

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

腫瘤標靶新藥 MH-01 之開發與探討

Development and Evaluation of Novel MH01 for Tumor Targeting

計畫編號：1062001INER021

受委託機關(構)：國立陽明大學生物醫學影像暨放射科學系

計畫主持人：陳傳霖 博士

聯絡電話：28267062

E-mail address：clchen2@ym.edu.tw

協同主持人：

研究期程：中華民國 106 年 2 月至 106 年 12 月

研究經費：新臺幣 93 萬元

核研所聯絡人員：李銘忻博士

報告日期：106 年 11 月 30 日

目 錄

目 錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計畫緣起與目的.....	3
一、表徵遺傳學.....	3
二、HDAC 抑制劑.....	4
三、HDAC 正子造影劑.....	6
四、研究目的.....	7
貳、研究方法與過程.....	9
一、使用的材料及儀器設備.....	9
(一) 放射藥物標誌.....	9
(二) 細胞實驗材料.....	9
(三) 實驗動物.....	10
(四) 儀器設備.....	10
二、研究方法.....	11
(一) 前驅物光譜鑑定.....	11
(二) F18-MH01 放射化學標誌及分析.....	12
(三) 放射性藥物之品管.....	13
(四) F18-MH01 藥物穩定性測試.....	14
(五) 細胞培養.....	14
(六) 細胞攝取實驗.....	14
(七) 荷腫瘤小鼠模式建立.....	15
(八) 生物分佈實驗.....	15
(九) 正子造影實驗.....	16
參、主要發現與結論.....	16
一、標誌前驅物 $^1\text{H-NMR}$ 光譜分析.....	16
二、MH01 放射化學標誌及分析.....	17
三、F18-MH01 藥物穩定性測試.....	20

四、F18-MH01 於腦腫瘤之細胞攝取實驗.....	21
五、F18-MH01 於荷有腦腫瘤之小鼠生物分佈.....	22
六、F18-MH01 於荷有腦腫瘤小鼠正子影像.....	23
七、結論.....	24
肆、參考文獻.....	28

中文摘要

組蛋白去乙酰基酶抑制劑是一類有潛力的藥物可運用於癌症治療上。研究發現 MH01 對 HDAC1 有不錯的專一性($IC_{50} \sim 32nM$)，因此發展 F-18 標誌的 MH01 應有潛力作為組蛋白去乙酰基酶之腫瘤正子造影劑，本研究成功完成 F-18 MH01 的放射化學標誌及純化分離，放射化學產率約 $15 \pm 3.3\%$ ，放射化學純度 $\geq 95\%$ 。兩種腦腫瘤細胞株 U87MG 及 GBM8401 對於此一示蹤劑的攝取量有明顯的不同，在兩小時的時間點，U87MG 對此藥物有顯著的攝取 ($11.92 \pm 0.37\% \text{ uptake}/10^5 \text{ cell}$)。在荷有 U87MG 及 GBM8401 的小鼠動物模式中，此藥物在正常器官中皆有高積聚，此結果可能與正常組織的 HDAC 表現相關，在腫瘤生物分佈及正子造影結果顯示，此藥物對於 U87MG 腫瘤對有不錯之造影結果，在兩小時時間點其 T/M 及 T/B 分別為 2.60 ± 0.20 及 3.04 ± 0.49 ，但若是對於原位 U87MG 腦腫瘤模式，因為腦部的高攝取也相當高，此一 F-18 MH01 可能不適合作為原位腦腫瘤正子造影使用。

Abstract

Histone Deacetylase inhibitors are a class of potential drugs that can be used in the treatment of cancer. Prior study found that MH01 has a good specificity ($IC_{50} \sim 32\sim 76$ nM) for HDAC1 and HDAC2, so the development of F18-labeling MH01 should have potential as histone deacetylase tumor PET imaging tracer. In this study, we prepared the F-18 MH01 and purified successfully. The radiochemical yield of F-18 MH01 is about $15 \pm 3.3\%$ and radiochemical purity $\geq 95\%$. Two tumor cell lines U87MG and GBM8401 were applied for in vitro and in vivo study. The significantly different at two hours for U87MG had a significant uptake of this tracer ($11.92 \pm 0.37\%$ uptake / 105cell). In animal models of U87MG and GBM8401 bearing mice, this tracer has high accumulation in the normal organs, and this result may be related to HDAC performance in normal tissues. The biodistribution and positron emission tomography imaging also showed that the F-18 MH01 possess nice T/M and T/B ratio of 2.60 ± 0.20 and 3.04 ± 0.49 after two hours injection in U87MG bearing mice, respectively. Due to the high brain uptake, F-18 MH01 may be not suitable as PET imaging agent for orthotopic U87MG glioblastoma.

壹、計畫緣起與目的

一、表徵遺傳學

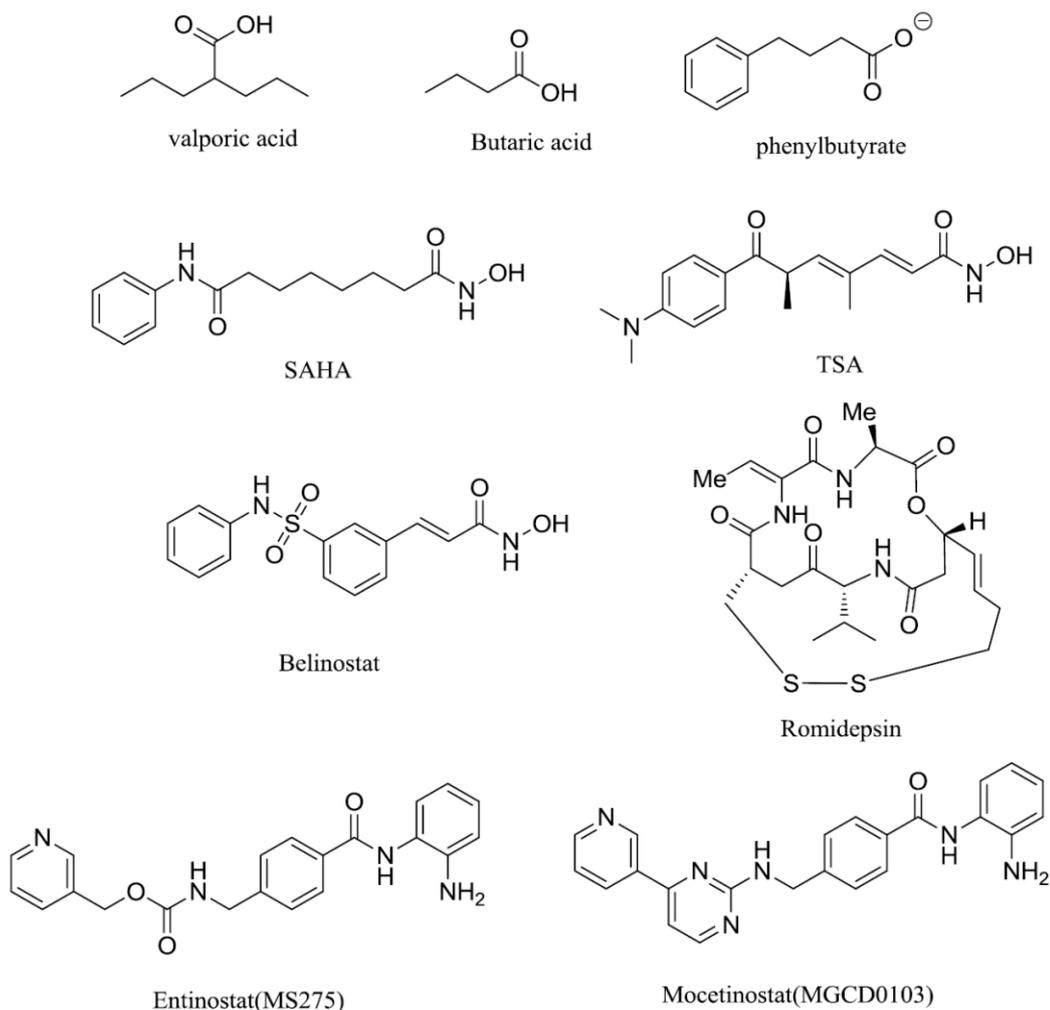
表徵遺傳學(epigenetic)，是研究基因如何調控表現及疾病的發病機制的一門重要科學，其所影響因子包含甚廣，如日常飲食及習慣、環境中的暴露性化學物質、成長過程中的事件、使用的藥物及老化等，皆對於其個體基表現有所影響。由於這些因子的加成作用，進而調控與改變了基因表現的機制，像是組蛋白的甲基化與去乙酰化的雙向作用，可以調控核小體，組蛋白影響纏繞於染色體的鬆緊纏繞的緊密程度，當 DNA 纏繞鬆弛態時，其轉錄分子即能裸露出結合位，進而能與轉錄體結合，開始進行其轉錄與轉譯功能，最後完成基因表現。以抑癌基因為例，當去乙酰化作用過度活化時，由於與染色體纏繞緊密程度，造成抑癌基因的低度表現，進而引發癌症風險的增加。因此若使用去乙酰酶抑制劑，藉由抑制其去乙酰酶功能時，便能提高其抑癌基因表現，以減低癌症引發的風險。因此表徵遺傳學可以說是目前的生物醫學研究中的重要研究領域的一環。而組蛋白之去乙酰基酶(HDAC)表現，亦是此一領域研究重要的一部分，特別在抗癌治療上有廣闊的前景。在許多近期實驗的數據也發現組蛋白去乙酰基酶表現與否，與心肌疾病及中樞神經功能退化上，也有高度之關聯性。利用組蛋白去乙酰酶阻斷劑，在癌症的相關研究上，目前也有相當顯著的報導，近年來，HDACs 變得越來越引起興趣，能作為治療的標靶使用，由於其具有逆轉的潛力與癌症相關的異常

表徵遺傳發展。Bolden 等人在 2006 年，研究癌細胞株及腫瘤中，在其乙醯化量與 HDAC 酶表現有明顯的變化。另外 Pandolfi 等人，在血液惡性腫瘤研究上，異常 HDACs 在腫瘤發生關連上具有重要的角色作用。另外 Minucci 和 Pelicci 的研究中，急性前骨髓細胞白血病(Acute promyelocytic leukemia)是第一個模型疾病，其中 HDACs 參與癌症發病在可在分子層次上顯示。在 100% 的患者顯示，皆有形成白血病的視黃酸受體- α 與前骨髓細胞銻基團或其他蛋白質的融合蛋白。這些融合蛋白含有 HDAC 的抑制複合物，其組成來自抑制專一的的特異性靶蛋白表達。

二、HDAC 抑制劑

根據過往的研究，HDAC1、HDAC2、HDAC3 跟 HDAC6 在體內的不正常表現可能疾病發生有密切的關聯。因此組蛋白去乙醯酶阻斷劑，是一種有潛力作為藥物開發對抗疾病的一類藥物，目前發現許多不同特定類型的結構藥物，可作為組蛋白去乙醯酶阻斷劑，包括；長鏈脂肪酸結構(aliphatic acid)如 phenylbutyrate, valporic acid 等，另外還有具有 hydroxamate 結構，cyclic tetrapeptides 結構及 benzamide 結構等類似物，皆發現能夠做為此類組蛋白去乙醯酶阻斷劑使用，Trichostatin A (TSA) 是一個具有 hydroxamate 結構衍生的抑制劑，發現可作為 Class I 與 II 的 HDAC 結合，它可以廣泛對於 HDACs 1, 3, 4, 6 and 10 等組蛋白去乙醯酶具有相當不錯的抑制效果，其對上述

TSA 對於的組蛋白去乙酰酶的 IC₅₀ 約 20 nM 左右，但在進入臨床三期研究時，由於毒性較高而無法進入後續臨床使用。SAHA (suberanilohydroxamic acid, Vorinostat) 為 TSA 的類似物，此一化合物已在 2006 年通過 FDA 核可，其具有相似的抑制能力，目前可作為皮膚 T 細胞淋巴瘤 cutaneous T cell lymphoma (CTCL) 臨床使用。除 Vorinostat 外，Belinostat 是另一個相似的化合物，並於 2014 年由美國 FDA 通過用來做為週邊 T 細胞淋巴瘤 (Peripheral T-cell lymphoma) 治療使用。除了 hydroxamate 結構的 HDAC 抑制劑外，環狀的四肽 (cyclic tetrapeptides) 化合物 Romidepsin 也是另一個 FDA 在 2009 年通過的 HDAC 抑制劑，它是由紫色色桿菌 (Chromobacterium violaceum) 所單離出來，是一個具有特殊的環狀的肽結構的抑制劑。最後一類是苯甲酰胺類 (benzamide) 化合物結構的抑制劑，如 entinostat 及 mocetinostat 等，其中 entinostat 對於組蛋白去乙酰酶的抑制能力是較具專一性的，分別對於 HDAC1 及 HDAC3 其 IC₅₀ 約 0.5 μ M 及 1.7 μ M。在 Yong 等人發表在 Oncotarget 的文獻發現，此藥物於肺癌的病人治療上，可以對於 Oncofetal protein SALL4 有標靶性，因此可以用來針對具有 SALL4 表現的病人進行治療。目前此一藥物已在臨床二期，三期的研究，針對 aromatase inhibitors 有抗性的乳癌病人或轉移肺癌的病人，用於進行合併 erlotinib 的治療研究上。

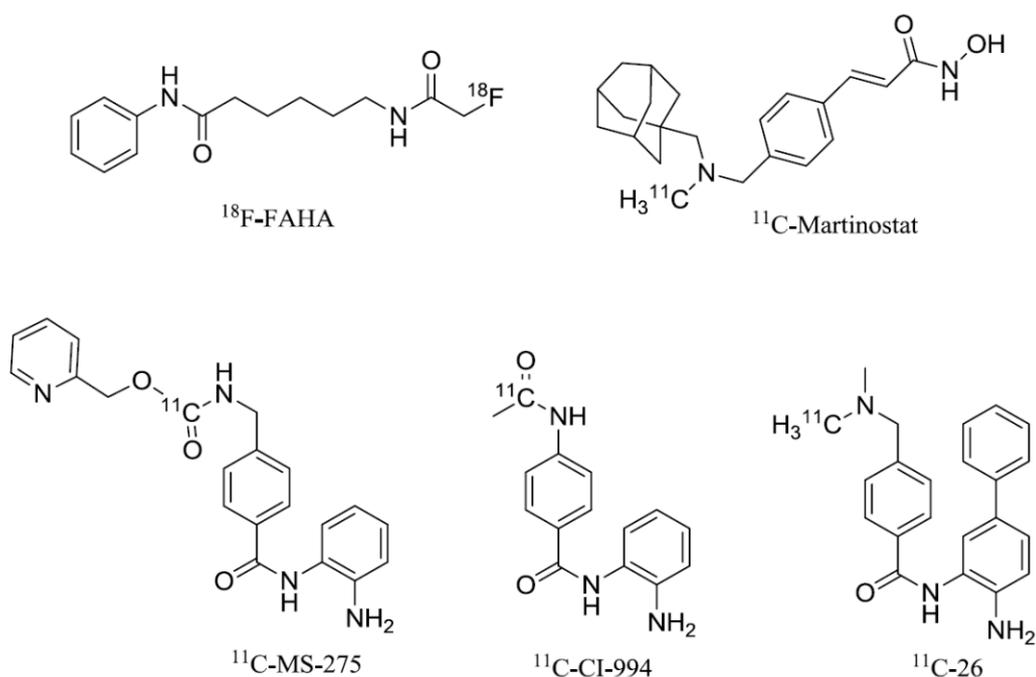


圖一、HDAC 抑制劑

三、HDAC 正子造影劑

由於 HDAC 抑制劑可做為腫瘤治療藥物開發的重要標的，因此開發其相關的正子造影劑，作為體內 HDAC 表現偵測或是未來腫瘤診斷及治療療效評估等，皆有其開發的潛力，目前的非侵入性的正子分子藥物發展多有 ^{11}C 標誌之 aliphatic acid 及 benzamide 類似物等，如 ^{11}C -VPA， ^{11}C -BA， ^{11}C -PBA 與 ^{11}C -MS-275， ^{11}C -Martinostat 與 ^{11}C -26 等，其中以 ^{11}C -Martinostat 及 ^{11}C -26 此兩種 ^{11}C 標誌的放射

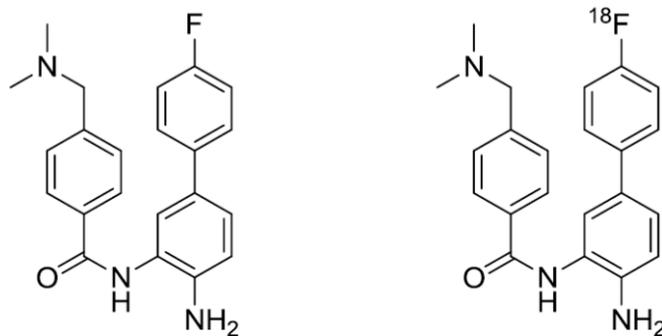
藥物有不錯通過 BBB 能力因此被作為腦部 HDAC 表現之正子造影劑，但由於 C-11 標誌其半衰期較短，使用上僅能提供較為短製造運輸路程之正子造影使用，因而有其使用上有其侷限性。另外以 hydroxamate 結構類似物為主所設計的正子造影劑，則以 F-18 標誌之 ^{18}F -FAHA 及 ^{18}F -SAHA 為目前最具代表性的組蛋白去乙醯基酶造影劑，其中 ^{18}F -FAHA 可作為組蛋白去乙醯基酶的受質，可被進一步代謝成為 ^{18}F -Fluoroacetate，其累積的量也可視為 HDAC 表現之結果，進而能獲得於活體動物中組蛋白去乙醯基酶之分佈與跟功能表現之位置等訊息，可作為未來此領域的醫學研究與藥物開發之基礎。



圖二、HDAC 正子造影劑

四、研究目的

由於 HDAC 抑制劑可做為腫瘤治療藥物開發的重要標的，本研究中所設計的 MH01 是一 benzamide 類似物，在文獻上其結構類似於碳 11 標誌之 ^{11}C -26，雖然認為氟取代的化合物會降低其進入腦中的含量，且發現對於 HDAC1 的專一性也較 26 稍差，但其非放射性 MH01 對 HDAC1 之 IC_{50} 仍有在 nM 以下的專一性，如此 F-18 標誌而成的 MH01 正子藥物，應有機會運用於 HDAC1 表現之腫瘤正子造影上，本計畫中預定建立標誌 ^{18}F -MH01 的放射化學標誌技術，藥物的純化分離及品管與性質測定等，由於此類藥物能有效穿越 BBB，因此我們先以腦腫瘤作為研究對象進行生物實驗，評估其作為腦腫瘤組蛋白去乙酰基酶正子造影劑之潛力及未來應用。



HDAC1, IC_{50} (0.036nM)

圖三、非放射性及放射性 F-18 的 MH01

貳、研究方法與過程

藥物的標誌前驅物硼酯取代MH01 由核能研究所提供，其中此一放射性標誌則經由目前新穎的銅介導催化方式進行標誌，以獲得¹⁸F-MH01供後續生物實驗進行。利用HPLC純化分離建立化合物QC條件等，並確定其放射化學純度及放射化學產率，進而量測此些藥物穩定性及同時以兩株腦腫瘤細胞攝取實驗，生物分佈實驗與正子造影實驗，以驗證其作為專一性HDAC 正子造影劑的潛力。

一、使用的材料及儀器設備

(一)放射藥物標誌

1. Potassium carbonate、Potassium trifluoromethanesulfonate、Kryptofix 2.2.2，皆購自 ACROS Organics, New Jersey, USA。
2. Anhydrous acetonitrile 購自 Merck KGaA, Darmstadt, Germany。
3. Anhydrous dimethylformamide (DMF)、Pyridine，皆購自 Sigma-Aldrich Co. Louis, USA。
4. QMA plus cartridge、QMA light cartridge、C18 plus sep-pek cartridge，皆購自 Waters, Milford, MA, USA。
5. 0.22 μm membrane filter 購自 Millipore。

(二)細胞實驗材料

1. GBM8401 細胞、U87MG 細胞。

2. 1N NaOH，購自 Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA。
3. RPMI 1640 細胞培養液
4. 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)購自 GE Healthcare - HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA。
5. 12 孔盤，購自 Costar®, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA。
6. PerkinElmer 1470 Automatic Gamma Scintillation Counter，購自 PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA。

(三)實驗動物

1. NOD/SCID免疫缺乏小鼠(6~8週齡)
2. Isoflurane，購自 Baxter Healthcare of Puerto Rico, USA

(四)儀器設備

1. 薄層層析片 Thin-layer chromatography (TLC) : Merck plates precoated with silica gel 60 F254 and precoated with silica gel 60 RP-18 F254s。
2. 管柱層析：分別以 silica gel 60 與 silica gel 60 RP-18 (Merck) 填充管柱。
3. NMR : Bruker 400 UltraShield Spectrometer at a proton frequency of 400 MHz and chemical shifts were expressed in ppm。

4. 真空幫浦：Sinku Kiko Co.,Ltd, Jpan。
5. 迴旋加速器 (Cyclotron)：MC17F，SCANDITRONIX，由台北榮民總醫院國家多目標醫用迴旋加速器中心提供。
6. Radioisotope Dose Calibrator：CRC-127R, Capintec, RAMSEY, USA。
7. Radio-TLC (Thin Layer Chromotography) scanner：Bioscan, AR-2000, Washington, DC, USA。
8. Radio-high pressure liquid chromatography (Radio-HPLC)：600 Controller、Delta 600，Waters, USA。UV detector：Tunable absorbance detector 486，Waters,USA。Radio-detector：Flow count detector FC-003 Capintec, Bioscan, Washington, DC, USA。Column：RP-C18 column (Hibar Purospher STAR, RP-18e, 250 × 10 mm, particle size 5mm, Merck, Darmstadt, Germany)。
9. Gamma counter：Wallac 1470 WIZARD Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA。
10. 微單光子斷層掃描儀MicroPET：preclinical imaging system。

二、研究方法

(一)前驅物光譜鑑定

1. 取 5 毫克硼酯前驅物置於 NMR 試管中。

2. 於試管內置入 0.5 c.c 氘代氯仿，並將樣品放入核磁共振儀分析。

(二)F18-MH01 放射化學標誌及分析

1. 加熱塊溫度 110°C ， Vial 打入 2ml dry ACN，同時插入入氣針與出氣針，通入 Ar ，共沸抽乾
2. QMA Precondition :依序用下列溶液順向注入 QMA 沖提
 - (1) 10 ml 的 EtOH
 - (2) 10 ml 的 KOTf 水溶液(濃度 KOTf 90 mg/ml)
 - (3) 10 ml 三次水
4. 抽 0.55 ml Eluted 液待用
5. 測氟水活性，將氟水抽起順向注入 QMA ，並測 QMA 活性
6. 拔掉入氣針上的 Ar 管，插上 QMA 注入順向抽好的 0.55 ml Eluted 液，測 QMA 殘存活性
7. 共沸抽乾大約 20-25 分鐘，抽乾後再加入 1ml dry CAN 共沸抽乾，將 Ar 換成 dry air 通入 vial
8. 確定完全抽乾，之後抽 0.5 ml 配好的 Cu(II)(OTf)₂-Pyridine/DMF 注入 vial ，用 0.2 ml dry DMF 溶解 precursor 加入 vial
9. 將入氣針&出氣針都拔掉，密閉反應 20 ~30 分鐘
10. 將 V-Vial 開蓋並做矽膠薄層分析 (條件:normal phase TLC 移

動相為 dichloromethane:methanol = 2:1)

11. Precondition Plus C-18 Sep-pak: 依序用下列溶液沖提
12. 10 ml EtOH 沖提
13. 10 ml 三次水 沖提
14. 將反應完的溶液注入 Plus C-18 Sep-pak，用 50ml 的三次水先將大量的 ^{18}F 離子沖出來，再依序用 3cc 10% EtOH & 3cc 30% EtOH 沖提
15. 由於前趨物不溶於水，一開始用水沖提時，標誌上 ^{18}F 的藥物將不太會被沖出
16. 以 5cc 100% EtOH 沖提，將標誌物沖出
17. 再以 Radio-TLC 鑑定
18. 條件: normal phase TLC 移動相為 dichloromethane :methanol = 2:1

(三) 放射性藥物之品管

1. 反應結束後，將反應混合物以逆向高壓液相層析法 (LiChrosorb RP-18, 250 × 8 mm, 10/87.5/2.5 ethanol /water/acetic acid (vol/vol/vol), 2.5 g/L ammonium acetate, pH 3.0, 4 mL/min) 純化，再將所收集到之產物通過強的離子交換 cartridge (LiChrolut SCX)。此放射性產物可分別與標誌品加以比對滯留時間以確認藥物之正確性。

2. 將 cartridge 以 1 mL 的水沖洗後，再以 4 mL 的 PBS (phosphate-buffer saline, 0.15 M, pH 7.4) 沖提出產物。
3. 將產物以 2 mL 的等張生理食鹽水稀釋，並過濾 (Millex-GX 0.25 μ m filter) 至含有 1 mL sodium bicarbonate (1M) 的無菌瓶中，即得最終產物。
4. QC 測試: HPLC 分析: column 為 LiChrolut RP-18, 250 \times 4 mm, 流動相 10/87.5/2.5 ethanol/water/acetic acid (v/v), 2.5 g/L ammonium acetate, pH 3.0, 流速 0.7 mL/min。

(四) F18-MH01 藥物穩定性測試

1. 將 18 F- MH01 以二甲基亞砒 (DMSO) 溶掉後各別加入至測定之環境二甲基亞砒 (DMSO) 及 serum (FBS) 當中，其總體積為 0.5 ml，而 DMSO 在血清中的含量小於 10% 置於水浴槽內以 37°C incubated 不同時間點 (5, 15, 30, 60, 120 min)。
2. 利用 Radio-TLC 薄層分析。觀察藥物在不同時間點的 in vitro 穩定度測試。

(五) 細胞培養

1. GBM8401 細胞與 U87MG 細胞株以含 10% FBS 之 MEM 培養於 37°C、5% CO₂ 之恆溫培養箱中。

(六) 細胞攝取實驗

1. 實驗前將 GBM8401 及 U87MG 細胞各種於十二孔盤，每孔含 2 \times 10⁵ 顆細胞。在 37°C 培養一晚，隔天將十二孔盤內的培養液移除。
2. 之後每孔加入 0.5 mL 含 18 F-MH01 的無血清培養液 (1 μ Ci/ml)，

於 37°C 下培養 5、15、30、60 及 120 分鐘後將含 ^{18}F -MH01 的細胞培養液收集至已標記為培養液之塑膠管內，接著每孔用 0.5 mL 的 PBS 清洗三次後再次收集至已標記培養液之塑膠管內。

3. 加入 1 mL 的胰蛋白酶將每孔之細胞切下並收集至標記為細胞之塑膠管內後再使用 PBS 清洗一次並收集至標記為細胞之塑膠管內。將各標記之塑膠管以固態閃爍偵檢器偵測後，計算出 2 株細胞攝取 ^{18}F -MH01 的比例。

(七) 荷腫腦瘤小鼠模式建立

1. 建立皮下腫瘤 GBM8401 或 U87MG 鼠，配置細胞液濃度為 3×10^7 cells/mL 之 GBM8401 或 U87MG 細胞，於 NOD/SCID 免疫缺乏小鼠右側肩上皮皮下種植 100 μL 之細胞液 (3×10^6 cells/mouse)，待腫瘤成長體積至約 200 mm^3 (約 14 天) 後進行生物實驗。

(八) 生物分佈實驗

1. 荷 GBM-8401 或 U87MG 之 NOD/SCID 免疫缺乏小鼠經尾靜脈施打 100 μCi 之 ^{18}F -MH01 後於不同時間點(15、30、60 及 120 分鐘，各時間點 n=4) 犧牲老鼠進行生物分布研究。
2. 血液樣本利用心臟採血收集，並摘除 13 個器官及排泄物(包括心臟、肺臟、肝臟、胃、小腸、大腸、脾臟、胰臟、大腿骨、肌肉、腫瘤、大腦、腎臟、尿液及糞便) 進行秤重及利用 γ -counter 測其放射活性。計算各樣本之放射性藥物攝取值(單位表示為 ID%/g, percentage of injection per gram of organ)，結果以平均值 \pm 標準差表示。

(九) 正子造影實驗

1. 皮下腫瘤模式將荷 GBM-8401/U87MG 腫瘤小鼠經尾靜脈施打約 300 μCi ^{18}F -MH01 進行小動物正子電腦斷層造影。皆於打藥後開始進行連續動態造影，收集 2 小時之影像。所得之影像皆經 Amide 軟體進行影像處理。

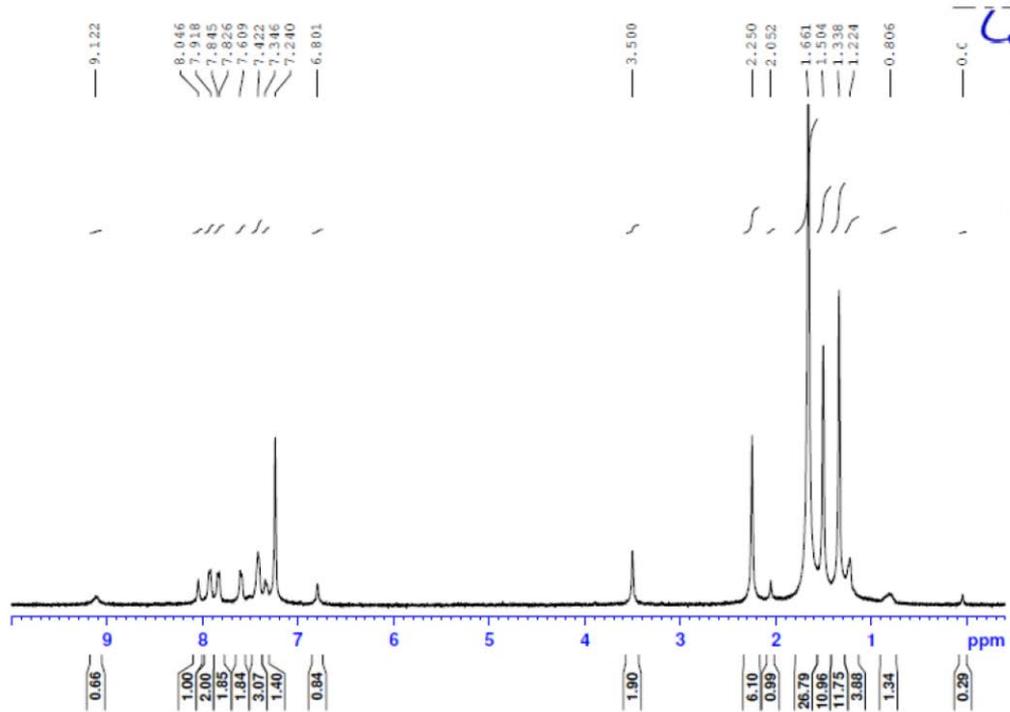
參、主要發現與結論

標誌藥物由核能研究所提供為硼酯取代 MH01，首先進行光譜鑑定後，確認其初步之結構，再進行放射性標誌，以近年來所發展的銅介導催化直接標誌方式並進一步水解後可獲得 ^{18}F -MH01，並利用 HPLC 純化分離建立化合物 QC 條件等，確定其放射化學純度及放射化學產率，以供後續生物實驗進行。經藥物穩定性測試後，以兩株腦腫瘤細胞攝取實驗，生物分佈實驗與正子造影實驗已驗證其作為 HDAC 專一性照影藥物其結果如下。

一、標誌前驅物 ^1H -NMR 光譜分析

由圖四 ^1H -NMR 光譜分析可發現在化學位移為 7-8.1 之間為芳香環上的氫的訊號，觀察到 11 個訊號，符合結構上芳香環上氫的數目，化學位移為 3.5 的 singlet，數目為兩個氫的訊號符合氮與苯環中間 methylene 上兩個氫的吸收，化學位移為 2.25 singlet，數目為六個氫的訊號亦符合氮上兩個甲基共六個氫的吸收，最後化學位移在 1-2 的位置應為較高場的烷基訊號分別為硼酯上的甲基及氮上 Boc 的保護基 t-Butyl 的吸收，理論上應該只有兩個 singlet 分別為 12 個氫及 9 個氫的訊號，但實際上可觀察到有數個 singlet 的訊號，此些訊號應為位純化乾淨的硼酯類雜質及 Boc anhydride 等的干擾。大致上此結構應為標誌前驅

物，應此尚可進行後續的放射化學標誌。

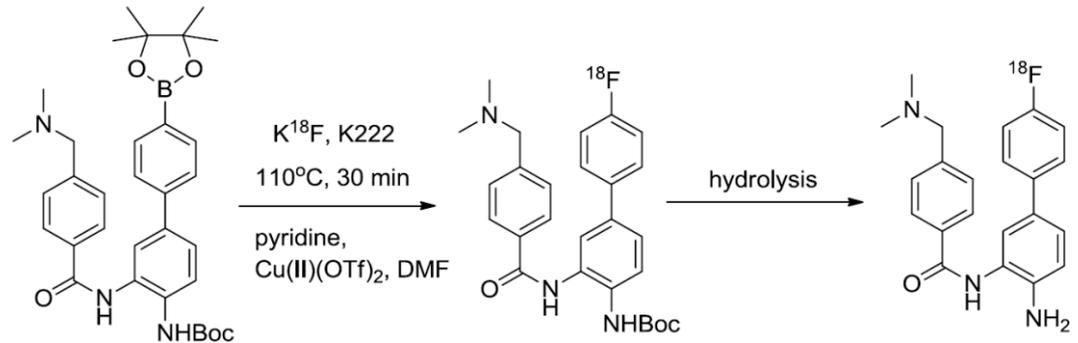


圖四、標誌前驅物之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖

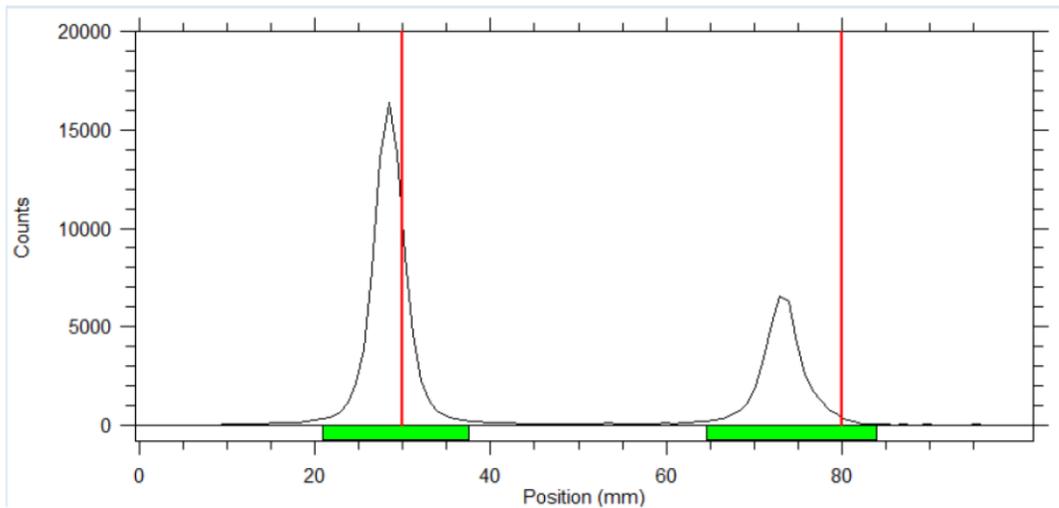
二、MH01 放射化學標誌及分析

氟 18 標誌的 MH01 造影劑，是以目前較為新穎的一步反應，在含空氣氧化環境下藉由 $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ 媒介促進 ^{18}F fluoride 進行芳香環上之取代反應所標誌完成的，後續再經由酸性水解，於 80°C 下，在以 3NHCl 水溶液進行水解，反應式如圖五所示。為確認反應是否順利進行，可藉有放射性薄層分析(Radio-TLC)追蹤反應的變化，結果顯示於圖六至圖八，在 $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ 媒介進行 ^{18}F fluoride 取代反應顯示標誌初產物(尚有 Boc 保護)其放射化學轉換率(radiochemical conversions, RCC) 為 $20\pm 5\%$ 。以 $\text{DCM}/\text{MOH}=2/1$ 之混合液為薄層分析展開溶劑，其 $R_f=0.8-0.9$ 即為該產物。由於在原點尚有未反應之 ^{18}F fluoride，因此以純水做稀釋，經 plus tC18 cartridge 純化，可先將多數未

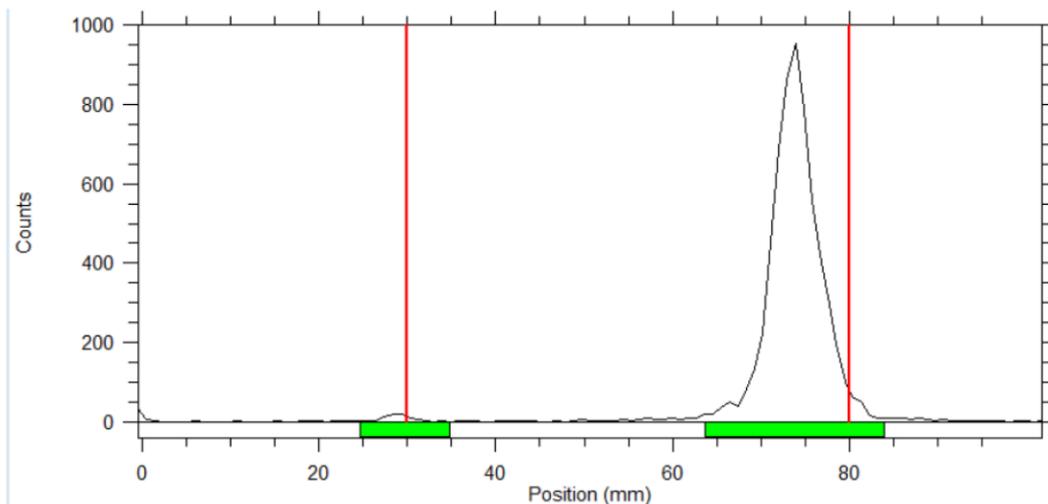
反應的氟離子與 Cu 離子及 Pyridine 去除，結果為圖七所示。可觀察到大部份的氟離子接以除去，主要的訊號為氟 18 標誌上的化合物，因此再進行後續的水解反應，最後再以梯度濃度為 50%，55%，60% 的 EtOH 水溶液分次沖提，收集到的產物，最後再通過 QAM cartridge 純化可得到(圖八)。



圖五、 ^{18}F -MH01 放射化學標誌

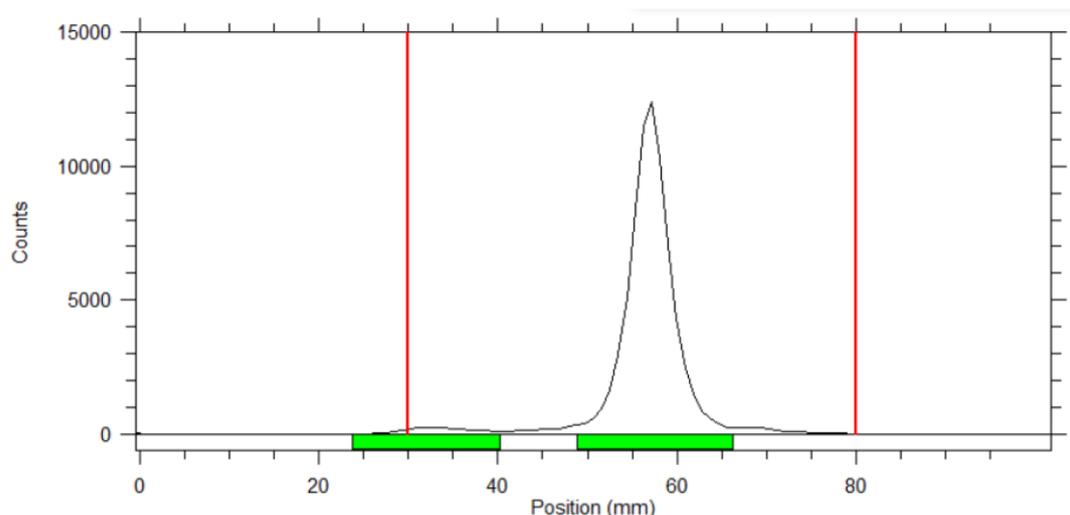


圖六、F-18 MH01 放射薄層分析: F-18 MH01 標誌反應粗產物薄層分析圖，以 normal phase TLC 移動相為 $\text{DCM}/\text{MeOH} = 2/1$ (V/V)，F-18 MH01 的 R_f 值在 0.8~0.9 之間



Rgn 1	24.7	34.9	29.0	-0.020	89.0	89.0	1.38	1.44
Rgn 2	63.7	84.1	73.9	0.878	6071.0	6071.0	94.11	98.56

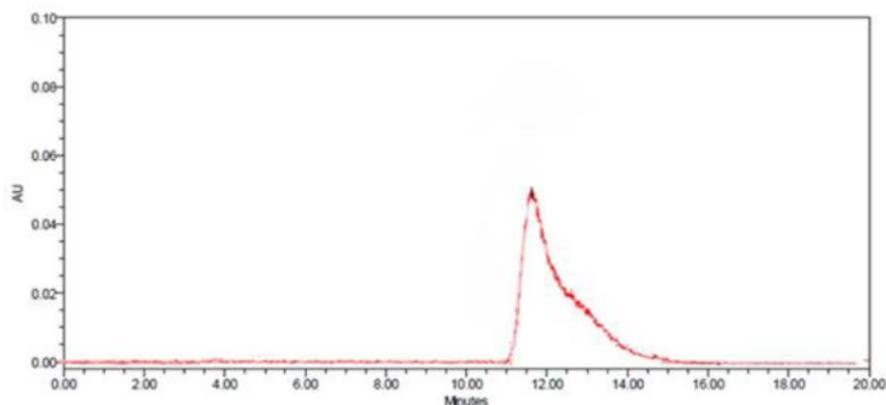
圖七、經純化後尚未水解之 F-18 MH01 放射薄層分析: F-18 MH01 標誌反應除去未反應之 F-18 離子後之未水解產物的薄層分析圖，以 normal phase TLC 移動相為 DCM/MeOH = 2/1 (V/V)，F-18 MH01 的 R_f 值在 0.8~0.9 之間



圖八、經水解級純化後之 F-18 MH01 放射薄層分析: F-18 MH01 標誌後，經由 3N HCl 80°C 水解 20 分鐘後再純化得到之 F-18 MH01 產物的薄層分析圖，以 normal phase TLC 移動相為 DCM/MeOH = 2/1 (V/V)，F-18 MH01 的 R_f 值在 0.5~0.6 之間

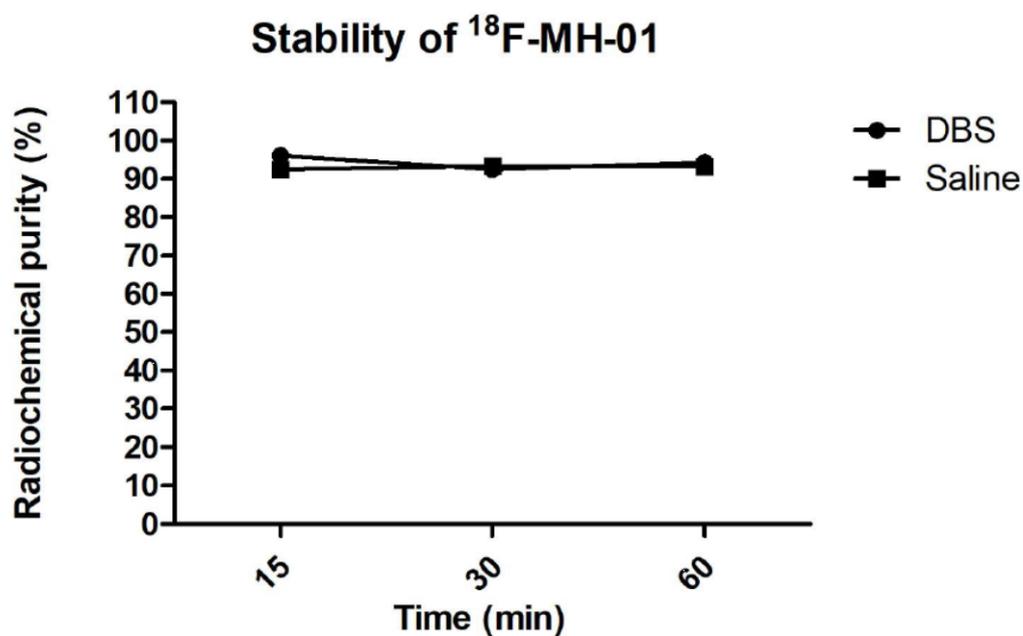
此一氟 18 標誌的 MH01 造影劑並經由高效能液相層析(HPLC): 展開相為展開相為 50% ACN,50% 0.025% TEA in H₂O(pH=9) ; Flow

rate : 0.7mL/min ; Analytical C18 column , 確認其純度 , 在滯留時間約在 12 分鐘(圖九) , 此一製程的放射化學產率 $15 \pm 3.3\%$, 放射化學純度 $\geq 95\%$ 。



圖九、F-18 MH01 高效能液相層析(HPLC): 展開相為展開相為 50% ACN,50% 0.025% TEA in H₂O(pH=9) ; Flow rate : 0.7mL/min ; Analytical C18 column

三、F18-MH01 藥物穩定性測試



圖十、放射藥物 F-18 MH01 穩定度測試:在 37°C 下於 DBS 及 Ssaline 之穩定度變化

將標誌完成與純化過後的 F18-MH01 藥物分別加入小牛血清(DBS)或生理食鹽水(Normal Saline)中，並置於 37 °C 水浴槽中以模擬於動物體內及體外的狀況，於不同時間點 (5, 15, 30, 60, 120 min) 以放射性薄層分析法分析藥物的穩定性。結果顯示者此一藥物經 2 小時後靜置後，在其放射化學純度(RCP)仍皆 $\geq 90\%$ ，因此可證明此一藥物不論在小牛血清或生理食鹽水中皆有不錯之安定性(圖十)。

四、F18-MH01 於腦腫瘤之細胞攝取實驗

將放射活度為 $1\mu\text{Ci/ml}$ 之 F18-MH01 放射性藥物加入於 U87MG 及 GBM8401 兩株不同腦腫瘤之細胞，分別於不同時間點(5, 15, 30, 60, 120 min)，將細胞與細胞培養液分離並收集細胞與細胞培養液，再分別量測細胞及培養液中所含的放射藥物放射活性，計算放射藥物在細胞中積聚的比例，細胞對藥物之攝取數值以 % radioactivity uptake/ 10^5 cells 表示。結果顯示對於兩個不同腦瘤細胞株 U87MG 及 GBM8401，在加入 F18-MH01 藥物後，攝取量皆有緩慢的上升，直到在 120 分鐘時到達最大值，其攝取量分別為 U87MG ($11.92\pm 0.37\%$ uptake/ 10^5 cell) 與 GBM8401 ($7.13\pm 0.22\%$ uptake/ 10^5 cell)，其中 F18-MH01 在 U87MG 的攝取量明顯高於在 GBM8401 的攝取量約在 1.5-2 倍之間。

五、F18-MH01 於荷有腦腫瘤之小鼠生物分佈

F18-MH01 於荷有 U87MG 及 GBM8401 腫瘤之小鼠，F18-MH01 於腫瘤及正常組織隨時間變化之積聚狀況。由尾靜脈注射 activity F18-MH01 藥物後，分別於 15、30、60、120 分鐘犧牲老鼠摘取各器官秤重並偵測放射活性，最後以 %ID/g(mean±SD) 表示。

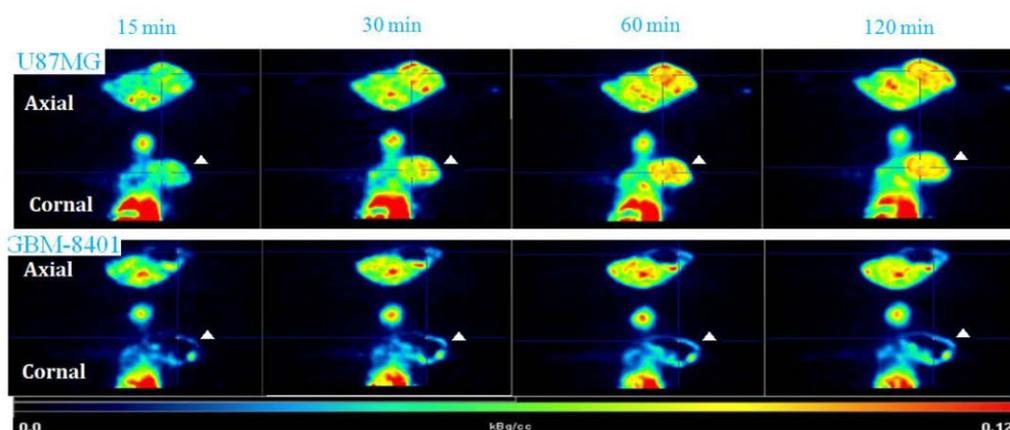
由尾靜脈注射放射性藥物其活性為 50 μ Ci 之 F18-MH01 後，在荷有 U87MG 的小鼠可發現，血液的活性，隨時間的增加而遞減，在正常組織的積聚亦是隨時間的增加而遞減，並且在正常組織如心臟、肺臟、肝臟、胰臟、脾臟、腎臟、大腦等都有十分高的積聚，顯示正常組織皆會表現 HDAC，而腫瘤組織的攝取也是隨時間的增加而遞減其至於 T/M 與 T/B 的比值在注射後 2 小時分別可達 2.60±0.20 及 3.04±0.49。

在荷有 GBM8401 的小鼠上、由尾靜脈注射放射性藥物其活性為 50 μ Ci 之 F18-MH01 後，其在正常組織的累積也與荷有 U87MG 的小鼠的實驗結果類似，但腫瘤的累積量則相對來說較為低，此結果與細胞攝取實驗類似，其 T/M 與 T/B 的比值在藥物注射後 2 小時分別為 1.95±0.63 及 1.64±0.63。

兩個腫瘤模式的 T/M 與 T/B 的比值，都可觀察到藥物在荷有 U87MG 的老鼠有較佳的腫瘤攝取比值，相較於在荷有 GBM8401 的小鼠上。因此此一藥物對於荷有 U87MG 的腫瘤有較佳的正子造影能力

六、F18-MH01 於荷有 U87MG 及 GBM8401 腦腫瘤小鼠正子影像

在小動物的正子影像顯示，藥物在腫瘤的積聚隨時間的增加而增加，由十五中由 Axial 或 Cornal 皆可發現藥物在 U87MG 腫瘤的累積量明顯高於 GBM8401，此外在正常組織亦具有高攝取值，此些影像結果皆與生物分佈之結果一致。



圖十五、放射藥物 ^{18}F -MH01 於荷 M87MG 及 GBM8401 腫瘤之小鼠之正子斷層影像

進一步將影像圈選，圖十六則是藉由正子影像圈選腫瘤及肌肉 ROI 之比值，此一結果所獲得的 T/M 比值與生物分佈所獲得的結果也是十分類似。

七、結論

本研究成功完成 F-18 MH01 的放射化學標誌及純化分離，其放射化學產率 $15\pm 3.3\%$ ，放射化學純度 $\geq 95\%$ ，對於兩種的腫瘤細胞株 U87MG 及 GBM8401 對於該藥物的攝取量有明顯的不同，應與兩腫瘤細胞之 HDAC 表現有關，此結果應能在後續研究中更進一步的釐清。在荷有 U87MG 及 GBM8401 的小鼠動物模式中，此藥物在正常器官中皆有高積聚，此可能與正常組織表現之 HDAC 相關，不論從生物分佈及正子造影接顯示 F18-MH01 對 U87MG 之腫瘤有不錯之造影結果，但若是原位腦腫瘤，此結果可能因為腦部的高攝取而有所影響，因此對有轉移 U87MG 可能會是一有潛力的正子造影劑。

肆、参考文献

1. Schmitt, M. and Matthies H. Biochemical studies on histones of the central nervous system. II. Acetylation of histones from neurons and glia of the rat brain in vitro. *Acta Biol Med Ger*, 1979. **38**(4): p. 677-82.
2. Levenson, J.M., et al., Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*, 2004. **279**(39): p. 40545-59.
3. Alarcon, J.M., et al., Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, 2004. **42**(6): p. 947-59.
4. Lattal, K.M. and M.A. Wood, Epigenetics and persistent memory: implications for reconsolidation and silent extinction beyond the zero. *Nat Neurosci*, 2013. **16**(2): p. 124-9.
5. Fischer, A., et al., Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampusdependent memory. *Neuron*, 2005. **48**(5): p. 825-38.
6. Cruz, J.C., et al., Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron*, 2003. **40**(3): p. 471-83.
7. Cruz, J.C., et al., p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo. *J. Neurosci*, 2006. **26**(41): p. 10536-41.
8. Broide, R.S., et al., Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci*, 2007. **31**(1): p. 47-58.
9. Fischer, A., et al., Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive

- disorders. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(12): p. 605-17.
10. Francis, Y.I., et al., Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, 2009. **18**(1): p. 131-9.
 11. Ricobaraza, A., et al., Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(7): p. 1721-32.
 12. Guan, J.S., et al., HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. Nature, 2009. **459**(7243): p. 55-60.
 13. Graff, J., et al., An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. Nature, 2012. **483**(7388): p. 222-6.
 14. Kilgore, M., et al., Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(4): p. 870-80.
 15. McQuown, S.C., et al., *HDAC3* is a critical negative regulator of long-term memory formation. J Neurosci, 2011. **31**(2): p.764-74.
 16. Govindarajan, N., et al., Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. J Alzheimers Dis, 2011. **26**(1): p. 187-97.. *Appl Radiat Isot* 2008; 66:513-22