

ループ標識法を用いた¹¹C]PK11195 の迅速・効率的な合成法の検討

寺崎一典¹、石川洋一²、別府高明³、小豆島正典⁴、後藤祥子⁵、岩田 鍊²

¹岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

²東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター
980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

³岩手医科脳神経外科学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

⁴岩手医科大学歯科放射線学講座
020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

⁵日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

[¹¹C]PK11195 は、マクログリア、マクロファージのミトコンドリア外膜に分布している末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) と特異的に結合し^{1,2)}、脳では神経炎症におけるマクログリアの活性化状態が描出されることから、アルツハイマー病³⁾、パーキンソン病などの脳変性疾患や虚血性脳疾患への応用が期待されている。

ループ標識法は、細いチューブをループ状にしたものに基質反応液を注入し、高反応性の [¹¹C]メチルトリフレートと基質を反応させるフロー式の迅速・高効率な標識合成法である。本研究は、東北大学、仁科記念サイクロトロンセンターで多くの ¹¹C-レセプターリガンド合成実績のあるループ標識法^{4,5)}を用いて、迅速かつ効率的な [¹¹C]PK11195 の合成法を開発し、臨床利用可能な薬剤に成熟させることを目的とする。ループ法を [¹¹C]メチル化標識化合物の合成に適応するためには、反応溶媒の選択、添加する塩基の量と種類を適切に設定することが重要である。本研究では、ループ法による最適な標識合成条件および HPLC 分離・精製法などの検討を行ったので報告する。

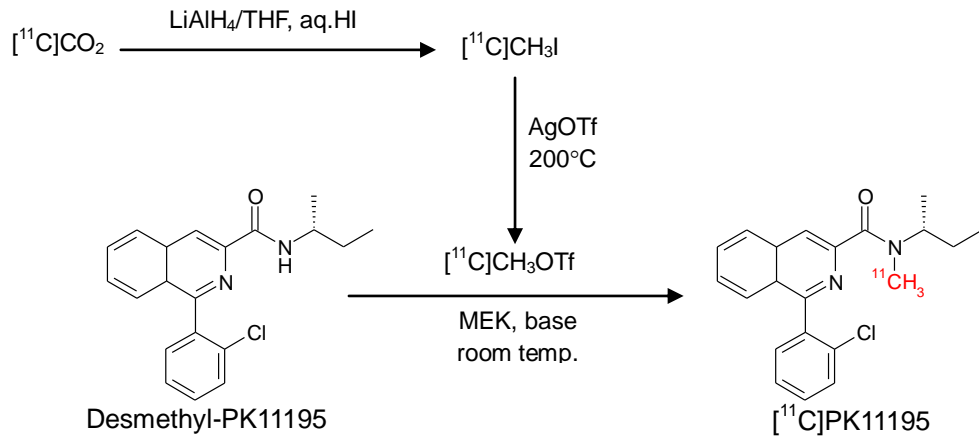


図 1 ^{11}C PK11195 の合成スキーム

2 方法

2.1 ループ標識合成装置

標識合成の中心となる住友重機製の合成装置は、トレイ上に電磁弁を配置し、その間をテフロン製の細い配管で連結してあり、このトレイを交換することによって、種々の ^{11}C メチル化標識化合物に対応できるように設計された応用性の高い装置である。

図 2 の ^{11}C PK11195 合成システムの系統図からわかるように、 ^{11}C ヨウ化メチル合成、銀トリフレート (AgOTf) カラム、標識反応ループ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) インジェクションユニット、および分取用 HPLC から構成されている。 ^{11}C メチルトリフレート (MeOTf) を標識前駆体とするループ法を適用するにあたって、既存のシステムに次のような改造を施した。まず、 200°C に加熱した AgOTf カラムを予備調整するため、流速制御したヘリウムガス (50 mL/min) を流せるように電磁弁を 2 方から 3 方弁に

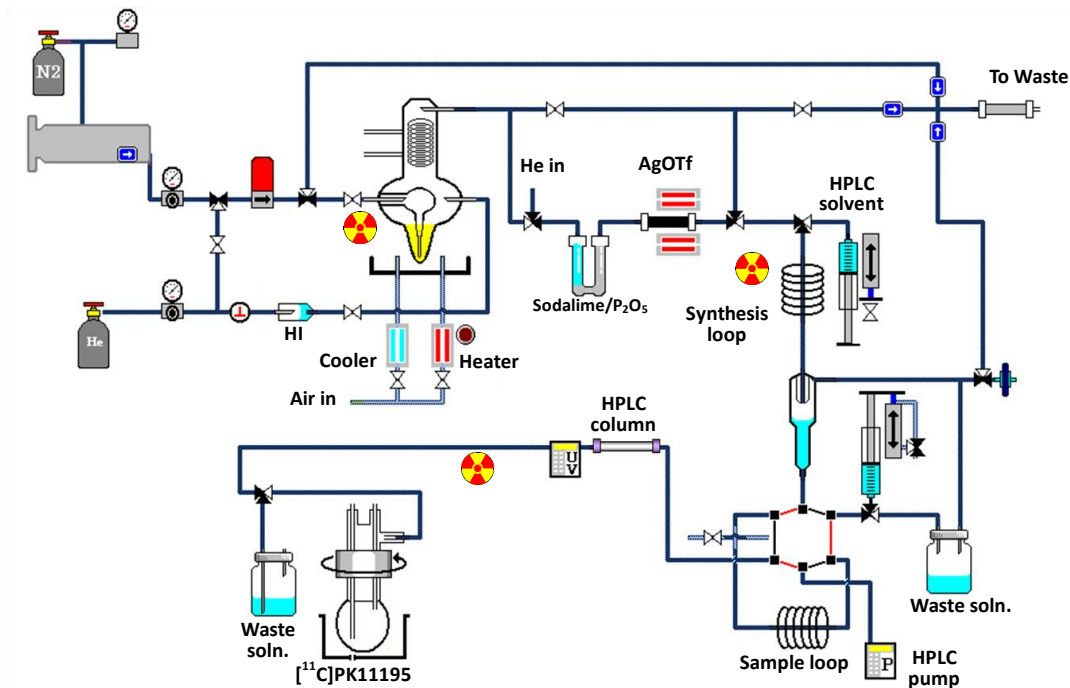


図 2 ループ標識法による ^{11}C メチル化合物合成装置の系統図

変更し、排ガスラインに至る電磁弁を解放することで常にヘリウムガスが流れるようにした。細いテフゼルチューブを巻いて作製したループ（内径 0.75 mm、約 50 cm）は、AgOTf カラムの下流に設置し、HPLC インジェクションユニットのガラス製リザーバーと接続した。また、ループ内の反応物を洗い出すためシリンジユニットを新たに追加し、液の流入の制御には 3 方電磁弁に変更して対応させた。また、従来、反応物の分離・精製はループから一旦ガラス製リザーバーに回収した後、HPLC ポンプを介して直接 HPLC カラムに流入させていたが、今回、新たに製作した HPLC インジェクションユニット使用し、リザーバーの反応液を HPLC サンプルループに充填、この後、バルブを切り替えることによって溶離液による希釈を気にすることなしに迅速にカラムに導入できるようになった。その結果として、ピーク波形の広がり改善され、他の成分の混入がない分離・分取が可能になった。

2.2 標識ループの調製

代表的な非プロトン性の反応溶媒としてメチルエチルケトン (MEK)、ジメチルホルムアミド (DMF) およびジメチルスルホキシド (DMSO) (60 μ L) を用い、約 1 mg の反応基質 Desmethyl-PK11195 (PharmaSynth AS, Estonia) を溶解した。塩基として 1 M テトラブチルアンモニウムヒドロキシド (TBAOH) のメタノール溶液 (3~9 μ L)、あるいは 1.2 M NaOH 溶液 (2~4 μ L) を加え、その全量を反応ループに注入し保持させた。

2.3 [11 C]メチルトリフレートによる標識反応

サイクロトロンのプロトン照射（電流値：30 μ A、照射時間：20 分間）によって得られる [11 C]CO₂ を常法によって [11 C]ヨウ化メチルに合成した後、ヘリウム気流下 (20~30 mL/min)、200°C に加熱した AgOTf-Graphpac GC カラムに通し、 [11 C]メチルトリフレート ([11 C]MeOTf) へ変換した後、これをループに導入し標識反応を行った。 [11 C]ヨウ化メチルから [11 C]MeOTf、および [11 C]メチル化標識反応はオンライン的に進行する。続いて、ループ内の反応物を 2 mL の HPLC 溶離液で洗い出し、HPLC インジェクションユニットのリザーバーに導き、HPLC で分離精製を行った。

HPLC の分取条件は以下のとおりである。

カラム：YMC-Pack ODS-A-323

溶離液：アセトニトリル/水=70/30

流速：4 mL/min

検出器：UV (235 nm)

3 結果および考察

ループ標識法は、細いチューブをループ状にしたものに基質反応溶液を入れ、高反応性の [11 C]メチルトリフレートと反応させるフロー式の迅速・高効率な標識合成法である。通常多用されているループ法は反応ループとして HPLC インジェクションループを用いる方法である⁶⁾。この方法は、標識反応後、インジェクションバルブを切り替えてループを通るように HPLC 溶離液を流すことでカラムに試料を導入できる簡便な方法であるが、カラムには常に試料液とともに空気の混入を伴い、そのため、カラム分離能の低下を招く危険性がある。また、通常、溶離液は通常ループを流れる構造になっているので、合成前のループの乾燥工程には十分注意を払う必要がある。それに対して本法の場合は、反応ループと HPLC インジェクションループの間にリザーバーを設置し、これに標識反応後のループをサンプルループ容量 (2 mL) に相当する溶媒で洗い流し、リザーバーに捕集してから完全に HPLC ループを試料で満たすため、空気の混入を全く気にすることなしに効率的に反応物を HPLC カラムに導入できる²⁾。

ループ法の特徴としてはオンラインで迅速に反応が進行するため、自動化に適している方法である。また、液体中にガスを吹き込む方法 (バブリング法) に比べ、合成プロセスが簡略化され、使用する反応溶媒量、

基質量を大幅に減じることができるため、HPLC 精製が容易になる。標識反応には加熱を必要としないため生成物の分解、副生成物への変換が抑えられるなどの優れた特徴を有する。

ループ標識の反応効率は反応溶媒と塩基の適切な選択が重要な因子になる。たとえば、ループ内の標識反応に揮発性の溶媒を使用すると、 $[^{11}\text{C}]$ メチルトリフレートがループ内を通過中に反応溶媒が蒸発し、このことが反応収率の低下を招く恐れがある。したがって、より高沸点の溶媒の使用が望ましく、また、その後のHPLC の分離・精製に影響を与えない溶媒を用いることが重要である。以上を考慮し、本研究では反応溶媒として高沸点で非プロトン性溶媒のメチルエチルケトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドを使用した。

図 3 に反応容器とループの放射能の推移を示した。 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ の導入速度はキャリアーガス 30 mL/min で実施した。さらに低い流速 (20 mL/min 以下) によって効率的な反応が期待できるが、本合成システムに採用されているフローコントローラの制御可能な最小流速は 50 mL/min 程度であるため、低速導入の効果を確かめることはできなかった。図からわかるように、 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルから変換された $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ を導入して約 25 秒でループの放射能が急激に上昇してくる。放射能が上がらなくなったところで、HPLC 溶媒でループ内の標識物を洗い出すことによって、捕集された放射能がほぼ完全になくなり、HPLC リザーバーに移送されたことが明確にわかる。 ^{11}C の吹き込み開始からリザーバーへの移送完了までに要した時間は約 9 分である。 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ は少量の水分の存在下でも容易に失活、分解してしまうので、ループ法の実施に当たっては、合成前にループを含む $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ が通過する細い配管を十分に乾燥させることが非常に重要になってくる。本合成においても、10 分以上の乾燥工程を合成プログラムに組み入れて実施している。

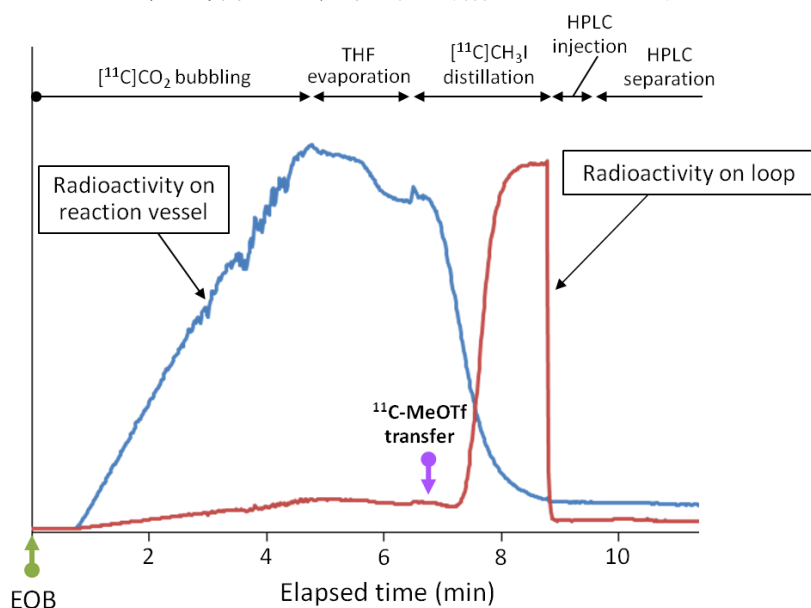
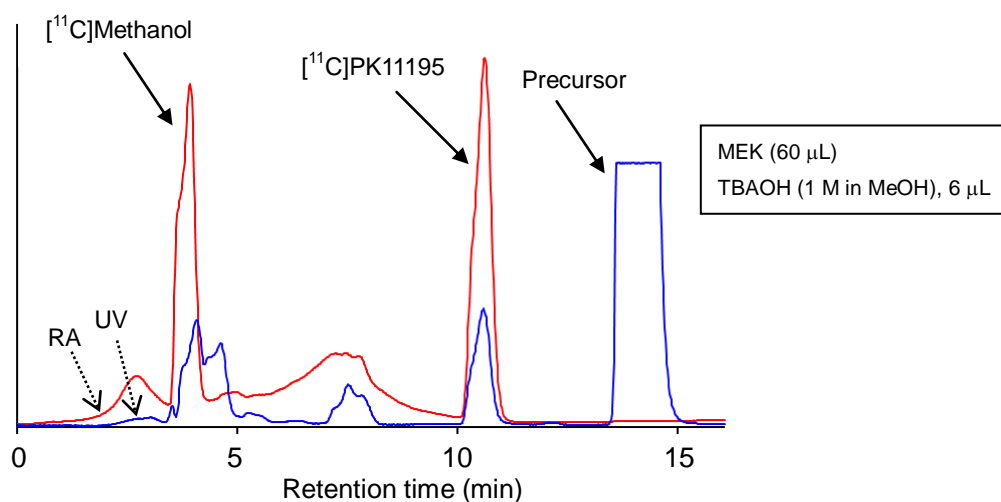


図 3 反応容器とループの放射能の推移

図 4 は UV および放射能検出器によって得られた分取 HPLC クロマトグラムの一例である。1 mg の反応基質と 60 μL の MEK、および 6 μL の 1M TBAOH を加えた基質反応液を用いて合成を実施した。HPLC 導入後 4 分で、 $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$ が溶離液によって分解されたと考えられる $[^{11}\text{C}]$ メタノールのピークが確認され、その後、比較的大きな不明瞭な放射能ピーク波形が認められるものの、以後はベースラインに戻り、保持時間約 11 分で成績体の $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ が明確に分離されているのがわかる。以上より、設定した HPLC 分離条件は妥当なものと判断され、また、 $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ の分取フラクションは高い化学的・放射化学的純度を有しているものと推測される。



Column: YMC ODS A-323 (10×300 mm), Mobile phase: MeCN / Water (70/30)
Flow rate: 4 ml/min, Detector: UV (235 nm)

図4 分取 HPLC 分離パターン

表1は異なる反応溶媒を用いた $[^{11}\text{C}]$ PK11195の合成結果である。溶媒はMEK、DMFおよびDMSOをいずれも60 μL 使用し、塩基として1 M TBAOHを3~9 μL (反応基質に対して3 μL は1当量に相当する)を添加した。合成収率はHPLCカラムに注入した全放射能(300~500 mCi)に対する $[^{11}\text{C}]$ PK11195の分離フラクションの放射能の比率(%)で表した。表より明らかなように、MEK中の反応基質に対して6 μL (2当量)のTBAOHを加えた時が最も良好で安定な収率が得られた。実収量においても30 μA 、20分間のプロトン照射条件で45~90 mCi (1.7~3.3 GBq)が得られた。しかしながら、3 μL (1当量)のTBAOHでは明らかに不足であり、その収率は不安定だった。データは示していないが、水系の塩基としてよく用いられるNaOH水溶液(1 N、2 μL)を加えて反応させた場合、 $[^{11}\text{C}]$ MeOTfが反応溶媒にほとんど捕集されなかった。この結果は、NaOH水溶液の微量の水によって $[^{11}\text{C}]$ MeOTfが分解したものと推測された。一方、DMFを用いた場合は、DMFのUVと一致する大きな放射能のピークが認められ、ほとんど目的標識体が得られない、あるいは低収率の結果をもたらした。DMF、DMSOは脱プロトンしやすく求核性の高い反応試薬の場合は溶媒と反応することが報告されているが^{7,8)}。本例でもDMFと $[^{11}\text{C}]$ MeOTfとが直接反応し、収率が低下するという結果になった。また、DMSOを使用した場合も同様の傾向があると考えられた。

今後は注射剤の有効性、安全性が発揮されるよう、溶解補助剤、放射線分解防止のための添加剤を適切に選択し、PET臨床薬剤としての品質を保持した $[^{11}\text{C}]$ PK11195の製剤化を行う予定である。

表1 $[^{11}\text{C}]$ PK11195合成における反応溶媒と塩基の影響

Solvent (60 μL)	Precursor (mg)	Base, TBAOH ^a (μL)	yield (%) ^b
MEK	1	3 (1 eq.)	1-26 (n=4)
		6 (2 eq.)	25-60 (n=7)
		9 (3 eq.)	22
DMF	1	6	2-15 (n=3)
DMSO	1	6	23

^a 1 M TBAOH (in MeOH)

^b Decay corrected yield (%) from radioactivity trapped in the loop to isolated $[^{11}\text{C}]$ PK11195 HPLC fraction.

まとめ

^{11}C PK11195 をループ法によって合成した。MEK (60 μL) と 1M TBAOH (6 μL) の組み合わせで良好な収率で目的物が得られた。HPLC 分取時の収量は 1.7~3.3 GBq (45~90 mCi) だった。しかしながら、水系の塩基 (NaOH) の存在下では ^{11}C MeOTf がほとんど捕集されなかった。DMF、DMSO は ^{11}C MeOTf と直接反応する可能性があり低収率だった。ループ法によって迅速・簡便に安定した収率で ^{11}C PK11195 の合成が達成された。

文献

1. Camsonne R. et al. Synthesis of N-(^{11}C)methyl, N-(methyl-1-propyl), (chloro-2-phenyl)-1-isoquinoline carboxamide-3(PK11195): a new ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *J Labelled Compd. Radiopharm.* 21: 985-991, 1984.
2. Hashimoto K.I. et al. Synthesis and evaluation of ^{11}C -PK11195 for in vivo study of peripheral-type benzodiazepine receptors using positron emission tomography. *Ann Nucl Med.* 3: 63-71, 1989.
3. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 12: 1005-1015, 2006.
4. Iwata R, Pascali C, Bogni A, Miyake Y, Yanai K, Ido T. A simple loop method for the automated preparation of [^{11}C]raclopride from [^{11}C]methyl triflate. *Appl Radiat Isotop.* 55: 17-22, 2001.
5. Iwata R, Pascali C, Bogni A, Yanai K, Kato M, Ido T, Ishiwata K. A combined loop-SPE method for the automated preparation of [^{11}C]doxepin. *J Labeld Compd Radiopharm.* 45: 271-280, 2002.
6. Wilson A A., Garcia A, Houle S, Vasdev N. Utility of commercial radiosynthetic modules in captive solvent [^{11}C]-methylation reactions. *J Label Compd Radiopharm.* 52: 490-492, 2009.
7. Mock BH, Zheng QH, Degrado TR. Avoid DMF when labeling with ^{11}C methyl triflate. *J Label Compd Radiopharm.* 50: S197, 2007
8. Verdurand M, Bort G, Tadino V, Bonnefoi F, Le Bars D, Zimmer L. Automated radiosynthesis of the Pittsburgh compound-B using a commercial synthesizer. *Nucl Med Commun.* 29: 920-926, 2008.

Effective synthesis of [¹¹C]PK11195 for clinical application by using loop method

K. Terasaki¹, Y. Ishikawa², T. Beppu³, M. Shozushima⁴, S. Goto⁵ and R. Iwata²

¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

²CYRIC, Tohoku University
Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

³Department of neurosurgery, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505, Japan

⁴Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-8505, Japan

⁵Japan Radioisotope Association, Nishina Memorial Cyclotron Center
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

[¹¹C]PK11195 is a specific ligand for the peripheral type benzodiazepine receptor and a marker of activated microglia, used to measure inflammation in neurologic disorders. A simple, rapid and fully automated preparation of [¹¹C]PK11195 was achieved with the automated methylation labelling system based on the loop method. To a solution desmethyl-PK11195 (1 mg) in MEK (60 μL) was added TBAOH (1 M in methanol, 6μL), and the solution loaded onto the loop. [¹¹C]MeOTf passed through the loop at room temperature. The products of the reaction were then transferred by passing mobile phase to a semi-preparative HPLC system. The method produced [¹¹C]PK11195 in approximately 20 min after end of bombardment, with a 25-60% radiochemical yield (decay corrected yield from radioactivity trapped in the loop to isolated HPLC fraction). The final [¹¹C]PK11195 activities are sufficient for several human PET. Moreover, the method can be successfully applied for routine clinical application, proved to be a simplified alternative to the bubbling method.