

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.2.158>

Reliable preparation of [^{11}C]GR205171, a selective NK1 radioligands for noninvasive imaging

Jae-kyung Park,¹ Young Jin Cho,² and Sang-Yoon Lee^{1,2,3,*}

¹Gachon Advanced Institute for Health Science and Technology, Graduate School, Gachon University, 155, Gaetbeol-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Korea

²Neuroscience Research Institute, Gachon University, 24, Namdong-daero 774 beon-gil, Namdong-gu, Incheon, Korea

³Department of Neuroscience, College of Medicine, Gachon University, 191, Hambangmoe-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Korea

ABSTRACT

[^{11}C]GR205171, a Neurokinin 1 (NK1) radioligand, has been known as such a promising PET probe for quantitation of NK1 receptors in the brain by positron emission tomography (PET) imaging. First trial to synthesis of [^{11}C]GR205171 was to use methylene chloride and tetrabutylammonium hydroxide for pre-activation of precursor, but the result was not successful in radiochemical yield (0~25%) and unreliable. 7 years later, inorganic base (Cs_2CO_3) was tried to achieve higher radiochemical yield, and they showed higher yield (~53%). We have tried to repeat the same synthesis method, but it did not work properly, because there were the lack of the detail procedure and still reproducibility in radiochemical yield. Here we report the improved synthesis protocol to produce [^{11}C]GR205171 in high yield via commercial automated synthesizer. The sonicator which combines water heating bath was used to activate desmethyl-GR205171, and this method showed high efficiency and reasonable yields ($4.7 \pm 0.6\%$, non-decay corrected from molecular sieve trap) with >95% radiochemical purity.

Key Word: : [^{11}C]GR205171, Radiochemical yield, [^{11}C]CH₃I, Cesium carbonate, Pre-activation

Introduction

비교적 짧은 반감기를 가지는 C-11 혹은 F-18과 같은 방사성동위원소를 이용하여 체내의 수용체에 특이적 결합을 하는 방사성 표지 화합물들은 살아있는 개체에 대한 생화학적 변화를 실시간으로 정량화 할 수 있게 해 주는 중요한 도구로서 여겨진다. 특히 뇌조직 내 수용체의 체내 양전자 방출 단층 (PET) 영상을 위해 다양한 수용체에 대한 방사성 추적자들이 개발되고 활용되어 왔다. 대부분의 경우에는 이미 임상에서 치료제로서 활용되고 있는 강한 결합도와 특이도를 가지는 길항제들이 PET 추적자로서 개발되었으며, 구조의 변형에 의한 약

리학적 특성 변화를 피하기 위하여 [^{11}C]CH₃I 등과 같은 C-11을 포함하는 전구체를 이용하여 기존의 구조를 유지한 채로 방사성 추적자로 개발되어 왔다. 비록 C-11 동위원소가 짧은 반감기를 가지고 있어서 배치(batch)의 활용률 (dose 수/batch)이 1에 가까운 상황일지라도, 기존에 알려진 신경 약물의 특성과 동일한 방사성 화합물을 PET에서 활용할 수 있다는 장점으로 인하여 C-11이 표지된 PET 리간드들은 현재까지도 꾸준히 활용되고 있다. [^{11}C]GR205171은 Neurokinin 1 (NK1) 수용체의 길항제로서 스웨덴 그룹에 의해 2000년 처음 소개되었으며(1)(2), 후에 사회 불안 장애, 우울증 등에 대한 연구에 활용되어 왔다(3). [^{11}C]GR205171의 합성

Received: December 16, 2019 / Revised: December 26, 2019 / Accepted: December 28, 2019

Corresponding Author : Sang-Yoon Lee, Department of Neuroscience, College of Medicine, Gachon University, 191, Hambangmoe-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Korea, 21565, +82-32-822-5360 (Office), +82-32-822-8251 (Fax), E-mail address: rchemist@gachon.ac.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

방법으로 초기에는 tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH)를 이용한 합성법을 사용하여 왔으나, 전구체인 desmethyl-GR205171의 반응 용매에 대한 낮은 용해도로 인하여 번거로운 합성 과정과 낮은 방사화학적 합성수율이 문제가 되었다(1)(4). 이 후에 Cs_2CO_3 를 이용한 개선된 방법이 소개되었으나, 합성법이 구체적으로 기술되지 않았으며 재현성에 문제가 있었다(5). 본 연구에서는 $[^{14}C]GR205171$ 의 합성을 위하여 Cs_2CO_3 를 염기로 하는 $[^{14}C]CH_3I$ 의 메틸화 반응을 이용하여 전구체의 전-활성화(pre-activation) 과정을 간단하고 쉽게 최적화하고 높은 수율과 재현성의 $[^{14}C]GR205171$ 의 합성을 상용화된 자동합성장치에서도 실시할 수 있는 프로토콜을 제공하고자 하였다.

Materials

$[^{14}C]GR205171$ 의 전구체인 desmethyl-GR205171은 HUAYI ISOTOPE (China)으로부터 주문 제조의 방식으로 공급받았다. 그 외에 사용된 화학 시료들은 Sigma-Adrich (USA)에서 구입하여 별도의 정제없이 사용하였다. C-11 표지 반응, 정제, 및 제형화 (formulation)는 상용 자동합성장치인 C-11 Pro2 (iPHASE, Australia)를 이용하였으며, 분리 정제에 사용된 semi-prep HPLC column은 Gemini C18 (10 μ m, 250x10 mm, Phenomenex)을 사용하였다. 분석용 HPLC는 Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 4.6x250 mm, Agilent)를 사용하였다. $[^{14}C]CO_2$ 는 Eclipse HP 11MeV cyclotron (SIEMENS, Knoxville, USA)를 이용하여 생산하였으며, Semi-prep HPLC를 위하여 Azura P2.1L system (KNAUER, Germany)을 사용하였고, anal-HPLC 분석을 위하여는 Acme 9000 (Younglin Instrument, south Korea)을 사용하였다. 전구체의 전-활성화를 위하여 사용된 초음파 세척기는 SH-1025 (새한초음파, south Korea)를 사용하였다. HPLC 정제 후, 고체상추출 (SPE)을 위하여 사용된 카트리지는 Sep-Pak C18 plus short cartridge (part no. WAR020515, Waster)이다.

Protocol

1. 활성화된 $[^{14}C]GR205171$ 전구체 용액의 준비

1.1) $[^{14}C]GR205171$ 전구체 용액의 준비

1.1.1) desmethyl-GR205171 (2 mg)과 Cs_2CO_3 (5 mg)을 반응 바이알 (vial 2, conical shape, 1.2 ml)에 담고 DMF (0.3 ml)를 추가하여 현탁액을 만들고, 알루미늄 캡 (PTFE septum)으로 완전히 밀봉한다.

1.1.2) 밀봉된 바이알을 70 °C로 가열된 초음파 세척기에서 30분간 가열 및 분쇄를 한다.

1.1.3) 30분 경과후에, 전구체 용액이 충분히 노란색을 띠지 않을 경우 추가적으로 가열 및 분쇄를 하여 매우 진한 노란색이 됨을 확인한다.

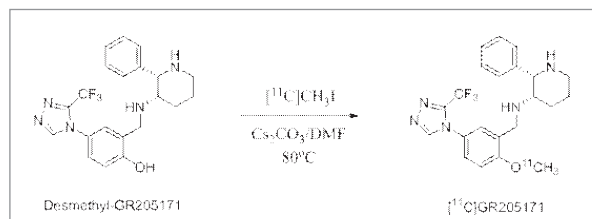
1.1.4) 충분히 활성화된 전구체 용액이 담긴 바이알을 합성장치에 설치하여 $[^{14}C]CH_3I$ 메틸화 반응을 위해 대기시킨다. (빔조사가 끝나기 약 5분전에 설치한다.)

2. 자동합성장치에서의 $[^{14}C]GR205171$ 의 표지 합성 및 정제

2.1) $[^{14}C]$ methyl iodide의 합성

2.1.1) 사이클로트론으로부터 빔조사 (55 uA, 40 분)에 의해 생성된 $[^{14}C]CO_2$ 는 자동합성장치 내의 molecular sieve column (5 A, 80/100 mesh)으로 상온에서 서서히 포집시킨다. 포집된 방사능의 양이 최대치가 될 때, column을 서서히 200 °C까지 가열하면서 약 400초간 $[^{14}C]CH_3I$ 합성 바이알 (vial 1, 150 μ l of $LiAlH_4$ 0.1 M in THF/diethyl ether)에 서서히 포집시킨다.

2.1.2) vial 1을 85 °C로 가열하면서 아르곤 가스 (20 ml/min)로 기화시켜 유기용매를 증발시키고, 300 μ l HI (57% in H_2O)를 vial 1에 추가하고 140 °C로 가열하면서 발생하는 $[^{14}C]CH_3I$ 를 전구체 바이알 (vial 2)에 상온에서 서서히 포집시킨다.

Scheme 1. Radiosynthesis scheme of [¹¹C]GR205171

2.2 [¹¹C]CH₃I 메틸화 반응 및 분리 정제

2.2.1) [¹¹C]CH₃I 포집이 완료된 후에, 밀봉된 상태를 유지하면서 5분간 80 °C에서 가열하여 methylation을 유도하고, 50 mM ammonium formate buffer 4.7 ml를 추가하여 반응을 종결하고, semi-prep HPLC (eluent condition: acetonitrile/50 mM ammonium formate = 30/70, 6 ml/min, 254 nm)에서 분리 정제를 한다.

2.2.2) [¹¹C]GR205171이 용출되는 시간은 7.3~8.3 분이었으며, 분취한 용액은 증류수 100 ml과 함께 섞은 뒤에 Sep-Pak (C18, Waters)에서 수집된 후에, 에탄올(1 ml)과 생리식염수(9 ml)을 순차적으로 통과시켜 용리하여 멸균 필터를 통해 무균 바이알에 모은다.

2.2.3) 무균 바이알에 담은 [¹¹C]GR205171의 소량을 취하여 분석용 HPLC (eluent condition: acetonitrile/50 mM ammonium formate = 30/70, 1 ml/min, 254 nm)에서 방사화학적 순도를 측정하였으며, GR205171 표준 시료용액과 섞은 후 재 분석하여 화학적 동일성을 확인한다.

Representative Results

전구체와 염기 촉매를 DMF에 녹인 상태에서 가열과

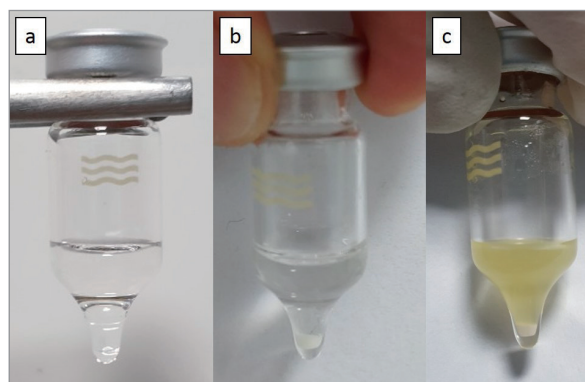


Figure 1. Pictures of typical color differences between pre-activation methods. (a) DMF re-dissolved after heating/evaporation of CH₂Cl₂ with TBAOH; (b) heating after sonication with Cs₂CO₃ in DMF; (c) heating and sonication simultaneously with Cs₂CO₃ in DMF.

초음파 분쇄를 따로 실시할 경우에는 전구체 용액의 색 변화가 거의 일어나지 않았으며, 가열과 초음파 분쇄를 동시에 실시할 경우에 매우 뚜렷하게 육안으로 식별이 가능할 정도로 진한 노란색을 띠는 것을 확인하였다.

합성수율은 [¹¹C]CO₂의 포집된 방사능량을 기준으로 계산하였으며, 비감쇠보정된 방사화학적 수율은 평균 4.7 ± 0.6% (n=3)이었으며, 총 합성시간은 37분이었다. 사이클로트론에서 40분간 조사 (55 μA) 하여 포집되는 [¹¹C]CO₂의 방사능량은 55.5~62.9 GBq (1.5~1.7 Ci)이었으며, 합성이 완료되어 최종 단계에서 무균 바이알에 수집되는 [¹¹C]GR205171의 방사능량은 평균 2.81 GBq (76 mCi) 였다 (10% 에탄올/생리식염수 10 ml).

Semi-prep HPLC를 통하여 분리 정제를 하였으며, gamma detector로 검출되는 3개의 큰 peak 중에서 7~8분 사이의 peak를 분취하였다.

최종 결과물인 [¹¹C]GR205171 생리식염수 용액의 일부를 취하여 분석용 HPLC에서 분석하였으며, 방사화학적 수율이 95%이상이었으며, 표준 시료인 GR205171 용액을 섞어서 함께 분석한 결과 8.2 분에서 동일하게

Table 1. Radiochemical yield of [¹¹C]GR205171 production

Entry	[¹¹ C]CO ₂ trap (GBq) ^{a)}	final product (GBq) ^{b)}	Radiochemical yield (%) ^{c)}
1	59.718 (1614 mCi)	3.145 (85 mCi)	5.3
2	58.941 (1593 mCi)	2.775 (75 mCi)	4.7
3	63.011 (1703 mCi)	2.516 (68 mCi)	4.0

^{a)} via molecular sieve in automated synthesizer ^{b)} radioactivity in final vial ^{c)} N.D.C. (E.O.B.) based on [¹¹C]CO₂ trap on molecular sieve column in automated synthesizer

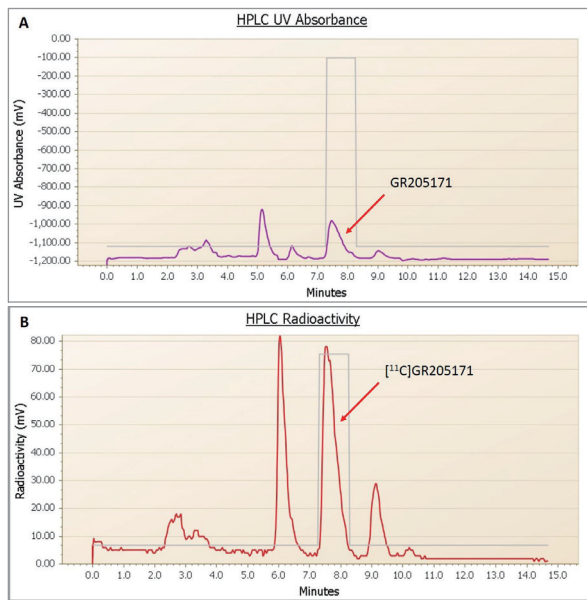


Figure 2. Preparative radio-HPLC chromatogram from purification of [^{11}C]GR205171. (A) UV detector (254 nm); (B) gamma-ray detector.

용출되는 것을 확인하였다.

Discussion

일반적으로 [^{11}C]CH₃I의 메틸화 반응에서는 부반응을 일으키는 관능기 (-NH or -OH 등)들은 보호기로 비활성화 시킨 전구체를 이용하여 방사성동위원소 표지를 실시한다. [^{11}C]GR205171의 경우에는 페놀성 알코올과 경쟁적으로 메틸화 반응이 가능한 2차 아민 두 개가 구조내에 존재하기 때문에 두 개의 아민을 보호기 (-Boc)로 결합한 전구체를 활용하기도 하였으나 (1), 보호기가 없는 전구체가 부반응이 존재할지라도 보다 빠르고 높은 수율로 합성을 수행할 수 있는 것으로 보고되었다 (5). 후자의 경우에는 적절한 염기의 선택과 메틸화 반응 전에 전-활성화를 실시하므로 부반응을 줄이고 목적하고자 하는 결과물을 얻을 수 있을 것으로 여겨진다. 방사성 동위원소 표지 반응의 초기 보고에는 tetrabutylammonium hydroxide (n-Bu₄NOH)를 이용하여 낮은 용해도의 전구체를 methylene chloride에 녹인 용액을 80 °C에서 가열하여 활성화된 전구체를 표지 반응에 이용하였다. 하지만 이 방법은 재

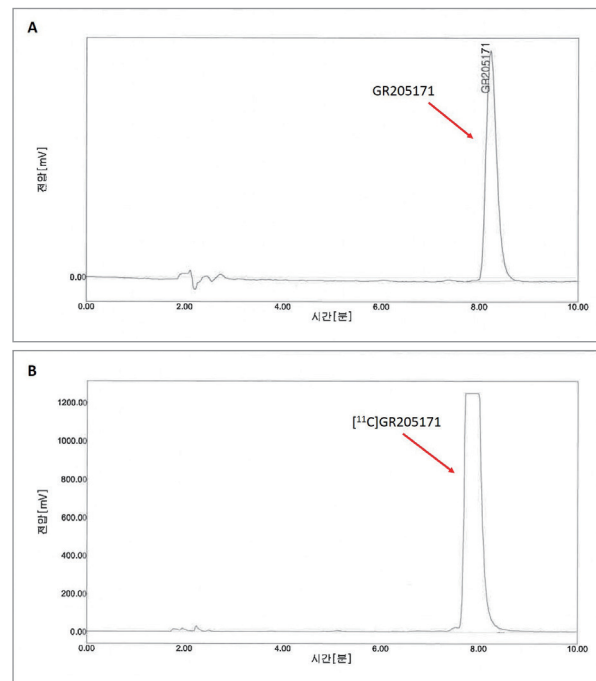


Figure 3. Analytical radio-HPLC chromatogram from final product of [^{11}C]GR205171. (A) UV detector (254 nm); (B) gamma-ray detector.

현성이 낮고 전구체의 상태 (전구체의 제조사가 다른 경우)에서 동일한 결과를 얻기가 어려웠으며 방사화학적 수율도 낮았다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 Cs₂CO₃를 촉매로 하는 방법이 보고되었는데, 단순히 가열하는 방법이 아닌 초음파 분쇄기를 이용하는 방법을 병행하였으며, 이는 DMF 용매에 녹지 않는 Cs₂CO₃의 촉매작용을 돕기 위해 사용된 것으로 여겨진다 (5). 저자는 이를 확인하기 위하여 동일한 방법으로 [^{11}C]GR205171의 합성을 시도하였으나, 화합물이 거의 생성되지 않았으며, 전구체를 전처리하는 과정에서 관찰할 수 있는 용액의 색변화도 거의 없었다. 따라서, 본 연구에서는 전구체가 충분히 활성화되어 메틸화가 쉽게 일어날 수 있는 황변 현상을 재현하기 위하여 여러 가지 전처리 방법을 시도하게 되었고, Cs₂CO₃가 충분히 작은 입자가 되어 이종상 (heterogeneous phase)에서도 촉매역할을 잘 할 수 있도록 초음파 분쇄기를 이용하였으며, 동시에 촉매에 의해 전구체 페놀성 알코올의 음이온화를 촉진할 수 있도록 약 70 °C의 중탕가열을 동시에 적용하였다. 여러 조건을 시도한 결과 70 °C에서 20~30분 동안 초음파 분쇄를 시도한 전구체 용액이 진한 노란색을 띠는 것을 확인되었으며, [^{11}C]CH₃I 메틸화 반응도 높

은 수율로 진행됨을 확인하였다. 다른 조건에서 전처리한 용액들은 무색 투명하거나 매우 옅은 노란색을 띠는 경우가 대부분이었으며, 이러한 경우는 표지 수율이 1% 미만의 결과를 보였다. 더불어 표지 반응을 위해서는 과량의 Cs_2CO_3 (5 mg)를 사용하게 되는데, 지나치게 많은 량을 사용할 경우, 용해되지 않고 남은 Cs_2CO_3 분말이 자동합성장치의 HPLC 루프를 막아서 정제 과정을 수행할 수 없는 경우가 발생할 수 있기 때문에 최적화된 촉매량의 사용이 요구 된다. 본 연구 방법이 제시하고자 하는 합성수율의 높은 재현성과 방법의 효율성을 확인하는 데에는 성공하였으나, 기존 합성법을 같은 시스템에서 함께 실시하여 비교 우위를 확인하는 과정은 생략되었으므로 추가적인 연구가 요구된다.

Conclusion

본 연구에서는 ^{11}C GR205171의 합성을 위하여 Cs_2CO_3 를 염기 촉매로 하는 ^{11}C CH₃I 메틸화를 수행하였으며, 자동합성장치에서 약 37분의 합성시간이 소요되었다. 3회에 걸쳐 실시한 합성에서 수율은 평균 $4.7 \pm 0.6\%$ ($n=3$)로 높은 재현성을 보였으며, 기존의 방법과 비교하여 가열 및 초음파 분쇄를 통한 전구체 전-활성화 방법은 단순하고 효율적이며 신뢰성이 높음을 확인할 수 있었다.

Acknowledgments

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임 (HI14C1135).

References

1. Bergström M, Fasth K-J, Kilpatrick G, Ward P, Cable KM, Wipperman MD, Sutherland DR, Långström B. Brain uptake and receptor binding of two ^{11}C labelled selective high affinity NK1-antagonists, GR203040 and GR205171 - PET studies in rhesus monkey. *Neuropharmacology* 2000;39:664-70.
2. Cable KM, Wells GN, Sutherland SR. Synthesis of carbon-14 labeled NK-1 receptor antagonist GR203040 and GR205171. *J Labelled Cpd Radiopharm* 2000;43:29-45.
3. Frick A, Ahs F, Linnman C, Jonasson M, Appel L, Lubberink M, Långström B, Fredrikson M, Furmark T. Increased neurokinin-1 receptor availability in the amygdala in social anxiety disorder: a positron emission tomography study with ^{11}C GR205171. *Transl Psychiatry* 2015;5:1-6.
4. Syvänen S, Eriksson J, Genchel T, Lindhe Ö, Antoni G, Bengt Långström B. Synthesis of two potential NK1-receptor ligands using $[1-^{11}\text{C}]$ ethyl iodide and $[1-^{11}\text{C}]$ propyl iodide and initial PET-imaging. *BMC Medical Imaging* 2007;7:6.
5. Zhu Z, Collier L, Wu Y, Kolb Hartmuth. An improved reliable labeling protocol of ^{11}C GR205171. *J Nucl Med* 2007;48:317.