

出國報告（出國類別：其他）

參加 2012 歐洲核醫學會年會公差報告

服務機關：核能研究所

姓名職稱：羅彩月 副研究員

林武智 研究員

派赴國家：義大利

出國期間：101 年 10 月 25 日~101 年 11 月 2 日

報告日期：101 年 12 月 2 日

摘 要

本次公差任務為參加 2012 歐洲核醫學會年會(2012 EANM)，並發表一篇壁報論文。2012 EANM 在義大利米蘭市國際會議中心舉行，會議共計 5 天(自 2012/10/17~10/31)。本次會議發表之論文超過 1900 篇，涵蓋目前核醫熱門之領域，尤其針對腫瘤診斷與治療核醫藥物相關研究，發表共計 828 篇，顯見治療用核醫藥物之研究已為核醫相當重要之領域。除此，並針對分子生物學、藥理學及生物技術等領域亦有專題討論，核醫藥物之發展已深入分子生物研究領域。

多年來核研所與各醫院的互動頻繁且積極，但只是限於少數的科別，其中以核醫科為最，為了尋求更創新的想法，應多參與其它學研單位之研究，跨領域合作，期望能開創出更具診斷與醫療效用之藥物及醫材等，造福百姓。

目 次

摘 要

(頁碼)

一、目 的	1
二、過 程	2
三、心 得	3
四、建 議 事 項	10
五、附 件	11

一、目 的

核能研究所(以下簡稱爲本所)積極從事開發於診斷與治療用核醫藥物等，爲瞭解先進國家在核醫藥方面技術開發現況與未來市場拓展之規劃，同位素組林武智組長及羅彩月博士奉派參加 2012 歐洲核醫學會年會(2012 Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2012 EANM)，發表論文，介紹本所 Re-188 Herceptin 之乳癌動物模式療效評估之研發成果，並蒐集國際間對於癌症治療之現況，並瞭解診斷用核醫藥物之研發現況，以作爲本未來核醫藥物發展之參考。

本次年會之地點爲義大利米蘭市國際會議中心，台灣共有台大醫院、三總、長庚、清大、核研所等代表出席。本次會議發表之論文超過 1900 篇，涵蓋目前核醫熱門之領域，包括:(1)心臟血管(2)診斷腫瘤(3)神經/精神學(4)放射藥學/放射化學(5)物理/儀器(6)放射腫瘤治療/劑量學(7)臨床科學(8)一般主題(9)分子造影等，尤其針對腫瘤診斷與治療相關研究(包含藥物、儀器及軟體等)，即佔全部發表論文之 44.5%，若細分核醫治療相關之論文(radiotherapy & dosimetry)，即有 326 篇的論文發表(佔全體論文之 17.5%)，明顯可以看出癌症之診斷與治療研究已成爲核醫相當重要之領域。除此，並針對分子生物學、藥理學及生物技術等領域亦有專題討論，會議中亦有研究提出利用高分子材料研製微粒之臨床試驗報告，此與本所目前開發之新劑型發展方向一致。

二、過 程

本次公差行程如下：

月	日	星期	地點	工作紀要
10	25	四	桃園	去程：桃園機場出發至米蘭
10	26	五	米蘭市	1. 抵達義大利米蘭市 2. 安置行李及辦理住宿
10	27	六	米蘭市	1. 至 2012 歐洲核醫學會年會會場辦理報到手續，並領取資料袋。 2. 張貼壁報論文一份，並參加 EANM 安排 pre-symposium。
10	28	日	米蘭市	1. 參加 2012 EANM 年會。 2. 參加各項專題演講與持續教育課程。
10	29	一	米蘭市	1. 參加 2012 EANM 年會。 2. 參加各項專題演講與持續教育課程。 3. 配合大會之安排，參加壁報展示與說明活動。 4. 晚上七點，參加 EANM 在教堂舉辦之慈善音樂會。
10	30	二	米蘭市	1. 參加 2012 EANM 年會。 2. 參加各項專題演講與持續教育課程。
10	31	三	米蘭市	1. 參加 2012 EANM 年會。 2. 參加各項專題演講與持續教育課程。 3. 參加 2012EANM 閉幕式。
11	1-2	四 至 五	米蘭至桃園	返程：自米蘭搭機至荷蘭，再轉機返回台灣桃園機場。

三、心得

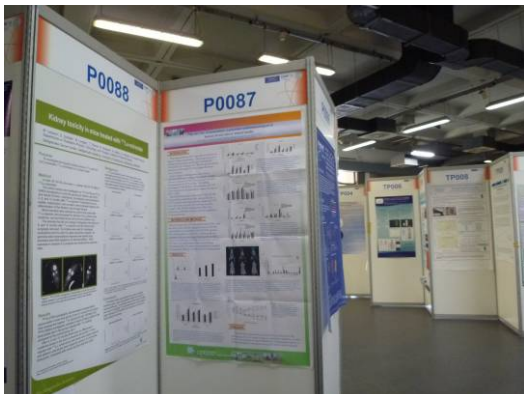
為期 5 天的歐洲核醫學會年會(圖一至三)，為歡迎國外之與會者，會場旁之地鐵站內及出口皆設有引導標示牌。本次大會分成相當多的研究主題，每日在 Gold Plenary，Brown 1-3, Space 1-4, Amber 1-3 等 11 個演講廳(一大及十小)分別安排不同領域之專題演講與討論，本人主要參加的講座包括治療用核醫藥物研究、肝癌治療研究、癌症之標靶治療、及醫療器材之研發等課程，並於與會期間參研國外學者之壁報論文成果。



圖一：義大利米蘭貿易中心(MICO, Milan Congress) 舉行 2012 EANM



圖二：義大利米蘭貿易中心地鐵站內之歡迎及標示牌



圖三： 2012EANM 會場壁報

歐洲核醫學會(EANM)為全球核醫界相當重要的研討會之一，每年皆有來自各地之核醫相關研究人員參加，會場並安排有廠商展示區，介紹目前最新之儀器(PET, SPECT, MRI)及設備(cyclotron、鉛室工程、自動化合成設備等)，核醫藥物及最新化學配合子及放射性同位素之供應商亦都利用此一核醫盛會，將他們的產品介紹核醫，多家尤以鉛室白動化設施，對於本所核醫藥物自動化 GMP/PIC-s 研製，值得注意其發展。

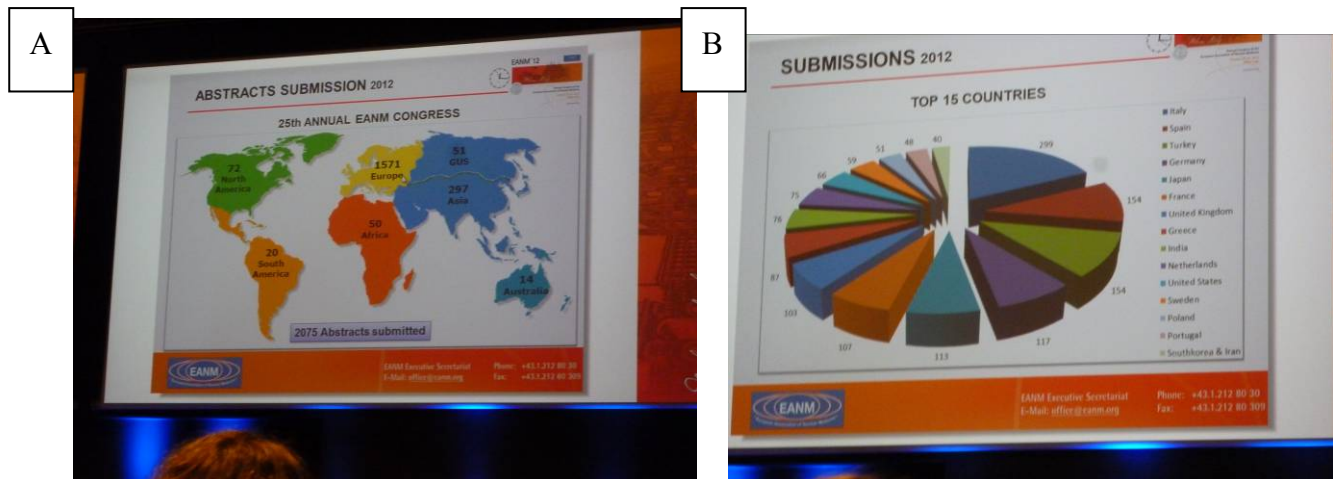
本年度欣逢 EANM 的 25 週年紀念，歐洲核醫學會特別出版紀念專輯(圖三)，介紹歐洲核醫學會(EANM)之發展以及過去二十五年來 EANM 之成就，並介紹各分會之發展。歷年來核研所皆會派員參加歐洲核醫學會除了發表論文外，並了解國外最新核醫研發現況。今年度我們發表一篇論文介紹 Re-188 HYNIC-Trastuzumab 應用於乳癌動模式之療效評估及可能作用機轉研究(poster No: P0087)。最新研究報告指出胃癌亦有多量之 HER2 受體表達，顯示 Re-188-Trastuzumab 除了做乳癌之診斷與治療用途，未來亦可擴大領域於胃癌診療之應用。



圖三、EANM 二十五週年紀念書

統計 2012 EANM 發表的論文，共有 2075 篇投稿(圖四 A)，經篩選後，口頭論文 726 篇及 poster 論文 1134 篇，共計 1860 篇，另有 technology poster 之 102 篇。論文發表最多國家為主辦國義大利，其次為西班牙及土耳其(圖四 B)。僅就一般論文進行分析，有關腫瘤之診斷或治療相關之研究報告即有 828 篇，全體論文的 44.5%；若細分核醫治療相關之論文(radiotherapy & dosimetry)，即有 326 篇的論文發表，佔全體論文之 17.5%。腫瘤之診斷與追蹤應用之論文者有 502 篇，最多論文於 thyroid cancer, breast cancer, lung cancer, prostate cancer 及 neuroendocrine tumor 等領域。癌症已是全球最重要之死亡原因，從論文發表情形可以看出核醫對此方面研究之重要，核醫治療應用亦受到重視，除了傳統的 I-131 應用於甲狀腺之治

療，核醫對於肝癌、乳癌及神經內分泌腫瘤之治療用核醫藥物亦受重視。歐洲地區對 peptide receptor radionuclide therapy (尤以 somatostatin receptor)的臨床診斷與治療相關之研究成果相當豐碩，荷蘭鹿特丹 Erasmus Medical Center 的 Dr. E.P. krenning 可以說是這方面研究之先驅，本次大會特別頒獎給 Dr. Krenning 以表彰他對於核醫之貢獻。



圖四、2012EANM 論文投稿歐域分佈(A)及投稿前 15 名之國家

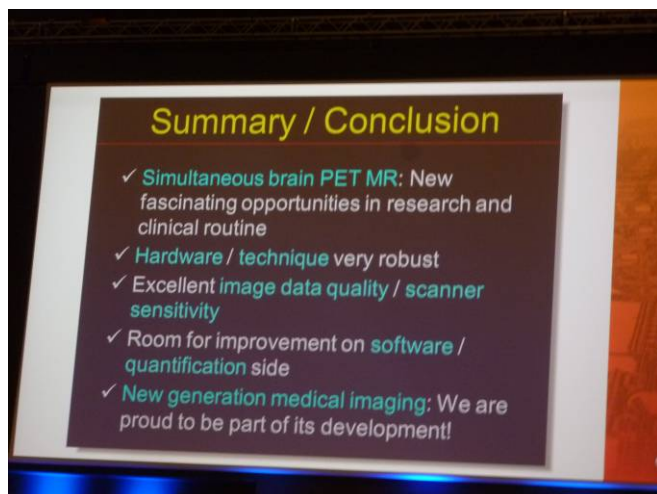
本次台灣長庚醫院的臨床研究團隊提出 F-18 AV-133 與 Parkinson's disease 症狀嚴重性之相關性之研究報告獲選為本年度 highlight lectures 之一，看到台灣的研究成果受到大會的重視，我們亦同感榮焉。負責口頭報告者為林口長庚醫院一位年輕之謝醫師，本次閻紫宸醫師帶領一群年輕之醫師參與 2012 EANM，經驗傳承之精神清楚可見。核研所亦面臨核能人才斷層之情形，如何鼓勵年輕之研究人員建立其對核醫之信心與研究興趣，應是我們需及早規劃的。

I-123/131 MIBG 對於小兒神經母細胞瘤診斷及治療之價值已廣受臨床之肯定，本次大會有相當多篇之論文發表。另外，MIBG 其化學結構與交感神經傳遞物 Norepinephrine 相似，I-123 MIBG 於今年度核醫學會之心臟造影研究領域佔有相當多篇幅，顯見 MIBG 對於交感神經功能診斷扮演著重要角色，2002 年我們即已發表 I-123 MIBG 於高血脂兔之交感神經功能研究，目前核研所亦與秀傳醫院簽定臨床合作協定，未來將應用 I-123 MIBG 針對心因性猝死症之診斷做深入之臨床探討。

有關於核種應用研究方面，本次大會安排有 Alpha emitter in nuclear Medicine 之應用，介紹 Ra-223 chloride(商品名 Alpharadin)應用於前列腺癌骨轉移之治療現況。Ra-223 可釋出 98%

alpha particle(27.8MeV)及 2% photon emission，其 Phase I and II 之結果顯示對於前列腺癌及乳癌之骨轉移可以有疼痛緩解之作用，Pain relief 之作用與 dose 具相關性，目前正在進行 Phase III ALSYMPCA (ALphradin SYMptomatic Prostate Cancer)之臨床試驗，初步結果顯示可以延長其存率。有關於 Ra-223 之 radiation dosimetry，其代謝路徑 13% excreted in feces 及 7% in urine 最高吸收劑量之器官為 bone 及 liver。另外，Y-90 是十分重要之治療核種，傳統 Y-90 都以 bremsstrahlung X-ray 來觀察其分佈，事實上，Y-90 衰減成 Zr-90 時，可以釋出 gamma emitter for PET，雖然其發生機率很低(happening rate 0.011%)，但目前已針對此一特色，發展出 Y-90 PET imaging 技術，值得我們注意，未來本所執行 Y-90 之相關研究，亦可注意此方面之發展。

本次會議中，Multimodality之研究對核醫藥物應用研究亦有相關論文被發表，PET/MRI 之臨床應用研究成果在本次會議中安排有專題討論(圖五)，未來之發展值得注意。另外，PET 結合螢光或者其它造影設施之開發亦有介紹，PET/NIR fluorescent probe ^{90}Zr -Df-TRC105-800CW即結合NIR dye (800CW)及PET核種(^{90}Zr)， ^{64}Cu -DOTA-Herceptin-IRDye800 為類似之多功能造影劑，可以協助做臨床診斷，同時亦可協助外科做開刀定位之應用。BioFLECT是一種Fluorescence emission computed tomography，它已發展到 3D-image of distribution of fluoroprobe，可以提供研究應用。



圖五、PET/MRI 之發展

本次大會也有介紹一種 multi-functional imaging，將 NIR fluorescence、autoradiography 及 H&E staining 等影像做一整合，使用一台機器即可蒐集三種影像，對於基礎研究應十分有幫助，值得注意其發展。Ho-166 可釋出 Gamma ray(81keV)及 Beta particle(1.84MeV)，為重要治療用核種之一，且適合 SPECT 及 MRI imaging，Ho-166 結合 PLLA microsphere 做為肝癌栓塞

之治療用藥(圖六)，phase I 臨床試驗選擇(1)colorectal carcinoma;(2) Ocular melanoma;
(3)Cholangioma; (4)Breast cancer 等癌症轉移至肝癌進行試驗，顯示其安全性，且最大忍受劑
量為 60Gy，正規劃進一步測試中。

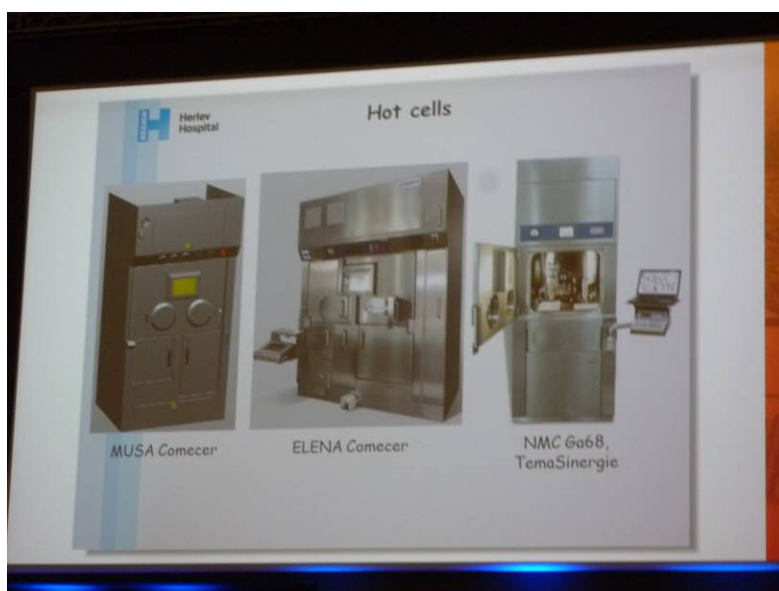
	Holmium Spheres	TheraSphere	SIR-Spheres
Matrix	PLLA	Glass	Resin
Diameter	30 µm	25 µm	32 µm
Isotope	Holmium-166	Yttrium-90	Yttrium-90
T _{1/2}	26.8 hours	64.0 hours	64.0 hours
Number of spheres	33 million	4 million	50 million
Mg per dose	600	110	1370
Activity per sphere	450 Bq	1,250-2,500 Bq	50 Bq
Max activity / dose	15 GBq	5 GBq	3 GBq
Cross section	64 barn	1.28 barn	1.28 barn
Imaging	MRI / SPECT	PET / Bremsstrahlung	PET / Bremsstrahlung
Test dose	Ho-spheres	Tc-MAA	Tc-MAA

Holmium Spheres (UMC Utrecht, The Netherlands)
 SIR-Spheres® (SIRTeX Medical Ltd., Sydney, New South Wales, Australia)
 TheraSphere® (MDS Nordion Inc., Kanata, Ontario, Canada)

圖六、三種栓塞劑型之比較

腦神經造影之開發亦是本次大會安排的重點，著重於臨床結果之討論與比較，新藥之開發相對較少(圖七)，臨床試驗目前皆著重於整合型計畫之執行，跨國跨院之合作，head to head之比較，使其結果更具客觀性(圖八)。本次會議，職亦參加專為臨床醫師開設之 artifacts and pitfalls，它的特色是請一位有經驗或者該領域傑出之醫師，先就該領域(例如 FET, FLT, F-DOPA)等做一介紹，並提出問題(可能是影像或者藥物之應用領域)，請在座的每一位學員按鈕選擇答案，並立即統計出各選項答題之百分比，再由演講者宣佈答案，並提供自己的經驗或學術論著來支持這些觀點，參與者亦可提出不同的看法或者經驗，這是一種很好的互動模式，可以避免答錯題目的尷尬，又可從多方觀點來分析疾病的可能性，對一位臨床醫師之判讀訓練應是蠻好的設計。雖然核醫藥物往好的一方面想它是一種 functional imaging or metabolic imaging，另一方面想它對疾病的專一性仍有許多變異存在，尤其新藥不停推陳出新之際，臨床醫師的經驗養成及持續再教育更顯重要。對一位基礎科學的研究人員亦應有相同的學習精神，以核研所同位素組目前的訓練僅是要求研究人員針對其研究內容與成果做分享，目前所內正在推動新進人員之 mentor-mentee 訓練，正是一個好的經驗傳承機會，對年輕同仁的學習及了瞭研究發展之全貌必有很大助益。

等等)，幹細胞治療及骨髓移植等，放射核種之治療則首推 I-131 MIBG。I-131 MIBG 的第一例臨床報告由美國密西根大學於 1981 發表，直至 2012 年 Michigan University 亦發表 the report about the therapy of I-131 MIBG，EANM 並在 2012 年 8 月出版了 the clinical diagnosis guideline for pheochromatocytoma 供臨床應用之參考，顯見 I-131 MIBG 對於神經母細胞瘤治療之重要性。



本次韓國發表一篇論文，他們利用 FDG 來做核電廠工作人員之癌症篩檢之工具，比較核電廠之工作人員(test group)與非電廠之人員(control group)之癌症發生率。本試驗自 2003 年 3 月起至 2011 年 12 月，蒐集 8922 個無症狀之受試者，4531 位男性，4391 位女性，平均年齡為 58 ± 10.4 歲，發現核電廠工作者之癌症發生率為 0.21%，低於對照組(0.98%)，核電廠之工作人員罹癌較多者是肺癌、大腸癌及鼻咽癌，相對地，對照組之非電廠人員，其主要癌症為甲狀腺癌，結論是 FDG 可以早期偵測癌症之發生，一般認為核電廠工作者有較高之癌症發生率，本調查報告當可做為科學性的客觀證據。

四、建 議 事 項

本次職奉派參與歐洲核醫學會，了解國外最新核醫發展現況，並與本所之核醫發展做比較，依此次公差經驗，對本所未來核醫發展有如下之建議：

- (一)、I-123 MIBG 之應用逐漸受到重視，尤其對於交感神經功能疾病相關者(例如心因性猝死症等等)，本所應繼續擴大其應用領域。
- (二)、缺氧組織造影劑對於癌症放射治療劑量之評估扮演重要角色，本所應積極與醫院之放射線相關科別合作，以增加其應用價值。腫瘤內部缺氧情形之資訊將影響放射治療療效，本所曾投入相關研究，唯合作對象僅侷限於核醫科，實際上真正需求單位為放射線科，發揮其功能。
- (三)、多支持年輕研究者多參加國內外之學術研討會，訓練其進行口頭論文發表，吸收國外最新醫學發展，也藉此鼓勵發表研究成果。
- (四)、癌症治療目前朝向標靶治療，可利用治療性放射性同位素鍵結專一性標靶藥物，增進癌症治療效果。
- (五)、新醫療器材（包含儀器、材料及分析軟體）之開發日新月異，除了本所內部之資源整合外，亦應擴大與國內學研單位合作，增強本所之競爭力。
- (六)、胃癌病人大量表現 Her-2，本所已建立 Re-188/Tc-99m Herceptin 之標幟技術，並應用於乳癌之診斷與治療，相關技術將可應用於胃癌之診斷。本可進一步利用 phage display 技術開發專一性胜肽，做為胃癌新的生物標記。
- (七)、韓國學者發表之核電廠工作人員與非電廠人員之健檢報告十分具有意義，國內民眾對於核能有諸多之誤解，建議我國亦應深入進行流行病學之調查與研究，以科學數據做佐證，以消彌誤解。

¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab: a potential radioimmunoagent in human breast cancer animal model

Tsai-Yueh Luo^{1,2*}, Po-Ching Cheng¹, Ping-Fang Chiang¹, Yu-Lung Wu¹,
and Wu-Jyh Lin¹

¹Isotope Application Division, Institute of Nuclear Energy Research, Taoyuan, Taiwan. ² Institute of Radiological Science, Central University, Taichung, Taiwan.

Abstract

Introduction. Radioimmunotherapy (RIT) provides an approach to improve Trastuzumab therapy. This research goal is to evaluate the therapeutic potential of Trastuzumab (Herceptin[®]) IgG, labeled with ¹⁸⁸Re through introduced hydrazino nicotinamide (HYNIC) ligand for breast cancer treatment.

Methods. Different molar ratios of Trastuzumab and HYNIC were selected to react, and the conjugation ratio of HYNIC-Trastuzumab was analyzed by MALDI-TOF method. The immunoreactivity of HYNIC-Trastuzumab was compared with non-conjugated Trastuzumab in HER-2/neu over-expressing the human breast cancer cell BT-474. An *in vivo* experiment in nude mice bearing subcutaneous BT-474 tumor was performed to evaluate the therapeutic efficacy of ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab.

Results. Four molar-ratios immunoconjugates (4:1, 8:1, 15:1 and 20:1 of HYNIC to Trastuzumab) resulted in the introduction of 0.57 ± 0.04 , 2.68 ± 0.62 , 4.5 ± 0.79 and 6.09 ± 0.19 HYNIC molecules per molecule of Trastuzumab by MALDI-TOF. In-vitro receptor-binding assay, there was no significant difference in dissociation kinetic constant between conjugated HYNIC-Trastuzumab and intact Trastuzumab in BT-474 cell line. The binding percentage of ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab in BT-474 cells was proven to be significantly higher than that of MCF-7 cells. The biodistribution data showed that ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab accumulated avidly and specifically in BT-474 tumors, achieving sufficient uptake and T/NT ratios. RIT tests on the BT-474 bearing mice also revealed

^{188}Re -HYNIC-Trastuzumab effectively enhanced the inhibition of tumor growth compared to Trastuzumab alone.

Conclusions. ^{188}Re -HYNIC-trastuzumab could specifically accumulate in the subcutaneous BT-474 tumors of mice to enhance the inhibition of tumor growth. This study proved that ^{188}Re -HYNIC-Trastuzumab might be a potential therapeutic radiopharmaceutical for breast cancer treatment.

Keywords: Radioimmunotherapy, HYNIC-Trastuzumab, ^{188}Re



¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab: a potential radioimmunoagent in human breast cancer animal model

Tsai-Yueh Luo^{1,2*}, Po-Ching Cheng¹, Ping-Fang Chiang¹, Yu-Lung Wu¹, and Wun-Jyh Lin¹
¹Isotope Application Division, Institute of Nuclear Energy Research, Taoyuan, Taiwan.

INTRODUCTION

Radioimmunotherapy (RIT) provides an approach to improve Trastuzumab therapy. This research goal is to evaluate the therapeutic potential of Trastuzumab (Herceptin®) IgG, labeled with ¹⁸⁸Re through introduced hydrazino nicotinamide (HYNIC) ligand for breast cancer treatment.

In-vitro receptor-binding assay, there was no significant difference in dissociation kinetic constant between conjugated HYNIC-Trastuzumab and intact Trastuzumab in BT-474 cell line. The binding percentage of ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab in BT-474 cells was proven to be significantly higher than that of MCF-7 cells.

The biodistribution data showed that ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab accumulated avidly and specifically in BT-474 tumors, achieving sufficient uptake and T/N ratios. RIT tests on the BT-474 bearing mice also revealed ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab effectively enhanced the inhibition of tumor growth compared to Trastuzumab alone.

MATERIALS AND METHODS

Different molar ratios of Trastuzumab and HYNIC were selected to react, and the conjugation ratio of HYNIC-Trastuzumab was analyzed by MALDI-TOF method. The immunoreactivity of HYNIC-Trastuzumab was compared with non-conjugated Trastuzumab in HER-2/neu over-expressing the human breast cancer cell BT-474. An *in vivo* experiment in nude mice bearing subcutaneous BT-474 tumor was performed to evaluate the therapeutic efficacy of ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab.

RESULTS

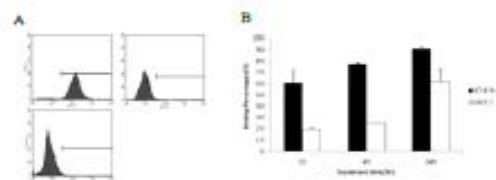


FIGURE 1. The affinity of cell binding on the Her2 receptor of different cell lines. (A) Expression of the Her2 proteins in BT-474, MCF-7 and BT-20 cells analyzed by flow cytometry. FITC-conjugated mouse anti-human anti-HER2 immunoglobulin was used to stain HER2 proteins on all of the cell surfaces. Histograms depict the frequency of Her2-expressing cells from different cell lines. The numbers on each histogram represent the mean frequency. The data shown is representative of a typical result. (B) ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab binding affinity in BT-474 and MCF-7 breast cancer cell lines. The cell-binding percentages of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab on BT-474 (black bars) and MCF-7 (white bars) were measured relative to the total amount of radioactivity added to incubation media. Data from three separate experiments are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared between two breast cancer cell lines.

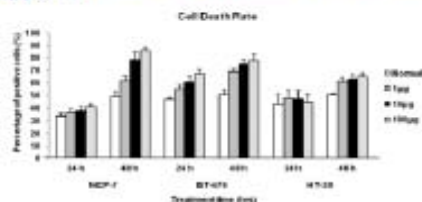


FIGURE 2. Trastuzumab-induced mortality in BT-474, MCF-7 and BT-20 cells by flow cytometry analysis. BT-474, MCF-7 and BT-20 cells were treated with different doses of trastuzumab as indicated. The cells treated with different doses of trastuzumab were removed and replaced with new media after 24 hr or 48 hr treatment. Twenty-four hours after treatment, the percentage of dead cells was measured by flow cytometry. Data from 3-5 separate experiments are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared with the normal control, respectively.

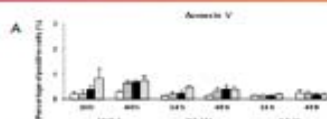


FIGURE 3. Trastuzumab-induced apoptosis phenotypes in BT-474, MCF-7 and BT-20 cells by flow cytometry analysis. BT-474, MCF-7 and BT-20 cells were treated with different doses of trastuzumab as indicated. The cells treated with different doses of trastuzumab were removed and replaced with new media after 24 hr or 48 hr treatment. Twenty-four hours after irradiation, the percentages of A) Annexin V positive cells, B) apoptotic cells with fragmented nuclei and C) mitochondrial membrane potential depolarization were measured by flow cytometry.

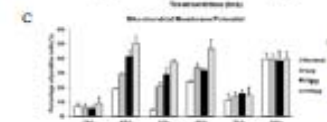


FIGURE 4. ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab-induced mortality in BT-474, MCF-7 and BT-20 cells by flow cytometry analysis. BT-474, MCF-7 and BT-20 cells were treated with different activity doses of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab or trastuzumab alone (1 μ g) or ¹⁸⁸Re alone as indicated. The cells treated with different doses of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab were removed and replaced with new media after 24 hr or 48 hr treatment. Twenty-four hours after irradiation, the percentage of cell death was measured by flow cytometry. The percentage of cell death was calculated as described in the text.

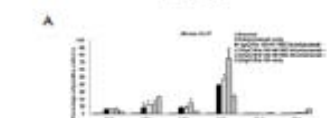


FIGURE 5. Comparison of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab-induced apoptosis phenotypes in BT-474, MCF-7 and BT-20 cells by flow cytometry. BT-474, MCF-7 and BT-20 cells were treated with different activity doses of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab or trastuzumab alone (1 μ g) or ¹⁸⁸Re alone as indicated. The cells treated with different doses of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab were removed and replaced with new media after 24 hr or 48 hr treatment. Twenty-four hours after irradiation, the percentages of A) Annexin V positive cells, B) apoptotic cells with fragmented nuclei and C) mitochondrial membrane potential depolarization were measured by flow cytometry.

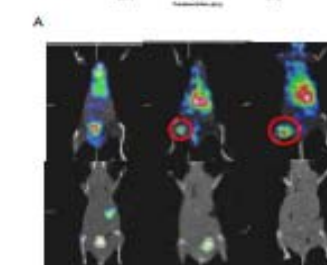


FIGURE 6. Images and biodistribution of nude mice bearing BT-474 tumor xenografts after injection of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab. (A) Posterior whole-body micro single photon emission computed tomography (microSPECT) fused PET/CT images of representative nude mice bearing subcutaneous HER-2/neu positive BT-474 human breast cancer xenografts at 1, 4, 24 and 48 hr after an intravenous injection of 1) ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab and 2) ¹⁸⁸Re isotope only, respectively. The red circles indicate location of tumor. The mouse was kept in a steady position by inhaling anaesthetic isoflurane for 1 hr imaging time for all images. (B) Percentage of injected dose per gram of tissue of ¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab at 1, 4, 24 and 48 hr post-injection in nude mice bearing subcutaneous HER-2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts.

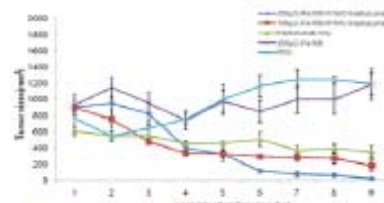


FIGURE 7. Change in tumor volume (mm³) in different treatment groups of BT-474-bearing mice xenografts. The mean $\pm$ standard deviation (SD) within each group is plotted by week after treatment start. The means for all groups are shown by week until week nine. The number of mice used in this experiment was 7-8 for each group.

Conclusion

¹⁸⁸Re-HYNIC-trastuzumab could specifically accumulate in the subcutaneous BT-474 tumors of mice to enhance the inhibition of tumor growth. This study proved that ¹⁸⁸Re-HYNIC-Trastuzumab might be a potential therapeutic radiopharmaceutical for breast cancer treatment.



行政院原子能委員會
核能研究所

Institute of Nuclear Energy Research