

國立臺灣大學理學院所化學研究所

碩士論文

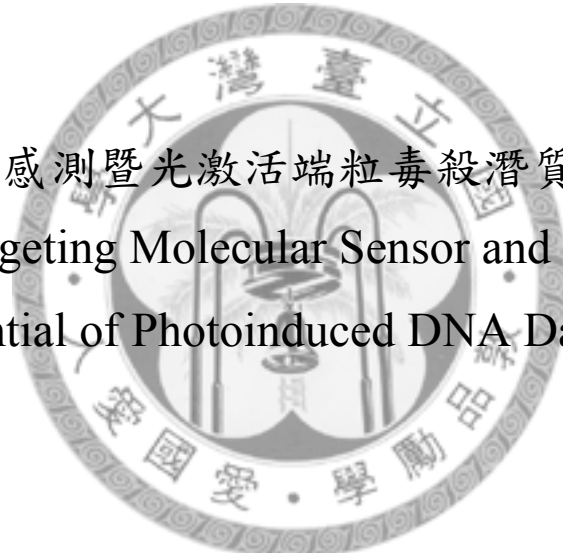
Department of Chemistry

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

腫瘤尋標感測暨光激活端粒毒殺潛質分子開發
Tumor Targeting Molecular Sensor and Therapeutic
Potential of Photoinduced DNA Damage



葉暘皓

Visgola Yang-Hao Yeh

指導教授：陳昭岑博士

Advisor: Chao-Tsen Chen, Ph.D.

中華民國 98 年 10 月

October, 2009



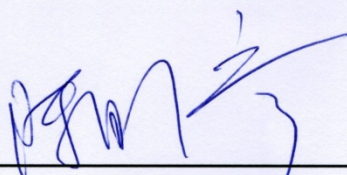
國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

腫瘤尋標感測暨光激活端粒毒殺潛質分子開發

Tumor Targeting Molecular Sensor and Therapeutic
Potential of Photoinduced DNA Damage

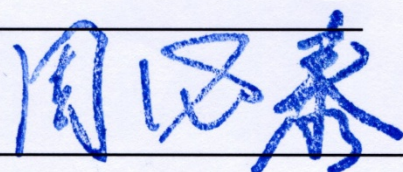
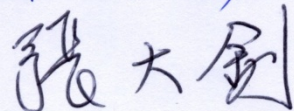
本論文係 葉暘皓 君 (R96223121) 在國立臺灣大學化學所完成之碩士學位論文，於民國 98 年 10 月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

口試委員：



(簽名)

(指導教授)



系主任、所長

(簽名)



謝誌

首要感謝指導老師陳昭岑博士在這兩年的指導，以及實驗上所需求的藥品儀器都不虞匱乏。兩年之間雖然我轉換了幾個題目，過程之中，老師也讓我在實驗室裡盡情的使用軟硬體來發揮我所設計的實驗。當然，實驗若無法在實驗室當中完成，老師也會讓我到各地的實驗室中進行學習，很感謝老師對我的信任與磨練。再者，十分感謝醫工所謝銘鈞醫師，在過去兩年多的時間讓我有機會參與會議，學習許多生醫的訊息並且受阿良學長與思翰學長的動物實驗技術栽培。在會議上也受到婁培人醫師、賴秉杉老師、林峰輝老師以及林文澧老師的指教，很感謝老師們的建議，讓我在生醫的領域能夠認識的更深入。

特別感謝陳昭岑老師與口試委員張大釗老師與賴秉杉老師在百忙中，抽空在周末來參加我的口試評審，精闢的批改我的論文，很感謝各位老師的幫忙，使我的論文得以更加完備。

在實驗室中，也感謝實驗室的夥伴們在實驗上的討論以及協助，學長姐佑忠、喻偵、明仁、肇哲、俊晏、易勳、維民、承翰、孟學，學弟妹建漢、書瑋、宗豪、蒼淳、皇羽、君威、子樵、怡文、治齊，以及重要的同學們皓晴、淑蘭、柔靚。在鄰近的實驗室鄰居們也都與我時常的往來，不論在學術上或生活上都有相當大的參與，由於人數眾多不及備載，在此也對他們表示謝意。

在我所參與謝醫師的實驗室裡，與學長姐阿良、明峰、淑娟及金陵常有實驗上及生活上的討論，獲益良多。同學們國盛、鯉源、皓名、彥安、永欣、享佑也都幫過我解決實驗上面臨的困擾，學弟小蔡以及睿彬貼心的會議通知也讓我不錯過精彩的會議內容，相當的感謝。

此外，在實驗中的電泳技術是在嘉義大學鄭建中老師的親自指導之下所習得，十分感謝老師能夠八八節前抽空解說並演示完整的實驗，並且不吝指教透過電子

郵件傳遞的投影片及實驗上的安排，都使得門外漢的我能夠獲得可信的電泳實驗結果。在嘉義大學的那天適逢莫拉克颱風的侵襲，在嘉義市區風雨交加，格外感受到鄭老師實驗室的學弟妹們俊霖、千慧、郁儒、施姍、宛珊、宛貞、喬林、俞汶熱情的招待，相當窩心。

在實驗上，需要使用張大釗老師實驗室的儀器，也多向學長們請教，並且多次的麻煩鼎元學長幫我配置 DNA，並且學長也在深夜探視實驗的進度，並提供協助，受學長的照顧，相當的感心。相同地，為了瞭解深入的 TRAP-G4 的實驗，老師也安排我到陽明大學林敬哲老師實驗室向黃豐淳學長求教，學長也厚費唇舌一一解釋我所未接觸的 PCR 實驗細節，獲益良多。在 ITC 的實驗上，則是麻煩陳錦地老師實驗室的吳旻霏學姊學習並考取執照，再將實驗細節對我一一傳授，雖然實驗的設計上具有先天的瑕疵，但是學姊一樣認真的將所有的實驗完成，相當的感謝學姊的用心。並且在質譜的送樣上，除了勞請陳昭岑老師幫我傳遞樣品至陳錦地老師實驗室之外，也是由學姐來幫忙登記送測並與技術員討論，再次感謝學姐對我的厚愛。

最後，這兩年來的研究論文將獻給支持我的家人們與準家人們，一路上家人們的支持與鼓勵讓我撐過一次次的關卡。最重要的當然是我的未婚妻維娟，直至今年我 24 歲，她幾乎參與我一半的人生，在我的背後給我最大的能量協助我完成許許多多的事情，也分享在研究中的喜怒哀樂。此時，我將離開這個充滿無限回憶的實驗室，帶得走的是在腦中的珍貴知識與手上的技術，帶不走的則是太重的 NMR-800 以及很冰的新冰箱，我打算將他們留下，讓學弟妹還能夠好好的享用實驗室的豐富資源，也祝福學長姐與同儕在日後見面時，還能洋溢著有機溶劑薰陶的微醺笑容。

目錄

目錄	i
圖目錄	III
表目錄	VII
中文摘要	VIII
Abstract.....	X
第一章 簡介	1
前言	1
1.1 淺談腫瘤標的與標靶藥物設計	1
1.2 重要的廣現性腫瘤標的：端粒與端粒酶	3
1.2.1 染色體複製機制與端粒及端粒酶作用	3
1.2.2 維持端粒的穩定：屏蔽蛋白群 (Shelterins)	7
1.2.3 與眾不同的結構標的：端粒的鳥嘌呤四股結構的多樣性	8
1.3 潛在抑制端粒酶與抑癌化合物	12
1.3.1 具顯影及抑癌作用的呋唑衍生物 BMVC	17
1.4 癌症化學治療與光化學	20
1.4.1 光動力治療 (Photodynamic Therapy)	22
1.4.2 [2+2] 環化加成 (Cycloaddition)	23
1.4.3 染色體內質性光化學傷害 (Intrinsic Photodamage)	26
第二章 TMPC 與 MTMPC 設計動機與合成	34
前言	34
2.1 DNA 傷害分子及端粒標的分子設計	34
2.2 目標分子 TMPC 與 MTMPC 設計與合成	37
2.2.1 預期目標與設計基礎	38

2.2.2	逆合成分析與實驗合成路徑選擇.....	40
2.2.3	目標化合物 TMPC 及 MTMPC 的合成.....	42
第三章	結果與討論.....	48
3.1	TMPC 與 MTMPC 的光物理表現與 DNA 作用後的吸收及螢光結果....	48
3.2	TMPC 與 MTMPC 與 DNA 膠體電泳.....	53
3.3	TMPC 與 MTMPC 對 Hum24 的辨識結合能力.....	60
3.4	TMPC 與 MTMPC 對端粒酶的抑制能力.....	63
3.5	TMPC 與 MTMPC 與端粒片段的光產物.....	66
第四章	總結.....	75
實驗部分	77
一、	一般敘述.....	77
二、	實驗步驟及光譜數據.....	79
參考文獻	88



圖目錄

圖 1.1	含有葉酸的近紅外光顯影分子。.....	1
圖 1.2	含葉酸的標靶顯影劑在老鼠活體顯影攝相。.....	2
圖 1.3	人類染色體末端的端粒示意圖。.....	3
圖 1.4	DNA 複製機制與端粒尾融合。.....	4
圖 1.5	端粒隨體細胞分裂縮短造成的生物現象與細胞凋亡態示意圖。.....	5
圖 1.6	端粒酶延長端粒的作用機制。.....	5
圖 1.7	生殖細胞的端粒與生命週期。.....	6
表 1.2	臨床腫瘤組織的端粒酶活性。.....	6
圖 1.8	端粒二級結構-端粒迴圈。.....	7
圖 1.9	屏蔽蛋白群與端粒酶辨識與端粒修補與片段化可能機制。.....	8
圖 1.10	DNA 的三股與四股平面結構與鳥嘌呤四方結構。.....	9
圖 1.11	近年解出的端粒片段 Hum22 溶液態結構。.....	9
圖 1.12	利用溴取代代鳥嘌呤四方結構示意圖。.....	11
圖 1.13	Hum22 鉀離子溶液態結構及其對應的旋光光譜。.....	12
圖 1.14	以鳥嘌呤四方結構抑制端粒酶的機制。.....	13
圖 1.15	端粒的動態結構實驗。.....	13
圖 1.16	文獻中常見的鳥嘌呤四股結構配體。.....	14
圖 1.17	Acridine 衍生物— BSU6039 與鳥嘌呤四方結構進行堆疊的示意圖。..	15
圖 1.18	分子模擬計算出可信的長序列四股結構。.....	16
圖 1.19	BRACO-19 與連續堆疊的端粒結合的晶體模型。.....	16

圖 1.22	四股結構與 BMVC 的光物理資訊與電泳結果。.....	17
圖 1.23	BMVC 對於腫瘤細胞的顯影。.....	18
圖 1.24	BMVC 運用於腫瘤快速篩選器。.....	19
圖 1.25	BMVC 造成腫瘤細胞生長抑制。.....	19
圖 1.26	化學治療用劑以及其相對作用對象與機制。.....	20
圖 1.27	Jablonski Diagram 與光治療或光動力治療的機制。.....	21
圖 1.28	臨床常用光感藥物 Photofrin [®] 、Foscan [®] ，以及細胞內毒害機制。.....	22
圖 1.29	光動力治療在組織層級所造成治療機制。.....	23
圖 1.30	乙烯分子軌域及環丁烷軌域對稱性的基礎定義。.....	23
圖 1.31	乙烯與環丁烷軌域對稱性電子組態與反應途徑對應圖。.....	24
圖 1.32	乙烯行 [2s+2s] 環化加成反應機制的位能表面圖。.....	25
圖 1.33	Supra-Supra 機制與 Supra-Antara 機制。.....	25
圖 1.34	乙烯行 [2s+2a] 環化加成反應機制的位能表面圖。.....	26
圖 1.35	常見 DNA 傷害產物。.....	27
圖 1.36	胸腺嘧啶在雙股中受光激發形成雙體示意圖與細胞中修復機制。.....	27
圖 1.37	DNA 光產物的量子產率。.....	28
圖 1.38	(dT)18 的雷射光譜資訊。.....	29
圖 1.39	(dT)18 減去 TMP 的差異吸收。.....	30
圖 1.40	理論計算所得胸腺嘧啶的激發態能階圖。.....	30
圖 1.41	胸腺嘧啶單體與寡核酸(dT)20 的實驗能階。.....	31
圖 1.42	單重態與三重態反應途徑。.....	32
圖 1.43	單重態胸腺嘧啶雙體的形成機制。.....	32

圖 1.44	三重態胸腺嘧啶雙體的形成機制。.....	33
圖 2.1	親電性 DNA 傷害化合物片段。.....	34
圖 2.2	黏稠劑對配體的 T_m 影響。.....	35
圖 2.3	具有鉑金活性的配體分子 Pt-MPQ 發生共價鍵的位置。.....	36
圖 2.4	以鉑為核心的有機金屬配體分子以及相對應攻擊的位置。.....	37
圖 2.5	模擬出的 BMVC 與端粒片段進行結合的最適圖。.....	38
圖 2.6	BMVC 與端粒片段 2:1 的結合模型與目標化合物設計。.....	39
圖 2.7	BMVC 與目標分子 TMPC 與 MTMPC 的差異。.....	40
圖 2.8	逆合成分析及路徑選擇圖。.....	41
圖 2.9	反應 (1) 的關鍵反應機制。.....	42
圖 3.1	TMPC 與 MTMPC 水溶液態與 DNA 作用後的光物理性質。.....	49
圖 3.2	TMPC 與 MTMPC 與 DNA 作用造成螢光提升作圖。.....	51
圖 3.3	TMPC 與 MTMPC 存在下的 Hum24 旋光光譜圖變化。.....	52
圖 3.4	TMPC 與 MTMPC 存在時解旋溫度變化圖。.....	53
圖 3.5	配體濃度梯度的膠體電泳圖。.....	54
圖 3.6	EtBr 與 Cyanine Dye。.....	55
圖 3.7	選擇性與反應性的的膠體電泳圖。.....	57
圖 3.8	推測雙股 DNA 與 TMPC 或 MTMPC 可能形成的辨識。.....	59
圖 3.9	ITC 示意圖。.....	60
圖 3.10	c 值所控制的 ITC 滴定曲線圖。.....	61
圖 3.11	二次水及 TMPC 對 Hum24 的滴定圖。.....	62
圖 3.12	TRAP Assay 配置與多種細胞全萃 TRAP 結果。.....	64

圖 3.13	TRAP-G4 Assay 流程。	65
圖 3.14	BMVC 與合成配體 TMPC 及 MTMPC 所得 TRAP-G4 結果。	66
圖 3.15	光產物的膠體電泳圖。	68
圖 3.16	可能存在的胸腺嘧啶與含水的互變異構物。	69
圖 3.17	酚-水的能態分布圖。	70
圖 3.18	理論計算所得含水的胸腺嘧啶互變異構物光激發能階與對應值。	71
圖 3.19	365 nm 紫外光激發後所得的光產物 MALDI-TOF 質譜圖。	72
圖 3.20	254 nm 紫外光激發後所得的光產物 MALDI-TOF 質譜圖。	73
圖 3.21	254 nm 紫外光激發後所得的光產物 ESI-TOF 質譜圖。	73
圖 3.22	胸腺嘧啶形成雙體 CPDs 的過渡態計算模型。	74



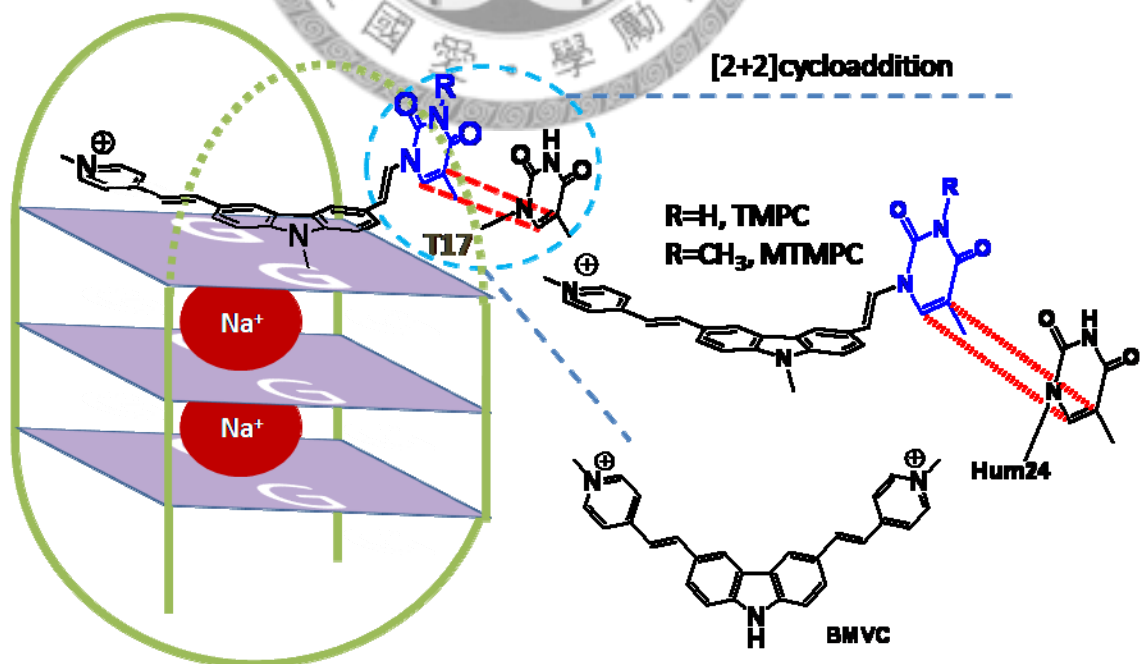
表目錄

表 1.1	氘同位素標定的葉酸分子決定萃取組織中的葉酸受體量。.....	2
表 3.1	由旋光度感變所測得的 Hum24 以及受配體穩定而改變的解旋溫度。..	52
表 3.2	緩衝溶液分子的離子化焓與相關熱平衡係數。.....	63



中文摘要

端粒在多數癌症細胞當中因具有過度表現的端粒酶而受到延長，因此成為染色體上的重要腫瘤標的。文獻中設計配體穩定端粒形成四股結構，造成端粒酶功能受抑制而限制腫瘤成長。其中配體 **BMVC** 具有辨識腫瘤並穩定端粒鳥嘌呤四股結構的作用及其螢光特性，本論文在結構上積極地引入具有光激活的端粒傷害分子片段，使在顯影出癌細胞的位置同時也伴隨有毒殺癌細胞的潛力。在文獻報導中得知，**BMVC** 一側的吡啶陽離子與四股結構平行股上的胸腺嘧啶 T17 距離 3.75 Å，並發生 π 堆疊。⁶⁶ 因此引入胸腺嘧啶取代吡啶陽離子，期望發生與 **BMVC** 在 DNA 中有相同的堆疊模式，並透過近紫外光激發進行 [2+2] 環化加成反應得到胸腺嘧啶雙體，而使配體與端粒共價緊縛且造成端粒傷害。設計並由人工合成得到化合物 **TMPC** 與 **MTMPC**。圖中 **TMPC** 與 **MTMPC** 模擬 **BMVC** 的結合模式，並推測受激發而發生由紅色虛線所指示的環丁烷共價結合。



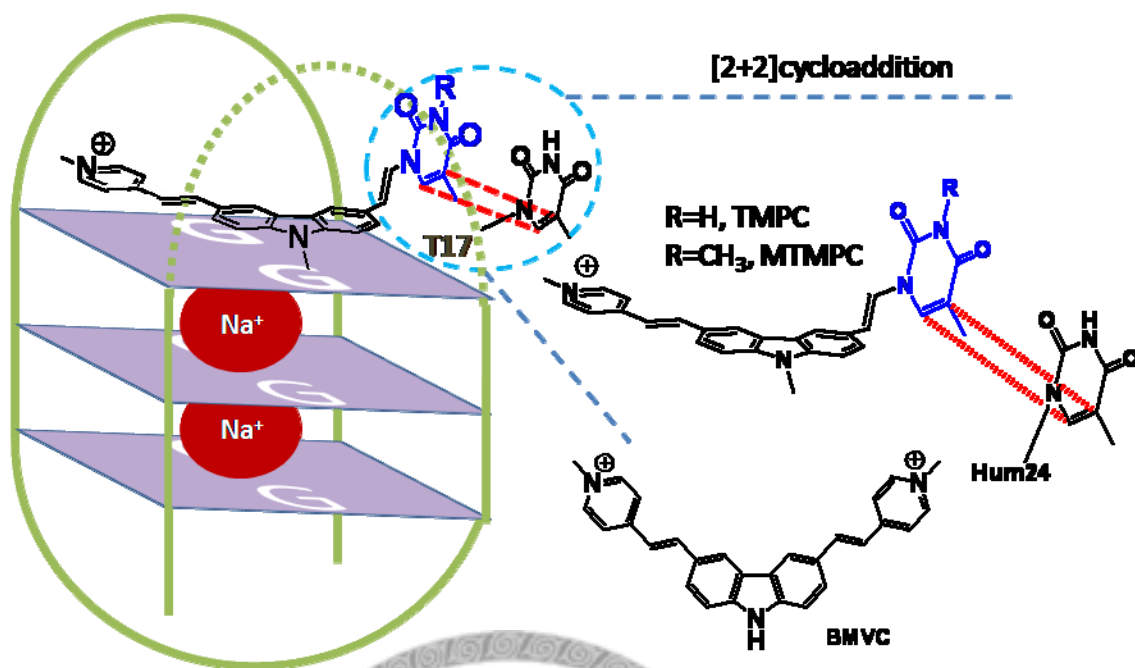
兩化合物分別可與 Hum24 結合，造成螢光的強度增加數倍。並且在電泳上可

以明顯觀察到 **TMPC** 與 **MTMPC** 與 Hum24 作用後，產生與 **BMVC** 相仿的拖曳帶。透過解旋溫度 T_m 的量測，發現 **TMPC** 與 **MTMPC** 分別可以穩定端粒四股結構 2.93 度與 2.42 度。在 TRAP-G4 Assay 也證實 **TMPC** 與 **MTMPC** 皆具有穩定端粒四股結構而達抑制端粒酶活性的潛力， IC_{50} 分別為 $3.9 \mu M$ (**TMPC**) 與 $6.6 \mu M$ (**MTMPC**) 的抑制效果。嘗試以質譜分析方法來鑑定是否產生共價性光產物，但卻沒有觀察到相對應的質譜訊號，所以實驗仍有改進的空間。



Abstract

Telomeres, an important tumor chromosomal target, are elongated by overexpressed telomerase in most tumor cell. Researchers have attempted to design and synthesize G-4 ligands to stabilize telomeric G-quadruplex aiming for telomerase inhibition as a potential anti-tumor route. Taking advantages of the strong binding of **BMVC** with telomeres as well as its fluorescent sensing, we decided to replace one of the pyridinium ring with a photoactive thymine in order to damage the telomere G-quadruplex. The reported simulation result indicates that one pyridinium arm of **BMVC** showed tightly π -stacking with 3.75Å to thymine-17 (T17) on the parallel loop of Hum24,⁶⁶ we predicted the equipped thymine would display similar binding modes compared with **BMVC** and can react with nearby T17 by photoactivation to yielding cyclobutane pyrimidine dimer (CPDs) via [2+2] cycloaddition. Once the dimer is formed, G-quadruplex telomere and ligand were crosslinked covalently. Based on this structure concept, we design and synthesize the thymine conjugated carbazole derivatives **TMPC** and **MTMPC** respectively. In the Figure shown below, **TMPC** and **MTMPC** are bound in the same site as **BMVC** does. The red dash lines show the chemical bond formation upon CPDs formation.



In the presence of Hum24, **TMPC** and **MTMPC** showed 3-7 times fluorescence enhancement in intensity. Electrophoresis experiments also revealed that **TMPC** and **MTMPC** had similar binding band of Hum24 binds with **BMVC**. Stabilization of G-quadruplex by these compounds was confirmed by T_m increment. The presence of **TMPC** and **MTMPC** increased T_m by 2.93 °C and 2.42 °C, respectively compared to native G-quadruplex. The TRAP-G4 assay showed that both **TMPC** and **MTMPC** were capable of inhibiting telomerase activity with IC_{50} 3.9 μ M (**TMPC**) and 6.6 μ M (**MTMPC**). However, in mass the spectroscopy experiments, we failed to obtain direct evidence of photoadducts formation. There are still some room for improvements in terms of structure design.

第一章 簡介

前言

以往主流的腫瘤治療，除了利用放射線治療或是手術，最大宗的便是利用化學治療的方式來使腫瘤細胞死亡。這樣的治療手段可謂是以毒攻毒，因為所使用的化學治療藥劑往往是針對細胞中最重要的生命核心—染色質（Chromatin）。染色質指的是在細胞核中的一些重要蛋白質以及最重要的染色體兩個單位，通常這兩個單位受傷將導致細胞的死亡。因此以往的非標靶化學治療多半伴隨嚴重的副作用，如落髮，免疫力下降，消化功能調降等問題。因此，吾人將藉由學者在近年來發展出的新興腫瘤染色體標的一端粒，以及透過有效率的光激發〔2+2〕環化加成的反應，設計新穎的抗腫瘤光感藥物，並於本章簡介這些成功的研究。

1.1 淺談腫瘤標的與標靶藥物設計

為了削減副作用並提高化療藥劑對於腫瘤的療效，學者們便朝著腫瘤在生物上的特有表現標誌（Bio-Marker）來下手。在學術研究上熱門的研究目標，分別為葉酸（Folate）及其受體、¹⁻³性腺荷爾蒙（Sex Hormones）及其受體、⁴⁻⁶上皮增生因子（Epidermal Growth Factor）及其受體。⁷⁻⁹ 在本小節將簡述葉酸的例子。

葉酸（Folate, 見圖 1.1 中分子右邊片段），¹是上皮細胞所常需要的維生素，特別在快速增殖的腫瘤細胞當中被大量的需求，因此也會在細胞的表面上大量的被表達²，見表 1.1。在不同部位的腫瘤有不同程度的表現，相對的，這些腫瘤上的葉酸受體表現都是正常組織的數倍至數十倍。

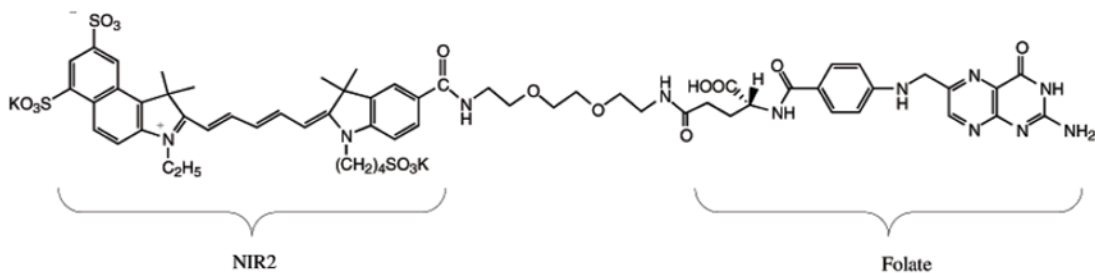


圖 1.1 含有葉酸的近紅外光（NIR）顯影分子。¹

Tissue	mRNA level (units) [†]		³ H] Folic acid bound [‡] (pmol/mg protein)
	FR- β	FR- α	
Normal ovary	2.2	0.3	0.6
Ovary carcinoma	4.9	30.9	28.4
Ovary carcinoma	3.2	29.7	39.3
Normal uterus	3.5	< 0.2	< 0.2
Uterine carcinoma	2.5	58.5	72.1
Normal colon	3.2	0.9	1.3
Colon carcinoma	0.8	1.1	0.6
Squamous cell carcinoma (head and neck)	5.8	< 0.2	1.2
Squamous cell carcinoma (head and neck)	5.5	< 0.2	1.3
Normal brain	3.5	0.7	0.4
Meningioma	45.0	3.2	21.0
Osteosarcoma	45.3	< 0.2	16.0
Uterine sarcoma	24.9	< 0.2	10.6
Lymphoma	12.3	< 0.2	3.4
Lymphoma	10.7	0.3	4.2
Lymphoma	8.7	13.8	23.0

表 1.1 利用氫同位素標定的葉酸分子決定萃取組織中的葉酸受體量，並利用細胞中 mRNA 的存在量來絕對定義該組中所含有的葉酸受體程度。²

因此利用葉酸當作導引，可以精確的將圖 1.1 中的顯影分子藉由尾靜脈注射 (Intravenous) 循環並累積在老鼠身上的腫瘤組織。觀察圖 1.2 中，分別在老鼠的左右胸上的腫瘤各為葉酸受體過度表現的 KB 細胞株，以及無過度表現的 HT1080 細胞株。兩者可以透過紅外光的攝影發現 KB 細胞明顯的累積了大量的顯影劑，這就是利用標靶導向設計的分 子優勢：提高藥物對腫瘤的精準度，並且降低藥物在正常組織的累積。

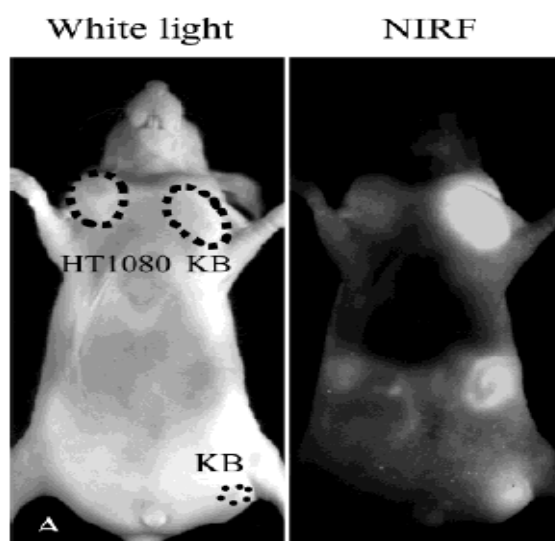


圖 1.2 含葉酸的標靶顯影劑在老鼠活體顯影攝相。¹

1.2 重要的廣現性腫瘤標的：端粒與端粒酶

除了上節所述的腫瘤標的均為蛋白質標的 (Protein Marker)，同時這些受體多半屬於嵌膜蛋白 (Membrane-Anchored Protein)，當受質辨識之後，會進行誘發內噬 (Inductive Internalization) 將藥物帶入細胞當中。這樣的機制有致命的缺點，也就是這些內噬的藥物將會包覆在吞噬體 (Endosome) 中，進一步傳遞至溶酶體 (Lysosome)，或經由多重抗藥機制 (Multi-Drug Resistance) 排除至細胞之外，這都將使藥物失效。另外，蛋白質標的若載入具有活性的藥物，則可能因為蛋白質的鄰近效應 (Proximity Effect) 與藥物進行反應，使得藥物失去原有活性。綜觀兩觀點而言，如果標的本身即是染色體，則配合化學治療手段將可以達到更高的期許。因此，在腫瘤上的染色體標的：端粒 (Telomere)，即成為相當令學者們期待的目標。在下節吾人將深入介紹端粒的重要性與其構造，並進一步探討對於腫瘤治療上的契機。

1.2.1 染色體複製機制與端粒及端粒酶作用

端粒是存在於真核生物 (Eukaryotes) 的染色體末端富含有鳥嘌呤 (Guanine) 的單股片段。在人類約有數千個鹼基對的長度並重複著 TTAGGG /CCAGGG 於雙股的片段 (圖 1.3)，以及在 3' 端單股存在的 TTAGGG 約五百個核酸，並且隨著細胞分裂而縮短。因此端粒的長度可以視為生物時鐘 (Biological Clock)，端粒的存在也被證實與細胞老化以及腫瘤有重要的聯繫。



圖 1.3 人類染色體末端的端粒示意圖。¹⁰

對於端粒的縮短，必須由正常的染色體複製說起。¹¹ 圖 1.4A 中是一個雙股解旋的 DNA，左段的領先股（Leading Strand）由聚合酶（Polymerase）進行由 5' 端往 3' 端的方向複製。然而右段的延遲股（Lagging Strand）則在導引子（Primer）的存在下由 5' 端往 3' 端進行複製，這個複製過程並不順利，是由一個片段接一個片段的不連續合成，這是由岡崎教授所發現，稱為岡崎片段（Okazaki Fragment）將由黏合酶（Ligase）黏合而成連續的 DNA。¹² 在這看似完美的過程，在最後卻發生了缺憾，因為引發複製的導引子將離開，並在 DNA 上留下一段未耦合的單股片段，將使 DNA 頭尾相連而失去作用稱之為尾融合（End Fusion）。圖 1.4B 中綠色螢光標示的端粒在染色體末端，而圖 1.4C，則是染色體相接。¹³ 細胞為了避免發生如此的悲劇，在演化過程中就已經儲備了一長串的備胎，也就是端粒。

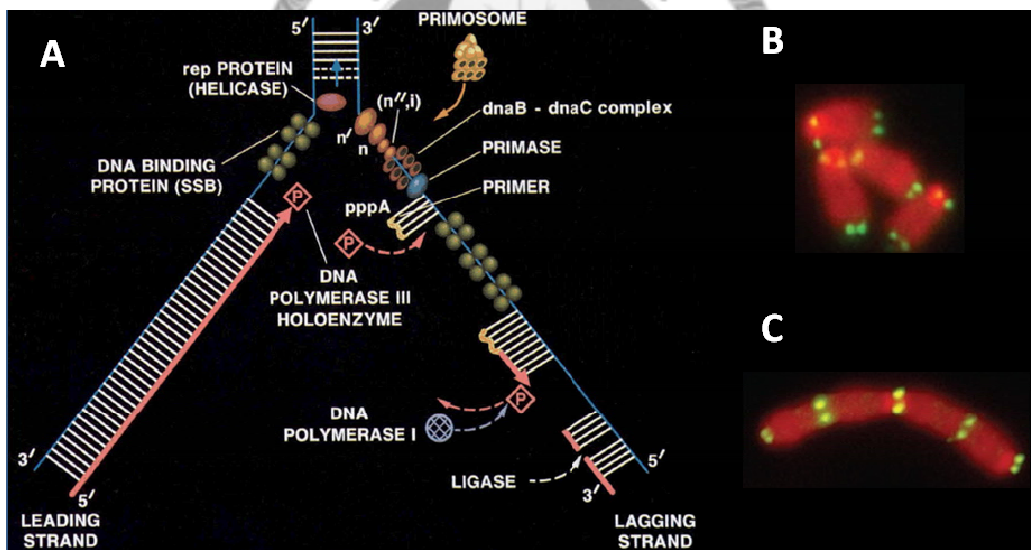


圖 1.4 A. DNA 複製機制。¹¹ B. 存在染色體兩端的端粒（綠色螢光）。
C. 端粒的尾融合，端粒串連多個染色體。¹³

圖 1.5A 中說明了分裂次數與端粒長度的關係，¹⁴ 並指出當端粒過短時造成的染色體不穩定將造成細胞的老化（Senescence），此時細胞若沒有適當的訊息調控而啟動端粒酶時，細胞的複製將減緩，並且在型態上也會呈現鬆散，圖 1.5B。¹⁵ 細胞老化若是繼續進行，將會使細胞進一步遭遇到危機（Crisis）進程序性的死亡，亦即凋亡（Apoptosis）。

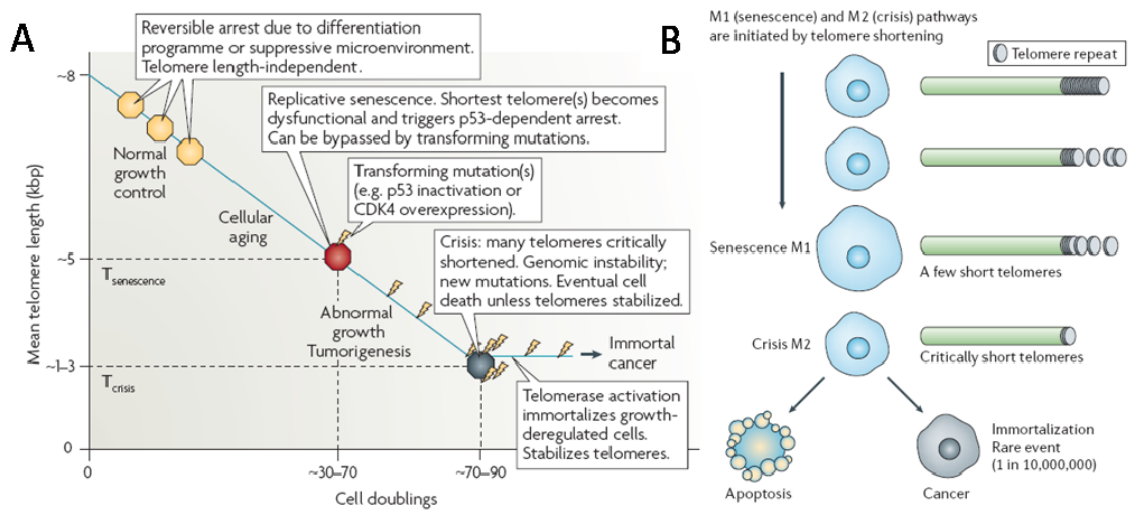


圖 1.5 A. 端粒隨體細胞分裂縮短造成的生物現象。¹⁴ B. 細胞凋亡態示意圖。¹⁵

為了使細胞能夠繼續生存，延續端粒是必要的，其中用以延長端粒的端粒酶 (Telomerase) 被 Greider 教授與 Blackburn 教授所發現並證實了延長端粒的假設。¹⁶ 圖 1.6 呈現出端粒酶延長端粒的機制，其中端粒酶包含兩個部分，一為人類端粒反轉錄酶 (Human Telomere Reverse-Transcriptase, hTERT) 以及 RNA 模板 (Telomere RNA Component, hTR)。端粒酶先辨識單純而非繞曲的端粒，並且進行複製，每當複製完模板的單位，就移到下一個需延長的端粒末端，完成後便脫附。¹⁷

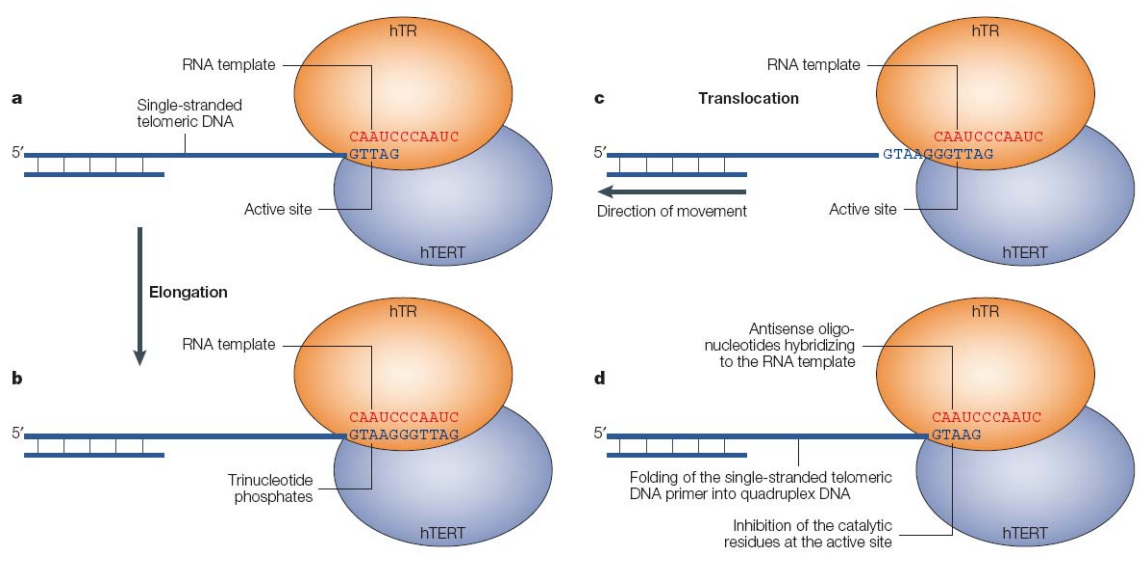


圖 1.6 端粒酶延長端粒的作用機制。¹⁷

端粒酶的活性在正常人體中僅在幹細胞 (Stem Cell) 及生殖細胞 (Germ Line Cell) 出現，因此在此類細胞有較長的端粒，較慢的老化及死亡速率，如圖 1.7。¹⁴

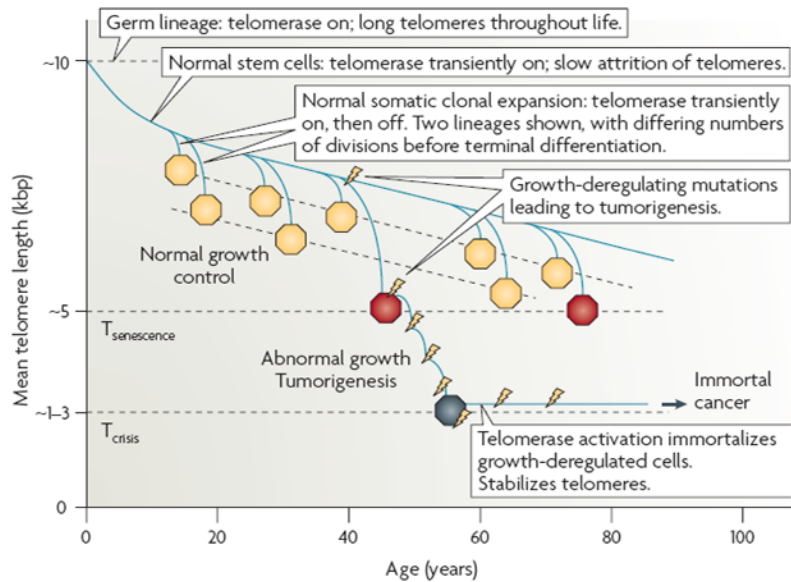


圖 1.7 生殖細胞的端粒與生命週期。¹⁴

體細胞若變異而啟動端粒酶的活性，則可能造成細胞的永生 (Immortalization)，也就可能成為腫瘤，如圖 1.5A。進一步檢視臨床腫瘤樣品，Kim 教授發現多數臨床樣品都呈現有端粒酶活性。¹⁸表 1.2 中，累計至 2000 年的樣品數，平均八成的各部位腫瘤的端粒酶活性呈現陽性。¹⁷相對於葉酸與上皮增生因子受體的表現在上皮癌為主，而荷爾蒙受體也侷限在性腺相關腫瘤中表現，因此端粒被視為是表現及分布最廣的腫瘤標的。

Tumour type	Number tested positive/total	% Positive
Breast	28/33	85
Prostate	24/30	80
Non-small-cell lung	74/101	73
Colon	22/23	96
Ovarian	13/14	93
Kidney	41/55	74
Gastric	56/66	85
Bladder	39/40	97
Neuroblastoma	53/76	70
Glioma	6/8	75
Head and neck	14/16	87

Cells were obtained from solid-tumour clinical material.

表 1.2 臨床腫瘤組織的端粒酶活性。¹⁷

1.2.2 維持端粒的穩定：屏蔽蛋白群 (Shelterins)

如同 DNA 複製完留下的單股缺陷，端粒也是具有單股結構的 DNA，容易受到酵素的水解或者再融合，使端粒造成缺失。因此在細胞當中端粒並非以單股形式存在，而是在二級結構上進行繞曲 (Folding)，形成迴避單股存在的大迴圈，端粒迴圈 (Telomere Loop, T-loop)，見圖 1.8 所示。¹⁰

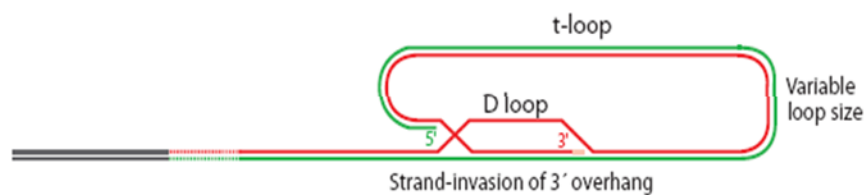


圖 1.8 端粒二級結構-端粒迴圈。¹⁰

在圖 1.8 中指出長片段的單股端粒以及雙股端粒片段分享形成大的端粒迴圈，以及末端插入雙股中形成隱密的小片段位移迴圈 (Displacement Loop, D-loop)。

然而形成如此巨大但鬆散的迴圈結構並不能完全穩定端粒的存在。在染色質的定義內，核蛋白 (Nuclear Protein) 類蛋白質的存在將會與染色體進行緊密的作用；在端粒片段也存在許多的屏蔽蛋白群 (圖 1.9A)，顧名思義即是保護端粒不受其他代謝蛋白的辨識與降解 (Degradation)。並利用屏蔽蛋白與端粒的結合與分開具有調控端粒酶活性的回饋作用，避免正常端粒酶過度延長端粒而造成染色體不穩定或者癌化。¹⁰，這些如 TRF1/2 (Telomeric Repeating Binding Factor 1/2) 主要作用於雙股的端粒片段，提供支撐及保護端粒的穩定；TIN2 (TRF-Interacting Nuclear Protein 2) 及 RAP1 (the Human Ortholog of the Yeast Repressor/Activator Protein 1) 作用於輔助穩定 TRF1/2；其中只有 POT1 (Protection of Telomere 1) 作用在單股的片段，因此最為受到重視。¹⁹一旦 POT1 離去，見圖 1.9B，則隱密的單股片段將暴露在外，在細胞核中的一些修復性核蛋白如 ATR 將會辨識並以組織蛋白 H2AX 標記為已受傷片段，將會使原本為單股的端粒被修復為雙股或者移除，如此所造成細胞致死性的傷害，見圖 1.9C。¹⁰

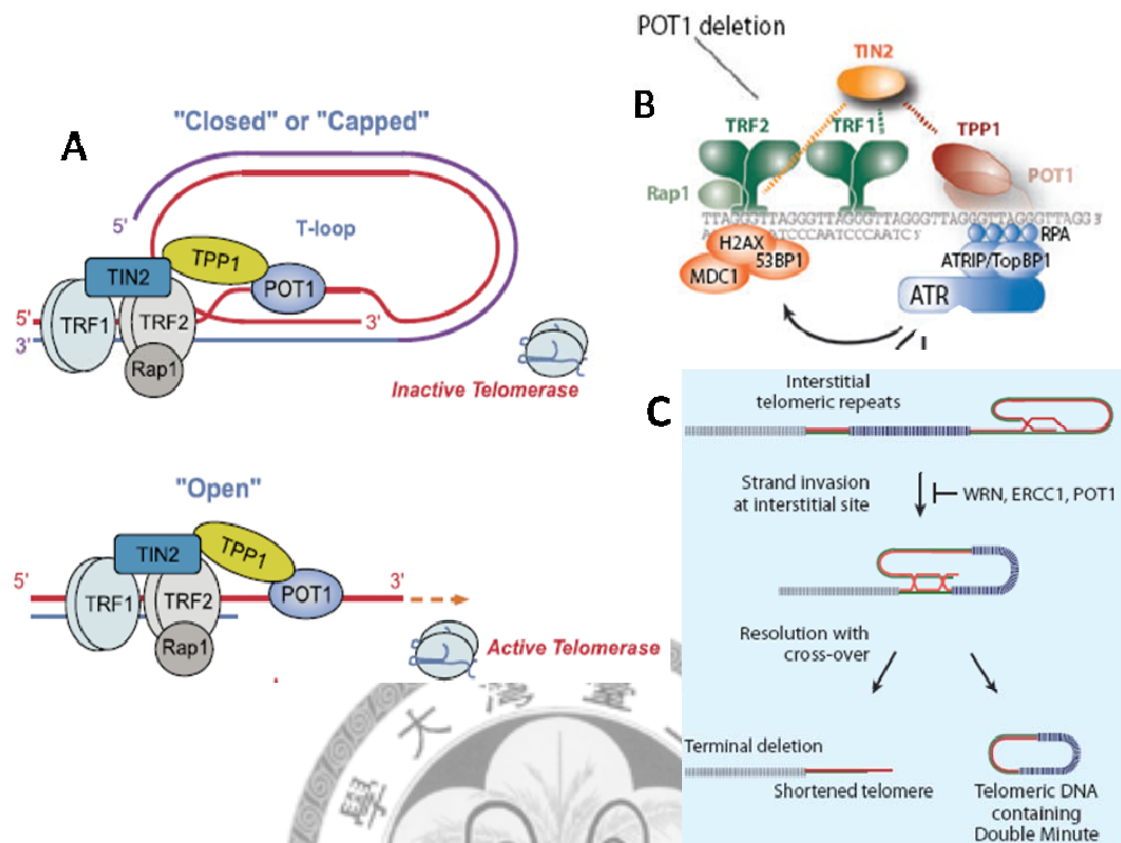


圖 1.9 A. 屏蔽蛋白群與端粒酶辨識。¹³ B. POT1 失去及核蛋白標誌。¹⁰
C. 端粒修補與片段化可能機制。¹⁰

1.2.3 與眾不同的結構標的：端粒的鳥嘌呤四股結構的多樣性

自 1960 年 Watson-Crick 確立出的雙股螺旋結構的染色體之後，基因體的結構就一直如火如荼的被解謎。Alexander Rich 教授在 Gene 期刊上發表一篇重要的文章'DNA Comes in Many Forms'，²⁰明確指出基因體並非簡單的雙螺旋構造而是具有更多複雜的多股結構。因此吾人將在此小節跟循學者們的脚步來發現端粒的特殊結構——鳥嘌呤四股結構（G-quadruplex）。

在 Rich 教授早期的研究中，便已經透過結晶繞射發現三股及四股平面結構的存在，如圖 1.10A。²¹白色圓圈指氧原子，而斜線圓圈則指示氮原子，虛線則是氫鍵連結的代表。形成這樣的多股結構似乎並不算穩定，因為所涉及的氫鍵數量明顯不足於雙股配對的穩定。進一步 Gellert 教授也在基因體發展的早期發現鳥嘌呤四方結構（Guanine Quartet），如圖 1.10B，所形成的氫鍵數量比雙股配對來的多；每個鳥

嘧啶都分享了四個氫鍵，因此是相當穩定而在生物體常出現的結構，特別是在含豐富鳥嘌呤的序列片段，其中端粒即是。²²

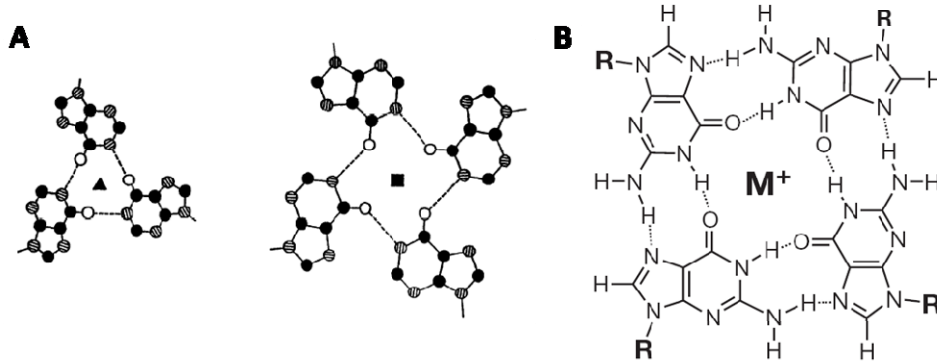


圖 1.10 A. DNA 的三股與四股平面結構。²⁰ B. 鳥嘌呤四方結構。²³

在 1993 年 Patel 教授率先利用核磁共振技術 (NMR) 解出在鈉離子溶液條件的端粒片段 Hum22: d[AG₃(T₂AG₃)₃] 結構，如圖 1.11A，是逆平行的菜籃狀。²⁴ 在此結構當中共有三個鳥嘌呤四方結構，形成更大的錯合體，並且在層與層中恰好擺入了鈉離子以穩定並平衡此結構的存在。在繞曲的 DNA 結構上具有其特徵的旋光光譜訊號 (Circular Dichroism)，如圖 1.11C 中藍色為鈉離子溶液態的旋光光譜，分別在 295 nm 以及 240 nm 有明顯的正值峰，在 265 nm 附近則呈現明顯的負值峰。

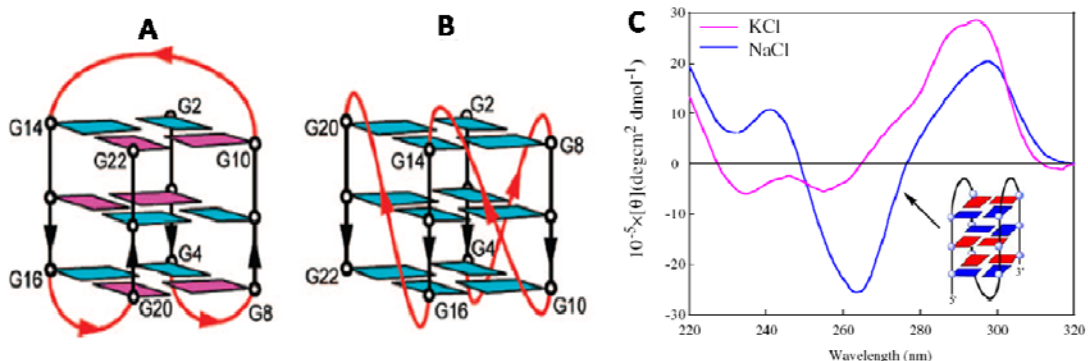


圖 1.11 近年解出的端粒片段 Hum22 結構 A. 於鈉溶液。 B. 於鉀結晶態。²⁵ C. 旋光光譜於鈉及鉀溶液。²⁶

接著 2002 年 Neidle 教授利用結晶繞射解出了結晶態含鉀離子的端粒片段結構，如圖 1.11B。²⁷ 這個結構當中懸股 (TTA-Loop) 纏繞的方式採取平行的螺旋槳狀，中間所含的依然是三層的鳥嘌呤四方結構，但中間嵌入的則是鉀離子。由於這個結構是由結晶所解出，因此可觀察到整體結構是較為緊實，是因結晶堆疊之故，因此失去了在生理條件下的自然環境，在結構上鉀離子的離子半徑相對比鈉離子大，因此所撐開的鳥嘌呤四方結構層板的高度會較高，在溶液相將是相對具有較高的自由度，而難以被研究。在研究鉀離子溶液模式結構的時期，Xu 教授與 Sugiyama 教授所發表的旋光光譜上的訊號相較比鈉離子溶液複雜許多(圖 1.11C)。²⁶ 其中除了與鈉離子相同的 295 nm 及 240 nm 的正值峰與在 260 nm 的負值峰依舊存在；但是明顯的可以看出在 270 nm 左右的肩線 (Shoulder) 存在，並且在原有的吸收峰都較為寬胖，因此可推斷鉀離子的溶液模式可能多樣而複雜。

在圖 1.11A 與 B 之間尚有一項重要的差異。由於懸股的纏繞及所含離子模式不同，鳥嘌呤四方結構當中鳥嘌呤的位向也有所不同，圖中紫色表是為異側 (anti) 位向，青色指的則是同側 (syn) 位向。在 Rich 教授的文章中提到，通常雙股螺旋當中所堆疊的配對都是以異側位向為主，而同側位向則少見於一般的 DNA 結構當中。²⁰ 重新審視鈉離子的結構是含有同側及異側雙駢的堆疊，在鉀離子晶體中則僅發現到全為異側位向的鳥嘌呤存在。

由於細胞核中以鉀離子為主，因此追求鉀離子溶液態的端粒結構即成為重要的課題，在 Xu 教授以及 Sugiyama 教授兩團隊的研究中，發展了利用溴取代的鳥嘌呤 8 號位置的甲基，利用結構上立體障礙相對較小，來驅使異側對同側位向的平衡能更容易向同側位向修正，如圖 1.12A，並且穩定可能的溶液態結構。²⁸ 由 NOESY 所確定鳥嘌呤四方結構由三個以溴取代設計為同側位向以及一個自然異側位向的鳥嘌呤相駢而成模型 (圖 1.12B)。²⁹

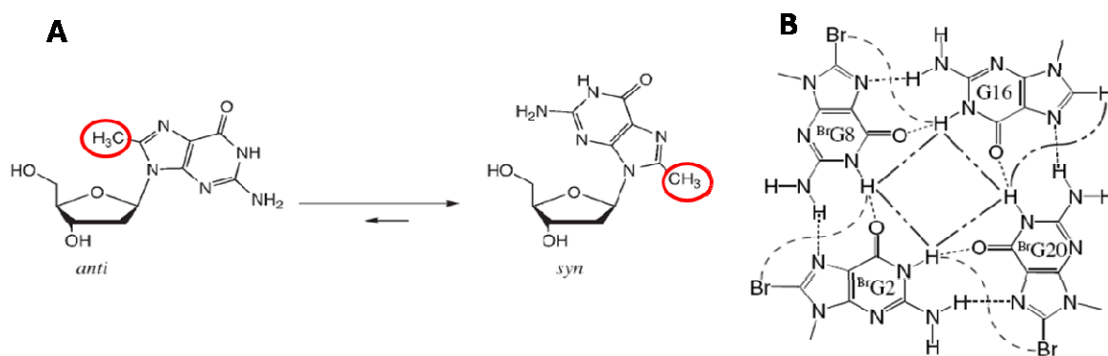


圖 1.12 A. 利用溴取代紅圈位置來引發平衡向左。²⁸ B. 穩定的溴取代鳥嘌呤四方結構示意圖。²⁹

接著 2006 年 Patel 教授分別發表了兩個修飾的端粒片段 $d[TA(GGGTTA)_3GGG]$ 以及 $d[TA(GGGTTA)_3GGGTT]$ 在鉀離子水溶液中的結構 (圖 1.13A 及 B)。³⁰⁻³¹ 如同以溴取代的模型所預測, 所鑑定出皆是以 (3+1) 的同側對異側的鳥嘌呤四方結構, 藉此也確定在結晶結構中全為異側的鳥嘌呤的結構差異性。在這兩個鉀離子溶液結構當中, 懸股皆是以混合前述鈉離子溶液以及鉀離子晶體模型的纏繞方式。在比較圖 1.11C 中的鉀離子旋光光譜訊號以及圖 1.13D 與 E 中的確定結構模型之光譜, 不難發現在前述的曲線中的肩線很可能肇因於模式 2 所擁有的 270 nm 左右的正值吸收峰; 相對在 250 nm 的正值吸收峰則可能是模式 1 所貢獻。在圖 1.13D 與 E 中, 紅色標示曲線為利用溴取代鳥嘌呤所確定的光譜, 虛線則為自然狀態下的結果, 兩者在趨勢上是相近的。

但是在鉀離子溶液下的結構並不僅有上述兩種, 在 2009 年 Patel 教授更進一步發表了只有兩層鳥嘌呤四方結構的模型, 圖 1.13C。此模型與鈉離子溶液的結構十分的相近, 都屬於逆平行的菜籃狀。²⁵ 但是在一般認知中的 TTA 懸股上首次出現尚未形成鳥嘌呤四方結構的鳥嘌呤, 即 (GTTA) 以及 (GTTAG)。並且在旋光光譜中 (圖 1.13F) 更明顯能夠區分出 270 nm 以及 250 nm 兩組正值吸收峰。這一系列鉀離子模型暗示在人類細胞中的端粒片段可能存在的結構多樣性與其複雜度。

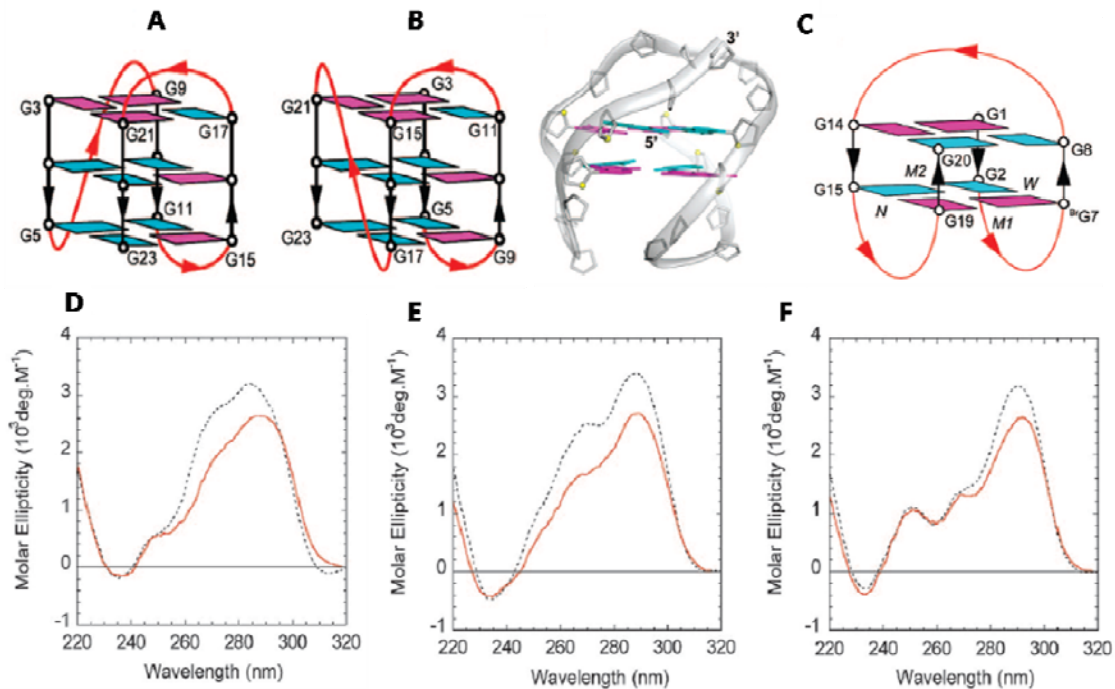


圖 1.13 Hum22 鉀離子溶液態結構 A. 模式 1。 B. 模式 2。 C. 模式 3。 及其對應的旋光光譜 D. 模式 1。 E. 模式 2。 F. 模式 3。²⁵

1.3 潛在抑制端粒酶與抑癌化合物

早在 1991 年 Zahler 教授與 Williamson 教授便提出 'Inhibition of Telomerase by G-quartet DNA Structure' 這樣的見解。³² 因此前小節所述的結構將用於抑制端粒酶的活性，其機制可參考圖 1.14。圖中敘述當鳥嘌呤四方結構配體 (G-4 Ligand) 進入端粒當中，幫助端粒穩定生成鳥嘌呤四股結構，相當於分子保護子 (Molecular Chaperone) 的作用，藉此達到失去端粒酶中 RNA 模板的辨識結合能力，進而使端粒酶的功能受到限制。³³ 如此一來，端粒酶將無法再進一步延續端粒長度，只要端粒再繼續隨分裂而縮短即可能導致細胞的死亡。利用所述機制針對廣泛表現於腫瘤的重要染色體標的一端粒，合成一系列的化合物以期抑制端粒酶活性而使腫瘤細胞死亡。

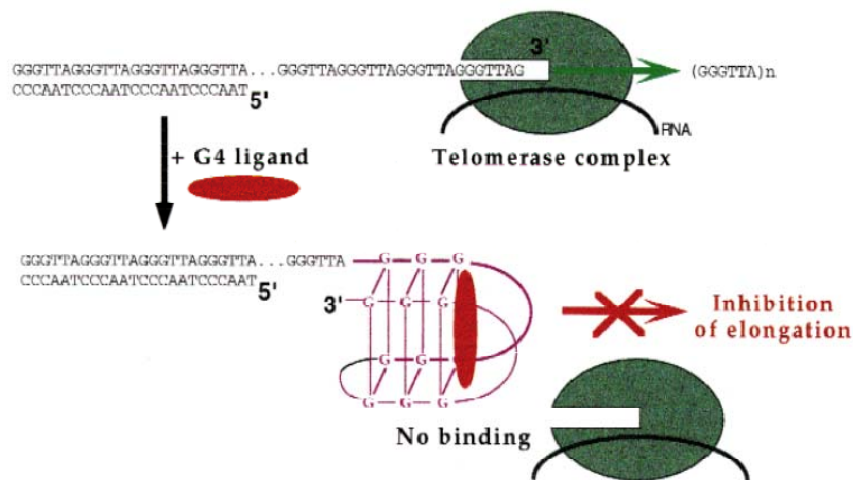


圖 1.14 以鳥嘌呤四方結構抑制端粒酶的機制。³⁴

近期 Shankar 教授團隊設計了模擬生物條件的單分子光譜 (Single Molecule Spectrum) 實驗證實配體在未形成鳥嘌呤四股結構的端粒片段上，可以穩定形成特定繞曲的化合物。³⁵ 將 3'端及 5'端分別修飾有可進行 FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer) 的螢光團配對 Tetramethylrhodamine (TMR) 及 Cyanine 5 (Cy5)。將這個端粒片段透過設計的雙股寡核酸支架與 Neutravidin 結合，再利用生物素 (Biotin) 的辨識結合接到修飾有犢牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 的石英表面上，示意如圖 1.15B。

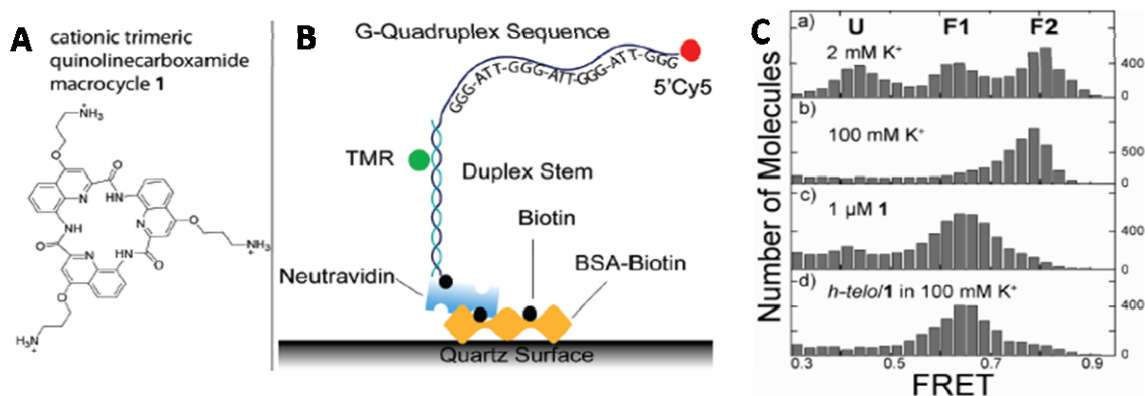


圖 1.15 A. 巨環端粒配體。 B. 實驗設計示意圖。 C. FRET 螢光效率分析圖。³⁵

當表面分別流洗不同濃度鉀離子溶液以及含有圖 1.15A 所示巨環配體溶液時，由端粒片段兩端所因結構折疊而靠近產生的 FRET 螢光訊號被記錄下來，圖 1.15C。在 FRET 分析圖中可以發現在低濃度鉀離子條件下即可以造成不同的兩種可能折疊結構，在高鉀條件則可確定其中 F2 的折疊結構可存在。此時加入微量的配體分子將可以明顯穩定端粒片段的結構，即使再利用高濃度的鉀離子溶液進行流洗也無法改變由配體所穩定的端粒折疊結構（圖 1.15C-D）。此實驗亦即證明在細胞當中的自由端粒片段可以因為配體的存在而穩定生成鳥嘌呤四股結構，且根據 Zahler 教授與 Williamson 所提出的機制，將可以抑制端粒酶的活性。

文獻中有相當大量的配體被合成與分析，在此領域的知名學者有 Neidle 教授，Hurley 教授，³⁶ Fedoroff 教授及 Kerwin 教授，³⁷ Teulade-Fichou 教授及 Mergny 教授，³⁸ Shankar 教授³⁵ 以及中研院原分所的張大釗教授，³⁹ 知名的分子列於圖 1.16。

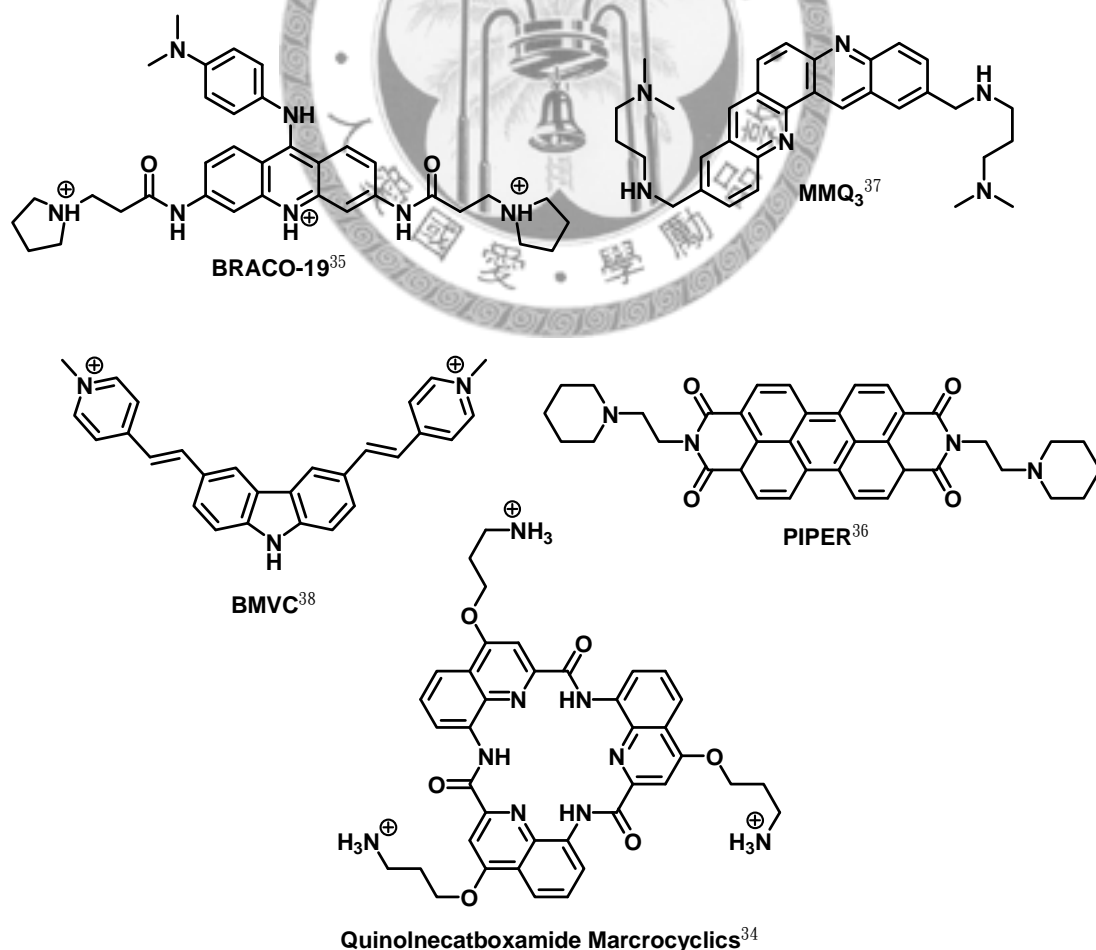


圖 1.16 文獻中常見的鳥嘌呤四股結構配體。³⁵⁻³⁹

文獻中還有許多成功的配體結構特性可歸納兩點：(1)骨架中間通常具有較大的 π 共軛的多環分子，或能提供大共軛平面的芳香環串連。如此結構特性是因為需要利用大的面積來與鳥嘌呤四方結構中間的鳥嘌呤雜環，進行 π 堆疊(π stacking)，以獲取非共價性質的穩定能量，見圖 1.17A。利用 Acridine 的三環平面與四方結構緊密堆疊；(2)在支臂 (Arm) 上通常會設計具有可以被質子化的三級胺集團 (3° -Amine)，或者是以帶正電荷的銨集團 (Ammonium)，甚至利用含氮雜環 (N-heterocyclics) 進行烷化而帶有正電荷如 **BMVC** 分子。這樣的設計將有利於與 DNA 骨架上的磷酸根集團進行靜電作用而增加結合效果，圖 1.17B，**BRACO-19** 支臂中的銨基集團與四股結構的溝槽相互作用。¹⁷

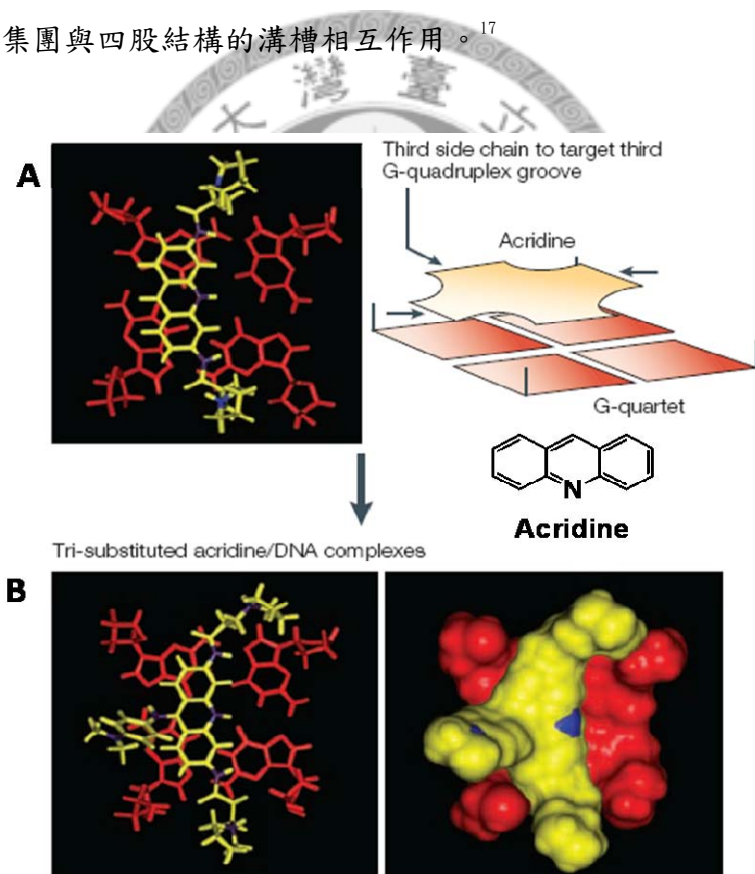


圖 1.17 A. Acridine 衍生物—**BSU6039** 與鳥嘌呤四方結構進行堆疊的示意圖。 B. **BRACO-19** 支臂對溝槽的關係。¹⁷

由於細胞中端粒單股片段約有 200 個核酸，因此在細胞中若存在四股結構則可能具有進一步的四股結構對四股結構的三級結構。但是由於長的端粒片段自由度相當高，結構不利於結晶或以 NMR 做研究⁴⁰，推測的模擬模型如圖 1.18。

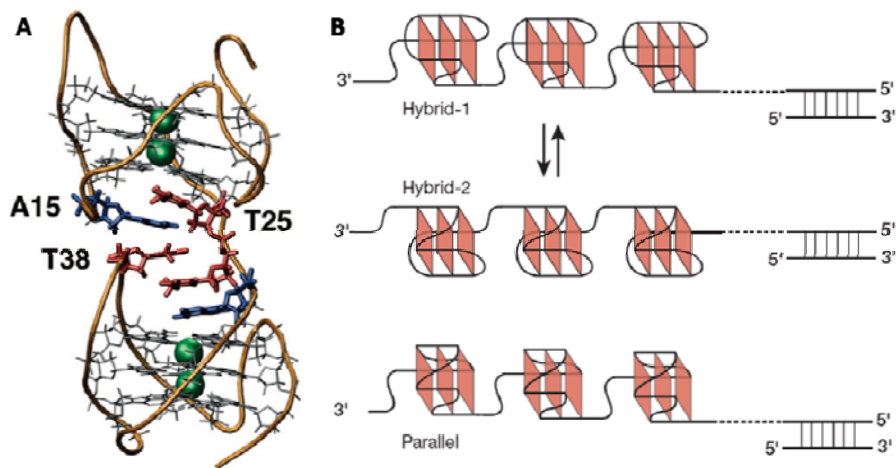


圖 1.18 A. 分子模擬計算出(TTAGGG)₈TT 的平均結構。⁴⁰
 B. 推測的長序列四股結構。²³

在圖 1.17 中所指出配體辨識與結合的位置是在於整個鳥嘌呤四股結構的四方結構上方以獲得穩定存在。配體 **BRACO-19** 與端粒片段結合的晶體在 2008 年利用 X 光繞射解出結構，圖 1.19A，此結構呈現出配體分子嵌入連續堆疊的鉀離子結晶型態鳥嘌呤四股結構當中，上半部為 3'端，下半部則為 5'端。其詳細的作用圖於圖 1.19B 中，灰色為磷酸根骨架與水分布的範圍，紅色為 5'端提供的 TATA 平面，藍色則為 3'端四股結構頂端的鳥嘌呤四方結構。可以發現配體核心 Acridine 三環與 GG 以及 TA 平面形成緊密的堆疊，並且支臂貼往磷酸根骨架方向以獲得更好的結合能力。⁴¹

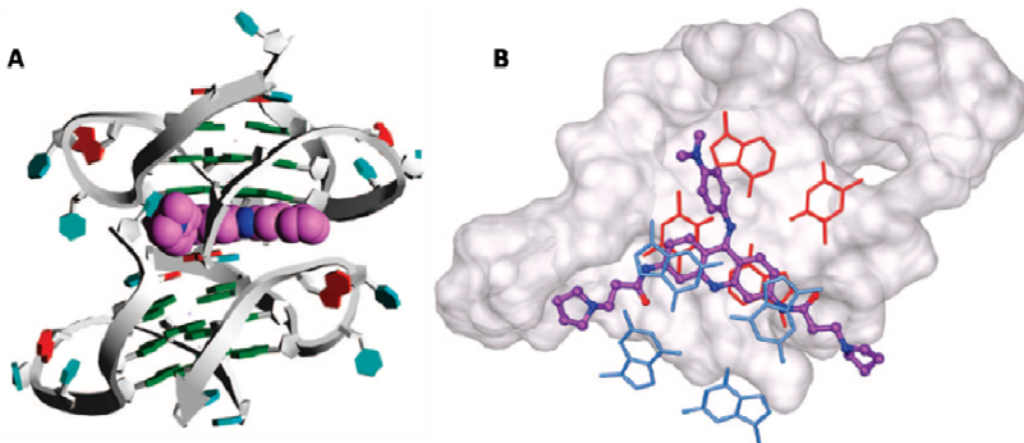


圖 1.19 **BRACO-19** 與連續堆疊的端粒結合的晶體模型。⁴¹

1.3.1 具顯影及抑癌作用的呋啉衍生物 BMVC

於2003年，張大釗教授團隊發展出具有特殊螢光性質的呋啉衍生物BMVC (3,6-Bis(1-methyl-4-vinylpyridium iodine)carbazole)，對於端粒片段具有穩定的能力。圖1.22A所示為利用四股結構旋光訊號295 nm的正值吸收峰對於溫度改變所測得解旋溫度 (T_m)，增加約為 13°C 。³⁹BMVC對於雙股與四股結構具有特殊的螢光改變，圖1.22B與D，對於雙股結構(D16)發出波長約545 nm的綠光，對於四股結構(H24)則是發出575 nm的黃綠光；且對DNA的存在，螢光強度可提升兩個級數左右。⁴²在膠體電泳上，BMVC可以與雙股與四股結構辨識，其中當四股結構被BMVC穩定時，結構趨向於穩定而相較緊實，會使其分析帶向下拖曳，如圖1.22C。⁴³

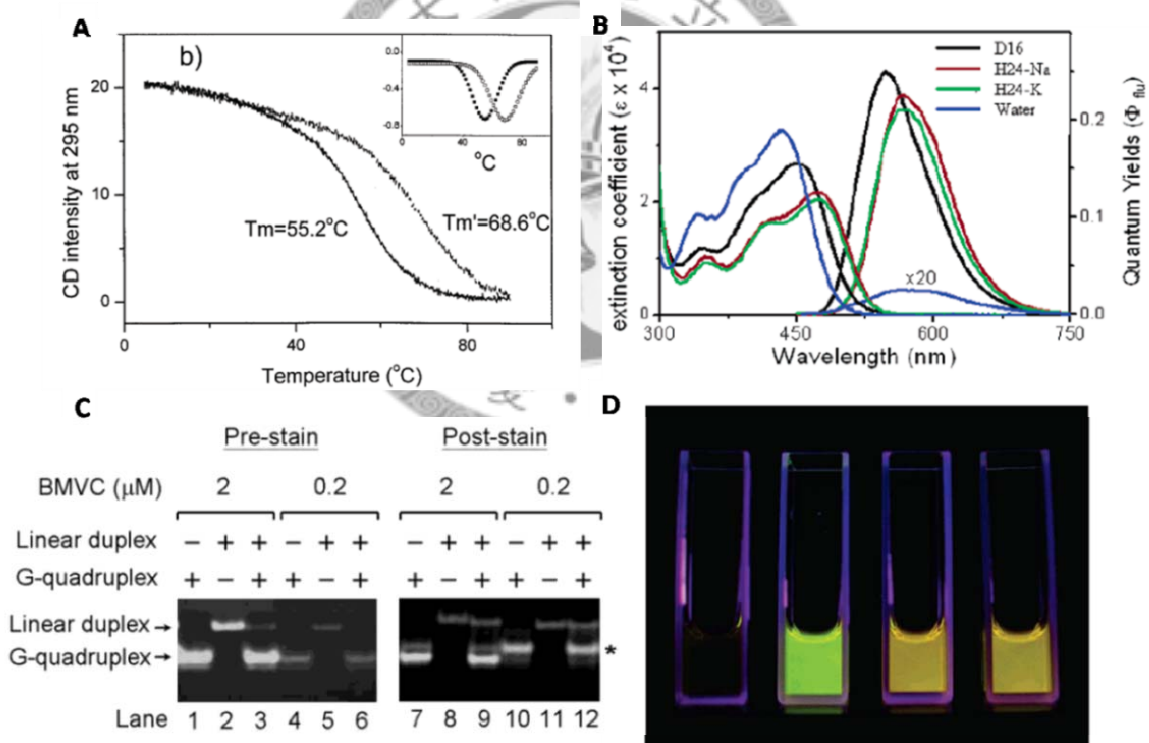


圖 1.22 A. 四股結構與 BMVC 造成解旋溫度改變。³⁹ B 與 D. BMVC 對不同 DNA 片段的特徵吸收及螢光光譜與照片。⁴² C. 膠體電泳圖，7-12 列為利用 BMVC 後染，星號指示未受前染 BMVC 的穩定四股結構 DNA 位置。⁴³

由於BMVC與雙股及四股DNA結合所具有的特殊螢光特性，將可利用於對人體細胞當中的端粒作為顯影用途。在2004年利用BMVC的螢光改變首次證實了人

類細胞當中的確存在有四股結構。利用BMVC對於四股結構的選擇性較雙股結構高，因此在低濃度及短時間的細胞浸漬可以顯現出BMVC在四股結構的575 nm特徵螢光訊號（圖1.23A-F）。在兩株人類癌症細胞株的螢光顯微鏡攝影中，將一定量的染色體獨立特寫並收集其整體及端粒部分的光譜（圖1.23E-F）。端粒部分的确貢獻出BMVC對於四股結構的特徵575 nm的螢光放射峰。如此可證明人類細胞當中的確存在有端粒的四股結構。⁴³此外觀察到BMVC對於腫瘤細胞具有有較好的核內累積能力，可見得BMVC對於腫瘤細胞有較好的選擇性，見圖1.24A-B。⁴⁴進一步在2007年時，BMVC被利用於手持式的快速腫瘤篩選器（圖1.24C）。⁴⁵

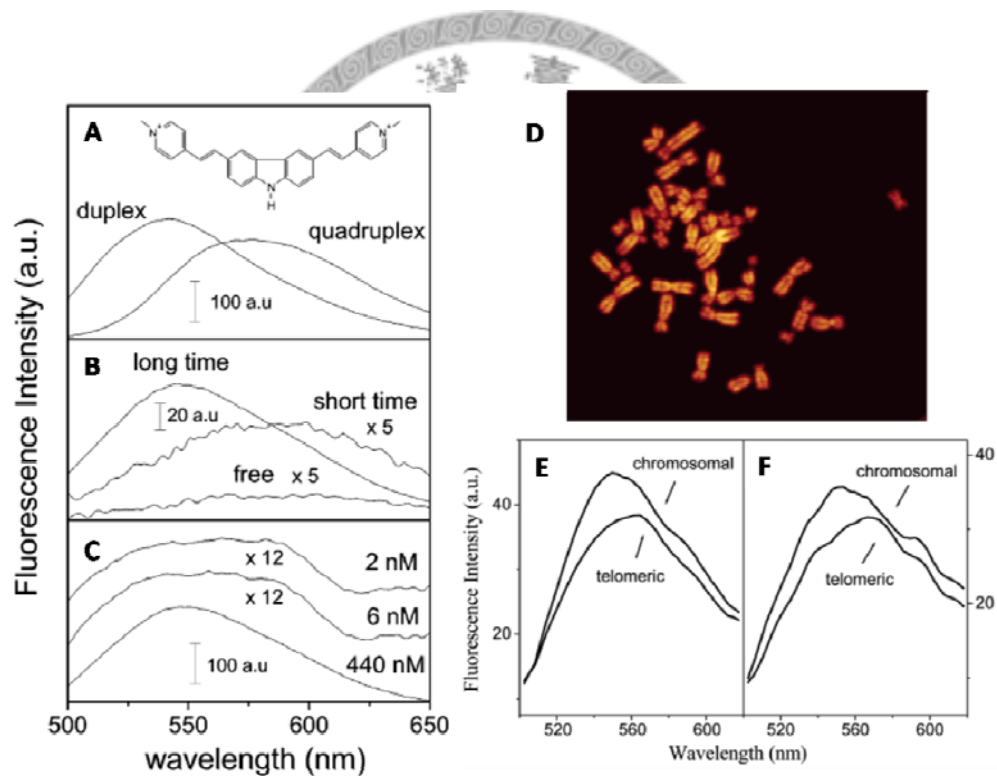


圖 1.23 A. BMVC 的雙股及四股結構 DNA 特徵螢光。 B. BMVC 對肺腺癌細胞 CL1-1 萃取的 DNA 在不同時間浸漬的螢光結果。 C. 不同濃度 BMVC 對口腔癌細胞 Ca9-22 萃取的 DNA 浸漬的螢光結果。 D. 螢光顯微鏡下 BMVC 染分裂中期的 DNA 攝相。 E-F. 螢光顯微鏡下 120 個獨立 CL1-1 與 60 個獨立 Ca9-22 的染色體 (Chromosomal) 螢光及染色體末端端粒部分 (Telomeric) 光譜。⁴³

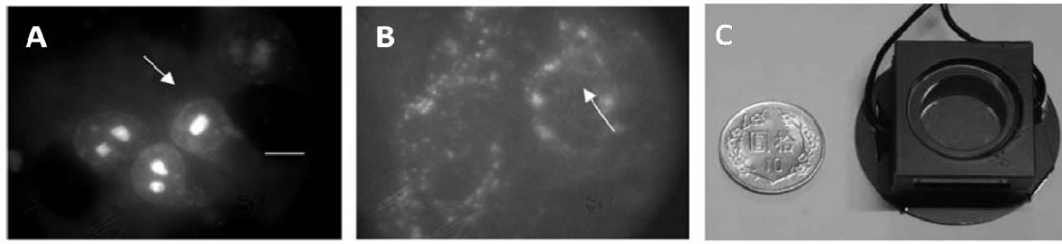


圖 1.24 A. **BMVC** 分別與 H1299 肺癌細胞及 B. 正常纖維母細胞培養後所取螢光顯微鏡照片。⁴⁴ C. 以 **BMVC** 顯影的手持式快速腫瘤篩選器。⁴⁵

除了利用其螢光特色進行腫瘤細胞顯影之外，**BMVC**同時具有極高的腫瘤抑制力，利用TRAP-G4 Assay鑑定下，**BMVC**對端粒酶活性 IC_{50} 為100 nM。⁴⁴ **BMVC**與腫瘤細胞共培養下，可以造成端粒酶活性抑制而造成延遲性的細胞活性抑制，圖1.25A。在型態上，受到**BMVC**抑制端粒酶活性，細胞也加速的老化(圖1.25B)，利用細胞老化的標記SA- β -gal確定**BMVC**的確造成細胞的老化。在章節1.2.1曾提及當配體分子穩定端粒形成四股結構時可能造成屏蔽蛋白群失去，進而造成修復性核蛋白在端粒上利用組織蛋白 γ -H2AX標記，即是早期的DNA傷害，圖1.25C-D。⁴⁶

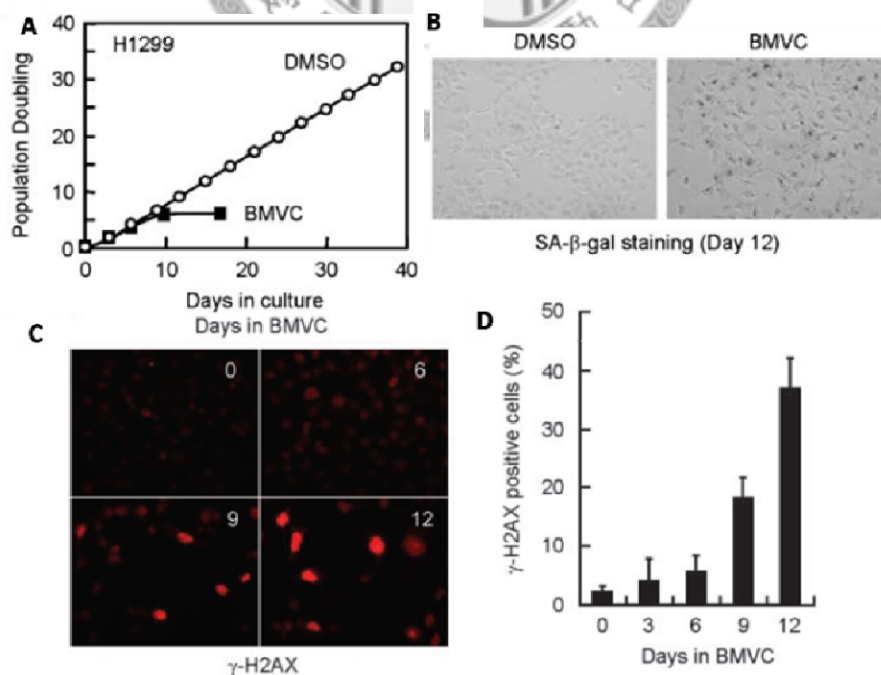


圖 1.25 A. **BMVC** 造成細胞延遲性抑制。 B. **BMVC** 造成細胞加速老化。 C. **BMVC** 造成早期細胞 DNA 傷害 H2AX 標記及 D. 定量圖。⁴⁶

1.4 癌症化學治療與光化學

在常見的癌症化學治療上所利用的藥劑（如圖 1.26 所示）都是針對染色體或者核蛋白來造成傷害。⁴⁷ 常用的抗代謝藥物（Antimetabolite）主要是以非自然的鹼基化合物，使快速分裂的腫瘤組織錯誤合成 RNA 或 DNA 來造成基因訊息不全而死亡。由於 DNA 複製或轉譯為蛋白質時皆需要將雙股分離，若無法分離則不能進行細胞分裂與合成重要蛋白質而限制其生長。所以利用烷化劑（Alkylating Agent）或鉑金藥物（Platinum Drug）來使雙股 DNA 受到雙股間或單股間的共價鍵束縛（Covalent Crosslink）。或者利用嵌合劑（Intercalators），如 Doxorubicin 與 Irinotecan 類型化合物以穩定位向異構酶（Topoisomerase）在解旋雙股過程中的中間體，造成 DNA 正常功能失調而限制腫瘤的生長。⁴⁸

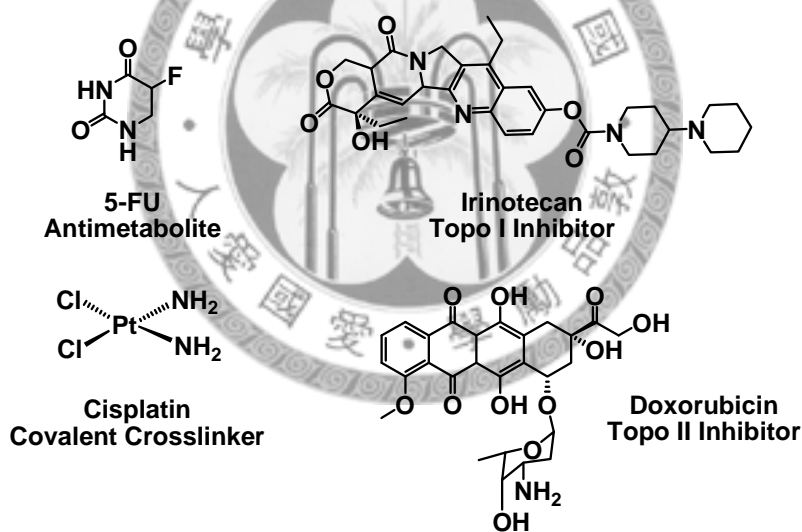


圖 1.26 化學治療用劑以及其相對作用對象與機制。⁴⁸

由於這些化療藥劑通常不具有對腫瘤的專一性，因此設計如 1.1 節中具標的功能的顯影化合物將可以降低藥物對正常組織的傷害。除此之外，如果將腫瘤細胞比喻為電視機，正常細胞為冷氣機，當吾人手持電視機遙控器來關閉電視機時，冷氣將正常運轉不受影響。此遙控器即比喻「光」，當利用光激發或活化在腫瘤部位局部的光感藥物(Photosensitizer)，將只會釋放出局部的光毒性(Phototoxicity)而不會造成重要人體器官的傷害。

利用光化學的方式來進行治療手段，吾人必須回顧基礎的光物理機構 Jablonski Diagram，如圖 1.27。基態 (S_0) 的光敏藥物受到特定的激發 (Excitation, 1) 而躍遷至激發態 (S_1)，激發態可透過發出螢光 (Fluorescence, 2) 或者是內轉換 (Internal Conversion, 3) 衰減至基態；也可能透過介系統轉換 (Inter-system Crossing, ISC, 4) 進入三重態 (Triplet state) 的激發態 (T_1)。在三重態中，除了發出磷光 (Phosphorescent, 5) 或者熱弛退 (Thermal Relaxation, 6) 到基態物理性質的衰減，同時具有很高的效率來進行化學反應 (Photochemical Reaction, 7) 或有效率的被三重態的氧分子透過能量轉移 (Energy Transfer, 9) 回基態，並得到具高活性的單重激發態氧分子。其中透過三重激發態光敏藥物進行光化學反應即是光治療的手段，相類似的，利用單重激發態氧分子進行傷害則為光動力治療的範疇。此章節將會對於這兩種運用光化學的腫瘤治療進行探討。⁴⁹

圖 1.27 Jablonski Diagram 與光治療或光動力治療的機制。⁴⁹

1.4.1 光動力治療 (Photodynamic Therapy)

近年來光動力治療在臨床上對付表層腫瘤有相當大的應用。光動力治療對細胞造成傷害的機制，見圖 1.28。利用進入細胞的光感藥物在適當波長的雷射光下激發產生活氧分子 (Reactive Oxygen Species, ROS)。由於光感藥物普遍所使用紫質類 (Porphyrin) 的化合物 (圖 1.29 右方常用臨床光感藥物)，通常具有較高的親脂性而易於存在於細胞內的膜系統上，如圖 1.28 所示。光感藥物傾向累積於粒腺體的膜上，⁴⁹ 因此所產生的活氧分子將對膜系統進行類似於脂質氧化的反應，使細胞膜崩解，放出大量細胞毒素 (Cytokine) 造成細胞壞死 (Necrosis) 或凋亡。⁵⁰



圖 1.28 臨床常用光感藥物 Photofrin[®]、Foscan[®]，以及細胞內毒害機制。⁵⁰

除了直接對腫瘤細胞造成傷害，對於周圍組織在引發 ROS 產生的過程中，將消耗周圍組織間及微血管中的氧氣，因此如燒夷彈一般造成患處組織的缺氧並使微血管管壁細胞死亡，導致中期的傷害，見圖 1.29。除了直接及間接的缺氧傷害之外，壞死及凋零的腫瘤細胞破片及所釋放的細胞毒素會引發組織間的發炎作用，進而引發一連串免疫反應。首先這些腫瘤破片帶有的抗原將進入淋巴系統，並使樹突細胞 (Dendritic Cell, DC) 活化，使下游的 T 細胞成熟具有對腫瘤抗原辨識能力，利用患者的免疫系統來毒殺腫瘤細胞，將是更長期的光動力治療的療效。⁵⁰

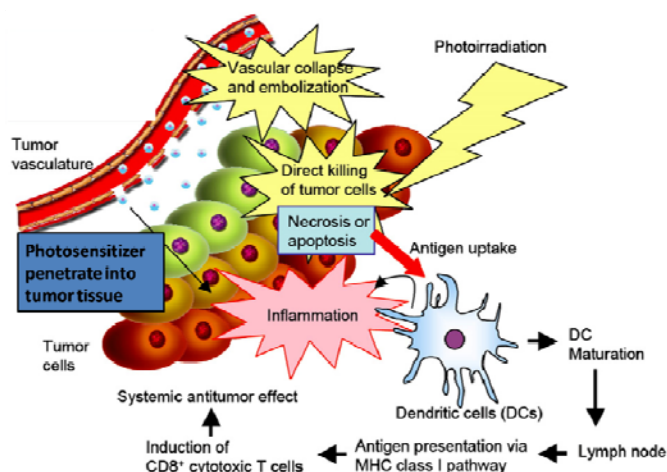


圖 1.29 光動力治療在組織層級所造成治療機制。⁵⁰

1.4.2 [2+2] 環化加成 (Cycloaddition)

[2+2] 環化加成在遵循 R. B. Woodward 與 Roald Hoffmann 所提出的選擇律 (Selection Rule)，在基態的狀況下禁止的 (Forbidden)，而在激發態下將是可行的 (Allowed) 反應。⁵¹ 利用 Woodward-Hoffmann 的定義來介紹兩分子乙烯的光環化加成反應，圖 1.30A 中對於基態與激發態的乙烯及產物環丁烷的分子以軌域對稱性定義，由最左邊起分別先定義兩個獨立的乙烯，並定義出對稱面 1 與 2 垂直與平行分子的排列；接著兩個分子將可定義出對稱 (Symmetric, S) 與反對稱 (Antisymmetric, A)，並排列出兩個基態與激發態的 π 軌域對稱性 SS 與 SA；相同地，環丁烷的 σ 軌域對稱性也加以定義如圖 1.30B 中所示。

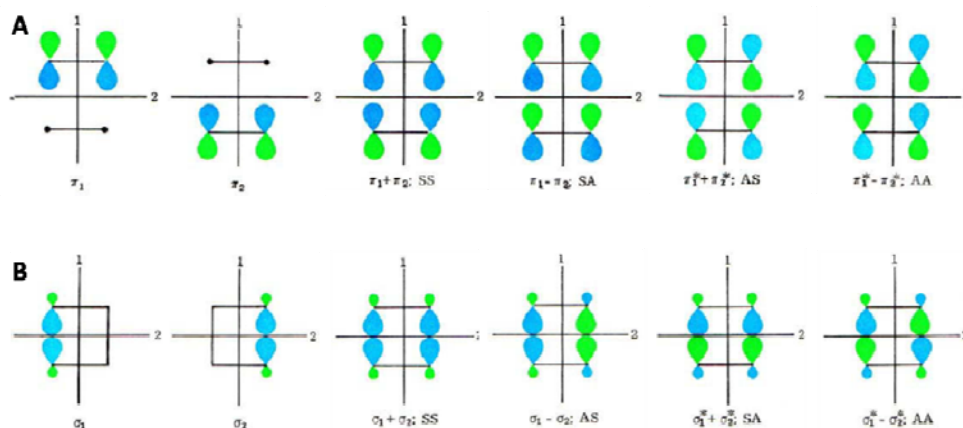


圖 1.30 對兩個 A. 乙烯分子 π 軌域及 B. 環丁烷 σ 軌域對稱性的基礎定義。⁵¹

將這些軌域對稱性的混成依能量高地排序並定義其相對的反應能階組態：基態的兩分子乙烯具有四個電子，因此所屬組態 $(SS)^2(SA)^2$ 相對其第一激發態將是 $(SS)^2(SA)^1(AS)^1$ ；所對照的基態及第一激發態的環丁烷電子組態為 $(SS)^2(AS)^2$ 與 $(SS)^2(AS)^1(SA)^1$ 。Woodward-Hoffmann 定義在分子的軌域對稱性必須在反應前後不變，稱作為對稱性許可 (Symmetry Allowed) 的反應並且為同步反應 (Concert Reaction)，相對則為對稱性禁止 (Symmetry Forbidden)。由此選擇性我們將審視各能態的乙烯及環丁烷的對稱性混成組態 (圖 1.31)。激態 S_0 的乙烯若要成功遵循選擇性，將須躍遷至對應的環丁烷 S_2 軌域中，相同的 S_2 的乙烯也可進行反應至基態環丁烷。但在能階對應圖當中，必須遵從非穿越定律 (Non-Crossing Rule)，因此在圖中激發態 S_1 的乙烯與環丁烷有相對應的對稱性存在，所以使前述的兩個反應路徑相被修正為對稱性禁止的組態。由此可見得在基態中 [2+2] 環化加成在對稱性不符的條件下是無法利用高溫進行反應 (Ground State Forbidden and Thermally Forbidden)，但在相對的光激發態中則是得到可以容易進行反應的對稱性組態 (Excited State Allowed and Symmetry Allowed)。

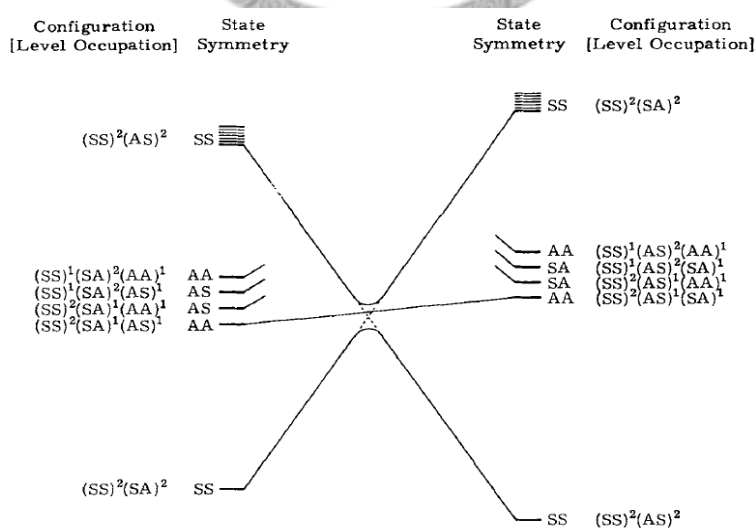


圖 1.31 乙烯與環丁烷軌域對稱性電子組態與反應途徑對應圖。⁵¹

利用理論計算的來模擬出乙烯光反應形成環丁烷的位能表面 (Potential Energy

Surface) 圖能夠進一步解釋在禁止的反應當中，存在相當高的能階障礙 (Energy Barrier)，如圖 1.32 左下圖為基態的反應位能表面，在黑線所示的反應途徑中，當兩分子乙烯在基態進行反應時，將是趨向區域最高值處 (Local Maxima)。因此在計算結果中另外出現一條較平緩的 Syn 產物，形成了非同步反應的中間產物，但是在能量位面上依然是存在於高點上，因此將趨向片段化回兩分子的乙烯。反觀圖 1.32 中上圖為 S_2 的能量位面，區域最低值的位置即是禁止的 [2s+2s] 環丁烷 Supra-Supra (Supra 為成鍵與斷鍵在同側的面向) 產物 (圖 1.33A)。⁵² 相對在符合對稱性的激發態與基態乙烯反應時，走的是 [2s+2a]，圖 1.33B，也就是一鍵形成於同側，另一鍵形成於反側的機制。

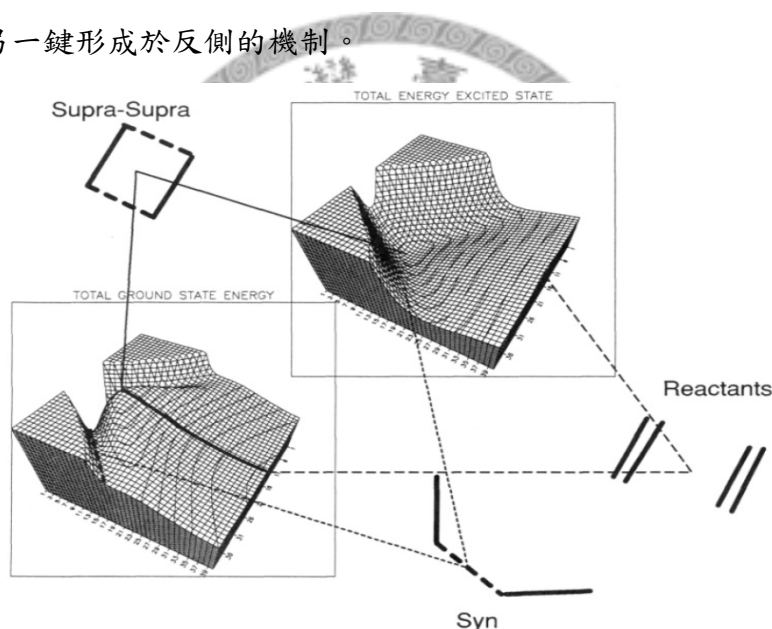


圖 1.32 乙烯行 [2s+2s] 環化加成反應機制的位能表面圖，上圖為 S_2 下圖則為 S_0 。位能圖上 X 軸為分子間距離，Y 軸則為分子間夾角。⁵²

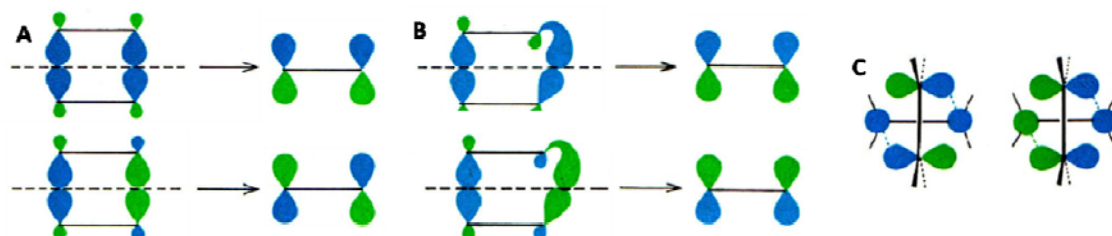


圖 1.33 A. Supra-Supra 機制，生鍵及斷鍵都在同一側，左圖為 $\pi+\pi$ 與 $\pi^*+\pi^*$ 右圖對應的 π 與 π^* 。在對稱性上為禁止的路徑。 B. Supra-Antara 機制，分別生成及斷鍵於同側以及生成及斷鍵於反側的機制。 C. 鍵結的乙烯與反鍵結的乙烯形成 σ 鍵的機制。⁵¹

經由計算的結果，如圖 1.34 所是在激發態時的過渡態 anti TS。在上方的 S_2 能態中存在有環丁烷的過渡態，並且在左下圖中基態的位能表面也存在穩定的區域最低值(Local Minima)。在這兩個能量面具有兩個錐形焦點(Conical Intersection)，一旦激發態的乙烯落入 S_2 中低點，便可經由內轉換 (Internal Crossing) 直接進入穩定的類產物過渡態中。由 Woodward-Hoffmann 所提出的 $[2s+2a]$ 環化加成反應便是走圖 1.33C 中所示，一個基態鍵結乙烯(π)加上一個激發態反鍵結乙烯(π^*)，來完成。⁵²

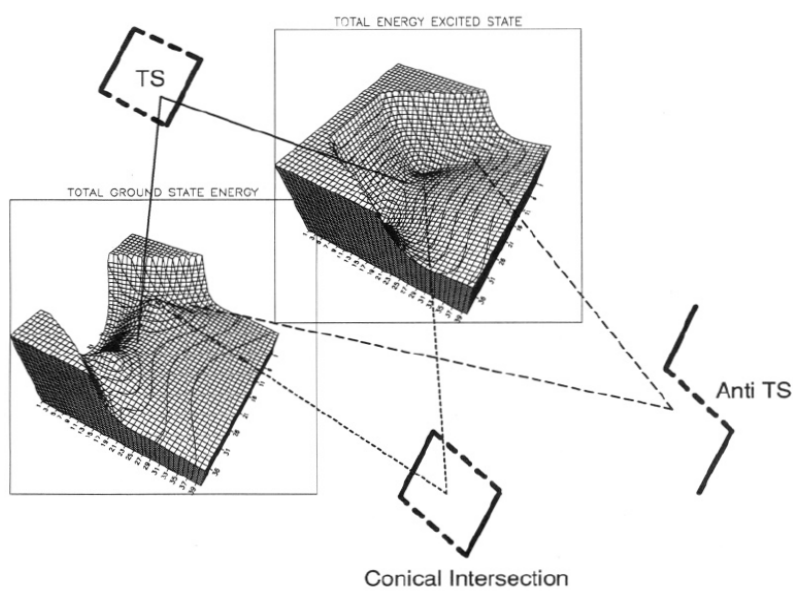


圖 1.34 乙烯行 $[2s+2a]$ 環化加成反應機制的位能表面圖，上圖為 S_2 下圖則為 S_0 。位能圖上 X 軸為分子間距離，Y 軸則為分子間夾角。⁵²

1.4.3 染色體內質性光化學傷害 (Intrinsic Photodamage)

染色體是細胞中最重要的角色，也是容易發生傷害的地方。圖 1.35 呈現出常在 DNA 上出現的傷害基制，包含由化療藥劑所導致的複製障礙 (Stalled replication fork) 與共價鍵束縛外，染色體本身也常見到磷酸骨架上的差錯 (Nick, Gap, Break)。當中吾人感到興趣的是光化學傷害所造成的胸腺嘧啶雙體 (Cyclobutane Pyrimidine Dimers, CPDs or T\leftrightarrowT)。⁵³

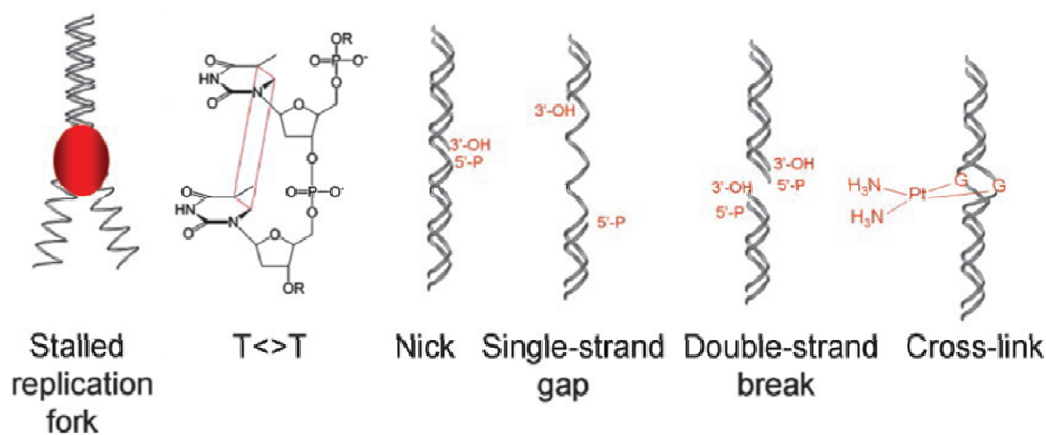


圖 1.35 常見 DNA 傷害產物。⁵³

CPDs 的形成主要是由鄰近的胸腺嘧啶受到紫外光的激發，而藉由〔2+2〕環化加成而得，如圖 1.36A 所示。⁵⁴所造成的傷害在細胞中存在有光解酶(Photolyase)，透過鉀基四氫葉酸 (Methyltetrahydrofolate, 5, 10-MTHF) 吸收光在進行能量轉移至還原態的核黃腺嘌呤雙核苷 (Flavin Adenine Dinucleotide, FADH)，透過其激發還原態提供電子催化雙體中環己烷的開環，完成修復 (圖 1.36B)。^{53, 55}

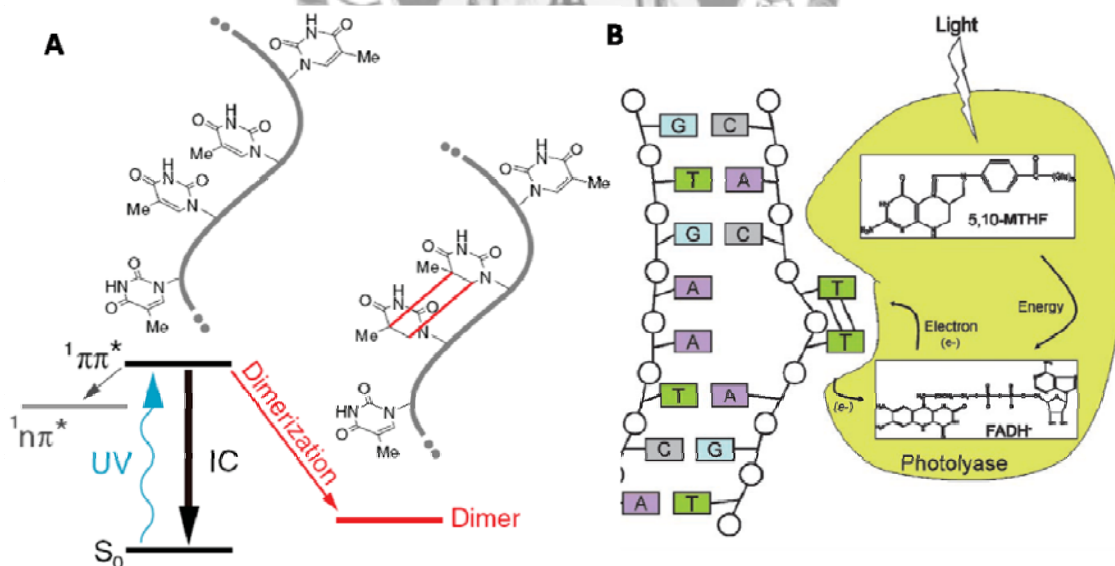


圖 1.36 A. 胸腺嘧啶在雙股中受光激發形成雙體示意圖。⁵⁴
B. 細胞中光解酶修復胸腺嘧啶雙體的傷害片段。⁵³

CPDs 的發現相當的早期約在 1960 年代左右，因此學者也對這個重要的生物光化學作用感到興趣，利用飛秒雷射技術及高階的理論計算逼近可能發生於胸腺

嘧啶的機制。⁵⁶ 紫外光對於染色體造成傷害不僅 CPDs，對於短波長的遠紫外光(193 nm)也可能發生前述的磷酸根骨架的差錯，這些的 DNA 光產物被利用雷射技術定出其量子產率(圖 1.37)。由於在地球大氣中的臭氧層阻隔了 193 nm 的紫外光，因此在量子產率中可發現主產物將會是 CPDs 的系列。⁵⁷

Quantum yields (10^{-4}) of various photoproducts of DNA*

Product/Process	λ_{irr}	
	193 nm	254 nm
Py-Dimers ^b	17-26	22-26
(6-4) Products	4.8	1.4
Destruction of nucleotides	480	21
Chromophore loss	530	31
Photohydrates		10
Interstrand crosslinks	1	0.01
Locally denatured sites	1	0.01
Base release	18	0.23
Single-strand breaks	15	0.4

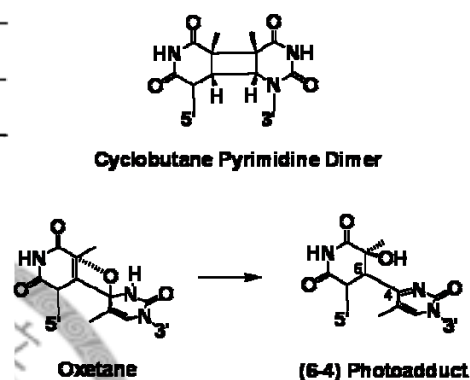


圖 1.37 DNA 光產物的量子產率與所形成的 CPDs，包括較少生成的 6-4 光產物。⁵⁷

Zinth 教授與 Kohler 教授在 2007 年利用紅外光暫態吸收(Transient Absorption) 究胸腺嘧啶的寡核酸片段(dT)₁₈ 發表了” Thymine Dimerization in DNA Is an Ultrafast Photoreaction”。在圖 1.38A 中先透過 266 nm 的紫外光連續激發，並收集其 IR 訊號，除了 1600—1700 cm^{-1} 的訊號為醯胺基及烯酮雙鍵的拉伸訊號外，在圖 1.38C 標示出三組新生成的訊號對照 D 圖中的雙體標準品，可發現是雙體形成後的特徵訊號。透過這三組訊號，在即短時間的暫態吸收中(圖 1.38E)，由於單磷酸胸腺嘧啶(TMP)在水溶液中不易有空間上的靠近，將不甚容易發生雙體形成。然而在寡核酸片段中，由於胸腺嘧啶受到磷酸跟骨架的束縛，具有空間中的鄰近效益，將預期有效的貢獻出在 1300—1500 cm^{-1} 間的雙體特徵峰。而前 3.3 皮秒間分布的紅色區塊大量吸收是貢獻於胸腺嘧啶 $\pi\pi^*$ 的暫態吸收，在文獻上的 $\pi\pi^*$ 半生期約在 540 飛秒內，此處也獲得證實。⁵⁸ 隨時間拉長 TMP 趨向於穩定態(Steady

State) 的光譜 (黃色虛線), 而在(dT)₁₈則是出現明顯的消長, 得到三組特徵的訊號峰。

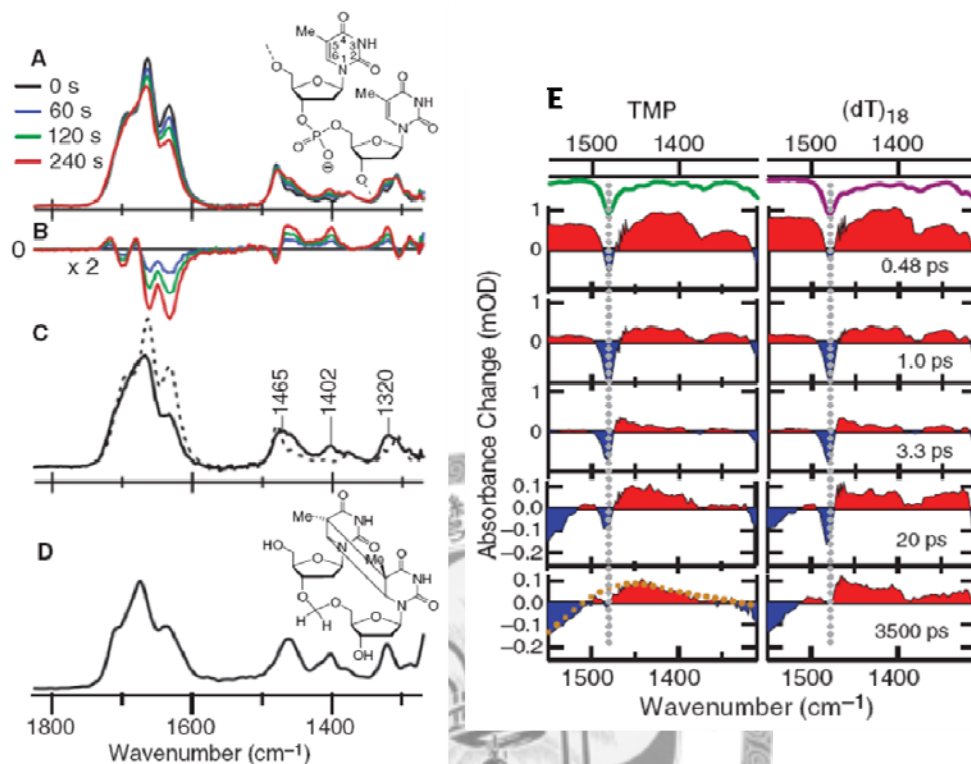


圖 1.38 A. 照射 266 nm 紫外光下(dT)₁₈隨時間的 IR 光譜變化與 B. 消長圖 C. 反應始末對照圖。 D. 胸腺嘧啶雙體 IR 光譜。 E. TMP 與(dT)₁₈在 277 nm 紫外光激發後不同時間下 IR 暫態吸收光譜, 綠色與紫色兩線分別標示起始光譜。⁵⁴

相同地, 將暫態吸收光譜相減, 將可推得胸腺嘧啶雙體的特徵峰消長如圖 1.39A。將不同時間的(dT)₁₈減去 TMP 的訊號所得到三組特徵峰符合雙體分子的特徵, 可以發現到在 15 皮秒時即出現了明顯的雙體訊號, 因此推斷雙體的形成是相當快速。進而檢視圖 1.39B 的色塊分析圖, 在上方的特徵圖定義下, 分別在 1465、1402 及 1320 cm⁻¹ 的差異吸收在激發光之後的最小時間單位 1 皮秒內就產生強烈的訊號, 同時也代表雙體的形成非常的快速, 可能透過無能障的過渡態。⁵⁴ 若參考 Woodward-Hoffmann 的選擇率, 雙體的形成可能透過有效的 [2s+2a] 的單重態路徑。⁵¹

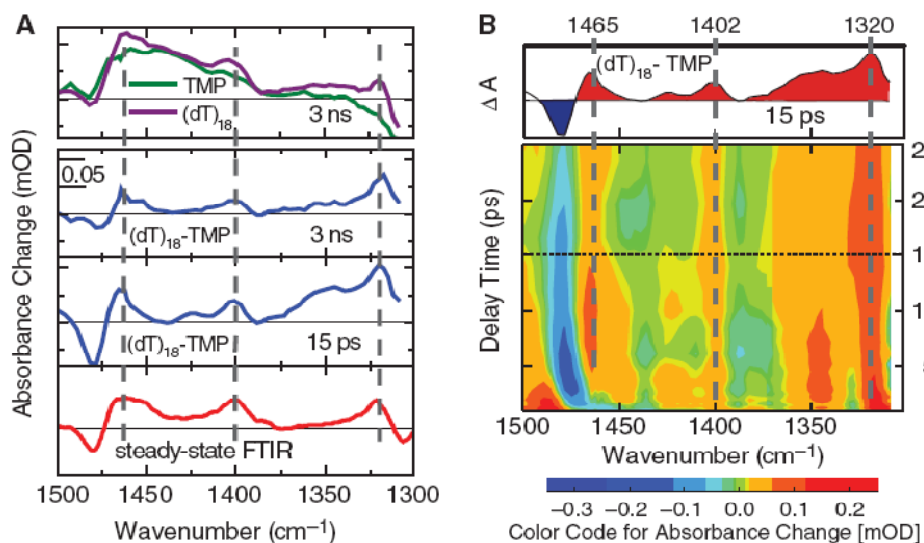


圖 1.39 A. $(dT)_{18}$ 減去 TMP 的差異吸收。 B. 色塊分析圖。⁵⁴

透過理論計算的模型檢視在胸腺嘧啶的激發態可能發生的能接轉換，圖 1.40 中胸腺嘧啶受激發到第二單重態 ($S_2, {}^1\pi\pi^*$)，在這狀態下具有多個可能發生的跨越點。可以透過介系統轉換到第二三重態 ($T_n, {}^3n\pi^*$) 以及第一三重態 ($T_\pi, {}^3\pi\pi^*$)，同時也具有兩個可進行單重態 [2s+2a] 路徑的錐形焦點 (CI)，分別可以內轉換到第一單重態 ($S_1, {}^1n\pi^*$) 以及基態。由於透過 CI 內轉換在自旋上是允許的，並且能量相當接近的過程，可提供快速的雙體形成時釋放能量及無能障的路徑。⁵⁹

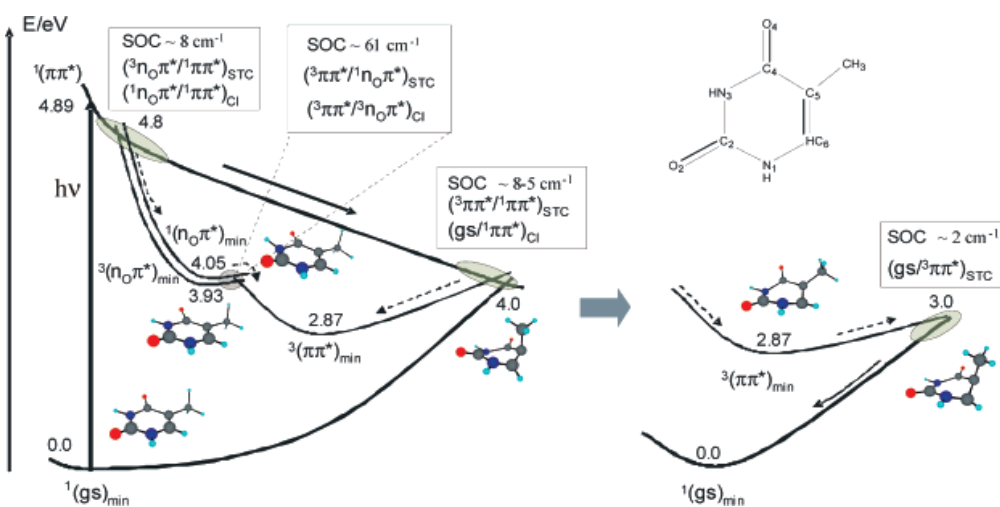


圖 1.40 理論計算所得胸腺嘧啶的激發態能階圖。⁵⁹

同時，透過雷射物化的方式也度量出可能的胸腺嘧啶與(dT)₂₀模型（圖 1.41A 與 B）。在此模型中將個態半生期標示上去，並且歸納出光物理數據。在兩個模型中由 S_π到 S_n是相當快的內轉換，並且符合在上述實驗中所得雙體形成速率小於 1 皮秒的歸納。此外，在圖 1.41C 表中提供的螢光量子產率僅在 10⁻⁴ 的數量級，也可以由可能發生的 CI 與 ISC 所競爭。在實驗的模型當中存在 M 態，文章稱做 ” Doorway State”，此態在單體及寡核酸中具有不同的作用，主要由於鄰近效應只發生於寡核酸中，因此單體的 M 態將導向於自退解（Self-quench）。⁶⁰

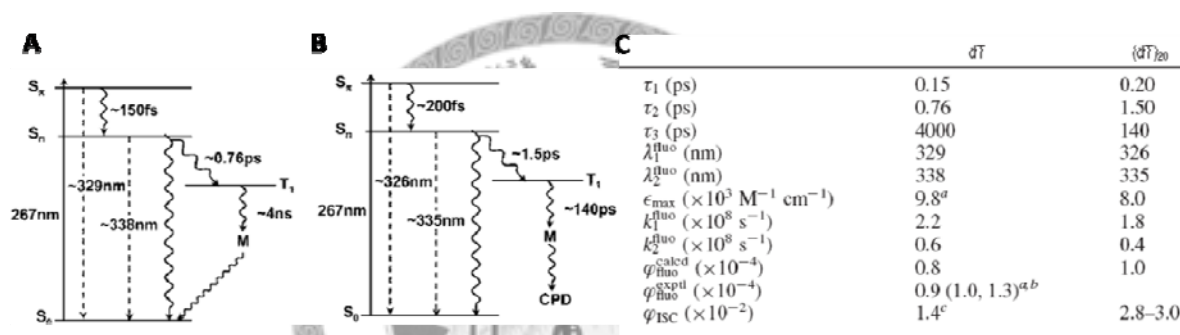


圖 1.41 A. 胸腺嘧啶單體與 B. 寡核酸(dT)₂₀ 的實驗能階。
C. 實驗所得光物理數據。⁶⁰

為了微觀討論胸腺嘧啶雙體的形成，必須再次借重於理論計算的模擬來推測。圖 1.42A 為所得單重態的路徑，透過 CI 上僅僅 15.9 Kcal/mol 的能差，激發態 S1 可以快速進行無能障的同步反應。相對地，如果這個反應透過熱的方式將需要攀升 87.6 Kcal/mol 的能量，因此在 Woodward-Hoffmann 選擇律中定義此類單重態的 [2+2] 環化加成反應熱力學上禁止但激發態則是允許的，並且經由 [2s+2a] 的路徑將是透過同步反應來達成，如圖 1.43 中在過渡態式形成歪斜的雙鍵夾角，如同圖 1.33C 中所走的同步生成兩鍵機制。然而在具有低能量且長半生期的三重態也可以參與反應，但所形成的雙體將藉由類雙自由基 (Diradicaloid) 的機制，一鍵一鍵生成 (圖 1.44)。在計算所得結果 (圖 1.42B) 可能透過 1-3-5-7-8 或 1-2-4-6-8

兩種路徑達到產物，在能量上由 5-7 或 4-6 兩步驟都需要額外的 50Kcal/mol 以克服在較低能量的三重態所需適應的旋轉應變 (Torsional Strain)，以達成第二個鍵結。但若考慮由 ISC 路徑進入三重態所調適的類單重態分子位向如 TT_S^2 ，則可能避免掉旋轉應變所帶來的能障而進行三重態的機制。⁶¹

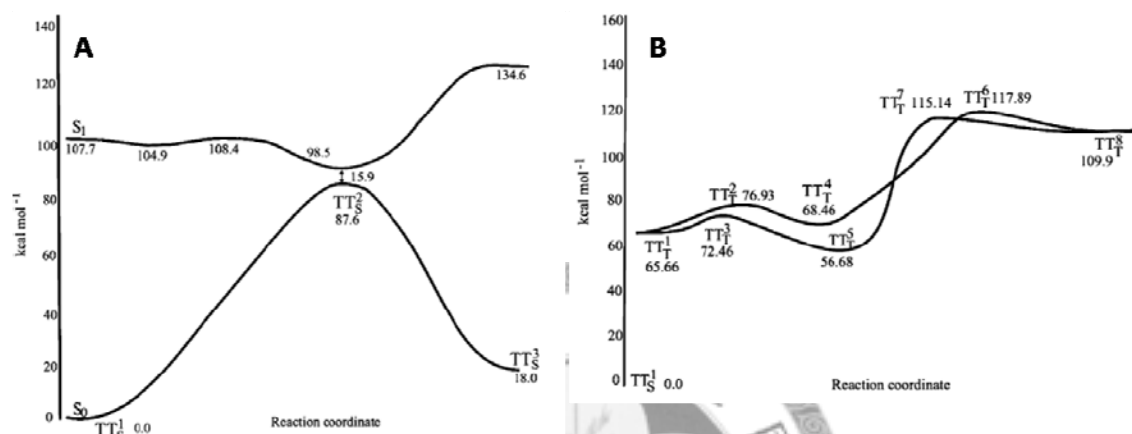


圖 1.42 A. 單重態反應途徑。 B. 三重態反應途徑。⁶¹

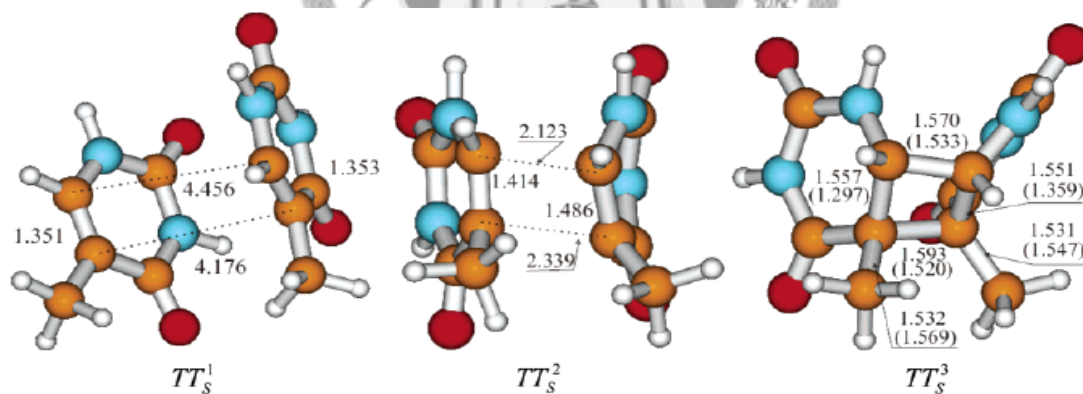


圖 1.43 單重態胸腺嘧啶雙體的形成，屬同步反應。⁶¹

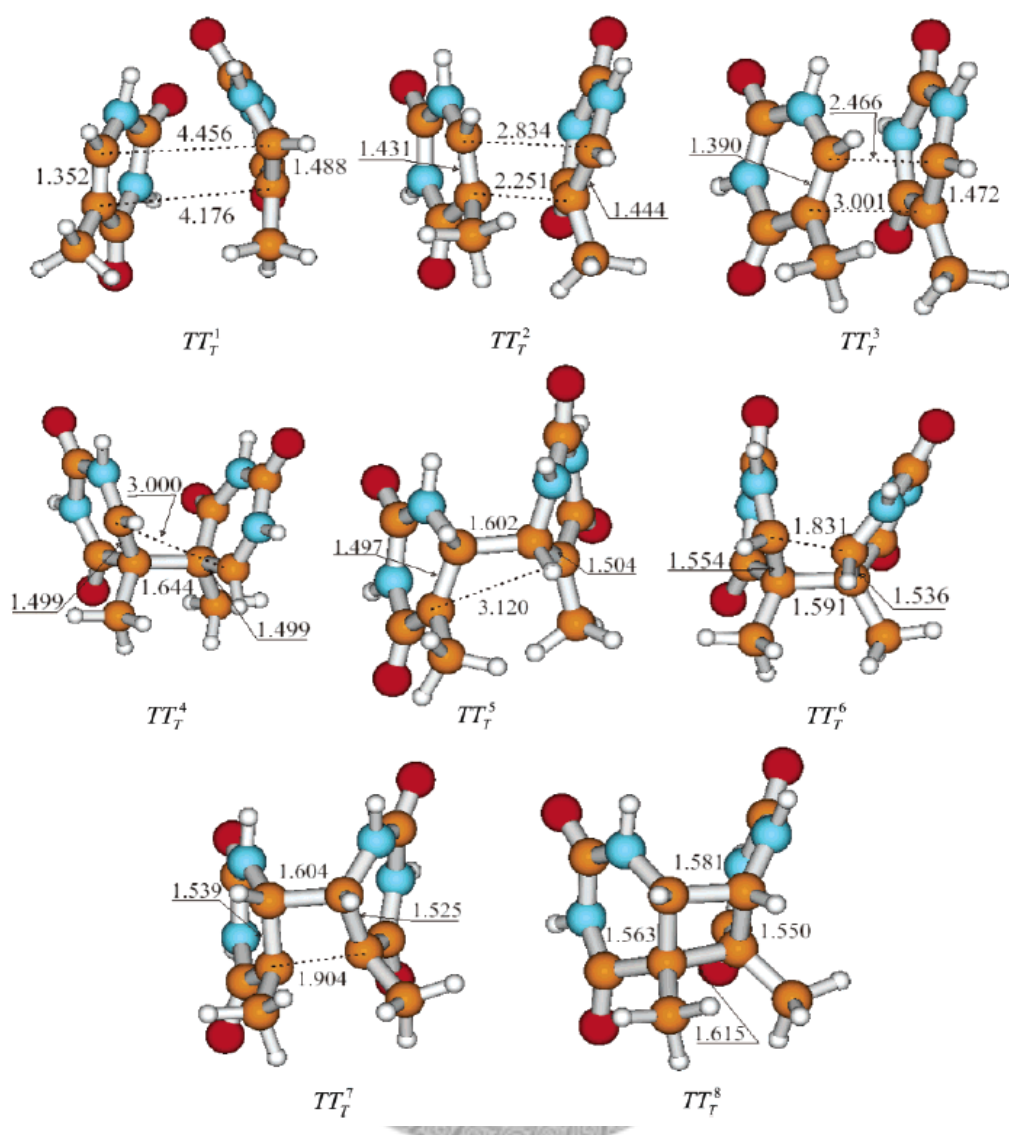


圖 1.44 三重態胸腺嘧啶雙體的形成機制，透過 1-3-5-7-8 或 1-2-4-6-8 兩種路徑。⁶¹

第二章 TMPC 與 MTMPC 設計動機與合成

前言

在吾人研究當中，將利用稍前第一章所討論的新穎廣泛表現的腫瘤標的一端粒，當作實驗的目標；並透過光療法的方式來活化所合成的光感藥物，對 DNA 造成傷害。在文獻當中，已有報導利用化學治療的方式來對端粒進行共價鍵傷害，在下節將敘述並參考這些成功的分子設計模型，並進一步討論。

2.1 DNA 傷害分子及端粒標的分子設計

在第一章所提及，傷害 DNA 的方式有許多種，然而運用於腫瘤化學治療的手段中，主要利用的都是親電性 (Electrophilic) 的分子，舉例如圖 2.1。這些分子在到達細胞核之前，即有可能被水分子或蛋白質上的親核性 (Nucleophilic) 胺基酸片段攻擊而失去活性。

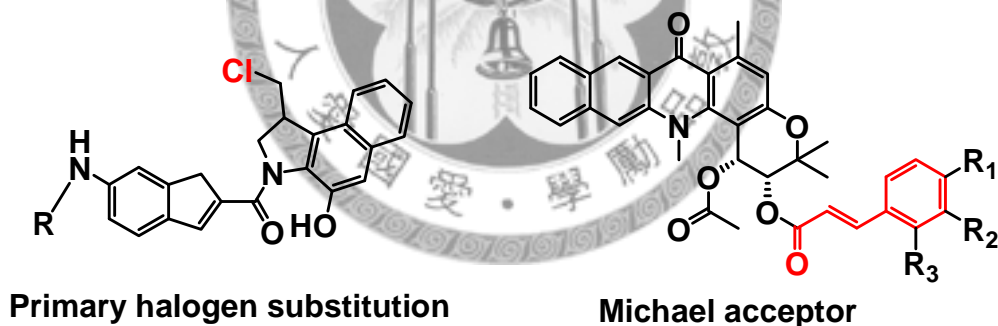


圖 2.1 親電性 DNA 傷害化合物片段，活性中心具含鹵素取代一級烷或者具有共軛烯酮片段。

此外若要針對端粒設計配體分子也在近期報導當中被披露出潛在的缺憾，即細胞當中的分子擁擠現象 (Molecular Crowding)，在細胞當中具有大量的巨分子約 0.4 g/mL 占據溶液體積約 20–40%，⁶²使細胞的溶液中具有高黏滯性 (Viscosity) 並改變在稀薄溶液中所鑑定的實驗結果。⁶³對於端粒而言，利用 40% 的 PEG (Polyethylene Glycol) 或甘油 (Glycerol) 模擬分子擁擠現象，造成配體分子對端粒的穩定

程度下降。圖 2.2 中，對 **BMVC** 而言，分別在鈉及鉀離子中可以穩定端粒約 15 至 20 度，但是引入了黏稠劑之後，穩定的能力下降至 3 度。透過 PEG200 來模擬的條件中，相對失去較多的氫鍵提供者，而在甘油中，則具有較多的羥基尚可提供足夠的氫鍵及較高的介電常數。因此在缺少水的參與，使端粒的結構趨於收斂而穩定，造成配體分子僅能夠穩定少量的能量。並且在衡量配體對端粒酶抑制能力的 TRAP-G4 Assay 中以 PEG200 溶液取代原用的稀釋溶劑，也造成 **BMVC** 在鉀離子條件下的 IC_{50} 由 $3.3 \mu\text{M}$ 上升到 $27 \mu\text{M}$ ，弱了 9 倍之多。⁶⁴

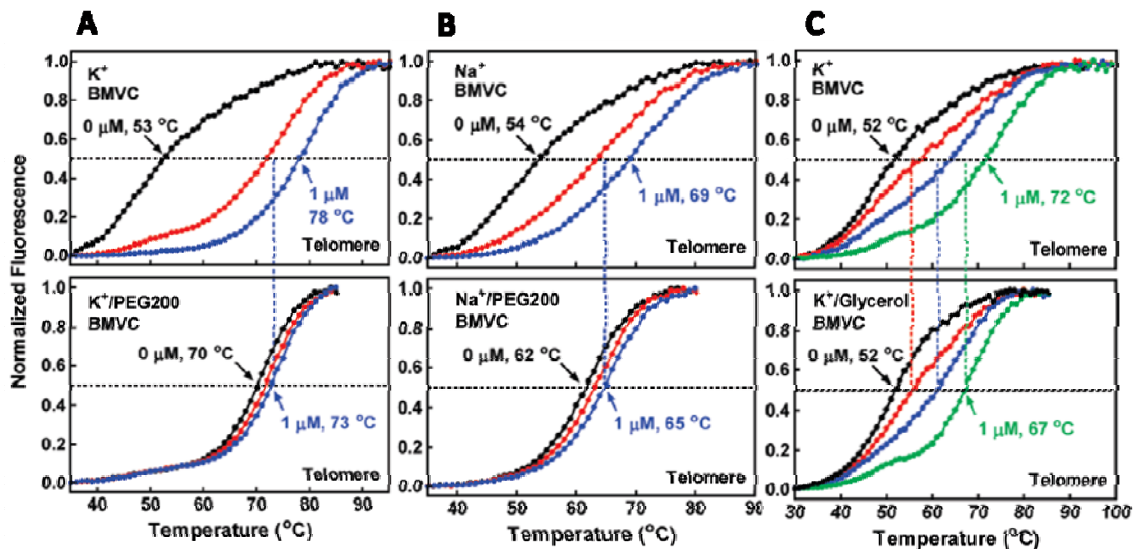


圖 2.2 上列不含黏稠劑，下列分別含有 A-B. PEG200 以及 C. 甘油。並於相對的 A. 鉀溶液 B. 鈉溶液 C. 鉀溶液中的 T_m 。⁶⁴

此外，僅透過配體進行穩定端粒四股結構而造成腫瘤細胞端粒酶受抑制，則端粒用罄前，腫瘤細胞將持續分裂 10 至 20 次，若以體積而言，該腫瘤已經成長了千倍之大。因此利用配體對於腫瘤端粒四股結構的標的辨識作用，加上具有對 DNA 傷害能力的化合物將可能更具有治療腫瘤的前瞻性。

的確，在 2007 年開始，Bombard 教授與 Teulade-Fichou 教授將其分別在抗腫瘤鉑金化合物及端粒四股結構配體的研究結合，合成了含有鉑金活性端的端粒配體，**Pt-MPQ** (圖 2.3A)。⁶⁵ 在鈉離子溶液的端粒模型中具有兩個較大的活性槽

(Active Cavity) 也就是上層四方結構版跟下層四方結構板與平行股及穿越股所圍成的區域 (圖 2.3B 灰色鍵頭所示)。在 Pt-MPQ 與端粒片段於鈉及鉀離子溶液下浸漬可形成端粒與鉑金的加成，透過變性膠體電泳 (Denaturing Gel Electrophoresis) 可以觀測到在圖 2.3C 中的第三及第四帶為生成共價性結合的產物所產生的延遲帶。利用酵素水解或鹼水解將 DNA 片斷化且決定出鉑金所作用的最佳位置在四股結構中的頭尾兩個鳥嘌呤 (圖 2.3D 中 G22 與 G2)。一般而言，形成鳥嘌呤四方結構 (圖 1.10B) 將會使最具有親核力的鳥嘌呤 N7 參與氫鍵而失去對鉑金的配位能力，在這個結果當中則是推測透過 MPQ 的嵌合所造成的鄰近效應，以及在前後兩端的鳥嘌呤對於四方結構的貢獻上具有較高的自由度，可能進行對鉑金的配位。⁶⁵

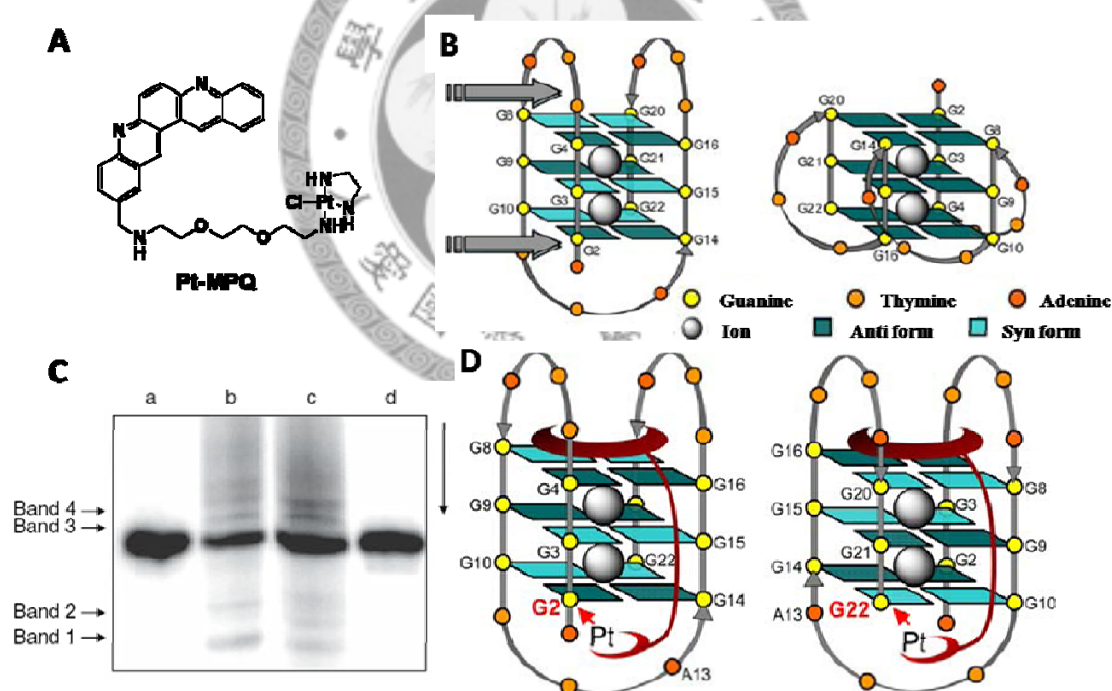


圖 2.3 A. 具有鉑金活性的配體分子 Pt-MPQ。 B. 最可能發生配體嵌合的位置。 C. 四組實驗分別為：a. 端粒片段 22AG 控制組。 b. 22AG 與配體在鈉溶液條件。 c. 22AG 與配體在鉀溶液條件。 d. 22AG 與缺乏鉑金的 MPQ 配體在鈉溶液條件。 D. 最可能發生共價鍵的位置。⁶⁵

近期，2009 年中，同一組人馬發展出具有平面性的三配位吡啶 (Terpyridine) 鉑金化合物 (圖 2.4 中 **Pt-tpy** 與 **Pt-ttpy**)，由於鉑金核心納入了配體分子的中心，因此所形成的共價鍵將無法利用具有最強親核力的鳥嘌呤 N⁷。並且受到配體嵌合的位置局限，透過鄰近效應，鉑金攻擊在平行股與穿越股上同樣具有親和力的腺嘌呤 (Adenine, A) N¹ 或 N⁷ (圖 2.4D)。又涉及兩個差異的π共軛平面，對端粒的結合位置有選擇性，圖 2.4B 中上層四方結構主要被 **Pt-tpy** 所偏好，相對下層板則為 **Pt-ttpy** 所選擇，且分別攻擊平行股上的 A7 位置與穿越股上的 A13 位置。⁶⁶

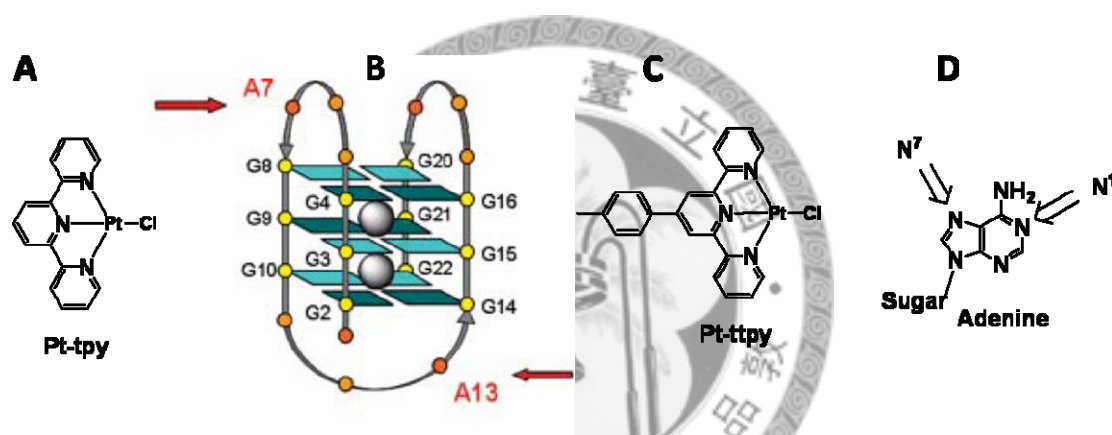


圖 2.4 以鉑為核心的有基金屬配體分子 A. **Pt-tpy** 與 C. **Pt-ttpy** 以及 C. 相對應選擇的端粒嵌合位置與攻擊的腺嘌呤位置。 D. 腺嘌呤可進行親核性攻擊的位置 N¹ 與 N⁷。⁶⁶

2.2 目標分子 TMPC 與 MTMPC 設計與合成

然而與前述的親電性分子相同，鉑上的配位氯是相當具有活性的配位基，可以輕易的被水解或者被親核性胺基酸集團攻擊，都將造成活性中心 Pt-Cl 鍵的失去。因此設計具有穩定的分子集團，同時又可以達到活化而進行共價鍵的生成。這樣的分子在吾人的設計過程中，將直接聯想到透過光親合類型 (Photoaffinity) 的反應來達成，其中又衍生出在第一章所介紹的 [2+2] 光激發環化加成反應，應用於內質性的 DNA 光化學傷害機制，將可能是對 DNA 有效造成共價鍵的方式。

2.2.1 預期目標與設計基礎

在吾人的研究中，首先對於張大釗教授團隊所開發的 **BMVC** 感到興趣，由於 **BMVC** 具有在第一章所提及的特徵螢光訊號改變，以及對於腫瘤分子的標的作用。因此吾人透過 **BMVC** 出發，以咪唑衍生物為中心骨架進行延伸，此時參考陽明大學許世宜教授利用模擬計算 (Docking and Simulative Annealing)，推演出 **BMVC** 與端粒片段 Hum22 的辨識結合作用模式。圖 2.5A 指示在端粒片段 Hum22 上的可能的配體結合位置(虛線圈起處)，其中最穩定的辨識結合位至於其左圖 B，配體嵌入平行股與上層四方結構當中。透過圖 2.5C 與 D 的詳細描述，紫色為與 **BMVC** 分子進行 π 堆疊的四方結構中三個鳥嘌呤，分別與 **BMVC** 上的吡啶陽離子部分以及咪唑中心進行堆疊(堆疊距離列於圖 2.5E 表中並示於圖 2.5D)。在平行股上的鹼基也參與了 π 堆疊的穩定作用，分別在 TTA 平行股上的 A19 (圖 2.5C-D 中綠色片段) 與咪唑中心生成 π 堆疊；在股上的 T17 (圖 2.5C-D 中藍色片段) 也對調適而翻轉的吡啶陽離子部分提供 π 穩定的堆疊能量。⁶⁷

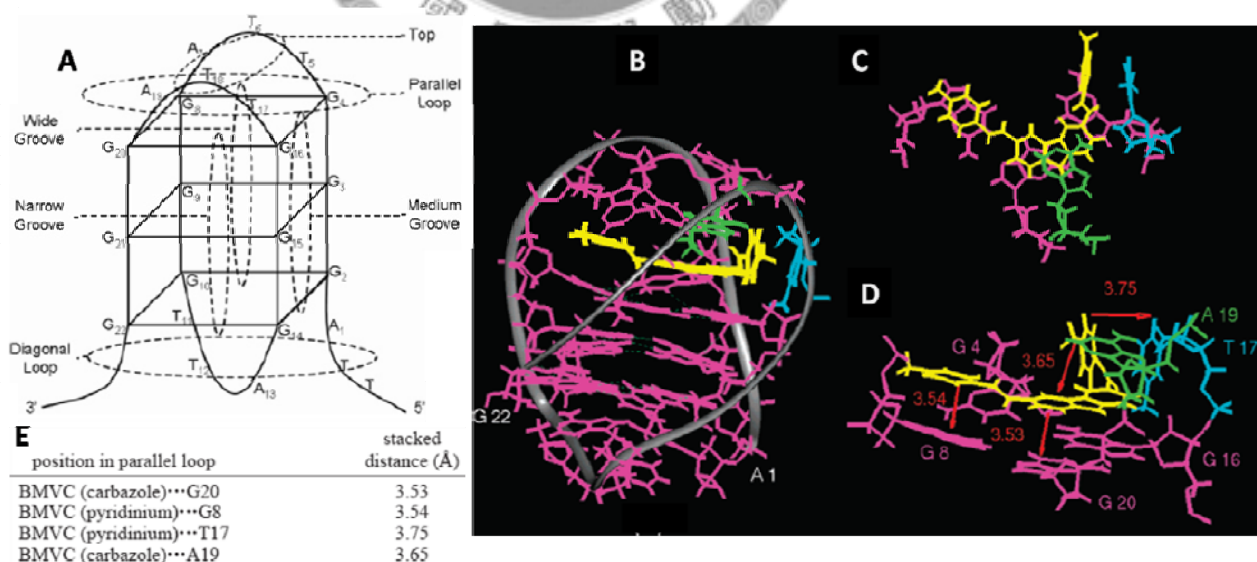


圖 2.5 A. 端粒片段 Hum22 可能的結合位置。 B. 模擬出的 **BMVC** 與端粒片段進行結合的最適圖。 C. 俯視圖截圖與 D. 側視圖截圖。 E. 進行 π 堆的共軛分子間距離。⁶⁷

最適合配體的結合位置為兩端堆積的模型 (End Stack)，如圖 2.6A。其中在上層平行股間堆積的模式可以獲得 84.52 Kcal/mol 的穩定能量，相對在底層穿越股間堆積的模式則可獲得較少的 69.06 Kcal/mol 的穩定能量。⁶⁷ 吾人對於這兩個結合位置的選擇主要決定以較高的作用能力的上層堆積，且在圖 2.6A 當中可以見到，**BMVC** 分子必須如穿針一般進入穿越股所圍繞的四方結構空間；相對地，在上層平行股端則具有較高的機會使配體接近。因此在圖 2.6B 當中，吾人透過調適的 **BMVC** 分子結構闡述在研究中所進行的設計。由結合調適的 **BMVC** 在橋連的雙鍵上 (Bridged Olefin) 為接近無鍵結 (Non-Bonding) 的旋轉，在末端的吡啶陽離子與相鄰的平行股上 T17 獲得 π 堆疊 (藍色虛線所示)。透過此模型，吾人將利用胸腺嘧啶受光激發形成雙體的方式將配體分子與端粒四股結構進行共價性的結合。因此在最接近 T17 的吡啶陽離子在吾人的設計中，將透過胸腺嘧啶取代而成目標化合物 **TMPC** 與 **MTMPC**，將預期透過 [2+2] 光激發環化加成反應而得到胸腺嘧啶雙體的形成 (如紅色虛線所示)。

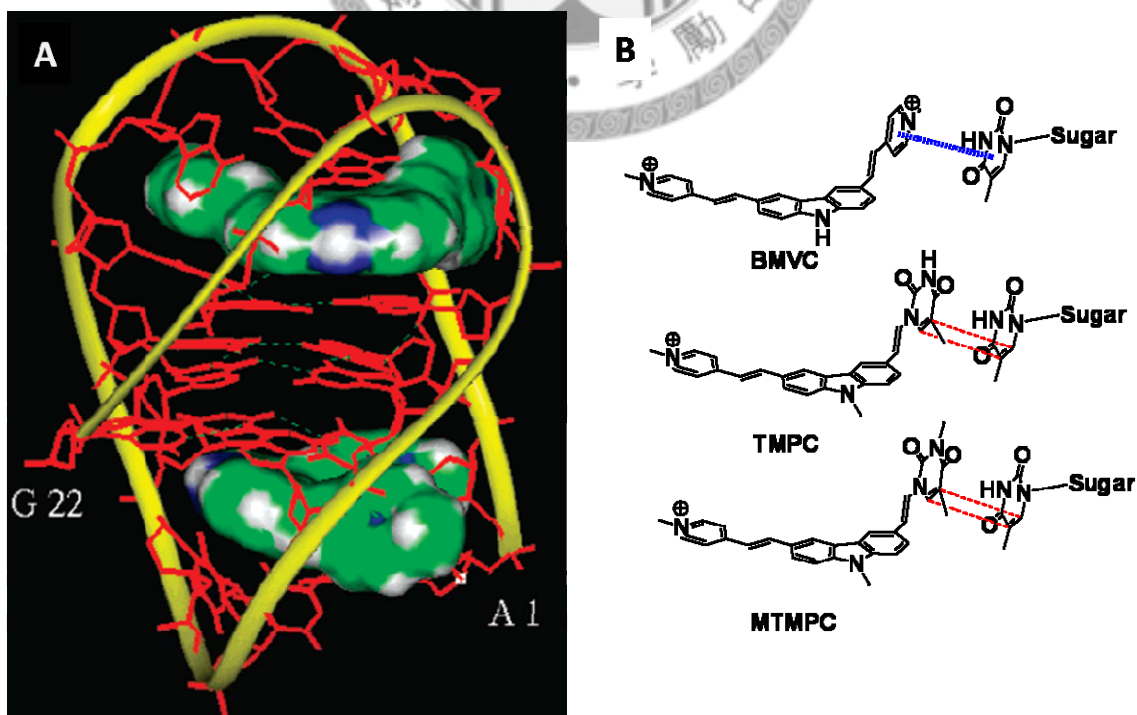


圖 2.6 A. **BMVC** 與端粒片段 2:1 的結合模型。⁶⁷ B. 目標化合物 **TMPC** 與 **MTMPC** 的結構設計與可能的光產物鍵結。

2.2.2 逆合成分析與實驗合成路徑選擇

首先觀察 **BMVC** 與目標分子 **TMPC** 與 **MTMPC** 的差異 (圖 2.7)，明顯可以分辨出 **BMVC** 具有對稱性的結構。反之，在吾人所設計的目標化合物上為了保留與 **BMVC** 骨架的相似度，以及具有帶正電荷的吡啶陽離子以利於對端粒的結合，因此僅取代一側的吡啶陽離子為胸腺嘧啶。造成分子上具有相同的乙烯連結與吡啶中心，卻具有不同的工作手臂，不利於合成上的進行。在 **BMVC** 的合成是透過 Heck 烯化耦合的反應鏈結起吡啶與吡啶再透過簡單的甲基化而得。³⁹ 因此吾人必須謹慎考慮合成不對稱的目標化合物。

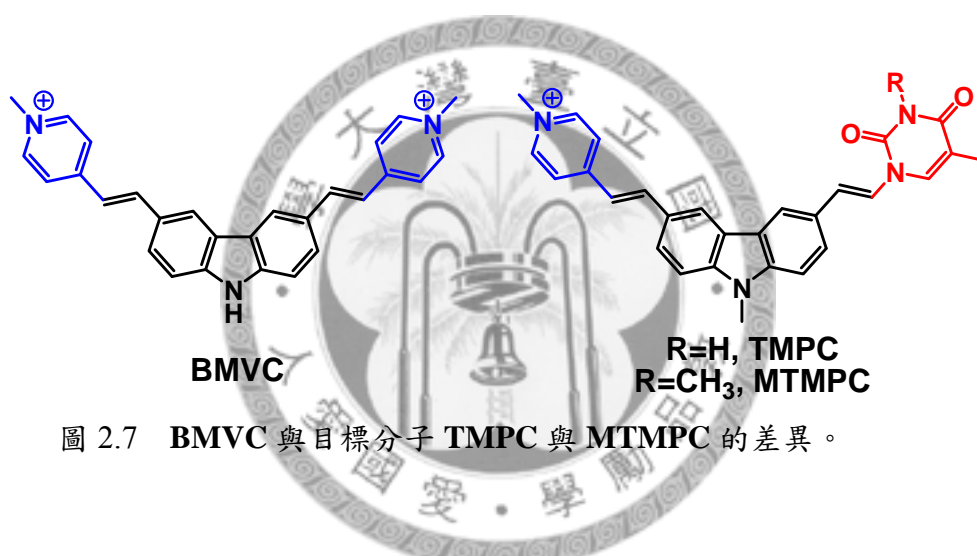


圖 2.7 **BMVC** 與目標分子 **TMPC** 與 **MTMPC** 的差異。

逆合成分析上，首先先將合成上難以進行純化的吡啶陽離子去除甲基。接著便面臨到相當大的抉擇，兩個部對稱的乙烯鍵結必須同時拆解，卻又必須考慮合成時可以控制單次耦合的反應。因此拆解為三種可能的途徑，Suzuki Coupling、Heck Reaction 以及 Wittig 或 H.W. E Reaction。然而 Suzuki Coupling 所需要的硼酯或鹵乙烯官能團無法在胸腺嘧啶的 N¹ 上建立，因此轉以考慮其他路徑。最簡短的路徑由 Heck Reaction 達成 (圖 2.8 右側路徑)，但是在吾人合成初期利用本實驗室常用的條件：醋酸鈹以及配體三新丁基膦催化，以碳酸鉀伴隨界面活性劑四正丁基銨鹽在甲醯胺中反應，無法成功將胸腺嘧啶與吡啶間乙烯鍵結形成，然而卻可以很有效率的形成雙吡啶的產物。因此轉而向吾人較為熟悉的 Wittig 與 H. W. E.

反應來合成乙烯鍵（圖 2.8 左下方路徑）。再參考文獻合成完成化合物 **11** 與化合物 **9**，⁶⁸⁻⁶⁹ 並利用胸腺嘧啶的 N¹ 上具有的親核力，取代 **11** 上的甲苯磺酸集團而得到化合物 **10**。⁷⁰⁻⁷² 但事事難料，化合物 **10** 在吾人的嘗試下透過多種的溶劑與鹼的組合都不能夠得到所求的化合物 **7**，並僅發現化合物 **10** 的分解副產物（Decomposed）。因此吾人再次透過 Heck 反應，並嘗試改變所用的配體、鹼、溶劑以及反應的溫度與時間，成功獲取目標化合物 **TMPC** 及 **MTMPC**。

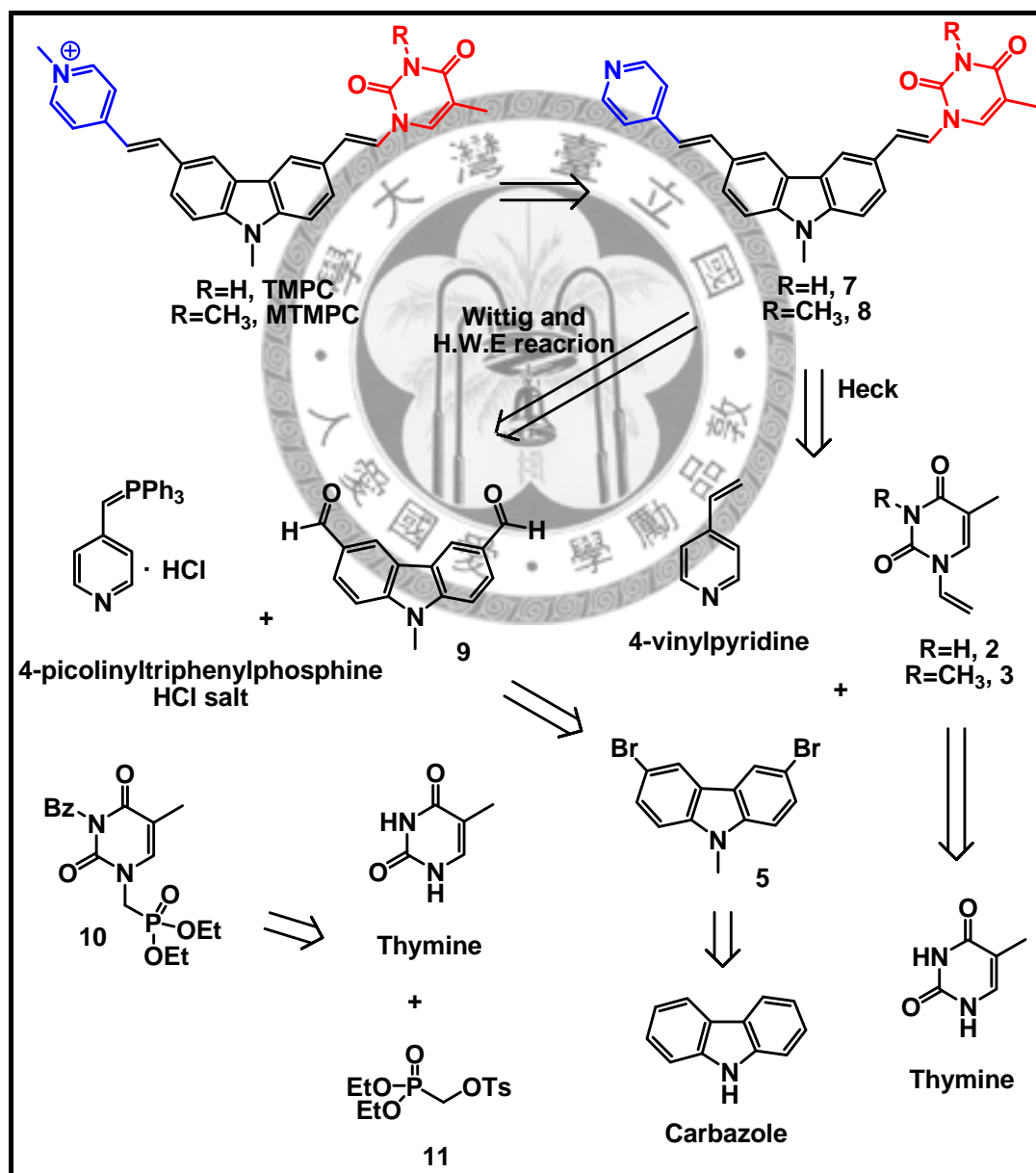
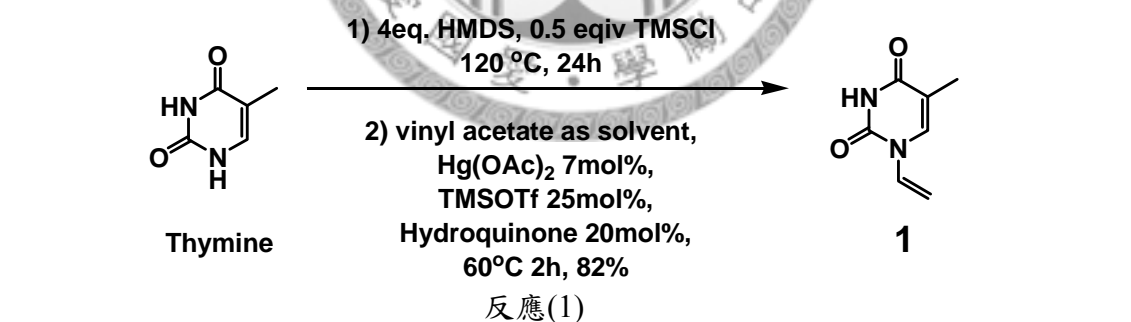


圖 2.8 逆合成分析及路徑選擇圖。

2.2.3 目標化合物 TMPC 及 MTMPC 的合成

由逆合成分析所得成功的路徑化合物，在此小節將一一合成。首先在胸腺嘧啶上建立乙烯取代基以備後續進行 Heck 耦合反應時所使用。如反應 (1) 所示首先在胸腺嘧啶在氯三甲基矽烷 (Trimethylsilyl chloride, TMSCl) 下透過六甲基二矽氮烷 (Hexamethyldisilane, HMDS) 催化進行互變異構作用 (Tautomerization) 並脫去質子而形成矽氧鍵保護。移除過多的 HMDS 之後在原瓶中加入反應劑同時也作為溶劑的乙烯乙酯，以及二乙酸汞與三甲基矽烷三氟甲磺酸酯 (Trimethylsilyl triflate, TMSOTf) 作為催化劑，在反應過程當分別提供活化乙烯乙酯中乙烯雙鍵與去矽氧保護活化胸腺嘧啶 N¹ 的活性，反應機制詳如圖 2.9。受活化的胸腺嘧啶在去矽烷保護後得到 N¹ 的親核力，對受二乙酸汞活化的乙烯鍵進行攻擊得到乙烷的中間體，進一步離去二乙酸汞與去掉 4 號羰基的矽氧保護可得到化合物 1。其中反應中所加入的對苯二酚 (Hydroquinone) 作為自由基的穩定劑，以避免發生聚合反應。因此可得到化合物 1 兩步產率 82%。⁷³



Proposed Mechanism:

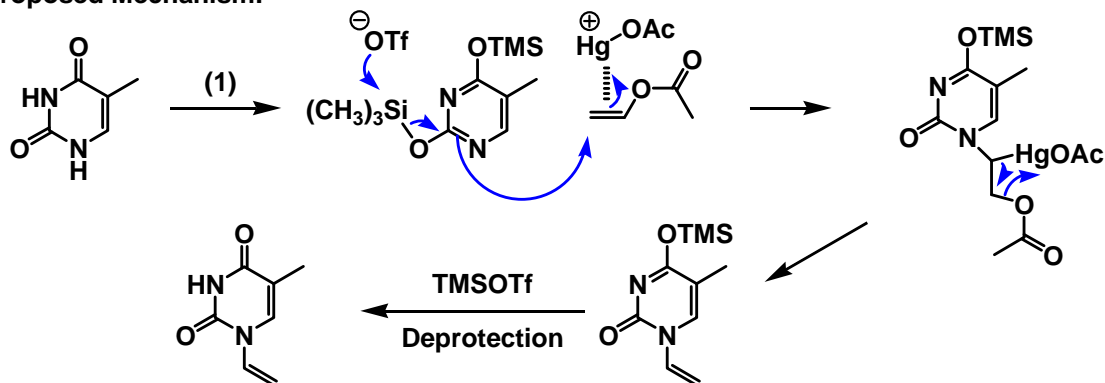
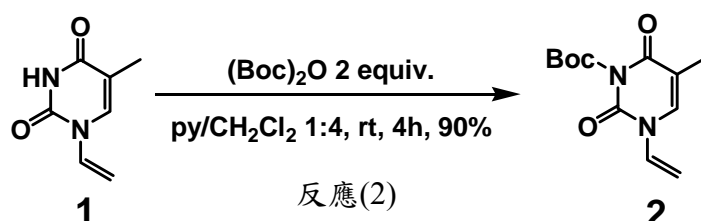
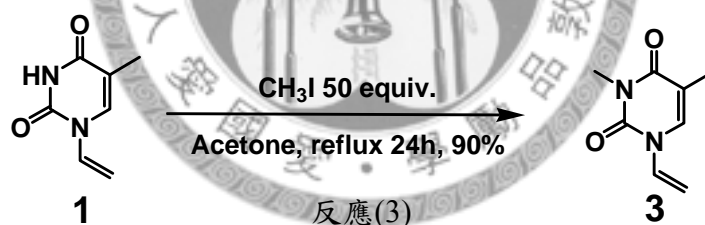


圖 2.9 反應 (1) 的關鍵反應機制。

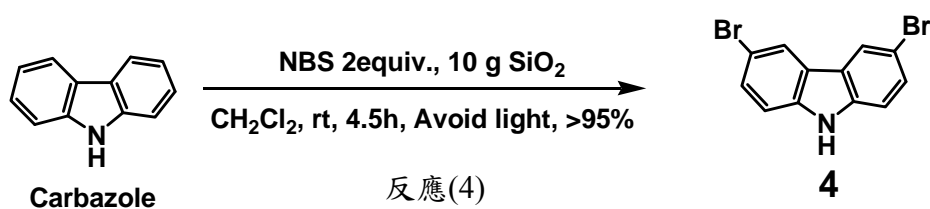
接著將所得化合物 **1** 在室溫下，透過吡啶在二氯甲烷溶劑中扮演中和反應中釋放出的質子，化合物 **1** 可以有效率的進行 N³ 的三級丁酯 (Boc) 的保護而得到化合物 **2**，如反應 (2) 所示，產率大於九成。⁷⁴



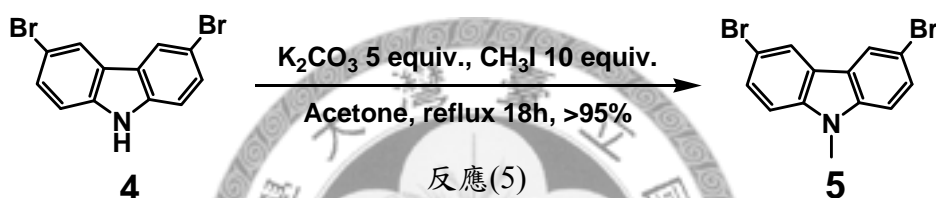
相同地，在合成上為了簡化反應的複雜度，吾人也嘗試將胸腺嘧啶 N³ 透過甲基化進行保護。如反應 (3) 所示，反應只須遵從一般的甲基化反應，在丙酮溶劑中利用碘甲烷有效率的進行 N³ 的保護。反應後僅需加入甲醇或水去除過量的碘甲烷活性即可獲得化合物 **3**，產率大於九成。



為設計符合 Heck 耦合反應的起始物，在胸腺嘧啶上已經具有乙烯的取代，相對就必須在咪唑上建立芳香族鹵素的取代，如反應 (4)。先將咪唑以二氯甲烷溶去置於反應瓶中，並加入催化用的矽膠粉末。反應過程中溴化劑溴琥珀醯亞胺 (*N*-bromosuccinimide, NBS) 懸浮於二氯甲烷溶液中，透過加料漏斗避光並緩緩加入均勻攪拌的反應溶液中。過程當中矽膠扮演路易氏酸的角色並提供豐富的反應表面基，在避光的條件下使加入的 NBS 成限量試劑並限制其反應活性，與受氮推擠而電子豐盈的咪唑 3 號與 6 號兩個位置行自由基反應而得到化合物 **4**，產率接近 100%。⁷⁵

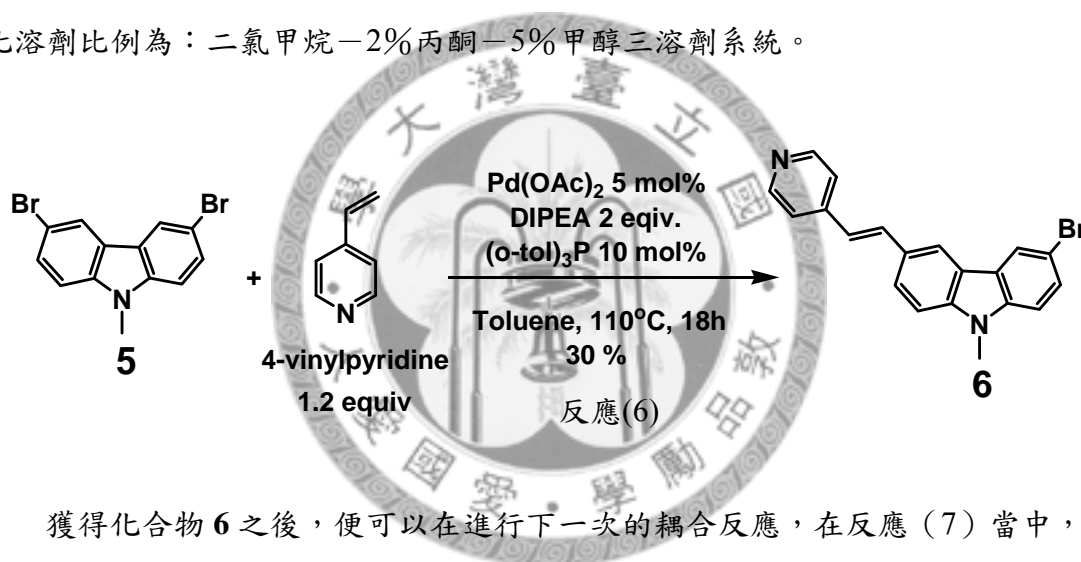


在合成上由於先前無法輕易透過化合物 4 進行耦合反應，因此為了合成上的便利性與可行性，將咔唑 N⁹ 透過相似的甲基化反應進行甲基取代得到化合物 5，如反應 (5) 所示，以避免自由的氫氫鍵在合成路徑上造成干擾。

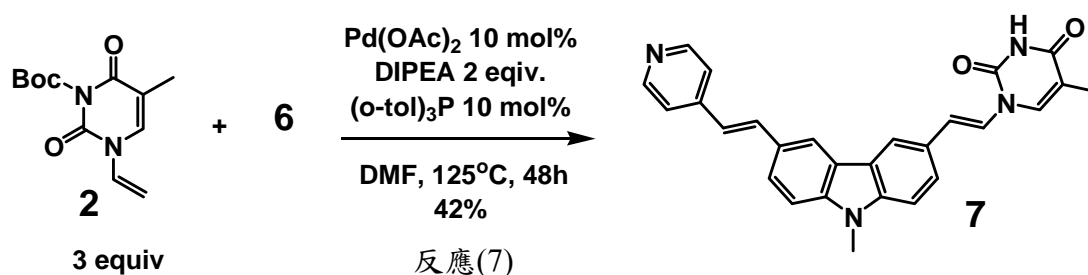


完成 Heck 反應前的起始物準備，即可進行 Heck 反應的嘗試。在吾人的研究過程當中，參考許多文獻並且做了許多的嘗試。利用市面上可獲取的配體三甲苯基膦取代已停產的三新丁基膦，可以在模型實驗當中得到相當的產率，因此在此決定透過三甲苯基膦進行相關的嘗試。並且考量反應當中減少額外由介面活性劑所造成的水分干擾，在選擇鹼的部分多直接選擇胺類的有機鹼。然而反應溫度所致，選擇二異丙基乙基胺 (Diisopropylethylamine, DIPEA) 當作反應中的鹼可以避免掉在高溫的條件下相對透過回流失去鹼的當量。進一步在溶劑與溫度上的選擇，也多了嘗試，其中吡啶與甲醯胺作為溶劑時可以得到高產率的雙吡啶產物。而在直接以三乙基胺 (Triethylamine, TEA) 或四氫呋喃 (Tetrahydrofuran, THF) 作為溶劑時，則因沸點較低所導致需要相當長的反應時間，並且以雙吡啶產物為主以及產率低。另外透過二氧陸園 (Dioxane) 也是以雙產物為主，且產率低。其中嘗試甲苯作為溶劑時可以在短時間 (約 3 小時內) 得到單側吡啶產物生成，但是產率也低；若提高反應時間則又使以雙吡啶產物為主。其中吾人觀察到在反應當

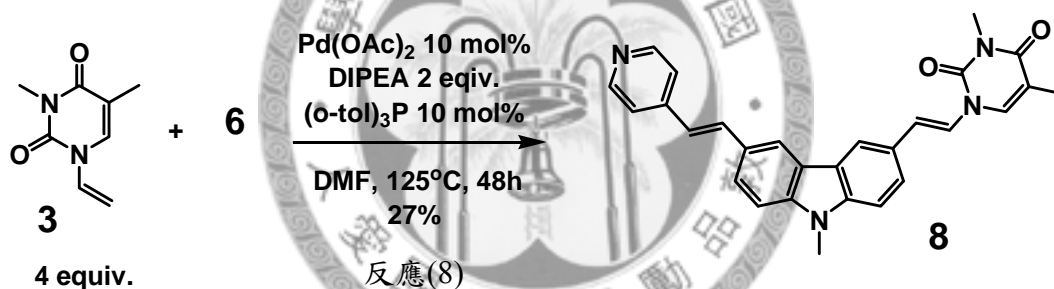
中甲苯似乎不對單側產物吡啶與雙吡啶產物有好的溶解度，因此吾人嘗試透過對化合物 **5** 的溶解度極限的甲苯量進行反應，可以發現反應過程中析出大量的紅色化合物，取出鑑定發現皆是以單吡啶產物為主，在延長時間至 18 小時大致上可以得到五成左右的化合物 **6**。但相對的在溶解度不好的條件下在更長的時間也無法完全消耗起始物，並且會有部分的化合物 **6** 再進行反應成雙吡啶產物。在最佳化的條件如反應 (6) 所示，然而其中所得化合物 **6** 的極性相當接近吡啶起始物，因此儘管可以在反應當中得到超過五成的產物，也只能單離出三成的純化合物 **6**。此外透過管柱層析也不能夠在常用的雙溶劑系統中分離出化合物，在吾人嘗試的最佳化溶劑比例為：二氯甲烷-2%丙酮-5%甲醇三溶劑系統。



獲得化合物 **6** 之後，便可以在進行下一次的耦合反應，在反應 (7) 當中，由於反應性不甚好，因此需要利用 3 當量的化合物 **2** 來推動反應，並且反應的條件也更加的嚴苛，需要利用 10 mol% 的醋酸鈣進行催化，並且在甲醯胺中，以 125°C 下進行兩天的反應，過程中由於使用甲醯胺為溶劑，在吾人的反應習慣將會包上鋁箔避光以降低甲醯胺裂解所造成的干擾。此外反應結束也意外得到了去 Boc 保護的化合物 **7**。由於具有胸腺嘧啶的官能基，化合物 **7** 的溶解度相當的差，透過再結晶僅能得到灰黃色的粉末，且光譜鑑定下式相當複雜。同樣地，透過管柱層析也需要仰賴三溶劑系統來進行調和，所用的沖提溶劑比例為：二氯甲烷-10%丙酮-5%甲醇。並且由於溶解度過差，在層析過程當中會不停析出，所以透過短而寬的矽膠管柱進行層析，可以較有利於收集化合物而減少層析時的損失。

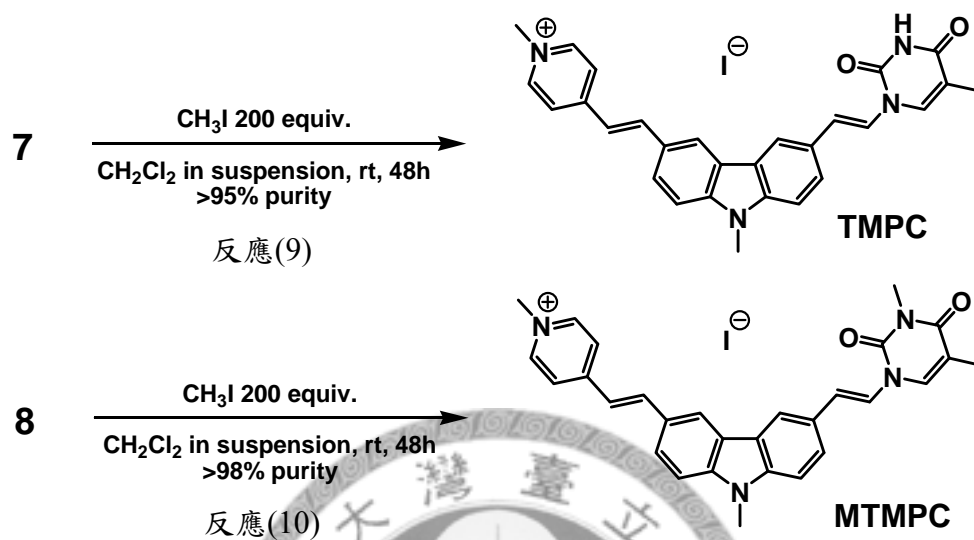


相同於化合物 **7**，化合物 **8** 透過相仿的反應方式得到，如反應 (8) 所示。其中化合物 **3** 在反應過程當中的表現更令人髮指，必須以更高的 4 當量化合物 **3** 來驅使反應有較高的產率。在吾人的實驗嘗試當中，的確，27% 是這個反應的極限，並且相同地需要透過三溶液系統來完成層析，其所用溶劑比例為：二氯甲烷—5% 丙酮—5% 甲醇。



將所得的化合物 **7** 與化合物 **8** 進一步甲基化就可以得到目標產物 **TMPC** 以及 **MTMPC**。如反應 (9) 與反應 (10) 所示，在室溫下利用少量二氯甲烷作為溶劑，使化合物 **7** 與化合物 **8** 呈現懸浮並利用超音波充分震盪，再加入過量碘甲烷進行甲基化反應。化合物 **7** 與化合物 **8** 將由灰黃色分別轉為深棕色的 **TMPC** 與鮮紅色的 **MTMPC**。並且在實驗進行過程中，必須多次進行超音波震盪以維持溶液的懸浮狀態。此外，在化合物 **7** 反應得到 **TMPC** 的過程，曾考慮胸腺嘧啶上 N^3 也可能進行甲基化，因此進一步在 N^3 上進行再一次的 Boc 保護，但是在得到 Boc**TMPC** 後利用三氟醋酸於二氯甲烷的強酸條件去保護時，則發現所得 **TMPC** 化合物不單純，有部分化合物崩壞。由於 **TMPC** 與 **MTMPC** 皆具有正電荷且溶解度差，不利於進

一步的分離，因此直接採取利用懸浮的化合物 **7** 在不易受溶劑交換 N^3 質子的狀態下進一步限制其稍弱的親核力，而得到高純度的 **TMPC**。



所得化合物皆經由核磁共振氫譜，碳譜以及高解析質譜的鑑定後才進行進一步的光物理與 DNA 相關討論。

第三章 結果與討論

合成並鑑定所得到的目標化合物 **TMPC** 與 **MTMPC**，吾人將進一步將探討化合物是否對於端粒具有辨識結合作用，並且是否具備 **BMVC** 相仿的螢光顯影性質以及所推測具有的光激發 [2+2] 環化加成的作用。在此章節將透過化合物的吸收及螢光光譜、DNA 的旋光度光譜以及解旋溫度的測試以了解 **TMPC** 與 **MTMPC** 在 DNA 存在時的光物理性質。並且透過膠體電泳的結果討論化合物與 DNA 的作用強度與光激發後化合物是否可與 DNA 形成預期的光化學產物。

3.1 **TMPC** 與 **MTMPC** 的光物理表現與 DNA 作用後的吸收及螢光結果

對於 **TMPC** 與 **MTMPC** 的光物理性質討論，首先將兩個化合物與對照組 **BMVC** 分別溶於二次去離子水中成為 10 μM 水溶液，與 2 當量的化合物對照組(分別標記為 **TMPC 2x** 與 **MTMPC 2x**) 濃度為 20 μM 。兩組 DNA，端粒片段 Hum24：(TTAGGG)₄ 以及雙股片段 Linear Duplex(LD)：(GCGCAATTGCGC) 溶於 Tris 緩衝溶液中酸鹼值為 7.5，並具有 150 mM 的氯化鈉作為提供四股結構於 90°C 再鍊合 (Reannealing) 時可以得到鈉溶液態的四股結構。所獲得配體的單純水溶液最大吸收峰皆在 430 nm 附近，但是 **TMPC** 與 **MTMPC** 吸收值相對較 **BMVC** 低約兩倍左右(見圖 3.1)。當分別加入 LD 或 Hum24 與 **BMVC** 及化合物 **TMPC** 與 **MTMPC** 進行作用後。發現 **BMVC** 吸收峰紅移至 455 nm 及 465 nm，推測為 **BMVC** 與 DNA 結合後所處的環境及性教水溶液低，使基態分子的最高填滿能階 (HOMO) 被去穩定而降低 HOMO 與最低未填滿能階(LUMO)間的能隙減少，而有紅位移。**TMPC** 在 LD 存在下，並無明顯的改變，然而有 Hum24 的存在下，吸收峰紅位移至 440—450 nm 之間，推測 **TMPC** 與 **BMVC** 相仿，皆受到 DNA 的為環境極性所影響，得到較活化的基態而紅位移。較特殊的是 **MTMPC** 與 **BMVC** 不同不受到 DNA 存在與否的影響，皆維持最大吸收峰於 430 nm 附近。

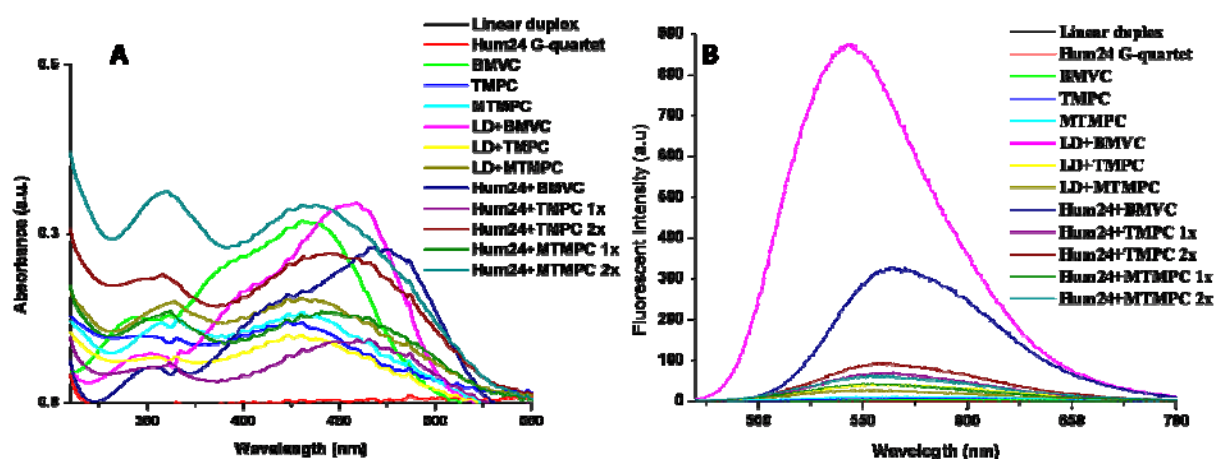


圖 3.1 TMPC 與 MTMPC 水溶液態及 DNA 的 A. 吸收及 B. 螢光光譜。

未標示 2x 配體與 DNA 皆為 10 mM，2x 則具有 20 mM 配體濃度。螢光光譜皆由各吸收光譜中的最大吸收進行激發，以激發/放射光柵為 10/3 所得。

透過吸收光譜中各組訊號的吸收最大值進行激發，得到相對應的螢光放射光譜，圖 3.1B。圖中使用光柵組合為吸收/放射為 10/3。明顯發現 DNA 在此區段並不會貢獻出螢光訊號，而且化合物的水溶液(圖 3.1B 中 **BMVC**、**TMPC** 與 **MTMPC** 三組)也都不具有明顯的螢光性質。分別加入兩種 DNA 之後，得到 **BMVC** 所具有的雙股特徵螢光訊號 545 nm (**BMVC**+**LD**) 與四股結構螢光訊號 575 nm (**BMVC**+**Hum24**)，符合第一章中所描述的 **BMVC** 所具有的感測性質(圖 1.22)。然而 **TMPC** 與 **MTMPC** 受到胸腺嘧啶存在的快速內轉換及相對低能量的三重態影響(圖 1.40)，以及於第一章中所提及胸腺嘧啶相對極低的螢光量子產率約在 10^{-4} (圖 1.41)，**TMPC** 與 **MTMPC** 在螢光的表現上都不如 **BMVC** 原有的明顯，在低光柵條件的螢光光譜中，僅能發現 **BMVC** 的螢光改變。利用雷射染料 **Coumarin-6** 作為參照，利用與化合物水溶液在 457 nm 的共吸收進行激發，所得放射峰面積代入(式 3.1)中，得到 **TMPC** 與 **MTMPC** 量子產率分別為 4.09×10^{-3} 與 1.98×10^{-3} 。其中 Φ 為量子產率， n 為溶劑折射率， A 為放射峰下面積積分值。

$$\phi_r = \phi_{STD} \left(\frac{n}{n_{STD}} \right)^2 \left(\frac{A}{A_{SRD}} \right) \quad - \text{(式 3.1)}$$

由於放光強度遠不及 **BMVC** 高，因此將光柵上修至吸收/放射為 10/8，並重新得到移除 **BMVC** 的螢光光譜（圖 3.2A），可獲得較明顯的 **TMPC** 與 **MTMPC** 螢光訊號。首先在單純水溶液中的 **TMPC** 與 **MTMPC** 都具有相當廣而低強度的放射峰，在 200 μM 的水溶液中肉眼中可以透過手持紫外光燈照射呈現微弱螢光的橘黃色溶液。其中 **TMPC** 所具有的螢光放射峰最大值約為 610 nm，相對 **MTMPC** 則具有較短波長的 560 nm 的放光。兩化合物在 LD 或 Hum24 存在下，螢光強度都有明顯的提升，並且波長皆位移至 550—560 nm 之間。由於 DNA 對於化合物提供的低極性環境可以避免極性分子對於基發態的碰撞導致能量損失，因此可以得到較強的螢光強度以及藍位移的螢光放射峰。

將存在 DNA 的配體水溶液放射峰下面積積分除去期單純水溶液的螢光放射峰面積作圖得到圖 3.2B，相對於無 DNA 存在的單純配體水溶液螢光訊號，在 LD 的存在下，**BMVC** 有接近 200 倍的提升（圖 3.2B 洋紅色色條），相對在 Hum24 存在時則僅有 80 倍的螢光強度提升。而吾人所合成的 **TMPC** 與 **MTMPC**，在 Hum24 存在時的 **TMPC** 與 **MTMPC** 螢光強度提升分別為 6.7 倍與 3.2 倍（圖 3.2B 紫色與綠色色條）。然而 2 當量的化合物條件中 **TMPC** 2x 與 **MTMPC** 2x 所受 Hum24 的螢光強度提升程度相近，比 1 當量的條件中成長約 1.3 倍達到 8.83 倍以及 4.45 倍的螢光強度提升（圖 3.2B 棕色及藍綠色色條）。LD 的存在下，**TMPC** 與 **MTMPC** 不同於 **BMVC**（圖 3.2B 深藍色色條）具有相對強於 Hum24 的螢光強度提升的效果，而是較弱於 Hum24 存在時的螢光強度。相對於 LD 的存在，Hum24 使 **TMPC** 與 **MTMPC** 的螢光強度具有兩倍強於 LD 的螢光強度提升。

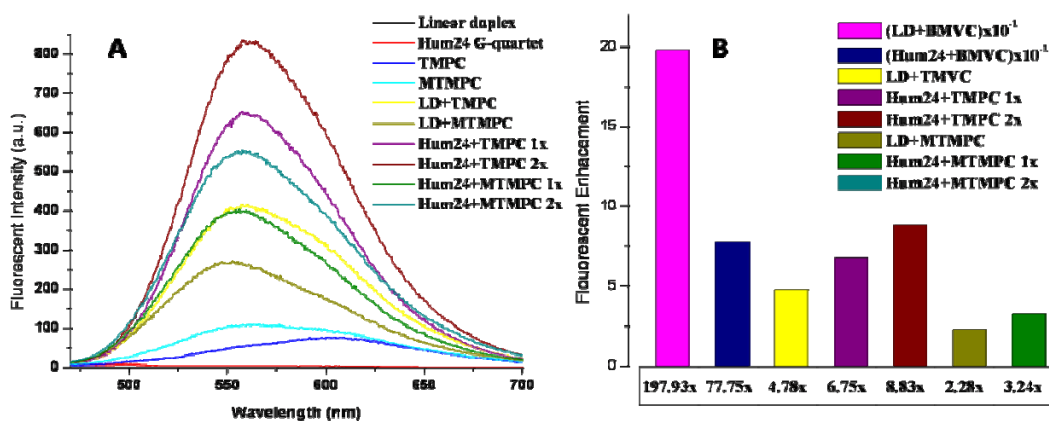


圖 3.2 A. 高光柵 (ex/em=10/8) 條件的化合物螢光光譜與 B. 將配體於 DNA 存在時的放射峰下面積積分除去單純配體水溶液的放射峰下面積積分所得的比例條狀圖，其中 BMVC 所得的螢光光譜取自於圖 3.1B 中。

透過 TMPC 與 MTMPC 在雙股及四股結構 DNA 的吸收及螢光改變，推測合成的配體可能與 DNA 發生作用。因此進一步將透過 DNA 的光物理訊號變化來佐證 TMPC 與 MTMPC 對於 Hum24 可能具有辨識結合能力。因此吾人也透過旋光光譜來觀察化合物是否會破壞四股結構。首先，在第一章中簡介 Hum22 鈉離子溶液態的端粒片段 DNA 所具有的特徵旋光度光譜 (圖 1.11C)，具有正值吸收於 295 nm 與 240 nm 以極負值吸收峰於 265 nm。在吾人的實驗中，圖 3.3，Hum24 旋光光譜圖如同鍊合為四股結構 Hum22 的旋光光譜圖 (圖 1.11C)，Hum24 的確時穩定具有鈉離子溶液態逆平行菜籃狀的四股結構，額外所加入配體 BMVC 或 1 當量與 2 當量的合成配體 TMPC 與 MTMPC 在 Hum24 的旋光度光譜並沒有發現新生成的吸收峰，同時也未觀測出特徵吸收峰向 0 旋光度收斂。因此歸納 TMPC 與 MTMPC 如同所發表的 BMVC 分子相同，不會破壞或誘導鈉離子溶液的四股結構發生改變。並且具有變異度不大的 295 nm 四股結構特徵吸收峰，將進一步以 295 nm 的吸收峰作為參考值，觀測隨溫度變化而造成四股結構解旋。解旋溫度 (Melting Point, T_m) 獲得提升是配體與 Hum24 作用的直接證據，將預期所合成的四股配體具有穩定端粒片段的作用。

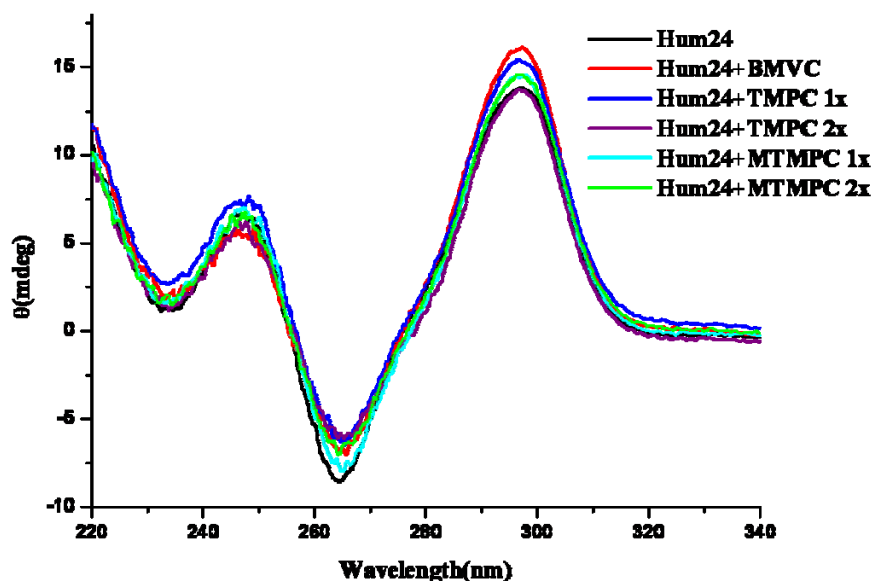


圖 3.3 Hum24 在 150 mM 氯化鈉溶液中再鍊合所得的鈉離子四股結構旋光度光譜, 以及 Hum24 在配體分子 BMVC 或合成的 TMPC 與 MTMPC 存在下的旋光光譜圖變化。

因此透過對裝有 5 μ M 的 Hum24 石英樣品槽穩定提升溫度, 由 10 度至 95 度的 295 nm 旋光度變化記錄於圖 3.4 中虛線, 並透過對虛線的一次微分曲線並利用以高斯鐘型分布做參考求其最低點所代表的 T_m , 於表 3.1 列出以黑色為單純 Hum24 的解旋溫度當作空白值的相對溫度改變。利用發表的 BMVC 作為參考依據。在實驗所測得 BMVC 可以穩定端粒片段約 6.8 度, TMPC 於 1 當量時可以穩定 T_m 約 3 度, 2 當量時則可以進一步穩定 4.4 度。另外具有甲基修飾的 MTMPC 則在 1 當量及 2 當量時能夠各穩定 2.4 及 3 度左右, 相對於 TMPC 的穩定能力較低且額外的當量加入也沒有預期的明顯溫度上升。推測可能是甲基的取代影響到部分結合時的區域立體障礙, 造成較差的結合強度。

GALigand		BMVC	TMPC 1x	TMPC 2x	MTMPC 1x	MTMPC 2x
DNA	Hum24	Hum24	Hum24	Hum24	Hum24	Hum24
T_m	53.75 °C	59.61 °C	56.68 °C	58.16 °C	56.17 °C	56.76 °C
ΔT_m	0 °C	6.86 °C	2.93 °C	4.41 °C	2.42 °C	3.01 °C

表 3.1 由旋光度感變所測得的 Hum24 以及受配體穩定而改變的解旋溫度。

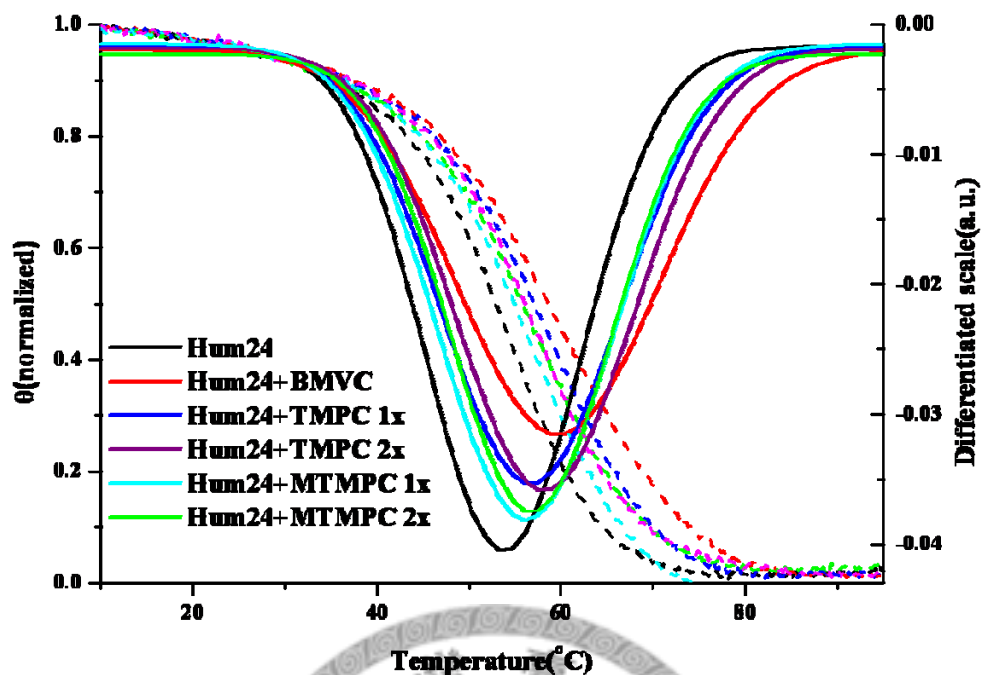


圖 3.4 虛線為由旋光度為基礎的四股結構與配體分子 **BMVC** 以及合成的 **TMPC** 與 **MTMPC** 於 1 當量以及 2 當量存在時解旋溫度變化圖。時線曲線則是透過一次微分求得解旋溫度變化圖的反曲點，並利用高斯鐘型分布求得各取線最低值列於表 3.1 中。

3.2 TMPC 與 MTMPC 與 DNA 膠體電泳

由螢光光譜變化與解旋溫度的改變確認化合物 **TMPC** 與 **MTMPC** 可以做為端粒配體，以穩定端粒的四股結構。因此進一步透過聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) 上 DNA 受配體作用而穩定的拖曳帶。實驗上，利用 40% (29:1) 的丙烯醯胺水溶液於含有 1x TBE (Tris-HCl, Boric acid, EDTA) 緩衝液的二次去離子水，利用過硫酸銨 (Ammonium persulfate, APS) 做為自由基引發劑，並以四甲基乙二胺作為催化劑活化 APS，製成 20% 的聚丙烯醯胺膠體。將配置好的 DNA 40 μM 與配體 40 μM (或更高濃度) 的組合填入在膠體上的樣品溝槽，透過 250 伏特的電壓於低溫下進行 5 小時左右的電泳過程。

所得的膠片以含有氧化鋅的薄層系膠層析片為背景，直接以 254 nm 的紫外光燈照射膠片，所得到類似於一般有機化合物在膠片上的顯影 (如圖 3.5A)。圖中

暗帶為 DNA 鹼基所吸收 254 nm 的激發光，造成背景的氧化鋅無法受到激發表現出綠光。膠片也透過黑色背景，利用 365 nm 的紫外光進行對具螢光能力的配體激發並以照相機（如圖 3.5B）拍下配體的螢光亮帶，或 Typhoon 雷射膠片顯影掃描系統（圖 3.5C）利用光電倍增管擷取螢光訊號並呈現黑色。進一步利用敏感度最高的染劑 SYBR-GOLD 後染（Post-staining）對於未含有螢光配體分子的 DNA 進行顯影。並以上述的拍照或掃描記錄膠片成色（如圖 3.5D-E）。

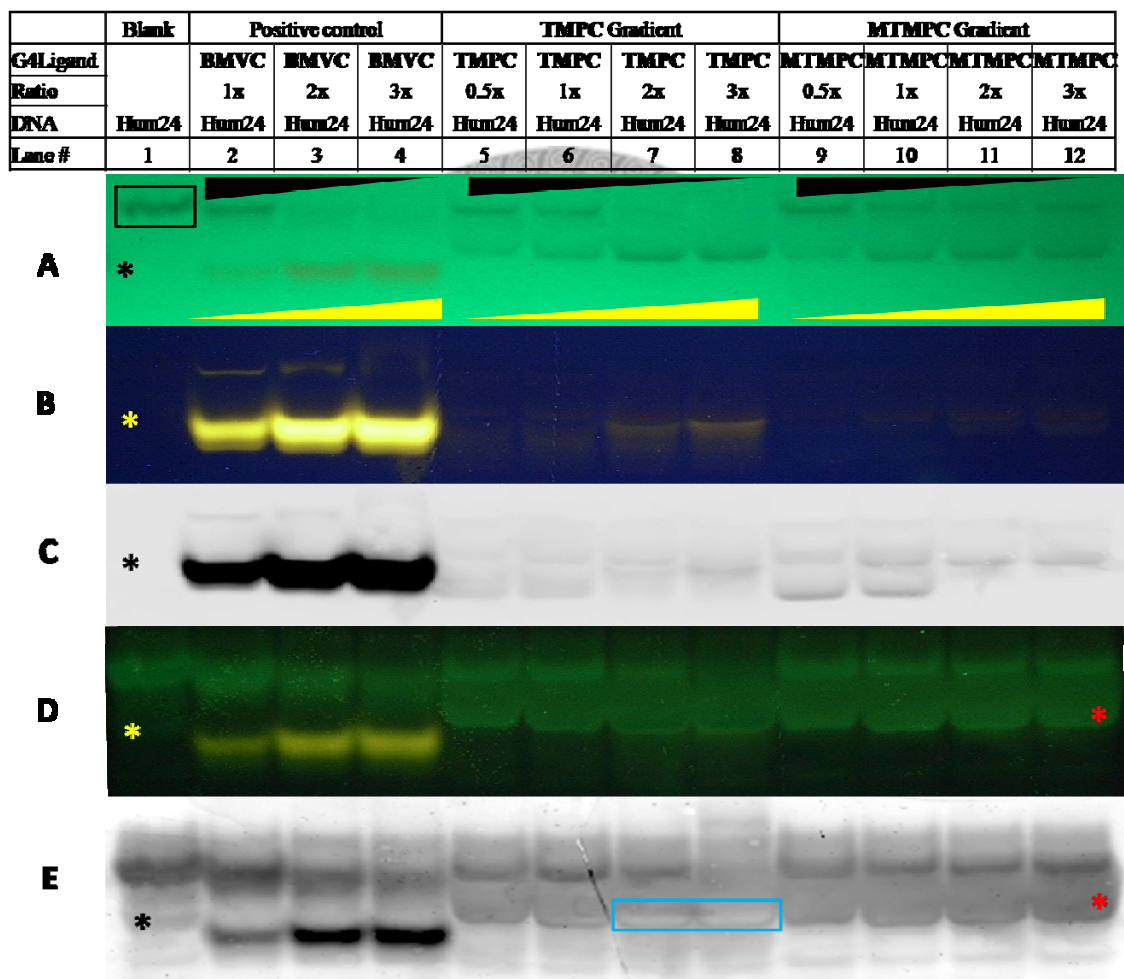


圖 3.5 配體濃度梯度的膠體電泳圖條件表格與 A. 紫外光顯影。 B. 螢光顯影相機攝相與 C. 膠片顯影掃描系統所得。D. SYBR-GOLD 後染後的螢光顯影相機攝影與 E. 膠片顯影掃描系統所得照片。圖中黑色與黃色星號標記 BMVC 所造成的 Hum24 拖曳帶，紅色星號則是標記由 TMPC 或 MTMPC 所造成的 Hum24 拖曳帶，黑色方框指示未受配體作用的 Hum24 電泳訊號帶，藍色方框則指示 SYBER 染劑無法進行染色的高濃度 TMPC 拖曳帶部分。

其中 **SYBR-GOLD** 染劑同屬為 Cyanine 基質的染劑 (圖 3.6)，對於 DNA 染色的辨識也是透過對於鹼基的嵌合與堆疊，因此可以造成染劑所受環境極性降低而造成明顯的螢光放射。因此對於端粒四股結構的四方結構將會是染劑最可能發生辨識的位置，實驗初期也曾經透過 EtBr (Ethidium Bromide) 進行後染，但是無法染上 Hum24 才改採對單股也具有相當高顯影能力的 **SYBR** 染劑。其中在圖 3.5D 與 E 中，不難發現第 7 與 8 行中，在已知有明顯拖曳帶的位置會出現白色的色塊，這是受到配體所穩定的四股結構，但相對無法被染劑給競爭出空間顯影，因此呈現反白的現象，類似的現象在 **BMVC** 所屬的幾行中也無法完整呈現 **SYBR-GOLD** 的綠色螢光，而是顯出 **BMVC** 所具有的黃色螢光與 **SYBER-GOLD** 疊合的黃綠光。

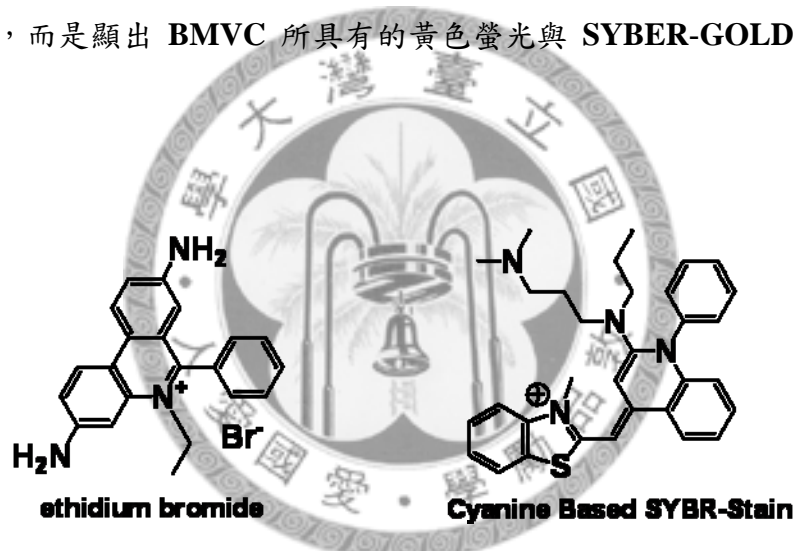


圖 3.6 EtBr 與 Cyanine Dye。

由實驗上的設計與對照，共得三張主要膠片結果。在圖 3.5 中，上方表格列出樣品配置的條件與互相參照的說明，主要變因為不同濃度的不同配體對於端粒片段 Hum24 所造成的穩定拖曳帶。首先圖 3.5A 中，方框圈起的第一行為單純四股結構在電泳上的結果，而後面的 2 到 12 行分別是 **BMVC**、**TMPC** 與 **MTMPC** 分別在表中所示的不同濃度梯度，想藉此呈現化合物對於四股結構穩定的能力。**BMVC** 在 2-4 行中圖 3.5A 可以明顯區分出 Hum24 與被拖曳向下的穩定帶由黑色及黃色星號所標記，特別在圖 3.5B 與 C 當中可以顯示 **BMVC** 相對強的黃色螢光

亮帶，是為圖 3.1B 中所呈現的 575 nm 明顯增強的螢光放射峰。在圖 3.5D 與 E 中，透過敏感的 **SYBR-GOLD** 螢光後染可以標定出在圖 3.5A 中不甚明顯的 Hum24 暗帶。

將 **BMVC** 視為標準對照組，進一步審視在圖 3.5A 第 5 到 12 行當中的，透過鏢型色塊標示出起始 Hum24 的暗帶隨配體使用當量增加而減少，相對則在下方形成緊密的四股結構拖曳帶明顯的增強，再一次證明所合成化合物具有對端粒四股結構的穩定能力。若比較解旋溫度的資料與圖 3.5A 中 **MTMPC** 的趨勢，再增加第二當量的 **MTMPC** 無法明顯增加解旋溫度，相同的在第 9 至 12 行中，增加 **MTMPC** 至三倍量的梯度無法明顯正比於所造成的拖曳帶。反觀 **TMPC** 則可以因為加入的當量增加而進一步將更多的 Hum24 暗帶完全拖曳下來。

在圖 3.5B 當中，可以發現 **TMPC** 透過延長的曝光時間，透過相機可以獲取在高當量配體的螢光放射帶，相對螢光改變強度較低的 **MTMPC** 則較不明顯產生螢光訊號。比較圖 3.5A 與 C 中的第 5 至 12 行，可發現在圖 3.5C 中產生了新的暗帶於拖曳帶之前，其中 5 到 8 行可以對照圖 3.5B 可發現與螢光帶重疊。但是在第 9 與 10 行中則無明顯的螢光帶於圖 B 卻產生明顯的暗帶，然而期拖曳的位置又符合 **BMVC** 所造成的拖曳帶。這樣的現象吾人的解釋是，在電泳上具有部份變性 (Denatured)，以及穩定兩種可能狀態。來源可能是在再鍊合的 DNA 溶液當中，存在部分的不完全為四股結構的 DNA，或者是在電泳過程中產生四股結構的變異化，而受到配體作用而誘導產生穩定的構型。其中部分變性可能造成 DNA 的構型較適合在電場中於膠片中進行穿梭而向下。證據可以在圖 3.5E 中第一行 Hum24 被敏感的 **SYBR-GOLD** 標誌出其他不同的 DNA 存在而對照此解釋的可能性。

在圖 3.5 中，3 當量的 **TMPC** 與 **MTMPC** 可以有較明顯的螢光訊號以及穩定的拖曳帶呈現，因此在後驗的幾組實驗當中將採取較高的配體濃度來增加所收穫的螢光訊號。

為了顯示合成的配體與 **BMVC** 相同具有對四股及雙股結構 DNA 的選擇性，因此做了圖 3.7 的實驗規劃，將 LD 納入變因當中並同時利用 365 nm 的紫外光進行於冰浴下 12 小時的照光反應，所利用燈源為手持式的 6 W 雙波段紫外光燈。冰浴下的溫度控制可以避免在長時間曝曬紫外光所造成的離心管及溶液升溫的現象，以防止 DNA 在光照過程受熱而解旋。

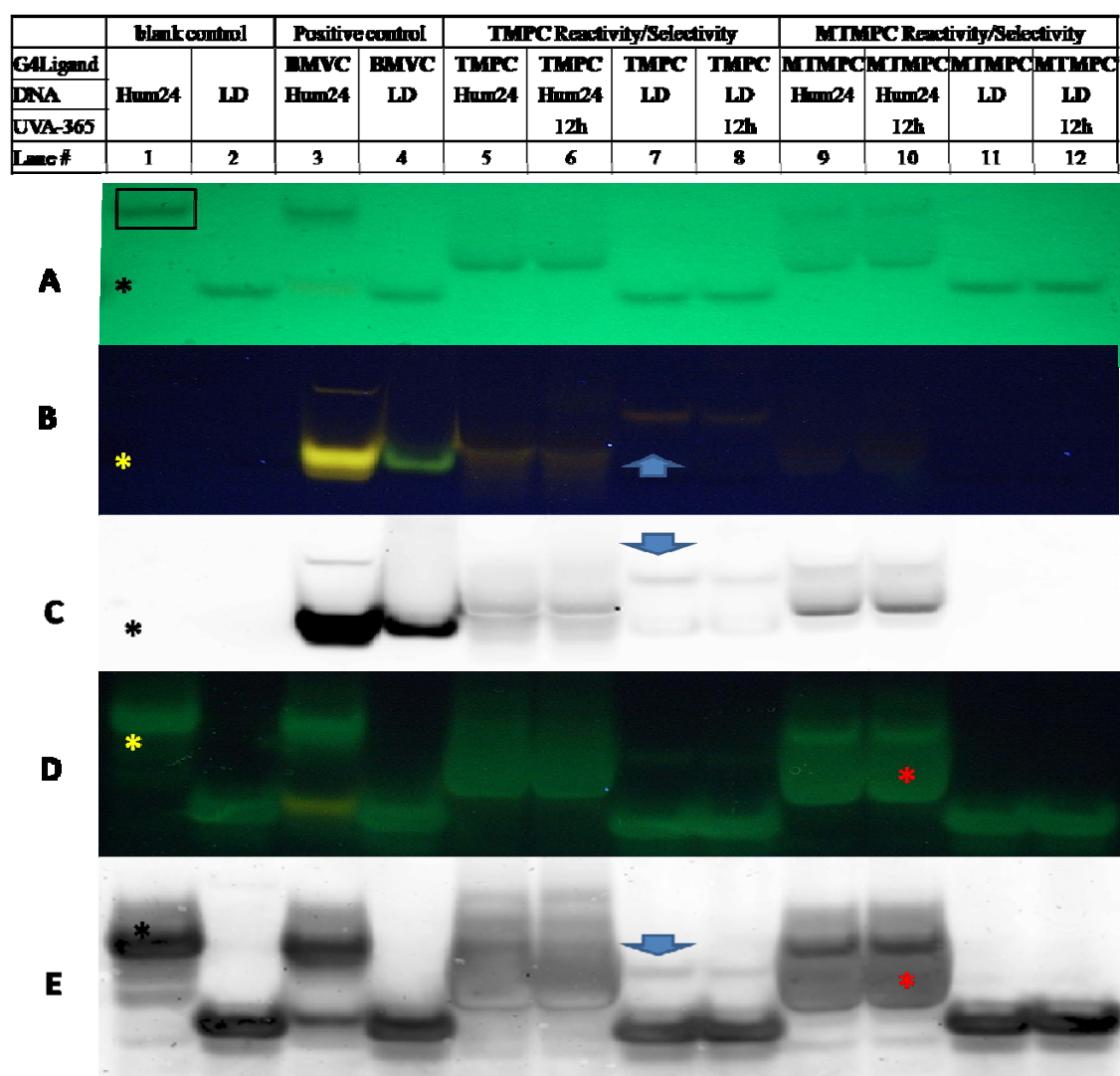


圖 3.7 選擇性與反應性的的膠體电泳圖條件表格與 A. 紫外光顯影。 B. 螢光顯影相機攝影與 C. 膠片顯影掃描系統所得。D. **SYBR-GOLD** 後染後的螢光顯影相機攝影與 E. 膠片顯影掃描系統所得照片。圖中黑色與黃色星號標記 **BMVC** 所造成的 Hum24 拖曳帶，紅色星號則是標記由 **TMPC** 或 **MTMPC** 所造成的 Hum24 拖曳帶，黑色方框指示未受配體作用的 Hum24 电泳訊號帶，藍色鍵頭指示 **TMPC-LD** 的訊號帶。

在圖 3.7 上表中同樣列出樣品的配置及互相參照的說明，第 1 與 2 行做為空白值，用以標定 Hum24 與 LD 在電泳之後的定位。同時可以發現 LD 在電泳中的結果是相對在 Hum24 的下方，是由於 LD 在結構上具有較容易在電場下的非變性聚丙烯醯胺膠體中進行穿梭，而往下方移動。若在變性膠 (Denaturing Gel) 中則可能僅能透過分子量進行區分而會處於相近的位置。在其後第 3 與 4 行是由 1 當量的 **BMVC** 對兩種 DNA 進行辨識所得到的電泳訊號。與圖 3.6 相同，**BMVC** 得到向下拖曳的暗帶 (與圖 3.5 相同利用黑色與黃色星號標記)，有顯色為明顯的黃色螢光。相對所加入的 LD 在 **BMVC** 上則造成綠色的 545 nm 特徵放光，並且不會改變 LD 的相對位置。

合成的配體 **TMPC** 在 5 到 8 行中，分別對 Hum24 及 LD 進行辨識結合，所產生的 Hum24 訊號帶上不論是否受紫外光的激發皆表現出與圖 3.6 中的電泳結果相同。相對在 LD 中的情形就不如 **BMVC** 單純，在第 7 與 8 行中，透過藍色鍵頭指示的微弱螢光帶在圖 3.7B 與 C 中被 **TMPC** 所顯色，但相對在的 2 行中 LD 標準品並未出現此訊號帶。因此綜合螢光光譜圖 3.2A 與 B 中 **TMPC** 對於 LD 的螢光訊號的增強，而相對 **MTMPC** 則未能有如此明顯的螢光強度改變。推測 **TMPC** 與 LD 具有明顯的結合，並佐證 **MTMPC** 在電泳上並未能發現與 LD 發生結合產生的延遲帶或螢光帶。胸腺嘧啶的取代將可能是造成辨識結合的變因，因為在 **MTMPC** 上利用甲基在胸腺嘧啶 N3 進行保護，並沒有發現辨識結合的訊號帶。在 **TMPC** 當中具有與 DNA 相同的鹼基—胸腺嘧啶，而在 LD 的單股序列為 (GCGCAATTGCGC) 可能可以透過 Hoogsteen 的第三股結合模式而進行辨識而進入雙股的溝槽當中，如圖 3.8A 中藍色標是為在 LD 中具有的 AT 配對，並且以虛線指示配對所形成的氫鍵。在腺嘌呤的左側為 **TMPC** 分子上具有的胸腺嘧啶，透過形成三股的結構使胸腺嘧啶獲得兩個氫鍵的穩定，並且可能將 **TMPC** 分子埋入溝槽當中得到吡啶陽離子對磷酸根骨架的靜電穩定能量，如此將形成可能的結

合模式。反觀圖 3.8B 中 MTMPC 被甲基所形成的立體障礙所滯，無法進一步得到穩定的氫鍵結合，引此不與 LD 發生較明顯的結合。對於圖 3.7B 與 C 中受 3 當量的 TMPC 所穩定的 LD 可能具有較大的分子量，或是產生其他的結構使得訊號帶受到遲滯。

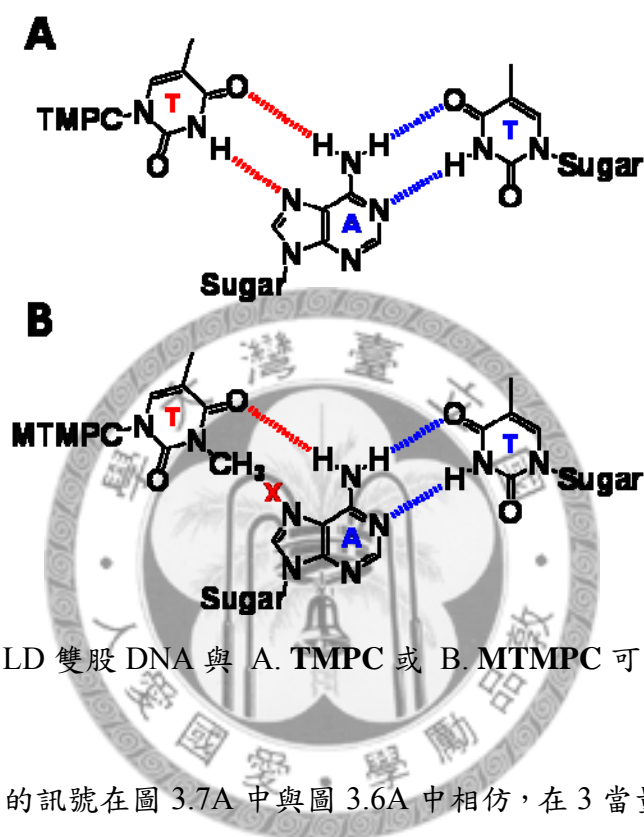


圖 3.8 推測 LD 雙股 DNA 與 A. TMPC 或 B. MTMPC 可能形成的辨識。

在 MTMPC 的訊號在圖 3.7A 中與圖 3.6A 中相仿，在 3 當量的配體也無法完全的將四股結構造成穩定而產生完整的訊號帶消失。但是在圖 3.7C 中則出現 MTMPC 在相同透過 Typhoon 系統 457 nm 雷射掃描下收集 555 nm 的訊號條件下，呈現出相對強於 TMPC 的異於圖 3.7B 中相機攝影的螢光結果，吾人則推測可能 TMPC 所形成的拖曳帶的濃度甚高，以雷射掃描系統所提供的氫離子雷射激發造成在濃度較高的條件下出現自吸收而相對降低螢光強度，在手持的紫外光燈的照射則又相對較弱而無法顯示出 MTMPC 較低濃度的拖曳帶造成的螢光訊號。另外在圖 3.7E 的第一行中，又可見到 Hum24 在訊號帶之前，被 SYBR-GOLD 所染出的變性帶。

3.3 TMPC 與 MTMPC 對 Hum24 的辨識結合能力

由於所合成配體 **TMPC** 與 **MTMPC** 對於水的溶解度較差，最高僅能配置於 100 mM 的二次水溶液當中，並且在水溶液中螢光量子產率相當的低，不利於透過螢光滴定實驗來量測對 DNA 的結合常數。因此考慮透過微量卡計 (Isothermal Titration Calometry, ITC) 進行微量的低定實驗，ITC(圖 3.9)是透過樣品槽(Sample)中的受體 (Host) 對於所滴加的少量的配體 (Ligand) 進行辨識結合所釋放或吸收熱，造成樣品槽中的溫度為量改變，透過標準槽 (Reference) 對於樣品槽的熱流 (Heat Flux) 的變化，在絕熱 (Adiabatic) 的條件下，透過微加熱線圈的加熱或放熱平衡之間的熱流，所得到的回饋訊號 (Feedback Signal) 進行做圖而得到滴定曲線，如例圖 3.9B 與 C。⁷⁶⁻⁷⁷

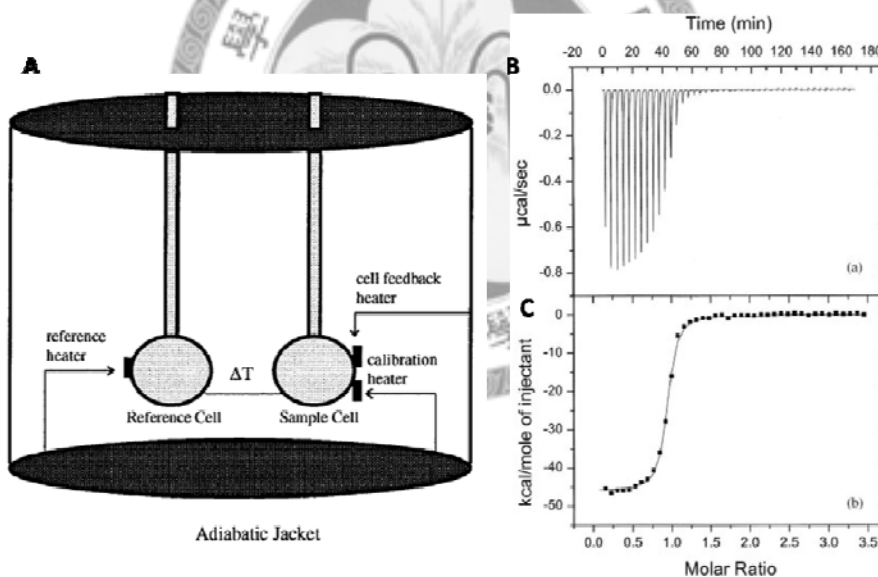


圖 3.9 A. ITC 示意圖。⁷⁷ B. 75 μM 6nt RNA 對其互補片段 5 μM 於含 1 M NaCl 的 HEPES 緩衝溶液中所獲得 ITC 時間對熱的作圖與 C. 熱量對莫爾比例作圖，得到 $DH = -46.1 \text{ Kcal/mol}$ ， $K_a = 4.3 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ 以及結合當量數為 0.91。⁷⁶

對於單純辨識結合系統如配體與受體為 $X-M$ 而言，當配體每次滴加時皆會造成熱量上的變化並同時改變樣品的體積與濃度。因此參考 Wiseman Isotherm 平衡式 (式 3.2)，其中每次滴定造成的熱量變化為 $dQ/d[X]_t$ 而 X_R 則為配體對受體

的莫爾比例 ($X_R=[X]_t/[M]_t$)，其中變量 r 中定義了 ITC 的關鍵常數 c (c-value)。

$$\frac{\partial Q}{\partial [X]_t} = \Delta H^0 V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R + r)^2 - 4X_R}} \right]; \quad \frac{1}{r} = c = nK_a [M]_t \quad - \text{(式 3.2)}$$

對於 ITC 所得到的結果必須將 c 值掌握在 1–1000 之間，然而如圖 3.10 所示由 c 值所決定的 ITC 滴定曲線。在分析上，過大的 c 值代表結合常數 K_a 太大或所配置的受體濃度太高，造成滴定結果只顯示出結合時的 ΔH 而不具有其他熱平衡常數的分析價值。相對的 c 值過低則可能是 K_a 太小或受體濃度過低，滴入配體直接達到飽和，也不具有分析意義。因此好的滴定條件須掌握於 c 值約在 20 至 50 之間，會具有最佳的可信度。⁷⁸

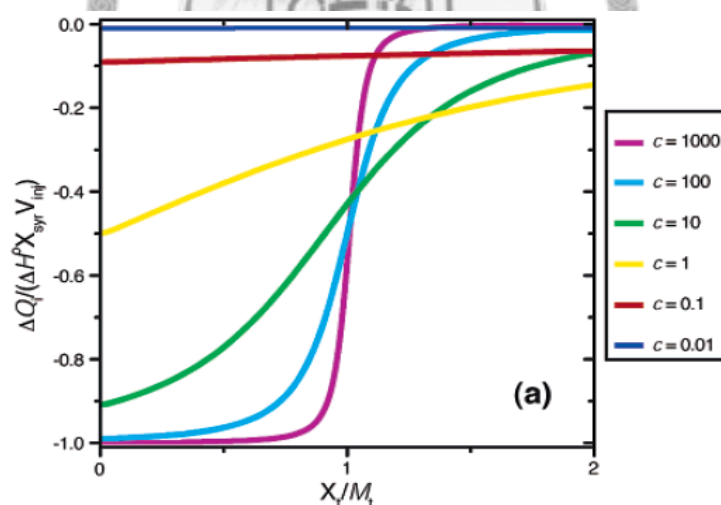


圖 3.10 c 值所控制的 ITC 滴定曲線圖。⁷⁸

一般非抗體抗原辨識的受體對有機化合物大約會具有 10^{-6} 的結合常數。透過中研原陳錦地老師實驗室的吳旻霏學姊進行 ITC 的測試，所用的 Hum24 是以 40 μM 的 280 μL 體積進行滴定，符合 c 值的最佳化區間估計約有 40。然而相對配體受限於不佳的溶解度僅能在 100 μM 的條件中，並且滴定過程中涉及 DNA 與配體為不同的溶液系統，DNA 溶於 $\text{pH}=7.5$ Tris-HCl 10 mM 且具有 150 mM NaCl 的緩

衝液中，相對配體為溶於二次水中。因此滴定結果必須扣除空白試驗以二次水滴定 DNA 的熱焓變化。圖 3.11A 紅色三角點為二次水對於 Hum24 所做的滴定曲線，與其下方黑色方型點為 TMPC 滴定 Hum24 所得的曲線。兩者皆式呈現類似的走勢，因此在圖 3.11B 中將水對 Hum24 的空白滴定扣除，則得到紊亂的點分布。在文獻上有搜尋到類似的滴定結果，由於 ITC 所得到的滴定曲線將由軟體中所建立的模型函數資料庫進行配對，進一步得出結合常數以及其他重要的熱平衡常數。因此在其討論中則是將此無法進行軟體分析的分布圖定義為「未偵測出結合」(Non-detectable Binding)。⁷⁹MTMPC 也得到相同的結果。



圖 3.11 A. 二次水（紅色三角點）及 TMPC（黑色方點）對 Hum24 的滴定結果作圖。 B. 將 A 中二次水滴定空白值進行扣除所得的 TMPC 對 Hum24 滴定圖

因此進一步討論所得的圖形與空白試驗的細節，由於在 ITC 的偵測訊號為整體的放熱，因此所得結果將包含單純系統的辨識結合所釋放的熱（式 3.3, ΔH ），以及錯合物生成時由緩衝溶液所提供的質子所造成的離子化焓（式 3.4, ΔH_i ），因此所測得將會是兩者的總合（式 3.5）。⁸⁰



$$\Delta H_{obs} = \Delta H + n\Delta H_i \quad - \text{ (式 3.4)}$$

因此必須考慮不同緩衝溶液所造成的離子化焓的大小（表 3.2），⁸⁰然而在本實驗所用的 Tris-HCl 則具有 48.99 KJ/mol 的極高離子化焓，相當不利於低結合常數的滴定實驗。⁸¹此外二次水對於 150 mM NaCl 高鹽濃度的稀釋作用也將提供可能的背景值。因此在此 ITC 實驗當中，未能具有較好的配體起始濃度以及適當的滴定緩衝條件，而無法得到所求的配體對端粒結合能力的訊息。這也是 ITC 測量上最大的限制，也就是緩衝溶液的選擇，樣品槽內與滴定液中也必須式完全相同的溶液以避免額外的大量熱含干擾。

Buffer substances	pK*	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔC_p (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	$\partial\Delta C_p/\partial T$ (10 ⁻³ JK ⁻² mol ⁻¹)
Acetate	4.62	0.49 ± 0.02	-128 ± 2	—
MES	6.07	15.53 ± 0.03	16 ± 2	—
Cacodylate	6.14	-1.96 ± 0.02	-78 ± 2	—
Glycerol 2-phosphate	6.26	-0.72 ± 0.02	-179 ± 2	0.79 ± 0.39
PIPES	6.71	11.45 ± 0.04	19 ± 4	—
ACES	6.75	31.41 ± 0.05	-27 ± 4	—
Phosphate	6.81	5.12 ± 0.03	-187 ± 3	2.01 ± 0.22
BES	7.06	25.17 ± 0.07	2 ± 5	—
MOPS	7.09	21.82 ± 0.03	39 ± 3	—
Imidazole	7.09	36.59 ± 0.06	-16 ± 5	—
TES	7.42	32.74 ± 0.03	-33 ± 3	—
HEPES	7.45	21.01 ± 0.07	49 ± 5	—
EPPS	7.87	21.55 ± 0.05	56 ± 4	—
Triethanolamine	7.88	33.59 ± 0.04	48 ± 3	—
Tricine	8.00	31.97 ± 0.05	-45 ± 4	—
Bicine	8.22	27.05 ± 0.05	2 ± 4	—
TAPS	8.38	41.49 ± 0.06	23 ± 5	—
CAPS	10.39	48.54 ± 0.07	29 ± 6	—

表 3.2 緩衝溶液分子的離子化焓與相關熱平衡係數。⁸⁰

3.4 TMPC 與 MTMPC 對端粒酶的抑制能力

1994 年 Kim 教授所研究腫瘤與端粒酶的相關性的同時，開發出了 Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP) Assay，用於探討活體取下的腫瘤組織所含有的端粒酶活性，裝置如圖 3.12A。¹⁸

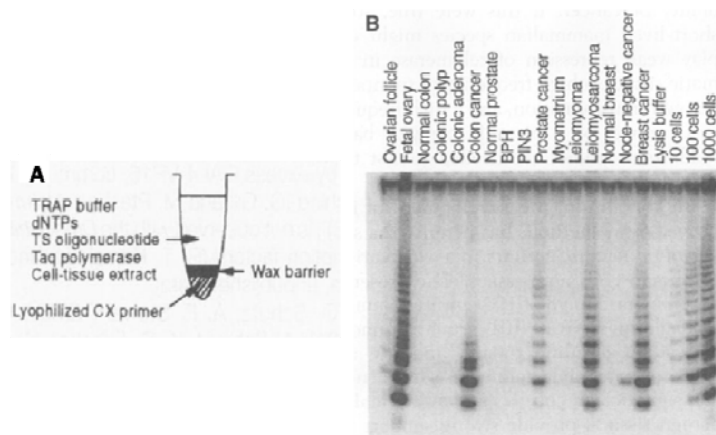


圖 3.12 A. TRAP Assay 配置。 B. 多種正常及腫瘤組織細胞全萃取 TRAP 結果。¹⁸

TRAP 基本上是利用腫瘤細胞的全萃取中的端粒酶對端粒酶受體導引子 TS(5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')，在蠟塊上方進行端粒片段的延長（圖 3.12A）。其中加入 Tag 聚合酶再透過聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR) 在高溫的條件下溶去蠟塊，釋放蠟塊下方 CX 導引子(5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3')，並啟動 Tag 聚合酶對端粒片段放大。透過電泳分析將具有端粒酶活性的結果呈現如圖 3.12B 中的階梯狀分析帶，訊號越強代表該細胞中具有更高的活性。

為了討論配體對於端粒酶的抑制，Mergny 教授便將 TRAP Assay 加以修改成適合衡量配體的 TRAP-G4 Assay。⁸² 在 TRAP-G4 Assay 的實驗，額外加入內標準品 TSNT(5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3')做為參照；且不加入組織萃取樣本，而加入標準端粒酶來源具端粒酶表現的 CHAPS 細胞株全細胞萃取。

實驗進行，如圖 3.13A 所示，首先在 PCR 專用離心管中加入 CX 導引子，做為第二階段 PCR 開始作用時用來複製第一階段所生成的端粒片段。接著融入一小塊蠟塊將 CX 導引子隔離於下層，並在蠟塊上方加入可以被端粒酶辨識而延長端粒片段的 TS 導引子，以及無法被端粒酶延長的內標準品 TSNT 導引子與第二階段 PCR 所用的 NT 反向導引子(5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3')。之後加入 CHAPS

全細胞萃取，以及 Tag 聚合酶分別作用於第一階段延長 TS 後方的端粒片段與第二階段 PCR 的進行。最重要的配體也在同時加入上層液中；如果 TS 被延長出端粒片段，則配體就有機會可以進行辨識並穩定端粒片段成為鳥嘌呤四股結構而停滯端粒片段的延伸。當第一階段結束只有 TS 導引子延長，待第二階段開始時，由於 PCR 需要先升高溫度到 95°C，此時蠟塊將會溶解，CX 導引子將與上層液混合，Tag 聚合酶便開始量化 ST-Telo-ACX 的片段。由於在第一階段的配體會使端粒酶作用停滯，因此所形成的端粒片段將是不均等的，因此在 PCR 結束後，利用膠體電泳即能形成階梯(Ladder)狀的分析帶了，如圖 3.13B 所示。

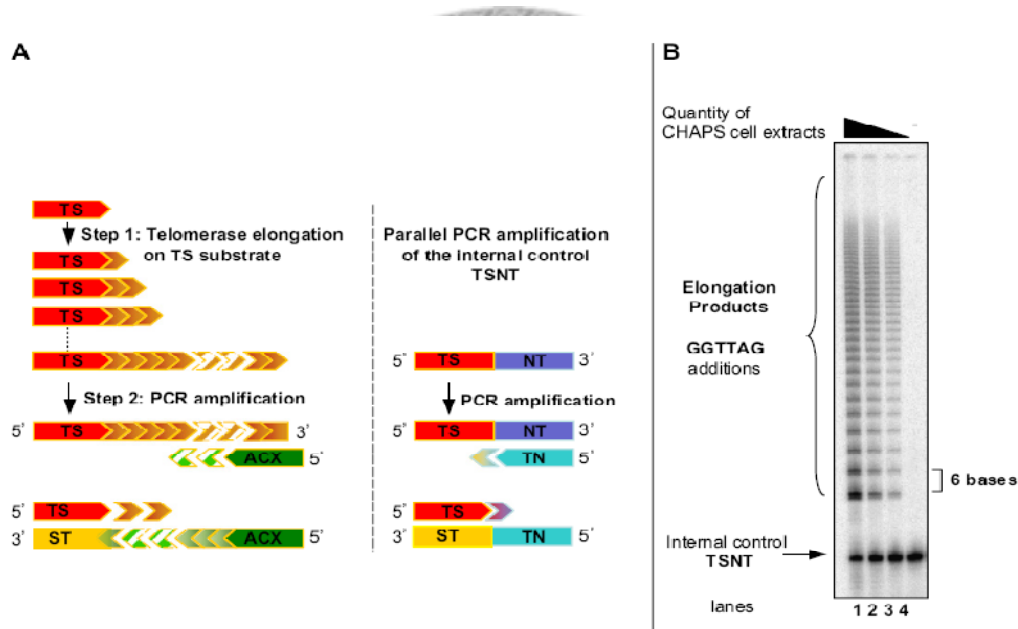


圖 3.13 A. TRAP-G4 流程。 B. 膠體電泳結果。¹³

在膠體電泳上的分析帶有不同的強度就代表了端粒酶被抑制的強弱，如果加入的配體有較高的抑制能力，就會表現得跟圖 3.13B 中的第三分析帶一樣，呈現出較弱的強度；對於更強的配體可能會出現向第四分析帶一樣的結果，如同是完全没有加入 CHAPS 全細胞粹取（零端粒酶活性）。

所合成的 TMPC 與 MTMPC 在陽明大學林敬哲老師的實驗室內，由黃豐淳學長指導進行上述的 TRAP-G4 Assay 實驗。PCR 之後所得的樣品，在 10%的聚丙

烯醯胺膠體進行電泳得到圖 3.14，圖中上列指示每一行所含有的樣品條件，兩組對照組中分別不加入配體分子以及加入 RNaseA 水解掉參與 PCR 的導引子，使結果為空白值，因此可以定義兩組訊號強度分別為對端粒酶活性抑制力為 0 與 100 的對照。再將所得到的膠片經過透過膠片分析軟體，得到的階梯狀帶的相對強度，而推演出合成配體 **TMPC** 具有 IC_{50} 為 $3.9 \mu\text{M}$ 以及 **MTMPC** 具有 IC_{50} 為 $6.6 \mu\text{M}$ 的端粒酶抑制能力。相對於 **BMVC** 的 $0.1 \mu\text{M}$ 的抑制能力有一段差距。

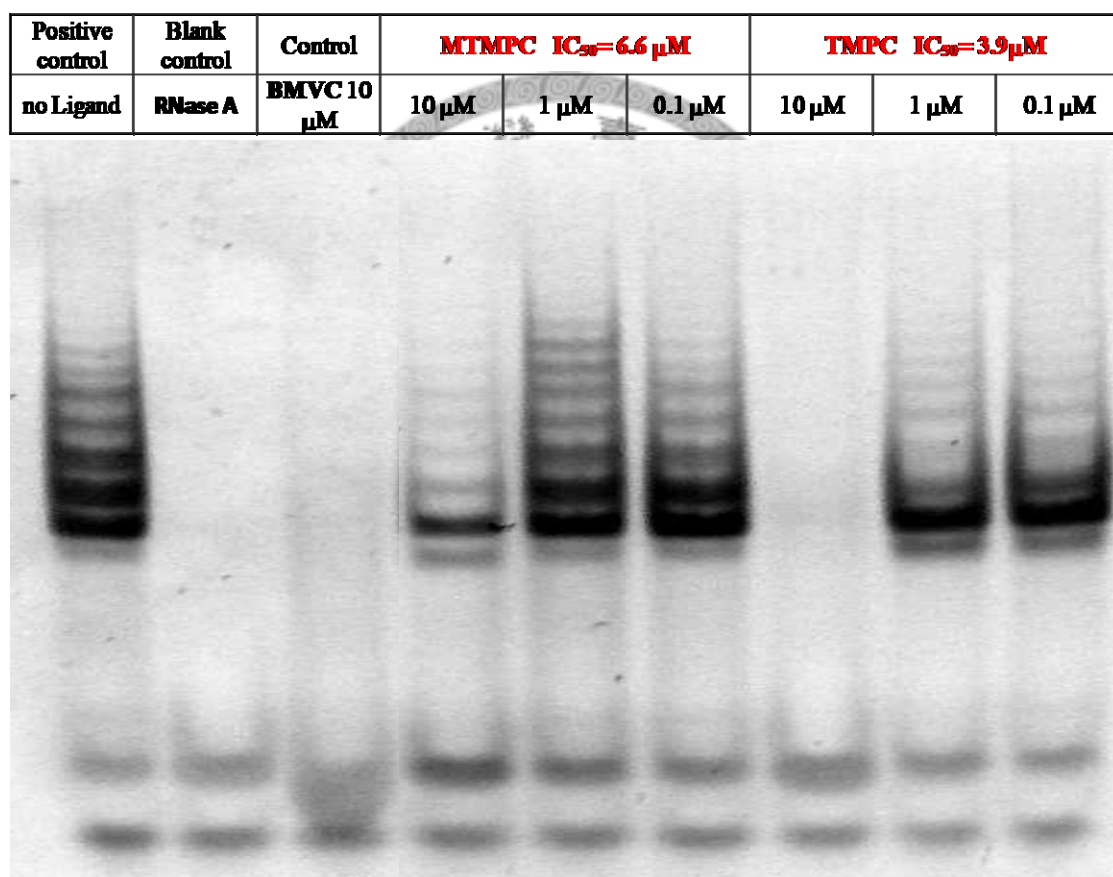


圖 3.14 **BMVC** 與合成配體 **TMPC** 及 **MTMPC** 所得 TRAP-G4 結果。

3.5 **TMPC** 與 **MTMPC** 與端粒片段的光產物

為了瞭解 **TMPC** 與 **MTMPC** 對於光照後是否能產生〔2+2〕環化加成反應而生成共價鍵光產物，吾人透過酒精沉澱 (Ethanol Precipitation) 的方式欲將配體分子溶入酒精中，並透過高濃度的酒精使難溶的 DNA 在低溫下形成沉澱，進而分離

而得到共價鍵的 DNA-TMPC 或 DNA-MTMPC 光產物。實驗上的操作，首先將 Hum24 與 3 當量的配體適當混合，利用上述的光照方式以 254 nm 對胸腺嘧啶進行 $\pi\pi^*$ 的激發，或者以 365 nm 避開 DNA 的吸收進行配體分子的激發，可能會透過一部分的胸腺嘧啶 $n\pi^*$ 以及配體的核心偶極-吡啶陽離子的激發。考慮 254 nm 對於 DNA 本身具有一定的吸收而自傷害，因此縮短一半的光照時間僅用 3 小時進行照射。所獲得的樣品以鋁箔紙避光保存，需要進行酒精沉澱的組別則先加入 3 倍體積的酒精均勻混合後置於 -20°C 冰箱維持 3 小時，以利於 DNA 的析出。移出冰箱後，在 4°C 狀態下透過微量透析管 (Microcon 3000)，進行 12000 rpm 的高速離心 45 分鐘，將溶液中分子量小於 3000 的片段透析或過濾至離心管中。並額外加入 2 次 50% 的酒精水溶液進行洗滌，並離心後將得到的 DNA 回溶於去離子水中，並進行電泳。

所得的實驗配置與互相參照的說明如圖 3.15 上表，分別具有空白值對照以及未進行酒精沉澱的對照組在第 2 到 4 行中，第 5 到 10 行中則是光照實驗後進行酒精沉澱所得的樣品。圖 3.15A 中控制組皆能在現圖 3.7 與圖 3.8 的實驗結果，得到 **BMVC** 明顯的螢光帶以及 **TMPC** 所形成微弱的螢光帶，**MTMPC** 則相同表現出較弱的四股結構穩定能力。

透過酒精沉澱可將非共價鍵結的配體移除於四股結構之外，可以透過圖 3.15A 或 D 與 E 以 DNA 的吸收或後染的 Hum24 標定，發現在第 5 到 10 行中 Hum24 所殘餘的量明顯比對照組第 3 與 4 行中明顯高出許多。但是比較受光照的組別與第 5 與 6 行未照光的對照組，則所產生的拖曳帶似乎不如預期的有高度對比。因此再次回顧酒精沉澱的實驗，透過酒精沉澱的方式移除如 EtBr 或者 **SYBR** 染劑都是以相同的步驟進行操作，唯獨在所加入的酒精當中若含有 3M 的乙酸銨則可以進一步徹底的將這些染劑移除。但是考量吾人的電泳所用為非變性膠，若利用乙酸銨進行 DNA 的離子交換，勢必造成四股結構的變性，並且將失去對於配體造成的

螢光加成效果，故在電泳結束後，將得到無意義的實驗結果。因此在圖 3.9A 中所產生的拖曳帶極有可能是與 DNA 作用較強的配體在低溫下形成共沉澱的結果，但相對於殘餘的 Hum24 訊號帶而言，已經相對微弱了許多。

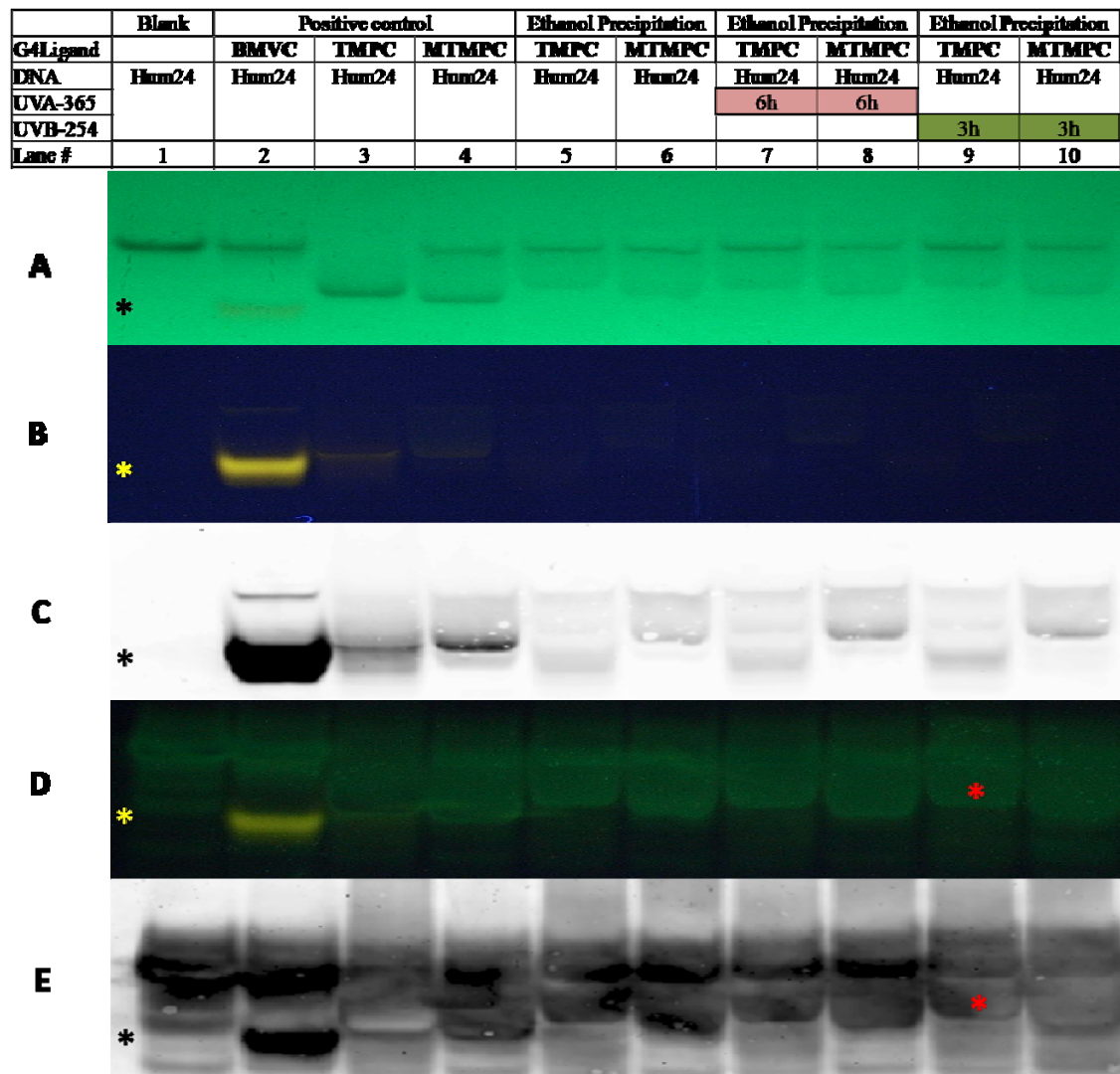


圖 3.15 光產物的膠體電泳圖條件表格與 A. 紫外光顯影。 B. 螢光顯影相機攝影與 C. 膠片顯影掃描系統所得。D. SYBR-GOLD 後染後的螢光顯影相機攝影與 E. 膠片顯影掃描系統所得照片。圖中黑色與黃色星號標記 BMVC 所造成的 Hum24 拖曳帶，紅色星號則是標記由 TMPC 或 MTMPC 所造成的 Hum24 拖曳帶，黑色方框指示未受配體作用的 Hum24 電泳訊號帶

雖然所得到的酒精沉澱結果未能夠明顯得到形成共價鍵結合的對比，但是在結果當中也凸顯出一個令人意外而不易解釋的結果：對照第 6、8 與 10 三行，不難發現到 **MTMPC** 相對在照光之下的條件較明顯有拖曳帶上的訊號增強。這部分實驗出乎意料，因此進行了多次重覆實驗皆是得到如此的結果。因此可以推測 **MTMPC** 雖具有較弱的四股結構辨識結合能力，但可能具有相對有效率的 [2+2] 光激發環化加成反應。由於 **TMPC** 與 **MTMPC** 在結構上差異相僅有胸腺嘧啶 N³ 上的甲基取代，並且在吸收及螢光放光光譜都有相當接近的表現，兩者都具有相當低的量子產率，因此解釋上就更不易圓滿。

若不考慮實驗上的誤差或者負面的解釋，透過 **TMPC** 與 **MTMPC** 在結構上唯一的甲基差異，在文獻上搜尋胸腺嘧啶光物理的機制中甲基可能造成的差異。吾人的探討中，認為唯一可能的便是在激發態的胸腺嘧啶分子在與水分子的氫鍵條件下，進行快速的質子交換使能量耗失而回歸於基態當中。首先，圖 3.16 中介紹在胸腺嘧啶分子可能存在的含水互變異構物 (Tautomers)，這些當中由於在 **TMPC** 及 **MTMPC** 中 N¹ 以參與鍵結，因此僅在意 1TW₁ 由 N³ 與相鄰羰基形成的互變異構物。⁸³

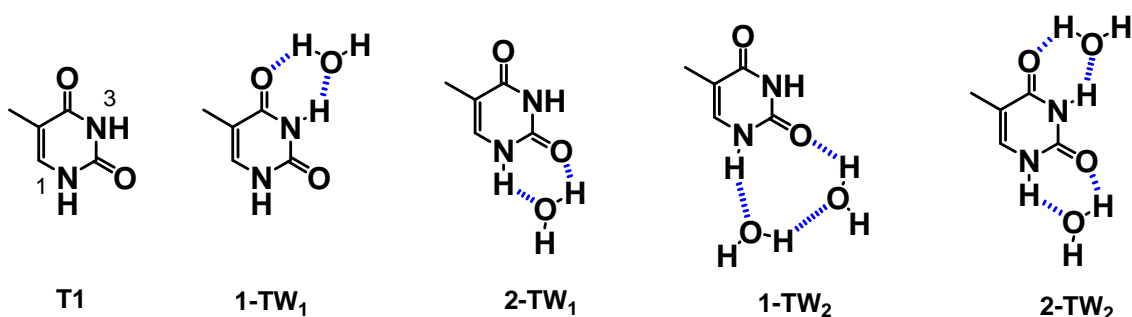


圖 3.16 可能存在的胸腺嘧啶與含水的互變異構物。⁸³

透過水橋的互變異構物中在激發態則可能發生質子傳輸 (Proton Transfer) 而得到相對應的互變異構物。曾有模型描述酚與水在激發態下涉及 ¹πσ* (圖 3.17A)

而使酚上的羥基鍵長延長，進而與鄰近的水分子進行質子的傳輸造成激發態能量失去至基態如圖 3.17B。相同的理論模型在腺嘌呤分子上可以發現受激發後的 $^1\pi\pi^*$ 藉由 CI 途徑內轉換至 $^1\pi\sigma^*$ 能態，並同時造成 X 軸上所定義的 N-H 鍵鍵長延伸。將可能可透過質子的傳輸而使能量傳遞至附近的極性溶劑分子（圖 3.17C）。⁸⁴

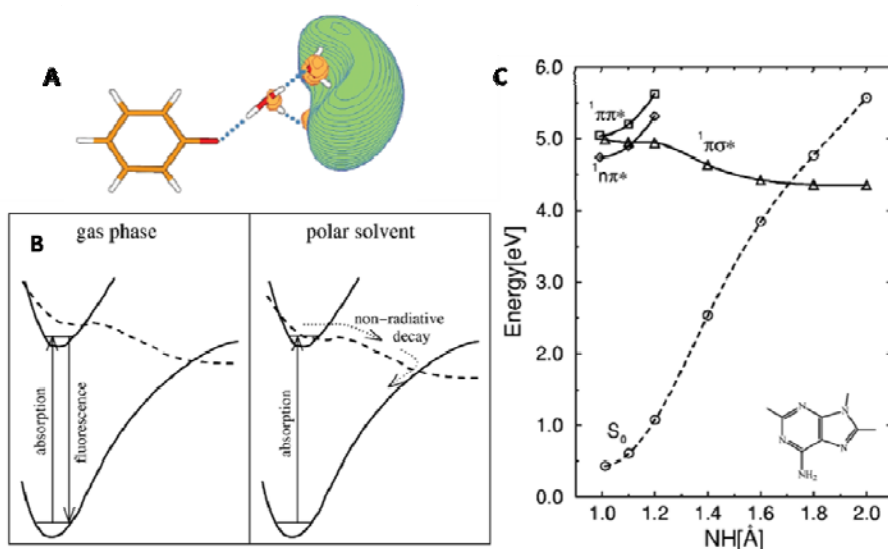


圖 3.17 A. 酚-水的 $^1\pi\sigma^*$ 能態電子分布圖。 B. 酚-水在不同的環境下涉及的能量釋放路徑。 C. 腺嘌呤涉及 $^1\pi\sigma^*$ 所造成 NH 鍵延長示意圖。⁸⁴

因此在胸腺嘧啶上也可能發生所述的高能量 $^1\pi\sigma^*$ 能態進而與鄰近的水分子進行質子的傳輸，在圖 3.18 中所示為胸腺嘧啶水合互變異構物在垂直基發時所得到的相對能階。⁸³ 在吾人所關注的是具有涉及 N^3 的互變異構物 1-TW1 與 T1 之間的差異，由最可能激發的 $\pi\pi^*$ 由紅線繪製，在兩個互變異構物上分別得到 5.13 eV 與 5.17 eV 相當的接近，並且在更高的 $^1\pi\sigma^*$ 能態也僅具有 0.1 eV 的垂直基發能量差異，因此不能排除 TMPC 透過尚可利用的 N^3 氫鍵達成水橋，而得到相對於 MTMPC 額外的 CI 路徑藉由質子的傳輸來釋放激發態的能量，並競爭形成 [2+2] 環化加成的路徑。因此在電泳上才可發現 MTMPC 中第 8 與 10 行具有較明顯的拖曳帶。反觀在 TMPC 可能參與有推測的質子傳輸途徑而造成光產物較不如

MTMPC 明顯。但唯獨此解釋卻與 TMPC 與 MTMPC 的螢光能力矛盾，但不失為可能的推測。

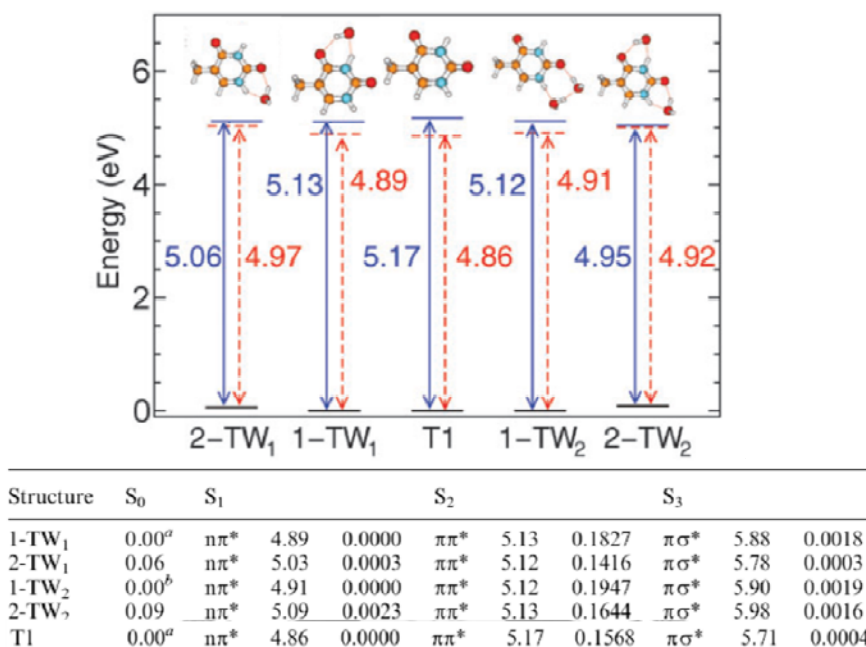


圖 3.18 理論計算所得含水的胸腺嘧啶互變異構物光激發能階與對應值， $\pi\pi^*$ 由紅線繪製，藍線則表示 $n\pi^*$ 。⁸³

欲了解 TMPC 與 MTMPC 是否能夠在紫外光激發之下，發生預期的與端粒片段 TTA 平行股上的胸腺嘧啶形成 [2+2] 環化加成而得到共價鍵的結合 (圖 2.6B 的設計機制)。因此利用質譜直接在分子量上的改變預期可以確認光產物的存在與否。樣品的配置與圖 3.9 中的電泳樣品相同，在含 40 μM Hum24 的緩衝溶液中加入 3 當量配體 TMPC 或 MTMPC，於冰浴下再受紫外光 254 nm 或 365 nm 的 6 小時與 12 小時，結束照光直接透過微量透析管進行透析離心 12000 rpm 下 45 分鐘，並再以兩次二次水的洗滌與透析離心並收集。所得到的樣品利用雷射輔助脫附離子化質譜儀 (MALDI-TOF) 進行測試，所得到的光譜如圖 3.19 與圖 3.20。在圖 3.19 中，利用受光 365 nm 照射的 Hum24 當作對照，在 TMPC 與 MTMPC 的光譜中，以紅色虛線方框標是預期所見的分子量，其中 Hum24 利用 Wiley InterScience 旗下 Current Protocols 所提供的 DNA/RNA/Protein Molecular Weight Calculator，計算得到分子量大約在 7575 D 附近，而當與 TMPC (分子量為 449.2⁺) 或 MTMPC

(分子量為 463.21^+) 產生共價鍵的光產物，則分子量將可能坐落於 8020 或 8030 附近。由於在分子量的條件下，MALDI-TOF 對於 500 道耳吞的解析度有限，並且透析的結果不如預期理想，所帶有的金屬離子將會隨雷射激發而伴隨樣品脫附，對所得訊號造成較寬胖的圖型。大致上僅能在紅色虛線方框中得到極少量的可能訊號。

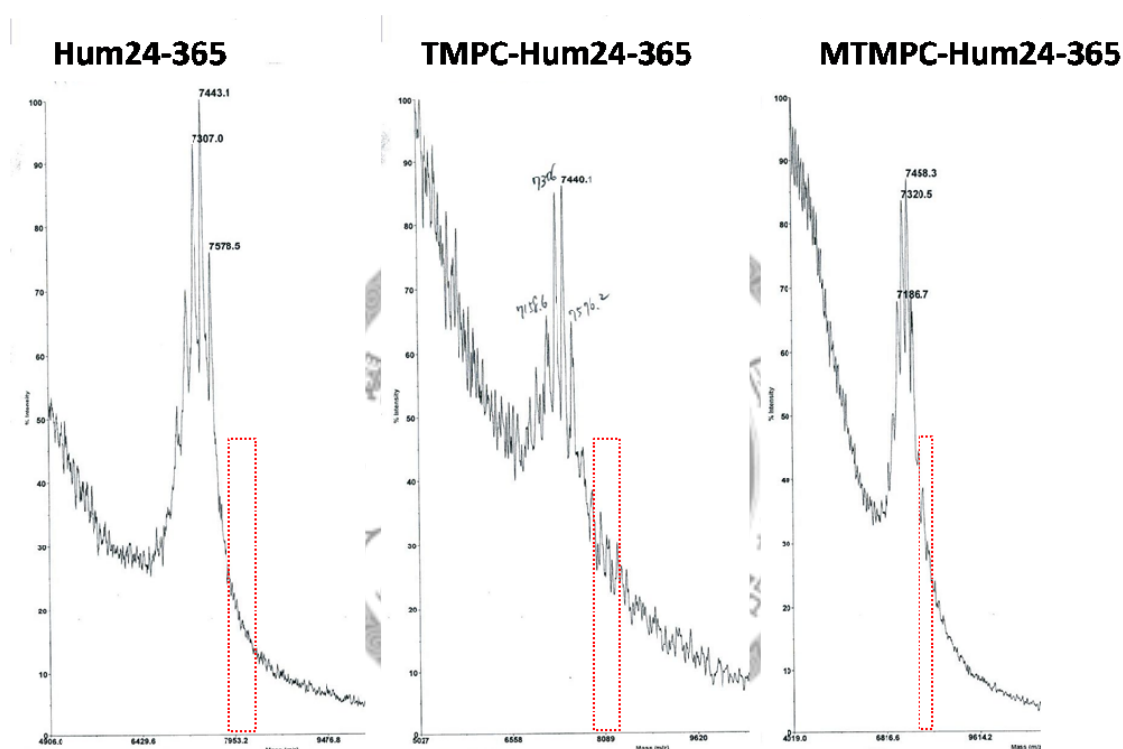


圖 3.19 365 nm 紫外光激發後所得的 Hum24 以及可能與 TMPC 或 MTMPC 形成光產物的 MALDI-TOF 質譜圖。紅色虛線方框標示可能存在光產物的質量位置。

受 254 nm 激發光照射的樣品送樣測試。但是對照空白組中相同以 254 nm 照射的 Hum24 中的方框，無法得到相對突出的數值，並且在 TMPC 的樣品中，甚至無法測出基礎的 DNA 訊號。所以樣品另外使用電噴灑質譜儀 (Electrospray Ionization ESI) 進行測試，透過 Nanospray 具有較少的多電荷訊號產生，對於 500 道耳吞的質量變化將能較有效的解析。圖 3.21 即是透過奈米電噴灑所得出的質譜，相同利用虛線方框圈出預期的產物位置，但都未能發現可信訊號。

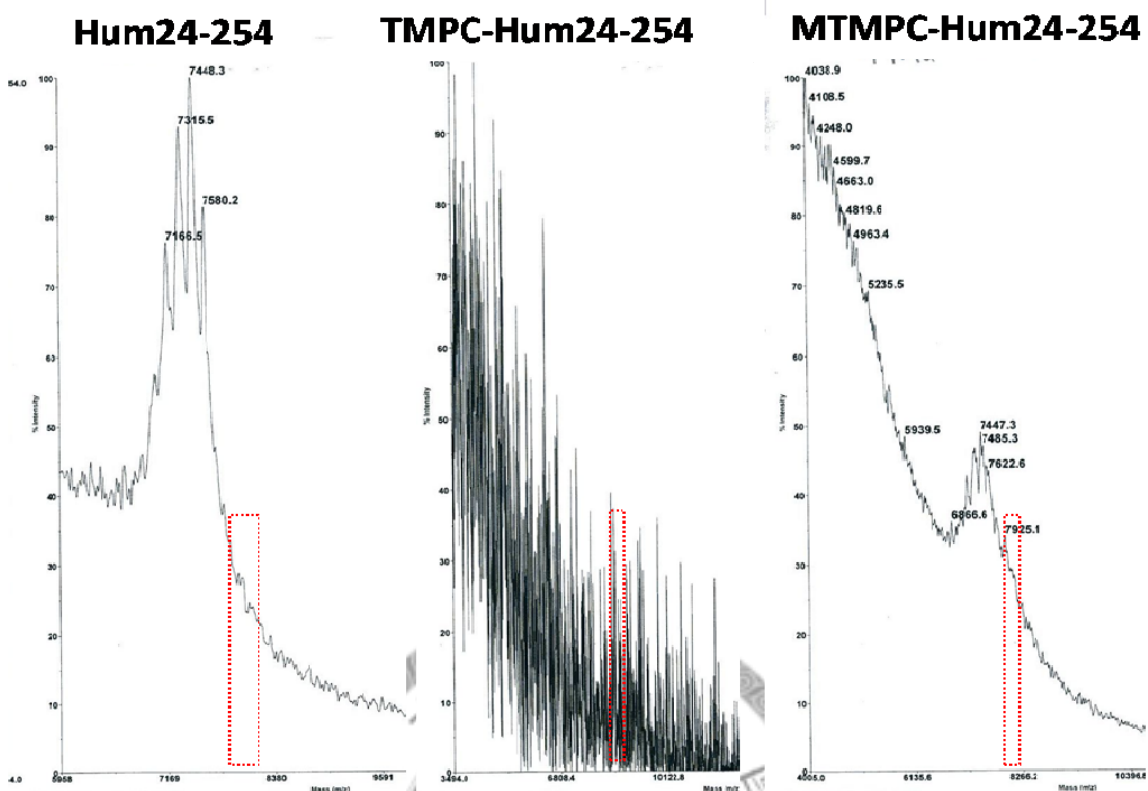


圖 3.20 254 nm 紫外光激發後所得的 Hum24 以及可能與 TMPC 或 MTMPC 形成光產物的 MALDI-TOF 質譜圖。紅色虛線方框標示可能存在光產物的質量位置。

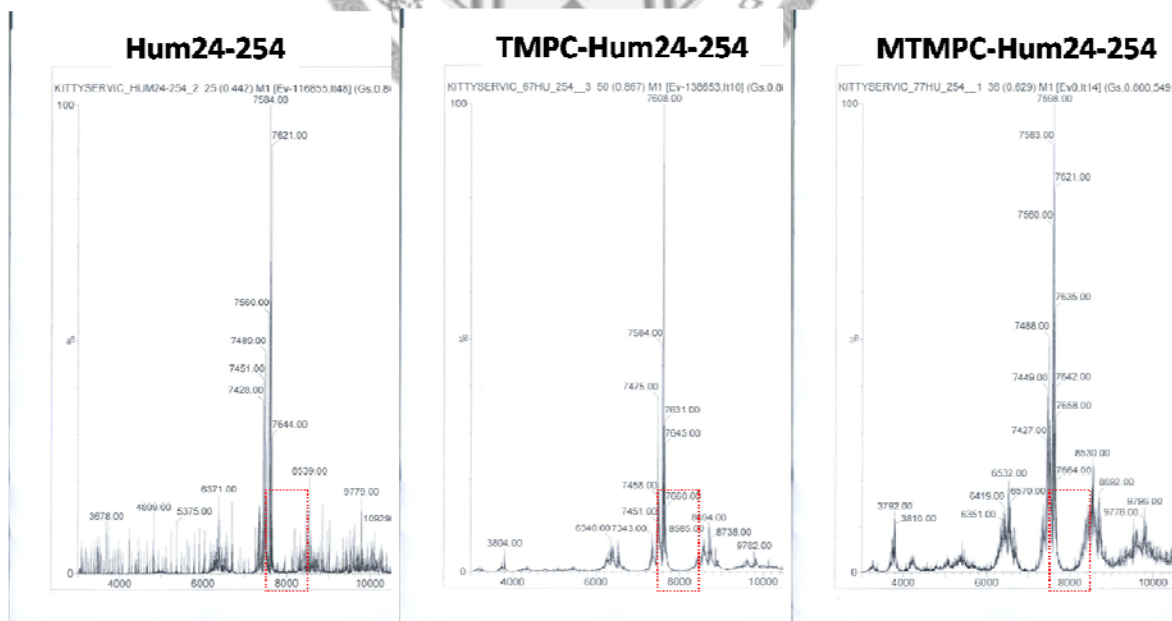


圖 3.21 254 nm 紫外光激發後所得的 Hum24 以及可能與 TMPC 或 MTMPC 形成光產物的 ESI-TOF 質譜圖。紅色虛線方框標示可能存在光產物的質量位置。

儘管在質譜訊號未能得到 TMPC 與 MTMPC 對 Hum24 受光激發形成的可能光產物，吾人也必須再次的追究 [2+2] 環化加成以及胸腺嘧啶所可能具有的光物理性質。在第一章末段對於胸腺嘧啶雙體與 [2+2] 反應機制與動力學上的討論中，尚含有玄機。胸腺嘧啶雙體的形成，在雷射的實驗中證實所發生的速率相當的快速僅需要 1 皮秒即可生成，⁵⁴ 但是同時需要再次強調胸腺嘧啶形成的量子產率在文獻中（圖 1.37）所量測的結果僅有 $22-26 \times 10^{-4}$ ，⁵⁷ 遠低於在基因體或蛋白質體上研究所常用的光親合反應的效率。主要原因即是胸腺嘧啶激發態的能階相當的稠密，具有極快的 CI (Conical intersection) 內轉換的途徑，並未能像光親合反應中存在雙自由基類的長生命期中間體以利進行侷限較少的反應。相對在胸腺嘧啶形成雙體的過程中主要透過 [2s+2a] 的同步反應，受限於空間中相鄰的乙烯雙鍵的位向必須具有 C_2 的對稱性（如圖 3.22A），透過旋轉將 π 軌域進行重疊而發生鍵結。相同在模擬胸腺嘧啶形成雙體的反應機制中，也可以發現兩分子上的乙烯雙鍵皆是透過歪斜已達成同步的鍵結生成，因此在空間中位向的限制是主要造成光產物量子產率低落的原因。透過對機制以及光產物量子產率相對低的歸納，不難理解在 pmol 數量級的樣品所測得質譜，若含有 2% 的光產物存在，也可能接近質譜儀的解析極限而無法得證。

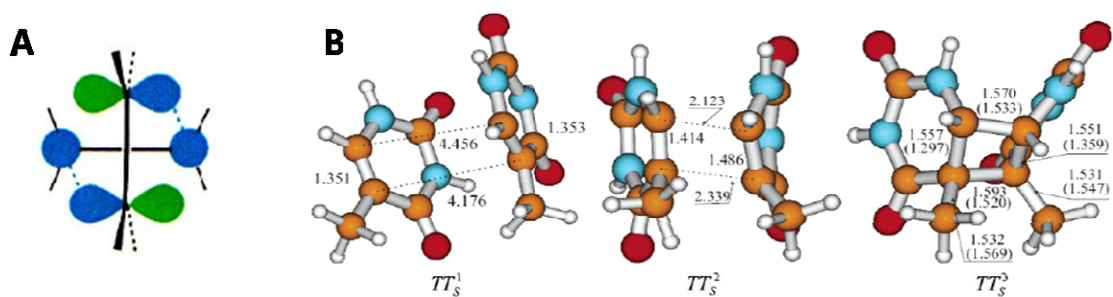


圖 3.22 A. 兩分子乙烯進行 [2s+2a] 所涉及的過渡態位向。⁵¹ B. 胸腺嘧啶透過 [2s+2a] 形成雙體 CPDs 的過渡態計算模型。⁶¹

第四章 總結

針對端粒設計的配體 **TMPC** 與 **MTMPC** 在吾人的研究中成功地透過兩次的關鍵的 Heck 反應製備得到，並且在鈉離子溶液中得到與中研院張大釗教授團隊所開發的 **BMVC** 相仿，具有穩定端粒片段 Hum24 的能力。**TMPC** 與 **MTMPC** 在結構上的胸腺嘧啶 N³ 甲基差異並未造成在吸收光譜上造成明顯影響，相對在螢光光譜上，在具有四股結構的寡核酸片段 Hum24 或雙股互補的 LD 的存在時，**TMPC** 與 **MTMPC** 可能與 DNA 進行結合明顯受到 DNA 所提供的低環境極性而提升螢光強度並且放射峰有藍位移的現象。其中 **TMPC** 相對比 **MTMPC** 敏感，在 LD 與 Hum24 當中皆能有兩倍於 **MTMPC** 的螢光強度提升。對於端粒四股結構而言，在旋光光譜中發現 **TMPC** 與 **MTMPC** 皆不造成鈉離子溶液下的四股結構受到破壞或者誘發產生異構化，因此以旋光度 295 nm 為基準，觀測受 **TMPC** 或 **MTMPC** 所穩定的解旋溫度，發現 **TMPC** 與 **MTMPC** 可以穩定 Hum24 約 3 度左右，並且額外添加一當量 **TMPC** 還可以再將解旋溫度提升 4.4 度。

透過非變性的聚丙烯醯胺膠體電泳的分析，**TMPC** 與 **MTMPC** 的確可以造成 Hum24 四股結構的穩定而形成較緊密的結構，在電泳結果中可以發現與 **BMVC** 相仿，產生新生成的拖曳帶。**TMPC** 與 **MTMPC** 在結構上的胸腺嘧啶 N³ 甲基差異在電泳結果中具有些微的差異，與 LD 作用時 **TMPC** 會形成於 LD 帶上方的位移帶，並且具有螢光，相對在 **MTMPC** 中則無發現此現象。其原因可能受 **TMPC** 的 N³ 位置位受甲基所屏蔽，可以與 LD 形成 Hoogsteen 三股的錯合結構，而造成 LD 在分子量上或者結構的改變所得到的電泳位移帶。此外對於 Hum24 的辨識與穩定能力如同在解旋溫度實驗所測得，**TMPC** 的確具有較強的能力可以將 Hum24 的電泳訊號帶形成完全的拖曳帶，而 **MTMPC** 則較差尚有殘留 Hum24 的訊號。為了衡量 **TMPC** 與 **MTMPC** 對於 Hum24 的結合能力，受到化合物的不佳的螢光能

力以及水溶性，無法透過螢光滴定進行量測。因此期望透過 ITC 可以得到 **TMPC** 與 **MTMPC** 對 Hum24 發生辨識結合時所釋放的熱，以求得相對的結合常數。然而受限化合物無法在相同的鈉離子緩衝液中溶解，因此未能求得 ITC 的結果。

透過文獻中用以定義端粒酶抑制能力的 TRAP-G4 Assay 對 **TMPC** 與 **MTMPC** 進行量測，發現透過穩定端粒造成的端粒酶活性失去能力尚屬佳作，分別具有 3.9 μM 以及 6.6 μM 。

對於所設計的光激發 [2+2] 環化加成反應可能會將 **TMPC** 或 **MTMPC** 與鈉離子溶液中 Hum24 的平行股上胸腺嘧啶進行共價鍵的結合，因此透過適當的紫外光激發，並利用酒精沉澱的方式與其移除非共價性結合的配體，將所透析所得的 Hum24 進行電泳分析，得到的拖曳帶相對減少，並且 Hum24 的訊號帶有明顯的成長，意味著多數的配體都被酒精沉澱的方式所移除。但所獲得的拖曳帶上比較未照光的組別沒有預期明顯的差異，推測配體與 Hum24 在酒精沉澱過程中具有共沉澱的現象。然而在 **MTMPC** 的拖曳帶上，相對位照光的組別具有些微的訊號增強，推測發生了光反應並可能獲得光產物。但是欲透過質譜儀進行分析卻未能得到所求的分子量分布，缺乏證據舉證。

然而 [2+2] 環化加成反應形成胸腺嘧啶雙體的動力學速率相當的快，但是光產物量子產率不及於常用的光親合化合物，並且所經由 [2s+2a] 的同步反應過程所受到的空間中相鄰活性雙鍵的位向限制，無法如光親合反應常走的雙自由基類反應的高活性，具有較有效的光反應產物，在吾人的研究結果中實屬缺憾。

實驗部分

一、一般敘述

1. 測試及實驗儀器

(1) 核磁共振光譜 (^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectrum): 使用 400MHz Varian NMR Mercury Plus 光譜儀測定，樣品以氘氯仿 (CDCl_3)、氘甲醇 (CD_3OD) 及氘代二甲基亞砜 ($\text{DMSO}-d_6$) 為溶劑。化學位移單位為 ppm，以溶劑峰或四甲基矽烷 ($\delta=0$) 為基準。氘氯仿 $\delta=7.24$ 、氘甲醇 $\delta=3.31$ 、氘代二甲基亞砜 $\delta=2.50$ ^1H NMR 分裂定義如下：單峰 (s)；雙峰 (d)；三重峰 (t)；四重峰 (q)；多重峰 (m)。耦合常數以 J 表示，單位是 Hz。

(2) 紅外線光譜 (Infrared Spectrum)：使用 Varian 640-IR 型儀器，樣品以純液 (neat) 測試，光譜單位為波數 (cm^{-1})。

(3) 高解析度質譜 (High-Resolution Mass, HRMS)：由 WATERS LCT Premier XE 型儀器測定。

(4) 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography, TLC)：使用 Merck silica gel 60 F₂₅₄ 層析薄片。展層後以手持紫外光燈檢視，或以磷鉬酸 (phosphomolybdic acid, PMA) 浸染後燒片顯色。

(5) 管柱色層分析 (Flash Column Chromatography)：管柱以 silica gel 60 型 (230-400 mesh ASTM) 矽膠填充於玻璃管柱，透過幫浦加壓沖提。

(6) 紫外光/可見光光譜 (Ultraviolet/Visible Spectrum, UV/Vis)：使用 HP 8453 型儀器測定。

(7) 螢光光譜 (Fluorescence Spectrum)：使用中研院原分所張大釗老師實驗室的 PerkinElmer LS-55 型儀器測定。

(8) 旋光光譜 (Circular Dichroism) 與 DNA 解旋溫度 (Melting Point, T_m)：使用

中研院原分所張大釗老師實驗室的 Jasco J-715 型儀器測定。

(9) 微量卡計 (Isothermal Titration Calometry, ITC) : 使用中研院化學所的 MicroCal iTC200 型儀器測定。

(10) 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) : 使用 BioRad Protein II Xi 電泳系統分析，並以手持紫外光燈照射以數位相機拍攝，或者利用 Typhoon9000D 雷射膠片顯影掃描系統，以氬離子雷射 457 nm 激發透過光電倍增管擷取 555 nm 的螢光所得。

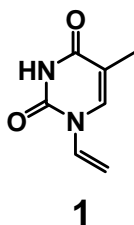
2. 溶劑之前處理：

(1) 無水四氫呋喃 (tetrahydrofuran, THF) 使用 Mallinckrodt 試藥級溶劑，經金屬鈉乾燥，於二苯基酮 (benzophenone) 呈深藍色狀態下蒸餾使用。

(2) 無水二氯甲烷 (dichloromethane, CH_2Cl_2) 使用 Echo 試藥級溶劑，經氫化鈣乾燥蒸餾使用。

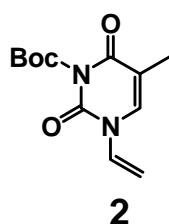
(3) 無水二甲基甲醯胺 (*N,N*-dimethyl formamide, DMF) 溶劑是使用 Mallinckrodt 試藥級溶劑，經氫化鈣乾燥除水後蒸餾使用。

二、實驗步驟及光譜數據



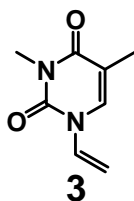
*N*¹-vinylthymine⁷³

稱取胸腺嘧啶 (Thymine) 1 g (7.9 mmol) ，置於圓底瓶中加入作為溶劑的六甲基二矽氮烷 (Hexamethyldisilazane, HMDS) 5 mL (23.7 mmol) ，彌封系統並換氣為氮氣條件下，加入氯三甲基矽烷 (Trimethylsilyl chloride, TMSCl) 0.5 mL (3.94 mmol) 。透過 120 °C 加熱迴流 24 小時可將懸浮的胸腺嘧啶完全溶解，透過減壓蒸餾移除過量的 HMDS 可得到白色的粉末。在原瓶中繼續加入反應劑同時也作為溶劑的乙烯乙酯 (Vinylacetate) 50 mL ，以及二乙酸汞 170 mg (0.5 mmol) 、三甲基矽烷三氟甲磺酸酯 (Trimethylsilyl triflate, TMSOTf) 0.36 mL (2 mmol) 以及對苯二酚 (Hydroquinone) 174 mg (1.58 mmol) 。加熱迴流 2 小時直到溶液澄清，移除熱源並濃縮，所得棕色晶體，以二氯甲烷再結晶可以得到透明的結晶 1 g ，總產率 82% ， $R_f = 0.35$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 10:1$) ， $\text{mp} = 203\text{-}204$ °C (lit. $\text{mp} = 205\text{-}207$ °C) ， $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.97 (s, 3H) ， 4.89-4.92 (dd, $J = 8.8$, 2 Hz, 1H) 5.036-5.081 (dd, $J = 8.8$, 2 Hz, 1H) 7.142-7.203 (dd, $J = 16$, 9.2 Hz, 1H) 7.316 (s, 1H) . $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 12.90, 94.52, 100.71, 112.22, 116.26, 129.67, 134.62.



*N*¹-vinyl-*N*³-*tert*-butyloxycarbonylthymine⁷⁴

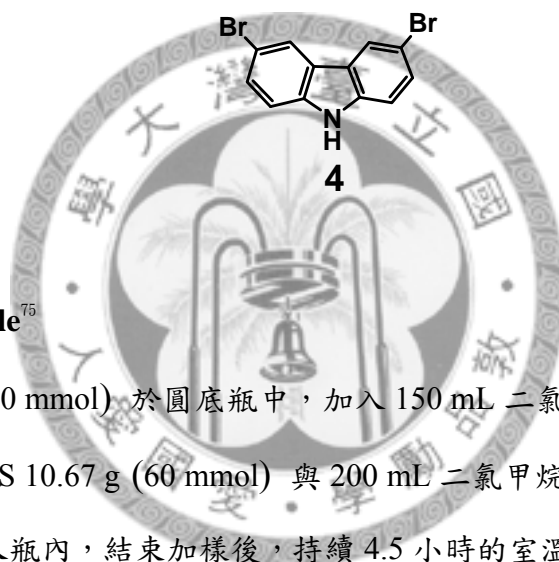
稱取 200 mg (1.3 mmol) 化合物 **1** 於圓底瓶中，配置吡啶在二氯甲烷溶劑下 1:4 的溶液 5 mL 加入瓶中。於冰浴下均勻攪拌，緩慢加入 0.58 mL (2.6 mmol) Boc₂O。回室溫後，持續 4 小時的攪拌後，加入 2 mL 水去除殘餘的 Boc₂O，並濃縮。得到粗產物以 EA:Hexane = 1:4 的沖提極性，以矽膠管柱層析而得透明晶體，300 mg，產率 90-95%。R_f = 0.3 (EA:Hexane = 1:4)，mp = 108-110 °C (lit. mp = 113-114 °C)，¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.60 (s, 9H), 1.98 (s, 3H), 4.92-4.95 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 5.05-5.09 (dd, *J* = 16, 2 Hz, 1H), 7.13-7.15 (dd, *J* = 16, 9.2 Hz, 1H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 12.85, 27.66, 87.14, 100.62, 111.78, 129.49, 134.59, 147.50, 160.98, 171.965. HRMS (FAB) : caclcd. for C₁₂H₁₆N₂O₄ (M+H)⁺ : 252.11; found: 252.1173. FT-IR (neat) : 1144, 1343, 1417, 1645, 1786 cm⁻¹



*N*¹-vinyl-*N*³-methylthymine

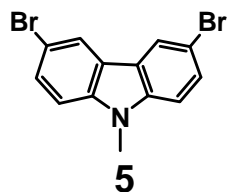
稱取 1 g (6.5 mmol) 化合物 **1** 於圓底瓶中，以 30 mL 丙酮溶去後，加入碳酸鉀 4.5 g (32 mmol) 以及碘甲烷 4 mL (65 mmol)，加熱迴流 24 小時後，加入少量水移除過量碘甲烷，並濃縮得白色粉末，以二氯甲烷再次溶去，以簡單過濾可

得到透明結晶產物，以二氯甲烷再結晶可得到 1 g 透明結晶，產率超過 90%。
 $R_f = 0.3$ (CH_2Cl_2), $\text{mp} = 92\text{-}94\text{ }^\circ\text{C}$, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.99 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 4.87-4.90 (dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, 1H), 5.017-5.062 (dd, $J = 16, 2$ Hz, 1H), 7.21-7.27 (dd, $J = 16, 9.2$ Hz, 1H), 7.30 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 13.55, 28.33, 100.36, 111.16, 130.55, 132.53, 150.08, 163.29. HRMS (FAB): calcd. for $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 166.07; found: 167.06. FT-IR (neat): 1161, 1263, 1344, 1633 cm^{-1} .



3,6-dibromocarbazole⁷⁵

稱取咔唑 5 g (30 mmol) 於圓底瓶中，加入 150 mL 二氯甲烷震盪溶去並加入 10 g 矽膠。稱取 NBS 10.67 g (60 mmol) 與 200 mL 二氯甲烷成懸浮溶液，透過加料漏斗避光緩慢加入瓶內，結束加樣後，持續 4.5 小時的室溫攪拌。結束時，以簡單過濾移去副產物 NHS，並將所得濾液濃縮，得到微黃色結晶，以二氯甲烷進行再結晶可以得到透明的結晶 9 g，產率 95%。 $R_f = 0.4$ (CH_2Cl_2 :Hexane = 1:1), $\text{mp} = 209\text{-}211\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. $\text{mp} = 209\text{-}213\text{ }^\circ\text{C}$), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (s, 2H), 7.26 (s, 2H), 7.45-7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.07 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 112.35, 123.35, 129.398. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Br}_2\text{N}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 323.8847; found: 323.8858.

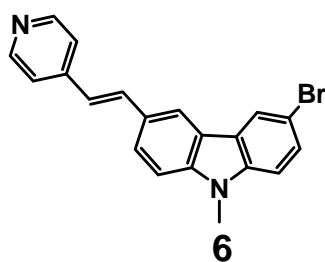


3,6-dibromo-9-methylcarbazole

稱取 0.7 g (2.16 mmol) 化合物 **4** 於圓底瓶中，以 20 mL 丙酮溶去後，加入碳酸鉀 1.5g (10 mmol) 以及碘甲烷 1.3 mL (21.6 mmol)，加熱迴流 24 小時後，加入少量水移除過量碘甲烷，並濃縮得白色粉末，以二氯甲烷再次溶去，以簡單過濾可得到透明結晶產物，以二氯甲烷再結晶可得到 0.7 g 透明結晶，產率超過 90%。 $R_f = 0.43$ (CH_2Cl_2 :Hexane = 1:1), mp = 137-139 °C (lit. mp = 141 °C), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.8 (s, 3H), 7.24-7.26 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.54-7.56 (dd, $J = 8.4, 2\text{Hz}$, 2H), 8.12 (d, $J = 2\text{Hz}$, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 29.502, 110.12, 112.06, 123.11, 123.28, 129.01, 139.72. HRMS (FAB): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Br}_2\text{N}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 336.91; found: 336.9095. FT-IR (neat): 1044, 1285, 1441, 1480, 1633 cm^{-1} .

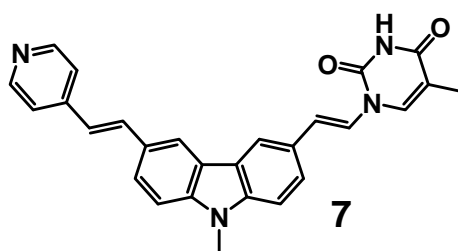
Heck 耦合反應的一般步驟：

稱取 1 當量含溴吡啶化合物 **5** 或 **6** 以及過量乙烯胸腺嘧啶化合物 **2** 或 **3**，至於乾燥雙頸瓶內，並加入催化劑 5-10 mol% 的醋酸鈀後彌封，透過高真空系統進行除氧除水。接著加入無水甲苯或二甲基甲醯胺作為溶劑，並加入 20 mol% 配體三甲基膦甲苯溶液與 2 當量鹼 DIPEA。將系統置入預熱至 110-125 °C 的矽油鍋中，加熱適當時間後，濃縮並直接透過適當沖提極性溶劑進行矽膠管柱層析。



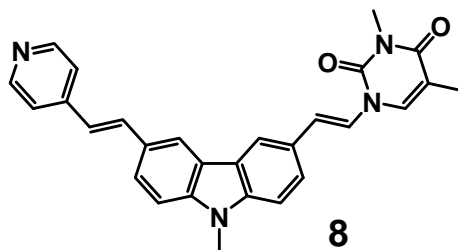
3-bromo-9-methyl-6-(2-(pyridin-4-yl)vinyl)carbazole

遵從一般敘述實驗步驟，分別加入 0.5 g (1.5 mmol) 化合物 5、0.2 mL (1.8 mmol) 4-乙烯吡啶、16 mg (0.09 mmol) 醋酸鈣、3 mL (0.15 mmol) 三甲苯基膦甲苯溶液以及 0.6 mL (3 mmol) DIPEA 與恰巧使化合物 5 飽和左右的甲苯約 8 mL。系統於 110 °C 加熱 18 小時，以二氯甲烷–2%丙酮–5%甲醇三溶劑系統進行矽膠管柱層析，獲得 190 mg，產率 30%。 $R_f = 0.3$ (CH₂Cl₂:Acetone:CH₃OH = 93:2:5)，mp = 219-221 °C, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (s, 3H), 7.02-7.062 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 7.26-7.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.38-7.40 (m, 3H), 7.46-7.50 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 7.55-7.58 (dd, $J = 8.8, 2$ Hz, 1H), 7.70-7.72 (dd, $J = 8.4, 2$ Hz, 2H), 8.18 (s, 1H), 8.21-8.22 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 8.57-8.55 (d, $J = 6$ Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 29.66, 109.17, 110.31, 112.32, 119.58, 120.717, 122.26, 123.22, 123.60, 124.45, 125.62, 127.86, 128.84, 133.88, 140.09, 141.55, 150.12. HRMS (ESI) : caclcd. for C₂₀H₁₆BrN₂ (M+H)⁺ : 363.0497; found: 363.0496. FT-IR (neat) : 1128, 1245, 1361, 1449, 1485, 1589, 1623 cm⁻¹.



3-(2-(thymine-1-yl)vinyl) - 9-methyl-6-(2-(pyridin-4-yl)vinyl) carbazole

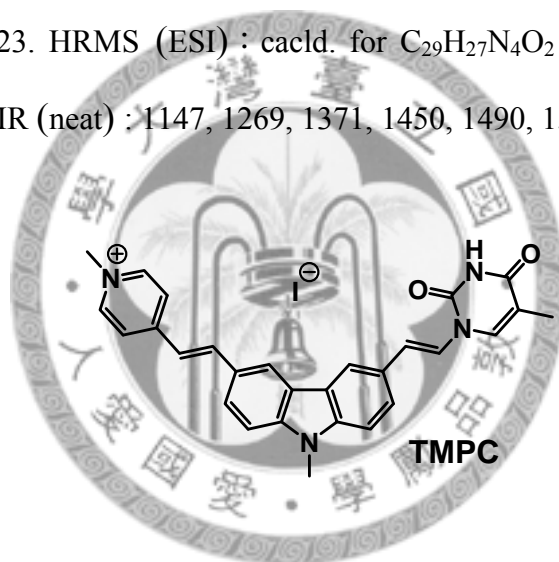
遵從一般敘述實驗步驟，分別加入 160 mg (0.44 mmol) 化合物 **6**、334 mg (1.32 mmol) 化合物 **2**、5 mg (0.044 mmol) 醋酸鈹、0.88mL (0.044 mmol) 三甲苯基膦甲苯溶液以及 0.16 mL (0.88 mmol) DIPEA 與二甲基甲醯胺 5 mL。系統於 125 °C 避光加熱 48 小時，濃縮後直接以二氯甲烷-10%丙酮-5%甲醇三溶劑系統進行矽膠管柱層析，獲得 80 mg 灰黃色粉末，產率 42%。 $R_f = 0.27$ (CH₂Cl₂:Acetone:CH₃OH = 85:10:5)，mp = 278 °C (Decomposed)，¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.04 (s, 3H)，3.87 (s, 3H)，6.69-6.72 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H)，7.048-7.088 (d, $J = 16$ Hz, 1H)，7.36-7.55 (m, 7H)，7.63-7.66 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H)，7.68-7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)，8.16 (s, 1H)，8.25 (s, 1H)，8.55-8.57 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H)。 ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.98, 30.09, 110.35, 110.48, 111.08, 114.10, 116.27, 118.13, 118.88, 120.03, 121.14, 122.08, 122.97, 123.67, 125.70, 126.23, 127.04, 128.07, 134.64, 136.91, 141.29, 141.92, 145.02, 150.15, 150.51, 152.44, 164.16. HRMS (ESI) : cacl. for C₂₇H₂₂N₄O₂ (M+H)⁺ : 435.1821; found: 435.1820. FT-IR (neat) : 1032, 1137, 1259, 1454, 1493, 1599, 1657, 1657 cm⁻¹.



3-(2-(3-methylthymine-1-yl)vinyl) -bromo-9-methyl-6-(2-(pyridin-4-yl)vinyl) carbazole

遵從一般敘述實驗步驟，分別加入 200 mg (0.55 mmol) 化合物 **6**、365 mg (2.2 mmol) 化合物 **3**、12 mg (0.055 mmol) 醋酸鈹、1.1mL (0.055 mmol) 三甲苯基膦

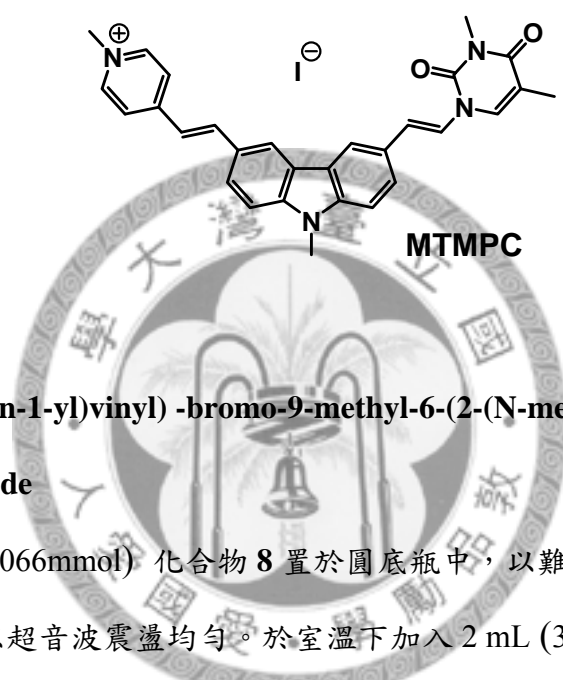
甲苯溶液以及 0.2 mL (1.1 mmol) DIPEA 與二甲基甲醯胺 5 mL。系統於 125 °C 避光加熱 48 小時，濃縮後直接以二氯甲烷—5%丙酮—5%甲醇三溶劑系統進行矽膠管柱層析，獲得 66 mg 灰黃色粉末，產率 27%。 $R_f=0.32$ (CH₂Cl₂:Acetone:CH₃OH = 90:5:5) , mp = 312 °C (Decomposed) , ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.05 (s, 3H) , 3.41 (s, 3H) , 3.87 (s, 3H) , 6.67-6.70 (d, *J* = 12 Hz, 1H) , 7.08-7.04 (d, *J* = 16 Hz, 1H) , 7.364-7.742 (m, 9H) , 8.16 (s, 1H) , 8.25 (s, 1H) , 8.55-8.56 (d, *J* = 5.2Hz, 1H) . ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 13.54, 28.38, 29.82, 109.00, 109.10, 110.94, 118.24, 119.21, 119.29, 120.51, 122.57, 123.98, 123.39, 124.67, 125.34, 125.95, 127.68, 133.57, 133.78, 149.97, 150.23. HRMS (ESI) : cacl'd. for C₂₉H₂₇N₄O₂ (M+H)⁺ : 449.1978; found: 449.1975. FT-IR (neat) : 1147, 1269, 1371, 1450, 1490, 1590, 1641, 1665, 1697.



3-(2-(thymine-1-yl)vinyl)-bromo-9-methyl-6-(2-(N-methylpyridin-4-yl)vinyl)carbazole iodide

稱取 26 mg (0.06mmol) 化合物 7 置於圓底瓶中，以難溶的二氯甲烷作為溶劑，加入 10 mL，以超音波震盪均勻。於室溫下加入 2 mL (32 mmol) 碘甲烷，可發現化合物顏色轉為深棕色，48 小時後，直接過濾取得目標化合物 **TMPC** 30 mg，產率 95%。 $R_f=0.3$ (CH₂Cl₂: CH₃OH = 85:15) , mp = 224 °C (Decomposed) , ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.89 (s, 3H) , 3.91 (s, 3H) , 4.22 (s, 3H) , 7.00-7.04 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H) , 7.49-7.53 (d, *J* = 16 Hz, 1H) , 7.62-7.70 (m, *J* = 12 Hz, 5H) , 7.87-7.98 (d, *J* = 4Hz, 2H) , 8.07 (s, 1H) , 8.14-8.18 (m, 5H) , 8.32 (s, 1H) , 8.62 (s, 1H) ,

8.76-8.78 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H) . ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 12.82, 30.19, 47.46, 53.54, 110.71, 111.14, 116.52, 118.04, 118.60, 120.65, 121.70, 122.21, 123.05, 123.10, 123.38, 125.76, 125.99, 126.98, 127.25, 127.52, 135.76, 136.80, 141.35, 142.77, 142.91, 145.27, 150.122, 153.53, 164.16. HRMS (ESI) : cacl. for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$ (M+H) $^+$: 449.1978; found: 449.1977. FT-IR (neat) : 1191, 1253, 1462, 1416, 1617, 1644, 1699.



3-(2-(3-methylthymine-1-yl)vinyl)-bromo-9-methyl-6-(2-(N-methylpyridin-4-yl)vinyl) carbazole iodide

稱取 30 mg (0.066mmol) 化合物 **8** 置於圓底瓶中，以難溶的二氯甲烷作為溶劑，加入 10 mL，以超音波震盪均勻。於室溫下加入 2 mL (32 mmol) 碘甲烷，可發現化合物顏色轉為深棕色，48 小時後，直接過濾取得目標化合物 **MTMPC** 36 mg，產率 95%。 $R_f = 0.3$ (CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH} = 85:15$)， $\text{mp} = 250$ °C (Decomposed)， ^1H NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$) δ 2.03 (s, 3H) , 3.39 (s, 3H) , 3.89 (s, 3H) , 4.26 (s, 3H) , 6.81-6.847 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H) , 7.25-7.29 (d, $J = 16$ Hz, 1H) , 7.43-7.49 (m, 5H) , 7.58-7.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) , 7.65-7.70 (m, 2H) , 7.81-7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H) , 7.98-8.02 (m, 3H) , 8.20 (s, 1H) , 8.42 (s, 1H) , 8.54-8.56 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H) . ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 12.86, 27.82, 29.40, 46.67, 52.88, 109.31, 109.92, 117.93, 118.38, 119.83, 120.93, 121.31, 122.24, 122.29, 122.59, 125.13, 126.20, 126.40, 126.62, 134.57, 140.57, 141.99, 142.11, 144.46, 149.53, 152.75, 162.44. HRMS (ESI) :

cacl. for $C_{29}H_{27}N_4O_2$ (M+H)⁺ : 463.2134; found: 463.2127. FT-IR (neat) : 1128, 1217, 1251, 1371, 1470, 1519, 1592, 1615, 1640,1670.



參考文獻

- (1) Moon, W. K.; Lin, Y.; O'Loughlin, T.; Tang, Y.; Kim, D.-E.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconj. Chem.* **2003**, *14*, 539.
- (2) Ross, J. F.; Chaudhuri, P. K.; Ratnam, M. *Cancer* **1994**, *73*, 2432.
- (3) Rosenholm, J. M.; Meinander, A.; Peuhu, E.; Niemi, R.; Eriksson, J. E.; Sahlgren, C.; Lindén, M. *ACS Nano* **2008**, *3*, 197.
- (4) Pike, A. C. W.; Brzozowski, A. M.; Walton, J.; Hubbard, R. E.; Thorsell, A.-G.; Li, Y.-L.; Gustafsson, J.-Å.; Carlquist, M. **2001**, *9*, 145.
- (5) Sharma, U.; Marquis, J. C.; Nicole Dinaut, A.; Hillier, S. M.; Fedeles, B.; Rye, P. T.; Essigmann, J. M.; Croy, R. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3829.
- (6) Hillier, S. M.; Marquis, J. C.; Zayas, B.; Wishnok, J. S.; Liberman, R. G.; Skipper, P. L.; Tannenbaum, S. R.; Essigmann, J. M.; Croy, R. G. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 977.
- (7) Zeng, F.; Lee, H.; Allen, C. *Bioconj. Chem.* **2006**, *17*, 399.
- (8) Lee, H.; Hu, M.; Reilly, R. M.; Allen, C. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 769.
- (9) Burgess, A. W.; Cho, H.-S.; Eigenbrot, C.; Ferguson, K. M.; Garrett, T. P. J.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A.; Sliwkowski, M. X.; Ward, C. W.; Yokoyama, S. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 541.
- (10) Palm, W.; de Lange, T. *Annu. Rev. Gene.* **2008**, *42*, 301.
- (11) Kornberg, A. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1.
- (12) Ogawa, T.; Okazaki, T. *Annu. Rev. Biochem* **2003**, *49*, 421.
- (13) De Cian, A.; Lacroix, L.; Douarre, C.; Temime-Smaali, N.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L. *Biochimie* **2008**, *90*, 131.
- (14) Harley, C. B. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 167.

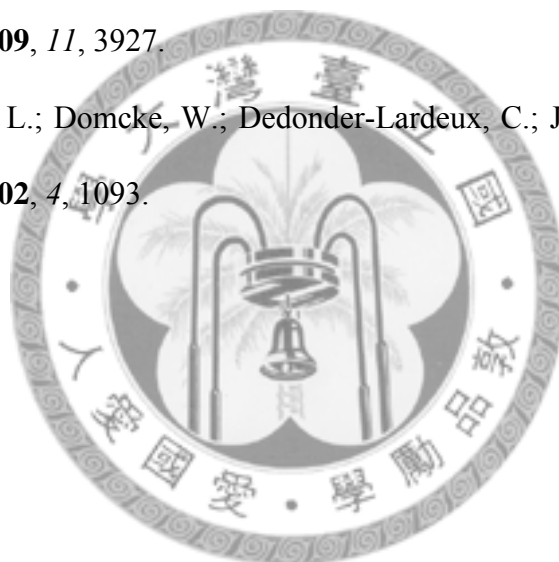
- (15) Shay, J. W.; Wright, W. E. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 577.
- (16) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1987**, *51*, 887.
- (17) Neidle, S.; Parkinson, G. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1*, 383.
- (18) Kim, N.; Piatyszek, M.; Prowse, K.; Harley, C.; West, M.; Ho, P.; Coviello, G.; Wright, W.; Weinrich, S.; Shay, J. *Science* **1994**, *266*, 2011.
- (19) Baumann, P.; Cech, T. R. *Science* **2001**, *292*, 1171.
- (20) Rich, A. *Gene* **1993**, *135*, 99.
- (21) Rich, A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1958**, *29*, 502.
- (22) Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1962**, *48*, 2013.
- (23) Bate, P.; Mergny, J.-L.; Yang, D. *EMBO Reports* **2007**, *8*, 1003.
- (24) Wang, Y.; Patel, D. J. *Structure* **1993**, *1*, 263.
- (25) Lim, K. W.; Amrane, S.; Bouaziz, S.; Xu, W.; Mu, Y.; Patel, D. J.; Luu, K. N.; Phan, A. T. n. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4301.
- (26) Xu, Y.; Noguchi, Y.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5584.
- (27) Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. *Nature* **2002**, *417*, 876.
- (28) Xu, Y.; Sugiyama, H. *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 949.
- (29) Matsugami, A.; Xu, Y.; Noguchi, Y.; Sugiyama, H.; Katahira, M. *FEBS J.* **2007**, *274*, 3545.
- (30) Luu, K. N.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Lacroix, L.; Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9963.
- (31) Phan, A. T.; Luu, K. N.; Patel, D. J. *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 5715.
- (32) Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M. *Nature* **1991**, *350*, 718.
- (33) Cian, A. D.; Mergny, J.-L. *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, 2483.

- (34) Mergny, J.-L.; Helene, C. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1366.
- (35) Jena, P. V.; Shirude, P. S.; Okumus, B.; Laxmi-Reddy, K.; Godde, F. d. r.; Huc, I.; Balasubramanian, S.; Ha, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12522.
- (36) Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113.
- (37) Fedoroff, O. Y.; Salazar, M.; Han, H.; Chemeris, V. V.; Kerwin, S. M.; Hurley, L. H. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12367.
- (38) Mergny, J.-L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J.-P.; Lehn, J.-M.; Riou, J.-F.; Garestier, T.; Hélène, C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 3062.
- (39) Chang, C.-C.; Wu, J.-Y.; Chang, T.-C. *J. Chin. Chem. Soc.* **2003**, *50*, 185.
- (40) Petraccone, L.; Trent, J. O.; Chaires, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16530.
- (41) Campbell, N. H.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6722.
- (42) Chang, C.-C.; Chu, J.-F.; Kao, F.-J.; Chiu, Y.-C.; Lou, P.-J.; Chen, H.-C.; Chang, T.-C. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2810.
- (43) Chang, C.-C.; Kuo, I. C.; Ling, I. F.; Chen, C.-T.; Chen, H.-C.; Lou, P.-J.; Lin, J.-J.; Chang, T.-C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4490.
- (44) Chang, C.-C.; Kuo, I.-C.; Lin, J.-J.; Lu, Y.-C.; Chen, C.-T.; Back, H.-T.; Lou, P.-J.; Chang, T.-C. *Chem Biodiv.* **2004**, *1*, 1377.
- (45) Kang, C.-C.; Chang, C.-C.; Chang, T.-C.; Liao, L.-J.; Lou, P.-J.; Xie, W.; Yeung, E. S. *The Analyst* **2007**, *132*, 745.
- (46) Huang, F.-C.; Chang, C.-C.; Lou, P.-J.; Kuo, I.-C.; Chien, C.-W.; Chen, C.-T.; Shieh, F.-Y.; Chang, T.-C.; Lin, J.-J. *Mol. Cancer Res.* **2008**, *6*, 955.

- (47) Skladanowski, A.; Bozko, P.; Sabisz, M. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2951.
- (48) Hurley, L. H. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188.
- (49) Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647.
- (50) Nishiyama, N.; Morimoto, Y.; Jang, W.-D.; Kataoka, K. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 327.
- (51) Woodward, R. B.; Hoffmann, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 781.
- (52) Bernardi, F.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *23*, 405.
- (53) Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L. A.; Ünsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. *Annu. Rev. Biochem* **2004**, *73*, 39.
- (54) Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Koller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernandez, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625.
- (55) Sancar, A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2.
- (56) Johns, H. E.; Pearson, M. L.; LeBlanc, J. C.; Helleiner, C. W. *J. Mol. Biol.* **1964**, *9*, 503.
- (57) Görner, H. *J. Photochem. Photobiol. B* **1994**, *26*, 117.
- (58) Crespo-Hernandez, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977.
- (59) Serrano-Perez, J. J.; Gonzalez-Luque, R.; Merchan, M.; Serrano-Andres, L. *J. Phys. Chem. B Lett* **2007**, *111*, 11880.
- (60) Kwok, W.-M.; Ma, C.; Phillips, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5131.
- (61) Zhang, R. B.; Eriksson, L. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7556.
- (62) Zimmerman, S. B.; Trach, S. O. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599.
- (63) Miyoshi, D.; Sugimoto, N. *Biochimie* **2008**, *90*, 1040.

- (64) Chen, Z.; Zheng, K.-w.; Hao, Y.-h.; Tan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10430.
- (65) Bertrand, H.; Bombard, S.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 1003.
- (66) Bertrand, H.; Bombard, S.; Monchaud, D.; Talbot, E.; Guedin, A.; Mergny, J.-L.; Grunert, R.; Bednarski, P. J.; Teulade-Fichou, M.-P. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2864.
- (67) Yang, D.-Y.; Sheu, S.-Y. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 9224.
- (68) Kuhnert, N.; Rossignolo, G. M.; Lopez-Periago, A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1157.
- (69) Morita, H.; Tashiro, S.; Takeda, M.; Fujimori, K.; Yamada, N.; Chanmiya Sheikh, M.; Kawaguchi, H. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3589.
- (70) Nawrot, B.; Michalak, O.; Clercq, E. D.; Stec, W. J. *Antivir. Chem. Chemother.* **2004**, *15*, 319.
- (71) Silveira, C. C.; Rinaldi, F.; Guadagnin, R. C. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4935.
- (72) Boesen, T.; Madsen, C.; Henriksen, U.; Dahl, O. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2000**, 2015.
- (73) Dalpozzo, R.; Nino, A. D.; Maiuolo, L.; Procopio, A.; Romeo, R.; Sindona, G. *Synthesis* **2002**, 0172.
- (74) Nguyen Van Nhien, A.; Tomassi, C.; Len, C.; Marco-Contelles, J. L.; Balzarini, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Postel, D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4276.
- (75) Smith, K.; James, D. M.; Mistry, A. G.; Bye, M. R.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7479.
- (76) Mathews, D. H. *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 526.
- (77) Pierce, M. M.; Raman, C. S.; Nall, B. T. *Methods* **1999**, *19*, 213.

- (78) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859.
- (79) Oddone, A.; Lorentzen, E.; Basquin, J.; Gasch, A.; Rybin, V.; Conti, E.; Sattler, M. *EMBO reports* **2007**, *8*, 63.
- (80) Fukada, H.; Takahashi, K. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1998**, *33*, 159.
- (81) BERNHARD, S. A. *J. Biol. Chem.* **1956**, *218*, 961.
- (82) Gomez, D.; Mergny, J.-L.; Riou, J.-F. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3365.
- (83) Gonzalez-Vazquez, J.; Gonzalez, L.; Samoylova, E.; Schultz, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3927.
- (84) Sobolewski, A. L.; Domcke, W.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvet, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 1093.



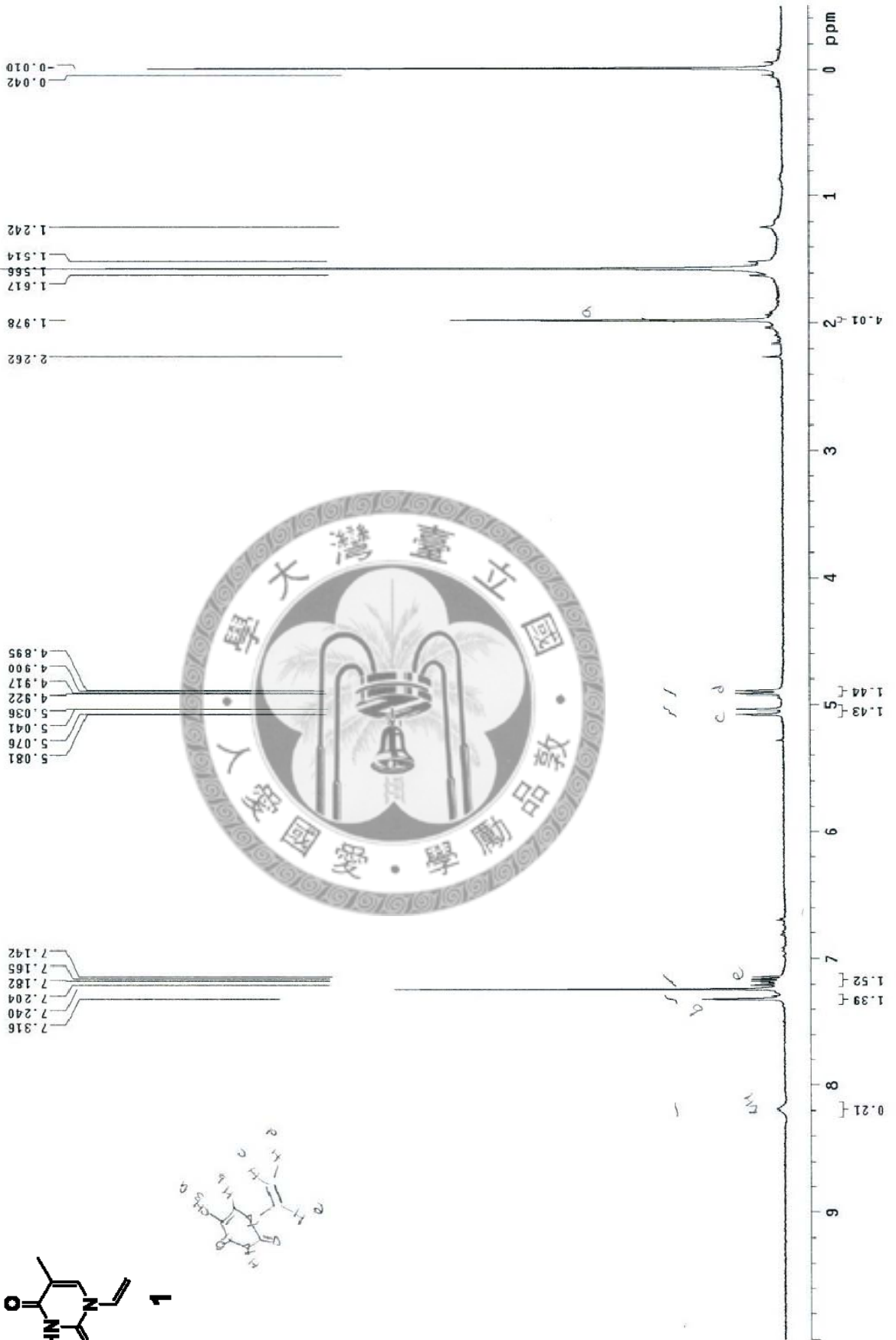
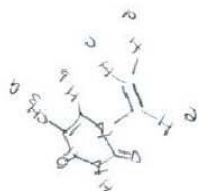
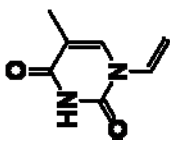
附錄

^1H NMR 光譜

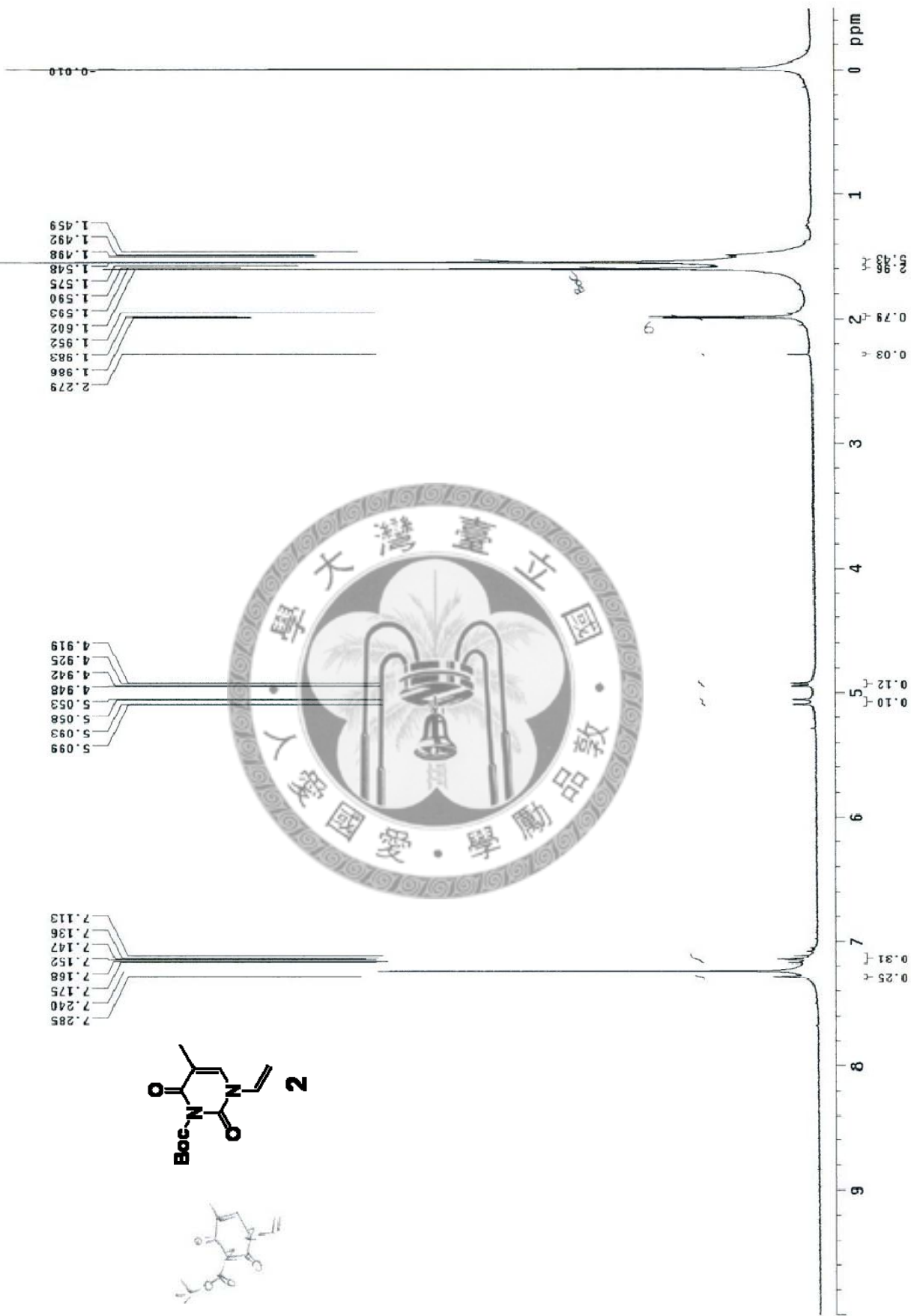
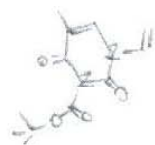
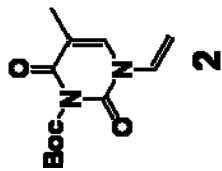


vis173_CDC13_20080824

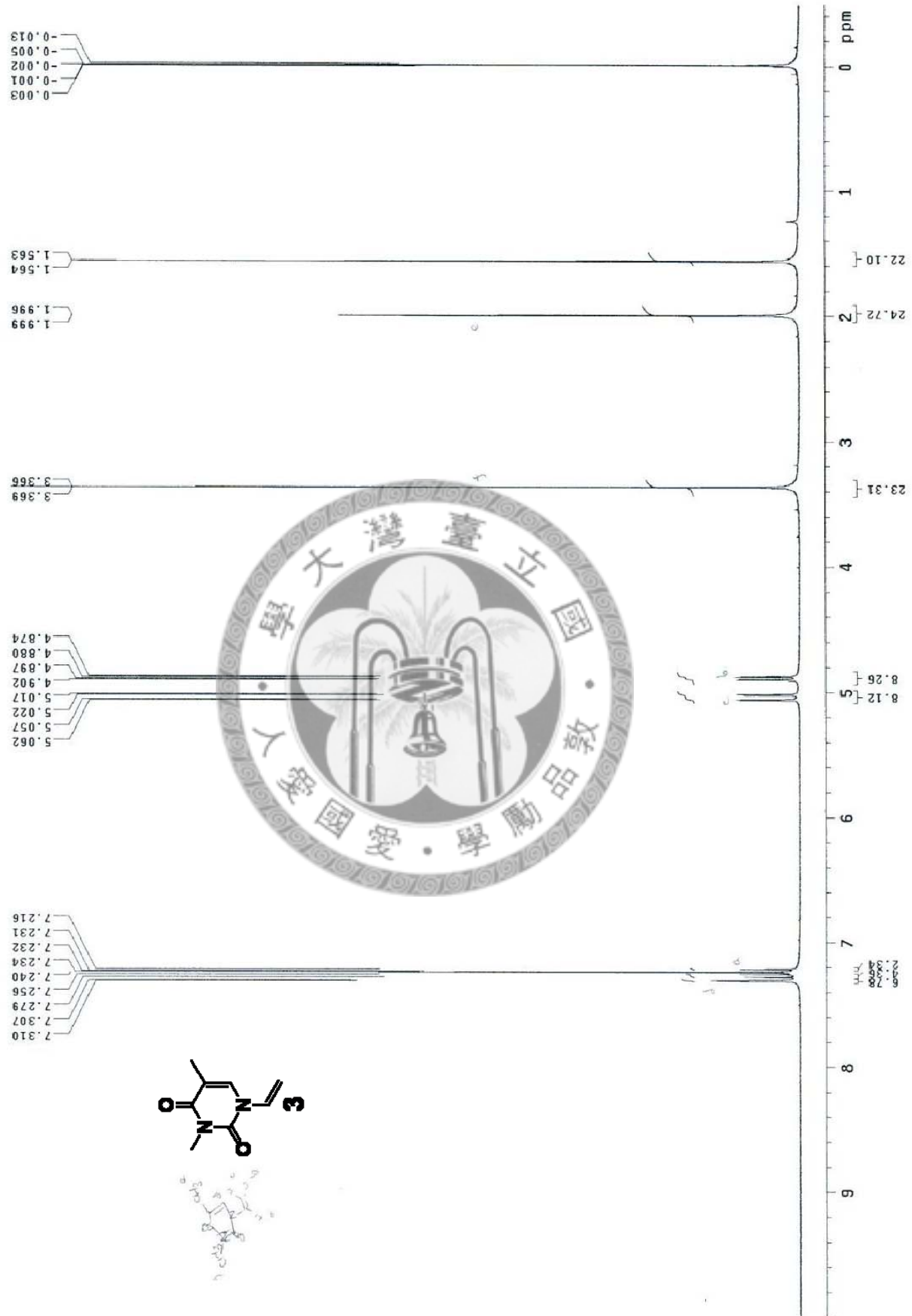
Pulse Sequence: s2pu1



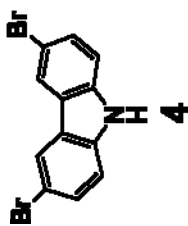
vis189_p1_CDCl3_20080824
Pulse Sequence: s2pu1



visB057_CDC13_20090413
Pulse Sequence: s2pu1



VISA215_CDC13_20050828
Pulse Sequence: szput



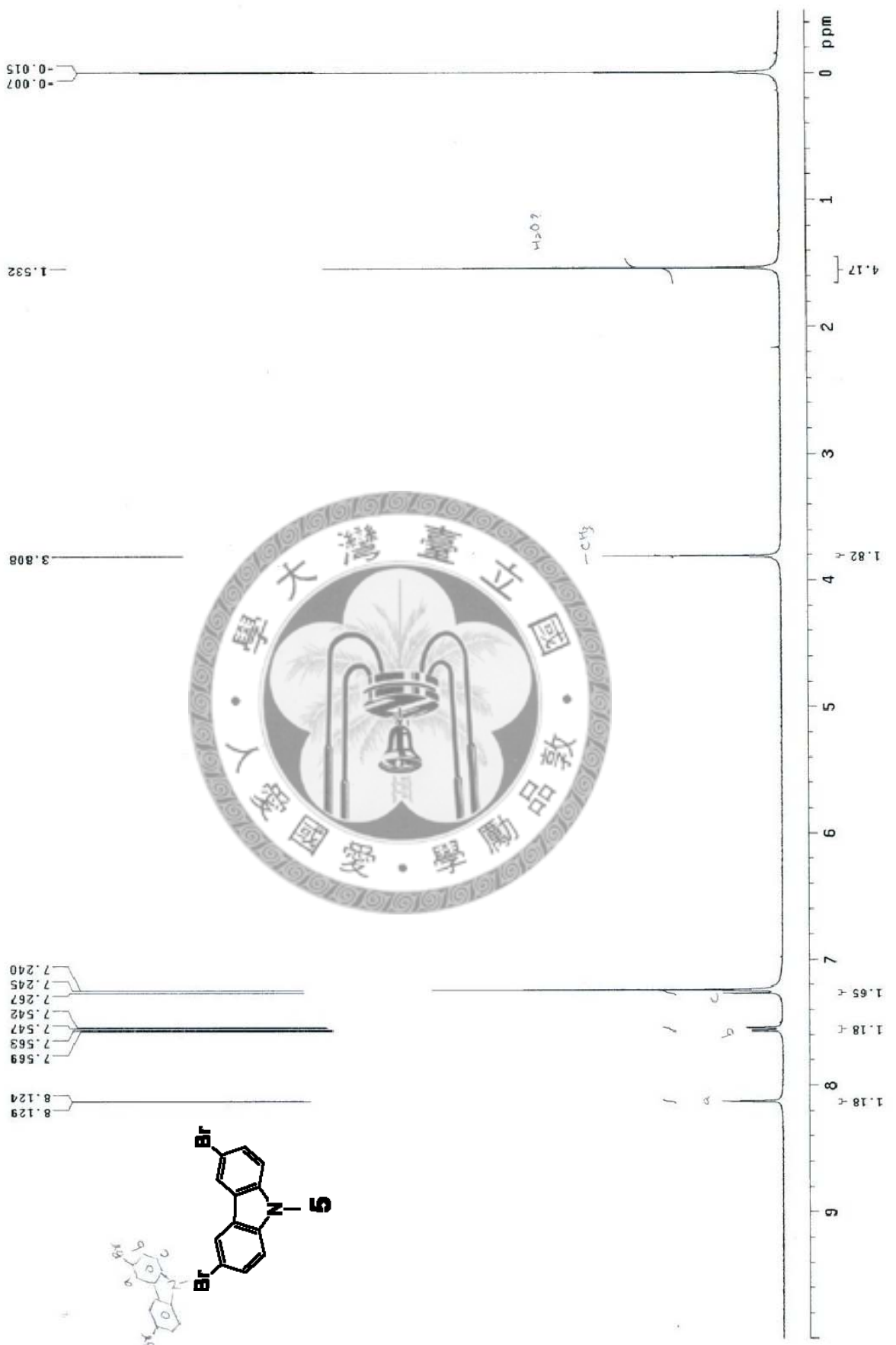
8.071
8.068
7.479
7.475
7.458
7.455
7.453
7.261
7.240
7.213
7.212



1.558



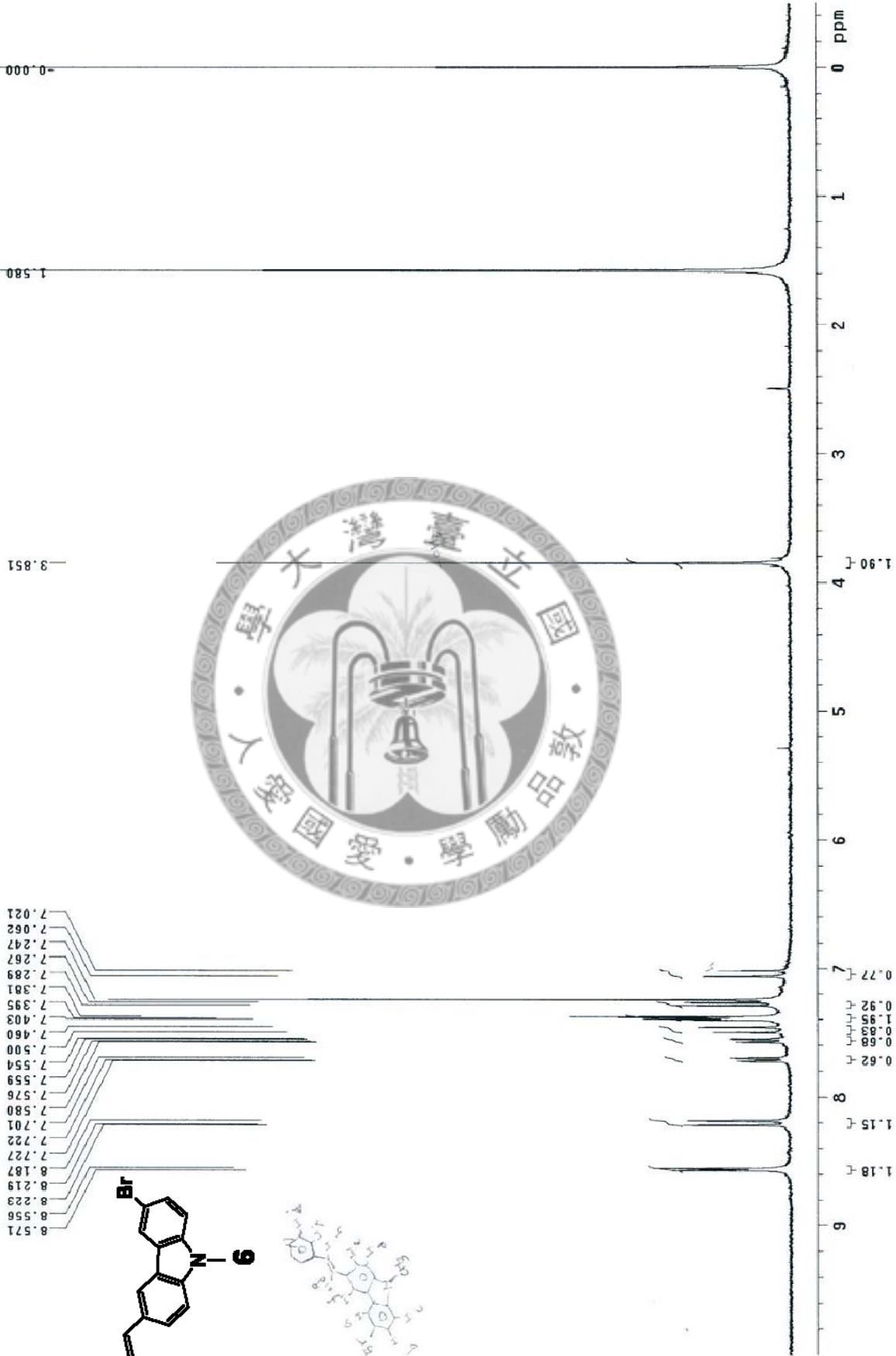
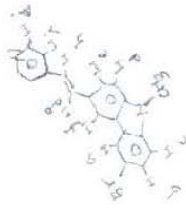
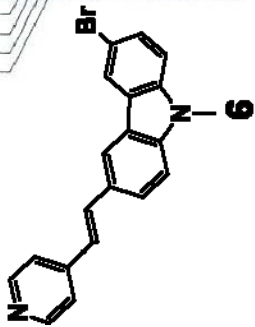
visB041_CDC13_20090219
Pulse Sequence: s2pu1



visB061-2_CDC13_20090416

Pulse Sequence: s2pu1

8.571
8.556
8.223
8.219
8.187
7.727
7.722
7.701
7.580
7.576
7.559
7.554
7.500
7.460
7.403
7.395
7.381
7.289
7.267
7.247
7.062
7.021



vis063_CDC13_20090511
Pulse Sequence: s2pu1

8.571
8.557
8.259
8.160
7.710
7.689
7.666
7.630
7.555
7.533
7.510
7.476
7.405
7.388
7.364
7.240
7.088
7.048
6.729
6.693

5.283

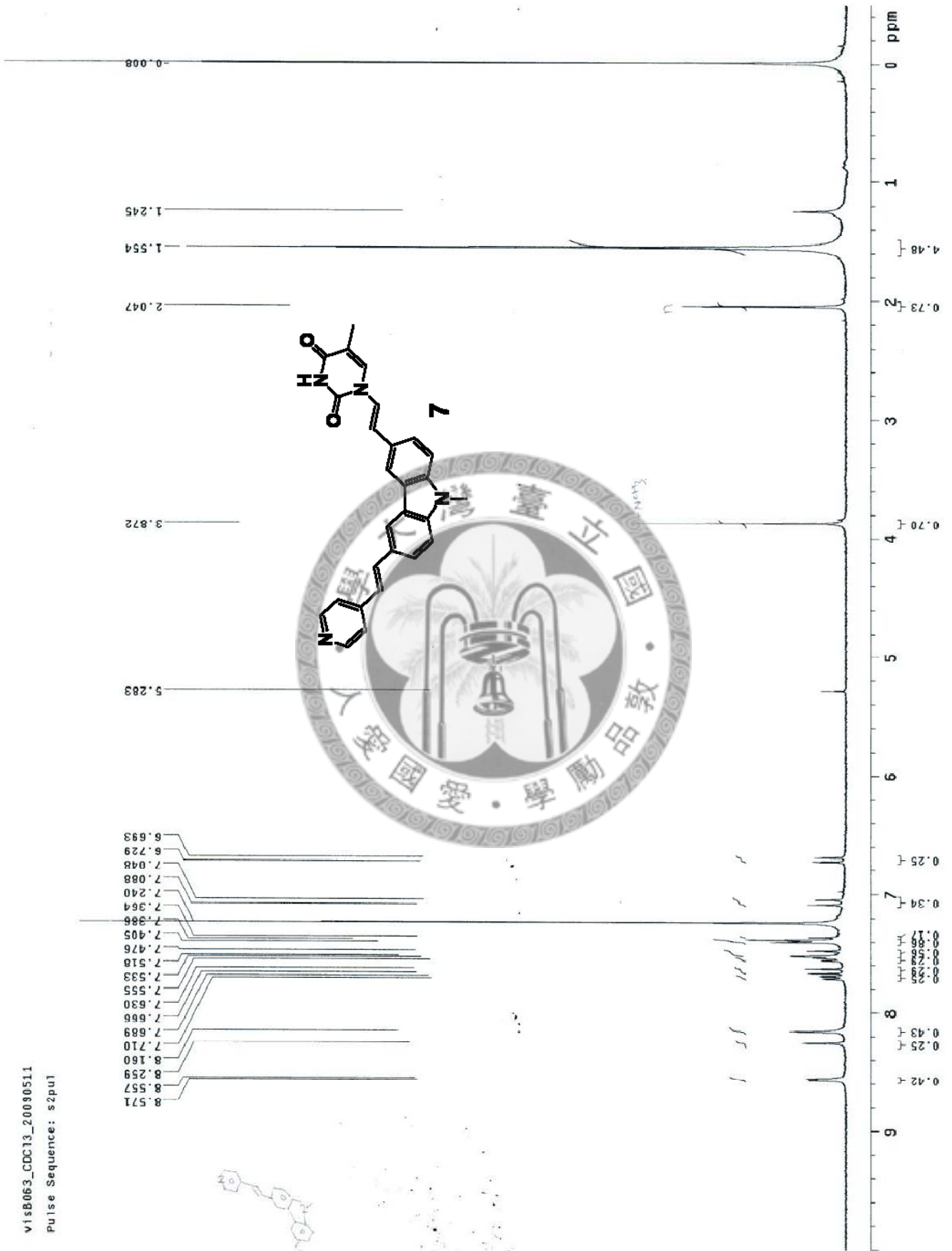
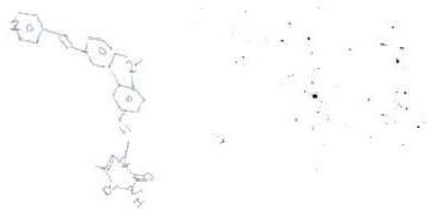
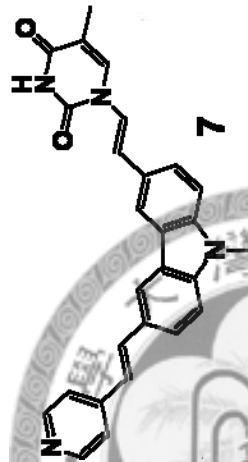
3.872

2.047

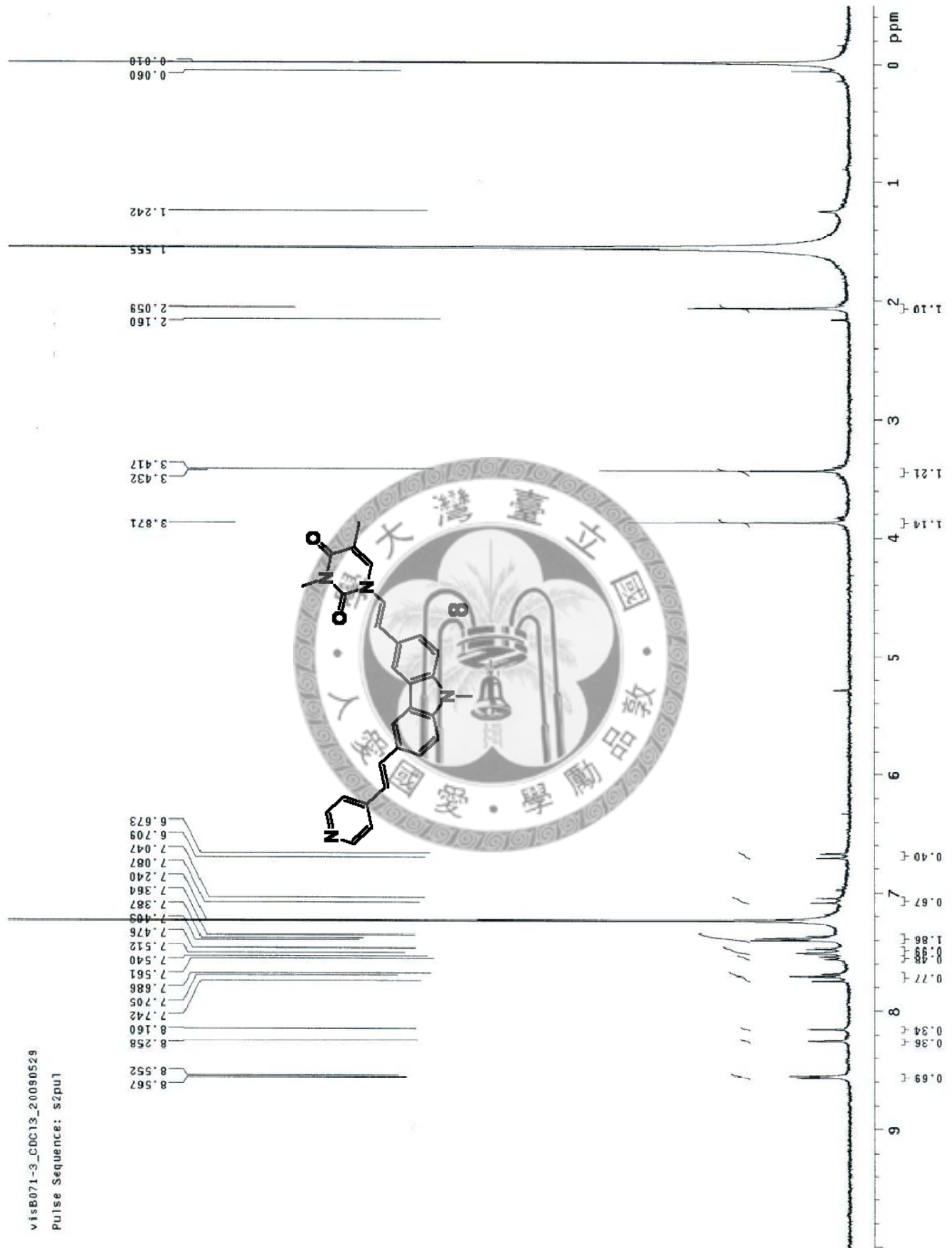
1.554

1.245

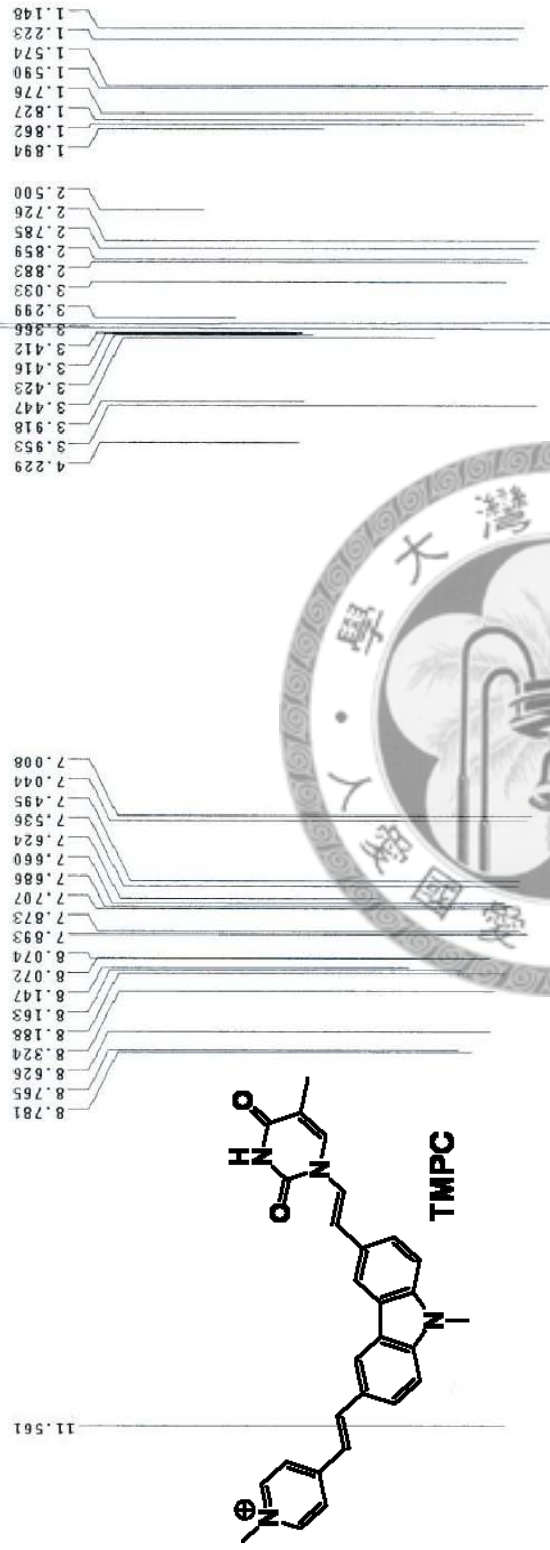
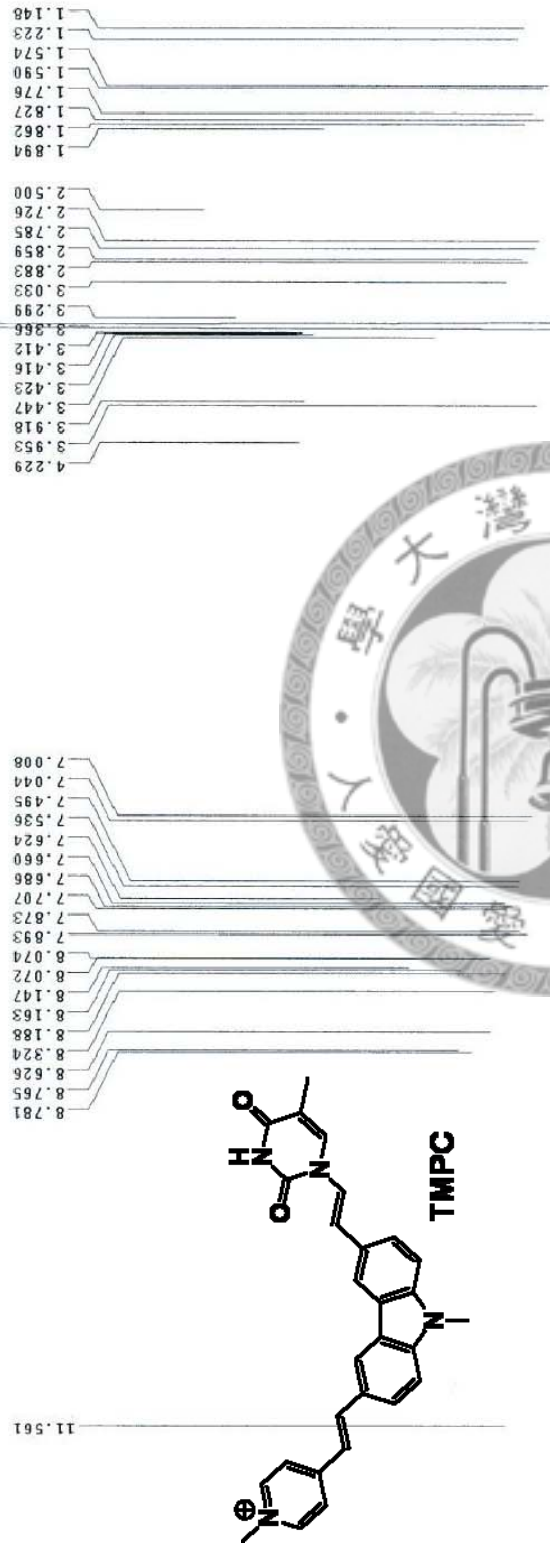
0.008



vis071-3_CDCl3_20090529
Pulse Sequence: s2pu1



vis067_DMSO_20090828
Pulse Sequence: s2pu1



vis8077-2_CDCl3+CD300_20090601
Pulse Sequence: s2pu1

