

Original Article **타우 PET영상을 위한  $^{18}\text{F}$ -THK5351의 표지방법 개발**

연세의료원 세브란스병원 핵의학과  
박준영 · 손정민 · 전중현

**Development of Radiosynthetic Methods of  $^{18}\text{F}$ -THK5351 for tau PET Imaging**

Jun-Young Park, Jeong-Min Son and Joong-Hyun Chun

*Department of Nuclear Medicine, Severance Hospital, Yonsei University Health System, Seoul, Korea*

**Purpose**  $^{18}\text{F}$ -THK5351 is the newly developed PET probe for tau imaging in alzheimer's disease. The purpose of study was to establish the automated production of  $^{18}\text{F}$ -THK5351 on a commercial module.

**Materials and Methods** Two different approaches were evaluated for the synthesis of  $^{18}\text{F}$ -THK5351. The first approach (method I) included the nucleophilic  $^{18}\text{F}$ -fluorination of the tosylate precursor, subsequently followed by pre-HPLC purification of crude reaction mixture with SPE cartridge. In the second approach (method II), the crude reaction mixture was directly introduced to a semi-preparative HPLC without SPE purification. The radiosynthesis of  $^{18}\text{F}$ -THK5351 was performed on a commercial GE TRACERlab<sup>TM</sup> FX-FN module. Quality control of  $^{18}\text{F}$ -THK5351 was carried out to meet the criteria guideline in USP for PET radiopharmaceuticals.

**Results** The overall radiochemical yield of method I was  $23.8 \pm 1.9\%$  (n=4) as the decay-corrected yield (end of synthesis, EOS) and the total synthesis time was  $75 \pm 3$  min. The radiochemical yield of method II was  $31.9 \pm 6.7\%$  (decay-corrected, n=10) and the total preparation time was  $70 \pm 2$  min. The radiochemical purity was >98%.

**Conclusion** This study shows that method II provides higher radiochemical yield and shorter production time compared to the pre-SPE purification described in method I. The  $^{18}\text{F}$ -THK5351 synthesis by method II will be ideal for routine clinical application, considering short physical half-life of fluorine-18 ( $t_{1/2}=110$  min).

**Key Words** Alzheimer's Disease,  $^{18}\text{F}$ -THK5351, tau PET, Radiopharmaceutical

## 서 론

타우(tau) 단백질은 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 타우병증(tauopathy)의 주요한 hallmark 단백질로 신경세포 내에서 세포의 형태유지 역할을 하는 미세소관(microtubule)을 결합시켜 세포의 구조를 안정화 시킨다.<sup>1)</sup>

미세소관은 골격유지 뿐만 아니라 세포 내에서 세포물질의 수송 및 세포분열 시 방추체(spindle pole) 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만 타우 단백질의 비정상적 과인산화로 인해 미세소관에서 떨어져 나가면 신경세포의 구조적 안정성이 떨어지면서 신경세포간의 신호전달물질의 수송이 저해되어 기억능력 및 인지기능 저하가 나타나는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 과인산화로 인해 떨어져나간 타우 단백질들은 신경세포 내에서 서로 응집하여 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangle, NFT)를 형성한다.<sup>3)</sup> 신경섬유덩어리는 알츠하이머병이 진행될수록 신경세포 내에 축적되는데, 발병초기에는 내후각피질(entorhinal cortex)에서 축적이 시작되어 중기에는 해마(hippocampus)를 비롯한 대뇌 변연부를 침범을

· Received: April 14, 2018 Accepted: April 30, 2018

· Corresponding author : **Joong-Hyun Chun**

Address for correspondence : Department of Nuclear Medicine,  
Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro,  
Seodaemun-gu, Seoul, 03722, Korea

Tel.: +82-2-2228-2348, Fax: +82-2-312-0578

E-mail: jchun@yuhs.ac

하고 말기에는 기저 전뇌(basal forebrain), 편도체 주위피질(periamygdaloid cortex) 등으로 광범위하게 퍼지는 것으로 보고되고 있다.<sup>4)</sup> 최근 알츠하이머 환자의 타우(tau) 단백질 표적으로 하는 양전자방출단층촬영(positron emission tomography, PET) 영상의 임상적 유효성이 입증됨에 따라 타우 단백질을 표적으로 한 방사성의약품의 개발이 활발히 진행되고 있다.<sup>5, 6)</sup> 신경섬유덩어리를 구성하는 과인산화된 타우 단백질은 paired helical filament(PHF) 구조를 가지는데, 타우 단백질 PET영상을 위해 개발된 <sup>18</sup>F-THK-5105, <sup>18</sup>F-THK-5117, <sup>18</sup>F-AV-1451, <sup>18</sup>F-MK-6240 등과 같은 방사성의약품들은 PHF에 높은 친화력을 가지고 있어 생체에 투여 시 PHF와 선택적으로 결합함으로써 타우 단백질의 침착 정도와 위치를 영상화할 수 있다. 본 연구는 기존의 타우 PET용 방사성의약품으로 개발된 <sup>18</sup>F-THK-5105, <sup>18</sup>F-THK-5117를 개량한 <sup>18</sup>F-THK5351의 임상적 용을 위하여 범용으로 사용되고 있는 GE TRACERlab™ FX-FN 자동 합성장치에 적용한 표지방법을 소개하고자 한다.

### 실험대상 및 방법

본 연구에서 사용된 <sup>18</sup>F-THK5351 표지 전구체는 일본 도호쿠 대학의 Nobuyuki Okamura로부터 제공받아 사용하였고, 용매로 사용한 시약들은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 별도의 정제 없이 사용하였다. Sep-Pak® QMA Carbonate Plus Light 카트리지, Sep-Pak® tC18 Plus Short 카트리지 및 Oasis® HLB Light 카트리지는 Waters(Milford, MA, USA)사에서 구매하였고, Strata® C18-E 튜브형 카트리지는 Phenomenex(Torrance, CA, USA)사에서 구매하여 사용하였다. 방사성 동위원소 불소-18 음이온(<sup>18</sup>F, fluoride, <sup>18</sup>F<sup>-</sup>)은 사이클로트론(PETtrace™ 16.5 MeV cyclotron, GE healthcare, WI, USA)을 사용하여 양성자빔을 조사하여 [<sup>18</sup>O(p, n)<sup>18</sup>F]의 핵반응으로 생산하였다. <sup>18</sup>F-THK5351의 합성은 GE사의 TRACERlab™ FX-FN 자동합성장치를 사용하였다. <sup>18</sup>F-THK5351의 분리정제는 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC) 컬럼(Gemini C18, 10 × 250 mm; Phenomenex)에 주입한 후 이동상 용매는 30% acetonitrile/20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (v/v)을 사용하여 유속 4 ml/min으로 분리하였다. <sup>18</sup>F-THK5351 표지방법은 표지반응물의 HPLC 분리정제 전 전처리 정제과정을 포함한 방법(method I)과 전처리 정제과정을 포함하지 않은 방법(method II)으로 나누어 진행하였다. 전처리 정제

과정을 제외한 표지 및 분리정제는 동일한 조건하에 실시하였다. <sup>18</sup>F-THK5351 표지는 사이클로트론에서 생산된 불소-18 음이온 14.8±3.7 GBq(400±100 mCi)을 Sep-Pak® QMA 카트리지에 흡착시킨 후 K<sub>2.2.2</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 상전이촉매 혼합액(K<sub>2.2.2</sub> 30 mg in 0.95 ml acetonitrile+K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5.5 mg in 0.05 ml water)으로 용출을 하였다. 반응용기에 110℃의 열을 가한 후 진공상태에서 헬륨을 불어넣어 혼합액을 건조한 후 표지 전구체 2 mg을 반응용기에 첨가하여 건조된 <sup>18</sup>F<sup>-</sup>-K<sub>2.2.2</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>과 110℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1 N HCl을 첨가하여 가수분해 반응을 통해 보호기를 제거하였고, 반응액의 중화를 위해 0.8 M CH<sub>3</sub>COOK 1 ml을 첨가하였다. 이후 전처리 정제의 유무에 따라 method I과 method II로 진행하였다. Method I은 HPLC 분리정제를 하기 전 고체상 추출(solid phase extraction, SPE) 카트리지를 이용한 전처리 정제를 위하여 반응용기에 7 ml의 주사용수를 넣어 희석 후 Sep-Pak® tC18 Plus Short 카트리지 혹은 Oasis® HLB Light 카트리지에 통과시켰다. 통과 후 10 ml의 주사용수를 카트리지에 통과시켜 유기용매 및 불순물을 제거한 후 1.5 ml의 에탄올로 카트리지에 흡착된 <sup>18</sup>F-THK5351을 용출한 후 주사용수에 희석하여 HPLC 컬럼에 주입하여 분리정제 하였다(Fig. 1).

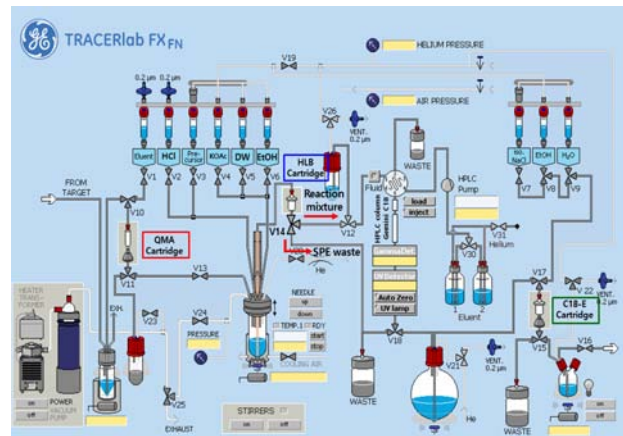


Fig. 1. Configuration of TRACERlab FX-FN module for <sup>18</sup>F-THK5351 production including pre-HPLC purification(method I).

Method II는 고체상 추출 카트리지를 이용한 전처리 정제 과정을 생략하고 중화과정이 끝난 반응용기에 3 ml의 HPLC 용매를 넣어 희석 후 HPLC 컬럼에 주입하여 분리정제 하였다(Fig. 2). HPLC를 이용하여 분취하고 얻어진 <sup>18</sup>F-THK5351은 주사용수 20 ml에 희석한 후 Strata® C18-E 튜브형 카트리지에 통과시켜 흡착하였다. 유기용매를 제거하기 위하여 주사용수 10 ml을 카트리지에 통과시킨 후 에탄올 1 ml을

사용하여 흡착된 <sup>18</sup>F-THK5351을 용출하였다. <sup>18</sup>F-THK5351은 생리식염수에 희석 후 0.22- $\mu$ m Millex<sup>®</sup> GV 멸균필터를 사용하여 멸균하였다. 제조완료 후 방사화학적 수율 및 순도를 측정하였다. 방사화학적 수율은 Waters사의 HPLC (Alliance e2695 HPLC system)를 사용하여 UV는 360 nm에서 검출하였고, 방사능의 검출은 Bioscan사의 FC-200을 사용하였다. 역상 HPLC 컬럼(Luna C18, 4.6 $\times$ 250 mm; Phenomenex)을 사용하여 분석하였고, 이동상으로 45% acetonitrile/20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(v/v)를 사용하여 0.8 ml/min의 유속으로 분석하였다.

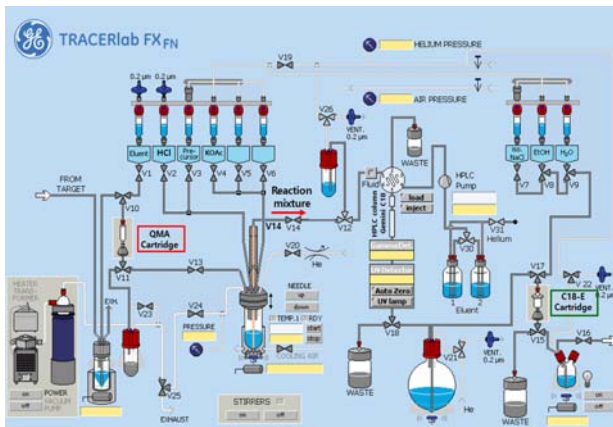


Fig. 2. Configuration of TRACERlab FX-FN module for <sup>18</sup>F-THK5351 production excluding pre-HPLC purification(method II).

## 결 과

고체상추출 카트리지를 사용하여 표지방반응물의 전처리 정제를 거친 method I 표지방방법의 방사화학적 수율은 23.8 $\pm$ 1.9% (decay-corrected, n=4)이었다. 전처리 정제 과정의 최적화를 위해 Waters사의 Sep-Pak<sup>®</sup> tC18와 Oasis<sup>®</sup> HLB 고체상 추출 카트리지를 사용하여 비교해 보았다. Sep-Pak<sup>®</sup> tC18 카트리지 는 수용액상에서 강한 소수성의 물질을 분리할 때 주로 사용되며, Oasis<sup>®</sup> HLB 카트리지는 친수성과 소수성 물질 모두 분리가 가능한 고체상 추출 카트리지로 알려져 있다. Sep-Pak<sup>®</sup> tC18 카트리지의 경우 23.6 $\pm$ 2.1 GBq(638.5 $\pm$ 55.9 mCi)의 표지 후 혼합물의 방사능 중 13.5 $\pm$ 0.5 GBq(365.0 $\pm$ 14.1 mCi, n=3)가 폐기물로 빠져나갔고, Oasis<sup>®</sup> HLB 카트리지 는 19.6 $\pm$ 0.1 GBq(530.5 $\pm$ 3.5 mCi)의 표지 후 혼합물의 방사능 중 8.0 $\pm$ 0.1 GBq(215.5 $\pm$ 0.7 mCi, n=3)가 폐기물로 빠져나갔다. 합성에 소요되는 시간은 약 76분이었다(Table 1). 전처리 정제과정이 생략된 method II 표지방방법의 방사화학적 수율은 31.9 $\pm$ 6.7% (decay-corrected, n=10)이었으며, 합성소요시간은 70분 이

었다. 방사화학적 순도는 두 방법 모두 > 98%이었다.

Table 1. Summary of <sup>18</sup>F-THK5351 production

	Method I	Method II
Total Synthesis Time	76 min	70 min
Radiochemical Yield (decay-corrected)	23.8 $\pm$ 1.9%(n=4)	31.9 $\pm$ 6.7%(n=10)
Radiochemical Purity	> 98%	> 98%

## 고찰 및 결론

전처리 정제과정이 포함된 <sup>18</sup>F-THK5351의 표지방방법은 원개발자인 일본 도호쿠 대학의 Okamura 그룹에 의해 고안된 표지방방법으로, 표지방반응물의 HPLC 분리정제에 앞서 표지방과정에서 생기는 불순물, 미반응물질 및 유기용매를 고체상 추출 카트리지를 사용하여 제거하는 방법이다.<sup>7)</sup> 도호쿠 대학은 전처리 정제과정을 위해 강소수성물질 분리용인 Sep-Pak<sup>®</sup> tC18 고체상 추출 카트리지를 사용하였다. 본 실험에서 원개발자의 방법과 동일한 Sep-Pak<sup>®</sup> tC18 카트리를 사용하여 실험한 결과 57.2%의 표지 후 혼합물의 방사능이 고체상 추출 카트리지에 흡착되지 않고 폐기물로 빠져나가는 것을 확인할 수 있었다. 표지방반응물의 소모를 감소하기 위해 친수성 및 소수성 물질 모두 분리가 가능한 Oasis<sup>®</sup> HLB 고체상 추출 카트리지를 사용하였지만 40.6%의 표지 후 혼합물의 방사능이 빠져나가는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 전처리 정제과정이 포함된 method I 표지방방법은 정제과정을 한 단계 더 거치기 때문에 표지방반응물의 손실이 많아 방사화학적 수율이 낮아지는 단점을 발견하였다. 하지만 전처리 정제과정이 생략된 method II 표지방방법은 모든 표지방반응물이 HPLC로 분리정제되기 때문에 방사화학적 수율이 method I 표지방방법보다 높은 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 전처리 정제과정을 거쳐 HPLC로 분리정제하는 방법과 전처리 정제과정을 거치지 않고 표지방반응물을 바로 HPLC 정제하는 표지방방법을 상용화된 자동합성장치를 사용하여 개발하였다. 두 방법 간의 합성 시 소요되는 총 시간은 크게 차이가 나지 않으나, 전처리 정제과정이 생략된 <sup>18</sup>F-THK5351 표지방방법의 방사화학적 수율이 크게 개선되어 향후 임상현장에서 통상적으로 생산 시 보다 유용한 표지방방법으로 기대된다.

## 요 약

본 연구는 타우 PET용 방사성의약품으로 개발된  $^{18}\text{F}$ -THK5351의 임상적용을 위하여 상용화된 자동 합성장치에 적용한 표지방법을 개발하고자 하였다.  $^{18}\text{F}$ -THK5351의 표지법 개발은 HPLC 분리정제 전 표지반응물의 유기용매, 불순물 및 미반응 물질을 제거하기 위해 고체상 추출 카트리지를 사용하여 정제하는 과정을 포함한 방법(method I)과 전처리 정제과정을 포함하지 않은 방법(method II)으로 나누어 진행하였다.  $^{18}\text{F}$ -THK5351 표지는 Sep-Pak<sup>®</sup> QMA 카트리지를 사용하여 흡착한 불소-18 음이온을  $\text{K}_2.2.2/\text{K}_2\text{CO}_3$ 으로 용출한 후 100°C에서 진공상태와 헬륨의 흐름하에 건조한 후 표지 전구체와 110°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl을 첨가하여 보호기를 제거한 후 0.8 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 를 사용하여 표지 반응물을 중화하였다. 이후 전처리 정제의 유무에 따라 method I과 method II로 진행하였다. Method I에서 전처리 정제 과정의 최적화를 위해 Sep-Pak<sup>®</sup> tC18과 Oasis<sup>®</sup> HLB 고체상 추출 카트리지를 사용하여 비교한 결과 Sep-Pak<sup>®</sup> tC18 카트리지는 57.2%의 표지 반응물이 빠져나갔고, Oasis<sup>®</sup> HLB 카트리지는 40.6%의 표지 반응물이 빠져나가는 것을 확인할 수 있었다. Method I 표지방법의 방사화학적 수율은  $23.8 \pm 1.9\%$ (decay-corrected, n=4) 이었고, method II 표지방법의 방사화학적 수율은  $31.9 \pm 6.7\%$ (decay-corrected, n=10) 이었다. 본 연구를 통해 전처리 정제과정을 거쳐 HPLC로 분리정제하는 방법과 전처리 정제과정을 거치지 않고 표지반응물을 바로 HPLC 정제하는 표지방법을 상용화된 자동합성장치를 사용하여 성공적으로 개발하였다. 하지만 전처리 정제과정을 포함한 표지방법은 표지반응물의 손실이 많아 방사화학적 수율이 낮아지는 단점을 발견하였다. 본 연구에서 개발된 전처리 정제과정이 생략된  $^{18}\text{F}$ -THK5351의 표지방법은 향후 통상적으로 생산 시 보다 유용한 표지방법으로 사용될 것으로 기대된다.

## REFERENCES

1. Desai A., Mitchison TJ., Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:83-117.
2. Gendron TF., Petrucelli L., The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2009;4:13.
3. Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S., Chohan MO., El-Akkad E., Gong CX., et al., Tau pathology in alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1739: 198-210.
4. Braak H., Braak E., Neuropathologicalstaging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82: 239-259
5. Okamura N., Harada R., Furumoto S., Arai H., Yanai K., Kudo Y., Tau PET imaging in alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14:500
6. Saint-Aubert L., Lemoine L., Chiotis K., Leuzy A., Rodriguez-Vieitez E., Nordberg A., Tau PET imaging: present and future directions. *Mol Neurodegener.* 2017; 12:19.
7. Harada R., Okamura N., Furumoto S., et al.,  $^{18}\text{F}$  THK5351: a novel PET radiotracer for imaging neurofibrillary pathology in alzheimer disease. *J Nucl Med.* 2016;57: 208-214.