



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE
3'-DEOXY-[¹⁸F]FLUORO-L-TIMIDINA
PARA ESTUDIOS
IN VIVO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GABRIELA CONTRERAS CASTAÑÓN



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** Profesor: Ofelia Espejo González.
- VOCAL:** Profesor: Norma Trinidad González Monzón.
- SECRETARIO:** Profesor: Miguel Ángel Ávila Rodríguez.
- 1er. SUPLENTE:** Profesor: Honoria Fuentes Sixtos.
- 2º SUPLENTE:** Profesor: Andrés Navarrete Castro.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD PET/CT-CICLOTRÓN, DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE MEDICINA-UNAM, PLANTA BAJA DEL NUEVO EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D. F. C. P. 04510.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez

SUSTENTANTE (S):

Gabriela Contreras Castañón

Dedicatorias.

A Ricardo Contreras y Ma. Otilia Castañón.

A mis hermanas Verónica y Nayelli.

A mis nuevos y horribles hermanitos (Ale y Memo).

A mis amigos

Agradecimientos

A la Unidad PET/CT-Ciclotrón de la Facultad de Medicina, UNAM, por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar la tesis.

Al CONACYT, proyecto **121652** "Producción de nuevos radionucleidos y radiofármacos para tomografía de emisión de positrones (PET) dirigido a blancos moleculares específicos"

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez, por darme la oportunidad de ser su alumna, enseñarme una rama de la industria farmacéutica completamente desconocida y abrirme las puertas de la Unidad PET/CT-Ciclotrón.

Para los miembros del jurado por la revisión cuidadosa de la tesis: Ofelia Espejo González, Norma Trinidad González Monzón, Honoria Fuentes Sixtos y Andrés Navarrete Castro.

Gracias a los compañeros del laboratorio por su valiosa compañía, consejos ayuda, explicaciones y todas las cosas importantes que hicieron, para hacer más comfortable mi estancia. Los físicos AFM, AZM, FTB, VLC, MVG, a los compañeros de radiofarmacia JCMA, EZR, y a los de transporte JS, AGP.

Gracias a mis amigos que con su ayuda y compañía facilitaron aquellos momentos tan difíciles de la carrera y vida, al recordarme de las tareas o me prestaban su libro (jajaja algunos todavía nos los devuelvo) o el simple hecho de comer juntos.

Gracias Gus por enseñarme el valor de leer.

Chío muchas gracias por ser mi amiga todo este tiempo después de que no nos soportábamos.

Mi trio favorito Lili, Lila y Lalo (lo siento mucho por ponerte aquí pero sabes que me encanta ponerlos juntos, gracias por estos 19 años de amistad). Como olvidarlas después de tantos ratos de chismes Mariel y Caro.

También quiero agradecer aquellas personas que fueron importantes en mi vida y por cuestiones del destino ya no están, el poco o el largo tiempo que compartimos juntos fueron fundamentales para mi desarrollo profesional y moral y aquellas que comienzan a hacerlo

Tranquilos aun no he olvidado a las personas más importantes de mi vida, aquellas a las cuales les debo el haber llegado hasta aquí, aquellas las cuales se me desmadrugaron, desvelaron y me han cuidado todo este tiempo sin olvidar el hecho de cumplir la mayoría de los regalos absurdos;-) MI FAMILIA.

Si su nombre no aparece aquí, descuiden si están en mi corazón y en mi memoria, perdón pero si continuo escribiendo nombres de todas aquellas personas a las que les debo algo nunca terminaría.

Índice

Introducción	1
Objetivos	3
Objetivo general.	3
Objetivos específicos.	3
1.0 Radiofármacos y Radionucleidos.....	4
1.1 Definición de radiofármaco.	4
-Características ideales de un radiofármaco.....	5
1.2 Tipos de radiomarcado.	5
1.2.1 Cambio del isótopo.....	5
1.2.2 Introducción de un átomo extraño.....	6
1.2.3 Agentes quelantes bifuncionales.....	6
1.2.4 Biosíntesis.	6
1.3 Radiofármacos para PET.....	6
1.4 Producción de radionucleidos emisores de positrones para uso médico.....	8
1.4.1 ¹¹ Carbono.	9
1.4.2 ¹³ Nitrógeno.	9
1.4.3 ¹⁵ Oxígeno.	9
1.4.4 ¹⁸ Flúor molecular (¹⁸ F ₂).....	9
1.4.5 ¹⁸ Flúor iónico (¹⁸ F ⁻).	9
1.5 [¹⁸ F]-Fluoro-2-Desoxi-Glucosa ([¹⁸ F]FDG).	10
1.5.1 Producción de [¹⁸ F]FDG.....	10
1.5.2 Bioquímica del [¹⁸ F]FDG.	11

2.0 Propiedades de la ([¹⁸F]FLT) 3´-Desoxi-3´-[¹⁸F]fluoro-L-timidina.	12
2.1 Estructura de la timidina y de la [¹⁸ F]FLT.	13
2.2 Biodistribución Normal (Farmacocinética).	13
2.3 Farmacodinamia.....	14
-Toxicidad.	16
2.4 Ventajas y desventajas de la [¹⁸ F]FLT.	17
2.5 Aplicaciones de la [¹⁸ F]FLT.....	19
2.6 Monografía del producto [5,34,35,36].	20
3.0 Producción de [¹⁸F]FLT.	22
-Producción de [¹⁸ F]fluoruro.	22
3.2 Tipos de reacciones entre el precursor y el anión ¹⁸ F-Fluoruro.....	22
3.2.1 Reacción de sustitución Nucleofílica bimolecular (SN ₂).	23
3.2.2 Reacción de Eliminación bimolecular (E ₂).	24
3.2.3 SN ₂ Vs E ₂	25
3.3 Módulo de síntesis empleado en la producción de [¹⁸ F]FLT.	26
3.4 Procedimientos involucrados en la síntesis de [¹⁸ F]FLT.....	30
3.4.1 Paso 1. Separación y elución del [¹⁸ F]Fluoruro.....	30
3.4.2 Paso 2. Eliminación del agua del medio de reacción.	30
3.4.3 Paso 3 [¹⁸ F]Fluoración, Sustitución nucleofílica (SN ₂).	31
3.4.4 Paso 4 Hidrólisis ácida.	31
3.4.5 Paso 5 Neutralización del medio de reacción.	32
3.4.6 Paso 6 Preparación para la purificación.....	32
3.4.7 Paso 7 Purificación química.....	32
3.1.8 Paso 8 Obtención del producto inyectable.	33

4.0 Control de calidad de los radiofármacos.	34
4.1 Pruebas Fisicoquímicas. (Pureza e integridad).	34
4.1.1 Inspección visual.	34
4.1.2 Medición de pH.	35
4.1.3 Pureza radioquímica.	35
4.1.4 Pureza radionucleídica.	35
4.1.5 Determinación de la vida media.	35
4.1.6 Pureza química.	36
4.2 Pruebas biológicas.	36
4.2.1 Prueba de la burbuja.	37
4.2.2 Cuantificación de endotoxinas bacterianas.	37
5.0 Desarrollo experimental.	38
5.1 Producción de la [¹⁸ F] FLT.	38
5.1.1 Reactivos.	38
5.1.2 Materiales.	38
5.1.3 Condiciones de los Equipos.	39
5.2 Metodología del control de calidad.	41
5.2.1 Determinación del pH.	41
5.2.2 Determinación de la pureza química y pureza radioquímica.	41
5.2.3 Cuantificación de pirógenos	42
5.2.4 Pureza radionucleídica.	43
5.2.5 Identificación del radionucleido [¹⁸ F]F.	43
5.2.6 Disolventes residuales.	44
5.2.7 La determinación del aminopoliéter.	45

5.2.8 Integridad de la membrana.	45
6.0 Resultados y discusión.....	46
6.1 Cromatogramas representativos de cada grupo; obtenidos durante la purificación de la [¹⁸ F]FLT.	46
6.1.1 Grupo 1. 20 mg de precursor-25 mg de K _{2.2.2}	47
6.1.2 Grupo 2. 10 mg de precursor-20 mg K _{2.2.2}	48
6.1.3 Grupo 3. 10 mg de precursor-7.95 mg K _{2.2.2}	49
6.1.4 Grupo 4. 10 mg de precursor-5.3 mg K _{2.2.2}	50
6.1.5 Determinación de la actividad específica.....	51
6.2 Pruebas de control de calidad.....	54
Certificado de control de calidad.....	57
6.3 Discusión.	58
7.0 Conclusiones.....	60
Acrónimos y términos.	61
Referencias.....	63
Apéndice A.....	68
Apéndice B.....	72

Introducción

La medicina nuclear, una ciencia interdisciplinaria, donde se fusionan diferentes métodos de adquisición de imágenes y el uso de compuestos radiactivos, "radiofármacos"; dan como resultado imágenes que proporcionan información funcional de los órganos estudiados, contribuyendo al diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades [1].

La biodistribución del radiofármaco y la acumulación en el organismo dependerá de las características y especificidad de éste, de una manera general la cantidad de radiactividad presente en los diferentes tejidos puede indicar la funcionalidad de éstos.

El 95% de los radiofármacos se utilizan para el diagnóstico y la [^{18}F]flourotimidina ([^{18}F]FLT) no es la excepción; al ser el análogo de la base de la timidina, la captación de este radiofármaco por cualquier tejido se relaciona con la tasa de proliferación celular existente en ese momento.

El isótopo radiactivo [^{18}F] flúor con el que se encuentra marcada la timidina, tiene un decaimiento por emisión de positrones. Cuando el positrón emitido del núcleo interacciona con un electrón, da como resultado la aniquilación de ambas partículas y la emisión de dos fotones con una energía de 511 keV cada uno, capaces de ser detectados fuera del organismo. Estos fotones son emitidos en ángulo de 180° .

La [^{18}F]FLT se administra al paciente vía intravenosa y se espera de 60 a 90 minutos antes de pasar al paciente a la cámara PET (Positron Emission Tomography), constituida de un arreglo cilíndrico de detectores los cuales detectarán los fotones generados en la aniquilación.

Los datos adquiridos por la cámara se procesan y almacenan en una computadora. Utilizando diferentes algoritmos de reconstrucción de imagen, se genera una

distribución espacio-temporal del radiofármaco en el paciente, obteniendo así una imagen metabólica. Al acoplarse con otras técnicas de adquisición de imagen, en especial la tomografía computarizada se obtiene una imagen híbrida; metabólica y estructural del paciente [2,3].

Desde el año 2000 la [^{18}F]FLT se utiliza en otros países como Estados Unidos y Japón, por lo que el objetivo de este trabajo es implementar en el país la producción de 3'-Desoxi-3'-[^{18}F]fluoro-L-timidina ([^{18}F]FLT) así como evaluar su función como radiofármaco específico para estudios de proliferación celular *in vivo* mediante estudios de tomografía por emisión de positrones. Para el cumplimiento de tal objetivo se empleó un módulo de síntesis química automatizado, al igual que un conjunto de análisis fisicoquímicos que garanticen la seguridad del compuesto para su administración.

Objetivos

Objetivo general.

Preparar y evaluar la calidad de 3'-Desoxi-3'-[¹⁸F]fluoro-L-timidina ([¹⁸F]FLT) como un radiofármaco específico para estudios de proliferación celular *in vivo* mediante estudios de tomografía por emisión de positrones.

Objetivos específicos.

- 1.- Adaptar la síntesis química de [¹⁸F]FLT en la Unidad de control de procesos químicos (CPCU por sus siglas en inglés) diseñado originalmente para la síntesis de [¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxi-Glucosa ([¹⁸F]FDG).
- 2.- Realizar las pruebas de control de calidad necesarias para garantizar la seguridad del producto.
- 3.- Realizar los estudios preclínicos de [¹⁸F]FLT en animales mediante estudios microPET.

1.0 Radiofármacos y Radionucleidos.

1.1 Definición de radiofármaco.

Un radiofármaco es aquel compuesto cuya estructura ha sido modificada químicamente; al añadirle o remplazarle un átomo o un grupo funcional por un radionucleido además de contar con una formulación adecuada para su administración en humanos. Se utilizan en la medicina nuclear para el diagnóstico o tratamiento de las algunas enfermedades [2,4,5]. Se caracteriza por tener dos componentes principales:

- Molécula de interés. Es un compuesto que determina la ruta metabólica o tiene un receptor específico en ciertos órganos de interés.
- Radionucleido o radioisótopo. Se caracteriza por su capacidad de emitir radiaciones en el momento en el que su núcleo se transforma a otro más estable y contar con un tiempo de vida media característico. Permite la detección externa de la biodistribución del radiofármacos dentro del organismo.

En el caso de radiofármacos emisores de positrones los radionucleidos más comunes son: ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F . En la Tabla 1 se muestran las características principales de los radioisótopos antes mencionados.

Tabla 1. Características generales de los radionucleidos convencionales [6].

Radionucleido	Tipo decaimiento	Vida media (min)	Energía de los positrones. (MeV)		Alcance en agua de los positrones (mm)	
			Máxima	Promedio	Máximo	Promedio
^{11}C	β^+ 99.8 %	20	0.959	0.326	4.1	1.1
^{13}N	β^+ 100 %	10	1.197	0.432	5.1	1.5
^{15}O	β^+ 99.9 %.	2	1.738	0.696	7.3	2.5
^{18}F	β^+ 96.9 % EC. 3.1 %	110	0.633	0.202	2.4	0.6

E.C Captura electrónica, β^+ emisión de positrones.

Características ideales de un radiofármaco.

- La dosis administrada del radiofármaco debe ser mínima pero fácilmente detectable, evitando la radiación innecesaria del paciente.
- El efecto farmacológico es mínimo o nulo, debido a las bajas concentraciones utilizadas ($\mu\text{mol/L}$).
- Su producción debe de ser fácil y barata.
- El radiomarcado debe presentar buenos rendimientos.
- Su síntesis debe de llevarse a cabo entre 1 y 2 vidas medias del radionucleido para mantener un buen rendimiento y alta actividad específica¹. [3].
- Deben de presentar nula toxicidad.
- El radioisótopo debe localizarse en una posición estable para evitar la degradación metabólica.
- No debe de metabolizarse antes de llegar a su órgano blanco y los metabolitos producidos deben de ser los menos posibles.
- Deben de ser químicamente estable.
- Estériles, libres de pirógenos.

1.2 Tipos de radiomarcado.

Existen diferentes métodos para realizar el radiomarcado, la elección de la técnica dependerá principalmente de las características fisicoquímicas de la molécula de interés [4].

1.2.1 Cambio del isótopo.

La molécula de interés cuenta con un elemento no radiactivo en su estructura, pero existen radioisótopos de éste; por medio de reacciones químicas se reemplaza el elemento por su isótopo radiactivo; siendo el mismo tipo de átomo, pero con

¹ Actividad específica. Se define como la radiactividad por unidad de masa del radionucleido o del compuesto marcado, siendo sus unidades Bq/mol.

diferente masa. La nueva molécula es idéntica a la otra y conservan sus propiedades químicas y biológicas.

1.2.2 Introducción de un átomo extraño.

Mediante enlaces covalentes o covalentes coordinados se modifica la estructura química de una molécula con actividad biológica conocida. Al hacerla reaccionar con un radioisótopo de un elemento no perteneciente a la molécula original, la nueva molécula tendrá diferentes propiedades químicas y biológicas a la original.

1.2.3 Agentes quelantes bifuncionales.

Este método se utiliza principalmente para marcar macromoléculas (péptidos, proteínas, anticuerpos monoclonales, etc.) ya que las características químicas de éstas no son las necesarias para que reaccionen con el radionucleido, por lo que es necesario utilizar un agente quelante bifuncional que tienen la característica de contar con dos sitios de reacción, uno de ellos reaccionará con la macromolécula y el otro sitio con el radionucleido, formando así un puente de unión entre la macromolécula y la marca radiactiva. Las propiedades químicas y biológicas se pueden llegar a alterar.

1.2.4 Biosíntesis.

Esta técnica permite la incorporación del radionucleido durante el anabolismo de los microorganismos, al añadirle al medio de cultivo el radioisótopo. Se pueden obtener metabolitos o la molécula de interés, por ejemplo vitaminas marcadas.

1.3 Radiofármacos para PET.

El marcaje con radionucleidos se inició desde 1930 cuando surgió la necesidad de estudiar y cuantificar *"in vivo"* las moléculas involucradas en rutas metabólicas; pero para lograr dicho objetivo fue necesario el desarrollo de diversas disciplinas.

Se desarrollaron aceleradores de partículas capaces de producir radioisótopos, de los elementos más abundantes en los seres vivos como: ^{11}C , ^{13}N y ^{15}O , sin embargo no existe uno isótopo para el hidrógeno, por lo que es necesario utilizar al ^{18}F flúor para remplazar a éste [7]. Una vez que se encontró una manera práctica de generar los radionucleidos, fue necesario la creación y el perfeccionamiento de cristales inorgánicos que fungieran como detectores. El arreglo sistematizado de éstos dio como resultado la cámara PET [8]. Estos avances impulsaron a los radioquímicos para estudiar la manera de marcar nuevas moléculas de interés biológico. Las aplicaciones médicas de los radionucleidos generados son muy amplias y dependerá de la molécula marcada; la tabla 2 muestra algunos usos [8,9].

Tabla 2. Usos frecuentes de los radiofármacos.

Radionucleido	Tiempo de vida media (min)	Radiofármaco	Blanco molecular
[^{11}C]	20	^{11}C metionina	Síntesis de proteínas
		^{11}C colina	Proliferación celular
		^{11}C CO	Volumen sanguíneo
		^{11}C CO ₂	Flujo sanguíneo
		^{11}C acetato	Metabolismo cardiaco y cáncer de próstata
		^{11}C raclopride	Detección de receptores dopaminérgicos
		^{11}C ácidos grasos	Metabolismo cardiaco
[^{13}N]	10	^{13}N NH ₃	Perfusión cardiaca
[^{15}O]	2	^{15}O H ₂ O	Flujo sanguíneo
[^{18}F]	110	[^{18}F]FDG	Metabolismo de glucosa
		[^{18}F]FLT	Proliferación celular
		^{18}F NaF	Detección de daños en el hueso
		^{18}F fluoromisonidazol	Hipoxia en tejido tumoral
		^{18}F DOPA	Detección de receptores dopaminérgicos

1.4 Producción de radionucleidos emisores de positrones para uso médico.

La producción de radionucleidos consiste en bombardear un núcleo estable con partículas con la finalidad de crear núcleos inestables. La irradiación con neutrones generalmente produce núcleos ricos en neutrones mediante la reacción nuclear (n,γ) , por lo que se requiere de un reactor y un blanco del mismo elemento químico que se desea producir, lo que dificulta la separación de los isótopos y disminuye la actividad específica [10].

Si la irradiación se hace con partículas cargadas, se emplean aceleradores de partículas que pueden ser lineales o tipo ciclotrón. Los segundos son los más utilizados al tener una energía versátil y más económica que los lineales [8]. Las partículas mayormente empleadas son protones o deuterones, las reacciones nucleares predominantes son (p,xn) ó (p,α) generando núcleos deficientes en neutrones.

La producción requiere de un material denominado "blanco" el cual será bombardeado, las características del blanco dependerán del tipo de radionucleido que se producirá, puede ser sólido, líquido o gaseoso. Para su irradiación estos materiales deben ser contenidos en un soporte comúnmente conocido como "cuerpo del blanco", cuya geometría y material con el que está construido dependerá del estado físico de material blanco a irradiar. Las principales propiedades del soporte del blanco son: buena conductividad térmica y resistencia mecánica, un alto punto de fusión y estable químicamente a la irradiación con partículas.

Una vez que el blanco es irradiado es necesario separar el producto de activación para lo cual se utilizan diferentes técnicas químicas como: intercambio iónico, destilación seca, extracción por disolventes, cromatografía, precipitación y filtración selectiva.

El acelerador de la Unidad PET/CT-Ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM, es un acelerador compacto tipo ciclotrón, el cual acelera iones negativos de hidrógeno hasta una energía de 11 MeV y puede emplear blancos líquidos y gaseosos [11]. Los radionucleidos generados en la unidad son:

1.4.1 ^{11}C Carbono.

Se utiliza como blanco una mezcla de nitrógeno con oxígeno entre 1-2%, la reacción es $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, obteniéndose $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ como producto.

1.4.2 ^{13}N Nitrógeno.

Se utiliza como blanco una solución de agua inyectable con 5 mM de etanol, la reacción nuclear es $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ y se forma $[^{13}\text{N}]$ amoníaco ($[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$) y un mínimo porcentaje (impurezas) de nitratos y nitritos.

1.4.3 ^{15}O Oxígeno.

Se utiliza como blanco una mezcla de nitrógeno (enriquecido isotópicamente con ^{15}N al 99%) y oxígeno al 2.5 %, la reacción es vía $^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$ obteniéndose como producto final $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$.

1.4.4 ^{18}F Flúor molecular ($^{18}\text{F}_2$).

Se utiliza como blanco oxígeno molecular enriquecido con ^{18}O al 97%, la reacción nuclear es $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ y se obtiene flúor molecular $^{18}\text{F}_2$ empleado en reacciones de sustitución electrofílica.

1.4.5 ^{18}F Flúor iónico ($^{18}\text{F}^-$).

Se utiliza como blanco agua enriquecida con oxígeno ^{18}O al 97%, la reacción nuclear es $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, el producto es flúor iónico el cual es utilizado en reacciones de sustitución nucleofílica.

1.5 [¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxi-Glucosa ([¹⁸F]FDG).

La [¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxi-Glucosa ([¹⁸F]FDG) fue desarrollada en 1976, es uno de los primeros radiofármacos sintetizados y actualmente el más utilizado en la realización de estudios PET [12]. Es un análogo de la glucosa en donde el grupo hidroxilo del carbono 2 fue sustituido por el radioisótopo del flúor [¹⁸F]F (Ilustración 1). El [¹⁸F]FDG tiene diversas aplicaciones en diferentes áreas de la medicina, se utiliza en neurología, cardiología y en oncología.

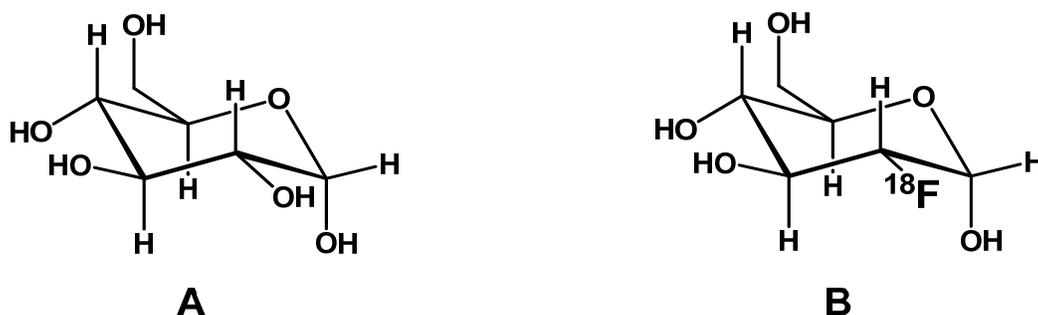


Ilustración 1. A Glucosa. B análogo de la glucosa [¹⁸F]-Fluoro-2-Desoxi-Glucosa ([¹⁸F]FDG).

1.5.1 Producción de [¹⁸F]FDG.

Existen dos maneras de producir [¹⁸F]FDG, la primera de ellas es mediante la fluoración nucleofílica del precursor sin embargo este método se encuentra en desuso por los bajos rendimientos obtenidos. La segunda involucra dos reacciones químicas y se obtienen rendimientos mayores al 70 %, la primera de ellas es una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) y la segunda es una hidrólisis ácida. El precursor utilizado es 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-2-O-manopiranososa (triflato de manosa) y se utiliza Kryptofix[®] (K_{2.2.2}) como catalizador. El producto final es purificado mediante columnas de retardación iónica, un cartucho de C18 y un cartucho de alumina, previo a su administración el producto debe de cumplir con las pruebas de calidad establecidas.

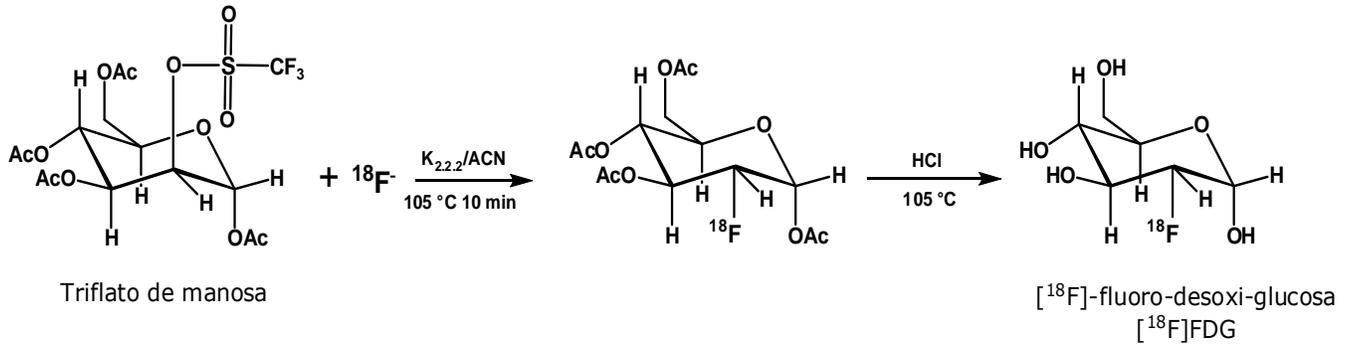


Ilustración 2. Síntesis química de la [¹⁸F]FDG, SN₂

1.5.2 Bioquímica del [¹⁸F]FDG.

El [¹⁸F]FDG al igual que la glucosa es captada por la célula mediante transportadores denominados GLUT's, una vez en el citoplasma la principal enzima de la glucólisis (hexocinasa) fosforila al hidroxilo del carbono 6 formando la glucosa-6-fosfato o en su caso [¹⁸F]FDG-6-fosfato (ilustración 3) [13]. En el momento en que el radiofármaco es fosforilado se queda atrapado en el citoplasma y por la posición del [¹⁸F] en la molécula le impide continuar en la glucólisis [14]. La absorción de [¹⁸F]FDG por las células indica la demanda energética de éstas, por lo que será captada por toda aquella célula que requiera altas concentraciones de glucosa para su funcionamiento [15].

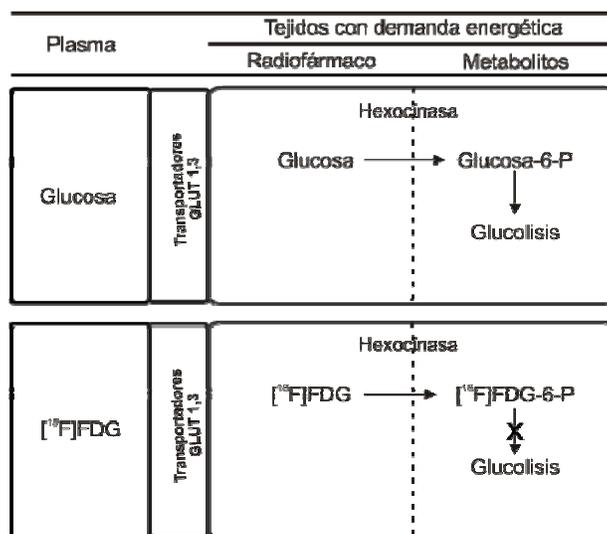


Ilustración 3 Metabolismo de la glucosa y del [¹⁸F]FDG

2.0 Propiedades de la ($[^{18}\text{F}]\text{FLT}$)

3'-Desoxi-3'- $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-L-timidina}$.

Los nucleótidos son derivados de las bases nitrogenadas purinas y pirimidinas, su estructura está ligada a un carbohidrato y al menos a un grupo fosfato. Las células tienen la capacidad de sintetizarlos de "*novó*" u obtenerlos mediante el reciclaje (salvage pathway) [16]. Los nucleótidos son imprescindibles para los organismos, ya que se encuentran involucrados en la mayoría de los procesos bioquímicos, catalíticos, estructurales y son las principales moléculas de información.

La Timidina es una de las cuatro bases que constituyen al ADN pero es la única que no está presente en el ARN; razón por la cual su presencia en las células se asocia directamente con la síntesis de ADN y por lo tanto a la tasa de replicación [17].

En los intentos de observar la proliferación celular se han sintetizado diferentes compuestos que contienen radionucleidos, análogos al nucleosido de la timina (timidina) como la $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2'-Desoxiuridina}$ [18], la $[^{11}\text{C}]\text{-metil-timidina}$ [19] y la $[^{11}\text{C}]\text{-timidina}$. Sin embargo las moléculas marcadas con $[^{11}\text{C}]\text{carbono}$ tienen la capacidad de continuar en las rutas metabólicas por lo que las estructuras son metabolizadas rápidamente dificultando la reconstrucción de imágenes, al no existir manera de distinguir los fotones emitidos por la aniquilación de los positrones en los metabolitos y los pertenecientes a los nucleosidos. A finales de los años noventa se comenzó a hablar de la 3'-Desoxi-3'- $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-L-timidina}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FLT}$) como un potencial marcador de proliferación celular, al poseer mayores ventajas sobre los anteriores.

2.1 Estructura de la timidina y de la [¹⁸F]FLT.

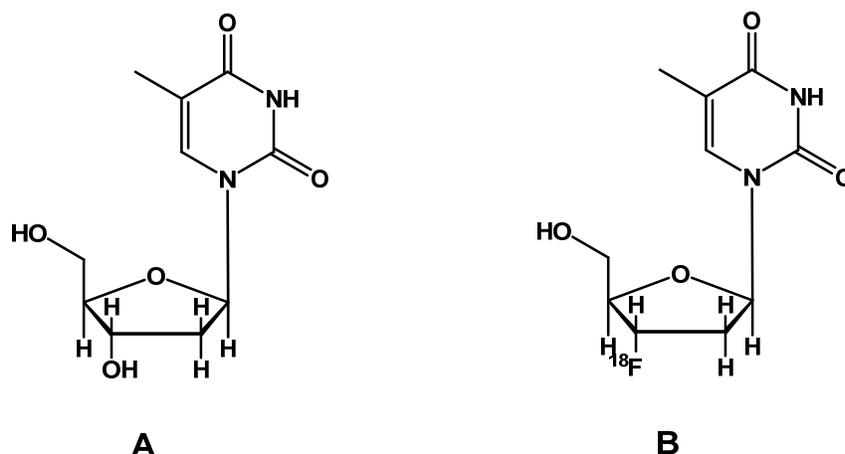


Ilustración 4. Derivados de la base pirimidina. **A.** Timidina, nucleosido presente en las células. **B** [¹⁸F]FLT, análogo de la timidina donde se sustituyó el grupo hidroxilo de la posición 3' por un átomo de flúor.

2.2 Biodistribución Normal (Farmacocinética).

La administración de la [¹⁸F]FLT es por vía intravenosa por lo cual no existe un proceso de absorción, razón por la cual se requiere esperar una hora u hora y media antes de pasar al paciente a la cámara PET/CT, tiempo en el cual se da la biodistribución. La acumulación de la [¹⁸F]FLT en los órganos dependerá del estado de salud del paciente y de ciertos aspectos bioquímicos, pero existen ciertos órganos donde la captación de [¹⁸F]FLT es normal, debido a la alta tasa de replicación o a su participación en la eliminación. Los sitios donde es normal la acumulación del radiofármaco son: la médula ósea, el hígado, el sistema genitourinario, el bazo y en algunas ocasiones el intestino [9,17,20]. Estudios de biodistribución en diferentes especies muestran que existen diferencias significativas; en perros la captación se da principalmente en la médula ósea, nariz y vejiga [13], mientras que en roedores la acumulación de [¹⁸F]FLT se da en sangre, plasma, hígado y riñones [21]. La eliminación de la [¹⁸F]FLT en humanos se da mediante su excreción en orina y se metaboliza en el hígado conjugándose con el ácido glucurónico [9].

2.3 Farmacodinamia.

La [^{18}F]FLT entra a la célula mediante dos tipos de transporte celular: difusión pasiva y difusión facilitada acoplada a canales de Na^+ [20], tal y como se muestra en la ilustración 5. Ya en el citoplasma es fosforilada en el carbono 5' por la enzima Timidina cinasa 1 (TK1), formando la [^{18}F]FLT-5'-monofosfato, el grupo fosfato impide el retorno de la [^{18}F]FLT al torrente sanguíneo. La posición del [^{18}F]flúor impide la adición de nuevos nucleótidos a la cadena de ADN, funcionando como cadena terminadora, por lo que su incorporación es limitada, alrededor del 0.2 % comparada con el 90% de incorporación de la [^3H]timidina [17].

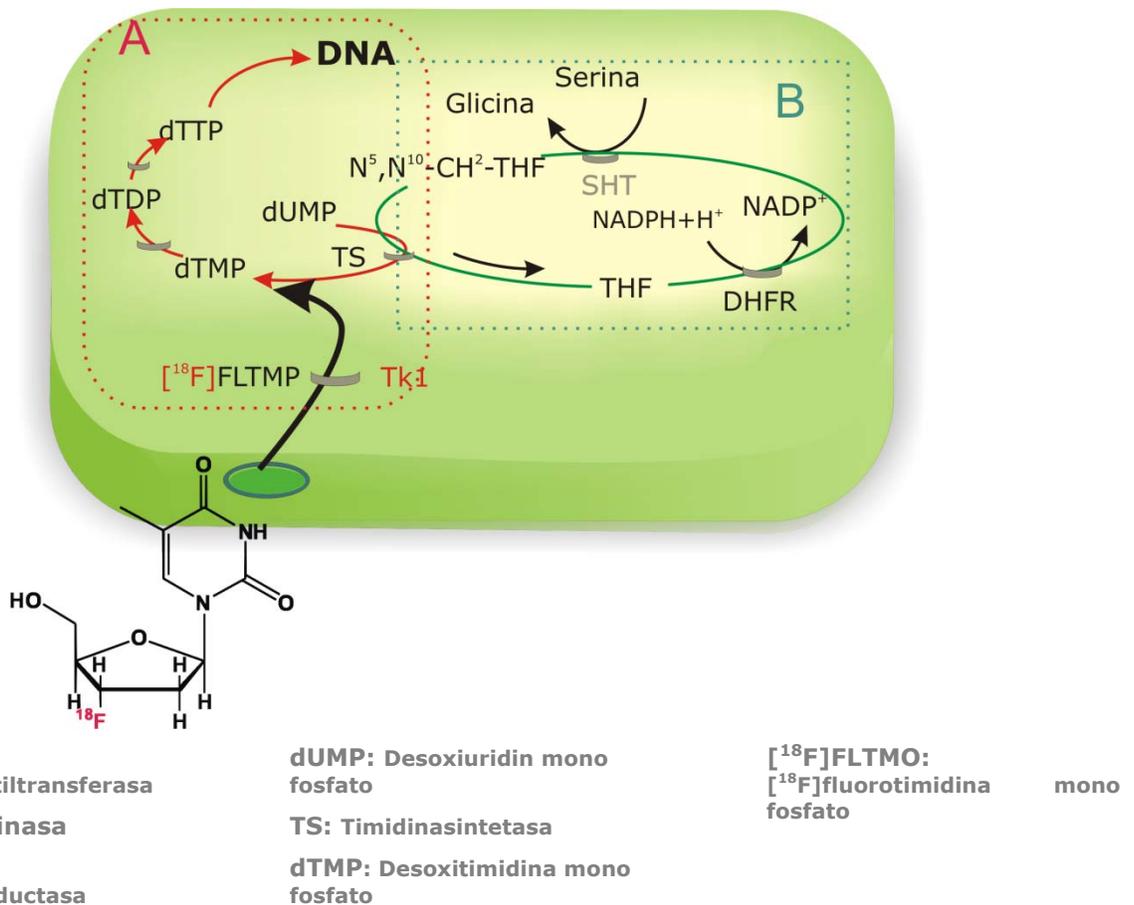


Ilustración 5 Anabolismo de la timidina. A vía de reciclaje. B síntesis de "Novo".

La TK1 es la enzima más importante involucrada en la vía de reciclaje de los nucleótidos y por lo mismo responsable de la absorción de [^{18}F]FLT. En células normales su actividad enzimática se limita a la fase final G_1 y durante toda la fase S del ciclo celular, razón por la que se considera un marcador de proliferación celular, pero en nuestro caso el radiofármaco sólo indica el primer paso de la ruta metabólica, el transporte [18], debido a las características de la TK1 que impiden que la actividad detectada de [^{18}F]FLT en el interior celular se considere como indicativo directo de la replicación celular.

La actividad de la TK1 dependerá de muchos factores bioquímicos así como el tipo de cáncer diagnosticado y el tipo de terapia que el paciente esté recibiendo. La actividad de la TK1 hacia la [^{18}F]FLT es tres veces menor a la que presenta hacia la timidina, está regulada por la cantidad ATP presente en el medio [20,22], con altas concentraciones de ATP forma un tetrámero, con bajas concentraciones de ATP forma un dímero, la eficiencia de fosforilación es mayor para el primer caso [23].

La actividad de la TK1 variará dependiendo del tipo de tumor, aumentando o disminuyendo la captación de [^{18}F]FLT. En los tumores sensibles a la [^{18}F]FLT la actividad enzimática de la TK1 puede llegar a aumentar de 3 a 4 veces, dicho aumento se debe a mutaciones presentes en el carbonilo terminal que evitan su degradación. Los tumores no sensibles a la [^{18}F]FLT son aquellos que no presentan dicha mutación lo que activará la síntesis de "novo". En la tabla 3 se muestran diferentes tipos de tumores y su sensibilidad a la [^{18}F]FLT, donde se observa que tiene más aplicación en neoplasias hematológicas y cerebrales.

Tabla 3. Sensibilidad a la [¹⁸F]FLT de diferentes tipos de tumores (tabla adaptada [18,24*,25⁺⁺,26[&]]).

Tipo de tumores	Sensibilidad al [¹⁸ F]FLT-PET(%)	Sensibilidad al [¹⁸ F]FDG-PET(%)
Leucemia mieloide aguda	100	NR
Sarcoma de tejido blando /hueso	100	NR
Carcinoma gástrico	100	69
Tumores cerebrales	100	NR
Glioblastomas	100	NR
Linfomas	92	100
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	>90 ⁺⁺	100
Cáncer de cabeza y cuello	>90 ⁺⁺	NR
Nódulos malignos pulmonares	86-90	NR
Cáncer esofágico	80*	100*
Glioma	80	100
Cáncer de mama	79	NR
Nódulos pulmonares malignos	78.3	NR
Carcinoma de páncreas	71.4	NR
Nódulos linfáticos	57 ^{&}	86 ^{&}
Nodos metastásicos de linfoma mediastino	53	67
Metástasis de hígado originada por cáncer de colon rectal	34	97

NR datos no reportados.

La captación de [¹⁸F]FLT por el tejido tumoral post-quimioterapia se verá modificada de acuerdo al tipo de medicamento administrado [18]. Cuando existe previo tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU), se presenta un decremento en la concentración de TK1 en las primeras 24-48 horas del tratamiento, pero existe un decremento en la captación de [¹⁸F]FLT ocasionado por la disminución de ATP en la célula [21]. Las complicaciones anteriores demuestran que la interpretación de las imágenes obtenidas utilizando a la [¹⁸F]FLT debe de ser interpretadas con cuidado.

Toxicidad.

La posible toxicidad de la [¹⁸F]FLT está relacionada con su estructura química y las radiaciones emitidas por el radionucleido. La primera de ellas se estudió en 1980 durante la evaluación de la Alovudina (FLT), un nuevo medicamento para el tratamiento del VIH. Los estudios demostraron que a dosis terapéuticas (50-417

ng*h/mL) administradas por un tiempo prolongado ocasiona daño hematológico, falla hepática y en ocasiones neuropatía periférica [17,27]. La dosimetría reportada para la [¹⁸F]FLT muestra que los órganos críticos son: la vejiga, el hígado, los riñones y la médula ósea tanto para hombres como para mujeres, sin embargo la dosis de radiación estimada se encuentra dentro de los límites asociado a los exámenes realizados dentro de la medicina nuclear [28].

En el 2007 se evaluó la posible toxicidad de la [¹⁸F]FLT uniendo los dos factores anteriores. El estudio demostró que no hay reacciones secundarias atribuibles a la radiación emitida por el radiofármaco y tampoco se presentaron daños como lo hace el Alovudine; pues la masa de [¹⁸F]FLT administrada es del orden de unos cuantos cientos de nanogramos y los estudios son esporádicos [27].

2.4 Ventajas y desventajas de la [¹⁸F]FLT.

El uso de la [¹⁸F]FLT presenta ciertas ventajas sobre otros radiofármacos a pesar de que también existen ciertos factores bioquímicos que pueden modificar la captación de ésta, generando las desventajas al compararse con el radiofármaco más utilizado en los estudios PET, la [¹⁸F]FDG. La principal ventaja de la [¹⁸F]FLT sobre su antecesor la [¹¹C]timidina, es el tiempo de vida media del radionucleido con el que la estructura se encuentra marcada ($t_{1/2}$ = 110 min. para el ¹⁸F contra 20 min. para el ¹¹C), lo que permite retardar el tiempo de adquisición de imagen o prolongarlo. Los metabolitos de la [¹⁸F]FLT son pocos y bien localizados, el principal de ellos es el que permite atraparlo en el interior de la célula.

El principal problema o desventaja que presenta la [¹⁸F]FLT frente al [¹⁸F]FDG es la menor captación del radiofármaco por las células tumorales (tabla 4), además de que no todos los tumores son sensibles a ésta. No obstante el [¹⁸F]FDG se acumula en zonas donde se requieren altas concentraciones de glucosa como es el caso de procesos inflamatorios (asépticos o sépticos) e infecciones bacterianas [29], tal es el caso que en otros países se utiliza para el diagnóstico de fiebres ocasionadas sin causa aparente [30], lo que diversifica mucho su uso provocando

falsos positivos cuando se emplea para el diagnóstico de procesos tumorales. En cuanto a la [¹⁸F]FLT puede diferenciar un proceso tumoral de un proceso inflamatorio o una infección bacteriana [31].

Tabla 4 Captación de [¹⁸F]FLT y [¹⁸F]FDG en ratones con diferentes tumores inducidos.

Tejido	Modelo tumoral			
	Inoculación de células RIF-1 ^[21]		Inoculación de células 6 C ^[31] (glioma)	
	[¹⁸ F]FLT [%ID/g]	[¹⁸ F]FDG [%ID/g]	[¹⁸ F]FLT SUV	[¹⁸ F]FDG SUV
Tumor	5.7 ± 0.8	6.1±0.9	1.14±0.62	2.35±0.72
Sangre	3.1 ± 0.6	0.4±0.1	0.31±0.15	0.31±0.09
Plasma	3.3 ± 0.7	0.4±0.1	0.31±0.15	0.43±0.17
Hígado	3.2 ±0.8	0.9±0.1	0.39±0.20	0.51±0.11
Riñones	8.3 ± 1.4	2.3±0.6	1.19±0.49	1.89±0.43
Pulmón	3.9 ± 0.5	4.2±0.5	0.34±0.19	1.15±0.26
Cerebro	0.6±0.1	8.1±0.2	0.04±0.02	1.45±0.33
Orina	454.4 ±58.2	307.8±23.7	16.3±12.4	9.0±2.0
Médula ósea	0.7 ±0.1	5.7±0.3	6.67±2.53	1.55±0.41
Bazo	7.0±2.3	2.5±0.1	1.16±0.63	1.64±0.42
Corazón	2.9±0.6	44.0±8.9	0.26±0.15	5.84±3.29
Musculo (pierna)	2.7±0.6	5.3±0.8	0.29±0.09	0.18±0.06
Hueso (pierna)	4.5± 1.3	3.0±1.1	1.18±0.67	0.35±0.11
Intestino delgado	8.1±1.8	2.2±0.3	1.28±0.58	1.1±0.23

SUV. Valor estandarizado de la captación del radiofármaco (Standardized Uptake Values).

La [¹⁸F]FLT se puede utilizar durante el seguimiento de radioterapia sin la necesidad de esperar seis semanas para poder realizar la tomografía PET/CT, tiempo requerido si el estudio se realiza con [¹⁸F]FDG; lo que disminuye la irradiación innecesaria de los pacientes en aquellos casos donde la respuesta al tratamiento no sea satisfactoria. Otra ventaja sobre el [¹⁸F]FDG es la disminución del fondo en las tomografías cerebrales ya que la [¹⁸F]FLT no es captada en el cerebro a menos que exista un daño en él. Cuando los estudios se realizan con

[¹⁸F]FDG la interpretación de los resultados se ve afectada por el alto fondo observado, debido al alto consumo de glucosa por el cerebro y ser uno de los órganos con mayor captación del radiofármaco.

A pesar de las ventajas con las que cuenta la [¹⁸F]FLT sobre el [¹⁸F]FDG el hecho de que su sensibilidad para detectar procesos tumorales dependa del tipo de tumor provocando falsos negativos y aunado al hecho que el [¹⁸F]FDG puede originar falsos positivos, lo más recomendable es el utilizar en conjunto los dos radiofármacos, obteniendo así un mejor diagnóstico [25]. A pesar de las grandes expectativas que se tenían con la [¹⁸F]FLT este radiofármaco difícilmente llegará a remplazar al [¹⁸F]FDG.

2.5 Aplicaciones de la [¹⁸F]FLT.

Como ya se mencionó anteriormente las principales aplicaciones de la [¹⁸F]FLT son en el diagnóstico de: tumores cerebrales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, gliomas, linfomas, entre otros desórdenes hematológicos cuyo diagnóstico se puede confundir con otros problemas hematológicos. Estos trastornos son displasia mieloide, trastornos mieloproliferativos crónicos, mielofibrosis y mieloma múltiple. Al ser problemas de la médula ósea la captación del radiofármaco se verá incrementada y aparecerán nuevas zonas de captación como son las extremidades y órganos involucrados en el metabolismo de las células sanguíneas (hígado y el vaso) [32]. Dentro de este rubro, se administra para verificar la eficacia de la quimioterapia administrada a los pacientes con leucemia mieloide aguda antes del trasplante de médula ósea.

También puede ser utilizada en proyectos de investigación básica, al medir el incremento de la proliferación celular en músculos y tendones ocasionada por ejercicio en ratas [33], además se puede monitorear la actividad de inhibidores de la timidinasintetasa (TS, enzima clave en la síntesis de *ново*), al disminuir la actividad enzimática de la TS aumenta la captación del radiofármaco por la células [25].

2.6 Monografía del producto [5,34,35,36]-

Fluorotimidina F 18, Inyección

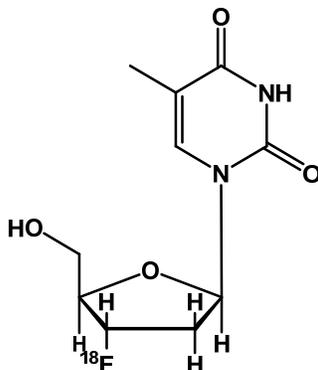


Ilustración 6. 3'-Desoxi-3'-[¹⁸F]fluoro-L-timidina

Definición.

La [¹⁸F]Fluorotimidina es una solución etanólica estéril, adecuada para administración intravenosa, de 3'-Desoxi-3'-[¹⁸F]fluoro-L-timidina, en la cual una porción de las moléculas están marcadas con ¹⁸F radiactivo. Contiene no menos del 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad (actividad) declarada a la hora indicada en el etiquetado.

Características

Apariencia. Es un líquido transparente, incoloro, libre de partículas suspendidas.

Tiempo de vida media. 110 min, con un decaimiento por emisión de positrones con una energía máxima de 0.633 MeV seguida por la aniquilación y emisión de dos fotones con una energía de 0.511 MeV.

Actividad específica: sin agregado de portador isotópico.

Envasado y almacenamiento: conservar en envases monodosis o multidosis debidamente blindados

Estándares de referencia: 3'-Desoxi-3'-fluorotimidina, Aldrich No Catálogo 361275.

Identificación:

A: Su vida media, determinada con el empleo de un sistema detector apropiado, es de 105 a 115 minutos.

B: El tiempo de retención obtenido para la [F-18] fluorotimidina en el cromatograma de la solución de prueba corresponde al tiempo de retención obtenido en el cromatograma de la solución estándar.

Pruebas de control de calidad.

pH: entre 4.5-7.5.

Endotoxinas bacterianas. No contiene más de 175/V Unidades de Endotoxinas (UE) por mL, en donde V es el volumen total de la producción, en mL.

Pureza química. Esta sección se refiere a las impurezas potencialmente asociadas al método de síntesis del producto.

Límite de aminopoliéter (Kryptofix®). Examinar mediante cromatografía en capa fina, utilizando sílica gel como fase estacionaria. El tamaño y la intensidad de la mancha obtenida a partir de la solución de prueba no excede el tamaño y la intensidad de la mancha obtenida a partir de la solución estándar de Kryptofix de 50 µg/mL.

Disolventes residuales. La concentración de acetonitrilo y DMSO en la solución de prueba no excede las 400 ppm, ni las 5000 ppm respectivamente.

Pureza radionucléidica. Con un espectrómetro de rayos gamma adecuado obtener un espectro gamma, donde las emisiones observadas corresponden a un sólo fotopico de 0.511 MeV.

Pureza radioquímica. Evaluada mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Donde el valor del tiempo de retención de la [¹⁸F]FLT (determinado mediante un detector de radioactividad) se corresponde con el valor de la solución estándar de FLT. La radioactividad de la [¹⁸F]FLT no es menor al 90% de la radioactividad total.

Integridad del filtro. Resiste hasta 50 psi de presión.

3.0 Producción de [^{18}F]FLT.

La producción de [^{18}F]FLT involucra diferentes etapas, iniciando por la obtención del radionucleido, seguida por una serie de reacciones químicas y finalizando con la adecuación del producto para su uso en humanos. Al tratarse de un compuesto radiactivo es necesario el uso de equipos automatizados y blindados para evitar la exposición del personal.

Producción de [^{18}F]fluoruro.

El anión [^{18}F]flúor se genera por la irradiación con protones de agua enriquecida con oxígeno-18 (^{18}O]H₂O) al 97 %, mediante la reacción nuclear $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, en el acelerador de partículas de 11 MeV tipo Ciclotrón RDS-111 de la unidad PET/CT-Ciclotrón de la Facultad de Medicina. Dicho equipo tiene la posibilidad de utilizar dos diferentes cuerpos blancos para contener el agua a irradiar. El primero de ellos está fabricado de tantalio con un volumen de 2.4 mL, las propiedades de tantalio permiten obtener mayor eficiencia durante la producción del [^{18}F]F⁻ y disminuir la cantidad de impurezas radionucléidicas generadas. El segundo blanco es de plata con un volumen de 1.2 mL, la plata genera una mayor cantidad de impurezas químicas y radionucléidicas, las cuales disminuyen la eficiencia de las reacciones químicas consecutivas. En la producción de [^{18}F]FLT el precursor utilizado puede reaccionar de diversas maneras con el [^{18}F]F⁻ producido.

3.2 Tipos de reacciones entre el precursor y el anión ^{18}F -Fluoruro.

Los halogenuros de alquilo (alquenos con un halógeno como sustituyente), presentan un enlace polar, donde la carga parcial negativa se localiza en el halógeno mientras el átomo de carbono se encuentra con una deficiencia de electrones (un electrófilo); el precursor utilizado en la reacción ha sido modificado de tal manera que en la posición 3' del precursor presenta el sustituyente *p*-nitrofenilsulfonilo (Nosil), proporcionando características similares a la de un

halogenuro de alquilo. La reactividad química de estos compuestos radica en reacciones iónicas con nucleófilos y bases; sin embargo, existen dos posibilidades en la que pueden reaccionar: el nucleófilo sustituye al grupo saliente **X** o el grupo saliente se elimina como **XH** formando un alqueno [37].

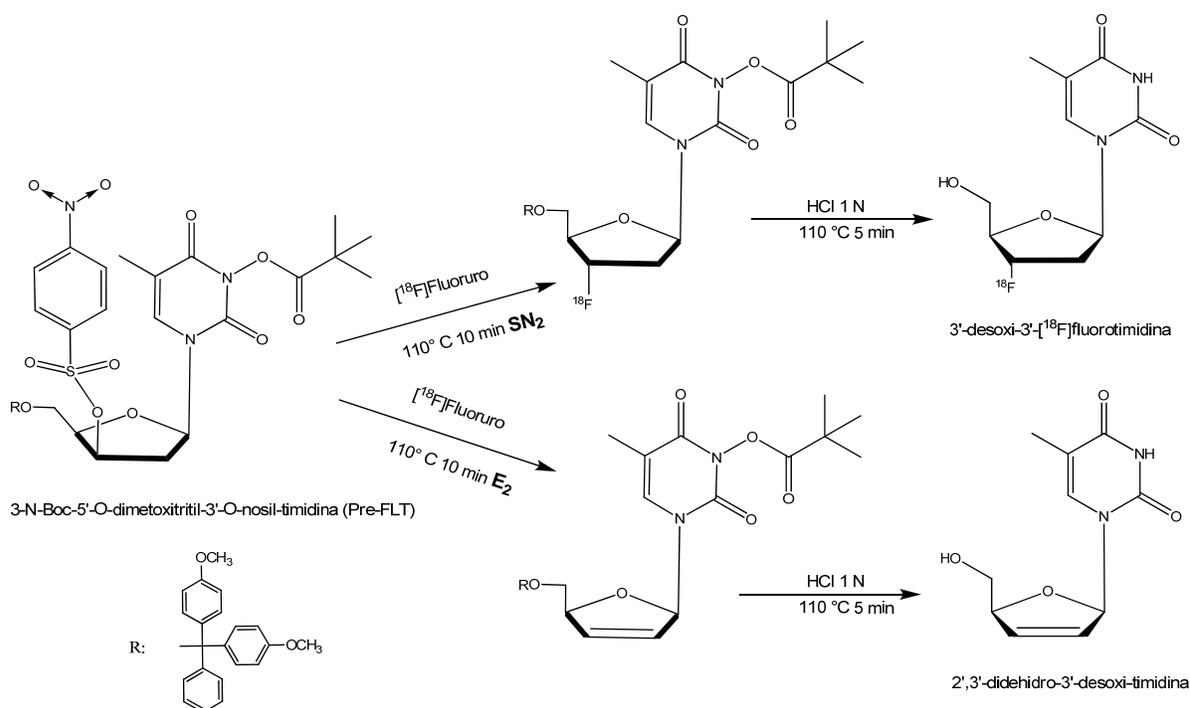


Ilustración 7 Posibles reacciones del precursor con el [¹⁸F] Fluoruro, SN₂ (parte superior) o E₂ (parte inferior).

3.2.1 Reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (SN₂).

Las sustituciones nucleofílicas están descritas principalmente por la velocidad de reacción. La SN₂ al ser una reacción concertada, donde se reemplaza un grupo funcional por otro; la velocidad depende de la concentración de los reactivos, en este caso [¹⁸F]F⁻ y el Pre-FLT, presentando así una cinética de segundo orden, donde la velocidad de reacción está dada por la ecuación (1) [37].

$$\text{velocidad de reacción} = k[[^{18}\text{F}]\text{F}^-] * [\text{Pre}^{18}\text{F} - \text{FLT}] \text{ ecuación (1)}$$

Sin embargo existen otras variables determinantes en una reacción S_N2 incluyendo el impedimento estérico del sustrato, la nucleofilicidad del sustituyente, el medio de reacción utilizado (el disolvente) y el grupo saliente. Otra característica importante es la inversión de la configuración si se trata de un carbono quiral [37,38,39].

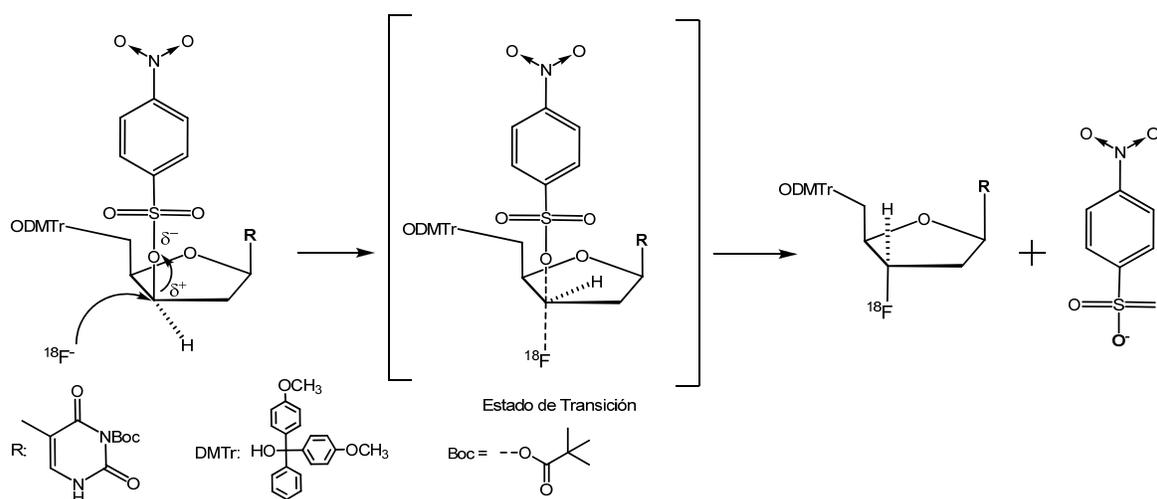


Ilustración 8. Mecanismo de reacción S_N2 para la formación de Dimetoxitritil-butoxicarbonil[^{18}F]FLT.

3.2.2 Reacción de eliminación bimolecular (E_2).

Al igual que la reacción S_N2 , la reacción de eliminación bimolecular (E_2) presenta una cinética de segundo orden. En una reacción E_2 se requiere que el sustrato tenga un hidrógeno en la posición β (un hidrógeno enlazado al carbono adyacente del átomo que posee el halógeno o el grupo saliente), y una geometría periplanar. El nucleófilo sustrae al hidrógeno rompiendo el enlace **H-C**, dando paso a la formación de un doble enlace **C=C**, mientras el grupo saliente se lleva el par de electrones compartidos [37,38,39].

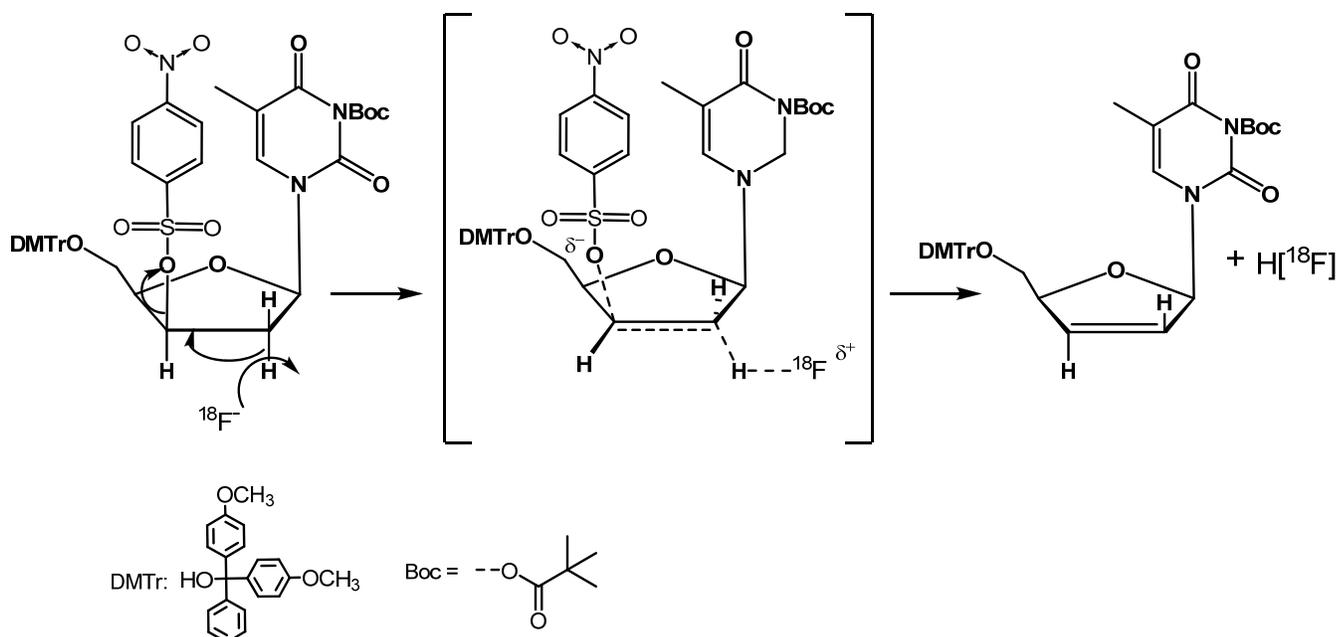


Ilustración 9. Mecanismo de reacción E₂ para la formación de Dimetoxitritil-butoxicarbonil [2',3'-didehidro-3'-desoxi-timidina.

3.2.3 SN₂ Vs E₂.

Las reacciones SN₂ y E₂ comparten muchas características, por lo cual la probabilidad de que se presenten simultáneamente es alta; las proporciones generadas de cada uno de estas dependerán del medio de reacción así como de los reactivos. La tabla 5 indica algunos de los parámetros a considerar y el tipo de reacción a la cual favorecen.

Tabla 5. Parámetros involucrados en la reacción SN₂ y E₂.

Parámetros	Reacción	
	SN ₂	E ₂
Grado de sustitución del carbono del sustrato	Primario y secundario	Terciario
Temperatura	Bajas	Altas
Disolvente	Apolar, que no solvaten al anión	Disolvente poco polar
Nucleófilo o base	Alta nucleofilicidad	Bases fuertes

3.3 Módulo de síntesis empleado en la producción de [^{18}F]FLT.

El módulo de síntesis CPCU (Unidad de Control de Procesos Químicos), fue diseñado originalmente para la producción automatizada de [^{18}F]FDG. Los dos constituyentes principales son: el módulo de producción (ilustración 10) y el programa que controla los parámetros de la síntesis química (ilustración 11). Al tratarse de un equipo semiautomático es posible modificar ciertos parámetros del módulo de producción, facilitando la síntesis de otros radiofármacos diferentes al [^{18}F]FDG, como la [^{18}F]FLT ó 4- ^{18}F fluorbenzaldehído ([^{18}F]FB-CHO).



Ilustración 10 Composición de fotografías del CPCU. A) Vista frontal con la cubierta donde se colocan los reactivos. B) Vista frontal sin cubierta se observan los baños de aceite. C) Vista lateral donde se puede colocar columnas de purificación. D) Vaso de reacción montado en el elevador.

El módulo de producción es un prisma de aluminio de 45 cm x 45 cm x 28 cm, en su interior se localizan dos baños de aceite y dos vasos de reacción montados sobre elevadores. El vaso de reacción puede tener diferentes alturas en el módulo,

éstas dependerán del tipo de procedimiento a realizar y del tiempo que se accionen las diferentes modalidades del elevador, siendo estas:

- Adición de los reactivos.

Los viales son sellados con tapas de butilo y sobre tapas de aluminio, cuentan con dos líneas, una de inyección de nitrógeno y otra de transferencia. Cuando se desea adicionar los reactivos el elevador sitúa al vaso de reacción a una altura intermedia, mientras se abre la válvula de suministro de nitrógeno del vial que contenga el reactivo a adicionar; provocando la presurización de éste, por diferencia de presión se lleva a cabo la adición del reactivo.

El volumen de reactivo adicionado dependerá del tiempo que se mantenga la válvula abierta de nitrógeno.

- Evaporación o temperatura de reacción.

El vaso de reacción se ubica dentro del baño de aceite, dependiendo la porción sumergida del vaso es la temperatura que alcanza en el interior. Si se requiere altas temperaturas el vaso se sumerge casi en su totalidad favoreciendo la evaporación de los disolventes utilizados. En caso de que sólo se desee aumentar la temperatura de reacción se sumergirá más o menos dependiendo de la temperatura deseada.

- Transferencia del producto.

El elevador se sube hasta el tope, en esta posición el vaso de reacción se sella al chocar con el tapón de silicón; en este momento se accionan las válvulas de nitrógeno, la presión del gas obliga al líquido a salir por la línea de descarga la cual llega hasta el fondo del vial. Los procesos anteriores se manejan desde una computadora a través de una pantalla de control (ilustración 11).

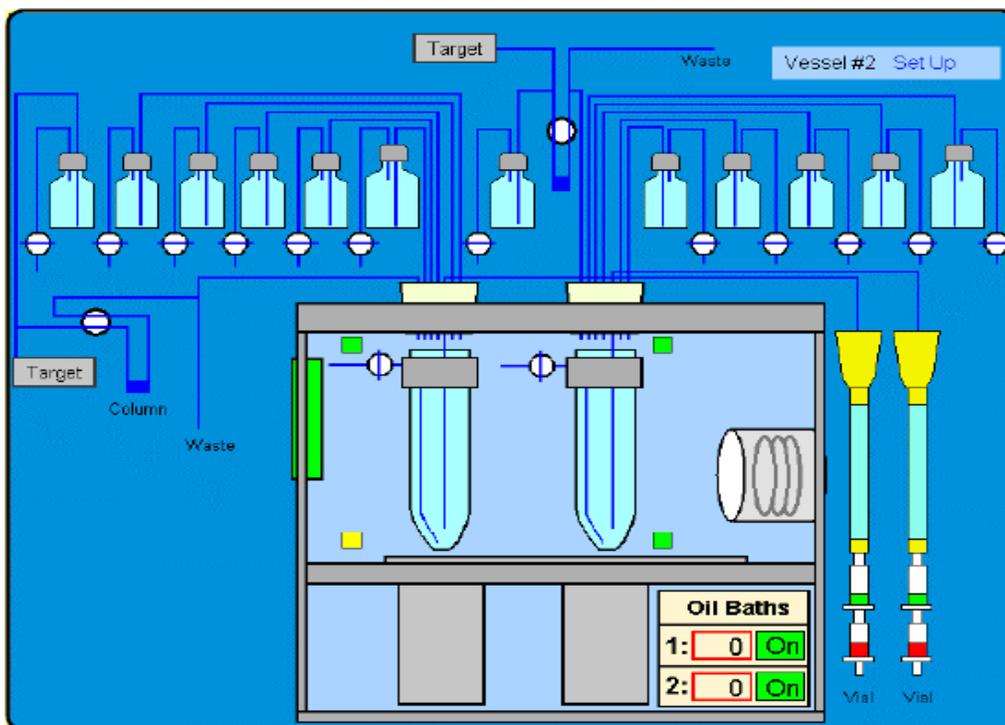


Ilustración 11. Pantalla de control del módulo CPCU.

Para visualizar la síntesis y verificar que los pasos anteriores se realizaron adecuadamente, se utilizan dos cámaras de video. Una de ellas se encuentra en el interior del prisma, proporcionando información de las operaciones (trasferencia del $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, evaporaciones y adición de reactivos) ocurridas en el vaso de reacción. La segunda cámara se ubica en el exterior del prisma, en esta posición se observan las líneas de adición de reactivos y la línea de salida del radiofármaco. A continuación se muestra un diagrama esquemático de los componentes del CPCU (ilustración 12).

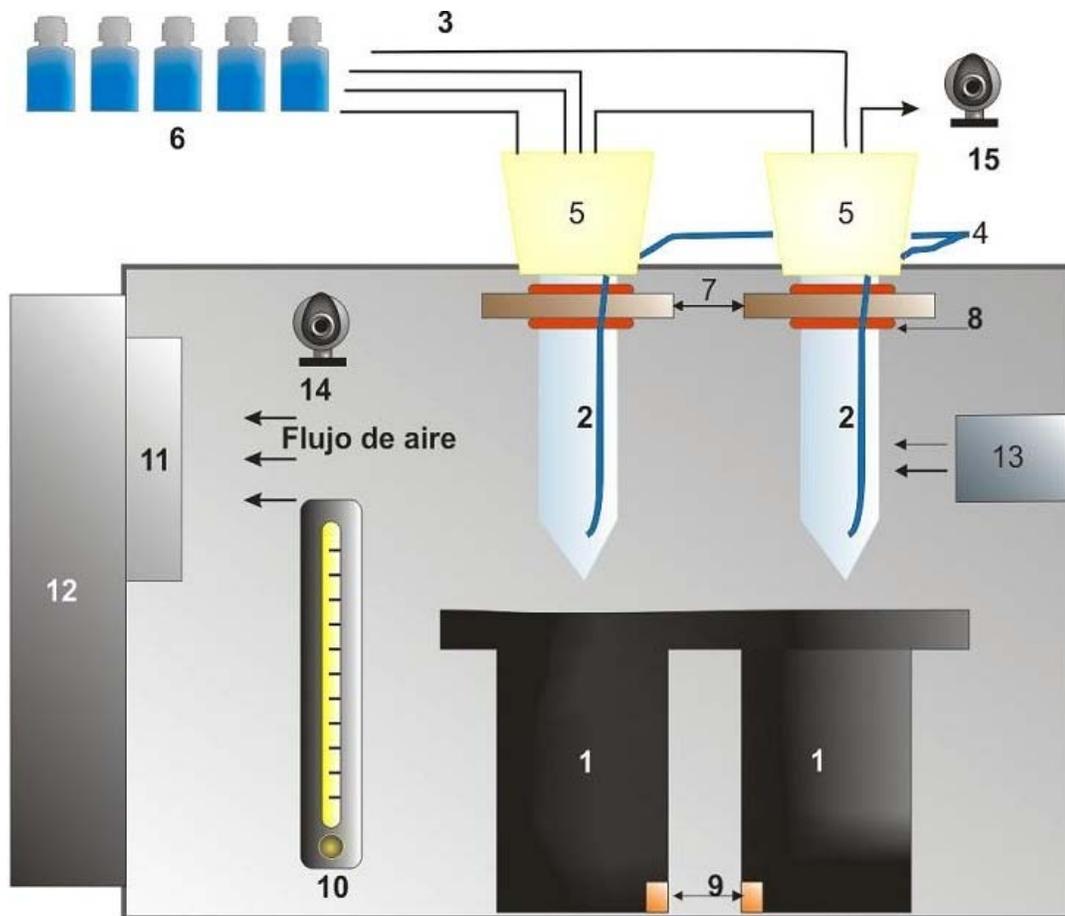


Ilustración 12 Diagrama esquemático del CPCU

Componentes del CPCU:

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Dos baños de aceite. | 8. Roscas de plástico (O-ring). |
| 2. Dos vasos de reacción. | 9. Termopares. |
| 3. Líneas de transferencia. | 10. Flujómetro. |
| 4. Suministro de Nitrógeno. | 11. Ventilador. |
| 5. Tapones de silicón con líneas de adición. | 12. Trampa de carbón activado. |
| 6. Viales de vidrio de 5 mL. | 13. Resistencia |
| 7. Elevadores. | 14. Cámara de video interna. |
| | 15. Cámara de video externa. |

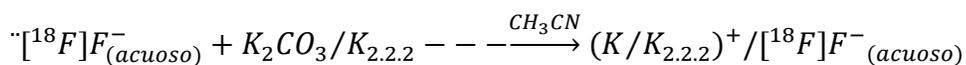
3.4 Procedimientos involucrados en la síntesis de [¹⁸F]FLT.

La producción de [¹⁸F] FLT, es un proceso de múltiples pasos, tres de éstos son reacciones químicas:

1. Sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), mediante la cual se desplaza el grupo Nosilato (ONs) del Pre-FLT (3-N-Boc-5'-O-dimetoxitritil-3'-O-nosil-timidina) por el anión [¹⁸F]Fluoruro.
2. Hidrólisis ácida de los grupos protectores Dimetoxitritil (DMTrO) y del Butoxicarbonil (BOC).
3. Reacción de neutralización del medio.

3.4.1 Paso 1. Separación y elución del [¹⁸F]Fluoruro.

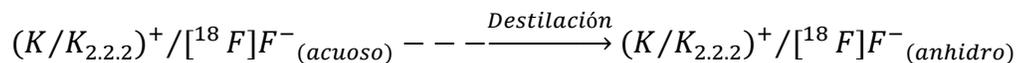
El ión [¹⁸F]fluoruro es separado del agua enriquecida con ¹⁸O, mediante el uso de cartuchos de intercambio iónico, se utilizaron cartuchos de aminas cuaternarias (QMA) activados con bicarbonato de sodio 1 M. El [¹⁸F]fluoruro es eluido del cartucho con la solución de Kryptofix/carbonato de potasio (25 mg/mL/5.5 mg/mL) en 95% acetonitrilo); la función del K2.2.2 es solubilizar el [¹⁸F]KF en el solvente orgánico para poder ser trasferido al vaso de reacción [40], así como disminuir la fuerza de unión entre el potasio y el flúor evitando la formación de un enlace irreversible [41].



3.4.2 Paso 2. Eliminación del agua del medio de reacción.

Es necesario eliminar cualquier traza de agua del medio de reacción. Debido a que el ión fluoruro es reactivo únicamente en medios no acuosos y más nucleofílico. La mínima cantidad de agua en el vaso de reacción puede solvatar al anión disminuyendo el rendimiento de la reacción. Por lo que se realiza una destilación

azeotrópica con acetonitrilo anhidro. La temperatura no puede elevarse a más de 115 °C, o el complejo $(K/K_{2.2.2})^+ / [^{18}F]F^-$ puede descomponerse [40,41].



3.4.3 Paso 3 [^{18}F]Fluoración, sustitución nucleofílica (SN_2).

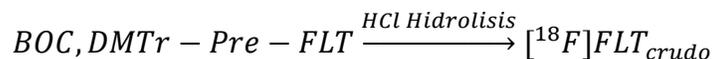
El tercer paso involucra la primera reacción química, donde se desplaza el grupo nosilato de la posición 3' de la timidina por el anión [^{18}F]fluoruro, rompiendo el enlace carbono-oxígeno y formando un nuevo enlace carbono-flúor. Un porcentaje del precursor puede sufrir una reacción de eliminación en lugar de la reacción de sustitución nucleofílica [42].

Terminando el tiempo de reacción, se realiza una última evaporación del medio de reacción, sin embargo el precursor fue disuelto en DMSO y acetonitrilo, por lo que al final de la evaporación el intermediario se encuentra disuelto en DMSO, el tener un volumen residual aumenta el rendimiento de la reacción [43].



3.4.4 Paso 4 Hidrólisis ácida.

La segunda de las reacciones químicas se realiza con HCl 1 N, con la finalidad de remover los dos grupos protectores restantes del precursor, el DMTr y el BOC.



3.4.5 Paso 5 Neutralización del medio de reacción.

La última reacción química es la adición de acetato de sodio 2 M, con la finalidad de aumentar el pH del medio de reacción, para evitar problemas en la columna de purificación e ir ajustando el pH del producto para su administración.



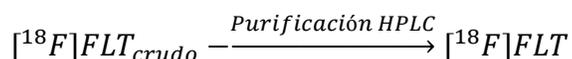
3.4.6 Paso 6 Preparación para la purificación.

El producto antes de ser purificado es transferido del módulo CPCU a la celda caliente, en donde es pre-purificado con un cartucho de Alumina light, el cual atrapa a los iones $[^{18}F]F^-$ que no reaccionaron. El producto es filtrado con una membrana de 0.22 μm , la cual retiene partículas que puedan tapar la columna de purificación.

Es necesario adicionar aproximadamente 2.5 mL de etanol al 7%, los cuales remueven la mayor cantidad del producto del vaso de reacción y de las líneas de transferencia. El incremento de volumen permite diluir el DMSO utilizado; la dilución del solvente orgánico previene que el producto se eluya simultáneamente con el solvente, más una dilución excesiva disminuye la resolución del cromatograma incrementando el volumen total del producto purificado.

3.4.7 Paso 7 Purificación química.

La purificación se realiza mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en una columna preparativa de fase reversa YMC-Pack Pro C18, con un método isocrático empleando una fase móvil de etanol al 7 % y un flujo de 5 mL/min, acoplada a dos detectores, uno de U.V. y el otro a un detector de radiación $[NaI(Tl)]$. El tiempo de retención donde se recolecta el producto es de 18 min aproximadamente y se observa con el detector de radiación [44].



3.1.8 Paso 8 Obtención del producto inyectable.

La fracción eluida del producto debe de adecuarse para su administración, dependiendo del volumen obtenido se mezcla con una relación 400 μL de solución salina (23.4%) concentrada por cada 10 mL del producto. La mezcla total es esterilizada por filtración con una membrana de 0.22 μm . Antes de administrar el producto se realizan las pruebas de calidad pertinentes.

4.0 Control de calidad de los radiofármacos.

Se puede definir "Control de Calidad", como el conjunto de operaciones que permiten comprobar que el medicamento producido cumple con las especificaciones establecidas y requeridas para el consumo humano. Dichas operaciones involucran la verificación de las materias primas necesarias en la elaboración del medicamento hasta la liberación de éste para su uso en pacientes.

Los radiofármacos al tener características diferentes a la mayoría de los medicamentos, es indispensable que cumplan con las pruebas de control de calidad establecidas para fármacos convencionales y las establecidas para compuestos radiactivos. La finalidad de estas pruebas es garantizar la identidad, la pureza, y disminuir el riesgo biológico. Las pruebas de control de calidad se pueden dividir en dos grupos: Pruebas fisicoquímicas y pruebas biológicas. Las pruebas fisicoquímicas involucran la determinación de la pureza radionucleídica, la pureza radioquímica, la pureza química, el pH y el aspecto físico; mientras que las pruebas biológicas incluyen la prueba de esterilidad y la determinación de endotoxinas bacterianas [4, 5, 34, 35, 36].

4.1 Pruebas Fisicoquímicas. (Pureza e integridad).

4.1.1 Inspección visual.

Estas pruebas son las más importantes y rápidas de realizar y es donde se define si se continúan con el resto de las pruebas o se rechaza. El producto debe ser incoloro y libre de partículas, si se detecta algún cambio en la apariencia física puede indicar un cambio en el radiofármaco y por lo tanto en la biodistribución. Se realiza a través del un vidrio plomado o a través de un espejo.

4.1.2 Medición de pH.

El intervalo de pH permitido en los radiofármacos es amplio (pH 4-8), sin embargo el pH ideal es 7.4, al tratarse de radiofármacos de administración intravenosa. La tolerancia respecto al pH se debe a que el volumen administrado es pequeño y la sangre cuenta con una gran capacidad amortiguadora.

4.1.3 Pureza radioquímica.

La pureza radioquímica es la determinación del porcentaje de la actividad presente en el radiofármaco en la forma química deseada, las impurezas químicas marcadas o el radionucleido libre, que no se integró a la molécula. Estas impurezas se pueden generar por cambios durante la reacción como: la temperatura, el pH, el tiempo de reacción etc.; o durante el almacenamiento por la presencia de agentes oxidantes o reductores y la radiólisis del medio. Las impurezas químicas degradan la calidad de imagen al incrementarse la cantidad de material circulante en los tejidos y en la sangre; incrementándose la radiación recibida por el paciente.

4.1.4 Pureza radionucleídica.

Durante la producción del radionucleido se pueden generar diferentes radioisótopos, por lo cual es necesario cuantificar e identificar estos contaminantes; se realiza mediante la evaluación del tipo de energía emitida y el tiempo de vida media. Las impurezas radionucleídicas pueden ocasionar errores en la cantidad de actividad administrada y/o en el diagnóstico además de aumentar la radiación absorbida.

4.1.5 Determinación de la vida media.

El tiempo de vida media es una característica intrínseca de los radionucleidos, por lo cual la determinación de ésta permite identificarlos con un 100% de confiabilidad. Es una manera de garantizar que el radiofármaco se encuentra marcado con el isótopo deseado.

4.1.6 Pureza química.

Los contaminantes químicos presentes en el radiofármaco pueden ser introducidos antes, durante y después de la síntesis; algunos de ellos son tóxicos, otros pueden modificar las propiedades fisicoquímicas y/o biológicas del producto; por lo cual es importante revisar que ninguno de ellos se encuentre fuera de los límites permisibles.

4.1.6.1 Disolventes residuales.

En la síntesis de los radiofármacos se utilizan disolventes orgánicos pues la mayoría de los precursores son moléculas sensibles al agua y al oxígeno. Es necesario verificar por cromatografía de gases (CG) que ninguno de ellos se encuentre fuera de los límites establecidos, los cuales son establecidos de acuerdo a la toxicidad [45].

4.1.6.2 Detección del aminopolieter.

En las síntesis donde se emplea [^{18}F] fluoruro como radionucleído, se utiliza una fase móvil compuesta por un aminopolieter, el cual facilita la reacción con el precursor sin embargo es tóxico [LD_{50} en ratas = 35 mg/kg], [46]. La técnica que nos permite detectar su presencia es la cromatografía en capa fina, utilizando como revelador yodo.

4.2 Pruebas biológicas.

Antes de que el producto sea administrado es necesario garantizar la esterilidad y la apirogenicidad de éste. La filtración del radiofármaco a través de una membrana de 0.22 μm , es el método más utilizado cuando se trata de radiofármacos de vida media corta y termosensibles.

4.2.1 Prueba de la burbuja.

Los métodos empleados en la determinación de la esterilidad en los medicamentos convencionales, requieren de aproximadamente dos semanas para incubar el producto en medios de cultivo, lo cual es impráctico para radiofármacos con vida media corta. La manera más rápida y sencilla de confirmar la esterilidad, es comprobando la integridad de la membrana por la cual se filtró el radiofármaco; al hacerle pasar aire a una presión de 40-50 psi.

4.2.2 Cuantificación de endotoxinas bacterianas.

Las endotoxinas bacterianas conocidas como pirógenos son glicoproteínas, productos del metabolismo bacteriano, sus dimensiones oscilan entre 0.05 – 1 μm , se caracterizan por ser solubles y termoresistentes. Su presencia en el producto genera diversos síntomas (fiebre, dolor de cabeza, malestar, escalofríos, etc.), esta reacción se presenta entre los 30 min y 2 horas después de la inyección.

Existen dos metodologías aceptadas para la determinación de pirógenos: “*in vitro*” e “*in vivo*”. La primera de ellas se utiliza el lisado de amebocitos procedentes del cangrejo *Limulus polyphenus* (aproximadamente 15-60 min); y la segunda se realiza con conejos, el tiempo que requiere la prueba es de 4 horas aproximadamente además de instalaciones especiales para el mantenimiento de los animales.

5.0 Desarrollo experimental.

Los procedimientos utilizados durante la producción de la [^{18}F]FLT se explicaron detalladamente en el sección 3.4, a continuación sólo se especificaran los insumos requeridos durante la producción.

5.1 Producción de la [^{18}F] FLT.

5.1.1 Reactivos.

Agua enriquecida al 97 % con [^{18}O]oxígeno, bicarbonato de sodio Sigma-Aldrich 236527, carbonato de potasio Sigma-Aldrich 367877, $\text{K}_2.2.2$ Sigma-Aldrich 291110, acetonitrilo anhidro Sigma-Aldrich 291110, agua desionizada Milli-Q 18m Ω -cm, precursor de [^{18}F]FLT (3-N-Boc-5'-O-dimetoxitritil-3'-O-nosil-timidina) ABX 1240, DMSO Sigma-Aldrich 276855, HCl 1. M Aldrich 318949, acetato de sodio Sigma-Aldrich S2889, solución salina concentrada al 23.4% estéril ABBOTT LABORATORIES, etanol absoluto NF/USP Tecsiquim EF1555-5; nitrógeno ultra alta pureza (99.999 %).

5.1.2 Materiales.

Cuerpo del blanco de tantalio o plata, cartucho Sep-Pak QMA waters, viales de vidrio de 5 mL, tapones de butilo ranurados de 20 mm, anillos de aluminio de 20 mm, viales de vidrio de 30 mL estériles y libres de pirógenos, filtro de esterilización de 0.22 μm Millex-GS, 25 mm de diámetro Millipore, filtro de venteo de 0.22 μm Millex-GV4 4 mm de diámetro, agujas de 18Gx 38 mm, agujas 22Gx32 mm, jeringas de 1, 3, 5, 10 mL y 20 mL plastipack, tubos de plástico estériles de 50 mL, vaso de reacción de vidrio, tapones de silicón horadado con 6 líneas, cartucho Sep-Pak de alumina light Waters, pre-columna de YMC-Pack Pro C18 HPLC.

5.1.3 Condiciones de los equipos.

5.1.3.1 Módulo de síntesis CPCU.

Tabla 6 Duración de los diferentes procedimientos en el equipo de síntesis.

Parámetros de la síntesis.	
Tiempo de la primera evaporación:	150 s
Tiempo segunda evaporación:	240 s
Tiempo del primer enfriamiento:	120 s
Primer tiempo de reacción:	200 s
Segundo tiempo de reacción:	200 s
Tercer tiempo de reacción:	200 s
Tiempo de la última evaporación:	10 s
Tiempo del segundo enfriamiento:	40 s
Tiempo de la primera hidrólisis:	100 s
Tiempo de la segunda hidrólisis:	100 s
Tiempo de la tercera hidrólisis :	100 s
La transferencia del producto se realiza manualmente.	180 s

Tabla 7. Posición del vaso de reacción dentro del baño de aceite en función de la posición del elevador.

Posición del elevador	
Primera evaporación (desde arriba):	15 s
Subsecuentes evaporaciones (desde arriba):	15 s
Reacción (desde arriba):	12 s
Hidrólisis (desde arriba):	12 s

Tabla 8 Volumen de los reactivos y posición en el módulo.

# Vial	Reactivo
1	1.5 mL de la solución $K_{2.2.2}-K_2CO_3$ (25 mg/mL/5.5 mg/mL) en 95% CH_3CN \bullet^2 1.5 o 1 mL de la solución $K_{2.2.2}^- - K_2CO_3$ (5.3 mg/mL/1.4 mg/mL) en 95% CH_3CN
2	2.0 mL CH_3CN
3	10 o 20 mg de precursor en 1.7 mL CH_3CN + 0.3 mL DMSO
4	0.5 mL 1M HCl
5	2 mL 2M NaAc
6	2.0 mL Etanol 7 % (Fase móvil del HPLC)

5.1.3.2 Cromatógrafo de líquidos.

La purificación del producto se realiza mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia empleando una columna de fase reversa.

Tabla 9 Condiciones del cromatógrafo de líquidos durante la purificación del producto.

Parámetro	Especificaciones
Columna	Largo: 250 mm. Diámetro interno: 10 mm
	YMC-Pack Pro C18. Tamaño de partícula 10 μm y tamaño del poro 12 nm
Temperatura	Ambiente
Fase móvil	Etanol 7 %
Flujo	5.0 mL/min
Detectores	U.V a 267 nm, Radiación NaI[Tl]
Tiempo de corrida	30 min.
Tiempo de retención del producto	18-20 min
Volumen de inyección	Variable, siendo el máximo 5 mL

²La concentración de elución se modificó, con la finalidad de mejorar el rendimiento de reacción. Se utilizó el criterio de la referencia [39] donde se considera la formación del complejo $K_{2.2.2} / K^+$ relación 1:1.

5.2 Metodología del control de calidad.

5.2.1 Determinación del pH.

Se realiza con tiras de papel pH (Whatman® Panpeha®).

5.2.2 Determinación de la pureza química y pureza radioquímica.

El equipo de cromatografía de líquidos se encuentra acoplado con dos detectores uno de U.V y otro de radiación, permitiendo observar las impurezas químicas que absorban a la longitud de onda establecida y cualquier probable compuesto que sea haya marcado durante la reacción.

5.2.2.1 Reactivos.

Etanol absoluto NF/USP Tecsiquim EF1555-5; agua desionizada Milli-Q 18 MΩ-cm, 3'-Desoxi-3'-fluorotimidina Aldrich No Catalogo 361275.

5.2.2.2 Materiales y condiciones del equipo.

Tabla 10 Condiciones del cromatografo de líquidos para realizar el control de calidad.

Parámetro	Especificaciones
Columna	Largo: 250 mm. Diámetro interno: 4.6 mm
	YMC-Pack Pro C18. Tamaño de partícula 5 µm, tamaño del poro 12 nm)
Temperatura	Ambiente
Fase móvil	Etanol 7 %
Flujo	1.0 mL/min
Detectores	U.V a 229 nm, Radiación NaI
Tiempo de corrida	30 min.
Tiempo de retención del producto	20-22 min
Volumen de inyección	20 µL

5.2.3 Cuantificación de pirógenos

La prueba de pirógenos no se realiza como lo sugiere la FEUM 8ª edición [5], se utiliza un sistema automatizado de detección de endotoxinas aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), "Endosafe Portable Test System (Endosafe® PTS)", cuyo principio es el mismo de la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus polyohemus* propuesto por la Farmacopea de Estados Unidos de Mexicanos, los motivos principales por lo que no se realiza de acuerdo a la normatividad es que el sistema automatizado permite obtener el resultado en un menor tiempo además de requerir una menor manipulación de la muestra.

5.2.3.1 Reactivos y materiales.

Agua libre de pirógenos (LAL Reagent Water) Charles River Laboratories W1-10, cartuchos Endosafe® PTS 20 Charles River Laboratories PTS20F, tubos de dilución de endotoxinas 13*100 mm Charles River Endosafe, puntas libres de pirógenos para pipeta de 25 µL, pipeta de 25 µL.

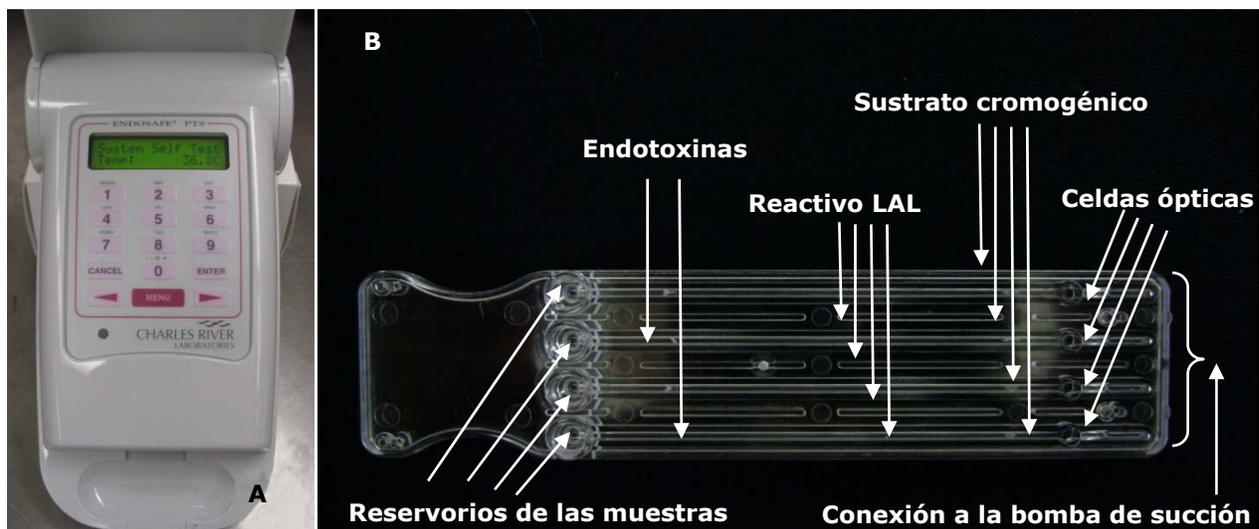


Ilustración 13. A. Equipo Endosafe® PTS, B. Cartucho utilizado en la prueba.

5.2.3.2 Condiciones del equipo.

El aparato es un sistema portátil que contiene un espectrómetro con cuatro detectores de U.V (395 nm), una bomba de vacío, una cámara de incubación y requiere de cartuchos especiales. Los cartuchos contienen cuatro orificios, dos de ellos contiene una cantidad de endotoxina conocida la cual funciona como control positivo, los otros dos pozos, no contienen endotoxina sirven para la cuantificación de las endotoxinas presentes en la muestra, por duplicado. El procesamiento de la muestra es sencillo y requiere de pocos pasos, el primero de ellos es permitir que el equipo así como el cartucho tengan una temperatura de 37 °C (se realiza de manera automática), segundo se requiere de una dilución adecuada de la muestra, siendo esta 1:50, de la cual se aplica 25 µL en cada orificio del cartucho. El tiempo en total en que se realiza el ensayo son 20 minutos aproximadamente [47].

5.2.4 Pureza radionucleídica.

Una pequeña porción del producto se coloca en el pozo del equipo "Wiper™ Single Detector Wipe Test / Well Counter" (detector de NaI(Tl)), la obtención del espectro gamma tarda 1 min y se obtiene un foto pico a los 511 keV, lo que verifica que la molécula ésta marcada con un radionucleido emisor de positrones.

5.2.5 Identificación del radionucleido [¹⁸F]F.

Se utiliza una cámara de ionización o activímetro CRC-ULTRA CAPINTEC, INC., comúnmente llamado "calibrador de dosis". En el interior del activímetro se introduce una muestra del producto y se realiza la lectura de la actividad, se deja transcurrir un intervalo de tiempo conocido y se realiza una nueva lectura de la muestra. Los valores obtenidos de las lecturas se sustituyen en la ecuación 2, mediante la cual se obtiene el tiempo de vida media característico del radionucleido.

$$\tau_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{\ln A_0 - \ln A} * \Delta t$$

Ecuación 2. Calculo de la vida media, donde A=Actividad obtenida en la segunda lectura en mcuries, A₀=Actividad inicial en mcuries y Δt=minutos trascurridos entre las dos mediciones.

5.2.6 Disolventes residuales.

Se busca principalmente la presencia de acetonitrilo en el producto. Las características y las condiciones del equipo se enlistan a continuación:

- **Detector de ionización a la llama.**

Temperatura 300 °C

Flujo de Aire 400 mL/min

Flujo de hidrógeno 35 mL/min

Flujo de Helio 25 mL/min

- **Inyector**

Modo dividido

Relación de la apertura 40:1

Temperatura 250 °C

Flujo de la apertura 80

Presión 20.2 psi

Flujo total 84.5

Volumen de la muestra 2 μL

- **Horno**

Temperatura 50°C

Temperatura final 80°C

Tiempo inicial 1

Tiempo final 4

Tasa de cambio 20

- **Columna**

DB-WAX 122-7032 (ALIGENT TECHNOLOGIES)

Intervalo de temperaturas 20 °C - 250/260 °C.

Longitud 30 m

Flujo de helio constante 2 mL/min constante

Diámetro interno 0.250 mm

Velocidad 42

Capa 0.250 μm.

5.2.7 La determinación del aminopoliéter.

Para comprobar que la concentración de $K_{2.2.2}$ se encuentre por debajo de los límites permisibles, se utiliza la cromatografía en capa fina.

Reactivos y materiales.

Cromatoplaque de sílice de 0.25 μm (10cm x1cm), yodo (S-A) 207772-10g, hidróxido de amonio (S-A) 221228-500 ml, metanol (S-A), vaso de precipitado de vidrio 250mL, tapa de vidrio, papel filtro whatman, micropipeta de 0.1-10 μL , solución estándar de kryptofix (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5.2.8 Integridad de la membrana.

Después que el producto es filtrado se corrobora la integridad de la membrana del mismo, se utiliza un vial de vidrio sellando con 20 mL de agua y se conecta al tanque de nitrógeno ultra alta pureza 99.999 %, se le aplica una presión mayor a 50 psi por 1 min y se verifica que la membrana se encuentre intacta.

6.0 Resultados y discusión.

Se realizaron once producciones de [^{18}F]FLT, en donde se utilizaron diferentes concentraciones del precursor y de la solución de elución ($\text{K}_{2.2.2}\text{-K}_2\text{CO}_3$) del cartucho de intercambio iónico (QMA). Para facilitar su análisis los resultados fueron divididos en cuatro grupos, utilizando como criterio las características anteriores. En la tabla 11 se resumen los resultados y las condiciones de síntesis, las eficiencias presentadas fueron previamente corregidas por decaimiento.

Tabla 11. Promedio de las eficiencias obtenidas en las producciones y variables modificadas.

Grupo	Cantidad de precursor (mg)	$\text{K}_{2.2.2}$ (mg)	Número de síntesis	Eficiencia de reacción (%)	Eficiencia de purificación (%)	Eficiencia Total (%)
1	20	25.0	3	30.1 ± 10.8	69.3 ± 7.7	21.8 ± 8.7
2	10	20.0	2	33.7 ± 9.6	59.4 ± 5.4	20.6 ± 7.5
3*	10	7.95	4	26.5 ± 9.0	76.1 ± 5.1	20.2 ± 6.7
4	10	5.30	2	25.6 ± 2.9	75.7 ± 9.9	19.6 ± 4.1

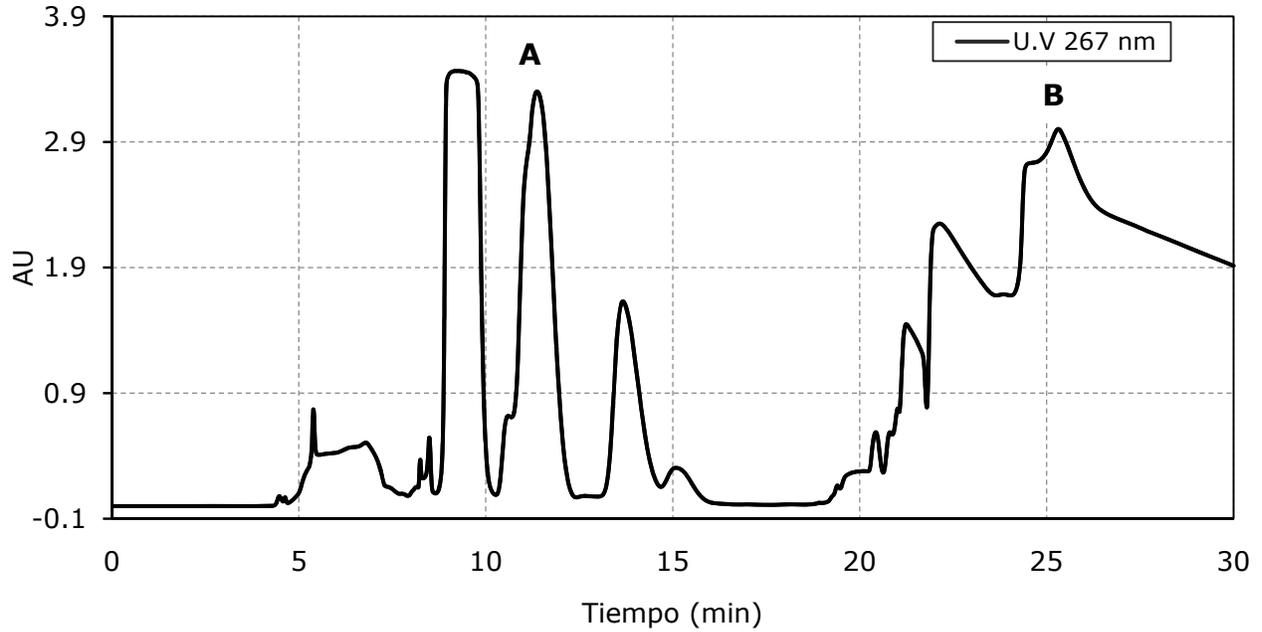
*Parámetros de síntesis seleccionados para realizar las producciones de [^{18}F]FLT posteriores a este trabajo.

6.1 Cromatogramas representativos de cada grupo; obtenidos durante la purificación de la [^{18}F]FLT.

Para cada grupo se presentan dos cromatogramas, el primero de ellos corresponde a la señal obtenida por el detector de U.V, mientras que el segundo corresponde al detector de radiación (NaI (TI)), ioduro de sodio activado con talio). El tiempo en el que se observa la señal en el detector de radiación se encuentra desplazado unos segundos, tiempo en que tarda el producto en llegar a éste después de pasar por el detector de U.V.

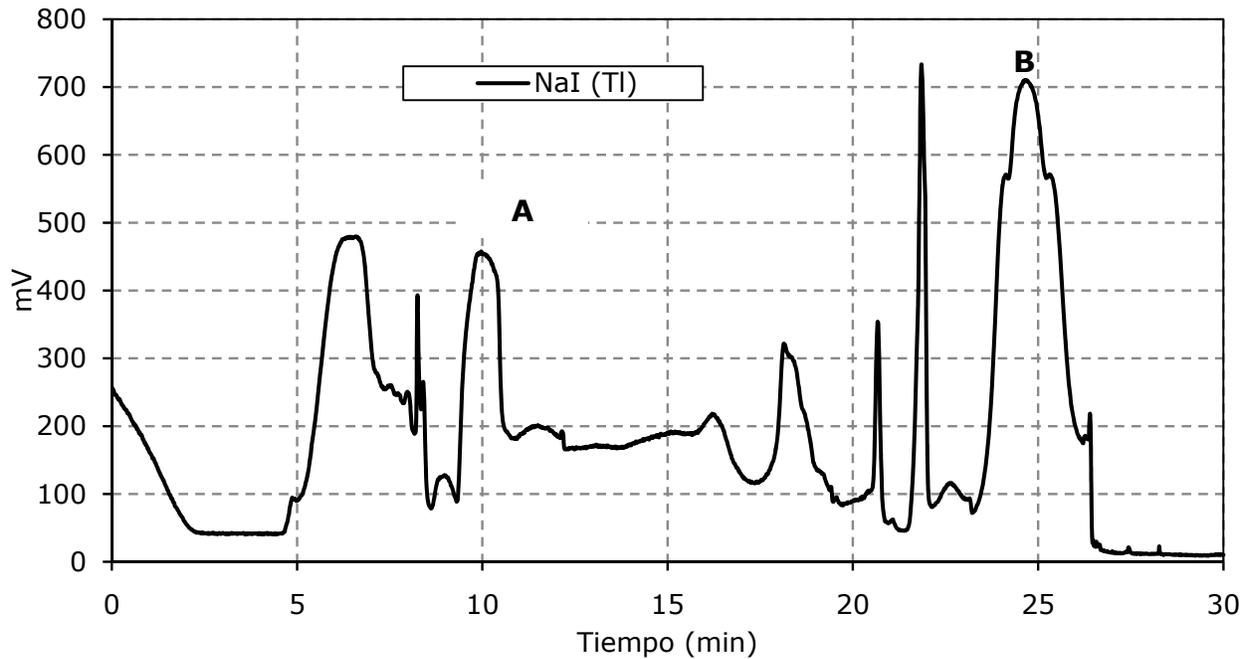
6.1.1 Grupo 1. 20 mg de precursor-25 mg de K₂S₂O₈.

Cromatograma 1.



A. Impurezas químicas, B Producto de la reacción de eliminación 2',3'-didehidro-3'-Desoxi-timidina (Stavudine).

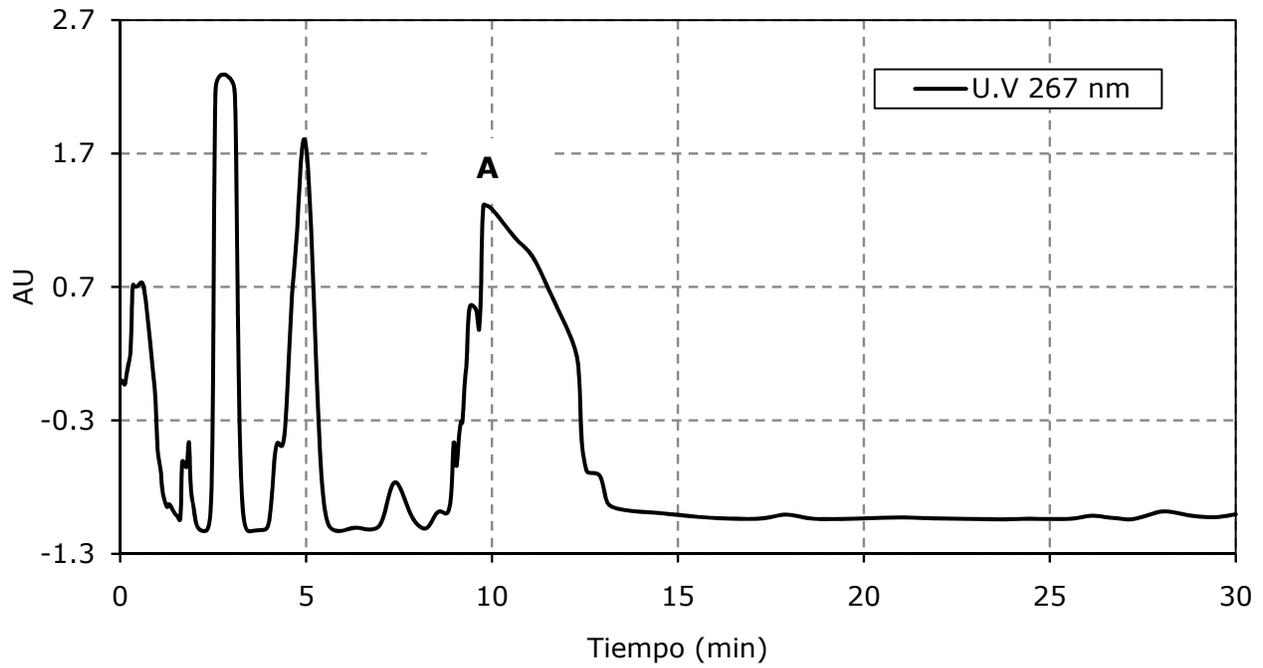
Cromatograma 2.



A. Impurezas radioquímicas, B. Fracción de interés correspondiente a la [¹⁸F]FLT.

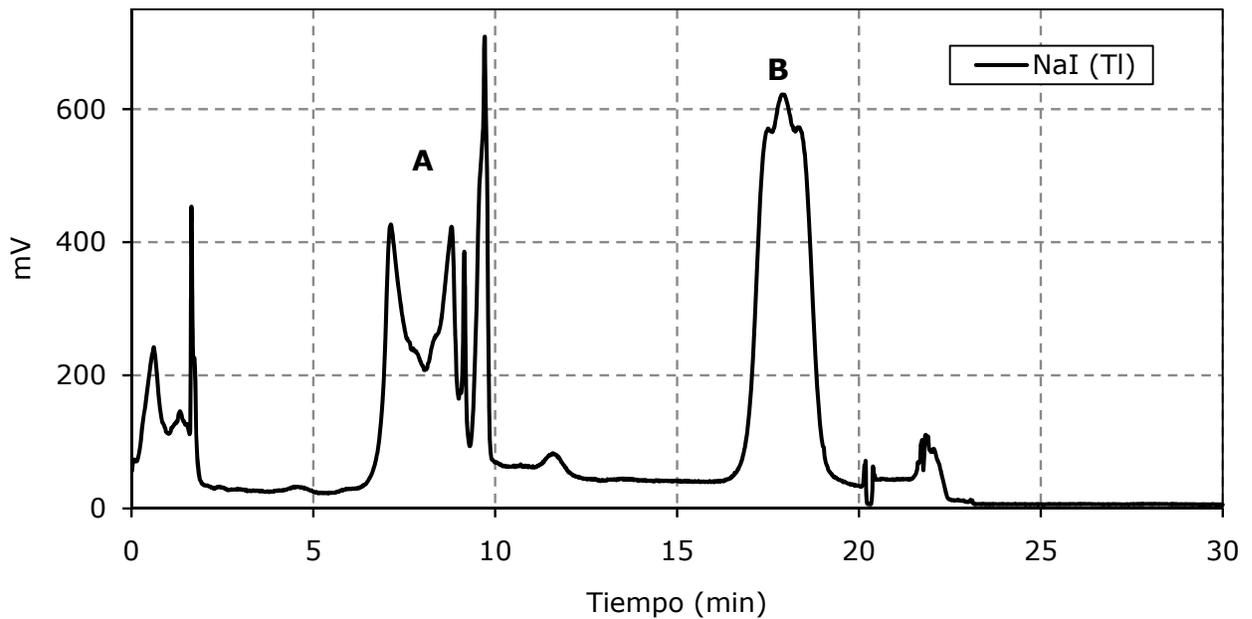
6.1.2 Grupo 2. 10 mg de precursor-20 mg K_{2.2.2}.

Cromatograma 3.



A Producto de la reacción de eliminación 2',3'-didehidro-3'-desoxi-timidina.

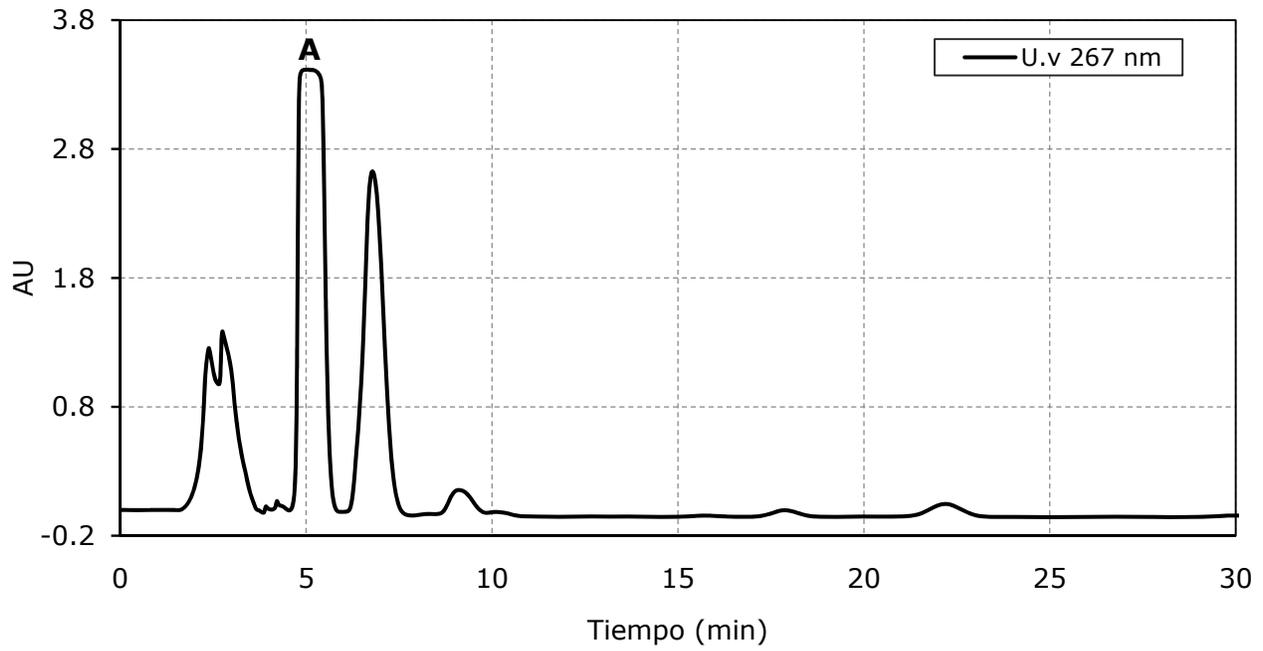
Cromatograma 4.



A. Impurezas radioquímicas, B. Fracción de interés correspondiente a la [¹⁸F]FLT.

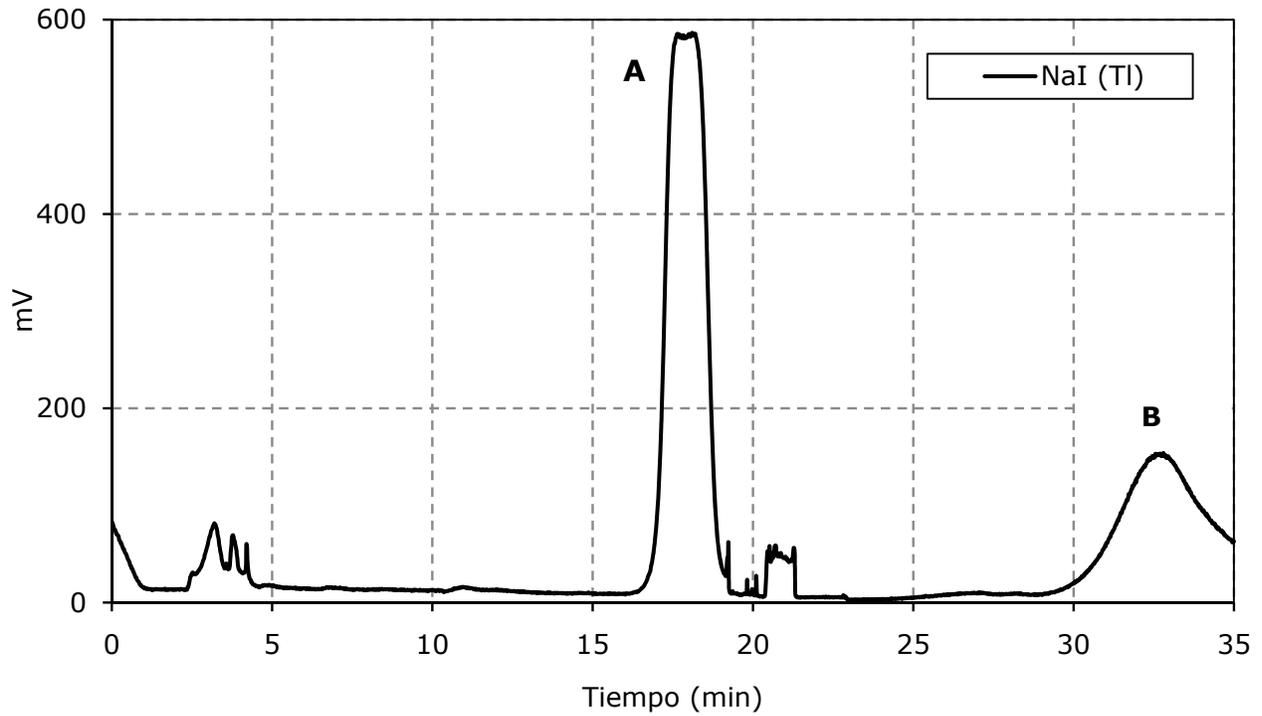
6.1.3 Grupo 3. 10 mg de precursor-7.95 mg K₂.2.2.

Cromatograma 5.



A. Impurezas químicas.

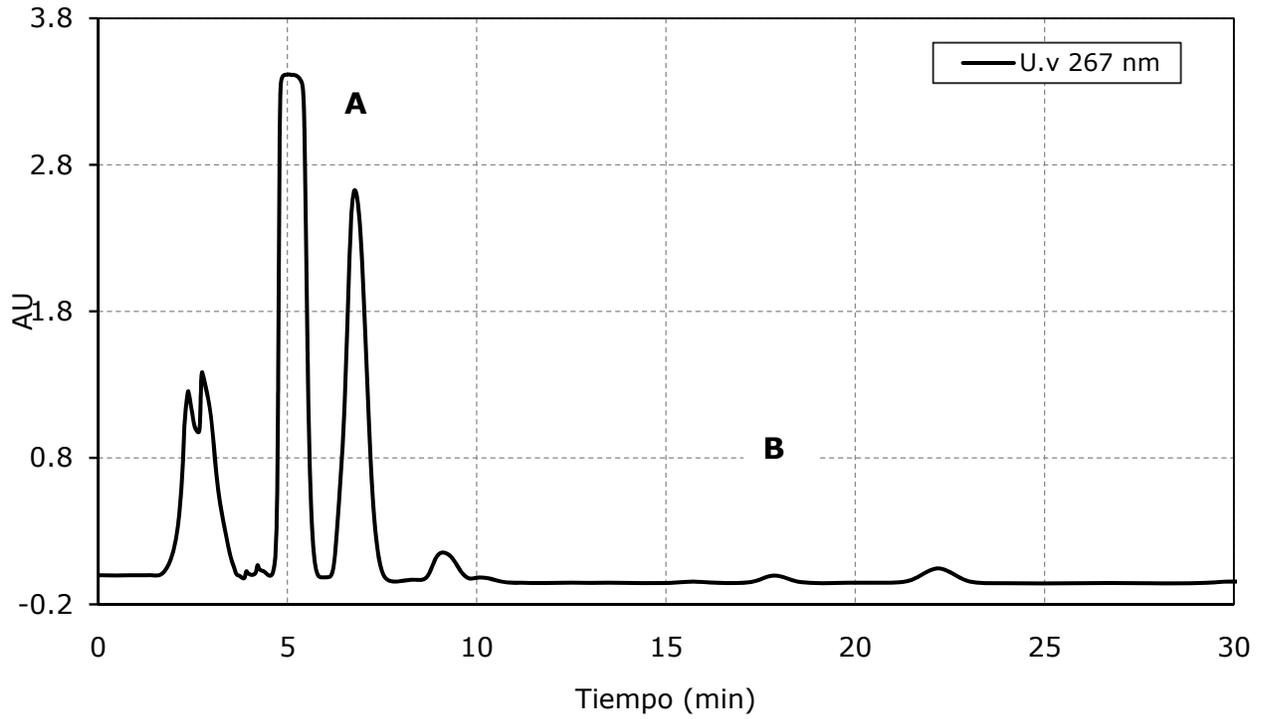
Cromatograma 6.



A. Fracción de interés correspondiente a la [¹⁸F]FLT. B. Impureza radioquímica.

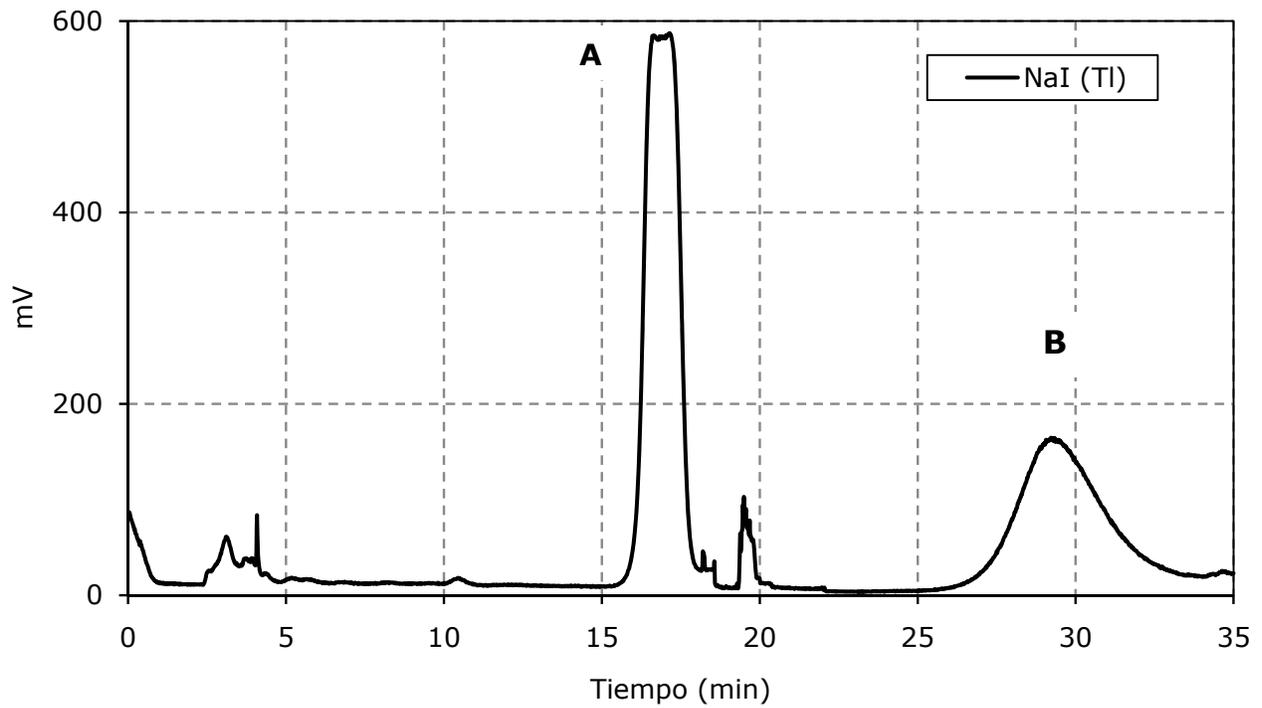
6.1.4 Grupo 4. 10 mg de precursor-5.3 mg K_{2.2.2}.

Cromatograma 7



A. Impurezas químicas. B Producto [¹⁸F]FLT

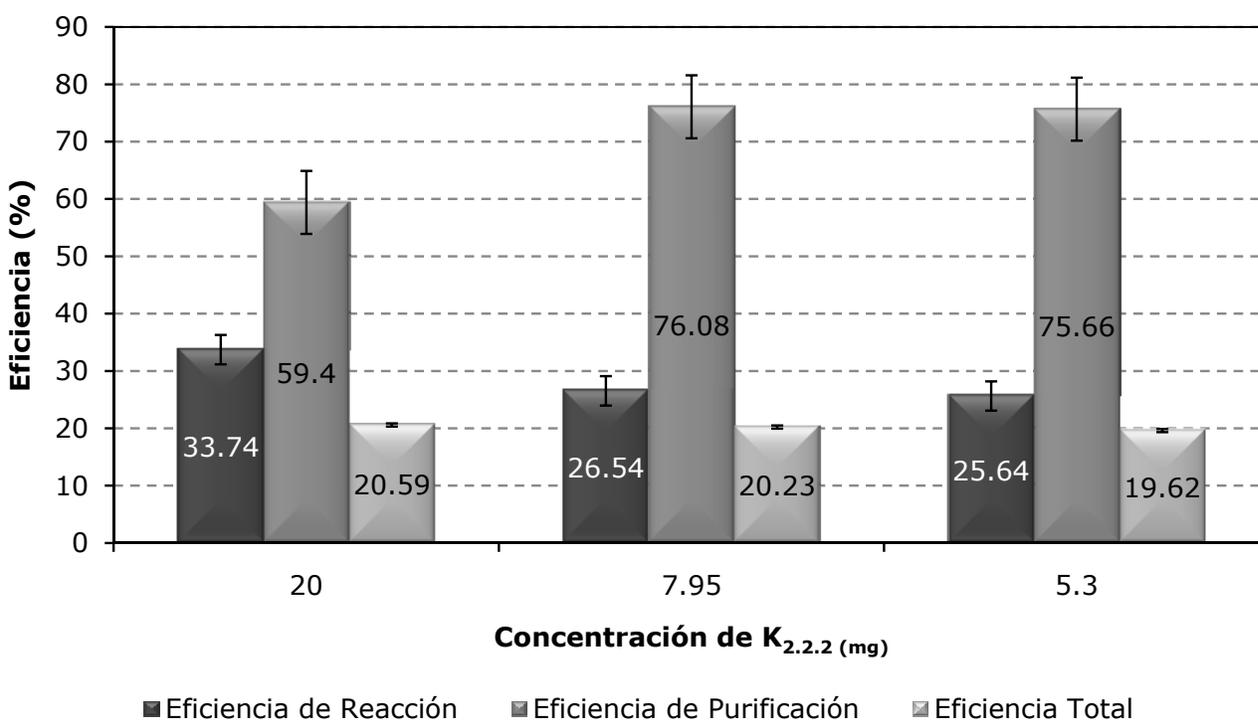
Cromatograma 8



A. Fracción de interés correspondiente a la [¹⁸F]FLT. B. Impureza radioquímica.

Los grupos 2, 3, y 4 son comparables, la cantidad de precursor fue constante durante las producciones (10 mg) y la concentración de la solución de elución se modifico de 20, 7.95, y 5.3 mg de $K_{2.2.2}$ respectivamente. Al comparar las eficiencias se obtiene la gráfica 1, donde se observa que no hay diferencia en la eficiencia total de reacción sin embargo donde se observan cambios significativos es en la eficiencia de purificación, ésta aumenta conforme disminuye la cantidad de $K_{2.2.2}$ y esto se confirma con los cromatogramas 3 y 4, donde la cantidad de picos detectados por el U.V. y el de detector de radiación es mayor que en los cromatogramas 5-9.

Gráfica 1. Comparación de las eficiencias promedio de reacción, purificación y total; con la concentración constante de precursor (10 mg) y variando la concentración de $K_{2.2.2}$.

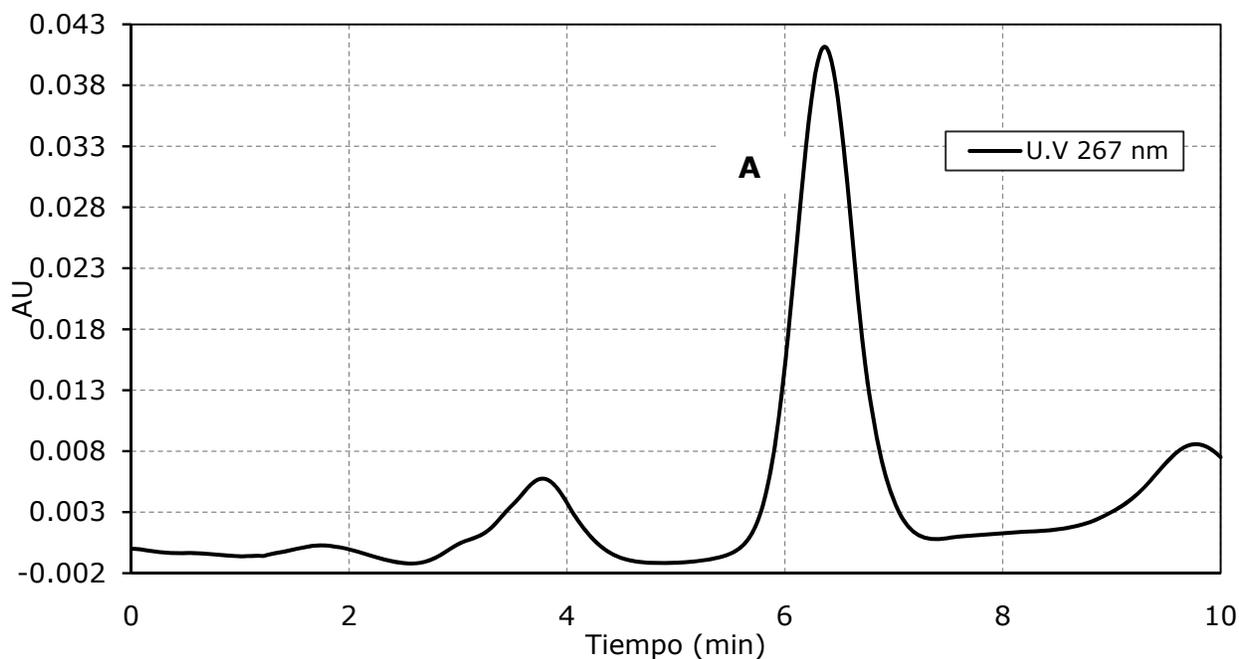


6.1.5 Determinación de la actividad específica.

En los cromatogramas del grupo cuatro se detectó un pequeño pico de masa (cromatograma 5) simultáneo al pico de radiación generado por la $[^{18}F]FLT$, de mostrándonos que la sensibilidad del detector era la suficiente para poder

cuantificar la masa del producto. Para logra una mayor resolución del un pico en el U.V. fue necesario dividir lo adquisición de datos en dos partes, siendo el segundo cromatograma el de interés (cromatograma 9). Este hecho permitió calcular el área bajo la curva, correspondiente a la masa del producto y así poder calcular el valor de la actividad específica. Posteriormente se inyectó por triplicado 20 μL de solución estándar de FLT empleando la misma columna de purificación. Con los datos mostrados en la tabla 12 y la ecuación 2 se determinó la actividad específica, además se midió la actividad de la fracción correspondiente a la $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$.

Cromatograma 9. Cromatograma parcial de la la purificación de la $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$.



A. Pico obtenido de la absorbancia del radiofármaco ($[^{18}\text{F}]\text{FLT}$).

Tabla 12 Datos necesarios para el cálculo de la actividad específica.

Datos de la solución estándar		
Concentración de la solución estándar. (mM)	Área promedio de las inyecciones (μV/s)	moles de FLT en los 20μL
4.03	11 706 931	81.8 nmol

Datos del producto		
Actividad de la fracción. (Ci)	Área del producto (μV/s)	moles calculados en el producto
0.0445	1 620 494	11.21 nmol

$$Actividad\ específica = \frac{Actividad\ de\ la\ fracción\ de\ interés}{masa\ del\ radiofármaco\ en\ dicha\ fracción} [=] \frac{Ci}{moles} \quad (\text{ecuación 2})$$

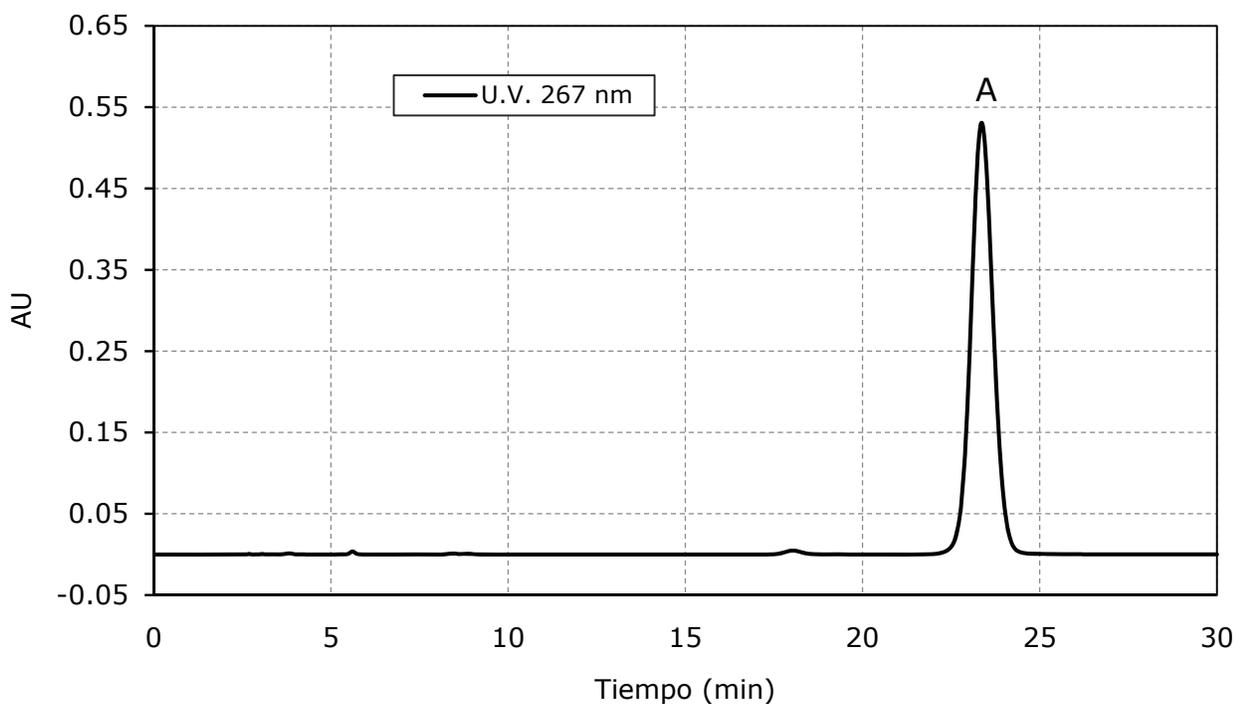
La determinación de la actividad específica nos proporciona una idea de la cantidad real de moléculas de FLT marcadas con el [¹⁸F]Flúor y a su vez conocer la masa de [¹⁸F]FLT administrada a los pacientes para la realización del estudio. La actividad específica calculada en el radiofármaco fue de 3.96 Ci/μmol.

6.2 Pruebas de control de calidad.

El producto cumple con las especificaciones propuestas en la monografía, siendo una solución incolora y libre de partículas con un pH de 5.5 a 6. No se encontró indicios de $K_{2.2.2}$ ni de acetonitrilo; presenta una pureza radioquímica mayor al 98.0 % (cromatograma 11).

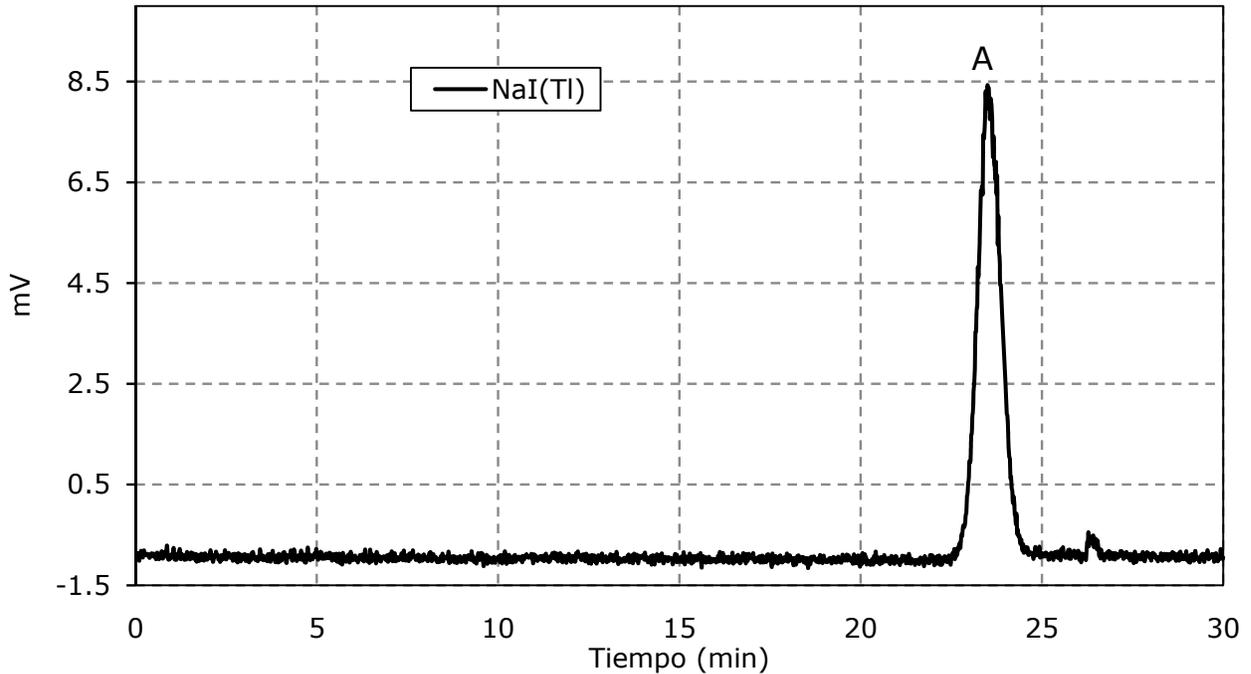
El radiofármaco obtenido se identificó como $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$, después de comparar el tiempo de retención del estándar con el del producto, cromatogramas 10 y 11. Debido a que la cantidad de masa del $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ no es detectable en el U.V. se pueden inyectar el producto mezclado con el estándar y considerar el tiempo de retención del producto al pico obtenido con el detector de radiación.

Cromatograma 10



A Estándar de fluorotimidina (1 mg/mL), detector de U.V.

Cromotograma 11



Radiocromatograma del producto después de su purificación. A [¹⁸F]FLT.

El espectro gamma obtenido del producto presenta un único fotopico a 511 keV, lo que nos permite inferir que nuestro radiofármaco se encuentra marcado con un radionucleido emisor de positrones (ilustración 14), pues dicha energía corresponde a la aniquilación de los positrones. Para garantizar que dicho radioisótopo es ¹⁸F se determinó el tiempo de vida media siendo este de 110 min.

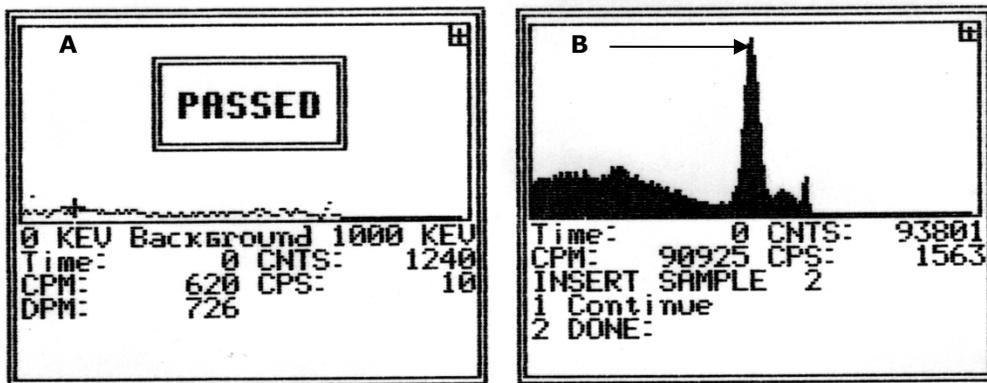


Ilustración 14. Espectro de energía. A Lectura sin fuente radioactiva, B Fotopico de 511 keV, originado por la aniquilación de positrones.

Los resultados de las pruebas biológicas se encuentran dentro de las especificaciones; las membranas utilizadas durante la filtración resistieron una presión de 50 psi lo que confirma su integridad. La cantidad de endotoxinas presentes en el producto es menor a 2.5 UE/mL (ilustración15), muy por debajo al límite permitido (17.5 UE/mL si consideramos un volumen de 10 mL).

```
***** ENDOSAFE Test Record *****
          V7.12B 12/9/2008
DateTime: ..... 30-03-10 @ 12:05:03
Device: ..... 2600
OperatorID: ..... JCM
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 9349133
Cartridge Cal Code: ..... 513235382938
Range: ..... 5-0.05
Range Time: ..... Sec: 132-753
Onset Times: ..... >753 344 >753 316
Slope: -0.378 ..... Intercept: +2.385
Dilution: ..... 50
Sample Lot: ..... FLT300310PCPU
Sample ID: ..... FLT
Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass
Spike Value: ..... 0.393 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 6.0% Pass
Spike Recovery: ..... 80% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample #1 Value: ..... <2.50 EU/mL
Sample #2 Value: ..... <2.50 EU/mL
```

Ilustración 15. Resultado de la prueba de pirógenos realizada en el equipo Endosafe® PTS

Certificado de control de calidad

Código del producto: [¹⁸ F]FLT	Lote: [¹⁸ F]-FLT270410CPCU-1
Producto: [¹⁸ F]-FLUOROTIMIDINA	Fecha: <u>27042010</u>

Parámetro	Metodología de la prueba	Criterio de aceptación	Resultado Acepta Si/No
Apariencia	Inspección visual	Es un líquido transparente, incoloro, libre de partículas suspendidas visibles	<u>Si/No</u>
Medición del pH	Tiras pH Whatman®	pH entre 4.5-7.5	pH <u>5.5</u> <u>Si/No</u>
Identificación			
Identificación química	HPLC columna analítica C18, fase móvil 7 % Etanol	El tiempo de retención de 23± 2 minutos	<u>Si/No</u>
Determinación del tiempo de vida media	Activímetro	110 ±5 minutos	<u>Si/No</u>
Pureza			
Pureza radioquímica	HPLC columna analítica C18, fase móvil 7 % Etanol	El porcentaje de la radiactividad Es ≥ 90% correspondiente a ¹⁸ FLT	<u>98.0</u> % <u>Si/No</u>
Pureza radionucléidica	Obtención del espectro Gamma	Presencia de un único fotopico con una energía 511 keV	<u>Si/No</u>
Determinación de disolventes residuales	Cromatografía de gases	Contiene: Acetonitrilo ≤ 400 ppm DMSO ≤ 5000 ppm	Acetonitrilo <u>100</u> ppm DMSO <u>75</u> ppm <u>Si/No</u>
Detección de K_{2.2.2}	TLC	Contiene: ≤ 50 µg/mL de K _{2.2.2}	<u>Si/No</u>
Pruebas biológicas			
Prueba de pirógenos	Endosafe® PTS	No contiene más de 17.5 UE/mL	<u><2.5</u> UE/mL <u>Si/No</u>
Integridad del filtro	Flujo de nitrógeno	Resiste hasta 50psi de presión	<u>Si/No</u>

6.3 Discusión.

En la tabla 11 se observa que las eficiencias totales son casi idénticas para los cuatro grupos, sin embargo al reducir la concentración de precursor al 50 % (\$10 USD/mg) y la concentración de $K_{2.2.2}$ - K_2CO_3 se puede obtener una eficiencia similar a la obtenida en el primer grupo

La eficiencia de purificación presenta un comportamiento inversamente proporcional a la eficiencia de reacción. Si aumenta la eficiencia de reacción, aumentan las impurezas producidas disminuyendo el rendimiento de purificación (cromatogramas 1, 5). Este comportamiento se puede atribuir a la concentración de carbonato que se encuentra directamente relacionada con la concentración de $K_{2.2.2}$. En las producciones del primer grupo se observa una gran cantidad de impurezas químicas y radioquímicas (cromatogramas 1, 2), conforme se reduce la concentración de $K_{2.2.2}$ se disminuyen las impurezas generadas en la reacción. La principal impureza química generada, es la 2',3'-didehidro-3'-desoxi-timidina (Stavudina), producto de la reacción de eliminación que puede sufrir el precursor. La Stavudina es un nucleosido análogo de la timidina utilizado para el tratamiento de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que desencadena reacciones adversas como vómito, daño hepático, neuropatía periférica, pancreatitis entre otras [48], por lo que es importante minimizar la contaminación de la [^{18}F]FLT con la Stavudina, con la finalidad de disminuir el riesgo de que el paciente presente efectos secundarios al radiofármaco ocasionados por la impureza. Sin embargo los efectos secundarios de la Stavudina se presentan con una exposición de 79 semanas a una dosis de 80 mg diarios [48].

Cuando se trabajó con una concentración de 7.95 mg de $K_{2.2.2}$. la contaminación de Stavudina se redujo casi al 100 % (cromatograma 5 y 7) permitiendo un aumento en la eficiencia de purificación.

Los cromatogramas y las eficiencias del grupo 3 y 4 son similares, su principal diferencia fue en el desarrollo experimental, inicialmente dos de las producciones del grupo 3 pertenecían al grupo 4. Sin embargo durante la elución de ^{18}F fue necesario añadir más solución de elución, ya que el cartucho conservaba más de 100 mCi después de la elución del mismo.

El mejor de los grupos es el 3 al ser en donde se generan menos impurezas y se eluye con una mayor eficiencia el ^{18}F , disminuyendo el riesgo a la exposición al momento de adicionar solución de elución.

Los resultados del control de calidad son consistentes y raramente variaron, sin embargo el tiempo de retención no es un buen parámetro de identificación, éste se modifica dependiendo del tipo de columna y del tiempo que se dejó equilibrar la columna. Para identificar completamente a la ^{18}F FLT, a una muestra del producto se le adicionó una fracción de solución estándar, dando como resultado un pico en el detector de U.V y otro simultáneo en el detector de radiactividad (cromatograma 9 y 10). Existe una mínima variación en el tiempo de retención cuando se inyectan simultáneamente el producto y el estándar, originada por la distancia que hay entre un detector a otro.

El espectro de rayos gamma muestra un único fotopico, indicándonos que la actividad medida corresponde únicamente al ^{18}F y en el producto se encuentra libre de impurezas radionucleídicas, generadas por la interacción del haz de protones con el material del blanco. Cuando se emplea plata como cuerpo del blanco se genera una mayor cantidad de impurezas radionucleídicas como es el ^{107}Cd y ^{109}Cd generados vía las reacciones nucleares $^{107, 109}\text{Ag}(p,n)$ [10], además de la erosión que sufre el cuerpo del blanco donde se desprenden partículas de plata. Estos cationes modifican el estado químico del $^{18}\text{F}^-$ mermando la calidad de éste y las reacciones posteriores. El cartucho de QMA además de retener al $^{18}\text{F}^-$ tiene la finalidad de retener estas impurezas radionucleídicas. Razón por la cual no son detectadas en el espectro de rayos gamma.

7.0 Conclusiones

Se logró implementar satisfactoriamente la síntesis de 3'-Desoxi-3'-[¹⁸F]fluoro-L-timidina ([¹⁸F]FLT), empleando un módulo de síntesis química diseñado originalmente para la producción de [¹⁸F]FDG, al modificar los parámetros de síntesis.

Se encontraron las condiciones de reacción más adecuadas para realizar la síntesis de [¹⁸F]FLT, obteniendo un rendimiento total promedio de 20.57 % \pm 0.09.

Mediante la modificación de la concentración de la solución de elución se aumentó la eficiencia de purificación, permitiéndonos obtener un producto de mayor calidad disminuyendo en un 50 % la concentración de precursor obteniendo la misma eficiencia total.

Las pruebas de control de calidad fueron satisfactorias, demostrando la seguridad del producto para la administración en pacientes.

Acrónimos y términos.

S-A Sigma-Aldrich

DMSO Dimetilsulfoxido

s segundos

min minutos

CPCU Chemistry Process Control Unit

HPLC Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High pressure liquid chromatography)

NOs Nosilato

DMTrO Dimetoxitritil

BOC Butoxicarbonil

[¹⁸F]FLT [¹⁸F]flourotimidina

FLT Flourotimidina

TKI Timidina cinasa I

[¹⁸F]FDG Fluorodesoxiglucosa

Pre -FLT 3-N-Boc-5'-O-dimetoxitritil-3'-O-nosil-timidina

[¹⁸F]FBCOH Fluoro-benzaldehído

5-FU 5-fluorouracilo

K_{2.2.2}: Kryptofix (4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosano)

PET Tomografía de emisión de positrones (Positron emission tomography)

psi libras cuadradas/pulgada

MeV Mega-electronvolts

keV kilo-electronvolts

Endosafe[®] PTS Endosafe Portable Test System

NaI[TI] Ioduro de sodio activado con talio

Actividad específica Actividad por unidad de masa (Ci/ μ mol)

UE Unidades de endotoxinas

Stavudina 2',3'-didehidro-3'-desoxi-timidina

OSEM Ordered subset expectation maximization

FBP Retroproyección filtrada (Filtered Back Projection)

RAMP Filtro rampa

FDA Food and Drug Administration

Referencias.

1. BCIT British Columbia Institute Of Technology Health Sciences Nuclear Medicine, July 2000.
2. Didier Le Bars. *Fluorine-18 and medical imaging: Radiopharmaceuticals for positron emission tomography*. Journal of Fluorine Chemistry (2006) **127** 1488–1493
3. N. Gupta, P.M. Price, E.O. Aboagye. *PET for in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements*. European Journal of Cancer (2002) **38** 2094–2107.
4. Gopal B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 5^a edition, Springer, United States of America 2004.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Volumen I, 9^a Edición, Secretaría de Salud, México 2008.
6. I. Bailey, Dale L. *Tomography, Emission*, Springer-Verlag Londo Limited 2005.
7. Ronald Nutt. *The History of Positron Emission Tomography*. Molecular Imaging and Biology, (2002)**4** 11–26.
8. Anne M.J. Paans, Aren van Waarde, Philip H. Elsinga et al. *Positron emission tomography: the conceptual idea using a multidisciplinary approach*. Methods (2002) **27** 195–207.
9. B. Neumair, A.T.J. Vogg, U. Seitz, M. Schmid, A.C. Buck, S.N. Reske. *[¹⁸F]3'-Fluorothymidine, a Much Promising New Oncological PET Tracer: From Precursor Synthesis to PET images*. Regional workshop on F-18 radiopharmaceuticals, Smolenice, Slovakia, November 25-27, (2001).
10. M.A.Ávila-Rodríguez, A. Zárate-Morales, A. Flores-Moreno. Cyclotron Production of Medical radioisotopes. AIP C.P. (2010) **1265** 371-378.
11. CTI, Inc. *RDS 111 Operating Instructions*. United States of America, 2000.

12. International Atomic Energy Agency. *Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice Technical Reports Series No. 465*. Vienna, 2008.
13. Anthony F. Shields., John R. Grierson, Bernhard M. Dohmen, *et al.* *Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography*. *Nature Medicine*. **4**(1998), 1334-1336.
14. S Yu, PhD, *Review of 18F-FDG synthesis and quality control*. *Biomedical Imaging and Intervention Journal* 2006;**2** (4):e57
15. Kenneth A. Krohna,T, David A. Mankoff a, Mark Muzia, Jeanne M. Linka, Alexander M. Spence, *True tracers: comparing FDG with glucose and FLT with thymidine*. *Nuclear Medicine and Biology* (2005) **32** 663– 671
16. Voet, Voet, Pratt, *Fundamentals of biochemistry life at molecular level*, 2^a edition, Editorial WileyUnited States of America, 2006.
17. Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH. *[¹⁸F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Dec; (2004) **31** (12):1659-72.
18. Andreas K. Buck , Ken Herrmann , Changxian Shen et al. *Molecular imaging of proliferation in vivo: Positron emission tomography with [¹⁸F]fluorothymidine*. Andreas Buck, Ken Herrmann. *Methods* **48** (2009) 205-215.
19. David Christman, Elizabeth J. Crawford, Morris Friedkin, Alfred P. Wolf. *Detection of DNA Synthesis in Intact Organisms with Positron-Emitting [Methyl-¹¹C]Thymidine*, David Christman. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* (1972) **69**, N°4, 988-992.
20. Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss LG. *The role of 18F-FLT in cancer imaging: does it really reflect proliferation?* *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Mar; (2008) **35** (3):527-31.
21. Henryk Barthel, Marcel C. Cleij, David R. Collingridge. *3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]Fluorothymidine as a New Marker for Monitoring Tumor Response to*

antiproliferative Therapy in vivo with Positron Emission Tomography. Cancer research **63**(2003),3791-3798 July 1.

22. B. Munch-Petersen, L. Cloos, H. K. Jensen G. Tyrstbd. *Human. Thymidine kinasa 1. Regulation in normal and in malignant cells*. Advan. Enzyme Regul. (1995) **35** pp 69-89.
23. Markus S. Birringer , Remo Perozzo , Elvan Kut et al. *High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: Quaternary structure, stability, and kinetics*. Protein Expression and Purification (2006) **47** 502-515.
24. Henderik L. van Westreenen, MD; David C.P. Cobben, MD, PhD; Pieter L. Jager. *Comparison of 18F-FLT PET and 18F-FDG PET in Esophageal Cancer*. J Nucl Med (2005)**46**,400-404.
25. Adrianus J. de Langen, Bianca Klabbers, Mark Lubberink, et al. *Reproducibility of quantitative 18F-3'-deoxy-3'-fluorothymidine measurements using positron emission tomography*. Eur J Nucl Med Mol Imaging (2009) **36**:389-395.
26. G. Halter, MD, A. K. Buck, MD,H. Schirrmeister, MD et al. *[¹⁸F] 3-deoxy-3'-fluorothymidine positron emission tomography: Alternative or diagnostic adjunct to 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in the workup of suspicious central focal lesions?*. J Thorac Cardiovasc Surg 2004;**127**:1093-9
27. Eric Turcotte, Linda W Wiens, John R Grierson et al. *Toxicology evaluation of radiotracer doses of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine (18F-FLT) for human PET imaging: Laboratory analysis of serial blood samples and comparison to previously investigated therapeutic FLT doses*. BioMed central Nuclear Medicine, 2007 **7**:3
28. Hubert Vesselle, PhD, MD; John Grierson, PhD; Lanell M. Peterson, BA et al. *¹⁸F-Fluorothymidine Radiation Dosimetry in Human PET Imaging Studies*. The Journal of Nuclear Medicine **Vol. 44** pp 1482-1488

29. Daniela Pellegrino, PhD; Ali A. Bonab, PhD; Stephen C. Dragotakes et al. *Inflammation and Infection: Imaging Properties of ^{18}F -FDG-Labeled White Blood Cells Versus ^{18}F -FDG*. J Nucl Med 2005; **46**:1522–1530
30. Zohar Keidar, Alexandra Gurman-Balbir, Diana Gaitini, Ora Israel. *Fever of Unknown Origin: The Role of ^{18}F -FDG PET/CT*. J Nucl Med 2008; **49**:1980–1985.
31. Aren van Waarde, PhD; David C.P. Cobben, MD; Albert J.H. Suurmeijer, PhD. *Selectivity of ^{18}F -FLT and ^{18}F -FDG for Differentiating Tumor from Inflammation in a Rodent Model*. J Nucl Med 2004; **45**:695–700
32. Ali Agool, Bart W. Schot, Pieter L. Jager, and Edo Vellenga. *^{18}F -FLT PET in Hematologic Disorders: A Novel Technique to Analyze the Bone Marrow Compartment*. J Nucl Med 2006; **47**:1592–1598
33. Dorthe Skovgaard, Monika L. Bayer, Abigail L. Mackey, et al. *Increased cellular Proliferation in Rat Skeletal Muscle and Tendon In Response to Exercise: Use of FLT and PET/CT*. Mol Imaging Biol (2010) 10.1007/s11307-010-0316-y.
34. British Pharmacopeia Volumen III, 2004 London, The Stationery office.
35. The United States Pharmacopeial Convention, *The United States Pharmacopeia* USP 31 Volume II, The National Formulary NF 27, 2009 Twinbrook Parkway Rockville MD 20852.
36. Gerhart Friedlander, Joseph W. Kennedy, Edward S. Macias, Julian Malcolm Miller, *Nuclear and Radiochemistry*, 3^a edition, Wiley-Interscience, United Stated of America 1981.
37. John Mac Murry. *Química Orgánica* 6^a edición. Editorial Thomson, México 2004.
38. Robert Thornton Morrison, Robert Neilson Boyd. *Organic Chemistry* 6^a edition, Pretice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA 1992.

39. Solomons G. *Química Orgánica*. 2ª edición. Editorial Limusa-Wiley. México. 2007.
40. Philip H. Elsinga. *Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography*. *Methods* (2002) **27** 208-217.
41. Siemens Molecular Imaging, Inc. *Explora FDG₄ Operating Instructions*, United States of America, 2006
42. Makiko Suehiro, Shankar Vallabhajosula, Stanley J. Goldsmith, Douglas J. Ballon. *Investigation of the role of the base in the synthesis of [¹⁸F]FLT*. *Applied Radiation and Isotopes* (2007) **65** 1350–1358.
43. Seung Jun Oh, Christoph Mosdzianowski, Dae Yoon Chi, Jung Young Kim, Se Hun Kang et al. *Fully automated synthesis system of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine*. *Nuclear Medicine and Biology*, (2004) **31** 803-809
44. Mickael Bourgeois, Marie Mougin-Degraef, Françoise Leost, et al. *Purification of [¹⁸F]-fluoro-1-thymidine ([¹⁸F]-FLT) for positron emission tomography imaging*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2007) **45** 154–157.
45. European Medicines Agency. *ICH Topic Q3C (R3) Impurities: Residual Solvents*, 1998.
46. Peter J.H. Scott, Michael R. Kilbourn. *Determination of residual Kryptofix 2.2.2 levels in [¹⁸F]-labeled radiopharmaceuticals for human use*. *Applied Radiation and Isotopes* (2007) **65** 1359–1362.
47. Charles River, The Endosafe[®]-PTS[™] Portable Test System User's Guide, Version 7, United States of America, 2003.
48. http://packageinserts.bms.com/pi/pi_zerit.pdf

Apéndice A.

El apéndice A, contiene imágenes obtenidas de las tomografías por emisión de positrones realizadas durante los estudios preclínicos en roedores de la [^{18}F]FLT. Para la realización de dichos estudios se utilizó el equipo microPET Focus 120 (Concorde Microsystems Inc.), ilustración 16. La actividad administrada del radiofármaco ([^{18}F]FLT) para la elaboración de dichos estudios depende del animal, donde a las ratas se les aplicó una actividad de 700 a 1000 μCi mientras que para los ratones se le administró una actividad de 400 a 500 μCi .

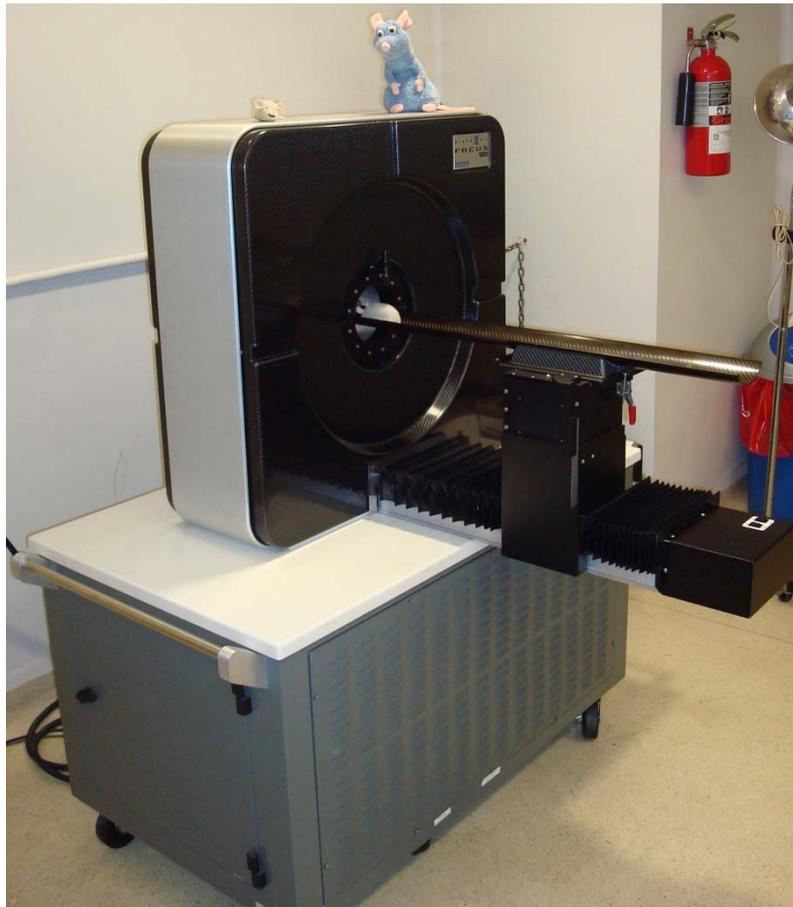


Ilustración 16 Microcámara PET para tomografías de emisión de positrones de animales pequeños.

La ilustración 17 representa el estudio PET de la biodistribución normal de la [^{18}F]FLT en una rata Wistar sana. La adquisición de la imagen fue dinámica sin tiempo de biodistribución. La reconstrucción de la imagen se realizó con el algoritmo OSEM 2D sin filtro. La imagen muestra que la principal zona de acumulación del radiofármaco es la vejiga y en contraste no se observa captación de [^{18}F]FLT por el cerebro.

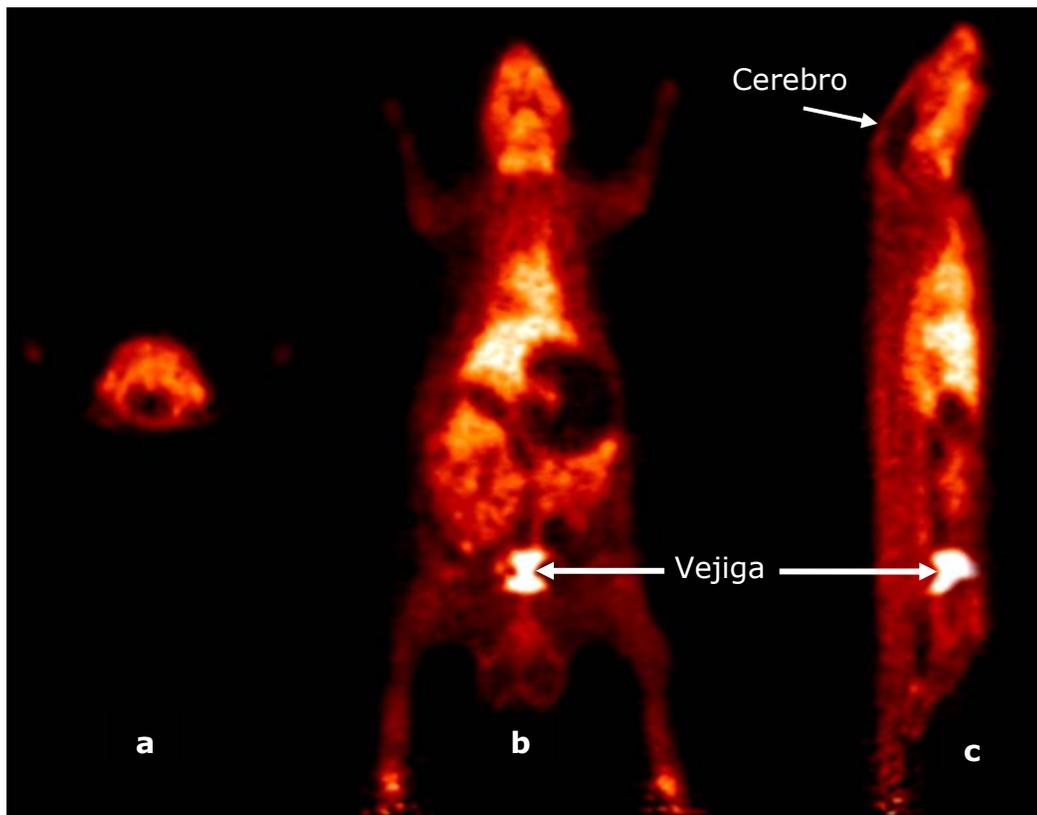


Ilustración 17. Biodistribución de la [^{18}F]FLT en un roedor sano. Corte: a. Transversal, b. Coronal, c. Sagital.

La ilustración 18 muestra el estudio PET realizado a un ratón atómico (BALB/c nu/nu), al cual se le inocularon intracranealmente un millón de células de la línea tumoral C6 (glioma); el ratón desarrollo un glioblastoma extracraneal. La adquisición de la imagen fue dinámica sin tiempo de biodistribución, en la

reconstrucción de la imagen se empleó el algoritmo FBP con filtro RAMP. La imagen muestra una zona con alta captación fuera del área cerebral mientras que en el cerebro no se acumuló el radiofármaco.

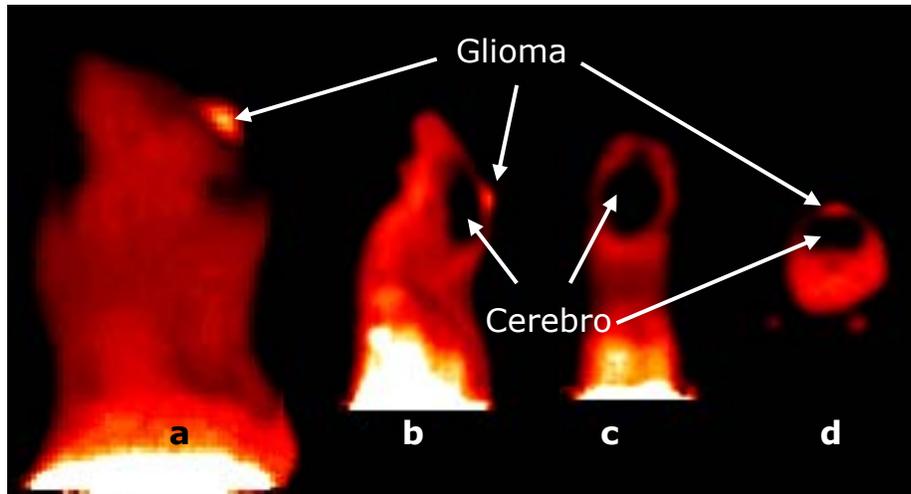


Ilustración 18. Biodistribución de la $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ en un roedor con un tumor extra craneal.
a. Proyección en 3D. Corte: b. Sagital, c. Coronal, d. Transversal.

La ilustración 19, es una fotografía de uno de los ratones con proceso tumoral inducido por células de glioma. El estudio PET del roedor se ejemplifica en la ilustración 20.



Ilustración 19. Ratón atómico con un proceso tumoral inducido por la línea celular C6(glioma).

La ilustración 20 ejemplifica el estudio PET realizado a un ratón atímico (BALB/c nu/nu), al cual se le inyectó subcutáneamente un millón de células de la línea tumoral C6 (glioma), en el hombro derecho. La adquisición de la imagen fue dinámica sin tiempo de biodistribución, en la reconstrucción de la imagen se empleó el algoritmo FBP con filtro RAMP. La imagen muestra dos zonas con alta captación de $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$, siendo estas el glioblastoma y la vejiga.

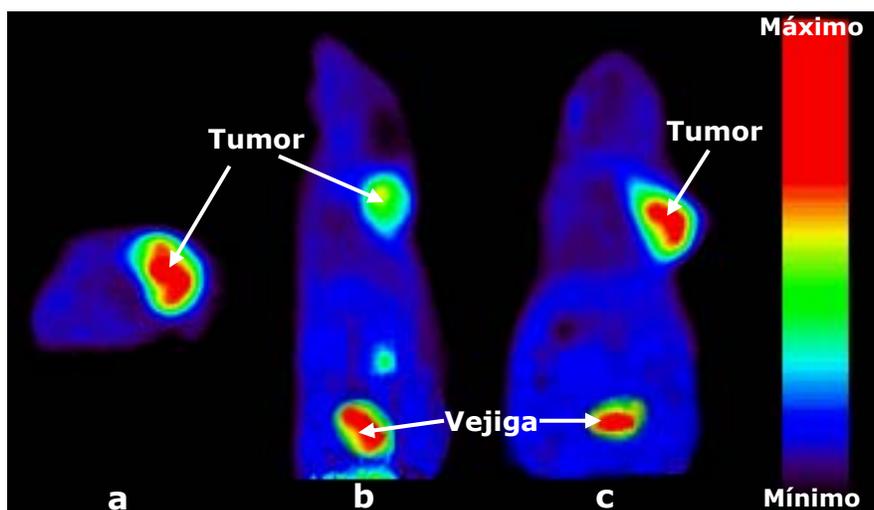


Ilustración 20 Corte: a. Transversal, b. Sagital, c. Coronal.

Apéndice B.

Una vez probado el radiofármaco en animales se administró en humanos. Hasta el momento se han realizado 22 estudios PET/CT en las instalaciones de la Facultad de Medicina. 19 de ellos son estudios cerebrales, los tres restantes son de cuerpo completo, uno de ellos posible leucemia, el otro sospecha de cáncer de mama y el restante de un voluntario sano (éste último fue el primer estudio realizado en humanos). Las ilustraciones mostradas en el apéndice B fueron adquiridas en una cámara Biograph 64 Slice PET/CT Scanner (Siemens). Se administró a los pacientes una actividad de 10 mCi del radiofármaco y se dio 60 minutos de biodistribución.

La ilustración 21 muestra el estudio PET/CT de [^{18}F]FLT realizado a un voluntario sano. Se puede distinguir claramente las zonas típicas de captación del radiofármaco, como es la médula ósea, la vejiga, el hígado, y un poco los riñones.

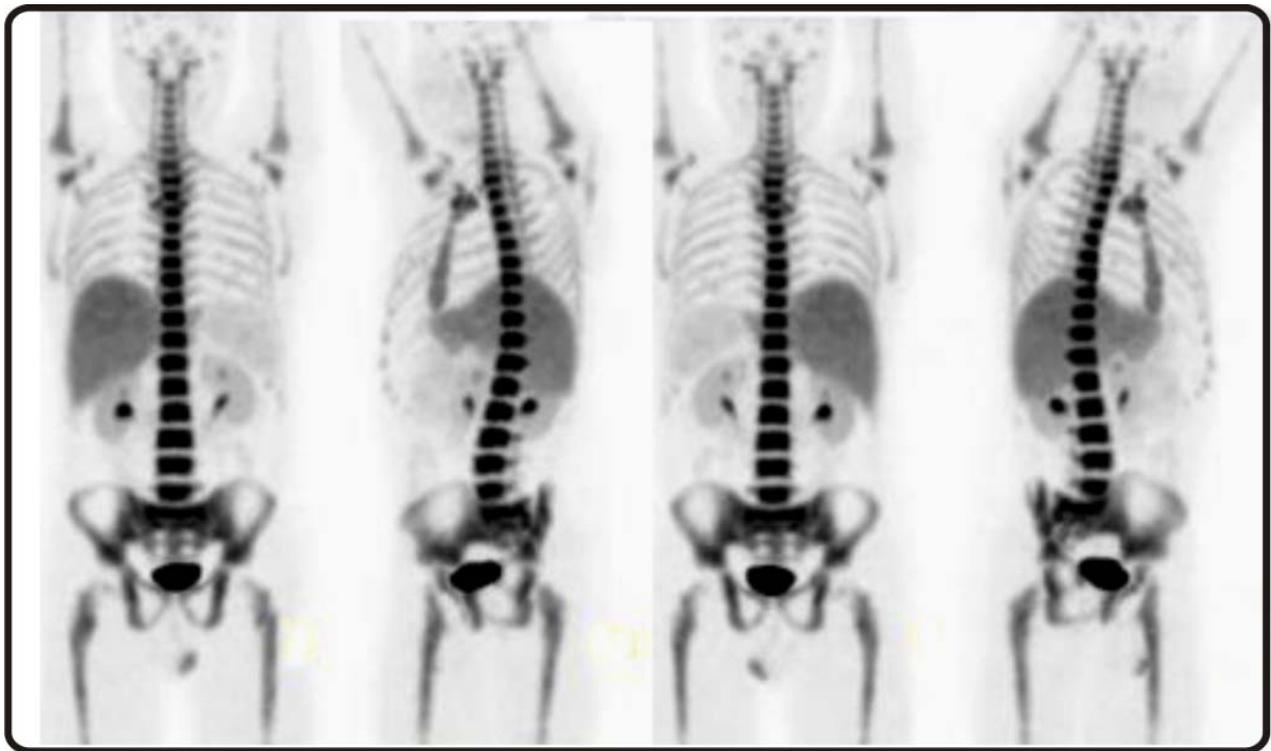


Ilustración 21 Biodistribución normal de la [^{18}F]FLT de un voluntario sano.

La ilustración 22 muestra la fusión de imágenes tomográficas por técnicas PET y CT. Adquiridas de un paciente masculino de 40 años diagnosticado con Astrocitoma grado II

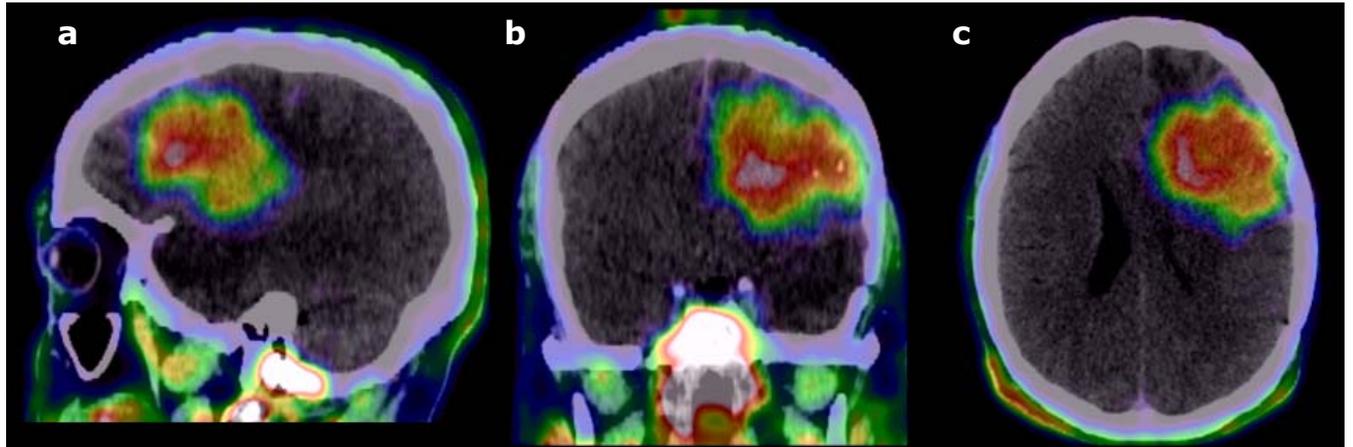


Ilustración 22 Estudio PET/CT región cerebral. Corte: a Transversal, b Coronal, c Sagital

La ilustración 23 muestra la fusión de imágenes tomográficas por técnicas PET y CT. Adquiridas de un paciente masculino de 36 años diagnosticado con Glioma de alto grado.

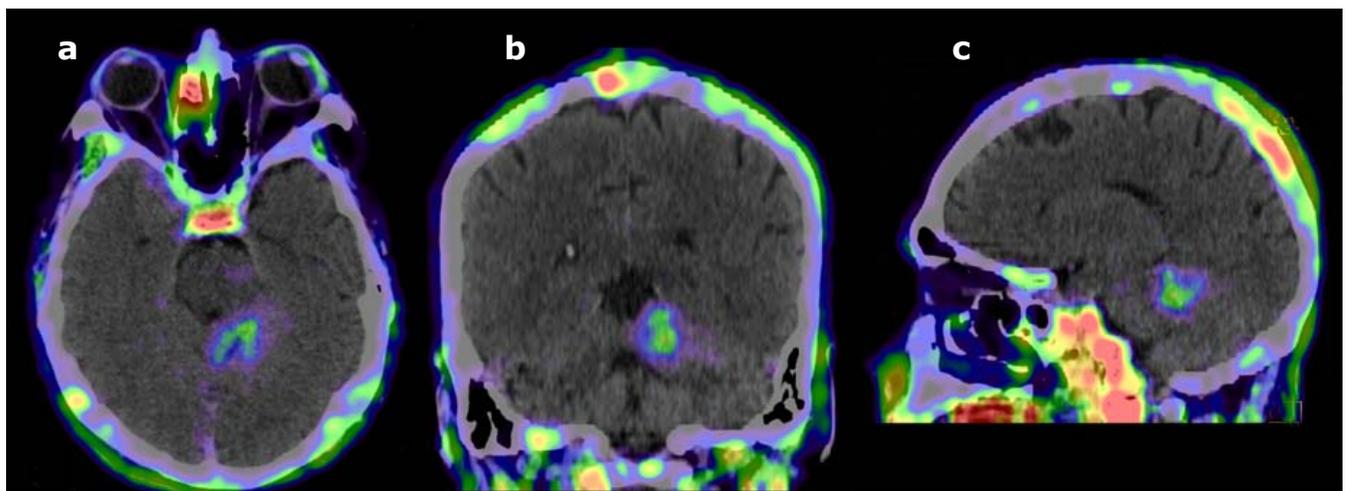


Ilustración 23. Estudio PET/CT región cerebral. Corte: a Transversal, b Coronal, c Sagital.

La ilustración 24 Representa el estudio comparativo utilizando [^{18}F]FLT y [^{18}F]FDG, realizado a un paciente masculino de 36 años, diagnosticado con Glioma de alto grado.

Se puede observar claramente las diferencias en la distribución cerebral de los radiofármacos. En el estudio realizado con [^{18}F]FLT la zona de captación mas intensa es aquella donde se localiza el tumor, mientras que en el estudio donde se utilizó [^{18}F]FDG existe una captación basal de éste aumentando el fondo de la imagen además de que existen zonas diferentes al tumor con gran captación del radiofármaco.

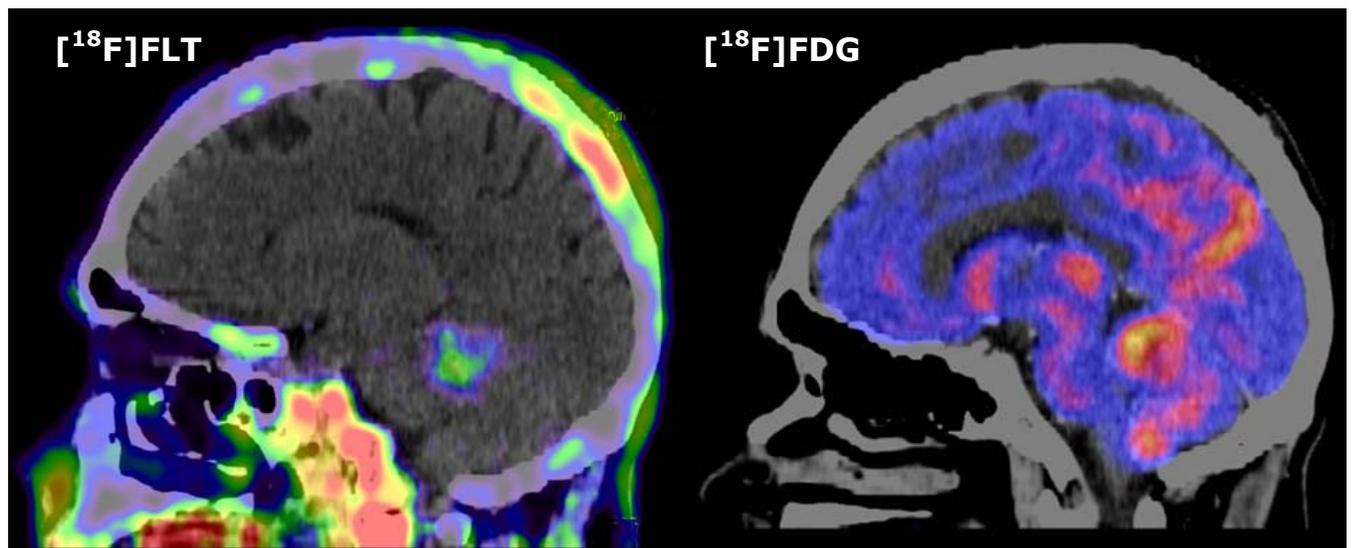


Ilustración 24 Estudio comparativo de la biodistribución cerebral de la [^{18}F]FLT y el [^{18}F]FDG