Original Article

자동합성장치를 이용한 [^{18}F]Fallypride의 합성

분당서울대학교병원 핵의학과
박준형 · 문병석 · 이홍진 · 이효준 · 이인원 · 이병철 · 김상은

Automated Synthesis of [^{18}F]Fallypride for Routine Clinical Use

Jun Hyung Park, Byung Seok Moon, Hong Jin Lee, Hyo Jun Lee, In Won Lee,
Byung Chul Lee and Sang Eun Kim
Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Purpose: [^{18}F]Fallypride plays an effective radiotracer for the study of dopamine D_2/D_3 receptor occupancy, neuropsychiatric disorders and aging in humans. This tracer has the potential for clinical use, but automated labeling efficiency showed low radiochemical yields about 5～20% with relatively long labelling time of fluorine-18. In present study, we describe an improved automatic synthesis of [^{18}F]Fallypride using different base concentration for routine clinical use. **Materials and Methods:** Fully automated synthetic process of [^{18}F]Fallypride was perform using the TracerLab FX_{FN} synthesizer under various labeling conditions and tosyl-fallypride was used as a precursor. [^{18}F]Fluoride was extracted with various concentration of $K_{2.2.2}/K_2CO_3$ from ^{18}O-enriched water trapped on the ion exchange cartridge. After azeotropic drying, the labeling reaction proceeded in CH_3CN at 100 °C for 10 or 30 min. The reaction mixture was purified by reverse phase HPLC and collected organic solution was exchanged by tc-18 Sep-Pak for the clinically available solution. **Results:** The optimal labeling condition of [^{18}F]Fallypride in the automatic production was that 2 mg of tosyl-fallypride in acetonitrile (1 mL) was incubated at 100 °C for 10 min with $K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.8 mg). [^{18}F]Fallypride was obtained with high radiochemical yield about 66±1.4% (decay-corrected, n=28) within 51±1.2 min including HPLC purification and solid-phase purification for the final formulation. **Conclusion:** [^{18}F]Fallypride was prepared with a significantly improved radiochemical yield with high specific activity and shorten synthetic time. In addition, this automated procedure provides the high reproducibility with no synthesis failures (n=28).
(Korean J Nucl Med Technol 2010;14(2):104-109)

Key Words : [^{18}F]Fallypride, Automated radiosynthesis, Dopamine D_2/D_3 receptor

서 론

[^{18}F]Fallypride는 뇌의 도파민(dopamine) D_2/D_3 수용체(receptor)에 특이적으로 결합하는 길항제(antagonist)로 매우 높은 친화력(K_i=30 pM for D_2 receptor sites)을 가지고 있으며 현재, PET를 이용한 뇌 기능별 영상화 연구에 사용되어지고 있는 방사성의약품이다. 특히, 신경정신학에서 대뇌피질의 도파민 기능을 규명하기 위하여 [^{18}F]fallypride가 중요하게 생각되어지고 있으며, striatal 영역 뿐 아니라 extrastriatal 영역의 도파민 D_2, D_3 수용체의 영상화도 가능하여 인지영역의 연구에 많이 사용되어지고 있다. [^{18}F]Fallypride의 원활한 임상연구를 위해서 중요시되는 점은 높은 합성 수율(radiochemical yield) 순도 그리고 높은 비방사능(specific activity)이다.

그동안 발표된 [^{18}F]Fallypride 생산연구들로서, Mukherjee와 coworkers는 전구체로 tosyl-fallypride를 사용하고 매뉴얼 합성 방법(hand-made)을 이용하여, 20~30%의 합성수율과 33-63 GBq/mmol의 비방사능을 보고 하였으나, 상대적으로 긴 표지시간과 높은 농도의 base를 사용하기 때문에 다양한 부산물(side-products)이 생성되어 고성능액체크로마토그래

• Received: September 2, 2010. Accepted: September 16, 2010.
• Corresponding author: Byung Chul Lee
Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 166 Gumi-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-707, Korea
Tel: +82-31-787-2957, Fax: +82-31-787-4072
E-mail: leebc@snu.ac.kr

피(HPLC, High Perfomance Liquid Chromatography) 정제의 어려움등이 있어 임상에 사용하기에는 한계가 있다.[1,2,7] 자동 합성장치를 사용한 [^{18}F]Fallypride의 합성 연구로는 tosyl-fallypride를 사용하여 one-step 합성방법이 개발되어졌으나 5-20%의 낮은 수율을 보였으며, 표지시간에만 30~35분이 소요된다.[8-10] 최근, 이러한 문제점을 해결하기 위해, 적은 농도의 base와 전구체를 사용, 빠른 합성 및 정제 시간 등을 가지는 마이크로 플루이딕 장치(microfluidic devices)를 이용한 표지기술이 있다. 하지만 마이크로 플루이딕 장치를 이용한 [^{18}F]Fallypride의 합성은 적은 양(small dose scale, 0.5-1.5 mCi)[11-17]의 방사성의약품 생산만 가능하며, 많은 양(high dose scale)의 합성에는 적합하지 않다.

사이클로트론에서 생산된 F-18은 과량의 ^{18}O-enriched H_2O안에 함유되어져 있으며, 이중 F-18만을 추출하기 위하여 QMA®나 Chromafix® PS-HCO_3 카트리지가 많이 사용되어지고, 그 후, $K_2CO_3/K_{2.2.2}$., $CsCO_3/K_{2.2.2}$., TBAOH, or $TBAHCO_3$ 같은 용출시약(phase transfer catalyst)에 의해 용출되어진다. 이때, 높은 농도의 base의 사용은 카트리지로부터 95% 이상 용출이 가능하나 많은 종류의 부산물을 생성시키는 단점이 있으며, 합성수율과 방사화학적 순도(radiochemical purity)를 저해시키는 주된 원인이 된다. 또한, 낮은 농도의 base의 사용은 카트리지로부터 F-18의 용출이 현저히 낮아져 표지 수율은 증가될 수 있지만 전체적인 방사화학적 수율은 낮아지게 된다.

[^{18}F]Fallypride 임상적 이용에는 많은 양의 방사능과 높은 합성수율이 요구되어지기 때문에 본 연구에서는 다목적 F-18 합성장치인 GE TracerLab FX_{FN} 모듈을 사용하여 base 농도를 최소화할 수 있는 연구를 수행하였고, 이를 [^{18}F]Fallypride 합성에 적용하여 합성수율, 비방사능(specific activity) 및 방사화학적 순도(radiochemical purity)의 결과 등을 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 전구체(precursor)와 시약(chemicals)

합성에 필요한 모든 시약들은 Sigma-Aldrich (U.S.)에서 구매하였으며, [^{18}F]Fallypride 전구체는 (tosylate precursor ((*S*)-*N*-[(1-allyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-5-(3-toluenesulfonyloxypropyl)-2,3-dimethoxybenzamide)와 기준물질 [^{19}F]Fallypride는 퓨처캠에서 구매하였다. ^{18}O-enriched H_2O (Taiyo Nippon Sanso Co. Japan)을 이용하여 사이클로트론(KIRAMS-13, Samyoung Unitech Co.)에서 만들어진 F-18은 Chromafix® PS-HCO_3 (45 mg, Macherey-Nagel Ins., Germany)을 사용하여 분리하였다. 고성능액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography) 컬럼은 Xterra RP-18 (5 μm, 7.9×250 mm, Waters, USA)을 사용하였다. 모든 방사능은 VDC-505 (Veenstra Instrument, Netherlands)를 이용하여 측정하였다.

2. F-18의 분리(F-18 seperation)

Chromafix® PS-HCO_3 카트리지를 MeOH (1.0 mL)/H_2O (0.2 mL) or CH_3CN (1.0 mL)/H_2O (0.2 mL)에 다양한 농도의 $K_{2.2.2}/K_2CO_3$를 사용하여 F-18을 용출하였다.

3. 전구체(Tosylate-fallypride precursor)를 이용한 표지

Chromafix® PS-HCO_3 카트리지에서 95% 이상의 F-18이 용출되는 조건에서, 전구체(tosylate-fallypride, 2 mg)를 1 mL의 CH_3CN anhydrous에 녹여 100 도에서 10분과 30분 (Figure 1) 동안 표지하였다. 그 후, 3 mL의 HPLC 용매로 희석한 후, HPLC system를 이용하여 분리하였다.

4. HPLC 정제와 품질관리

HPLC 정제조건은 Xterra RP-18 컬럼을 사용하여 50%

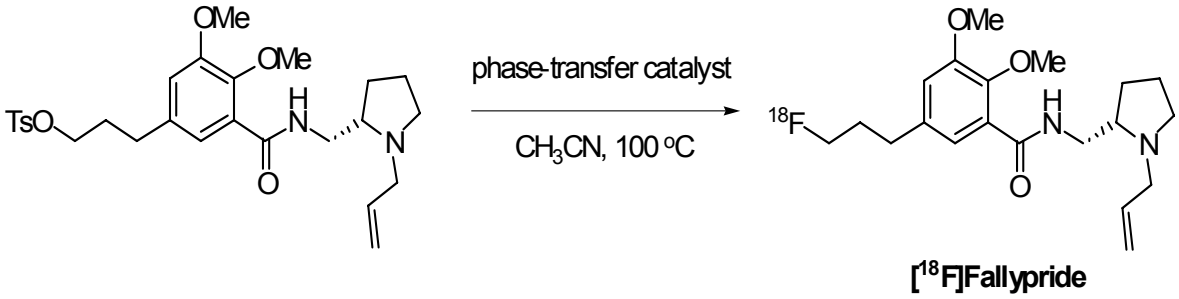

Fig. 1. Radiosynthesis of [^{18}F]fallypride from its tosylate precursor in a single-step with fluorine-18.

CH_3CN/H_2O (0.6% triethylamine)을 사용하였고, flow rate은 4 mL/min, 검출은 UV-254 nm와 gamma-ray 검출기를 사용하였으며, 정제된 [^{18}F]Fallypride는 SPE (solid-phase extraction) 정제를 위해 70 mL의 물에 희석하였다. 희석된 용액은 tC18 Sep-Pak으로 유기용매를 제거하였고, 1 mL의 에탄올로 용출하여 식염수 10 mL로 희석하였다. Radio-TLC를 이용하여 품질관리 시행하였으며, 분석용 HPLC 컬럼(analytical HPLC)을 이용하여 비방사능(radio-activity/mol)을 측정하였다.

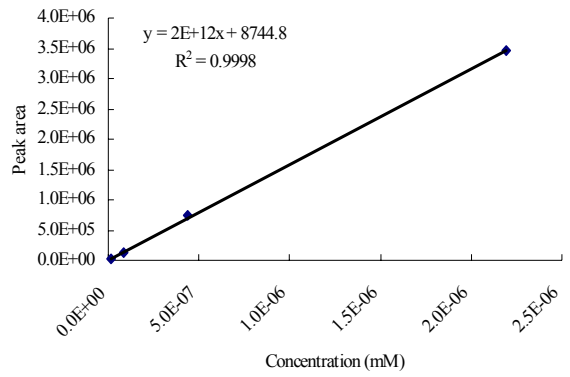

Fig. 2. Specific activity calibration curve.

5. 비방사능(Specific activity) 측정

합성 후, 200 μL의 샘플을 취해 비방사능을 측정하였다. 먼저 기준물질(Standard [^{19}F]Fallypride)을 계대 희석하여 검량곡선(calibration curve)을 그려 기준물질 영역/농도를 계산하였다. YMC Tri-art (4.6×250 mm, 5 μm) 분석 컬럼을 사용하였고, 70% CH_3CN/H_2O (0.6% TEA) 용매에서 flow rate은 0.7 mL/min, UV 254 nm이었다. 정제된 [^{18}F]Fallypride를 해밀턴(Hamilton) 주사기를 이용하여 20 μL 주입하여 10분에서 생산된 [^{18}F]Fallypride의 방사능 피크(peak)를 확인할 수 있었으며 이때 UV 스펙트럼에서 확인되는 면적을 계산하여 검량곡선(Fig. 2)에 대입하여 비방사능을 계산하였다.

6. 자동화 합성(Automation)

TracerLab FX_{FN} 모듈을 이용하여 [^{18}F]Fallypride 합성을 자동화하였고, 그에 대한 조건은 그림 3에 설명하였다. 각각의 사용한 시약은 표 1과 같다.

결과 및 고찰

여러 농도의 base를 사용하여 용출 실험을 수행하였으며,

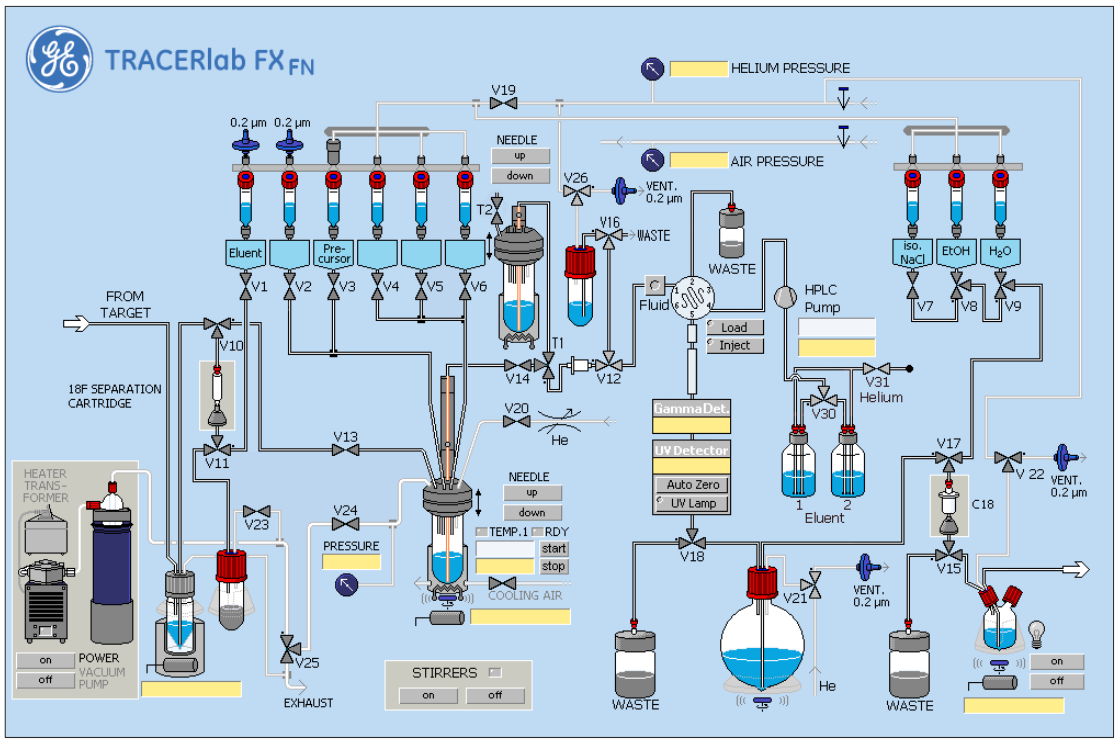

Fig. 3. The scheme of the TracerLab FXFN chemistry module.

다양한 농도에서 18~95% 이상의 방사능이 용출되었으며 그 결과는 표 2에 요약하였다. 이 결과들에서 볼 때, F-18을 95% 이상 최적의 용출한 조건은 $K_{2.2.2}/K_2CO_3$ in CH_3CN/H_2O (13/3.0 mg, entry 3)과 $K_{2.2.2}/K_2CO_3$ in $MeOH/H_2O$ (11/0.8 mg, entry 5)이다. F-18이 95% 이상 용출되지 않는 다른 조건들(entry 1, 2, and 4)은 낮은 농도의 base를 사용할 수 있을 수는 있지만 합성에 사용되지 않고 버려지는 F-18이 많아 최종적으로 합성되는 수율은 낮아진다. 표 2의 2가지 조건에서 F-18을 drying 후, 표지, 표지 시간, HPLC 정제 등을 포함하여 표 3에 요약하였다. 가장 최적화된 [^{18}F]Fallypride의 합성은 $K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.8 mg, entry 2)이었고, 합성 수율은 71%, 총 합성 시간은 74분이 소요되었다. 같은 조건에서 30분과 10분의 짧은 표지시간으로 합성(entry 3)해 보았을 때, 66%의 높은 합성수율과 총 51분의 합성 시간이 소요되었으며, 비방사능은 166-470 GBq/μmol이었다. 그러나 반감기를 고려해 본 결과, entry 3보다 entry 2가 높은 합성 수율을 보였으나, 반감기를 고려하지 않았을 때 두 조건 모두 46~50%로 비슷한 합성 수율을 갖기 때문에 짧은 표지시간(10분, entry 3)을 갖는 조건이 최적조건임을 확인하였다. 최종적으로 얻은 [^{18}F]Fallypride (Fig. 4)를 기준물질 [^{19}F]Fallypride와 같이 동시 주입한 결과는 그림 5에 나타내었으며, 같은 시간에 용출됨을 확인함으로써 동일 물질임을 판단하였다.

요약하면, cyclotron에서의 [^{18}F]fluoride (8.1-26 GBq in $H_2{}^{18}O$)를 F-18 trap vial (left bottom in Figure 3)에 모은 후, Chromafix® PS-HCO_3 카트리지에 160초 동안 흡착시킨다. 흡착된 F-18을 vial 1에 들어있는 $K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.8 mg) in $MeOH/H_2O$ (1.0/0.2 mL)을 사용하여 반응용기로 이동시키게 된다. 그 후, 65~95도에서 3분 동안 vacuum 펌프와 He 가스를 이용하여 건조시키고, vial 3의 1 mL의 CH_3CN에 녹인 전구체(tosylate-precursor, 2 mg)를 이용하여 100도, 10분 동안 반응하였다. 반응용기를 약 40도로 식힌 후, 각각 vial 5, vial 6의 1.5 mL HPLC 용액으로 반응 용기안의 혼합물을 희석시키고, HPLC injecter vial (middle upper)로 보내게 된다. Injector vial에서 용액들을 잘 혼합 후에, 자동으로 HPLC system으로 주입이 되고, HPLC 정제 및 분리는 50% CH_3CN/H_2O+0.6% TEA에서 flow rate 4.0 mL/min, UV-254 nm에

Table 1. Reagents in each vial

Vial	Reagents	Vial	Reagents
V1	phase-transfer catalyst	V6	HPLC solvent:H_2O (1.5 mL:0.5 mL)
V2	no use	V7	saline (10 mL)
V3	precursor (Ts-Fallypride, 2 mg)) in CH3CN (1 mL)	V8	ethanol (1 mL)
V4	no use	V9	DI[a] water (10 mL)
V5	HPLC solvent:H2O (1.5 mL:0.5 mL)	V10	DI water (70 mL)

[a]DI water: deionized water

Table 2. Recovery % of fluorine-18 varying various bases from trapped Chromafix® PS-HCO3 cartridge

	Base	Solvent (1.0/0.2 mL)	Recovery %[a]
1	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (5.5/0.5 mg)	CH_3CN/H_2O	~18
2	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (5.5/1.5 mg)	CH_3CN/H_2O	~57
3	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (13/3.0 mg)	CH_3CN/H_2O	>95
4	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.5 mg)	$MeOH/H_2O$	~88
5	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.8 mg)	$MeOH/H_2O$	>95

[a]The starting radioactivity (8.1-26 GBq), remained radioactivity in PS-HCO3 cartridge and recovery radioactivity with phase-transfer catalysts were measured in dose calibrator after take out from automatic device (n=2 or 3).

Table 3. The radiochemical yields of [18F]fallypride in various conditiona

	Phase-transfer catalyst	Extraction solvent (1.0/0.2 mL)	Reaction time (min)	RCY (%)[b]	Total time
1	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (13/3.0 mg)	CH_3CN/H_2O	30	26±4.9	74±1.2
2	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.8 mg)	$MeOH/H_2O$	30	71±1.9	74±1.2
3	$K_{2.2.2}/K_2CO_3$ (11/0.8 mg)	$MeOH/H_2O$	10	66±1.4[c]	51±1.2

[a]Reaction conditions: 2 mg of tosylate precursor in CH3CN (1 mL), 100 °C of reaction temperature in the carbon reaction vessel; [b]Decay corrected yield; [c]n=8

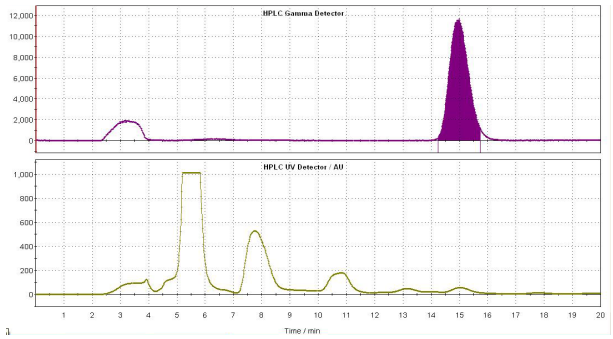

Fig. 4. The crude HPLC chromatogram from the FXFN module (upper: g-ray, bottom: UV (254 nm)).

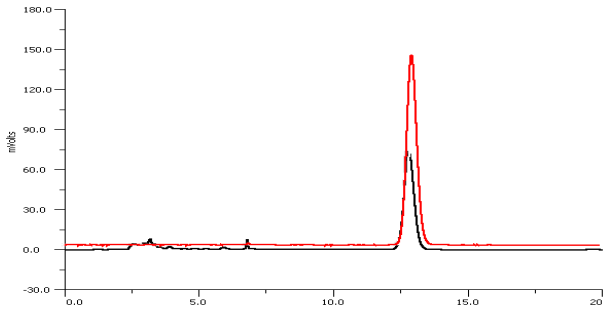

Fig. 5. The co-injected HPLC chromatogram with standard [19F]Fallypride (Xterra RP-18; 50% CH3CN/H2O contained 0.6% TEA; flow rate: 3 mL/min; red: g-ray, black: UV (254 nm)).

서 진행된다. [^{18}F]Fallypride는 12~13분 사이에서 분리되어지며, vial 10 (right bottom)에서 100 mL의 물에 희석되어진다. 희석되어진 용액은 tC18 Sep-Pak으로 이동하게 되며 [^{18}F]Fallypride만 Sep-Pak에 남게 되고 다른 유기용매들은 빠져나가게 된다. Vial 9의 10 mL의 물로 tC18 Sep-Pak의 잔여 유기용매를 제거하고, vial 8의 1 mL 에탄올로 [^{18}F]Fallypride를 용출한다. 그 후 마지막으로 임상적 사용을 위해 10 mL의 식염수로 [^{18}F]Fallypride를 희석하여 임상 적용한다. 이러한 방법으로 66±1.4% (decay-corrected, n=28)의 높은 합성수율, HPLC 분리와 SPE 정제시간을 포함하여 51±1.2분에 합성할 수 있었다. 합성 후, 품질관리 테스를 해 본 결과, 방사화학적 순도는 95% 이상, 비방사능은 166~470 GBq/μmol 이었다.

결 론

본 연구에서 자동 합성장치를 이용하여 높은 합성수율(66±1.4%, decay-corrected)과 97% 이상의 순도(purity), 비방사능(166~470 GBq/μmol)의 [^{18}F]Fallypride를 성공적으로 합성할 수 있었다. HPLC 분리와 SPE 정제과정을 포함한 총 합성시간은 51±1.2분으로 다른 합성방법보다 짧았으며, 그 이유는 10분만으로 표지 시간이 충분하기 때문이다. 본 연구에서 사용된 합성법은 [^{18}F]Fallypride를 이용한 dopamine D_2/D_3 연구의 임상적 사용에 도움이 될 것이며, 낮은 농도의 base를 사용한 이 F-18 추출방법은 base에 민감한 전구체의 자동합성 생산에 유용할 것으로 사료된다.

요 약

[^{18}F]Fallypride는 뇌의 도파민(dopamine) D_2/D_3 수용체(receptor)에 특이적으로 결합하는 길항제(antagonist)로 대뇌 피질의 도파민 기능을 규명하기 위하여 많이 사용되어지는 방사성의약품이다. 그동안 발표되어진 자동 합성화 장치를 이용한 [^{18}F]Fallypride 합성은 20~30%의 낮은 합성 수율과 33~63 GBq/mmol의 낮은 비방사능이 보고되어졌고, 또, 상대적으로 긴 표지시간과 높은 농도의 base를 사용하기 때문에 다양한 부산물이 생성되어 정제의 어려움이 있어 임상에 사용되기에 한계가 많았었다. 본 연구에서는 다목적 F-18 합성장치인 GE TracerLab FX_{FN} 모듈을 사용하여 base 농도를 최소화할 수 있는 연구를 수행하였고, [^{18}F]fallypride 합성에 적용하여 높은 합성수율과 비방사능(specific activity) 및 방사화학적 순도(radiochemical purity)를 합성하는 최적의 조건을 찾을 수 있었다. 이를 바탕으로 66±1.4% (decay-corrected, n=28)의 높은 합성수율과 HPLC 분리, SPE 정제시간을 포함하여 총 51±1.2분에 빠르게 합성할 수 있었다. 합성 후, 품질관리 테스를 해 본 결과, 방사 화학적 순도는 95% 이상, 비방사능은 166~470 GBq/μmol이었다. 본 연구에서 사용된 합성법은 [^{18}F]Fallypride를 이용한 dopamine D_2/D_3 연구의 임상적 사용에 도움이 될 것이며, 낮은 농도의 base를 사용한 이 F-18 추출방법은 base에 민감한 전구체의 자동합성 생산에 유용할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Mukherjee J, Yang ZY, Brown T, Lew R, Wernick M, Ouyang XH, et al. Preliminary assessment of extrastriatal dopamine D2 receptor binding in the rodent and nonhuman primate brains using the high affinity radioligand, [^{18}F]Fallypride. ***Nucl Med Biol*** 1999;26:519-27
2. Mukherjee J, Yang ZY, Das MK, Brown T. Fluorinated benzamide neuroleptics III. Development of (*S*)-*N*-[(1-allyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-5-(3-[^{18}F]-fluoropropyl)-2,3-dimethoxybenzamide as an improved dopamine D_2receptor tracer. ***Nucl Med Biol*** 1995;22:283-96
3. Mukherjee J, Christian BT, Dunigan K, Shi B, Narayanan TK,

Satter M, et al. Brain imaging of [^{18}F]Fallypride in normal volunteers: blood analysis, distribution, test-retest studies, and preliminary assessment of sensitivity to aging effects on dopamine D_2/D_3 receptors. ***Synapse*** 2002;46:170-88

4. VandeheyNT, Garell PC, Hampel JA, Murali D, Smith EM, Davidson R, et al. PET measurement of changes in D_2/D_3 dopamine receptor binding in a nonhuman primate during chronic deep brain stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. ***J. Neurosci Meth*** 2009;176:129-35
5. Elsinga PH, Hatano K, Ishiwata K. PET tracers for imaging of the dopaminergic system. ***Curr Med Chem*** 2006;13:2139-53
6. Siessmeier T, Zhou Y, Buchholz H-G, Landvogt C, Vernaleken I, Piel M, et al. Parametric mapping of binding in human brain of D2 receptor ligands of different affinities. ***J Nucl Med*** 2005;46:964-72
7. Christian BT, Vandehey NT, Fox AS, Murali D, Oakes TR, Converse AK, et al. The distribution of D_2/D_3 receptor binding in the adolescent rhesus monkey using small animal PET imaging. ***NeuroImage*** 2009;44:1334-44
8. Ansari M, Kessler R, Clanton J, De Paulis T, Baldwin R. Comparison of three [^{18}F]Fallypride methods intended for automated remote chemistry modules. ***J Nucl Med*** 2006;47:159S
9. http://www.ps.uci.edu/~markm/fallypride_IND/IND%20Fallypride%20chemistry06 2007.doc
10. Shi B, Narayanan TK, Mattmuller S, Carone M, Christian B, Mukherjee J, et al. Automated clinical production ofF-18 radiopharmaceuticals with electrophilic or nucleophilic substitution in a custom manufactured fluorination module. ***J Nucl Med*** 2002; 43:1522S
11. Lucignani G. Pivotal role of nanotechnologies and biotechnologies for molecular imaging and therapy. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging*** 2006;33:849-51.
12. Jeffery NT, Luthra SK, Manz A, De Mello A, Wootton R, Brady F. Radiochemistry on microfabricated devices: Proof of principle. ***J Nucl Med*** 2004;45(S2):51P
13. Liow E, O'Brien A, Luthra SK, Brady F, Steel C. Preliminary studies of conducting high level production radiosynthesis using microfluidic devices. ***J Label Compd Radiopharm*** 2005;48(S1): S28
14. Gillies JM, Prenant C, Chimon GN, Smethurst GJ, Perrie W, Hamblett I, et al. Microfluidic reactor for the radiosynthesis of PET radiotracers. ***Appl Radiat Isot*** 2006;64:325-32
15. Steel CJ, O'Brien AT, Luthra SK, Brady F. Automated PET radiosyntheses using microfluidic devices. ***J Label Compd Radiopharm*** 2007;50:308-11
16. Lee CC, Sui GD, Elizarov A, Shu CYJ, Shin YS, DooleyAN, et al. Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. ***Science*** 2005;310:1793-6
17. Lu S, Giamis AM, Pike VW. Synthesis of [^{18}F]Fallypride in a micro-reactor: Rapid optimization and multiple-production in small doses for microPET studies. ***Curr Radiopharm*** 2009;2:49-55