

## 中文摘要

環狀胜肽在生醫研究方面對於藥物開發以及分子探測器來說是很重要的化合物。與線狀胜肽做比較，環狀胜肽較具功效，因為可以降低構形的自由度，因此比較不會被蛋白質水解酶水解，且可以對巨大的分子受體做專一性有效的結合。由於相同種類的含有硫之線性胜肽有很高的傾向形成寡聚物，因此分子內的胜肽形成反應是形成硫醚鍵方式環狀胜肽的關鍵步驟。液相方式的環化反應通常在相當高稀釋溶液的條件下進行環化反應以避免同序列的線狀胜肽形成寡聚物。可是，液相的環化反應方法即使在相當高稀釋的條件下也有許多的缺點，如：產生雙聚物和寡聚物類的副反應。將胜肽依附在固相支持物上進行環化反應，將能得到類似稀釋現象的效果，使反應傾向於在樹脂上進行胜肽分子內的反應，並使分子之間的作用力減到最小。因此硫醚鍵方式的環狀胜肽可以藉由固相胜肽合成法及依附在樹脂上的環化方法有效的合成出來。本篇研究利用不同的方式來合成硫醚鍵方式的環狀胜肽並分析其合成效率以及產率。液相以及固相方式的產率分別為13.76%、17.25%。

## 英文摘要

Cyclic peptides are significant compounds for drug discovery and molecular probes in biomedical research. Compared to linear peptides, cyclic peptides were generally more effective than the corresponding linear peptides, that have reduced conformational freedom, which makes them more resistant to proteolytic degradation and potentially tighter-binding and more-specific ligands of macromolecular receptors. Intramolecular peptide forming reaction, is the key step in the synthesis of constrained thioether-bridged cyclopeptides due to the high tendency of the corresponding linear peptides to oligomerize. Solution phase cyclization generally react in solution under high dilution conditions to avoid corresponding linear peptides to oligomerize. However, solution-phase methodologies, even in high dilution conditions, suffer from several drawbacks, such as dimerization and oligomerization side reactions. If the peptide remains anchored on a solid support, the cyclization takes advantage of the pseudodilution phenomenon, which favors intramolecular resin-bound reactions, minimizing interchain interactions. Therefore, thioether-bridged cyclopeptides can be conveniently synthesized by SPPS and on-resin cyclization methods. In this study, thioether-bridged cyclopeptides synthesis were performed via different mode (by solution-phase cyclization and on-resin cyclization). The efficiency and yield of both reactions were analyzed. The yields of solution-phase cyclization and on-resin cyclization methods are 13.76% and 17.25%, respectively.

# 目 錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
目錄.....	3
圖目錄.....	6
表目錄.....	8
第一章 緒論.....	9
第一節 前言.....	9
第二節 研究動機與目的.....	12
第二章 文獻探討.....	14
第一節 生長因子 (Growth factor).....	14
第二節 訊息傳遞 (Signal transduction).....	16
第三節 Grb2轉接蛋白質 (Grb2 adaptor protein).....	17
第四節 固相胜肽合成 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS).....	18
第五節 環狀胜肽 (Thioether-bridged peptide).....	21
第三章 材料與方法.....	23
第一節 實驗材料.....	23
一、藥品試劑.....	23
二、設備、器材.....	24

第二節 實驗方法.....	25
一、固相胜肽合成.....	25
(一) 線狀胜肽 (Linear peptide)之合成.....	25
(二) Ninhydrin reaction.....	26
二、環狀胜肽之合成.....	28
(一) 線狀胜肽氣乙醯化.....	28
(二) Solution-phase cyclization.....	29
(三) On-resin cyclization.....	30
三、逆相高效能液相層析法 (Reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC).....	32
四、基質輔助雷射脫附游離-飛行時間質譜儀 (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight, MALDI-TOF MS).....	35
第四章 結果與討論.....	37
第一節 三種小型環狀胜肽的合成.....	37
一、線性胜肽之設計、合成、氣乙醯化及鑑定.....	37
二、環狀胜肽合成.....	41
第二節 環狀胜肽Thioether-bridged(-CH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH <sub>2</sub> 的合成及鑑定.....	48
一、Solution-phase cyclization.....	48
二、On-resin cyclization.....	51

第三節 不同的環狀胜肽合成方法之產率比較分析.....	53
一、 Solution-phase cyclization.....	53
二、 On-resin cyclization.....	53
第五章 結論.....	55
參考資料與文獻.....	56
附件.....	60

## 圖目錄

圖 1. 與 Grb2 SH2 蛋白相關的細胞訊息傳遞路徑.....	57
圖 2. BCR-abl 磷酸化胜肽與 Grb2 SH2 區塊結合的緞帶圖.....	57
圖 3. 短胜肽 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH <sub>2</sub> 的結構圖.....	58
圖 4. 短序列的環狀胜肽，cyclo(-CH <sub>2</sub> CO- <u>X</u> -Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide 的結構圖.....	58
圖 5. 固相胜肽合成法之簡圖.....	59
圖 6. 實驗上常見的樹脂結構以及其裂解條件.....	60
圖 7. TFA 去除 t-BOC 保護基的反應機構.....	61
圖 8. piperidine 去除 FMOC 保護基的反應機構.....	61
圖 9. 受 HOBt、HBTU、DIEA 活化後的胺基酸與 Rink Amide resin 結合的反應機構.....	62
圖 10. 利用不同的試劑來移除 N 端 FMOC、side chain 上的保護基以及樹脂裂解的示意圖.....	62
圖 11. Flow-chart for selecting cleavage cocktail for Fmoc SPPS.....	63
圖 12. 實驗設計上的固相胜肽合成的流程圖.....	26
圖 13. Ninhydrin reaction 的反應機制.....	27
圖 14. 線性胜肽氯乙醯化的流程.....	29
圖 15. thioether bridged 環狀胜肽固相方式的合成步驟.....	31
圖 16. HPLC 溶液與時間的梯度關係圖.....	33
圖 17. MALDI-TOF 儀器所使用的探針外觀.....	36
圖 18. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 粗產物之 HPLC 層析圖.....	37
圖 19. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 粗產物之 HPLC 層析圖.....	38
圖 20. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 粗產物之 HPLC 層析圖.....	38
圖 21. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 純化後之 ESI-MS 圖譜.....	39
圖 22. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 純化後之 ESI-MS 圖譜.....	39
圖 23. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 純化後之 ESI-MS 圖譜.....	40
圖 24. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 粗產物直接進行環化後之 HPLC 層析圖.....	41

圖 25. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 粗產物直接進行環化後之 HPLC 層析圖.....	41
圖 26. 線狀胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 粗產物直接進行環化後之 HPLC 層析圖.....	42
圖 27. 先將氯乙醯化後的線性胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 純化後再行環化的 HPLC 層析圖.....	43
圖 28. 純化後的氯乙醯化胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH <sub>2</sub> 環化後的 MS 鑑定圖.....	43
圖 29. 可能的立體障礙分子結構假設圖.....	44
圖 30. 環狀胜肽 cyclo(-CH <sub>2</sub> CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide 的分子模擬圖.....	45
圖 31. 環狀胜肽 cyclo(-CH <sub>2</sub> CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide 的分子模擬圖.....	46
圖 32. 環狀胜肽 cyclo(-CH <sub>2</sub> CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide 的分子模擬圖.....	46
圖 33. 環狀胜肽 cyclo(-CH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-amide 的分子模擬圖.....	47
圖 34. ClCH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH <sub>2</sub> 氯乙醯化胜肽粗產物後經 RP-HPLC 純化的分析圖.....	48
圖 35. 氯乙醯化胜肽 ClCH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH <sub>2</sub> 環化後經 RP-HPLC 純化的分析圖.....	49
圖 36. ClCH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH <sub>2</sub> 胜肽粗產物經 MALDI-TOF MS 鑑定的結果.....	49
圖 37. 氯乙醯化胜肽粗產物 ClCH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH <sub>2</sub> 環化後經 MALDI-TOF MS 鑑定的結果.....	50
圖 38. On-resin cyclization 方式所合成的環狀胜肽 thioether bridged cyclo-(CH <sub>2</sub> CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH <sub>2</sub> 之 RP-HPLC 層析圖.....	51

圖 39. On-resin cyclization 方式所合成的環狀胜肽 thioether bridged  
(-CH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH<sub>2</sub> 之  
MALDI-TOF MS 鑑定圖.....52

## 表目錄

表 1. HPLC 移動相溶液的分配比例與時間的關係.....33  
表 2. 三種氯乙醯化胜肽其 RP-HPLC (rt)及 ESI-MS 鑑定結果.....40  
表 3. 假設平均每個胺基酸合成效率與胺基酸序列長度及最終產率的關  
係.....54

# 第一章 緒論

## 第一節 前言

癌症一直是國人最大的夢魘，已連續廿五年位居國人十大死因的頭號殺手。根據衛生署公佈 2006 年十大死因統計，癌症仍為榜首，平均每十三分五十秒就有一人死於癌症。依死亡率排序，前三名分別為肺癌、肝癌、大腸直腸癌，而且每年還以 1% 的比例持續增加中。因此，相關抗癌藥物的開發已成為現今最重要的研究課題。

目前小分子藥物中以胜肽藥物最具有開發潛力，胜肽製藥的好處在於胜肽為身體內最自然的傳輸機制，且一些文獻的報導指出蛋白質的 Grb2 SH2 (Growth factor receptor-bound protein 2) 區塊與癌症的形成有關聯[1, 2]。Grb2 SH2 區塊在細胞的訊息傳導路徑中位居於致癌蛋白質 Ras 的上游，因此間接參與了 Ras 蛋白的活化反應(如圖 1)，此舉將直接造成細胞的異常增生或分化[3]。因此，設計研發能夠阻斷 Grb2 SH2 區塊與其他蛋白質結合的胜肽抑制物(inhibitor)已成為研發抗癌藥物的新方向。

由許多研究中可知 Grb2 SH2 區塊可以藉由辨識 pTyr-X-Asn 胺基酸序列而與活化後的生長因子受體結合，進而引發下游的一連串訊息傳遞。更有學者利用 X-ray 發現當 Grb2

SH2 區塊與 BCR-abl 磷酸化胜肽(具 KPFpYVNV 之胺基酸序列)結合後會誘使形成  $\beta$ -turn 的構形[4] (如圖 2)。此發現一直被往後的學者所引用，作為開發 Grb2 SH2 胜肽抑制劑的結構設計基礎。

2002 年本實驗室依據結構設計為基礎來設計一系列的 Grb2 SH2 胜肽抑制劑 [5, 6]，並選用非天然的胺基酸 Aib 於胜肽中藉以誘導  $\beta$ -turn 之構形來提高胜肽與 Grb2 SH2 區塊的親和效力。從其中篩選出最具有抑制效力的短胜肽為 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub> (如圖 3)，其 IC<sub>50</sub> 值為 8.7  $\mu$ M [6] 之後更進一步的利用 SPR (surface plasma resonance technology)以及 QCM (quartz crystal microbalance)技術來分別偵測胜肽 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub> 和 H-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub>，與 Grb2 SH2 區塊的結合平衡常數 ( $K_A$ )分別為  $1.58 \times 10^8$ 、 $3.24 \times 10^4$  以及解離平衡常數 ( $K_D$ )[7]分別為  $6.34 \times 10^{-9}$ 、 $3.09 \times 10^{-5}$ 。

由實驗數據得知，擁有 Fmoc 官能基的效果比不具 Fmoc 官能基來的好。有了此數據結果以致有了新的結構設計想法：設計了三種短序列的環狀胜肽，cyclo(CH<sub>2</sub>CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide、cyclo(CH<sub>2</sub>CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide、cyclo(CH<sub>2</sub>CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide (如圖 4)。藉由 Phe、Trp、Tyr 三個胺基酸殘基的芳香性來取代 Fmoc 官能基，並利用環狀胜肽的安定性特質

來測試其與 Grb SH2 區塊的親和效果，期望所設計的胜肽能與 Grb2 SH2 區塊有效的結合，以便達到可以阻斷 Grb2 SH2 區塊與其他訊息傳遞的相關蛋白質結合的目的，防止或減緩使癌細胞增生或誘導癌細胞分化之訊息傳遞，以抑制細胞增生或分化。

然而，實驗上碰上了瓶頸，所設計的這些小型環狀胜肽始終無法成功的合成出來，也因此對於環狀胜肽的製備流程考慮其可能造成合成困難之處加以改善，並找尋更有效率的合成方法。因此，採用實驗室曾經發表過並且成功合成的環狀胜肽  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys})\text{-NH}_2$ ，用不同方式的環狀胜肽合成法來合成以及比較兩者之間產率及效率。

## 第二節 研究動機與目的

本篇論文原本之實驗構想是根據本實驗室歷年來研究計畫最佳效果之不具有磷酸化酪氨酸胜肽 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> 值為 8.7 μM) [5, 6, 8] 為基礎設計三個小型環狀胜肽的衍生物，探討其與 Grb2 SH2 區塊的生物活性關係。由於線性胜肽容易在生物體內被水解而失去其生物活性，而環狀胜肽在其構造上比較剛性不易被水解，所以環狀胜肽更適於藥物的開發以及應用[9]，所以近年來更有許多的學者[10-13]開發各種環狀胜肽的合成法來開發新的抗癌藥物。在臨床上有許多環狀胜肽的治療藥物，如 cyclosporin A (免疫抑制劑)[14]、caspofungin (抗真菌藥物)[15]、daptomycin (抗生素)[16] 等。因此為了增進胜肽的生物活性以及安定性我們設計了三種小型環狀胜肽 cyclo(CH<sub>2</sub>CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-NH<sub>2</sub>、cyclo(CH<sub>2</sub>CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-NH<sub>2</sub>、cyclo(CH<sub>2</sub>CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-NH<sub>2</sub>。不過在合成這三種小型環狀胜肽上卻碰上了困難，實驗上起初認為是人為以及反應條件的因素，或是所合成的胜肽產率太低，因此改變了一些的反應條件去嘗試提高合成產率，但是卻依舊毫無突破，推論是構形的因素使得環化反應難以進行。為了解釋並不是反應條件以及人為的誤差所致，搜尋了許多關於固相胜肽合成的相關文

獻，以致有了後來的研究想法：採用不同方式的硫醚鍵環狀胜肽合成法來嘗試合成。由於本實驗室採用硫醚鍵(Thioether-bridged)方式在液相中進行環化反應(solution-phase cyclization)，因此引用相同的硫醚鍵方式但在樹脂上進行環化反應(on-resin cyclization)的想法[12]來做比較，藉以提高環狀胜肽的合成產率以及合成的效率，以及可作為日後實驗室環狀胜肽合成的有利參考條件。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 生長因子 (Growth factor)

「生長因子」是隨著組織培養的研究而發現的。為了在實驗室中培養哺乳類細胞，因而發現不同的細胞類型必需要有特定的蛋白質分子存在，才能促進細胞的正常生長，這些蛋白質即是所謂的生長因子。例如：表皮細胞則需表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)，才能培養。現今，已知的生長因子大約有 50 種，而對於生長因子如何刺激細胞增生，也漸漸被了解，簡單的說，即是受質與受體的關係，細胞表面有受體 (receptor)，能和生長因子結合而引發細胞增殖。

受體的作用方式有很多種，而許多生長因子受體則是屬於 receptor tyrosine kinase 一類，它們作用的方式為：1.受體和生長因子結合 2.受體結構發生變化 3.受體自己的 tyrosine 磷酸化 4.細胞內的訊息開始倍增傳遞 (signaling cascade) 5.細胞增生。生長因子經由這種方式來控制細胞增殖，然而許多致癌基因 (oncogen)即是利用此途徑作用來產生腫瘤，例如：sis oncogen 即可合成活化的 PDGF (platelet-derived growth factor)，若細胞又帶有 PDGF receptor 的話，則細胞會持續增生；erbB oncogen 則可合成截斷型式的 EGF receptor，此受體在細胞內側有活化的 tyrosine kinase domain，因此細胞如同一直接收到 EGF

的刺激一般持續增殖。所以由生長因子所引發的反應途徑及其中間的蛋白質分子，及可藉由致癌基因的研究而發現[17]。

除了組織培養和生長因子有關外，肝臟再生、腎臟發炎、傷口復原的研究，農產品的發育等，也都和生長因子有密切的關係。而且還有許多醫學和農業的應用使用到生長因子。

## 第二節 訊息傳遞 (Signal transduction)

細胞內的訊息傳遞與人體內的細胞生長、生理機能、新陳代謝、免疫反應以及基因的轉錄等許多功能有關，因此生化機制之異常情形往往與細胞內訊息傳遞之異常有關聯[18-20]，在一些血癌和乳癌中發現細胞的異常增生已被證實與細胞內之蛋白質 Grb2 ( growth factor receptor-bound protein 2)的 SH2 (Src homology)區塊有關。[1, 21-23]

RTKs (Receptor tyrosine kinases)在細胞內的訊息傳遞中扮演著非常重要的角色，RTK 過度的活化常伴隨著惡性腫瘤的產生，因此抑制 RTK 的活性將能有效的用來對抗各種不同的癌症。如 EGFR (Epidermal growth factor receptor)為 RTK 的一種，當 EGF (Epidermal growth factor)與 EGFR 位於細胞外的結合區塊(ligand-binding domain)結合後誘發 EGFR 形成穩定的雙聚體，之後 EGFR 的 tyrosine kinase domain 催化腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP)使得  $\gamma$ -phosphate 轉移到 EGFR 位於細胞膜內 C 端的自體磷酸化區域的 tyrosine 殘基上並使得 EGFR 被活化。此舉將能使得許多訊息傳遞蛋白，如 Grb2，被活化並影響細胞的增生或突變[24]。

### 第三節 Grb2 轉接蛋白質 (Grb2 adaptor protein)

Grb2 是細胞內不可或缺的一個轉接蛋白，在細胞的訊息傳遞過程中扮演中間協調的角色[25]，由 x-ray 可知是由一個 SH2 區塊以及兩側相接各一個 SH3 區塊所構成[26]。SH2 與 SH3 區塊屬於小型蛋白藉由蛋白質酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinases) 的活化來調控蛋白質與蛋白質 (protein-protein) 在訊息傳遞路徑上的交互作用。SH2 (src homology 2) 區塊為大約 100 個胺基酸所組成的蛋白模組，超過 50 種細胞內的訊息傳遞蛋白 (如 Grb2、Shc、Src) 中都可被發現其存在[27]。

Grb2 SH2 區塊會辨識被活化的生長因子受體：具有磷酸化酪氨酸 (phosphotyrosine: pY) 的 pYXNX (X 為任意胺基酸) 序列[24]，並與之形成  $\beta$ -turn 的構形[4]，因此 Grb2 的 SH2 區塊會與自體磷酸化的生長因子受體如上表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor)[28] 或其他的轉接蛋白如 Shc 的磷酸化酪氨酸 (pY) 殘基作用[29]，進而活化 Ras 蛋白質來誘發下游的訊息傳遞機制。而 SH3 區塊則會與 Ras 交換因子 Sos (Son of sevenless) 的 proline-rich 部位以及疏水性胺基酸的序列相結合。當 Ras 交換因子 Sos 與 Grb2 結合後，藉由被活化的酪胺酸激酶受體使的 Sos 轉移到細胞膜上，使得 Sos 被活化並誘發到 Ras 的訊息傳遞使得 Ras 被活化。之後將使得下游的訊息傳遞蛋白 raf、MAP 接續被活化。[28, 30, 31]

#### 第四節 固相胜肽合成 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS)

早期利用標準胜肽合成法，科學家們不斷努力地研究且成功的運用此方法合成出例如胰島素 (Insulin)和數種其他胜肽激素 (Peptide hormone)。雖有以上之成就，但亦存在著先天性的缺陷，限制了所要合成多胜肽 (Polypeptide)之長度以及每進行下一胜肽鍵合成反應前，需先將反應中間產物 (Intermediate product)純化出來，因此需要許多分離 (Isolation)和純化 (Purification)的繁複手續，這些步驟甚且是多胜肽合成反應中最困難的部份，因此消耗相當多的原料與時效。所以為了使合成法既簡單又有效，才促使一些科學家們從一九五九年六月起，集中精力去尋求新的合成法。

一九六三年 R.B. Merrifield 提出一種新方法，利用共價鍵結合的方式，將所要合成的胜肽連接在固相支持物樹脂上，這樣一來就可以用簡單的過濾方式來沖洗去除過剩的反應物及副產物，而不需要像早期的液相合成法那般需要額外進行分離及純化的步驟，如此便能大大的提高合成效率及產率，由於在整個合成過程中繼續增長之多胜肽是以不溶解的固相存在，因此稱固相合成法 (Solid-phase peptide synthesis)。其當初所提出之固相胜肽合成法的樹脂是利用聚苯乙烯 (polystyrene)，所以為使 C 端胺基酸易與樹脂基行酯化反應而附著其上，故樹脂基之苯環需先經氯甲基化 (Chloromethylation)之過程，然

後將 C 末端 (C terminal) 胺基酸的羧基和固態樹脂基 (Resin) 作用形成酯鍵 (Ester bond)，之後由此開始依照預定之胺基酸順序逐次地合成胜肽鍵，等到整個多胜肽合成後再把與固態樹脂基形成之酯鍵切斷，就得到所要之多胜肽[32] (如圖 5)。

這新方法在理論上有下列優點，一、多孔性固態樹脂基之化性，物性很穩定且在非極性溶液中，例如二氯甲烷 (DCM)，體積容易膨大，使反應物在空隙中容易進行，又增長中之多胜肽因固著在不溶解之樹脂基上，我們只要充分沖洗就可將溶解性之多餘反應物或副產品除去，不必精製中間產物，因此簡化了合成過程。二、操作速率快，一天大概可完成六個胺基酸之聚合。三、消旋現象 (Racemization) 不易發生，故合成之多胜肽具有生物功能。因此，此方法直至現今仍被廣泛的應用在胜肽以及小型蛋白質的製備上。

固相支持物，樹脂在固相合成法中的選擇是最重要的一環，它必須具備幾種特性：第一、樹脂基在整個反應過程中對於所用之溶劑，不論酸性、中性、或鹼性之有機溶劑，甚至於作用很強之無機酸等皆不溶才可。第二、具多孔性。使反應物在樹脂基之空隙內反應很容易進行，且反應完成後易於過濾和洗濯，以除去過剩之反應物或副產品。

樹脂的選擇除了上述的條件外，還可以依照實驗設計上的需求來做選擇，基本上考慮的因素為裂解試劑 (cleavage reagent) 的條件以及

C 端胺基酸末端官能基的形成種類來作為選擇樹脂的考量如(圖 6)。

除了樹脂的選擇之外，胺基酸 N 端的保護基也有不同的種類，較常用的兩種如 t-BOC (tert-butoxycarbonyl)、FMOC (fluorenylmethoxycarbonyl)。可依照所設計的胜肽其殘基上的保護基及樹脂對酸鹼的不同穩定性來選擇使用。t-BOC 對酸不穩定，因此可以利用如 TFA 的酸來使具有 t-BOC 保護基的胺基酸去保護，反應機構參見(圖 7)，而 FMOC 對鹼不穩定，則可用如 piperidine 此類的鹼來對具有 FMOC 保護基的胺基酸去保護，其反應機構參見(圖 8)。

為了提高胜肽耦合時的效率，因此需藉助耦合試劑 (coupling reagent)來提高反應產率以及縮短反應時間。本實驗室胜肽合成時所採用的偶合試劑為 HBTU (O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphate)、HOBt (1-hydroxybenzotriazole)、DIEA (N,N-Diisopropylethylamine)，此耦合試劑除了可提高效率外還能抑制外消旋化 (racemization)的產生，其與胺基酸反應後-COOH 官能基會形成強的缺電子基團，使得欲耦合的胺基酸或樹脂 N 端的未鍵結電子對利於進攻，之後離去-OBt 便完成胜肽鍵的形成[33]，如(圖 9)。

最終合成好依附在樹脂上的胜肽則可選擇裂解試劑將胜肽胺基酸支鏈上的保護基以及樹脂移除，如(圖 10)，即可得到最終產物，配方的參考可以參照附件，如(圖 11)[34]。

## 第五節 環狀胜肽 (Thioether-bridged peptide)

線性胜肽雖然可以在利用固相胜肽合成的技術下，配合自動胜肽合成儀做自動化的合成，但是其本身的結構是利於自由彎曲的，因此相對的會影響到生物活性[9]。由於環狀胜肽的環狀結構可形成較穩定之構象，因此可以提高了胜肽之安定性以及生物活性，且由於傳統的雙硫鍵 (disulfide-bridged bond)的環狀結構會因為還原作用而轉變成線性，失去其具有生物活性之結構，導致失去其生物活性。因此，為了增進環狀胜肽的生物安定性及生物活性，本實驗室在環狀胜肽的設計上採頭尾相連 (head-to-tail)之硫醚鍵 (thioether-bridged bond)的方式來形成環狀胜肽。

胜肽分子內的反應是形成硫醚鍵方式環狀胜肽的關鍵，因為相同種類的線性胜肽有很高的傾向形成寡聚物 (oligomerize)，因此線性胜肽分子內的反應步驟顯得非常的重要。為了要避免寡聚物的產生，通常要合成環狀胜肽時 (包含液相或固相方式)都會對線狀胜肽前驅物 (linear precursor)做一些保護措施。液相方式的環狀胜肽合成時需把反應物環境控制在相當高稀釋的條件下進行，來避免線狀胜肽的寡聚物產生，雖然在相當稀釋的溶液條件下進行，但是仍然會發現一些嚴重的缺點，如: dimerization 或是 oligomerization 這些副反應的產生，

即是線狀胜肽之間形成的聚合物。如果將胜肽利用固相支持物的方式來作環化反應，即可模擬相當稀釋的反應環境，又可利用線狀胜肽支鏈上的保護基以及樹脂保護C端的優點進行環化反應，減少許多的干擾因素，因此固相方式的環狀胜肽合成法可以更有效率地合成環狀胜肽[35]。

### 第三章 材料與方法

#### 第一節 實驗材料

##### 一、藥品試劑

Piperidine .....	(TEDIA, Ohio, USA)
DMF (N,N-dimethylformamide) .....	(Malinckrodt, MO, USA)
DCM (Dichloromethane).....	(TEDIA, Ohio, USA)
DIEA (N,N-Diisopropylethylamine).....	(SIGMA, MO, USA)
HBTU (O-Benzotriazol -1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate).....	(ANASPEC, California, USA)
HOBt (1-hydroxybenzotriazole).....	(ANASPEC, California, USA)
Rink amide resin (4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl-phenoxy-acetamido- norleucylaminomethyl resin).....	(NOVAbiochem, Darmstadt, Germany)
Fmoc-Phe-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Trp-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Glu(tBu)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Tyr(tBu)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Aib-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Asn(Trt)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Cys(Trt)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Cys(Mmt)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Gly-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Fmoc-Asp(tBu)-OH.....	(ANASPEC, California, USA)
Chloroacetic anhydride.....	(SIGMA, MO, USA)
TFA (Trifluoroacetic acid).....	(Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany)
TEA (triethylamine).....	(Fisher Chemical, Springfield, NJ)
Acetonitrile.....	(TEDIA, Ohio, USA)
NMM (N-methylmorpholine).....	(Acros Organics, Geel, Belgium)
kaiser test kit.....	(Fluka, NY, USA)
TIS (Triisopropylsilane).....	(Acros Organics, Geel, Belgium)
EDT (Ethanedithiol).....	(SIGMA, MO, USA)

HATU (N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridino-1-yl-methylene]-Nmethylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide)  
 .....(AgeneMax, Taipei, Taiwan)  
 HOAt (1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole).....(AgeneMax, Taipei, Taiwan)

## 二、設備、器材

PD-10 Column (17-0435-01)..(Amersham biosciences, New Jersey, USA)  
 自動旋轉器 (Model. SD-50).....(Young chenn, Kuan Tung, China)  
 抽氣馬達 (DOA-P704-AA).....(GAST mech, Taipei, Taiwan)  
 真空萃取裝置 (SPE Vacuum manifold).....(Great tide, Taipei, Taiwan)  
 冷凍乾燥機 (FD3-12P).....(Kingmech, Taipei, Taiwan)  
 塑膠注射針 (23G×1.25 R.B.).....(TaiwaTOP, Taipei, Taiwan)  
 塑膠注射針筒 10 ml.....(Taiwan TOP, Taipei, Taiwan)  
 微量注射幫浦.....(KdScientific, PA, USA)  
 pH meter.....(SUNTEX, Taipei, Taiwan)  
 加熱攪拌器.....(PANTECH, Taipei, Taiwan)  
 HPLC (Pump: L2130 UV detector:L2400).....(HITACHI)  
 C-18 column (10×250mm cat.238TP101510 particle size 10-15 micron)  
 .....(VYDAC, GA,USA)  
 微量注射器 500 µl (80830 750RN).....(HAMILTON)  
 玻璃過濾裝置 (AK95375-00000).....(KONTES, NJ, USA)  
 0.22 µm filter.....(Millipore, NY, USA)  
 0.45 µm filter.....(MILLEX, NY, USA)

## 第二節 實驗方法

### 一、固相胜肽合成

固相胜肽合成技術由 Bruce Merrifield 於 1963 年所發明，廣泛的應用在胜肽以及小型蛋白質的製備上，線狀胜肽的合成利用固相胜肽合成技術，應用 Fmoc Chemistry (fluorenylmethoxycarbonyl 簡稱 FMOC)將胜肽合成在固相支撐物樹脂上，再以化學裂解法將胜肽自樹脂上裂解後，進行冷凍乾燥以得到胜肽之粗產物。

#### (一) 線狀胜肽 (Linear peptide)之合成

##### 實驗方法

首先稱取 176 mg (0.125 mmole)的 Rink Amide Resin (0.71 mmole/g) 置入 PD-10 反應試管中之後，加入 DCM 5 ml 反應時間 5 分鐘兩次，使樹脂膨鬆之後，再加入 DMF 5 ml 反應時間 5 分鐘兩次，使樹脂潤濕，再加入 20 % piperidine 5 ml 反應時間 15 分鐘 2 次使樹脂上的 Fmoc 保護基去除 (圖 8)，接下來利用 DMF 5 ml 反應時間 5 分鐘進行三次來沖洗掉殘餘的試劑，然後加入耦合試劑 (coupling reagent: 包含 2 eq. HOBt、2 eq. HBTU、4 eq. DIEA 87  $\mu$ l)[36]以及具有 N- $\alpha$ -protection 的 Fmoc 保護基與支鏈含有特殊保護基的胺基酸來進行耦合反應，反應時間 2 小時；反應完成後重複 DMF 5 ml 反應時間 5 分鐘兩次的步驟到與胺基酸耦合的步驟，直到線性

胜肽完成，流程如下圖(圖 12)。此時先不進行樹脂與胜肽的裂解反應，才能進行之後環化反應的前處理步驟，即進行線狀胜肽之氯乙醯化反應。

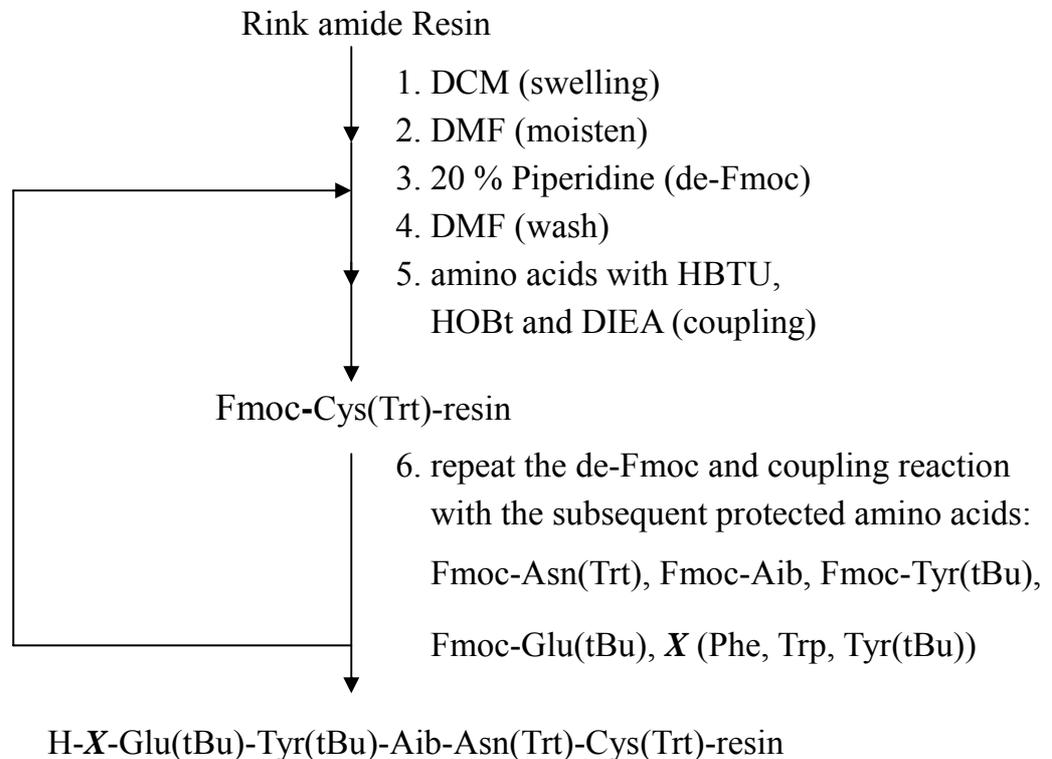


圖 12. 實驗設計上的固相胜肽合成的流程圖。

## (二) Ninhydrin reaction

1910年Ruhemann發現Ninhydrin與一級胺基反應會形成的紫色現象；又稱為Ruhemann's purple (RP)；目前常應用在農業、生化、環境科學、食品或法律上的鑑定等等。在本實驗中利用其與一級胺基反應會形成顏色變化的現象來判斷所合成的胜肽N端的Fmoc保護基是否存在，來斷定所合成的胜肽序列是否正確的接上，其反應的機制（如圖13）所示：[37]

$\alpha$ -amino acids and amines:

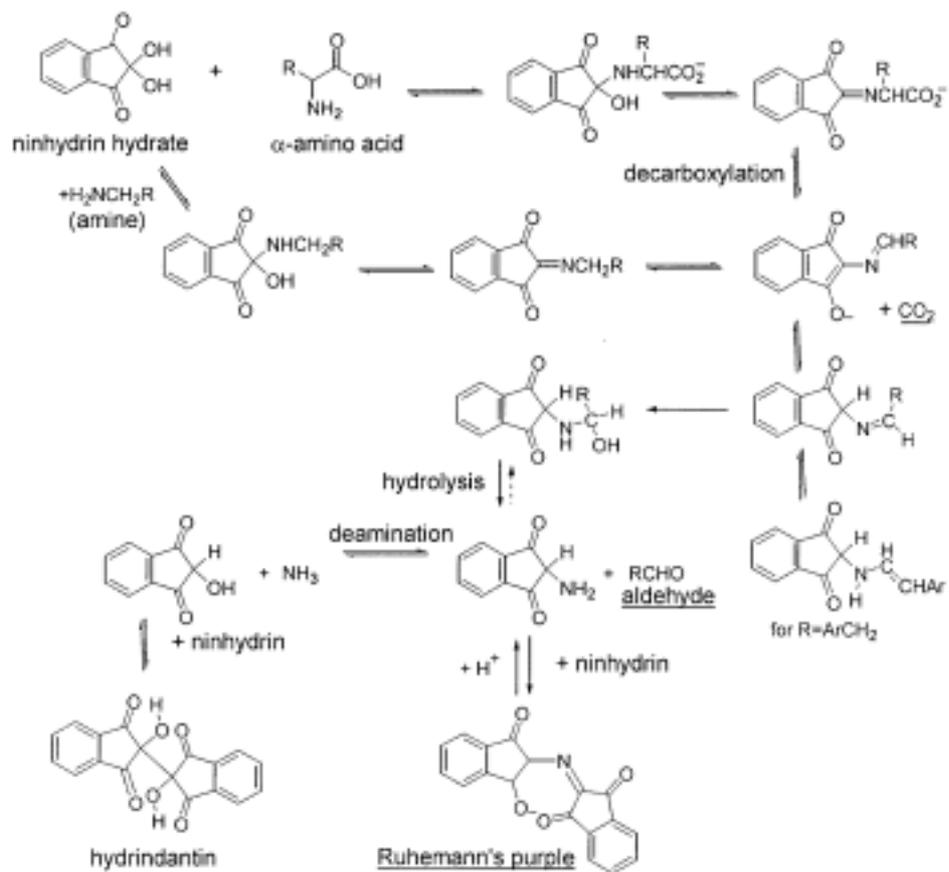


圖 13. Ninhydrin reaction 的反應機制。

實驗方法

將些微量的樹脂顆粒由 PD-10 反應試管挑出放進小玻璃試管內，之後加入 kaiser test kit 中的三種試劑各 20  $\mu$ l，再將玻璃試管放入加熱器中維持在 95  $^{\circ}$ C 下 5 分鐘。之後可在顯微鏡下明顯的看出樹脂的顏色變化，若 N 端 piperidine 去保護後可觀察到樹脂顯示成深藍色，另外當 N-Fmoc 胺基酸完成 coupling 後則可觀察到樹脂呈現略為透明的淺黃

## 二、環狀胜肽之合成

由於環狀胜肽的環狀結構可形成較穩定之構象，因此可以提高胜肽之安定性。由於傳統的雙硫鍵 (disulfide-bridged bond) 的環狀結構會因為還原作用而轉變成線性失去其具有生物活性之結構導致至失去其生物活性，因此，為了增進環狀胜肽的生物安定性及生物活性，實驗上設計成頭尾相連 (head-to-tail) 之硫醚鍵 (thioether-bridged bond) 的方式來形成環狀胜肽。

### (一) 線狀胜肽之氯乙醯化反應

#### 實驗方法

將 4 倍過量的 chloroacetic anhydride 溶於 DMF 5 ml 與合成好未裂解的線性胜肽在室溫下反應 24 小時後，加入裂解試劑 (95% TFA, 2.5% water, 2.5% TIS) 5 ml 反應 2 小時，以化學裂解法將所合成好的胜肽從樹脂上分離，流程如下圖 (圖 14) 以得到氯乙醯化之線性胜肽的粗產物，再經過 HPLC 的分析純化後，進行冷凍乾燥，經 MS 鑑定之後進行胜肽環化反應。

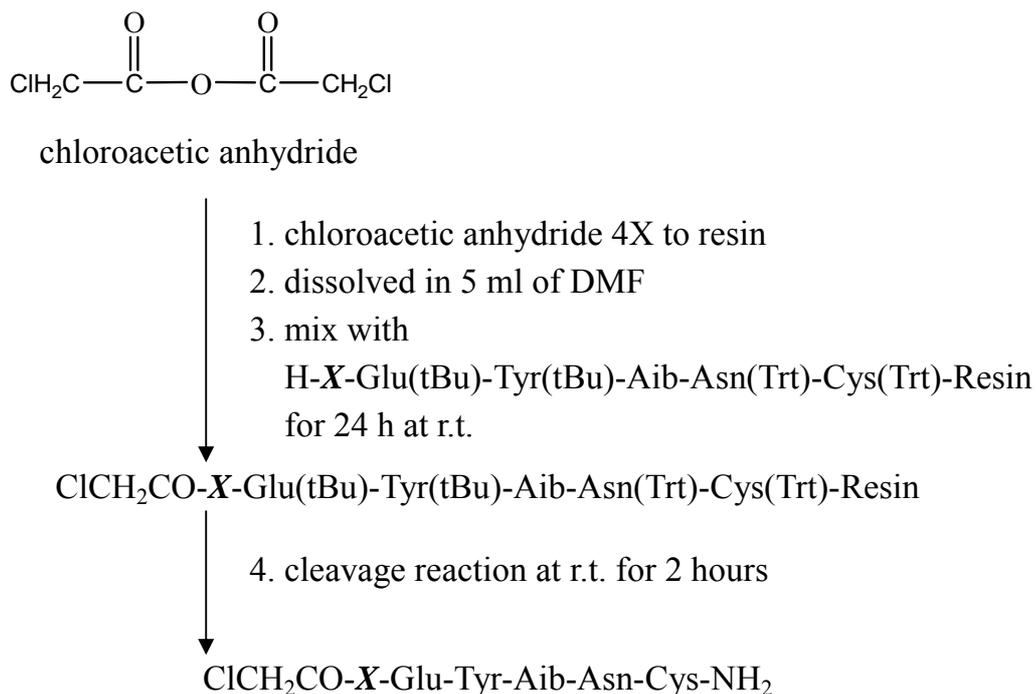


圖 14. 線性胜肽之氯乙醯化反應的流程。

## (二) Solution-phase cyclization

### 實驗方法

將氯乙醯化後經 HPLC 純化之線狀胜肽純化產物之稀釋液置於 10 mL 之注射針筒中，以微量注射幫浦控制滴定速度 (1 ml/h) 滴入裝有 50 mL 二次水之錐形瓶中，滴定前先加入 TEA (triethylamine) 使水溶液的 pH 值大於 10，滴定開始後固定時間以 pH meter 監控 pH 值，並陸續以 TEA 調整錐形瓶中反應溶液之 pH 值，維持大於 8.5 (Cys pK<sub>R</sub> 約等於 8.24)，持續攪拌，當滴定完成後，進行冷凍乾燥以得到環狀胜肽之粗產物。胜肽粗產物以 RP-HPLC 進行分析確認其純度及滯留時間 (R.t.)，純化之後再經由冷凍乾燥機處理，然後經 Mass 鑑定。

### (三) On-resin cyclization

合成環狀胜肽的時候很容易形成寡聚物 (oligomerize), 因此線性胜肽分子內的反應步驟顯得非常的關鍵, 液相的環狀方法雖然在相當稀釋的溶液條件下進行, 但是仍然會發現一些嚴重的缺點, 如環雙聚體化或環寡聚體化這些副反應的產生, 所以為了讓環狀胜肽的產率更高我們亦嘗試固相的方式來進行環化反應。

#### 實驗方法

實驗方式上先利用先前的方式合成好線性的氯乙醯化胜肽(保護基以及樹脂未切除), 由於在 Cys 胺基酸的選擇方面我們選擇一個具有對酸非常靈敏的保護基(Mmt), 因此可以先利用 1% TFA 的 DCM 溶液 5 ml 將 Cys(Mmt)上的 Mmt 保護基優先去除之後加入 5% NMM (N-methyl-morpholine)的 DMF 溶液 5 ml, 在鹼性的條件下進行樹脂上的環化反應, 反應時間 24 小時, 當環化反應結束後再來用裂解試劑 (95% TFA, 2.5% water, 2.5% TIS)將所有的保護基以及樹脂切除, 即可完成環狀胜肽製備。將完成反應的環狀胜肽利用 N<sub>2</sub> 幫助裂解試劑加速揮發, 之後加入 8-10 倍體積的冰乙醚來幫助環狀胜肽的沉澱, 抽掉乙醚層後加入少許二次水進行冷凍乾燥以得到環狀胜肽之粗產物。胜肽粗產物以 RP-HPLC 進行分析確認其純度及滯留時間 (R.t.), 純化之後再經由冷凍乾燥機處理, 然後經 Mass 鑑定。

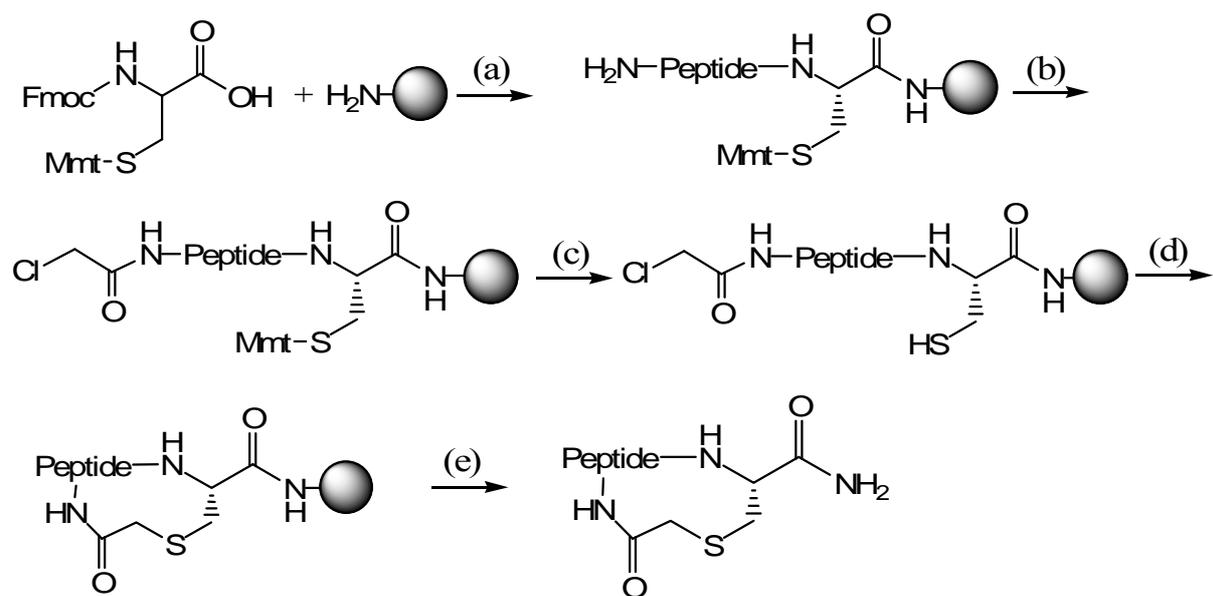


圖 15. 固相方式的 thioether bridged 環狀胜肽一般的合成步驟。(a) (1) HATU, HOAt, DIEA in DMF, (2) 20% piperidine in DMF, (3) ten cycles of Fmoc SPPS with HBTU/HOBt/DIEA coupling; (b) (ClCH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O in DMF, rt, overnight; (c) 1% TFA in DCM, 2 mins, 10 times; (d) 5% NMM in DMF, overnight; (e) 95% TFA, 2.5% TIS and 2.5% H<sub>2</sub>O, 2 h.

### 三、逆相高效能液相層析法 (Reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)

逆相高效能液相層析法(RP-HPLC)是一種能將物質依其極性大小加以分離的方法。原理是樣本的各個成份藉由移動相 (mobile phase)攜帶通過帶有非極性官能基之固定相 (stationary phase)，透過樣本在非極性固定相之間不同的疏水性之交互作用，而達到分離的效果。其固定相管柱表面的填充材質為低至中極性的物質，通常是鍵結很強的非極性官能基團，如由 C<sub>4</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>18</sub> 所組成的長烷鏈、苯環。其所適用之 pH 值範圍為 2-9。而移動相沖提液則是偏中至極性的溶液，如乙腈 (氰甲烷)、 甲醇等與水所組成的混合物。RP-HPLC 之分離機制係利物質與固定相之間相互疏水作用力 (hydrophobic interaction)不同，使樣品的各個成份於層析管柱中因滯留時間不同而被分離出來，極性最大的物質與管柱填充物表面間作用力最小，故最早被沖提出；反之，極性越小的物質與管柱填充物表面間作用力越強，故越晚被沖提出。

#### 實驗方法

HPLC 的的離析率與流速、管柱的長度、管柱填充物的顆粒大小以及移動相溶劑的選擇有關；為了得到最佳的分離狀況，實驗上沿用先前實驗室所設定的參數，溶液配製方面為：solution A 為 4 L 之 D.I. Water + 0.05% trifluoroacetic acid (TFA)，solution B 為 4 L acetonitrile (ACN) + 0.05%

TFA，溶液的分配比例與時間的關係參見表 1，溶液 B 與時間的梯度關係參見圖 16。

表 1. HPLC 移動相溶液的分配比例與時間的關係

Time(min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0	90	10
30	10	90
33	10	90
38	90	10
40	90	10

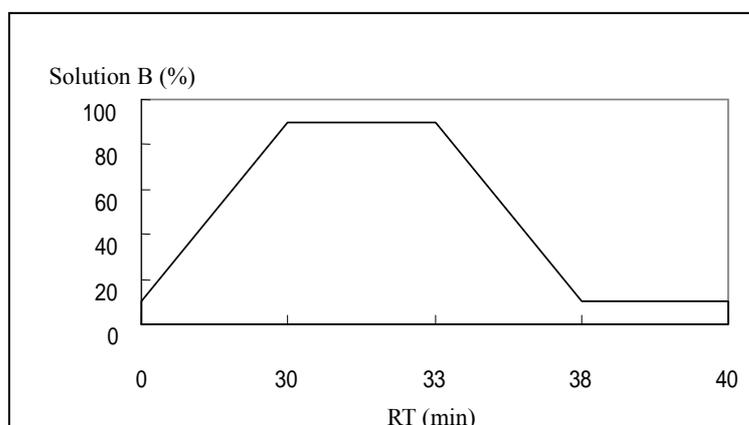


圖 16. HPLC 溶液與時間的梯度關係圖。

欲分析或純化的樣品需於分析或純化前，先以孔徑 0.45  $\mu\text{m}$  針筒過濾器 (filter) 過濾。使用儀器前，須先去除儀器內部管路的氣泡 (Purge)，再讓儀器不注入任何樣品的情況下執行一次，確認管柱內沒有殘餘的干擾物。若有雜訊出現，應設定適當條件 (流速、溶劑配比係數) 將管柱清洗乾

淨後，再行樣品分析。樣品注入樣品注射閥，此時樣品仍停留於閥內，注射閥箭頭停留在 lode 位置；先按 start run 待螢幕畫面出現 waiting for inject 時，將閥往下推至 inject，樣品就會進入 RP-C<sub>18</sub> 管柱進行層析。樣品中成分經 UV 光源 225 nm 偵測後之數據：滯留時間 (retention time, Rt) 會呈現在積分儀的圖上，積分儀隨著時間會出現面積大小不一的波峰 (peak)，此時若要進行純化可依積分儀出現的波峰，個別收集每個波峰出現時所層析出的液體，經冷凍乾燥，便可得到純化的白色乾燥胜肽粉末。

#### 四、基質輔助雷射脫附游離-飛行時間質譜儀 (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight Mass spectroscopy, MALDI-TOF MS)

傳統的質譜游離方法，如電子撞擊游離法EI ( Electron Impact Ionization) 及化學游離法CI (Chemical Ionization)，必須先將樣品加熱揮發成氣相才能進行游離，因此無法偵測出大多數具有高極性、低揮發性、高分子量及熱不穩定性的生化分子。為能順利偵測到此類生化分子，陸續有數種以脫附游離為基礎的質譜技術相繼被提出，所謂的脫附游離是指分析物分子在很小的體積內於極短時間之下被加以巨大的能量，使得分子由凝相 (固相或液相)轉變至氣相，並同時發生游離的現象。

其中，MALDI具有許多其他質譜游離法所沒有的特點，包括有：(1)極高的靈敏度，可偵測到femtomole甚至attomole濃度的分析物。(2)極高的偵測質量範圍，可偵測到分子量高達百萬Da以上的分析物。(3)操作非常簡單且偵測時間短。由於MALDI具有這些的特點，所以此技術在1980年代末期被發展出來之後，極短的時間內就被商業化並廣泛應用於生化樣品的分析上。

#### 實驗方法

首先將基質溶液 $\alpha$ -CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid)(0.5  $\mu$ l)與分析物樣品溶液等量均勻混合於一探針(鐵氟龍盤子)上，(如圖17)所示；待混和溶液的溶劑在空氣下揮發後，基質和分析物便會在探針上形成共結晶，

此時即可將含此樣品的探針置入質譜儀之游離源中進行脫附游離，並以質量分析器進行偵測。

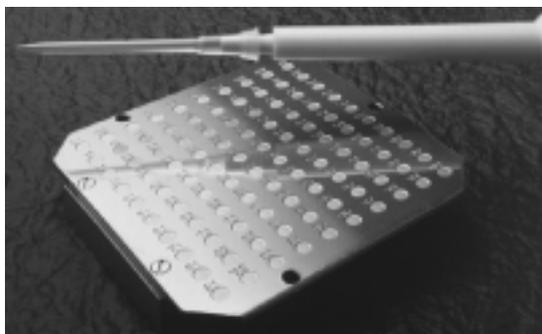


圖 17. MALDI-TOF 儀器所使用的探針外觀。

## 第四章 結果與討論

### 第一節 三種小型環狀胜肽的合成

#### 一、線性胜肽之設計、合成、氯乙醯化及鑑定

設計之胜肽序列為(peptide 1 : ClCH<sub>2</sub>CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH<sub>2</sub> ; peptide 2 : ClCH<sub>2</sub>CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH<sub>2</sub> ; peptide 3 : ClCH<sub>2</sub>CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH<sub>2</sub>)。線性胜肽氯乙醯化後經 RP-HPLC 純化後的分析圖分別如下， peptide 1 之分析圖(圖 18)，滯留時間 (Rt)為 17.07 分鐘； peptide 2 之分析圖(圖 19)，滯留時間為 20.61 分鐘； peptide 3 之分析圖(圖 20)，滯留時間為 19.13 分鐘。

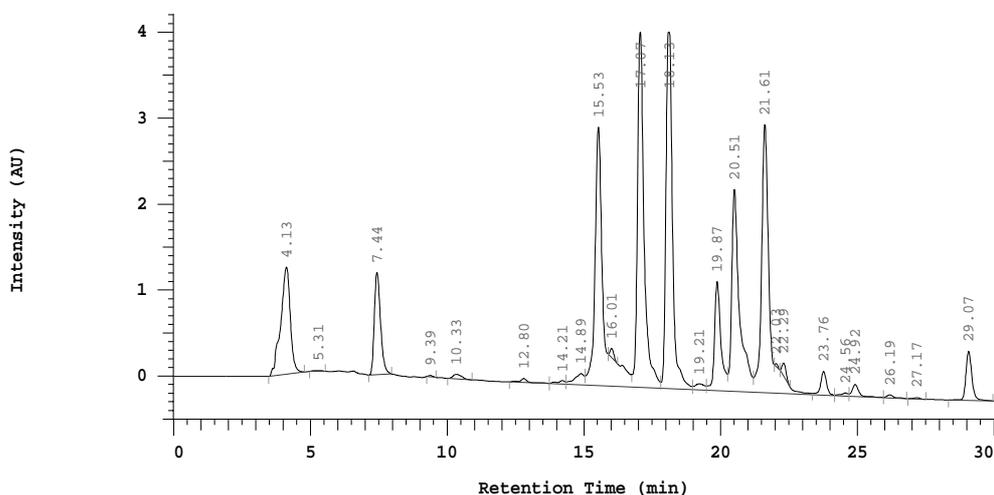


圖 18. 線狀胜肽 ClCH<sub>2</sub>CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH<sub>2</sub> 粗產物之 HPLC 層析圖。滯留時間 (Rt)為 17.07 分鐘。

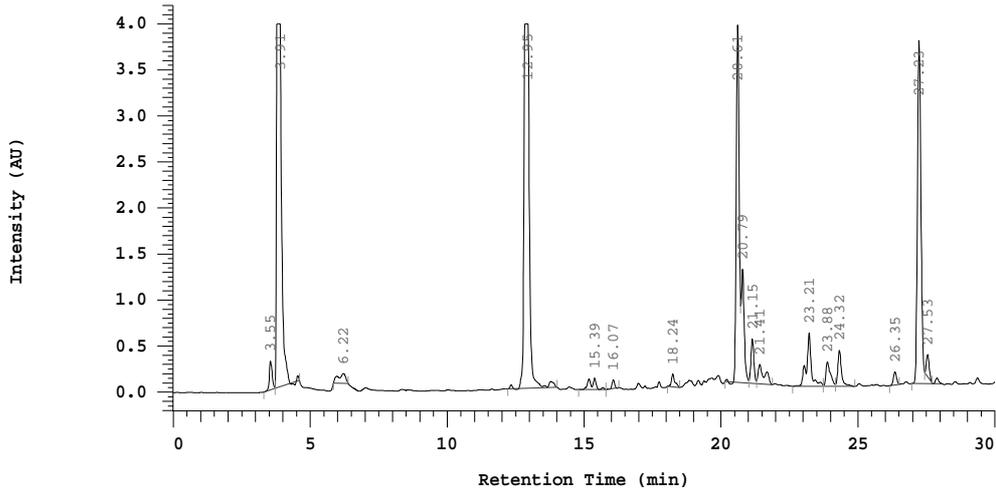


圖 19. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  粗產物之 HPLC 層析圖。滯留時間為 20.61 分鐘。

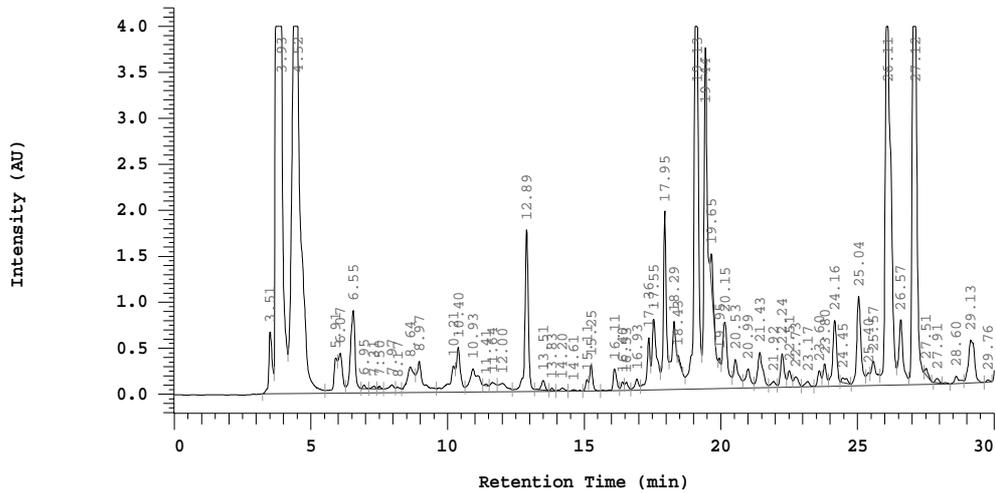


圖 20. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  粗產物之 HPLC 層析圖。滯留時間為 19.13 分鐘。

經 RP-HPLC 所純化的線性胜肽 peptide 1, peptide 2, peptide 3，其分子量經計算後分別為 835.26、874.3 及 851.26，ESI-MS 所鑑定的結果分別如圖 21、圖 22 以及圖 23，詳細結果整理在表格 2。

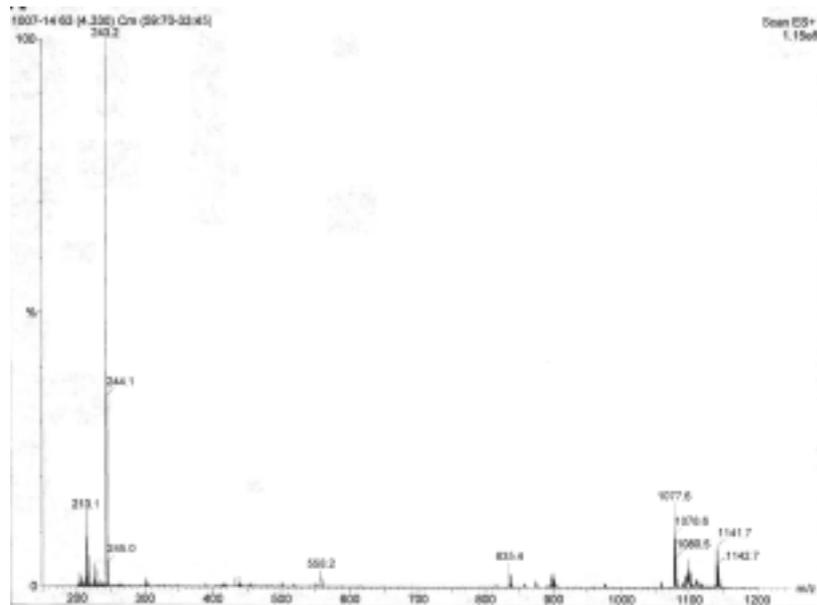


圖 21. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  純化後之 ESI-MS 圖譜。計算值為 835.26，鑑定值為 835.4。

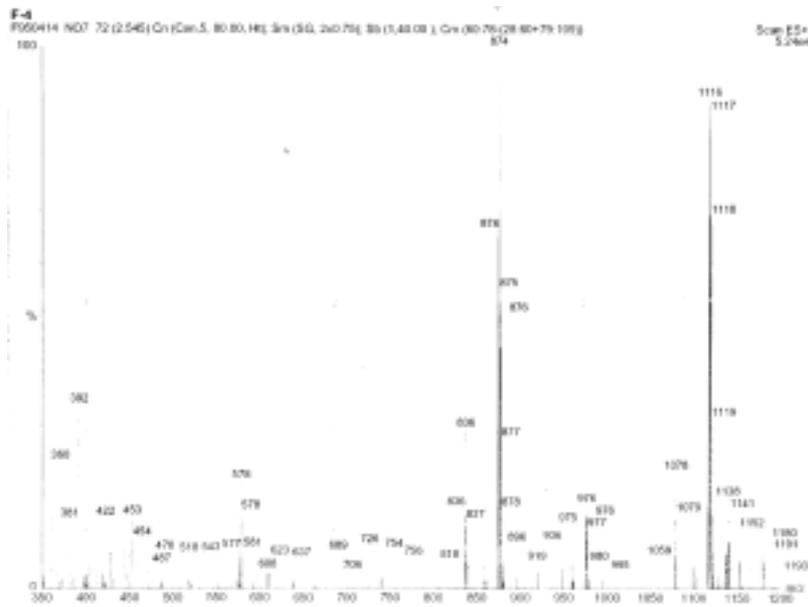


圖 22. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  純化後之 ESI-MS 圖譜。計算值為 874.3，鑑定值為 874.0。

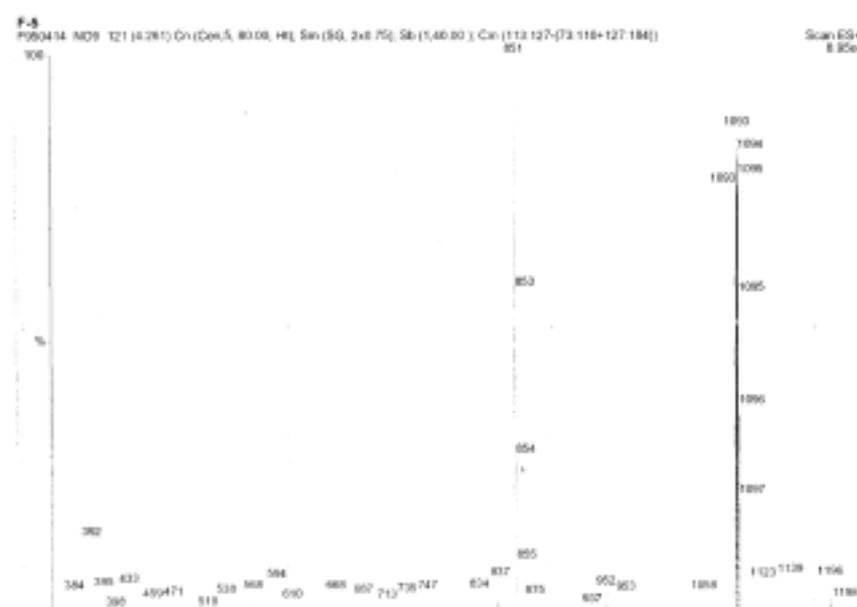


圖 23. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  純化後之 ESI-MS 圖譜。計算值為 851.26，鑑定值為 851.0。

表 2. 三種氯乙醯化胜肽之 RP-HPLC 及 ESI-MS 鑑定結果

Peptide	RP-HPLC (retention time: minutes)	ESI-MS (actual mass: daltons)
1	17.07	835.4
2	20.61	874.0
3	19.13	851.0

## 二、環狀胜肽合成

分別將上述經過氯乙醯化後之三組線性胜肽進行環化反應，其 HPLC 層析圖分別如圖 24、圖 25 以及圖 26。

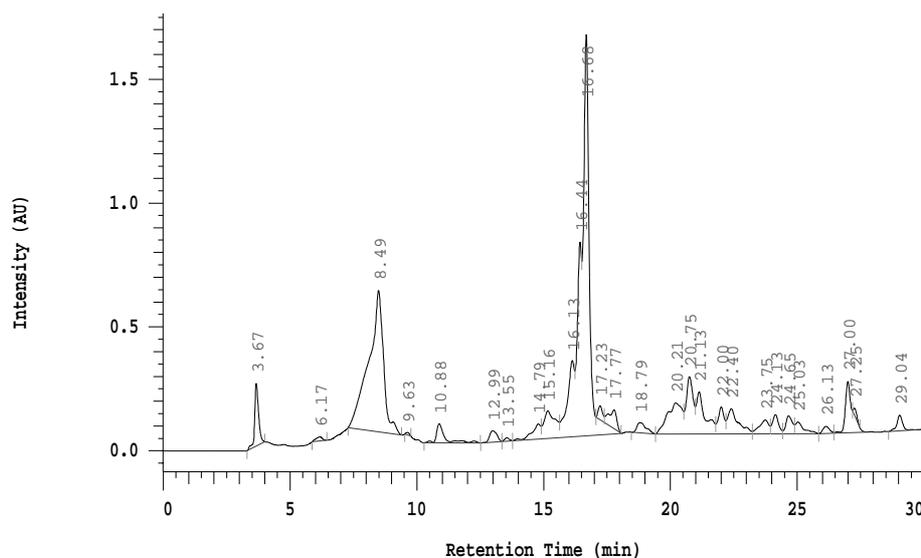


圖 24. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  粗產物直接進行環化後之 HPLC 層析圖。

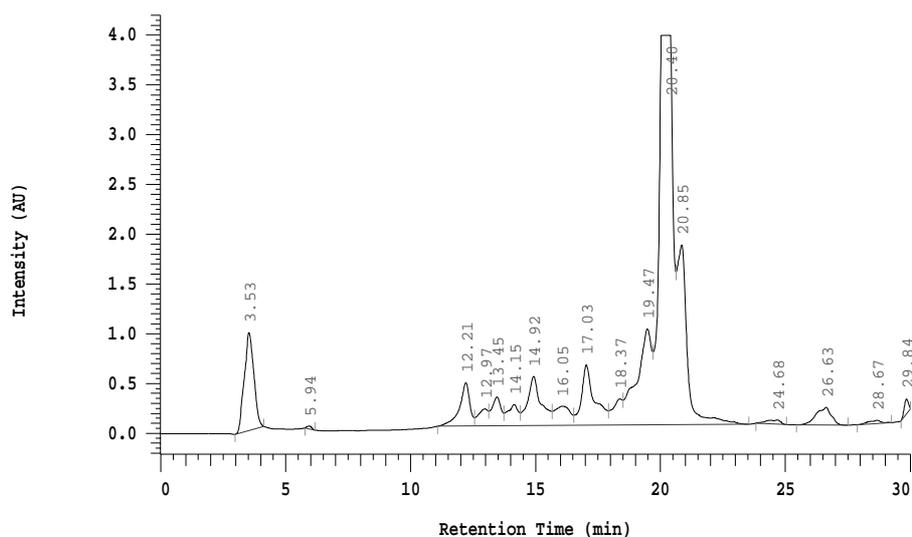


圖 25. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  粗產物直接進行環化後之 HPLC 層析圖。

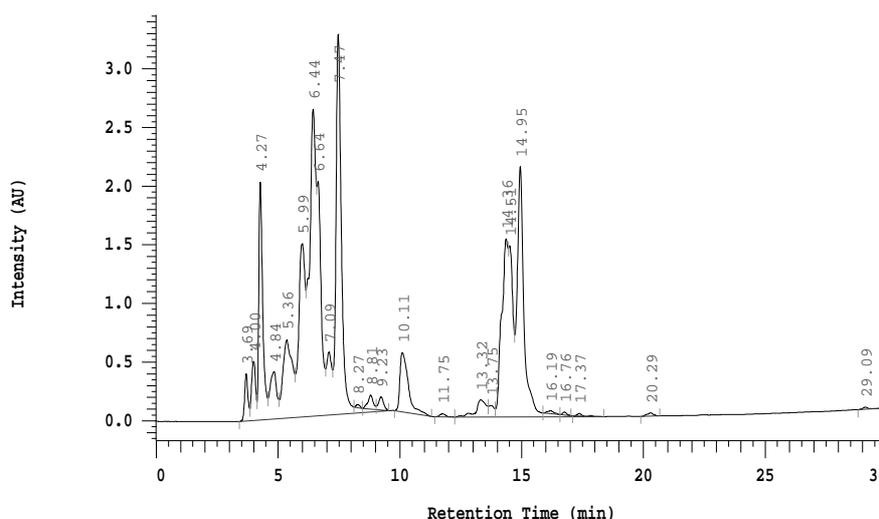


圖 26. 線狀胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  粗產物直接進行環化後之 HPLC 層析圖。

然而，環狀胜肽經過多次的嘗試合成，粗產物經過MS的鑑定並沒有得到預期的結果，也因此發現線性胜肽環化的過程有許多的難題，本實驗室所設計的線性胜肽環化方法是採用thioether bridged的方式，因此氯乙醯化的步驟顯得相當的重要，為了使環化反應的干擾降低，因此環化的過程也做了些許的改變，目前的作法是直接向廠商購置chloroacetic anhydride來取代chloroacetic acid與dicyclohexylcarbodiimide之反應步驟以及提高更多倍過量的chloroacetic anhydride來參與氯乙醯化反應。此外，改變了原先將氯乙醯化之後的線性胜肽粗產物直接進行環化的步驟，改變成線性胜肽經氯乙醯化後，先採用HPLC進行純化分析(圖18)，然後將所收集的溶液以MS鑑定(圖21)確定為氯乙醯化成功的線性胜肽之後，再將其進行環化反應，最後再用HPLC進行進一步的純化(圖27)。

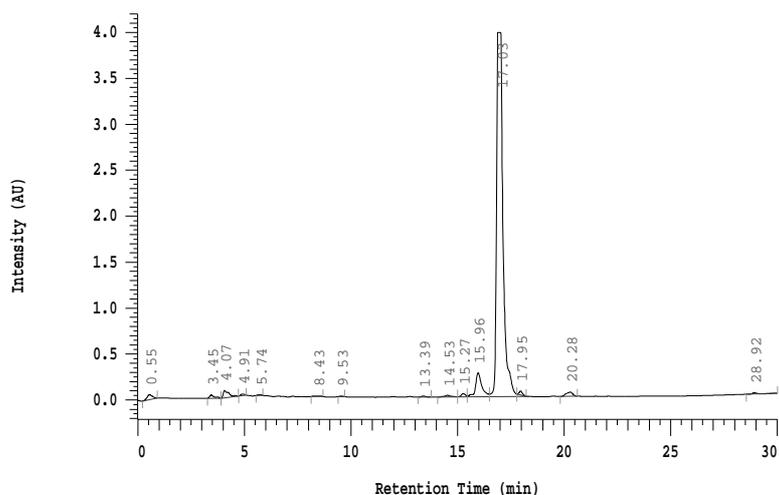


圖 27. 先將氯乙醯化後的線性胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  純化後再行環化的 HPLC 層析圖。

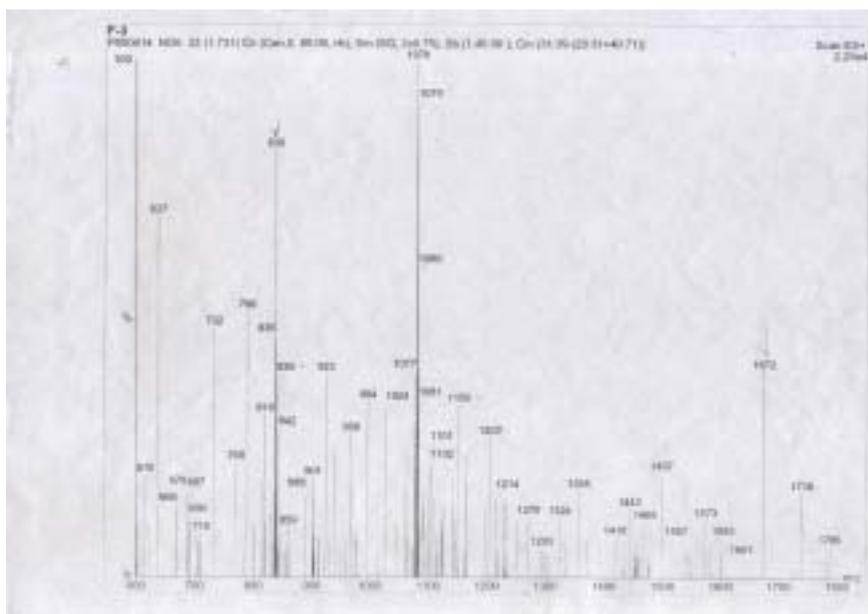


圖 28. 純化後的氯乙醯化胜肽  $\text{ClCH}_2\text{CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys-NH}_2$  環化後的 MS 鑑定圖。

然而經過步驟改變之後，經 MS 鑑定後仍然沒有預期的結果。由(圖 28)可看出環化前跟後都有氯乙醯化起始物的存在，且沒有正確的環化產物出現，可推論環化反應沒有進行。因為環化反應沒有進行使得起始物更

容易形成 dimer (起始物的濃度越來越高，增加碰撞的機率)。也發現到，因為液相方式的環化反應是先加入裂解試劑，因此沒有固相支持物 resin 的存在下，支鏈上的保護基無法用沖堤的方式先行移除，會在進行環化時干擾反應。再者，本實驗室另一研究主題的截然不同序列胜肽卻可以成功的利用以上之方式合成環狀胜肽，所以推測很有可能是結構本身的因素使得環化反應不易進行。(圖 29)為一個可能的立體障礙分子結構假設圖，其中因為立體障礙的關係，使的整體結構彎曲程度不夠，造成 Cys 上的 S 原子與 ClCH<sub>2</sub>CO-上的  $\alpha$  碳原子距離過遠，使環化反應無法進行。

之後並委請淡江大學王伯昌教授實驗室的學生利用 Gaussian 98 套裝軟體中含電子相關 B3LYP 方法並配合 6-31G\*基組函數 (basis set function) 進行密度汎函數法(density functional method)來進行分子模擬的整體能量計算(圖 30、圖 31、圖 32、圖 33)。

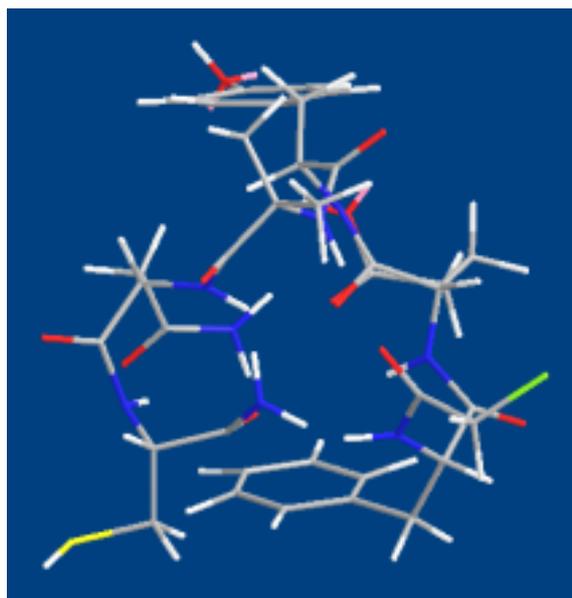


圖 29. 可能的立體障礙分子結構假設圖。其中，黃色為 S 原子綠色為 Cl 原子。

並搜尋了許多關於固相胜肽合成的相關文獻，以致有了後來的研究想法：採用不同方式的硫醚鍵環狀胜肽合成法來嘗試合成胜肽。之後利用固相的方式來合  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys})\text{-NH}_2$  發現一樣無法得到環狀產物，所以才會合成  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys})\text{-NH}_2$  來作為對照組，並利用不同的合成方式來探討合成產率以及效率。

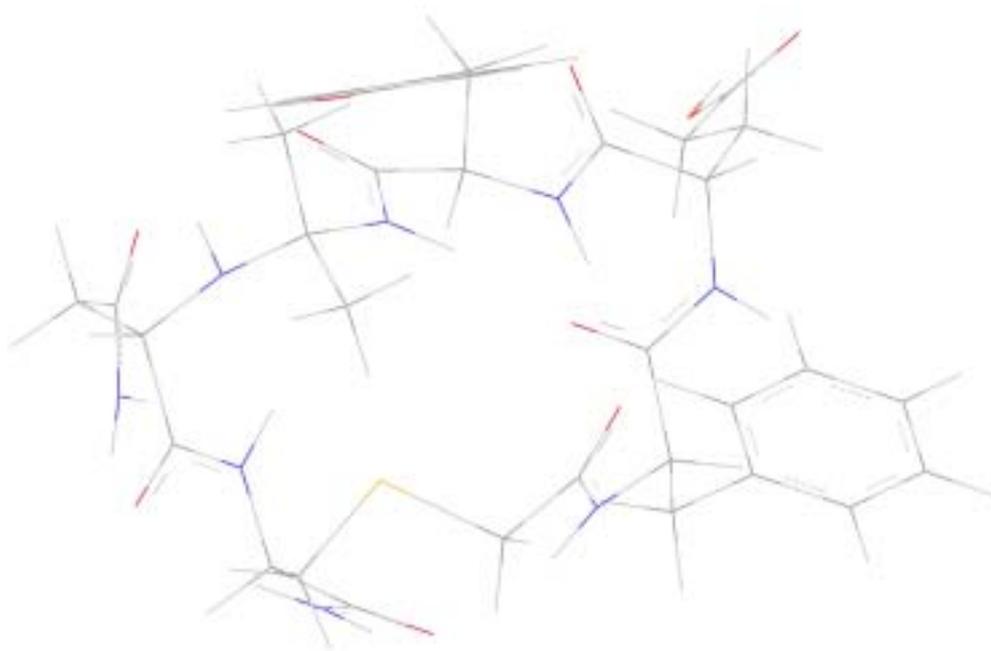


圖 30. 環狀胜肽  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Phe-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys})\text{-NH}_2$  的分子模擬圖。  
M.W.= 798.76, HF= -2950.0099197 hartree, 1 hartree= $4.359 \times 10^{-18}$  joules

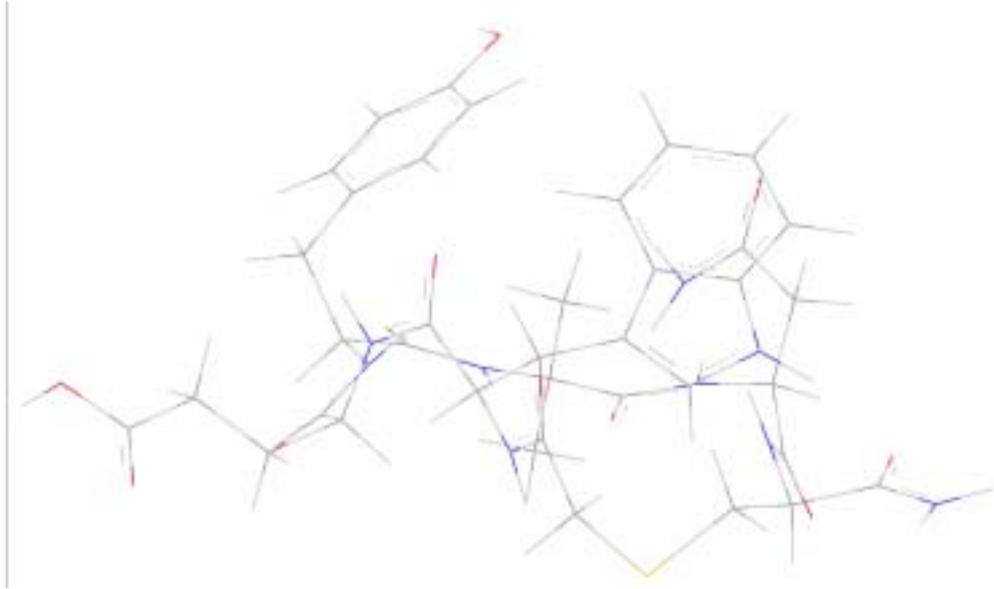


圖 31. 環狀胜肽  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Trp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys})\text{-NH}_2$  的分子模擬圖。  
M.W.= 837.8, HF= -3194.9062314 hartree

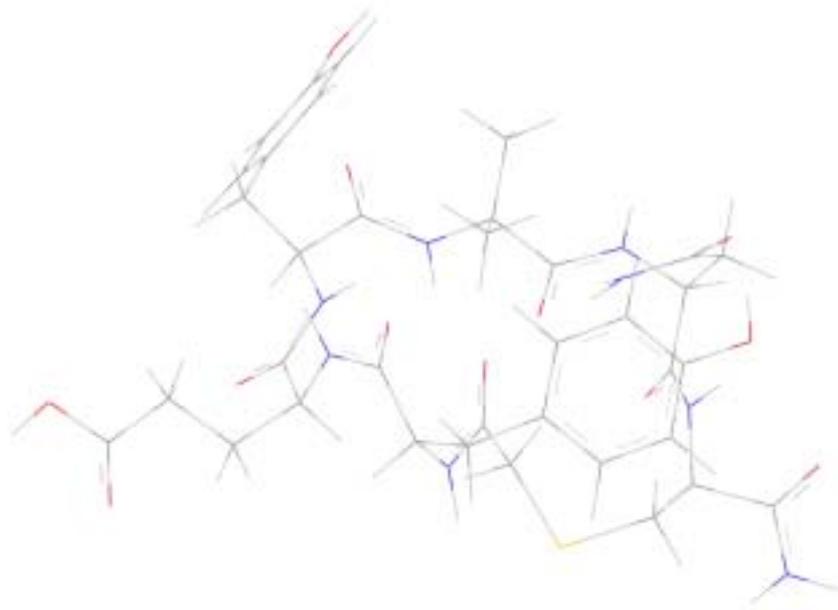


圖 32. 環狀胜肽  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Tyr-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys})\text{-NH}_2$  的分子模擬圖。  
M.W.= 814.76, HF= -3138.5592183 hartree

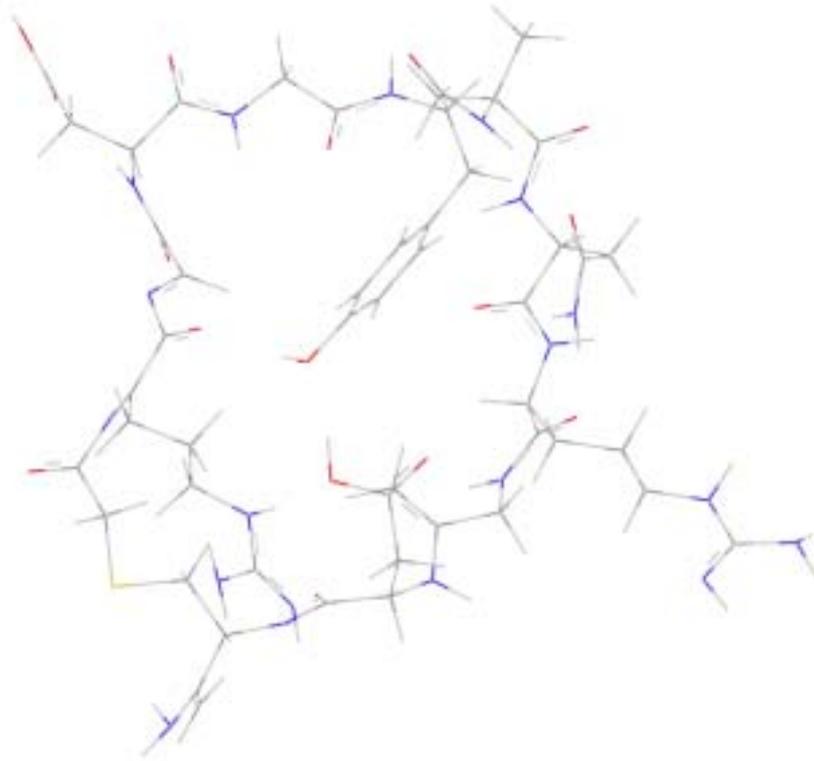


圖 33. 環狀胜肽  $\text{cyclo}(\text{CH}_2\text{CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys})\text{-NH}_2$  的分子模擬圖。M.W.= 1308.06, HF= -4591.4143527 hartree

## 第二節 環狀胜肽thioether-bridged(CH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH<sub>2</sub>的合成及鑑定

### 一、 Solution-phase cyclization

氯乙醯化後經過裂解試劑切除樹脂的胜肽 ClCH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH<sub>2</sub> 粗產物其 HPLC 純化情形如(圖 34)，滯留時間 (Rt)為 10.24 分鐘，分子量經 MALDI-TOF MS 所鑑定的值為  $m/z$  1344.339 (M+H)<sup>+</sup>，鑑定的結果(圖 36)，確定氯乙醯化成功後，進行接下來的環化反應。

環化後經 RP-HPLC 純化的分析圖如(圖 35)，滯留時間 (Rt)為 8.88 分鐘，而經 MALDI-TOF MS 所鑑定的值為  $m/z$  1308.362 (M+H)<sup>+</sup>，鑑定的結果如(圖 37)。

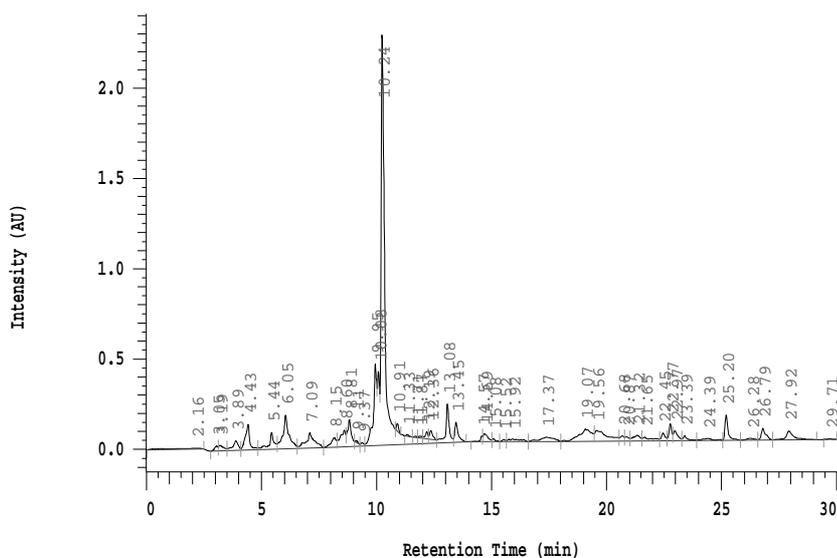


圖 34. ClCH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH<sub>2</sub> 氯乙醯化胜肽粗產物後經 RP-HPLC 純化的分析圖。滯留時間 (Rt)為 10.24 分鐘。

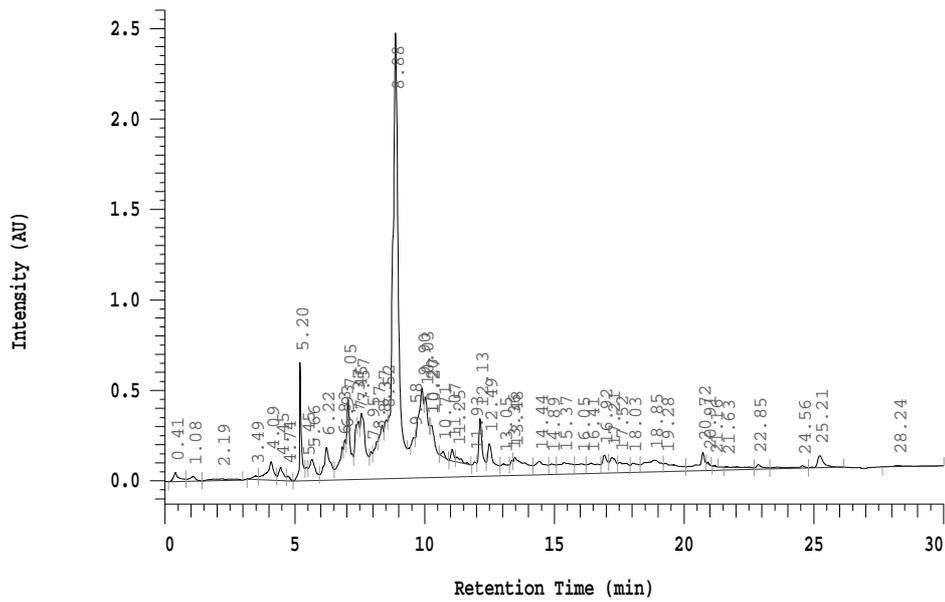


圖 35. ClCH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH<sub>2</sub> 氯乙醯化胜肽環化後經 RP-HPLC 純化的分析圖。滯留時間 (Rt) 為 8.88 分鐘。

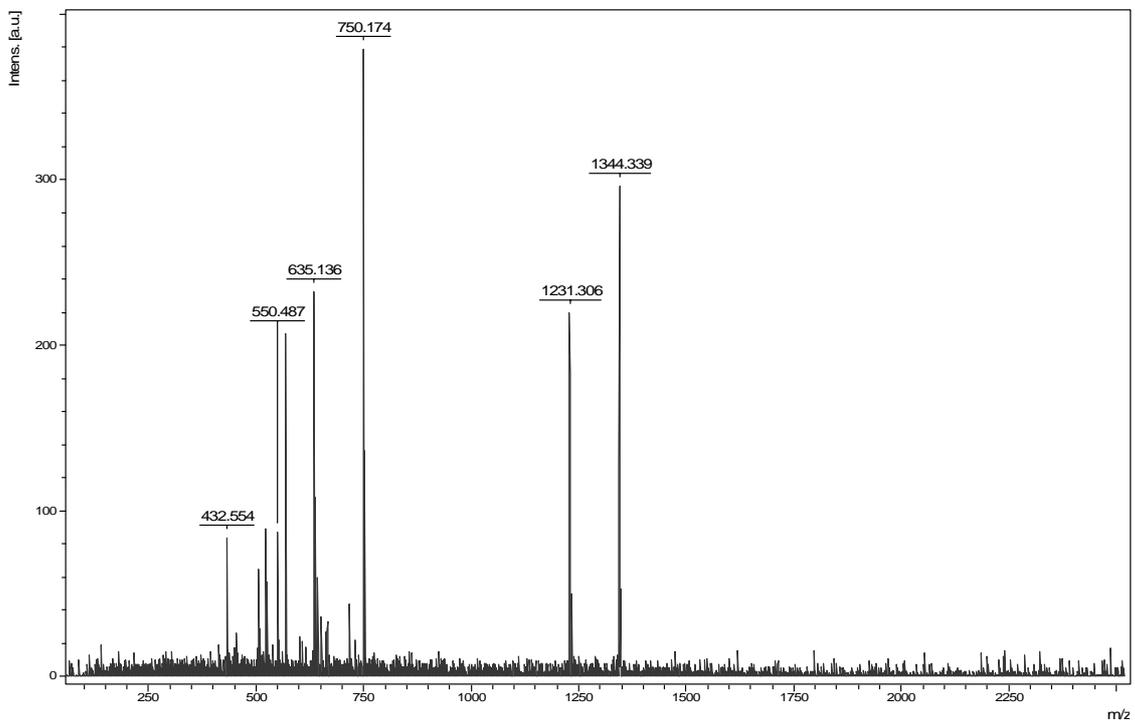


圖 36. ClCH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH<sub>2</sub> 胜肽粗產物經 MALDI-TOF MS 鑑定的結果。而經 MALDI-TOF MS 所鑑定的值為  $m/z$  1344.339 (M+H)<sup>+</sup>。

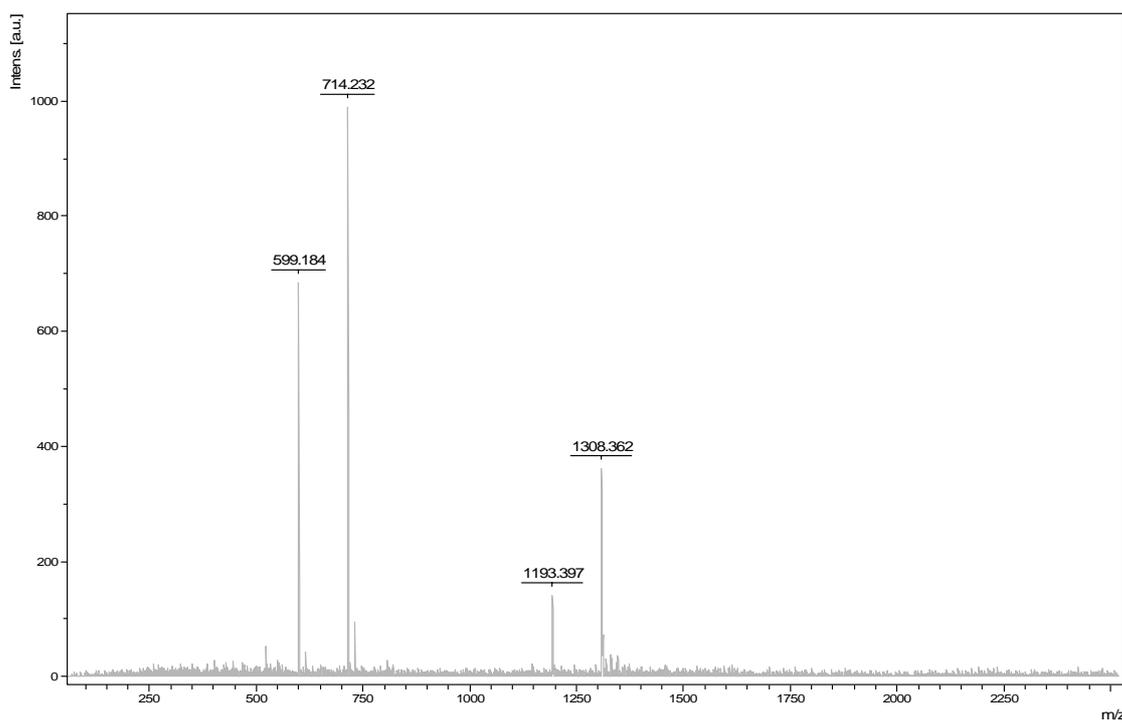


圖 37. ClCH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys-NH<sub>2</sub> 氯乙醯化胜肽粗  
產物環化後經 MALDI-TOF MS 鑑定的結果。MALDI-TOF MS 所鑑定的值為  $m/z$   
1308.362 (M+H)<sup>+</sup>。

## 二、 On-resin cyclization

將依附在樹脂上的胜肽 H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Glu(tBu)-Tyr(tBu)-Aib-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Cys(Mmt)-resin 氯乙醯化後，利用 1% TFA/DCM 將 Cys(Mmt)上的對酸非常靈敏的保護基 Mmt 去除之後進行環化反應，完成後將其從樹脂上切除，(圖 38)即為 thioether-bridged cyclo-(CH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH<sub>2</sub> 之 RP-HPLC 層析圖，滯留時間 (Rt)為 9.89.分鐘。

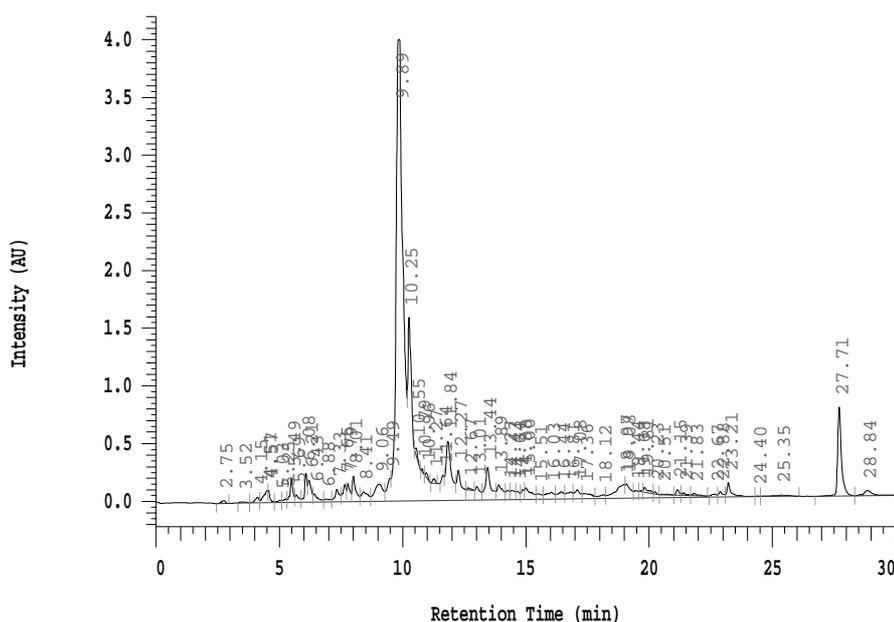


圖 38. On-resin cyclization 方式所合成的環狀胜肽 thioether-bridged(CH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH<sub>2</sub> 之 RP-HPLC 層析圖。滯留時間 (Rt) 為 9.89.分鐘。

其經 RP-HPLC 純化後，經 MALDI-TOF MS 所鑑定的結果如下圖，  
(圖 39)。鑑定值為  $m/z$  1308.648 (M+H)<sup>+</sup>。

。

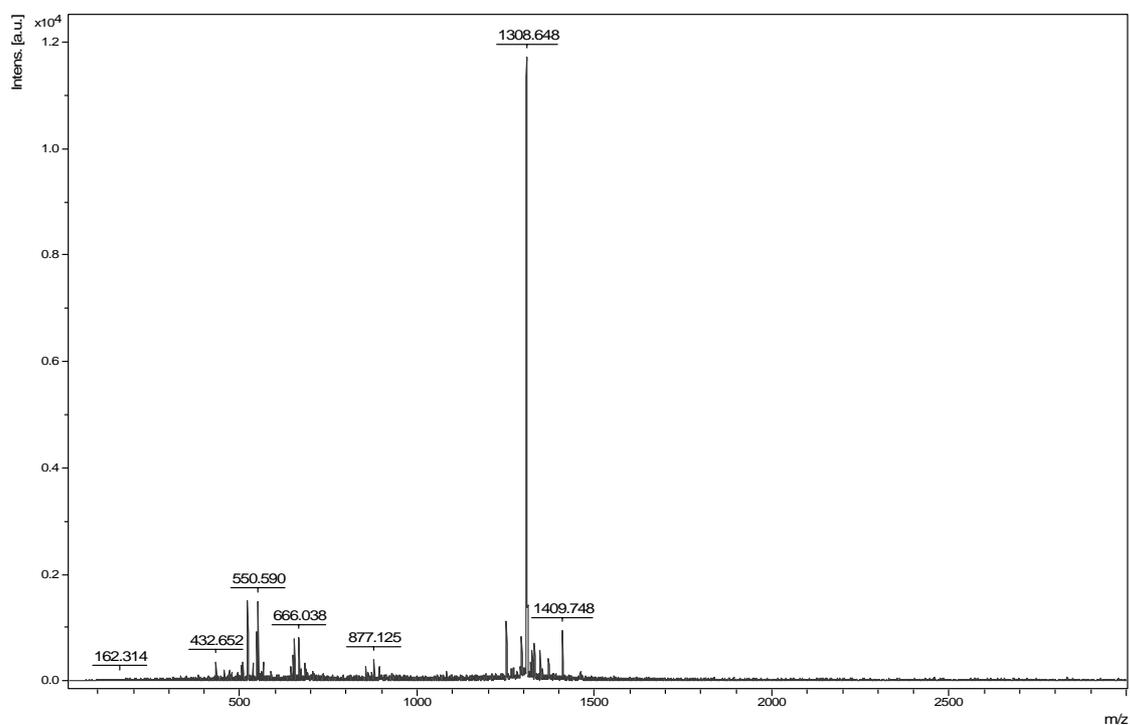


圖 39. On resin cyclization 方式所合成的環狀胜肽 thioether bridged(CH<sub>2</sub>CO-Arg-Gly-Asp-Glu-Tyr-Aib-Asn-Arg-Gly-Asp-Cys)-NH<sub>2</sub> 之 MALDI-TOF MS 鑑定圖。  $m/z$  1308.648 (M+H)<sup>+</sup>。



### 第三節 不同的環狀胜肽合成方法之產率比較分析

#### 一、 Solution-phase cyclization

環狀胜肽經 RP-HPLC 完全純化完成後，連同空試管共秤得 10304.8 mg 扣掉空試管重量 10282.3 mg 後實得環狀胜肽 22.5 mg。除以分子量 1308.21 後為 0.017 mmole，樹脂的取量為 0.125 mmole 因此產率為 13.76 %。

#### 二、 On-resin cyclization

環狀胜肽經 RP-HPLC 完全純化完成後，連同空試管共秤得 10393.8 mg 扣掉空試管重量 10365.6 mg 後實得環狀胜肽 28.2 mg。除以分子量 1308.21 後為 0.022 mmole，樹脂的取量為 0.125 mmole 因此產率為 17.25 %。

兩種方法最後獲得的產率差異不大，也許是序列的關係使得副反應的影響因素降低，因此最終產率影響不大。大致上兩者平均每個胜肽的合成效率都有 85% 上下(表三)，不過固相方式的環狀胜肽粗產物的純度由 HPLC 圖譜來看比液相方式來的高(圖 35)、(圖 38)，對於要開發超過 20 個序列的環狀胜肽而言，影響最終產率將會更為明顯。因此提高每個序列的合成效率以及提升環狀胜肽粗產物的純度，將會是開發更長序列環狀胜肽的關鍵。

表 3. 假設平均每個胺基酸合成效率與胺基酸序列長度及最終產率的關係

平均合成效率 efficiency (%)	最終產率 (%)				
	11-mer	20-mer	30-mer	40-mer	50-mer
98	80.1	66.8	54.5	44.6	36.4
95	56.9	35.8	21.5	12.9	7.7
85	16.7	3.9	0.8	0.2	0
80	8.6	1.2	0.1	0	0

## 第五章 結論

綜合結果，無論是固相方式或是液相方式的硫醚鍵形式環狀胜肽合成方法，所合成的最終產率都有一定水準，結果也都大致相同。研究結果顯示出固相方式的方法不僅可以有效率的合成出硫醚鍵環狀胜肽，平均每個序列的合成效率有 85% 以上；且環化的過程較為簡便，亦不需花多餘的時間來濃縮粗產物，粗產物的純度亦比液相方式來的高(圖 32)、(圖 35)。本實驗建立之方法，對於現階段環狀胜肽尚沒有自動合成儀可以做自動化合成的現況，提供了實驗室環狀胜肽合成有利的參考條件，以及可作為日後便利開發環狀胜肽藥物的方法。

## 參考資料與文獻

- [1] J.L. Boerner, A.J. Danielsen, C.A. Lovejoy, Z. Wang, S.C. Juneja, J.M. Faupel-Badger, J.R. Darce, N.J. Maihle, Grb2 regulation of the actin-based cytoskeleton is required for ligand-independent EGF receptor-mediated oncogenesis, *Oncogene* 22 (2003) 6679-6689.
- [2] T.K. Sawyer, Src homology-2 domains: structure, mechanisms, and drug discovery, *Biopolymers* 47 (1998) 243-261.
- [3] B. Gay, P. Furet, C. Garcia-Echeverria, J. Rahuel, P. Chene, H. Fretz, J. Schoepfer, G. Caravatti, Dual specificity of Src homology 2 domains for phosphotyrosine peptide ligands, *Biochemistry* 36 (1997) 5712-5718.
- [4] J. Rahuel, B. Gay, D. Erdmann, A. Strauss, C. Garcia-Echeverria, P. Furet, G. Caravatti, H. Fretz, J. Schoepfer, M.G. Grutter, Structural basis for specificity of Grb2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode, *Nat Struct Biol* 3 (1996) 586-589.
- [5] F.D. Lung, J.Y. Tsai, S.Y. Wei, J.W. Cheng, C. Chen, P. Li, P.P. Roller, Novel peptide inhibitors for Grb2 SH2 domain and their detection by surface plasmon resonance, *J Pept Res* 60 (2002) 143-149.
- [6] F.D. Lung, C.W. Chang, M.C. Chong, C.C. Liou, P. Li, M.L. Peach, M.C. Nicklaus, B.S. Lou, P.P. Roller, Small nonphosphorylated Grb2-SH2 domain antagonists evaluated by surface plasmon resonance technology, *Biopolymers* 80 (2005) 628-635.
- [7] 李婉菁, 中國醫藥大學營養研究所碩士論文 (2005).
- [8] F.D. Lung, J.Y. Tsai, Grb2 SH2 domain-binding peptide analogs as potential anticancer agents, *Biopolymers* 71 (2003) 132-140.
- [9] Y. Zhang, S. Zhou, A.S. Wavreille, J. DeWille, D. Pei, Cyclic peptidyl inhibitors of Grb2 and tensin SH2 domains identified from combinatorial libraries, *J Comb Chem* 10 (2008) 247-255.
- [10] S.A. Kates, S.B. Daniels, F. Albericio, Automated allyl cleavage for continuous-flow synthesis of cyclic and branched peptides, *Anal Biochem* 212

(1993) 303-310.

[11] W.J. Choi, Z.D. Shi, K.M. Worthy, L. Bindu, R.G. Karki, M.C. Nicklaus, R.J. Fisher, T.R. Burke, Jr., Application of azide-alkyne cycloaddition 'click chemistry' for the synthesis of Grb2 SH2 domain-binding macrocycles, *Bioorg Med Chem Lett* 16 (2006) 5265-5269.

[12] S. Jiang, P. Li, M.L. Peach, L. Bindu, K.W. Worthy, R.J. Fisher, T.R. Burke, Jr., M. Nicklaus, P.P. Roller, Structure-based design of potent Grb2-SH2 domain antagonists not relying on phosphotyrosine mimics, *Biochem Biophys Res Commun* 349 (2006) 497-503.

[13] H.F. Juan, I.H. Wang, T.C. Huang, J.J. Li, S.T. Chen, H.C. Huang, Proteomics analysis of a novel compound: cyclic RGD in breast carcinoma cell line MCF-7, *Proteomics* 6 (2006) 2991-3000.

[14] R.M. Wenger, Synthesis of ciclosporin and analogues: structural and conformational requirements for immunosuppressive activity, *Prog Allergy* 38 (1986) 46-64.

[15] P. Sandhu, X. Xu, P.J. Bondiskey, S.K. Balani, M.L. Morris, Y.S. Tang, A.R. Miller, P.G. Pearson, Disposition of caspofungin, a novel antifungal agent, in mice, rats, rabbits, and monkeys, *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004) 1272-1280.

[16] P. Kirkpatrick, A. Raja, J. LaBonte, J. Lebbos, Daptomycin, *Nat Rev Drug Discov* 2 (2003) 943-944.

[17] 周成功, 科學月刊 0204 期 (1986).

[18] Y. Xie, A.M. Pendergast, M.C. Hung, Dominant-negative mutants of Grb2 induced reversal of the transformed phenotypes caused by the point mutation-activated rat HER-2/Neu, *J Biol Chem* 270 (1995) 30717-30724.

[19] A.M. Tari, M.C. Hung, K. Li, G. Lopez-Berestein, Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells, *Oncogene* 18 (1999) 1325-1332.

[20] W.A. Lim, The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains, *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002) 61-68.

- [21] D. Dankort, B. Maslikowski, N. Warner, N. Kanno, H. Kim, Z. Wang, M.F. Moran, R.G. Oshima, R.D. Cardiff, W.J. Muller, Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer, *Molecular and cellular biology* 21 (2001) 1540-1551.
- [22] S.S. Yip, A.J. Crew, J.M. Gee, R. Hui, R.W. Blamey, J.F. Robertson, R.I. Nicholson, R.L. Sutherland, R.J. Daly, Up-regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human breast cancer and correlation with GRB2 expression, *Int J Cancer* 88 (2000) 363-368.
- [23] L. Sastry, T. Cao, C.R. King, Multiple Grb2-protein complexes in human cancer cells, *International journal of cancer* 70 (1997) 208-213.
- [24] Z. Songyang, S.E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X.R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, et al., Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav, *Mol Cell Biol* 14 (1994) 2777-2785.
- [25] B.J. Mayer, D. Baltimore, Signalling through SH2 and SH3 domains, *Trends Cell Biol* 3 (1993) 8-13.
- [26] S. Maignan, J.P. Guilloteau, N. Fromage, B. Arnoux, J. Becquart, A. Ducruix, Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor, *Science* 268 (1995) 291-293.
- [27] B. Schaffhausen, SH2 domain structure and function, *Biochim Biophys Acta* 1242 (1995) 61-75.
- [28] C. Garbay, W.Q. Liu, M. Vidal, B.P. Roques, Inhibitors of Ras signal transduction as antitumor agents, *Biochem Pharmacol* 60 (2000) 1165-1169.
- [29] G.A. Koretzky, The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation, *Immunol Today* 18 (1997) 401-406.
- [30] P. Chardin, D. Cussac, S. Maignan, A. Ducruix, The Grb2 adaptor, *FEBS letters* 369 (1995) 47-51.
- [31] J. Schlessinger, SH2/SH3 signaling proteins, *Current opinion in genetics & development* 4 (1994) 25-30.
- [32] R.B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis*. I. The Synthesis of a

Tetrapeptide, J Am Chem Soc 85 (1963) 2149-2154.

[33] [http://en.wikipedia.org/wiki/Peptide\\_synthesis](http://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_synthesis).

[34] <http://www.merckbiosciences.com/SharedImages/novabiochem/>.

[35] Z.J. Kaminski, B. Kolesinska, J. Kolesinska, G. Sabatino, M. Chelli, P. Rovero, M. Blaszczyk, M.L. Glowka, A.M. Papini, N-triazinylammonium tetrafluoroborates. A new generation of efficient coupling reagents useful for peptide synthesis, J Am Chem Soc 127 (2005) 16912-16920.

[36] <http://www.anaspec.com/resources/peptide.asp>.

[37] M. Friedman, Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences, J Agric Food Chem 52 (2004) 385-406.

附件

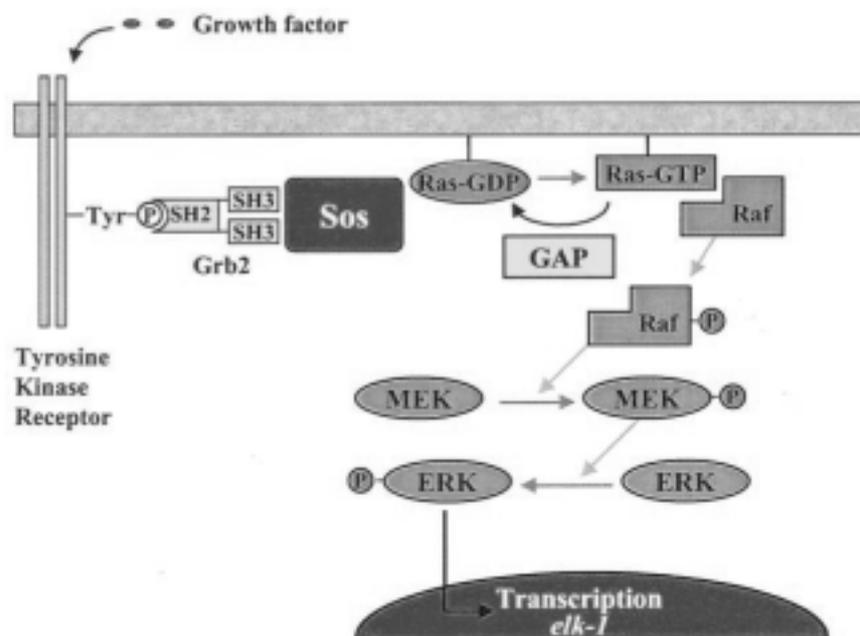


圖 1. 與 Grb2 SH2 蛋白相關的細胞訊息傳遞路徑。

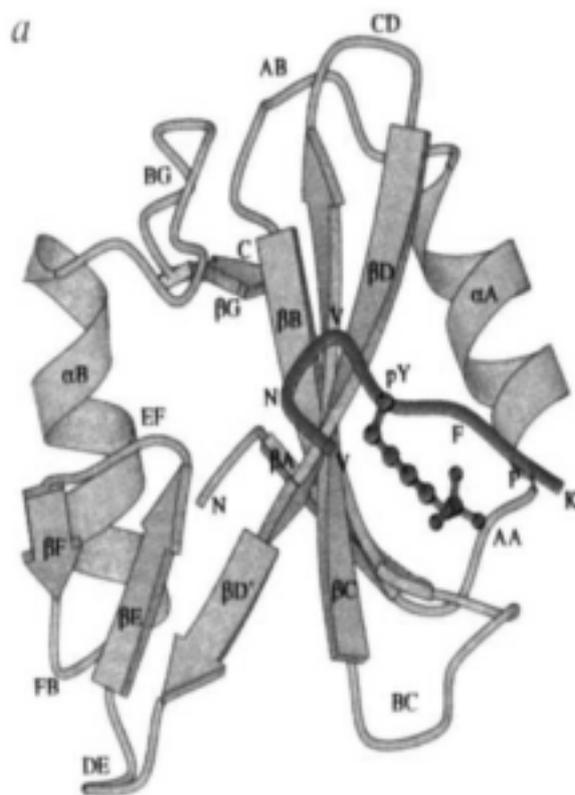


圖 2. BCR-abl 磷酸化胜肽與 Grb2 SH2 區塊結合的緞帶圖。

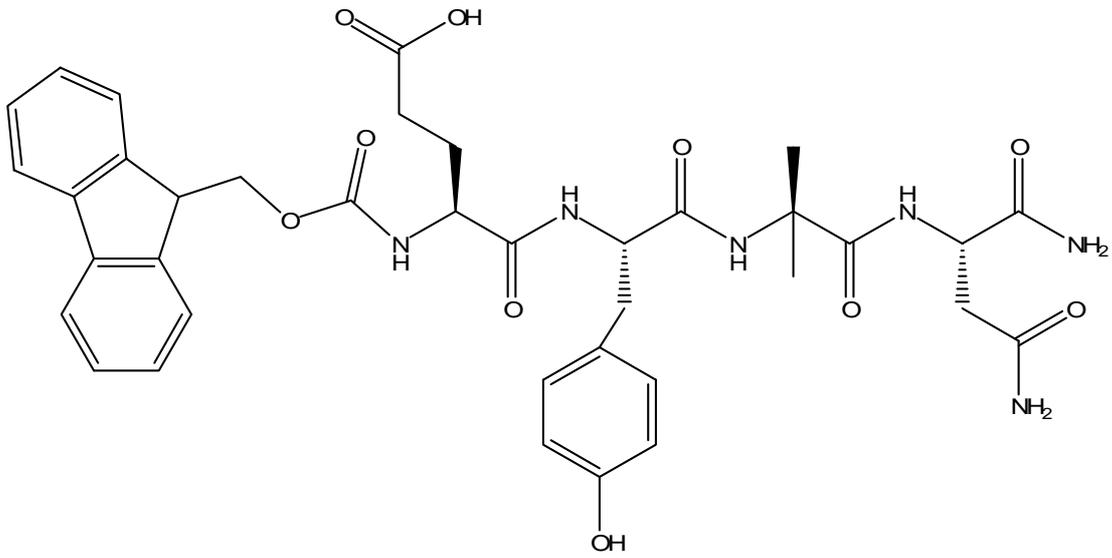


圖 3. 短胜肽 Fmoc-Glu-Tyr-Aib-Asn-NH<sub>2</sub> 的結構圖。

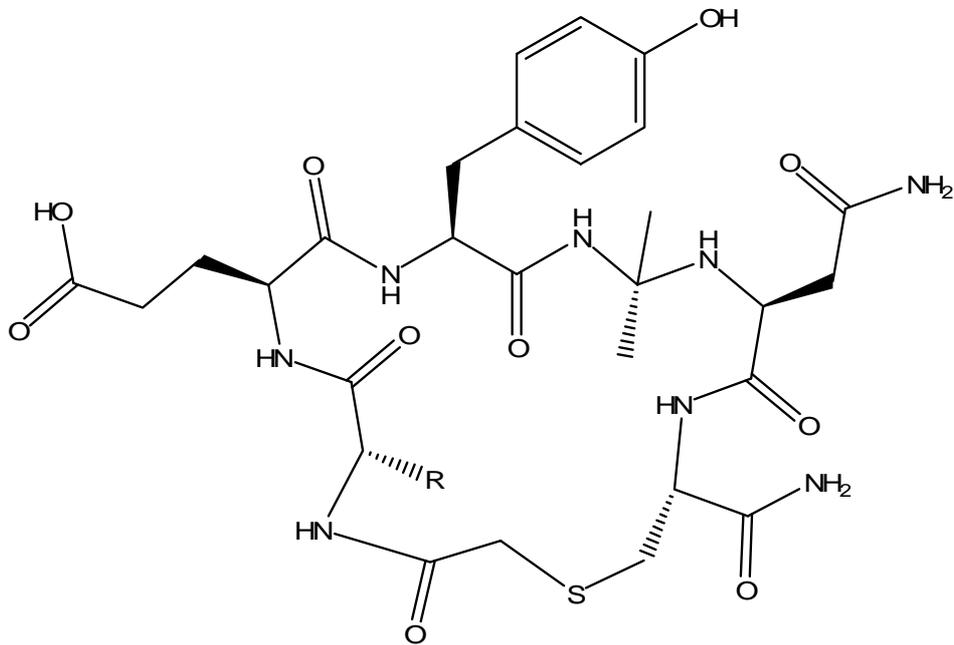


圖 4. 短序列的環狀胜肽，cyclo(CH<sub>2</sub>CO-X-Glu-Tyr-Aib-Asn-Cys)-amide 的結構圖。X 為 Phe、Trp、Tyr 三種胺基酸。

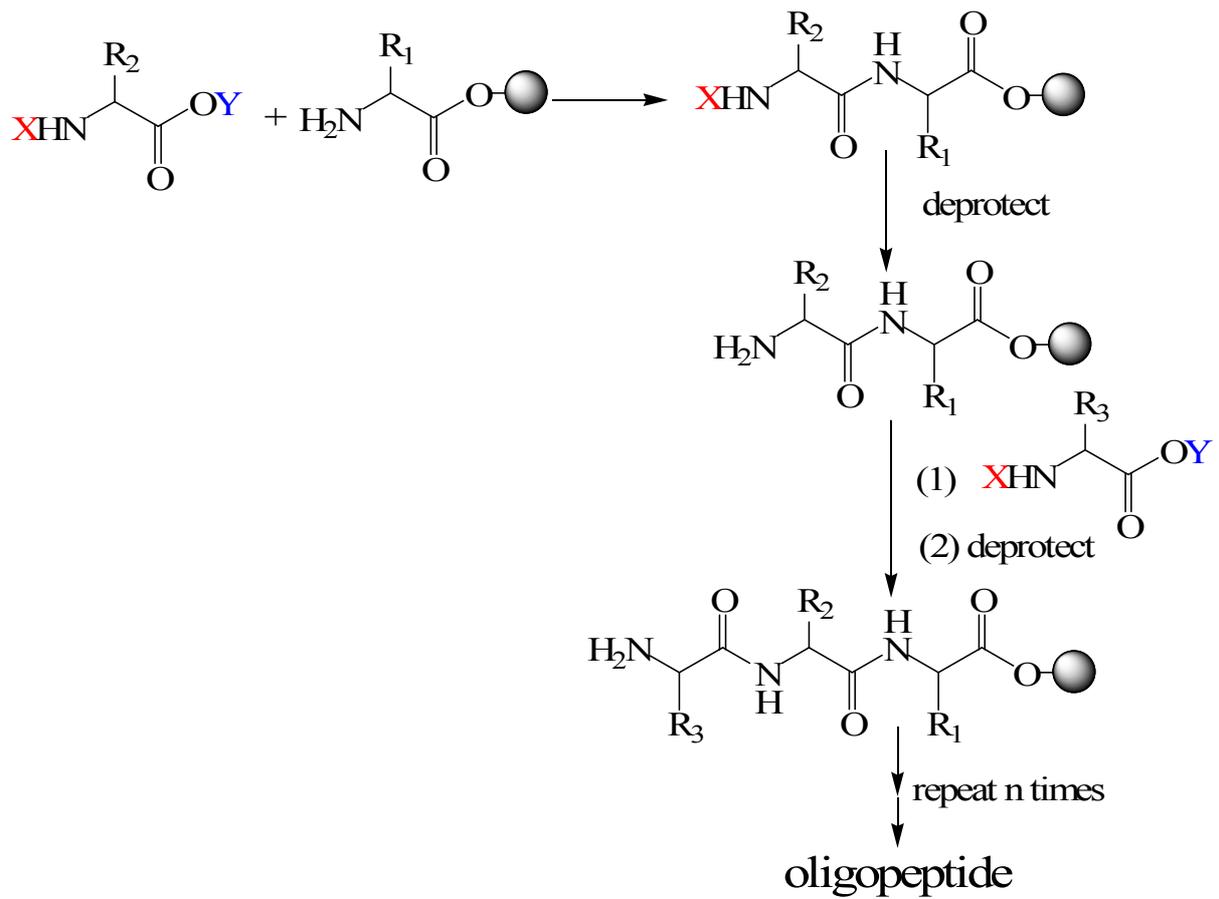
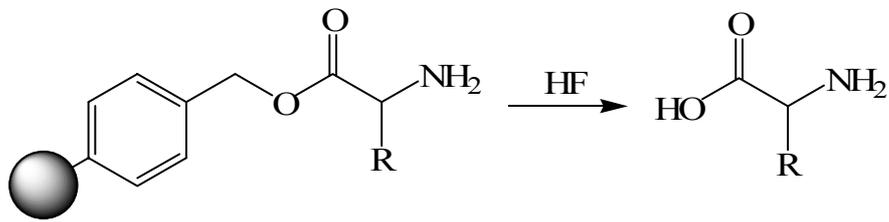
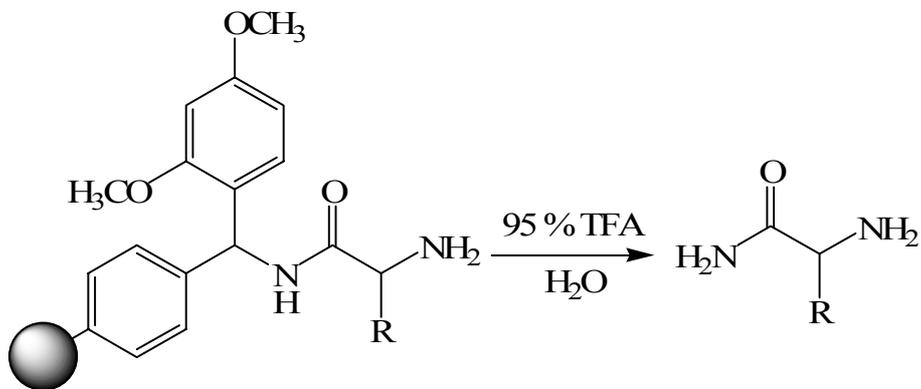


圖 5. 固相胜肽合成法之簡圖。X 和 Y 分別代表胺基酸的保護基 (Protecting group) 以及活化基 (Activating group)、R<sub>1</sub>……R<sub>n</sub> 代表在此多胜肽中由 C 端起到 N 端止，各個有一定順序的胺基酸殘基。

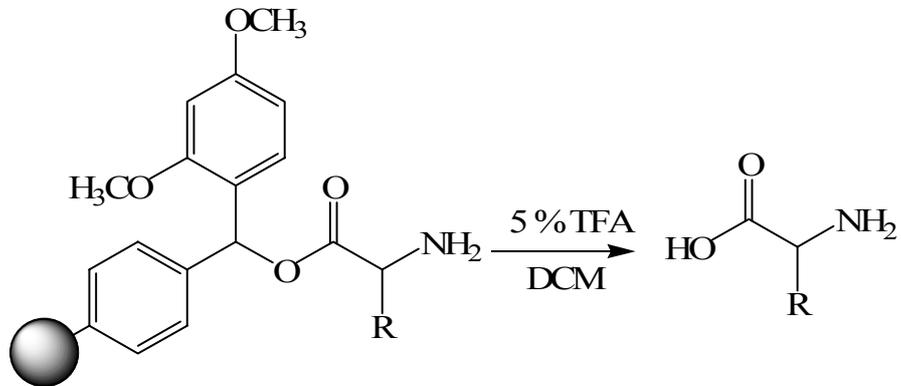
Linkers Cleaved by Strong Acid  
Merrifield Resin



Linkers Cleaved by Moderate Acid  
Rink Amide resin



Rink Acid resin



PAL resin

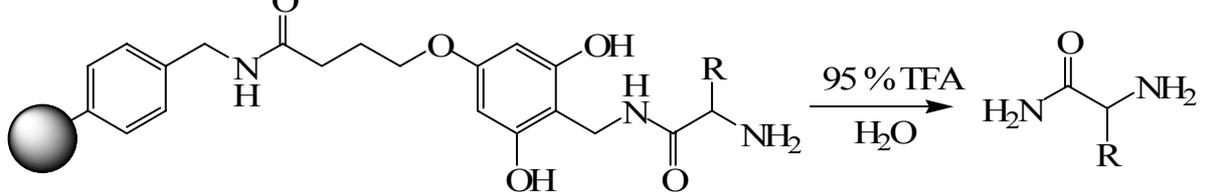


圖 6. 實驗上常見的樹脂結構以及其裂解條件。

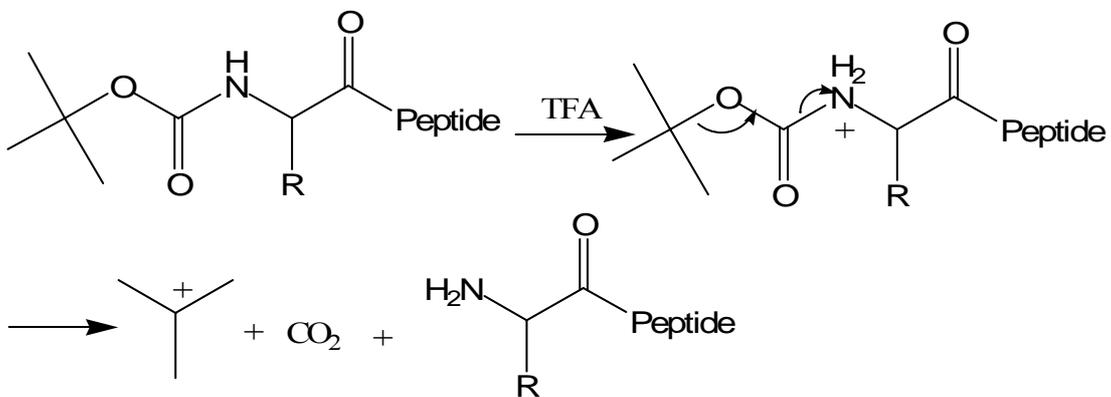


圖 7. TFA 去除 t-BOC 保護基的反應機構

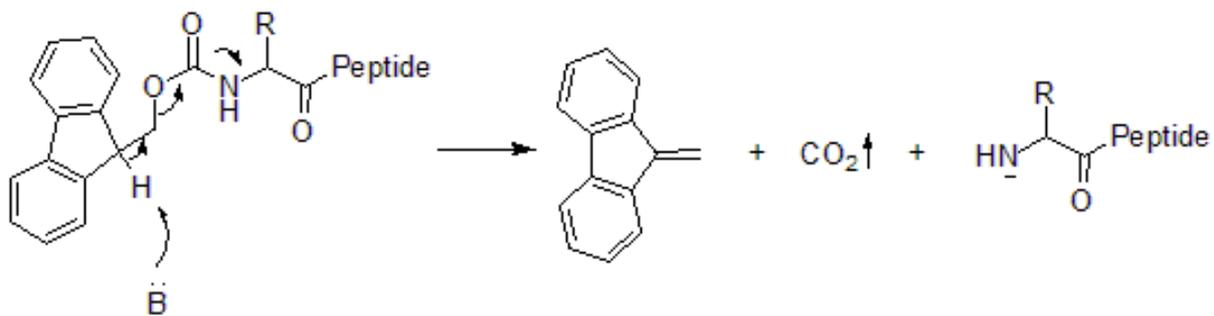


圖 8. piperidine 去除 Fmoc 保護基的反應機構

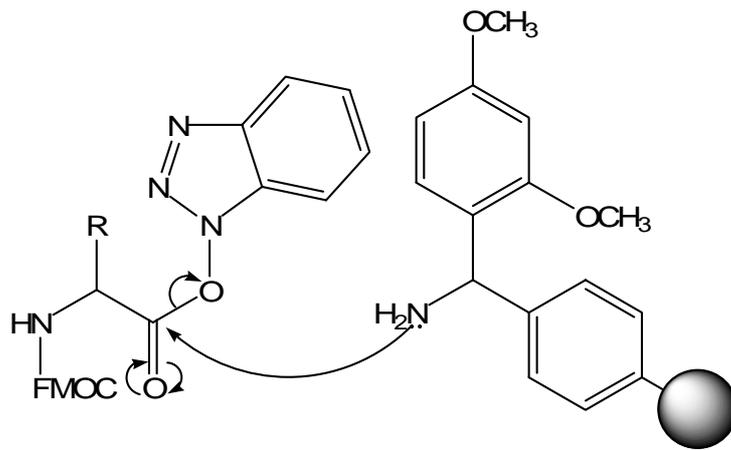


圖 9. 受 HOBt、HBTU、DIEA 活化後的胺基酸與 Rink Amide resin 結合的反應機構。

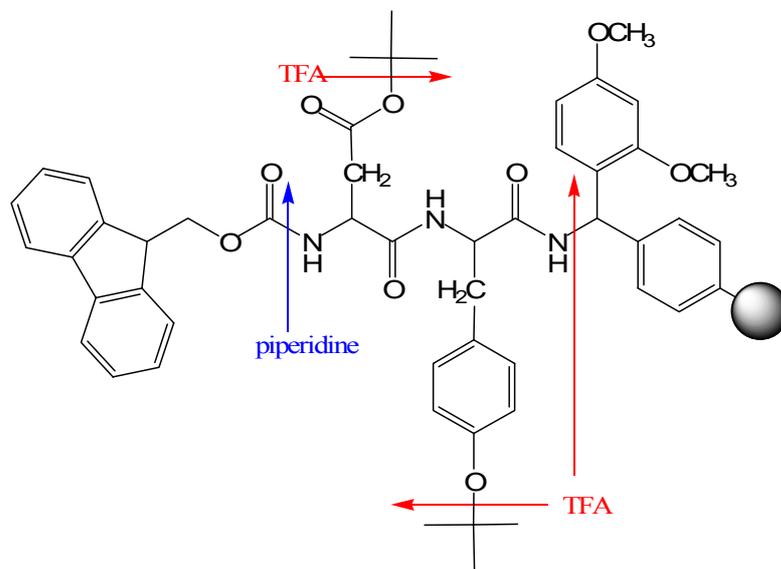


圖 10. 利用不同的試劑來移除 N 端 FMOC、side chain 上的保護基以及樹脂裂解的示意圖。

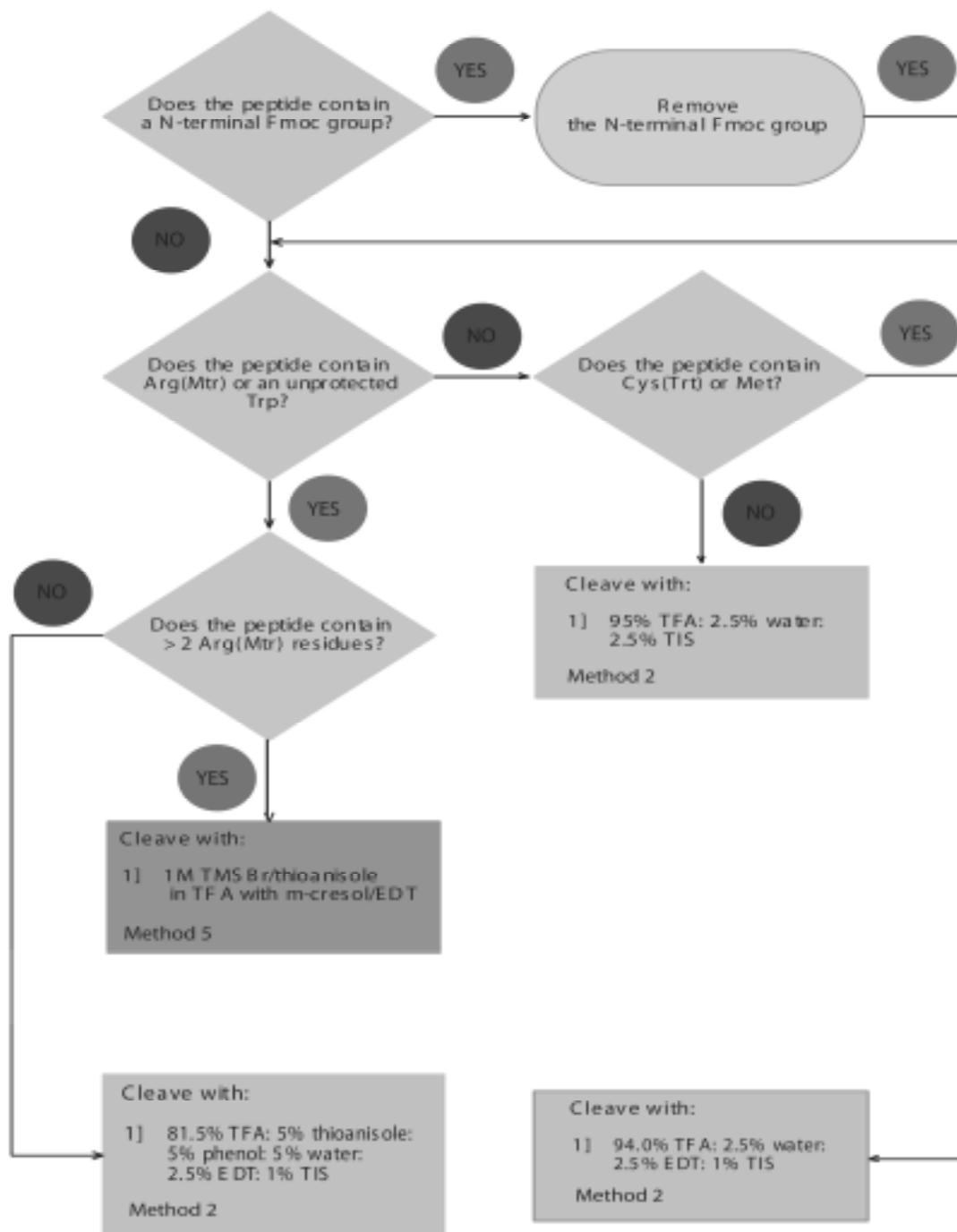


圖 11. Flow-chart for selecting cleavage cocktail for Fmoc SPPS.

## Method 2: General TFA cleavage

CAUTION: TFA is an extremely corrosive liquid; great care must be taken when using this reagent. Proper eye protection, lab coat, and gloves are mandatory. Follow local, state/provincial and federal safety regulations. Use in an efficient fume hood.

1. Place dry resin in a flask and add TFA solution containing appropriate scavengers (10 – 25 ml/g resin). Stopper the flask and leave to stand at rt with occasional swirling. Reaction time depends upon the sequence (see “Monitoring the cleavage reaction”, below).
2. Remove the resin by filtration under reduced pressure. Wash the resin twice with TFA. Combine filtrates, and add (drop-wise) an 8 - 10 fold volume of cold ether. Sometimes it is necessary to evaporate most of the TFA to achieve a good precipitation of the crude peptide. The ether can be cooled with ice to further assist precipitation.
3. Isolate the peptide as described in **Method 15**.

## Method 5: Cleavage with TMSBr

1. Add TMSBr (1.32 ml) to a solution of EDT (0.50 ml), m-cresol (0.1 ml) and thioanisole (1.17 ml) in TFA (7.5 ml) cooled to 0 °C. Add the peptide resin (200 mg) and allow the mixture to stand for 15 min under a blanket of N<sub>2</sub> at 0 °C.
2. Remove the resin by filtration under reduced pressure. Wash the resin twice with clean TFA. Combine filtrates, and add (drop-wise) an 8 - 10 fold volume of cold ether. Sometimes it is necessary to evaporate most of the TFA to achieve a good precipitation of the crude peptide. The ether can be cooled with ice to further assist precipitation.
3. Isolate the peptide as described in **Method 15**.

NOTE: Occasionally an additional treatment of the peptide with ammonium fluoride is required to reverse any silylation which may have occurred.

## **Method 15: Post-cleavage work-up**

Peptide isolation and work-up can be achieved by ether precipitation (1) or centrifugation (2). For water soluble peptides, the method in steps 3 - 6 can be used.

1. Precipitation: Filter the precipitated peptide through hardened filter paper in a Hirsch funnel under a light vacuum. Wash the precipitate further with cold ether, dissolve the peptide in a suitable aqueous buffer and lyophilize.
2. Centrifugation: Add a small volume of t-butyl methyl ether to the residue and triturate thoroughly until a free suspension is obtained. Transfer the suspension to a clean centrifuge tube, seal and centrifuge. It is essential that a spark-free centrifuge is used for this process. Carefully decant the ether from the tube. Repeat the ether wash as necessary. Dissolve the residual solid in a suitable aqueous buffer and lyophilize.
3. Water-soluble peptides: After precipitation, add water to the residue and transfer mixture to a separating funnel. A little AcOH may be necessary to aid dissolution.
4. Shake the stoppered funnel well. Release the stopper and allow the two layers to separate by standing. Isolate the lower (aqueous) layer.
5. Add more water to the funnel and repeat step 4 three times. Remove the upper (ethereal) layer and store in a clean flask. Return the combined aqueous extracts to the separating funnel.
6. Add a small amount of fresh diethyl ether and repeat step 4 two or three times, each time removing the ethereal layer and returning the aqueous layer to the separating funnel. Collect the aqueous layer in a clean flask and lyophilize.