



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201602166 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 16 日

(21) 申請案號：103123757

(22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 10 日

(51) Int. Cl. :

*C08G69/00 (2006.01)**A61K38/04 (2006.01)*

(71) 申請人：國立交通大學 (中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72) 發明人：林欣杰 LIN, HSIN CHIEH (TW) ; 許舒閔 HSU, SHU MIN (TW)

(74) 代理人：陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：7 共 63 頁

(54) 名稱

胜肽分子材料

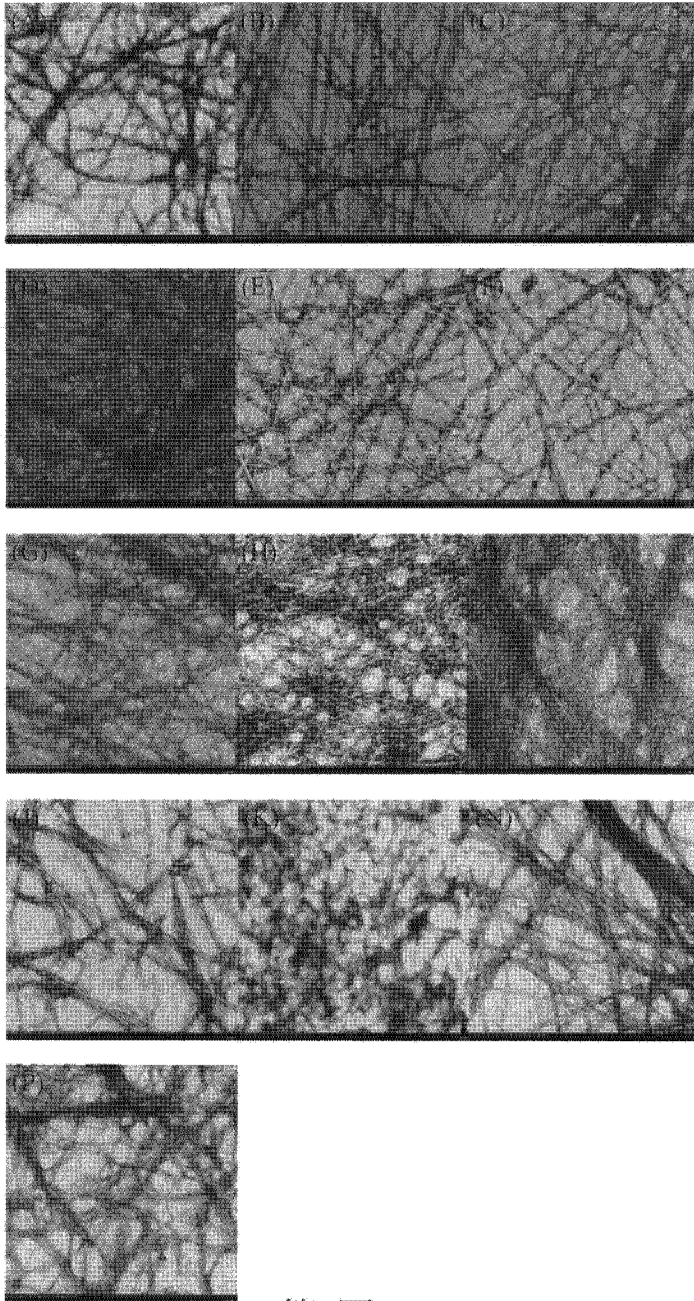
PEPTIDE MOLECULAR MATERIALS

(57) 摘要

一種胜肽分子材料，該材料之分子結構為經鹵素取代或未經取代之芳基環與胜肽分子的結合，此材料可在水中自組裝形成奈米纖維並形成水凝膠，而該水凝膠具有低細胞毒性、促進細胞生長與遷移等特性，並且擁有在生理環境及人體溫度下穩定的性質。

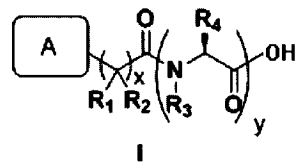
This invention discovers a new peptide molecular material where structure is a combination of aryl may substituted with halogen(s) with peptide molecular. This material can self-assembly form hydrogels by self-assembling of molecules into nanofibers. This material has various properties, including nontoxic, promoting cell growth and migration as well as stable hydrogels under physiological condition and body temperature.

指定代表圖：



第2圖

特徵化學式：



其中，A、R₁、R₂、R₃、R₄、x 及 y 之定義如說明書所述。

※申請案號：103123757

※申請日：103. 7. 1 0

※IPC分類：C08G69/00(2006.01)
A61K38/04(2006.01)**【發明名稱】(中文/英文)**

胜肽分子材料

PEPTIDE MOLECULAR MATERIALS

【中文】

一種胜肽分子材料，該材料之分子結構為經鹵素取代或未經取代之芳基環與胜肽分子的結合，此材料可在水中自組裝形成奈米纖維並形成水凝膠，而該水凝膠具有低細胞毒性、促進細胞生長與遷移等特性，並且擁有在生理環境及人體溫度下穩定的性質。

【英文】

This invention discovers a new peptide molecular material where structure is a combination of aryl may substituted with halogen(s) with peptide molecular. This material can self-assembly form hydrogels by self-assembling of molecules into nanofibers. This material has various properties, including nontoxic, promoting cell growth and migration as well as stable hydrogels under physiological condition and body temperature.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

胜肽分子材料

PEPTIDE MOLECULAR MATERIALS

【技術領域】

本發明係關於一種胜肽分子材料，尤係關於在水中可自組裝形成水凝膠之胜肽分子材料。

【先前技術】

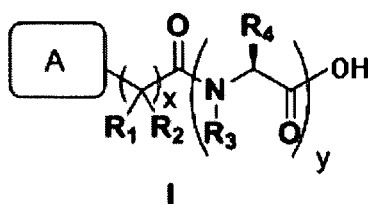
目前小分子胜肽水凝膠技術由於需要其分子自組裝產生可以固定水流動的奈米結構，因此往往需要一段很長的胜肽以提供足夠的分子間作用力，所以其成本高，如第 7,884,185 號美國專利所揭露，需要 20 個胺基酸形成的水凝膠材料。另一種小分子胜肽水凝膠技術可用相對簡易的芳基環與可與生物作用的胜肽片段結合以減少成本，類似技術已發表之代表性專利為第 20070224273 號美國專利、第 20070243255 號美國專利，其中，Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl，芴基甲氧羰基)芳基基團為目前廣泛使用的自組裝基團，其產生的自組裝材料可在生理環境產生水凝膠，但其缺點是有易解離的氫原子，因此，其長時間穩定性不佳。除了 Fmoc 可以展現低細胞毒性的水凝膠外，最近也有核鹼基(nucleobase)與胜肽片段形成的低細胞毒性的水凝膠專利，如 WO 2012/166705A2，這樣的水凝膠具有發展潛力，但問題是其合成核鹼基需要多個合

成步驟，成本相對高，且需較高的成膠濃度(2至3wt%)。

因此，仍有需要開發一種新穎的胜肽分子材料，其可透過簡化步驟合成，並具有高穩定度、無生物毒性及促進組織生長之功效。

【發明內容】

本發明提供一種胜肽分子材料，係具有下式(1)結構：



其中，A 為經 1 至 5 個鹵素取代或未經取代之芳基，該鹵素係選自氟、氯、溴或碘原子；

R₁、R₂ 係獨立選自氫原子或經取代或未經取代之烷基，且 R₁、R₂ 為相同或不同；以及

R₃、R₄ 係獨立選自由氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基、C2-C10 烷基硫代烷基、C7-C10 羥基芳烷基 (hydroxyaralkyl)、C6-C10 雜芳烷基、C2-C10 羧基烷基、C2-C10 胍基烷基及 C1-C10 胺基烷基所組成之群組中之一者，且 R₃、R₄ 為相同或不同。

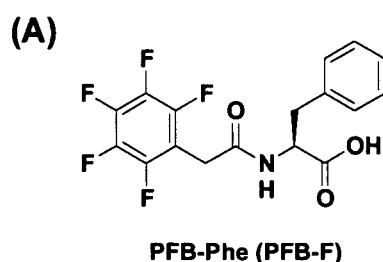
此外，x 為 0 至 10 之整數，且當 x > 1 時，式(1)中各 R₁ 或各 R₂ 係為相同或不同。例如，當 x 為 2 時，該位置具有二個重複單元，而該二個 R₁ 可為相同或不同，該二個 R₂ 可為相同或不同。

又，y 為 1 至 20 之整數，且當 y > 1 時，式(1)中各 R₃ 或各 R₄ 係為相同或不同。例如，當 y 為 2 時，該位置具有

二個重複單元，而該二個 R_3 可為相同或不同，該二個 R_4 可為相同或不同。

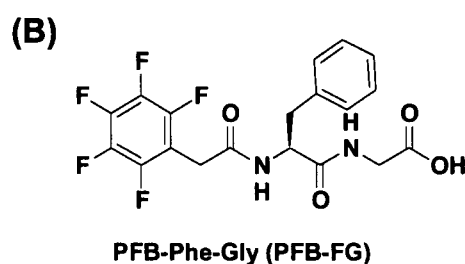
於一具體實施例中，A 為經氟取代之苯基； R_1 、 R_2 係氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子或芳烷基； x 為 1； y 為 1。

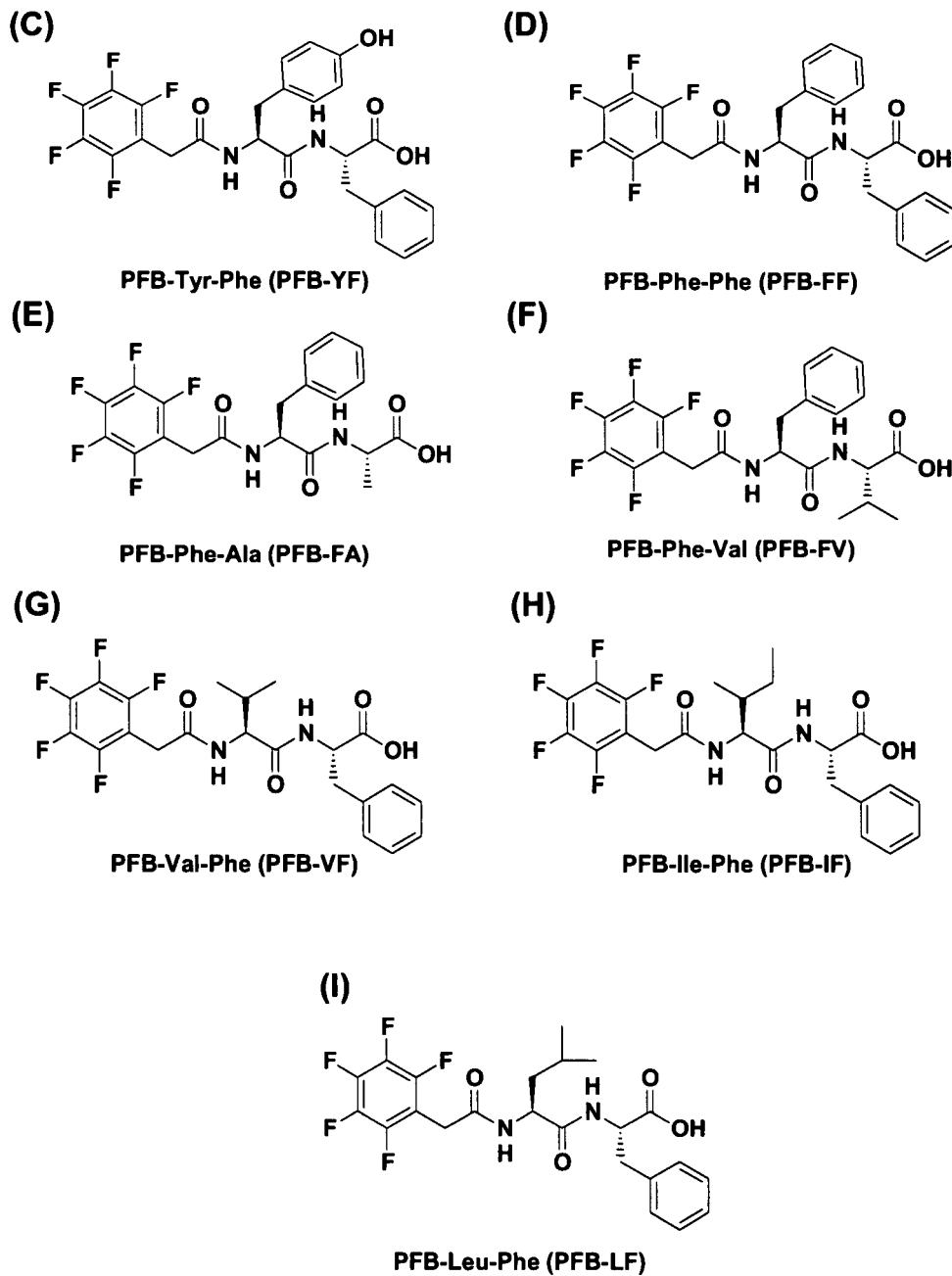
例如，本發明之胜肽分子材料係具有下式(A)之結構：



於一具體實施例中，A 為經氟取代之苯基； R_1 、 R_2 係獨立選自氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基或 C7-C10 羥基芳烷基； x 為 1； y 為 2。

例如，本發明之胜肽分子材料係具有下式(B)至(I)之結構：

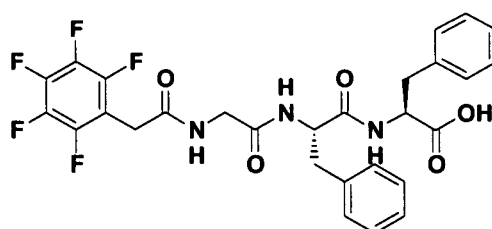




於一具體實施例中，A 為經氟取代之苯基； R_1 、 R_2 係獨立選自氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基或 C7-C10 羥基芳烷基；x 為 1；y 為 3。

例如，本發明之胜肽分子材料係具有下式(J)之結構：

(J)

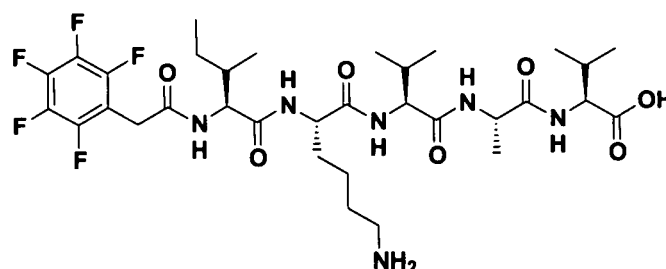


PFB-Gly-Phe-Phe (PFB-GFF)

於一具體實施例中，A 為經氟取代之苯基； R_1 、 R_2 係氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基或 C1-C10 胺基烷基； x 為 1； y 為 5。

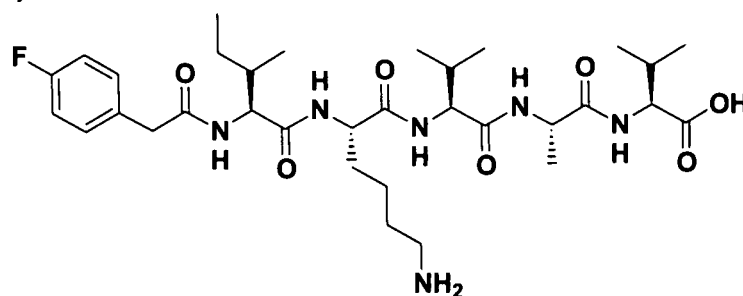
例如，本發明之胜肽分子材料係具有下式(K)或(L)之結構：

(K)



PFB-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PFB-IKVAV)

(L)



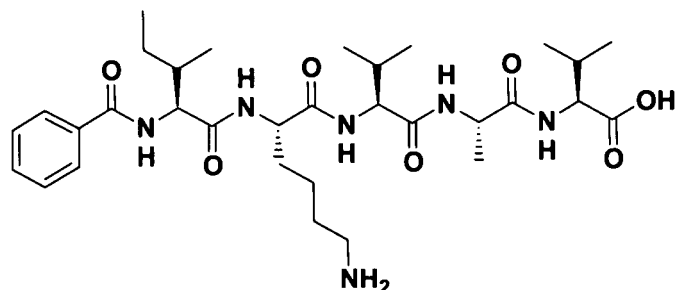
4-MFB-Ile-Lys-Val-Ala-Val (4-MFB-IKVAV)

於一具體實施例中，A 為苯基； R_1 、 R_2 係氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基或 C1-C10 胺基烷基； x

為 0 至 2；y 為 5。

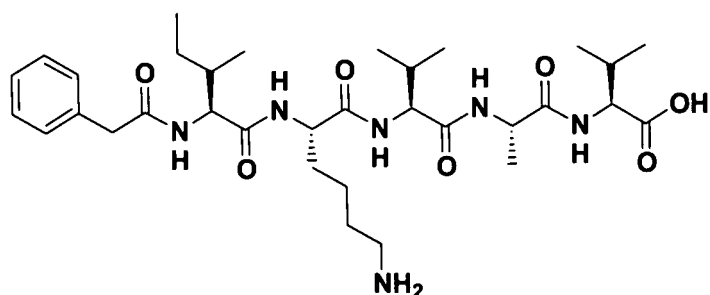
例如，本發明之胜肽分子材料係具有下式(M)、(N)或(O)之結構：

(M)



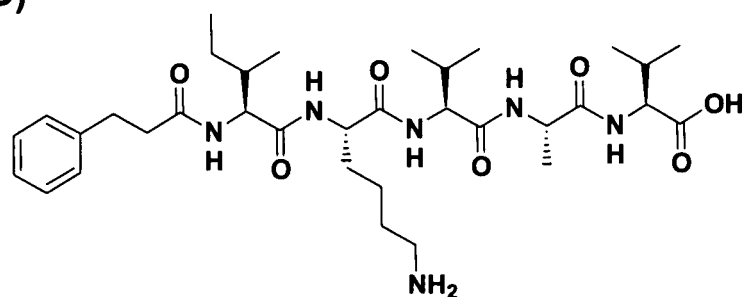
Ben-Ile-Lys-Val-Ala-Val (Ben-IKVAV)

(N)



Benzyl-Ile-Lys-Val-Ala-Val (Benzyl-IKVAV)

(O)

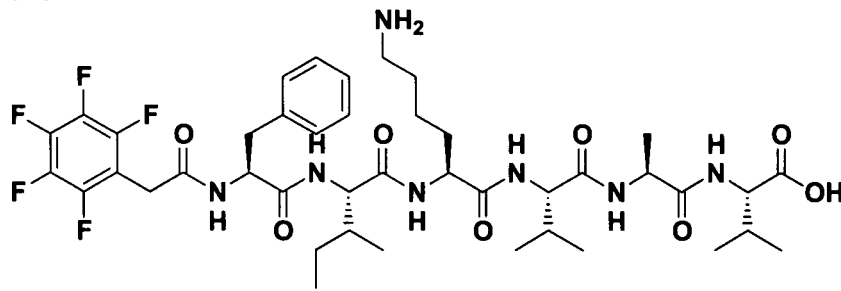


PropylBen-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PropylBen-IKVAV)

於一具體實施例中，A 為經氟取代之苯基；R₁、R₂ 係氫原子；R₃、R₄ 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基或 C1-C10 胺基烷基；x 為 1；y 為 6。

例如，本發明之胜肽分子材料係具有下式(P)之結構：

(P)



PFB-Phe-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PFB-FIKVAV)

本發明復提供一種具有本發明胜肽分子材料之自組裝水凝膠。

本發明之胜肽分子材料，利用經鹵素取代或未經取代之芳基環在胜肽序列 N 端的設計，完全不依賴 Fmoc 自組裝基團，就具有自組裝成水凝膠的能力，並且完全不需要添加具細胞毒性的二甲基亞砷(DMSO)來增加水凝膠的穩定度。另外，本發明之自組裝水凝膠可藉由適當的調控胺基酸於生理環境(pH=7.4)及人體溫度下穩定存在(本發明之水凝膠具有儲存模數>10000 Pa)，具有良好的穩定性，並且具有低細胞毒性、可以增進細胞貼附成長以及成本相對較低等優勢。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示水凝膠(A)PFB-F (1 wt%, pH=5)、(B)PFB-FG(1 wt%, pH=6-7)、(C)PFB-YF(1 wt%, pH=7-8)、(D)PFB-FF(1 wt%, pH=9-10)、(E)PFB-FA(1 wt%, pH=6-7)、(F)PFB-FV(1 wt%, pH=6-7)、(G)PFB-VF(1 wt%, pH7)、(H)PFB-IF(pH7), (I)PFB-LF(pH7) (J)PFB-GFF(1 wt%,

pH=5-6)、(K)PFB-IKVAV(1 wt%, pH=7-8)、
(L)4-MFB-IKVAV(1 wt%, pH=9)、(M)Ben-IKVAV(1 wt%,
pH=2-4)、(N)Benzyl-IKVAV(1 wt%, pH=4)、
(O)PropylBen-IKVAV (P)PFB-FIKVAV(1 wt%, pH=5-8)之光
學圖像。

第 2 圖顯示水凝膠(A)至(K)、(N)和(P)之透射型電子顯
微鏡照片。

第 3 圖顯示水凝膠(A)至(P)之儲存模量和損耗模量的
頻率相依關係。

第 4-1 圖為水凝膠(A)、(B)和(C)之 Hela 細胞存活率測試。

第 4-2 圖為水凝膠(A)、(B)、(C)和(I)之 CTX TNA2 細
胞存活率測試。

第 4-3 圖為水凝膠(C)之 MCF-7 細胞存活率測試。

第 5-1 圖顯示水凝膠(A)至(E)和對照組(無添加化合物)
之傷口癒合試驗之光學影像圖(測試細胞：Hela 細胞)。

第 5-2 圖顯示水凝膠(C)和對照組之傷口癒合試驗之光
學影像圖(測試細胞：CTX TNA2 細胞)。

第 6 圖顯示包含抗癌藥物艾黴素(DOX)之水凝膠(C)的
藥物釋放試驗。

第 7 圖顯示水凝膠(C)之 3D 細胞培養之實驗結果(測試
細胞：CTX TNA2 細胞)。

【實施方式】

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方
式，熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容輕易地

瞭解本發明之優點及功效。本發明亦可藉由其它不同之實施方式加以施行或應用，本說明書中的各項細節亦可基於不同觀點與應用，在不悖離本發明所揭示之精神下賦予不同之修飾與變更。

本發明提供一種新穎的胜肽分子材料，其利用有機合成方法將經鹵素取代之芳基環與胜肽分子結合產生新穎的胜肽分子材料。

本發明係以固相胜肽合成(solid phase peptide synthesis, 簡稱 SPPS)方法製備該胜肽衍生物，將所欲之一種或多種胜肽以化學鍵結之方式結合，最後於經結合之胜肽之 N 末端接上經鹵素取代或未經取代之苯基。

以下實例用以說明本發明，本發明之申請專利範圍並不會因此而受限制。

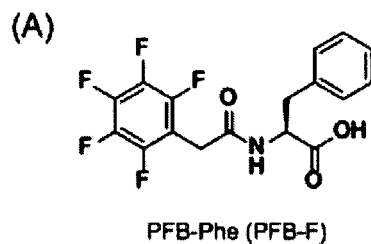
材料、技術和通用程序

本發明之材料、技術和通用程序適用於以下實施例。所有使用之化學試劑和溶劑皆可從供應商購得。¹H 和 ¹³C 光譜係自 Bruker DRX-300 測得，LC-MS 係自 MICROMASS Q-Tof 測得，TEM 係自 Hitachi HT7700 生物透射型電子顯微鏡(Bio-transmission electron microscope)測得。

本發明以安東帕流變儀(Anton Paar rheometer)進行流變測量(Rheological test)。以光吸收酶標儀(Sunrise absorbance microplate reader, DV990/BV4 GDV Programmable MPT reader)進行 MTT 細胞存活測試。

實施例 1-胜肽分子材料之合成

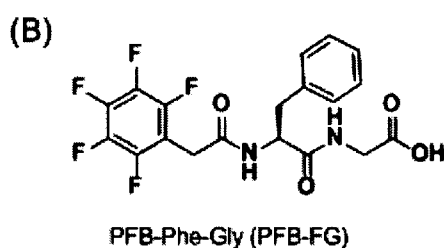
實施例 1-A : PFB-Phe (PFB-F)之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氨樹脂(100 至 200 目(mesh)和 0.3 至 0.8 毫莫耳/克(mmol/g))和對應之 Fmoc-L-苯丙胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(2.4 g)於無水二氯甲烷(DCM)膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(1.16 g, 3 mmol)裝載在於無水 N,N'-二甲基甲醯胺(DMF)和 N,N'-二異丙基乙胺(DIEA) (1.3 mL, 7.5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。接著，使用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphate (HBTU)，1.14 g, 3 mmol)和 DIEA，1.3 mL, 7.5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.68 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基。之後將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、甲醇(MeOH)和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液切斷該胜肽衍生物 3 小時。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.24 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =

2.85-3.00 (m, 1H), 3.00-3.20 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 4.46 (m, 1H), 7.20-7.40 (m, 5H), 8.62 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 28.5, 36.8, 53.9, 110.2, 126.4, 128.1, 129.1, 136.7, 137.7, 143.8, 144.8, 166.6, 172.7$; MS (ESI): 計算值 373.07 ; 實測值(M-H) $^-$ =372.00。

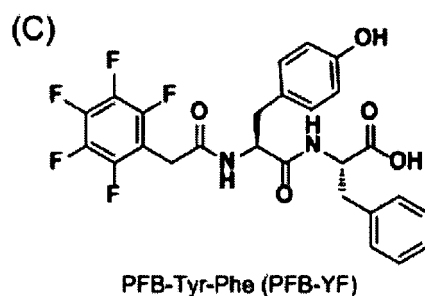
實施例 1-B : PFB-Phe-Gly (PFB-FG)之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氨樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-甘胺酸、Fmoc-L-苯丙胺酸和五氟苯乙酸之固相勝肽合成(SPPS)製備該勝肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-甘胺酸(0.6 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.758g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.775 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.45 g,

2 mmol) 偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液切斷該胜肽衍生物 3 小時。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.21 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.70-2.85 (m, 1H), 3.05-3.15 (m, 1H), 3.63 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 3.82 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 4.55-4.65 (m, 1H), 7.20-7.35 (m, 5H), 8.46 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.56 (d, J = 8.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 29.1, 38.2, 41.2, 54.3, 54.4, 110.7, 127.5, 128.9, 130.0, 137.2, 138.2, 145.3, 166.9, 171.6, 171.7; MS (ESI): 計算值 430.10; 實測值 429.10。

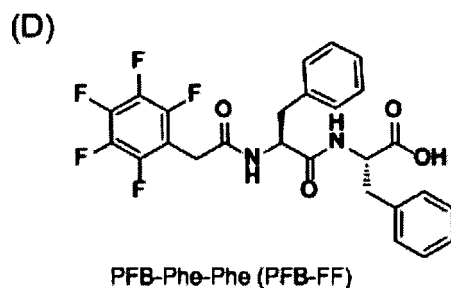
實施例 1-C：PFB-Tyr-Phe (PFB-YF) 之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氫樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-L-苯丙胺酸、O-第三丁基-L-酪氨酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.78 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.8mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc

基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.76g, 2 mmol)和 DIEA(2.1 mL, 12.5 mmol)為偶合劑將該 O-第三丁基-L-酪氨酸(2.3 g, 5 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(0.76 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.45 g, 2 mmol) 偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.33 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.60-2.70 (m, 1H), 1.85-3.20 (m, 3H), 3.59 (s, 2H), 4.40-4.55 (m, 2H), 6.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.20-7.35 (m, 5H), 8.4 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 28.6, 36.6, 36.9, 53.5, 54.1, 110.4, 114.7, 126.4, 127.6, 128.1, 129.1, 130.0, 136.7, 137.4, 139.3, 144.8, 155.7, 166.2, 171.1, 172.7; MS (ESI):計算值 536.45 ; 實測值 535.1。

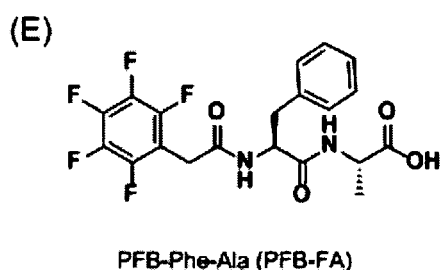
實施例 1-D：PFB-Phe-Phe (PFB-FF)之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氫樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)並經 Fmoc-L-苯丙胺酸處理 2 次和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(2.4 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(1.16 g, 3 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(1.3 mL, 7.5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(1.52 g, 4 mmol)和 DIEA(1.7 mL, 10.0 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-苯丙胺酸(1.55 g, 4 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(2.28 g, 6 mmol)和 DIEA(2.5 mL, 15.0 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(1.356 g, 6 mmol) 偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.56 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.70-2.80 (m, 1H), 2.90-3.15 (m, 3H), 3.58 (s,

2H), 4.45-4.55 (m, 1H), 4.55-4.65 (m, 1H), 7.20-7.35 (m, 10H), 8.35-8.50 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 28.6, 36.8, 37.9, 53.6, 53.8, 110.3, 126.2, 126.4, 127.9, 128.1, 129.1, 129.2, 137.5, 137.6, 139.2, 144.8, 166.3, 170.9, 172.7; MS (ESI): 計算值 520.14 ; 實測值 519.20 。

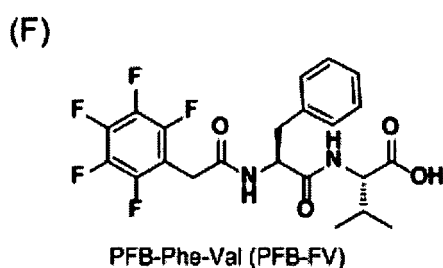
實施例 1-E : PFB-Phe-Ala (PFB-FA)之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氯樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-L-丙胺酸、Fmoc-L-苯丙胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-丙胺酸(0.62 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.94g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.77 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.13 g, 3 mmol)和

DIEA(1.3mL, 7.5 mmol)爲偶合劑將該五氟苯乙酸(0.67 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.29 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.34 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 2.70-2.85 (m, 2H), 3.05-3.15 (m, 2H), 3.61 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 4.20-4.35 (m, 1H), 4.55-4.65 (m, 1H), 7.20-7.35 (m, 5H), 8.45 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 8.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 18.0, 29.5, 38.7, 48.5, 54.8, 111.2, 127.2, 128.9, 130.1, 137.6, 138.7, 145.7, 167.4, 171.8, 174.9; MS (ESI):計算值 444.35 ; 實測值 443.0。

實施例 1-F：PFB-Phe-Val (PFB-FV)之合成

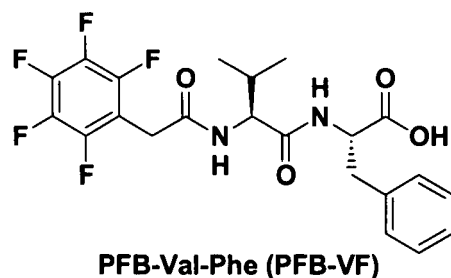


藉由使用 2-氨基三苯甲基氯樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-L-纈胺酸、Fmoc-L-苯丙胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-纈胺酸(0.68 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和

DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.76g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.78 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.14 g, 3 mmol)和 DIEA(1.25mL, 7.5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.45 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.48 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.92 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 2.05-2.20 (m, 1H), 2.75-2.90 (m, 1H), 3.05-3.15 (m, 1H), 3.61 (s, 2H), 4.20 (dd, J = 5.8, 8.6 Hz, 1H), 4.65-4.75 (m, 1H), 7.20-7.35 (m, 5H), 8.17 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 18.9, 20.0, 29.6, 38.5, 54.8, 58.2, 111.2, 127.2, 128.9, 130.2, 137.7, 138.6, 141.9, 145.8, 167.5, 172.2, 173.7; MS (ESI):計算值 472.41；實測值 471.1。

實施例 1-G：PFB-Val-Phe (PFB-VF)之合成

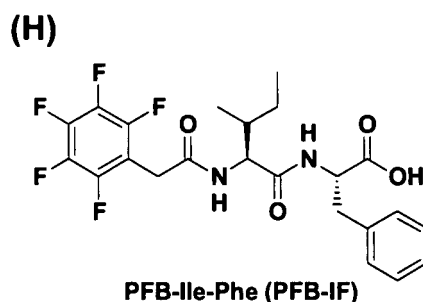
(G)



藉由使用 2-氨基三苯甲基氫樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-L-纈胺酸、Fmoc-L-苯丙胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.77 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.76g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-纈胺酸(0.68 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.9 g, 5 mmol)和 DIEA(20.8 mL, 12.5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(1.13 g, 5 mmol)偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.33 g)。¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 25°C): δ =0.8-0.95 (m, 6H; CH₃), 1.90-2.205 (m,

1H; CH), 2.85-3.00 (m, 1H; CH₂), 3.05-3.15 (m, 1H; CH₂), 3.60-3.85 (m, 2H; CH₂), 4.20-4.30 (m, 1H; CH), 4.40-4.50 (m, 1H; CH), 7.15-7.35 (m, 5H; CH), 8.25-8.40 (m, 2H; NH); ¹³C NMR (125 MHz, [D₆]DMSO, 25°C): δ = 17.9, 19.1, 28.5, 30.9, 36.6, 53.4, 57.5, 110.7, 126.4, 128.1, 129.1, 136.8, 137.7, 139.2, 144.9, 166.6, 170.8, 172.8; MS [ESI⁻]: m/z(%): 計算值 472.14 ; 實測值 471.3 [M-H]⁻。

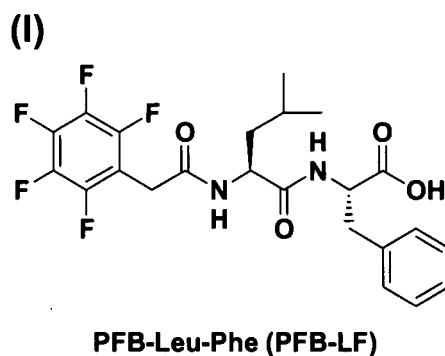
實施例 1-H : PFB-Ile-Phe (PFB-IF)之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氯樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-L-苯丙胺酸、Fmoc-L-異白胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.78g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂之 C 終端上。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 30 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.76g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-異白胺酸(0.71 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc

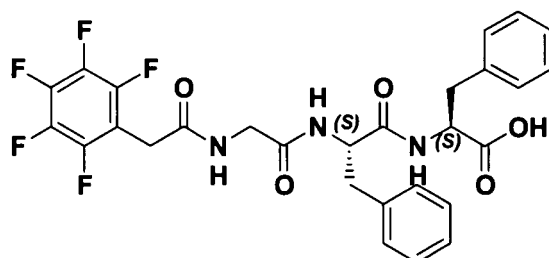
基去保護期間，使用 20 % 吡啶之 DMF 溶液 30 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.14 g, 3 mmol)和 DIEA(1.25 mL, 5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.68 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體: 0.156 g)。¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 25°C): δ = 0.75-0.95 (m, 6H; CH₃), 1.00-1.18 (m, 1H; CH₂), 1.37-1.53 (m, 1H; CH₂), 1.68-1.85 (m, 1H; CH), 2.88-3.15 (m, 2H; CH₂), 3.59-3.81 (m, 2H; CH₂), 4.28 (t, *J*=8.1 Hz, 1H; CH), 4.41-4.53 (m, 1H; CH), 7.17-7.35 (m, 5H; CH), 8.27-8.43 (m, 2H; NH); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO, 25°C): δ = 11.9, 16.1, 24.9, 29.5, 37.5, 37.9, 54.3, 57.7, 111.6, 127.3, 129.0, 130.0, 137.6, 138.5, 145.7, 167.4, 171.8, 173.7; MS [ESI⁻]: *m/z*(%): 計算值 486.16; 實測值 485.40 [*M*-H]⁻。

實施例 1-I: PFB-Leu-Phe (PFB-LF)之合成



藉由使用 2-氨基三苯甲基氯樹脂(100 至 200 目和 0.3

至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-L-苯丙胺酸、Fmoc-L-白胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.78g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 30 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.76g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-白胺酸(0.71 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 30 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.13 g, 3 mmol)和 DIEA(1.3 mL, 7.5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.68 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.341 g)。¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 25°C): δ =0.81-1.00 (m, 6H; CH₃), 1.42-1.55 (m, 2H; CH₂), 1.55-1.72 (m, 1H; CH₂), 2.89-3.16 (m, 2H; CH₂), 4.28 (s, 2H; CH), 4.35-4.53 (m, 2H; CH), 7.19-7.38 (m, 5H; CH), 8.27 (d, *J*=8.1 Hz, 1H; NH), 8.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H; NH); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO, 25°C): δ =22.6, 23.9, 25.1, 29.5, 37.4, 51.9, 54.3, 111.4, 127.3, 129.0, 130.0, 137.7, 138.5, 145.8, 167.3, 172.7, 173.7; MS [ESI]: *m/z*(%): 計算值 486.16; 實測值

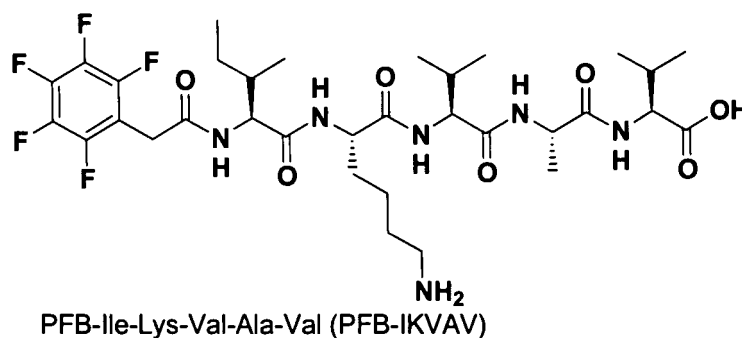
485.30 [M-H]⁻。**實施例 1-J：PFB-Gly-Phe-Phe (PFB-GFF)之合成****(J)****PFB-Gly-Phe-Phe (PFB-GFF)**

藉由使用 2-氨基三苯甲基氨樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)並經 Fmoc-L-苯丙胺酸處理 2 次、Fmoc-甘胺酸和五氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.775 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.758g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.775 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。使用 HBTU(0.758g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-甘胺酸(0.6 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 30 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.45 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪

拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.37 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.70-2.80 (m, 1H), 2.90-3.15 (m, 3H), 3.55-3.90 (m, 4H), 4.40-4.50 (m, 1H), 4.55-4.65 (m, 1H), 7.15-7.35 (m, 10H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.35-8.45 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 29.5, 37.6, 38.5, 43.0, 54.5, 111.2, 127.2, 127.4, 128.9, 129.2, 130.0, 130.1, 137.7, 138.4, 138.6, 145.8, 168.0, 169.1, 172.0, 173.6; MS (ESI⁺): 計算值 577.50 ; 實測值 576.2 。

實施例 1-K : PFB-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PFB-IKVAV) 之合成

(K)

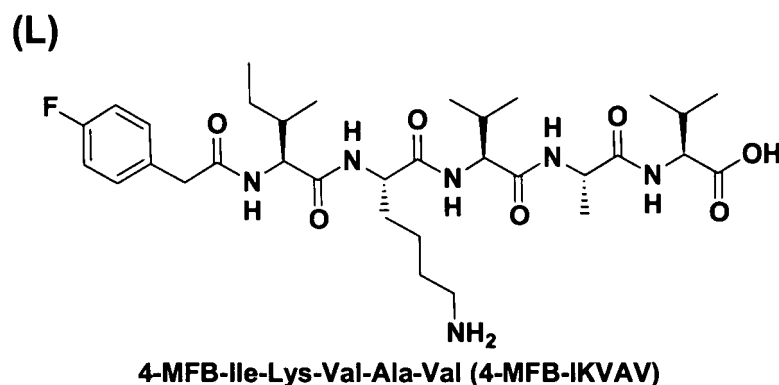


藉由使用 2-氨基三苯甲基氨樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)並經 Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-丙胺酸-OH、Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-離胺酸(Boc)-OH、Fmoc-異白胺酸-OH 和五氟苯乙酸處理之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。

然後，將 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol) 裝載在於無水 DMF 和 DIEA (0.83 mL, 5 mmol) 中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次 (每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU (0.758 g, 2 mmol) 和 DIEA (0.83 mL, 5 mmol) 為偶合劑將該 Fmoc-丙胺酸-OH (0.623 g, 2 mmol) 偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次 (每次 2 分鐘)。使用 HBTU (0.758 g, 2 mmol) 和 DIEA (0.83 mL, 5 mmol) 為偶合劑將該 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol) 偶合至該游離胺基 40 分鐘。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次 (每次 2 分鐘)。接著，使用 HBTU (0.758 g, 2 mmol) 和 DIEA (0.83 mL, 5 mmol) 為偶合劑將該 Fmoc-離胺酸(Boc)-OH (0.937 g, 2 mmol) 和 Fmoc-異白胺酸-OH (0.707 g, 2 mmol) 重複上述步驟 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次 (每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU (1.3 g, 3.5 mmol) 和 DIEA (1.45 mL, 8.75 mmol) 為偶合劑將該五氟苯乙酸 (0.79 g, 3.5 mmol) 偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液 (白色固體：0.62 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.8-2.2 (m, 32H), 2.77 (s, 2H), 3.75 (m, 2H), 4.10-4.50 (m, 5H), 7.65-7.80

(m, 4H), 7.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12.0, 16.3, 18.8, 19.1, 20.0, 20.1, 23.3, 25.2, 27.6, 29.6, 31.7, 32.1, 32.4, 37.3, 37.8, 48.9, 53.5, 58.0, 58.1, 58.3, 111.6, 117.8, 137.7, 145.9, 167.8, 171.3, 171.8, 172.3, 173.3, 173.8$; MS (ESI $^+$): 計算值 736.4; 實測值 737.4。

實施例 1-L: 4-氟苯乙酸-Ile-Lys-Val-Ala-Val (4-MFB-IKVAV) 之合成

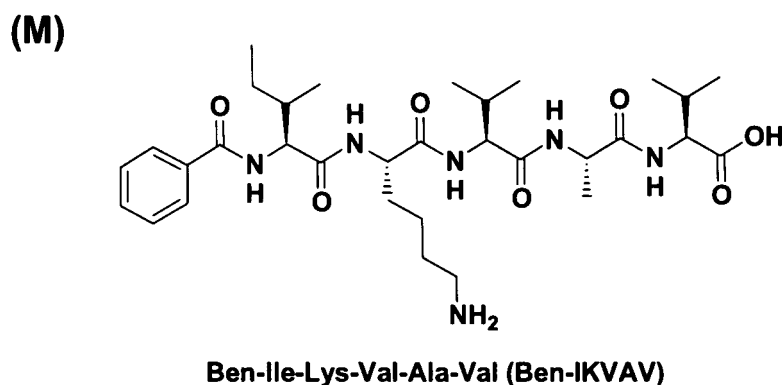


藉由使用 2-氨基三苯甲基氫樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-丙胺酸-OH、Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-離胺酸(Boc)-OH、Fmoc-異白胺酸-OH 和 4-氟苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(0.4 g, 0.33 mmol)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-纈胺酸-OH (0.23 g, 0.67 mmol) 裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.28 mL, 1.67 mmol)中之該樹脂之 C 終端上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然

後，使用 HBTU(0.25 g, 0.67 mmol)和 DIEA(0.28 mL, 1.67mmol)爲偶合劑將該 Fmoc-丙胺酸-OH (0.21 g, 0.67 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.25 g, 0.67 mmol)和 DIEA(0.28 mL, 1.67mmol)爲偶合劑將該 Fmoc-纈胺酸-OH (0.23 g, 0.67 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。接著，亦同上述步驟，使用 HBTU(0.25 g, 0.67 mmol)和 DIEA(0.28 mL, 1.67mmol)爲偶合劑將該 Fmoc-離胺酸(Boc)-OH(0.31 g, 0.67 mmol)和 Fmoc-異白胺酸-OH(0.707g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(0.37 g, 1 mmol)和 DIEA(0.42 mL, 2.5 mmol)爲偶合劑將 4-氟苯乙酸(0.15 g, 1 mmol)偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.23 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.75-2.15(m, 32H), 2.77 (m, 2H), 3.3-3.7 (m, 2H), 4.15-4.50 (m, 5H, 7.10-7.80 (m, 7H), 7.92 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz,

DMSO-d₆): δ = 10.9, 15.3, 17.8, 17.8, 17.8, 18.1, 19.0, 19.1, 22.2, 24.2, 26.6, 30.0, 31.1, 36.6, 38.7, 41.0, 47.9, 52.4, 56.8, 57.0, 57.2, 114.8, 130.7, 130.8, 132.8, 170.0, 170.3, 171.1, 171.2, 172.2, 172.8; MS (ESI⁺): 計算值 664.4; 實測值 665.5 (M-H)⁺。

實施例 1-M: 苯甲酸-Ile-Lys-Val-Ala-Val (Ben-IKVAV)之合成

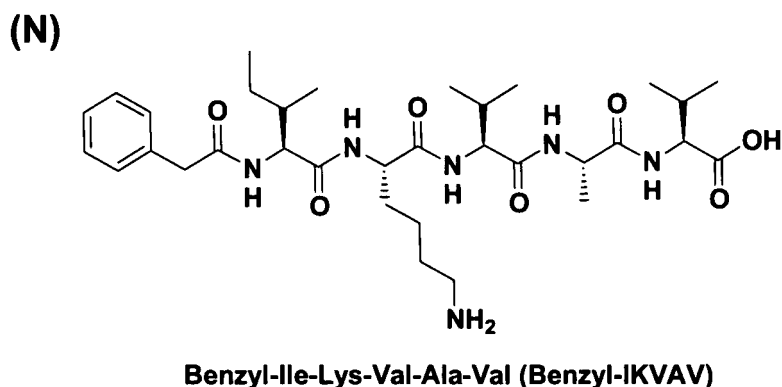


藉由使用 2-氨基三苯甲基氫樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-丙胺酸-OH、Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-離胺酸(Boc)-OH、Fmoc-異白胺酸-OH 和苯甲酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(0.65 g, 0.5 mmol)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-纈胺酸-OH (0.34 g, 1 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.28 mL, 1.67 mmol)中之該樹脂之 C 終端上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.38 g, 1 mmol)和 DIEA(0.42 mL, 2.5 mmol)為偶合劑

將該 Fmoc-丙胺酸-OH (0.3 g, 1 mmol) 偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.38 g, 1 mmol)和 DIEA(0.42 mL, 2.5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-纈胺酸-OH (0.34 g, 1 mmol) 偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。接著，亦同上述步驟，使用 HBTU(0.38 g, 1 mmol)和 DIEA(0.42 mL, 2.5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-離胺酸(Boc)-OH(0.47 g, 1 mmol) 和 Fmoc-異白胺酸-OH(0.35 g, 1 mmol) 偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(0.55 g, 1.5 mmol)和 DIEA(0.63 mL, 3.75 mmol)為偶合劑將苯甲酸(0.19 g, 1.5 mmol) 偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 % 三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.37 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.8-2.15 (m, 32H), 2.7-2.85 (m, 2H), 4.15-4.50 (m, 5H), 7.45-8.0 (m, 10H), 8.08 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.7, 16.4, 18.8, 19.1, 20.0, 20.1, 23.2, 25.8, 27.6, 31.0, 31.7, 32.2, 36.8, 48.9, 53.3, 58.0, 58.3, 58.9, 128.5, 129.2, 132.3, 135.2, 167.5,

171.3, 172.2, 173.2, 173.9; MS (ESI⁺): 計算值 660.4 ; 實測值 661.5 (M-H)⁺。

**實施例 1-N : 苯乙酸-Ile-Lys-Val-Ala-Val (Benzyl-IKVAV)
之合成**

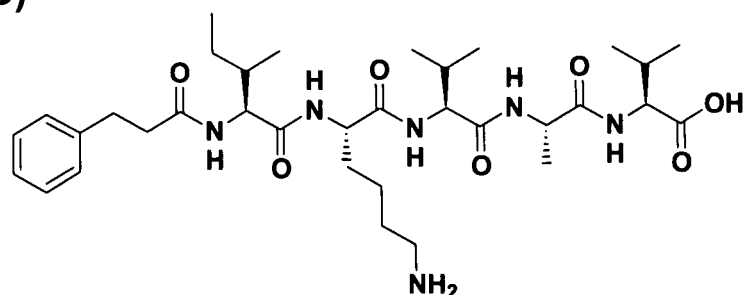


藉由使用 2-氨基三苯甲基氨樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-丙胺酸-OH、Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-離胺酸(Boc)-OH、Fmoc-異白胺酸-OH 和苯乙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.21 g, 1 mmol)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)中之該樹脂之 C 終端上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-丙胺酸-OH (0.623 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用

HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)爲偶合劑將該 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。接著，亦同上述步驟，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)爲偶合劑將該 Fmoc-離胺酸(Boc)-OH(0.937 g, 2 mmol)和 Fmoc-異白胺酸-OH(0.707g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.1 g, 3 mmol)和 DIEA(1.25mL, 7.5 mmol)爲偶合劑將苯乙酸(0.45 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.46 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.8-2.2(m, 32H), 2.766 (m, 2H), 2.85-3.15 (m, 2H), 4.10-4.50 (m, 5H), 7.15-7.40 (m, 5H), 7.6-8.25 (m, 7H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.9, 16.3, 18.8, 19.1, 20.0, 20.1, 22.6, 23.2, 25.3, 27.5, 30.7, 30.9, 31.7, 32.1, 37.6, 43.0, 44.7, 48.9, 53.4, 57.9, 58.0, 58.2, 127.2, 129.1, 129.9, 137.6, 171.2, 171.3, 172.1, 172.3, 173.0, 173.2, 173.8, 171.7; MS (ESI⁺): 計算值 660.4; 實測值 661.5 (M-H)⁺。

實施例 1-O : 3-苯基丙酸-Ile-Lys-Val-Ala-Val
(PropylBen-IKVAV)之合成

(O)



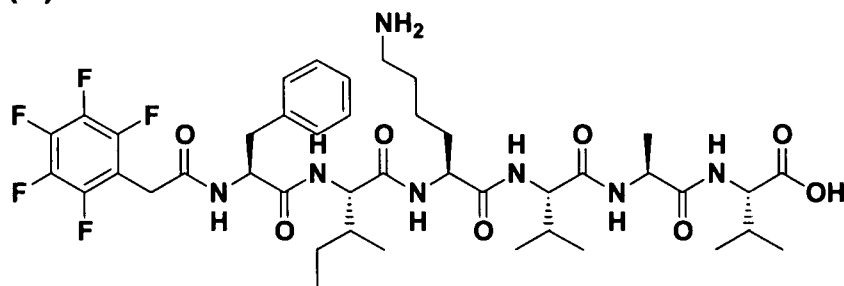
PropylBen-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PropylBen-IKVAV)

藉由使用 2-氨基三苯甲基氨樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)和對應之 Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-丙胺酸-OH、Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-離胺酸(Boc)-OH、Fmoc-異白胺酸-OH 和 3-苯基丙酸之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g, 1 mmol)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol) 裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)中之該樹脂之 C 終端上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-丙胺酸-OH (0.623 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 % 哌

啖之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。接著，亦同上述步驟，使用 HBTU(0.758 g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-離胺酸(Boc)-OH(0.937 g, 2 mmol)和 Fmoc-異白胺酸-OH(0.707g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.1 g, 3 mmol)和 DIEA(1.25 mL, 7.5 mmol)為偶合劑將 3-苯基丙酸(0.45 g, 3 mmol)偶合至該游離胺基，並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.67g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.15-2.2(m, 32H), 2.961 (s, 2H), 3.15-3.3 (m, 4H), 4.55-4.90 (m, 5H), 7.60-7.75 (m, 5H), 8.1-8.3 (m, 4H), 8.33 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.4 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.5 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 8.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.8, 16.3, 18.8, 19.1, 20.0, 20.1, 23.2, 25.3, 27.5, 30.9, 32.1, 32.2, 37.3, 37.6, 48.9, 53.3, 57.8, 58.0, 58.2, 126.8, 129.2, 142.2, 171.3, 172.2, 172.2, 172.4, 173.2, 173.8, 207.5; MS (ESI⁺): 計算值 660.4 ; 實測值 661.5 (M-H)⁺。

實施例 1-P : PFB-Phe-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PFB-FIKVAV)之合成

(P)



PFB-Phe-Ile-Lys-Val-Ala-Val (PFB-FIKVAV)

藉由使用 2-氨基三苯甲基氫樹脂(100 至 200 目和 0.3 至 0.8 mmol/g)並經 Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-丙胺酸-OH、Fmoc-纈胺酸-OH、Fmoc-離胺酸(Boc)-OH、Fmoc-異白胺酸-OH、Fmoc-L-苯丙胺酸和五氟苯乙酸處理之固相胜肽合成(SPPS)製備該胜肽衍生物。首先，將該樹脂(1.2 g)於無水 DCM 膨脹 30 分鐘。然後，將 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol)裝載在於無水 DMF 和 DIEA(0.83mL, 5 mmol)中之該樹脂上 1 小時。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.758g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-丙胺酸-OH (0.623 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。使用 HBTU(0.758g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-纈胺酸-OH (0.678 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %吡啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。接著，使用 HBTU(0.758g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-離胺酸(Boc)-OH(0.937 g, 2 mmol)和 Fmoc-異白胺酸-OH (0.707 g,

2 mmol)重複上述步驟 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。然後，使用 HBTU(0.76g, 2 mmol)和 DIEA(0.83 mL, 5 mmol)為偶合劑將該 Fmoc-L-苯丙胺酸(0.78 g, 2 mmol)偶合至該游離胺基 40 分鐘。接著，於 Fmoc 基去保護期間，使用 20 %哌啶之 DMF 溶液 20 分鐘然後重複 2 次(每次 2 分鐘)。最後，使用 HBTU(1.3g, 3.5 mmol)和 DIEA(1.45mL, 8.75 mmol)為偶合劑將該五氟苯乙酸(0.79 g, 3.5 mmol)偶合至該游離胺基並將該反應混合物攪拌隔夜，以 DMF、DCM、MeOH 和己烷移除過量試劑。使用 90 %三氟乙酸去離子水溶液 3 小時切斷該胜肽衍生物。以空氣乾燥所得溶液，然後添加乙醚沈澱出目標產物。真空乾燥該固體以移除剩餘溶液(白色固體：0.72 g)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.8-2.15(m, 32H), 2.70-3.10 (m, 4H), 3.62 (s, 2H), 4.10-4.70 (m, 6H), 7.26 (d, J = 5.1 Hz, 5H), 7.65-7.85 (m, 4H), 7.9 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 8.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.0, 15.3, 17.8, 18.2, 19.0, 19.1, 22.2, 24.2, 26.6, 28.6, 30.0, 30.7, 31.3, 36.8, 37.3, 38.7, 39.0, 47.9, 52.3, 54.0, 56.9, 57.0, 57.2, 110.2, 116.1, 118.5, 126.2, 127.9, 129.2, 135.7, 137.7, 143.9, 145.8, 166.6, 170.3, 170.7, 171.2, 172.3, 172.8; MS (ESI⁺):計算值 883.4 ; 實測值 884.2。

實施例 2-將實施例 1 所製備之胜肽分子材料(A)至(P)製備成水凝膠(A)至(P)

水凝膠(A)：取 3.3 mg PFB-F 溶於 270 μ L 的水，超音波震盪均勻後，添加 1 M 的氫氧化鈉 2 μ L 溶解後，再添加 0.1M 鹽酸 16 μ L，靜置隔夜。

水凝膠(B)：取 3.1 mg PFB-FG 溶於 280 μ L 的水，超音波震盪均勻後，添加 0.5 M 氫氧化鈉 2 μ L 溶解後，再添加 0.5 M 鹽酸 2 μ L(白色固體生成)，再添加 0.5 M 氫氧化鈉 2 μ L 及 0.1 M 氫氧化鈉 2 μ L 後，添加 0.1 M 鹽酸 10 μ L。

水凝膠(C)：取 2.1 mg PFB-YF 溶於 180 μ L 的水，超音波震盪均勻後，添加 0.5 M 的氫氧化鈉 2 μ L 溶解後，再添加 0.1 M 鹽酸 6 μ L 及 0.05 M 鹽酸 2 μ L。

水凝膠(D)：取 1.9 mg PFB-FF 溶於 180 μ L 的水，超音波震盪均勻後，添加 0.5 M 的氫氧化鈉 4 μ L 溶解後，再添加 0.1 M 鹽酸 6 μ L。

水凝膠(E)：取 2.2 mg PFB-FA 溶於 185 μ L 的水，超音波震盪後，添加 0.5 M 的氫氧化鈉 4 μ L 溶解後，添加 0.1 M 鹽酸 12 μ L 後，再添加 0.1 M 的氫氧化鈉 4 μ L，再添加 0.1 M 的鹽酸 2 μ L。

水凝膠(F)：取 1.9 mg PFB-FV 溶於 185 μ L 的水，超音波震盪後，添加 0.5 M 的氫氧化鈉 4 μ L 溶解後，添加 0.1 M 鹽酸 4 μ L 後，再添加 0.1 M 氫氧化鈉 2 μ L 及 0.1 M 鹽酸 2 μ L 重複三次，靜置隔夜。

水凝膠(G)：取 2.0 mg PFB-VF 溶於 180 μ L 的水，超

音波震盪後，添加 1 M 氫氧化鈉 6 μ L，0.5 M 氫氧化鈉 2 μ L，再添加 1 M 鹽酸 4 μ L，0.1 M 氫氧化鈉 4 μ L。

水凝膠(H)：取 2.2 mg PFB-IF 溶於 180 μ L 水，超音波震盪後，添加 1 M 氫氧化鈉 4 μ L，添加 0.5 M 氫氧化鈉 6 μ L，再添加 1 M 鹽酸 4 μ L，0.1 M 鹽酸 2 μ L，0.5 M 鹽酸 4 μ L。

水凝膠(I)：取 2.0 mg PFB-LF 如於 180 μ L 的水，超音波震盪後，添加 1 M 氫氧化鈉 4 μ L，再添加 0.5 M 鹽酸 6 μ L。

水凝膠(J)：取 2 mg PFB-GFF 溶於 180 μ L 的水，超音波震盪後，添加 0.5 M 氫氧化鈉 4 μ L 後，添加 0.5 M 鹽酸 2 μ L 及 0.1 M 鹽酸 10 μ L，靜至隔夜。

水凝膠(K)：取 2 mg PFB-IKVAV 溶於 180 μ L 的水，超音波震盪後，加 0.5 M 氫氧化鈉 10 μ L 後，添加 0.5 M 鹽酸 10 μ L。

水凝膠(L)：取 2.1 mg 4-MFB-IKVAV 溶於 180 μ L 的水，超音波震盪後，加 1 M 氫氧化鈉 4 μ L 後，添加 12 μ L 的水。

水凝膠(M)：取 2 mg Ben-IKVAV 溶於 200 μ L 的水，超音波震盪。

水凝膠(N)：取 2 mg Benzyl-IKVAV 溶於 200 μ L 的水，超音波震盪。

水凝膠(O)：取 2.1 mg PropylBen-IKVAV 溶於 200 μ L 的水，超音波震盪。

水凝膠(P)：取 2.2 mg PFB-FIKVAV 溶於 180 μ L 的水，加 0.5 M 氫氧化鈉 2 μ L，超音波震盪。

第 1 圖顯示水凝膠(A)PFB-F (1 wt%, pH=5)、(B)PFB-FG(1 wt%, pH=6-7)、(C)PFB-YF(1 wt%, pH=7-8)、(D)PFB-FF(1 wt%, pH=9-10)、(E)PFB-FA(1 wt%, pH=6-7)、(F)PFB-FV(1 wt%, pH=6-7)、(G)PFB-VF(1 wt%, pH7)、(H)PFB-IF(pH7), (I)PFB-LF(pH7) (J)PFB-GFF(1 wt%, pH=5-6)、(K)PFB-IKVAV(1 wt%, pH=7-8)、(L)4-MFB-IKVAV(1 wt%, pH=9)、(M)Ben-IKVAV(1 wt%, pH=2-4)、(N)Benzyl-IKVAV(1 wt%, pH=4)、(O)PropylBen-IKVAV (P)PFB-FIKVAV(1 wt%, pH=5-8)之光學圖像。

第 2 圖顯示水凝膠(A)PFB-F、(B)PFB-FG、(C)PFB-YF、(D)PFB-FF、(E)PFB-FA、(F)PFB-FV、(G) PFB-VF、(H)PFB-IF(pH7), (I) PFB-LF (pH7)、(J)PFB-GFF、(K)PFB-IKVAV、(N)Benzyl-IKVAV 和(P)PFB-FIKVAV 之穿透式電子顯微鏡照片。如第 2 圖所示，本發明之水凝膠藉著胜肽分子間的自組裝能力(例如氫鍵、 π - π 作用力、凡得瓦力、及溶合效應等)形成三維網狀結構。

實施例 3-水凝膠之流變測量

以安東帕流變儀(Anton Paar rheometer)進行水凝膠之流變測量。實驗過程中使用 25mm 平行板。將 200 μ L 之水凝膠(A)至(P)放置於該平行板上。角頻率掃描測量(Angular

frequency sweep test)：測量範圍(0.1 至 100 雷得/秒(rad/s) 頻率，應變 = 0.8 %)，每 10 回 13 個點。掃描模式為「對數(log)」且執行溫度為 25°C。

第 3 圖顯示水凝膠(A)至(P)之儲存模量和損耗模量的頻率相依關係。第 3 圖中， G' 表示儲存模量、 G'' 表示損耗模量。 G' & G'' 數值越大表示水凝膠的穩定性越高。

在角頻率從 0.1%至 100%的測量中，可得知水凝膠(A)的儲存模量達 2×10^3 ，水凝膠(B)儲存模量達 10^4 ，水凝膠(C)的儲存模量達 5×10^3 ，水凝膠(D)的儲存模量達 2×10^4 ，水凝膠(E)的儲存模量達 4×10^3 ，水凝膠(F)的儲存模量達 3×10^3 ，水凝膠(G)的儲存模量達 3×10^4 ，水凝膠(H)的儲存模量達 1×10^4 ，水凝膠(I)的儲存模量達 2×10^3 ，水凝膠(J)的儲存模量達 3×10^2 ，水凝膠(K)的儲存模量達 1×10^3 ，水凝膠(L)的儲存模量達 1×10^4 ，水凝膠(M)的儲存模量達 6×10^3 ，水凝膠(N)的儲存模量達 6×10^3 ，水凝膠(O)的儲存模量達 1×10^4 ，水凝膠(P)的儲存模量達 1.0×10^3 ，顯示儲存模量皆遠超過最小可支撐細胞的能量模數(100 Pa)。

實施例 4-水凝膠的相轉變溫度($T_{gel-sol}$)測試

將水凝膠(A)至(P)傾斜放入水浴鍋，同時將裝有水並插入溫度計的燒杯放入水浴鍋，開始加熱 ($2^\circ\text{C}/\text{min}$) 直到該些水凝膠開始流動(由膠態(gel)轉變為液態(sol))，並紀錄其開始流動之轉變溫度，即為水凝膠相轉變溫度。

該些水凝膠之 $T_{gel-sol}$ ：水凝膠(A)之 $T_{gel-sol}$ 為 56°C ，水

凝膠(B)之 $T_{gel-sol}$ 為 48°C ，水凝膠(C)之 $T_{gel-sol}$ 為 43°C ，水凝膠(D)之 $T_{gel-sol}$ 為 45°C ，水凝膠(E)之 $T_{gel-sol}$ 為 48°C ，水凝膠(F)之 $T_{gel-sol}$ 為 46°C ，水凝膠(G)之 $T_{gel-sol}$ 為 72°C ，水凝膠(H)之 $T_{gel-sol}$ 為 71°C ，水凝膠(I)之 $T_{gel-sol}$ 為 55°C ，水凝膠(J)之 $T_{gel-sol}$ 為 38°C ，水凝膠(K)之 $T_{gel-sol}$ 為 42°C ，水凝膠(L)之 $T_{gel-sol}$ 為 66°C ，水凝膠(M)之 $T_{gel-sol}$ 為 62°C ，水凝膠(N)之 $T_{gel-sol}$ 為 65°C ，水凝膠(O)之 $T_{gel-sol}$ 為 $>90^{\circ}\text{C}$ ，水凝膠(P)之 $T_{gel-sol}$ 為 40°C 。整體而言， $T_{gel-sol}$ 皆大於 38°C ，顯示水凝膠在人體溫度下具有良好的穩定性。

實施例 5-細胞活性測試

藉由 MTT 細胞存活測試，測量該不同胜肽材料所製得之水凝膠之生物相容性。

以光吸收酶標儀(Sunrise absorbance microplate reader, DV990/BV4 GDV Programmable MPT reader)進行 MTT 細胞存活測試。將 Hela 細胞種植於含有 10 %胎牛血清(FBS)和 1 %青黴素之 0.5mL 介質(DMEM)中之 24 孔培養板，每孔濃度為 50000 個細胞並培養 24 小時。細胞放置好後，加入不同濃度(10、50、100、200、500 mM)之水凝膠。24 小時和 48 小時後，每孔之介質以含有 0.5 mL MTT 試劑(4 mg mL^{-1})之新鮮的補充介質置換。再過 4 小時後，移除該含有 MTT 試劑之介質並加入 DMSO(每孔 0.5 mL)以溶解該甲臍晶體(formazan crystal)。將 24 孔培養板之細胞轉移至 96 孔培養板。使用光吸收酶標儀(DV990/BV4 GDV Programmable

MPT reader)於 595 nm 測量該所得溶液之光學密度。使用未經處理之細胞為比較例。藉由下式計算細胞存活率：

$$\text{細胞存活率}(\%) = \text{OD}_{\text{樣品}} / \text{OD}_{\text{比較例}}$$

第 4-1 圖為水凝膠(A)、(B)和(C)之 Hela 細胞存活率測試。第 4-2 圖為水凝膠(A)、(B)、(C)和(I)之 CTX TNA2 細胞存活率測試。第 4-3 圖為水凝膠(C)之 MCF-7 細胞存活率測試。從細胞存活率測試中發現，細胞存活率於 500 μ M 水凝膠下皆高達 80%，尤其水凝膠(C)於 Hela、CTX TNA2 及 MCF-7 細胞存活率都接近 100%，亦即其 IC₅₀ 抑制濃度皆高於 500 μ M，顯示其為具有生物相容性(無生物毒性)之水凝膠材料。

實施例 6-傷口癒合試驗

以 PBS(磷酸緩衝液)沖洗 Hela 細胞 2 次後，將其再懸浮於 T-75 組織培養瓶(tissue culture flask)中。添加含有 0.1 % EDTA 之 0.25 % 胰蛋白酶並將細胞再懸浮於 5 mL 完全介質(complete medium)中。將 30000 個細胞(於 3 mL 之介質中)放置於 6 孔培養板上之各個小玻璃瓶中以創造一個融合的單層。附著 24 小時後，以 p200 吸管尖(pipet tip)刮該細胞單層以創造傷口。以 2 mL PBS 清洗 2 次移除流動的細胞並以 3 mL 完全介質置換。取得 0 小時之影像作為參考點。該介質以 3 mL 之含有 1 wt % 水凝膠之介質置換且該培養板於 37°C，5 % CO₂ 培育 24 小時。於適當之區域取得 0 小時、24 小時和 48 小時之影像。以相同步驟進行水凝膠(C)

和對照組(無添加化合物)於 CTX TNA2 細胞之傷口癒合試驗。

第 5-1 圖顯示水凝膠(A)至(E)和對照組之傷口癒合試驗之光學影像圖(測試細胞：Hela 細胞)。第 5-2 圖顯示水凝膠(C)和對照組之傷口癒合試驗之光學影像圖(測試細胞：CTX TNA2 細胞)。從傷口癒合實驗中發現，經過 24 小時後，水凝膠(A)至(E)對 Hela 細胞之傷口癒合程度接近於對照組，並於 48 小時後傷口完全癒合。除了 Hela 細胞外，對於其他一些較多人研究的有用的細胞，如 CTX TNA2 細胞，PFB 系列之水凝膠其貼附能力效果較好(相較於 Hela 細胞)，且水凝膠(C)於傷口癒合試驗(測試細胞：CTX TNA2 細胞)中顯示其癒合效果高於對照組。

實施例 7-藥物釋放

將水凝膠(C)包裹抗癌藥物艾黴素(DOX)，於水凝膠上方添加 1.5ml 水，於每 10 分鐘利用螢光光譜儀測試一次。

第 6 圖顯示包含抗癌藥物艾黴素之水凝膠(C)的藥物釋放試驗。我們可以發現在 20 分鐘後，藥物持續從水凝膠中釋出，於 1 小時藥物釋放達 80%，於 2 小時內釋放完畢。顯示此水凝膠具有快速藥物釋放之功能。

實施例 8-3D 細胞培養

於接種細胞前製備該水凝膠。水凝膠(C)之膠化係藉由將 0.18 mL 溶劑加入於 2 mL 小瓶中之 2.0 mg PFB-YF 化合

物，再加入鹼性溶液至該化合物溶解。將該溶液轉移至 96 孔 (well) 板 (每孔 40 μ L)，然後加入酸性溶液以在中性條件形成該水凝膠，再放入 37 °C，5% CO₂ 之培育箱隔夜以穩定該水凝膠。將細胞以每孔 10000 個細胞之密度接種在含有 10 % FBS 和 1 % 青黴素之 0.1 mL DMEM (Dulbecco' s 改良培養基) 之該以水凝膠覆蓋之 96 孔 (well) 板上。藉由活/死細胞存活分析法 (Live/Dead Viability Assay) (分子探針) 測量該存活率。於培養的第 2 天，以 PBS 清洗 2 次，然後以含有 2 μ M 鈣黃綠素 AM (calcein AM) (套組組分 A) 和 4 μ M 乙錠同型二聚體-1 (ethidium homodimer-1) (套組組分 B) 於 PBS 溶液之溶液，於 37 °C，5% CO₂ 之培育箱培育 45 分鐘。以 PBS 清洗細胞數次並留在 PBS 中直到成像。反置型 (inverted) 螢光光譜圖案之數據係以 Zeiss 雷射掃描顯微鏡取得。FITC 過濾器：激發：440 至 520 nm，放射收集：510 nm 長傳。羅丹明 (Rhodamine) 過濾器：激發：515 至 575 nm，放射收集：572 nm 長傳。從 FITC 過濾器、羅丹明過濾器和亮場圖案 (bright-field) 合併該圖案。

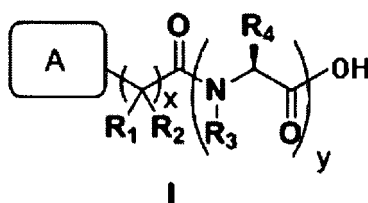
第 7 圖顯示水凝膠 (C) 之 3D 細胞培養之實驗結果 (測試細胞：CTX TNA2 細胞)。從結果中我們可以發現利用本發明之自組裝水凝膠進行 3D 細胞培養，其細胞形貌與正常之 CTX TNA2 細胞類似且未觀察到紅色染色細胞 (即死細胞)。此外，相較於過去已知技術，此胜肽材料不需要化學交聯劑，且相對於其他高分子材料較容易代謝，顯示其為具有潛力應用於組織修復之新穎胜肽水凝膠材料。

由以上實驗可證明本發明之水凝膠除了無生物毒性，對於傷口治癒、藥物釋放與 3D 細胞培養亦具有良好特性。

【符號說明】 無。

申請專利範圍

1. 一種胜肽分子材料，係具有下式(1)結構：



其中，A 為經 1 至 5 個鹵素取代或未經取代之苯基，該鹵素係選自氟、氯、溴或碘原子；

R_1 、 R_2 係獨立選自氫原子或烷基，且 R_1 、 R_2 為相同或不同；

R_3 、 R_4 係獨立選自由氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基、C2-C10 烷基硫代烷基、C7-C10 羥基芳烷基 (hydroxyaralkyl)、C6-C10 雜芳烷基、C2-C10 羧基烷基、C2-C10 胍基烷基及 C1-C10 胺基烷基所組成之群組中之一者，且 R_3 、 R_4 為相同或不同；

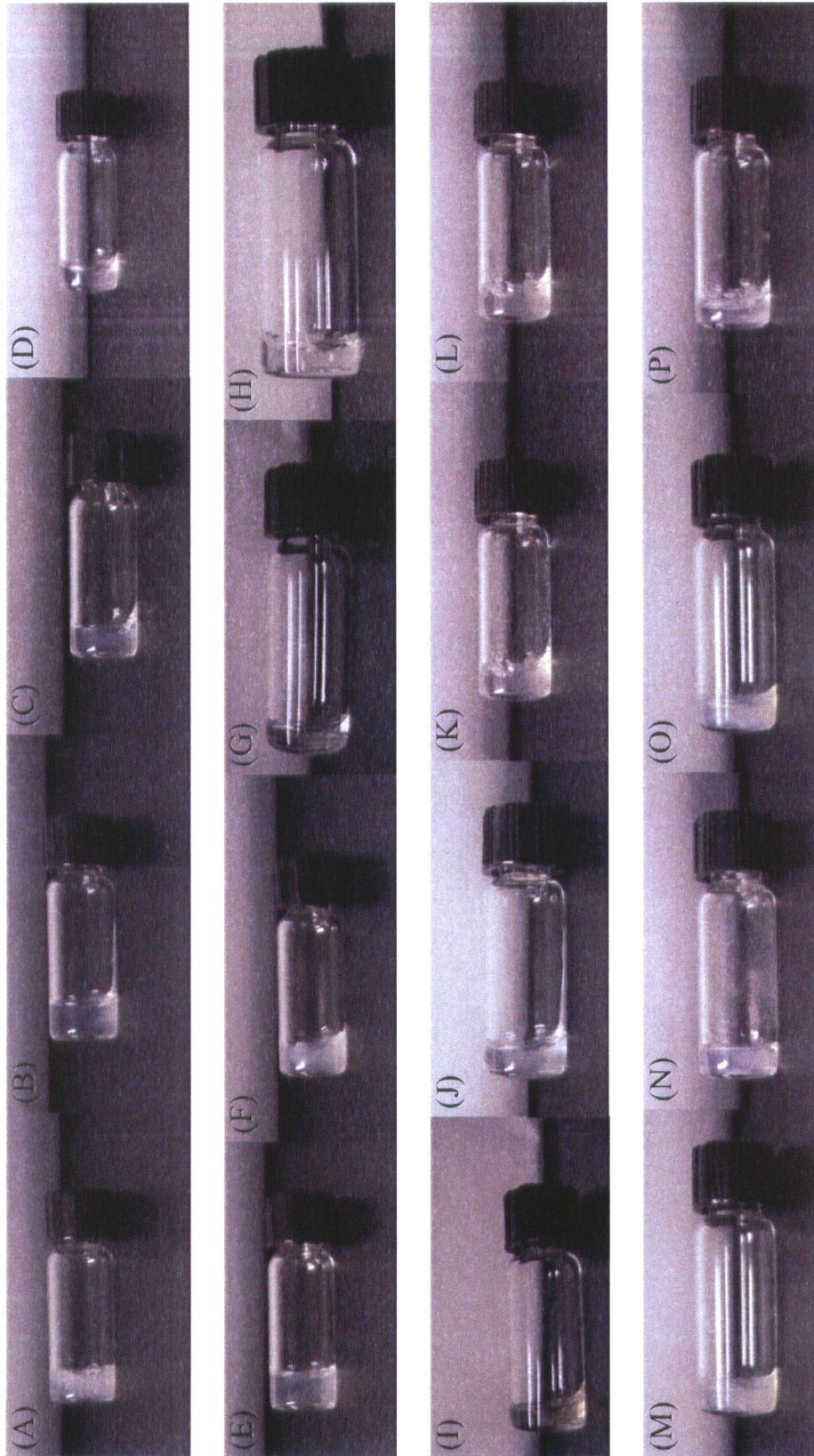
x 為 0 至 10 之整數，且當 $x > 1$ 時，式(I)中各 R_1 或各 R_2 為相同或不同；以及

y 為 1 至 20 之整數，且當 $y > 1$ 時，式(I)中各 R_3 或各 R_4 為相同或不同。

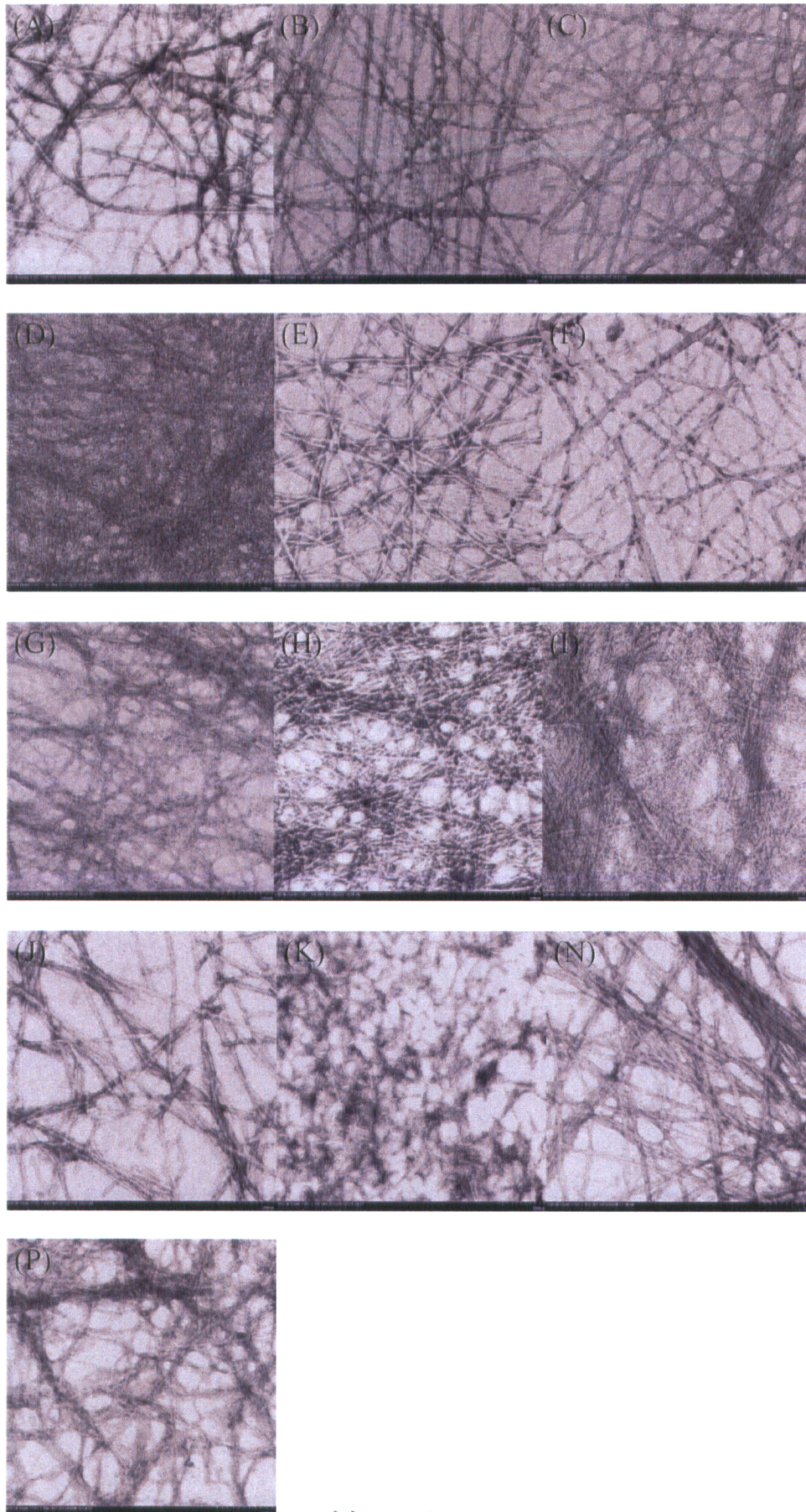
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料，其中，A 為經氟取代之苯基； R_1 、 R_2 係氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子或 C7-C10 芳烷基； x 為 1；及 y 為 1。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料，其中，A 為經氟取代之苯基； R_1 、 R_2 係獨立選自氫原子； R_3 、 R_4 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基或

- C7-C10 羥基芳烷基；x 為 1；及 y 為 2。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料，其中，A 為經氟取代之苯基；R₁、R₂ 係獨立選自氫原子；R₃、R₄ 係獨立選自氫原子或 C7-C10 芳烷基；x 為 1；及 y 為 3。
 5. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料，其中，A 為經氟取代之苯基；R₁、R₂ 係氫原子；R₃、R₄ 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基或 C1-C10 胺基烷基；x 為 1；及 y 為 5。
 6. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料，其中，A 為苯基；R₁、R₂ 係氫原子；R₃、R₄ 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基或 C1-C10 胺基烷基；x 為 0 至 2；及 y 為 5。
 7. 如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料，其中，A 為經氟取代之苯基；R₁、R₂ 係氫原子；R₃、R₄ 係獨立選自氫原子、C1-C10 烷基、C7-C10 芳烷基或 C1-C10 胺基烷基；x 為 1；及 y 為 6。
 8. 一種自組裝水凝膠，其係具有申請專利範圍第 1 項所述之胜肽分子材料及水。
 9. 如申請專利範圍第 8 項所述之自組裝水凝膠，其 pH 介於 5 至 10。
 10. 如申請專利範圍第 8 項所述之自組裝水凝膠，其具有網狀結構。

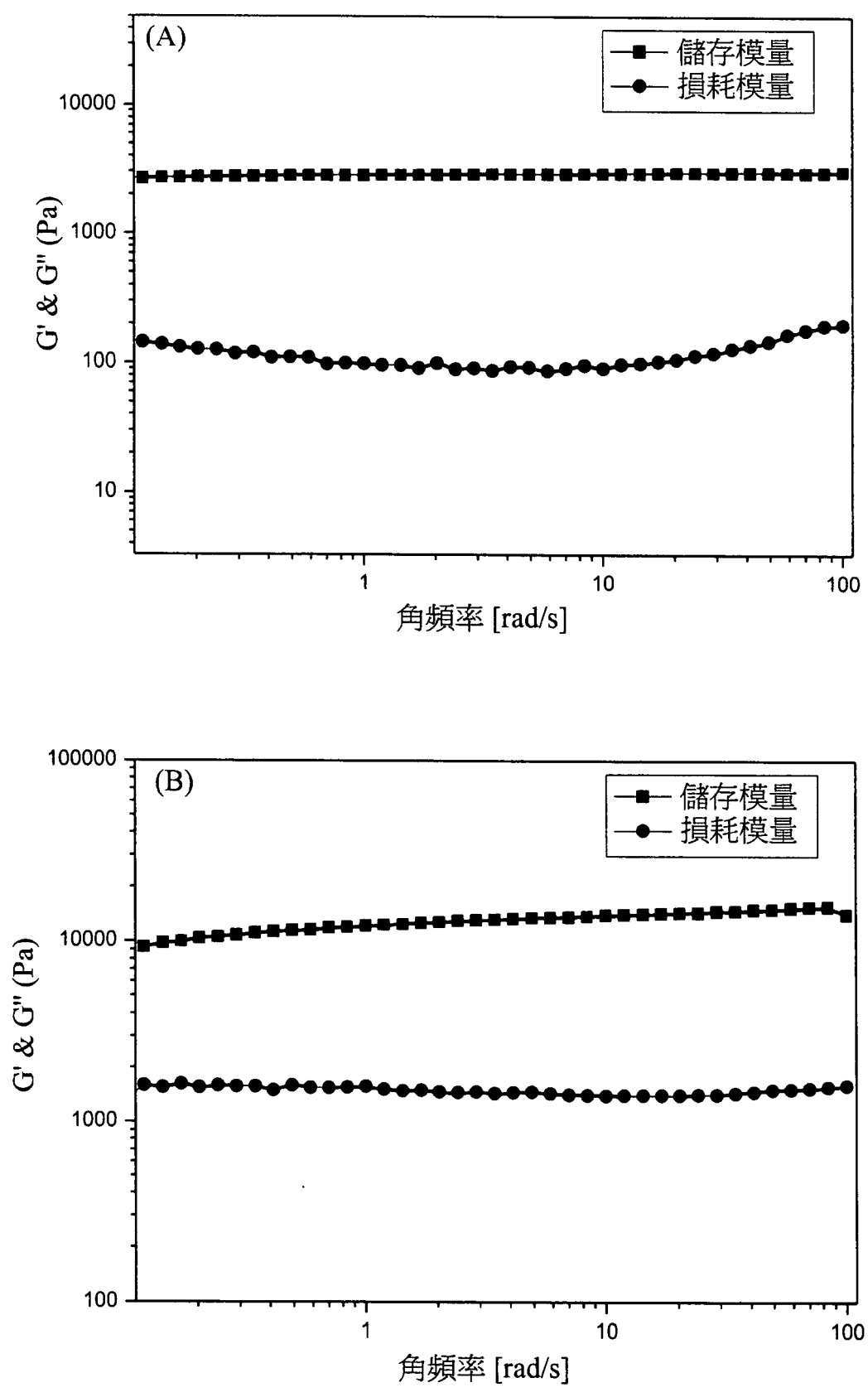
圖式



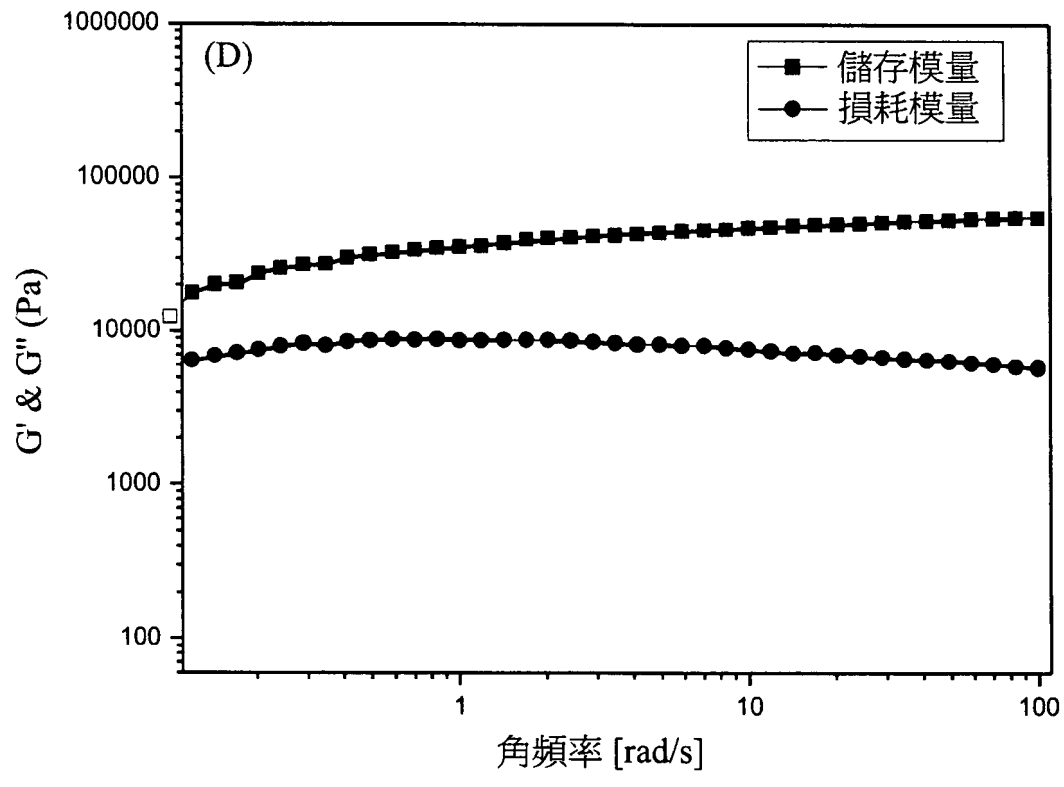
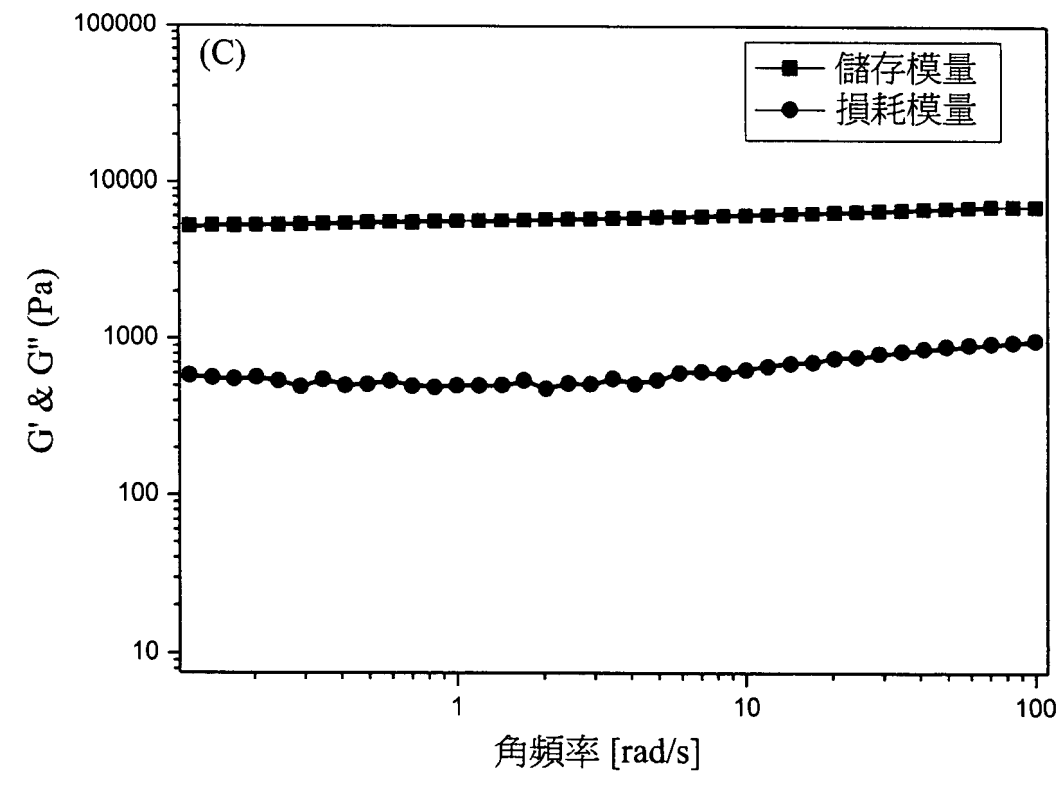
第1圖



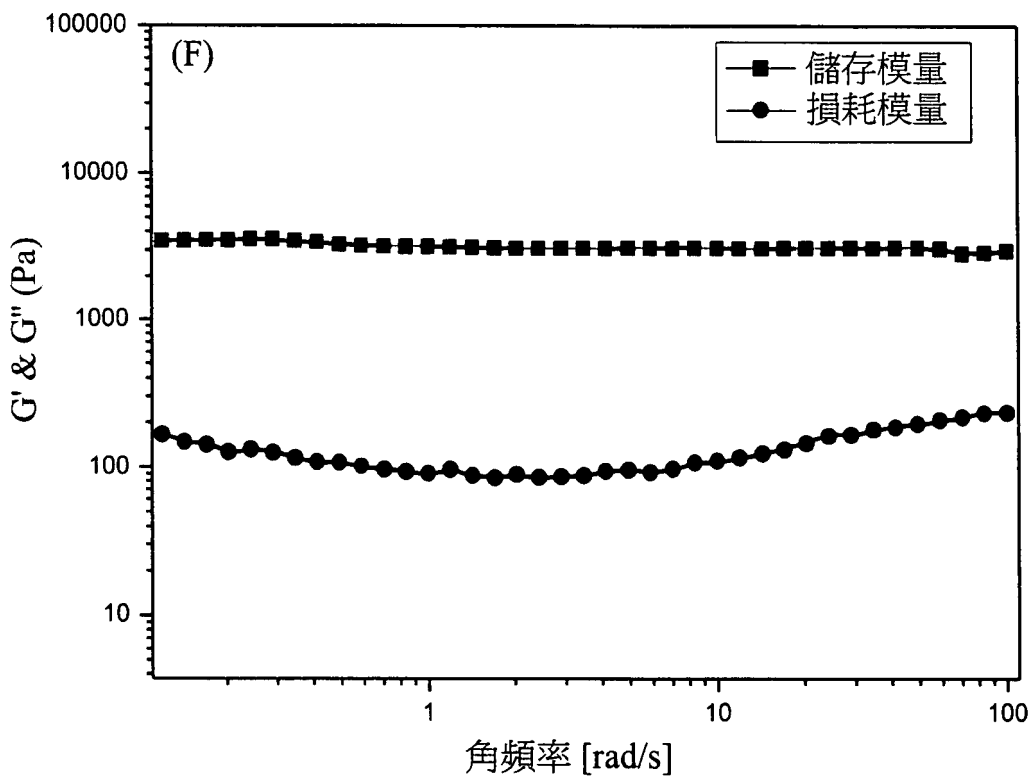
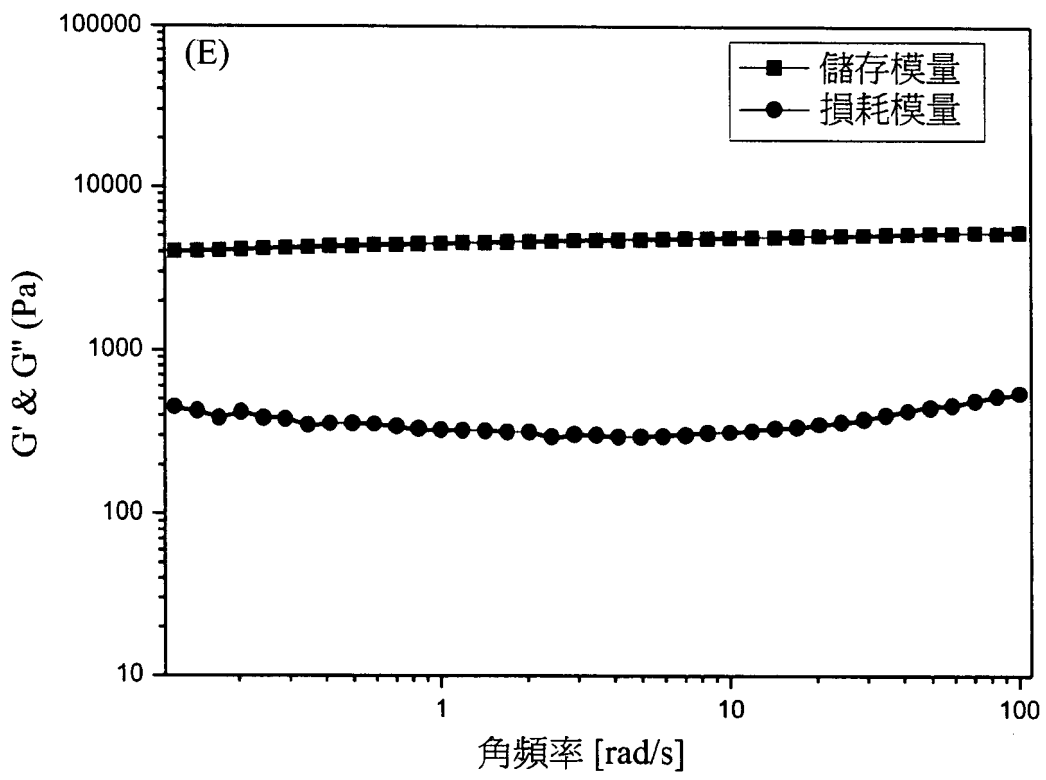
第2圖



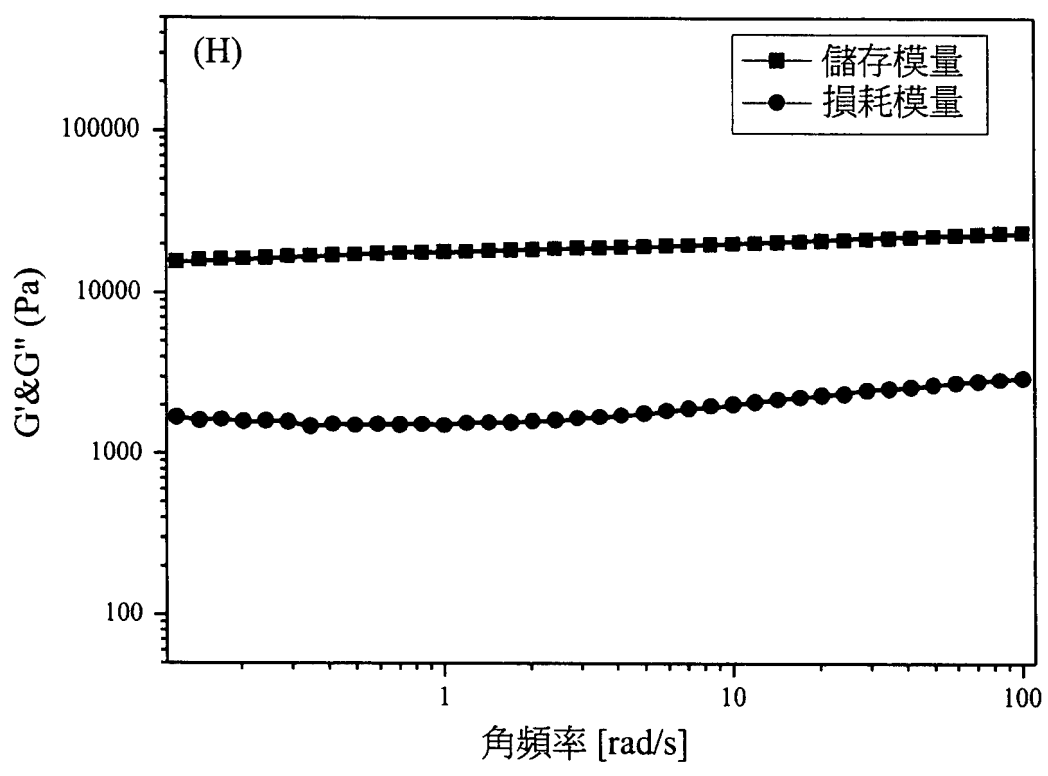
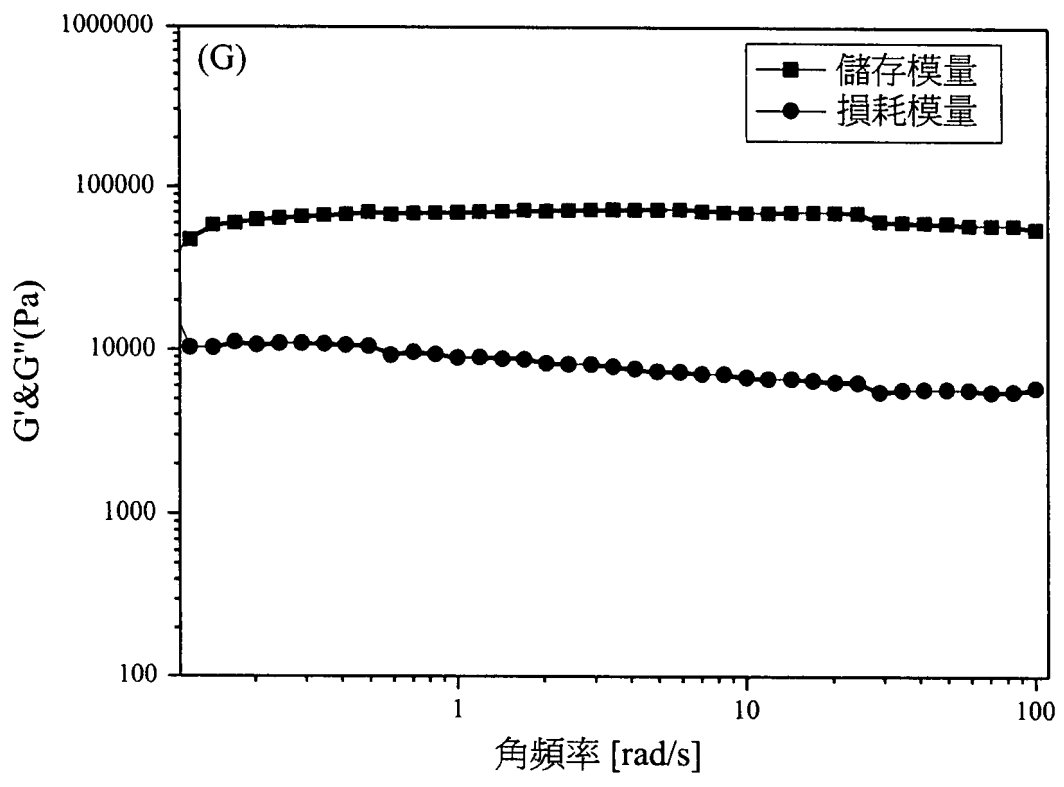
第3圖



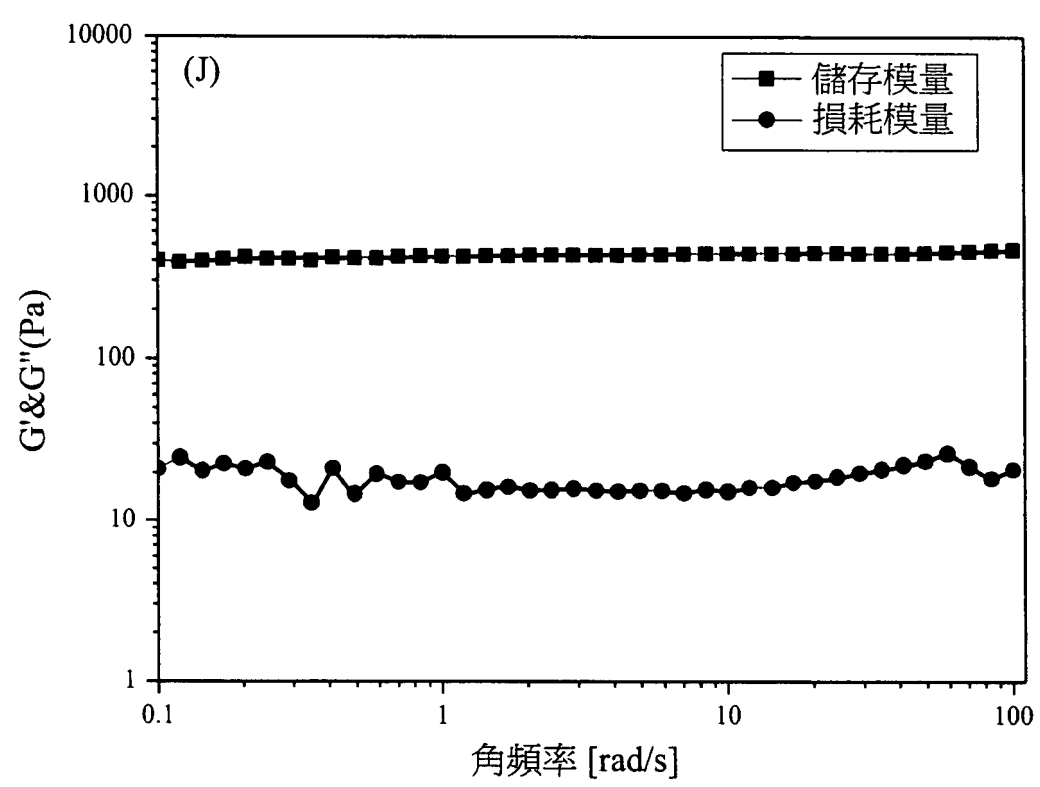
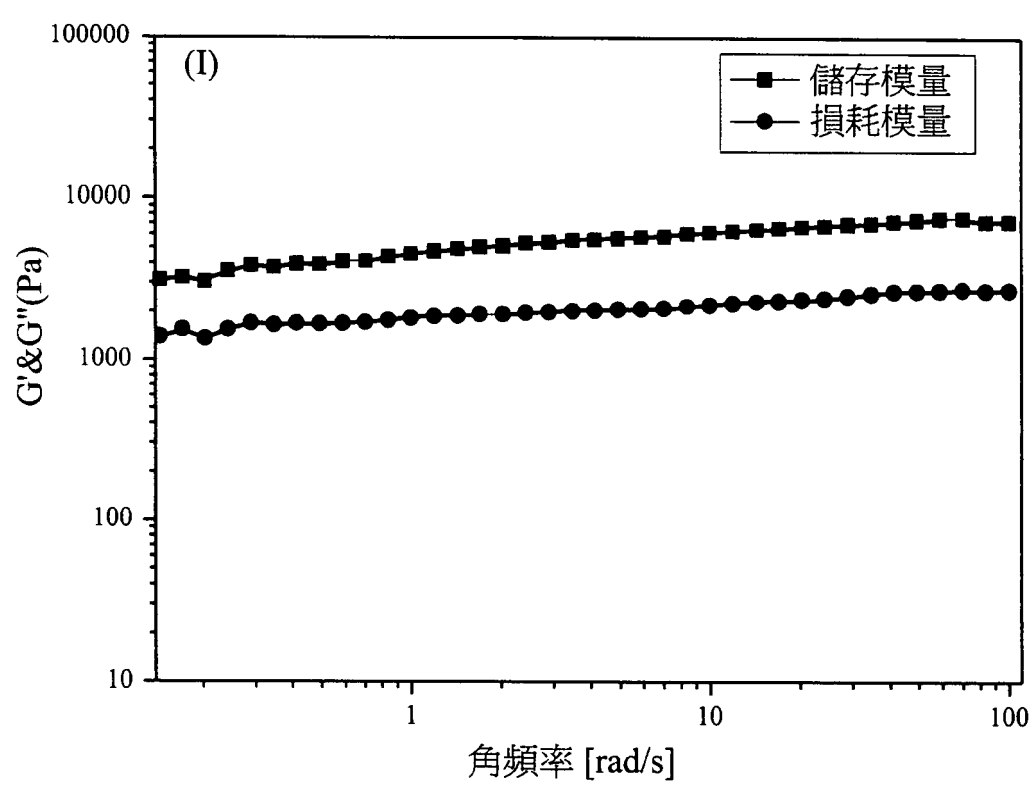
第3圖



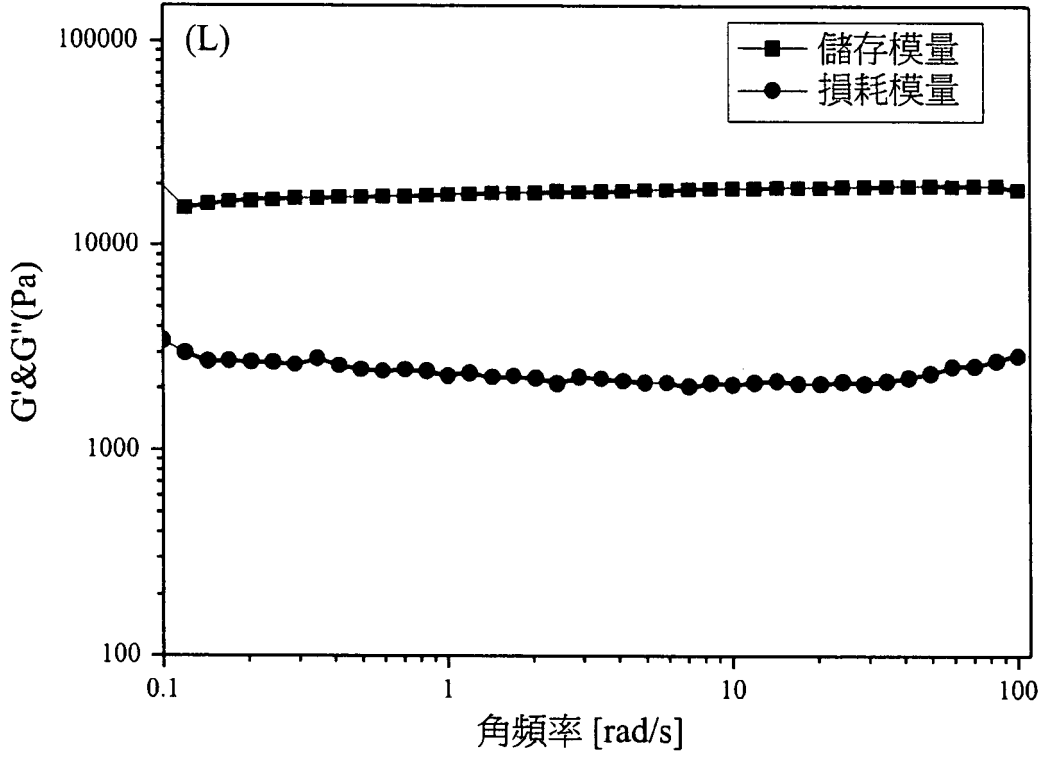
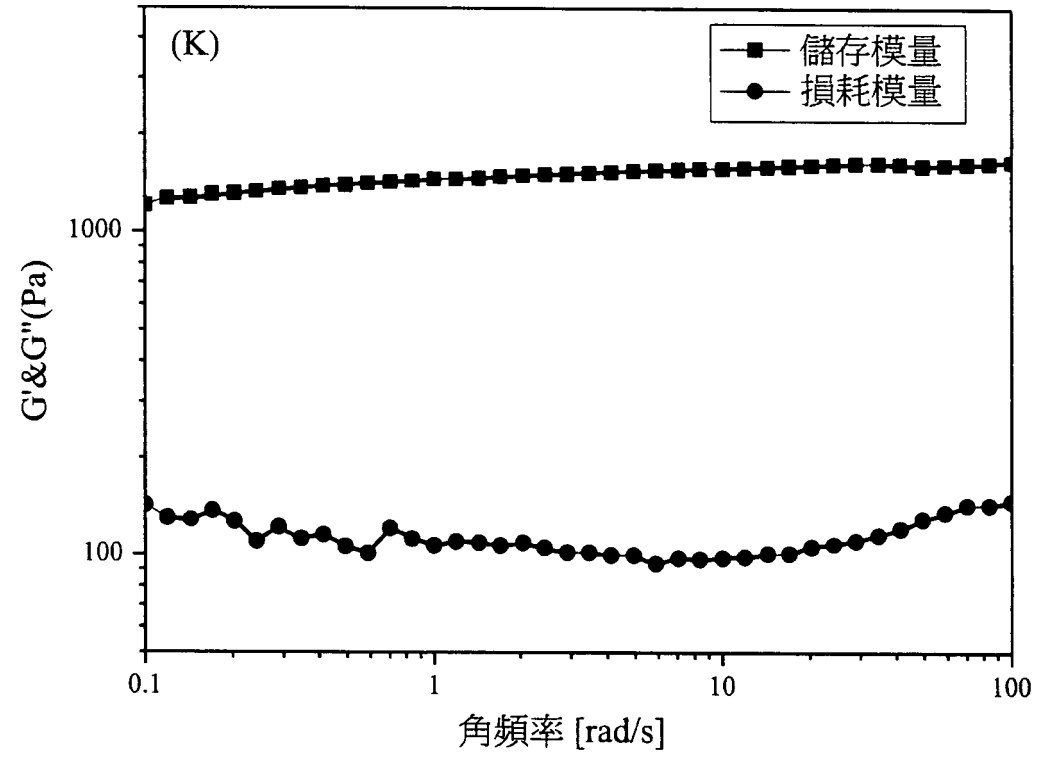
第3圖



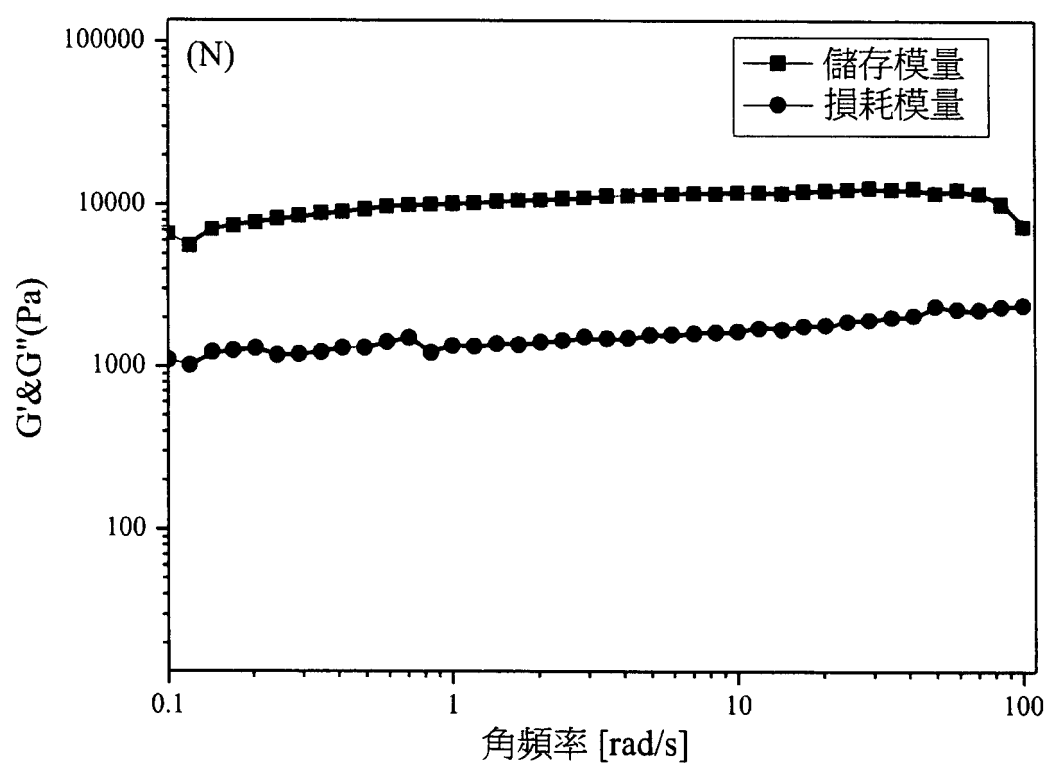
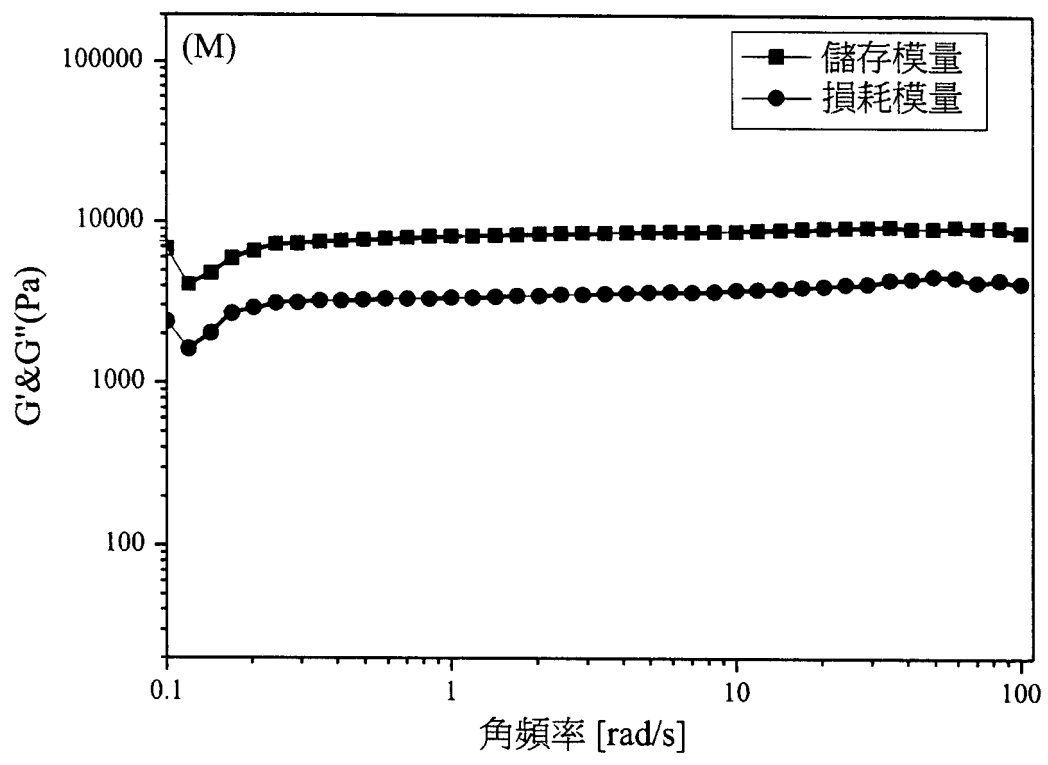
第3圖



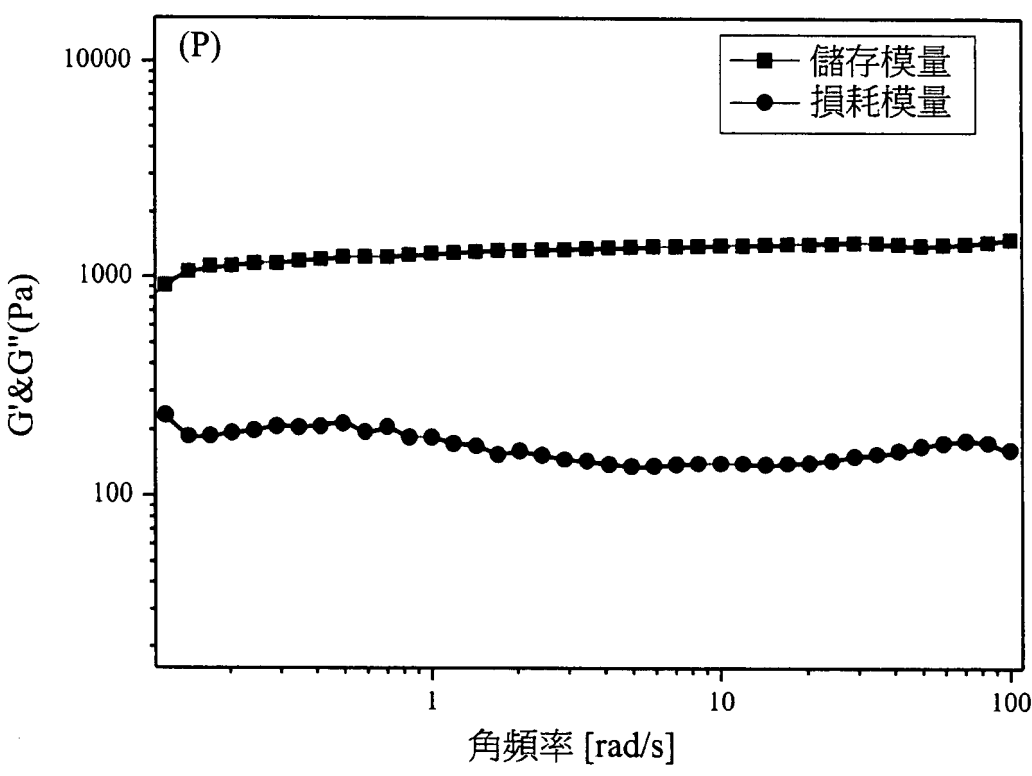
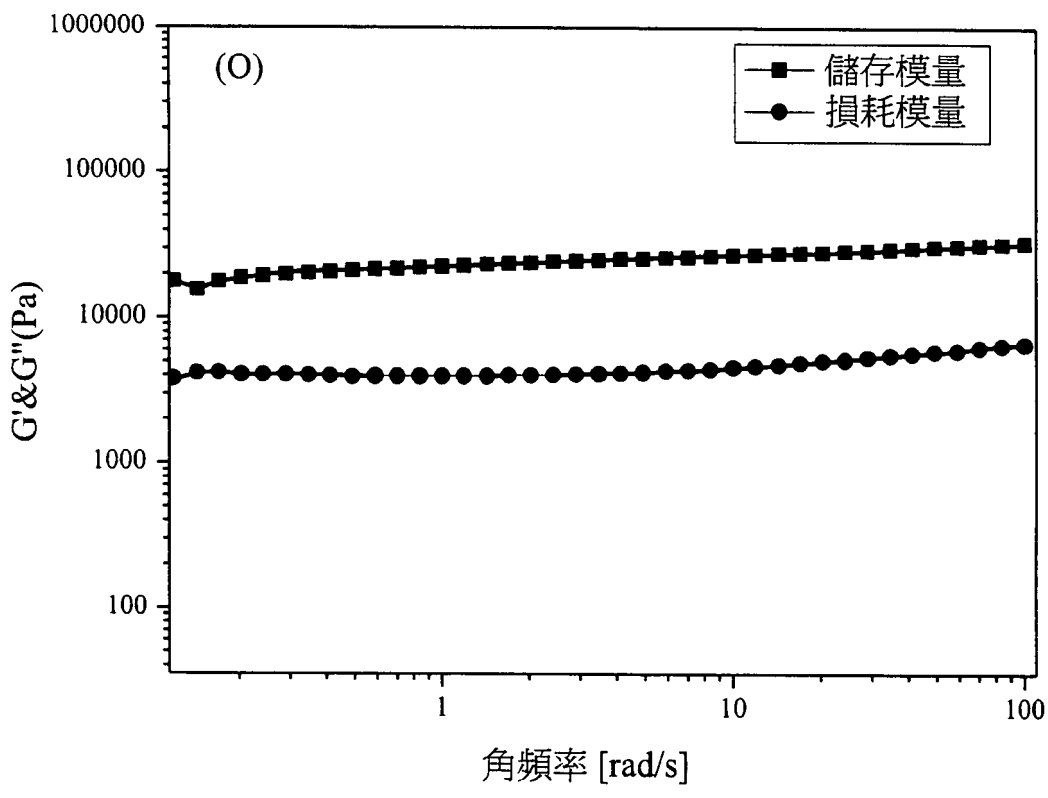
第3圖



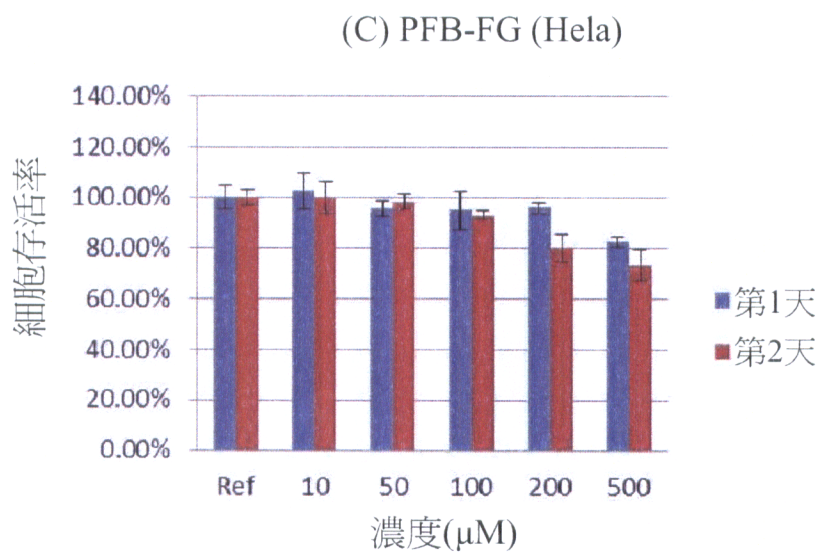
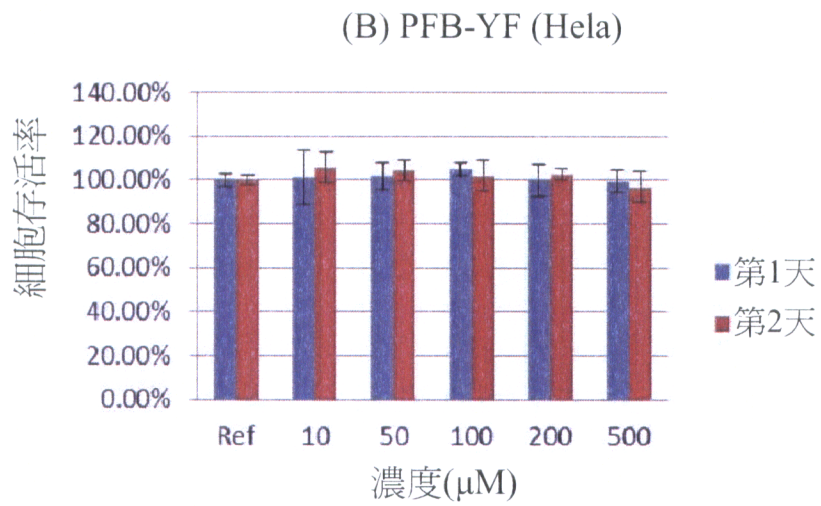
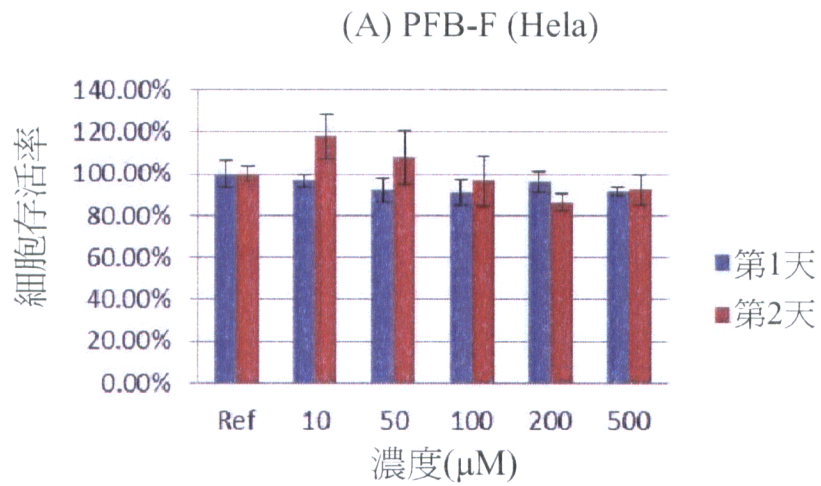
第3圖



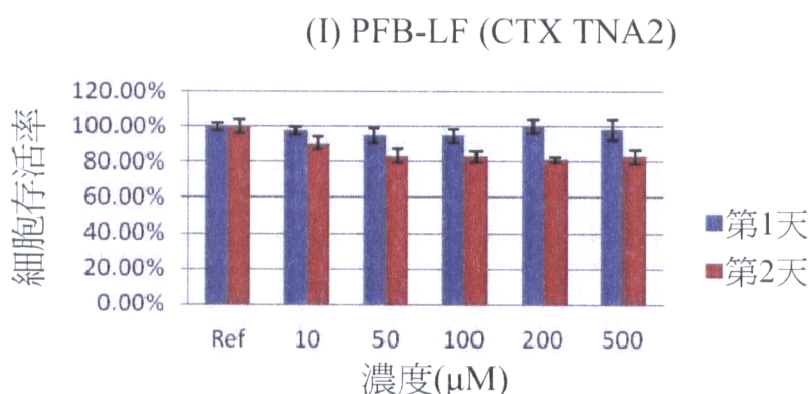
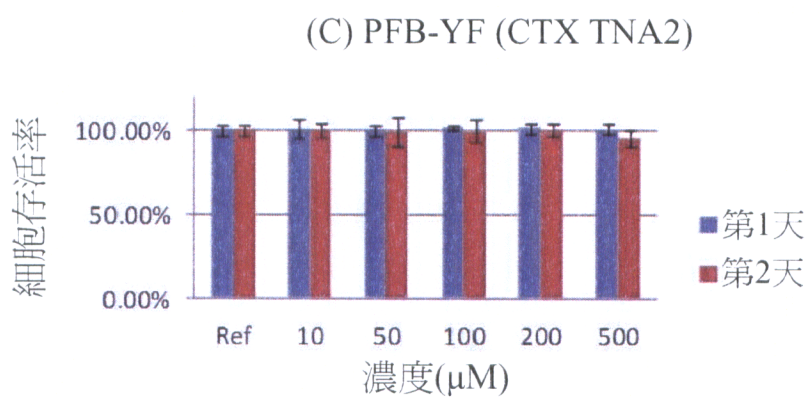
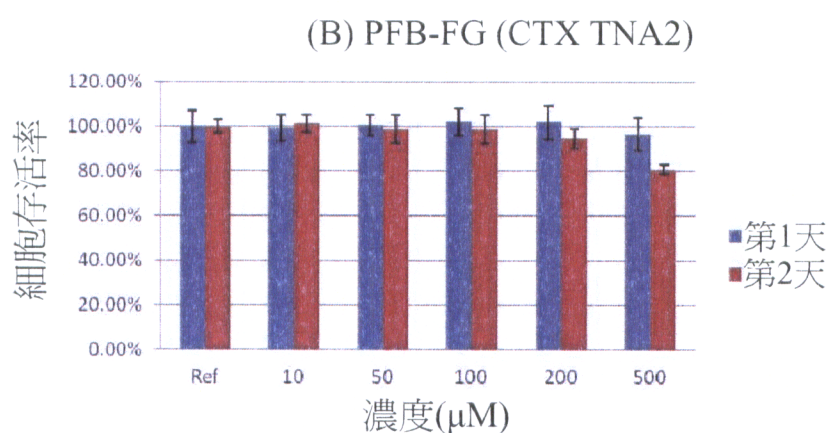
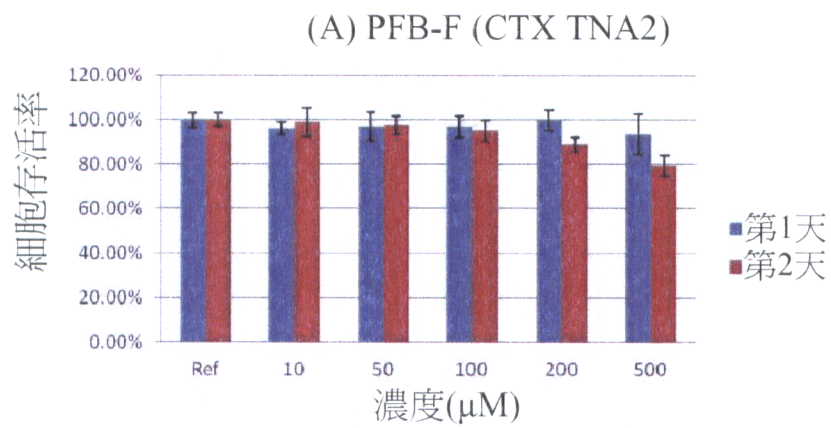
第3圖



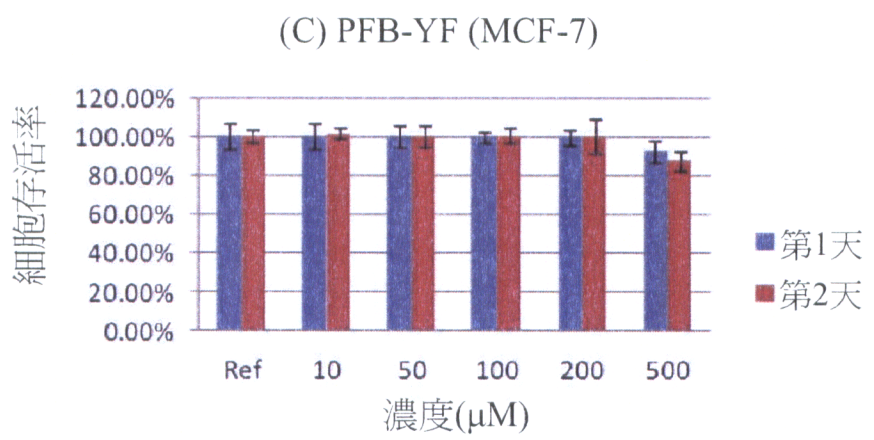
第3圖



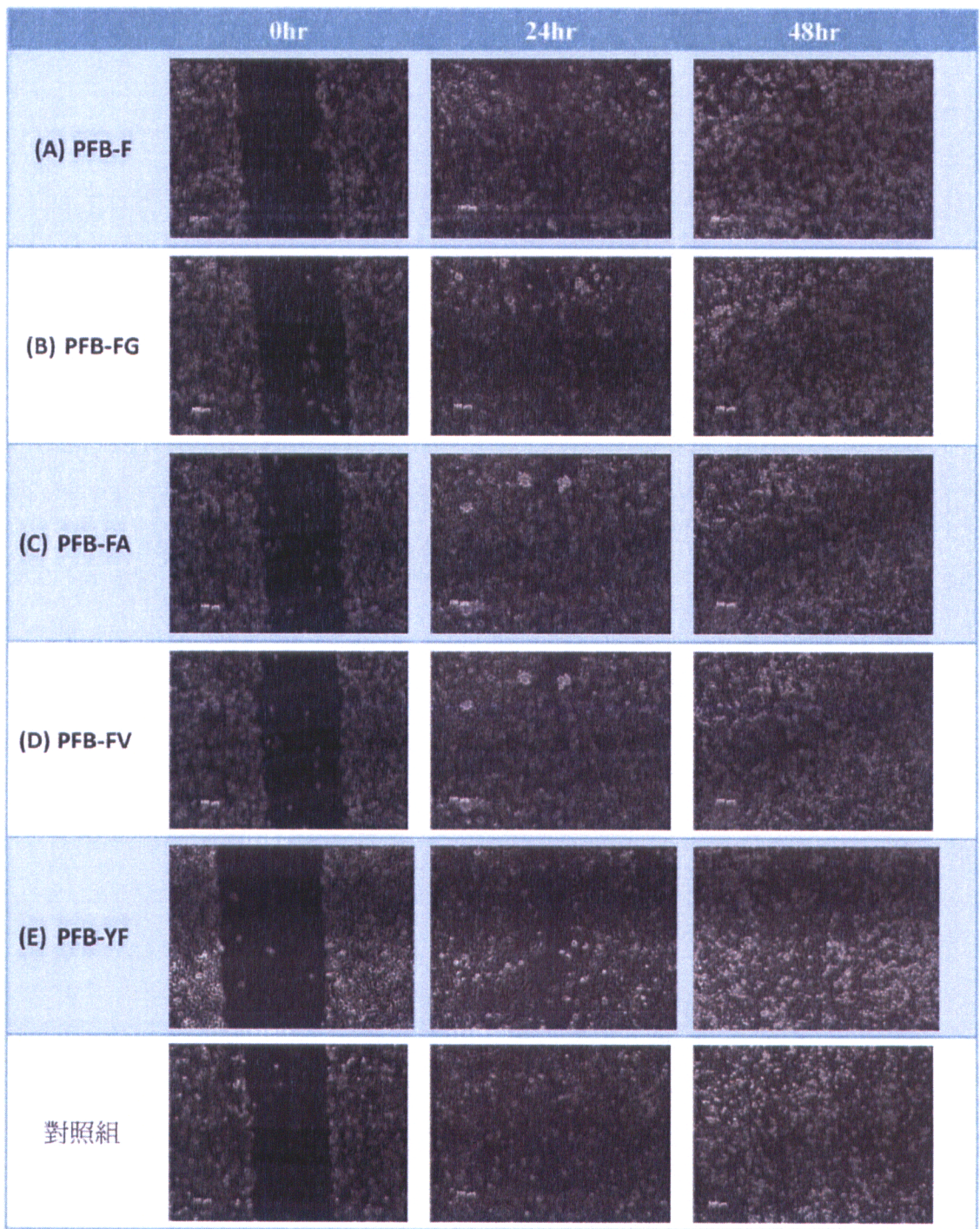
第4-1圖



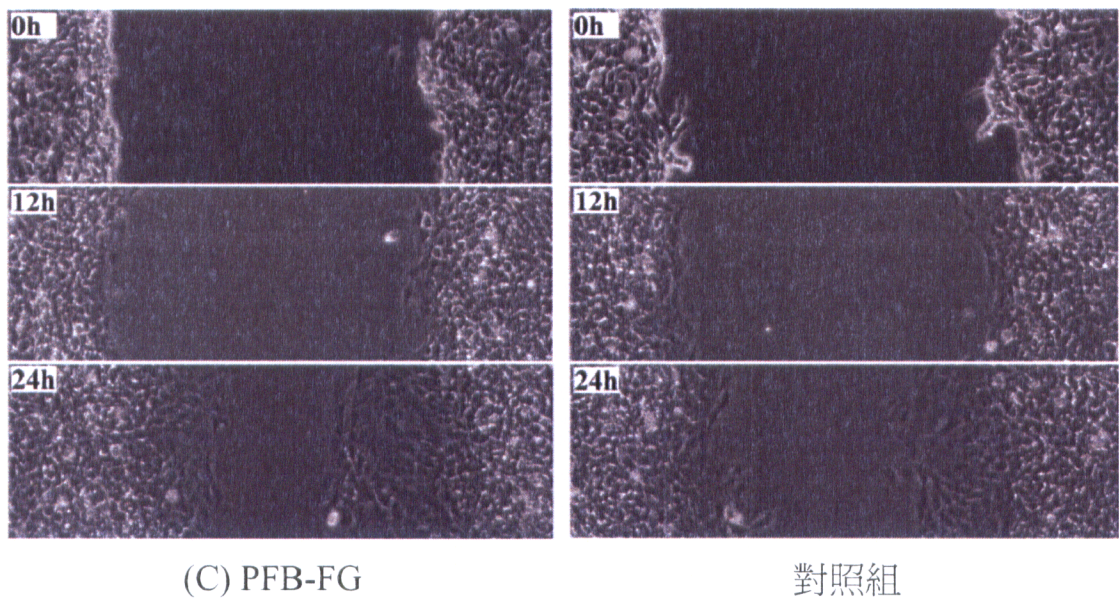
第4-2圖



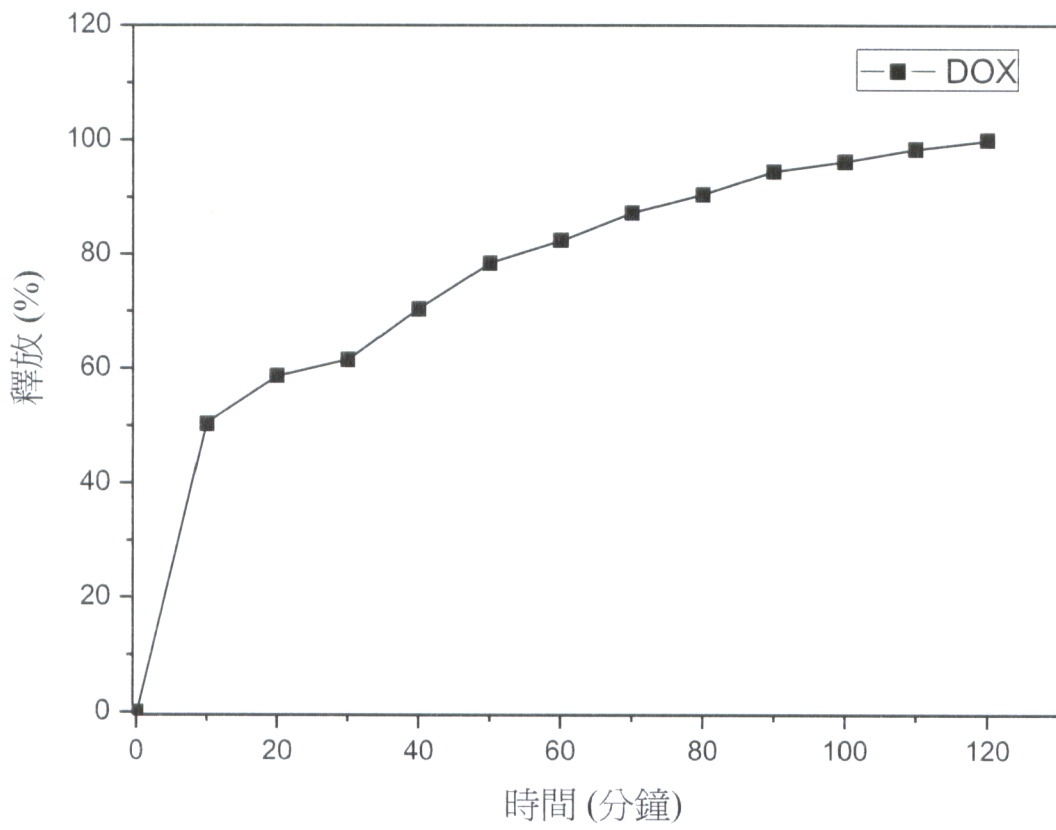
第4-3圖



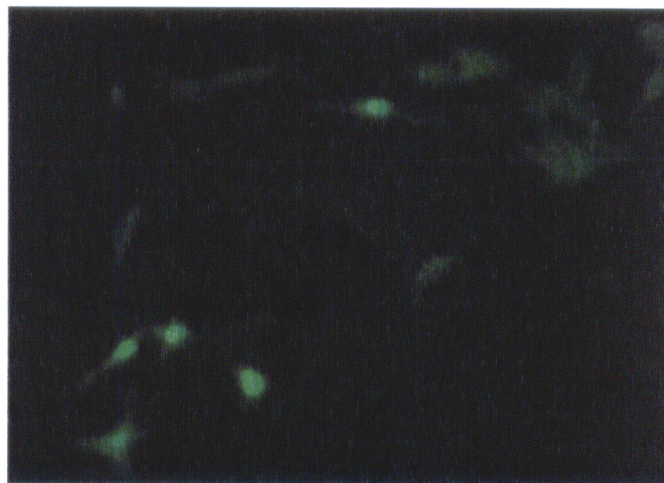
第5-1圖



第5-2圖



第6圖



第7圖