

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE
UN MÉTODO DE SÍNTESIS Y CONTROL DE CALIDAD DE
[¹⁸F]PSMA-1007: UN NUEVO RADIOMARCADOR PARA
CÁNCER DE PRÓSTATA EN EL SISTEMA DE SALUD PÚBLICO
CHILENO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Química área de Especialización en Química
Analítica.**

Roberto Andrés Mercado Muñoz

**Directoras de Tesis: Dra. María Loreto Ascar Estay
Dra. Ethel Velásquez Opazo**

Santiago-CHILE

Marzo 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Roberto Andrés Mercado Muñoz

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Analítica, en el examen público rendido el día.

Director de Tesis:

Dra. María Loreto Ascar Estay

Director de Tesis:

Dra. Ethel Velásquez Opazo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Morales Valenzuela

Dr. Alejandro Álvarez Lueje

Dr. Mario Aranda Bustos

*A quienes me han apoyado
incondicionalmente*

Agradecimientos

Quiero aprovechar este espacio para demostrar mi afecto y reconocimiento a quienes han estado presentes durante esta nueva etapa de estudios. A mis padres Hugo y Nela, quienes me enseñaron el mérito de la perseverancia, a mis hermanos Eduardo y Daniel, con quienes comparto dicha senda y a Paula, quien, con amor, creyó incondicionalmente en mi capacidad de concretar este proyecto. También quiero agradecer a mis directoras de Tesis: a la Dra. Loreto Ascar, por su generosidad, dedicación y atención entregados desde el momento en que me acerque con la propuesta de este proyecto; y a la Dra. Ethel Velásquez, con quien compartimos a diario laboralmente, buscando concretar grandes desafíos, gracias por su compromiso y por su ayuda desinteresada en este proyecto.

Quiero extender mi agradecimiento a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ciclotrón y del Laboratorio Control de Calidad de la CCHEN. Gracias por su colaboración al desarrollar las actividades experimentales de este trabajo.

Quiero agradecer a la Comisión Chilena de Energía Nuclear, que, a través de su División de Investigación y Aplicaciones Nucleares y su División de Producción y Servicios, otorgaron el tiempo de dedicación y el financiamiento para el desarrollo de este proyecto de tesis. Por último, agradecer el financiamiento otorgado por la Beca de Magister para Funcionarios/as del Sector Público de ANID: ANID-PCHA/Magíster para Funcionarios/as del Sector Público/2019-79190208

Tabla de Contenido

Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras	x
Resumen	xii
Summary	xiii
Introducción	1
Imagenología molecular y radiofármacos	1
Antígeno de membrana específico de próstata y [¹⁸ F]PSMA-1007	6
Hipótesis	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
Radiofármaco en estudio	14
Especificaciones fisicoquímicas para el producto terminado.....	15
Materiales y equipos	16
Compuesto precursor y PSMA-1007	16
Materiales y equipos utilizados en la síntesis química de [¹⁸ F]PSMA-1007 ..	16
Equipos y materiales	16
Solventes y reactivos	16

Materiales y equipos utilizados en las pruebas de control de calidad fisicoquímicas para [¹⁸ F]PSMA-1007	17
Equipos y materiales	17
Solventes y reactivos	18
Metodología	20
1. Síntesis semiautomatizada de [¹⁸ F]PSMA-1007	20
1.1 Obtención de ¹⁸ F	20
1.2 Síntesis química automatizada de [¹⁸ F]PSMA-1007	22
1.2.1 Preprocesamiento del ¹⁸ F	22
1.2.2 Reacción de radiomarcación	23
1.2.3 Purificación vía extracción en fase sólida (SPE)	25
2. Análisis fisicoquímicos de control de calidad de [¹⁸ F]PSMA-1007	26
2.1 Análisis de identidad, pureza radioquímica y pureza química	26
2.1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	26
2.1.2 Cromatografía de gases (GC)	28
2.1.3 Prueba de análisis de gota o Spot-Test	31
2.2 Análisis de pureza radionucleídica	32
2.2.1 Análisis por espectrometría gamma	32
2.2.2 Determinación del tiempo de semidesintegración	33

2.3 Determinación de pH.....	34
Resultados y discusión	35
1.Producción de [¹⁸ F]PSMA-1007.....	35
1.1 Dificultades de la implementación del método de producción del [¹⁸ F]PSMA-1007 en el módulo IBA Synthera V2	39
2.Control de calidad fisicoquímico de [¹⁸ F]PSMA-1007	42
2.1 Apariencia	42
2.2 Identidad.....	42
2.3 Pureza radioquímica.....	43
2.4 Pureza química vía HPLC	44
2.4.1 Dificultades en la cuantificación de [¹⁸ F]PSMA-1007 y sus impurezas	49
2.5 Determinación de tetrabutilamonio residual (TBA)	50
2.6 Determinación de solventes residuales	54
2.6.1 Dificultades en la cuantificación de los solventes residuales	59
2.7 Análisis por espectrometría gamma	59
2.8 Determinación del tiempo de semidesintegración	60
2.9 Determinación del pH.....	62
Conclusiones	63

Perspectiva de trabajo futuro 65

Bibliografía 69

Índice de Tablas

Tabla 1. Especificaciones recomendadas para el control de calidad de [¹⁸ F]PSMA-1007.....	15
Tabla 2. Resumen de condiciones cromatográficas para HPLC.....	27
Tabla 3. Resumen de concentraciones máximas de solvente por radiofármaco	30
Tabla 4. Resumen de condiciones cromatográficas para la determinación de solventes residuales.	30
Tabla 5. Cuadro resumen de las síntesis realizadas.	39
Tabla 6. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de pureza química vía HPLC	48
Tabla 7. Resultados de la pureza química vía HPLC de la síntesis de prueba 5	49
Tabla 8. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de solventes residuales involucrados en los procesos de producción de [¹⁸ F]PSMA-1007, [¹⁸ F]FDG y [^{99m} Tc]NaTcO ₄	58
Tabla 9. Actividad medida cada 2 minutos para [¹⁸ F]PSMA-1007	61

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de la formación de un radiofármaco.	2
Figura 2. Imágenes obtenidas por un escáner PET utilizando [¹⁸ F]FDG.	3
Figura 3. Cantidad estimada de incidencia y muertes por cáncer de varones en Chile durante el año 2020.	5
Figura 4. Estructura química del [¹⁸ F]PSMA-1007.	14
Figura 5. Esquema de decaimiento del ¹⁸ F.	21
Figura 6. Esquema de síntesis resumido de [¹⁸ F]PSMA-1007 en módulo de síntesis IBA Synthera V2.	24
Figura 7. Mecanismo de reacción de sustitución nucleofílica heteroaromática que describe la radiomarcación de [¹⁸ F]PSMA-1007.	25
Figura 8. Gráfico de seguimiento de la síntesis de [¹⁸ F]PSMA-1007.	35
Figura 9 . Fotografía de la solución de [¹⁸ F]PSMA-1007.	42
Figura 10. Comparación entre los cromatogramas obtenidos para el producto sintetizado [¹⁸ F]PSMA-1007 y el estándar de OH-PSMA y [¹⁹ F]PSMA-1007 a una concentración de 20 µg/mL.	43
Figura 11. Espectro UV-Visible de [¹⁹ F]PSMA (A) y OH-PSMA (B).	45
Figura 12. Curvas de calibración de [¹⁹ F]PSMA y OH-PSMA en las longitudes de 230 nm y 254 nm.	46
Figura 13. Comparación de los cromatogramas al incorporar ascorbato de sodio a la formulación.	50

Figura 14. Rango de concentraciones estudiado para el análisis de TBA residual	52
Figura 15. Estudio de especificidad del análisis de TBA en una matriz con ascorbato de sodio.....	53
Figura 16. Rango de concentraciones estudiado para la prueba de análisis de gota en una solución de [¹⁸ F]PSMA-1007 que contiene ascorbato de sodio	53
Figura 17. Comparación del análisis de TBA residual en presencia y ausencia de ascorbato de sodio.....	54
Figura 18. Cromatograma obtenido para la determinación de solventes residuales	55
Figura 19. Ajuste lineal para los solventes residuales: acetonitrilo, dimetilsulfóxido, etanol y metiletilcetona.	57
Figura 20. Espectro gamma obtenido al analizar una muestra de [¹⁸ F]PSMA- 1007.....	60
Figura 21. Ajuste lineal obtenido para las mediciones descritas en la tabla 9 ..	62
Figura 22. Medición de pH de una producción de [¹⁸ F]PSMA-1007.....	62

Resumen

Estudios preliminares para la implementación de un método de síntesis y control de calidad de [¹⁸F]PSMA-1007: Un nuevo radiotrazador para cáncer de próstata en el sistema de salud público chileno.

En Chile, el cáncer de próstata es la patología oncológica con mayor incidencia y mortalidad, siendo responsable de alrededor de 2000 muertes cada año. Dicha cifra cobra relevancia al considerar que, con las herramientas actuales, el diagnóstico se realiza en etapas tardías donde ya se encuentran desencadenados procesos metastáticos.

El [¹⁸F]PSMA-1007 es un radioligando del antígeno específico de membrana y utiliza la tomografía de emisión de positrones para obtener un diagnóstico precoz del cáncer de próstata. En este trabajo, se implementó y puso en marcha un método de producción de este radiofármaco en la Comisión Chilena de Energía Nuclear. Así mismo, se desarrolló una metodología de análisis fisicoquímico que asegura su seguridad, evaluando el cumplimiento de atributos críticos de calidad del radiofármaco como son la pureza química, pureza radioquímica, pureza radionucleídica, tiempo de semidesintegración del radioisótopo y pH final del producto terminado. Además, se estudió la interferencia del ascorbato de sodio en los ensayos de pureza química.

Este trabajo da cuenta de la primera etapa requerida para poner a disposición el [¹⁸F]PSMA-1007 desde el sistema público, otorgando una potente herramienta para la detección precoz del cáncer de próstata en Chile.

Summary

Preliminary studies for the implementation of a synthesis method and quality control of [¹⁸F]PSMA-1007: A new radiotracer for prostate cancer in the Chilean public health system.

Prostate cancer is the oncological pathology with the highest incidence and mortality in Chile, being responsible for around 2000 deaths each year. That number becomes relevant when considering, with current tools, the diagnosis is carried out in late stages where metastatic processes are already triggered.

[¹⁸F]PSMA-1007 is a membrane-specific antigen radioligand and uses positron emission tomography to obtain an early diagnosis of prostate cancer. In the current work, a production method for PSMA-targeted radiopharmaceutical was implemented and put into practice at the Chilean Nuclear Energy Commission. Likewise, a physicochemical analysis methodology was developed that ensures its safety, assessing compliance with critical radiopharmaceutical quality attributes such as chemical purity, radiochemical purity, radionuclide purity, radioisotope half-life and final pH of the finished product. In addition, the interference of sodium ascorbate in chemical purity tests was studied.

This work lays the foundations for the first stage required to make [¹⁸F]PSMA-1007 available from the public system, providing a powerful tool for the early detection of prostate cancer in Chile.

Introducción

Imagenología molecular y radiofármacos

La imagenología molecular (IM) es un tipo de procedimiento médico que provee la visualización, caracterización y medición de los procesos biológicos a nivel molecular y celular en sistemas vivos. La medicina nuclear es una rama de la IM que, a través del uso de radiofármacos, permite a los médicos especialistas observar y medir los procesos funcionales, metabólicos, químicos y biológicos dentro del organismo para diagnosticar y/o tratar los tumores malignos y otras enfermedades.

En general, un radiofármaco es un producto medicinal que usualmente es administrado intravenosamente al paciente y resulta de la unión de 2 elementos: un mínimo de un radioisótopo, que con su naturaleza radiactiva define el carácter y su uso como diagnóstico o terapia del radiofármaco y un *carrier* químico, que juega un importante rol en el transporte selectivo del radionúclido blanco biológico específico. La figura 1 provee de un esquema pictórico de la formación y unión biológica de los radiofármacos^[1]. Al inyectar a un paciente un radiofármaco y con la tecnología de detección necesaria, habitualmente escáneres PET (del inglés, Tomografía de Emisión de Positrones) o SPECT (del inglés, Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único), es posible realizar diagnósticos por imágenes que permiten caracterizar distintas enfermedades, comúnmente cáncer.

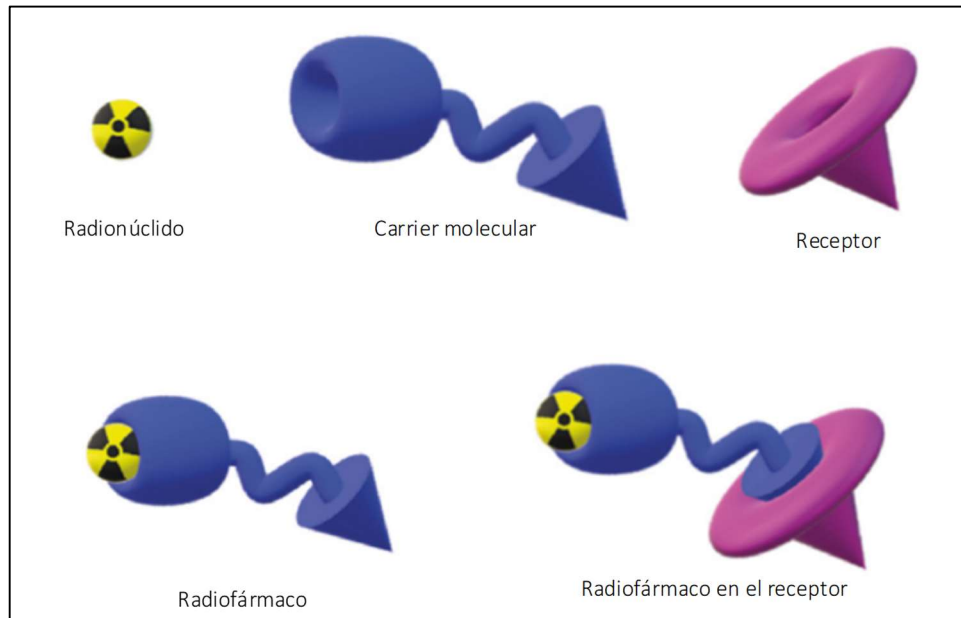


Figura 1. Representación esquemática de la formación de un radiofármaco. Dentro de estos radiofármacos se destaca el [^{18}F]FDG, que es una molécula de glucosa marcada con ^{18}F Fluor [2] y se trata del radiofármaco de mayor uso en la tomografía de emisión de positrones. Su principal ventaja es que al ser un radioisótopo emisor de positrones, se obtienen imágenes con una mejor resolución espacial y como resultado de ello se obtienen imágenes de diagnóstico de mayor calidad. Con ^{18}F es posible detectar tumores desde 1,5 mm de tamaño. Al ser una molécula de glucosa y dado el alto consumo energético del tejido neoplásico que se encuentra en constante proceso de replicación, el [^{18}F]FDG es metabolizado preferentemente por dichos tejidos, los que se visualizarán con detalle en la imagen obtenida por el escáner PET. La principal ventaja de utilizar glucosa marcada es que es útil para casi todo tipo de tumores.

La especialización de la síntesis de [^{18}F]FDG con altos rendimientos de reacción empezó en la década de los 80, pero su uso clínico de rutina como herramienta de diagnóstico cuenta con menos de 25 años a nivel global [2]. La figura 2 muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas utilizando tomografía de emisión de positrones utilizando [^{18}F]FDG, en esta imagen las imágenes representan el consumo del trazador en linfonodos comprometidos en linfoma de la ingle, ambas axilas y cuello (zonas rojas).

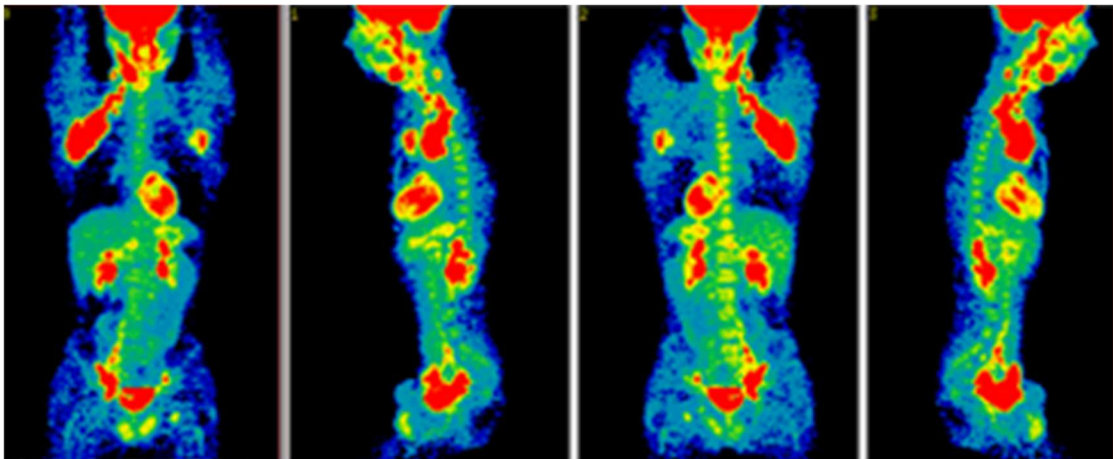


Figura 2. Imágenes obtenidas por un escáner PET utilizando [^{18}F]FDG.

Luego de la [^{18}F]FDG se han sintetizado otro tipo de moléculas marcadas con ^{18}F que son específicas para ciertos trastornos, como [^{18}F]Fluorotimidina para cuantificar la proliferación celular [5] y hormonas esteroidales como el [^{18}F]Fluoroestradiol para caracterizar cáncer de mama entre otras [4]. Estos radiofármacos suelen tener etapas de síntesis más complejas que la marcación de glucosa y están dirigidos a receptores específicos del organismo, por lo que es necesario asegurar su correcto funcionamiento, observando detalladamente

su pureza química y monitoreando la concentración del radiofármaco y los potenciales productos secundarios de la síntesis química.

Cáncer de próstata en Chile

El cáncer de próstata es una enfermedad cada vez con mayor incidencia en Chile y siendo responsable de alrededor de 2000 muertes cada año, corresponde a la patología oncológica con mayor incidencia y la tercera causa de muerte en varones en nuestro país ^[5]. Dicha cifra aumenta su relevancia al considerar que con las herramientas actuales el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad, donde ya se encuentran desencadenados procesos metastáticos. Al diagnóstico tardío se suma el envejecimiento de la población, de hecho, la mortalidad por cáncer de próstata en Chile ha ido aumentando progresivamente desde el 1997 al 2015 ^[6]. La figura 3 muestra las cifras de incidencia y muertes por cáncer de varones en Chile durante el año 2020, de acuerdo con el Observatorio Global del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (Globocan). Estas cifras ubican al cáncer de próstata como el trastorno neoplásico con mayor incidencia y como la principal causa de muerte en varones por cáncer en Chile ^[5]. Por ello es de especial importancia desarrollar e implementar métodos que provean de un diagnóstico precoz en etapas tempranas de la enfermedad, implicando una mejor probabilidad de recuperación y supervivencia de la población afectada.

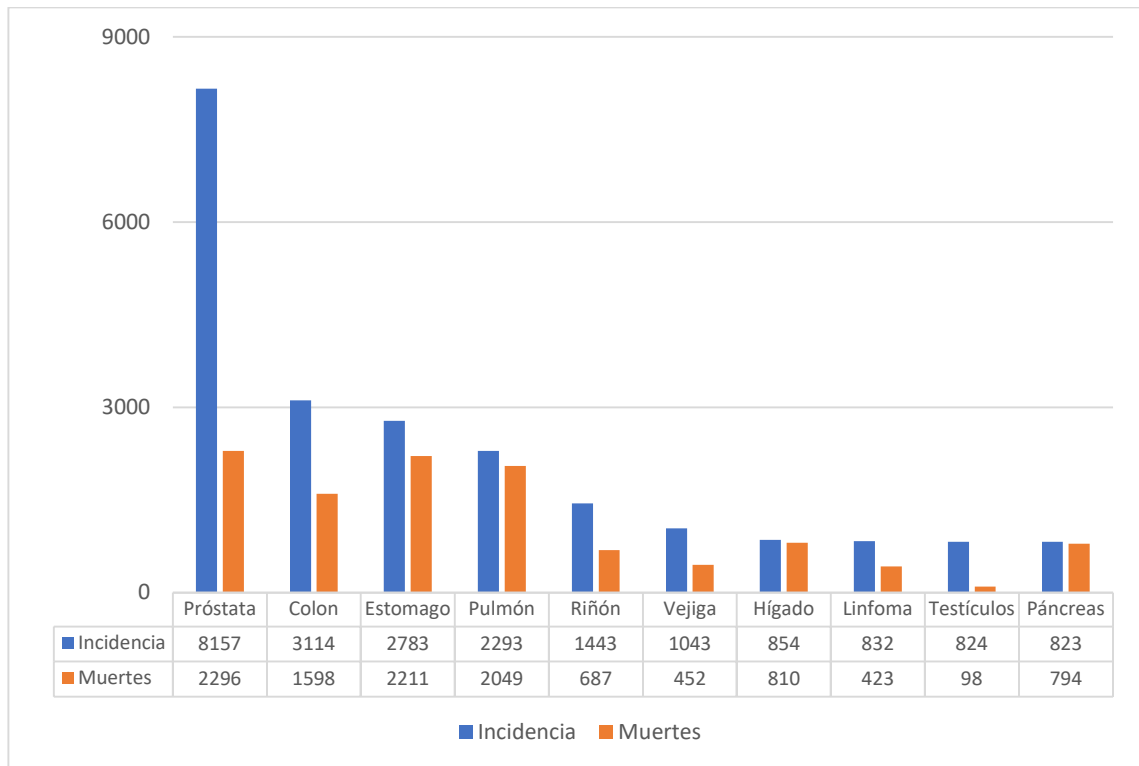


Figura 3. Cantidad estimada de incidencia y muertes por cáncer de varones en Chile durante el año 2020.

En línea con los Objetivos Sanitarios de la Década propuestos por el Ministerio de Salud en la Estrategia Nacional de Salud para el período 2011-2020 (mejorar la salud, disminuir las desigualdades en salud, asegurar la calidad de las intervenciones sanitarias), la imagenología molecular es una tecnología que brinda enormes beneficios al diagnóstico precoz y seguimiento del cáncer en general. En ese contexto, resulta de especial importancia el contribuir al plan Nacional del Cáncer y su Plan de Acción 2018 - 2028, promulgado en el 2018 y cuyo objetivo es disminuir tanto la incidencia como la mortalidad atribuible a la enfermedad, a través de estrategias y acciones que faciliten la promoción, prevención, diagnóstico precoz, tratamiento, cuidados paliativos y seguimiento

de pacientes, para mejorar su supervivencia, calidad de vida y la de sus familias y comunidades [6].

Antígeno de membrana específico de próstata y [¹⁸F]PSMA-1007

El PSMA es una proteína transmembrana presente en todos los tejidos prostáticos. El incremento de la expresión de PSMA está presente en varios tumores, aunque su concentración es más elevada en el cáncer de próstata. Casi todos los adenocarcinomas de próstata muestran expresión de PSMA en la mayoría de las lesiones, tanto primarias como metastásicas. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la expresión de PSMA está incrementada en pacientes con tumores dediferenciados, metastásicos u hormonorrefractarios. Más aún, el nivel de expresión del PSMA tiene un valor pronóstico para la evolución de la enfermedad [7].

Uno de los últimos avances en la tecnología de síntesis de moléculas marcadas con ¹⁸F es el [¹⁸F]PSMA-1007, la estructura química de esta radiomolécula ha sido diseñada para lograr una unión selectiva de este radiofármaco con el antígeno de membrana específico, logrando transportar y unir al ¹⁸F con aquellas células que sobreexpresan el PSMA. La PET, utilizando [¹⁸F]PSMA-1007 como radiotrazador es una técnica de imagen no invasiva para el estudio del cáncer de próstata, basado en el incremento de la expresión del antígeno prostático específico de membrana, PSMA. La tomografía por emisión de positrones proporciona una medida de la distribución tridimensional del tejido con

sobreexpresión de PSMA, a través de la unión específica con ligandos de [¹⁸F]PSMA-1007. Así, mediante el uso de este radiofármaco, se pueden obtener imágenes semicuantitativas que permiten valorar de forma no invasiva la expresión de PSMA, proporcionando una herramienta para el diagnóstico y caracterización temprana de la enfermedad.^[8]

Se ha reportado el desarrollo de técnicas químicas y precursores de marcación para obtener [¹⁸F]PSMA-1007, además se han realizado las primeras pruebas preclínicas en animales del radiofármaco ^[8,9]. Cardinale Jens y cols. han descrito un método eficiente que cumple con las Buenas Prácticas de Manufactura de Radiofármacos, así como las especificaciones de producto terminado que deben ser verificadas mediante análisis fisicoquímicos.^[9]

Pruebas de control de calidad

En Chile, la Norma Técnica N°127 del Instituto de Salud Pública, que regula las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para la Industria de Productos Farmacéuticos en su Anexo N°6 “Norma Técnica de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Radiofarmacéuticos”, indica que el laboratorio de control de calidad deberá disponer de procedimientos de muestreo y ensayo diseñados de forma tal que se asegure que las correspondientes materias primas, productos semielaborados y producto final, cumplen con los estándares aplicables, incluyendo la estabilidad, identidad, potencia, calidad y pureza^[10,11]. Por ello inmediatamente después de un proceso de síntesis, todos lo

radiofármacos PET deben ser sometidos a rigurosas pruebas fisicoquímicas y microbiológicas. Debido a la vida media del producto manufacturado, todos estos análisis deben ser completados en un corto periodo de tiempo para la liberación del producto.

Dentro de las primeras se encuentra la **inspección visual** del producto, la que es realizada detrás de un vidrio plomado. Esta prueba asegura que la solución final es limpia, transparente y libre de material particulado. Las fallas detectadas en esta prueba pueden ser resultado de diversos factores, como problemas en la síntesis, resultando en una solución turbia. Una septa reseca puede causar la presencia de material particulado en la solución. Cualquier paso del proceso de producción que pueda ser realizado nuevamente, implica que el producto final debe ser reprocesado. Dicho reproceso debe estar validado e incluido en la fórmula maestra del radiofármaco.

La **concentración radiactiva** es determinada dividiendo la actividad del producto al final de la síntesis (EOS: *End of Synthesis*) por el volumen final del producto registrado en mCi/mL o MBq/mL. El volumen puede ser determinado de diferentes maneras, como el masar el vial de producto final antes y después de la síntesis o validando el volumen final de solución entregado por el módulo automatizado de síntesis. La concentración radiactiva debe ser incluida dentro del etiquetado final, así como su rango de uso apropiado.

El **pH** de la solución final normalmente es requerido dentro de un rango, su determinación puede realizarse con varillas de papel pH o con un pHmetro calibrado, si es que se requiere un valor más preciso. En la práctica rutinaria de producción de radiofármacos es más usada la varilla de papel pH, evitando así la contaminación radiactiva del electrodo del pHmetro.

Los **solventes residuales** se encuentran clasificados según su riesgo relativo en un rango desde: Clase 1 (deben ser evitados) hasta Clase 3 (deben ser limitados) [12,13]. Cuando estos son usados en el proceso de síntesis, las cantidades residuales deben ser cuantificadas durante los ensayos de control de calidad, dicha determinación se realiza utilizando la técnica de cromatografía de gases. Cuando se planifican los ensayos de control de calidad, primero se debe determinar si el solvente es realmente un solvente residual o si es parte de la formulación del producto final. Por ejemplo, el etanol es un solvente Clase 3 y uno de los solventes más comunes en la producción de radiofármacos. Sin embargo, si es utilizado en pequeñas cantidades para eluir el producto de un cartucho de separación, entonces debe considerarse como parte de la formulación del producto final. En este caso, debe estimarse la cantidad máxima de etanol presente en el producto final y se debe justificar su uso, el que está estrechamente relacionado con las capacidades del proceso de producción [14].

La **identidad y pureza radioquímica**, son usualmente determinadas por cromatografía de capa fina (TLC: *Thin layer chromatography*) o cromatografía

líquida de alta eficacia (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*). Para radiofármacos bien conocidos y utilizados hace ya mucho tiempo como la [¹⁸F]FDG, es posible utilizar un método de TLC validado y realizado según la farmacopea ^[15]. Sin embargo, para nuevos agentes es necesario utilizar HPLC debido a su mejor capacidad de separación e identificación de picos de impurezas. Debido a su mayor costo es que los sistemas HPLC y columnas cromatográficas son utilizadas para análisis de múltiples radiocompuestos, por ello, estos sistemas deben ser apropiadamente limpiados con métodos adecuados según la naturaleza química de la columna de separación, de modo de prevenir la contaminación cruzada de las muestras.^[14]

Si el radionucleído utilizado para marcar la molécula fue manufacturado *in-house* será necesario realizar una prueba de **identidad y pureza radionucleídica** mediante espectroscopía gamma, utilizando un detector de germanio hiper puro (HPGe). Con este instrumento es posible identificar los radioisótopos presentes en una muestra mediante su emisión energética característica en el intervalo de energías entre 0 a 2250 KeV.^[14,16]

Dentro de las pruebas microbiológicas, se debe realizar una comprobación de la esterilidad del producto final. El proceso de esterilización se realiza utilizando un filtro pirinola de esterilización de 0,22 µm, que debe ser analizado como parte del control de calidad, asegurando que la membrana ha permanecido intacta durante el proceso de filtración. Para ello se realiza una **prueba de integridad de filtro**,

la que frecuentemente es realizada mediante una prueba de punto de burbuja. Para realizar esta prueba el filtro es conectado a una fuente de aire comprimido y por el otro extremo es conectada una aguja cuya punta es sumergida en un vaso con una pequeña cantidad de agua, el operador lentamente incrementa la presión de aire comprimido hasta observar una pequeña corriente de burbujas en el vaso con agua, el nivel de presión en el que la membrana se rompe es registrado como el punto de burbuja. Algunos factores pueden afectar la prueba de punto de burbuja arrojando un resultado incorrecto. Por ejemplo, el etanol posee una tensión superficial inferior al agua o la solución salina 0,9 %, así que altos niveles de etanol en el producto final resultarán en un valor menor de punto de burbuja. En estos casos el filtro debe ser enjuagado con agua antes de realizar la prueba, asegurando que no existan residuos de etanol en el filtro.

Por último, se encuentra la **prueba de endotoxinas bacterianas**. Las endotoxinas son componentes pirogénicos provenientes de la barrera externa de las bacterias gramnegativas. Aunque el producto final se encuentre estéril, puede existir presencia de endotoxinas, por lo que el producto final debe ser analizado antes de su liberación. La máxima cantidad de endotoxinas bacterianas permitida es de 175 unidades de endotoxinas bacterianas por mL (UE/mL). La prueba más común para determinar la presencia de endotoxinas bacterianas es el método cromogénico, el que se basa en el cambio de coloración del *limulus amebocito lisato* (LAL) tras reaccionar con las endotoxinas bacterianas.^[14]

El presente trabajo un método de producción del radiofármaco [^{18}F]PSMA-1007 en la Comisión Chilena de Energía Nuclear y el desarrollo de una propuesta de metodología de análisis fisicoquímicos para asegurar la calidad química del [^{18}F]PSMA-1007, utilizado como un radiotrazador específico para estudios de cáncer de próstata, empleando la tomografía de emisión de positrones.

Hipótesis

Un radiofármaco es un producto medicinal que incorpora específica y selectivamente radionúclidos en el organismo, como un radiotrazador de tumores u otro tipo de enfermedades. El desarrollo de estos compuestos se basa en el entendimiento perfeccionado de la química entre el radionúclido y un *carrier* químico que interactúa con un blanco biológico.

La puesta en marcha del método de producción de [¹⁸F]PSMA-1007 y el desarrollo de una propuesta de metodología analítica para asegurar la calidad del producto farmacéutico, sentará las bases para disponer de un nuevo radiotrazador para la detección de cáncer de próstata.

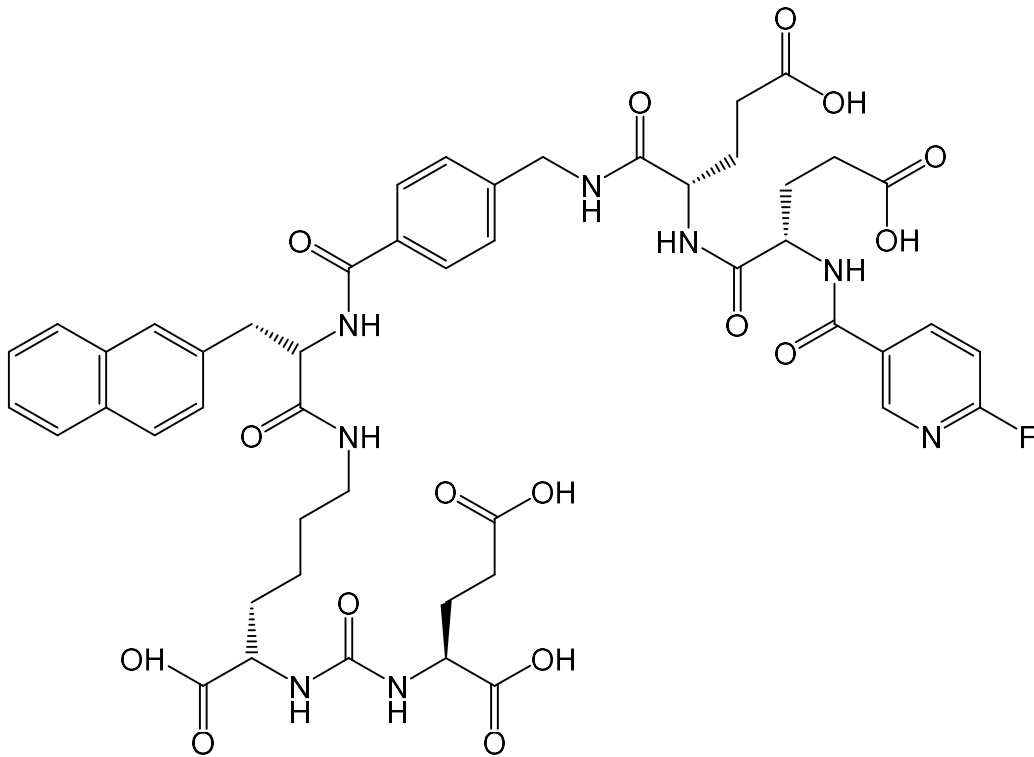
Objetivo general

Preparar el radiofármaco [¹⁸F]PSMA-1007 y evaluar su calidad química, para su aplicación como un radiotrazador PET específico para aplicaciones médicas en estudios de cáncer de próstata.

Objetivos específicos

- 1.- Preparar el radiofármaco [¹⁸F]PSMA-1007 en el módulo de síntesis comercial IBA SYNTHERA.
- 2.-Desarrollar y realizar las pruebas de control de calidad fisicoquímicas necesarias para garantizar la seguridad del [¹⁸F]PSMA-1007 como producto farmacéutico.

Radiofármaco en estudio



[¹⁸F]PSMA-1007

Figura 4. Estructura química del [¹⁸F]PSMA-1007.

Especificaciones fisicoquímicas para el producto terminado

Las especificaciones fisicoquímicas propuestas en la bibliografía [9] para [18F]PSMA-1007 se describen en la tabla 1. Es importante destacar que para el desarrollo de métodos analíticos se consideró un volumen máximo de inyección al paciente (V_{\max}) de 5 mL.

Tabla 1. Especificaciones recomendadas para el control de calidad de [18F]PSMA-1007.

Parámetro	Método	Criterio de Aceptación
Apariencia	Visual	Limpia, incolora y sin material particulado
Identidad	HPLC	$t_R \pm 0,5$ min del estándar de referencia
Pureza radioquímica	HPLC	≥ 95 %
Pureza radionucleídica	Espectroscopía gamma	511 keV $\geq 99,9$ % (post liberación)
	Tiempo de vida media	110 ± 5 minutos
Pureza química	HPLC	PSMA-1007: $\leq 0,1$ mg/ V_{\max} \rightarrow 20 μ g/mL
		Cualquier otra impureza $\leq 0,1$ mg/ V_{\max} \rightarrow 20 μ g/mL Ejemplo de impureza: OH-PSMA
		Suma de todas las impurezas $\leq 0,5$ mg/ V_{\max} \rightarrow 100 μ g/mL
	TLC	TBA $\leq 2,6$ mg/ V_{\max}
		DMSO ≤ 50 mg/ V_{\max}
		EtOH ≤ 10 % V/V
pH	Varilla indicadora	4,5 – 7,5

Materiales y equipos

Compuesto precursor y PSMA-1007

Precursor:

5-(((S)-4-carboxi-1-(((S)-4-carboxi-1-((4-(((S)-1-(((S)-5-carboxi-5-(3-((S)-1,3-dicarboxypropil)ureido)pentil)amino)-3-(naftalen-2-yl)-1-oxopropan-2-yl)carbamoil)benzil)amino)-1-oxobutan-2-yl)amino)-1-oxobutan-2-yl)carbamoil)-N,N,N-trimetillpiridin-2-amonio.

Radiofármaco:

Ácido((S)-1-carboxi-5-((S)-2-(4-(((S)-4-carboxi-2-((S)-4-carboxi-2-(6-fluoronicotinamido)butanamido)butanamido)methyl)benzamido)-3-(naftalen-2-yl)propanamido)pentyl)carbamoil)-L-glutámico.

Materiales y equipos utilizados en la síntesis química de [¹⁸F]PSMA-1007

Equipos y materiales

- Ciclotrón IBA Cyclone 18/18.
- Módulo de Síntesis IBA Synthera V2.
- Cartucho de intercambio de cationes fuertes SCX.
- Cartucho SPE C18ec.

Solventes y reactivos

- Materiales del kit de reactivos
 1. Solución de etanol al 5 %.

2. Solución de Etanol al 25 %.
 3. Solución salina de buffer fosfato.
 4. Ascorbato de sodio.
 5. Etanol para acondicionamiento de cartuchos SPE.
 6. Dimetilsulfóxido.
 7. Solución acuosa de carbonato de tetrabutilamonio (0,075 M) estabilizado con etanol.
 8. Cartucho SEP-PAK Light QMA.
 9. Agua para inyectable.
- Agua enriquecida con ^{18}O 98 %, WO Isotope Co. LTD.

Accesorios

1. Jeringas de 3, 5, 10, 20 y 30 mL.
2. Cánulas estériles.
3. Filtro Millex 25 de 0,2 μm .

Materiales y equipos utilizados en las pruebas de control de calidad fisicoquímicas para [^{18}F]PSMA-1007

Equipos y materiales

1. Cromatógrafo líquido de alta eficacia, HPLC Agilent 1190, el que consta de:
 - a. Bomba cuaternaria con desgasificador.
 - b. Detector de arreglo de diodos, serie 1190.
 - c. Detector de radiación Raytest de cristal de NaI.

- d. Inyector manual con loop de 5µL.
 - e. Columna de separación Phenomenex Kinetex C18, 150 mm x 2,6 µm y 100 Å.
 - f. Software de control Agilent Chemstation for LC 3D Rev. A10.02 [1757].
2. Cromatógrafo de gases, GC Agilent 6890N equipado con autosampler Agilent 7683B y detector de ionización de llama (FID).
- 3.- Detector de germanio de alta pureza (HPGE) Canberra. Software de control Genie 2000 Gamma Acquisition and analysis 3.2.1.
- 4.- Soporte de cromatografía de capa fina Merck TLC sílica gel 60. Fabricado por Merck. Lote: HX301819.

Solventes y reactivos

1. Estándar de referencia de [19F]PSMA-1007. Análogo no radiactivo del radiofármaco [18F]PSMA marcado con ¹⁹F. Fabricado por Advanced Biochemical Compounds (ABX) Alemania. Lote: 2017101. Certificado de análisis:20171101.
2. Estándar de referencia de OH-PSMA. Fabricado por Advanced Biochemical Compounds (ABX), Alemania. Lote: 20180101. Certificado de Análisis: 20180101.
3. Ácido trifluoroacético para HPLC ≥ 99.0 % Fabricado por Sigma-Aldrich, Francia. Lote N° SHBJ2433. Certificado de análisis: SHBJ2433.
4. Agua ultrapura tipo I, apta para análisis en HPLC.

5. Acetonitrilo Lichrosolv. Fabricado por Merck. Lote: L1013830919.
6. Etanol absoluto para análisis. Fabricado por Merck. Lote: K50552383837.
7. Dimetilsulfoxido para cromatografía de gases. Fabricado por Merck.
Lote: K48040378804.
8. Metiletilcetona para análisis. Fabricado por Merck. Lote: K48941408748.
9. Iodo resublimado para análisis. Fabricado por Merck. Lote: B1649861907.
10. Hidróxido de tetrabutilamonio 30 hidratado. Fabricado por Merck.
Lote: BCBX5142.
11. Cinta papel pH Merck en el rango de 5,0 a 10,0.

Metodología

1. Síntesis semiautomatizada de [^{18}F]PSMA-1007

El proceso de producción de [^{18}F]PSMA-1007, se puede resumir en las siguientes etapas:

1.1 Obtención de ^{18}F : el radioisótopo ^{18}F es el emisor de positrones más utilizado en la producción de radiofármacos PET debido a sus favorables propiedades de decaimiento nuclear. El ^{18}F tiene un periodo de semidesintegración de 109 minutos, un 96.9 % de su decaimiento corresponde a una emisión β^+ y solo un 3,1 % es a causa de captura electrónica (EC). La energía máxima del positrón emitido es de $E_{\text{max}}= 634 \text{ KeV}$, y su energía media $E_{\text{media}}=250 \text{ KeV}$, estas energías corresponden a un rango máximo en agua de $R_{\text{max}} 2,4 \text{ mm}$ y un rango medio de $R_{\text{medio}}= 0,6 \text{ mm}$. La figura 5 muestra el esquema de decaimiento del ^{18}F .

Estas características le otorgan al ^{18}F las siguientes ventajas:

- Posee un conveniente tiempo de semidesintegración, otorgándole pocas limitaciones de tiempo de síntesis y permitiendo protocolos de adquisición de imágenes más largos.
- Cuenta con una alta producción de β^+ , lo que promueve una mayor tasa de producción de positrones, incrementando la sensibilidad de las imágenes.

- Tiene una baja energía de positrones de 649 KeV, por lo que proporciona imágenes PET de alta resolución.

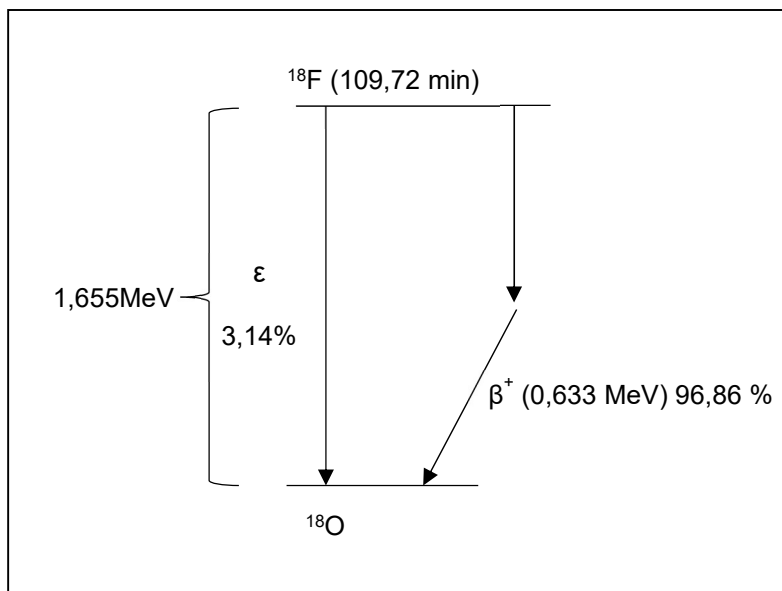
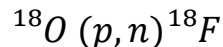


Figura 5. Esquema de decaimiento del ^{18}F .

El ^{18}F utilizado en la producción de radiofármacos PET, habitualmente es unido a la molécula *carrier* mediante una reacción de sustitución nucleofílica, para ello es necesario que el ^{18}F utilizado se encuentre como un anión fluoruro, $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Este anión es monovalente y forma un enlace covalente y estable con el carbono, además la introducción de un átomo de flúor dentro de una molécula incrementa su lipofilidad modificando su perfil de biodistribución ^[17]

La ruta de producción de $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ utilizada en este trabajo fue realizada en el acelerador de partículas tipo ciclotrón de 18 MeV IBA Cyclone 18/18, mediante la irradiación por una hora de un blanco líquido de 2225 μL de H_2^{18}O .

Esta reacción nuclear se define a continuación:



Para este trabajo se produjeron actividades de 1484 hasta 1862 mCi de ^{18}F , el que es transferido al módulo de síntesis IBA Synthera V2, donde se realiza el proceso de síntesis química de [^{18}F]PSMA-1007.

1.2 Síntesis química automatizada de [^{18}F]PSMA-1007: el proceso de síntesis química es realizado en un módulo de síntesis automatizado del fabricante Ion Beam Application (IBA) modelo Synthera V2. Este proceso automatizado se lleva a cabo con un *cassette* de síntesis, comercialmente llamado IFP (*Integrated Fluidic Processor*), el que consiste en una serie de válvulas y capilares plásticos que realizan los movimientos de fluidos, calentamiento, enfriamiento y purificaciones necesarias para la síntesis de [^{18}F]PSMA.

La síntesis química se puede describir en las siguientes etapas:

1.2.1 Preprocesamiento del ^{18}F : el [^{18}F]F⁻ enviado desde el ciclotrón se encuentra en solución acuosa, por lo que es fuertemente hidratado debido a su alta densidad de carga y es fácilmente protonable. En estas condiciones, el radioisótopo no es apropiado para participar en una reacción de sustitución nucleofílica, hasta que se haya eliminado el agua de su entorno. Para resolver esta situación, la solución obtenida en el ciclotrón es cargada en un cartucho de intercambio aniónico fuerte, como el cartucho SEP-PAK Light QMA para atrapar

el anión $^{18}\text{F}^-$. Luego, este es eluido utilizando una base débil no nucleofílica, de modo de evitar una competencia en la reacción de sustitución. En este caso se utiliza como base débil carbonato de tetrabutilamonio, que luego es enviado al vaso de reacción del módulo de síntesis. Luego de la elución, el complejo es secado repetidamente mediante destilaciones azeotrópicas consecutivas, de modo de remover cualquier traza de agua, durante esta etapa la base débil utilizada (CO_3^{2-}) previene la pérdida de ^{18}F en su forma volátil $^{18}\text{F}]\text{HF}$. Este proceso da como resultado un $^{18}\text{F}^-$ altamente nucleofílico, debido a la formación de pares iónicos débiles entre el $^{18}\text{F}^-$ y el tetrabutilamonio, formando el complejo de $^{18}\text{F}]\text{TBAF}$, que se encuentra seco y que luego es disuelto con un solvente polar aprótico, como el dimetilsulfóxido (DMSO) en el que viene también disuelto el reactivo precursor.

1.2.2 Reacción de radiomarcación: luego de acondicionar apropiadamente el $^{18}\text{F}^-$ para una reacción de sustitución nucleofílica, se agrega al vaso de reacción 1 mg de precursor descrito en el esquema de síntesis de la figura 6, el que se encuentra disuelto en 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), donde ocurre la reacción de sustitución nucleofílica. El vaso de reacción se encuentra herméticamente sellado y la reacción ocurre por 10 minutos a una temperatura de 85 °C. El producto de esta reacción es llamado mixtura cruda. La figura 6 muestra un resumen de la reacción de radiomarcación.

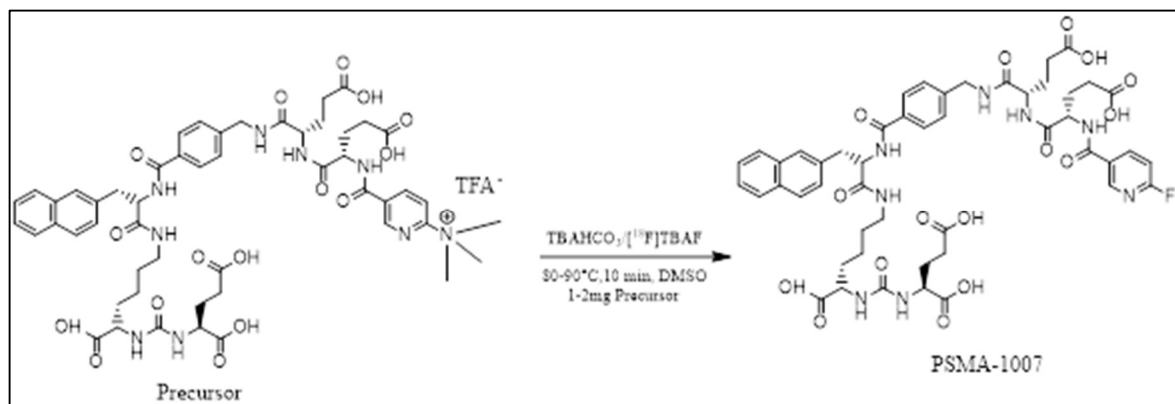


Figura 6. Esquema de síntesis resumido de [¹⁸F]PSMA-1007 en módulo de síntesis IBA Synthera V2.

La radiomarcación descrita en la figura 6 corresponde a una reacción de sustitución nucleofílica con ¹⁸F de un heteroareno, formando una [¹⁸F]fluoropiridina^[8]. En este tipo de reacciones, las posiciones 2 y 4 de la piridina se encuentran altamente activadas, favoreciendo las reacciones de intercambio nucleofílico que utilizan grupos salientes como I, Br, Cl, F, NO₂, o en este caso +NMe₃. Las condiciones de radiomarcación para las 2-[¹⁸F]piridinas son similares a las de las sustituciones nucleofílicas aromáticas (S_NAr) utilizadas en homoarenos, como el uso de altas temperaturas de radiomarcación (>80°C) por lo que se usan solventes con alto punto de ebullición como dimetilformamida (DMF) o en este caso DMSO (punto de ebullición: 189°C) ^[17].

La figura 7 muestra el mecanismo de sustitución nucleofílica descrito previamente.

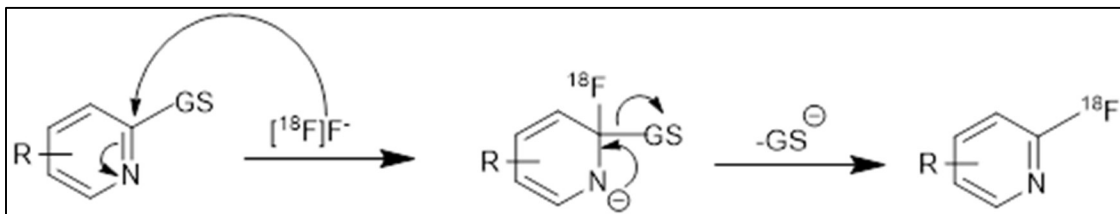


Figura 7. Mecanismo de reacción de sustitución nucleofílica heteroaromática que describe la radiomarcación de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ (GS: grupo saliente).

1.2.3 Purificación vía extracción en fase sólida (SPE): luego de la reacción de fluorinación, la mixtura cruda es arrastrada desde el vial reactor con 4 mL de una solución de etanol al 5 % donde es cargada en un cartucho SPE de C18ec, donde se retienen los compuestos lipofílicos y el resto es conducido a un vial destinado a los desechos de reacción. El cartucho C18ec es lavado 4 veces con un volumen de 5mL de etanol al 5 % y luego con un lavado adicional con 1 mL de etanol al 25 % que elimina del cartucho las impurezas lipofílicas de la mixtura cruda que no fueron arrastradas en el primer lavado. Finalmente se realiza una elución final del $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ retenido en el cartucho C18ec con 5 mL de etanol al 25 %. Esta solución es una vez más purificada a través de un cartucho SCX (*Strong Cation Exchange*, Intercambio de cationes fuertes), donde son retenidos los contaminantes polares que pudieron haber quedado luego del proceso de purificación en C18Ec. Finalmente, la solución es esterilizada mediante una filtración en un filtro Millex-Cathivex GV 0,22 μm que previamente contenía 15 mL de buffer fosfato salino estéril.^[9]

2. Análisis fisicoquímicos de control de calidad de [¹⁸F]PSMA-1007

2.1 Análisis de identidad, pureza radioquímica y pureza química

Las técnicas analíticas utilizadas para realizar las pruebas de identidad, pureza radioquímica y pureza química se describen a continuación:

2.1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): la HPLC de fase inversa consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. La cromatografía de fase inversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional y se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar [18].

En este trabajo se utilizó la técnica de HPLC para estudiar la composición de la solución de [¹⁸F]PSMA-1007 en los ensayos de identidad, pureza química y pureza radioquímica. Dado que el límite establecido en la tabla 1 para OH-PSMA y [¹⁸F]PSMA-1007 es de 20 µg/mL para un V_{max} de 5 mL, se confeccionó una metodología de análisis utilizando una solución estándar de OH-PSMA y [¹⁹F]PSMA-1007 en el rango de concentración desde 5 a 40 µg/mL. El sistema HPLC utilizado cuenta con 2 detectores, el primero es un detector UV de arreglo de diodos (DAD, *diode array detector*), que permite hacer un barrido de longitudes de onda de cada pico cromatográfico y un detector de radiaciones gamma de cristal de yoduro de sodio que se encuentra conectado en serie luego del detector

DAD. Este último es utilizado para realizar mediciones radiométricas cuando el analito cuenta con propiedades radiactivas.

Las condiciones cromatográficas para el método desarrollado se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de condiciones cromatográficas para HPLC.

Parámetro cromatográfico	Condición utilizada
Columna de separación	Phenomenex Kinetex C18 150 mm x 2,6 μm y 100 \AA
Detección	Detección en serie de absorción UV en 230 nm y 254 nm. Detección radiométrica de rayos gama en el caso de moléculas radiomarcadas.
Flujo	1,0 mL/minuto
Fase móvil	Acetonitrilo: Agua 35:65. Ambas fases contienen ácido trifluoroacético al 0,1 %. Este método posee un gradiente de lavado que no se registra en el informe cromatográfico: Desde el minuto 4,5 hasta 6,5 aumenta la concentración de acetonitrilo hasta 100 %, la que se mantiene hasta el minuto 7,5. Luego vuelve a 35 % en 2 minutos, resultando un tiempo total de análisis cromatográfico de 9,5 minutos
Volumen de inyección	5 μL

Para la determinación individual de las impurezas cuyo límite permitido es 20 $\mu\text{g/mL}$ y la sumatoria de estas limitada a 100 $\mu\text{g/mL}$ (resumido en la tabla 1), se asume que estas impurezas tienen el mismo coeficiente de extinción molar (ϵ_0)

del estándar de referencia de PSMA-1007^[9], salvo el caso del OH-PSMA del que se cuenta con un estándar de referencia.

2.1.2 Cromatografía de gases (GC): la cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza en una columna cromatográfica de separación, habitualmente de tipo capilar. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte que no interacciona con la muestra ni con la fase estacionaria de la columna; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Esta técnica es una herramienta de separación eficaz para analitos volátiles como solventes utilizados en diferentes procesos de síntesis. En combinación con un detector de ionización en llama (FID: *Flame Ionization Detector*) los métodos de medición tienen suficiente sensibilidad para cuantificar sustancias volátiles en el orden de concentración de los $\mu\text{g/mL}$ ^[19].

En un equipo de cromatografía de gases se implementó un método de cuantificación para los solventes residuales asociados al proceso de producción de los radiofármacos $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{NaTcO}_4]$, ^{18}F FDG y ^{18}F PSMA-1007. Para ello el desarrollo de método considero los siguientes solventes:

Etanol: para el método de producción de ^{18}F FDG este solvente es utilizado para la ambientación del cartucho de purificación C18ec, previo a las etapas de purificación. Es considerado un solvente con bajo potencial tóxico Clase 3^[12,13], por lo que la cantidad presente en el volumen inyectable debe ser limitada a 50

mg por día. Sin embargo, en el caso del [^{18}F]PSMA-1007 este solvente es utilizado para eluir el [^{18}F]PSMA-1007 del cartucho de purificación, por lo tanto, es considerado como parte de la formulación y en este caso particular su concentración no debe exceder el 10 % del volumen del producto final ^[14].

Dimetilsulfóxido (DMSO): este solvente es utilizado como solvente del precursor de [^{18}F]PSMA-1007. En este medio polar aprótico ocurre la reacción de sustitución nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{ar}$) a una temperatura de 80 °C a 90 °C, la que da lugar a la mixtura cruda que luego es purificada para obtener el producto. La bibliografía califica al dimetilsulfóxido como un solvente con bajo potencial tóxico Clase 3 ^[12,13]. Por ello la cantidad de DMSO en el volumen inyectable máximo al paciente (5 mL) debe ser limitada a 50mg.

Acetonitrilo (ACN): para el método de producción de [^{18}F]FDG este solvente es utilizado para solubilizar el precursor manosa triflato y como parte de la solución eluyente que contiene Cryptand 2.2.2 (Kriptofix). El acetonitrilo es considerado un solvente Clase 2, por ello la cantidad de acetonitrilo presente el volumen inyectable máximo al paciente (5 mL) debe ser limitada a un máximo de 4,1 mg ^[12,13].

Metiletilcetona (MEC): este solvente es utilizado como solvente extractante durante el proceso de separación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ desde la solución de ^{99}Mo y luego es evaporada a 80 °C. La metiletilcetona es considerada un solvente de bajo potencial tóxico Clase 3 y su cantidad en el volumen máximo inyectable debe ser limitada a un máximo de 50 mg ^[12,13].

La tabla 3 muestra la concentración máxima permitida de solventes para cada radiofármaco según su volumen de inyección máximo estimado, mientras que la tabla 4 resume las condiciones del cromatógrafo de gases para el método de análisis de solventes residuales desarrollado.

Tabla 3. Resumen de concentraciones máximas de solvente por radiofármaco.

Radiofármaco	V _{máx} (mL)	[Etanol] máxima permitida (%)	[DMSO] máxima permitida (%)	[ACN] máxima permitida [%]	[MEC] máxima permitida [%]
[¹⁸ F]FDG	10	0,5	N/A	0,041	N/A
[¹⁸ F]PSMA-1007	5	10	1,0	N/A	N/A
[^{99m} Tc]NaTcO ₄	10	N/A	N/A	N/A	0,5

Tabla 4. Resumen de condiciones cromatográficas para la determinación de solventes residuales.

Parámetro cromatográfico	Condición utilizada
Columna de separación	ZB-Wax Plus 30 m x 0,53 mm x 1,0 µm
Volumen de Inyección	10,0 µL
Condiciones de inyección	Temperatura de inyección: 200 °C; Modo Split 4:1
Flujo	10,8 mL/minuto (variable según temperatura) Modo presión constante a 7psi
Gradiente de temperatura	Rampla de temperatura desde 40 °C hasta 240 °C a una tasa de calentamiento de 40 °C/minuto.
Detector FID	Temperatura terminal de 250 °C, flujo de H ₂ a 40 mL/min, flujo de aire 450 mL/min

2.1.3 Prueba de análisis de gota o *Spot-Test*: el análisis de gota o *Spot-test* es una prueba química que se destaca por ser una técnica simple y eficiente, donde los ensayos son ejecutados con una o unas pocas gotas de un analito o solución química en un soporte como papel filtro o una placa para cromatografía de capa fina. Con esta técnica es posible estimar el rango de concentración de un analito sin necesidad de utilizar instrumentación sofisticada. Esta prueba es utilizada para realizar la cuantificación del tetrabutilamonio empleado como catalizador de transferencia de fase en la síntesis de [¹⁸F]PSMA-1007. Dado que la cantidad límite de TBA residual descrito en la Farmacopea Europea ^[20] es de 2,6 mg/V_{max}, donde V_{max} es el volumen máximo de inyección al paciente, definido en este trabajo como 5 mL, entonces se considera 520 µg/mL como la concentración máxima permitida de TBA residual en la solución de [¹⁸F]PSMA-1007.

Para realizar esta prueba se depositó una gota de 2 µL de solución (estándar o analito según sea el caso) sobre una placa soporte de sílica gel 60 de dimensiones 8 x 3 cm. Luego de depositar la gota, la placa fue insertada en un recipiente de vidrio aislado de la luz que contenía 18 g de yodo resublimado. La placa es depositada en un soporte que impide el contacto directo con los cristales y el recipiente es cerrado herméticamente por exactamente 3 minutos. El vapor de yodo reacciona con las moléculas de analito, formando un complejo coloreado que tiñe la gota proporcionalmente a la concentración de analito.

2.2 Análisis de pureza radionucleídica

2.2.1 Análisis por espectrometría gamma: la pureza radionucleídica de una preparación radiofarmacéutica se refiere a la proporción de radioactividad debida al radionucleido deseado, con respecto a la radioactividad total medida. Este atributo es importante para la estimación de la dosis de radiación recibida por el paciente cuando se le administra la preparación. Las impurezas radionucleídicas pueden surgir de impurezas en los materiales originales, diferencias en los valores de diferentes secciones cruzadas de producción y funciones de excitación a la energía o energías de las partículas bombardeantes durante la producción [16]. Para cuantificar la pureza radionucleídica de la solución de [¹⁸F]PSMA-1007 se utilizó la espectrometría gamma, de manera de obtener el espectro de las radiaciones gamma emitidas por los radionucleidos en la solución, para ello se utilizó un detector semiconductor de germanio de alta pureza (HPGe) el que provee de una mayor resolución que los clásicos detectores de NaI o de gas, utilizados para este mismo propósito. Este detector semiconductor funciona bajo el principio de que la radiación penetrante crea un par electrón-hueco, de manera que los electrones fluyen en una dirección y las vacantes a otra. El número final de electrones recogidos puede crear un pulso electrónico cuya amplitud es proporcional a la energía de la radiación.

Para determinar la pureza radionucleídica se tomó una alícuota de volumen equivalente a un máximo de 1 µCi de [¹⁸F]PSMA-1007 recién sintetizado y se realizó un análisis de barrido en el intervalo de medidas desde 0 a 2250 KeV. El

pico de energía esperado para ^{18}F es de 511KeV correspondiente a la energía del rayo gamma proveniente del fenómeno de aniquilación positrónica.

2.2.2 Determinación del tiempo de semidesintegración: Debido a que la energía de 511 KeV es un valor característico de la aniquilación positrónica, es necesario confirmar la identidad del radioisótopo ^{18}F presente en el radiofármaco, realizando una prueba de medición del tiempo de semidesintegración. Así, con un periodo de semidesintegración de alrededor de 109 minutos y una energía de emisión de 511 KeV, es posible identificar inequívocamente el radioisótopo ^{18}F . Para determinar el periodo de semidesintegración se tomó una alícuota de 300 a 600 μL de muestra y se midió en un calibrador de dosis por 10 minutos con intervalos de registro cada 2 minutos. Se obtuvo el valor del logaritmo natural, en base a los datos de actividad registrados y se ajustaron a un modelo lineal tipo $y = mx + b$, obteniendo una curva de la forma:

$$\text{Ln}(A) = \text{Ln}(A_0) - \lambda(t) \quad (\text{Ecuación 1})$$

La pendiente de la curva obtenida del ajuste lineal (λ) es su constante de decaimiento radiactivo. Con este valor y la ecuación 2 se obtuvo el valor de período de semidesintegración del radiofármaco.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\text{Ln}(2)}{\lambda} \quad (\text{Ecuación 2})$$

2.3 Determinación de pH

Para el caso del [^{18}F]PSMA-1007 el pH de la solución final debe encontrarse entre 4,5 y 7,5. Para realizar su medición se utilizaron varillas indicadoras de pH en el intervalo 0 -14 para una medición en rango completo y luego para una medición acotada se utilizaron varillas indicadoras en el intervalo 5,0 – 10,0.

Resultados y discusión

1. Producción de [^{18}F]PSMA-1007

Durante el proceso de implementación de la metodología de producción de [^{18}F]PSMA-1007 en el módulo semiautomatizado IBA-Synthera V2, se llevaron a cabo 5 procesos de síntesis completos con una cantidad de ^{18}F inicial en el rango de 986 a 1862 mCi. La figura 8 muestra el gráfico de seguimiento presentado por el *software* del módulo de síntesis. En color rojo se muestra el seguimiento de la temperatura del vaso de reacción en grados Celsius, en color azul se realiza el seguimiento de la presión en KPa y en color verde la actividad registrada por el detector de radiación incorporado en el módulo automatizado, que se encuentra frente al vaso de reacción.

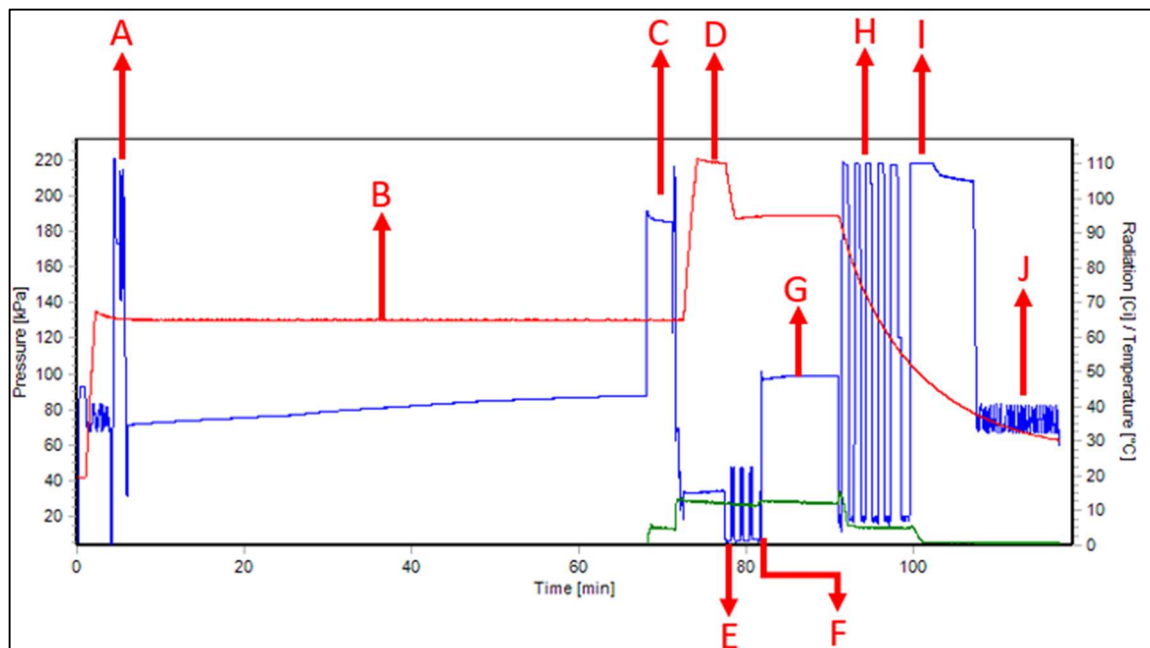


Figura 8. Gráfico de seguimiento de la síntesis de [^{18}F]PSMA-1007.

A continuación, se resumen las fases del proceso de síntesis, estas han sido identificadas en el gráfico de seguimiento de la figura 8:

- A. Test de IFP: cada vez que se realiza una síntesis en el módulo IBA Synthera V2, se utiliza un nuevo cassette de síntesis o IFP, por lo que debe ser chequeado su correcto funcionamiento, descartando fugas de gases o algún otro contratiempo. En esta etapa también el propio módulo verifica el correcto funcionamiento de sus electroválvulas y del suministro de gases.
- B. Tiempo de espera de transferencia de ^{18}F desde el ciclotrón hasta el módulo de síntesis: se trata del registro del tiempo que toma la irradiación y posterior transferencia del H_2^{18}O irradiada. En un proceso de producción de rutina, la irradiación y la preparación de reactivos se realiza de forma paralela, disminuyendo este intervalo de tiempo a menos de 3 minutos.
- C. Acumulación de ^{18}F en resina de amonio cuaternario QMA: se trata del inicio del preprocesamiento de ^{18}F , el radioisótopo disuelto en agua es cargado en la resina de amonio cuaternario preconcentrándolo. Luego el radioisótopo es eluído de la resina hasta el reactor.
- D. Etapa de secado de TBA y formación de complejo $[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$: una vez el radioisótopo se encuentra en el vaso de reacción, es llevado a sequedad a unos $110\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos, dejando el complejo $[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$ totalmente seco en el fondo del reactor.

- E. Purga del reactor: durante la etapa previa de secado se volatilizan sustancias que podrían interferir en la etapa de fluorinación, por ello se realizan varias purgas con gas N₂ ultrapuro, con el fin de eliminar dichos interferentes.
- F. Precursor enviado al reactor: una vez que el [¹⁸F]F⁻ se encuentra en las condiciones nucleofílicas adecuadas, se envía 1 mg de precursor disuelto en 1,5 mL de dimetilsulfóxido al vaso de reacción.
- G. Etapas de fluorinación: inicia la reacción de marcación (S_{ar}), el vaso de reacción es calentado a 85 °C por 10 minutos, tras esta etapa es producida la mixtura cruda.
- H. Transferencia de la mixtura cruda al cartucho C18: La solución que se encuentra en el reactor es arrastrada al cartucho C18 con 4 mL de etanol al 5 %, cargando el cartucho con el [¹⁸F]PSMA-1007 sintetizado y sus impurezas. Después el cartucho es lavado cuatro veces con un volumen de 5 mL de etanol al 5 % y luego con un lavado adicional con 1 mL de etanol al 25 %, que elimina del cartucho las impurezas lipofílicas de la mixtura cruda que no fueron arrastradas en el primer lavado. Durante este último lavado se pierde una pequeña fracción de [¹⁸F]PSMA, privilegiando la obtención de un producto con mayor pureza.
- I. Elución final: en esta etapa la radiomolécula es eluída del cartucho C18 con 5 mL de etanol al 25 %, este volumen es pasado a través de un cartucho de intercambio aniónico, encargado de retener el [¹⁸F]F⁻ residual,

y otras potenciales impurezas de naturaleza aniónica, luego de esta última purificación, la solución es esterilizada utilizando un filtro de esterilización de 0,22 μm , para luego ser recibida en el vial final, el que contiene 15 mL de solución de buffer fosfato salino estéril (PBS).

- J. Fin de la síntesis: se obtiene un registro de la presión tras finalizar el proceso de síntesis. La media del tiempo de producción obtenido es de 38 minutos.

La tabla 5 muestra un resumen de las experiencias realizadas. En dicha tabla, la actividad corregida corresponde a la actividad final de radiofármaco obtenido y corregida por el tiempo de síntesis utilizando la ley de decaimiento radiactivo, mientras que el rendimiento no corregido por decaimiento es calculado con la actividad final sin corregir. Finalmente, el rendimiento de síntesis corregido fue calculado utilizando la actividad corregida. En las experiencias realizadas, el rendimiento corregido por decaimiento varió desde un 37,2 % hasta un 74 %. En el caso de la experiencia 3, con un rendimiento de solo 37,2 %, se observó en el gráfico de seguimiento una pérdida de presión del vaso de reacción durante la etapa de fluorinación, dicha pérdida puede deberse a un mal sello del vaso de reacción o a sus conectores, permitiendo la fuga de $^{18}\text{F}^-$. Una fuga de este tipo también puede afectar la etapa de preprocesamiento del $^{18}\text{F}^-$, afectando la eficiencia del proceso de secado y formación del complejo $^{18}\text{F}]\text{TBAF}$, disminuyendo la disponibilidad del radioisótopo para la radiomarcación.

Tabla 5. Cuadro resumen de las síntesis realizadas.

Prueba	Actividad de inicio (mCi)	Actividad al final de la síntesis (mCi)	Tiempo de síntesis desde inicio del test de IFP (min)	Actividad corregida (mCi)	Rendimiento de síntesis no corregido por decaimiento (%)	Rendimiento de síntesis corregido por decaimiento (%)
1	1862	783	46	1048	42,1	56,3
2	1513	873	33	1075	57,7	71
3	986,5	300	32	367,6	30,4	37,2
4	1490	753,7	42	983,2	51	66
5	1484	853,2	39	1098	57	74

Durante el desarrollo de este trabajo se incorporó el uso de ascorbato de sodio en la formulación final, agregando al kit de reactivos un vial con 400 mg de ascorbato de sodio, los que deben ser disueltos en agua y agregados al vial de recepción final, sumando a la formulación una concentración aproximada de 20 mg/mL de ascorbato de sodio. Este componente cumple con el rol de antioxidante, mitigando el efecto de radiólisis que produce la emisión gamma del radioisótopo. Según Cardinale Jens y col, este efecto es relevante para procesos de síntesis con actividad final superior a 540 mCi (27 mCi/mL)^[9].

1.1 Dificultades de la implementación del método de producción del [¹⁸F]PSMA-1007 en el módulo IBA Synthera V2: el sistema de producción con módulos requiere de gas N₂ para realizar el movimiento de líquidos dentro del IFP, transfiriendo los reactivos hacia el reactor o desde este, hasta los cartuchos de purificación y al vial final. El rango de operación recomendado de esta válvula se

debe encontrar entre 205-220 kPa. Durante el desarrollo de las actividades de implementación de la síntesis semiautomatizada, el módulo de síntesis presentó fallas en la válvula interna de suministro de gas N₂. Esta falla implicó que la etapa de “Transferencia de la mezcla cruda al cartucho C18”, se realizara en condiciones de sobrepresión, provocando el derrame de la solución y, en consecuencia, la falla del proceso de producción. Para solucionar este problema sin contar con la asistencia técnica del fabricante, tomando como referencia las recomendaciones del manual de usuario del módulo ^[21], se implementó un proceso de recalibración *in-house*, que permitió corregir esta falla, pudiendo realizar la síntesis de [¹⁸F]PSMA-1007 bajo el rango de presión recomendado. Sin embargo, esta solución es temporal y no corrige la causa raíz de esta falla, la que necesariamente debe ser resuelta por el servicio técnico del fabricante, el que no podía hacer ingreso al país debido a las restricciones a causa de la pandemia de COVID-19. Hasta que esto ocurra, esta recalibración debe ser realizada previamente al proceso de síntesis. A continuación, se indican los pasos del proceso de recalibración de la válvula interna de suministro de gas;

- A. Instalar el *cassette* de síntesis, IFP.
- B. Utilizando el *software* de control del módulo, fijar la presión en 300 kPa
- C. Abrir la válvula 16 con el *software* de control.
- D. Abrir el suministro de gas inerte y aumentar gradualmente la presión con el regulador externo hasta que la lectura de la presión se sitúe en el rango de 205 a 220 kPa.

E. Cerrar válvula 16 con el *software* de control.

Adicionalmente, ocurrió una falla relacionada con el control de la presión de gas dentro del reactor, cuyos valores se encontraban por sobre el rango de operación recomendado de 25-35 kPa. Esta falla implicaba que la “Etapa de secado de TBA y formación de complejo [¹⁸F]TBAF” y “Purga del reactor” no se realizaban de manera correcta, lo que se traduce en bajos rendimientos de radiomarcación. Debido a las mismas dificultades de asistencia técnica descritas en el párrafo anterior, se implementó un proceso de recalibración *in-house*, que permitió corregir esta falla temporalmente. A continuación, se muestran los pasos del proceso de recalibración del control de la presión del gas dentro del reactor:

A. Instalar el IFP.

B. Utilizando programa de control del PC fijar la presión en 0 kPa.

C. Abrir a válvula 16 del módulo de síntesis con el *software* de control.

D. Encender la bomba con el *software* de control.

E. Ajustar la válvula de aguja situada en la cubierta posterior para alcanzar una presión de 25-35 kPa.

F. Con el *software* de control cerrar V16 y apagar la bomba

De la misma forma que en la falla de la válvula interna de suministro gas N₂, este proceso de recalibración es una solución temporal que debe realizarse previo a un proceso de producción hasta que sea solucionada de forma definitiva por el servicio técnico del fabricante.

2. Control de calidad fisicoquímico de [¹⁸F]PSMA-1007

La solución de [¹⁸F]PSMA-1007 fue analizada utilizando las técnicas descritas en la columna “Método” de la tabla 1 y según las técnicas descritas en la sección “Metodología”.

2.1 Apariencia: la figura 9 muestra que la solución obtenida es limpia, transparente y sin partículas visibles.



Figura 9 . Fotografía de la solución de [¹⁸F]PSMA-1007.

2.2 Identidad: para confirmar la identidad de [¹⁸F]-PSMA-1007 sintetizado se utilizó el método con cromatografía líquida descrito previamente y se comparó su tiempo de retención con el de un estándar no radiactivo de [¹⁹F]PSMA-1007. La figura 9A corresponde al cromatograma obtenido en el detector radiométrico, mientras que la figura 9B muestra el cromatograma obtenido en el detector de arreglo de diodos al medir el radiofármaco producido. Por último, la figura 9C corresponde al cromatograma de una solución estándar a una concentración de 20 µg/mL de OH-PSMA y [¹⁹F]PSMA-1007.

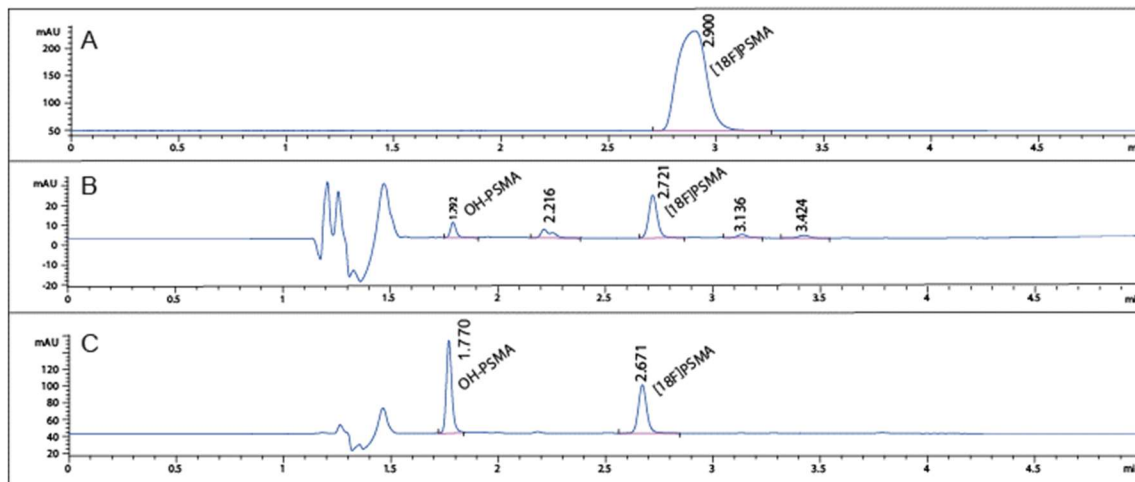


Figura 10. Comparación entre los cromatogramas obtenidos para el producto sintetizado $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ y el estándar de OH-PSMA y $[^{19}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ a una concentración de $20\ \mu\text{g/mL}$.

La coincidencia del tiempo de retención del estándar de referencia del cromatograma de la figura 9C con el radiofármaco producido en el cromatograma de la figura 9A y 9B en aproximadamente 2,7 minutos, permite identificar al producto radiactivo como $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$. La diferencia de tiempo entre la señal de 2,721 de la figura 9B y 2,9 minutos en la figura 9A (0,179 minutos) corresponde al tiempo que toma el analito para viajar entre el detector de arreglo de diodos al detector radiométrico.

2.3 Pureza radioquímica: corresponde a la proporción de actividad presente en la forma química deseada. En la figura 9A es posible observar que existe un único pico en el detector radiométrico en el tiempo de retención asociado al $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$. Con este resultado es posible asegurar que el radioisótopo presente en la muestra se encuentra exclusivamente asociado a la molécula de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA}$

2.4 Pureza química vía HPLC: la concentración en masa de [^{18}F]PSMA, así como sus impurezas de síntesis fueron medidas utilizando el método de cromatografía líquida, descrito en el apartado “Metodología”. Dicho método posee un tiempo de análisis de 5 minutos más una etapa de lavado de 5 minutos, tomando en total 10 minutos por cada medición, este tiempo es sensiblemente inferior al descrito en la bibliografía ^[9], que tarda alrededor de 30 minutos. Dicha mejora se logró utilizando una columna de la misma composición química (C18), pero con un tamaño de partículas de 2,6 μm en comparación a la originalmente usada de 5 μm . Con este cambio fue posible utilizar una columna de 150 mm de largo en lugar de 250 mm, sin afectar notoriamente la eficiencia del método. Adicionalmente, se reemplazó el gradiente de fase móvil utilizado en la bibliografía ^[9] y se implementó una etapa isocrática de 35 % de acetonitrilo y 65 % de ácido trifluoroacético al 0,1 % durante el tiempo de análisis, seguido de un gradiente de lavado de columna posterior al análisis.

En el mismo método descrito por Cardinale Jens y cols. ^[9], se utiliza 254 nm como longitud de onda de detección. Sin embargo, utilizando el detector de arreglo de diodos, es posible obtener el espectro UV-Visible de los picos correspondientes a los analitos OH-PSMA y [^{19}F]PSMA. La figura 11 muestra que ambos compuestos tienen un máximo de absorción en 190 nm, seguido de uno de similar intensidad en 230 nm y que no se observa una señal relevante en la zona de 254 nm.

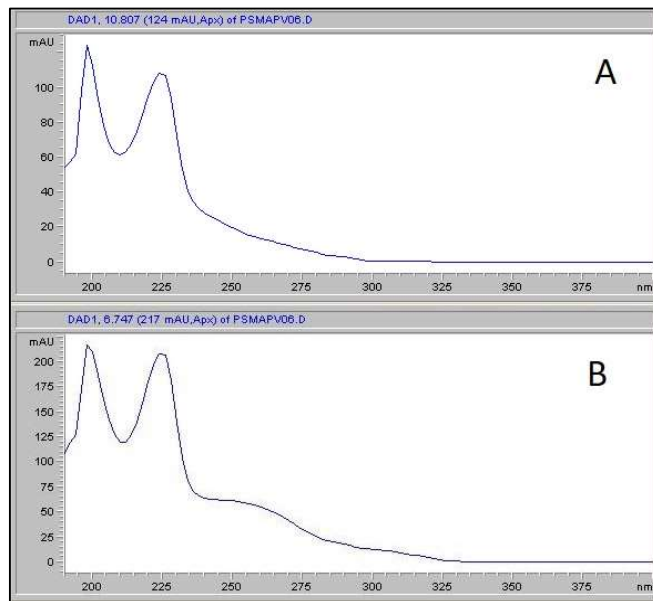


Figura 11. Espectro UV-Visible de $[^{19}\text{F}]\text{PSMA}$ (A) y OH-PSMA (B).

Considerando la diferencia en la longitud de onda de detección del método utilizado en este trabajo, se confeccionaron 4 curvas de calibración correspondientes a OH-PSMA y $[^{19}\text{F}]\text{PSMA}$ en las longitudes de onda de 230 nm y 254 nm. Las curvas fueron confeccionadas con 6 medidas por punto, el rango utilizado fue escogido considerando la concentración de rechazo de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para un volumen máximo de inyección al paciente de 5 mL. Dicha concentración se encuentra al centro de la curva de modo de disminuir el error residual de su ajuste lineal. La figura 12 muestra el ajuste lineal obtenido para cada curva de calibración.

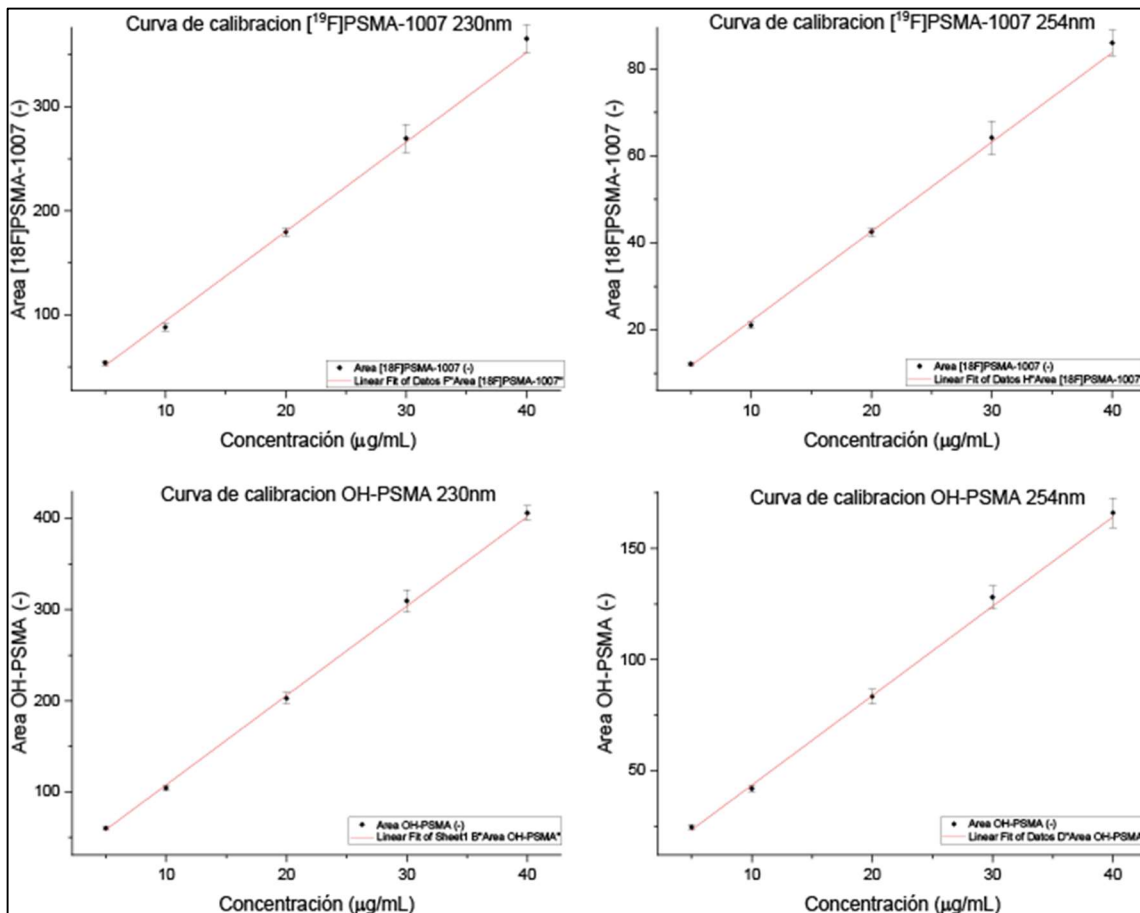


Figura 12. Curvas de calibración de [¹⁹F]PSMA y OH-PSMA en las longitudes de 230 nm y 254 nm.

La tabla 6 muestra los parámetros analíticos obtenidos a partir de estas curvas de calibración, donde se destaca que en el caso de [¹⁹F]PSMA-1007, el cambio de longitud de onda de detección de 254 nm a 230 nm cuadruplica su sensibilidad, mientras que en caso del OH-PSMA duplica su sensibilidad. El aumento de la sensibilidad es un aspecto relevante del método desarrollado, pues un aumento en la sensibilidad implica una mejora en la capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito.

Para determinar el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones respecto a las utilizadas en el estudio de linealidad ^[22], empleando cuatro niveles de concentración (1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µg/mL). La estimación de la repetibilidad o precisión, calculada a partir del promedio del coeficiente del coeficiente de variación (CV) de las mediciones realizadas en las concentraciones 5, 20 y 40 µg/mL realizados en sextuplicado ^[23].

Tabla 6. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de pureza química vía HPLC.

Parámetro	OH-PSMA 230nm	[¹⁸ F]PSMA-1007 230nm	OH-PSMA 254nm	[¹⁸ F]PSMA-1007 254nm				
Rango	5 a 40 µg/mL	5 a 40 µg/mL	5 a 40 µg/mL	5 a 40 µg/mL				
Identidad	t _r = 1,75 min	t _r = 2,63 min	t _r = 1,751 min	t _r = 2,63 min				
Sensibilidad (pendiente curva de calibración)	9,82	8,59	4,02	2,05				
Especificidad (Rs)	---	15,74	---	15,87				
Linealidad (R Pearson, Carencia de ajuste)	R= 0,99948		R= 0,99804		R= 0,9984		R= 0,99889	
	Valor F	Prob>F	Valor F	Prob>F	Valor F	Prob>F	Valor F	Prob>F
	1,62963	0,20772	2,14071	0,12038	1,51493	0,23504	0,78503	0,51355
Exactitud (Error relativo en punto límite de rechazo)	-1,60%	-0,37%	-0,47%	-0,24%				
Límite de detección	0,67 µg/mL	0,78 µg/mL	0,97 µg/mL	0,67 µg/mL				
Límite de cuantificación	1,32 µg/mL	1,85 µg/mL	2,30 µg/mL	1,54 µg/mL				
Precisión (Repetibilidad)	2,82 %	4,28 %	3,57 %	3,1 %				
Incerteza	5,12 %	4,1%	4,06 %	4,03 %				

Es relevante mencionar que, al inicio de este trabajo, se contempló utilizar un volumen máximo de inyección al paciente de 10 mL, dejando la concentración límite en 10 µg/mL. Sin embargo, durante las primeras pruebas de síntesis se obtuvieron valores de concentración de [¹⁸F]PSMA-1007 superiores a dicha concentración límite. Con el propósito de no introducir cambios en las materias primas o en la formulación final, se optó por reducir el volumen máximo de

inyección a 5 mL, considerando que en la experiencia productiva de [¹⁸F]FDG es difícil que a un paciente se le administre un volumen mayor a 5 mL de la solución preparada en el laboratorio. Con este cambio todas las producciones cumplen con las especificaciones deseadas. La tabla 7 muestra los resultados de pureza química obtenida para la síntesis número 5, que obtuvo el mayor rendimiento de síntesis.

Tabla 7. Resultados de la pureza química vía HPLC de la síntesis de prueba 5.

Medición de muestra					
N° Inyección	230 nm				
	Área OH-PSMA	Área [¹⁸ F]PSMA	Área Impureza 1 (2,220 min)	Impureza 2 (3,165 min)	Impureza 3 (3,437 min)
1	15,09181	57,10199	14,97463	6,72131	5,38115
2	14,2903	59,4471	16,0062	5,8416533	5,16533
3	14,37372	59,82067	15,41761	5,78207	5,32472
Media	14,58527667	58,78992	15,46614667	6,1150111	5,2904
SD	0,440649223	1,473675473	0,517494949	0,5259147	0,111928392
CV	3 %	3 %	3 %	9 %	2 %
Cuantificación					
[OH-PSMA] [µg/mL]	[¹⁸ F]PSMA [µg/mL]	Impureza 1 (2,220 min) [µg/mL]*	Impureza 2 (3,165 min) [µg/mL]*	Impureza 3 (3,437 min) [µg/mL]	Suma Impurezas [µg/mL]*
1,491	7,497	1,972	0,780	0,675	4,918

*Asumiendo que el coeficiente de extinción molar ϵ_0 de las impurezas no identificadas es el mismo que el de [¹⁸F]PSMA

2.4.1 Dificultades en la cuantificación de [¹⁸F]PSMA-1007 y sus impurezas: en el apartado de “Producción de [¹⁸F]PSMA-1007” se mencionó la incorporación del ascorbato de sodio como un antioxidante que previene la radiólisis del compuesto cuando la actividad final es superior a 540 mCi. No obstante, el ascorbato de sodio resulta ser un interferente (en el método HPLC descrito, debido a su alta concentración (20 mg/mL). La figura 13A muestra un cromatograma del

radiofármaco obtenido en presencia de ascorbato de sodio, donde se destaca una señal inicial de alta intensidad que enmascara la señal de los analitos, por lo que la integración de los picos cromatográficos debe ser realizada de forma manual, mientras que la figura 13B muestra un cromatograma del producto sin el ascorbato de sodio. Donde es posible realizar la integración sin problemas.

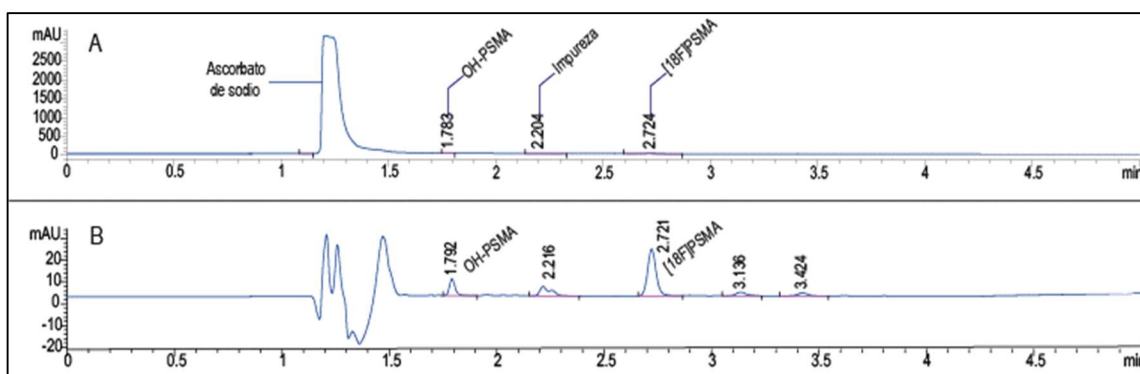


Figura 13. Comparación de los cromatogramas al incorporar ascorbato de sodio a la formulación.

2.5 Determinación de tetrabutilamonio residual (TBA): el carbonato de

tetrabutilamonio es un catalizador de transferencia de fase utilizado en la síntesis de radiofármacos PET. En el proceso de producción de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ se le considera una impureza con una concentración máxima permitida de $520\ \mu\text{g}/\text{mL}$ al considerar un volumen máximo de administración al paciente de $5\ \text{mL}$. Para radiofármacos fluorados la Farmacopea Europea ^[20] recomienda un método de cuantificación utilizando HPLC. Es importante considerar que el requisito de este análisis es dar cuenta si el analito se encuentra por sobre una concentración límite, en este caso $520\ \mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que una cuantificación por cromatografía líquida resulta innecesariamente costosa frente a otras técnicas más simples.

Kuntz y cols ^[24] desarrollaron un método de cuantificación de TBA mediante una prueba de análisis de gota con revelado con yodo sublimado y 10 µL de MeOH/NH₄OH (90:10 V/V), para los radiofármacos [¹⁸F]Fluorotimidina y [¹⁸F]Fluorocolina. En este trabajo, se desarrolló un método similar al descrito en la Farmacopea Europea para cuantificar el Kryptofix residual en la monografía de análisis de [¹⁸F]FDG ^[15], sembrando 2 µL de analito y realizando un revelado con yodo sublimado por exactamente 3 minutos. El resultado de esta experiencia fue satisfactorio, ya que la intensidad de tinción de las gotas fue gradual y distinguible para el rango de concentraciones utilizado. La figura 14A muestra el rango de concentraciones estudiado de 52 a 520 µg/mL, al lado de cada gota de TBA fue sembrado 2 µL de matriz acuosa de [¹⁸F]PSMA-1007, de modo de comparar la tinción. Tratándose de un análisis visual, el límite de detección aproximado de este método corresponde a la mínima coloración distinguible al ojo del analista entrenado. La figura 14B muestra la mínima coloración distinguible correspondiente a 10µg/mL.

Tal como ocurrió en los análisis por HPLC, la inclusión de ascorbato de sodio en la formulación incorporó un interferente en el análisis. Halvorsen y Kvernenes ^[25] realizaron un estudio de esta interferencia en la formulación de [¹⁸F]PSMA-1007, utilizando como revelador una solución de yodoplatino, reduciéndola al agregar 2,5 µL de H₂O₂ a la gota de analito sembrada. Sin embargo, este análisis incluye etapas de secado que son inconvenientes durante una rutina de análisis, por ello se estudió la posibilidad de optimizar el método con yodo sublimado, dicho

estudio mostró que es posible realizar la cuantificación siempre que el tiempo de revelado sea exactamente de 3 minutos.

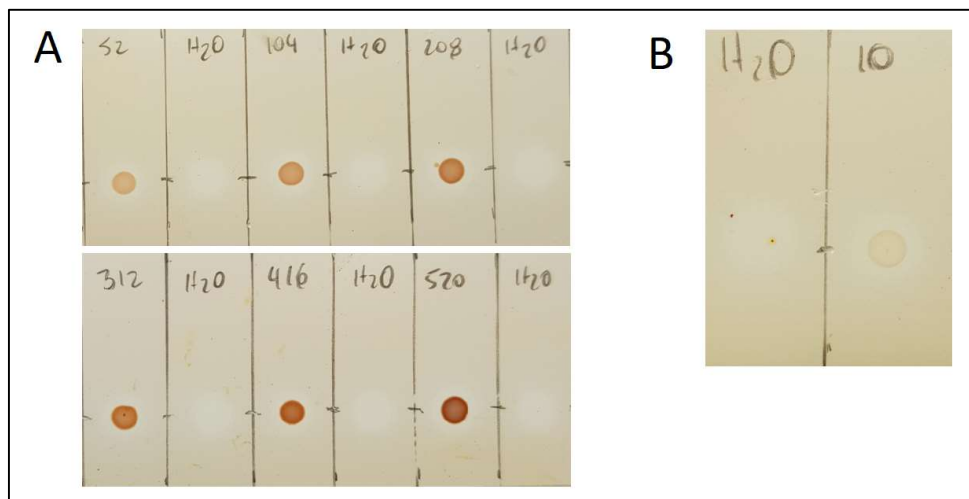


Figura 14. Rango de concentraciones estudiado para el análisis de TBA residual. La figura 15 muestra un estudio de especificidad, donde es posible ver que la matriz acuosa que contiene buffer fosfato de sodio no genera ninguna mancha, luego es posible ver la mancha que presenta el TBA a 520 µg/mL (TBA + H₂O), en tercer lugar se observa como la matriz con ascorbato de sodio (M) forma un círculo coloreado en los bordes al reaccionar con el yodo sublimado, mientras que el TBA en una concentración de 520 µg/mL disuelto en la matriz (TBA+M) forma una mancha concéntrica a este círculo, dicha mancha es de una intensidad de color menor a la observada en la matriz acuosa. En quinto lugar, es posible ver el análisis de una muestra de PSMA cuya formulación incluye ascorbato de sodio y finalmente se observa la mancha de una muestra de PSMA que contiene TBA a 520 µg/mL y cuya forma e intensidad es perfectamente distinguible.

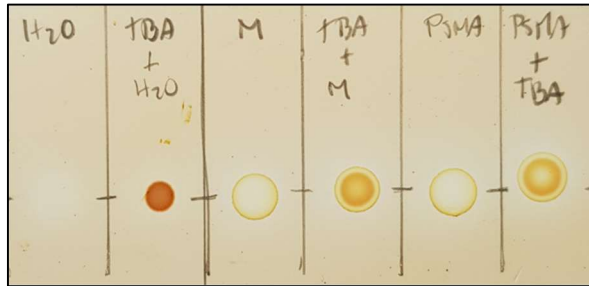


Figura 15. Estudio de especificidad del análisis de TBA en una matriz con ascorbato de sodio.

La figura 16 muestra el rango de 50 a 520 $\mu\text{g/mL}$ estudiado para la determinación de TBA en una formulación que contiene ascorbato de sodio en una concentración de 20 mg/mL . En este caso se observa que el límite de detección de este método, determinado visualmente es de 104 $\mu\text{g/mL}$.

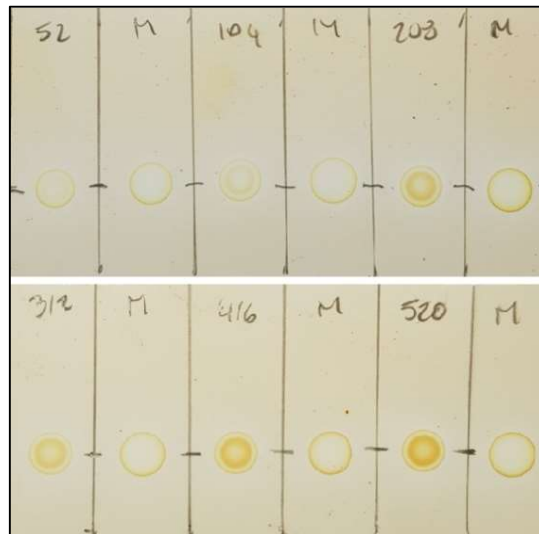


Figura 16. Rango de concentraciones estudiado para la prueba de análisis de gota en una solución de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ que contiene ascorbato de sodio.

La figura 17A muestra el análisis de una solución de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$ sin ascorbato de sodio, cuyo resultado es $\text{TBA}_{\text{residual}} < \text{LD}$ (10 $\mu\text{g/mL}$), mientras que

la figura 17B muestra el análisis con ascorbato de sodio presente en la muestra, donde se observa que el $TBA_{residual} < LD$ (104 $\mu\text{g/mL}$)

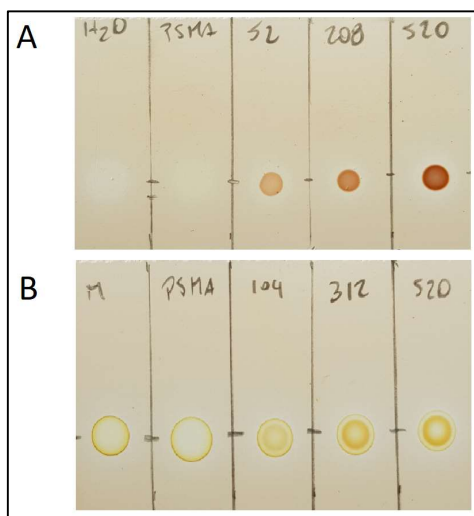


Figura 17. Comparación del análisis de TBA residual en presencia y ausencia de ascorbato de sodio.

2.6 Determinación de solventes residuales: como se mencionó en la sección metodología, el objetivo del método desarrollado es realizar una determinación de los solventes implicados en los procesos de producción de los radiofármacos $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ y $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$.

La columna capilar Phenomenex Zebron ZB-WAX de largo 30 m, diámetro 0,53 mm y un espesor de film de 1 μm (30 m x 0,53 mm x 1 μm) es utilizada para el análisis rutinario de solventes residuales de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ y $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{NaTcO}_4$ en el Laboratorio de Control de Calidad de la CCHEN. La fase estacionaria de esta columna está basada en polietilenglicol, otorgando una buena separación para analitos volátiles polares. Sin embargo, esta columna no es adecuada para la determinación de dimetilsulfóxido (DMSO), ya que debido a su alta polaridad

tiende a fijarse en la fase estacionaria, entregando picos cromatográficos con *tailing* y requiriendo extensas etapas de descontaminación de la columna a altas temperaturas, reduciendo la vida útil de esta. Por ello se utilizó la columna Phenomenex Zebron ZB-624 (30 m x 0,53 mm x 3 μ m), Su fase estacionaria de 6 % cianopropilfenill y 94 % dimetilpolisiloxano, calificada por la Farmacopea americana [26] como G43 y recomendada para el análisis de solventes residuales es menos polar que la columna anterior, resolviendo el problema de retención de DMSO en la columna. Para mejorar la retención de los otros analitos (etanol, metiletilcetona y acetonitrilo) se aumentó el espesor de *film* a 3 μ m. La figura 18 muestra el cromatograma obtenido con el método desarrollado.

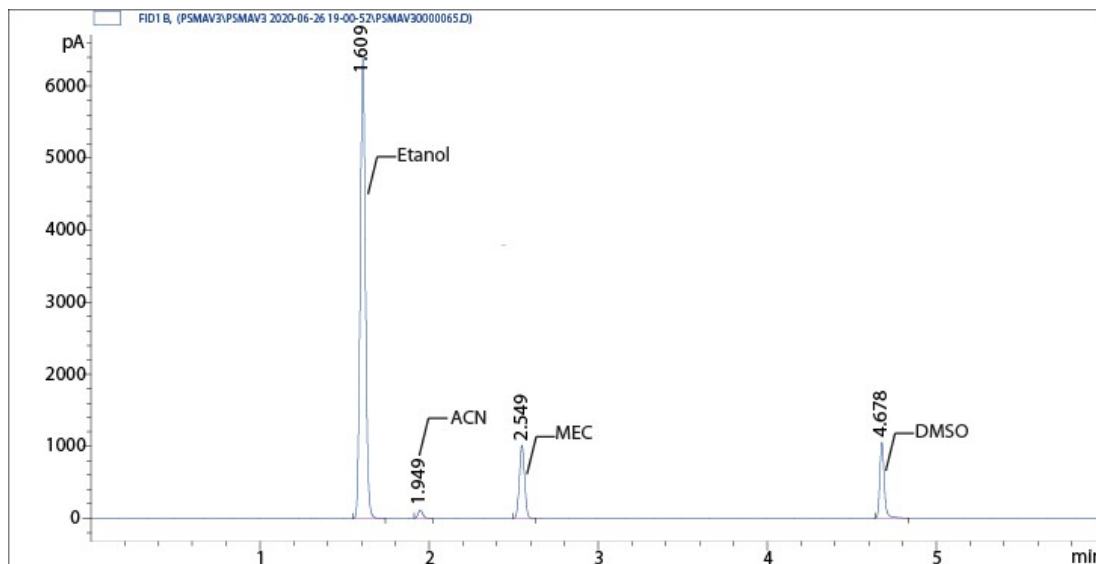


Figura 18. Cromatograma obtenido para la determinación de solventes residuales.

Para cada uno de los solventes residuales se escogió un rango adecuado de concentraciones de trabajo, descrito en la tabla 8.

En el caso del etanol, inicialmente se escogió un rango de concentraciones de trabajo desde 0,0157 % hasta 15 %, sin embargo, al realizar el tratamiento de datos fue notorio como el ajuste lineal de un rango de concentraciones tan amplio implicaba un aumento del error en las cuantificaciones a baja concentración, por ello se realizaron 2 curvas en diferentes rangos de concentración para la determinación de etanol. La primera es una curva de rango bajo de 0,0157 % a 5 % que se utilizará para las cuantificaciones de etanol en [¹⁸F]FDG y la segunda una de rango alto que va desde 5 % a 15 %, obteniendo así un ajuste lineal adecuado.

La figura 19 muestra los ajustes lineales obtenidos para la determinación de solventes residuales, mientras que la tabla 8 muestra un resumen de los parámetros analíticos obtenidos para cada ajuste lineal.

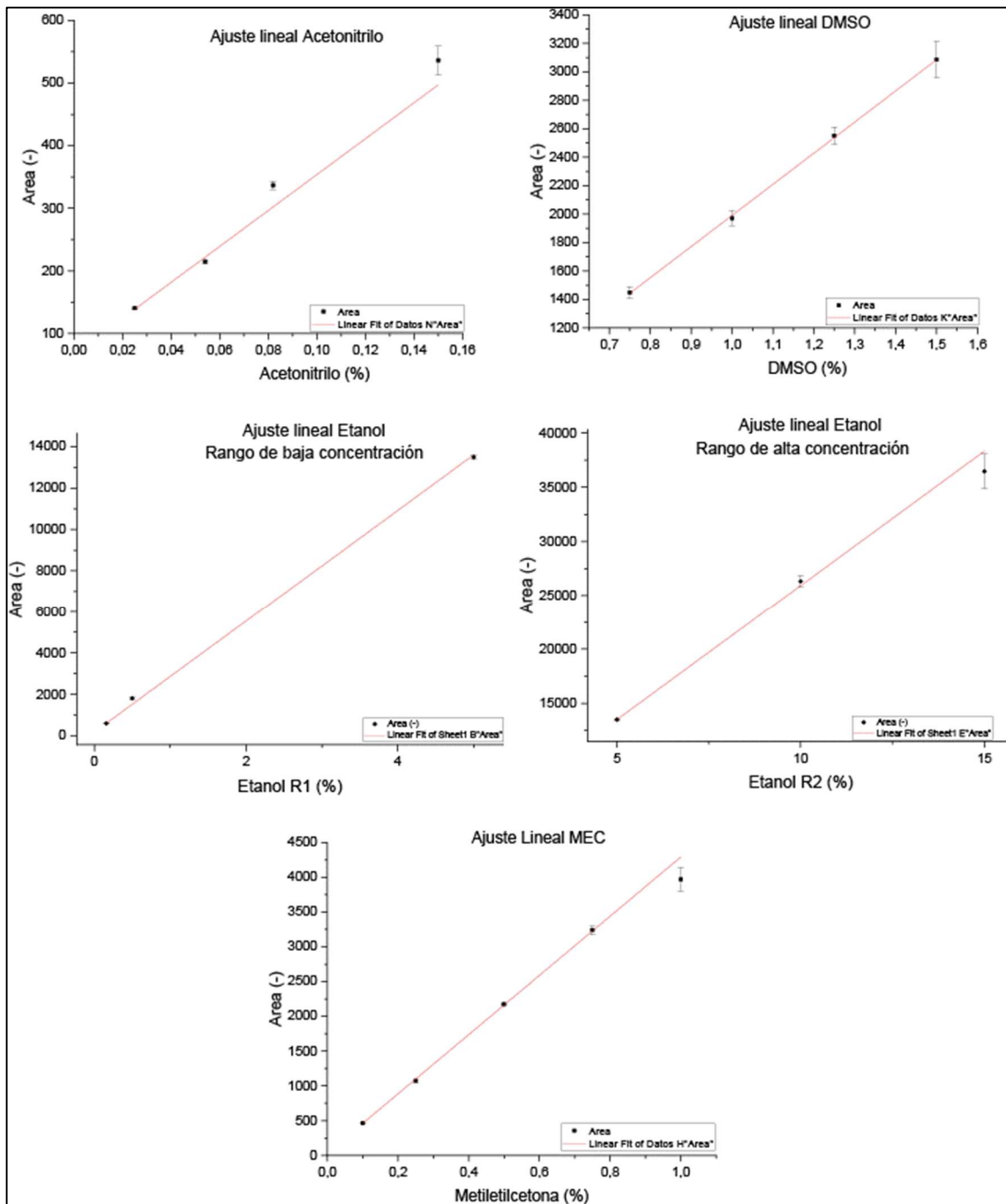


Figura 19. Ajuste lineal para los solventes residuales: acetonitrilo, dimetilsulfóxido, etanol y Metiletilcetona.

Tabla 8. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de solventes residuales involucrados en los procesos de producción de [¹⁸F]PSMA-1007, [¹⁸F]FDG y [^{99m}Tc]NaTcO₄.

Parámetro	Acetonitrilo	Dimetilsulfoxido	Metiletilcetona	Etanol rango bajo1	Etanol rango alto					
Rango	0,025 a 0,15 µg/mL	0,75 a 1,5 µg/mL	0,1 a 1,5 µg/mL	0,0157 – 5 %	5-15 %					
Identidad	t _r = 1,949	t _r = 4,679	t _r = 2,550	t _r = 1,610	t _r = 1,610					
Sensibilidad	3726,41	2023,37	4136,61	2592,30 ± 5,83	2504,85					
Especificidad (Rs)	5,51	39,97	10,12	---	---					
Linealidad (R Pearson, Carencia de ajuste)	R=0,99768		R= 0,99931		R=0,99715		R=0,99706		R=0,99991	
	Valor F	Prob> F	Valor F	Prob> F	Valor F	Prob>F	Valor F	Prob> F	Valor F	Prob> F
	23,48	9x10 ⁻⁷	3,50	0,03	14,45	3x10 ⁻⁶	1,65	0,22	13,22	4,86X10 ⁻⁴
Exactitud	3,0 %	2,61 %	3,8 %	5,1 %	1,5 %					
Límite de detección (%)	5.5x10 ⁻⁴	1.1x10 ⁻³	5.9x10 ⁻⁴	8,03x10 ⁻⁵	8,03x10 ⁻⁵					
Límite de cuantificación (%)	1,8x10 ⁻³	3.8x10 ⁻³	3.8x10 ⁻³	2,7x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻⁴					
Precisión (Replicabilidad)	2,0%	2,6%	0,8%	2,1%	2,0%					
Incerteza	6,9%	7,7%	5,2%	3,27	10,1%					

2.6.1 Dificultades en la cuantificación de los solventes residuales: pese a que se realizaron las experiencias necesarias para desarrollar las curvas de calibración para la determinación de solventes residuales, no fue posible realizar la cuantificación de estos en la solución resultante de los procesos de producción realizados en este trabajo. Esto se debe, fundamentalmente, a que el equipo utiliza otra columna en el análisis de rutina y se debe invertir un tiempo extenso en realizar el proceso de cambio y ambientación de la columna cromatográfica para este análisis, para luego volver a instalar la columna original. Además, se debe considerar que, en los procesos de cambio de columna, existe el riesgo de ocurrencia de alguna falla, como por ejemplo la obstrucción de la columna o del *jet* ubicado en el detector. Considerando estos dos factores y a causa de que existe un único cromatógrafo de gases en el Laboratorio Control de Calidad de la CCHEN, se optó por posponer la cuantificación de solventes residuales hasta contar con otro cromatógrafo de gases disponible, donde será posible perfeccionar el método, para luego realizar una migración completa de la nueva metodología de determinación de solventes residuales. De esta manera no se comprometerá el suministro continuo de [^{18}F]FDG y [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]NaTcO₄.

2.7 Análisis por espectrometría gamma: dado que el método de obtención de ^{18}F para sintetizar [^{18}F]PSMA1007 es el mismo que el utilizado para producir [^{18}F]FDG, es que se utilizó el mismo método de análisis por espectrometría gamma utilizado en los análisis de control de calidad de rutina. La figura 20 muestra un análisis de [^{18}F]PSMA-1007 en el rango de energías desde 0 a 2250

KeV. Para todos los análisis ejecutados, no existió presencia de radionucleidos contaminantes, identificando solo el pico en 511 KeV proveniente del ^{18}F como la única emisión detectada.

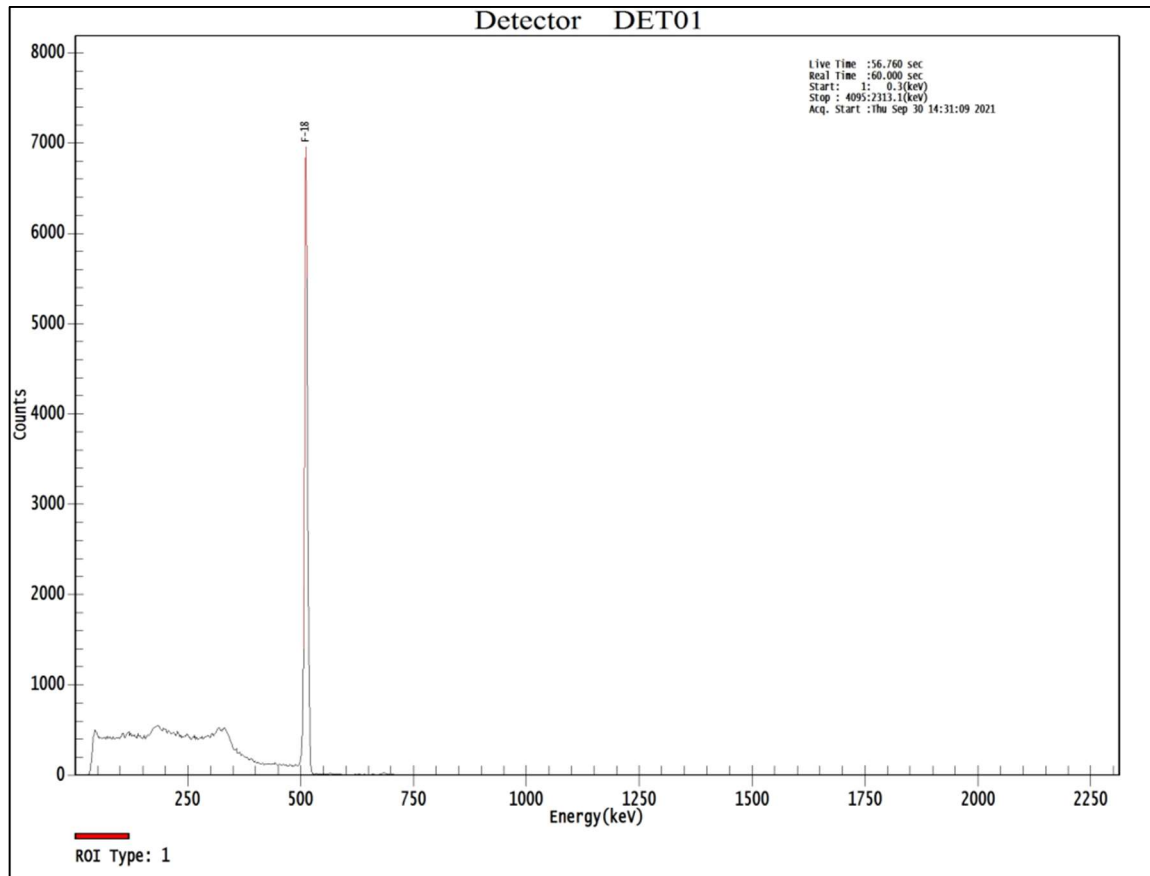


Figura 20. Espectro gamma obtenido al analizar una muestra de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$.

2.8 Determinación del tiempo de semidesintegración: en un calibrador de dosis adecuado, se midió cada 2 minutos la actividad de una alícuota de 12,5mCi de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$, hasta completar 10 minutos. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 9. Con dichos datos se realizó un ajuste lineal como el que se muestra en la figura 21 y utilizando las ecuaciones 1 y 2 descritas en la sección

metodología, fue posible obtener el tiempo de semidesintegración del radioisótopo.

Para todas las producciones de prueba realizadas, el tiempo de semidesintegración se encontró entre 108 y 111 minutos. Este resultado complementa al valor de energía obtenido de 511 KeV, identificando al radioisótopo estudiado como ^{18}F .

Tabla 9. Actividad medida cada 2 minutos para [^{18}F]PSMA-1007.

Tiempo [min]	Actividad [mCi]	Ln(Act)
0	12,501	2,525
2	12,343	2,513
4	12,19	2,500
6	12,04	2,487
8	11,88	2,474
10	11,740	2,463

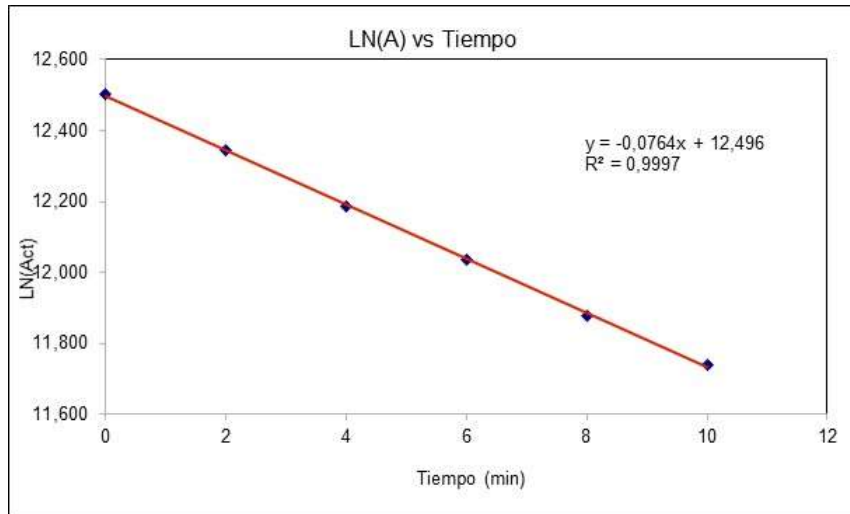


Figura 21. Ajuste lineal obtenido para las mediciones descritas en la tabla 9.

2.9 Determinación del pH: las mediciones se realizaron con varillas de pH de rango 0 a 14 y luego con una varilla en el rango 5 a 10. La figura 22A muestra una medición en el rango 0-14 y la figura 22B en el intervalo 5 a 10. Todas las pruebas realizadas muestran que el valor de pH se encuentra dentro de 4,5 - 7,5.

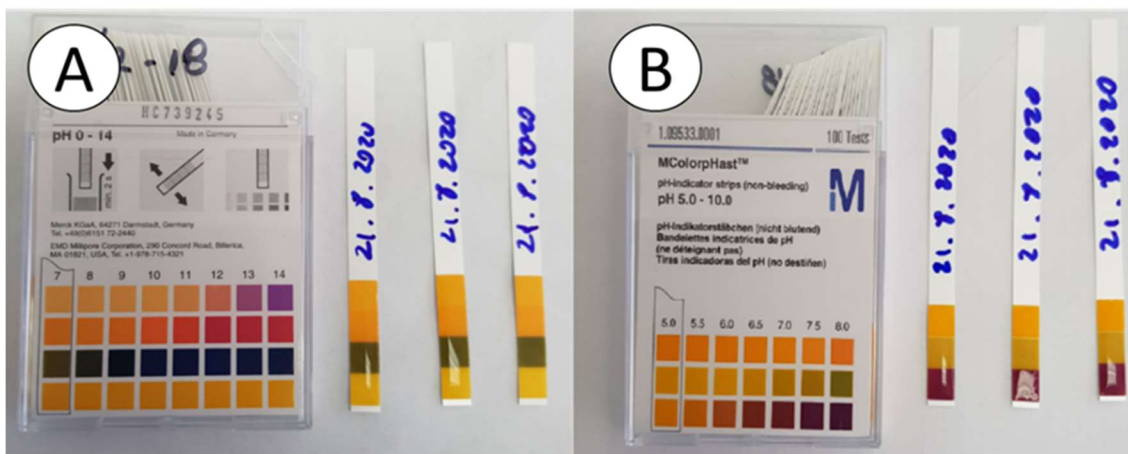


Figura 22. Medición de pH de una producción de [¹⁸F]PSMA-1007.

Conclusiones

- Durante el desarrollo de este trabajo fue posible realizar con éxito el proceso de radiomarcación de [¹⁸F]PSMA-1007 en el Laboratorio Ciclotrón de la Comisión Chilena de Energía Nuclear, con un rendimiento que fluctuó entre 37,2 a 74 %, corregido por decaimiento radiactivo. Tras cada síntesis y posterior análisis fisicoquímico, fue posible ajustar los análisis y lograr una metodología adecuada para el control de calidad de la formulación de [¹⁸F]PSMA-1007.
- Tras el análisis de pureza química en las primeras pruebas de síntesis se encontró que la concentración en masa de [¹⁸F]PSMA-1007 era mayor a 10 µg/mL, considerando que la especificación declara que la concentración de [¹⁸F]PSMA-1007 ≤ 0,1mg/V_{max}, se optó por reducir el volumen máximo a 5mL, aumentando la concentración límite de [¹⁸F]PSMA-1007 a 20 µg/mL.
- La longitud de onda de absorción más adecuada para el análisis de [¹⁸F]PSMA-1007 por HPLC fue de 230 nm, permitiendo duplicar la sensibilidad de análisis de [¹⁸F]PSMA-1007 respecto a la obtenida utilizando una longitud de onda de 254 nm utilizada en la bibliografía.
- Luego de la implementación de los análisis fisicoquímicos de control de calidad, fue posible constatar que el [¹⁸F]PSMA-1007 sintetizado en el Laboratorio de Ciclotrón de la CCHEN, cumple con las especificaciones para producto terminado declarados en las monografías de análisis de

otros radiofármacos PET, tanto en la Farmacopea Europea, como en Farmacopea de los Estados Unidos.

- A partir de este trabajo y tras la completa implementación de la metodológica analítica, incluyendo los ensayos microbiológicos de control de calidad, será posible poner a disposición desde el sistema público el radiofármaco PET [^{18}F]PSMA-1007, mejorando el acceso del sistema de salud a una potente herramienta para la detección precoz del cáncer de próstata, beneficiando a la población masculina susceptible de sufrir esta enfermedad.

Perspectiva de trabajo futuro

A continuación, se definen algunas líneas de acción que se recomiendan para alcanzar la completa implementación del proceso de producción y de los análisis de control de calidad del [^{18}F]PSMA-1007.

1.- Análisis de solventes residuales

El método cromatográfico de determinación de solventes residuales desarrollado en este trabajo, utiliza una inyección directa de una alícuota de 1 μL de [^{18}F]PSMA-1007 al inyector que se encuentra a 200 °C. Debido a la inclusión de ascorbato de sodio con una concentración de 20 mg/mL en la formulación final, es posible inferir que ocurrirá una cristalización de la sal en el interior del inyector, obstruyéndolo e inhabilitando el equipo, por lo que se sugiere explorar otras estrategias como por ejemplo el uso de *headspace* ^[27]. Con dicha técnica será posible evaporar los solventes residuales, recogiendo una fracción o la totalidad de estos, la que no incluirá al ascorbato de sodio, dado que se encontrará cristalizado al fondo del vial de muestra. El volumen de muestra a utilizar para este ensayo debe encontrarse entre los 1 a 10 μL , esta restricción se encuentra relacionada a que el volumen de muestra total para todos los análisis de control de calidad fisicoquímicos y microbiológicos es de solo 500 μL .

2.- Desarrollo de análisis microbiológicos

En conjunto con la implementación de los ensayos de control de calidad fisicoquímicos, se deben implementar los ensayos de control de calidad microbiológicos que dan cuenta de la esterilidad de la muestra y de que esta no contiene endotoxinas bacterianas [14].

La evaluación de esterilidad verifica la ausencia de contaminación por microorganismos (bacterias y hongos) en la muestra esterilizada o preparada asépticamente. Para realizar este ensayo, habitualmente se realiza un cultivo en un medio de crecimiento adecuado, como, por ejemplo, digerido de caseína y soja. No obstante, esta prueba dura 14 días y debido al corto tiempo de vida media del radiofármaco (110 minutos), la esterilidad debe ser inferida mediante una prueba de punto de burbuja, la que dará cuenta de la integridad de la membrana que posee un tamaño de poro de 0,22 μm y que es utilizada para realizar el proceso de esterilización. Debido a la naturaleza radiactiva de la muestra, este ensayo debe ser implementado en la celda de dispensado aséptico del Laboratorio Ciclotrón de la CCHEN, la que cuenta con un módulo automatizado Elisia-Raytest, modelo Safira, que permitirá realizar esta prueba de forma remota y sin exposición radiológica del personal.

Para determinar la presencia de endotoxinas bacterianas en la solución radiactiva recién preparada, se debe desarrollar un método cromogénico, el que utiliza el cambio de coloración que ocurre cuando el *limulus ameobocito lisato* (LAL)

reacciona con las endotoxinas bacterianas. La principal dificultad para la implementación de este método es la determinación de las diluciones para cuantificar adecuadamente en el rango de las 175 UE/mL. Este método es sensible a la fuerza iónica de la solución, por lo que debe estudiarse el efecto del ascorbato de sodio presente en la formulación final.

3.- Ensayos biológicos *in vitro*

Dado que el [¹⁸F]PSMA-1007 aún es un radiofármaco de reciente uso, es pertinente realizar pruebas biológicas *in vitro*, que provean de evidencia científica que el producto sintetizado en la CCHEN posee el comportamiento biológico deseado a nivel celular. Para ello se propone realizar dos estudios complementarios.

Estudio de unión a superficie e internalización: con este ensayo se propone evaluar la incorporación de [¹⁸F]PSMA-1007 en cultivos celulares. Se sugiere utilizar una línea celular de cáncer de próstata que expresa PSMA (LNCaP). Este ensayo consiste en incubar las células en presencia del radiofármaco y obtener las distintas fracciones que corresponden a radioactividad unida a membrana y radioactividad internalizada, para finalmente calcular el porcentaje de internalización (% I). Adicionalmente, para determinar la especificidad de la unión, se propone realizar otro set de experimentos utilizando el inhibidor comercial de PSMA, 2-PMPA (ácido 2-PMPA (2-(fosfonometil) pentano-1,5-dioico) [28].

Estudio de afinidad: con este ensayo se propone evaluar la incorporación de [¹⁸F]PSMA-1007 en cultivos celulares, en presencia del ligando frío (PSMA-1007), utilizando la línea celular de cáncer de próstata LNCaP. Este ensayo consiste en incubar las células con una concentración del ligando marcado en presencia de varias concentraciones del ligando sin marcar, en un rango de 5 órdenes de magnitud. Así, se propone cuantificar la radioactividad acumulada en las células y estimar la concentración de ligando que produce el 50% de inhibición ^[29].

Bibliografía

- [1] A. BOSCHI, L. UCCELLI, P. MARTINI. (2019). A picture of modern Tc-99m radiopharmaceuticals: production, chemistry, and applications in molecular imaging. *Applied Sciences*. (9) 12: 2526. doi:10.3390/app9122526
- [2] K. HAMACHER, H. COENEN, G. STÖCKLIN. (1986). Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *Journal of Nuclear Medicine*. 27 (2) :235-8.
- [3] B. TENG, S. WANGS, Z. FU, Y. DANG, Z. WU, L. LIU. (2005). Semiautomatic synthesis of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]Fluorothymidine using three precursors. *Applied Radiation and Isotopes*. 64(2):187-93
- [4] J. SENG, C. DAE-YOON, C. MOSDZIANOWSKI, K. HEE SEUO, J. SOOK RYU, D. MOON. (2007). The automatic production of 16 α -[¹⁸F]Fluoroestradiol using a conventional [¹⁸F]FDG module with a disposable cassette system. *Applied Radiation and Isotopes*. 65 (6): 676-681. doi: 10.2349/bijj.2.4.e57
- [5] World Health Organization. International Agency for Research on Cancer [en línea]< <https://qco.iarc.fr/today/home>> [Consulta 27 de diciembre de 2021]
- [6] CHILE. Ministerio de Salud. Departamento de Manejo Integral del cáncer y otros tumores. (2019). Plan Nacional del Cáncer 2018-2028. Enero de 2019. 33p.
- [7] M. GRZMIL, A. MEISEL. (2019) En; J. LEWIS, A. WINDSHORST, M. ZEGLIS. Radiopharmaceutical Chemistry. Suiza. Springer International Publishing. Página 90.
- [8] J. CARDINALE, M. SCHÄFER, M. BENESOV, U. BAUDER-WÜST, K. LEOTTA, M. EDER, O. NEELS, U. HABERKORN, L. GIESEL, K. KOPKA. (2017). Preclinical evaluation of 18F-PSMA-1007, a new Prostate-Specific Membrane Antigen ligand for prostate cancer imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. 58 (3): 425-431. doi:10.2967/jnumed.116.181768.
- [9] J. CARDINALE, R. MARTIN, M. SCHÄFER, A. HIENZSCH, S. HÜBNER, A. ZERGES, H. MARX, R. HESSE, K. WEBER, R. SMITS, A. HOEPPING, M. MÜLLER, O. NEELS, K. KOPKA. (2017). Procedures for the GMP-compliant production and quality control of [¹⁸F]PSMA-1007: A next generation

radiofluorinated tracer for the detection of prostate cancer. *Pharmaceuticals.*; 10 (4) :77. doi:10.3390/ph10040077

[10] CHILE. Ministerio de Salud. (2012) Decreto Exento N°128: Norma Técnica N°127 “Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria de productos Farmacéuticos”. Enero de 2012

[11] CHILE. Ministerio de Salud. (2021). Resolución Exenta 464 que actualiza la Norma Técnica 127. Mayo de 2021.13p.

[12] European Medicine Agency. (2021) ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents. Páginas 10-13.

[13]US Food and Drugs Administration (FDA). (2017). Tables and list guidance for industry. Páginas 6-7.

[14] A. MISHOE, P. DENOBLE. (2019). En; J. LEWIS, A. WINDSHORST, M. ZEGLIS. Radiopharmaceutical Chemistry. Suiza. Springer International Publishing. Páginas 630-631.

[15] The United States Pharmacopeial Convention. (2017). Farmacopea de los Estados Unidos de America, Fludeoxuglucose F18 for injection. USP 40-NF35. 4520p

[16] The United States Pharmacopeial Convention. (2015). Farmacopea de los Estados Unidos de América, Radiactividad. USP 38 -NF33. 665p

[17] J. EMERT, B. NEUMAIER. (2019). En; J. LEWIS, A. WINDHORST, M. ZEGLIS, Radiopharmaceutical Chemistry. Suiza. Springer International Publishing. Pp. 279-281.

[18] Principios de Análisis Instrumental. (2001). Por Skoog “y col.”. 5ª ed. Madrid, McGraw-Hill. 785p.

[19] Principios de Análisis Instrumental. (2001). Por Skoog “y col.”. 5ª ed. Madrid, McGraw-Hill. 759p.

[20] European Directorate for the Quality of (EDQM). (2014). The European Pharmacopoeia, 8.0; Strasbourg, France.

[21] Ion Beam Applications. (2013). Synthera V2 Manual de usuario. Revision B. pp 23

- [22] L. SANABRI, J. MARTINEZ, Y. BAENA. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*. 46 (2), 202-219.
- [23] Chile. Ministerio de Salud. (2015). Resolución Exenta 201. Guía Técnica para realización de la Validación de Métodos de Ensayo. Enero de 2015. 14p.
- [24] M. KUNTZ, D. LAMPARTER; N. BRÜGGNER; M. MÜLLER; G. KIENZLE; G. REISCHL (2014). Development and succesful validation of simple and fast TLC spot test for determination of Kryptofix® 2.2.2 and tetrabutylammonium in ¹⁸F-labeled radiopharmaceuticals. *Pharmaceuticals*. 7 (5): 621-633. doi:10.3390/ph7050621
- [25] N. HALVORSEN, O. KVERNENES. (2020). A fast and simple method for the determination of TBA in ¹⁸F-Labeled radiopharmaceuticals. *Pharmaceuticals*. 13 (2): 27. doi:10.3390/ph13020027
- [26] The United States Pharmacopeial Convention. (2015) Farmacopea de los Estados Unidos de America. USP 38-NF33. 2081p
- [27] A. Klick, A Sköld. (2004). Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 36: 401–409
- [28] E. Gurni, G. Henriksen. (2017) Metal based PSMA Radioligands. *Molecules* 22 (4): 523 doi 10.3390/molecules22040523
- [29] N.Harada, H. Kimura, S. Onoe, H. Watanabe, D. Matsouka, K. Arimitsu. M. Ono. H. Saji. (2016). Sinthesis and Biologic Evaluation of Novel ¹⁸F-Labelled Probes Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for PET of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 57:1978-1984