

科技部補助專題研究計畫成果報告

期末報告

開發腸道葡萄糖醛酸酶專一性抑制劑57以降低化療誘導腹瀉及 提高化療療效(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 105-2325-B-041-001-

執行期間：105年05月01日至106年04月30日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學藥學系(含碩士班)

計畫主持人：呂玉玲

共同主持人：鄭添祿、王照元、吳寶珠、陳建樹

計畫參與人員：學士級-專任助理人員：林偉琪

碩士班研究生-兼任助理人員：邱沛芳

碩士班研究生-兼任助理人員：陳國輝

中 華 民 國 106 年 05 月 10 日

中文摘要：葡萄糖醛酸化(glucuronidation)是肝臟藥物解毒的主要路徑；然而，當化療藥物進入腸道後會被腸道菌所分泌的葡萄糖醛酸酶(beta-glucuronidase; betaG)再活化而造成腸道損傷及誘發腹瀉(chemotherapy-induced diarrhea)。有50-80%的化療藥物會誘發腹瀉，其中大腸癌第一線化療藥物Irinotecan (CPT-11)在臨床上有60-80%的病人有腹瀉的副作用，嚴重的腹瀉會影響病人生活品質，甚至停藥而降低治療效果。目前抗腹瀉劑或抗生素雖可降低腹瀉，但是不是針對betaG，無法有效改善腹瀉現象。為了有效改善化療藥物誘導腹瀉，我們將開發一細菌葡萄糖醛酸酶(e betaG)專一抑制劑做為化療口服佐劑，以保護腸道而降低化療誘發腹瀉，並增加療效。我們先前已證實了口服e betaG 專一性抑制性57 可抑制腸道e betaG 活性而降低CPT-11 所引起的小鼠體重流失及腹瀉。基於此結果，我們將開發e betaG 專一性抑制性57 成為化療口服佐劑。同時參照先前構想書審查意見及Gap analysis 分析，設計以下實驗：(1)檢測CPT-11 合併e betaG 專一性抑制性57 之腫瘤治療效率。(2)最佳化e betaG 專一性抑制性57 劑型開發成為化療口服佐劑57。(3)對口服佐劑57 進行藥物動力學及毒理測試以朝向臨床試驗檢測。此計畫成功，將可有效降低化療誘發腹瀉並且提高化療效果及改善病人生活品質，以解決目前臨床上化療藥物治療之困境。

中文關鍵詞：葡萄糖醛酸酶，腸道葡萄糖醛酸酶專一性抑制劑，口服佐劑，化療誘導腹瀉，降低副作用，增加化療效果

英文摘要：Glucuronidation represents a major route of drug detoxification. However, deconjugation of the drug-glucuronide by intestinal microflora beta-glucuronidase (e betaG) can reactivate the detoxified drugs and induce intestinal injury and chemotherapy-induced diarrhea (CID). CID is the main drawback for cancer patients, which can occur in 50-80% of patients depending on the chemotherapy regimen, especially in patients with advanced cancers. For example, irinotecan (CPT-11), a first-line therapeutic drug mainly used for the treatment of metastatic colorectal cancer, has been clinically demonstrated to induce diarrhea varies 60-80% depending on treatment regime. Currently, the anti-diarrheal agents or antibiotics were used to reduce the CID. However, these treatments are not specific to the e betaG, thus they only have palliative effects to relieve symptoms. To overcome these problems, we will develop an e betaG specific inhibitor as oral adjuvant to protect intestine against chemically-induced toxicity and reduce CID, thus enhancing chemotherapeutic efficiency. In our previously result, we have identified a lead compound 57 which can effectively inhibit eG activity but have no effect on human betaG (h betaG). The inhibition ability of the compound 57 ($IC_{50} = 0.15$ micromolar) is better than beta-G Inh (a Science-published compound 1, $IC_{50} = 2$ micromolar). Importantly, oral administration of the

inhibitor 57 can inhibit CPT-11 induced weight loss and diarrhea by blocking intestinal β glucuronidase activity. Based on these results, we will promote β glucuronidase specific inhibitor 57 (lead compound) to be oral adjuvant 57 (candidate) against CID. Toward this goal, we have the following aims based on the suggestion of NRPB and the Gap Analysis report. (1) Examine the in vivo anti-tumor efficacy of CPT-11 combined with the β glucuronidase specific inhibitor 57. (2) Optimal formulation of the β glucuronidase specific inhibitor 57 as oral adjuvant for chemotherapy. (3) Examine the pharmacokinetics and toxicity of the oral adjuvant 57 towards IND enabling studies. We believe, upon completion, the β glucuronidase specific inhibitor 57 as an oral adjuvant will reduce chemotherapy-induced toxicity and improve patients' quality of life.

英文關鍵詞：beta-glucuronidase, intestinal beta-glucuronidase specific inhibitor, oral adjuvant, chemotherapy induced diarrhea (CID), reduce side-effect, enhancing chemotherapeutic efficiency

科技部補助生技醫藥國家型科技計畫(NRPB)
105 年度研究發展計畫成果報告

計畫名稱：開發腸道葡萄糖醛酸酶專一性抑制劑 57 以降低化療誘導腹瀉及提高化療療效

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

科技部計畫編號：MOST 105-2325-B-041-001-

NRPB 計畫編號：103CA1052

執行期程（全程）：103 年 5 月 1 日 至 106 年 4 月 30 日

104 年度經費：2120000 元；全程經費：6330000 元

計畫主持人：呂玉玲 教授

共同主持人：鄭添祿 教授、王照元 教授、吳寶珠 教授、陳建樹 助理教授

計畫參與人員：博士後研究人員 鄭達駿 博士
博士班兼任助理 鄭凱文
學士級專任助理 林偉琪

執行機構及系所：嘉南藥理大學 藥學系

中 華 民 國 106 年 05 月 08 日

目 錄

成果報告內容

一、前言	1
二、計畫目的	3
三、本計畫預定完成之工作項目/查核點 (Milestone)，及其實際執行情形	4
四、主要研發成果及重大突破 (Outcomes)	6
五、主要成果之應用價值與貢獻 (Impacts)	10
六、研發成果	11
七、參考文獻	12

附表

研發成果智財權追蹤表 (為釐清 NRPB 項下計畫智財權之歸屬，並保障計畫主持人日後申請及執行計畫之相關權益，請計畫主持人務必述明計畫相關的專利及技轉狀態)	14
--	----

一、前言

Glucuronidation represents a major route of drug detoxification [1]. However, deconjugation of the drug-glucuronide by *E. coli* β -glucuronidase (e β G) produced in the intestinal microflora can reactivate the detoxified drugs and induce severe toxicity resulting in intestinal injury [2]. Chemotherapy-induced diarrhea (CID) is one of the main drawbacks for cancer patients, which can occur in 50-80% of patients depending on the chemotherapy regimen, especially in patients with advanced cancers [3]. Severe diarrhea may result in dose reductions or even cause the interruption of chemotherapy [4]. Several chemotherapy agents, such as Epirubicin [5], Fulvestrant [6], and Thalidomide [7] which are detoxified through glucuronidation have been reported to cause CID. Irinotecan (CPT-11), a first-line therapeutic drug mainly used for the treatment of metastatic colorectal cancer, has been clinically demonstrated to induce diarrhea varies 60-80% depending on treatment regime [3, 8, 9]. The main mechanism of CPT-11-induced diarrhea is due to its activation and subsequent metabolism. CPT-11 is a prodrug that is hydrolyzed to the active topoisomerase 1 inhibitor, SN-38. SN-38 subsequently undergoes glucuronidation in liver to form SN-38 glucuronide (SN-38G) [10], which is excreted into the gastrointestinal tract. When SN-38G reaches the intestines, it is subjected to e β G that converts SN-38G back to free SN-38, and thus inducing diarrhea during cancer chemotherapy [11-13]. **This intestinal injury is debilitating and a potentially life-threatening side effect that have significant effects on patients' quality of life [4]. Therefore, inhibiting the intestinal e β G activity may decrease exposure of the intestine to the re-activated glucuronide drugs, thereby protecting intestines from injury, reducing CID, and enhancing the therapeutic index (Figure 1).**

Currently, available treatments against CID are antidiarrheal agents such as loperamide or octerotide in clinical [14, 15]. **However, since these treatments are not specific to e β G, they only have palliative effects to relieve symptoms, and the outcomes are sometimes limited and not effective [16].** There are several approaches indicating that inhibiting β G activity can reduce CID *in vivo* [17]. Inhibition of intestinal β G by antibiotics (streptomycin/penicillin or neomycin/bacitracin) reduced CPT-11-induced diarrhea *in vivo* [18-20]. Unfortunately, antibiotics will kill all native gut floras, including probiotics within the digestive tract, which is not recommended to chemotherapeutic patients. Glucaro-1,4-lactone, a specific β G inhibitor, has been shown to alleviate CPT-11-induced mucosal damage in the small intestine *in vivo* [2]. However, glucaro-1,4-lactone preferentially inhibits human β G (h β G) activity [9], which will induce mucopolysaccharidoses (MPS) [21]. Although these approaches for e β G inhibition have been proposed to reduce CID *in vivo*, there are drawbacks and limited to be applicable for clinical use. Therefore, **it is strongly needed for an effective anti-CID treatment to increase therapeutic efficacy and improve patient's quality of life.** In order to reach this goal, **our strategy is to develop an e β G specific inhibitor as oral adjuvant to protect intestine against chemically-induced toxicity and reduce CID, and thus enhancing chemotherapeutic efficiency (Figure 1).**

In previously, we have identified **e β G specific inhibitor 57 which can selectively block intestinal e β G activity without effects on h β G.** Moreover, **oral administration of e β G specific inhibitor 57 can reduce CPT-11-induced diarrhea and weight loss.** Therefore, the e β G specific inhibitor 57 is a good candidate to be further developed as oral adjuvant against CID. **In order to promote e β G specific inhibitor 57 (lead compound) to oral adjuvant 57 (candidate) against CID, we have the following aims based on suggestion from the NRPB and the Gap Analysis report: (1) Examination of the *in vivo* anti-tumor efficacy of CPT-11 combined with e β G specific inhibitor 57. (2) Optimal formulation of e β G specific**

inhibitor 57 as oral adjuvant for chemotherapy. (3) Examination of the pharmacokinetics and toxicology of oral adjuvant 57 towards IND enabling studies. We believe that inhibitor 57 is an ideal e β G specific inhibitor to fulfill the demands for drugs that are able to prevent intestinal damage eliminating diarrhea induced by chemotherapy. Inhibitor 57 is indeed a potential chemotherapy-adjuvant to prevent CID and improve the chemotherapy index.

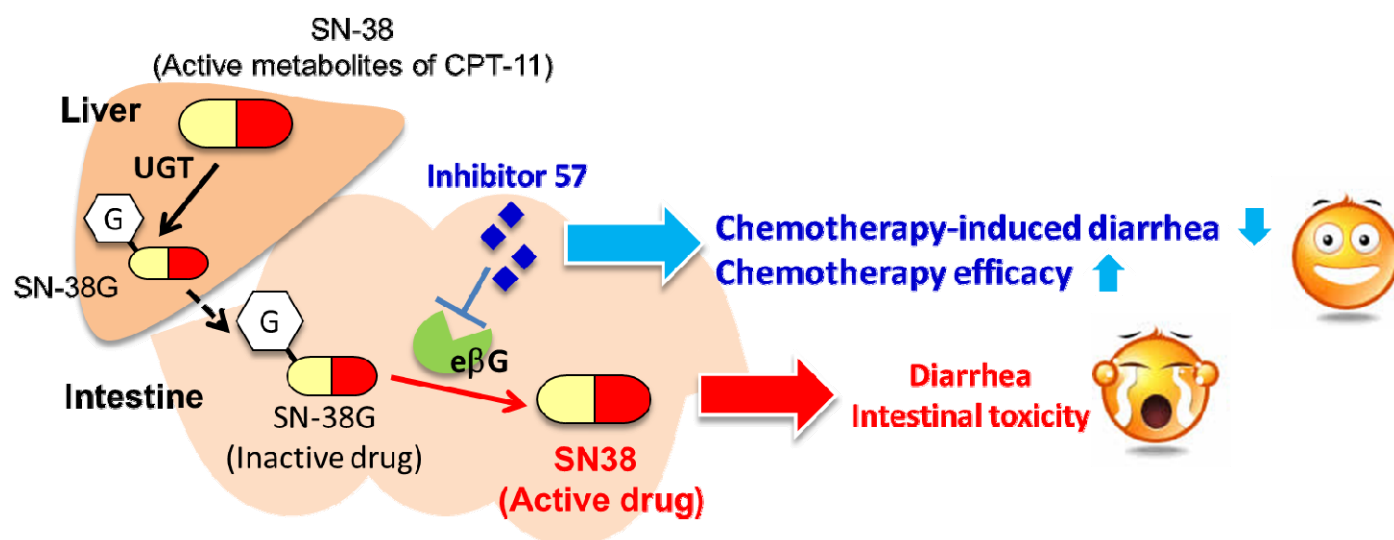


Figure 1. Development of *E. coli* β -glucuronidase specific inhibitor 57 reduces chemotherapy-induced diarrhea enhancing the chemotherapeutic index. Irinotecan (CPT-11), a clinical used chemotherapy drug to treat colon cancer, will be activated to SN-38, which then is inactivated to SN-38G by UDP-glucuronosyltransferase (UGT) via glucuronidation in the liver. SN-38G is sent to the intestines and converted back to SN-38 by *E. coli* β -glucuronidase (e β G) and thus causing diarrhea and intestinal toxicity. Therefore, specific e β G inhibitors are expected to block the e β G activity and thus reducing chemotherapy-induced diarrhea and improving chemotherapy efficacy.

The potential for commercialization and marketing of e β G specific inhibitor 57

The Spectra Intelligence published report indicating that the marketing of chemotherapy are about USD\$42 billion. Several chemotherapy agents, such as Epirubicin, Fulvestrant, and Thalidomide have been reported to cause CID. The EvaluateTM website reported that the world sales of **Irinotecan** is USD\$17 million and Epirubicin is USD\$18 million in 2011. The DrugAnalyst website estimated that the world sales of Fulvestrant is USD\$654 million and Thalidomide is USD\$302 million in 2012. We believe that successfully development inhibitor 57 as oral adjuvant which combined with Irinotecan-based therapy will worth at least the same market of Irinotecan. For the other of the chemodrugs, the market for inhibitor 57 is estimated at USD\$21~33.6 billion. Therefore, inhibitor 57 has great potential and is valuable to be promoted to clinical use.

二、計畫目的 (請勿直接摘錄自原計畫書；1 頁為宜)

本計畫旨在開發腸道菌葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase; β G)抑制劑 **57** 作為口服化療佐劑以保護腸道避免受到化療藥物刺激及誘發腹瀉，並且改善病人生活品質及提高化療療效。

臨床上有許多化療藥物會經由肝臟的葡萄糖醛酸化(glucuronidation)代謝並與葡萄糖醛酸(glucuronide)鍵結而降低毒性，然而，當此類低毒性藥物經由肝腸循環進入腸道後，會被腸道菌所表現之 β G 再活化而恢復其毒性，因而造成腸道損傷進而引起化療誘發腹瀉(chemotherapy-induced diarrhea)。針對大腸癌的化療藥物 Irinotecan (CPT-11)造成高達 88%的病人腹瀉，其中 20~30%的病人具有嚴重的腹瀉，而嚴重的腹瀉將會影響病人生活品質，也將影響治療效果。目前雖然可使用抗腹瀉劑 loperamide、octerotide 舒緩腹瀉，但因為不是針對 β G，無法有效改善腸道破壞的現象。因此，為了解決化療藥物誘發腹瀉及造成腸道病變之問題，我們將開發腸道菌 β G 抑制劑，針對腸道菌 β G 蛋白酶進行抑制，將可以避免藥物於腸道內的再活化。於先前研究中，我們已發現 β G 抑制劑 **57** 此化合物可選擇性的抑制細菌 β G 而不影響人類 β G 的活性，並且其 IC50 更優於在 Science 所發表之目前最佳 β G 抑制劑(β G Inhibitor)；此外，抑制劑 **57** 可有效抑制細菌內生性 β G 活性而不影響細菌生長；進一步以抑制劑 **57** 餵食小鼠可有效抑制腸道菌 β G 活性。基於以上成果，本計畫將有如下規劃：

1. 檢測化療藥物 CPT-11 合併給予腸道菌 β G 抑制劑 **57** 時之腫瘤治療效果

測試腸道菌 β G 抑制劑 **57** 是否可舒緩化療藥物 CPT-11 誘發腹瀉，並且增加小鼠對 CPT-11 劑量之耐受性；檢測抑制劑 **57** 是否會影響 CPT-11 對腫瘤之治療療效。

2. 最佳化腸道菌 β G 抑制劑 **57** 之合成製備

針對腸道菌 β G 專一性抑制劑 **57** 於大鼠內進行初步藥物動力學測試，並且根據其結果以化學結構修飾增加降低身體吸收率而增加腸道停留時間，並評估劑型改良或開發之條件，再檢測化療藥物合併劑型改良後的抑制劑 **57** 之治療效果。此外，也將最佳化生成步驟，提高至大量製備等級。

3. 檢測腸道菌 β G 抑制劑 **57** 之藥物動力學和急毒性測試

檢測以預配方劑型進行腸道菌 β G 專一性抑制劑 **57** 於大鼠內藥物動力學測試，並且於大鼠內進行最大容忍量及單一劑量之毒理安全評估。

我們期望能有效開發該腸道菌 β G 抑制劑 **57** 至臨床前測試，透過此計畫，我們將該腸道菌 β G 抑制劑 **57** 開發作為口服化療佐劑，此外，透過與財團法人生物技術開發中心(DCB)的合作，將可加速該藥物劑型開發最適化並且促進推至臨床前試驗。以腸道菌 β G 抑制劑 **57** 作為口服化療佐劑，將可有效改善目前臨床上化療產生腹瀉之副作用，提高病人生活品質並且增加化療療效。此策略若成功可應用於任何因肝臟 glucuronidation 解毒後而在腸道因腸道菌 β G 使藥物毒性再活化而導致副作用(腹瀉)的藥物。

三、本計畫預定完成之工作項目/查核點 (Milestone)，及其實際執行情形 (2 頁內為宜)

(1) 原規劃工作項目之達成情形

Checkpoint (查核點)	Items (查核項目)	Description (預計工作項目之達成情形)
Aug., 2016	<i>In vitro</i> ADME study of oral adjuvant 57	金費不足，評估後尚不需執行
Dec., 2016	Single/ multiple oral PK study of oral adjuvant 57	委託 DCB 進行抑制劑 57 之單一劑量藥動試驗，動物實驗已完成，待檢體分析。
Dec., 2016	Genotoxicity test of oral adjuvant 57	1. 完成抑制劑 57 之體外突變潛力評估 (Ames test)。 2. 完成測試腸道菌 β G 抑制劑 57 之腸道毒性、致癌潛力。
Dec., 2016	Cardiac safety assay of oral adjuvant 57 .	金費不足，評估後尚不需執行
Apr. 2017	<i>In vivo</i> toxicity study of oral adjuvant 57 .	1. 完成初步抑制劑 57 之毒性測試(體重、肝指數檢測)。 2. 利用基因缺陷小鼠檢測抑制劑 57 之腸道毒性、致癌潛力。 3. 委託 DCB 完成抑制劑 57 之最大容忍劑量測試。 4. 委託 DCB 進行抑制劑 57 之單一劑量毒性測試，實驗進行中。

(2) 請具體描述上述工作項目之實際執行情形

先前執行項目：

1. 檢測餵食小鼠抑制劑 **57** 是否可降低化療藥物 CPT-11 誘發腸道毒性，觀察小鼠肛門沾黏情形做為腹瀉程度指標，及觀察腸道組織切片判斷腸道損傷情形。
2. 檢測餵食小鼠抑制劑 **57** 是否可影響化療藥物 CPT-11 抗癌療效，以小鼠大腸癌細胞 CT26 皮下注射形成腫瘤後，餵食小鼠抑制劑 **57** 並同時施打化療藥物 CPT-11，每天測量小鼠腫瘤生長情形做為判斷化療藥物 CPT-11 抗癌療效。
3. 委託財團法人生物技術開發中心(DCB)完成對抑制劑 **57** 的初步藥物動力學測試以了解抑制劑 **57** 在活體內吸收的情形。以抑制劑 **57** 餵食大鼠，並收集血清、糞便、血液檢測抑制劑 **57** 含量。
4. 委託 DCB 檢測餵食小鼠抑制劑 **57** 是否影響化療藥物 CPT-11 代謝，收集血液分析 CPT-11 及其代謝物 SN-38、SN-38 glucuronide 含量。

本年度執行項目：

5. 最佳化抑制劑 **57** 之合成製備步驟，可自行生產公克等級，並且測試其於常溫保存下之穩

定度。

6. 委託 DCB 進行抑制劑 **57** 的 pre-formulation 預配方劑型篩選、溶解度、穩定度測試。
7. 檢測抑制劑 **57** 之體外突變潛力(Ames test)。
8. 委託 DCB 以預配方劑型於大鼠進行抑制劑 **57** 之藥物動力學檢測，並分析生體利用率。(執行中)
9. 檢測抑制劑 **57** 初步毒性測試，餵食小鼠抑制劑 **57** 連續 20 天，觀察小鼠體重變化及測試肝功能指數。
10. 檢測抑制劑 **57** 之腸道毒性、致癌潛力，餵食基因缺陷小鼠(APC^{min/+})抑制劑六周，觀察小鼠腸道腫瘤生長情形。
11. 委託 DCB 於大鼠檢測抑制劑 **57** 之最大容劑量(MTD)，觀察小鼠生存率、體重、食物及水取量變化。
12. 委託 DCB 於大鼠檢測抑制劑 **57** 之單一劑量毒性測試，觀察重要器官是否有損傷情形。(執行中)

預定達成目標：

Specific aim 3: Examine the pharmacokinetics and toxicology of eβG specific inhibitor 57 towards IND enabling studies.

3-1 *In vitro* ADME study of oral adjuvant 57. (metabolism, suitability, distribution, drug-drug interaction). (金費不足，未執行)

原預計由NRPB小額委外試驗服務執行，但單位金費不足未執行。評估後，待其他藥物動力學、毒理實驗完成，再由後續計畫進行。

3-2 Single/ multiple oral PK study of oral adjuvant 57.

委託DCB利用預配方劑型(DMA:PG:HPBCD:H2O = 3:10:25:62)進行腸道菌βG抑制劑**57**之單一劑量藥物動力學試驗，並且分析生體利用率。目前動物實驗部分已完成，待檢體分析。

3-3 Genotoxicity test of oral adjuvant 57.

1. 完成測試腸道菌βG抑制劑**57**之體外突變潛力評估(Ames test)。
2. 測試腸道菌βG抑制劑**57**之腸道毒性、致癌潛力。

3-4 Cardiac safety assay of oral adjuvant 57. (hERG activity assay) (金費不足，未執行)

原預計由NRPB小額委外試驗服務執行，但單位金費不足未執行。評估後，待其他藥物動力學、毒理實驗完成，再由後續計畫進行。

3-5 *In vivo* toxicity study of oral adjuvant 57. (body-weight loss, GOT/GPT, et al.)

1. 完成測試腸道菌βG抑制劑**57**之初步毒性測試(體重、肝指數變化)。
2. 委託DCB利用預配方劑型(DMA:PG:HPBCD:H2O = 3:10:25:62)完成最大容忍劑量測試。
3. 委託DCB利用預配方劑型(DMA:PG:HPBCD:H2O = 3:10:25:62)進行單一劑量(90 mg/kg)毒性測試。

四、主要研發成果及重大突破 (Outcomes) (請以條列式呈現，附表或附圖；3 頁內為宜)

結果

1. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之穩定度測試。

於常溫下保存抑制劑 57，並且利用 HPLC 分析其純度，結果顯示，室溫保存兩年以上抑制劑 57 仍維持其純度，具有良好之穩定性。

2. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之預配方劑型篩選及其穩定物。(Table 1、Table 2)

委託 DCB 進行抑制劑 57 的 pre-formulation 預配方劑型相關試驗，利用預配方劑型 (DMA:PG:HPBCD:H₂O = 3:10:25:62)濃度可達 10 mg/ml，並且於不同溫度下培養 4 周仍維持其穩定度。

3. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之體外突變潛力評估(Ames test)。

利用鼠傷寒沙門氏菌 (Salmonella typhimurium)組氨酸營養缺陷型菌株(包含 TA98、TA100、TA1535 和 TA1537 四支菌株)進行試驗。結果顯示，抑制劑 57 於任何測試濃度下沒有致突變活性的表現。

4. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之初步毒性測試。(Figure 1、Figure 2)

餵食小鼠(APC^{min/+})抑制劑 57 (3 mg/kg/day)連續 20 天，每天觀察體重變化，並檢測肝功能指數。結果顯示，體重、肝功能指數無明顯變化，初步顯示抑制劑 57 不具明顯毒性。

5. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之腸道毒性、致癌潛力測試。(Figure 3、Figure 4)

餵食好發腸道腫瘤之基因缺陷小鼠(APC^{min/+})抑制劑 57 (6 mg/kg/day)每周三次，並且腹腔注射致癌劑 DMH (30 mg/kg)每周一次，實驗持續六周，犧牲小鼠觀察腸道腫瘤數目評估抑制劑 57 其致癌潛力。結果顯示，餵食抑制劑 57 不會誘發腫瘤生長，並且具有降低致癌劑誘發腫瘤生長之效果。

6. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之最大容忍劑量測試。(Figure 5)。

委託 DCB 進行抑制劑 57 於大鼠之最大容忍劑量測試，以 30 mg/kg、60 mg/kg、90 mg/kg 之劑量每周餵食一次大鼠，結果顯示，並沒有造成大鼠死亡，且體重、食物及水攝取量沒有明顯下降，顯示 90 mg/kg 之劑量仍不造成嚴重毒性，而目前正在進行單一劑量毒性測試。

圖表

Table 1 腸道菌βG 抑制劑 57 之預配方劑型篩選、溶解度測試

eBG (concentration target at 10 mg/mL)				
WT (mg)	Solution	Result	Dilute	composition
3.121	DMA 15 uL +PG 30 uL+ 10% Cremophor in H2O 150 uL + H2O 105 uL	O	1/10 OK	DMA:PG:Cremophor:H2O =5:10:5:80
2.092	DMA 10 uL +PG 20 uL+ 10% Tw80 in H2O 100 uL + H2O 70 uL	O	1/10 OK	DMA:PG:Tw80:H2O =5:10:5:80
2.076	DMA 10 uL +PG 20 uL+ 10% Solutol in H2O 100 uL + H2O 70 uL	O	1/10 OK	DMA:PG:Solutol:H2O =5:10:5:80
2.117	DMA 10 uL +PG 30 uL+ 50% HPBCD 100 uL + H2O 60 uL	O	1/10 OK	DMA:PG:HPBCD:H2O =5:15:25:55
2.035	DMA 6 uL +PG 20 uL+ 50% HPBCD 100 uL + H2O 74 uL	O	1/10 OK	DMA:PG:HPBCD:H2O =3:10:25:62

O: soluble; X: insoluble

我們選取 DMA:PG:HPBCD:H2O = 3:10:25:62 進行後續試驗，其溶解度可至 10 mg/ml，並且以水稀釋 10 倍後，仍可維持抑制劑 57 之溶解度，沒有析出的現象。

Table 2 腸道菌βG 抑制劑 57 於預配方劑型穩定度測試

Temp.	5°C		25°C		40°C	
Time(weeks)	2	4	2	4	2	4
peak area	283062	289157	379987	400497	389205	372248
	284210	291819	381680	403498	392591	367038
	283223	293224	377844	405811	392440	367134
AV	283498	291400	379837	403269	391412	368807
Con.(mg/mL)	7.30	7.51	9.79	10.39	10.08	9.50
Remaining	73.04%	75.07%	97.86%	103.89%	100.84%	95.02%

將抑制劑 57 溶於以預配方劑型(DMA:PG:HPBCD:H2O = 3:10:25:62) (10 mg/ml)，分別培養於 5°C、25°C、40°C 各 2、4 周，再以 HPLC 分析其溶解度，結果顯示，除了在低溫下(5°C)因為沉澱而導致有溶解度下降的情形，其溶解度在 2 周及 4 周都維持一樣，顯示良好之穩定性。

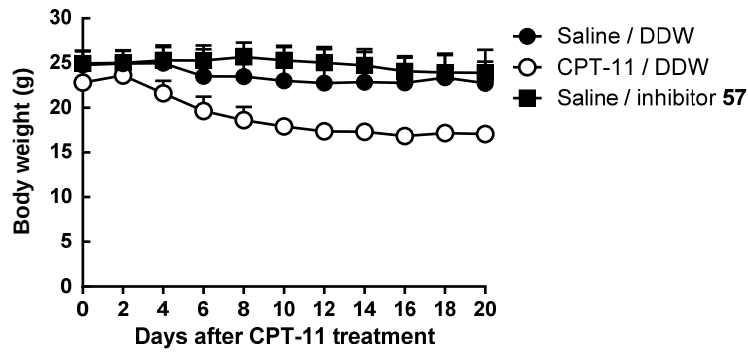


Figure 1. 餵食腸道菌 β G 抑制劑 57 對小鼠體重影響。餵食小鼠抑制劑 57 (3 mg/kg/day)或腹腔注射化療藥 CPT-11 (50 mg/kg/day)連續 20 天，每兩天記錄小鼠體重變化。結果顯示，餵食抑制劑 57 沒有造成體重明顯變化，顯示該劑量不具有明顯毒性。n=5, Mean $\pm$ SD。

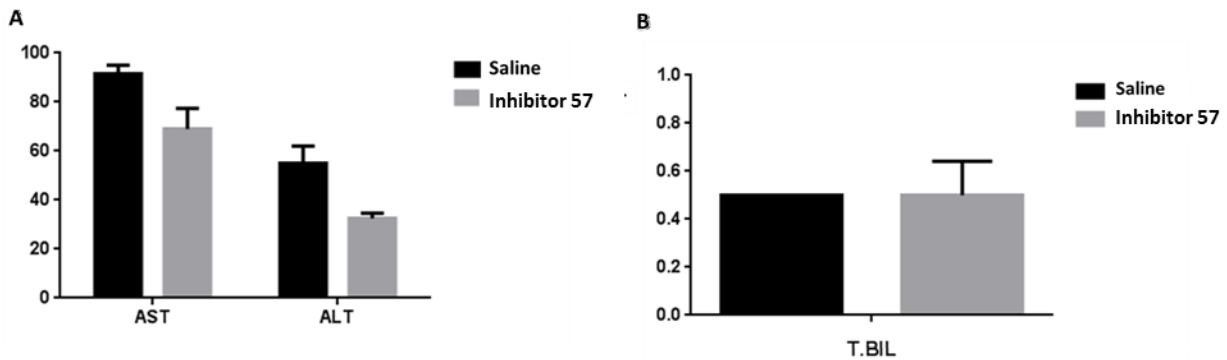


Figure 2. 餵食腸道菌 β G 抑制劑 57 對小鼠肝發炎指數(AST、ALT)與肝功能指數(T.BIL)影響。餵食小鼠抑制劑 57 (3 mg/kg/day)或水連續六天，以尾靜脈採血並檢測小鼠血中(A)肝發炎指數(ALT, AST)濃度，(B)肝功能指數(T.BIL)。結果顯示，餵食抑制劑 57 會降低肝發炎指數，但肝發炎指數(AST: 54~269, ALT: 26~77)肝功能指數(T.BIL: 0.7~0.9)及肝發炎指數(AST: 54~269, ALT: 26~77)都在正常範圍內。n=3, Mean $\pm$ SD。

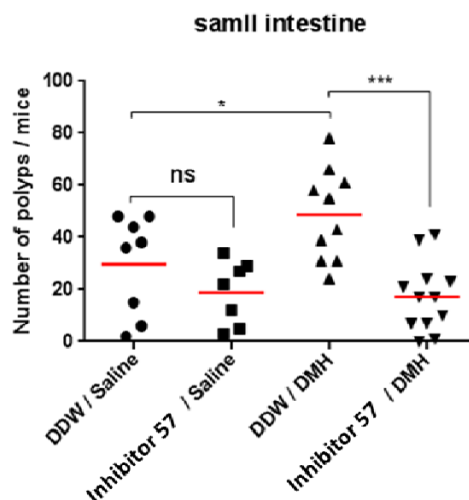


Figure 3. 腸道菌 β G 抑制劑 57 之小腸致癌性。餵食好發腸道腫瘤之基因缺陷小鼠(APC^{min/+})小鼠抑制劑 57 (6 mg/kg/day)每周三次或腹腔注射致癌劑 DMH (30 mg/kg/day)每周一次，連續六周，並

犧牲小鼠計算小腸內腫瘤數目，結果顯示餵食抑制劑 **57** 不會增加腫瘤生成，並且可降低致癌劑誘發腫瘤生成，顯示其不具致癌性。

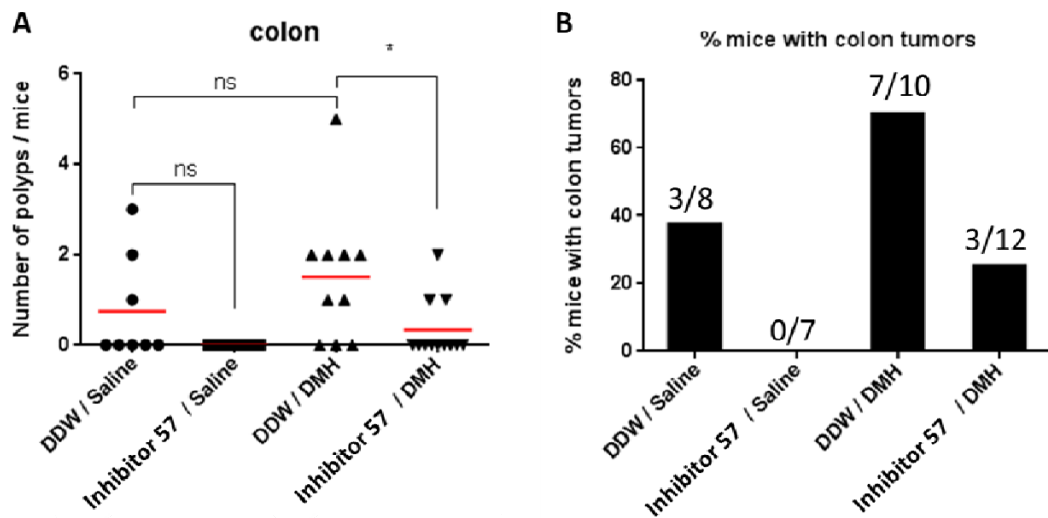


Figure 4. 腸道菌βG 抑制劑 57 之大腸致癌性。餵食好發腸道腫瘤之基因缺陷小鼠($APC^{min/+}$)小鼠抑制劑 **57** (6 mg/kg/day)每周三次或腹腔注射致癌劑 DMH (30 mg/kg/day)每周一次，連續六周，並犧牲小鼠計算(A)大腸內腫瘤數目及(B)小鼠生長大腸腫瘤發生率。結果顯示餵食抑制劑 **57** 不會增加腫瘤生成，並且可降低致癌劑誘發腫瘤生成，顯示其不具致癌性。

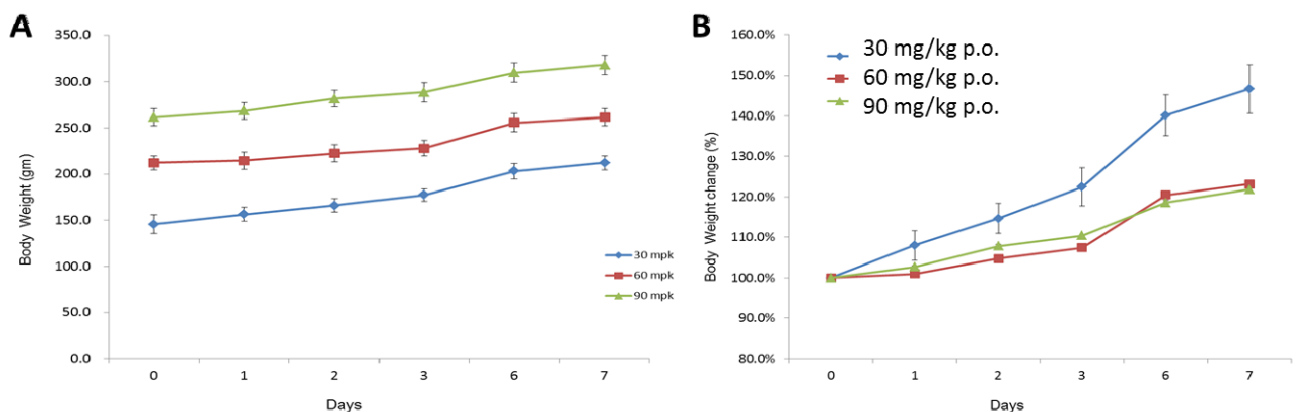


Figure 5. 腸道菌βG 抑制劑 57 之大腸致癌性。委託 DCB 進行抑制劑 **57** 於大鼠之最大容忍劑量測試，以 30 mg/kg、60 mg/kg、90 mg/kg 之劑量每周餵食大鼠一次。(A)體重變化，(B)體重百分比變化。結果顯示，60 mg/kg、90 mg/kg 之劑量下雖然會延緩大鼠體重增加百分比，但沒有造成大鼠死亡，顯示不具有明顯毒性。n=3, Mean $\pm$ SD。

五、主要成果之應用價值與貢獻 (Impacts) (學術、經濟、社會及其他面向效益；2 頁為宜)

葡萄糖醛酸化(glucuronidation)為人體內藥物代謝與清除之主要路徑，許多藥物在肝臟內會經由與葡萄糖醛酸(glucuronide)鍵結而降低毒性，然而，當此類低毒性藥物經由肝腸循環進入腸道後，會被腸道菌所表現之 β G 再活化而恢復其毒性，因而造成腸道損傷及誘發腹瀉。其中化療藥物 Irinotecan (CPT-11) 及 Epirubicin 等已被證實是經由上述途徑而造成腹瀉，目前臨床上大多使用抗腹瀉劑舒緩腹瀉，但由於此類治療並非針對 β G，無法有效改善腸道被破壞的情形，因此我們想開發腸道菌 β G 抑制劑，針對腸道菌 β G 進行抑制，將可以避免藥物在腸道內的再活化，而有效改善藥物於腸道造成的毒性及損害。我們已發現腸道菌 β G 專一性抑制劑 **57** 可選擇性抑制腸道菌表現 β G 而不影響人類 β G 活性；可有效抑制細菌內生性 β G 活性而不影響細菌生長；並且餵食小鼠該抑制劑 **57** 有效抑制腸道菌 β G，且對於哺乳類細胞具有低毒性；進一步檢測發現餵食該抑制劑 **57** 有效舒緩化療藥物 CPT-11 誘發腹瀉之副作用，並且維持 CPT-11 對腫瘤的治療效果；經過藥物動力學試驗發現抑制劑 **57** 主要經由糞便排泄，而證實可有效在腸道作用。未來我們將對抑制劑 **57** 進行劑型改造並開發作為口服化療佐劑至臨床前試驗。本計畫的成功，將有以下之貢獻：

1. 以腸道菌 β G 專一性抑制劑 **57** 作為口服化療佐劑將可取代目前化療使用之抗腹瀉劑
2. 抑制劑 **57** 可降低化療誘發腹瀉而改善化療病人生活品質
3. 提升化療病人對化療藥物之耐受性而提高治療療效
4. 改善現行造成腹瀉藥物並提升其市場價值 (如：Irinotecan、Epirubicin 等化療藥物)

癌症化療藥物市場預估約為 420 億美元，而目前臨床上使用的癌症化療藥物有 50~80% 會造成化療病人腹瀉，其中已被證實可經腸道菌 β G 再活化而造成腹瀉的藥物的 Irinotecan (CPT-11)，其 2008 年時全球銷售約為 5.6 億美元(Pfizer)，而 Epirubicin 在 2006 年時約為 3.1 億美元(Pfizer)。因此我們相信若成功開發腸道菌 β G 專一性抑制劑 **57** 作為口服化療佐劑將具有可觀的市場潛在價值及具備極高之開發潛力。除了化療藥物外，用於治療癌症的口服荷爾蒙療法藥物 Fulvestrant (2012 年全球銷售額為 6.54 億美元)及抗血管新生藥物 Thalidomide (2012 年全球銷售額為 3.02 億美元)也同樣被發現會誘發腹瀉。另外，近年研究指出非類固醇止痛消炎藥(nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)，如 diclofenac (DCF) 也會經由腸道菌 β G 再活化而造成腸道損傷。因此，我們所開發之腸道菌 β G 專一性抑制劑除了可做為化療佐劑外，也可與其他藥物合併使用，抑制藥物在腸道內的再活化及損害，降低藥物副作用而增加藥物功效。

另外，我們也預期本計畫的成功將會具有 4 篇 SCI 期刊的發表及 1 專利申請。若成功將腸道菌 β G 專一性抑制劑 **57** 開發作為口服化療佐劑，我們將進行技術轉移給大型藥廠等，期望能將之推至臨床試驗。同時，在本計畫的支持下已經訓練博士班及碩士班研究生有關小分子藥物開發、劑型調整、癌症治療等相關技術。

六、研發成果

文獻發表

1. Prijovich, ZM, Burnouf, PA, Chou, HC, Huang, PT, Chen, KC, Cheng, TL, **Leu, YL***, and Roffler, SR*. Synthesis and Antitumor Properties of BQC-Glucuronide, a Camptothecin Prodrug for Selective Tumor Activation. *Mol. Pharm.*, 2016 Apr 4;13(4):1242-50. (IF2015 = 4.342, 22/142 (82.661) in MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL)
2. Cheng, TC, Chuang, KH, Roffler, SR, Cheng, KW, **Leu, YL**, Chuang, CH, Huang, CC, Kao, CH, Hsieh, YC, Chang, LS, Cheng, TL*, and Chen, CS*. Discovery of Specific Inhibitors for Intestinal E. coli β -Glucuronidase through In Silico Virtual Screening. *ScientificWorldJournal*, 2015;2015:740815. (IF2013 = 1.219, 16/55 (71.818) in MELTIDISCIPLINARY SCIENCES)
3. Chuang, CH, Cheng, TC, **Leu, YL**, Chuang, KH, Tzou, SC, and Chen, CS*. Discovery of Akt Kinase Inhibitors through Structure-Based Virtual Screening and Their Evaluation as Potential Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015 Feb 2;16(2):3202-12. (IF2015 = 3.257, 110/289 (62.111) in BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY)
4. Su, YC, Cheng, TC, **Leu, YL**, Roffler, SR, Wang, JY, Chuang, CH, Kao, CH, Chen, KC, Wang HE, and Cheng, TL*. PET Imaging of β -Glucuronidase Activity by an Activity-Based 124I-Trapping Probe for the Personalized Glucuronide Prodrug Targeted Therapy. *Mol. Cancer Ther.*, 2014 Dec;13(12):2852-63. (IF2015 = 5.579, 27/213 (87.559) in ONCOLOGY)

專利（請填入目前已獲得或申請中之專利。「類別」請填入代碼：A.發明專利 B.新型專利）

類別	專利名稱	國別	專利號碼/ 申請號碼	發明人	專利 權人	專利 期限	經費補助單 位及其計畫 編號
A	具腫瘤選擇性之抗癌 前驅藥物 BQC-G	Taiwan.	TWI457127 B/ TW0991409 69	羅傳倫, 呂玉玲, 皮 喬偉	中央 研究 院	2010/11 /15~20 25/11/2 5	
A	BQC-G, A TUMOR-SELECTIVE ANTI-CANCER PRODRUG	USA	US 9353140 B2/ US1351225 5	Zeljko M. Proijovic, Yu-Lin Leu, Steve R. Roffler	Acade mia Sinica	2010/11 /24~20 25/11/2 4	

七、参考文献

1. Rowland, A., J.O. Miners, and P.I. Mackenzie, *The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(6): p. 1121-32.
2. Takasuna, K., et al., *Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. **58**(4): p. 494-503.
3. Stein, A., W. Voigt, and K. Jordan, *Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management*. Ther Adv Med Oncol, 2010. **2**(1): p. 51-63.
4. Viele, C.S., *Overview of chemotherapy-induced diarrhea*. Semin Oncol Nurs, 2003. **19**(4 Suppl 3): p. 2-5.
5. Innocenti, F., et al., *Epirubicin glucuronidation is catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(5): p. 686-92.
6. Edavana, V.K., et al., *Fulvestrant up regulates UGT1A4 and MRPs through ERalpha and c-Myb pathways: a possible primary drug disposition mechanism*. Springerplus, 2013. **2**: p. 620.
7. Jain, A.K., S. Jain, and A.C. Rana, *Metabolic enzyme considerations in cancer therapy*. Malays J Med Sci, 2007. **14**(1): p. 10-7.
8. Kobayashi, K., *[Chemotherapy-induced diarrhea]*. Gan To Kagaku Ryoho, 2003. **30**(6): p. 765-71.
9. Fittkau, M., et al., *Saccharic acid 1,4-lactone protects against CPT-11-induced mucosa damage in rats*. J Cancer Res Clin Oncol, 2004. **130**(7): p. 388-94.
10. Yong, W.P., et al., *Effects of ketoconazole on glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferase enzymes*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6699-704.
11. Nelson, G.M., et al., *Metabolism, microflora effects, and genotoxicity in haloacetic acid-treated cultures of rat cecal microbiota*. Toxicol Sci, 2001. **60**(2): p. 232-41.
12. Rowland, I., *The influence of the gut microflora on food toxicity*. Proc Nutr Soc, 1981. **40**(1): p. 67-74.
13. Humblot, C., et al., *Beta-glucuronidase in human intestinal microbiota is necessary for the colonic genotoxicity of the food-borne carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats*. Carcinogenesis, 2007. **28**(11): p. 2419-25.
14. Abigeres, D., et al., *Irinotecan (CPT-11) high-dose escalation using intensive high-dose loperamide to control diarrhea*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(6): p. 446-9.
15. Pro, B., R. Lozano, and J.A. Ajani, *Therapeutic response to octreotide in patients with refractory CPT-11 induced diarrhea*. Invest New Drugs, 2001. **19**(4): p. 341-3.
16. Trifan, O.C., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11*. Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5778-84.
17. Benson, A.B., 3rd, et al., *Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea*. J Clin Oncol, 2004. **22**(14): p. 2918-26.
18. Kurita, A., et al., *Streptomycin alleviates irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in rats by a mechanism other than inhibition of beta-glucuronidase activity in intestinal lumen*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(1): p. 201-13.
19. Kehrer, D.F., et al., *Modulation of irinotecan-induced diarrhea by cotreatment with neomycin in cancer patients*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(5): p. 1136-41.
20. Takasuna, K., et al., *Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats*. Cancer

Res, 1996. **56**(16): p. 3752-7.

21. Gillett, P.M., et al., *Mucopolysaccharidosis type VII (Sly syndrome) presenting as neonatal cholestasis with hepatosplenomegaly*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **33**(2): p. 216-20.

附表

研發成果智財權追蹤表

填表日期：105 年 05 月 08 日

(1) 專利 (請填寫與此研發計畫相關，已獲證或申請中之專利；如申請/獲證之專利有多件，請自行新增必要之欄位)

專利狀態	☒ 未曾申請專利 (是否進行過可專利性評估? ☒ 是 ☐ 否) ☐ 專利申請中 ☐ 已獲證
近期規劃	預計於年底申請國內專利及進行全球專利佈局(PCT)。
專利名稱	Bacterial Glucuronidase specific inhibitor and its application
申請日期/ 專利期限	
專利權人	
發明人	
申請國別	☐ PCT ☒ 臺灣 ☐ 美國 ☐ 歐盟 ☐ 日本 ☐ 其他 _____
專利獲證字號/ 獲證國家	
新穎性確認	專利申請前，是否曾公開發表相關內容 (包括期刊、博碩士生論文、研討會/展覽上公開之海報、摘要或其他技術內容、網路文獻、專書/專章等?) ☐ 是 ☒ 否
專利申請範圍 (claims)	1. 針對 inhibitor 57 及其衍生物申請專利保護。 2. 針對 inhibitor 57 及其衍生物之生產與製造方法申請專利保護。 3. 針對以 inhibitor 57 及其衍生物可抑制葡萄糖醛酸酶(β G)之活性申請專利保護。 4. 針對以 inhibitor 57 及其衍生物可降低化療引起之副作用申請專利保護。 5. 針對以 inhibitor 57 及其衍生物可降低化療引起之腹瀉申請專利保護。 6. 針對以 inhibitor 57 及其衍生物可作為化療佐劑申請專利保護。 7. 針對以 inhibitor 57 及其衍生物可預防癌症發生申請專利保護。 8. 針對以 inhibitor 57 及其衍生物可預防大腸癌發生申請專利保護。

(2) 智慧財產權

智財權釐清	(本技術或相關技術在研發過程中，若有執行產學合作計畫、發生（或即將發生）技術授權或與任何廠商合作之事實，請條列詳述，並檢附相關合約或文件。請計畫主持人及所屬機構研發處/技轉中心，協助確認該執行機構擁有本計畫相關研究成果其智慧財產權後續開發之權利，且無侵犯曾經合作廠商權利之虞)。
技術名稱	
技術/產品 應用範圍	
被授權單位	
授權範圍	(請述明授權標的，並提供佐證資料)
技轉金額	
合約期間	

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2017/05/08

科技部補助計畫	計畫名稱：開發腸道葡萄糖醛酸酶專一性抑制劑57以降低化療誘導腹瀉及提高化療療效(3/3)
	計畫主持人：呂玉玲
	計畫編號：105-2325-B-041-001-學門領域：生技醫藥國家型研究計畫
無研發成果推廣資料	

105年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：呂玉玲				計畫編號：105-2325-B-041-001-			
計畫名稱：開發腸道葡萄糖醛酸酶專一性抑制劑57以降低化療誘導腹瀉及提高化療療效(3/3)							
成果項目				量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	1		具腫瘤選擇性之抗癌前驅藥物BQC-G (TWI457127B/ TW099140969)
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
		技術移轉	件數		0		件
	收入		0	千元			
國外	學術性論文	期刊論文		4	篇	1. Mol. Pharm., 2016 Apr 4;13(4):1242-50. (IF2015 = 4.342, 22/142 (82.661) in MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL) 2. ScientificWorldJournal, 2015;2015:740815. (IF2013 = 1.219, 16/55 (71.818) in MELTIDISCIPLINARY SCIENCES) 3. Int. J. Mol. Sci., 2015 Feb 2;16(2):3202-12. (IF2015 = 3.257, 110/289 (62.111) in BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY) 4. Mol. Cancer Ther., 2014 Dec;13(12):2852-63. (IF2015 = 5.579, 27/213 (87.559) in ONCOLOGY)	
		研討會論文		0			
		專書		0		本	
		專書論文		0		章	

		技術報告			0	篇		
		其他			0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件		
				已獲得	1		BQC-G, A TUMOR-SELECTIVE ANTI-CANCER PRODRUG (US 9353140 B2/US13512255)	
			新型/設計專利		0			
		商標權			0			
		營業秘密			0			
		積體電路電路布局權			0			
		著作權			0			
		品種權			0			
		其他			0			
		技術移轉	件數				0	件
	收入			0	千元			
	參與計畫人力	本國籍	大專生			0	人次	
			碩士生			0		
博士生			0					
博士後研究員			0					
專任助理			0					
非本國籍		大專生			0			
		碩士生			0			
		博士生			0			
		博士後研究員			0			
		專任助理			0			
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)								

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）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（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

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200字為限）

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，以500字為限）

本計畫的成功，將有以下之貢獻：

1. 以腸道菌betaG專一性抑制劑57作為口服化療佐劑將可取代目前化療使用之抗腹瀉劑
2. 將可降低化療誘發腹瀉並改善化療病人生活品質
3. 提升化療病人對化療藥物之耐受性而提高治療療效
4. 改善現行藥物造成腹瀉並提升其市場價值（如：Irinotecan、Epirubicin等化療藥物）

我們也預期本計畫的成功將會具有4篇SCI期刊的發表及1專利申請。若成功將腸道菌G專一性抑制劑57開發作為口服化療佐劑，我們將進行技術轉移給大型藥廠等，期望能將之推至臨床試驗。同時，在本計畫的支持下將可訓練博士班及碩士班研究生有關小分子藥物開發、劑型調整、癌症治療等相關技術。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：☒ 否 ☐ 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現：☒ 否 ☐ 是

說明：（以150字為限）