การสังเคราะห์และสมบัติของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีโซ่ข้างแบบไฮโดรฟิลิก

นาย ชาญชัย คงดีเสมอ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-224-9

SYNTHESIS OF NOVEL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS CARRYING HYDROPHILIC SIDE-CHAIN AND THEIR PROPERTIES

Mr. Chanchai Khongdeesameor

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-224-9

Thesis Title SYNTHESIS OF NOVEL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS CARRYING HYDROPHILIC SIDE-CHAIN AND THEIR PROPERTIES

By Mr. Chanchai Khongdeesameor

Department Chemistry

Thesis Advisor Assistant Professor Tirayut Vilaivan, D. Phil.

.....

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

.....Dean of Faculty of science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph. D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Associate Professor Udom Kokpol, Ph. D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Tirayut Vilaivan, D. Phil.)

..... Member

(Buncha Pulpoka, Ph. D.)

..... Member

(Assistant Professor Supasorn Wanichwecharungruang, Ph. D.)

ชาญชัย คงดีเสมอ : การสังเคราะห์และสมบัติของเปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีโซ่ข้างแบบไฮโดรฟีลิก : (SYNTHESIS OF NOVEL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS CARRYING HYDROPHILIC SIDE-CHAIN AND THEIR PROPERTIES): ผศ.ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ; 197 หน้า. ISBN 974-334-224-9

ได้สังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดแบบมีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด(ซีพีเอ็นเอ)ที่มีโครงสร้างต่างกัน 3 แบบ ซีพีเอ็นเอนี้เป็นสารเลียนแบบดีเอ็นเอโดยแทนที่ดีออกซีไรโบสฟอสเฟตของดีเอ็นเอทั้งหมด ด้วยไดเปปไทด์โมโนเมอร์ของดีและแอลซีรีลโปรลีน หรือดีออกซีไกลซิลโปรลีนที่เชื่อมต่อกับไทมีนที่เป็นนิวคลีโอเบสที่ตำแหน่งที่ 4 ของวง โครงสร้างที่แข็งเกร็งของซีพีเอ็นเอได้จากการเชื่อมวงโปรลีนที่มีสเตอริโอเคมีแบบ “ซีส-ดี” หรือ *2R, 4R* สลับกับกรดอะมิโนซีรีนทั้งชนิดแอลหรือดีหรือหมู่อะมิโนเอธิลด้วยวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของซีพีเอ็นเอ ไดเปปไทด์โมโนเมอร์นี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก ซีส-4-ไฮดรอกซี่-ดี-โปรลีน ที่ถูกแทนที่ด้วยไทมีนโดยอาศัยปฏิกริยามิซูโนบุและจึงนำไปทำปฏิกิริยาคู่ควบต่อเข้ากับชิ้นส่วนสเปเซอร์ ในกรณีของซีรีนจะใช้ Fmoc-Ser(O^{t}Bu)-OH ซึ่งสามารถคู่ควบเข้ากับสารมัธยันตร์ได้โดยตรง ในขณะที่การต่อหมู่ดีออกซีไกลซิลสเปเซอร์ทำได้โดยใช้แอซิริดีนที่ถูกกระตุ้น การโอลิโกเมอร์ไรซ์ให้ซีพีเอ็นเอมีความยาว 10 หน่วย ทำได้โดยใช้ยุทธวิธีการคู่ควบแบบชิ้นส่วนโดยใช้การปกป้องแบบ Fmoc/O^{t}Bu และใช้การกระตุ้นด้วยเพนตะฟลูออฟีนิลเอสเทอร์ หรือ HBTU นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเสถียรภาพในการจับยึดเบื้องต้นระหว่างซีพีเอ็นเอที่ได้กับโอลิโกแอดินิลิกแอซิดที่ผ่านการติดฉลากแบบฟลูออเรสเซนต์ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟลิซิสผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าไม่พบการจับยึดกันแม้จะใช้ความเข้มข้นซีพีเอ็นเอสูงก็ตาม

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....ชาญชัย คงดีเสมอ.....

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ธีรยุทธ วิไลวัลย์.....

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072241923 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: PNA / peptide nucleic acid / DNA mimics

CHANCHAI KHONGDEESAMEOR : SYNTHESIS OF NOVEL PEPTIDE NUCLEIC ACIDS CARRYING HYDROPHILIC SIDE-CHAIN AND THEIR PROPERTIES.
THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. TIRAYUT VILAIVAN, D. Phil.
197pp. ISBN 974-334-224-9

Three different conformationally constraint peptide nucleic acids (cPNA) have been synthesized. These cPNA are DNA mimics in which the entire deoxyribose phosphate is replaced with L- and D-serylproline or deoxyglycylproline dipeptide units bearing thymine as nucleobase at C-4 position. Their rigid backbones were derived from "*cis*-D" or (*2R, 4R*) absolute stereochemistry on proline ring alternating with D or L serine or aminoethyl spacers with the aim to improve water solubility of the resulting cPNA. Dipeptide monomers were synthesized from *cis*-4-hydroxy-D-proline derivatized with thymine by Mitsunobu reaction followed by coupling with the spacer moiety. The serine spacer were introduced as Fmoc-Ser(O^{t}Bu)-OH which could be directly coupled to the intermediate by DCC coupling whereas the deoxyglycyl spacer was introduced by alkylation of the intermediate with activated aziridine. Oligomerization of the cPNA up to 10-mers were achieved by solid phase peptide synthesis methodology employing Fmoc/O^{t}Bu fragment coupling strategy using pentafluorophenyl ester or HBTU activation. Preliminary binding stability of these cPNA toward fluorescence labelled oligoadenylic acid F(dA_{10}) were studied by gel electrophoresis. Lacking of binding of all cPNA oligomers was observed even at high PNA concentration.

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the following: the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for 1997 Local Graduate Schlolarship (LGS) and central office project RDE-Co grant number: CO-B-06-22-09-001 for 1999 research assistant scholarship; Assistant Professor Dr. Tirayut Vilaivan, my thesis advisor, for good advice and some financial support throughout the course of this research; Associate Professor Dr. Udom Kokpol, Dr. Buncha Pulpoka and Assistant Professor Dr. Supasorn Wanichwecharungruang, thesis examiners, for all valuable comments regarding this thesis; Dr. Aroonsiri Shitangkoon for her help involving HPLC experiments; Dr. Pongchai Hanyuthanakorn for some chemicals and materials for the gel electrophoresis experiment and invaluable suggestion on biological assay; Chulalongkorn Research Equipment Centre, Ms. Amporn Ungpakornkaew for Elemental analysis, Mrs Wanna Sririnnut and Ms Wanwimon Thabdee for 500 MHz NMR experiment; Institute of Biotechnology and Genetic Engineering for UV-spectrophotometer service and Ms. Nanthiga Panchan for MALDI-TOF mass spectrometry. Department of Chemistry, Chulalongkorn University for laboratory facilities, chemicals and equipment. I wish to express my special thank also to Mr. Sutirawat Samingprai for some parts of laboratory setup, without his help I would not have a chance to be here and writing this thesis. Finally, I would like to pay obeisance to my parent who had encouraged me with sincere throughout the research courses and to my family for introducing the will power. Thanks God for giving power, hope and confidence during the research.

CONTENTS

page

page

LIST OF FIGURES

page

page

page

page

page

page

page

page

page

LIST OF TABLES

page

LIST OF ABBREVIATIONS

i) Nomenclature and abbreviations of nucleic acids and their constituents

DNA	deoxyribonucleic acids
RNA	ribonucleic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
A	Adenine
T	Thymine
C	Cytosine
G	Guanine
B	unspecified nucleobase
dA	2′-deoxy adenosine
dT	(2′-deoxy)thymine

ii) Nomenclature and Abbreviations of amino acids

Ala	Alanine
Gly	Glycine
Lys	Lysine
Pro	Proline
Ser	Serine

iii) Miscellaneous

Ac_2O	acetic anhydride
Boc	*tert*-butoxycarbonyl
Boc_2O	di-*tert*-butyl dicarbonate
br	broad
Bz	benzoyl

c	concentration
°C	degree celcius
calcd	calculated
CD	circular dichroism
$CDCl_3$	deuterated chloroform
cm^{-1}	unit of wave number
^1H-^1H COSY	proton-proton correlation spectroscopy
cPNA	chiral or conformationally constraint peptide nucleic acid
d	doublet
dd	doublet of doublet
ddd	doublet of doublet of doublet
dt	doublet of triplet
DC	direct current
DCC	*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichloromethane
DCU	dicyclohexyl urea
DEAD	diethylazodicarboxylate
DIAD	diisopropylazodicarboxylate
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DIEA	*N,N'*-diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	*N,N'*-dimethylformamide
DMSO-d_6	deuterated dimethylsulfoxide
Dpm	diphenylmethyl
D_2O	deuterium oxide
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
eq.	equivalent (s)
Fmoc	*9*-fluorenylmethoxycarbonyl
FmocCl	9-fluorenylmethylchloroformate
g	gram

HBTU	(1-*H*-benzotriazol-1-yloxy)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOAc	acetic acid
HOBt	1*H*-hydroxybenzortriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hour
IR	infrared
J	coupling constant
m	multiplet
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
mg	milligram
MHz	megahertz
min	minute
mL	milliliter
mmol	millimole
mp.	melting point
M_r	relative molecular mass
NMR	nuclear magnetic resonance
Ns	nosyl or 4-nitrobenzenesulfonyl
m/z	mass per charge ratio
Pfp	pentafluorophenyl
PfpOH	pentafluorophenol
Ph	phenyl
PNA	peptide nucleic acid or polyamide nucleic acid
ppm	part per million
rpm	round per minute
s	singlet
t	triplet
T^{Bz}	N^3-benzoylthymine
TBE	tris-borate EDTA buffer
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran

TLC	thin layer chromatography
T_m	melting temperature
TEMED	*N, N, N′, N′*-tetramethylethylenediamine
t_R	retention time
UV	ultraviolet
V	volt
ν_{max}	the wavelength at maximum absorption
μL	microliter
μm	micrometer
μmol	micromol
δ	chemical shift
$[\alpha]_D$	specific rotation