

SYNTÉZA PET RADIOFARMAKA [¹⁸F] FLUOROCHOLIN, VÝVOJ ANALYTICKÝCH METOD A OPTIMALIZACE OBSAHU DIMETHYLAMINOETHANOLU V KONCOVÉM PRODUKTU

FILIP KUŽEL^{a,c}, ALENA NOVOTNÁ^c a JAN
ADAM^{b,c}

^a FJFI ČVUT, Břehová 78/7, 110 00 Praha 1 - Staré Město, ^b Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO), Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, ^c ÚJV Řež, a.s., Hlavní 130, 250 63 Husinec-Řež
filip.kuzel@ujv.cz

Došlo 9.5.17, přijato 4.8.17.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: pozitronová emisní tomografie; radiofarmaka; [¹⁸F] fluorocholin; analytické metody

Úvod

[¹⁸F]fluorocholin (*N,N*-dimethyl-*N*-[¹⁸F]fluormethyl-2-hydroxyethylamonium-chlorid) je radiofarmakem určeným primárně pro diagnostiku karcinomu prostaty prostřednictvím pozitronové emisní tomografie (PET). Tento typ rakoviny v posledních letech rapidně nabývá na významu – s prodlužující se očekávanou dobou dožití narůstá množství mužů, kteří touto chorobou trpí, neboť pravděpodobnost výskytu karcinomu prostaty u pacienta prudce stoupá s věkem. Ročně je různými metodami diagnostikováno kolem 7000 nových případů. Fluorodeoxyglukosa, základní PET radiofarmakum, je ovšem pro účel zobrazování prostaty spíše nevhodná^{1,2}.

Fluorocholin je fluorem značeným analogem cholinu, základního stavebního kamene fosfolipidických membrán. Cholin je prekurzorem pro biosyntézu fosfolipidů a do buňky proniká skrze cholinové transportéry. Takzvanou Kennedyho dráhou je z něj posléze syntetizován fosfatidylcholin³. Krokem limitujícím rychlost této dráhy je hned krok první, kdy je pomocí cholinkinasy katalyzována fosforylace cholinu na fosfocholin⁴. V buňkách karcinomu prostaty je enzym cholinkinasa zvýšeně exprimován. De-Grado a spol. v roce 2001 doložili, že fluorem-18 značený fluorocholin je *in vitro* fosforylován cholinkinase stejně jako jeho neznačený analog⁵. Tento poznatek zavedl podnět k využití fluorocholinu jako zobrazovacího PET traceru pro karcinom prostaty^{6–11}.

Při syntéze jakéhokoli PET radiofarmaka musí být brán zřetel na následující:

- prekurzor účinné látky musí být dostupný v požadovaném množství a ve farmaceutické kvalitě obecně popsané lékopisem, v případě komerční produkce registrovaného radiofarmaka pak navíc s podrobnou dokumentací odpovídající požadavkům na Active Substance Master File (ASMF),
- je nutný dostatečně vysoký výtěžek syntézy účinné látky k získání reálně aplikovatelného množství radiofarmaka,
- musí být vypracován definitivní postup přípravy a kontroly kvality vyhovující přísným podmínkám správné výrobní praxe (SVP).

Experimentální část

Reagencie

[¹⁸O]H₂O – voda obohacená isotopem [¹⁸O], minimální obohacení > 95 %, (ROTEM Industries Ltd., Izrael). Souprava chemikálií pro výrobu [¹⁸F]fluorocholinu ve formě kitů (každý kit obsahuje 7 skleněných vialek s ochranou atmosférou, výrobce ABX Advanced Biochemical Compounds, Německo) Souprava obsahuje: roztok aminopolyetheru Cryptand 222 (22,6 mg kryptandu 222, 4,2 mg K₂CO₃, 300 μl acetonitrilu, 300 μl vody na injekci), 500 μl dibrommethanu (DBM), 3,5 ml suchého acetonitrilu (< 0,01 % vody), 1 ml dimethylaminoethanolu (DMAE), 3,5 ml vodného roztoku chloridu sodného (0,9 % w/v), 10,0 ml ethanolu, 10,0 ml vody na injekci. Při experimentech věnujících se optimalizaci obsahu DMAE ve finálním produktu navíc roztok NH₃ v ethanolu (6 %, 2 %, 1 %, 0,25 %, 0,1 %).

Další pomocné látky

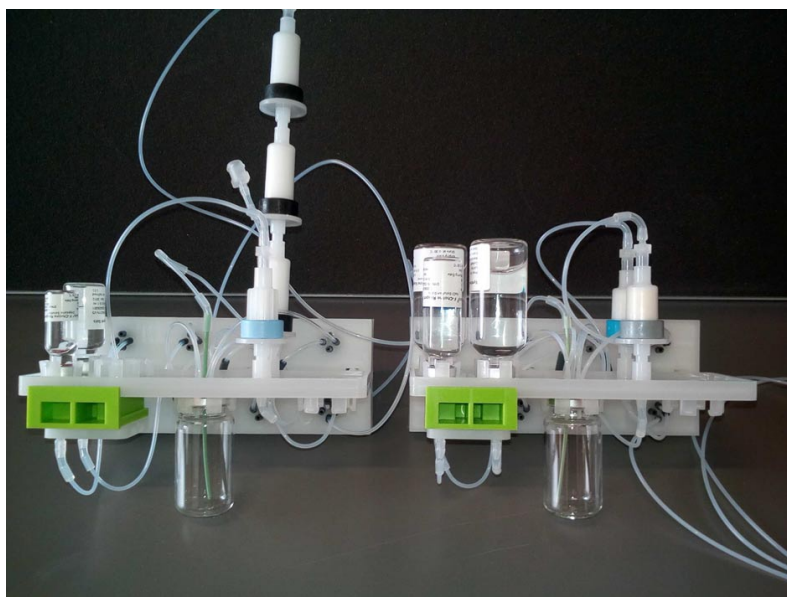
Voda na injekci (Fresenius Kabi, Ardeapharma), HCl 37% (Merck KGaA), NaHCO₃ (Merck KGaA), helium (stlačené 6.0, čistota ≥ 99,9999, Linde Technoplyn a.s., Praha), stlačený vzduch.

Integrované fluidní procesory

Destilační a alkylační integrované fluidní procesory (IFP); oba typy IFP pro syntézu se skládají z 8 rotačních ventilů, 2 držáků na kolonky, 5 držáků na vialky a 1 reakční nádobky (viz obr. 1) výrobce ABX Advanced Biochemical Compounds, Německo. V části optimalizace došlo k výměně vitonových spojek za silikonové.

Postup syntézy

Syntéza fluorocholinu byla provedena na sestavě dvou modulů IBA Synthera 2 (výrobce IBA, Belgie), která využívá dvojkrokového postupu sestávajícího z přípravy alkylačního činidla [¹⁸F]-fluorbrommethanu a jeho purifi-



Obr. 1. Kombinace IFP (integrováných fluidních procesorů) používaných pro výrobu fluorocholinu, s osazenými chemikáliemi a kolonkami nutnými k syntéze. Vlevo destilační IFP (krok přípravy ^{18}F fluorbrommethanu) s osazenou separační QMA kolonkou a trojicí kolonek s oxidem křemičitým, vpravo alkylační IFP (krok přípravy ^{18}F fluorocholinu), s HLB kolonkou pro syntézu ^{18}F fluorocholinu a Accell CM kolonkou pro purifikaci produktu

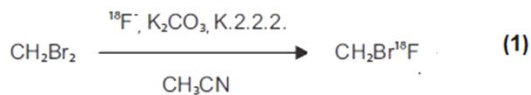
kace destilací (první integrovaný fluidní procesor), následovaného alkylací diaminoethanolu za vzniku finální látky (druhý integrovaný fluidní procesor). Syntézní schéma demonstruje obr. 2.

Ozařování

Ozařování proběhlo na cyklotronu Cyclone 18/9 výrobce IBA na PET centru v Brně. Ozařováno bylo 2,01 ml H_2^{18}O , tj. vody obohacené o isotope kyslíku 18, protonovým paprskem po dobu 90 min proudem 39,4 μA .

Syntéza

Ozářená voda z cyklotronového terče byla kapilárou vedena na první IFP (destilační). Na předem aktivované



Obr. 2. Schéma syntézy ^{18}F fluorocholinu. Fáze (1) probíhá na destilačním IFP na modulu č.1, fáze (2) na alkylačním IFP na modulu č. 2. K.2.2.2. – 2,2,2-kryptand, DMAE – dimethylaminoethanol

(promytím 5 ml 8,4 % w/v NaHCO_3) aniontově výměnné kolonce QMA byly zachyceny $^{18}\text{F}^-$ ionty. Tyto ionty byly z kolonky eluovány roztokem 2,2,2-kryptandu (Kryptofix) (600 μl) do první reakční nádoby. Následovala fluorace dibrommethanu za přípravy vysoce těkavého ^{18}F fluorbrommethanu (do nádoby bylo přidáno 500 μl dibrommethanu ve 3 ml acetonitrilu, reakce probíhala 10 min při 110 $^\circ\text{C}$). Výsledný fluorbrommethan byl přečištěván kombinací destilace (60 $^\circ\text{C}$, nízký průtok helia 32 ml min^{-1}) a vedení přes izolačně-purifikační soustavu tří kolonek s oxidem křemičitým. Výsledná směs byla kontinuálně vedena na druhý, alkylační IFP, konkrétně na HLB (hydrophilic-lipophilic balance – sorbent s hydrofilně-lipofilně vyrovnanými vlastnostmi) kolonku předem napuštěnou 1 ml dimethylaminoethanolu. Zde došlo k *N*-alkylační reakci za vzniku ^{18}F fluoro(methyl)cholinu. Dvěma přidávkami ethanolu (celkem 10 ml) byla směs z kolonky eluována dvěma přidávkami vody (celkem 10 ml) na katexovou kolonku Waters Accell CM, prekonkondicionované roztokem HCl (1 mol l^{-1}), kde došlo k zachycení produktu. Ten byl následně eluován z katexové kolonky fyziologickým roztokem (3,5 ml, ve dvou přidávkách) do sterilní produktové nádoby v dispenzačním boxu.

Kontrola jakosti

Kontrola vzhledu byla provedena vizuálně proti světlému a tmavému pozadí.

- Chemická a radiochemická čistota byla určena pomocí:
 - a) iontové HPLC s použitím Chromatografu Dionex ICS-5000+ s vodivostním detektorem (Dionex)

a radiometrickým detektorem Flow-RAM (LabLogic), zapojenými v sérii. Mobilní fáze: 9 mM kyselina sírová s průtokem 1 ml min⁻¹. Gradientová metoda: 0–9 min – samotná 9 mM kyselina sírová; 9–14 min – směs 9 mM kyseliny sírové a vody (2:8); 14–35 min – samotná 9 mM kyselina sírová;

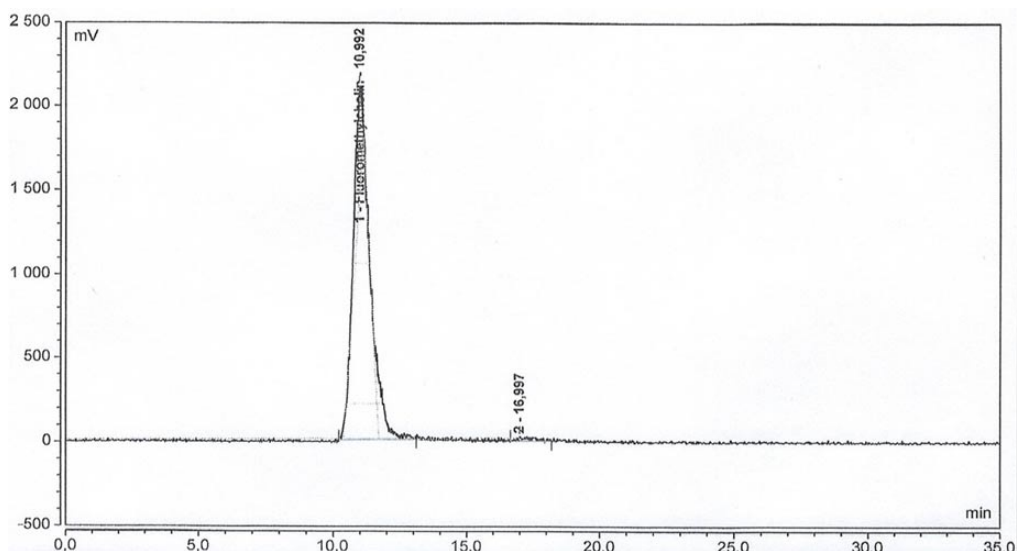
- b) tenkovrstvé chromatografie s použitím TLC desky (TLC Silikagel 60) a mobilní fáze acetonitril + fyziologický roztok (poměr 1:1), měření rozložení radioaktivity na přístroji miniGita (gama Radio TLC scanner, Raytest).
- Radionuklidová čistota byla určena gama spektrometrem (P-type Coaxial Germanium Detector, DSA-1000 Digital Spectrum Analyzer, Canberra Packard).
 - Poločas přeměny a objemová aktivita byly kontrolovány měřičem radioaktivity Curiementor 4 (PTW Freiburg).
 - Stanovení zbytkových rozpouštědel bylo provedeno plynovým chromatografem Perkin-Elmer Clarus 500 s FID detekcí a s kolonou Elite-200 (nosný plyn N₂, teplota kolony 40 °C a teplota detektoru 250 °C).
 - Kontrola obsahu aminopolyetheru (2,2,2-kryptand) byla provedena kapkovou zkouškou na desce se silikagelem pro aminopolyetherovou zkoušku (objem kapek 2,5 µl).
 - pH kontrolováno pomocí pH-metru Seven Easy (Mettler Toledo) se skleněnou kombinovanou mikroelektrodou InLab Micro.
 - Pro stanovení sterility byla použita metoda přímého očkování, pro stanovení obsahu bakteriálních endotoxinů byla použita gelová metoda.

Výsledky a diskuse

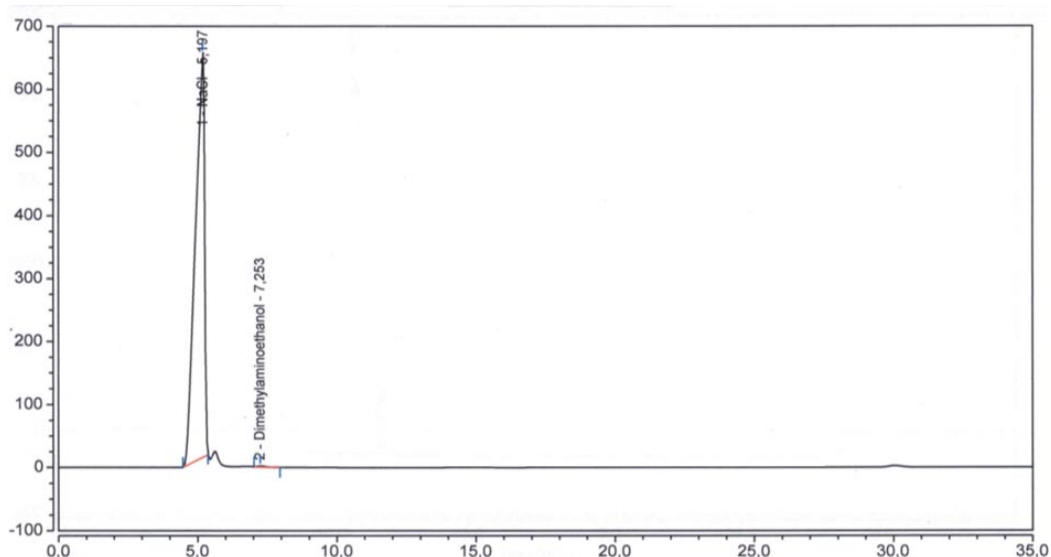
Vývoj analytických metod

V době, kdy probíhaly přípravné práce na zavedení přípravy fluorocholinu na pracovišti PET Brno ÚJV Řež, a. s., neexistoval lékopisný článek pro [¹⁸F]fluorocholin, a to ani v Českém lékopisu, ani v lékopisu evropském (European Pharmacopoeia). Efektivně tak nebylo známo, jaké metody analýzy jakosti budou u této látky ze strany regulačních orgánů vyžadovány. V tomto informačním vakuu bylo nutno identifikovat vhodné metody pro jednotlivé parametry jakosti, metodiku vyvinout a validovat.

Pro většinu parametrů bylo možno využít již popsané metody či metody používané pro jiná radiofarmaka. Nalezení vhodných metod se tak týkalo chemické a radiochemické čistoty, zejména ve vztahu ke zbytkovému obsahu reagensů, totiž dibrommethanu a dimethylaminoethanolu. V případě dibrommethanu se jedná o vysoce těkavou látku, a proto se jako vhodná volba jevila plynová chromatografie, tedy běžné vybavení laboratoře uzpůsobené ke kontrole jakosti fluorodeoxyglukosy. V případě dimethylaminoethanolu byla situace komplikovanější. S přihlédnutím k internímu požadavku, aby zvolená metoda pokrývala pokud možno co nejširší spektrum možných analyzovaných parametrů s ideálně co nejvyšší citlivostí, byla na základě vlastností diaminoethanolu, fluorocholinu a možných vznikajících vedlejších produktů jako nejvhodnější metoda identifikována iontová kapalinová chromatografie s radiodetekcí a konduktometrickou analýzou, která disponuje nižší mezí detekce a větší citlivostí, než dostupné alternativy. Analýzy byly v obou případech provedeny metodami napsanými výše. Příklady chromatogramů z analýzy radiochemické a chemické čistoty poskytují obr. 3 a 4.



Obr. 3. HPLC chromatogram analýzy produktu, záznam z radiometrického detektoru, určení radiochemické čistoty. [¹⁸F]fluorocholin má retenční čas 10,99 minuty, celkově je v požadované formě [¹⁸F]fluorocholinu přítomno 98,7 % veškeré aktivity



Obr. 4. HPLC chromatogram analýzy produktu, záznam z vodivostního detektoru, určení chemické čistoty. Jedinou významnou chemickou nečistotou je dimethylaminoethanol (DMAE) s retenčním časem 7,25 minuty. Signál NaCl (retenční čas 5,1 minuty) pochází z fyziologického roztoku použitého k eluci produktu z poslední kolony

Popsané metody byly zavedeny a validovány v souladu s požadavky na správnou výrobní praxi (GMP). V popsané podobě byly obsaženy v dokumentaci přiložené k žádosti o povolení k provedení klinického hodnocení předložené Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv. Toto povolení bylo ze strany SÚKL uděleno v roce 2014 (EudraCT Number 2014-005345-50). V časovém rozpětí 2014–2016 bylo realizováno více než 50 příprav látky fluorocholinu, včetně 20 výrob pro účely aplikace pacientům v rámci klinického hodnocení látky, které využívaly popsané syntézní a analytické metody.

Optimalizace obsahu reaktantu DMAE ve finálním produktu

Vzhledem k neexistenci lékopisného článku pro fluorocholin nebyla zpočátku práce věnována pozornost obsahu zbytkového dimethylaminoethanolu ve finálním produktu. V průběhu práce byla nicméně publikována data naznačující, že vyšší obsah DMAE ve finálním produktu by mohl ve výsledku negativně ovlivňovat zobrazování tumorové aktivity prostřednictvím [¹⁸F]fluorocholinu. Syntéza v popsáném uspořádání produkovala fluorocholin se zbytkovým obsahem dimethylaminoethanolu přibližně 1000 ppm. Za účelem snížení obsahu přibližně o řád byla navázána vývojová spolupráce s firmou IBA, výrobcem používaných modulů. Po analýze a rešerši dostupné literatury byly definovány celkem tři přístupy, potenciálně vedoucí ke zvýšení kvality syntézy a snížení obsahu DMAE (cit.¹²).

- Celkové zvýšení těsnosti jednorázového kapilárního systému na obou integrovaných fluidních procesorech výměnou vitonových spojek za silikonové o stejném průměru (OD/ID 3/1 mm). Tento krok by měl vést

obecně k větší výtěžnosti syntézy ve vztahu k obsahu [¹⁸F]fluorocholinu ve finálním produktu.

- Nahrazení Waters Accell CM kolony, sloužící k v posledním kroku přípravy k izolaci fluorocholinu z reakční směsi, slabou katexovou kolonkou Oasis WCX Plus, taktéž od výrobce Waters. Chemické složení kolony by mělo přispět k lepšímu zachytu fluorocholinu skrze hydrofobní interakce; kolonka navíc na rozdíl od původní nevyžaduje aktivaci promytím roztokem hydrogenuhličitanu.
- Přidání vodného roztoku amoniaku k ethanolu používaného k eluci z HLB kolony. Přítomnost amoniaku zapříčiní deprotonaci DMAE-H⁺ (pK_a amonného iontu je 9,25, zatímco pro DMAE-H⁺ jen kolem 8,80). Deprotonovaný dimethylaminoalkohol pak nebude mít tendence být zadržován výše zmíněnou katexovou přečišťovací kolonkou.

Na základě výše uvedeného schématu byly navrženy série experimentů s různou konfigurací těchto tří modifikací. Výsledky jednotlivých experimentů jsou přehledně shrnuty v tab. I.

Z těchto výsledků je zřejmé, že náhrada spojovacího materiálu a výměna Accell CM kolony za slabou katexovou WCX kolonku neměla hmatatelný dopad na výtěžek reakce, ani nepřispěla ke kýženému efektu, tedy redukcí obsahu DMAE ve finálním produktu. Toho bylo dosaženo až použitím šestiprocentního vodného roztoku NH₃ v ethanolu. Efekt přidavku amoniaku byl v sekvenci experimentů ověřen ještě experimentem, kdy došlo k výměně spojovacího materiálu a kolony, ale přidavek neproběhl. Protože přítomnost amoniaku ve finálním produktu by měla ideálně být co nejnižší, byla provedena série experimentů s postupně snižující se koncentrací vodného roztoku amoniaku. Jako minimální efektivní hranice byla v tomto

Tabulka I
Přehled výsledků syntézních běhů s provedenými modifikacemi procesu

Syntéza č.	Výměna konektorů	Výměna kolonky	Přídavek NH ₃ (aq)	Výtěžek [%] ^a	Obsah DMAE [% limitu] ^b	Redukce obsahu DMAE
1, 2	ano	ne	ne	22,20 ± 0,08	220,92 ± 7,68	ne
3, 4	ne	ano	ne	21,75 ± 0,06	215,42 ± 15,0	ne
5, 6	ne	ne	6%	23,015 ± 0,21	5,89 ± 0,64	ano
7, 8	ano	ano	6%	22,03 ± 0,38	1,56 ± 0,39	ano
9, 10	ne	ano	6%	21,61 ± 0,70	2,33 ± 0,08	ano
11, 12	ano	ano	ne	23,22 ± 0,2	186,48 ± 3,94	ne
13, 14	ne	ano	2%	22,38 ± 0,22	12,745 ± 0,71	ano
15, 16	ne	ano	0,25%	21,40 ± 1,10	18,45 ± 0,05	ano
17, 18	ne	ano	0,10%	21,24 ± 0,79	103,58 ± 2,02	nedostatečně
19–21	ne	ano	0,25%	22,99 ± 0,40	22,5 ± 0,30	ano

^a Výtěžek nekorigovaný na rozpad (aktivita produktu vs. vstupní aktivita); ^b vztaženo ke 100 % limitu požadovaného odpovídajícím lékopisem (0,2 mg ml⁻¹) při uvážení aplikovaného množství 5 ml

případě identifikována hodnota 0,25 %.

Výsledky experimentů byly zpracovány formou výzkumného reportu a poskytnuty společnosti IBA.

Závěr

Na pracovišti PET Brno společnosti ÚJV Řež, a. s. byla zavedena a validována metoda přípravy radiofarmaka [¹⁸F]fluorocholin s využitím komerční sestavy modulů Synthera v2 výrobce IBA. Za absence oficiálních předepsaných metod kontroly jakosti výsledného radiofarmaka byly ve dvou případech vyvinuty a validovány metody kontroly jakosti. Vyvinuté metody byly akceptovány SÚKL v rámci žádosti o provedení klinického hodnocení látky [¹⁸F]fluorocholin.

Byla provedena série 21 experimentů studujících efekty tří možných modifikací procesu či použitého zařízení na snížení obsahu nezreagovaného dimethylaminoethanolu pod limit požadovaný lékopisem. Jako klíčový byl identifikován efekt přídavku amoniaku, následně byla identifikována minimální účinná koncentrace a provedeny kontrolní validační běhy, jejichž výsledky poslouží jako podklady výrobcí modulů pro plošné vylepšení procesu pro všechny uživatele. Aktualizace bude spočívat v přidání nezbytného množství amoniaku v elučním kroku z HLB kolonky a výměně Accell CM kolonky za WCX. Výměna kolonky neměla sice pozitivní, ale ani negativní efekt na výtěžek a obsah DMAE; použitím WCX kolonky nevyžadující prekonkondicaci nicméně odpadá jeden přípravný krok a celá syntéza se stává uživatelsky příjemnější.

Samotná klinická studie s [¹⁸F]fluorocholinem byla provedena v rozmezí září 2015 – září 2016, v rozsahu 35 pacientů. Výsledky budou využity ke komerční registraci radiofarmaka v ČR.

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPUI – LO1413.

LITERATURA

- Morris M. J., Akhurst T., Osman I., Nunez R., Macapinlac H., Siedlecki K., Verbel D., Schwartz L., Larson S. M., Scher H. I.: *Urology* 59, 913 (2002).
- Sanz G., Robles J. E., Giménez M., Arocena J., Sánchez D., Rodríguez-Rubio F., Rosell D., Richter J. A., Berian J. M.: *BJU Int.* 84, 1028 (1999).
- Kennedy E. P., Weiss S. B.: *J. Biol. Chem.* 222, 193 (1956).
- Kent C.: *Prog. Lipid Res.* 29, 87 (1990).
- DeGrado T. R., Baldwin S. W., Wang S., Orr M. D., Liao R. P., Friedman H. S., Reiman R., Price D. T., Coleman R. E.: *J. Nucl. Med.* 42, 1805 (2001).
- Bauman G., Belhocine T., Kovacs M. Ward A., Beheshti M., Rachinsky I.: *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 15, 45 (2012).
- Soyka J. D., Muster M. A., Schmid D. T., Seifert B., Schick U., Miralbell R., Jorcano S., Zaugg K., Seifert H. H., Veit-Haibach P., a kol.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39, 936 (2012).
- Kwee S. A., Coel M. N., Lim J.: *Ann. Nucl. Med.* 26, 501 (2012).
- Hodolič M.: *Radiol. Oncol.* 45, 17 (2011).
- Fabrizi C., Galassi R., Moretti A., Sintuzzi E., Mautone V., Sarti G., Strigari L., Benassi M., Matteucci F.: *Phys. Med.* 30, 346 (2014).
- Umbehre M. H., Müntener M., Hany T., Sulser T., Bachmann L. M.: *Eur. Urol.* 64, 106 (2013).
- Slaets D., De Bruyne S., Dumolyn C., Moerman L., Mertens K., De Vos F.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 2136 (2010).

F. Kužel^{a,c}, A. Novotná^c, and J. Adam^{b,c} (^a *FNSPE CTU, Praha*; ^b *RECAMO – Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*; ^c *ÚJV Řež, a.s., Husinec-Řež*): **Synthesis of the PET Radiopharmaceutical [¹⁸F]Fluorocholine, Development of Analytical Methods and Optimization of Dimethylaminoethanol Content in the Final Product**

[¹⁸F]fluorocholine is a substance of utmost importance for prostate carcinoma diagnostics by positron emission tomography (PET). The process of synthesis, development of quality control methods and optimization of performance to fulfill strict requirements of drug control authorities for commercial production of the substance are demonstrated.