

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2017.3.2.85>

Fully automated radiosynthesis of [⁶⁸Ga]edotreotide ([⁶⁸Ga]DOTA-TOC) and its quality controls

Hyun Sik Park¹, Hong Jin Lee¹, Hyun Ho An¹, Byung Seok Moon^{1,*}, Byung Chul Lee^{1,2,*}, Won Woo Lee¹, Sang Eun Kim^{1,2,3}

¹Department of nuclear medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, 13620, Republic of Korea

²Center for Nanomolecular Imaging and Innovative Drug Development, Advanced Institutes of Convergence Technology, Suwon, 16229, Republic of Korea

³Department of Transdisciplinary Studies, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Suwon, 16229, Republic of Korea

ABSTRACT

⁶⁸Ga-PET is of growing importance in the practice of nuclear medicine diagnostic imaging for neuroendocrine tumors as well as prostate cancers. Following this interests, we herein present the radiosynthesis process of [⁶⁸Ga]edotreotide ([⁶⁸Ga]DOTA-TOC) based on the fully automated procedure for clinical doses that can be provided the reduction of radiation exposure and high reproducibility. The quality controls of clinical doses in compliant with European Pharmacopoeia are also discussed.

Key Word: Gallium-68, [⁶⁸Ga]DOTATOC, [⁶⁸Ga]Edotreotide, Neuroendocrine tumor

Introduction

Ga-68은 67.6분의 반감기를 가진 양전자방출단층촬영용 방사성동위원소로 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 발생기(⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator)로부터 용출하여 이용이 가능하다. 1961년 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 발생기가 처음 개발된 이래로(1) alumina, 1-deoxy-1-(methylamino)sorbitol-(N-methylglucamine) polymer(2), tin(II) dioxide, silica 및 titanium(IV) dioxide 등을 기반으로 구연산, 염산과 같은 용액으로 용출하여 사용되어 왔으나 최근에는 tin(II) dioxide, silica 및 titanium(IV) dioxide 기반 발생기가 주로 사용되고 있다. 발생기의 제조사에 따라 약간의 차이는 있으나 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 발생기는 ⁶⁸Ge 방사능 50 mCi (1,850 MBq) 용량 기준으로 사용 가능 주기는 9-12 개월이며, 약 300번의 용출이 가능하다. 일반적으로 용출 후 약 6시간 후에 Ga-68 방사능양이 최대 용출이 가능한 평형 상태에 도달하며, 보통 70%의 Ga-68이 용출되

므로 필요 시 용출하여 사용이 가능한 장점이 있다. Ga-68을 이용한 방사화학적 표지 반응은 일반적으로 염산 용액을 사용하여 용출하며 이때 사용되는 볼륨은 5-10 mL을 사용한다. 이러한 볼륨은 현저히 낮은 방사화학적 수율을 제공하므로 용출액의 부피를 줄이기 위한 방법으로 anion 또는 cation exchange resin 등을 사용하는 방법이 보고된바 있다(3,4). 이러한 방법은 농축하는 단계의 부가적인 시간이 소요되므로 상대적으로 짧은 반감기를 가진 Ga-68의 경우 최종적으로 낮은 방사화학적 제조 수율을 보여준다(5,6). 따라서 최근에는 용출 과정 중 Ga-68 방사능양이 최대로 포함된 볼륨만 표지 과정에 사용하는 fractionation 방법이 주로 이용되고 있다. 전세계적으로 Ga-68은 발생기 핵종이므로 사이클로트론과 부대시설 등이 불필요하여 많은 연구 그룹에서 Ga-68을 이용한 다양한 방사성추적자가 개발 연구를 수행하고 있으며, 그 중에 대표적인 [⁶⁸Ga]에도트레오타이드 ([⁶⁸Ga]edotreotide, [⁶⁸Ga]DOTA-TOC, Figure 1)는 소마토

Received: December 07, 2017/ Revised: December 18, 2017/ Accepted: December 21, 2017

Corresponding Author : Byung Seok Moon, Seoul National University Bundang Hospital, 82, Gumi-ro 173 Beon-gil, Bundanggu, Seongnam 13620, Korea. Tel: 82-31-787-2957, Fax: 82-31-787-4072, E-mail: bsmoon@snu.ac.kr; Byung Chul Lee, Seoul National University Bundang Hospital, 82, Gumi-ro 173 Beon-gil, Bundanggu, Seongnam 13620, Korea. Tel: 82-31-787-2956, Fax: 82-31-787-4072, E-mail: leebc@snu.ac.kr.

Copyright©2017 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

며, 본 과정을 5회 반복 확인 후 그 결과를 자동화 제조 시스템에 적용하였다. 최종적으로 표지 반응은 1.7-3.7 mL에 용출된 용액을 60초간 포집하여 사용하였으며, 이때 방사능량은 전체 5 mL의 용액으로 용출했을 때와 비교할 때 91-93%의 방사능량을 분획할 수 있었다(n=5).

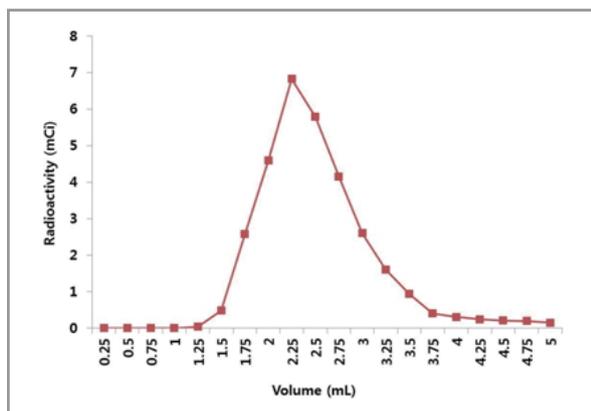


Figure 3. Elution profile of ⁶⁸Ga-generator

2. 자동합성장치의 구성

자동합성장치는 TRACERlab FX N pro (GE Healthcare)를 사용 하였으며, 이동경로는 그림 4에 표현하고, 각각의 사용된 시약은 표 1에 요약하였다.

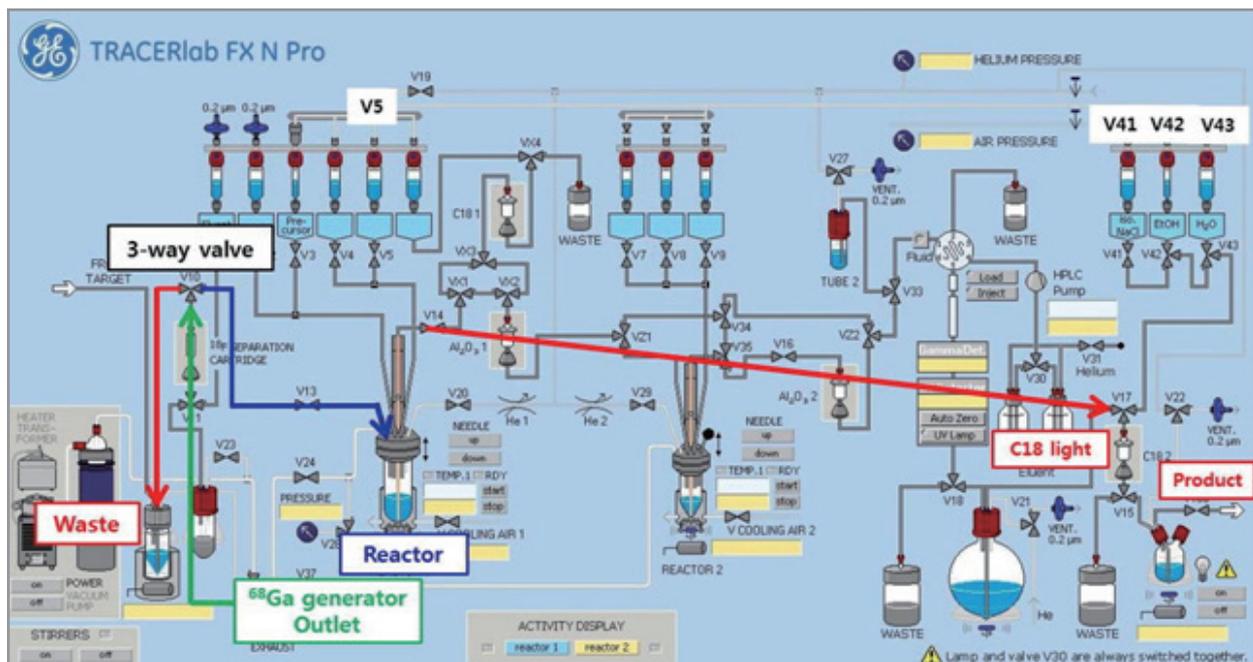


Figure 4. The scheme of the TRACERlab FX N pro chemistry module

Table 1. Reagent in each vial

Vial	Reagents
Vial 5 (V5)	D.W. (3 mL)
Reactor	DOTATOC acetate (50 µg) in 1 M sodium acetate (0.2 mL)
Vial 41 (V41)	Saline (9 mL)
Vial 42 (V42)	50% EtOH/saline (1 mL)
Vial 43 (V43)	D.W. (10 mL)

3. [⁶⁸Ga]에도트레오타이드 주사액의 제조

총 반응 볼륨, pH, 반응 시간, 반응온도, 전구체의 양 및 멸균필터 종류 등의 변화에 따른 방사화학적 수율 변화를 확인 후 최적화된 표지 조건을 완성하였으며, 최종적으로 자동합성장치에 적용한 반응 조건은 아래와 같다.

- ① 자동합성장치는 합성 전, 미리 입력된 세척 및 건조 프로토콜을 따라 아세톤을 이용하여 모든 바이알과 라인을 세척하였으며, 최종적으로 3차 증류수를 통과 시킨 후 건조 (vacuum, heating, air 이용)하여 사용하였다.
- ② 표지 반응을 위해 반응조건이 입력된 자동합성장치와

실린지 펌프의 작동을 동시에 시작하였으며, 이때 Ga-68은 2 mL/min의 속도로 용출시켰다.

③ 초기 약 1.7 mL까지는 waste vial로 용출시켰고, 그 후 자동합성장치 내 3-way 밸브를 이용, 60초간 반응용기(reactor)로 이송 방향을 변경하여 볼륨당 방사능 농도가 높은 2 mL의 용출 용액만 표지 과정에 이용 되도록 하였다.

④ 반응 용액의 pH는 sodium acetate 완충용액(0.2 mL)을 사용하여 pH 3.0-3.5로 조절하였으며, 전구체 50 μ g과 93도에서 7분간 반응하였다.

⑤ 반응 용기를 실온으로 냉각시킨 후 혼합액에 3 mL의 증류수(Vial 5)를 적가한 후 희석하고 이를 C18 light 카트리지에 흡착시켰다.

⑥ 10 mL의 증류수(vial 43)로 잔류용매를 제거 한 후 50% EtOH/saline 용액(vial 42)으로 [^{68}Ga]에도트레오타이드를 용출하였으며, 생리식염수(9 mL, vial 41)를 추가 적가한 후 멸균필터(AEF filter, 0.20 μm) 함으로써 제조를 완료하였다.

4. 품질관리

제조된 [^{68}Ga]에도트레오타이드 주사액의 품질관리는 성상, 방사화학적 순도, 확인시험, pH, 잔류용매, Ge-68 contamination, 엔도톡신 및 무균시험 등과 멸균필터 완전성시험의 항목으로 시행하였다. 성상은 511 KeV를 차폐할 수 있는 납유리에서 확인하였다. [^{68}Ga]에도트레오타이드 주사액의 radiochemical identity는 역상 액체크로마토그래피(Reverse-phase high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하고 표준물질(ABX, #9703)과 동시 주입하여 동일한 시간에 용출됨을 통해 확인하였다(Figure 5C)(10). 방사화학적 순도는 radio-TLC(Thin layer chromatography)를 이용하여 i) iTLC-SG I, 0.1 M Citrate (^{68}Ga : Rf = 0.8-1.0, ^{68}Ga -DOTA-TOC: Rf = 0.0-0.1, Figure 5A) 및 ii) iTLC-SG II, 0.1 M ammonium acetate in 50% methanol : water (^{68}Ga : Rf = 0.0-0.1, ^{68}Ga -DOTA-TOC: Rf = 0.8-1.0, Figure 5B) 조건에서 확인하였다. Ge-68 contamination은 일정양의

Ga-68 방사능 양을 측정된 후 동일한 샘플을 약 48시간 방사능 감쇄시키고, full-open-window (15-2,000 keV) 조건에서 감마카운터로 측정하여 regression fit (counts per minute versus kilobecquerel)에 따라 계산하였다. 이외의 품질관리는 대한민국약전 일반시험법에 따라 시험하였다.

Representative Results

[^{68}Ga]에도트레오타이드 주사액의 자동화 제조를 위한 총 합성시간은 약 22분 소요되었으며, [^{68}Ga]에도트레오타이드 주사액의 방사화학적 수율은 멸균 필터 후 $62.4 \pm 1.4\%$ ($n = 27$, non-decay corrected), 방사화학적 순도는 radio-TLC를 이용하여 두 가지 조건에서 확인하였을 때 99% 이상이었다. 품질관리는 성상, 확인시험, pH, 잔류용매, Ge-68 contamination, 엔도톡신 및 무균시험 등을 포함하여 멸균 필터 완전성시험 모두 설정된 기준에 만족함을 확인할 수 있었다(표 2).

Discussion

현재까지 보고된 [^{68}Ga]에도트레오타이드 주사액의 제조 방법은 용출된 Ga-68 용액을 이용하여 작업원이 수동합성하는 방법 혹은 용출된 Ga-68 용액을 작업자가 자동합성장치에 직접 주입하여 자동 합성하는 방법이 대부분이었다. 하지만 본 연구에서 확립한 제조 방법은 Ga-68의 용출 과정부터 [^{68}Ga]에도트레오타이드 주사액의 멸균 과정까지 자동화함으로써 높은 재현성(방사화학적 수율 $62.4 \pm 1.4\%$, $n=27$)과 함께, 작업원의 방사선피폭의 최소화할 수 있었다. 또한 본 연구에 사용된 자동합성장치에 국한 되지 않고, 최소한의 기능을 가지는 자동합성장치에도 응용하여 사용 될 수 있을 것으로 판단된다. 확립된 제조 시스템을 효과적으로 적용시키기 위해서는 Ga-68 표지에 사용되는 모든 시약과 증류수는 trace metal 등급 이상을 사용해야 할 것으로 판단되며, 무엇보다도 반응 용액의 정확한 pH 조절이 제조 수율에 중대한 영향을 주었다. 표지에 사용되는 전구체의 양은 유럽약전에는 허용하는 최대 허용량(50 $\mu\text{g}/\text{person}$)에 맞춰 50 μg 을

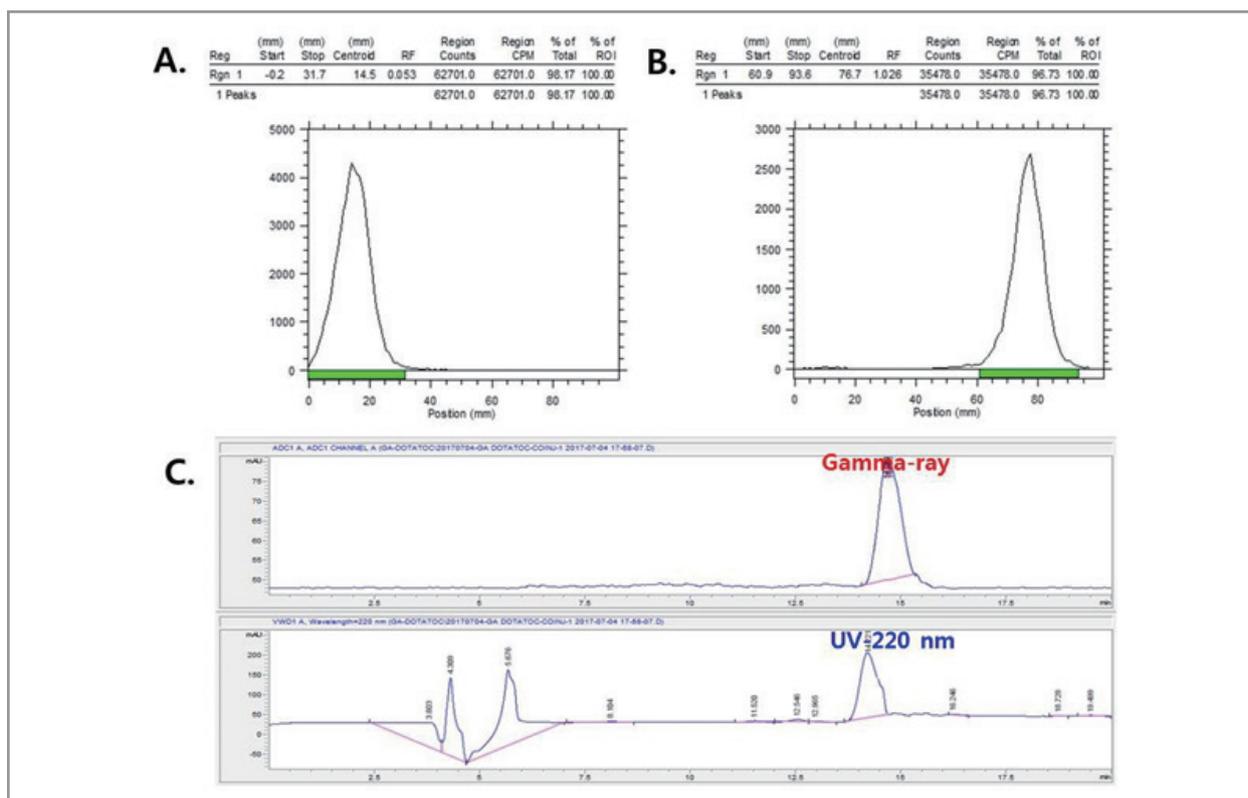


Figure 5. Profiles of radio-TLC (A and B) and HPLC chromatogram (C) by co-injecting an authentic compound and the collected radioactive fraction.

Table 2. Results for radiosynthesis and quality controls of [⁶⁸Ga]DOTA-TOC

	Specification ^a	[⁶⁸ Ga]DOTA-TOC
Radiochemical yield (% , n.d.c., n=27)		62.4 ± 1.4%
Radiochemical purity (%)	>91 (ITLC-SG I: Rf 0.05-0.1); >91 (ITLC-SG II: Rf 0.8-1.0)	>99 (Passes) >99 (Passes)
Visual inspection	Clear, colorless, no precipitate	Passes
Radionuclide purity (KeV)	511, 1022	511, 1022
pH	4.0-8.0	6.0-7.0
Radionuclide identity	62-74 min	Passes
Residual solvent analysis	acetone <5,000 ppm ethanol <100,000 ppm	acetone <50 ppm ethanol <70,000 ppm
Endotoxins	<175 EU/V	<2 EU/mL
Sterility	Sterile	Sterile
Ge-breakthrough	<0.001%	Passes
Terminal filter integrity	>50 psi	Passes
Synthesis time (min)	N/A	22 ± 1

^aReference 11

사용하여 최적화하였으며, 30 µg 이하에서는 반응 볼륨을 최소화했을 때(<2 mL) 비교적 높은 방사화학적 수율을 보여주었으나, 반응 볼륨 증가에 따라 수율이 감소하는 경향을 보이거나 재현성이 낮았다. [⁶⁸Ga]에도트레오타이드를 합성 후 멸균필터 종류에 따른 손실율은 Millipore GV > Millipore GS > Pall AEF 순으로 낮았으나 5% 내외의 차이를 보였다.

Conclusion

본 연구에서는 fractionation 방법을 이용하여 [⁶⁸Ga]에 도트레오타이드 주사액의 안정화된 자동화 제조 기술을 확립하였으며, 이는 높은 재현성과 함께 분당서울대학교병원 임상 진료에 활발히 이용되고 있다. 향후 본 자동화 제조 시스템은 Ga-PSMA-11 등과 같이 임상적 유용성이 알려진 다양한 Ga-68 표지 방사성의약품의 자동화 제조에도 효과적으로 적용 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgments

This study was funded by the Ministry of Health & Welfare and the Korean Research Foundation grants (HI14C-1072-010014, NRF-2014R1A2A2A01007980 and NRF-2015R1C1A1A02037284).

References

1. Green MW, Tucker WD. An improved Gallium-68 cow. *Int J Appl Radiat Isot* 1961;12:62-63.
2. Nakayama M, Haratake M, Ono M, Koiso T, Harada K, Nakayama H, Yahara S, Ohmomo Y, Arano Y. A new ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator system using an organic polymer containing N-methylglucamine groups as adsorbent for ⁶⁸Ge. *Appl Radiat Isot* 2003;58:9-14.
3. Meyer GJ, Mäcke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M. ⁶⁸Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1097-1104.
4. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rösch F. Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application. *J Nucl Med* 2007;48:1741-1748.
5. Breeman WAP, de Jong M, de Blois E, Bernard BF,

- Konijnenberg M, Krenning EP. Radiolabelling DOTA-peptides with ⁶⁸Ga. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:478-485.
6. Decristoforo C, Knopp R, von Guggenberg E, Rupprich M, Dreger T, Hess A, Virgolini I, Haubner R. A fully automated synthesis for the preparation of ⁶⁸Ga-labelled peptides. *Nucl Med Commun* 2007;28:870-875.
7. Hofmann M, Maecke H, Börner AR, Weckesser E, Schoffski P, Oei ML, Henze M, Heppeler A, Meyer GJ, Knapp WH. Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand ⁶⁸Ga-DOTATOC: preliminary data. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1751-1757.
8. Breeman WA, de Jong M, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Bakker WH, Kooij PP, Visser TJ, Krenning EP. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1421-1429.
9. Al-Nahhas A, Win Z, Szyszko T, Singh A, Nanni C, Fanti S, Rubello D. Gallium-68 PET: a new frontier in receptor cancer imaging. *Anticancer Res* 2007;27:4087-4094.
10. HPLC condition was as follows: Poroshell 120-C18 (Agilent), 3.0 x 50 mm, 2.7 µm; mobile phase: 0-8 min: 76% A and 24% B; 8-9 min: 40% A and 60% B; 9-14 min: 40% A and 60% B; flow rate: 0.6 mL/min, λ = 220 nm. Eluent A: 0.1% trifluoroacetic acid in distilled water; Eluent B: 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile.
11. The specifications for quality controls of [⁶⁸Ga]DOTA-TOC are based on the current general requirements for radiopharmaceuticals laid out in the European Pharmacopoeia and Scott PJH, Hockley BG. *Radiochemical syntheses*, volume 1. Wiley; 2012, 321-334.