

# 行政院原子能委員會 委託研究計畫研究報告

缺氧造影劑 HL91 衍生物 (HL91-NI) 之臨床前診斷  
與安全性研究

計畫編號：942001 INER016  
受委託機關(構)：陽明大學  
計畫主持人：蘇瑤  
報告日期：94年12月20日

# 目 錄

一、	中文摘要-----	2
二、	英文摘要-----	4
三、	計畫目的與緣起-----	6
四、	執行方法與進度說明-----	11
五、	結果-----	17
六、	結論與建議-----	23
七、	附圖-----	24
八、	參考文獻-----	32

## 一、摘要

惡性腫瘤由於其細胞增殖速率超越血管之增生，因此較大之腫瘤其內部常因血液及氧氣供應不足而有相當比例之缺氧或壞死細胞。缺氧細胞對於游離輻射之耐受性約為正常細胞的3倍，對於腫瘤之放射治療，如何判定其缺氧部位並予以適當之增敏處理，以提高游離輻射對缺氧細胞之殺傷力，乃為此種治療能否成功之重要因素。另外，在心肌梗塞或中風時，亦可見組織局部缺氧現象，若能及早測知並進行治療，常可避免器官功能之惡化或甚至恢復功能。

Misonidazole之代謝產物可選擇性地積聚於缺氧細胞，以氟-18同位素標記之<sup>18</sup>F-FMISO配合正子電腦斷層掃描 (positron emission tomography, PET) 設施，已在台北榮總國家正子/迴旋加速器中心(National PET/Cyclotron Center, NPCC)成功地應用於體內腫瘤診斷及因急性心肌梗塞或中風所引起之局部器官或組織缺氧狀況之診斷。使用加馬放射核種 (如鎳-99m) 標記核醫藥物，雖然在定量分析上不如PET，但幾乎所有大型醫院均可進行單光子放射電腦斷層掃描(SPECT)，故以<sup>99m</sup>Tc標記之缺氧組織造影核醫藥物目前仍廣泛地被研究。

本研究使用核能研究所合成之 N4 配位子 HL91，結合上 FMISO 特有的 2-nitroimidazole 官能基，組合成新的 HL91 衍生物

(HL91-NI)，結合 HL91 與 FMISO 的優點；另外，設計與修改 HL91 的化學結構以延長側鏈 (HL91-ET)，以降低藥物的化學極性，以鎔-99m 過鎔酸鈉進行新缺氧造影劑之標誌測試，最後進行細胞體外 (in vitro) 與體內 (in vivo) 腫瘤與腦中風模式之實驗老鼠之實驗，評估此二新核醫藥物之有效性，作為進一步之臨床應用參考。

## 二、Abstract

Tumor growth beyond the vascular oxygen supply capability could result in hypoxic regions, the extent of which correlating with the severity of disease, metastasis and poor response to radiotherapy. Clinically well-developed procedures for identifying tumors with increased hypoxic areas had been in great demands in view of appropriate therapeutic strategies. The nonnitro-aromatic hypoxic cell marker,  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91, had been evaluated for noninvasive detection of hypoxic fractions in tumors, heart and brain, respectively. Based on their specific trapping metabolism in cells, we developed two novel HL91-derivative analogs, HL91-NI and HL91-ET, desire lesser hydrophilic of  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91. Our results showed that the two novel HL91-derivative analogs selectively entered hypoxic regions as their parental compound,  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91. Relatively more hydrophobic characteristics of these two analogs could increase the ability to pass the cell membrane phospholipid bilayers, and provide higher utility with better biodistribution and applied in the diagnosis of hypoxia.

The excipient of HL91-NI or HL91-ET kits were composed of ligand, reducing agent and buffer. The radiochemical purity was verified by Thin-layer Chromatography (TLC) and HPLC. Cellular uptake assays of  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91,  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI and  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET were performed in the oxygen controlled  $\text{CO}_2$  incubator to evaluate their cell retention efficiency under various oxygen concentrations. The biodistribution of these

compounds and microSPECT/CT imaging were following the injection of radiopharmaceuticals into the glioma-bearing nude mice, and images were obtained at 1 to 4 hours time point after injection.

After labeling with  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate with optimal excipient kits, the radiochemical purity were all greater than 95% and the successively time stability was more than 24 hours. In vitro retention study proved that these two novel radiopharmaceuticals could selectively be trapped in hypoxic cells and both had higher cell uptake than  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91. The Tumor/Muscle ratio of at 2 hours time point of  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI and  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET were  $3.5\pm 0.58$  and  $4.2\pm 0.67$ , respectively.

We conclude that novel HL91-derivative radiopharmaceuticals have great potential in detecting malignant neoplasms in terms of assessing tumor hypoxia. In the near future, better-designed preclinical trials will be dedicated to evaluating all the latent applications.

### 三、計畫目的與緣起

所有哺乳動物的身體組織均需氧氣供應來進行新陳代謝，通常細胞內部僅需3~5mmHg的氧分壓即足供代謝之用，一旦氧供應不足，細胞代謝能力亦隨之減弱，無法提供其所需之足夠能量，此時細胞將進入休眠狀態而設法存活。因此，正常組織均有複雜之機制以維持氧的供應與需求之間巧妙的平衡。

早在1955年Thomlinson等人<sup>(1)</sup>在一項對肺部支氣管癌 (broncho carcinoma) 的研究中即已發現，腫瘤半徑在160~200  $\mu$  以下者，其內部無壞死(necrosis)的現象；而半徑超過200  $\mu$  以上者，其中心部位普遍有壞死細胞。此結果後來在一項氧在組織內的擴散實驗中獲得驗證：當氧從微血管壁向外擴散，迅速被外層細胞代謝消耗，距離微血管60~70  $\mu$  m處的氧分壓會降低至接近零（參見圖一）。在一個較大的腫瘤中，鄰近壞死組織周圍的細胞，由於氧供應不足而處於缺氧狀態。細胞在缺氧環境中會進入休眠期，仍能存活一段時間，但長期氧氣供應不足仍終將導致細胞之死亡。

惡性腫瘤由於細胞分裂增殖快速，血管增生趕不上細胞成長速率，因此較大之固態腫瘤(solid tumor)內部常因血液及氧供應不足而有不同程度之缺氧及壞死細胞。缺氧細胞由於身處惡劣環境，多停滯於G1期呈休息狀態，對於輻射及化學藥物治療有較高之耐受

性。據研究<sup>(2)</sup>指出：缺氧狀態之細胞，對於游離輻射之耐受性約為正常細胞的3倍。腫瘤經放射或化學治療後，大多數含氧細胞已被消滅，而原先處於缺氧狀態、未被輻射或藥物殺死之細胞將因氧氣提供恢復正常而重新分裂增殖，造成腫瘤之復發與轉移率升高。因此，如何測定癌病患者腫瘤內之缺氧細胞比例及提高其輻射或化學藥物敏感性，為癌病治療能否成功之關鍵因素。

除了惡性腫瘤之外，某些疾病亦會導致暫時性之組織缺氧，如因急性心肌梗塞或冠心病等造成低血流量而導致暫時性心肌缺氧現象，或因中風而引起腦部局部組織的暫時缺氧，若能及早測知並進行治療，常可避免器官功能之惡化或甚至恢復其功能。

常見之缺氧組織診斷用核醫藥物有下列幾種：

(1)  $^{123}\text{I}$ 類：如IAZA<sup>(3)</sup>、IVM<sup>(4)</sup>。

(2) PET類：如 $^{18}\text{F}$ MISO<sup>(5、6、7、8、9、10)</sup>、 $^{64}\text{Cu}$ -ATSM<sup>(11、12、13)</sup>。

(3)  $^3\text{H}$ 與 $^{14}\text{C}$ 類：如 $^3\text{H}$ MISO<sup>(14)</sup>、 $^{14}\text{C}$ MISO<sup>(15)</sup>。

(4)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 類：如BMS-181321<sup>(16)</sup>、HL91<sup>(17、18、19)</sup>。

目前臨床上能夠選擇性地積聚於缺氧細胞的核醫藥物，乃以 nitroimidazole 類為主，其反應機制<sup>(20、21)</sup>主要是利用其硝基 (nitro) 官能基在進入缺氧細胞後，被體內之 xanthine oxidase 逐步還原成胺基 (amine)，還原之胺基由於分子極性增大，無法

通過細胞膜而停留在細胞內，而在具正常含氧量之細胞中，氧氣可將藥物再氧化回到硝基，而使其可以離開細胞，利用此特性可進行缺氧細胞之核醫造影診斷。

氟-18 同位素標記之  $^{18}\text{F}$ -FMISO 配合正子電腦斷層掃描 (PET) 設施來進行缺氧組織造影，已普遍應用於體內腫瘤診斷及因急性心肌梗塞或腦中風所引起之局部器官或組織缺氧狀況之臨床診斷，且  $^{18}\text{F}$ -FMISO 亦被視為缺氧組織核醫造影診斷之 Golden Standard；加馬放射核種 (如鎝-99m、碘-123...等) 標誌核醫藥物，雖然在定量分析上不如 PET，然而幾乎所有醫院均可進行單光子發射電腦斷層掃描 (SPECT)，普及性及方便性較高，成本亦較低。

應用銅 (Cu) 之放射性同位素 (如  $^{61}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ ...等) 標誌 ATSM (diacetyl-bis- $\text{N}^4$ -methylthio-semicarbazone) 為最近發展之缺氧造影劑，其反應機制主要是利用  $\text{Cu}(2+) \rightarrow \text{Cu}(1+)$  的還原特性而留於缺氧組織，達到診斷 ( $^{64}\text{Cu}$ 、釋放  $\beta^+$  粒子，應用於 PET 造影) 或治療 ( $^{67}\text{Cu}$ 、釋放  $\beta^-$  粒子) 之目的。據 Lewis 等人於 1999 年研究報告指出：在體外細胞實驗中， $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 在中、低度缺氧細胞的攝取量遠較  $^{18}\text{F}$ -FMISO 與  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HL91 等為高，顯示  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 針對缺氧細胞產生聚集之專一性 (specificity) 佳。唯此藥物之缺點為 in vivo 穩定性較差 (因為體內之 Fe 會與 Cu 進行競爭性結合)，脂溶性太強 (partition coefficient=20)，造影時背景活度較強，目前美國華盛頓大學正積極進行人體臨床試驗中。

以  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標誌 nitroimidazole 之化合物主要分為  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BATO (boronic acid adduct of technetium dioxine)、PnAO (propylene amine oxine)、Schiff-base 與 BnAO (butylenes

amine oxine)等四類，如 BMS-181321 就是一個 PnAO 類的 nitroimidazole 的化合物，但因其脂溶性相當高，血液清除率慢，故背景活度較強，target/blood 比率僅 0.3，target/muscle 比率 3.5~4，因此臨床應用價值不大。HL91 為 1995 年由 Nicolini 等人利用鎘-99m 所標誌的核醫藥物，其結構屬 BnAO 類，此藥物水溶性極高(partition coefficient=0.1)，血液清除率較快，背景活度低，進入細胞之藥量相對也較低，因此敏感度 (sensitivity) 較差。不過，此藥因為標誌效率佳，穩定性好，目前世界已在進行 Phase III 臨床研究，相關的缺氧造影研究世界各國亦積極進行中。

理想的缺氧診斷藥物迄今尚未找到，遑論能夠實際的應用在人體缺氧部位之臨床診斷。為了研發此最理想之缺氧診斷藥物，本研究利用有機合成方式，將：

(1) 把 1 個的 2-nitroimidazole 官能機與 HL91 進行結合 (參見圖二)，利用 2-nitroimidazole ( $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2$ ) 與 Tc-99m (+5 $\rightarrow$ +4) 的雙重還原特性，因此可以合理的推測提高藥品的專一性 (specificity)；另因加入 2-nitroimidazole 後，降低藥品的極性，藉此提高藥物進入細胞內之藥量，進而提高藥品的靈敏度 (sensitivity)。

(2) 延長 HL91 之側鏈長度 (參見圖三)，側鏈長度越長，極性越低，故可增加 HL91 衍生物的脂溶性，適度的加長側鏈長度，將可提高藥品的 sensitivity，且並不至於增加太高的背景值。

上述二衍生物已順利合成與建立標誌技術，將使用種植神經膠質瘤 (glioma) 的小鼠與腦中風模式大鼠進行

PK、PD 研究，並使用 microSPECT/CT 進行造影，以評估新藥於腫瘤老鼠與腦中風老鼠之診斷效果。

#### 四、執行方法與進度說明

##### 1、材料

(1)、 HL91衍生物 (HL91-NI、HL91-ET) →核能研究所林正憲博士提供

(2)、 氯化亞錫( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、NaOH、HCl (12 N)、acetonitrile、Sodium Bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )、Tetrahydrofuran (THF)、Sodium acetate、n-octanol → 購自Merck公司 (試藥級)

(3)、  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  溶液 → 購自GMS公司

(4)、 SG-ITLC、1MM之paper chromatography → 分別購自Gelman Science 與Whatman公司

(5)、 Normal saline、注射用水 → 購自信東藥廠

(6)、 HPLC → Controller : WATERS 600型

UV-detector : WATERS 486型

Radio-detector : PACKARD 100型

Auto sampler : WATERS 717型

(7)、 PRP-1 column → 購自Merck公司

(8)、 放射薄層掃描分析儀 → Bioscan System 200

## Imaging scanner

(9)、 C57BL/6雄鼠 (8~12週、體重25~30公克) →購自

國科會動物中心

(10)、 microSPECT/CT →核能研究所

## 2、方法

### (一) HL91-NI、HL91-ET之標誌配方研究

1、 HL91衍生物 (HL91-NI或HL91-ET) 試藥小瓶的配方試

製

(1)、 取10mg的氯化亞錫( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )，溶於10mL HCl  
(0.1N)。

(2)、 秤取10mg之HL91-NI或HL91-ET，加入2mL的HCl  
(0.1N) 中。

(3)、 依照表一之內容，進行氯化亞錫與HL91-NI或  
HL91-ET之分配，做成7支不同配方之試藥小瓶。

表一、氯化亞錫與HL91-NI分配表

Vial編號	1	2	3	4	5	6	7
氯化亞錫含量 ( $\mu\text{g}$ )	0	1	2	3	5	10	30
HL91-NI含量 (mg)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
MDP含量 (mg)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

(4)、取1mL新鮮淘洗之 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 溶液 (2~10mCi) 注入裝有HL91-NI或HL91-ET及氯化亞錫之試藥小瓶 (內已含buffer及MDP)，搖晃使其充分反應後置於室溫下，在反應30分鐘後取樣，並利用快速薄層分析法 (ITLC)，配合選用不同極性的展開溶劑(如 normal saline與50% acetonitrile)來間接測量放射化學純度。

## 2. 鎇-99m錯化物的放射化學合成與放射化學純度分析

(1)酸鹼值 (pH)：將已確定配方之Kit小瓶以citrate buffer (0.1N, pH=5)、bicarbonate buffer (飽和液、pH=8.2)、phosphate buffer (0.1N, pH=8) 與NaOH (0.1N、pH=13)，分別調整溶液於弱酸性 (citrate buffer)、弱鹼性 (bicarbonate buffer、phosphate buffer) 與強鹼性

(NaOH) 之環境，然後再添加 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液，於室溫下反應30分鐘，以ITLC測試 $^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 或 $^{99m}\text{Tc-HL91-ET}$ 之標誌效率，探討pH對於標誌效率之影響。

(2) Radio-HPLC分析：選用reverse phase的PRP-1

column，mobile phase則使用含50mM sodium acetate的注射用水(A溶液)與tetrahydrofuran (THF)(B溶液)兩種不同極性的物質。以syringe抽取 $^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 或 $^{99m}\text{Tc-HL91-ET}$ 各1~5  $\mu\text{L}$ 樣品(約1~5  $\mu\text{Ci}$ )後，注入HPLC，於開始時使用100% A溶液，以梯度(gradient)逐漸改變的方式於17分鐘時轉變為100% B溶液，流速為1 mL/min。利用HPLC的高解析度，可以判定快速薄層分析法(ITLC)的準確度。

(3) 本配方HL91-NI或HL91- ET kit可承受之 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 活度測定：將已確定配方之Kit小瓶經以 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液(10~50mCi)標誌後，以ITLC測 $^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 或 $^{99m}\text{Tc-HL91-ET}$ 標誌產率，測試研究Kit小瓶最高可以承受多少活度的 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 標誌。

### 3. In vitro細胞測試

(1) 培養glioma cell line於6 well的plate上，當細胞量約為

$1 \times 10^7$ 時，開始進行實驗。

(2)利用PROOX儀器(如圖四)以控制培養箱的含氧量(1%、5%、20%)，然後將上述含有glioma cell line的plate，置於不同含氧量的培養箱內(如圖五)，使用Oxymeter進行細胞培養環境的含氧量監控，確認空氣中含氧量為設定值。

(3)於上述細胞培養基上添加約 $100 \mu\text{Ci}$ 的 $^{99\text{m}}\text{Tc-HL91}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc-HL91-NI}$ 或 $^{99\text{m}}\text{Tc-HL91-ET}$ ，混合均勻，然後於固定的時間點(15min、30min、1 hr、2hr)，以pipetman吸取DMEM培養基至一試管，殘留之細胞以PBS清洗3次後，加入trypsin反應15~20分鐘，以便將細胞從培養皿底部打下來，收集這些打下來的細胞，置入另一支試管內分別收集培養基與細胞，以 $\gamma$ -counter分別量測培養基與細胞的放射活度，計算不同時間點的細胞/培養基ratio。

#### 4. 瘤鼠之in vivo生物體分佈試驗

(1)將約 $5 \times 10^6$ 的glioma cell line以皮下注射的方式注入裸鼠下背部接近腿部的位罝，待腫瘤長至約0.5~1.0 cm時，即可開始進行試驗。

(2)將上述裸鼠放入老鼠架內，由尾靜脈注射約0.1~0.2 mCi 的<sup>99m</sup>Tc-HL91-NI或<sup>99m</sup>Tc-HL91- ET，於不同的時間點 (30min、1hr、2hr、4h)(n=3)利用氣麻機以isofuran 麻醉裸鼠後，至於microSPECT/CT上進行造影，完成後立即犧牲裸鼠，取出體內各主要器官、肌肉、血液與皮膚...等，以電子天平與 $\gamma$ -counter分別秤重與量測放射活度，並加以記錄。

5. 腦部缺氧模式：

1) 動物：採用 Spontaneous hypertensive rat (SHR) (20)，體重約 320-400 克重。

2) 實驗步驟：

A. 以 5% halothane 麻醉，然後以 1.0-2.5% halothane 維持 Surgical anesthesia。

B. 採用 3-mm trephine 執行 craniectomy，找到中腦動脈，以 electrocautery in tandem 加以阻塞，並且將同側內頸動脈綁起來。

待 rat 恢復清醒後 3 小時，以 0.5-1.0% halothane 再將 rat 麻醉，於靜脈注射<sup>99m</sup>Tc- HL91-NI (約 0.5mCi)，30 分鐘後進行 SPECT 造影。

D. 核醫造影檢查：利用 EzScope 於腦部進行造影，採用 Region-of-interest(ROI)影像分析，將 ROI 置於患處，另一個 ROI 置於對側正常處，進行核醫造影檢查的影像分析。

## 五、結果

### 1、HL91試藥小瓶配方最佳化試驗結果

依據表一的配方內容進行<sup>99m</sup>Tc標誌，並用SG-ITLC法進行放射化學純度分析，根據實驗之結果可以看出，在HL91-NI配位子僅0.2mg時，當氯化亞錫（SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O）量由0 μg逐漸增加至30 μg時，free-Tc量逐漸減少，在5 μg之後就沒有出現；相對的，水解還原銻（TcO<sub>2</sub>）在亞錫量逐漸增加後亦逐漸增加，當亞錫量在30 μg達最大值。綜合二者之結果，可以看到只有在亞錫量2 μg時，free-Tc量與TcO<sub>2</sub>皆為0。

綜合上述之實驗結果，故將kit小瓶暫訂之配方為亞錫量2.0 μg，HL91-NI配位子為0.2mg。

#### 1.1、<sup>99m</sup>Tc-HL91-NI放射化學純度分析結果

HL91-NI kit經以Tc-99m標誌後，選用2種不同極性的solvent（normal saline與50% acetonitrile）當作展開劑，分別於SG-ITLC與Whatman#1層析紙為固定相進行層析分離。

以normal saline為solvent的分析所得層析圖（圖六）發現於solvent front並無peak出現，表示並無free-Tc出現；以50% acetonitrile為solvent的分析所得層析圖（圖七）發現於solvent original出現少量peak，表示僅有少量（4.32%）reduced-Tc出現，由此可知， $^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 的放射化學純度可以 $>95\%$ ，效果相當良好。

1.2、pH：以上述配方製備之kit小瓶，於不同酸鹼度下進行 $^{99m}\text{Tc}$

標誌，結果如圖八所示。當pH=5時，free-Tc量大量出現，但無 $\text{TcO}_2$ 存在；當pH=10時，free-Tc量仍有少量出現，且亦無 $\text{TcO}_2$ 存在；但當pH=8時，free-Tc與 $\text{TcO}_2$ 皆為0。由此可以得知，kit配方內需添加碳酸氫鈉（Sodium bicarbonate）以調整溶液為弱鹼性，如此即可提高藥物之標誌效率。

此實驗曾選用屬於弱鹼性（pH=8.1）之磷酸鹽緩衝液（phosphate buffer）調劑，並進行藥物標誌，但發現標誌結果並不好，此更證實碳酸氫鈉

（Sodium bicarbonate）是較理想之選擇。

1.3、高活度 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液分析結果：將已確定最佳配方之Kit

小瓶經以 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液（10~50mCi）標誌後置於室

溫（20~30°C）之環境，其結果（圖九）可以看出：  
kit內加入free-Tc放射活度從1mCi~10mCi皆不影響  
其標誌效率，但若活度超過10mCi，free-Tc開始出現。

1.4、HPLC分析結果：當以reverse phase的PRP-1 column，  
mobile phase溶劑選擇強極性的注射用水（含50mM  
sodium acetate）與弱極性的tetrahydrofuran（THF），以  
梯度（gradient）的方式進行分析。

在HPLC的展開圖（圖十）可見只在11.51分鐘處有一  
主要peak存在，於3.02分鐘處則有一小peak，顯示  
<sup>99m</sup>Tc-HL91-NI的標誌效率>98%，此結果驗證SG-ITLC分  
析結果之正確性。

於以上之結果，證實可以利用迅速且方便之  
SG-ITLC層析法來進行藥物標誌效率之鑑定，並可以完全  
取代複雜、昂貴且操作不方便之HPLC分析法，節省許多  
之成本、時間與精力。

## 2、in vitro細胞試驗

2.1、將glioma cell line培養盤置於37°C之二氧化碳培養  
箱中，利用PROOX系統控制培養箱內氧氣含量為

1%、5%與20%，加入藥物各約0.01mCi，混合均勻，於反應後固定時間後處理與計算cell/media放射活度比例，結果如圖十一所示：

$^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 於重度缺氧（1% $\text{O}_2$ ）的細胞內確實有最高的細胞吸收量，且於反應30分鐘後即可達到最大量，而後隨著時間的延長逐漸下降。而隨著培養箱內氧氣含量的增加，細胞吸收的藥物量確實有減少狀況，尤其在正常含氧量（20% $\text{O}_2$ ）的環境下，藥物的細胞吸收量並未隨著時間的改變而明顯的改變。

$^{99m}\text{Tc-HL91-ET}$  的in vitro細胞試驗結果（如圖十二）趨勢與 $^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 類似，細胞的藥物吸收量皆與氧氣的含量多寡有明顯的負相關。

綜合上述兩種藥物的in vitro試驗結果，並與早期研發的 $^{99m}\text{Tc-HL91}$ 的in vitro試驗結果進行彙整（如圖十三），可以明顯的看出：在1%氧氣量的環境下， $^{99m}\text{Tc-HL91-ET}$ 有最高的細胞藥物吸收量， $^{99m}\text{Tc-HL91-NI}$ 次之， $^{99m}\text{Tc-HL91}$ 最差；在20%的氧氣環境下，三種藥物的細胞藥物吸收量差異

則較不明顯。

### 3、in vivo生物體分佈實驗

#### 3.1 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI 實驗結果

以種有glioma腫瘤的小鼠，經由尾靜脈的途徑將約0.1~0.2mCi的 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI注入小鼠體內，於不同的時間點以microSPECT/CT進行造影，並將SPECT影像與CT影像利用電腦軟體加以融合（image fusion）（影像如圖十四），確認藥物聚集的位置，結果發現 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI雖然在肝臟與甲狀腺位置有明顯的藥物吸收，可以在腫瘤位置亦確實有藥物的吸收，經儀器圈選腫瘤處興趣區（ROI）計算其T/NT值達3.5，此數據表示此藥具有臨床診斷之價值。

#### 3.2 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET實驗結果

同樣的，以上述種有glioma腫瘤的小鼠，經由尾靜脈的途徑將約0.1~0.2mCi的 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET注入小鼠體內，於不同的時間點以microSPECT/CT進行造影，並將SPECT影像與CT影像融合（影像如圖十五）後，結果發現 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET同樣在肝臟與甲狀腺位置有明顯的藥物吸收，可以在腫瘤位置亦確實有藥物的吸收，經儀器圈選腫瘤處興趣區（ROI）

計算其T/NT值達4.2，此數據表示此藥之造影結果較具<sup>99m</sup>Tc-HL91-NI為佳，也符合in vitro試驗的結果，未來此藥應更具有更高的臨床診斷價值，值得更進一步的研究。

### 3.3 腦中風模式老鼠實驗結果

Spontaneous hypertensive rat在執行 craniectomy，找到中腦動脈，以electrocautery in tandem加以阻塞，並且將同側內頸動脈綁起來，於靜脈注射<sup>99m</sup>Tc- HL91-NI (約0.5mCi)，利用EzScope進行腦部造影，採用Region-of-interest(ROI)影像分析，將ROI置於患處，另一個ROI置於對側正常處，核醫造影檢查的影像分析，經過3小時後，其腦部target/background ratio可達2.52 (圖十六)，證實Tc-99m-HL91-NI確實可以進入腦缺氧部位。

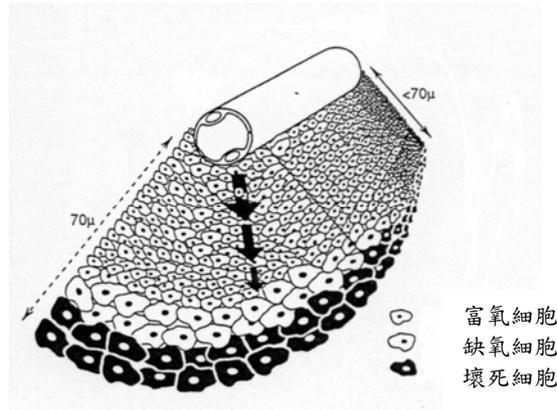
## 六、結論與建議

目前臨床研究之缺氧造影劑(如  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91 與  $^{18}\text{F}$ -FMISO)，大部份只適用於重度缺氧條件的缺氧組織造影診斷，可是體內大部分之腫瘤、心臟心肌梗塞或腦中風等病灶，大都屬於中、低度缺氧，因此診斷之效果有限， $^{64}\text{Cu}$ -ATSM (diacetyl-bis- $\text{N}^4$ -methylthio-semicarbazone) 之體外缺氧細胞攝取實驗結果，顯示其應為較適合中、低度缺氧之造影診斷藥物，但體內實驗結果卻只與  $^{99m}\text{Tc}$ -HL91 和  $^{18}\text{F}$ -FMISO 等缺氧造影劑相當。本研究利用有機合成的方式，結合 HL91 與 FMISO 的主要結構，形成全新配位子 HL91-NI，目前實驗結果已藥物之標誌技術建立，in vitro 的實驗結果證實藥物確實可以選擇性的進入缺氧部位，且藥物進入細胞之量較過去 HL91 為高，in vivo 結果也證實 HL91 衍生物可以進入缺氧部位，包含腫瘤與腦中風之缺氧組織中。

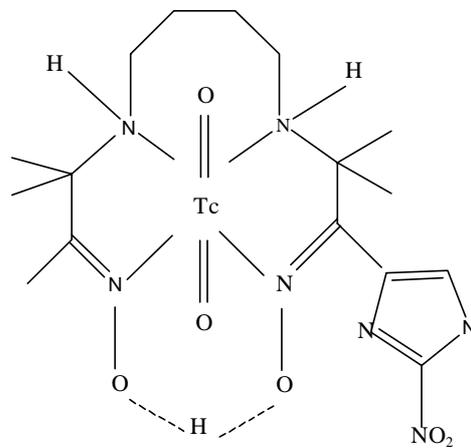
利用可以放射  $\beta^-$  粒子之放射性核種 Re-188 (能量 2.1 MeV、半衰期 17 小時，可以穿透之距離約為 4.4mm) 與新配位子 HL91-NI...等進行標誌，未來可以考慮利用  $\beta^-$  粒子的能量穿透特性，結合 HL91 衍生物之優點，進行腫瘤近接治療，未來具有相當之研發潛力。

## 七、附圖

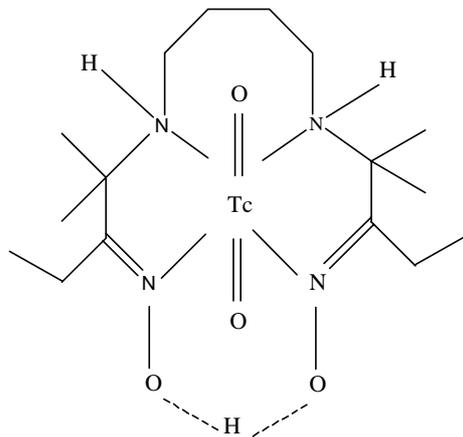
圖一、血管擴散氧氣示意圖：距離血管越遠，氧分壓越低，最後產生缺氧或壞死



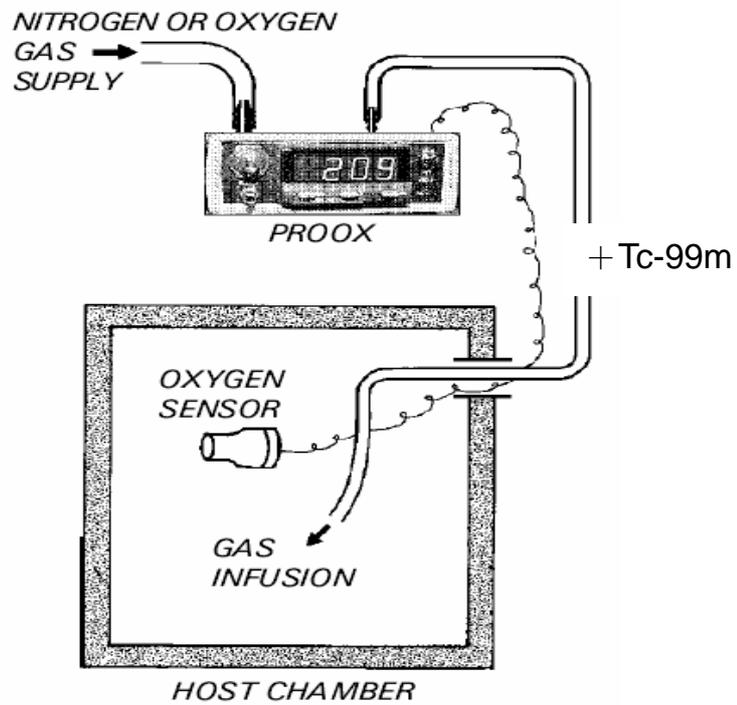
圖二、 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI (HL91+2-nitroimidazole) 結構示意圖



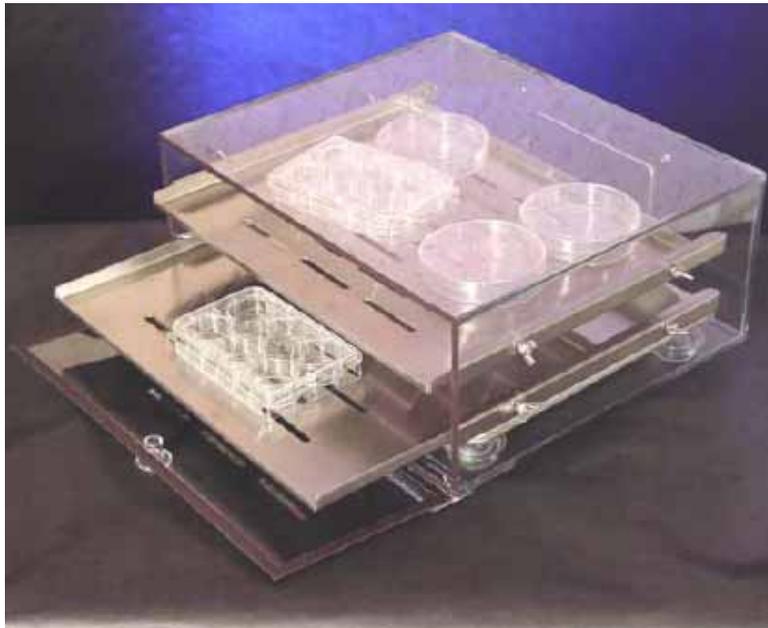
圖三、<sup>99m</sup>Tc-HL91-ET (HL91+poly-C-sidechain) 結構示意圖



圖四、PROOX儀器監控氧氣設計原理

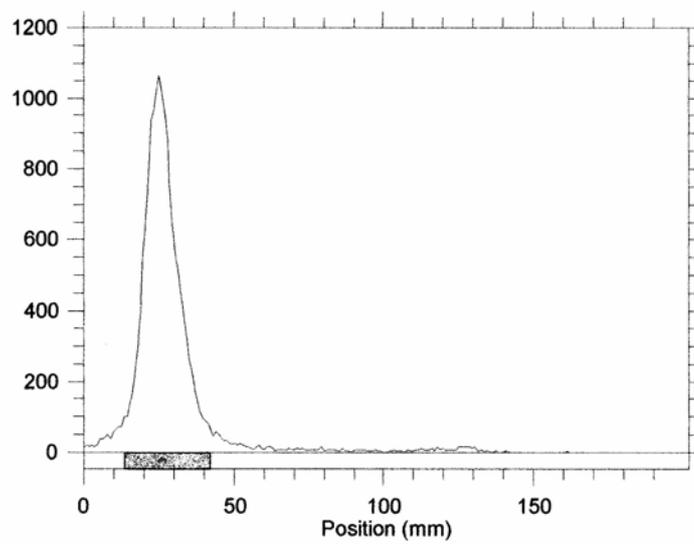


圖五、細胞實驗培養箱



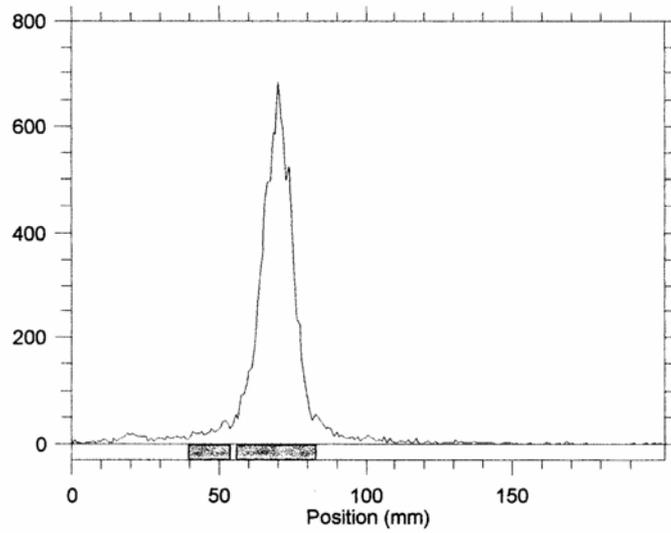
圖六、SG-ITLC層析圖

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	13.4	42.2	26.2	0.062	15039.0	15039.0	88.79	100.00
1 Peaks					15039.0	15039.0	88.79	100.00

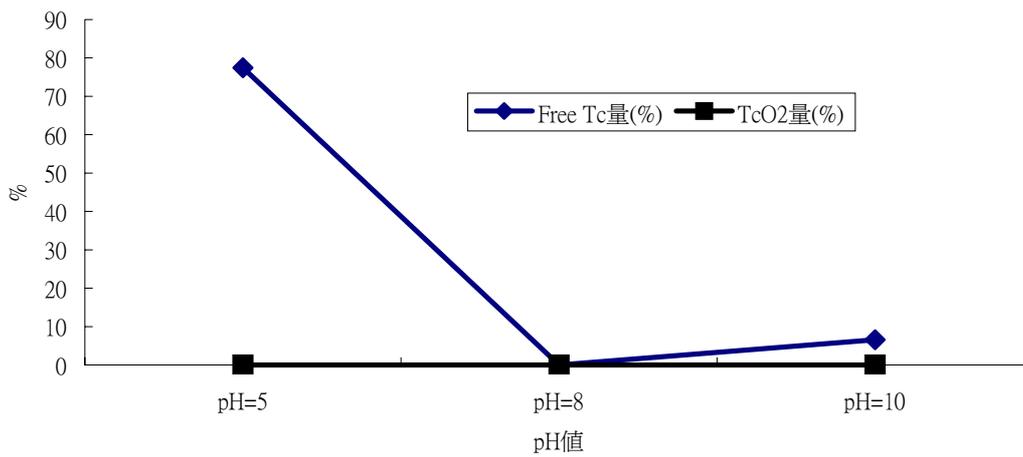


圖七、Whatman #1層析圖

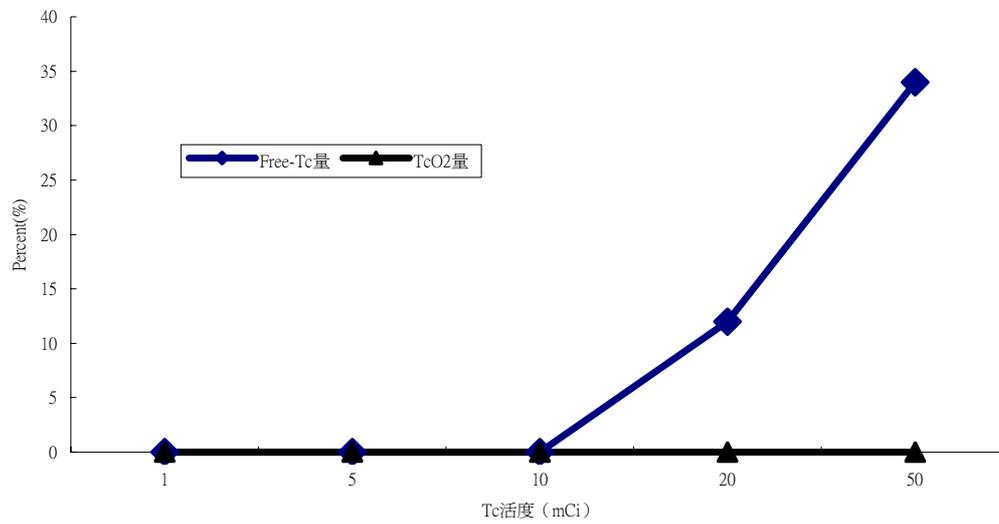
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	39.5	53.9	47.6	0.345	405.0	405.0	3.81	4.32
Rgn 2	55.7	82.8	69.6	0.620	8962.0	8962.0	84.21	95.68
2 Peaks					9367.0	9367.0	88.02	100.00



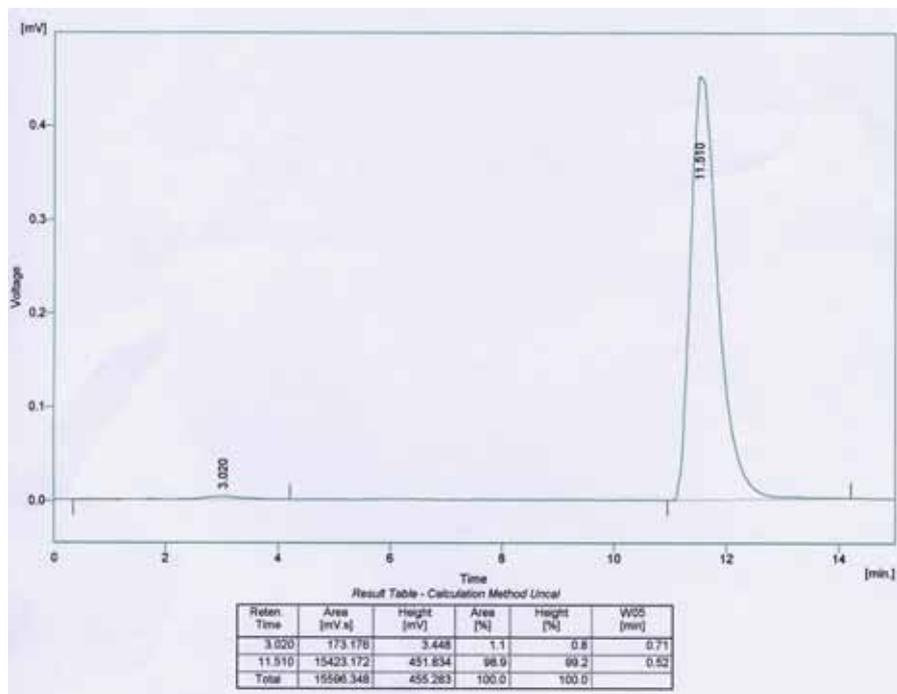
圖八、pH對於標誌效率之影響



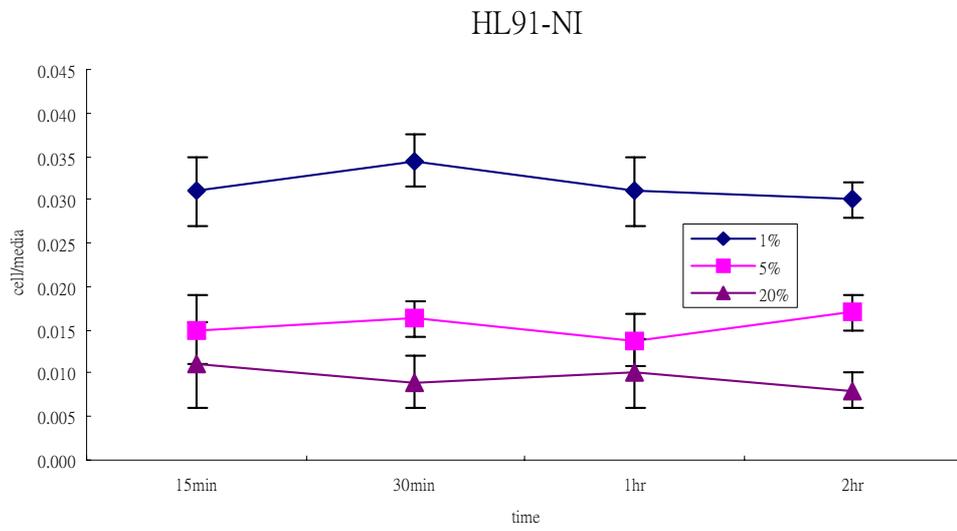
圖九、kit標誌活度之影響



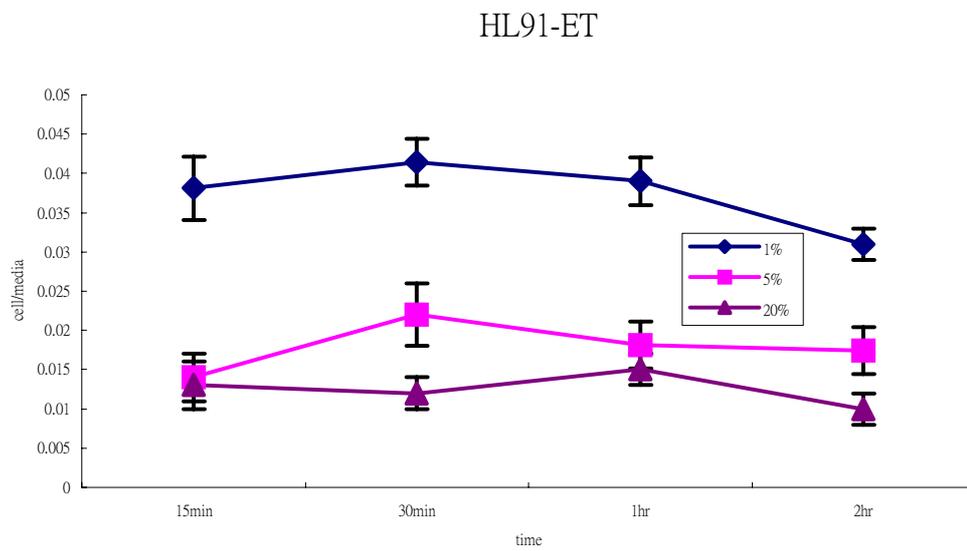
圖十、radio-HPLC層析圖



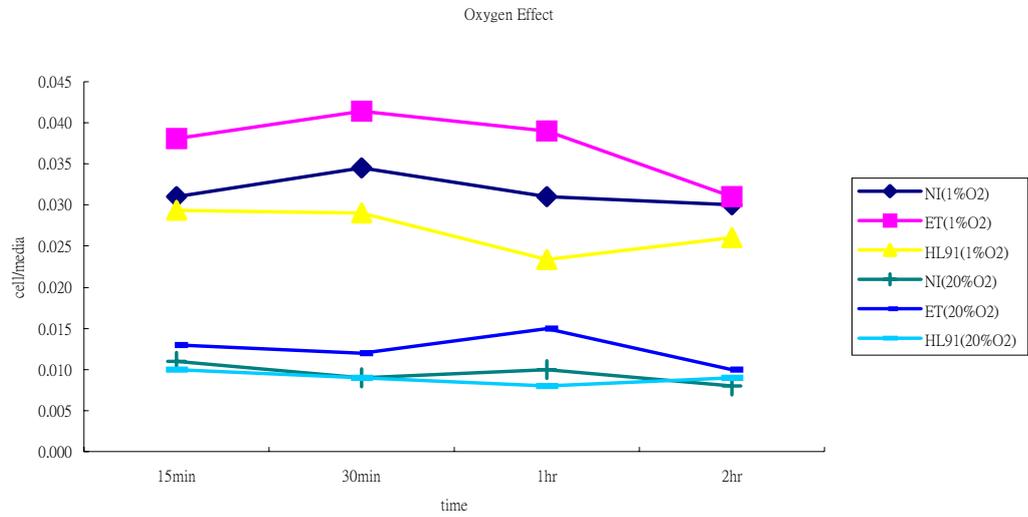
圖十一、 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI細胞試驗圖



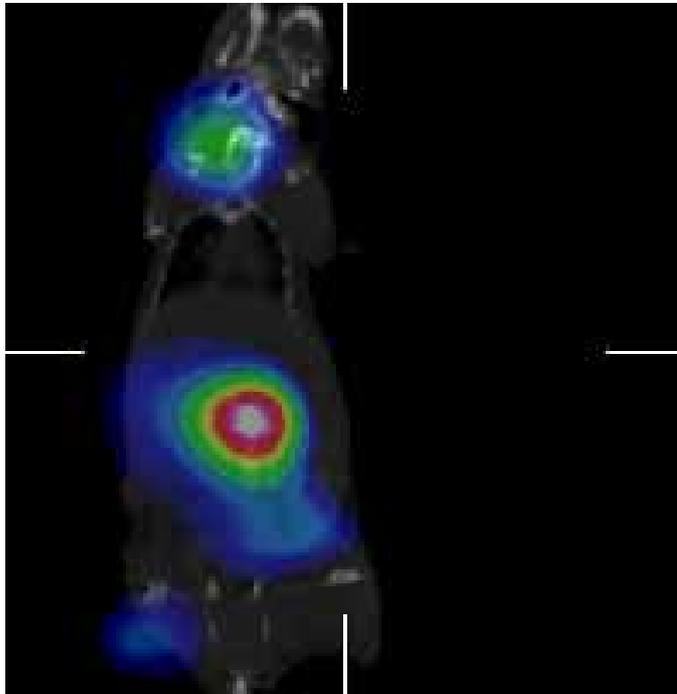
圖十二、 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET細胞試驗圖



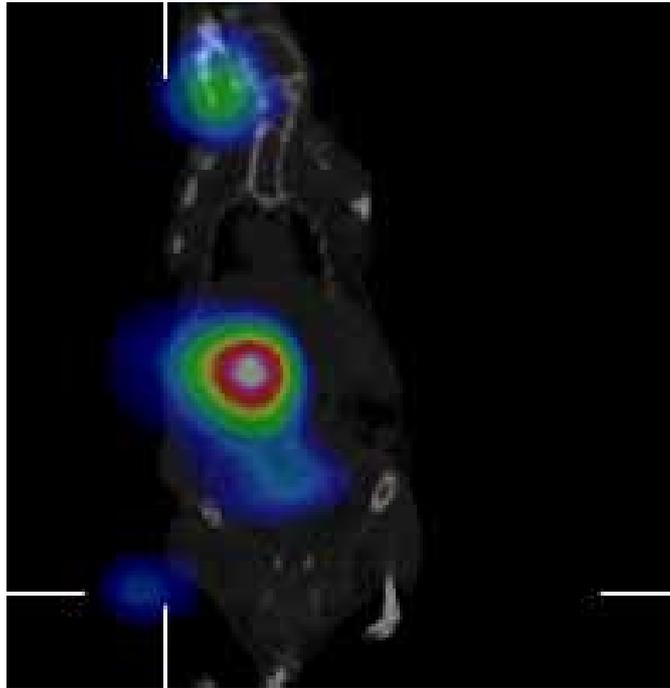
圖十三、三種藥物之細胞試驗結果



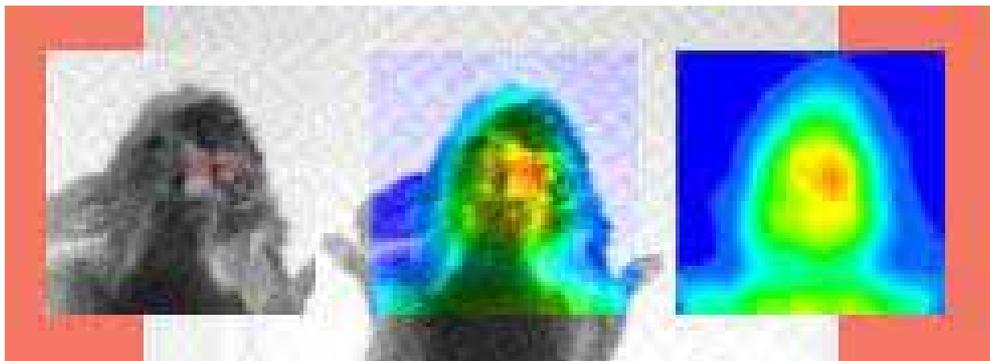
圖十四、 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-NI 之microSPECT/CT造影圖



圖十五、 $^{99m}\text{Tc}$ -HL91-ET 之microSPECT/CT造影圖



圖十六、腦中風模式動物造影圖



## 八、參考文獻

1. Hockel M, Schlenger K, Mitze M, Scha"ffer U, Vaupel P. Hypoxia and radiation response in human tumours. *Semin Radiol Oncol* 1996; 6: 3-9.
2. Brown JM. Hypoxic cell radiosensitisers: Where next? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16 :987-993.
3. Mannan RH, Somayaaii VV et al. Radioiodinated 1-(5-iodo-5'-deoxy-D-arabinofuranosyl)-2-nitronidazole(iodo azomycin arabinoside:IAZA): a novel marker of tissue hypoxia. *J Nucl Med* 1991;32 :1764-1770.
4. Biskupiak JE, Grierson JR, Rasey JS et al. Synthesis on an (iodovinyl)Misonidazole derivative for hypoxia imaging. *J Med Chem* 1991; 34:2165-2168.
5. S.H. Yeh, L.C. Wu, R.S. Liu, D.J. Yang, S.H. Yen, T.W. Yu, 'Fluorine-18 fluoromisonidazole([F-18]-FMISO) tumor : muscle retention ratio in detecting hypoxia in nasopharyngeal carcinoma ' ,NPCC 1992-1997
6. R.S.Liu, S.H.Yeh, W.Y.Guo, D.H.C.Pan, L.S.Lee, L.S.Chu, C.P.Chang, J.K.Wang, and L.C. Wu, Detection of cerecral hypoxia in arteriovenous malformation (AVM) by [F-18]fluorodeoxyglucoses(FMISO) ,NPCC 1992-1997.
7. R.S.Liu, S.H.Yeh, C.P.Chang, J.K.Wang, L.C.Wu, K.L.Chou, C.W.Chang, H.M. Lin, and L.S. Lee,'[F-18] fluoromisonidazole PET scan in meningioma', NPCC 1992-1997
8. R.S.Liu, S.H.Yeh, W.Y.Guo, D.H.C.Pan, L.S.Lee, L.S.Chu, C.P.Chang, J.K.Wang, and L.C. Wu, Detection of cerecral hypoxia in arteriovenous malformation (AVM) by [F-18]fluorodeoxyglucoses(FMISO) ,NPCC 1992-1997.
9. R.S.Liu, S.H.Yeh, C.P.Chang, J.K.Wang, L.C.Wu, K.L.Chou, C.W.Chang, H.M. Lin, and L.S. Lee,'[F-18] fluoromisonidazole PET scan in meningioma', NPCC 1992-1997
10. Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, et al. Quantifying regional hypoxia in human with positron emission tomography of [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology,*

- Physics. 1996; 36: 417-428.
11. Jason S Lewis, Deborah W. McCarthy et al, evaluation of 64-Cu-ATSM In Vitro and In Vivo in a Hypoxic Tumor Model. J Nucl Med 1999; 40: 177-183.
  12. Philip J. Blower, Jason S. Lewis et al, Copper Radionuclides and Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. Nucl Med & Bio 1996; 23 : 957-980.
  13. Deborah W. McCarthy, Laura A. Bass, Michael J. Welch et al, High Purity production and Potential Applications of Copper-60 and Copper-61. Nucl Med & Bio, 1999; 26: 351-358,.
  14. Hoffman JM, Rasey JS. Binding of the hypoxia tracer 3H-misonidazole in cerebral ischaemia. Stroke 1987;18:168-176.
  15. Garrecht BM, Chapman JD. The labeling of EMT-6 tumors in BALB/C mice with <sup>14</sup>C-misonidazole. Br J Radiol 1983; 56:745-753.
  16. Ballinger JR, Kee JWM, Rauth AM. In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labelled 2-nitromidazole (BMS181321) as a marker of tumor hypoxia. J Nucl Med 1996; 37: 1023-1031.
  17. Cook GJR, Barrington S, Houston S, Maisey MN, Fogelman I. HL-91, a new Tc-99m-labelled agent with potential for identifying tumor hypoxia: correlation with FDG PET. J Nucl Med 1996; 37: 87P-88P.
  18. Brauers G, Archer CM, Burke JF. The chemical characterization of the tumor imaging agent 99mTc-HL91. Eur J Nucl Med 1997; 24: 943.
  19. Cook GJR, Houston S, Barrington SF, Fogelman I. Technetium-99m-labelled HL-91 to identify tumor hypoxia: correlation with fluorine-18-FDG. J Nucl Med 1998; 39: 99-103.
  20. Vaupel, P., Schlenger, K. Knoop, C. et al. Oxygenation of Human Tumors: Evaluation of Tissue Oxygen Distribution in Breast cancers by Computerized O<sub>2</sub> Tension Measurements. Cancer Res. 1991;51:3316-3322.
  21. Hockel M, Schlenger K, Knoop C and Vaupel P. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: Evaluation

- by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res* 1991;51:6098-6102.
22. Kallinowski F, Zander R, Hoeckel M and Vaupel P. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO<sub>2</sub>-histography. *Int J Radiation Oncology Biol* 1990;19:953-961.
  23. Stone, H.B. Brown, J.M. Philips, T.L. and Sutherland, R.M. Oxygen in human Tumors: Correlation's between methods of Measurement and Response to Therapy. *Rad Res.* 1993;136:422-434.
  24. Webster LT. Drug used in chemotherapy of protozoal infections. In: Gilman AG, Rall TW, Niles AS, Taylor P, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, 8<sup>th</sup> edn. New York:Pergamon; 1990;1002-1004.
  25. Adrian Nunn,Karen Linder,H.William Strauss, Nitroimidazoles and imaging hypoxia , *Eur J Nucl Med* 1995; 22:265-280.
  26. Chapman JD, franko AJ. A marker for hypoxic cells in tumors with potential clinical applicability. *Br J Cancer* 1981;43 :546-550.
  27. P. Winnard, Jr., F. Chang et al. Preparation and Use of NHS-MAG3 for Technetium-99mLabeling of DNA. *Nuclear Medicine & Biology*, Vol. 24, pp. 425-432, 1997.
  28. David Lando<sup>1</sup>, Jeffrey J. et al. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur. J. Biochem.* 270, 781 – 790 (2003)