Original Article

9-(4-[^{18}F] Fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine 합성의 자동화와 최적화에 관한 연구

국립암센터 핵의학과[1], 연구소 분자영상치료연구과[2]
안재석[1] · 홍성탁[1] · 강세훈[2] · 원우재

A Study on the Automation and Optimization of 9-(4-[^{18}F] Fluoro-3-hydroxymethylbutyl) Guanine Synthesis

Jae Seok An[1], Sung Tack Hong[1], Se Hun Kang[2] and Woo Jae Won[1]
[1]*Department of Nuclear Medicine, National Cancer Center, Goyang, Korea*
[2]*Molecular Imaging and Therapy Branch, National Cancer Center, Goyang, Korea*

Purpose: The HSV1-tk reporter gene system is the most widely used system because of its advantage is that it is possible to monitor directly without the introduction of a separate reporter gene in case of HSV1-tk suicide gene therapy. This study was performed to automate 9-(4-[^{18}F] Fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine ([^{18}F] FHBG) that are widely used as substrate for the HSV1-tk reporter gene in living organisms with positron emission tomography (PET) and find the optimized conditions of synthesis. **Materials and Methods:** Fully automated synthesis of [^{18}F] FHBG was performed using Explora-RN (CTI, USA) module. We have changed of reaction time (3, 5, 10 min) and temperature (110, 120, 130°C) for the optimized conditions of synthesis. Also we experimented to find the optimal concentration of precursor (5, 7, 10 mg). **Results:** [^{18}F] FHBG was purified by HPLC system and collected at around 10-12 min. Synthesis using Explora-RN module showed a 32.0±1.2% yield of radiochemical (decay corrected), the purity was greater than 98%. And the entire synthesis time was less than 48 min. Temperature of the highest synthesis yield was 130°C, reaction time was 5 minutes and concentration of precursor was 10 mg (recommended volume in manual) (n=36). In contrast to radiochemical yield of precursor 10 mg (32±1.2%), yield of 5 and 7 mg precursor was unstable. **Conclusion:** Automation of [^{18}F] FHBG synthesis at Explora-RN module has been completed. In addition, we were able to obtain optimized reaction time, temperature and concentration of precursor. Therefore this study would be provided more rapid synthesis and higher radiochemical yield. **(Korean J Nucl Med Technol 2011;15(2):72-75)**

Key Words : HSV1-tk, [^{18}F] FHBG, Explora-RN module

서 론

단순 헤르페즈 제1형 티미딘 키나제(Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase, HSV1-tk) 유전자는 보고 유전자(reporter gene)로서 필요한 조건뿐만 아니라 별도의 치료 유전자를 따로 이입할 필요가 없다는 장점을 가지고 있어 유전자 영상과 치료에서 가장 널리 사용되는 유전자 중 하나이다.[1)] HSV1-tk 보고 유전자의 기질은 크게 acycloguanosine 유도체와 uracil nucleoside 유도체로 나누어진다. [^{18}F] Fluoride로 표지하여 PET (Positron Emission Tomography) 영상에 사용되는 acycloguanosine 계열의 기질은 [^{18}F] FHBG, [^{18}F] FHPG, [^{18}F] FFAU, [^{18}F] FEAU, [^{18}F] FMAU 등이 보고되고 있다.[2,3)]

[^{18}F] FHBG는 지금까지 합성된 acycloguanosine 계열 유도체 중에서 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포 내에서의 섭취율이 가장 좋은 것으로 알려져 있고 최근에는 영장류에 대한 전임상 연구가 보고된 바 있다.[4)]

• Received: June 28, 2011. Accepted: July 5, 2011.
• Corresponding author: Jae Seok An
Department of Nuclear Medicine, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 410-769, Korea
Tel: +82-31-920-0176, FAX: +82-31-920-0179
E-mail: anjaedol@hanmail.net

본 연구는 간암 세포 중에서 HSV1-tk 보고 유전자의 기질로서 가장 많이 사용되어지고 있는 [^{18}F] FHBG의 합성 자동화를 완성하기 위하여 진행하였다. 또한 가장 높은 합성 수율을 나타내는 반응 조건들을 찾아 임상에 적용하고 합성의 효율성을 극대화하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 전구체(precursor)와 시약

[^{18}F] FHBG의 전구체 N2-monomethoxytrityl-9-[(4-tosyl)-3-(mono-methoxytrityloxy) methylbut-1-yl] guanine은 퓨처켐에서 구입하였으며 실험에 사용된 시약 K_2CO_3, Kryptofix $_{2.2.2}$. (K_{222}), acetonitrile, $NaHCO_3$는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매하였다. ^{18}O-H_2O는 Taiyo Nippon Sanso Co. (Japan)에서 구매하였으며 사용된 [^{18}F] Fluoride는 본원 사이클로트론 CTI RDS111 (USA) 제품으로 생산하였다. 만들어진 [^{18}F] Fluoride는 Chromafix® PS-HCO_3 (45 mg, Macherey- Nagel Ins., Germany)를 사용하여 분리하였다. HPLC (High performance liquid chromatography)의 컬럼은 Alltech사의 Econosil C18 (10 μ m, 10×250 mm)제품을 사용하였고 사용된 기기는 DIONEX사의 P680 모델을 사용하였다.

2. 합성

1) 합성의 자동화

[^{18}F] FHBG합성의 자동화 과정은 Explora-RN 모듈 (CTI/Siemens, USA)을 사용하여 진행하였고 사용된 프로그램의 모습은 Fig. 2와 같다.

2) 자동화 과정

Chromafix®에 의해 분리된 [^{18}F] Fluoride는 K_2CO_3 0.4

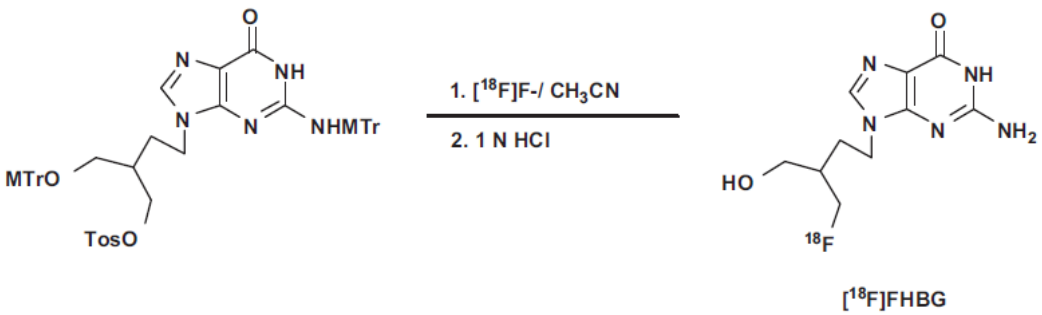

Fig. 1. Synthesis of [^{18}F] FHBG

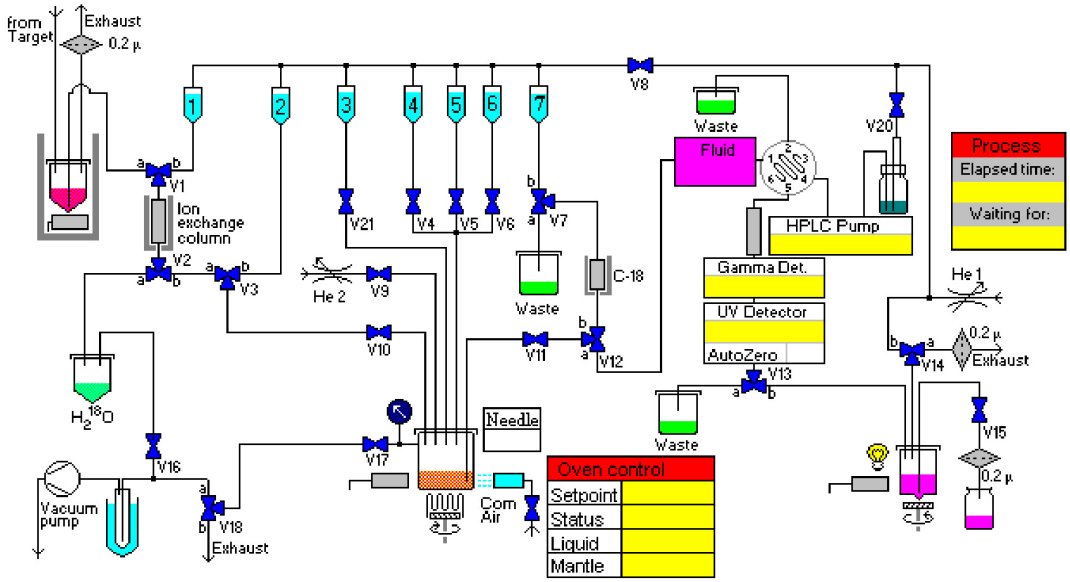

Fig. 2. Explora-RN module for automatic synthesis

mL와 K_{222} 1 mL에 의하여 용출 과정을 거친다. 시약의 조제는 K_2CO_3 7 mg을 300 μL의 증류수에 녹여 사용하고 K_{222} 22 mg을 300 μL의 acetonitrile에 첨가해 사용한다. 만들어진 시약은 Fig. 2의 1번과 2번 시약부에 차례로 주입하여 진행된다. 3번 시약부에는 0.8 mL의 acetonitrile에 용해시킨 precursor (10 mg)가 들어가며 fluorination 과정을 거친다. 그 후 4번 시약부의 1N HCl 2 mL에 의해 가수분해 과정이 진행된다(85°C, 5 min). 마지막으로 5번 시약부의 1N NaOH 2mL와 $NaHCO_3$ 0.5 mL에 의한 중화 과정과 HPLC의 정제 과정을 끝으로 최종 product인 [^{18}F] FHBG가 생산된다.

3. 정도관리

GS filter (MILLEX®-GS,MILLIPORE Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland)를 거쳐 최종 생산된 [^{18}F] FHBG는 HPLC (flow rate 4 mL/min, 254 nm UV) (Fig. 3), TLC (Thin-layer chromatography), GC (Gas chromatography), PH test, LAL (Limulus amebocyte lysate) test를 시행하였다.

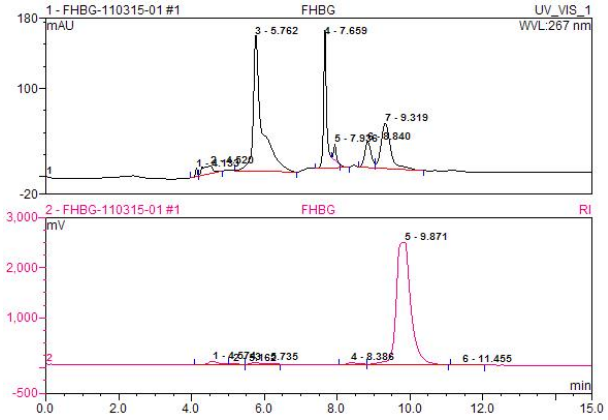

Fig. 3. Analytical HPLC chromatogram of final [^{18}F] FHBG product

4. 합성의 최적화

합성 조건의 최적화를 찾기 위하여 fluorination 단계에서의 반응시간 및 반응온도, precursor의 농도에 변화를 주어 실험을 하였다. 반응시간은 3분, 5분, 10분으로 변화를 주어 실험하였고 반응온도는 110°C, 120°C, 130°C로 조건을 달리하여 진행하였다. Precursor의 농도는 매뉴얼에서 권장하는 농도인 10 mg을 시작으로 7 mg, 5 mg까지 순차적으로 농도를 줄여 나가며 실시하였다. 각 실험은 3번씩 반복하여 진행하였고 최종 합성수율은 decay correction을 적용하여 구하였다.

결 과

여러 번 실험을 시행한 결과 Explora-RN 모듈에서의 자동화를 적용 완성하였다. 그에 따른 진행과정과 주입되는 시약의 종류 및 양은 Table 1.과 같다. [^{18}F] FHBG 합성의 최적화를 찾기 위해 실시한 실험에 대한 각각의 합성 수율 값은 Table 2.와 Table 3.에 나타난 것과 같다. 반응온도에 변화를 주어서 실험 하였을 경우 130°C에서 가장 높은 합성수율을 나타냈다(30.1±2.8%). 또한 최적의 반응시간 조건은 5분으로 나타났다(29.4±3.1%). 마지막으로 precursor의 농도에 차등 변화를 주어 실험한 값에서는 10 mg일 때에 가장 높은 합성수율을 나타냈다(32.0±1.2%). 총 합성에 소요된 시간은 평균 42분이었고 방사 화학적 순도는 99.0±3.4%였으며 모든 정도

Table 2. Radiochemical yields of [^{18}F] FHBG which used 10 mg precursor for each conditions

Condition	110°C	120°C	130°C
3 min	26.9±2.7	25.5±3.9	28.0±2.5
5 min	27.5±3.3	26.4±4.0	32.0±1.2
10 min	26.8±3.6	27.1±3.3	28.4±2.8

Table 3. Radiochemical yields of [^{18}F] FHBG for each precursor concentration

Condition	5 mg	7 mg	10 mg
130°C 5 min	27.4±4.4	26.9±4.6	32.0±1.2

Table 1. Procedures and materials for the synthesis of [^{18}F] FHBG

	Procedure	Vial	Reagents or materials
1	^{18}F-capture		
2	Elution	V1, V2	K2CO3 0.4mL, Kryptofix222 1 mL
3	Fluorination	V3	Precursor add in ACN 0.8 mL
4	Hydrolysis	V4	1N HCl 2 mL
5	Neutralization	V5	1N NaOH 2 mL, aq. NaHCO3 0.5 mL
6	Purification(HPLC)		8% EtOH:PBS buffer = 8:92
7	Final product		

관리 시험에서 적합으로 판명되었다.

결 론

본 연구에서 Explora-RN 모듈을 사용하여 합성의 자동화를 완성할 수 있었다. 이로 인하여 높은 합성수율과 순도 높은 [18F] FHBG를 얻을 수 있었고 매뉴얼 합성 시 발생 할 수 있는 피폭의 양을 최소화 시킬 수 있었다. 또한 합성의 최적화 역시 반응온도 및 반응시간, precursor의 농도 부분에서 성공적으로 이루어졌고 임상 적용이 가능하게 되었다. 하지만 생산 원가를 절감하기 위하여 시행하였던 precursor의 감량 방법은 소기의 성과는 달성 하였으나 낮은 precursor 농도에서의 합성수율이 비교적 높은 편차를 보여 안정된 결과를 얻었다고 볼 수는 없었다. 이에 따라 [18F] FHBG의 합성 시 precursor의 농도를 줄여 사용하기 위해서는 더욱 많은 연구가 요구될 것으로 사료된다.

요 약

단순 헤르페즈 제1형 티미딘 키나제(Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. HSV1-tk) 유전자는 보고 유전자(reporter gene)로서 필요한 조건뿐만 아니라 별도의 치료 유전자를 따로 이입할 필요가 없다는 장점을 가지고 있어 유전자 영상과 치료에서 가장 널리 사용되는 유전자 중 하나이다. 본 연구는 HSV1-tk 보고 유전자의 기질로서 많이 사용하고 있는 9-(4-[18F] Fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine ([18F] FHBG) 합성의 자동화와 더불어 최적의 합성 조건을 구현하기 위하여 실행하게 되었다. [18F] FHBG 합성의 자동화를 위해 Explora-RN (CTI, USA) module을 사용하였다. 최적의 합성수율 조건을 찾기 위하여 반응시간의 변화(3 min, 5 min, 10 min)와 반응온도의 변화(110°C, 120°C, 130°C)를 주었다. 또한 precursor 용량의 변화(5 mg, 7 mg, 10 mg)에도 합성수율이 어떻게 영향을 미치는지 알아보았다. [18F] fluorination 단계에서 가장 높은 합성수율을 보인 반응온도는 130°C였고, 반응시간은 5분이었다. 반면 precursor의 용량 변화 실험에서는 10 mg을 넣었을 때의 합성 수율(32±1.2%)에 비하여 5 mg과 7 mg의 양에서는 안정된 값을 얻지 못하였다. [18F] FHBG 합성의 Explora-RN 모듈에서의 자동화를 완성하였고 최적의 합성수율을 재현할 수 있는 반응시간과 반응온도, precursor의 농도를 찾았다. 하지만 감량 precursor 방법은 낮은 농도에서 비교적 큰 편차를 보여 안정된 값을 얻지는 못하였다. 이에 따라 임상에 직접 적용하기 위해서 더 많은 연구가 시행되어져야 할 것이다.

REFERENCES

1. Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. ***Nucl Med Biol*** 1999;26:481-90
2. Alauddin MM and Conti PS. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F] fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine ([18F] FHBG): A new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. ***Nucl Med Biol*** 1998;25:175-80
3. Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, et al. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. ***J Nucl Med*** 2002;43:1072-83
4. Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, Bading JR, Conti PS. Preclinical evalution of the penciclovir analog 9-(4-[18F] fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. ***J Nucl Med*** 2001;42:1682-90
5. Min JJ, Iyer M, Gambhir SS. Comparison of [18F] FHBG and [14C] FIAU for imaging of HSV1-tk reporter gene expression: adenoviral infection vs stable transfection. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging*** 2003;30:1547-60
6. Chang CW, Lin M, Wu SY, Hsieh CH, Liu RS, Wang SJ, et al. A high yield robotic synthesis of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine ([18F] FHBG) and 9-[3-[18F] fluoro-1-hydroxy-2- propoxy) methyl] guanine ([18F] FHPG) for gene expression imaging. ***Appl Radiat Isot*** 2007; 65: 57-63
7. Shiue GG, Shiue CY, Lee RL, MacDonald D, Hustinx R, Eck SL, et al. A simplified one-pot synthesis of 9-[(3-[18F] fluoro-1-hydroxy-2-propox-y) methyl] guanine ([18F] FHPG) and 9-(4-[18F] fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine ([18F] FHBG) for gene therapy. ***Nucl Med Biol*** 2001;28:875-883
8. Wang JQ, Zheng QH, Fei X, Mock BH, Hutchins GD. Novel radiosynthesis of PET HSV-tk gene reporter probes [18F] FHPG and [18F] FHBG employing dual Sep-Pak SPE techniques. ***Bioorg Med Chem Lett*** 2003;13: 3933-3938
9. Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [18F] FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. ***J Nucl Med*** 2001;42:1225-1234
10. Nichol C, Kim EE. Molecular imaging and gene therapy. ***J Nucl Med*** 2001;42:1368-374
11. Larson SM, Tjuvajev J, Blasberg R. Triumph over mischance: a role for nuclear medicine in gene therapy (Editorial). ***J Nucl Med*** 1997;38:1230-233