

科技部補助專題研究計畫成果報告

(☐期中進度報告/☒期末報告)

(計畫名稱)

活體造影內生性葡萄糖醛酸酶活性以進行個人化前驅藥物之標靶治療

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：MOST 101-2320-B-041-001-MY2

執行期間：2012 年 08 月 01 日至 2014 年 07 月 31 日

執行機構及系所：嘉南藥理大學

計畫主持人：呂玉玲

共同主持人：鄭添祿

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

☐執行國際合作與移地研究心得報告

☐出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

☐非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

☒涉及專利或其他智慧財產權，☐一年☒二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：☒否 ☐是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 ☒否 ☐是，____（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 103 年 10 月 31 日

目 錄

一、計畫摘要

1a. 中文摘要 (一頁為限) -----	page	<u>II</u>
1b. 英文摘要 (一頁為限) -----	page	<u>III</u>

二、報告內容

2a. 研究目的 -----	page	<u>1</u>
2b. 文獻探討 -----	page	<u>1</u>
2c. 研究方法 -----	page	<u>3</u>
2d. 研究成果 -----	page	<u>3</u>
2e. 分析與討論 -----	page	<u>6</u>
2f. 學術期刊發表情形 -----	page	<u>7</u>
2g. 參考文獻 -----	page	<u>8</u>

三、附件

附件二、科技部補助專題研究計畫成果報告自評表 -----	page	<u>10</u>
附件三、可供推廣之研發成果資料表 -----	page	<u>11</u>
附件四、科技部補助專題研究計畫執行國際合作與移地研究心得報告-----	page	<u>13</u>
附件五、科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告 -----	page	<u>14</u>
附件六、科技部補助專題研究計畫國外學者來臺訪問成果報告 -----	page	<u>15</u>

一、計畫摘要

1a 中文摘要

β -葡萄糖酸苷酶(β -glucuronidase)以經被廣泛使用於活化前驅藥物之標靶治療。目前已經有許多葡萄糖酸苷前驅藥物被證實可用於腫瘤治療。若能夠於治療前評估前驅藥物之治療效果，將對 β -葡萄糖酸苷酶為主的個人化前驅藥物之標靶治療相當的重要。然而目前臨床沒有相關文獻指出，腫瘤的 β -葡萄糖酸苷酶高低與前驅藥物的治療效果具有關連性。而我們先前的成果顯示，遠紅光之葡萄糖醛酸造影劑(NIR-TrapG)可以經由 β -葡萄糖酸苷酶催化產生共價鍵結，相較於CT26(對照組)可累積在表現 β G的CT26/m β G 腫瘤。甚至可以追蹤深層肝臟移植的CT26/m β G 腫瘤。在以NIR-TrapG非侵犯性造影不同皮下腫瘤(Hela, CL1-5, HCC36, SW620, colon205)之內生性 β G活性時，結果顯示Hela, CL1-5, colon205有較高的 β G活性。此外我們在透過腺病毒攜帶 β G基因進行基因治療的結果中顯示，增加腫瘤區域之 β G活性可以增加CPT-11 與葡萄糖酸苷前驅藥物(SN38-G, 9ACG)之療效。基於上述的成果，我們預計以造影腫瘤內生性的 β G評估 β G為主的個人化前驅藥物之標靶治療。在此計畫中，活體外結果顯示人類大腸癌腫瘤細胞(Colon205與SW620)的人類 β G的表現以及對於9ACG前驅藥物的敏感性相當接近。但於活體內以NIR-TrapG與X-GlcA去評估Colon205與SW620腫瘤時，相較於SW620腫瘤，Colon205腫瘤具有較高的 β G的表現與活性。經由定量PCR放大人類與老鼠的 β G的表現，我們發現Colon205腫瘤具有較高的 β G活性，是因為表現於腫瘤微環境中的老鼠 β G所致。此現象也導致了9ACG前驅藥物對於Colon205腫瘤於活體具有較高的毒殺腫瘤效果。這些結果顯示了，NIR-TrapG可以造影評估Colon205腫瘤微環境中的 β G活性並進一步預測9ACG之療效。因此造影追蹤腫瘤內酵素之活性能提供治療前/後評估酵素活性藥物療效的參考，成為個人化葡萄糖酸苷前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。

關鍵字: β -葡萄糖酸苷酶，前驅藥物，遠紅光葡萄糖醛酸造影劑，非侵犯性造影，個人化醫療，標靶治療

1b 英文摘要

β -glucuronidase (β G) is an attractive prodrug-converting enzyme for selective chemotherapy therapy. Several glucuronide prodrugs have been synthesized for β G and shown to produce potent anti-tumor activity. The ability to access the therapeutic efficacy of glucuronide prodrugs would be ideal to personalize β G based enzyme prodrug therapy. However, clinical studies have not yet clarified the relationship between antitumor effect and β G activity in tumors. Our previous results demonstrate that the near infrared glucuronide probe (NIR-TrapG) can be activated by β G and accumulate in β G-expressing tumors (CT26/m β G) rather than control tumor. Furthermore, using NIR-TrapG to monitor the endogenous β G-activities in variant human tumors (Hela, CL1-5, HCC36, SW620, colon205), the result indicate the Hela, CL1-5 and colon205 tumors are with high β G-activities. In addition, we also demonstrated that using adenovirus to increase expression of β G can enhance the antitumor activity of CPT-11 and glucuronide prodrugs (SN38G, 9ACG). Based on those results, we propose to image the endogenous β G activity for personalized glucuronide prodrug target therapy. In this project, the *in vitro* results of endogenous human β G level and the sensitivity to 9ACG are similar in the pair of human colon cancer cell models (Colon205 and SW620). However, using NIR-TrapG and X-GlcA staining to monitor the β G-activities in Colon205 and SW620 tumors, the Colon205 tumor shows higher β G-activities than SW620 tumor *in vivo*. We found the Colon205 related high β G-activities are the mouse β G in microenvironments rather than the human β G of Colon205 cells after enhancement of human and mouse β G by quantitative PCR. In addition, the mouse β G in Colon205 tumor's microenvironment are result in the highly antitumor efficacy of 9ACG prodrug *in vivo*. These results indicated that Colo205 xenografts in nude mice that express elevated microenvironment β G can be monitored by using NIR-TrapG and suppressed by 9ACG prodrug treatment. We concluded that monitoring endogenous enzyme activity for accessing the therapeutic efficacy of prodrugs will provide a valuable tool for personalized enzyme based prodrug target therapy.

Keywords: β -glucuronidase (β G), prodrug, near infrared glucuronide probe (NIR-TrapG), noninvasive imaging, personalized therapy, target therapy

二、報告內容：包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）等。

2a 研究目的

(a) Long-term objectives:

利用葡萄糖醛酸造影劑評估人類腫瘤內生性葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)之活性，作為個人化葡萄糖酸甘前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。

(b) Specific Aims:

β -葡萄糖酸甘酶(β -glucuronidase, β G)以經被廣泛使用於活化葡萄糖酸甘前驅藥物(glucuronide prodrugs)之標靶治療。而我們已經成功開發出遠紅光之葡萄糖酸甘造影劑(NIR-TrapG)並證實可於活體造影評估 β G 活性(NSC100-2320-B-041-002, JACS revision:ja-2011-09335z-R1)。由我們先前的成果顯示 NIR-TrapG 可以經由葡萄糖酸甘酶(β G)催化產生共價鍵結，相較於 CT26(對照組)可停留在表現 β G 的 CT26/m β G 腫瘤。遠紅光能解決深層組織的穿透性，適用來監測篩選 β G 表現較高的內臟腫瘤。在以 NIR-TrapG 非侵犯性造影皮下不同人類腫瘤(Hela, CL1-5, HCC36, SW620, colon205)的結果發現，不同腫瘤累積 NIR-TrapG 的量也不一樣，我們也在透過腺病毒攜帶 β G 基因進行基因治療的結果中顯示，增加腫瘤區域之 β G 活性可以增加 CPT-11 與葡萄糖酸甘前驅藥物(SN38-G, 9ACG)之療效。另外，Glu-trap-NIR 探針具有不會自身抑制活化酶的特性， β G 在不受抑制下，即可併用葡萄糖甘前驅藥物作酶標靶治療。[1]基於上述的成果，本計劃預期應用 NIR-TrapG 於非侵犯性造影評估不同人類腫瘤(大腸癌、肝癌、肺癌...)內生性 β G 活性，以抗癌藥物(CPT-11)與葡萄糖酸甘前驅藥物(SN38-G, 9ACG)進行治療，探討人類腫瘤若具較高內生性 β G 活性是否也具有較高的藥物敏感性，與治療效果。

2b 文獻探討

傳統化學療法之化療藥物具高毒性、低選擇性，長期使用又易產生副作用，因而限制了化療藥物的使用。針對腫瘤高度表現的酵素，設計酵素活化前驅藥物以作為腫瘤治療的策略(Enzyme prodrug therapy)以經被廣泛應用於臨床或臨床前研究。酵素活化前驅藥物的策略的優點在於 1.前驅藥物低生物毒性，2.前驅藥物僅在腫瘤處被酵素活化成毒性藥物，3.旁觀者效益(bystander effect)在腫瘤區營造高毒性的環境可全面性毒殺腫瘤細胞[2]，此策略可提高藥物專一性，抗癌效果，並降低化學療法所造成的副作用(Figure A)。

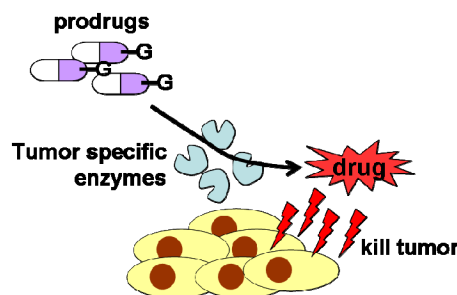


Figure A. 酵素活化前驅藥物以作為腫瘤治療的策略(enzyme prodrug therapy)。

葡萄糖酸甘酶(β -glucuronidase, β G)是可以被分泌的溶小體酵素(lysosomal enzyme)[3, 4]，也存在於許多腫瘤周圍組織，目前已廣泛使用作為腫瘤標記(tumor marker)[4-6]，應用於轉化葡萄糖酸甘前驅藥物成為毒性藥物[7, 8]。目前已有葡萄糖醛酸衍生之前驅藥物被合成，如 doxorubicin[9], etoposide,[10] camptothecin analogs[11, 12], paclitaxel[13] and alkylating agents[14, 15]。甚至臨床抗癌藥物 CPT-11 也已

經被報告主要是以葡萄糖醛酸甘化的代謝物 SN38G 的形式存在。而在酵素活化前驅藥物的研究中，利用腫瘤專一性抗體將 β G 送至腫瘤組織(Antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)[12, 16]、或以基因傳送的方式讓腫瘤組織表現 β G (Gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT)[17-19]，或直接治療高表現 β G 的腫瘤[3, 20]，都證實人工表現 β G 於腫瘤可以提高 CPT-11 或葡萄糖醛酸甘前驅藥物的治療效果。但目前並沒有直接證據指出腫瘤內生性的 β G 活性與抗癌藥物 CPT-11 或葡萄糖醛酸甘前驅藥物的治療效果有關。

在我們先前的成果中，我們已經成功開發以 difluoromethylphenol 連結葡萄糖醛酸與遠紅光探針(IR-820)之遠紅光之葡萄糖醛酸甘造影劑(NIR-TrapG)。NIR-Trap 並證實可於活體造影評估 β G 活性(NSC100-2320-B-041-002, *J Am Chem Soc.* 2012; 134(6):3103-3110.)。NIR-TrapG 可以經由葡萄糖醛酸酶(β G)催化產生共價鍵結，相較於 CT26(對照組)可累積在表現 β G 的 CT26/m β G 腫瘤。此外 NIR-TrapG 也可在深層組織(肝臟)造影表現 β G 的 CT26/m β G 腫瘤。由此顯示 NIR-TrapG 是一個可以於活體造影評估 β G 活性之遠紅外光造影劑。而在以 NIR-TrapG 非侵犯性造影皮下不同人類腫瘤(Hela, CL1-5, HCC36, SW620, colon205)的結果發現，不同腫瘤累積 NIR-TrapG 的量也不一樣。這樣的結果也顯示了不同腫瘤內生性所表現的 β G 活性有強弱之分。此外我們也藉腺病毒攜帶 β G 基因進行基因治療的結果中顯示，增加腫瘤區域之 β G 活性可以增加 CPT-11 與葡萄糖醛酸甘前驅藥物(SN38-G, 9ACG)之療效。[1]基於上述的成果，本計劃的策略是：非侵犯性造影檢測不同腫瘤內生性 β G 活性，以進行個人化前驅藥物之標靶治療。(Figure B)

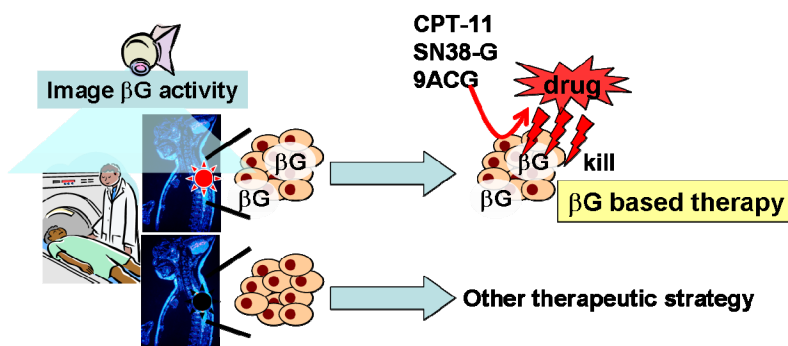


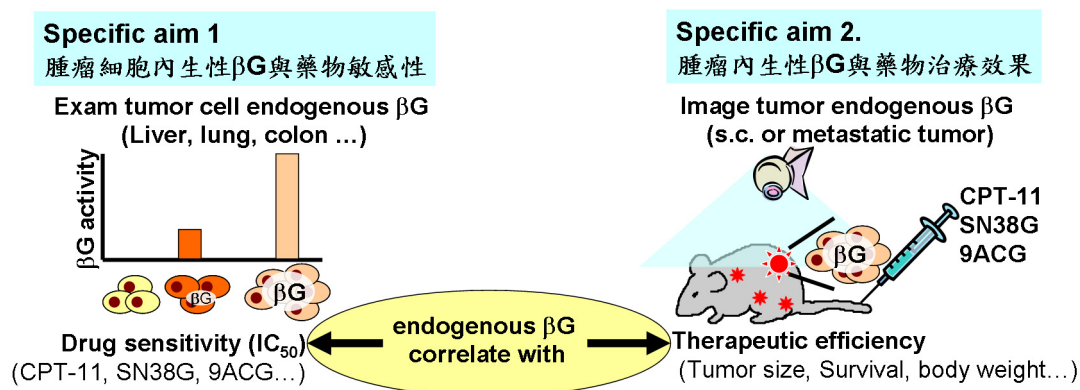
Figure B: 非侵犯性造影檢測不同腫瘤內生性 β G 活性，以進行個人化前驅藥物之標靶治療。以 β G 造影探針評估腫瘤內生性 β G 活性，並透過 CPT-11 與葡萄糖醛酸甘前驅藥物(SN38-G, 9ACG)之治療，建立個人化前驅藥物之標靶治療模式。

此計畫的成功將可以提供一個新的個人化治療策略，應用於以 CPT-11 與葡萄糖醛酸甘前驅藥物為基礎之腫瘤治療，並提供一種評估之平台於治療前/後評估藥物療效的方法。

2c 研究方法

由我們先前的成果證實遠紅光之葡萄糖酸苷造影劑(NIR-TrapG)可於活體造影βG 活性。若增加腫瘤區域之βG 活性即可以增加 CPT-11 與葡萄糖酸苷前驅藥物(SN38-G, 9ACG)之療效。基於上述的結果，我們的研究方法如下：

Flow chart



(1) 檢測人類腫瘤細胞內生性βG 活性與對藥物敏感性之相關性

以葡萄糖酸苷探針(4MUG)檢測人類腫瘤細胞內生性βG 活性，並檢測人類腫瘤細胞對於抗癌藥物(CPT-11)與葡萄糖酸苷前驅藥物(SN38-G, 9ACG)之敏感性(IC₅₀)，以線性回歸模式分析人類腫瘤較高內生性βG 活性是否具有較高的藥物敏感性。

(2) 於活體檢測人類腫瘤內生性βG 活性與藥物治療效果之相關性

以遠紅光之葡萄糖酸苷造影劑(NIR-TrapG)於活體造影人類腫瘤細胞內生性βG 活性，並以抗癌藥物(CPT-11)與葡萄糖酸苷前驅藥物(SN38-G, 9ACG)進行治療，並追蹤腫瘤大小及治療效果，以複回歸模式探討人類腫瘤若具較高內生性βG 活性是否也具有較高的藥物敏感性，與治療效果。

2d 研究結果

β-葡萄糖酸苷酶(β-glucuronidase)已經被廣泛使用於活化前驅藥物之標靶治療。目前已經有許多葡萄糖酸苷前驅藥物被證實可用於腫瘤治療。若能夠於治療前評估前驅藥物之治療效果，將對β-葡萄糖酸苷酶為主的個人化前驅藥物之標靶治療相當的重要。在此計畫中，為了監測人類大腸癌腫瘤細胞的人類βG的表現以及對於9ACG前驅藥物的敏感性。我們於活體外以Western blotting與anti-human βG抗體監測人類大腸癌腫瘤細胞(Colon205與SW620)的人類βG的表現。Figure 1結果顯示了人類βG的表現於人類大腸癌腫瘤細胞(Colon205與SW620)的表現沒有明顯的差異。於活體外將大腸癌腫瘤細胞(Colon205與SW620)處理9ACG前驅藥或以活化的9AC藥物後發現，Colon205與SW620對於9ACG前驅藥或以活化的9AC藥物敏感性並不明顯差異(Figure 2)。但於活體內以NIR-TrapG非侵犯性造影評估Colon205與SW620腫瘤內βG活性時相較於SW620腫瘤，Colon205腫瘤具有較高的βG的表現與活性(Figure 3)。為了確認NIR-TrapG非侵犯性造影的結果，我們將Colon205與SW620腫瘤切片以βG的前驅染劑(X-GlcA)染色。Figure 4顯示了相似的結果，Colon205腫瘤具有較高的βG的表現與活性。為確認腫瘤內βG的表現

與活性的來源，我們萃取Colon205與SW620中的total RNA並轉成cDNA，經由定量PCR放大人類與老鼠的 β G的表現。我們發現Colon205腫瘤具有較高的 β G活性，是因為表現於腫瘤微環境中的老鼠 β G所致 (Figure 5)，而在Colon205與SW620腫瘤細胞內生的人類 β G則沒有明顯差異。此現象也導致了9ACG前驅藥物對於Colon205腫瘤於活體具有較高的毒殺腫瘤效果 (Figure 6)。這些結果顯示了，NIR-TrapG可以造影評估Colo205腫瘤微環境中的 β G活性並進一步預測9ACG之療效。因此造影追蹤腫瘤內酵素之活性能提供治療前/後評估酵素活性藥物療效的參考，成為個人化葡萄糖酸甘前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。

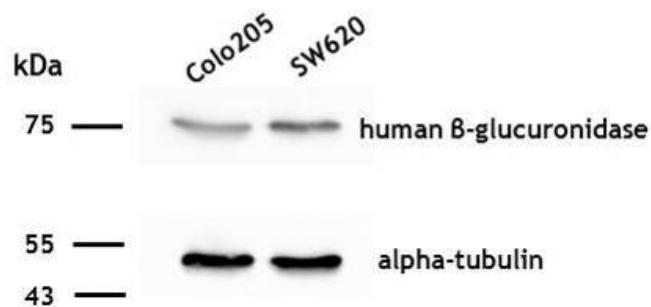


Figure 1. **Expression of endogenous β G in human colon cancer cells.** 1×10^4 Colon205 and SW620 cells were harvested and the endogenous β G expressions were detected by Western blotting and anti-human β G antibodies staining. Protein loading was visualized by anti- α -tubulin antibodies staining.

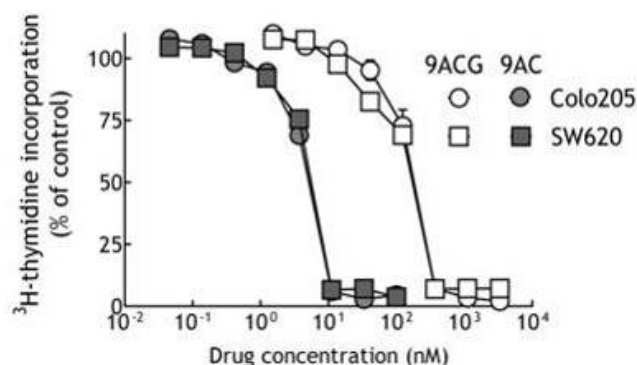


Figure 2. **Drug efficacy of 9ACG to Colon 205 and SW620 tumors.** 1×10^5 Colon205 and SW620 cells were incubated with serial diluted 9ACG or 9AC for 72 hours. The cell viability were determined by incorporation of 3 H-thymidine. The data show the percentages compared to un-treated control.

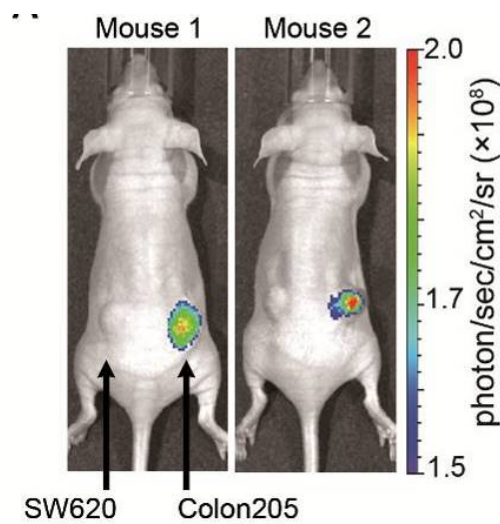


Figure 3. **Assessment of β G activity by NIR-TrapG *in vivo*.** NIR-TrapG was intravenously injected to BALB/c nude mice bearing Colon205 (right flank) and SW620 (left flank) tumors. *In vivo* optical imaging of NIR-TrapG at 48 hours after probe injection.

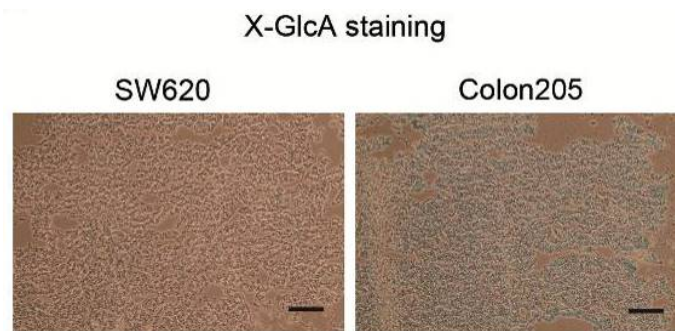


Figure 4. **Assessment of β G activity by X-GlcA staining.** To confirm β G activity, Colon205 and SW620 tumors were resected at 48 hours after NIR-TrapG injection, stained with X-GlcA and examined under bright field. Scale bar: 100 μ m.

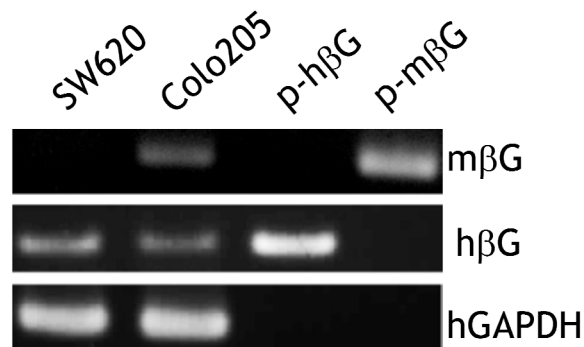


Figure 5. **Expression of endogenous mouse and human β G in Colo205 and SW620 tumor tissue.** Total RNA samples prepared from Colo205 and SW620 tumor tissue samples were used as templates for RT-PCR by using mouse β G (upper panel), human β G (middle panel) or human GAPDH (lower panel) gene-specific primers. The human GAPDH served as a loading control and the DNA plasmids containing mouse β G or

human β G genes (p-m β G and p-h β G) served as positive controls.

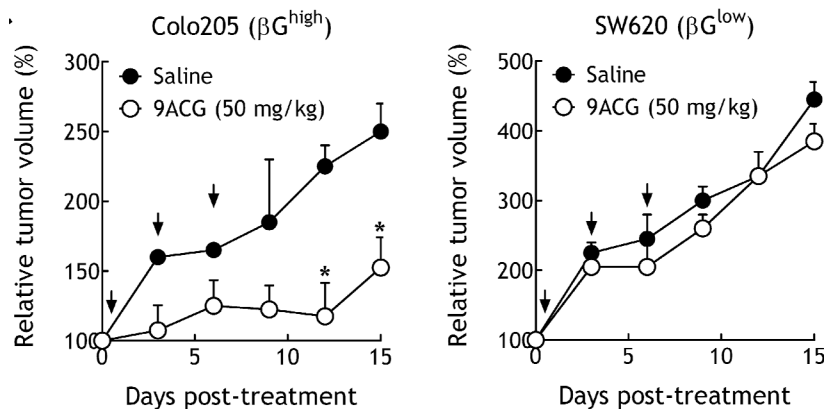


Figure 6. **Anti-tumor activity of 9ACG to Colon 205 and SW620 tumors.** BALB/c nude mice bearing 100 mm³ s.c. Colo205 (left panel) or SW620 (right panel) tumors were i.p. injected with PBS (●) or 50 mg/kg 9ACG (○) on days 1, 3 and 6. Bars, SEM (n = 4). Arrows, treatment schedule. Significant differences in mean tumor size in mice treated with 9ACG are indicated: *, p < 0.05.

2e 分析與討論

葡萄糖酸苷酶(β -glucuronidase, β G)是可以被分泌的溶小體酵素(lysosomal enzyme)[3, 4], 也存在於許多腫瘤周圍組織, 目前已廣泛使用作為腫瘤標記(tumor marker)[4-6], 應用於轉化葡萄糖酸苷前驅藥物成為毒性藥物[7, 8]。目前已有葡萄糖醛酸衍生物之前驅藥物被合成, 如 doxorubicin[9], etoposide,[10] camptothecin analogs[11, 12], paclitaxel[13] and alkylating agents[14, 15]。甚至臨床抗癌藥物 CPT-11 也已經被報告主要是以葡萄糖酸苷化的代謝物 SN38G 的形式存在。而在酵素活化前驅藥物的研究中, 利用 ADEPT[12, 16]、GDEPT[17-19], 或直接治療高表現 β G 的腫瘤[3, 20], 都證實人工表現 β G 於腫瘤可以提高 CPT-11 或葡萄糖酸苷前驅藥物的治療效果。因此人類腫瘤內生性 β G 之活性, 將可以作為個人化葡萄糖酸苷前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。我們利用先前開發之遠紅外光葡萄糖醛酸造影劑(NIR-TrapG)於活體造影評估 β G 活性。並發現相較於 SW620(β G^{Low}), Colon205(β G^{High})腫瘤的微環境中具有較高的 β G 的表現與活性, 並且葡萄糖醛酸前驅藥物(9ACG)對於 Colon205(β G^{High})腫瘤具有較好的療效。雖然活體外細胞結果顯示人類大腸癌腫瘤細胞(Colon205 與 SW620)的人類 β G 的表現以及對於 9ACG 前驅藥物的敏感性沒有明顯差異。但經由定量 PCR 放大人類與老鼠的 β G 的表現, 我們發現活體內 Colon205 腫瘤據要較高的 β G 活性, 是因為表現於腫瘤微環境中的老鼠 β G 所致。此現象也導致了 9ACG 前驅藥物對於 Colon205 腫瘤於活體具有較高的毒殺腫瘤效果。我們先前也發表 9ACG 前驅藥物的抗腫瘤效果與於腫瘤微環境中的因免疫細胞浸潤所表現 β G 的量呈現正相關(*Clin Cancer Res.* 2009; 15(14): 4600-4611)。這些結果顯示了, NIR-TrapG 可以造影評估 Colo205 腫瘤微環境中的 β G 活性並進一步預測 9ACG 之療效。因此造影追蹤腫瘤內酵素之活性能提供治療前/後評估酵素活性藥物療效的參考, 成為個人化葡萄糖酸苷前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。

2f 學術期刊發表情形

1. Ta-Chun Cheng[#], Kuo-Hsiang Chuang[#], Steve R. Roffler, Kai-Wen Cheng, **Yu-Lin Leu**, Chih-Hung Chuang, Chien-Chaio Huang, Chien-Han Kao, Yuan-Chin Hsieh, Long-Sen Chang, Tian-Lu Cheng^{*}, Chien-Shu Chen^{*} **Discovery of specific inhibitors for intestinal *E. Coli* β -glucuronidase through in silico virtual screening.** *The Scientific World Journal* (740815, Accepted)
2. Yu-Cheng Su[#], Ta-Chun Cheng[#], **Yu-Ling Leu**, Steve R Roffler, Jaw-Yuan Wang, Chih-Hung Chuang, Chien-Han Kao, Kai-Chuan Chen, Hsin-El Wang^{*} and Tian-Lu Cheng^{*} **PET Imaging of β -Glucuronidase Activity by an Activity-Based ^{124}I -Trapping Probe for the Personalized Glucuronide Prodrug Targeted Therapy.** *Molecular Cancer Therapeutics* (MS# MCT-14-0212R, Accepted)

Dear Dr. Cheng,

The review of the Research Article 740815 titled "Discovery of specific inhibitors for intestinal *E. coli*. β -glucuronidase through in silico virtual screening," by Ta-Chun Cheng, Kuo-Hsiang Chuang, Steven Roffler, Kai-Wen Cheng, Yu-Lin Yeu, Chih-Hung Chuang, Chien-Chaio Huang, Chien-Han Kao, Yuan-Chin Hsieh, Long Sheng Chang, Tian-Lu Cheng and Chien-Shu Chen submitted to The Scientific World Journal, has been completed, and I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The special issue for which the paper is being processed is
"Toxicology and Disease/Cancer Therapy in Reactive Oxygen Species-Mediated Drugs and Treatments"

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of the electronic files. Please login to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/740815/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file (Word or TeX/LaTeX).
- 2- Final PDF file of the accepted manuscript.
- 3- Editable Figure files (each figure in a separate eps/postscript/word file) if any, taking into consideration that tiff, jpg, jpeg, bmp formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to The Scientific World Journal.

Best regards,

Li-Yeh Chuang
chuang@isu.edu.tw

MS# MCT-14-0212R

PET Imaging of β -Glucuronidase Activity by an Activity-Based ^{124}I -Trapping Probe for the Personalized Glucuronide Prodrug Targeted Therapy

Dear Dr. Cheng,

We are pleased to inform you that your above-referenced manuscript is acceptable for publication in MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS.

Please note that you will receive electronic proofs within 2-3 weeks. If you expect your e-mail address to change within that time, please notify the MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS Editorial Office (mct@aacr.org). The e-mail you will receive will include detailed information about marking and returning your proofs. Please read, correct, and return proofs within 2 business days. NOTE THAT IF PROOFS ARE NOT RETURNED WITHIN THIS TIMEFRAME, PUBLICATION OF THE ARTICLE WILL BE DELAYED.

2g 參考文獻

1. Huang PT, Chen KC, Prijovich ZM, Cheng TL, Leu YL, Roffler SR: **Enhancement of CPT-11 antitumor activity by adenovirus-mediated expression of beta-glucuronidase in tumors.** *Cancer Gene Ther* 2011, **18**(6):381-389.
2. Albert A: **Chemical aspects of selective toxicity.** *Nature* 1958, **182**(4633):421-422.
3. Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson JP, Koch M, Monneret C: **Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy.** *Cancer Res* 1998, **58**(6):1195-1201.
4. Juan TY, Roffler SR, Hou HS, Huang SM, Chen KC, Leu YL, Prijovich ZM, Yu CP, Wu CC, Sun GH *et al*: **Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(14):4600-4611.
5. Sperker B, Werner U, Murdter TE, Tekkaya C, Fritz P, Wacke R, Adam U, Gerken M, Drewelow B, Kroemer HK: **Expression and function of beta-glucuronidase in pancreatic cancer: potential role in drug targeting.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000, **362**(2):110-115.
6. Murdter TE, Friedel G, Backman JT, McClellan M, Schick M, Gerken M, Bosslet K, Fritz P, Toomes H, Kroemer HK *et al*: **Dose optimization of a doxorubicin prodrug (HMR 1826) in isolated perfused human lungs: low tumor pH promotes prodrug activation by beta-glucuronidase.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **301**(1):223-228.
7. de Graaf M, Boven E, Scheeren HW, Haisma HJ, Pinedo HM: **Beta-glucuronidase-mediated drug release.** *Curr Pharm Des* 2002, **8**(15):1391-1403.
8. Chen X, Wu B, Wang PG: **Glucuronides in anti-cancer therapy.** *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003, **3**(2):139-150.
9. Haisma HJ, van Muijen M, Pinedo HM, Boven E: **Comparison of two anthracycline-based prodrugs for activation by a monoclonal antibody-beta-glucuronidase conjugate in the specific treatment of cancer.** *Cell Biophys* 1994, **24-25**:185-192.
10. Schmidt F, Monneret C: **Prodrug Mono Therapy: synthesis and biological evaluation of an etoposide glucuronide-prodrug.** *Bioorg Med Chem* 2003, **11**(10):2277-2283.
11. Leu YL, Roffler SR, Chern JW: **Design and synthesis of water-soluble glucuronide derivatives of camptothecin for cancer prodrug monotherapy and antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT).** *J Med Chem* 1999, **42**(18):3623-3628.
12. Angenault S, Thiot S, Schmidt F, Monneret C, Pfeiffer B, Renard P: **Cancer chemotherapy: a SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) glucuronide prodrug for treatment by a PMT (Prodrug MonoTherapy) strategy.** *Bioorg Med Chem Lett* 2003, **13**(5):947-950.
13. Bouvier E, Thiot S, Schmidt F, Monneret C: **First enzymatically activated Taxotere prodrugs designed for ADEPT and PMT.** *Bioorg Med Chem* 2004, **12**(5):969-977.
14. Wang SM, Chern JW, Yeh MY, Ng JC, Tung E, Roffler SR: **Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy.** *Cancer Res* 1992, **52**(16):4484-4491.
15. Lougerstay-Madec R, Florent JC, Monneret C, Nemati F, Poupon MF: **Synthesis of self-immolative glucuronide-based prodrugs of a phenol mustard.** *Anticancer Drug Des* 1998, **13**(8):995-1007.
16. Chen BM, Cheng TL, Tzou SC, Roffler SR: **Potentiation of antitumor immunity by**

- antibody-directed enzyme prodrug therapy.** *Int J Cancer* 2001, **94**(6):850-858.
17. Bosslet K, Czech J, Hoffmann D: **Tumor-selective prodrug activation by fusion protein-mediated catalysis.** *Cancer Res* 1994, **54**(8):2151-2159.
 18. Chen BM, Chan LY, Wang SM, Wu MF, Chern JW, Roffler SR: **Cure of malignant ascites and generation of protective immunity by monoclonal antibody-targeted activation of a glucuronide prodrug in rats.** *Int J Cancer* 1997, **73**(3):392-402.
 19. Cheng TL, Chen BM, Chern JW, Wu MF, Roffler SR: **Efficient clearance of poly(ethylene glycol)-modified immunoenzyme with anti-PEG monoclonal antibody for prodrug cancer therapy.** *Bioconjug Chem* 2000, **11**(2):258-266.
 20. Prijovich ZM, Chen BM, Leu YL, Chern JW, Roffler SR: **Anti-tumour activity and toxicity of the new prodrug 9-aminocamptothecin glucuronide (9ACG) in mice.** *Br J Cancer* 2002, **86**(10):1634-1638.

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☒已發表 ☐未發表之文稿 ☐撰寫中 ☐無

專利：☐已獲得 ☐申請中 ☒無

技轉：☒已技轉 ☐洽談中 ☐無

其他：（以 100 字為限）

1. 目前已被 The Scientific World Journal 接受發表論文一篇(740815); 投稿至 Molecular Cancer Therapeutics 接受發表論文一篇 (MCT-14-0212R)

2. 學術技轉至 University of Minnesota 一件

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

本計畫成功以遠紅光葡萄糖酸甘造影劑(NIR-TrapG)造影評估腫瘤微環境中的 β G 活性並進一步預測葡萄糖酸前驅藥物(9ACG)之療效。未來將可以開發以造影追蹤腫瘤內酵素之活性能提供治療前/後評估酵素活性藥物療效的參考，成為個人化葡萄糖酸甘前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。目前已被 The Scientific World Journal 接受發表論文一篇(740815); 投稿至 Molecular Cancer Therapeutics (MCT-14-0212R) 一篇。學術技轉至 University of Minnesota 一件，進行活體內評估基因轉殖小鼠 β G 活性相關性研究。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期：__年__月__日

科技部補助計畫	計畫名稱：活體造影內生性葡萄糖醛酸酶活性以進行個人化前驅藥物之標靶治療 計畫主持人：呂玉玲 計畫編號：101-2320-B-041-001-MY2 領域：藥學		
研發成果名稱	(中文) 活體造影內生性葡萄糖醛酸酶活性以進行個人化前驅藥物之標靶治療		
	(英文) In vivo imaging of endogenous β -glucuronidase activity for personalized glucuronide prodrug		
成果歸屬機構	嘉南藥理大學	發明人 (創作人)	呂玉玲 25%，鄭添祿 25%，羅傳倫 20%，鄭達駿 15%，蘇昱誠 15%
技術說明	(中文) 葡萄糖酸苷酶(β -glucuronidase, β G)目前已廣泛使用作為腫瘤標記(tumor marker)，應用於轉化葡萄糖酸苷前驅藥物成為毒性藥物。若能夠於治療前評估前驅藥物之治療效果，將對 β G 為主的個人化前驅藥物之標靶治療相當的重要。我們以 difluoromethylphenol-glucuronide moiety (TrapG) 結合螢光(FITC)，遠紅光(IR-820)以及同位素碘(^{124}I)形成螢光(FITC-TrapG)、遠紅光(NIR-TrapG)以及正子造影(^{124}I -TrapG)之葡萄糖酸苷造影劑。此 TrapG 造影劑可以專一的於活體內外累積在 β G 表現的腫瘤位置。TrapG 更可以造影評估腫瘤微環境中的 β G 活性並進一步預測葡萄糖酸苷前驅藥物之療效。造影追蹤腫瘤內酵素之活性能提供治療前/後評估酵素活性藥物療效的參考，成為個人化葡萄糖酸苷前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。		
	(英文) β -glucuronidase (β G) has been used as tumor marker and prodrug-converting enzyme for selective chemotherapy. The ability to monitor β G activity in patients would be ideal to access the efficacy of β G-mediated drug release and generate personalized prodrug therapy. We conjugated fluorescein (FITC), near infrared dye (IR-820) and radioactive isotope (^{124}I -tyramine) to a difluoromethylphenol-glucuronide moiety (TrapG) to form FITC-TrapG, NIR-TrapG and ^{124}I -TrapG, respectively, for noninvasively monitoring β G activity by optical and positron emission tomography (PET) imaging. TrapG can specifically trap on β G-expressing cell/tumor in vitro and in vivo. Moreover, TrapG probes can monitor the β G-activities in the microenvironment of tumors and assess the therapeutic efficacy of glucuronide prodrugs. Thus, monitoring endogenous enzyme activity for accessing the therapeutic efficacy of prodrugs will provide a valuable tool for personalized enzyme based prodrug target therapy.		

產業別	其他專業、科學及技術服務業 化學業 醫療器材製造業
技術/產品應用範圍	前驅藥物，標靶治療，個人化醫療，藥學，醫學
技術移轉可行性及預期效益	造影追蹤腫瘤內酵素之活性能提供治療前/後評估酵素活性藥物療效的參考，成為個人化葡萄糖酸苷前驅藥物之標靶治療及療效評估之指標。

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

科技部補助專題研究計畫執行國際合作與移地研究心得報告

日期：__年__月__日

計畫編號	MOST — — — — —		
計畫名稱			
出國人員 姓名		服務機構 及職稱	
出國時間	年 月 日至 年 月 日	出國地點	
出國研究 目的	☐ 實驗 ☐ 田野調查 ☐ 採集樣本 ☐ 國際合作研究 ☐ 使用國外研究設施		

一、執行國際合作與移地研究過程

二、研究成果

三、建議

四、本次出國若屬國際合作研究，雙方合作性質係屬：(可複選)

- ☐ 分工收集研究資料
- ☐ 交換分析實驗或調查結果
- ☐ 共同執行理論建立模式並驗證
- ☐ 共同執行歸納與比較分析
- ☐ 元件或產品分工研發
- ☐ 其他 (請填寫) _____

五、其他

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：__年__月__日

計畫編號	MOST — — — — —		
計畫名稱			
出國人員 姓名		服務機構 及職稱	
會議時間	年 月 日至 年 月 日	會議地點	
會議名稱	(中文) (英文)		
發表題目	(中文) (英文)		

一、參加會議經過

二、與會心得

三、發表論文全文或摘要

四、建議

五、攜回資料名稱及內容

六、其他

科技部補助專題研究計畫國外學者來臺訪問成果報告

日期：__年__月__日

計畫編號	MOST — — — — —		
計畫名稱			
邀訪學者 姓名		服務機構 及職稱	
國籍		來臺時間	年 月 日至 年 月 日
來訪目的 (可複選)	☐ 技術指導 ☐ 實驗設備設立 ☐ 計畫諮詢/顧問 ☐ 學術演講 ☐ 國際會議主講員 ☐ 其他		

一、訪問過程

二、對本項專題計畫產生之影響、貢獻或主要成果

三、建議

四、其他