การสังเคราะห์และสมบัติการจับยึดดีเอ็นเอของพิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี (1*S*,2*S*)-2-อะมิโนไซโคลเพนเทนคาร์บอกซิลิกแอซิดเป็นตัวเชื่อม

นางช่อลัดดา ศรีสุวรรณเกศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-14-1291-7

SYNTHESIS AND DNA-BINDING PROPERTIES OF PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS BEARING (1*S*,2*S*)-2-AMINOCYCLOPENTANE CARBOXYLIC ACIDS SPACER

Mrs. Choladda Srisuwannaket

A Disertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-1291-7

Thesis Title	Synthesis and DNA-Binding Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Bearing (1*S*,2*S*)-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acids Spacer
By	Mrs. Choladda Srisuwannaket
Field of Study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Tirayut Vilaivan, D. Phil.

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

T. Vitidsant ..... Deputy Dean for Administrative Affairs,
.....Acting Dean, The Faculty of Science
(Associate Professor Tharapong Vitidsant, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor Sophon Roengsumran, Ph. D.)

Tirayut Vilaivan ..... Thesis Advisor
(Associate Professor Tirayut Vilaivan, D. Phil.)

N. Ngamrojnavanich ..... Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph. D.)

Polkit Sangvanich ..... Member
(Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph. D.)

..... Member
(Professor Yongyuth Yuthavong, D. Phil.)

ช่อลัดดา ศรีสุวรรณเกศ : การสังเคราะห์และสมบัติการจับยึดดีเอ็นเอของพิร์โรลิดินิลเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่มี (1*S*,2*S*)-2-อะมิโนไซโคลเพนเทนคาร์บอกซิลิกแอซิดเป็นตัวเชื่อม. (SYNTHESIS AND DNA-BINDING PROPERTIES OF PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS BEARING (1*S*,2*S*)-2-AMINOCYCLOPENTANECARBOXYLIC ACIDS SPACER) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์; 180 หน้า. ISBN 974-14-1291-7

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการสังเคราะห์เพพไทด์นิวคลีอิกแอซิด (พีเอ็นเอ) ชนิดใหม่ที่มีเบสผสมทั้ง 4 ชนิดบนวัฏภาคของแข็ง ซึ่งในงานวิจัยนี้ ใช้พีเอ็นเอโมโนเมอร์เป็นอนุพันธ์ของพิโรลิดีนที่มีสเตอริโอเคมีเป็นซีส-ดี ต่อกับนิวคลีโอเบสและ (1*S*,2*S*)-2-อะมิโนไซโคลเพนเทนคาร์บอกซิลิกแอซิดเป็นตัวเชื่อม สภาวะที่ดีที่สุดในการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่ถูกกระตุ้นด้วยหมู่เพนตะฟลูออโรฟีนิล ใช้ร่วมกับ HOAt และ DIEA เป็นเวลา 30 นาที ในขั้นตอนการคู่ควบ และใช้ลอโรอิลคลอไรด์/DIEA สำหรับขั้นตอนการครอบพีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์เพื่อทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ค่าเฉลี่ยการคู่ควบในแต่ละขั้นโดยทั่วไปมากกว่าร้อยละ 95 ได้สังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสผสมชนิดต่างๆที่มีความยาวระหว่าง 5-15 เบส โดยอาศัยวิธีที่พัฒนาแล้วนี้ ผลการศึกษาอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ระหว่างพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่เป็นเบสคู่สมแสดงการเกิดสารเชิงซ้อนที่เสถียรในลักษณะดับเบิลเฮลิกซ์ที่มีความสามารถในการจดจำคู่เบสอย่างจำเพาะเจาะจงสูงมาก และเป็นไปตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (A-T, C-G) ในทิศทางแอนติพาราเรล และพีเอ็นเอชนิดนี้แสดงการจับยึดกับดีเอ็นเอได้ดีกว่าอาร์เอ็นเอและตัวพีเอ็นเอเอง

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต ช่อลัดดา ศรีสุวรรณเกศ

สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ปีการศึกษา 2548

##4473809023 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD : PEPTIDE NUCLEIC ACID / PNA / ACPC PNA.

CHOLADDA SRISUWANNAKET: SYNTHESIS AND DNA-BINDING PROPERTIES OF PYRROLIDINYL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS BEARING (1*S*,2*S*)-2-AMINOCYCLOPENTANECARBOXYLIC ACIDS SPACER.THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. TIRAYUT VILAIVAN, D.Phil. 180 pp. ISBN 974-14-1291-7

A solid phase protocol for the synthesis of a new peptide nucleic acid (PNA) carring all four nucleobases has been developed. The PNA monomers in this research consist of a nucleobase-modified pyrrolidine derivatives with *cis*–D stereochemistry and (1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC). The optimized solid phase synthesis conditions include the use of Pfp-activated monomer with HOAt and DIEA for 30 minutes in the coupling step. For capping step, lauroyl chloride and DIEA were used in order to facilitate the purification of PNA. The average coupling yield in each step was generally over 95 %. A number of mixed bases PNA with 5-15 mer in length were successfully synthesized by this protocol. T_m studies with complementary DNA showed that the PNA can form a stable hybrid with high affinity and sequence specificity for Watson-Crick type base pairing (A-T, C-G) exclusively in an antiparallel fashion. These PNA also exhibited a strong preference for binding to DNA over RNA and over self pairing.

Department.....Chemistry.....Student's signature.....Choladda Srisuwannaket.....

Field of study.....Chemistry.....Advisor's signature.....Tirayut Vilaivan.....

Academic year.....2005.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to sincerely thank and express my deepest gratitude to Associate Professor Dr. Tirayut Vilaivan, my thesis advisor, for his kindness, guidance, suggestions and assistance throughout the course of this research. I am also grateful to thesis examiners: Professor Dr. Sophon Roengsumran, Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojnavanich, Assistant Professor Dr. Polkit Sangvanich and Professor Dr. Yongyuth Yuthavong for their valuable comments and suggestions. I would like to thank the Thailand-Japan Technology Transfer Project (TJTTP), Organic Synthesis Research Unit; Depatment of Chemistry, Chulalongkorn University for the use of facilities, equipment, glassware, and chemicals; Professor Yasufumi Ohfune and Dr. Tetsuro Shinada Osakacity University, Japan for HRMS analysis; Dr. Khanit Suwanborirux and Mr. Amnat Pakdeepo of the center of Pharmaceutical Research Equipment for a generous use of CD spectrometer; Dr Usanee Yosyingyuad a former vice-president of Chulalongkorn University, for initiating a generous support of the UV-visible Spectrophotometer; King Mongkut's University of Technology Thonburi for financial support during my study; Mr. Chaturong Suparpprom and Miss Patcharee Ngamviriyavong for synthesis of some intermediate compounds and starting materials; Miss Woraluk Mansawat for NMR experiments; members of TV & WB group for their friendship, advice and their helpful. Finally, I would like to thank my parents who had encouraged me with sincere, my family for their moral support throughout the research and my best friends for their love, understanding encouragement and social support throughout my study period.

CONTENTS

Page

LIST OF FIGURES

Page

Page

Page

Page

Page

Page

Page

Page

Page

TIST OF TABLES

Page

Page

LIST OF ABBREVIATIONS

δ	chemical shift
μL	microliter
μmol	micromole
$[\alpha]_D$	specific rotation
A	adenine
A^{Bz}	N^4-benzoyladenine
Ac	acetyl
Ac_2O	acetic anhydride
AcOH	acetic acid
aq	aqueous
Boc	*tert*-butoxycarbonyl
br	broad
Bz	benzoyl
c	concentration
C	cytosine
calcd	calculated
C^{Bz}	N^4-benzoylcytosine
CCA	α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid
$CDCl_3$	deuterated chloroform
d	doublet
D_2O	deuterium oxide
DCM	dichloromethane
DIAD	diisopropylazodicarboxylate
DIC	diisopropyl carbodiimide
DIEA	*N*,*N*'-dimethylaminopyridine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	*N*,*N*'-dimethylformamide
DMSO-d_6	deuterated dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
Dpm	diphenylmethyl
EDC.HCl	*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethyl-carbodiimide hydrochloride

equiv	equivalent (s)
FAB^+	positive ion fast atom bombardment (mass spectrometry)
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
FmocCl	9-fluorenylmethyl chloroformate
FmocOSu	9-fluorenylsuccinimidyl carbonate
g	gram
G	guanine
G^{Ibu}	N^2-isobutyrylgaunine
h	hour
HATU	*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
Ibu	isobutyryl
J	coupling constant
Lys	lysine
m	multiplet
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
MeCN	acetonitile
MeOH	methanol
MeOTs	methyl tosylate
mg	milligram
MHz	megahertz
min	minute
mL	milliliter
mM	millimolar
mmol	millimole
mp.	melting point
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
nm	namometer
NMR	nuclear magnetic resonance
Npe	2-(4-nitrophenyl)ethyl
°C	degree celcius

OD_{xxx}	optical density at xxx nm (= A_{xxx})
Pfp	pentafluorophenyl
PfpOH	pentafluorophenol
PfpOTfa	pentafluorophenyl trifluoroacetic acid
PG	an unspecified protecting group
Ph	phenyl
PNA	peptide nucleic acid or polyamide nucleic acid
ppm	part per million
R_f	retention factor
RNA	ribonucleic acid
s	singlet
t	triplet
T	thymine
T^{Bz}	N^3-benzoylthymine
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
T_m	melting temperature
t_R	retention time
Ts	*p*-toluenesulfonyl (=tosyl)
UV	ultraviolet
X	an unspecified leaving group