

Synteza i badanie właściwości fizykochemicznych ^{18}F [FDG]

Joanna Borowska, Klaudia Koszel, Karolina Milewska, Wiktoria Szcześniak

Streszczenie

Celem pracy było przeprowadzenie syntezy ^{18}F [FDG] oraz zbadanie właściwości fizykochemicznych otrzymanego radiofarmaceutyku. Syntezę oraz kontrolę jakości uzyskanego produktu przeprowadzono w Centrum Produkcji Radiofarmaceutyków Voxel. Otrzymane wyniki spełniają wszystkie wymagania jakościowe określone przez Farmakopeę, co oznacza, że zsyntetyzowany produkt może zostać dopuszczony do obrotu.

Wstęp

^{18}F [FDG] (fluorodeoksyglukoza) jest jednym z najczęściej używanych radiofarmaceutyków, który jest wykorzystywany w badaniu PET w onkologii. Podaje się ją w formie zastrzyku dożylnego. ^{18}F [FDG] jest przyswajana przez wszystkie tkanki ciała, a różnice w szybkości wchłaniania glukozy przez prawidłowe i patologiczne tkanki są podstawową właściwością pozwalającą na rozpoznanie ognisk chorobowych.

^{18}F [FDG] to analog glukozy, pobierany przez transportery glukozy (glut-1) i fosforylowany do fosforanu 6-FDG, który bierze udział w wielu szlakach metabolicznych. Z powodu różnicy w budowie fosforan 6-FDG nie jest już substratem dla enzymów i w rezultacie ^{18}F -FDG jest uwięziona wewnątrz komórek na czas badania.^[1] Zastosowanie ^{18}F [FDG] w onkologii opiera się na obserwacji, że większość komórek nowotworowych wykazuje wysoką ekspresję transporterów glut-1 w błonie komórkowej. Fluorodeoksyglukozę najczęściej wykorzystuje się w diagnostyce raka płuc, jelita grubego i białaczek. Jednak stosowanie ^{18}F [FDG] ma również pewne wady, między innymi ^{18}F [FDG] jest pobierana przez tkanki objęte procesem zapalnym, w szczególności przez makrofagi, co skutkuje zmniejszeniem swoistości. Jest ona również wydalana razem z moczem, akumulacja ^{18}F [FDG] w pęcherzu moczowym utrudnia ocenę narządów miednicy mniejszej.

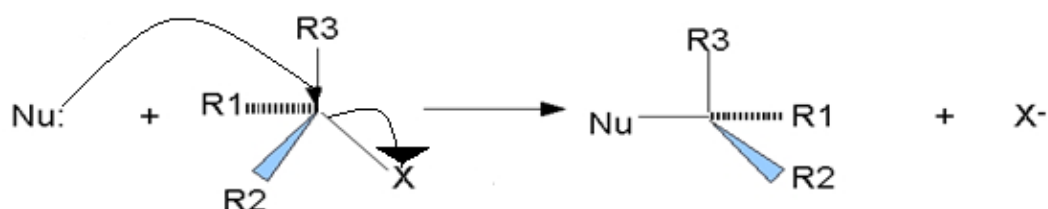
Obecnie badanie PET z zastosowaniem ^{18}F [FDG] stanowi 10% wszystkich badań obrazowanych z użyciem radiofarmaceutyków.^[2]

Synteza

Syntezę przeprowadzono w Centrum Produkcji Radiofarmaceutyków Voxel. Informacje odnośnie działań są poufne. Proces przedstawiono na podstawie publikacji Philipa S. Yu „Review of ^{18}F -FDG Synthesis and Quality Control”.

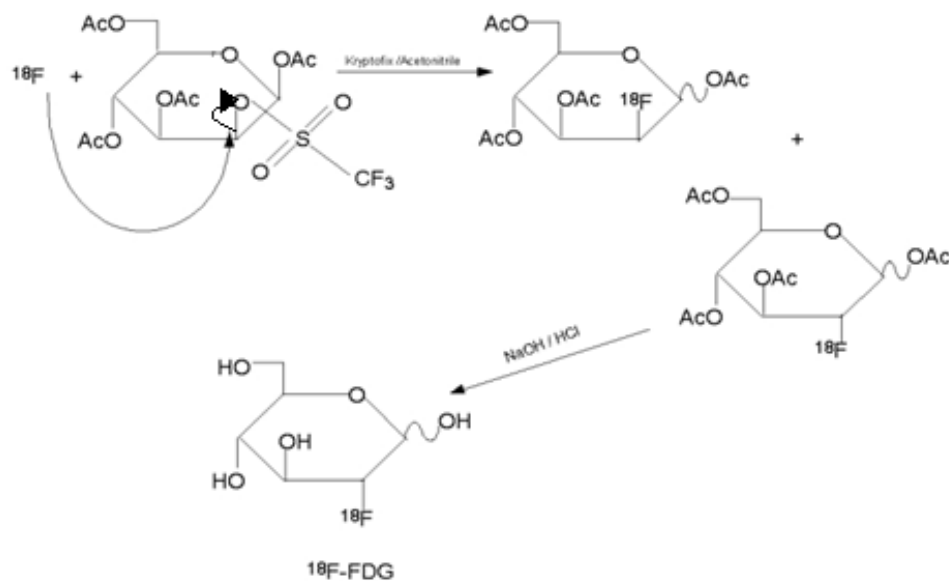
$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ jest analogiem glukozy, w którym grupa hydroksylowa przy atomie węgla C-2, w cząsteczce glukozy jest zastąpiona atomem fluoru. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ jest wchłaniane do żywych komórek podobnie jak glukoza, a następnie fosforylowane przez heksokinazę. W przeciwieństwie do glukozy, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ nie może podlegać dalszemu metabolizmowi. Niemniej jednak fluorodeoksyglukoza jest dobrym wskaźnikiem wychwytu glukozy i żywotności komórek.

Podstawienie nukleofilowe to reakcja chemiczna polegająca na wymianie grupy opuszczającej (przeważnie grupa elektronoakceptorowa) na czynnik nukleofilowy. Schemat reakcji podstawienia nukleofilowego S_N2 przedstawiono na Rys. 1.



Rys 1. Substytucja nukleofilowa.

Grupa nukleofilowa ma wysokie powinowactwo do elektrofilowego centrum cząsteczki macierzystej. W rezultacie grupa nukleofilowa tworzy wiązanie kowalencyjne z cząsteczką macierzystą. Zgodnie z mechanizmem S_N2 jednocześnie następuje odłączenie grupy opuszczającej. Zmienia się również stereokonfiguracja cząsteczki macierzystej w miejscu podstawienia. W syntezie $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, jon $^{18}\text{F}^-$ jest nukleofilem. Prekursorem natomiast, jest triflat mannozy, w którym atomy węgla w pozycji 1, 3, 4, 6 są zabezpieczone grupą acetylową, a trifluorometanosulfonian jest grupą opuszczającą przy atomie węgla C-2. W obecności odczynnika Kryptofix 222 jako katalizatora i acetonitrylu jako rozpuszczalnika, jon $^{18}\text{F}^-$ zbliża się do triflatu mannozy przy atomie węgla C-2 podczas gdy grupa trifluorometanosulfonowa opuszcza cząsteczkę mannozy, tworząc $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Schemat reakcji przedstawiono na Rys 2.



Rys 2. Mechanizm syntezy [^{18}F]FDG

Kontrola Jakości FDG

Wymagania jakościowe dla produktów leczniczych określa Farmakopea, czyli spis leków dopuszczonych do obrotu, który zawiera ściśle określone wymagania dotyczące produkcji leku oraz jego kontroli jakości. Farmakopealny opis leku jest podzielony na monografię ogólną i monografię szczegółową. Monografia ogólna zawiera ogólne sposoby wytwarzania, kontroli jakości oraz sposoby przechowywania substancji. Natomiast monografia szczegółowa zawiera wszystkie informacje danego leku, np. nazwę, właściwości fizykochemiczne czy metody na potwierdzenie tożsamości substancji.

Farmakopea zawiera monografie szczegółowe preparatów prawnie dopuszczonych do obrotu. Najważniejsze parametry, które muszą być zbadane podczas lub po produkcji radiofarmaceutyku, to:

1. Postać preparatu,
2. Czystość radionuklidowa,
3. Czystość radiochemiczna,
4. pH,
5. Zawartość endotoksyn,
6. Czas półrozpadu,
7. Sterylność,
8. Widmo promieniowania,

9. Pozostałości rozpuszczalników organicznych.

Postać roztworu radiofarmaceutyku określa się wizualnie. Należy stwierdzić czy preparat jest klarowny, zdefiniować jego barwę, dokładnie sprawdzić czy nie wydzielił się osad lub czy nie ma mechanicznych zanieczyszczeń.

Bardzo ważnym elementem kontroli jakości jest sprawdzenie czystości produktu. Należy zbadać czystość radionuklidową, radiochemiczną i chemiczną (m.in. pozostałości rozpuszczalników organicznych). Czystość radionuklidowa to innymi słowy stosunek aktywności radionuklidu do aktywności innych radionuklidów w preparacie wyrażony w procentach. Natomiast czystość radiochemiczna to stosunek aktywności danej formy chemicznej radionuklidu do aktywności wszystkich form wyrażony w procentach. Czystość chemiczna to zawartość pozostałości organicznych w preparacie. W przypadku radiofarmaceutyków znakowanych ^{18}F sprawdza się głównie zawartość Kryptofixu 222 oraz acetonitrylu. Wszystkie te trzy parametry można badać metodą chromatografii:

- wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC),
- cienkowsarstwowej chromatografii cieczowej (TLC),
- chromatografii gazowej (GC).

Wartość pH najczęściej mierzy się przy użyciu papierka wskaźnikowego (lakmusowego) bądź pH-metru. Natomiast widmo promieniowania oraz czas połowicznego zaniku bada się spektrometrem gamma. Kluczowym parametrem jakości radiofarmaceutyku jest sterylność produktu, gdyż jej brak może wpłynąć negatywnie na zdrowie pacjenta.

Sterylność próbki można zapewnić wykorzystując jedną z dwóch metod sterylizacji: sterylizację końcową lub produkcję aseptyczną. Najczęściej stosuje się tę drugą, która polega na eliminowaniu zanieczyszczeń mikrobiologicznych podczas każdego etapu produkcji. Sprowadza się to głównie do używania materiałów jałowych oraz do wykonywania wszelkich czynności w specjalnych pomieszczeniach o określonej klasie czystości. W niektórych zakładach produkujących radiofarmaceutyki, do każdej serii wyprodukowanego produktu wykonuje się monitoring mikrobiologiczny z wykorzystaniem m.in. płytek sedymentacyjnych i odciskowych, który również jest sposobem na zbadanie sterylności leku. Na wyniki badań jałowości czeka się około dwóch tygodni, dlatego należy zadbać, aby podczas produkcji wszystkie operacje i procesy przebiegały aseptycznie. Wtedy wyniki monitoringu mikrobiologicznego są tylko potwierdzeniem tego, że cała produkcja przebiegła zgodnie z ustalonymi normami.

Ponadto ważnym elementem kontroli jakości jest również badanie na zawartość endotoksyn w preparacie. Najbardziej popularnym sposobem jest test LAL (Limulus Amebocyte Lysate Test). Do tego celu wykorzystuje się lizat amebocytów skrzypłocza, który jest bardzo wrażliwy na obecność

wielu endotoksyn bakterii G(-). W ich obecności lizat koaguluje. Jest to szybka i czuła metoda na sprawdzenie pirogenności próbki.

Wyniki

Po zsyntetyzowaniu radiofarmaceutyku [^{18}F]-FDG w firmie Voxel w CPR Warszawa, zajęliśmy się badaniem jakościowym produktu. Pod uwagę wzięliśmy takie parametry jak:

1. Ocenę wizualną,
2. Widmo promieniowania,
3. Aktywność,
4. Czystość radionuklidową,
5. Czystość radiochemiczną,
6. Czystość chemiczną,
7. pH,
8. Endotoksyny bakteryjne.

Wizualnie określiliśmy jakość roztworu radiofarmaceutyku. Stwierdziliśmy, że preparat jest klarowny, bezbarwny.

Za pomocą spektrometru gamma zaobserwowaliśmy pik o energii 0,511 MeV. Ta czynność wchodzi w zakres identyfikacji radiofarmaceutyku. Następnie zmierziliśmy czas połowicznego rozpadu produktu (112 min).

Badanie czystości radionuklidowej wykonaliśmy za pomocą spektroskopu gamma z wynikiem pozytywnym. Piki odpowiadające fotonom o energii innej niż 0,511 MeV reprezentowały nie więcej niż 0,1 % radioaktywności całkowitej.

Czystość radiochemiczną zbadaliśmy przy użyciu HPLC i TLC. Stosunek aktywności ^{18}F -FDG i ^{18}F -FDM był bardzo wysoki, rzędu 99% aktywności ^{18}F -fluoru. W produkcji ilość ^{18}F -FDM stanowiła 0% aktywności ^{18}F -FDG i ^{18}F -FDM. ^{18}F -FDG i ^{18}F -FDM to 100% całkowitej aktywności ^{18}F -fluoru. ^{18}F -fluoru w formie fluorków oraz częściowo lub całkowicie acetylowanych pochodnych ^{18}F -FDG i ^{18}F -FDM wynosił 0% aktywności całkowitej ^{18}F -fluoru.

Aby zbadać czystość chemiczną, czyli pozostałości w preparacie, sprawdziliśmy zawartość Kryptofixu 222 (0,147 mg/ml) oraz acetonitrylu (0,055 mg/ml).

Za pomocą urządzenia LAL sprawdziliśmy ilość endotoksyn bakteryjnych (<5,0 IU/m).

Dyskusja

Tabela 1 Porównanie wartości oczekiwanych z rzeczywistymi.

L.p.	Parametr	¹⁸ F-FDG FARMAKOPEA	¹⁸ F-FDG DOŚWIADCZENIE
1	Właściwości	Przezroczysty, bezbarwny lub lekko żółty roztwór (bez cząstek makroskopowych)	Bezbarwny
2	Czystość radionuklidowa	Piki odpowiadające fotonom o energii innej niż 0,511 MeV lub 1,022 MeV reprezentują nie więcej niż 0,1 % radioaktywności całkowitej.	< 0,1 %
3	Czystość radiochemiczna	¹⁸ F-fluoru -FDG i ¹⁸ F-FDM łącznie nie mniej niż 95 % aktywności ¹⁸ F. ¹⁸ F-fluoru -FDM nie więcej niż 10 % aktywności ¹⁸ F-FDG i ¹⁸ F-FDM. ¹⁸ FFDG i ¹⁸ F-FDM nie mniej niż 95 % całkowitej aktywności ¹⁸ F. ¹⁸ F w formie fluorków oraz częściowo lub całkowicie acetylowanych pochodnych ¹⁸ F-FDG i ¹⁸ F-FDM nie więcej niż 5% aktywności całkowitej ¹⁸ F.	99% 0% 100% 0%
4	pH	4,5 – 8,5	5,5
5	Zawartość endotoksyn	$< \frac{175 \text{ IU}}{v \text{ ml}}$	<5,0 IU/m
6	Czas połowicznego rozpadu	105 – 115 min	112
7	Sterylność	Jałowy	-
8	Widmo gamma	511 keV, 1022 keV	0,511 MeV
9	Aktywność	90% - 110% aktywności deklarowanej	-
10	Pozostałości rozpuszczalników organicznych	410 ppn ($\frac{mg}{v}$) ACN	0,055 mg/ml
11	Czystość chemiczna (kryptofix)	$< 2,2 \frac{mg}{v}$	0,147 mg/ml

W tabeli zestawiliśmy wyniki z eksperymentu wraz z danymi z wymaganiami jakościowymi określonymi w Farmakopei. Zsyntetyzowany radiofarmaceutyk był bezbarwny i klarowny. Nie zaobserwowaliśmy osadu i żadnych mechanicznych uszkodzeń fiołki. Przy użyciu spektroskopu gamma określiliśmy czystość radionuklidową produktu. Zgodnie z danymi farmakopealnymi piki odpowiadające fotonom o energii innej niż 0,511 MeV bądź 1,022 MeV reprezentowały mniej niż 0,1% radioaktywności całkowitej. Wyniki czystości radiochemicznej zgodne z kryteriami zawartymi

w farmakopei. Produkt o mieszczącym się w zakresie: pH, zawartości endotoksyn. Przy pomocy GC dowiedzieliśmy się jaka ilość acetonitrylu pozostała w produkcie (0,055 mg/ml). Wszystkie zbadane parametry kontroli jakości na czas EOS są zgodne z wymaganiami co oznacza, że otrzymanych radiofarmaceutyk może zostać zwolniony do obrotu.

Bibliografia

[1] Łukasz Zapała, *Pozytonowa tomografia emisyjna – zastosowanie w urologii*, Przegląd Urologiczny, 2009/6 (58)

[2] Doina Piciu, *Endokrynologia nuklearna*, red. wyd. polskiego prof. dr n. med. Marek Dedecjus. Medipge, Warszawa, 2015, rozdział 6, s. 39-42