

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2016.2.2.137>

Fully automated ethanolic loop synthesis of the [¹¹C]OMAR

Keun Sam Jang,* Ho-Chun Song

Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Republic of Korea

ABSTRACT

We have successfully synthesized of 4-cyano-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide ([¹¹C]OMAR), which has been shown a progressing candidate to human brain PET study, from fully automated loop method using ethanol as the only solvent for the entire manufacturing process. The radiochemical yield of [¹¹C]OMAR was observed in 4.1 ± 0.2 % with 4990 ± 384 Ci/mmol of the specific activity and total synthesis time was about 45 minutes after HPLC purification (n = 3, decay corrected) from ethanolic loop system, which was exhibited to better results compared with conventional methods. Ethanolic loop chemistry is favorable and efficient method by simplifies manufacturing procedures as well as satisfied suitable for human administration.

J Radiopharm Mol Probes 2(2):137-142, 2016

Key Word: [¹¹C]OMAR, Loop chemistry, Cannabinoid receptor, Positron emission tomography, Green radiochemistry

Introduction

내성 카나비노이드 시스템 (Endogenous cannabinoid system)은 중추 신경계와 말초세포조직과 연관된 다양한 생리학적 활동 조절에 중요한 역할을 한다 (1). 이 시스템은 G protein-coupled 수용체와 관련되어 서로 다른 역할을 하는 두 가지 카나비노이드 수용체로 이루어져 있는데 하나는 중추 신경계에 많이 분포되어 있는 cannabinoid receptor-1 (CB₁)와 면역체 조절 및 암세포와 관련된 cannabinoid receptor-2 (CB₂)로 구성되어 있다 (2,3). 따라서, 카나비노이드 수용체는 뇌 질환, 심장질환, 및 암질환 치료와 관련된 중요한 부분으로 많은 CB₁ antagonist 및 CB₂ agonist과 연구 및 보고되어 있다 (4). 더불어, 약물의존성, 비만, 우울증, 조현병 등과 같은 다양한 뇌 관련 질환은 CB₁ 수용체의 밀도 농도 및 기능의 변화와 밀접한 관련이 있다 (5-8). 따라서, 이와 같은 질환을 조

기에 확인하기 위해서 비침습적으로 살아있는 개체에 생리학적 변화를 실시간으로 관찰할 수 있는 양전자방출단층촬영 (Positron emission tomography, PET) (9-10) 및 단일광자방출단층촬영 (Single photon emission computed tomography, SPECT) (11)을 이용한 다양한 방사성의약품이 보고되어 있다. 높은 결합 친화력, 적합한 친유성 및 충분한 섭취력의 특징을 나타내는 화합물과 높은 투과성 및 정량적 분석이 가능한 PET 방사성동위원소를 이용한 방사성의약품 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적으로, C-11 과 F-18 방사성동위원소를 이용한 [¹¹C]SD-5024 (12), [¹¹C]MePPEP (13), [¹¹C]JHU75575 (14), [¹¹C]OMAR ([¹¹C]JHU75528) (15)와 [¹⁸F]MK9470 (16), [¹⁸F]FMPEP-d2 (17) 방사성의약품이 CB₁ 관련 뇌 영상 연구 전임상 및 임상 연구에 이용되고 있다. 특히, Johns Hopkins University에서 개발된 4-cyano-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-N-(piperidin-1-

December 2, 2016 / Revised: December 14, 2016 / Accepted: December 17, 2016

Corresponding Author : Keun Sam Jang, Ph. D. Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School and Hospital 42 Jenong-no, Donggu Gwangju 501-757, Republic of Korea.

Telephone: +82-62-220-5650, FAX: +82-62-223-1666, E-mail: ksjang0704@jnu.ac.kr

Copyright©2016 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (^{11}C]OMAR) 의약품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 최근에는 상대적으로 반감기 긴 F-18 ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$) 방사성동위원소를 이용한 (^{18}F]JHU88868) (18) 연구도 이루어지고 있다. ^{11}C]OMAR의 임상적 가치 및 효율성, 유용성을 바탕으로 이를 이용한 다양한 뇌 질환 연구를 활발히 진행하기 위해서는 손쉽게 방사성의약품이 제공되어야 하는데 그러기 위해서는 전체적으로 일련의 과정을 간소화 해야 하는데, 이르기 위해서는 많은 제한점이 따르게 되는데, C-11방사성동위원소는 반감기가 짧기 때문에 빠른 시간에 효율적으로 표지 과정이 이루어져야 하며, 또한 해당 방사성의약품을 환자에게 주입하기 위해서는 표지 후 (end of synthesis, EOS) 1 시간 이내에 일련의 과정이 이루어져야 한다. 이를 위해서는 표지 과정뿐만 아니라 빠른 시간 내에 제제 (formulation) 및 품질 관리 (quality control) 과정 등 전처리 과정이 이루어져야 한다. (19) 기존의 고전적인 표지 방법은 유기 용매 [N,N-dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), 3-pentanone, methyl ethyl ketone (MEK), n-propanol (nPrOH), acetone, acetonitrile (MeCN)]하에 ^{11}C]methyl iodide (^{11}C]MeI) 또는 ^{11}C]methyl triflate (^{11}C]MeOTf)를 이용해서 적당한 염기 상황에서 해당되는 헤테로아톰 (N, O or S)위치에 메틸화반응을 진행시켜 원하는 방사성의약품을 얻게 된다. 하지만, 이러한 유기 용매를 사용하게 되면, 해당 방사성의약품을 환자에게 사용하기 전에 반드시 gas chromatography 를 이용해서 잔류 용매 농도를 면밀히 확인해야 하는 추가적인 과정을 거쳐야 한다. 이와 같은 불필요한 과정을 거치지 않고 신속하고 효율적으로 C-11 방사성의약품을 제조 및 환자에게 공급하기 위해서는 전체적인 과정이 일률적으로 이루어져야 하며 이 과정 또한 간소화 되어야 한다.

최근 환경화학 (green chemistry)에 대한 관심이 증가되면서 환경화학이 핵 의학까지 확장 되고 있는데, 특히 PET 과 관련된 방사성의약품 합성 시 위험하거나 유독한 물질의 사용을 최소화하는 방향으로 진행할 것을 권장하고 있다 (20). 사용량을 최소화하기 위해서는 HPLC 루프를 이용하는 Loop chemistry (the radiochemical equivalent of flow chemistry)을 적용할 수 있는데 이 방법은 적은 양의 용매와

전구체를 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 더 농축된 반응 상황으로 반응 효율을 높일 수 있음과 동시에 연속해서 HPLC 정제를 할 수 있어서 컬럼 및 분리 시스템에 대한 부담을 줄일 수 있어 HPLC 분리 과정을 간소화시킬 수 있다 (21). 이와 더불어 분리 및 제제 공정을 간소화하기 위해서는 유독한 유기 용매의 사용을 자제해야 하는데, 유독한 유기 용매를 대체할 수 있는 유기 용매로 에탄올 (EtOH)을 추천하는데 (22), 먼저, 품질 관리에서 The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)에 따르면, 에탄올은 DMSO, acetone, MEK와 함께 Class III으로 분류되어, 상대적으로 넓은 5000 ppm 허용범위 안에서 다른 Class [Class I-benzene, CCl_4 /Class II-MeCN, DCM, DMF, THF]보다 안정하다고 규정되어있다 (23). 또한, 제조 후 정화 및 제제 과정에 폭넓게 사용되고 있으며, HPLC 분리 과정에서는 이동상으로 이용함으로써 reformulation 과정을 간편하게 하고 있다. 특히, 에탄올은 제제 공정 후 oxidative radiolysis가 일어나는 것을 막기 위해서 방사성의약품 제제 용액에 의도적으로 넣어주기도 한다. 따라서, C-11 방사성의약품 관련 제조부터 제제까지 전반적인 과정 (모듈 청소, 제조, 정화, 및 제제)에 에탄올을 사용함으로써 불필요한 과정을 최소화함으로써 일률적이고 효율적으로 해당 방사성의약품을 제공할 수 있다. 따라서, 이 연구에서는 다양한 뇌질환 관련 방사성 추적자인 ^{11}C]OMAR 를 fully automated ethanolic loop system 을 통한 합성 내용과 기존의 고전적인 표지 방법과의 비교, 분석을 하였다.

Materials and Methods

1. General considerations

반응에 사용한 모든 물질은 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 전구체 및 최종 생성물은 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, US)에서 해당 물질을 구매한 후 합성하였다 (24). 에탄올, 멸균주사용증류수, 염화나트륨 (0.9%)은 미국 약전 (United States Pharmacopeia (USP))에 맞는 것

을 사용하였으며, 에탄올은 Decon Labs, Inc 에서 멸균주 사용증류수와 염화나트륨 (0.9%)은 Hospira에서 구입하였다. Ammonium acetate, sodium dihydrogen phosphate 와 molecular sieves 는 Fisher Scientific에서 구입하였다. 무균필터는 Millipore에서 무균바이알은 Hollister-Stier, C18-light Sep-Paks는 Waters Corporation에서 구입하였다.

2. Preparation of TBA salts of precursor (1a)

에탄올 (100 μ L) 과 증류수 (50 μ L)에 용해한 desmethyl precursor (10 \pm 0.2 mg)을 30초간 볼텍싱 한 후, 1.0 M tetrabutylammonium hydroxide (100 μ L in methanol) 첨가한 후 30초간 더 볼텍싱을 해 준다. 혼합물은 증류수 (6 mL)으로 희석시킨 후, 에탄올 (5 mL)과 증류수 (10 mL)으로 미리 활성화해 둔 C18 extraction disk에 통과시킨다. 다시 증류수 (2 x 5 mL) 로 닦아준 후, 질소가스를 이용해 건조시킨다. 최종 생성물은 에탄올 (2 mL)로 새로운 용기에 (각 용

기에 1.0 mg precursor in 200 μ L ethanol)의 비율로 나누어 옮긴 후, 배قم 건조해서 보관해서 사용하였다. (22)

3. Radiochemistry

3.1. Production of carbon-11

General Electric PETTrace cyclotron을 이용해 C-11을 생산하였다. \sim 111 GBq 의 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 TRACERlab FXC-Pro synthesis module로 이동시켰으며, $[^{11}\text{C}]\text{MeI}$ 로 \sim 33.3 GBq 으로 변환시킨 후 (20), $>90\%$ 이상의 변환 수율로 $[^{11}\text{C}]\text{MeI}$ 를 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ 로 변환시켰다 (21,22).

3.2. Loop Chemistry

The TRACERlab FXC-Pro synthesis module을 loop chemistry에 맞게 구성하였다 (21,22). 전구체 (1.0 mg)을 에

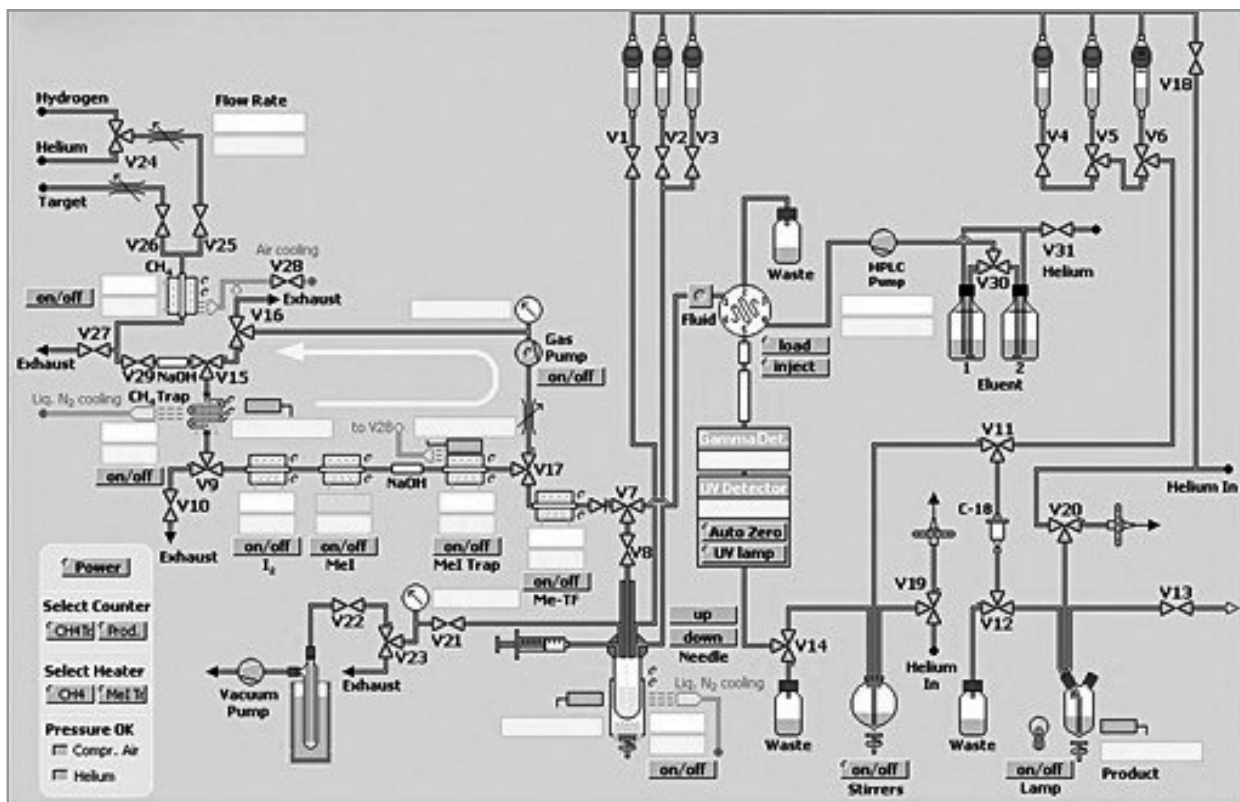


Figure 1. Module Tracerlab FXC-Pro Configuration for Loop Chemistry (21,22)

탄올 (100 μ L)에 용매한 후, 2 mL HPLC loop 에 옮긴다. 옮긴 후, 약 20초 동안 10 mL/min으로 질소 가스를 틀어준다. 이렇게 준비한 후 각 바이알에 다음과 같이 준비한다 (Figure 1). Vial 1,2,3: 비움; Vial 4: 멸균주사용식염수 (7 mL); Vial 5: 에탄올 (0.5 mL); Vial 6: 염화나트륨 (0.9%, 9.5 mL); Round-bottomed Dilution Flask: Milli-Q Water (20–50 mL). [11C] MeOTf 이 3분 동안 40 mL/min로 HPLC loop를 통과한 후, 혼합물을 다음의 조건으로 semi-preparative HPLC (column: Phenomenex Luna C-5, 100 x 10 mm, mobile phase: 20 mM NH₄OAc in 45% ethanol, flow rate: 4 mL/min, UV :

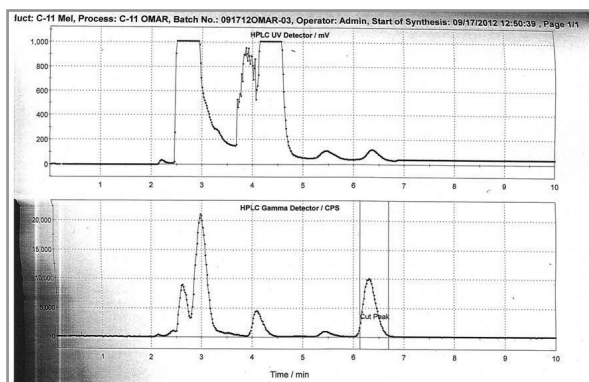


Figure 2. Typical HPLC result from conventional method

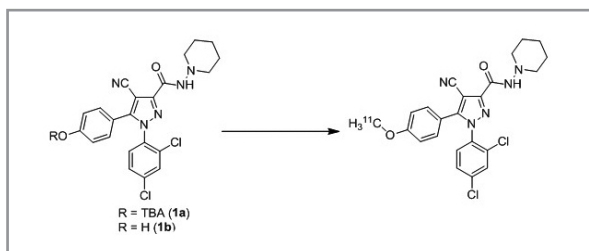


Table 1. Synthesis of [11C]OMAR from loop method and conventional method

| | Loop method (n = 3) | | Conventional method (n = 3) | |
|---------------------------------|---------------------|--|-----------------------------|------------------|
| | 25 oC | | 25 oC | 60 oC |
| Precursor | 1a | | 1b | 1b |
| Yield (% EOS) | 4.1 \pm 0.2 | | 0.5 \pm 0.1 | 3.1 \pm 0.1 |
| Visual inspection | Clear, colorless | | Clear, colorless | Clear, colorless |
| Specific activity(Ci/mmol, EOS) | 4990 \pm 384 | | 4778 \pm 203 | 4331 \pm 174 |
| pH | 5.0-6.0 | | 5.0-6.0 | 5.0-6.0 |
| Radiochemical purity | >95% | | >95% | >95% |
| Endosafe test | <2.0 | | <2.0 | <2.0 |

254 nm) 분리를 한다. 최종 생성물은 14 분에 피크가 나오는 것을 확인하였으며 (Figure 4), 원형 플라스크에 수집을 한다. 수집한 용액은 C18 Sep-Pak을 통과한 후 멸균주사용증류수 (7 mL)로 닦아준다. 최종 생성물은 에탄올 (0.5 mL) 과 생리 식염수 (9.5 mL)로 닦아준다. 마지막 제제는 0.22- μ m 필터를 통해 무균바이알로 옮긴 후, 분석을 실시한다.

Results and Discussion

전구체의 합성은 중심구조인 pyrazole 합성시 부반응을 줄일 수 있는 cycloaddition 반응 조건에 따라 65%의 수율로 반응 전구체 및 최종 물질을 합성하였다 (24). 먼저, 기존의 고전적인 방법으로 상온과 60°C 에서 3분간 2.0 M NaOH (2.0 μ l) in DMSO (100 μ l) 조건에서 반응을 한 결과, 각각 0.5 \pm 0.1 %, 4778 \pm 203 Ci/mmol과 3.1 \pm 0.1 %, 4331 \pm 174 Ci/mmol (n = 3) 의 수율과 비방사능을 얻었다 (Table 1). 다음으로, fully automated ethanolic loop system으로 반응을 실시하였다. 먼저, TBA salt 전구체를 에탄올 (100 μ l)에 녹인 후, HPLC loop에 주입하고 [11C]MeOTf를 40 mL/min으로 3 분간 반응하게 한 후, 20 mM NH₄OAc in 45% EtOH 이 동상으로 HPLC 분리 및 분리 후 에탄올 식염수로 제제를 하였다. [11C]OMAR을 4.1 \pm 0.2 % 수율과 4990 \pm 384 Ci/mmol 의 비방사능을 얻어 기존의 고전적인 방법보다 좀 더 높은 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 4). 분리용 HPLC에서 [11C]OMAR의 지연시간 약 14분이었고, 방사화학적 순도는 모두 95% 이상으로 합성하는데 총 소요시간은 약 45분

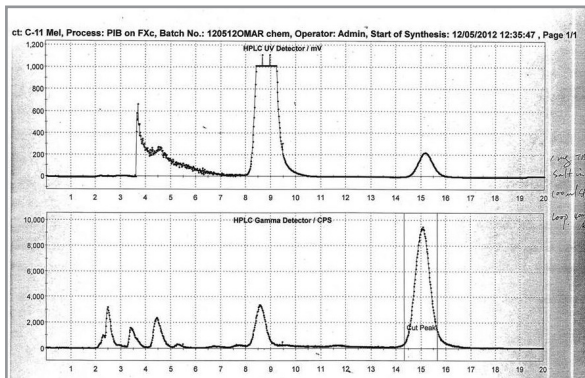


Figure 3. Typical HPLC result from loop method (using reactor vessel)

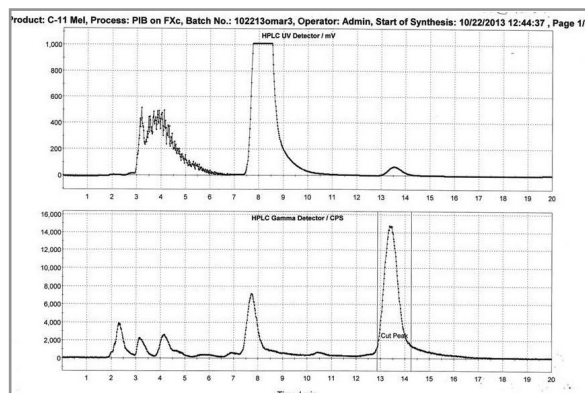
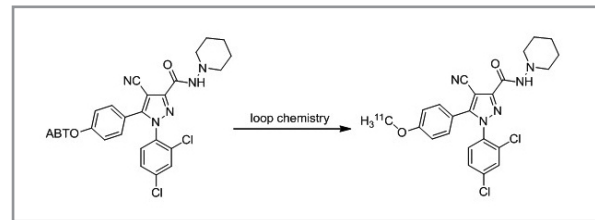


Figure 4. Typical HPLC result from loop method (using directly loop)

이 소요되었다. 두 가지 방법 모두 pH 및 육안검사와 엔도톡신 시험에서 동물실험이나 임상시험용으로 사용하기에 적합한 결과를 보였다. 더불어, TBA salt 전구체를 이용해서 반응기에서 에탄올 용매 조건하에 상온에서 반응을 실시한 결과, 마찬가지로 기존의 고전적인 방법보다 더 좋은 결과를 얻었다 (Figure 3).

Conclusion

본 연구에서는 모듈 청소부터 시작해서 제제까지 모든 공정에 에탄올만 사용하는 loop method를 통해 [^{11}C]OMAR를 성공적으로 합성 및 품질 분석을 실시하였다. Loop method 방법을 통해 반응 시작부터 마지막 단계까지 단순화 시킬 수 있었으며, 더불어 여기에 사용하는 유기 용매가 에탄올 하나만을 사용함으로써, 분리 과정에 부담 및 불필요한 추가적인 과정을 간소화 시킬 수 있었다. 또한, 기존의 반응 과정과 장비



Scheme 1. Synthesis of [^{11}C]OMAR from ethanolic loop chemistry

를 단순화 및 최소화 시킴으로써 작업자의 방사선 피폭과 작업량을 줄일 수 있으며, 반복적으로 방사성의약품을 생산해 낼 수 있다. 품질 분석 결과 임상 적용에도 적합한 ethanolic loop chemistry 방법은 [^{11}C]OMAR 뿐만 아니라 다른 동물 연구용 및 임상시험용 C-11 표지 방사성의약품의 적용에도 유용한 표지 방법으로 기대된다.

Acknowledgments

본 연구는 원자력안전위원회의 재원으로 한국원자력안전재단의 지원을 받아 수행한 원자력안전연구사업의 연구결과입니다. (No. 1305033)

References

1. Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 2011;63:461-470.
2. Talwar R, Potluri VK. Cannabinoid 1 (CB1) receptor—pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonist. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2011;10:536-544.
3. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunol Res* 2011;51:26-38.
4. Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonist and antagonists. *Curr Med Chem* 2010;17:1360-1381.
5. Le Foll B, Goldberg SR. Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:875-883.
6. Black SC. Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr Opin Invest Drugs* 2004;5:389-394.
7. Serra G, Fratta W. A possible role for the endocannabinoid system in the neurobiology of depression. *Clin Pract Epidemiol Mental Health* 2007;3:25-36.
8. Dean B, Sundram S, Bradbury R, Scarr E, Copolov D.

- Studies on [³H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density on cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* 2001;103:9-15.
- Horti AG, Van Laere K. Development of radioligands for in vivo imaging of type 1 cannabinoid receptors (CB1) in human brain. *Curr Pharm Des* 2008;14:3363-3383.
 - Evens N, Bormans GM. Non-invasive imaging of the type 2 cannabinoid receptor, focus on positron emission tomography. *Curr Top Med Chem* 2010;10:1527-1543.
 - Donohue SR, Varnäs K, Jia Z, Gulyás B, Pike VW, Halldin C. Synthesis and in vitro autoradiographic evaluation of a novel high-affinity radioiodinated ligand for imaging brain cannabinoid subtype-1 receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:6209-6212.
 - Tsujikawa T, Zoghbi SS, Hong J, Donohue SR, Jenko KJ, Gladding RL, Halldin C, Pike VW, Innis RB, Fujita M. In vitro and in vivo evaluation of ¹¹C-SD5025, a novel PET radioligand for human brain imaging of cannabinoid CB1 receptors. *Neuroimage* 2014;84:733-741.
 - Donohue SR, Krushinski JH, Pike VW, Chernet E, Phebus L, Chesterfield AK, Felder CC, Halldin C, Schaus JM. Synthesis, EX Vivo evaluation, and radiolabeling of potent 1,5-diphenylpyrrolidin-2-one cannabinoid subtype-1 receptor ligands as candidates for In Vivo imaging. *J Med Chem* 2008;51:5833-5842.
 - Fan H, Ravert HT, Holt DP, Dannals RF, Horti AG. Synthesis of 1-(2,4-dichlorophenyl)-4-cyano-5-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide ([¹¹C]JHU75528) and 1-(2-bromophenyl)-4-cyano-5-(4-[¹¹C]methoxyphenyl)-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide ([¹¹C]JHU75575) as potential radioligands for PET imaging of cerebral cannabinoid receptor. *J Labelled Compd Radiopharm* 2006;49:1021-1036.
 - Horti AG, Fan H, Kuwabara H, Hiltor J, Ravert HT, Holt DP, Alexander M, Kumar A, Rahmim A, Scheffel U, Wong DF, Dannals RF. ¹¹C-JHU75528: A radiotracer for PET imaging of CB1 cannabinoid receptors. *J Nucl Med* 2006;47:1689-1696.
 - Liu P, Lin LS, Hamill TG, Jewell JP, Lanza TJ, Gibson RE, Krause SM, Ryan C, Eng W, Sanabria S, Tong X, Wang J, Levorse DA, Owens KA, Fong TM, Shen CP, Lao J, Kumar S, Yin W, Payack JF, Springfield SA, Hargreaves R, Burns HD, Goulet MT, Kagmann WK. Discovery of N-((1S,2S)-2-(3-cyanophenyl)-3-[4-(2-[¹⁸F]fluoroethoxy)phenyl]-2-methylpropyl)-2-methyl-2-[(5-methylpyridin-2-yl)oxy]propanamide, a cannabinoid-1 receptor positron emission tomography tracer suitable for clinical use. *J Med Chem* 2007;50:3427-3430.
 - Terry GE, Hirvonen J, Liow JS, Zoghbi SS, Gladding R, Tauscher JT, Schaus JM, Phebus L, Felder CC, Morse CL, Donohue SR, Pike VW, Halldin C, Innis RB. Imaging and quantification of cannabinoid CB1 receptors in human and monkey brains using ¹⁸F-labeled inverse agonist radioligands. *J Nucl Med* 2010;51:112-120.
 - Gao Y, Ravert HT, Dannals RF, Horti AG. 5-(4-(2-[¹⁸F]fluoroethoxy)phenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-cyano-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide ([¹⁸F]JHU88868), a novel radioligand for PET imaging of cannabinoid type 1 receptors. *Curr Radiopharmaceuticals* 2009;2:195-198.
 - Scott PJH. Methods for the incorporation of carbon-11 to generate radio-pharmaceuticals for PET imaging. *Angew Chem Int Ed* 2009;48:6001-6004.
 - Shao X, Schnau PL, Fawaz MV, Scott PJH. Enhanced radiosyntheses of [¹¹C]raclopride and [¹¹C]DASB using ethanolic loop chemistry. *Nucl Med Biol* 2013;40:109-116.
 - Shao X, Kilbourn MR. A simple modification of GE Tracerlab FX C Pro for preparation of [¹¹C]carfentanil and [¹¹C]raclopride. *Appl Radiat Isot* 2009;67:602-605.
 - Shao X, Fawaz MV, Jang KS, Scott PJH. Ethanolic carbon-11 chemistry: The introduction of green radiochemistry. *Appl Radiat Isot* 2014;89:125-129.
 - ICH Harmonised Tripartite Guideline Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5). 2011:1-29.
 - Gao M, Wang M, Zheng QH. A new high-yield synthetic route to PET CB1 radioligands [¹¹C]OMAR and its analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 2012;22:3704-3709.