

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโน

Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids
Carrying β -Amino Acid Spacers

ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2545
จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

1 ตุลาคม 2544 - 30 กันยายน 2545

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของทุกฝ่าย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ แหล่งเงินทุนสนับสนุน จากทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2545 และทุนเมธีวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และนิสิต/ผู้ช่วยวิจัยที่เป็นกำลังสำคัญของโครงการได้แก่ นายจตุรงค์ สุภาพพร้อม และขอขอบคุณความอนุเคราะห์ของ Prof. Gordon Lowe, Oxford University ประเทศสหราชอาณาจักรที่ให้คำปรึกษาในโครงการวิจัย และ Dr. Carolyn A. Carr/Dr. Martin S. Westwell, Synptica Research, UK ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่อง UV-spectrophotometer และ MALDI-TOF mass spectrometer ดร.พงษ์ ชาญยุทธนากร ที่ให้คำปรึกษาในการทำเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งระบบสาธารณูปโภคต่างๆ ที่จำเป็น

บทคัดย่อ

เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นโมเลกุลเลียนแบบกรดนิวคลีอิกซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอเบสที่ต่อกันเป็นสายเปปไทด์โดยมีระยะห่างและการจัดเรียงตัวในสามมิติของนิวคลีโอเบสที่เหมาะสมที่จะเกิดสารเชิงซ้อนที่มีเสถียรภาพสูงกับกรดนิวคลีอิก สารเหล่านี้มีสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกคล้ายคลึงกับกรดนิวคลีอิกธรรมชาติ แต่ก็มีคุณสมบัติที่แตกต่างที่เป็นลักษณะเฉพาะอยู่หลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความแข็งแรงของการจับยึด ดังนั้นมันจึงเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและการรักษาโรคโดยหลักการแอนติเซนส์ ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะศึกษาการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่ถูกจำกัดคอนฟอร์เมชันโดยการใส่วงแหวนพิโรลิดีนเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างและเชื่อมกันด้วยกรดเบต้าอะมิโนที่ยืดหยุ่นได้ 2 ชนิดคือ เอ็น-อะมิโน-เอ็นเมทิลไกลซีน ซึ่งมีประจุบวก และ อะมิโนออกซีอะซิติกแอซิด ซึ่งมีประจุเป็นกลางภายใต้ภาวะของร่างกาย โดยจะเลือกสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีไทมีนเป็นนิวคลีโอเบส และมีความยาว 10 เบส และมีสเตอริโอเคมีบนวงแหวนพิโรลิดีนเป็น (2R,4R) และ (2S,4S) ซึ่งพบว่าสามารถสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็น เอ็น-อะมิโน-เอ็นเมทิลไกลซีน ได้เป็นผลสำเร็จโดยอาศัยปฏิกิริยาการควบคู่ของสะพานเชื่อมกับ (2R,4R) หรือ (2S,4S)-พิโรลิดีนโมโนเมอร์ บนวัฏภาคของแข็ง หมู่มากป้องอะมิโนที่ใช้คือหมู Fmoc และกระตุ้นหมูคาร์บอกซิลโดยใช้เพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์ ในขณะที่การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็น อะมิโนออกซีอะซิติกแอซิดโดยวิธีเดียวกันไม่ประสบความสำเร็จ ได้ศึกษาการจับยึดของเดคะไทมีนเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นเอ็น-อะมิโน-เอ็นเมทิลไกลซีนที่สังเคราะห์ได้ทั้งสองไอโซเมอร์กับโพลีดีออกซีดีนิลิกแอซิด ซึ่งเป็นตัวแทนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และโพลีอะดีนิลิกแอซิด ซึ่งเป็นตัวแทนของอาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม โดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีไทเทรชัน และ CD สเปกโตรสโคปี พบว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้งสองไม่สามารถจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ การศึกษา CD สเปกตรัมของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเหล่านี้เสนอแนะว่าสารทั้งสองจัดตัวอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่แน่นอนคอนฟอร์เมชันหนึ่งทำให้มันไม่สามารถจับยึดกับกรดนิวคลีอิกเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรได้ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพิโรลิดีนเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ศึกษานี้ขึ้นกับโครงสร้างของสะพานเชื่อมที่จำเพาะเจาะจงมาก ข้อมูลที่ได้มีความสำคัญอย่างยิ่งในการออกแบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ๆ ที่มีสมบัติในการจับยึดที่ดีขึ้นต่อไป

สารบัญ

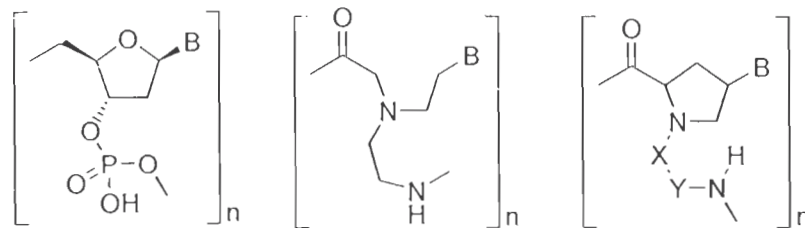
เรื่อง	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด	1
เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด	2
เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโน	4
แนวคิดหลักของงานวิจัย	5
บทที่ 2 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	8
การสังเคราะห์ส่วนของสะพานเชื่อม	8
การสังเคราะห์ เอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน (ไนโตรเจน) โมโนเมอร์ (8)	8
การสังเคราะห์อะมิโนออกซีอะซิติกแอซิด (ออกซิเจน) โมโนเมอร์ (9)	11
การสังเคราะห์ส่วนของพิโรลิดีนโมโนเมอร์	12
การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด	15
การศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก	18
การศึกษาโดยเจลอเล็กโตรโฟรีซิส	18
การศึกษาโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี	19
การศึกษาโดยเทคนิคเซอร์คิวลาร์ไดโครอิมัสเปกโตรสโคปี	23
วิเคราะห์ผลการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก	28
บทที่ 3 รายละเอียดการทดลอง	29
การสังเคราะห์ เอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน โมโนเมอร์ (8)	29
การสังเคราะห์ อะมิโนออกซีอะซิติกแอซิด โมโนเมอร์ (9)	30
การสังเคราะห์ (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-พิโรลิดีนโมโนเมอร์ (10)	31
การสังเคราะห์ (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-พิโรลิดีนโมโนเมอร์ (11)	32
การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4a, 4b, 5a และ 5b	33
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	37
เอกสารอ้างอิง	38

บทที่ 1

บทนำ

เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

กรดนิวคลีอิกหรือโพลิโกนิวคลีโอไทด์ (โพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ) มีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคบางประเภทที่เกี่ยวข้องเนื่องกับการแสดงออกของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยการจับยึดอย่างจำเพาะเจาะจงกับสารพันธุกรรมเช่น ดีเอ็นเอ และเอ็มซีเอ็นเจอาร์เอ็นเอ ซึ่งมีผลทำให้การผลิตโปรตีนถูกยับยั้ง ผลการวิจัยจำนวนมากได้แสดงให้เห็นว่าหลักการบำบัดโรคโดยการควบคุมการแสดงออกทางพันธุกรรมที่ระดับยีนโดยตรงดังกล่าวซึ่งมีชื่อเรียกว่าหลักการแอนติเซนส์ (The Antisense Principle) [1] มีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติโดยหลักการแล้ววิธีนี้จะสามารถควบคุมการแสดงออกทางพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะเจาะจงถึงระดับของสารพันธุกรรม ซึ่งจะมีผลทำให้การควบคุมมีประสิทธิภาพมากกว่าการควบคุมในระดับของเอนไซม์หรือรีเซพเตอร์ซึ่งสร้างจากการถอดรหัสสารพันธุกรรมอีกทีหนึ่ง การออกแบบของแอนติเซนส์โพลิโกนิวคลีโอไทด์สามารถทำได้โดยง่ายถ้าทราบลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่เป็นเป้าหมายเนื่องจากการจับยึดของคู่เบสระหว่างแอนติเซนส์โพลิโกนิวคลีโอไทด์และกรดนิวคลีอิกที่เป็นเป้าหมายจะเป็นไปอย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (A-T, C-G) หรือ วัตสัน-คริก-ชุกสทิน (T-A-T และ C⁺.G-C) อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่สำคัญในการพัฒนารักษาโรคโดยอาศัยหลักการแอนติเซนส์ไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติก็คือโพลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างหลักที่เป็นสายไรโบสหรือดีออกซีไรโบสฟอสเฟตสลายตัวได้ง่ายด้วยการกระทำของเอนไซม์นิวคลีเอสในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงมีผู้หันมาให้ความสนใจกับโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนเพื่อทำให้มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้น ประกอบกับมีสมบัติอื่นที่ต้องการเช่น การละลายน้ำ การแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และความจำเพาะเจาะจงในการจับยึดกับสารพันธุกรรมที่เป็นเป้าหมายเป็นต้น



DNA

PNA-1

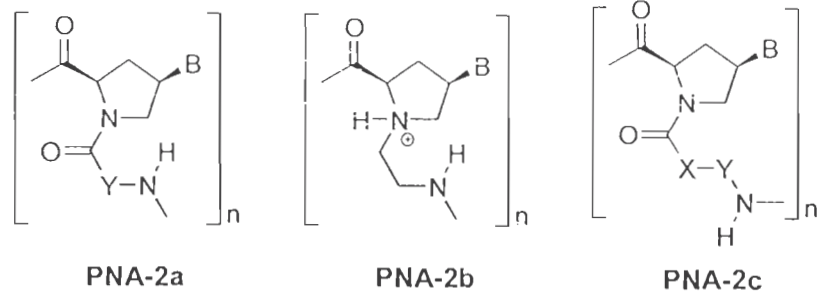
PNA-2

คณะวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยโคเปนเฮเกนได้แสดงให้เห็นว่าการแทนที่โครงสร้างไรโบสฟอสเฟตในกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (DNA) ด้วยสายของเปปไทด์ซึ่งมีจำนวนพันธะและระยะห่างของอะตอมใกล้เคียงกัน จะได้โมเลกุลใหม่ซึ่งมีชื่อเรียกว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด หรือพีเอ็นเอ (PNA) [2-5] (PNA-1) เป็นที่น่าประหลาดใจอย่างยิ่งว่า ไม่เพียงแต่เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดจะสามารถยึดจับกับโพลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary sequence) เกิดเป็นโมเลกุลลูกผสม (hybrid molecule) แบบดับเบิล

หรือทริปเปิลเฮลิคซ์เช่นเดียวกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติเท่านั้น แต่โมเลกุลลูกผสมที่ได้ยังมีเสถียรภาพสูงกว่าโมเลกุลลูกผสมที่เกิดจากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติอีกด้วยซึ่งเชื่อกันว่าเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดบร่าคจากแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตดังที่ปรากฏในไรโบสฟอสเฟต นอกจากนี้มันยังมีความจำเพาะ (specificity) ในการจับยึดมากกว่าด้วยดังจะเห็นได้จากความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นระหว่างเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด-ดีเอ็นเอจะลดลงมากกว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นระหว่างดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอเมื่อมีเบสที่ไม่เข้าคู่กันอยู่ด้วย (mismatched base pair เช่น A-A, A-C, G-T เป็นต้น) ด้วยสมบัติการจับยึดกับสารพันธุกรรมที่คัดเลือกประกอบกับความเสถียรต่อเอ็นไซม์นิวคลีเอสและโปรตีเอส เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดจึงเป็นสารประกอบใหม่ที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นแอนติเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ [6-10] ดังจะเห็นจากงานวิจัยจำนวนมากที่หันมาใช้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเพื่อวัตถุประสงค์นี้แทนการใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบางส่วน นอกจากนี้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดยังได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัยทางชีววิทยาโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การศึกษาการทำงานของยีนในสิ่งมีชีวิต [11] การใช้แทนดีเอ็นเอเพื่อเป็นโพรบในการตรวจสอบโรคบางชนิดเช่นโรคหัวใจ [12] หรือโรคซิสติกไฟโบรซิส [13] การตรวจสอบพอยนต์มิวเทชันในการวิเคราะห์โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR clamping) [14] การใช้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดร่วมกับ nuclease S1 เพื่อเป็นเครื่องมือในการตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งใดๆที่ต้องการอย่างจำเพาะเจาะจง [15] เป็นต้น มีสิทธิบัตรสหรัฐอเมริกาที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการใช้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดในวัตถุประสงค์ต่างๆ ถึงปัจจุบัน (มีนาคม ค.ศ. 2001) จำนวนถึง 764 เรื่อง [16] และมีบทความวิจัยตีพิมพ์อีกนับพันเรื่อง [17] ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันความสำคัญของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นอย่างดีซึ่งส่วนใหญ่ในสิทธิบัตรและบทความวิจัยเหล่านี้จะอาศัยระบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-1) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Nielsen ในปี 1991 เป็นหลัก

เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด

การศึกษาโครงสร้างในสามมิติของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-1) และสารประกอบเชิงซ้อนของมันกับกรดนิวคลีอิกและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ในช่วงประมาณ 5-6 ปีที่ผ่านมา [18,19] ได้ทำให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความสามารถในการจับยึดระหว่างเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดและกรดนิวคลีอิก และแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดน่าจะยังสามารถดัดแปลงได้เพื่อให้มีความสามารถในการจับยึดและมีการเลือกสรรที่ดียิ่งขึ้นไปอีก นอกจากนี้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดยังมีคุณสมบัติที่ไม่พึงประสงค์บางประการ เช่น การละลายที่จำกัด การเกาะกลุ่มกันเอง (self aggregation) การจับยึดแบบไม่จำเพาะเจาะจงในบางครั้ง และการไม่เลือกสรรระหว่างการจับกับกรดนิวคลีอิกในรูปแบบพาราเรลและแอนติพาราเรล ดังนั้นในช่วงประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาจึงได้มีกลุ่มวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจและพัฒนาโมเลกุลที่คล้ายคลึงกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดขึ้นมาเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ [20-41] โดยสำหรับงานที่ทำก่อนปี 1998 สามารถศึกษารายละเอียดได้จากเอกสารอ้างอิงที่เป็นบทความปริทรรศน์ [6-10]



กลุ่มของผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการบังคับให้โครงสร้างของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีความยืดหยุ่นสูงให้อยู่ในคอนฟอร์เมชันเดียวจะทำให้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ได้สามารถเกิดโมเลกุลลูกผสมที่มีเสถียรภาพสูงมากยิ่งขึ้น จึงได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์พีไรดิโนลเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-2) ที่ประกอบด้วยวงแหวนพิโรลิดีนที่เชื่อมต่อกับนิวคลีโอเบสโดยให้มีสเตอริโอเคมีของวงแหวนพิโรลิดีนเป็น (2*R*,4*R*) ซึ่งสอดคล้องกับนิวคลีโอไซด์ที่พบในธรรมชาติ และมีสะพานเชื่อมเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ [30-37] ในช่วงปี ค.ศ. 1992 - 1997 กลุ่มของผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-2a) ที่ประกอบด้วยโครงสร้างของโปรลีนที่เชื่อมต่อกับนิวคลีโอเบสโดยให้มีสเตอริโอเคมีสอดคล้องกับนิวคลีโอไซด์ที่พบในธรรมชาติ (2*R*,4*R*) และมีแอลฟาอะมิโนแอซิดเช่นไกลซีนเป็นสะพานเชื่อมระหว่างนิวคลีโอเบส (PNA-2a, Y = -CH₂-) [30-32] ผลการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีแสดงให้เห็นว่าสารประกอบดังกล่าวแสดงสมบัติการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ธรรมชาติ [33] อย่างไรก็ตาม ความพยายามที่จะทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการจับยึดต่อไปโดยเทคนิคทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์และเอ็กซ์เรย์คริสตัลโลกราฟีไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากความสามารถในการละลายของโมเลกุลลูกผสมที่เกิดขึ้นไม่เพียงพอ เมื่อแทนที่ไกลซีนด้วยซีรีนจะช่วยเพิ่มการละลายของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด [PNA-2a, Y = -CH(CH₂OH)-] และโมเลกุลลูกผสมของมันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์แต่ทำให้สมบัติในการจับยึดกับดีเอ็นเอของมันลดลง [34,35] ในขณะที่จอร์แดนและคณะ [27,28] รายงานว่าระบบที่คล้ายกันแต่มีสเตอริโอเคมีที่วงแหวนโปรลีนแตกต่างกันไม่สามารถจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ได้ แต่โพลิเมอร์ผสมของมันกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (II) มีความเสถียรในการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ดีขึ้น

ในปี 2000 โดยความสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กลุ่มของผู้วิจัยได้สังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ (PNA-2b) ที่มีสเตอริโอเคมีที่วงแหวนพิโรลิดีนเป็น (2*R*,4*R*) และมีหมู่อะมิโนเอทิลเป็นสะพานเชื่อมแทนกรดแอลฟาอะมิโน [35-37] และพบว่านอกจากเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ได้จะละลายน้ำได้ดีแล้วยังสามารถเลือกจับกับกรดไรโบนิวคลีอิกได้ดีกว่ากรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก [37] และยังพบว่าค่าพีเอชมีผลต่อความแข็งแรงของการจับยึดของโมเลกุลดังกล่าวกับกรดไรโบนิวคลีอิกอีกด้วย แสดงว่าการโปรโตเนตของเอมีนในโดรนอะตอมใน (PNA-2a) ที่พีเอชที่เป็นกลางหรือกรดอ่อนมีส่วนช่วยให้การจับยึดทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุกับสารไรโบสฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบ จากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าการเลือกจับกับกรดไรโบนิวคลีอิกได้ดีกว่ากรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกนั้นเป็นผลมาจากปัจจัยทางด้านโคเนตริกส์หรือเทอร์โมไดนามิกส์ แต่การทดลองของ

Micklefield เมื่อไม่นานมานี้ [38] กับระบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่คล้ายกันมีข้อมูลที่น่าสนับสนุนว่าการเลือกจับนั้นเกิดจากปัจจัยทางด้านโคเนดิกส์

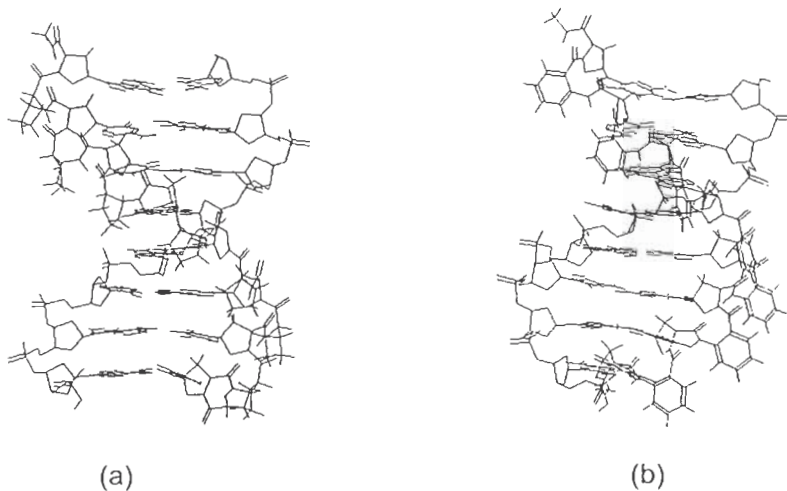
เป็นที่น่าสังเกตว่าในงานวิจัยของ D'Costa และคณะซึ่งตีพิมพ์เมื่อไม่นานมานี้ [29] เกี่ยวกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-2b) ที่มีสเตอริโอเคมีที่วงแหวนพิโรลิดีนแตกต่างออกไประบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดดังกล่าวสามารถจับกับกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกได้ดีจากการศึกษาโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และไม่มีรายงานถึงการศึกษาการจับยึดกับกรดไรโบนิวคลีอิก ถ้าเป็นเช่นนั้นจริงย่อมแสดงว่าสเตอริโอเคมีของวงแหวนพิโรลิดีนมีความสำคัญยิ่งยวดต่อสมบัติการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงระบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนพิโรลิดีนคล้ายกันโดยกลุ่มวิจัยอื่นจากทั่วโลก ซึ่งหลายชนิดแสดงสมบัติในการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่น่าสนใจดังตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Altman [39] และ Puschl [40,41] เป็นต้น

ผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าพิโรลิดีนเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-2) มีศักยภาพสูงในการพัฒนาต่อไปเพื่อการประยุกต์ใช้งานเช่นเดียวกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-1) และอาจมีสมบัติบางประการที่ดีกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลือกสรร (selectivity) ในการจับยึด

เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโน

งานวิจัยเกี่ยวกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกบังคับโดยเป็นวงแหวนพิโรลิดีนยังอยู่ในระยะเริ่มต้นเท่านั้น จึงมีผู้ศึกษาอย่างค่อนข้างจำกัดและยังขาดข้อมูลสำคัญอีกหลายประการที่จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงปัจจัยทางโครงสร้างที่มีอิทธิพลต่อการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดกับสารพันธุกรรมจากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่ายังไม่เคยมีผู้วิจัยกลุ่มอื่นได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของพิโรลิดีนเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิด (PNA-2) ที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโน (PNA-2c) และความสามารถในการจับยึดของมันกับกรดนิวคลีอิกหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์มาก่อน งานวิจัยนี้จึงจะมุ่งเน้นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดดังกล่าว โดยมีสมมติฐานว่าการใช้กรดเบต้าอะมิโนมาเป็นสะพานเชื่อมอาจช่วยจำกัดคอนฟอร์เมชันของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ได้ยิ่งขึ้นไปอีกดังที่ Gellman ได้แสดงให้เห็นว่าโอลิโกเมอร์ของกรดเบต้าอะมิโนมีคอนฟอร์เมชันเป็นเกลียวที่ค่อนข้างแน่นอนและทำนายได้ง่ายกว่าโอลิโกเมอร์ของกรดแอลฟาอะมิโน [42,43] การจำกัดคอนฟอร์เมชันนี้น่าจะช่วยให้ความสามารถในการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ถ้าสายของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดนั้นถูกจำกัดอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสม ผลการศึกษาด้วยแบบจำลองโมเลกุล [44] พบว่าแนวคิดนี้สามารถเป็นไปได้ (แผนภาพ 1.2) และผลการทดลองเบื้องต้นโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสได้พิสูจน์ว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (PNA-2c) ที่มีกรดเบต้าอะมิโนที่เหมาะสมเช่น *R*-aminopyrrolidine-2-carboxylic acid เป็นสะพานเชื่อมนั้นสามารถจับยึดกับโอลิโกดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสคู่สมได้จริง [45] จึงเห็นสมควรที่จะมีการศึกษาสมบัติการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโนนี้ต่อไปในรายละเอียดทั้งในแง่ของความจำเพาะเจาะจง ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการจับยึด ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความสามารถในการจับยึด และการศึกษาโครงสร้างในสามมิติ ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ในสาขาเคมีของสารประกอบเลียนแบบธรรมชาติ (Biomimetic Chemistry) และการจดจำในระดับโมเลกุล

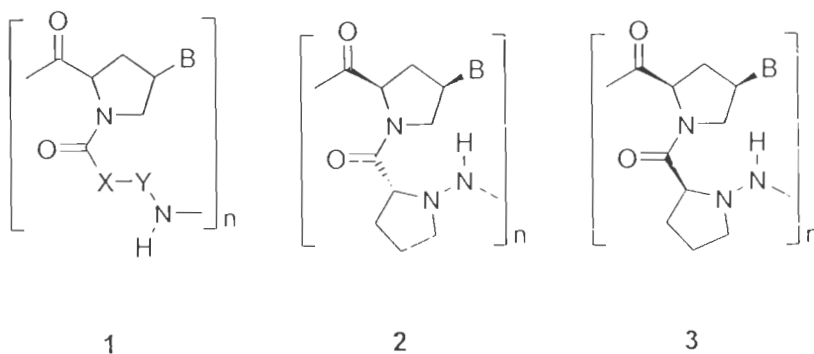
(Molecular Recognition) โดยจะทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด และความสามารถในการจับยึดกับสารพันธุกรรม ซึ่งจะเป็พื้นฐานของการออกแบบโมเลกุลของเปปไทด์ นิวคลีอิกแอซิดที่มีสมบัติการจับยึดกับสารพันธุกรรมที่ดียิ่งขึ้นไปอีกในอนาคต นอกจากนี้ยังได้วิธีการสังเคราะห์โมเลกุลที่เป็นสารประกอบเลียนแบบสารพันธุกรรมชนิดใหม่ซึ่งมีสมบัติการจับยึดกับสารพันธุกรรมในลักษณะที่จำเพาะเจาะจงต่อลำดับเบส ซึ่งจะมีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาต่อไปเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางไบโอเทคโนโลยีเช่นเป็นแอนติเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์

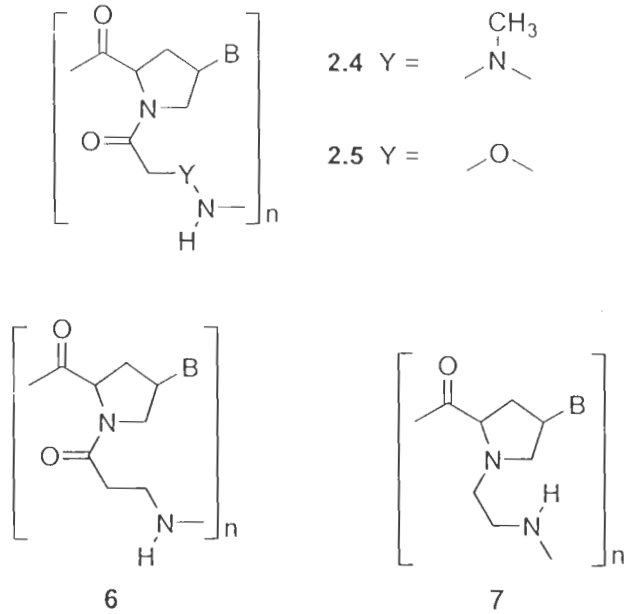


แผนภาพ 1.2 แสดงแบบจำลองโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี (1R,2S)-2-aminocyclopentane carboxylic acid (a) หรือ anthranilic acid (b) เป็นสะพานเชื่อม กับกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกที่มีลำดับเบสคู่สมกัน

แนวคิดหลักของงานวิจัย

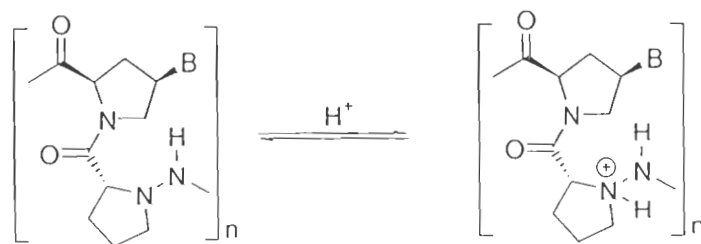
โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะสังเคราะห์และศึกษาสมบัติของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเป็นไดเปปไทด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของโปรลีนที่ต่อกับนิวคลีโอเบสสลับกับสะพานเชื่อมที่เป็นกรดเบต้าอะมิโน (1) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่มีสะพานเชื่อมแบบไม่เป็นวงแหวน 2 และ 3 ซึ่งอาจเขียนเป็นสูตรทั่วไปได้ดังนี้ (แผนภาพ 1.3)





แผนภาพ 1.3 สูตรโครงสร้างทั่วไปของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโน (1 - 6) และหมู่อะมิโนเอทิล (7)

สาเหตุที่คณะผู้วิจัยให้ความสนใจกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมแบบไม่เป็นวงแหวน เนื่องจากมีความเชื่อว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมที่มีคอนฟอร์เมชันที่ยืดหยุ่นได้ทั้งสองชนิดน่าจะปรับตัวให้อยู่ในคอนฟอร์เมชันต่างๆ ได้ง่ายกว่าพวกที่มีสะพานเชื่อมเป็นวงแหวน ดังเช่นเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี 1-อะมิโนพิโรลิดีน-2-*R*-คาร์บอกซิลิกแอซิดเป็นสะพานเชื่อม (2) แสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเออย่างแข็งแรงเป็นพิเศษ และมีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสอย่างยิ่ง นอกจากนี้ เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดดังกล่าวยังเลือกจับกับดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรกว่าของอาร์เอ็นเอมาก [46] สาเหตุที่เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นวงแหวนดังกล่าวจับกับดีเอ็นเอคู่สมได้อย่างแข็งแรงนั้นส่วนหนึ่งเชื่อว่าเกิดจากแรงดึงดูดระหว่างประจุลบบนหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอ กับไนโตรเจนอะตอมบนวงแหวนพิโรลิดีน ซึ่งที่ pH 7.0 น่าจะอยู่ในรูปโปรตอนेटจึงมีประจุไฟฟ้าเป็นบวก (แผนภาพ 1.4)



แผนภาพ 1.4 การเกิดโปรตอนะชันของพิโรลิดีนไนโตรเจนอะตอมในเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 2

อย่างไรก็ตาม การที่ส่วนของสะพานเชื่อมมีคอนฟอร์เมชันและสเตอริโอเคมีที่เหมาะสมก็มีความสำคัญอย่างยิ่งยวดต่อความสามารถในการจับยึด ดังจะเห็นได้จากเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี 1-อะมิโนพิโรลิดีน-2S-คาร์บอกซิลิกแอซิด เป็นสะพานเชื่อม (3) กลับไม่สามารถจับยึดกับทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ [45,46] เช่นเดียวกับเมื่อใช้เบต้าอะลานีน (6) ซึ่งมีความยืดหยุ่นของคอนฟอร์เมชันสูงเป็นส่วนของสะพานเชื่อม [46] ดังนั้นจึงน่าคิดต่อไปว่าหากเพิ่มความยืดหยุ่นของส่วนสะพานเชื่อมโดยที่ยังคงรักษาความเป็นประจวบกันได้ดังเช่นในเอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน จะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ได้กับการดนิวคลีอิก

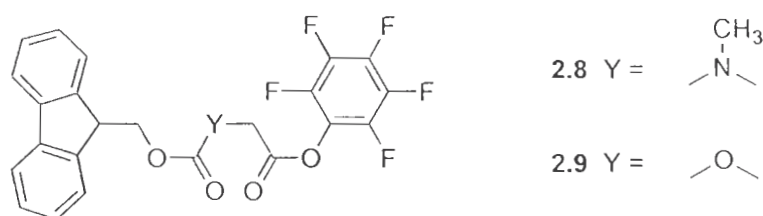
ตามทฤษฎี ประกอบกับผลการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้สามารถทำนายได้ว่าการเพิ่มความยืดหยุ่นของส่วนสะพานเชื่อมน่าจะมีผลกระทบในทางลบต่อความแข็งแรงของการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกเนื่องจากมันจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียเอ็นโทรปีของระบบในขณะที่เกิดการจับยึดเนื่องจากคอนฟอร์เมชันของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดจะถูกล็อคให้อยู่กับที่เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองจากกลุ่มของผู้วิจัยและกลุ่มวิจัยอื่นได้แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดซึ่งมีสะพานเชื่อมที่ยืดหยุ่นมากดังเช่น หมูอะมิโนเอทิล (7) ก็ยังสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้อย่างแข็งแรงพอสมควร [37] ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้วว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมที่มีคอนฟอร์เมชันที่ยืดหยุ่นได้น่าจะปรับตัวให้อยู่ในคอนฟอร์เมชันต่างๆ ได้ง่ายกว่าพวกที่มีสะพานเชื่อมเป็นวงแหวน ซึ่งย่อมจะส่งผลกระทบต่อลักษณะเฉพาะของการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกในลักษณะที่แตกต่างออกไป นอกจากนี้ การใช้กรดเบต้าอะมิโนที่ปราศจากจุดศูนย์กลางไครัลเป็นสะพานเชื่อมจะทำให้สามารถศึกษาอิทธิพลของสเตอริโอเคมีของส่วนวงแหวนพิโรลิดีนได้ง่ายขึ้นโดยไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์ระบบของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดขึ้นมาหลายระบบเกินไป

บทที่ 2

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การสังเคราะห์ส่วนของสะพานเชื่อม

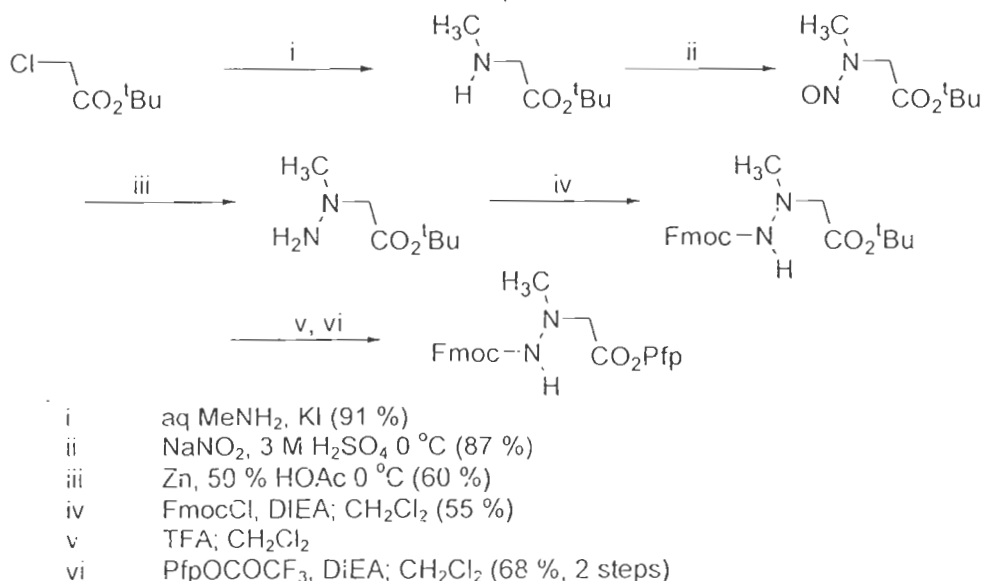
ส่วนของสะพานเชื่อมที่จะสังเคราะห์ตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้คือกรดเบต้าอะมิโนสองชนิดที่มี X = NCH₃ (ไนโตรเจนโมโนเมอร์, 8) และ O (ออกซิเจนโมโนเมอร์, 9) ตามลำดับ โดยกรดอะมิโนเหล่านั้นจะต้องถูกปกป้องโดยหมู่ปกป้องที่เหมาะสม จากประสบการณ์ที่ผ่านมาพบว่าหมู่ 9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl (Fmoc) เป็นหมู่ปกป้องอะมิโนที่ใช้ได้ผลดีสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง และก่อนการนำไปสังเคราะห์เปปไทด์จะต้องกระตุ้น (activate) ปลายด้านคาร์บอกซิลให้เป็นแอคทีฟเอสเทอร์ได้แก่ เพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์เสียก่อน ดังนั้นโมเลกุลเป้าหมายคือ (แผนภาพ 2.1)



แผนภาพ 2.1 โครงสร้างของ N-protected beta-amino acid spacer

การสังเคราะห์ เอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน (ไนโตรเจน) โมโนเมอร์ (8)

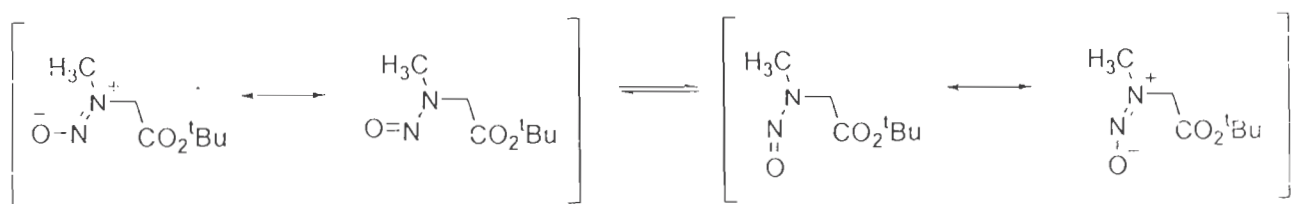
ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ไนโตรเจนโมโนเมอร์ของส่วนสะพานเชื่อมได้แก่ N-amino-N-methylglycine ในรูปที่ถูกปกป้องทางด้านไนโตรเจนด้วยหมู่ Fmoc และกระตุ้นด้านคาร์บอกซิลด้วยเพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์ แนวทางการสังเคราะห์โมเลกุลดังกล่าวแสดงได้ดังแผนภาพ 2.2



แผนภาพ 2.2 การสังเคราะห์ C-activated, N-protected spacer (X = NCH₃)

การสังเคราะห์เริ่มต้นจากปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอไฟล์ของคลอรีนใน *tert*-butyl chloroacetate ด้วย 40 % aqueous methylamine ที่มากเกินไป พบว่าปฏิกิริยาไม่เกิดที่อุณหภูมิห้องแต่ถ้าเติม KI ลงไป ปริมาณ 1 eq เพื่อเป็นคะตะลิสต์จะเกิดปฏิกิริยาคายความร้อนอย่างรวดเร็วให้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-methylsarcosine *tert*-butyl ester ตามต้องการ แม้ว่าในกรณีนี้การเกิดการอัลคิลเลชันของเมทิลามีนมากกว่าหนึ่งครั้ง (multiple alkylation) โดย *tert*-butyl chloroacetate จะไม่ใช่ปัญหาสำคัญเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ *N*-methylsarcosine *tert*-butyl ester มีความเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่น้อยกว่าเมทิลามีนด้วยความเกาะกะที่เพิ่มขึ้นและด้วยปัจจัยอิเล็กทรอนิกส์จากหมู่อัลคอกซีคาร์บอนิลเมทิลซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนที่จะไปลดความหนาแน่นของอิเล็กตรอนบนไนโตรเจนอะตอมลง อย่างไรก็ตาม เพื่อหลีกเลี่ยงโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยากว่าจึงยังจำเป็นต้องใช้ methylamine มากเกินไป โดยที่เอมีนที่มากเกินไปจะทำหน้าที่จับแก๊ส HCl ที่เกิดจากปฏิกิริยาอีกด้วย เชื่อว่าบทบาทของ KI คือไอโอไดด์ไอออนทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ไปแลกเปลี่ยนกับอะตอมของคลอรีนใน *tert*-butyl chloroacetate ก่อนเกิดเป็น *tert*-butyl iodoacetate ซึ่งว่องไวต่อปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอไฟล์มากขึ้น และแยกผลิตภัณฑ์ออกโดยการสกัดสารละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นนี้เป็นของเหลวใสไม่มีสี ปริมาณผลผลิต 91 % โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมแสดงสัญญาณที่สอดคล้องกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และปราศจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการอัลคิลเลตมากกว่า 1 ครั้งหรือผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่น จึงสามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ work-up ไปทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปได้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

ในขั้นต่อมาเป็นการทำปฏิกิริยา *N*-nitrosation ของ *N*-methylsarcosine *tert*-butyl ester โดยใช้ของผสมระหว่างโซเดียมไนไตรต์และกรดซัลฟิวริก 3 M ที่มากเกินไป เนื่องจากกรดไนไตรต์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาไม่เสถียรจึงต้องทำปฏิกิริยาที่ 0 °C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-nitroso-*N*-methylglycine *tert*-butyl ester (หมายเหตุ: สารประกอบนี้จัดเป็นพวกเอ็น-ไนโตรซามีน ซึ่งสารส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นสารที่เชื่อว่าอาจก่อมะเร็งได้ จึงต้องให้ความระมัดระวังเป็นพิเศษในการสังเคราะห์ ใช้งาน และกำจัด) สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกมาได้โดยการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองใส ซึ่งจะกลายเป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อนเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น ปริมาณผลผลิต 87 % สารประกอบนี้แสดงลักษณะของ thin layer chromatogram และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมคล้ายกับเป็นสารผสมของสาร 2 ชนิด ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจากการหมุนอย่างไม่อิสระ (restricted rotation) ของพันธะ N-N ของสารประกอบ *N*-nitroso ดังแสดงในแผนภาพ 2.3 ความจริงข้อนี้เป็นที่ทราบกันดีในสารประกอบที่มีพันธะดังกล่าว สามารถหาสัดส่วนของทั้งสองไอโซเมอร์ว่าได้ประมาณ 1:1 ในตัวทำละลายที่เป็นคลอโรฟอร์มจากการอินทิเกรตพีคของทั้งสองไอโซเมอร์ในโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์เทียบกัน



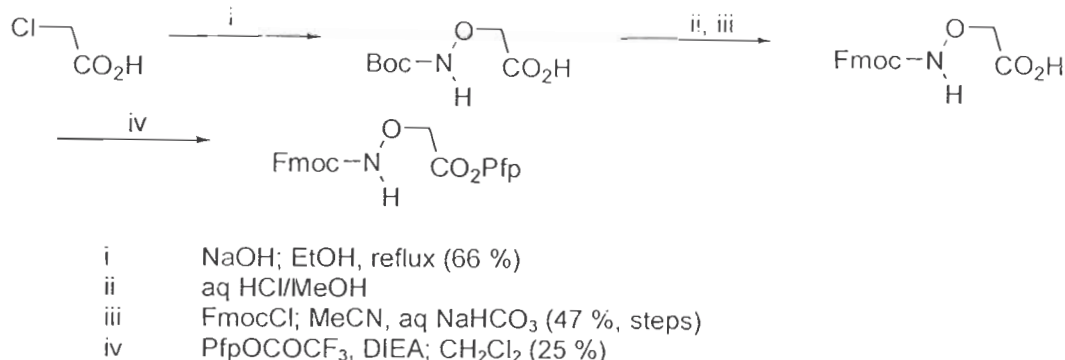
แผนภาพ 2.3 Restricted rotation in *N*-Nitroso-*N*-methylglycine *tert*-butyl ester

ขั้นตอนต่อไปเป็นการทำปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไนโตรโซ ในบรรดาวิธีการที่ทดสอบมาทั้งหมด พบว่าการใช้ผงสังกะสีในกรดอะซิติกให้ผลดีที่สุดในการรีดิวส์สารประกอบไนโตรโซให้เป็น *N*-aminosarcosine *tert*-butyl ester ตามต้องการ ข้อสำคัญคือจะต้องควบคุมเวลาและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาให้ดี มิฉะนั้นจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันมากเกินไป จนกระทั่งพันธะ N-N ขาดออก ซึ่งจะเป็นสาเหตุให้ได้ปริมาณผลผลิตต่ำ ภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาคือใช้ activated zinc powder ที่มากเกินไปในสารละลายกรดอะซิติก 50 % ในน้ำ โดยทำปฏิกิริยาที่ 0-5 °C ในอ่างน้ำแข็ง และติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ทินแลร์โครมาโตกราฟี เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตั้งจะทราบได้จากจุดสารตั้งต้นซึ่งดูดกลืนแสง UV อย่างแรงหายไปจึงเติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นจนตะกอนที่เกิดขึ้นในตอนแรกหายไปหมดและสารละลายมีฤทธิ์เป็นเบส เพื่อเปลี่ยนเกลือของสังกะสีให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน $Zn(NH_3)_4^{2+}$ ซึ่งละลายน้ำได้และทำให้ผลิตภัณฑ์คือ *N*-amino-*N*-methylglycine *tert*-butyl ester อยู่ในรูปของเบสอิสระแทนที่จะเป็นเกลืออะซิเตต ซึ่งสามารถแยกออกจากปฏิกิริยาได้โดยการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของเหลวใสไม่มีสี ปริมาณผลผลิต 60 % โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมสอดคล้องกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและปราศจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการอัลคิลเลตมากกว่า 1 ครั้งหรือผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่น จึงสามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ work-up ไปทำปฏิกิริยาในขั้นต่อไปได้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

จากนั้นจึงนำ *N*-amino-*N*-methylglycine *tert*-butyl ester ที่เตรียมได้ไปทำการปกป้องสารประกอบอะมิโนด้วยหมู่ Fmoc โดยใช้ 9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl) เป็นรีเอเจนต์โดยมี diisopropyl ethylamine (DIEA) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบสอยู่ด้วย โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและมีไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย ปฏิกิริยาจะเกิดอย่างรวดเร็วได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยซิลิกาเจล โดยใช้เอทิลอะซิเตต-เฮกเซนเป็นตัวชะ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ *N*-Fmoc-amino-*N*-methylglycine *tert*-butyl ester มีลักษณะเป็นของแข็งเป็นโพลสีขาว ปริมาณผลผลิต 55 % สารนี้เคยมีผู้สังเคราะห์ได้มาก่อนหน้านี้โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่าง *N*-Fmoc-*N'*-methylhydrazine กับ *tert*-butyl bromoacetate [47]

ในขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นการกำจัดหมู่ *tert*-butyl ester โดยให้ทำปฏิกิริยากับกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) และให้กรดอะมิโนที่ได้ทำปฏิกิริยาต่อกับ pentafluorophenyl trifluoroacetate (PfpOTfa) โดยมี DIEA อยู่ด้วย [48] จะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น C-activated, *N*-Fmoc protected ไนโตรเจนโมโนเมอร์ตามต้องการ โดยมีปริมาณผลผลิตรวมของสองขั้นตอนนี้เป็น 68 % ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีและการตกผลึกจากเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีและการวิเคราะห์อื่น ๆ ยืนยันว่าสามารถสังเคราะห์ไนโตรเจนโมโนเมอร์ (8) ที่ต้องการได้จริง

การสังเคราะห์อะมิโนออกซีอะซิติกแอซิด (ออกซิเจน) โมโนเมอร์ (9)



แผนภาพ 2.4 การสังเคราะห์ C-activated, N-protected spacer (X = O)

สำหรับการสังเคราะห์ออกซิเจนโมโนเมอร์ทำได้ในทำนองเดียวกันกับไนโตรเจนโมโนเมอร์ (แผนภาพ 2.4) แต่ในกรณีนี้พบว่าการปกป้องหมู่คาร์บอกซิลไม่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ แต่ต้องมีการปกป้องไนโตรเจนอะตอมของไฮดรอกซิลามีนเพื่อบังคับให้การแทนที่ที่เกิดที่ตำแหน่ง O ในที่นี้เลือกหมู่ Butoxycarbonyl (Boc) เป็นหมู่ปกป้องไนโตรเจนชั่วคราว เนื่องจากหมู่ Fmoc นั้นไม่เสถียรภายใต้ภาวะที่เป็นเบสซึ่งจำเป็นในปฏิกิริยาแทนที่ขั้นต่อไป ประกอบกับหมู่ปกป้องนี้มีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมที่จะใส่เข้าไปในตอนี้ ดังนั้นสารตั้งต้นที่ต้องการคือ *tert*-butyl *N*-hydroxycarbamate (*N*-Boc hydroxylamine, BocNHOH) ซึ่งแม้จะมีจำหน่ายแต่ก็มีราคาแพงมาก จึงสังเคราะห์เองจาก hydroxylamine hydrochloride และ di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) โดยใช้วิธีการตามเอกสารอ้างอิง [49] เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับกรดคลอโรอะซิติกในเอทานอลโดยมี NaOH เป็นเบส ภายใต้การรีฟลักซ์ ตามด้วยการระเหยเอทานอลออกภายใต้สุญญากาศ ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น *N-tert*-butoxycarbonyl aminooxyacetic acid มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ปริมาณผลผลิต 66 %

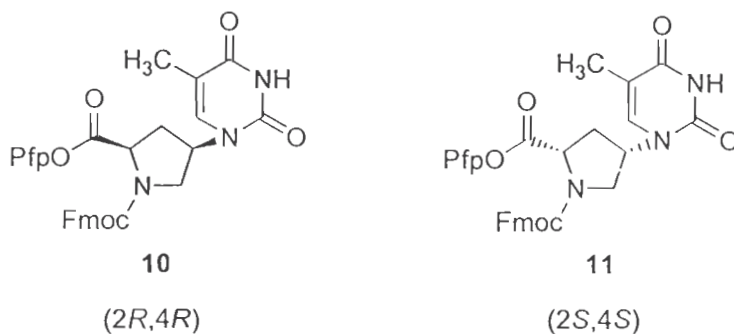
ขั้นตอนต่อไปเป็นการกำจัดหมู่ Boc ออกโดยให้ทำปฏิกิริยากับกรดไตรฟลูออโรอะซิติก และตามด้วยการใส่หมู่ปกป้องไนโตรเจนใหม่ด้วย Fmoc-Cl ภายใต้ภาวะเบสอ่อนๆ เนื่องจากสารที่ผ่านการกำจัดหมู่ Boc ออกแล้วเป็นกรดอะมิโนในรูปไอโซสเตรปจากหมู่ปกป้องไนโตรเจนและคาร์บอกซิล จึงอยู่ในรูป Zwitterion ที่ละลายน้ำแต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นในการปกป้องจึงกระทำภายใต้ภาวะที่เป็นตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำ-อะซิโนไนโตรล ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ *N*-Fmoc aminooxyacetic acid ซึ่งแยกออกจากปฏิกิริยาได้โดยการสกัดกรด-เบส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว ปริมาณผลผลิต 47 %

ในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการ activate ปลายด้านคาร์บอกซิลของ *N*-Fmoc aminooxyacetic acid โดยให้ทำปฏิกิริยากับ pentafluorophenyl trifluoroacetate เช่นเดียวกับไนโตรเจนโมโนเมอร์ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น C-activated, *N*-Fmoc protected ออกซิเจนโมโนเมอร์ตามต้องการ โดยมีปริมาณผลผลิตเป็น 25 % ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี

และการดกผลึกจากเอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จากข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีและการวิเคราะห์อื่นๆ ยืนยันได้ว่าสามารถสังเคราะห์ออกซิเจนโมโนเมอร์ (9) ได้จริง

การสังเคราะห์ส่วนของพิโรลิดีนโมโนเมอร์

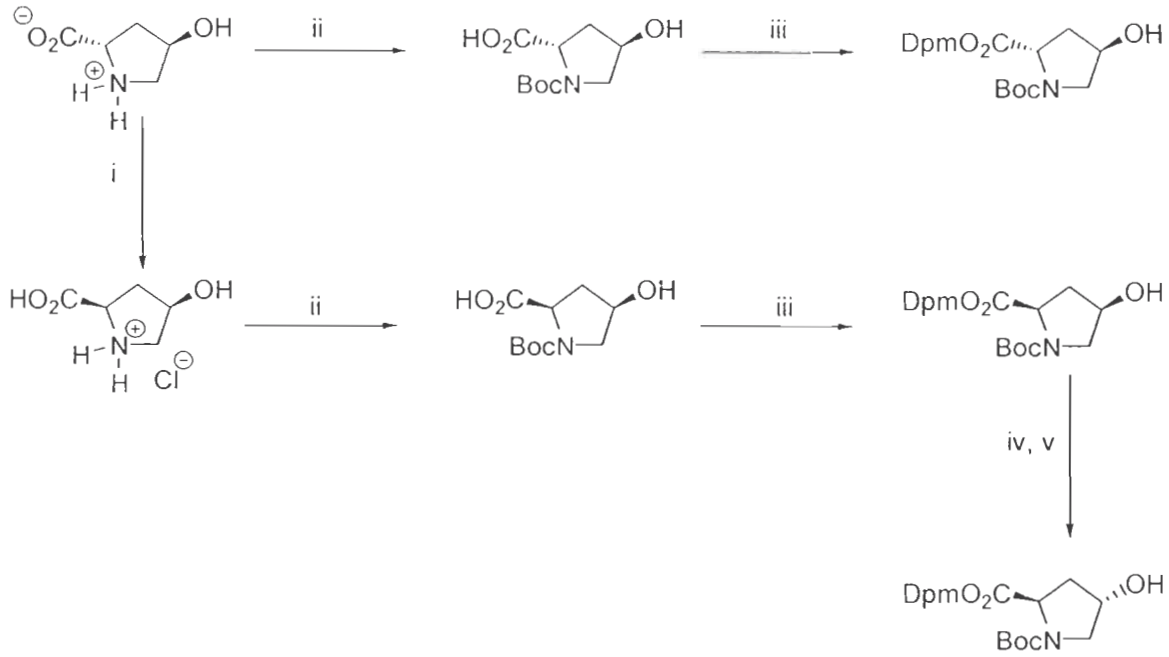
โมเลกุลที่เป็นเป้าหมายคือ (2*R*,4*R*) และ (2*S*,4*S*) ไทมิดีนโมโนเมอร์ในรูปที่ไนโตรเจนถูกปกป้องด้วย Fmoc และปลายด้านคาร์บอกซิลเป็นเพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์ (10) และ (11)



แผนภาพ 2.5 โครงสร้างของพิโรลิดีนโมโนเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้

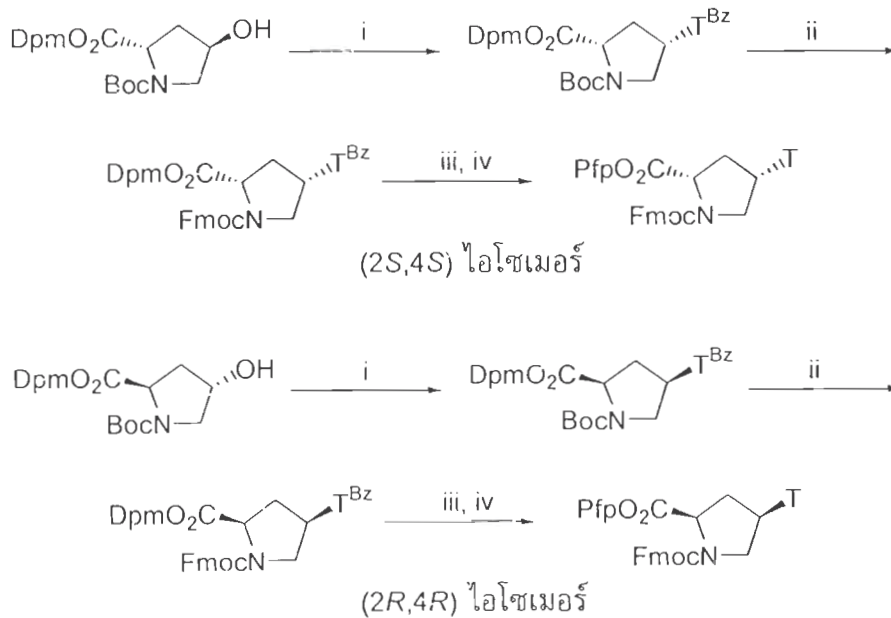
เนื่องจากความไม่เสถียรของหมู่ Fmoc ภายใต้ภาวะของการเตรียมโมโนเมอร์ ประกอบกับมันเป็นหมู่ปกป้องที่มีราคาแพง จึงจะใส่หมู่นี้ลงไปตอนท้ายของการสังเคราะห์ และใช้หมู่ Boc ซึ่งเสถียรต่อเบสและนิวคลีโอไฟล์มากกว่า และราคาถูกกว่ามากเป็นหมู่ปกป้องชั่วคราว

ในขั้นแรกเป็นการสังเคราะห์โมโนเมอร์ที่เป็นไทมิดีนเป็นนิวคลีโอเบสก่อน โดยจะสังเคราะห์ทั้ง 2*R*,4*R* และ 2*S*,4*S* ไอโซเมอร์ วิธีการที่ใช้เป็นไปตามเอกสารอ้างอิง [31] ทุกประการ (แผนภาพ 2.6 และแผนภาพ 2.7)



- i a) Ac₂O, AcOH, reflux
b) 2 N HCl
- ii Boc₂O, NaOH; aq ^tBuOH followed by fractional crystallization
- iii Ph₃CN₂; EtOAc
- iv HCO₂H, Ph₃P, DEAD; THF
- v aq NH₃, MeOH (quantitative, 2 steps)

แผนภาพ 2.6 การสังเคราะห์สารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด



- i N³-BzT, Ph₃P, DEAD; THF
- ii a) *p*-TsoH (2.5 eq); MeCN
b) FmocCl, DIEA
- iii TFA, anisole; CH₂Cl₂
- iv PfpOCOFCF₃, DIEA; CH₂Cl₂

แผนภาพ 2.7 การสังเคราะห์โมโนเมอร์ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

ในกรณีของ 2S,4S ไอโซเมอร์จะเริ่มต้นจากการนำ *trans*-4-hydroxyproline มาปกป้องหมู่ NH ด้วยหมู่ Boc และปกป้องหมู่คาร์บอกซิลด้วยไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ (Dpm) ได้เป็นอินเทอร์มีเดียตคือ *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester ส่วน 2R,4R ไอโซเมอร์ จะเริ่มต้นจากการ epimerize ที่ตำแหน่ง 2 ของ *trans*-4-hydroxyproline ก่อนโดยการรีฟลักซ์กับของผสม HOAc-Ac₂O ตามด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง แต่ได้มีการปรับปรุงวิธีการ work-up เล็กน้อยโดยการใช้โพรพิลีนออกไซด์เป็นตัวกำจัด HCl แทนที่จะใช้เบสอินทรีย์ ซึ่งทำให้สามารถ recover ผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังได้พบอีกว่าไม่จำเป็นต้องตกผลึกแยก *cis*-4-hydroxy-D-proline ออกจาก *trans*-4-hydroxy-L-proline ซึ่งเป็นสารตั้งต้น แต่สามารถเติมหมู่ Boc ลงไปโดยตรงโดยใช้ Boc₂O-NaOH แล้วตกผลึกแยก Boc-protected hydroxyproline แทน โดยที่ *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-D-proline จะสามารถตกผลึกออกมาได้ดีกว่า *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-L-proline ในเอทิลอะซิเตต จึงทำให้สามารถแยกไฮดรอกซีโปรลีนทั้งสองไอโซเมอร์ออกจากกันได้โดยวิธีนี้ซึ่งจะให้ recovery ของ *cis*-hydroxyproline ที่ดีกว่าการตกผลึกตัวกรดอะมิโนอิสระ จากนั้นจึงเปลี่ยน *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-D-proline ให้เป็น *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-D-proline diphenylmethyl ester โดยให้ทำปฏิกิริยากับ diphenyldiazomethane

ในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการดอมนิวคลีโอเบสเข้าไปกับวงแหวนโปรลีนโดยการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิกของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งสำหรับไทมีนจะทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา Mitsunobu ระหว่าง protected hydroxyproline ที่เหมาะสมกับ *N*³-benzoylthymine โดยมีไตรฟีนิลฟอสฟีน/ไดไอโซโพรพิล เอไซไดคาร์บอกซิเลต (Ph₃P/DIAD) เป็นรีเอเจนต์ และทำปฏิกิริยาในแอนไฮดรัสเทระไฮโดรฟิวแรนที่ 0 °C ซึ่งจะเกิดการแทนที่แบบ S_N² ที่ตำแหน่ง 4 ของวงแหวนพิโรลิดีน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น *cis* ตามต้องการ โดยการปกป้องที่ตำแหน่ง *N*³ ของไทมีนมีความจำเป็นเนื่องจากมีฉะนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของผสมระหว่าง *N*¹, *N*³ และ dialkylated products ทั้งสองอินแนซีโอเมอร์ของ *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-proline ทำปฏิกิริยาได้ในทำนองเดียวกันให้ผลิตภัณฑ์เป็น 2S,4S และ 2R,4R ตามต้องการ และมีข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีเหมือนกับที่รายงานไว้ในเอกสารอ้างอิง [31] ทุกประการ

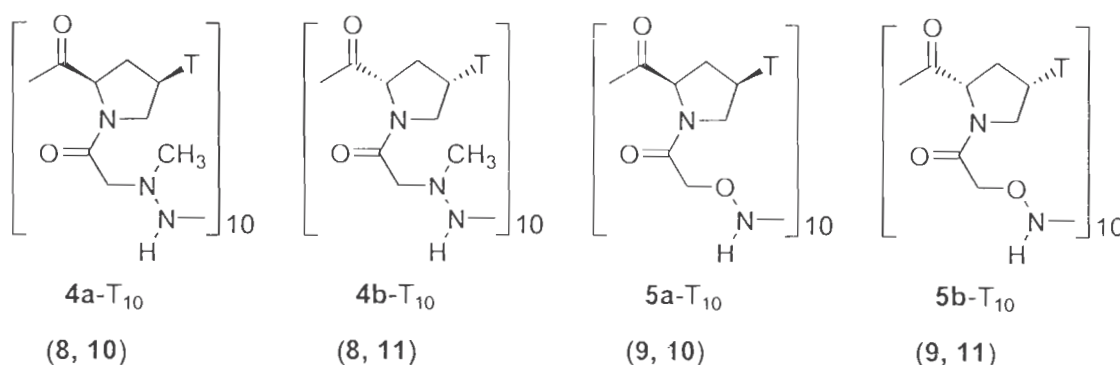
ส่วนขั้นตอนต่อไปจะเป็นการเปลี่ยนหมู่ปกป้องอะมิโนจาก Boc เป็น Fmoc โดยในขั้นแรกเป็นการกำจัดหมู่ Boc โดยไม่ให้รบกวนหมู่ diphenylmethyl ซึ่งเป็นหมู่ปกป้องคาร์บอกซิลและมีสมบัติไม่เสถียรภายใต้ภาวะที่เป็นกรดเหมือนกัน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้เสนอแนะว่าการกำจัดหมู่ Boc ดังกล่าวสามารถทำได้โดยใช้กรดพาราโทลูอินซัลโฟนิก 2.5 eq ในอะซิโดไนโตรล ที่อุณหภูมิห้อง และติดตามปฏิกิริยาโดยใช้ทินแลร์โครมาโตกราฟี ซึ่งพบว่าเสร็จสมบูรณ์ภายในเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเติมหมู่ Fmoc โดยปรับ pH ของสารละลายให้เป็นเบสโดยใช้ DIEA และเติม DIEA เพิ่มไปอีก 1 eq จากนั้นจึงให้ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Cl และแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ทั้งสองอินแนซีโอเมอร์ของ *N*-Boc-*cis*-4-(*N*³-benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester ทำปฏิกิริยาได้ในทำนองเดียวกัน ในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการกำจัดหมู่ diphenylmethyl ซึ่งเป็นหมู่ปกป้องคาร์บอกซิลออก ซึ่งกระทำได้โดยใช้กรดไตรฟลูออโรอะซิติกโดยมีอะนิโซลอยู่ด้วย ภายใต้ภาวะดังกล่าว หมู่ *N*³-benzoyl บนวงแหวนไทมีนจะถูกกำจัดออกไปพร้อมกัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Fmoc-amino acid ซึ่งทำให้

บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยอีเทอร์ มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำไปเปลี่ยนเป็นเพนตะฟลูออโรฟีนิล เอสเทอร์โดยให้ทำปฏิกิริยากับ pentafluorophenyl trifluoroacetate/DIEA ใน DMF ได้ปริมาณผลผลิต 83 และ 58 % (สองขั้นตอน) สำหรับ (2*R*,4*R*) และ (2*S*,4*S*) ไอโซเมอร์ตามลำดับ

การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด

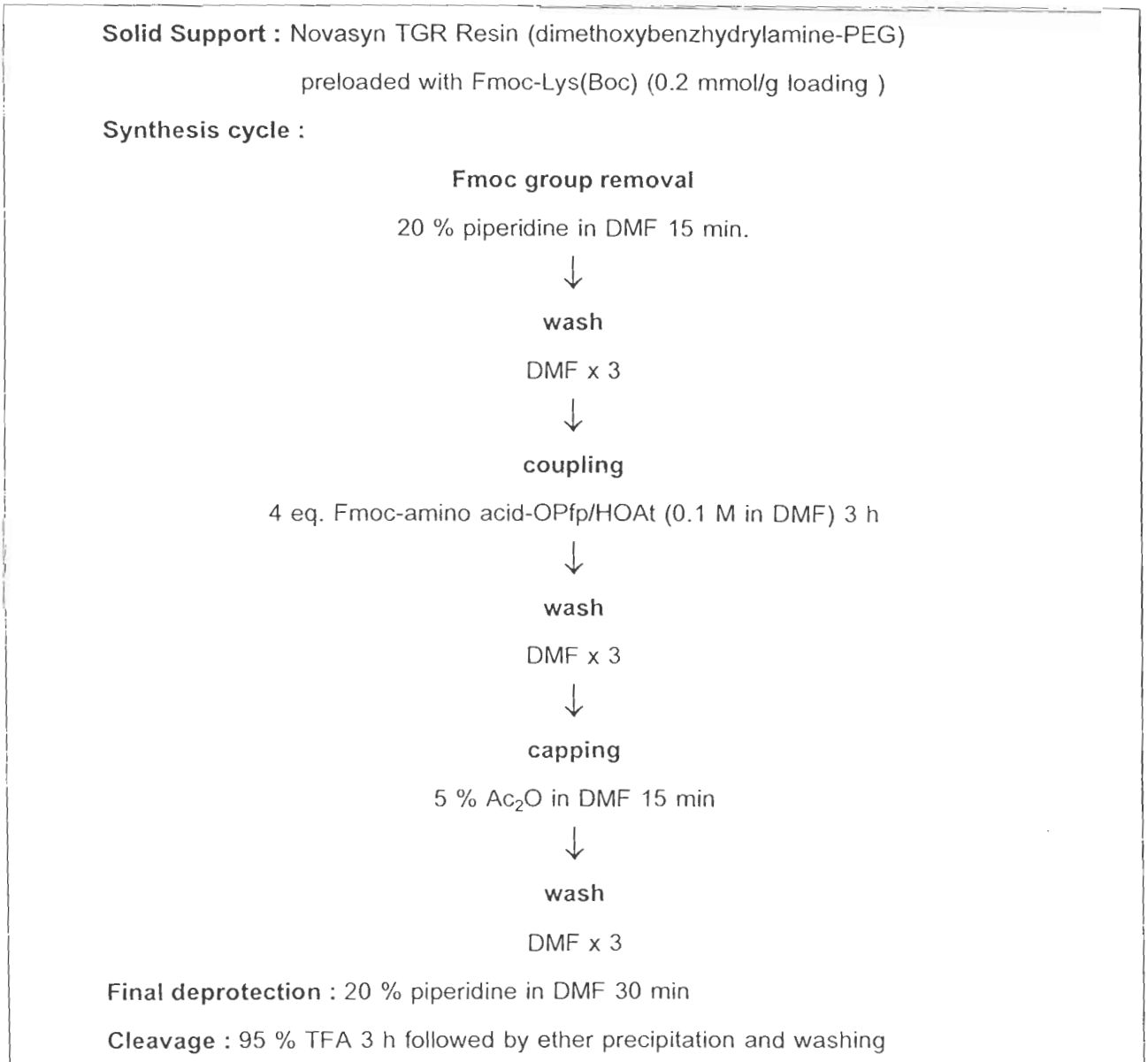
เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่เป็นเป้าหมายคือโฮโมไทมีน เดคะเมอร์ ซึ่งมีลำดับเบสของเปปไทด์ นิวคลีอิกแอซิดที่สนใจจะศึกษาคือ H-T₁₀-Lys-NH₂ เนื่องจากต้องการศึกษาทั้งอิทธิพลของสเตอริโอเคมีของวงแหวนโปรลีน (2*S*,4*S* และ 2*R*,4*R*) และโครงสร้างของกรดอะมิโนที่เป็นสะพานเชื่อมด้วย (NMe และ O) จึงต้องสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้งหมด 4 ชนิดได้แก่



แผนภาพ 2.8 โครงสร้างของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่จะสังเคราะห์และโมโนเมอร์ที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษานี้ได้ใส่ L-ไลซีนไมด์ ไว้ที่ C-terminal ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้งสี่ชนิดตามแนวคิดของ Nielsen ซึ่งเชื่อว่าหมู่อะมิโนของไลซีนซึ่งเป็นประจุบวกในสารละลายที่ pH ประมาณ 7 การที่มีประจุบวกจะช่วยให้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดของ Nielsen ซึ่งค่อนข้างจะไม่มีขั้วให้ละลายน้ำได้ดีขึ้นและยังช่วยลดการเกิด aggregation ของเปปไทด์อีกด้วย [2] ในกรณีของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็น *N*-amino-*N*-methylglycine (ไนโตรเจนโมโนเมอร์) น่าจะไม่มีปัญหาของการละลายและ aggregation ดังกล่าวเนื่องจากมีหมู่ไนโตรเจนอยู่บนสายเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดซึ่งจะถูกโปรโตเนตเกิดเป็นประจุบวกที่ pH 7 เช่นเดียวกับไลซีนอยู่แล้ว ส่วนเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี aminooxyacetic acid (ออกซิเจนโมโนเมอร์) เป็นสะพานเชื่อมแม้ว่าอะตอมของออกซิเจนจะไม่ถูกโปรโตเนต แต่มันก็เป็นอะตอมที่ทำให้โมเลกุลมีสภาพขั้วสูง จึงน่าจะทำให้ผลิตภัณฑ์ละลายน้ำได้ดี และลดการ aggregate ลงเนื่องจากแรงผลักระหว่างอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของออกซิเจนอะตอมระหว่างเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดคนละสายกัน อย่างไรก็ตาม ในทั้งสองกรณี คณะผู้วิจัยตัดสินใจที่จะใส่ C-terminal Lysinamide ไว้เพื่อการเปรียบเทียบผลการทดลองกับของ Nielsen และกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย

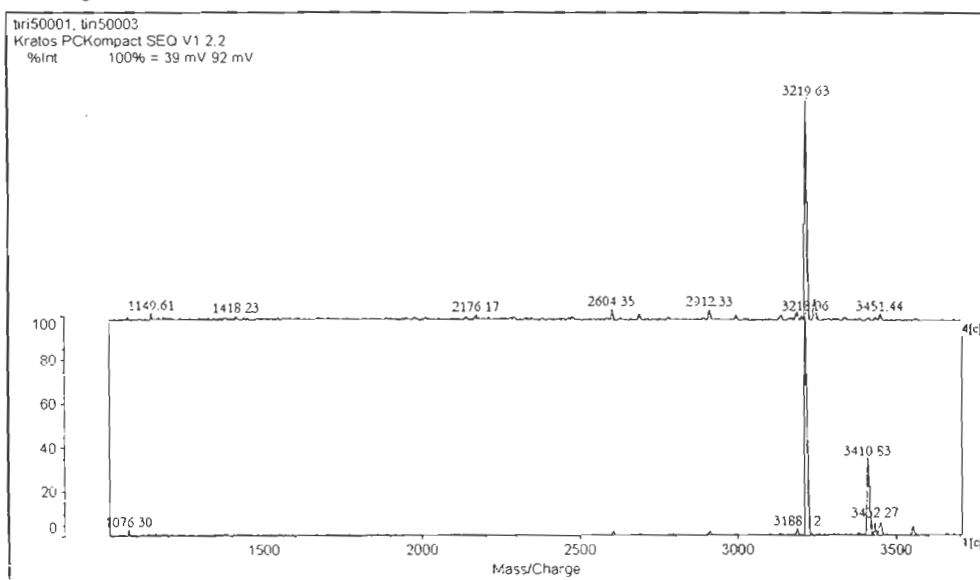
การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้ง 4 ชนิดอาศัยเทคนิคการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งโดยใช้หมู่ปกป้องเป็น Fmoc ดังที่กลุ่มของผู้วิจัยได้เคยรายงานไว้แล้ว [32] มีขั้นตอนของการสังเคราะห์ดังแสดงในแผนภาพ 2.9



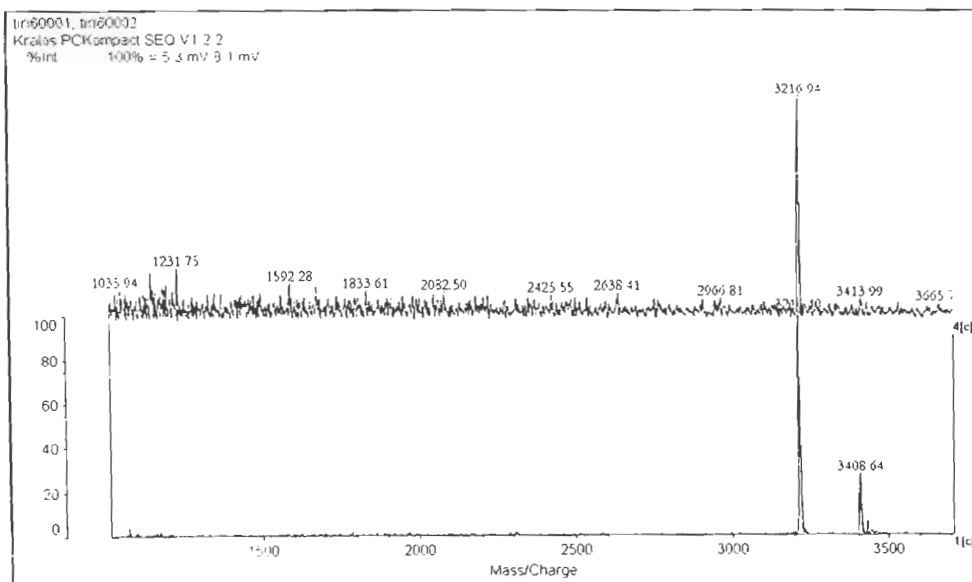
แผนภาพ 2.9 วงรอบของการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดโดยใช้ Fmoc-SPPS

ในการทดลองพบว่าหากสะพานเชื่อมเป็นไนโตรเจนประสิทธิภาพของแต่ละรอบของการสังเคราะห์ได้ว่าไม่ต่ำกว่า 95 % ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ดีมากทั้งในกรณีของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4a (2R,4R) และ 4b (2S,4S) ในทางกลับกัน สะพานเชื่อมที่เป็นออกซิเจนให้ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ต่ำมากในทั้งสองกรณี (5a และ 5b) เหตุผลที่ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาดังกล่าวยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนักแต่เป็นที่ชัดเจนว่าไม่สามารถใช้วิธีสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดปกติกับสะพานเชื่อมชนิดนี้ได้ จึงตัดสินใจที่จะหยุดปฏิกิริยาและมุ่งเน้นการศึกษาเฉพาะเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นไนโตรเจนแทน

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการสังเคราะห์แล้วจึงตัดสายเปปไทด์ออกจากเรซินโดยใช้กรดไตรฟลูออโรอะซิติก และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ reverse phase HPLC เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วแสดงพีกใน HPLC โครมาโตแกรมเพียงพีกเดียว และยืนยันสูตรโมเลกุลโดยใช้ MALDI-TOF mass spectrometry ซึ่งให้พีกหลักเพียงพีกเดียว **4a-T₁₀** M = 3218.06 (calcd for M+ = 3216.42), **4b-T₁₀** M = 3216.40 (calcd for M+ = 3216.42) (รูป 2.1) ปริมาณของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่บริสุทธิ์ที่แยกได้คือ 0.51 และ 0.49 mg ตามลำดับซึ่งพร้อมจะนำไปศึกษาการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกต่อไป



4a-T₁₀

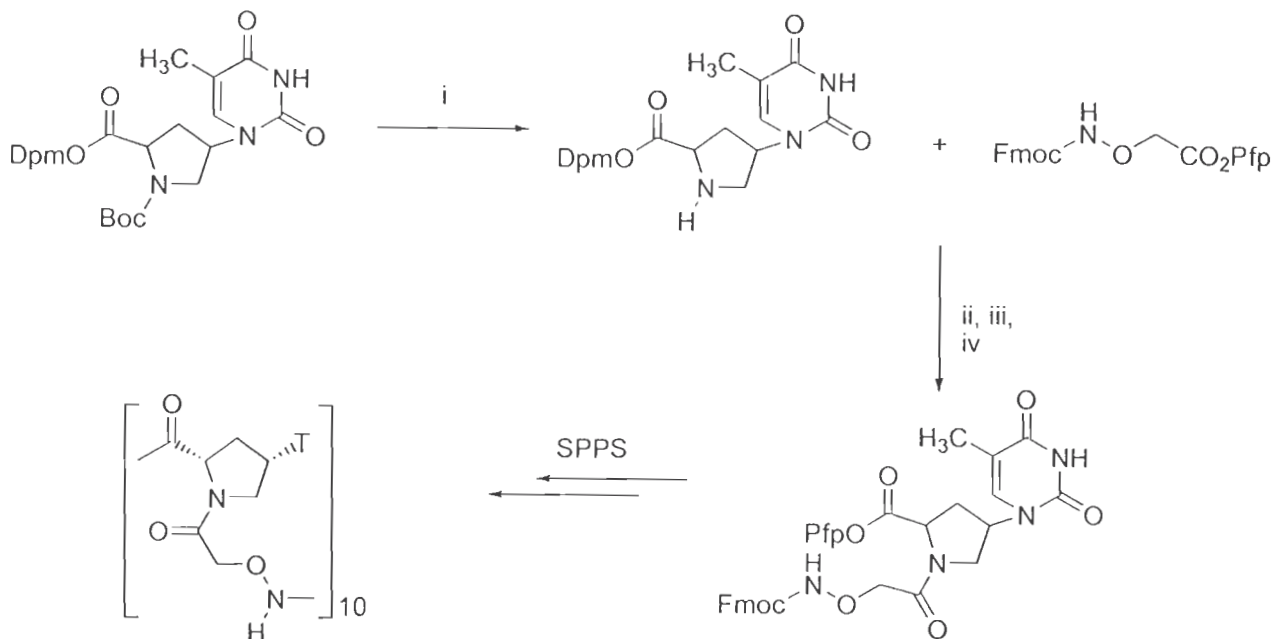


4b-T₁₀

รูป 2.1 MALDI-TOF mass spectrum (negative ion mode) ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่สังเคราะห์ได้

ส่วนแนวทางแก้ไขปัญหานี้ในอนาคตสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นออกซิเจนโมโนเมอร์อาจต้องใช้วิธี fragment coupling โดยต้องเชื่อมโมโนเมอร์ที่เป็นส่วนของวงแหวนพิโรลิดีนกับส่วนที่เป็นสะพานเชื่อมเข้าด้วยกันก่อนเพื่อลดขั้นตอนการทำปฏิกิริยาและเป็นการสร้างพันธะ

เปปไทด์ที่เกิดยากโดยใช้การสังเคราะห์ในวัฏภาคสารละลายที่สามารถแยกอินเทอร์มีเดียตออกมาและทำให้บริสุทธิ์ก่อนได้



แผนภาพ 2.10 แสดงแนวทางการทำ fragment coupling สำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 5-T₁₀

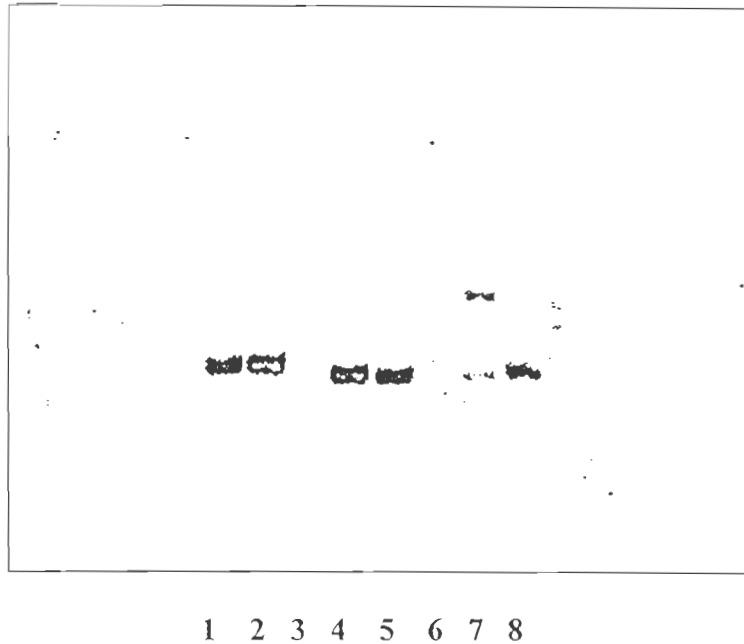
การศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก

ได้ศึกษาการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4a-T₁₀ และ 4b-T₁₀ ที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิคต่างๆ ดังต่อไปนี้

การศึกษาโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ได้ทดสอบการจับยึดเบื้องต้นของ 4a-T₁₀ และ 4b-T₁₀ กับโอลิโกดีออกซีนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ได้แก่ (dA)₁₀ โดยเพื่อให้สามารถติดตามได้ง่ายจึงติดฉลากทางปลายด้าน 5' ด้วยฟลูออเรสเซนต์แทก หลักการคือเมื่อให้โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปบนเจลเช่น โพลีอะครีลาไมด์ที่มีรูพรุนที่เหมาะสม (ขึ้นกับเปอร์เซ็นต์การครอสลิงค์ด้วยเมทิลีนบิสอะครีลาไมด์) ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับขนาด มวล และประจุของโมเลกุล ซึ่งเป็นหลักการคล้ายกับการทำ TLC ของโมเลกุลขนาดเล็กๆ นั้นเอง ถ้าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดและ (dA)₁₀ สามารถจับคู่กันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจะทำให้เกิดสารใหม่ที่มีการเคลื่อนที่บนเจลเปลี่ยนไปจากเดิมเนื่องจากมีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น แต่มีประจุเท่าเดิม (หรือลดลง ถ้าพิจารณาว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดมีประจุบวกซึ่งจะไปหักล้างกับประจุลบบนโอลิโกดีออกซีนิวคลีโอไทด์) วิธีนี้ได้เคยใช้ในการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเบื้องต้นระหว่างเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดและกรดนิวคลีอิกซึ่งพบว่าประสบความสำเร็จอย่างสูง

ในการทดลองได้นำ **4a-T₁₀** และ **4b-T₁₀** มา anneal กับ (dA)₁₀ ที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์แทกในบัฟเฟอร์ที่ pH 8.3 และนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล 15 % โดยเทียบกับสารอ้างอิงคือ (dA)₁₀ ที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์แทกเอง ภายใต้ภาวะตามที่แสดงในรูป 3 ผลปรากฏว่าไม่เกิดแถบเรืองแสงใหม่เมื่อนำไปส่องด้วยแสงยูวีที่ 254 nm แถบเรืองแสงที่เห็นเป็นเพียง (dA)₁₀ ที่ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์แทกเท่านั้น จึงสรุปได้ว่าทั้ง **4a-T₁₀** และ **4b-T₁₀** ไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ (dA)₁₀ ได้ ภายใต้ภาวะของการทดลอง



รูป 2.2 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ **4a-T₁₀** และ **4b-T₁₀** กับ (dA)₁₀ ที่ติดฉลากเรืองแสง (FdA₁₀) เลน 1: **4b-T₁₀**:FdA₁₀ 1:1; เลน 2: **4b-T₁₀**:FdA₁₀ 2:1; เลน 4: **4a-T₁₀**:FdA₁₀ 1:1; เลน 5: **4a-T₁₀**:FdA₁₀ 2:1; เลน 7: **4a-T₁₀**:FdA₁₀ 1:1; เลน 8: FdA₁₀ ภาวะของการทดลอง: 15 % พอลิอะครีลาไมด์เจลใน 90 mM TBE บัฟเฟอร์ พีเอช 8.3 ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์

การที่เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดนิวคลีอิกแอซิดนั้นอาจเกิดได้จากปัจจัยหลายประการ เพื่อยืนยันว่าผลการทดลองนี้ถูกต้องจึงได้ใช้เทคนิคอื่นในการศึกษาการจับยึดของสารทั้งสองนี้ต่อไป

เนื่องจากโอลิโกไรโบนิวคลีโอไทด์ (rA)₁₀ มีราคาแพงมาก และสลายตัวได้ง่ายโดยการกระทำของเอนไซม์นิวคลีเอสจึงไม่นำมาศึกษาการจับยึดกับเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดโดยวิธีนี้

การศึกษาโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

เมื่อกรดนิวคลีอิกสองสายมาจับคู่กันโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสแบบวัตสัน-คริก จะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่โดยที่เบสที่เข้ามาเข้าคู่กันจะเกิดการซ้อนทับกันเอง (base stacking) ภายในโมเลกุลที่เป็นเกลียวคู่ของกรดนิวคลีอิกนั้น ผลของการซ้อนทับกันของคู่เบสทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่

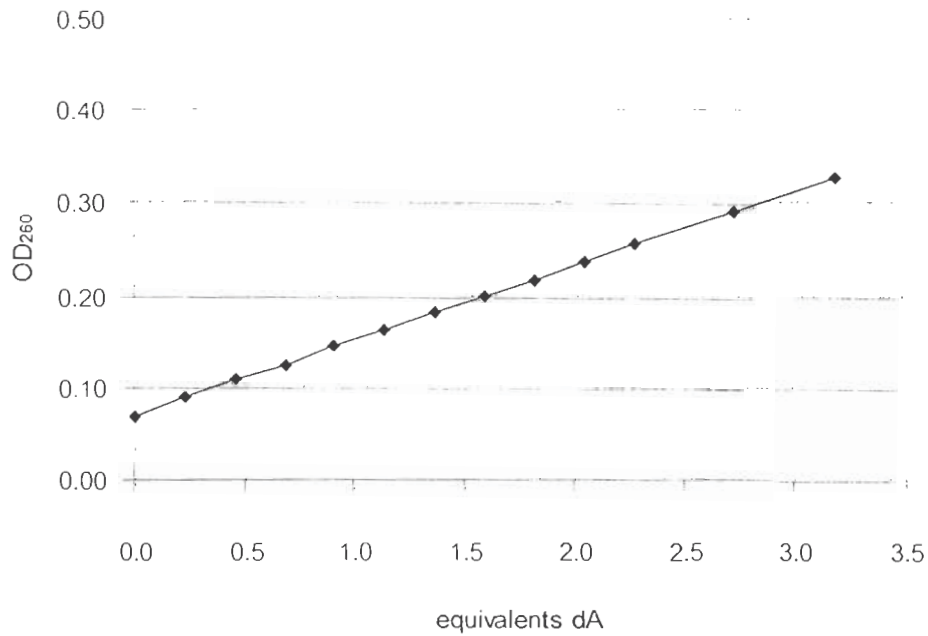
เรียกว่าไฮโปโครมิซึม (hypochromism) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในการศึกษากรดนิวคลีอิก ปรากฏการณ์นี้คือการที่ค่าโมลาร์แอมซอร์ปติวิตีของกรดนิวคลีอิกสองสายมีค่าน้อยกว่าผลรวมของโมลาร์แอมซอร์ปติวิตีของกรดนิวคลีอิกแต่ละสาย โดยในทางปฏิบัติ ค่าแอมซอร์ปติวิตีที่ลดลงนี้จะอยู่ในช่วงประมาณ 10 - 20 % ของโมลาร์แอมซอร์ปติวิตีรวม ดังนั้น ถ้าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดและกรดนิวคลีอิกสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกันโดยผ่านการเกิดคู่เบสแบบวัตสัน-คริกจริง เมื่อนำสารทั้งสองมาผสมกันควรจะเกิดปรากฏการณ์ไฮเปอร์โครมิซึม ซึ่งมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่ำกว่าผลรวมของค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 260 nm ของสารแต่ละชนิด โดยหากแปรเปลี่ยนสัดส่วนของสารทั้งสองไปเรื่อยๆ จุดที่มีการลดต่ำลงของค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่มากที่สุดก็คือจุดที่สารทำปฏิกิริยากันพอดีหรือจุดอีควิวาเลนซ์ (equivalence point) นั้นเอง ดังนั้น วิธีนี้นอกจากจะใช้ศึกษาการจับยึดในเชิงคุณภาพ (qualitative) ว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดและกรดนิวคลีอิกสามารถจับยึดกันได้หรือไม่แล้วยังสามารถใช้ศึกษา stoichiometry ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นได้อีกด้วย

ในทางปฏิบัติทำได้โดยการค่อยๆ เติมสารละลายของกรดนิวคลีอิกลงไปในสารละลายของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด โดยที่ต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายทั้งสอง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 260 nm จากนั้นจึงนำไปพล็อตกราฟเทียบกับปริมาตรของสารละลายกรดนิวคลีอิกที่เติมลงไป หากสารทั้งสองสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้จริง กราฟที่ได้จะไม่เป็นเส้นตรง เนื่องจากก่อนที่จะถึงจุดอีควิวาเลนซ์จะเกิดปรากฏการณ์ไฮโปโครมิซึม ทำให้การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่าที่ควรจะเป็นตามทฤษฎี เมื่อผ่านจุดอีควิวาเลนซ์ไปแล้วค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามปกติ ดังนั้นเส้นกราฟจะคล้ายกับเป็นเส้นตรงสองเส้นที่มีความชันไม่เท่ากัน และมีจุดหัก (turning point) ที่ใกล้กับจุดอีควิวาเลนซ์ แต่ถ้าไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อน กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรงและค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่วัดได้จะใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการคำนวณ

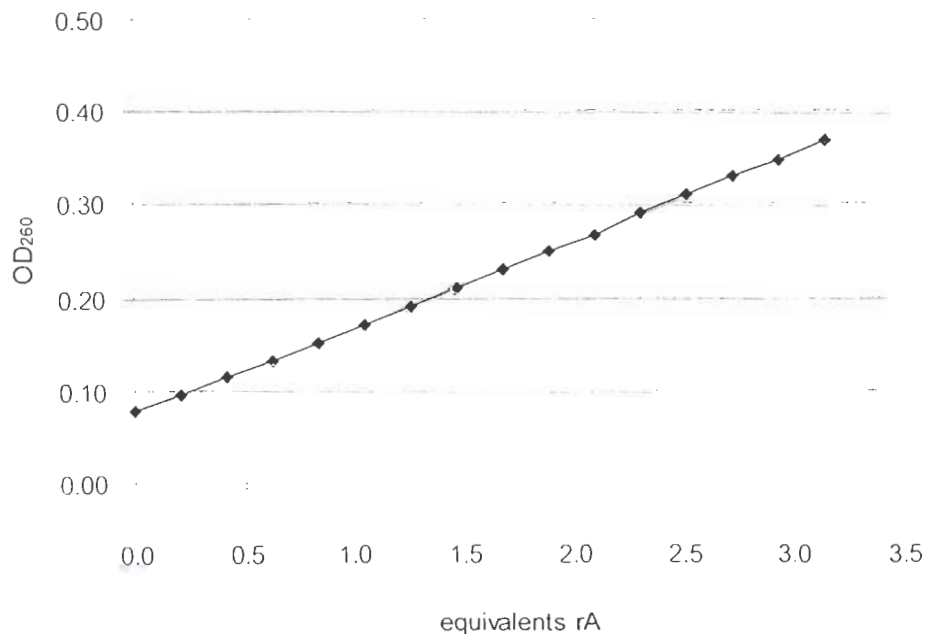
ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าภายใต้ภาวะของการทดลอง (20 °C, สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0) เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด **4a** ไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโพลีดีออกซีอะดีนีนิกแอซิด [poly (dA)] ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกันได้เลย เนื่องจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรหรืออีควิวาเลนซ์ของ dA ที่เติมลงไปกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm มีลักษณะเป็นเส้นตรงอย่างสมบูรณ์และทับกันสนิทกับกราฟแสดงความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการคำนวณ (รูป 4) ในช่วงจาก 0 - 4 อีควิวาเลนซ์ อนึ่ง ในการทดลองนี้และต่อไป เลือกใช้กรดนิวคลีอิกที่เป็นพอลิเมอร์สายยาวแทนที่จะเป็น (dA)₁₀ เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นกับกรดนิวคลีอิกสายยาวจะเสถียรกว่า

ผลการทดลองกับกรดไรโบนิวคลีอิกที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้แก่ poly(rA) ก็ให้ผลเช่นเดียวกันกล่าวคือ **4a-T₁₀** ไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ poly(rA) ได้ภายใต้ภาวะของการทดลอง

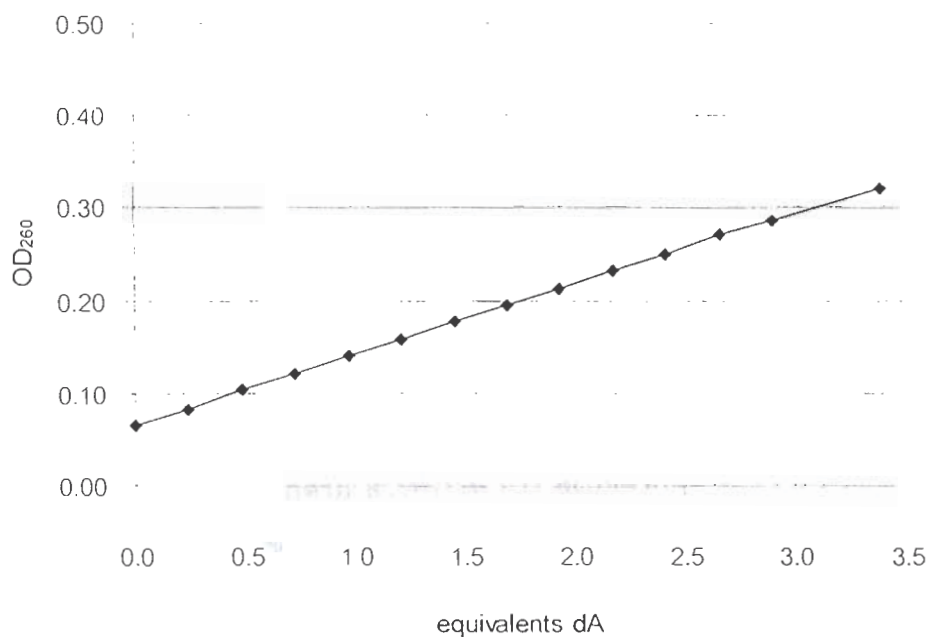
ในทำนองเดียวกัน **4b-T₁₀** ก็ไม่แสดงการจับยึดกับ poly(dA) และ poly(rA) (รูป 2.5-2.7)



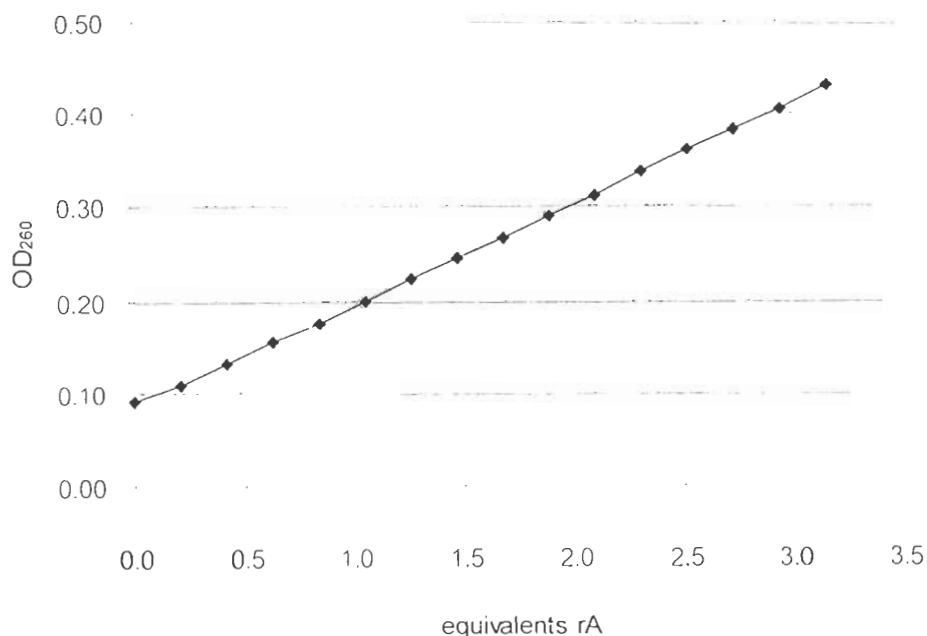
รูป 2.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอีควิวาเลนต์ของ dA ที่เติมลงไปกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ในการศึกษาการจับยี่ดระหว่าง 4a-T₁₀:poly(dA) ภาวะของการทดลอง: ความเข้มข้นเริ่มต้นของ 4a-T₁₀ = 7.7 μ M, ความเข้มข้นของไทแตรนด์ [poly(dA)] = 1.05 mM, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิที่ศึกษา 20 $^{\circ}$ C



รูป 2.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอีควิวาเลนต์ของ rA ที่เติมลงไปกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ในการศึกษาการจับยี่ดระหว่าง 4a-T₁₀:poly(rA) ภาวะของการทดลอง: ความเข้มข้นเริ่มต้นของ 4a-T₁₀ = 9.0 μ M, ความเข้มข้นของไทแตรนด์ [poly(rA)] = 0.93 mM, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิที่ศึกษา 20 $^{\circ}$ C



รูป 2.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอีควิวาเลนต์ของ dA ที่เติมลงไปกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ในการศึกษาการจับยี่ดระหว่าง 4b-T₁₀:poly(dA) ภาวะของการทดลอง: ความเข้มข้นเริ่มต้นของ 4b-T₁₀ = 7.3 μ M, ความเข้มข้นของไทแทรนต์ [poly(dA)] = 1.00 mM, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิที่ศึกษา 20 °C



รูป 2.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนอีควิวาเลนต์ของ rA ที่เติมลงไปกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ในการศึกษาการจับยี่ดระหว่าง 4b-T₁₀:poly(rA) ภาวะของการทดลอง: ความเข้มข้นเริ่มต้นของ 4b-T₁₀ = 10.6 μ M, ความเข้มข้นของไทแทรนต์ [poly(rA)] = 0.89 mM, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิที่ศึกษา 20 °C

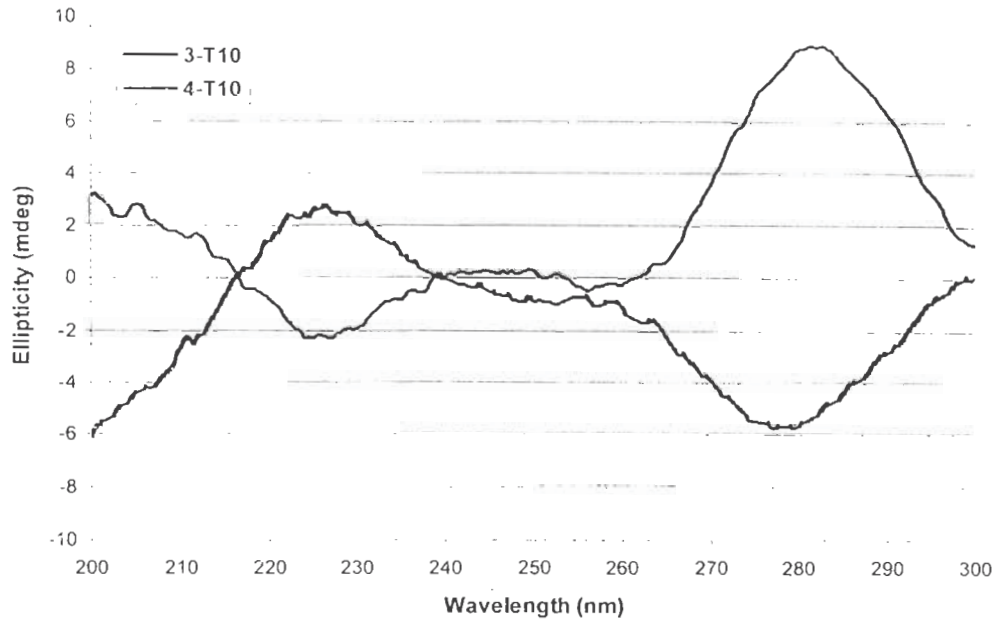
ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาโดยเทคนิคยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่สังเคราะห์ได้ไม่ว่าจะเป็น 4a-T₁₀ หรือ 4b-T₁₀ ไม่สามารถจับยึดกับทั้งกรดไรโบนิวคลีอิกและกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกได้ภายใต้ภาวะของการทดลอง และเป็นที่ยืนยันผลการศึกษาโดยเทคนิคเจลอเล็กโตรโฟรีซิสที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การศึกษาโดยเทคนิคเซอร์คิวลาร์ไดโครอิมสเปกโตรสโคปี

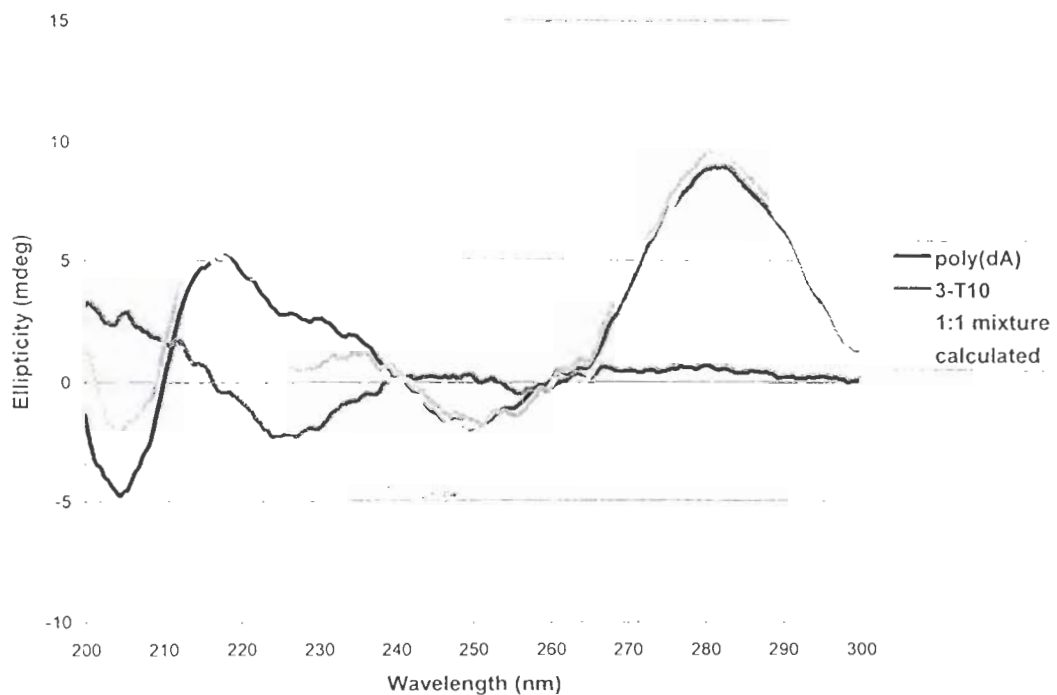
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการจับยึดระหว่างเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดกับกรดนิวคลีอิกเพิ่มเติมอีกโดยใช้เทคนิคเซอร์คิวลาร์ไดโครอิมสเปกโตรสโคปี เทคนิคนี้เป็นการวัดความแตกต่างค่าการดูดกลืนแสง right-handed circularly polarized light และ left-handed circularly polarized light ผลที่ได้จะพล็อตกับความยาวคลื่น ซึ่งจะเรียกว่า CD สเปกตรัม สารที่จะให้ CD สเปกตรัมจะต้องมีหมู่โครโมฟอร์ และมีการจัดตัวอยู่ในคอนฟอร์เมชันแบบไครัล ซึ่งถ้าเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เช่นเปปไทด์หรือกรดนิวคลีอิกจะหมายถึงการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิที่เสถียร ในหลายๆ กรณีสามารถใช้ความสัมพันธ์แบบเอ็มพิริกัลในการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโมเลกุลขนาดใหญ่ดังกล่าวได้โดยการเปรียบเทียบ CD สเปกตรัมกับระบบอ้างอิงที่เหมาะสม เนื่องจากกรดนิวคลีอิก (รวมทั้งเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด) เป็นโมเลกุลแบบไครัล และมีโครโมฟอร์ในส่วนของพันธะเปปไทด์และนิวคลีโอเบส อีกทั้งเมื่อเกิดการจับยึดกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุล กลายเป็นโครงสร้างทุติยภูมิแบบไครัลที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังนั้นจึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาศึกษาโดยเทคนิคนี้

ตามปกติเปปไทด์ที่ประกอบด้วยหน่วยของกรดแอสลฟาอะมิโนประมาณ 10-20 หน่วยจะไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิที่ชัดเจน และดังนั้นจะไม่แสดง CD สเปกตรัม เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ได้มีการศึกษามาส่วนใหญ่ก็เป็นเช่นนั้น ดังนั้นจึงเป็นที่น่าประหลาดใจอย่างยิ่งว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4a-T₁₀ แสดง CD สเปกตรัมที่ชัดเจนมากที่อุณหภูมิห้องในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM pH 7.0 โดยมีเนกาทีฟแบนด์ที่ 225 nm และโพสิทีฟแบนด์ที่ประมาณ 280 nm ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามันมีการพับตัว (fold) เป็นโครงสร้างทุติยภูมิที่เสถียร ซึ่งเชื่อว่าจะจะเป็นเกลียวแบบไครัลแบบหนึ่งที่พบในโพลีเมอร์ของกรดเบต้าอะมิโน ซึ่งกำลังเป็นที่ศึกษากันอย่างกว้างขวางเมื่อไม่กี่ปีมานี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานจากกลุ่มวิจัยของ Gellman (Wisconsin, USA) และ Seebach (ETH Zurich, Switzerland) [42,50] อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลที่มีจำกัดในเอกสารอ้างอิงจึงยังไม่สามารถระบุคอนฟอร์เมชันของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดนี้ได้อย่างแน่ชัด นอกจากนี้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4b-T₁₀ ซึ่งมีโครงสร้างของโมเลกุลเกือบจะเป็นภาพสะท้อนในกระจกเงาของ 4a-T₁₀ เนื่องจากมันประกอบด้วยนิวคลีโอเบสแอซิดที่มีคอนฟิกรูเรชันตรงข้ามกันและมีสะพานเชื่อมซึ่งปราศจากจุดศูนย์กลางไครัล เว้นเสียแต่ว่าเปปไทด์ทั้งสองมี L-Lysine ซึ่งมีคอนฟิกรูเรชันเป็น L- เหมือนกันอยู่ตรงปลายด้าน C-terminal ของโมเลกุล ดังนั้นจึงไม่เป็นที่น่าประหลาดใจว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้งสองชนิดแสดง CD สเปกตรัมที่เกือบจะเป็นเงาในกระจกซึ่งกันและกัน (รูป 2.8)

ในทำนองเดียวกัน poly(dA) และ poly(rA) ก็มีสัญญาณ CD สเปกตรัมที่มีลักษณะเฉพาะตัวของมัน เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่ากรดนิวคลีอิกสายเดี่ยวก็มีโครงสร้างทุติยภูมิที่เสถียร



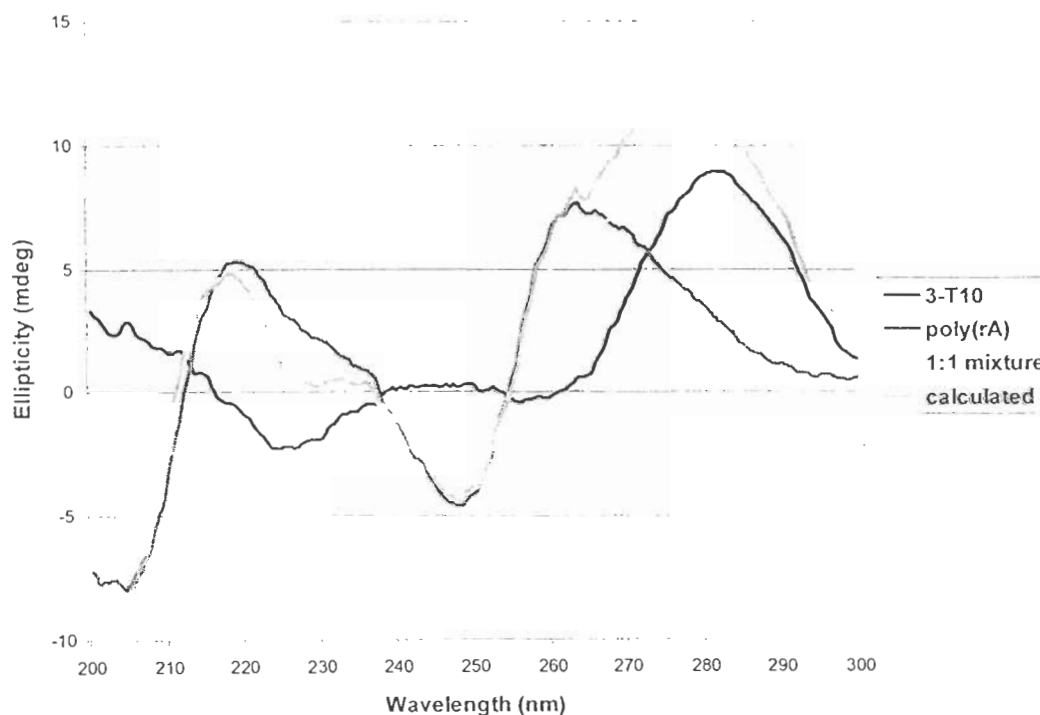
รูป 2.8 CD สเปกตรัมของ 4a-T₁₀ และ 4b-T₁₀ ภาวะ: ความเข้มข้นของสายเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด = 1 μ M สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C



รูป 2.9 CD สเปกตรัมของ poly(dA), 4a-T₁₀ และสารผสมของสารทั้งสองเปรียบเทียบกับ CD สเปกตรัมของ สารผสมที่ได้จากการคำนวณ ภาวะ: ความเข้มข้นของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด = poly(dA) = 10 μ M นิวคลี โอไทด์ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C

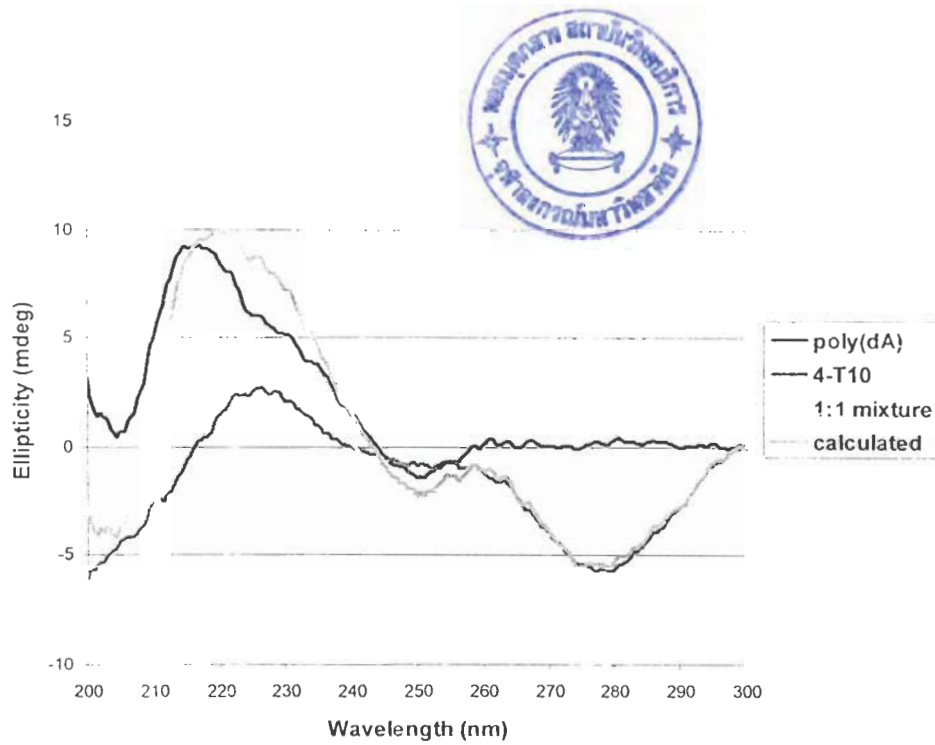
เมื่อผสมสารละลายของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด **4a-T₁₀** กับ poly(dA) ในอัตราส่วน 1:1 (คิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์) พบว่า CD สเปกตรัมของสารผสมที่ได้เกือบจะซ้อนทับกันได้สนิทกับผลรวมของ CD สเปกตรัมของ **4a-T₁₀** กับ CD สเปกตรัมของ poly(dA) (รูป 2.9) แสดงว่าไม่มีการจัดตัวเป็นคอนฟอร์เมชันใหม่เกิดขึ้นซึ่งผิดไปจากที่ควรจะเป็นหากโมเลกุลทั้งสองสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกันโดยการเข้าคู่ของเบสแบบวัตสัน-คริก ดังนั้นผลการทดลองจึงยืนยันการทดลองก่อนหน้านี้ว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด **4a** ไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกที่มีลำดับเบสคู่สมกันได้

ในทำนองเดียวกัน CD สเปกตรัมของสารผสม 1:1 ระหว่าง **4a-T₁₀** กับ poly(rA), **4b-T₁₀** กับ poly(dA) และ **4b-T₁₀** กับ poly(rA) ก็ไม่แตกต่างจากผลรวมของ CD สเปกตรัมขององค์ประกอบแต่ละตัว (รูป 2.10 - 2.12) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้งสองชนิดไม่สามารถจับยึดกับกรดนิวคลีอิกได้

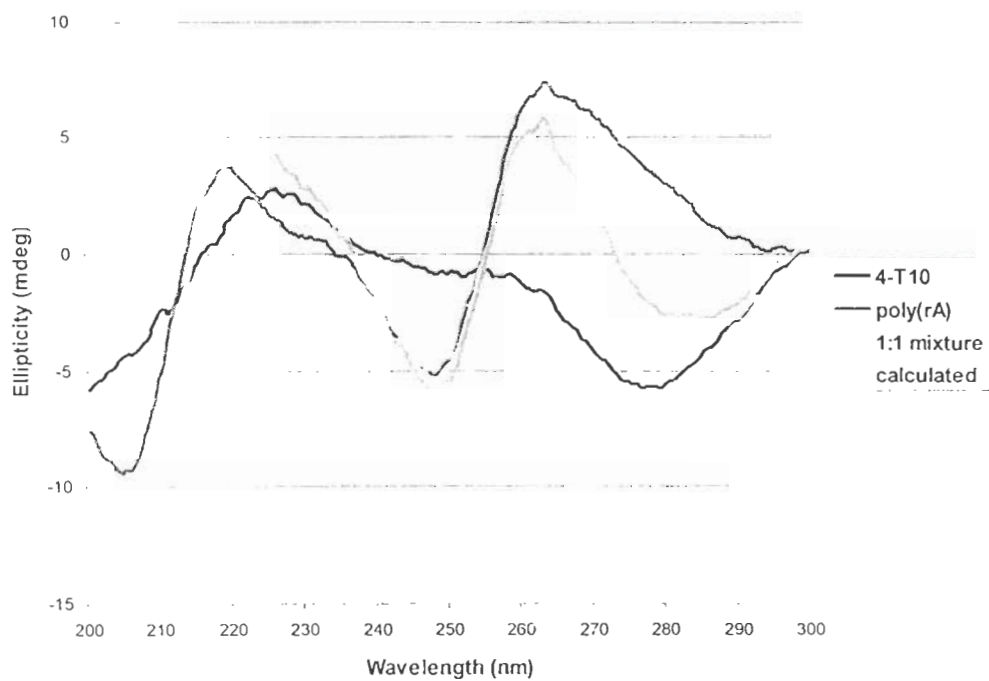


รูป 2.10 CD สเปกตรัมของ poly(rA), **4a-T₁₀** และสารผสมของสารทั้งสองเปรียบเทียบกับ CD สเปกตรัมของสารผสมที่ได้จากการคำนวณ ภาวะ: ความเข้มข้นของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด = poly(rA) = 10 μ M นิวคลีโอไทด์ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิ 20 °C

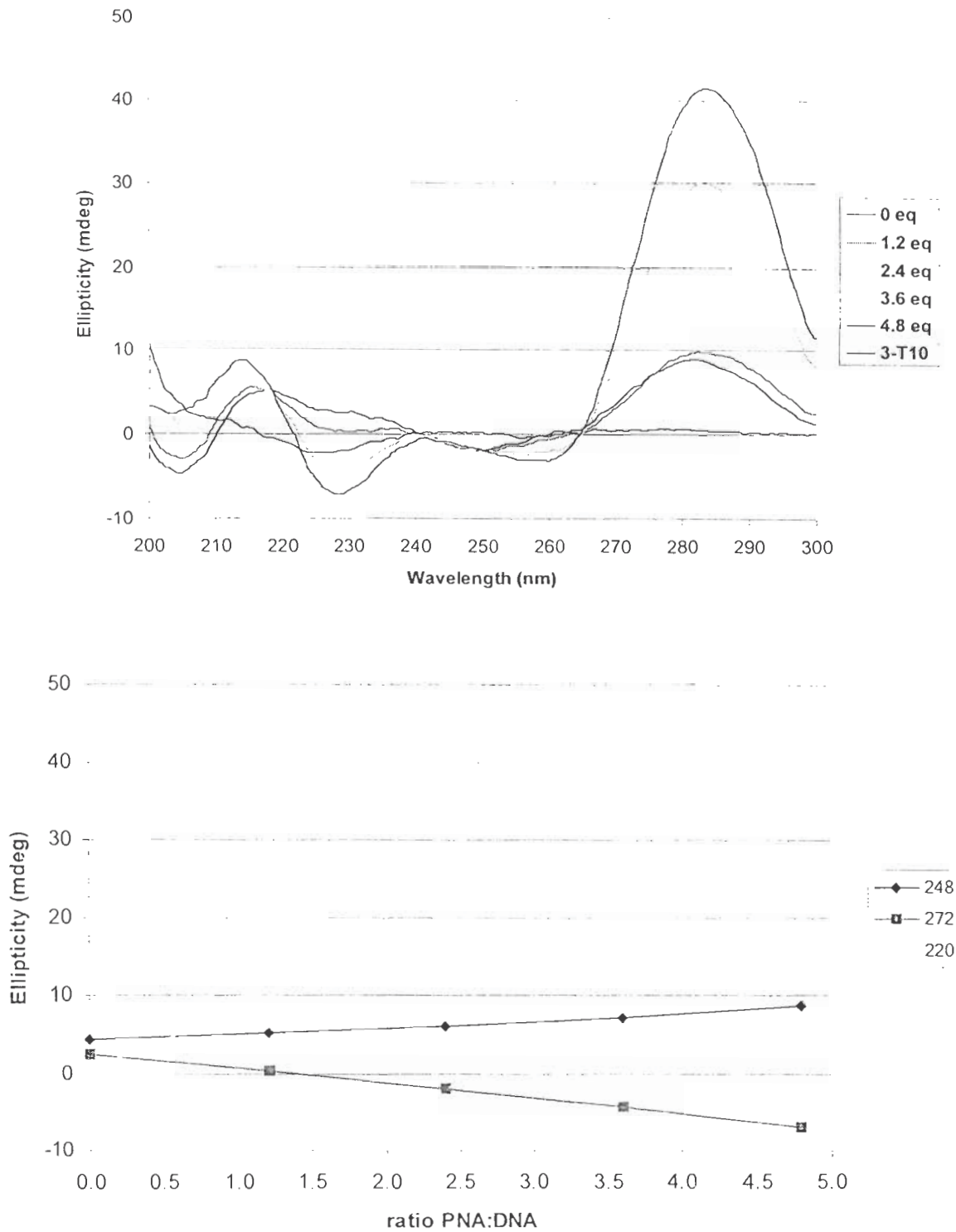
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลง CD สเปกตรัมของสารผสมระหว่าง **4a-T₁₀** และ poly(dA) ที่อัตราส่วน T:A ต่างๆ กันที่บางช่วงคลื่น พบว่าที่ทุกช่วงคลื่นที่ศึกษามีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD ในลักษณะที่เป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นการยืนยันอีกเช่นกันว่าสารทั้งสองไม่เกิดเป็นสารเชิงซ้อนกันไม่ว่าที่อัตราส่วน T:A ใดๆ ในช่วง 0:1 - 4:1 (รูป 2.13)



รูป 2.11 CD สเปกตรัมของ poly(dA), 4b-T₁₀ และสารผสมของสารทั้งสองเปรียบเทียบกับ CD สเปกตรัมของสารผสมที่ได้จากการคำนวณ ภาวะ: ความเข้มข้นของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด = poly(dA) = 10 μ M นิวคลีโอไทด์ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิ 20 °C



รูป 2.12 CD สเปกตรัมของ poly(rA), 4b-T₁₀ และสารผสมของสารทั้งสองเปรียบเทียบกับ CD สเปกตรัมของสารผสมที่ได้จากการคำนวณ ภาวะ: ความเข้มข้นของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด = poly(rA) = 10 μ M นิวคลีโอไทด์ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิ 20 °C



รูป 2.13 (บน) CD สเปกตรัมของสารผสมระหว่าง 4a-T₁₀ กับ poly(dA) ที่จำนวนอิกิวาเลนต์ของ T:A ต่างๆ (ล่าง) พล็อตระหว่างสัญญาณ CD ที่ 220, 248 และ 272 nm ของสารผสมระหว่าง 4a-T₁₀ กับ poly(dA) ที่จำนวนอิกิวาเลนต์ของ T:A ต่างๆ ภาวะของการทดลอง: ความเข้มข้นเริ่มต้นของ [poly(dA)] = 8.0 μ M, ความเข้มข้นของไทแทรนด์ (4a-T₁₀) = 0.32 mM, โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0, อุณหภูมิที่ศึกษา 20 $^{\circ}$ C

วิเคราะห์ผลการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก

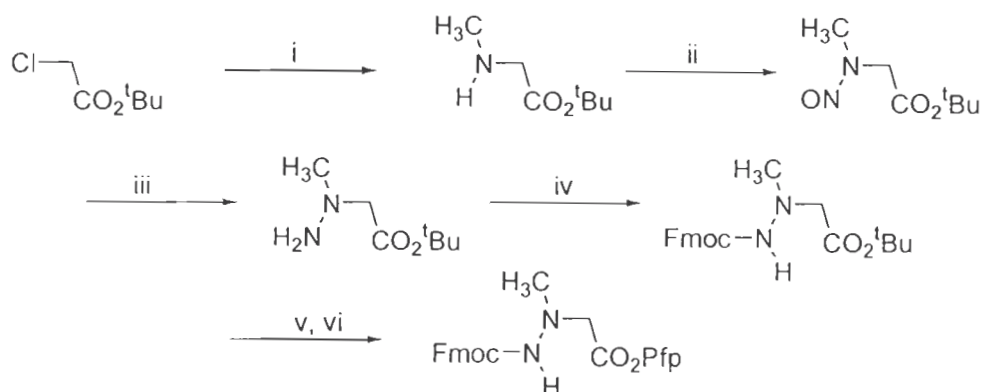
ผลการทดสอบการจับยึดระหว่างเปปไทด์นิวคลีอิกแอสิด **4a-T₁₀** และ **4b-T₁₀** และกรดนิวคลีอิกที่มีลำดับเบสคู่สมกันโดยเทคนิค เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และเซอร์คิวลาร์ไดโครอิมิซึม แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอสิดเหล่านี้ไม่สามารถจับยึดกับกรดนิวคลีอิกเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรได้ภายใต้ภาวะของการทดลอง (อุณหภูมิ 20 °C โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM, pH 7.0) ได้ทดลองศึกษาการจับยึดโดยเทคนิคเซอร์คิวลาร์ไดโครอิมิซึมภายใต้ภาวะอื่นๆ เช่น อุณหภูมิต่ำลง (10 °C), ภายใต้ภาวะปราศจากเกลือ ซึ่งก็พบว่าให้ผลการทดลองเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังได้พิสูจน์ว่าการที่เปปไทด์นิวคลีอิกแอสิดและกรดนิวคลีอิกไม่จับยึดกันนั้นไม่ได้เกิดจากปัจจัยด้านไคเนติกส์ซึ่งอาจจะช้ามากโดยการ anneal สารผสมที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะทิ้งสารผสมไว้ข้ามคืน แล้วนำไปวัด CD สเปกตรัม ซึ่งพบว่าผลการทดลองก็ยังคงเหมือนเดิม ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างปราศจากข้อสงสัยว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอสิดเหล่านี้ไม่สามารถจับยึดกับกรดนิวคลีอิกได้จริง ผลการทดลองนี้เป็นสิ่งที่คาดไม่ถึงเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเปปไทด์นิวคลีอิกแอสิดที่มีโครงสร้างของสะพานเชื่อมคล้ายคลึงกันแต่มีคอนฟอร์เมชันที่แข็งแกร่ง (rigid) กว่าได้แก่ **2** แสดงการจับยึดที่ดีเลิศกับกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกที่มีลำดับเบสคู่สมภายใต้ภาวะที่เหมือนกันทุกประการ และแสดงการจับยึดที่ไม่ดีนักกับกรดไรโบนิวคลีอิกแต่อยู่ในระดับที่สามารถตรวจสอบได้ จากผลการทดลองนี้จึงพอสรุปได้ว่าสมบัติการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกในกลุ่มนี้ขึ้นกับคอนฟอร์เมชันของสะพานเชื่อมที่จำเพาะเจาะจงมาก และประจุบวกบนสะพานเชื่อมอาจจะมีส่วนช่วยในการจับยึดน้อยกว่าเนื่องจากทั้ง **2** และ **4** ควรจะมี pK_a ของไฮดรอกซิลในโตรเจนอะดอมที่ไม่แตกต่างกันมากนักและควรจะอยู่ในสภาพที่ถูกโปรโตเนตเหมือนกันภายใต้ภาวะของการทดลอง

การที่เปปไทด์นิวคลีอิกแอสิดทั้งสองแสดงสัญญาณ CD เป็นการบ่งชี้ว่าคอนฟอร์เมชันของเปปไทด์นิวคลีอิกแอสิด **4a-T₁₀** และ **4b-T₁₀** ซึ่งมี เอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน ซึ่งมีโครงสร้างไม่เป็นวงแหวนและน่าจะมีคอนฟอร์เมชันที่ยืดหยุ่นได้เป็นสะพานเชื่อมนั้นไม่ได้ยืดหยุ่นจริงอย่างที่คิด แต่มันกลับจัดตัวอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่แน่นอนคอนฟอร์เมชันหนึ่ง ถ้าคอนฟอร์เมชันนั้นแตกต่างจากคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมที่จะจับยึดกับกรดนิวคลีอิกได้ก็จะทำให้ต้องมีการจัดคอนฟอร์เมชันของโมเลกุลใหม่ (conformational reorganization) ซึ่งจะมีผลทำให้กระบวนการจับยึดของมันกับกรดนิวคลีอิกเป็นกระบวนการที่ไม่เหมาะสมในเชิงเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamically unfavourable) และอธิบายผลการทดลองดังกล่าว

บทที่ 3

รายละเอียดการทดลอง

การสังเคราะห์ เอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน โมโนเมอร์ (8)



(i) *N*-methyl glycine *tert*-butyl ester

คนสารผสมระหว่าง *tert*-butyl chloroacetate (4.3 mL, 30 mmol) กับสารละลาย 40 % เมทิลามีน (25 mL) ที่มีโพแทสเซียมไฮไดรด์ (4.98 g, 30 mmol) อยู่ด้วยที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สกัดสารละลายด้วยไดคลอโรมีเทนและระเหยตัวทำละลายออกได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันสีเหลือง (3.94 g, 91%). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.38 (s, 9H), 2.34 (s, 3H), 3.18 (s, 2H)

(ii) *N*-nitroso-*N*-methyl glycine *tert*-butyl ester

ละลาย *N*-methyl glycine *tert*-butyl ester (3.94 g, 27 mmol) ในกรดซัลฟิวริก 2 N 50 mL ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมโซเดียมไนไตรด์ (18.6 g) ลงไปที่ละน้อย สกัดสารละลายที่ได้ด้วยอีเทอร์ เมื่อระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศโดยไม่ใช้ความร้อนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันสีเหลือง (4.14 g, 87%). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (d, 9H, rotamer), 3.07, 3.85 (s, 3H, rotamer), 4.82, 5.27 (s, 2H, rotamer)

(iii) *N*-amino-*N*-methyl glycine *tert*-butyl ester

เติมผงสังกะสี (3.27 g, 50 mmol) ลงในสารละลายของสารประกอบไนโตรโซ (1.74 g, 10 mmol) ในกรดอะซิติก 50 % (20 mL) ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง คนสารผสมในอ่างน้ำแข็งจนกระทั่งสารประกอบไนโตรโซเกิดปฏิกิริยาหมด ทำให้เป็นเบสด้วยสารละลายแอมโมเนีย สกัดสารละลายด้วยไดคลอโรมีเทน และนำชั้นสารอินทรีย์ไประเหยภายใต้สุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำมันใส (0.66 g, 41%) ซึ่งมี *N*-methyl glycine *tert*-butyl ester ที่เป็น over-reduction product ปนอยู่เล็กน้อย อย่างไรก็ตามได้ใช้สารนี้ทำปฏิกิริยาต่อไปโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมอีก. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (s, 9H), 2.58 (s, 3H), 3.33 (s, 2H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 28.1, 44.5, 59.1, 81.9, 156.7

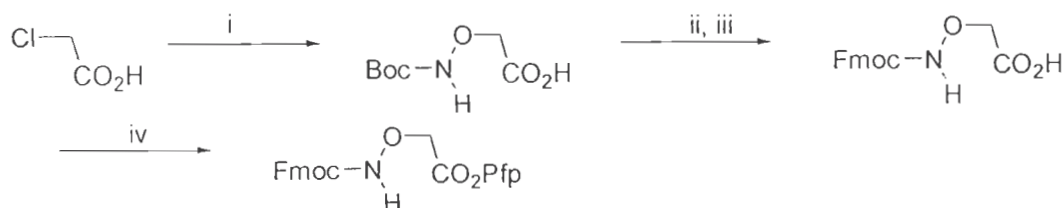
(iv) Fmoc-*N*-amino-*N*-methyl glycine *tert*-butyl ester

ละลาย *N*-amino-*N*-methyl glycine *tert*-butyl ester (0.80 g, 5 mmol) ในไดคลอโรมีเทน (10 mL) เติม *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (0.9 mL, 5 mmol) แล้วจึงเติม Fmoc-Cl (1.29 g, 5 mmol) ตาม

ลำดับ คนสารผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไประเหยภายใต้สุญญากาศ แล้วทำสารที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (EtOAc:Hexane 1:3) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโพลีสีขาว (1.05 g, 55%). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.46 (s, 9H), 2.75 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 4.22 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 4.38 (d, 2H, J = 7.3 Hz) 7.27-7.36 (m, 4H) 7.57 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 7.72 (d, 2H, J = 7.1 Hz); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 27.8, 44.5, 46.8, 56.4, 66.3, 81.6, 119.6, 124.8, 126.6, 127.3, 140.9, 143.4, 169.5 (v), (vi) Fmoc-*N*-amino-*N*-methyl glycine pentafluorophenyl ester (8)

ละลาย Fmoc-*N*-amino-*N*-methyl glycine *tert*-butyl ester (0.56 g, 1.47 mmol) ในไดคลอโรมีเทน (10 mL) แล้วเติมกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) 5 mL คนสารละลายที่ได้จนกระทั่งสารตั้งต้นทำปฏิกิริยาหมดระเหยตัวทำละลายออกโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมไดคลอโรมีเทน (10 mL), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (0.3 mL, 1.8 mmol) และเพนตะฟลูออโรฟีนิลไตรฟลูออโรอะซิเตด (0.30 mL, 1.77 mmol) ลงในภาชนะที่เหลือ คนสารผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมไดคลอโรมีเทนลงไปอีก สกัดด้วยน้ำ แล้วนำชั้นสารอินทรีย์ไประเหยภายใต้สุญญากาศ ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (EtOAc:Hexane 1:3) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว (0.48 g, 68%). m.p. 122.4-125.2 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.82 (s, 3H) 4.03 (m, 2H), 4.22 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 4.46 (d, 2H, J = 6.80 Hz), 7.25-7.42 (m, 4H), 7.57 (d, 2H, J = 6.9 Hz), 7.75 (d, 2H, J = 7.3 Hz); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 44.3, 47.1, 53.9, 57.7, 67.2, 120.0, 125.0, 127.1, 127.8, 135.4, 140.5, 141.4, 143.6, 155.6, 166.4; Anal. Calcd. for C₂₄H₁₇F₅N₂O₄ C; 58.54, H;3.48 N;5.69 ; Found C;58.51 H;3.46 N;5.69 %; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₄H₁₇F₅N₂O₄+Na⁺, 515.1008; found 515.0425.

การสังเคราะห์ อะมิโนออกซีอะซิติกแอซิด โมโนเมอร์ (9)



(i) *N*-Boc-aminooxyacetic acid

รีฟลักซ์สารผสมระหว่าง BocNHOH (1.26 g, 9.46 mmol), กรดคลอโรอะซิติก (0.81 g, 8.6 mmol) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.89 g, 47.3 mmol) ในเอทานอลเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก ละลายภาชนะที่เหลือน้ำและปรับพีเอชให้เป็นกรดด้วย 5 % HCl แล้วจึงสกัดด้วยเอทิลอะซิเตด ทำชั้นสารอินทรีย์ให้แห้งและระเหยภายใต้สุญญากาศ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว (1.12 g, 62 %). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (s, 9H), 4.48 (s, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 28.1, 73.9, 83.9, 158.44, 172.3

(ii), (iii) *N*-Fmoc-aminoxyacetic acid

ละลาย *N*-Boc-aminoxyacetic acid (1.18 g, 6.2 mmol) ในเมทานอล (5 mL) แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.9 mL (62 mmol) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน ระเหยตัวทำละลายออก ละลายกากที่เหลือ (0.56 g, 6.2 mmol), (9-fluorenylmethyl chloroformate (FmocCl) (1.60 g, 6.2 mmol) และ NaHCO_3 (1.04 g, 12.4 mmol) ในสารผสมระหว่างน้ำและอะซิโตนไตรล คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน สกัดสารผสมด้วยอีเทอร์และนำชั้นน้ำมาทำให้เป็นกรดด้วย 5 % HCl แล้วจึงสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ทำชั้นสารอินทรีย์ให้แห้งและระเหยภายใต้สุญญากาศได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว (1.10 g, 57 %). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 4.25 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 4.45 (s, 2H), 4.51 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 7.30 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.40 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.55 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.75 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 8.41 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 46.8, 68.3, 73.3, 120.1, 124.9, 127.2, 128.0, 141.3, 143.1, 158.4, 172.2

(iv) *N*-Fmoc-aminoxyacetic acid pentafluorophenyl ester (9)

ละลาย *N*-Fmoc-aminoxyacetic acid (1.07 g, 3.43 mmol) ในไดคลอโรมีเทน (10 mL) เติม *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (0.70 mL, 4.1 mmol) และเพนตะฟลูออโรฟีนิลไตรฟลูออโรอะซิเตต (0.71 mL, 4.1 mmol) ลงในกากที่เหลือ คนสารผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมไดคลอโรมีเทนลงไปอีก สกัดด้วยน้ำ แล้วนำชั้นสารอินทรีย์ไประเหยภายใต้สุญญากาศ ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (EtOAc:Hexane 1:3) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว (1.16 g, 71 %). m.p. 127.0-130.5 °C; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 4.24 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 4.53 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 4.75 (s, 2H), 7.37 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz), 7.41 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz), 7.57 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz), 7.75 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.95 (s, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 46.9, 67.9, 72.0, 120.1, 124.9, 127.2, 128.0, 141.4, 143.2, 157.0, 165.5; HRMS (ESI-TOF) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{F}_5\text{NO}_5 + \text{Na}^+$, 502.0692; found 502.0147

การสังเคราะห์ (2*R*,4*R*)-พิโรลิดีนโมโนเมอร์ (10)

คนสารผสมของ (2*R*,4*R*)-*N*-Boc-*cis*-4-(N^3 -benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester (1.61 g, 2.64 mmol) และกรดพาราโทลูอินซัลโฟนิก (1.25 g, 6.58 mmol) ในอะซิโตนไตรล 10 mL เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมไดไอโซโพรพิลเอทิลามีน (DIEA) (1.40 mL, excess) และ FmocCl (0.750 g, 2.90 mmol) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ระเหยตัวทำละลายออก และทำอินเทอร์มีเดียต (2*R*,4*R*)-*N*-Fmoc-*cis*-4-(N^3 -benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโพลีสีขาว 1.321 g (68 %)

นำ (2*R*,4*R*)-*N*-Fmoc-*cis*-4-(N^3 -benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester ที่ได้ 0.730 g (1.00 mmol) ละลายในสารผสมระหว่างกรดไตรฟลูออโรอะซิติก 4.0 mL และอะนิโซล 0.5 mL คนที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน ใช้แก๊สไนโตรเจนเป่าไล่ตัวทำละลายออก เติมอีเทอร์จะได้ตะกอนสีขาว ล้างตะกอนด้วยอีเทอร์ ทำให้แห้ง จะได้ (2*R*,4*R*)-*N*-Fmoc-*cis*-4-(N^3 -benzoylthymine-1-yl)-proline เป็นของแข็งสีขาว (0.361 g) ละลายตะกอนในไดคลอโรมีเทน 2 mL เติมเพนตะฟลูออโรฟีนิล (294 mg, 1.6 mmol) และ

DCC (165 mg, 0.80 mmol) คนที่อุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว 0.519 g (83 %, 2 steps)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 2.00 (s, 3H), 2.35 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 3.40-4.10 (m, 3H), 4.25 (t, 1H), 4.50 (d, 2H), 4.70 (m, 1H), 5.30 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.25-7.50 (m, 4H), 7.60 (d, 2H), 7.80 (d, 2H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 12.4, 33.7/31.1, 47.0, 48.9/49.2, 52.4/52.8, 56.9/57.3, 68.2/68.6, 112.1/112.5, 120.3, 125.1, 127.3, 128.1, 135.9/136.1, 141.6, 143.6/143.8, 151.5, 154.3/154.8, 164.1, 168.5 (some signals are doubling due to the presence of two rotamers)

การสังเคราะห์ (2S,4S)-พิโรลิดีนโมโนเมอร์ (11)

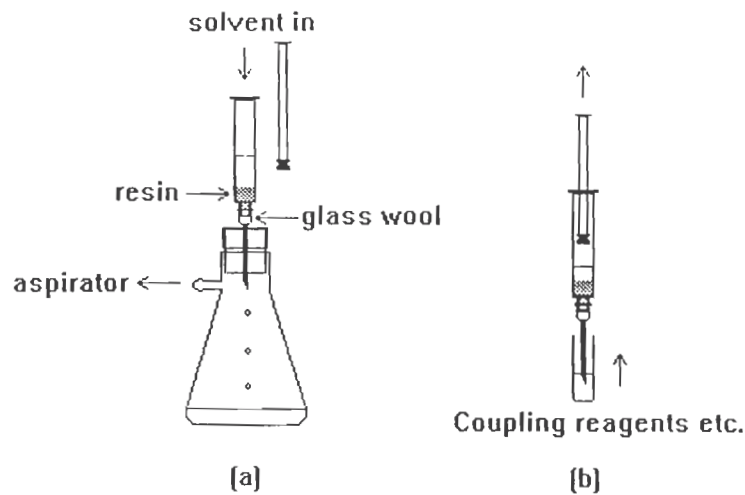
คนสารผสมของ (2S,4S)-*N*-Boc-*cis*-4-(*N*³-benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester (1.00 g, 1.64 mmol) และกรดพาราโทลูอินซัลโฟนิก (0.780 g, 4.10 mmol) ในอะซิโตนไดรล์ 5 mL เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมไดไอโซโพรพิลเอทิลามีน (DIEA) (1.00 mL, excess) และ FmocCl (0.452 g, 1.75 mmol) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ระเหยตัวทำละลายออก และทำอินเทอร์มีเดียต (2S,4S)-*N*-Fmoc-*cis*-4-(*N*³-benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโฟมสีขาว 1.11 g (92 %)

นำ (2S,4S)-*N*-Fmoc-*cis*-4-(*N*³-benzoylthymine-1-yl)-proline diphenylmethyl ester ที่ได้ 0.739 g (1.00 mmol) ละลายในสารผสมระหว่างกรดไตรฟลูออโรอะซิติก 4.0 mL และอะนิโซล 0.5 mL คนที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน ใช้แก๊สไนโตรเจนเป่าไล่ตัวทำละลายออก เติมอีเทอร์จะได้ตะกอนสีขาว ล้างตะกอนด้วยอีเทอร์ ทำให้แห้ง จะได้ (2S,4S)-*N*-Fmoc-*cis*-4-(*N*³-benzoylthymine-1-yl)-proline เป็นของแข็งสีขาว (0.313 g) ละลายตะกอนในไดคลอโรมีเทน 2 mL เติมเพนตะฟลูออโรฟีโนล (276 mg, 1.5 mmol) และ DCC (155 mg, 0.75 mmol) คนที่อุณหภูมิห้อง 4 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว 0.362 g (58 %, 2 steps) สารที่ได้มี ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมเหมือนกับ (2*R*,4*R*)-โมโนเมอร์ 10 ซึ่งเป็นอีแนนชิโอเมอร์กันทุกประการ

การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4a, 4b, 5a และ 5b

การสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้ง 4 ชนิดอาศัยเทคนิคการสังเคราะห์เปปไทด์บนนิวภาคของแข็งโดยใช้หมู่ปกป้องเป็น Fmoc ตั้งที่กลุ่มของผูวิจัยได้เคยรายงานไว้แล้ว [32]

การสังเคราะห์เปปไทด์จะกระทำแบบ manual โดยใช้เครื่องมือง่ายๆ ที่ประกอบขึ้นจากพาสเจอร์บีเปดต์ หลอดเอฟเฟนดอร์ฟ และขวดสุญญากาศ ดังรูป



รูป 3.1 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดบนวัสดุของแข็ง

ภายในพาสเจอร์ปีเปดต์จะอัดไว้ด้วยใยแก้วทางปลายด้านตึบ และบรรจุวัสดุของแข็ง (เรซิน) ซึ่งเป็นตัวค้ำจุนสำหรับการสังเคราะห์เพปไทด์ไว้ ในการทำปฏิกิริยาจะใส่รีเอเจนต์ที่ต้องการลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟและใช้พาสเจอร์ปีเปดต์ที่มีเรซินอยู่ด้วยดูดเข้าไปเพื่อให้สารทำปฏิกิริยากัน และทิ้งไว้ตามเวลาที่ต้องการ โดยอาจมีการคนสารผสมด้วยการดูดสารละลายขึ้น-ลง เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วจึงบีบสารละลายออกจากด้านล่างของพาสเจอร์ปีเปดต์ ประกอบเข้ากับชุดขวดสูญญากาศ แล้วเติมตัวทำละลายที่เหมาะสมทางด้านบนของปีเปดต์เพื่อล้างเรซิน และดูดออกโดยใช้สูญญากาศ ซึ่งสามารถกระทำซ้ำได้ตามต้องการจนกระทั่งเรซินสะอาดปราศจากสารตกค้าง และนำกลับไปทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป

เรซินที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Novasyn TGR Resin (dimethoxybenzhydrylamine-PEG) ซึ่งเป็นโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) เพื่อช่วยให้เกิดการพองตัวในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น DMF ได้ดีขึ้นทำให้รีเอเจนต์แทรกเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารที่เกาะอยู่บนวัสดุของแข็งภายในเมทริกซ์ของวัสดุของแข็งได้ดีขึ้น และผ่านการดัดแปลงด้วย dimethoxybenzhydrylamine หรือ Rink amide linker เพื่อเป็นตัวเชื่อมระหว่างเรซินและสายเปปไทด์ ตัวเชื่อมดังกล่าวเป็นประเภท acid labile จึงสามารถตัดออกได้ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก และได้เปปไทด์หลุดออกมาจากวัสดุของแข็งในรูปของ C-terminal amide ความจุของเรซิน (loading) อยู่ที่ประมาณ 0.2 meq/g ในการสังเคราะห์จะใช้เรซินประมาณ 10 - 20 mg ซึ่งเทียบเท่ากับสเกลการสังเคราะห์ขนาด 3-5 mmol

วงรอบของการสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดเป็นดังแสดงในแผนภาพ 2.9 ในขั้นแรกจะเป็นการแช่เรซินให้พองตัวใน DMF แล้วทำปฏิกิริยากับ activated lysine monomer ได้แก่ Fmoc-Lys(Boc)-OPfp 10 eq โดยมี 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) 10 eq อยู่ด้วยเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยสารนี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า 1-hydroxybenzotriazole ที่เคยใช้มาในอดีต ทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมงซ้ำ 2 ครั้งและล้างให้สะอาด จากนั้นจึงตัดหมู่ Fmoc ซึ่งเป็นหมู่ปกป้องด้านในโตรเจนออกโดยใช้ 20 % พิเพอริดีนใน DMF เป็นเวลา 20 นาที เมื่อเสร็จแล้วจึงล้างเรซินให้สะอาด ในขั้นตอนนี้สำคัญมากที่จะต้อง

ล้างพีเพอริดีนให้หมดจริงๆ มิฉะนั้นจะทำให้การคัปปลิงในขั้นต่อไปไม่สำเร็จเนื่องจากการหลุดออกของหมู่ Fmoc ขั้นต่อไปเป็นการทำปฏิกิริยากับโมโนเมอร์ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดซึ่งอยู่ในรูปของเพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์โดยมี HOAt เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะต้องใช้โมโนเมอร์ให้มากเกินพอเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ภายใต้ระยะเวลาจำกัด ในการสังเคราะห์นี้ใช้ 4 eq ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงจึงจะเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ เมื่อเสร็จปฏิกิริยาแล้วจึงผ่านขั้นตอนการล้างและทำ "capping" ด้วยของผสมอะซิติกแอนไฮไดรด์-DIEA ใน DMF เพื่ออะเซทิลเลตหมู่อะมิโนที่ทำปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ออกเพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงในการทำปฏิกิริยาต่อไป เมื่อผ่านการ capping และล้างแล้วก็ถือว่าจบ 1 วงรอบของการสังเคราะห์เปปไทด์ จากนั้นจึงตัดหมู่ Fmoc ออกโดยใช้ 20 % พีเพอริดีนใน DMF เช่นเดิม โดยสารละลายที่ได้จากการตัดหมู่ Fmoc ออกนี้สามารถนำไปตรวจสอบปริมาณหมู่ Fmoc ที่มีอยู่ได้โดยการวัด UV absorbance ที่ 264 nm ของ dibenzofulvene-piperidine adduct ซึ่งสามารถใช้บ่งชี้ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์เปปไทด์ในรอบที่ผ่านมาได้ ซึ่งประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยาแต่ละวงรอบไม่ควรจะต่ำกว่า 90 % สำหรับเปปไทด์ขนาดประมาณ 20 หน่วยดังที่กำลังสังเคราะห์อยู่นี้ หากประสิทธิภาพต่ำกว่านั้นจะแยกผลิตภัณฑ์สุดท้ายออกจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นได้ยากมาก ขั้นต่อไปเป็นการทำปฏิกิริยากับโมโนเมอร์ของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดอีกครั้ง วงรอบการสังเคราะห์นี้จะทำซ้ำไปเรื่อยๆ โดยในแต่ละวงรอบจะมีการใส่ส่วนของสะพานเชื่อมสลับกับส่วนของพีโรลิดีนโมโนเมอร์ จนกระทั่งสังเคราะห์สายเปปไทด์ที่สมบูรณ์ สำหรับ 10 mer เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดจะต้องทำปฏิกิริยา 20 วงรอบ ผลการตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาโดยการตรวจวัด dibenzofulvene piperidine adduct ที่เกิดขึ้นเป็นดังแสดงในตาราง 3.1

ตาราง 3.1 ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ PNA

รอบที่	PNA 4a ^a โมโนเมอร์ (%)	PNA 4b ^b โมโนเมอร์ (%)	PNA 5a ^c โมโนเมอร์ (%)	PNA 5b ^d โมโนเมอร์ (%)
1	10 (95)	11 (97)	10 (< 80)	11 (< 60)
2	8 (95)	8 (97)	9 (< 80)	9 (< 60)
3	10 (95)	11 (97)	10 (< 80)	11 (< 60)
4	8 (95)	8 (97)	9 (< 80)	9 (< 60)
5	10 (95)	11 (97)	10 (N.D.) ^e	11 (N.D.) ^f
6	8 (98)	8 (98)		
7	10 (98)	11 (98)		
8	8 (98)	8 (98)		
9	10 (98)	11 (98)		
10	8 (98)	8 (100)		
11	10 (N.D.)	11 (N.D.)		
12	8 (N.D.)	8 (N.D.)		
13	10 (96)	11 (94)		

ตาราง 3.1 (ต่อ) ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ PNA

รอบที่	PNA 4a ^a โมโนเมอร์ (%)	PNA 4b ^b โมโนเมอร์ (%)	PNA 5a ^c โมโนเมอร์ (%)	PNA 5b ^d โมโนเมอร์ (%)
14	8 (96)	8 (94)		
15	10 (95)	11 (N.D.)		
16	8 (N.D.)	8 (100)		
17	10 (100)	11 (95)		
18	8 (95)	8 (93)		
19	10 (93)	11 (90)		
20	8 (N.D.) ^g	8 (N.D.) ^h		

^a สเกลเริ่มต้น 3.2 μmol ; ^b สเกลเริ่มต้น 3.1 μmol ; ^c สเกลเริ่มต้น 3.0 μmol ; ^d สเกลเริ่มต้น 3.0 μmol

^e หยุดการทดลองเนื่องจาก overall coupling efficiency ลดต่ำกว่า 30 %

^f หยุดการทดลองเนื่องจาก overall coupling efficiency ลดต่ำกว่า 6 %

^g overall coupling efficiency 48 %; ^h overall coupling efficiency 58 %

N.D. = not determined

จากตารางจะเห็นได้ว่าเป็นที่น่าพอใจหากสะพานเชื่อมเป็นไนโตรเจนประสิทธิภาพของแต่ละรอบของการสังเคราะห์ได้ไม่น้อยกว่า 95 % ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ดีมากทั้ง 2R,4R และ 2S,4S ไอโซเมอร์ของวงแหวนพิโรลิดีน ในทางกลับกัน สะพานเชื่อมที่เป็นออกซิเจนให้ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ที่ต่ำมากในทั้งสองกรณี เหตุผลที่ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาดังกล่าวยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนักแต่เป็นที่ชัดเจนว่าไม่สามารถใช้วิธีสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดปกติกับสะพานเชื่อมชนิดนี้ได้จึงตัดสินใจที่จะหยุดปฏิกิริยาและมุ่งเน้นการศึกษาเฉพาะเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มีสะพานเชื่อมเป็นไนโตรเจนแทน

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการสังเคราะห์แล้วจึงตัดสายเปปไทด์ออกจากเรซินโดยให้ทำปฏิกิริยากับกรดไตรฟลูออโรอะซิติก นำสารละลายที่ได้ไประเหยโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเป่าและตกตะกอนเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดด้วยอีเทอร์ที่เย็นจัด เช่นไตรฟีลล์และล้างตะกอนด้วยอีเทอร์หลายๆ ครั้ง จะได้เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ลักษณะเป็นของแข็ง ซึ่งต้องนำไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ reverse phase HPLC (HPLC conditions column: C-18, 4 μ particle size, acetonitrile:water gradient 10:90-90:10 over 20 min, hold time 5 min, flow rate 0.5 mL/min) รวมแฟรกชันและทำให้แห้งโดยการ freeze drying

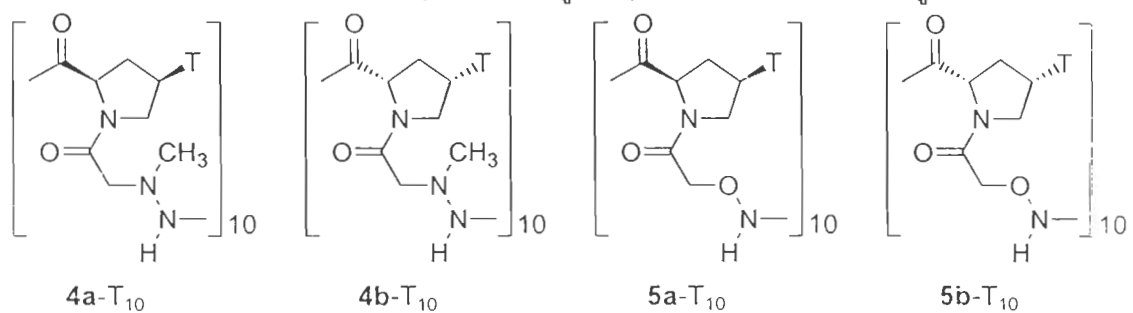
4a-T₁₀-LysNH₂: $t_R = 28.5$ นาที (ภาวะ: คอลัมน์ C-18, ขนาดอนุภาค 4 μ ; ระบบตัวทำละลาย อะซิโตนไตรลีน:น้ำ เกรเดียนท์จาก 10:90 - 90:10 ในช่วงเวลา 20 นาที เวลา hold time 5 นาที อัตราการไหล 0.5 mL/นาที) m/z (MALDI-TOF mass spectrometry) 3218.06 (calcd for M+ = 3216.42)

4b-T₁₀-LysNH₂: $t_R = 25.5$ นาที (ภาวะ: คอลัมน์ C-18, ขนาดอนุภาค 4 μ ; ระบบตัวทำละลาย อะซิโตนไตรลีน:น้ำ เกรเดียนท์จาก 10:90 - 90:10 ในช่วงเวลา 20 นาที เวลา hold time 5 นาที อัตราการไหล 0.5 mL/นาที); m/z (MALDI-TOF mass spectrometry) 3216.40 (calcd for M+ = 3216.42)

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์พิโรลิดีนิลเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ 2 ชนิดที่มีสะพานเชื่อมเป็น เอ็น-อะมิโน-เอ็นเมทิลไกลซีน โดยมีไทมีนเป็นนิวคลีโอเบส และมีความยาว 10 เบส และมีสเตอริโอเคมีบนวงแหวนพิโรลิดีนตรงกันข้ามกันได้แก่ 4a-T₁₀ และ 4b-T₁₀ เป็นผลสำเร็จโดยอาศัยปฏิบัติการควบคู่ของ เอ็น-อะมิโน-เอ็นเมทิลไกลซีน กับ (2*R*,4*R*) หรือ (2*S*,4*S*)-พิโรลิดีนโมโนเมอร์ บนวัฏภาคของแข็ง หมู่ปกป้องอะมิโนที่ใช้คือหมู่ Fmoc และกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลโดยใช้เพนตะฟลูออโรฟีนิลเอสเทอร์ ทำผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดให้บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิค HPLC และวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ mass spectrometry ซึ่งยืนยันว่าสามารถสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ต้องการได้จริง นอกจากนี้ยังได้พยายามสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่คล้ายกันแต่มีสะพานเชื่อมเป็น อะมิโนออกซิอะซิติกแอซิด แทนเอ็น-อะมิโน-เอ็น-เมทิลไกลซีน โดยอาศัยวิธีการเดียวกันแต่เปลี่ยนส่วนโมโนเมอร์ของสะพานเชื่อม อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์สารเหล่านี้ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากปฏิกิริยาควบคู่บนวัฏภาคของแข็งเกิดไม่สมบูรณ์



ได้ศึกษาการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิด 4a-T₁₀ และ 4b-T₁₀ กับโพลีดีออกซีอะดีนีนิกแอซิด ซึ่งเป็นตัวแทนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม และโพลีอะดีนีนิกแอซิด ซึ่งเป็นตัวแทนของอาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สม โดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีไทเทรชัน และเทคนิค CD สเปกโตรสโคปี พบว่าเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดทั้งสองไม่สามารถจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ ผลที่ได้ต่างจากที่คาดหมายไว้อย่างมาก แต่สามารถอธิบายได้โดยการศึกษา CD สเปกตรัมของ 4a-T₁₀ และ 4b-T₁₀ ซึ่งเสนอแนะว่าสารทั้งสองไม่ได้มีโครงสร้างที่ยืดหยุ่นอย่างที่คิดไว้ แต่น่าจะจัดตัวอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่แน่นอนคอนฟอร์เมชันหนึ่ง โดยคอนฟอร์เมชันนี้น่าจะแตกต่างจากคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมที่จะจับยึดกับกรดนิวคลีอิก ทำให้กระบวนการจับกับกรดนิวคลีอิกต้องมีการจัดคอนฟอร์เมชันของโมเลกุลใหม่ ซึ่งจะมีผลทำให้กระบวนการจับยึดของมันกับกรดนิวคลีอิกเป็นกระบวนการที่ไม่เหมาะสมในเชิงเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamically unfavourable)

แม้ผลการทดลองที่ได้จะไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ แต่สิ่งที่ได้เรียนรู้จากงานวิจัยนี้คือสมบัติการจับยึดของเปปไทด์นิวคลีอิกในกลุ่มนี้ขึ้นกับคอนฟอร์เมชันของสะพานเชื่อมที่จำเพาะเจาะจงมาก และประจุบวกบนสายเปปไทด์นิวคลีอิกไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่จะกำหนดว่ามันจะจับยึดกันได้หรือไม่ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในการออกแบบเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ๆ ที่มีสมบัติในการจับยึดที่ดีขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. E. Uhlmann, A. Peymann *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543.
2. P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt *Science* **1991**, *254*, 1497.
3. M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen, R.H. Berg *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895.
4. M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen, R.H. Berg *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677.
5. M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S.M. Freier, D.A. Driver, R.H. Berg, S.K. Kim, B. Norden, P.E. Nielsen *Nature* **1993**, *365*, 566.
6. O. Buchardt, M. Egholm, R.H. Berg, P.E. Nielsen *Trends in Biotechnology* **1993**, *11*, 384.
7. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D.W. Will *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2797.
8. P.E. Nielsen, G. Haaima *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 73.
9. B. Falkiewicz *Acta Biochimica Polonica* **1999**, *46*, 509.
10. P.E. Nielsen *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624.
11. P.E. Nielsen, L. Good, US Patent 6,190,866 February 20, 2001.
12. L.T. Norberg, M.K. Andersson, P.H.R. Lindstrom, Methods for assessing cardiovascular status and compositions for use thereof, US Patent 6,197,505 March 6, 2001.
13. C. Carlsson, M. Jonsson, B. Norden, M.T. Dulay, R.N. Zare, J. Noolandi, P.E. Nielsen, L.C. Tsui and J. Zielenski *Nature* **1996**, *380*, 207.
14. C. Thiede, E. Bayerdoerffer, R. Blasczyk, B. Wittig and A. Neubauer *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 983.
15. V. Demidov, M.D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt and P.E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2103.
16. US Patent and Trade Mark Office, Patent Full Text and Images Database, www.uspto.gov
17. ISI Database on the Web.
18. L. Betts, J.A. Josey, J.M. Veal and S.R. Jordan *Science* **1995**, *270*, 1838.
19. S.C. Brown, S.A. Thomson, J.M. Veal and D.G. Davis *Science* **1994**, *265*, 777.
20. S. Sforza, G. Haaima, R. Marchelli and P.E. Nielsen, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 197.
21. B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt and P.E. Nielsen *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1083.
22. M. Cantin, R. Schutz and C.J. Leumann *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4211.
23. P. Wittung, P.E. Nielsen and B. Norden *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3189.
24. P. Lagriffoule, P. Wittung, M. Eriksson, K.K. Jensen, B. Norden, O. Buchardt and P.E. Nielsen, *P. E. Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 912.
25. B.P. Gangamani and V.A. Kumar *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15017.
26. B.P. Gangamani, V.A. Kumar and K.N. Ganesh *Tetrahedron* **1999**, *55*, 177.

27. S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, E. Schwenner, U. Stropp and B. Mielke *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 681.
28. S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, U. Stropp, E. Schwenner and B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 687.
29. M. D'Costa, V.A. Kumar and K.N. Ganesh *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1513.
30. G. Lowe and T. Vilaivan *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 539.
31. G. Lowe and T. Vilaivan *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 547.
32. G. Lowe and T. Vilaivan *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 555.
33. G. Lowe, T. Vilaivan and M.S. Westwell *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 321.
34. T. Vilaivan, C. Khongdeesameor, W. Wiriyawaree, M. Mansawat, M.S. Westwell and G. Lowe, *Science Asia*. **2001**, *27*, 113-120.
35. C. Khongdeesameor, Master's Degree Thesis, Chulalongkorn University, 1999.
36. T. Vilaivan, Synthesis and Properties of Novel Peptide Nucleic Acids carrying a Hydrophilic Side-Chain, Final Report submitted to NSTDA, 1999.
37. T. Vilaivan, C. Khongdeesameor, P. Harnyuttanakorn, M.S. Westwell and G. Lowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2541.
38. D. Hickman, P.M. King, M.A. Cooper, J.M. Slater and J. Micklefield *Chem. Commun.* **2000**, 2251.
39. K.H. Altmann, D. Husken, B. Cuenoud and C. Garcia-Echeverria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 929.
40. A. Puschl, T. Tedeschi and P.E. Nielsen *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4161.
41. A. Puschl, T. Boesen, G. Zuccarello, O. Dahl, S. Pitsch and P.E. Nielsen *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 707.
42. S.H. Gellman *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173.
43. D.H. Appella, L.A. Christianson, D.A. Kleinl, M.R. Richards, D.R. Powell and S.H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 7574.
44. M.S. Westwell and G. Lowe, unpublished results.
45. T. Vilaivan, C. Suparpprom, P. Harnyuttanakorn, G. Lowe *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533.
46. T. Vilaivan and G. Lowe *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326.
47. A. Cheguillaume, I. Doubli-Bounoua, M. Baudy-Floc'h, P. Le Grel *SynLett.* **2000**, 331.
48. M. Green, J. Berman *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5851.
49. Peake, et.al., US Patent 5,300,503 April 5, 1994.
50. R.P. Cheng, S.H. Gellman, W.F. DeGrado *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219.



Pergamon



Tetrahedron Letters 44 (2003) 1663-1666

TETRAHEDRON
LETTERS

Synthesis and nucleic acid binding studies of novel pyrrolidinyl PNA carrying an *N*-amino-*N*-methylglycine spacer

Tirayut Vilaivan,^{a,*} Chaturong Suparpprom,^a Preeyanut Duanglaor,^a
Pongchai Harnyuttanakorn^b and Gordon Lowe^c

^a*Organic Synthesis Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand*

^b*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand*

^c*Dyson Perrins Laboratory, Department of Chemistry, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QY, UK*

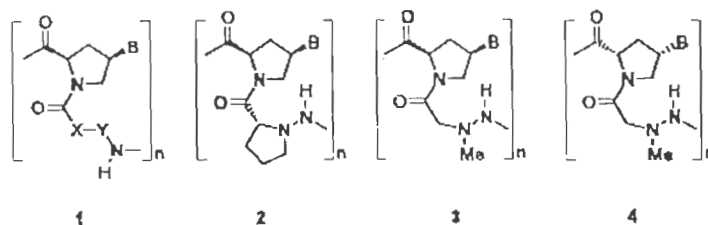
Received 4 November 2002; accepted 20 December 2002

Abstract—Two novel pyrrolidinyl peptide nucleic acids comprising alternating sequences of thymine-modified D- or L-proline and an *N*-amino-*N*-methylglycine spacer were synthesized using solid-phase methodology. UV and CD titrations together with a gel-binding shift assay revealed that neither of the homothymine PNA decamers bind to their complementary DNA or RNA. This was considered to be due to an unfavorable secondary structure which could not be alleviated by the presence of the positively charged protonated amine in the PNA backbone. © 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Peptide nucleic acid (PNA) is a DNA analogue with a polyamide backbone which was shown to possess strong nucleic acid binding properties.¹ Recently there has been much interest in conformationally rigid analogues of PNA since in principle they should bind more strongly with nucleic acids according to the concept of pre-organization.² We have recently synthesized and studied the interactions of a conformationally constrained PNA based on an alternating sequence of (2*R*,4*R*)-4-thymitylproline and β-amino acid spacers **1** with complementary DNA and RNA.^{3,4} It was evident that the stereochemistry of the spacer amino acid is critical for successful binding. Furthermore, we have discovered that PNA **2** bearing the aminopyrrolidine-2*R*-carboxylic acid spacer (D-Apc) shows an unusual preference for binding to its complementary DNA over

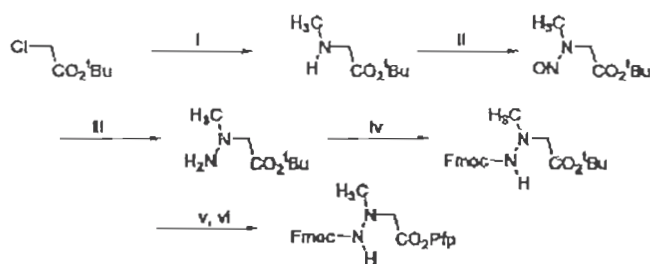
RNA.⁴ From the limited data available, it was not entirely clear whether a structural factor or the presence of a positive charge on the PNA strand at physiological pH, or both, were responsible for the unusual tight binding properties of the PNA **2**.

To investigate further the effect of structure and positive charge on the spacer, we designed a novel PNA **3** bearing a flexible *N*-amino-*N*-methylglycine spacer. This is expected to decrease the binding affinity of **3** compared to **2** due to the higher entropy loss on binding. On the other hand, the more flexible spacer would allow **3** to adopt some conformations not available to **2**, which may result in a PNA with different binding characteristics. Indeed, related PNA systems bearing a positively charged and conformationally



Keywords: nucleic acids; PNA; DNA; RNA; β-amino acids.

* Corresponding author. Tel.: +66-2-2187627; Fax: +66-2-2187598; e-mail: vtirayut@cc.cku.ac.th



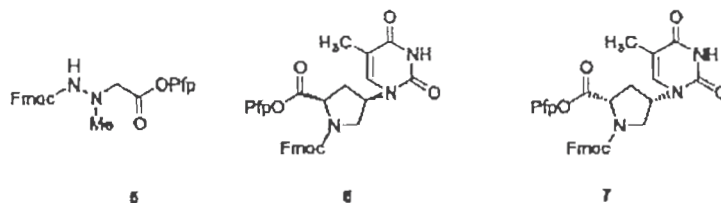
Scheme 1. Reagents and conditions: (i) excess 40% aq. MeNH₂, KI (1 equiv.) (91%); (ii) NaNO₂, 3 M H₂SO₄ 0°C (87%); (iii) Zn, 50% HOAc 0°C (60%); (iv) FmocCl, DIEA; CH₂Cl₂ (55%); (v) TFA; CH₂Cl₂; (vi) PfpOCOCE₂, DIEA; CH₂Cl₂ (68%, two steps).

flexible aminoethyl spacer showed good binding to RNA and DNA.⁵ Since different stereochemistries on the thymitylproline unit can have a dramatic effect on the binding characteristics of the PNA,^{5,6} the PNA 4 was also included in our target molecules.

The Fmoc-protected *N*-amino-*N*-methylglycine monomer 5 was synthesized from readily available starting materials as shown in Scheme 1.⁷ The pentafluorophenyl-activated Fmoc-protected thymine building blocks 6 and 7 were synthesized as previously described.¹⁸ The target sequence for both 3 and 4 was H-T₁₀-LysNH₂, i.e. B=thymine. The lysinamide was included at the C-termini of both PNA for comparison with previous PNA in this series.⁹ The PNA syntheses were carried out following our previously reported protocol.¹⁰ The acid-sensitive Rink-amide Novasyn TGR resin was used as the solid support. The lysine, nucleosaminic acids and spacer were introduced as their pentafluorophenyl esters (4 equiv.) in the presence of 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) in DMF (120 min, single coupling). UV monitoring of the dibenzofulvene-piperidine adduct suggested that the efficiency of each coupling step was greater than 95%, nevertheless, capping (Ac₂O/DIEA) was routinely performed at every step. The overall coupling efficiency was determined to be 48% for (3-T₁₀) and 58% for (4-T₁₀). After the synthesis of the entire sequence was completed, the PNAs were released from the resin by treatment with trifluoroacetic acid followed by ether precipitation and were purified by reverse phase HPLC. The purified PNAs were homogeneous by reverse phase HPLC (3-T₁₀, *t*_R = 28.5 min, 4-T₁₀, *t*_R = 25.5 min, column: C-18, 4 μ particle size, acetonitrile:water gradient 10:90–90:10 over 20 min, hold time 5 min, flow rate 0.5 mL/min) and showed the expected molecular weight (MALDI TOF, 3-T₁₀, calcd for M⁺, 3216.42, found 3218.06; 4-T₁₀, calcd for M⁺, 3216.42 found 3216.40).

Binding of the PNA 3-T₁₀ and 4-T₁₀ to polydeoxyadenylic acid (complementary DNA) and polyadenylic acid (complementary RNA) were studied by UV titration (20°C, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0). If the PNA and DNA can form a stable hybrid at or above the temperature at which the titration was carried out, a non-linear increment in absorbance at 260 nm would be expected due to hypochromism, with a discontinuity at the equivalence point. According to such criteria, no binding between 3-T₁₀ or 4-T₁₀ and complementary DNA was observed as the absorbance showed a near-perfect linearity with the observed and calculated absorbance in good agreement. Likewise, the UV-titration experiment indicated that 3-T₁₀ and 4-T₁₀ did not bind to their complementary RNA. The lack of binding was also supported by polyacrylamide gel electrophoresis of 3-T₁₀ in the presence of fluorescent-labeled (dA)₁₀, the only fluorescent band observed migrating at the same rate as the unhybridized fluorescent-labeled (dA)₁₀.

Finally, CD experiments confirmed the lack of binding between 3-T₁₀ poly(dA), 3-T₁₀ poly(rA), 4-T₁₀ poly(dA) and 4-T₁₀ poly(rA). Interestingly, the single stranded PNA 3-T₁₀ showed strong CD signals with an ellipticity maximum at 280 nm and a minimum at 225 nm while 4-T₁₀ showed a CD spectrum which is almost the mirror image of 3-T₁₀ (Fig. 1).¹¹ This suggests the presence of a stable secondary structure in both PNA as found in polymers of β-amino acids.¹² Nevertheless, in all cases the CD spectra of a 1:1 mixture of the PNA and poly(rA) or poly(dA) were identical to the sum of each component even at a temperature as low as 10°C (Fig. 2). In addition, a plot of ellipticity at different ratios of PNA:DNA in CD-titration experiments did not show any discontinuity, confirming the lack of binding.



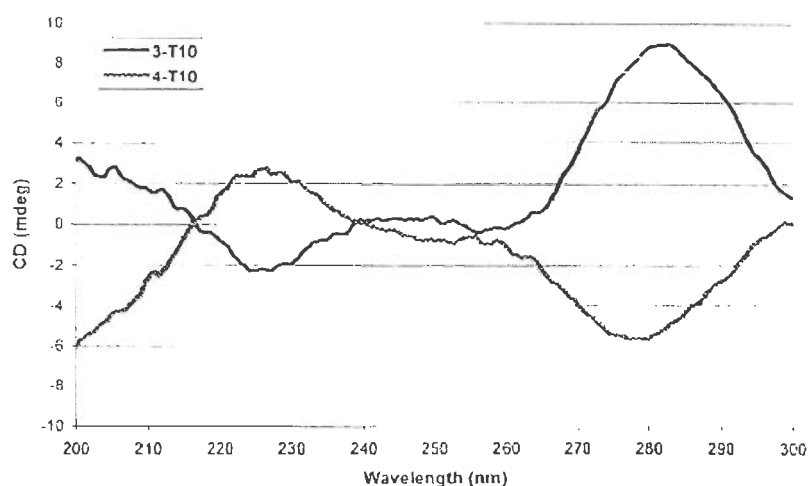


Figure 1. CD spectra of single stranded PNA 3-T₁₀ and 4-T₁₀. Conditions: concentration of PNA strand = 1 μ M, 10 mM sodium phosphate pH 7.0, 20°C.

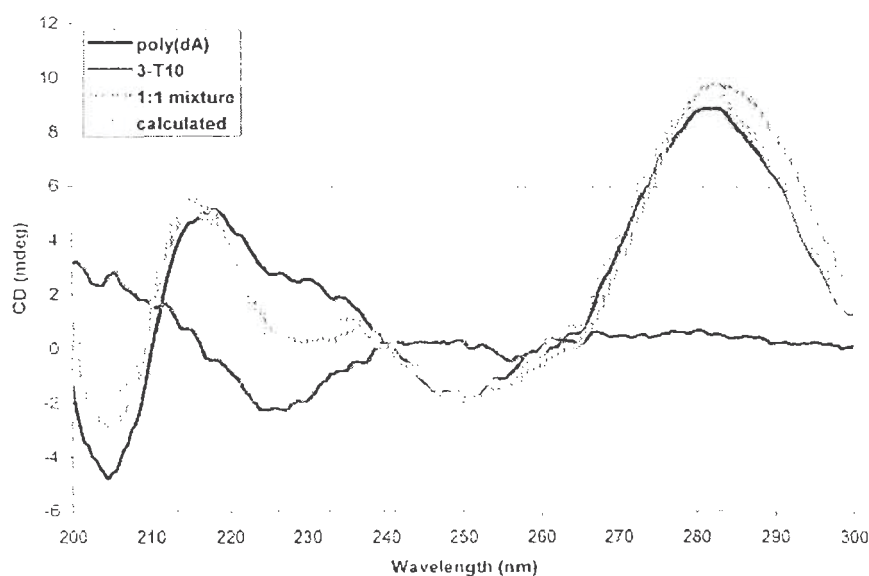


Figure 2. CD spectra of single-stranded poly(dA), 3-T₁₀ and their 1:1 mixture compared with the calculated spectra. Conditions: concentration of PNA = DNA = 10 μ M nucleotides, 10 mM sodium phosphate pH 7.0, 20°C.

The binding experiments indicate that the PNA 3-T₁₀ and 4-T₁₀ were unable to form stable hybrids with poly(dA) or poly(rA). This is in sharp contrast to the PNA 2-T₁₀ which forms a very stable 1:1 PNA–DNA hybrid with a T_m of 80°C (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) and a less stable hybrid with RNA (T_m 32°C).² The results suggested that the presence of a positively charged protonated amine on the PNA strand is probably not the major contributor to the unusual nucleic acid binding

properties of PNA 2. Consequently, the presence of the structurally rigid aminopyrrolidine carboxylic acid spacer appeared to be the more important factor. The fact that single stranded PNA 3-T₁₀ and 4-T₁₀ show strong CD spectra (Fig. 1) indicates that the PNA's adopt secondary structures which are not favorable for binding to complementary DNA or RNA, the need for structural-reorganization rendering the binding process thermodynamically unfavorable.

In conclusion, we have successfully synthesized two novel pyrrolidinyI PNAs carrying the *N*-amino-*N*-methylglycine spacer. The T₁₀ sequence of both PNAs did not hybridize with poly(dA) and poly(rA) under the conditions studied. The lack of binding provides valuable new information on the structural requirements for the PNA–nucleic acids interaction which is important in designing further PNA systems with improved binding properties.

Acknowledgements

This work is supported by a grant from the Thai Government Research Fund (The Bureau of The Budget Office of the Prime Minister, 2002) and the Thailand Research Fund (RSA/04/2545) (to T.V.). C.S. is a research fellow under the Royal Golden Jubilee Ph.D. project. P.D. is supported by the Thai Government's Promotion and Development of Science and Technology Talents Project (DPST) and Thailand's Junior Science Talents Project (JSTP). We also thank Dr. Carolyn A. Carr (Synaptica Research, UK) for obtaining the MALDI-TOF mass spectra.

References

- Recent reviews: Uhlman, E.; Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796–2823; Nielsen, P. E.; Haaime, G. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *73*, 78; Nielsen, P. E. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 105–110; Nielsen, P. E. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624–630; Falkiewicz, B. *Acta Biochimica Polonica* **1999**, *46*, 509–529; Ganesh, K. N.; Nielsen, P. E. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 931.
- Kumar, V. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2021–2032.
- Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533–5536.
- Vilaivan, T.; Lowe, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326–9327.
- (a) Vilaivan, T.; Khongdeesameon, C.; Harnyuttanakorn, P.; Westwell, M. S.; Lowe, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2541–2545; (b) D'Costa, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1513–1516; (c) D'Costa, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1281–1284.
- (a) Lowe, G.; Vilaivan, T.; Westwell, M. S. *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 321–329; (b) Puschl, A.; Boesen, T.; Zuccarello, G.; Dahl, O.; Pirsch, S.; Nielsen, P. E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 707–712.
- 5: white crystalline solid, mp 122.4–125.2°C, anal. calcd. for C₂₄H₃₁F₂N₂O₂: C, 58.54, H, 3.48, N, 5.69; found C, 58.51, H, 3.46, N, 5.69%; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H: 2.82 (s, 3H), 4.03 (br m, 2H), 4.22 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz), 4.46 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz), 6.60 (br m, 1H), 7.25–7.42 (m, 4H), 7.57 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.75 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ_C: 44.2, 47.1, 57.7, 67.2, 120.0, 125.0, 127.1, 127.8, 135.4, 140.5, 141.3, 143.6, 155.6, 166.4; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₄H₃₁F₂N₂O₂•Na⁺, 515.1006; found 515.1000.
- (a) Lowe, G.; Vilaivan, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 539–546; (b) Lowe, G.; Vilaivan, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 547–554.
- Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Beig, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895–1897.
- Lowe, G.; Vilaivan, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 555–560.
- PNA 3-T₁₀ and 4-T₁₀ are not exactly mirror images because they contain L-lysineamide at the C-termini.
- Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.