

(21) 申請案號：104140184

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 01 日

(51) Int. Cl.:

G01N33/52 (2006.01)

C09K11/06 (2006.01)

C07K2/00 (2006.01)

C07D221/14 (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：李世章；秦建譜

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：16 共 85 頁

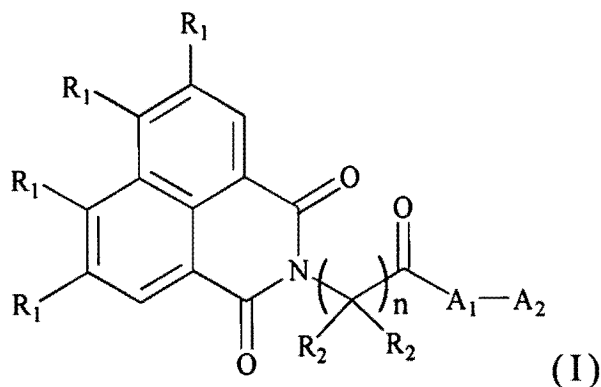
(54) 名稱

水溶性螢光胜肽材料

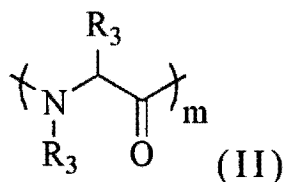
WATER-SOLUBLE PEPTIDE FLUORESCENCE MATERIAL

(57) 摘要

一種水溶性螢光胜肽材料，具有式(I)之結構：

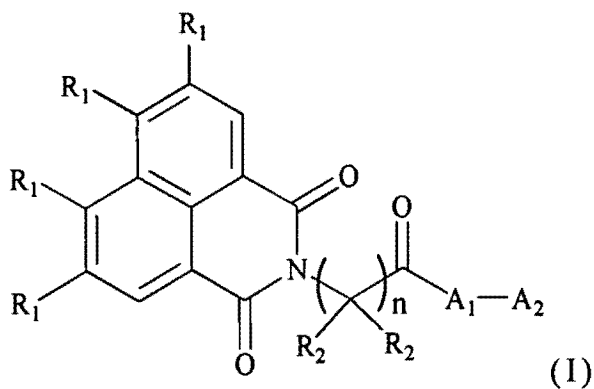


在式(I)中， n 為 1 以上之整數， R_1 係獨立選自氫或含氮取代基， R_2 係獨立選自氫或烷基， A_1 係由一個以上的胺基酸單體聚合而成，具有式(II)之結構：

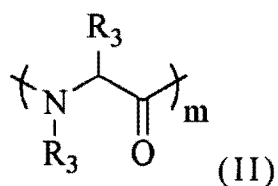


在式(II)中， m 為 1 以上之整數，且 A_1 中各該胺基酸單體的 R_3 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基， A_2 為 $-OR_5$ 或 $-N(R_4)_2$ ，其中 R_4 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、胍基烷基、單糖基、雙糖基、或寡糖基， R_5 為氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基。

A water-soluble peptide fluorescence material has the structure of formula (I):



in formula (I), n is an integer greater than or equal to 1, R_1 is independently selected from hydrogen or nitrogen-containing functional group, R_2 is independently selected from hydrogen or alkyl, A_1 is polymerized by at least one amino acid monomer, which A_1 has the structure of formula (II):

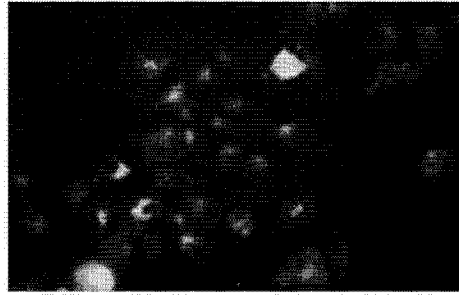


in formula (II), m is an integer greater than or equal to 1, R_3 in each amino acid monomer from A_1 is independently selected from hydrogen, alkyl, aralkyl, alkylthioalkyl, hydroxyaralkyl, heteroaralkyl, carboxylalkyl, or guanidinyllalkyl, A_2 is $-OR_5$ or $-N(R_4)_2$, which R_4 is independently selected from hydrogen, alkyl, aralkyl, alkylthioalkyl, hydroxyaralkyl, heteroaralkyl, carboxylalkyl, guanidinyllalkyl, monoglycosyl, biglycosyl, or oligosaccharyl, and R_5 is hydrogen, alkyl, aralkyl, alkylthioalkyl, hydroxyaralkyl, heteroaralkyl, carboxylalkyl, or guanidinyllalkyl.

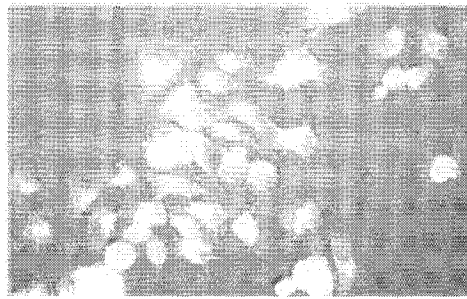
指定代表圖：



第 1A 圖

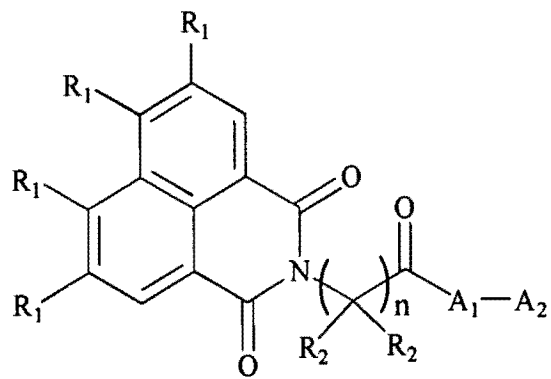


第 1B 圖



第 1C 圖

特徵化學式：



發明摘要

※申請案號：104140184

※申請日：104.12.01

※IPC 分類：

G01N33/52 (2006.01)

C09K11/06 (2006.01)

C07K21/00 (2006.01)

C07D221/14 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

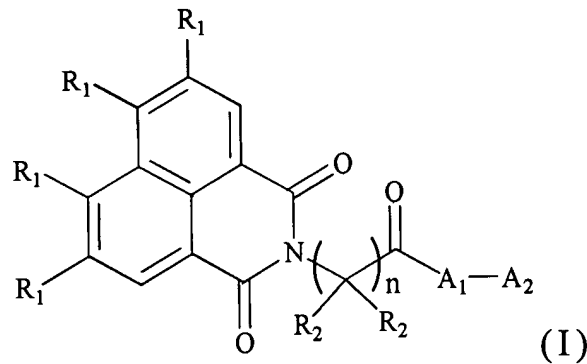
水溶性螢光胜肽材料

WATER-SOLUBLE PEPTIDE FLUORESCENCE

MATERIAL

【中文】

一種水溶性螢光胜肽材料，具有式(I)之結構：



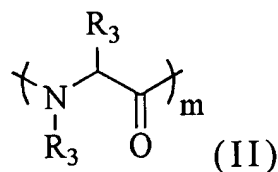
在式(I)中，n 為 1 以上之整數，

R₁ 係獨立選自氫或含氮取代基，

R₂ 係獨立選自氫或烷基，

A₁ 係由一個以上的胺基酸單體聚合而成，具有式(II)

之結構：



在式(II)中，m 為 1 以上之整數，且 A₁ 中各該胺基酸

單體的 R_3 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、
 羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基，

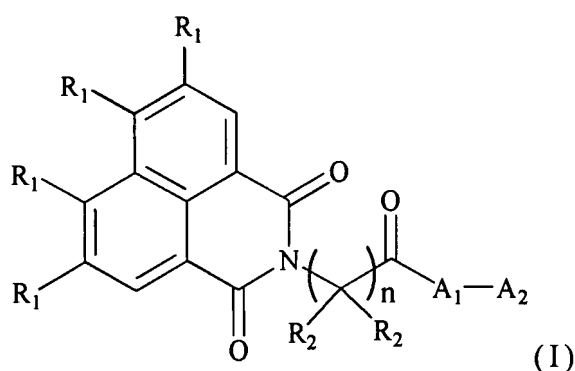
A_2 為 $-OR_5$ 或 $-N(R_4)_2$ ，

其中 R_4 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、
 羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、胍基烷基、
 單醣基、雙醣基、或寡醣基，

R_5 為氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香
 烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基。

【英文】

A water-soluble peptide fluorescence material has the
 structure of formula (I):

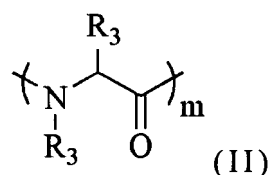


in formula (I), n is an integer greater than or equal to 1,

R_1 is independently selected from hydrogen or
 nitrogen-containing functional group,

R_2 is independently selected from hydrogen or alkyl,

A_1 is polymerized by at least one amino acid monomer,
 which A_1 has the structure of formula (II):



in formula (II), m is an integer greater than or equal to 1, R_3 in each amino acid monomer from A1 is independently selected from hydrogen, alkyl, aralkyl, alkylthioalkyl, hydroxyaralkyl, heteroaralkyl, carboxylalkyl, or guanidylalkyl,

A_2 is $-\text{OR}_5$ or $-\text{N}(\text{R}_4)_2$,

which R_4 is independently selected from hydrogen, alkyl, aralkyl, alkylthioalkyl, hydroxyaralkyl, heteroaralkyl, carboxylalkyl, guanidylalkyl, monoglycosyl, biglycosyl, or oligosaccharyl, and

R_5 is hydrogen, alkyl, aralkyl, alkylthioalkyl, hydroxyaralkyl, heteroaralkyl, carboxylalkyl, or guanidylalkyl.

:

:

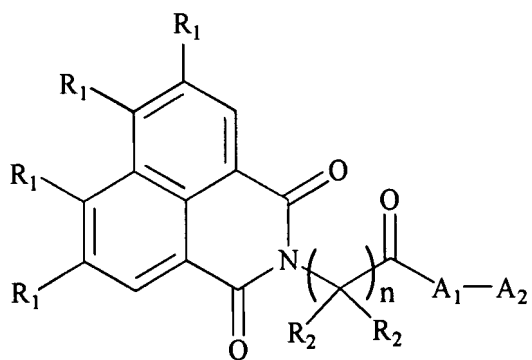
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1A, 1B, 1C）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

【發明名稱】(中文/英文)

水溶性螢光胜肽材料

WATER-SOLUBLE PEPTIDE FLUORESCENCE
MATERIAL

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一種水溶性螢光胜肽材料，特別是有關於一種萘醯亞胺的水溶性螢光胜肽材料。

【先前技術】

【0002】 螢光分子探針因具有靈敏度高、快捷方便、時間分辨率高、費用低等諸多優點，因此已廣泛應用於生物學及醫學研究中。常使用的螢光染料為吖啶菁綠(Indocyanine Green)，但此分子照光後會分解出有毒物質，在使用上需額外進行遮光。此外，接上二氮己環的萘醯亞胺雖具有較高的螢光強度，但此材料只能當作酸性細胞的螢光探針。若要製作成薄膜用於細胞外 pH 感測用，則必需額外加入引發劑，如偶氮二異丁腈(azobisisobutyronitrile, AIBN)，並在氮氣下進行加熱聚合。

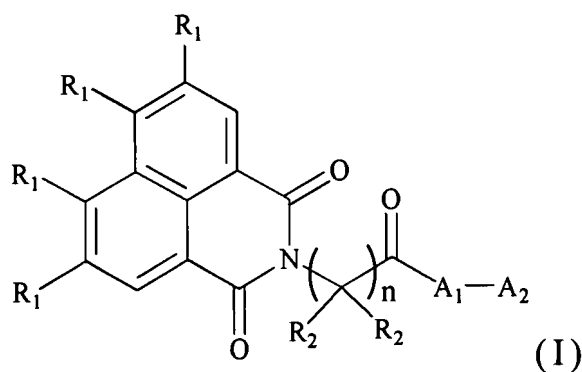
【0003】 此外，這些傳統的螢光分子探針在使用上普遍存在其他問題。螢光染料在聚集下易發生螢光減弱或淬滅的現象，使發光減弱甚至不發光並大幅降低偵測效果。若要避免分子聚集，一般常在螢光分子上進行化學修飾，即接上

大基團(bulky group)創造分子間立體阻礙可有效避免分子聚集，然而此方法需要多步驟的合成，而成本偏高。

【發明內容】

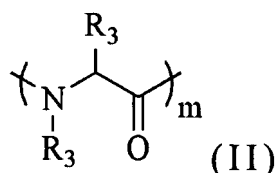
【0004】 因此，本發明提供一種水溶性螢光胜肽材料，其可調控於酸性、弱鹼性或中性環境下發光，更具有聚集誘導發光性質。

【0005】 本發明之一態樣係提供一種水溶性螢光胜肽材料，其具有式(I)之結構：



【0006】 在式(I)中，n 為 1 以上之整數，R₁ 係獨立選自氫或含氮取代基，R₂ 係獨立選自氫或烷基。

【0007】 A₁ 則由一個以上的胺基酸單體聚合而成，具有式(II)之結構：



【0008】 在式(II)中，m 為 1 以上之整數，且 A₁ 中各胺基酸單體的 R₃ 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基。

【0009】 A₂ 為 -OR₅ 或 -N(R₄)₂，其中 R₄ 係獨立選自氫、烷

基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、胍基烷基、單醣基、雙醣基、或寡醣基， R_5 為氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基。

【0010】根據本發明一或多個實施方式，其中 R_2 為碳數 1~16 之烷基。

【0011】根據本發明一或多個實施方式，其中 R_1 為胺基葡萄糖、硝基、吡咯、哌啶、環己亞胺或環庚亞胺。

【0012】根據本發明一或多個實施方式，其中 m 為 1~20 之整數。

【0013】根據本發明一或多個實施方式，其中 n 為 1~10 之整數。

【0014】根據本發明一或多個實施方式，其中 R_4 中的單醣基為果醣基或半乳糖基、雙醣基為甘露醣基、而寡糖基為寡核苷酸。

【圖式簡單說明】

【0015】為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之詳細說明如下：

第 1A-1C 圖為根據本發明部分實施方式，相同濃度下本發明水溶性螢光胜肽材料與傳統螢光材料的比較圖。

第 2 圖為根據本發明部分實施方式，水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與放光波長。

第 3 圖為根據本發明部分實施方式，PC-3 細胞於不同

濃度水溶性螢光胜肽材料中的存活率。

第 4 圖繪示式(III-1)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞砒與水之共溶劑中的螢光強度與放光波長。

第 5 圖繪示本發明式(III-5)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與放光波長。

第 6 圖繪示式(III-14)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之甘油與甲醇之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。

第 7 圖繪示本發明式(III-21)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。

第 8 圖繪示本發明式(III-22)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。

第 9 圖繪示式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞砒與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。

第 10 圖繪示本發明式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。

第 11 圖繪示本發明式(III-27)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。

第 12 圖繪示式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞砒與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。

第 13 圖則繪示在吸收光波長為 400 奈米時，實驗例 1202-1211 與實驗例 1201 之間的螢光強度比值。

第 14 圖繪示本發明式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料

的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。

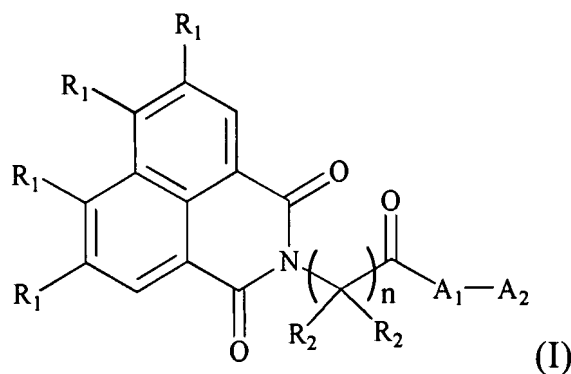
第 15 圖繪示式(III-30)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞礬與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。

第 16 圖繪示在吸收光波長為 410 奈米時，實驗例 1502-1511 與實驗例 1501 之間的螢光強度比值。

【實施方式】

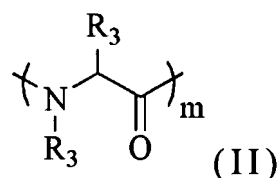
【0016】為了使本揭示內容的敘述更加詳盡與完備，下文將參照附隨圖式來描述本發明之實施態樣與具體實施例；但這並非實施或運用本發明具體實施例的唯一形式。以下所揭露的各實施例，在有益的情形下可相互組合或取代，也可在一實施例中附加其他的實施例，而無須進一步的記載或說明。

【0017】本發明提供一種水溶性螢光胜肽材料，藉由萘醯亞胺上環氮取代基的變換達到聚集誘導發光的效果，並得到不同顏色的螢光染料。此外，變換萘醯亞胺上的胺基酸序列可讓螢光胜肽材料分別在酸性、中性或弱鹼性環境下顯色。本發明的水溶性螢光胜肽材料具有下列式(I)之結構：



【0018】 在式(I)中， n 為 1 以上之整數， R_1 係獨立選自氫或含氮取代基，而 R_2 係獨立選自氫或烷基。在本發明之部分實施例中，含氮取代基為胺基葡萄糖(glucosamine)、硝基(nitro group)、吡咯(pyrrolidine)、哌啶(piperidine)、環己亞胺(azepane)或環庚亞胺(azocane)。在本發明之其他部分實施例中， R_2 為碳數 1~16 之烷基。

【0019】 式(I)中的 A_1 由一個以上的胺基酸單體聚合而成，其具有下列式(II)之結構：



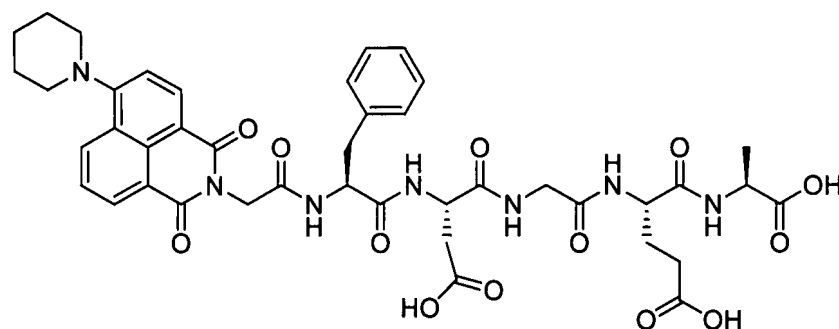
在式(II)中， m 為 1 以上之整數，且 A_1 中各個胺基酸單體的 R_3 係獨立選自氫、烷基(alkyl)、芳香烷基(aralkyl)、烷基硫代烷基(alkylthioalkyl)、羥基芳香烷基(hydroxyaralkyl)、雜芳香烷基(heteroaralkyl)、羧基烷基(carboxylalkyl)、或胍基烷基(guanidylalkyl)。在本發明之部份實施例中， A_1 中的各個胺基酸單體可均相同。在本發明之其他部分實施例中， A_1 中的各個胺基酸單體均不相同。

【0020】 請繼續參閱式(I)，式(I)中的 A_2 可為 $-\text{OR}_5$ 或 $-\text{N}(\text{R}_4)_2$ ，其中 R_4 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、胍基烷基、單醣基、雙醣基、或寡醣基。而 R_5 為氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基

烷基、或胍基烷基。在本發明之部分實施例中， R_4 中的單醣基為果糖基(fructosyl)或半乳糖基(galactosyl)、雙醣基為甘露醣基(mannosyl)、而寡醣基為寡核苷酸(oligonucleic acid)。

【0021】 在本發明之部分實施例中， n 為 1~10 之整數，而 m 為 1~20 之整數。

【0022】 本發明的螢光胜肽材料可設計以在中性、酸性或弱鹼性環境下發光，以下列舉酸性環境下發光的實施例。請參閱第 1A-1C 圖，第 1A-1C 圖為相同濃度下，本發明水溶性螢光胜肽材料與傳統螢光材料的比較圖。其中，水溶性螢光胜肽材料具有下列之結構：



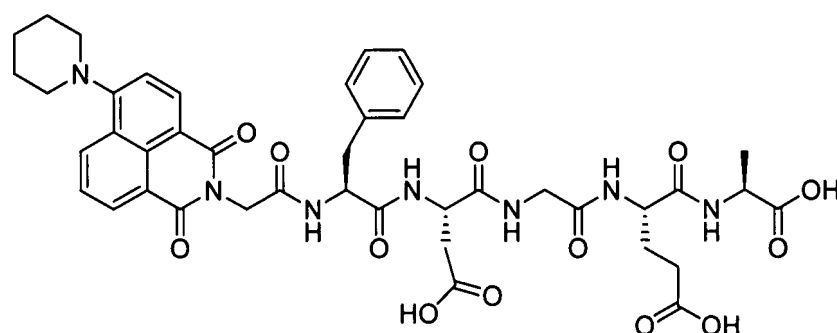
請先參閱第 1A 圖，第 1A 圖為傳統市售的紅色螢光材料 LysoTracker(Life Technologies)，其用以標記活細胞中的酸性細胞。由第 1A 圖可觀察得，LysoTracker 會於酸性細胞處顯現紅色螢光。請繼續參閱第 1B 圖，並與第 1A 圖相比較。第 1B 圖使用本發明的水溶性螢光胜肽材料，同樣用於標記活細胞中的酸性細胞。水溶性螢光胜肽材料於酸性細胞處顯現綠色螢光，且產生螢光強度遠強於 LysoTracker 所產生的紅色螢光。第 1C 圖為第 1A 圖與第 1B 圖的疊合圖，

由疊合圖更可發現本發明的水溶性螢光胜肽材料於細胞處產生螢光的位置與市售的 *Lysotracker* 大致相同。據此，本發明的水溶性螢光胜肽材料可適用於生物性的螢光探針，以探測並標記酸性細胞之位置。

【0023】此外，在相同的濃度下，本發明的水溶性螢光胜肽材料能呈現較強的螢光強度，因此可使用較低的劑量以達到與市售 *Lysotracker* 相同的螢光強度，而大幅降低醫療成本及對人體的傷害。

【0024】且此水溶性螢光胜肽材料具有聚集誘導發光現象，將水溶性螢光胜肽材料置入水與有機溶劑的混合溶液中，可發現混合溶液的螢光強度隨著水比例的增加而變強。且水溶性螢光胜肽材料因分子上的胺基酸具有氫鍵，因此在水中具有聚集誘導螢光特性增加細胞顯像對比，應用範圍廣泛且操作簡便。

【0025】接著請參閱第 2 圖，第 2 圖繪示本發明水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與放光波長。其中，水溶性螢光胜肽材料具有下式之結構：



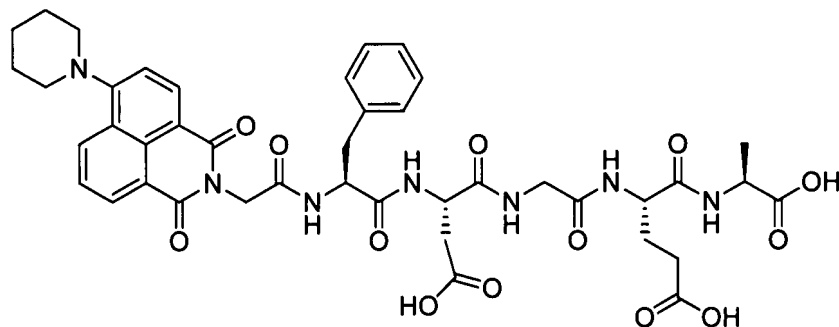
實驗例 210、220、230、240、250、260、270、280 分別將水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、

4、3 的環境中測試。在實驗例 210-230 中，水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 8、9、10 的鹼性環境中，由第 2 圖得知此時螢光強度非常低，而不會產生明顯的螢光標記。實驗例 240 在中性環境(pH=7)下的螢光強度雖些微上升，但仍略同於實驗例 210-230，此時依然無法以肉眼觀察到明顯螢光。此外，雖然實驗例 250 是置於 pH 值為 6 的酸性環境中，但產生的螢光強度與實驗例 210-240 相較下並無明顯變化。

【0026】請繼續參閱第 2 圖的實驗例 260，當酸性環境的 pH 值降到 5 時，水溶性螢光胜肽材料產生的螢光強度明顯驟升至約 350 螢光單位，此時的放光波長約為 550 奈米，因此在前述第 1B 圖中觀察到螢光顏色為綠色。再降低 pH 值至 4 時，實驗例 270 產生的螢光強度上升至約 500 螢光單位，繼續降低 pH 值至 3 時，實驗例 280 產生的螢光強度更大幅上升到約 900 螢光單位。目前已知最佳的螢光材料，在酸性環境下的最大螢光強度僅約 350 螢光單位。反觀本發明提供的水溶性螢光胜肽材料的螢光強度可高達 900 螢光單位，除能提供更明顯的標記效果，更能在濃度降低下達到相同的螢光效果，以減少成本。此外，實驗例 240(pH=3)與實驗例 280(pH=7)之間的螢光強度比值約為 25.5，此水溶性螢光胜肽材料具有明顯的發光區間，易於辨識並檢測酸性細胞之位置。

【0027】請繼續參閱第 3 圖，第 3 圖為 PC-3 細胞於不同濃度水溶性螢光胜肽材料中的存活率。其中，水溶性螢光胜

肽材料具有下式之結構：

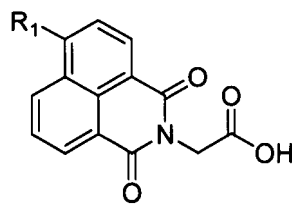


從第 3 圖中可得知 PC-3 細胞(BCRC-60122，食品工業發展研究所)在濃度 500 μM 的水溶性螢光胜肽材料中兩天後，仍能具有 80 % 的存活率。此實驗結果遠大於 IC50(50 % 抑制濃度)之標準。IC50 是指細胞存活率達一半時藥物的濃度，在存活率方面，一定濃度的某種藥物來檢測細胞死亡數達 50% 時，此濃度稱為 50 % 抑制濃度，即死亡細胞數與原細胞數之比值等於 50 % 時所對應的濃度。本發明的水溶性螢光胜肽材料對 PC-3 細胞的毒性低，兩者間具有良好的相容性，並不會造成細胞的大量死亡。此外，更額外測試 HeLa、MCF-7、CTXTAN2、PC12、WSI、3T3L1 等細胞。水溶性螢光胜肽材料與此些細胞間均具有良好相容性，在兩天後細胞存活率均大於 50 %。

【0028】 本案的水溶性螢光胜肽材料係以固相胜肽合成法(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)製備，包含下列步驟：

1. 接枝胺基酸單體至樹脂上，且胺基酸單體的胺基上具有一保護基。
2. 移除保護基。

3. 使用耦合劑，以令使



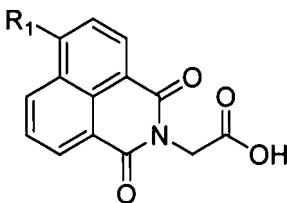
與移除保護基的胺

基進行耦合反應形成水溶性螢光胜肽材料，其中 R_1 係獨立選自氫或含氮取代基。在本發明之部分實施例中，含氮取代基為胺基葡萄糖(glucosamine)、硝基(nitro group)、吡咯(pyrrolidine)、哌啶(piperidine)、環己亞胺(azepane)或環庚亞胺(azocane)。

4. 最後自樹脂上切除水溶性螢光胜肽材料。

值得注意的是，在步驟 2 後，可先耦合相同或不同的胺基酸單體至胺基上，且此胺基酸單體同樣具有保護基。

移除保護基後，再耦合



，藉此可調控水溶

性螢光胜肽材料的胺基酸序列，以控制其在不同的 pH 值中顯色。以下列舉數個實施例，以更清楚描述水溶性螢光胜肽材料的製備過程。

【0029】 1.合成末端發光團

【0030】 首先合成水溶性螢光胜肽材料中的末端發光團，將酸酐、甘胺酸和三乙胺加入乙醇溶劑中迴流攪拌 6 小時，用點片追蹤反應。反應完全後，冷卻至室溫，以旋轉減壓濃縮機移除大部分溶劑。接著將 1M 的鹽酸溶液慢慢滴入使固體析出。抽氣過濾後取出固體，以再結晶純化，最後過

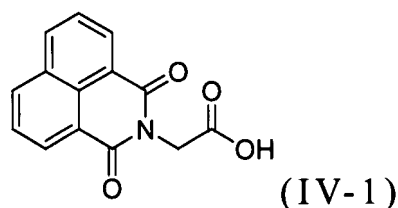
濾出得固體產物。各種不同末端發光團的反應物與所得之產物列示於下表一。

【0031】 表一：以不同的酸酐合成各種末端發光團

酸酐 (重量，莫耳數)	甘胺酸 (重量，莫耳數)	三乙胺 (重量，莫耳數)	產物統稱 (顏色，重量，產率)
1,8-萘二甲 酸酐 (1.5 克，7.58 毫莫耳)	甘胺酸 (1.7 克， 22.67 毫莫 耳)	三乙胺 (3.2 毫升， 22.8 毫莫耳)	NI，式(IV-1) (白色粉末，1.3278 克，產率：68.65%)
4-吡啶-1,8- 萘二甲酸酐 (2.142 克， 7.6 毫莫耳)	甘胺酸 (1.710 克， 22.8 毫莫耳)	三乙胺 (3.19 毫升， 22.8 毫莫耳)	PPNI，式(IV-2) (黃色，1.60 克，產 率：66%)
4-吡咯烷基 -1,8-萘二甲 酸酐 (1.335 克，5 毫莫耳)	甘胺酸 (1.125 克， 15 毫莫耳)	三乙胺 (2.1 毫升， 15 毫莫耳)	PRNI，式(IV-3) (橘色，0.21 克，產 率：13%)
4-氮雜環庚 烷基-1,8-萘 二甲酸酐 (0.407 克， 1.38 毫莫耳)	甘胺酸 (0.517 克， 6.9 毫莫耳)	三乙胺 (0.97 毫升， 6.9 毫莫耳)	AHNI，式(IV-4) (黃色，0.462 克，產 率：91%)
4-氮雜環辛	甘胺酸	三乙胺	AONI，式(IV-5)

烷基-1,8-萘二甲酸酐 (0.428 克， 1.38 毫莫耳)	(0.517 克， 6.9 毫莫耳)	(0.97 毫升， 6.9 毫莫耳)	(黃色，0.460 克，產 率：91%)
--	-----------------------	-----------------------	-------------------------

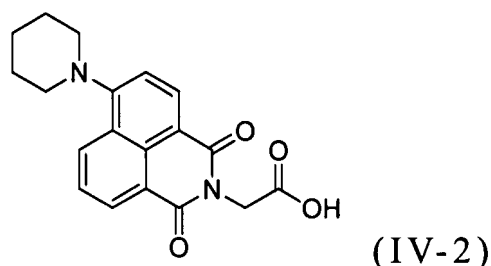
【0032】 NI 具有下列式(IV-1)的結構式：



並將式(IV-1)的產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR)進行結構鑑定。光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 4.78 (s, 2H; CH_2), 7.94 (dd, $J(\text{H,H})=7.8$, 7.8 Hz, 2H; CH), 8.55 (d, $J(\text{H,H})=7.8$ Hz, 2H; CH), 8.56 (d, $J(\text{H,H})=7.8$ Hz, 2H; CH)。且為方便後續敘述，式(IV-1)之結構統稱為 NI (1,8-Naphthalimide-N-acetic acid)。

【0033】 PPNI 具有下列式(IV-2)的結構式：

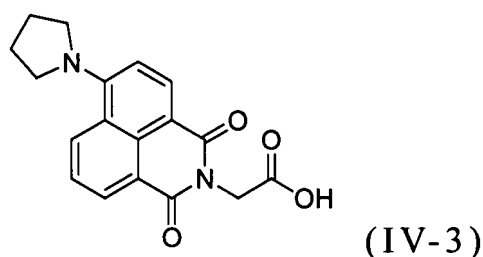


並將式(IV-2)的產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR)進行結構鑑定。光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.68-1.75 (br, 2H; CH_2), 1.80-1.95 (br, 4H; CH_2), 3.26 (t, $J=5.0$ Hz, 4H; CH_2),

4.75 (s, 2H; CH₂), 7.36 (d, J=8.1 Hz, 1H; CH), 7.87 (dd, J=7.5, 7.5 Hz, 1H; CH), 8.44 (d, J=8.1 Hz, 1H; CH), 8.51 (d, J=7.5 Hz, 1H; CH), 8.54 (d, J=7.5 Hz, 1H; CH)。且為方便後續敘述，式 (IV-2) 之結構統稱為 PPNI (4-piperidinyl-naphthalimide)。

【0034】 PRNI 具有下列式 (IV-3) 的結構式：



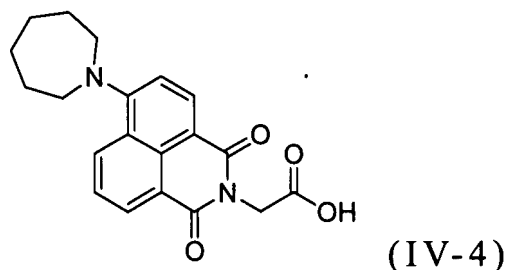
並將式 (IV-3) 的產物利用核磁共振光譜儀 (¹H NMR 與 ¹³C NMR) 進行結構鑑定。光譜資訊如下：

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=2.05 (s, 4H; CH₂), 3.79 (s, 4H; CH₂), 4.71 (s, 2H; CH₂), 6.87 (d, J=8.7 Hz, 1H; CH), 7.63 (dd, J=7.6, 7.6 Hz, 1H; CH), 8.23 (d, J=8.7 Hz, 1H; CH), 8.44 (d, J=7.6 Hz, 1H; CH), 8.76 (d, J=7.6 Hz, 1H; CH);

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=26.5, 41.8, 53.9, 109.0, 109.4, 121.9, 122.6, 124.1, 131.7, 131.8, 134.1, 150.1, 153.3, 163.3, 164.5, 170.6;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 324.11, 實驗值 323.1 [M-H]⁻。為方便後續敘述，式 (IV-3) 之結構統稱為 PRNI (4-pyrrolidyl-naphthalimide)。

【0035】 AHNI 具有下列式 (IV-4) 的結構式：



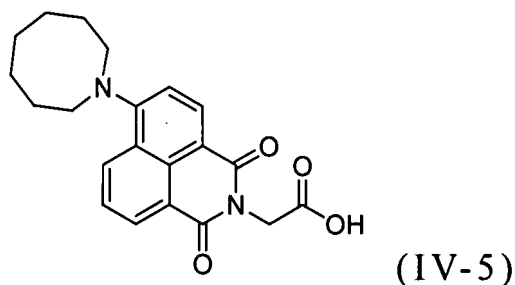
並將式(IV-4)的產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR 與 ^{13}C NMR)進行結構鑑定。光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.60-1.80 (br, 4H; CH_2), 1.80-2.05 (br, 4H; CH_2), 3.61 (t, J =5.25 Hz, 4H; CH), 4.71 (s, 2H; CH_2), 7.19 (d, J =8.4 Hz, 1H; CH), 7.70 (dd, J =7.8, 7.8 Hz, 1H; CH), 8.26 (d, J =8.4 Hz, 1H; CH), 8.42 (d, J =7.8 Hz, 1H; CH), 8.47 (d, J =7.8 Hz, 1H; CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =28.2, 28.7, 41.8, 55.6, 112.3, 113.8, 122.5, 124.9, 125.3, 131.0, 131.7, 133.2, 133.4, 157.9, 163.4, 164.3, 170.5;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 352.14 , 實驗值 350.9 [M-H] $^-$ 。為方便後續敘述，式(IV-4)之結構統稱為 AHNI (4-azacycloheptyl-naphthalimide)。

【0036】 AONI 具有下列式(IV-5)的結構式：



並將式(IV-5)的產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR 與 ^{13}C NMR)進行結構鑑定。光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.55-1.75 (br, 6H; CH_2), 1.75-1.95 (br, 4H; CH_2), 3.68 (t, J =10.5 Hz, 4H; CH), 4.72 (s, 2H; CH_2), 7.26 (d, J =8.7 Hz, 1H; CH), 7.71 (dd, J =8.0, 8.0 Hz, 1H; CH), 8.27 (d, J =8.7 Hz, 1H; CH), 8.4 (d, J =8.0 Hz, 1H; CH), 8.54 (d, J =8.0 Hz, 1H; CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =25.3, 27.7, 27.8, 41.8, 54.8, 111.6, 113.3, 122.6, 124.5, 125.1, 131.3, 131.8, 132.7, 133.6, 156.4, 163.3, 164.4, 170.6;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 366.16 , 實驗值 365.0 [M-H]。為方便後續敘述，式(IV-5)之結構統稱為 AONI (4-azacyclooctyl-naphthalimide)。

【0037】 2-1.固相胜肽合成法(接枝一個胺基酸)

【0038】 在合成末端發光團後，以固相胜肽合成法(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)製備水溶性螢光胜肽材料，其中使用的原料為 2-氯三苯甲基氯樹脂(2-chlorotrityl chloride resin)、胺基酸與末端發光團。

【0039】 末端發光團與胺基酸之間的合成方法敘述如下：先將 2-氯三苯甲基氯樹脂(1.2 克，1 毫莫耳)以無水二氯甲烷膨潤 30 分鐘，接著將具有 Fmoc 保護基的第一胺基酸和 N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解，並將此溶液與樹脂反應 1 小時，使第一胺基酸接枝至樹脂上。

【0040】 接著，加入含有 20%哌啶(piperidine)的二甲基甲醯胺溶液，反應 35 分鐘以去除第一胺基酸上的 Fmoc 保護基，

並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)。接著將末端發光團、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升, 5 毫莫耳)與苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluraniunhexafluorophosphate, HBTU)(0.76 克, 2.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應,使末端發光團與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

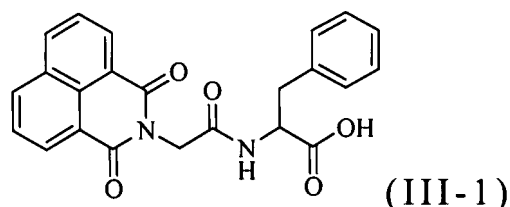
【0041】反應液在攪拌一個晚上後,用 90%三氟乙酸的去離子水溶液反應三小時,以自 2-氯三苯甲基氯樹脂上切下完成的水溶性螢光胜肽材料。再將所得溶液於空氣流中乾燥,並加入乙醚以沉澱目標產物。將沉澱物在真空中乾燥以去除殘留溶液,所得的固體產物即為水溶性螢光胜肽材料。將最後產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR, ^{13}C NMR)進行結構鑑定。請接著參考表二,表二為以不同種類的胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料。

【0042】表二:以不同種類的胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料

實施例	第一胺基酸 (重量, 莫耳數)	末端發光團 (重量, 莫耳數)	產物的結構式 (顏色, 重量)
實施例 1	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.78 克, 2.0 毫莫耳)	NI (0.51 克, 2 毫莫耳)	III-1 (白色固體, 0.14 克)

實施例 2	Fmoc-O-叔丁基-L-酪胺酸(0.92 克, 2.0 毫莫耳)	NI (0.77 克, 3 毫莫耳)	III-2 (黃色固體, 0.14 克)
實施例 3	Fmoc-L-甘胺酸 (0.59 克, 2.0 毫莫耳)	NI (0.77 克, 3 毫莫耳)	III-3 (白色固體, 0.17 克)
實施例 4	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.78 克, 2.0 毫莫耳)	PPNI (1.02 克, 3 毫莫耳)	III-4 (白色固體, 0.18 克)

【0043】 實施例 1 具有下列式(III-1)的結構：



光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.90–3.15 (m, 2H, CH_2), 4.40–4.50 (m, 1H, CH), 4.73 (s, 2H, CH_2), 7.20–7.40 (m, 5H, CH), 7.94 (t, 2H, CH), 8.50–8.60 (m, 4H, CH), 8.63 (d, 1H, NH).

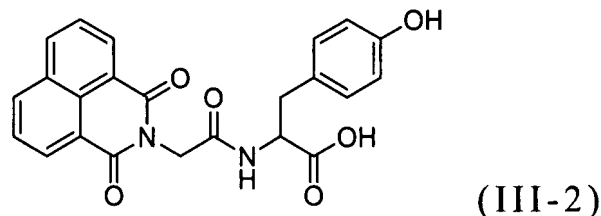
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 38.1, 43.1, 54.9, 122.9, 127.3, 128.2, 128.4, 129.1, 130.2, 131.8, 132.3, 135.5, 135.7, 138.6, 164.1, 167.4;

MS [ESI $^-$]: m/z(%) : 理論值 402.12 , 實驗值

401.0[M-H]⁻.

【0044】 接著請參閱第 4 圖，第 4 圖繪示式(III-1)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞礪與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。在實驗例 401、402、403、404、405、406、407、408、409、410 與 411 中，水分別佔共溶劑總體積之 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 與 100%。由第 4 圖得知，式(III-1)之水溶性螢光胜肽材料在實驗例 401-408 中的共溶劑中的螢光強度非常低，而不會產生明顯的螢光標記，此時難以肉眼觀察到明顯螢光。但當水所佔的體積比例增加至 80% (實驗例 409)與 90% (實驗例 410)時，螢光強度明顯上升至 50 螢光單位與 100 螢光單位，此時開始能觀察到微弱的螢光。繼續增加水所佔的體積比例增加至 100%，實驗例 411 產生的螢光強度更大幅上升到約 650 螢光單位，而能提供更明顯的標記效果。藉此能得知式(III-1)之水溶性螢光胜肽材料會隨著水比例的增加提升亮度，其具有聚集誘導發光現象。此外，式(III-1)之水溶性螢光胜肽材料的放光波長約為 400 奈米，因此觀察到的螢光顏色為藍紫色。

【0045】 實施例 2 具有下列式(III-2)的結構：



光譜資訊如下：

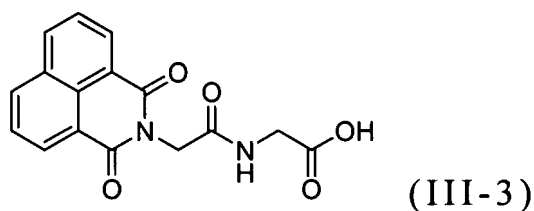
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.75–3.10 (m, 2H,

CH₂), 4.30–4.45 (m, 1H, CH), 4.73 (s, 1H, CH₂), 6.72 (d, J = 7.8 Hz, 2H, CH), 7.06 (d, J = 7.8 Hz, 2H, CH), 7.92 (t, J = 7.65 Hz, 2H, CH), 8.40–8.70 (m, 5H, CH, NH), 9.10–9.40 (br, 1H, OH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 37.1, 43.0, 55.0, 116.0, 122.8, 128.2, 128.3, 128.4, 131.1, 131.8, 132.3, 135.5, 156.9, 164.1, 167.5, 173.8;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 418.12, 實驗值 417.1 [M-H]⁻.

【0046】 實施例 3 具有下列式(III-3)的結構：



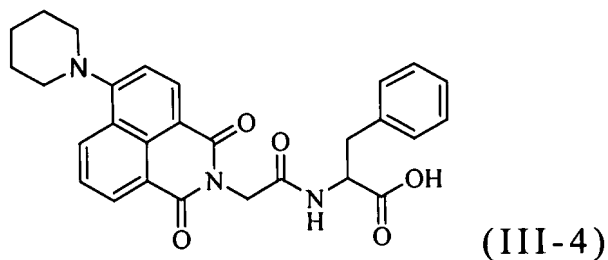
光譜資訊如下：

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.83 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 4.76 (s, 2H, CH₂), 7.94 (t, J = 10.4 Hz, 2H, CH), 8.50–8.65 (m, 5H, CH, NH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 41.6, 43.1, 122.9, 128.2, 128.5, 131.8, 132.3, 135.5, 164.2, 168.0, 172.0;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 312.07, 實驗值 310.90 [M-H]⁻.

【0047】 實施例 4 具有下列式(III-4)的結構：



光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.60–1.80 (m, 2H; CH_2), 1.80–1.95 (m, 4H; CH_2), 2.90–3.15 (m, 2H; CH_2), 3.15–3.30 (m, 4H; CH_2), 4.40–4.55 (m, 1H; CH), 4.699 (s, 2H; CH_2), 7.20–7.40 (m, 5H; CH), 7.84 (t, J = 7.95 Hz, 1H; CH), 8.35–8.55 (m, 3H; CH), 8.61 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 24.8, 26.6, 37.8, 42.8, 54.6, 54.9, 115.8, 115.9, 123.3, 126.4, 126.8, 127.4, 129.1, 130.16, 130.24, 131.6, 131.7, 133.3, 138.3, 157.8, 163.7, 164.3, 167.7, 173.6;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 485.53 , 實驗值 484.1 [M-H] $^-$.

【0048】 2-2.固相胜肽合成法(接枝兩個胺基酸)

【0049】 在接枝兩個胺基酸的實施方式中，先將 2-氯三苯甲基氯樹脂(1.2 克，1 毫莫耳)以無水二氯甲烷膨潤 30 分鐘，接著將具有 Fmoc 保護基的第一胺基酸和 N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解，並將此溶液與樹脂反應 1 小時，使第一胺基酸接枝至樹脂上。接著，加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液，反應 20 分鐘以去除第一胺基酸上的 Fmoc 保護基，並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)。然後將具有 Fmoc 保護基的第二胺基

酸、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)與 HBTU (0.76 克，2.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應 30 分鐘，使第二胺基酸與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

【0050】接著，再加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液反應 20 分鐘，並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)以再度去除第二胺基酸上的 Fmoc 保護基。之後將末端發光團、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)與 HBTU (0.76 克，2.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑，使末端發光團與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

【0051】反應液在攪拌一個晚上後，用 90 %三氟乙酸的去離子水溶液反應三小時，以自 2-氯三苯甲基氯樹脂上切下完成的水溶性螢光胜肽材料。再將所得溶液於空氣流中乾燥，並加入乙醚以沉澱目標產物。沉澱物在真空中乾燥以去除殘留溶液，所得的固體產物即為水溶性螢光胜肽材料。將所得之產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR, ^{13}C NMR)進行結構鑑定。請接著參考表三，表三為以兩個胺基酸基團與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料。

【0052】表三：以兩個胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料

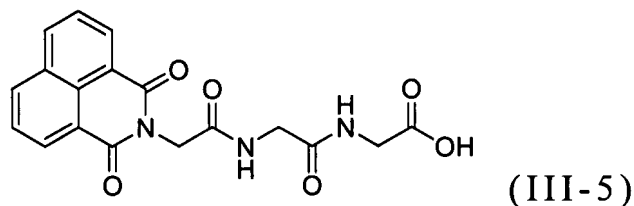
實施例	第一胺基酸 (重量，莫耳 數)	第二胺基酸 (重量，莫耳 數)	末端發光團 (重量，莫耳 數)	產物的結構式 (顏色，重量)

實施例 5	Fmoc-L-甘 胺酸 (0.59 克, 2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘 胺酸 (0.59 克, 2.0 毫莫耳)	NI (0.51 克, 2.0 毫莫耳)	III-5 (白色固體, 0.35g)
實施例 6	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (1.16 克, 3.0 毫莫耳)	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (1.55 克, 4.0 毫莫耳)	NI (1.53 克, 6.0 毫莫耳)	III-6 (白色固體, 0.35g)
實施例 7	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (1.16 克, 3.0 毫莫耳)	Fmoc-L-酪 胺酸 (1.84 克, 4.0 毫莫耳)	NI (1.53 克, 6.0 毫莫耳)	III-7 (白色固體, 1.06g)
實施例 8	Fmoc-L-酪 胺酸 (1.38 克, 3.0 毫莫耳)	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (1.55 克, 4.0 毫莫耳)	NI (1.53 克, 6.0 毫莫耳)	III-8 (白色固體, 1.15g)
實施例 9	Fmoc-L-酪 胺酸 (0.919 克, 2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-酪 胺酸 (0.919 克, 2.0 毫莫耳)	NI (0.51 克, 2.0 毫莫耳)	III-9 (淡黃色固體, 0.32 克)
實施例 10	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (1.16 克, 3.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘 胺酸 (1.19 克, 4.0 毫莫耳)	NI (1.53 克, 6.0 毫莫耳)	III-10 (白色固體, 0.48g)

實施例 11	Fmoc-L-甘 胺酸 (0.89 克, 3.0 毫莫耳)	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (1.55 克, 4.0 毫莫耳)	NI (1.53 克, 6.0 毫莫耳)	III-11 (白色固體, 0.38 克)
實施例 12	Fmoc-L-甘 胺酸 (0.4 克, 1.3 毫莫耳)	Fmoc-O-叔 丁基-L-酪胺 酸 (0.61 克, 1.3 毫莫耳)	NI (0.35 克, 1.3 毫莫耳)	III-12 (白色固體, 0.22 克)
實施例 13	Fmoc-O-叔 丁基-L-酪胺 酸 (0.92 克, 2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘 胺酸 (0.6 克, 2.0 毫莫耳)	NI (0.77 克, 3.0 毫莫耳)	III-13 (白色固體, 0.18 克)
實施例 14	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	PPN I(0.51 克, 1.5 毫莫耳)	III-14 (黃色固體, 0.515 克)
實施例 15	Fmoc-L-苯 丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-酪 胺酸 (0.69 克, 1.5 毫莫耳)	PPN I(0.51 克, 1.5 毫莫耳)	III-15 (黃色固體, 0.534 克)
實施例 16	Fmoc-L-天 門冬胺酸	Fmoc-L-天 門冬胺酸	PPNI (0.677 克,	III-16 (深棕色固體,

	(0.62 克, 1.5 毫莫耳)	(0.62 克, 1.5 毫莫耳)	2.0 毫莫耳)	0.376 克)
實施例 17	Fmoc-L-天門冬胺酸 (0.62 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	PPNI (0.677 克, 2.0 毫莫耳)	III-17 (黃色固體, 0.554 克)
實施例 18	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	PRNI (0.486 克, 1.5 毫莫耳)	III-18 (橘色固體, 0.434 克)
實施例 19	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	AHNI (0.528 克, 1.5 毫莫耳)	III-19 (黃色固體, 0.611 克)
實施例 20	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.29 克, 0.75 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.29 克, 0.75 毫莫耳)	AONI (0.366 克, 1 毫莫耳)	III-20 (黃色固體, 0.248 克)
實施例 21	Fmoc-L-谷胺酸 (0.425 克, 1.000 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.387 克, 1.000 毫莫耳)	PPN I(0.507 克, 1.500 毫莫耳)	III-21 (黃色固體, 0.230 克)

【0053】 實施例 5 具有下列式(III-5)的結構：



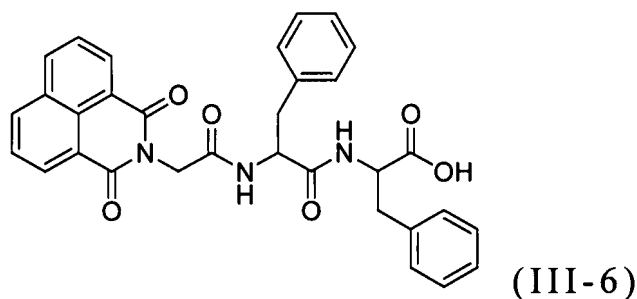
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.75-3.85 (m, 4H; CH₂), 4.783 (s, 1H; CH₂), 7.94 (t, J = 7.8 Hz, 2H; CH), 8.24 (t, J = 5.7 Hz, 1H; NH), 8.50-8.65 (m, 5H; CH, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 41.5, 42.7, 43.3, 122.9, 128.3, 131.8, 135.5, 164.3, 168.1, 170.0, 172.1;

MS [ESI⁻]: m/z (%) : 理論值 369.10 , 實驗值 367.9 [M-H]⁻.

【0054】 實施例 6 具有下列式(III-6)的結構：



光譜資訊如下：

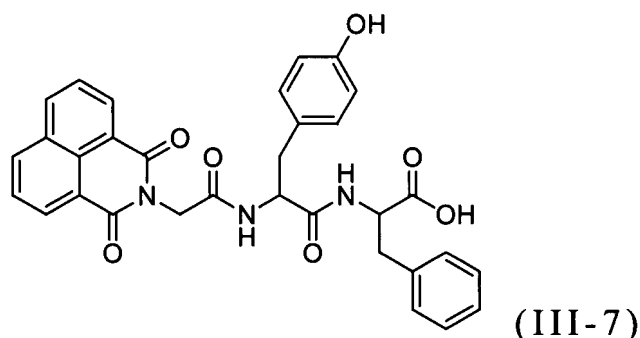
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.75-3.15 (m, 4H; CH₂), 4.40-4.50 (m, 1H; CH), 4.55-4.65 (m, 1H; CH), 4.688 (s, 2H; CH₂), 7.20-7.35 (m, 10H; CH), 7.90-8.00 (t, J = 7.8 Hz, 2H; CH), 8.38 (d, J = 8.1 Hz, 1H; NH), 8.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H; NH), 8.54 (d, J = 7.5 Hz, 4H; CH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 37.7, 38.5, 43.1,

54.6, 122.8, 127.1, 127.4, 128.2, 128.4, 128.9, 129.1, 130.0, 130.2, 131.8, 132.3, 135.4, 138.3, 138.5, 164.1, 167.3, 171.8, 173.6;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 549.19 , 實驗值 548.1 [M-H]⁻.

【0055】 實施例 7 具有下列式(III-7)的結構 :



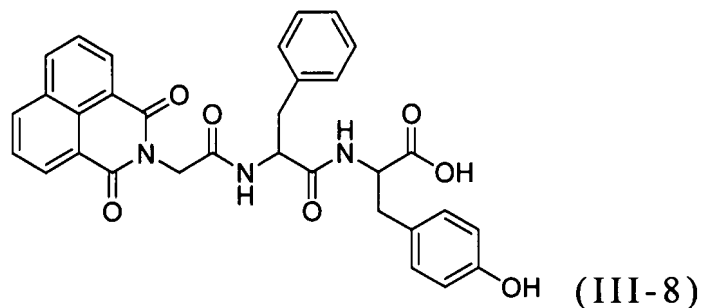
光譜資訊如下 :

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.60-3.15 (m, 4H; CH₂), 4.40-4.55 (m, 2H; CH), 4.693 (s, 2H; CH₂), 6.68 (d, J = 8.1 Hz, 2H; CH), 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H; CH), 7.15-7.40 (m, 5H; CH), 7.3 (t, J=7.65 Hz, 2H; CH), 8.33 (d, J = 7.5 Hz, 1H; NH), 8.42 (d, J = 8.4 Hz, 1H; NH), 8.53 (d, J = 8.1 Hz, 4H; CH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 37.7, 43.1, 54.5, 55.0, 115.8, 122.9, 127.4, 128.2, 128.4, 128.6, 129.2, 130.1, 131.1, 131.8, 132.3, 135.5, 138.4, 156.7, 164.1, 167.3, 171.9, 173.6;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 565.18 , 實驗值 564.22 [M-H]⁻.

【0056】 實施例 8 具有下列式(III-8)的結構：



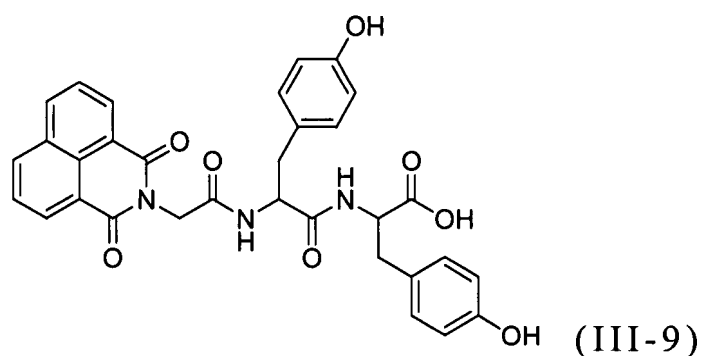
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.75-3.10 (m, 4H; CH_2), 4.35-4.45 (m, 1H; CH), 4.55-4.65 (m, 1H; CH), 4.694 (s, 2H; CH_2), 6.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H; CH), 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 2H; CH), 7.20-7.35 (m, 5H; CH), 7.92 (t, J =7.65 Hz, 2H; CH), 8.29 (d, J = 7.5 Hz, 1H; NH), 8.45-8.55 (m, 5H; CH, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 40.0, 38.5, 43.1, 54.6, 54.9, 116.0, 122.8, 127.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.9, 130.2, 131.0, 131.8, 132.3, 135.5, 138.6, 156.9, 164.1, 167.4, 171.8, 173.7;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 565.18 , 實驗值 564.2
[M-H] $^-$.

【0057】 實施例 9 具有下列式(III-9)的結構：



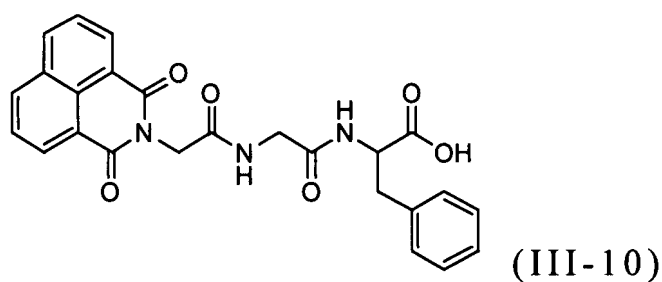
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =2.60-3.15 (m, 4H; CH_2), 4.30-4.40 (m, 1H; CH), 4.40-4.55 (m, 1H; CH), 2.70-2.90 (m, 1H; CH_2), 4.697 (s, 2H; CH_2), 6.60-6.75 (m, 4H; CH), 7.00-7.15(m, 4H; CH), 7.94 (t, J =7.8 Hz, 2H; CH), 8.21 (d, J =6.9 Hz, 1H; NH), 8.43 (d, J =8.4 Hz, 1H; NH), 8.54 (d, J =7.8 Hz, 4H; CH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 37.0, 37.7, 43.2, 55.0, 115.8, 116.0, 122.9, 128.2, 128.4, 128.7, 131.0, 131.2, 131.8, 132.3, 135.5, 156.7, 156.9, 164.2, 167.3, 171.9, 173.8;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 581.1 , 實驗值 580.5 [M-H] $^-$.

【0058】 實施例 10 具有下列式(III-10)的結構：



光譜資訊如下：

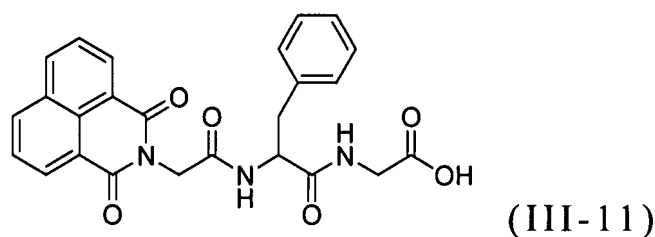
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =2.85-3.00 (m, 1H; CH_2), 3.00-3.15 (m, 1H; CH_2), 3.65-3.90 (m, 2H; CH_2), 4.35-4.55 (m, 1H; CH), 4.70-4.80 (m, 2H; CH_2), 7.20-7.35 (m, 5H; CH), 7.94 (t, J = 7.65 Hz, 1H; CH), 8.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H; NH), 8.50-8.60 (m, 5H; CH, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 37.9, 43.3, 54.5, 122.9, 127.4, 128.2, 128.5, 129.2, 130.1, 131.8, 132.3, 135.5, 138.4, 164.3, 168.0, 169.5, 173.7$;

MS [ESI $^-$]: m/z(%): 理論值 459.14, 實驗值 458.4 [M-H] $^-$.

【0059】 接著請參閱第 5 圖，第 5 圖繪示本發明式(III-10)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。實驗例 510、520、530、540、550、560、570、580 分別將式(III-10)的水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、4、3 的環境中測試。在實驗例 510-560 中，水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 10-5 的環境中，由第 5 圖得知此時有一個吸收波峰在 400 奈米附近，而另一吸收波峰在 500 奈米附近，此時觀察到的螢光顏色為紫光與綠光的混合光。然而，再降低 pH 值至 4(實驗例 570)與 3(實驗例 580)時，只剩下位於 400 奈米附近的吸收波峰，此時觀察到的螢光顏色會接近紫色。因此，式(III-10)的水溶性螢光胜肽材料可藉由顏色上變化以探測並標記酸性細胞之位置。

【0060】 實施例 11 具有下列式(III-11)的結構：



光譜資訊如下：

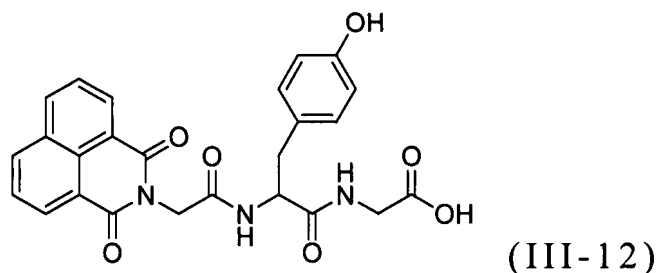
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2.75-2.90$ (m, 1H;

CH₂), 3.00-3.10 (m, 1H; CH₂), 3.80-3.90 (m, 2H; CH₂), 4.50-4.65 (m, 1H; CH), 4.65-4.75 (m, 2H; CH₂), 7.20-7.35 (m, 5H; CH), 7.94 (t, J = 7.8 Hz, 2H; CH), 8.46 (t, J = 5.85 Hz, 1H; NH), 8.54 (d, J = 7.8 Hz, 4H; CH), 8.60 (d, J = 8.1 Hz, 1H; NH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 38.8, 41.6, 43.1, 54.8, 122.8, 127.2, 128.2, 128.3, 129.0, 130.2, 131.8, 132.2, 135.4, 138.7, 164.1, 167.5, 172.0, 172.3;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 459.14 , 實驗值 458.1 [M-H]⁻.

【0061】 實施例 12 具有下列式(III-12)的結構 :



光譜資訊如下 :

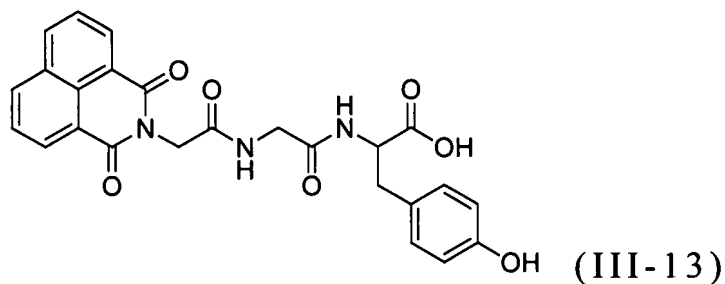
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.65-2.80 (m, 1H; CH₂), 2.90-3.00 (m, 1H; CH₂), 3.75-3.85 (m, 2H; CH₂), 4.40-4.55 (m, 1H; CH₂), 4.713 (s, 2H; CH₂), 6.69 (d, J = 8.1 Hz, 2H; CH), 7.08 (d, J = 8.1 Hz, 2H; CH), 7.92 (t, J = 7.8 Hz, 2H; CH), 8.4 (d, J = 5.4 Hz, 1H; NH), 8.52 (d, J = 7.2 Hz, 4H; CH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 38.0, 43.2, 55.2, 115.8, 122.9, 128.2, 128.4, 128.7, 131.1, 131.8, 132.3, 135.5,

156.7, 164.2, 167.4, 172.1, 172.4;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 475.14 , 實驗值 474.0
[M-H]⁻.

【0062】 實施例 13 具有下列式(III-13)的結構 :



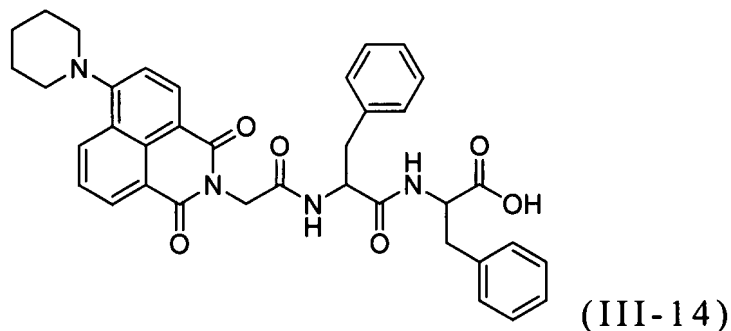
光譜資訊如下 :

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.75-2.85 (m, 1H; CH₂), 2.90-3.05 (m, 1H; CH₂), 3.65-3.90 (m, 2H; CH₂), 4.30-4.45 (m, 1H; CH), 4.76 (d, J = 3.0 Hz, 2H; CH₂), 6.68 (d, J = 8.1 Hz, 2H; CH), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H; CH), 7.94 (t, J = 7.8 Hz, 2H; CH), 8.10 (d, J = 7.8 Hz, 1H; NH), 8.50-8.65 (m, 4H; CH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 37.1, 42.6, 43.3, 54.8, 116.0, 122.9, 128.2, 128.3, 128.36, 128.43, 131.0, 131.8, 132.0, 132.3, 135.5, 135.8, 156.9, 164.0, 164.3, 168.0, 169.4, 170.3, 173.8;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 475.14 , 實驗值 474.0
[M-H]⁻.

【0063】 實施例 14 具有下列式(III-14)的結構 :



光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.60-1.80 (br, 2H; CH_2), 1.80-1.95 (br, 4H; CH_2), 2.70-3.20 (m, 4H, CH_2), 3.23 (s, 4H; CH_2), 4.40-4.55 (m, 1H; CH), 4.55-4.75 (m, 2H; CH, CH_2), 7.15-7.45 (m, 11H; CH), 7.82 (dd, J =6.9, 6.9 Hz, 1H; CH), 8.35-8.60 (m, 5H; CH, NH);

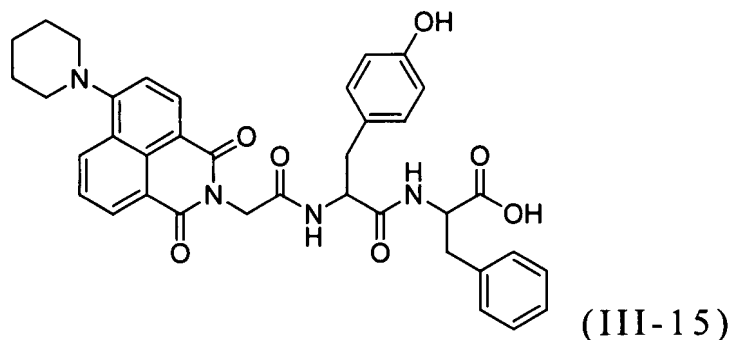
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =24.8, 26.7, 37.7, 38.5, 43.0, 46.2, 54.5, 54.9, 111.5, 115.75, 115.85, 123.3, 126.4, 126.8, 127.2, 127.4, 128.9, 129.2, 130.1, 130.3, 131.6, 133.3, 138.3, 138.6, 157.8, 163.7, 164.3, 167.5, 171.9, 173.6;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 632.26 , 實驗值 631.1 [M-H] $^-$.

【0064】 接著請參閱第 6 圖，第 6 圖繪示式(III-14)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之甘油與甲醇之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。在實驗例 601、602、603、604、605、606、607、608、609 與 610 中，甲醇分別佔共溶劑總體積之 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90%。如第 6 圖所示，式(III-14)之水溶性螢光胜肽材料在實驗例 610 時，能具有最大的發光強度，而能提供更明顯的標記效果。

藉此能得知式(III-14)之水溶性螢光胜肽材料可隨著甲醇比例的增加提升亮度，其在甲醇中同樣具有聚集誘導發光現象。此外，式(III-14)之水溶性螢光胜肽材料的放光波長約為 550 奈米，因此觀察到的螢光顏色為綠色。

【0065】 實施例 15 具有下列式(III-15)的結構：



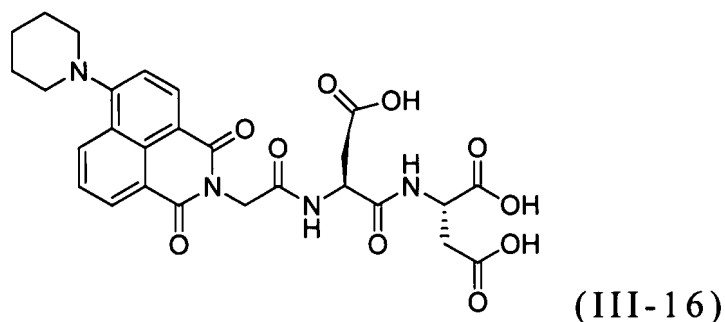
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.65-1.80 (br, 2H; CH_2), 1.80-2.00 (br, 4H; CH_2), 2.60-3.15 (m, 4H; CH_2), 3.20-3.30 (br, 4H; CH_2), 4.40-4.60 (m, 2H; CH), 4.66 (s, 2H; CH_2), 6.67 (d, J =8.4 Hz, 2H; CH), 7.06 (d, J =8.4 Hz, 2H; CH), 7.15-7.35 (m, 5H; CH), 7.37 (d, J =8.1, 1H; CH), 7.86 (dd, J =7.5, 8.4, 1H; CH), 8.30-8.55 (m, 5H; CH, NH), 9.20 (s, 1H; OH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =23.9, 25.7, 36.8, 42.0, 53.6, 54.0, 105.6, 114.8, 115.0, 122.4, 125.5, 125.9, 126.4, 127.7, 128.2, 129.1, 129.3, 130.2, 130.7, 132.4, 137.4, 155.7, 156.9, 162.8, 163.4, 166.5, 171.0, 172.7;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 648.26 , 實驗值 647.1 [M-H] $^-$.

【0066】 實施例 16 具有下列式(III-16)的結構：



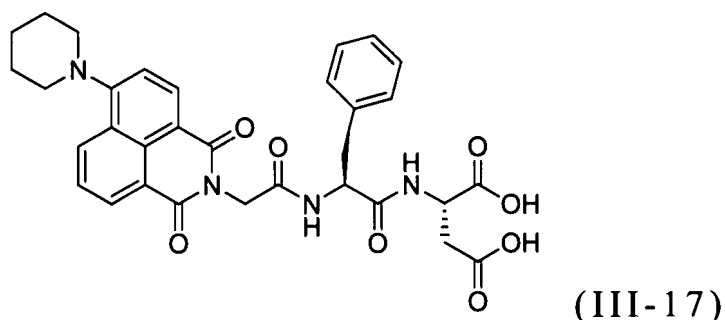
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.65-1.75 (br, 2H; CH₂), 1.80-1.95 (br, 4H; CH₂), 2.60-2.80 (m, Hz, 4H; CH₂), 3.20-3.35 (br, 4H; CH₂), 4.55-4.65 (m, 1H; CH), 4.65-4.75 (m, 3H; CH₂), 7.37 (d, J =8.1 Hz 1H; CH), 7.86 (t, J =7.8 Hz, 1H; CH), 8.11 (d, J =8.1 Hz, 1H; NH), 8.42 (d, J =8.1 Hz, 1H; CH), 8.49 (t, J =8.4 Hz, 2H; CH), 8.62 (d, J =7.8 Hz, 1H; NH) ;

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =23.9, 25.8, 36.0, 36.4, 42.2, 48.7, 49.4, 54.0, 114.8, 114.9, 122.4, 125.5, 125.8, 129.4, 130.8, 130.9, 132.5, 157.0, 163.0, 163.5, 167.1, 170.4, 171.6, 171.7, 172.2;

MS [ESI⁻]: m/z (%) : 理論值 568.18 , 實驗值 567.0 [M-H]⁻.

【0067】 實施例 17 具有下列式(III-17)的結構：



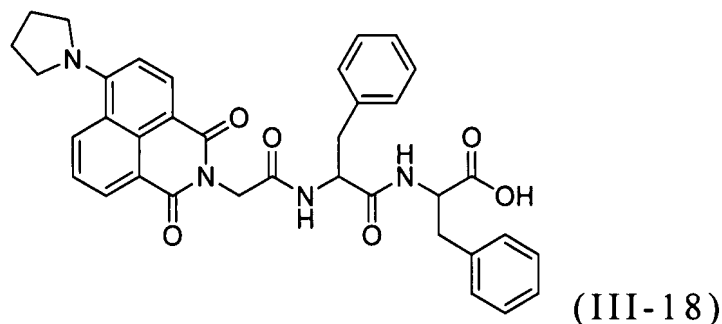
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.65-1.75 (br, 2H; CH_2), 1.80-1.90 (br, 4H; CH_2), 2.55-3.10 (m, 4H; CH_2), 3.20-3.30 (br, 4H; CH_2), 4.55-4.65 (m, 2H; CH), 4.67 (s, 2H; CH_2), 7.20-7.25 (m, 1H; CH), 7.25-7.35 (m, J =6.0 Hz, 4H; CH_2), 7.36 (d, J =8.1 Hz, 1H; CH), 7.86 (t, J =7.95 Hz, 1H; CH), 8.41 (d, J =8.4 Hz, 1H; CH), 8.48 (t, J =7.2 Hz, 4H; CH) ;

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =23.9, 25.7, 36.0, 37.8, 42.0, 48.7, 53.7, 54.0, 114.8, 114.9, 122.4, 125.5, 125.9, 126.3, 128.0, 129.3, 129.4, 130.7, 130.8, 132.4, 137.6, 156.9, 162.8, 163.4, 166.6, 170.9, 171.6, 172.3;

MS [ESI]: m/z (%) : 理論值 600.22 , 實驗值 599.0
[M-H] $^-$.

【0068】 實施例 18 具有下列式(III-18)的結構：



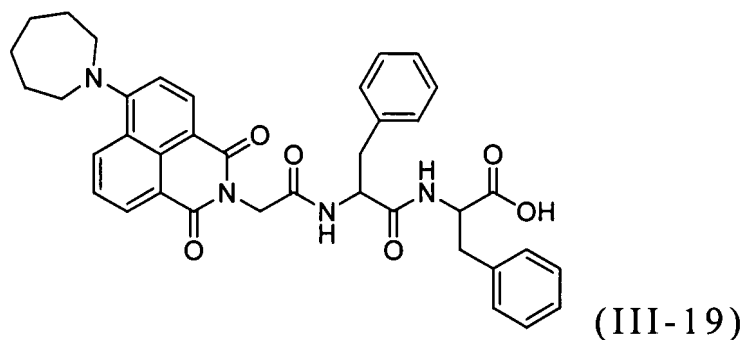
光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.95-2.10 (br, 4H; CH_2), 2.75-3.20 (m, 4H; CH_2), 3.70-3.90 (br, 4H; CH_2), 4.40-4.55 (m, 1H; CH), 4.55-4.80 (m, 3H; CH, CH_2), 6.89 (d, J =7.8 Hz, 1H; CH), 7.15-7.45 (m, 10H; CH), 7.63 (dd, J =8.0, 8.0 Hz, 1H; CH), 8.23 (d, J =8.0 Hz, 1H; CH), 8.35-8.50 (m, 4H; CH, NH), 8.76 (d, J =8.0 Hz, 1H; CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =26.5, 37.7, 38.5, 42.8, 53.8, 54.6, 109.4, 109.5, 122.3, 122.7, 124.1, 127.2, 127.4, 129.0, 129.2, 130.1, 130.3, 131.6, 133.7, 133.9, 138.3, 138.6, 151.4, 153.2, 163.5, 164.6, 167.8, 171.9, 173.6;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 618.25 , 實驗值 617.1 [M-H] $^-$.

【0069】 實施例 19 具有下列式(III-19)的結構 :



光譜資訊如下 :

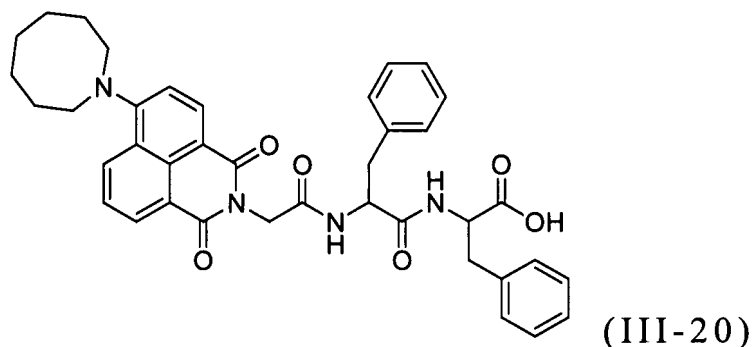
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.65-1.80 (br, 4H; CH_2), 1.80-2.00 (br, 4H; CH_2), 2.70-3.20 (m, 4H; CH_2), 3.60-3.75 (br, 4H; CH), 4.40-4.55 (m, 1H; CH), 4.55-4.65 (br, 1H; CH), 4.66 (s, 2H; CH_2), 7.20-7.40 (m, 11H; CH), 7.77 (dd, J =7.5, 8.4 Hz, 1H; CH), 8.30-8.50 (m, 4H; NH, CH),

8.56 (d, J=8.4 Hz, 1H; CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ =27.1, 28.2, 28.7, 37.7, 38.5, 54.5, 55.7, 58.8, 106.5, 113.0, 114.0, 123.0, 125.1, 127.2, 127.4, 128.9, 129.2, 130.1, 130.3, 131.6, 133.3, 138.3, 138.6, 157.9, 161.8, 163.6, 164.5, 167.6, 167.8, 171.9, 173.6;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 646.28 , 實驗值 645.1 [M-H]⁻.

【0070】 實施例 20 具有下列式(III-20)的結構 :



光譜資訊如下 :

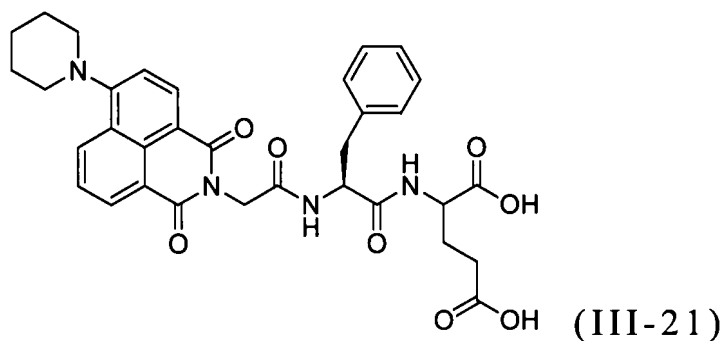
^1H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ =1.60-1.80 (br, 6H; CH₂), 1.80-2.00 (br, 4H; CH₂), 2.70-3.20 (m, 4H; CH₂), 3.74 (s, 4H; CH), 4.40-4.50 (m, 1H; CH), 4.50-4.70 (m, 3H; CH, CH₂), 7.15-7.45 (m, 11H; CH), 7.65-7.85 (br, 1H; CH), 8.31 (d, J=8.7 Hz, 1H; CH), 8.35-8.55 (m, 3H; CH, NH), 8.61 (d, J=7.5 Hz, 1H; CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ =25.3, 27.7, 27.8, 37.7, 38.5, 42.8, 54.5, 54.8, 73.0, 112.3, 113.6, 123.1, 124.7, 125.2, 127.0, 127.2, 127.4, 128.9, 129.2, 130.1, 130.3, 131.3,

131.6, 132.4, 133.4, 138.3, 138.6, 162.8, 164.5, 167.6, 171.8, 173.6;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 660.29 , 實驗值 659.2
[M-H]⁻.

【0071】 實施例 21 具有下列式(III-21)的結構 :



光譜資訊如下 :

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.65-1.75 (br, 2H; CH₂), 1.80-1.90 (br, 4H; CH₂), 1.95-2.05 (q, *J*=8.6 Hz, 2H; CH₂), 2.25-2.35 (t, *J*=7.3 Hz, 2H; CH₂), 2.75-2.85 (m, 1H; CH₂), 3.05-3.15 (m, 1H; CH₂), 3.20-3.30 (br, 4H; CH₂), 4.20-4.30 (q, *J*=9.4 Hz, 1H; CH), 4.50-4.60 (q, *J*=9.8 Hz, 1H; CH), 4.60-4.70 (s, 2H; CH₂), 7.20-7.25 (m, 1H; CH), 7.25-7.35 (m, *J*=6.0 Hz, 4H; CH), 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1H; NH), 7.85 (t, *J*=7.5 Hz, 1H; CH), 8.25 (d, *J*=7.5 Hz, 1H; NH), 8.4 (d, *J*=8.1 Hz, 1H; NH), 8.5 (t, *J*=7.2 Hz, 3H; CH);

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=24.3, 26.1, 26.8, 30.5, 37.8, 42.0, 42.5, 51.8, 54.2, 54.4, 115.2, 115.3, 122.8, 125.8, 126.2, 126.7, 128.5, 129.7, 131.1, 132.8, 138.2, 157.3, 163.3, 163.9, 167.2, 171.5, 173.5, 174.2;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 614.65, 實驗值 613.10
[M-H]⁻.

【0072】 請參閱第 7 圖, 第 7 圖繪示本發明式(III-21)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。實驗例 710、720、730、740、750、760、770、780 分別將式(III-21)的水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、4、3 的環境中測試。在實驗例 710-750 中, 水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 10-6 的環境中, 由第 7 圖得知此時此時螢光強度非常低, 而不會產生明顯的螢光標記。當酸性環境的 pH 值降到 5(實驗例 760)時, 水溶性螢光胜肽材料產生的螢光強度明顯驟升, 此時的吸收光波長約為 550 奈米, 因此能觀察到螢光顏色為綠色。再降低 pH 值至 4 時, 實驗例 770 產生的螢光強度更大幅上升, 而降低 pH 值至 3 時, 實驗例 780 產生的螢光強度又大幅下降。由此可得知式(III-21)之水溶性螢光胜肽材料在 pH 值為 4 時可達到最高的螢光強度。

【0073】 2-3.固相胜肽合成法(接枝三個胺基酸)

【0074】 在接枝三個胺基酸的實施方式中, 先將 2-氯三苯甲基氯樹脂(1.2 克, 1 毫莫耳)以無水二氯甲烷膨潤 30 分鐘。接著將具有 Fmoc 保護基的第一胺基酸和 N,N-二異丙基乙基胺(0.62 毫升, 3.75 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解, 並將此溶液與樹脂反應 30 分鐘, 使第一胺基酸接枝至樹脂上。接著, 加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液, 反應 20 分鐘以去除第一胺基酸上的 Fmoc 保護基, 並重複

此步驟兩次(每次 2 分鐘)。接著將具有 Fmoc 保護基的第二胺基酸、N,N-二異丙基乙基胺(0.6225 毫升, 3.75 毫莫耳)與 HBTU(0.57 克, 1.5 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應 30 分鐘, 使第二胺基酸與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

【0075】 接著, 再加入含有 20% 吡啶的二甲基甲醯胺溶液反應 20 分鐘, 並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)以再度第二胺去除第二胺基酸上的 Fmoc 保護基。更將具有 Fmoc 保護基的第三胺基酸、N,N-二異丙基乙基胺(0.6225 毫升, 3.75 毫莫耳)與 HBTU(0.57 克, 1.5 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應 30 分鐘, 使第三胺基酸與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

【0076】 最後, 再加入含有 20% 吡啶的二甲基甲醯胺溶液反應 20 分鐘, 並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)以再度去除第三胺基酸上的 Fmoc 保護基。並將末端發光團、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升, 5.0 毫莫耳)與 HBTU (0.76 克, 2.0 毫莫耳) 以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑, 使末端發光團與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

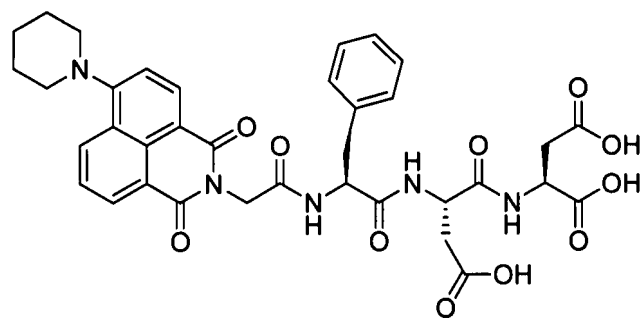
【0077】 反應液在攪拌一個晚上後, 用 90 % 三氟乙酸的去離子水溶液反應三小時, 以自 2-氯三苯甲基氯樹脂上切下完成的水溶性螢光胜肽材料。再將所得溶液於空氣流中乾燥, 並加入乙醚以沉澱目標產物。沉澱物在真空中乾燥以

去除殘留溶液，所得的固體產物即為水溶性螢光胜肽材料。將所得之產物利用核磁共振光譜儀(^1H NMR, ^{13}C NMR)進行結構鑑定。請接著參考表四，表四為以三個胺基酸基團與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料。

【0078】 表四：以三個胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料

實施例	第一胺基酸 (重量, 莫耳數)	第二胺基酸 (重量, 莫耳數)	第三胺基酸 (重量, 莫耳數)	末端發光團 (重量, 莫耳數)	產物的結構式 (顏色, 重量)
實施例 22	Fmoc-L-天門冬胺酸 (0.62 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-天門冬胺酸 (0.62 克, 1.5 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.58 克, 1.5 毫莫耳)	PPNI (0.677 克, 2.0 毫莫耳)	III-22 (橘色固體, 0.554 克)
實施例 23	Fmoc-L-谷胺酸 (0.425 克, 1.000 毫莫耳)	Fmoc-L-天門冬胺酸 (0.414 克, 1.000 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.387 克, 1.000 毫莫耳)	PPNI (0.4365 克, 1.000 毫莫耳)	III-23 (黃色固體, 0.310 克)

【0079】 實施例 22 具有下列式(III-22)的結構：



(III-22)

光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.65-1.75 (br, 2H; CH_2), 1.85-1.95 (br, 4H; CH_2), 2.60-3.10 (m, 6H; CH_2), 3.20-3.30 (br, 4H; CH_2), 4.50-4.60 (m, 2H; CH), 4.67 (s, 3H; CH_2), 7.20-7.25 (m, 1H; CH), 7.25-7.35 (m, 4H; CH), 7.36 (d, J =8.1 Hz, 1H; CH), 7.85 (t, J =7.8 Hz, 1H; CH), 8.05 (d, J =8.1 Hz, 1H; NH), 8.41 (d, J =8.4 Hz, 1H; NH), 8.45-8.55 (m, 4H; CH);

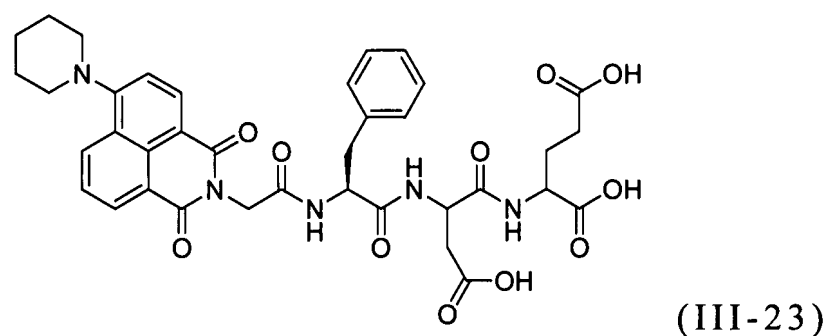
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =23.9, 25.7, 35.9, 36.1, 37.6, 42.1, 48.6, 49.4, 53.9, 54.0, 114.8, 114.9, 122.4, 125.5, 125.8, 126.2, 128.0, 129.3, 130.7, 132.4, 137.8, 156.9, 162.8, 163.4, 166.8, 170.3, 171.1, 171.6, 171.7, 172.1, 181.0;

MS [ESI $^-$]: m/z (%) : 理論值 715.25 , 實驗值 714.2
[M-H] $^-$. [M-H] $^-$.

【0080】 接著請參閱第 8 圖，第 8 圖繪示本發明式(III-22)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。實驗例 810、820、830、840、850、860、870、880 分別將式(III-22)的水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、4、3 的環境中測試。在實驗例 810-850

中，水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 10-6 的環境中，由第 8 圖得知此時此時螢光強度非常低，而不會產生明顯的螢光標記。當酸性環境的 pH 值降到 5 時(實驗例 860)，水溶性螢光胜肽材料產生的螢光強度明顯驟升，此時的吸收光波長約為 575 奈米，因此能觀察到螢光顏色約為黃色。再降低 pH 值至 4 時，實驗例 870 產生的螢光強度大幅下降，而降低 pH 值至 3 時，實驗例 880 產生的螢光強度略微上升。可得知式(III-22)之水溶性螢光胜肽材料在 pH 值為 5 時可達到最高的螢光強度。且實驗例 860(pH=5)與實驗例 810(pH=10)之間的螢光強度比值約為 90，代表此水溶性螢光胜肽材料具有明顯的發光區間，易於辨識並檢測酸性細胞之位置。

【0081】 實施例 23 具有下列式(III-23)的結構：



光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.65-1.75 (br, 2H; CH_2), 1.80-1.90 (br, 4H; CH_2), 1.95-2.05 (q, J =9.7 Hz, 2H; CH_2), 2.25-2.35, (t, J =4.9 Hz, 2H; CH_2), 2.65-2.75 (m, 3H; CH_2), 2.95-3.15 (m, 1H, CH_2), 3.20-3.30 (br, 4H, CH_2), 4.15-4.25 (q, J =6.9 Hz, 1H; CH), 4.45-4.55 (q, J =12.1 Hz, 2H;

CH), 4.60 (s, 3H; CH₂), 7.15-7.30 (m, 5H; CH), 7.30-7.40 (d, $J=7.8$ Hz, 1H; NH), 7.85 (t, $J=8.1$ Hz, 1H; CH), 7.95 (d, $J=7.5$ Hz, 1H; NH), 8.35 (d, $J=8.1$ Hz, 2H; CH), 8.45-8.55 (t, $J=7.8$ Hz, 3H; CH) ;

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta=24.3, 26.1, 26.7, 36.1, 30.2, 36.4, 38.06, 42.4, 49.9, 51.7, 54.4, 115.2, 115.3, 122.8, 125.8, 126.2, 126.6, 128.4, 129.7, 132.4, 138.2, 157.3, 163.2, 163.8, 167.3, 170.9, 171.5, 172.0, 173.4, 174.2$;

MS [ESI⁻]: $m/z(\%)$: 理論值 729.73, 實驗值 728.30 [M-H]⁻.

【0082】 請參閱第 9 圖，第 9 圖繪示式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞砒與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。在實驗例 901、902、903、904、905、906、907、908、909 與 910 中，甲醇分別佔共溶劑總體積之 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90%。由第 9 圖能得知，式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料在實驗例 910 時，能具有最大的發光強度，而能提供更明顯的標記效果。藉此能得知式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料可隨著水比例的增加提升亮度，其在水中具有聚集誘導發光現象。此外，式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料的放光波長約為 550 奈米，因此觀察到的螢光顏色為綠色。

【0083】 請參閱第 10 圖，第 10 圖繪示本發明式(III-23)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。實驗例 1010、1020、1030、1040、1050、1060、

1070、1080 分別將式(III-23)的水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、4、3 的環境中測試。在實驗例 1010-1050 中，水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 10-6 的環境中，由第 10 圖得知此時此時螢光強度非常低，而不會產生明顯的螢光標記。當酸性環境的 pH 值降到 5(實驗例 1060)時，水溶性螢光胜肽材料產生的螢光強度明顯驟升，此時的吸收光波長約為 525 奈米，因此能觀察到的螢光顏色接近綠色。再降低 pH 值至 4 與 3 時，實驗例 1070 與實驗例 1080 產生的螢光強度更略為上升，除能提供更明顯的標記效果，更能在濃度降低下達到相同的螢光效果，以減少成本。

【0084】 2-4.固相胜肽合成法(接枝四個胺基酸)

【0085】 在接枝四個胺基酸的實施方式中，先將 2-氯三苯甲基氯樹脂(1.2 克，1 毫莫耳)以無水二氯甲烷膨潤 30 分鐘，接著將具有 Fmoc 保護基的第一胺基酸和 N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解，並將此溶液與樹脂反應 1 小時，使第一胺基酸接枝至樹脂上。接著，加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液，反應 20 分鐘以去除第一胺基酸上的 Fmoc 保護基，並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)。

【0086】 將具有 Fmoc 保護基的第二胺基酸、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)與 HBTU(0.76 克，2.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應 30 分鐘，使第二胺基酸與去除 Fmoc

保護基的胺基進行耦合反應。接著，加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液，反應 20 分鐘以去除第二胺基酸上的 Fmoc 保護基，並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)。

【0087】 接著將具有 Fmoc 保護基的第三胺基酸、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)與 HBTU(0.76 克，2.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應 30 分鐘，使第三胺基酸與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。再加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液，反應 20 分鐘以去除第三胺基酸上的 Fmoc 保護基，並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)。

【0088】 再將第四胺基酸、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)與 HBTU(0.76 克，2.0 毫莫耳)以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑反應 30 分鐘，使第四胺基酸與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。最後，再加入含有 20%哌啶的二甲基甲醯胺溶液反應 20 分鐘，並重複此步驟兩次(每次 2 分鐘)以再度去除第四胺基酸上的 Fmoc 保護基。

【0089】 最後將末端發光團、N,N-二異丙基乙基胺(0.83 毫升，5.0 毫莫耳)與 HBTU (0.76 克，2.0 毫莫耳) 以適量無水二甲基甲醯胺溶解並與樹脂反應。藉由 HBTU 作為耦合劑，使末端發光團與去除 Fmoc 保護基的胺基進行耦合反應。

【0090】 反應液在攪拌一個晚上後，用 90%三氟乙酸的去離子水溶液反應三小時，以自 2-氯三苯甲基氯樹脂上切下完

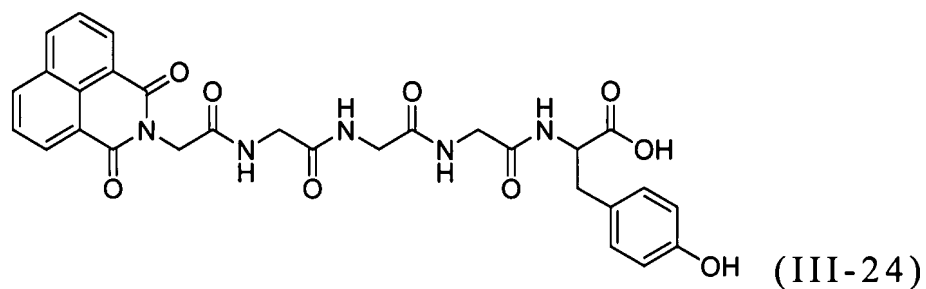
成的水溶性螢光胜肽材料。再將所得溶液於空氣流中乾燥，並加入乙醚以沉澱目標產物。沉澱物在真空中乾燥以去除殘留溶液，所得的固體產物即為水溶性螢光胜肽材料。將所得之產物利用核磁共振光譜儀($^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$)進行結構鑑定。請接著參考表五，表五為以四個胺基酸基團與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料。

【0091】 表四：以四個胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料

實施例	第一胺基酸 (重量，莫耳數)	第二胺基酸 (重量，莫耳數)	第三胺基酸 (重量，莫耳數)	第四胺基酸 (重量，莫耳數)	末端發光團 (重量，莫耳數)	產物的結構式 (顏色、重量)
實施例 24	Fmoc-O-叔丁基-L-酪胺酸 (0.92 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘胺酸 (0.6 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘胺酸 (0.6 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘胺酸 (0.6 克，2.0 毫莫耳)	NI (0.77 克，3.0 毫莫耳)	III-24 (白色固體，0.42 克)
實施例 25	Fmoc-O-叔丁基-L-天門冬胺酸 (0.92 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-甘胺酸 (0.6 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-Pb-f-L-精胺酸 (1.3 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L-苯丙胺酸 (0.78 克，2.0 毫莫耳)	NI (0.51 克，2.0 毫莫耳)	III-25 (白色固體，0.29 克)

	克，2.0 毫莫耳)		耳)	毫莫耳)		
實施例 26	Fmoc-L- 天門冬 胺酸 (0.62 克，1.5 毫莫耳)	Fmoc-L- 天門冬 胺酸 (0.62 克，1.5 毫莫耳)	Fmoc-L- 天門冬 胺酸 (0.62 克，1.5 毫莫耳)	Fmoc-L- 苯丙胺 酸 (0.58 克，1.5 毫莫耳)	PPNI (0.677 克，2.0 毫 莫耳)	III-26 (棕色固 體，0.734 克)
實施例 27	Fmoc-L- 谷胺酸 (0.425 克， 1.000 毫 莫耳)	Fmoc-L- 谷胺酸 (0.425 克， 1.000 毫 莫耳)	Fmoc-L- 谷胺酸 (0.425 克， 1.000 毫 莫耳)	Fmoc-L- 苯丙胺 酸 (0.387 克， 1.000 毫 莫耳)	PPNI (0.4365 克，1.000 毫莫耳)	III-27 (黃色固 體，0.350 克)

【0092】 實施例 24 具有下列式(III-24)的結構：



光譜資訊如下：

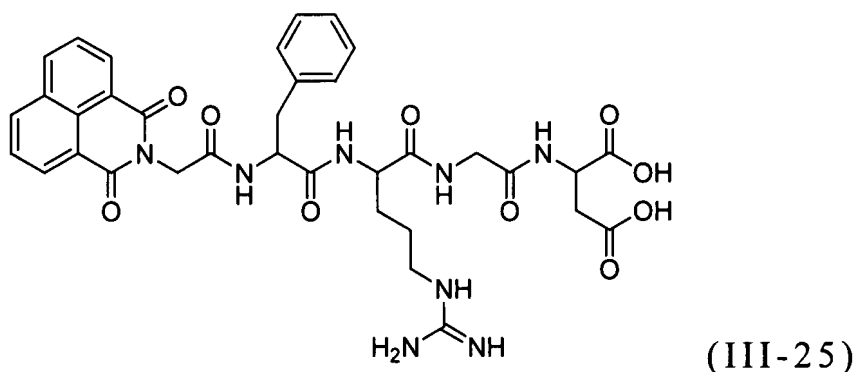
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.75-2.85 (m, 1H; CH₂), 2.90-3.00 (m, 1H; CH₂), 3.65-3.90 (m, 6H; CH₂),

4.30-4.45 (m, 1H; CH), 4.781 (s, 2H; CH₂), 6.69 (d, J = 8.9 Hz, 2H; CH), 7.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H; CH), 7.91 (t, J = 7.65 Hz, 2H; CH), 8.05-8.20 (m, 2H; NH), 8.20-8.30 (m, 1H; NH), 8.45-8.60 (m, 5H; CH, NH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 37.1, 42.6, 42.9, 43.0, 43.3, 54.9, 116.0, 122.9, 128.2, 128.4, 131.0, 131.8, 132.3, 135.5, 156.9, 164.3, 168.2, 169.3, 169.9, 170.0, 173.9;

MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 589.18 , 實驗值 588.2 [M-H]⁻.

【0093】 實施例 25 具有下列式(III-25)的結構 :



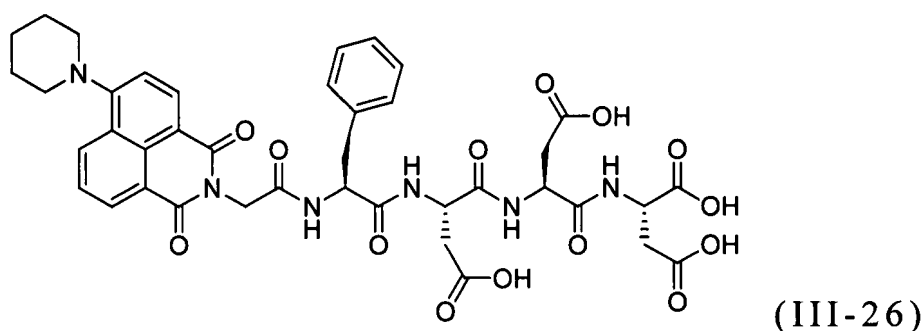
光譜資訊如下 :

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.45-1.70 (m, 3H; CH₂), 1.70-1.85 (m, 1H; CH₂), 2.60-2.70 (m, 2H; CH₂), 2.80-2.95 (m, 1H; CH₂), 3.00-3.20 (m, 3H; CH₂), 3.65-3.90 (m, 2H; CH₂), 4.25-4.40 (m, 1H; CH), 4.45-4.65 (m, 1H; CH), 4.706 (s, 2H; CH₂), 7.20-7.35 (m, 5H; CH), 7.91 (t, J = 7.65 Hz, 2H; CH), 8.10-8.20 (m, 1H; NH), 8.20-8.30 (m, 1H; NH), 8.45-8.60 (m, 5H; CH, NH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 25.8, 30.2, 37.5, 38.3, 42.7, 43.2, 49.6, 53.3, 55.0, 122.8, 127.2, 128.2, 128.4, 129.0, 130.3, 131.8, 132.3, 135.5, 138.6, 157.7, 164.2, 167.6, 169.4, 172.0, 172.4, 172.9, 173.4$;

MS [ESI $^-$]: $m/z(\%)$: 理論值 730.27, 實驗值 731.3
[M-H] $^-$.

【0094】 實施例 26 具有下列式(III-26)的結構：



光譜資訊如下：

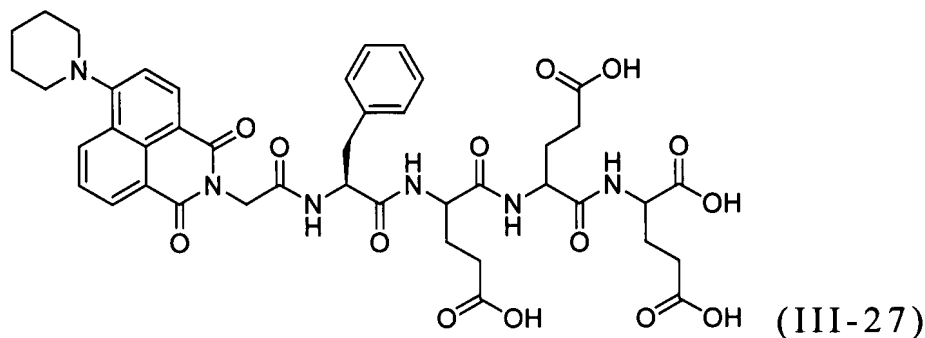
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta=1.65-1.75$ (br, 2H; CH_2), $1.80-1.90$ (br, 4H; CH_2), $2.55-2.90$ (m, 7H; CH_2), $3.00-3.10$ (m, 1H; CH_2), $3.20-3.30$ (br, 4H; CH_2), $4.55-4.65$ (m, 4H; CH), 4.67 (s, 2H; CH_2), $7.20-7.25$ (m, 1H; CH), $7.25-7.35$ (m, 4H; CH), 7.36 (d, $J=8.4$ Hz, 1H; NH), 7.85 (t, $J=7.95$ Hz, 1H, NH), 7.99 (d, $J=8.1$ Hz, 1H; NH), 8.14 (d, $J=8.1$ Hz, 1H; NH), $8.35-8.55$ (m, 5H; CH) ;

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta=23.9, 25.8, 36.0, 36.1, 36.2, 37.7, 42.2, 48.7, 49.4, 49.7, 53.9, 54.1, 114.8, 115.0, 122.4, 125.5, 125.9, 126.3, 128.1, 129.40, 129.44, 130.8, 132.5, 137.8, 157.0, 158.2, 158.7, 162.9, 163.5, 166.9, 170.3$,

170.5, 171.2, 171.8, 171.9, 172.2;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 830.28, 實驗值 829.2
[M-H]⁻.

【0095】 實施例 27 具有下列式(III-27)的結構：



光譜資訊如下：

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=1.65-1.75 (br, 2H; CH₂), 1.80-1.90 (br, 4H; CH₂), 1.90-2.05 (q, *J*=9.0 Hz, 5H; CH₂), 2.25-2.35 (t, *J*=8.1 Hz, 7H; CH₂), 2.75-2.85 (m, 1H; CH₂), 3.00-3.10 (m, 1H; CH₂), 3.20-3.30 (br, 4H; CH₂), 4.20-4.30 (q, *J*=7.7 Hz, 1H; CH), 4.30-4.40 (q, *J*=10.8 Hz, 2H; CH), 4.55-4.65 (m, 1H; CH), 4.65 (s, 2H; CH₂), 7.20-7.25 (m, 1H; CH), 7.25-7.30 (m, 4H; CH), 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1H; NH), 7.85 (t, *J*=7.95 Hz, 1H, CH), 8.00 (d, *J*=7.2 Hz, 1H; NH), 8.20 (d, *J*=7.8 Hz, 2H; NH), 8.4-8.55 (m, 4H; CH);

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=24.5, 26.4, 26.8, 28.0, 28.2, 30.6, 30.7, 30.8, 38.0, 42.7, 51.9, 52.3, 52.6, 54.5, 54.6, 115.5, 115.6, 123.1, 126.1, 126.5, 126.9, 128.7, 129.9, 131.4, 133.1, 138.4, 157.6, 163.5, 164.1, 167.5, 171.5, 171.6, 171.8;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 872.87, 實驗值 871.2

[M-H]⁻.

【0096】請參閱第 11 圖，第 11 圖繪示本發明式(III-27)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。實驗例 1110、1120、1130、1140、1150、1160、1170、1180 分別將式(III-27)的水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、4、3 的環境中測試。在實驗例 1110-1150 中，水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 10-6 的環境中，由第 11 圖得知此時此時螢光強度非常低，而不會產生明顯的螢光標記。當酸性環境的 pH 值降到 5(實驗例 1160)時，水溶性螢光胜肽材料產生的螢光強度明顯驟升，此時的放光波長約為 525 奈米，因此能觀察到的螢光顏色接近綠色。再降低 pH 值至 4 與 3 時，實驗例 1170 與實驗例 1180 產生的螢光強度更大幅上升，除能提供更明顯的標記效果，更能在濃度降低下達到相同的螢光效果，以減少成本。

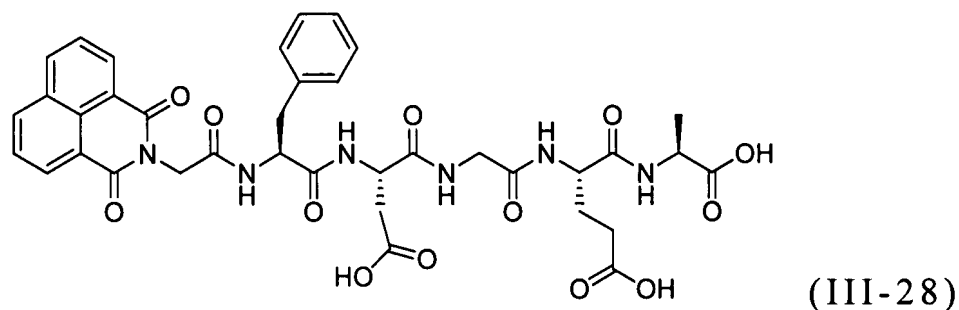
【0097】 2-5.固相胜肽合成法(接枝五個胺基酸)

【0098】接枝五個胺基酸的實施方式請參考前述 2-4 中接枝四個胺基酸的實施方式，並在接枝末端發光團前增加接枝第五胺基酸的步驟，且其方式同於接枝第四胺基酸的步驟，在此不再贅述。所得之產物同樣以核磁共振光譜儀(¹H NMR, ¹³C NMR)進行結構鑑定。請接著參考表六，表六為以五個胺基酸基團與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料。

【0099】表五：以五個胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料

實施例	第一胺 基酸 (重量， 莫耳數)	第二胺 基酸 (重量，莫 耳數)	第三胺 基酸 (重量， 莫耳數)	第四胺 基酸 (重量， 莫耳數)	第五胺 基酸 (重量， 莫耳數)	末端發光 團 (重量，莫 耳數)	產物的 結構式 (顏色， 重量)
實施 例 28	Fmoc-L- 丙胺酸 (0.623 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L- 穀胺酸 (0.851 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L -甘胺酸 (0.6 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L- 天門冬 胺酸 (0.823 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L- 苯丙胺 酸 (0.78 克，2.0 毫莫耳)	NI (0.77 克， 3.0 毫莫 耳)	III-28 (白色固 體，0.05 克)
實施 例 29	Fmoc-L- 丙胺酸 (0.623 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L- 穀胺酸 (0.851 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L -甘胺酸 (0.6 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L- 天門冬 胺酸 (0.823 克，2.0 毫莫耳)	Fmoc-L- 苯丙胺 酸(0.78 克，2.0 毫莫耳)	PPNI (1.02 克， 3.0 毫莫 耳)	III-29 (黃色固 體， 0.6956 克)

【0100】 實施例 28 具有下列式(III-28)的結構：



光譜資訊如下：

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta=1.29$ (d, $J(\text{H,H})=7.2$

Hz, 3H; CH₃), 1.70-1.90 (m, 1H; CH₂), 1.85-2.05 (m, 1H; CH₂), 2.29 (t, J(H,H)=8.25 Hz, 2H; CH₂), 2.70-2.90 (m, 2H; CH₂), 3.00-3.15 (m, 1H; CH₂), 3.65-3.85 (m, 2H; CH₂), 4.15-4.30 (m, 1H; CH), 4.30-4.40 (m, 1H; CH), 4.50-4.65 (m, 2H; CH), 4.78 (s, 2H; CH₂), 7.20-7.30 (m, 5H; CH), 7.93 (t, J(H,H)=7.8 Hz, 4H; CH), 8.29 (d, J(H,H)=7.2 Hz, 1H; NH), 8.40-8.65 (m, 6H; NH, CH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ= 17.8, 28.5, 30.9, 36.9, 38.4, 43.1, 48.4, 50.6, 52.4, 54.9, 122.8, 127.2, 128.2, 128.4, 129.0, 130.2, 131.8, 132.3, 135.5, 138.5, 164.2, 167.6, 169.2, 171.6, 171.7, 172.0, 172.7, 174.8, 175.0;

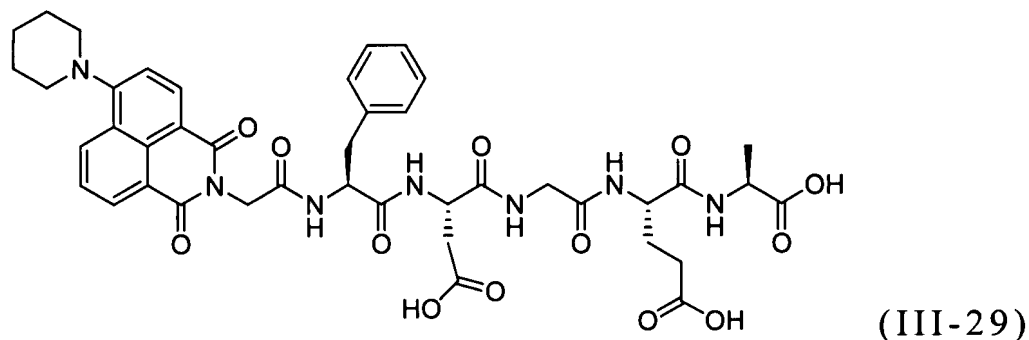
MS [ESI⁻]: m/z(%) : 理論值 774.25 , 實驗值 773.3 [M-H]⁻.

【0101】 接著請參閱第 12 圖，第 12 圖繪示式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞砷與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。在實驗例 1201、1202、1203、1204、1205、1206、1207、1208、1209、1210 與 1211 中，水分別佔共溶劑總體積之 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 與 99%。由第 12 圖能得知，式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料在實驗例 1201-1209 中的共溶劑會產生微弱螢光(低於 100 螢光單位)，此時難以肉眼觀察到明顯的螢光標記。但當水所佔的體積比例增加至 90% (實驗例 1210)時，螢光強度明顯上升至約 150 螢光單位。繼續增加水所佔的體積比例增加至 99%，實驗例 1211 產生的螢光強度更大幅

上升到約 1100 螢光單位，而能提供更明顯的標記效果。藉此能得知式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料會隨著水比例的增加提升亮度，其具有聚集誘導發光現象。此外，式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料的放光波長約為 400 奈米，因此觀察到的螢光顏色為紫色。第 13 圖則繪示在吸收光波長為 400 奈米時，實驗例 1202-1211 與實驗例 1201 之間的螢光強度比值。如第 13 圖所示，實驗例 1211 產生之螢光強度約為實驗例 1201 產生之螢光強度的 225 倍。

【0102】 接著請參閱第 14 圖，第 14 圖繪示本發明式(III-28)之水溶性螢光胜肽材料的在不同 pH 值下的螢光強度與吸收光波長。實驗例 1410、1420、1430、1440、1450、1460、1470、1480 分別將式(III-28)的水溶性螢光胜肽材料置於 pH 值為 10、9、8、7、6、5、4、3 的環境中測試。在實驗例 1410-1450 中，水溶性螢光胜肽材料分別置於 pH 值為 10-6 的環境中，由第 14 圖得知此時此時螢光強度非常低，而不會產生明顯的螢光標記。當酸性環境的 pH 值降到 5(實驗例 1460)時，水溶性螢光胜肽材料產生的螢光強度明顯驟升，此時的放光波長約為 400 奈米，因此能觀察到螢光顏色為紫色。再降低 pH 值至 4 與 3 時，實驗例 1470 與實驗例 1480 產生的螢光強度更大幅上升，除能提供更明顯的標記效果，更能在濃度降低下達到相同的螢光效果，以減少成本。

【0103】 實施例 29 具有下列式(III-29)的結構：



光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ =1.30 (d, $J(\text{H,H})=7.2$ Hz, 3H; CH_3), 1.71 (br, 2H; CH_2), 1.75-1.85 (m, 1H; CH_2), 2.27 (br, 4H; CH_2), 1.90-2.05 (m, 1H; CH_2), 2.30 (t, $J(\text{H,H})=8.1$ Hz, 2H; CH_2), 2.55-2.65 (m, 1H; CH_2), 2.70-2.95 (m, 2H; CH_2), 3.00-3.15 (m, 1H; CH_2), 3.25 (br, 4H; CH_2), 3.65-3.85 (m, 2H; CH_2), 4.10-4.25 (m, 1H; CH), 4.30-4.40 (m, 1H; CH), 4.50-4.65 (m, 2H; CH), 4.69 (s, 2H; CH_2), 7.20-7.30 (m, 5H; CH), 7.35 (d, $J(\text{H,H})=8.4$ Hz, 1H; NH), 7.80-8.00 (m, 3H; CH), 8.29 (d, $J(\text{H,H})=7.2$ Hz, 1H; NH), 8.35-8.60 (m, 5H; NH, CH);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ =17.8, 24.8, 26.6, 28.5, 30.9, 36.8, 38.4, 43.0, 43.2, 48.4, 50.6, 52.3, 54.9, 115.7, 115.9, 123.3, 126.4, 126.8, 127.2, 129.0, 130.2, 131.4, 131.7, 133.4, 138.5, 157.8, 163.8, 164.4, 167.8, 169.2, 171.6, 171.7, 172.0, 172.7, 174.8, 175.0;

MS [ESI $^-$]: m/z (%): 理論值 857.32, 實驗值 856.60
[M-H] $^-$.

【0104】 2-6.固相胜肽合成法(接枝六個胺基酸)

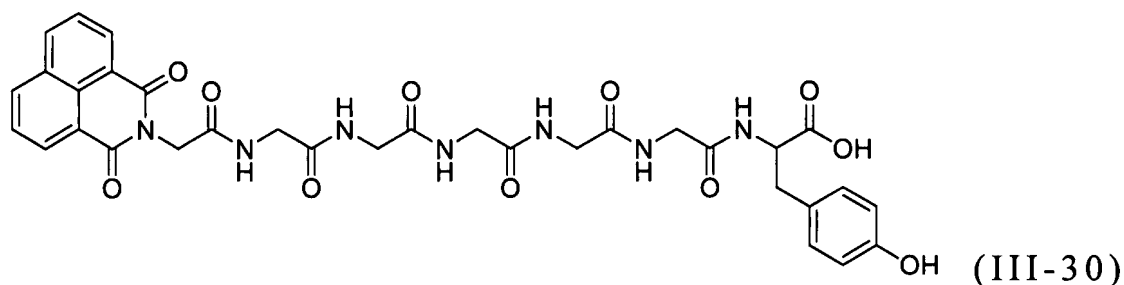
【0105】接枝六個胺基酸的實施方式請參考前述 2-4 中接枝四個胺基酸的實施方式，並在接枝末端發光團前增加接枝第五胺基酸與第六胺基酸的步驟，且其方式同於接枝第四胺基酸的步驟，在此不再贅述。所得之產物同樣以核磁共振光譜儀(^1H NMR, ^{13}C NMR)進行結構鑑定。請接著參考表六，表六為以六個胺基酸基團與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料。

【0106】表六：以六個胺基酸與末端發光團合成各種水溶性螢光胜肽材料

實施例	第一 胺基 酸 (重 量, 莫 耳數)	第二 胺基 酸 (重 量, 莫 耳數)	第三 胺基 酸 (重 量, 莫 耳數)	第四 胺基 酸 (重 量, 莫 耳數)	第五 胺基 酸 (重 量, 莫 耳數)	第六 胺基 酸 (重 量, 莫 耳數)	末端發 光團(重 量, 莫 耳數)	產物的 結構式 (顏色, 重量)
實施 例 30	Fmoc- O-叔 丁基 -L-酪 胺酸 (0.92 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-甘 胺酸 (0.6 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-甘 胺酸 (0.6 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-甘 胺酸 (0.6 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-甘 胺酸 (0.6 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-甘 胺酸 (0.6 克, 2.0 毫莫 耳)	NI (0.51 克, 2.0 毫莫耳)	III-30 (白色固 體, 0.20 克)

實 施 例 31	Fmoc- L-纈 胺酸 (0.68 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-丙 胺酸 (0.622 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-纈 胺酸 (0.68 克, 2.0 毫莫 耳)	N-Boc -N'-Fm oc-L- 賴氨 酸 (0.94 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-異 亮氨 酸 (0.71 克, 2.0 毫莫 耳)	Fmoc- L-苯 丙胺 酸 (0.78 克, 2.0 毫莫 耳)	NI (0.79 克, 3.0 毫莫耳)	III-31 (白色固 體, 0.92 克)
-------------------	---	--	---	--	--	--	-------------------------------	---------------------------------

【0107】 實施例 30 具有下列式(III-30)的結構：



光譜資訊如下：

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.70-3.05 (m, 2H; CH₂), 3.60-3.90 (m, 10H; CH₂), 4.30-4.40 (m, 1H; CH), 4.70-4.80 (m, 2H; CH₂), 6.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H; CH), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H; CH), 7.94 (t, J = 7.8 Hz, 2H; CH), 8.00-8.10 (m, 2H; NH), 8.10-8.25 (m, 3H; NH), 8.50-8.65 (m, 4H; CH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 37.0, 42.2, 42.5, 43.0, 43.3, 54.8, 116.0, 122.9, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 131.0, 131.8, 135.5, 156.9, 164.3, 168.2, 169.5, 169.9, 170.07,

170.13, 170.3, 173.9;

MS [ESI⁻]: m/z(%): 理論值 703.22, 實驗值 702.0
[M-H]⁻.

【0108】接著請參閱第 15 圖，第 15 圖繪示式(III-30)之水溶性螢光胜肽材料，在不同比例之二甲亞砷與水之共溶劑中的螢光強度與吸收光波長。在實驗例 1501、1502、1503、1504、1505、1506、1507、1508、1509、1510 與 1511 中，水分別佔共溶劑總體積之 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 與 100%。由第 15 圖能得知，式(III-30)之水溶性螢光胜肽材料在實驗例 1501-1509 中的共溶劑會產生的螢光過於微弱(低於 100 螢光單位)，此時難以肉眼觀察到明顯的螢光標記。但當水所佔的體積比例增加至 90% (實驗例 1510) 時，螢光強度明顯上升至約 200 螢光單位。繼續增加水所佔的體積比例增加至 100%，實驗例 1511 產生的螢光強度更大幅上升到約 700 螢光單位，而能提供更明顯的標記效果。藉此能得知式(III-30)之水溶性螢光胜肽材料會隨著水比例的增加提升亮度，其具有聚集誘導發光現象。此外，式(III-30)之水溶性螢光胜肽材料的放光波長約為 400-425 奈米，可觀察到的螢光顏色為藍紫色。第 16 圖繪示在吸收光波長為 410 奈米時，實驗例 1502-1511 與實驗例 1501 之間的螢光強度比值。如第 16 圖所示，實驗例 1511 產生之螢光強度約為實驗例 1501 產生之螢光強度的 100 倍。

【0109】由上述本發明實施例可知，本發明具有下列優點。水溶性螢光胜肽材料利用萘醯亞胺上環氮取代基的變換達

到聚集誘導發光的効果，並產生不同顏色的螢光。此外，變換水溶性螢光胜肽材料中的胺基酸序列可讓螢光胜肽材料分別在酸性、中性或弱鹼性環境下顯色。胺基酸上的氫鍵更使水溶性螢光胜肽材料在水中具有聚集誘導螢光特性，不需額外添加引發劑或升溫即可直接在室溫下成膜。綜觀而言，水溶性螢光胜肽材料具有顯影效果佳、細胞毒性低、以及成本低廉等優勢，可廣泛應用於細胞顯影、細胞器顯影、藥物載體顯影與癌症細胞檢測的螢光探針。

【0110】 雖然本發明已以實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0111】

210-280：實驗例

401-411：實驗例

510-580：實驗例

601-610：實驗例

710-780：實驗例

810-880：實驗例

901-911：實驗例

1010-1080：實驗例

1110-1180：實驗例

1201-1211：實驗例

1410-1480：實驗例

1501-1511：實驗例

.

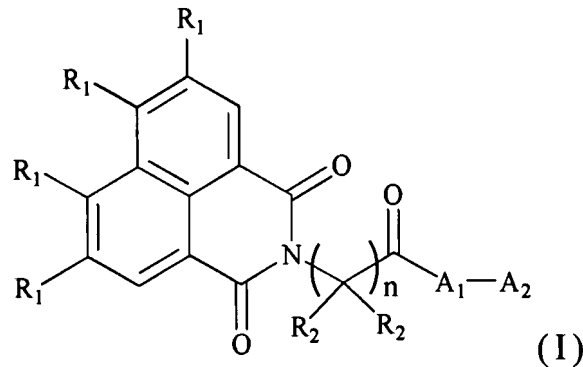
.

.

.

申請專利範圍

1. 一種水溶性螢光胜肽材料，具有式(I)之結構：

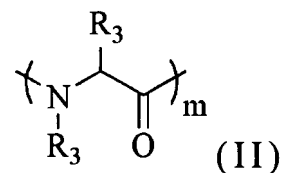


在該式(I)中，n 為 1 以上之整數，

R₁ 係獨立選自氫或含氮取代基，

R₂ 係獨立選自氫或烷基，

A₁ 係由一個以上的胺基酸單體聚合而成，具有式(II)之結構：



在該式(II)中，m 為 1 以上之整數，且 A₁ 中各該胺基酸單體的 R₃ 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基，

A₂ 為 -OR₅ 或 -N(R₄)₂，

其中 R₄ 係獨立選自氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、胍基烷基、單醣基、雙醣基、或寡醣基，

R₅ 為氫、烷基、芳香烷基、烷基硫代烷基、羥基芳香烷基、雜芳香烷基、羧基烷基、或胍基烷基。

2. 如請求項 1 所述之水溶性螢光胜肽材料，其中 R_2 為碳數 1~16 之烷基。

3. 如請求項 1 所述之水溶性螢光胜肽材料，其中 R_1 為胺基葡萄糖、硝基、吡咯、哌啶、環己亞胺或環庚亞胺。

4. 如請求項 1 所述之水溶性螢光胜肽材料，其中 m 為 1~20 之整數。

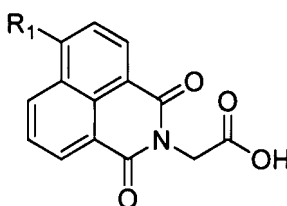
5. 如請求項 1 所述之水溶性螢光胜肽材料，其中 n 為 1~10 之整數。

6. 如請求項 1 所述之水溶性螢光胜肽材料，其中 R_4 中的單醣基為果醣基或半乳糖基、雙醣基為甘露醣基、而寡糖基為寡核苷酸。

7. 一種水溶性螢光胜肽材料的製備方法，包含：

接枝一第一胺基酸單體至一樹脂上，且該第一胺基酸單體的胺基上具有一第一保護基；

移除胺基上的該第一保護基；

使用一耦合劑，以令使  與胺基進行耦

合反應形成一水溶性螢光胜肽材料，其中 R_1 係獨立選自氫

或含氮取代基；以及

自樹脂上切除水溶性螢光胜肽材料。

8. 如請求項 7 所述之水溶性螢光胜肽材料的製備方法，在移除該保護基後更包含：

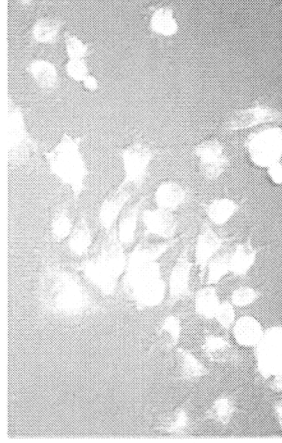
使用一耦合劑，以令使具有一第二保護基的一第二胺基酸單體與胺基進行耦合反應；以及

移除該第二保護基。

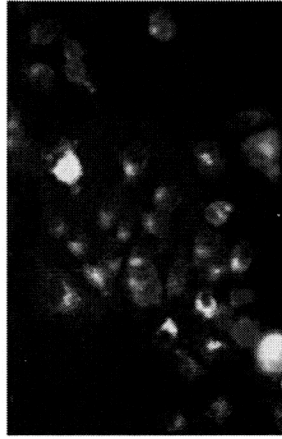
9. 如請求項 7 所述之水溶性螢光胜肽材料的製備方法，其中含氮取代基為胺基葡萄糖、硝基、吡咯、哌啶、環己亞胺或環庚亞胺。

10. 如請求項 7 所述之水溶性螢光胜肽材料的製備方法，其中該耦合劑為苯並三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽
(O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluraniumphosphorophosphate)。

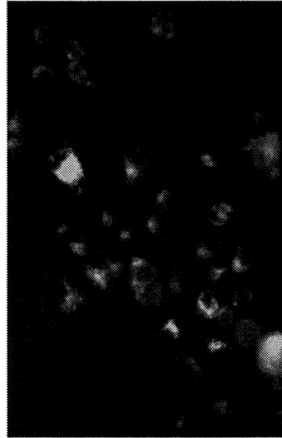
圖式



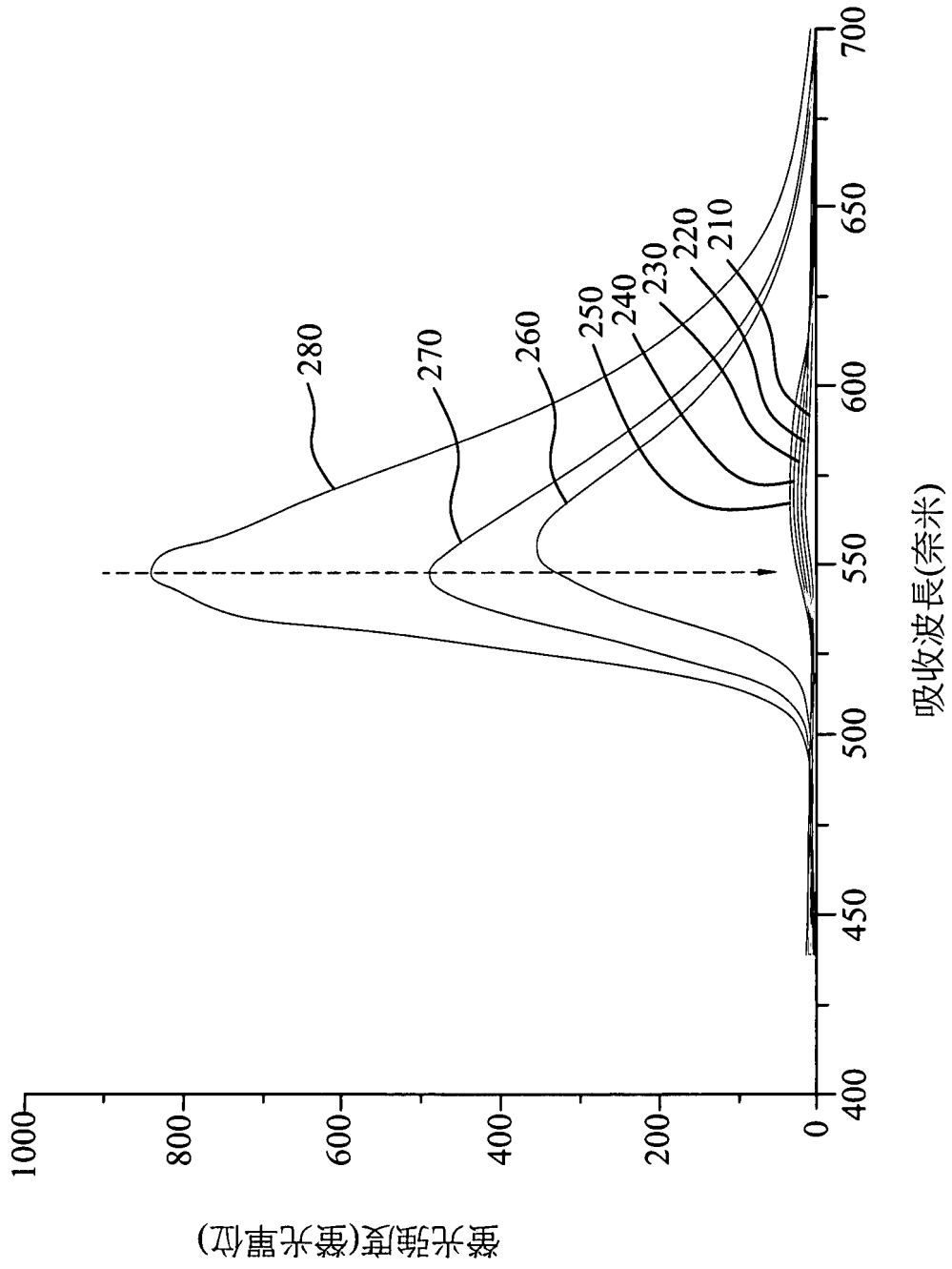
第1C圖



第1B圖

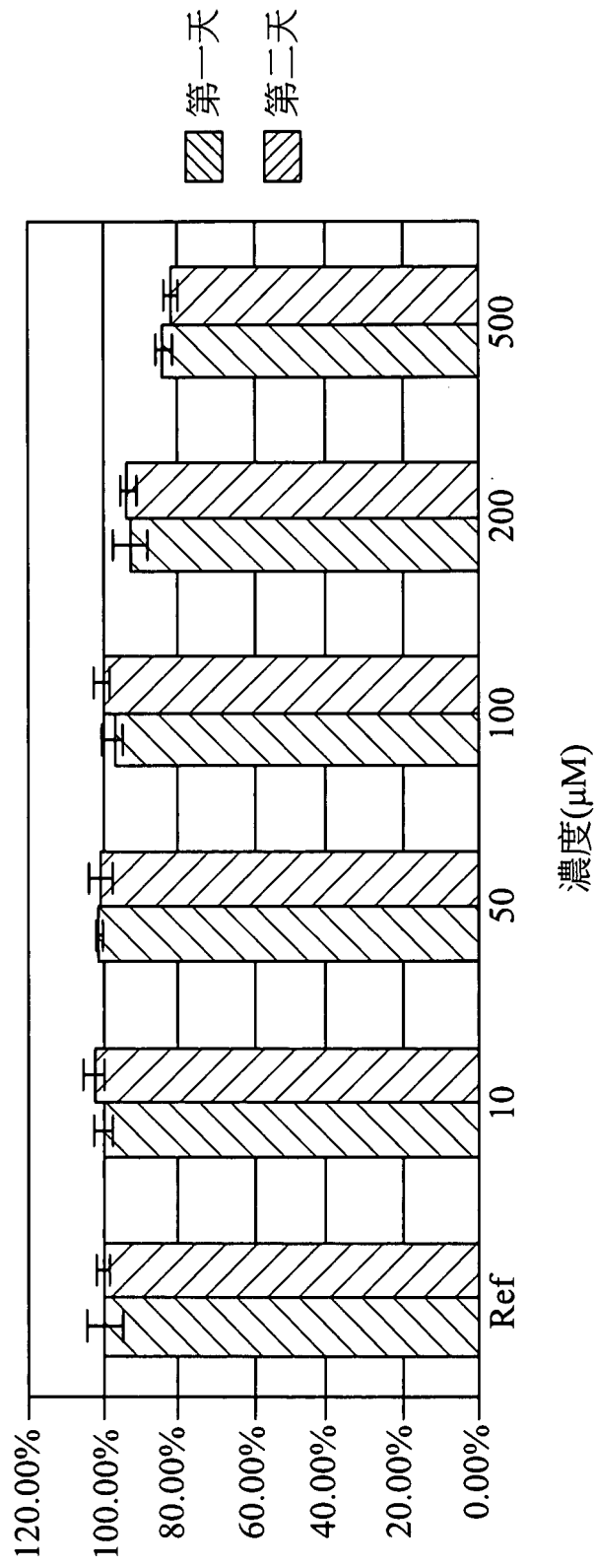


第1A圖

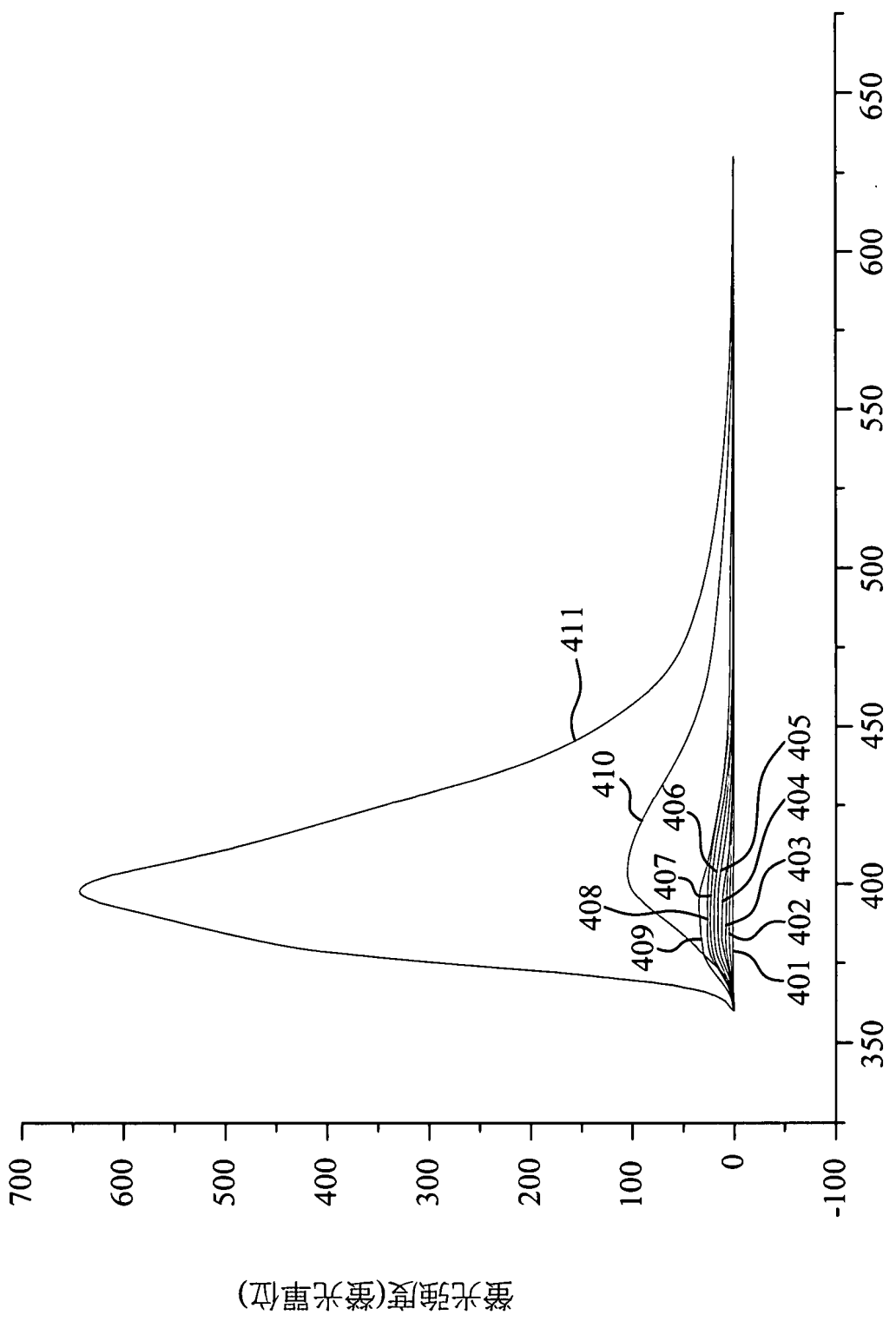


第2圖

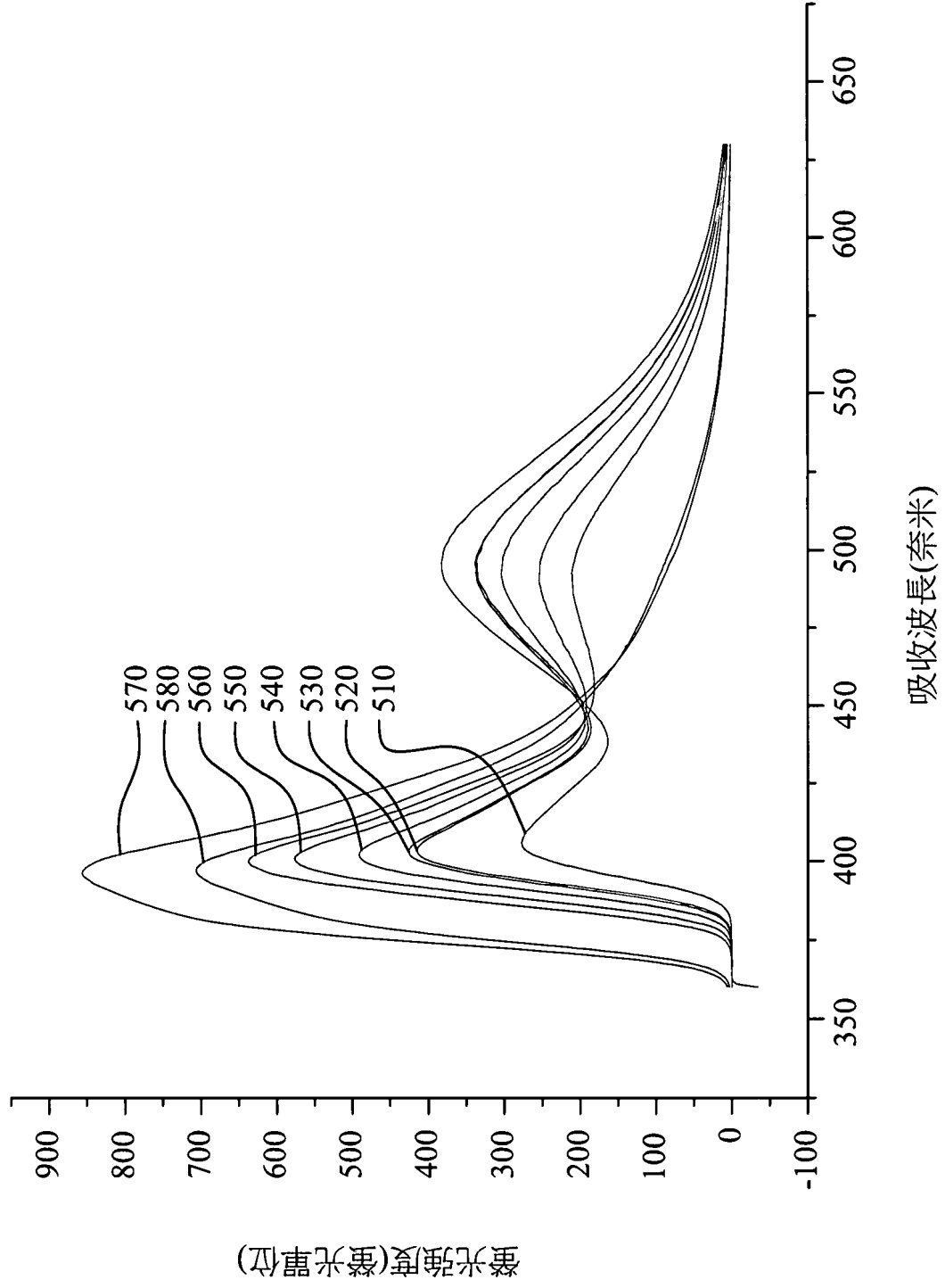
PC-3細胞存活度測試



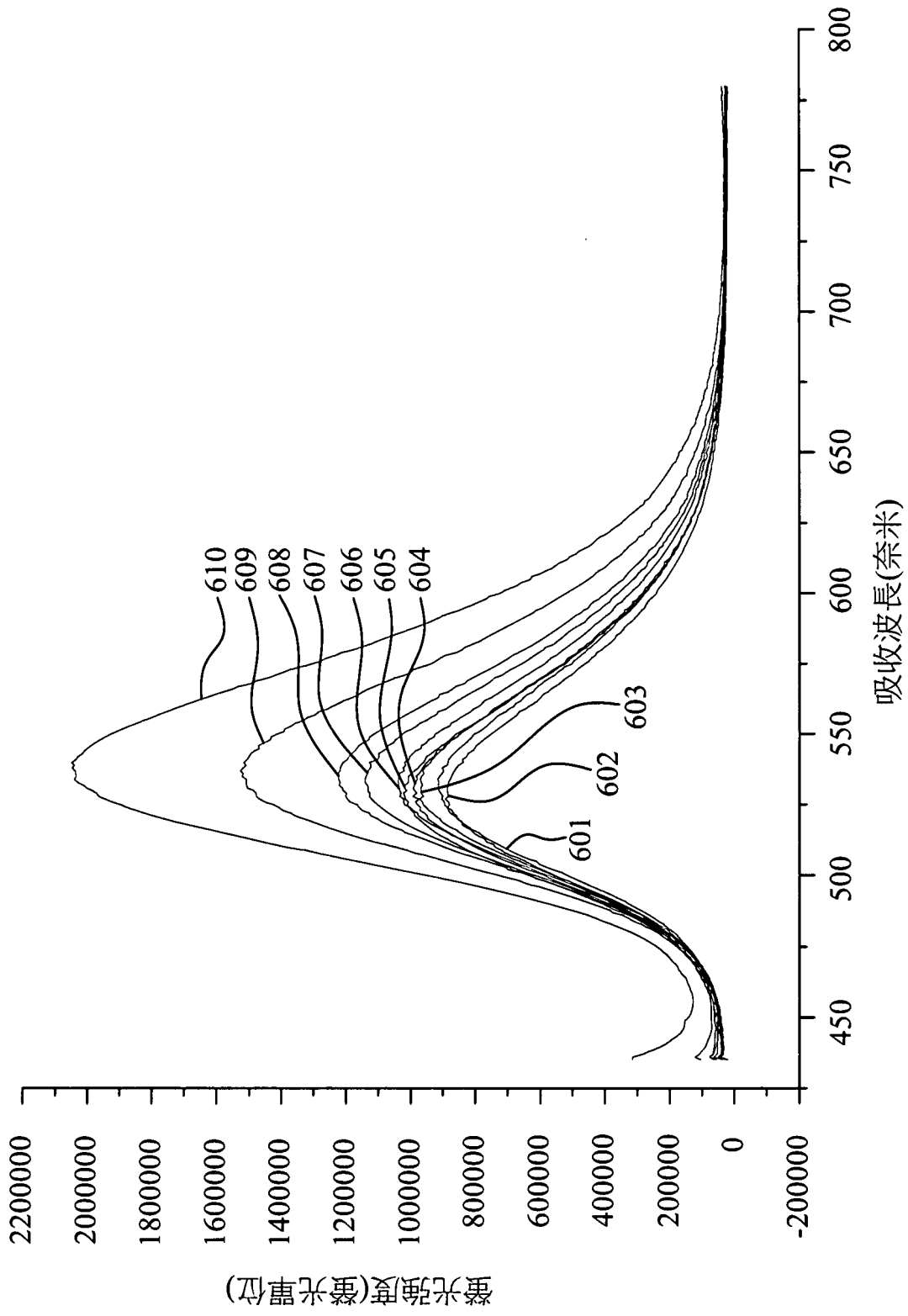
第3圖



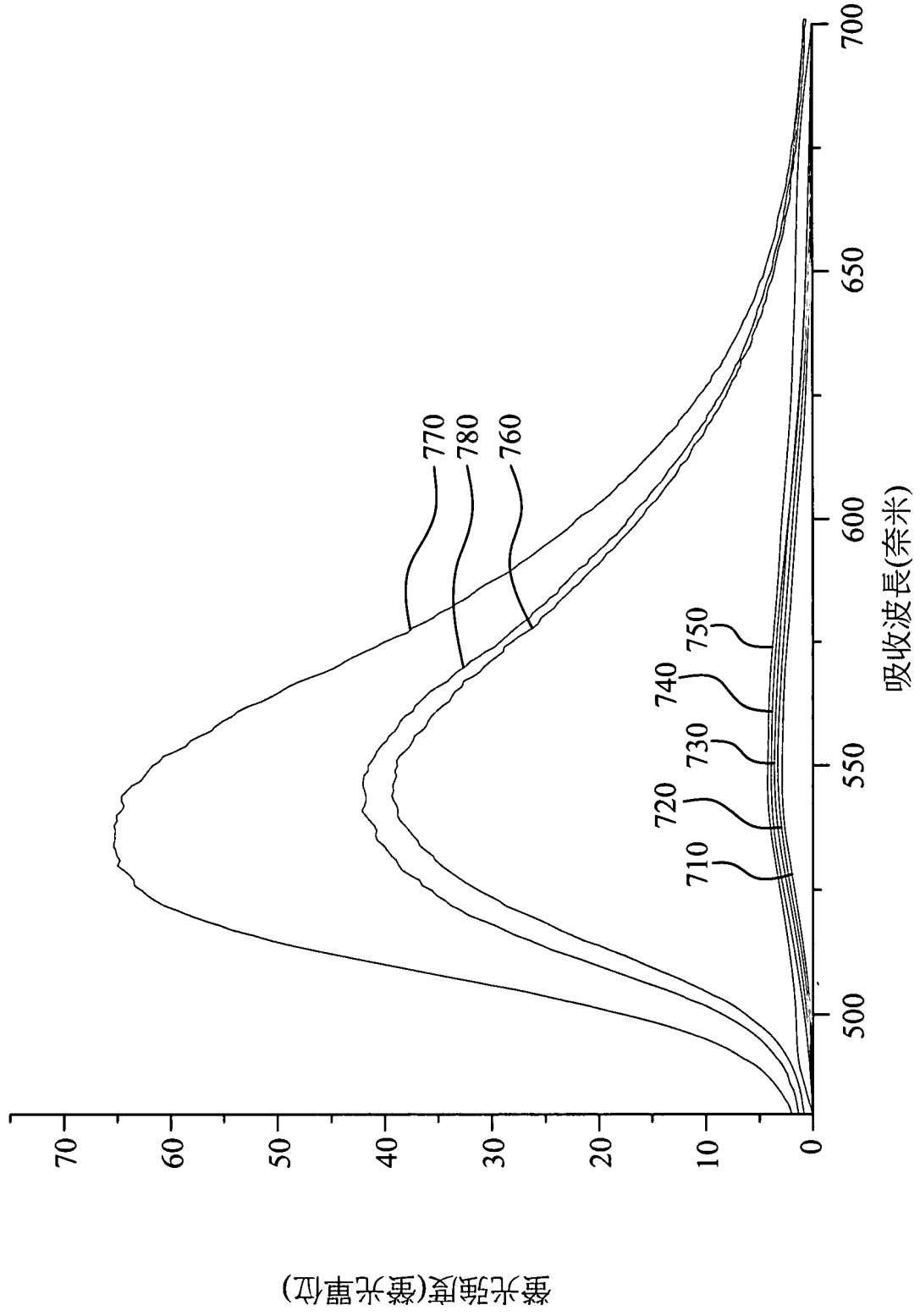
第4圖



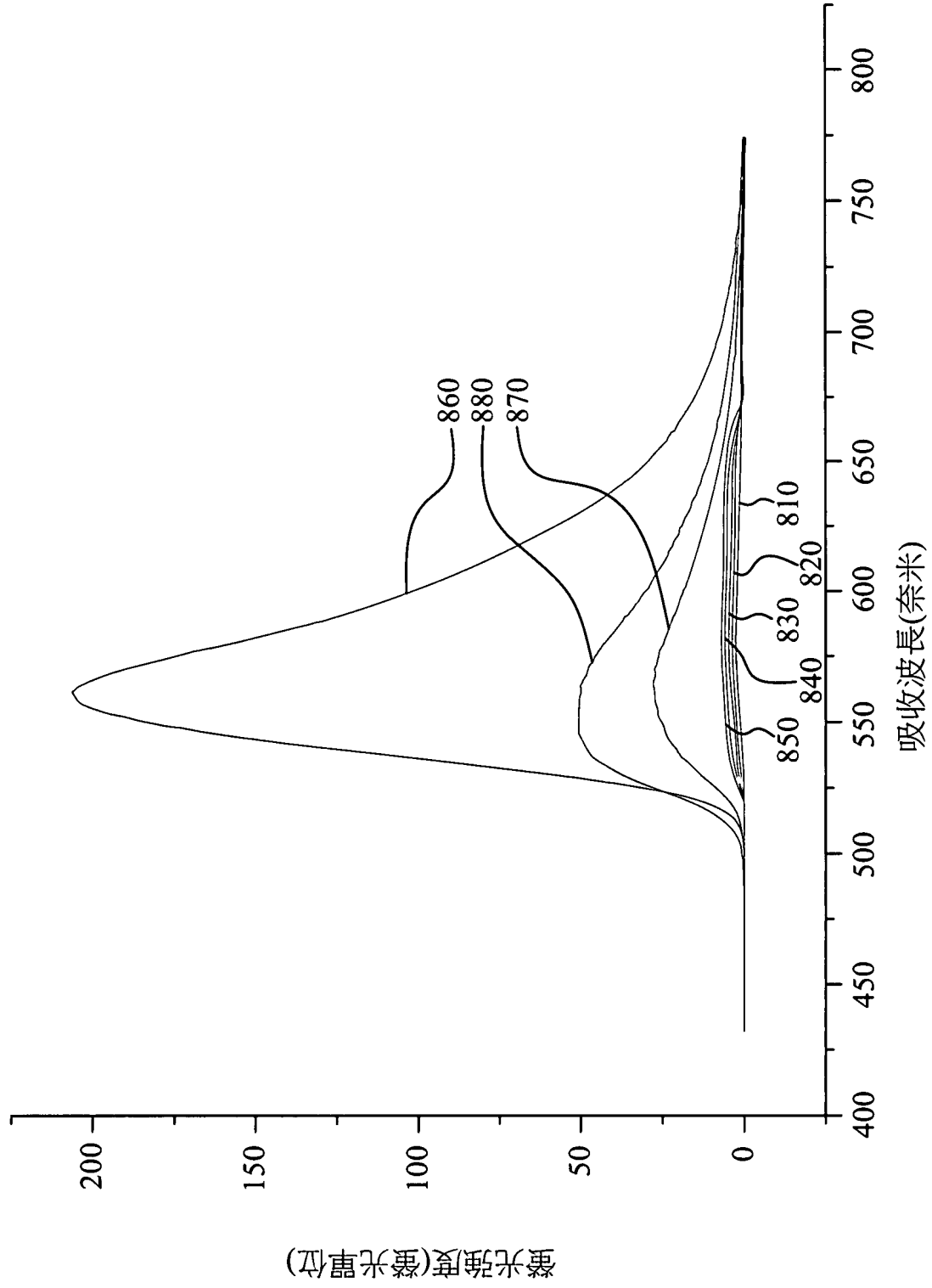
第 5 圖



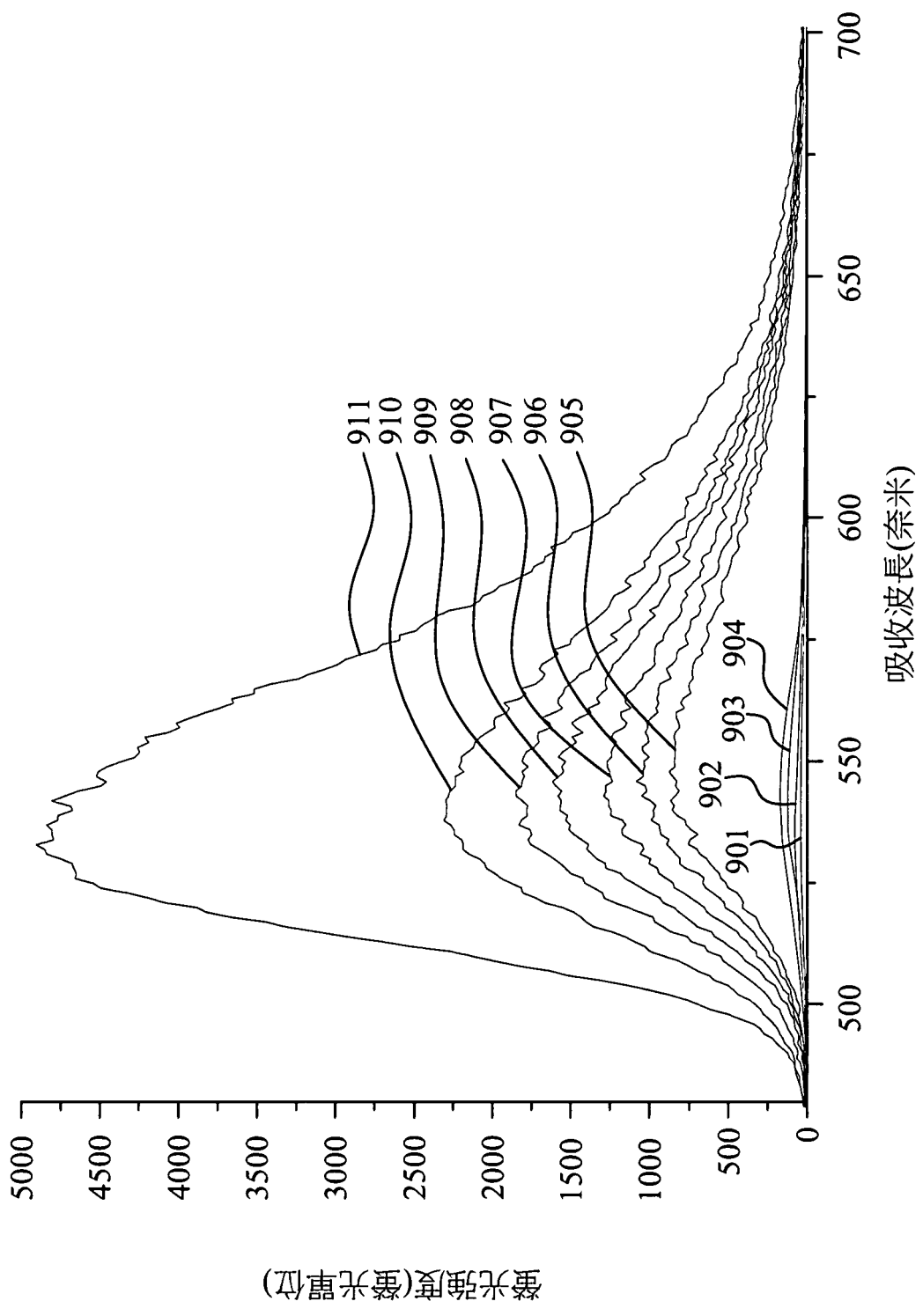
第6圖



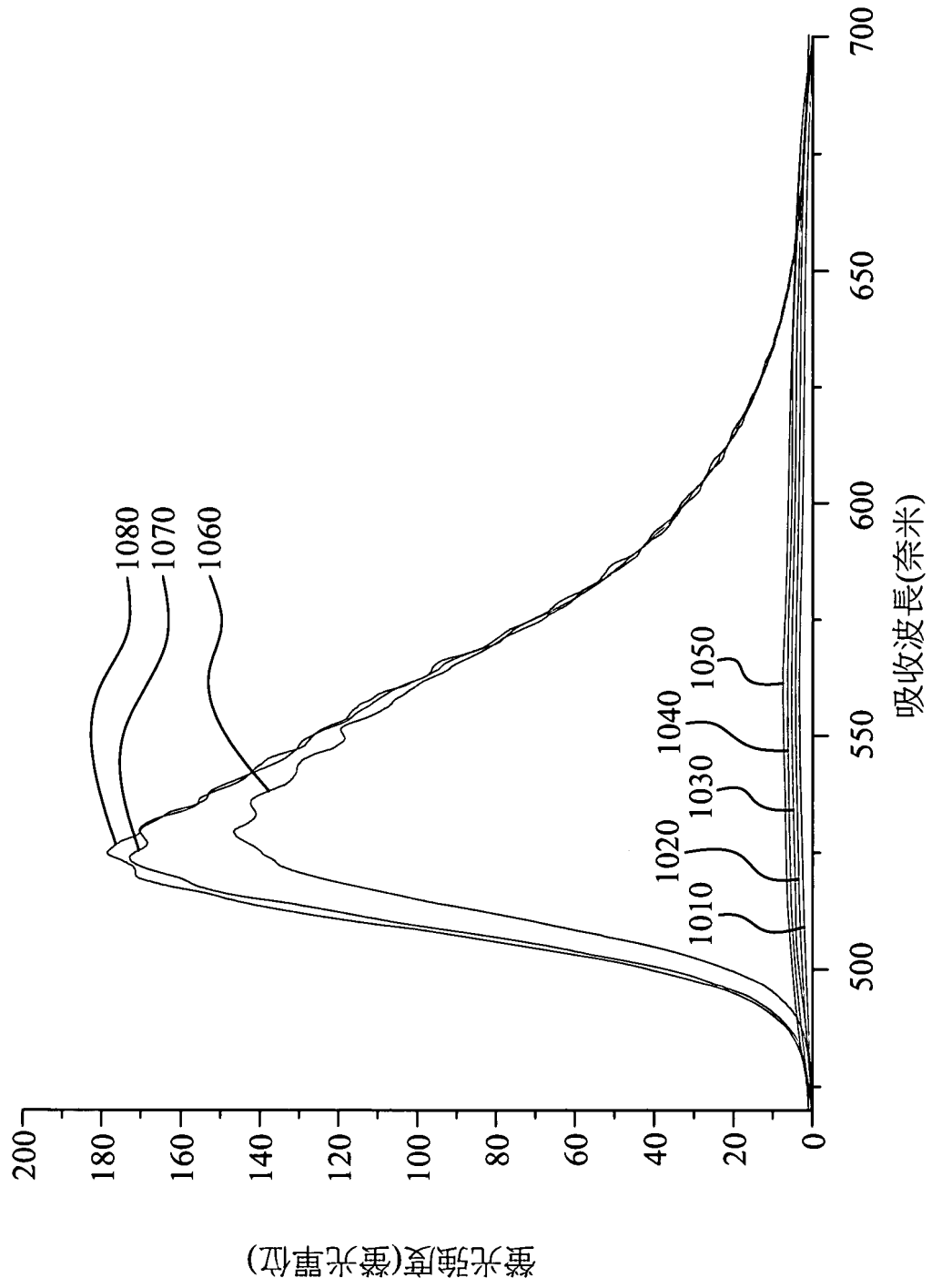
第7圖



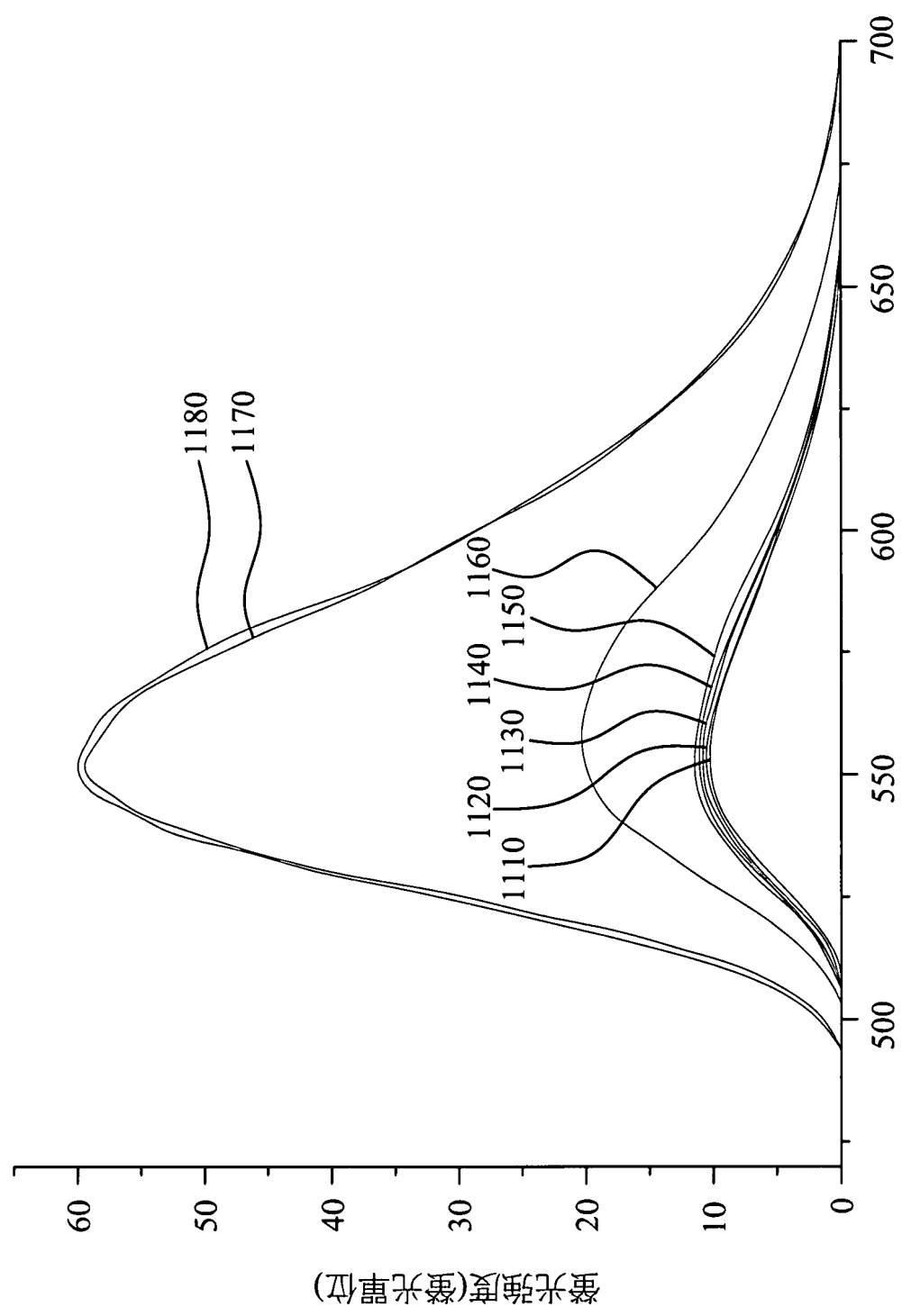
第 8 圖



第9圖

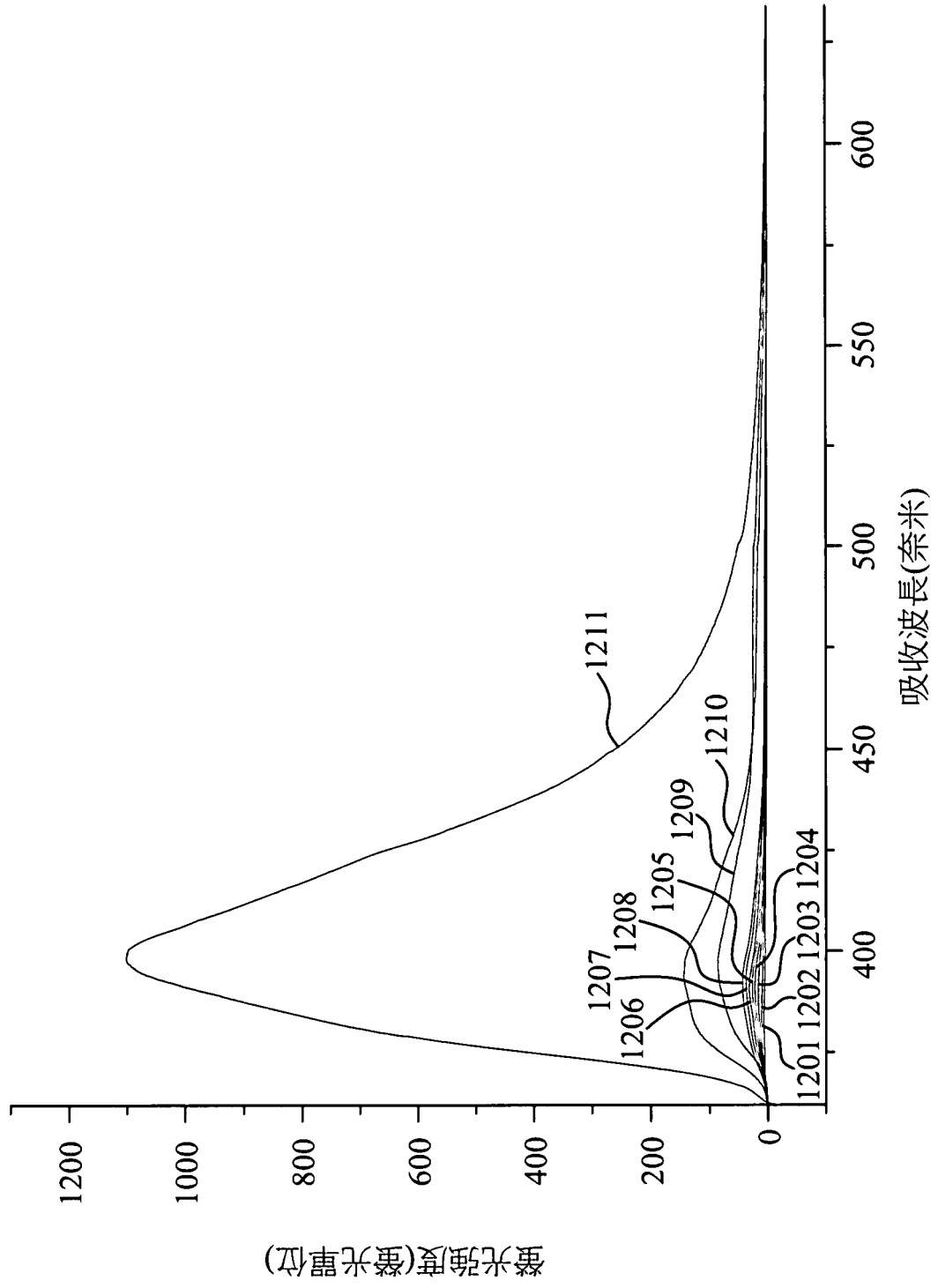


第 10 圖

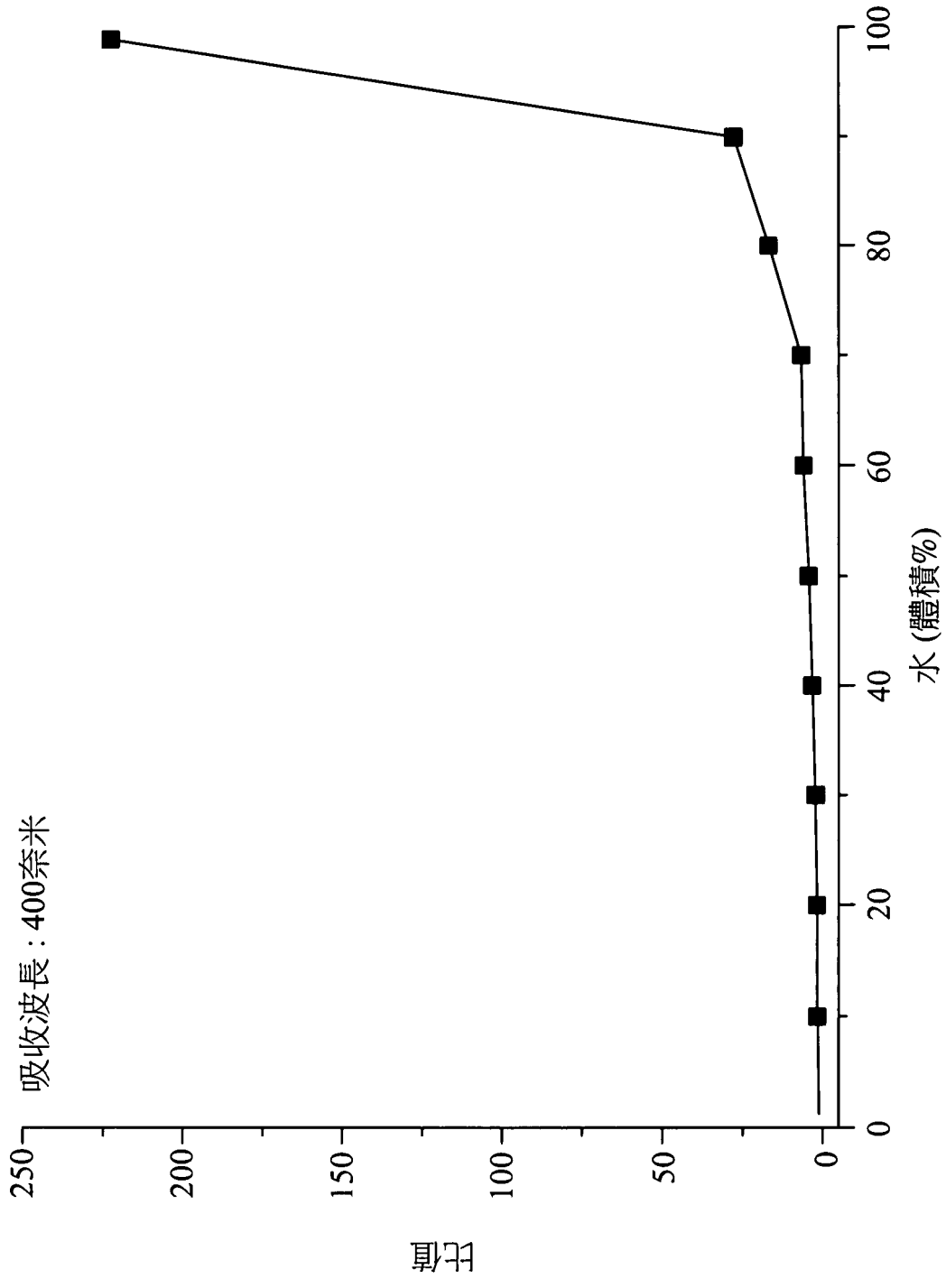


吸收波長(奈米)

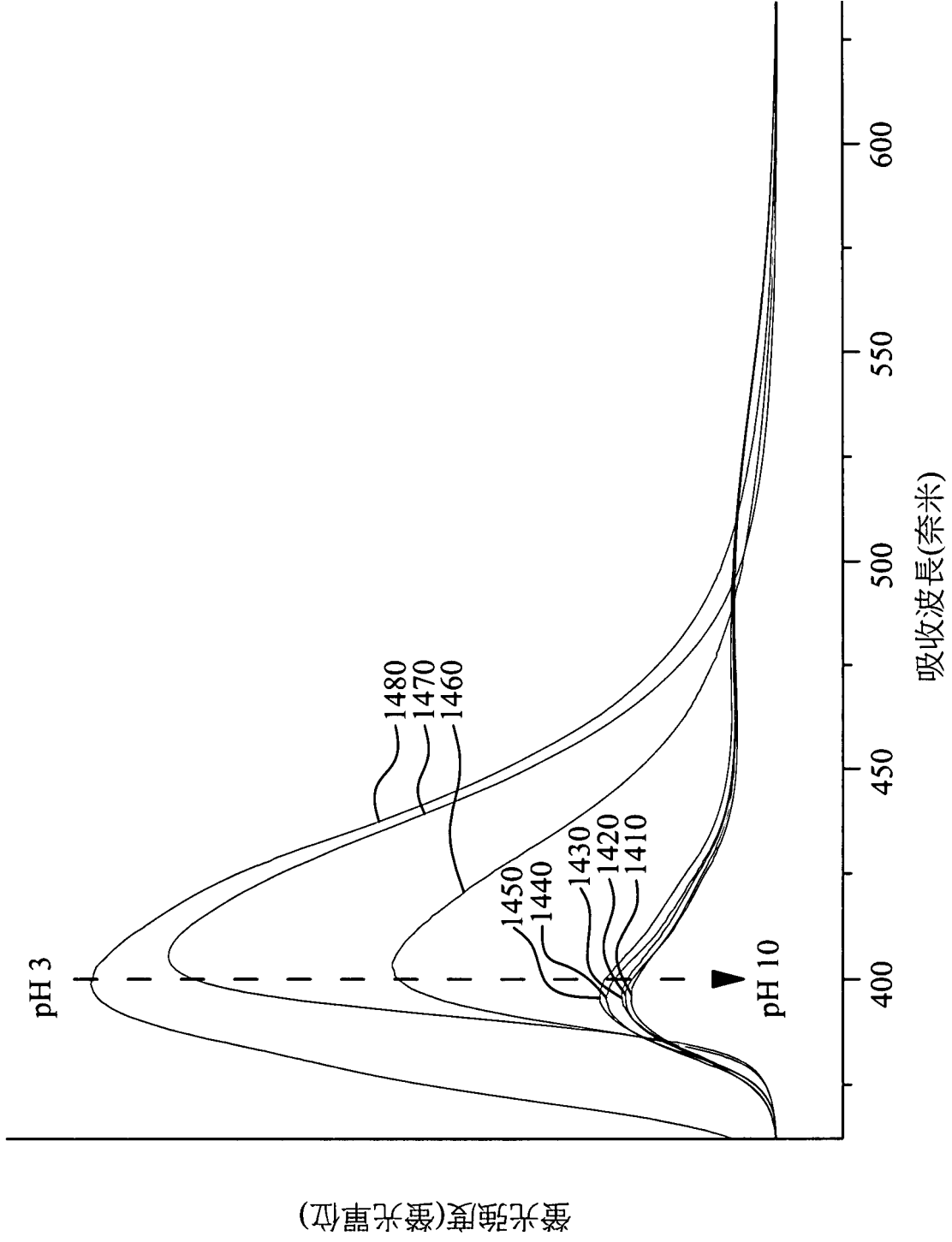
第11圖



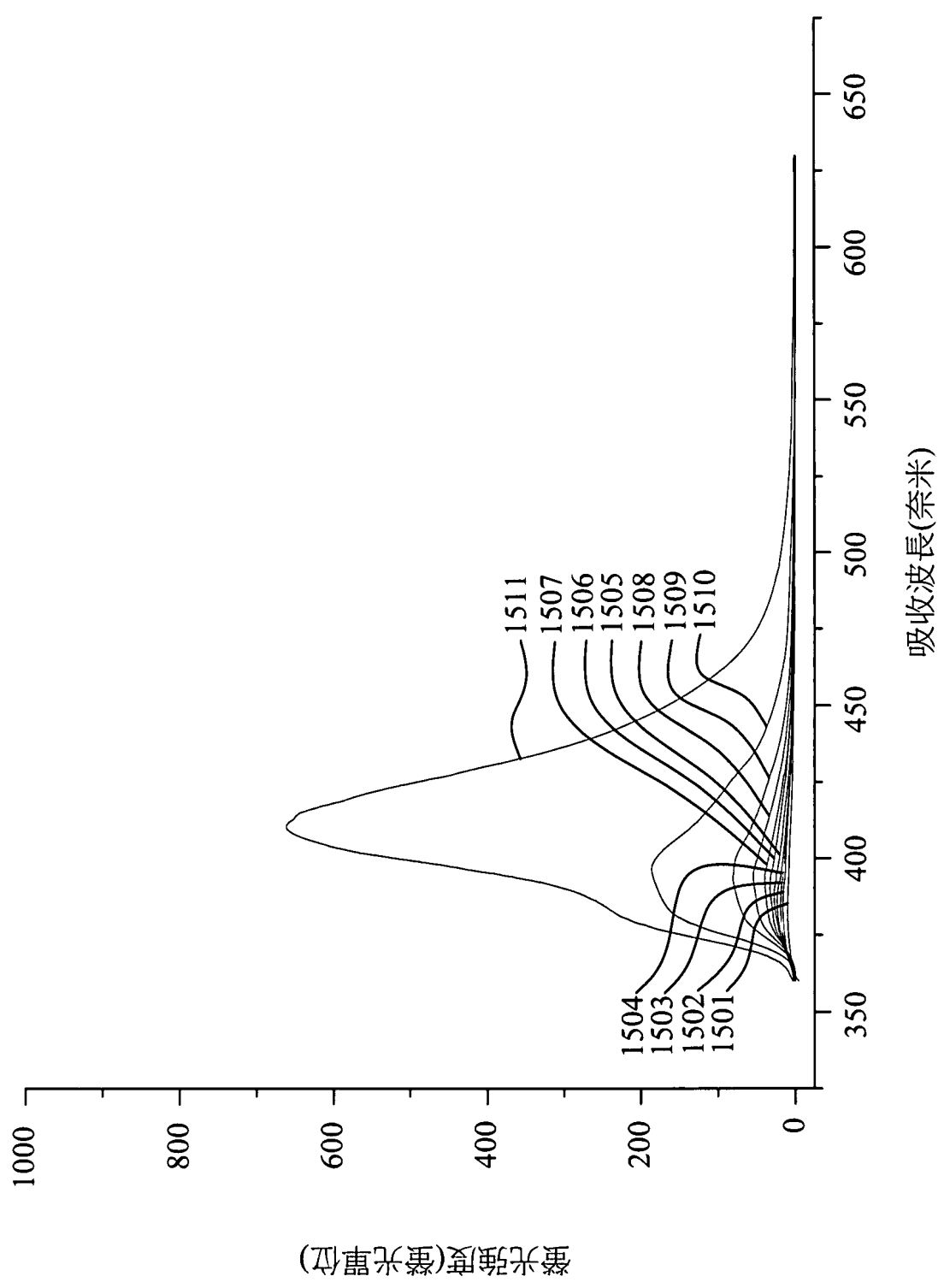
第 12 圖



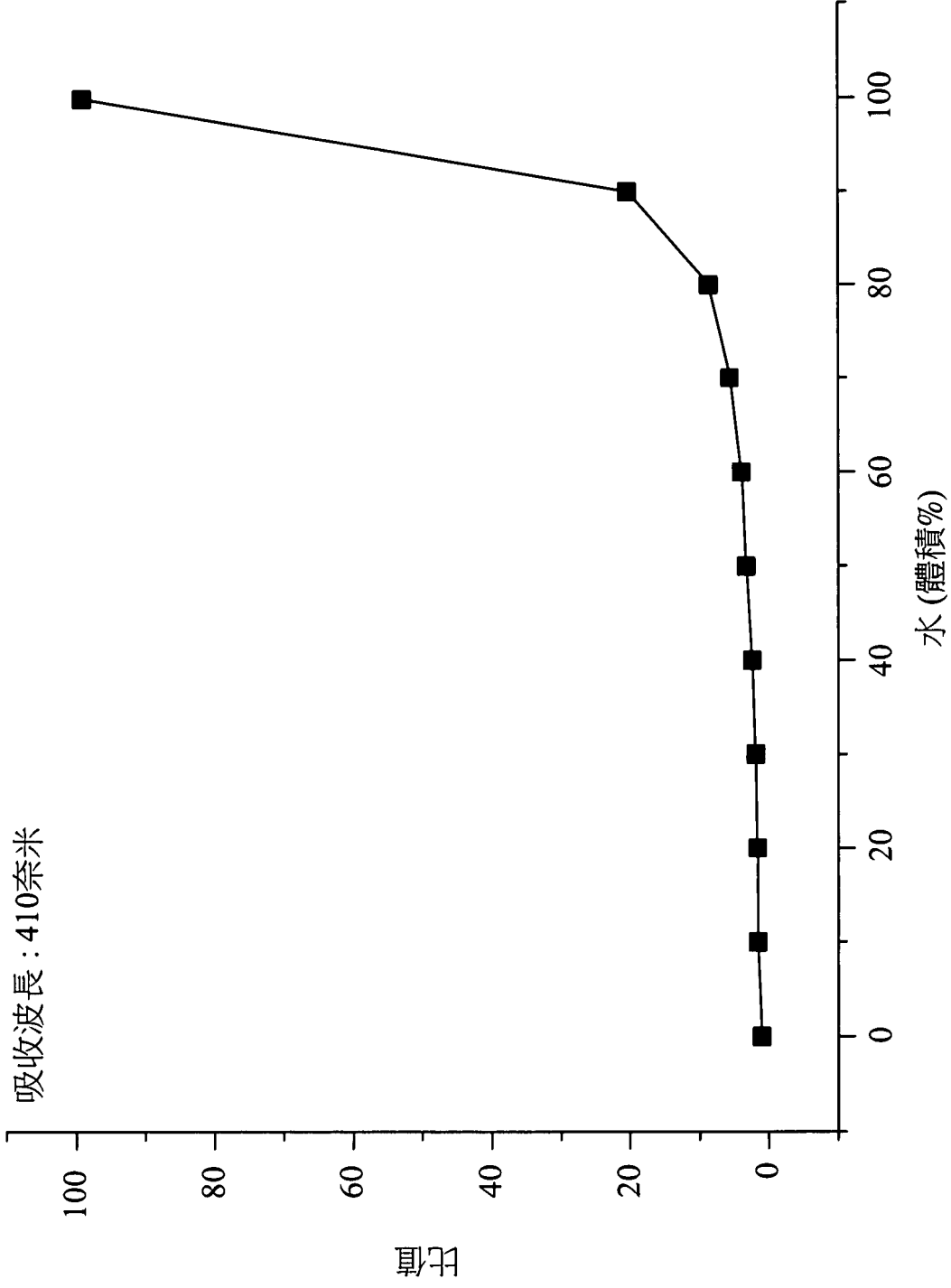
第 13 圖



第 14 圖



第 15 圖



第16圖