

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.2.69>

The rapid synthetic strategy of [¹¹C]PIB via disposable column cartridge purification

Jihye Lee,¹ Yansheng Li,³ Sang-Yoon Lee,^{1,2,*} and Tatsuo Ido¹

Neuroscience Research Institute, Gachon University, 24, Namdong-daero 774 beon-gil, Namdong-gu, Incheon, Korea ¹ Department of Neuroscience, College of Medicine, Gachon University, 191, Hambangmoe-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Korea ² PET-CT Center, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin, China ³

ABSTRACT

PIB is the first amyloid plaque PET image tracer reported for the first time in 2003, and is considered to be the best and is still being utilized due to its very high uptake and kinetic properties. Initially, it was synthesized by radioisotope labeling using a precursor containing a methoxy methyl protection group, but now it is synthesized using a 6-OH precursor that can be easily synthesized in one step using [¹¹C]methyl triflate. Carbon-11 has several limitations in clinical studies using PET because its half-life is as short as 20 minutes. In this study, in order to overcome the difficulty of this half-life, a rapid method using Sep-Pak was adopted instead of HPLC purification to significantly reduce the burden of the purification process and attempted synthesis. As a result, the synthesis time was shortened by more than 50%, and the yield of the final compound was higher than the previous result and showed relatively high specific radioactivity, confirming that it is a strategic method with high applicability for various precursors having primary amines.

Key Word: [¹¹C]PIB, Radiochemical yield, [¹¹C]Methylation, tC18 Sep-Pak cartridge

Introduction

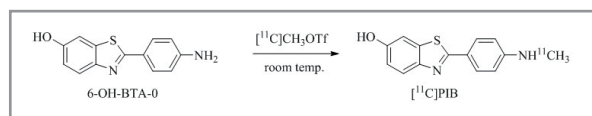
짧은 반감기를 가지는 C-11과 같은 방사성동위원소를 이용하여 생체내의 수용체에 결합하는 방사성추적자들은 비침습적으로 생화학적 변화를 실시간으로 정확히 정량할 수 있는 도구로서 다양한 용도로 활용되고 있다. 특히 뇌 내 수용체에 대한 대부분의 방사성추적자들은 신약개발의 결과물에서 유래되어 많은 수가 C-11동위원소를 포함하는 방사성추적자들이다. C-11동위원소가 매우 짧은 반감기 (20분)를 가지고 있어서 다른 방사성동위원소에 비해 시간과 비용에 대한 부담이

매우 클지라도, 기존에 널리 알려진 신경 약물의 물리적 생물학적 특성과 동일한 방사성추적자를 영상 연구에 직접 활용할 수 있기 때문에, C-11 동위원소가 포함된 방사성추적자들이 꾸준히 활용되고 있다. [¹¹C]PIB는 알츠하이머병 환자의 뇌조직에 분포하는 아밀로이드 침전에 특이적으로 결합하는 방사성추적자로서 2003년 피츠버그대학 그룹에 의해 처음 소개되었으며(1), 그 후 [¹¹C]PIB를 이용한 PET 연구를 통해 알츠하이머병의 병태생리와 관련하여 많은 연구가 보고되었다. [¹¹C]PIB의 합성은 초기에는 6번 하이드록시기의 부반응을 막고자 methoxymethyl기로 보호된 전구체를 이용한 2단계

Received: December 23, 2020 / Revised: December 27, 2020 / Accepted: December 29, 2020

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©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes



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

반응으로 합성을 하였으나(2), $[^{11}\text{C}]\text{methyl triflate}$ 의 광범위한 사용을 기반으로 보호기가 없는 6-OH-BTA-0 (6-Benzothiazolol, 2-(4-aminophenyl)-)를 전구체로 하는 단일 반응 합성법이 현재 널리 이용되고 있다(3). $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ 를 비롯하여 C-11 동위원소를 포함하는 거의 모든 방사성추적자들은 semi prep-HPLC를 이용하여 분리 정제를 통해 최종화합물을 얻어내는데, 짧은 반감기에 비해 총합성시간이 60분 정도로 매우 길기 때문에 방사화학적 합성수율이 낮아지고, 비방사능도 함께 낮아지는 단점을 가지고 있다. 만약, 총합성시간을 단축하여 합성수율을 올릴 수 있다면 보다 높은 비방사능의 방사성추적자를 이용한 PET 영상연구가 가능해 질것으로 기대할 수 있으며, 다수의 PET 장비를 활용할 경우, 단위 합성 당 활용지수를 높일 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 본 연구에서는 분리 정제에서 매우 긴 시간을 소요하는 HPLC 정제 방법을 사용하는 대신 전구체와 화합물의 용해도 차이를 이용한 Sep-Pak 카트리지를 이용한 분리 정제 방법을 활용하여 총합성시간을 단축하고자 하였다 (4, 5).

Materials and methods

1. 장비 및 시약

$[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ 의 전구체인 6-OH-BTA-0와 LAH(lithium aluminum hydride, 0.05M in THF)은 ABX (Germany)으로부터 공급받았다. 그 외에 사용된 화학 시료들은 Sigma-Adrich

(USA)에서 구입하여 별도의 정제없이 사용하였다. 사이클로트론에서 생성된 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 를 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 로 변환하기 위해 CTI-MeI (Siemens, Germany) 장치를 사용하였다. C-11 표지 반응, 정제, 및 제제화 (formulation)는 10개의 솔레노이드밸브와 공압 실린더로 구성된 자체 제작된 합성장치를 이용하였으며, 고체상 추출 또는 분리 정제에 사용된 C18 카트리지는 Waters사의 Sep-Pak C18 plus short cartridge (part no. WAR020515, Wasters) 과 tC18 (part no. WAT036810, Wasters) 카트리지를 사용하였다. Semi-prep HPLC 분리 정제에 사용된 semi-prep HPLC column은 Gemini C18 (10 μm , 250x10 mm, Phenomenex)을 사용하였고, 분석용 HPLC는 Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4.6x250 mm, Agilent)을 사용하였다. $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ 는 Eclipse HP 11MeV cyclotron (SIEMENS, Knoxville, USA)를 이용하여 고정된 빔세기 (45 μA)와 조사시간 (40분)에서 생산하였으며, semi prep-HPLC 분취 및 HPLC 분석을 위하여는 Acme 9000 (Younglin Instrument, south Korea)을 사용하였다. HPLC 정제 후, 고체상추출 (SPE)을 위하여 사용된 카트리지는 Sep-Pak C18 plus short cartridge (part no. WAR020515, Waster)이다.

2. $[^{11}\text{C}]\text{methyl triflate}$ 를 이용한 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ 의 $[^{11}\text{C}]\text{methylation}$

2.1) synthesis of $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$

방사성동위원소 C-11은 이산화탄소의 형태로 11 MeV 사이클로트론 (Eclipse HP, Siemens, Germany)에서 생산되었으며, 1% 산소가 포함된 초고순도 질소 가스를 타겟 가스로 하여 45 μA 의 빔세기로 40분간 조사되었다. 빔조사가 완료된 후,

헬륨 가스를 이용하여 $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 합성장치 (CTI-MeI, Siemens, Germany)로 이송되어, LAH (0.05 M, 0.4 ml)가 담긴 5ml 유리 바이알에서 포집한 후, “wet chemistry” 방법에 의해 $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 로 변환하였다.

$[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 를 헬륨 가스를 이용하여 AgOTf와 sea sand (SiO_2 , 10~20 mesh)가 충전되어 200도씨로 가열되어 있는 석영관에 통과시켜 $[^{14}\text{C}]\text{Methyl Triflate}$ 를 생성하고 바로 전구체 용액이 들어있는 바이알에 포집하였다.

$[^{14}\text{C}]\text{Methyl Triflate}$ 는 전구체 (1mg in 0.2 ml of MEK) 용액을 미리 넣어둔 바이알에 상온에서 7분간 포집하면서 반응하였다 (scheme. 1).

3. $[^{14}\text{C}]\text{PIB}$ 의 분리 정제

3.1) conventional purification by Semi Prep-HPLC

Semi-prep HPLC에서 분리정제를 하기 위하여 반응 혼합액에 50 mM ammonium formate buffer 1.8ml를 추가하여 반응을 종결시켰으며, 반응 용액을 HPLC loop (2 ml)에 채운 뒤, 전개하여 21분에 용출되는 화합물의 피크를 UV 검출기와 감마선 검출기를 참고하여 분취하였다. (acetonitrile: 50 mM ammonium formate buffer = 40:60, 254 nm, 3 ml/min). 분취한 분획은 3차 증류수 30 ml과 고르게 혼합한 뒤, C18 SEP-PAK을 이용하여 고체상 추출을 하였으며, 에탄올 1 ml (USP 200 proof)과 9 ml 생리식염수를 이용하여 최종 결과물을 추출하여 무균 필터 (0.22 μm)가 연결된 무균 바이알에 모았다.

3.2) optimization of Sep-Pak purification

Sep-Pak 카트리지를 이용하여 전구체와 화합물 (PIB)을 분리하기 위하여 최적의 조건을 찾고자 하였으며, 25%, 28%, 30% EtOH 수용액을 다양한 전개 방법으로 카트리지에 로딩된 전구체와 화합물의

용출 경향을 파악하고자 하였다. Sep-Pak카트리지에 전구체와 PIB 표준시료를 로딩하고 전개하여 용출되는 분획을 1, 2, 10 ml 등의 다양한 부피로 모아서 anal HPLC를 통하여 UV 흡광도를 측정하였으며, 표준 농도의 UV 흡광도와 비교하여 용출되는 물질의 백분율을 구하였다.

3.3) Purification by Sep-Pak cartridge

Sep-Pak 카트리지를 이용한 간편한 정제를 수행하기 위하여, 반응 혼합액에 25% 아세토니트릴 수용액 2 ml를 첨가하여 반응을 종결시켰으며, 그대로 tC18 Sep-Pak에 통과시켰다. 여기에 25% 아세토니트릴 수용액 2 ml를 흘려주었으며, 아르곤 가스로 여액을 모두 제거하고, 다시 25% 아세토니트릴 수용액 20 ml를 흘려주어 전구체를 제거하였다. 잔류 유기용매를 제거하기 위하여 3차 증류수 10 ml를 흘려주고 아르곤 가스로 여액을 제거하여 수분을 최소화한 다음에 50% 에탄올 수용액 2 ml과 생리식염수 10ml를 순차적으로 흘려주어서 $[^{14}\text{C}]\text{PIB}$ 를 추출하고, 무균필터 (0.22 μm)를 통과시켜 무균 바이알에 담았다.

4. 최종 화합물 $[^{14}\text{C}]\text{PIB}$ 의 분석

두 가지 정제 방법에 대해서 화학적 순도를 평가하기 위하여 anal HPLC에서 시료를 분석하였으며 (acetonitrile/50 mM ammonium formate = 50/70, 1 ml/min, 350 nm, 20 μl injection), Sep-Pak 정제법의 최종 화합물에 대해서는 molar activity 및 잔존 유기용매를 분석하였다. 추가적으로 육안 검사, pH 검사를 실시하였다.

Results

Sep-Pak 카트리지를 통한 분리 정제를 실시하기 위하여 전구체와 PIB 표준 시료를 이용하여 최적의 분리 효율을 얻을 수 있는 조건을 잡고자 하였으며, 25% EtOH 수용액에 대한 전구체 및 PIB 용출량을 조사하였다. 25% EtOH 수용액을 10 ml 단위로 3번 전개하여 수집한 용액을 조사한 결과 최종적으로 전구체의 0.57%가 Sep-Pak에 남고, PIB의 경우는 37.88%가 용출되는 것을 확인하였다. 실제 합성 조건과 동일한 결과를 예측하기 위하여 25% EtOH 수용액 30ml를 끊임없이 흘러주면서 2ml씩 분취하여 분석한 결과 24 ml 전개된 시점에서 전구체는 용출되지 않는 것으로

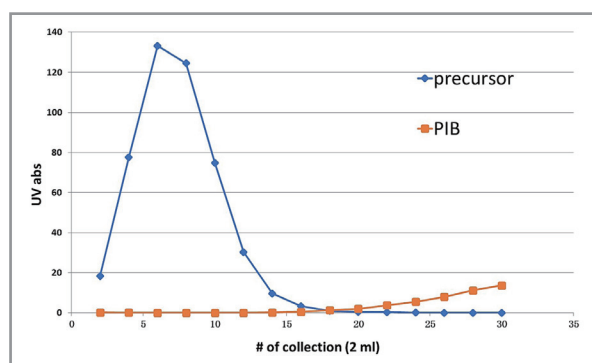


Figure 1. UV abs profile for precursor and PIB eluted from Sep-Pak cartridge

확인하였고, PIB는 투입량과 비교하여 11.37% 용출된 것으로 확인되었다 (Fig.1). HPLC를 이용한 기존 정제 방법으로 $[^{11}\text{C}]$ PIB를 합성하는 경우, 총 합성시간은 60분이 소요되었으며, 소요 시간 중에서 HPLC를 통한 분리 정제 과정은 약 25분이 소요되었다 ($[^{11}\text{C}]$ PIB peak의 retention time은 약 21분이었다. Fig.2). 반면, Sep-Pak 정제법을 이용한 합성법의 총 합성시간은 약 30분이 소요되어 기존 방법보다 절반 이하의 시간이 필요하였다. HPLC를 사용한 $[^{11}\text{C}]$ PIB의 합성에서 최종 화합물의 평균 방사능량은 $720.7 \text{ MBq} \pm 467.5$ ($n=30$, 최소값

232.7 MBq , 최대값 1591 MBq)였으며, 비방사능은 $29.1 \text{ GBq}/\mu\text{mol} \pm 22.7$ 이었고 (Fig.3), Sep-Pak 카트리지를 이용한 합성에서 최종 화합물의 평균 방사능량은 $783.4 \text{ MBq} \pm 12.7$ ($n=21$, 최소값 121.36 MBq , 최대값 2001.7 MBq)였으며, 비방사능은 $88.4 \text{ GBq}/\mu\text{mol} \pm 78.9$ 였다 (Fig.4). Sep-Pak 카트리지를 이용한 합성법에서 낮은 전구체 농도를 사용할 경우를 고려하여, 전구체 용액 (MEK용액)의 안정성을 테스트한 결과 용액을 제조한 당일과 1일 후, 15일 후의 합성 수율은 각각 851, 843.6 및 1417.1 MBq이었다. Sep-Pak 정제법에 의해 합성된 화합물에서는 다소 높은 전구체 농도를 보였고, 농도는 0.2 ppm 수준으로 HPLC 정제법에 의해 합성된 결과물에 비해서는 다소 높은 수준이나, 여전히 낮은 농도로 화학적 순도는 3% 수준이었다. 육안 검사로 맑고 투명한 액체임을 확인하였으며, pH는 6~7 사이의 값을 나타내었다. 가스 크로마토그래피를 통해 여분의 유기 용매 잔량을 분석한 결과 아세토니트릴의 농도는 20 ppm 미만이었다.

Discussion

$[^{11}\text{C}]$ PIB의 합성에서 전구체와 $[^{11}\text{C}]$ PIB의 분리 조건을 최적화하기 위하여 전구체 1 mg과 PIB 표준물질 0.1mg을 25% EtOH 수용액에 용해하여 샘플을 만들고, 분취량을 1ml에서 10ml까지 변화를 주어 최대한 실제 반응 조건과 동일하게 분리 정제를 시도하였다. 그러나, 반응 용매인 MEK를 포함하지 않았기 때문에 실제 합성 반응에서 Sep-Pak 로딩시에 과적되어 용출되는 분획에서 상당한 양의 방사능량이 발견이 되었고, anal HPLC를 분석한 결과 $[^{11}\text{C}]$ MeOH과 더불어 $[^{11}\text{C}]$ PIB도 상당량 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 그럼에도 불구하고 Sep-

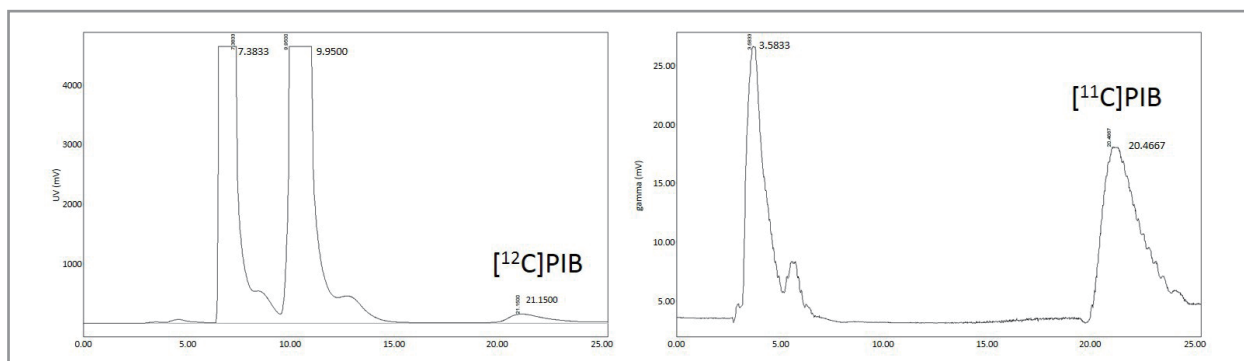


Figure 2. Legend Title. (A) It is legends; (B) It is legends.

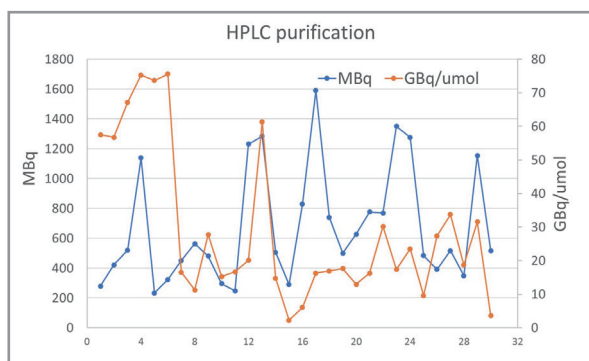


Figure 3. Radiochemical yield (blue line) and molar activity (orange line) for each single batch production of $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ via HPLC purification method.

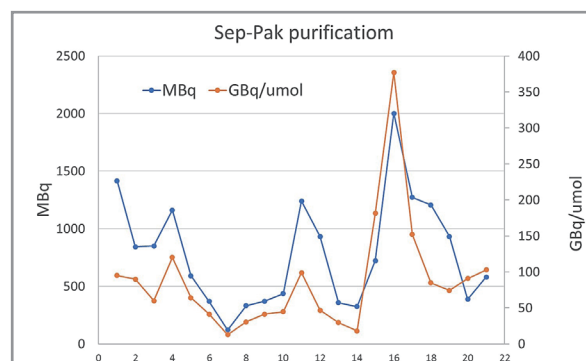


Figure 4. Radiochemical yield (blue line) and molar activity (orange line) for each single batch production of $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ via Sep-Pak purification method.

Pak에 포함된 방사능량은 대부분 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ 였으며, prep HPLC로 분리 정제한 방사능량보다 평균 16% 더 높은 방사능량을 보이는 것으로 확인되었다. 전구체의 분리 효율을 극대화하기 위하여 기존 방법에서 사용하는 전구체의 양보다 25% 낮은 수준으로 합성을 하고자 하였다. 1 mg 미만의 양을 전구체로 사용하기 위해서는 용액의 형태로 사용하는 것이 합리적이기 때문에, 용액 상태로 저온 보관된 전구체가 15일까지 방사화학적 수율이 유지되는 것을 확인하였고 15일까지 방사화학적 수율이 떨어지지 않음을 확인하였다. 그러나, 0.2 mg (in MEK 0.2 ml)의 전구체를 이용하여 합성을 실시하였을 때에는 방사화학적 수율이 현저히 떨어지는 것을 관찰하였다 (data not shown). 따라서, 분리 정제 효율을 올리기 위해서 전구체의 양은 줄여야 하지만, 합성

수율을 올리기 위해서는 전구체의 양을 늘려야 하기 때문에 적절한 양을 최적화하는 것도 매우 중요할 것으로 여겨진다. Sep-Pak 카트리지에서 성공적인 분리 정제를 위해서 반응 효율을 높여 주어 적은 양의 전구체를 사용할 수 있을 것이다. 본 연구에서 제안한 Sep-Pak 카트리지 분리 정제법으로 얻어진 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ 의 최종 방사능량은 평균 $783.4 \text{ MBq} \pm 12.7$ ($n = 21$)였으며, 평균 비방사능은 $88.4 \text{ GBq}/\mu\text{mol} \pm 78.9$ 로 기존 방법을 상회하면서 매우 안정적인 결과를 보여주었다. 최종 합성시간은 HPLC를 이용한 방법에서는 최소 60분이었으나, Sep-Pak 카트리지를 이용한 방법에서는 25분으로 50%이상의 시간적 이득이 있었다. 이러한 단축된 시간의 장점은 합성 시스템의 공간적 부담을 줄여 주고, 복잡한 정제 분리 장치로 기인하는 불확실성을 낮추어 주며, 1일

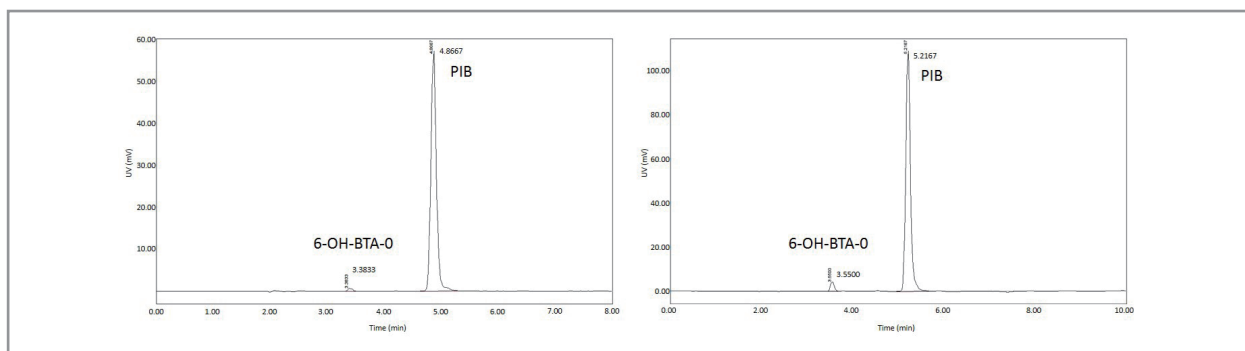


Figure 5. Comparison of HPLC analysis of two different purification methods. (A) semi-prep HPLC purification; (B) Sep-Pak purification.

합성 횟수를 증가시켜 줄 수 있어 C-11 동위원소를 포함하는 다양한 방사성추적자의 폭넓은 활용에 크게 기여할 수 있을 것이라 여겨진다.

Conclusion

본 연구에서는 [^{11}C]PIB의 향상된 합성을 위하여 기존 방법에 널리 사용하고 있는 HPLC를 이용한 분리 정제 방법 대신 tC18 Sep-Pak 카트리지를 활용하여 보다 빠르고 간편한 분리 정제 방법을 채택함으로써 총 합성시간을 단축하면서도 동일한 빔조사 조건에서 최종 생성된 방사능량과 비방사능의 향상을 보이는 결과를 보여줄 수 있었다. 1, 2차 아민의 상대적 용해도 차이를 이용한 새로운 분리 정제 방법은 많은 수의 C-11 표지 방사성추적자들의 합성에 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 여겨진다.

Acknowledgments

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건 의료 기술 연구 개발 사업 지원 (HI14C1135)과 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 해외고급과학자초빙사업 (2018H1D3A2000959)에 의해 이루어짐.

References

1. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem*. 2003 Jun 19;46(13):2740-54.
2. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004 Mar;55(3):306-19.
3. Wilson, A.A., Garcia, A., Chestakova, A., Kung, H. and Houle, S. (2004), A rapid one-step radiosynthesis of the β -amyloid imaging radiotracer N-methyl- ^{11}C 2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([^{11}C]-6-OH-BTA-1). *J Label Compd Radiopharm*, 47: 679-682.
4. Fedorova, O., Kuznetsova, O., Stepanova, M. et al. A facile direct nucleophilic synthesis of O-(2- ^{18}F fluoroethyl)-L-tyrosine (^{18}F FET) without HPLC purification. *J Radioanal Nucl Chem* 301, 505-512 (2014).
5. Fedorova O, Nikolaeva V, Krasikova R. Automated SPE-based synthesis of 16 α - ^{18}F fluoroestradiol without HPLC purification step. *Appl Radiat Isot*. 2018 Nov;141:57-63.