



ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA Y APLICACIONES NUCLEARES

**Estudio de la radiosíntesis de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 con  
potencial uso terapéutico**

TRABAJO FINAL

Tesista: Lic. Gastón O. Franceschinis

Directora: Mg. Noemí N. Nevares

Co-directora: Lic. Gabriela Peña

Lugar de trabajo: Laboratorio de Radiofarmacia, División Radiofarmacia Básica  
y Aplicada, edificio de Aplicaciones, Centro Atómico Ezeiza.



**UNSAM**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN



El presente trabajo experimental fue llevado a cabo en el Laboratorio de Radiofarmacia, de la División Radiofarmacia Básica y Aplicada, en el edificio de Aplicaciones del Centro Atómico Ezeiza (CAE) de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), desde el mes de septiembre hasta el mes de noviembre del 2022 bajo la dirección de la Mg. Noemí N. Nevares y la codirección de la Lic. Gabriela Peña. Nevares es investigadora de radiofarmacia en la CNEA, mientras que Peña es jefa de la Sección Procesos Radioquímicos de la División Ciclotrón, de la misma institución. El Laboratorio de Radiofarmacia se encuentra bajo la jefatura de la Esp. Ana Clarisa López Bularte, perteneciente al Departamento Investigación y Desarrollo en Radiofarmacia a cargo del Dr. Oscar Pozzi.

## **EXPRESIONES DE GRATITUD**

**Más allá de mi trabajo final, mirando todo mi recorrido por la Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares, puedo darme cuenta de que sin el apoyo de muchas personas que me acompañaron no hubiese logrado llegar hasta el final. Ni mucho menos, lo hubiese disfrutado como lo disfrute.**

**Es por esto que no quiero dejar de mencionar a aquellas personas que hicieron que mi paso por el Instituto Dan Beninson y mi trabajo final en el Laboratorio de Radiofarmacia los haya disfrutado de principio a fin. Así que acá está mi breve y sin duda incompleta lista de personas a las que quiero agradecer:**

**Primero que nada, quiero agradecer a mi directora de trabajo final, Noemí, quien no solo me enseñó con buena predisposición todo lo que sabía, sino que me abrió las puertas de su laboratorio y me hizo sentir parte desde el primer día. Sin duda su apoyo profesional y humano fue indispensable para el desarrollo de este trabajo. A ella mi mayor gratitud.**

**También quiero agradecerle a mi Co-directora Gabriela, que me brindó su apoyo profesional cada vez que lo necesite.**

**A Sandra, que además de ser una excelente profesora fue quien siempre me ayudó, escuchó, aconsejó y me dió la oportunidad de aprender y crecer profesionalmente realizando la ERAN.**

**A Ana Lerner, quien desde la escuela de verano del Instituto Dan Beninson en el año 2019, me motivó para hacer la Especialización.**

**A Clarisa, que siempre me enseñó con muy buena predisposición y me transmitió sus conocimientos de radiofarmacia de manera motivadora.**

**Con mucho cariño quiero agradecer a mis compañeras Carla, Génesis, Solange y Xiomara, a quienes la ERAN me permitió conocer en el aula y compartir con ellas todo este recorrido. A ellas gracias por el aguante y la buena onda.**

**También quiero agradecer a aquellos docentes que enseñaban desde la pasión y me motivaban a seguir aprendiendo.**

**Finalmente quiero agradecer a Pablo, cuyo apoyo incondicional y constante motivación hizo que pueda cumplir un logro más.**

## ÍNDICE

EXPRESIONES DE GRATITUD	4
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	11
1.1 Introducción	13
1.2 Cáncer de próstata metastásico	14
1.2.1 Terapias actuales	15
1.2.2 Terapias basadas en radiofármacos	16
1.2.2.1 Radiofármacos	16
1.2.2.2 Características de los radiofármacos	16
1.2.2.3 Radiofármacos dirigidos al antígeno PSMA	18
1.2.2.4 Radiofármacos como terapias emergentes	20
1.3 Características del $^{177}\text{Lu}$	22
1.3.1 Actividad específica y su relación con la producción de $^{177}\text{Lu}$	24
1.4 Radiosíntesis de $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617	26
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo general	33
2.2 Objetivos específicos	33
CAPÍTULO 3: MARCACIÓN	35
3.1 Introducción	37
3.2 Materiales y métodos	37
3.2.1 Materiales	37

3.2.2 Métodos	37
3.2.2.1 Obtención del $^{177}\text{Lu}$	37
3.2.2.2 Medición de la actividad con activímetro	38
3.2.2.3 Complejación de $^{177}\text{Lu}$ con DOTA del PSMA-617	39
3.2.2.4 Purificación	40
3.3 Resultados y discusiones parciales	40
3.3.1 PSMA-617	41
3.3.2 $^{177}\text{Lu}$ obtenido por irradiación de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$	42
3.3.3 Actividad del $^{177}\text{Lu}$ obtenida del RA-3	42
3.3.4 Radiosíntesis	44
CAPÍTULO 4: CONTROL DE CALIDAD	47
4.1 Introducción	49
4.2 Materiales y métodos	49
4.2.1 Materiales	49
4.2.2 Métodos	49
4.2.2.1 Porcentaje de incorporación determinado por ITLC	49
4.2.2.2 Pureza radioquímica mediante radio PR-HPLC	50
4.3 Resultados y discusiones parciales	51
4.3.1 Porcentaje de incorporación	51
4.3.2 Pureza radioquímica	54
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	63
5.1 Discusión final	65
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA A FUTURO	71

6.1 Conclusiones finales	73
6.2 Perspectiva a futuro	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXO I REGISTROS	81
ANEXO II RESULTADOS DE ITLC	85

## RESUMEN

El antígeno de membrana específico de próstata se expresa en células epiteliales de la próstata, pero se sobre expresa en las células de cáncer de próstata metastásico; lo cual hace que sea una diana apropiada como objetivo molecular en diagnóstico y tratamiento de esta patología. Debido a esto se han desarrollado inhibidores de este receptor (como el PSMA-617) que presentan gran afinidad y selectividad. La evidencia científica sugiere que el complejo formado entre el Lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) y el PSMA-617 es un radiofármaco que muestra excelentes resultados contra el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración debido a los beneficios clínicos encontrados en las propiedades radioquímicas del  $^{177}\text{Lu}$ .

Actualmente en Argentina, no se encuentra este tipo de terapias como primera opción, sino más bien, por carecer de registro comercial se utiliza como terapia compasiva cuando los tratamientos de primera línea no presentan respuesta favorable. Es por este motivo, y debido al incremento de esta patología en el mundo entero, que el presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de la marcación del PSMA-617 con  $^{177}\text{Lu}$  para evaluar la factibilidad de poder sintetizar el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 en nuestro país. Aprovechando la posibilidad de irradiación en el reactor nuclear RA-3 (CAE, Ezeiza) para obtener el radionucleido.

Se llevó a cabo la obtención del  $^{177}\text{Lu}$  partiendo de un precursor frío, se realizó la optimización de los parámetros de marcación, como así también el correspondiente control de calidad y análisis de estabilidad a 24 horas.

## ABSTRACT

Prostate specific membrane antigen is expressed on prostate epithelial cells, but is overexpressed on metastatic prostate cancer cells. This makes a white appropriate molecular target in the diagnosis and treatment of this pathology, with inhibitors of this receptor (such as PSMA-617) having been developed with great affinity and selectivity. Scientific evidence suggests that the complex formed between Lutetium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) and PSMA-617 is a radiopharmaceutical that shows excellent results against castration resistant metastatic prostate cancer due to the clinical benefits found in the radiochemical properties of  $^{177}\text{Lu}$ .

Currently in Argentina, this type of therapy is not found as a first option, otherwise, due to lack of commercial registration, it is used as compassionate therapy when first line treatments do not present a favorable response. It is for this reason, and due to the increase of this pathology throughout the world, that the present work aimed to study the labeling of PSMA-617 with  $^{177}\text{Lu}$  to evaluate the feasibility of synthesize  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 in our country. Taking advantage of the possibility of irradiation of the RA-3 nuclear reactor (CAE, Ezeiza) to obtain the radionuclide.

The  $^{177}\text{Lu}$  was obtained starting from a cold precursor, the optimization of the labeling parameters was carried out, as well as the corresponding quality control and stability analysis at 24 hours.

---

# **CAPÍTULO 1**

## **MARCO TEÓRICO**

---

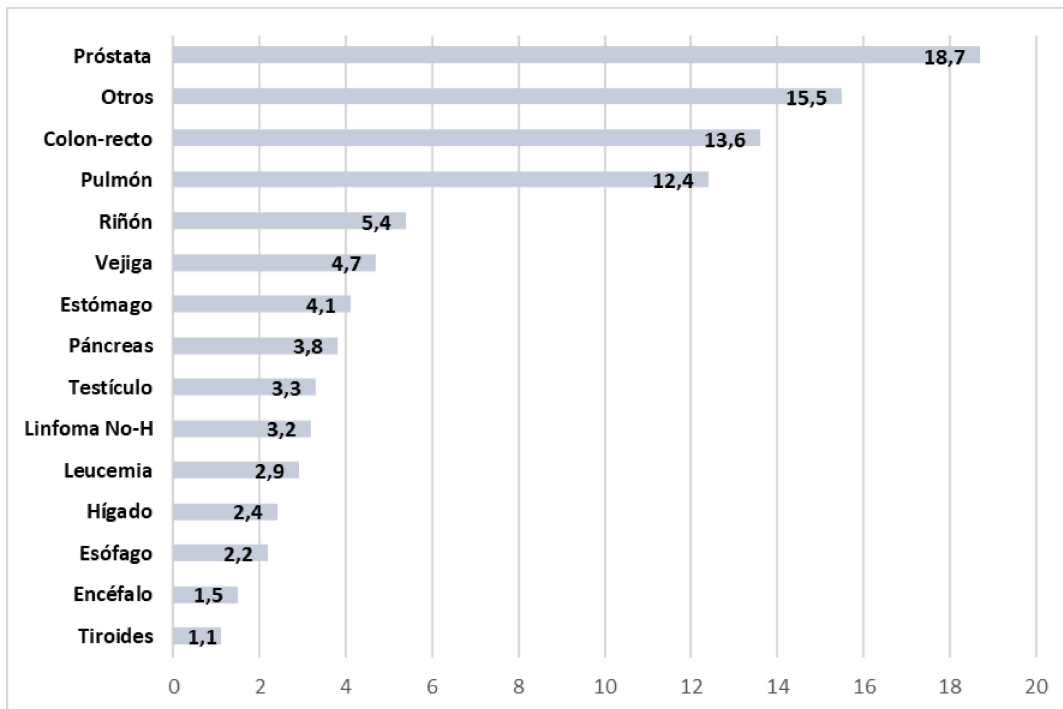


## 1.1 Introducción

El cáncer de próstata (PCa) es la neoplasia maligna más común en los hombres, representa el 7,1% de todos los cánceres diagnosticados, es el segundo más frecuente y la quinta causa de muerte en todo el mundo, lo que representa 3,8% del total de muertes por cáncer (Bray, F. et al. 2018; Prashanth, R. 2019).

El diagnóstico de esta enfermedad se da con mayor asiduidad en países desarrollados, mientras que la incidencia y mortalidad se encuentra relacionado con el aumento de la edad, teniendo una tasa de diagnóstico del 65% en este tipo de cáncer en hombres mayores de 65 años (Prashanth, R. 2019).

En cuanto a Argentina, según las estadísticas del Ministerio de Salud de la Nación en el año 2020, Argentina se encuentra en una incidencia media-alta de cáncer respecto a la media mundial y quinto en la región de América Latina. El Pca se encuentra como el de mayor incidencia en hombres representando el 18,7% del total de casos, como se ve en la Figura 1. La tasa de mortalidad para el país en el año 2019 fue de 11,10 defunciones por cada cien mil varones para esta enfermedad y representó el 11,75% del total de defunciones por cáncer en varones seguido de pulmón con 18,88% y colon-recto con 12,45% del total de casos (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).



**Figura 1.** Distribución de casos incidentes de cáncer en varones estimados por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer para Argentina en 2020, según localizaciones tumorales más frecuentes. Gráfico adaptado del Instituto Nacional del Cáncer, 2020.

Se estima que la mortalidad de esta enfermedad se duplicará para el año 2040 en todo el mundo. Este dato surge de los limitados recursos en investigación y desarrollo de métodos diagnósticos y terapias mejoradas, lo que conlleva a que se detecte en etapas avanzadas en las cuales los tratamientos son poco efectivos. Sumado a este hecho se encuentra que en varios países la atención y asistencia médica no son beneficios ampliamente accesibles a toda la población, lo que puede proporcionar un incremento en la mortalidad (Ferlay, J. et al. 2019).

## 1.2 Cáncer de próstata metastásico

Cuando el cáncer de próstata inicia su etapa metastásica una estrategia es tratarlo reduciendo los valores de testosterona sérica hasta niveles de

castración (<50 ng/dL). Sin embargo, puede continuar progresando incluso a niveles de castración de testosterona, a este caso se lo denomina cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (CPRCm). Las diferencias terapéuticas entre ambos no son significativas ya que los abordajes actuales tienden a la aprobación de fármacos que tengan acción en ambos casos (Swami, U. et al. 2020).

### **1.2.1 Terapias actuales**

En los casos avanzados del 10 al 20% del total de casos progresa a CPRCm, de los cuales el 90% desarrolla metástasis ósea que causa dolor, fracturas y morbilidad (Kirby, M. et al. 2011). Cuando se llega a este estadio, se utilizan terapias como la privación de andrógenos, la inmunoterapia o la quimioterapia con docetaxel, aunque existen pocas opciones para los pacientes que no son respondedores a este tipo de alternativas (Yadav, M. et al. 2018).

Algunas terapias que se utilizan actualmente en estadios metastásicos de PCa son el docetaxel (Zhu, M. L. et al. 2010), cabazitaxel (Van Soest, R. J. et al. 2015), abiraterona (De Bono, J. S. et al. 2011) y enzalutamida (Beer, T. M. et al. 2014).

Tanto el docetaxel como el cabazitaxel son utilizados como primera línea en la terapia contra el CPRCm induciendo la privación de andrógenos, debido a que el crecimiento del PCa depende en gran medida de los andrógenos. Estos fármacos quimioterapéuticos actúan interrumpiendo la mitosis de las células cancerosas (Kraus, L. A. et al. 2003). La abiraterona actúa bloqueando la producción intratumoral de la testosterona y sus metabolitos inhibiendo directamente los receptores de andrógeno (Li, z. et al. 2016). La enzalutamida altera la unión de andrógenos al receptor de andrógenos, la translocación nuclear al mismo receptor y la unión al ADN (Tran, C. et al. 2009).

La estrecha relación entre el PCa y la vía de señalización de andrógenos presenta la capacidad que impulsa la progresión del tumor, lo que la hace un blanco terapéutico interesante. Si bien la terapia de privación de andrógenos es el tratamiento de primera línea contra el CPRCm puede ocurrir una respuesta

posterior al tratamiento que lleva a la aparición de un estado de PCa independiente de los andrógenos que hace progresar la enfermedad (Shahinian, V. B. et al. 2005). Los avances en nuevas estrategias llevan el esfuerzo a terapias combinadas de respuesta mejorada (Zhu, M. L. et al. 2010).

## **1.2.2 Terapias basadas en radiofármacos.**

### **1.2.2.1 Radiofármacos**

Se denomina radiofármaco a aquella sustancia que gracias a su calidad, forma farmacéutica y emisión radiactiva puede ser utilizada en diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades en los seres vivos sin ejercer acción farmacológica alguna. El radiofármaco es un medicamento que representa una fuente de radiación interna administrada a un paciente por diferentes vías. Cuando son utilizados para realizar diagnóstico, se aprovecha la radiación que producen los radionucleidos para ser detectados por equipos, como por ejemplos tomógrafos de emisión de positrones o cámaras gamma. Si lo que se requiere es hacer tratamiento, se utiliza el efecto deletéreo de la radiación sobre las células, como por ejemplo tratamientos oncológicos o del dolor.

Se puede clasificar a los radiofármacos de la siguiente manera:

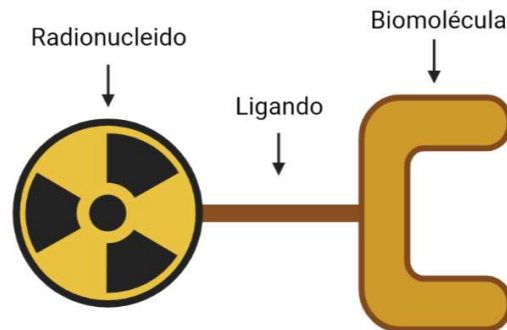
- Según su forma química: orgánicos e inorgánicos.
- Según su dispensación: soluciones (o suspensiones), sólidos (cápsulas), o Kits fríos.
- Según su producción: radioisótopos primarios, moléculas marcadas y radiofármacos para marcación posterior.

Las vías de administración pueden ser: oral, parenteral o inhalatoria y dependen directamente del tipo de radiofármaco y el blanco del mismo.

### **1.2.2.2 Características de los radiofármacos**

En general un radiofármaco está constituido por un radionucleido unido a una biomolécula que actúa como transportador (Figura 2). Aunque en muy

pocos casos el radioisótopo por sí mismo puede actuar como radiofármaco, un ejemplo de este es el caso del yoduro de sodio, con Yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ) para terapia de patologías de la tiroides.



**Figura 2:** Esquema realizado con BioRender© 2022. Se muestra un radiofármaco típico, se indica el ligando que une al radionucleido junto a la biomolécula.

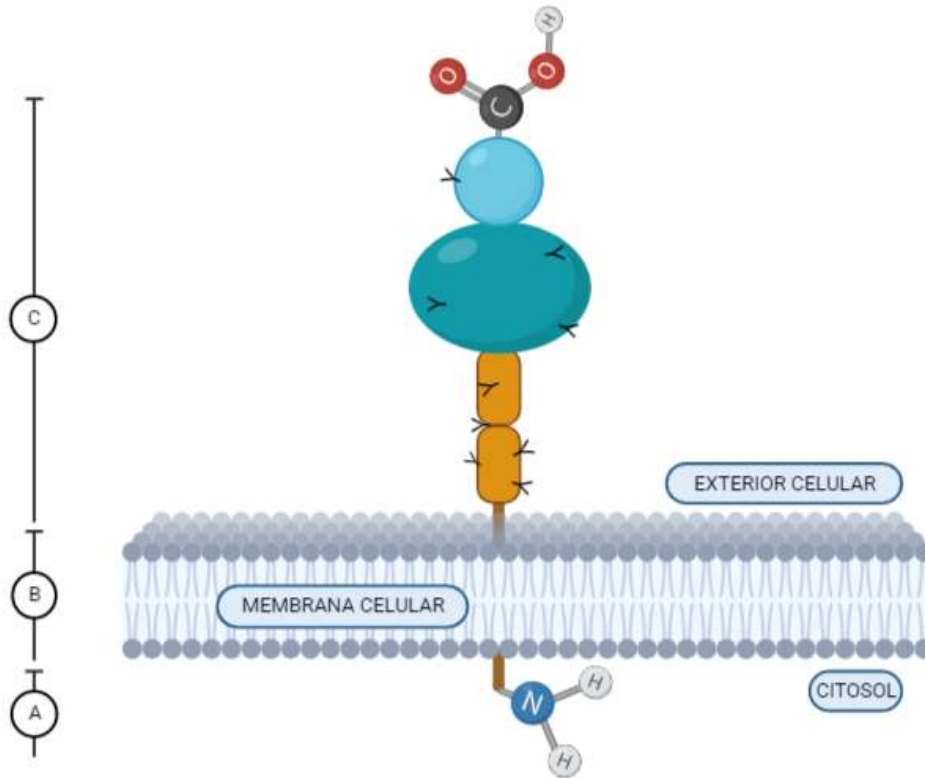
El radionucleido se elige de acuerdo a sus características nucleares como son el tipo de radiación emitida, el período de semidesintegración, la energía de emisión, toxicidad química, disponibilidad y costo. Mientras que la biomolécula cumple el rol de dirigir el radionucleido selectivamente a un tejido específico en respuesta a condiciones fisiológicas. La elección de esta molécula se encuentra dada por la especificidad que ésta posea por el blanco de acción final, la participación que pueda tener en procesos metabólicos (propiedades biológicas), toxicidad, y factibilidad de ser unida al radionucleido.

Independientemente del uso del radiofármaco se debe cumplir que su disponibilidad sea asequible al momento de utilizarlo, es decir, no solo el radiofármaco *per se* condiciona su utilización, sino que su fácil disponibilidad en los servicios de medicina nuclear hace que el diagnóstico o tratamiento sea un método elegido por el profesional médico hacia el paciente. Por consiguiente, el radiofármaco debe contar con un método de producción accesible o estar disponible comercialmente, debe ser de bajo costo y se debe tener en cuenta que la distancia geográfica entre el usuario y el proveedor sea la adecuada

teniendo en cuenta el período de semidesintegración del radionucleido y la estabilidad de la molécula marcada.

### **1.2.2.3 Radiofármacos dirigidos al antígeno PSMA**

En el último tiempo, la investigación de radiofármacos basados en el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) ha ofrecido un desarrollo prometedor para esta patología. El PSMA es una glicoproteína transmembrana de 750 aminoácidos (Figura 3), multifuncional, que se encuentra involucrada en procesos celulares como la absorción de nutrientes, la migración, proliferación, entre otros (Rajasekaran A. K. et al. 2005). En condiciones no patológicas se expresa en bajos niveles en el epitelio prostático, sin embargo, se sobreexpresa hasta 1000 veces más en las células de PCa (Perera, M. et al. 2016). El receptor de PSMA tiene un proceso de internalización que permite la endocitosis de las proteínas unidas en la superficie de la célula que se dirigen a un compartimento endosómico, lo que permite que el PSMA radiomarcado con radionucleidos, como el  $^{177}\text{Lu}$ , se concentren dentro de la célula, por esto es una buena opción de diana tanto para diagnóstico como para tratamiento (Emmett, L. et al. 2017).



**Figura 3:** Esquema realizado con BioRender© 2022. Diagrama de la estructura del antígeno de membrana específico de la próstata. Se muestra el dominio citoplasmático (A) corto con un grupo amino terminal, una región transmembrana hidrofóbica (B) y un dominio extracelular (C) de mayor tamaño con un grupo carboxilo terminal. La región extracelular se encuentra altamente glicosilada (Y) con nueve sitios de N-glicosilación. La región (A) abarca los residuos 1 a 19, la (B) de 20 a 44 y la (C) de 45 a 750 (Rajasekaran A. K. et al. 2005).

Hasta que se desarrollaron los inhibidores de PSMA como agentes marcados con radionucleidos, como el PSMA-617 y PSMA-I&T, las terapias con radionucleidos eran exclusivas como tratamientos paliativos del dolor óseo. Los métodos podían incluir etilendiamino-tetrametilen-fosfonato marcado con  $^{153}\text{Sm}$ , difosfonato marcado con  $^{177}\text{Lu}$ , Radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ ) como cloruro (Xofigo de Bayer) y radioinmunoterapia. Sin embargo, como efecto no deseado los

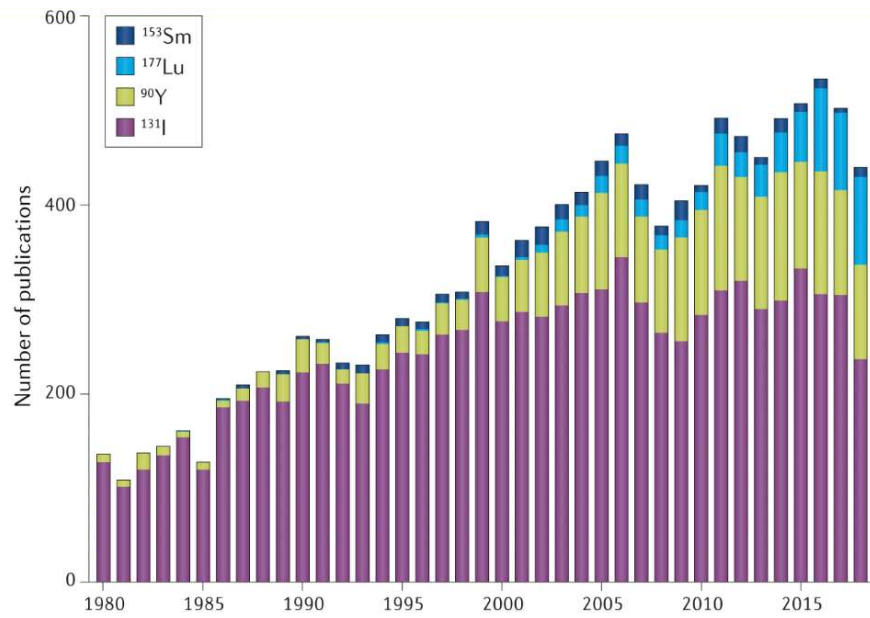
agentes dirigidos al hueso y la radioinmunoterapia producen daño a la médula ósea (Yadav, M. et al. 2018).

Los compuestos PSMA-617 y PSMA-I&T marcados con  $^{177}\text{Lu}$ , dan esperanza a la terapia de CPRCm dado que son una alternativa viable que desde el punto de vista dosimétrico resultan seguros para tratar este tipo de pacientes. El  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 presenta como órgano limitante de la dosis radiactiva la glándula parótida principalmente, quedando en segundo lugar los riñones y la médula ósea que son órganos generalmente limitantes en los tratamientos con isótopos radiactivos (Kabasakal, L. et al 2015). Además, el compuesto PSMA-617 exhibe una alta captación tumoral específica de PSMA, una rápida excreción renal, lo que brinda ventajas clínicas desde el punto de vista de la endoradioterapia y la capacidad para obtener imágenes con equipos adecuados (Benesova, M. et al. 2015). En cuanto a la efectividad terapéutica, los estudios sobre la eficacia han mostrado resultados prometedores y se han visto casos de mejoras significativas en la calidad de vida de los pacientes con CPRCm cuya enfermedad ha avanzado a pesar de las opciones terapéuticas utilizadas (Hofman, M. S. et al. 2018).

Actualmente en nuestro país, el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA, no se presenta como una alternativa de primera línea en el tratamiento de esta enfermedad, sino más bien, se administra de manera compasiva y en casos limitados cuando se han agotado todas las opciones terapéuticas tradicionales.

#### **1.2.2.4 Radiofármacos como terapias emergentes**

Las investigaciones de los radionucleidos que son candidatos para terapia han ido en incremento en los últimos años, como se muestra en la Figura 4, dentro de los de interés creciente se encuentra el  $^{177}\text{Lu}$  y el Itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) (Sgouros, G. et al. 2020).



**Figura 4:** Número de publicaciones de los radioisótopos utilizados en radiofármacos en función de los años, desde 1980 hasta el 2016 para emisores de partículas β- (Sgouros, G. et al. 2020).

Empresas farmacéuticas multinacionales se encuentran actualmente investigando radiofármacos con inversiones millonarias, fuertemente impulsadas por el precedente de la aprobación del Lutathera por parte de la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos en el 2018. Si bien anteriormente los reguladores de Europa y Estados Unidos ya habían autorizado la comercialización de algunos radiofármacos, la mayoría de estos resultaban ser ineficaces lo que los llevaba a ser fracasos comerciales para las empresas que los producían. El primer éxito comercial de los radiofármacos actuales lo tuvo el  $^{223}\text{RaCl}_2$ , comercialmente llamado Xofigo, el cual es una sal que se deposita en hueso por intercambio del calcio por el radio y se utiliza como paliativo del dolor. Este fue desarrollado por Algeta, una empresa noruega que recibió financiación de Bayer para el ensayo clínico de fase 3 del Xofigo. Luego de la aprobación de éste en el año 2013, Bayer compró Algeta por 3 mil millones de dólares. Años más tarde, en el 2017, el gigante farmacéutico Novartis compró Lutathera, que utiliza  $^{177}\text{Lu}$ , por el valor de 3,9 mil millones de dólares a la empresa francesa Advanced Accelerator Applications.

Al año siguiente Novartis también adquirió por un valor de 2,1 mil millones de dólares la empresa estadounidense Endocyte la cual estaba desarrollando un candidato terapéutico que utilizaba PSMA-617 radiomarcado con  $^{177}\text{Lu}$  para cáncer de próstata que al momento de ser adquirida por Novartis no contaba con los ensayos de fase 3 culminados (Dolgin, E. 2018).

El interés y éxito actual por este tipo de terapias se encuentra íntimamente relacionado con la naturaleza de la tecnología que acompaña al radionucleido en el radiofármaco. Las biomoléculas dirigidas de manera específica contra los tumores se encuentran disponibles hace apenas un par de décadas y se cuenta con mejores herramientas tecnológicas para desarrollarlas (Dolgin, E. 2018). En este sentido, las radioterapias dirigidas (endoradioterapia) presentan serias ventajas respecto a la radioterapia externa, lográndose como resultado una mayor dosis en las células diana con detrimento de las células malignas y una menor irradiación de células sanas circundantes (Sgouros, G. et al. 2020).

### 1.3 Características del $^{177}\text{Lu}$

Hoy en día existe un creciente interés en el  $^{177}\text{Lu}$  como radionucleido de uso terapéutico. La elección de este radiometal es debida a sus propiedades físicas deseables. Este radionucleido es un emisor  $\beta^-$ , presenta rango energético de  $E_{\beta^- \text{máxima}} = 498 \text{ keV}$  y su período de semidesintegración es  $T_{1/2} = 6,7 \text{ días}$ . La penetración tisular de la emisión radiactiva es  $< 2 \text{ mm}$ , este rango de emisión  $\beta^-$  proporciona una mejor irradiación de tumores pequeños, estas características lo hacen atractivo cuando se lo compara con por ejemplo otros radionucleidos como se ve en la Tabla 1. Además, el período de semidesintegración del  $^{177}\text{Lu}$  lo hace adecuado para llegar a tiempo a células diana y entregarles alta actividad (Emmett, L. et al. 2017).

**Tabla 1:** Comparación de radionucleidos utilizados en terapia ordenados en rango creciente, se distinguen sus energías de emisión  $\beta$ - y  $\gamma$ .

Radionucleido	$T_{1/2}$ (días)	Radiación (Mev)	Rango (mm)
$^{177}\text{Lu}$	6,7	$\beta$ - 0,497; $\gamma$ 0,208	1,5
$^{67}\text{Cu}$	2,58	$\beta$ - 0,54; $\gamma$ 0,185	1,8
$^{131}\text{I}$	8	$\beta$ - 0,6; $\gamma$ 0,364	2
$^{186}\text{Re}$	3,77	$\beta$ - 1,08; $\gamma$ 0,131	5
$^{90}\text{Y}$	2,67	$\beta$ - 2,28	12

El estado de oxidación más estable del lutecio es +3, en este sentido es sabido que los cationes metálicos trivalentes en solución se caracterizan por la fuerte tendencia a formar complejos con átomos donantes de electrones como el oxígeno, nitrógeno y flúor. Si bien los detalles estructurales del lutecio con los ligandos no están del todo dilucidados, este metal forma complejos estables con ligandos del tipo poliamino o policarboxilo tanto cíclicos como alifáticos. Entre estos ligandos se encuentra el ácido 1,4,7,10 - tetraaza ciclododecano 1,4,7,10 - tetraacéticos (DOTA) que forma complejos con lutecio termodinámicamente estables (Banerjee, S. et al. 2015).

Esta propiedad fue utilizada en el compuesto análogo de somatostatina DOTA-Tyr3-octreotate (DOTA-TATE), el cual fue marcado con  $^{177}\text{Lu}$  demostrando exitosos resultados en pacientes con tumores neuroendocrinos, siendo este hecho el ejemplo más importante que ha contribuido al interés

actual del  $^{177}\text{Lu}$  como radionucleido terapéutico (Zaknun, J. et al. 2013). De hecho, el éxito del Lu-DOTA-TATE lo condujo a que en el año 2018 fuera el primer tratamiento de receptor específico utilizando  $^{177}\text{Lu}$ , aprobado por la FDA para tratamiento de tumores neuroendocrinos con receptores de somatostatina (Jia, A. et al. 2022), el cual sienta un precedente para la investigación y posterior aprobación de este tipo de tecnologías terapéuticas.

### 1.3.1 Actividad específica y su relación con la producción de $^{177}\text{Lu}$

La actividad específica (AE) es la actividad de un radionucleido específico por unidad de masa del elemento o forma química de la que es parte. Esta puede ser con portador (c.a; por las siglas de *carrier added*) que es una especie química isotópica presente junto con el radioisótopo o libre de portador (n.c.a; por las siglas *non carrier added*) cuando no hay adición o presencia de portador. En esta última situación la actividad final obtenida sería la más cercana a la máxima teórica.

Durante la utilización de  $^{177}\text{Lu}$  se consideran dos tipos de AE, la actividad específica de producción (AE<sub>p</sub>) que es la que se mide inmediatamente al finalizar la reacción nuclear de producción (e.o.b; por las siglas de *end of bombardment*) y la actividad específica de marcación (AE<sub>m</sub>) que brinda la AE que se obtuvo con el proceso de radiosíntesis (Breeman, W. 2012). Las ecuaciones correspondientes a AE<sub>p</sub> y AE<sub>m</sub> se muestran a continuación:

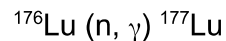
$$AE_p = \frac{\text{Actividad de } ^{177}\text{Lu}}{\Sigma \text{ masa de } ^{175}+^{176}\text{Lu}}$$

$$AE_m = \frac{\text{Actividad de } ^{177}\text{Lu}}{\Sigma \text{ masa de ligando}}$$

La AE<sub>m</sub> se encuentra directamente relacionada con la AE<sub>p</sub> y ésta a su vez con el método de producción del radionucleido. El radioisótopo  $^{177}\text{Lu}$  se

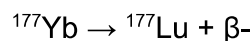
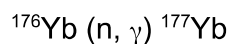
produce actualmente utilizando un reactor nuclear mediante dos rutas denominadas directa e indirecta.

- La vía directa implica la siguiente reacción nuclear:



Para este método se utiliza un blanco enriquecido en el isótopo  $^{176}\text{Lu}$  (sección eficaz de 2020b), este es irradiado por neutrones térmicos para dar como producto  $^{177}\text{Lu}$ , el cual se obtendrá c.a.; debido a que se tiene una mezcla de isótopos 175, 176 y 177 de lutecio más el radioisótopo  $^{177m}\text{Lu}$ . La AEp en este caso irá decreciendo en el tiempo debido a que disminuirá la actividad de  $^{177}\text{Lu}$  pero la masa del portador permanecerá constante.

- La vía indirecta sigue la siguiente reacción nuclear:



En este método el blanco es  $^{176}\text{Yb}$  (Iterbio-176, de sección eficaz 2,85b) el cual produce  $^{177}\text{Yb}$ , el cual decae ( $T_{1/2} = 1,9 \text{ h}$ ) generando  $^{177}\text{Lu}$  y emitiendo partículas  $\beta^-$ . Este tipo de producción de  $^{177}\text{Lu}$  es n.c.a y cuenta con la ventaja de que no se formará el radioisótopo  $^{177m}\text{Lu}$ . El producto final será de alta AEp, sin embargo, debido a su pequeña sección eficaz, este método de producción no es muy utilizado ya que pocos reactores nucleares en el mundo son capaces de alcanzar los flujos neutrónicos capaces de llevar a cabo la reacción nuclear del  $^{176}\text{Yb}$ .

En Argentina, el  $^{177}\text{Lu}$  se obtiene por el método directo en el reactor nuclear RA-3 en el cual se bombardea con neutrones térmicos una ampolla de cuarzo que contiene un blanco de  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$  enriquecido al 86,5% en  $^{176}\text{Lu}$ . Este método de obtención del  $^{177}\text{Lu}$  presenta la limitación que la AEp e.o.b experimental del radionucleido es media, AEp = 444-592 MBq/ $\mu\text{g}$  (12-16 mCi/ $\mu\text{g}$ , según datos obtenidos con anterioridad por el Laboratorio de Radioquímica Básica y Datos Nucleares, Gerencia de Área Aplicaciones de la Tecnología Nuclear, CAE, CNEA) y depende de las condiciones de irradiación, así como del flujo de neutrones del reactor nuclear.

Conforme a la información del *GUIDELINES* realizado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA) en colaboración con Asociación Europea de Medicina Nuclear (EANM) y la Sociedad de Medicina Nuclear e Imágenes Moleculares (SNMMI) en el año 2013, la AEp del  $^{177}\text{Lu}$  para ser utilizado en terapia, debe ser de 740 MBq/ $\mu\text{g}$  (20 mCi/ $\mu\text{g}$ ) para que en el momento de realizar la marcación se cuente con una AEp de 555 MBq/ $\mu\text{g}$  (15 mCi/ $\mu\text{g}$ ). Sin embargo, esta última no debe estar por debajo de 370 MBq/ $\mu\text{g}$  (10 mCi/ $\mu\text{g}$ ) (Zaknun, J. et al. 2013). Con lo cual, a *priori*, la AEp obtenida en el RA-3 sería adecuada para realizar la marcación de una molécula destinada a uso terapéutico.

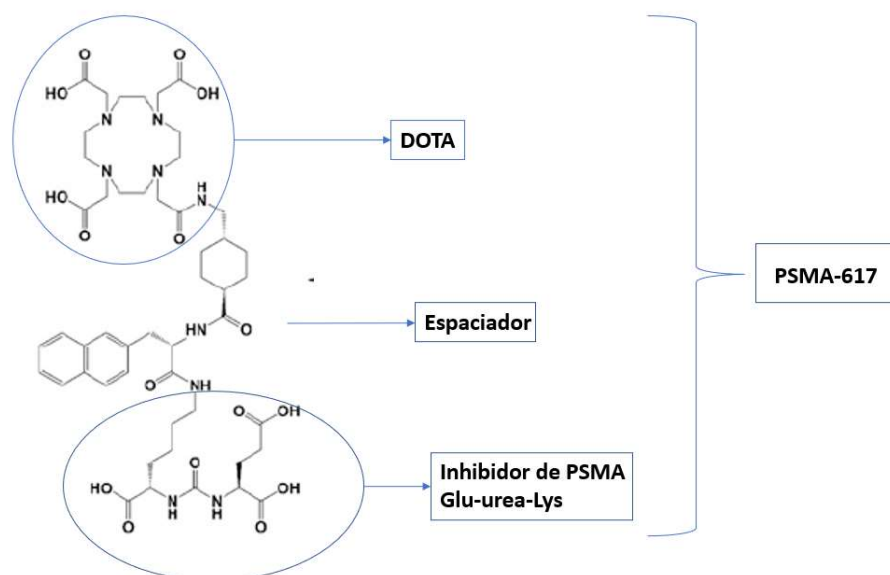
Para que este último hecho sea factible en nuestro país, cabe destacar que el tiempo entre e.o.b del blanco y la marcación de la molécula ligando debe ser reducido, de manera de aprovechar la mayor actividad posible y cumplir con los valores publicados por la *GUIDELINES*, ya que como se mencionó, bajo la vía directa de producción, donde se obtiene  $^{177}\text{Lu}$  c.a; la AE decrece en el tiempo. Situación que también debe tenerse en cuenta al momento de sintetizar un radiofármaco dirigido a pacientes.

#### **1.4 Radiosíntesis de $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617**

Los resultados prometedores del ligando PSMA marcado con  $^{177}\text{Lu}$  han llevado a que se investiguen diversas alternativas, como el PSMA-617 (Bräuer, A. et al. 2017) y PSMA-I&T (Heck, M. M. et al. 2019). Las conclusiones observadas en bibliografía revelan una supervivencia global más prolongada en los pacientes tratados con estos métodos. Adicionalmente, estos resultados suman una leve toxicidad por parte de estos radiofármacos (Emmett, L. et al. 2017), lo que hace más atractivo este tipo de tratamientos. En consecuencia, se deben desarrollar métodos de producción de rutina convenientes y dentro del marco de las normas GMP (buenas prácticas de manufactura) de modo de trasladar estos productos del laboratorio a la radiofarmacia clínica donde serán aplicados en pacientes.

La producción de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 puede realizarse mediante diversas estrategias, como una marcación manual en la cual se obtiene un protocolo de síntesis en el que operador manipula las soluciones correspondientemente, o bien, puede utilizarse un módulo de síntesis semiautomático como los Trasis mini All in One comerciales, en el cual la producción del radiofármaco se encuentra confinada dentro del equipo y controlada por una computadora. En ambos casos se conserva el esfuerzo por cumplir con las normas GMP. En el presente plan de trabajo experimental se utilizará la metodología manual.

Inicialmente se debe obtener el inhibidor de PSMA (glutamina - urea - lisina) conjugado con un agente quelante adecuado para el radiometal  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ , en el caso de este trabajo experimental se utilizará DOTA como quelante. Al producto de la conjugación entre DOTA y PSMA se lo denomina PSMA-617 (Figura 5), adicionalmente para mejorar el impedimento estérico se agrega un agente espaciador a la molécula. La síntesis de este compuesto se realiza por un método de química peptídica en resina de fase sólida (Benesova, M. et al. 2015).



**Figura 5:** Molécula PSMA-617. Se indica en la molécula el quelante DOTA, el espaciador y el inhibidor de PSMA.

Luego se debe realizar la complejación del  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  con el DOTA de la molécula de PSMA-617 (Figura 6). El quelante compleja al radiometal mediante un mecanismo en dos pasos, el cual inicialmente origina una captura electrostática del metal y luego seguidamente ocurre la encapsulación, este proceso sucede gracias a que se desprotonan los grupos amino pertenecientes al DOTA y se arreglan espacialmente los carboxilos para admitir la unión al radiometal (Banerjee, S. et al. 2015). Para que esto ocurra, se deben respetar las condiciones de marcación, que son un pH entre 4,5 a 5,0 y una temperatura de entre 80 y 100°C. Estas limitaciones las establece el complejante DOTA (Sinnes, J. P. et al. 2020). El medio de reacción debe contar con una solución tampón, que regule el pH del medio (como el acetato de sodio) y una solución que disminuya el daño por radiolisis (como el ácido gentísico o el ácido ascórbico) (Di Iorio, V. et al. 2022).

La formulación final considera que el principio farmacéutico activo (API) del radiofármaco es el  $^{177}\text{Lu}$  ( $\text{LuCl}_3$ ) y el precursor es la molécula ligando PSMA-617 (Di Iorio, V. et al. 2022).

PSMA-617

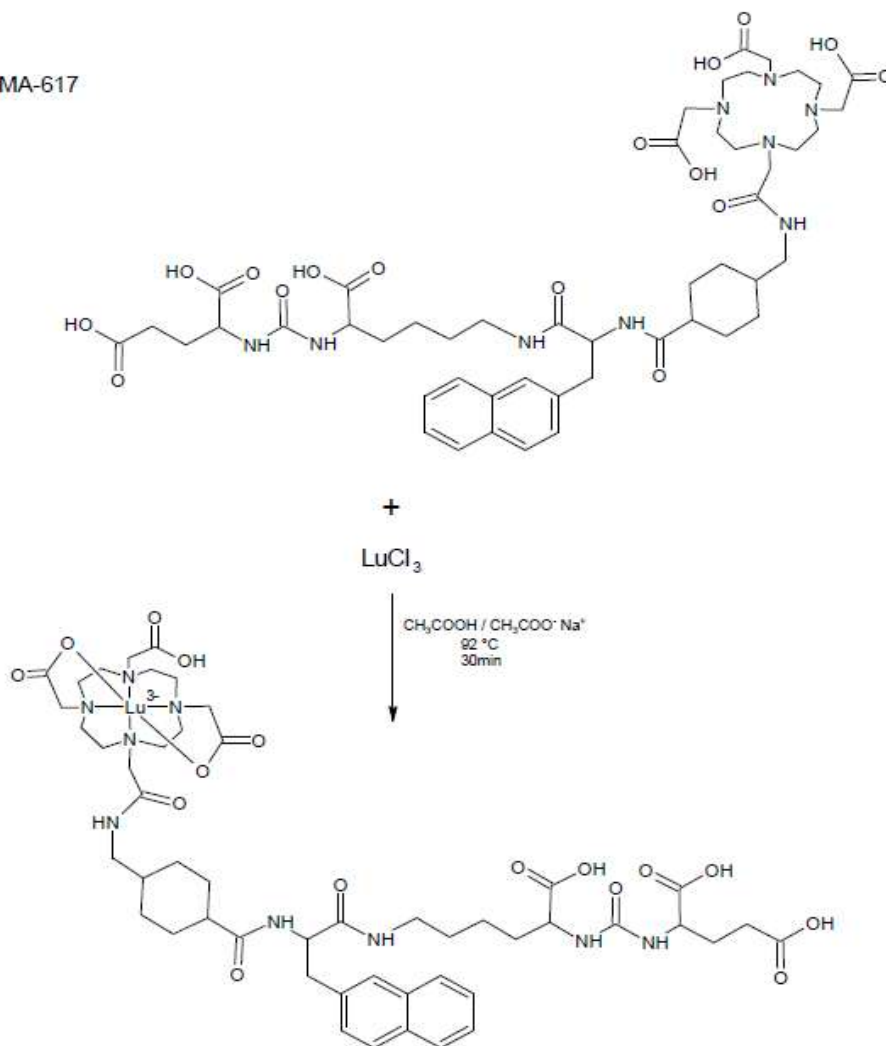


Figura 6: esquema de radiosíntesis del  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617.



---

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

---



## **2.1 Objetivo general:**

Radiosintetizar  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 con un método de marcación manual de laboratorio, efectuar el consiguiente control de calidad y posteriormente analizar los datos obtenidos.

## **2.2 Objetivos específicos:**

- Obtención y recuperación del  $^{177}\text{Lu}$  proveniente del reactor nuclear RA-3 (CAE, Ezeiza).
- Establecer protocolos de radiosíntesis para el método involucrado en la marcación del PSMA-617 con el  $^{177}\text{Lu}$ .
- Calcular el rendimiento de síntesis.
- Identificar los factores que afectan a la radiomarcación.
- Establecer y optimizar los parámetros adecuados de pH, temperatura y tiempo de marcación.
- Efectuar la purificación correspondiente y evaluar su impacto en la pureza final del producto.
- Realizar el control de calidad conveniente para obtener datos de pureza radioquímica y porcentaje de incorporación.



---

# **CAPÍTULO 3**

## **MARCACIÓN**

---



### 3.1 Introducción

La investigación se llevó a cabo de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio, manteniendo siempre las condiciones de seguridad e higiene para ámbitos en los cuales se trabaja con radiaciones ionizantes, ya sea de fuentes abiertas como el  $^{177}\text{Lu}$  o cerradas como el Cesio-137 ( $^{137}\text{Cs}$ ). Además, se respetó el uso del dosímetro correspondiente como así también se hizo buen uso de los detectores de radiación.

Para obtener el PSMA-617 marcado con el  $^{177}\text{Lu}$  se planteó la metodología de síntesis manual. Esta consiste en un procedimiento llevado a cabo completamente por el operador manualmente, conservando las normas de seguridad en laboratorio radioquímico.

### 3.2 Materiales y métodos

#### 3.2.1 Materiales

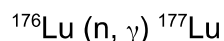
Se utilizó un blanco de trióxido de lutecio ( $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ , Trace Science International, 11,4mg) enriquecido al 86,5% en  $^{176}\text{Lu}$  (en el ANEXO I, Figura 15 se encuentra el registro de materia prima perteneciente al  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ ). El HCl empleado era grado Suprapur con nivel de impureza de Fe menor a 2 ppb (Merck). El inhibidor de PSMA empleado fue adquirido conjugado con DOTA (JPT Peptide Technologies). También se requirió etanol grado medicinal al 96% y agua ultrapura que se generó en el laboratorio con equipo Milli-Q®. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

#### 3.2.2. Métodos

##### 3.2.2.1 Obtención del $^{177}\text{Lu}$

El blanco de  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$  se disolvió en HCl Suprapur concentrado en una concentración final de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , luego se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  y se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de HCl Suprapur, quedando una concentración de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ . Se dosificó 1-2 $\mu\text{g}$  de ésta última solución en ampollas de cuarzo.

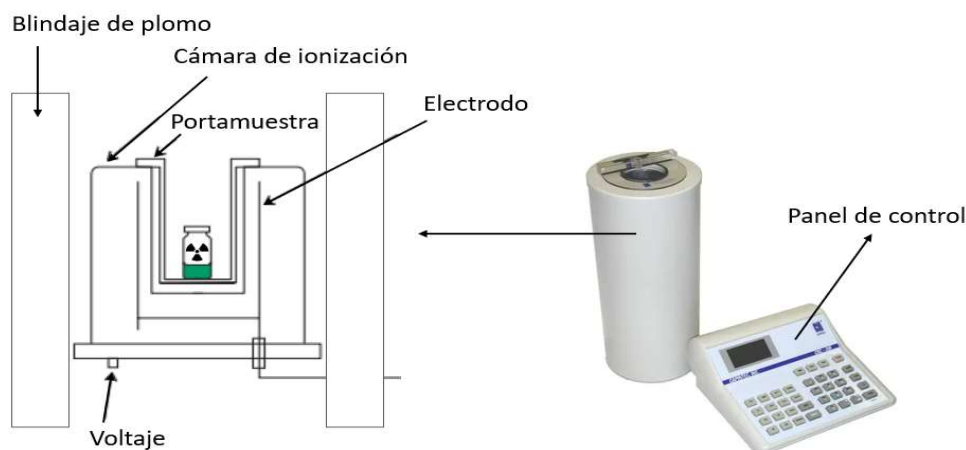
Se evaporó el solvente, se cerró la abertura de la ampolla mediante fundición en llama y se la colocó dentro de un minican de aluminio de calidad nuclear. Este último fue colocado en posición de mayor flujo neutrónico en el reactor RA-3. Se irradió durante 66 horas con neutrones térmicos. En el núcleo del reactor se llevó a cabo la siguiente reacción nuclear:



La ampolla irradiada fue devuelta cerrada como se la envió al reactor, pero con el producto activado. En el Laboratorio de radiofarmacia se procedió a abrirla cortando el cuarzo con un mini torno Dremel® (Robert Bosch Tool Corporation, Estados Unidos) y se disolvió el contenido en 10 µL de HCl Suprapur concentrado, el cual se trasvasó a un tubo eppendorf y se evaporó hasta sequedad, quedando en este estado hasta el momento de ser utilizado.

### 3.2.2.2 Medición de la actividad con activímetro

Un activímetro es un detector de radiación de cámara de ionización de tipo pozo (Figura 7). Permite la medición directa de la actividad en fuentes o muestras radiactivas líquidas de volumen variable, la cual puede encontrarse dentro de diversos recipientes, como frascos, viales o jeringas.



**Figura 7:** Esquema de un activímetro como el utilizado en este trabajo experimental. Imagen adaptada de Capintec, INC.

La medición de la actividad debe realizarse una vez que al equipo se le haya realizado la verificación diaria, que incluye la estabilidad y lectura de fondo. Estos datos quedan asentados en un registro (en el ANEXO I, Figura 16 se encuentra un ejemplo de registro utilizado en el presente desarrollo experimental).

Una vez terminada la verificación diaria, se introduce el material a medir en el portamuestra del equipo y se mide la corriente de ionización, producida por la radiación que emite el radionucleido que interactúa con el gas de la cámara, esta corriente es directamente proporcional a la actividad del radionucleido. La cámara de ionización se encuentra sellada bajo presión y tiene dos electrodos cilíndricos coaxiales en los cuales se mantiene una diferencia de potencial. La electrónica del equipo convierte la diferencia de potencial en una señal de voltaje que es amplificada y posteriormente visualizada como actividad expresada en Bq o Ci en la pantalla del equipo.

El activímetro utilizado es CRC-ULTRA (Capintec, INC. Estados Unidos), el cual fue verificado diariamente utilizando una fuente de  $^{137}\text{Cs}$ . Todas las mediciones de actividad fueron realizadas con este equipo.

### **3.2.2.3 Complejación de $^{177}\text{Lu}$ con DOTA del PSMA-617**

Inicialmente se preparó 2,5 mL de una solución de acetato de sodio 0,8 M, ácido genticónico 0,26 M y se ajustó a pH 4,5-5,0 con hidróxido de sodio. La solución se agitó durante 30 minutos en presencia de Chelex 100 (Bio-Rad®, Estados Unidos). Esta última fue adicionada para retener los cationes trivalentes como el  $\text{Fe}^{3+}$  que puedan llegar a competir con el  $\text{Lu}^{3+}$  en la reacción de complejación con el DOTA. Pasado este tiempo, se prosiguió a filtrar la solución con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  Millex-GV (Millipore, Irlanda). Esta solución fue utilizada como medio de reacción.

Por otro lado, se disolvió el PSMA-617 con una solución de agua ultrapura y etanol 20%, cantidad suficiente para obtener una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Paralelamente se calculó el volumen de HCl Suprapure 0,1 M para obtener la actividad de  $^{177}\text{Lu}$  requerida para la marcación en una alícuota de 10  $\mu\text{L}$ .

Una vez obtenido el dato de  $^{177}\text{Lu}$  y preparada la dilución, se adicionaron los 10  $\mu\text{L}$  a un tubo eppendorf que contenían los 50  $\mu\text{L}$  de medio de reacción junto con un volumen definido de PSMA-617 y se incubó un tiempo determinado a 100°C.

Los parámetros de actividad de  $^{177}\text{Lu}$ , volumen de PSMA-617 y tiempo fueron evaluados a modo de obtener información para mejorar el rendimiento de marcación.

#### **3.2.2.4 Purificación**

La purificación se llevó a cabo una vez obtenido el producto de marcación. Para esto se utilizó columnas de SepPak C-18 Classic y como control de la purificación se emplearon detectores adecuados.

Inicialmente la columna fue activada como indica el fabricante: se eluyó 10 mL de una solución de etanol 50% y 10 ml de agua ultrapura, posteriormente se inyectó aire para retirar el excedente de solución del interior de la columna. Una vez activada la columna se procedió a realizar la purificación, para esto, se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra en la columna. Inicialmente se eluyó con 5 ml de agua ultrapura y se colocó en un vial. Luego se eluyó con 5 mL de etanol 96% y se colectó en otro vial. La columna SepPak se colocó en un tercer vial. Posteriormente a todos los viales se le midió la actividad en activímetro.

### **3.3 Resultados y discusiones parciales**

El PSMA-617 se radiomarcó con  $^{177}\text{Lu}$  siguiendo un protocolo utilizado con anterioridad por el grupo del Laboratorio de Radiofarmacia, el cual fue actualizado con los datos hasta ahora encontrados en bibliografía. Durante

todo el proceso de radiosíntesis se trabajó dentro de campana radioquímica, utilizando los blindajes adecuados y dosímetros reglamentarios.

La variante que condiciona la radio síntesis es la AEp obtenida del  $^{177}\text{Lu}$  c.a. del reactor RA-3. Esto conlleva a que se deban evaluar los parámetros de reacción de manera de obtener una marcación con aceptables rendimientos. Para esto, se midió en activímetro la actividad recuperada de la ampolla de cuarzo que era devuelta del reactor nuclear.

Se consideraron dos compuestos principales para la radiosíntesis del producto final, uno es el ligando PSMA-617 y el otro es el ingrediente farmacéutico activo (API)  $^{177}\text{Lu}$  proveniente del  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$  (Di Iorio, V. et al. 2022).

### 3.3.1 PSMA-617

El PSMA-617 utilizado en el presente trabajo experimental se encontraba en forma de polvo seco, fraccionado de a 50  $\mu\text{g}$ , los datos se resumen en la Tabla 2. El ligando fue disuelto en su envase original con 50  $\mu\text{L}$  de solución de etanol 20% utilizando agua ultrapura y se homogeneizó suavemente hasta completa disolución, la concentración obtenida era de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Inmediatamente se proseguía a realizar la radiosíntesis.

**Tabla 2.** Datos del PSMA-617 utilizado en el desarrollo de este trabajo experimental.

<b>Nomenclatura</b>	PSMA-617
<b>Fórmula molecular</b>	$\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{O}_{16}\text{Na}$
<b>Peso Molecular</b>	1042,14 g/mol (*)
<b>Apariencia</b>	Polvo blanco
<b>Marca comercial</b>	JPT Peptide Technologies

(\*) (Raviteja, N. et al. 2016)

### 3.3.2 $^{177}\text{Lu}$ obtenido por irradiación de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$

El PSMA-617 se radiomarcó con  $^{177}\text{Lu}$ . Este radionucleido se encontraba como  $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$  el cual se produjo en el reactor nuclear RA-3 del Centro Atómico Ezeiza. Se irradió  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$  enriquecido en un 86,5% en  $^{176}\text{Lu}$  el cual contenía el resto de  $^{175}\text{Lu}$ , con lo cual el  $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$  obtenido era c.a. Además, como impureza radionucleídica se sospechaba la presencia de  $^{177\text{m}}\text{Lu}$ .

### 3.3.3 Actividad de $^{177}\text{Lu}$ obtenida del RA-3

Cada vez que se recibió la ampolla de cuarzo que contenía el lutecio activado proveniente del reactor nuclear, se midió la actividad para comprobar cuánta actividad de  $^{177}\text{Lu}$  poseía cada lote. Luego, la actividad recuperada de la ampolla de cuarzo se media nuevamente al momento de la radiosíntesis. La actividad recuperada de la ampolla varió entre un 48% y un 98%, mejorando con los sucesivos lotes de  $^{177}\text{Lu}$ , lo que significó un mejor aprovechamiento del material y consecuentemente una mayor actividad de trabajo.

Se consideró que toda la actividad medida pertenecía al  $^{177}\text{Lu}$ , entonces, con la actividad recuperada dividida la masa de blanco se obtenía el dato de AE aparente. Esta última fue denominada de este modo debido a que los datos son relativos a las capacidades de medición del laboratorio, es decir, para obtener una AEp se necesita el dato certero de masa recuperada de  $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$  por algún método de sensibilidad adecuada, y corresponder que toda la actividad medida es de  $^{177}\text{Lu}$ , con lo cual, hasta no poder corroborar estos datos analíticamente, la AEp será denominada AE aparente. Se muestra en la Tabla 3 el valor de actividad de cada ampolla de cuarzo medida cuando fue recibida del reactor RA-3, la AE aparente calculada y los días que pasaron entre el e.o.b y la marcación de la molécula ligando.

**Tabla 3.** Se detalla la actividad recibida en cada lote, medida en activímetro, la AE aparente calculada y los días transcurridos entre la e.o.b y la marcación.

Lote N°	Actividad de <sup>177</sup> Lu en ampolla de cuarzo	AE aparente	Días entre la marcación y el e.o.b
1	177,60 MBq (4,80 mCi)	147,26 MBq/μg (3,98 mCi/μg)	8,5
2	267,88 MBq (7,24 mCi)	94,72 MBq/μg (2,56 mCi/μg)	5,5
3	255,30 MBq (6,90 mCi)	189,44 MBq/μg (5,12 mCi/μg)	6,5
4	288,23 MBq (7,79 mCi)	322,64 MBq/μg (8,72mCi/μg)	1,5
5	725,94 MBq (19,62 mCi)	397,01 MBq/μg (10,73 mCi/μg)	1,5

El tiempo transcurrido entre el e.o.b y la utilización del <sup>177</sup>Lu para la marcación se debe a dos factores. El primero es que, por cuestiones técnicas, el personal del reactor en los primeros tres lotes devolvió la ampolla de cuarzo a los 5,5 días del e.o.b; y en segundo lugar, como se puede ver en la Tabla 3, los lotes 1 y 3 no fueron utilizados inmediatamente fueron recibidos, esto se debió a la disponibilidad para realizar la marcación.

Los lotes de <sup>177</sup>Lu de 1 a 3, se utilizaron a los 8,5, 5,5 y 6,5 días de e.o.b respectivamente, debido a que por cuestiones de tasas de dosis, no era posible abrir el minican de aluminio para acceder a la ampolla de cuarzo que era extraído del RA-3. Esta operación la realizó el personal del reactor. Sin embargo, para los lotes 4 y 5, el personal del reactor, logró mejorar el proceso de apertura del minican, con lo cual se recibieron las ampollas a 1,5 días del e.o.b. Este adelanto permitió realizar marcaciones con <sup>177</sup>Lu de mayor AE.

### 3.3.4 Radiosíntesis

Durante el curso de este trabajo experimental, se desarrollaron cinco radiomarcaciones de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, en las cuales los parámetros evaluados en cada una se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Parámetros de las radiosíntesis de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 llevadas a cabo en el laboratorio para cada una de las marcaciones.

<b>Parámetros</b>	<b>Marcación 1</b>	<b>Marcación 2A</b>	<b>Marcación 2B</b>
<b>PSMA-617</b>	20 $\mu\text{L}$ /20 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{L}$ /20 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{L}$ /50 $\mu\text{g}$
<b>Actividad de <math>^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3</math></b>	68,45 MBq (1,85 mCi)	51,8 MBq (1,40 mCi)	39,22 MBq (1,06 mCi)
<b>Acetato de sodio/ácido gentísico</b>	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
<b>Chelex 100</b>	No	Si	Si
<b>pH</b>	5,0	5,2	5,0
<b>Tiempo</b>	30 min	30 min	30 min
<b>Apariencia*</b>	Cumple	Cumple	Cumple
<b>Volumen final</b>	80 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	113 $\mu\text{L}$
<b>AEm</b>	3,33 MBq/ $\mu\text{g}$ (0,09 mCi/ $\mu\text{g}$ )	2,59 MBq/ $\mu\text{g}$ (0,07 mCi/ $\mu\text{g}$ )	0,74 MBq/ $\mu\text{g}$ (0,02 mCi/ $\mu\text{g}$ )

(Tabla 4: continuación)

Parámetros	Marcación 3	Marcación 4	Marcación 5
PSMA-617	50µL/50µg	50µL/50µg	50µL/50µg
Actividad de <sup>177</sup> Lu <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	70,30 MBq (1,90 mCi)	264,18 MBq (7,14 mCi)	353,72 MBq (9,56 mCi)
Acetato de sodio/ácido gentísico	50 µL	50 µL	50 µL, con 0,4 g de ácido ascórbico
Chelex 100	Si	Si	Si
pH	5,0	5,0	5,0
Tiempo	10 min	30 min	30 min
Apariencia (*)	No Cumple	Cumple	Cumple
Volumen final	110 µL	79 µL	110 µL
AEm	3,70 MBq/µg (0,10 mCi/µg)	5,18 MBq/µg (0,14 mCi/µg)	7,03 MBq/µg (0,19 mCi/µg)

(\*) criterio de aceptación en apariencia, **Cumple: solución clara incolora, No Cumple: solución turbia o coloreada.**

Se modificaron ciertos parámetros de reacción entre cada marcación, para que cada una de las variantes brinde información y permita decidir las mejores condiciones de radiosíntesis.

La Marcación 1 se realizó utilizando <sup>177</sup>Lu correspondiente al Lote 1, empleando el protocolo proporcionado por el laboratorio, actualizado de acuerdo a lo reportado en bibliografía. Para este ensayo no se utilizó Chelex en la preparación del buffer de reacción.

A partir de la Marcación 2 siempre se utilizó Chelex en la preparación del buffer de reacción.

El Lote 2 de  $^{177}\text{Lu}$  se utilizó para realizar 2 marcaciones, para la Marcación 2A se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de PSMA-617 y para la Marcación 2B se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de PSMA-617, estas marcaciones se realizaron en días consecutivos.

En la Marcación 3 se utilizó el Lote 3 de  $^{177}\text{Lu}$ , en este caso la marcación resultó fallida, debido a que cuando se introdujo el  $^{177}\text{Lu}$  a la solución de reacción esta presentó coloración amarillo. No se muestran resultados posteriores.

En la Marcación 4 se utilizó el Lote 4 de  $^{177}\text{Lu}$ . A partir de esta marcación se utilizó  $^{177}\text{Lu}$  de mayor AE aparente, 322,64 MBq/ $\mu\text{g}$  (8,72 mCi/ $\mu\text{g}$ ) y se alcanzó una AEm de 5,18 MBq/ $\mu\text{g}$  (0,14 mCi/ $\mu\text{g}$ ).

Finalmente, a la Marcación 5, que se realizó con el Lote 5 de  $^{177}\text{Lu}$ , se le adicionó al medio de reacción 0,4 g de ácido ascórbico, el cual actúa como secuestrador de radicales (*scavenger*) (Di Iorio, V. et al. 2022). El valor de la AEm fue el más alto obtenido (7,03 MBq/ $\mu\text{g}$ ; 0,19 mCi/ $\mu\text{g}$ ).

Para la evaluación del rendimiento obtenido en cada caso fue necesario realizar el control de calidad correspondiente, este se analiza en el Capítulo 4.

---

# **CAPÍTULO 4**

## **CONTROL DE CALIDAD**

---



## **4.1 Introducción**

Los ensayos de control de calidad de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 están relacionados con la determinación de la pureza radioquímica y el porcentaje de incorporación del  $^{177}\text{Lu}$  al ligando. Estos datos se determinaron mediante cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) y por radio cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

La pureza radioquímica es la cantidad de muestra presente en la forma química deseada. Requiere la separación de las diferentes sustancias que contiene el radionucleido y la medición de la radiación asociada con la sustancia que se desea obtener. Las impurezas radioquímicas que pueden encontrarse dan una idea acerca de fallas en el proceso de marcación o de purificación.

El rendimiento de marcación es la cantidad porcentual de  $^{177}\text{Lu}$  complejo con DOTA exitosamente que se encuentra unido a la molécula de PSMA-617. Como criterio de aceptación de la radiosíntesis se consideró que el  $^{177}\text{Lu}$  libre o coloidal debe ser menor o igual al 3% (Di Iorio, V. et al. 2022).

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Materiales**

Se utilizaron placas cromatográficas adecuadas para ITLC. Para la corrida en radio RP-HPLC se utilizó metanol grado HPLC (Anedra, Argentina), el agua ultrapura se generó en el laboratorio con equipo Milli-Q®. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### **4.2.2 Métodos**

#### **4.2.2.1 Porcentaje de incorporación determinado por ITLC**

La determinación del porcentaje de incorporación del  $^{177}\text{Lu}$  al PSMA-617 se realizó mediante cromatografía en capa fina instantánea. Esta se efectuó en

tiras de papel de cromatografía de microfibra de vidrio sin aglutinante, impregnado con sílica gel (Macherey-Nagel, Alemania). Se utilizó un tamaño de papel de 1 cm de ancho por 10 cm de largo.

Este ensayo da como resultado el factor de retención (Rf) el cual es la relación comprendida entre la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por el eluyente. La retención es básicamente una medida de la competencia del soluto a separarse de la fase estacionaria. A cada especie marcada se le asigna un valor de Rf y un porcentaje de actividad con respecto al total.

Se sembró 1  $\mu\text{L}$  de muestra del complejo  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 en el origen a 1 cm del extremo sobre el largo del papel y se lleva a sequedad en estufa a  $37^\circ\text{C}$ . La cromatografía se desarrolló de manera ascendente dentro de una cuba cromatográfica. El solvente utilizado para la corrida fue acetato de amonio 0,1 M y metanol en una relación 1:1 v/v. Adicionalmente se colocó en el punto de siembra un marcador coloreado (solución 1% de azul de bromofenol) que indicó visualmente el frente de solvente. La placa cromatográfica fue retirada de la cuba una vez que el frente de solvente llegaba a los 9 cm de la tira.

El revelado de la placa de ITLC se llevó a cabo mediante autorradiografía en pantalla de almacenamiento de fósforo MS (MultiSensitive Phosphor Screens), el cual utiliza un sistema de almacenamiento de fósforo Cyclone Plus (PerkinElmer, USA). La autorradiografía obtenida permite conocer los Rf y porcentaje de las especies marcadas. Los cromatogramas se analizaron con el *software* OptiQuant.

#### **4.2.2.2 Pureza radioquímica mediante radio PR-HPLC**

La detección y cuantificación de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 se llevó a cabo mediante un método de radio cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en el cual se utilizó un protocolo de análisis acorde. La cromatografía se realizó en el equipo HPLC Shimadzu Nexera XR (Shimadzu Corporation, Japón) acoplado a un detector de arreglo de diodos y a un detector radiométrico de pozo. Se utilizó la columna Aeris Peptide 3.6u xb-c18

(Phenomenex®, Estados Unidos). El flujo fue de 1 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 25°C y el volumen de inyección fue ajustado por actividad entre 0,296 y 0,37 MBq (8 y 10 µCi). Las condiciones de elución consistieron en un gradiente entre las fases móviles del solvente A (agua/TFA 0,1%) y solvente B (metanol/TFA 0,1%) como se detalla en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones porcentuales del solvente B a las cuales se realizó la radio PR-HPLC, para la determinación de pureza radioquímica del <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 manteniendo en toda la corrida un flujo de 1 mL/min.

Tiempo (min)	Solvente B (%)
5	6
20	80
23	100
25	100
27	6

La detección se realizó midiendo con un detector de pozo. Los cromatogramas se analizaron con el *software* Lab Solution v.5.84.

### 4.3 Resultados y discusiones parciales

#### 4.3.1 Porcentaje de incorporación

El resultado observado de porcentaje de incorporación mediante ITLC puede arrojar datos acerca del lutecio complejado a la molécula de PSMA-617 respecto al Lu<sup>3+</sup> libre o coloidal. Estos últimos son los que quedan retenidos ( $R_f = 0,1 \pm 0,1$ ), mientras que la molécula del radiofarmaco <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 migra junto al frente del solvente ( $R_f = 0,9 \pm 0,1$ ) (en el ANEXO II, Figuras 20, 21 y 22

se muestran ejemplos de cromatogramas). Los resultados se resumen en la Tabla 6, para las alícuotas tomadas previo purificación, post purificación y a las 24 horas como control de estabilidad en el medio de reacción, adicionalmente la misma Tabla muestra los datos de AEm con el motivo de mejorar la visualización de cada marcación. Los valores se reportaron como promedio de  $n = 3$  con sus correspondientes desviaciones estándar ( $\pm$  SD).

**Tabla 6.** Resultados de porcentaje de incorporación medido por ITLC posterior a la marcación, posterior a la purificación y estabilidad a las 24 horas en medio de reacción.

Resultados	Marcación 1	Marcación 2A	Marcación 2B
<b>AEm</b>	3,33 MBq/ $\mu$ g (0,09 mCi/ $\mu$ g)	2,59 MBq/ $\mu$ g (0,07 mCi/ $\mu$ g)	0,74 MBq/ $\mu$ g (0,02 mCi/ $\mu$ g)
<b>% incorporación post marcación</b>	49,9 $\pm$ 2,3	42,1 $\pm$ 12,4	99,2 $\pm$ 0,25
<b>% incorporación post purificado</b>	50,1 $\pm$ 0,4	49,8 $\pm$ 0,1	-
<b>% de estabilidad a las 24 h</b>	42,1 $\pm$ 12,3	-	99,7 $\pm$ 0,1

(Tabla 6: continuación)

Resultados	Marcación 3	Marcación 4	Marcación 5
<b>AEm</b>	-	5,18 MBq/ $\mu$ g (0,14 mCi/ $\mu$ g)	7,03 MBq/ $\mu$ g (0,19 mCi/ $\mu$ g)
<b>% incorporación post marcación</b>	-	100 $\pm$ 0,0	80,5 $\pm$ 5,0 18,4 $\pm$ 4,9 (*)
<b>% incorporación post purificado</b>	-	-	-
<b>% de estabilidad a las 24 h</b>	-	81,6 $\pm$ 3,5 17,9 $\pm$ 3,5 (*)	83,6 $\pm$ 1,0 15,1 $\pm$ 0,9 (*)

(\*) valores referidos a  $R_f = 0,6$ .

Idealmente, es de esperar que se encuentre una única fracción del 100% en el  $R_f = 0,8$ , si todo el PSMA-617 se hubiese marcado con el  $^{177}\text{Lu}$  y no quedará remanente libre o coloidal del radiometal (Wang, J. et al. 2020). Sin embargo, lo que se observó experimentalmente fue lo siguiente:

Para la Marcación 1 se alcanzó el  $49,9 \pm 2,3$  % de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 una vez finalizada la incubación (Se muestra el cromatograma en el ANEXO II, Figura 17). Posteriormente se pasó el producto por columna SepPak para ser purificado y se obtuvo  $50,1 \pm 0,4$  %. Con lo cual no se alcanzó una mejora en el producto purificado. Pasadas 24 horas se observó que el porcentaje de incorporación disminuyó hasta  $42,1 \pm 12,3$  %, lo que reveló una escasa estabilidad en el medio de reacción. Una hipótesis de este comportamiento es que la disminución en el porcentaje de incorporación se podría deber a que la falta de Chelex haya dejado iones trivalentes remanentes provenientes de los reactivos utilizados y estos compitan con el  $^{177}\text{Lu}$  por el ligando en la reacción de coordinación produciendo una marcación insuficiente y una escasa estabilidad (Asti, M. et al. 2011).

La Marcación 2A mostró un porcentaje de incorporación posterior a la incubación de  $42,1 \pm 12,4$  % y luego de la purificación por columna SepPak, se obtuvo el  $49,8 \pm 0,1$  %. En este caso la purificación no consiguió la eliminación del  $^{177}\text{Lu}$  libre o coloidal presente en el fin de la marcación, hasta valores de aceptación. La estabilidad a 24 horas no se ensayo debido a los valores obtenidos de marcación.

Al observar los pobres rendimientos de marcación de la Marcación 1 y 2A, se decidió aumentar la masa de PSMA-617, para evitar sumar esta incertidumbre en la masa, al tomar una alícuota del vial ya fraccionado en  $50\mu\text{g}$ . La Marcación 2B mostró un porcentaje de incorporación posterior a la incubación del  $99,2 \pm 0,25$ , con lo cual no hubo necesidad de purificar el producto. En cuanto a la estabilidad a 24 horas también se mantuvo en  $99,7 \pm 0,1$  %.

La Marcación 3 resultó fallida por lo tanto no se muestran resultados.

La Marcación 4 mostró que el porcentaje de incorporación luego de 10 min de la incubación fue total. Sin embargo, pasadas 24 horas se notaron algunas diferencias significativas, se observó una segunda especie marcada con  $R_f = 0,6$  correspondiente al  $17,9 \pm 3,5 \%$  (Se muestran los cromatogramas en el ANEXO II, Figura 18 y 19) y el  $R_f = 0,8$  correspondiente al  $81,6 \pm 3,5 \%$ . La fracción de  $^{177}\text{Lu}$  libre o coloidal fue de  $0,8 \pm 0,1 \%$ , lo que indica una muy buena estabilidad a 24 horas.

La Marcación 5 presentó dos especies marcadas ( $R_f = 0,6$  y  $R_f = 0,8$ ) una vez terminada la incubación y de igual manera se visualizó a las 24 horas. Para esta marcación también se encontró  $^{177}\text{Lu}$  libre o coloidal tanto al fin de la incubación como a las 24 horas, obteniéndose  $1,1 \pm 0,1 \%$  y  $1,3 \pm 0,3 \%$  respectivamente, con lo que la estabilidad resultó muy buena y cumple con las especificaciones. La suma de los porcentajes encontrados en los  $R_f = 0,6$  y  $0,8$  da como resultado el  $98,9 \pm 0,1 \%$  de incorporación posterior a la marcación.

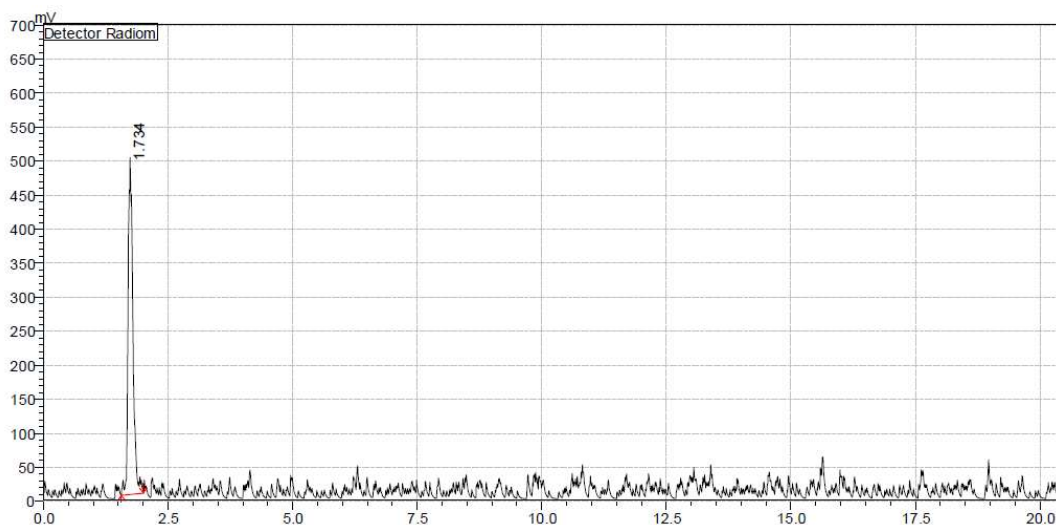
La estabilidad a 24 horas del producto marcado corresponde a la capacidad del DOTA de conservar el  $^{177}\text{Lu}$ , es decir, a conservar la integridad de la molécula de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617. Para este análisis se consideraron los porcentajes de incorporación posteriores a la incubación y, en los casos que fue necesario, se utilizó el porcentaje de incorporación posterior a la purificación (Marcación 1) que muestran los resultados de estabilidad medidos por ITLC. Lo observado es una tendencia a conservar los valores obtenidos de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 mostrando un producto relativamente estable a 24 horas.

#### **4.3.2 Pureza radioquímica**

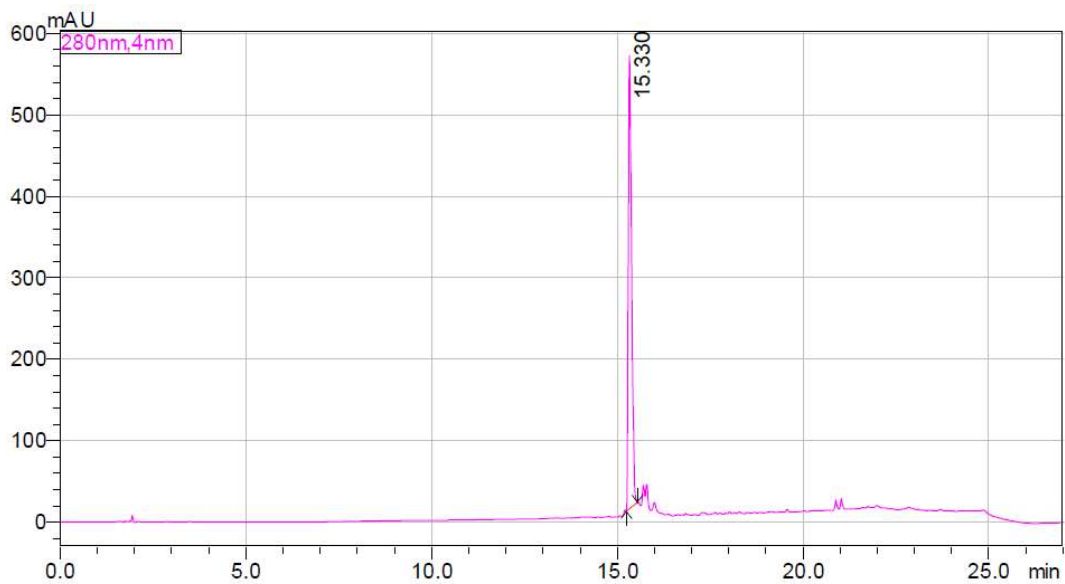
Se determinó la pureza radioquímica de cada una de las radiosíntesis mediante PR-HPLC utilizando un sistema de gradiente en fase reversa y un detector radiométrico. Para las marcaciones 1 y 2 los análisis fueron realizados tomando tres alícuotas, la primera una vez finalizado el proceso de incubación, la segunda una vez purificado el radiofármaco y la tercera a las 24 horas como control de estabilidad. En las marcaciones 4 y 5 se tomaron 2 alícuotas, una al finalizar la incubación y la otra a las 24 horas.

Además, se realizaron tres cromatogramas para identificar el  $^{177}\text{Lu}$  libre, el PSMA-617 y el medio buffer de reacción y se tomó el tiempo de retención de cada uno como parámetro para luego realizar los cromatogramas radiométricos al  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617.

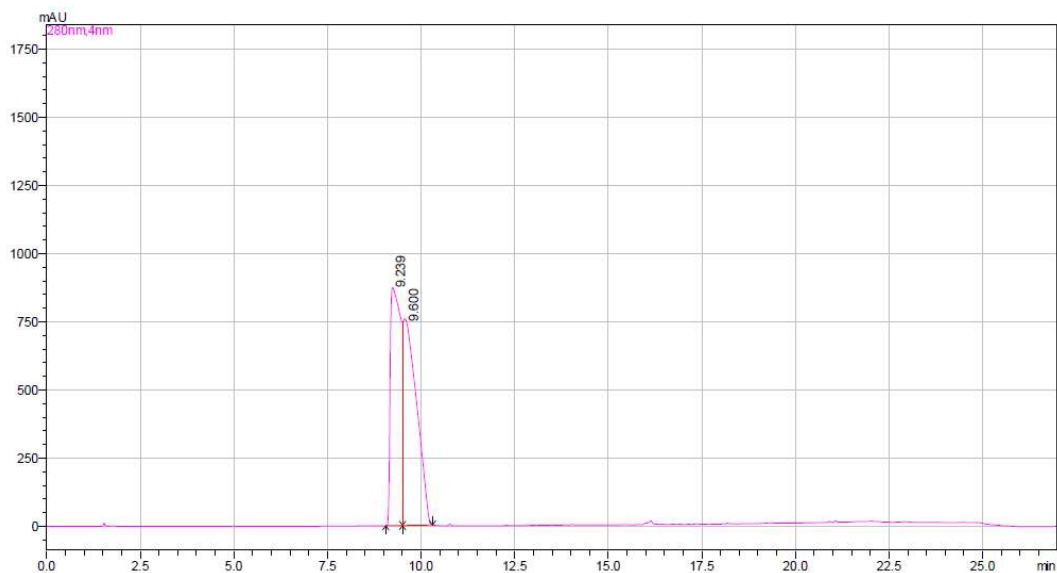
Los resultados demostraron un tiempo de retención de  $^{177}\text{Lu}$  libre de 1,7 minutos (Figura 8) luego de comenzada la corrida cromatográfica. La molécula de PSMA-617 mostró un tiempo de retención de 15,3 minutos (Figura 9) la cual fue identificada utilizando el detector UV-visible del HPLC. Adicionalmente se identificó el medio de reacción (Figura 10) sin presencia de PSMA-617 ni  $^{177}\text{Lu}$  como blanco, con el fin de ver la injerencia que pueda llegar a tener el ácido gntísico que es la sustancia de mayor absorbancia en el medio de reacción (Di Iorio, V. et al. 2022), que al igual que el PSMA-617 sin marcar, fue identificado utilizando el detector de UV-visible del HPLC.



**Figura 8:** Radio cromatogramas de HPLC en fase reversa para  $^{177}\text{Lu}$ .



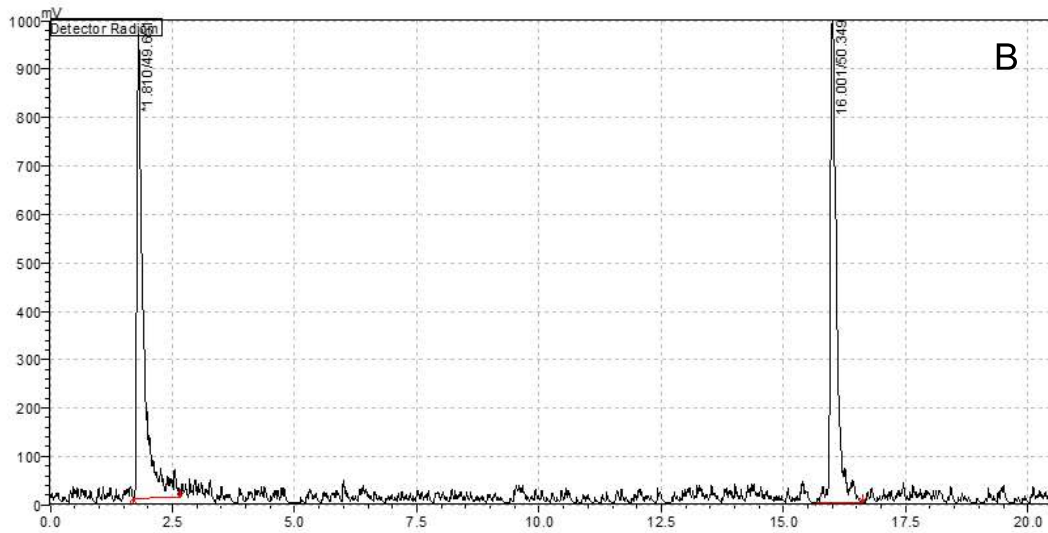
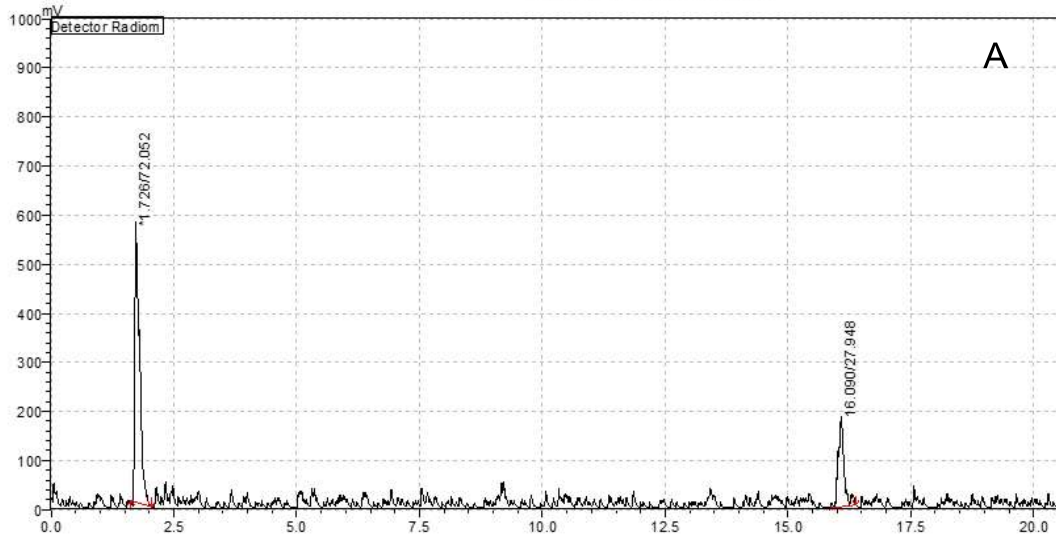
**Figura 9:** cromatograma con detector UV-visible a 280 nm de longitud de onda para el PSMA-617.

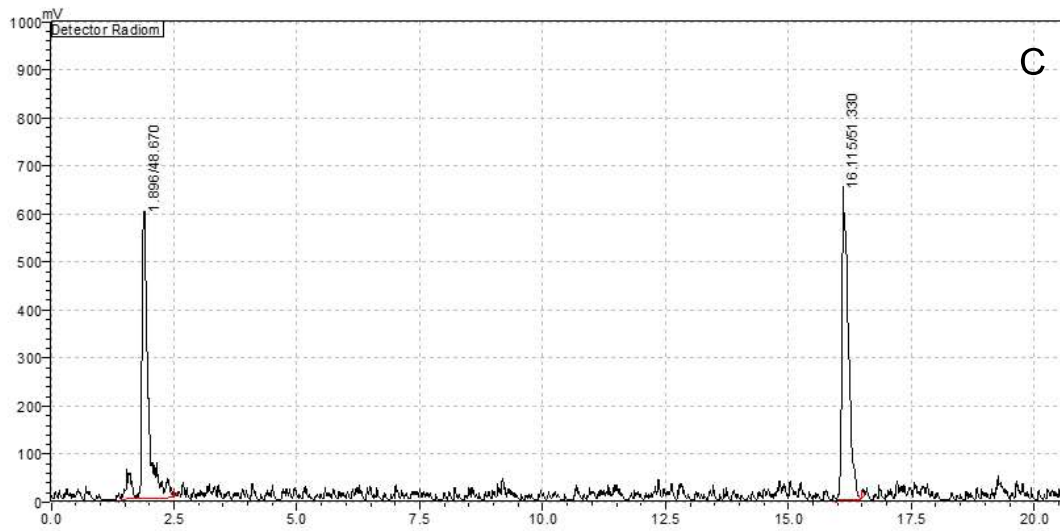


**Figura 10:** Cromatograma con detector UV-visible a 280 nm de longitud de onda para el blanco del medio de reacción.

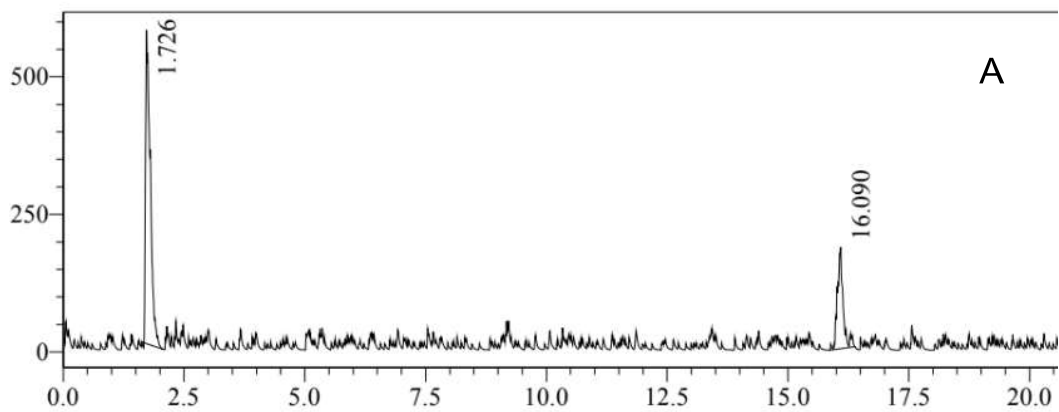
Los cromatogramas de las radiomarcaciones de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 (marcaciones 1, 2A, 4 y 5) se observan en las Figuras 11, 12, 13 y 14

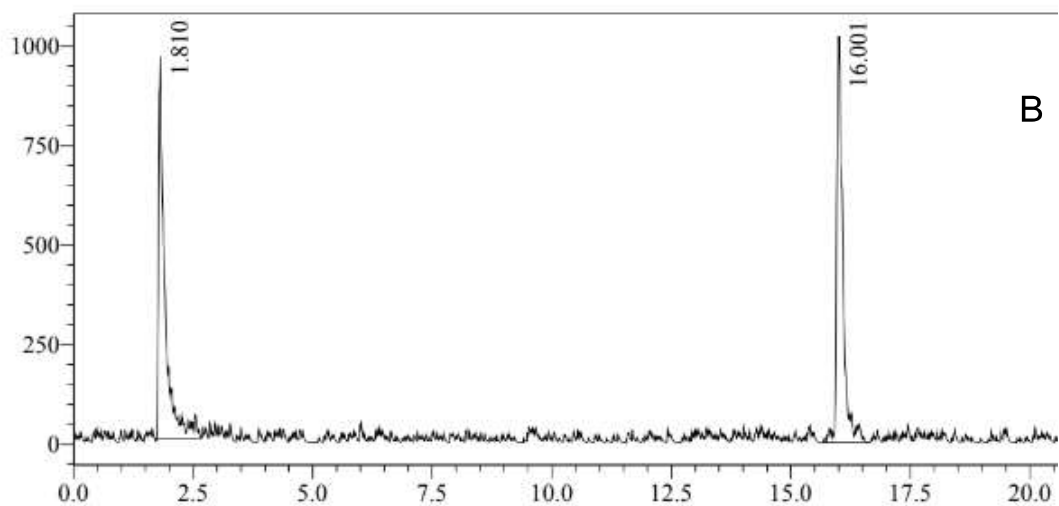
respectivamente. Estos ensayos fueron determinados utilizando un medidor radiométrico de pozo asociado al HPLC.



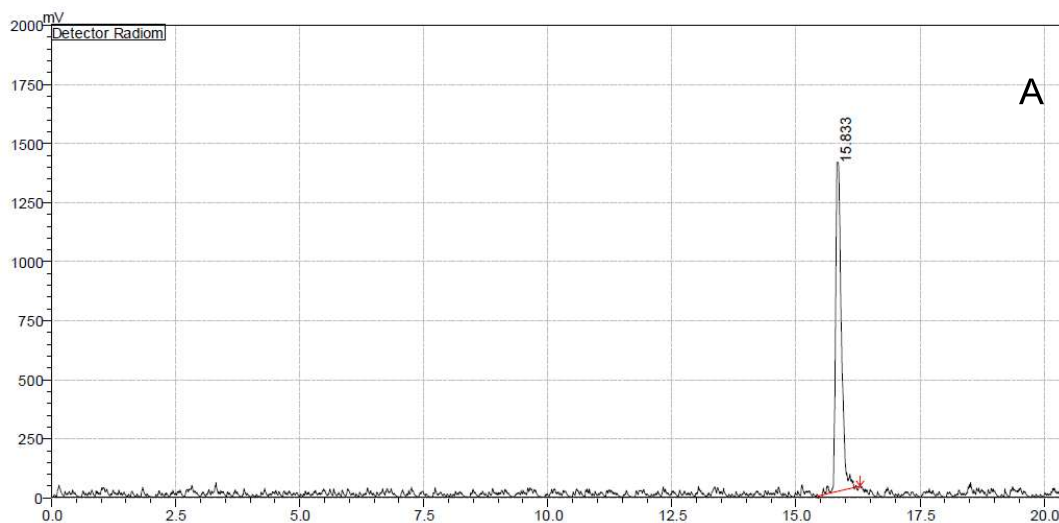


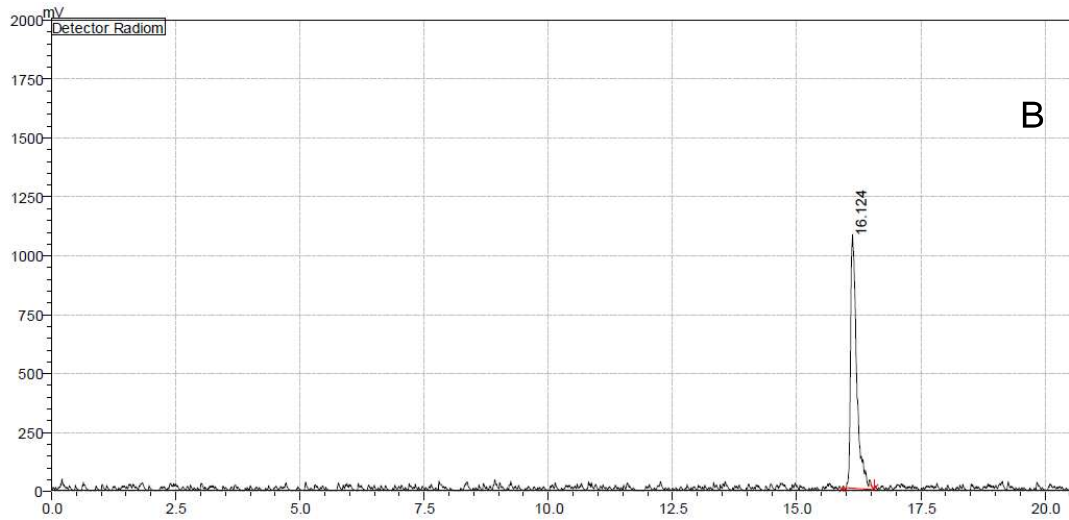
**Figura 11:** Radio cromatogramas de HPLC en fase reversa para  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, Marcación 1. Gráficos A: previo purificación, B: luego de purificar, C: a las 24 horas.



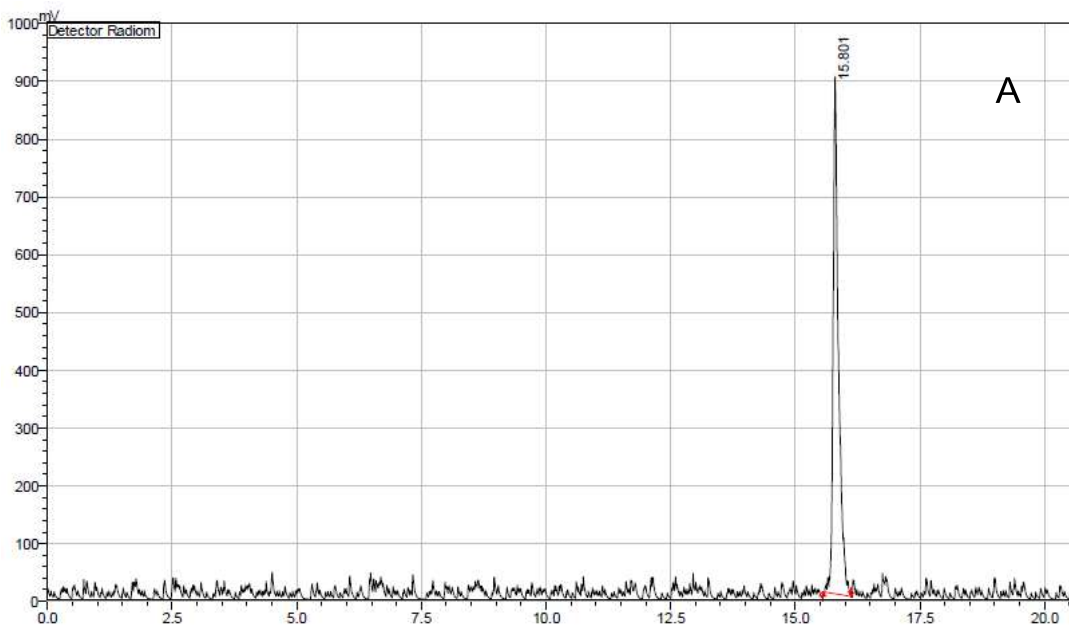


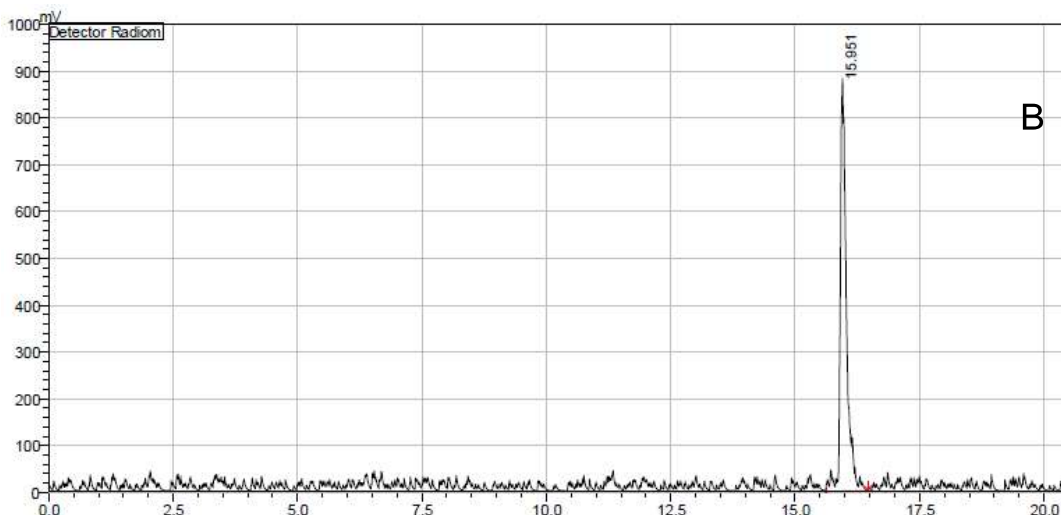
**Figura 12:** Radio cromatogramas de HPLC en fase reversa para  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, Marcación 2A. Gráficos A: luego de la incubación, B: a las 24 horas.





**Figura 13:** Radio cromatogramas de HPLC en fase reversa para  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, Marcación 4. Gráficos A: luego de 10 min de incubación, B: a las 24 horas.





**Figura 14:** Radio cromatogramas de HPLC en fase reversa para  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, Marcación 5. Gráficos A: luego de la marcación, B: a las 24 horas.

En la Marcación 1 se observa la presencia de  $^{177}\text{Lu}$  libre, en todas las etapas analizadas junto con el pico correspondiente al  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617.

Para la Marcación 2 solo se realizó el análisis cromatográfico de la muestra 2A. En ésta se observa que no hay  $^{177}\text{Lu}$  libre (tiempo de retención de 1,7 minutos) y que todo el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 se muestra con tiempo de retención de 16,1 minutos.

Las Marcaciones 4 y 5 muestran perfiles similares y se corresponden con un alto porcentaje de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, tanto posterior a la marcación como en la estabilidad a 24 horas..

Los resultados obtenidos por RP-HPLC son coincidentes a los de ITLC. En este sentido, se encuentran señales que pertenecen al  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 en los tiempos de retención o  $R_f$  adecuados. Mientras que para  $^{177}\text{Lu}$  libre y coloidal es válida una diferencia, cuando se analizan muestras por ITLC, en  $R_f = 0$  pueden quedar retenidos tanto el  $^{177}\text{Lu}$  libre como el coloidal, pero cuando se analizan las muestras por RP-HPLC, al tiempo de retención de 1,7 minutos se le asigna solamente el  $^{177}\text{Lu}$  libre, mientras que el lutecio en forma coloidal

no es posible que sea detectado ya que en el caso de que lo hubiera, quedaría retenido en el guardacolumna el cual se coloca con el fin de extender la vida útil de la columna.

Con respecto a los radiocromatogramas de la Marcación 4 y 5, se observa que no pueden identificarse las 2 especies marcadas, como si se ven en las ITLC. Esto tal vez pueda mejorarse modificando el gradiente o cambiando el solvente de corrida, cuestión que será estudiada próximamente.

---

# **CAPÍTULO 5**

## **DISCUSIÓN**

---



## 5.1 Discusión final

Ha habido grandes avances para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, sin embargo, este sigue siendo un desafío que atribuye un gran esfuerzo técnico tecnológico en la realización de terapias efectivas contra esta patología que cobra la vida de millones de hombres alrededor del mundo por año. De hecho, esta es la neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada en hombres en todo el mundo y sigue siendo una de las principales causas de muertes relacionadas con el cáncer (Sung, H. et al. 2020).

Por ser una enfermedad con alta incidencia se sabe relativamente poco sobre su etiología. Los factores de riesgo que se encuentran establecidos se limitan a la edad avanzada, los antecedentes familiares y a ciertas mutaciones genéticas o afecciones como el síndrome de Lynch. Los hombres afrodescendientes en los Estados Unidos y el Caribe tienen las tasas de incidencia más altas a nivel mundial, lo que sustenta la hipótesis del rol genético por parte de la ascendencia africana occidental en la modulación del riesgo de cáncer de próstata (Rebbeck, T. et al. 2013). Hasta la fecha, se han identificado escasos factores ambientales y de estilo de vida para la que se encuentre evidencia concluyente, sin embargo, son bien conocidos los riesgos para hombres fumadores, con exceso de peso corporal y malos hábitos alimenticios que pueden aumentar el riesgo de contraer esta patología (Clinton, S. et al. 2020).

Esta enfermedad conlleva a la sobre expresión del antígeno de la membrana específicos de próstata, el cual está correlacionado con la malignidad de esta patología, aumentando aún más cuanto más agresivo es el cáncer como en pacientes metastásicos y refractarios a las hormonas. Consecuentemente el PSMA ha ganado la atención como objetivo para diagnóstico molecular y terapia dirigida, en particular para cáncer de próstata resistente a la castración (Di Iorio, V. et al. 2022).

En los últimos años, los inhibidores de antígenos de la membrana específicos de próstata son estudiados intensamente para desarrollar ligandos de bajo peso molecular marcados con radionucleidos para obtener imágenes u

opciones terapéuticas dirigidas al cáncer de próstata. Esta última es un tipo de endoradioterapia que requiere la optimización tanto de la obtención del radionucleido (su disponibilidad) como de la incorporación de este a la molécula ligando la cual posee capacidad de dirigirse específicamente al blanco terapéutico sin verse modificada por el radionucleido.

En un esfuerzo por realizar un tratamiento efectivo contra el cáncer de próstata metastásico, se ha desarrollado el inhibidor de PSMA conjugado con DOTA el cual compleja al  $^{177}\text{Lu}$  obteniendo como producto la molécula denominada  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617. Este es un agente terapéutico que ha demostrado buenos resultados en el tratamiento de esta patología el cual fue aprobado por la FDA en el año 2022 (bajo el nombre comercial de Pluvicto® de Novartis-Endocyte). Actualmente en nuestro país sólo es accesible como terapia de uso compasivo por carecer de registro comercial, lo cual limita el acceso a los pacientes.

Las estrategias actuales de tratamiento de cáncer de próstata incorporan enfoques basados en diagnósticos precisos que permitan adaptar los tratamientos con dosis individualizadas para cada paciente. Esta perspectiva se basa en la sensibilidad y especificidad de la adquisición de la imagen subyacente. Aprovechando entonces, la sobre expresión del PSMA en el cáncer de próstata, se diseñó al inhibidor de PSMA-11, el cual es marcado con Galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) para recrear imágenes moleculares de esta patología utilizando un equipo de tomografía de emisión de positrones obteniéndose excelentes resultados (Sterzing, F. et al. 2016). Una ventaja adicional de este método diagnóstico es que la diana molecular es equivalente a la que es dirigida el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, que es utilizado como tratamiento, dando como resultado un buen par teragnóstico. Actualmente en nuestro país, el  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 se utiliza de forma limitada a unos pocos centros de salud como diagnóstico de cáncer de próstata que sobre expresa PSMA. En el año 2021 solo en Ciudad Autónoma de Buenos Aires se realizaron 280 diagnósticos, con lo cual, para los casos en los que se haya encontrado metástasis, el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 sería una adecuada opción terapéutica.

Entonces, debido a que la importancia de disponer de  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  para terapia queda clara, la síntesis del radiofármaco bajo condiciones oportunas que logre obtener un producto apropiado para uso en pacientes resulta en un interés estratégico para la sanidad pública que brindaría un gran avance en el tratamiento de cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.

Para la obtención del complejo  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  en el presente Trabajo Final de Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares se estableció en la metodología el estudio de ciertos parámetros de reacción, los cuales permitieron optimizar la marcación. Posteriormente se realizaba el control de calidad el cual evaluaba la incorporación del  $^{177}\text{Lu}$  al PSMA-617, una vez finalizada la incubación y al cabo de 24 horas como control de estabilidad en el medio de reacción.

Inicialmente para obtener el  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  fue necesario contar con  $^{177}\text{Lu}$  de calidad apropiada. En el presente trabajo experimental se utilizó como precursor el  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ , el cual fue el blanco de irradiación enviado al reactor nuclear RA-3. El producto activado, devuelto por el reactor era con portador de isótopos de lutecio (isótopos  $^{175+176+177+177m}\text{Lu}$ ) los cuales no pueden ser aislados por separación radioquímica. Los primeros tres lotes de  $^{177}\text{Lu}$  se emplearon para marcar a los 8,5, 5,5 y 6,5 días e.o.b respectivamente, mientras que los dos lotes siguientes se utilizaron a 1,5 días de e.o.b. Este adelanto fue provocado por una mejora técnica en la apertura del minican de aluminio por parte del personal de reactor y en el desarrollo de este trabajo experimental significó contar con una mayor actividad de  $^{177}\text{Lu}$  y de mayor AE aparente para realizar los ensayos.

Cuando se presentó el protocolo experimental utilizado para este trabajo experimental se basó en uno preexistente utilizado antes de la pandemia del SARS-CoV-2 (marzo del 2020), con lo cual se tuvo que ir adecuando a las posibilidades actuales. Con esto, uno de los parámetros que se vio modificado fue la cantidad de  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$  que era enviada al reactor nuclear RA-3. En el lote 1 y 2 de blanco de irradiación, se envió 1  $\mu\text{g}$  de  $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$  en la ampolla de cuarzo, como la actividad devuelta por el reactor no era lo suficientemente alta se

decidió aumentar a 2  $\mu\text{g}$  la cantidad de blanco en los lotes 3, 4 y 5. Este hecho dio como resultado una mayor actividad recibida para la realización de las marcaciones. Esto sumado a la optimización en la apertura del minican y la mejora en la recuperación de la actividad que se encontraba en la ampolla de cuarzo, logró una mejora significativa de la actividad que se obtuvo para realizar el desarrollo de estos experimentos. Así mismo, se encuentra en desarrollo un tipo de blanco denominado blanco mixto, el cual pretende aumentar de manera relevante la AE<sub>p</sub> del  $^{177}\text{Lu}$ .

En cuanto a la radiosíntesis, la AEm máxima alcanzada del  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 fue de 7,02 MBq/ $\mu\text{g}$  (0,19 mCi/ $\mu\text{g}$ ) que es el 20% del valor necesario recomendado de la *GUIDELINES* para terapia con  $^{177}\text{Lu}$ . Lo cual sienta un precedente sobre el cual se puede continuar trabajando en la posibilidad de obtener el radiofármaco  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617. Además, la AEm obtenida durante el desarrollo de este trabajo experimental mostró una tendencia ascendente, lo que brinda la idea de que se pueda escalar a los valores de AE tanto de marcación como la de producción (aparente) normativos.

Para analizar la mejor situación de marcación, no basta con solo observar el dato de AEm, se deben comparar todos los parámetros que se variaron con respecto al control de calidad realizado al producto obtenido. Los resultados encontrados se resumen brevemente a continuación.

La Marcación 1 en la que no se incluyó Chelex en el protocolo, mostró una pobre marcación, se obtuvo un valor inferior al 97% necesario para ser considerado aprobado.

A la Marcación 2 se le incluyó el Chelex y fue dividida en dos partes, una con 20 $\mu\text{L}$ /20 $\mu\text{g}$  de ligando (2A) y otra con 50 $\mu\text{L}$ /50 $\mu\text{g}$  de ligando (2B). Los resultados de control de calidad mostraron una variación significativa entre ambas variantes. La Marcación 2A tuvo una escasa incorporación, a diferencia de la 2B que obtuvo una marcación de más del 99% y además mostró una estabilidad admisible a 24 horas.

La Marcación 3 no fue considerada debido a que la apariencia se mostraba con presencia de color y se tomó como criterio de aceptación que la solución de reacción debía estar incolora, translúcida y sin presencia de partículas.

La Marcación 4 fue realizada con más actividad aún y se volvió a incubar por 30 minutos. Lo que se encontró fue que en la marcación se obtuvo una incorporación completa del radionucleido a la molécula ligando pero que a las 24 horas esa estabilidad disminuye levemente y se encuentran especies que no estaban presentes ni bien terminó el proceso de marcación que fueron detectadas por ITLC.

En la Marcación 5 lo que se realizó fue que se utilizó más actividad inicial y se adicionó ácido ascórbico, que en bibliografía se encontró que reduce el efecto de la radiolisis producida por el radionucleido, actuando como *scavenger*. Los resultados de control de estabilidad mostraron la presencia de especies no establecidas encontradas en la ITLC que no se visualizaban por HPLC. Esto ocurría tanto al finalizar la incubación, como a las 24 horas, presentando estabilidad en el tiempo.

Un dato importante surgido al analizar las tendencias de estabilidad a 24 horas es que la estabilidad no depende de la actividad, es decir, con el aumento de la actividad en las sucesivas marcaciones no se ve un descenso significativo en la estabilidad del  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$ . Este hecho influencia a continuar aumentando la cantidad de actividad hasta dosis terapéuticas debido a que el producto se obtiene con un proceso de radiomarcación que lo hace relativamente estable.

En el desarrollo de este método de marcación para el  $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$  se fueron realizando modificaciones de los parámetros, en las sucesivas marcaciones, con la intención de ir mejorando en AEm y estabilidad de la marcación en el tiempo.

En base a los datos analizados, se consideró la situación de la Marcación 5 como la más favorable, debido a que la incorporación es superior al 97%, la AEm es 7,03 MBq/ $\mu\text{g}$  (0,19 mCi/ $\mu\text{g}$ ), la más alta obtenida entre las

marcaciones del presente desarrollo y se obtiene un producto estable a 24 horas en el mismo medio de reacción. Adicionalmente, la AE aparente es 397,01 MBq/ $\mu$ g (10,73 mCi/ $\mu$ g), alcanzando al valor de 370 MBq/ $\mu$ g (10 mCi/ $\mu$ g) recomendado en bibliografía para ser utilizado posteriormente en una radiosíntesis de molécula terapéutica (Zaknun, J. et al. 2013). Sin embargo, se debe seguir estudiando el origen de la especie no identificada que se encuentra en los resultados de ITLC pero que no son visualizados en RP-HPLC con el gradiente que se utilizó en el desarrollo del presente trabajo experimental. Partiendo de este antecedente se pueden establecer protocolos optimizados que tengan en cuenta seguir avanzando en un producto cada vez más adecuado, siempre siguiendo el lineamiento de las características finales de un radiofármaco.

Finalmente, resulta relevante estudiar la estabilidad del  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 en un medio diferente al medio de reacción, como suero salino o suero humano y continuar describiendo criterios experimentales que permitan obtener un radiofármaco cuyos resultados de control de calidad sean aceptables y permitan avanzar hacia un plan de validación y escalabilidad.

---

## **CAPÍTULO 6**

# **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA A FUTURO**

---



## 6.1 Conclusiones finales

A partir de este trabajo se obtuvo información acerca de la radiosíntesis del  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, la cual es la primera marcación de este radiofármaco realizada en la Comisión Nacional de Energía Atómica, sentando un precedente para obtener un tratamiento contra el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración que tiene el potencial de ser desarrollado con  $^{177}\text{Lu}$  producido del reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza.

Se adecuaron los parámetros de la radiosíntesis para mejorar los rendimientos, se estudió su estabilidad a 24 horas y se analizaron los resultados del control de calidad en cada uno de los ensayos, obteniendo resultados satisfactorios a partir de un método manual de laboratorio.

Si bien aún falta determinar más fehacientemente ciertos parámetros referidos a la actividad específica del radionucleido, resulta crucial seguir mejorando la actividad procedente del reactor nuclear RA-3 mediante alguna estrategia que involucre al blanco de reacción. Esto logrará obtener actividades del orden de los tratamientos terapéuticos, que es, en fin de cuentas, el resultado pragmático al cual se aspira.

Queda claro que cada nuevo compuesto que se sintetice, en este caso el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, debe ser estudiado en detalle individualmente, hasta lograr los parámetros deseados, dado que no es posible extrapolar de manera directa los datos obtenidos en bibliografía que se reportan de otros investigadores que también trabajan con la misma molécula. Esto se debe, en parte a que las características finales del  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 dependen íntimamente del proceso de radiomarcación, como se demostró.

Por último, la radiosíntesis de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 utilizando  $^{177}\text{Lu}$  con portador, obtenido en el RA-3 proporciona un avance científico y tecnológico para el país, ya que queda demostrado que con la capacidad instalada se puede obtener el  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 de manera rentable y consecuentemente accesible a la población.

## 6.2 Perspectiva a futuro

A mediano plazo se continuará realizando pruebas para optimizar la radiosíntesis como así también se avanzará en la validación del proceso.

Se llevarán a cabo ensayos mediante espectrometría de rayos X (TXRF) y espectrometría gamma utilizando detectores adecuados, para caracterizar la actividad específica de producción.

También se planifica llevar a cabo ensayos de farmacocinética *in vitro*, ensayos farmacológicos *in vitro* en líneas celulares, y estudios *in vivo* como dosimetría, radiotoxicidad y eficacia terapéutica.

Además, como se mencionó anteriormente, se encuentra en marcha el desarrollo para obtener  $^{177}\text{Lu}$  procedente del RA-3 con actividad específica superior hasta la reportada actualmente, a través de la investigación de un nuevo tipo de blanco denominado blancos mixtos.

Actualmente junto con mi Co-directora nos encontramos trabajando en un proyecto para realizar la radiosíntesis de  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 mediante un método de marcación semiautomática en módulo, el cual tiene la ventaja de cumplir con las normas GMP y brindar la posibilidad de proyectar a los radiofarmacos de  $^{177}\text{Lu}$  como una opción terapéutica que llegue a pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.

En cuanto a lo personal, seguiré formando parte del Laboratorio de Radiofarmacia, continuando la línea de investigación del presente Trabajo Final.

---

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



## Bibliografia

Asti, M. et al. 2011. Influence of cations on the complexation yield of DOTATATE with yttrium and lutetium: a perspective study for enhancing the  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  labeling conditions. *Nuclear medicine and biology*. 39 (4), 509-517.

Banerjee, S. et al. 2015. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linker chemistry, radiochemistry, and practical applications. *American Chemical Society*. 115 (8), 2934-2974.

Beer, T. M. et al. 2014. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*. 371, 424-433.

Benesova, M. et al. 2015. Preclinical evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *The Journal of Nuclear Medicine*. 56 (6) 914-920.

Bräuer, A. et al. 2017.  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 radioligand therapy and outcome in patients with metastasized castration-resistant prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 44, 1663–1670-

Bray, F. et al. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal Clinic*.

Breeman, W. 2012. Practical aspects of labeling DTPA- and DOTA- peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , and  $^{68}\text{Ga}$  for peptide-receptor scintigraphy and peptide-receptor radionuclide therapy in preclinical and clinical applications. *College of pharmacy*. 16 (5), 1-34.

Clinton, S. et al. 2020. World cancer research fund/american institute for cancer research third expert report on diet, nutrition, physical activity, and cancer: impact and future directions. *The Journal of Nutrition, American Society for Nutrition*. 150 (4), 663-671.

De Bono, J. S. et al. 2011. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*. 364, 1995-2005.

Di Iorio, V. et al. 2022. Production and quality control of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-I&T: development of an investigational medicinal product dossier for clinical trials. *Molecules*. 27(13), 4143.

Dolgin, E. 2018. Radioactive drugs emerge from the shadows to storm the market. *Nature Biotechnology*. 36, 1125–1127.

Emmett, L. et al. 2017. Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literatura and discusión of practical aspects of therapy. *Journal of Medical Radiation Sciences*. 64, 52-60.

Ferlay, J. et al. 2019. Global cancer observatory: cancer tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 3 (20).

Heck, M. M. et al. 2019. Clinical outcomes of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA radioligand therapy in earlier and later phases of metastatic castration resistant prostate cancer grouped by previous taxane chemotherapy. *Journal Nuclear Medicine*. 60 (7) 955-962.

Hofman, M. S. et al. 2018.  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 radionuclide treatment in patients whit metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-center, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncology*. 19 (6), 825-833.

Instituto Nacional del Cáncer, 2020. Estadísticas - Incidencias. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

Jia, A. et al. 2022. Lutetium-177 DOTATATE: a practical review. *Practical Radiation Oncology*. 12 (4), 305-311.

Kabasakal, L. et al 2015. Pre-therapeutic dosimetry of normal organs and tissues of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitor in patients with castration-resistant prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 42, 1976–1983.

Kirby, M. et al. 2011. Characterizing the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International Journal Clinic Practice*. 65 (11), 1180-1192.

Kraus, L. A. et al. 2003. The mechanism of action of docetaxel (Taxotere®) in xenograft models is not limited to bcl-2 phosphorylation. *Investigational New Drugs*. 21, 259-268.

Li, Z. et al. 2016. Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy. *Nature*. 533, 547-551

Perera, M. et al. 2016. Sensitivity, specificity, and predictors of positive <sup>68</sup>Ga–prostatespecific membrane antigen positron emission tomography in advanced prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Urology*. 70 (6), 926-937.

Prashanth, R. 2019. Epidemiology of prostate cancer. *World Journal Oncology*. 10 (2), 63-89.

Rajasekaran A. K. et al. 2005. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 288 (5), 975-981.

Raviteja, N. et al. 2016. Preparation of (<sup>177</sup>Lu)PSMA-617 using carrier added (CA) <sup>177</sup>Lu for radionuclide therapy of prostate cancer. *Journal of nuclear medicine and radiation therapy*. 7 (5).

Rebbeck, T. et al. 2013. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of African descent. *Prostate Cancer*. 2013 (12).

Sgouros, G. et al. 2020. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 19, 589-608.

Shahinian, V. B. et al. 2005. Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*. 352, 154-164.

Sinnes, J. P. et al. 2020. <sup>68</sup>Ga, <sup>44</sup>Sc and <sup>177</sup>Lu-labeled AAZTA5-PSMA-617: synthesis, radiolabeling, stability and cell binding compared to DOTA-PSMA-617 analogues. *EJNMMI radiopharmacy and chemistry*. 5 (28).

Sterzing, F. et al. 2016.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. *European Journal Nuclear Medicine Molecular Imaging*. 43, 34-41.

Sung, H. et al. 2020. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide form 36 cancer in 185 countries. *American Cancer Society*. 71 (3), 209-249.

Tran, C. et al. 2009. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 324 (5928), 787-790.

Van Soest, R. J. et al. 2015. Targeting the androgen receptor confers in vivo cross-resistance between enzalutamide and docetaxel, but not cabazitaxel, in castration-resistant prostate cancer. *European Urology*. 67 (6), 981-985.

Wang, J. et al. 2020. High-throughput radio-TLC analysis. *Nuclear medicine and biology*. 82, 41-48.

Yadav, M. et al. 2018. Radioligand therapy with  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA for metastatic castration-resistant prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Roentgenology*. 213 (2).

Zaknun, J. et al. 2013. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRNT) in neuroendocrine tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 40, 800-816.

Zhu, M. L. et al. 2010. Tubulin-targeting chemotherapy impairs androgen receptor activity in prostate cancer. *Cancer Research*. 70 (20), 7992-8002.

---

# **ANEXO I**

# **REGISTROS**

---





Controles Diarios:																		
ID activímetro :E-RF-014 Serie N° 410092																		
ID Fuente control de Cs-137 : 060-15 A=3,59 ± 0,54 MBq (97,03µCi)14/10/15																		
Persona	Fecha y Hora	Comp. previas	Controles Diarios			Fondo < 1µCi	Indicación para fuente control	Resultados Estabilidad ±5%	Respuestas relativas diarias									
			Auto Zero (mV)	BKG	Voltaje (V)				<sup>177</sup> Lu:CAL #		<sup>99m</sup> Tc:CAL #							
Gaspari	08/11/22 10:45	PASA	0,04	0,48	155,5	PASA	PASA	PASA	<sup>177</sup> Lu:CAL # 445 x40				<sup>99m</sup> Tc:CAL # 089					
									A <sub>060-15</sub> <sup>Ref</sup> = 82,4		464		464		141		141	
									A <sub>060-15</sub> = 80		463		464		141		143	
									Desv = 3,3 %		463		464		141		142	
											462		462		141		142	
		463		462		145		142										
Persona	Fecha y Hora	Comp. previas	Controles Diarios			Fondo < 1µCi	Indicación para fuente control	Resultados Estabilidad ±5%	Respuestas relativas diarias									
			Auto Zero (mV)	BKG	Voltaje (V)				<sup>177</sup> Lu:CAL #		<sup>99m</sup> Tc:CAL #							
NAMI	09/11/22	PASA	0,04	0,44	155,5	PASA	PASA	PASA	<sup>177</sup> Lu:CAL #				<sup>99m</sup> Tc:CAL #					
									A <sub>060-15</sub> <sup>Ref</sup> = 82,4		468		466		142		141	
									A <sub>060-15</sub> = 81		467		466		141		141	
									Desv = -2,1 %		466		463		141		141	
											466		467		141		141	
		467		467		141		141										
Persona	Fecha y Hora	Comp. previas	Controles Diarios			Fondo < 1µCi	Indicación para fuente control	Resultados Estabilidad ±5%	Respuestas relativas diarias									
			Auto Zero (mV)	BKG	Voltaje (V)				<sup>177</sup> Lu:CAL #		<sup>99m</sup> Tc:CAL #							
Miguel	10/11/22	PASA	0,04	0,70	155,5	PASA	PASA	PASA	<sup>177</sup> Lu:CAL #				<sup>99m</sup> Tc:CAL #					
									A <sub>060-15</sub> <sup>Ref</sup> = 82,4		466		466		141		141	
									A <sub>060-15</sub> = 80		466		466		141		141	
									Desv = -2,4 %		466		466		141		141	
											465		466		141		141	
		465		466		141		141										

**FIGURA 16:** Ejemplo de registro del control diario del activímetro utilizado en el presente trabajo experimental.

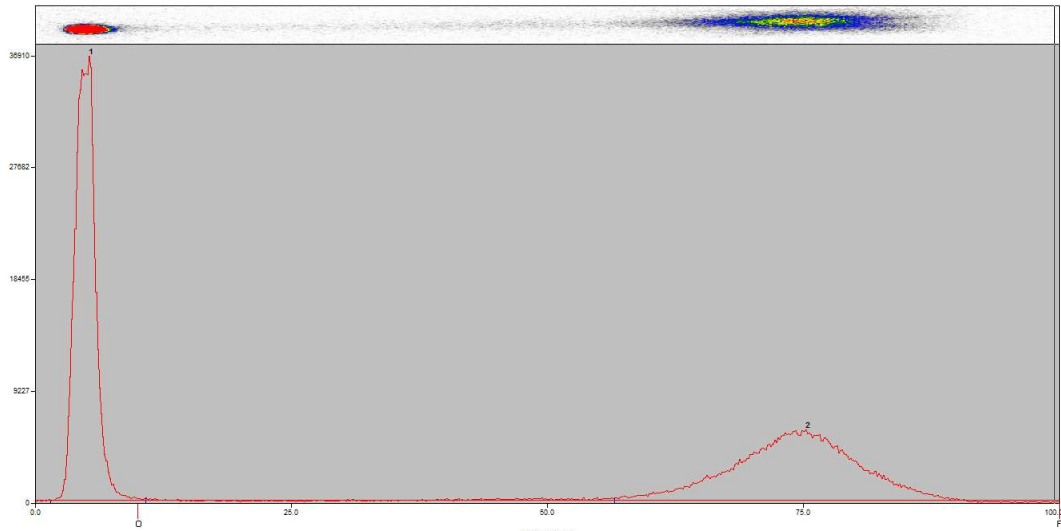
---

## **ANEXO II**

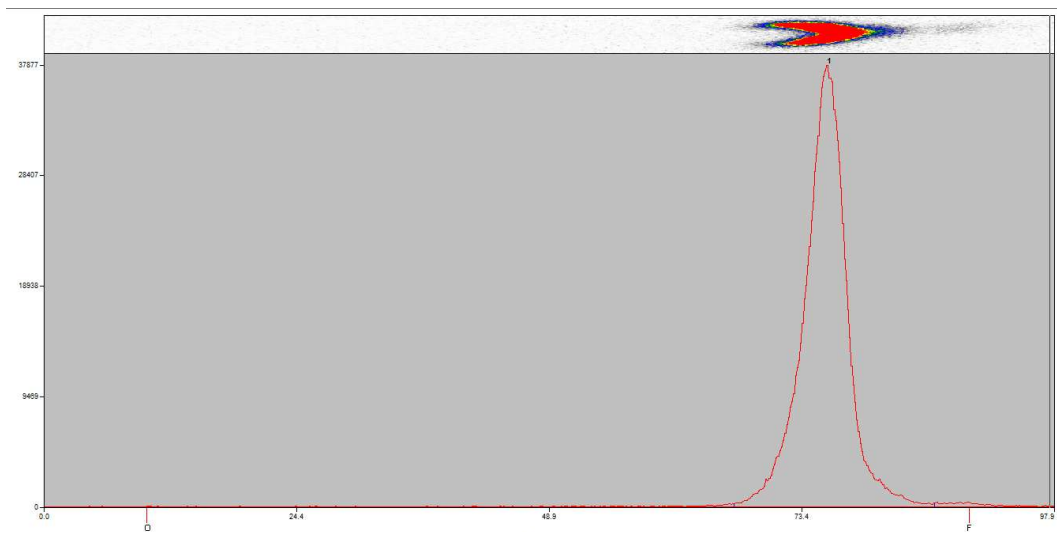
### **RESULTADOS DE ITLC**

---

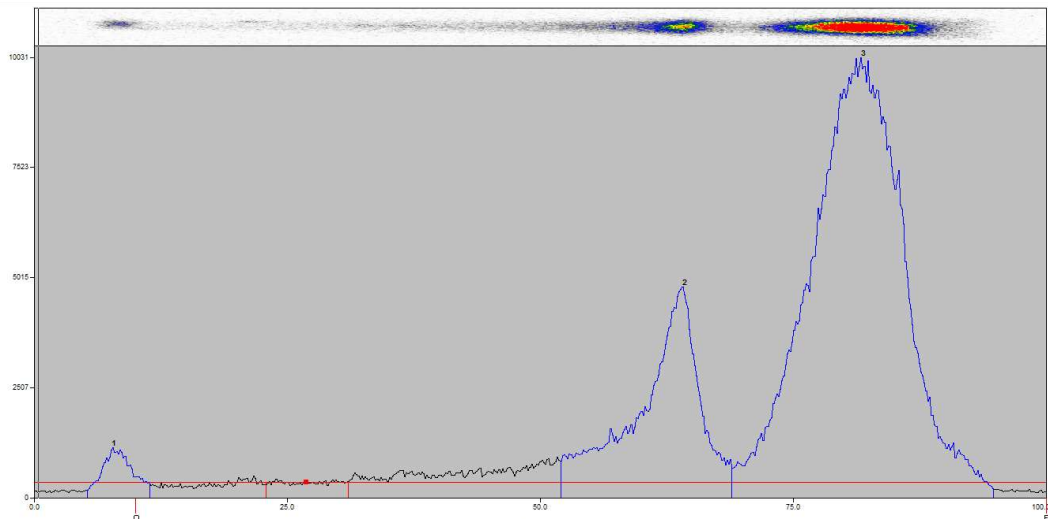




**FIGURA 17:** Se muestra el cromatograma perteneciente a la Marcación 1, realizado al finalizar la incubación.



**FIGURA 18:** Se muestra el cromatograma perteneciente a la Marcación 4, realizado al finalizar la incubación.



**FIGURA 19:** Se muestra el cromatograma perteneciente a la Marcación 4, realizado a las 24 h como control de estabilidad.