

<http://dx.doi.org/10.22643/kisti.2017.3.2.91>

An optimized radiosynthesis of ^{18}F -THK-5351 for routine production on TRACERlab™ FX_{FN}

Jun Young Park¹, Jeongmin Son¹, Mijin Yun^{1,2}, and Joong-Hyun Chun^{1,2,*}

¹ Department of Nuclear Medicine, Severance Hospital, Yonsei University Health System, Seoul, Republic of Korea; ² Department of Nuclear Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea

ABSTRACT

^{18}F -THK-5351 is a PET radiotracer to image the hyperphosphorylated tau fibrillar aggregates in human brain. This protocol describes the optimized radiosynthesis of ^{18}F -THK-5351 using a commercial GE TRACERlab™ FX_{FN} radiosynthesis module. ^{18}F -THK-5351 was prepared by nucleophilic [^{18}F]fluorination from its protected tosylate precursors, (S)-(2-(2-methylaminopyrid-5-yl)-6-[[2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-3-tosyloxy]propoxy]quinolone(THK-5352), at 110 °C for 10 min in dimethyl sulfoxide, followed by deprotection with 1 N HCl. The average radiochemical yield of ^{18}F -THK-5351 was $31.9 \pm 6.7\%$ (decay-corrected, n = 10), with molar activity of 198.1 ± 33.9 GBq/ μmol (5.4 ± 0.9 Ci/ μmol , n = 10). The radiochemical purity was determined to be above 98%. The overall production time including HPLC purification is approximately 70 min. This fully-automated protocol is validated for clinical use.

Key Word: ^{18}F -THK-5351, Tau imaging, Fluorine-18, PET, Radiotracer, Automation

Introduction

알츠하이머병(Alzheimer's disease)의 조직병리학적 특징으로 베타 아밀로이드가 침착된 아밀로이드 플라그(amyloid plaques)와 타우(tau) 단백질의 과인산화로 형성된 신경섬유다발(neurofibrillary tangles, NFT)이 있다(1, 2). 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography; PET)을 이용한 아밀로이드 플라그와 신경섬유다발의 비 침습적 진단법은 알츠하이머병의 진단 및 치료방법 결정에 유용한 것으로 알려져 있다. 하지만 최근 연구에 따르면 아밀로이드 플라그를 표적으로 개발된 방사성의약품의 PET 영상은 뇌 백질(white matter)에 비특이적 섭취가 현저히 높고(3), 인지장애와 같은 임상증상의 진행이 뇌 피질(cortex)에 침착된 아밀로이드 플라그와 상관관계가 떨어지는 것으

로 보고되어 있다(4, 5). 이에 비해 신경섬유다발(NFT)의 침착은 알츠하이머병의 진행과 강한 상관관계를 갖는 것으로 알려짐에 따라 타우 단백질을 표적으로 한 방사성의약품의 개발이 활발히 진행되어 왔다(6, 7). 현재까지 타우 PET영상을 위해 개발되어 임상에 적용된 방사성의약품으로 ^{18}F -FDDNP, ^{18}F -THK-5105, ^{18}F -THK-5117, ^{18}F -AV-1451, ^{11}C -PBB3, ^{18}F -THK-5351, ^{18}F -MK-6240 등이 있다(8). 그 중 ^{18}F -THK-5351은 일본 도호쿠 대학(Tohoku university, Japan)의 Nobuyuki Okamura 연구팀이 최근에 개발한 타우 PET용 방사성의약품으로, 피질 하 백질 부위(subcortical white matter)에 비특이적 섭취를 보이는 ^{18}F -THK-5105, ^{18}F -THK-5117의 단점을 개량하기 위해 ^{18}F -THK-5117의 벤젠고리(benzene ring)를 피리딘(pyridine)으로 대체하여 지질친화성(lipophilicity)을 낮춤

Received: December 08, 2017/ Revised: December 26, 2017/ Accepted: December 28, 2017

Corresponding Author : Joong-Hyun Chun

Department of Nuclear Medicine, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Republic of Korea

Tel: +82-2-2228-2348, Fax: +82-2-312-0578, E-mail: jchun@yuhs.ac

Copyright©2017 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

으로써 체내의 대사 속도를 증가시켰다. 또한 백질 부위의 비 특이적 섭취를 줄이고 신경섬유다발과의 결합친화도를 증가시켜 PET영상을 개선시킨 것으로 보고되어 있다(9). 본 연구에서는 타우 PET용 방사성의약품인 ^{18}F -THK-5351의 최적화된 표지법을 자동합성장치를 이용하여 수행할 수 있는 방법을 소개하여, 임상적용 시 일률적으로 제조할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

Materials and Methods

1. 장비 및 시약

본 연구에서 사용된 표지 전구체인 (S)-(2-(2-methylaminopyrid-5-yl)-6-[[2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-3-tosyloxy]propoxy]quinolone(THK-5352) 과 ^{18}F -THK-5351표준물질은 도호쿠 대학의 Nobuyuki Okamura로부터 제공받아 사용하였다. 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO, part no. 326881000)는 Acros(Geel, Belgium) 제품을 사용하였고, acetonitrile(part no. 271004)은 Aldrich(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 1 N Hydrochloric acid(HCl; part no. 109057)는 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구매하였고, potassium carbonate(K_2CO_3 ; part no. 60109), ethyl alcohol(200Proof, partno. 493546), Kryptofix2.2.2($\text{K}_{2.2.2}$; part no. 291110), sodium acetate (part no. S8750), sodium phosphate monobasic monohydrate(NaH_2PO_4 ; part no. 71504)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 별도의 정제과정 없이 사용하였다. Sep-Pak[®] QMA Carbonate Plus Light(part no. 186004540) 카트리지는 Waters(Milford, MA, USA)에서 구매하였고, Strata[®]C18-E(100 mg/mL, part no. 8B-S001-EAK) 튜브형은 Phenomenex(Torrance, CA, USA)사의 제품을 사용하였다. QMA carbonate 카트리는 사용 전 10 mL의 물로 전처리한 후 사용하였고, Strata[®] C18-E 튜브는 사용 전 5 mL의 ethanol로 흘려 준 후 10 mL의 water를 흘려 conditioning 후 사용하였다. 표지 된 ^{18}F -THK-5351의 분

석은 Waters사의 고성능액체크로마토그래피 장비(Alliance e2695 HPLC system)를 사용하였으며, UV는 Waters사의 2489 UV/Vis detector를 사용하여 360 nm에서 검출하였고, 방사능은 Bioscan사의 FC-200을 사용하여 검출하였다. 고성능액체크로마토그래피의 용매로 사용한 acetonitrile과 water는 J. T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.

2. ^{18}F -THK-5351의 표지

2.1. [^{18}F]fluoride의 생산

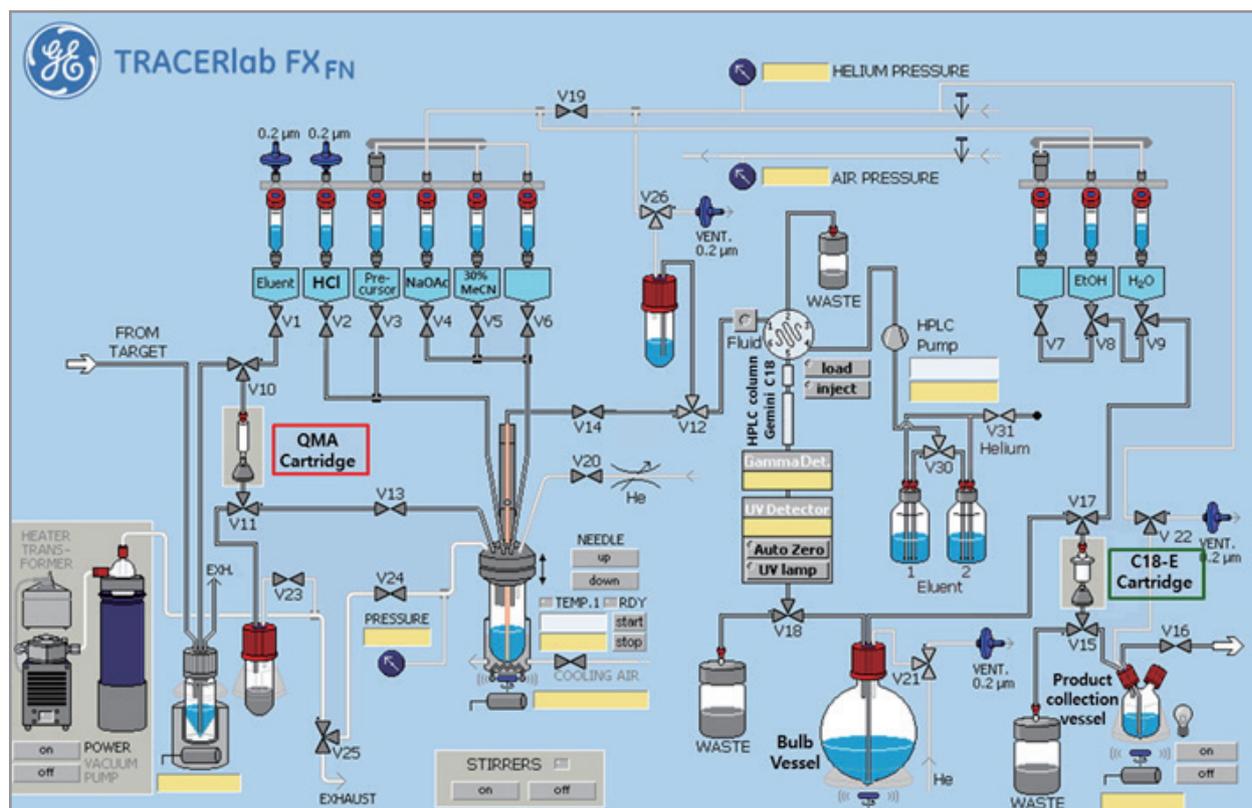
사이클로트론(PETtrace[™] 16.5-MeV cyclotron, GE Healthcare, WI, USA)을 이용하여 40 μA 로 약 20분간 양성자를 ^{18}O - H_2O 에 조사하여 [^{18}O (p,n) ^{18}F]의 핵반응으로 37 ± 3.5 GBq($1,000 \pm 96$ mCi)의 불소-18 음이온을 수화된 형태로 얻었다. 표지반응은 불소-18 전용 자동합성장치인 TRACERlab[™] FX_{FN}(GE Healthcare)을 변경이나 개조 없이 사용하였다(Figure 1). ^{18}F -THK-5351의 표지반응에 사용한 시약은 Table 1,에 요약하였다.

2.2. ^{18}F -THK-5351의 표지반응

사이클로트론에서 생성된 수화된 불소-18 음이온을 TRACERlab[™] FX_{FN} 으로 전송 후 QMA carbonate 카트리지에 흡착시켰다. QMA carbonate 카트리지에 흡착된 불소-18 음이온은 acetonitrile(0.95 mL)에 녹여져 있는 $\text{K}_{2.2.2}$ (30 mg, 0.079 mmol)와 water(0.05 mL)에 녹여져 있는 K_2CO_3 (5.5 mg, 0.040 mmol)의 혼합액(1 mL, vessel 1)을 사용하여 반응용기로 용출하였다. 반응용기는 헬륨가스의 흐름 하에 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 예열 후 110 $^{\circ}\text{C}$ 로 온도를 올려 진공 및 헬륨의 흐름 하에 9분간 건조하였다. 반응용기를 70 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉각한 후 DMSO(0.7 mL)에 녹아 있는 표지 전구체(2 mg, vessel 3)를 건조된 ^{18}F - $\text{K}_{2.2.2}/\text{K}_2\text{CO}_3$ 에 첨가하여 110 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시켰다. 불소-18 표지반응이 끝난 후, 1 N HCl(0.4 mL, vessel 2)을 반응 혼합물에 첨가 후 110 $^{\circ}\text{C}$

Table 1. Preparation of reagents for ^{18}F -THK-5351 on the TRACERlab FX_{FN} module

Position	Reagents or materials	Quantities
Vessel 1	$\text{K}_{2.2.2}$ in acetonitrile + K_2CO_3 in water	30 mg in 0.95 mL + 5.5 mg in 0.05 mL
Vessel 2	1 N HCl	0.4 mL
Vessel 3	Precursor in DMSO	2 mg in 0.7 mL
Vessel 4	0.8 M Sodium acetate	1 mL
Vessel 5	30% acetonitrile/water (v/v)	3 mL
V10-V11	Sep-Pak [®] QMA Carbonate	1
Vessel 8	Ethyl alcohol 200 Proof	1 mL
Vessel 9	Water for injection	10 mL
V15-V17	Strata [®] C18-E	1
Bulb vessel	Water for injection	30 mL
Product collection vessel	0.9% NaCl	9 mL
V16-Product Vial	0.22- μm Millex [®] GV sterile filter	1

**Figure 1.** Layout of TRACERlab[™] FXFN module for ^{18}F -THK-5351 production

에서 5분 동안 가수분해반응을 진행하여 보호기를 제거하였다. 가수분해 반응 후 반응용기를 50 °C로 냉각시키고 0.8 M sodium acetate 용액(1 mL, vessel 4)을 첨가하여 혼합물을 중화하였다.

2.3. ^{18}F -THK-5351의 분리, 정제 및 멸균

반응용기에 30% acetonitrile/water(v/v) 용액(3 mL, vessel 5)을 첨가한 후 헬륨가스를 이용하여 반응 혼합물을 semi-prep 고성능액체크로마토그래피 컬럼(Gemini C18,

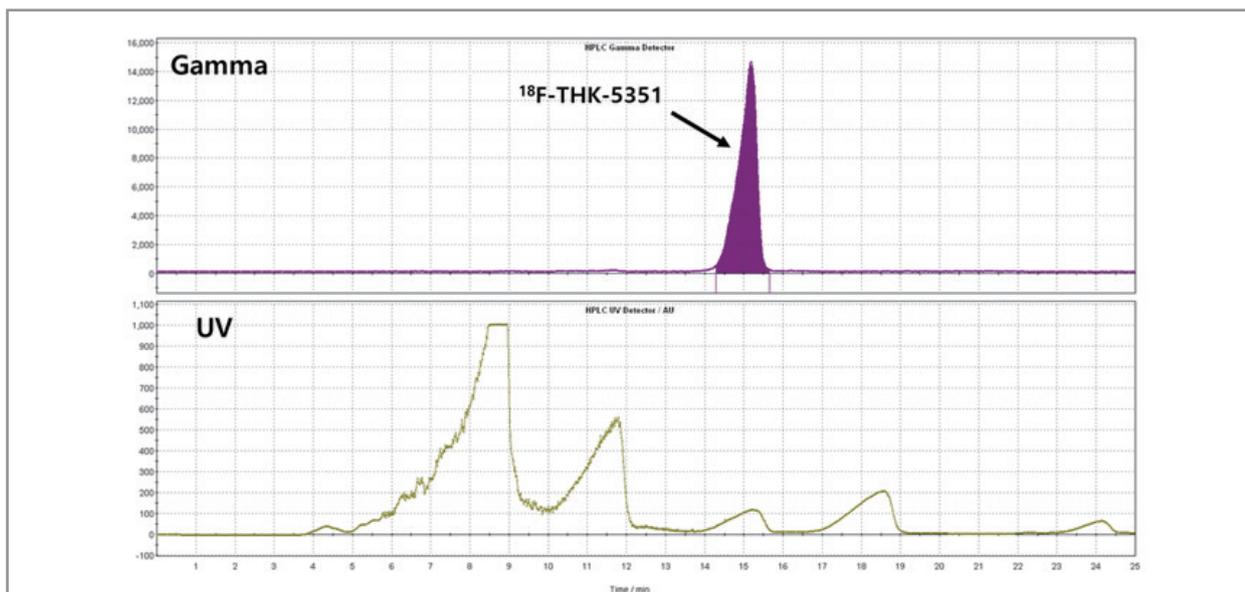


Figure 2. Typical semi-preparative HPLC chromatograms of ¹⁸F-THK-5351 reaction mixture. up: radioactivity, down: UV chromatogram (UV wavelength = 360 nm). ¹⁸F-THK-5351 eluted around 14.5-16.5 min retention fraction was collected.

10 × 250 mm; Phenomenex)에 주입하여 분리하였다. 이 동상 용매로 30% acetonitrile/20 mM NaH₂PO₄(v/v)을 사용하였고, 유속은 4 mL/min으로 분리하였다. 최종 산물인 ¹⁸F-THK-5351은 UV(λ = 360 nm) 검출기와 감마선 검출기로 모니터링하여 14-16분대에서 용리시켰다(Figure 2). 분획하여 취득한 ¹⁸F-THK-5351은 bulb vessel에 담겨있는 주사용수(30 mL)로 희석한 후 Strata[®] C18-E 에 통과시켜 흡착시켰다. Strata[®] C18-E는 주사용수(10 mL, vessel 9)로 세척하여 잔여 유기용매를 제거한 후, ethyl alcohol(200 Proof, 1 mL, vessel 8)를 ¹⁸F-THK-5351을 생리식염수(9 mL)가 담겨있는 product collection vessel에 용출하였다. 최종산물인 ¹⁸F-THK-5351혼합용액은 헬륨가스를 이용하여 0.22-μm Millex[®] GV 멸균필터(vented filter, Millipore, Billerica, MA, USA)에 통과시킨 후 멸균 바이알(Huayi Isotopes Company, Changshu, China)에 충전하였다.

3. ¹⁸F-THK-5351 의 정도관리

제조 완료된 ¹⁸F-THK-5351의 정도관리를 위하여 멸균 바이알로부터 검체 약 1 mL을 채취하였다. 정상확인을 위

하여 색깔 및 탁도 등을 육안으로 관찰하고, pH의 측정은 pH indicator strips(pH range 0-14; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 방사성핵종 순도시험은ORTEC[®] DigiBASE 다중채널분석기를 사용하여 실시하였고, 반감기 계산을 위해 CRC[®] -25PET 방사능 측정용 전리함(Capintec, Ramsey, NJ, USA)을 사용하여 방사능을 측정하였다. 방사 화학적 순도시험 및 비방사능(molar activity) 측정을 위하여 분석용 역상 고성능액체크로마토그래피 컬럼(Luna C18, 4.6 × 250 mm; Phenomenex)에 주입 후 이동상 용매로 45% acetonitrile/20 mM NaH₂PO₄(v/v)를 사용하여 0.8 mL/min의 유속으로 분석하였다(Figure 3). 잔류 유기용매는 DB-WAX 컬럼(0.53 mm id × 30 m length, 1 μm; J&W scientific/Agilent Technologies, Santa Clara, USA)이 장착된 기체크로마토그래피(Agilent 7890A, Wilmington, Delaware USA)를 이용하여 검출하였고, 잔류 Kryptofix 2.2.2의 검출은 알려진 요오드 spot test를 실시하여 확인하였다(10). 엔도톡신시험은 U.S. Pharmacopeia(USP) <85>에 명시되어 있는 광학적방법 중 비색법을 자동화한 Endosafe PTS-100 Portable Testing System(Charles River Laboratories, Willimantic, CT, USA)을 사용하여 실시하였고, 멸균 필터 완전성은 버블포인트(bubble point)

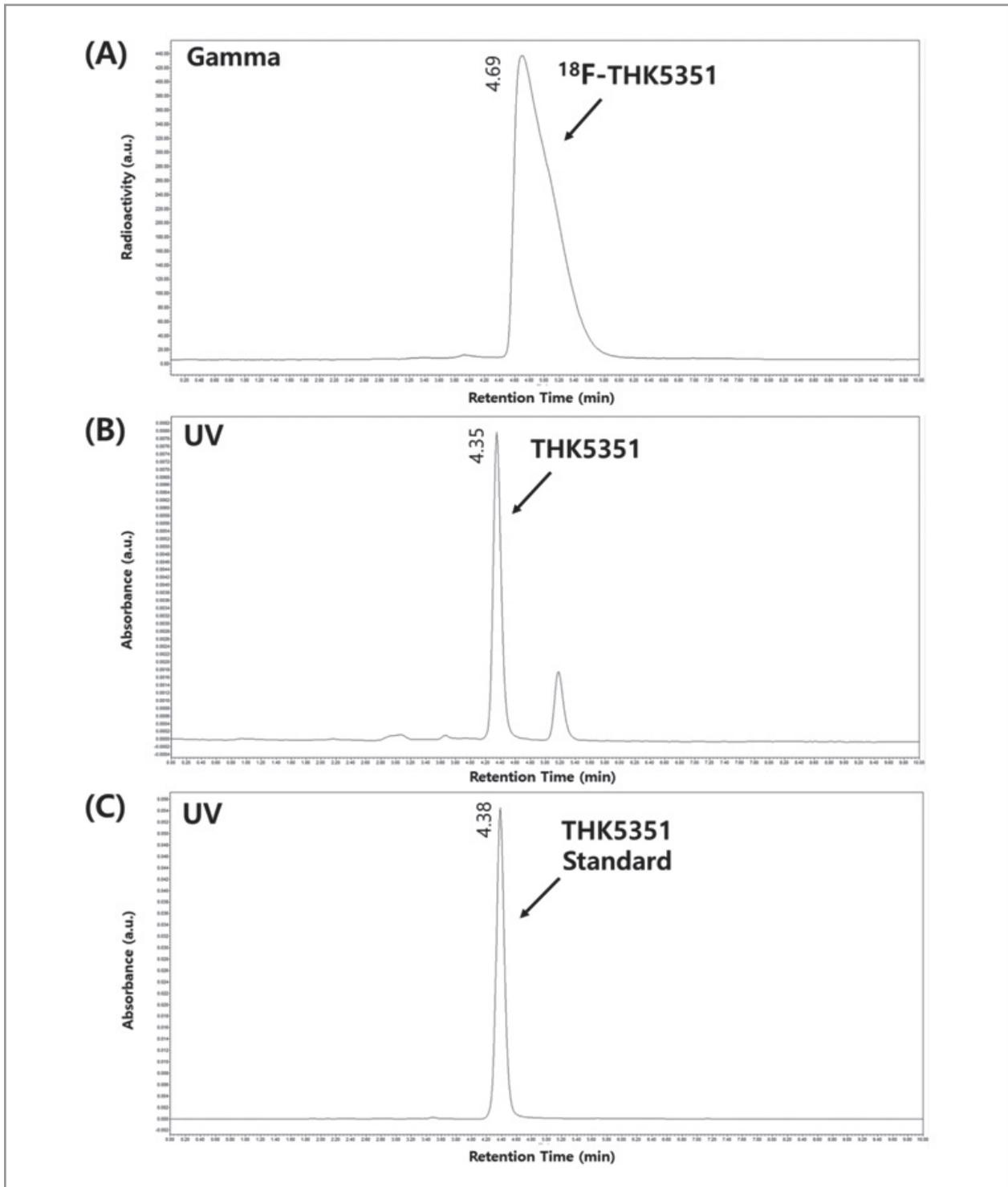


Figure 3. Analytical HPLC chromatograms of ^{18}F -THK-5351. (A) Radio-HPLC of ^{18}F -THK-5351 ($t_R = 4.69$ min) (B) UV-HPLC of ^{18}F -THK-5351 ($t_R = 4.35$ min, $\lambda = 360$ nm) (C) UV-HPLC of authentic ^{18}F -THK-5351 ($t_R = 4.38$ min, $\lambda = 360$ nm)

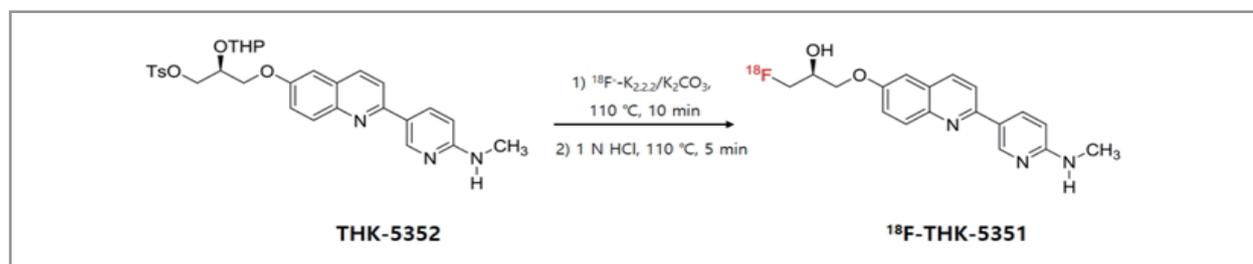
시험으로 실시하였다. 무균시험은 USP <71>에 명시되어 있는 가이드라인을 따라 액상티오키올리콜산배지 및 대두카제인

소화배지(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 사용하여 실시하였다.

Results and Discussion

본 프로토콜은 상용화된 자동합성장치를 사용하여 타우 PET 영상용 방사성의약품인 ^{18}F -THK-5351의 최적화된 표지방법을 확립하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 자동합성장치는 가장 널리 사용되고 있는 GE Healthcare사의 TRACERlab™ FX_{FN} 모듈을 이용하였고, 표지반응 시 특별한 장치의 변경이나 개조 없이 사용하여 프로토콜의 범용성을 넓혔다. 사이클로트론에서 생산된 불소-18 음이온은 물분자를 제거 후 토실레이트(tosylate)기가 도입된 표지 전구체와 친핵성 불소화반응(nucleophilic fluorination)으로 표지하여 가수분해 하였다(Scheme 1). 표지 후 역상 고성능액체크로마토그래피를 사용하여 ^{18}F -THK-5351을 분리한 후 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)으로 정제하였다. 분리 정제한 ^{18}F -THK-5351은 생리식염수에 희

석 후 0.22- μm 멸균필터에 통과시켜 제조를 완료하였다. ^{18}F -THK-5351을 제조하는데 소요되는 시간은 고성능액체크로마토그래피를 포함하여 총 70분 이었으며, 방사화학적 수율은 $31.9 \pm 6.7\%$ (decay-corrected, $n = 10$)이었다. 방사화학적 순도는 98% 이상이었으며, 비방사능은 198.1 ± 33.9 GBq/ μmol (5.4 ± 0.9 Ci/ μmol , $n = 10$)으로 확인되었다. 제조된 ^{18}F -THK-5351의 안정성을 평가하기 위해 차폐체 내에서 8시간까지 실온에 방치 후 매 시간마다 분석용 고성능액체크로마토그래피를 사용하여 분석한 결과 8시간 까지 방사화학적 순도는 98% 이상을 유지하며 실온에서 안정한 것으로 나타났다. 최종 생산된 ^{18}F -THK-5351의 성상은 육안으로 관찰 시 맑고 투명하였으며 부유입자가 관찰되지 않았고, pH는 ^{18}F -THK-5351검체가 점적된 pH indicator strips를 육안으로 관찰 시 기준범위(pH 4.0–8.0)를 만족하였다(11). 방사성핵종 순도시험 시 이핵종은 검출되지 않았고, 전리함



Scheme 1. Radiosynthesis of ^{18}F -THK-5351

Table 2. Quality control release criteria for ^{18}F -THK-5351

Test	Method	Acceptance criteria ^{a)}	^{18}F -THK-5351 release
Appearance	Visual observation	Colorless, no particles	Conform
Radionuclidic identity	Half-life determination		110–112 min
Radionuclidic purity	Gamma spectroscopy	511 KeV	Conform
Radiochemical purity	Gamma spectroscopy	> 99.9%	Conform
pH	HPLC analysis	$\geq 95\%$	$\geq 99\%$
Molar activity	pH paper	4.0–8.0	6.5–7
Residual solvents	HPLC analysis	≥ 18.5 GBq/ μmol	198.1 ± 33.9 GBq/ μmol
Residual Kryptofix	GC ^{b)} with FID	Acetonitrile < 410 ppm	Not detected
Ethanol content		DMSO < 5000 ppm	Not detected
Sterile filter integrity	Iodine spot test	< 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	< 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Bacterial endotoxin	GC ^{b)} with FID	< 10.0% v/v	< 10.0% v/v
Sterility	Filter bubble test	≥ 50 psi	≥ 50 psi
	Photometric test ^{c)}	< 17.5 EU/mL	< 17.5 EU/mL
	Culture media ^{d)}	No growth	No growth

^{a)} Reference 11, ^{b)} Gas chromatography, ^{c)} USP <85>, ^{d)} USP <71>.

으로 10분간 측정 후 반감기를 산출하였을 때 F-18의 반감기 기준(105-115분)을 만족하였다. USP <467>에 명시되어 있는 잔류 유기용매의 검출시험법에 따라 기체크로마토그래피로 측정 시 표지반응에 사용한 acetonitrile(Class 2)과 DMSO(Class 3)는 검출되지 않았다. 잔류 Kryptofix 2.2.2는 50 µg/mL미만으로 검출되었으며, 멸균 필터 완성성 시험에서 Millex® GV 멸균필터는 3.4 bar(50 psi) 이상의 압력을 유지하였다. 엔도톡신시험은 17.5 EU/mL 미만으로 검출되었으며, 직접법으로 무균시험을 실시하여 14일간 배지를 관찰 시 어떠한 호기성균, 혐기성균 및 진균의 발육도 관찰되지 않았다. 품질관리 시험결과는 Table 2.에 요약하였다.

Conclusion

본 연구를 통해 타우 PET용 영상제제인 ¹⁸F-THK-5351의 표지방법을 자동합성장치를 사용하여 성공적으로 최적화하였다. 본 연구에서 소개된 표지방법은 현재 가장 널리 보급되어 있는 자동합성장치인 GE Healthcare사의 TRACERlab™ FX_{FN}을 이용하여 ¹⁸F-THK-5351을 생산하는 방법을 확립하였으며, 임상 현장에서 표준화된 방사성의약품을 사용하는데 큰 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgments

이 연구는 연세대학교 의과대학 신진교수연구비 지원(과제 번호: 6-2015-0083)에 의해 수행되었으며, 상업적인 이해관계는 없음을 밝힙니다.

References

1. Kawabata S, Higgins GA, Gordon JW. Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss in brains of transgenic mice overexpressing a C-terminal fragment of human amyloid precursor protein. *Nature* 1992;356:265.
2. Bloom GS. Amyloid-β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* 2014;71:505-508.
3. Rowe CC, Villemagne VL. Brain amyloid imaging. *J Nucl Med* 2013;41:11-18.
4. Chung JK, Plitman E, Nakajima S, Chakravarty MM, Caravaggio F, Gerretsen P, Iwata Y, Graff-Guerrero A. Cortical Amyloid β Deposition and Current Depressive Symptoms in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2016;29:149-159.
5. Nasrallah IM, Wolk DA. Multimodality imaging of Alzheimer disease and other neurodegenerative dementias. *J Nucl Med* 2014;55:2003-2011.
6. Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Masters CL, Rowe CC. Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol* 2015;14:114-124.
7. Okamura N, Harada R, Furukawa K, Furumoto S, Tago T, Yanai K, Arai H, Kudo Y. Advances in the development of tau PET radiotracers and their clinical applications. *Ageing Res Rev* 2016;30:107-113.
8. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Yanai K, Arai H, Kudo Y. Characteristics of Tau and Its Ligands in PET Imaging. *Biomolecules* 2016;6:7.
9. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Tago T, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Inami A, Yoshikawa T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. ¹⁸F-THK5351: A Novel PET Radiotracer for Imaging Neurofibrillary Pathology in Alzheimer Disease. *J Nucl Med* 2016;57:208-214.
10. Kuntzsch M, Lamparter D, Brüggener N, Müller M, Kienzle GJ, Reischl G. Development and Successful Validation of Simple and Fast TLC Spot Tests for Determination of Kryptofix® 2.2.2 and Tetrabutylammonium in ¹⁸F-Labeled Radiopharmaceuticals. *Pharmaceuticals* 2014;7:621-633.
11. Betthausen TJ, Ellison PA, Murali D, Lao PJ, Barnhart TE, Furumoto S, Okamura N, Johnson SC, Engle JW, Nickles RJ, Christian BT. Characterization of the radiosynthesis and purification of [¹⁸F]THK-5351, a PET ligand for neurofibrillary tau. *Appl Radiat Isot* 2017;130:230-237.