



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยัดกับกรดนิวคลีอิกของ
พิวโรลิดีนเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น
3-อะมิโนพิวโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด

โดย จตุรงค์ สุภาพพร้อม และคณะ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ พฤศจิกายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของ
พอลิไดนาไมด์ชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น
3-อะมิโนพอลิไดนาไมด์-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด

คณะผู้วิจัย

- นายจตุรงค์ สุภาพพร้อม
- นางสาวนิษานารถ ธีรภักดิ์
- นายธีรยุทธ วิไลวัลย์

สังกัด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการ
วิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพอลิโรลิตินเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น 3-อะมิโนพอลิโรลิติน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือจากหลายฝ่าย ขอขอบคุณแหล่งทุนวิจัย ได้แก่ ทุนพัฒนาศักยภาพอาจารย์รุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปี 2551 (MRG5180025) ขอขอบคุณรศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ นักวิจัยพี่เลี้ยงประจำโครงการ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งทางด้านคำปรึกษา อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีด้วยดีเสมอมา ซึ่งเป็นผู้บุกเบิกงานวิจัยด้านเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดในประเทศไทย และเป็นจุดเริ่มต้นให้ข้าพเจ้าสนใจในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังเป็นต้นแบบที่ดีในด้านการทำงานและการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณนางโชติมา วิไลวัลย์ ที่ได้เสียสละเวลาในการสอนการสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง และดูแลลูกศิษย์เป็นอย่างดี รวมทั้งทีมงานในกลุ่มวิจัยของรศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ได้แก่ ดร.วรลักษณ์ มั่นสวัสดิ์ นส.ชโลธร บุญเหลือ และนิสิตคนอื่น ๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่ได้ช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ระหว่างการทำวิจัยที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในด้านสถานที่ และสาธารณูปโภคในระหว่างการทำวิจัยที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดร.อนุสรณ์ วรสิงห์ ผศ.ดร.วิจิตร อุดอ้าย ที่แบ่งปันพื้นที่ในห้องวิจัย 502 ขอขอบคุณทุกท่านที่กล่าวมาโดยเฉพาะนางสาวนิษานารท รินับถือ ซึ่งได้รับทุนบัณฑิตศึกษาของศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) และเป็นนิสิตปริญญาโทคนแรกของข้าพเจ้า ที่ได้ช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้ ดำเนินไปได้ และสำเร็จลุล่วงด้วยดี หากปราศจากบุคคลเหล่านี้ งานคงจะดำเนินไปอย่างล่าช้ามาก สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดันสังกัดที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ที่จำเป็นในงานวิจัย

รหัสโครงการ : MRG5180025
ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพิโรลิดีนเพปไทด์นิวคลีอิก
แอซิดชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น 3-อะมิโนพิโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : 1. นายจตุรงค์ สุภาพพร้อม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นางสาวนิษานารถ รีนับถิอ
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. นายธีรยุทธ วิไลวัลย์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์พิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีกรดเบต้าอะมิโนชนิด 3-อะมิโนพิโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด (APC) เป็นสะพานเชื่อมชนิดใหม่ ซึ่งมีหมู่ไนโตรเจนอิสระที่สามารถดัดแปรหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เข้าไปในพีเอ็นเอได้ และศึกษาผลในการแทรกสะพานเชื่อมดังกล่าวต่อสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ โดยคาดว่า การเปลี่ยนสะพานเชื่อมดังกล่าวจะไม่ส่งผลเชิงลบต่อสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอมากนัก โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ (N^3 -Fmoc/ N^1 -Boc and N^3 -Fmoc/ N^1 -Tfa) (3*R*,4*S*)-APC และ (3*S*,4*R*)-APC ตามวิธีในเอกสารอ้างอิง และได้พัฒนาการสังเคราะห์ขึ้นบางส่วน และทำการแทรกสะพานเชื่อมดังกล่าวในพิโรลิดีนพีเอ็นเอระบบเดิมที่มี (1*S*,2*S*)-ACPC หลังจากนั้นจึงศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ UV-titration, UV-melting temperature และ CD spectroscopy พบว่า พีเอ็นเอที่มีการแทรก (3*R*,4*S*)-APC นั้นส่งผลให้ความเสถียรระหว่างสารเชิงซ้อนพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ลดลงเล็กน้อย ในขณะที่พีเอ็นเอที่มีการแทรก (3*S*,4*R*)-APC นั้นส่งผลให้ความเสถียรระหว่างสารเชิงซ้อนพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการเพิ่มหมู่ฟลูออเรสเซนต์ 2 ชนิด ได้แก่ pyrene-1-carboxylic acid และ pyrene-1-butyric acid ไปยังไนโตรเจนบน APC ผ่านพันธะเอไมด์ พบว่าพีเอ็นเอที่ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์นั้นสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสารเชิงซ้อนพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอแบบคู่สม กับสารเชิงซ้อนที่มีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่งได้ด้วยการพิจารณาจากสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เปลี่ยนแปลง

Keywords: พีเอ็นเอ, ดีเอ็นเอ, พิโรลิดีน, ดีเอพีซี, โพลดาเมอร์, ฟลูออเรสเซนต์, กรดเบต้าอะมิโน

Project Code : MRG5180025

Project title : Synthesis and Nucleic Acid Binding Properties of Novel Pyrrolidine Peptide Nucleic Acid Carrying 3-Aminopyrrolidine-4-Carboxylic Acid

Investigators : 1. Mr. Chaturong Suparpprom
2. Miss Nisanath Reenabtue
Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University
3. Mr. Tirayut Vilavan
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Conformationally restricted pyrrolidinyl PNAs with an α/β -dipeptide backbone consisting of a nucleobase-modified proline and a cyclic five-membered amino acid spacer such as (1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (ACPC) (acpcPNA) can form very stable hybrids with DNA with high Watson-Crick base pairing specificity. This work aims to explore the effect of incorporating 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (aza-ACPC), which is isosteric to the ACPC spacer, into the acpcPNA. It is expected that the modification should not negatively affect the DNA binding properties, and that the additional nitrogen atom in the aza-ACPC should provide a handle for internal modification. Orthogonally-protected (N^3 -Fmoc/ N^1 -Boc and N^3 -Fmoc/ N^1 -Tfa) aza-ACPC monomers have been successfully synthesized and incorporated into the acpcPNA by Fmoc-solid-phase peptide synthesis. T_m , UV and CD spectroscopy confirmed that the (3*R*,4*S*)-aza-ACPC could substitute the (1*S*,2*S*)-ACPC spacer in the acpcPNA with only slightly decreasing the stability of the hybrids formed between the modified acpcPNA and DNA. In contrast, the (3*S*,4*R*) enantiomer of aza-ACPC caused substantial destabilization of the hybrids. Furthermore, a successful on-solid-support internal labeling of the modified acpcPNA via amide bond formation between pyrene-1-carboxylic acid or pyrene-1-butyric acid and the pyrrolidine nitrogen atom of aza-ACPC spacer has been demonstrated. Fluorescence properties of the pyrene-labeled acpcPNA are sensitive to its hybridization state and can readily distinguish between complementary and single-mismatched DNA targets.

Keywords: PNA, DNA, Pyrrolidine, DAPC, Foldamer, Fluorescence, β -amino acid

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

ผู้แต่ง : Nisanath Reenabthue, Chalothorn Boonlua, Chotima Vilaivan, Tirayut Vilaivan และ Chaturong Suparpprom*

ชื่อเรื่อง : 3-Aminopyrrolidine-4-carboxylic acid as a versatile handle for internal labeling of pyrrolidinyI PNA

วารสาร : กำลังรอการตอบรับ

Impact Factor : กำลังรอการตอบรับ

ปี : กำลังรอการตอบรับ

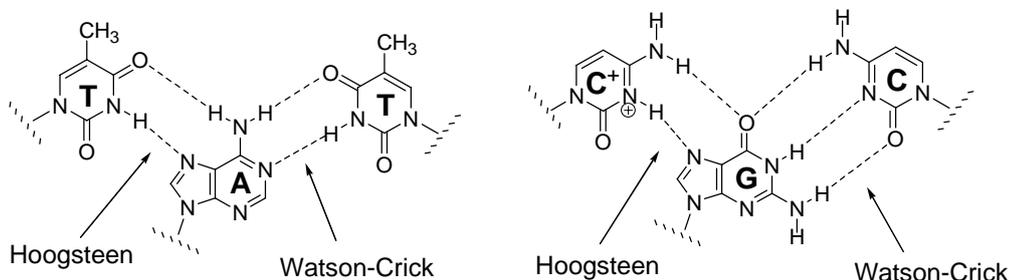
เล่มที่ : กำลังรอการตอบรับ

หน้า : กำลังรอการตอบรับ

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

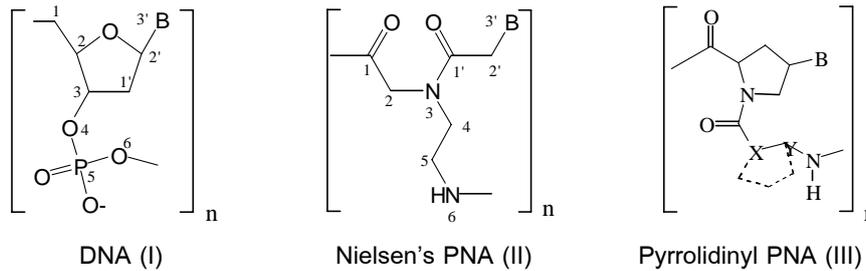
เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีแนวคิดใหม่เกี่ยวกับการรักษาโรคเกี่ยวกับพันธุกรรม โดยใช้หลักการแอนตี้เซนส์ (antisense technology) หลักการของแอนตี้เซนส์ เริ่มจากการอาศัยความรู้ทางด้านการสืบทอดพันธุกรรมมนุษย์ ในการทำนายว่าโรคทางพันธุกรรมเกิดจากการแสดงออกของยีนชนิดใด ซึ่งในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้เกือบจะสมบูรณ์แล้ว และเมื่อทราบลำดับเบสของยีนดังกล่าวแล้ว ก็จะสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่มีลำดับเบสคู่สมตรงกับรหัสพันธุกรรมของโรคนั้น เพื่อนำไปจับยึดกับสารพันธุกรรมในบริเวณเป้าหมายให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อน (hybrid molecule) ได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (A•T, C•G) หรือ วัตสัน-คริก-ฮุกสตัน (T•A•T และ C⁺•G•C) ดังรูปที่ 1 ซึ่งจะเรียกโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ว่า แอนตี้เซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (antisense oligonucleotide) แต่อย่างไรก็ตาม หลักการแอนตี้เซนส์ก็มีข้อจำกัด กล่าวคือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนั้น ไม่มีความเสถียรต่อสภาวะต่างๆ ในร่างกาย และถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไม่สามารถที่จะใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์มาใช้เป็นแอนตี้เซนส์ดรักส์ (antisense drug) ได้ ถึงแม้ว่าจะมีความพยายามในการดัดแปลงโครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งหรือบางอะตอมแล้วก็ตาม ก็ยังสามารถถูกทำลายด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสได้อยู่ดี เนื่องจากว่าโครงสร้างหลักยังคงเป็นไดออกซีไรโบสฟอสเฟต (deoxyribose phosphate) หรือไรโบสฟอสเฟต (ribose phosphate) ดังนั้นในการพัฒนาแอนตี้เซนส์ดรักส์ให้มีประสิทธิภาพนั้น ทางเลือกหนึ่งก็คือต้องทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้แตกต่างจากดีเอ็นเอ หรือแมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอธรรมชาติ เพื่อให้มีเสถียรภาพต่อเอนไซม์นิวคลีเอส โปรตีเอส และสภาวะต่างๆ ภายในร่างกาย และมีคุณสมบัติในการจับยึดกับสารพันธุกรรมด้วยความจำเพาะเจาะจงได้เท่าเดิมหรือดีกว่าเดิม รวมทั้งมีการพัฒนาสมบัติในด้านอื่นๆ เช่น การละลายน้ำ การที่สมบัติไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ การแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น



รูปที่ 1 แสดงพันธะไฮโดรเจนผ่านการจับคู่แบบวัตสัน-คริก-ฮุกสตัน

ในปี 1991 P. E. Nielsen และคณะจากมหาวิทยาลัยโคเปนเฮเกน ได้รายงานการวิจัยว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบประเภทพอลิเอไมด์นิวคลีอิกแอซิด หรือเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (polyamide nucleic

acid หรือ peptide nucleic acid) ซึ่งเรียกสั้นๆ ว่า พีเอ็นเอ (PNA) และพบว่าพีเอ็นเอมีคุณสมบัติสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอได้อย่างน่าประหลาด โดยอาศัยกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (A•T, C•G) หรือ วัตสัน-คริก-อูกสตัน (T•A•T, C•G•C) แม้ว่าจะมีโครงสร้างที่แตกต่างจากดีเอ็นเอโดยสิ้นเชิง โดยได้ออกแบบโครงสร้างของพีเอ็นเอให้เลียนแบบโครงสร้างของดีเอ็นเอ (รูปที่ 2-I) โดยใช้โครงสร้าง 2-อะมิโนเอทิลไกลซีน (2-aminoethylglycine unit) เป็นโครงสร้างหลักแทนไดออกซีไรโบสฟอสเฟต โดยที่เป็นไปตามหลักการที่ว่าจำนวนอะตอมระหว่างมอนอเมอร์ของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอยังคงมีค่าใกล้เคียงกัน คือ เป็นไปตามกฎ 6+3 ดังรูปที่ 2-II



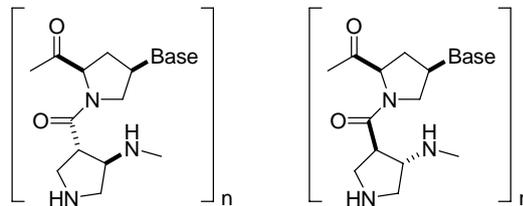
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ (I) ดีเอ็นเอ (II) พีเอ็นเอ (III) พีโรลิดินพีเอ็นเอ

จากการวิจัยดังกล่าวพบว่าพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นเมื่อต่อหมู่นิวคลีโอเบสไทมีนที่ตำแหน่ง N3 โดยมีหมู่เมทิลีนคาร์บอนิล (methylene carbonyl) เป็นสะพานเชื่อม ดังรูป 2-(II) จะสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับพอลิอะดีนีนลิกแอซิดในอัตราส่วน 2:1 และสารเชิงซ้อนที่ได้มีความเสถียรมากกว่าสารเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอที่พบในธรรมชาติ (double stranded) โดยเปรียบเทียบจากค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) นอกจากนี้ พีเอ็นเอที่มีเบสทั้ง 4 ชนิด (A,T,C,G) สามารถเกิดสารเชิงซ้อน 1:1 กับดีเอ็นเอที่มีความเสถียรมากเช่นกัน จากผลการวิจัยดังกล่าว ทำให้พีเอ็นเอเป็นสารประกอบที่มีแนวโน้มว่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านยารักษาโรคในระดับพันธุกรรม (anti-sense technology) การดัดแปลงเป็นสารชีวโมเลกุลเพื่อใช้เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระดับโมเลกุล ในกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรมหรือการคัดลอกรหัสพันธุกรรม นอกจากนี้ พีเอ็นเอยังได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การใช้พีเอ็นเอเป็นโพรบในนิวคลีอิกแอซิดไฮโอเซนเซอร์ การใช้พีเอ็นเอร่วมกับเอ็นไซม์นิวคลีเอส (nuclease S1) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งต่างๆ ที่ต้องการอย่างจำเพาะเจาะจง หรือใช้ในการตรวจสอบ single nucleotide polymorphisms (SNP) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พีเอ็นเอก็ยังมีข้อด้อยอีกหลายประการที่ต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงต่อไป เช่น ความสามารถในการละลายน้ำที่ค่อนข้างต่ำเนื่องจากความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ของโมเลกุล การลำเลียงผ่านเข้าสู่เซลล์ทำได้ยาก ความจำเพาะเจาะจงในการเข้าคู่สมนิวคลีโอเบส ความจำเพาะเจาะจงในการจับยึดกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ ความจำเพาะเจาะจงในเรื่องทิศทางการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกในแบบพาราเรล (parallel) หรือแอนตีพาราเรล (antiparallel) ซึ่งในเวลาต่อมาก็ได้มีกลุ่มวิจัยอีกหลายกลุ่มทั่วโลกที่มีความสนใจ และได้พัฒนาพีเอ็นเอขึ้นอีกหลายระบบเพื่อให้ได้พีเอ็นเอที่มีสมบัติตามต้องการ

เมื่อเร็วๆ นี้ มีงานวิจัยของ Vilaivan และคณะ ได้พัฒนาพีเอ็นเอระบบใหม่ขึ้นมาเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ โดยได้ออกแบบโครงสร้างของพีเอ็นเอที่ประกอบด้วยวงแหวนพิโรลิดีนที่เชื่อมต่อกับนิวคลีโอเบส โดยมีสเตอริโอเคมีของวงแหวนพิโรลิดีนเป็น (2*R*,4*R*) ซึ่งสอดคล้องกับนิวคลีโอไซด์ที่พบในธรรมชาติ และเชื่อมต่อกันด้วยกรดเบต้าอะมิโนชนิดต่างๆ ดังรูป 2-(III) พบว่าพีเอ็นเอที่ได้สามารถเกิดโมเลกุลผสมที่มีเสถียรภาพสูง และมีแนวโน้มสามารถใช้ในการพัฒนาต่อไปเพื่อการประยุกต์ใช้งานเช่นเดียวกับพีเอ็นเอ 2-(II) และมีสมบัติบางประการที่ดีกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลือกสรร (selectivity) ในการจับยึด ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาพิโรลิดีนพีเอ็นเอระบบดังกล่าว ให้มีความหลากหลายมากขึ้น โดยหวังให้มีความสามารถในการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เสียรและจำเพาะเจาะจงมากขึ้น ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น รวมทั้งจะทำการดัดแปลงโครงสร้างให้สามารถเพิ่มหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ได้ โดยการออกแบบปรับปรุงส่วนของสะพานเชื่อมซึ่งเป็นกรดเบต้าอะมิโน ชนิดวงแหวนอะมิโนพิโรลิดีนคาร์บอกซิลิกแอซิดที่มีสเตอริโอเคมีแบบต่างๆ ผลการศึกษาดังกล่าว จะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ในสาขาของวิชาสารเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ทำให้ทราบถึงบทบาทของโครงสร้างที่มีต่อสมบัติการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ และทำให้ได้วิธีการสังเคราะห์พีเอ็นเอระบบใหม่ ที่มีศักยภาพที่แตกต่างจากระบบเดิม เพื่อสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. ออกแบบและศึกษาวิธีการสังเคราะห์พิโรลิดีนพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น 3-อะมิโนพิโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด โดยเฉพาะ (3*R*,4*S*)-isomer และ (3*R*,4*S*)-isomer



2. ศึกษาสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์
3. พัฒนาศักยภาพในด้านการทำงานวิจัยของคณะผู้วิจัย
4. ผลิตบุคลากรทางวิทยาศาสตร์ระดับปริญญาตรีหรือโทที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์และชีวฟิสิกส์

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สังเคราะห์วงแหวนพิโรลิดีนที่มีการปรับปรุงโครงสร้างและต่อนิวคลีโอเบส เพื่อใช้เป็นมอนอเมอร์ของพีเอ็นเอ ดังวิธีการในเอกสารอ้างอิง และพิสูจน์ทราบสารที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี

3.2 สังเคราะห์อนุพันธ์ของ 3-อะมิโนพิโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด ที่มีหมู่ปกป้องที่เหมาะสมโดยวิธีการตามเอกสารอ้างอิง หรือโดยพัฒนาวิธีสังเคราะห์ขึ้นใหม่ เพื่อใช้เป็นส่วนของสะพานเชื่อมในการสังเคราะห์พีเอ็นเอ และพิสูจน์ทราบสารที่สังเคราะห์ได้โดยการวิเคราะห์ธาตุและเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี

3.3 สังเคราะห์โอลิโกไทมิดีนพีเอ็นเอที่มี 3-อะมิโนพิโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด เป็นสะพานเชื่อมจากมอนอเมอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 โดยใช้เทคนิคการสังเคราะห์เพปไทด์บนนิวคลีโอไทด์ของแข็งเพื่อให้ได้โอลิโกไทมิดีนพีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 6-10 เบส และพิสูจน์ทราบสารที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิคมัลติ-ทอพ แมสสเปกโตรเมตรี

3.4 ศึกษาสมบัติการจับยึด ความจำเพาะเจาะจง และปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการจับยึดของโอลิโกไทมิดีนพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้กับโอลิโก-อะดีนีนิกแอซิด และ/หรือ โอลิโก-ดีออกซีอะดีนีนิกแอซิด โดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี และซีดีสเปกโตรสโคปี

3.5 ศึกษาอิทธิพลของสเตอริโอเคมีของสะพานเชื่อมที่มีต่อสมบัติในการจับยึดของพีเอ็นเอที่ได้ออกกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ โดยการเปรียบเทียบเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นในแต่ละกรณี

3.6 (ขึ้นกับผลการศึกษาในข้อ 3.4 และ 3.5) เลือกระบบพีเอ็นเอที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.4 และ 3.5 เพื่อสังเคราะห์พีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสอย่างน้อย 1 ชนิดที่นอกเหนือจากไทมีน และนำไปศึกษาสมบัติการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน

3.7 (ขึ้นกับผลการศึกษาในข้อ 3.4 และ 3.5) ศึกษาความเป็นไปได้ในการเติมหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ที่ตำแหน่งไนโตรเจนของสะพานเชื่อม เช่น ฟลูออเรสซีน (fluorescein) และนำไปศึกษาสมบัติการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน โดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์

3.8 หากพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสผสมดังกล่าว สามารถแสดงสมบัติการจับยึดกับสารพันธุกรรมอย่างจำเพาะเจาะจงและมีเสถียรภาพ ควรศึกษาความเป็นไปได้เบื้องต้นในการนำพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ไปใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การใช้เป็นแอนติเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ หรือใช้เป็นโพรบในการวิเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ต่อไป

หมายเหตุ การดำเนินงานในข้อ 3.1-3.3 จะใช้เวลาในการดำเนินงานประมาณ 12-18 เดือน ขึ้นกับปัญหาและอุปสรรคที่พบในระหว่างทำวิจัย ส่วนในข้อ 3.4-3.6 ในส่วนนี้จะเป็นการวิเคราะห์และศึกษาสมบัติของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เครื่องมือมัลติ-ทอพ แมสสเปกโตรเมตรี และยูวี-สเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งต้องขอความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ชีรยุทธ วิไลวัลย์ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แต่จะเป็นส่วนที่ใช้เวลาไม่นานนัก ส่วนในข้อ 3.7-3.8 ขึ้นกับผลการทดลองที่ได้ และอาจจะได้ผลการศึกษาเพื่อเป็นการต่อยอดในการวิจัยในขั้นต่อไป

Output ปีที่ 2

ถ้าการดำเนินงานเป็นไปตามเป้าหมายน่าจะได้ผลการศึกษาย่างน้อย 1 เรื่องเกี่ยวกับการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีทรานส์-3-อะมิโนพิโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิดเป็นสะพานเชื่อมที่สามารถตีพิมพ์ในลักษณะ communication หรือ letter โดยจะตีพิมพ์ในหัวข้อเรื่อง Synthesis and Oligodeoxynucleotide Binding Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids Bearing *trans*-3-Aminopyrrolidine-4-Carboxylic Acid Spacers. ซึ่งคาดว่าจะตีพิมพ์ได้ในวารสาร Tetrahedron Letters (Impact Factor 2.509) หรือ Bioorganic and Medicinal Chemistry (Impact Factor 2.624)

5. ผลงานหัวข้อเรื่องที่จะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่จะตีพิมพ์ : -

ชื่อวารสารที่จะตีพิมพ์ : -

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่จะตีพิมพ์ : Synthesis and Oligodeoxynucleotide Binding Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids Bearing *trans*-3-Aminopyrrolidine-4-Carboxylic Acid Spacers.

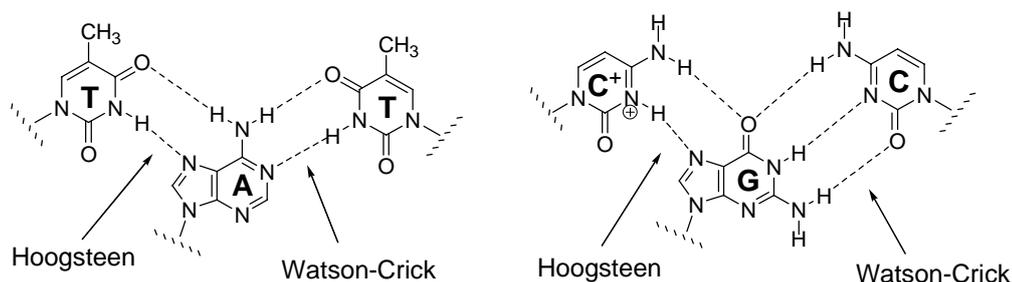
ชื่อวารสารที่จะตีพิมพ์ : Tetrahedron Letters (Impact Factor 2.509) หรือ Bioorganic and Medicinal Chemistry (Impact Factor 2.624)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 Peptide Nucleic Acid

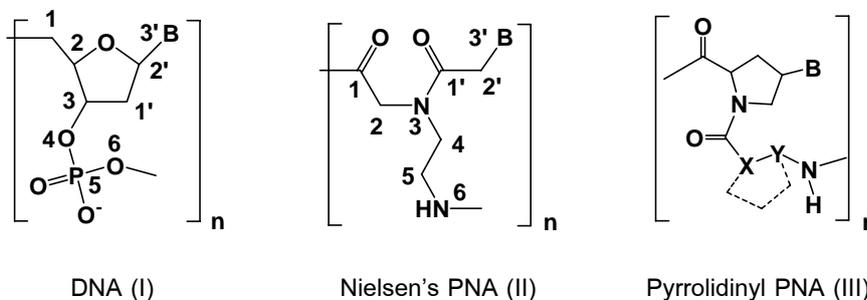
หลักการของแอนตี้เซนส์ (antisense principle) [1] เป็นแนวคิดในการยับยั้งการแสดงออกของโรคในระดับพันธุกรรม เครื่องมือที่สำคัญที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการแสดงออกของโรคดังกล่าว คือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สมตรงกันกับรหัสพันธุกรรมของโรคที่ต้องการจะยับยั้งบนอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ โดยโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ นี้จะทำหน้าที่จับยึดกับสารพันธุกรรมเกิดเป็นสารเชิงซ้อน (hybrid molecule) ในบริเวณเป้าหมาย ได้อย่างจำเพาะเจาะจงตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (A•T, C•G) หรือ วัตสัน-คริก-ฮุกสตัน (T•A•T และ C⁺•G•C) ดังภาพที่ 1.1 และจะเรียก โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นนี้ว่า แอนตี้เซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (antisense oligonucleotide) อย่างไรก็ตาม หลักการนี้ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ กล่าวคือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ไม่มีความเสถียรเท่าที่ควรต่อสภาวะในร่างกาย และถูกทำลายได้ด้วยเอ็นไซม์นิวคลีเอสที่อยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไม่สามารถใช้เป็นแอนตี้เซนส์ดริคส์ (antisense drug) ได้ ถึงแม้ว่าจะมีความพยายามในการดัดแปลงโครงสร้างของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งหรือบางอะตอมแล้วก็ตาม แต่โครงสร้างหลักยังคงเป็นไดออกซีไรโบสฟอสเฟต (deoxy-ribose phosphate) หรือไรโบสฟอสเฟต (ribose phosphate) ซึ่งยังเป็นสับสเตรตของเอ็นไซม์นิวคลีเอส ดังนั้นในการพัฒนาแอนตี้เซนส์ดริคส์ให้มีประสิทธิภาพนั้น ทางเลือกหนึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลัก (backbone หรือ core structure) ให้แตกต่างจากดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอธรรมชาติ เพื่อให้มีเสถียรภาพต่อเอ็นไซม์และสภาวะต่างๆ ในร่างกาย โดยยังคงคุณสมบัติในการจับยึดกับสารพันธุกรรมด้วยความจำเพาะเจาะจงได้เทียบเท่าหรือดีกว่าเดิม รวมทั้งมีการพัฒนาสมบัติในด้านอื่นๆ เช่น การละลายน้ำ สมบัติที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ และการแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น



ภาพที่ 1.1 แสดงพันธะไฮโดรเจนผ่านการจับคู่แบบวัตสัน-คริก-ฮุกสตัน

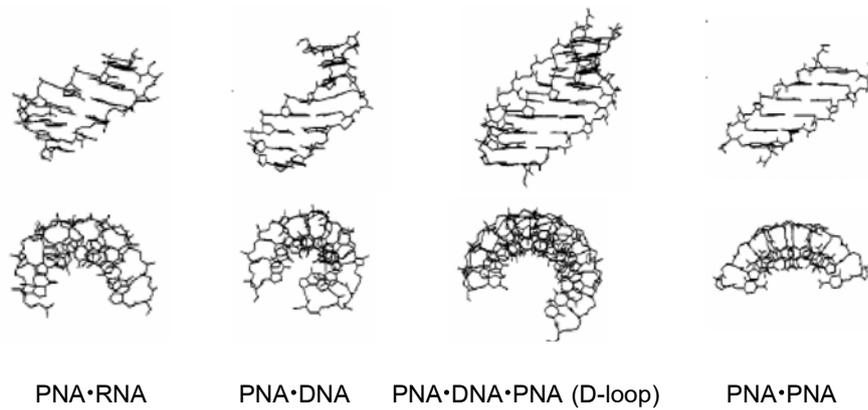
ในปี ค.ศ. 1991 P. E. Nielsen และคณะจากมหาวิทยาลัยโคเปนเฮเกน ได้รายงานการวิจัยว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบประเภทพอลิเอไมด์นิวคลีอิกแอซิด หรือเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (polyamide nucleic acid หรือ peptide nucleic acid) ที่เรียกสั้นๆ ว่า พีเอ็นเอ (PNA) [2] และพบว่าพีเอ็นเอมีคุณสมบัติสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอได้อย่างน่าประหลาด โดยอาศัยกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (A•T, C•G) หรือ วัตสัน-คริก-ฮุกสตัน

(T·A·T, C⁺·G·C) ถึงแม้ว่าจะมีโครงสร้างที่แตกต่างจากดีเอ็นเอโดยสิ้นเชิง โดยได้ออกแบบโครงสร้างของพีเอ็นเอ ให้เลียนแบบโครงสร้างของดีเอ็นเอ [ภาพที่ 1.2-(I)] โดยใช้ 2-อะมิโนเอทิลไกลซีน (2-aminoethylglycine) เป็นโครงสร้างหลักแทนที่ออกซิโรโบสฟอสเฟต โดยที่เป็นไปตามหลักการที่ว่าจำนวนอะตอมระหว่างมอนอเมอร์ในพีเอ็นเอและดีเอ็นเอนั้นมีระยะที่ใกล้เคียงกัน คือ เป็นไปตามกฎ 6+3 ดังภาพที่ 1.2-(II)



ภาพที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของ (I) ดีเอ็นเอ (II) พีเอ็นเอ (III) พิโรลิดินพีเอ็นเอ

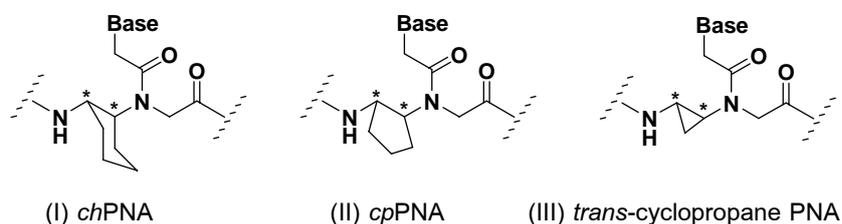
สมบัติของพีเอ็นเอที่ต่อหมู่นิวคลีโอเบสไทมีน (B = thymine) ที่ตำแหน่ง N^3 โดยมีหมู่เมทิลีนคาร์บอนิล (methylene carbonyl; 1'-2') เป็นสะพานเชื่อม [ภาพที่ 1.2-(II)] จะสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับพอลิอะดีนีนิกแอซิด (polydA) ในอัตราส่วน 2:1 [(PNA)₂·DNA] และสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากกว่าสารเชิงซ้อนระหว่างดีเอ็นเอ (DNA·DNA) ที่พบในธรรมชาติ (double stranded) โดยเปรียบเทียบจากค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) ที่สูงกว่า และพิสูจน์โครงสร้างสามมิติของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) และ X-ray crystallography [3-6] นอกจากนี้ พีเอ็นเอที่มีเบสทั้ง 4 ชนิด (B = A, T, C หรือ G) สามารถเกิดสารเชิงซ้อน 1:1 กับดีเอ็นเอ (PNA·DNA) ที่มีความเสถียรมากเช่นกัน [7-8] ดังภาพที่ 1.3 จากผลการวิจัยดังกล่าว เป็นการชี้ให้เห็นว่าพีเอ็นเอเป็นสารประกอบที่น่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคในระดับพันธุกรรม (anti-sense technology) เพื่อใช้เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระดับโมเลกุล ในกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรมหรือการคัดลอกรหัสพันธุกรรม [9-11] ซึ่งงานวิจัยของ Nielsen นี้ นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยและพัฒนาพีเอ็นเอในระบบต่างๆ อีกมากมายในเวลาต่อมา หลังจากนั้นได้มีการวิจัยและพัฒนาพีเอ็นเอไปใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การใช้พีเอ็นเอเป็นโพรบในนิวคลีอิกแอซิดไฮโดรเจนเชอร์ [12] การใช้พีเอ็นเอร่วมกับเอ็นไซม์นิวคลีเอส (nuclease S1) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งต่างๆ ที่ต้องการอย่างจำเพาะเจาะจง [13] หรือใช้ในการตรวจสอบ single nucleotide polymorphisms (SNP) [14] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พีเอ็นเอก็ยังมีข้อด้อยบางประการที่ต้องมีการพัฒนาให้ดีขึ้น เช่น ความสามารถในการละลายน้ำที่ค่อนข้างต่ำเนื่องจากสมบัติไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) ของโมเลกุล ปัญหาในด้านการลำเลียงผ่านเข้าสู่เซลล์ ความจำเพาะเจาะจงในการเข้าสู่มนิวคลีโอเบส หรือในการเลือกสรรต่อดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ทิศทางการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกในแบบพาราเรล (parallel) หรือแอนตีพาราเรล (antiparallel) ซึ่งในเวลาต่อมาก็ได้มีกลุ่มวิจัยอีกหลายกลุ่มทั่วโลกที่มีความสนใจ และได้พัฒนาพีเอ็นเอขึ้นอีกหลายระบบเพื่อให้ได้พีเอ็นเอที่มีสมบัติตามต้องการ [15-20]



ภาพที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอ-อาร์เอ็นเอ
พีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ พีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ-พีเอ็นเอ และพีเอ็นเอ-พีเอ็นเอ

1.2 พีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด

จากรายงานการวิจัยพีเอ็นเอของ Nielsen หลังจากนั้นได้มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพีเอ็นเอที่มีการดัดแปลงโครงสร้างในลักษณะต่างๆ ตีพิมพ์ออกมาเป็นจำนวนมากมายนับพันเรื่อง (สืบค้นจากฐานข้อมูล ISI นับถึงพฤษภาคม 2011) ในการดัดแปลงโครงสร้างนั้นสามารถดัดแปรได้หลายลักษณะ เช่น การเพิ่มไครลอะตอมลงในโมเลกุล การเพิ่มส่วนของวงแหวนขนาดต่างๆ การดัดแปลงหมู่นิวคลีโอเบส หรือการเติมหมู่ฟังก์ชันที่บริเวณปลายของสายพีเอ็นเอ ทั้งหมดนี้เป็นไปในลักษณะเพื่อการเพิ่มเสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อน ความจำเพาะเจาะจงในการจับยึดทั้งต่อนิวคลีโอเบส ลักษณะทิศทางการจับยึด และความสามารถในการละลาย สำหรับกรณีการเพิ่มวงแหวนหรือการเพิ่มไครลอะตอมเข้าไปในโครงสร้างของพีเอ็นเอนั้น เชื่อว่าจะทำให้โมเลกุลมีความแข็งเกร็ง (rigidity) เพิ่มขึ้นและอาจมีการจำกัดคอนฟอร์เมชัน (restricted conformation) ที่จะส่งผลให้เกิดการลดลงของการเปลี่ยนแปลงเอนทัลปีและเอนโทรปี ซึ่งจะทำให้พีเอ็นเอนั้นสามารถจับยึดกับโพลิโกนิวคลีโอไทด์ได้แข็งแรงและจำเพาะเจาะจงมากขึ้น

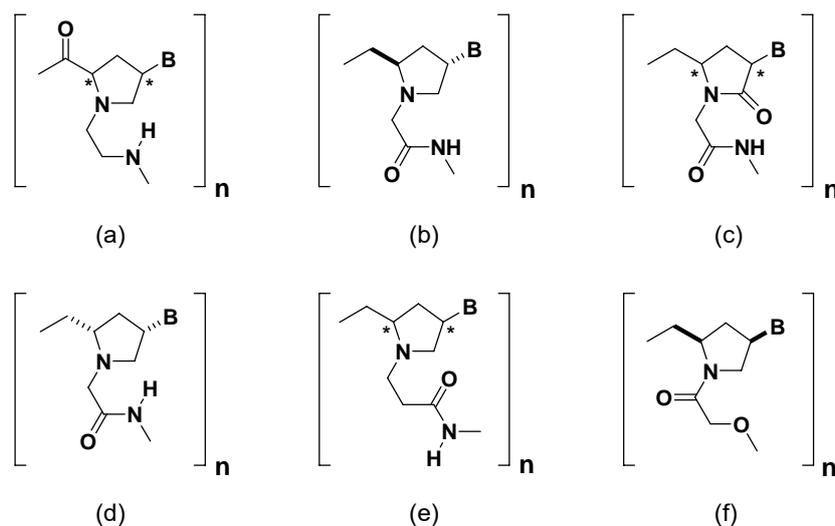


ภาพที่ 1.4 แสดงโครงสร้างพีเอ็นเอบางชนิดที่มีการเพิ่มวงแหวนเข้าไปในโมเลกุล

ตัวอย่างเช่น การเพิ่มวงแหวนไซโคลเฮกซิล (cyclohexyl) เข้าไปในโครงสร้างเดิมของเออีจีพีเอ็นเอปกติ (chPNA) ดังภาพที่ 1.4-(I) ซึ่งรายงานโดย Lagriffoule [21] และ Govindaraju [22] พบว่าเมื่อมีการแทรกโครงสร้างดังกล่าวเข้าไปในสายของพีเอ็นเอปกติ ทำให้พีเอ็นเอชนิดใหม่ที่ได้แสดงสมบัติการจับยึดที่แตกต่างกัน

โดยขึ้นอยู่กับจำนวนของโมเลกุลที่แทรกในสายพีเอ็นเอ สเตอริโอเซ็นเตอร์ที่เกิดขึ้นใหม่ และลำดับเบส ในทำนองเดียวกัน งานวิจัยของ Appella [23-24] ได้เพิ่มหมู่ไซโคลเพนเทน (cyclopentane) ที่มีสเตอริโอเคมีแบบ (1*S*,2*R*) และ (1*R*,2*S*) ดังภาพที่ 1.4-(III) พบว่าเมื่อแทรกโครงสร้างดังกล่าวเข้าไปในสายพีเอ็นเอปกติ ทำให้สามารถจับยึดกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้เสถียรมากขึ้นกว่าพีเอ็นเอปกติและดีกว่าใน *chPNA* รวมถึงการเพิ่มหมู่ทรานส์-ไซโคลโพรเพนพีเอ็นเอ (*trans*-cyclopropane PNA) โดย Pokorski [25] ก็เป็นการศึกษาในลักษณะเดียวกัน

นอกจากการศึกษาวิจัยทางด้านการเพิ่มวงแหวนไฮโดรคาร์บอนขนาดต่างๆ ทั้งวงขนาดสามเหลี่ยม ห้าเหลี่ยม และหกเหลี่ยมแล้ว ยังมีงานวิจัยในลักษณะคล้ายคลึงกันที่เกี่ยวกับพีเอ็นเอที่มีคอนฟอร์เมชันที่ถูกจำกัด ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนพิโรลิดีนอยู่ในโครงสร้างหลักที่พื้อมออกมาเป็นจำนวนมาก เช่น งานของ Vilaivan [26] Nielsen [20,27] Micklefield [18] Kumar [19] Ganesh [28] และ Altmann [29] ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวงแหวนพิโรลิดีนนั้นมีแนวโน้มที่จะเพิ่มความแข็งแกร่งให้กับโครงสร้างของพีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มทางเลือกในการสร้างไครัลเซ็นเตอร์ขึ้นในโมเลกุล และในพีเอ็นเอบางระบบยังพบว่าสามารถเกิดการโปรโตเนชัน (protonation) ของหมู่อะมิโนในวงแหวนพิโรลิดีนอีกด้วย ทำให้เพิ่มแรงดึงดูดระหว่างประจุในการจับยึดกับนิวคลีโอไทด์ได้ดีขึ้น จากการศึกษาข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง ทำให้เห็นว่าพีเอ็นเอที่มีส่วนของวงแหวนพิโรลิดีนมีแนวโน้มที่ดีในการเพิ่มความสามารถในการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์



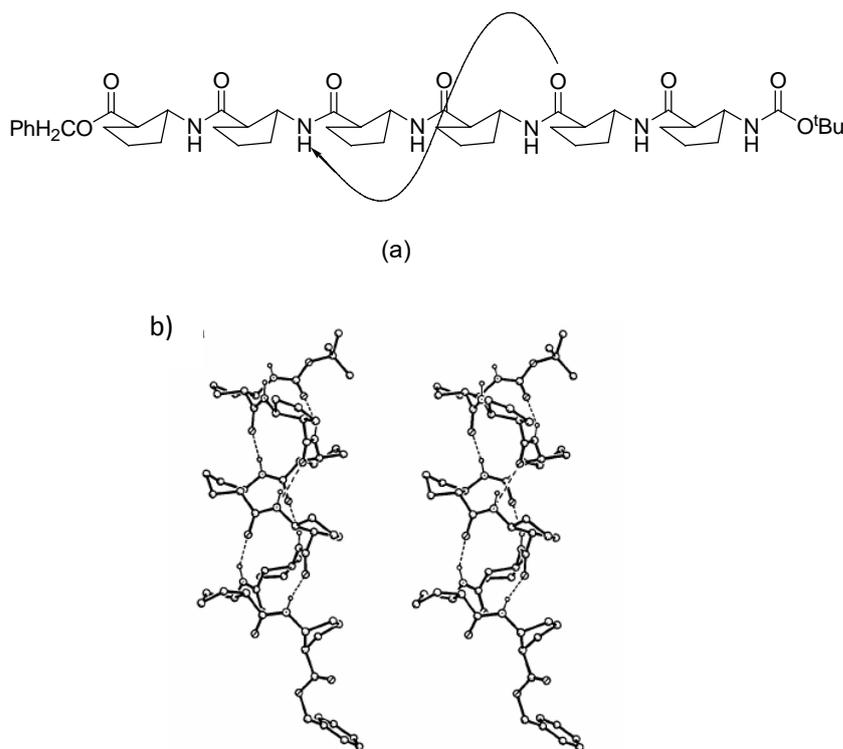
ภาพที่ 1.5 แสดงโครงสร้างของพิโรลิดีนพีเอ็นเอระบบต่างๆ ที่รายงานโดย

(a) Vilaivan (2000) และ Kumar (2002) (b),(c) Nielsen (2000,2001)

(d) Micklefield (2007) (e) Ganesh (2002) (f) Altmann (2000)

ในระหว่างปี 2000-2006 ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์พิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบตอะมิโน [30-32] [ภาพที่ 1.2-(III)] ซึ่งได้แนวคิดมาจากของ Gelmann [33,34] ที่ได้รายงานถึงสมบัติที่น่าสนใจของโอลิโกเมอร์ของกรดเบตอะมิโนสายสั้นๆ โดยพบว่ามีการจัดเรียงตัวให้มีคอนฟอร์เมชันเป็นลักษณะเกลียวที่มีรูปร่างแน่นอน และทำนายได้ง่ายกว่าโอลิโกเมอร์ของกรดแอลฟาอะมิโน เช่น โอลิโกเมอร์ความยาวเฮกซะเมอร์ (hexamer) ของโมเลกุลทรานส์-อะมิโนไซโคลเพนเทนคาร์บอกซิลิกแอซิด (*trans*-(1*R*,2*R*) aminocyclopentane

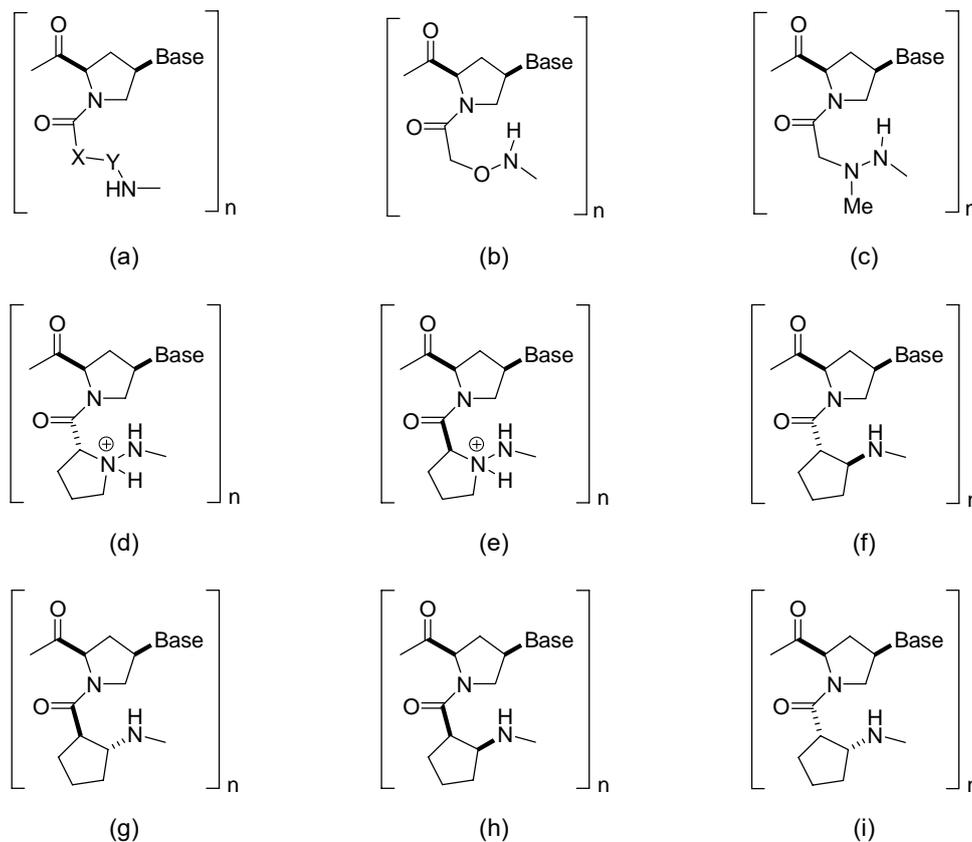
carboxylic acid) [35] สามารถเกิดคอนฟอร์เมชันแบบ 12-helix ได้โดยผ่านพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ภายในโมเลกุล ดังภาพที่ 1.6



ภาพที่ 1.6 แสดง (a) โครงสร้างของโอลิโกเมอร์ของ *trans*-(1*R*,2*R*) aminocyclopentane carboxylic acid และพันธะไฮโดรเจน และ (b) การเกิดคอนฟอร์เมชันแบบ 12-helix

การจำกัดคอนฟอร์เมชันโดยการเพิ่มวงแหวนพิโรลิดีนและการเพิ่มส่วนของกรดเบต้าอะมิโนนี้ น่าจะช่วยให้เพิ่มความสามารถในการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ในกรณีที่สายของพีเอ็นเอ็นนั้นถูกจำกัดอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสม ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบพิโรลิดีนพีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของวงแหวนพิโรลิดีนที่มีนิวคลีโอเบสต่ออยู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 4 โดยมีสเตอริโอเคมีเป็น (2*R*,4*R*) (2*R*,4*S*) (2*S*,4*R*) และ (2*S*,4*S*) และเชื่อมต่อกันด้วยกรดเบต้าอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ เอ็น-อะมิโน เอ็น-เมทิลไกลซีน (*N*-amino *N*-methyl glycine) [31] และอะมิโนออกซี แอซีติกแอซิด (amino-oxy acetic acid) [31] ซึ่งเป็นกรดเบต้าอะมิโนชนิดเส้นตรง (linear β -amino acid) และชนิดวงแหวนที่มีไครัลอะตอม 1 ตำแหน่ง ได้แก่ ดี-อะมิโน พิโรลิดีน คาร์บอกซิลิกแอซิด (D-amino pyrrolidine carboxylic acid: D-APC) และแอล-อะมิโน พิโรลิดีน คาร์บอกซิลิกแอซิด (L-amino pyrrolidine carboxylic acid: L-APC) [30] และชนิดวงแหวนที่มีไครัลอะตอม 2 ตำแหน่ง ได้แก่ (1*S*,2*S*), (1*R*,2*R*), (1*S*,2*R*) และ (1*R*,2*S*)-2-อะมิโนไซโคลเพนเทนคาร์บอกซิลิกแอซิด (2-aminocyclopentane carboxylic acid) [32] ดังภาพที่ 1.7 พบว่าพีเอ็นเอระบบ 1.7-(d) และ 1.7-(f) เท่านั้นที่แสดงสมบัติการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ได้ แสดงให้เห็นว่า กรดเบต้าอะมิโนที่มีคอนฟิกูเรชันแบบเอส (*S*-configuration) ที่ตำแหน่ง C-1 จะทำให้โครงสร้างของพีเอ็นเอถูกจำกัดอยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสม และส่งผลให้สามารถจับยึดกับกรดนิวคลีอิกด้วยความเสถียรที่สูงมาก

โดยเฉพาะอย่างยิ่งพีเอ็นเอ 1.7-(f) ที่มีค่าอุณหภูมิหลอมเหลวสูงถึงประมาณ 70 °C (ในพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น T₁₀) [32]

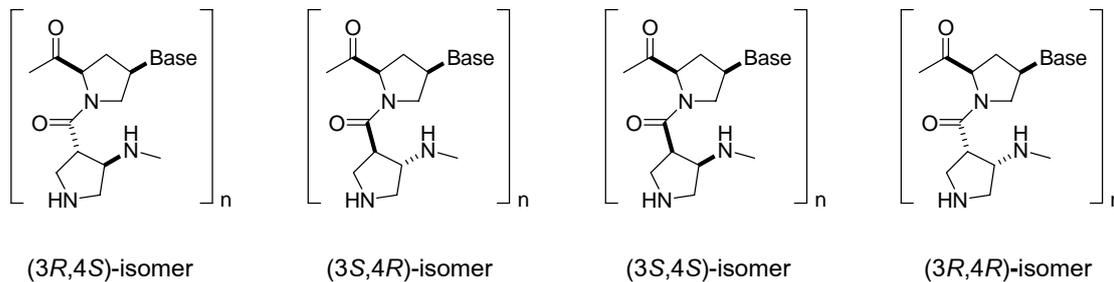


ภาพที่ 1.7 แสดงโครงสร้างของพีโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโนชนิดต่างๆ

นอกจากนี้ Vilaivan และ Srisuwannaket [36] ยังได้ขยายผลการศึกษาพีเอ็นเอ 1.7-(f) ที่มีเบสผสม (mixed-base sequences; A T C G) ที่มีความยาว 9 เบส พบว่า พีเอ็นเอดังกล่าวสามารถจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสคู่สมกันอย่างจำเพาะเจาะจงมาก ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีอันตรกิริยาด้วยการเข้าคู่แบบวัตสัน-คริก โดยเปรียบเทียบจากค่าอุณหภูมิหลอมเหลวที่ลดลงประมาณ 20 °C เมื่อมีเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch) และยังพบว่าพีเอ็นเอชนิดนี้เลือกทิศทางการจับแบบแอนติพาราเรล (anti-parallel) ที่มีความเสถียรมากกว่าทิศทางการจับแบบพาราเรล (parallel) เมื่อเปรียบเทียบกับพีเอ็นเอระบบเดิมของ Nielsen (aegPNA) แสดงให้เห็นว่าพีโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีสะพานเชื่อมเป็นกรดเบต้าอะมิโนชนิด (*trans*-(1*S*,2*S*) amino cyclopentane carboxylic acid) นั้นเป็นพีเอ็นเอที่มีศักยภาพสูงในการเกิดสารเชิงซ้อนกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ได้

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาพีเอ็นเอระบบดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ด้วยการดัดแปลงบริเวณสะพานเชื่อมกรดเบต้าอะมิโนให้มีหมู่ฟังก์ชัน เช่น หมู่อะมิโน ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 1.8 ซึ่งน่าจะสามารถเกิดการโปรโตเนชันได้ที่พีเอชปกติ และน่าจะสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลต่างๆ ซึ่งจะเพิ่มความสามารถในการละลาย และการจับยึดกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (ซึ่งมีประจุลบ) และที่สำคัญตำแหน่งของหมู่อะมิโนในส่วน of สะพานเชื่อมดังกล่าวยังสามารถประยุกต์ด้วยการต่อหมู่อะมิโนฟังก์ชันอื่นๆ เช่น ฟลูออโรฟอร์

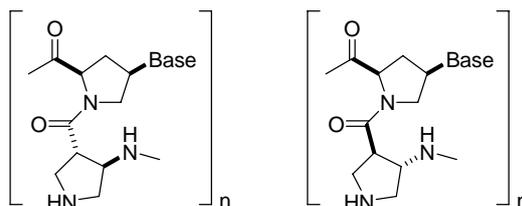
(fluorophore) ชนิดต่างๆ ที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในการเป็นเครื่องมือตรวจวัดให้กับโมเลกุลพีเอ็นเอชนิดนี้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ



ภาพที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของไพโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีสะพานเชื่อมเป็น 3-อะมิโนไพโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ออกแบบและศึกษาวิธีการสังเคราะห์ไพโรลิดีนพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น 3-อะมิโนไพโรลิดีน-4-คาร์บอกซิลิกแอซิด โดยเฉพาะ (3R,4S)-isomer และ (3R,4S)-isomer



2. ศึกษาสมบัติการจับยึดของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้กับโพลิโกนิวคลีโอไทด์
3. พัฒนาศักยภาพในด้านการทำงานวิจัยของคณะผู้วิจัย
4. ผลิตบุคลากรทางวิทยาศาสตร์ระดับปริญญาตรีหรือโทที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์และชีวฟิสิกส์

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การสังเคราะห์มोनอเมอร์

2.1.1 Materials and Method

- รีเอเจนต์ที่ใช้ซื้อจากบริษัท Fluka AG, MERCK, Aldrich Company Ltd. หรือ Acros Chemical และนำมาใช้โดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

- การหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง electrothermal melting point apparatus model 9100

- การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ^1H NMR และ ^{13}C NMR ใช้เครื่อง Varian Mercury-400 plus หรือ Bruker Avance 400 NMR spectrometers, โดยกระทำที่ 400 MHz สำหรับ ^1H NMR และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C NMR

- การวิเคราะห์ด้วย IR spectrum ใช้เครื่อง Perkin Elmer FT-IR spectrometer Model GX0 Series X

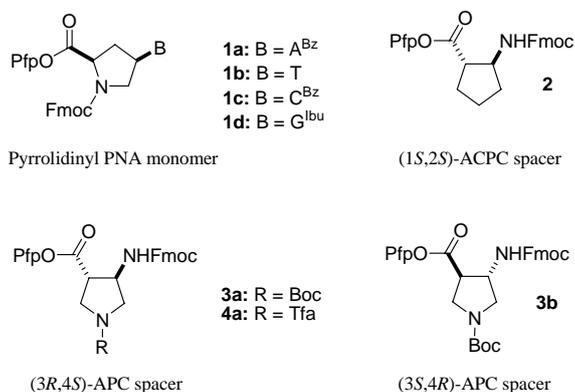
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย high resolution mass spectra โดยใช้ positive ESI mode บนเครื่อง

Bruker Daltonics micrOTOF

- การวัด $[\alpha]_D$ ใช้เครื่อง Bellingham & Stanley ModelADP220 Polarimeter

2.1.2 การสังเคราะห์พีเอ็นเอมอนอเมอร์

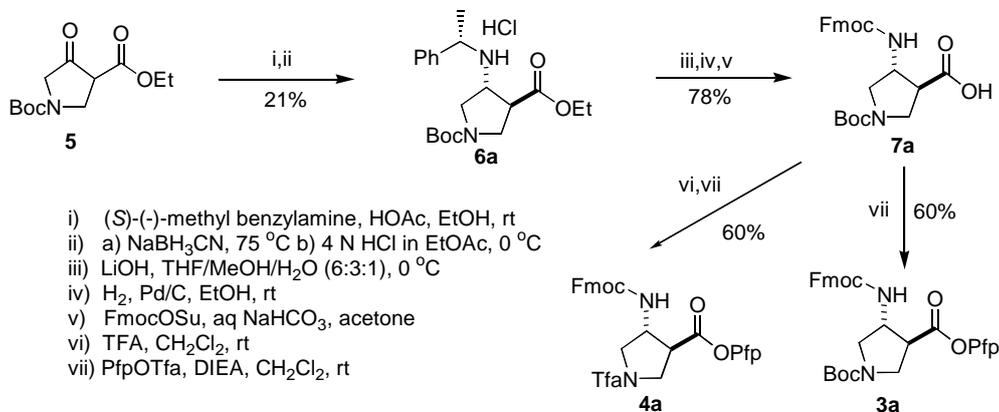
พีเอ็นเอมอนอเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ แสดงดังภาพ



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างมอนอเมอร์และสะพานเชื่อมของ acpcPNA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ตัวย่อ: Boc: *tert*-butoxycarbonyl; ACPC: 2-aminocyclopentanecarboxylic acid; APC: 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid; Bz: benzoyl; Fmoc: fluorene-9-ylmethoxycarbonyl; Ibu: isobutyryl; Pfp: pentafluorophenyl; Tfa: trifluoroacetyl)

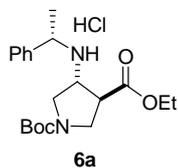
สารประกอบหมายเลข 1a, 1b, 1c และ 1d สังเคราะห์ตามเอกสารอ้างอิง [36] และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีในเอกสารอ้างอิง สำหรับสารประกอบ 3a, 3b และ 4a นั้นเป็น

สารประกอบชนิดใหม่ โดยดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์จากเอกสารอ้างอิง [37,38] โดยเริ่มจากการสังเคราะห์สารมัธยันต์ 5 ซึ่งมีวิธีการดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์สะพานเชื่อม (3*R*,4*S*)-APC (ขั้นตอนที่ i-iv ดัดแปลงมาจากเอกสารอ้างอิง [3]) สำหรับอีโกิแนนซีโอเมอร์ (3*S*,4*R*)-APC คือ 6b, 7b และ 3b เตรียมได้ร้อยละ 17, 66 และ 66 ตามลำดับ โดยเริ่มต้นจากสาร 5 และ (*R*)-(+)-methylbenzylamine

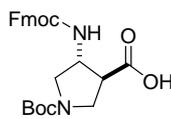
การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*)-1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-3-[(1'*S*)-phenylethylamino]pyrrolidine-4-carboxylic acid ethyl ester hydrochloride (6a)



สาร 6a ทำการสังเคราะห์เริ่มจากสาร 5 โดยใช้ (*S*)-methylbenzylamine เป็น chiral auxiliary ด้วยวิธีการตามเอกสารอ้างอิง [38] ได้ผลผลิตร้อยละ 21 หลังจากทำให้บริสุทธิ์และตกผลึกด้วย acetonitrile

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 1.14 (3H, *t* *J* = 7.2 Hz), 1.38 (9H, *s*), 1.64 (3H, *d* *J* = 6.3 Hz), 3.40–3.45 (3H, *m*), 3.68–3.75 (3H, *m*), 4.05 (2H, *q* *J* = 7.2 Hz), 4.45 (1H, *m*), 7.42–7.65 (5H, *m*), 10.04 and 10.11 (2H, 2×*s*, NH₂⁺); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 13.8, 19.9, 27.9, 44.2 and 45.0 (rotamers), 46.6, 47.9, 55.6, 56.5, 61.2, 79.2, 128.1, 128.9, 129.0, 136.6, 152.9, 170.3; m.p. 215–217 °C, [α]_D²⁷ = –4.6 (c 1.0, MeOH) {Lit.³ [α]_D²³ ของ (3*S*,4*R*) enantiomer = +4.8 (c 1.05, MeOH)}.

การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*)-1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-3-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino) pyrrolidine-4-carboxylic acid (7a)

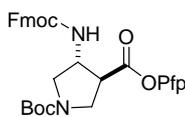


7a

สาร 7a สังเคราะห์จากสาร 6a ด้วยวิธีการตามเอกสารอ้างอิง [38] ได้ผลผลิตร้อยละ 78

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 1.46 (9H, s), 3.00 (1H, *m*), 3.16 (1H, *dd* $J = 9.5, 5.3$ Hz), 3.55–3.70 (3H, *m*), 4.18 (1H, *m*), 4.30–4.42 (3H, *m*), 7.29 (2H, *t* $J = 7.4$ Hz), 7.37 (2H, *t* $J = 7.4$ Hz), 7.62 (2H, *d* $J = 6.9$ Hz), 7.77 (2H, *d* $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 28.7, 48.0, 50.1, 51.4 and 51.9 (rotamers), 54.2 and 54.9 (rotamers), 67.8, 81.3, 120.9, 126.1, 126.2, 128.2, 128.8, 142.6, 145.2, 145.3, 156.1, 158.2, 175.3; m.p. 106–108 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +21.9$ (c 1.0, MeOH) {Lit.³ $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +18.3$ (c 1.2, MeOH)}.

การสังเคราะห์ (3*R*,4*S*)-1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-3-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino) pyrrolidine-4-carboxylic acid pentafluorophenyl ester (3a)



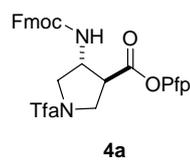
3a

ละลายสาร 7a (100 mg, 0.22 mmol) ใน dichloromethane (1 mL) และเติม pentafluorophenyl trifluoro acetate (PfpOTfa) (76 μL , 0.44 mmol) และ *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (75 μL , 0.44 mmol) นำไปคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ เติม dichloromethane (10 mL) และสกัดด้วย 10% HCl (2×20 mL) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดด้วยน้ำ water (20 mL) และสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 (2×20mL) กำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 anhyd. และนำไประเหยตัวทำละลายภายใต้ภาวะสุญญากาศ นำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วย dichloromethane/hexanes จะได้ผลิตภัณฑ์ 3a เป็นของแข็งสีขาว (80 mg, ร้อยละ 60)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.50 (9H, s), 3.37–3.49 (2H, *m*), 3.82 (3H, *m*), 4.23 (1H, *m*), 4.52 (2H, *m*), 4.58 (1H, *m*), 5.13 (1H, *br m*), 7.33 (2H, *t* $J = 7.3$ Hz), 7.42 (2H, *t* $J = 7.2$ Hz), 7.59 (2H, *d* $J = 7.4$ Hz), 7.78 (2H, *d* $J = 7.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 28.4, 46.3, 47.2, 48.3, 49.9 and 50.3 (rotamers), 53.3 and 53.8 (rotamers), 66.9, 80.5, 120.0, 124.9, 127.1, 127.8, 136.6, 138.5, 139.2, 141.1, 141.4, 143.7, 154.0, 155.5, 167.7; IR: ν_{max} (KBr disc, cm^{-1}) 3337 (N-H stretching), 3069 (C-H stretching, aromatic), 2979, 2893 (C-H stretching, aliphatic), 1783 (C=O stretching, ester), 1695 (C=O stretching, carbamate), 1521 (N-H bending, amide II band, carbamate), 1411, 1385 (C-H bending), 1275 (C-N

stretching), 1173 (C-O stretching), 1123 (C-F stretching); $R_f = 0.50$ (EtOAc:hexanes 1:4); m.p. 97–98 °C, $[\alpha]_D^{29} = +17.81$ (c 1.0, CHCl₃); HRMS (ESI+): m/z calcd. for C₃₁H₂₇F₅N₂O₆Na 641.1687 [M+Na]⁺; found: 641.1621.

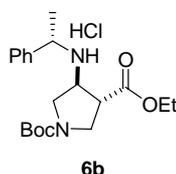
การสังเคราะห์ (3R,4S)-1-(2,2,2-Trifluoroacetyl)-3-(9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino)pyrrolidine-4-carboxylic acid pentafluorophenyl ester (4a)



ผสมสาร 7a (170 mg, 0.35 mmol) และ trifluoroacetic acid (0.50 mL) ใน dichloromethane (1 mL) นำไปคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำของผสมไปทำให้แห้งด้วยการเป่าด้วยไนโตรเจนเพื่อกำจัด TFA ที่มากเกินไป หลังจากนั้นนำมาละลายด้วย dichloromethane (1 mL) และเติม *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (180 μL, 1.05 mmol) และ pentafluorophenyl trifluoroacetate (121 μL, 0.70 mmol) นำสารละลายที่ได้ไปคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC นำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยไม่ผ่านชั้นตอนใดๆ ด้วย column chromatography โดยใช้ EtOAc:hexanes (1:1 v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ และตกผลึกด้วย dichloromethane/hexanes จะได้ผลิตภัณฑ์ **4a** เป็นของแข็งสีขาว (0.13 g, ร้อยละ 60)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 3.59 (1H, *m*), 3.72 (1H, *m*), 3.92–4.10 (3H, *m*), 4.23 (1H, *m*), 4.57 (2H, *m*), 4.63 (1H, *m*), 5.30 (1H, *m*), 7.33 (2H, *t* *J* = 7.2 Hz), 7.42 (2H, *t* *J* = 7.2 Hz), 7.58 (2H, *d* *J* = 7.2 Hz), 7.78 (2H, *d* *J* = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C 45.3 and 46.6 (rotamers), 47.2 (CH, Fmoc), 47.5 and 48.2 (rotamers), 50.2 and 50.9 (rotamers), 52.0 and 54.2 (rotamers), 67.0, 114.5, 117.3, 120.1, 124.8, 127.1, 127.9, 136.7, 139.2, 139.5, 141.4, 142.2, 143.4, 155.5, 165.3, 166.1, 167.0; IR: ν_{\max} (KBr disc, cm⁻¹) 3340 (N-H stretching), 3068 (C-H stretching, aromatic), 2970, 2897 (C-H stretching, aliphatic), 1783 (C=O stretching, ester), 1694 (C=O stretching, Tfa), 1522 (N-H bending, amide II band, carbamate), 1392 (C-H bending), 1280 (C-N stretching), 1259 (C-F stretch, CF₃), 1211 (C-O stretching), 1128 (C-F stretching, Pfp), $R_f = 0.64$ (EtOAc:hexanes 1:1 v/v), m.p. 97–98 °C; $[\alpha]_D^{27} = -4.60$ (c = 2.0, CHCl₃) HRMS (ESI+): m/z calcd. for C₂₈H₁₈F₈N₂O₅Na 637.0986 [M+Na]⁺; found: 637.0996

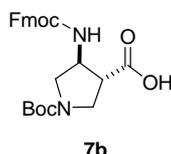
การสังเคราะห์ (3S,4R)-1-(*N*-tert-Butoxycarbonyl)-3-[(1'*R*)-phenylethylamino]pyrrolidine-4-carboxylic acid ethyl ester hydrochloride (6b)



สาร 6b สามารถสังเคราะห์จากสาร 5 โดยใช้ (*R*)-methylbenzylamine เป็น chiral auxiliary ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง [3] ได้ผลผลิตร้อยละ 17 หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผกผันด้วย acetonitrile

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1.13 (3H, *t* J = 7.1 Hz), 1.38 (9H, *s*), 1.65 (3H, *d* J = 6.3 Hz), 3.36–3.48 (3H, *m*), 3.65–3.80 (3H, *m*), 4.05 (2H, *q* J = 7.1 Hz), 4.54 (1H, *m*), 7.41–7.67 (5H, *m*), 10.16 and 10.23 (2H, 2 \times *s*, NH_2^+); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 13.8, 19.9, 28.0, 44.2 and 44.9 (rotamers), 46.7, 47.9, 55.6, 56.5, 61.2, 79.1, 128.1, 128.9, 136.7, 152.8, 170.4; m.p. 215–217 °C (Lit.³ m.p. 190–191 °C); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +4.6$ (c 1.0, MeOH) {Lit.³ $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +4.8$ (c 1.05, MeOH)}.

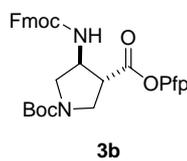
การสังเคราะห์ (3*S*,4*R*)-1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-3-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino) pyrrolidine-4-carboxylic acid (7b)



สาร 7b สังเคราะห์จากสาร 6b ตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง [38] ได้ผลผลิตร้อยละ 66

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 1.46 (9H, *s*), 2.92 (1H, *m*), 3.14 (1H, *dd* J = 9.9, 5.5 Hz), 3.54–3.71 (3H, *m*), 4.19 (1H, *m*), 4.30–4.42 (3H, *m*), 7.30 (2H, *t* J = 7.3 Hz), 7.38 (2H, *t* J = 7.3 Hz), 7.64 (2H, *d* J = 7.3 Hz), 7.79 (2H, *d* J = 7.5 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 28.8, 48.5, 50.5 and 51.3 (rotamers), 51.7 and 52.1 (rotamers), 54.5 and 55.2 (rotamers), 67.8, 81.1, 120.9, 126.2, 128.2, 128.8, 142.6, 145.3, 145.4, 156.2, 158.3, 176.9; m.p. 104–105 °C (Lit.³ m.p. 113–115 °C), $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -22.0$ (c 1.0, MeOH) {Lit.³ $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -18.3$ (c 1.2, MeOH)}.

การสังเคราะห์ (3*S*,4*R*)-1-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-3-(9*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino) pyrrolidine-4-carboxylic acid pentafluorophenyl ester (3b)



ละลายสาร 7b (0.10 g, 0.22 mmol), pentafluorophenyl trifluoroacetate (PfpOTfa) (76.3 μL , 0.44 mmol) และ *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (75.7 μL , 0.44 mmol) ใน dichloromethane (1 mL) และนำไปคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วจึงเติม Dichloromethane (10 mL) และสกัดด้วยสารละลาย 10% HCl (2 \times 20 mL) นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ไปสกัดด้วยน้ำ (20 mL) และสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 (2 \times 20mL) หลังจากนั้นนำไปกำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4

anh. และระเหยตัวทำละลายภายใต้ภาวะสุญญากาศ นำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกโดยใช้ hexane จะได้ผลิตภัณฑ์ 3b เป็นของแข็งสีขาว (90 mg, ร้อยละ 66)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.50 (9H, s), 3.38–3.48 (2H, m), 3.82 (3H, m), 4.23 (1H, m), 4.52 (2H, m), 4.58 (1H, m), 5.13 (1H, br m), 7.33 (2H, t $J = 7.3$ Hz), 7.42 (2H, t $J = 7.0$ Hz), 7.59 (2H, d $J = 7.2$ Hz), 7.78 (2H, d $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 28.4, 46.3, 47.2, 48.2, 49.8 and 50.3 (rotamers), 53.4 and 53.8 (rotamers), 66.9, 80.5, 120.0, 124.9, 127.1, 127.8, 136.6, 138.4, 139.1, 141.1, 141.4, 143.6, 154.0, 155.5, 167.7; IR IR: ν_{max} (KBr disc, cm^{-1}) 3331 (N-H stretching), 3069 (C-H stretching, aromatic), 2979, 2894 (C-H stretching, aliphatic), 1782 (C=O stretching, ester), 1695 (C=O stretching, carbamate), 1520 (N-H bending, amide II band, carbamate), 1411, 1385 (C-H bending), 1275 (C-N stretching), 1171 (OC-O stretching), 1123 (C-F stretching); $R_f = 0.50$ (EtOAc:hexanes 1:4) m.p. 95–97 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.26$ (c 2.0, CHCl_3) HRMS (ESI+): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ 641.1687 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found: 641.1615.

2.2 การสังเคราะห์เพปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง

2.2.1 Materials and Method

- พีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Reverse-Phase HPLC Water 600™ โดยใช้ ACE 5 C18-AR HPLC column, 3 μm particle size 150 \times 4.6 mm

- การพิสูจน์เอกลักษณ์พีเอ็นเอด้วย MALDI-TOF mass spectra ใช้เครื่อง Microflex MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics) และใช้เมทริกซ์เป็น α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CCA) ที่ละลายในสารละลาย Trifluoroacetic acid ใน acetonitrile:water (1:2)

2.1.2 การสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัฏภาคของแข็ง

ในการสังเคราะห์ acpc/apcPNA บนวัฏภาคของแข็งนั้นสามารถสังเคราะห์ได้ตามเอกสารอ้างอิง [36] จึงไม่ขอกล่าวรายละเอียดดังกล่าว

สำหรับการติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ จะทำหลังจากสังเคราะห์พีเอ็นเอบนวัฏภาคจนครบวงจรแล้ว โดยหากต้องการจะติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ สะพานเชื่อมที่ใช้แทรกในสายพีเอ็นเอจะต้องใช้สะพานเชื่อม 4a และจะทำกรกกำจัดหมู่ trifluoroacetyl (Tfa) และหมู่ปกป้องบนนิวคลีโอเบส ภายใต้สภาวะ 1:1 aqueous ammonia/dioxane ที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนี้หมู่ Tfa จะหลุดออกให้หมู่เอมีนอิสระที่ตำแหน่ง N^1 ของสะพานเชื่อม แล้วจึงติดฉลากด้วย pyrene-1-carboxylic acid หรือ 4-(pyrene-1-yl)butyric acid โดยใช้ HATU หลังจากนั้นจึงปลดสายพีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยากับ TFA และ acpc/apcPNA ที่ได้จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry

2.3 การศึกษาการจับยัดของพีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ

2.3.1 Materials and Method

- โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทดลอง ซื้อมาจาก Biodesign (Bangkok, Thailand)
- การศึกษาความเสถียรของสารเชิงซ้อนระหว่างพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ โดยการวัด Melting temperature (T_m) ใช้เครื่อง CARY 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian, Inc., USA) ที่มีการติดตั้ง thermal melt system
- การทดลองฟลูออเรสเซนซ์ ใช้เครื่อง Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer

2.3.2 UV-titration

การไทเทรตทดลองโดยใช้เครื่อง MALTON ROY spectronic 3000 array UV spectrophotometer ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ 25 °C โดยผสมสารละลายพีเอ็นเอ (ความเข้มข้น 2 μ M), สารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 (8 μ L) และสารละลาย 100 mM sodium chloride (80 μ L) ในควอทซ์ เมื่อเริ่มไทเทรต เติมสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบการจับยัด (ความเข้มข้น 40 μ M) ที่ละ 5-10 μ L เมื่อเติมเสร็จนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ที่ 260 nm เทียบกับแบล็ก และเติมสารละลายดีเอ็นเอและบันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุกครั้งจนกระทั่งเติมได้ 200 μ L (อัตราส่วน PNA:DNA ประมาณ 1:4) นำค่าที่ได้ไปพลอตระหว่างอัตราส่วนของค่า Abs ที่วัดได้กับค่า Abs จากการคำนวณ เป็นแกน X และอัตราส่วนโมลของพีเอ็นเอต่อดีเอ็นเอ เป็นแกน Y และคำนวณหาจุดสมมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

2.3.3 UV Melting

การวัด melting temperature ทดลองโดยใช้เครื่อง CARY 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Ltd.) ที่ติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างในการวัดเตรียมโดยผสมพีเอ็นเอและดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:1 ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM sodium chloride และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 μ L ในควอทซ์เซลล์ขนาด 10 mm ที่ปิดด้วยเทฟลอน ทำการวัดที่ 260 nm โดยตั้งโปรแกรมเริ่มจากอุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 10 นาที และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 90 °C (อัตราการเพิ่ม 1 °C/นาที) ค้างไว้ที่อุณหภูมินี้ 10 นาที และกลับไป 20 °C และกลับมาที่ 90 °C อีกครั้ง (20 → 90 → 20 → 90) โดยจะมีการบันทึกค่าอุณหภูมิและค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 1 °C

สำหรับค่าอุณหภูมิที่บันทึกได้จะต้องนำมาคูณ correction factor ของเครื่องมือ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Correct Temp.} = (0.9696 \times T_{\text{block}}) - 0.8396$$

ส่วนค่าการดูดกลืนแสง (Abs_{obs}) จะถูกเปลี่ยนเป็นค่า Normalized Abs ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

$$\text{Normalized Abs.} = \text{Abs}_{\text{obs}} / \text{Abs}_{\text{init}}$$

ค่าอุณหภูมิหลอมเหลวพิจารณาจากการพล็อตกราฟระหว่าง Correct Temp. กับ Normalized Abs จะได้กราฟรูปตัวเอส และหาค่าอุณหภูมิหลอมเหลวจากกราฟที่มีความชันสูงสุดของอนุพันธ์ลำดับที่ 1 โดยใช้โปรแกรม KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software) และ Microsoft Excel

2.3.4 CD spectroscopy

การวัดค่า CD ทดลองโดยใช้เครื่อง JASCO Model J-715 spectropolarimeter ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างจะเตรียมโดยการผสมพีเอ็นเอและดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ ในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM sodium chloride ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 μ L ในควอทซ์เซลล์ขนาด 10 mm ที่ปิดด้วยเทฟลอน ทำการวัดที่ 200-400 nm ที่ 25 °C และนำมาค่าที่ได้มาลบด้วยแบลนด์ (สารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM sodium chloride)

2.3.5 Fluorescence experiment

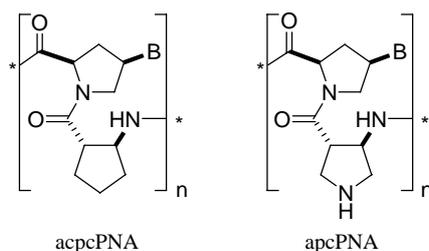
การวัดค่าฟลูออเรสเซนซ์ จะใช้เครื่อง Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างเตรียมโดยการผสมพีเอ็นเอและดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการในสารละลาย 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 μ L ในควอทซ์เซลล์ขนาด 10 mm ที่ปิดด้วยเทฟลอน ค่า excitation วัดที่ 345 nm ที่ 25 °C

บทที่ 3

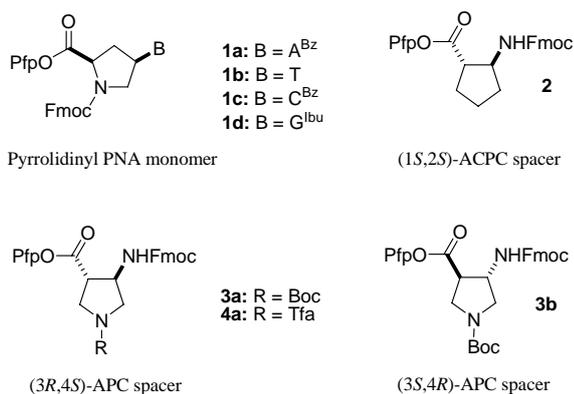
ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์มोनอเมอร์

ในงานวิจัยนี้จะพัฒนาพิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีสะพานเชื่อมเป็น APC เพื่อใช้ในการแทรกลงในสายพีเอ็นเอทดแทนสะพานเชื่อมตัวเดิมคือ ACPC ศึกษามอนอเมอร์

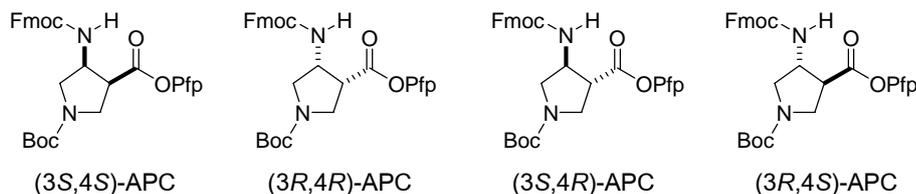


พีเอ็นเอทั้ง 2 ระบบ จะประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นวงพิโรลิดีนที่มีนิวคลีโอเบส (B) ต่ออยู่ในที่นี้จะเรียกว่าพิโรลิดีนมอนอเมอร์ ซึ่งจะศึกษาทั้งหมด 4 ชนิด คือ พิโรลิดีนมอนอเมอร์ที่มีเบสเป็นอะดีนีน (adenine; A; สาร 1a) ไทมิน (thymine; T; สาร 1b) ไซโตซีน (cytosine; C; สาร 1c) และกวานีน (guanine; G; สาร 1d) กับส่วนที่เป็นกรดเบต้าอะมิโน ในที่นี้จะเรียกว่าสะพานเชื่อม ซึ่งจะศึกษา 3 ชนิด คือ (1*S*,2*S*)-2-aminocyclopentanecarboxylic acid หรือ (ACPC; สาร 2) และ (3*R*,4*S*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC; สาร 3a, 4a) ซึ่งมีคอนฟิกูเรชันเหมือนกัน และ (3*S*,4*R*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC; สาร 3b) ที่เป็นอีแนนซ์ไอเมอร์กับสองชนิดแรก โดยในงานวิจัยครั้งนี้สารหมายเลข 1a, 1b, 1c, 1d และ 2 เป็นสารที่ผู้วิจัยเคยศึกษาร่วมกับรศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ นักวิจัยที่ปรึกษา และจะนำพีเอ็นเอที่ได้จากมอนอเมอร์เหล่านี้ (acpcPNA) [41] มาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับพีเอ็นเอชนิดใหม่ (acpc/apcPNA และ apcPNA) ในด้านสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก โดยสารดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการของรศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

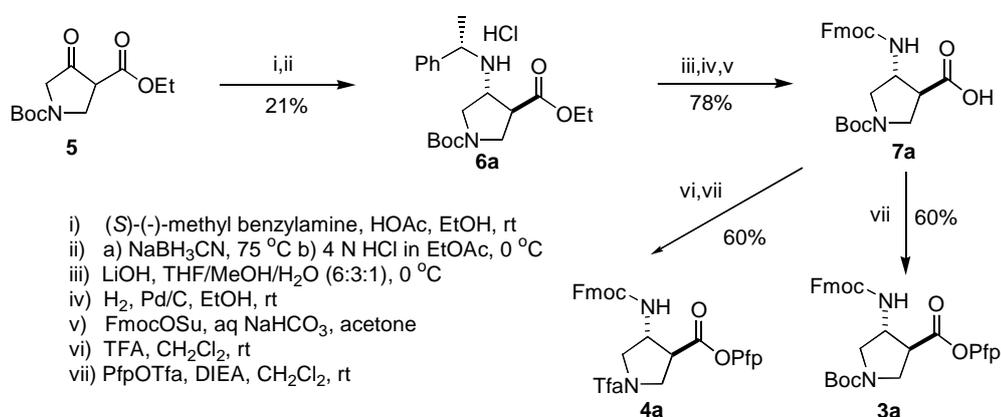


สำหรับมอนอเมอร์อีก 2 ชนิด คือ (3*R*,4*R*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid และ (3*S*,4*S*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid ที่ได้เสนอไปในแบบเสนอโครงการวิจัยนั้นนั้น ไม่ได้ทำการศึกษา เนื่องจากมันมีคอนฟิกูเรชันที่แตกต่างจาก (1*S*,2*S*)-ACPC และผลการทดลองเบื้องต้นของการแทรก (3*S*,4*R*)-APC ไปในสายพีเอ็นเอนั้น ไม่แสดงสมบัติการจับยึด ดังนั้น จึงเป็นที่คาดว่า (3*R*,4*R*)-APC และ (3*S*,4*S*)-APC ก็น่าจะเป็นไป

ในการทำงานเดียวกัน อีกทั้ง (3R,4S)-APC ก็ให้ผลการทดลองที่เป็นที่น่าพอใจ บรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการ ผู้วิจัยจึงไม่ศึกษาอนุพันธ์ทั้งสองชนิดดังกล่าว

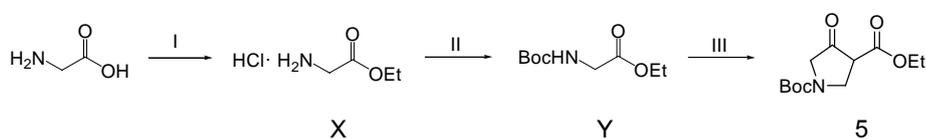


สำหรับแนวทางการสังเคราะห์อนุพันธ์นั้นจะดำเนินการ โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ให้ได้สารมัธยันต์ (5) ก่อน ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ (3R,4S)-APC และ (3S,4R)-APC ได้ ดังแผนภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.13 การสังเคราะห์สาร 3a และ 4a

โดยจะเริ่มจาก glycine ethyl ester hydrochloride ซึ่งมีจำหน่าย นำมาเติมหมู่ *tert*-butoxy carbonyl หรือหมู่ Boc ที่ตำแหน่งไนโตรเจนอะตอมของสาร X โดยการให้ทำปฏิกิริยากับ di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) ในเมทานอล และมี triethylamine (NEt₃) เป็นเบส ที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่ทำปฏิกิริยาจะเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และเทอร์เชียรีบิวทานอล (*tert*-butanol) เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง และได้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-Boc glycine ethyl ester (สาร Y) คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 99

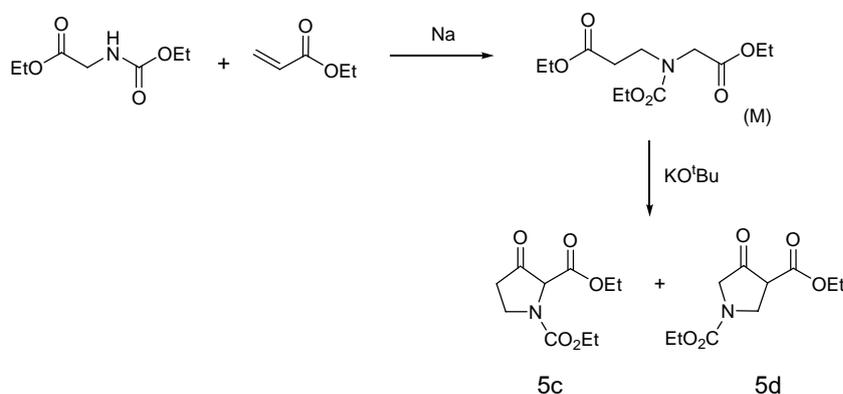


Reagent and Condition: (I) AcCl, EtOH 0 °C → RT (86.5% yield) (II) Boc₂O, Et₃N, MeOH 30 °C (99 % yield)
 (III) ethyl acrylate, KO^tBu, toluene, 0 °C, N₂ (51.7% yield)

ภาพที่ 3.2 แนวทางการสังเคราะห์สาร 5

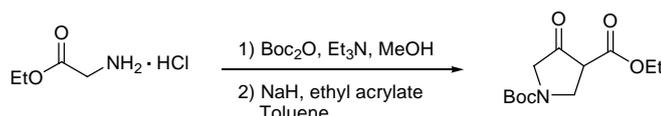
หลังจากที่เตรียมสาร Y ได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Ethyl 1-*tert*-butoxy carbonyl-4-oxopyrrolidine-3-carboxylate, สาร 5) โดยได้ดำเนินการตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง [37] ที่รายงาน

โดย Henry Rapoport และคณะ (1964) ซึ่งกลุ่มวิจัยดังกล่าวนี้ ได้ทำการสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน ได้แก่ ethyl-1-ethoxycarbonyl-3-oxo pyrrolidine-2-carboxylate (สาร 5c) และ ethyl-1-ethoxycarbonyl-4-oxo pyrrolidine-3-carboxylate (สาร 5d) จากปฏิกิริยาระหว่าง ethyl acrylate กับ *N*-ethoxy glycine ethyl ester โดยมีโลหะโซเดียมเป็นรีเอเจนต์ ได้สาร ethyl 1-ethoxycarbonyl-3-oxopyrrolidine-2-carboxylate (สาร M) ก่อนแล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ potassium *tert*-butoxide ได้สาร 5c และสาร 5d ดังสมการ (ภาพที่ 3.3)



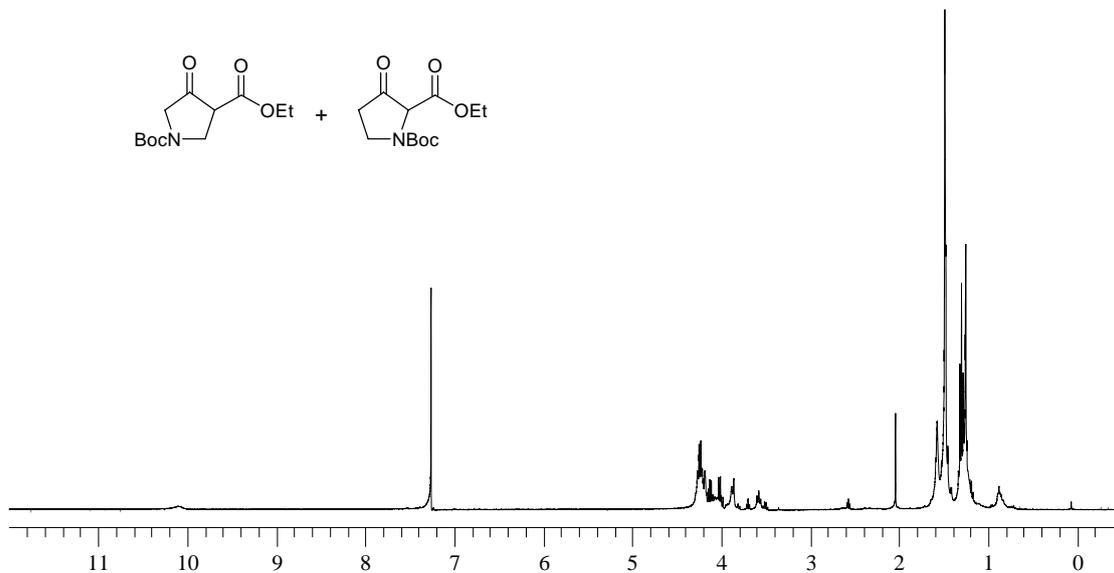
ภาพที่ 3.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร 5c และสาร 5d [37]

การสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ สามารถเริ่มสังเคราะห์จาก *N*-ethoxy carbonyl glycine ethyl ester กับ ethyl acrylate โดยทำปฏิกิริยากับโลหะโซเดียมในเบนซีน [39] เพื่อเตรียมสาร M ขึ้นก่อน หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาการปิดวงแบบดิกค์แมน (Dieckman cyclization) โดย KO^tBu ใน toluene ที่ 0 °C พบว่าได้สารผสมของผลิตภัณฑ์สองชนิด คือสาร 5c และสาร 5d อย่างไรก็ตาม Tae-Ho Park และคณะ [40] ได้รายงานว่ปฏิกิริยานี้สามารถเตรียมได้โดยการใช้ NaH (ภาพที่ 3.4) ทำปฏิกิริยากับสาร Y และ ethyl acrylate ใน toluene ซึ่งสามารถสังเคราะห์สาร 5 ได้โดยไม่ต้องผ่านสาร M ก่อน โดยได้ถึง 81% yield



ภาพที่ 3.4 การสังเคราะห์สาร 5 โดยวิธีของ Tae-Ho Park [40]

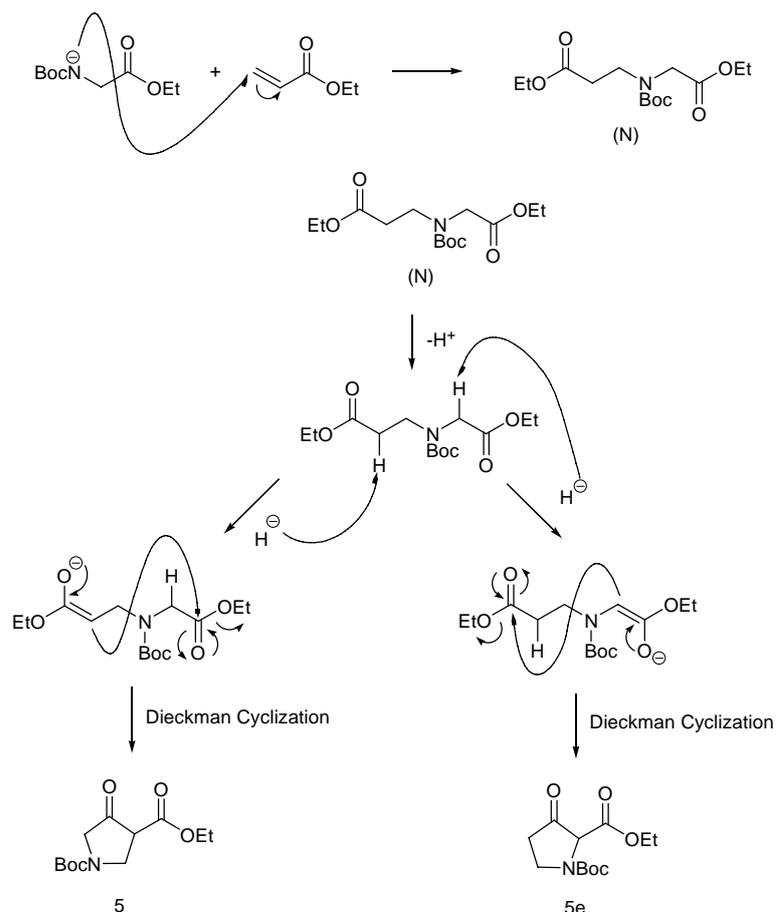
ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ลองทำการทดลองโดยทำปฏิกิริยาระหว่างสาร Y กับ ethyl acrylate โดยใช้ NaH เป็นรีเอเจนต์ โดยได้ทำการทดลองที่ 2 อุณหภูมิได้แก่ ที่ 0 °C และที่ 80 °C ซึ่งจากการทดลอง เมื่อติดตามการดำเนินของปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่ามีจุดสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ hexane:ethyl acetate อัตราส่วน 6:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ และเก็บจุดสารที่ $R_f = 0.16$ อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ¹H NMR พบว่าไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ โดยสเปกตรัมมีลักษณะมีสารผสมปนกันอยู่ด้วย ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากการผสมกันระหว่างสาร 5 และสาร 5e ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์



ภาพที่ 3.5 ^1H NMR สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสาร 5 และสาร 5e

ทั้งนี้เมื่อพิจารณากลไกการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว พบว่าจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 จะเกิดปฏิกิริยาการเติมของไนโตรเจนนิวคลีโอไฟล์ของสาร Y ไปยังพันธะคู่ที่ตำแหน่งปลายแบบ 1,4-addition เกิดเป็นสาร N ขึ้นก่อน หลังจากนั้นสาร N จะถูก deprotonated โดยเบส ที่คาร์บอนตำแหน่ง α ที่อยู่ติดกับหมู่คาร์บอนิล ซึ่งมี 2 ตำแหน่ง เกิดเป็น enolate anion ซึ่งจะสามารถเกิดปฏิกิริยา intramolecular acyl substitution ชนิด Dieckmann cyclization เข้าชนที่หมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ภายในโมเลกุลเกิดเป็นวง 5 เหลี่ยม (five-membered ring) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ 5 และ 5e ดังกลไกการเกิดปฏิกิริยาในภาพที่ 3.6

กลไกการเกิดปฏิกิริยา

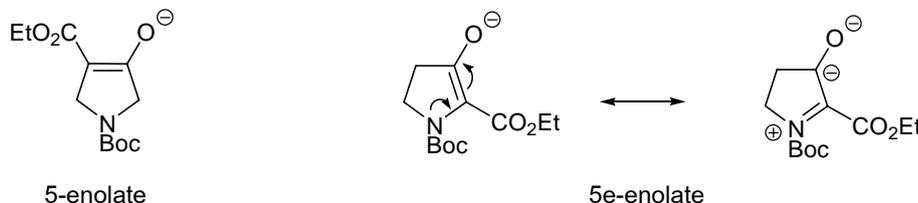


ภาพที่ 3.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสาร 5 และสาร 5e

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของสาร N ถึงแม้ว่าจะไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นกรด (acidity) ของโปรตอนทั้งสองตัวที่ตำแหน่ง α อย่างไรก็ตามก็อาจจะสันนิษฐานได้จากความแตกต่างทางโครงสร้างของโปรตอนทั้งสองว่า โปรตอนที่ตำแหน่ง α ของไกลซีน (acetic methylene proton) น่าจะมีความเป็นกรดมากกว่าโปรตอนที่ตำแหน่ง α ของเอทิลอะซิเตต (propionic methylene proton) เนื่องจาก inductive effect ของหมู่ *N*-Boc หรือสามารถพิจารณาจากค่า pK_a ของ *N*-ethoxycarbonylacetic acid ที่มีค่า 3.66 ในขณะที่ pK_a ของ acetic acid ที่มีค่า 4.76 [37] ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า acetic methylene proton มีความเป็นกรดมากกว่า propionic methylene proton ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ Rapoport ได้รายงานไว้ที่ได้สาร 5 มากกว่าสาร 5e [39]

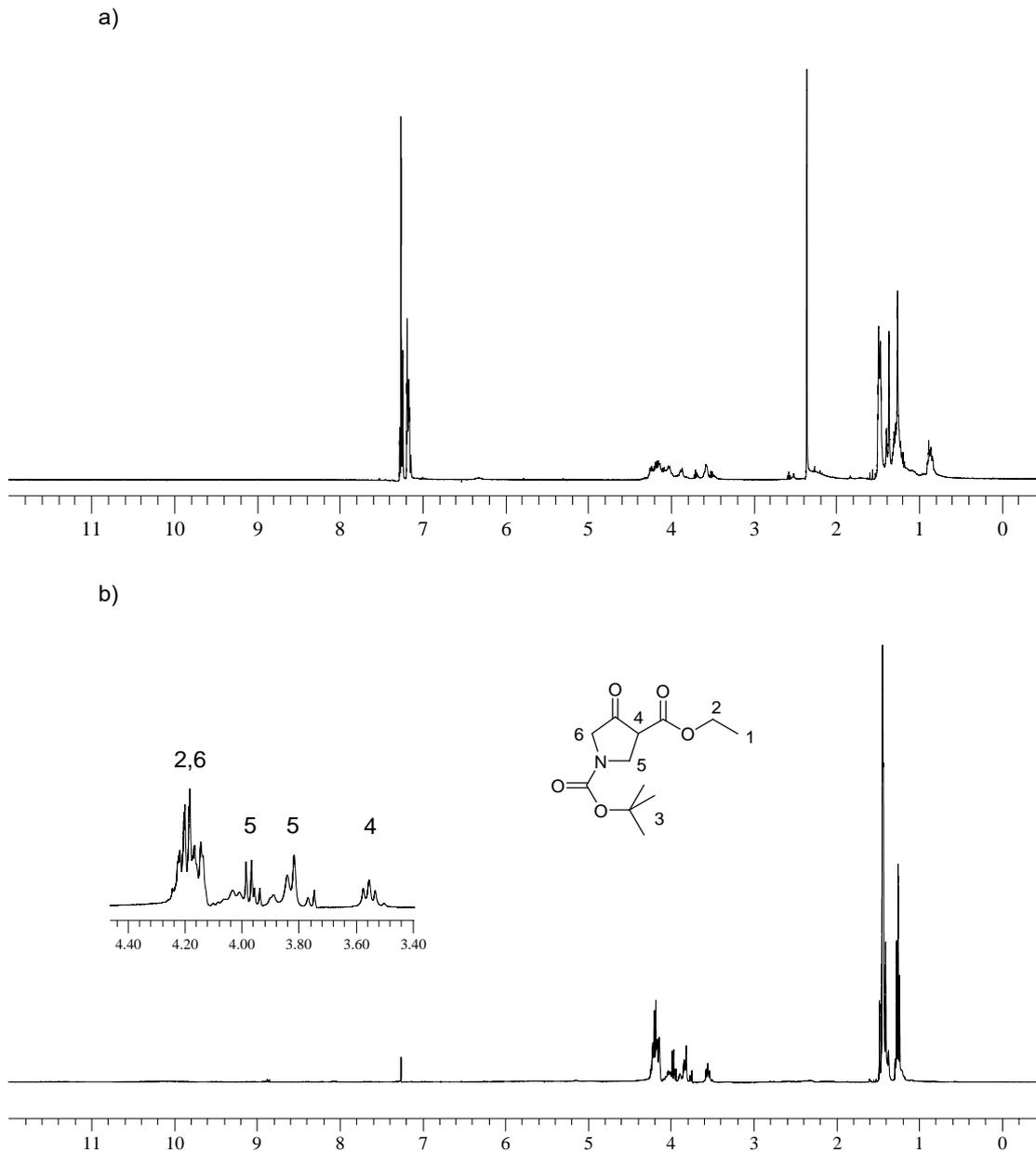
ภาพ 3.7 แสดงค่า pK_a ของ acetic acid และ *N*-ethoxycarbonylacetic acid

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงความเสถียรของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ สาร 5 และสาร 5e ที่อยู่ในรูปของ enolate anion (ภาพที่ 3.8) แล้วจะพบว่าสาร 5-enolate นั้นมีความเสถียรมากกว่าเมื่อเทียบกับสาร 5e-enolate ที่มีผลของเรโซแนนซ์ (resonance effect) จากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของไนโตรเจน delocalized ทำให้เกิดการผลักกันระหว่างประจุลบที่เกิดขึ้น ซึ่งไปลดเสถียรภาพของโมเลกุล และสอดคล้องกับผลการทดลองที่รายงานว่า เกิดสาร 5 มากกว่าสาร 5e ตามที่ Rapoport ได้รายงานไว้ [39]



ภาพที่ 3.8 โครงสร้างของอีโนเลท แอนไอออนของสาร 5-enolate และ สาร 5e-enolate

จากเหตุผลและกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้ทราบว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Ethyl 1-*tert*-butoxycarbonyl-4-oxopyrrolidine-3-carboxylate (สาร 5) นั้นจะได้ของผสมของผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด ได้แก่ สาร 5 และสาร 5e ซึ่งแยกออกจากกันได้ยากเนื่องจากมีสภาพขั้ว (polarity) ที่ใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตาม จากเอกสารอ้างอิง มีรายงานว่าสาร 5 และสาร 5e นั้นสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยการสกัดกับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9.5 โดยที่สาร 5 นั้นจะมีครึ่งชีวิต (half life) อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวประมาณ 10 วัน ในขณะที่ สาร 5e จะมีครึ่งชีวิตประมาณ 2 นาที [37] ซึ่งจากการทดลองพบว่า ถ้าทำการสกัดสารจากปฏิกิริยาด้วยสารละลาย carbonate buffer pH 9.5 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่าจะได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้นและมีโครงสร้างว่าเป็นสาร 5 ตามที่ต้องการโดยยืนยันจาก ^1H NMR spectroscopy (ภาพที่ 3.9) โดยสเปกตรัมนั้นจะเกิดการ rotamer หรือ enolization และนอกจากนี้จะสังเกตได้ว่าในภาพที่ 3.9a ซึ่งเป็นสเปกตรัมของสาร 5 นั้นมี toluene เป็นสารปนเปื้อน ซึ่งจะหายไปเมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าว



ภาพที่ 3.9 การเปรียบเทียบสเปกตรัมของ Ethyl 1-*tert*-butoxycarbonyl-4-oxopyrrolidine-3-carboxylate

(สาร 5) a) ก่อนและ b) หลังการสกัดด้วยสารละลายคาร์บอนेटบัฟเฟอร์

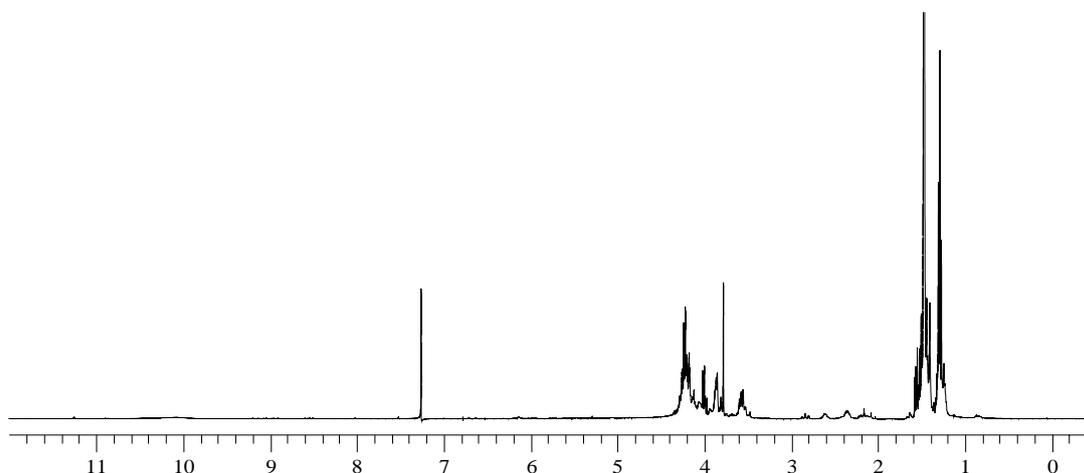
โดยสภาวะที่ใช้ในการทดลองนั้น ได้ทำทั้งหมด 4 สภาวะ โดยได้เลือก NaH หรือ KO^tBu เป็นเบส และใช้ toluene หรือ THF เป็นตัวทำละลาย โดยทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 0 °C และผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลาย carbonate buffer pH 9.5 และทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ และใช้สารละลายระหว่าง hexane:ethyl acetate อัตราส่วน 6:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3.1 การสังเคราะห์ Ethyl 1-*tert*-butoxycarbonyl-4-oxopyrrolidine-3-carboxylate (สาร 5) สภาวะต่างๆ

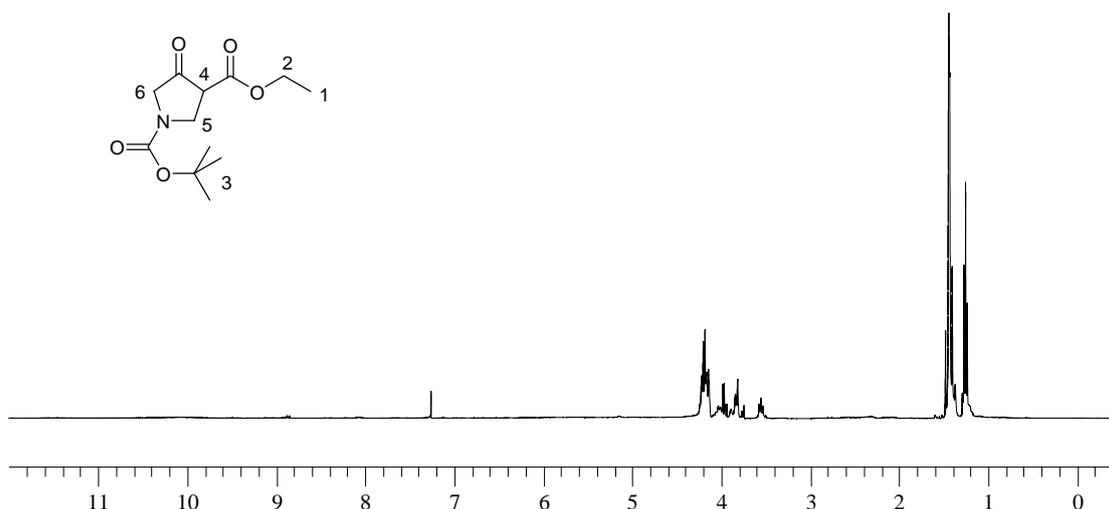
วิธีที่	รีเอเจนต์	ตัวทำละลาย	สภาวะ	% yield
1	NaH	toluene	80 °C	-
2	NaH	toluene	0 °C	-
3	NaH	toluene	reflux/N ₂	20.6
4	KO ^t Bu	toluene	reflux/N ₂	51.7
5	NaH	THF	reflux/N ₂	8.7
6	KO ^t Bu	THF	reflux/N ₂	11.1

จากผลการทดลอง วิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 นั้นไม่สามารถวัดผลผลิตร้อยละได้ เนื่องจากเหตุผลตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ส่วนวิธีที่ 3 ถึง 6 จะเห็นได้ว่า เมื่อใช้ toluene เป็นตัวทำละลายจะได้ผลิตภัณฑ์มากกว่าเมื่อใช้ THF เป็นตัวทำละลาย และเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่ 3 กับวิธีที่ 4 จะพบว่าเมื่อใช้ NaH เป็นเบส จาก ¹H NMR สเปกตรัมจะพบว่าสเปกตรัมจากวิธีที่ 3 นั้นยังมีสิ่งเจือปนมากกว่าสเปกตรัมที่ได้จากการทดลองวิธีที่ 4 และให้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่น้อยกว่า จึงสรุปว่าจะเลือกใช้วิธีที่ 4 ในการสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ดี ถึงแม้จะมีสาร 5e ปนมาในปริมาณเล็กน้อยนั้น น่าจะเป็นผลยอมรับได้ เนื่องจากว่าในขั้นต่อไปที่จะนำสาร 5 ไปทำปฏิกิริยากับ (*S*)-methylbenzylamine ใน acetic acid และ ethanol นั้นมีรายงานว่าเฉพาะสาร 5 เท่านั้นที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในขณะที่สาร 5e นั้นจะไม่เกิดปฏิกิริยา [37]

a)



b)



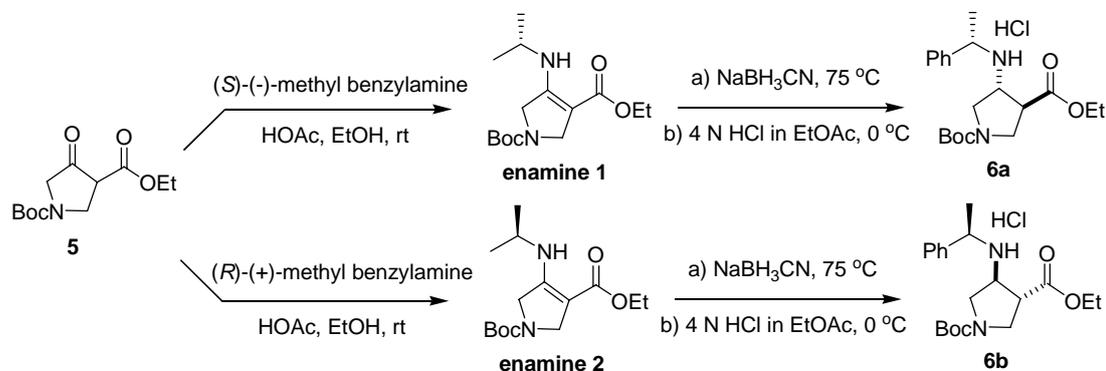
ภาพที่ 3.10 การเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมของการสังเคราะห์สาร 5

ด้วยวิธีที่ 3 (a) และวิธีที่ 4 (b)

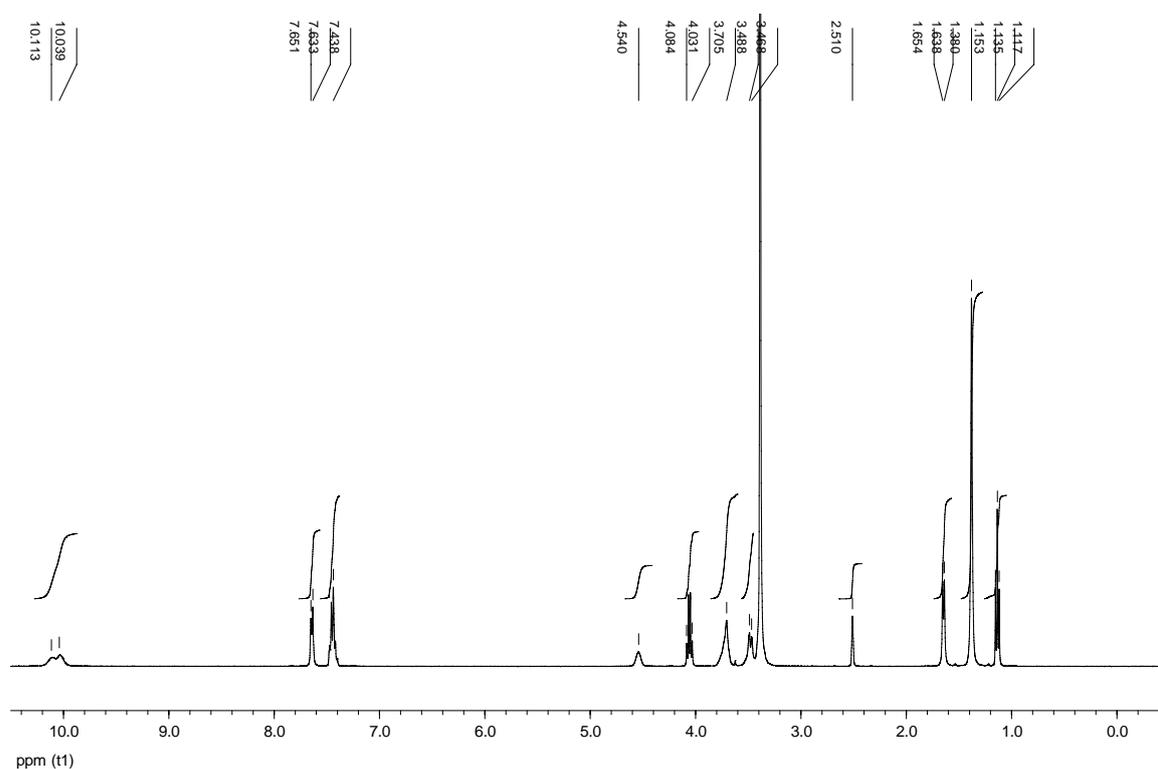
ดังนั้นจากผลการทดลอง พบว่าสามารถเตรียมสาร 5 ได้จากปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอฟิลิกแบบ 1,4-addition และ Dieckmann cyclization โดยใช้ $\text{KO}^\text{t}\text{Bu}$ เป็นเบส และใช้ toluene เป็นตัวทำละลาย (วิธีที่ 4)

เมื่อได้สาร 5 มาแล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ chiral auxiliary คือ (S)-(-)-methylbenzylamine หรือ (R)-(+)-methylbenzylamine โดยถ้าใช้ (S)-(-)-methylbenzylamine จะได้สาร enamine-1 และนำไปทำ selective reduction ด้วย NaBH_3CN จะได้ *trans*-isomer 6a เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่งตามเอกสารอ้างอิง [38] รายงานว่าจะสามารถแยก 6a และ 6b ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการแยกสาร diastereomer ทั้งสองออกจากกันด้วยวิธีโครมาโตกราฟีทำได้ค่อนข้างยากและสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร ทางกลุ่มวิจัยจึงลองทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึก และพบว่าสามารถตกผลึกในรูปของเกลือไฮโดรคลอไรด์ได้ด้วยตัวทำละลาย acetonitrile ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูง (มากกว่าร้อยละ 98 จากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR และ

HPLC) โดยได้ผลผลิตร้อยละ 21 และยืนยันความบริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบค่าการบิดระนาบแสงโดยวัดได้ $[\alpha]_D^{27} = -4.6$ (c 1.00, MeOH) เมื่อเทียบจากค่าในเอกสารอ้างอิง [Lit.[38] $[\alpha]_D^{23}$ ของ (3*S*,4*R*) enantiomer = +4.8 (c 1.05, MeOH)]

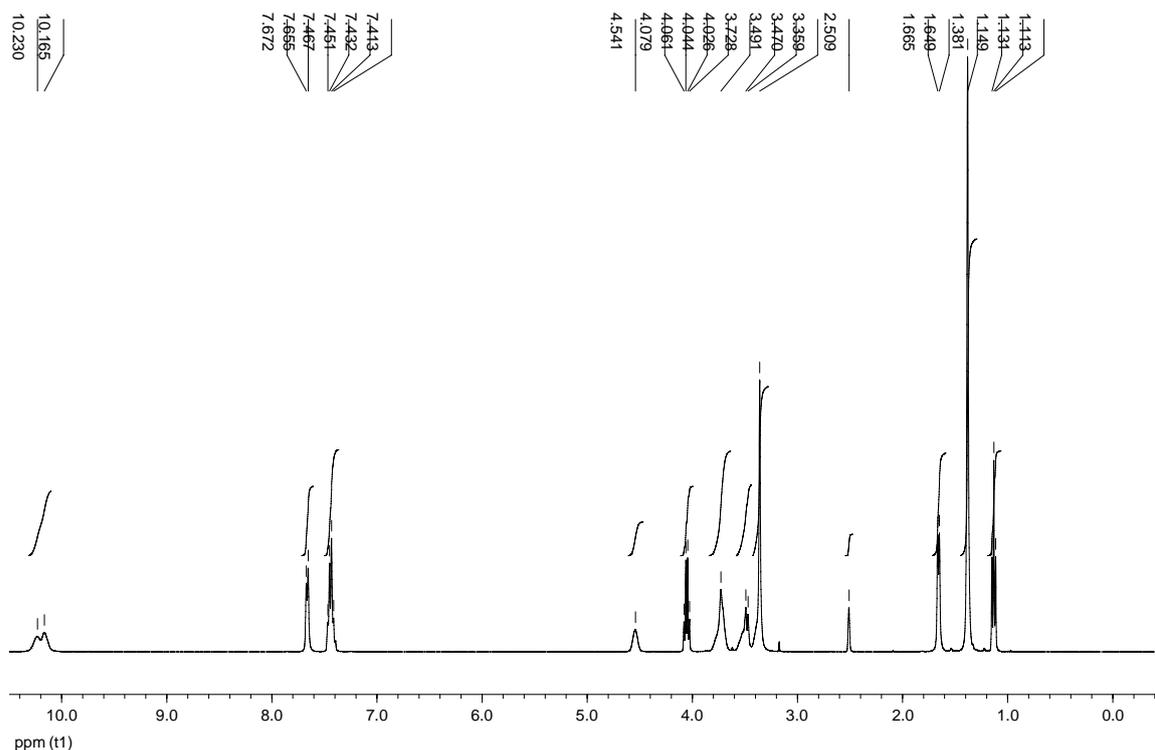


ภาพที่ 3.11 การสังเคราะห์สาร 6a และ 6b



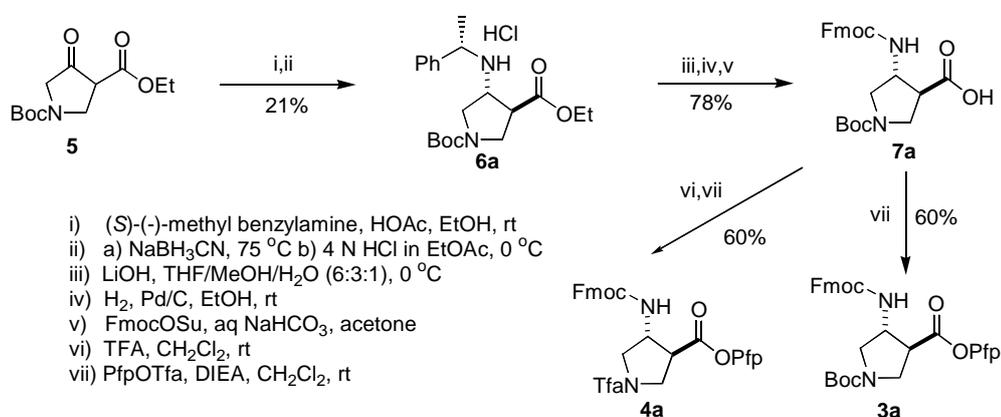
ภาพที่ 3.12 ¹H-NMR สเปกตรัมของ 6a

ในทำนองเดียวกันสามารถเตรียมสาร 6b ได้ด้วยปฏิกิริยาเดียวกัน แต่เปลี่ยน chiral auxiliary จาก (S)-(-)-methylbenzylamine เป็น (R)-(+)-methylbenzylamine โดยได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 6b ผลผลิตร้อยละ 17 และมีค่าการบิดระนาบแสง $[\alpha]_D^{27} = +4.6$ (c 1.00, MeOH) [Lit.[38] $[\alpha]_D^{23} = +4.8$ (c 1.05, MeOH)]



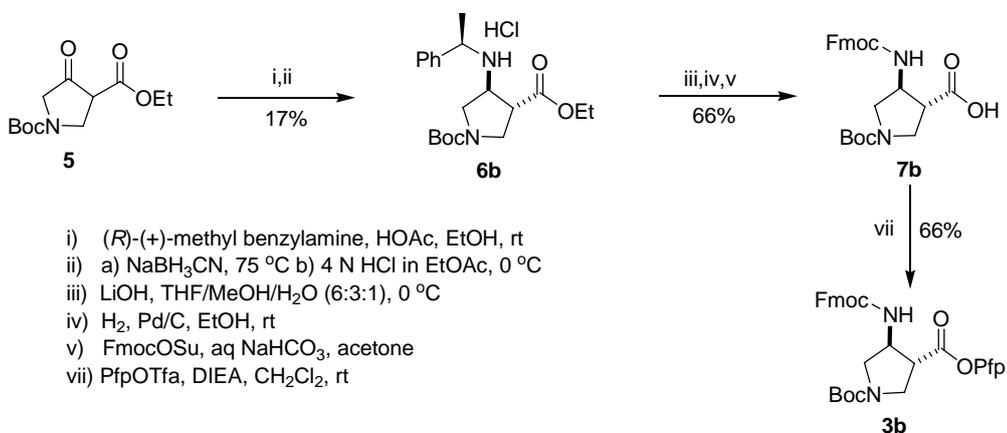
ภาพที่ 3.13 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 6b

หลังจากที่ได้สาร 6a หรือ 6b มาแล้ว ในขั้นต่อไปจะเป็นการปลดหมู่ chiral auxiliary ออกและ protect หมู่อะมิโนด้วย Fmoc ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยให้ทำปฏิกิริยากับ FmocOSu ภายใต้สภาวะเบสในตัวทำละลายผสมน้ำและ acetone จะได้สาร 7a และจะนำไปเตรียมเป็นสะพานเชื่อมแบบ (3*R*,4*S*)-APC ใน 2 รูปแบบ คือ N^1 -Boc, N^3 -Fmoc (3a) และ N^1 -Tfa, N^3 -Fmoc (4a) ตามแผนภาพ 3.10 โดยสาร 4a นั้นจะผ่านขั้นตอนการปลดหมู่ Boc ด้วย TFA ก่อนแล้วจึง activated ด้วย PfpOTfa ก็จะได้สาร 4a ตามต้องการ และเหตุผลที่เลือกหมู่ปกป้องตรงตำแหน่ง N^1 เป็นหมู่ Tfa นั้นเนื่องจากมันมีความเสถียรภายใต้สภาวะ non-aqueous basic ซึ่งใช้ในการปลดหมู่ Fmoc ในขั้นตอนการสังเคราะห์เพปไทด์บนวิฏภาคของแข็ง และหมู่ Tfa เองยังสามารถถูกปลดออกด้วยการทำปฏิกิริยากับ aqueous base ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับการปลดหมู่ปกป้องบนนิวคลีโอเบส ก่อนขั้นตอนการปลดสายพีเอ็นเอ็นออกจากวิฏภาคของแข็ง



ภาพที่ 3.14 การสังเคราะห์สาร 3a และ 4a

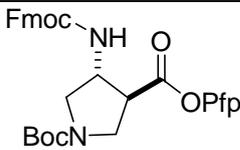
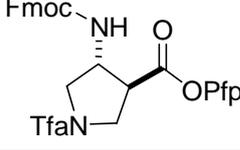
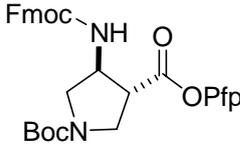
สำหรับสาร 3b จะดำเนินการในทำนองเดียวกันกับสาร 3a โดยเริ่มจากสาร 5 ทำปฏิกิริยากับ chiral auxiliary จะได้สาร 6a นำไปปกป้องหมู่เอมีโนและคาร์บอกซิลจะได้สาร 3b ตามภาพที่ 3.15



ภาพ 3.15 การสังเคราะห์สาร 3b

หลังจากที่ได้สะพานเชื่อม 3a, 4a และ 3b มาแล้วโดยสรุปได้ดังตารางที่ 3.2 ก็จะนำมาสังเคราะห์เป็นพีเอ็นเอด้วยวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์บนวิวกภาคของแข็งตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง [36] โดยสะพานเชื่อม 3a, 4a หรือ 3b จะถูกแทนที่เข้าไปใน acpcPNA บางส่วน (acpc/apcPNA) หรือทั้งหมด (apcPNA) โดยในแต่ละรอบของการสังเคราะห์จะมีประสิทธิภาพไม่ต่ำกว่าร้อยละ 98 สำหรับพีเอ็นเอปกติจะใช้สะพานเชื่อม 3a แทนที่สะพานเชื่อม (1*S*,2*S*)-ACPC (2) และหมู่ Boc จะหลุดออกในขั้นตอนปลดสายพีเอ็นเอออกจากวิวกภาคของแข็ง สำหรับพีเอ็นเอที่ต้องการติดหมู่ฟลูออเรสเซนต์จะกระทำบนวิวกภาคของแข็งจะใช้สะพานเชื่อม 4a แทน 3a และจะปลดหมู่ Tfa ออก ในขั้นตอนของการปลดหมู่ปกป้องนิวคลีโอเบส โดยใช้สภาวะ 1:1 aqueous ammonia/dioxane at 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหมู่ฟลูออเรสเซนต์ เช่น pyrene-1-carboxylic acid หรือ 4-(pyrene-1-yl)butyric acid จะถูกต่อผ่านปฏิกิริยาการ coupling โดยใช้ HATU เป็นรีเอเจนต์ หลังจากนั้นจะปลดพีเอ็นเอออกจากวิวกภาคของแข็งด้วย TFA และ acpc/apcPNA หรือ apcPNA ที่ได้จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry พีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะนำไปศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกต่อไปในหัวข้อ 3.2

ตารางที่ 3.2 ชื่อ โครงสร้าง และผลผลิตร้อยละของสะพานเชื่อมที่สังเคราะห์ได้

ชื่อ	โครงสร้าง	Overall yield* (%)
(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1-(<i>N</i> -Boc)-3-(Fmoc)-pyrrolidine-4-carboxylic acid Pfp ester; (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-APC (3a)		9.8
(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1-(<i>N</i> -Tfa)-3-(Fmoc)-pyrrolidine-4-carboxylic acid Pfp ester; (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-APC (4a)		9.8
(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-(<i>N</i> -Boc)-3-(Fmoc)-pyrrolidine-4-carboxylic acid Pfp ester; (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-APC (3b)		7.4

*คิดเริ่มจากสาร (5)

3.2 การศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิก

พีเอ็นเอที่สังเคราะห์ในการวิจัยนี้ มีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ PNA1-8 และ DNA 4 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยนี้
ชื่อมาจาก Biodesign (Bangkok, Thailand) ได้แก่ DNA1-4 แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ลำดับเบส มวลโมเลกุลจากการคำนวณและจากที่วิเคราะห์ได้ และค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ของพีเอ็นเอ
เอที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

รหัส	Sequence (N→C) ^a	m/z (calcd)	m/z (found)	T _m (°C) ^b	ΔT _m (°C) ^c
PNA1	Bz- <u>TTTTTTTTT</u> -LysNH ₂	3250.5	3250.1	55.5 ^{d,e}	-17.0
PNA2	Bz- <u>TTTTTTTTT</u> -LysNH ₂	3250.5	3251.2	<20 ^d	-
PNA3	Bz- <u>TTTTT</u> <u>TTTTT</u> -LysNH ₂	3242.5	3242.6	71.1 ^d	-1.4
PNA4	Bz- <u>TTTTT</u> <u>TTTTT</u> -LysNH ₂	3242.5	3243.7	28.3 ^d	-44.2
PNA5	Bz-GTAGA <u>TC</u> ACT-LysNH ₂	3621.9	3622.2	50.8 ^d	-1.4
PNA6	Ac- <u>TTTT</u> (Py) <u>TTTTT</u> -LysNH ₂	3409.6	3411.0	62.2 ^f	-10.3
PNA7	Ac-GTAGA(Py) <u>TC</u> ACT-LysNH ₂	3788.9	3789.4	44.3 ^f	-7.9
PNA8	Bz-GTAGA(PyBu) <u>TC</u> ACT-LysNH ₂	3893.0	3893.7	45.7 ^f	-6.5
DNA1	dA ₉	-	-	-	-
DNA2	dA ₄ TA ₄	-	-	-	-
DNA3	dAGTGATCTAC	-	-	-	-
DNA4	dAGTGACCTAC	-	-	-	-

^a T = ssACPC-T; T = (3R,4S)-APC-T; T = (3S,4R)-APC-T;

(Py) = pyrene-1-carbonyl modification; (PyBu) = 4-(pyrene-1-yl)butyryl

^b กับ complementary DNA (dA₉ สำหรับ PNA1–PNA4 และ PNA6; dAGTGATCTAC สำหรับ PNA5, PNA7 และ PNA8)

^c ค่าที่ลดลงเปรียบเทียบกับ acpcPNA ภายใต้สภาวะเดียวกัน (T_m ของพีเอ็นเอกับ complementary DNA; Ac-TTTTTTTTT-LysNH₂: 72.5 °C; Ac-GTAGATCACT-LysNH₂: 52.2 °C).

^d สภาวะ: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, [PNA] = 1.0 μM and [DNA] = 1.0 μM

^e กราฟเป็นลักษณะแบนราบ (very broad) และไม่แสดงกราฟการหลอมเหลว 2 ชั้น (non-two-state melting curve)

^f สภาวะ: 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, [PNA] = 2.5 μM and [DNA] = 3.0 μM

พีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นั้นนำไปหาค่า melting temperature (T_m) เพื่อศึกษาความสามารถในการจับยึด
กับกรดนิวคลีอิกโดยมีรายละเอียดดังนี้

PNA1: homothymine acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3R,4S)-APC ทั้งสาย

PNA2: homothymine acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3S,4R)-APC ทั้งสาย

PNA3: homothymine acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3R,4S)-APC ตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว

PNA4: homothymine acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3S,4R)-APC ตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว

PNA5: mix base acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3R,4S)-APC ตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว

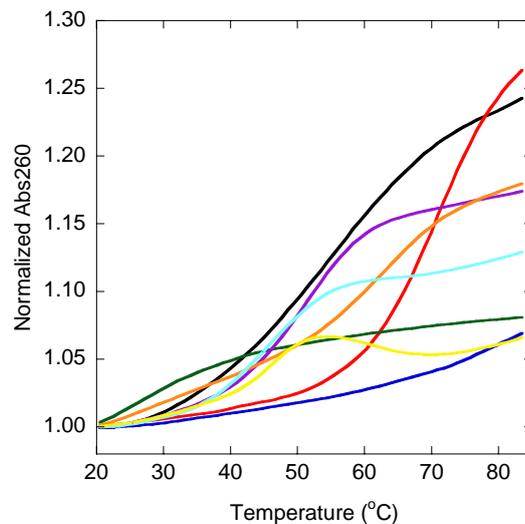
PNA6: homothymine acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3R,4S)-APC ตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว

และมีการติดหมู่ pyrene-1-carbonyl ที่ตำแหน่ง N¹ ของ (3R,4S)-APC

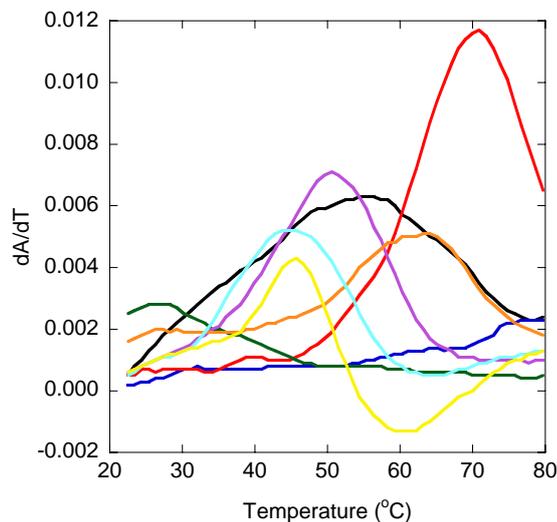
PNA7: mix base acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3R,4S)-APC ตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว และมีการติดหมู่ pyrene-1-carbonyl ที่ตำแหน่ง N^1 ของ (3R,4S)-APC

PNA8: mix base acpcPNA ที่เปลี่ยน (1S,2S)-ACPC เป็น (3R,4S)-APC ตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว และมีการติด 4-(pyrene-1-yl)butyryl ที่ตำแหน่ง N^1 ของ (3R,4S)-APC

การทดลองด้วยเทคนิค spectroscopy ทั้งหมดจะกระทำใน 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่ความเข้มข้นของเกลือเป็น 100 mM sodium chloride และความเข้มข้นของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ เท่ากับ 1.0 μM (ในกรณีที่กระทำในสภาวะอื่นจะกำหนดไว้ได้ภาพ เช่น ที่ความเข้มข้นอื่น หรือที่ pH อื่น) การทดลองหา UV melting temperature ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3 และภาพ 3.16a



a)



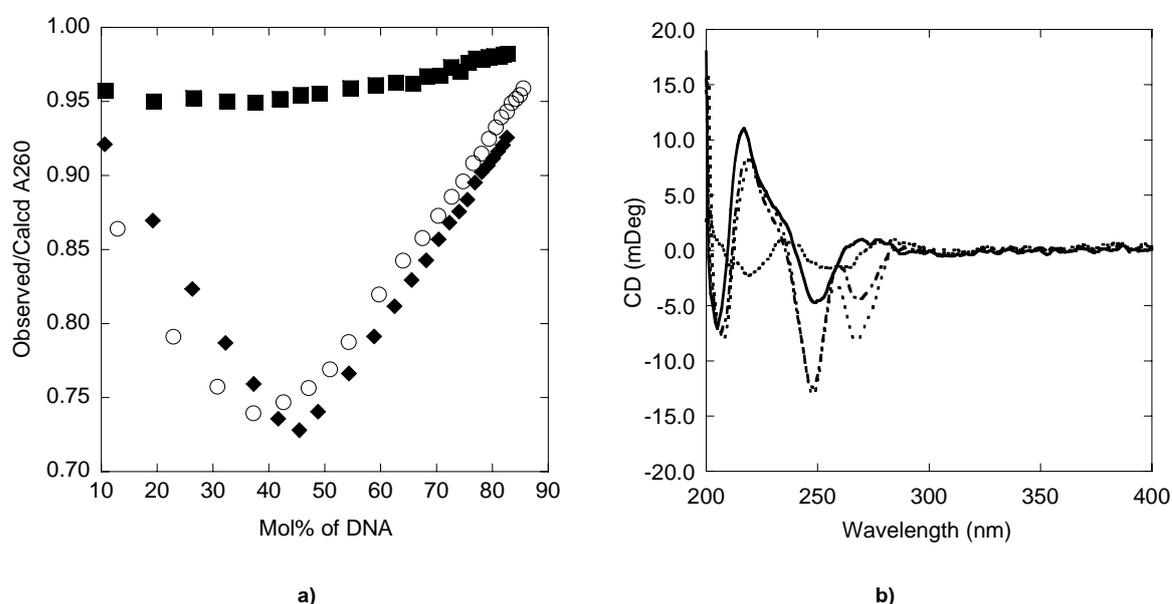
b)

ภาพ 3.16 a) กราฟ Thermal denaturation และ b) First derivative plot ของสารประกอบเชิงซ้อน

PNA1+DNA1 (—), PNA2+DNA1 (—), PNA3+DNA1 (—), PNA4+DNA1 (—), PNA5+DNA3 (—), PNA6+DNA1 (—), PNA7+DNA3 (—), PNA8+DNA3 (—). ค่า T_m วัดภายใต้สภาวะ 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, สำหรับ PNA1–PNA5 [PNA] = 1 μM และ [DNA] = 1 μM ,

สำหรับ PNA6–PNA8 [PNA] = 2.5 μM และ [DNA] = 3.0 μM .

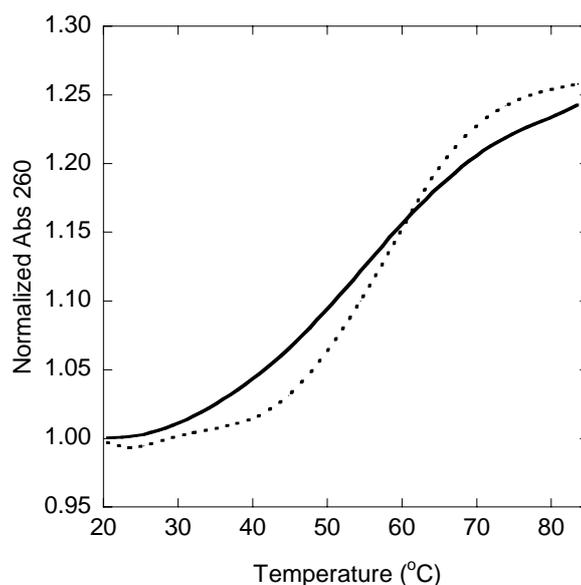
จากภาพที่ 3.16 ในการตรวจสอบความสามารถในการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนสะพานเชื่อมไปทั้งระบบ จากผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนสะพานเชื่อมจาก (1*S*,2*S*)-ACPC ไปเป็น (3*R*,4*S*)-APC (PNA1) ทั้งสายจะทำให้ค่า T_m นั้นลดลงพอสมควร ($\Delta T_m = -17.0$ °C คิดเป็นลดลง 23.4%) เมื่อเทียบกับ acpcPNA ซึ่งก็เป็นไปตามที่คาดหมายไว้ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของสะพานเชื่อมไป โดยที่การเปลี่ยนแปลงอะตอมคาร์บอนเป็นไนโตรเจนในสะพานเชื่อม อาจทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างในระดับสามมิติที่เปลี่ยนแปลงไป และไปทำลายความเสถียรโดยรวมของระบบ แต่อย่างไรก็ตามค่า T_m ที่ปรากฏก็ยังสูงกว่าของดีเอ็นเอธรรมชาติมาก และเป็นที่น่าสังเกตว่าลักษณะของกราฟที่ได้จะมีลักษณะแบนกว่า acpcPNA แต่ก็ยังมีลักษณะเป็น S-curve อยู่ ซึ่งสันนิษฐานว่าสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นน่าจะมีหลายรูปแบบปนกันอยู่ (เช่นอาจเกิดเป็น triplex hybrid) และเพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานดังกล่าวจึงได้ทำการทดลองด้วยเทคนิค UV titration และ CD spectroscopy ได้ผลดังภาพที่ 3.17



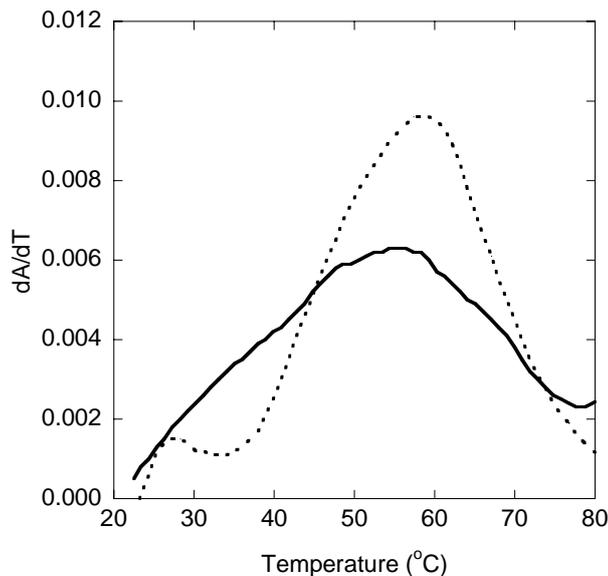
ภาพที่ 3.17 a) UV titration plots ของ PNA1 (O), PNA2 (■), PNA3 (◆) และ complementary DNA (dA₉). กราฟแสดงสัดส่วนของ observed A₂₆₀/calculated A₂₆₀ และ mole fraction ของ DNA และวัดภายใต้สภาวะ 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl at 25 °C, ความเข้มข้นเริ่มต้นของ PNA = 2 μM และ b) CD spectra ของ dA₉ (—), PNA1 (····), dA₉ + 1 equiv. PNA1 (- —), และ dA₉ + 2 equiv. PNA1 (····). spectra ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 100 mM NaCl at 25 °C, [PNA] = 2.5 or 5.0 μM และ [DNA] = 2.5 μM.

ในการยืนยันลักษณะการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ acpc/apcPNA หลังจากที่ได้ทำการทดลอง UV titration (ภาพ 3.13a) เปรียบเทียบระหว่าง PNA1-3 พบว่า PNA1 น่าจะสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ dA₉ ได้ทั้งแบบ PNA-DNA และ (PNA)₂-DNA ดูได้จากกราฟ (O) แสดงให้เห็นว่ามีจุดหักเห (inflection point) 2 จุด คือที่บริเวณ 50 และ 35% mol โดยประมาณ แสดงถึงลักษณะของสารประกอบเชิงซ้อนที่แตกต่างกัน ในขณะที่ PNA3 (◆) ที่มีการแทรกสะพานเชื่อม (3*R*,4*S*)-APC ในตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียวนั้น (acpc/apcPNA) จะมีจุดหักเหที่บริเวณใกล้เคียงกับ 50%mol ซึ่งหมายถึงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ PNA-DNA 1:1 เหมือนกับที่

พบในระบบของ acpcPNA ส่วน PNA2 (■) นั้นพบว่ากราฟจะมีลักษณะแบนราบ ไม่มีการหักเหเกิดขึ้น แสดงว่าไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรระหว่าง PNA กับ DNA ได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค CD spectroscopy (ภาพที่ 3.17b) โดย CD spectra ของของผสมระหว่าง PNA1 กับ dA₉ ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ซึ่งยืนยันได้ว่าการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นจริง โดย negative band ของ dA₉ ที่ 250 nm จะเกิดการเลื่อนแบบ blue-shifted ไปที่ 247 nm และมีการเพิ่มของสัญญาณเกิดขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมี negative band ปรากฏที่ 267 nm ซึ่งความเข้มของสัญญาณจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนของ PNA:DNA เพิ่มขึ้นจาก 1:1 เป็น 2:1 เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอคงที่ ส่วนพีคอื่นๆ นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากทั้งหมดที่กล่าวมา ทำให้สรุปได้ว่าในระบบของ acpPNA (PNA1) มีการเกิดขึ้นของสารเชิงซ้อนที่มีลักษณะแตกต่างกัน เมื่ออัตราส่วนระหว่าง PNA:DNA แตกต่างกัน ซึ่งคำอธิบายที่เป็นไปได้ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ (PNA)₂:DNA เมื่อเปรียบเทียบกับ acpcPNA ที่จะเกิดแบบ PNA:DNA 1:1 น่าจะมาจากแรงดึงดูดระหว่างประจุ (electrostatic attraction) ระหว่างประจุบวกของพีเอ็นเอกับประจุลบของดีเอ็นเอ ซึ่งการทดลอง UV-melting temperature ที่ pH 8.0 (ภาพที่ 3.18) นั้นสนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว เนื่องจากที่ pH สูงนั้น (pH 8.0) ไนโตรเจนของวงพิโรลิดีน (pKa ~ 8.75) [41] จะเกิดการ protonated น้อย แรงดึงดูดระหว่างประจุก็จะลดน้อยลงด้วย ซึ่งในภาวะที่เกิดการ protonated น้อยนี้ พฤติกรรมของสะพานเชื่อม APC จะใกล้เคียงกับสะพานเชื่อม ACPC กล่าวคือไม่มีประจุบวกอยู่บนสายพีเอ็นเอ ในขณะที่ pH 7.0 น่าจะเกิดการ protonated ได้ทำให้พีเอ็นเอมีประจุบวกดังที่ได้กล่าวมา ขณะเดียวกันจะสังเกตได้จาก PNA3 ที่มีการแทนที่สะพานเชื่อมไปเพียง 1 ตำแหน่ง จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ duplex ได้ แต่จะไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ triplex เนื่องจากสะพานเชื่อมส่วนใหญ่ยังเป็น ACPC อยู่ ส่วนของ APC ที่แทรกไปจึงไม่มีอิทธิพลมากนัก อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติ ถ้านำระบบ acpc/acpPNA ไปใช้เป็น probe ในการตรวจวัดดีเอ็นเอ จะต้องมีการต่อ signaling unit เช่น fluorescence เข้าไปในบริเวณไนโตรเจนดังกล่าวโดยผ่านพันธะเอไมด์ ซึ่งก็จะทำให้ไม่สามารถเกิดการ protonate ได้ ปัญหาในเรื่องการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนแบบ (PNA)₂:DNA จึงไม่ใช่ประเด็นสำคัญ



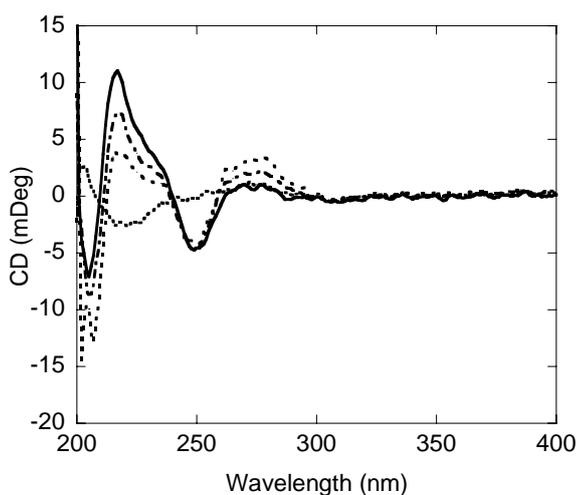
a)



b)

ภาพที่ 3.18 a) กราฟ Thermal denaturation และ b) First derivative plot ของสารประกอบเชิงซ้อน PNA1 และ DNA1 ที่ pH 7.0 (—) และ pH 8.0 (....) ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0 or pH 8.0), 100 mM NaCl, [PNA] = 1 μ M และ [DNA] = 1 μ M.

ในทางกลับกัน การเปลี่ยนสะพานเชื่อมจาก (1S,2S)-ACPC ไปเป็น (3S,4R)-APC (PNA2) ทั้งสายนั้น จะทำให้ค่า T_m ลดลงมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง คือ 20 °C แสดงให้เห็นว่าสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความเสถียรมากพอ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง UV titration (ภาพ 3.17a) และ CD spectra (ภาพที่ 3.19) ของ PNA2 นั้นจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ PNA2 กับ dA_9 ทั้งในอัตราส่วน 1:1 และ 2:1 ซึ่งแสดงว่าไม่พบสัญญาณของสารเชิงซ้อนใดๆ และสามารถสรุปได้ว่าเฉพาะสะพานเชื่อมชนิด (3R,4S)-APC เท่านั้นที่สามารถแทนที่สะพานเชื่อมชนิด (1S,2S)-ACPC แล้วทำให้พีเอ็นเอที่ไต้ยังคงมีสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกอยู่ ส่วนสะพานเชื่อมชนิด (3S,4R)-APC (PNA2) นั้นจะไม่คงสมบัติดังกล่าว

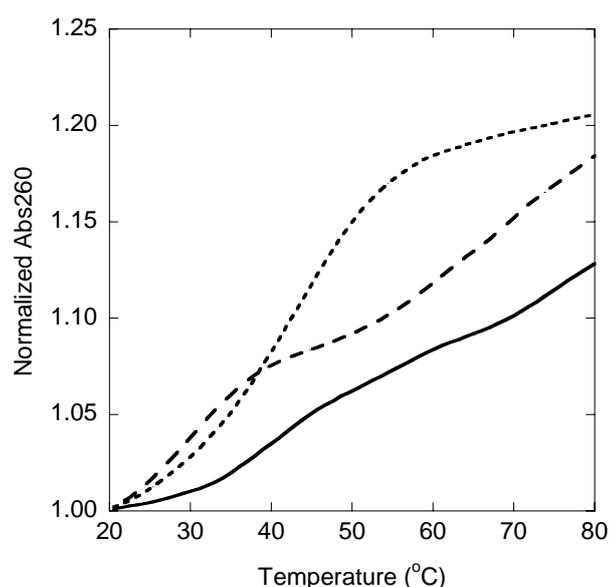


ภาพที่ 3.19 Comparison of CD spectra of a) dA_9 (—), PNA2 (....), dA_9 + 1 equiv PNA2 (- —), and dA_9 + 2 equiv PNA2 (.....) spectra ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 100 mM NaCl at 25 °C, [PNA] = 2.5 or 5.0 μ M และ [DNA] = 2.5 μ M.

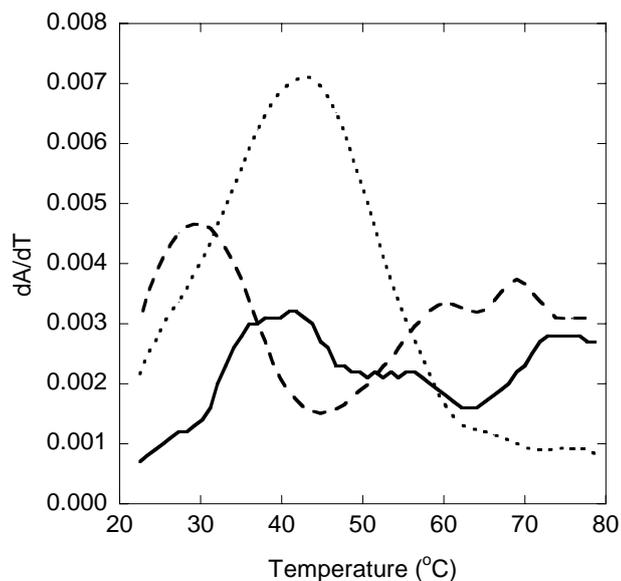
ในกรณีของ PNA3 ซึ่งเป็นระบบที่เปลี่ยนสะพานเชื่อมตำแหน่งกลางตำแหน่งเดี่ยวนั้น โดยเป็นสะพานเชื่อมชนิด (3*R*,4*S*)-APC จากค่า UV-melting temperature จะพบว่ามียาลดลงเล็กน้อย $-1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (คิดเป็น 2.3%) เมื่อเทียบกับ acpcPNA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนสะพานเชื่อมดังกล่าวมีผลทำให้ความเสถียรลดลงเล็กน้อย แต่ก็ยังน่าจะมีศักยภาพในการนำไปทำเป็น probe ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้ โดยสามารถนำไปติดฉลาก fluorescence เพื่อประยุกต์เป็น probe ได้โดยที่ค่า T_m ไม่แตกต่างจากระบบ acpcPNA มากนัก ในขณะที่ การเปลี่ยนสะพานเชื่อมจาก (1*S*,2*S*)-ACPC เป็น (3*S*,4*R*)-APC (PNA2 และ PNA4) จะทำให้ค่า T_m นั้นลดลงอย่างมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ ในกรณีที่เปลี่ยนทั้งสาย (PNA2) และลดลงอย่างมากถึง $-44.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (คิดเป็น 60.9%) ในกรณีที่เปลี่ยนตำแหน่งกลางตำแหน่งเดียว (PNA4) ซึ่งเป็นไปตามที่คาด เพราะสะพานเชื่อม (3*S*,4*R*)-aza-acpc นั้นมีรูปแบบสเตอริโอเคมีที่ต่างไปจาก (1*S*,2*S*)-acpc โดยสิ้นเชิง จึงทำให้ สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA-DNA ที่เกิดขึ้นไม่มีความเสถียรในสภาวะดังกล่าว

จากที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับ PNA1 และ PNA3 ที่เป็นระบบของ homothymine ที่ใช้สะพานเชื่อมแบบ (3*R*,4*S*)-APC นั้นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง PNA และ DNA ที่ได้จะมีความเสถียร จึงได้ทดลองต่อในระบบของ mix base sequence ซึ่งก็พบว่า เป็นเช่นเดียวกัน โดย PNA5 นั้นมีค่า T_m ลดลงเล็กน้อยเพียง $-1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (คิดเป็น 2.3%) เมื่อเทียบกับ acpcPNA ซึ่งน่าจะเป็นการยืนยันว่า acpc/acpcPNA ที่พัฒนาขึ้นนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น PNA Probe ในการตรวจวิเคราะห์ DNA ได้จริงในระบบดีเอ็นเอที่มีนิวคลีโอเบสธรรมชาติ

นอกจากการศึกษาความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นแล้ว ยังได้ศึกษา base pair specificity ของ acpcPNA และ acpc/acpcPNA อีกด้วย โดยได้นำ PNA1, PNA3 และ PNA5 ทดสอบการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอที่เป็น single mismatch (dA4TA4 สำหรับ PNA1, PNA3 และ dAGTGACCTAC สำหรับ PNA5) ด้วยเทคนิค UV-melting temperature ดังภาพที่ 3.20 พบว่าเมื่อมีลำดับเบสผิดไป 1 ตำแหน่ง (single mismatch) จะมีค่า T_m ลดลงถึง -14.5°C , -28.0°C และ -21.3°C ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความมี specificity ต่อ base pair ที่สูง



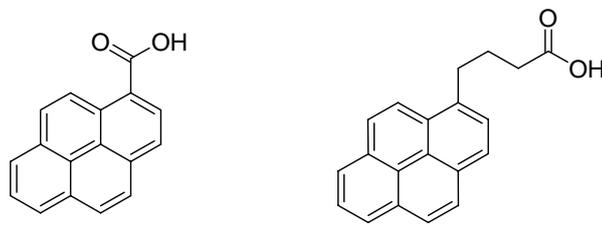
a)



b)

ภาพที่ 3.20 a) กราฟ Thermal denaturation และ b) First derivative plot ของสารประกอบเชิงซ้อนแบบ single-mismatched ระหว่าง PNA1+DNA2 (—), PNA3+DNA2 (····), PNA5+DNA4 (---) ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 100 mM NaCl, [PNA] = 1 μ M และ [DNA] = 1 μ M.

และเพื่อตรวจสอบการนำ acpc/apcPNA ไปใช้งานในการเป็น probe สำหรับตรวจวัดดีเอ็นเอ พีเอ็นเอ 3 ชนิดที่มีการต่อหมู่ pyrene หรือ อนุพันธ์ของ pyrene ได้แก่ PNA6, PNA7 และ PNA8 ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นต้นแบบในการศึกษา โดย pyrene ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ Pyrene-1-carboxylic acid (ใน PNA6 และ PNA7) และ 4-(pyrene-1-yl)-butyric acid (ใน PNA8) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3.21

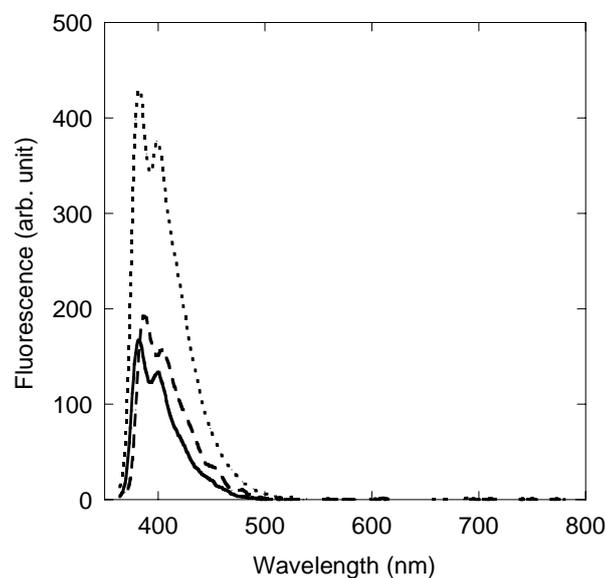


ภาพที่ 3.21 โครงสร้างของ Pyrene-1-carboxylic acid และ 4-(pyrene-1-yl)-butyric acid

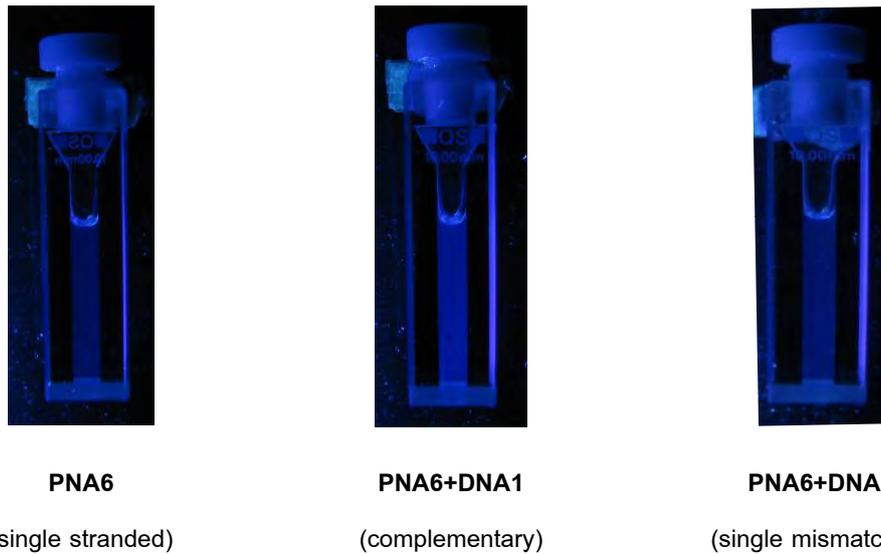
โดยคาดหวังว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ fluorescence ระหว่างรูปแบบ single-stranded PNA และ PNA-DNA duplex โดยมีสมมติฐานคือ เมื่ออยู่ในรูป single-stranded PNA หมู่ pyrene จะสามารถเกิดแรงยึดเหนี่ยวกับนิวคลีโอเบสบนพีเอ็นเอได้อย่างแข็งแรง ซึ่งส่งผลให้สัญญาณ fluorescence อ่อนลง แต่เมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอขึ้นผ่าน Watson-Crick base pairing หมู่ pyrene น่าจะเกิดแรงกระทำกับนิวคลีโอเบสเปลี่ยนไป และส่งผลให้สัญญาณในการเกิด fluorescence เปลี่ยนแปลงไปด้วย และควรจะสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน จากผลการวัด UV-melting temperature ตามตารางที่ 3.3 นั้นพบว่า สารประกอบเชิงซ้อนของ PNA6, PNA7 และ PNA8 มีค่า T_m ที่ลดลงเท่ากับ -10.3, -7.9 และ -6.5 $^{\circ}$ C ตามลำดับ

เมื่อเทียบกับ acpcPNA ทั้งนี้การที่ความเสถียรลดลงน่าจะมาจากความเกะกะ (steric effect) ของหมู่ pyrene นั้นเอง

สำหรับ PNA6 ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่เป็นชนิด homothymine ที่ติดหมู่ pyrene-1-carboxylic acid เข้าไปนั้น เมื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer ดังภาพที่ 3.22 พบว่า เมื่ออยู่ในรูป single-stranded PNA จะให้สัญญาณของ emission bands ที่ 382 และ 400 nm และเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ dA₉ (complementary DNA; DNA1) พบว่าสัญญาณที่ 382 nm มีความเข้มเพิ่มขึ้นประมาณ 2.6 เท่าเมื่อเทียบกับ single-stranded PNA และสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสง UV (ภาพที่ 3.23) ในขณะที่เมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ dA₄TA₉ (single mismatch DNA; DNA2) พบว่าสัญญาณ fluorescence มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีความเข้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ single-stranded PNA

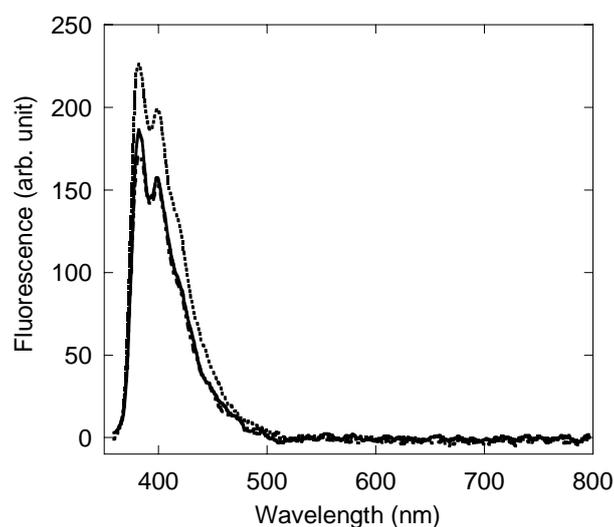


ภาพที่ 3.22 Fluorescence spectra ของ pyrene-labeled acpc/apcPNA PNA6 (—), PNA6 + complementary DNA (.....), PNA6 + single mismatch DNA (·-·-·) ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, [PNA] = 2.5 μ M และ [DNA] = 3.0 μ M, excitation wavelength = 345 nm.



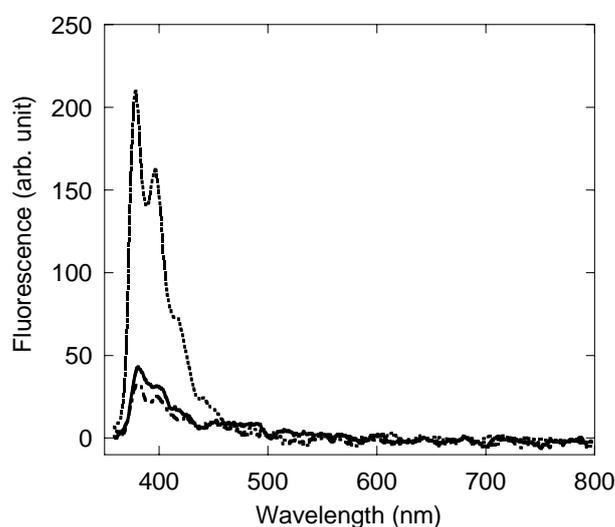
ภาพที่ 3.23 ภาพถ่ายของ pyrene-labeled PNA6 แบบ single-stranded PNA และแบบเกิดสารเชิงซ้อนกับ complementary DNA และ single mismatch DNA ภายใต้แสง UV (365 nm) ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, [PNA] = 2.5 μM และ [DNA] = 3.0 μM

สำหรับ PNA7 ที่เป็น mixed base sequence ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ fluorescence ในลักษณะเดียวกัน แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะมีค่าน้อย คือ ประมาณ 1.3 เท่า เมื่อเทียบระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับ dA_9 (PNA7+DNA3) กับ single-stranded PNA (PNA7) ส่วนสารประกอบเชิงซ้อนของ PNA7 กับ single mismatch DNA (PNA7+DNA4) นั้นจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงสัญญาณ fluorescence ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงที่สูงมากของพีเอ็นเอระบบนี้ ดังภาพที่ 3.24



ภาพที่ 3.24 Fluorescence spectra ของ pyrene-labeled acpc/apcPNA PNA7 (—), PNA7 + complementary DNA (.....), PNA7 + single mismatch DNA (· · · · ·) ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, [PNA] = 2.5 μM และ [DNA] = 3.0 μM , excitation wavelength = 340 nm.

การเปลี่ยนแปลงสัญญาณ fluorescence ที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งนั้นพบใน PNA8 ซึ่งเป็นพีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมือนกับ PNA7 แต่เปลี่ยนหมู่ fluorophore จาก pyrenecarbonyl ไปเป็น pyrenebutyryl คือมีการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมให้ยาวขึ้นจาก 1 อะตอม เป็น 4 อะตอม ซึ่งส่งผลให้หมู่ pyrene นั้นมีระยะห่างจากสายพีเอ็นเอเพิ่มขึ้น นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของสัญญาณ fluorescence ที่ 379 nm ประมาณ 4.8 ถึง 5 เท่าในสารประกอบเชิงซ้อนของพีเอ็นเอกับ complementary DNA (PNA8+DNA3) เทียบกับ single-stranded PNA (PNA8) และสารประกอบเชิงซ้อนของ PNA8 กับ single mismatch DNA (PNA8+DNA4) ดังภาพที่ 3.25 ความแตกต่างที่เพิ่มขึ้นมากนี้ น่าจะมาจากการที่หมู่ pyrenebutyryl สามารถเกิดแรงยึดเหนี่ยวกับนิวคลีโอเบสในพีเอ็นเอมากกว่าที่หมู่ pyrenecarbonyl เกิดแรงยึดเหนี่ยวกับนิวคลีโอเบสในพีเอ็นเอ ซึ่งพิจารณาได้จากสัญญาณ fluorescence ที่ค่อนข้างต่ำของ single-stranded PNA8 (ประมาณ 50 unit) เมื่อเทียบกับ single-stranded PNA7 (ประมาณ 180 unit) และหลังจากที่พีเอ็นเอทั้งสองเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วจะเห็นว่ามีความสัญญาณ fluorescence ที่ใกล้เคียงกัน (ประมาณ 220-230 unit)



ภาพที่ 3.25 Fluorescence spectra ของ pyrene-labeled acpc/apcPNA PNA8 (—), PNA8 + complementary DNA (.....), PNA8 + single mismatch DNA (· · · · ·) ทำการวัดที่ 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, [PNA] = 2.5 μ M และ [DNA] = 3.0 μ M, excitation wavelength = 340 nm.

การเพิ่มขึ้นของสัญญาณ fluorescence ในลักษณะที่เกิดกับ PNA8 นี้จะมีประโยชน์ในด้านการเป็น DNA probe ชนิดที่มี pyrene ติดอยู่เป็นอย่างมาก เนื่องจากโดยทั่วไปสัญญาณ fluorescence ของ pyrene นั้นมักจะลดลงเมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอ [42] เนื่องจากการซ้อนเหลื่อม (stacking) และแทรกตัวของหมู่ pyrene (intercalation) เข้าไปในชั้นของ base (base stack) ใน DNA duplex แต่ในระบบของ acpcPNA/DNA duplex กลับให้ผลตรงกันข้าม ซึ่งอาจเกิดจากการที่ pyrene ไม่สามารถ intercalate เข้าไประหว่างคู่เบสของ acpcPNA/DNA duplex ได้ การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงเมื่อเกิดเป็น duplex กับ DNA ทำให้ pyrenecarbonyl-acpc/apcPNA หรือ pyrenebutyryl-acpc/apcPNA สามารถทำหน้าที่เป็น quencher-free PNA beacons ได้ เพราะพีเอ็นเอระบบนี้ มีหมู่ fluorophore เพียงหมู่เดียว ไม่จำเป็นต้องมี quencher ก็สามารถแสดงสัญญาณที่แตกต่างระหว่าง single-stranded PNA กับ PNA·DNA duplex ได้ และเนื่องจากมีหมู่ fluorophore หมู่เดียวจึงทำ

ให้ง่ายต่อการสังเคราะห์มากกว่า probe ที่มีหมู่ fluorophore 2 หมู่ และยังทำให้ลดปัญหาเรื่องการละลายน้ำได้อีกด้วย ถึงแม้ว่าการเพิ่มขึ้นของสัญญาณ fluorescence จะไม่สูงมากนัก (ประมาณ 5 เท่า) เนื่องจากสัญญาณ background ที่สูงของ pyrene chromophore ใน single-stranded PNA แต่พีเอ็นเอระบบนี้ก็มีข้อดีในด้านความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นและความจำเพาะเจาะจงต่อเบสที่สูง ทำให้ acpc/apcPNA มีศักยภาพที่ดีในการนำไปใช้ในการตรวจวัดลำดับเบสในดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังต้องมีการศึกษาและพัฒนาอีกมาก ทั้งในด้านการเพิ่มความเสถียรให้เทียบเคียงกับระบบ acpcPNA การศึกษาชนิดของ fluorophore ผลกระทบของนิวคลีโอเบสข้างเคียงว่ามีผลต่อสัญญาณที่เกิดขึ้นอย่างไร เพื่อให้ได้ acpc/apcPNA ที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิคการตรวจสอบลำดับเบสบนดีเอ็นเอต่อไป

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสังเคราะห์พิโรลิดีนพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่มีสะพานเชื่อมเป็น 3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid (APC) ซึ่งพัฒนามาจากพิโรลิดีนพีเอ็นเอชนิด acpcPNA พีเอ็นเอชนิดใหม่นี้จะมีหมู่เอมีนทุติยภูมิอิสระที่สามารถปรับแต่งต่อไปได้ เช่นโดยการเติมฉลากเรืองแสง (fluorescence label) งานวิจัยส่วนแรกจะเป็นการพัฒนาการสังเคราะห์สะพานเชื่อม APC ซึ่งมีทั้งหมด 4 สเตอริโอไอโซเมอร์ ได้แก่ (3R,4S)-APC, (3R,4R)-APC, (3S,4S)-APC และ (3S,4R)-APC โดยการดัดแปลงวิธีจากเอกสารอ้างอิง จากผลการทดลองสามารถสังเคราะห์ *trans*-isomer ของ APC ได้แก่ (3R,4S)-APC ในรูป N^3 -Fmoc/ N^1 -Boc (3a) และ N^3 -Fmoc/ N^1 -Tfa (4a) และ (3S,4R)-APC ในรูป N^3 -Fmoc/ N^1 -Boc (3b) ได้สำเร็จโดยได้ผลผลิตร้อยละ 9.8, 9.8 และ 7.4 ตามลำดับเมื่อเริ่มจากสารมัธยันต์ ethyl 1-*tert*-butoxycarbonyl-4-oxopyrrolidine-3-carboxylate (5) ส่วน *cis*-isomer คือ (3R,4R)-APC และ (3S,4S)-APC ไม่ได้ศึกษาต่อในงานวิจัยนี้ เนื่องจากการสังเคราะห์ทำได้ยาก ประกอบกับผลการศึกษาพบว่า (3R,4S)-APC ได้ให้ผลการทดลองที่บรรลุวัตถุประสงค์ของการทดลองแล้ว จึงเน้นการศึกษาเชิงลึกกับเฉพาะสะพานเชื่อมตัวนี้เท่านั้น หลังจากนั้น จึงนำสะพานเชื่อมที่ได้ร่วมกับพิโรลิดีนมอนอเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ A monomer (1a), T monomer (1b), C monomer (1c) และ G monomer (1d) ไปสังเคราะห์เป็น acpcPNA หรือ acpc/apcPNA โดยใช้วิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง โดยได้ออกแบบ acpc/apcPNA ทั้งหมด 8 ชนิด ที่มีการแทนที่ส่วนของสะพานเชื่อม (1S,2S)-ACPC ด้วย (3R,4S)-APC (3a) หรือ (3S,4R)-APC (3b) ใน acpcPNA ทั้งหมดหรือเพียงบางส่วน โดยในกรณีของพีเอ็นเอที่จะต่อหมู่ฟลูออเรสเซนต์นั้นจะแทนที่ด้วยสะพานเชื่อมชนิด (3R,4S)-APC (4a) ที่มีหมู่ปกป้องอะมิโนเป็น Tfa (N^1 -Tfa) ซึ่งสามารถปลดหมู่ Tfa ออกและต่อหมู่ฟลูออเรสเซนต์บนสายพีเอ็นเอที่ยังอยู่บนวัฏภาคของแข็งได้ จากนั้นจึงปลดสายพีเอ็นเอออกจากวัฏภาคของแข็งและนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค HPLC และพิสูจน์เอกลักษณ์โดย MALDI-TOF Mass Spectrometry

งานวิจัยในส่วนที่สองเป็นการศึกษาสมบัติการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกของพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้น โดยจะใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ เทคนิค UV melting temperature (T_m), UV-titration, circular dichroism (CD) spectroscopy และ fluorescence spectrophotometry จากผลการทดลองระบุได้ว่าสะพานเชื่อมชนิด (3R,4S)-APC สามารถแทนที่สะพานเชื่อมชนิด (1S,2S)-ACPC ใน acpcPNA ได้โดยมีผลทำให้ความแข็งแรงของการจับยึดกับกรดนิวคลีอิกลดลงเล็กน้อย โดยการแทนที่ทั้งหมด จะทำให้ค่า T_m ลดลงมากที่สุด ในขณะที่การแทนที่เพียงตำแหน่งเดียว (acpc/apcPNA) จะทำให้ค่า T_m ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปลง และยังคงความจำเพาะเจาะจงกับการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ โดยการวัดค่า T_m กับ single mismatch DNA พบว่ามีค่า $\Delta T_m = -14.5^\circ\text{C}$, -28.0°C และ -21.3°C ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพีเอ็นเอระบบนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเบสสูง ส่วน acpc/apcPNA ที่มีสะพานเชื่อมชนิด (3S,4R)-APC แทนที่สะพานเชื่อมชนิด (1S,2S)-ACPC นั้นจะมีความแข็งแรงของการจับยึดกับดีเอ็นเอที่ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับ acpcPNA ที่ไม่ได้ดัดแปลง

นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการติดฉลากเรืองแสงลงบน acpc/apcPNA เพื่อศึกษาความสามารถในการทำหน้าที่เป็น probe ที่สามารถเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงได้เมื่อจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยพบว่าเมื่อทำการติดฉลากด้วย pyrenecarbonyl (Py) บน acpc/apcPNA จะสามารถวัดค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เปลี่ยนแปลงได้หลังการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอคู่สม โดยมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 1.3-2.6 เท่า เมื่อเทียบกับ single-stranded PNA ในขณะที่การติดฉลากด้วย pyrenebutyryl (PyBu) จะทำให้ค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้นประมาณ 4.8-5.0 เท่า เมื่อเทียบกับ single-stranded PNA ซึ่งแสดงให้เห็นว่า acpc/apcPNA ที่ติดฉลากด้วย pyrene สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของ single-stranded PNA กับ PNA·DNA hybrid ได้และน่าจะมีศักยภาพนำไปพัฒนาเป็นตัวตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไปในอนาคต โดยต้องมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมในด้านการเพิ่มความเสถียรให้เทียบเคียงกับระบบ acpcPNA ศึกษาชนิดของหมู่ฟลูออเรสเซนส์ที่ใช้ รวมทั้งผลกระทบของลำดับเบสที่มีต่อความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] Uhlmann, E.; Peyman, A. Antisense ODNs: A New Therapeutic Principle. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 544-584.
- [2] Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500.
- [3] Brown, S. C.; Thomson, S. A.; Veal, J. M.; Davis, D. G. NMR Solution Structure of a Peptide Nucleic Acid Complexed with RNA. *Science* **1994**, *265*, 777-780.
- [4] Erikson, M.; Nielsen, P. E. Solution Structure of a Peptide Nucleic acid-DNA Duplex. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3410-3413.
- [5] Rasmussen, H.; Kastrop, J. S.; Nielsen, J. N.; Nielsen, J. M.; Nielsen, P. E. Crystal Structure of a Peptide Nucleic Acid (PNA) duplex at 1.7Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 98-101.
- [6] Betts, L.; Josey, J. A.; Veal, J. M.; Jordan, S. R. A Nucleic Acid Triple Helix Formed by a Peptide Nucleic Acid-DNA Complex. *Science* **1995**, *270*, 1838-1841.
- [7] Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. PNA Hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [8] Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Buchardt, O., Evidence for (PNA)₂/DNA triplex structure upon binding of PNA to dsDNA by strand displacement. *J. Mol. Recog.* **1994**, *7*, 165-170.
- [9] Uhlmann, E.; Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D. W., PNA: synthetic polyamide nucleic acids with unusual binding properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823.
- [10] Norden, B.; Ray, A. Peptide Nucleic Acid (PNA): Its Medical and Biotechnical Applications and Promise for the Future. *The FASEB Journal* **2000**, *14*, 1041-1059.
- [11] Mologni, L.; leCoutre, P., Nielsen, P. E.; Gambacorti-Passerini, C., Additive antisense effects of different PNAs on the *in vitro* translation of the PML/RAR α gene. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1934-1938.
- [12] Winssinger, N. *et al.* From split-pool libraries to spatially addressable microarrays and its application to functional proteomic profiling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3152-3155.
- [13] B. Falkiewicz, Peptide nucleic acids and their structural modifications. *Acta Biochimica Polonica*, 1999, **46**, 509.
- [14] Komiyama, M.; Ye, S.; Liang, X.; Yamamoto, Y.; Tomita, T.; Zhou, J; Aburatani, H. PNA for one-base differentiating protection of DNA from nuclease and its use for SNPs detection. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3758-3762.

- [15] Hyrup, B.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E., A flexible and positively charged PNA analogue with an ethylene-linker to the nucleobase: Synthesis and hybridization properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1083-1088.
- [16] Krotz, A. H.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E., Synthesis of 'retro-inverso' peptide nucleic acids: 2. Oligomerization and stability. *Tet. Lett.* **1995**, *36*, 6941-6944.
- [17] Haaima, G.; Lohse, A.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E., P. Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: Hybridization and solubility properties of D-lysine PNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1939-1942.
- [18] Worthington, R. J.; O'Rourke, A. P.; Morral, J.; Samuel Tan, T. H.; Micklefield, J., Mixed-sequence pyrrolidine-amide oligonucleotide mimics: Boc(Z) synthesis and DNA/RNA binding properties. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 249-259.
- [19] Govindaraju, T.; Kumar, V. A., Backbone Extended Pyrrolidine Peptide Nucleic Acids (*bep*PNA): Design, Synthesis and DNA/RNA binding Studies. *Chem. Commun.* **2002**, 1-2.
- [20] Püschi, A.; Tedeschi, T.; Nielsen, P. E., Pyrrolidine PNA: A Novel Conformationally Restricted PNA Analogue. *Org. Lett.* **2000**, *2*(26), 4161-4163.
- [21] Lagriffoule, P.; Wittung, P.; Eriksson, M.; Jensen, K. K.; Norden, B.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E., Peptide nucleic acids with a conformationally constrained chiral cyclohexyl-derived backbone. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 912-919.
- [22] Govindaraju, T.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. (*SR/RS*)-Cyclohexanyl PNAs: Conformationally Preorganized PNA Analogs with Unprecedented Preference for Duplex Formation with RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4144-4145.
- [23] Pokorski, J. K.; Witschi, M. A.; Purnell, B. L.; Appella, D. H. (*S,S*)-*trans*-Cyclopentane-Constrained Peptide Nucleic Acids. A General Backbone Modification that Improves Binding Affinity and Sequence Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15067-15073.
- [24] Englund, E. A.; Xu, Q.; Witschi, M. A.; Appella, D. H. PNA·DNA Duplexes, Triplexes, and Quadruplexes Are Stabilized with *trans*-Cyclopentane Units. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16456-16457.
- [25] Pokorski, J. K.; Myers, M. C.; Appella, D. H., Cyclopropane PNA: observable triplex melting in a PNA constrained with a 3-membered ring. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*(6), 915-917.
- [26] Vilaivan, T.; Khongdeesameor, C.; Harnyuttanakorn, P.; Westwell, M. S.; Lowe, G. Synthesis and Properties of Chiral Peptide Nucleic Acids with a *N*-Aminoethyl-D-proline Backbone. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2541-2545.

- [27] Püschi, A.; Boesen, T.; Zuccarello, G.; Dahl, O.; Pitsch, S.; Nielsen, P. E., Synthesis of Pyrrolidinone PNA: A Novel Conformationally Restricted PNA Analogue. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 707-712.
- [28] D'Costa, M.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N., Synthesis of 4(S)-(N-Boc-amino)-2-(S/R)-(thymine-1-ylmethyl)-pyrrolidine-N-1-acetic acid: a novel cyclic PNA with constrained flexibility. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 883-886.
- [29] Altmann, K. H.; Husken, D.; Cuenoud, B.; Garcia-Echeverria, C., Synthesis and Hybridization Properties of Polyamide Based Nucleic Acid Analogues Incorporating Pyrrolidine-derived Nucleoamino Acids. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 929-933.
- [30] Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G., Synthesis and properties of novel pyrrolidinyl PNA carrying β -amino acid spacers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533-5536.
- [31] Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Duanglaor, P.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Nucleic Acid Binding Studies of Novel Pyrrolidinyl PNA Carrying an N-amino-N-methylglycine Spacer. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1663-1666.
- [32] Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. Synthesis and Oligodeoxy nucleotide Binding Properties of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids Bearing Prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic Acid (ACPC) Backbones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833-2837.
- [33] Gellman, S.H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180.
- [34] Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H., β -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of β -Amino Acid Oligomers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 13071-13072.
- [35] Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Synthesis and Structural Characterization of Helix-Forming β -Peptides: *trans*-2-Aminocyclopentane carboxylic Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574-7581.
- [36] Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. Hybridization of Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acids and DNA: Selectivity, Base-Pairing Specificity and Direction of Binding. *Org. Lett.* **2006**, *8*(9), 1879-1900.
- [37] Blake, J.; Willson, C. D.; Rapoport, H. 3-Pyrrolidinones by intramolecular condensation. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5293-5299.
- [38] Lee, H. S.; LePlae, P. R.; Porter, E. A.; Gellman, S. H. An efficient route to either enantiomer of orthogonally protected *trans*-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 3597-3599.
- [39] Rapoport, H.; Willson, D. C., The preparation and properties of some methoxy pyrroles *J. Org. Chem.*, **1961**, *84*, 630-635.

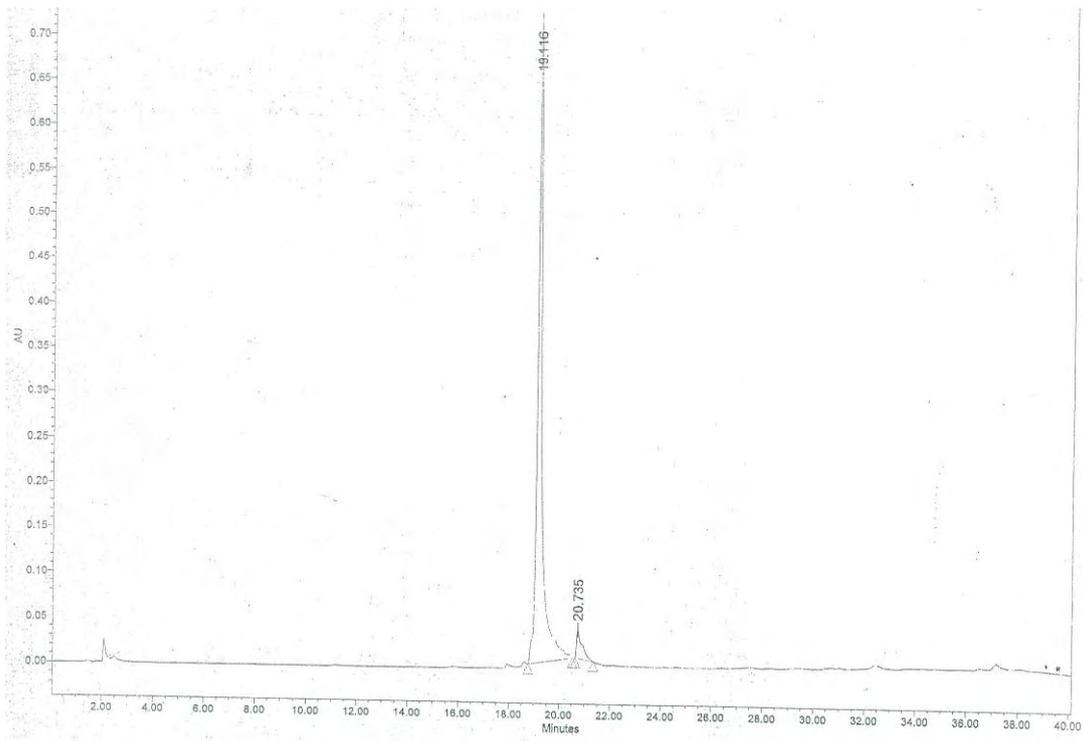
- [40] Kim, S. G.; Lee, S. G.; Park, T. H., Novel stereoselective synthesis of all four diastereomers of 3a-methyl-pyrrolo [3,4-c]piperidine form glycine ethyl ester *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 5023-5026.
- [41] ค่า pKa ของ pyrrolidine nitrogen atom of *N*-Boc-(3*S*,4*R*)-3-aminopyrrolidine-4-carboxylic acid ethyl ester [955138-41-7] คำนวณจาก SciFinder database, เข้าถึงเมื่อวันที่ 7 เมษายน 2554
- [42] Seidel, C.A.; Schulz, A.; Sauer, M.H.M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541–5553.

ภาคผนวก

ตารางที่ S1 รายชื่อพีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้และดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้

Code	Sequences	Figure label	
		HPLC	MS
PNA1	Bz-T ₉ -LysNH ₂	S1a	S1b
PNA2	Bz-T ₉ -LysNH	S2a	S2b
PNA3	Bz-T ₄ <u>I</u> T ₄ -LysNH ₂	S3a	S3b
PNA4	Bz-T ₄ <u>II</u> T ₄ -LysNH ₂	S4a	S4b
PNA5	Bz-GTAGA <u>I</u> CAC T-LysNH ₂	S5a	S5b
PNA6	Ac-T ₄ (Py) <u>I</u> T ₄ -LysNH ₂	S6a	S6b
PNA7	Ac-GTAGA(Py) <u>I</u> CACT-LysNH ₂	S7a	S7b
PNA8	Bz-GTAGA(PyBu) <u>I</u> CACT-LysNH ₂	S8a	S8b
DNA1	dA ₉	-	-
DNA2	dA ₄ TA ₄	-	-
DNA3	dAGTGATCTAC	-	-
DNA4	dAGTGACCTAC	-	-

สำหรับ PNA: T = ssACPC-T; I = (3R,4S)-APC-T; II = (3S,4R)-APC-T; (Py) = pyrene-1-carbonyl modification; (PyBu) = 4-(pyrene-1-yl)butyryl modification



ภาพที่ S1 a) HPLC โครมาโตแกรมของ PNA1

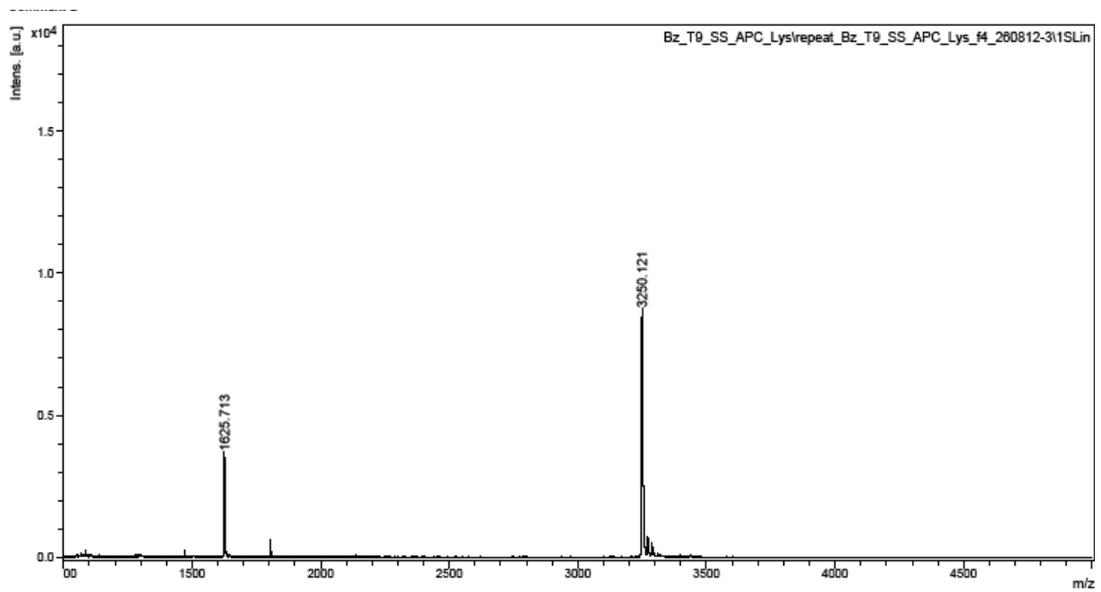


Figure S1 b) MALDI-TOF MS ของ PNA1

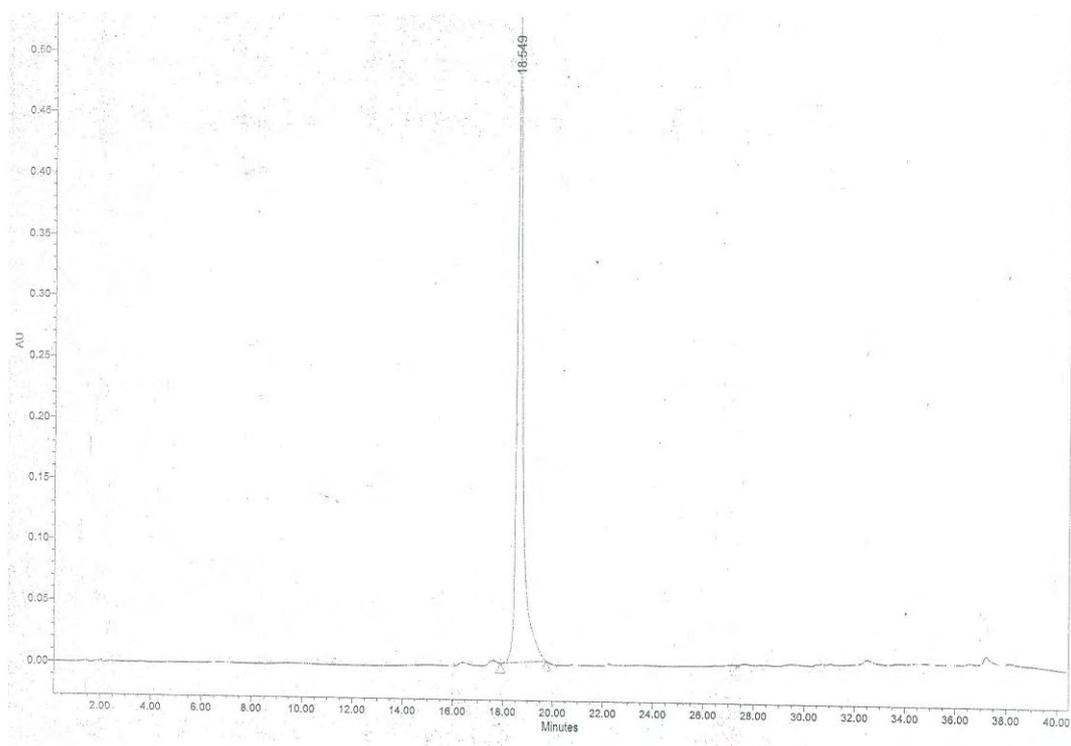


Figure S2 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA2

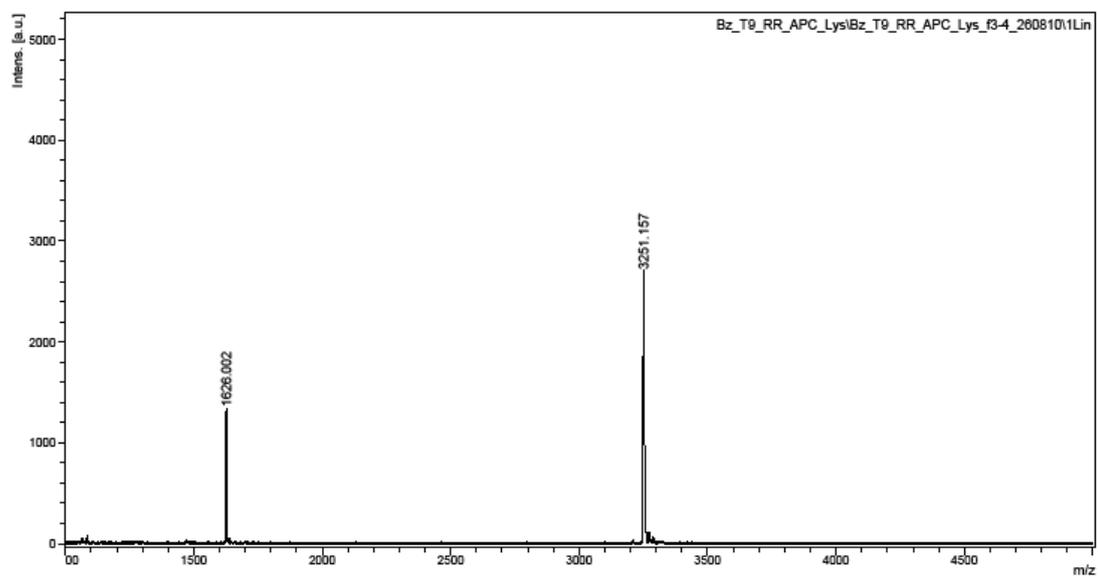


Figure S2 b) MALDI-TOF MS ของ PNA2

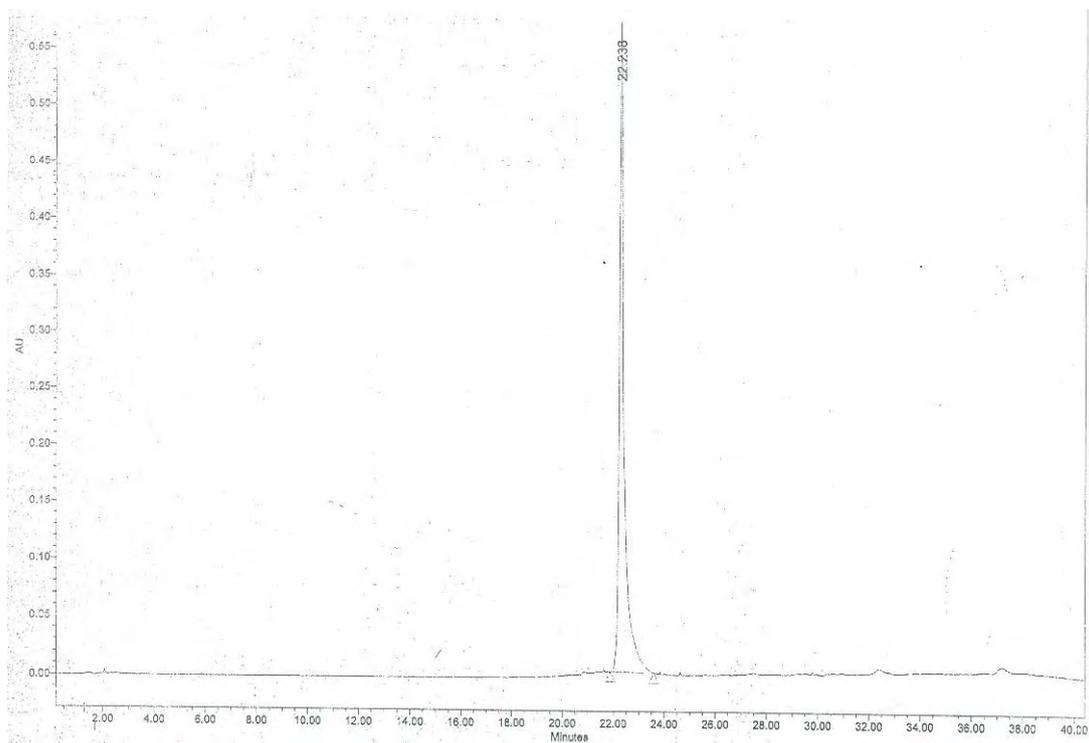


Figure S3 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA3

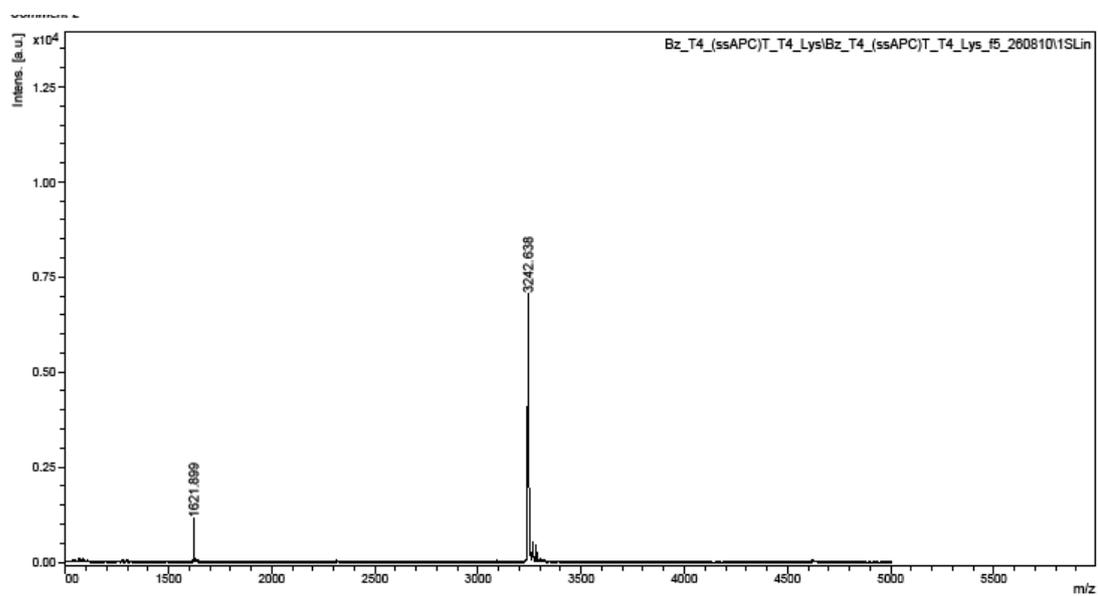


Figure S3 b) MALDI-TOF MS ของ PNA3

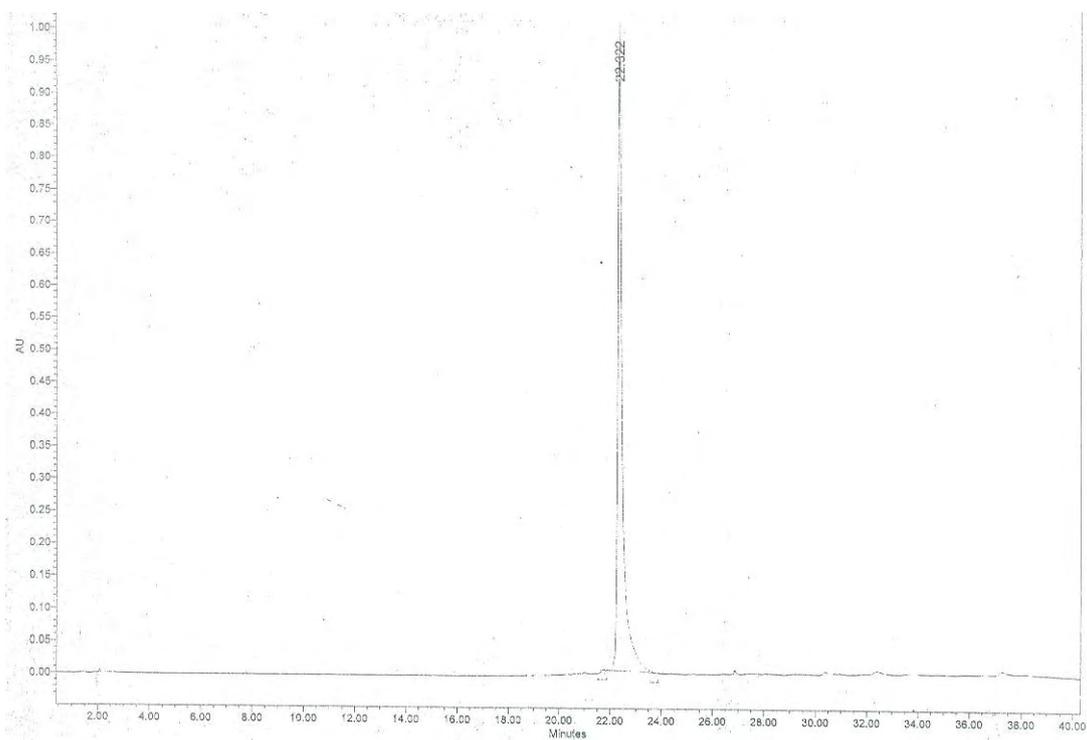


Figure S4 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA4

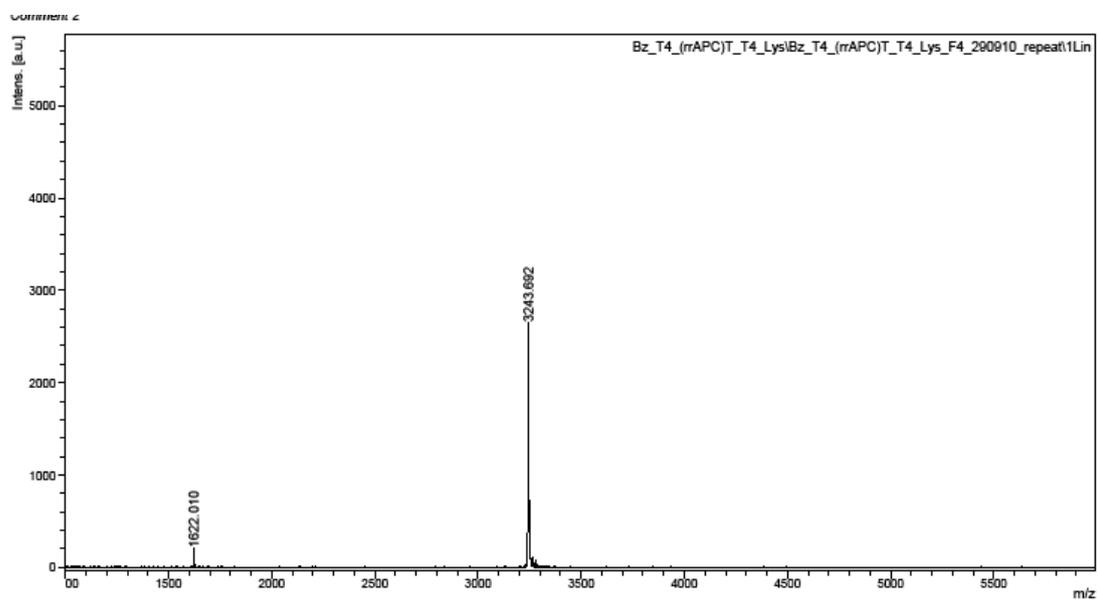


Figure S4 b) MALDI-TOF MS ของ PNA4

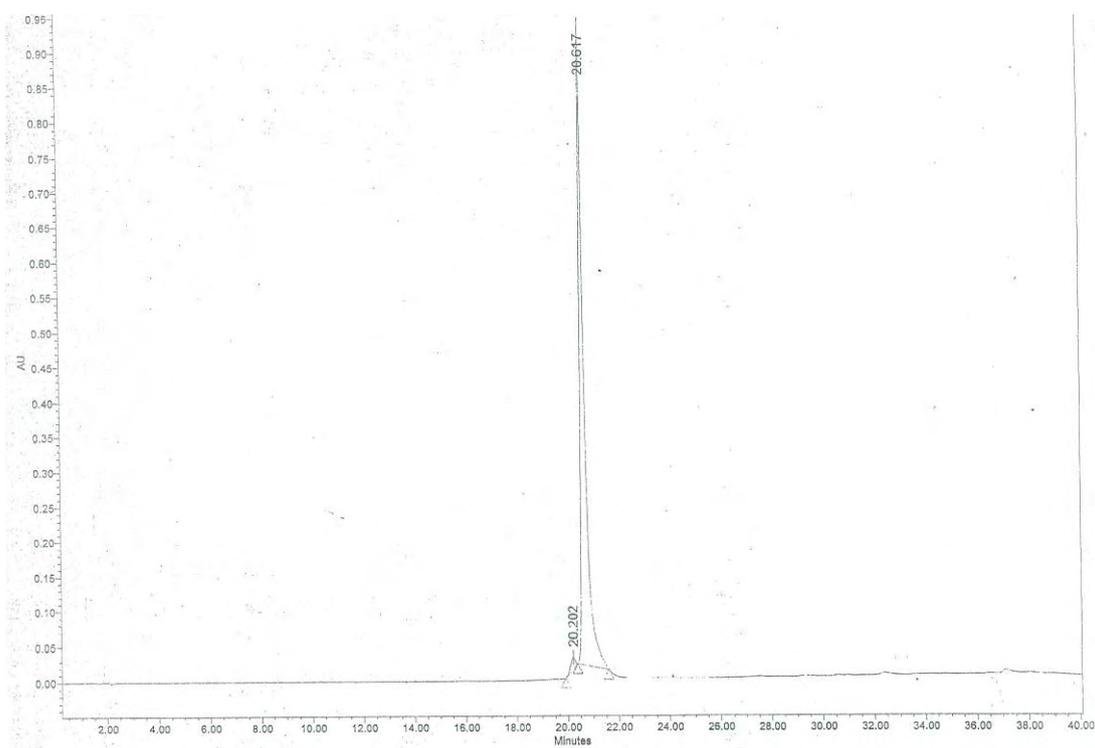


Figure S5 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA5

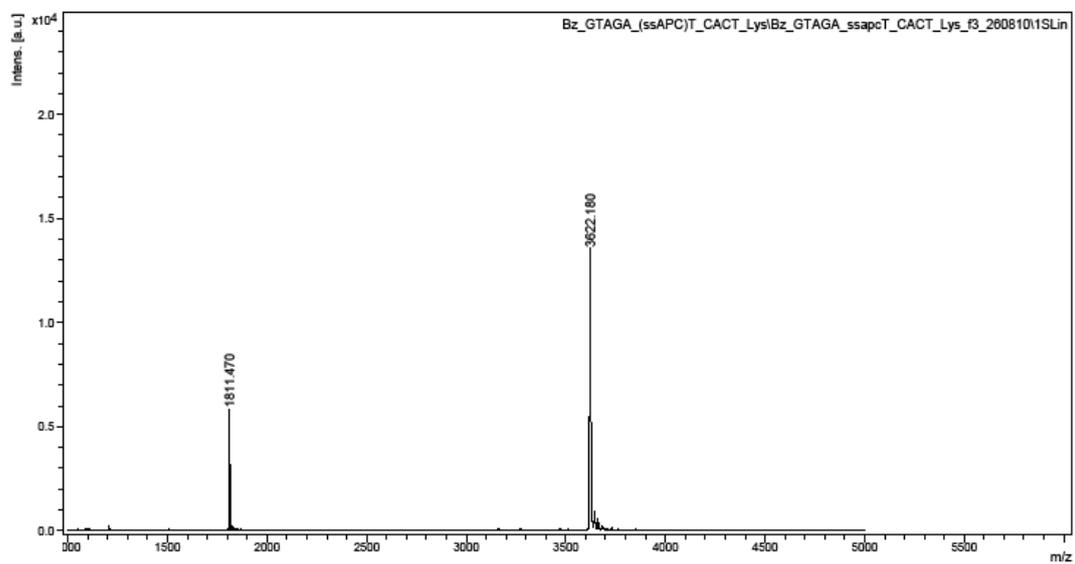


Figure S5 b) MALDI-TOF MS ของ PNA5

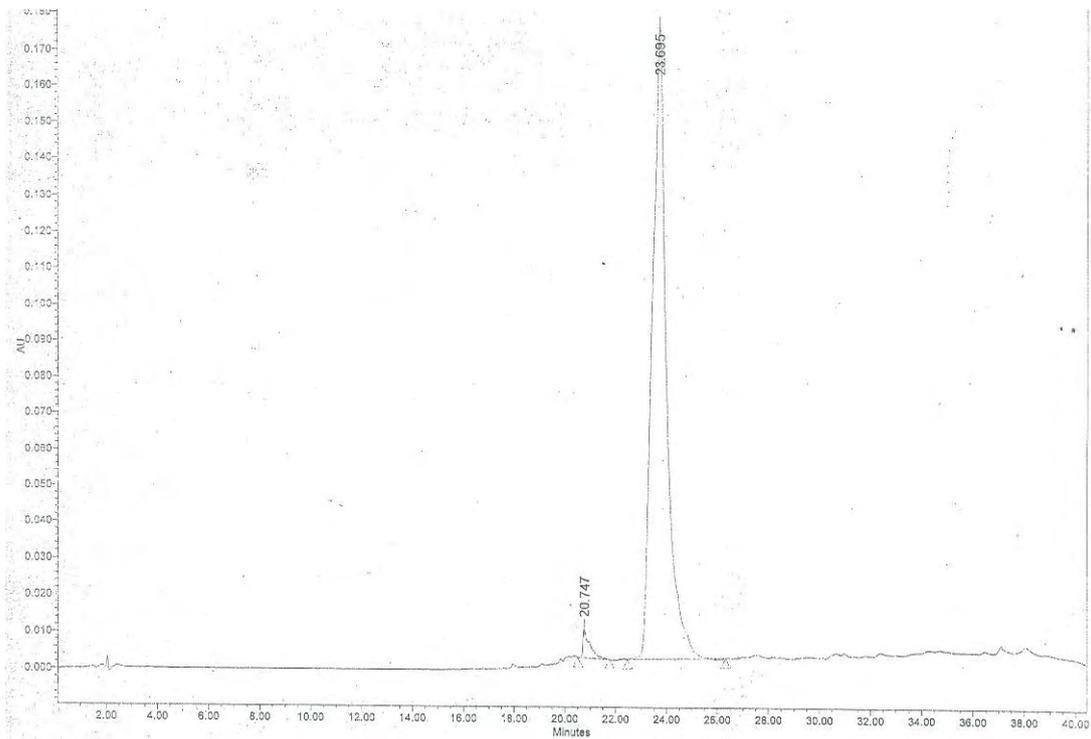


Figure S6 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA6

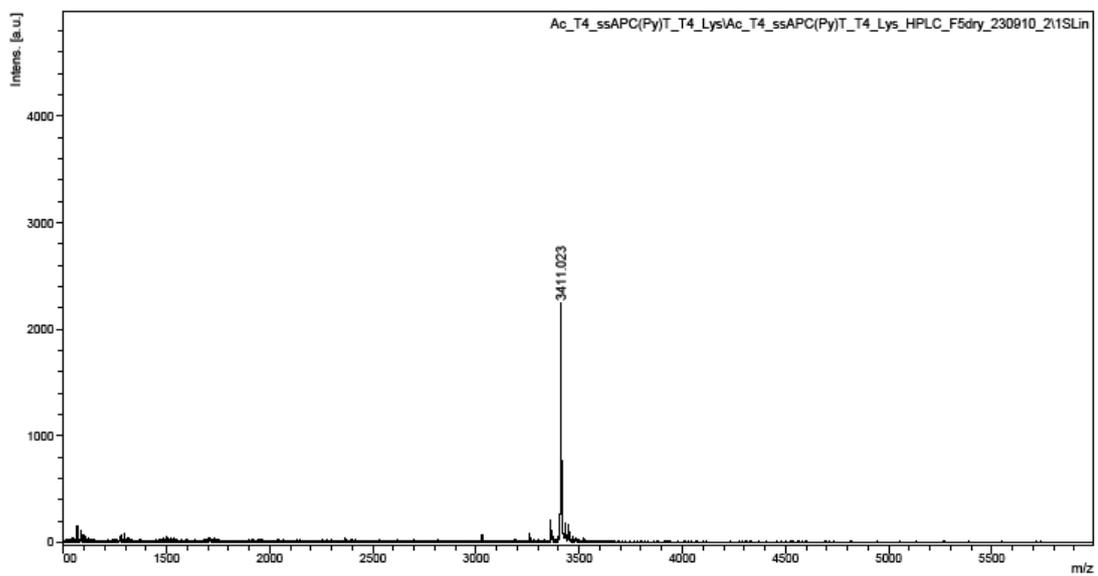


Figure S6 b) MALDI-TOF MS ของ PNA6

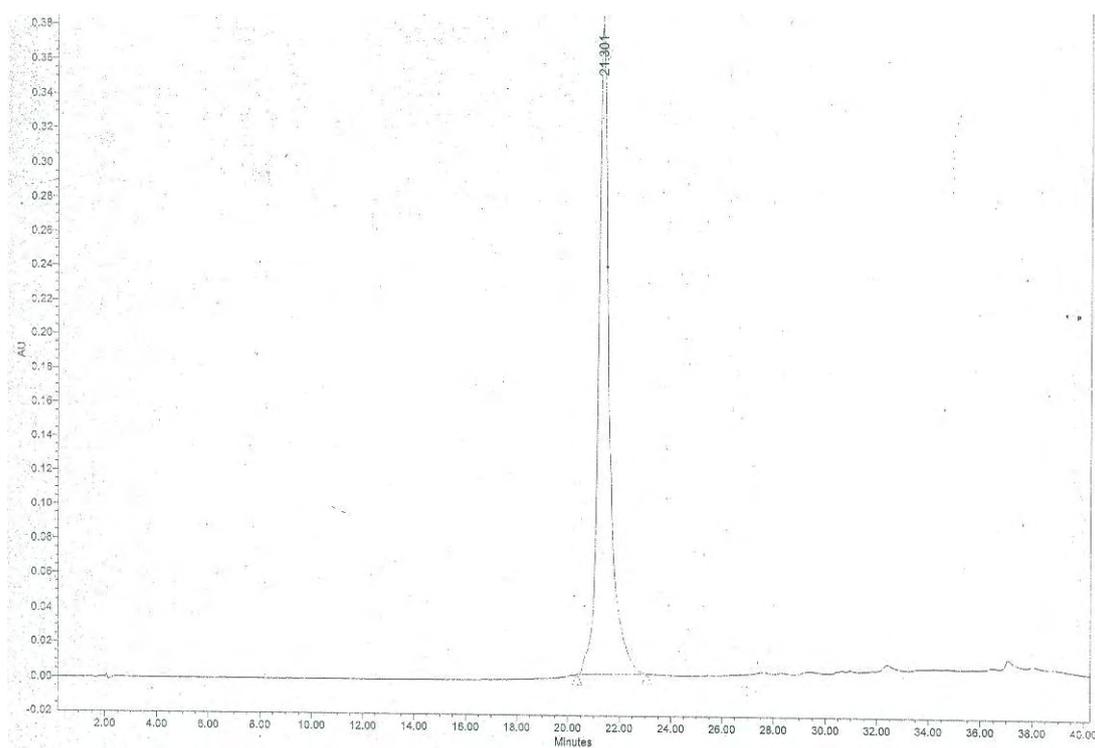


Figure S7 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA7

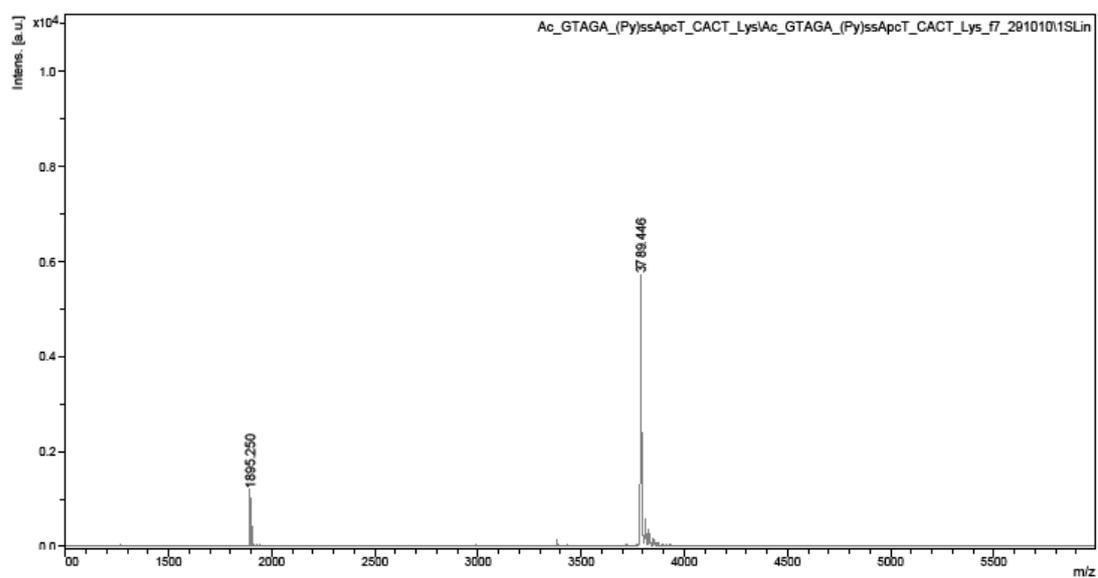


Figure S7 b) MALDI-TOF MS ของ PNA7

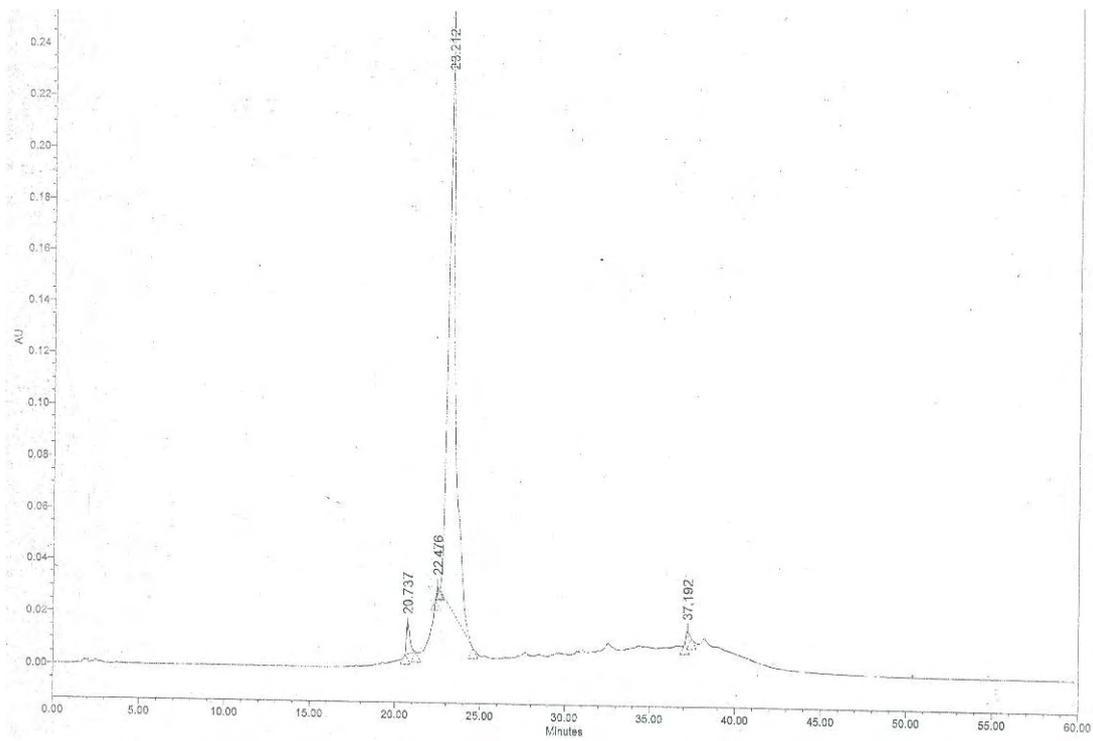


Figure S8 a) HPLC โครมาโตแกรม ของ PNA8

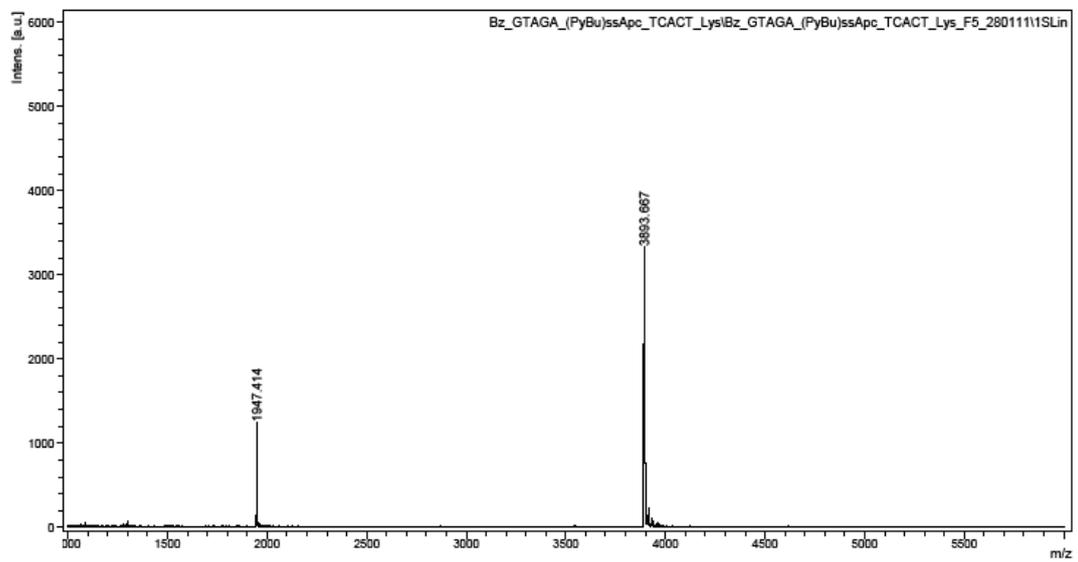


Figure S8 b) MALDI-TOF MS ของ PNA8