from Thai microorganisms

รหัสโครงการ BRT R_645004

โดย ศ. ดร. ยอดหทัย เทพธรานนท์ และ คณะ

รหัสโครงการ BRT R_645004

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

1 สิงหาคม 2545 – 31 กรกฎาคม 2546

โครงการ การคัดหาและการหาโครงสร้างทางเคมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทย

Screening and characterization of bioactive compounds from Thai microorganisms

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ	ศ. ดร. ยอดหทัย เทพธรานนท์	
ผู้ร่วมโครงการ	นางพนิดา อุนะกุล	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก
	นางสาวศรีสุดา ตระกูลน่าเลื่อมใส	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก
	นายประเสริฐ ศรีกิติกุลชัย	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก
	นางสุมาลี สุโพธิณะ	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก
	ดร.ประสาท กิตตะคุปต์	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	Dr. Isaka Masahiko	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	ดร.ปัทมา พิทยขจรวุฒิ	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	ดร.ชะวะนี ศิริชัยวัฒน์	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	นางรัชดา หริตกุล	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	นายสุทธิชัย อินทมาตร์	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	นางสาววาระดี วงศ์สวัสดิ์	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	นายจักรพงศ์ อินทรอุดม	ห้องปฏิบัติการทรัพยากรชีวภาพ
	ดร. วนิชา วิชัย	ห้องปฏิบัติการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
	ดร. กัญญวิมว์ กีรติกร	ห้องปฏิบัติการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
	นางสาวดาราพร พิทยขจรวุฒิ	ห้องปฏิบัติการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
	นางสาวกัณวัฒน์ ด่านวิเศษกาญจน	ห้องปฏิบัติการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

บทสรุป

การดำเนินงานวิจัยใน 1 ปีที่ผ่านมาของโครงการวิจัย การคัดหาและการหาโครงสร้างทางเคมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทย คณะผู้วิจัย ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ จำนวน 1,525 สายพันธุ์จาก BIOTEC Culture Collection เพื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงและตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้ anti-cancer cells, anti-*Mycobacterium tuberculosis*, anti-*Plasmodium falciparum*, anti-herpes simplex visrus type I, anti-*Candida albicans* และนำตัวอย่างบางส่วนไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ลิง หลังการทดสอบในขั้นแรกได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จำนวน 216 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีและนำไปเลี้ยงในปริมาณเพิ่มขึ้นเพื่อยืนยันการสร้างสารออกฤทธิ์ จากนั้นพบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่น่าสนใจได้ 42 สายพันธุ์ไปทำการศึกษาโดยวิธี bioassay guided fractionation จากงานวิจัยทำให้ทราบสูตรโครงสร้างของสารจำนวนหนึ่งพร้อมฤทธิ์ทางชีวภาพ และในขณะเดียวกันอนุพันธ์ของสารต่างๆ ในกลุ่ม 2,4-diaminopyrimidine ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อหาโครงสร้างที่เหมาะสมกับการจับกับเอนไซม์ DHFR นอกจากนี้ได้มีการวิจัยด้านการปรับปรุงสูตรอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อราในกลุ่มราก่อโรคในแมลง (Insect pathogenic fungi) ซึ่งโดยปกติเจริญช้ากว่าราในกลุ่มอื่นๆ

Summary

During one year of this research project, 1,525 fungal isolates from the BIOTEC Culture Collection were selected for primary screening against cancer cell lines, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, herpes simplex visrus type I, or *Candida albicans*. A number of isolates were also tested for their cytotoxic effects on a monkey cell line. Subsequently, 216 isolates showing good activities in various tests were recultured in a larger scale to confirm test results. Fourty two isolates were chosen for bioassay guided fractionation. From our investigations, a set of compounds with elucidated structures are shown with biological activities. Furturemore, derivatives of 2,4-diaminopyrimidine were synthesized and tested with DHFR enzymes to identify the most suitable structure to inhibit DHFR activity. In addition, we have modified the components of culture media in order to increase the growth rate of insect pathogenic fungi, which normally grow at a much slower rate when compared with other groups of fungi.

สารบัญ

	หน้าที่
บทสรุป	4
บทนำ	8
แผนการดำเนินงาน	10
ผลงานวิจัย	
ตอนที่ 1: การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราและการพัฒนาหาอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการ	
ก. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา	
1. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราในขั้นต้น (Primary screening)	
1.1 สรุปจำนวนจุลินทรีย์ (รา) ที่ได้รับ เพื่อนำไปคัดเลือกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	12
1.2 จำนวนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	13
1.3 ผลการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติต่อต้านฤทธิ์ต่างๆ ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่ส่งตรวจ	15
1.3.1 คุณสมบัติต่อต้านมาลาเรีย	15
1.3.2 คุณสมบัติต่อต้านเชื้อวัณโรค (Anti-TB)	18
1.3.3 คุณสมบัติต่อต้าน Herpes Simplex Virus (Anti-HSV)	26
1.3.4 คุณสมบัติต่อต้านเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer)	32
1.3.5 คุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา (Anti-fungal)	39
2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราในขั้นที่สอง (Secondary screening)	42
สรุปผลงานวิจัยในส่วนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา	55
ข. การพัฒนาอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราที่ก่อโรคในแมลง	
1. การหาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา	56
2. ศึกษาผลของสารอาหารต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	61
สรุปผลการพัฒนาอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราที่ก่อโรคในแมลง	63
ตอนที่ 2: ผลงานวิจัยด้านการวิเคราะห์ทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม 2,4-diaminopyrimidine	
ก. การวิเคราะห์ทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	64
ข. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม 2,4-diaminopyrimidine	72

บทนำ

ในขั้นตอนการพัฒนายาใหม่นั้น ขั้นตอนที่จัดว่าสำคัญมากที่สุดขั้นตอนหนึ่ง คือการมีวิธีตรวจสอบคุณสมบัติของสารที่อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสม เนื่องจากว่าขั้นตอนนี้จะเป็นการคัดแยกสารที่มีฤทธิ์ซึ่งมีจำนวนน้อยออกจากสารที่ไม่มีฤทธิ์ซึ่งมีจำนวนมากกว่า การคัดเลือกในขั้นแรกนี้จะช่วยให้นักเคมีมีเป้าหมายของการสกัดและวิเคราะห์สารที่จำเพาะมากขึ้น จากการที่ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นเหมาะกับการเจริญของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ต้นไม้ และจุลินทรีย์ จึงมีความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติเหล่านี้ตามไปด้วย สิ่งเหล่านี้นับว่าเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่ามากของคนไทย และเป็นมรดกที่ควรรักษาไว้ยิ่ง การศึกษาถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ควบคู่ไปกับการสงวนรักษา (conservation) เป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ไทยควรปฏิบัติก่อนที่สิ่งมีชีวิตต่างๆจะสูญพันธุ์หรือหายไปจากระบบนิเวศน์

เป็นที่ทราบกันดีว่ายารักษาโรคต่างๆ ในปัจจุบันส่วนใหญ่มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไปปรับเปลี่ยน (modification) ตัวอย่างเช่น ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibiotics) ต่างๆ เช่น erythromycin และ streptomycin เป็นต้น เป็นเหตุผลหนึ่งที่ห้องปฏิบัติการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกจัดตั้งขึ้นในปีพ.ศ. 2540 โดยมีจุดประสงค์ที่จะเป็นห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Candida albicans* (anti-fungus) การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด (anti-cancer cells) และเชื้อไวรัส herpes simplex virus type I (anti-HSV I) ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อใช้ซื้อครุภัณฑ์ที่จำเป็นและวัสดุสำหรับการพัฒนาวิธีการและดำเนินงาน ในปีแรกนั้นห้องปฏิบัติการฯได้รับการจัดตั้งขึ้นจนดำเนินการได้ และได้ทำการตรวจสอบสารจำนวนมากกว่า 1,000 ตัวอย่าง นับเป็นจำนวนการทดสอบมากกว่า 1,000 การทดสอบในแต่ละชนิดของการตรวจ ในขณะเดียวกันในระหว่างปี พ.ศ. 2540-2547 การตรวจสอบสารยับยั้งเชื้อมาเลเรียได้รับการสนับสนุนจาก 2 หน่วยงานคือ

1) โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อการป้องกันและบำบัดโรคเขตร้อน (T2) ภายใต้โครงการวิจัยหัวข้อต่อไปนี้

1.1) การตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์ pfDHFR จากสารสังเคราะห์ โดยเทคนิค Combinatorial Chemistry ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2540 - 30 กันยายน 2541

1.2) High-Throughput Screening of Extracts from Thai Natural Products: Screening against *Plasmodium falciparum* in Culture ระหว่างวันที่ 15 เมษายน 2541 - 14 เมษายน 2542

1.3) Enhanced Expression of DHFR-TS as Antifolate Resistance Mechanism of *Plasmodium falciparum* ระหว่างวันที่ 3 ตุลาคม 2545 - 31 มีนาคม 2547

2) โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) ภายใต้โครงการวิจัยหัวข้อต่อไปนี้

- การตรวจหาสารต้านมาเลเรียจากสารสกัดจากพืช และจุลินทรีย์ในประเทศไทย: การตรวจกับเชื้อมาเลเรียในจานทดลอง ระหว่างวันที่ 1 กันยายน 2542 - 1 กันยายน 2544

และในส่วนของการตรวจสอบสารยับยั้งเชื้อวัณโรคได้รับการสนับสนุนจาก 2 หน่วยงานเช่นกันคือ

1) ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ภายใต้โครงการวิจัยหัวข้อต่อไปนี้

- การตรวจกรองสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรค ระหว่างวันที่ 1 ธันวาคม 2540 – 28 กุมภาพันธ์ 2542

2) องค์การอนามัยโลก (WHO) ภายใต้โครงการวิจัยหัวข้อต่อไปนี้

- การตรวจกรองสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรค ระหว่างวันที่ 1 พฤษภาคม 2544 - 1 เมษายน 2545

ต่อมาในปี พ.ศ. 2541 ศช.ได้ให้การสนับสนุนโครงการ "การตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์" โดยผ่านโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศ เพื่อทำการทดสอบสารสกัดจากพืชและเชื้อราใน anti-fungus, anti-cancer cells และ anti-HSV I tests ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น รวมทั้งพัฒนาวิธีตรวจสอบวิเคราะห์กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยที่ปัจจุบันโครงการได้สิ้นสุดลงแล้ว และได้ผลสรุปดังนี้

1. ได้ข้อมูลของเชื้อที่ถูกเก็บไว้ใน BCC (BIOTEC Culture Collection) ซึ่งเป็นทรัพยากรของประเทศ เชื้อจุลินทรีย์จำนวน 4,336 สายพันธุ์ (strains) เมื่อแบ่งตามรายละเอียดกลุ่มเชื้อ พบว่ามีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อ assay ต่างๆ ไม่เหมือนกัน ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาต่อไปในอนาคต รวมทั้งจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกกลุ่มเชื้อราที่จะเลือกเก็บเพื่อหาสารออกฤทธิ์

2. เป็นส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

จากศักยภาพและข้อมูลที่ได้ดังกล่าวโครงการนี้จึงเสนอที่จะทำการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป เนื่องจากจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อราสามารถให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้กับ assay หลายชนิด โครงการนี้เสนอที่จะทดสอบเชื้อราจากกลุ่มต่างๆ เพิ่มเติม สารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ผล positive ตามเกณฑ์ของแต่ละ assay และมีความเป็นพิษต่อ Vero cell ต่ำ จะได้รับการสกัดแยกเพิ่มขึ้น (bioassay guided fractionation) และศึกษาหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ต่อไป

แผนการดำเนินงาน

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากกลุ่มต่างๆ โดยใช้ผลการตรวจสอบที่ผ่านมาเป็นแนวทาง รวมทั้งคัดเลือกเชื้อจากกลุ่มที่ไม่เคยได้รับการตรวจสอบมาก่อนด้วย เชื้อเหล่านี้จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญบนอาหารแข็งก่อนเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายืนยันความถูกต้องของสายพันธุ์กับข้อมูลที่ได้บันทึกไว้

1) การเพาะเลี้ยงเชื้อราและการสกัดเบื้องต้น

1.1) อาหารที่ใช้เลี้ยง

เพื่อเพิ่มโอกาสในการให้จุลินทรีย์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะคัดเลือกต่อไป จะเลี้ยงจุลินทรีย์ในเงื่อนไขต่างๆ ในอาหารซึ่งมีองค์ประกอบแตกต่างกันอย่างน้อย 3 ชนิดเพื่อทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุด สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการอยู่ในภาคผนวก ก.

1.2) สภาวะที่ใช้เลี้ยง

1.2.1) เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสภาวะไม่เขย่า (static condition)

1.2.2) เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสภาวะเขย่า (shake condition)

1.2.3) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง จะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น Insect pathogenic fungi และรากลุ่มอื่น ๆ เลี้ยงที่ 22 °C ยกเว้น soil fungi เลี้ยงที่ 30°C

1.2.4) ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ขึ้นกับชนิดของเชื้อรา โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ 1–3 อาทิตย์ หรือนานกว่านั้น กรณีเป็นเชื้อราชนิดที่โตช้ามาก

ทำการสกัดตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ methanol : dichloromethane (1:1) และเตรียมตัวอย่างให้แห้งอีกครั้ง

1) ตรวจหาสารออกฤทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์ 700 สายพันธุ์ดังต่อไปนี้คือ

- anti-cancer cells 3 ชนิด (oral cavity cancer, breast cancer and lung cancer)
- anti-HSV I
- anti-Candida albicans
- anti-*Mycobacterium tuberculosis*
- anti-*Plasmodium falciparum*

(รายละเอียดวิธีการทดสอบอยู่ในภาคผนวก ข.)

2) สารตัวอย่างที่พบว่า positive ตามเกณฑ์ที่กำหนด จะผ่านการพิจารณาเพื่อทำการเลี้ยงใน scale ที่ใหญ่ขึ้น จากนั้นจะถูกสกัดและส่งตรวจทดสอบใน assay นั้นๆ อีก

3) การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากจุลินทรีย์

ทำการเลือกจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด หรือเลือกจุลินทรีย์ที่เป็น species ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ไปทำการสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทาง chromatography และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy ได้แก่ nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), mass spectrometry (MS), ultraviolet-visible spectrometry (UV) และ infrared spectrometry (IR) เป็นต้น

4) สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นสารบริสุทธิ์และพบว่าผลิตได้น้อยถ้าใช้กระบวนการหมักแบบเดิม จะได้รับการศึกษาเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตสารนั้นๆ

5) ข้อมูลที่ได้จะถูกรวบรวมเพื่อจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ และจัดทำ catalogue of culture

6) ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ (Medicinal Chemistry)

สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ดีแต่อาจพบว่ายังมีความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่บ้างหรือมีความสามารถในการละลายได้ไม่ดี จะได้รับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้น จากโครงการที่ผ่านมาได้มีสารที่พบว่ามีสูตรโครงสร้างที่น่าจะพัฒนาเป็นยาได้แต่ต้องการการสร้างอนุพันธ์เพื่อปรับปรุงฤทธิ์ขึ้นอีก ซึ่งนักเคมีมีความพร้อมที่จะดำเนินการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้เลย (โดยที่ในขณะเดียวกันเมื่อมีสารที่ได้จากการตรวจหาดังกล่าวข้างต้นที่มีฤทธิ์ดีก็จะได้นำมาปรับปรุงต่อไป) ในระยะแรกนี้สารกลุ่มที่ต้องการคืออนุพันธ์ของ chavicol ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านวัณโรคเป็นที่น่าพอใจ แต่ต้องมีการทำอนุพันธ์โดยเปลี่ยน functional group ต่างๆ เพื่อหาสารตัวที่มีฤทธิ์ดีที่สุดก่อนจะนำไปทดลองในสัตว์ (*in vivo*)

ผลงานวิจัย

ตอนที่ 1: การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา และการพัฒนาหาอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อการเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการ

ก. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา

1. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราในขั้นต้น (Primary Screening)

1.1 สรุปจำนวนเชื้อราที่ได้รับเพื่อนำไปคัดเลือกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากกลุ่มต่างๆ กันทั้งสิ้น 9 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีหลักการเลือกคือจะทำการศึกษาทั้งราในกลุ่มที่เคยได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อนและให้ผลของการสร้างสารออกฤทธิ์สูงกว่ารากลุ่มอื่นๆ เช่น ราก่อโรคในแมลงและ รากลุ่ม Endophytic fungi (มากกว่าร้อยละ 7.8 และ 10.7 ให้ผล positive ต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ตามลำดับ) ส่วนรากลุ่มอื่นๆ ได้รับการคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบศักยภาพในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งสิ้นจำนวน 1,117 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 : แสดงจำนวนราแต่ละชนิดที่นำมาเลี้ยงเพื่อเตรียมส่งทำ Screening ในวิธีการทดสอบต่างๆ

Fungal group	Number of isolates
ราย่อยไม้ (Wood decaying fungi)	1
ราก่อโรคในแมลง (Insect pathogenic fungi)	385
รามูลสัตว์ (Dung Fungi)	6
ราน้ำ (Aquatic fungi)	4
รากลุ่ม Coelomycete	15
รากลุ่ม Endophytic fungi	583
ราจากน้ำทะเล (Marine fungi)	27
ราที่เจริญบนปาล์ม (Palm fungi)	78
รากลุ่ม Xylariaceae	18
รวมทั้งสิ้น	**1,117**

1.2 **จำนวนตัวอย่างหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**

จุลินทรีย์ที่ได้รับ (1,117 ตัวอย่าง) จะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ รวมทั้งหมดได้เป็น 6,036 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปทำให้แห้ง และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ Methanol: Dichloromethane (1:1) หลังจากนั้นส่งไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย วัณโรค เริม (HSV) มะเร็ง (KB, BC, NCI-H 187) และเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ (*Candida albicans*) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 : สรุปจำนวนตัวอย่างที่ได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ

Month	จำนวนตัวอย่างที่เตรียมส่งสกัด	จำนวนตัวอย่างสกัดที่ส่ง Bioassay Lab.	จำนวนตัวอย่างที่ได้รับการทดสอบแล้วจากห้องปฏิบัติการ Screening ในฤทธิ์การต่อต้าน						
			TB	Malaria	HSV	Cancer			Fungal
						KB	BC	NCI-H 187	
1	-	384	480	376	350	465	467	435	481
2	-	384	480	375	258	218	349	456	498
3	600	-	*	*	*	*	*	398	*
4	900	192	96	-	118	174	28	31	-
5	504	576	480	325	188	74	248	133	314
6	504	576	-	283	244	233	241	179	796
7	504	576	288	322	206	398	400	154	943
8	504	576	480	354	152	845	847	145	530
9	504	576	600	342	103	501	502	87	637
10	504	384	479	596	192	408	408	208	408
11	504	504	746	558	174	328	332	0	562
12	504	576	504	537	208	320	320	74	333
13	504	384	576	483	152	243	248	173	318
Total	6,036	5,688	5,209	4,551	2,345	4,207	4,390	2,473	5,820

*อยู่ในระหว่างการเคลื่อนย้ายห้องปฏิบัติการมายังอุทยานวิทยาศาสตร์

1.3 **ผลการทดสอบสารที่มีคุณสมบัติต่อต้านฤทธิ์ต่างๆ ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่ส่งตรวจ**

จุลินทรีย์ที่ผ่านการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว จำนวน 1,525 สายพันธุ์ เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งผลการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่รายงานนี้จะได้จากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงก่อนหน้านี้แล้ว เนื่องจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อราต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโต อีกทั้งกระบวนการหลังการเพาะเลี้ยง ตลอดจนกระบวนการสกัดโดยวิธีการทางเคมี ทำให้ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่รับมาเพื่อทำการเพาะเลี้ยงกับผลที่ได้ไม่อยู่ในช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ได้รายงานแยกไว้ในแต่ละการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 3 : แสดงจำนวนราแต่ละชนิดที่ผ่านการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Fungal group	Number of isolates
รากลุ่ม Basidiomycete	367
รากลุ่ม Coelomycete	14
รามูลสัตว์ (Dung Fungi)	62
รากลุ่ม Endophytic Fungi	377
ราก่อโรคในแมลง (Insect pathogenic fungi)	284
ราจากน้ำทะเล (Marine Fungi)	11
ราที่เจริญบนปาล์ม (Palm Fungi)	34
ราน้ำ (Aquatic Fungi)	117
ราจากทราย (Sand Fungi)	12
ราที่เจริญบนเมล็ดพืช (Seed Fungi)	70
ราดิน (Soil Fungi)	5
ราย่อยสลายไม้ (Wood Decaying Fungi)	172
รวมทั้งสิ้น	1,525

1.3.1 **คุณสมบัติต่อต้านมาลาเรีย**

ผลการทดสอบการสร้างสารต้านมาลาเรียในระยะเวลา 1 ปีที่ผ่านมา จำนวน 4,551 ตัวอย่าง พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียจำนวน 55 ตัวอย่าง (28 สายพันธุ์) คิดเป็น 1.21% ของตัวอย่างทั้งหมด (ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3) โดยพบตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียในระดับสูง (ค่า ED_{50}<1 µg/ml) จำนวน 8 ตัวอย่าง และให้ฤทธิ์ในระดับปานกลาง (ค่า ED_{50} 1-50 µg/ml) จำนวน 47 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 14.55% และ 85.45% ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียในระดับสูงพบได้จากเชื้อในกลุ่ม Endophytic

fungi จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.27% ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive และยังพบเชื้อในกลุ่มรามูลสัตว์ (Dung fungi) และราก่อโรคในแมลง (Insect fungi) ที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านมาเลเรียในระดับสูงจำนวน 3 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ โดยคิดเป็น 5.45% และ 1.82% ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive ตามลำดับ จำนวนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียส่วนใหญ่ให้ผลในระดับปานกลางซึ่งเป็นตัวอย่างราในกลุ่มต่างๆ คือ ราก่อโรคในแมลงจำนวน 20 ตัวอย่าง ราในกลุ่ม Endophytic fungi จำนวน 12 ตัวอย่าง ราในกลุ่ม Basidiomycete จำนวน 10 ตัวอย่าง รามูลสัตว์ (Dung fungi) 3 ตัวอย่าง และราที่เจริญบนปาล์ม (Palm fungi) และรายอยสลายไม้ (Wood-decay fungi) อีกอย่างละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 36.36%, 21.82%, 18.18%, 5.45% และ 1.82% ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงชนิดจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย

No.	Screening code	Ferment code	Original code	ED_{50} (µg/ml)
1	YO 1076	450391.11 B	SRS 31	0.40
2	YM 1201	441332.3 B	SFC 1532	0.50
3	YM 1202	441332.11 B	SFC 1532	0.50
4	YO 1073	450391.11 A	SRS 31	0.60
5	YP 0149	460127.4 A	NHJ 12040	0.60
6	YO 1075	450319.3 B	SRS 31	0.60
7	YO 0888	450360.8 A	SRS 34	0.60
8	YM 323	441186.11 A	SFC 1516	0.75
9	YP 0151	460127.3 B	NHJ 12040	3.50
10	YP 0152	460127.4 B	NHJ 12040	4.40
11	YP 0064	460048.3 A	NHJ 12030	4.80
12	YO 0694	450346.3A	KPFCD 1021	5.10
13	YN 1069	450133.3 B	NHJ 11660	5.30
14	YN 1068	450133.9 A	NHJ 11660	5.30
15	YM 936	441288.8 A	TB 37	5.40
16	YP 0697	460173.3 A	NHJ 12198	5.40
17	YM 938	441288.11 B	TB 37	5.50
18	YO 1353	460006.9 B	NHJ 11834	5.60
19	YN 1527	450239.8 B	SRS 35	5.70

No.	Screening code	Ferment code	Original code	ED_{50} (μg/ml)
20	YO 0889	450360.3 B	SRS 34	5.75
21	YP 0779	460186.4 B	AL 259	5.90
22	YP 0698	460173.4 A	NHJ 12198	5.90
23	YO 1074	450391.8 A	SRS 31	6.00
24	YN 242	450025.11 B	PGI 350	6.10
25	YO 1072	450391.3 A	SRS 31	6.40
26	YN 1524	450239.8 A	SRS 35	6.40
27	YO 1342	460005.3 A	NHJ 11809	6.50
28	YN 1523	450239.11 A	SRS 35	6.50
29	YN 1526	450239.11 B	SRS 35	6.70
30	YN 877	450173.3 B	NHJ 11538	6.80
31	YN 308	450036.11 B	PGI 351	6.90
32	YO 1326	460002.9 A	NHJ 11690	7.40
33	YN 1522	450239.3 A	SRS 35	7.40
34	YN 239	450025.11 A	PGI 350	7.50
35	YO 1378	460011.3 A	NHJ 11953.04	7.70
36	YP 0065	460048.4 A	NHJ 12030	7.70
37	YM 1199	441332.11 A	SFC 1532	8.10
38	YM 939	441288.8 B	TB 37	8.20
39	YN 878	450173.4 B	NHJ 11538	8.40
40	YP 0067	460048.3 B	NHJ 12030	8.50
41	YP 0290	450466.11 B	SRM 12	8.90
42	YO 0623	450334.11A	PP 216	9.10
43	YM 1056	441308.8 A	PRT 83	9.60
44	YP 0148	460127.3 A	NHJ 12040	10.0
45	YN 1066	450133.3 A	NHJ 11660	12.30
46	YP 0362	450478.11 B	SRM 73	12.60
47	YN 1418	450221.11 B	SRS 14	13.00
48	YN 1525	450239.3 B	SRS 35	13.50

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
8	YN 1184	450152.11 B	CMUZE 67	Active	0.78
9	YM880	441279.3A	PGI 511	Active	0.78
10	YO1061	450389.11A	SRS 66	Active	0.78
11	YN 0391	450050.3 B	AL 166	Active	3.13
12	YO 0971	450374.11 A	SRS 47	Active	3.13
13	YN 1486	450233.3A	SRS 72	Active	3.13
14	YN 0392	450050.4 B	AL 166	Active	6.25
15	YP0779	460186.4 B	AL 259	Active	6.25
16	YM 572	441227.4B	AL 270	Active	6.25
17	YP 0005	460038.11A	CMUEO 1725	Active	6.25
18	YP 0011	460039.11A	CMUEO 1727	Active	6.25
19	YO 1534	460037.3A	CMUEO 1751	Active	6.25
20	YP 0149	460127.4 A	NHJ 12040	Active	6.25
21	YP 0097	460053.3 B	NHJ 12103	Active	6.25
22	YP0698	460173.4 A	NHJ 12198	Active	6.25
23	YN 1091	450137.11 A	PGI 358	Active	6.25
24	YM 883	441279.3 B	PGI 511	Active	6.25
25	YO 1076	450391.11 B	SRS 31	Active	6.25
26	YM 571	441227.3B	AL 270	Active	12.50
27	YM 809	441267.11 A	CB 112	Active	12.50
28	YM 346	441190.3A	CB 18	Active	12.50
29	YO 1184	450427.11 B	CMUE 1318	Active	12.50
30	YP 0004	460038.3A	CMUEO 1725	Active	12.50
31	YP 0007	460038.3B	CMUEO 1725	Active	12.50
32	YP 0014	460039.11B	CMUEO 1727	Active	12.50
33	YP 0010	460039.3A	CMUEO 1727	Active	12.50
34	YP 0013	460039.3B	CMUEO 1727	Active	12.50
35	YP 0002	460037.11B	CMUEO 1751	Active	12.50
36	YP 0001	460037.3B	CMUEO 1751	Active	12.50

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
37	YO 1504	460032.3A	NHJ 11293	Active	12.50
38	YN0130	450007.3A	NHJ 11350	Active	12.50
39	YN 0877	450173.3 B	NHJ 11538	Active	12.50
40	YP0754	460182.3 B	NHJ 11766.01	Active	12.50
41	YP0766	460184.3 B	NHJ 11766.02	Active	12.50
42	YO 1378	460011.3A	NHJ 11953.04	Active	12.50
43	YO 1383	460011.9B	NHJ 11953.04	Active	12.50
44	YP 0152	460127.4 B	NHJ 12040	Active	12.50
45	YP 0124	460058.3 A	NHJ 12076	Active	12.50
46	YP 0098	460053.4 B	NHJ 12103	Active	12.50
47	YP 0063	460047.9 B	NHJ 12133	Active	12.50
48	YP 0140	460060.4 B	NHJ 5516	Active	12.50
49	YN 1094	450137. 11 B	PGI 358	Active	12.50
50	YM 884	441279.11 B	PGI 511	Active	12.50
51	YM 226	441137.3 A	PP 333	Active	12.50
52	YO 0646	450338.3A	PP 426	Active	12.50
53	YO 0649	450338.3B	PP 426	Active	12.50
54	YL 1126	441027.3 A	PP 646	Active	12.50
55	YO 0974	450374.11 B	SRS 47	Active	12.50
56	YM 548	441223.4B	AL 160	Active	25.00
57	YM 683	441246.4A	AL 169	Active	25.00
58	YM 686	441246.4B	AL 169	Active	25.00
59	YM0337	441188.3B	AL 197	Active	25.00
60	YM 569	441227.4A	AL 270	Active	25.00
61	YM 812	441267.11 B	CB 112	Active	25.00
62	YM 784	441263.3 A	CB 21-3	Active	25.00
63	YM 786	441263.8 A	CB 21-3	Active	25.00
64	YL 1504	441178.3 A	CB 8	Active	25.00
65	YO 0061	450251.3 B	CMUBE 838	Active	25.00

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
66	YO0460	450307.3A	CMUE 1736	Active	25.00
67	YO0460	450307.3A	CMUE 1736	Active	25.00
68	YN 0793	450117.3 B	CMUE 1770	Active	25.00
69	YO 1517	460034.11A	CMUEO 1722	Active	25.00
70	YO 1520	460034.11B	CMUEO 1722	Active	25.00
71	YP 0008	460038.11B	CMUEO 1725	Active	25.00
72	YN 1171	450150.3 B	CMUZE 387	Active	25.00
73	YN 1279	450168.3 B	CMUZE 401	Active	25.00
74	YN 1187	450153.11 A	CMUZE 447	Active	25.00
75	YN 0730	450107.3 A	NHJ 11268.1	Active	25.00
76	YN 0733	450107.3 B	NHJ 11268.1	Active	25.00
77	YN 0772	450114.3 A	NHJ 11268.2	Active	25.00
78	YN 0776	450114.4 B	NHJ 11268.2	Active	25.00
79	YO 1507	460032.3B	NHJ 11293	Active	25.00
80	YO 1326	460002.9A	NHJ 11690	Active	25.00
81	YO 1375	460010.3B	NHJ 11770	Active	25.00
82	YO 1408	460016.3A	NHJ 11942	Active	25.00
83	YO 1381	460011.3B	NHJ 11953.04	Active	25.00
84	YO 1380	460011.9A	NHJ 11953.04	Active	25.00
85	YP0739	460180.3 A	NHJ 11995	Active	25.00
86	YP 0127	460058.3 B	NHJ 12076	Active	25.00
87	YP 0061	460047.3 B	NHJ 12133	Active	25.00
88	YP0700	460173.3 B	NHJ 12198	Active	25.00
89	YM 881	441279.11 A	PGI 511	Active	25.00
90	YM 885	441279.8 B	PGI 511	Active	25.00
91	YL671	44970.11A	PP 1114	Active	25.00
92	YM 799	441265.3 B	PP 312	Active	25.00
93	YM 172	441128.3 A	PP 324	Active	25.00
94	YO 646	450338.3A	PP 426	Active	25.00

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
95	YL1129	441027.3B	PP 646	Active	25.00
96	YN 0991	450192.3 B	PP 904	Active	25.00
97	YM 851	441274.11 A	SFC 1552	Active	25.00
98	YM 1270	441344.3 A	SFC 1559	Active	25.00
99	YM 1273	441344.3 B	SFC 1559	Active	25.00
100	YP 0322	450472.3 A	SRM 78	Active	25.00
101	YN 0893	450176.11 A	SRS 10	Active	25.00
102	YN 1418	450221.11B	SRS 14	Active	25.00
103	YO 1073	450391.11 A	SRS 31	Active	25.00
104	YO 1075	450391.3 B	SRS 31	Active	25.00
105	YO0487	450311.3B	SRS 50	Active	25.00
106	YO0487	450311.3B	SRS 50	Active	25.00
107	YM 687	441246.9B	AL 169	Active	50.00
108	YM682	441246.3A	AL 169	Active	50.00
109	YM 1301	441349.4 A	AL 221	Active	50.00
110	YM 1304	441349.4 B	AL 221	Active	50.00
111	YP0778	460186.3 B	AL 259	Active	50.00
112	YP0776	460186.4 A	AL 259	Active	50.00
113	YM 570	441227.9A	AL 270	Active	50.00
114	YM0568	441227.3A	AL 270	Active	50.00
115	YM 613	441234.3B	AL 68	Active	50.00
116	YM 614	441234.4B	AL 68	Active	50.00
117	YM 808	441267.3 A	CB 112	Active	50.00
118	YM 716	441251.11 B	CB 130	Active	50.00
119	YM 347	441190.11A	CB 18	Active	50.00
120	YM 348	441190.8A	CB 18	Active	50.00
121	YM 460	441209.3A	CB 20	Active	50.00
122	YM787	441263.3B	CB 21-3	Active	50.00
123	YM 721	441252.3 B	CB 22	Active	50.00

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
124	YM 722	441252.11 B	CB 22	Active	50.00
125	YN0104	450002.11B	CMUBE 1803	Active	50.00
126	YN 1207	450156.3 B	CMUBE 1812	Active	50.00
127	YN 1206	450156.8 A	CMUBE 1812	Active	50.00
128	YO 0059	450251.11 A	CMUBE 838	Active	50.00
129	YO 0062	450251.11 B	CMUBE 838	Active	50.00
130	YO 0058	450251.3 A	CMUBE 838	Active	50.00
131	YO 0063	450251.8 B	CMUBE 838	Active	50.00
132	YN 0788	450116.11 B	CMUE 1338	Active	50.00
133	YN 1300	450202.3A	CMUE 1394	Active	50.00
134	YO 1102	450396.3 A	CMUE 1487	Active	50.00
135	YN 0800	450118.11 B	CMUE 1506	Active	50.00
136	YN 0799	450118.3 B	CMUE 1506	Active	50.00
137	YO 1187	450428.11 A	CMUE 1529	Active	50.00
138	YO 0147	450265.8 B	CMUE 1746	Active	50.00
139	YN 0790	450117.3 A	CMUE 1770	Active	50.00
140	YO 1516	460034.3A	CMUEO 1722	Active	50.00
141	YO 1519	460034.3B	CMUEO 1722	Active	50.00
142	YO 1535	460037.11A	CMUEO 1751	Active	50.00
143	YP 0003	460037.8B	CMUEO 1751	Active	50.00
144	YN 1169	450150.11 A	CMUZE 387	Active	50.00
145	YN 1285	450169.3 B	CMUZE 388	Active	50.00
146	YN 1277	450168.11 A	CMUZE 401	Active	50.00
147	YN 1276	450168.3 A	CMUZE 401	Active	50.00
148	YN 1281	450168.8 B	CMUZE 401	Active	50.00
149	YN 0622	450089.3 A	CMUZE 405	Active	50.00
150	YN 0623	450089.11 A	CMUZE 405	Active	50.00
151	YN 1186	450153.3 A	CMUZE 447	Active	50.00
152	YN 1166	450149.11 B	CMUZP 3	Active	50.00

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
153	YN 0461	450062.4 A	NHJ 11253	Active	50.00
154	YN0112	450004.3A	NHJ 11262.01	Active	50.00
155	YN 0734	450107.4 B	NHJ 11268.1	Active	50.00
156	YN 0775	450114.3 B	NHJ 11268.2	Active	50.00
157	YN0188	450016.4B	NHJ 11271.5	Active	50.00
158	YN0149	450010.4A	NHJ 11271.7	Active	50.00
159	YN0152	450010.4B	NHJ 11271.7	Active	50.00
160	YN 0505	450069.3 B	NHJ 11271.8	Active	50.00
161	YN 0506	450069.4 B	NHJ 11271.8	Active	50.00
162	YN 0757	450111.3 B	NHJ 11299	Active	50.00
163	YN 0878	450173.4 B	NHJ 11538	Active	50.00
164	YO 1324	460002.3A	NHJ 11690	Active	50.00
165	YO 1329	460002.9B	NHJ 11690	Active	50.00
166	YO 1372	460010.3A	NHJ 11770	Active	50.00
167	YO 1347	460005.9B	NHJ 11809	Active	50.00
168	YO 1363	460008.3B	NHJ 11810	Active	50.00
169	YO 1365	460008.9B	NHJ 11810	Active	50.00
170	YO 1411	460016.3B	NHJ 11942	Active	50.00
171	YO 1382	460011.4B	NHJ 11953.04	Active	50.00
172	YP0742	460180.3 B	NHJ 11995	Active	50.00
173	YP0792	460188.9 B	NHJ 12004	Active	50.00
174	YP 0073	460049.3 B	NHJ 12012	Active	50.00
175	YP0719	460176.4 B	NHJ 12053	Active	50.00
176	YP 0094	460053.3 A	NHJ 12103	Active	50.00
177	YP 0058	460047.3 A	NHJ 12133	Active	50.00
178	YP 0135	460059.9 B	NHJ 12173	Active	50.00
179	YP 0138	460060.9 A	NHJ 5516	Active	50.00
180	YN 0263	450029.11 A	PGI 110	Active	50.00
181	YM 882	441279.8 A	PGI 511	Active	50.00

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti TB	MIC(μg/ml)
182	YM 1457	441375.11 A	PGI 537	Active	50.00
183	YM1456	441375.3A	PGI 537	Active	50.00
184	YO0392	450295.11B	PGI 697	Active	50.00
185	YO0392	450295.11B	PGI 697	Active	50.00
186	YL670	44970.3A	PP 1114	Active	50.00
187	YN 1254	450164.8 A	PP 1212	Active	50.00
188	YM 174	441128.8 A	PP 324	Active	50.00
189	YM 175	441128.3 B	PP 324	Active	50.00
190	YM 229	441137.3 B	PP 333	Active	50.00
191	YM 196	441132.3 A	PP 600	Active	50.00
192	YM 197	441132.11 A	PP 600	Active	50.00
193	YP 0209	450453.11 A	SFC 1008	Active	50.00
194	YM 326	441186.11B	SFC 1516	Active	50.00
195	YO 0766	450413.3A	SRM 79	Active	50.00
196	YP 0347	450476.11 A	SRM 80	Active	50.00
197	YO 0995	450378.11 A	SRS 30	Active	50.00
198	YO 0994	450378.3 A	SRS 30	Active	50.00
199	YO 0980	450375.11 B	SRS 32	Active	50.00
200	YP 0272	450463.11 B	SRS 4	Active	50.00
201	YO 0551	450322.11A	SRS 46	Active	50.00
202	YN 1307	450203.11A	SRS 53	Active	50.00
203	YO 1063	450389.3 B	SRS 66	Active	50.00
204	YN 1408	450220.3A	SRS 73	Active	50.00
205	YM 214	441135.3 A	SS 1042	Active	50.00
206	YM977	441295.11 A	TB 191-2B	Active	50.00
207	YL 1325	441060.11 A	CB 54	Active	50.00*

* Active แต่มีตะกอนเกิดขึ้น ค่า MIC อาจอยู่ที่ความเข้มข้น +1 เท่าของความเข้มข้นเดิม

1.3.3 **คุณสมบัติต่อต้าน** Herpes Simplex Virus (Anti-HSV)

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ Herpes Simplex Virus type I จากตัวอย่างจุลินทรีย์จำนวน 2,345 ตัวอย่าง พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ Herpes Simplex Virus ได้ 156 ตัวอย่าง (121 สายพันธุ์) คิดเป็น 6.65% ของตัวอย่างทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 5 ตัวอย่างที่ให้ผลยับยั้งเชื้อ Herpes Simplex Virus ในระดับสูง ($IC_{50} \leq 50$ µg/ml) มีจำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 17.95% ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive และส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มของ insect fungi จำนวน 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 14.10% , Aquatic fungi จำนวน 3 ตัวอย่าง, Endophytic fungi จำนวน 2 ตัวอย่าง และ Wood-decay fungi จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.92%, 1.28% และ 0.64% ตามลำดับ และตัวอย่างที่ให้ผลยับยั้งเชื้อ Herpes Simplex Virus ในระดับปานกลางมีจำนวน 128 ตัวอย่าง พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มของ insect fungi มีจำนวน 43 ตัวอย่าง คิดเป็น 27.56% รองลงมาคือ Endophytic fungi (22), Wood-decay fungi (20), Basidiomycte (13), Aquatic fungi (11), Dung (9), Seed fungi (6), Sand fungi (2), ราดิน Soil fungi (1) และ ราที่เจริญบนปาล์ม (1)

ตารางที่ 6 : แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต่อต้านเชื้อ Herpes Simplex Virus

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti-HSV-1	Cytotoxicity
1	YO 1326	460002.9A	NHJ 11690	Active (1.70)	12.4
2	YO 1380	460011.9A	NHJ 11953.04	Active (1.80)	41.1
3	YP 0780	460186.9 B	AL 259	Active (13.90)	> 50
4	YK 821	44593.11 A	SS 876	Active (16.16)	> 50
5	YK 824	44593.11 B	SS 876	Active (16.26)	> 50
6	YK 37	44371.3 B	AL 38	Active (19.24)	> 50
7	YO 0316	450622.3 B	NHJ 11762	Active (19.40)	>50
8	YO 1329	460002.9B	NHJ 11690	Active (19.80)	> 50
9	YK 0003	44365.9 B	AL 27	Active (22.49)	35.76
10	YL 9	44877.9 B	AL 180	Active (23.12)	> 50
11	YO 1415	460017.4A	NHJ 11828	Active (28.40)	> 50
12	YP 0706	460174.3 B	NHJ 11771.01	Active (28.40)	> 50
13	YL 71	44888.4 A	AL 78	Active (29.88)	> 50
14	YP 0821	450493.11 A	SRM 33	Active (29.90)	> 50
15	YK 991	44804.3 B	PP 743	Active (34.11)	> 50
16	YJ 0883	44163.3 B	NHJ 10771	Active (34.97)	> 50
17	YK 929	44794.11 A	PP 43	Active (38.23)	> 50

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti-HSV-1	Cytotoxicity
18	YO 0332	450625.4 A	NHJ 11471	Active (39.90)	> 50
19	YK 0319	44426.3 B	AL 61	Active (4.95)	34.85
20	YK 873	44784.18 B	SS 841	Active (44.78)	> 50
21	YK 310	44425.3 A	AL 46	Active (49.09)	> 50
22	YK 0005	44366.4 A	AL 111	Active (5.35)	11.98
23	YP 0691	460172.3 A	NHJ 12002	Active (5.50)	> 50
24	YO 1337	460004.4A	NHJ 12029	Active (50.00)	> 50
25	YP 0689	460171.4 B	AL 31	Active (7.40)	19
26	YK 1085	44818.4 A	AL 25	Active (7.99)	> 50
27	YP 0688	460171.3 B	AL 31	Active (8.00)	45.2
28	YL 8	44877.4 B	AL 180	Active (8.41)	> 50
29	YK 879	44785.18 B	SS 747	Moderately active	38.06
30	YL 207	44910.8 B	CB 53	Moderately active	> 50
31	YL 279	44922.8 B	CBSS 1-7	Moderately active	> 50
32	YL 1	44876.3 B	CBSS 1-9	Moderately active	> 50
33	YL 1	44876.3 B	CBSS 1-9	Moderately active	> 50
34	YK 0831	44594.8 B	PP 963	Moderately active	> 50
35	YK 0600	44556.18 A	SS 634	Moderately active	> 50
36	YK 544	44407.3 A	SS 679	Moderately active	> 50
37	YK 547	44407.3 B	SS 679	Moderately active	> 50
38	YK 0725	44577.11 A	SS 712	Moderately active	> 50
39	YK 0727	44577.3 B	SS 712	Moderately active	> 50
40	YK 0875	44785.11 A	SS 747	Moderately active	> 50
41	YK 0592	44555.3 A	SS 771	Moderately active	> 50
42	YK 0597	44555.18 B	SS 771	Moderately active	> 50
43	YK 1221	44840.18 B	SS 888	Moderately active	> 50
44	YK 1342	44928.3 A	CB 55	Moderately active	> 50
45	YK 1524	44874.8 A	CBSS 1-2	Moderately active	> 50
46	YK 1525	44874.3 B	CBSS 1-2	Moderately active	> 50

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti-HSV-1	Cytotoxicity
76	YK 1077	44816.9 B	AL 161	Moderately active	> 50
77	YK 495	44545.9 B	AL 186	Moderately active	> 50
78	YK 1530	44875.9 A	AL 193	Moderately active	> 50
79	YK 1325	44858.4 A	AL 215	Moderately active	> 50
80	YK 1328	44858.4 B	AL 215	Moderately active	> 50
81	YK 1089	44818.9 B	AL 25	Moderately active	> 50
82	YK 1486	44952.3 A	AL 251	Moderately active	> 50
83	YK 38	44371.4 B	AL 38	Moderately active	> 50
84	YK 1516	44873.3 A	AL 5	Moderately active	> 50
85	YK 1520	44873.4 B	AL 5	Moderately active	> 50
86	YK 1521	44873.9 B	AL 5	Moderately active	> 50
87	YK 1330	44859.3 A	AL 58	Moderately active	> 50
88	YK 1333	44859.3 B	AL 58	Moderately active	> 50
89	YK 373	44525.3 B	AL139	Moderately active	> 50
90	YK 0695	44572.4 A	NHJ 10441	Moderately active	> 50
91	YK 673	44568.3 B	NHJ 10681	Moderately active	> 50
92	YK 326	44427.4 B	NHJ 10825	Moderately active	> 50
93	YK 327	44427.9 B	NHJ 10825	Moderately active	> 50
94	YK 401	44530.4 A	NHJ 11005	Moderately active	> 50
95	YK 0705	44573.9 B	NHJ 11014	Moderately active	> 50
96	YK 357	44522.8 B	PP 46	Moderately active	> 50
97	YK 0769	44584.3 B	SFC 34	Moderately active	> 50
98	YK 0622	44560.3 A	SFC 610	Moderately active	> 50
99	YK 0625	44560.3 B	SFC 610	Moderately active	> 50
100	YK 0626	44560.11 B	SFC 610	Moderately active	> 50
101	YK 0621	44559.8 B	SFC 613	Moderately active	> 50
102	YK 0785	44587.11 A	SF 188	Moderately active	> 50
103	YK 0787	44587.3 B	SF 188	Moderately active	> 50
104	YK 849	44780.8 B	PP 309	Moderately active	> 50

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti-HSV-1	Cytotoxicity
105	YK 453	44538.8 B	PP 1029	Moderately active	> 50
106	YK 0960	44799.8 A	PP 133	Moderately active	> 50
107	YK 961	44799.3 B	PP 133	Moderately active	> 50
108	YK 0798	44589.8 A	PP 448	Moderately active	> 50
109	YK 1354	44930.3 A	PP 53	Moderately active	> 50
110	YK 1358	44930.11 B	PP 53	Moderately active	> 50
111	YK 1038	44812.8 A	PP 60	Moderately active	> 50
112	YK 1384	44935.3 A	PP 781	Moderately active	> 50
113	YK 1300	44854.3 A	PP 87	Moderately active	> 50
114	YK 0792	44588.8 A	PP 88	Moderately active	> 50
115	YK 0793	44588.3 B	PP 88	Moderately active	> 50
116	YK 0794	44588.11 B	PP 88	Moderately active	> 50
117	YK 367	44524.3 B	PP 885	Moderately active	> 50
118	YK 1267	44848.3 B	PP 89	Moderately active	> 50
119	YK 1311	44855.8 B	PP 90	Moderately active	> 50
120	YK 1308	44855.8 A	PP 90	Moderately active	> 50
121	YK 1294	44853.3 A	PP 91	Moderately active	> 50
122	YK 1299	44853.8 B	PP 91	Moderately active	> 50
123	YK 0938	44795.11 B	PP 92	Moderately active	> 50
124	YL 346	441004.3 A	PP 777	Moderately active	> 50
125	YO 293	450618.4 B	NHJ 11489	Moderately active	> 50
126	YO 298	450619.3 B	NHJ 10363	Moderately active	> 50
127	YO 329	450624.4 B	NHJ 11574	Moderately active	> 50
128	YP 0007	460038.3B	CMUEO 1725	Moderately active	> 50
129	YP 0018	460040.8A	CMUW 2270	Moderately active	> 50
130	YP 0044	460044.4 B	NHJ 12039	Moderately active	> 50
131	YP 0096	460053.9 A	NHJ 12103	Moderately active	> 50
132	YP 0115	460056.3 B	NHJ 12027	Moderately active	> 50
133	YP 0123	460057.9 B	NHJ 12044	Moderately active	> 50

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Anti-HSV-1	Cytotoxicity
134	YP 0126	460058.9 A	NHJ 12076	Moderately active	> 50
135	YP 0130	460059.3 A	NHJ 12173	Moderately active	> 50
136	YP 0150	460127.9 A	NHJ 12040	Moderately active	> 50
137	YP 0157	460128.3B	NHJ 11771.04	Moderately active	> 50
138	YP 0171	460130.9 B	NHJ 11805.02	Moderately active	> 50
139	YP 0179	460132.4 A	NHJ 12078	Moderately active	> 50
140	YP 0187	460133.3 B	NHJ 11924	Moderately active	> 50
141	YP 0819	450492.8 B	SFC 1018	Moderately active	> 50
142	YP 0827	450494.11 A	SRM 18	Moderately active	> 50
143	YP 0653	450530.11A	SRM 65	Moderately active	> 50
144	YP 0654	450530.8A	SRM 65	Moderately active	> 50
145	YP 0804	450535.8A	SRS 84	Moderately active	> 50
146	YP 0811	450536.3B	SRS 58	Moderately active	> 50
147	YP 0810	450536.8A	SRS 58	Moderately active	> 50
148	YP 0835	450537.3 B	SRM 56	Moderately active	> 50
149	YP 0839	450538.11 A	SRS 64	Moderately active	> 50
150	YP 0855	450540.8 B	SRM 40	Moderately active	> 50
151	YP 0674	460169.4 A	NHJ 12207	Moderately active	> 50
152	YP 0683	460170.4 B	NHJ 12079	Moderately active	> 50
153	YP 0714	460175.9 B	NHJ 12243	Moderately active	> 50
154	YP 0737	460179.4 B	NHJ 12071	Moderately active	> 50
155	YP 0742	460180.3 B	NHJ 11995	Moderately active	> 50
156	YP 0744	460180.9 B	NHJ 11995	Moderately active	> 50

1.3.4 **คุณสมบัติต่อต้านเซลล์มะเร็ง** (Anti-cancer)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบคือ BC, KB cell line และ NCI- H187 พบตัวอย่างที่ให้ผลต่อต้านในระดับความเข้มข้นที่น่าสนใจดังนี้ (ตารางที่ 6 ก. ข. และ ค.)

ตารางที่ 7 ก. : แสดงจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต่อต้านเซลล์มะเร็ง BC cell line

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (µg/ml)
1	YN 58	441398.3 A	NHJ 11343.01	Strongly active	0.20
2	YN 62	441398.4 B	NHJ 11343.01	Strongly active	0.38
3	YN 59	441398.4 A	NHJ 11343.01	Strongly active	0.60
4	YN 29	441393.4 A	NHJ 11343.02	Strongly active	0.97
5	YO 0155	450267.11 A	CMUE 1841	Strongly active	1.03
6	YN 0031	441393.3 B	NHJ 11343.02	Strongly active	1.08
7	YM 0937	441288.3 B	TB 37	Strongly active	1.09
8	YM 0934	441288.3 A	TB 37	Strongly active	1.22
9	YP 0149	460127.4 A	NHJ 12040	Strongly active	1.28
10	YN1253	450164.11 A	PP 1212	Strongly active	1.50
11	YP 779	460186.4 B	AL 259	Strongly active	2.17
12	YN 0032	441393.4 B	NHJ 11343.02	Strongly active	2.19
13	YN 61	441398.3 B	NHJ 11343.01	Strongly active	2.22
14	YN0389	450050.4 A	AL 166	Strongly active	2.67
15	YN1256	450164.11 B	PP 1212	Strongly active	3.20
16	YM 0938	441288.11 B	TB 37	Strongly active	3.43
17	YO 0346	450627.3 B	SRS 7	Strongly active	3.52
18	YM 323	441186.11A	SFC 1516	Strongly active	4.31
19	YN 877	450173.3 B	NHJ 11538	Moderately Active	5.42
20	YM 0935	441288.11 A	TB 37	Moderately Active	6.20
21	YM 0936	441288.8 A	TB 37	Moderately Active	6.37
22	YM 0614	441234.4B	AL 68	Moderately Active	6.50
23	YM 1055	441308.11 A	PRT 83	Moderately Active	6.80
24	YM 1055	441308.11 A	PRT 83	Moderately Active	6.80

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (µg/ml)
25	YP 697	460173.3 A	NHJ 12198	Moderately Active	7.01
26	YM 0939	441288.8 B	TB 37	Moderately Active	7.89
27	YN 231	450023.8 B	PGI 241	Moderately Active	8.26
28	YM 0613	441234.3B	AL 68	Moderately Active	8.67
29	YM 511	441217.3B	AL 74	Moderately Active	8.68
30	YO 0522	450317.11A	CMUE 1961	Moderately Active	8.68
31	YO 522	450317.11A	CMUE 1961	Moderately Active	8.68
32	YO 1326	460002.9A	NHJ 11690	Moderately Active	8.98
33	YM 214	441135.3 A	SS 1042	Moderately Active	9.15
34	YN 319	450038.3 B	PGI 396	Moderately Active	9.57
35	YN0319	450038.3 B	PGI 396	Moderately Active	9.57
36	YN 0319	450038.3 B	PGI 396	Moderately Active	9.57
37	YO 0185	450272.11 A	CMUE 1935	Moderately Active	9.60
38	YP 0097	460053.3 B	NHJ 12103	Moderately Active	9.81
39	YM 0835	441271.3 B	CB 115	Moderately Active	9.98
40	YP 0151	460127.3 B	NHJ 12040	Moderately Active	10.08

ผลการทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งชนิด BCA cell จำนวน 4,390 ตัวอย่าง พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง BCA cell จำนวน 40 ตัวอย่าง (24 สายพันธุ์) คิดเป็น 0.91% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง BCA cell สูง คือ $IC_{50} \leq 10$ µg/ml มีจำนวน 18 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม Insect fungi 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 25% ของตัวอย่างที่ให้ผล positive รองลงมาคือ เชื้อในกลุ่ม Endophytic fungi 4 ตัวอย่าง, Basidiomycetes 3 ตัวอย่าง และรามูลสัตว์ (Dung fungi) 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 10%, 7.5% และ 2.5% ของตัวอย่างที่ให้ผล positive ตามลำดับ ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง BCA cell ปานกลางมีจำนวน 22 ตัวอย่าง ส่วนมากได้จากเชื้อในกลุ่ม Basidiomycetes 9 ตัวอย่าง (22.5%) และ Insect fungi 8 ตัวอย่าง (20%) และรองลงมาได้แก่ รา กลุ่ม Endophytic fungi 3 ตัวอย่าง (7.5%) Aquatic fungi และ Wood-decay fungi อย่างละ 1 ตัวอย่าง (2.5%)

ตารางที่ 7 ข. : แสดงจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต่อต้านเซลล์มะเร็งคือ KB cell line

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (µg/ml)
1	YN 0059	441398.4 A	NHJ 11343.01	Strongly active	0.24
2	YN 389	450050.4 A	AL 166	Strongly active	0.28
3	YN 0389	450050.4 A	AL 166	Strongly active	0.28
4	YN 0029	441393.4 A	NHJ 11343.02	Strongly active	0.66
5	YN 29	441393.4 A	NHJ 11343.02	Strongly active	0.66
6	YN 528	450073.8 A	PP 403	Strongly active	0.70
7	YP 0149	460127.4 A	NHJ 12040	Strongly active	0.98
8	YO 600	450330.8A	CMUE 1842	Strongly active	1.32
9	YN 525	450072.8 B	PGI 431	Strongly active	1.33
10	YN 0061	441398.3 B	NHJ 11343.01	Strongly active	1.38
11	YN 0062	441398.4 B	NHJ 11343.01	Strongly active	1.59
12	YO 0889	450360.3 B	SRS 34	Strongly active	1.61
13	YN 0028	441393.3 A	NHJ 11343.02	Strongly active	1.73
14	YM 0937	441288.3 B	TB 37	Strongly active	2.08
15	YO 587	450328.11A	CMUE 1418	Strongly active	2.62
16	YM 938	441288.11 B	TB 37	Strongly active	2.90
17	YN 508	450070.3 A	PGI 424	Strongly active	3.11
18	YM 323	441186.11A	SFC 1516	Strongly active	3.26
19	YO 0155	450267.11 A	CMUE 1841	Strongly active	4.07
20	YN 509	450070.11 A	PGI 424	Strongly active	4.18
21	YO 0923	450366.4 A	HCKUH 1	Strongly active	4.26
22	YN 877	450173.3 B	NHJ 11538	Strongly active	4.44
23	YP 0064	460048.3 A	NHJ 12030	Strongly active	4.56
24	YP 689	460171.4 B	AL 31	Strongly active	4.67
25	YN 555	450077.8 B	CMUZE 444	Moderately active	5.04
26	YN 196	450018.3 A	PP 498	Moderately active	6.53
27	YN 521	450072.11 A	PGI 431	Moderately active	6.55

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (µg/ml)
28	YO 0924	450366.9 A	HCKUH 1	Moderately active	6.95
29	YN 231	450023.8 B	PGI 241	Moderately active	7.92
30	YO 0922	450366.3 A	HCKUH 1	Moderately active	8.61
31	YL 1504	441178.3 A	CB 8	Moderately active	8.99
32	YM 1130	441320.11 B	TB 182B	Moderately active	9.11
33	YO 0894	450361.9 A	HCKU 934	Moderately active	9.30
34	YN 199	450018.3 B	PP 498	Moderately active	9.44
35	YM 0935	441288.11 A	TB 37	Moderately active	9.45

ผลการทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งคือ KB cell จำนวน 4,207 ตัวอย่าง พบว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB cell จำนวน 35 ตัวอย่าง (24 สายพันธุ์) คิดเป็น 0.83% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB cell สูง (ED_{50} < 5 µg/ml) มีจำนวน 24 ตัวอย่าง ได้จากเชื้อในกลุ่ม Insect fungi เป็นส่วนใหญ่จำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็น 37.14% ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive รองลงมาได้แก่ รากลุ่ม Endophytic fungi (4 ตัวอย่าง) Basidiomycete และ Wood-decay fungi อย่างละ 2 ตัวอย่าง และ รามูลสัตว์ (Dung fungi) และ Seed fungi อีกอย่างละ 1 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB cell ในระดับปานกลางมีจำนวน 11 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าเป็นราในกลุ่ม Insect fungi, Basidiomycete และ Wood-decay fungi อย่างละ 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.57% ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผล positive และรองลงมาคือราในกลุ่ม Endophytic fungi และ Seed fungi อีกอย่างละ 1 ตัวอย่าง (2.86%)

ตารางที่ 7 ค. : แสดงจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต่อต้านเซลล์มะเร็งคือ NCI-H187

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (µg/ml)
1	YK 662	44566.11 B	SFC 842	Strongly active	0.09
2	YL 764	44986.11 B	SFC 827	Strongly active	0.28
3	YL 751	44983.3 B	SFC 676	Strongly active	0.50
4	YK 1491	44952.9 B	AL 251	Strongly active	0.65
5	YL 1211	441041.11 A	PP 8	Strongly active	0.70
6	YL 0049	44884.3 B	PP 732	Strongly active	0.80
7	YL 0752	44983.11 B	SFC 676	Strongly active	0.84
8	YK 1304	44854.11 B	PP 87	Strongly active	0.85

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (μg/ml)
9	YL 831	44997.9 B	AL 103	Strongly active	0.91
10	YL 0698	44974.4 B	AL 237	Strongly active	0.95
11	YK 1482	44951.8 A	PRT 51	Strongly active	0.96
12	YO 0328	450624.3 B	NHJ 11574	Strongly active	1.00
13	YL 01126	441027.3 A	PP 646	Strongly active	1.04
14	YL 0736	44981.3 A	AL 98	Strongly active	1.27
15	YN 1171	450150.3 B	CMUZE 387	Strongly active	1.35
16	YL 0697	44974.3 B	AL 237	Strongly active	1.40
17	YL 743	44982.11 A	GL 265	Strongly active	1.46
18	YK 962	44799.11 B	PP 133	Strongly active	1.47
19	YK 1087	44818.3 B	AL 25	Strongly active	1.52
20	YN 0951	450185.8 B	CMUE 1405	Strongly active	1.57
21	YL 0830	44997.4 B	AL 103	Strongly active	1.63
22	YL 1389	441158.8 B	CB 83	Strongly active	1.69
23	YL 0824	44996.4 B	AL 116	Strongly active	1.92
24	YP 0098	460053.4 B	NHJ 12103	Strongly active	1.92
25	YL 0231	44914.8 B	PP 864	Strongly active	2.12
26	YO 0336	450625.9 B	NHJ 11471	Strongly active	2.23
27	YP 0689	460171.4 B	AL 31	Strongly active	2.25
28	YN 1003	450194.3 B	SRS 69	Strongly active	2.29
29	YP 0151	460127.3 B	NHJ 12040	Strongly active	2.30
30	YL 0686	44972.4 B	AL 231	Strongly active	2.42
31	YL 0302	44926.11 B	PP 636	Strongly active	2.50
32	YK 1084	44818.3 A	AL 25	Strongly active	2.54
34	YL 0294	44925.8 A	PP 789	Strongly active	2.79
35	YL73	44888.3 B	AL 78	Strongly active	2.97
36	YL 0882	441069.8 A	CBSS 16-4	Strongly active	3.01
37	YL 0733	44980.3 B	AL 228	Strongly active	3.02

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (μg/ml)
38	YP 0097	460053.3 B	NHJ 12103	Strongly active	3.16
39	YL 0763	44986.3 B	SFC 827	Strongly active	3.16
40	YL 1363	441154.3 B	CB 60	Strongly active	3.25
41	YL 1267	441050.3 B	SS 756	Strongly active	3.36
42	YK 1367	44932.11 A	CBSS 1-3	Strongly active	3.39
43	YL 0226	44914.3 A	PP 864	Strongly active	3.39
44	YK 961	44799.3 B	PP 133	Strongly active	3.43
45	YN 0877	450173.3 B	NHJ 11538	Strongly active	3.58
46	YL 0530	44614.4 B	AL 142	Strongly active	3.68
47	YL 01214	441041.11 B	PP 8	Strongly active	3.78
48	YK 1129	44825.3 B	PP 26	Strongly active	3.78
49	YL 1515	441179.8 B	CB 80	Strongly active	3.89
50	YN 0867	450171.8 B	PGI 731	Strongly active	3.96
51	YL 01285	441053.3 B	PP 641	Strongly active	3.98
52	YL 340	441003.3 A	SS 1184	Strongly active	4.00
53	YN 1033	450199.3 B	SRS 70	Strongly active	4.18
54	YK 1488	44952.9 A	AL 251	Strongly active	4.73
55	YN 1091	450137.11 A	PGI 358	Strongly active	4.87
56	YK 1505	44871.4 A	AL 116.2	Strongly active	4.96
57	YL 0527	44614.4 A	AL 142	Moderately active	5.14
58	YN 1068	450133.9 A	NHJ 11660	Moderately active	5.16
59	YL 738	44981.9 A	AL 98	Moderately active	5.17
60	YL 704	44975.11 B	PP 1178	Moderately active	5.28
61	YN 0806	450119.11 B	PP 1220	Moderately active	5.53
63	YN 0947	450185.11 A	CMUE 1405	Moderately active	5.63
64	YO 0334	450625.3 B	NHJ 11471	Moderately active	5.97
65	YL 0814	44995.3 A	PP 314	Moderately active	5.97
66	YL0064	44887.3 A	PP 650	Moderately active	5.98

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Cytotoxicity	ED_{50} (µg/ml)
67	YN 1069	450133.3 B	NHJ 11660	Moderately active	5.99
68	YN 0918	450180.8 A	PP 411	Moderately active	6.12
69	YL 1504	441178.3 A	CB 8	Moderately active	6.14
70	YK 1301	44854.11 A	PP 87	Moderately active	6.20
71	YL 968	441083.11 B	CBSS 16-10	Moderately active	6.21
72	YL 1532	441182.11 B	CB 121	Moderately active	6.22
73	YP 0697	460173.3 A	NHJ 12198	Moderately active	6.39
74	YL 821	44996.4 A	AL 116	Moderately active	6.74
75	YN 0975	450189.8 B	PGI 703	Moderately active	6.93
76	YL 01226	441043.11 B	PP 330	Moderately active	6.93
77	YK 1259	44847.4 A	AL 261	Moderately active	7.01
78	YN 0890	450175.11 B	PP 682	Moderately active	7.16
79	YP 0152	460127.4 B	NHJ 12040	Moderately active	7.37
80	YL 0107	44894.11 A	CB 104	Moderately active	7.85
81	YN 0973	450189.3 B	PGI 703	Moderately active	7.88
82	YL98	44892.11 B	PP 780	Moderately active	8.15
83	YL0044	44883.11 B	PP 609	Moderately active	8.29
84	YL 980	441085.11 B	CBSS 1-4	Moderately active	8.50
85	YL 0656	44967.3 A	PP 1240	Moderately active	8.65
86	YL 1405	441161.3 B	PP 614	Moderately active	8.99
87	YN 1007	450195.11 A	CMUE 1322	Moderately active	9.91

Note : Strongly Active = < 5 µg/ml
Moderately Active = 5-10 µg/ml
Weakly Active = 10-20 µg/ml
Inactive = >20 µg/ml

ผลการทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งคือ NCI-H187 จำนวน 2,473 ตัวอย่าง พบว่า มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 จำนวน 87 ตัวอย่าง ของเชื้อจำนวน 70 สายพันธุ์ คิดเป็น 3.52% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 ในระดับสูง มีจำนวน 56 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม Insect fungi จำนวน 22 ตัว

No.	Screening code	Ferment code	Original code	Evaluation	IC_{50}(μg/ml)
41	YO 1076	450391.11 B	SRS 31	Moderately active	17.85
42	YO 0093	450256.8 B	CMUZE 384	Moderately active	17.94
43	YM 0165	441126.8 B	PP 501	Moderately active	18.59
44	YN1426	450223.3A	CMUE 1731	Moderately active	18.62
45	YM 0737	441255.11 A	PP 603	Moderately active	18.86
46	YM 0319	441185.3B	PP 500	Moderately active	19.49
47	YO 0062	450251.11 B	CMUBE 838	Moderately active	19.62
48	YN1276	450168.3 A	CMUZE 401	Moderately active	19.86
49	YO 0540	450320.18A	SS 993	Moderately active	19.92
50	YM 0937	441288.3 B	TB 37	Moderately active	19.99

Note : Strongly Active = <5 μg/ml Moderately Active = 5-20 μg/ml
Weakly Active = 20-50 μg/ml Inactive = >50 μg/ml

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราในขั้นที่สอง (Secondary Screening)

หลังจากได้รับผลการทดลองในขั้นต้น (Primary screening) จากห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในแต่ละการทดสอบ จะมีการประสานกับนักวิจัยห้องปฏิบัติการ BRU ในการคัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพ และมีแนวโน้มว่าจะให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารใหม่ที่น่าสนใจ โดยการทำเป็น Secondary screening เพื่อเป็นการยืนยันผลเดิมอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลดี โดยปริมาณสารอาหารที่ใช้เพิ่มขึ้นเป็น 250 มิลลิลิตร ก่อนที่จะมีการเลี้ยงในปริมาณเพิ่มขึ้นจากเดิมในขั้นตอนขยายขนาด (Large scale) เพื่อให้ได้สารปริมาณเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการสกัด ในการวินิจฉัยสารชีวภาพที่น่าสนใจต่อไป

ในระยะเวลา 1 ปีที่ผ่านมา มีการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับ Secondary screening เพื่อการวินิจฉัยสารชีวภาพที่น่าสนใจ จำนวนทั้งสิ้น 237 ตัวอย่าง (216 สายพันธุ์) ดังนี้ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 9 : สรุปจำนวนและชนิดจุลินทรีย์ที่ทำ Secondary screening

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
1	44925.8 A	PP 789	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 2.79
2	441288.11 B	TB 37	Anti-KB	ED_{50} = 2.896
3	441308.11 A	PRT 83	Anti-BCA	ED_{50} = 6.8
4	44986.3 B	SFC 827	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.16
5	44983.11 B	SFC 676	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 0.84
6	44914.8 B	PP 864	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 2.12
7	41325.18 A	SS 393	Anti-HSV -1	IC_{50} = 46.3 ,cytotoxicity > 50
8	441190.3 A	CB 18	Anti-Malaria	IC_{50} = 17.40
9	441060.11 A	CB 54	Anti-TB	MIC = 50
10	441344.3 A	SFC 1559	Anti-TB	MIC = 25
11	441375.11 A	PGI 537	Anti-TB	MIC = 50
12	44874.8 A	CBSS 1-2	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
13	44873.3 A	AL 5	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
14	441135.11 A	SS 1042	Anti-Fungal	IC_{50} = 15.66
15	44981.3 A	AL 98	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 1.27
16	44614.4 B	AL 142	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.68
17	44974.4 B	AL 237	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 0.95

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
18	44593.11 A	SS 876	Anti-HSV -1	IC_{50} = 16.16, cytotoxicity >50
19	441261.3 B	PP 323	Anti-Fungal	IC_{50} = 16.41
20	44852.11 B	PP 326	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
21	441332.3 B	SFC 1532	Anti-Malaria	IC_{50} = 0.5
22	44167.3 A	SFC 739	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 6.63
23	44928.3 A	CB 55	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
24	450029.11 A	PGI 110	Anti-TB	MIC = 50
25	450119.11 B	PP 1220	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 5.532
26	450002.11 B	CMUBE 1803	Anti-TB	MIC = 50
27	441146.11 B	SS 973	Anti-Fungal	IC_{50} = 15.51
28	441398.4 A	NHJ 11343.01	Anti-KB	ED_{50} = 0.238
29	441393.4 A	NHJ 11343.02	Anti-KB	ED_{50} = 0.656
30	441311.8 B	PRT 02	Anti-Fungal	IC_{50} = 5.4
31	441393.3 B	NHJ 11343.02	Anti-BCA	ED_{50} = 1.077
32	44818.4 A	AL 25	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
33	450062.4 A	NHJ 11253	Anti-TB	MIC = 50
34	450050.3 A	AI 116	Anti-TB	MIC = 0.78
35	441398.4 A	NHJ 11343.01	Anti-KB	ED_{50} = 0.238
36	44180.11 A	SF 181	Anti-HSV -1	IC_{50} = 42.71 , cytotoxicity >50
37	441269.3 B	NHJ 11290	Anti-Fungal	EC_{50} = 16.93
38	441027.3 B	PP 646	Anti-TB	MIC = 25
39	44411.4 A	NHJ 10681.01	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 4.41
40	44840.18 B	SS 888	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
41	44931.3 A	CBSS 15-6	Anti-HSV -1	IC_{50} > 50
42	44780.3 B	PP 309	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 5.48
43	450073.8 A	PP 403	Anti-KB	ED_{50} = 0.7
44	450180.8 A	PP 411	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 6.121
45	450168.3 A	CMUZE 401	Anti-Fungal	ED_{50} = 19.86
			Anti-TB	MIC = 50

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
46	450185.11 A	CMUE 1405	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 5.626
47	450153.11 A	CMUZE 447	Anti-TB	MIC = 25
48	44356.3 B	AL 39	Anti-HSV-1	ED_{50} = 6.16, cytotoxicity > 50
49	44094.3 B	NHJ 10856	Anti-HSV-1	ED_{50} = 14.07, cytotoxicity > 50
50	450176.11 A	SRS 10	Anti-TB	MIC = 25
51	450018.3 A	PP 498	Anti-KB	ED_{50} = 6.53
52	44967.3 A	PP 1240	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 8.649
53	450164.11 A	PP 1212	Anti-BCA	ED_{50} = 1.501
54	450267.11 A	CMUE 1841	Anti-KB	ED_{50} = 4.074
			Anti-BCA	ED_{50} = 1.031
55	450195.11 A	CMUE 1322	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 9.906
56	441004.3 A	PP 777	Anti-HSV -1	Moderately active, cytotoxicity>50
57	450133.9 A	NHJ 11660	Anti-Malaria	ED_{50} = 5.3
58	450272.11 A	CMUE 1935	Anti-BCA	ED_{50} = 9.604
59	44888.4 A	AL 078	Anti-HSV -1	ED_{50} = 29.884, cytotoxicity >50
60	450107.3 A	NHJ 11268.01	Anti-TB	MIC = 25
61	460037.3 A	CMUEO 1751	Anti-TB	MIC = 6.3
62	460127.4 A	NHJ 12040	Anti-Malaria	ED_{50} = 0.6
			Anti-KB	ED_{50} = 1.0
			Anti-BCA	ED_{50} = 1.3
63	460011.3 A	NHJ 11953.04	Anti-Malaria	ED_{50} = 7.7
64	44347.3 B	SFC 685	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 2.51
65	44892.11 B	PP 780	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 8.153
66	450618.4 B	NHJ 11489	Anti-HSV -1	Moderately active, cytotoxicity>50
67	450072.8 B	PGI 431	Anti-KB	ED_{50} = 1.331
68	450199.3 B	SRS 70	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 4.18
69	450038.3 B	PGI 396	Anti-BCA	ED_{50} = 9.568
70	450171.8 B	PGI 731	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.958
71	450221.11 B	SRS 14	Anti-TB	MIC = 25

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (µg/ml)
72	450233.3 A	SRS 72	Anti-TB	MIC = 3.1
73	460002.9 A	NHJ 11690	Anti-Malaria	ED_{50} = 7.4
			Anti-BCA	ED_{50} = 9.0
74	450624.3 B	NHJ 11574	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 0.998
75	44910.8 B.	CB 53	Anti-HSV -1	Moderately active, cytotoxicity>50
76	450025.11 B	PGI 350	Anti-Malaria	ED_{50} = 6.1
77	441158.8 B	CB 83	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 1.689
78	450146.3 B	NHJ 11619	Anti-Fungal	IC_{50} = 13.6
79	441050.3 B	SS 756	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.359
80	441154.3 B	CB 60	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.252
81	450239.8 B	SRS 35	Anti-Malaria	ED_{50} = 5.7
82	450338.3 A	PP 426	Anti-TB	MIC = 12.5
83	460034.11 A	CMUEO 1722	Anti-TB	MIC = 25
84	44986.11 B	SFC 827	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 0.276
85	450117.3 B	CMUE 1770	Anti-TB	MIC = 25
86	441267.11 A	CB 112	Anti-TB	MIC = 12.5
87	44066.3 B	SS 719	Anti-HSV -1	ED_{50} = 7.54 , cytotoxicity 17.92
88	44894.11 A	CB 104	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 7.85
89	44584.3 B	SFC 34	Anti-HSV -1	Moderately active , cytotoxicity > 50
90	44584.11 B	SFC 34	Anti-Fungal	IC_{50} = 10.29
91	441279.3 A	PGI 511	Anti-TB	MIC = 0.78
92	44795.11 B	PP 92	Anti-HSV -1	Moderately active , cytotoxicity > 50
93	44780.8 B	PP 309	Anti-HSV -1	Moderately active , cytotoxicity > 50
94	441133.11 A	PRT 27	Anti-Fungal	IC_{50} = 12.61
95	441126.3 A	PP 501	Anti-Fungal	IC_{50} = 9.3
96	441069.8 A	CBSS 16-4	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.01
97	44794.11 A	PP 43	Anti-HSV -1	ED_{50} = 38.23 , cytotoxicity >50
98	441185.11 A	PP 500	Anti-Fungal	IC_{50} = 14.82
99	441271.3 B	CB 115	Anti-BCA	ED_{50} = 9.98

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
100	44791.8 B	PP 1013	Anti-Fungal	IC_{50} = 12.13
101	441320.11 B	TB 182B	Anti-KB	ED_{50} = 9.108
102	44825.3 B	PP 26	Anti-NCI-H187	ED_{50} = 3.78
103	44435.3 B	SFC 598	Anti-TB	MIC = 1.56
			Anti-Fungal	IC_{50} = 7.06
104	44930.3 A	PP 53	Anti-Fungal	IC_{50} = 13.83
105	44827.11 A	PP 49	Anti-Malaria	ED_{50}= 5.50
			Anti-BCA	ED_{50}= 3.44
106	44821.11 A	PP 513	Anti-Fungal	IC_{50}= 12.55
107	44936.11 B	PP 94	Anti-Fungal	IC_{50}= 11.66
108	44799.11 A	PP 133	Anti-BCA	ED_{50}= 4.65
109	42483.3 A	NHJ 1450.11	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 1.45
110	44169.3 A	SF 193	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 9.307
111	44825.3 A	PP 26	Anti-Fungal	IC_{50}= 5.22
112	441041.11 A	PP 8	Anti-Malaria	ED_{50}= 5.5
113	44798.3 A	PP 131	Anti-TB	MIC = 3.125
114	44779.11 B	PP 1245	Anti-Fungal	IC_{50}= 13.44
115	441066.3 A	PRT 47	Anti-Malaria	ED_{50}= 9.6
116	42560.3 A	NHJ 2491	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 2.54
117	44804.3 A	PP 743	Anti-Fungal	IC_{50}= 18.27
118	44831.3 A	PP 543	Anti-Fungal	IC_{50}= 8.19
119	44112.3 B	SF 170	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 2.248
120	42521.3 B	NHJ 1895	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 0.04
121	44196.11 A	SFC 594	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 5.682
122	44429.3 B	SFC 846	Anti-TB	MIC = 3.125
123	44109.11 A	SF 144	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 7.475
124	401088.9 A	NHJ 1894	Anti-HSV -1	IC_{50}= 2.87, cytotoxicity 18.74
125	44798.3 B	PP 99	Anti-TB	MIC = 0.19
126	41030.11 A	L49-Tr2	Anti-HSV -1	IC_{50}= 2.39, cytotoxicity 15.07

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (µg/ml)
127	44854.3 A	PP 87	Anti-Malaria	ED_{50}= 9.6
128	44995.3 A	PP 314	Anti-Malaria	ED_{50}= 5.2
			Anti-TB	MIC =12.5
			Anti-BCA	ED_{50}= 4.611
129	44585.11 A	SS 722.1	Anti-Fungal	IC_{50}= 7.88
130	44345.8 A	SFC 650	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 6.34
131	44578.4 A	NHJ 10963	Anti-Fungal	IC_{50}= 15.82
132	431022.4 A	NHJ 10409	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.546
133	42527.11 A	PR 26-1	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 6.05
134	43921.4 A	NHJ 6723	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.698
135	44541.8 B	PP 1158	Anti-TB	MIC = 6.25
136	42493.3B	SFC 511	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.66
137	44980.3 B	AL 228	Anti-Malaria	ED_{50}= 1.6
138	42524.11 B	MPA 7-2	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 4.21
139	44972.4 B	AI 231	Anti-Malaria	ED_{50}= 6.7
140	44412.3 A	NHJ 10998.1	Anti-BCA	ED_{50}= 4.25
141	44952.9 A	AL 251	Anti-Malaria	ED_{50}= 2.8
			Anti-BCA	ED_{50}= 0.92
142	44937.3 A	PP 662	Anti-Malaria	ED_{50}= 7.60
143	44167.3 A	SFC 739	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 6.63
144	44845.11 A	PP 1115 *	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.68
145	44841.11 A	SS 833	Anti-Fungal	IC_{50}= 18.36
146	44835.3 A	AL 230	Anti-Malaria	ED_{50}= 4.6
147	44193.11 B	SF 142	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.38
148	431227.3 B	PP 242	Anti-TB	MIC = 0.39
			Anti-NCI-H187	ED_{50}= 1.1
			Anti-HSV-1	IC_{50}= 5.2
149	44199.11 B	SF 197	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 7.64
150	44192.3 B	SF 185	Anti-TB	MIC = 6.25

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
151	44625.11 B	PP 1159	Anti-Malaria	ED_{50}= 6.40
152	44216.11 B	SF 191	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.33
153	44563.8 B	SFC 647	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.63
154	44558.3 B	SFC 660	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.02
155	44569.9 B	NHJ. 11100	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.67
156	44824.11 B	PP 51	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.32
157	44254.11 A	SF 205	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.45
158	44216.11 A	SF 191	Anti-HSV-1	IC_{50} =16.00 , cytotoxicity > 50
159	44590.11 B	PP 557	Anti-NCI-H 187	ED_{50}= 2.36
160	44223.3 A	SF 204	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.97
161	44953.3 A	CB 19	Anti-TB	MIC = 25
162	441023.3 B	PP 629	Anti-Malaria	ED_{50}= 12.8
163	44926.11 B	PP 636	Anti-TB	MIC =12.5
164	42504.11 B	SFC 285	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 1.50
165	44565.8 B	SFC 649	Anti-Fungal	IC_{50}= 17.06
166	44186.3 B	SF 198	Anti-NCI-H187	ED_{50}=6.28
167	44581.11 B	SFC 768	Anti-Fungal	IC_{50}= 11.42
168	44551.3 B	PP 1224	Anti-BCA	ED_{50}= 6.10
169	44784.18 B	SS 841	Anti-Fungal	IC_{50}= 9.27
170	42468.11 B	PR 42-1	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 8.755
171	44215.11 A	SFC 818	Anti-HSV-1	IC_{50} =34.7 , cytotoxicity > 50
172	44847.3 B	AL 261	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.93
173	44233.3 B	SF 212	Anti-HSV-1	IC_{50} = 37.74 , cytotoxicity > 50
174	44217.8 B	SF 195	Anti-HSV-1	IC_{50} =12.5 , cytotoxicity > 50
175	44996.4 B	AL 116	Anti-Malaria	ED_{50}= 4.2
176	44560.8 B	SFC 610	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.39
177	44893.8 B	PP 96	Anti-Malaria	ED_{50}= 17.5
178	44584.11 B	SFC 34	Anti-Fungal	IC_{50}= 10.29
179	42561.4 B	NHJ 1370.01	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.1795

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
180	44785.3 B	SS 747	Anti-BCA	ED_{50}= 5.6
181	441128.3 A	PP 324	Anti-TB	MIC = 25
182	44982.3 A	GL 265	Anti-Fungal	IC_{50}= 16.02
183	44781.8 A	PP 1099	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.36
184	431246.3 A	SS 718	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 3.65
185	44576.3 A	NHJ 10998.04	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 3.57
186	44354.4 A	NHJ 10979	Anti-HSV-1	IC_{50} = 6.16 , cytotoxicity > 50
187	44420.3 A	AL 048	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.20
188	441178.3 A	CB 8	Anti-Malaria	ED_{50}= 7.00
189	41469.8 A	RPF 9613	Anti-HSV-1	Moderately active cytotoxicity > 50
190	44164.9 B	NHJ 10684	Anti-HSV-1	Moderately active cytotoxicity > 51
191	41249.4 B	NHJ 6101	Anti-HSV-1	IC_{50}=21.63 , cytotoxicity > 50
192	441137.3 A	PP 333	Anti-TB	MIC =12.5
193	44970.11 A	PP 1114	Anti-TB	MIC = 25
194	44583.11 A	SFC 619	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 5.21
195	41315.4 A	NHJ 3957	Anti-HSV-1	IC_{50}= 22.28 , cytotoxicity > 50
196	441135.3 A	SS 1042	Anti-BCA	ED_{50}= 9.15
197	44592.3 A	PP 1232	Anti-Fungal	IC_{50}= 14.49
198	44361.8 B	SFC 701	Anti-HSV-1	Moderately active,cytotoxicity > 50
199	44986.11 B	SFC 827	Anti-Malaria	ED_{50}= 0.60
			Anti-BCA	ED_{50}= 1.13
200	44566.11 B	SFC 842	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.09
201	44799.11 B	PP 133	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 1.47
202	42430.3 B	SFC 144	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.197
203	44997.9 B	AL 103	Anti-KB	ED_{50}= 2.386
204	42527.3 B	PR 26-1	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 4.23
205	441288.8 A	TB 37	Anti-Malaria	ED_{50}= 5.40
206	44822.8 B	PP 451	Anti-Fungal	IC_{50}= 11.38

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
207	441186.11 A	SFC 1516	Anti-Malaria	ED_{50}= 0.75
208	44425.3 A	AL 46	Anti-KB	ED_{50}= 3.26
			Anti-BCA	ED_{50}= 4.31
			Anti-HSV-1	IC_{50}= 49.09,cytotoxicity > 50
209	441217.3 B	AL 74	Anti-BCA	ED_{50}= 8.68
210	441227.4 B	AL 270	Anti-TB	MIC = 6.3
211	44888.3 B	AL 78	Anti-Malaria	ED_{50}= 4.5
212	44818.3 B	AL 25	Anti-KB	ED_{50}= 3.7
			Anti-BCA	ED_{50}= 1.18
			Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.97
			Anti-NCL-H187	ED_{50}= 1.52
213	44840.11 A	SS 888	Anti-Fungal	IC_{50}= 14.46
214	441112.3 A	PRT 59	Anti-Fungal at 15.7	IC_{50}= 15.7
215	44951.8 A	PRT 51	Anti-NCI-H187at 0.96	ED_{50}= 0.96
216	44842.8 A	PP 129	Anti-Fungal	IC_{50}= 12.68
217	41035.11 A	SS 429	Anti-HSV-1	IC_{50}= 4.85
218	44883.11 B	PP 609	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 8.29
219	44884.3 B	PP 732	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 0.8
220	441279.3 B	PGI 511	Anti-TB	MIC = 6.25
221	44577.11 A	SS 712	Anti-HSV-1	Moderately active;cytotoxicity>50
223	441274.11 A	SFC 1552	Anti-TB	MIC= 25
224	441288.11 B	TB 37	Anti-Malaria	ED_{50}= 5.5
225	44555.3 A	SS 771	Anti-HSV-1	Moderately active ,cytotoxicity > 50
226	44566.8 A	SFC 842	Anti-NCL-H187	ED_{50}= 5.61
227	44243.3 B	NHJ 10665	Anti-NCL-H187	ED_{50}= 3.79
228	44430.3 B	SFC 730	Anti-HSV-1	Moderately active,cytotoxicity > 50
229	44371.3 B	AL 38	Anti-HSV-1	IC_{50} =19.24 ; cytotoxicity >50
230	44871.4 A	AL 116.02	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 4.96
231	41212.3 A	100C-tr3	Anti-HSV-1	IC_{50}= 2.97, cytotoxicity > 50

No.	Ferment code	Original code	Positive test	Activity (μg/ml)
232	441098.3 A	BL 9	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 2.67
233	44932.11 A	CBSS 1-3	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 3.39
234	44914.3 A	PP 864	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 3.39
235	441295.11 A	TB 191-2B	Anti-TB	MIC = 50
236	441053.3 B	PP 641	Anti-NCI-H187	ED_{50}= 3.98
237	441251.11 B	CB 130	Anti-TB	MIC= 50

หลังจากผ่านการทดสอบยืนยันในขั้น Secondary screening นี้แล้ว พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราที่น่าสนใจ 46 ตัวอย่าง (42 สายพันธุ์) ที่สมควรนำไปศึกษาในขั้นตอนการขยายขนาดเพื่อการสกัดและศึกษาต่อไป สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วนี้แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 10 : สรุปชนิดของเชื้อราที่ศึกษาโดยห้องปฏิบัติการเคมีในขั้นตอนวินิจฉัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

No.	Original code	Sciencetific Name	Positive activity (unit = μg/ml)
1	SF 184	Unidentified Sand Fungi	(primary) Anti-TB at 3.12
			(2^{nd}) (cell) Anti-TB at 6.25
			(broth) Anti-TB at 3.12
2	NP 20	Unidentified *Coelomycete* Fur	(primary) Anti-malaria at 1.73
			(2^{nd}) Anti-malaria at 13.5
			(cell) Anti-KB at 9.95 + Anti-BCA at 2.06
			(broth) Anti-KB at 5.3 + Anti-BCA at 2.03
3	SFC 635	Unidentified Seed Fungi	(primary) Anti-malaria at 1.1
			(2^{nd}) (cell) Anti-malaria at 6.32
4	RPF 9753	*Phomopsis sp.*	Anti-malaria at 2.7
5	L49-Tr2	Unidentified Lichen fungi	(primary) Anti-malaria at 10
			Anti-HSV-1 active (7.26) cytotoxicity > 50
			(2^{nd}) (broth) Anti-malaria at 12

No.	Original code	Sciencetific Name	Positive activity (unit = µg/ml)
6	NHJ 10356	*Beauveria sp.*	(primary) Anti-malaria at 3.68
			(2^{nd}) (broth) Anti-malaria at 6.6
			(cell) Anti-malaria at 6.22
7	SFC 181	*Stachybotrys nephrospora*	(primary) Anti-malaria at 5.3
			(2^{nd}) Anti-HSV at 5-10
8	SFC 544	*Menisporopsis theobromae*	(primary) Anti-malaria at 10.4
			(2^{nd}) (broth) Anti-malaria at 3.7
			(cell) Anti-malaria at 1.9
9	SFC 643	*Cyathus sp.*	(primary) Anti-NCI-H187 at 6.56
			(2^{nd}) (broth) Anti-NCI-H187 at 0.94
			(cell) Anti-NIL-H187 at 0.78
10	RN 347	*Cordyceps militaris*	(primary) Anti-malaria at 7.48, Anti-NCL-H187 at 1.25
			(2^{nd}) (broth) Anti-NCL-H187 at 4.52
			(cell) Anti-NCL-H187 at 16.37
11	RN 333	*Cordyceps millitaris*	(primary) Anti-malaria at 2.8 + Anti-BCA at 0.65
			(2^{nd}) (broth) Anti-malaria at 12 + Anti-BCA at 7.9+Anti-TB at 200+Anti-NCL-H187 at 6.3
			(cell) Anti-malaria at 16 + Anti-BCAat 13 + Anti-TB at 50 + Anti-NCI-H187 at 10
12	GL 1080	*Xylaria sp.*	(primary) Anti-Fungal at 6.48
			(2^{nd}) (broth) Anti-Fungal at 15.55
			(cell) Anti-Fungal at 31.77
13	PP 314	*Unidentified Endophytic fung*	(primary) Anti-malaria at 5.2 + Anti-BCA at 4.6
			Anti-TB at MIC 12.5
14	GL 1275	*Diapathe sp.*	(primary) Anti-KB at 0.66 + Anti-BCA at 2.4
15	NHJ 4710	*Cordyceps sp.*	NMR profile (maybe new compound)
16	NHJ 4098	*Cordyceps sp.*	NMR profile (maybe new compound)

No.	Original code	Sciencetific Name	Positive activity (unit = μg/ml)
17	SFC 598	*Trichotrichum sp.*	Anti-TB at MIC 1.56 + Anti-fungal at M 7.06
18	NHJ 2306	*Cordyceps sp.*	NMR profile (maybe new compound)
19	NHJ 793.1	*Poronia gigantea*	(primary) Anti-malaria at 0.95
			(2^{nd}) (broth) Anti-malaria at inactive
			(cell) Anti-malaria at 1.7
20	SF 174	*Pestaliopsis sp.*	(primary) Anti-TB at 3.1
			(2^{nd}) (broth) Anti-TB at 0.78
			(cell) Anti-TB at 6.25
21	SF 187	*Penicillium sp.*	(primary) Anti-malaria at 7.9
			(2^{nd}) (broth) Anti-malaria at 2.1
			(cell) Anti-malaria at 4.9
22	NHJ 10749	*Torrubiella sp.*	(primary) Anti-KB at 6.94 + Anti-BCA at 9.27
			(2^{nd}) (broth) Anti-KB at 3.15+ Anti-BCA at 3.45
			(cell) Anti-KB at 9.75 +Anti-BCA at 6.85
23	NHJ 5340	*Hirsutella* sp.01 on cricket	Anti-TB (no data)
24	NHJ 6739	*Beauveria sp.*	Anti-Malaria ED_{50} at 23
25	GL 7322	*Massarina sp.*	(primary) Anti-TB MIC at 12.5
			(2^{nd}) (broth) Anti-TB MIC at 0.097
			(cell) Anti-TB MIC at 0.195
26	NP 18	*Unidentified Coelomycete*	(primary) Anti-Malaria ED_{50} at 3.0
			(2^{nd}) (broth) Anti-MalariaED_{50}at 0.31
			(cell) Anti-Malaria ED_{50} at 0.36
27	NHJ 2108	*Discomycete on wood cream*	(primary) Anti-Malaria at ED_{50} 15.25
			(2^{nd}) Anti-Malaria at ED_{50} 9.89
28	6808 Tr1	*M icrosphaeropsis sp.*	(primary) Anti-Fungal at IC_{50} 5.7
29	SFC 739	Cylindocladium sp.	(primary) Anti-NCI-H187 at ED_{50}6.63
30	NHJ 6739	*Beauveria sp.*	Anti-Malaria ED_{50} at 23

No.	Original code	Sciencetific Name	Positive activity (unit = μg/ml)
31	SF 144	*Pennicillium sp.*	Anti-NCI-H187 at ED_{50} 7.475
32	SFC 284	*Kionochaeta spissa*	(2^{nd}) Anti-Malaria (broth) inactive
			(cell) at EC_{50} 0.5
33	SFC 284	*Kionochaeta spissa*	เพิ่ม Condition in MEB mediumโดยไม่มีผล 1^{st} และ 2^{nd} Screen
34	PP 1099	*Unidentified Basidiomycete*	(primary) Anti-NCI-H187 at EC_{50} 2.36
35	SFC 504	*Menisporopsis theobromae*	(primary) Anti-TB at MIC 6.25
			(2^{nd}) Anti-TB (broth) at MIC 0.8
			(cell) at MIC 0.1
36	NHJ 8056NT8	Unidentifeid Insect Fungi	(2^{nd}) Anti-Malaria at 2.7 + Anti-KB at 7.9 + Anti-BCA at 5.1
37	NHJ 8056NT8	Unidentifeid Insect Fungi	เพิ่ม Condition in YES medium โดยไม่มีผล 1^{st} และ 2^{nd} Screening
38	X 1456	Xylaria sp.	Anti-KB at 2.50
39	N 10749	*Torrubiella sp.*	(primary) Anti-KB at 6.94 + Anti-BCA at 9.27
			(2^{nd}) (cell) Anti-KB at 9.75 + Anti-BCA at 6.85
			(broth) Anti-KB at 3.15 +Anti-BCA at 3.45
40	N 4098	*Cordyceps sp.*	NMR profile (maybe new compound)
41	PP 131	*Hypocrea pezzizoides*	(primary) Anti-TB at MIC 3.125
			(2^{nd}) Anti-TB (cell) at MIC 0.0015
			Anti-TB (broth) at MIC 0.0487
42	NHJ 3497	*Akanthomyces sp.*	มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์แมลง
43	NHJ 6073	*Paecilomyces tenuipes*	Anti-Malaria at 6.7 (in medium MM with 20 mM L-Tylosine)
44	NHJ 5968	*Aschersonia tamurai*	มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์แมลง
45	NHJ 7932	*Hirsutella nivea*	(2^{nd}) Anti-Malaria at 2.2 + Anti-KB at 7.2
46	NHJ 4740	*Cordyceps sp.*	NMR profile (maybe new compound)

สรุปผลงานวิจัยในส่วนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา

1. เชื้อราจำนวน 1,525 สายพันธุ์ จากรากลุ่มต่างๆ กัน 12 กลุ่ม ได้ถูกเลี้ยงในอาหารหลายชนิด ในสภาวะที่ต่างกันเพื่อส่งสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพมีจำนวนทั้งสิ้น 5,688 ตัวอย่าง
2. เชื้อราจำนวน 36 สายพันธุ์ ผ่านการทดสอบทุก assays และเชื้อราจำนวน 85 สายพันธุ์ผ่านการทดสอบอย่างน้อย 3 assays ส่วนเชื้อราจำนวนที่เหลือได้ผ่านการทดสอบฤทธิ์อย่างน้อย 1 วิธีทดสอบ
3. ผลการทดสอบการสร้างสารต้านมาลาเรียพบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 1.21% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม Insect fungi
4. ผลการทดสอบการสร้างสารต้านวัณโรคพบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 3.97% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านวัณโรคในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม Endophytic fungi และ insect pathogenic fungi
5. ผลการทดสอบการสร้างสารต้าน HSV-1 พบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 6.65% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้าน HSV-1 ในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม insect pathogenic fungi
6. ผลการทดสอบการสร้างสารต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB พบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 0.83% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ KB ในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม insect pathogenic fungi
7. ผลการทดสอบการสร้างสารต้านเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 พบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 3.56% ของตัว อย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ NCI-H187 ในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม insect pathogenic fungi
8. ผลการทดสอบการสร้างสารต้านเซลล์มะเร็งชนิด BC พบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 0.91% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ ในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม insect pathogenic fungi และเชื้อในกลุ่ม Basidiomycetes
9. ผลการทดสอบการสร้างสารต้าน *C. albicans* พบว่ามีตัวอย่างให้ผล positive 0.86% ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ *C. albicans* ในระดับที่น่าสนใจส่วนใหญ่ได้จากเชื้อในกลุ่ม Endophytic fungi
10. เชื้อราที่มีลักษณะการออกฤทธิ์ที่น่าสนใจจำนวน 230 ตัวอย่าง (216 สายพันธุ์) ได้รับการคัดเลือกเพื่อนำไปเลี้ยงยืนยันผลในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 ml และ จำนวน 46 ตัวอย่าง (42 สายพันธุ์) ได้รับการคัดเลือก

ข. การพัฒนาอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราที่ก่อโรคในแมลง

ปัจจุบันพบว่ามีราก่อโรคในแมลงหลายชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีเช่น ราจีนัส *Ascherponia*, *Hyporeclla* และ *Cordyceps* การเพาะเลี้ยงในเบื้องต้นได้ใช้อาหารเหลวชนิด PDB, MM และ M102 และพบว่าราแมลงในกลุ่ม *Cordyceps* มีอัตราการเจริญในอาหารเหลวดังกล่าวช้ามากเมื่อเทียบกับราในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราแมลง *Cordyceps* ได้ศึกษาหาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและติดตามการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราในกลุ่มนี้

1. การหาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

อาหารที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

1. Potato Dextrose Broth (PDB) มีองค์ประกอบคือ

Potato Starch	4.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
DW	1000	ลิตร

2. PDB ผสมไข่ มีองค์ประกอบคือ

Potato Starch	4.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
DW	1000	ลิตร

เติมไข่ไก่ในอาหาร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

3. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) มีองค์ประกอบคือ

Enzymatic Digest of Cascin	10.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
DW	1000	ลิตร

4. SDB ผสมไข่ มีองค์ประกอบคือ

Enzymatic Digest of Cascin	10.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
DW	1000	ลิตร

เติมไข่ไก่ในอาหาร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

5. PDB ในน้ำมะพร้าว
6. SDB ในน้ำมะพร้าว
7. น้ำมะพร้าว (CO) ประกอบด้วย โปรตีน, ไขมัน, คาร์โบไฮเดรต, วิตามินซี และวิตามินบี 6

เชื้อราที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 8 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มโตเร็วและกลุ่มโตช้า ถึงช้าที่สุด ในกลุ่มโตเร็วมี 5 สายพันธุ์ และกลุ่มโตช้า ถึงช้าที่สุดมี 3 สายพันธุ์ดังนี้

เชื้อ *Cordyceps* ในกลุ่มโตเร็วมีจำนวน 5 สายพันธุ์

1. *Codyceps unilateralis* BCC 1869
2. *Cordyceps sp.* BCC 1575
3. *Cordyceps uleana* BCC 1683
4. *Cordyceps pseudomilitalis* BCC 1472
5. *Cordyceps khaoyaiensis* BCC 7020

ในกลุ่มโตช้าถึงช้าที่สุดมีจำนวน 3 สายพันธุ์

1. *Paecilomyces cinnamomeus* BCC 2107
2. *Aschersonia badia* BCC 8111
3. *Hypocrella reineceiane* BCC 2354

การทดลองมีขั้นตอนคือ จากเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA ตัดเชื้อราส่วนปลายของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร และตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆเลี้ยงในอาหารเหลว SDB + CO ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Shaker) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายเชื้อราจากกล้าเชื้อ 5% โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว PDB, PDB, ผสมไข่, SDB, SDB ผสมไข่, PDB ในน้ำมะพร้าว, SDB ในน้ำมะพร้าว และ น้ำมะพร้าวที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า (Static) ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างอายุ 7, 14, 21, 28และ 35 วัน วัดค่า pH บันทึกการเจริญเติบโต และ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของเชื้อ *Cordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

สายพันธุ์	อายุ (วัน)	PDB DCW (g/l)	PDB+Egg DCW (g/l)	PDB+CO DCW (g/l)	SDB DCW (g/l)	SDB+Egg DCW (g/l)	SDB+CO DCW (g/l)	CO DCW (g/l)
BCC 1683	7	2.49	7.43	6.26	7.86	4.28	17.99	4.34
	14	5.32	9.36	13.85	8.71	15.13	28.98	6.8
	21	8.09	12.58	18.05	9.78	16.24	29.23	8.81
	28	9.21	15.15	19.25	11.18	17.78	33.67	9.26
	35	11.66	20.12	19.13	12.26	20.88	37.76	10.97
BCC 1869	7	0.63	3.29	2.05	1.18	1.76	11.23	2.57
	14	3.39	5.94	9.02	4.06	6.07	19.19	4.66
	21	5.39	7.18	16.98	7.3	7.43	19.42	10.33
	28	6.56	8.17	19.24	9.15	9.23	20.49	10.78
	35	8.39	10.67	23.46	10.25	11.82	23.18	12.26
BCC 7020	7	1.35	2.48	2.8	4.23	4.21	5.59	1.64
	14	5.63	6.05	3.49	6.31	8.75	8.46	3.51
	21	6.8	9.29	4.61	9.38	10.41	9.13	4.5
	28	8.8	10.46	6.35	10.27	11.44	10.23	6.42
	35	9.41	12.57	7.33	14.14	14.6	12.63	8.35
BCC 1575	7	0.86	1.83	3.69	2.2	1.16	2.6	1.15
	14	3	7.41	9.89	11.56	2.41	17.55	1.7
	21	5.43	16.38	16.59	15.91	15.16	18.5	6.66
	28	9.78	19.61	17.46	17.06	16.98	22.94	14.64
	35	10.7	25.03	22.04	21.58	24.64	24.9	15.91
BCC 1472	7	2.67	8.59	9.35	9.17	15.51	19.71	6.26
	14	4.08	11.9	12.86	10.75	16.65	20.75	8.35
	21	6.65	13.58	15.36	11.87	19.52	22.43	9.71
	28	7.26	15.33	17.47	13.45	21.81	23.78	11.59
	35	8.5	19.39	18.71	15.49	23.35	25.27	12.54

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าจาก *Cordyceps* ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า *Cordyceps uleana* BCC 1683 และ *Cordyceps pseudomilitalis* BCC 1472 ในอาหาร SDB ที่มีน้ำมะพร้าวให้เซลล์สูงสุดที่ 35 วัน คือประมาณ 37.76 กรัมต่อลิตรและ 25.27 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Codyceps unilateralis BCC 1869 พบว่าให้เซลล์สูงสุดในอาหาร PDB และ SDB ที่มีน้ำมะพร้าวที่ 35 วันในค่าที่ใกล้เคียงกัน คือประมาณ 23.46และ 23.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Cordyceps sp. BCC 1575 พบว่าในอาหาร PDB ผสมไข่ ให้เซลล์สูงสุดที่อายุ 35วัน คือประมาณ 25.03 กรัมต่อลิตร

Cordyceps khaoyaiensis BCC 7020 พบว่าในอาหาร SDB ผสมไข่ ให้เซลล์สูงสุดที่อายุ35 คือ ประมาณ 14.6 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวหรือไข่ผสมอยู่ด้วย มีผลทำให้การเจริญของ *Cordyceps* ดีขึ้นโดยเฉพาะการใช้น้ำมะพร้าว จึงได้นำผลการทดลองที่ได้มาประยุกต์และทดสอบกับเชื้อราที่โตช้า คือ *Paecilomyces cinnamomeus* BCC 2107, *Aschersonia badia* BCC 8111 และ *Hypocrella reineceiane* BCC 2354 โดย vary ปริมาณน้ำมะพร้าวออกเป็น 0, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ติดตามการเจริญโดยการวัดน้ำหนักแห้ง (ดังแสดงในตารางที่ 11) ผลการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อ *Paecilomyces cinnamomeus* BCC 2107 ใน SDB ผสมน้ำมะพร้าว 100 เปอร์เซ็นต์ให้เซลล์มากที่สุด ส่วน *Aschersonia badia* BCC 8111 และเชื้อ *Hypocrella reineceiane* BCC 2354 ในอาหาร SDB ในน้ำมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ให้เซลล์มากที่สุด

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ *Cordyceps* ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ

สายพันธุ์	อายุ (วัน)	0% DCW (g/l)	25% DCW (g/l)	50% DCW (g/l)	75% DCW (g/l)	100% DCW (g/l)
BCC 2107	4	1.8	3.8	4.6	3.2	2.4
	7	6.4	10.8	15.6	13.8	15.6
	11	11	13.8	18.4	19.8	23.4
	14	11.2	13.8	18.2	19.8	22.4
	21	27.6	30.2	32.8	35.4	38
BCC 2354	7	0.6	0.4	0.8	0.6	0.01
	11	0.8	0.8	1.2	0.8	0.6
	21	0.8	1.6	1.6	1.2	1.2
	28	0.8	1.4	2.4	1.4	1.2
	35	1.2	2	2.6	2.2	1
BCC 8111	14	0.8	-	0.6	-	0.2
	21	0.2	-	0.2	-	0.2
	28	0.8	-	1	-	0.4
	35	1.2	-	2.4	-	0.6
	42	1	-	1.8	-	1

หมายเหตุ : ในเชื้อตัวที่ 3 *Aschersonia badia* เลี้ยงเฉพาะในน้ำมะพร้าว 0%, 50% และ 75% เท่านั้น

2. **ศึกษาผลของสารอาหารต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**

เชื้อราตัวแรกที่นำมาทดสอบคือ *Codyceps unilateralis* BCC 1869 เป็นเชื้อราที่ผลิตสารสีแดง Naphthoquinones มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ค่า EC_{50} เท่ากับ 2.5 µg/ml และที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้อีก 20 เท่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BC, KB และ Vero ซึ่งถือได้ว่ามีศักยภาพที่ดีในการประยุกต์เพื่อพัฒนายาต่อไป อย่างไรก็ตามการเลี้ยงราชนิดนี้เพื่อให้ผลิตสาร Naphthoquinones ยังเป็นปัญหาอยู่คือ การใช้เวลาในการเลี้ยงนานปริมาณสารได้น้อย จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในกลุ่ม *Cordyceps* ในอาหารเหลวชนิดต่างๆพบว่าน้ำมะพร้าวมีความสามารถในการเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Cordyceps* ได้ ดังนั้นเพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าวต่อการสร้างสาร Naphthoquinones ใน *Cordyceps unilateralis* BCC 1869 ได้เลี้ยงเชื้อในอาหารต่างๆ ดังนี้

1. Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato starch	4.0	g
Dextrose	20.0	g
DW	1000	l

2. Potato Dextrose Broth (PDB) in cocnut + juic (PDB+CO 50%)

Potato starch	4.0	g
Dextrose	20.0	g
น้ำมะพร้าว (CO)	500	ml
DW	500	ml

3. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) in cocnut juic (SDB+CO 50%)

Enzymatic Digest of Cascin	10.0	g
Dextrose	20.0	g
น้ำมะพร้าว (CO)	500	ml
DW	500	ml

หมายเหตุ : เตรียม PDB และ SDB ในน้ำมะพร้าวโดยใช้น้ำมะพร้าว 50%

การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิด เลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า (Static) ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างอายุ 14, 21, 28และ 35 วัน วัดค่า pH บันทึกการเจริญเติบโต หาน้ำหนักแห้งและวัดความเข้มของสี

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 12 และ 13 การสร้างสาร Naphthoquinones ในอาหารชนิดต่างๆ พบว่าในช่วงอายุ 28 วัน รา *Cordyceps uinlateralis* BCC 1869 มีการสร้างสาร Naphthoquinones ได้สูงสุดในอาหาร PDB คือ เท่ากับ 1.89 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะพบว่าการสร้างสาร Naphthoquinones ในช่วงอายุ 28 วัน จะสูงกว่าในช่วงอายุ 14 วันในอาหารทั้ง 3 ชนิด และพบอีกว่าการสร้างสาร Naphthoquinones ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ PDB, PDB+CO และ SDB+CO ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร SDB+CO ในช่วงอายุ 28 วัน คือ 25.63 กรัมต่อลิตร แต่การสร้างสาร Naphthoquinones ได้ปริมาณน้อยกว่าใน PDB และ PDB+CO ซึ่งเป็นผลที่ตรงข้ามกัน

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณสาร Naphthoquinones ในอาหาร PDB, PDB+CO และ SDB+CO

อาหาร	Naph. (g/l)	
	อายุ 14 วัน	อายุ 28 วัน
PDB	0.07	1.89
PDB+CO	0.05	0.18
SDB+CO	0.06	0.11

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณสาร Naphthoquinones และน้ำหนักเซลล์ ในอาหาร PDB, PDB+CO และ SDB+CO

อาหาร	อายุ 14 วัน		อายุ 23 วัน		อายุ 28 วัน	
	Cell (g/l)	Nap. (g/l)	Cell (g/l)	Nap. (g/l)	Cell (g/l)	Nap. (g/l)
PDB	3.52	0.22	-	1.59	3.99	1.74
PDB+CO	8.99	0.12	-	1.02	12.43	0.27
SDB+CO	13.25	0.07	-	0.83	25.63	0.22

สรุปผลการพัฒนาอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราที่ก่อโรคในแมลง

1. การเจริญเติบโตของรา *Cordyceps* จะค่อนข้างโตเร็วในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวและไข่เป็นองค์ประกอบ เพราะว่าไข่และน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งของโปรตีนและมี คาร์โบไฮเดรตในปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งทำให้ราเจริญเติบโตและให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าในอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าวและไข่เป็นองค์ประกอบ
2. น้ำมะพร้าวมีผลต่อการเจริญเติบโตของรา *Cordyceps unilateralis* BCC 1869 ดังจะเห็นได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบ PDB+CO และ SDB+CO จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่าใน PDB ที่ไม่มีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบถึง 3 เท่า และ 6 เท่าตามลำดับ แต่ในการผลิตสาร Naphthoquinones กลับผลิตน้อยลงเมื่อปริมาณเซลล์มากขึ้น

ตอนที่ 2: ผลงานวิจัยด้านการวิเคราะห์ทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม 2,4-diaminopyrimidine

ก. การวิเคราะห์ทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลงานวิจัยมีดังนี้

1) จากการศึกษาองค์ประกอบย่อย (minor constituents) ของเชื้อรา *Halorosellinia oceanica* พบสารที่มีความน่าสนใจทางเคมีกลุ่ม isocoumarin glucosides และผลงานได้ตีพิมพ์ใน J. Chem Soc., Perkin Trans. I, 2002, 2473-2476 ในหัวเรื่อง "Halorosellins A and B, unique isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*"(ดูเอกสารประกอบ)

2) จากการศึกษาสารต้านเชื้อวัณโรคจากเชื้อราแมลง *Hirsutella kobayasii* พบสารใหม่พวก cyclohexadepsipeptide ซึ่งผลงานนี้ถูกตีพิมพ์ใน J. Nat. Prod., 2002, *65*, 1346-1348 ในหัวเรื่อง "Hirsutellide A, a New Antimycobacterial Cyclohexadepsipeptide from the Entomopathogenic Fungus *Hirsutella kobayasii*" (ดูเอกสารประกอบ)

3) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา *Streptomyces spectabilis* พบสารออกฤทธิ์ต้านมาลาเรีย Metacycloprodigiosin ซึ่งผลงานนี้ได้ตีพิมพ์ใน Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, *46*(4), 1112-1113 ในหัวเรื่อง "Potent *In Vitro* Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785" (ดูเอกสารประกอบ)

4) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา *Xylaria mellisii* พบสารชื่อ mellisol และ 1,8-dihydroxynaphthol 1-O-α-glucopyranoside จากการพิสูจน์ทางเคมี และ ผลทางสเปกโตรสโคปี ซึ่งผลการศึกษานี้ได้ submit ใน J. Nat. Prod. ในหัวข้อเรื่อง "Anti-HSV-1 Active Compounds from *Xylaria mellisii* BCC 1005" (ดู manuscript หน้า 65-71)

Anti-HSV-1 Active Compounds from *Xylaria mellisii* (BCC 1005)

Pattama Pittayakhajonwut[a,*], Rapheephat Suvannakad[a], Morakot Tanticharoen[a], Yodhathai Thebtaranonth [a, b]

[a]*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113, Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand*

[b]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rajdhevee, Bangkok 10400, Thailand*

*To whom correspondence should be addressed. Phone: +662-5646700 (Ext 3359). Fax: +662-5646707. E-mail: pattamap@biotec.or.th.

Abstract

A new metabolite, mellisol (1), and naturally new 1,8-dihydroxynaphthol 1-O-α-glucopyranoside (3) together with four known metabolites, cytochalasins C and D, (-)-5-carboxymellein and (-)-5-methylmellein, were isolated from the fungus *Xylaria mellisii* (BCC 1005). Compounds 1 and 3 exhibited activity against herpes simplex virus-1 with IC_{50} values of 10.50 and 8.40 μg/mL, respectively. They showed low cytotoxic activity against *vero* cell and were inactive against BCA and KB cell lines at the concentration > 20 μg/mL.

Mycologists at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) have been collecting and identifying microorganisms from various parts of Thailand. These organisms are kept at the BIOTEC Culture Collection (BCC) for further study and extracts of some of these have shown to possess a variety of biologically active secondary metabolites.[1,2] As part of our on-going search for bioactive substances from microorganisms we have been working with fungi of the genus *Xylaria* and came across the anti-herpes simplex virus activity of the crude extract of *Xylaria mellisii* (BCC 1005), therefore we pursue the investigation in order to identify the active principle(s).

Altogether, six compounds, mellisol (1), 1,8-dihydroxynaphthol 1-*O*-α-glucopyranoside (3), cytochalasins C and D, (-)-5-carboxymellein and (-)-5-methylmellein were isolated and identified. Physical properties and spectroscopic data of cytochalasins C and D, (-)-5-carboxymellein and (-)-5-methylmellein were identical in all respects to those already published.[3-6]

Compound 1 was obtained as needles and its HRMS revealed a molecular formula $C_{12}H_{18}O_6$ (observed *m/z* 281.0684 $[M+Na]^+$, Δ 0.0 mmu). IR spectrum showed absorptions at ν_{max} 3448 (OH) and 1735 cm^{-1} (C=O) while ^{13}C and DEPT-135 NMR spectral data showed 12 carbons consisting of one methyl, four methylenes, four methines and three quaternary carbons. Five carbons at δ_C 64.3 (C-11), 77.2 (C-10), 79.9 (C-5), 99.3 (C-2) and 104.2 (C-6) suggested their connection to oxygens, two of which (δ_C 79.9 and 104.2) were quaternary carbons. The HMQC experiment of 1 showed correlations of C-11, C-10 and C-2 to the unequivalent methylene protons (at δ_H 4.29, H_α-11 and 4.57, H_β-11) and the two methine protons (at δ_H 4.76, H-10 and 6.03, H-2) respectively. In ^1H-^1H COSY spectrum not only indicated that this unequivalent methylene protons showed connectivity to the chiral proton at δ_H 3.10 but it also showed the correlations of H-2 to H-3; H-7 to H-8; H-8 to H-7 and H-9; H-9 to H-8 and H-10; H-12 to H-9 and H-13. The HMBC spectrum showed the cross peaks from H-2 to C-4, C-10 and C-11; H-3 to C-2, C-4 and C-5; H-7 to C-6 and C-8; H-8 to C-9; H-9 to C5; H-10 to C-4, C-5, C-6, C-8 and C-9; H-11 to C-2, C-4 and C-6; H-12 to C-9; H-13 to C-9 and C-12. From the data described above structure of compound 1, named mellisol, was then established. Interestingly, the methine proton at δ_H 6.03 (H-2) showed no coupling to H-3, thus the dihedral angle between H-2 and H-3 was suggested to be about 90°C. The NOESY spectrum indicated spatial correlation from H-13 to H-2 and H-10; H_α-11 to H-2, this suggested the relative stereochemistry of mellisol to be as shown.

Acetylation of compound 1 with acetic anhydride and pyridine gave a yellow oil 2 (ν_{max} at 1766 and 1742 cm^{-1}; C=O) which showed two additional methyl groups, at δ_H 2.12 and 2.32, in its ^1H NMR spectrum. The unequivalent methylene protons originally resonated at δ_H 4.29 (H_α-11), 4.57 (H_β-11) in 1 shifted to δ_H 4.29 (H_α-11), 5.03 (H_β-11) and the methine proton of H-2 (at δ_H 6.03 in 1) to δ_H 6.57, respectively. The absence of carbon at δ_C 207.2 in the parent compound and the presence of α,

β-unsaturated carbonyl carbon absorptions at δ_C 173.6 and 181.9 pointed to the ring opening of the ketal group as shown in 2. The absence of the methine proton at δ_H 4.76 (H-10) and the extra carbons at δ_C 133.0 and 164.6 confirmed the formation of a double bond. This was also confirmed by the IR absorption at ν_{max} 1686 cm^{-1}. The proposed structure 2 was also confirmed by the 1D and 2D NMR spectral data.

Compound 3 was obtained as a brown solid. HRMS revealed a molecular formula $C_{16}H_{18}O_7$ (observed *m/z* 321.0983 $[M-H]^-$, Δ -0.1 mmu). IR spectrum showed a broad peak at ν_{max} 3386 cm^{-1} (OH) and peaks at ν_{max} 1629, 1607 and 1587 cm^{-1} indicated an existence of aromatic component. ^1H and ^{13}C NMR spectra indicated the presence of typical glucose moiety where absorptions at δ_H 3.20-5.50 and δ_C 60.8-101.2 were observed. Four hydroxyl groups of the sugar unit (δ_H 4.70, 5.10, 5.27, 6.09) and an extra OH at δ_H 9.66 disappeared after the addition of D_2O. Six protons resonated in the aromatic region at δ_H 6.78-7.53 ppm and ten carbons situated in the range of δ_C 110-160 ppm could be contributed to 1,8-disubstituted naphthalene moiety where upon two quaternary carbons attached to oxygen resonated at δ_C 153.6 and 154.4. HMBC spectrum indicated that the anomeric proton of glucose moiety (at δ_H 5.50) correlated to the carbon at 154.4, also the coupling constant of 3.46 Hz at the anomeric proton suggested that the naphthol moiety was attached to the glucose unit at α-position[7]. All evidences, including detailed ^1H-^1H COSY and HMQC experiments of compound 3 and its acid hydrolysis product, 4, indicated that compound 3 was 1,8-dihydroxynaphthol 1-O-α-glucopyranoside. Although compound 3 is known synthetically[7], this is the very fist time that this compound has been isolated from natural source.

Compounds 1 and 3 exhibited anti-HSV-1 activity at IC_{50} 10.50 and 8.40 μg/mL respectively and displayed low cytotoxicity against *vero* cell line at the concentration of 39.42 and 45.84 μg/mL. In addition, both were inactive against BCA and KB cell lines at the concentration of >20 μg/mL. Cytochalasins C, D, (-)-5-methylmellein and (-)-5-carboxymellein showed no activity against HSV-1 virus. (-)-5-Carboxymellein was earlier reported to be antimalarial principle from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*.[8]

Experimental Section

General Experimental Procedures. Mps were determined on an Electrothermal IA 9100 digital melting point apparatus and were uncorrected. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer System 2000 Spectrophotometer, UV spectra on a Varian CARY 1E UV-visible spectrophotometer and ESI (Electron Spray Ionization)-TOF mass spectra on a Micromass LCT mass spectrometer. Optical rotations were recorded on a JASCO DIP-370 digital polarimeter. Chromatography columns were

made up using Sephadex LH-20 and Merck Kieselgel GF_{254}. ^1H NMR (400 and 500 MHz) and ^{13}C NMR (100 and 125 MHz) spectra were recorded on Brukers DRX-400 and AV-500D spectrometers using $CDCl_3$ (δ_c 77.0), DMSO-d_6 (δ_c 39.5) and C_5D_5N (δ_c 149.9, 135.5, 123.5) as references. Type of carbon atoms were established by employing a combination of broadband proton-decoupled and distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. Assignments were established by employing a combination of 1D and 2D NMR experiments.

Fungal Material. *X. mellisii* (BCC 1005) was collected from Kaeng Krachan National Park, Phetchaburi, identified by Dr. Surang Thienhirun and deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), Thailand (registration no. BCC1005).

Extraction and Isolation. The culture maintained on potato dextrose agar (6 days) was inoculated into a malt extract medium (2×250 mL). After 25 days, the primary inocculum was transferred into 20 L Erlenmeyer flasks, each containing 250 mL of malt extract media with extra 6% glucose (20×1 L), and incubated for 8 weeks. The mycelium was removed by filtration through filter paper and the medium was extracted with EtOAc (3×2 L), dried with Na_2SO_4. The dried extract was evaporated to yield a semi-soild gum (2.9 g). The mycelium was macerated in MeOH (2 L) for 7 days at room temperature, followed by soaking (also 7 days) in CH_2Cl_2 (2 L). The combined organic solvent was evaporated then extracted with hexane (3×1 L) and EtOAc (3×1 L).

The solid gum (2.9 g) was triturated with EtOAc (5 ml) to give brown solid of 1,8-dihydroxynaphthol 1-O-α-glucopyranoside (3) (0.55 g), which was further purified by Sephadex LH-20 to give pure sample (0.41 g). The filtrate was evaporated to dryness (2.0 g) and purified by a silica gel column chromatography using a mixture of toluene: EtOAc: acetic acid (50:49:1) as eluent; 15 ml fractions were collected to provide 4 major parts as indicated by TLC. Part 1 was further purified by Sephadex LH-20 using 100% MeOH as an eluent to obtain (-)-5-carboxymellein (3.05 mg). Part 2 was crystallized from a mixture of acetone and hexane to give mellisol (1) as colourless needles (56.9 mg). Part 3 contained cytochalasin D (60.73 mg) and part 4 provided compound 3 (0.23 g).

In addition, (-)-5-methylmellein (24.04 mg) and cytochalasin C (61.15 mg) were isolated from the haxane extract of mycelium while the EtOAc extract provided (-)-5-carboxymellein (28.47 mg), cytochalasin D (0.52 g), cytochalasin C (21.75 mg) and 1,8-dihydroxynaphthol 1-O-α-glucopyranoside (3) (0.77 mg). Chemical and physical properties of cytochalasins C and D, (-)-5-carboxymellein and (-)-5-methylmellein were identical to those published in the literatures.[3-6]

Bioassay Procedures. Antiviral activity was evaluated against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) employing the colorimetric method described by Skehan and coworkers.[9] HSV-1 was maintained in the *vero* cell line (kidney fibroblast of an African green monkey) which was cultured in Eagle's minimum essential medium (MEM) with the additional of heat-inactivated fetal bovine serum

(FBS) (10%) and antibiotics. The reference compound, acyclovir, exhibited the antiviral HSV-1 with IC_{50} of 2-5 μg/mL. The cytotoxicity assay against the BCA (human breast cancer cells), KB (human epidermoid carcinoma of the mouth), and *vero* cell line was performed employing the colorimetric method using ellipticine as reference (IC_{50} of 0.1-0.4 μg/mL for both BCA and KB cells and 0.4-0.9 μg/mL for *vero* cell).

Compound 1 (mellisol): $C_{12}H_{18}O_6$; colorless needles; HRMS *m/z* 281.0684[M+Na]$^+$; calc. for $C_{12}H_{18}O_6Na$ 281.0684; mp 125-127 ^{0}C; $[\alpha]_D^{28}$ + 141.91° (c 0.2720, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} nm (log ε) 205 (3.49), 267 (2.65); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} 3448 (br), 2961, 2932, 2905, 1735, 1467 (w), 1459 (w), 1389, 1341, 1273, 1211,1198, 1153, 1123, 1092, 993, 966, 935, 916, 857, 812, 702; ^{1}H NMR (500 MHz, C_5D_5N) 0.82 (3H, td, J 7.43, 1.53 Hz, H-13), 1.42 (1H, quint, J 7.43 Hz, H□-12), 1.56-1.63 (2H, m, H□-8 and H□-12), 2.11 (1H, dt, J 12.95, <<1 Hz, H□-7), 2.15-2.20 (1H, m, H-9), 2.32 (1H, ddt, J 12.60, 3.60, <<1 Hz, H□-8), 2.46 (1H, ddd, J 12.95, 9.72, 1.24 Hz, H□-7), 3.10 (1H, d, J 1.19 Hz, H-3), 4.29 (1H, d, J 11.05 Hz, H□-11), 4.57 (1H, dt, J 11.05, 1.19 Hz, H□-11), 4.76 (1H, s, H-10), 6.03 (1H, s, H-2), 6.90 (1H, s, OH), 8.20 (1H, s, OH), 8.70 (1H, s, OH) ^{13}C NMR (125MHz, C_5D_5N) 11.6 (q, C-13), 24.9 (t, 8-C), 25.0 (t, 12-C), 34.6 (t, 7-C), 36.8 (d, 9-C), 56.7 (d, 3-C), 64.3 (t, 11-C), 77.2 (d, 10-C), 79.9 (s, 5-C), 99.3 (d, 2-C), 104.2 (s, 6-C), 207.2 (s, 4-C).

Mellisol diacetate 2: Compound 1 (5.2 mg) was stirred overnight with acetic anhydride (1.5 ml) and pyridine (3 drops). The reaction mixture was poured into ice-water (2 ml) and stirred for 2 hours, followed by addition of $NaHCO_3$ and then extracted with EtOAc (3×5 ml). The EtOAc extract was evaporated to dryness to give brown gum (5.54 mg). The gum was purified by Sephadex LH-20 using 100% MeOH as an eluent to give mellisol diacetate 2 (2.29 mg); $C_{16}H_{20}O_7$; yellow oil; HRMS m/z 347.1114 [M+Na]$^+$; calc. for $C_{16}H_{20}O_7Na$ 347.1107; UV (EtOH) λ_{max} nm (log ε) 203 (3.44), 273 (3.58); IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} 2963, 2929, 1766, 1742, 1686, 1623, 1540, 1456, 1373, 1219, 1146, 1036, 962, 935; ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 0.68 (3H, t, J 7.48 Hz, H-13), 1.45-1.65 (2H, m, H-12), 1.90-2.05 (1H, m, Hα-8), 2.12 (3H, s, CH_3CO), 2.18-2.23 (1H, m, Hβ-8), 2.30-2.40 (2H, m, Hα-7and H-9), 2.32 (3H,s, CH_3CO), 2.43-2.53 (1H, m, Hβ-7), 2.75 (1H, m, H-3), 4.29 (1H, dd, J 11.30, 3.01 Hz, Hα-11), 5.03 (1H, dd, J 11.30, 1 Hz, Hβ-11), 6.57 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) 11.8 (t, C-13), 20.3 ($COCH_3$), 20.7 ($COCH_3$), 24.9 (t, 12-C), 29.6 (t, 8-C), 33.1 (t, 7-C), 41.1 (d, 9-C), 48.4 (d, 3-C), 60.7 (t, 11-C), 92.3 (d, 2-C), 133.0 (s, 5-C), 164.6 (s, 10-C), 168.3 ($COCH_3$), 168.5 ($COCH_3$),173.6 (s, 6-C), 181.9 (s, 4-C).

Compound 3: $C_{16}H_{18}O_7$; brown amorphous; HRMS *m/z* 321.0984 [M-H]$^+$; calc. for $C_{16}H_{18}O_7$ 321.0983; mp 205-207 ^{0}C (dec); $[\alpha]_D^{31}$ +127 °(c 0.3185, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} nm (log ε) 226 (4.89), 302 (4.09), 317 (4.04), 332 (4.01) ; IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} 3386 (br), 2936, 1629 (w), 1607, 1587, 1397, 1298, 1247, 1110, 1087, 1045, 998, 814, 754; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) 3.20-3.25 (1H, s, H-4′), 3.52-3.60 (4H,

m, H-2′, H-3′, H-5′, H-6′), 3.72-3.75 (1H, m, H-6′), 4.70 (1H, t, J 5.79 Hz, OH), 5.10 (1H, d, J 6.14 Hz, OH), 5.27 (1H, d, J 4.61 Hz, OH), 5.50 (1H, d, J 3.46 Hz, H-1′), 6.09 (1H, d, J 3.87 Hz, OH), 6.78 (1H, dd, J 3.39, 5.38 Hz, H-2), 7.33-7.36 (3H, m, H-3, H-4, H-6), 7.44 (1H, dd, J 7.65, 0.85 Hz, H-7), 7.53 (1H, dd, J 8.28, 0.85 Hz, H-5), 9.66 (1H, s, OH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) 60.8 (t, 6′-C), 69.5 (d, 4′-C), 71.0 (d, 3′-C), 73.6 (d, 5′-C), 74.2 (d, 2′-C), 101.2 (d, 1′-C), 110.7 (d, 2-C), 110.9 (d, 7-C), 115.5 (s, 9-C), 118.7 (d, 4-C), 122.8 (d, 5-C), 126.3 (d, 6-C), 127.4 (d, 3-C), 136.3 (s, 10-C), 153.6 (s, 8-C), 154.4 (s, 1-C).

Acknowledgments

We are grateful for the financial support from the Biodiversity Research and Training Program (BRT). We thank Dr. Surang Thienhirun for identifying the fungus registered as BCC 1005 in the BIOTEC Culture Collection and acknowledge the help of BIOTEC's fermentation technology laboratory and biological activity screening laboratory for large-scale fermentation and bioactivity screening, respectively. Y.T. also thanks the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for the Senior Research Fellowship Award.

References and Notes

(1) Boonphong, S.; Kittakoop, P.; Pittayakhajonwut, D.; Tatichareon, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* 2001, *64*, 965-967.

(2) Isaka, M.; Jaturapat, A.; Kiadwang, W.; Punya, J.; Lertwerawat, Y.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Planta Medica* 2000, *66*, 473 - 475.

(3) Merifield, E.; Thomas, E. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1999, 3269-3283.

(4) Claydon, N.; Grove, J. F.; Pople, M. *Phytochemistry* 1985, *24*, 937-943.

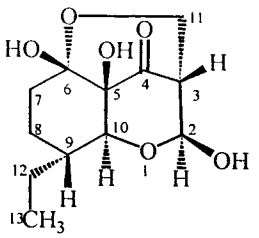
(5) Anderson, J. R.; Edwards, R. L.; Whalley, A. J. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1983, 2185-2192.

(6) Okuno, T.; Oikawa, S.; Goto, T.; Sawai, K.; Shirahama, H.; Matsumoto, T. *Agric. Biol. Chem.* 1986, *50*, 997-1001.

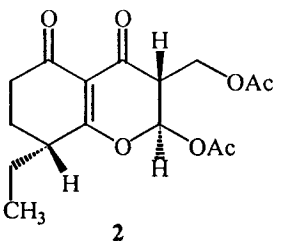
(7) Cameron, D. W.; Craik, J. C. A. *J. Chem. Soc. (C)* 1968, 3068-3072.

(8) Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Rungrod, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2001, *11*, 1965 - 1970.

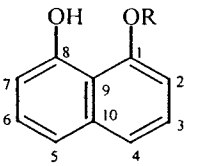
(9) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, *82*, 1107-1112.



1

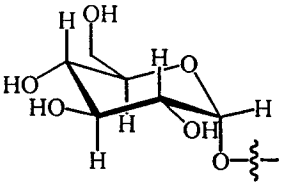


2



3 R = α-glucose

4 R =H

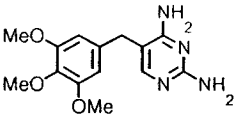


α-glucose

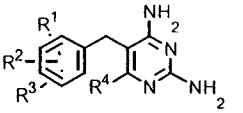
โครงสร้างของสารเคมีที่แยกได้

ข. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารในกลุ่ม 2,4-diaminopyrimidine

จากการพัฒนาสารออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียในกลุ่ม 2,4-diaminopyrimidine โดยเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันต่างๆที่ตำแหน่ง R^1, R^2, R^3 และ R^4 ดังรูป



Trimethoprim



Trimethoprim Derivatives

โดยอนุพันธ์ต่างๆที่สังเคราะห์ขึ้นเหล่านี้ได้นำไปทดสอบความสามารถในการจับกับเอนไซม์ DHFR ทั้งชนิดดั้งเดิมและชนิดกลายพันธุ์ รวมทั้งศึกษาทางด้าน molecular modeling ควบคู่กันไปเพื่อดูการจับตัวกันระหว่างตัวยับยั้ง (inhibitors) กับเอนไซม์ในบริเวณ active site ซึ่งการศึกษานี้ได้นำไปสรุปและ submit ใน J. Med. Chem. ในหัวข้อเรื่อง "Target Guided Synthesis of 5-Benzyl-2,4-diamonopyrimidines : Their Antimalarial Activities and Binding Affinities to Wild Type and Mutant Dihydrofolate Reductases from *Piasmodium falciparum* (ดู manuscript หน้า 73-106)

Target Guided Synthesis of 5-Benzyl-2,4-diamonopyrimidines : Their Antimalarial Activities and Binding Affinities to Wild Type and Mutant Dihydrofolate Reductases from *Plasmodium falciparum*

Chawanee Sirichaiwat,[a,b] Chakapong Intaraudom,[a] Sumalee Kamchonwongpaisan,[a] Jarunee Vanichtanankul,[a] Yodhathai Thebtaranonth *[,a,b] and Yongyuth Yuthavong[a]

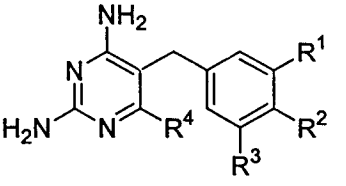
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, 113 Thailand Science Park, Pahonyothin Road, Klong 1, Klongluang, Pathumtani 12120, Thailand; Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol Univerity, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

* To whom correspondence should be addressed. Tel. : 662-2015135 Fax. : 662-2458332. E-mail : scytr@mahidol.ac.th

[a] National Science and Technology Development Agency

[b] Department of Chemistry, Mahidol University

Table of Contents graphic



Abstract

The resistance to pyrimethamine (Pyr) of *Plasmodium falciparum* arising from mutation at position 108 of dihydrofolate reductase (pfDHFR) from serine to asparagine (S108N) is due to steric interaction between the bulky side chain of N108 and Cl atom of 5-*p*-Cl aryl group of Pyr which, consequently, resulted in the reduction in binding affinity between the enzyme and inhibitor. Molecular modeling suggested that the flexible antifolate, such as trimethoprim (Tmp) derivatives, could avoid this steric constraint and should be considered as new potentially effective compounds. The hydrophobic interaction between the side chain of inhibitor and the active site of the enzyme around position 108 was enhanced by the introduction of longer and more hydrophobic side chain on Tmp's 5-benzyl moiety. The prepared compounds, especially those bearing aromatic substituents, exhibited better binding affinities to both wild type and mutant enzymes than that of the parent compound. Binding affinities of these compounds correlated well with their antimalarial activities against both wild type and resistant parasites. Molecular modeling of the binding of such compounds with pfDHFR also supported the experimental data and clearly showed that aromatic substituents play an important role in enhancing binding affinity. In addition, some compounds, with 6-alkyl substituents, showed relatively less decrease in binding constants with the mutant enzymes and relatively good antimalarial activities against the parasites bearing the mutant enzymes.

Introduction

Malaria, one of the most widespread tropical diseases, is caused by parasites of *Plasmodium spp.*, of which *falciparum* is most lethal. The emergence of resistant parasites to various available drugs has become a very serious problem in malaria control.[1,2] *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (pfDHFR), which is an essential enzyme in the folate pathway and exists as a bifunctional enzyme linked to thymidylate synthase (TS), has long been an important target for malarial therapy. Pyrimethamine (Pyr, 1) and cycloguanil (Cyc, 2), the active metabolite of proguanil, are potent DHFR inhibitors and were effectively used for *P. falciparum* malaria treatment. Unfortunately, resistance of the parasite to these drugs occurred rapidly and hence their clinical utility has been drastically affected. The mechanism of resistance has been shown to be due to the various point mutations of DHFR, including those at positions 16, 50, 51, 59, 108, 140 and 164.[3-7]

During the past few years, molecular modeling of pfDHFR has extensively been studied in order to understand the basis of drug resistance which can lead to the development of new effective inhibitors.[8-11] From a homology model based on leishmania DHFR, Mckie *et al.* pointed out that S108N mutation had led to steric clash with *p*-Cl atom of Pyr.[9] Results from other molecular modeling studies of various different species of DHFRs also gave similar explanation for the resistance of this mutant.[8,10,11]

It has been suggested that the flexible antifolate could avoid this steric constraint and should be an effective inhibitor.[12] This was demonstrated in case of WR99210, the triazine derivative with flexible trichlorophenoxypropyloxy side chain, which is effective against Pyr-resistant parasites.[13,14] Trimethoprim (Tmp, 3) also possesses a flexible benzyl side chain and it was shown that the binding affinity of Tmp analogues to mutant enzymes were relatively less affected than Pyr, although the relative influence of side chain flexibility must be weighed against other influence of structural changes in the various derivatives.[15] It was also shown that derivatives with benzyloxy substituent on the 5-benzyl group had favorable binding characteristics. These implied that the aromatic group at 5-benzyl moiety played an important role in the binding affinity. In order to explore the significance of aromatic and other hydrophobic substituents on the 5-benzyl moiety, the binding affinity of various Tmp derivatives bearing these substituents with both wild type and mutant enzymes were extensively studied. Moreover, molecular modeling of the binding of Tmp derivatives with the active site of the recently solved pfDHFR[16] were also studied.

Results and Discussion

Chemical Syntheses. Preparation of Tmp analogues was achieved by the improved method recently reported by our group[15] and the synthetic route is shown in Scheme 1. Derivatives of Tmp with 5-benzyl substituent were synthesized by aldol condensation between 3-morpholinopropionitrile and substituted benzaldehyde, followed by treatment of the intermediates with guanidine. In cases of derivatives with 6-alkyl substituents, an additional methylation step, using diazomethane, was needed prior to the treatment with guanidine. For derivatives bearing long ether side chains, the preparation of starting aldehydes is outlined in Scheme 2. 4-(3-Hydroxypropoxy)-3-substituted benzaldehyde (**14**) and 3-substitutedphenoxy-1-propanol (**17**) were synthesized by alkylation of the corresponding hydroxybenzaldehyde (**12**) or phenol (**16**) with 3-chloro-1-propanol using K_2CO_3/DMF at 80°C. Treatment of compound **14** with *p*-toluenesulfonylchloride at 0°C gave the tosylated product **15** as a white solid. Synthesis of compound **18** was achieved by alkylation of compound **17** with tosylated **15** under NaH/DMF conditions.

Molecular Modeling of pfDHFR Bound with Tmp. Since the structure of pfDHFRs was being solved during the course of this research, molecular modeling of trimethoprim with the enzyme was conducted with these solved structures in order to understand the mode of binding of the inhibitor in the active site pocket. Predicted conformations of this compound in the active site pocket of wild type and quadruple mutant pfDHFRs are shown in Figures 1 and 2. The benzyl side chain of the inhibitor was found to be oriented in the "up" conformation, bending away from NADPH, as observed in eucaryotes, whereas in bacterial DHFR the benzyl group was pointing "downward" towards nicotinamide ring.[17,18] In this case, the inhibitor was positioned more closely to NADPH than that in the bacteria, and adjustment to the "down" conformation would lead to steric clash with nicotinamide ring of NADPH. It should be noted that the conformation of Tmp in the active site pocket of the enzyme reported in this study is very similar to that of the established conformation of WR99210 in the same active site (Figure 1c).[16]

As Figures 1a and 2a show, the inhibitor was bound in the active site of the enzyme with its pyrimidine ring occupying the interior of the deep cleft while its benzyl side chain extended out towards the entrance of the hydrophobic binding cavity. This inhibitor was held in the pocket by a combination of van der Waals, hydrogen bonding and ionic interactions with the protein. The key interaction was the hydrogen bonding between carboxylate side chain of Asp54 and both N1 and 2-amino groups of pyrimidine ring. Furthermore, the backbone carbonyl oxygens of Ile 14 and 164 were found to locate in the plane of pyrimidine ring which formed a hydrogen-bond with the 4-amino group of the inhibitor. Additional major hydrophobic contacts occurred between the pyrimidine ring and the side chain of Phe 58 and Leu46, located above the ring and adjacent to its exterior edge, respectively. Three methoxy

groups were in van der Waals contact with the side chain of Met55, Leu46, Ile164 and nicotinamide ring of NADPH. The model showed that interaction between side chain of the inhibitor and amino acid at residue 108 and the pi-pi interaction caused by the stacking between phenyl ring of inhibitor and nicotinamide ring of NADPH, which took place in case of Pyr and Cyc,[8,10] were absent and therefore resulted in poor binding. In order to produce optimal interaction, addition of longer and more hydrophobic substituents was required. However, the space around methoxy group at position 5 was quite limited for modification. Consequently, modification at positions 3 and 4 on the benzyl moiety was focused.

It is shown, in Figure 2b, that in the case of quadruple mutant enzyme there is no interaction between benzyl side chain and the surrounding amino acids, Met55 and Leu164. In addition, the distance between the backbone oxygen of Leu164 and the 4-amino group of the pyrimidine ring increased significantly, resulting in weaker hydrogen-bonding interaction. All these results constituted poor binding of the inhibitor to this mutant enzyme, when compared to those of the wild type.

Inhibition of the Wild Type and Mutant pfDHFRs by Tmp Derivatives. From the characteristics of binding discussed, we make a hypothesis that aromatic and other hydrophobic substituents on the 5-benzyl moiety of Tmp would increase the binding affinity, resulting in enhanced enzyme inhibition and parasite killing. The trimethoprim derivatives with these substituents were subjected to screening for inhibitory activity with wild type, S108N, C59RS108N double mutant, C59RS108NI164L triple mutant and N51IC59RS108NI164L quadruple mutant DHFRs. K_i values for these compounds, binding with wild type and mutant enzymes, are shown in Tables 2-5 along with K_i values of trimethoprim for comparison. Effects of substituents on the inhibitors in their binding to both wild type and mutant DHFRs were assessed by determination of the ratios of inhibition constants for the mutants as compared to the wild type enzyme (K_i mut/K_i wt), as well as their K_i values relative to trimethoprim.

The K_i values of trimethoprim analogues having various long chain alkoxy substituents are shown in Table 2. In the case of compounds **20-22**, it was noted that the increase of carbon atoms at *p*-alkoxy side chain resulted in the decrease of K_i values for both wild type and mutant enzymes, compared to the simple *p*-methoxy substituent (compound **19**). Binding affinities of derivatives with substituents at positions 3 and 4, compounds **23-27**, in which one of these two substituents was long alkoxy chain, improved the binding by about 5-10 folds against both wild type and mutant enzymes. In Table 3, trimethoprim derivatives with aromatic substituents showed relatively more favorable binding to both wild type and mutant enzymes, especially for compound **40** which is about 30 and 60-200-fold more effective than trimethoprim against wild type and mutant enzymes respectively as has been reported in the previous study [15]. In addition, the change from H to alkoxy group at *m*-position improved binding affinity to both wild type and mutant enzymes (e.g. compounds **38-41**) while the K_i

values decreased when the methoxy group (e.g. compounds 30 and 38) at this position was replaced by ethoxy functionality (e.g. compounds 31 and 39). These results support our hypothesis concerning the addition of more hydrophobic substituents to produce the optimal interaction and the important of aromatic ring on the binding affinity.

An attempt to extend the aromatic side chain (Table 4), by increasing the number of carbon atoms either of the alkyl (compounds 42-44) or ether chain (compounds 45-50), had no significant effect on the binding affinity with the enzymes, compared to derivatives having aromatic substituents without any extension as shown in Table 3. Derivatization at 6-position of pyrimidine ring by replacing H atom with either methyl or ethyl group did not improve the binding affinity to wild type enzyme (Table 5), compared to those without 6-alkyl substituent (Table 3). However, in the case of compound 52, small decreases in K_i values were observed (compared to Tmp). These results might be due to steric clash of the larger substituent with the benzyl group resulting in conformational change which affected the binding affinity to the enzyme. Some of these compounds (*i.e.* 51-56) showed better binding affinity, specifically with the mutant enzymes. The results described above implied that the alkyl group at position 6 on pyrimidine ring played a significant role on the binding affinity with mutant enzymes.

In Vitro Antiplasmodial Activity. All compounds were also subjected to *in vitro* malaria screening system against wild type and resistant *Plasmodium falciparum* parasites carrying various mutation enzymes and some of these results are shown in Table 6.

Antiplasmodial activity (IC_{50} values) of compounds described in this study ranged in micromolar regions. Although not as good as predicted according to the enzyme inhibition constants, some exhibited IC_{50} values against both wild type and resistant parasites in low micromolar level (e.g. compounds 37-41). Correlations between antimalarial and inhibitory activities of these analogues are shown in Figure 3, where upon log K_i (of wild type, double, triple and quadruple mutant enzymes) were plotted against their corresponding log IC_{50}. Figures indicated that antimalarial activity of almost all compounds against wild type and resistant strains correlated linearly with the ability of these compounds to inhibit wild type and mutant DHFRs. This implied that the drug target in the cell was the enzyme DHFRs. However, lack of correlation between antimalarial and inhibitory activities of some trimethoprim analogues were also observed. For example, compounds 33-36 showed better K_i values than Tmp for wild type enzyme but exhibited less potency in antimalarial activity against wild type parasite. It has been reported[19] that the ability to penetrate cellular membrane of DHFR inhibitors with various side chain was not equal, thus the lack of correlation between DHFR inhibition and *in vitro* antiplasmodial activity could be attributed to differences in absorption, distribution and metabolism of drugs inside the cells. However, other factors such as secondary effects on other enzymes could not be ruled out.

Toxicity test of these compounds to evaluate the selective inhibition against three mammalian cell lines, African green monkey kidney fibroblast (vero cells), human epidermoid carcinoma (KB) and human breast cancer (BC) (Table 7), showed that the compounds are relatively non-toxic compared to their activity against the malaria parasites.

Molecular Modeling of Binding of Trimethoprim Derivatives with pfDHFR.

In order to understand further the role of hydrophobic and aromatic substituents on the binding affinity, molecular modeling of compound 40 (which showed high binding affinity to both wild type and mutant enzymes) bound with both wild type and quadruple mutant enzymes were studied. Predicted conformations of this compound in the active site pocket of wild type and quadruple mutant DHFRs are shown in Figure 4.

In Figure 4a, the model showed that aromatic substituent of this inhibitor was stacked against the phenyl side chain of Phe116 and formed pi-pi interaction. This interaction would lead to better binding affinity of trimethoprim derivatives having aromatic substituents to both wild type and mutant enzymes than that of the derivatives with alkoxy substituents. The additional three methoxy groups on the benzyl substituent were in van der Waals contact with the amino acid residues, Pro113, Phe116, Cys50 and Met55, near the entrance of the active site. The *p*-methoxy oxygen was positioned 3.27 Å from the side chain of Cys50 and could form H-bonding interaction. Although well-documented hydrogen bonds involving methoxy groups were rare, they were not entirely unknown.[20] Moreover, the propoxy group at 3' position was bound closely to the side chain of Ile112, Val 45and Leu46 with the distances of 3.75 Å, 3.54 Å and 3.55 Å respectively, close enough to be involved in van der Waals interactions. This model supported the experimental data which showed very good binding to both wild type and mutant enzymes. For the quadruple mutant enzyme (Figure 4b), the solved structure[16] showed significant movement of residues 48-51 and 164-166 which opened up the gap between residues 50 and 164 in the active site. Accordingly, the distance between the inhibitor and the nearby amino acid side chains in this mutant enzyme was larger than that observed in wild type enzyme. This leads to the decrease in various interactions, for examples, H-bonding between the side chain of Cys50 and *p*-methoxy oxygen of benzyl substituent, van der Waals interaction of Met55 and methoxy group, favourable stacking between aromatic ring and phenyl side chain of Phe116, and H-bonding between backbone oxygen of Leu164 and 4-amino group of pyrimidine ring, which resulted in the reduction of binding affinity between the inhibitor and the enzyme.

Compounds with 6-alkyl substituents (52-56) showed relatively less decrease in binding affinities with the mutant enzymes, and are therefore of higher potential interest. To study the effect of

alkyl group at 6 position of the pyrimidine ring on the binding affinity, molecular modeling of compound 53 bound to both wild type and quadruple mutant enzymes were therefore performed and results are shown in Figure 5. Due to the steric interaction between alkyl group at 6 position and 5-benzyl group, the conformation of 5-benzyl moiety was adjusted in order to avoid this steric constraint and also the aromatic substituent was repositioned. This phenomenon led to unfavorable stacking interaction between the aromatic substituent and the phenyl side chain of Phe116 of the wild type enzyme, resulting in the reduction of binding affinity of this inhibitor to the enzyme as compared with those without 6-alkyl substituents (compound 30). For quadruple mutant enzyme (Figure 5b), there is relatively more favorable stacking interaction between aromatic substituent and phenyl side chain of Phe116 after the conformation adjustment of 5-benzyl moiety. Moreover, the additional methyl group at position 6 on pyrimidine ring was in van der Waals contact with Leu46 and Met55. All these interactions led to better binding affinity of this inhibitor to the mutant enzymes.

Conclusion. The extension of hydrophobic side chain on 5-benzyl moiety of 5-benzyl-2,4-diaminopyrimidine led to better binding affinity to both wild type and mutant enzymes than that of trimethoprim, especially with benzyloxy substituents which were about 5-30 and 60-200 folds more effective against wild type and mutant enzymes respectively. Some compounds (52-56) showed relatively less decrease in binding affinities with the mutant enzymes, and higher antimalarial activities, and are therefore of higher potential interest. These compounds also exhibited IC_{50} values against wild type and resistant parasites at low micromolar level, which correlated well with their binding affinity. Molecular modeling studies of pfDHFR bound with trimethoprim derivatives bearing aromatic substituents showed the stacking of the aromatic substituent with the phenyl side chain of Phe116. Evidently, this interaction led to better binding affinity to both wild type and mutant enzymes than those derivative bearing alkoxy substituents.

Experimental Section

Methods and Materials

For the synthesis of Tmp analogues, solvents (DMSO, ethanol and dioxane) were dried according to standard methods. Reagents were purchased from Fluka, Merck and Sigma-Aldrich Ltd. and were distilled before use. For enzyme studies, chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Ltd., Merck, and BDH and were used without further purification. Melting points were determined by an Electrothermal 9100 melting point apparatus and were uncorrected. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in DMSO-d_6 and $CDCl_3$ on a Bruker DRX 400 spectrometer; chemical shifts are reported in parts per million (ppm) using TMS (0 ppm) as internal standard. Mass spectra were recorded on a Micromass LCT using electrospray ionization technique. Elemental Analyses were carried out using a Perkin-Elmer Elemental Analyzer 2400.

Chemical Syntheses of Tmp Analogues

Tmp analogues were synthesized by an improved method described in the previous study,[15] as shown in Scheme 1, and results are summarized in Table 1. General procedure for the syntheses of long chain ether substitued benzaldehyde is outlined in Scheme 2.

Preparation of Compound 14

To a suspension of K_2CO_3 (15.2 g, 0.11 mole) in DMF (10mL) was added a solution of 3-substitued-4-hydroxy benzaldehyde (12, 0.1 mole) in DMF (10 mL). After the reaction mixture was heated at 60°C for 30 min the solution of 3-chloro-1-propanol (13, 9.2 g, 0.11 mole) in DMF (5mL) was added dropwise and the mixture was left stirring at 60°C overnight. The mixture was neutralized with diluted aqueous HCl then extracted with CH_2Cl_2, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness under reduced pressure to yield the crude product as a yellow oil. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, 55% EtOAc/45% Hexane as developing solvent) to obtain the desired product as a colorless oil.

4-(3-Hydroxy propoxy) benzaldehyde (14a, R = H) ; Colorless oil (13.7 g, 76%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.02 (2H, quint, J = 6.10 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 3.06 (1H, s, OH), 3.81 (2H, t, J = 6.09 Hz, $HOCH_2CH_2$), 4.13 (2H, t, J = 6.11 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 6.94 (2H, d, J = 8.64 Hz, ArH), 7.74 (2H, d, J = 8.65 Hz, ArH), 9.78 (1H, s, CHO)

3-Methoxy-4-(3-hydroxy propoxy) benzaldehyde (14b, R = OMe) ; Colorless oil (17.0 g, 81%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.15 (2H, tt, J = 6.0, 4.91 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.40 (1H, bs, OH), 3.91 (2H, t, J = 4.91 Hz, $HOCH_2CH_2$), 3.94 (3H, s, OCH_3), 4.30 (2H, t, J = 6.0 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 7.01 (1H, d, J = 8.07 Hz, ArH), 7.43 (1H, s, ArH), 7.47 (1H, d, J = 8.03 Hz, ArH), 9.87 (1H, s, CHO)

3-Ethoxy-4-(3-hydroxy propoxy) benzaldehyde (14c, R = OEt) ; Colorless oil (16.1 g, 72%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.47 (3H, t, J = 6.98 Hz, OCH_2CH_3), 2.14 (2H, quint, J = 5.64 Hz,

$CH_2CH_2CH_2$), 2.730 (1H, t, J = 5.57 Hz, CH_2OH), 3.91 (2H, dt, J = 5.57, 5.64 Hz, $HOCH_2CH_2$), 4.21 (2H, q, J = 6.98 Hz, OCH_2CH_3), 4.29 (2H, t, J = 5.68 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 6.99 (1H, d, J = 8.13 Hz, ArH), 7.40 (1H, d, J = 1.64 Hz, ArH), 7.44 (1H, dd, J = 8.13, 1.66 Hz, ArH), 9.85 (1H, s, CHO)

Preparation of Compound 15

To a solution of compound **14** (0.05 mole) in CH_2Cl_2 (5mL) and Et_3N (9 mL) was added *p*-toluenesulfonylchloride (14.3 g, 0.075 mole) a 0°C and the reaction was continuously stirred for 2 h. After neutralization with diluted aqueous HCl, the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. Purification by column chromatography (silica gel, 25% EtOAc/45% Hexane as eluent) gave compound **15** as a white solid. NMR spectra of compounds **15a–15c** indicated that they were of high purity, therefore compounds **15a–15c** were used in the next step without further purification.

4-[3-(4-Toluenesulfonyl) propoxy] benzaldehyde (15a, R = H) ; White solid (10.4 g, 62%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.17 (2H, quint, J = 5.40 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.37 (3H, s, $ArCH_3$), 4.06 (2H, t, J = 5.39 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 4.26 (2H, t, J = 5.38 Hz, $CH_2CH_2OSO_2$), 6.88 (2H, d, J = 8.34 Hz, ArH), 7.25 (2H, d, J = 7.80 Hz, ArH), 7.76 (2H, d, J = 7.82 Hz, ArH), 7.81 (2H, d, J = 8.33 Hz, ArH), 9.90 (1H, s, CHO)

3-Methoxy-4-[3-(4-toluenesulfonyl) propoxy] benzaldehyde (15b, R = OMe) ; White solid (10.7 g, 59%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.23 (2H, tt, J = 5.87, 5.98 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.38 (3H, s, $ArCH_3$), 3.88 (3H, s, OCH_3), 4.18 (2H, t, J = 5.98 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 4.30 (2H, t, J = 5.87 Hz, $CH_2CH_2OSO_2$), 6.89 (1H, d, J = 8.13 Hz, ArH), 7.25 (2H, d, J = 8.10 Hz, ArH), 7.40 (1H, d, J = 1.31 Hz, ArH), 7.43 (1H, dd, J = 8.10, 1.38 Hz, ArH), 7.77 (2H, d, J = 8.10 Hz, ArH), 9.87(1H, s, CHO)

3-Ethoxy-4-[3-(4-toluenesulfonyl) propoxy] benzaldehyde (15c, R = OEt) ; White solid (12.5 g, 66%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.42 (3H, t ,J = 6.94 Hz, CH_2CH_3), 2.21 (2H, quint, J = 5.90 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.37 (3H, s, CH_3), 4.08 (4H, m, $ArOCH_2CH_2$, $ArOCH_2CH_3$), 4.29 (2H, t, J = 5.93 Hz, $CH_2CH_2OSO_2$), 6.87 (1H, d, J = 8.07 Hz, ArH), 7.23 (2H, d, J = 8.07 Hz, ArH), 7.37 (1H, s, ArH), 7.39 (1H, d, J = 8.05 Hz, ArH), 7.75 (2H, d, J = 8.10 Hz, ArH), 9.85(1H, s, CHO)

Preparation of Compound 17

Compound **17** was prepared from substituted phenol (**16**) and chloropropanol (**13**) according to the procedure described for the synthesis of compound **14** and was purified by column chromatography (silica gel, 60% EtOAc/40% hexane as eluent). Compounds **17a** and **17b** were of high purity (NMR spectra), therefore they were used in the next reaction step without additional purification.

3-Phenoxy-1-propanol (17a, R' = H) ; Colorless oil (10.5 g, 69%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.03 (2H, tt, J = 6.15, 6.20, Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 3.61 (1H, bs, OH), 3.82 (2H, t, J = 6.20 Hz, CH_2CH_2OH), 4.07 (2H, t, J = 6.15 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 6.97 (3H, m, ArH), 7.32 (2H, m, ArH)

3-(2,4,5-Trichlorophenoxy)-1-propanol (17b, R' = 2,4,5-trichloro) ; Colorless oil (18.4 g, 72%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.09 (2H, tt, J = 5.97, 5.78, Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.42 (1H, bs, OH), 3.88 (2H, t, J = 5.78 Hz, CH_2CH_2OH), 4.15 (2H, t, J = 5.97 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 7.0 (1H, d, J = 4.64 Hz, ArH), 7.42 (1H, d, J = 4.64 Hz, ArH)

Preparation of Compound 18

To a suspension of NaH (0.92 g, 21 mmole) in DMF (2 mL) at 0°C was added a solution of alcohol **17** (20 mmole) in DMF (3 mL) and the reaction mixture was left stirring at 0°C for 30 min then the solution of aldehyde **15** (21 mmole) in DMF (5 mL) was added. After continuous stirring at 0°c for 2 h, the reaction mixture was carefully neutralized with diluted aqueous HCl solution, extracted with CH_2Cl_2, dried over $MgSO_4$ and evaporated to dryness. Purification by column chromatography (silica gel, 40% EtOAc/75% hexane as eluent) gave pure compound **18** as a colorless oil.

4-[3-(3-Phenoxy-propoxy)-propoxy] benzaldehyde (18a, R = R' = H) ; Colorless oil (2.4 g, 38%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.08 (4H, m, $2xCH_2CH_2CH_2$), 3.65 (4H, t, J = 6.01 Hz, $2xOCH_2CH_2$), 4.06 (2H, t, J = 6.22 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 4.15 (2H, t, J = 6.29 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 6.89 (2H, d, J = 8.3 Hz, ArH), 6.97 (3H, m, ArH), 7.28 (3H, m, ArH), 7.82 (2H, d, J = 8.4 Hz, ArH), 9.89 (1H, s, CHO)

3-Methoxy-4-[3-(3-phenoxy-propoxy)-propoxy] benzaldehyde (18b, R = OMe, R' = H) ; Colorless oil (2.5 g, 36%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.01 (2H, quint, J = 6.42 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.13 (2H, quint, J = 6.19Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 3.62 (4H, m, $2xOCH_2CH_2$), 3.86 (3H, s, OCH_3), 4.02 (2H, t, J = 6.16 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 4.18 (2H, t, J = 6.43 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 6.91 (3H, m, ArH), 7.25 (3H, m, ArH), 7.37 (2H, m, ArH), 9.81 (1H, s, CHO)

3-Ethoxy-4-[3-(3-phenoxy-propoxy)-propoxy] benzaldehyde (18c, R = OEt, R' = H) ; Colorless oil (3.8 g, 41%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.46 (3H, t, J = 6.89 Hz, CH_2CH_3), 2.04 (2H, quint, J = 6.05 Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.13 (2H, quint, J = 6.07Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 3.64 (4H, m, $2xOCH_2CH_2$), 4.03 (2H, t, J = 6.06 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 4.12 (2H, q, J = 6.90 Hz, OCH_2CH_3), 4.18 (2H, t, J = 6.06 Hz, $ArOCH_2CH_2$), 6.90 (3H, m, ArH), 7.26 (3H, m, ArH), 7.39 (2H, m, ArH), 9.82 (1H, s, CHO)

4-{3-[3-(2,4,5-Trichlorophenoxy)-propoxy]-propoxy} benzaldehyde (18d, R = H, R' = 2,4,6-trichloro) ; Colorless oil (3.9 g, 48%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.08 (4H, m, $2xCH_2CH_2CH_2$), 3.63 (4H, m, $2xOCH_2CH_2$), 4.10 (4H, m, $2xArOCH_2CH_2$), 6.94 (2H, d, J = 8.75 Hz, ArH), 7.27 (1H, s, ArH), 7.39 (1H, s, ArH), 7.80 (2H, d, J = 8.70 Hz, ArH), 9.88 (1H, s, CHO)

3-Methoxy-4-{3-[3-(2,4,5-trichlorophenoxy)-propoxy]-propoxy} benzaldehyde (18e, R = OMe, R' = 2,4,6-trichloro) ; Colorless oil (4.6 g, 51%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.10 (4H, m, 2x $CH_2CH_2CH_2$), 3.65 (4H, m, $2xOCH_2CH_2$), 3.88 (3H, s, OCH_3), 4.14 (4H, m, $ArOCH_2CH_2$), 6.89 (1H, m, ArH), 6.94 (1H, s, ArH), 7.37 (2H, m, ArH), 7.42 (1H, s, ArH), 9.82 (1H, s, CHO)

3-Ethoxy-4-{3-[3-(2,4,5-trichlorophenoxy)-propoxy]-propoxy} benzaldehyde (18f, R = OEt, R' = 2,4,6-trichloro) ; Colorless oil (4.2 g, 45%) : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.46 (3H, t, J = 6.98 Hz, CH_2CH_3), 2.11 (4H, m, 2x$CH_2CH_2CH_2$), 3.66 (4H, m, 2xOCH_2CH_2), 4.06 (2H, t, J = 6.11 Hz, ArOCH_2CH_2), 4.13 (2H, q, J = 6.99 Hz, OCH_2CH_3), 4.18 (2H, t, J = 6.14 Hz, ArOCH_2CH_2), 6.91 (1H, m, ArH), 6.94 (1H, m, ArH), 7.40 (2H, m, ArH), 7.46 (1H, s, ArH), 9.83 (1H, s, CHO)

Enzyme Preparation.

The wild type and mutant pfDHFR enzymes were expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS according to the procedure previously described.[21] After disruption of the bacterial cells by a French Pressure Cell at 18,000 psi, the crude extract in 20 mM potassium phosphate buffer at pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT, 50 mM KCl and 20% v/v glycerol was applied to Methotrexate-Sepharose column, and the pfDHFR was purified according to the procedure described.[15,22]

Enzyme Assays and Inhibition by Antifolates and Derivatives.

The methods used for determination of pfDHFR activities and for the study of inhibition by antifolates and derivatives were described previously.[15,21] Calculation of K_i values was based upon the assumption that the inhibitors compete for substrate binding to the active site of the enzyme.

Parasite Culture and Antimalarial Testing *In Vitro.*

Four *P. falciparum* strains were used in this study. Strains TM4/8.2 (Wild type DHFR) and K1CB1 (C59R+S108N) were generous gifts from S. Thaithong, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University; CsI-2 (C59R+S108N+I164L), from A. Cowman WEHI, Australia, and V1/S (N51I+C59R+S108N+I164L) from D. Kyle through MR4. These parasites were maintained continuously in human erythrocytes at 37 องศาเซลเซียส under 3% CO_2 in RPMI 1640 culture media supplemented with 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.2% $NaHCO_3$, 40 μg/mL gentamicin and 10% human serum.[23] *In vitro* antimalarial activity was determined by using [^{3}H]-hypoxanthine incorporation method [24] as described in detail elsewhere.[15,21]

Cytotoxicity tests of selected analogues against African green monkey kidney fibroblast (Vero cells), human epidermoid carcinoma (KB) cells, and human breast cancer (BC) cells were performed at the Bioassay Research Facility of the BIOTEC Center, NSTDA, according to the protocol described by Skehan et al (1990).[25]

Molecular modeling

Sine the structure of pfDHFRs have already been solved, these enzymes were used for the molecular modeling study. The force field AM1 in the Semi-empirical method of the program Hyperchem 7 was employed and the structure of small molecules (inhibitors) were geometrically optimized to a gradient of 0.001. The inhibitor was modeled as protonated state at N1, as evidence by the NMR studies of both pfDHFR-bound and free states of pyrimethamine, of methotrexate and

trimethoprim.[26,27] The inhibitor was docked into the active site of pfDHFR in which the protonated amino portion was arranged to initially occupy position suitable for interaction with the carboxylate side chain of aspatate 54 (D54). Five thousand steps of minimization on the complex, which included the inhibitor, NADPH, and all protein residues located within 7 Å from the inhibitor, was performed on Silicon Graphic using InsightII program and molecular mechanics (MM2) force field.

Acknowledgement. We thank the Bioassay Research Facility of the BIOTEC Center, NSTDA, for performing cytotoxicity tests. This research was supported by grants to Y.Y. from MMV, TDR, the European Union (INCO-DC-and INCO-DEV), and the Wellcome Trust, grants from Thailand-TDR and Biodiversity Research and Training (BRT) Programs to S.K., from BIOTEC/NSTDA to Y.T., and Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) to C.S.

Supporting Information Available : Additional experimental data (^{1}H NMR) of all compounds not listed in the Experimental Section. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

References.

(1) White, N. J. Drug resistance in Malaria. *Br. Med. Bull.* 1998, *54*, 703-715.

(2) Morel, C. M. Reaching maturity-25 years of the TDR. *Parasitol. Today* 2000, *16*, 503-551.

(3) Cowman, A. F.; Morry, M. J.; Biggs, B. A.; Cross, G. A.; Foote, S. J. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, *85*, 9109-9113.

(4) Peterson, D. S.; Walliker, D.; Wellems, T. E. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, *85*, 9114-9118.

(5) Hyde, J. E. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microb. Inf.* 2002, *4*, 165-174.

(6) Yuthavong, Y. Basis of antifolate action and resistance in malaria. *Microb. Inf.* 2002, *4*, 175-182.

(7) Quaye, I.; Sibley, C. H. Molecular data on *Plasmodium falciparum* chloroquine and antifolate resistance : a public health tool. *Trends Parasitol.* 2002, *18*, 184-186.

(8) Lemcke, T.; Christensen, I. T.; Jorgensen, F. S. Towards an understanding of drug resistance in malaria : Three dimensional structure of *Plasmodium falciparum* by homology building. *Bioorg. Med. Chem.* 1999, *7*, 1003-1010.

(9) Mckie, J. H.; Douglas, K. T.; Chan, C.; Roser, S. A.; Yates, R. et al. Rational drug design approach for overcoming drug resistance : Application to pyrimethamine resistance in malaria. *J. Med. Chem.* 1998, *41*, 1367-1370.

(10) Rastelli, G.; Sirawaraporn, W.; Sompornpisut, P.; Vilaivan, T.; Kamchonwongpaisan, S. et al. Interaction of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase : Structural basis of antifolate resistant. *Bioorg. Mec. Chem.* 2000, *8*, 1117-1128.

(11) Santos-Filho, O. A.; Alencastro, R. B.; Figueroa-Villar, J. D. Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. *Biophy. Chem.* 2001, *91*, 305-317.

(12) Warhurst, D. C. Antimalarial drug discovery : Development of inhibitors of dihydrofolate reductase active in drug resistance. *Drug Discovery Today* 1998, *3*, 538-546.

(13) Canfield, C. J.; Milhous, W. K.; Ager, A. L.; S.N., R.; Sweeney, T. R. et al. PS-15 : a potent, orally active antimalarial from a new class of folic acid antagonists. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993, *49*, 121-126.

(14) Hekmat-Nejad, M.; Rathod, P. K. *Plasmodium falciparum* : Kinetic interactions of WR99210 with pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine resistant dihydrofolate reductase. *Exp. Parasitol.* 1997, *87*, 222-228.

(15) Tarnchompoo, B.; Sirichaiwat, C.; Phupong, W.; Intaraudom, C.; Sirawaraporn, W. et al. Development of 2,4-diaminopyrimidines as antimalarials based on inhibition of the S108N and C59R+S108N mutants of dihydrofolate reductase from pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* 2002, *45*, 1244-1252.

(16) Yuvaniyama, J.; Chitnumsub, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Vanichtanankul, J.; Sirawaraporn, W. et al. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. *Nature Structural Biology* 2003, *10*, 357-365.

(17) Matthews, D. A.; Bolin, J. T.; Burridge, J. M.; Filman, D. T.; Volz, K. M. et al. Refined crystal structures of *Eschrichia coli* and chicken liver dihydrofolate reductase containing bound trimethoprim. *J. Biol. Chem.* 1985, *260*, 381-391.

(18) Matthews, D. A.; Bolin, J. T.; Burridge, J. M.; Filman, D. J.; Volz, K. M. et al. Dihydrofolate reductase : The stereochemistry of inhibitor selectivity. *J. Biol. Chem.* 1985, *260*, 392-399.

(19) Baker, B. K.; Meyer, R. B. Irreversible enzyme inhibitors. CLIV. Some factors in cell wall transport of active-site-directed irreversible inhibitors of dihydrofolic reductase derived from 5-substituted2,4-diaminopyrimidines. *J. Chem. Soc.* 1969, *12*, 668-671.

(20) Domak, M.; Riche, C. Structure cristalline et moleculaire de la polycarpine. *Acta. Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 1977, *33*, 3419-3422.

(21) Yuthavong, Y.; Vilaivan, T.; Chareonsethakul, N.; Kamchonwongpaisan, S.; Sirawaraporn, W. et al. Development of a lead inhibitor for the A16V+S108T mutant of dihydrofolate reductase from the cycloguanil-resistant strain (T9/94) of *Plasmodium falciparum*. *J. Med. Chem.* 2000, *43*, 2738-2744.

(22) Sirawaraporn, W.; Prapunwattana, P.; Sirawaraporn, R.; Yuthavong, Y.; Santi, D. V. The dihydrofolate reductase domain of *Plasmodium falciparum* thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *J. Biol. Chem.* 1993, *29*, 21637-21644.

(23) Trager, N.; Jensen, J. B. Human malarial parasites in continuous culture. *Science* 1976, *193*, 673-675.

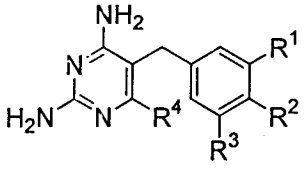
(24) Desjardins, R. E.; J., C. C.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, *16*, 710-718.

(25) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; Mcmahon, J. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1990, *82*, 1107-1112.

(26) Cocco, L.; Groff, J. P.; Temple JR., C.; Montgomery, J. A.; London, R. E. et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of protonation of methotrexate and aminopterin bound to dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 1981, *20*, 3972-3978.

(27) Cocco, L.; Roth, B.; Temple JR., C.; Montgomery, J. A.; London, R. E. et al. Protonated state of methotrexate, trimethoprim and pyrimethamine bound to dihydrofolate reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983, *226*, 567-577.

Table 1 Data of Tmp Analogues



cpd	R^1	R^2	R^3	R^4	yd%	mp (°C)	formula	*m/z* : $[M+1]^+$	anal
19	H	OMe	H	H	68	206.5-207.5	$C_{12}H_{14}N_4O$	231.1221	CHN
20	H	OPr^n	H	H	74	164-165	$C_{14}H_{18}N_4O$	259.1569	CHN
21	H	$OPen^n$	H	H	65	165-166	$C_{16}H_{22}N_4O$	287.1867	CHN
22	H	$OHep^n$	H	H	68	161.5-162.5	$C_{18}H_{26}N_4O$	315.2184	CHN
23	OPr^n	OMe	H	H	63	151-152	$C_{15}H_{20}N_4O_2$	289.1656	HN[b]
24	OBu^n	OMe	H	H	65	153.5-154.5	$C_{16}H_{22}N_4O_2$	303.1826	CH[c]
25	$OPen^n$	OMe	H	H	71	161-162	$C_{17}H_{24}N_4O_2$	317.1980	CHN
26	$OHep^n$	OMe	H	H	77	138.5-139.5	$C_{19}H_{28}N_4O_2$	345.2297	CHN
27	OEt	$OPen^n$	H	H	74	151.5-152	$C_{18}H_{26}N_4O_2$	331.2136	CHN
28	OMe	OEt	H	H	65	194.5-195.5	$C_{14}H_{18}N_4O_2$	275.1520	CHN
29	OMe	OMe	H	H	85	234.5-235	$C_{13}H_{16}N_4O_2$	261.1349	CHN
30[a]	OMe	OCH_2Ph	H	H	84	162.5-163	$C_{19}H_{20}N_4O_2$	337.1672	CHN
31[a]	OEt	OCH_2Ph	H	H	65	173.5-174	$C_{20}H_{22}N_4O_2$	351.1828	CHN
32[a]	OCH_2Ph	OCH_2Ph	H	H	63	137-137.5	$C_{25}H_{24}N_4O_2$	413.1983	CHN
33	H	OCH_2Ph	H	H	67	201.5-202	$C_{18}H_{18}N_4O$	307.1569	CHN

34	OCH_2Ph	H	H	H	76	154-155	$C_{18}H_{18}N_4O$	307.1562	CHN
35	OPh	H	H	H	79	202-203	$C_{17}H_{16}N_4O$	293.1408	CHN
36	OCH_2Ph	OMe	H	H	89	214.5-215.5	$C_{19}H_{20}N_4O_2$	337.1665	CHN
37 [a]	H	OCH_2-[3,4,5-$(OMe)_3$]Ph	H	H	89	174-174.5	$C_{21}H_{24}N_4O_4$	397.1905	CHN
38 [a]	OMe	OCH_2-[3,4,5-$(OMe)_3$]Ph	H	H	90	155.5-156	$C_{22}H_{26}N_4O_5$	427.1985	CHN
39	OEt	OCH_2-[3,4,5-$(OMe)_3$]Ph	H	H	83	153-154	$C_{23}H_{28}N_4O_5$	441.2133	CHN
40	OPr^n	OCH_2-[3,4,5-$(OMe)_3$]Ph	H	H	65	143.5-144.5	$C_{24}H_{30}N_4O_5$	455.2296	CHN
41	OBu^n	OCH_2-[3,4,5-$(OMe)_3$]Ph	H	H	87	154.5-155.5	$C_{25}H_{32}N_4O_5$	469.2447	CHN
42	H	OC_3H_6Ph	H	H	85	167-168	$C_{23}H_{28}N_4O_5$	335.1870	CHN
43 [a]	OMe	OC_3H_6Ph	H	H	80	134.5-135.5	$C_{21}H_{24}N_4O_2$	365.1975	CHN
44	OEt	OC_3H_6Ph	H	H	87	137-138	$C_{22}H_{26}N_4O_2$	379.2135	CHN
45	H	OC_3H_6OPh	H	H	83	151.5-152	$C_{20}H_{22}N_4O_2$	351.1823	CHN
46	OMe	OC_3H_6OPh	H	H	77	154-154.5	$C_{21}H_{24}N_4O_3$	381.1931	CHN
47	OEt	OC_3H_6OPh	H	H	84	141.5-142	$C_{22}H_{26}N_4O_3$	395.2084	CHN
48	H	$OC_3H_6OC_3H_6OPh$	H	H	66	108.5-109	$C_{23}H_{28}N_4O_3$	409.2240	CH [d]
49	OMe	$OC_3H_6OC_3H_6OPh$	H	H	65	131.2-131.8	$C_{24}H_{30}N_4O_4$	439.2345	CHN
50	OEt	$OC_3H_6OC_3H_6OPh$	H	H	68	147.5-148	$C_{25}H_{32}N_4O_4$	453.2506	CHN
51	OMe	OMe	OMe	Me	89	193-194	$C_{15}H_{20}N_4O_3$	305.1612	CHN
52	OMe	OMe	OMe	Et	90	218.219	$C_{16}H_{22}N_4O_3$	319.1769	CHN
53	OMe	OCH_2Ph	H	Me	91	180-181	$C_{20}H_{22}N_4O_2$	351.1816	HN [e]
54	OMe	OCH_2Ph	H	Et	87	176-177	$C_{21}H_{24}N_4O_2$	365.1970	CHN

55 [a]	OCH_2Ph	OCH_2Ph	H	Me	92	153-153.5	$C_{26}H_{26}N_4O_2$	427.2130	CHN
56 [a]	OCH_2Ph	OCH_2Ph	H	Et	91	114.5-115	$C_{27}H_{28}N_4O_2$	441.2290	CHN
57	OPr^n	OCH_2-[3,4,5-$(OMe)_3$]Ph	H	Et	89	161-162	$C_{26}H_{34}N_4O_5$	483.2650	HN[f]

[a] *Data from ref. 13.* [b] *C calcd, 62.46; found, 61.76.* [c] *N calcd, 18.54; found, 19.20.* [d] *N calcd, 13.72; found, 14.59.* [e] *C calcd, 68.55; found, 67.82.* [f] *C calcd, 64.69; found, 63.85.*

Table 2 K_i values of trimethoprim derivatives with various long alkoxy chain substituents

Cpd	K_i wt(nM)	Rel to Tmp	K_iC59RS108N(nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp	K_i N51I C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp
Tmp	10.3±0.5	1.0	242.1±40.1	1.0	5688.7±557.1	1.0	6664.5±1516.3	1.0
19	23.5±8.0	2.3	464.1±59.1	1.9	3957.8±1358.4	0.7	20491.0±5209.4	3.1
20	15.1±1.5	1.5	211.5±31.5	0.9	1091.3±171.0	0.2	1518.0±268.2	0.2
21	8.6±0.6	0.8	137.3±18.5	0.6	539.5±103.3	0.1	914.6±147.4	0.1
22	17.8±0.5	1.7	196.3±25.1	0.8	2208.4±229.0	0.4	1380.0±190.8	0.2
23	1.8±0.1	0.2	52.1±10.0	0.2	144.4±22.2	0.03	919.6±176.8	0.1
24	2.5±0.2	0.2	194.1±24.9	0.8	771.8±106.9	0.1	1033.3±48.3	0.2
25	2.2±0.2	0.2	134.5±18.5	0.5	252.6±1.0	0.04	444.2±71.9	0.1
26	3.1±0.1	0.3	103.5±8.2	0.4	292.4±64.4	0.05	445.1±67.2	0.1
27	1.6±0.3	0.1	46.6±5.7	0.2	1162.5±638.1	0.2	901.7±225.5	0.1
28	15.4±0.8	1.5	187.4±20.6	0.8	3541.8±1788.8	0.6	11817.9±950.6	1.8

29	11.5±0.6	1.1	234.8±32.6	1.0	2646.8±460.3	0.5	13858.0 ±970.7	2.1

Table 3 K_i values of trimethoprim derivatives with various aromatic substituents

Cpd	K_i wt(nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108N (nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp	K_i N51I C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp
30	2.2±0.5	0.2	60.7±8.7	0.3	1974.1±123.3	0.4	1375.7±223.4	0.21
31	0.8±0.3	0.09	9.7±1.4	0.04	570.3±70.1	0.1	431.4±112.4	0.06
32	1.7±0.2	0.2	60.2±2.6	0.2	491.2±56.0	0.09	2454. ±257.1	0.4
33	6.5±0.5	0.6	101.0±22.8	0.4	994.0±289.2	0.2	4636.7±730.8	0.7
34	6.3±0.6	0.6	113.5±17.6	0.9	515.4±127.8	0.09	455.5±124.8	0.07
35	5.3±0.5	0.5	81.7±16.9	0.3	161.2±16.2	0.03	671.4±281.9	0.1
36	7.2±0.9	0.7	143.4±17.8	0.6	629.8±56.9	0.11	1129.6±55.7	0.2
37	1.3±0.2	0.1	5.2±0.3	0.02	511.9±62.9	0.09	76.5±20.2	0.01
38	0.6±0.0	0.06	8.7±1.0	0.04	47.6±5.4	0.01	124.0±12.9	0.02
39	0.3±0.0	0.03	2.2±0.1	0.009	24.7±2.6	0.004	119.3±22.5	0.02
40	0.4±0.2	0.04	3.5±0.8	0.001	88.6±6.2	0.02	35.8±3.6	0.005
41	0.4±0.2	0.04	5.6±0.4	0.02	105.6±8.4	0.02	258.6±39.3	0.04

Table 4 K_i values of trimethoprim derivatives with various long chain aromatic and ether substituents

Cpd	K_i wt(nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108N (nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp	K_i N51I C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp
42	5.9±1.1	0.57	58.1±17.0	0.44	3044.8±595.7	0.54	801.4±210.4	0.12
43	1.8±0.4	0.17	44.2±2.7	0.33	3100.2±456.9	0.54	1122.8±644.8	0.17
44	1.0±0.3	0.10	10.6±1.2	0.08	374.1±21.8	0.06	525.3±148.3	0.08
45	6.5±1.5	0.63	169.9±11.4	0.70	470.6±28.4	0.08	2261.0	0.34
46	2.0 ±0.6	0.19	37.1±0.8	0.15	256.9±30.6	0.05	605.8±38.1	0.09
47	0.6±0.2	0.06	47.7±6.5	0.2	166.4±7.1	0.03	770.1	0.12
48	7.0±0.5	0.68	107.7±11.6	0.45	263.6±16.0	0.05	1589.0±33.5	0.24
49	1.8±0.3	0.18	153.5±22.9	0.63	424.8±21.9	0.07	2191.7	0.33
50	2.3±0.4	0.22	46.9±2.2	0.19	313.7±68.8	0.06	937.4±49.9	0.14

Table 5 K_i values of trimethoprim derivatives with various 6-alkyl substituents

Cpd	K_i wt(nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108N (nM)	Rel to Tmp	K_i C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp	K_i N51I C59RS108NI164L (nM)	Rel to Tmp
51	38.2±3.1	3.7	520.3±122.8	2.2	1364.3±132.1	0.24	1634.3±362.6	0.25
52	4.3±0.6	0.4	116.4±25.9	0.5	466.8±37.7	0.08	697.6±41.1	0.11
53	3.4±0.5	0.3	89.5±12.7	0.4	66.3±14.9	0.01	93.4±2.6	0.01
54	3.5±0.5	0.3	60.1±8.1	0.25	3737.7±1497.3	0.66	732.5±98.1	0.11
55	8.6±0.4	0.8	80.0±10.3	0.3	174.6±24.1	0.03	241.0±36.6	0.04
56	3.7±0.9	0.4	99.1±17.2	0.4	273.4±24.7	0.05	204.7±42.5	0.03
57	1.8±1.0	0.17	48.7±6.95	0.20	154.2±42.0	0.03	693.1±125.6	0.1

Table 6 Antimalarial activity of some of trimethoprim derivatives, IC_{50} (□M)

Cpd	TM4/8.2[a]	Rel to Tmp	K1CB1[b]	Rel to Tmp	Csl-2[c]	Rel to Tmp	VI/S[d]	Rel to Tmp
30	4.66±1.71	0.70	>100[e]	>0.73	25.61±1.26	0.21	38.02±1.69	<0.19
31	0.47±0.10	0.07	16.59±1.85	0.12	14.36±2.90	0.12	16.47±4.63	<0.08
32	3.12±0.56	0.47	14.58±2.33	0.11	6.75±4.28	0.06	8.13±1.53	<0.04
33	15.15±5.10	2.27	17.14±6.56	0.13	15.26±2.35	0.13	21.49±2.25	<0.11
34	15.22±5.42	2.28	3.52±0.82	0.03	3.33±0.19	0.03	12.75±3.18	<0.06
35	19.08±5.98	2.86	3.69±0.51	0.03	3.517±1.01	0.03	29.61±20.21	<0.15
36	17.48±0.74	2.62	3.83±0.45	0.03	5.73±1.94	0.05	>50[e]	0.25
37	0.68±0.21	0.10	19.88±3.79	0.15	19.85±7.49	0.17	21.12±0.09	<0.11
38	0.31±0.06	0.05	27.76±10.63	0.13	30.58±7.47	0.26	26.08±2.30	<0.13
39	0.07±0.02	0.01	5.01±1.53	0.04	13.15±0.73	0.11	19.45±0.19	<0.10
40	0.15±0.05	0.02	4.29±0.96	0.03	7.70±4.34	0.06	9.75±0.92	<0.05
41	0.33±0.06	0.05	10.16±4.23	0.07	3.40±0.33	0.03	15.91±5.68	<0.13
51	22.73±2.77	3.41	>100[e]	>0.73	90.81±2.28	0.76	>100[e]	0.5
52	2.40±0.67	0.36	>50[e]	>0.37	>50[e]	>0.42	>50[e]	0.25
53	6.84±1.36	1.03	25.24±7.02	0.18	2.85±0.40	0.02	4.82±1.87	<0.02
54	5.06±1.45	0.76	16.26±3.71	0.12	5.37±1.78	0.05	11.30±0.82	<0.06
55	4.48±0.29	0.67	4.38±1.69	0.03	2.64±0.91	0.02	3.11±0.30	<0.02
56	3.57±0.52	0.54	4.18±1.47	0.03	3.46±0.51	0.03	3.02±0.29	<0.02

[a] parasite strain with wild type DHFR, [b] parasite strain with double mutation (C59R+S108N) DHFR, [c] parasite strain with triple mutation (C59R+S108N+I164L) DHFR, [d] parasite strain with quadruple mutation (N51I+C59R+S108N+I164L) DHFR, [e] maximun concentration which the inhibitor could be dissolved in DMSO.

Table 7 Cytotoxicity of Tmp Analogues to Mammalian Cells

Cpd	vero cells (μM)	KB cells (μM)	BC cells (μM)
Tmp[a]	>50	>250	>250
19	>50	>50	>50
20	>50	>50	>50
21	>50	>50	>50
22	>50	>50	>50
23	>50	>50	>50
24	>50	>50	>50
25	>50	>50	>50
26	>50	>50	>50
27	43	>50	39
28	>50	>50	>50
29	>50	>50	>50
30	>50	>50	>50
31[a]	>250	47	100
32	>50	>50	33
33	>50	>50	>50
34	>50	>50	>50
35	38	>50	>50
36	>50	>50	>50
37[a]	>250	>250	>250
38	>50	>50	>50
39[a]	34	102	139
40[a]	13	108	56
41[a]	>50	>50	16
42	>50	37	>50
43[a]	200	72	32
44	>50	>50	>50
45	>50	>50	>50
46	45	26	26
47	>50	>50	>50
48	37	>50	>50
49	>50	>50	>50

50	>50	>50	>50
51	32	>50	>50
52	46	>50	>50
53	>50	>50	>50
54	>50	>50	>50
55	>50	>50	>50
56	>50	>50	>50
57	>50	>50	>50

[a] Data from Ref. 13.

Figure legends

Figure 1 A predicted conformation of Tmp in the binding pocket of wild type *P. falciparum* DHFR : (a) Showing overall folding of the enzyme; (b) Showing the conformation of Tmp with NADPH; (c) Superimposition of Tmp(red) and WR99210(green).

Figure 2 Tmp in the binding pocket of pfDHFRs with selected amino acid residues : (a) wild type; (b) quladruple mutant.

Figure 3 Correlation between : (a) logK_i wt and IC_{50} TM4/8.2; (b) logK_i C59RS108N and IC_{50} K1CB1; (c) logK_i C59RS108NI164L and IC_{50} CsI-2 ; (d) logK_i N51IC59RS108NI164L and IC_{50} VI/S.

Figure 4 Compound **40** in the binding pocket of pfDHFR with selected amino acid residues : (a) wild type; (b) quadruple mutant.

Figure 5 Compound **53** in the binding pocket of pfDHFR with selected amino acid residues : (a) wild type; (b) quadruple mutant.

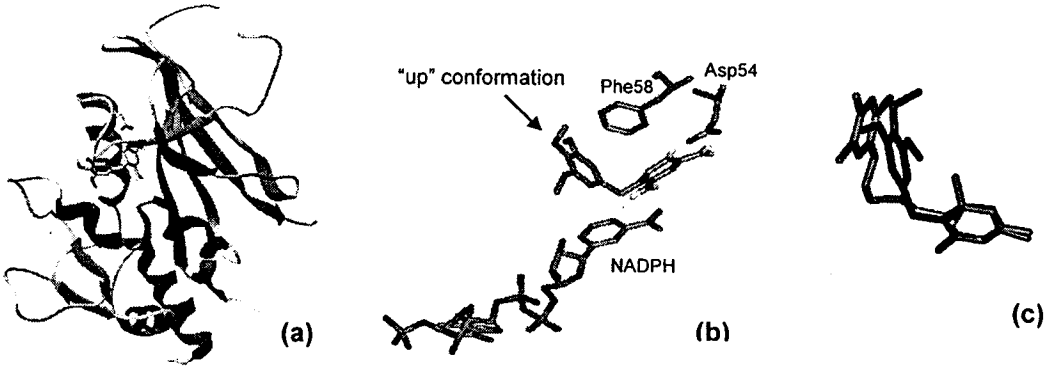


Figure 1 A predicted conformation of Tmp in the binding pocket of wild type *P. falciparum* DHFR : (a) Showing overall folding of the enzyme; (b) Showing the conformation of Tmp with NADPH; (c) Superimposition of Tmp(red) and WR99210(green).

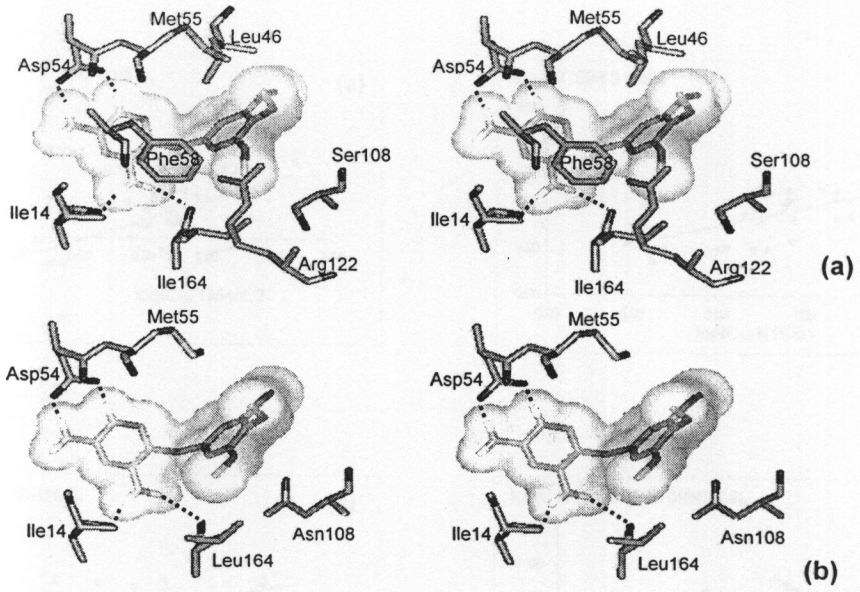


Figure 2 Tmp in the binding pocket of pfDHFRs with selected amino acid residues : (a) wild type; (b) quadruple mutant.

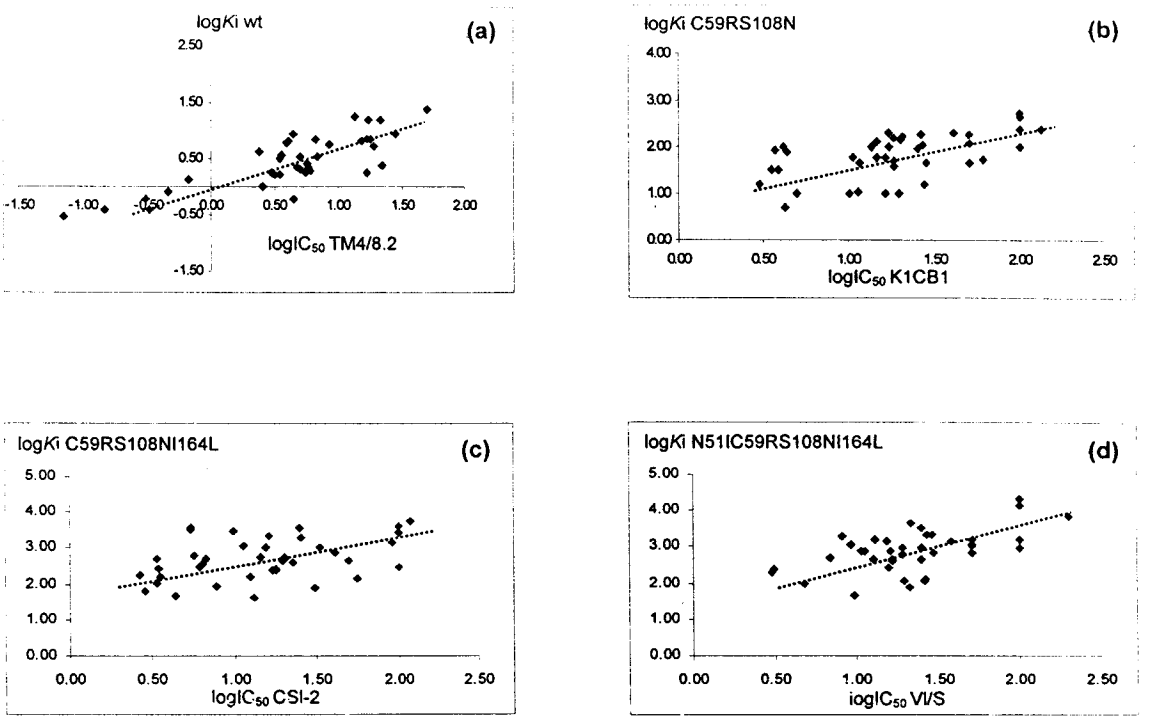


Figure 3 Correlation between : (a) logK_i wt and IC_{50} TM4/8.2; (b) logK_i C59RS108N and IC_{50} K1CB1; (c) logK_i C59RS108NI164L and IC_{50} CsI-2 ; (d) logK_i N51IC59RS108NI164L and IC_{50} VI/S.

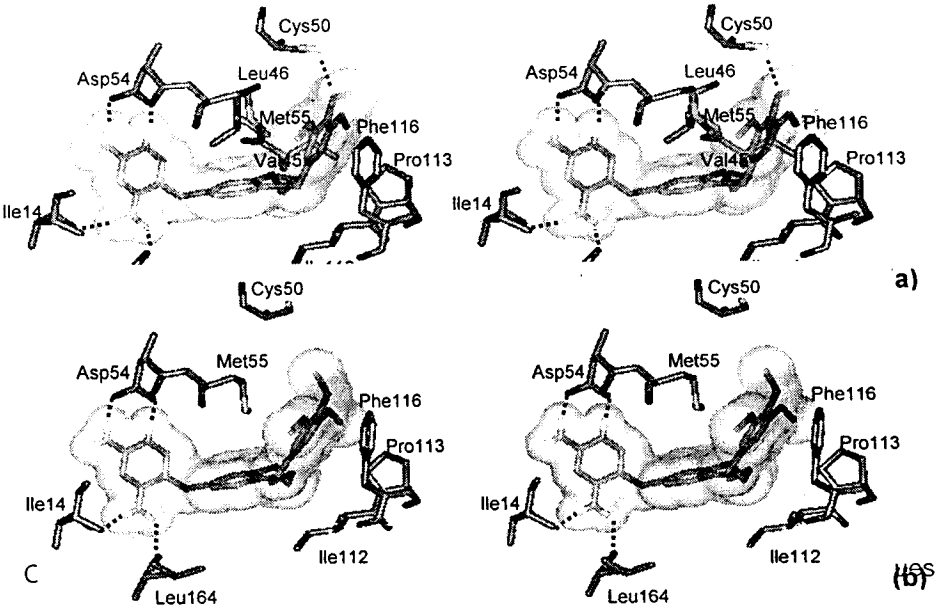


Figure 4 C HSS : (a) wild type; (b) quadruple mutant.

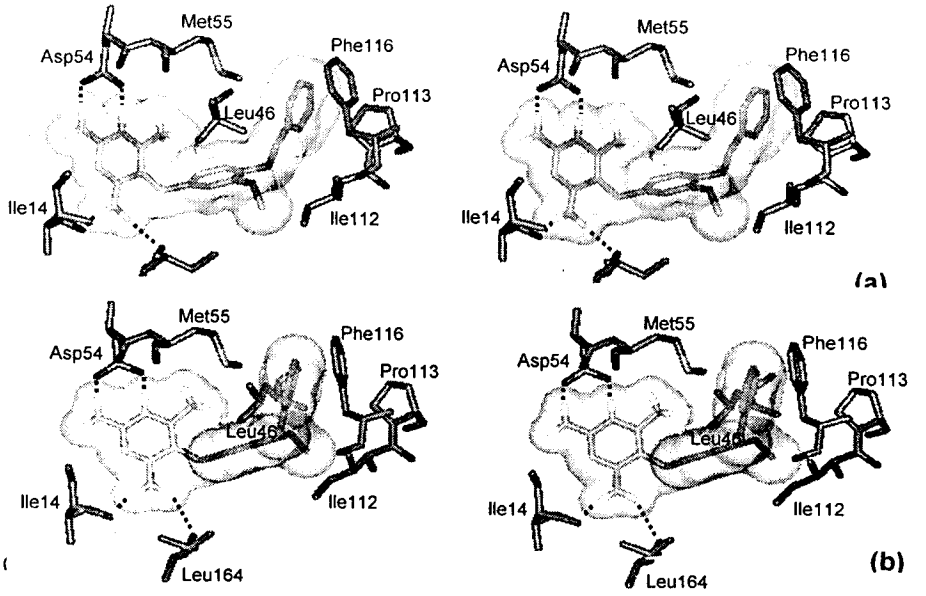
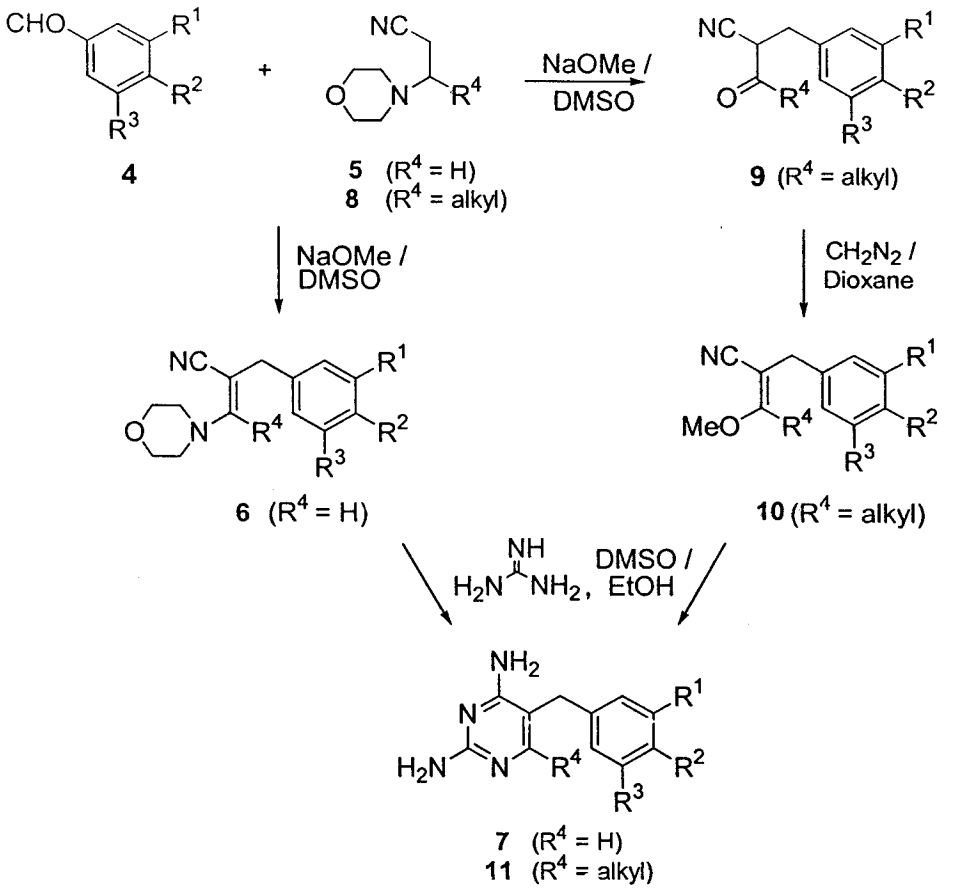
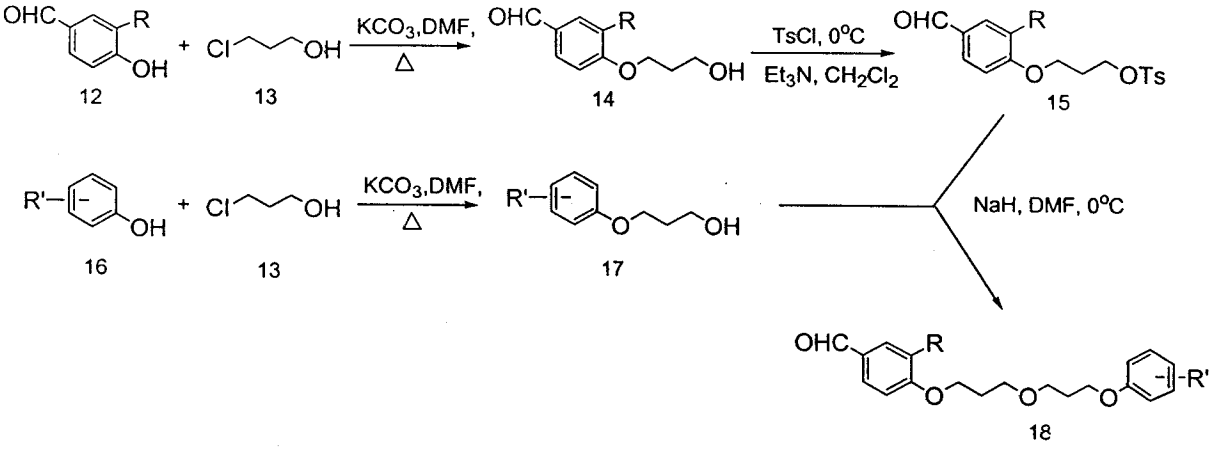


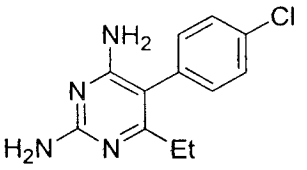
Figure 5 (residues : (a) wild type; (b) quadruple mutant.

Scheme 1

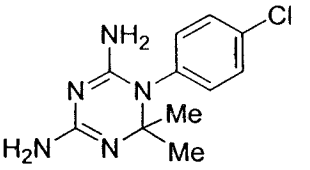

CHO
R1
R2
R3
4
+
NC
O
N
R4
5 (R4 = H)
8 (R4 = alkyl)
NaOMe /
DMSO
NC
O
R4
R1
R2
R3
9 (R4 = alkyl)
NaOMe /
DMSO
CH2N2 /
Dioxane
NC
O
N
R4
R1
R2
R3
6 (R4 = H)
NC
MeO
R4
R1
R2
R3
10 (R4 = alkyl)
NH
H2N
NH2,
DMSO /
EtOH
NH2
N
H2N
N
R4
R1
R2
R3
7 (R4 = H)
11 (R4 = alkyl)

Scheme 2

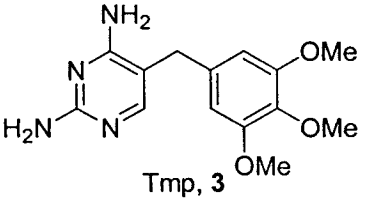

OHC
R
OH
12
Cl
OH
13
KCO3,DMF,
Δ
14
TsCl, 0°C
Et3N, CH2Cl2
OTs
15
R'
16
17
NaH, DMF, 0°C
18



Pyr, **1**



Cyc, **2**



Tmp, **3**

ภาคผนวก ก.

องค์ประกอบของอาหารแบบต่างๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ แยกตามชนิดของอาหาร

1. Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato, infusion	200.00	g
Glucose	20.00	g
D.W.	1000	ml

2. M102 Medium

Sucrose	30.00	g
Malt Extract	20.00	g
Bacto-peptone	2.00	g
Yeast Extract	1.00	g
KCl	0.50	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.50	g
KH_2PO_4	0.50	g
D.W.	1000	ml

3. Peptone Yeast Glucose Medium (PYGM)

Bacteriological Peptone	5.00	g
Yeast Extract	20.00	g
Glucose	10.00	g
KH_2PO_4	1.00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.50	g
D.W.	1000	ml

4. Minimum Salt Medium (MM)

NH_4NO_3	3.00	g
Glucose	20.00	g
KH_2PO_4	0.50	g
NaH_2PO_4	0.50	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.50	g
$CaCl_2$	0.50	g
Yeast Extract	1.00	g
D.W.	1000	ml

5. Sabouraud's Dextrose Broth (SDB)

Peptone	15.00	g
Glucose	20.00	g
D.W.	1000	ml

6. Bacto-Malt Extract Broth (MEB)

Malt Extract	6.00	g
Maltose	1.80	g
Dextrose	6.00	g
Yeast Extract	1.20	g
D.W.	1000	ml

7. YES (Yeast Extract Sucrose)

Yeast Extract	20.00	g
Sucrose	50.00	g
DW	1000	ml

8. Czapex dox medium

$NaNO_3$	3.00	g
K_2HPO_4	1.00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.50	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	g
KCl	0.50	g
Sucrose	30.00	g
DW	1000	ml

9. Bio 19 (Walcsman media) pH =7.0

Glucose	20.00	g
Peptone	5.00	g
Dry yeast	3.00	g
Meat extract	5.00	g
NaCl	5.00	g
$CaCO_3$	3.00	g
DW	1000	ml

10. Bio 20 (Starch-yeast extract media) pH =7.0

Starch	24.00	g
Glucose	1.00	g
Peptone	3.00	g
Yeast extract	5.00	g
Meat extract	3.00	g
$CaCO_3$	4.00	g
DW	1000	ml

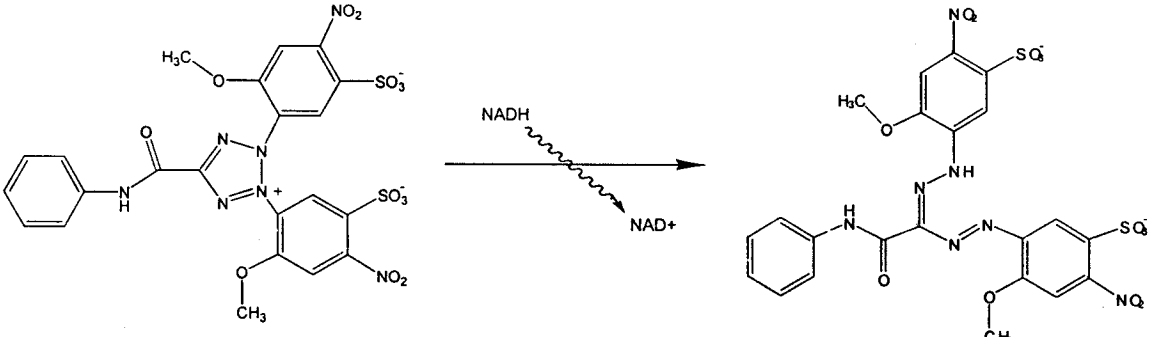
11. Bio 21 (Inorganic salts-starch media) pH =7.2

Starch soluble		10.00	g
K_2HPO_4	1.00	g	
$MgSO_4.7H_2O$		1.00	g
$(NH4)_2SO_4$		2.00	g
NaCl		1.00	g
$CaCO_3$		2.00	g
DW		1000	ml

ภาคผนวก ข.

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal assay)

จะใช้วิธี soluble formazan assay ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจสอบหาปริมาณเซลล์เชื้อราที่มีชีวิตอยู่ โดยวิธีนี้จะใช้ 96-well microculture plate ซึ่งจะสามารถตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารได้ครั้งละหลายตัวอย่าง วิธีนี้จะเป็นการตรวจสอบหาเซลล์ที่ยังมีชีวิตซึ่งสามารถเปลี่ยนสาร XTT (tetrazolium reagent) ให้เป็นสาร formazan ที่มีสี (1) ดังแสดงในแผนภาพข้างล่างนี้ เซลล์ที่ไม่ตายจะทำให้เกิดสี ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



XTT tetrazolium (colorless)

XTT formazan (orange)

หมายเหตุ : XTT = 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonylphenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใส่สารที่ต้องการทดสอบ แล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง แล้ว ใส่สารละลายผสมของ XTT ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 0.025 mM *N*-methylphenazolium methosulfate (PMS) ปริมาณ 50 µl แล้ว incubate ต่อ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ใช้ Amphoteracin B เป็นตัวควบคุมผลบวกและ DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Anticancer assay)

จะใช้ colorimetric method ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งอาศัยหลักการวัดเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตเหลืออยู่ในสภาวะที่มีสารตัวอย่างโดยการย้อมสีผนังเมมเบรนของเซลล์แล้ววัดการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง (2) เพื่อศึกษาผลของสารตัวอย่างต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยมีวิธีและหลักการทั่วไปดังนี้

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาคือ KB (epithelial carcinoma of oral cavity) และ BC (breast cancer)

ทดสอบฤทธิ์โดยผสมเซลล์มะเร็ง (1 x 10^5 cells/ml) และสารที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) ให้มีความเข้มข้นของสารต่างๆกัน (two-fold dilution) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ใน Microplate แล้ว incubate ใน CO_2 incubator 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเติม 50% Trichloroacetic acid (TCA) ที่แช่เย็น แช่ Microplate ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงย้อมด้วย 0.05% sulforhodamine B ใน 1% acetic acid ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วย 1% acetic acid 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากเติม 10 mM Tris-base pH 10 แล้ว นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

ด้วยเครื่อง ELISA Microplate Reader คำนวณผลและสรุปฤทธิ์ของสารโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากหลุมที่มีสารกับหลุมควบคุมซึ่งไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ โดยการทดลองทุกครั้งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ทุกการทดลองจะใช้ ellipticine และ doxorubicin เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริม (Anti-HSV-1 assay)

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารต่อเชื้อ HSV-1 จะใช้ colorimetric method (2) ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสอาศัยหลักการวัดเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตเหลืออยู่ในสภาวะที่มีไวรัสและสารตัวอย่างโดยการย้อมสีผนังเมมเบรนของเซลล์แล้ววัดการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีสารตัวอย่างแต่มีไวรัสอยู่ เพื่อศึกษาผลของสารตัวอย่างต่อ viral infection โดยมีวิธีและหลักการทั่วไปดังนี้

ไวรัสที่ใช้ในการศึกษาคือ HSV-1 (KOS strain); เซลล์ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อไวรัสคือ Vero cell line (African green monkey kidney cell line) ซึ่งเลี้ยงใน Eagle's minimum essential medium (MEM) ที่เติม heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 10% และ antibiotics

ทดสอบฤทธิ์โดยผสมไวรัสในปริมาณ 30 PFU และสารที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้มีความเข้มข้นของสารต่างๆกัน (two-fold dilution) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เพื่อใช้เลี้ยงเซลล์ Vero ใน Microplate แล้ว incubate ใน CO_2 incubator 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วเติม 50% Trichloroacetic acid (TCA) ที่แช่เย็น แช่ Microplate ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงย้อมด้วย 0.05% sulforhodamine B ใน 1% acetic acid ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วย 1% acetic acid 4 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วเติม 10 mM Tris-base pH 10 อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Microplate Reader แล้วคำนวณผลและสรุปฤทธิ์ของสารโดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากหลุมที่มีสารกับหลุมควบคุมซึ่งไม่มีสารตัวอย่าง โดยการทดลองทุกครั้งค่าที่ได้จะเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และทุกการทดลองจะใช้ acyclovir เป็นตัวควบคุมผลบวก และ DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ

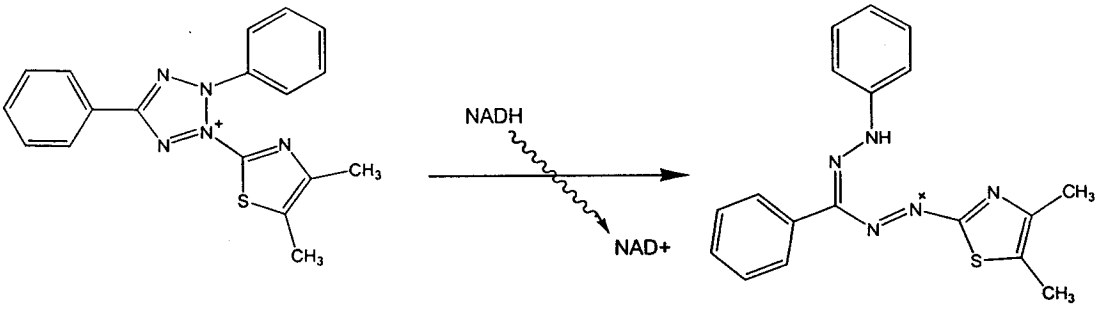
นอกจากนี้ยังตรวจสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารต่อ host cell โดยทำการทดลองดังวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้นแต่ใช้ host cell ที่ไม่มีการ infect ด้วยเชื้อไวรัส

เอกสารอ้างอิง

1. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Research 48: 4827-4833; 1988
2. Skehan P, Storeng R, Scudiero D *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of Natural Cancer Institute 82: 1107-1102; 1990
3. Stebbins J and Debouch C. A microtiter colorimetric assay for the HIV-1 protease. Analytical Biochemistry 248: 246-250; 1997

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง NCI-H187 (Anticancer assay)

เซลล์มะเร็ง NCI-H187 (Human small cell lung carcinoma) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติไม่ยึดเกาะกับภาชนะ (nonadherent cell line) การตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านมะเร็งทำได้โดยการตรวจสอบหาเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เมื่อได้รับสารตัวอย่างโดยใช้วิธี formazan assay ซึ่งเซลล์จะสามารถเปลี่ยนสาร MTT (tetrazolium reagent) ให้เป็นสาร formazan ที่มีสี โดยใช้เอนไซม์ mitrochondrial dehydrogenases ดังแสดงในแผนภาพข้างล่างนี้ เซลล์ที่ไม่ตายจะทำให้เกิดผลึก formazan ที่มีสี ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร



MTT tetrazolium (yellow)

MTT formazan (purple)

Note: MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

การทดสอบจะทำในถาดหลุม 96-well microculture plate ซึ่งจะสามารถตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารตัวอย่างได้ครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่าง วิธีการตรวจสอบเริ่มด้วยการเลี้ยงเซลล์ NCI-H187 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% Fetal calf serum แล้วใส่สารที่ต้องการทดสอบลงไป จากนั้นนำไป incubate ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วัน จึงเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาณ 50 µl ลงไป หุ้ม foil แล้ว incubate ต่ออีก 4 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 200 x g 5 นาที แล้วดูดสารละลาย MTT ออก จากนั้นละลายผลึก formazan ด้วย 100% DMSO ปริมาณ 200 µl และ Sorensen' glycine buffer ปริมาณ 25 µl แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ใช้ Ellipticine เป็นตัวควบคุมผลบวก และ 10% DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640 + 10% Fetal calf serum) เป็น Blank เพื่อเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

การทดสอบหาสาร anti-Mycobacterium tubercuosuis **โดยวิธี** Microplate Alamar Blue Assay (MABA) (1)

ในจานเลี้ยงแบบ 96 หลุม เติมน้ำกลั่นที่ sterile ในแถวรอบนอกของจานเพื่อกันการระเหยของหลุมทดสอบภายในสารที่จะทดสอบซึ่งอยู่ในน้ำที่ sterile หรืออยู่ใน DMSO จะถูกผสมกับ Middlebrook 7H9 media ซึ่งมี 0.2% v/v glycerol และ 1.0 g/l casitone (7H9GC) จากนั้นทำ twofold dilutions ไปยังหลุมข้างๆ โดยผสมกับ 0.1 ml ของ 7H9GC

จากนั้นนำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เตรียมและแช่แข็งไว้มาเจือจาง 1:1000 ใน 7H9GC แล้วเติม 0.1 ml ลงในแต่ละหลุมทำให้มี bacteria $5x10^4$ CFU/ml บาง หลุมจะมีแต่สารที่จะทดสอบโดยที่ไม่มีเชื้อ

M. tuberculosis เพื่อทดสอบว่าสารสามารถเปลี่ยนสี Alamar blue ได้หรือไม่ ส่วนในหลุมควบคุม B จะมีแต่ bacteria เท่านั้น และในหลุมควบคุม M จะมีแต่ media เท่านั้น จากนั้นเก็บจานไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จนถึงวันที่ 6 จึงเติม 20 µl of Alamar Blue solution และ 12.5 µl ของ 20% Tween 80 และเก็บไว้ที่ 37องศาเซลเซียส อีก 24 ชม. เพื่อดูการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นสีชมพู การหาค่า MIC ของสารกำหนดได้จาก ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารที่จะป้องกันการเปลี่ยนสีได้ โดยที่ทดสอบกับยาเพื่อใช้ควบคุมผลการ screening ทุกครั้ง ยาที่ใช้คือ Rifampin, Isoniazid และ Kanamycin

เอกสารอ้างอิง

1. Collins K and Franzblau SG. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997;41;1004-1009

การตรวจกรองสารต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ในจานทดลอง

<u>การเลี้ยงเชื้อมาเลเรีย *Plasmodium falciparum*</u>

การเพาะเลี้ยงเชื้อมาเลเรียในเม็ดโลหิตแดงของมนุษย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล ใน 3% CO_2 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มี 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.2% $NaHCO_3$, 40 µg/ml gentamicin และ 10% serum โดยต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน และเฝ้าคอยสังเกตเปอร์เซ็นต์ของเชื้อปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ (เอกสารอ้างอิง 1)

การตรวจกรองสารต้านเชื้อมาลาเรีย

นำสารสกัดได้จากพืชหรือจุลินทรีย์มาละลายด้วย 100% DMSO ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (เช่น 20 มก/มล) และเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อตามความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี serum และควบคุมปริมาณ DMSO นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 25 µl ลง 96-well plate และเติมเชื้อ P. falciparum 200 µl ในแต่ละหลุม (1%parasite, 1.5%cell suspension, 0.1%DMSO) จากนั้นบ่มเชื้อที่ 37องศาเซลเซียล ในตู้บ่มเชื้อซึ่งมี 3% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการอยู่รอดของเชื้อโดยวิธี LDH assay (สำหรับ pre-screening ใช้กับตัวอย่างที่ได้จากเชื้อราของ lab Fermentation Technology เป็นส่วนใหญ่) หรือวิธี ^{3}H-hypoxanthine (เพื่อได้ค่า IC_{50} ที่ใช้เปรียบเทียบผลในระดับสากล) ดังนี้

ก. วิธีวัดเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (pfLDH assay) (เอกสารอ้างอิง 2-3)

หลังจากบ่มยากับเชื้อมาลาเรียในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารผสมดังกล่าวมา 20 µl ย้ายลง 96 well plate แล้วเติมสารละลาย LDH assay 120 µl (20 mM Tris pH9.2, 100 mM lactate, 0.5 mM APAD, 0.05% TritonX-100, 21 µM PES และ 170 µM NBT) และนำไปเก็บไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 5% acetic acid 100 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปแปลผล OD_{650} โดยใช้เครื่อง Microplate reader โดยมี pfLDH activity ของเซลเม็ดเลือดแดงหรือ 0% parasitemia เป็น Blank และตัว parasite ที่ไม่มีตัวยา

เป็นตัวควบคุม (100% pfLDH activity) การคำนวณหาค่า pfLDH activity สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\% \text{ LDH activity of treated parasite} = 100 \times (OD_a - OD_b)/OD_c$$

โดย OD_a = ผลอ่านจากเชื้อที่บ่มกับยา; OD_b = ผลอ่านจากเม็ดเลือดแดง; OD_c = ผลอ่านจากเชื้อที่ไม่มียา ตัวอย่างที่ให้ผล น้อยกว่า 70% LDH activity หรือ มากกว่า 30% inhibition จะถูกเลือกเพื่อทดสอบหา antimalarial activity โดยวิธี ^{3}H-Hypoxanthine uptake ต่อไป

ข. วิธี ^{3}H-Hypoxanthine uptake (เอกสารอ้างอิง 4)

หลังจากบ่มยากับเชื้อมาลาเรียในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเติมสารละลาย ^{3}H-hypoxanthine 25 µl ในแต่ละหลุม จากนั้นบ่มเชื้อต่อไปอีก 18-24 ชั่วโมง แล้วเก็บเกี่ยวเชื้อบน filter (Unifilter GF/C) ทิ้งไว้ให้แห้ง เติม liquid scintillant ในแต่ละหลุม แล้วอ่านผลโดยเครื่อง □-scintillation counter (TopCount) ทำการหาค่า 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) จาก dose response curve

เอกสารอ้างอิง

1. Trager W and Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193, 673-675.
2. Makler MT and Hinrichs DJ. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 48, 205-210.
3. Kamchonwongpaisan S. High throughput screening of extracts from Thai natural products: Screening against Plasmodium falciparum in culture. A final report submitted to Thailand-Tropical Diseases Research and Training Programme (98-1-MAL-22-003) 1999.
4. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution techniques. *Antimicrob Agents Chemother 1979*, 16, 710-718.

เอกสารประกอบของผลงานวิจัยตอนที่ 2

Halorosellins A and B, unique isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*

Maneekarn Chinworrungsee,[a] Prasat Kittakoop,*[a] Masahiko Isaka,[b] Ratchada Chanphen,[b] Morakot Tanticharoen[b] and Yodhathai Thebtaranonth[a,b]

[a] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*
[b] *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Science Park, 113, Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Prathumthani 12120, Thailand. E-mail: prasat@biotec.or.th; Fax: +662-5646707; Tel: +662-5646700 ext. 3560*

Received (in Cambridge, UK) 12th August 2002, Accepted 4th September 2002
First published as an Advance Article on the web 15th October 2002

Structurally unique isocoumarin glucosides, named halorosellins A (**1**) and B (**2**), were isolated from the EtOAc extract of a broth of the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. Other new minor metabolites including 4,8-dihydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methyleneisochroman-1-one (**3**), 3-acetyl-7-hydroxy-5-methoxy-3,4-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one (**4**) and an ophiobolane sesterterpene, 17-dehydroxyhalorosellinic acid (**5**), were also isolated. Structures of these compounds were elucidated by analyses of spectroscopic data. Compound **4** exhibited mild antimycobacterial activity (MIC value of 200 μg mL^{-1}).

Introduction

As part of our continuing search for biologically active substances conducted at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,[1-4] we have intensively screened biological activities of extracts from plants and microorganisms. Preliminary results showed that a crude extract of the marine fungus *Halorosellinia oceanica* BCC 5149 exhibited cytotoxicity against KB cells with an IC_{50} of 6.5 μg mL^{-1}, and this led us to isolate and identify biologically active principles from this fungus.[4] The marine fungus *Halorosellinia oceanica* is closely related to *Hypoxylon oceanicum*, from which several interesting bioactive compounds were isolated,[5,6] whilst the fungus *Halorosellinia oceanica* has rarely been chemically explored. We report herein our further study concerning the isolation and characterization of two new isocoumarin glucosides, named halorosellin A (**1**) and halorosellin B (**2**), together with other new metabolites, 4,8-dihydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methyleneisochroman-1-one (**3**), 3-acetyl-7-hydroxy-5-methoxy-3,4-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one (**4**) and 17-dehydroxyhalorosellinic acid (**5**), from the marine fungus *H. oceanica* BCC 5149. Halorosellins A (**1**) and B (**2**) possess an isocoumarin aglycone, whose structure is uniquely decorated with a C-3 methylene group of an isochroman unit.

Results and discussion

A crude EtOAc extract of a culture broth (5 L) of *H. oceanica* BCC 5149 was sequentially chromatographed by sephadex LH-20 column and preparative HPLC (C_{18} reversed phase column), to yield halorosellin A (**1**) (1.87 mg), halorosellin B (**2**) (2.81 mg), compound **3** (2.17 mg), compound **4** (5.18 mg), and 17-dehydroxyhalorosellinic acid (**5**) (1.32 mg).

The ESI-TOF mass spectrum of halorosellin A (**1**) gave a molecular formula of **1** of $C_{19}H_{24}O_9$ [observed *m/z* 397.1500 $(M + H)^+$, Δ +0.2 millimass units (mmu)]. The ^1H NMR spectral data (acetone-d_6–D_2O 9 : 1) of halorosellin A (**1**) showed three methyl groups (at δ_H 1.31, 2.10 and 3.90), *exo*-methylene (at δ_H 4.58 and 4.60), an aromatic proton signal (at δ_H 7.09), and a number of protons attached to carbons bearing an oxygen atom (at δ_H 3.43–3.91). The ^1H and ^{13}C NMR spectra demonstrated the presence of a sugar unit in halorosellin A (**1**), showing the characteristics of an anomeric proton and carbon (at δ_H 5.48 and δ_C 100.7, respectively). Analyses of the ^{13}C and DEPT spectra of halorosellin A (**1**) revealed seven methine, two methylene, three methyl, and seven quaternary carbons. The HMQC spectral data of halorosellin A (**1**) assisted in the assignment of protons attached to their corresponding carbon (Table 1), while the ^1H–^1H COSY spectrum demonstrated the correlations from H-1′ through H-6′ and between H-4 and H-10. The HMBC spectrum of halorosellin A (**1**) showed correlations of H-9 to C-3 and C-4; H-10 to C-3 and C-4a; H-4 to C-4a, C-5, C-8a and C-10; H-11 to C-4a, C-5 and C-6; H-7 to C-5, C-6, C-8 and C-8a; and methoxy protons to C-6. Attachment of the unsaturated C-3 to an oxygen atom in **1** was evident from a downfield shift (at δ_C 157.9) of its ^{13}C resonance. Based upon these spectral data, the isocoumarin unit in halorosellin A (**1**) was readily established, and the presence of an *exo*-methylene moiety in the isocoumarin skeleton makes halorosellin A (**1**) structurally unique. Assignment of the relative stereochemistry of the sugar moiety in halorosellin A (**1**) was accomplished by analyses of coupling constants and NOESY spectrum. The *J* values of 3.6, 9.5, 9.3, and 9.4 Hz for $J_{H\text{-}1',H\text{-}2'}$, $J_{H\text{-}2',H\text{-}3'}$, $J_{H\text{-}3',H\text{-}4'}$, and $J_{H\text{-}4',H\text{-}5'}$ indicated equatorial, axial, axial, and axial orientations of H-1′, H-2′, H-3′, and H-4′, respectively; this spectral data suggested that the sugar unit in **1** is α-glucopyranose. Comparison of the ^{13}C NMR data of the sugar unit in **1** with those in the literature[7,8] conclusively confirmed the presence of α-glucopyranose in halorosellin A (**1**). The positive optical rotation ($[\alpha]_D^{30}$ +203.03, *c* 0.066 in EtOH) of **1**, together with the fact that D-glucopyranose was used as a carbon source in a culture medium for the fungus *H. oceanica* BCC 5149, implied that the sugar in **1** is more likely to be α-D-glucose. Acetylation of halorosellin A (**1**) with acetic anhydride in pyridine afforded a tetra-*O*-acetate derivative **1a** whose NMR data fully supported the identity of α-D-glucopyranose in **1**. On the basis of the described data, the chemical structure of halorosellin A (**1**) was therefore secured.

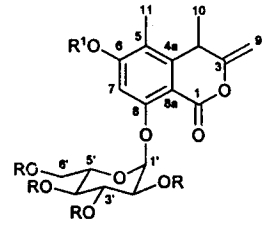
DOI: 10.1039/b207887m

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2002

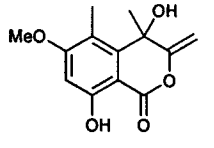
Table 1 ^{1}H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR spectral data of halorosellins A (1) and B (2)

	Halorosellin A (1)[b]		Halorosellin B (2)[c]	
C	δ_C, multiplicity[a]	δ_H, multiplicity, J in Hz	δ_C, multiplicity[a]	δ_H, multiplicity, J in Hz
1	161.0, s	—	161.0, s	—
3	157.9, s	—	158.2, s	—
4	35.6, d	4.01, q, 7.0	35.1, d	4.10, q, 7.1
4a	144.8, s	—	143.4, s	—
5	116.9, s	—	117.0, s	—
6	164.1, s	—	163.1, s	—
7	100.8, d	7.09, s	101.5, d	6.73, s
8	160.2, s	—	163.0, s	—
8a	104.0, s	—	100.0, s	—
9	94.3, t	4.58, br s 4.60, br s	95.9, t	4.74, br s 4.75, br s
10	21.6, q	1.31, d, 7.1	22.3, q	1.38, d, 7.1
11	10.1, q	2.10, s	10.1, q	2.19, s
6-OMe	56.5, q	3.90, s	—	—
1′	100.7, d	5.48, d, 3.6	98.3, d	5.68, d, 3.5
2′	72.5, d	3.50, dd, 3.6, 9.5	72.8, d	3.63–3.74, m
3′	74.8, d	3.91, dd, 9.3, 9.3	74.8, d	3.92, dd, 9.0, 9.0
4′	70.6, d	3.43, dd, 9.4, 9.4	77.2, d	3.47–3.57, m
5′	74.5, d	3.83, m	74.7, d	3.47–3.57, m
6′	61.8, t	3.68, dd, 5.9, 11.9 3.81, m	62.1, t	3.63–3.74, m
6-OH	—	—	—	10.92, s

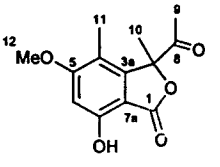
[a] Multiplicity was determined by analyses of DEPT spectra. [b] Acquired in acetone-d_5–D_2O (9 : 1). [c] Acquired in acetone-d_6.



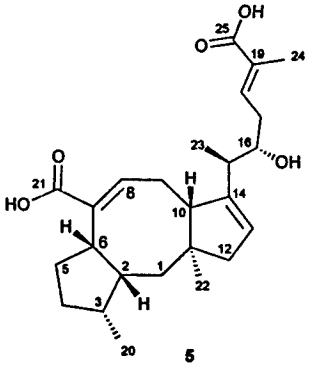
1, R = H, R^1 = Me
1a, R = Ac, R^1 = Me
2, R = H, R^1 = H



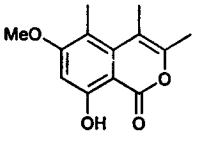
3



4



5



6

The ^{1}H and ^{13}C NMR spectral data (acetone-d_6) of halorosellin B (2) were generally similar to those of halorosellin A (1), except that the methoxy signal (at δ_H 3.90, s; δ_C 56.5) in 1 was replaced by a hydroxy resonance (at δ_H 10.92, s) in 2. A molecular formula of $C_{18}H_{22}O_9$ for halorosellin B (2) was deduced from the ESI-TOF mass spectrum [observed *m/z* 383.1355 (M + H)$^+$, Δ +1.3 mmu], which indicated that halorosellin B (2) was a desmethyl derivative of halorosellin A (1). In a similar fashion to that of 1, protons and carbons in halorosellin B (2) were successfully assigned by analyses of the ^{1}H–^{1}H COSY and HMBC spectral data (Table 1). Important ^{1}H–^{13}C long ranged correlations (HMBC) of halorosellin B (2) are as follows: H-9 to C-3 and C-4; H-10 to C-3, C-4 and C-4a; H-4 to C-4a, C-5, C-8a, C-9 and C-10; H-11 to C-4a, C-5 and C-6; H-7 to C-5, C-6, C-8 and C-8a; and hydroxy proton to C-5, C-6 and C-7. The HMBC spectrum of halorosellin B (2) also showed the correlation of H-1′ to C-8, establishing the linkage between α-D-glucose and the isocoumarin unit.

The structurally unique isochroman unit in 1 and 2 was additionally confirmed by the presence of compounds 3 and 4 in the fungus extract. Chemical structures of the isomeric six and five membered ring lactones, 3 and 4 respectively, were closely related to an aglycone of 1 and 2. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectral data of 3 were similar to those of the aglycones in 1 and 2, except that compound 3 possessed a singlet methyl (at δ_H 1.67) instead of a doublet methyl as in 1 and 2 (at δ_H 1.31 in 1 and 1.38 in 2). In addition, a quartet methine signal (at δ_H 4.01 in 1 and 4.10 in 2) was absent in compound 3. The ^{13}C and DEPT spectra indicated that C-4 (at δ_C 72.0) in 3 was a quaternary carbon attached to an oxygen atom. The ESI-TOF mass spectrum established the molecular formula of 3 as $C_{13}H_{14}O_5$ [observed *m/z* 251.0923 (M + H)$^+$, Δ +0.4 mmu]. Protons and carbons in 3 were assigned by analyses of the ^{1}H–^{1}H COSY and HMBC spectral data. The HMBC spectra of 3 demonstrated long-range correlations of H-9 to C-3 and C-4; H-10 to C-3, C-4 and C-4a; H-11 to C-4a, C-5 and C-6; H-7 to C-5, C-6, C-8 and C-8a; and methoxy protons to C-6. Based on these spectral data, compound 3 was identified as 4,8-dihydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methyleneisochroman-1-one.

Compound 4 also exhibited the same molecular formula, $C_{13}H_{14}O_5$, as that of 3 (observed *m/z* 251.0928 (M + H)$^+$, Δ +0.9 mmu). The ^{1}H NMR spectrum of 4 showed four methyl groups at δ_H 1.69, 1.97, 1.97 and 3.88, and an aromatic proton at δ_H 6.60. Protons and carbons in 4 were readily assigned by analyses of the HMBC spectrum, from which the following correlations were observed: H-6 to C-4, C-5, C-7 and C-7a; H-11 to C-3a, C-4 and C-5; OMe to C-5; Me-9 to C-8; and Me-10 to C-8, C-3 and C-3a. On the basis of these spectral data, compound 4 was identified as 3-acetyl-7-hydroxy-5-methoxy-3,4-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one.

Compounds 1–4 possess the same aromatic part but different lactone units; it is most likely that their biosynthetic pathways are closely related. However, based upon the spectroscopic data available, the absolute stereochemistry of compounds 1–4

could not be determined due to the limited amount of these minor metabolites (major metabolites being halorosellinic acid, 2-hexylidene-3-methylsuccinic acid, 5-carboxymellein and cytochalasins).[4] The isocoumarins halorosellins A (**1**) and B (**2**) might be biosynthesized from **I** *via* the intermediate **II**,[9–11] *e.g.* a naturally occurring isocoumarin, sclerin A.[10] Dehydration followed by glycosylation of a sclerin A-like intermediate (**II**) gives rise to the formation of halorosellins A (**1**) and B (**2**) (Fig. 1). The presence of a C-3 methylene group on the isochroman unit in **1–3** is exceptionally unique; this structural feature has not yet been isolated from a natural environment. Surprisingly, the more stable isomer of the aglycone part, *e.g.* compound **6**, was not obtained from this isolation.

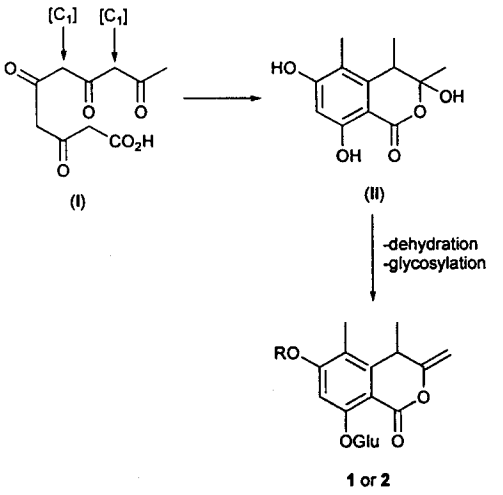


Fig. 1 Possible biosynthetic pathway of halorosellins A (**1**) and B (**2**).

17-Dehydroxyhalorosellinic acid (**5**) was also isolated from the culture broth of the *H. oceanica* BCC 5149, and identified by analyses of spectral data as well as comparison spectral data with those of halorosellinic acid.[4] The ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) of **5** was similar to those of halorosellinic acid,[4] except that a hydroxy signal (H-17) of halorosellinic acid was replaced by a methylene resonance in **5**. The molecular formula of compound **5**, $C_{25}H_{36}O_5$, was obtained from the ESITOF mass spectrum (negative ion), showing an accurate mass of *m/z* 415.2479 [(M − H)$^-$, Δ −0.6 mmu]. These spectral data indicated that compound **5** was a dehydroxy derivative of halorosellinic acid, and identified as 17-dehydroxyhalorosellinic acid. Analyses of ^{1}H–^{1}H COSY and NOESY spectra of **5**, in combination with spectral data correlation of **5** to those of halorosellinic acid,[4] led to the assignment of protons in **5**, however, the ^{13}C NMR spectrum of **5** could not be recorded due to the limited amount of the isolated substance.

Unfortunately, compounds **1**, **2**, **3** and **5** showed no biological activities (antimalaria, antimycobacterium, antivirus and cytotoxicity against BC-1 and KB cells), while **4** exhibited only mild antimycobacterial activity with the minimum inhibitory concentration (MIC) value of 200 μg mL^{-1}.

Experimental

General

^{1}H, ^{13}C, DEPTs, ^{1}H–^{1}H COSY, NOESY, HMQC, and HMBC experiments were carried out on a Bruker DRX 400 NMR spectrometer, operating at 400 MHz for protons and 100 MHz for carbons. ESI-TOF mass spectra were obtained from a Micromass LCT mass spectrometer, and the lock mass calibration was applied for the determination of the accurate mass. Optical rotations were measured on JASCO DIP 370 polarimeter, while UV spectra were recorded on a Cary 1E UV–VIS spectrophotometer. Optical rotations are given in 10^{-1} deg cm^2 g^{-1}.

Fungal material

The marine fungus *H. oceanica* BCC 5149 was collected from Samutsongkram Province, Thailand, by Dr A. Piluntanapark, identified by Professor E. B. G. Jones, and deposited at the BIOTEC Culture Collection, Bangkok, Thailand (registration no. BCC 5149). The fungus was grown in a potato dextrose broth, and incubated for 5 days at 25 °C, then transferred into 250 mL of the same culture medium. The culture was subsequently incubated (at 25 °C) for 21 days, and harvested for further study.

Extraction and isolation

The culture (5 L) of *H. oceanica* BCC 5149 was filtered to separate cell and broth. The culture broth was extracted twice with an equal volume of EtOAc, and the EtOAc layers were combined and evaporated to dryness. The crude EtOAc extract (2.3 g) was subsequently chromatographed on Sephadex LH-20 column, and eluted with MeOH to provide three major fractions (Fr. 1–3). Fraction 2 was repeatedly purified on Sephadex LH-20 column, using MeOH as eluent, to give five major fractions (Fr. 2.1–2.5), which were further purified by preparative HPLC. Separation of fraction 2.2 by preparative HPLC (C_{18} reversed phase column, and MeCN–H_2O 40 : 60 as eluent) yielded 1.32 mg of 17-dehydroxyhalorosellinic acid (**5**). Fraction 2.5 was purified by preparative HPLC (MeCN–H_2O 30 : 70 as eluent) to furnish halorosellin B (**2**) (2.81 mg). Fraction 3 was rechromatographed on a Sephadex LH-20 column (MeOH as eluent) to give four major fractions (Fr. 3.1–3.4), which were further purified by preparative HPLC. Fraction 3.2 was subjected to preparative HPLC (MeCN–H_2O 40 : 60) to afford halorosellin A (**1**) (1.87 mg), while fraction 3.4 was subsequently purified by preparative HPLC (MeCN–H_2O 30 : 70), followed by semi-preparative HPLC with a solvent system of MeCN–H_2O (70 : 30), yielding compound **3** (2.17 mg) and compound **4** (5.18 mg).

Halorosellin A (1). Amorphous solid; $[\alpha]_D^{30}$ +203.03 (*c* 0.066, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} 222, 268 and 302 nm; ESITOF MS *m/z* 397.1500 (M + H)$^+$, calcd. for $[C_{19}H_{24}O_9 + H]^+$ 397.1498; ^{1}H and ^{13}C NMR see Table 1.

Halorosellin A acetate (1a). Amorphous solid; ESITOF MS *m/z* 565.1940 [M + H]$^+$, calcd. for $[C_{27}H_{32}O_{13} + H]^+$ 565.1921; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ_H 6.59 (1H, s H-7), 5.94 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-1′), 5.94 (1H, t, *J* = 9.5 Hz, H-3′), 5.22 (1H, t, *J* = 9.7 Hz, H-4′), 5.07 (1H, dd, *J* = 3.5, 10.1 Hz, H-2′), 4.70 (1H, H-9a), 4.49 (1H, H-9b), 4.49 (1H, H-5′), 4.27 (1H, H-6′a), 4.09 (1H, dd, *J* = 3.8, 12 Hz, H-6′b), 3.88 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, q, *J* = 7.2 Hz, H-4), 2.15 (3H, s, H-11), 2.05–2.09 (12H, OAc), and 1.41 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, H-10).

Halorosellin B (2). Amorphous solid; $[\alpha]_D^{30}$ +240.57 (*c* 0.140, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} 218, 267 and 315 nm; ESITOF MS *m/z* 383.1355 [M + H]$^+$, calcd. for $[C_{18}H_{22}O_9 + H]^+$ 383.1342; ^{1}H and ^{13}C NMR see Table 1.

4,8-Dihydroxy-6-methoxy-4,5-dimethyl-3-methyleneisochroman-1-one (3). Colorless needles; $[\alpha]_D^{29}$ +92.63 (*c* 0.048, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} 218, 261 and 306 nm; ESITOF MS *m/z* 251.0923 [M + H]$^+$, calcd. for $[C_{13}H_{14}O_5 + H]^+$ 251.0919; ^{1}H NMR (acetone-d_6) δ_H 6.53 (1H, s, H-7), 5.12 (1H, br s, H-9a), 4.88 (1H, br s, H-9b), 3.94 (3H, s, OMe), 2.40 (3H, s, H-11), and 1.67 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR δ_C 166.0 (s, C-6), 164.0 (s, C-8), 162.1 (s, C-3), 161.0 (s, C-1), 144.0 (s, C-4a), 117.0

(s, C-5), 100.3 (s, C-8a), 98.7 (d, C-7), 95.1 (t, C-9), 72.0 (s, C-4), 56.6 (q, OMe), 20.1 (q, C-10), and 10.1 (q, C-11).

3-Acetyl-7-hydroxy-5-methoxy-3,4-dimethyl-3*H*-isobenzofuran-1-one (4). Colorless needles; $[\alpha]_D^{29}$ +200.00 (*c* 0.050, EtOH); UV (EtOH) λ_{max} 216, 260 and 303 nm; ESITOF MS *m/z* 251.0928 $[M + H]^+$, calcd. for $[C_{13}H_{14}O_5 + H]^+$ 251.0919; ^1H NMR (acetone-d_6) δ_H 6.60 (1H, s, H-6), 3.88 (3H, s, OMe), 1.97 (3H, s, H-9), 1.97 (3H, s, H-11), and 1.69 (3H, s, H-10); ^{13}C NMR δ_C 203.4 (s, C-8), 166.0 (s, C-5), 164.0 (s, C-1), 160.0 (s, C-7), 147.8 (s, C-3a), 113.0 (s, C-4), 103.5 (s, C-7a), 100.8 (d, C-6), 90.3 (s, C-3), 56.6 (q, OMe), 23.6 (q, C-9), 20.2 (q, C-10) and 9.9 (q, C-11).

17-Dehydroxyhalorosellinic acid (5). Colorless needles; $[\alpha]_D^{28}$ +42.42 (*c* 0.066, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 210 nm; ESITOF MS *m/z* 415.2479 $[M - H]^-$, calcd. for $[C_{25}H_{36}O_5 - H]^-$ 415.2485; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ_H 7.00 (1H, t, J = 6.3 Hz, H-18), 6.56 (1H, br d, J = 7.42 Hz, H-8), 5.37 (1H, br s, H-13), 3.80 (1H, H-16), 3.32 (1H, H-10), 3.32 (1H, H-6), 2.55 (1H, H-9β), 2.48 (2H, H-17), 2.45 (1H, H-2), 2.26 (1H, H-12β), 2.23 (1H, H-15), 2.11 (1H, H-3), 2.11 (1H, H-5α), 2.11 (1H, H-9α), 1.88 (3H, s, H-24), 1.87 (1H, H-12α), 1.85 (1H, H-5β), 1.68 (1H, H-4β), 1.57 (1H, H-1β), 1.54 (1H, H-4α), 1.39 (1H, H-1α), 1.10 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-23), 0.90 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-20), and 0.90 (3H, s, H-22).

Bioassays

Antimalarial activity was evaluated against the parasite *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug resistant strain), which was cultured continuously according to the method of Trager and Jensen.[12] Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* was determined by means of the microculture radioisotope technique based upon the method described by Desjardins, *et al.*.[13] The inhibitory concentration (IC_{50}) represents the concentration which causes 50% reduction in parasite growth as indicated by the *in vitro* uptake of [^{3}H]-hypoxanthine by *P. falciparum*. An IC_{50} value of 1 ng mL^{-1} was observed for the standard compound, artemisinin, in the same test system. The cytotoxicity of compounds **1**–**5** was determined, employing the colorimetric method as described by Skehan and coworkers.[14] The reference substance, ellipticine, exhibited activities toward BC-1 and KB cell lines (both with the IC_{50} of 0.3 μg mL^{-1}). The antimycobacterial activity was assessed against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA).[15] Standard drugs, isoniazid and kanamycin sulfate, the reference compounds for the antimycobacterial assay, showed the minimum inhibitory concentrations (MIC) of 0.040 -0.090 and 2.0–5.0 μg mL^{-1}, respectively.

Acknowledgements

We are indebted to the Biodiversity Research and Training Program (BRT) for financial support. We are grateful to the Fermentation Technology Laboratory for mass cultivation of the fungus. Y. T. thanks BIOTEC for the Senior Research Fellowship Award. M. C. acknowledges the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) for the student's grant.

References

1 N. Vongvanich, P. Kittakoop, J. Kramyu, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 5420.
2 P. Kittakoop, S. Wanasith, P. Watts, J. Kramyu, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth, *J. Nat. Prod.*, 2001, **64**, 385.
3 S. Boonphong, P. Kittakoop, M. Isaka, P. Palittapongarnpim, A. Jaturapat, K. Danwisetkanjana, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth, *Planta Med.*, 2001, **67**, 279.
4 M. Chinworrungsee, P. Kittakoop, M. Isaka, A. Rungrod, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 1965.
5 (*a*) G. Schlingmann, L. Milne, D. R. Williams and G. T. Carter, *J. Antibiot.*, 1998, **51**, 303; (*b*) D. Albaugh, G. Albert, P. Bradford, V. Cotter, J. Froyd, J. Gaughran, D. R. Kirsch, M. Lai, A. Rehnig, E. Sieverding and S. Silverman, *J. Antibiot.*, 1998, **51**, 317; (*c*) A. W. Dombrowski, G. F. Bills, G. Sabnis, L. R. Koupal, R. Meyer, J. G. Ondeyka, R. A. Giacobbe, R. L. Monaghan and R. B. Lingham, *J. Antibiot.*, 1992, **45**, 671; (*d*) M. Daferner, S. Mensch, T. Anke and O. Sterner, *Z. Naturforsch., C: Biosci.*, 1999, **54**, 474.
6 (*a*) J. R. Anderson, R. L. Edwards and A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1985, 1481; (*b*) A. J. S. Whalley and R. L. Edwards, *Can. J. Bot.*, 1995, **73** (Suppl. 1), S802; (*c*) R. L. Edwards, D. J. Maitland and A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1989, 57; (*d*) A. Espada, A. Rivera-Sagredo, J. M. De La Fuente, J. A. Hueso-Rodriguez and S. W. Elson, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 6485; (*e*) J. R. Anderson, R. L. Edwards and A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1983, 2185.
7 J. Reuben, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 6180.
8 T. E. Walker, R. E. London, T. W. Whaley, R. Barker and N. A. Matwiyoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 5807.
9 R. F. Curtis, C. H. Hassall and M. Nazer, *J. Chem. Soc. (C)*, 1968, 85.
10 J. Barber, M. J. Garson and J. Staunton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1981, 2584.
11 I. Fujii, A. Watanabe, U. Sankawa and Y. Ebizuka, *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 189.
12 W. Trager and J. B. Jensen, *Science*, 1976, **193**, 673.
13 R. E. Desjardins, C. J. Canfield, J. D. Haynes and J. D. Chulay, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1979, **16**, 710.
14 P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, **82**, 1107.
15 L. Collins and S. G. Franzblau, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, **41**, 1004.

J. Nat. Prod. 2002, *65*, 1346−1348

Hirsutellide A, a New Antimycobacterial Cyclohexadepsipeptide from the Entomopathogenic Fungus *Hirsutella kobayasii*

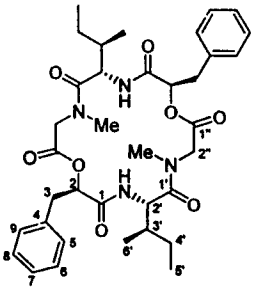
Namphung Vongvanich,[†] Prasat Kittakoop,*[,‡] Masahiko Isaka,[‡] Srisuda Trakulnaleamsai,[‡] Saovaluk Vimuttipong,[‡] Morakot Tanticharoen,[‡] and Yodhathai Thebtaranonth[†,‡]

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand, and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Science Park, 113, Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Prathumthani, 12120, Thailand

Received February 20, 2002

A new cyclohexadepsipeptide, named hirsutellide A (**1**), was isolated from a cell extract of the entomopathogenic fungus *Hirsutella kobayasii* BCC 1660. The structure of **1** was elucidated by analyses of spectroscopic data, and its absolute stereochemistry was addressed by the use of Marfey's method. Hirsutellide A (**1**) exhibited antimycobacterial and antimalarial activities, but was inactive toward the Vero cell line (at 50 μg/mL).

The incidence of tuberculosis has rapidly increased worldwide, particularly among those associated with HIV infection. It is estimated that approximately one-third of the global population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* and that seven to eight million new cases of tuberculosis occur each year.[1] Development of new drugs for use against the emerging drug-resistant strains of *M. tuberculosis* is therefore urgently needed. As part of our continuing search for biologically active compounds from plants and microorganisms,[2] we report herein a new antimycobacterial cyclohexadepsipeptide, named hirsutellide A (**1**), from a cell extract of *Hirsutella kobayasii* BCC 1660. It should be noted that entomopathogenic fungi of the genus *Hirsutella* have rarely been chemically explored; only a toxic polypeptide, hirsutellin A, has been reported to date.[3]



1

Hirsutellide A (**1**) was obtained as an off-white solid. Its IR exhibited characteristic stretchs of an amide NH (3292 cm^{-1}), an ester carbonyl (1752 cm^{-1}), and amide carbonyls (1663 and 1634 cm^{-1}). The ^1H NMR spectrum ($CDCl_3$) showed signals of protons of three methyl groups (singlet at δ_H 3.27, doublet at δ_H 0.87, and triplet at δ_H 0.91), three nonequivalent methylenes at δ_H 1.19−4.46, two downfield methines at δ_H 4.93 and 5.63, aromatic protons at δ_H 7.16−7.28, and an amide NH at δ_H 7.57. Analyses of ^{13}C NMR, DEPT, and HMQC spectral data revealed that hirsutellide A (**1**) possessed 18 carbons (two equivalent carbon signals at δ_C 129.1 (C-5 and C-9) and δ_C 128.6 (C-6 and C-8) of a substituted benzene ring). However, a molecular formula, $C_{36}H_{48}O_8N_4$, was inferred by the ESITOF mass spectrum [accurate mass observed at *m/z* 665.3579 $(M + H)^+$, Δ +2.9 mmu]; hirsutellide A (**1**) therefore possessed a C_2 symmetry. Analyses of $^1H-^1H$ COSY, NOESY, HMQC, and HMBC spectral data unambiguously revealed the presence of isoleucine, sarcosine, and 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid in hirsutellide A (**1**) (Figure 1). The $^1H-^1H$ COSY spectrum of **1** established the partial structure from H-2′ to H-6′ of the isoleucine residue and also showed correlations between H-2′ of isoleucine to an adjacent amide proton (NH) as well as between H-2 and H-3 of 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid. The HMBC spectrum of hirsutellide A (**1**) assisted in the assignment of the amino acid sequence in **1** (H-2′ of isoleucine to C-1 of 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid and H-2″ of sarcosine to C-1′ of isoleucine), as depicted in Figure 1. The position of the *N*-methyl at the sarcosine residue was also assigned by HMBC, from which correlations of the singlet methyl protons (δ_H 3.27) to C-1″ (δ_C 166.8) and C-2″ (δ_C 51.7) of sarcosine were observed (Figure 1). On the basis of these spectral data, the chemical structure of hirsutellide A (**1**) was secured. Complete assignment of protons and carbons in **1** is shown in Table 1.

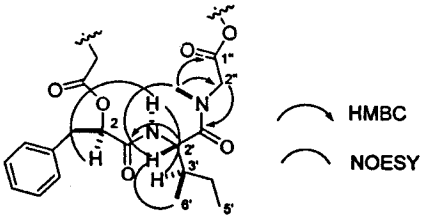


Figure 1. Selected HMBC and NOESY correlations of hirsutellide A (**1**).

The relative stereochemistry of hirsutellide A (**1**) was successfully assigned by analyses of the NOESY spectrum. Correlations from the amide proton (NH) to H-3′ of isoleucine and to H-2 of 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid were observed, suggesting that these protons were coplanar (Figure 1). The NOESY spectral data of **1** also revealed correlations between H-2′ and the methyl protons (H-6′) of isoleucine and between H-2′ of isoleucine and the *N*-methyl of sarcosine. The absolute stereochemistry in

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +66-2-5646700, ext. 3560. Fax: +66-2-5646707. E-mail: prasat@biotec.or.th.
† Department of Chemistry, Mahidol University.
‡ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

10.1021/np020055+ CCC: $22.00 © 2002 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy
Published on Web 07/26/2002

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR Spectral Data ($CDCl_3$) of Hirsutellide A (**1**)

unit	δ_C, multiplicity	δ_H, multiplicity (J in Hz)
2-hydroxy-3-phenyl-propanoic acid		
1	168.8, s	
2	74.1, d	5.63, dd (11.8, 2.9)
3	38.7, t	2.74, dd (14.0, 11.9)
		3.68, dd (14.0, 2.8)
4	136.1, s	
5, 9	129.1, d	7.16, br d (7.0)
6, 8	128.6, d	7.28, dd (7.0, 7.0)
7	127.1, d	7.23, m
L-*allo*-isoleucine		
1′	174.1, s	
2′	52.3, d	4.93, dd (10.1, 9.7)
3′	35.8, d	2.24, m
4′	24.2, t	1.19, m
		1.55, m
5′	10.2, q	0.91, t (7.4)
6′	15.4, q	0.87, d (6.7)
NH		7.57, d (9.7)
sarcosine		
1″	166.8, s	
2″	51.7, t	3.20, d (17.1)
		4.46, d (17.2)
*N*Me	37.9, q	3.27, s

hirsutellide A (**1**) was addressed by the use of Marfey's method.[4] Hirsutellide A (**1**) was hydrolyzed and subsequently derivatized with Marfey's reagent (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamide, FDAA). HPLC analysis established the L stereochemistry of the isoleucine unit in **1**; however, the reversed-phase column failed to distinguish between L-isoleucine and L-*allo*-isoleucine. The problem was solved using a chiral column, from which the presence of L-*allo*-isoleucine in hirsutellide A (**1**) was firmly established. The absolute configuration at C-2 of 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid was assigned as *R* according to the NOESY spectrum of **1**.

Hirsutellide A (**1**) exhibited antimycobacterial activity with a MIC (minimum inhibitory concentration) of 6−12 μg/mL, but showed no cytotoxic effect toward Vero cells at 50 μg/mL. Additionally, hirsutellide A (**1**) also possessed weak in vitro antimalarial activity, with an IC_{50} value of 2.8 μg/mL.

Experimental Section

General Experimental Procedures. The IR spectra and optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 2000 spectrometer and Jasco DIP370 polarimeter, respectively. The UV spectra were recorded on a Cary 1E UV−vis spectrophotometer. The ^1H, ^{13}C, DEPT, ^1H−^1H COSY, NOESY, HMQC, and HMBC experiments were carried out on a Bruker DRX 400 NMR spectrometer, operating at 400 MHz for proton and 100 MHz for carbon. The ESI-TOF mass spectra were obtained from a Micromass LCT mass spectrometer, and the lock mass calibration was applied for the determination of accurate mass.

Fungal Material, Extraction, and Isolation. The fungus *H. kobayasii* BCC 1660 was collected from Kaeng Krachan National Park, Phetchburi, Thailand, and identified by Dr. Nigel Leslie Hywel-Jones of the Mycology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC). The specimen has been deposited (registration no. BCC 1660) at the BIOTEC Culture Collection. *H. kobayasii* BCC 1660 was cultured in potato dextrose broth (5 L culture); cells were separated from the broth by filtration and subsequently extracted twice with CH_2Cl_2 to yield 1.3 g of a crude extract. The extract was subjected to a Sephadex LH-20 column (eluted with MeOH), and the fraction containing hirsutellide A (**1**) was further purified by silica gel column chromatography (eluted with acetone/hexane, gradient elution from 5:95 to 30:70) to afford **1** (18 mg).

Hirsutellide A (1): off-white solid; $[\alpha]^{28}_D$ −13.6° (*c* 0.25, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 212 (4.32) and 257 (sh) nm; IR (KBr) ν_{max} 3292, 3030, 3012, 2967, 2933, 1752, 1663, 1634, 1527, 1464, 1262, 1132, 1095, 1061 cm^{-1}; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; ESITOF MS *m/z* 665.3579 $(M + H)^+$, calcd for $(C_{36}H_{48}O_8N_4 + H)^+$, 665.3550.

Determination of Amino Acid Configuration by Marfey's Method. A mixture of hirsutellide A (**1**) (1 mg) and 2 M HCl (2 mL) was heated to reflux at 110 °C for 14 h, after which it was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 0.5 mL of H_2O, then 2 mL of 1 M $NaHCO_3$ and 1 mL of 1% Marfey's reagent (FDAA)[4] in acetone were added. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 1 h, quenched with 0.2 mL of 2 N HCl, and subjected to HPLC analysis (C_{18} reversed-phase column, eluted with MeCN/H_2O (30:70), flow rate 1.0 mL/min, and UV detector set at 340 nm). D and L forms of isoleucine and *allo*-isoleucine were separately derivatized with FDAA in the same manner as that described for **1**. Under the HPLC conditions employed, D- and L-isoleucine (and *allo*-isoleucine) had retention times of 41.26 and 19.62 min, respectively. The residue in **1** was found to be the L form; however, the reversed-phase column failed to distinguish between L-isoleucine and L-*allo*-isoleucine. This problem was solved using a chiral column (ChiraDex, Merck), eluted with MeOH/H_2O (30:70), at a flow rate of 0.7 mL/min. Under these HPLC conditions, L-isoleucine and L-*allo*-isoleucine exhibited retention times of 7.08 and 7.88 min, respectively. The sample was co-injected with standard compounds to finally establish the amino acid from hirsutellide A (**1**) as L-*allo*-isoleucine.

Bioassays. The antimycobacterial activity was assessed against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA).[5] Standard drugs, isoniazid and kanamycin sulfate, the reference compounds for the antimycobacterial assay, showed minimum inhibitory concentrations (MICs) of 0.040−0.090 and 2.0−5.0 μg/mL, respectively. The antimalarial activity was evaluated against the parasite *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug-resistant strain), which was cultured continuously according to the method of Trager and Jensen.[6] Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro was determined by means of the microculture radioisotope technique based upon the method described by Desjardins et al.[7] The inhibitory concentration (IC_{50}) represents the concentration that causes 50% reduction in parasite growth as indicated by the in vitro uptake of [^3H]-hypoxanthine by *P. falciparum*. An IC_{50} value of 1 ng/mL was observed for the standard compound, artemisinin, in the same test system. Cytotoxicity was determined by employing the colorimetric method described by Skehan and co-workers.[8] The reference compound, ellipticine, exhibited activity toward the BC-1 and KB cell lines, both with an IC_{50} of 0.3 μg/mL.

Acknowledgment. N.V. is a Ph.D. student under the Royal Golden Jubilee program. We are indebted to the Biodiversity Research and Training Program (BRT) for financial support. The support of the Thailand-Tropical Diseases Research Program (T-2)′ to the antimycobacterial assay laboratory is gratefully acknowledged. Y.T. thanks the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology for the Senior Research Fellowship Award.

Supporting Information Available: ^1H, ^{13}C, ^1H−^1H COSY, NOESY, HMQC, HMBC, and ESI-TOF MS spectra of hirsutellide A (**1**). This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

References and Notes

(1) (a) Small, P. M.; Schecter, G. F.; Goodman, P. C.; Sande, M. A.; Chaisson, R. E.; Hopewell, P. C. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 289−294. (b) Bradford, W. Z.; Martin, J. N.; Reingold, A. L.; Schecter, G. F.; Hopewell, P. C.; Small, P. M. *Lancet* **1996**, *348*, 928−931.

(2) (a) Vongvanich, N.; Kittakoop, P.; Kramyu, J.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5420−5423. (b) Kittakoop, P.; Wanasith, S.; Watts, P.; Kramyu, J.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 385−388. (c) Boonphong, S.;

Kittakoop, P.; Isaka, M.; Palittapongarnpim, P.; Jaturapat, A.; Danwisetkanjana, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Planta Med.* **2001**, *67*, 279−281. (d) Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Rungrod, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1965−1969. (e) Boonphong, S.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Pittayakhajonwut, D.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 965−967.

(3) Mazet, I.; Vey, A. *Microbiology* **1995**, *141*, 1343−1348.

(4) Fujii, K.; Shimoya, T.; Ikai, Y.; Oka, H.; Harada, K. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2579−2582.

(5) Collins, L.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004−1009.

(6) Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673−675.

(7) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710−718.

(8) 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.

NP020055+

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2002, p. 1112–1113 Vol. 46, No. 4
0066-4804/02/$04.00+0 DOI: 10.1128/AAC.46.4.1112–1113.2002
Copyright © 2002, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Potent In Vitro Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785

Masahiko Isaka,* Amonlaya Jaturapat, Jarin Kramyu, Morakot Tanticharoen, and Yodhathai Thebtaranonth

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 10400, Thailand

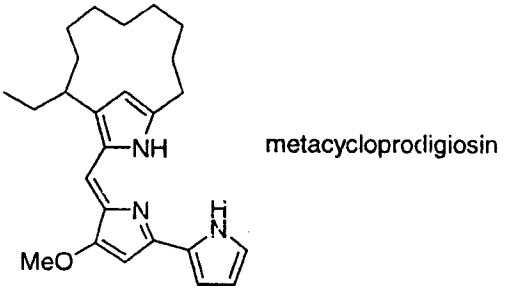
Received 17 August 2001/Returned for modification 4 December 2001/Accepted 2 January 2002

Bioassay-guided fractionation of the extract from the fermentation broth of *Streptomyces spectabilis* BCC 4785 led to the isolation of three principle antimalarial agents, metacycloprodigiosin, bafilomycin A_1, and spectinabilin. Metacycloprodigiosin exhibited potent in vitro activity against *Plasmodium falciparum* K1, with a 50% inhibitory concentration of 0.0050 ± 0.0010 μg/ml, while its cytotoxicity was much weaker.

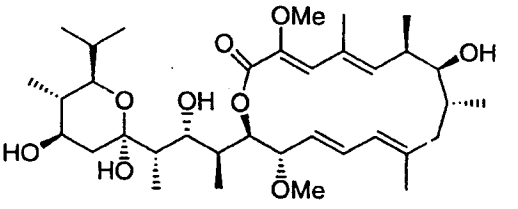
Malaria is a serious endemic disease in many parts of Africa, Asia, Latin America, and Oceania, affecting 5% of the world's population, and mortality is estimated to be over 1 million deaths each year (13, 21). Because of the worsening problems of drug resistance, there has been an urgent need for the discovery of a new chemical class of antimalarial agents (4). As part of an ongoing natural product research program, we have been screening microbial extracts for in vitro antimalarial activity (7–9). Among these, an extract from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785 showed significant activity against *Plasmodium falciparum* (K1, a multidrug-resistant strain), with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.01 μg/ml. Therefore, mass fermentation and activity-guided isolation of antimalarial agents from this strain have been undertaken.

S. spectabilis was isolated from a soil sample collected in Thailand, identified to the species level, and deposited at the BIOTEC Culture Collection as BCC 4785. The strain was incubated in a fermentor containing 75 liters of a liquid medium (10.0 g of soluble starch, 1.0 g of K_2HPO_4, 1.0 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g of NaCl, 2.0 g of $(NH_4)_2SO_4$, and 3.0 g of $CaCO_3$ per liter). Chromatographic separation and purification of the methanolic extract from mycelia led to the isolation of three known compounds, metacycloprodigiosin (free-base form, orange powder, 490 mg; further purified as a hydrochloride, magenta powder) (18, 19), bafilomycin A_1 (colorless crystals, 14 mg) (1, 20), and spectinabilin (orange powder, 41 mg) (11). The structures of these compounds (Fig. 1) were identified by spectroscopic analyses and comparison with the literature data.

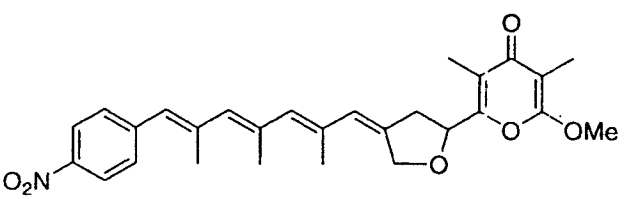
An assay for activity against *P. falciparum* K1 was performed by using a standard protocol (10) based on the microculture radioisotope technique described by Desjardins et al. (3). The reported IC_{50} represents the concentration that causes a 50% reduction of parasite growth, as indicated by the in vitro uptake of [^{3}H]hypoxanthine by *P. falciparum*. For comparison, the cytotoxicities of the compounds against human epidermoid carcinoma cells (KB cells), human breast cancer cells (BC-1 cells), and African green monkey kidney fibroblasts (Vero cells) were screened by using a colorimetric method (16). The



metacycloprodigiosin



bafilomycin A_1



spectinabilin

FIG. 1. Structures of the metabolites from *S. spectabilis* BCC 4785.

* Corresponding author. Mailing address: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand. Phone: (662) 6448103. Fax: (662) 6448107. E-mail: isaka@biotec.or.th.

TABLE 1. Antimalarial activities and cytotoxicities of compounds isolated from *S. spectabilis* BCC 4785

Compound	Activity (IC_{50}, μg/ml) against *P. falciparum* K1	Cytotoxicity (IC_{50}, μg/ml) for:		
		KB cells	BC-1 cells	Vero cells
Metacycloprodigiosin hydrochloride[a]	0.0050 ± 0.0010	0.36 ± 0.02	0.27 ± 0.01	1.35 ± 0.28
Bafilomycin A_1[a]	0.041 ± 0.010	0.27 ± 0.03	0.20 ± 0.04	1.14 ± 0.04
Spectinabilin	7.8	0.10	0.80	20
Chloroquine diphosphate[b]	0.16	16	>20	>20
Artemisinin[b]	0.0011	>20	>20	>20

[a] Assays were performed in triplicate for these highly active compounds; values are means and standard deviations.
[b] Standard antimalarial compounds.

IC_{50}s of the standard compound, ellipticine, in our system were 0.46 μg/ml for KB cells and 0.60 μg/ml for BC-1 cells.

The bioassay results are summarized in Table 1. Metacycloprodigiosin hydrochloride and bafilomycin A_1 exhibited significant antimalarial activity, while spectinabilin moderately inhibited the proliferation of *P. falciparum* K1. The cytotoxic activity of metacycloprodigiosin hydrochloride was much weaker than its antimalarial activity.

Prodigiosins have been known to exhibit a wide range of biological activities, and recent investigations on their immunosuppressive activities (5, 14, 17) and activities as proton pump inhibitors (12, 15) have sparked renewed interest in these tripyrrole pigments. The in vivo activities of metacycloprodigiosin hydrochloride and several other prodigiosins against *Plasmodium berghei* in mice have been reported (2, 6). According to the literature (6), elongation of the mean survival time of *P. berghei*-infected mice by oral administration of metacycloprodigiosin hydrochloride was observed with a dose of 20 mg/kg. Although members of this class of compounds have shown activity against malaria in an animal model, little has been done concerning their further development. This situation may be due to the lack of availability of compounds in large amounts. To the best of our knowledge, this is the first report on the in vitro activity of a prodigiosin against a human malaria parasite (*P. falciparum*). The high antiplasmodial activity, good selectivity index, and structural novelty of this class of compounds deserve further investigation.

Financial support from the Biodiversity Research and Training Program (BRT) is gratefully acknowledged. The BIOTEC antimalarial screening laboratory was partly supported by the Thailand-Tropical Diseases Research Programme (T-2). Y.T. thanks BIOTEC, NSTDA, for the senior research fellowship award.

We are grateful to Arinthip Thamchaipenet, Kasetsart University, for identification of strain BCC 4785.

REFERENCES

1. **Baker, G. H., B. J. Brown, R. J. J. Dorgan, J. R. Everett, S. V. Ley, A. M. Z. Slawin, and D. J. Williams.** 1987. A conformational study of bafilomycin A1 by X-ray crystallography and NMR techniques. Tetrahedron Lett. **28**:5565–5568.
2. **Castro, A. J.** 1967. Antimalarial activity of prodigiosin. Nature 903–904.
3. **Desjardins, R. E., C. J. Canfield, and J. D. Chulay.** 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob. Agents Chemother. **16**:710–718.
4. **Ekthawatchai, S., M. Isaka, P. Kittakoop, P. Kongsaeree, C. Sirichaiwat, M. Tanticharoen, B. Tarnchompoo, Y. Thebtaranonth, and Y. Yutavong.** 1999. Synthetic and naturally occurring antimalarials. J. Heterocycl. Chem. **36**: 1599–1605.
5. **Fürstner, A., J. Grabowski, C. W. Lehmann, T. T. Kataoka, and K. Nagai.** 2001. Synthesis and biological evaluation of nonylprodigiosin and macrocyclic prodigiosin analogues. ChemBioChem **2**:60–68.
6. **Gerber, N. N.** 1975. A new prodiginine (prodigiosin-like) pigment from streptomyces. Antimalarial activity of several prodiginines. J. Antibiot. **28**: 194–199.
7. **Isaka, M., A. Jaturapat, W. Kladwang, J. Punya, Y. Lertwerawat, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth.** 2000. Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. Planta Med. **66**:473–475.
8. **Isaka, M., J. Punya, Y. Lertwerawat, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth.** 1999. Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. J. Nat. Prod. **62**:329–331.
9. **Isaka, M., M. Tanticharoen, P. Kongsaeree, and Y. Thebtaranonth.** 2001. Structures of cordpyridones A-D, antimalarial *N*-hydroxy- and *N*-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. J. Org. Chem. **66**:4803–4808.
10. **Jaturapat, A., M. Isaka, N. L. Hywel-Jones, Y. Lertwerawat, S. Kamchonwongpaisan, K. Kirtikara, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth.** 2001. Bioxanthracenes from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. I. Taxonomy, fermentation, isolation and antimalarial activity. J. Antibiot. **54**:29–35.
11. **Kakinuma, K., C. A. Hanson, and K. L. Rinehart, Jr.** 1976. Spectinabilin, a new nitro-containing metabolite isolated from *Streptomyces spectabilis*. Tetrahedron **32**:217–222.
12. **Matsuya, H., M. Okamoto, T. Ochi, A. Nishikawa, S. Shimizu, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, and S. Ohkuma.** 2000. Reversible and potent uncoupling of hog gastric $(H^+ + K^+)$-ATPase by prodigiosins. Biochem. Pharmacol. **60**:1855–1863.
13. **Morel, C. M.** 2000. Reaching maturity—25 years of the TDR. Parasitol. Today **16**:522–526.
14. **Nakamura, A., K. Nagai, K. Ando, and G. Tamura.** 1986. Selective suppression by prodigiosin of the mitogenic response of murine splenocytes. J. Antibiot. **39**:1155–1159.
15. **Sato, T., H. Konno, Y. Tanaka, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, and S. Ohkuma.** 1998. Prodigiosins as a new group of H^+/Cl^- symporters that uncouple proton translocators. J. Biol. Chem. **273**:21455–21462.
16. **Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M. R. Boyd.** 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. **82**: 1107–1112.
17. **Songia, S., A. Mortellaro, S. Taverna, C. Fornasiero, E. A. Scheiber, E. Erba, F. Colotta, A. Mantovani, A. M. Isetta, and J. Golay.** 1997. Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes: retinoblastoma protein, cyclin-dependent kinase-2, and cyclin-dependent kinase-4 as molecular targets. J. Immunol. **158**:3987–3995.
18. **Wasserman, H. H., D. D. Keith, and G. C. Rodgers.** 1976. The structure of metacycloprodigiosin. Tetrahedron **32**:1855–1861.
19. **Wasserman, H. H., G. C. Rodgers, and D. D. Keith.** 1969. Metacycloprodigiosin, a tripyrrole pigment from *Streptomyces longisporus ruber*. J. Am. Chem. Soc. **91**:1263–1264.
20. **Werner, G., H. Hagenmaier, K. Albert, and H. Kohlshorn.** 1983. The structure of the bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Tetrahedron Lett. **24**:5193–5196.
21. **World Health Organization.** 1998. W. H. O. fact sheet 94. World Health Organization, Geneva, Switzerland.