

私立東海大學化學研究所
碩士論文

Master Thesis, Department of Chemistry
Tung-Hai University

指導教授：龍鳳娣 博士

(Dr. Feng-Di T. Lung)

設計、合成 MAPK 之胜肽衍生物抑制劑以開發成為抗癌試劑

Design, Synthesis and Bioactivities Studies of Peptidic Inhibitors of MAPK
for the Development of Anticancer Agents

研究生：詹湛如

(Jhan-Ru Jhan)

中 華 民 國 一 零 六 年 七 月

謝誌

至今仍記得當初選擇留在東海大學繼續念五年一貫的初衷，這裡擁有最美的校園、完善的師資，其中我最要感謝的老師為指導教授龍鳳娣老師。老師對學生就像媽媽一樣充滿溫暖，關心我們並鼓勵我們積極參與各種研討會及競賽，以增加自己的實力，陪伴我度過無數次緊張的場面及低潮的日子，有優秀的指導老師，才能讓我這一年有所成長。

由衷感謝系上的楊定亞老師、柯安南老師、吳雨珊老師、許員豪老師、劉建忠老師及楊振宜老師在學業上的指導；感謝私校能量計劃合作的老師，包含：生科系謝明麗老師、趙偉廷老師、蔡玉貞老師及吳旻寰老師；畜產系謝長奇老師以及食科系盧錫祺老師，提供了我細胞相關實驗的協助及指教，才能使我學會更多生物分析的實驗技巧及擁有更完整的數據結果；感謝藍恩慈小姐，對於我們在學校所碰到行政事物上的困難都能為我們處理。

感謝實驗室有一群用心傳承的學長姐：德倫、子喬、佳駿、立瑀、冠勳、忻曼、家豪，有學長姊的領導讓我們一進實驗室，能有最基礎的知識及各領域的學習；感謝學習期間陪伴的同儕：宜哲、俊毅、雅筑、韻嬛、智慧、岱偉、信榮、品豪，有你們讓我能在競爭中成長及為我解決各種疑難雜症的問題；感謝學弟妹們在實驗上的協助：冠婷、秉謙、懷忻、雅柔、微明、品秀、詩容、乃瑛、之鈴、靜君、昱佑、冠晴、冠緯，有你們才能分擔實驗上的分量及協助實驗室的各種大小瑣碎的事；感謝生科系謝明麗老師及趙偉廷老師實驗室的學生在實驗上的指導及協助：詩涵、冠宇、政諺、安怡、惻瑩，因為有你們才能讓我的實驗更加順利完成。

最後我要感謝我的家人及朋友：感謝媽媽給予我大力支持及辛苦養育，在我受挫時總能適時的鼓勵及安慰我；感謝姊姊的照顧，每次在我需要的時候都能及時伸出援手；感謝在這條路上陪伴我的朋友們：安妮、淑芬、庭瑜、燁柔、涑鈞、棕鈿，有你們陪我暢談心事，讓我能釋放壓力並適時的給我意見。

念碩士的這一兩年過程也許跌跌撞撞，為實驗感到沮喪懊惱；為實驗與同學們一起挑燈夜戰，但這些經歷都將成為回憶，它使我們更加能獨立完成實驗及思考；能訓練我們擁有找期刊論文及解決問題的能力。轉眼間，當學生的日子已是最後一個月，沒有後悔曾經的衝動，

只有更加珍惜得來不易的經歷。我相信「自信不是相信自己比別人強，而是相信自己比以前強」，未來的路還很漫長，希望自己能一直保持學習新東西的熱忱及不斷精進的精神來面對挑戰。

目錄

中文摘要	6
Abstract	7
名詞簡稱及縮寫對照表	8
第一章、研究背景與目的	10
1-1 癌症介紹	10
1-2 IDA 蛋白質	11
1-3 細胞之訊息傳導	12
1-4 胜肽藥物之設計	14
1-5 抗癌胜肽之簡介	15
1-6 研究動機與目的	15
1-7 實驗設計與流程	16
第二章、材料與方法	18
2-1 固相胜肽合成法所需實驗材料及設備	18
2-1-1 固相胜肽合成法	18
2-1-2 合成胜肽之螢光標記	20
2-2 應用逆相高效能液相層析儀法 (RP-HPLC) 純化胜肽粗產物	20
2-2-1 RP-HPLC 所需實驗材料及儀器設備	20
2-2-2 應用 RP-HPLC 純化合成胜肽粗產物	21
2-3 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS)	21
2-3-1 MALDI-TOF MS 所需實驗材料及儀器設備	21
2-3-2 應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成胜肽粗產物	22
2-4 應用 MTT 測試法測試合成胜肽之生物活性及實驗原理	22
2-5 應用 PrestoBlue™ 測試法測試合成胜肽之生物活性及實驗原理	23
2-6 應用 Wound healing assay 評估合成胜肽對癌細胞傷口的癒合率之方法	24
2-7 應用共軛焦顯微鏡觀察合成胜肽是否進入癌細胞內之方法	24
2-8 應用西方墨點法評估合成胜肽對癌細胞蛋白質表現量之方法	25
第三章、結果與討論	26
3-1 胜肽之設計	26
3-2 合成胜肽之生物活性測試	27
3-3 應用 Wound healing assay 評估合成胜肽對癌細胞傷口之癒合率	32
3-4 應用西方墨點法評估合成胜肽對癌細胞蛋白質表現量	33
3-5 應用共軛焦顯微鏡觀察合成螢光標記之胜肽藥物是否進入癌細胞內	34
第四章、未來展望	36
第五章、參考資料	37
第六章、國內外文獻之評述	39
第七章、附錄	41

圖目錄

圖 1. 大腸癌之分期示意圖。.....	10
圖 2. IDA 激活片段 (殘基 184-208) 之結構示意圖。.....	12
圖 3. 細胞內訊號傳遞路徑圖.....	13
圖 4. 環狀胜肽 G1 (A) 和環狀胜肽 G1TE (B) 之化學結構。.....	14
圖 5. IDA-1-3 (A) 及 IDA-1-4 (B) 之前導肽結構圖。.....	14
圖 6. 抗癌胜肽之作用機制圖。.....	15
圖 7. MAPK 抑制劑之 IDA 截短序列圖。.....	16
圖 8. 實驗設計與流程圖。.....	17
圖 9. 固相胜肽合成法之流程圖。.....	19
圖 10. MALDI-TOF MS 之示意圖。.....	22
圖 11. 粒腺體還原酶 (mitochondrial reductase) 將 MTT 還原成紫色不溶性沉澱物 formazan.....	23
圖 12. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度, 觀察對 HT-29 纖維肉瘤細胞之抑制效果。.....	29
圖 13. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度, 觀察對 SW480 結腸癌細胞之抑制效果。.....	29
圖 14. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度, 觀察對 HT-29 纖維肉瘤細胞之抑制效果。.....	30
圖 15. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度, 觀察對 SW480 結腸癌細胞之抑制效果。.....	30
圖 16. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度, 觀察對 HT-29 纖維肉瘤細胞之抑制效果。.....	31
圖 17. IDA 之二級結構模擬示意圖。.....	31
圖 18. 評估稀釋液與 50 μ M 合成胜肽對於 SW480 結腸癌細胞爬行的效力。.....	33
圖 19. 評估 100 μ M 之胜肽藥物之 pMAPK 蛋白質表達量。.....	33
圖 20. 評估 75 μ M FITC-IDA-1 對 HT-29 纖維肉瘤細胞或 SW480 結腸癌細胞, 處理 24 小時後, 對癌細胞是否有影響。.....	34
圖 21. 評估 75 μ M FAM-IDA-1-3 對 HT-29 纖維肉瘤細胞或 SW480 結腸癌細胞, 處理 24 小時後, 對癌細胞是否有影響。.....	35

表目錄

表 1.SPPS 所需之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。.....	18
表 2.RP-HPLC 所需之耗材及試劑、儀器設備及其製造廠商。.....	20
表 3.MALDI-TOF MS 所需之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。.....	21
表 4. BSA Stander 所使用之配方。.....	25
表 5.合成與設計胜肽之胺基酸序列。.....	26
表 6. 合成胜肽處理 HT-29 癌細胞 24 小時後之存活率。.....	27
表 7. 合成胜肽處理 SW480 癌細胞 24 小時後之存活率。.....	28
表 8. 合成胜肽處理 HT-29 癌細胞 24 小時後之存活率。.....	28

中文摘要

細胞內訊息傳遞是細胞重要的生理作用，其促使細胞對外界刺激的反應，例如：細胞的生長、分裂、分化和凋亡等過程。有絲分裂活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 屬於絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶，能將細胞外信號轉導至細胞及細胞核內，並激活轉錄因子，進而調節基因表達，影響細胞生長、分化、凋亡等，因此 MAPK 成為開發抗癌劑的一個重要目標。根據文獻 *Xenopus* 爪蟾的 MAPK 活化部位，含 26 個胺基酸的胜肽序列 (LARVADPDHDHTGFLTEYVATR WYRC - NH₂, IDA) 可以形成磷酸化敏感的二級結構。未磷酸化的 MAPK 胜肽經體外實驗證實可以選擇性地抑制 MAPK 的活性，因此，本實驗室選擇此序列作為模板設計出一系列截短之胜肽序列 IDA-1~3 及其衍生物 IDA-1-1~3，以開發 MAPK 途徑之胜肽類抑制物成為抗癌藥劑。設計的胜肽是應用固相胜肽合成法 (SPPS) 來合成，接著以逆相-高效能液相層析儀 (RP-HPLC) 進行純化及基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 來鑑定胜肽的分子量。鑑定之胜肽以生物活性測試 (MTT assay、prestoblue assay) 及傷口癒合實驗 (wound healing assay) 來評估抑制人類結腸癌細胞 (SW480 及 HT-29) 生長及移動的能力，再利用共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 觀察胜肽藥物是否進入癌細胞內，以及利用西方墨點法 (western blotting) 觀察對特定蛋白質 pMAPK 表達量的差異。MTT assay 及 prestoblue assay 皆證明 IDA-1-3 對 HT-29 癌細胞有較好的生物活性抑制效果；螢光實驗也證明胜肽藥物能進入 HT-29 癌細胞內，然而，在西方墨點法的實驗結果未能看出抑制蛋白表達量的結果，以期本實驗結果可提供探討 MAPK 介導的信號傳導，並開發成為有潛力的抗癌藥劑。

關鍵字：MAPK 途徑、胜肽抑制物、大腸結腸癌、共軛焦顯微鏡

Abstract

Cell signaling is an important physiological function of the cell, which causes the cell to respond to external stimulation. Such as cell growth, division, differentiation, and apoptosis. Protein kinase plays an important role in the signaling pathway. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) belongs to serine/threonine protein kinases, it can be transduction into cells to the nucleus, activating transcription factors and regulating gene expression, therefore MAPK making an important target for the development of anticancer agents. MAPK is activated by phosphorylation within its activation segment. It was reported that a phosphorylation-sensitive secondary structure could be formed in a 26-amino-acid (LARVADPDHDHTGFLTEYVATR WYRC-NH₂, IDA) long synthetic peptide corresponding to the activation segment of *Xenopus* MAPK, termed IDA MAPK peptide. The unphosphorylated IDA MAPK peptide can specifically inhibit *in vitro* MAPK activity. Therefore, we selected this sequence as a template to design a series of peptide analogs IDA-1~3 and IDA-1-1~3. For the development of peptidic inhibitors of MAPK pathway as anticancer agents. These peptide analogs were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS), followed by reverse phase -high performance liquid chromatography (RP-HPLC) purification and matrix assisted laser desorption ionization -time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) characterization of synthetic peptides. Characterized peptides were analyzed for their bioactivities and cell migration by MTT assay, prestoblu assay and wound healing assay in human colon cancer cells (SW480 and HT-29). The cell permeability of peptides was analyzed by using confocal microscopy. We used western blotting to observe different properties of pMAPK protein kinase. According to the results, IDA-1-3 exhibited greater anti-proliferative effect in the colon cancer cells. The cell permeability of peptides were evaluated by analyzing cells treated with FITC labeled IDA-1 and FAM labeled IDA-1-3 using confocal microscopy, and the results suggested that peptides into HT-29 cancer cells. However, the results of the western blotting did not show the inhibition of protein expression. The results can be used to explore MAPK-mediated signaling. It is a potential lead peptide for further development of anticancer agents.

Keywords : MAPK pathway, antagonist, colon cancer cell, confocal microscopy

名詞簡稱及縮寫對照表

ACN	Acetonitrile
AMPs	Antimicrobial peptides
BSA	bovine serum albumin
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CPP	cell-penetrating peptide
DCM	Dichloromethane
DDW	Distilled-deionized water
DIEA	N,N-Diisopropylethamine
DMF	N,N-Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDT	1,2-Ethanedithiol
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
IC ₅₀	the half maximal inhibitory concentration
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight

MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MS	Mass Spectrometry
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Ninhydrin	2,2-Dihydroxyindane-1,3-dione
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium iodide
t _R	Retention time
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography
SH2	Src homology 2
SPPS	Solid phase peptide synthesis
TE	Trypsin-EDTA
TFA	Trifluoroacetic acid
THUROC-1	Fmoc-E-Y-Aib-N-NH ₂
UV	Ultraviolet

第一章、研究背景與目的

1-1 癌症介紹

腫瘤一般分為良性及惡性腫瘤，良性與惡性腫瘤最大的區別在於它們的散播性質，良性腫瘤通常會保持它的局限性質，相反的，惡性腫瘤很容易就經由淋巴、血液或體液等直接轉移侵犯到其他器官。從組織病理學來看，良性腫瘤細胞的顯微結構與來源母細胞看起來十分類似，而惡性腫瘤的細胞與來源組織相異且分化異常，而惡性腫瘤雖經切除後，仍有可能局部復發，或轉移至遠端器官，及造成預後不良^[1]，最終造成死亡。

美國癌症聯合會及國際抗癌聯盟發展出 TNM (Tumor-Node-Metastasis) 分期，是目前最廣為臨床醫師所使用的系統。T 是指腫瘤的大小 (分為 T0-T4)，N 指淋巴腺轉移 (分為 N0-N3)，M 指遠處轉移 (分為 M0-M1)。大腸癌大致上分期的定義為：第零期：腫瘤侵犯前的變化；第一期：腫瘤侵犯到黏膜下層或肌肉層，但只侷限在原發器官；第二期：腫瘤穿過肌肉層至漿膜層或無腹膜覆蓋之大腸及直腸周圍組織侵，但無遠端轉移；第三期：腫瘤轉移到附近淋巴腺；第四期：腫瘤轉移到遠端淋巴腺或遠端組織^[2](如圖 1)。

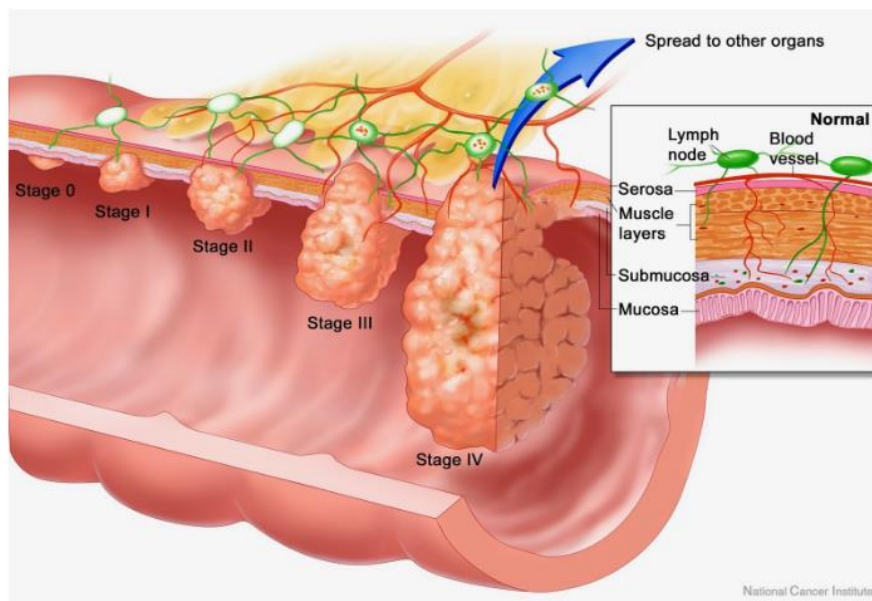


圖 1. 大腸癌之分期示意圖。

(圖片來源：美國國家癌症研究所 National Cancer Institute (NCI))

大腸癌 (colorectal cancer, CRC) 近年來成為國人好發癌症的第一名。根據衛福部國民健康署 2016 年公布最新國人十大癌症排行榜，大腸癌發生人數第 8 度居冠，因國人飲食西化，經常食用高脂肪低纖維的飲食，以及肥胖等因素，因此死亡率逐年上升。一般來說，結腸癌及直腸癌的生長速度緩慢，其起源於息肉，可以持續多年。屬於腺瘤的息肉就是有機會發展成癌細胞的一種息肉，及早切除可以預防癌症的出現。超過 95% 的結腸癌及直腸癌都是腺癌。其分子致病機轉為：(一) 致癌基因 (oncogene) 變異：於第 11 對染色體上，k-Ras 的產物是一種 GTPase (guanosinetriphosphatase)，當 k-Ras 發生突變時，會持續與 GTP 結合，引發一系列的蛋白激酶 (protein kinase) 反應，造成多種細胞核轉錄因子的磷酸化，進而導致細胞癌化。(二) 抑癌基因 (tumor suppressor gene) 變異：APC、DCC、p53 發生突變而失調^[3]。(三) 去氧核糖核酸修補基因 (DNA mismatch repair gene, MMR) 產生變異：DNA 在複製過程中，當發生配對錯誤而無法及時修補而產生癌變。

臨床上對於大腸癌的治療方法主要分成四種：(1) 外科微創手術、(2) 放射線治療、(3) 化學治療、以及 (4) 標靶藥物。其治療方式仍以手術切除為主，其他三者為輔。傳統化療藥物缺乏區別癌細胞和正常細胞的特性，一些正常的細胞也遭受毒害，其副作用包括倦怠、食慾降低、嘔吐、口腔潰瘍、腹瀉、掉髮、指甲變形、免疫力下降、貧血、肝毒性、腎臟毒性…等^[4]。標靶藥物的問世，成為癌症治療的一線曙光。其會循著癌細胞的生物特徵直接攻擊癌細胞，其優點是具有高度的對象選擇性，且藥物毒性與副作用較傳統化學治療減輕許多。因此，開發天然且副作用低的標靶藥物成為研發抗癌藥物的重要課題^[5]。

1-2 IDA 蛋白質

蛋白激酶和磷酸酶在調節、調控代謝、基因表達，細胞生長、細胞運動、細胞分化和細胞分裂方面起關鍵作用。因此，蛋白激酶和磷酸酶的開關對於其催化活性的功能至關重要。多重序列比對已經表明所有的蛋白激酶應該具有相似的結構，這些亞結構域的殘基已經在酶的結構和功能中起重要作用。

目前已知控制的機制包括：透過響應於第二信使作用，進而調控另外的亞基或結構域以進行控制 (例如：環狀 AMP 調控亞基環 AMP 依賴性蛋白激酶 (cyclic AMP-dependent protein kinase, cAPK)、Ca²⁺/鈣調蛋白結合鈣調素依賴性蛋白激酶以及 Ca²⁺ 和二醯基甘油與蛋白激酶 C 的 N 端結構域結合)；根據細胞的功能狀態，控制其他亞基表達量 (例如：細胞週期蛋白依賴性蛋白激酶 (cyclin-dependent protein kinases, CDKs))；透過將激酶靶向不同分子或亞細胞的定位進而控制其他結構域的改變 (例如：Src 激酶的 SH2 和 SH3 結構域)；透過自動調節過程抑制其他激酶的活性 (例如：肌球蛋白輕鏈激酶 (myosin light chain kinase, MLCK))；以及透過激酶和磷酸酶的磷酸化和去磷酸化來控制。特定蘇胺酸、絲胺酸以及酪氨

酸殘基的磷酸化可能發生在許多位點。近年來被認為是許多蛋白激酶位於激酶結構域中心的特定片段的殘基上被磷酸化，其稱為“激活片段” [6]。

IDA 之激活片段定義為跨越保守序列 DFG 和 APE 的區域，並且對應於 cAPK 中的殘基 184-208^[7]。激活區段包括 Thr-197 及 cAPK 中兩個自體磷酸化位點。無活性激酶轉化為活性激酶，其涉及蛋白質中的構象變化，藉由底物結合活化部位使序列正確排列，並釋放空間允許底物進入催化位點。在關鍵的作用位上，利用磷酸化激活片段及構象改變進而影響細胞的表達 (如圖 2)。

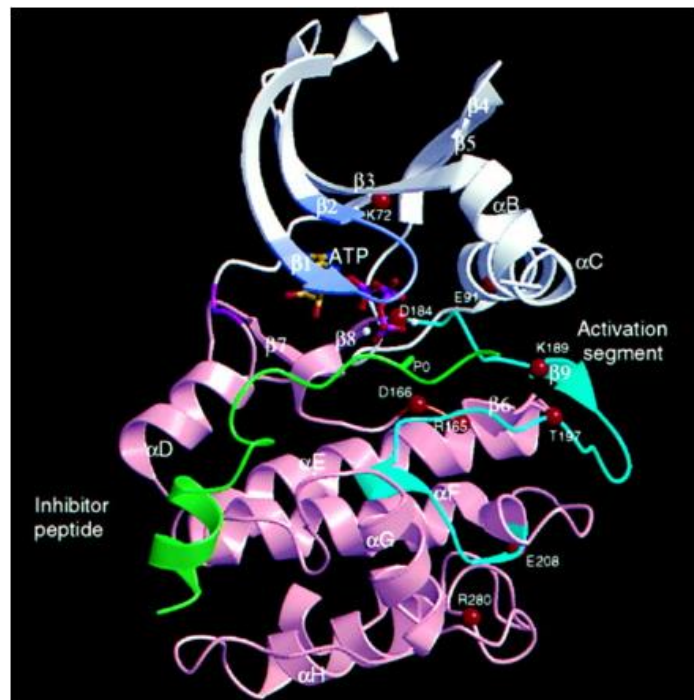


圖 2. IDA 激活片段 (殘基 184-208) 之結構示意圖。

1-3 細胞之訊息傳導

細胞與細胞的溝通方式主要是透過信使 (messengers) 與專一接受體 (specific receptors) 的結合；少數則可利用直接接觸，包括細胞表面抗原與淋巴球細胞膜抗體的結合、相鄰細胞的各式黏膜連結 (adhesions)、及細胞間的連接 (gap junction) 等。人體細胞利用信使溝通的方式，首先是由某細胞釋出第一信使 (primary messengers)，經由體液傳送，鍵結到另一細胞的專一接受體後，產生一定的生理反應，包括細胞增生、分化以及死亡等^[8]。當訊息傳遞路徑上的蛋白質發生突變時，有可能造成細胞癌化。因此，研究拮抗物來阻斷訊息途徑之傳遞成為研發癌症藥物的重要課題。

其中，最廣為人知的就是『表皮生長因子受體』 (epidermal growth factor receptor, 簡稱為 EGFR)，是屬於受體酪氨酸激酶 (Receptor Tyrosine Kinase, 簡稱 RTK) 的一種。當 EGF 與 EGFR 結合 (受器一開始為單體形式) 使受體形成 dimer 後，進行自我磷酸化 (autophosphorylation) 以傳遞訊號，其分為兩種傳遞訊號的方式：一為磷酸化下游蛋白質配體 (ligand)；另一種則藉由 EGFR 上的磷酸根吸引蛋白質結合，而將訊號傳遞下去。當 RTK 被活化後，其磷酸化的部位可吸引 Grb-2 (又稱 Sem-5) 蛋白以其 SH2 domain 與 RTK 結合^[9]，而 Sos 蛋白會再結合至 Grb-2 的 SH3 domain，之後以 SOS 進一步活化 Ras^[10]，將 Ras 結合之 GDP 置換為 GTP 並產生一連串的激酶級聯。第一個激酶為 MAPKKK，作用於 MAPKK 上；第二個激酶通稱為 MAPKK (Mitogen-activated protein kinase kinase)；而第三個激酶通稱為 MAPK (Mitogen-activated protein kinase)，可直接進入細胞核或再透過其他激酶磷酸化轉錄因子，促進基因表現 (如圖 3)^[11]。

其中，RTK^[12] 活化後與蛋白質 Grb2 鍵結，其可辨識 pY-X-N 序列 (X 為任一胺基酸)^{[13],[14]}，藉此與數種訊號蛋白結合來調控細胞內的訊息傳導^[15]，因此，本團隊研發結合 IDA (爪蟾之 MAPK 之活化區域的胜肽序列) 之截短序列及 Grb2 之辨識序列胜肽拮抗物，來影響細胞內蛋白質間的交互作用，以阻斷癌細胞之訊號傳遞，進而抑制癌細胞生長。

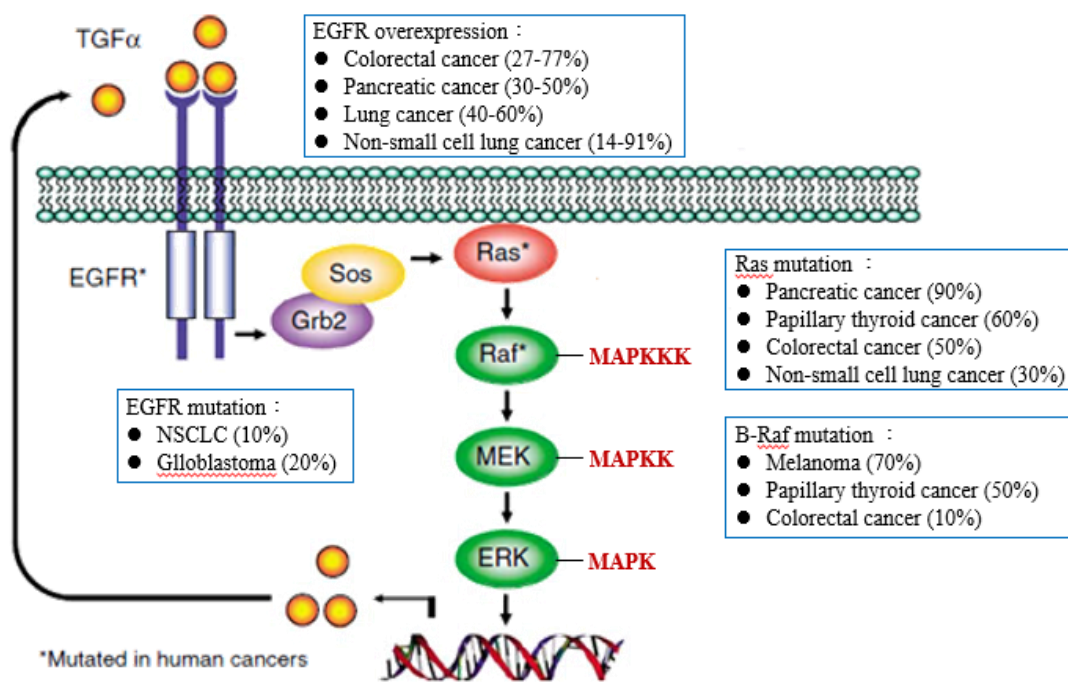


圖 3. 細胞內訊號傳遞路徑圖

1-4 胜肽藥物之設計

在 1997 年，龍等人利用噬菌體顯現技術 (Phage display) 發現了一條具有潛力的非磷酸化胜肽 G1，其為環狀胜肽，序列為 CELYENVGMY^[16](圖 4-A)。G1 為研發 Grb2-SH2 抑制物的前驅，但由於其雙硫鍵的環狀結構會因為還原作用而轉變為線性，而失去生物活性。因此，為了增加 G1 的穩定性及生物活性，刪除氮端及碳端的 Cys，改以硫酯鍵 (thioether-bridged bond) 來取代雙硫鍵之環狀結構，其命名為 G1TE，thioether-bridged (ELYENVGMYC)-amide^[17](圖 4-B)。

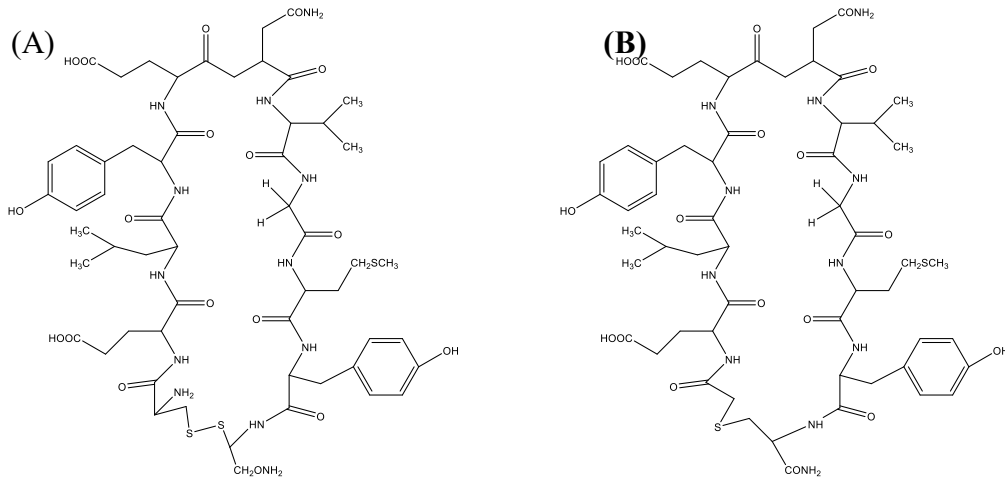


圖 4. 環狀胜肽 G1 (A) 和環狀胜肽 G1TE (B) 之化學結構。

測試結果發現：G1TE 具有和 G1 相當的生物活性，且在生理狀態下有較佳的生物活性結果，因此，本實驗室根據 G1TE 之結構，設計小分子之胜肽衍生物，其胺基酸組成為 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH₂ (THUROC-1)，與原始序列 IDA-1 之氮端有類似的胺基酸序列，因此，我們將前導肽 THUROC-1 的結構結合了 IDA-1 序列之氮端，並選擇了天然胺基酸 Pro 及非天然胺基酸 Aib 進而形成局部彎曲之構型，使胜肽較易與細胞膜作用，以期增加生物活性 (如圖 5)。

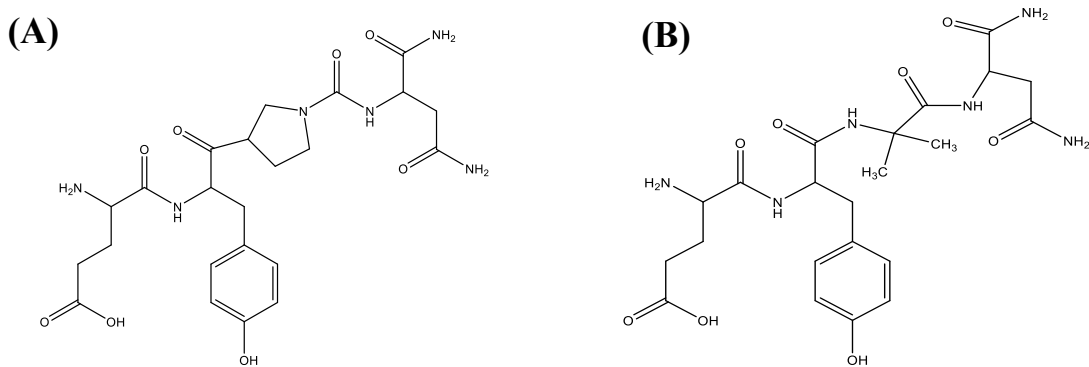


圖 5. IDA-1-3 (A) 及 IDA-1-4 (B) 之前導肽結構圖。

1-5 抗癌胜肽之簡介

癌症為國人第一大死因，因此為重大關切議題，新藥治療或策略的發展刻不容緩。與其他小的有機分子和蛋白質相比，抗癌胜肽 (Anticancer peptides, ACPs) 具有幾個特殊性質，如分子量小，降低免疫反應，良好的生物相容性，序列多樣性及多修飾位點。因此，抗癌胜肽已成為抗癌藥物之候選藥物。

抗癌胜肽可分為抑制活性，壞死和凋亡三大機制路徑。對於抑制劑活性，它們可以靶向癌細胞表面的跨膜蛋白抑制遷移和轉移。因此，它們也可以作為靶向治療。大多數的胜肽，例如抗微生物胜肽 (antimicrobial peptides, AMPs)，他們可以快速結合帶高度負電荷的癌細胞膜上，並透過靜電作用力靠近細胞，並透過疏水性作用力，使癌細胞凋亡。部分 ACPs 可誘導細胞粒線體滲透或腫脹並釋放細胞色素c (cytochrome c, Cyt c) 導致癌細胞凋亡^{[18],[19]}(如圖 6)。然而，胜肽具低穩定性和容易被腎臟代謝等缺點，因此需加以修飾以增加其生物活性。

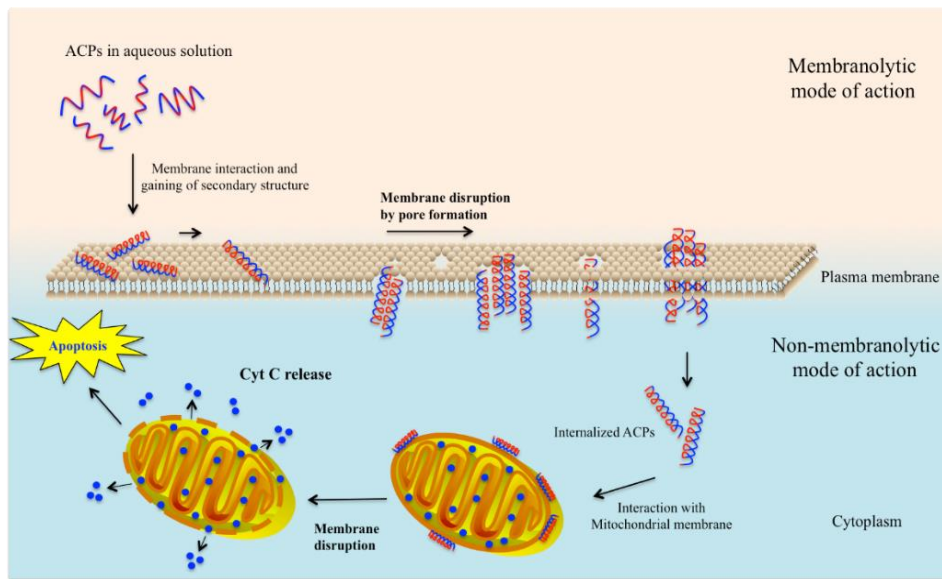


圖 6.抗癌胜肽之作用機制圖。

1-6 研究動機與目的

癌症連續 30 年為國人十大死因之首，因此此健康議題為眾人所關注。大腸癌 (colorectal cancer, CRC) 近年來成為國人好發癌症的第一名，對於國人生命造成一大威脅。在目前臨床治療幾乎都會有副作用包括倦怠、食慾降低、嘔吐、口腔潰瘍、腹瀉、免疫力下降…等，治療期間嚴重影響病人的生活品質，因此，開發天然且副作用小的胜肽抗癌藥物為重要的課題。

本實驗室針對致癌基因 k-ras 突變中較下游的分子，有絲分裂活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinases (簡稱 MAPK) 訊息傳導路徑進行研究。文獻中指出 MAPK 路徑涉及細胞增殖、細胞分化、癌症發生和細胞凋亡的過程^[20]，因此，為了研發具抗癌功效之胜肽衍生物並探討路徑機制之影響。

MAPK 之 IDA (Inter-DFG-APE) 胜肽片段為爪蟾的 MAPK 的活化部位，可形成對磷酸化敏感的二級結構；體外實驗證實未磷酸化的 MAPK IDA 胜肽可以選擇性地抑制 MAPK 的活性，因此，我們利用 IDA 胜肽之胺基酸序列作為模板 (如圖 7)，設計一系列胜肽衍生物，這一系列線性胜肽，應用生物活性評估合成胜肽對大腸直腸癌細胞的抑制效力；應用共軛焦顯微鏡觀察藥物是否進入癌細胞內；並應用西方墨點法觀察胜肽藥物是否降低蛋白質的表達量；藉由實驗測試結果評估胜肽藥物之結構活性關係 (structure activity relationship, SAR) 所得的結果，以期研發 MAPK 之抑制物作為抗癌藥劑之模板。

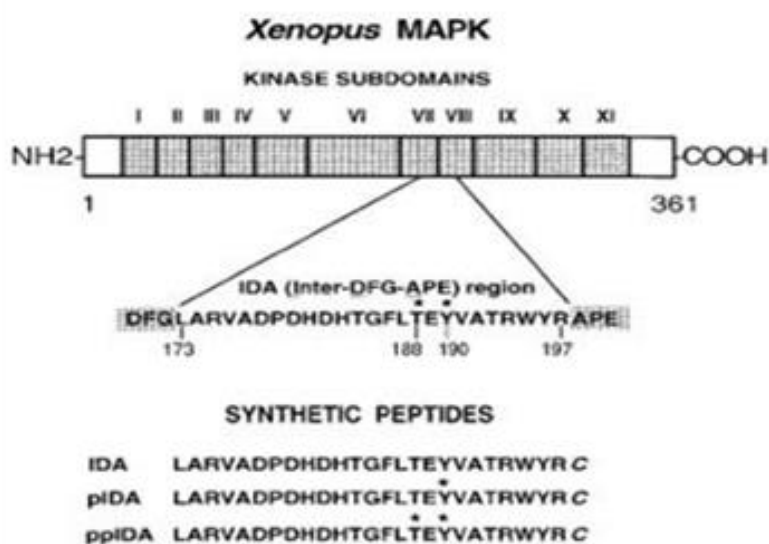


圖 7. MAPK 抑制劑之 IDA 截短序列圖。

1-7 實驗設計與流程

實驗流程為：(1) 應用 SPPS 固相胜肽合成法合成所設計之胜肽衍生物；(2) 應用 RP-HPLC 純化與分析合成胜肽藥物之滯留時間；(3) 應用 MALDI-TOF-MS 鑑定合成胜肽之分子量；(4) 應用 MTT assay 及 prestoblue assay 進行生物活性測試評估合成胜肽抑制癌細胞之效果；(5) 應用傷口癒合實驗，觀察合成胜肽抑制癌細胞爬行能力；(6) 應用共軛焦顯微鏡

觀察胜肽藥物是否進入細胞內與癌細胞作用；(7) 應用西方墨點法觀察癌細胞內特定蛋白質 pMAPK 表達量是否降低。實驗設計與流程如圖 8 所示。

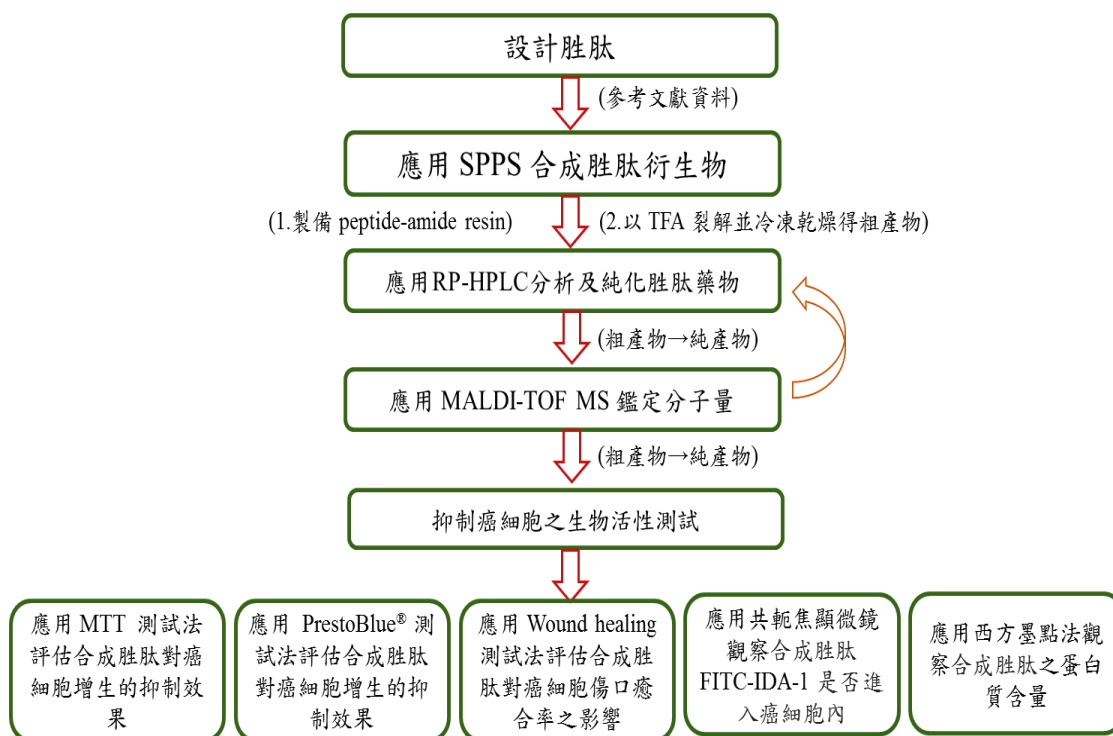


圖 8. 實驗設計與流程圖。

第二章、材料與方法

2-1 固相胜肽合成法所需實驗材料及設備

固相胜肽合成法 (Solid-phase peptide synthesis, 簡稱 SPPS) 所需之試劑及耗材, 相關資料整理於表 1。

表 1.SPPS 所需之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。

實驗試劑、耗材及儀器設備	製造廠商
Column PD-10, Empty	GE Healthcare, 美國
Rink Amide AM resin (200-400 mesh)	MERCK, 德國
N _α -Fmoc-D-Amino Acids	AnaSpec, 美國
HBTU, anhydrous	AgeneMax, 台灣
HOBt, anhydrous	AgeneMax, 台灣
N-Ethyldiisopropylamine	Alfa Aesar, 美國
Dichloromethane	Macron Fine Chemicals, 美國
N,N-Dimethylformamide	DUKSAN, 南韓
Piperidine	MERCK, 德國
Trifluoroacetic acid	MERCK, 德國
Ethoxyethane	SIGMA, 美國
氮氣	東洋氣體有限公司, 台灣

2-1-1 固相胜肽合成法

本實驗室應用固相胜肽合成法 (Solid-phase peptide synthesis, 簡稱 SPPS), 由 R.Bruce

Merrifield 所發表的實驗方法，其應用 AM resin 作為起始胺基酸的固相支撐物。因 AM resin 上有對鹼性環境下不穩定的 Fmoc- 保護基 (9-fluorenylmethyl oxycarbonyl, Fmoc-protecting group)，加入 5 mL 鹼性的 30% Piperidine/DMF 混合反應 15 分鐘，重複三次，使樹脂及胺基酸的 N 端裸露出 NH-，使用耦合試劑 (HOBt : HBTU : DIEA = 1 : 1 : 2) 以活化後胺基酸的 C 端，可貼附於樹脂上。當第一個胺基酸成功貼附在樹脂上後，加入 5 mL DMF 清洗 5 分鐘，再以 Ninhydrin reaction 鑑定是否耦合成功。確定耦合成功，再用 30% Piperidine/DMF 去除第一個胺基酸 N α 端上的 Fmoc- 保護基，使第二個胺基酸再接上，重複上述步驟，依序耦合上胺基酸，最後以化學試劑 TFA 將肽從樹脂上裂解下來，並同時切除所有胺基酸側鏈上的保護基，再利用減壓過濾取得濾液，以氮氣吹除裂解液，再加入 5 mL 乙醚使肽沉澱，即可得到肽粗產物。合成之實驗流程圖 (如圖 9) 所示。

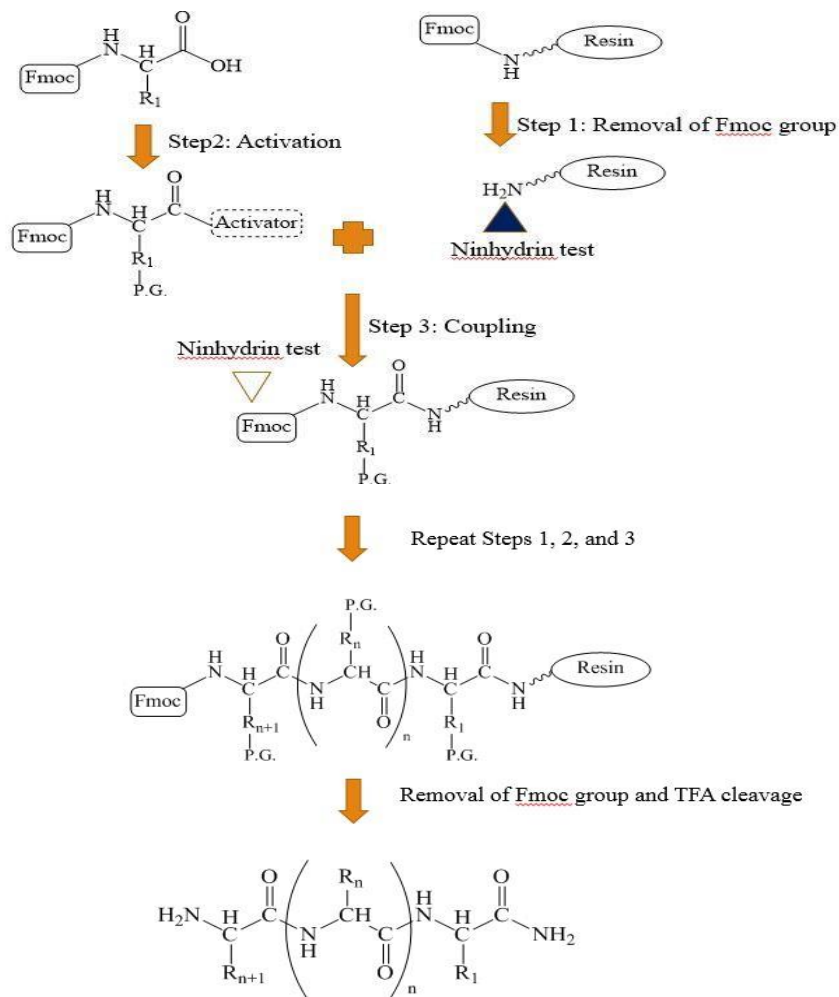


圖 9. 固相肽合成法之流程圖。

2-1-2 合成胜肽之螢光標記

前製之合成步驟如 2-1。將合成序列皆合至樹脂上後，加入 5 mL 鹼性的 30% Piperidine/DMF 混合反應 15 分鐘，重複三次，移除氮端 (NH₂-) Fmoc 保護基，再秤取 0.2 mmole 之 Ahx (N-ε-Aminocaproic acid) 作為架橋，並溶於 5mL DMF 中，並混合 27 mg HOAT、76 mg HATU 及 70 μL DIEA 活化試劑，加入至 PD-10 管中與樹脂反應一夜，待反應完後再重複前述步驟，再秤取 0.2 mmole 之 FAM (5 - (and - 6) - Carboxyfluorescein) 螢光標記物並與 DMF 及活化試劑進行反應，反應一夜後，以 DMF 清洗樹脂，並加入 TFA 混合液 4~6 小時，將胜肽從樹脂上裂解下來，即可得胜肽之螢光標記物。

2-2 應用逆相高效能液相層析儀法 (RP-HPLC) 純化胜肽粗產物

2-2-1 RP-HPLC 所需實驗材料及儀器設備

RP-HPLC 所需耗材及試劑和儀器設備分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 2。

表 2.RP-HPLC 所需之耗材及試劑、儀器設備及其製造廠商。

實驗試劑、耗材及儀器設備	製造廠商
逆向高效能液相層析儀 Pump L-2130	株式会社日立製作所，日本
逆向高效能液相層析儀 UV Detector L-2130	株式会社日立製作所，日本
Ascentis™ C18 HPLC Column (25 cm × 10 mm, 5 μm)	Supelco，美國
Microliter Syringes	Hamilton，美國
Smart Synergy-Type I 超純水系統	MERCK，德國
Durapore™ Membrane Filter (0.22 μm GV)	Millipore，美國
Acetonitrile	J.T.Baker，美國

Trifluoroacetic acid	MERCK，德國
TERUMOTM SYRINGE with NEEDLE (1 cc)	Terumo，日本
PureTech™ Syringe Filter (0.22 μm)	致寬科技股份有限公司，台灣

2-2-2 應用 RP-HPLC 純化合成胜肽粗產物

將合成的胜肽應用逆相高效能液相層析儀 (reverse-phase high performance liquid chromatography, 簡稱 RP-HPLC) 分離及純化。此層析法的原理是藉由移動相 (mobile phase) 通過固定相 (stationary phase) 達到分離的效果；當胜肽混合物樣品稀釋溶液通過分離管柱時，不同胜肽的成分，在非極性固定相管柱滯留時間的差異 (親合力作用不同)，達到分離純化的目的。本實驗室選用孔徑為 0.22 μm 過濾膜 (filter) 過濾樣品及層析管柱為孔徑 10 μm 之 C18 管柱以制定最適當之離析率，其偵測波長為 225 nm，固定流速為 4 mL/min，而 RP-HPLC 移動相溶劑組成為 solvent A：4 L D.D.water + 0.05 % trifluoroacetic acid (TFA)，而 solvent B：4 L Acetonitrile + 0.05 % trifluoroacetic acid (TFA)，其中加入微量的 TFA，主要是利用共同離子效應來防止胜肽解離。

2-3 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS)

2-3-1 MALDI-TOF MS 所需實驗材料及儀器設備

MALDI-TOF MS 所需之試劑和儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 3。

表 3.MALDI-TOF MS 所需之試劑耗材、儀器設備及其製造廠商。

實驗試劑、儀器設備	製造廠商
基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀 <u>microflex</u>	Bruker，德國
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	Aldrich，美國
Acetonitrile	<u>J.T.Baker</u> ，美國
<u>Trifluoroacetic acid</u>	MERCK，德國

2-3-2 應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成胜肽粗產物

將合成的胜肽應用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜技術 (Matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, 簡稱 MALDI-TOF MS) 鑑定純化的胜肽。其利用雷射照射分析物與基質 (CHCA) 形成共結晶，基質會吸收雷射光的能量，傳遞給分析物，使其游離出帶電離子，這些帶電的離子在進入飛行管之前會有一電壓使所有離子集中在同一起始位置後，再經電場加速送入飛行管。不同的離子會因質荷比不同而有不同速度，藉由達到偵測器的時間長短求得質荷比 (m/z)，與其所對應的強度 (intensity) 的質譜圖形 (如圖 10)。

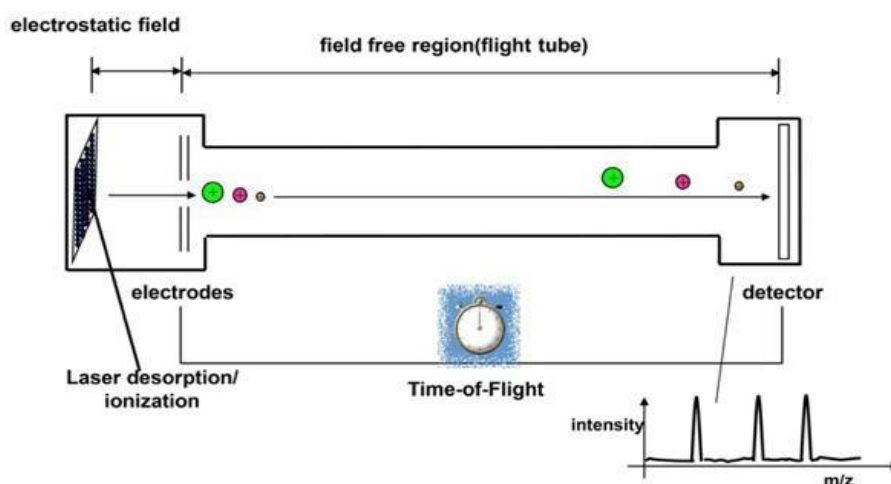


圖 10. MALDI-TOF MS 之示意圖。

2-4 應用 MTT 測試法測試合成胜肽之生物活性及實驗原理

經過鑑定並確認後的純胜肽應用 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) 測試法評估其抑制癌細胞增生的功效即癌細胞的代謝活動。本實驗室將人類大腸癌細胞以 RPMI-1640 培養液進行培養，RPMI-1640 粉末溶於 900 mL 滅菌水中，加入 2 g NaHCO_3 ，並利用 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 及 6 N HCl 調整至 pH 值至 7.1~7.2，再加入 5 mL L-Glutamin、NEAA 以及 penicillin，最後加入 50 mL 胎牛血清，培養液利用 0.22 μm 濾杯進行過濾，再吸取 1 mL 進行培養液測試兩天。培養細胞於培養盤中，當細胞生長到培養盤的八分滿時，抽去培養液再加入 2 mL 的 TE (trypsin-EDTA, TE) 緩衝液，待 3~5 分鐘，培養盤中的細胞會脫離培養盤的底部 (trypsin 作用為分解細胞附著在培養盤的附著蛋白質，EDTA 作用為去除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金屬

離子，以避免金屬離子影響 trypsin 的作用效果，讓細胞易與培養盤分開)。用 5 mL 的培養液清洗細胞培養盤，並收集培養盤中的溶液至 15 mL 離心管內，在轉速 1500 rpm 下，離心 5 分鐘，最後取其沉澱物，加入 10 mL 培養液並取細胞懸浮液 10 μ L 計數細胞濃度，使細胞濃度為 1×10^5 cells/mL，取細胞液 300 μ L 至 24 孔盤中培養至隔天等細胞貼附後，加入合成肽藥物，培養 24 小時，再加入 MTT 試劑培養 1 小時後細胞會有紫色結晶產生，再加入 DMSO 溶掉結晶，以偵測細胞 OD (optical density) 值。

MTT 測試法的原理 (如圖 11) 為活細胞的粒線體中包含琥珀酸脫氫酶，能使外源性 MTT 還原為不溶性的藍紫色結晶 - 甲瓚(formazan)並沉積在細胞中，再以二甲基亞砷(DMSO)溶解細胞中的甲瓚結晶，在觀察 OD₅₇₀ 吸光值的變化，顏色深淺與存活率成正比關係。最後應用 ELISA reader 測定甲瓚結晶溶解液之吸光值，經數據分析後，評估合成肽對大腸癌細胞的抑制效果。

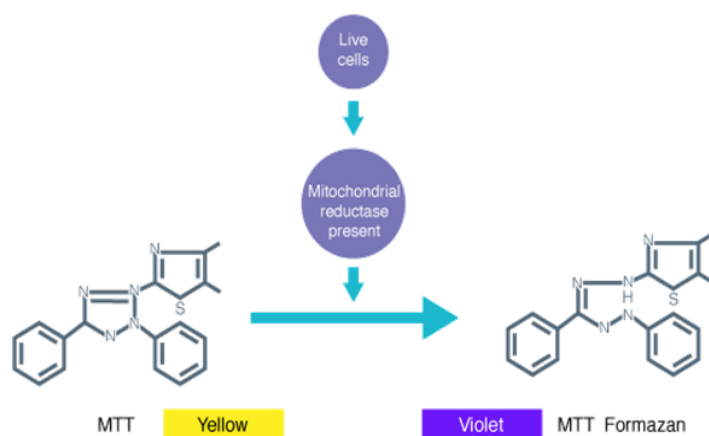


圖 11. 粒腺體還原酶 (mitochondrial reductase) 將 MTT 還原成紫色不溶性沉澱物 formazan。
(資料來源：http://www.seeingbioscience.com/tech_1_2.html)

2-5 應用 prestoblue™ 測試法測試合成肽之生物活性及實驗原理

Prestoblue™ 試劑為一種刃天青 (resazurin) 溶液。它利用活細胞的還原能力來定量測定培養盤中的細胞活性。Prestoblue™ 試劑中包含了一種細胞通透性的化合物，這種化合物是藍色的且沒有螢光，在加入細胞後 Prestoblue™ 試劑被活細胞還原變成粉紅色^[21]。本實驗室將人類大腸癌細胞以 RPMI-1640 培養液，培養於細胞培養盤中。當細胞生長到培養盤的八分滿時，抽去培養液再加入 2 mL 的 TE 緩衝液 (trypsin-EDTA, TE)，待 3~5 分鐘，培養盤中的細胞會脫離培養盤的底部 (trypsin 作用為分解細胞附著在培養盤的附著蛋白質，EDTA 作用為去除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金屬離子，以避免金屬離子影響 trypsin 的作用效果，讓細胞易與培養

盤分開)。用 5 mL 的培養液清洗細胞培養盤，並收集培養盤中的溶液至 15 mL 離心管內，在轉速 1500 rpm 下，離心 5 分鐘，最後取其沉澱物，加入 10 mL 培養液並取細胞懸浮液 10 μ L 計數細胞濃度，使細胞濃度為 1×10^5 cells/mL，取細胞液 300 μ L 至 24 孔盤中培養至隔天等細胞貼附後，加入合成胜肽藥物，培養 24 小時，再加入 PrestobluTM 試劑(1 : 10 PrestobluTM/medium) 測量細胞存活率，且因 PrestobluTM 無需用 DMSO 溶解結晶較 MTT 更精準及安全。

2-6 應用 Wound healing assay 評估合成胜肽對癌細胞傷口的癒合率之方法

本實驗室將人類大腸癌細胞以 RPMI-1640 培養液，培養於細胞培養盤中。當細胞生長到培養盤的八分滿時，抽去培養液再加入 2 mL 的 TE 緩衝液 (trypsin-EDTA, TE) ，待 3~5 分鐘，培養盤中的細胞會脫離培養盤的底部，用 5 mL 的培養液清洗細胞培養盤，並收集培養盤中的溶液至 15 mL 離心管內，在轉速 1500 rpm 下，離心 5 分鐘，每孔注入 1×10^5 個細胞/100 μ L 細胞液，至插入 Stoppers 之 96 孔盤中，於培養箱中培養 24 小時。待細胞貼附滿後，加入合成胜肽藥物，培養 24 及 48 小時。利用倒立式顯微鏡來擷取 96 孔盤中的影像，並拍攝觀察不同時間點 (0、24 及 48 小時)，細胞爬行的狀況，並評估合成胜肽與對照組對於癌細胞傷口的癒合率是否有減緩。

2-7 應用共軛焦顯微鏡觀察合成胜肽是否進入癌細胞內之方法

應用共軛焦顯微鏡觀察具螢光標記的合成胜肽對大腸癌細胞之穿膜效果。將大腸癌細胞培養至適當的密度後，利用胰蛋白酶分解、收集細胞、離心處理。本實驗室將細胞培養於 24 孔盤中，先置入 1% HCl、DDW 及 ethanol 預先處理過的蓋玻片，再將細胞分種至培養盤的每個孔洞中，每一孔洞約含 1×10^5 cells / 300 μ L 培養液，放入 37°C 培養箱中培養 24 小時，待細胞貼附在蓋玻片上。我們以培養液為對照組；實驗組為 50 μ M 不同的胜肽藥物，加入孔盤中。放入培養箱中於 24 小時觀察藥物是否進入癌細胞中。首先取出的蓋玻片利用緩衝液 PBS 清洗掉殘留的培養液，將蓋玻片上的細胞利用 3.7 % 的甲醛固定 20 分鐘，使細胞停止代謝且保持不腐敗；接著使用 0.1 % PBST (PBS + 0.05 % Triton X-100) 處理，以增加細胞膜的通透性；再來加入 PI (Propidium iodide) 混合液 (PI:RNase:0.05 % PBST = 1:1:500 再加 50 μ L FBS)，此試劑會與核酸結合以確定細胞核之位置，最後利用共軛焦顯微鏡來觀察大腸癌細胞中胜肽藥物是否進入癌細胞內。

2-8 應用西方墨點法評估合成胜肽對癌細胞蛋白質表現量之方法

西方墨點法利用特定抗體能夠專一結合其抗原蛋白質，來對樣品進行分析。透過樣品位置 and 呈色深度獲得特定蛋白質在所分析的細胞中的表現情形。取 200 μL PRO-PREP™ 細胞裂解液，待約 3~5 分鐘，利用刮刀將細胞從培養盤中裂解下來，可儲存至 -20°C 冰箱。再利用 2mg/mL BSA Stander 與待測樣品以 Bradford assay 進行定量 (如表 4)。

表 4. BSA Stander 所使用之配方。

Table 1. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube and Microplate Protocols (Working Range = 100–1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			
Vial	Volume of Diluent	Volume and Source of BSA	Final BSA Concentration
A	0	300 μL of Stock	2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
B	125 μL	375 μL of Stock	1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
C	325 μL	325 μL of Stock	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
D	175 μL	175 μL of vial B dilution	750 $\mu\text{g}/\text{mL}$
E	325 μL	325 μL of vial C dilution	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
F	325 μL	325 μL of vial E dilution	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
G	325 μL	325 μL of vial F dilution	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$
H	400 μL	100 μL of vial G dilution	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
I	400 μL	0	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = Blank

將膠片齒梳拆除後，加入 Running buffer (reuse) 至電泳槽的刻度線，loading 5 μL 或 2 μL 標準品及 20 μL 待測樣品，與 5 μL 呈色試劑進行混合，設定電壓為 200 V，待標準品跑至膠片底部，便可停止加壓 (約 40~60 分鐘)。於 DDW 中取出膠片，將膠片利用 invitrogen 乾式轉漬儀，將膠片轉印至 NC paper 上。配製麗春紅 (ponceau S) (20 mg ponceau S + 1 mL acetic acid + 20 mL DDW) 觀察待測樣品之蛋白質質量區間，再配製 1 g 脫脂奶粉 (1 g 脫脂奶粉 + 20 mL PBST) 於 70 rpm 振盪器上約 1 小時，進行 blocking，再將所需要觀察之蛋白質區段進行切割。以 PBST 清洗 NC paper 後，加入一級抗體，於冷房搖晃一夜，再以 PBST 清洗，加入二級抗體，於冷房搖晃一夜，再以 PBST 清洗後，加入 2000 μL 顯色劑，約 30~60 分鐘，即可觀察待測樣品之蛋白質含量並進行掃描。

第三章、結果與討論

3-1 胜肽之設計

MAPK 之 IDA (Inter-DFG-APE) 胜肽片段為爪蟾的 MAPK 的活化部位，可形成對磷酸化敏感的二級結構；可以選擇性地抑制 MAPK 的活性，因此，我們利用 IDA 胜肽之胺基酸序列作為模板，設計一系列胜肽衍生物（如表 5）。IDA-1 及 IDA-2 分別為 IDA-3 截短片段，根據 MTT assay 測試結果為 IDA-1 具有較好的抑制效果，因此又以 IDA-1 為模板設計出後續的胜肽衍生物，其分別為：IDA-1-1 為合成雙重磷酸化之胺基酸 (Tyr、Thr) 於序列上；IDA-1-2 為將較小分子量的 Ala 置換成疏水性胺基酸 (Leu)，以及將體積較大的 Trp 置換成帶正電胺基酸 (Arg)；IDA-1-3 及 IDA-1-4 為加入前導肽之序列，將帶正電的 Arg 置換成疏水性胺基酸 (Leu)，並以天然胺基酸 Pro 及非天然胺基酸 Aib 進而形成局部彎曲之結構，使胜肽藥物較容易進入癌細胞膜內。藉由胺基酸序列的改變，以期增加胜肽藥物抑制癌細胞的效果。

表 5.合成與設計胜肽之胺基酸序列。

Name	Amino acid sequence
IDA-1	YVATRWYRC - CONH ₂
IDA-2	DHTGFLTEYVATRWYRC - CONH ₂
IDA-3	LARVADPDHDHTGFLTEYVATRWYRC - CONH ₂
IDA-1-1	TEYVATRWYRC - CONH ₂
IDA-1-2	TEYVLTTRYRC - CONH ₂
IDA-1-3	TEYPNTRYRC - CONH ₂
IDA-1-4	TEYAibNTRYRC - CONH ₂

3-2 合成胜肽之生物活性測試

本實驗應用 MTT assay 評估合成胜肽抑制大腸癌細胞 (HT-29 纖維肉瘤細胞及 SW480 結腸癌細胞) 增生的功效及癌細胞的代謝活動。將合成胜肽藥物稀釋成不同濃度 (0、25、50 及 75 μM) 分別處理，其測試所得結果如表 6 及表 7。我們又選擇具有較好抑制效果的胜肽分別為 IDA-1、IDA-1-3 以及含非天然胺基酸之序列 IDA-1-4，利用 Prestoblue cell viability assay，評估對 HT-29 纖維肉瘤細胞之活性測試，其測試結果如表 8。

表 6. 合成胜肽處理 HT-29 癌細胞 24 小時後之存活率。

濃度 胜肽	胜肽藥物處理 HT-29 癌細胞之存活率結果				
	0 μM	25 μM	50 μM	75 μM	IC50(μM)
IDA-1	100 \pm 4.1	99.18 \pm 4.8	82.63 \pm 2.6	47.52 \pm 3.1	73.1 μM
IDA-2	100 \pm 6.7	71.74 \pm 1.9	71.38 \pm 5.9	64.91 \pm 13.2	N/A
IDA-3	100 \pm 6.8	90.81 \pm 4.5	101.31 \pm 2.7	51.70 \pm 4.6	N/A
IDA-1-1	100 \pm 4.6	103.15 \pm 3.3	101.32 \pm 3.5	95.66 \pm 7.0	N/A
IDA-1-2	100 \pm 5.4	92.82 \pm 4.6	84.99 \pm 6.1	70.82 \pm 2.1	N/A
IDA-1-3	100 \pm 2.9	101.76 \pm 5.6	52.48 \pm 6.0	109.80 \pm 6.0	N/A

表 7. 合成胜肽處理 SW480 癌細胞 24 小時後之存活率。

濃度 胜肽	胜肽藥物處理 SW480 癌細胞之存活率結果				
	0 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	IC ₅₀ (μ M)
IDA-1	100 \pm 7.2	115 \pm 8.7	109.58 \pm 4.3	106.27 \pm 4.2	N/A
IDA-2	100 \pm 2.7	88.75 \pm 2.3	93.02 \pm 2.4	93.39 \pm 7.9	N/A
IDA-3	100 \pm 1.7	100.32 \pm 1.5	102.58 \pm 0.6	100.75 \pm 1.7	N/A
濃度 胜肽	0 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	IC ₅₀ (μ M)
IDA-1-1	100 \pm 0	92.49 \pm 0	91.95 \pm 0	92.41 \pm 0	N/A
IDA-1-2	100 \pm 3.1	106.08 \pm 2.0	96.53 \pm 2.6	92.62 \pm 0.6	N/A
IDA-1-3	100 \pm 2.4	90.50 \pm 2.0	93.40 \pm 1.7	93.54 \pm 2.0	N/A

表 8. 合成胜肽處理 HT-29 癌細胞 24 小時後之存活率。

濃度 胜肽	胜肽藥物處理 SW480 癌細胞之存活率結果				
	0 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	IC ₅₀ (μ M)
IDA-1	100 \pm 0.1	101.22 \pm 3.2	95.07 \pm 2.8	88.06 \pm 0.4	N/A
IDA-1-3	100 \pm 1.8	85.87 \pm 3.0	81.84 \pm 2.9	79.59 \pm 5.0	N/A
IDA-1-4	100 \pm 4.5	94.76 \pm 4.0	89.24 \pm 5.5	87.48 \pm 5.5	N/A

MTT assay 之結果顯示：胜肽藥物 IDA-1、IDA-2 及 IDA-3 在 HT-29 細胞中，濃度為 75 μM 時，IDA-1 有較好的抑制效果；而 SW480 細胞中，胜肽藥物均無明顯抑制作用。本團隊藉由短序列 IDA-1 之生物活性測試結果，設計一系列 IDA-1 衍生物 (分別為 IDA-1-1、IDA-1-2 及 IDA-1-3)，其結果為 IDA-1-3 在 HT-29 細胞中，濃度為 50 μM 下，有較好的抑制效果 (如圖 12 .圖 13.

圖 14. 圖 15)。而 PrestoBlue cell viability assay 之結果也顯示：IDA-1-3 有較好的抑制效力(如圖 16)。

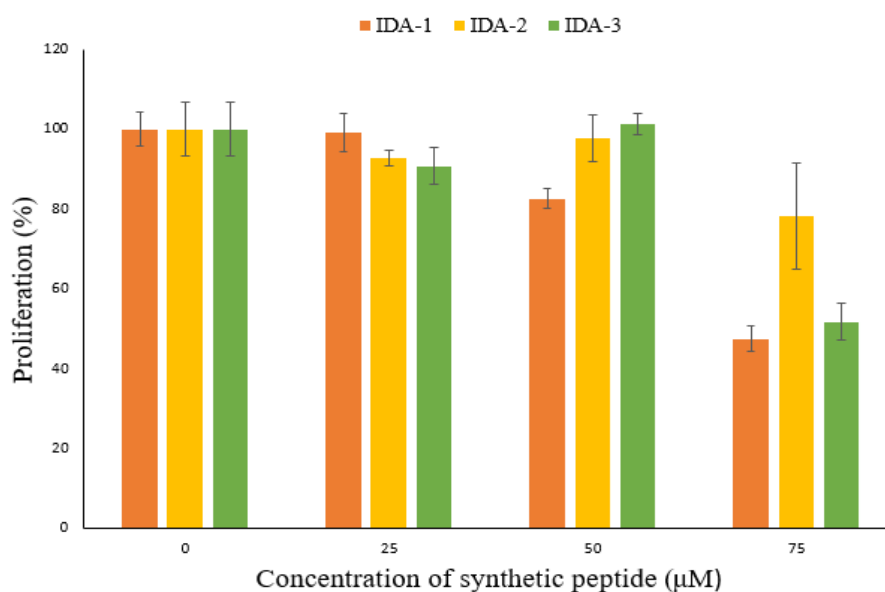


圖 12. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度，觀察對 HT-29 纖維肉瘤細胞之抑制效果。

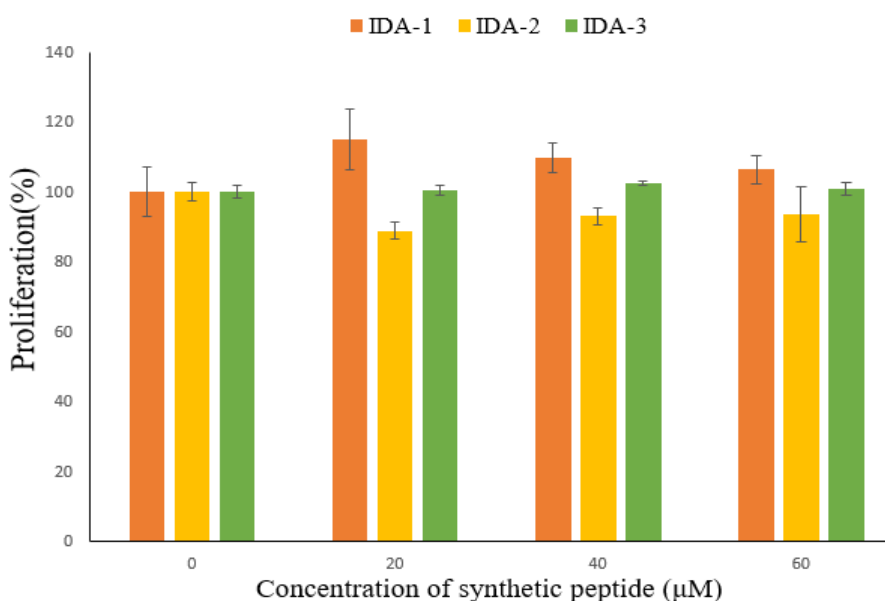


圖 13. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度，觀察對 SW480 結腸癌細胞之抑制效果。

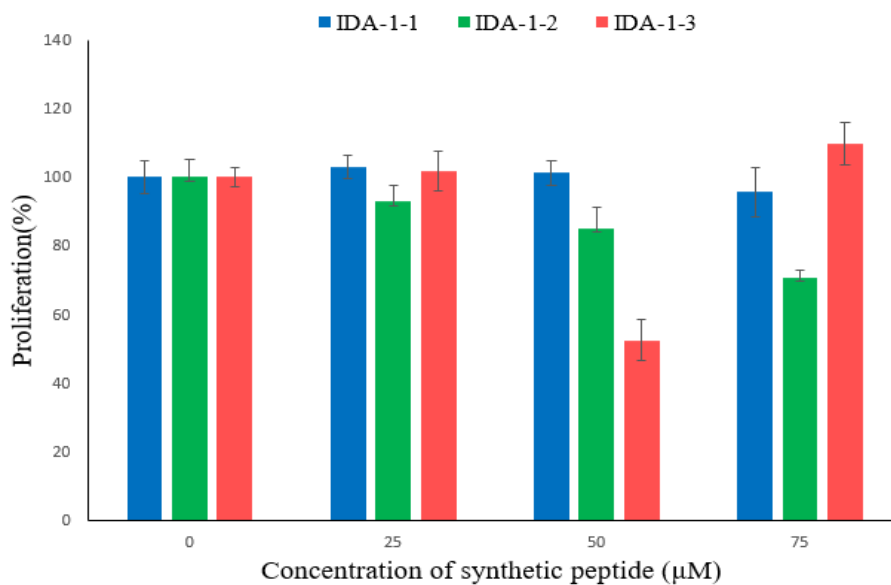


圖 14. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度，觀察對 HT-29 纖維肉瘤細胞之抑制效果。

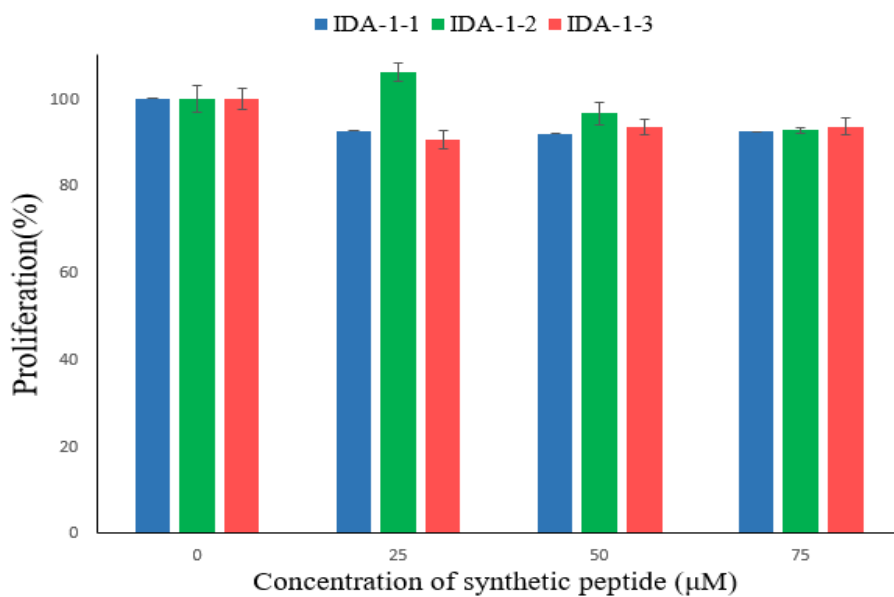


圖 15. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度，觀察對 SW480 結腸癌細胞之抑制效果。

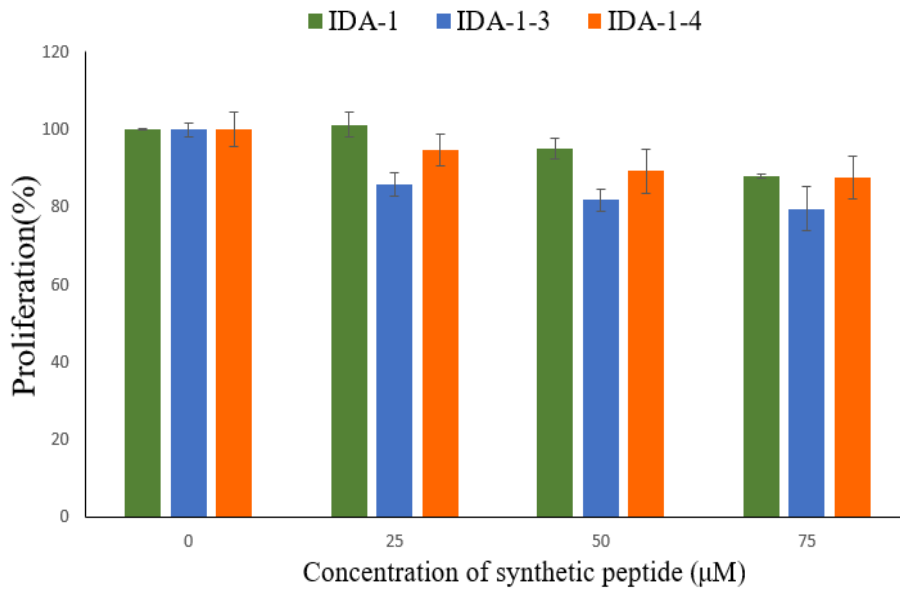


圖 16. 將胜肽藥物稀釋成不同濃度，觀察對 HT-29 纖維肉瘤細胞之抑制效果。

由以上結果觀察 IDA-1 之生物活性測試結果，可推測雙重磷酸化的胺基酸（分別為 T188 及 Y190）T188 對 N 端可能具有重要的作用，且因由二級模擬結構圖（如圖 17）可知 IDA-1 具有 α -helix 之二級結構，可使胜肽藥物較易進入膜內^[22]，因此具有較好的抑制效果。原始序列 IDA-3 抑制效果較不明顯，可能是因為其胜肽序列較長，使胜肽藥物不易穿透細胞膜與癌細胞作用；而 IDA-1 衍生序列 IDA-1-3 於濃度 50 μ M 下，約有半數抑制癌細胞的效果，較 IDA-1 (75 μ M) 效果佳。之後我們又以 Prestoblue assay 進行測試，其結果也證明 IDA-1-3 有較佳的抑制效果，其推測為天然胺基酸 Pro 所形成的局部彎曲結構，使胜肽藥物之構型形成類似鈎子的結構與細胞膜作用，且較不易被腎臟代謝，因此具有較好的抑癌功效，後續將選擇 IDA-1-3 作為癌症藥物之設計模板，以開發新穎抗癌胜肽藥物。

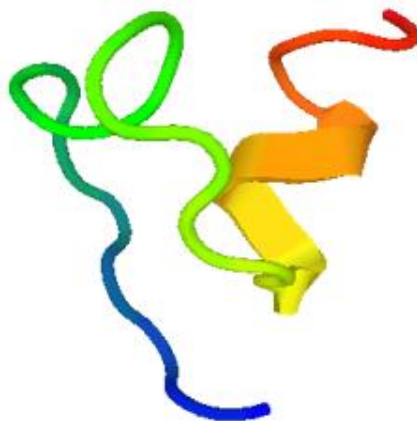
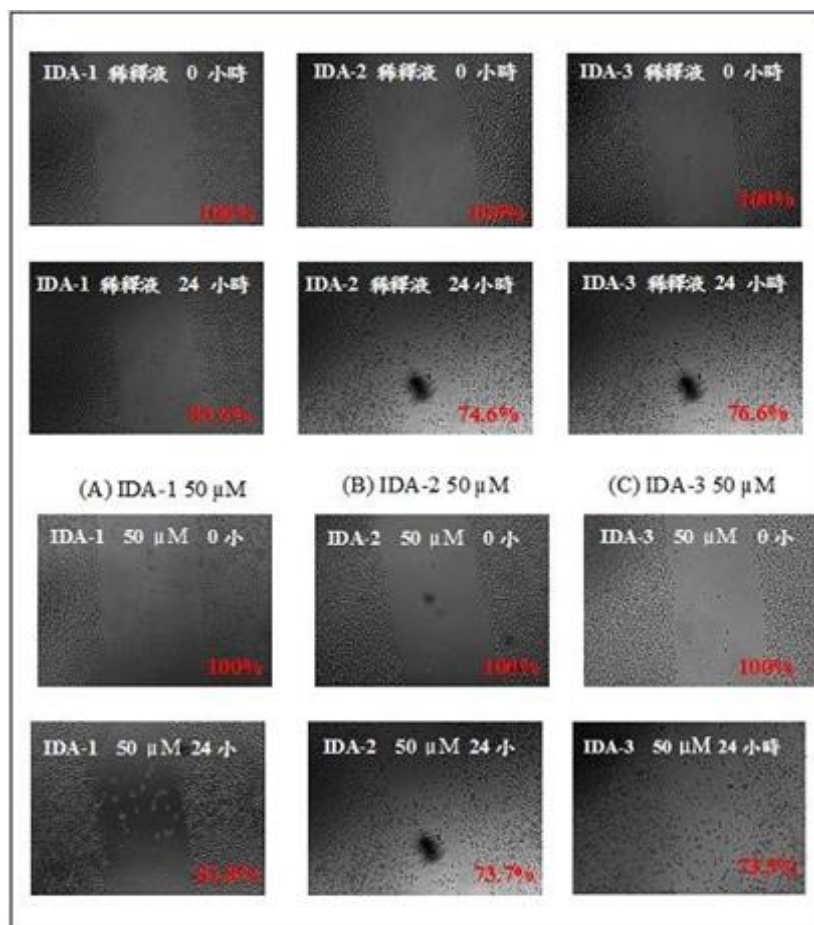


圖 17. IDA 之二級結構模擬示意圖。

3-3 應用 wound healing assay 評估合成胜肽對癌細胞傷口之癒合率

應用 wound healing 測試法觀察合成胜肽對 SW480 結腸癌細胞處理 0 小時、24 小時後，是否抑制癌細胞遷移之效果。傷口癒合實驗結果顯示：胜肽藥物 50 μ M 下與對照組相比，IDA-1 對於 SW480 結腸癌細胞中些微有抑制癌細胞爬行的效果。但因傷口癒合實驗有人為誤差，例如：每孔所使用 tip 所產生的刮痕力道不同；拍攝所選定的面積未完全一致，以及選取面積時，進行定量的差異等，因此，我們購買 Oris™ Cell Migration Assembly Kit 組（購自創世紀生物科技公司），以進行比較後續衍生胜肽藥物之傷口癒合率。結果顯示：加入 50 μ M 胜肽藥物及稀釋百倍的 PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)，此試劑為一種誘導劑，可使細胞增生，並以 crystal violet 進行染色，方便觀察 24 小時後，癌細胞爬行之差異。我們將控制組與藥物進行比較，可觀察 IDA-1-4 具有較好的抑制細胞爬行結果，此胜肽藥物使癌細胞癒合效果下降，而非降低癌細胞生長速率（如圖 18）。

(A)



(B)

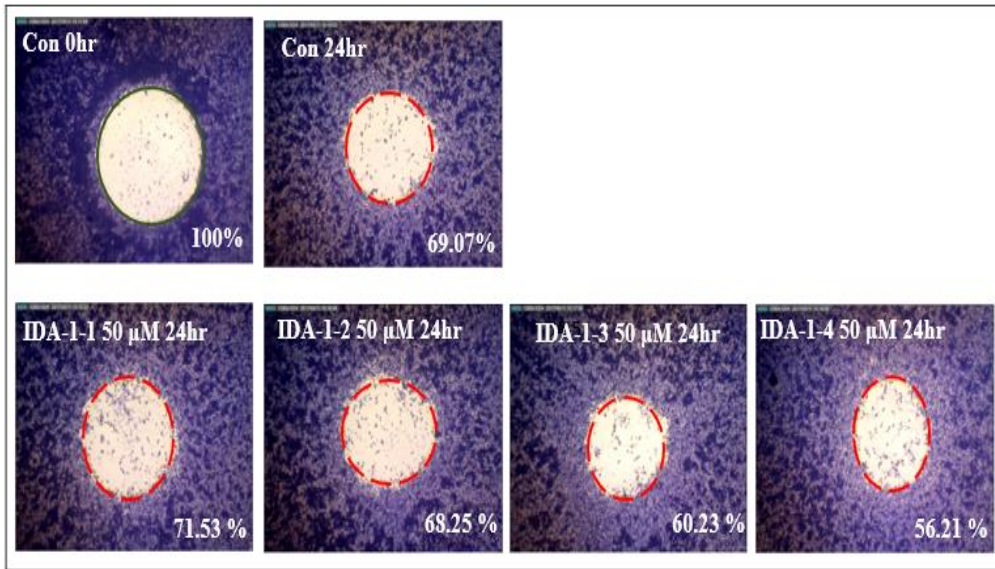
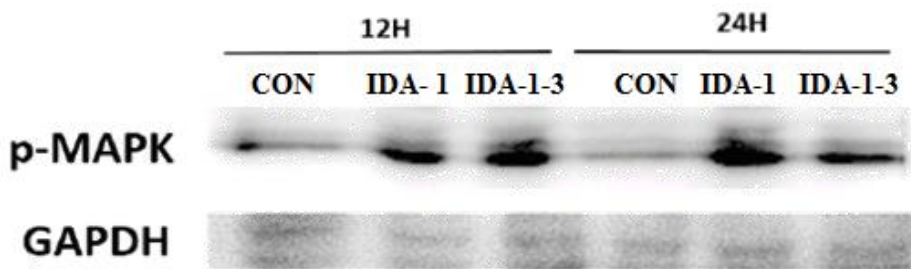


圖 18. 評估稀釋液與 50 μM 合成胜肽對於 SW480 結腸癌細胞爬行的效力。

3-4 應用西方墨點法評估合成胜肽對癌細胞蛋白質表現量

應用西方墨點法評估由 100 μM 之胜肽藥物 IDA-1 及 IDA-1-3 處理後 HT-29 纖維肉瘤細胞後，對於 pMAPK 的蛋白質表達量是否下降 (如圖 16)。

(A)



(B)

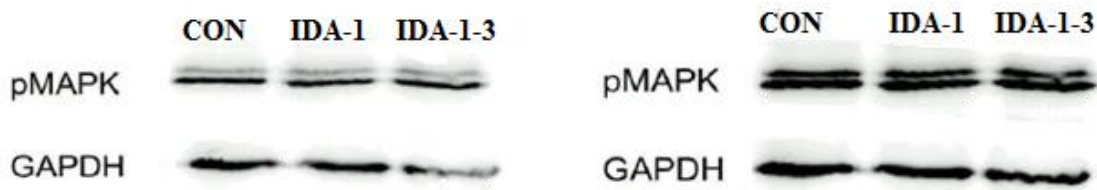


圖 19. 評估 100 μM 之胜肽藥物之 pMAPK 蛋白質表達量。

Western blotting 結果顯示：以 100 μ M 之胜肽藥物截短序列 IDA-1 及 IDA-1-3 處理 HT-29 癌細胞，經 24 小時之後，pMAPK 蛋白質的表達量並無顯著影響 (如圖 19-A)。起初我們推測胜肽藥物可能藉由抑制 pMAPK 蛋白質表達量競爭其作用位，進而導致抑制癌細胞之效果，因此，我們加入表皮生長因子 (EGFR) 進行誘導，以期能增加受體表達量，進而提升藥物與 pMAPK 蛋白質活化作用位之結合率，但仍無明顯影響。其推測為截短的胜肽片段可能不直接影響 MAPK 蛋白質之作用位，可能間接影響其受質結合效果，且癌細胞的生長亦受到其他路徑的蛋白質所調控，因此，對於 pMAPK 蛋白質的表達無明顯差異(如圖 19-B)。

3-5 應用共軛焦顯微鏡觀察合成螢光標記之胜肽藥物是否進入癌細胞內

應用共軛焦顯微鏡觀察 MTT assay 及 wound healing assay 實驗結果中，原始截短序列中，選擇抗增生效果較好的 IDA-1 胜肽及衍生物 IDA-1-3 胜肽，鍵結 FITC 及 FAM 螢光標記物，再利用共軛焦顯微鏡觀察經過 75 μ M FITC-IDA-1 及 FAM-IDA-1-3 之胜肽藥物，將 HT-29 纖維肉瘤細胞及 SW480 結腸癌細胞，處理 24 小時後，將細胞固定、染色，以進行封片，再利用共軛焦顯微鏡判斷胜肽藥物是否進入癌細胞內 (如圖 20、圖 21)。

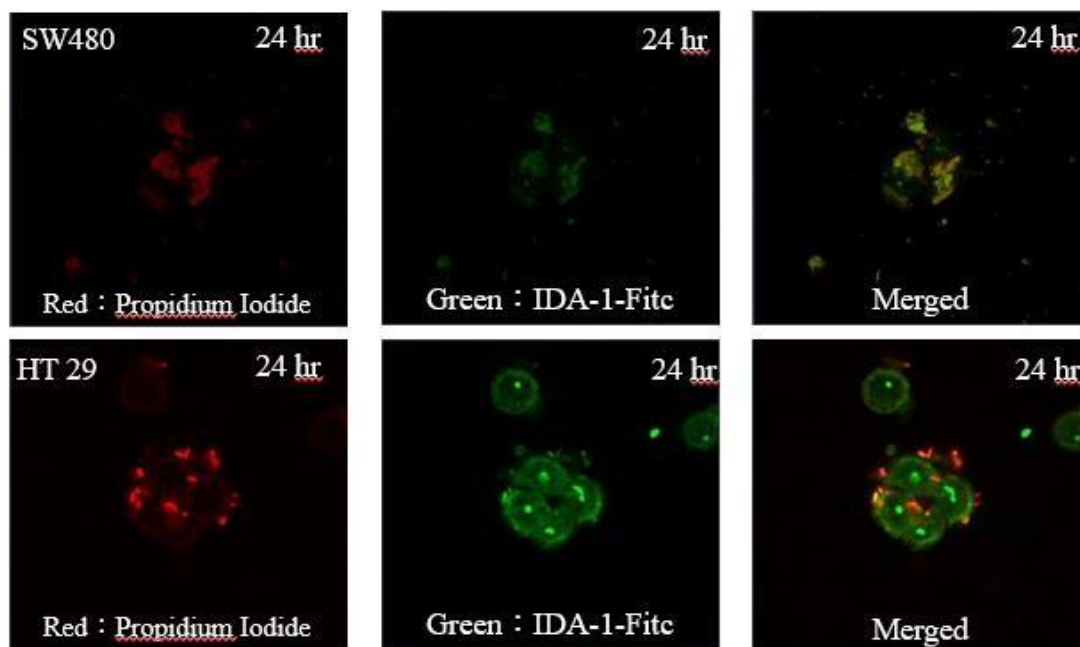


圖 20.評估 75 μ M FITC-IDA-1 對 HT-29 纖維肉瘤細胞或 SW480 結腸癌細胞，處理 24 小時後，對癌細胞是否有影響。(紅色：細胞和位置；綠色：胜肽藥物。)

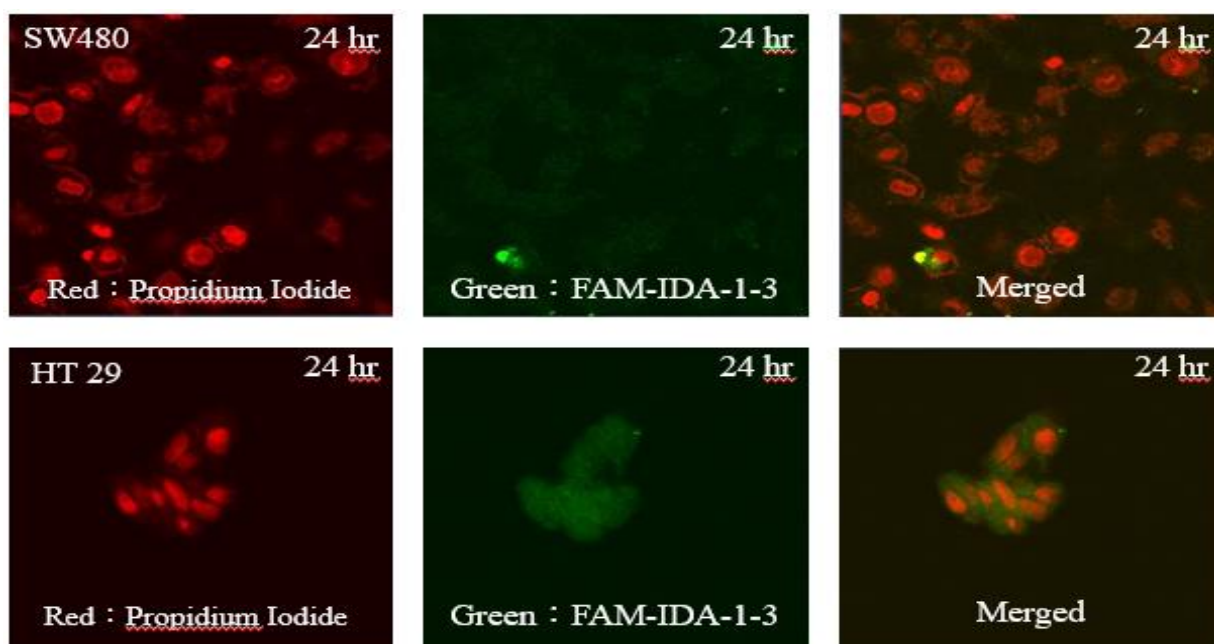


圖 21. 評估 75 μ M FAM-IDA-1-3 對 HT-29 纖維肉瘤細胞或 SW480 結腸癌細胞，處理 24 小時後，對癌細胞是否有影響。(紅色：細胞和位置；綠色：胜肽藥物。)

由上述結果可觀察到在 HT-29 及 SW480 中，75 μ M FITC-IDA-1 及 FAM-IDA-1-3 之胜肽藥物，處理 24 小時後，利用共軛焦顯微鏡觀察發現不論是 FITC-IDA-1 或 FAM-IDA-1-3，皆有較多的藥物進入 HT-29 癌細胞中，然而在 SW480 癌細胞中，含有螢光標記的胜肽藥物含量較少，其推測為含 k-ras 基因突變的大腸癌細胞，造成細胞膜產生變異，使胜肽藥物不易與癌細胞產生作用，進而無法抑制癌細胞的生長，因此這也證明胜肽藥物對於 SW480 存活率皆無明顯之影響。

第四章、未來展望

本團隊的貢獻在於，我們參考文獻選擇爪蟾 MAPK 之 IDA (Inter-DFG-APE) 胜肽片段，於截短序列中，我們發現 IDA-1 具有較好的抗增生效果及抑制癌細胞爬行。為了增加抑制大腸癌細胞生長效力，我們選擇 IDA-1 作為模板，藉由置換胺基酸序列及結合 Grb2-SH2 之前導肽 Fmoc-E-Y-Aib-N-NH₂，其利用天然胺基酸 Pro 及甲基的非天然胺基酸 Aib，以躲避酵素的辨識，使藥物不易代謝，進而設計一系列胜肽衍生物 (IDA-1-1、IDA-1-2、IDA-1-3 及 IDA-1-4)，以期增加抑制大腸癌細胞生長效力。由生物活性測試結果發現 IDA-1-3 不論是在 MTT assay 或 Prestoblu assay 都有較佳的抑制效果，推測是因穿膜胜肽接在 N 端後，使胜肽更易與癌細胞作用，因此提升藥物的抗癌效果。我們藉由共軛焦顯微鏡之實驗觀察到在 HT-29 癌細胞中胜肽藥物有較高的螢光表達量，其也證明胜肽藥物對於 HT-29 有較好的抑制效果。

以七條胜肽之實驗結果，可選擇 IDA-1-3 成為先導藥物，以抑制 HT-29 纖維肉瘤細胞。未來將了解特定蛋白質對於大腸癌細胞表達的影響，可利用表面膜漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技術為基礎之生物感測器，評估合成胜肽對於 pMAPK 及 Grb2-SH2 蛋白質之抑制效力，並計算胜肽對於特定蛋白質之解離平衡常數 (K_A , K_D) 以評估親和力。對於本實驗結果，以期開發新穎 MAPK 類胜肽藥物。

第五章、參考資料

1. 林哲斌主任, 台.血., *良性腫瘤與惡性腫瘤要如何鑑別*.
2. 吳秋文, *腫瘤的分期與預後因子*.
3. Akkiprik, M., et al., *Clinical Significance of p53, K-ras and DCC Gene Alterations in the Stage I-II Colorectal Cancers*. J Gastrointestin Liver Dis, 2007. **16**(1): p. 11-17.
4. 何民康醫師, *標靶治療—大腸癌的最新用藥*.
5. Thundimadathil, J., *Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects*. J Amino Acids, 2012: p. 967347.
6. Johnson, L.N., M.E.M. Noble, and D.J. Owen, *Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation*. cell, 1996(85): p. 149–158.
7. SerotaTaylor, S. and ElzbietaRadzio-Andzelm, *Three protein kinase structures define a common motif*. Current Biology, 1994. **2**(5): p. 345-355.
8. Wilson, M.R., T.W. Close, and J.E. Trosko, *Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis*. Exp Cell Res, 2000. **254**(2): p. 257-68.
9. Liu, B.A., B.W. Engelmann, and P.D. Nash, *The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction*. FEBS Lett, 2012. **586**(17): p. 2597-605.
10. DING, C.-B., et al., *Structure and function of Gab2 and its role in cancer (Review)*. MOLECULAR MEDICINE REPORTS, 2015. **12**(3): p. 4007-4014.
11. Roberts, P. and C. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-3310.
12. Mayer, B.J., *The discovery of modular binding domains: building blocks of cell signalling*. NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY, 2015. **16**(11): p. 691-698.
13. Jiang, S., et al., *Discovery of thioether-bridged cyclic pentapeptides binding to Grb2-SH2 domain with high affinity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**(10): p. 2693-2698.
14. Long, Y.-Q., et al., *Structural Requirements for Tyr in the Consensus Sequence Y-E-N of a Novel Nonphosphorylated Inhibitor to the Grb2-SH2 Domain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **264**(3): p. 902–908.

15. Friday, B.B. and A.A. Adjei, *Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(2): p. 342-346.
16. Oligino, L., et al., *Nonphosphorylated Peptide Ligands for the Grb2 Src Homology 2 Domain*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997. **272**(46): p. 29046–29052.
17. Lou, Y.-C., et al., *Solution Structure and Dynamics of GITE, a Nonphosphorylated Cyclic Peptide Inhibitor for the Grb2 SH2 Domain*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. **372**(2): p. 309-314.
18. Hu, C., et al., *Design and Modification of Anticancer Peptides*. Drug Designing: Open Access, 2016. **05**(03).
19. Tyagi, A., et al., *CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. 837-843.
20. Tokmakov, A.A., et al., *Inhibition of MAPK Pathway by a Synthetic Peptide Corresponding to the Activation Segment of MAPK*. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1998. **252**: p. 214–219.
21. 十分鐘的細胞活性檢測. 2015; Available from: <http://www.ebiotrade.com/newsf/2011-5/2011523171605427.htm>.
22. Huang, Y., J. Huang, and Y. Chen, *Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function*. Protein Cell, 2010. **1**(2): p. 143-152.
22. JAYANTA CHATTERJEE, C.G., AMNON HOFFMAN, and AND HORST KESSLER, *N-Methylation of Peptides: A New Perspective in Medicinal Chemistry*. accounts of chemical research, 2008.

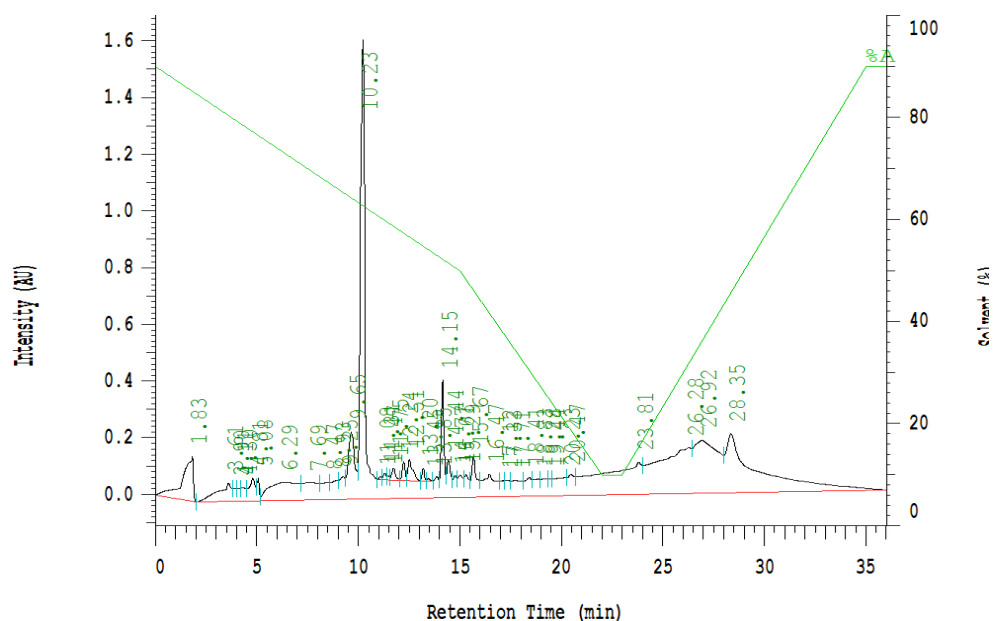
第六章、國內外文獻之評述

1. Takahashi, S., et al., *Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane.* Journal of Cell Science 2012, **125**, 4049-4057.
2. Serafino, A., et al., *Anti-proliferative effect of atrial natriuretic peptide on colorectal cancer cells: evidence for an Akt-mediated cross-talk between NHE-1 activity and Wnt/beta-catenin signaling.* Biochim Biophys Acta,2012,**1822**(6): 1004-1018.
3. Ya-Qiu Long, et al., *Structural Requirements for Tyr in the Consensus Sequence Y-E-N of a Novel Nonphosphorylated Inhibitor to the Grb2-SH2 Domain.* BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS.1999,**264**, 902–908
4. Dong Li, W. et al., *Cathelicidin, an antimicrobial peptide produced by macrophages, promotes colon cancer by activating the Wnt/ β -catenin pathway.* Oncotarget,2014,**6**,(5):2939-2950.
5. Koehler, J. A., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor activation inhibits growth and augments apoptosis in murine CT26 colon cancer cells.* Endocrinology,2011,**152**(9): 3362-3372.
6. JUDITH S. SEBOLT-LEOPOLD, et al., *Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo.* NATURE MEDICINE,1999,**5**: 810-816.
7. Kuroda, K., et al., *The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 and Mimics are Potential Anticancer Drugs.* Front Onco,2015,**15**: 144.
8. Maryse M. et al., *Insulin-like Growth Factor-I Protects Colon Cancer Cells from Death Factor-induced Apoptosis by Potentiating Tumor Necrosis Factor α -induced Mitogen-activated Protein Kinase and Nuclear Factor κ B Signaling Pathways.*CANCER RESEARCH,2000: **60**, 2007–2017.
9. Robinson, M. W., et al., *A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides.* PLoS Pathog,2011,**7**(5): 1002042.
10. Lan, Q., et al., *Methyl Sartortuoate Inhibits Colon Cancer Cell Growth by Inducing Apoptosis and G2/M-Phase Arrest.* Int J Mol Sci,2015,**16**(8): 19401-19418.
11. Giulia Bon, et al., *Dual targeting of HER3 and MEK may overcome HER3-dependent drug-resistance of colon cancers.* Oncotarget,2016: 1-17.
12. Albrethsen, J., et al., *Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer.* Eur J Cancer,2006,**42**(17): 3057-3064.
13. Xiao, Y. F., et al., *Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy.* J Immunol Res 2015: 761820.

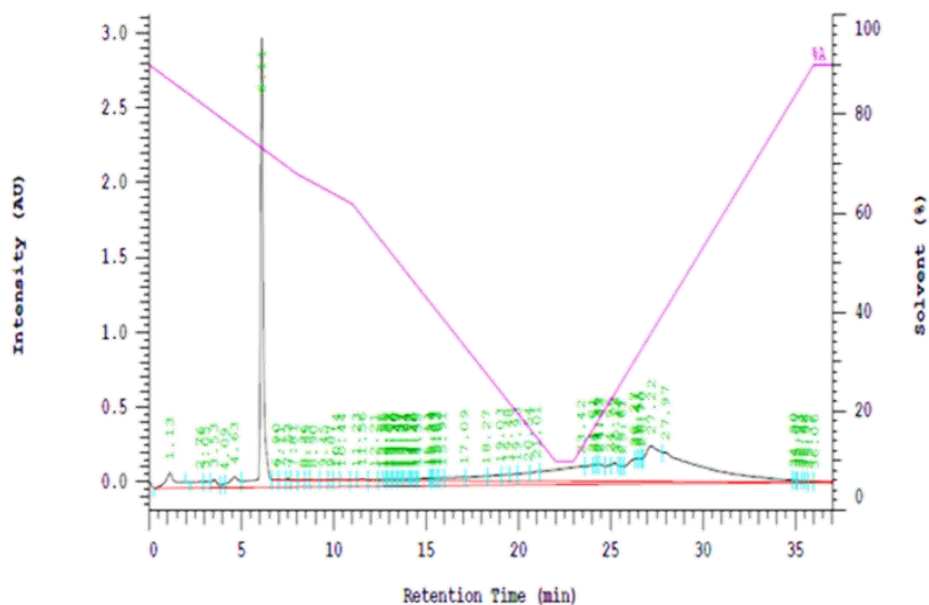
14. Yang, M., et al., *Tumor cell-activated CARD9 signaling contributes to metastasis-associated macrophage polarization*. *Cell Death Differ*,2014,**21**(8): 1290-1302.
15. Vlachos, P., et al., *The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway*. *Cell Death Differ*,2007,**14**(8): 1497-1507.
16. Mechkarska, M., et al., *Anti-cancer, immunoregulatory, and antimicrobial activities of the frog skin host-defense peptides pseudhymenochirin-1Pb and pseudhymenochirin-2Pa*. *Regul Pept*,2014,**194-195**: 69-76.
17. Oh, D., et al., *Antibacterial activities of amphiphilic cyclic cell-penetrating peptides against multidrug-resistant pathogens*. *Mol Pharm*,2014,**11**(10): 3528-3536.

第七章、附錄

(A)

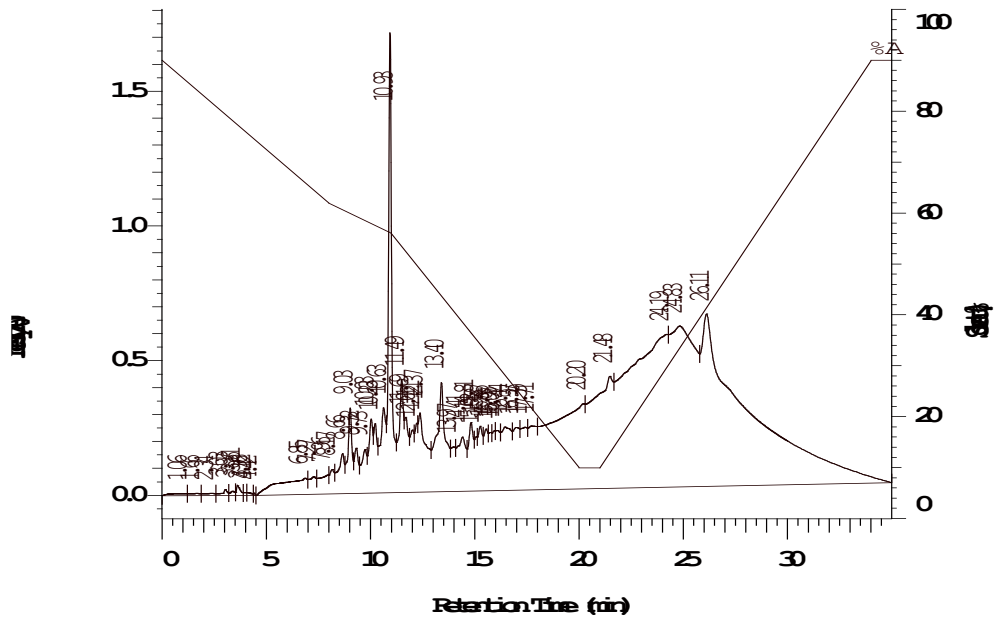


(B)

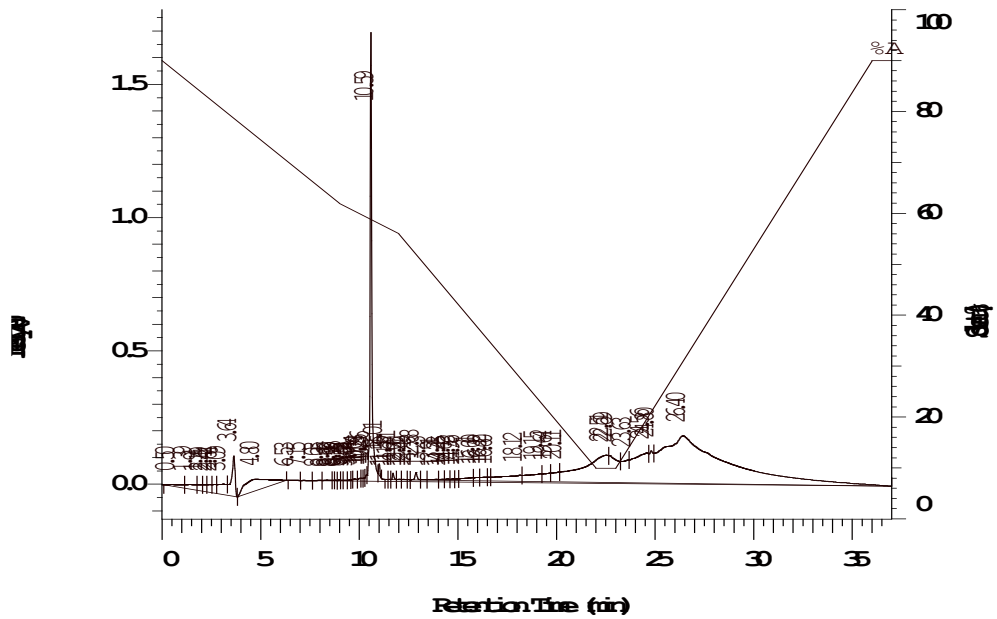


附錄 1、IDA-1 經 RP-HPLC 之層析圖，梯度由 10% 的 ACN (含 0.05% TFA) 沖提到 90%。(A) IDA-1 粗產物經 RP-HPLC 分析後之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 10.23 分鐘 (B) IDA-1 純產物之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 6.11 分鐘。

(A)

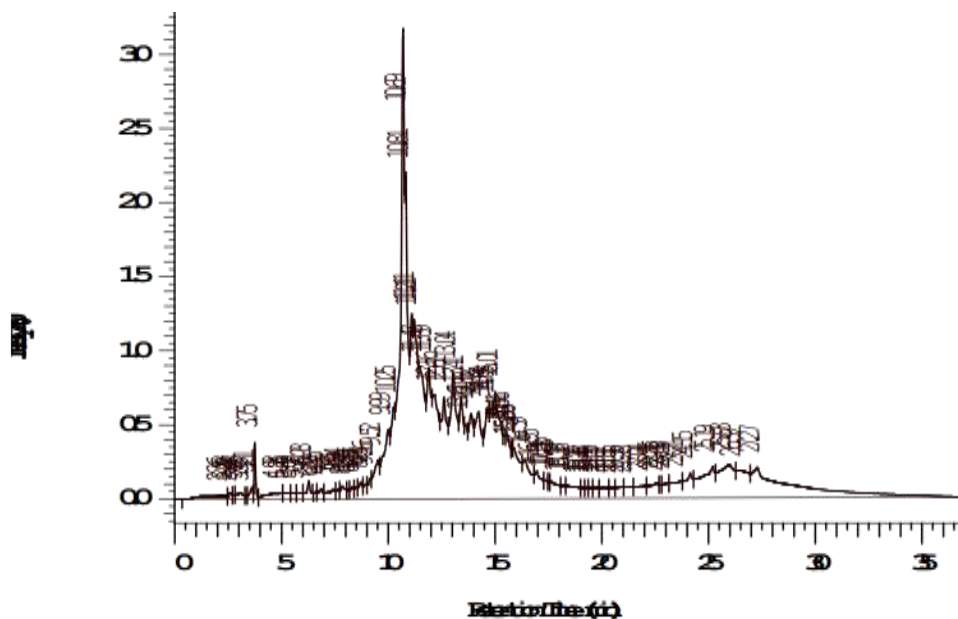


(B)

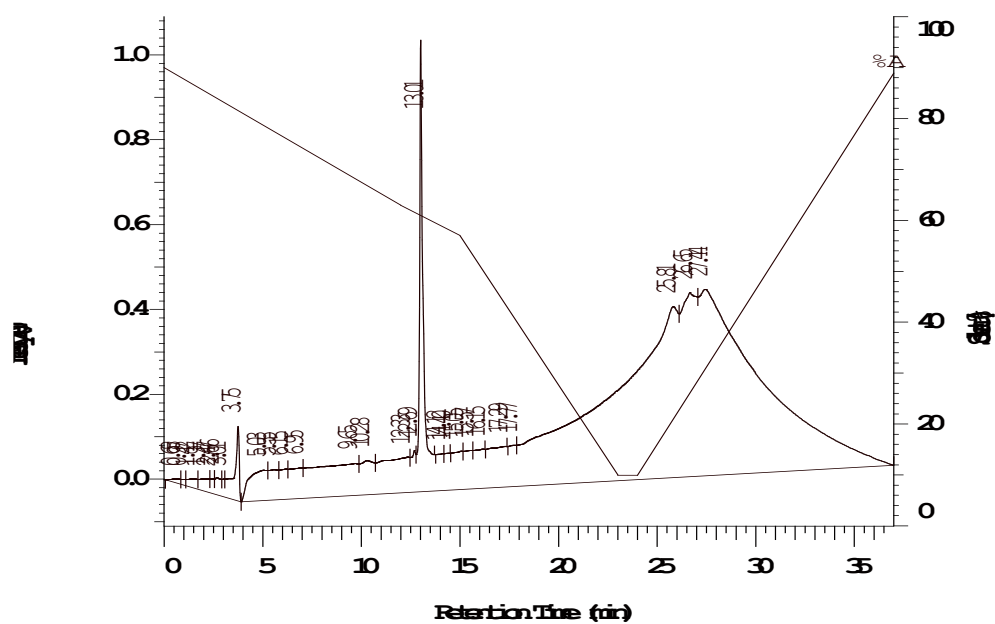


附錄 2、IDA-2 經 RP-HPLC 之層析圖，梯度由 10 % 的 ACN (含 0.05 % TFA) 沖提到 90 %。(A)IDA-2 粗產物經 RP-HPLC 分析後之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 10.93 分鐘 (B) IDA-2 純產物之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 10.59 分鐘。

(A)

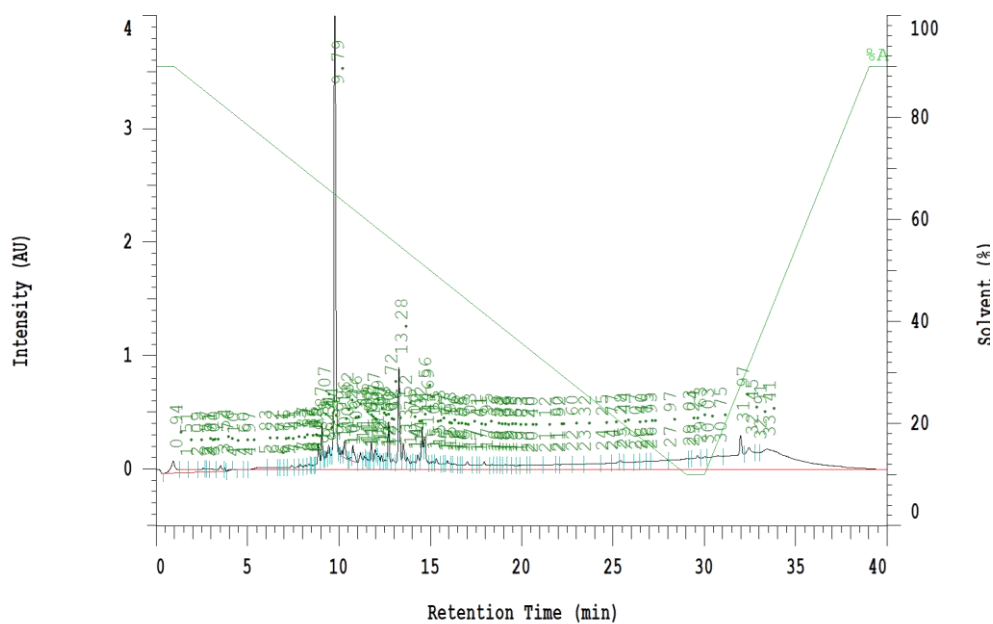


(B)

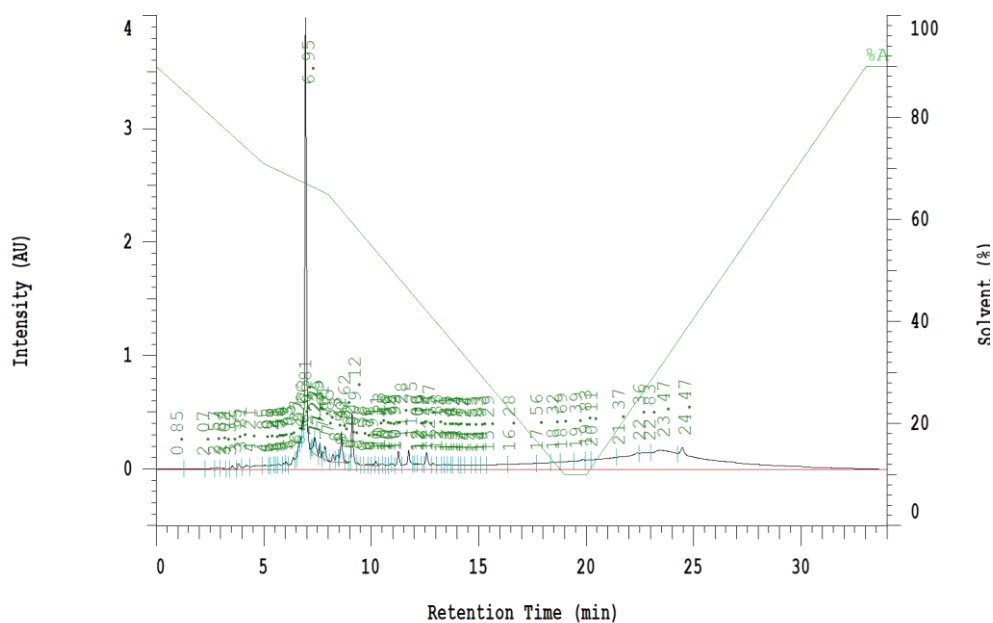


附錄 3、IDA-3 經 RP-HPLC 之層析圖，梯度由 10 % 的 ACN (含 0.05 % TFA) 沖提到 90 %。(A) IDA-3 粗產物經 RP-HPLC 分析後之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 10.81 分鐘 (B) IDA-3 純產物之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 13.01 分鐘。

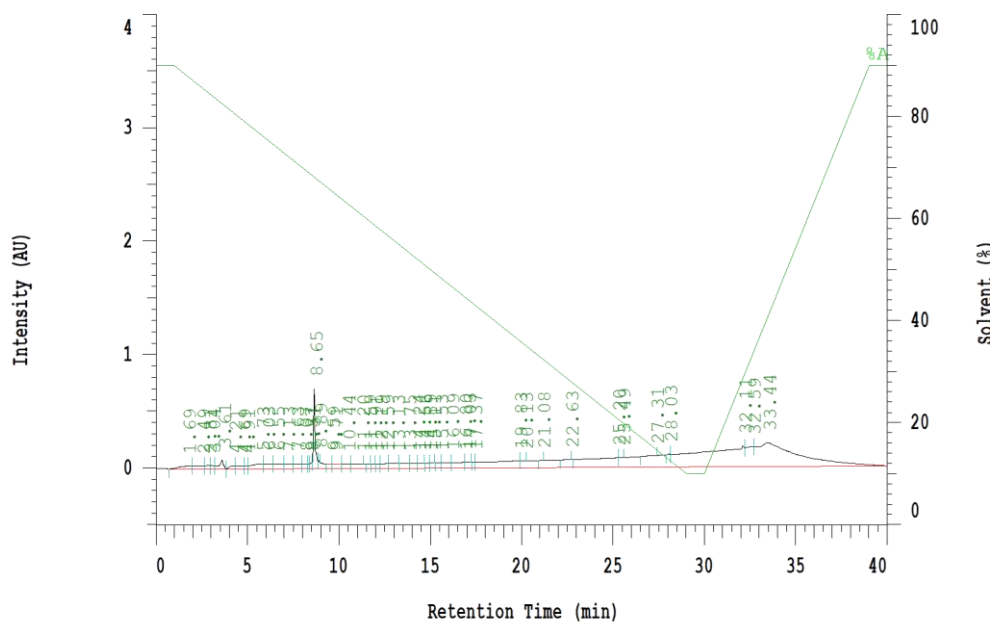
(A)



(A)

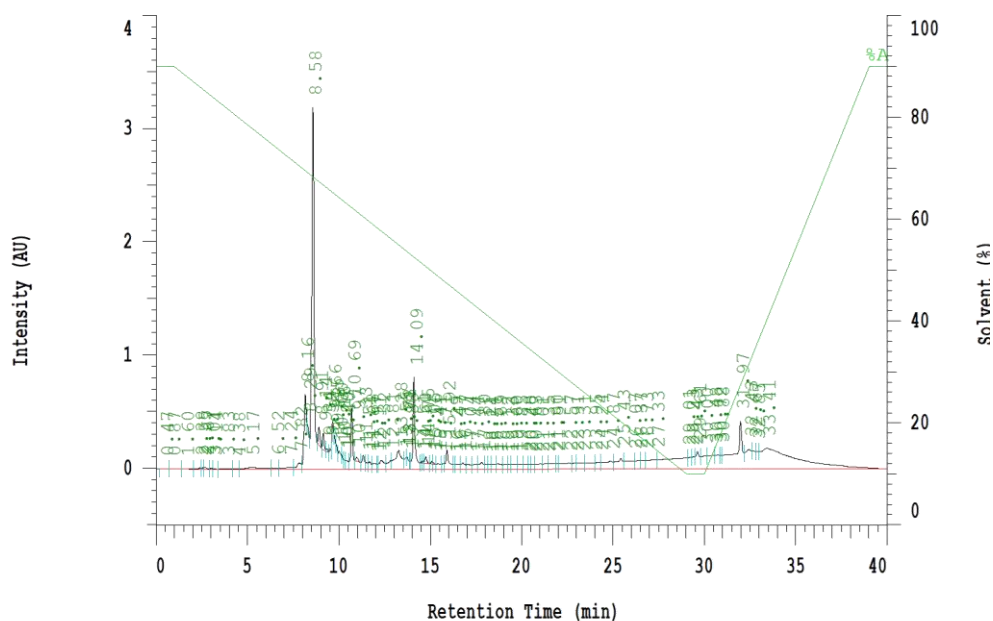


(B)

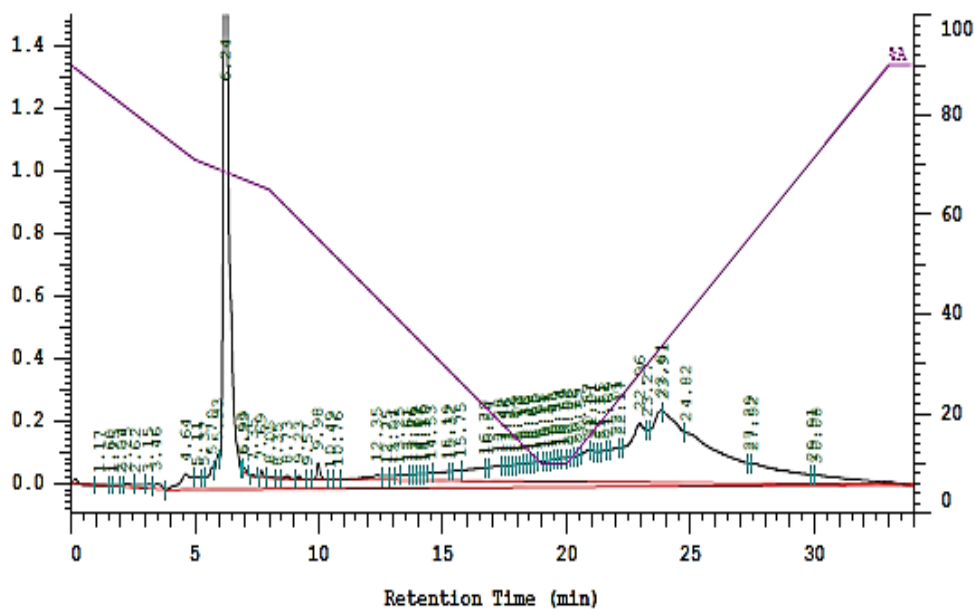


附錄 5、IDA-1-2 經 RP-HPLC 之層析圖，梯度由 10 % 的 ACN (含 0.05% TFA) 沖提到 90 %。(A) IDA-1-2 粗產物經 RP-HPLC 分析後之層析結果圖，其滯留時間(t_R)為 6.95 分鐘 (B) IDA-1-1 純產物之層析結果圖，其滯留時間(t_R)為 8.65 分鐘。

(A)

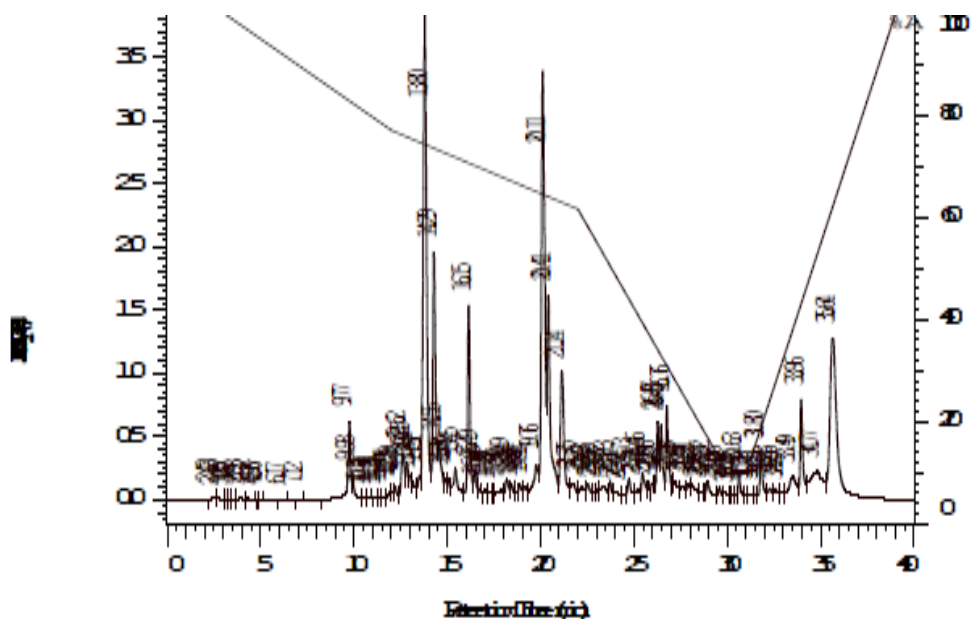


(B)

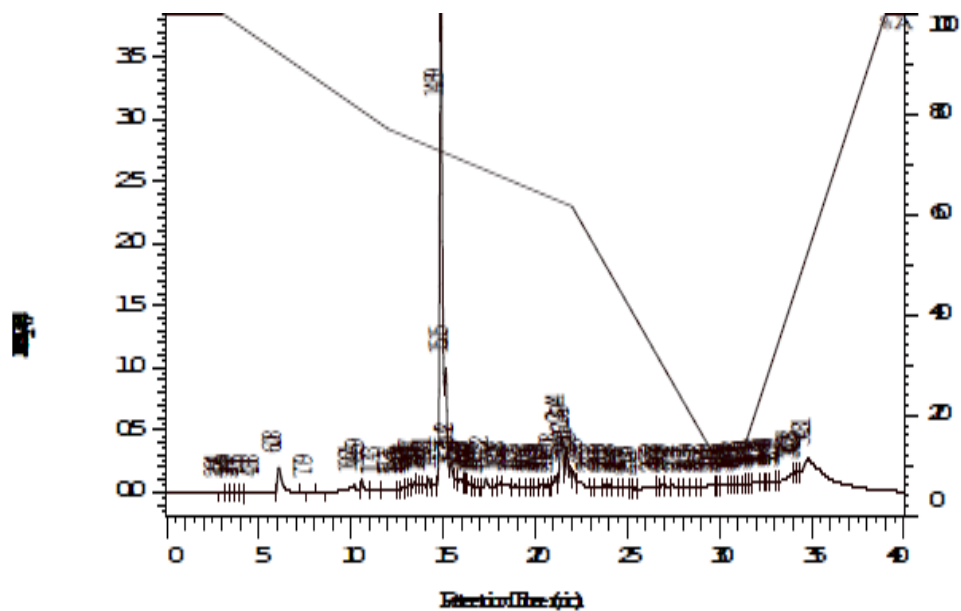


附錄 6、IDA-1-3 經 RP-HPLC 之層析圖，梯度由 10% 的 ACN (含 0.05% TFA) 沖提到 90%。(A) IDA-1-3 粗產物經 RP-HPLC 分析後之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 8.58 分鐘 (B) IDA-1-1 純產物之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 6.24 分鐘。

(A)

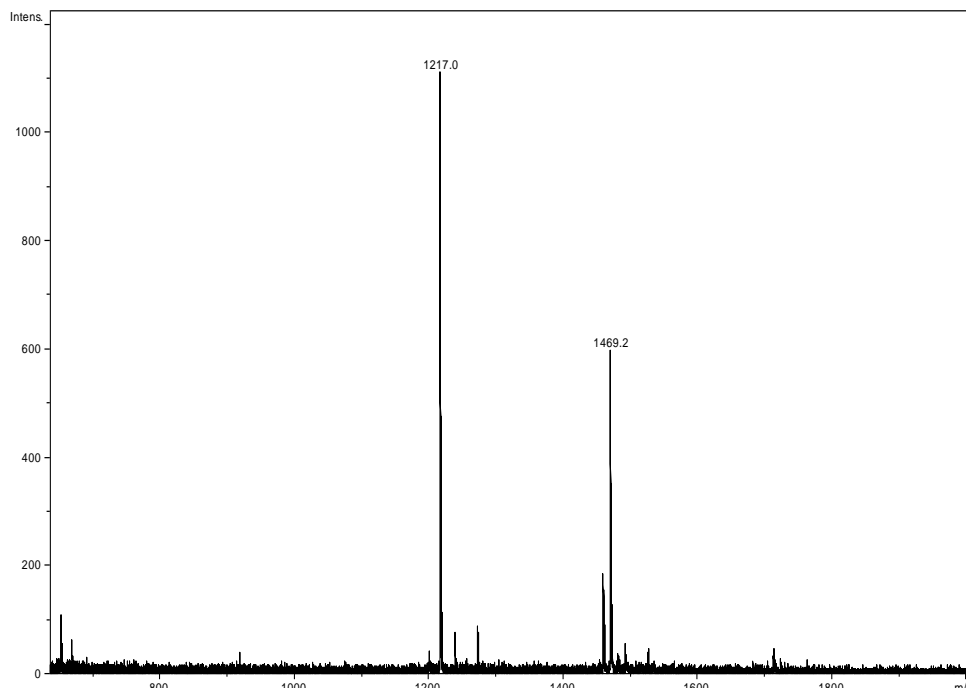


(B)

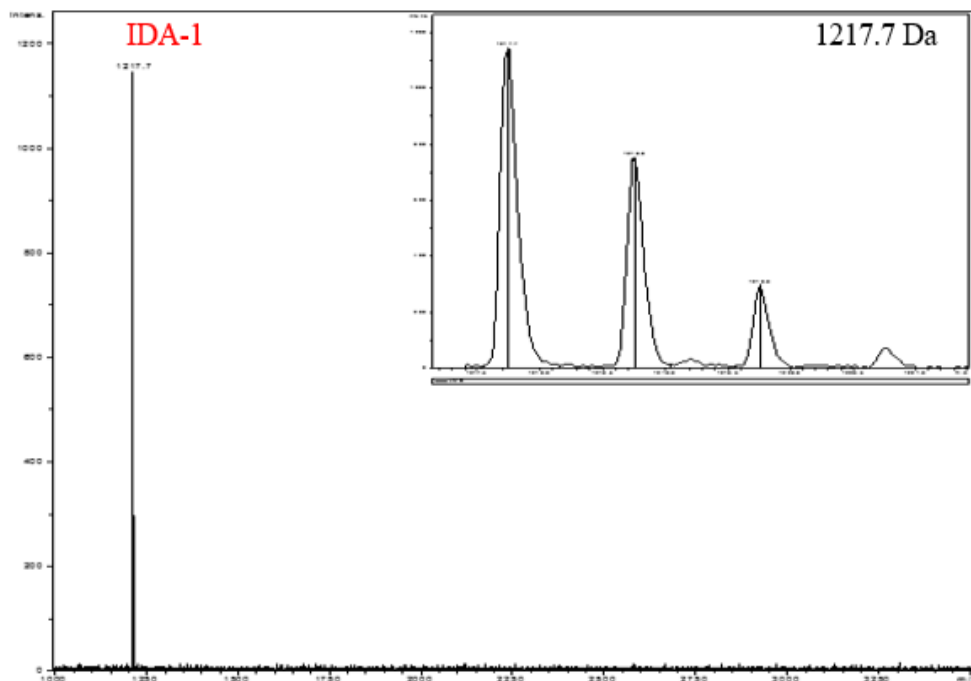


附錄 7、IDA-1-4 經 RP-HPLC 之層析圖，梯度由 10% 的 ACN (含 0.05% TFA) 沖提到 90%。(A) IDA-1-4 粗產物經 RP-HPLC 分析後之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 13.80 分鐘 (B) IDA-1-1 純產物之層析結果圖，其滯留時間 (t_R) 為 14.89 分鐘。

(A)

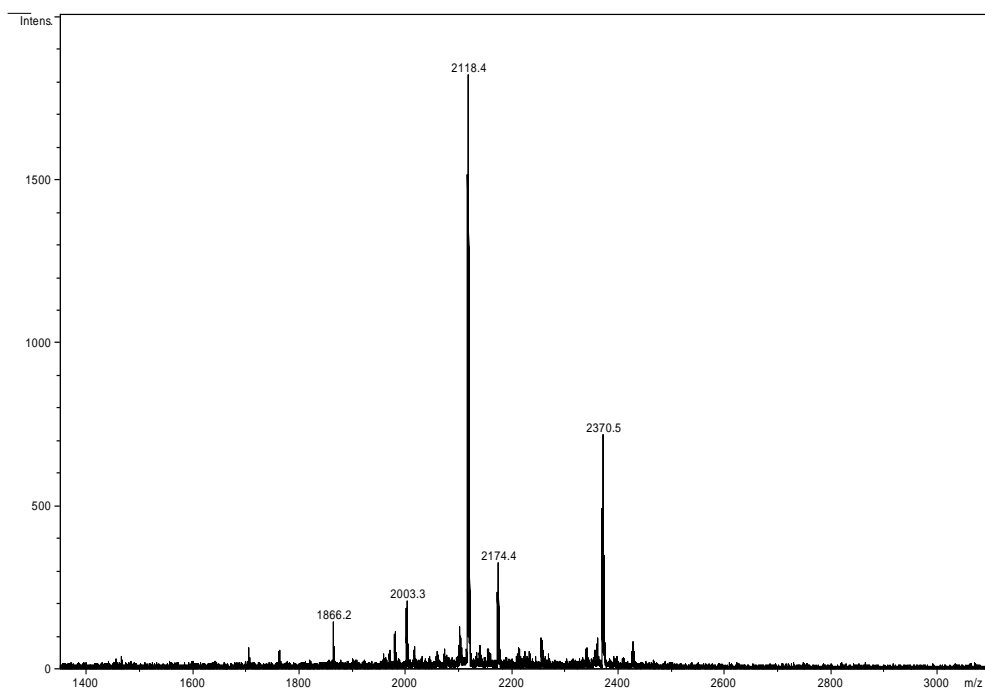


(B)

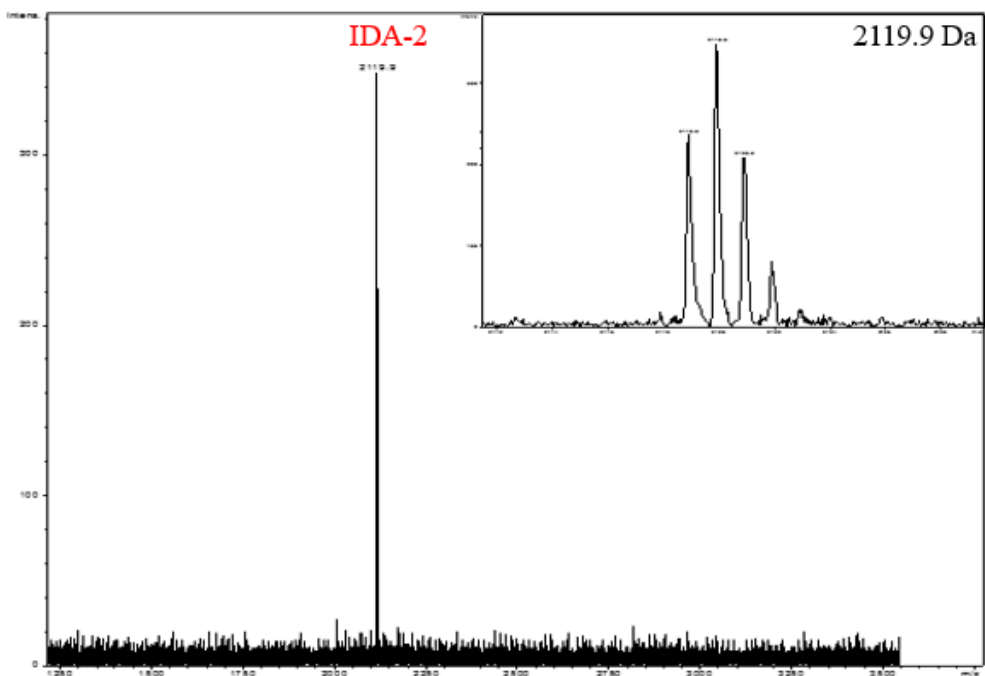


附錄 8、IDA-1 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-1 的分子量之理論值：1216.4 Da；實際值：1217.7 Da)

(A)

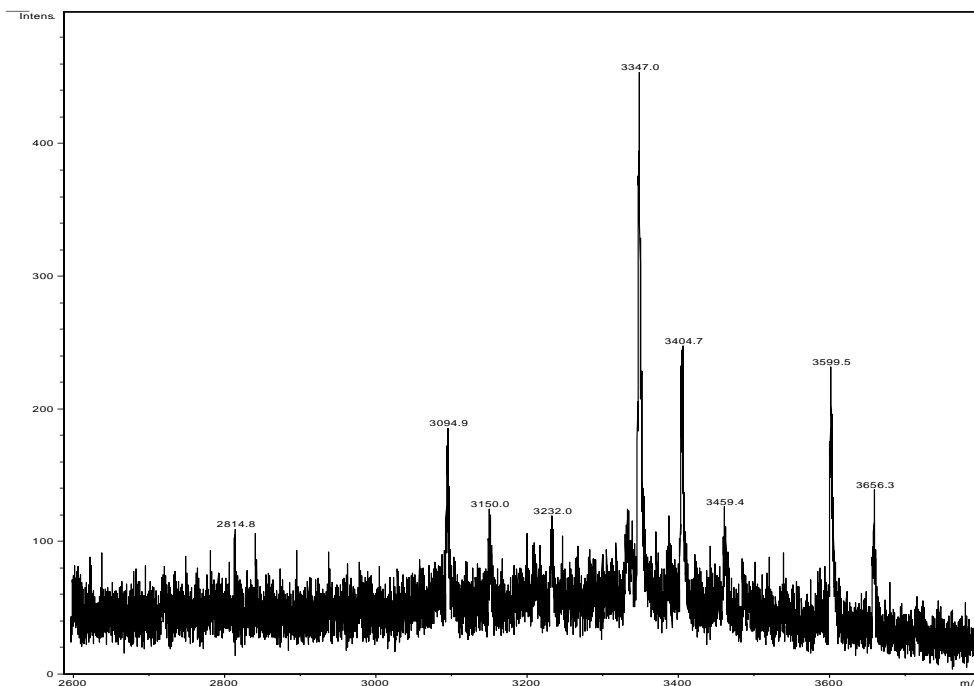


(B)

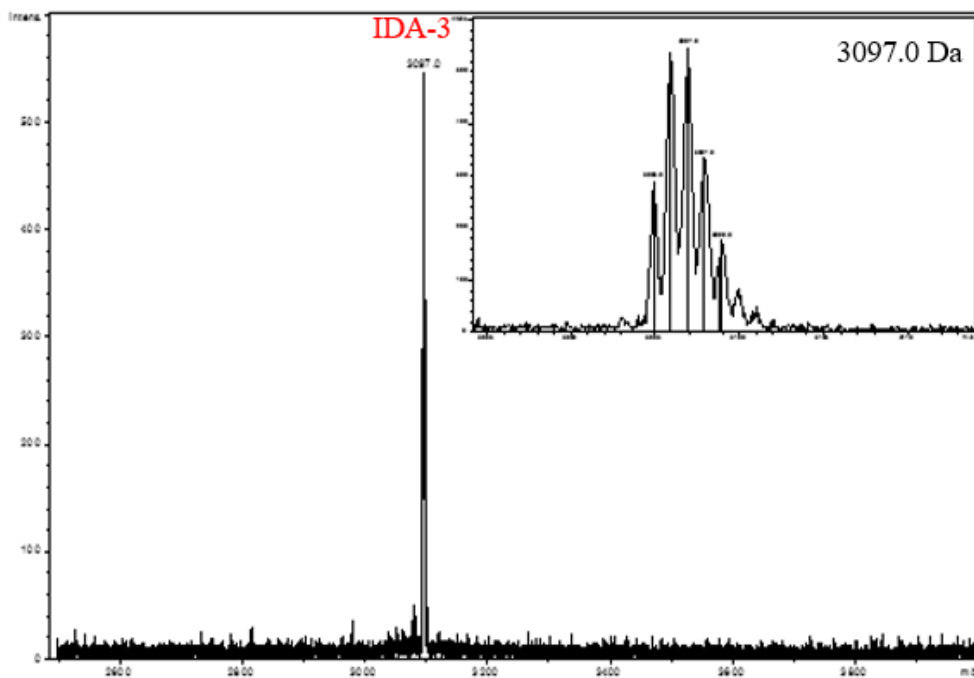


附錄 9、IDA-2 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-2 的分子量之理論值：2117.3 Da；實際值：2119.9 Da)

(A)

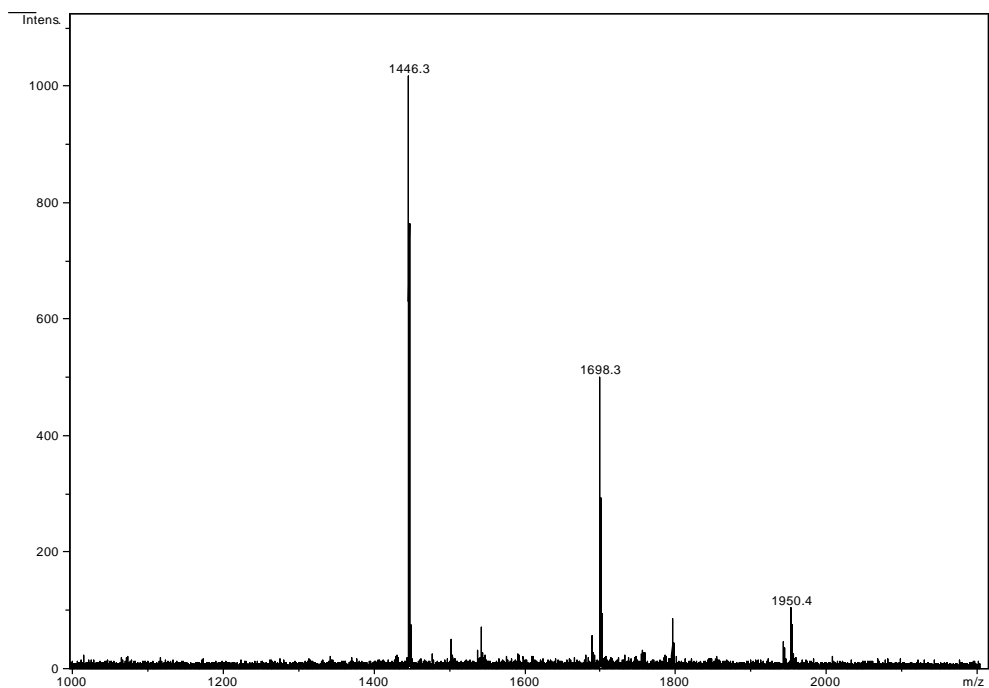


(B)

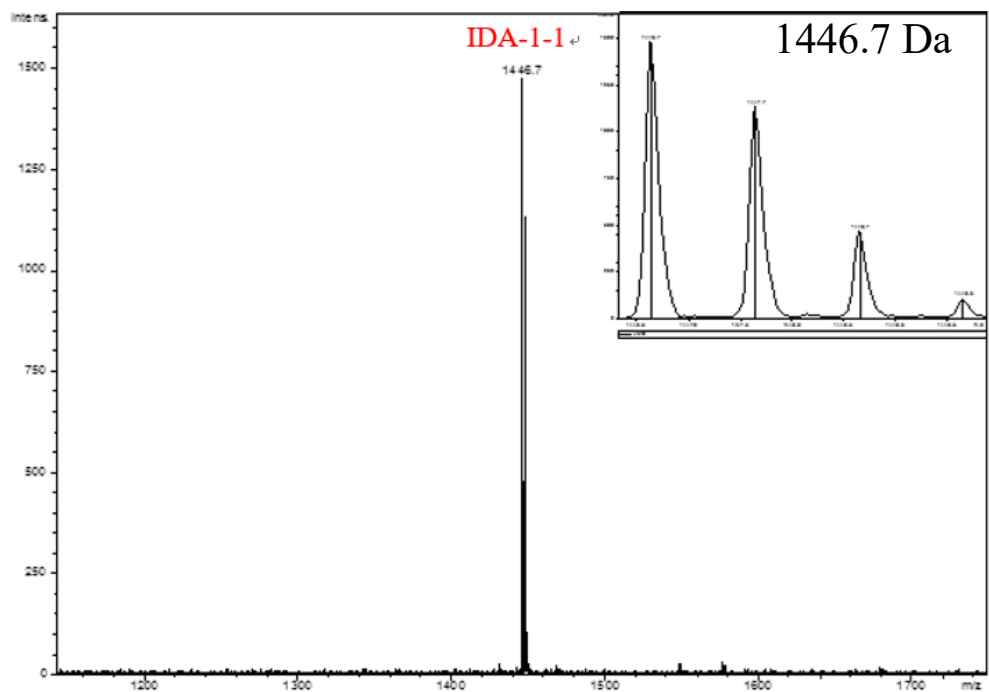


附錄 10、IDA-3 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-3 的分子量之理論值：3092.0 Da；實際值：3097.0 Da)

(A)

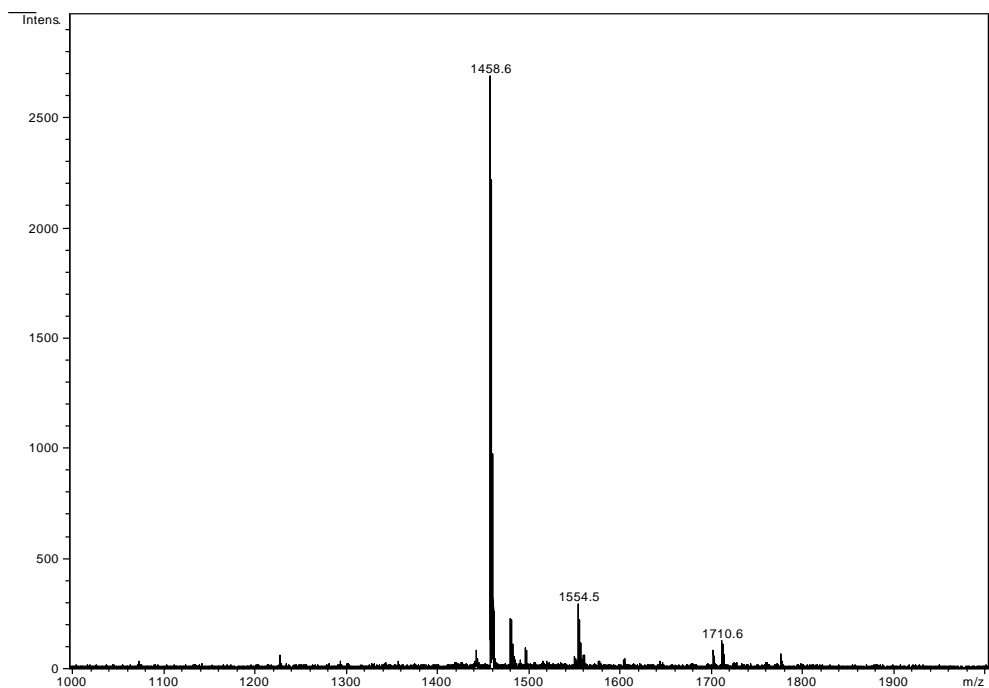


(B)

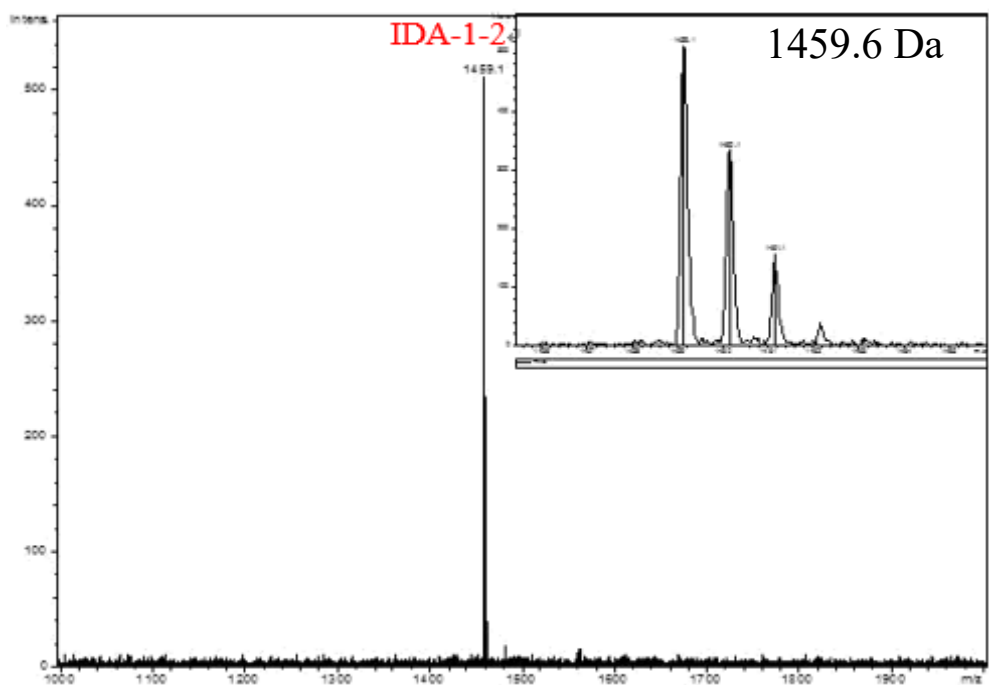


附錄 11、IDA-1-1 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-1-1 的分子量之理論值：1446.6 Da；實際值：1446.7 Da)

(A)

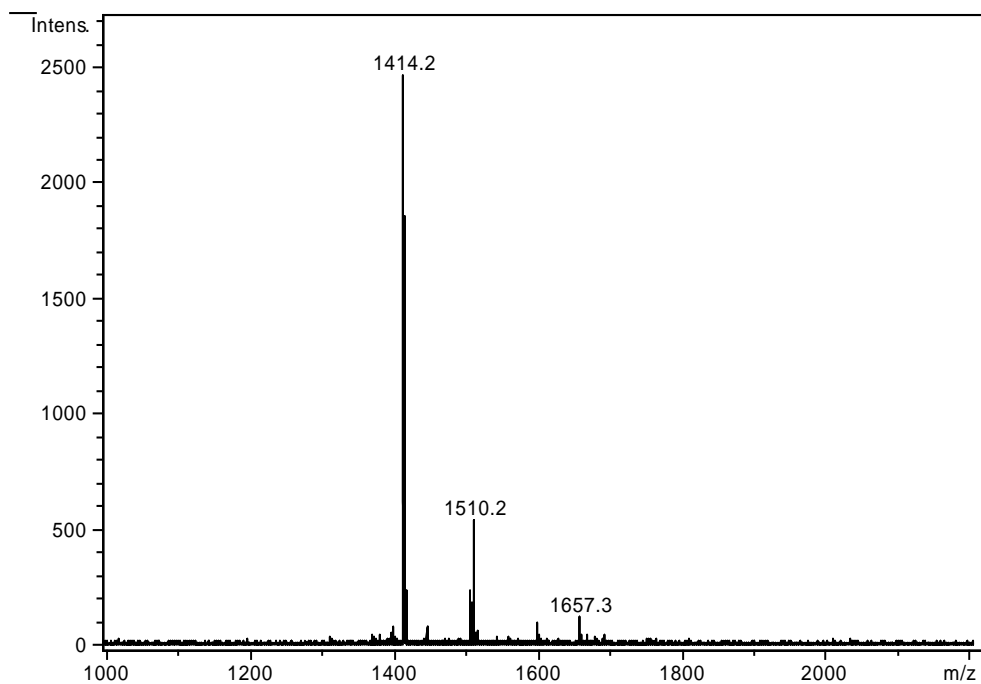


(B)

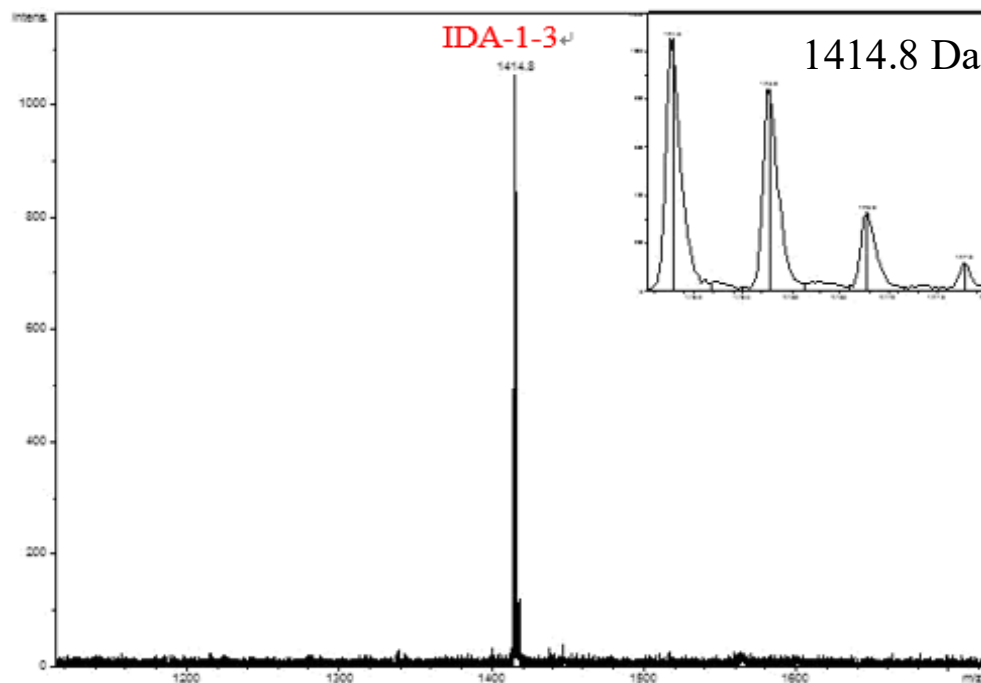


附錄 12、IDA-1-2 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-1-2 的分子量之理論值：1458.6 Da；實際值：1459.1 Da)

(A)

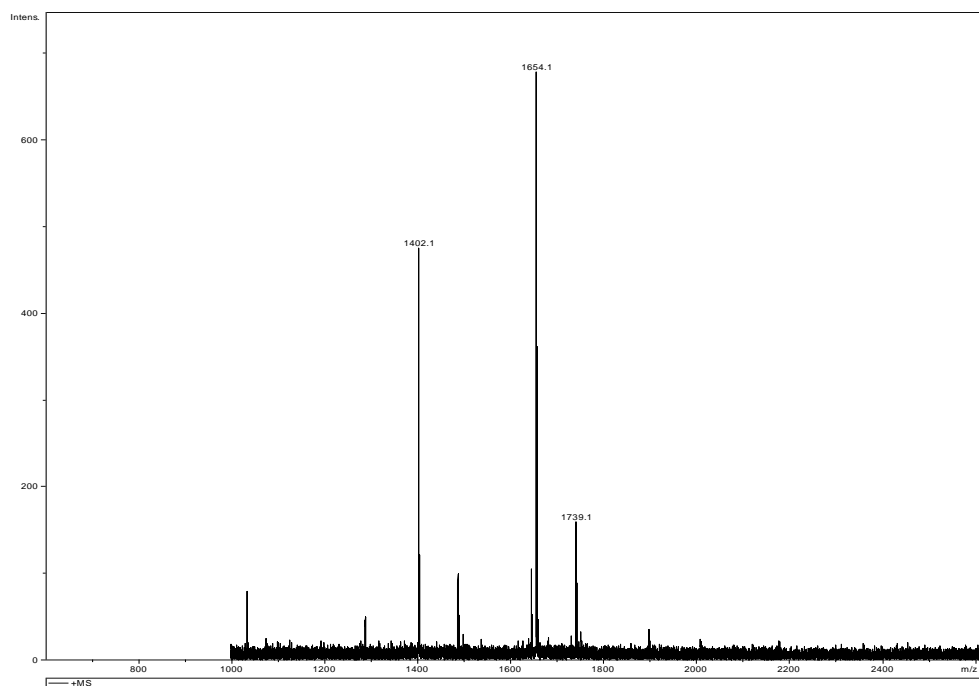


(B)

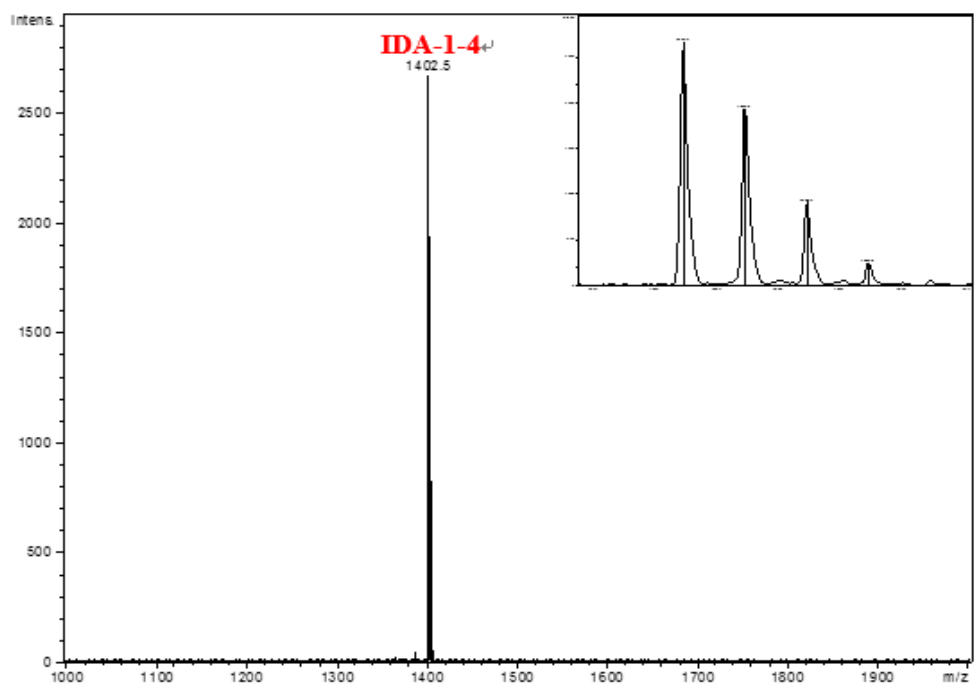


附錄 13、IDA-1-3 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-1-3 的分子量之理論值：1414.5 Da；實際值：1414.8 Da)

(A)

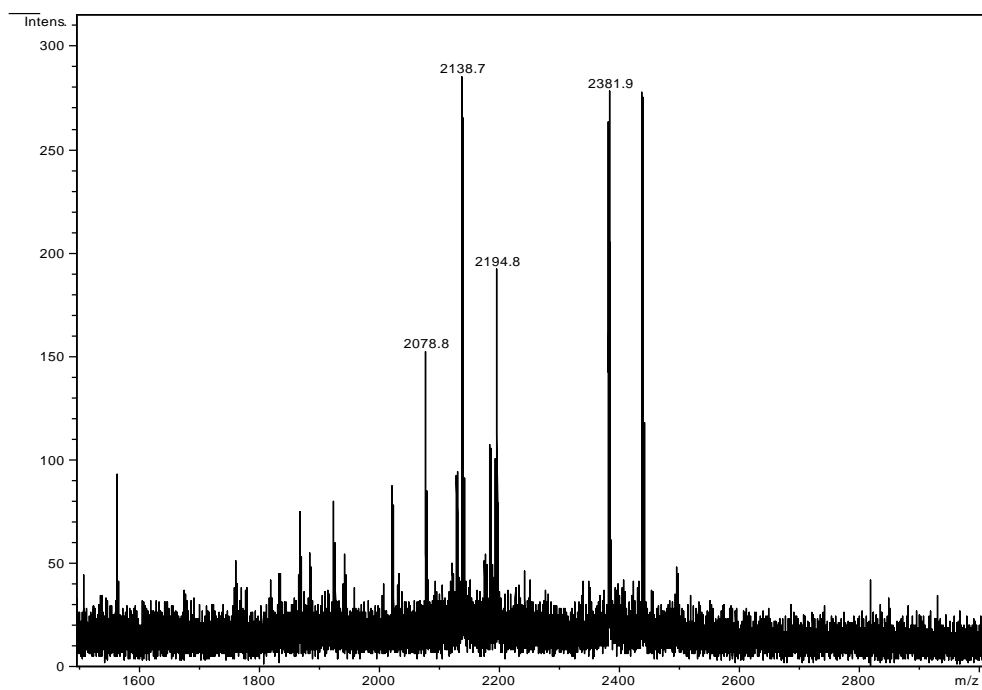


(B)

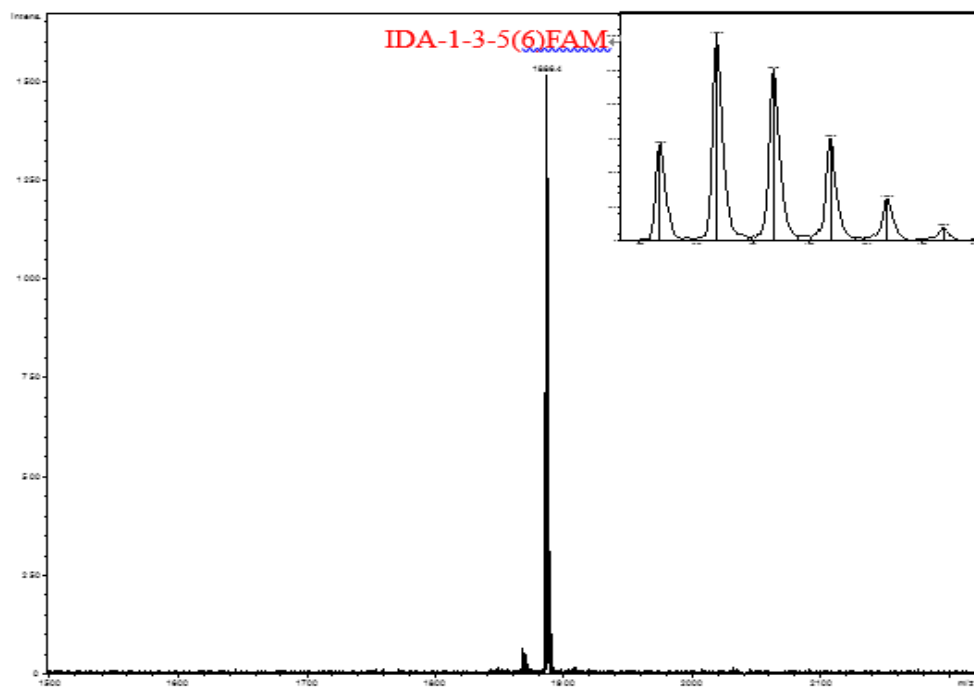


附錄 14、IDA-1-4 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-1-4 的分子量之理論值：1419.51 Da；實際值：1402.5 Da)

(A)

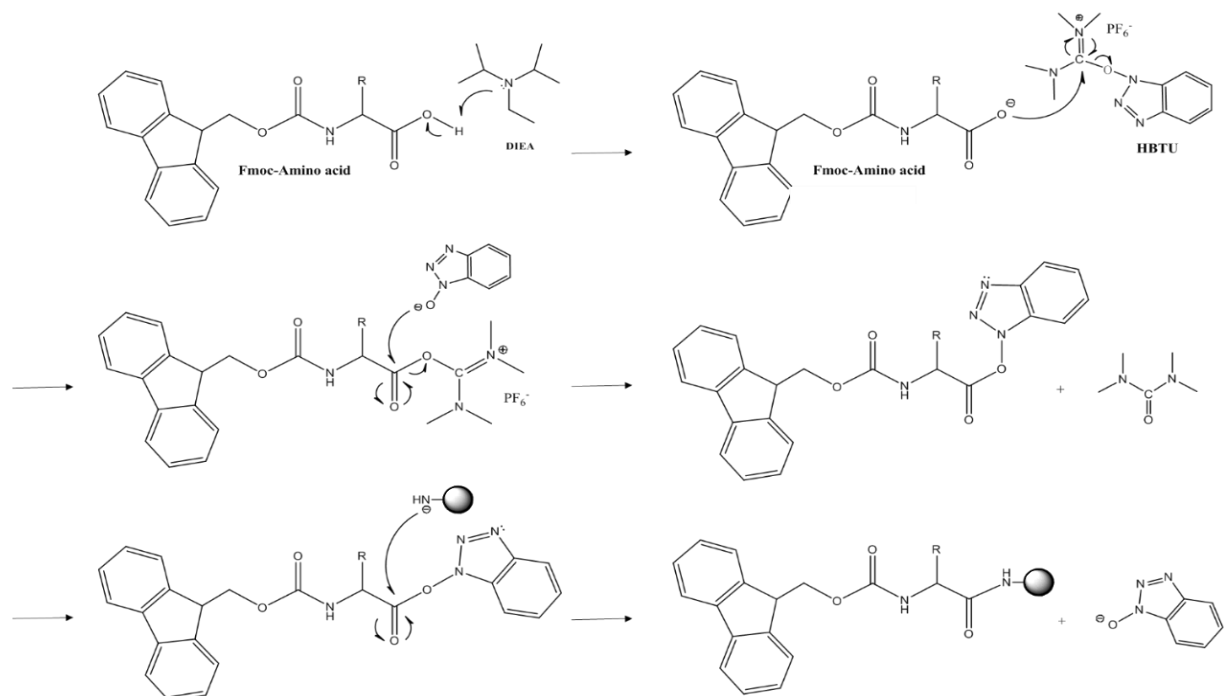


(B)

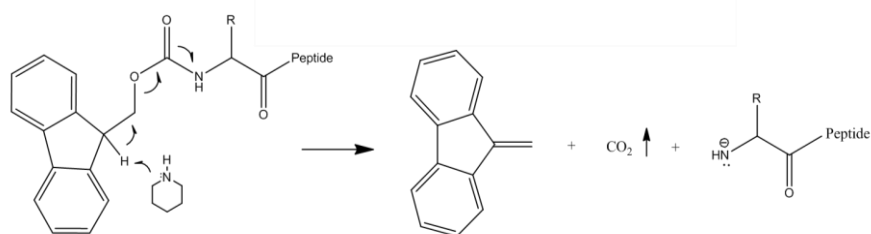


附錄 15、IDA-1-3-5(6) FAM 粗產物及純產物之 MALDI-TOF 質譜圖。
(IDA-1-35(6) FAM 的分子量之理論值：1904.7 Da；實際值：1886.4 Da)

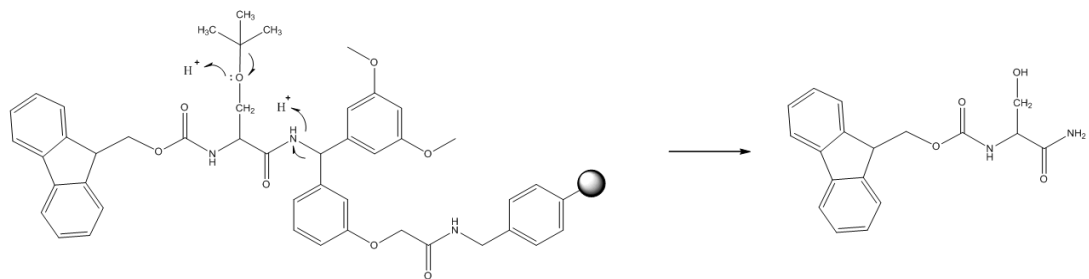
胜肽序列之反應機制：



活化胺基酸之反應機構。



Piperidine 去 N 端保護基 Fmoc 之反應構。



以 TFA 裂解胜肽之反應機構。