

國家原子能科技研究院
委託研究計畫研究報告

放射性碘-131 標幟 PARP 抑制劑於三陰性乳癌治療效益評估
Characterize the therapeutic efficacy of an iodine-131 labeled PARP
inhibitor for triple negative breast cancer

計畫編號：112A001

受委託機關(構)：長庚大學

計畫主持人：翁啓昌

研究期程：中華民國 112 年 1 月至 112 年 12 月

研究經費：新臺幣 玖拾捌 萬元

國原院聯絡人員：李美芳

報告日期：112 年 12 月 19 日

目錄

中文摘要	1
ABSTRACT	2
壹、計畫緣起與目的	4
貳、研究方法與過程	9
一、 建立碘-131-KX-1 放射標幟方式及評估其放化性質	9
二、 細胞培養	9
三、 西方墨點法	10
四、 放射活性結合試驗	10
五、 放射性碘-131-KX-1 生物分布實驗	11
六、 腫瘤動物模型準備	11
七、 放射性碘-123-KX-1 於腫瘤動物模型上之活體造影	12
八、 放射性碘-131-KX-1 治療	12
參、主要發現與結論	14
一、 放射性標幟 PARP 抑制劑純度分析結果	14
二、 放射性碘 131-KX-1 放化製備條件分析	15
三、 西方墨點法	16
四、 放射藥品之生物活性分析	17
五、 放射性碘-131-KX-1 生物分布實驗	18
六、 放射性碘-123-KX-1 於腫瘤動物模型上之活體造影	19
七、 放射性碘-131-KX-1 治療	20
結論	22
肆、參考文獻	23

中文摘要

十幾年來癌症皆為造成國人死亡之首位，其中乳癌更是我國婦女最為好發之頭號殺手。根據乳癌細胞表面受體之表現，可分別選擇不同之治療方式並取得一定之治療成果，然而，其中一無表現任何受體之三陰性乳癌腫瘤細胞，由於其受體表現與其他種類之乳癌細胞皆不相同，也因此以常見之治療方式效果皆不盡理想。根據研究發現，該細胞除具備 BRCA1/2 抑癌基因突變外，同時細胞內亦大量表現一可修復細胞 DNA 單股螺旋損傷之多聚 ADP-核糖聚合酶 (PARP)。然而，根據臨床文獻報導，該抑制劑之治療療效差異性十分大，主要原因可能是因為無法針對受測病患癌細胞內之 PARP 表現量進行評估。藉由使用放射性標幟之 PARP 抑制劑，如本實驗室透過 I-123-KX-1 可有效評估腫瘤細胞內 PARP 之表現量。本研究計畫已完成放射性碘-131-PARP 抑制劑之標幟工作，並確認放射化學純度及其標幟後對 PARP 酵素仍維持一定之親和力，最後透過於 MDA-MB-231 之乳癌腫瘤細胞動物模型確認經口服放射性碘-131 標幟之 KX-1 後，可有效抑制該腫瘤之治療效果，代表該藥物極有潛力作為三陰性乳癌細胞治療之能力。

Abstract

In the past decade, cancer has been the leading cause of death for Taiwanese people, and breast cancer is the most diagnosed cancer among women in our country. For the treatment of breast cancer, usually different targeted drugs or compounds are prescribed depending on the expression of receptors on the surface of breast cancer cells, and usually this method may provide a suitable therapeutic efficacy. However, the triple-negative breast cancer cells, which do not express any receptors, making the common treatment methods for breast cancer ineffective. According to research findings, these cells not only have BRCA1/2 gene mutations but also express a large amount of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), which plays a major role on the repairment of the single-stranded DNA damage in cells. As such reason, couples of PARP inhibitors have been approved by FDA for breast cancer treatment. However, based on some published literature reports, there is a great difference in the therapeutic effect of PARP inhibitors, mainly because the expression of PARP is different individually. To provide a quick and efficient monitoring method for the PARP expression in different patients, several radiolabeled PARP inhibitors, for instance, I-123-KX-1. This research project has completed the labeling of radioactive

iodine-131-PARP inhibitor, and confirmed its radiochemical purity and maintained a certain affinity for PARP enzymes after labeling. Finally, through an oral administration of radioactive iodine-131-labeled KX-1 in a MDA-MB-231 breast cancer tumor cell animal model, the effective inhibition of tumor growth was confirmed, indicating the significant potential of this drug for the treatment of triple-negative breast cancer cells.

壹、計畫緣起與目的

根據衛生福利部國民健康署一百零七年度最新統計資料顯示，癌症已名列國人十大死因首位達 36 年之久，而其中佔據癌症致死率排名第四之乳癌更是我國婦女發生率第一位之癌症，病患好發年齡落在 45-69 歲之間，平均約為每十萬名婦女中有 188-194 人[1]。針對罹癌病患所採用之常見的治療方式分為手術治療、放射線治療、化學治療及荷爾蒙治療等。相對於前三種治療手段，賀爾蒙治療一直至 1970-1980 年代才開始被廣泛運用，由於該癌細胞之生長與雌激素相關，因此藉由減少雌激素產生亦或阻擋雌激素與癌細胞上之雌激素受體(estrogen receptor, 簡稱 ER) 或黃體素受體 (progesterone receptor, 簡稱 PR) 結合，不僅提供一有效率之癌症治療手段，同時一般病患於術後合併荷爾蒙治療亦可明顯降低癌症復發及轉移之機會。

然而荷爾蒙治療並非適用於全部罹患乳癌之患者，主要是病患之癌症細胞並非全部具有該受體之表現，因此事先需要對其細胞進行染色篩檢，並且根據檢驗結果可分為下列幾種類型 (1) ER/PR 陽性乳癌：最普遍的一種乳癌，顧名思義此種細胞表面存在可與雌激素相結合的雌激素受體，相對而言其他類型的乳癌是最容易治療且較不具有侵略性的。(2) HER-2 陽性乳癌(HER-2 positive)：此類型乳癌之人類表皮生長因子第二型受體 (human epidermal growth factor receptor 2, 簡稱 HER2) HER2 有明顯的過度表現，具有過多的 HER2 蛋白質，往往具有攻擊性和快速增長的性質[2]，HER-2 陽性乳癌通常比 ER/PR 陽性乳癌等荷爾蒙受體陽性乳癌要嚴重一些。該患者雖然無法受惠於荷爾蒙治療，但是該類型的患者可以通常可以藉由使

用 Trastuzumab (Herceptin, 賀癌平) 進行標靶治療。(3) 三陰性乳癌 (triple negative)：少數病人屬於這種乳癌，當上述檢測 ER、PR、及 HER2 皆呈現陰性者，就稱為三陰性乳癌[3, 4]，相對於前兩者，三陰性乳癌的治療選擇相當有限，且此類型之乳癌最難治癒，同時也是最容易復發的。除此之外，更有研究指出，該類型癌症之形成與特定基因之突變，如 BRCA1 及 BRCA2 等基因有一定之關聯性[5]。

BRCA1 及 BRCA2 此兩種基因如同 P53 一樣同屬於抑癌基因，其主要功能為協助 DNA 單股螺旋或雙股螺旋受到傷害時進行同源性修復(homologous recombination, HR) [6]。其中 BRCA1 會結合至受損 DNA 處對該處進行核酸之修剪；BRCA2 則是與 RAD51 結合，並尋找一適合之同源 DNA 模板進行受損處 DNA 之對照及修復使用。也因此，當 BRCA1 及 BRCA2 基因的發生突變而無法順利採用 HR 進行修復時，面對 DNA 受損的情況，身體會改而採用另外一套機制著手處理該受損處的修復工程，也就是非同源性末端接合(nonhomologous end joint, NHEJ)。NHEJ 的修復方式相對 HR 而言十分地簡略，該方式直接省略掉另外尋找一段模板對受損處的 DNA 修復的過程，並且將受損處之 DNA 兩端直接地進行連接，也因此，該方式不但容易造成該段 DNA 出現異常，同時也增加了修復後之細胞轉變成腫瘤細胞的可行性。也是因為這個原因使的 BRCA1 及 BRCA2 的基因突變常與病人罹患乳癌、卵巢癌有關，並且與家族之遺傳有關連性[7]。

近年來發現除了上述用於受損 DNA 修復反應的 HR 及 NHEJ 兩種方式之外，Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)，亦是另一種用於進行修復 DNA 損傷的酵素[8]。文獻指出 PARP 家族可再細分為

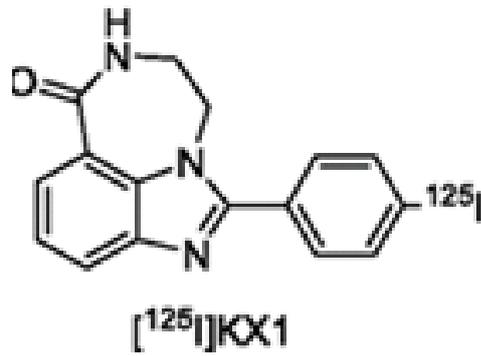
18 種不同的 PARP 酵素，分別為 PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, PARP-5(a), PARP-5(b), PARP-5(c), PARP-6, PARP-7, PARP-8, PARP-9, PARP-10, PARP-11, PARP-12, PARP-13, PARP-14, PARP-15, PARP-16；其中又以 PARP-1 為該家族中含量最為豐富的一種酵素[9-11]。PARP-1 本身是一種 DNA 修復酶，主要是 DNA 發生單股螺旋斷裂(single strand break, SSB)時，利用 BER (base excision repair) 的方式幫助 DNA 修復，PARP-1 的啟動細胞修復 DNA 的反應後會招募多種下游的蛋白質，組成 DNA 修復組合體 (DNA-repair complex)，帶至 DNA 受損的地方進行斷裂修復，等修復完成，DNA 修復組合體便會解離；反之當 PARP-1 活性受到抑制時，會使得 DNA 修復組合體無法解離，因而導致 DNA 在進行複製時產生複製叉停滯 (replication forks stalling) 因而造成 DNA 修復程序無法完成，導致更多之修復行為改採 NHEJ 方式進行，引起更多細胞產生變異或傷害。

也因此，若在具有 BRCA1 或 BRCA2 基因變異之乳癌患者投以 PARP 抑制劑(PARPi)，藉由抑制 PARP 酵素活性並阻斷癌細胞修復機制[12]，進而造成受損 DNA 之腫瘤細胞演變成合成致死(synthetic lethality)之結局，極有潛力作為改善惡性三陰性乳癌之治療手段。根據此一特性，近年來許多研究指出透過 PARP inhibitor (PARPi)其中 Olaparib 與 Rucaprib 更是通過美國 FDA 認證確認其可藉由抑制 PARP-1 活性作為乳癌治療之用途。然而，近年來許多研究成果亦指出目前投入 PARPi 之療效差異性極大，療效約 30%-70% 不等。造成該療效之差異性之主要原因極有可能肇因於無法事先確認病患體內 PARP-1 之表現量[13-15]。

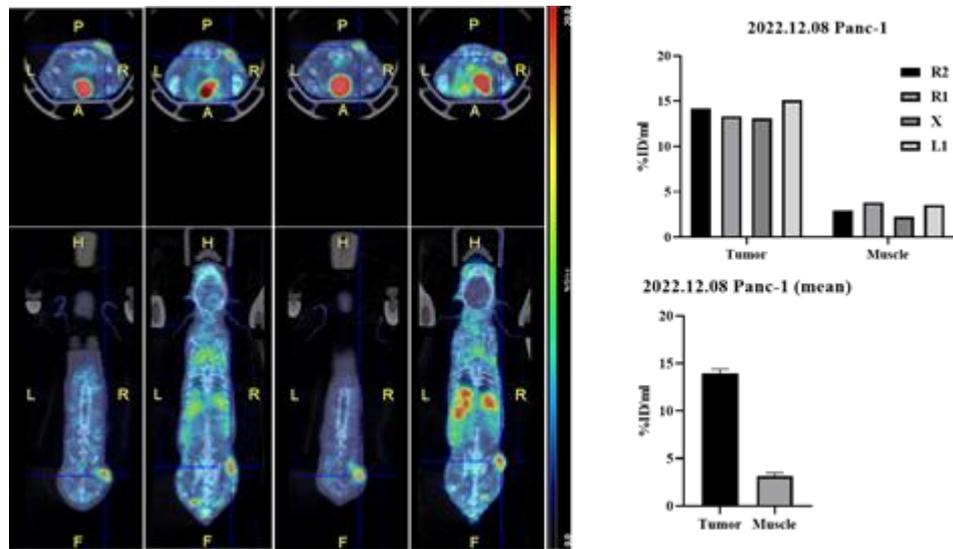
為了協助臨床上建立一套準確、簡便及快速的鑑別病患是否適合此抑制劑治療方式，一些利用標誌有放射性核種之小分子示蹤劑被

提出並分別使用不同腫瘤細胞株(如乳癌細胞、卵巢癌細胞...等)，亦或者動物實驗證實其具備針對 PARP-1 之高特異性集結合力 [16-18]。其中，本實驗室與美國賓州大學 Dr. Mach 團隊合作，以 rucaparib 為骨架且採用放射性碘-125 標幟之針對 PARP 之小分子藥 1-(4-(Iodo-¹²⁵I)phenyl)-8,9-dihydro-2,7,9a-triazabenz[cd]azulen-6(7H)-one ([¹²⁵I]KX-1) (相關結構如圖一所示) 經由放射生物活性分析方法：放射活性抑制實驗 (competition binding assay) 與放射活性飽和實驗 (saturation binding assay) 測試後，皆顯示出其對乳癌腫瘤細胞所表現之 PARP-1 具備極高結合能力 [16, 18]。為確認其是否具備透過活體造影方式進行 PARP 酵素造影之能力，本實驗室進一步將該示蹤劑之碘-125 置換為碘-123 並於具備 PARP 酵素大量表現之胰臟癌細胞動物模型進行活體造影，結果如圖二所示，可明顯看到其優異之腫瘤偵測能力。

由於該分子對 PARP 酵素具備極為優異之結合力且其亦有機會以臨床核子醫學科常見之治療用放射性核種，碘-131 進行標幟進而成為具有腫瘤治療潛力之分子藥物，本計畫預計分為三階段進行測試，首先將進行碘-131-KX-1 之製備，並確認其標幟條件、放射化學純度及產率，確認其標幟之可行性；隨後使用放射活性分析技術，分別於不同之乳癌細胞株測試其生物結合特性是否有變；最後使用具不同 PARP 酵素表現之腫瘤動物模型，以口服的方式測試該藥物是否具備腫瘤治療之潛力。



圖一、 [¹²⁵I]KX-1 之化學結構[19]。



圖二、碘-123-KX-1 於 Pan-1 胰臟癌動物模型之活體造影結果
(本實驗室未發表成果)。

貳、研究方法與過程

一、 建立碘-131-KX-1 放射標幟方式及評估其放化性質

放射性碘標幟之碘-131-KX-1 將使用本實驗室先前建立用於製備碘-123-KX-1 之方式進行初步效果測試，並於計畫執行過程進行調整。標幟過程簡述如下：首先將含有 10 μ g 之 Sn-KX-1 之標幟前驅物溶解於 50 μ L 之乙醇中，隨後分別加入 30 μ L 放射性碘-131 溶液(約 1mCi)、50 μ L 之 4N HCl 及 100 μ L 之 30% H_2O_2 進行標幟反應，初步將測試置於室溫下反應，並視標幟結果進行反應時間之調整。

反應結束後加入 100 μ L 之 $NaHSO_3$ 終止反應並隨後以過飽和之 $NaHCO_3$ 溶液調整溶液之 pH 值。隨後以 C18 之固相萃取匣進行最終產物之純化，並以 HPLC 進行最終產物之品管。HPLC 管柱為 Phenomenex C18, 5 μ 250*4.6mm, 移動相為 ACN/0.1M ammonium formate (4:6)。UV detector 為 W2489, 波長設定為 254nm, 流速為 1mL/min。

二、 細胞培養

本計畫分別選用 MDA-MB-231 及 MCF-7 細胞 (皆購自生物資源保存及研究中心 BCRC)，兩者皆使用 MEM (Gibco™) 作為培養基，前者培養液中加入 1% 的非必需胺基酸、1% 丙酮酸鈉，和胎牛血清 (10%)；後者則加入左旋麩醯胺酸(2mM)、碳酸氫鈉 (1.5g/L)、非必

需氨基酸 (0.1mM)、丙酮酸鈉 (1.0mM)及胎牛血清(10%)。MDA-MB-231 和 MCF-7 皆於 37°C和 5%二氧化碳之細胞培養箱環境中培育。

三、 西方墨點法

為確認實驗中所使用腫瘤細胞內 PARP 酵素之表現量，本計畫首先將上述兩種細胞按廠商所提供的試劑使用的相關程序進行電泳分析，測量其 PARP 蛋白之表現量，待樣品轉印至 PVDF 膜上後，先將其與經過 1:16000 稀釋之一級抗體 PARP-1 (#9542, Cell Signaling, USA) 進行反應 60 分鐘，隨後以 PBST 清洗後再使用經過 1:15000 稀釋之二級抗體進行反應 30 分鐘，最後以 ECL Reagent (TU-ECL02,TOOLS)進行成色並使用二維電泳凝膠圖像掃描器 (Amersham Imager 600,GE) 讀取其化學冷光訊號，接著使用 ImageJ software 分析該細胞 PARP-1 之表現量。

四、 放射活性結合試驗

為確認本研究中所準備之碘-131-KX-1 對於結合至腫瘤細胞內 PARP-1 之親和力，本計畫使用上述步驟一中所準備之碘-131-KX-1 於 MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞上進行放射活性飽和結合試驗 (saturation binding assay) 以求得該放射性示蹤劑之解離常數

(dissociation constant; K_d) 及最大結合量 (maximum binding capacity; B_{max})。

量測方式如下，實驗前一天於 96 孔盤將上述細胞以每 50,000/well 之細胞密度進行培養。隔天於細胞內加入不同放射藥品濃度於細胞後將其置入 37°C 細胞培養箱後進行反應，另準備一組同時加入 20 μ M 之 Olaparib 組別做為分特异性結合組。60 分鐘後扣除非特异結合訊號並使用 GraphPad Prism 軟體進行 K_d 及 B_{max} 等數值的分析。

五、 放射性碘-131-KX-1 生物分布實驗

因本計畫預計將採計口服碘-131-KX-1 方式進行動物腫瘤之治療試驗，考量其與先前文獻或計畫執行結果內可能有所不同，本計畫透過已口服方式(約 10 μ Ci/100 μ L 食鹽水) 餵食免疫功能缺乏小鼠 (BALB/c Nude, female, 8-10 week)，分別於不同時間 (1、6、24 小時) 後將動物犧牲，取出器官計讀其放射活性及重量，並將最後結果以百分比注射藥物濃度/組織重 (percentage injected dose per gram of tissue; %ID/g) 呈現。

六、 腫瘤動物模型準備

實驗動物模型製備將採用從國內合格動物房所購買之免疫功能

缺乏小鼠(BALB/c Nude, female, 8-10 week) 於氣體麻醉之狀態下 (isoflurane, 2.0% O₂) 在實驗動物之右後肢側進行 MDA-MB-231 腫瘤細胞溶液之注射，注射之細胞濃度為 2x10⁶/mL。注射完畢後將在實驗室靜置觀察 2 個小時後，確認動物無任何不適狀態下移回動物房飼養。並於隨後記錄每周體重及腫瘤體積之變化。

七、 放射性碘-123-KX-1 於腫瘤動物模型上之活體造影

為確認步驟六所建立之腫瘤動物對本實驗中所使用之 PARP-1 抑制劑 (KX-1) 是否具備相對之生物活性，該實驗動物於投入治療實驗前，參採本實驗室先前建立放射性碘-123-KX-1 之準備流程，將製備好之碘-123-KX-1 經尾靜脈施打至該實驗動物上進行活體造影。

本造影流程簡述如下，首先將動物以 2.0% isoflurane 進行氣體麻醉後，以靜脈注射方式將含有 300-400 μ Ci 之碘-123-KX-1 施打至實驗動物體內，隨後在注射藥物 1 小時後再次將動物麻醉後置於小動物 SPECT/CT 掃描機 (Nano SPECT/CT, Mediso) 台上進行 30 分鐘之影像蒐集。隨後使用 Pmod 軟體 (PMOD Ver. 3.7, PMOD Technologies LLC, Zurich, Switzerland) 進行影像分析。

八、 放射性碘-131-KX-1 治療

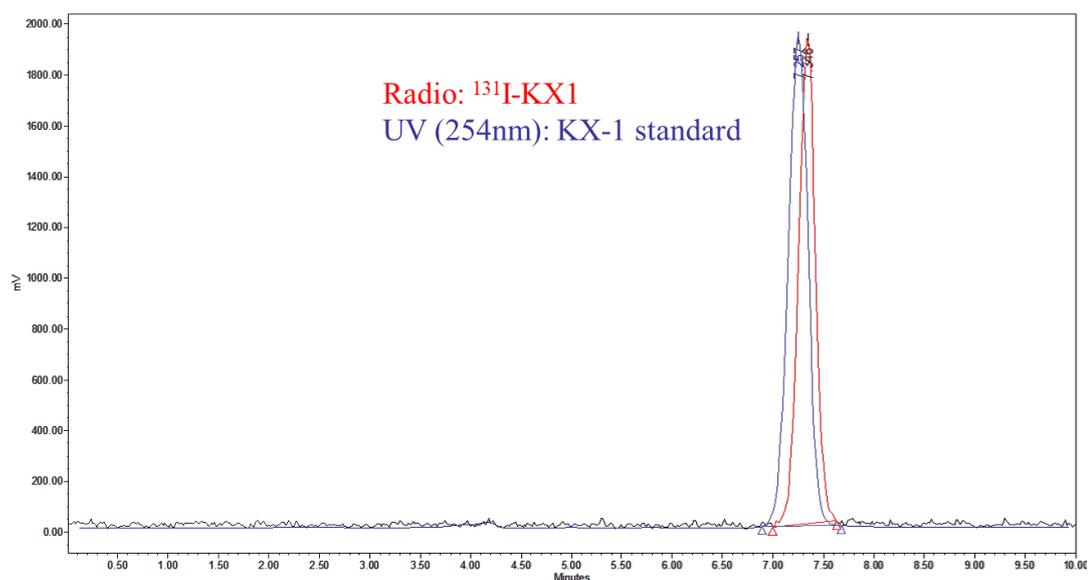
待腫瘤細胞生長 4 周後，將動物隨機分成 3 個組別，分別為高劑

量治療組、低劑量治療組以及未治療組，注射藥物分別為 100 μ Ci 之碘-131-KX-1、10 μ Ci 之碘-131-KX-1 以及食鹽水 (連續以口服方式給藥五天，每天一次)，並於隨後連續兩周記錄其腫瘤體積之變化。

參、主要發現與結論

一、 放射性標幟 PARP 抑制劑純度分析結果

為確認本研究中所製備之碘-131-KX-1 放射化學純度，該反應最終產物以 QC 型 HPLC 進行分析，分析圖譜如下方圖三所示。從該圖中可以觀察到，標幟反應最終產物其滯留時間 ($7.4\pm 0.1\text{min}$) 與 KX-1 標準品相仿，確認該產物為本實驗所需要之放射性碘標幟 KX-1；此外，根據放射性訊號分析結果也可明顯看出，試驗中採用 C18 固相萃取匣純化方式可相當有效地移除相關之放射性不純物。



圖三、放射性碘-131 標幟 KX-1 之代表性 HPLC 分析圖譜，其中藍色訊號為 KX-1 標準品 UV 分析圖譜，紅色曲線為碘-131-KX-1 之放射性訊號分析結果。

二、 放射性碘 131-KX-1 放化製備條件分析

因無先前使用臨床碘-131 口服液進行 KX-1 標幟之放化製備流程可供參考，故於本計畫中針對該藥物之標幟條件進行測試。下表一所列出的數據為截至目前為止，使用不同條件進行測試之代表性結果。從該表所列之資料，可以發現，採用碘-131 口服液進行 KX-1 標幟時無法使用本實驗室先前所開發之方式，直接於室溫下進行標幟，即使將反應時間延長 6 倍（先前為 10 分鐘）亦不見明顯放化產率增長。為了提升該標幟反應之效率，本計畫嘗試將該反應溶液置於 100°C 之乾浴器內進行加熱反應 30 分鐘，從結果可以觀察到該方式可非常有效地用於放射性碘-131-KX-1 之準備工作；此外，經一系列測試後，發現於採用原先一半之前驅物組別中，僅在 10 分鐘加熱組別中其放化產率已接近本次操作測試中最佳化之結果，也因此，後續實驗中將採用此方式進行該放射性碘-131 藥物之準備工作。

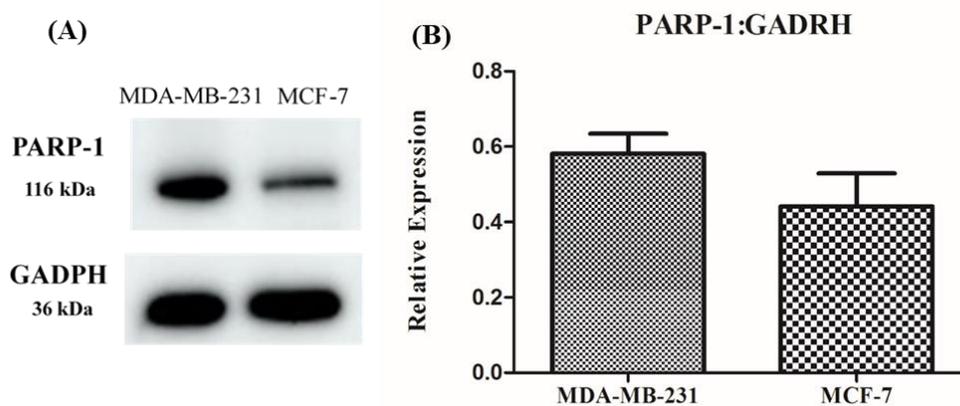
表一、放射性碘-131 標幟 KX-1 之放射藥物標幟暨分析結果

反應條件	放射化學產率 (Radiochemical yield; RY)	放射化學純度 (Radiochemical purity; RP)	標幟批數 (n)
RT, 60min, 10 μ g	14.4%	>99%	1
100 ° C, 30 min, 10 μ g	80.4 \pm 12.8%	>99%	5
100 ° C, 10 min, 5 μ g	73.0 \pm 1.3%	>99%	4

三、 西方墨點法

為確認本研究中所使用之兩種不同乳癌細胞株其 PARP-1 酵素的表現量，實驗中使用了西方墨點法來進行評估。相關結果如圖四所示，從圖四(A)中可以觀察到 MDA-MB-231 之 PARP-1 表現量較 MCF-7 細胞高，此項結果與諸多文獻報導結果一致。但將其影像進一步採用 ImageJ 軟體進行量化後，從其結果可看到與圖四(A)類似的結果，有趣的是根據分析數據所示，兩個細胞之 PARP-1 相對表現量分別為 0.6 ± 0.1 和 0.4 ± 0.2 ，且將兩組別進行統計分析後(student T-test)得出之 p 值為 0.2227，顯示兩株細胞系在 PARP-1 表現量之差異並無統計上的意義。此數據與 Dr. Alghanem 團隊於 2016 年所發表之文獻當中所得之結果相符[20]。

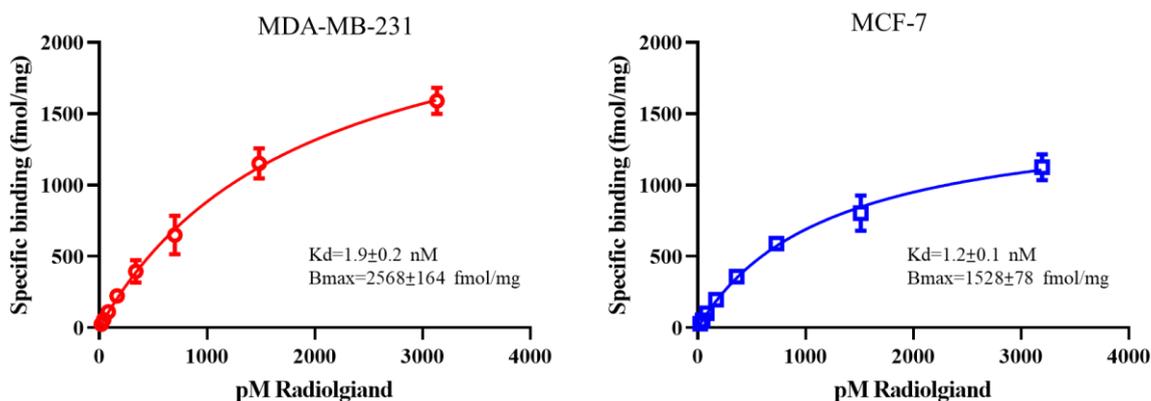
由上述之結果可得知若是後續實驗仍選用 MCF-7 作為 PARP-1 蛋白表達為陰性的控制組，可能會有 PARP-1 表達為陽性之風險。因此，若是能選用將細胞 PARP-1 基因剔除 (Gene knock-out) 之方法製備 PARP-1 之對照組細胞樣品，有機會可以解決本研究在細胞篩選上所遇到的問題。



圖四、(A) MDA-MB-231 及 MCF-7 細胞分別之 PARP-1 及 GADPH 表現。(B) MDA-MB-231 及 MCF-7 分別之 PARP-1/GADPH 相對表現量。

四、放射藥品之生物活性分析

本研究所使用放射性碘 131 標幟之 KX-1 經放射飽和結合實驗所得到之結果如圖五所示，其中 MDA-MB-231 及 MCF-7 之 K_d 結果相似 (1.9nM v.s. 1.2nM)， B_{max} 值則是與電泳結果類似，MDA-MB-231 細胞所得之結果高於 MCF-7 組別 (2568fmol/mg v.s. 1528fmol/mg)。另外，參考 Dr. Mach 團隊之研究數據，碘-125-KX-1 在 MDA-MB-231 細胞株上所呈現之 K_d 值為 5.6 ± 0.1 nM; B_{max} 值為 2867 ± 78 fmol/mg [18]，和本研究具有相似的結果，由此可證實本計畫中運用 I-131 所製備之 KX-1，其在 PARP-1 結合特異性之方面，和先前文獻已發表之碘-125-KX-1 相當，並未改變其結合特性。

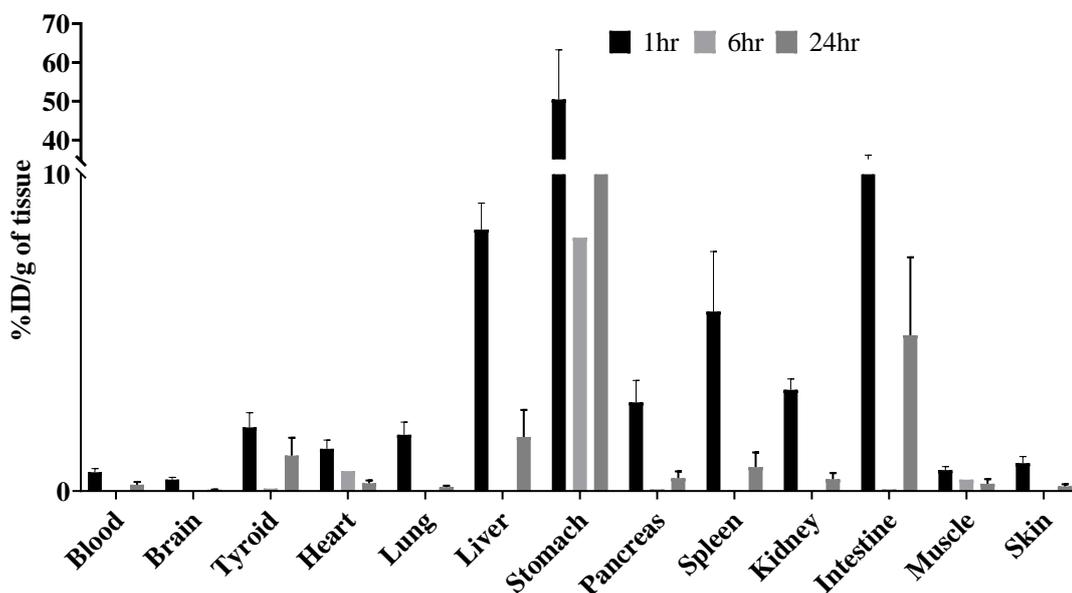


圖五、MDA-MB-231 和 MCF-7 細胞放射性飽和結合之特異性結合曲線。

五、 放射性碘-131-KX-1 生物分布實驗

為確定經口服後放射性碘-131-KX-1 於實驗動物體內之正常分布，計畫中分別於三個不同時間點於動物口服該放射性藥物後將其進行生物分布實驗。從該實驗結果(圖六)可以清楚發現，實驗動物經口服餵食 1 小時後雖然在胃部有高達 50%ID/g 之放射性活度累積，但是隨著時間到了 6 個小時後，僅剩下約 1/5 左右的活度累積，與此同時，在其他器官的活度訊號亦相當低，代表該藥物於實驗動物體內被 wash out 的速率相當不錯，未來可進一步透過增加實驗動物隻數藉此進行該過程所造成放射劑量的推算。

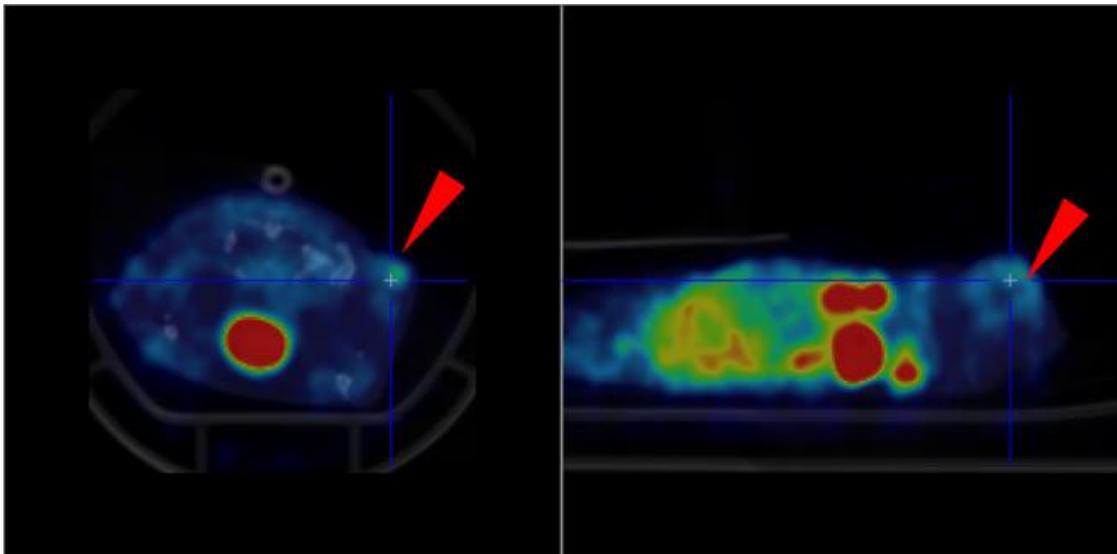
Biodistribution: I-131-KX-1 on Nomal Balb/c Nude mice



圖六、實驗動物分別於經口服給予放射性碘-131-KX-1 後 1、6 及 24 小時後之生物分布資料。

六、 放射性碘-123-KX-1 於腫瘤動物模型上之活體造影

待實驗動物經 MDA-MB-231 腫瘤細胞注射 4 周後，為進一步評估 KX-1 結合至動物體內腫瘤 PARP-1 之情況，本計畫使用實驗室所建立之碘-123-KX-1 對該實驗動物進行活體造影。圖七為代表性活體造影影像，該影像中採用紅色箭頭標示之處為腫瘤植入之處，從該結果中可明顯觀察到放射性 KX-1 可以清楚的呈現出腫瘤所在之處，該結果亦與文獻上所報導之氟-18-FTT (KX-1 衍生物) 結果類似 [21]。



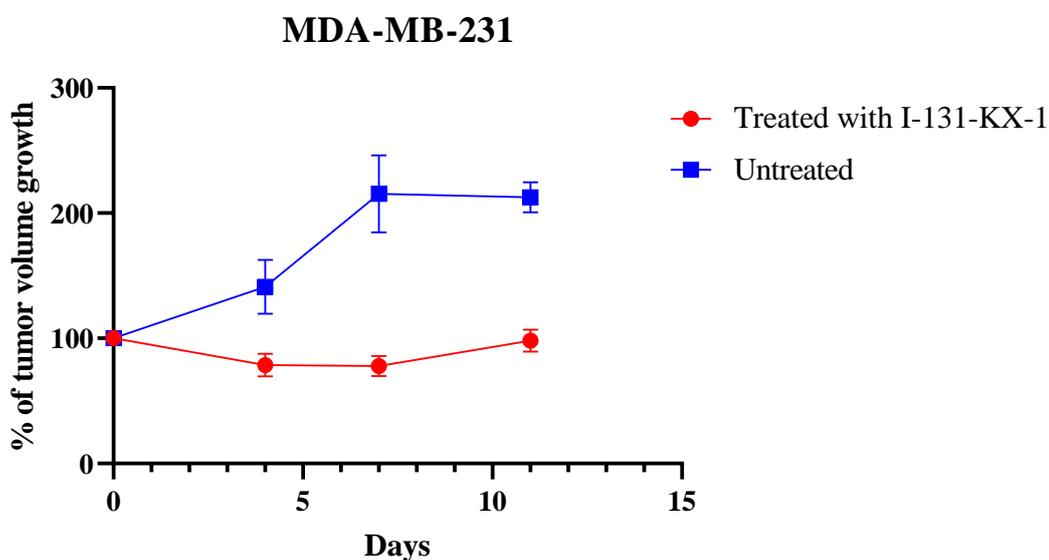
圖七、碘-123-KX-1 於 MDA-MB-231 腫瘤動物上之代表性活體 SPECT/CT 造影影像。

七、 放射性碘-131-KX-1 治療

待完成包含放射性碘-131-KX-1 製備、確認其放射化學及生物活性結合特質後，隨即將該放射性藥品投入腫瘤動物模型之治療測試實驗中。本次實驗中原定預計將實驗治療組別分為高劑量組以及低劑量組，但因於初步測試中發現低劑量組別並沒有產生效果，故僅於實驗結果中列出高劑量組別之資料。

測試結果如圖八所示，於該數據中可以清楚看到，該實驗動物在未經碘-131-KX-1 治療組別中，其腫瘤體積在開始觀察後兩週體積約增加了將近一倍，然而，在使用該放射性藥物進行治療的組別中，

於治療完成後一周內可以明顯觀察到腫瘤體積略有縮小(約10-20%)，可惜的是在治療後兩周腫瘤體積仍緩慢增加，或許意味著後續研究中可能需提高治療劑量或修改治療流程之設計(如增加每天治療次數或延長治療天數)。



圖八、MDA-MB-231 腫瘤動物分別經過碘-131-KX-1 治療(n=3)與未治療組別(n=5)其身上腫瘤體積變化趨勢。

結論

綜合整個研究所發現之結果，本計畫之主要貢獻包含建立一簡便之放射性碘-131-KX-1 標幟方式，其中關於所使用的碘-131 來源可選用一般臨床上之碘-131 口服液即可，相對於購自特定廠商之途徑，亦可有效地節約成本及省去等待進口時間之困擾。本研究過程中亦透過生物分布之實驗數據，釐清了該放射性藥品於口服 6 小時後相關之正常組織活度累積極低，雖此次數據未進一步估算其造成之劑量，但該數據亦大幅度提升了該藥品未來之發展潛力。

此外，本次研究執行過程中亦使用碘-123-KX-1 於 MDA-MB-231 腫瘤動物模型中進行活體造影，此結果亦為文獻上首次使用該藥品進行該腫瘤動物模型之活體 SPECT 造影；最後，則是在該腫瘤動物模型上成功地確定了放射性碘-131-KX-1 透過口服的治療方式能減少甚至暫緩該腫瘤之增長速率，可惜的是根據目前的結果無法持續地讓腫瘤體積減少，未來或可針對治療方式進行一系列之探討以期找出更好之治療方式。

肆、參考文獻

1. 衛生福利部：106年死因統計年報電子書。
<http://www.mohw.gov.tw>。引用 2018/10/19。Ministry of Health and Welfare, R.O.C. (Taiwan). 2017 Statistics of Causes of Death. Available at: <http://www.mohw.gov.tw>. Accessed October 19, 2018. [In Chinese]
2. Chia, S. K., Speers, C. H., D'yachkova, Y., Kang, A., Malfair-Taylor, S., Barnett, J., ... & Olivotto, I. A. (2007). The impact of new chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort of women with metastatic breast cancer. *Cancer*, 110(5), 973-979.
3. Giordano, S. H., Buzdar, A. U., Smith, T. L., Kau, S. W., Yang, Y., & Hortobagyi, G. N. (2004). Is breast cancer survival improving?. *Cancer*, 100(1), 44-52.
4. Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, 363(20), 1938-1948.
5. Venkitaraman, A. R. (2014). Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science*, 343(6178), 1470-1475.
6. Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nature reviews cancer*, 4(10), 814.
7. Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., ... & Pasini, B. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.
8. Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., ... & Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913.
9. Amé, J. C., Spenlehauer, C., & de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays*, 26(8), 882-893.
10. Nguewa, P. A., Fuertes, M. A., Valladares, B., Alonso, C., & Pérez,

- J. M. (2005). Poly (ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Progress in biophysics and molecular biology*, 88(1), 143-172.
11. Virag, L., & Szabó, C. (2002). The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological reviews*, 54(3), 375-429.
 12. Papadimitriou, M., Mountzios, G., & Papadimitriou, C. A. (2018). The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. *Cancer treatment reviews*.
 13. Murai, J., Shar-yin, N. H., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., ... & Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer research*, 72(21), 5588-5599.
 14. Pettitt, S. J., Rehman, F. L., Bajrami, I., Brough, R., Wallberg, F., Kozarewa, I., ... & Lord, C. J. (2013). A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. *PloS one*, 8(4), e61520.
 15. Hopkins, T. A., Shi, Y., Rodriguez, L. E., Solomon, L. R., Donawho, C. K., DiGiammarino, E. L., ... & Stolarik, D. F. (2015). Mechanistic dissection of PARP1 trapping and the impact on in vivo tolerability and efficacy of PARP inhibitors. *Molecular Cancer Research*, 13(11), 1465-1477.
 16. Anderson, R. C., Makvandi, M., Xu, K., Lieberman, B. P., Zeng, C., Pryma, D. A., & Mach, R. H. (2016). Iodinated benzimidazole PARP radiotracer for evaluating PARP1/2 expression in vitro and in vivo. *Nuclear medicine and biology*, 43(12), 752-758.
 17. Zmuda, F., Malviya, G., Blair, A., Boyd, M., Chalmers, A. J., Sutherland, A., & Pimlott, S. L. (2015). Synthesis and evaluation of a radioiodinated tracer with specificity for poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in vivo. *Journal of medicinal chemistry*, 58(21), 8683-8693.
 18. Makvandi, M., Xu, K., Lieberman, B. P., Anderson, R. C., Effron, S. S., Winters, H. D., ... & Mach, R. H. (2016). A radiotracer strategy to quantify PARP-1 expression in vivo provides a biomarker that can enable patient selection for PARP inhibitor therapy. *Cancer research*, 76(15), 4516-4524.

19. Knight, J. C., Koustoulidou, S., & Cornelissen, B. (2017). Imaging the DNA damage response with PET and SPECT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 44(6), 1065-1078.
20. Alghanem, Bandar, et al. "Proteomics Profiling of KAIMRC1 in Comparison to MDA-MB231 and MCF-7." *International journal of molecular sciences* 21.12 (2020): 4328.
21. Lee, Hsiaoju S., et al. "The development of 18F fluorthanatrace: A PET radiotracer for imaging poly (ADP-Ribose) polymerase-1." *Radiology: Imaging Cancer* 4.1 (2022): e210070.