

***Generación de radiofármacos: enfoque en técnicas de
radiomarcación y control de calidad***

**CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA
Y APLICACIONES NUCLEARES**

Alumna: Dra. María Cristina Soraires Santacruz
Director: Lic. Adrián Durán

Mes y año: Julio 2023



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	2
Capítulo 1: Radiofármacos	
1.1. Generalidades	3
1.2. Radiomarcación	3
1.3. Control de calidad	4
Capítulo 2: Radiomarcación con Fluor-18 y control de calidad	
2.1 Introducción	9
2.2 Objetivos.	15
2.3. Materiales y métodos	15
2.4. Resultados y discusión	23
Capítulo 3: Radiomarcación con Galio-68 y control de calidad	
3.1 Introducción	27
3.2 Objetivos.	31
3.3. Materiales y métodos	31
3.4. Resultados y discusión	35
Capítulo 4: Radiomarcación con Lutecio-177 y caracterización	
4.1 Introducción	39
4.2 Objetivos.	41
4.3. Materiales y métodos	41
4.4. Resultados y discusión	44
Conclusiones	51
Referencias	52

Agradecimientos

Gracias a Adrián Durán y Alicia Coronel de la Fundación Diagnóstico Nuclear por abrirme las puertas del lugar y enseñarme con tanta generosidad. Sin ustedes no habría sido posible este trabajo.

Gracias a Roger Schibli y Martin Behe del Instituto Paul Scherrer de Suiza por confiar en mí y permitirme hacer las experiencias con Lutecio en sus laboratorios.

Gracias a mi familia por estar siempre.

Resumen

El presente escrito se enmarca en el Trabajo Final de la Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares.

En el primer capítulo se presentan ciertos conceptos básicos de los radiofármacos así como sus características, ciertas definiciones y requisitos de calidad generales de los radiofármacos importantes a tener en cuenta para el desarrollo del trabajo.

En el segundo capítulo se presentan los estudios de la técnica de rutina de radiomarcación automatizada de ^{18}F -FDG, sus cuidados, condiciones estandarizadas y controles de calidad. Dichos estudios incluyeron conocer y analizar el proceso productivo de dicha molécula, el análisis de las técnicas empleadas y el estudio de sus resultados.

En el tercer capítulo se describe la técnica de rutina de radiomarcación automatizada del ^{68}Ga -DOTATATE. También en este capítulo se hace hincapié en cómo es dicho proceso, sus características clave, técnicas y controles necesarios para la liberación del lote para su uso médico.

En el capítulo final se presenta el desarrollo de un potencial nuevo radiofármaco para su uso como antitumoral utilizando Lutecio-177. Este capítulo presenta resultados novedosos en cuanto a la molécula estudiada, describiéndose técnicas manuales de funcionalización y radiomarcación junto con su caracterización a través de estudios físicoquímicos y biológicos.

Finalmente, el trabajo pretende exponer distintas técnicas de radiomarcación, algunas de rutina y otras a nivel experimental, así como también ilustrar y analizar los distintos controles que se hacen a los radiofármacos presentados.

Capítulo 1: Radiofármacos

1.1 Generalidades

Un radiofármaco es una sustancia de calidad farmacéutica que se administra a un paciente para convertirse en una fuente interna de radiación. Está compuesto por un radioisótopo y se utiliza para diagnóstico y/o para tratamiento. A diferencia de los fármacos convencionales, los radiofármacos no tienen acción farmacológica directa, sino que actúan o brindan información a través de la radiación emitida por el radioisótopo.

Un radiofármaco se compone de un radioisótopo y una molécula fría que sirve de transportador o precursor, que pueden ser desde compuestos inorgánicos y moléculas orgánicas pequeñas, hasta péptidos, anticuerpos o células. Es decir, el radiofármaco es producto de la unión de un precursor/transportador y un radioisótopo (salvo excepciones como el NaI).

Las aplicaciones de los radiofármacos son múltiples, se utilizan para obtener información morfológica y funcional de órganos y sistemas, así como para detectar procesos bioquímicos en tiempo y espacio. También se emplean en el tratamiento del cáncer mediante radioinmunoterapia con anticuerpos monoclonales marcados o péptidos marcados. Además, se utilizan para aliviar el dolor causado por metástasis óseas mediante la destrucción de células tumorales y terminaciones nerviosas, entre otras.

El radiofármaco ideal se caracteriza por ser fácil de preparar y administrar, tener una rápida y mayoritaria distribución al sitio blanco, y ser eliminado del organismo en el tiempo óptimo según su aplicación. Cabe mencionar que se debe contar con el radioisótopo adecuado para su uso, considerando el tipo de emisión, energía y período de semi desintegración.

1.2 Radiomarcación

Los requisitos generales para la radiomarcación en aplicaciones médicas son de vital importancia para asegurar la eficacia y seguridad de los radiofármacos utilizados. Estos requisitos abarcan diversos aspectos cruciales que deben cumplirse para obtener un producto final de alta calidad y apto para su uso clínico.

En primer lugar, es fundamental lograr un alto rendimiento de marcación, lo cual implica maximizar la cantidad de radiofármaco obtenido a partir de los precursores radiomarcables. Esto contribuye a optimizar los costos asociados con la producción de radiofármacos, asegurando su viabilidad económica.

La Pureza Radioquímica (PR) es otro aspecto crucial, ya que se busca obtener

productos con una alta pureza radioquímica. Esto implica que la proporción de radiofármaco marcado sea elevada en comparación con otros productos radioquímicamente impuros.

Es importante que el método de marcación utilizado preserve la actividad biológica de la biomolécula. Esto implica que la biomolécula siga siendo capaz de reconocer y unirse a las moléculas diana en el organismo, lo cual es fundamental para asegurar la eficacia del tratamiento o la detección en el diagnóstico.

Asimismo, se requiere que los conjugados obtenidos sean estables, es decir, que conserven su actividad y características durante el almacenamiento y transporte. Esto es esencial para garantizar la eficacia y seguridad del radiofármaco durante su uso clínico, evitando la degradación o pérdida de actividad.

Por último, se deben considerar el costo y la disponibilidad del radioisótopo utilizado para la marcación. Es importante que el radioisótopo seleccionado sea económicamente viable y esté comercialmente disponible en la región. Además, deben seguir las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP), lo cual garantiza estándares de calidad y seguridad en su producción.

Cumplir con estos requisitos generales es fundamental para el desarrollo de radiofármacos eficaces y seguros en aplicaciones médicas. Al garantizar un alto rendimiento de marcación, actividad específica adecuada, alta PR, preservación de la actividad biológica, estabilidad del conjugado y consideraciones de costo y disponibilidad, se asegura la calidad y eficacia de los radiofármacos utilizados en beneficio de los pacientes.

1.3 Control de calidad

El control de calidad y la garantía de calidad son de vital importancia para todas las especialidades medicinales, pero existen ciertos asuntos específicos en el caso de los radiofármacos.

Un radiofármaco de diagnóstico de baja calidad podría proporcionar información incorrecta sobre la condición del paciente, lo que llevaría a una elección inapropiada de la terapia. Por otro lado, un radiofármaco terapéutico de no conformidad con la calidad podría resultar en una exposición excesiva a la radiación en tejidos no blanco y/o una disminución de la eficacia del tratamiento. Además, la disminución de la actividad de los radiofármacos en el tiempo, plantean desafíos logísticos para realizar el control de calidad antes de su liberación para su uso clínico. Por lo tanto, resulta fundamental que los radiofármacos se preparen dentro de un sistema de calidad que asegure un control sobresaliente de los materiales y el personal, una documentación

adecuada y una revisión continua de los resultados obtenidos.

En general, se considera que los radiofármacos que se utilizan en la clínica son agentes seguros, en parte debido a las pequeñas cantidades químicas que se administran en la mayoría de los casos (Ballinger, 2015). Aunque la preparación de los radiofármacos suele ser confiable, a lo largo de los años se han encontrado una amplia gama de problemas, tanto mayores como menores (Vermeulen et al., 2019). La confiabilidad de los radiofármacos depende tanto del diseño de los procedimientos de preparación (por ejemplo, generadores y kits, unidades de síntesis automatizadas) como de las medidas de control de calidad implementadas antes de su liberación para su uso clínico.

Mencionaremos además algunas cuestiones generales que deben cumplirse para las especialidades medicinales según la Farmacopea Argentina 7ma ed. En cuanto a los laboratorios de control de calidad, los mismos deben estar separados de las áreas de producción. A su vez, las áreas donde se realizan pruebas biológicas, microbiológicas o por radioisótopos, deben estar adecuadamente separadas entre sí.

Los laboratorios de control deben estar diseñados de conformidad con las operaciones que en ellos se llevarán a cabo. Se debe contar con espacio adecuado para el almacenamiento de muestras, sustancias de referencia y registros. También se debe prever una adecuada ventilación y prevenir la formación de vapores nocivos. Es importante que los laboratorios de radioisótopos cuenten con instalaciones independientes, incluyendo las de control de aire.

En cuanto a los equipos se deben diseñar, construir, adaptar, ubicar y mantener de conformidad a las operaciones que se llevarán a cabo. El diseño y ubicación de los equipos deben ser tales que se reduzca al mínimo el riesgo de cometer errores y que se pueda efectuar eficientemente la limpieza y mantenimiento de los mismos, con el fin de evitar la contaminación cruzada, el polvo, la suciedad y cualquier factor que pueda influir negativamente en la calidad de los productos. Es importante instalar los equipos de manera que se minimice el riesgo de error y contaminación. Los equipos de producción deben ser diseñados, mantenidos y ubicados de tal forma que puedan usarse para los fines previstos. Su diseño debe permitir una fácil y completa limpieza siguiendo un cronograma establecido.

La calidad de los materiales utilizados en la producción debe ser adecuada a los fines a los que se destinan. Los materiales no conformes deben ser rechazados y debidamente identificados y almacenados de forma segura. Se deben establecer procedimientos para el manejo de los materiales no conformes y su disposición final, que pueden incluir su destrucción o devolución al proveedor, según corresponda.

Se deben establecer procedimientos para el manejo y transporte de los radiofármacos, incluyendo su embalaje y etiquetado, a fin de garantizar que lleguen a su destino en las condiciones adecuadas. Los materiales deben ser transportados en vehículos adecuados y envasados de forma que se evite su exposición. Además, se deben mantener registros de los envíos realizados, incluyendo la identificación, las fechas de envío y recepción, y la firma de las personas responsables.

En resumen, la implementación de prácticas adecuadas en el área de control de calidad, la selección y control riguroso de los equipos y materiales utilizados en la fabricación, y el cumplimiento de los requisitos establecidos, son elementos fundamentales para garantizar la calidad y seguridad de los productos farmacéuticos.

Criterios generales para el control de calidad de las preparaciones radiofarmacéuticas:

Las preparaciones radiofarmacéuticas deben cumplir con ciertos criterios de calidad para garantizar su eficacia y seguridad en el uso médico. A continuación, se describen los criterios generales que se aplican a estas preparaciones:

1. **Pureza radionucleídica:** Este criterio se refiere a la verificación de la identidad de todos los radionucleídos presentes en la preparación y su actividad. La actividad debe informarse para un tiempo determinado, especificando el día, hora y, en algunos casos, minutos. La determinación de la pureza radionucleídica depende del período de semidesintegración del radionucleído y se utiliza un método de detección adecuado para evaluar cada radionucleído.
2. **Pureza radioquímica:** Se refiere a la separación de las diferentes sustancias que contienen el radionucleído y a la estimación de la fracción de radiactividad asociada a la sustancia declarada. Las impurezas radioquímicas pueden originarse durante la producción del radionucleído, en los procedimientos radioquímicos, en los procesos de separación o purificación durante la elaboración de la preparación y durante el almacenamiento, especialmente debido a la autorradiólisis. La pureza radioquímica debe mantenerse hasta la fecha de vencimiento de la preparación y se puede determinar utilizando métodos analíticos de separación, como cromatografías en papel y en placa, electroforesis, autorradiografía, densitometría y radiocromatografía.
3. **Actividad específica y concentración de actividad:** Este criterio implica el cálculo de la actividad específica mediante la división de la concentración de actividad por la concentración de la sustancia en cuestión, siempre y

cuando la pureza radionucleídica y la pureza radioquímica hayan sido evaluadas previamente. Tanto la actividad específica como la concentración de actividad varían con el tiempo, por lo que deben establecerse para un tiempo específico, indicando la fecha, horas y minutos de acuerdo con el período de semidesintegración del radionucleído.

4. Pureza química: Se refiere a la determinación cuantitativa de cada una de las especies químicas presentes en la preparación radiofarmacéutica. La monografía correspondiente especificará las sustancias a analizar y el método de análisis requerido.
5. Controles Físico-Químicos: Además de la determinación del pH, se deben realizar controles del aspecto físico del radiofármaco en diferentes etapas, como la producción, la recepción, la marcación (si corresponde) y antes de su administración. Se recomienda realizar una observación directa del producto marcado utilizando vidrio plomado o indirectamente a través de un espejo. Cualquier cambio en el color o claridad de la solución debe ser analizado, ya que puede indicar cambios en el radiofármaco que podrían afectar su comportamiento biológico. Además, se deben determinar la presencia de partículas coloidales y de macroagregados y microesferas utilizando métodos físicos apropiados.
6. Controles biológicos: Toda preparación radiofarmacéutica que se emplea con fines médicos, tanto para estudios diagnósticos como para fines terapéuticos, debe ser capaz de localizarse preferentemente en el órgano o sistema cuya forma, función o metabolismo se desea evaluar. Para garantizar esta localización precisa, es imprescindible su estudio durante el desarrollo del radiofármaco. El estudio de biodistribución es una etapa fundamental en la evaluación de un radiofármaco, ya que permite determinar la distribución y el comportamiento del mismo en el organismo. Mediante este estudio, se busca obtener información sobre la acumulación, retención y eliminación del radiofármaco en los diferentes tejidos y órganos. Durante el proceso de estudio de biodistribución, se utilizan técnicas de imagenología nuclear, como la gammagrafía o la autoradiografía, para visualizar y cuantificar la distribución del radiofármaco en el cuerpo del paciente. Estas técnicas permiten obtener imágenes detalladas y precisas de la localización del radiofármaco en los órganos de interés. Es importante destacar que el estudio de biodistribución debe llevarse a cabo de manera minuciosa y cumplir con los protocolos y criterios establecidos en las regulaciones y directrices pertinentes. Esto asegura la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos, permitiendo una correcta interpretación de los mismos y una adecuada toma de decisiones clínicas.

a) Biodistribución: Se debe realizar un estudio de biodistribución para evaluar la localización preferente de la preparación radiofarmacéutica en el órgano o sistema deseado. El estudio debe ser exhaustivo y cumplir con los límites y parámetros establecidos en la monografía correspondiente.

b) Toxicidad aguda y subcrónica: Se deben llevar a cabo estudios de toxicidad aguda y subcrónica para evaluar los efectos adversos del radiofármaco en los diferentes sistemas biológicos. Los estudios deben cumplir con las directrices y normativas nacionales e internacionales pertinentes.

c) Esterilidad y endotoxinas: Si la preparación radiofarmacéutica es para administración parenteral, se deben realizar pruebas de esterilidad y detección de endotoxinas bacterianas, siguiendo los métodos y límites establecidos en las farmacopeas y regulaciones correspondientes.

Estos son criterios generales para el control de calidad de las preparaciones radiofarmacéuticas, pero es importante tener en cuenta que cada preparación específica puede tener requisitos adicionales que deben cumplirse. Las farmacopeas, regulaciones y directrices nacionales e internacionales proporcionan orientación detallada sobre los ensayos y límites específicos para cada radiofármaco.

Capítulo 2: Radiomarcación con Fluor-18 y control de calidad

2.1 Introducción

Generalidades del ^{18}F

El radionúclido Fluor-18, un emisor de positrones, es ampliamente utilizado en la imagen molecular mediante la tomografía por emisión de positrones (PET). El Fluor-18 tiene un corto periodo de semidesintegración de 109.7 minutos, lo que limita las síntesis y protocolos de estudio en términos de tiempo. Por lo tanto, los métodos para incorporar este radionúclido de corta duración en moléculas orgánicas requieren una química rápida, siendo deseable introducir al ^{18}F durante la última etapa sintética posible. El ^{18}F se fabrica principalmente utilizando un ciclotrón para bombardear un blanco, generalmente de ^{18}O -agua pura. El flúor producido está en forma de una solución acuosa de fluoruro 18, que se utiliza en una rápida síntesis química del radiofármaco.

^{18}F -FDG

^{18}F -FDG es un análogo de la glucosa en el cual el grupo hidroxilo en el carbono 2 de una molécula de glucosa es reemplazado por un fluoruro. Al igual que la glucosa, el ^{18}F -FDG es captado por las células vivas a través de un transporte facilitado y luego fosforilado por la hexoquinasa. A diferencia de la glucosa, el ^{18}F -FDG no puede someterse a un metabolismo adicional debido a que el grupo hidroxilo en el carbono 2 es necesario para este proceso (Gallagher, et al., 1978). Sin embargo, el ^{18}F -FDG es un buen indicador de la captación de glucosa y la viabilidad celular.

La captación de análogos de glucosa en las células vivas también depende de modificaciones en varios carbonos en diferentes posiciones. Se ha demostrado que la especificidad de la 3-desoxiglucosa (3-DG) y la 4-desoxiglucosa (4-DG) hacia la hexoquinasa se reduce en 100 veces (Bessell et al., 1973), por lo tanto, la 3-DG y la 4-DG no se retienen dentro de las células. Del mismo modo, la 3-fluoro-desoxiglucosa y la 4-fluoro-desoxiglucosa no se acumulan tanto en las células vivas como el ^{18}F -FDG. Dentro de las técnicas para su obtención, la reacción de sustitución nucleófila es la más utilizada actualmente, sin embargo cabe mencionar que también es posible su obtención mediante la reacción de fluoración electrofílica.

Síntesis de ^{18}F -FDG

La sustitución nucleofílica es una reacción química que implica el reemplazo de un nucleófilo (especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie) por un grupo saliente. La Figura 1 muestra la reacción de sustitución

nucleofílica SN_2 . El nucleófilo tiene una alta afinidad hacia el centro relativamente deficiente en electrones y como resultado, se forma un enlace covalente con la molécula principal y se desplaza al grupo saliente. Además, la configuración estereoquímica de la molécula principal también se modifica.

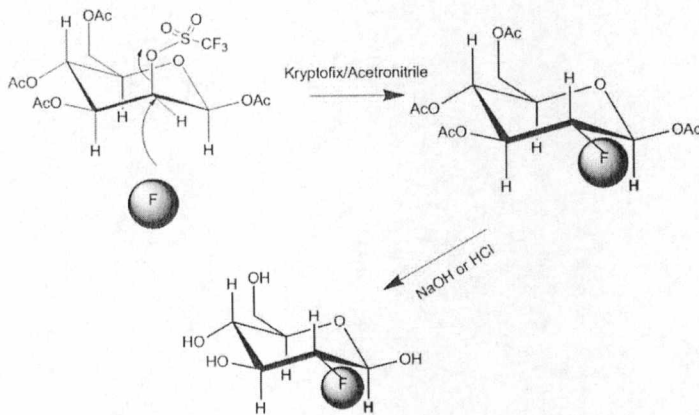


Fig. 1. Sustitución nucleofílica para la obtención de ^{18}F -FDG

En la síntesis de ^{18}F -FDG, el ion $^{18}F^-$ es el nucleófilo. El precursor es triflato de manosa, en el cual los carbonos en las posiciones 1, 3, 4 y 6 de una molécula de manosa están protegidos con un grupo acetilo y el triflato es el grupo saliente en el carbono 2. En presencia de Kryptofix como catalizador y acetonitrilo como solvente, el ion $^{18}F^-$ se acerca al triflato de manosa en el carbono 2, mientras que el grupo triflato abandona la molécula de manosa protegida para formar ^{18}F -FDG (Fig. 1).

Las etapas de síntesis de ^{18}F -FDG comprende:

1. Extracción de ^{18}F del agua enriquecida en $^{18}O^-$ proveniente del blanco del ciclotrón. El flúor tiene una alta energía de hidratación, por lo que el agua no es un solvente adecuado en esta síntesis. Se debe utilizar un solvente polar aprótico como el acetonitrilo en una reacción de sustitución nucleofílica SN_2 . Dado que el $^{18}F^-$ se produce mediante la reacción $^{18}O(p,n)^{18}F^-$, es necesario aislar el ion $^{18}F^-$ de su entorno acuoso. La forma más conveniente de lograrlo es utilizar una columna Sep-Pak QMA (intercambio de aniones de amonio cuaternario). El $^{18}F^-$ se retiene mediante una reacción de intercambio iónico y se permite que el agua enriquecida en $^{18}O^-$ fluya a través de ella. Luego, el $^{18}F^-$ retenido se eluye con una solución de acetonitrilo de Kryptofix y carbonato de potasio (Figura 5).
2. Agregar un contraión cargado positivamente para restablecer la reactividad del $^{18}F^-$ antes de la evaporación del agua residual. En un entorno acuoso, los iones cargados negativamente deben ir

acompañados de contrapartes cargadas positivamente. Por lo general, el $^{18}\text{F}^-$ lavado del blanco del ciclotrón va acompañado de trazas de iones metálicos de la superficie del blanco. Al pasar a través del intercambio iónico QMA de amonio ligero, se retiene el $^{18}\text{F}^-$ y los iones metálicos se pierden en el agua enriquecida en $^{18}\text{O}^-$. Se han utilizado varios tipos de contracciones cargados positivamente, incluyendo iones metálicos grandes como rubidio o cesio, iones de potasio complejados por una estructura de anillo grande como Kryptofix y sales de tetrabutylamonio (Schlyer, 2004). Kryptofix es un éter de corona cíclica (Figura 6) que se une al ion de potasio, evitando la formación de $^{18}\text{F-KF}$. Por lo tanto, el potasio actúa como el contraión del $^{18}\text{F}^-$ para mejorar su reactividad pero no interfiere con la síntesis. Dado que Kryptofix puede causar apnea y convulsiones, todos los módulos de síntesis automáticos incluyen múltiples etapas de eliminación para asegurar que haya una cantidad insignificante de Kryptofix en los productos finales de $^{18}\text{F-FDG}$. Las sales de tetrabutylamonio (TBA) también se utilizan ampliamente como catalizadores en lugar de Kryptofix (Lemaire et al., 2002). Lógicamente, la adición de un catión contraión también incluye la adición de otro anión. El anión carbonato es el más utilizado debido a que es menos probable que interfiera con la síntesis (Schlyer, 2004).

3. Evaporación del agua residual con acetonitrilo. Después de que el $^{18}\text{F}^-$ se eluye en el recipiente de reacción, es necesario evaporar cualquier agua residual de la solución. La ventaja de utilizar acetonitrilo como solvente de elución es que forma una mezcla azeotrópica con agua. La evaporación del acetonitrilo en una atmósfera de nitrógeno secará la mezcla de reacción. La mayoría de los sintetizadores automáticos de $^{18}\text{F-FDG}$ realizan la etapa de evaporación del acetonitrilo varias veces para asegurar que se elimine toda el agua residual.
4. Sustitución nucleofílica de $^{18}\text{F-FDG}$. Una vez que se ha evaporado el agua residual, se agrega el precursor de triflato de manosa y se inicia la reacción nucleofílica. Se ha desarrollado una amplia variedad de protocolos para esta etapa, pero en general, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante un tiempo determinado en presencia del catalizador, como Kryptofix 222TM o sales de tetrabutylamonio. La reacción se lleva a cabo en un recipiente cerrado para evitar la pérdida de $^{18}\text{F-FDG}$ y minimizar la exposición a la radiación.
5. Luego de la sustitución nucleofílica es necesaria una etapa de hidrólisis para eliminar los cuatro grupos acetilo que protegen las demás posiciones. La hidrólisis puede ser tanto ácida como básica, en reactor o en columna.

6. Purificación y formulación del ^{18}F -FDG sintetizado. Después de la reacción nucleofílica, el ^{18}F -FDG se purifica mediante una combinación de métodos, como cromatografía en columna, extracción líquido-líquido y síntesis de fase sólida. Esto asegura que los productos de degradación y otros contaminantes se eliminen, y el ^{18}F -FDG se obtenga en su forma pura. Luego, el ^{18}F -FDG se formula en una solución adecuada para su administración a los pacientes, generalmente una solución acuosa estéril de ^{18}F -FDG.

En resumen, la síntesis de ^{18}F -FDG mediante sustitución nucleofílica es un proceso complejo, pero bien establecido. Ha habido avances significativos en los últimos años, lo que ha llevado a un mejor rendimiento y reducción del tiempo de reacción. Los sintetizadores automáticos controlados por computadora han facilitado la producción eficiente y reproducible de ^{18}F -FDG, que es un radiotrazador esencial en la imagenología molecular y la medicina nuclear.

Control de calidad de ^{18}F -FDG

Los requisitos de calidad del ^{18}F -FDG se establecen en diversas farmacopeas, la USP, BP, EP, más no así en la Farmacopea Argentina. Diferentes países pueden adoptar un conjunto diferente de estándares.

El control de calidad desempeña un papel importante en la producción y suministro de ^{18}F -FDG, ya que es una obligación legal asegurarse de que el producto sea absolutamente seguro desde el punto de vista fisiológico antes de su distribución (Weiler, 2000). A continuación, se muestra una lista de pruebas de control de calidad que deben realizarse antes de la distribución de ^{18}F -FDG, a excepción de la prueba de endotoxina bacteriana.

Inspección visual

La ^{18}F -FDG debe ser incolora, transparente y libre de partículas, y debe inspeccionarse detrás de un blindaje suficiente (Yu, 2006)

Identidad y pureza radionucleídica

Para evaluar la identidad radionucleídica, se coloca una muestra de ^{18}F -FDG en un calibrador de dosis para medirla. Una vez medida, se deben anotar tanto el tiempo como la actividad. Después de 20-30 minutos, se debe volver a medir la muestra y se deben anotar nuevamente el tiempo y la actividad. La vida media se puede calcular utilizando la ecuación, $t_{1/2} = -\ln 2$ (diferencia de tiempo / [(actividad final / actividad inicial)]) y debe estar dentro del rango de 105-115 minutos (Yu, 2006).

Pureza química

La prueba de pureza química se realiza en cualquier sustancia química que se use o se forme durante el proceso de síntesis de ^{18}F -FDG (Yu, 2006). La determinación del contenido de glucosa se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Durante el proceso de síntesis, no solo se forma ^{18}F -FDG, sino también glucosa y, dependiendo del método de síntesis utilizado, 2-cloro-2-deoxi-D-glucosa (2-CIDG) en el caso de la hidrólisis ácida y 2-deoxi-2- ^{18}F fluor-D-manosa (^{18}F -FDM) en el caso de la hidrólisis alcalina. Por lo tanto, es muy importante realizar pruebas de pureza química debido a la separación analítica de estos compuestos muy similares (Weiler, 2000).

Se debe utilizar una columna de intercambio iónico aniónico básico fuerte con una fase móvil de NaOH 0,1 M y una velocidad de flujo de 1 ml/min para realizar la corrida en el HPLC (Weiler, 2000). La corrida se realiza inyectando una solución estándar de referencia y luego la solución de la muestra a analizar. Los resultados deben mostrar que el área bajo el pico de FDG de la muestra debe encontrarse dentro de límites aceptables.

También es necesario probar cualquier residuo del catalizador de transferencia de fase. Esto se realiza mediante cromatografía en capa fina (TLC) y, en el caso de ^{18}F -FDG, se utiliza para la detección de posibles residuos de Kryptofix, el aminopolietéter. Se aplican 2 μL de la solución del producto en una placa junto a un punto de solución de referencia que contiene el catalizador de transferencia de fase en un límite concentrado de 2,2 mg por dosis. Luego, la placa se desarrolla utilizando una mezcla de 1 volumen de amoníaco y 9 volúmenes de metanol (Weiler, 2000). Luego se seca durante 15 minutos y la placa se expone al vapor de yodo, lo que hace que los puntos de aminopolietéter sean visibles. Luego se realiza una comparación visual entre la intensidad de los puntos para evaluar la concentración de aminopolietéter del producto. El punto de la solución de prueba debe tener un color más claro que el punto de la solución de referencia (Yu, 2006).

Pureza radioquímica e identidad radioquímica

Para evaluar la pureza radioquímica, se pueden utilizar los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC). En el caso del método de HPLC, se debe utilizar un detector de actividad adecuado y las áreas de pico calculadas deben corresponder al porcentaje de la actividad total. El ^{18}F -FDG y el ^{18}F -FDM combinados deben representar el 95% de la actividad sin perjuicio de otros rangos que pueda establecer el laboratorio. La parte de ^{18}F -FDM del porcentaje total debe ser como máximo 1/10 (Weiler, 2000). La identidad radioquímica se determina mediante cromatografía en capa fina (TLC). La TLC se realiza utilizando una placa de sílice, llamada fase estacionaria, y con un eluyente compuesto por un 95% de acetonitrilo y un 5%

de agua, llamado fase móvil, y un escáner TLC. La técnica de aplicación tiene un efecto significativo en los resultados de TLC, por lo tanto, el debe estandarizarse un volumen de muestra entre 2 y 5 μL (Hung, 2002).

Prueba de integridad del filtro

Debido a que el ^{18}F -FDG se libera e inyecta en pacientes antes de la realización de la prueba de esterilidad, no hay una forma directa de asegurar la esterilidad del producto. La prueba de integridad del filtro es una forma indirecta de determinar si el producto es estéril. La teoría detrás es que si la integridad del filtro no está comprometida, el filtro habría cumplido su función y, por lo tanto, habría eliminado cualquier microorganismo presente en el producto ^{18}F -FDG (Yu, 2006).

Existen varios dispositivos de prueba de integridad del filtro disponibles en el mercado, aunque el mecanismo detrás de ellos es el mismo. Se pasa un flujo de aire a través del dispositivo para llegar al filtro y luego a un depósito de agua. Un indicador mostrará la presión ejercida sobre la membrana del filtro por el flujo de aire. La membrana del filtro debe poder soportar la presión máxima indicada en las especificaciones del filtro. Si la membrana está rota, el flujo pasará a través de la membrana del filtro y entrará en el depósito de agua, lo que provocará la aparición de burbujas de aire (Yu, 2006).

Solvente residual

La cromatografía de gases (GC) es un método utilizado para medir la presencia de solventes residuales como alcohol y acetonitrilo en el ^{18}F -FDG. La prueba de GC debe realizarse utilizando detección de ionización de llama. Los solventes residuales pueden permanecer en la preparación final de la dosis de ^{18}F -FDG y pueden tener efectos tóxicos, farmacológicos y fisiológicos potenciales en el paciente. Por lo tanto, se debe realizar la prueba de solvente residual para asegurar que cualquier solvente residual con potencial toxicidad esté dentro de los límites apropiados. Los límites aceptables son los siguientes: 0,04% de acetonitrilo, 0,5% de alcohol deshidratado y 0,5% de éter presentes en el producto final de ^{18}F -FDG (Hung, 2002).

pH

Los niveles de pH de un trazador radiactivo inyectable deben ser lo más cercanos posible al pH fisiológico. La prueba de nivel de pH se puede realizar con el uso de papel de prueba de pH. El rango de pH aceptable para el ^{18}F -FDG es entre 4,5 y 8,5, y esta prueba debe completarse antes de que se libere el producto (Hung, 2002).

Prueba de esterilidad

La esterilidad se refiere a la presencia de microorganismos. Se debe realizar la prueba de esterilidad posterior a la liberación para cada lote individual de ^{18}F -FDG. El ^{18}F -FDG se debe inocular tanto en medio de tioglicolato fluido (FTM) como en medio de digestión de caseína de soja (SCDM) dentro de las 30 horas posteriores a la producción a 37°C. El FTM es un medio para bacterias anaerobias y el SCDM para bacterias aerobias. La prueba de esterilidad puede tardar hasta 14 días en completarse y, por lo tanto, no permite obtener resultados antes de la liberación (Yu, 2006). Dado que el radiofármaco se libera y se utiliza clínicamente antes de que los resultados estén disponibles, el producto final de ^{18}F -FDG se pasa a través de un filtro de 0,22 μm (Hung, 2002).

Prueba de endotoxinas bacterianas

La prueba del lisado de amebocitos de Limulus (LAL) se utiliza para evaluar la presencia de endotoxinas bacterianas en la preparación de radiofármacos. Se utiliza el método de ensayo de coágulo en gel y se basa en la formación de un coágulo de gel en presencia de endotoxina (Yu, 2006). Este método utiliza un lisado de amebocitos del cangrejo herradura, Limulus Polyphemus (Weiler, 2000). La presencia de endotoxinas no debe superar los 175/V por mililitro de ^{18}F -FDG, donde V es la dosis total administrada máxima, en mililitros, en el tiempo de vencimiento (Hung, 2002). El kit de prueba requiere un período de incubación de 20 a 60 minutos (Yu, 2006).

2.2 Objetivos

Se proponen como objetivos el estudio de la técnica de rutina de radiomarcación automatizada de ^{18}F -FDG, sus cuidados, condiciones estandarizadas y control de calidad.

2.3 Materiales y métodos

Flujograma de trabajo general

El proceso de producción y distribución del ^{18}F -FDG en la Fundación Diagnóstico Nuclear sigue un flujo de trabajo bien definido. Comienza con la irradiación en el ciclotrón, donde el Operador de Ciclotrón enciende el equipo. A las 2:30 hs, se inicia la irradiación a una corriente de 100 mA, que se mantiene durante 3 horas hasta las 5:30 hs, momento en el que se completa la irradiación.

Mientras tanto, a las 4:00 hs, el operador ingresa a la celda de producción y realiza los chequeos, la limpieza y la carga de los módulos de síntesis y

fraccionamiento (Fig 2). Una vez que se recibe la actividad del ciclotrón, que generalmente es de 8 Ci, se inicia el proceso de síntesis del ^{18}F -FDG. Durante esta etapa, el OPR realiza tomas de aire del laboratorio de producción y/o de la chimenea para garantizar la seguridad y control del entorno.

Una vez que se recibe la actividad de ^{18}F -FDG en la celda de fraccionamiento, que suele ser de 5.5 Ci, se procede al fraccionamiento de los pedidos. Estos se esterilizan mediante filtrado aséptico, se calibran y se preparan para su entrega al despacho. Antes de ser liberados, se realizan los controles de calidad físicoquímicos para asegurar la calidad del producto. Cabe mencionar que el sector de control de calidad (Fig. 3) se encuentra en el área lindante al de producción conectadas por una esclusa (Fig.4).



Fig. 2. área de producción de radiofármacos de la Fundación Diagnóstico Nuclear



Fig.3. Área de control de calidad de la Fundación Diagnóstico Nuclear.



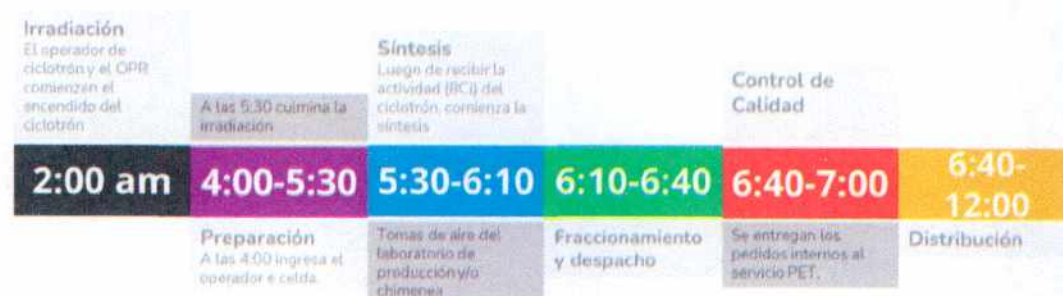
Fig. 4. Esclusa que comunica el área de producción con el área de control de calidad. La cercanía de estas áreas hace posible la rapidez en el análisis, crítica por los tiempos de decaimiento de los radiofármacos. En la mesa de la imagen se observan varios contenedores de plomo utilizados para trasladar las alícuotas de las muestras a ser analizadas

Posteriormente, el personal de despacho se encarga de acondicionar los bultos y entregarlos a los choferes para su transporte. Mientras tanto, el operador monitorea y confecciona las etiquetas de transporte necesarias para asegurar la trazabilidad y seguridad del producto.

A las 7:00 hs, el Control de Calidad (CC) aprueba el lote y la Dirección Técnica (DT) procede a su liberación. Es importante destacar que los pedidos internos al servicio de Tomografía por Emisión de Positrones (PET) se entregan, pero no se inyectan hasta que DT los libere. A las 12:00 hs, se realiza la entrega del pedido más lejano, que en este caso sería Paraná, Entre Ríos.

Finalmente, los choferes inician la distribución a todos los clientes, pero el producto no se entrega hasta que DT lo libere. Este proceso asegura la calidad, seguridad y eficiencia en la producción y distribución del ^{18}F -FDG a los diferentes centros de salud y hospitales que lo requieren.

Diagrama general de flujo de trabajo:



Síntesis de ^{18}F -FDG

La generación de los iones ^{18}F se llevó a cabo en un ciclotrón auto-blindado con capacidad de producción de radioisótopos de corta vida media (Siemens CTI Eclipse), utilizando un blanco de agua enriquecida en ^{18}O .

La radiosíntesis completamente automatizada de ^{18}F -FDG se realizó en un sistema de síntesis Trasis All in One (Fig. 5) con un *cassette* de un solo uso y un kit de reactivos listo para usar de ABX (ABX, advanced biochemical compounds, Alemania). El *cassette* y el kit de reactivos contienen cartuchos Sep-Pak y productos químicos necesarios para la síntesis de ^{18}F -FDG. El kit de reactivos incluye: solución eluyente, acetonitrilo, precursor de manosa triflato, etanol, solución de hidróxido de sodio, solución buffer y agua estéril para inyección.

Los iones de $^{18}\text{F}^-$ resultantes del ciclotrón se transfirieron al módulo de síntesis de Trasis All in One y se separaron del agua enriquecida utilizando una columna de intercambio aniónico de amonio cuaternario (Sep Pak light accell plus QMA,

Waters), seguido de la elución del cartucho al recipiente de reacción utilizando una solución eluyente (kryptofix, carbonato de potasio, acetonitrilo extrapuro y agua pura) (Fig. 6)

Para preparar las condiciones de sustitución nucleofílica, la mezcla de reacción se secó por destilación azeotrópica del agua con acetonitrilo seguida de evaporación al vacío para asegurarse de que no quedara agua. La evaporación se realizó a 95 °C bajo flujo de nitrógeno y vacío. En el siguiente paso, se agregó el precursor de manosa triflato (1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometansulfonil- β -D-manopiranos, grado farmacéutico) disuelto en acetonitrilo de alta pureza al recipiente de reacción. En presencia de kryptofix, el anión triflato fue reemplazado por el ion ^{18}F (reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ a 85 °C) y se formó 2-fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosa (ACY- ^{18}F FDG). La mezcla de reacción se diluyó con agua estéril y se transfirió a un cartucho de fase inversa (Sep Pak plus C18, Waters). El ACY- ^{18}F FDG se adsorbió en el cartucho y los productos polares (disolventes, iones ^{18}F no reaccionados, kryptofix) se eliminaron mediante lavado con agua hacia un recipiente de desecho. Para eliminar todos los grupos protectores, se aplicó hidróxido de sodio 2N al cartucho C18. El ^{18}F FDG se eluyó con agua del cartucho, mientras que los compuestos protegidos de acetilo no hidrolizados o parcialmente hidrolizados permanecieron en el cartucho C18. La solución de ^{18}F FDG neutralizada se purificó pasando a través de un segundo cartucho C18, seguido de pasar a través de un cartucho de Alúmina N (Sep-pak plus Alúmina N, Waters) para retener los compuestos parcialmente hidrolizados, subproductos no polares, iones ^{18}F no reaccionados, aniones Na^+ y kryptofix.

El producto se esterilizó pasando a través de un filtro de membrana estéril de 0.22 μm . Toda la síntesis duró aproximadamente 30 minutos. La solución de ^{18}F FDG resultante fue clara, incolora, neutra e isotónica. Estuvo lista para su fraccionamiento, controles de calidad y dispensación o distribución.

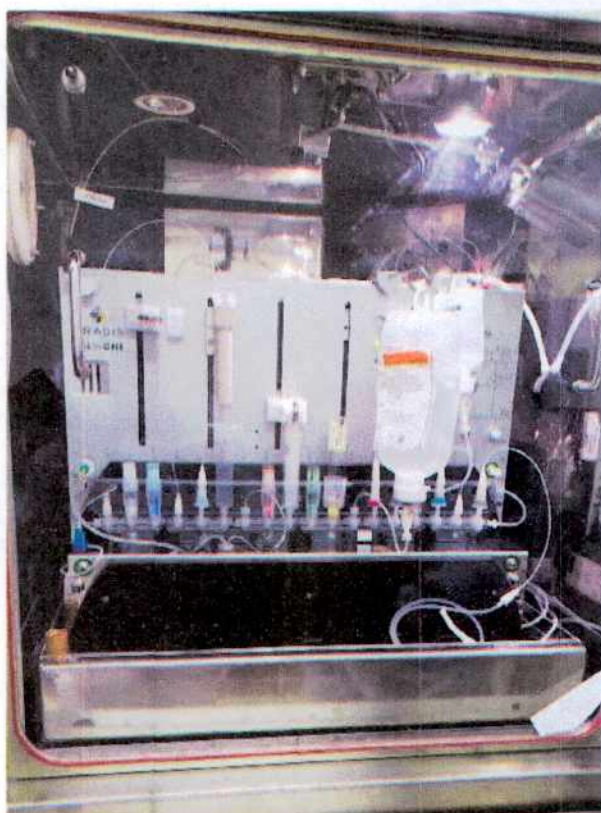


Fig 5. Sistema de síntesis Trasis All in One con un *cassette* de un solo uso y un kit de reactivos dentro de una celda caliente.

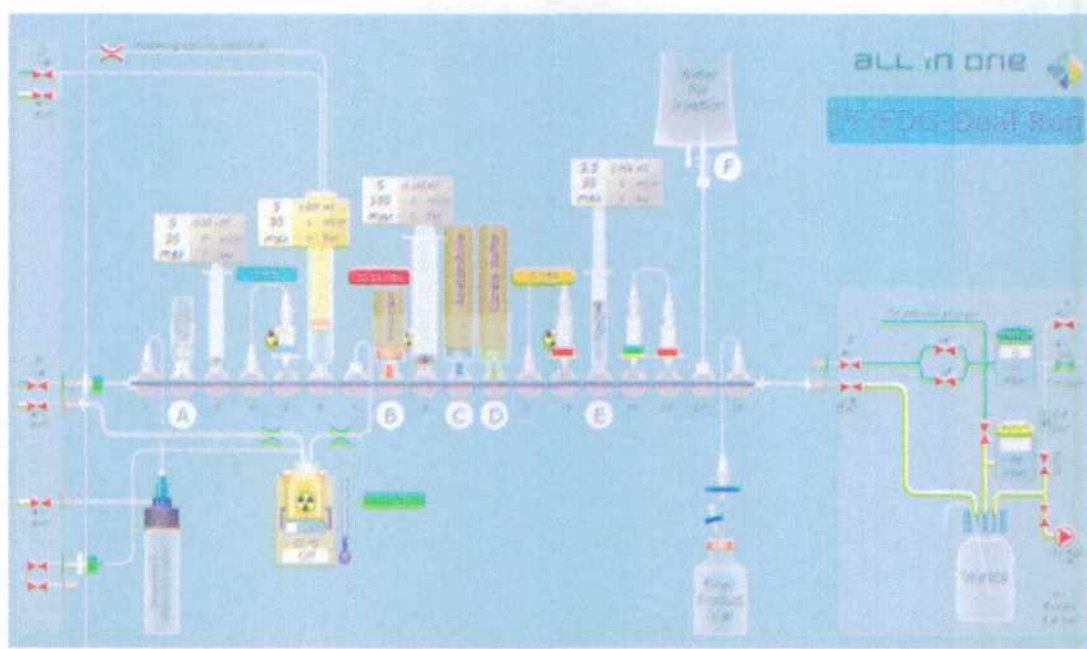


Fig. 6. Captura de pantalla del monitoreo de la síntesis de ^{18}F -FDG

Control de calidad de ^{18}F -FDG

Los requisitos de calidad de ^{18}F -FDG están establecidos en diversas farmacopeas, incluyendo USP, BP, EP, etc. Los requisitos básicos incluyen apariencia, ensayo de actividad radioactiva, pH, identidad y pureza radionuclídica, identidad y pureza radioquímica, pureza química, endotoxinas y esterilidad

Apariencia:

La apariencia de la solución de ^{18}F -FDG se determinó mediante inspección visual bajo vidrio de plomo.

Radioactividad:

Se midió la radioactividad de la muestra que sale de la síntesis mediante un activímetro y de las muestras enviadas a control de calidad en un contador de pozo.

pH:

La medición del pH es uno de los requisitos antes de la liberación del producto final. Se dejó caer una alícuota de la muestra de control de calidad en papel indicador de pH 0-14 (indicador universal, Merck).

Identidad y pureza radionuclídica:

La identidad y pureza radionuclídica se evaluó mediante espectrometría de rayos gamma y determinación del periodo de semidesintegración.

Determinación del periodo de semidesintegración:

Se tomó una alícuota de la muestra de control de calidad y se midió la radioactividad utilizando un contador de pozo cada 10 minutos durante 30 minutos bajo las mismas condiciones de medición o geométricas. La vida media se determinó utilizando la fórmula $t_{1/2} = (0.693 \times t) \div \ln(A_0/A_t)$, donde: $t_{1/2}$ (vida media), t (intervalo de tiempo en minutos), A_0 (actividad inicial), A_t (actividad medida después de 10 minutos).

Espectro gamma:

Se determinó el espectro gamma de una alícuota de la muestra de control de calidad utilizando un espectrómetro gamma (analizador multicanal, Canberra).

Cromatografía en capa fina (TLC):

Se aplicaron aproximadamente 2 μL de muestra de control de calidad, una

solución de 30 mg de 1,2,3,4-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranososa (ABX), glucosa (ABX) en 1 mL de agua y un standard de kryptofix en una placa de gel de sílice (TLC silica gel 60 F254, Merck) con una fase móvil de metanol: hidróxido de amonio 30% (90:10) a lo largo de un recorrido de 8 cm. La distribución de la radioactividad se determinó utilizando un escáner TLC Mini-Scan (MiniGita, Rayscan) equipado con contador de flujo (B-FC-1000, Bioscan) y detector gamma (MS3200, Bioscan). La placa se reveló con iodo.

HPLC:

Se inyectaron por separado 20 μ L de soluciones de referencia de FDG en distintas concentraciones y la muestra de control de calidad utilizando un HPLC (Shimadzu) equipado con un detector radiométrico y un detector amperométrico de pulso (RID). Se utilizó una columna de resina de intercambio aniónico, fase móvil (NaOH 0.1 N), velocidad de flujo (1 mL/min).

Residuos de solventes:

Los solventes residuales en la solución final (acetonitrilo, etanol) pueden identificarse y cuantificarse con un cromatógrafo de gases (GC). El instrumento de GC debe estar equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna adecuada para el análisis de los solventes residuales (Columna capilar de 30 m de largo, diámetro interno 0.32 mm, espesor de película: 0.25 μ m, tipo 5% difenil/95% dimetil polisiloxano). Se inyectaron por separado 1 μ L de la solución de referencia [una solución de etanol y acetonitrilo en agua] y la muestra de control de calidad en el GC (GC 2010 Plus, Shimadzu) equipado con FID, a 200 °C de temperatura del inyector y 250°C la temperatura del detector, presión del gas carrier (He): 12.6 psi, 14 ml/min. temperatura inicial: 40°C, temperatura final 130°C, gradiente de temperatura: 20°C/min

Análisis microbiológico:

El estudio microbiológico del producto final de ^{18}F -FDG se evaluó mediante pruebas de endotoxina bacteriana (BET) y esterilidad. Las endotoxinas bacterianas se cuantificaron mediante el método cromogénico, utilizando un sistema de prueba portátil - PTS® (Endosafe). Este dispositivo incluye un sistema de bombeo, un espectrofotómetro portátil y software integrado para calcular los datos de la muestra. Se insertó una muestra en los cartuchos (Endosafe), el dispositivo asegura muestras duplicadas y pruebas de control de producto positivas.

La prueba de esterilidad debe iniciarse en un período razonable de tiempo, permitiendo que la radioactividad decaiga. Se realizó después de la liberación del lote de radiofármaco. Los tiempos de incubación son de aproximadamente 15 días, con lo cual sería imposible de determinar durante la vida útil del

radiofármaco. Se inoculó la muestra en dos tipos de medios, uno para microorganismos aerobios y otro para anaerobios. Se consideró que cumple el ensayo cuando no se detectan microorganismos en ninguno de los dos medios.

Resultados y discusión

De acuerdo a los procedimientos de rutina empleados en el laboratorio se obtuvo el producto de síntesis ^{18}F -FDG. Dicho proceso fue seguido a través del software conectado a los detectores de presión, radiación y temperatura que cuenta el módulo de síntesis en sus distintas partes. En la figura 7 se puede seguir el proceso en actividad en el eje X en función del tiempo, Los distintos colores corresponden a las distintas partes del sistema. Gracias a estas gráficas puede visualizarse si el proceso fue exitoso ya que se esperan determinadas actividades, presiones y temperaturas en cada uno de los puntos. En caso que haya alguna falla es fácilmente identificable.

Tal como se ve en la figura los iones fluoruro ingresaron al sistema de columna QMA por lo cual se vió un aumento de la radiactividad en la primer etapa donde se produce una primer purificación de los componentes, luego se transfirió al reactor visualizándose una caída de la actividad en la columna QMA con el consiguiente aumento de actividad en el reactor en esta etapa se vió como la actividad se mantiene constante durante la síntesis que duró aproximadamente unos 15 minutos para luego el producto pasar por una jeringa que conecta con la columna de sílice trifuncionalizada con cadenas de C18 para su purificación.

Finalmente, el producto final fue inmediatamente enviado mediante tubuladuras especiales a una celda de fraccionamiento donde se midió la actividad y se separó en los viales según la cantidad de actividad necesaria en cada uno de ellos. En esta etapa se manipularon los viales a través de telepintas observando el área a través de vidrios plomados adecuados para la radioprotección. Por último, se separó una alícuota que fue derivada al sector de control de calidad para su análisis.

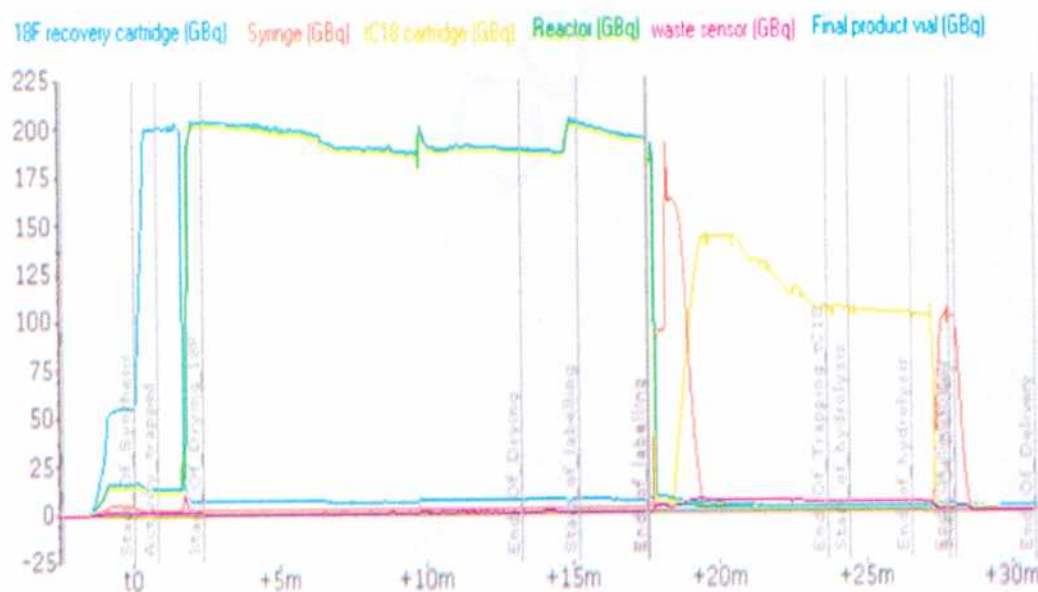


Fig. 7. Gráfico de actividad en GBq en función del tiempo. En azul se representa la radioactividad medida en la columna de intercambio aniónico (QMA), en verde la actividad en el reactor, en rojo en la jeringa del sistema, en amarillo en la columna de C18, en magenta el del descarte y en naranja el del producto final que en este caso en el proceso el producto final directamente fue transferido a una celda de fraccionamiento.

En el control de calidad del ^{18}F -FDG se evaluaron diversos parámetros que debieron cumplir determinadas especificaciones para que el lote sea liberado (Fig 8). Se evaluó la apariencia, la cual tiene como especificación ser una solución transparente, incolora libre de particulados. En la producción analizada se cumplió con esta especificación por lo cual se informó como "c" (abreviatura de cumple).

El pH debe estar entre 4.5 y 7.5 siendo que en el lote estudiado el valor encontrado fue de 5.5 por lo cual cumplió.

Dentro de los análisis para pureza e identidad radioquímica se evaluó el porcentaje de FDG y de posibles impurezas siendo la especificación de mayor o igual al 90% de FDG y menos al 10% para impurezas. Se encontró que en el lote analizado el porcentaje de FDG fue del 100% como puede verse en la corrida de HPLC (Fig.9) donde se evidenció un solo pico bien definido correspondiente al FDG.

Para la determinación del kryptofix, su valor debe ser menor a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se encontró para el lote estudiado que cumple, esto puede visualizarse en una cromatografía de capa delgada (Fig.10).

FUNDACIÓN CENTRO DIAGNÓSTICO NUCLEAR

SECTOR: CONTROL DE CALIDAD

ANEXO I

Código:

Revisión:

Fecha:

Vigencia: 2 años

Página: 7/8

Protocolo de Aprobación de FDG

N° de Lote:

Fecha: 11-1-2022

PON	Análisis	Especificación	Resultados			Res
			Valor	C	NC	
PON342	Apariencia	Solución colorless, transparente libre de impurezas		✓		C
PON341	pH	4.5 - 7.5	5.5	✓		C
PON343	Pureza e Identidad Radiquímica	FDG	290.0%	100%	✓	C
		Impurezas Radiquímicas	<10.0%	0%		
PON346	Determinación de Kriptonio	< 8 µg/ml		✓		C
PON347	Determinación de solventes residuales	Etanol	< 0.5%	✓		C
		Acetonitrilo	< 0.041%			
PON344	Pureza e Identidad Radionucleídica	Espectro	Un pico a 511 keV y picos de dispersión Compton (sin picos a 1024 keV)	✓		C-C
		Periodo de Semidesintegración	105.0-115.0 minutos	108.5 min		C-C
PON348	Integridad de membrana filtrante	2300cmbar (45 psi)		✓		C-C
PON349	Endotoxinas Bacterianas	< 58 E.U. /ml		✓		C
PON350	Ensayo de Estabilidad	Sin deterioro		✓		C

C: Corresponde a la especificación

NC: No corresponde a la especificación

Cantidad de hojas Anexos: 7

Observaciones:

Aprobado: ☒

Rechazado: ☐

Firma CQ:

Firma DI:

Fecha: 11-1-2022

Fecha: 11-1-2022

Fig. 8. Protocolo de aprobación de ¹⁸F-FDG utilizada para documentar los resultados de los análisis de control de calidad efectuados a un lote.

En la determinación de solventes residuales se midió etanol y acetonitrilo, con una especificación de valores menor o igual a 0,5% y menor o igual a 0,041% respectivamente. Se encontraron valores dentro del rango por lo cual cumplió.

En pureza e identidad radionucleídica el espectro cumplió con lo esperado de un pico a los 511 keV y picos de dispersión Compton así como también el

cumplimiento del periodo de semidesintegración esperado (entre 105 y 115 min).

Finalmente, para el lote analizado se mantuvo la integridad de la membrana filtrante, las endotoxinas bacterianas y la esterilidad también cumplieron la especificación.

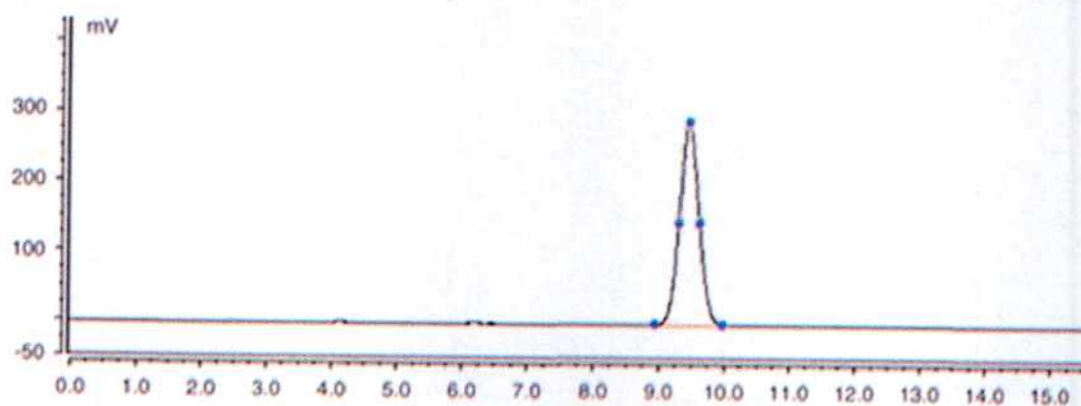


Fig. 9. Espectro de una corrida de HPLC con señales en mV donde se visualiza el pico definido correspondiente al ^{18}F -FDG a los 9.5 min y las posibles impurezas que pudiese haber, que en este caso no se detectan.

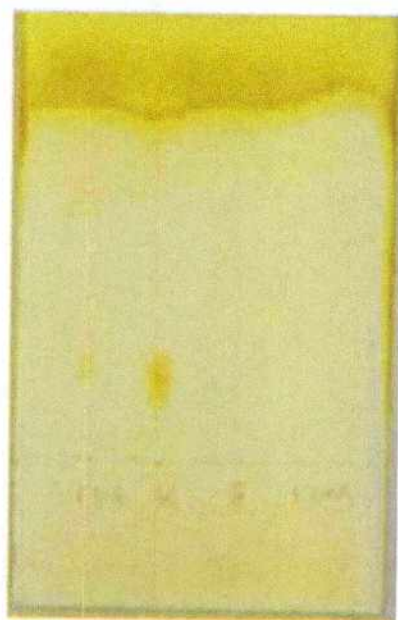


Fig. 10. TLC donde se evalúa en la primera calle la muestra de FDG, en la segunda calle el kryptofix, en la tercera la glucosa y en la última calle FDM.

Capítulo 3: Radiomarcación con Galio-68 y control de calidad

3.1 Introducción

Generalidades del Galio-68

El Galio-68 ha ganado rápidamente atención como uno de los radioisótopos PET ideales para investigaciones y uso médico. Tiene la ventaja de poder producirse *in situ* a partir de un pequeño generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, por lo que puede estar disponible en cuestión de minutos y sin la necesidad de equipamiento de alta complejidad. Tiene una vida media corta (67,7 minutos), lo que lo hace adecuado para estudios en pacientes y con una baja dosis de radiación. La naturaleza trivalente del Galio-68 también lo hace adecuado para el radiomarcado de compuestos basados en ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), así como para su utilización junto a biomoléculas como proteínas y péptidos (Wangler et al., 2011), (Breeman, et al., 2005).

Radiofármacos usados en tumores neuroendócrinos

La incorporación de péptidos marcados con ^{68}Ga ha revolucionado los estudios de los receptores de somatostatina mediante la tomografía por emisión de positrones (PET). Estos radiofármacos presentan ventajas significativas en comparación con las imágenes de tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), incluyendo una resolución espacial mejorada, una relación señal-ruido más alta y una menor exposición a la radiación para los pacientes.

En la práctica clínica, los péptidos más utilizados, como el DOTATOC, el DOTATATE (Fig. 11) y el DOTA-NOC, se marcan mediante el agente quelante de metales DOTA. Estos péptidos han demostrado ser efectivos para la detección de tumores neuroendócrinos (TNE) al dirigirse a los receptores de somatostatina sobreexpresados en dichos tumores (Ambrosini et al., 2010). Aunque muestran diferencias en los perfiles de afinidad hacia los subtipos de receptores de somatostatina, estudios han demostrado una precisión diagnóstica comparable entre ellos. El PET se realiza aproximadamente una hora después de la administración intravenosa de una dosis que oscila entre 100 y 200 MBq.

Es importante destacar que los péptidos marcados con ^{68}Ga imitan de cerca el patrón de distribución de los análogos de somatostatina utilizados en la terapia radionucleídica de TNE con ^{90}Y o ^{177}Lu . Esto los convierte en herramientas útiles tanto para la detección como para el seguimiento de los pacientes sometidos a terapia radionucleídica.

En resumen, los péptidos marcados con ^{68}Ga representan una herramienta prometedora para la detección y seguimiento de tumores neuroendócrinos,

brindando una excelente resolución y una baja exposición a la radiación.

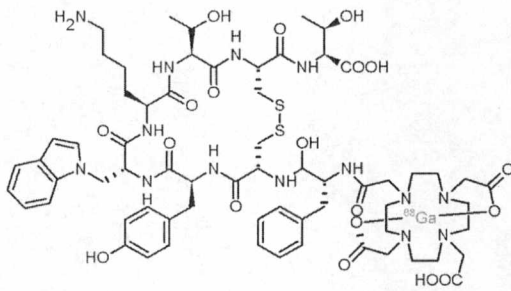


Fig. 11. Estructura química del ^{68}Ga -DOTATATE.

Radioquímica del Galio-68

La reactividad química de los radiofármacos basados en radiometales, como lo es el Galio-68, se fundamenta en la interacción entre los iones metálicos y los ligandos, los cuales actúan como ácidos de Lewis y bases de Lewis, respectivamente (Liu, 2008). Los iones metálicos poseen orbitales de valencia vacíos, lo que les permite aceptar electrones de los ligandos que tienen pares de electrones no compartidos.

Estos compuestos se conocen como complejos o compuestos de coordinación, donde el metal central (M^+) y los ligandos (L) forman una estructura coordinada. El número de coordinación representa la cantidad de átomos donadores que se encuentran unidos al metal central. Este número depende del número de orbitales libres del metal central y coincide con la capacidad de enlaces coordinados que puede formar el ligando. La esfera de coordinación está constituida por el metal central y los ligandos unidos a él.

La variedad de metales y ligandos utilizados en los radiofármacos da lugar a diferentes números de coordinación. Los ligandos pueden ser monodentados, bidentados o polidentados, según el número de átomos donadores involucrados en el enlace. Los ligandos monodentados tienen un solo átomo donador, los bidentados presentan dos átomos donadores y los polidentados poseen tres o más átomos donadores.

Estos conceptos son de suma importancia en el diseño y desarrollo de radiofármacos. La correcta elección del metal central y los ligandos adecuados garantiza la obtención de compuestos altamente estables y selectivos, capaces de reconocer y unirse específicamente a las moléculas diana en el organismo. Además, comprender el número de coordinación y la esfera de coordinación contribuye a optimizar la eficacia y la seguridad de los radiofármacos en aplicaciones médicas.

En resumen, la reactividad química de los radiofármacos basados en radiometales se basa en la capacidad de los iones metálicos de actuar como ácidos de Lewis y los ligandos como bases de Lewis. La formación de complejos de coordinación, donde el metal central y los ligandos se unen, depende del número de coordinación y la esfera de coordinación. Estos principios son esenciales para el desarrollo de radiofármacos eficaces y seguros en el campo de la medicina nuclear, tanto para diagnóstico como para terapia.

Un agente quelante, también conocido como secuestrante o ligando polidentado de metales, es una sustancia que tiene la capacidad de formar complejos con iones metálicos. Estos complejos se denominan quelatos, haciendo referencia a la palabra griega "*chele*", que significa "garra".

Un agente quelante bifuncional (BFCA) es una molécula que puede unirse covalentemente a una biomolécula y, al mismo tiempo, formar un complejo con un metal. Actúa como un "conector" entre la biomolécula y el radioisótopo (RN*). Un BFCA consta de tres regiones principales: la región de conjugación, que se relaciona con la proteína; la región de complejación, que involucra al RN*; y los grupos funcionales que le otorgan la identidad química al compuesto.

En el contexto de los radiofármacos, los agentes quelantes desempeñan un papel crucial en la marcación de radiometales. Dado que los metales no pueden formar enlaces covalentes con proteínas y péptidos de la misma manera que los halógenos, por lo que se requiere una estrategia diferente que involucra el uso de quelantes.

En el campo de los radiofármacos, se emplean dos estrategias comunes para la marcación de radiometales utilizando BFCAs: el método del quelante premarcado y la marcación post-conjugación.

El método del quelante premarcado implica la formación del complejo entre el radioisótopo y el quelante como primer paso, seguido de la unión de este complejo a la biomolécula, como un anticuerpo o un péptido. Sin embargo, este método generalmente presenta rendimientos de marcación más bajos en comparación con la técnica de marcación post-conjugación. Se prefiere utilizar el método del quelante premarcado solo en condiciones extremas que podrían afectar la actividad biológica de la proteína, como altas temperaturas o pH.

Por otro lado, en la marcación post-conjugación, el primer paso es la unión del BFCA a la biomolécula, seguido de la formación del complejo con el radiometal. En la mayoría de los casos, una vez optimizada, esta estrategia puede lograr excelentes rendimientos de marcación y no requeriría una etapa adicional de purificación (Liu, 2008).

La estabilidad de los complejos quelato es un factor crucial para tener en cuenta.

La afinidad de los complejos es fundamental y se mide mediante el parámetro K_d (constante de disociación). Los quelatos más inertes tienen una velocidad de disociación/asociación más baja. Es esencial que los complejos sean altamente estables *in vivo* para evitar que enzimas endógenas, como la transferrina "quiten" el radioisótopo del quelante. Estos quelantes endógenos se encuentran en concentraciones significativamente más altas en comparación con los radioconjugados.

Al seleccionar un BFCA, se deben cumplir ciertos requisitos. Debe tener una alta estabilidad *in vivo*, resistir la hidrólisis en condiciones fisiológicas y la radiólisis. Además, no debe alterar las propiedades biológicas de la proteína a la que se une. El isomerismo también debe considerarse, ya que influye en la especificidad del sitio activo del compuesto. Es importante destacar que no existe un único BFCA universal, ya que el tamaño, la carga y la configuración electrónica del radiometal determinan el número de coordinación requerido para el BFCA, que puede variar entre 2 y 8.

Dentro de los quelantes para radiometales, se encuentran los derivados del ácido poliaminocarboxílico. Estos BFCAs son eficaces para la complejación de lantánidos, como el ^{177}Lu , ^{153}Sm y ^{166}Ho , así como el ^{111}In y el ^{90}Y . Se pueden clasificar en quelantes acíclicos y macrocíclicos.

Los quelantes acíclicos derivados del ácido DTPA fueron los primeros en utilizarse. Estos quelantes poseen 8 sitios donadores y pueden ser octadentados o hexadentados, dependiendo del radiometal. Aunque son menos inertes que los quelantes macrocíclicos, tienen la ventaja de que la reacción de complejación es rápida y se produce a temperatura ambiente. Esto los hace apropiados para anticuerpos y proteínas grandes, ya que rara vez afectan su actividad biológica.

En contraste, los quelantes macrocíclicos derivados del ácido DOTA son más cinéticamente inertes y, por lo tanto, más estables. La reacción de complejación con el metal es rápida, pero requiere temperaturas óptimas más altas, entre 80 y 100 °C. Esto los hace menos adecuados para anticuerpos y proteínas grandes, ya que podrían afectar su actividad biológica. Sin embargo, son apropiados para pequeños péptidos y moléculas pequeñas.

En resumen, los agentes quelantes desempeñan un papel esencial en la marcación de radiometales para el desarrollo de radiofármacos. Estos compuestos forman complejos quelato con iones metálicos, permitiendo la unión entre biomoléculas y radioisótopos. La elección del quelante adecuado es crucial para lograr complejos estables y selectivos, teniendo en cuenta la estabilidad *in vivo*, la preservación de las propiedades biológicas y la preferencia química del metal. Los BFCAs acíclicos y macrocíclicos derivados de ácidos poliaminocarboxílicos son ejemplos de quelantes utilizados en aplicaciones radiomédicas, cada uno con sus propias ventajas y consideraciones. El

desarrollo continuo de agentes quelantes más eficaces y específicos contribuye al avance de la medicina nuclear y la terapia con radiometales.

3.2 Objetivos

Se proponen como objetivos el estudio de la técnica de rutina de radiomarcación automatizada de ^{68}Ga -DOTA-TATE, sus cuidados, condiciones estandarizadas y control de calidad.

3.3 Materiales y métodos

La síntesis de ^{68}Ga -DOTA-TATE se realizó utilizando el sistema de síntesis automatizada Modular ATT Scintomics, diseñado específicamente para la síntesis de radiofármacos (Fig.12). Todos los *cassettes* de un solo uso y los kits de reactivos para la radiosíntesis fueron estériles y fabricados bajo normas de buenas prácticas de fabricación (GMP).

El proceso constó de tres partes: a) obtención del ^{68}Ga a partir de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ de Eckert & Ziegler IGG100 GMP (Berlín, Alemania) (Fig. 13); b) los módulos con sus compartimentos de generación del radiofármaco en las que se colocan los productos químicos, reactivos, filtros, columnas, etc. apropiados; y c) el sistema informatizado que ejecuta los módulos, que a su vez controlan las válvulas y jeringas para producir el radiofármaco requerido.

Dado que el sistema está controlado por computadora, siempre se mantiene un registro de auditoría, lo cual es un requisito para las producciones bajo las Buenas Prácticas de Manufactura. Actualmente, el sistema también se utiliza para la producción de otros radiofármacos como ^{68}Ga -DOTA-NOC y ^{68}Ga -PSMA. (Decristoforo, et al., 2007).

El generador se eluyó diariamente y dentro de las 24 horas previas a la síntesis de DOTA-TATE, debido a la acumulación de iones metálicos en la columna (Asti et al., 2008). El proceso de elución implicó inyectar una solución de HCl 0,1 M impulsada por el sistema Modular-Lab en aproximadamente 5 mL de volumen de elución.

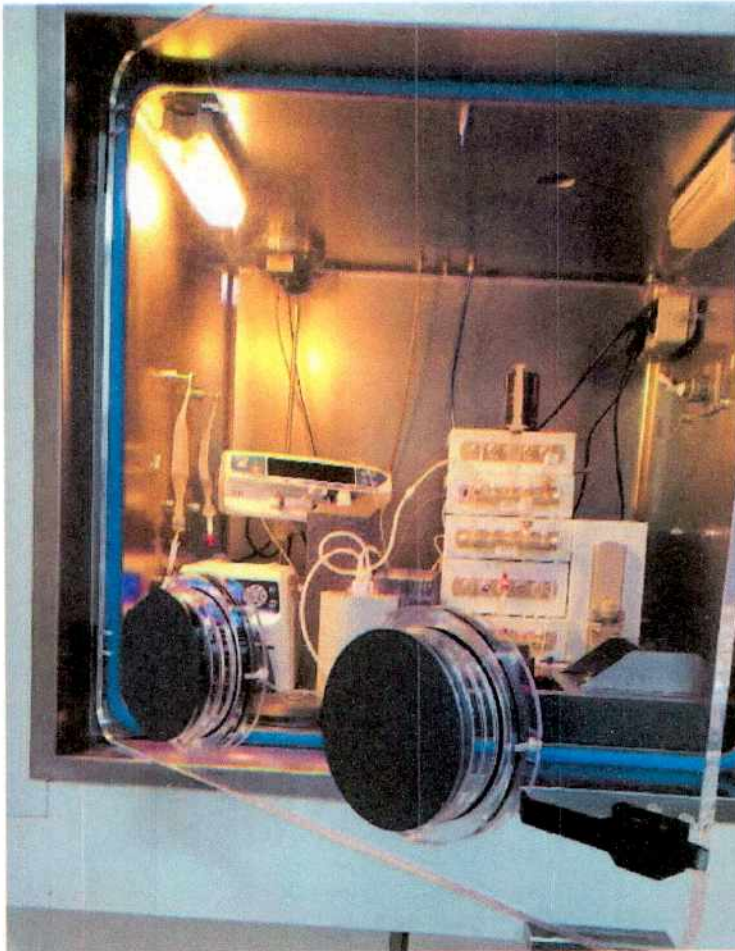


Fig. 12. Sistema de síntesis automatizada Modular ATT Scintomics, diseñado específicamente para la síntesis de radiofármacos

Dentro de los cuidados que se tuvieron en cuenta están:

- Eluir el generador regularmente (mínimo 2 veces por semana)
- No usar el eluido del generador si este no ha sido eluido el día anterior
- Usar HCl de la máxima calidad (bajo contenido de metales)
- Mantener la velocidad de elución
- Nunca dejar secar la columna
- Nunca usar el eluido sin purificar
- Usar materiales plásticos para las partes de contacto con todos los reactivos



Fig. 13. Generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ de Eckert & Ziegler utilizado.

El movimiento de todos los líquidos fue impulsado por una jeringa de 10 mL conectada al módulo de control de jeringa. Esta fase involucró varios pasos diferentes, incluyendo el lavado de diversas secciones con solución salina al 0.9%. El cartucho de sílica de fase reversa C18 se humedeció inicialmente con etanol seguido de solución salina al 0.9%. Luego, el generador se eluyó con HCl 0.1 M y se pasó a través del cartucho de intercambio iónico, atrapando el cloruro de Galio-68. El exceso de HCl 0.1 M se descartó en el recipiente de desechos. El cloruro de Galio-68 se eluyó posteriormente del cartucho y se añadió al vial de reacción que contenía el péptido DOTATATE en un buffer de acetato. La mezcla se calentó durante 400 segundos a 95°C para unir el DOTATATE con el cloruro de Galio-68 y evaporar los solventes. Luego, se retiraron los contenidos del vial de reacción y se pasaron a través del cartucho de intercambio iónico C18 donde el ^{68}Ga -DOTATATE quedó atrapado y el ^{68}Ga y el DOTATATE no unidos se enviaron al recipiente de desechos. El ^{68}Ga -DOTATATE atrapado se eluyó del intercambiador iónico C18 mediante etanol y luego solución salina al 0.9% hacia el vial del producto a través de un filtro de 0.22 μm .

Control de Calidad de ^{68}Ga -DOTA-TATE

El control de calidad del producto resultante se realizó mediante varias técnicas: TLC, GC, HPLC, estudios microbiológicos, etc. utilizando una muestra tomada directamente del producto final de ^{68}Ga -DOTATATE.

Apariencia:

La apariencia de la solución de ^{68}Ga -DOTA-TATE se determinó mediante inspección visual bajo vidrio de plomo.

Radioactividad:

Se midió la radioactividad de la muestra que salió de la síntesis mediante un activímetro y de las muestras enviadas a control de calidad en un contador de pozo.

pH:

Se dejó caer una alícuota de la muestra de control de calidad en papel indicador de pH 0-14 (indicador universal, Merck).

Identidad y pureza radionuclídica:

La identidad y pureza radionuclídica se evaluaron mediante espectrometría de rayos gamma y determinación del periodo de semidesintegración.

Determinación del $t_{1/2}$:

Se tomó una alícuota de la muestra de control de calidad y se midió la radioactividad utilizando un contador de pozo cada 10 minutos durante 30 minutos bajo las mismas condiciones de medición o geométricas. La vida media se determinó utilizando la fórmula $t_{1/2} = (0.693 \times t) \div \ln(A_0/A_t)$, donde: $t_{1/2}$ (vida media), t (intervalo de tiempo en minutos), A_0 (actividad inicial).

Espectro gamma:

Se determinó el espectro gamma de una alícuota de la muestra de control de calidad utilizando un espectrómetro gamma (analizador multicanal, Canberra).

Cromatografía en capa fina (iTLC):

Se aplicaron aproximadamente 2 μ L de muestra y un standard de ^{68}Ga coloidal. La distribución de la radioactividad se determinó utilizando un escáner TLC Mini-Scan (MiniGita, Rayscan) equipado con contador de flujo (B-FC-1000, Bioscan) y detector gamma (MS3200, Bioscan).

La prueba de iTLC se utilizó para determinar el porcentaje de ^{68}Ga -DOTATATE, las impurezas de Galio-68 y los coloides de Galio-68 en el producto final. Las tiras de papel iTLC se contaron en un contador gamma de laboratorio (MiniGita, Rayscan) equipado con contador de flujo (B-FC-1000, Bioscan) y detector gamma (MS3200, Bioscan). Para la determinación del porcentaje de coloide de Galio-68, se utilizó acetato de amonio 1 mol/L / metanol (1:1).

HPLC:

Se inyectaron por separado 20 μ L de soluciones de referencia de Ga-DOTA-TATE en distintas concentraciones y la muestra de control de calidad utilizando un HPLC (Shimadzu) equipado con un detector radiométrico y un detector UV Velocidad de flujo de 0.6 mL/min, utilizando una mezcla de agua/acetonitrilo

(ACN)/ácido trifluoroacético al 0.1% con un 22% de ACN.

Residuos de solventes:

Los solventes residuales en la solución final (etanol) pudieron identificarse y cuantificarse con un cromatógrafo de gases (GC). El instrumento de GC estaba equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna adecuada para el análisis de los solventes residuales (Columna capilar de 30 m de largo, diámetro interno 0.32 mm, espesor de película: 0.25 μ m, tipo 5% difenil/95% dimetil polisiloxano). Se inyectaron por separado 1 μ L de la solución de referencia de etanol y la muestra en el GC (GC 2010 Plus, Shimadzu) equipado con FID, a 200 °C de temperatura del inyector y 250°C la temperatura del detector, presión del gas carrier (He): 12.6 psi, 14 ml/min, temperatura inicial: 40°C, temperatura final 130°C, gradiente de temperatura: 20°C/min.

Análisis microbiológico:

Se evaluó mediante pruebas de endotoxina bacteriana y esterilidad. Las endotoxinas bacterianas se cuantificaron mediante el método cromogénico, utilizando un sistema de prueba portátil - PTS® (Endosafe). La prueba de esterilidad se hizo después de la liberación del lote de radiofármaco. Los tiempos de incubación fueron de 15 días. La experiencia se basó en la inoculación de la muestra en dos tipos de medios, uno para microorganismos aerobios y otro para anaerobios. Se consideró que cumplen el ensayo cuando no desarrolla en ninguno de los dos medios.

Presencia de ^{68}Ge

La presencia de Germanio-68 se midió en una muestra eluida, después de un periodo completo de desintegración de ^{68}Ga (>48 horas). Las mediciones se realizaron en un contador gamma.

3.4 Resultados y discusión

Para el generador utilizado se comprobaron los resultados de fábrica que aseguran su calidad. Para ello se contó con el reporte del proveedor el cual informó los valores de actividad del eluido en distintas fracciones (Fig. 14 y 15). Evidenciándose para la fracción número 5 la mayor actividad de todas con un valor de 20 mCi.

Fraction #	Assay time (hh:mm:ss)	Ga-68 @ Assay (mCi)	ΔT Elution to Assay (min)	Ga-68 @ Elution (mCi)	Eluted (%)
1	13:29:00	0.010	2.00	0.010	0.0
2	13:30:00	0.011	3.00	0.012	0.0
3	13:31:00	0.184	4.00	0.192	0.4
4	13:32:00	9.053	5.00	9.524	20.1
5	13:33:00	18.923	6.00	20.110	42.5
6	13:34:00	10.042	7.00	10.780	22.8
7	13:35:00	3.604	8.00	3.909	8.3
8	13:36:00	1.369	9.00	1.500	3.2
9	13:37:00	0.691	10.00	0.765	1.6
10	13:38:00	0.466	11.00	0.523	1.1
				47.32	100.0
					Total

Fig. 14. Perfil de elución del generador de tamaño nominal de 65 mCi y cargado con ^{68}Ge 65.2 mCi. Eluciones con 5 ml de HCl en fracciones de 0.5 ml en 1 min cada elución recolectados en 10 viales separados en total.

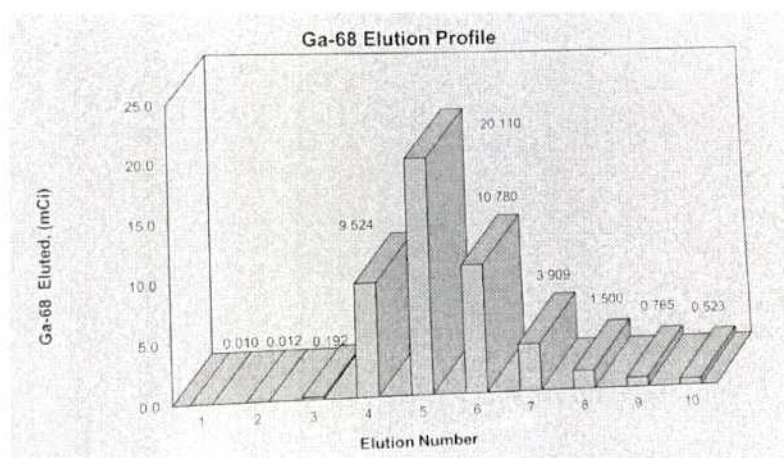


Fig 15. Histograma realizado a partir de los datos presentados en la figura anterior.

De acuerdo a los procedimientos de rutina empleados en el laboratorio se obtuvo el producto de síntesis ^{68}Ga -DOTA-TATE. Dicho proceso fue seguido a través del software conectado a los detectores que cuenta el módulo de síntesis en sus distintas partes y posteriormente se separó una muestra para el análisis de control de calidad.

En el control de calidad del producto de síntesis se evaluaron diversos parámetros que debieron cumplir determinadas especificaciones para que el lote sea liberado (Tabla 1). Se evaluó la apariencia, la cual tiene como especificación ser una solución transparente, incolora libre de particulados. En la producción analizada se cumplió con esta especificación por lo cual se informó como

“cumple”.

El pH debió estar entre 4.0 y 8.0 siendo que en el lote estudiado el valor encontrado fue de 6.0 por lo cual cumplió.

Dentro de los análisis para pureza e identidad radioquímica se evaluó el porcentaje de ^{68}Ga -DOTA-TATE total (especificación de mayor o igual al 91%) y sus posibles impurezas como el $^{68}\text{Ga}^{3+}$ libre y ^{68}Ga coloidal (especificaciones menores al 2% y al 3% respectivamente). Se encontró que en el lote analizado el porcentaje de ^{68}Ga -DOTA-TATE fue del 100%.

En pureza e identidad radionucleídica el espectro cumplió con lo esperado de un pico a los 511 keV y otro pico de 1077 keV así como también el cumplimiento del periodo de semidesintegración esperado (entre 62 y 74 min).

La determinación de ^{68}Ge también fue aprobada ya que no se detectó su presencia por encima del límite especificado de 0.001%.

En la determinación de solventes residuales se midió etanol, con una especificación de máximo de 10% v/v y se encontró un valor por debajo, por lo cual cumplió.

Finalmente, para el lote analizado se mantuvo la integridad de la membrana filtrante. Las endotoxinas bacterianas y la esterilidad también cumplieron la especificación.

Análisis	Especificación requerida	Resultado
Apariencia	Solución incolora, transparente	Solución límpida. Cumple
pH	4.0-8.0	Cumple
Pureza e identidad radioquímica. $^{68}\text{Ga}^{3+}$ libre (HPLC)	<2%	Cumple
Pureza e identidad radioquímica. ^{68}Ga coloidal (iTLC)	<3%	Cumple
Pureza e identidad radioquímica. ^{68}Ga DOTATATE Total	$\geq 91\%$	Cumple

Pureza e identidad radionucleídica. Espectro gamma	Pico principal a 511 keV, 1077 keV, y eventualmente otro a 1022 keV	Cumple
Pureza e identidad radionucleídica. Periodo de semidesintegración	62-74 min	Cumple
Determinación de ^{68}Ge	<0.001%	Cumple
Contenido de etanol	Máximo 10% v/v	Cumple
Endotoxinas bacterianas	< 8 EU/ml	Cumple
Ensayo de esterilidad	Sin desarrollo	Cumple
Integridad de membrana filtrante	≥ 3100 mbar (45psi)	Cumple

Tabla 1. Protocolo de aprobación de ^{68}Ga -DOTATATE.

Capítulo 4: Radiomarcación con Lutecio-177 y caracterización

4.1 Introducción

Uno de los radionúclidos teranósticos emergentes que mejor se adapta a la combinación de requisitos fisicoquímicos y de producción/suministro es el radiometal llamado Lutecio-177. En primer lugar, presenta propiedades físicas adecuadas para su uso clínico, como una emisión β^- de energía media ($E_{\text{max}} = 0.5 \text{ MeV}$, 100%) y una longitud de trayectoria en tejido (longitud media de trayectoria = 0.16 mm, longitud máxima de trayectoria = 2 mm), lo cual es ideal para tratar el cáncer metastásico diseminado, ya que limita los efectos tóxicos en el tejido normal (Jia, et al., 2022). La partícula β^- terapéutica del ^{177}Lu se emite junto con varios fotones y acompañantes de 208 keV (10.4%) y 113 keV (6.2%), que se utilizan con fines diagnósticos y dosimétricos. Además, su semivida física ($T_{1/2} = 6.64$ días) se puede adaptar tanto a la logística de suministro como al uso clínico con diversos agentes de destino, desde péptidos hasta biomoléculas grandes (De Decker, & Turner, 2012), (Heh et al., 2023). En segundo lugar, sus propiedades químicas permiten la quelación con quelantes bifuncionales clínicamente aprobados, como el DOTA, debido a su pequeño radio iónico entre los lantánidos (0.86-1.03 Å) y un número de coordinación preferido entre 8 y 9 (Karczmarczyk, et al., 2022). En tercer lugar, el Lutecio-177 decae para formar el Hafnio-177, un isótopo estable, y además el Lutecio-177 se puede obtener tanto mediante rutas de producción con ciclotrón como con reactores nucleares (Albander, & Aljalis, 2022).

Radioquímica del Lutecio-177

La radiomarcación o complejación del ^{177}Lu con el conjugado de biomolécula DOTA constituye un aspecto importante en la preparación de radiofármacos marcados con ^{177}Lu basados en anticuerpos, péptidos y moléculas pequeñas. El lutecio sigue la química general de los iones de lantánidos (Ln^{3+}) con derivados de DOTA, por lo que este ligando puede aprovecharse para estudios de radiomarcación (Banerjee, et al., 2015).

Al igual que en todas las reacciones de complejación, diversos parámetros como el pH, la temperatura, la relación ligando-metal y la elección del buffer son atributos importantes que requieren una optimización cuidadosa para obtener complejos estables con $^{177}\text{Lu}^{3+}$. A pesar de las constantes de estabilidad muy altas, la velocidad de formación de los complejos de Lu^{3+} con DOTA y otros ligandos macrocíclicos es muy lenta, especialmente a las bajas concentraciones de Lu y agentes quelantes utilizados en preparaciones de radiofármacos. Según indican las medidas cinéticas, el primer paso en la formación de complejos de lantánidos con derivados de DOTA implica la rápida formación de un intermediario monoprotonado o diprotonado, y el paso determinante de la

velocidad es la reorganización asistida por base de este intermediario. La lenta velocidad de complejación de los ligandos basados en DOTA con ^{177}Lu se convierte en una desventaja significativa para la preparación de radiofármacos basados en DOTA. Por esta razón, en la mayoría de los casos es necesario calentar para aumentar la velocidad del proceso de quelación. Generalmente, se realiza un calentamiento a 95 °C durante 25-30 minutos para obtener rendimientos de marcación casi cuantitativos en la preparación de análogos de somatostatina conjugados con ^{177}Lu -DOTA (De León-Rodríguez, & Kovacs, 2008). Sin embargo, muchas veces no es posible un calentamiento a estas temperaturas cuando se trabaja con anticuerpos o con cualquier otra molécula de naturaleza termosensible.

En todos estos procedimientos de radiomarcación, el pH también juega un papel crítico, ya que la velocidad de formación del complejo aumenta con la concentración de iones de hidrógeno. Sin embargo, por encima de pH 6, los cationes de lantánidos forman hidróxidos insolubles, lo que hace que el pH óptimo para la radiomarcación esté entre 5 y 6, lo cual generalmente se mantiene utilizando buffers acordes. Los procedimientos de radiomarcación se realizan generalmente con un exceso de ligando varias veces mayor en comparación con el radiometal. Por esta razón, solo una pequeña fracción de los sitios quelantes disponibles se marca y el exceso grande de ligando evita la formación de especies metálicas-hidróxido insolubles a través de la formación rápida de complejos intermedios. Esto también permite la complejación a valores de pH más altos (pH 7-8).

La presencia de contaminantes de iones metálicos afecta negativamente la actividad específica de los radiofármacos específicos para el blanco al competir con Lu^{3+} por la formación del complejo en el conjugado. Por lo tanto, todos los disolventes y reactivos utilizados deben tener una pureza muy alta. Una cantidad significativa de iones metálicos de ^{177}Hf estará presente como producto de decaimiento de ^{177}Lu en la preparación del radionúclido. Sin embargo, Hf^{4+} tiene una baja afinidad por DOTA y, por lo tanto, no afecta la quelación de Lu con DOTA.

Radiofármaco experimental con Lutecio-177 contra EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está sobreexpresado en una variedad de cánceres diferentes, como el cáncer de pulmón (40-80%), cáncer de mama (14-9%) o cáncer de colon (25-77%) (Normanno, et al., 2006), (Charpidou, et al., 2008). La terapia con anticuerpos monoclonales completos puede estar limitada debido a la resistencia que pueden adquirir las células cancerosas y a la potencial respuesta inmune que se desencadena al incorporar anticuerpos exógenos. Además, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales completos dan resultados subóptimos en pacientes con tumores sólidos debido a una penetrabilidad deficiente. En este trabajo, ensayamos un

nanocuerpo (VHH; 12-16 kDa) de unión al EGFR con un quelante y Lutecio-177 para terapia y diagnóstico radioinmunológico. Las ventajas de estos fragmentos pequeños de anticuerpos en comparación con los anticuerpos completos son que aún conservan la capacidad de unión al antígeno y mantienen la especificidad y alta afinidad por el receptor (Omidfar, et al., 2013). Además, no poseen la región FC de los anticuerpos completos, por lo que son poco inmunogénicos. Debido a su pequeño tamaño, se pueden expresar fácil y económicamente en bacterias y se sabe que penetran rápidamente en tejidos densos.

4.2 Objetivos

Se proponen como objetivos el estudio de distintas condiciones de radiomarcación manual de ^{177}Lu con un nanoanticuerpo, y su caracterización fisicoquímica y biológica.

4.3 Materiales y métodos

Funcionalización y radiomarcación

Se utilizó una concentración de nanoanticuerpo conocido como VHH anti-EGFR de 7.1 mg/mL (5 mg en 0.704 mL, equivalente a 0.333 μmol) obtenida previamente de expresión recombinante en bacterias *Escherichia coli* (Li et al., 2005) en la cual en dicha proteína se le agregó en el vector de clonado una cola de histidina para su posterior purificación con columna de Ni. Se mezcló el nanoanticuerpo con DOTA- β -A-ARAK-NH₂ y a la reacción se le adicionó la enzima transglutaminasa bacteriana MTG (marca Zedira) a una concentración de 50 UI/mL, utilizando 6 UI la cual permite catalizar la unión entre el nanoanticuerpo y el quelante y se agregaron 80 equivalentes de DOTA- β -A-ARAK-NH₂ (PM 901.04 g/mol) donado por el grupo del Dr. Schibli de la Universidad de Zurich e Instituto Paul Scherrer. Para completar el volumen, se añadió 6.4 mL de PBS. Se prepararon de la forma anteriormente descrita tres tubos idénticos y se los incubó a 37 °C, 45°C y 50°C durante 2 hs, 4hs, 5hs y 24 horas. A lo largo de los distintos tiempos, se verificó la funcionalización en un espectrómetro de masas Waters LTC Premier ESI-TOF (Waters, Milford, EE. UU.) acoplado a un HPLC Waters 2795 Alliance HT (Waters, Milford, EE. UU.) para la separación.

A continuación, se procedió a la purificación del producto de reacción. Se utilizó resina de Ni para eliminar el exceso del VHH sin reaccionar. Antes de la purificación, se verificó la concentración de la proteína mediante espectrofotometría.

Luego se purificó la proteína restante de la enzima a través de una purificación en columna con proteína A. Brevemente se preparó una columna con 1 mL de

solución de proteína A y se equilibró con 20 mL buffer de fosfato de potasio 1 M, pH 9.0. La muestra de proteína funcionalizada se diluyó 1:1 con buffer y se añadió a la columna a un flujo de 0.5 mL/min (50 mL en total). A continuación, se lavó la columna con 20 mL de buffer para eliminar cualquier contaminante residual. Para elución, se utilizaron 6 tubos de 2 mL prellenados con 800 μ L de buffer 0.1 M ácido cítrico, pH 3.0. Cada tubo recibió 1 mL y se recogieron las fracciones eluidas. Se verificó la concentración de proteína en estas fracciones. Luego, se realizó un reajuste a PBS/Trizma utilizando un dispositivo de concentración con un tamaño de corte de 3 kDa, repitiendo el proceso 5 veces. Finalmente, se verificó la concentración de proteína después del reajuste y se tomó una muestra para realizar análisis de espectrometría de masas y confirmar la funcionalización del VHH.

Una vez obtenido el VHH unido al quelante DOTA se procedió a la radiomarcación con Lutecio-177 en un cuarto caliente acondicionado (Fig 16). Se mezcló el inmunoc conjugado (100 μ g) con buffer 0.25M amonio acetato pH 5.5 en un tubo eppendorf y se precalentó durante 5 min a 37°C y 350 rpm. Se agregó luego 2MBq por cada μ g de VHH, se agitó por vortex y se dejó incubar 1 h a 37°C. Luego se agregó 2 μ L de EDTA 5mM y se incubó 5 min a 37°C. Finalmente se analizó el producto de la reacción por HPLC (Agilent 1200 Infinity Series) con detector radiométrico (Fig 17).



Fig. 16. Laboratorio caliente del Instituto Paul Scherrer, Suiza, donde se llevaron a cabo las radiomarcaciones con Lutecio-177.

Ensayos biológicos

Una vez obtenido el radiofármaco con Lutecio-177 se evaluó su desempeño en estudios biológicos. Se analizó el grado de internalización en células A431, la cual es una línea celular epidérmica que sobre-expresan el receptor EGFR. Para

evaluar la internalización específica se realizó el experimento en varias condiciones. Brevemente, se recubrieron placas de seis pocillos con poli-L-lisina. Se lavaron las células con PBS y se sembraron 10^6 células por pocillo. En el ensayo, a tres pocillos se los pre-trató con cetuximab frío durante 30 min y luego se lavó con PBS. Luego se agregaron 25 μ L del radiofármaco a todos los pocillos. Se incubaron las células durante diferentes tiempos (tiempo 0, 1.5 hs, 2.5 hs, 5 hs y 6 hs). Luego de cada tiempo se lavaron los pocillos con PBS, se descartó el líquido y se hicieron dos lavados con buffer glicina pH 2.8 y se separó dicho líquido para ser medido en el contador gamma automático. Posteriormente se lizaron las células con una solución de NaOH 1N y se analizó en un contador gama automático. Todas las condiciones se realizaron por triplicado en tres experiencias distintas.

Para el ensayo clonogénico se utilizaron células A431 y medio de cultivo DMEM. Se sembró una placa de 6 pocillos con 500 células por pocillo, se dejaron adherir toda la noche y al día siguiente fueron tratadas con el radiofármaco a tres concentraciones diferentes, 0.1 MBq, 0.2 MBq y 1 MBq. Como controles se utilizaron células sin tratar y tratadas con el VHH frío. Las células fueron incubadas 18 hs con el tratamiento y luego se les cambió el medio a todos los pocillos. Las células se dejaron crecer durante 12 días renovando cada 3 días el medio de cultivo. Finalmente fueron fijadas con metanol y teñidas con el colorante cristal violeta. Todas las condiciones se realizaron por triplicado en tres experiencias distintas.



Fig. 17. HPLC con detector radiométrico utilizado para seguir el rendimiento de la radiomarcación con Lutecio-177.

4.4 Resultados y discusión

Para la unión del nanoanticuerpo al quelante se probaron tres condiciones diferentes de temperatura y varios tiempos de incubación. En base a la mayor estabilidad térmica que presentan los nanoanticuerpos en comparación con los anticuerpos completos, fue posible alcanzar temperaturas de hasta 50°C sin que se desnaturalizara la proteína. Las reacciones fueron seguidas mediante espectrometría de masa y tal como se muestran en las figuras 18, 19 y 20 el quelante o también llamado para esta experiencia "*linker*" se pudo unir al nanoanticuerpo VHH no solo de forma estequiométrica 1:1 sino que también varios quelantes se unieron a una misma molécula de VHH observándose asimismo poblaciones de VHH unidos a 2, 3 y hasta 4 quelantes al mismo tiempo ya que la unión se da entre grupos γ - carboxamida de los distintos aminoácidos glutamina del VHH y el grupo amina terminal del quelante utilizado.

Para la condición de 37°C (Fig. 18) recién a las 24 hs de incubación se visualizó la unión del quelante a la proteína. Para tiempos inferiores los espectros solo evidenciaron el VHH libre sin ningún quelante. Cabe destacar que para las 24 hs la población mayoritaria fue la del VHH libre y luego en forma decreciente las poblaciones de 1 linker, 2 linkers, 3 linkers y 4 linkers, en ese orden.

Para la condición de 45°C (Fig. 19) a tiempos cortos como 2 hs de incubación se encontró una población de VHH unido a quelante, encontrándose igualmente de forma mayoritaria el nanoanticuerpo sin funcionalizar. Recién a las 5hs de reacción cobró más relevancia las poblaciones funcionalizadas y a las 24 hs el VHH libre disminuyó significativamente.

Para el tercer caso, 50°C de incubación (Fig. 20), a las 4 hs la población mayoritaria es la del VHH funcionalizado y a las 24 hs la cantidad de VHH sin funcionalizar es mínima. En este último tiempo, además, predominan las poblaciones de VHH unido a 3 quelantes y a 4 quelantes.

Por todo lo analizado, tiempos de 24 hs se relacionan con mayor completitud de la reacción, así como también mayores temperaturas aceleran la reacción. Teniendo en cuenta la naturaleza de los nanoanticuerpos, una temperatura de 50°C resulta conveniente y por otro lado tiempos de incubación de 24 hs también resultan adecuados para la funcionalización de la proteína.

Como siguiente paso, luego de la funcionalización de la proteína, la obtenida a las 24 hs y a los 50°C fue radiomarcada con Lutecio-177. El resultado de la radiomarcación se observa en la corrida de HPLC en la Fig. 21 donde se observa como primer pico (tiempo de corrida de 2 min) al lutecio libre y como segundo pico (6.2min) al VHH radiomarcado, siendo el área de este último pico de 93.59% lo cual indica una radiomarcación con un buen rendimiento de reacción para los propósitos experimentales, por lo cual no se consideró su posterior purificación

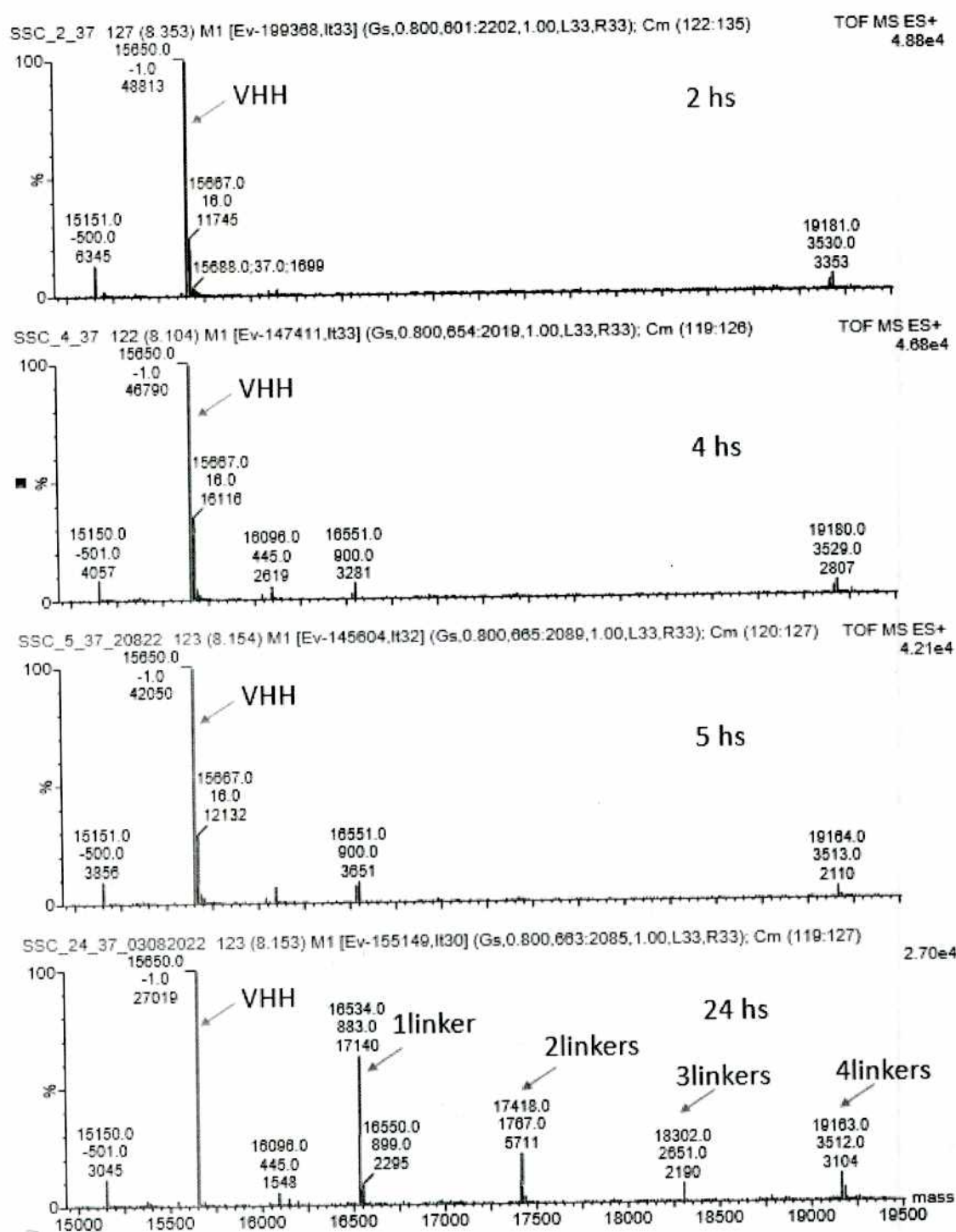


Fig. 18. Espectros de masa para la condición de reacción a 37°C entre el VHH y el quelante. Se presentan distintos tiempos de reacción.

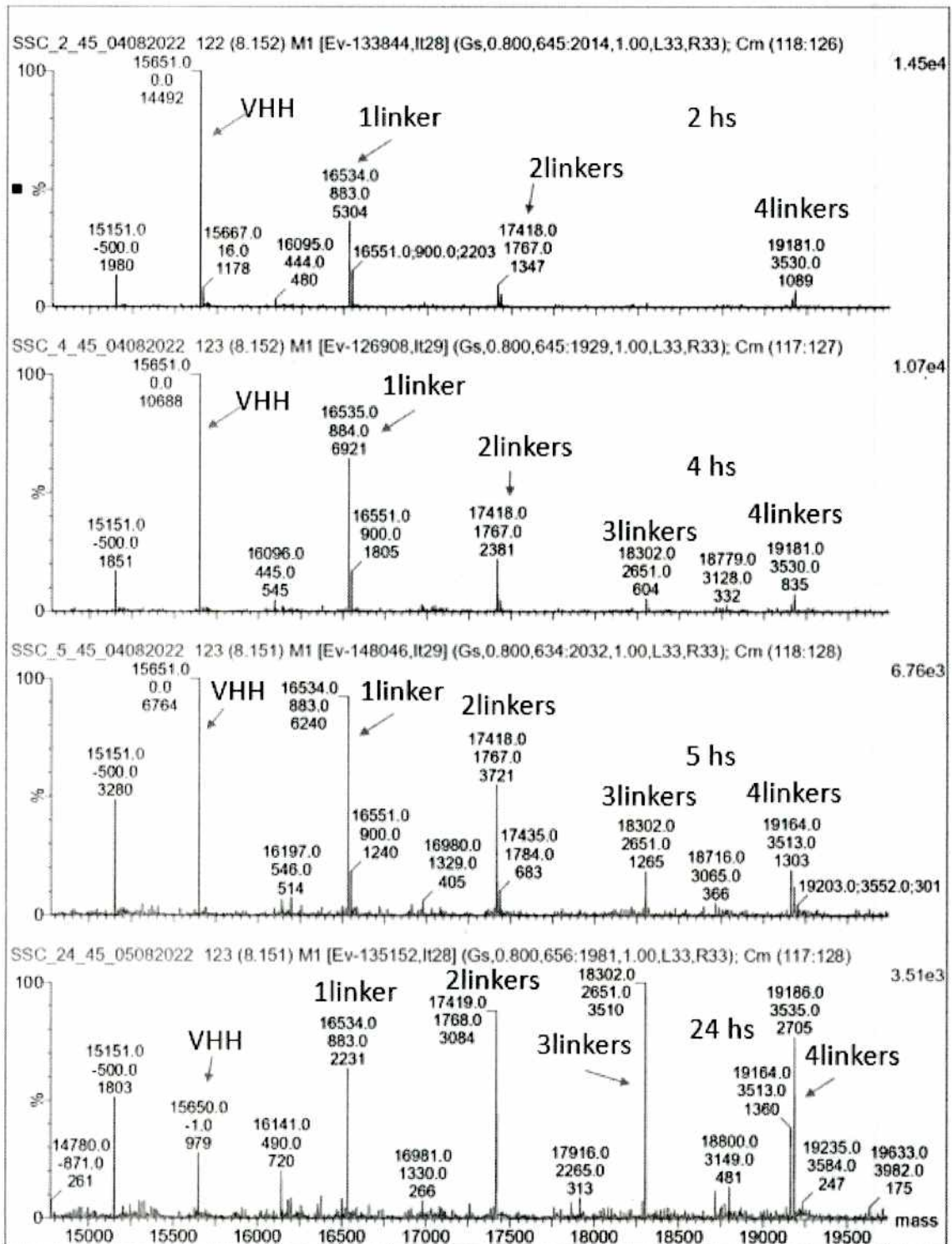


Fig. 19. Espectros de masa para la condición de reacción a 45°C entre el VHH y el quelante. Se presentan distintos tiempos de reacción.

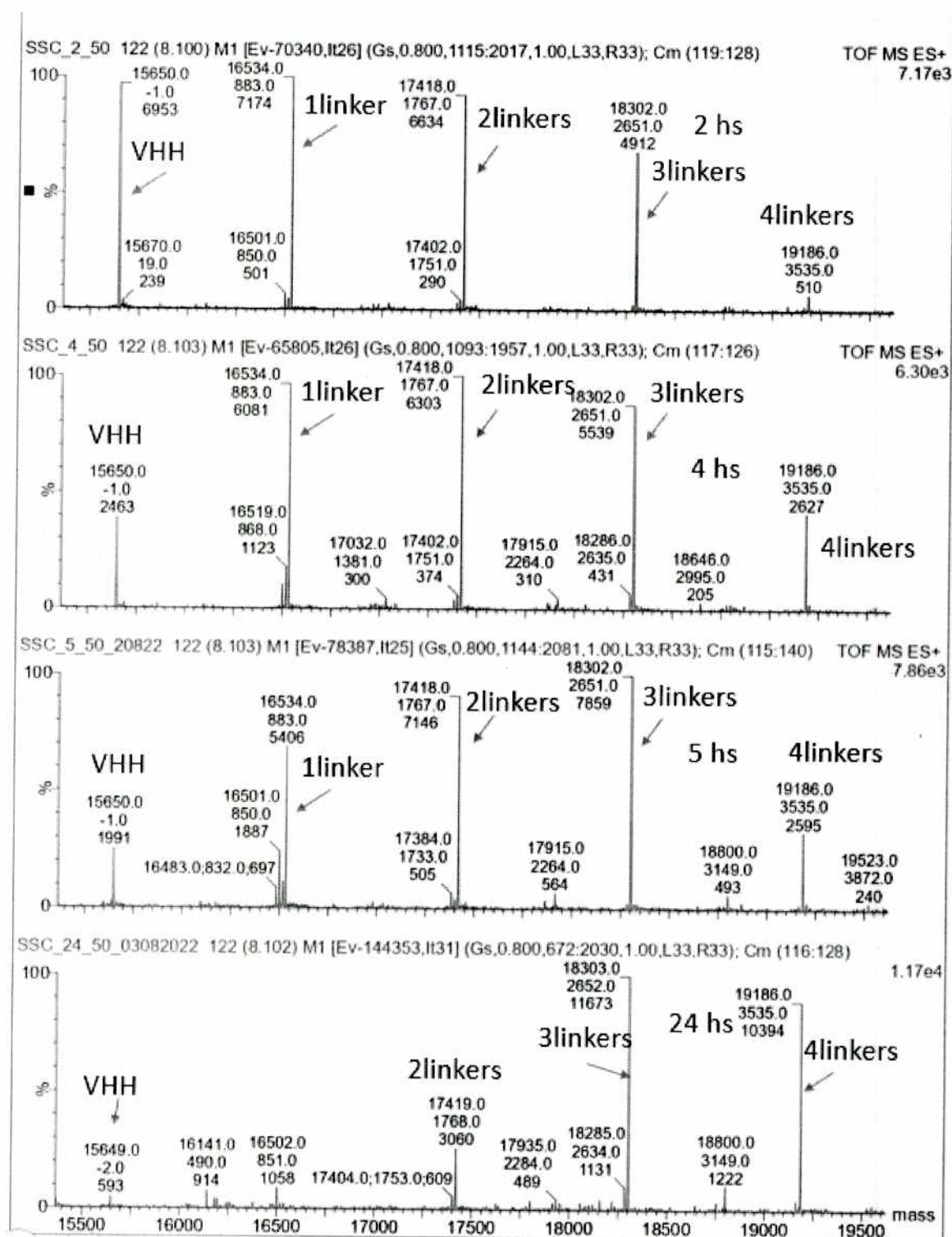


Fig. 20. Espectros de masa para la condición de reacción a 50°C entre el VHH y el quelante. Se presentan distintos tiempos de reacción.

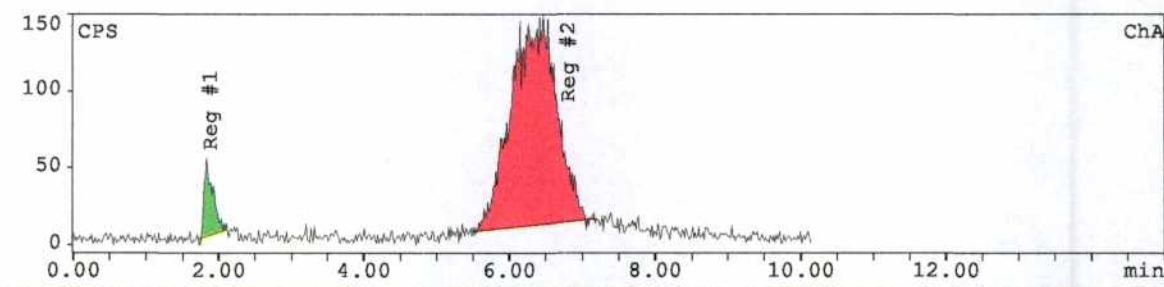


Fig. 21. Resultado de la corrida de HPLC. En verde se representa el área del ^{177}Lu libre y en rojo el área del ^{177}Lu -VHH (93,59%).

A partir del radiofármaco obtenido se continuaron con estudios biológicos. Para ello, se seleccionó la línea celular A431 ya que la misma corresponde a una línea epidérmica que sobre-expresa los receptores de EGFR lo cuales son el blanco molecular del VHH.

En una primera etapa, se estudió el grado de internalización de la radioactividad a partir de la incubación del radiofármaco con las células. Los resultados se vuelcan en la Fig. 22 la cual muestra las cpm cada 1 millón de células en función del tiempo de incubación (tiempos 0, 1.5 hs, 2.5 hs, 5 hs y 6 hs). Además, se notan tres curvas que corresponden a la radiactividad presente en la membrana de las células (sin haber internalización del Lutecio-177) la cual se corresponde al sobrenadante que fue lavado con buffer de glicina ya que por el pH ácido del mismo se pierden las uniones débiles del nanoanticuerpo marcado con su receptor y por lo tanto quedan en dicha fracción. Por otro lado, otra de las gráficas corresponde a células pre-tratadas con cetuximab, lo cual al ser un anticuerpo frío con una constante de afinidad mucho mayor por el receptor EGFR que el VHH permite bloquear los sitios de interacción y por lo tanto la internalización medida correspondería idealmente solo a aquella que ingresó a la célula de forma inespecífica, es decir sin mediar su unión al receptor. Por último, la otra curva representa a la internalización total.

Como puede verse en el gráfico, la radioactividad internalizada inespecífica es mínima (triángulos en el gráfico) en todos los tiempos, lo cual nos indica que efectivamente las internalizaciones son producto de la interacción con el receptor EGFR. La fracción de radiofármaco unida a la membrana representa la radiactividad mayoritaria en todos los puntos, por lo cual se deduce que no todo el radiofármaco que se une al receptor logra ser internalizado a los tiempos estudiados. Cabe mencionar que se observa un *plateau* a tiempos cortos demostrando que esta interacción ya se da en el tiempo de 1.5 hs y luego se mantiene. Por último, la internalización total se observa que aumentó a lo largo de los tiempos estudiados alcanzando su valor máximo a las 5 hs y no observándose que a las 6 hs haya un cambio significativo de las cpm respecto al punto anterior.

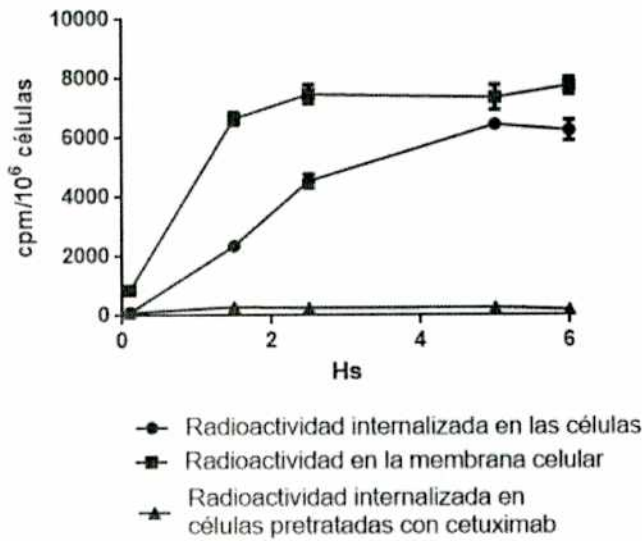


Fig. 22. Gráfico de radioactividad medida en función del tiempo para cultivo celular de A431 en distintas condiciones.

En el estudio clonogénico lo que se estudió fue el efecto biológico que provocó el radiofármaco (Fig. 23 y 24). Se evaluaron 3 concentraciones con el radiofármaco y el Lutecio-177 libre así como con un control con el nanoanticuerpo frío, y células sin ningún tratamiento (sin mostrar en el gráfico). El objetivo de este tratamiento fue evaluar el potencial efecto antitumoral del radiofármaco por lo cual se espera que con el tratamiento las células estudiadas pierdan su viabilidad. Según los resultados, hubo una diferencia significativa entre el VHH radiomarcado y el Lutecio-177 libre, encontrándose menor sobrevida en las condiciones tratadas con el radiofármaco. A su vez, a mayores MBq entregados menor fue la viabilidad.

Por otro lado, las células tratadas con el VHH frío no afectaron la sobrevida de las células con respecto al control sin ningún tipo de tratamiento. Por lo tanto, se concluye que el radiofármaco de VHH con Lutecio-177 presentó un efecto antitumoral prometedor para avanzar con sus estudios.

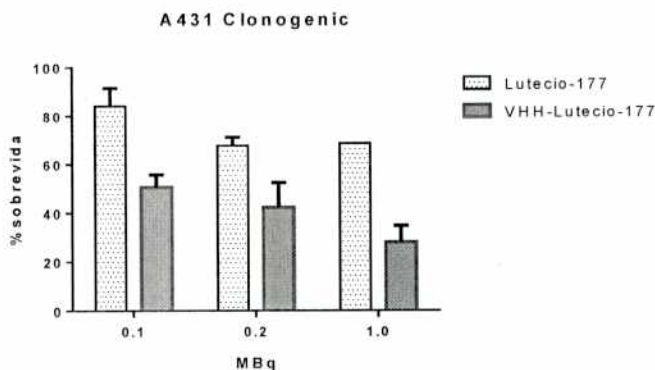


Fig 23. Gráfico de sobrevida celular en función del tratamiento utilizado.

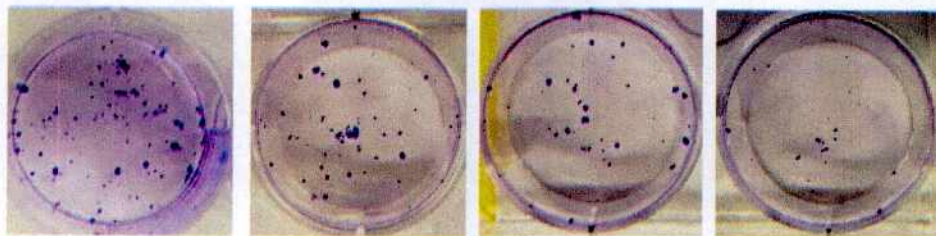


Fig. 24. Resultados del ensayo clonogénico. En violeta se visualizan las colonias de células sobrevivientes. De izquierda a derecha se visualizan los siguientes pocillos: control si tratamiento, 0.1 MBq de VHH-Lutecio-177, 0.2 MBq de VHH-Lutecio-177 y 1.0 MBq de VHH-Lutecio-177.

Conclusiones

El trabajo final abordó diferentes aspectos relacionados con la radiomarcación y el desarrollo de nuevas terapias radiológicas. En primer lugar, se investigó la técnica de radiomarcación automatizada de ^{18}F -FDG, incluyendo su proceso de producción, análisis de técnicas utilizadas y los resultados obtenidos. Se analizaron cuidadosamente las condiciones estandarizadas y los controles de calidad necesarios para garantizar la eficacia y seguridad del radiofármaco.

En segundo lugar, se estudió la radiomarcación automatizada del ^{68}Ga -DOTATATE, destacando los procesos clave, las técnicas empleadas y los controles necesarios para la liberación de lotes de uso médico. Se hizo hincapié en la importancia de mantener la estandarización y calidad en todas las etapas del proceso de radiomarcación.

Finalmente, se presentó el desarrollo de un potencial nuevo fármaco utilizando Lutecio-177 como agente terapéutico contra el cáncer. Se describieron las técnicas manuales de funcionalización y radiomarcación, así como los estudios físicoquímicos y biológicos realizados para evaluar su eficacia y especificidad.

En conclusión, este trabajo proporciona una visión integral de las técnicas de radiomarcación de radiofármacos, resaltando la importancia de los controles de calidad en cada etapa del proceso. Los resultados presentados en este estudio, en especial los de Lutecio-177, resultan prometedores para el avance de nuevas terapias radiológicas más efectivas.

Referencias

- Albander, H., & Aljalis, M. I. (2022). New trends in preparation, bio distribution, and pharmacokinetics of radiopharmaceuticals in diagnosis and research. In *Radiopharmaceuticals-Current Research for Better Diagnosis and Therapy*. IntechOpen.
- Ambrosini, V., Campana, D., Bodei, L., Nanni, C., Castellucci, P., Allegri, V., & Fanti, S. (2010). ^{68}Ga -DOTANOC PET/CT clinical impact in patients with neuroendocrine tumors. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(5), 669-673.
- Argentina, F. 7° ed.[FA 7°]. Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT.(2003). *Farmacopea Argentina*.
- Ballinger, J. R. (2015, September). Pitfalls and limitations of SPECT, PET, and therapeutic radiopharmaceuticals. In *Seminars in nuclear medicine* (Vol. 45, No. 5, pp. 470-478). WB Saunders.
- Banerjee, S., Pillai, M. R. A., & Knapp, F. F. (2015). Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemical reviews*, 115(8), 2934-2974.
- Bessell, E. M., Courtenay, V. D., Foster, A. B., Jones, M., & Westwood, J. H. (1973). Some in vivo and in vitro antitumour effects of the deoxyfluoro-D-glucopyranoses. *European Journal of Cancer* (1965), 9(7), 463-470.
- Breeman, W. A., de Jong, M., de Blois, E., Bernard, B. F., Konijnenberg, M., & Krenning, E. P. (2005). Radiolabelling DOTA-peptides with ^{68}Ga . *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 32, 478-485.
- Charpidou, A., Blatza, D., Anagnostou, E., & Syrigos, K. N. (2008). EGFR mutations in non-small cell lung cancer-clinical implications. *in vivo*, 22(4), 529-536.
- Decristoforo, C., Knopp, R., von Guggenberg, E., Rupprich, M., Dreger, T., Hess, A., ... & Haubner, R. (2007). A fully automated synthesis for the preparation of ^{68}Ga -labelled peptides. *Nuclear medicine communications*, 28(11), 870-875.
- De Decker, M., & Turner, J. H. (2012). Automated module radiolabeling of peptides and antibodies with gallium-68, lutetium-177 and iodine-131. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27(1), 72-76.
- De León-Rodríguez, L. M., & Kovacs, Z. (2008). The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates. *Bioconjugate chemistry*, 19(2), 391-402.
- Gallagher, B. M., Fowler, J. S., Gutterson, N. I., MacGregor, R. R., Wan, C. N., & Wolf, A. P. (1978). Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [^{18}F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of Nuclear Medicine*, 19(10), 1154-1161.
- Heh, E., Allen, J., Ramirez, F., Lovasz, D., Fernandez, L., Hogg, T., ... & Chacon, J. (2023). Peptide Drug Conjugates and Their Role in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 829.
- Hung, J. C. (2002). Comparison of various requirements of the quality assurance procedures for

- ¹⁸F-FDG injection. *Journal of Nuclear Medicine*, 43(11), 1495-1506.
- Karczmarczyk, U., Sawicka, A., Garnuszek, P., Maurin, M., & Wojdowska, W. (2022). Does the number of bifunctional chelators conjugated to a mAb affect the biological activity of its radio-labeled counterpart? Discussion using the example of mAb against CD-20 labeled with ⁹⁰Y or ¹⁷⁷Lu. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(9), 6419-6430.
- Keech, F. (2012). Steves' Review of Nuclear Medicine Technology: Preparation for Certification Examinations.
- Jia, A. Y., Kashani, R., Zaorsky, N. G., Spratt, D. E., Kiess, A. P., Michalski, J. M., ... & Baumann, B. C. (2022). Lutetium-177 DOTATATE: a practical review. *Practical Radiation Oncology*, 12(4), 305-311.
- Lemaire, C., Damhaut, P., Lauricella, B., Mosdzianowski, C., Morelle, J. L., Monclus, M., ... & Luxen, A. (2002). Fast [¹⁸F] FDG synthesis by alkaline hydrolysis on a low polarity solid phase support. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals: The Official Journal of the International Isotope Society*, 45(5), 435-447.
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., & Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell*, 7(4), 301-311.
- Liu, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced drug delivery reviews*, 60(12), 1347-1370.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., ... & Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2-16.
- Omidfar, K., Amjad Zanjani, F. S., Hagh, A. G., Azizi, M. D., Rasouli, S. J., & Kashanian, S. (2013). Efficient growth inhibition of EGFR over-expressing tumor cells by an anti-EGFR nanobody. *Molecular biology reports*, 40, 6737-6745.
- Pharmacopeia, U. S. (2016). USP. The United States Pharmacopeial.
- Schlyer, D. J. (2004). PET tracers and radiochemistry. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, 33(2), 146-154.
- Vermeulen, K., Vandamme, M., Bormans, G., & Cleeren, F. (2019, September). Design and challenges of radiopharmaceuticals. In *Seminars in nuclear medicine* (Vol. 49, No. 5, pp. 339-356). WB Saunders.
- Wängler, C., Wängler, B., Lehner, S., Elsner, A., Todica, A., Bartenstein, P., ... & Schirrmacher, R. (2011). A universally applicable ⁶⁸Ga-labeling technique for proteins. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(4), 586-591.
- Wieler, H. J. (2000). *PET in clinical oncology*. Springer Science & Business Media.
- Yu, S. (2006). Review of ¹⁸F-FDG synthesis and quality control. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*(4), e57.).
- Asti, M., De Pietri, G., Fraternali, A., Grassi, E., Sghedoni, R., Fioroni, F., ... & Salvo, D. (2008). Validation of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of ⁶⁸Ga-DOTATOC. *Nuclear medicine and biology*, 35(6), 721-724.