

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2016.2.2.113>

Simple synthesis of [¹¹C]DASB in HPLC loop and small animal PET imaging study

Boeun Lee^{1,2,3}, Yong-Hyun Cho³, Yun-Sang Lee^{1,2,3,*}, and Jae Min Jeong^{1,3,5}

¹Department of Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea; ²Department of Molecular Medicine and Biopharmaceutical Sciences, Graduate School of Convergence Science and Technology, and College of Medicine or College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ³Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Republic of Korea; ⁴Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea; ⁵Department of Biomedical Sciences, Seoul National University Graduate School, Seoul, Republic of Korea.

ABSTRACT

As a neurotransmitter, serotonin plays important roles in brain. It relates various neuropsychiatric disorders such as anxiety, depression, schizophrenia. [¹¹C]DASB is a well-known PET tracer for serotonin transporter imaging. In this study, we synthesized [¹¹C]DASB in HPLC loop for simple and rapid production. Total synthesis time was about 40 minutes and the radiochemical purities were over 99%. The specific activity was 51.4 GBq/μmole (n=16). [¹¹C]DASB showed highest uptake in mid-brain that serotonergic nerves are abundant and lowest uptake in cerebellum. In conclusion, we used HPLC loop method for [¹¹C]DASB labeling and this method is useful for production of ¹¹C labeled PET tracers.

J Radiopharm Mol Probes 2(2):113-117, 2016

Key Word: [¹¹C]DASB, Loop method, Serotonin transporter, Positron emission tomography

Introduction

세로토닌은 뇌 전반에 걸쳐 다양한 생리현상을 조절하는 신경전달물질로, 세로토닌성 신경계는 감정, 식욕, 수면 및 기억이나 학습과 같은 인지기능과도 관련이 있다. 세로토닌은 L-트립토판의 수산화반응과 탈탄산반응을 거쳐 생합성되고, 시냅스 전 뉴런 내 세로토닌 소포에 보관되어 있다가 신경세포 말단에서 유리되어 시냅스 후 뉴런의 세로토닌 수용체에 결합하여 작용한다. 작용이 끝난 유리 세로토닌의 일부는 모노아민산화효소에 의해 대사되어 배설되고, 일부는 세로토닌 운반체에 의해 시냅스 전 뉴런으로 재흡수되어 소포에 다시 저장된다.

세로토닌 운반체는 중뇌(midbrain)에 가장 많이 분포하며, 그 외에 시상(thalamus), 시상하부(hypothalamus), 선조체(striatum)에 분포하며 해마(hippocampus), 소뇌(cerebellum)에서 가장 낮은 밀도를 보인다. 세로토닌 운반체는 시냅스에서의 세로토닌 농도를 조절하는데 중요한 역할을 하며, 세로토닌 운반체의 기능 이상은 세로토닌 농도 조절 실패로 인한 불안증, 우울증, 강박증, 정신분열, 알츠하이머, 성기능장애 등의 질환을 유발한다(1-5). 따라서 우울증을 비롯한 각종 정신질환의 치료에 1단계 선택 약물로 널리 사용되는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 (SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor)는 세로토닌 운반체의 작용을 차단하여 세로토닌의 재흡수를 막아 농도를 조절함으로써 치료의 효과를 얻는다(6-9). SSRI계 약물

October 27, 2016 / Revised: December 08, 2016 / Accepted: December 12, 2016

Corresponding Author : Yun-Sang Lee, Ph.D.

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, 103, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul, 03080, Rep. of Korea. Tel: 82-2-740-8906, Fax:82-2-745-7690, E-mail: wonza43@snu.ac.kr

Copyright©2016 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

은 선택적으로 세로토닌성 운반에만 약리작용이 있기 때문에 다른 약물과 약물상호작용을 나타내는 경우는 적다. 그러나 시토크롬 P450 효소의 작용을 억제하여 다른 약물의 산화성 대사를 방해하기도 한다(10). 따라서 SSRI계 약물을 사용하는 데 있어 다른 약물과의 병용투여에 의한 약동학, 약력학적 상호작용을 고려하며 적정 투여량을 결정하는 것은 환자 치료에 매우 중요하다.

세로토닌 운반체 영상용 방사성 추적자는 SSRI로 개발된 약물에 방사성 동위원소를 표지한 것이 일반적이다 (Figure 1).

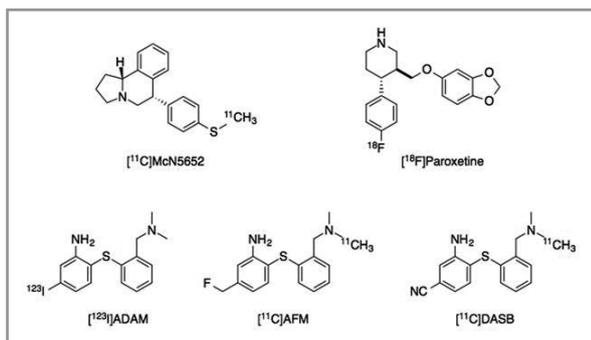
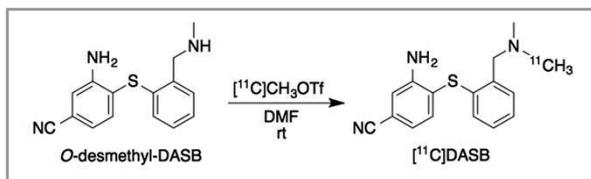


Figure 1. Structures of radiotracers for serotonin transporter imaging.



Scheme 1. Radiosynthesis of $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$.

^{11}C 표지된 3-amino-4-(2-dimethylaminomethylphenylsulfanyl)-benzonitrile ($[^{11}\text{C}]\text{DASB}$)는 대표적인 세로토닌 운반체 영상용 양전자방출단층촬영 (positron emission tomography, PET) 방사성 추적자이다(11). $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 는 도파민 운반체나 노에피네프린 운반체를 비롯하여 다른 신경전달물질 수용체에 대한 친화력이 무시할 만큼 낮아 뇌 내 세로토닌 운반체를 선택적, 특히적으로 영상화함으로써 세로토닌 운반체의 기능 이상을 평가할 수 있으며, SSRI계 약물의 혈중 농도와 운반체 점유율 평가에 유용하게 쓰일 수 있다(12). 따라서, $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 고수율, 고품질로 간편하게 생산하는 방법을 개발하는 것은 매우 의미 있는 일이다.

^{11}C -methyl iodide ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$)와 ^{11}C -methyl triflate ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$)와 같은 기체 형태의 이차전구물질을 사용하여

^{11}C 을 표지할 때 고성능액체크로마토그래피 (HPLC) 시료주입부의 루프 내에서 반응을 시키고 연속해서 HPLC 정제를 하는 방법이 사용된다. 이러한 방식으로 ^{11}C 을 표지하는 것은 반응기를 사용하는 고전적인 방식보다 방사성 추적자의 생산 절차를 간소화할 수 있다(13-15). $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 는 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ 를 이용하여 메틸화반응으로 표지하기 때문에 루프법을 적용하여 생산이 가능하다(11, 15, 16).

이 연구에서는 세로토닌 운반체 영상용 방사성 추적자 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 자동합성장치와 HPLC 루프를 이용하여 간편하게 합성한 결과에 대해 기술하였다.

Materials and Methods

1. 장비 및 시약

합성 전구체인 O-desmethyl-DASB와 DASB표준물질은 (주)퓨처컴 (서울, 대한민국)에서 구매하였고, 용매로 쓴 dimethylformamide (DMF)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 표지된 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 의 정제와 분석은 Gabi star flow-through gamma radioactivity detector (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany)가 장착된 고성능액체크로마토그래피 (Gilson Inc., WI, USA) 장비를 이용했으며, 사용한 용매는 모두 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA) 구입하였다. 방사성 동위원소 ^{11}C 는 18 MeV 사이클로트론 (Cyclone[®] 18/9, IBA, Belgium)을 가지고 1%의 산소를 포함한 질소 기체 (순도 99.9999%)에 양성자빔을 조사하여 $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ 반응으로 생산하였고, 표지 반응은 TRACERLab FX MeI 자동합성장치 (GE medical Systems, Germany)를 사용하였다. 소동물 PET 영상 연구는 small animal PET/CT scanner (eXplore VISTA, GE Healthcare, USA)를 사용하여 수행하였고, 영상 분석은 ASIPro software를 사용하였다.

2. 표지

사이클로트론에서 $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ 반응으로 생산한 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 가스를 자동합성장치로 이동하여 니켈 촉매 하에서 350°C 에서 수소 가스와 반응시켜 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ 를 만들었다. 만들어진 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ 가스를 요오드와 700°C 에서 10분 간 반응시켜 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 를 합성한 뒤, AgOTf 와 220°C 에서 5분 간 반응시켜 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ 가스를 만들었다. 합성 전구체 O-desmethyl-DASB 1.0 mg은 DMF 100 μL 에 녹여서 Hamilton 주사기로 semi-preparative HPLC의 루프(2 mL, stainless steel)에 미리 주입해 두었다. 생산된 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ 는 질소(99.9999%) 가스를 20 mL/min 속도로 5분간 불어 주며 HPLC 루프 내로 넣어주었고, 미리 루프에 주입해 둔 O-desmethyl-DASB와 실온에서 반응시켜 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 합성하였다. 반응이 끝난 혼합물은 semi-preparative HPLC를 사용하여 정제하였다 (XTerra[®] preparative column RP18, 10 μm , 10 \times 250 mm, Waters; 10 mM 아세트산나트륨:에탄올=70:30, isocratic; flow rate, 5 mL/min).

3. 품질관리 시험

표지 후 정제한 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 는 생리식염주사액으로 희석하여 에탄올 함량을 5%로 맞추고, 0.22 μm 무균 필터를 통과시켜 동물실험에 적합하도록 조제하였다. 조제 완료된 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 는 분석용 컬럼(XTerra[®] analytical column RP18, 3.5 μm , 4.6 \times 100 mm, Waters)을 가지고 HPLC (10 mM 아세트산나트륨:에탄올=70:30, isocratic; flow rate, 1 mL/min)를 사용하여 방사화학적 순도와 비방사능을 확인하였다. 또한 육안검사와 pH 시험(pH paper, Advantec Toyo, Japan) 및 LAL (limulus ameocyte lysate) 시험 (Endosafe[®], Charles River Laboratories, Inc., USA)을 실시하였다.

4. 소동물 뇌 영상 연구

2% (v/v) Isoflurane으로 호흡마취시킨 정상 Sprague-Dawley 랫트 (수컷, 9주령)의 꼬리정맥에 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 40

MBq/1 mL을 주사하고, micro-PET/CT로 90분 간 동적 영상을 획득하고 분석하였다. 모든 동물 실험은 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International의 승인을 받은 서울대학교병원에서 수행하였다.

Result and Discussion

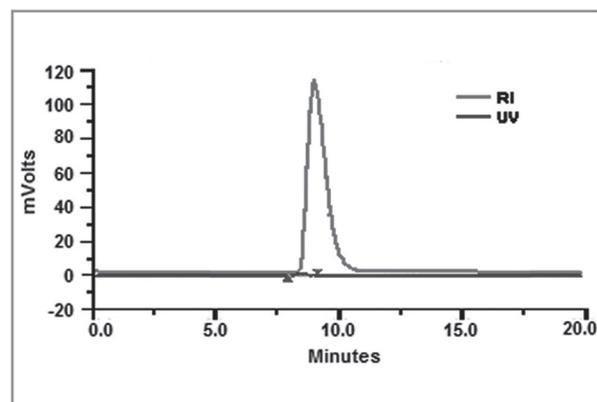


Figure 2. Analytical HPLC chromatogram of $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$.

루프법을 이용하여 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 합성하고 HPLC 정제하는데 걸린 총 소요 시간은 약 40 분 이었고, 18 MeV의 양성자 빔을 20 μA 로 15분 간 조사하여 ^{11}C 을 생산할 때 최종 합성된 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 는 평균 1.08 GBq (n=27) 이었다. 분리용 HPLC에서 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 피크의 지연시간은 약 11 분 이었고, 분석용 HPLC에서의 피크 지연시간은 약 8.3 분 이었다 (Figure 2). HPLC로 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 의 방사화학적 순도를 측정하였을 때, 생산된 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 의 방사화학적 순도는 모두 99%이상이었다. 비방사능은 비방사성 표준물질의 HPLC 피크 (UV detector) 면적값과 생산된 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 로 인한 HPLC피크 면적값을 비교하여 계산하였고, 평균 51.4 GBq/ μmole (n=16) 이었다. pH는 평균 7.0이며, 육안검사와 엔도톡신 시험에서 모두 동물실험이나 임상시험용으로 사용하기에 적합한 결과를 보였다.

기존의 루프법으로 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 생산한 연구에서는 에탄올 용매를 사용하였으나 본 연구에서는 루프법에 더 적합한 점성이 더 큰 DMF 용매를 사용하였다(15). $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ 를

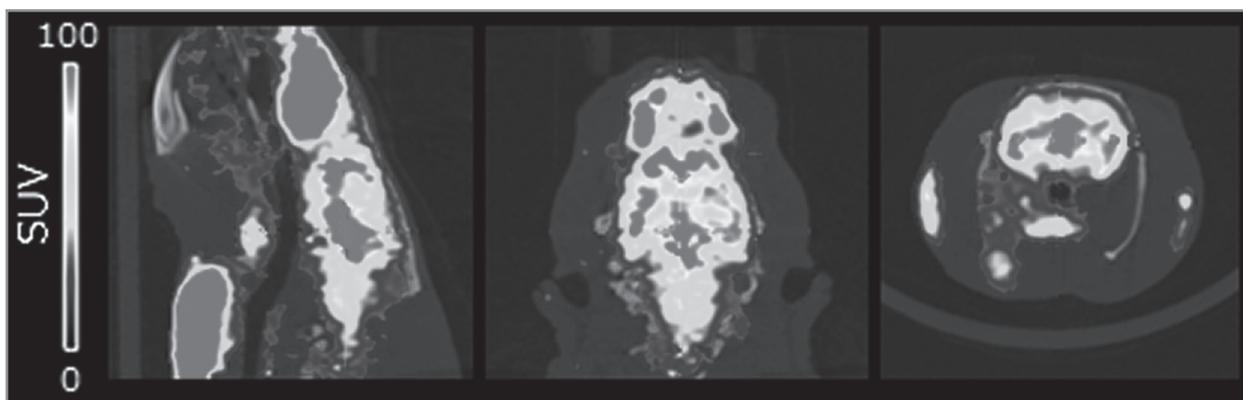


Figure 3. Brain PET images of $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ in a normal SD rat.

질소 가스로 불어주는 과정에서 전구체와 용매가 빠르게 루프 밖으로 빠지는 것을 방지하기 위함이다. 또한 기존 연구에 비해 총 합성 시간을 40분으로 약간 단축시켰으며, 방사화학적 순도를 더 높일 수 있었다. 비방사능은 기존 연구의 결과 (약 $560 \text{ GBq}/\mu\text{mole}$)보다 떨어지지만 반복적인 연구를 통해 더 높일 수 있을 것으로 생각한다.

$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 에서 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 를 생산하는 방법은 건식법(dry method)과 습식법(wet method)이 있다. 습식법은 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 LiAlH_4 로 환원한 다음 HI와 반응시켜 합성하는 방법으로, 사용하는 LiAlH_4 시약이 액체 형태로 쓰이기 때문에 습식법이라고 한다. 습식법은 건식법에 비해 표지된 화합물의 비방사능이 낮은 문제점이 있어 본 연구에서는 건식법을 사용하여 표지하였다(17). 건식법은 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 니켈(Ni) 촉매 하에서 수소 가스(H_2)와 반응시켜 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ 가스를 만든 뒤, 고온에서 요오드(I_2)와 반응시켜 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 를 생산하는 방법이다. 기존의 습식법을 이용하여 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 생산하였을 때 비방사능은 $0.95 \text{ GBq}/\mu\text{mole}$ 로 뇌 영상에 사용하기에 충분하지 않았으나, 건식법을 사용하여 합성할 경우 비방사능이 습식법으로 생산한 결과보다 약 54배 증가하였다. 또한, 사이클로트론에서 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 2회 예비생산하여 타겟 가스를 빼줌으로써 안정 동위원소인 $[^{12}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 제거하여 비방사능을 높일 수 있었다. 보통 사이클로트론에서 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 생산하고 자동합성장치로 이동하여 ^{11}C 표지화합물을 합성하는 과정은 밀폐된 시스템 상에서 이루어진다. 그러나 이 시스템에서 장치 연결 부위 등에서의 미세한 틈을 통해 안정 동위원소 $[^{12}\text{C}]\text{CO}_2$ 가 섞이게 되어 비방사능에 영향을 주는 것

로 예상된다. 사실, $[^{12}\text{C}]\text{CO}_2$ 의 기원은 정확히 밝혀져 있지 않으나, ^{11}C 을 표지할 때 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 한두 번 예비생산하여 제거하면 경험적으로 비방사능이 증가하는 경향을 확인할 수 있다.

루프법을 사용하여 ^{11}C 표지 방사성 추적자를 생산하는 방법은 합성의 마지막 단계를 HPLC 주입 루프 내에서 이루어지도록 함으로써 반응의 단계와 장비를 단순화할 수 있다. 또한 표지에 실패를 하였거나 하루에 수회 생산이 필요한 경우 합성에 사용한 반응기를 세척할 필요가 없기 때문에 작업자의 방사선 피폭과 작업량을 줄여 반복적으로 생산이 가능하다(14).

생산한 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 정상 랫트에 투여하여 소동물 PET/CT로 뇌 영상을 획득하였다. 뇌에서 세로토닌 운반체가 많이 분포하는 것으로 알려져 있는 중뇌(mid brain) 영역의 시상(thalamus)에 방사능 섭취가 가장 높으며, 소뇌의 방사능 섭취가 가장 낮음을 PET 영상으로 확인할 수 있었다(Figure 3). 실제로 세로토닌 신경계는 봉선핵(raphe nuclei)에 주로 존재하며 기저핵(basal ganglia), 대뇌 변연계(limbic system) 등으로 신경로를 구성하는 것으로 알려져 있으며, 세로토닌 운반체 영상 연구에 중뇌와 소뇌의 방사능 섭취비를 측정하기도 한다(18, 19).

Conclusion

본 연구에서는 DMF 용매와 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ 를 사용하여 루프법으로 $[^{11}\text{C}]\text{DASB}$ 를 성공적으로 합성하여 품질 분석을 하

였고, 합성한 [¹¹C]DASB가 세로토닌 운반체 영상을 적절히 반영할 수 있음을 랫트를 이용한 소동물 PET영상을 통해 확인하였다. ¹¹C표지를 실온 하에 HPLC 루프 내에서 이루어지도록 하여 생산을 단순화할 수 있었고, 이 방법은 [¹¹C]DASB 뿐만 아니라 다른 ¹¹C표지 방사성 추적자의 생산에도 적용할 수 있어 유용한 표지 방법으로 기대된다.

Acknowledgments

이 연구는 보건복지부의 임상연구인프라조성사업(HI15C3093)의 지원을 받았으며, 다른 이해관계는 없음을 밝힙니다.

References

- Owens MJ, Nemeroff CB. Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression - Focus on the Serotonin Transporter. *Clin Chem.* 1994;40:288-295.
- Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: Parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiat.* 2003;54:953-959.
- Spies M, Knudsen GM, Lanzenberger R, Kasper S. The serotonin transporter in psychiatric disorders: insights from PET imaging. *Lancet Psychiat.* 2015;2:743-755.
- Assal F, Alarcon M, Solomon EC, Masterman D, Geschwind DH, Cummings JL. Association of the serotonin transporter and receptor gene polymorphisms in neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2004;61:1249-1253.
- Hariri AR, Holmes A. Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends Cogn Sci.* 2006;10:182-191.
- Seo JS, Min KJ, Kim W, Seok JH, Bahk WM, Song HC. Korean medication algorithm for depressive disorder 2006(I). *Eur Neuropsychopharm.* 2007;17:S314-S315.
- Davidson JR, Zhang W, Connor KM, Ji J, Jobson K, Lecrubier Y, McFarlane AC, Newport DJ, Nutt DJ, Osser DN, Stein DJ, Stowe ZN, Tajima O, Versiani M. A psychopharmacological treatment algorithm for generalised anxiety disorder (GAD). *Journal of Psychopharmacology.* 2010;24:3-26.
- Katzman M. Clinical practice guidelines: Management of anxiety disorders. *Can J Psychiat.* 2006;51:1S-92S.
- Hiemke C, Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2000;85:11-28.
- Harvey AT, Preskorn SH. Cytochrome p450 enzymes: Interpretation of their interactions with selective serotonin reuptake inhibitors .1. *J Clin Psychopharm.* 1996;16:273-285.
- Wilson AA, Ginovart N, Schmidt M, Meyer JH, Threlkeld PG, Houle S. Novel radiotracers for imaging the serotonin transporter by positron emission tomography: synthesis, radiosynthesis, and in vitro and ex vivo evaluation of ¹¹C-labeled 2-(phenylthio)araalkylamines. *J Med Chem.* 2000;43:3103-3110.
- Ginovart N, Wilson AA, Meyer JH, Hussey D, Houle S. [¹¹C]DASB, a tool for in vivo measurement of SSRI-induced occupancy of the serotonin transporter: PET characterization and evaluation in cats. *Synapse.* 2003;47:123-133.
- Wilson AA, Garcia A, Jin L, Houle S. Radiotracer synthesis from [¹¹C]-iodomethane: a remarkably simple captive solvent method. *Nucl Med Biol.* 2000;27:529-532.
- Lee HJ, Jeong JM, Lee Y-S, Kim HW, Choi JY, Lee DS, Chung J-K, Lee MC. A Convenient Radiolabeling of [¹¹C](R)-PK11195 Using Loop Method in Automatic Synthesis Module. *Nucl Med Mol Imaging.* 2009;43:337-343.
- Shao X, Schnau PL, Fawaz MV, Scott PJ. Enhanced radiosyntheses of [¹¹C]raclopride and [¹¹C]DASB using ethanolic loop chemistry. *Nucl Med Biol.* 2013;40:109-116.
- Ungersboeck J, Philippe C, Haeusler D, Mitterhauser M, Lanzenberger R, Dudczak R, Wadsak W. Optimization of [¹¹C]DASB-synthesis: vessel-based and flow-through microreactor methods. *Appl Radiat Isot.* 2012;70:2615-2620.
- Larsen P, Ulin J, Dahlstrom K, Jensen M. Synthesis of [¹¹C]iodomethane by iodination of [¹¹C]methane. *Appl Radiat Isotopes.* 1997;48:153-157.
- Houle S, Ginovart N, Hussey D, Meyer JH, Wilson AA. Imaging the serotonin transporter with positron emission tomography: initial human studies with [¹¹C]DAPP and [¹¹C]DASB. *Eur J Nucl Med.* 2000;27:1719-1722.
- Ginovart N, Wilson AA, Meyer JH, Hussey D, Houle S. Positron emission tomography quantification of [¹¹C]-DASB binding to the human serotonin transporter: modeling strategies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:1342-1353.