

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STUDIUM SYNTÉZY 3'-DEOXY-3'-[¹⁸F]FLUORTHYMINU – PERSPEKTIVNÍHO RADIOFARMAKA PRO POZITRONOVOU EMISNÍ TOMOGRAFII

LIBOR PROCHÁZKA, MARTIN KROPÁČEK,
MARCELA MIRZAJEVOVÁ, JANA ZIMOVÁ,
MICHAELA FÖRSTEROVÁ, HELENA
ŠVECOVÁ a FRANTIŠEK MELICHAR

*Ústav jaderné fyziky, v.v.i., Laboratoř PET, Akademie věd
České republiky, 250 68 Řež
melichar@ujf.cas.cz*

Došlo 20.7.06, přepracováno 11.3.08, přijato 20.5.08.

Klíčová slova: PET radiofarmaka, syntéza značených sloučenin, FLT, nukleofilní substituce

Úvod

3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]fluorthymin (3'-[¹⁸F]FLT) představuje mezi radiofarmaky pro pozitronovou emisní tomografii (PET) účinnou látku pro selektivní zobrazení rychle rostoucí tkáně. Důvodem je zabudování tohoto fluorovaného nukleosidu do nově vznikající DNA v rychle rostoucí nádorové tkáni. Zádrž v buňkách a efektivní poločas 3'-[¹⁸F]FLT jsou dostatečné k zobrazení akumulace účinné látky v nádorové tkáni a následně k stanovení rychlosti buněčného dělení.

Při návrhu syntézy účinné látky pro PET radiofarmaka je nutno vycházet z následujících požadavků:

- prekurzor účinné látky musí být dobře syntetizovatelný v požadovaném množství (miligramy) a ve farmaceutické kvalitě obecně popsané lékopisem (např. s definovaným obsahem rozpouštědel),
- vysoký výtěžek syntézy účinné látky k přípravě konečného radiofarmaka pro reálně aplikovatelné množství, kdy je nutné účinnost syntézy korigovat na fyzikální rozpad radioisotopu ¹⁸F (109 min),
- kontrola kvality konečného radiofarmaka, která zahrnuje stanovení radionuklidové, radiochemické a chemické čistoty, osmolality a apyrogenity, musí být časově zvládnutelná řádově v desítkách minut,
- definitivní postup přípravy a kontroly kvality musí

vyhovovat velmi přísným podmínkám správné výrobní praxe (SVP).

Experimentální část

Reagencie

Voda obohacená isotopem kyslíku [¹⁸O]H₂O – obsah min. 97 % (Rotem, Israel); 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-threo-penta-furanosyl)-3-(terc-butyloxykarbonyl)thymin – min. 95 % (ABX, Německo); 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-threo-penta-furanosyl)thymin – min. 95 % (ABX, Německo); 2,3'-anhydro-5'-O-benzoylthymidin – min. 95 % (ABX, Německo); acetonitril pro syntézu DNA – min. 99,8 %, obsah vody max. 0,03 % (Merck, Německo); dimethylsulfoxid bezvodý SeccoSolv (max. 0,05 % vody) (Merck, Německo); ethanol LichroSolv – min. 99,9 % (Merck, Německo); 3'-deoxy-3'-fluorthyminidin (referenční standard) – min. 95 % (ABX, Německo); Kryptofix 222 pro syntézu – min. 99 % (Merck, Německo); uhlíčitán draselný p.a. – min. 99 % (Merck, Německo); hydrogenfosforečnan sodný, odpovídá Evropskému lékopisu (PhEur), (Fluka, Švýcarsko); hydroxid sodný, PhEur (Merck, Německo); kyselina chlorovodíková, 1 mol l⁻¹, Ph Eur (Sigma-Aldrich, Švýcarsko); Ardeaelysol konc. natriumchlorid 5,85 %, PhEur (Ardeapharma, ČR); sterilizovaná voda na injekci, PhEur (Phoenix, ČR).

Přístroje

Ozařování

Příprava výchozího nuklidu ¹⁸F byla provedena za následujících podmínek ozařování: cyklotron U-120M s ozařovacím terčem vyrobeným z niobu o objemu 3,6 ml (IBA, Belgie). Podmínky ozařování: terčový materiál – 3,3 ml [¹⁸O]H₂O, max. proud částic H⁺ 35 μA, energie 17 MeV, rychlost produkce cca 1–2 GBq/min/25 μA.

Syntéza a separace

Syntéza účinné látky 3'-[¹⁸F]FLT byla prováděna na syntézním modulu TRACERlab Mx FDG (General Electric Medical Systems, Švédsko) s řídicím počítačem a modifikovaným softwarem, který byl připraven pro jednotlivé stupně syntézy.

Separace účinné látky 3'-[¹⁸F]FLT z reakční směsi byla provedena semipreparativní chromatografií na přístroji složeném z binární gradientové pumpy P680P HPG (Dionex Softron, Německo), dávkovacího ventilu EV700-100-SU (Supelco, USA) se smýčkou 20 ml, kolony Polaris 5 μ C18-A, 250×10 mm s předkolonou Polaris

5 μ C18-A, 50×10 mm (Varian, USA), UV detektoru UVD 170U (Dionex Softron, Německo), radiodetektoru LB6500-3 (Berthold Technologies, Německo) a automaticky ovládaného solenoidového ventilu 225T031 (NResearch Europe, Švýcarsko) pro separaci žádané frakce. Mobilní fáze měla složení ethanol:voda na injekci 7,5:92,5.

Kontrola kvality

Zbytková rozpouštědla byla stanovena na plynovém chromatografu STAR 3400CX (Varian, USA) s kolonou Varian VA-1 a plamenovým ionizačním detektorem za těchto podmínek: teplotní gradient kolony 40–80 °C, nosný plyn dusík, nástřik 1 μ l metodou „split“, teplota injektoru 260 °C, teplota detektoru 300 °C.

Chemická a radiochemická čistota byla stanovena kapalinovou chromatografií na přístroji s binární gradientovou pumpou Beckman 127 NM (Beckman Instruments, USA), ručním dávkovacím ventilem s 20 μ l smyčkou (Rheodyne, USA), UV detektorem UVIS 200 (Linear Instruments, USA) a radiodetektorem GABI (Raytest, Německo). Použitá mobilní fáze měla složení ethanol: voda 10:90.

Stanovení radioaktivity bylo provedeno ionizační komorou Atomlab 300 (Biodex, USA).

Pro stanovení bakteriálních endotoxinů byl použit inkubační turbidimetr LAL 5000 (Associates of Cape Cod, USA).

Stanovení osmolality bylo uskutečněno na osmometru Micro-osmometer 210 (Fiske, USA).

Měření pH bylo provedeno pH-metrem pH538 (WTW, Německo) se skleněnou kombinovanou mikroelektrodou Biotrode (Hamilton, USA).

Výsledky a diskuse

Syntéza účinné látky a formulace konečného přípravku

Pro přípravu 3'-[¹⁸F]FLT byla použita nukleofilní substituce vhodné funkční skupiny prekursoru radioaktivním nuklidem ¹⁸F za katalýzy Kryptofixem 222. Konečným výsledkem byl sterilní apyrogenní izotonický roztok radiofarmaka vhodný pro intravenózní aplikaci v humánní medicíně.

Celý vývoj syntézy účinné látky a léčivého přípravku 3'-[¹⁸F]FLT, injekce, zahrnoval:

- separaci ¹⁸F[−] z terčového materiálu na polárním bazickém anexu v uhličitánovém cyklu,
- eluci [¹⁸F]F[−] do reakční nádoby elučním roztokem (22 mg Kryptofixu 222, 7 mg uhličitanu draselného, 0,3 ml acetonitrilu, 0,3 ml vody),
- odvodnění fluoračního činidla azeotropickou destilací s acetonitrem (3×0,2 ml),
- značení prekursoru radionuklidem,
- kyselou nebo alkalickou hydrolýzu (podle použitého

prekursoru),

- neutralizaci reakční směsi alkalickým fosfátovým pufrům nebo kyselým acetátovým pufrům,
- zachycení nezreagovaného [¹⁸F]F[−] na oxidu hlinitém a transport reakčního produktu do smyčky dávkovacího ventilu semipreparativního chromatografu.

Dalšími kroky přípravy radiofarmaceutického přípravku bylo odstranění ethanolu z frakce 3'-[¹⁸F]FLT, izotonizace a sterilizace konečného přípravku, což představovalo:

- odpaření ethanolu destilací za sníženého tlaku v proudě sterilního dusíku,
- izotonizace koncentrovaným roztokem NaCl,
- sterilizace sterilizujícím filtrem.

Tímto postupem bylo získáno 6–9 GBq přípravku 3'-[¹⁸F]FLT (korigovaná účinnost značení 26,0 % (23,6 až 29,3 %), počet provedených syntéz 14). Připravená aktivita přípravku umožňuje vyšetření cca 7–11 pacientů.

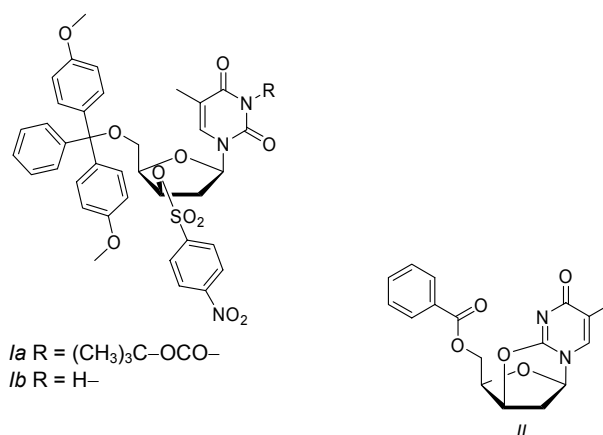
Volba prekursoru a optimalizace podmínek značení

Testovány byly tři prekursory, poskytující dle literatury nejvyšší výtěžky značení (obr. 1):

- 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-threo-penta-furanosyl)-3-(tert-butyloxykarbonyl)thymín (zkráceně Boc-FLT, Ia)¹,
- 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-threo-penta-furanosyl) thymín (Non-Boc-FLT, Ib)^{2,3},
- 2,3'-anhydro-5'-O-benzoylthymidin (BATH, II)⁴.

Z rozpouštědel byly dle literatury^{1–7} použity: acetonitril (MeCN), dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMF) a 1,2-dichlorbenzen (DCB).

Jedním z cílů studia syntézy bylo nahradit acetonitril, který se při teplotách běžně používaných pro značení deri-



Obr. 1. Strukturní vzorce prekursorů použitých pro syntézu 3'-[¹⁸F]FLT

Tabulka I

Výtěžky zkušebních syntéz 3'-[^{18}F]FLT s použitím prekursoru Non-Boc-FLT v roztoku MeCN

Označení syntézy	Navážka prekursoru [mg]	Teplota značení [°C]	Doba značení [min]	Výtěžek značení [%]
4 aktivní ^a	30	130	5	18
5 neaktivní ^b	18	85	4	0
6 neaktivní ^b	24	110	5	3
7 neaktivní ^b	24	120	10	25
8 neaktivní ^b	23	120	10	18
9 neaktivní ^b	24	120	10	34
10 neaktivní ^b	24	120	10	16
11 aktivní ^a	30	120	10	3
12 aktivní ^a	30	160	10	22
16 neaktivní ^b	12	130	10	5
18 neaktivní ^b	25	130	10	25
19 aktivní ^a	25	130	10	15
20 aktivní ^a	25	130	10	22
24 aktivní ^a	25	150	10	29

^a Pro syntézu použit neradioaktivní $^{19}\text{F}^-$, ^b syntéza s radioaktivním $^{18}\text{F}^-$

Tabulka II

Výtěžky zkušebních syntéz 3'-[^{18}F]FLT s použitím prekursoru Boc-FLT v roztoku MeCN

Označení syntézy	Navážka prekursoru [mg]	Teplota značení [°C]	Doba značení [min]	Výtěžek značení [%]
21 aktivní ^a	25	130	10	50
22 aktivní ^a	25	110	10	51
23 aktivní ^a	25	150	10	44
25 aktivní ^a	25	130	10	58
26 neaktivní ^b	25	130	10	52

^a Pro syntézu použit neradioaktivní $^{19}\text{F}^-$, ^b syntéza s radioaktivním $^{18}\text{F}^-$

vátů thymidinu aniontem $^{18}\text{F}^-$ nukleofilní substitucí (130 až 180 °C), velice rychle odpařuje a strhává sebou část nuklidu ^{18}F . Tím se snižuje radiochemická účinnost syntézy a výtěžek 3'-[^{18}F]FLT.

Souhrn výsledků provedených zkušebních syntéz s jednotlivými prekursory je uveden v tabulkách I a II.

Z tabulek je patrné, že podstatně vyšší výtěžky syntézy poskytuje prekursor Boc-FLT. V další tabulce III jsou uvedeny výsledky syntézy 3'-[^{18}F]FLT s roztoky prekursorů v DMSO a MeCN za stejných podmínek syntézy.

Výtěžek syntézy 3'-[^{18}F]FLT je také závislý na navážce použitého prekursoru a reakční teplotě syntézy.

Z uvedených výsledků vyplývá, že dimethylsulfoxid je vhodnějším rozpouštědlem při vysoké teplotě značení (160 °C) (poskytuje poněkud vyšší výtěžky), jeho použití je ale limitováno nízkou odolností materiálu kazety (polysulfon).

V rámci studia syntézy 3'-[^{18}F]FLT byla provedena také konečná bilance aktivity ^{18}F v jednotlivých reakčních stupních syntézy v závislosti na teplotě značení prekursoru Boc-FLT. Výsledky jsou patrné z obr. 2 a 3.

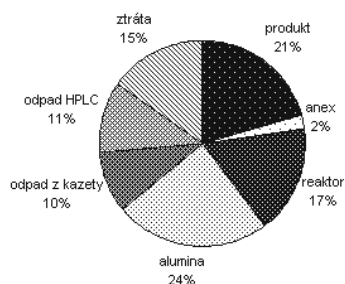
Z těchto grafů jednoznačně vyplývá, že se zvýšením teploty značení se snížil podíl nezreagovaného [^{18}F]fluoridu (zachyceného na alumině) a zvýšil se výtěžek

Tabulka III

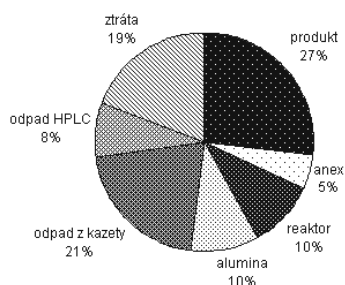
Porovnání účinnosti značení v acetonitrilu a DMSO pro všechny prekursor

Prekursor	Značení				Hydrolýza		Hlavní podíly aktivity (% , korekce na rozpad)					
	roz- pouš- tědlo	objem rozp. [ml]	teplota [°C]	navážka prek. [mg]	činidlo	teplota [°C]	produkt	kolona QMA	reaktor	alumina	odpad HPLC	ztráta
Boc-FLT	DMSO	0,8	130	20	TFA	50	19	1	4	26	32	18
Boc-FLT	DMSO	0,8	130	20	HCl	50	24	2	5	30	28	11
Boc-FLT	DMSO	0,8	160	20	TFA	100	26	1	8	15	36	14
Boc-FLT	DMSO	0,8	160	20	HCl	100	34	1	7	13	24	21
Non-Boc-FLT	MeCN	2,0	130	12	TFA	50	10	2	6	42	25	15
Non-Boc-FLT	MeCN	2,0	130	12	HCl	50	14	2	8	39	22	15
Non-Boc-FLT	MeCN	5,3	160	12	TFA	100	18	1	10	17	31	23
Non-Boc-FLT	MeCN	5,3	160	12	HCl	100	21	1	12	19	29	18
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	130	12	TFA	50	15	2	5	34	27	17
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	130	12	HCl	50	17	1	4	30	24	24
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	160	12	TFA	100	24	1	7	19	33	16
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	160	12	HCl	100	26	2	8	16	32	16
BATH	MeCN	2,0	130	12	NaOH	80	14	2	3	37	22	22
BATH	MeCN	5,3	160	12	NaOH	80	22	1	9	15	19	34
BATH	DMSO	0,8	160	12	NaOH	80	28	1	8	13	17	33
BATH	DMSO	0,8	160	12	NaOH	80	31	2	12	14	16	25

Hydrolytická činidla: HCl = 1 ml 1 M HCl; TFA = 0,806 ml 1 M HCl + 0,194 ml konc. kyseliny trifluoroctové, NaOH = 0,25 M NaOH



Obr. 2. **Balance aktivity:** značení prekursoru Boc-FLT při 130 °C, 10 min, hydrolýza 1 M HCl, 100 °C, 5 min



Obr. 3. **Balance aktivity:** značení prekursoru Boc-FLT při 160 °C, 10 min, hydrolýza 1 M HCl, 100 °C, 5 min

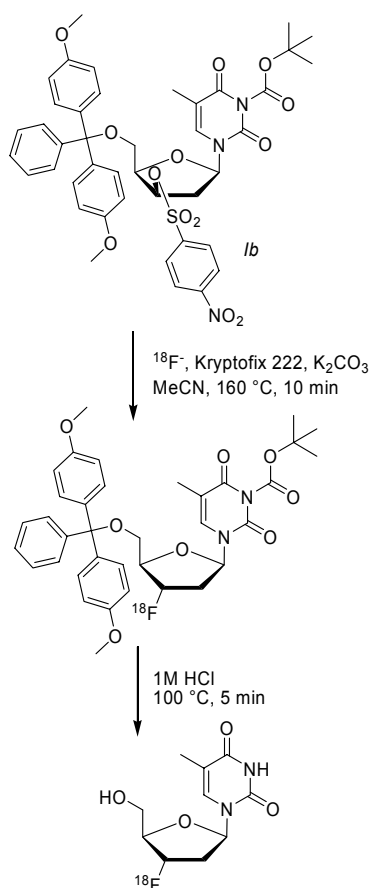
produktu. Zároveň se ale zvýšil i podíl ^{18}F v odpadu ze syntézního modulu, což je důsledkem zvýšené teploty, proto lze teplotu 160 °C považovat za optimum. Obdobný trend lze sledovat u obou dalších prekursorů.

Konečné schéma syntézy 3'- ^{18}F FLT je patrné z následujícího obr. 4.

Závěr

Příprava 3'- ^{18}F FLT byla studována s použitím tří prekursorů, nejvyšších výtěžků syntézy bylo dosaženo s použitím prekursoru Boc-FLT. Studován byl vliv dvou rozpouštědel na výtěžek značení tří prekursorů. Ve všech třech případech je poněkud vyššího výtěžku dosaženo při použití dimethylsulfoxidu. Dosažený celkový výtěžek syntézy je vyšší než ve většině publikací jiných autorů (o 5 až 15 %) ^{1,2,5,6}. Příprava 3'- ^{18}F FLT v požadované radiochemické a chemické čistotě vyžaduje přečištění s použitím HPLC. Celý proces syntézy byl dále optimalizován. Syntézy byly provedeny na původně jednorázovém syntézním modulu, pro který byl připraven příslušný software.

Parametry připraveného 3'- ^{18}F FLT odpovídají přísným požadavkům Správné výrobní praxe kladeným na radiofarmaceutické přípravky tak, aby i obsah zbytkového rozpouštědla vyhověl požadavku českého a evropského

Obr. 4. Schéma syntézy 3'-[¹⁸F]FLT

lékopisu. Navržený postup syntézy umožňuje připravit radiofarmakum o dostatečné aktivitě použitelné pro klinickou aplikaci u několika pacientů.

Autoři děkují Interní grantové agentuře Ministerstva zdravotnictví České republiky za podporu projektu NL/7688-3.

LITERATURA

1. Martin S. J., Eisenbarth J. A., Wagner-Utermann U., Mier W., Henze M., Pritzkow H., Haberkorn U., Eisenhut M.: Nucl. Med. Biol. 29, 263 (2002).
2. Grierson J. R., Shields A. F.: J. Labelled. Comp. Radiopharm. 42, 525 (1999).
3. Grierson J. R., Shields A. F.: J. Nucl. Med. 40, 83P (1999).
4. Cleij M. C., Steel C. J., Brady F., Ell P. J., Pike V. W., Luthra S. K.: J. Labelled. Comp. Radiopharm. 44, 871 (2001).
5. Machulla H.-J., Blocher A., Kuntzsch M., Piert M., Wei R., Grierson J. R.: J. Radioanal. Nucl. Chem. 243, 843 (2000).
6. Grierson J. R., Shields A. F.: Nucl. Med. Biol. 27, 143 (2000).
7. Wodarski C., Eisenbarth J., Weber K., Henze M., Haberkorn U., Eisenhut M.: J. Labeled. Comp. Radiopharm. 43, 1211 (2000).
8. Shields A. F., Grierson J. R., Dohmen B. M., Machulla H. J., Stayanoff J. C., Lawhorn-Crews J. M., Obradovich J. E., Muzik O., Mangner T. J.: Nat. Med. 4, 1334 (1998).
9. Sherley J. L., Kelly T. J.: J. Biol. Chem. 263, 8350 (1998).
10. Siegmund H., Pfeleiderer W.: Helv. Chim. Acta 79, 426 (1996).

L. Procházka, M. Kropáček, M. Mirzajevová, J. Zimová, M. Försterová, H. Švecová, and F. Melichar (Nuclear Physics Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež near Prague): **Study of Synthesis of 3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine – Prospective Radiopharmaceutical in Positron Emission Tomography**

¹⁸F-Labelled compounds as active substances of radiopharmaceuticals are used for imaging in positron emission tomography (PET) in nuclear medicine. The radiosynthesis of PET radiopharmaceuticals is based on nucleophilic substitution with F[−] in a precursor. The synthesis is demonstrated on 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine.