



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE METODOLOGÍAS RADIO-SINTÉTICAS PARA LA INCORPORACIÓN DE ^{11}C EN MOLÉCULAS ORGÁNICAS

Q.F. PABLO JAVIER BUCCINO EVANS

Programa de Posgrado en Química

Facultad de Química, Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

PEDECIBA-Química

MONTEVIDEO-URUGUAY

JUNIO DE 2019



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE METODOLOGÍAS RADIO-SINTÉTICAS PARA LA INCORPORACIÓN DE ^{11}C EN MOLÉCULAS ORGÁNICAS

Q.F. PABLO JAVIER BUCCINO EVANS

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado en Química Facultad de Química, Universidad de la República y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA-Química, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Química.

Directores:

Dr. Prof. Williams Porcal

Dr. Eduardo Savio

Director académico:

Dr. Prof. Williams Porcal

MONTEVIDEO-URUGUAY

JUNIO DE 2019

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Prof. Ignacio Carrera

Dr. Prof. Javier Giglio

Dr. Vasko Kramer

Montevideo-Uruguay

Junio de 2019

Indice

AGRADECIMIENTOS I	15
AGRADECIMIENTOS II	17
RESUMEN	19
ABREVIATURAS	23
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	25
1. Imagenología Molecular PET	25
2. Radionucleidos y Radiofármacos PET	27
2.1. Radionucleidos usados en PET	27
2.2. Radiotrazadores y Radiofármacos PET	29
2.3. Radiosíntesis y Control de Calidad de Radiofármacos PET	31
2.3.1. Generalidades	31
2.3.2. Equipamiento y medidas de seguridad	33
3. Radioquímica del ^{11}C	38
3.1. Generalidades	38
3.2. ^{11}C y dilución isotópica	42
3.3. Métodos de marcación con ^{11}C	43
3.3.1. ^{11}C -Metilación nucleofílica	43
3.3.2. ^{11}C -Metilaciones mediadas por Pd	45
3.3.3. ^{11}C -Carbonilaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}$	46
3.3.4. ^{11}C -Cianaciones con el precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$	46
3.3.5. Marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	51
3.3.5.1. Marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando reactivos organometálicos	54
3.3.5.2. Nuevos métodos de fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	55
CAPITULO 2: ANTECEDENTES	63
1. Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM)	63
2. Tecnología y <i>Know-how</i> disponible en CUDIM	64

3.	Contexto en el que se enmarca esta tesis	64
CAPITULO 3: OBJETIVOS		67
1.	Objetivo General	67
2.	Objetivos Específicos	67
3.	Estrategias de trabajo	67
3.1.	¹¹ C-Cianaciones con el precursor [¹¹ C]CN ⁻	67
3.2.	¹¹ C-Metilacion directa con el precursor [¹¹ C]CO ₂	68
CAPITULO 4: ¹¹C-CIANACIONES CON EL PRECURSOR [¹¹C]CN⁻		70
1.	Introducción	70
2.	Parte experimental	71
2.1.	Metodologías orgánicas y analíticas	71
2.1.1.	Síntesis de 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio	72
2.1.2.	Síntesis de 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio	72
2.1.3.	Síntesis de clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanonitrilo:	73
2.1.4.	Sistema HPLC analítico para la evaluación de la pureza de los precursores y estándares (asimétrico y quiral).	73
2.2.	Puesta a punto de la producción de [¹¹ C]CN ⁻ en el módulo ProCab®	74
2.2.1.	Descripción de la plataforma	74
2.2.2.	Acondicionamiento de la Plataforma	77
2.2.3.	Manejo de la Plataforma	77
2.2.4.	Optimización de la producción de [¹¹ C]CN ⁻	78
2.3.	Modelo de Reactividad	79
2.3.1.	Radiosíntesis de 1-[¹¹ C]-2-amino-3-fenilpropanonitrilo	80
2.3.2.	Radiosíntesis de D,L-1-[¹¹ C]Fenilalanina por hidrólisis básica	81
2.3.3.	Radiosíntesis de D,L-1-[¹¹ C]Fenilalanina por hidrólisis ácida.	81
3.	Resultados y Discusión	82
3.1.	Síntesis de precursores y estándares	82
3.2.	Optimización de la producción de [¹¹ C]CN ⁻	84
3.2.1.	Evaluación de los tamices moleculares del horno OC1A	84
3.2.2.	Evaluación del horno de Níquel (OC3A)	85
3.2.3.	Evaluación de la performance general del sistema, para la producción de [¹¹ C]CN ⁻	86
3.3.	Radiosíntesis de D,L-1-[¹¹ C]Fenilalanina	94

4. Conclusiones preliminares de esta etapa	97
ANEXO 1: Espectroscopía	98
ANEXO 2. Producciones de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ realizadas durante el trabajo experimental de la tesis.	103
ANEXO 3: Instructivo de producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$	105
CAPITULO 5: ^{11}C-METILACION DIRECTA CON EL PRECURSOR $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	113
1. Introducción	113
2. Parte experimental	114
2.1. Metodologías orgánicas y analíticas	114
2.1.1. Preparación de estándares y puesta a punto del sistema HPLC analítico	114
2.2. Radioquímica con el precursor $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	116
2.2.1. Plataforma automatizada	116
2.2.2. Operaciones preliminares sobre el módulo	117
2.2.3. Purga del target y las líneas target-módulo para la disminución de la concentración de CO_2	117
2.2.4. Preparación de las soluciones de marcación con $\text{DBU} / \text{PhSiH}_3 / \text{ZnCl}_2$	117
2.2.5. Preparación de las soluciones de marcación con $\text{IPr} / \text{PhSiH}_3 / \text{ZnCl}_2$	117
2.2.6. Preparación de las soluciones de marcación con $\text{PhSiH}_3 / \text{TBAF}$	118
2.2.7. Metodología para la radiosíntesis de $\text{N}-[^{11}\text{C}\text{-metil}]-4\text{-Toluidina}$	118
2.2.8. Radiosíntesis automatizada de $[^{11}\text{C}] \text{PiB}$	118
2.2.9. Controles de Calidad fisicoquímicos	119
2.2.10. Controles de Calidad fisicoquímicos para $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ en producciones completas	119
3. Resultados y discusión	120
3.2. Metodologías orgánicas y analíticas	120
3.2.1. Síntesis orgánica de estándares	120
3.2.2. Estándares analíticos en sistema de HPLC	120
3.2. Radioquímica con el precursor $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$	122
3.2.1. Estrategias de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con $\text{DBU} / \text{PhSiH}_3$	122
3.2.2. Estrategias de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con $\text{IPr} / \text{PhSiH}_3$	131
3.2.3. Estrategia de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con $\text{TBAF} / \text{PhSiH}_3$	138
3.3. Aplicación de las estrategias de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$	145
3.3.1. Introducción	145
4. Fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ para la obtención de otros radiofármacos utilizados en CUDIM	160
5. Conclusiones preliminares de esta etapa	163

ANEXO 1: Espectroscopía	164
ANEXO 2: Manuscrito de publicación	166
CAPITULO 6: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	198

“El ejecutor de una empresa atroz debe imaginar que ya la ha cumplido, debe imponerse un porvenir que sea irrevocable como el pasado.”

J.L. Borges, “El jardín de los Senderos que se bifurcan” (Ficciones, 1941)

“This task was appointed to you, and if you do not find a way, no one will.”

J.R.R. Tolkien, “The Fellowship of the Ring” (The Lord of the Rings, 1954)

*A mi familia,
por el apoyo brindado*

AGRADECIMIENTOS I

- A la Dirección del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones, brindándome los materiales y equipamientos necesarios.
- A los Dres. Eduardo Savio y Williams Porcal, por realizar la tutoría de este trabajo, y por el valioso aporte realizado a mi formación académica y profesional.
- A PEDECIBA QUIMICA, por el apoyo económico brindado. Asimismo, un agradecimiento especial a sus secretarias (Gabriela y Laura) por su constante amabilidad y disposición.
- A la Prof. M.Sc. Carmen S. Dence (Mallinckrodt Institute of Radiology – Washington University in St. Louis - EEUU), por recibirme en dos oportunidades en su laboratorio y por generosamente compartir conmigo sus conocimientos en radioquímica del ^{11}C .
- Al Q.F. Juan Vázquez, por la colaboración en la puesta a punto de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$, y la síntesis de precursores para la 1- $[^{11}\text{C}]$ Fenilalanina, durante su pasantía como becario de ANII.
- Al Tec. Omar García y al Ing. Carlos Casatti, por su ayuda a la hora de resolver los problemas técnicos surgidos con las plataformas radiosintéticas durante el trabajo de esta tesis.
- Al personal de Control de Calidad de CUDIM: T.Q. Lucía Tajam, T.Q. Andrea Boné, y Dr. Javier Giglio, por su apoyo para el análisis cromatográfico de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$

AGRADECIMIENTOS II

En estas breves líneas, quisiera agradecer especialmente a varias personas que me han acompañado con su amistad, cariño y apoyo durante el transcurso de estos años. Tal vez no muchos tienen la suerte de contar con buenos compañeros, y menos aún con amigos, en su ámbito laboral. En mi caso, puedo considerarme afortunado. Desde mis primeros años en CUDIM, he tenido conmigo la amistad de Florencia e Ingrid, sumándose un poco más tarde la de Andrea y Kevin. Al día de hoy, difícilmente concibo venir a CUDIM y saber que cualquiera de ellos ya no está ahí, sea para trabajar, aprender, reír, llorar, discutir, frustrarnos, alegrarnos, desear matarnos o planificar algún viaje, cena o salida.

Deseo expresar además mi gratitud hacia Victoria y Javier, los químicos jóvenes “senior” de nuestra Radiofarmacia, de quienes y con quienes aprendí (y aprendo) muchas de las cosas que hoy sé y aplico día a día. Vaya aquí también un cálido reconocimiento a Natalí, Lucía y Stefanía, con quienes he compartido relativamente poco tiempo, pero lo suficiente para reconocerlas como excelentes compañeras. No me podría olvidar de Inés, con quien pude compartir no sólo algunos ratos de Área Blanca sino también un paseo inolvidable por el norte de Italia. Tampoco de Laura R. con quien a veces intento desentrañar los misterios termodinámicos y cinéticos de las relaciones entre hombres y mujeres (al menos sólo en la teoría).

Difícilmente pueda dejar de mencionar a Juan, quien no sólo fue parte de este trabajo, sino también me dio la oportunidad de aprender enseñando, y con quien también entablé una cálida amistad llena de discusiones sobre temas de lo más variados, mientras el ProCab no funcionaba. Tampoco dejaría afuera el aprecio hacia Camilo, que es una de las pocas personas en el mundo (sino la única) que cree que además de hacer química, puedo hacer música.

No dejo de señalar la alta estima que siento por Omar y por Carlos, por Magdalena y por Mónica, por Bea, por Elena, por Laura P., por Yamila, por Gabriel, por Tania, por Ariadna y por tantos otros compañeros a los cuales me ha acercado el noble emprendimiento llamado AFCUDIM. Tampoco dejaré afuera de estas líneas a buenos compañeros tales como Enrique, o Richard, o José, o Andrea P., o a la Cátedra de Radioquímica y a sus integrantes (Ana, Mariella como docentes, y a Emilia, Leticia como compañeras) siempre agradecido por sus aportes a mi formación en esta rama de la Radioquímica.

Y a Soledad, en su memoria; porque creo que este trabajo habría sido de su agrado.

RESUMEN

El estudio de nuevos radiotrazadores para PET es un área mundialmente muy activa que requiere de un trabajo multidisciplinario y que implica desde la selección de los blancos moleculares, la síntesis orgánica, la marcación utilizando metodologías automatizadas que minimicen la irradiación del operador y el desarrollo de metodologías de evaluación fisicoquímica y biológicas compatibles con los cortos períodos de semidesintegración de los radionucleidos. Dentro de éstos últimos, el ^{11}C ocupa un lugar fundamental por sus ventajas, pero también por sus limitaciones. El ^{11}C permite realizar marcaciones isotópicas, con lo cual se logran radiotrazadores sin modificaciones fisicoquímicas significativas respecto a las moléculas endógenas cuyo metabolismo se desea estudiar. Por otra parte, el ^{11}C puede ser obtenido con buenos rendimientos en los ciclotrones comercialmente disponibles, y su radioquímica ha sido bien estudiada y desarrollada a lo largo de las cuatro últimas décadas. La principal limitante de su uso radica fundamentalmente en el corto período de semidesintegración (20.4 minutos), y es lo que supone un desafío para el radioquímico que desarrolla métodos de marcación con ^{11}C .

La metodología más utilizada para introducir ^{11}C en moléculas orgánicas a ser utilizadas como radiotrazadores PET, es a través de reacciones de ^{11}C -metilación con los precursores radiactivos secundarios $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$. Estos precursores están disponibles en plataformas comerciales, su radioquímica ha sido bien estudiada y por ello su utilización es mundialmente muy amplia. Un gran número de radiotrazadores PET se sintetizan utilizando estos dos precursores radioactivos, y a la fecha se utilizan para la producción de todos los radiofármacos de ^{11}C en uso preclínico y clínico en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM). Sin embargo, su aplicabilidad está limitada a moléculas nucleofílicas conteniendo los heteroátomos O, N o S. Otros precursores tales como el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, $[^{11}\text{C}]\text{CO}$, o el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ permiten la obtención de moléculas marcadas en otros grupos funcionales, con lo que se amplía el espectro de estructuras conteniendo ^{11}C y las aplicaciones de las mismas. Teniendo en cuenta lo anterior, es que en el presente trabajo se plantea la posibilidad de trabajar en el CUDIM con precursores de ^{11}C alternativos a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$.

Como punto de partida del trabajo se propuso al $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (comúnmente referido como $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ o $[^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$) como precursor radiactivo. En la Química Orgánica tradicional, el anión CN^- es un sintón atractivo, pues permite la formación de un enlace C-C por sustitución nucleofílica sobre estructuras que presenten la función C-X (X = halógeno u otros grupos salientes). El grupo nitrilo también está presente en un importante número de fármacos y compuestos de interés biológico. El uso del precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ permite obtener radiotrazadores atractivos para el diagnóstico mediante PET de alteraciones metabólicas y otros fenómenos patológicos. La síntesis de moléculas de importancia bioquímica tales como 1- $[^{11}\text{C}]\text{aminoácidos}$ 1- $[^{11}\text{C}]\text{glucosa}$, 1- $[^{11}\text{C}]\text{ácidos grasos}$, entre otros ha sido descrita en la literatura. CUDIM cuenta con una plataforma automatizada (módulo ProCab®) capaz de convertir químicamente el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, por lo que el trabajo comenzó realizando un estudio de algunas variables de la producción de este precursor en nuestra plataforma. Se

determinó que la robustez de la misma depende fundamentalmente de su frecuencia de uso, y de finos ajustes en parámetros físicos tales como el flujo de los gases utilizados. En condiciones optimizadas, el módulo ProCab® es capaz de transformar $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ con un rendimiento radioquímico de aproximadamente 30% (corregido) en no más de 10 minutos. El $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ así producido, se utilizó en un sistema modelo de reactividad, lográndose obtener D,L-1- $[^{11}\text{C}]$ Fenilalanina, utilizando para la misma una plataforma automatizada TRACERlab® FX C Pro.

En una segunda etapa, se trabajó con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ como precursor radiactivo, de acuerdo a la metodología comúnmente conocida como “fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ”. La radioquímica de fijación o incorporación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ es un terreno fértil para la obtención eficiente de radiotrazadores PET, al punto que es referida por algunos reconocidos investigadores como el “*Renacimiento de la Química PET*”. Tradicionalmente, el uso de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ se encontraba limitado a la reacción de Grignard para la síntesis de ácidos ^{11}C -carboxílicos. Aun cuando esta técnica ha sido y es extensamente empleada, posee desventajas en cuanto a la inestabilidad inherente de los precursores orgánicos empleados, y la escasa variabilidad estructural de los radiotrazadores obtenidos. Recientemente ha habido avances significativos en la incorporación de ^{11}C en moléculas orgánicas utilizando $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, para dar estructuras moleculares tales como ureas, carbamatos, oxazolidinonas y ácidos carboxílicos, o su incorporación y posterior reducción para obtener especies N - ^{11}C -metiladas. Dado el alto número de radiofármacos de uso clínico que poseen el grupo ^{11}C -metilo, se considera muy ventajoso sintetizarlos a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en lugar de los agentes ^{11}C -metilantes tradicionales ($[^{11}\text{C}]\text{MeI}$ o $[^{11}\text{C}]\text{MeOTf}$). El uso directo de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y de modalidades de reacción “one-pot” minimiza el número de pasos sintéticos, y presupone un aumento de los rendimientos de síntesis, lo que se traduce en una mayor actividad final disponible para estudios preclínicos o clínicos. En tal sentido, se propuso estudiar condiciones para llevar a cabo y optimizar reacciones de incorporación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y su posterior reducción con el fin de contar con metodologías eficientes aplicables a la síntesis de ^{11}C -radiotrazadores.

Para el trabajo con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ se utilizó también la plataforma automatizada TRACERlab®, con mínimas modificaciones de tal manera de dirigir el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ purificado a un reactor de marcación. Se estudió la fisicoquímica de su captura en solución. Se evaluaron tres sistemas radioquímicos para promover la incorporación reductiva de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en un sistema modelo de reactividad compuesto por 4-toluidina: i) DBU / PhSiH_3 , ii) IPr carbeno / PhSiH_3 y iii) TBAF / PhSiH_3 . Para cada uno de ellos se estudió la influencia de factores físicos y químicos, tanto en la pureza radioquímica de la amina ^{11}C -metilada como en su rendimiento radioquímico. Dos de ellos (IPr / PhSiH_3 y TBAF / PhSiH_3) se aplicaron a la síntesis del radiotrazador PET $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$. Mediante el uso de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ / TBAF / PhSiH_3 en diglyme, a 150°C por 1 min, se logró marcar $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ en un 14.8% de rendimiento radioquímico, con actividad molar de $61\text{ GBq}/\mu\text{mol}$. Si bien este valor es aparentemente bajo por el uso directo de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, el rendimiento radioquímico del $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ producido de esta forma duplica al del método de ^{11}C -metilación con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ actualmente utilizado en CUDIM. La aplicación de esta metodología permitió desarrollar un método novedoso de preparación para este

radiofármaco, junto con su control de calidad en un contexto preclínico. La validación de este proceso en el marco del área de Producción permitiría evaluar la aplicabilidad de este método para producciones de rutina.

ABREVIATURAS

La siguiente lista presenta las abreviaturas utilizadas en esta tesis. Las abreviaturas que provienen del idioma inglés (se indican con “en”) se muestran directamente traducidas al español (“es”).

(ac)	Acuoso, en solución acuosa
(g)	Gaseoso
(l)	Líquido
(s)	Sólido
6-OH-BTA-0	2-(4-aminofenil)benzo[d]tiazol-6-ol, precursor de [¹¹ C]PIB
A_E	Actividad específica (Bq/kg)
A_M	Actividad molar (Bq/mol)
BEMP	2- <i>tert</i> -Butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina.
CT	Tomografía Computada
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-eno.
dc (en)	Corregido por decaimiento (es)
diglyme	Bis(2-metoxietil)éter
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EOB (en)	Final de la irradiación (es)
EOD (en)	Final del envío (es)
EOL (en)	Final del marcado (es)
EOS (en)	Final de la síntesis (es)
GMP (en)	Buenas Prácticas de Manufactura (es)
HPLC (en)	Cromatografía Líquida de Alta Performance (es)
IMes	1,3-Bis(2,4,6-trimetilfenil)imidazol-2-ilideno
IPr	1,3-Bis-(2,6-diisopropilfenil)imidazol-2-ilideno
IR	Infrarrojo

MeCN	Acetonitrilo
ndc (en)	No corregido por decaimiento (es)
NHC (en)	Carbeno N-heterocíclico (es)
OTf	Triflato (trifluorometilsulfonato)
PET (en)	Tomografía de Emisión de Positrones (es)
PiB	Pittsburg Compound B (2-(4-(metilamino)fenil)benzo[d]tiazol-6-ol)
PRN	Pureza radionucleídica
PRQ	Pureza radioquímica
RMN	Resonancia magnética nuclear
RRQ	Rendimiento radioquímico
SNC	Sistema Nervioso Central
SOB (en)	Comienzo de la irradiación (es)
SOD (en)	Comienzo del envío (es)
SOL (en)	Comienzo del marcado (es)
SOS (en)	Comienzo de la síntesis (es)
SPE (en)	Extracción en fase sólida (es)
SPECT (en)	Tomografía computada de emisión de fotón único (es)
$t_{1/2}$	Período de semidesintegración
t_R	Tiempo de retención
TBAF (en)	Fluoruro de tetrabutilamonio (es)
TBD	1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno
TLC (en)	Cromatografía en capa delgada (es)
UV	Ultravioleta

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1. IMAGENOLÓGÍA MOLECULAR PET

La Tomografía de Emisión de Positrones (PET) es una de las técnicas de diagnóstico de mayor especificidad y sensibilidad de la Imagenología Molecular. Permite la visualización y medición de procesos fisiológicos, bioquímicos y farmacológicos *in vivo* a nivel molecular en forma mínimamente invasiva. La técnica PET brinda imágenes funcionales en relación al comportamiento de una molécula determinada en el tejido u órgano en estudio. Esta técnica ha encontrado numerosas aplicaciones en los campos de la oncología, neurología, cardiología, así como en las ciencias farmacéuticas (farmacocinética y farmacodinamia) y en el desarrollo de moléculas bioactivas.¹

La técnica PET se basa en los análisis de la distribución de compuestos radiactivos (denominados radiofármacos PET) marcados con radionucleidos emisores de positrones que se administran a los organismos vivos, generalmente por vía intravenosa. Dichos radiofármacos se utilizan en concentraciones muy bajas (10^{-6} - 10^{-12} M) por lo cual permiten estudiar los procesos biológicos sin perturbar el sistema bioquímico ni producir efectos farmacológicos y toxicológicos significativos.²

Los fundamentos físicos de la técnica PET residen en la naturaleza de los radionucleidos emisores de positrones. Los núcleos de estas especies poseen un déficit de neutrones, y por lo tanto son inestables. La estabilidad se logra por medio de una transformación, a nivel nuclear, de un protón a un neutrón, con la concomitante emisión de un positrón (β^+ o e^+) y un neutrino (ν). Los positrones viajan una corta distancia que depende de la energía con la que son emitidos desde el núcleo, y a medida que avanzan en su trayectoria van perdiendo energía cinética. Cuando el positrón agota su energía cinética, puede encontrarse con un electrón (e^-) del medio y aniquilarse con éste emitiendo dos fotones gamma de 511 keV en sentidos opuestos (**Figura 1**). Esta energía coincide con la masa en reposo de ambas partículas de acuerdo a la fórmula de equivalencia masa-energía de Einstein ($E = m \cdot c^2$).

¹ [a] Fass, L. (2008) *Molecular oncology*. 2: 115, [b] Fowler, J. S., Wolf, A. P. (1997) *Acc. Chem. Res.* 30: 181, [c] Phelps, M. E. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 9226, [d] Paans, A. M. J. vanWaarde, A., Elsinga, P. H. Willemsen, A. T. M., Vaalburg, W. (2002) *Methods*, 27: 195. [e] Hargreaves R. J., Rabiner E. A. (2014) *Neurobiol. Dis.* 61: 32. [f] Wahl, R.L. (2009) "Principles and Practice of PET and PET/CT" 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. PA.

² Valk, P.E., Bailey, D.L, Townsend, D.W., Maisey, M.N. (2004) *American Journal of Neuroradiology* 26(9): 2429.

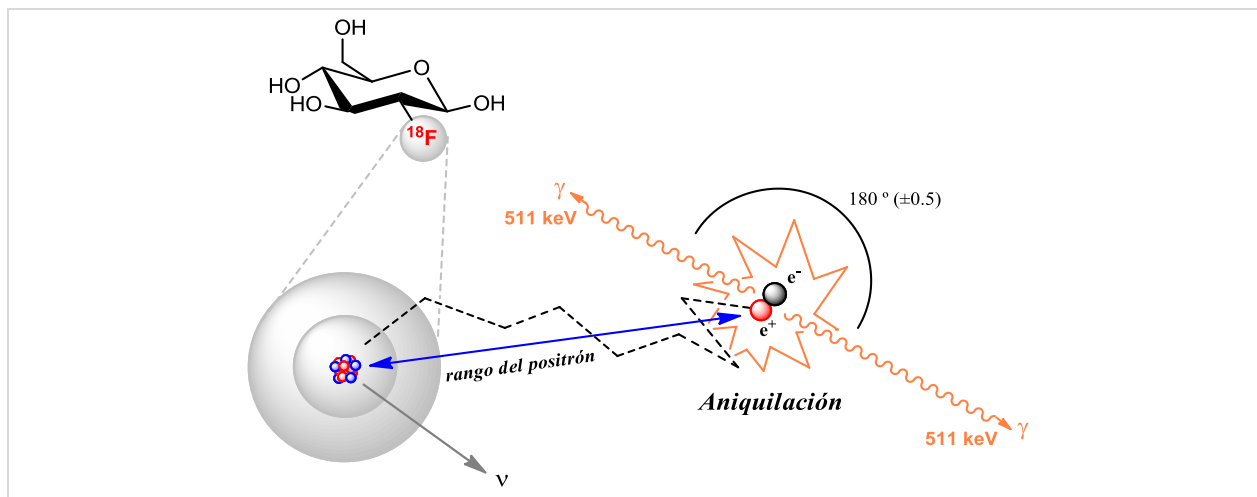


FIGURA 1. Aniquilación positrón-electrón que genera dos fotones gamma de 511 keV, emitidos en la misma dirección, pero en sentidos opuestos. Ejemplo radiofármaco 2-[18F]fluoro-2-desoxiglucosa.

La emisión de los fotones gamma de 511 keV y su detección es la base de la técnica PET. El radiofármaco PET que se administra al paciente es debidamente elegido para su patología y/o la pregunta que se busca responder. Una vez inyectado, se distribuye en su organismo y tenderá a acumularse en aquellos tejidos que presenten determinada alteración fisiológica propia de la enfermedad. La radiación gamma de aniquilación que emerge del cuerpo del paciente interacciona con los detectores ubicados en anillos en el tomógrafo. Dichos detectores son capaces de discriminar dos haces de fotones a 180 ° que llegan al anillo en forma simultánea, lo que se conoce como captación de coincidencia (**Figura 2**).



FIGURA 2. La detección de la coincidencia por parte del anillo detector permite la reconstrucción de imágenes tridimensionales de la distribución del radiofármaco en el cuerpo del paciente.

La reconstrucción digital de la información permite a los médicos nucleares contar con imágenes tridimensionales de la distribución del radiofármaco en el organismo del paciente, a partir de las cuales se realiza el diagnóstico.³ De esta forma, la técnica permite identificar anomalías bioquímicas a nivel tisular de forma específica, sensible y mínimamente invasiva.

2. RADIONUCLEIDOS Y RADIOFÁRMACOS PET

2.1. RADIONUCLEIDOS USADOS EN PET

Como se mencionó en el apartado anterior, los radionucleidos utilizados en la técnica PET son nucleidos emisores de positrones debido a un déficit de neutrones en su estructura. Usualmente su $t_{1/2}$ es corto o ultracorto (pocos minutos a algunas horas). Poseen un alto porcentaje de emisión β^+ y la energía media de emisión del positrón es característica de cada radionucleido. Usualmente cuanto mayor es la energía de emisión de un positrón, mayor es la distancia que éste puede recorrer antes de aniquilarse con un electrón del medio. Este fenómeno afecta la calidad de las imágenes ya que cuanto mayor es el rango máximo, menor resulta la resolución de las mismas⁴. Los radionucleidos PET de uso clínico son producidos fundamentalmente de dos formas: a) generadores, o b) aceleradores de partículas (ciclotrones). Estos últimos se describirán en el apartado 2.3.2.1

Los radionucleidos más utilizados para preparar radiofármacos PET provenientes de ciclotrón, se presentan en la **Tabla 1**. Dado que ^{11}C , ^{13}N y ^{15}O son isótopos de elementos presentes en la mayoría de las moléculas biológicamente activas, estos radionucleidos permiten la marcación de una multitud de compuestos virtualmente indistinguibles de sus contrapartes no marcadas, lo cual se conoce como marcación isotópica.⁵

A diferencia de C, N y O, la abundancia natural de flúor en las biomoléculas endógenas es muy limitada. Sin embargo, se acepta que el flúor puede actuar como bioisótopo del H o del O en función de su tamaño pequeño y su elevada electronegatividad. Además, el flúor es un sustituyente común en el campo del desarrollo de fármacos, y existe un número importante de moléculas conteniendo flúor que pueden ser utilizadas como compuestos líderes en el desarrollo de ^{18}F -radiofármacos (particularmente para radiofármacos PET del SNC).⁶

³ Khalil, M.M. (2011) “Basic Sciences of Nuclear Medicine: Positron Emission Tomography (PET): Basic Principles” 179. Springer-Verlag: Heidelberg.

⁴ Levin, C.S., Hoffman, E. J. (1999) *Phys. Med. Biol.*, 44:781.

⁵ Mach, R.H. (2008). University of New Mexico Health Sciences Center. Pharmacy Continuing Education.

⁶ [a] Barnes-Seeman D.; Beck J.; Springer C. (2014) *Curr. Top. Med. Chem.* 14: 855. [b] Park B. K.; Kitteringham N. R. (1994) *Drug Metab. Rev.* 26: 605.

TABLA 1. Principales radionucleidos utilizados para la marcación de radiofármacos PET⁷

Radionucleido	t _{1/2} (min)	Características de la emisión β ⁺ (%, Energía)	A _M teórica (GBq/μmol)	Rango máximo del positrón en agua (mm) FW 0.5M	Producción
¹⁵ O	2,07	99.9%, 1.7 MeV	3.49 x 10 ⁶	1.5	Ciclotrón
¹³ N	9,97	99.8%, 1.2 MeV	6.99 x 10 ⁵	1.4	Ciclotrón
¹¹ C	20,3	99.8%, 1.0 MeV	3.41 x 10 ⁵	1.1	Ciclotrón
¹⁸ F	109,7	96.7%, 0.7 MeV	6.33 x 10 ⁴	1.0	Ciclotrón

Aunque se considera que el ¹⁸F es un radionucleido ventajoso para la obtención de radiofármacos PET en función de sus características nucleares, físicas y químicas⁸, el ¹¹C cuenta con particularidades que lo hace un radionucleido atractivo para el desarrollo y aplicación de radiofármacos PET. Dichas propiedades serán discutidas en el apartado 3.1.

En virtud del breve período de semidesintegración de ¹³N y ¹⁵O, su aplicación se ve limitada a la preparación de moléculas sencillas como [¹³N]NH₃ o [¹⁵O]H₂O, utilizadas para estudios de perfusión cardíaca y cerebral respectivamente.

Dentro de los radionucleidos PET obtenidos por medio de un generador, se encuentra el ⁶⁸Ga (t_{1/2} = 68.3 min). Este radiometal ha encontrado numerosas aplicaciones en la clínica PET, fundamentalmente para el marcado de péptidos o ligandos de dianas biológicas, a las cuales se les une un “agente quelante bifuncional”. Estos agentes poseen una función química con la que se unen al péptido o ligando, y una porción molecular capaz de quelar al ⁶⁸Ga³⁺ (anillos DOTA, NOTA, TETA, etc.). Los avances en la radioquímica del ⁶⁸Ga han permitido desarrollar numerosos radiofármacos tales como el ⁶⁸Ga-DOTA-TATE (para el diagnóstico de tumores neuroendócrinos) o el ⁶⁸Ga-PSMA (para el diagnóstico de tumores de próstata), entre otros.⁹

⁷ IAEA, (2008) Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice. Vienna. Vol. Technical Reports Series no. 465

⁸ Jacobson, O., Kiesewetter, D.O, Chen, X.Y. (2015) *Bioconjug Chem.* 26(1): 1.

⁹ [a] Velikyan, I. (2015) *Molecules*, 20:12913, [b] Velikyan, I. (2014) *Theranostics* 4(1):47.

2.2. RADIOTRAZADORES Y RADIOFÁRMACOS PET

El uso de átomos o compuestos radiactivos para seguir procesos biológicos fue usado por primera vez por George De Hevesy en 1911, quien estudió la captación de ^{212}Pb en plantas.¹⁰ Desde ese entonces se han utilizado los trazadores radiactivos (radiotrazadores) en numerosas aplicaciones biológicas, en distintos campos del conocimiento científico. En principio, un radiotrazador es cualquier sustancia (atómica o molecular) que pueda ser utilizada para seguir y estudiar cuantitativamente un fenómeno biológico en un organismo vivo sin perturbar dicho fenómeno, y cuya detección se basa en la emisión de radiación desde el interior del organismo.¹¹ Por su parte un radiofármaco es un radiotrazador que ha sido producido bajo la forma de una formulación medicinal apta para ser administrada a seres humanos principalmente por vía intravenosa, con aplicaciones diagnósticas o terapéuticas (**Figura 3**).¹² Los radiofármacos de diagnóstico poseen en su estructura un emisor gamma ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{67}Ga) o un emisor de positrones (^{11}C , ^{18}F , ^{68}Ga); en ambos casos, la radiación emerge del cuerpo del paciente y es captada externamente. Los radiofármacos de terapia poseen un radionucleido emisor β^- (^{177}Lu , ^{188}Re , ^{131}I) o α (^{223}Ra), ya que su finalidad es dañar selectivamente el tejido blanco al cual se unen.¹³

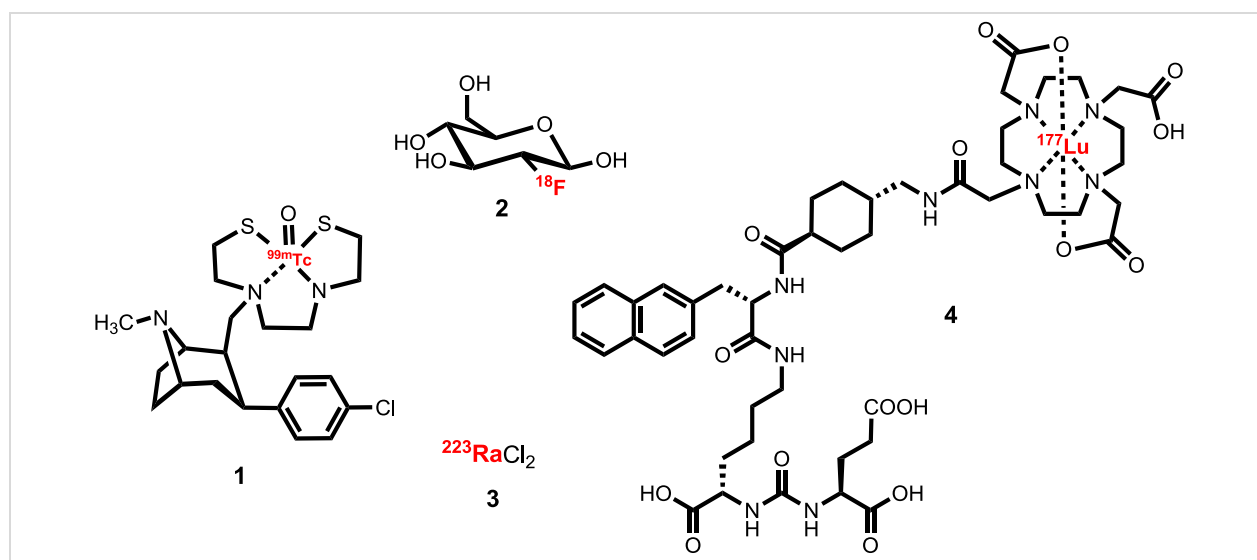


FIGURA 3. Ejemplos de estructuras de diferentes radiofármacos. 1: [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TRODAT-1, radiofármaco SPECT para sistema dopaminérgico, 2: 2- ^{18}F fluoro-2-desoxiglucosa, radiofármaco PET para hipermetabolismo glucídico, 3: $^{223}\text{RaCl}_2$, radiofármaco de terapia (emisor α) para metástasis óseas de cáncer de próstata, 4: ^{177}Lu -PSMA-617, radiofármaco de terapia (emisor β^-) para cáncer de próstata.

¹⁰ Hevesy, G. (1923) *Biochem. J.* 17, 439.

¹¹ [a] Fowler J. S., Wolf A. P. (1982). *Nucl. Sci. Ser. Natl Acad. Sci. Natl Res. Council Monogr.* 1982., [b] "Tracer" en <https://goldbook.iupac.org/html/T/T06422.html> (consultado Nov. 2018)

¹² World Health Organization (2008) "Radiopharmaceuticals" Document QAS/08.262/FINAL

¹³ Chain, Y., Illanes, L. (2015) "Radiofármacos en Medicina Nuclear" 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

Cientos de moléculas han sido hasta la fecha marcadas utilizando tan sólo ^{11}C y ^{18}F , dentro de las que se incluyen metabolitos, hormonas, neurotransmisores, ligandos endógenos y exógenos, fármacos, entre otros.¹⁴ No obstante, sólo una pequeña fracción de estas moléculas ha encontrado aplicación clínica para el diagnóstico PET. De todos modos, mencionar exhaustivamente todos los radiofármacos de ^{11}C y ^{18}F que se utilizan en la clínica PET va más allá del alcance de esta sección. En la **Tabla 2** se resumen algunos de los radiofármacos de ^{11}C y ^{18}F que se han validado para el diagnóstico por medio de la técnica PET.¹⁵

TABLA 2. Algunos radiofármacos de ^{11}C y ^{18}F utilizados en la clínica PET para el diagnóstico de procesos patológicos oncológicos, neurológicos y cardiológicos.

Radiofármaco	Proceso Bioquímico	Aplicaciones representativas
^{11}C -L-metionina	Metabolismo Proteico	Tumores SNC
^{11}C -colina	Biosíntesis de fosfolípidos	Tumores de Próstata
^{11}C -PiB	Unión a proteína β -amiloide	Enfermedad de Alzheimer
^{11}C -Deuterodeprenil	Inhibidor MAO-B	Enfermedad de Creutzfeld-Jakob.
^{11}C -Acetato	β -Oxidación de ácidos grasos	Metabolismo cardíaco; tumores de próstata y riñón.
^{11}C -Metomidato	Inhibidor 11 β -hidroxilasa	Carcinomas adrenocorticales
^{18}F -Fluorodesoxiglucosa	Metabolismo glucídico	Múltiples aplicaciones onco- y neurológicas
^{18}F -Fluorotimidina	Metabolismo ADN	Tumores en pulmón, mama, cerebro.
^{18}F -Fluoromisonidazol	Bioreducción en condiciones de baja $p\text{O}_2$	Tumores hipóxicos
^{18}F -Fallypride	Antagonista de receptores D_2 / D_3	Desórdenes neuropsiquiátricos
^{18}F -Fluoruro de sodio	Metabolismo óseo	Cáncer óseo
^{18}F -Flumazenil	Antagonista receptor benzodiazepinas	Epilepsia

¹⁴ [a] Iwata, R. "Reference Book for PET radiopharmaceuticals" (2004) CyRIC Tohoku University, [b] Miller, P. W., Long, N. J., Vilar, R., Gee, A. D. (2008). 47(47):8998, [c] Chaturvedi, S., Mishra A.K. (2016) *Front. Med.* 3:5.

¹⁵ "Radiochemical Syntheses, Volume 1: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, 1st. Edition (2012). Editors: Scott, P.J.H and Hockley, B.G. John Wiley & Sons. Inc.

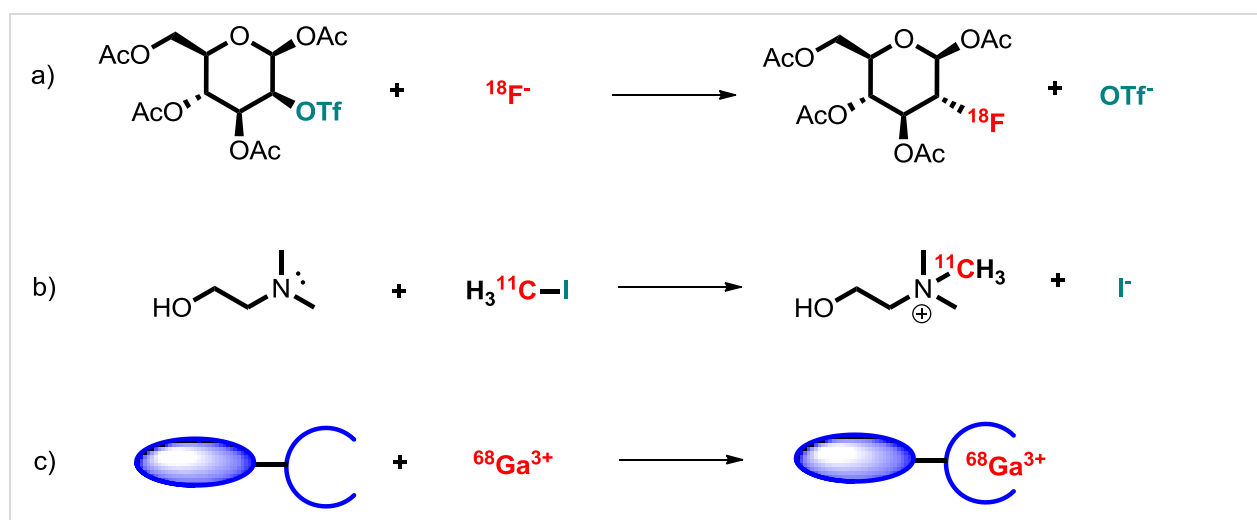
2.3. RADIOSÍNTESIS Y CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFÁRMACOS PET

2.3.1. Generalidades

Las técnicas radioquímicas son una parte importante para el desarrollo de radiotrazadores y radiofármacos. De esta forma, la radioquímica PET es de vital importancia para el desarrollo de la tecnología PET en la medida que nuevas técnicas dan lugar a nuevos compuestos que amplían el espectro de radiofármacos disponibles.¹⁶

La marcación de una molécula usualmente se lleva a cabo mediante una reacción química entre una *molécula precursora no radiactiva*, comúnmente orgánica, y un *precursor radiactivo*, que contiene el radionucleido elegido, bajo forma iónica o molecular.

Dichas reacciones pueden ser sustituciones (las reacciones de marcación más habituales con ^{11}C o ^{18}F) o adiciones (más comúnmente encontradas en las reacciones de complejación con radiometales) como se muestra en el **Esquema 1**.



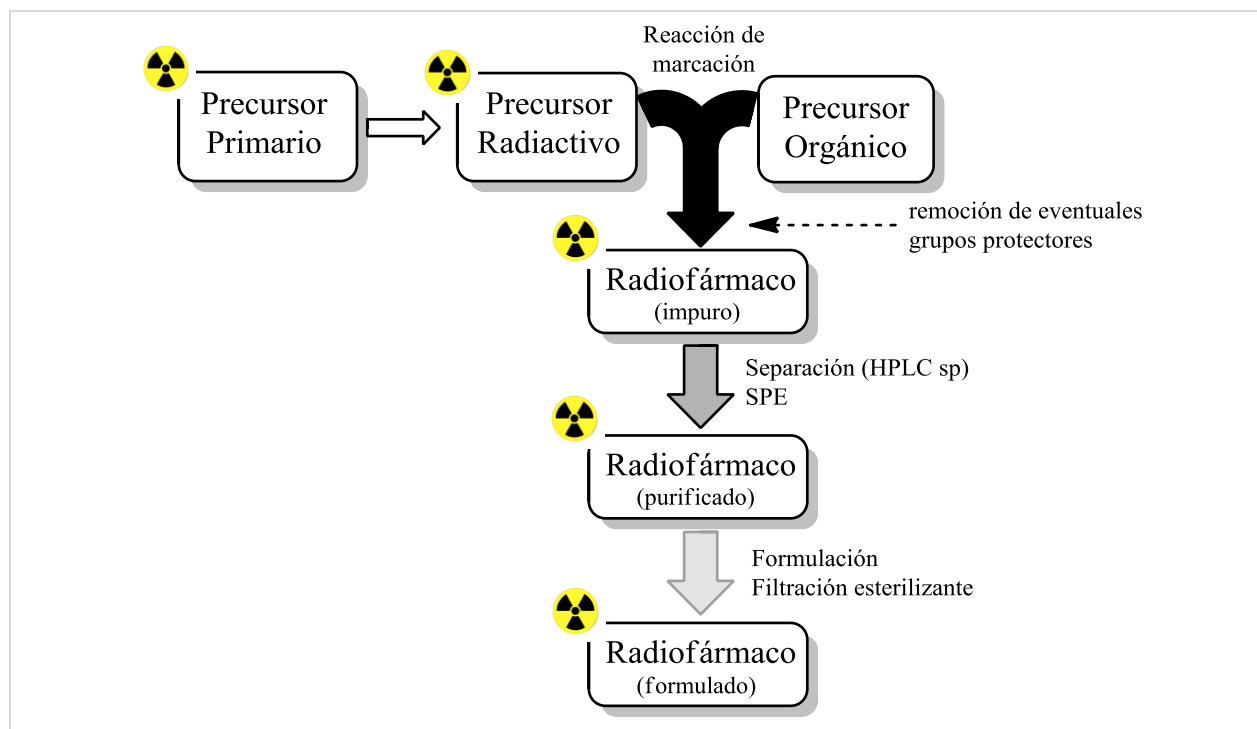
ESQUEMA 1. Ejemplos de reacciones de marcación con radionucleidos PET: a) marcación de 2-triflato de tetraacetilmanosa (precursor [^{18}F]FDG) con [^{18}F]F $^-$ (^{18}F -fluoración nucleofílica), b) marcación del *N,N*-dimetilaminoetanol (precursor [^{11}C]Colina) con [^{11}C]CH $_3$ I (^{11}C -metilación electrofílica), c) ejemplo de marcación con $^{68}\text{Ga}^{3+}$ de una biomolécula funcionalizada con un quelante.

Dado el breve período de semidesintegración de la mayoría de los radionucleidos PET, manipulaciones químicas extensivas y procedimientos largos se hacen inviables. En tal sentido, los procedimientos tradicionales (“de mesada”) utilizados en la Química Orgánica clásica resultan inadecuados para ser aplicados en reacciones de marcación con radionucleidos PET.¹⁷

¹⁶ Långström, B., Itsenko, O., Rhaman, O. (2007) *J. Labelled. Compd. Rad.*, 50: 794.

¹⁷ Li, Z.B., Conti, P.S., (2010) *Advanced Drug Delivery Reviews* 62:1031.

Los procesos de marcación deben ser rápidos y eficientes. Éstos usualmente involucran una serie de etapas que en forma esquemática se pueden describir como: (1) la preparación del precursor radiactivo a partir del precursor radiactivo primario, (2) la reacción de marcación propiamente dicha, (la reacción química entre el precursor orgánico y el precursor radiactivo), (3) la remoción de grupos protectores residuales del precursor orgánico (si los tuviere), (4) la purificación de la molécula marcada (separación de impurezas químicas y radioquímicas), y (5) la formulación y filtración esterilizante para hacer al preparado biocompatible (**Esquema 2**).



ESQUEMA 2. Producción de un radiofármaco PET.

Teniendo en cuenta lo anterior, se comprende que el desarrollo de procesos de marcación de moléculas aplicada a la síntesis de radiofármacos PET es un desafío para el investigador. El radioquímico intentará minimizar el número de etapas sintéticas, reducir el tiempo de las mismas o simplificarlas a los efectos de aumentar el rendimiento radioquímico.

Otra característica notable de las reacciones de marcación con precursores radiactivos, es que éstos están presentes en cantidades muy inferiores a las utilizadas en la escala semi-micro de la síntesis orgánica tradicional. A modo de ejemplo: una reacción de marcación en donde se utilizan 18.500 MBq (500 mCi) de un precursor radiactivo de ^{11}C , implica trabajar con 5.4×10^{-11} mol de dicha especie. Si se considera que dicho precursor se enfrenta usualmente a 4.0×10^{-6} mol de precursor orgánico (por ejemplo 1 mg de un compuesto de masa molar hipotética 250 g/mol), es notorio el defecto estequiométrico en el cual se encuentran los precursores radiactivos. Por este hecho se requiere que la pureza de los precursores orgánicos y solventes de marcación sea elevada, evitando o minimizando reacciones competitivas y por lo tanto la formación de productos no deseados. Sin embargo, el defecto estequiométrico del precursor radiactivo hace que las reacciones sean de cinética de pseudo-primer orden respecto a

esta especie. Muchas reacciones que son imprácticas a escala estequiométrica (ej. metilación de aminas con CH_3I) se hacen útiles en las condiciones de marcación (mono- ^{11}C -metilación de aminas con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$).¹⁸

Una particularidad de los compuestos marcados, es la posibilidad de sufrir descomposición por el fenómeno denominado radiolisis, es decir, la descomposición causada directa o indirectamente por la energía de su propia emisión radiactiva. La descomposición radiolítica va más allá del propio decaimiento del radionucleido presente en el radiofármaco, e involucra transformaciones promovidas ya sea por la energía que una molécula recibe de sus vecinas (radiolisis primaria), o por oxidación mediada por especies radicalarias generadas por la radiación del medio (radiolisis secundaria). En principio, en toda reacción de marcación es esperable que aparezcan subproductos oxidados, hidrolizados, etc., debido a la radiolisis. Esta última puede evitarse o atenuarse agregando aditivos a la formulación del radiofármaco, que actúan como *scavengers* de radicales libres (tales como EtOH, ácido ascórbico, ácido gentísico) y así protegen las moléculas de radiofármaco.¹⁹

2.3.2. Equipamiento y medidas de seguridad

A continuación, se detallan los principales componentes del equipamiento tecnológico utilizado en la producción de radionucleidos y radiofármacos PET, así como las medidas de seguridad radiológica que utiliza el operador.

2.3.2.1. Ciclotrón

El ciclotrón es un acelerador de partículas que se emplea para la producción de los radionucleidos PET.²⁰ El primer ciclotrón se desarrolló en la década del '30 por parte de E. O. Lawrence y M. Stanley-Livingston en Berkeley (California).²¹ La mayoría de los actuales ciclotrones de uso médico descienden del primer ciclotrón de protones de 1 MeV, pero operan a energías más elevadas (10 a 20 MeV).

Un ciclotrón (**Figura 4**) consta de una cámara de alto vacío en la que se aceleran partículas (tales como protones o deuterones) por la aplicación conjunta de un campo magnético constante y un campo eléctrico alternante (producido por una radiofrecuencia). Las partículas son producidas por la ionización de los gases H_2 o D_2 en el centro de la cámara y adquieren altas energías cinéticas en el interior del ciclotrón. Mediante la colisión de estas partículas (proyectiles) con las sustancias contenidas en los blancos (targets) se producen reacciones nucleares que dan lugar a los diferentes radionucleidos PET. Los targets se clasifican de acuerdo al estado de agregación de su contenido, en tal sentido, se tienen targets sólidos (ej: $[^{64}\text{Ni}]\text{NiSO}_4$ (s) para la obtención de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$), targets líquidos (ej: $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ (l)

¹⁸ Långström B. (1980) Doctoral Thesis. Acta Universitatis Upsaliensis. No. 555

¹⁹ [a] Bayly, R.J., Evans, E.A. (1966). *J. Labelled. Compd. Radiopharm.* 2:1, [b] Fukumura, T., Nakao, R., Yamaguchi, M, Suzuki, K. (2004) *App. Radiat. Isotop.* 61:1279.

²⁰ A. M. J. Paans, (2003) *Nukleonika*, 48: S169.

²¹ Lawrence, E.O., Livingston, M. S. (1932) *Phys. Rev.* 40: 19

para la obtención de [^{18}F]F $^-$) y targets gaseosos (ej: N $_2$ (g)/O $_2$ (g) para la obtención de [^{11}C]CO $_2$).

En la **TABLA 3** se detallan los métodos más usuales de obtención de radionucleidos PET a nivel de los ciclotrones de uso médico.

TABLA 3. Métodos más comunes para la obtención de radionucleidos PET de ciclotrón

Radionucleido	Especie contenida en el blanco	Reacción nuclear involucrada	Forma química bajo la cual se produce el radionucleido
^{11}C	N $_2$ (O $_2$)	$^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$	[^{11}C]CO $_2$ (g)
^{18}F	H $_2$ ^{18}O	$^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n}) ^{18}\text{F}$	[^{18}F]F $^-$ (ac)
^{13}N	H $_2$ ^{16}O (EtOH)	$^{16}\text{O} (\text{p}, \alpha) ^{13}\text{N}$	[^{13}N]NH $_3$ (ac)
^{15}O	N $_2$ (O $_2$)	$^{14}\text{N}(\text{d}, \text{n}) ^{15}\text{O}$	[^{15}O]O $_2$ (g)

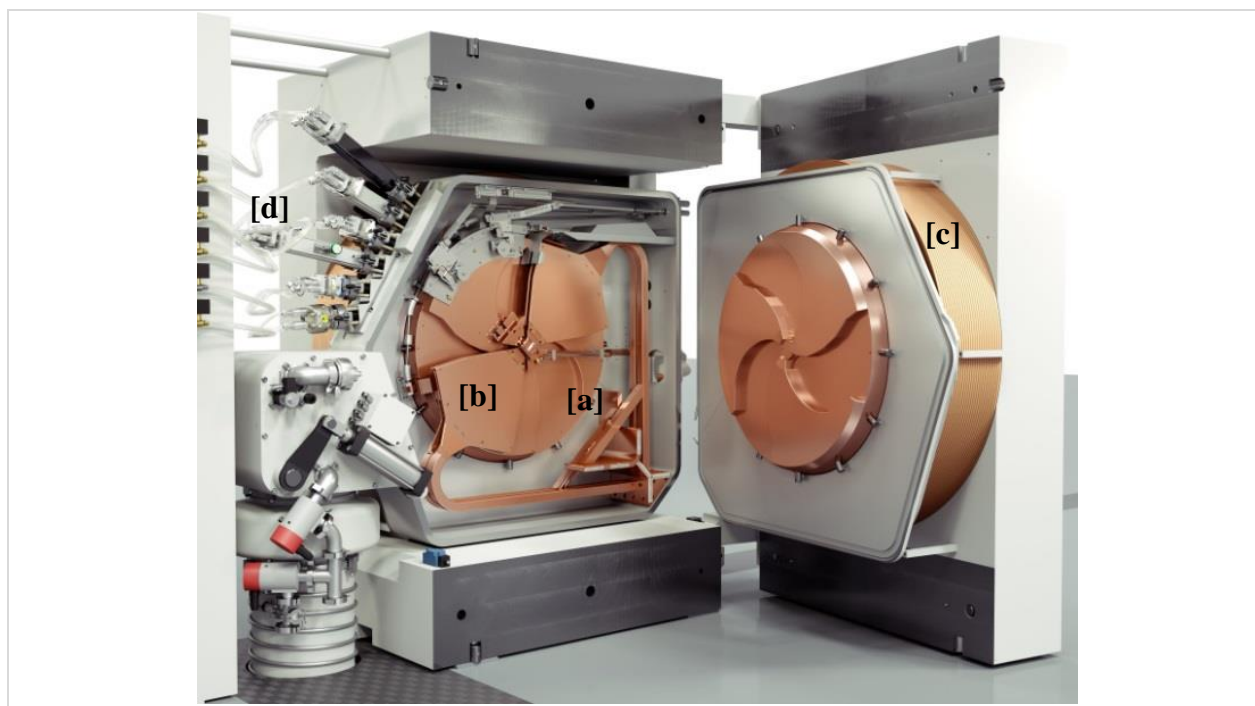


FIGURA 4. Ciclotrón comercial PETtrace® 800de 16.5 MeV (GENERAL ELECTRIC) ²², mostrando su parte interna. Se aprecia [a] la cámara de alto vacío donde se produce la aceleración de las partículas, [b] las “Ds” donde se establece el campo eléctrico oscilante, [c] el electroimán, [d] el sistema de blancos (targets). Este ciclotrón es capaz de acelerar protones y deuterones.

²² “SNMMI Product Showcase” <https://www.dotmed.com/legal/print/story.html?nid=43058> (consultado enero 2019)

Para el caso del ^{11}C , el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ es la forma química usual bajo la cual este radionucleido es obtenido en los targets que utilizan mezclas gaseosas $\text{N}_2 / 0.1\% \text{O}_2$ de alta pureza (99.999% o mayor). En tal sentido, el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (g) es el *precursor radiactivo primario* de radiofármacos de ^{11}C . Si en lugar de O_2 se utiliza H_2 , la forma química de obtención de ^{11}C será $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (g). La producción de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ tiene la ventaja de ser menos proclive a sufrir dilución isotópica por parte del CO_2 ambiental, y por lo tanto el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ puede ser obtenido con mayor A_M^{23} (ver apartado 3.2) aunque su rendimiento es menor si se compara con la obtención de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.²⁴

2.3.2.2. Módulos de Síntesis y Hot-cells

Los módulos de síntesis son plataformas que permiten la automatización de los procesos de marcación. Contienen los accesorios necesarios para llevar a cabo todos los pasos de una radiosíntesis, tales como fueron mencionados en la sección 2.3.1. Son capaces de recibir el precursor radiactivo proveniente del ciclotrón, purificarlo y eventualmente transformarlo químicamente en especies más reactivas. Poseen un reactor donde llevan a cabo la reacción de marcación (incorporación del radionucleido en la molécula orgánica precursora), y usualmente cuentan con sistemas que permiten la separación del radiofármaco de las impurezas químicas (disolvente de marcación, catalizadores, aditivos, etc.) y radioquímicas (precursor radiactivo sin reaccionar, productos secundarios, productos de radiólisis, etc.) que lo acompañan luego de finalizar la marcación. Esta separación se puede lograr mediante HPLC semipreparativo (con detección UV y gamma), que permite detectar y recoger la fracción que corresponde al radiofármaco. Una vez que éste último ha sido separado de sus impurezas químicas y radioquímicas usualmente se purifica por SPE (que permite remover los disolventes del HPLC). Por último, los módulos son capaces de formular el radiofármaco de tal manera de que el mismo se encuentre en una preparación inyectable, agregando agentes que permitan obtener un producto biocompatible.

Los módulos pueden ser comerciales o “*custom-made*” (diseñadas de acuerdo a las necesidades del radioquímico). La gran mayoría de los módulos comerciales permiten automatizar los procesos radiosintéticos, ya que son controlados por una computadora que comanda la ejecución de cada paso requerido en la radiosíntesis (calentamientos, vaciado de reservorios o transferencia de sus contenidos, apertura o cierre de válvulas, monitoreo de parámetros físicos en tiempo real, etc.). El operador ejecuta el método inmediatamente antes de recibir el precursor radiactivo desde el ciclotrón, y sigue el proceso radiosintético desde la computadora, observando la evolución de los parámetros fisicoquímicos del mismo tal como los muestra la interfase del programa (**Figura 5**).²⁵

²³ Andersson, J, Truong, P., Halldin, C. (2009) *App. Radiat. Isotop.*, 67:106.

²⁴ Buckley, K. R., Huser, J., Jivan, S., Chun, K. S., Ruth, T. J. (2000) *Radiochim. Acta* 88:201

²⁵ GE Medical Systems.(2004) “GUÍA DEL OPERADOR TRACERlab FXC” DOCUMENTO 2368517-106 .Rev (0)

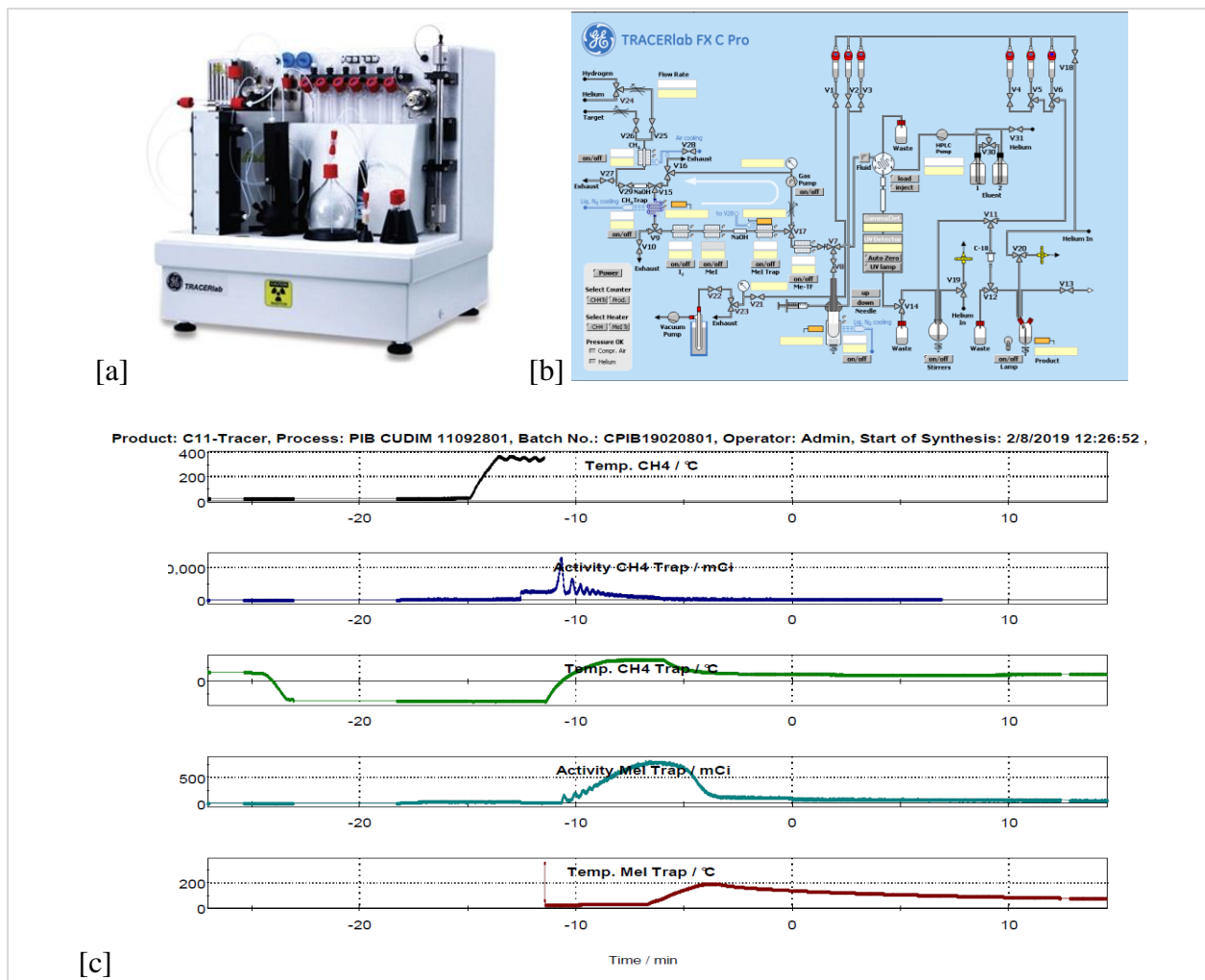


FIGURA 5. [a] Módulo automatizado TRACERlab® FX C Pro (GE) y [b] Interfase digital del programa que lo comanda, donde se aprecian válvulas, tubuladuras, reservorios, sensores, etc. [c]gráficas mostrando los parámetros físico-radioquímicos del proceso radiosintético.

La automatización posee ventajas en el marco de una Radiofarmacia PET que opera bajo los lineamientos de las GMP, pues brinda la posibilidad de contar con métodos de preparación de radiofármacos robustos, seguros y reproducibles, en la medida que se minimizan los posibles errores humanos. Aun así, los módulos requieren un plan de mantenimiento riguroso, múltiples acondicionamientos, ajustes y chequeos previos al proceso sintético, y un continuo control de los parámetros operativos para detectar fallas. En aquellos módulos que no utilizan partes descartables (“cassettes”), una limpieza exhaustiva (previamente validada) posterior a cada radiosíntesis es crucial para evitar contaminación cruzada.



FIGURA 6. Módulo automatizado GE TRACERlab® FX C Pro en Hot-Cell COMECER MIP1-1 1390 LAF (Fotografía de CUDIM).

Los módulos usualmente se colocan en recintos blindados denominados “hot cells” (celdas calientes, **Figura 6**) que brindan seguridad radiológica al operador, (acorde a las normas internacionales de protección radiológica) pues minimizan las dosis de radiación recibidas por aquél.²⁶ Las hot cells por su parte pueden contar con aire de calidad para la preparación de inyectables en su interior, y estar localizadas en un área limpia de producción de inyectables, de modo de cumplir con los requisitos GMP para la preparación de radiofármacos.²⁷

2.3.2.3. Control de Calidad

Previo a la utilización de un radiotrazador en un estudio clínico o preclínico, se debe controlar que la preparación cumpla con determinados requerimientos de calidad, que aseguren que la misma sea inocua para el paciente u organismo en estudio.²⁸ Los controles de calidad de un radiofármaco se encuentran por lo general establecidos en las diferentes farmacopeas (USP

²⁶ IAEA. (2016) “Protección Radiológica y seguridad de las fuentes de radiación: Normas básicas internacionales de seguridad. Normas de seguridad de la OIEA para la protección de las personas y el medio ambiente”. Requisitos de seguridad Generales. Parte 3. Viena.

²⁷ OMS (2011) “Buenas Prácticas de manufactura establecidas por la OMS para productos farmacéuticos estériles” Serie de informes técnicos de la OMS. No. 961, Anexo 6.

²⁸ [a] Saha, G. B. (2003) “Fundamentals of Nuclear Pharmacy”, 5th ed. Springer, Heidelberg, p. 151. [b] Nakao, R., Furutuka, K., Yamaguchi, M., Suzuki, K. (2006), *Nucl. Med. Biol.* 33: 441.

o Ph.Eur.)²⁹, pero en caso de que en ellas no esté presente la monografía, cada centro establece controles generales internos basados en antecedentes bibliográficos.

La identificación y caracterización de un radiofármaco debe basarse en métodos indirectos. Técnicas tales como RMN o IR no pueden ser utilizadas dada la baja concentración molar en la que se encuentra el radiotrazador. En tal sentido, la cromatografía líquida (TLC o HPLC, o ambas) es el método por excelencia para la identificación y cuantificación de los radiofármacos, por comparación de la retención de dicho producto con un estándar de referencia conocido.

La Pureza Química (PQ) y Radioquímica (PRQ) son usualmente determinadas por HPLC o TLC. Para la determinación de solventes residuales utilizados en la preparación de los radiofármacos se utiliza cromatografía gaseosa (CG). Otros parámetros relevantes para la liberación son pH, isotonicidad, y ausencia de partículas visibles, esterilidad y endotoxinas bacterianas. También se determinan parámetros físicos del radionucleido tales como identidad radionucleídica (por medio de la medición de $t_{1/2}$) y pureza radionucleídica (PRN) por espectroscopia gamma.

3. RADIOQUÍMICA DEL ^{11}C

3.1. GENERALIDADES

La primera producción de ^{11}C fue llevada a cabo en el año 1934 por Crane y Lauritsen³⁰. Dadas sus características de decaimiento (98.1% por emisión positrónica, 0.19% por captura electrónica), se reconoció rápidamente su potencial como herramienta en la Imagenología Molecular. El primer experimento biológico usando ^{11}C fue llevado a cabo por Ruben en 1939³¹, quien estudió la fotosíntesis en plantas usando $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, seguido por Tobias, quien en el año 1945 investigó la fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ en eritrocitos humanos³². De allí en adelante se reconoció la posibilidad de sintetizar moléculas orgánicas más complejas marcadas con ^{11}C , a partir de un amplio espectro de precursores radiactivos de este radionucleido.

El ^{11}C representa un desafío para los radioquímicos, tanto por sus ventajas como por sus desventajas. En relación a las primeras, se deben considerar cinco fundamentales:

- a) el carbono está presente en todos los compuestos orgánicos y por ello, un análogo de cualquier molécula orgánica conteniendo ^{11}C poseerá un comportamiento fisicoquímico y bioquímico virtualmente idéntico al de la molécula no marcada. Por ello, las

²⁹ [a] Pharmacopeial Convention (2016) “United States Pharmacopeia and National Formulary” (USP 41-NF 36). Rockville, MD, United States, [b] Council of Europe. (2001) “European pharmacopoeia.” Council of Europe, Strasbourg, France.

³⁰ Crane, H.C., Lauritsen, T. (1934) *Phys. Rev.*: 430.

³¹ Ruben, S., Hassid, W.Z., Kamen, M.D. (1939) *J. Am. Chem. Soc.* 61: 661.

³² Tobias, C.A., Lawrence, J.H., Roughton, F.J.W, Rott, W.S., Gregersen, M.I.(1945) *Amer. J. Physiol.* 145: 253.

marcaciones con ^{11}C se conocen como “marcaciones isotópicas”. Este concepto se ilustra en la **Figura 7**.

- b) el ^{11}C puede ser obtenido con altos rendimientos a nivel de ciclotrón por medio de la reacción nuclear $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$, bajo las formas químicas $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (utilizando como gas del target mezclas N_2/O_2) o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (utilizando mezclas N_2/H_2). Estas dos especies (llamadas frecuentemente “precursores primarios”) pueden ser transformadas químicamente -por métodos bien conocidos- en otras (“precursores secundarios”) de diferente reactividad química, como se aprecia en el **Esquema 3**.³³

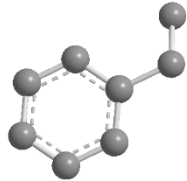
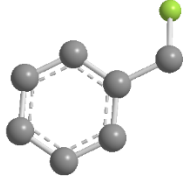
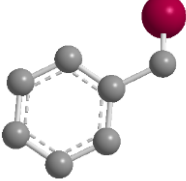
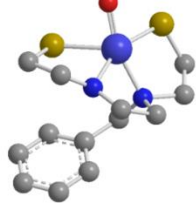
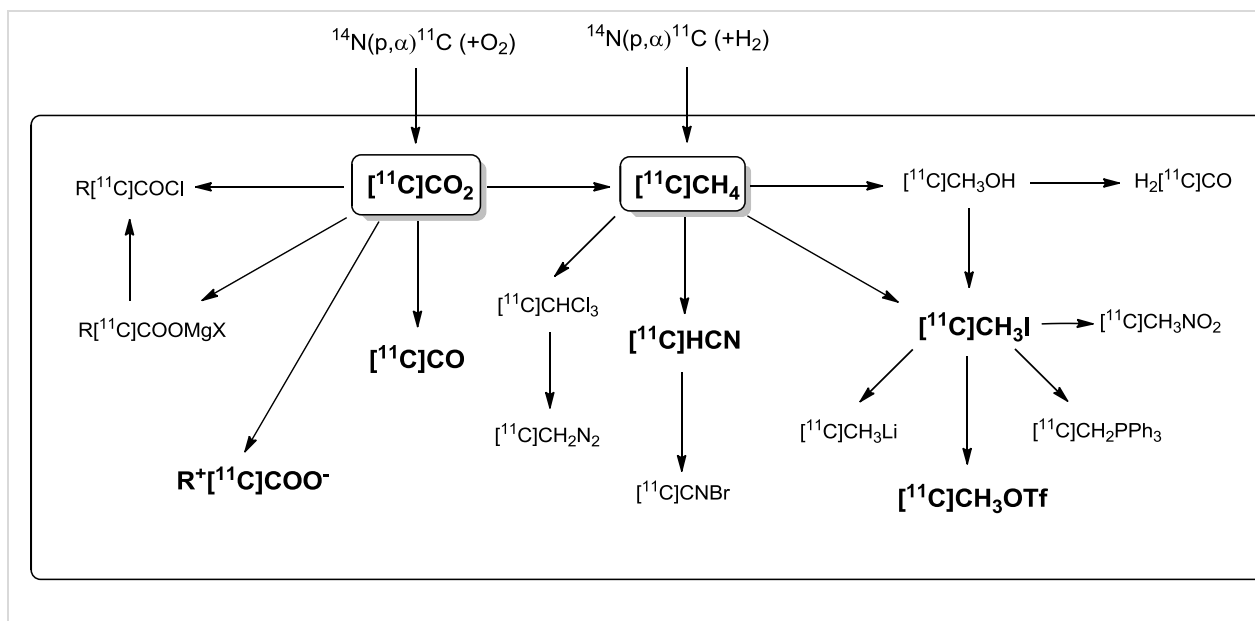
			
^{11}C	^{18}F	^{123}I	Quelatos Metálicos (ej. $^{99\text{m}}\text{Tc}$)
r_{vdw} 1.7 Å	r_{vdw} 1.6 Å	r_{vdw} 2.1 Å	
Idénticas	Bioisosterismo:	Bioisosterismo:	
propiedades:	H, OH	OH, Me, Ph	Impredecible
<i>físicas,</i>			
<i>químicas,</i>			
<i>biológicas,</i>			
<i>farmacológicas</i>			

FIGURA 7. Biocompatibilidad y marcado isotópico. La marcación con ^{11}C no modifica las propiedades del radiotrazador. Adaptado de Wuest, 2012³⁴.

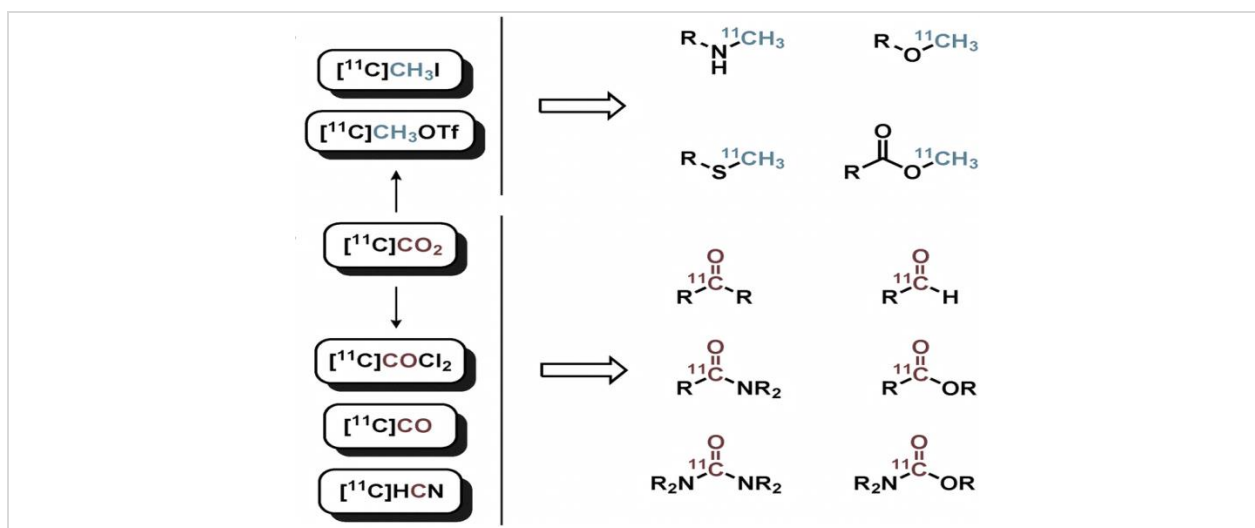
³³ Valk PE, et al. (2003), “Positron Emission Tomography: Basic Science and Clinical Practice”. Springer-Verlag London Ltd. Capítulo 10. 237–250.

³⁴ Wuest, F. (2012) “Carbon-11 Radiochemistry: Basic Principles and Recent Advances” Beijing Normal University. Summer School.



ESQUEMA 3. Precursores primarios y secundarios utilizados en la marcación de moléculas orgánicas con ^{11}C . Recuadrados: precursores primarios, no recuadrados: precursores secundarios.

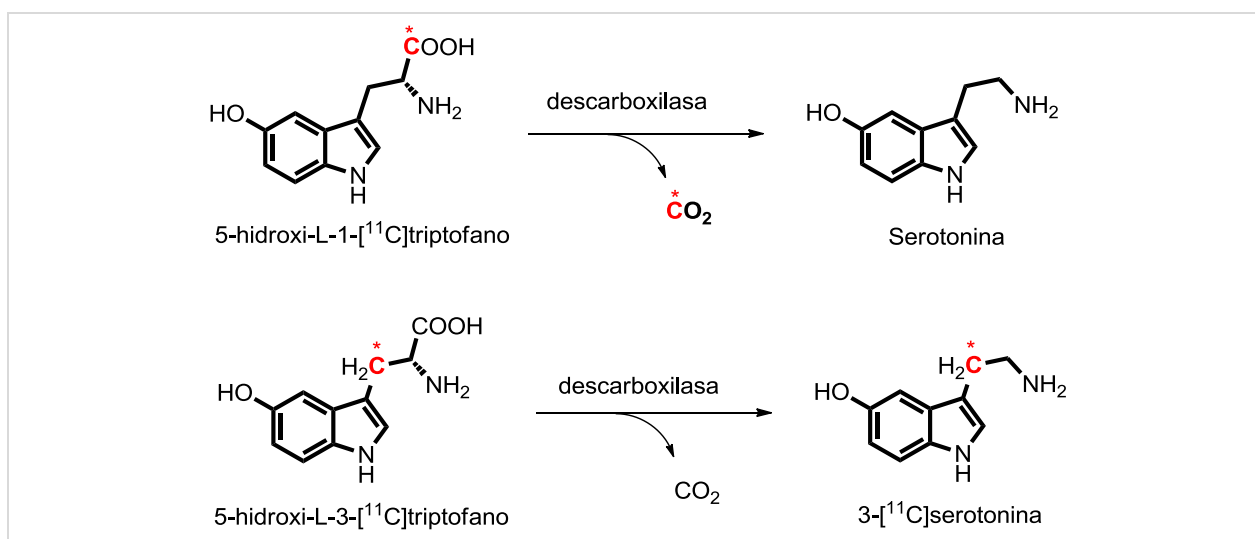
- c) El espectro estructural de moléculas marcadas con ^{11}C es amplio. La multiplicidad de precursores radiactivos de ^{11}C permite sintetizar una gran variedad de grupos funcionales (**Esquema 4**) presentes en metabolitos, hormonas, neurotransmisores o fármacos.³⁵



ESQUEMA 4. Algunos grupos funcionales posibles de ser sintetizados con diferentes precursores secundarios de ^{11}C .

³⁵ Rotstein, B.H., Liang, H.S., Placzek, M.S., Hooker, J.M., Gee, A.D., Dollé, F. Wilson, A.A., Vasdev, N. (2016) *Chem. Soc. Rev.* 45: 4708.

- d) Asimismo, una misma estructura orgánica puede ser marcada en diferentes posiciones moleculares. Tal es el ejemplo del 5-hidroxi-L-triptófano, precursor de 5-hidroxitriptamina. Cuando esta molécula es ^{11}C -marcada a nivel del grupo carboxilo (C-1), la radiactividad no es retenida en el tumor dado que el ^{11}C se pierde bajo la forma de $^{11}\text{C}\text{CO}_2$. Esto se evita marcando la molécula a nivel de C-3 (**Esquema 5**) logrando que la transformación enzimática no elimine el ^{11}C del trazador.³⁶
- e) Las metodologías sintéticas de incorporación de ^{11}C a las moléculas orgánicas son bien conocidas en la Química Orgánica tradicional, si bien existen diferencias significativas inherentes a la naturaleza radioactiva de los precursores.



ESQUEMA 5. La posición de la marca ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$) influye en el éxito de la técnica PET.

Las desventajas del ^{11}C están relacionadas fundamentalmente con su corto período de semidesintegración el cual limita sus aplicaciones radiosintéticas. En términos generales, se exige que los procesos sintéticos completos no transcurran en más de 2-3 periodos de semidesintegración (40.8 – 61.2 minutos), lo cual es un desafío desde el punto de vista de la síntesis orgánica tradicional, donde usualmente los tiempos de reacción y purificación son prolongados.

Desde el punto de vista clínico, también se encuentran ventajas y desventajas al respecto de la utilización del ^{11}C . Los radiofármacos que contienen ^{11}C en su estructura deben ser utilizados en las mismas instalaciones donde son producidos, debido a su corto $t_{1/2}$. A su vez, los métodos clínicos o preclínicos de análisis también se ven afectados en cuanto a su duración y aplicabilidad por el rápido decaimiento del radionucleido. Sin embargo, la rápida desaparición física de la radiactividad en el cuerpo del paciente o animal hace al ^{11}C atractivo para investigación clínica o preclínica, dado que el mismo sujeto puede ser estudiado mediante PET varias veces en un corto período de tiempo.

³⁶ Eriksson, B, Bergström, M., Lilja, A., Ahlström, H., Långström, B., Öberg, K. (1993) *Acta Oncologica*, 32: 189.

3.2. ¹¹C Y DILUCIÓN ISOTÓPICA

En los procesos que involucran al [¹¹C]CO₂ como precursor primario, la dilución isotópica por parte del CO₂ (no radiactivo, “frío”) de múltiples fuentes (ambiental, impureza de los gases del target, etc.)³⁷ se vuelve un parámetro crítico que debe ser controlado³⁸, en especial para radiofármacos que actúan mediante la unión a receptores. El principio de la dilución isotópica es consecuencia del igual comportamiento químico que presentan especies conteniendo isótopos de un elemento distinto que H. Todas las transformaciones químicas que sufra el [¹¹C]CO₂ las experimentarán también sus versiones isotópicas [¹²C]CO₂ y [¹³C]CO₂ (principales fuentes de carbono estable). A menos que se utilicen métodos especiales para bajar la cantidad de CO₂ estable de los sistemas radiosintéticos, todos los ¹¹C-radiotrazadores estarán acompañados de su versión conteniendo C estable. La forma de cuantificar ésta última es mediante el parámetro *actividad específica* (A_E, actividad por unidad de masa, Bq/kg) o *actividad molar* (A_M, actividad por cantidad de sustancia, Bq/mol). La A_M se expresa como la relación entre la actividad de una muestra de ¹¹C respecto a la suma de la cantidad de especies conteniendo cada uno de los isótopos de C (**Ecuación 1**). En la medida que la contribución molar en ¹²C supera por varios ordenes de magnitud a la de los otros isótopos, se simplifica la expresión del denominador, quedando expresada como en la **Ecuación 2**.

$$A_m = \frac{A(^{11}\text{C-F})}{n_{11\text{C-F}} + n_{12\text{C-F}} + n_{13\text{C-F}} + n_{14\text{C-F}}} \quad (1)$$

$$A_m \approx \frac{A(^{11}\text{C-F})}{n_{12\text{C-F}}} \quad (2)$$

La máxima A_M para el ¹¹C es 340.000 GBq/μmol, sin embargo, este valor en la práctica es muy inferior debido a la dilución isotópica que sufre el ¹¹C por parte de los diferentes aportes de CO₂. Generalmente, actividades molares en el rango de 10-30 GBq/ μmol son suficientes para estudios de receptores usando PET.³⁹

³⁷ Pichler, V., Zenz, T., Philippe, C., Vraka, C., Berrotéran-Infante, N., Pfaff, S., Nics, L., Ozenil, M., Langer, O., Willeit, M., Traub-Weidinger, T., Lanzenberger, R., Mitterhauser, M., Hacker, M., Wadsak, W. (2018) *Nucl. Med. Biol.* 67:21

³⁸ Gómez-Vallejo, V., Gaja, V., Kozirowski, J. Llop, J. (2012) en “Positron Emission Tomography - Current Clinical and Research Aspects” consultado en <https://www.intechopen.com/books/positron-emission-tomography-current-clinical-and-research-aspects> (nov. 2018)

³⁹ Elsinga, P.H. (2002) *Methods* 27: 208.

3.3. MÉTODOS DE MARCACIÓN CON ^{11}C

3.3.1. ^{11}C -Metilación nucleofílica

La ^{11}C -metilación es sin dudas el método más utilizado para marcar moléculas orgánicas con ^{11}C , dada la extensa presencia del grupo metilo en ligandos endógenos, hormonas, metabolitos, fármacos, etc.⁴⁰ Asimismo, los precursores utilizados para estas marcaciones, $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, pueden obtenerse fácilmente y con altos rendimientos a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Estos dos precursores secundarios con marcada reactividad metilante, permiten la incorporación del ^{11}C bajo la forma de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ por medio de reacciones de *N*-, *O*- o *S*- metilación (metilación nucleofílica). A nivel mundial existen varios proveedores de plataformas comerciales para realizar radiosíntesis con estos precursores, siendo un ejemplo de ellos el TRACERlab® FX_C Pro de General Electric.⁴¹ A la fecha, la gran mayoría de radiofármacos de uso clínico (algunos ejemplos se muestran en la **Tabla 4**) son sintetizados utilizando este tipo de metilaciones.⁴²

TABLA 4. Radiofármacos obtenidos por metilación nucleofílica.

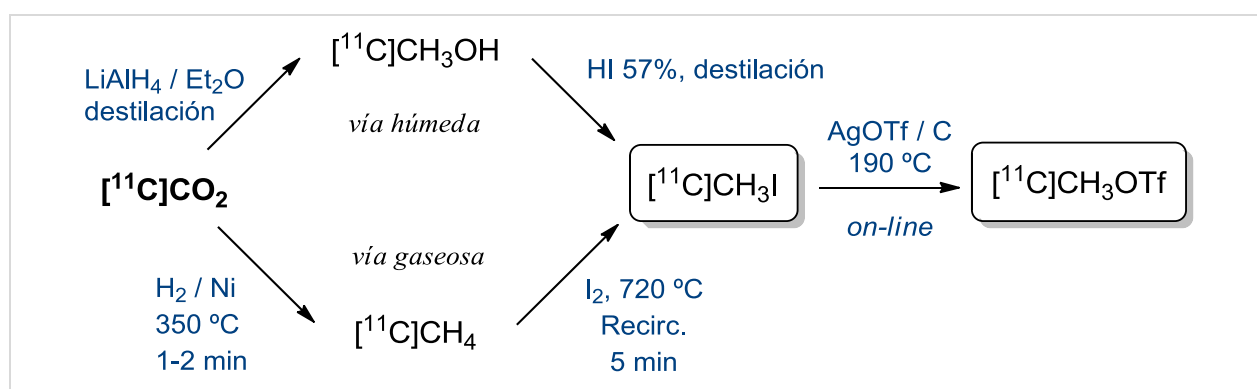
^{11}C -Radiofármaco	Agente ^{11}C -metilante	Función ^{11}C -metilada
^{11}C -Colina	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	Amina 2 ^a alifática (N)
^{11}C -PiB	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	Amina 1 ^a aromática (N)
^{11}C -Metahidroxiefedrina	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	Amina 1 ^a alifática (N)
^{11}C -Metionina	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	Alquiltolato (S)
^{11}C -Deuterodeprenil	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	Amina 2 ^a alifática (N)
^{11}C -Metomidato	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	Carboxilato (O)
^{11}C -Flumazenil	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$	Amida 2 ^a alifática (N)
^{11}C -Carfentanilo	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	Carboxilato (O)
^{11}C -Raclopride	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$	Fenolato (O)

⁴⁰ Bolton, R. (2001) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 44:701.

⁴¹ Shao, X., Houreau, R., Runkle, A.C., Tluczek, L.J.M., Hockley, B.G., Henderson, B.D., Scott, P.J.H. (2011) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 54: 819.

⁴² [a] Någren K, Müller L, Halldin C, Swahn C, Lehikoinen P (1995) *Nucl. Med. Biol.*, 22:235 [b] Scott, P.J. H., Hockley, B.G. (2012) "Radiochemical Syntheses: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Volume 1" John Wiley and Sons. Inc.

La preparación de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ puede ser en dos modalidades: la vía húmeda y la vía gaseosa⁴³ (**Esquema 6**). La primera⁴⁴, actualmente en desuso con el advenimiento de las plataformas comerciales, consiste en reducir el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con LiAlH_4 en éter anhidro, para formar $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$, que luego se hace reaccionar con HI para dar $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. La principal desventaja reside en el LiAlH_4 que es un reactivo sensible a la humedad y al CO_2 ambiental, lo que conduce a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ de baja A_M . La vía gaseosa⁴⁵ consiste en la reducción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con H_2 catalizado por Ni a $350\text{ }^\circ\text{C}$ para dar $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, el cual luego se hace reaccionar con vapores de I_2 a $720\text{ }^\circ\text{C}$ en un loop de recirculación gaseosa, lo que maximiza el rendimiento de formación de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$. El rendimiento habitual de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ es de entre 20-40 % (ndc) a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en aproximadamente 15 minutos.



ESQUEMA 6. Preparación de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ y de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ de acuerdo a las diferentes vías.

El $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ puede obtenerse a partir del $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, haciendo reaccionar éste con AgOTf soportado en carbón grafitado, a $190\text{ }^\circ\text{C}$ en un proceso *on-line*.⁴⁶

Las reacciones de ^{11}C -metilación nucleofílica han mostrado una gran versatilidad en cuanto al medio de reacción. Así, estas reacciones pueden ser llevadas a cabo en: a) solución, donde el agente ^{11}C -metilante se recoge en un disolvente adecuado el cual disuelve el precursor orgánico a ^{11}C -metilar; b) en fase sólida, donde la reacción entre el agente ^{11}C -metilante y el nucleófilo tiene lugar en un soporte sólido tal como un cartucho C_{18} o de intercambio iónico; c) en loop cromatográfico, donde la reacción entre el agente ^{11}C -metilante y el nucleófilo tiene lugar en una fina capa de disolvente formada en el interior de un loop, la cual puede posteriormente ser inyectada en una columna de HPLC semipreparativa.

Cada uno de estos métodos presenta diferente aplicabilidad, que varía según la naturaleza química de la molécula a marcar, de la necesidad de calentamiento o de separación cromatográfica, entre otros factores. Radiofármacos tales como $[^{11}\text{C}]\text{Metionina}$ o $[^{11}\text{C}]\text{Colina}$ pueden ser sintetizados mediante ^{11}C -metilación con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ en fase sólida con buenos

⁴³ [a] Kniess, T., Rode, K., Wuest, F. (2008) *App. Radiat. Isot.* 66:482 [b] Wuest, F., Berndt, M., Kniess, T. (2007). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 183.

⁴⁴ Langstrom, B., Lundqvist, H., (1976) *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 27: 357.

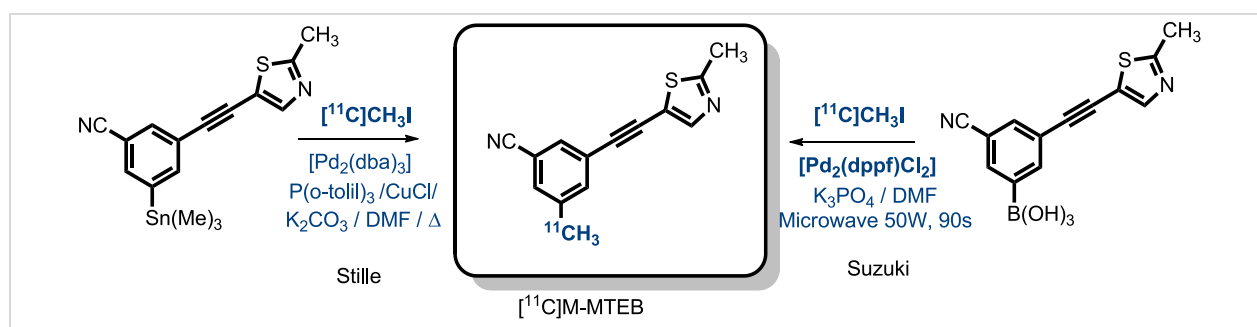
⁴⁵ Larsen, P., Ulin, J., Dahlstrom, K., Jensen, M. (1997) *Appl. Radiat. Isot.* 48(2):153.

⁴⁶ Jewett, D. (1992) *Appl. Radiat. Isot.* 43:1383.

rendimientos⁴⁷. Otros radiofármacos cuya marcación requiere calentamiento, tales como [¹¹C]PiB, se sintetizan en reactores cerrados a temperatura elevada⁴⁸. [¹¹C]Raclopride constituye un ejemplo de radiofármaco que ha sido sintetizado en loop cromatográfico⁴⁹. Si bien las reacciones de ¹¹C-metilación nucleofílica son ampliamente usadas en la preparación de ¹¹C-radiofármacos, poseen la desventaja inherente a su naturaleza química. La molécula precursora del radiofármaco debe poseer una función oxigenada, azufrada o nitrogenada capaz de actuar como nucleófilo. Si bien esto ocurre en un gran número de moléculas, para otras estructuras se hace necesario contar con otras metodologías de introducción de ¹¹C alternativas. Gracias a la versatilidad del ¹¹C dada por la variedad de sus precursores radiactivos y a la amplia diversidad de reacciones orgánicas conocidas a la fecha, existen otras metodologías que se detallan a continuación.

3.3.2. ¹¹C-Metilaciones mediadas por Pd

Con las reacciones de incorporación de un grupo [¹¹C]CH₃ mediadas por Pd es posible no sólo la formación de enlaces ¹¹C-O, ¹¹C-S o ¹¹C-N, sino también la formación de enlaces ¹¹C-C, lo cual siempre constituye un atractivo desde el punto de vista de la síntesis orgánica. Estas reacciones logran introducir grupos [¹¹C]CH₃ sobre grupos funcionales tales como dobles o triples enlaces, y grupos fenilos⁵⁰. Se destacan en este marco las reacciones de acoplamiento cruzado de Stille (cross-coupling) a partir de compuestos organostánnicos y complejos de Pd (0) y las reacciones de Suzuki, a partir de compuestos organoborados (**Esquema 7**). Un ejemplo de estas metodologías aplicadas a la radiosíntesis de radiotrazadores lo constituye la radiosíntesis de [¹¹C]M-MTEB (ligando del receptor de glutamato subtipo 5) con aplicación en neuroimagen.⁵¹



ESQUEMA 7. Radiosíntesis de [¹¹C]M-MTEB por medio de acoplamientos de Suzuki o Stille.

⁴⁷ [a] Lodi, F., Trespidi, S., Di Pierro, D., Marengo, M., Farsad, M., Fanti, S., Franchi, R., Boschi, S. (2007) *App. Radiat. Isot.* 65:691. [b] Shao, X., Hockley, B.G., Hoareau, R., Schnau, P.L., Scott, P.J.H. (2011) *App. Radiat. Isot.* 69:403.

⁴⁸ Philippe, C., Haeusler, D., Mitterhauser, M., Ungersboeck, J., Viernstein, H., Dudczak, R., Wadsak, W. (2011). *App. Radiat. Isot.* 69:1212.

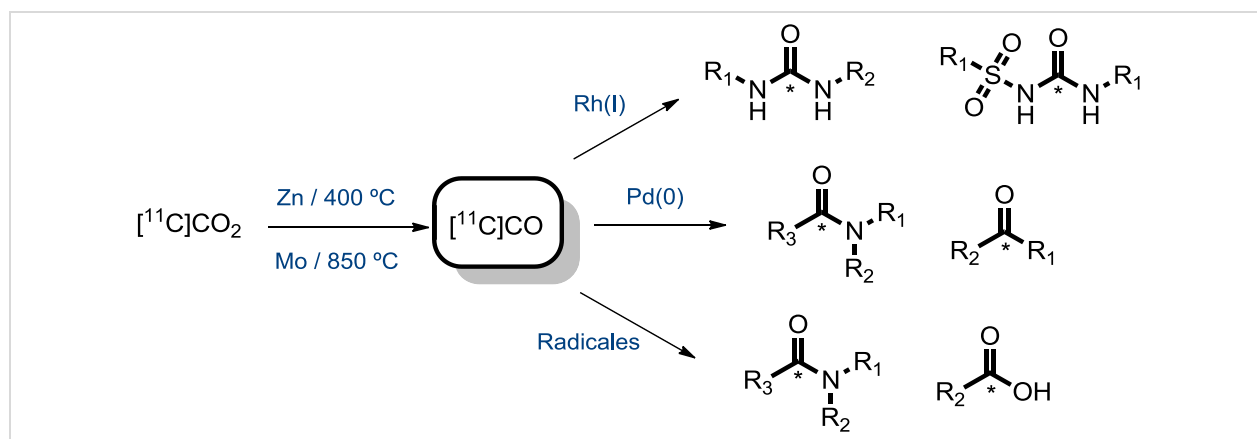
⁴⁹ Wilson, A.A., Garcia A, Jin L, Houle S. (2000) *Nucl Med and Biol*, 27: 529.

⁵⁰ Pretze, M, Grosse-Gehling, P, Mamat, C. (2011) *Molecules* 16:1129.

⁵¹ T. G. Hamill, S. Krause, C. Ryan, C. Bonnefous, S. Govek, T. J. Seiders, N. D. P. Cosford, J. Roppe, T. Kamenecka, S. Patel, R. E. Gibson, S. Sanabria, K. Riffel, W. S. Eng, C. King, X. Q. Yang, M. D. Green, S. S. O'Malley, R. Hargreaves, H. D. Burns, (2005) *Synapse*, 56: 205.

3.3.3. ^{11}C -Carbonilaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}$

Las reacciones de ^{11}C -carbonilación, extensamente estudiadas a lo largo de más de 10 años por el grupo del Prof. Långström (Univ. de Uppsala), resultan atractivas fundamentalmente por dos razones: 1) la amplia variedad de moléculas orgánicas que contienen el grupo C=O (bajo la forma de cetonas, amidas, imidas, ácidos carboxílicos, etc.)⁵², 2) la facilidad de obtención del $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ por reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ sobre Zn o Mo.⁵³ Al igual que en el caso de Stille o Suzuki, el método de ^{11}C -carbonilación más utilizado utiliza compuestos de Pd como mediador catalítico, pero también se encuentran ejemplos de utilización de compuestos de Rh como catalizador en la síntesis de gran variedad de estructuras (**Esquema 8**). Estos métodos poseen la desventaja inherente a las propiedades fisicoquímicas del $[^{11}\text{C}]\text{CO}$, como ser su baja solubilidad en disolventes orgánicos a baja presión. No obstante, se han desarrollado métodos que utilizan sistemas de reacción de alta presión (microautoclave) y otras modalidades para aumentar la performance de estos métodos⁵⁴.



ESQUEMA 8. Resumen de las estrategias de marcación con $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ y los grupos funcionales que originan. (C* = ^{11}C)

3.3.4. ^{11}C -Cianaciones con el precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}$

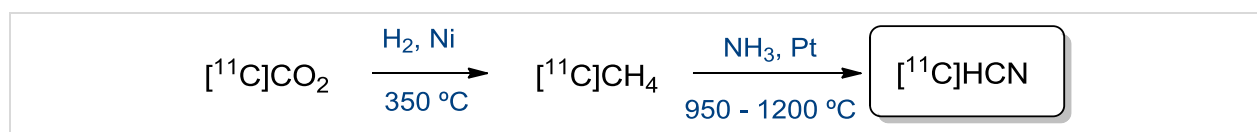
Las ^{11}C -cianaciones permiten la incorporación de un grupo $[^{11}\text{C}]\text{CN}$ (^{11}C -nitrilo) en una molécula orgánica por una amplia variedad de mecanismos. En la Química Orgánica tradicional, el anión CN^- es un sintón atractivo, pues permite la formación de un enlace C-C por sustitución nucleofílica sobre estructuras que presenten por ejemplo la función C-X (X: halógeno u otros grupos salientes) o C=Y (Y: O, NR). El grupo nitrilo también está presente en un importante número de fármacos y compuestos de interés biológico, y es químicamente transformable en grupos carboxilos, amida, amina, etc.

⁵² Rahman, O. (2015) *J. Labelled. Compd. Radiopharm.*, 58: 86–98

⁵³ Zeisler, S. K., Nader, M., Theobald A., Oberdorfer, F. (1997) *Appl. Radiat. Isot.* 48:1091.

⁵⁴ Långström, B., Isenko, O., Rahman, O. (2007) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 50:794.

Las reacciones de ^{11}C -cianación tienen como precursor secundario al $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$. Las primeras síntesis de este precursor datan de principios de los años '70, mediante procesos largos, poco eficientes que conducían a un $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ de baja A_M .⁵⁵ Pocos años después, Christmas y col. (1974)⁵⁶ presentaron la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ y NH_3 sobre Pt a alta temperatura, la cual constituye la base de los métodos modernos de preparación de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$. Hoy en día se utilizan tanto sistemas *home-made* como sistemas automatizados comerciales para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ y su preparación consiste en: i) la reducción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ (como ya fue descrito anteriormente en el apartado 3.3.1), y ii) la conversión catalítica de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ en $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ por reacción con NH_3 sobre Pt a 950-1200 °C (**Esquema 9**).



ESQUEMA 9. Producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Dentro de los usos más importantes que ha tenido el precursor $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$, se encuentra la síntesis de 1- ^{11}C - α -aminoácidos. Estas especies han demostrado ser útiles en el diagnóstico PET de tejidos tumorales que poseen hipermetabolismo proteico.⁵⁷ Numerosos 1- ^{11}C -aminoácidos se han sintetizado por medio de reacciones de ^{11}C -cianación, a modo de ejemplo se destacan 1- $[^{11}\text{C}]\text{Leucina}$ ⁵⁸, 1- $[^{11}\text{C}]\text{Alanina}$ ⁵⁹, 1- $[^{11}\text{C}]\text{Valina}$ ⁶⁰, 1- $[^{11}\text{C}]\text{Fenilalanina}$ ⁶¹, 1- $[^{11}\text{C}]\text{tirosina}$ ⁶², L-1- $[^{11}\text{C}]\text{Dopa}$ ⁶³, 1- $[^{11}\text{C}]\text{glicina}$ ⁶⁴, entre otros. La aproximación radiosintética para su preparación consistió en la mayoría de los casos, en aplicar la síntesis modificada de aminoácidos de Strecker-Bücherer, en donde inicialmente un aldehído conteniendo la cadena lateral del aminoácido deseado, se hace reaccionar con NaHSO_3 acuoso para formar un aducto hidroxialcanolsulfonato (como una mezcla racémica). El mismo es posteriormente tratado con NH_3 25% para formar un aminoalcanosulfonato de sodio, que es el precursor orgánico de la marcación. El aminoalcanosulfonato de sodio se trata con $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ para rendir 1- $[^{11}\text{C}]\text{aminoalcanonitrilo}$ que por hidrólisis ácida o alcalina produce el 1- $[^{11}\text{C}]\text{aminoácido}$

⁵⁵ [a] Lamb, J.F., James, R.W., Winchell, H.S. (1971) *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 22:475. [b] Finn, R.D., Christmas, D.R., Ache, H.J., Wolf, A.P. (1971) *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 22:735

⁵⁶ Christmas, D.R., Finn, R.D., Karlstrom, K.I., Wolf, A.P. (1975) *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 26:435

⁵⁷ [a] Busch, H., Davis, J.R., Honing, G.R., Anderson, D.C., Nair, P.V., Nyhan, W.L. (1959) *Cancer Research* 19:1030. [b] Kubota, L., Yamada, L., Fukuda, H., Endo, S., Ito, M., Abe, Y., Fujiwara, T., Yamaguchi, T., Sato, T., Ito, K., Yoshioka, S., Hatazawa, J., Matsuzawa, T., Iwata, R., Takahashi, T., Ido, T. (1982) CYRIC Annual Report

⁵⁸ [a] Barrio, J.R., Keen, R.E., Ropchan, J.R., MacDonald, N.S., Baumgartner, F.J., Padgett, H.C., Phelps, M.E. (1983) *J. Nucl. Med.* 24:515. [b] Iwata, R., Ido, T., Takahashi, T., Nakanishi, H., Iida, S. (1987) *Appl. Radiat. Isot.* 38(2):97

⁵⁹ Ropchan, J.R., Barrio, J.R. (1984) *J. Nucl. Med.* 25:887.

⁶⁰ Iwata, R. y col. (1987) *Op.cit.*

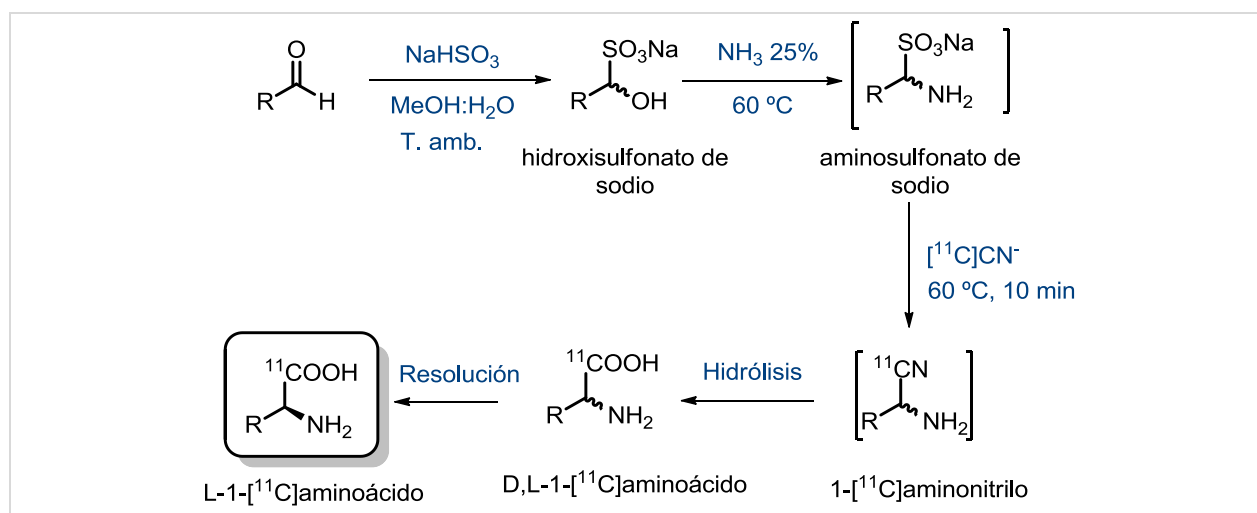
⁶¹ [a] Iwata, R. y col. (1987) *Op.cit.* [b] Studenov, A.R., Szalda, D.E., Ding, Y.S. (2003) *Nucl. Med. Biol.* 30:39.

⁶² [a] Halldin, C., Schoeps, K.O., Stone-Elander, S., Wiesel, F.A. (1987) *Eur. J. Nucl. Med.* 13:288. [b] Studenov, A.R. y col. (2003) *Op.cit.*

⁶³ Adam, M.J., Grierson, J.R., Ruth, T.J., Pedersen, K., Pae, D.B. (1987) *J. Nucl. Med.* 28:1599.

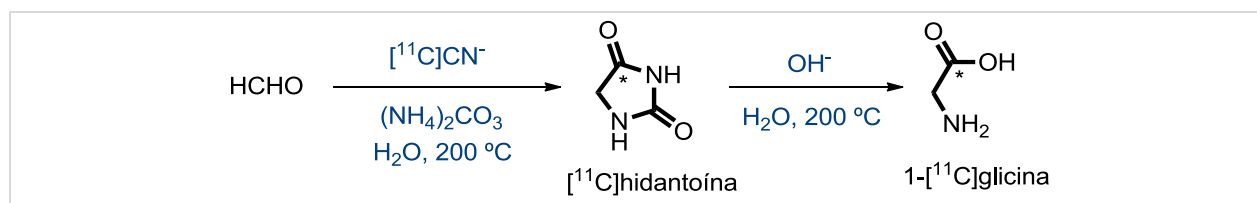
⁶⁴ Johnström, P., Stone-Elander, S., Ericson, K., Mosskin, M., Bergström, M. (1987) *Appl. Radiat. Isot.* 38(9):729

deseado como mezcla de enantiómeros D y L (racemato). La obtención del enantiómero L natural requiere usualmente resolución enzimática o cromatográfica (HPLC quiral). (**Esquema 10**)



ESQUEMA 10. Radiosíntesis de 1-¹¹C-α-aminoácidos mediante una síntesis modificada de Strecker-Bücherer.

La síntesis de 1-[¹¹C]glicina, utiliza la síntesis de Bücherer-Bergs⁶⁵ (**Esquema 11**) a partir de formaldehído, e involucra la formación de un intermediario [¹¹C]hidantoína y posterior hidrólisis básica a alta temperatura.



ESQUEMA 11. Radiosíntesis de 1-[¹¹C]glicina. (C* = ¹¹C)

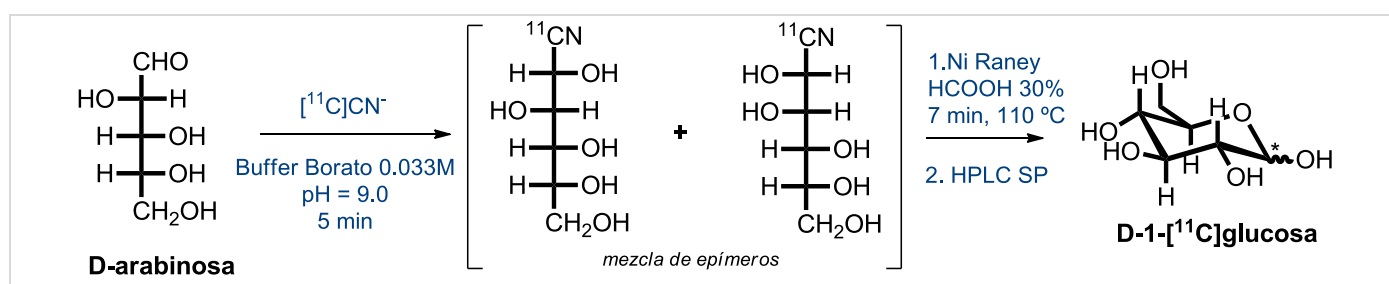
La utilización de [¹¹C]CN⁻ para la radiosíntesis de 1-[¹¹C]aminoácidos ilustra el concepto de versatilidad del ¹¹C en cuanto a precursores radiactivos disponibles y la posibilidad de marcar moléculas en distintas posiciones funcionales. Con el precursor [¹¹C]CH₃I sólo es posible la radiosíntesis del aminoácido L-S-[¹¹C-metil]metionina⁶⁶ ya que es el único aminoácido (natural) que posee una función X-metilada (siendo X = S, N u O). Para el resto de los aminoácidos, se requiere una estrategia diferente, que es la que brinda el precursor [¹¹C]CN⁻ pues permite marcar la función carboxílica presente en todos los aminoácidos naturales o no.

Otras especies químicas han sido radiosintetizadas utilizando el precursor [¹¹C]HCN. Como forma de evitar los inconvenientes de utilizar 2-desoxi análogos de la D-glucosa marcada con emisores de positrones a la hora de medir y calcular el metabolismo de esta especie, han

⁶⁵ Kappe, C., Monteiro, J., Pieber, B., Corrêa, A. (2015) *Synlett*, 27(01): 83

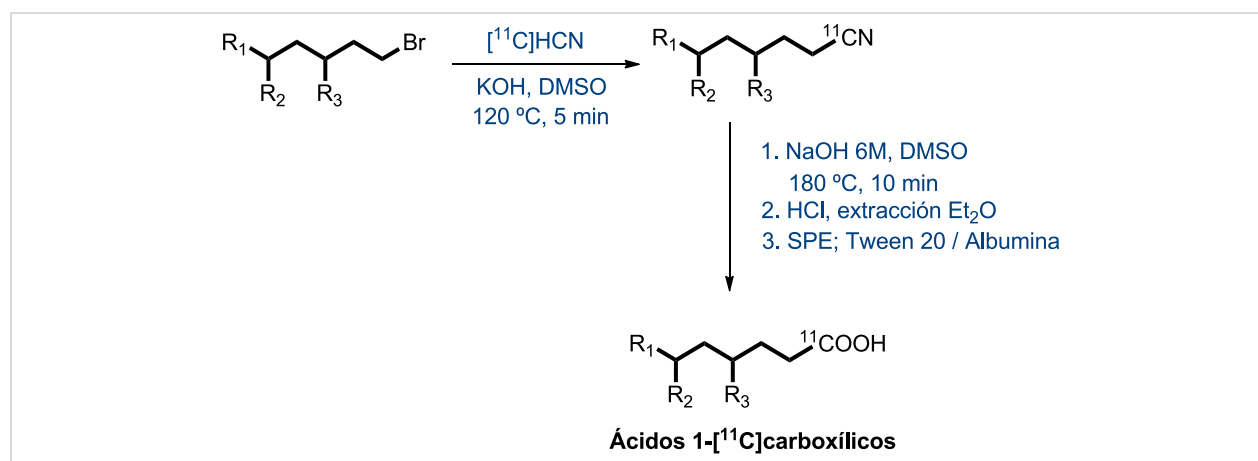
⁶⁶ Comar, D., Cartron, J.C., Maziere, M, Marazano, C. (1976) *Eur. J. Nucl. Med.* 1: 11

sido publicadas varias síntesis de D- ^{11}C glucosa (en particular D-1- ^{11}C glucosa⁶⁷). La D-1- ^{11}C glucosa fue radiosintetizada por medio de la síntesis de Fisher-Kiliani a partir de D-arabinosa y ^{11}C HCN. El epímero D-1- ^{11}C manosa también es un producto de esta síntesis, pero la estereoselectividad se favorece con el uso de buffer borato a pH=8.1, obteniéndose una relación D-1- ^{11}C glucosa:D-1- ^{11}C manosa de aprox. 1.8:1⁶⁸ (**Esquema 12**)



ESQUEMA 12. Radiosíntesis de D-1- ^{11}C glucosa por medio de ^{11}C HCN. (C* = ^{11}C)

Los 1- ^{11}C -ácidos grasos, cuya utilidad en la evaluación por medio de PET del metabolismo del miocardio ha sido bien demostrada⁶⁹, también han sido radiosintetizados mediante ^{11}C HCN. En el trabajo de Takahashi y col.⁷⁰ se presentó la radiosíntesis de 1- ^{11}C -ácidos grasos de 14 a 16 átomos de C, lineales y ramificados, a partir de sus correspondientes bromuros de alquilo por sustitución nucleofílica con ^{11}C CN⁻ y posterior hidrólisis (**Esquema 13**).



ESQUEMA 13. Radiosíntesis de 1- ^{11}C -ácidos grasos con ^{11}C CN⁻

⁶⁷ Shiue, C.-Y., & Wolf, A. P. (1985) *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 22(2):171

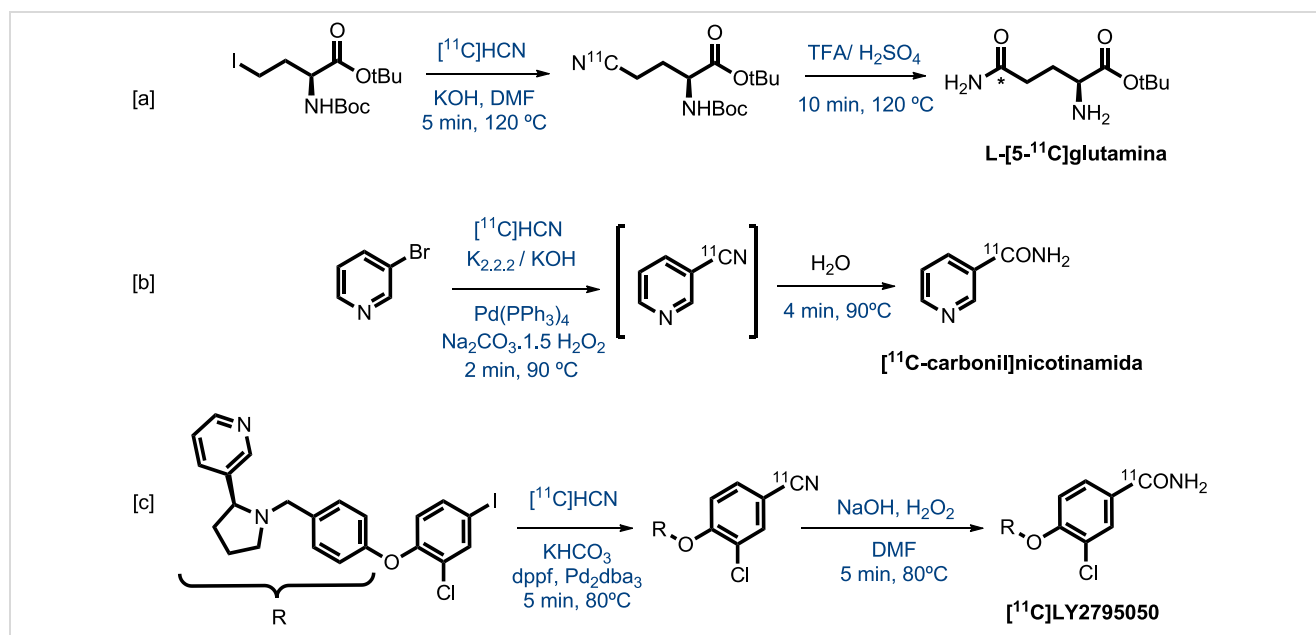
⁶⁸ Dence, C. S., Powers, W. J., & Welch, M. J. (1993). *Appl Radiat Isot.*, 44(6):971

⁶⁹ [a] Poe, N.D., Robinson, G.D., Jr., MacDonald, N.S. (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:215. [b] Sobel, B.E., Weiss, E.S., Welch, M.J., Siegel, B.A., Ter-Pogossian, M.M. (1977) *Circulation* 55:851.

⁷⁰ Takahashi, T., Ido, T., Hatano, K., Iwata, R., Nakanishi, H. (1990) *Appl. Radiat. Isot.* 41(7):649.

El precursor $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ también ha sido utilizado para radiosintetizar ^{11}C -amidas, ^{11}C -tetrazoles y ^{11}C -amidinas de interés para el diagnóstico PET. En relación a las primeras, se puede mencionar algunos ejemplos, como la síntesis de 5- $[^{11}\text{C}]\text{glutamina}$ ⁷¹ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{KCN}$ y 2-((*t*-butoxicarbonil)amino)-4-iodobutanoato de *t*-butilo (**Esquema 14**, [a]), la síntesis del trazador para la poli(ADP ribosa) sintetasa $[^{11}\text{C}$ -carboxi]nicotinamida⁷² a partir de 3-bromopiridina y $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ en presencia de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (**Esquema 14**, [b]), o la síntesis de antagonista del receptor κ -opioide $[^{11}\text{C}]\text{LY2795050}$ ⁷³ (**Esquema 14**, [c]). Las ^{11}C -cianaciones que involucran $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ y son mediadas por Pd también han sido utilizadas para preparar una amplia variedad de ^{11}C -benzonitrilos.⁷⁴

El $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ puede transformarse en otros precursores radiactivos útiles para llevar a cabo reacciones radiosintéticas. Por tratamiento con CuSO_4 en $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ acuoso, $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ puede transformarse en $[^{11}\text{C}]\text{CuCN}$ que se ha utilizado para la síntesis de ^{11}C -benzonitrilos por la reacción de Rosemund-von Braun⁷⁵. Por tratamiento del $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ con tribromuro de piridinio, se ha obtenido $[^{11}\text{C}]\text{CNBr}$ ⁷⁶, el cual se utilizó para la síntesis de ^{11}C -cianamidas y ^{11}C -guanidinas (**Esquema 15**).



ESQUEMA 14. Preparación de ^{11}C -amidas a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$)

⁷¹ Qu, W., Oya, S., Lieberman, B. P., Ploessl, K., Wang, L., Wise, D. R., Divgi, C.R., Chodosh, L.P., Thompson, C.B., Kung, H. F. (2011). *J. Nucl. Med.*, 53(1):98

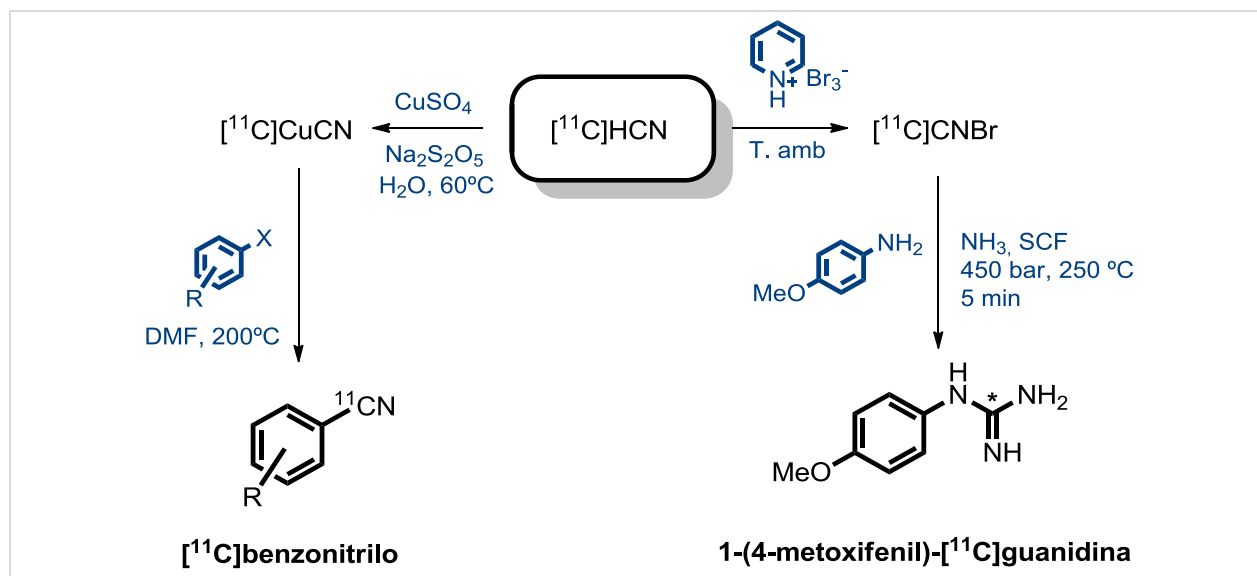
⁷² Andersson, Y., Bergström M., Långström, B. (1994) *Appl. Radiat. Isot.* 45(6):707.

⁷³ Zheng, M.-Q., Nabulsi, N., Kim, S. J., Tomasi, G., Lin, S. -f., Mitch, C., Quimby, S., Barth, V., Rash, K., Masters, J., Navarro, A., Seest, E., Morris, E.D., Carson, R.E., Huang, Y. (2013) *J. Nucl. Med.*, 54(3):455

⁷⁴ Andersson, Y., Långström, B. (1994) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1(11):1395

⁷⁵ Ponchant, M., Hinnen, F., Demphel, S., Crouzel, C. (1997) *App. Radiat. Isot.* 48:6.

⁷⁶ Jacobson, G. B., Westerberg, G., Markides, K. E., Långström, B. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118(29): 6868



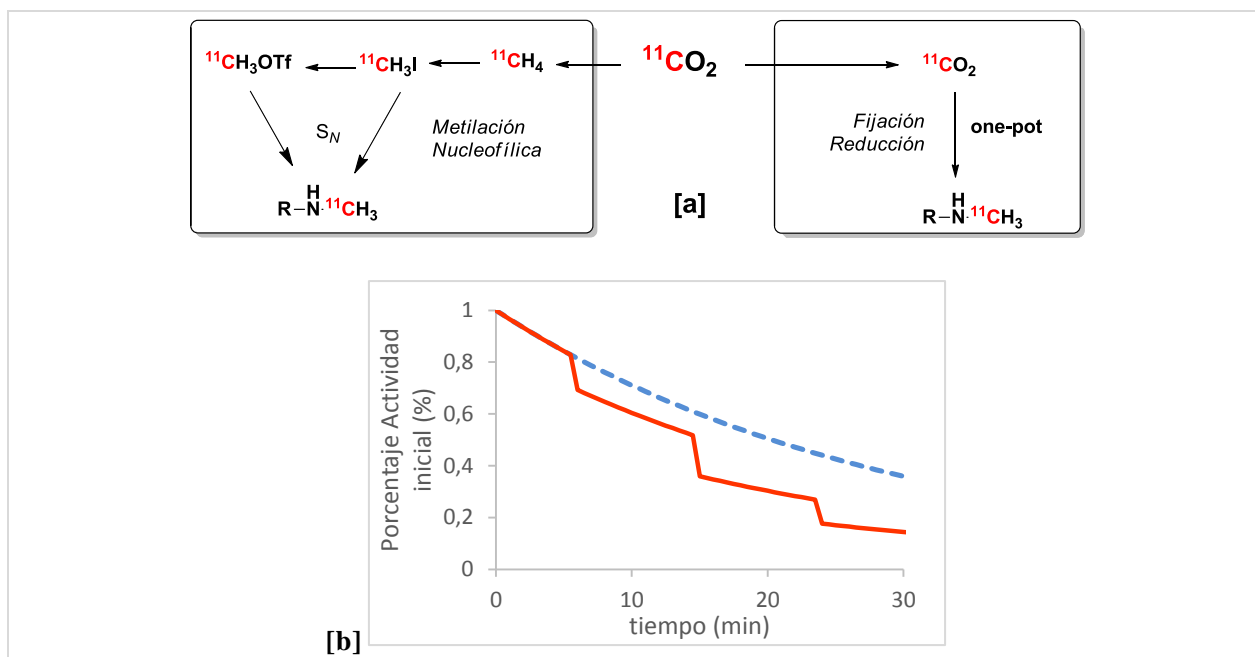
ESQUEMA 15. Radiosíntesis utilizando los precursores $[^{11}\text{C}]\text{CuCN}$ y $[^{11}\text{C}]\text{CNBr}$ ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$)

3.3.5. Marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

La marcación de moléculas en forma directa con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ representa una ventaja de este precursor frente a los otros ya mencionados, ya que se hace innecesario su transformación química en otras especies precursoras. Se debe recordar que el proceso de radiosíntesis de precursores secundarios tales como $[^{11}\text{C}]\text{MeX}$ (X: I o OTf) o $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ consume frecuentemente más de la mitad de la radiactividad inicial producida (si se consideran factores de eficiencia de atrapamientos, rendimientos, además de decaimiento)⁷⁷. El uso directo de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en reacciones “one-pot” rápidas, minimiza el número de pasos sintéticos, disminuye la pérdida de actividad por decaimiento, y produce un aumento de los rendimientos de síntesis (**Esquema 16**). Lo anterior se traduce en una mayor actividad final disponible para estudios preclínicos o clínicos.⁷⁸

⁷⁷ [a] Fowler, J. S., Wolf, A.P. (1997) *Acc. Chem. Res.* 30:181, [b] Långström, B., Kihlberg, T., Bergstrom, M., Antoni, G., Bjorkman, M., Forngren, B.H., Hartvig, P., Markides, K., Yngve, U., Ogren, M. (1999) *Acta Chem. Scand.* 53:651.

⁷⁸ Rotstein, B., Liang, S., Holland, J., Lee, T.L., Hooker, J.M., Wilson, A., Vasdev, N. (2013) *Chem Comm.* 49:5621.



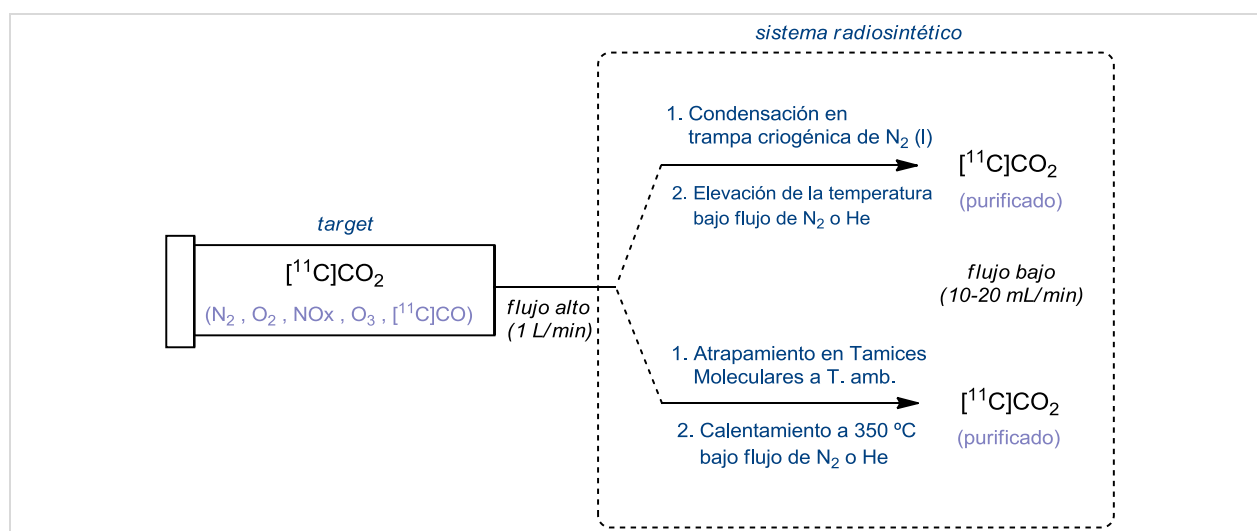
ESQUEMA 16. [a] $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ como «agente ^{11}C -metilante» [b] Evolución de actividad de dos procesos radiosintéticos de ^{11}C hipotéticos de 30 minutos de duración, uno de ellos (línea llena roja) tiene 3 pasos donde ocurren pérdidas de actividad, el otro (línea punteada azul) es un proceso “one-pot”. La actividad final en este último es 35% de la actividad inicial, mientras que en el de 3 pasos es menos a 15%.

Como ya se mencionó, el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ puede ser obtenido directamente en el ciclotrón con alta actividad molar y altos rendimientos. La purificación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ de las impurezas químicas y radioquímicas que se generan en el target, puede conseguirse fácilmente por medio de purificación criogénica con N_2 (l) y posterior liberación por elevación de temperatura⁷⁹, o mediante adsorción selectiva en tamices moleculares y posterior desorción por calentamiento⁸⁰ (**Esquema 17**). Estos tratamientos de purificación tienen la ventaja adicional de permitir modular el flujo de gas portador que transporta el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Usualmente el flujo de vaciado de un target de alta eficiencia de ^{11}C es elevado ($\sim 1 \text{ L/min}$)⁸¹, lo cual dificulta el barboteo del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en un pequeño volumen de solución contenido en el reactor donde se llevará a cabo la radiosíntesis. Por esta razón es necesario disminuir este flujo y así facilitar la disolución del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en el medio de reacción.

⁷⁹ Tewson, T. J., Banks, W., Franceschini, M., Hoffpauir, J. (1989) *Appl. Radiat. Isot.* 40: 765.

⁸⁰ Mock, B. H., Vavrek, M. T., Mulholland, G. K. (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22: 667.

⁸¹ GE HEALTHCARE. PETtrace 800 series SERVICE MANUAL – MAINTENANCE. REVISION 21 DIRECTION 2169049-100



ESQUEMA 17. Métodos de purificación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Por otra parte, la baja solubilidad en medios líquidos y baja reactividad química del CO_2 es un aspecto desfavorable de esta especie para llevar a cabo marcaciones directas. El CO_2 usualmente requiere activación por parte de nucleófilos o bases fuertes que actúen como catalizadores para formación de uniones covalentes. En procesos a escala industrial se utilizan altas presiones de CO_2 ,⁸² lo cual es imposible a escala radiosintética dado el defecto estequiométrico con el que se encuentran los precursores radiactivos frente a los reactivos convencionales. Es por ello que las marcaciones directas con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ requieren de la utilización de “agentes fijadores”, esto es, sustancias básicas o nucleofílicas que interaccionen con CO_2 para mantenerlo en solución y eventualmente incrementar su reactividad como electrófilo. Extensas revisiones de este tópico pueden encontrarse en la bibliografía.⁸³

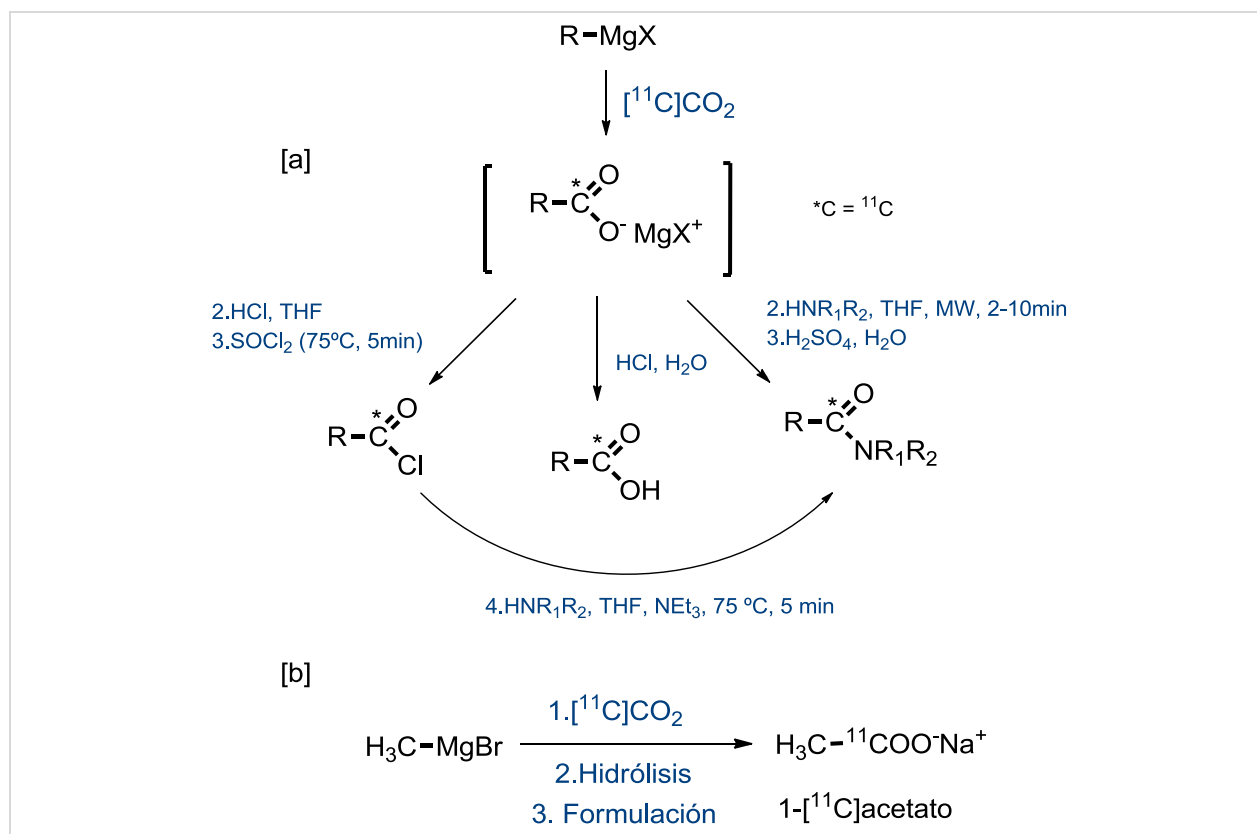
A continuación, se detallan las diferentes metodologías que se han empleado hasta el momento que ejemplifican marcaciones directas utilizando $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

⁸² Omae, I. (2012) *Coord. Chem. Rev.* 256: 1384.

⁸³ [a] D’Alessandro, D. M., Smit, B., Long, J.R. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49: 6058. [b] Yuan, Z., Eden, M. R., Gani, R. (2015) *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(12), 3383. [c] Song, Q.-W., Zhou, Z.-H., & He, L.-N. (2017) *Green Chemistry*, 19(16):3707.

3.3.5.1. Marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando reactivos organometálicos

Un ejemplo clásico de este tipo de marcaciones es la reacción de Grignard con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Por medio de la reacción de este último con un halogenuro de alquil magnesio (“Reactivo de Grignard”)⁸⁴ se logran obtener ácidos carboxílicos, sales de los mismos o incluso amidas⁸⁵ (**Esquema 18**) marcados a nivel de C-1. El $[^{11}\text{C}]$ acetato de sodio⁸⁶, y $[^{11}\text{C}]$ palmitato de sodio⁸⁷, son radiofármacos PET utilizados para el estudio del metabolismo del miocardio que utilizan esta metodología de síntesis para su obtención. La reacción de Grignard ha sido bien adaptada a las plataformas comerciales para ser llevada a cabo en condiciones GMP.⁸⁸



ESQUEMA 18. [a] Utilización de la reacción de Grignard sobre $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ para la síntesis de radiofármacos. [b] obtención de 1- $[^{11}\text{C}]$ acetato mediante la reacción de Grignard.

⁸⁴ Smith, Michael B.; March, Jerry (2007), “Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure” (6th ed.), New York: Wiley-Interscience. Cap. 16.

⁸⁵ C. Aubert, C. Huard-Perrio, M. C. Lasne, (1997) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2837.

⁸⁶ R. J. Davenport, K. Dowsett, V.W. Pike (1997) *Appl. Radiat. Isot.* 48:1117.

⁸⁷ Padgett, H.C., Robinson, G.D., Barrio, J.R. (1982) *Int J Appl Radiat Isot.* 33(12):1471

⁸⁸ Le Helleix, S., Dollé, F., Kuhnast, B. (2013) *Appl Radiat Isot.* 82:7.

Otras aproximaciones radiosintéticas con reactivos organometálicos la ejemplifican el uso de compuestos de organolitio (R-Li) con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ para la síntesis de ^{11}C -cetonas⁸⁹ o 1- ^{11}C -aminoácidos⁹⁰ o el uso de silanaminas para producir $[^{11}\text{C}]$ aminas terciarias⁹¹.

Las marcaciones de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando reactivos organometálicos u organosililados poseen las desventajas inherentes al uso de materiales de partida altamente reactivos, con baja quimioselectividad, inestables frente a los componentes atmosféricos y difíciles de manejar. Por tanto su aplicabilidad en la Radiofarmacia, con excepción del $[^{11}\text{C}]$ acetato u $[^{11}\text{C}]$ palmitato, ha sido escasa debido a estos inconvenientes que resultan en procesos dificultosos y poco reproducibles.

3.3.5.2. Nuevos métodos de fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Acompañado por los avances de la Química Verde⁹², con énfasis en la síntesis orgánica referido a la incorporación de CO_2 en moléculas orgánicas (en virtud de ser un material de partida de bajo costo, abundante y no tóxico), ha surgido en los radioquímicos el interés de utilizar directamente $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ para la preparación de radiofármacos, más allá de la ya mencionada reacción de Grignard y sus variaciones. La “fijación” de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ha sido llamada “*el renacimiento de la radioquímica PET*” en función de su impacto.⁹³ Las investigaciones en esta línea de trabajo han demostrado que mediante condiciones y reactivos “suaves” es posible incorporar ^{11}C en moléculas orgánicas partiendo de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

Los primeros reportes de fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ datan de la última década del siglo XX, como alternativas al uso del precursor secundario $[^{11}\text{C}]\text{COCl}_2$. Se destaca el trabajo de Chakraborty y col., quienes reportaron la primera síntesis de $[^{11}\text{C}]$ urea por medio de la reacción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}^+\text{Li}^-$ y posterior hidrólisis con NH_4Cl acuoso.⁹⁴ Seguidamente, Schirbel y col. demostraron la posibilidad de ^{11}C -carbonilar aminas primarias para formar ^{11}C -ureas simétricas, ^{11}C -carbodiimidias, ^{11}C -isocianatos y ^{11}C -benzimidazolonas, barboteando $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en soluciones de aminas primarias en $\text{NEt}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.⁹⁵

Más recientemente surgieron métodos que involucran la formación de ^{11}C -carbamatos a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ activado por superbases tales como DBU o BEMP. Se destaca el trabajo de Hooker y col.⁹⁶ en donde se utilizó el sistema fijador $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2/\text{DBU}$ en DMF para sintetizar ^{11}C -carbamatos a partir de aminas primarias y secundarias.

⁸⁹ [a] Prenant, C., Sastre, J., Crouzel, C., Syrota, A. (1987) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 24:227., [b] van der Meij, M., Carruthers, N. I., Herscheid, J. D. M., Jablownowski, J. A., Leysen, J. E., Windhorst, A. D. (2003) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 46:1075.

⁹⁰ Bolster, J. M., Vaalburg, W., Elsinga, Ph. H., Woldring, M. G., H. Wynberg (1986) *Appl. Radiat. Isot.* 37:985.

⁹¹ Ram, S., Ehrenkauf, R. E. (1985) *Tetrahedron Lett.* 26:5367.

⁹² Sakakura, T., Choi, J.-C., Yasuda, H. (2007) *Chem. Rev.* 107: 2365.

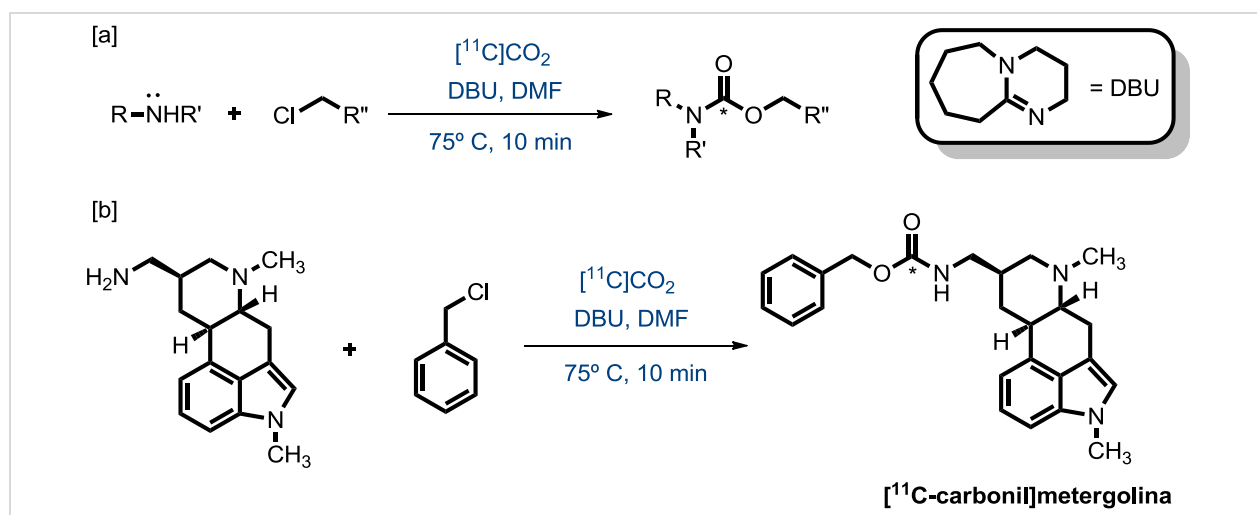
⁹³ Rotstein B, Liang S, Holland J, Lee TL, Hooker JM, Wilson A, Vasdev N (2013) *Chem. Comm.* 49:5621.

⁹⁴ Chakraborty, P. K., Mangner, T. J., Chugani, H. T. (1997). *App. Radiat. and Isot.* 48(5): 619.

⁹⁵ Schirbel, A., Holschbach, M.H., Coenen, H.H. (1999) *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 42:537.

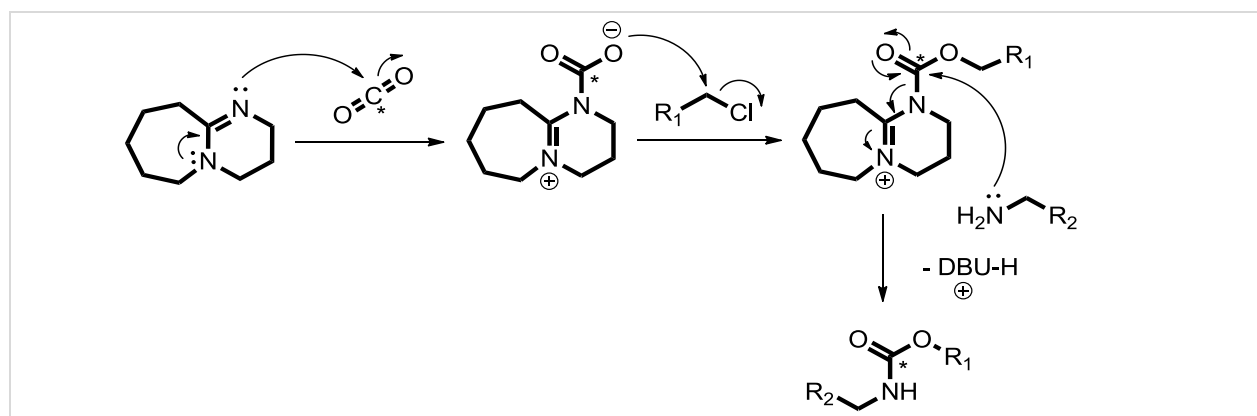
⁹⁶ Hooker, J.M., Reibel, A., Hill, S., Schueller, M., Fowler, J.S. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.* 48:3482.

En el trabajo, los autores demostraron su potencial mediante la radiosíntesis de [^{11}C]metergolina, un antagonista de los receptores de serotonina (5HT) con un RRQ de 32-40%. (**Esquema 19**)



ESQUEMA 19. [a] Radiosíntesis de [^{11}C]carbamatos a partir de aminas y cloruros de alquilo utilizando DBU en la fijación de [^{11}C]CO₂. [b] Radiosíntesis de [^{11}C]metergolina. (C* = ^{11}C)

Los autores plantean para este proceso un mecanismo tentativo cuyo primer paso es la formación de un aducto zwitteriónico DBU⁺- ^{11}C O₂⁻ (DBU- ^{11}C carbamato) seguido de una reacción de alquilación con el cloruro de alquilo utilizado. Posteriormente se propone una adición/sustitución sobre el intermedio carbamato por parte de la amina para dar el [^{11}C]carbamato deseado. (**Esquema 20**)

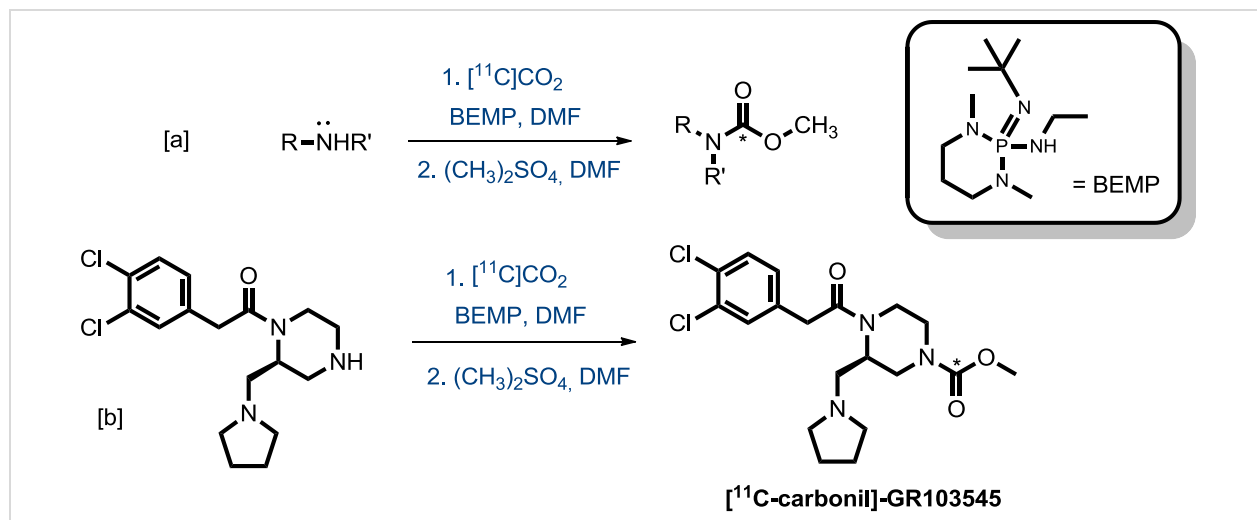


ESQUEMA 20. Mecanismo propuesto por Hooker y col. (2009) para la radiosíntesis de [^{11}C]carbamatos. (C* = ^{11}C)

Poco tiempo después surgieron trabajos como el de Wilson y col.⁹⁷ en donde se presenta el uso de BEMP como agente fijador para la radiosíntesis de [^{11}C -carbonil]carbamatos de metilo. Los autores demostraron que BEMP resultó ser un agente fijador más efectivo que

⁹⁷ Wilson, A, Garcia, A, Houle, S, Vasdev, N. (2010). *Org Biomol Chem* 8:428.

DBU, tanto para atrapar $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ como para promover su transferencia a la amina. El uso del sistema $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ / BEMP en DMF (temp. ambiente, loop) fue aplicado a la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{-GR103545}$ (un agonista selectivo de los receptores kappa-opioides) con buen RRQ (**Esquema 21**).



ESQUEMA 21. [a] Radiosíntesis de metil $[^{11}\text{C}]$ carbamatos a partir de aminas y sulfato de dimetilo utilizando BEMP en la fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. [b] Radiosíntesis de $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{GR103545}$, un agonista selectivo de los receptores κ -opioides. ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$)

El uso del sistema $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ / BEMP seguido de POCl_3 se ha utilizado para la síntesis de $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{carbamatos}$ y $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{ureas}$ asimétricas *vía* un intermedio $[^{11}\text{C}]\text{isocianato}$. Por tratamiento de dichos $[^{11}\text{C}]\text{isocianatos}$ con alcoholes terciarios o fenoles se obtienen $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{carbamatos}$ ⁹⁸ que no serían posible de sintetizar utilizando agentes alquilantes. Por otra parte, si el $[^{11}\text{C}]\text{isocianato}$ se hace reaccionar con aminas primarias o secundarias es posible obtener $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{ureas}$ simétricas o asimétricas. (**Esquema 22**, [a]) Los intermedios $[^{11}\text{C}]\text{isocianatos}$ pueden también prepararse a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y trifetilfosfiniminas⁹⁹ (rindiendo fenil $[^{11}\text{C}]\text{isocianatos}$, que por tratamiento con aminas primarias o secundarias dan fenil $[^{11}\text{C}]\text{ureas}$ asimétricas, **Esquema 22**, [b]) o en las condiciones de Mitsunobu (PBU_3 , DBAD)¹⁰⁰, dando como productos $[^{11}\text{C}]\text{ureas}$ simétricas, asimétricas o incluso $[^{11}\text{C}]\text{amidás}$ si el intermedio de reacción se hace reaccionar con reactivos de Grignard¹⁰¹. (**Esquema 22**, [c]), metodología que ha sido empleada para la síntesis de $[^{11}\text{C}\text{-carbonil}]\text{melatonina}$.

La utilización de estas metodologías de fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ trasciende su interés meramente académico, y cuenta con aplicaciones para la síntesis de especies con interés

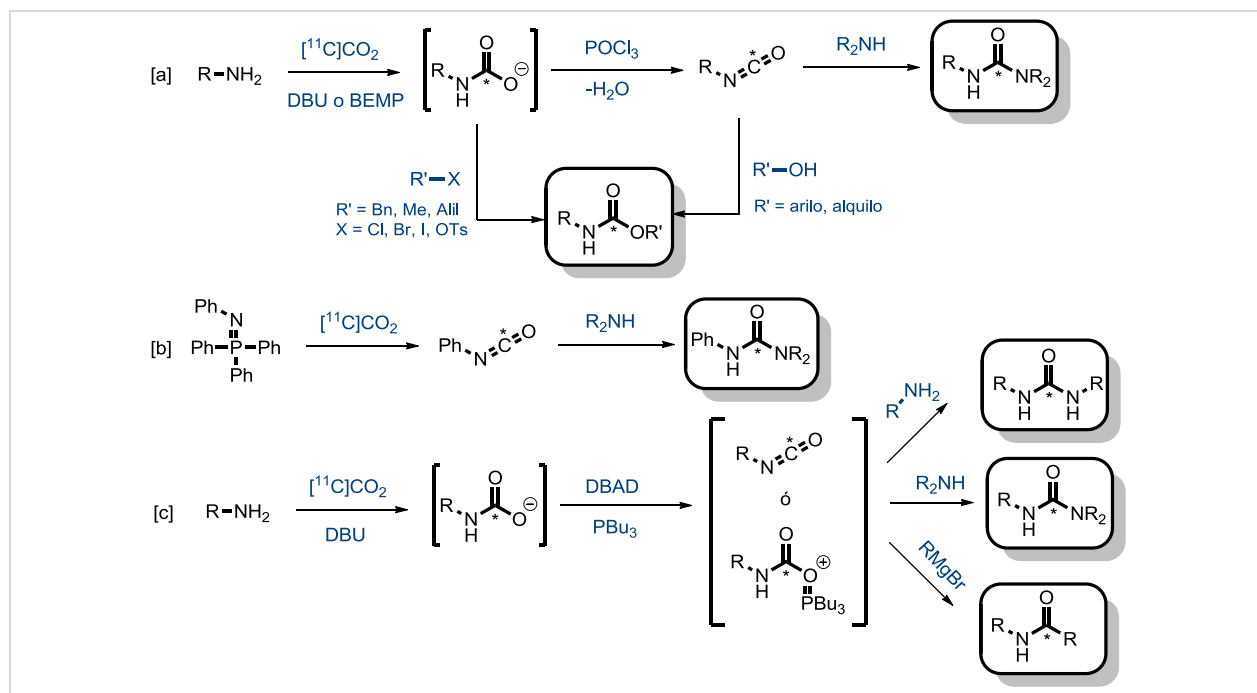
⁹⁸ Wilson, A.A., Garcia, A., Houle, S., Sadovski, O. Vasdev, N. (2011) *Chem.-Eur. J.* 17:259.

⁹⁹ van Tilburg, E. W., Windhorst, A. D., van der Mey, M. Herscheid J. D. M. (2006) *J. Labelled. Compd. Radiopharm.* 49:321.

¹⁰⁰ [a] Dheere, A., Yusuf, N., Gee, A.D. (2013) *Chem. Comm.* 49:8193. [b] Dheere, A., Bongarzone, S., Taddei, C., Yan, R., Gee, A.D. (2015) *Synlett* 26:2257.

¹⁰¹ Bongarzone, S., Runser, A., Taddei, C., Dheere, A. K. H., Gee, A. D. (2017). *Chem. Comm.*, 53: 5334

clínico. A modo de ejemplo, el inhibidor de la glicógeno-sintasa kinasa 3 β (GSK-3 β , blanco molecular en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer) [^{11}C -carbonil]AR-A014418, sintetizado originalmente utilizando ^{11}C -metilación nucleofílica con [^{11}C]CH $_3\text{I}$ ¹⁰², fue preparado mediante el sistema [^{11}C]CO $_2$ / BEMP seguido de POCl $_3$ ¹⁰³ con un RRQ de 8.3% (nc) y una A $_M$ de 150 GBq/ μmol . (**Esquema 23**, [a]) Otra radiomolécula PET que ejemplifica el uso de dicha metodología lo constituye el [^{11}C -carbonil]PF-04457845, un inhibidor de la amida-hidrolasa de ácidos grasos (FAAH)¹⁰⁴. Este radiotrazador fue sintetizado en la metodología one-pot, con RRQ aceptable (4.5%, ndc) y A $_M$ adecuada (75 GBq/ μmol). (**Esquema 23**, [b]).



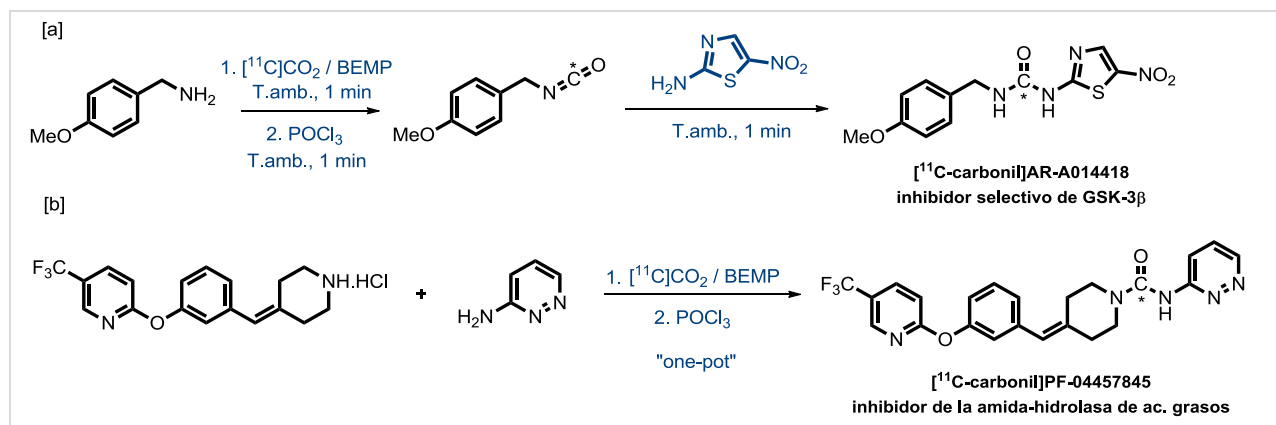
ESQUEMA 22. Síntesis de ^{11}C -ureas y ^{11}C -carbamatos por medio de fijación de [^{11}C]CO $_2$ (adaptado de Rotstein y col¹⁰⁵). (DBAD = dibutildiazodicarboxilato), (C* = ^{11}C)

¹⁰² Vasdev, N., Garcia, A., Stableford, W. T., Young, A. B., Meyer, J. H., Houle, S., Wilson, A. A. (2005) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(23): 5270.

¹⁰³ Hicks, J. W., Wilson, A. A., Rubie, E. A., Woodgett, J. R., Houle, S., Vasdev, N. (2012) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(5): 2099.

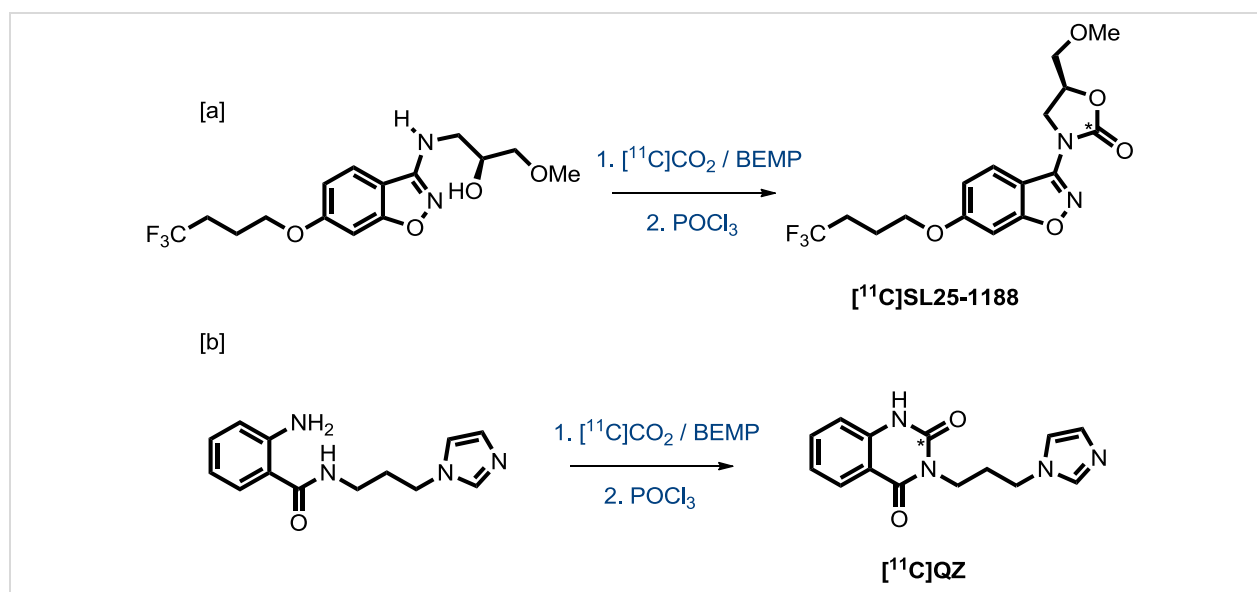
¹⁰⁴ Hicks, J. W., Parkes, J., Sadovski, O., Tong, J., Houle, S., Vasdev, N., & Wilson, A. A. (2013) *Nucl. Med. Biol.*, 40(6):740.

¹⁰⁵ Rotstein, B. H., Liang, S. H., Placzek, M. S., Hooker, J. M., Gee, A. D., Dollé, F., Wilson, A.A., Vasdev, N. (2016) *Chem. Soc. Rev.* 45(17): 4708.



ESQUEMA 23. Radiosíntesis de ¹¹C-ureas asimétricas a partir de [¹¹C]CO₂ / BEMP // POCl₃ . (C* = ¹¹C)

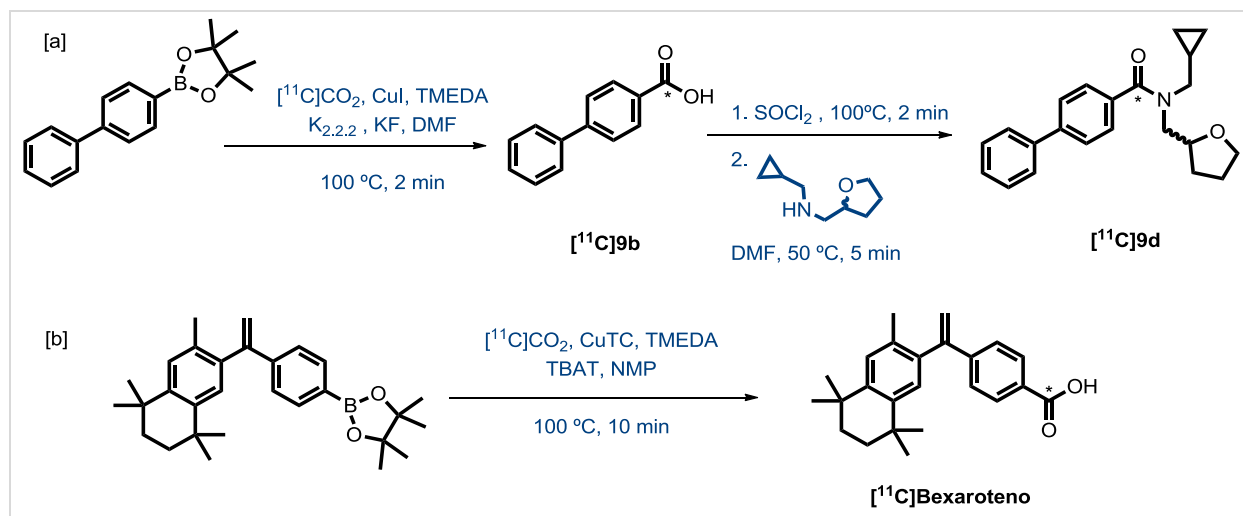
Las metodologías de fijación de [¹¹C]CO₂ se han utilizado para sintetizar también ácidos ¹¹C-carboxílicos, en reacciones mediadas por Cu(I), con la concomitante ampliación de la técnica para preparar ¹¹C-ésteres y ¹¹C-amidas. Este tipo de aproximación sintética representó una ventaja sobre ¹¹C-carboxilación con reactivos de Grignard u organolitios, ya que los ésteres alquilborónicos utilizados como precursores son más estables y fáciles de manipular, y presentan mucha mayor tolerancia a la presencia de otros grupos funcionales.



ESQUEMA 24. Radiosíntesis de sistemas cíclicos partir de [¹¹C]CO₂ / BEMP // POCl₃ (C* = ¹¹C)

Por medio de la ¹¹C-carboxilación de ésteres borónicos mediada por Cu(I) y utilizando como agente fijador TMEDA (*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina) se sintetizó el compuesto [¹¹C]9d, una ¹¹C-amida radioligando candidato del receptor de oxitocina, a partir del ácido

[1,1'-bifenil]-4- ^{11}C -carbonil]carboxílico (^{11}C 9b).¹⁰⁶ Otro ejemplo lo constituye el ^{11}C Bexaroteno, un inhibidor de la FAAH, que fue sintetizado por medio de fijación de ^{11}C CO₂ mediada por Cu(I) con un RRQ del 15% (ndc).¹⁰⁷ (Esquema 25)



ESQUEMA 25. Radiosíntesis de Ácidos ^{11}C -carboxílicos por fijación de ^{11}C CO₂ mediada por Cu(I)

En un estudio reciente, Liger y col.¹⁰⁸ han descrito la aplicación de ^{11}C CO₂ como bloque C₁ para la ^{11}C -metilación catalítica de aminas, mediante la utilización de “fijación-reducción” con IPr (un carbeno *N*-heterocíclico, NHC, Esquema 26) / ZnCl₂ y PhSiH₃. Esta aproximación radiosintética tiene como punto de partida el trabajo de Jacquet y col.¹⁰⁹, los cuales por primera vez demostraron el uso de CO₂ como bloque C₁ para la metilación catalítica de aminas con el sistema IPr / ZnCl₂ / PhSiH₃, ampliado luego por el trabajo de Das y col.¹¹⁰, donde se utilizó CO₂ para metilar aminas con el sistema IMes / Ph₂SiH₂. El rol de los NHC como catalizadores en Química Orgánica, y en especial como agentes fijadores de CO₂ se conoce desde finales de los años ‘80, donde se publica por primera vez la síntesis de NHC estables¹¹¹ y ha sido bien documentado en la literatura.¹¹²

¹⁰⁶ Riss, P., Lu, S., Telu, S., Aigbirhio, F., Pike, V.W. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.* 51:2698.

¹⁰⁷ Rotstein, B., Hooker, J.M., Woo, J, Lee, T.L., Brady, T., Liang, S., Vasdev, N. (2014) *ACS Med Chem Lett* 5:668.

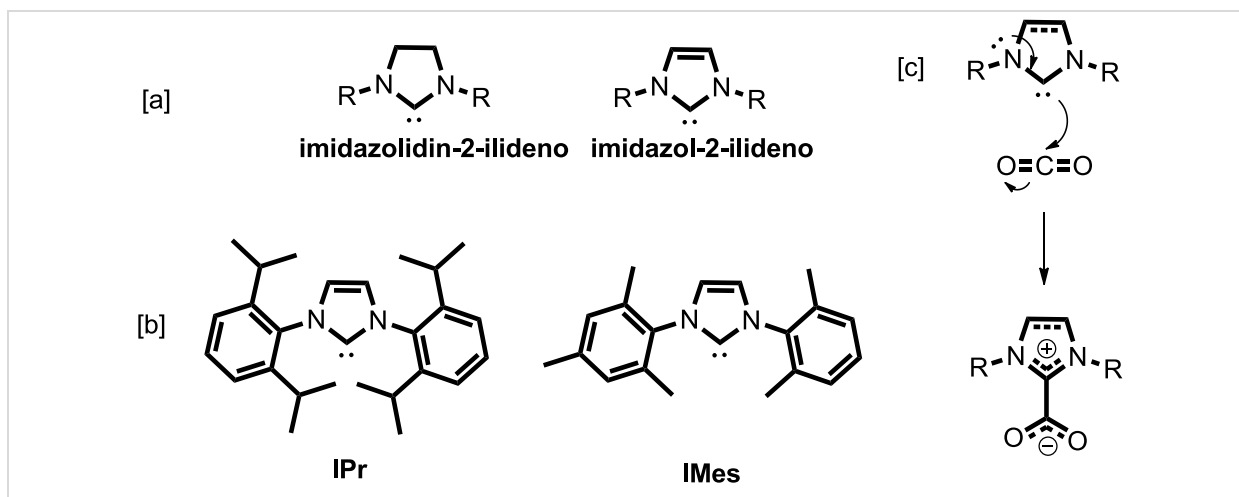
¹⁰⁸ Liger, F., Eijsbouts, T., Cadarossanesaib, F., Tourvieille, C., Le Bars, D., Billard, T. (2015) *Eur J Chem Org* 6434–6438

¹⁰⁹ Jacquet, O., Frogneux, X., Das Neves Gomes, C., Cantat, T. (2013). *Chemical Science*, 4(5), 2127.

¹¹⁰ Das, S., Bobbink, F. D., Laurency, G., & Dyson, P. J. (2014). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53(47), 12876.

¹¹¹ Arduengo, A.; Harlow, R.; Kline, M. J. (1990) *Am. Chem. Soc.* 113:361

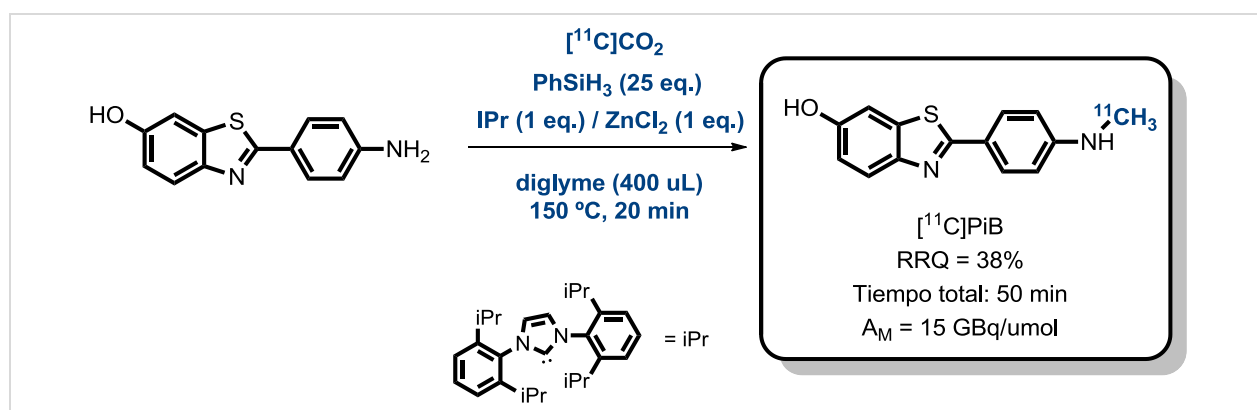
¹¹² [a] Enders, D., Niemeier, O., Henseler, A. (2007) *Chem. Rev.* 107(12), 5606, [b] Zhou, H., Zhang, W.-Z., Liu, C.-H., Qu, J.-P., Lu, X.-B. (2008). *J. Org. Chem.*, 73(20), 8039, [c] Huang, F., Lu, G., Zhao, L., Li, H., & Wang, Z.-X. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, 132(35), 12388.



ESQUEMA 26. NHC: [a] estructuras de los NHC derivados del imidazolidin-2-ilideno y del imidazol-2-ilideno, [b] estructura de los NHC utilizados para la metilación de aminas con CO₂, [c] mecanismo propuesto para formación del zwitterion NHC⁺-CO₂⁻

Liger y col. presentaron además la aplicación de esta metodología para ¹¹C-aminas de interés en la clínica PET tales como [¹¹C]imipramina, [¹¹C]efedrina y el radiofármaco [¹¹C]PiB utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer por medio de PET ¹¹³ (radiofármaco empleado en CUDIM con dicho fin). Con relación a este último, constituye la primera radiosíntesis de este trazador por medio de fijación con [¹¹C]CO₂, en contraposición con la radiosíntesis convencional que utiliza [¹¹C]CH₃OTf (**Esquema 27**). Esta aproximación “one-pot” elimina la preparación de [¹¹C]CH₃OTf (que en plataformas radiosintéticas comerciales puede demorar hasta 15 min), pero en el trabajo de los investigadores, la síntesis de [¹¹C]PiB insume 20 minutos, lo que de por sí limita el rendimiento de la misma. El RRQ obtenido en el presente trabajo mediante esta marcación resultó ser de 38% (dc a partir del [¹¹C]CO₂ atrapado en el reactor de marcación), ligeramente inferior al de la síntesis a partir de [¹¹C]CH₃OTf realizada en el laboratorio de los investigadores (45%, dc).

¹¹³ [a] Mathis, C. A., Wang, Y., Holt, D. P., Huang, G.-F., Debnath, M. L., Klunk, W. E. (2003) *J. Med. Chem.* 46: 2740. [b] Engler, H., Blomqvist, G., Bergstrom, M., Estrada, S., Sandel, J., Antoni, G., Langstrom, B., Nordberg, A., Barletta, J., Klunk, W., Debnath, M., Holt, D., Wang, Y., Huang, G., Mathis, C. (2002) *Neurobiol Aging*, 23: S429. [c]. Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D.P., Bergstrom, M., Savitcheva, I., Huang, G.F., Estrada, S., Ausen, B., Debnath, M.L., Barletta, J., Price, J.C., Sandell, J., Lopresti, B.J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C.A., Langstrom, B. (2004) *Ann Neurol.* 55:306.



ESQUEMA 27. Radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ mediante fijación-reducción según la técnica de Billard y col. (2015)

Asimismo, la A_M del $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ obtenido de esta manera, resultó baja (15 GBq/ μmol) en comparación a otros métodos de producción de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ reportados en la literatura (**Tabla 5**)¹¹⁴

Tabla 5. Producciones de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ citadas en la literatura y parámetros asociados a la misma

Referencia	Masa precursor (mg)	Radiosíntesis (condiciones)	RRQ (%) ^[a]	A_M (GBq/ μmol)
Wilson y col. (2004)	0,4	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, temp. amb. (loop o vial)	11-16 (ndc) ^[b]	30-60
Solbach y col. (2005)	4-8	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, 80°C, 1 min Acetona	58±2	80-120
Phillipe y col. (2011)	2	$[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, 75 °C, 2 min 2-butanona	48,0±2,7	183±14
Liger y col. (2015)	1,7	$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, PhSiH ₃ , IPr 120° C, 20 min, diglyme	38	15 ^[c]

[a] A partir del precursor radiactivo, corregido, a menos que se indique lo contrario, [b] 22 min de síntesis, [c] 50 GBq/ μmol cuando los autores lo preparan con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$.

La metodología de Liger y col. si bien es novedosa, es presentada como “prueba de concepto” y sus resultados como “preliminares”, con la salvedad de que es una metodología abierta a mejoras radiosintéticas.

¹¹⁴ Wilson, A. A., Garcia, A., Chestakova, A., Kung, H., Houle, S. (2004) *J. Labelled. Compd. Radiopharm.* 47:679. [b] Solbach, C., Uebele, M., Reischl, G., Machulla, H.-J. (2005) *Appl. Radiat. Isot.* 62: 591 – 595, [c] Philippe, C, Haeusler D, Mitterhauser M, Ungersboeck J, Viernstein H, Dudczak R, Wadsak, W. (2011) *Appl Radiat Isot* 69: 1212.

CAPITULO 2: ANTECEDENTES

1. CENTRO URUGUAYO DE IMAGENOLÓGÍA MOLECULAR (CUDIM)

El Centro Uruguayo de Imagenología Molecular es una institución creada bajo el amparo de la Ley 18172 del año 2007¹¹⁵, cuyos objetivos principales son i) brindar asistencia a la población en forma de diagnóstico PET, ii) realizar tareas de investigación para desarrollar nuevos marcadores de diagnóstico, iii) constituirse en un Centro de formación de profesionales y científicos en el área, estimulando la formación de estudios de postgrado.

En particular, la Radiofarmacia de CUDIM tiene como cometidos la producción radiofármacos PET de ¹⁸F, ¹¹C, ¹³N y ¹⁵O (ciclotrón) y ⁶⁸Ga (generador) y su control de calidad fisicoquímico y microbiológico para las áreas Clínica (estudios diagnósticos en pacientes) y Preclínica (estudios biomédicos en modelos animales *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*). En la Radiofarmacia se llevan a cabo las actividades de desarrollo, implementación de metodologías e investigación Radioquímica.

La Radiofarmacia de CUDIM posee 8 años de experiencia en la producción de radiotrazadores de ¹¹C. A la fecha se cuenta con 6 radiofármacos de ¹¹C en uso clínico y preclínico, que se producen con frecuencias variables de acuerdo a la demanda clínica¹¹⁶. Dichos radiofármacos cubren el diagnóstico de variadas patologías oncológicas, neurológicas y cardiológicas.

Se destacan por su mayor frecuencia la [¹¹C]metionina (de utilización en tumores del SNC), la [¹¹C]colina (cáncer de próstata), el [¹¹C]PiB (Enfermedad de Alzheimer) y el [¹¹C]deuterodeprenil (Astrocitosis). De menor frecuencia de producción son el [¹¹C]metomidato y la [¹¹C]metahidroxiefedrina (lesiones oncológicas adrenocorticales).

A nivel de investigación, se cuenta con otros radiotrazadores marcados con ¹¹C tales como la [¹¹C]S-adenosilmetionina¹¹⁷, en etapa de validación clínica en pacientes con cáncer de próstata, o la [¹¹C]clorgilina¹¹⁸ actualmente en estudios preclínicos de modelos xenográficos de cáncer de próstata.

¹¹⁵ Poder Legislativo. Ley 18172- 31 de agosto de 2007

¹¹⁶ Página web CUDIM: www.cudim.org

¹¹⁷ [a] Zoppolo F. (2018) “Desarrollo y evaluación de radiotrazadores para el diagnóstico de cáncer de próstata y evaluación de su agresividad y progresión mediante PET” *Tesis De Doctorado En Química*. Facultad de Química, UdelaR. [b] Zoppolo, F., Porcal, W., Oliver, P., Savio, E., & Engler, H. (2017) *Current Radiopharmaceuticals*, 10(3), [c] Zoppolo, F., Mora-Ramirez, E. Reyes, L., Vasilskis, E., Paolino, A., Porcal, W., Oliver, P., Savio, E., Bardiès, M., Engler, H. (2018) *Cancer Research Frontiers*, 4(1): 27.

¹¹⁸ Zirbesegger, K. “Inhibidores de MAO A marcados con ¹¹C como potenciales agentes de diagnóstico por imágenes PET en cáncer de próstata” Tesis de posgrado. Facultad de Química, UdelaR, *en curso*.

2. TECNOLOGÍA Y *KNOW-HOW* DISPONIBLE EN CUDIM

A lo largo de estos años, el grupo de trabajo de la Radiofarmacia de CUDIM ha ganado valiosa experiencia en la producción de [^{11}C]CO₂ de alta actividad molar a nivel del ciclotrón, así como su conversión a precursores secundarios [^{11}C]CH₃I y [^{11}C]CH₃OTf a nivel de los módulos automatizados de síntesis con los que cuenta el CUDIM (GE TRACERlab® FX Pro). Todos los radiotrazadores mencionados en el apartado anterior se producen en forma rutinaria mediante ^{11}C -metilación nucleofílica, por medio de procesos radiosintéticos robustos adaptados a las GMP. Alternativamente, CUDIM posee también un módulo (GE ProCab®) capaz de producir precursores ^{11}C -carbonados alternativos como [^{11}C]CO y [^{11}C]CN⁻ que, hasta el momento de comenzar esta tesis, no había sido utilizado para tales fines. CUDIM también cuenta con la posibilidad de llevar a cabo síntesis de precursores orgánicos para radiofármacos de ^{11}C y ^{18}F .

3. CONTEXTO EN EL QUE SE ENMARCA ESTA TESIS

El estudio de enfermedades crónicas, cómo el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, ha impulsado el desarrollo de una disciplina de investigación biomédica y clínica denominada Imagenología Molecular. Ésta comprende la visualización, la caracterización y medición de los procesos biológicos a nivel molecular y celular. Este tipo de tomografía se basa en detectar y analizar el patrón de distribución que adopta en el interior del organismo un radiotrazador o radiofármaco administrado de forma intravenosa, permitiendo diferenciar una anatomía o fisiología anormal de una normal.

En este contexto, nuestro grupo de investigación en CUDIM lleva adelante diferentes líneas de trabajo orientadas al desarrollo de radiotrazadores PET, incorporando tanto ^{11}C como ^{18}F en biomoléculas específicas, para el estudio y diagnóstico en la enfermedad de Alzheimer y cáncer de próstata por Imagenología Molecular PET¹¹⁹.

El desarrollo de nuevos radiotrazadores o radiofármacos PET es un área mundialmente muy activa en salud humana y requiere de un trabajo multi- e interdisciplinario que implica varios aspectos claves: a) selección de los blancos moleculares específicos; b) síntesis de moléculas precursoras para su marcación; c) implementación de plataformas radiosintéticas automatizadas que minimicen la irradiación del operador y los tiempos de síntesis d) estudios

¹¹⁹ Algunas publicaciones representativas: [a] Buccino, P., Kreimerman, I., Zirbesegger, K., Porcal, W., Savio, E., & Engler, H. (2016). *Applied Radiation and Isotopes*, 110, 47; [b] Giglio, J., Zeni, M., Savio, E., & Engler, H. (2018) *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 3(1); [c] Zirbesegger, K., Buccino, P., Kreimerman, I., Engler, H., Porcal, W., Savio, E., (2017) *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* 2:10; [d] Zoppolo y col. (2017) *op cit.*; [e] Zoppolo y col. (2018) *op cit.*; [f] Rafique, W., Kramer, V., Pardo, T., Smits, R., Spilhaug, M. M., Hoeppling, A., Savio, E., Engler, H., Kuljs, R., Amaral, H., Riss, P. J. (2018) *ACS Omega* 3:7567. [g] Savio, E., García, O., Trindade, V., Buccino, P., Giglio, J., Balter, H., & Engler, H. (2012) *AIP Conf. Proc.* 1509, 185. [h] Kreimerman, I., Porcal, W., Oliver, P., Savio, E., Engler, H. (2017) *Current Radiopharmaceuticals*, 10:1.

biológicos compatibles con los cortos períodos de semidesintegración de los radionucleidos, como por ejemplo ^{11}C .

En particular, en la radioquímica PET de ^{11}C , la estrategia de marcación más utilizada hasta el momento se basa en una reacción clásica de alquilación, utilizando precursores orgánicos adecuadamente sustituidos y los precursores secundarios $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ como agentes alquilantes. En todos los casos el control de calidad se efectúa por HPLC (equipado con detectores UV y gamma), por lo cual es necesario contar con los estándares de los productos metilados. Por lo tanto, luego de analizar teóricamente las posibles reacciones de marcación, el siguiente paso consiste en la obtención de los estándares (no radioactivos) para HPLC, los cuales deben ser obtenidos mediante métodos de síntesis orgánica. Si bien hasta el momento nuestro grupo ha logrado obtener precursores orgánicos de forma eficiente y marcaciones con ^{11}C optimizadas mediante módulos automáticos, esta ruta clásica de radiosíntesis PET limita la posibilidad de desarrollar nuevos radiotrazadores y potenciales radiofármacos. Esto es debido a que muchas veces la molécula bioactiva a marcar con el radionucleido no presenta en su estructura un grupo funcional metilo. Así, el aprendizaje en la utilización de otros precursores radioquímicos, tanto primarios como secundarios, podría expandir la plataforma química de radiotrazadores ^{11}C -PET dentro de CUDIM.

En este mismo contexto, si bien la mayoría de las veces el precursor primario $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ se transforma en especies más reactivas, como los reactivos de metilación mencionados anteriormente, para facilitar la reacción de radiomarcado, $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en sí mismo es un material de partida atractivo para los radioquímicos, ya que se produce directamente a partir del ciclotrón en alta actividad específica. Su utilización en el radiomarcado inicial permitiría la incorporación de grupos funcionales de alto estado de oxidación, tales como ácidos carboxílicos, amidas, ureas y carbamatos entre otros. Además, mediante una estrategia química elegante permitiría en un solo paso de radiosíntesis su incorporación y reducción *in situ* hacia la obtención de un grupo metilo ($^{11}\text{CH}_3\text{-R}$) en la molécula precursora. De esta forma, en comparación con la ruta clásica de metilación, podríamos en principio esperar una marcación en menor tiempo y con mejores rendimientos radioquímicos.

En base a lo expuesto, en el marco de la presente propuesta de tesis doctoral, nos planteamos implementar y desarrollar en CUDIM nuevas metodologías radiosintéticas dirigidas a la incorporación de ^{11}C en moléculas orgánicas mediante la utilización de plataformas automáticas. En este sentido, uno de los objetivos trazados por nuestro grupo en CUDIM es desarrollar metodologías radiosintéticas optimizadas (eficientes y rápidas) mediante la implementación de módulos automatizados. Las marcaciones automatizadas proporcionan ventajas sobre los métodos manuales o semiautomáticos. Las síntesis automatizadas generalmente son más reproducibles que las manuales y síntesis semi-remotas minimizando la posibilidad de errores por parte del operario. Esto permitiría además la formación de recursos humanos calificados en el desarrollo y la obtención de radiotrazadores PET con potencial uso clínico.

Es de destacar que el CUDIM cuenta con el módulo ProCab® (GE) capaz de generar $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ y $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ que hasta la fecha del plan de tesis no fue utilizado para tales fines. Este módulo es capaz además de generar $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ purificado mediante un sistema fisicoquímico análogo al que poseen los módulos de síntesis. En este sentido, nos hemos planteado el estudio y aplicación de ^{11}C -precursores alternativos disponibles en nuestro centro, $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$, por medio de reacciones de fijación/reducción y reacciones de cianación, respectivamente. El correcto aprendizaje y cumplimiento de los objetivos planteados nos daría la oportunidad de acceder a un mayor número de radiotrazadores y potenciales radiofármacos de uso preclínico y clínico.

Como objetivo a más largo plazo, buscamos poder alcanzar un impacto positivo con el éxito de la presente propuesta sobre la calidad de salud de la población uruguaya, mediante investigación desarrollada en un centro de características únicas en el país.

La demanda clínica y preclínica de radiotrazadores hace que sea necesario contar con métodos de marcación que se caractericen por ser robustos, reproducibles, fáciles de implementar y que además logren generar una amplia variedad de estructuras moleculares diversas. Como fue mencionado y expuesto en el capítulo anterior, el ^{11}C posee una versatilidad radioquímica difícil de igualar por otros radionucleidos PET. *La preparación de ^{11}C -precursores alternativos a los agentes ^{11}C -metilantes $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{X}$ y la exploración de su reactividad química enfocada a la preparación de ^{11}C -radiofármacos se convierte en un proyecto atractivo para una Radiofarmacia que se enmarca en un centro donde la clínica y la investigación operan en forma conjunta.* La mejora de los procesos existentes por medio de metodologías radioquímicas alternativas, en términos de mayores rendimientos o purezas también es deseable en el marco de una demanda clínica aumentada. En base a estos enfoques contemplados en CUDIM surge el interés en realizar este trabajo de tesis, cuyos objetivos generales se exponen en el siguiente capítulo.

CAPITULO 3: OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Generar aprendizajes en el uso de vías alternativas de marcación con ^{11}C a las habitualmente empleadas, en particular con $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ y $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Estudiar su aplicabilidad en sistemas de interés radiofarmacéutico.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumplir con el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

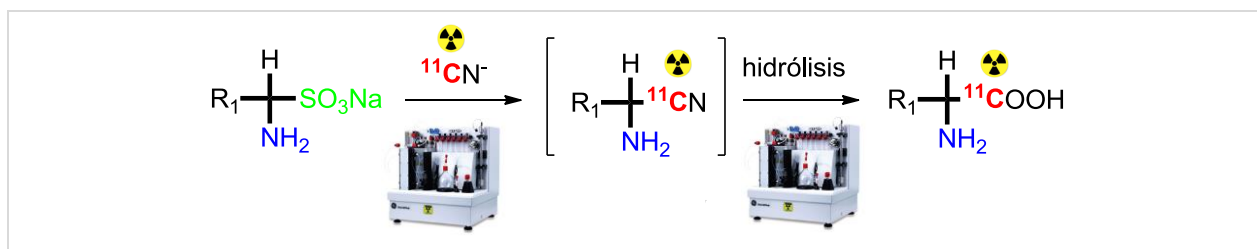
1. Explorar los aspectos fisicoquímicos relacionados a la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ y $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, en los medios donde se llevarán a cabo las reacciones de marcación.
2. Investigar la reactividad en función de diferentes variables fisicoquímicas, eligiendo sistemas moleculares modelo para la aplicación de vías de marcación con $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ y $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.
3. Aplicar el conocimiento generado en los puntos anteriores a sistemas moleculares de interés en la rutina clínica y preclínica PET de CUDIM, en particular mediante metodologías novedosas e innovadoras.
4. Implementar el uso de plataformas para radiosíntesis automatizadas o semiautomatizadas para el desarrollo de los puntos anteriores, mediante la realización de modificaciones reversibles en los módulos TRACERlab® FX C Pro.

3. ESTRATEGIAS DE TRABAJO

3.1. ^{11}C -CIANACIONES CON EL PRECURSOR $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$

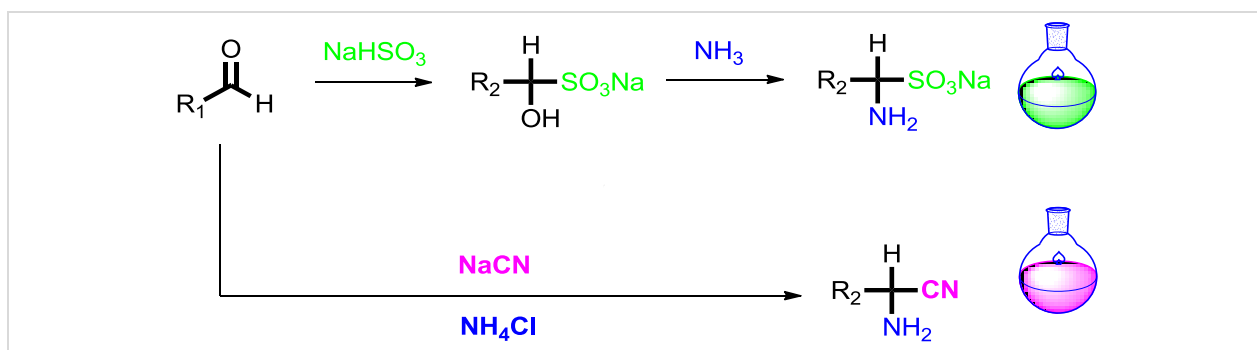
Se plantea el estudio de la aplicabilidad de reacciones de ^{11}C -cianación para la síntesis de 1- $[^{11}\text{C}]\text{-}\alpha$ -aminoácidos, y su potencial utilización en el desarrollo de otros radiotrazadores para diagnóstico en neurología u oncología, de interés para el CUDIM. Para ello se propone:

1. Puesta a punto de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ a nivel del módulo ProCab® (GE). Estudio de las variables fisicoquímicas de la misma.
2. Puesta a punto de la radiosíntesis de 1- $[^{11}\text{C}]\text{-}\alpha$ -aminoácidos a partir de 1-amino-1-alquilsulfonatos de sodio (metodología de Strecker-Bücherer) como aplicación de una metodología de ^{11}C -cianación (**Esquema 28**):



ESQUEMA 28. Estrategia de marcación de 1-[^{11}C]- α -aminoácidos con [^{11}C]HCN

3. Síntesis orgánica y caracterización fisicoquímica de precursores orgánicos y estándares de referencia para el punto 2 (**Esquema 29**):



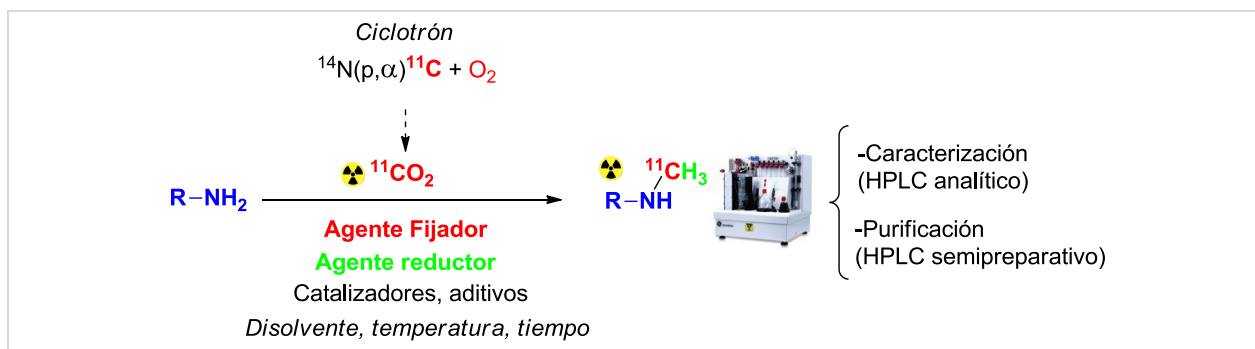
ESQUEMA 29. Síntesis de precursores y estándares de referencia.

4. Puesta a punto de sistemas analíticos para el seguimiento de las reacciones llevadas a cabo en los puntos anteriores.

3.2. ^{11}C -METILACION DIRECTA CON EL PRECURSOR [^{11}C]CO₂

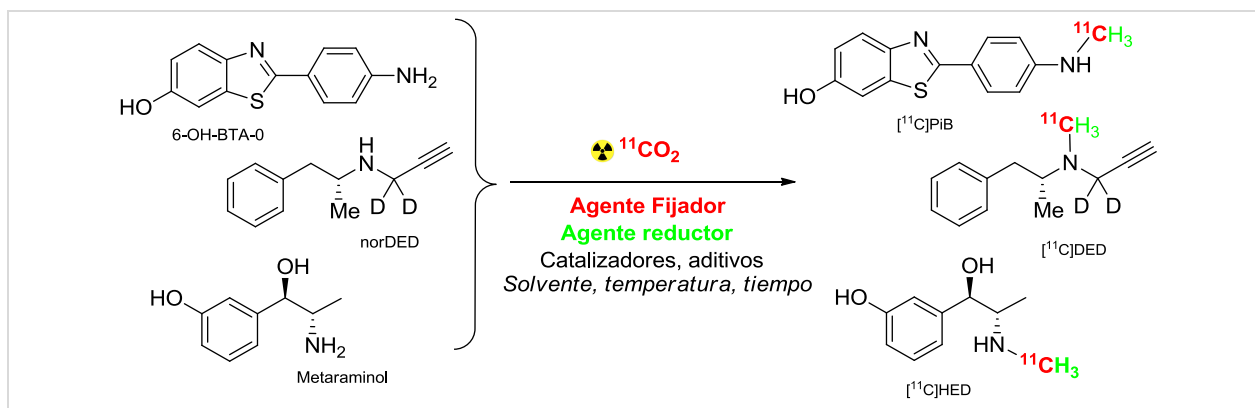
Se plantea el estudio de la aplicabilidad de reacciones de fijación-reducción de [^{11}C]CO₂ para la radiosíntesis de ^{11}C -aminas de interés radiofarmacéutico para el CUDIM. Para ello se propone:

1. Estudio de los parámetros fisicoquímicos de la captura de [^{11}C]CO₂
2. Desarrollo de metodologías radiosintéticas orientadas a la ^{11}C -metilación de aminas a partir de [^{11}C]CO₂ mediante la utilización de sistemas fijadores-reductores descritos en la literatura para CO₂ o para [^{11}C]CO₂ (**Esquema 30**).



ESQUEMA 30. Desarrollo de metodologías orientadas a la ^{11}C -metilación de aminas con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

3. Aplicación de las antedichas metodologías en la obtención de radiofármacos PET de uso clínico en CUDIM ($[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, $[^{11}\text{C}]\text{Metahidroxiefedrina}$, L- $[^{11}\text{C}]\text{deprenil-D}_2$) (**Esquema 31**):



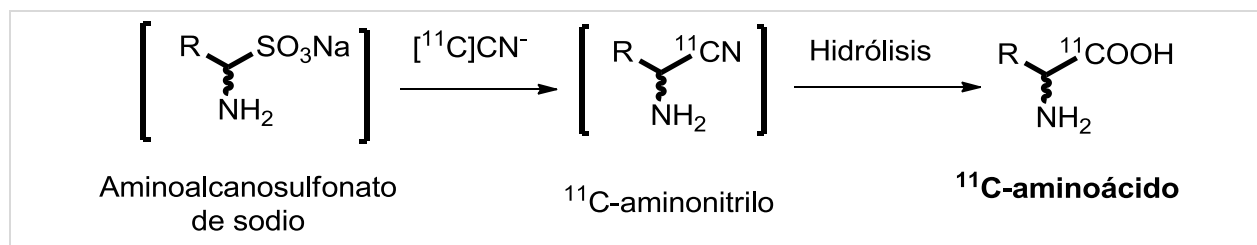
ESQUEMA 31. Aplicación de las metodologías de fijación/reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ para la radiosíntesis de aminas de interés radiofarmacéutico.

4. Puesta a punto de sistemas analíticos para el seguimiento de las reacciones llevadas a cabo en los puntos anteriores.

CAPITULO 4: ^{11}C -CIANACIONES CON EL PRECURSOR $^{11}\text{C}[\text{CN}]^-$

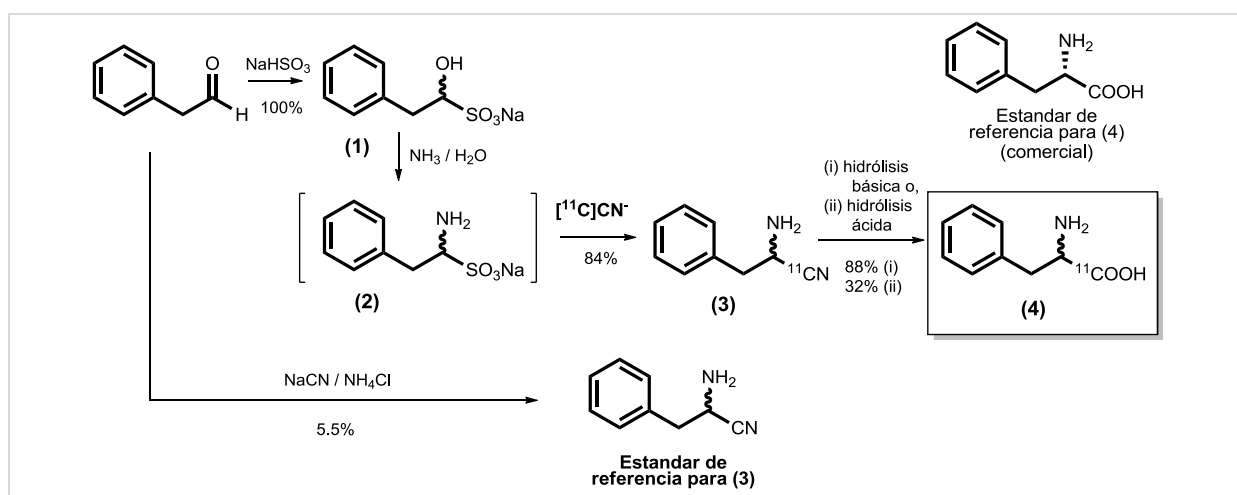
1. INTRODUCCIÓN

La estrategia elegida para llevar a cabo marcaciones con el precursor $^{11}\text{C}[\text{CN}]^-$ fue la versión modificada de la reacción de Strecker-Bücherer, donde un alquil o aril 1-amino-1-sulfonato reacciona con el precursor radiactivo $^{11}\text{C}[\text{CN}]^-$ para dar un alquil o aril 1-amino-1- ^{11}C nitrilo. Este último, por posterior hidrólisis ácida o básica, permite obtener 1- ^{11}C - α -aminoácidos como se muestra en el **Esquema 32**. A menos que se controle químicamente la estereoquímica, sea en el uso de aminosulfonatos enantioméricamente puros o utilizando auxiliares quirales en el paso de incorporación del $^{11}\text{C}[\text{CN}]^-$, el 1- ^{11}C - α -aminoácido obtenido es racémico.



ESQUEMA 32. Síntesis de Strecker – Bücherer para la radiosíntesis de 1- ^{11}C - α -aminoácidos

La síntesis de precursores orgánicos y estándares analíticos para la identificación radioquímica de los productos ^{11}C -marcados, se realizó en base al **Esquema 33** para la síntesis de la D,L-1- ^{11}C fenilalanina (D,L- ^{11}C Phe), que fue el aminoácido elegido como modelo. Partiendo de Fenilacetaldehído se preparó el intermedio D,L-1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio (1) por tratamiento con NaHSO_3 . Seguidamente este intermedio se hizo reaccionar con NH_3 a 60°C para rendir el 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio (2) que constituye el precursor orgánico de la reacción de ^{11}C -cianación. Este último al reaccionar con $^{11}\text{C}[\text{CN}]^-$ generaría el 2-amino-3-fenilpropano-1- ^{11}C nitrilo (3), que por hidrólisis ácida o básica permitiría obtener D,L- ^{11}C Phe (4). Paralelamente se sintetizó 2-amino-3-fenilpropanonitrilo a partir de fenilacetaldehído mediante la reacción de Strecker, como estándar de referencia HPLC para (3). Como estándar de referencia para D,L- ^{11}C Phe se utilizó L-Phe comercial.



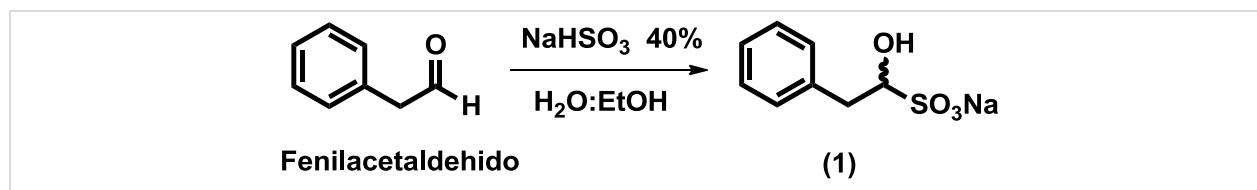
ESQUEMA 33. Radiosíntesis de D,L-[^{11}C]Phe (4), utilizando como material de partida Fenilacetaldehído. (Detalles en el texto)

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. METODOLOGÍAS ORGÁNICAS Y ANALÍTICAS

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba), de calidad analítica o superior, y utilizados sin posterior purificación a menos que se indique lo contrario. Los análisis en Cromatografía en capa fina (TLC) fueron llevados a cabo en placas de sílica gel 60F-254 y reveladas bajo luz UV (254 nm), o ninhidrina 0.2% en etanol. Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker DPX-400 (400 MHz). La asignación de los desplazamientos químicos se realizó en base a experimentos de RMN estándares (^1H , ^1H -COSY, HSQC, HMBC y ^{13}C -RMN). Los desplazamientos químicos fueron expresados en ppm relativos a tetrametilsilano como estándar interno. Los espectros IR fueron adquiridos en un espectrómetro Shimadzu IRAffinity-1 (FT-IR). Los compuestos fueron analizados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un cromatógrafo Shimadzu-UFLC con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie.

2.1.1. Síntesis de 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio

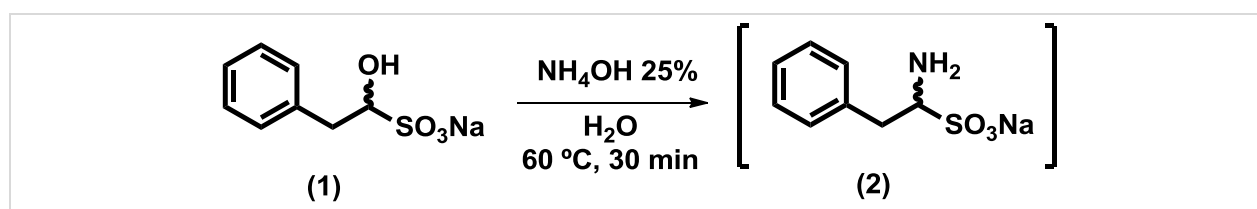


ESQUEMA 34. Síntesis de 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio (1)

La síntesis del 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio (1) (**Esquema 34**) se realizó tomándose como base el trabajo de Pandit y col. (2013)¹²⁰. Sobre una solución de fenilacetaldehido (2.61 mL; 20 mmol) en etanol absoluto (43 mL) se agregó gota a gota solución de NaHSO₃ 40% (5.20 mL, 20 mmol), con agitación magnética intensa. El tiempo estimado de agregado de NaHSO₃ fue de 30 minutos. Se dejó la solución con agitación magnética durante 24 horas aproximadamente, a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se colocó la suspensión resultante en un baño de 0 °C durante 4 hs. Posteriormente se filtró por vacío y se lavó el sólido con porciones de 10 mL de acetato de etilo (3 como mínimo). Se dejó secar en desecador hasta constancia de masa.

Se obtuvo el 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio como un sólido blanco (4.5 g, R: 100%). ¹H-RMN (400 Hz, DMSO-*d*₆) δ_H(ppm): 7.2 (5H, m, ArH), 5.4 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, OH), 3.9 (1H, ddd, *J* = 1.6; 6.0; 10.8 Hz, CH), 3.1 (1H, dd, *J* = 1.6 Hz; 14 Hz, CH₂), 2.6 (1H, dd, *J* = 10.4 Hz; 14.0 Hz, CH₂). IR (KBr): 3250 cm⁻¹ (ν_{O-H}), 1150 cm⁻¹ (ν_{S(=O)₂} asimétrica), 1050 cm⁻¹ (ν_{S(=O)₂} simétrica).

2.1.2. Síntesis de 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio



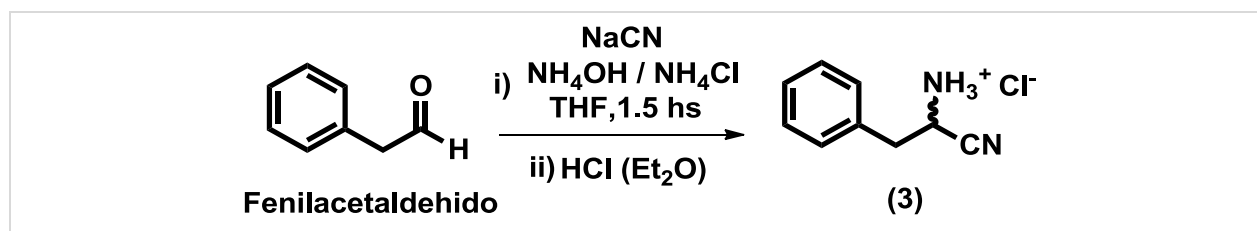
ESQUEMA 35. Síntesis de 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio (2)

La síntesis del 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio (**Esquema 35**) se llevó a cabo siguiendo lo detallado al respecto de dicha síntesis en el SOP#481 del Washington University in St. Louis – Mallinckrodt Institute of Radiology (2013). Se disolvieron 10 mg de (1) (4.42 x 10⁻⁵ mol) en 0.6 mL de H₂O mQ (o bidestilada), seguido del agregado de 20 μL de solución de NH₄OH 25%. Se agitó con vortex la solución, que comenzó a desarrollar una turbidez blanco-amarillenta. Se incubó la solución a 60 °C por 30 minutos y transcurrido ese tiempo se filtró la

¹²⁰ Pandit, C. R., Mani, N. S. (2009) *Synthesis* 23:4032.

solución por 0,22 μm . La solución límpida se utilizó sin purificación posterior para efectuar la reacción de marcación con $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$.

2.1.3. Síntesis de clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanonitrilo:



ESQUEMA 36. Síntesis del clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanonitrilo (3)

La síntesis del 2-amino-3-fenilpropanonitrilo (bajo la forma de clorhidrato) (**Esquema 36**) se adaptó de Paventi, M., y col. (1987)¹²¹. Sobre una solución de NH_4OH 25% (83 μL , 1.1 mmol) en THF (1 mL) se agregó fenilacetaldehido (133 μL , 1.0 mmol) con agitación. Transcurridos 10 minutos, se agregó NH_4Cl (53 mg, 1.0 mmol) y NaCN (49 mg, 1.0 mmol). La mezcla se dejó a temperatura ambiente por 1.5 hs con agitación. Transcurrido ese tiempo se agregó Na_2SO_4 (300 mg) y Et_2O (1 mL) y se dejó agitando por 30 minutos. Posteriormente se filtró por gravedad, se lavó el filtro con 5 mL de Et_2O , y se eliminó los disolventes por evaporación a presión reducida.

El residuo obtenido (un aceite amarillo) se trató con Et_2O saturado en HCl , con lo que se obtuvo un precipitado amarillento (10.3 mg, R: 5.5%). ^1H -RMN (400 Hz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} (ppm): 9.2 (3H, br s, NH_3^+), 7.3 (5H, m, ArH), 4.8 (1H, dd, $J = 5.2$ Hz, 10.0 Hz, CH), 3.3 (dd, $J = 5.6$ Hz, 13.6 Hz, CH_2), 3.1 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, 13.2 Hz). IR (KBr): 2850 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-H}}$), 2000 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$), 1500 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-H}}$, asimétrica, $-\text{NH}_3^+$).

2.1.4. Sistema HPLC analítico para la evaluación de la pureza de los precursores y estándares (asimétrico y quiral).

Con el fin de evaluar la pureza de los precursores y estándares obtenidos, y para contar con un sistema cromatográfico que permita seguir la reacción de marcación de $[^{11}\text{C}]\text{Phe}$, se puso a punto un método por HPLC en fase reversa (Sistema 1). Como fase estacionaria se utilizó una columna Nucleodur C_{18} 100-5 μm 250/4.6 mm (Macherey-Nagel). La fase móvil fue una mezcla isocrática de KH_2PO_4 10 mM pH = 3: MeCN (9:1) a flujo 1.0 mL/min. La detección fue UV (254 nm) y gamma (en serie). En las corridas se inyectó la especie a evaluar en una concentración en el rango 10 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ en H_2O bidestilada. El volumen de inyección estuvo en el rango de 10 – 50 μL .

¹²¹ Paventi, M. Edward, J.T. (1987) *Can. J. Chem.* **65**(2):282

2.2. PUESTA A PUNTO DE LA PRODUCCIÓN DE $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ EN EL MÓDULO PROCAB®

2.2.1. Descripción de la plataforma

Una parte fundamental de este trabajo fue la puesta a punto de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a nivel de la plataforma ProCab® (*PROcess CABinet*, **Figura 8**) de General Electric (GE) Healthcare, que a la fecha de comienzo de las actividades no había sido usada para tal fin.

El módulo ProCab®, a través de su panel de procesamiento para ^{11}C (^{11}C Process Panel, **Figura 8** [b] y **Figura 9**), recibe el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ proveniente del ciclotrón, lo purifica y eventualmente lo transforma en otros precursores radiactivos de ^{11}C como se ejemplifica en el **Esquema 37**. El módulo es capaz de purificar el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ que llega del target del ciclotrón, mediante una trampa de tamices moleculares. Este $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ purificado puede enviarse a los módulos de síntesis, transformarse en $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ por reducción sobre Mo o Zn a 350°C , o servir como material de partida para la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ como se describirá a continuación.

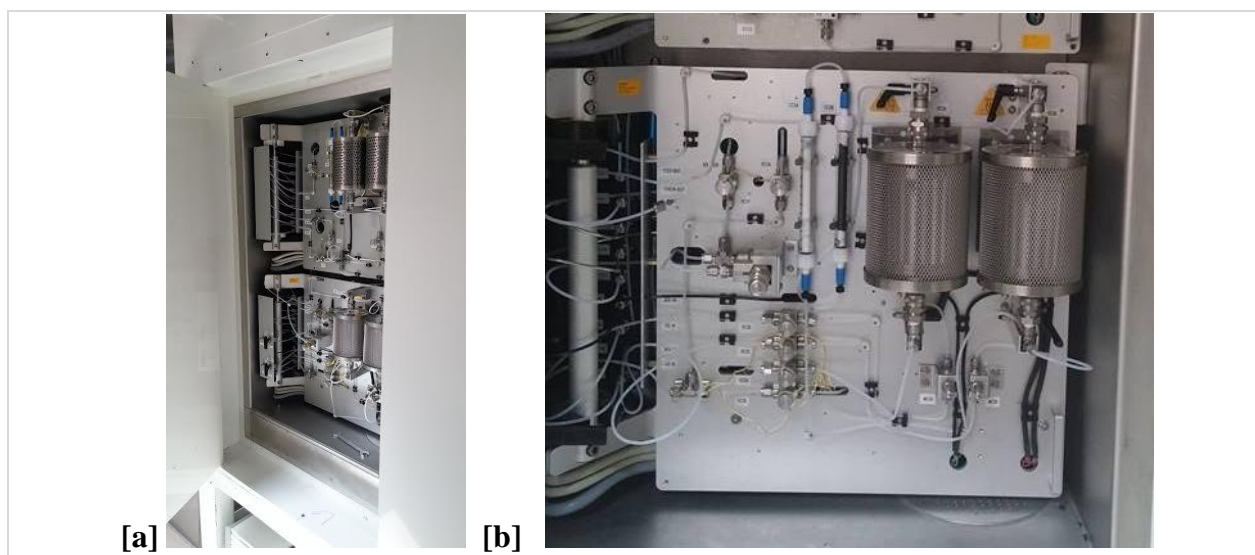
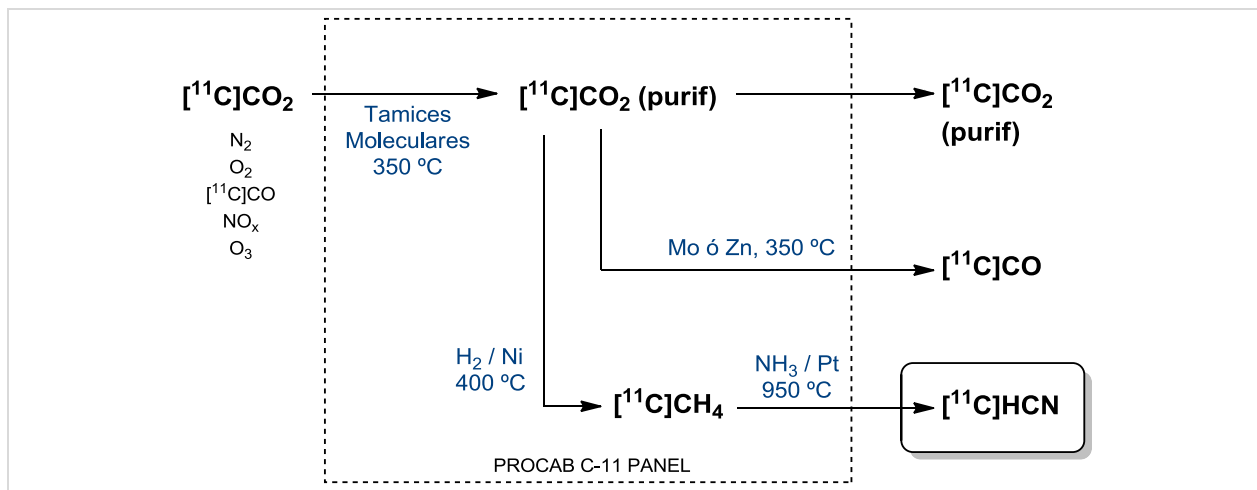


FIGURA 8. Módulo ProCab® (GE) [a] módulo con su puerta blindada abierta mostrando sus paneles de procesamiento de ^{15}O (superior) y ^{11}C (inferior). [b] Vista de la parte anterior del Panel de ^{11}C (^{11}C Process Panel)



ESQUEMA 37. Panel de ^{11}C y los precursores radiactivos que procesa.

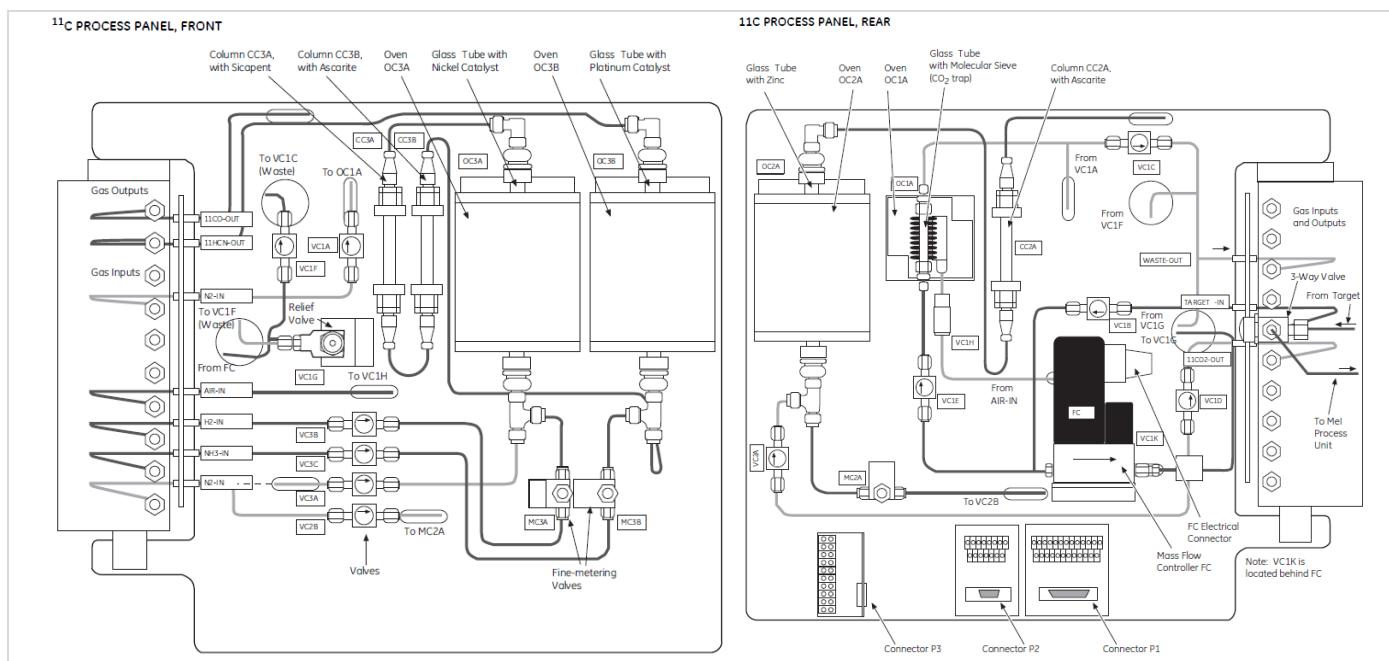
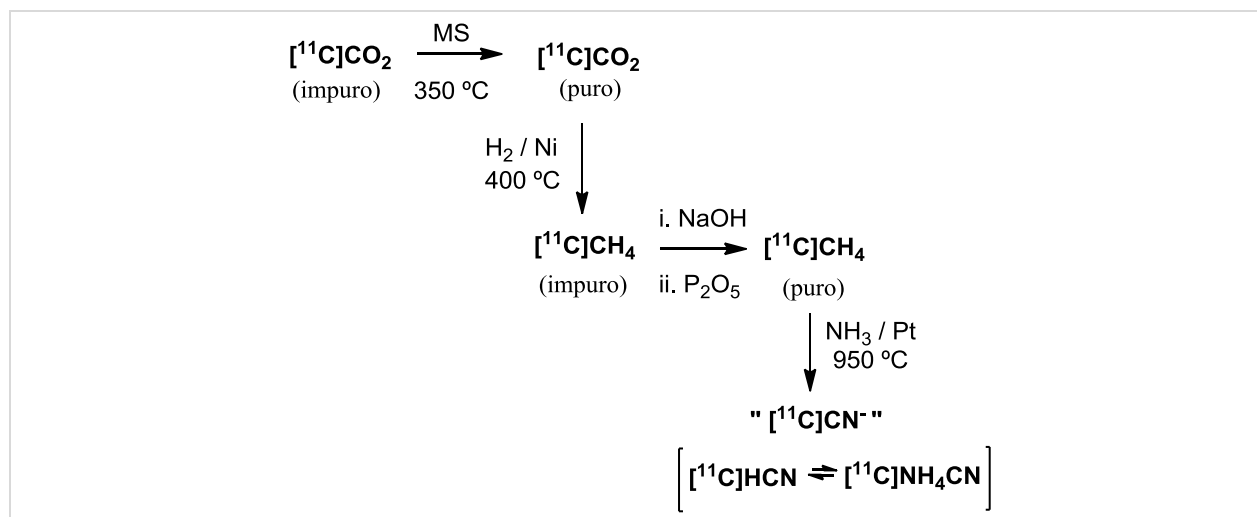


FIGURA 9. Panel de ^{11}C . Izquierda: vista anterior, Derecha: vista posterior

La radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (**Esquema 38**) comienza a con el envío de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ impuro desde el target de ^{11}C del ciclotrón. El $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ es atrapado selectivamente en una columna conteniendo tamices moleculares (Molecular Sieves 4\AA 60/80, GRACE Davison Discovey Sciece) (horno OC1A) a temperatura ambiente y por tanto separado de los otros gases que provienen del target (N_2 , O_2 , trazas de O_3 , $[^{11}\text{C}]\text{CO}$, NO_x) que son enviados a un descarte (WASTE). Por calentamiento a $350\text{ }^\circ\text{C}$ del horno OC1A, el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ es desorbido de los tamices bajo corriente de gas de barrido (N_2 de alta pureza; 99.9995%) a flujo 300 mL/min .



ESQUEMA 38. Producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a nivel del módulo ProCab

El $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ de esta forma purificado es enviado a otro horno (OC3A) relleno con Ni sobre soporte (Nickel Ni-3266 E1/8 100119 P/N Lplats PROKEM). Bajo atmósfera de H_2 de alta pureza (99.999%) a $400\text{ }^\circ\text{C}$ se produce la reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$. Dado que la reducción no es completa y en la misma se genera H_2O , se interponen a la salida de OC3A dos columnas rellenas de Ascarita® (NaOH sobre soporte, Sigma-Aldrich) y SicaPent® (P_2O_5 sobre soporte, Merck), a los efectos de purificar el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ producido (ambas columnas son referidas por el fabricante como CC3A). El $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ se transporta bajo corriente de $\text{N}_2:\text{H}_2$ al horno OC3B, en el cual se encuentra un alambre de Pt (Sigma-Aldrich) enrollado. Este horno se calienta a $950\text{ }^\circ\text{C}$ y a dicha temperatura en presencia de NH_3 anhidro (99,9990%) se da la conversión a $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (el cual formalmente se encuentra en el equilibrio: $[^{11}\text{C}]\text{HCN} + \text{NH}_3 \rightleftharpoons [^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$, favorecido hacia la formación de esta última especie). El $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ así producido puede ser enviado a una hot-cell bajo corriente de $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{NH}_3(30:8:1.5)$ a flujo aproximadamente de 300 mL/min . A la salida de la línea que lo transporta se coloca el medio (sólido o líquido) donde se desea retener el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$. El proceso global desde la entrega de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ desde el target, hasta la finalización de la entrega del $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ dura aproximadamente 9 minutos.

2.2.2. Acondicionamiento de la Plataforma

Por recomendación técnica por parte de GE (Service note DOC0230034) el módulo debe ser acondicionado previo a su uso, para eliminar fundamentalmente la humedad de los hornos OC1A y OC3A. Se aconseja realizar dicho acondicionamiento antes de comenzar la producción. También es necesario hacer un test de fugas gaseosas (leaktest) para verificar hermeticidad del sistema. De acuerdo al documento mencionado, se recomienda el acondicionamiento de los hornos del módulo según se muestra en la **Tabla 6**.

TABLA 6. Acondicionamiento del módulo ProCab® según su fabricante

Horno (relleno)	Temperatura	Flujo de gas	Tiempo	Observaciones
OC1A (tamices moleculares)	200 °C	N ₂ , 200 mL/min	20 min	Conjuntamente con OC3A
OC3A (Ni sobre soporte)	200 °C	N ₂ , 200 mL/min	20 min	Salida de OC3A desconectada del circuito
OC3B (Pt)	200 °C	N ₂ , 200 mL/min	20 min	Salida de OC3B desconectada del circuito
Leaktest: Fijando el flujo de N ₂ en 500 mL/min, la lectura de FC ^a debe bajar a 5-10 mL/min cuando se cierra la salida de [¹¹ C]CN ⁻ .				

a. FC: flow controller. Controlador de flujo que se encuentra a la salida del horno OC1A

Alternativamente, el módulo ProCab® puede acondicionarse desde la interface del ciclotrón, a través de las opciones “Activate Trap” (acondicionamiento del horno OC1A a 350 °C bajo flujo de N₂ por 5 minutos) y “Preheat” (precalentamiento de los hornos OC3A y OC3B hasta sus temperaturas de trabajo, bajo flujo de H₂, por el tiempo que desee el operador). La operación “Preheat” siempre fue realizada previo a las irradiaciones, ya que permite comenzar el trabajo del ciclotrón (encendido del electroimán) con los hornos ya en su temperatura de operación. Como la opción “Preheat” utiliza H₂ que fluye a través del sistema, durante su ejecución es posible monitorear el flujo de H₂ que llega a la celda por la línea del ProCab® y realizar cualquier ajuste del mismo.

2.2.3. Manejo de la Plataforma

El módulo ProCab® se maneja principalmente desde la consola del ciclotrón PETtrace® 800 (GE) que posee el CUDIM (**Figura 10**). No obstante, tareas fundamentalmente de mantenimiento, chequeos y ajustes, deben realizarse desde una computadora de servicio que se conecta directamente al módulo. Por otra parte, la línea de salida del ProCab® llega a la hot-cell donde se encuentra el módulo TRACERlab™ FX C Pro (GE).

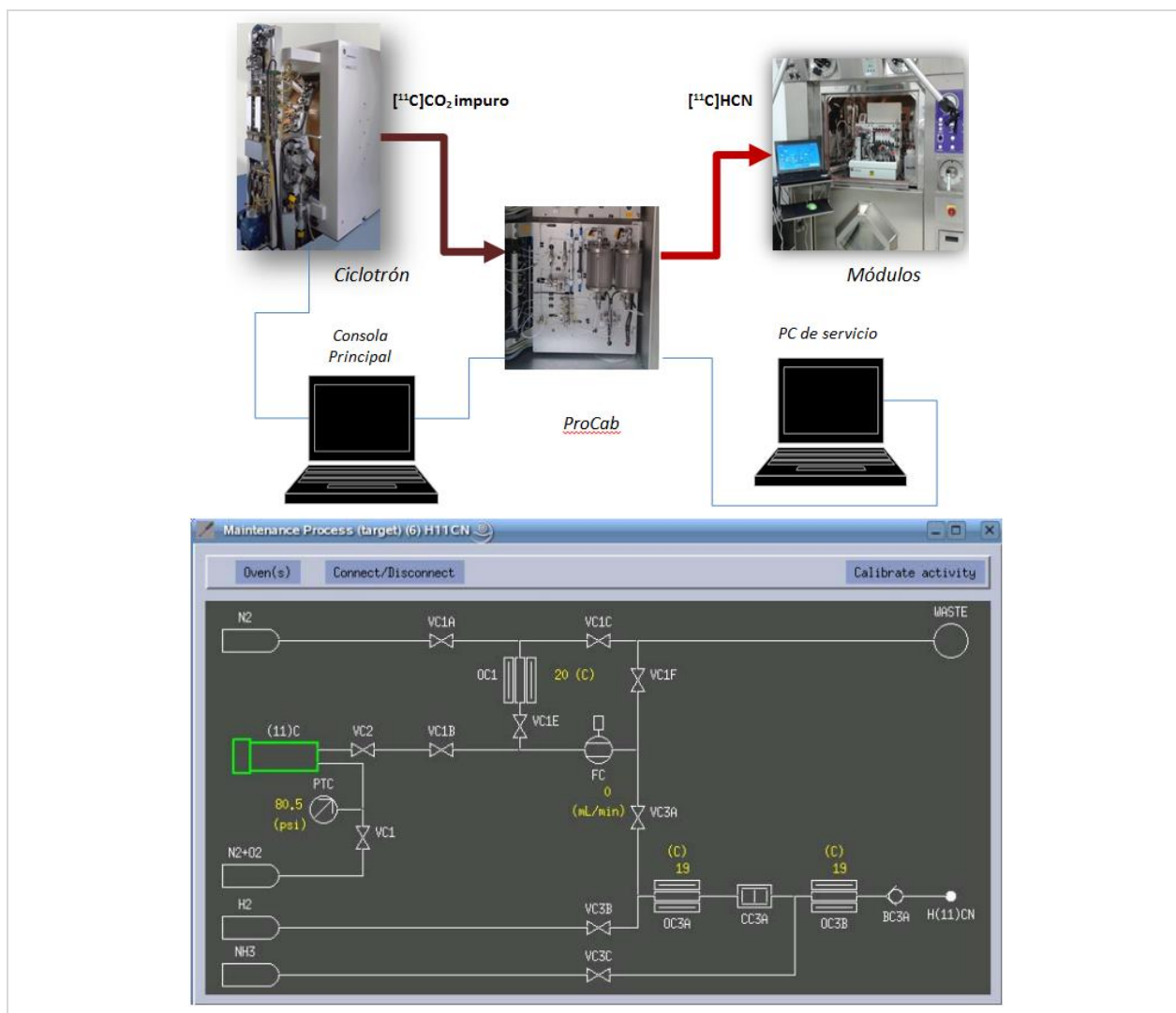


FIGURA 10. [a] diagrama que presenta las conexiones del módulo ProCab y su control [b] Ventana del software del ciclotrón que muestra esquemáticamente el diseño del sistema de purificación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$

2.2.4. Optimización de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$

El procedimiento para optimizar la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ consistió en realizar producciones del mismo¹²² y recogerlo en un medio sólido o líquido adecuado para su retención cuantitativa, haciendo uso de las propiedades ácido-base del $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$. El recipiente conteniendo el medio de recolección del $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ se colocó en un calibrador de dosis, a los efectos de medir la actividad de precursor retenida, y calcular el rendimiento de producción como la relación entre la actividad recogida ($A_{[^{11}\text{C}]\text{CN}^-}$) y la actividad de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ teórica producida en el ciclotrón ($A_{[^{11}\text{C}]\text{CO}_2}$) (corregido por decaimiento).

¹²² GE Healthcare (2013) “PETtrace 800 series SERVICE MANUAL –Radiochemistry system” Rev. 5. Direction 2169048-100, 131.

A los efectos de evaluar la influencia del flujo de gas portador sobre la recolección de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ en medios líquidos, se instaló una válvula de aguja ajustable (Swagelok®) en la línea que conduce el precursor del ProCab® a la celda. Los flujos de gases se controlaron por medio de un flujímetro digital (ADM1000 Universal Gas Flowmeter, Agilent Technologies) durante los acondicionamientos y ajustes, y mediante el Flowmass controler (FC, **Figura 10**, [b]) del módulo ProCab®.

Para descartar posibles problemas en los pasos preliminares de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ en el módulo ProCab®, se diseñó una metodología para:

- evaluar la performance de OC1A (columna de tamices moleculares)
- evaluar la performance de OC3A (horno de Ni) y CC3A (columnas de Ascarita® y Sicapent®)
- evaluar la performance de OC3B (horno de Pt) de acuerdo a la cantidad de catalizador utilizada.

Se evaluaron los posibles puntos críticos del sistema y del proceso.

2.3. MODELO DE REACTIVIDAD

La radiosíntesis automatizada de D,L-1- $[^{11}\text{C}]$ fenilalanina fue llevada a cabo según la metodología descrita por Studenov, A. y col. (2003)¹²³, adaptada al equipamiento disponible en el CUDIM. Para llevar a cabo la marcación se utilizó el módulo automático TRACERlab® FX C Pro, modificado para recibir $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ proveniente del ProCab® (**Figura 11**). El precursor radiactivo ingresa al módulo a través de la válvula V7 y se hace barbotar en el reactor del mismo, donde previamente se cargó la solución acuosa: amoniacal del precursor 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio (2).

A continuación se describe el proceso utilizado para:

- la marcación del 1- $[^{11}\text{C}]$ -2-amino-3-fenilpropanonitrilo (3),
- la obtención de D,L-1- $[^{11}\text{C}]$ Fenilalanina por hidrólisis básica de (3) y
- la obtención de D,L- 1- $[^{11}\text{C}]$ Fenilalanina por hidrólisis ácida de (3).

¹²³ Studenov, A.R., Szalda, D.E., Ding, Y.S. (2003) *Nucl. Med. Biol.* 30:39.

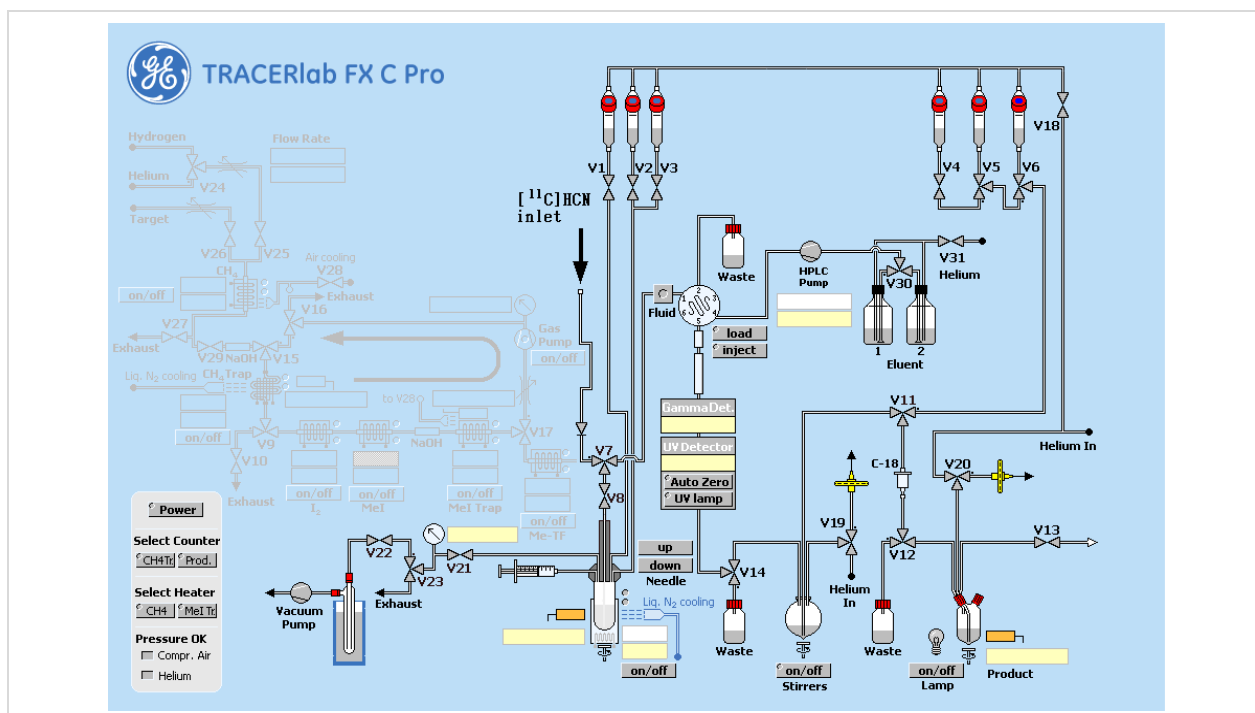
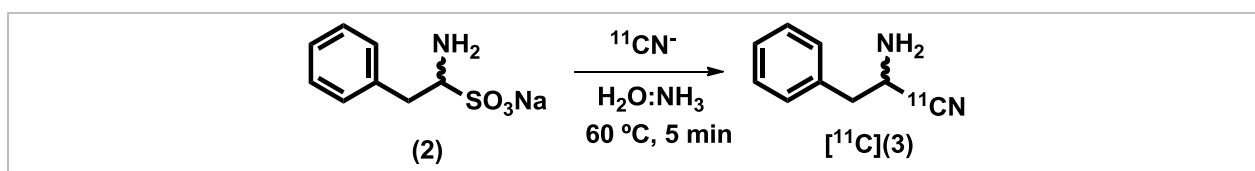


FIGURA 11. Módulo TRACERlab® FX C Pro, modificado para recibir el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ del módulo ProCab®. Se anuló la parte de generación de Precursores ^{11}C -metilantes.

2.3.1. Radiosíntesis de 1- $[^{11}\text{C}]$ -2-amino-3-fenilpropanonitrilo

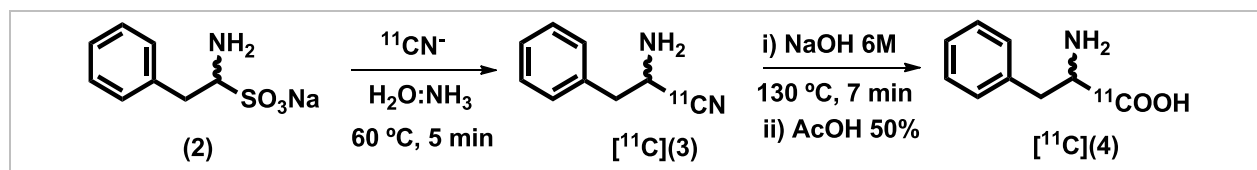


ESQUEMA 39. Marcación de 1- $[^{11}\text{C}]$ -2-amino-3-fenilpropanonitrilo

Sobre la solución de síntesis del precursor (2) filtrada por $0,22\ \mu\text{m}$ y enfriada a $0\ ^\circ\text{C}$, en el reactor del módulo TRACERlab FX C Pro, se introdujo $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ en corriente de $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{NH}_3$ 30:8:1,5 a flujo aprox. $300\ \text{mL}/\text{min}$ (**Esquema 39**). La recolección de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ se detuvo cuando la actividad retenida alcanzó un plateau. La solución se calentó a $60\ ^\circ\text{C}$ por 5 minutos, y transcurrido este tiempo se diluyó con 1 mL con H_2O bidestilada y se envió la mezcla a un vial, para medir la actividad del crudo. El mismo se analizó por HPLC utilizando el Sistema 1 descrito anteriormente. Se determinó la pureza radioquímica (PRQ) del 1- $[^{11}\text{C}]$ -2-amino-3-fenilpropanonitrilo como la relación entre el área del pico correspondiente a esta especie y el área de todos los picos del cromatograma gamma. Se calculó el rendimiento radioquímico (RRQ) de la marcación como la relación entre la actividad final de 1- $[^{11}\text{C}]$ -2-amino-3-fenilpropanonitrilo (actividad crudo de reacción x PRQ) y la máxima actividad de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ atrapada en la solución de marcación (**Ecuación 3**)

$$RRQ (\%) = \frac{A_{\text{crudo}} \cdot PRQ (\%)}{A_{[^{11}\text{C}]CN-\text{atrapado}}} \quad (3)$$

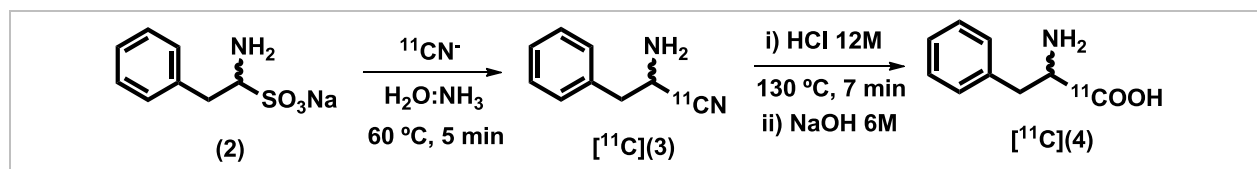
2.3.2. Radiosíntesis de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis básica



ESQUEMA 40. Marcación de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis básica.

La síntesis de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis básica de [¹¹C](3) (**Esquema 40**) se llevó a cabo en forma idéntica al proceso descrito anteriormente, en lo concerniente al atrapamiento de [¹¹C]CN⁻ y al calentamiento inicial. Transcurridos los 5 minutos de dicho calentamiento a 60 °C, se agregó sobre la mezcla 600 µL de NaOH 6.0 M (3.6 mmol) y la misma se calentó a 130 °C por 7 minutos. Posteriormente se enfrió la mezcla a 80 °C y se agregaron 200 µL de AcOH 50% (1.75 mmol). Por último, la mezcla se envió desde el reactor a un vial conteniendo 800 µL adicionales de AcOH 50% (7.0 mmol) y se midió la actividad del crudo. El mismo se analizó por HPLC utilizando el Sistema 1 descrito anteriormente.

2.3.3. Radiosíntesis de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis ácida.



ESQUEMA 41. Marcación de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis ácida.

La principal variante en la síntesis de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis ácida (**Esquema 41**) respecto a su análogo por hidrólisis básica consistió en el agregado de 400 µL de HCl 12 N (4.8 mmol) sobre la mezcla a 60 °C, y posterior calentamiento a 130 °C por 7 minutos. La mezcla luego se neutralizó con 800 µL de NaOH 6 M (4.8 mmol), se midió la actividad total, y se analizó por HPLC utilizando el Sistema 1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SÍNTESIS DE PRECURSORES Y ESTÁNDARES

En relación al 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio (1), (pre-precursor orgánico) la síntesis de este compuesto se realizó sin inconvenientes con rendimientos cuantitativos (100%). El análisis por HPLC utilizando el Sistema 1 (**Figura 12**) permitió corroborar la pureza (> 90%) adecuada de este compuesto con miras a la síntesis de (2) (precursor orgánico).

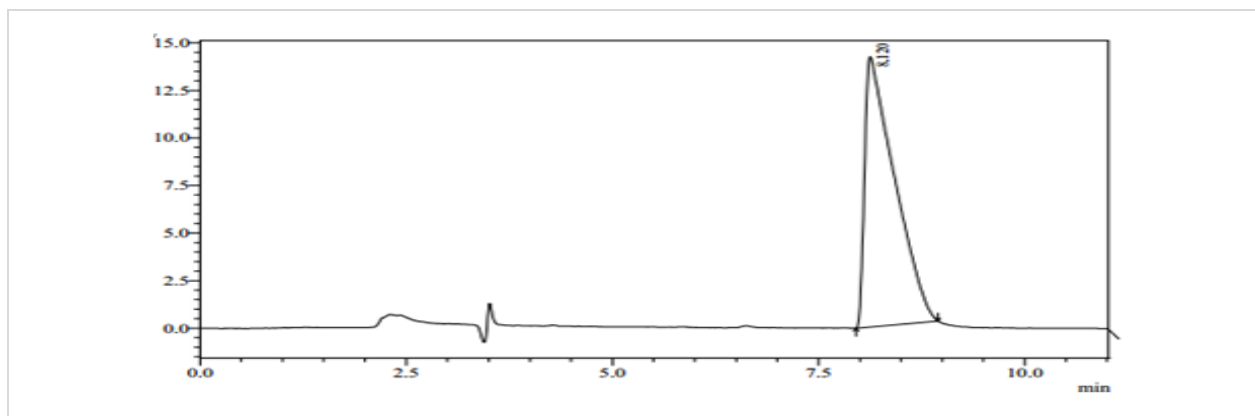


FIGURA 12. Cromatograma UV (254 nm) correspondiente al 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio ($t_R = 8.12$ min)

La estructura química de este compuesto fue verificada por experimentos espectroscópicos de RMN mono y bidimensional, así como IR. Los respectivos espectros fueron adjuntados en el ANEXO 1 de este capítulo. Se destaca en el ^1H -RMN y en el COSY la presencia de protones diasterotópicos que son aquellos protones metilénicos adyacentes al carbono asimétrico de la molécula. Estos protones metilénicos dan señales a desplazamientos químicos distintos (2.68 y 3.14 ppm) y las constantes de acoplamiento son consistentes el patrón de acople esperado (el cual se aprecia también en el COSY). En el HSQC se observa una correlación entre el protón asignado al carbono metínico (4.0 ppm) y un carbono a 85 ppm, señal que corresponde a un C metínico unido a grupo hidroxilo y sulfonato. En el espectro de IR obtenido para el derivado (1) se observan bandas de estiramiento del enlace O-H ($\nu_{\text{O-H}}$) a 3000 cm^{-1} , mientras que se observa la ausencia de bandas atribuibles a estiramiento de enlace C=O, correspondientes a eventual fenilacetaldehído sin reaccionar.

El 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio (2) se obtuvo con una pureza mayor al 90%, tal como evidenció el análisis por HPLC (**Figura 13**). Cuando se llevó a cabo su síntesis, se observó por HPLC un pico nuevo mayoritario a $t_R = 5,74$ min, con mínima presencia (< 10%) de 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio (**Figura 12**). Este hecho se tomó como especificación para utilizar la solución de 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio para las marcaciones: el pico de (2) debe corresponder como mínimo al 90% de las áreas totales cuando la longitud de onda del detector se fija en 254 nm. Se realizó también un estudio (datos no presentados) de estabilidad en el tiempo de este compuesto, resultando estable hasta 1.5 hs.

Luego de ese tiempo la proporción (2):(1) comienza a disminuir. Dada la inestabilidad intrínseca de esta especie (Studenov, A.R. y col., 2003), no fue aislada con el fin de llevar a cabo estudios espectroscópicos.

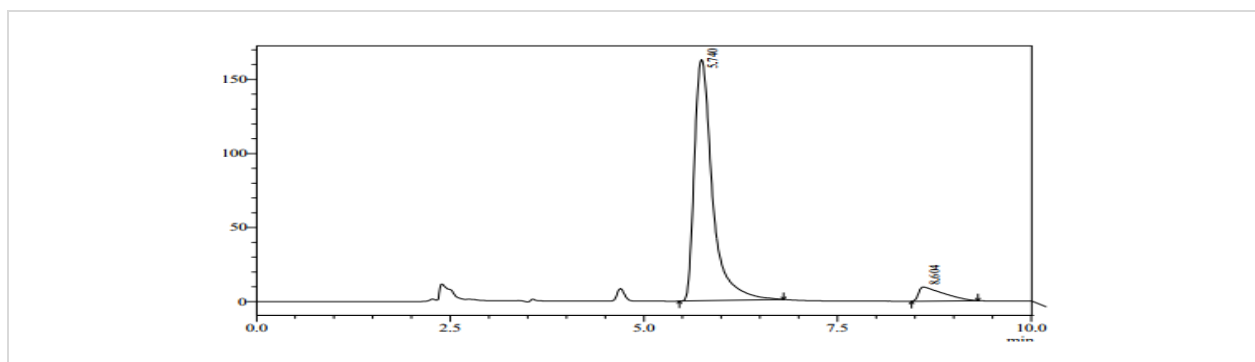


FIGURA 13. Cromatograma UV (254 nm) correspondiente al 1-amino-2-feniletanosulfonato de sodio ($t_R=5.74$ min, 92.6%). Se aprecia 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio sin reaccionar, ($t_R=8.60$ min, 7.3%)

El clorhidrato de 2-amino-3-fenilpropanonitrilo (3) fue obtenido con bajo rendimiento (6%) en relación a lo reportado en la literatura (Paventi y col.). Este valor se atribuyó a una insuficiente concentración de HCl (g) en la solución generada para la formación del clorhidrato correspondiente o una elevada cantidad de agua en el disolvente orgánico de elección. No obstante, la masa obtenida con este rendimiento cumple con el propósito de utilizar esta sustancia como estándar de referencia para monitorear la marcación de (2) con $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ y verificar la formación de 1- $[^{11}\text{C}]$ -2-amino-3-fenilpropanonitrilo ($[^{11}\text{C}]3$). Por HPLC se evidenció un pico con $t_R = 11.2$ min, cuya pureza resultó satisfactoria (>95%) (FIGURA 14).

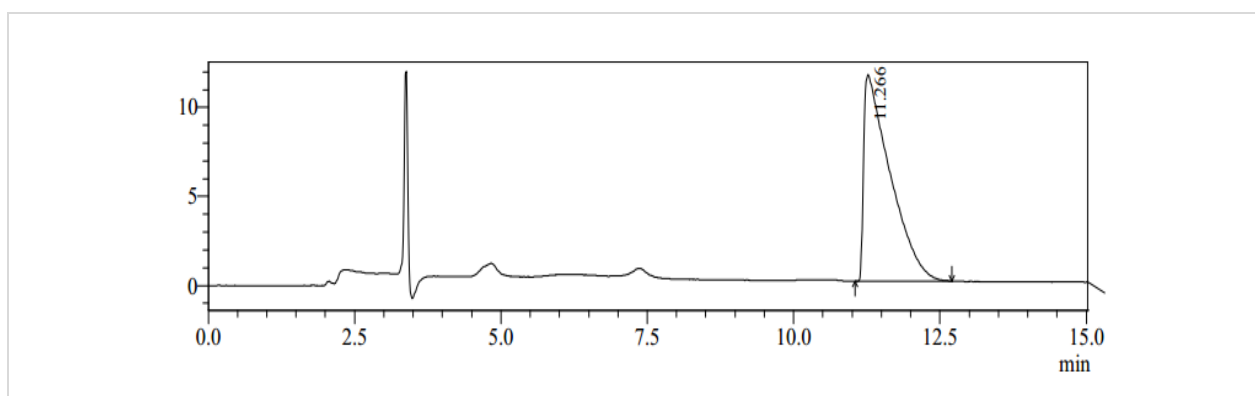


FIGURA 14. Cromatograma UV (254 nm) correspondiente al 2-amino-3-fenilpropanonitrilo (3) ($t_R=11.2$ min)

El análisis espectroscópico permitió corroborar la estructura del compuesto. Se destaca en el ^1H -RMN la presencia de protones metilénicos diastereotópicos (doble dobletes en 3.1 y 3.3 ppm) con patrones de acoplamiento evidenciados en el experimento COSY, consistentes a la estructura. En el experimento HSQC se apreció una correlación entre el protón metínico asignado (4.8 ppm) y un carbono que por su desplazamiento (44 ppm) estaría unido a grupo NH_2 . Este resultado permitió descartar la formación del posible producto no deseado 2-hidroxi-

3-fenilpropanonitrilo (cianhidrina), ya que en dicho caso el desplazamiento químico esperado para dicho carbono, tanto por Tablas espectroscópicas como utilizando programas predictivos como ChemDraw¹²⁴, sería mayor (~60 ppm). El HMBC permitió observar una correlación a dos enlaces entre el protón metínico (4.8 ppm) y el carbono del grupo nitrilo (118 ppm), así como una correlación a tres enlaces entre los protones metilénicos diastereotópicos (3.1 y 3.3 ppm) y carbono de grupo nitrilo. El espectro IR mostró una banda ancha intensa a 2850 cm⁻¹ asignable al estiramiento N-H, y un pico de intensidad media a 2000 cm⁻¹, correspondiente al estiramiento del enlace C≡N.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE [¹¹C]CN-

3.2.1. Evaluación de los tamices moleculares del horno OC1A

A los efectos de evaluar la performance de los tamices moleculares contenidos en el horno OC1A, se realizó un by-pass de los hornos OC3A y OC3B. Se acondicionaron los mismos de acuerdo al esquema propuesto en la **Tabla 6**. El [¹¹C]CO₂ purificado emergente de los tamices moleculares se envió directamente a la hot-cell y se recogió sobre Ascarita® (columna de 10 cm) colocada en el calibrador de dosis de la celda. Se calculó la eficiencia de purificación de [¹¹C]CO₂ como el cociente entre la actividad recogida en la columna de Ascarita® y la actividad de [¹¹C]CO₂ teórica producida a nivel del ciclotrón, corregida por decaimiento.

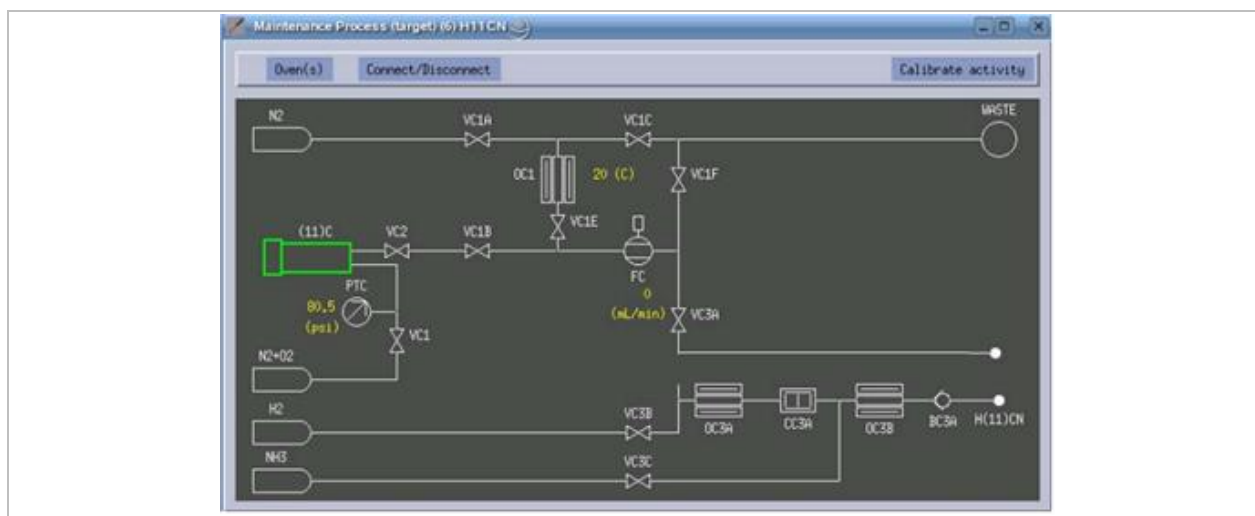
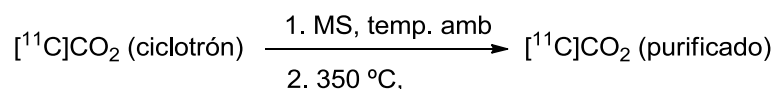


FIGURA 15. By-pass de los hornos OC3A y OC3B para la evaluación de la performance de OC1A.



- *A teórica* [¹¹C]CO₂: 1008 mCi (t₀ = 17:52)
- *A recolectada* [¹¹C]CO₂ en Ascarita®: 766 mCi (t_f = 17:59)

¹²⁴ ChemDraw Ultra, Ver. 12.0.2.1076. CambridgeSoft 1986 – 2010.

$$\Rightarrow \text{Eficiencia de purificación de } [^{11}\text{C}]\text{CO}_2 \text{ (dc): } \frac{766 \text{ mCi}}{1008 \text{ mCi}} \cdot e^{\ln 2 \cdot \frac{7 \text{ min}}{20.3 \text{ min}}} \cdot 100 = 97\%$$

Del resultado obtenido se desprende que la capacidad de los tamices moleculares de módulo ProCab® una vez que han sido acondicionados, a los efectos prácticos, es cuantitativa.

3.2.2. Evaluación del horno de Níquel (OC3A)

La evaluación de la performance del horno de Níquel (OC3A) donde se lleva a cabo la reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ purificado a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ se realizó por medio de un by-pass del horno de Pt (OC3B) a nivel del ProCab®. El horno (OC3A) se acondicionó según lo expuesto en la **Tabla 6**. El $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ purificado se recogió en una trampa criogénica compuesta por una columna rellena de Graph-Pak® (1 cm³), la cual fue completamente sumergida en un baño de N₂ (líquido) durante el envío del $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$. Finalizado el mismo, se retiró la columna de Graph-Pak® del baño de N₂ (l) y se la colocó en el calibrador de dosis de la celda a los efectos de medir la actividad retenida.

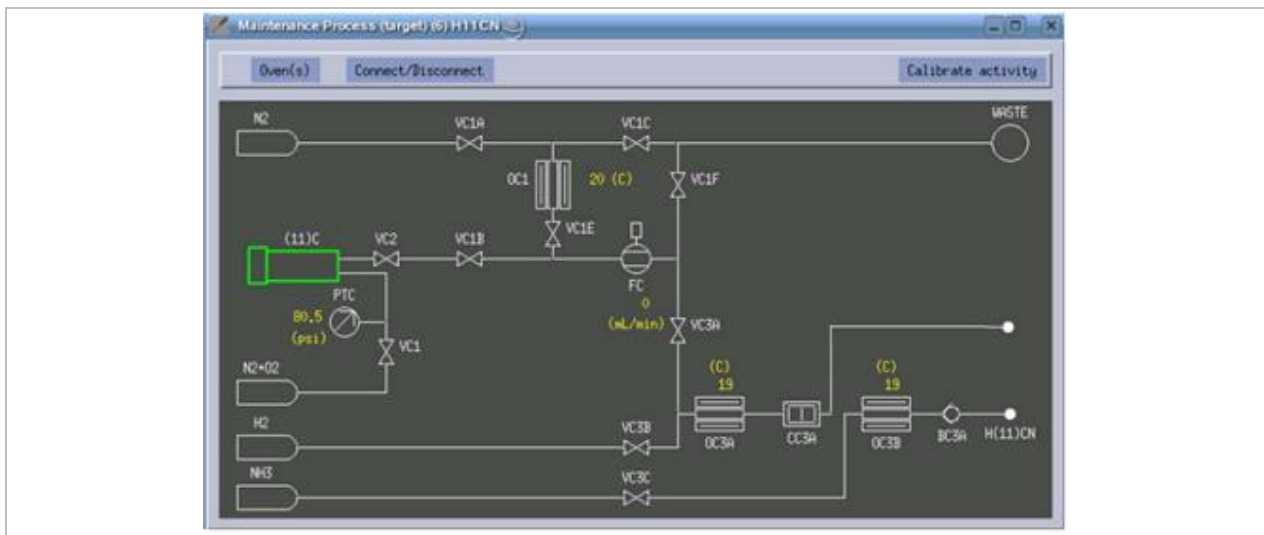
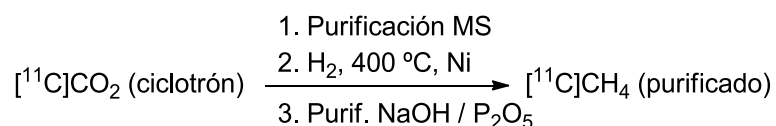


FIGURA 16. By-pass del horno OC3B para la evaluación de la performance de OC3A.

Se calculó la eficiencia de producción de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ como el cociente entre la actividad recogida en la columna de Graph-Pak® y la actividad de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ teórica producida a nivel del ciclotrón, corregida por decaimiento.



- *A teórica* $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$: 1008 mCi ($t_0 = 17:34$)
- *A recolectada* $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ en Graph-Pak®: 617 mCi ($t_f = 17:44$)

$$\Rightarrow \text{Eficiencia de conversión a } [^{11}\text{C}]\text{CH}_4 \text{ (dc): } \frac{617 \text{ mCi}}{1008 \text{ mCi}} \cdot e^{\ln 2 \cdot \frac{10 \text{ min}}{20.3 \text{ min}}} \cdot 100 = 87\%$$

En condiciones operativas, el horno de Ni (OC3A) para la reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$, y las columnas de Ascarita® y Sicapent® (conjuntamente denominadas CC3A) permiten recuperar un 87% del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ producido a nivel del ciclotrón bajo forma de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$.

3.2.3. Evaluación de la performance general del sistema, para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$

La recolección de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ se efectuó principalmente en dos sistemas diferentes (**Tabla 7**): soporte sólido (Ascarita®) o solución acuosa (NaOH 0.01M, H₂O: NH₃ 25% (30:1 v/v), o solución de precursor (2)).

TABLA 7. Medios de recolección del precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ utilizados para evaluar la producción del mismo a nivel del módulo ProCab®.

Medio	Sistema	Propósito
Sólido	Ascarita® (NaOH sobre soporte)	Evaluación de actividad
	NaOH (ac) 0,01 M (0.5 mL)	Evaluación de actividad, Captación en medio líquido
Líquido	H ₂ O:NH ₃ 25% 30:1 (0.62 ó 1.24 mL)	Evaluación de actividad, Captación en medio líquido Blanco
	H ₂ O:NH ₃ 25% 30:1 (0.62 mL + Precursor orgánico)	Evaluación de actividad, Captación en medio líquido Marcación

La recolección en Ascarita® fue llevada a cabo fundamentalmente para evaluar la performance del módulo y realizar ajustes en el mismo. Las soluciones acuosas fueron colocadas en recipientes de fondo cónico adecuados para el barboteo de un gas, o en el reactor del módulo automatizado TRACERlab® FX C Pro (GE), realizando la conexión del mismo a la línea por donde ingresa el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a la hot-cell. La recolección en medios líquidos se realizó con la perspectiva de la factibilidad de utilizar el ProCab® para las marcaciones deseadas.

3.2.3.1. Generalidades respecto a la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$.

La optimización de la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ fue un proceso dificultoso, debido fundamentalmente a la dificultad inherente a una plataforma compleja, con múltiples variables físicas para controlar. A diferencia de los módulos automáticos productores de los agentes ^{11}C -metilantes $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ (en particular el TRACERlab® FX C Pro, presente en nuestro centro) el ProCab® resultó notoriamente menos robusto y mucho más demandante de ajustes previos a cada producción. El alto número de producciones fallidas (RRQ corregidos menores a 2%) ejemplifica dicha afirmación (Ver ANEXO 2: Producciones de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$).

Una vez que se determinaron los puntos y pasos críticos del sistema (discutidos en las secciones siguientes) y se tomaron medidas para controlar las variables afectadas por dichos puntos, se logró producir el precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ con rendimiento radioquímico adecuado para ser utilizado en reacciones de ^{11}C -cianación. En condiciones operativas controladas, con acondicionamiento previo e independiente del medio utilizado para la recolección, el RRQ de producción y captura de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (bajo la forma química $[^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$) se obtuvo una actividad promedio de 261 ± 47 (mCi, promedio \pm SD, $n = 12$) a partir de 1.2 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Eso representa un rendimiento radioquímico promedial de 28.9 ± 4.1 % (dc) (**Tabla 8**). Este valor resulta similar al reportado en la literatura por otros grupos de investigación, en donde utilizando un módulo ProCab® se logra obtener 1 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ a partir de ~ 3 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.¹²⁵

TABLA 8. Datos de 12 producciones consecutivas de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a partir de 1.2 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.^[a]

Soporte de recolección	Actividad de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$	Δt (min) ^[b]	RRQ (%, dc)	Observaciones
Ascarita 25 cm	284	00:07	29.7	Valvula MC3B (NH_3) ajustada a 15-20 mL/min
Ascarita 25 cm	283	00:08	30.6	duplicado del anterior
0.5 mL NaOH 0,01 M	230	00:10	26.7	En vial de fondo cónico
0.5 mL NaOH 0,01 M	280	00:07	29.3	En reactor (lectura aprox de actividad)
Solución de precursor (2)	250	00:07	26.1	En reactor (lectura aprox de actividad)
Reactor $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_3$ 600:20	300	00:08	32.5	En reactor (lectura aprox de actividad)
Solución de precursor (2)	320	00:07	33.5	En reactor (lectura aprox de actividad)
Solución de precursor (2)	310	00:07	32.4	En reactor (lectura aprox de actividad)
0.5 mL NaOH 0,01 M	233	00:11	28.0	En reactor (lectura aprox de actividad)
0.5 mL NaOH 0,01 M	260	00:11	31.2	2 alambres de Pt
0.5 mL NaOH 0,01 M	145	00:12	18.0	2 alambres de Pt
0.5 mL NaOH 0,01 M	236	00:11	28.3	2 alambres de Pt

[a] Flujo de gas portador: 300 mL/min, [b] Δt entre EOB y la lectura de actividad de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$

¹²⁵ Shao, X., Rodnick, M.E., Brooks, A.F., Scott, P.J.H. "Synthesis and application of $[^{11}\text{C}]\text{Hydrogen Cyanide}$ ". in *Radiochemical Syntheses, Volume 2: Further Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography and New Strategies for their Production*. Editor Peter J.H. Scott. 1st. Ed. John Wiley & Sons. 2015

3.2.3.2. Efecto del flujo de gases en la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$.

- *Flujo de gas portador.*

Iwata, R. y col. (1987) encontraron que flujos superiores a 200 mL/min son los más adecuados para obtener altos rendimientos de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$. Sin embargo, otros trabajos descritos en literatura emplean flujos menores, tal como Dence, C. y col. (1990)¹²⁶ que utiliza una mezcla de 5% H_2 / N_2 a 35-40 mL/min a la cual se suma luego NH_3 a 2 mL/min. A los efectos de estudiar este parámetro en nuestro sistema, una válvula de aguja fue instalada en la línea de salida del ProCab® a nivel de la hot-cell. Dicha válvula fue regulada de tal manera de disminuir 10 veces un flujo de N_2 de 300 mL/min. De esa forma, la válvula completamente cerrada permitió disminuir aproximadamente a 30 mL/min el flujo de gas total proveniente del ProCab®. Los resultados de la **Tabla 9** muestran la dependencia del RRQ en la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (bajo la forma química $[^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$, retención en Ascarita®) respecto al flujo de gas portador. Se observó una clara disminución del RRQ a flujos bajos, respecto al flujo de fábrica (no modificado) del módulo, aproximadamente 5 veces. Esto puede estar de acuerdo con los hallazgos de Iwata, R. y col. (1987), quienes afirman que tiempos de contacto más cortos entre el $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ y el Pt en presencia de NH_3 dan lugar a mejores conversiones de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ pues evitan la oxidación a $[^{11}\text{C}]\text{CO}$. Como es de esperar, también se apreció un mayor tiempo de envío del $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ con la válvula cerrada, lo que va en detrimento tratándose de una especie marcada con ^{11}C .

¹²⁶ Dence, C. y col. (1990), *op. cit.*

TABLA 9. Influencia del flujo de gas portador sobre el RRQ de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$.

Estado de la Válvula de aguja	Lectura de flujo a nivel del FC (mL/min)	Actividad máxima retenida (mCi)	Δt entre EOB y la lectura de Actividad (min)	RRQ[a] (% ndc)	RRQ (% dc)	RRQ promedio (% dc) (\pm SD)
Abierta	290	179	11	15.0	21.8	19.7 \pm 1.8
Abierta	290	156	11	13.0	18.9	
Abierta	285	177	7	14.5	18.4	
Cerrada	30	33	13	2.7	4.2	4.9 \pm 1.0
Cerrada	25	28	19	2.3	4.4	
Cerrada	25	42	17	3.4	6.1	

[a] Producciones de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a partir de $\sim 1\text{Ci}$ de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (EOB), recolección en Ascarita®

Ensayos posteriores evidenciaron que la válvula cerrada, al representar una “obstrucción” en la línea, afecta fundamentalmente la desorción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ de los tamices moleculares del horno OC1A. Se encontró que al disminuir el flujo de N_2 de 300 mL/min a 30 mL/min, la desorción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ de los tamices moleculares disminuye de 87% a aproximadamente 54% (**Tabla 10**). La disminución no es tan pronunciada como para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a flujo bajo, lo que indica que posiblemente el efecto del contacto prolongado del $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ con el Pt a alta temperatura, descrito por Iwata, R. y col., también puede estar presente en nuestro sistema y así explicar la disminución observada en la **Tabla 9**.

TABLA 10. Influencia del flujo de gas portador sobre la desorción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ de los tamices moleculares.

Estado de la Válvula de aguja	Lectura de flujo a nivel del FC (mL/min)	Actividad máxima retenida (mCi)	Δt entre EOB y la lectura de Actividad (min)	Porcentaje de la actividad recuperada ^[a] (% ndc)	Porcentaje de la actividad recuperada (% ndc) (\pm SD)
Abierta	280	184	5	92	87.5 \pm 0.1
Abierta	290	166	7	83	
Cerrada	35	114	14	57	54.5 \pm 0.1
Cerrada	30	103	12	52	

[a] Purificación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a partir de 200 mCi de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (EOB), recolección en Ascarita®

- *Flujo de H_2 .*

De acuerdo a las especificaciones del fabricante, el flujo de H_2 debe estar comprendido entre 30 – 100 mL/min, a una presión de 2.5 bar. En numerosas ocasiones, se observó que durante el “Preheat”, el barboteo de H_2 en el medio líquido de recolección fue intermitente, o incluso descontrolado (con lo cual se perdía solución de captura por salpicaduras fuera del vial de fondo cónico a través de la aguja de venteo). Ello se atribuyó a un defectuoso ajuste de la válvula de aguja MC3A (que regula el flujo de dicho gas en el ProCab®). Por ello, se estableció que previo a cada producción, es aconsejable verificar el ajuste de dicha válvula con un flujímetro digital, de tal forma que el flujo de H_2 esté en 80 mL/min.

- *Flujo de NH₃.*

Un flujo adecuado de NH₃ es crucial para que la producción de [¹¹C]CN⁻, como fue demostrado por Iwata, R. y col. (1986)¹²⁷. Luego de varias producciones fallidas, se determinó la causa de ello era que el flujo de amoníaco era nulo a través de la válvula de aguja que lo controla (MC3B) o a través de la válvula solenoide 3C que controla la entrada de NH₃ al sistema. La naturaleza corrosiva del NH₃ hace que estas válvulas se corroan fácilmente, y deba ser necesario su remplazo. Por ello, se estableció de que previo a cada producción (y con énfasis si el módulo no ha sido utilizado luego de mucho tiempo), se debe comprobar el correcto estado de ambas válvulas verificando la salida de NH₃ por las mismas. Esto se consigue, primero ajustando la válvula MC3B con aire, de tal manera que el flujo a través de ella (determinado por un flujímetro digital) se encuentre en el rango 7.5 y 10 mL/min (ya que para dicha válvula se ha demostrado que $\varphi_{\text{aire}} = (\varphi_{\text{amóniaco}})/2$). Con ello se logra un flujo de NH₃ de entre 15 a 20 mL/min. El flujo real de NH₃ se determinó con una jeringa invertida conectada a la salida de MC3B, midiendo el tiempo necesario para que la misma se llene en un volumen V (mL), y calculando el flujo de manera aproximada como $\varphi_{\text{amóniaco}} = V \text{ (mL)}/t \text{ (min)}$

El indicativo más frecuente de una obstrucción de las válvulas que controlan la entrada y el flujo de NH₃ fue el de una pérdida de actividad del medio de recolección, más rápida que lo atribuible al decaimiento. Este hecho se explicó considerando que en ausencia de NH₃ falla el paso de conversión de [¹¹C]CH₄ a [¹¹C]CN⁻, y lo que llega efectivamente a la hot-cell es [¹¹C]CH₄ sin reaccionar (que por carecer de afinidad fisicoquímica por los soportes utilizados se escapa del medio, **Figura 17**, [a]), en lugar de permanecer atrapado (**Figura 17**, [c]). Esto fue corroborado enviando [¹¹C]CH₄ desde el ProCab® a la hot-cell (by-pass de OC3A), y observando un comportamiento idéntico al de la pérdida. (**Figura 17**, [b])

¹²⁷ Iwata, R. y col. (1987) *Op.cit.*

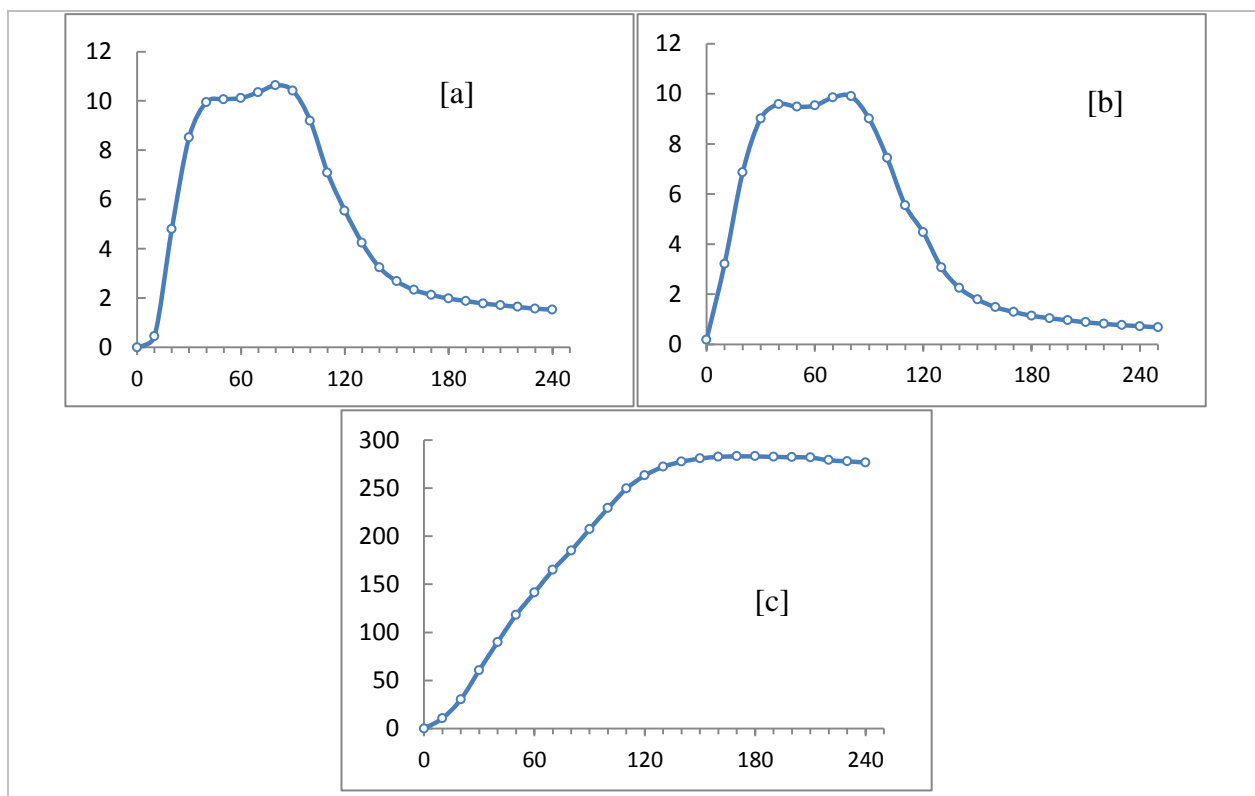


FIGURA 17. Gráficas de Actividad recogida en Ascarita® (mCi) vs tiempo (seg) para las siguientes condiciones: [a] Producción fallida de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a partir de 1.2 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (EOB), [b] Envío de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ a través de un by-pass del horno de Pt (OC3B), a partir de 1.2 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (EOB), [c] Producción exitosa de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (bajo la forma química de $[^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$) a partir de 1.2 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (EOB).

3.2.3.3. Influencia de la cantidad de Pt en OC3B.

En función de estudiar la influencia de la masa del catalizador de Pt y el RRQ para el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, se ensayaron síntesis en donde la cantidad de Pt fue duplicada. A diferencia de los hallazgos de Iwata, R, y col., en donde trabajar con menos de 2.0 g de Pt produce una disminución drástica del rendimiento de producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ (70%, calculado partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$) respecto a trabajar con masas iguales o mayores a 3.0 g (90%), no se observaron diferencias significativas para los casos analizados usando 1 alambre (1.37 g) o 2 alambres (2.73 g) de Pt en OC3B (**Figura 18**).

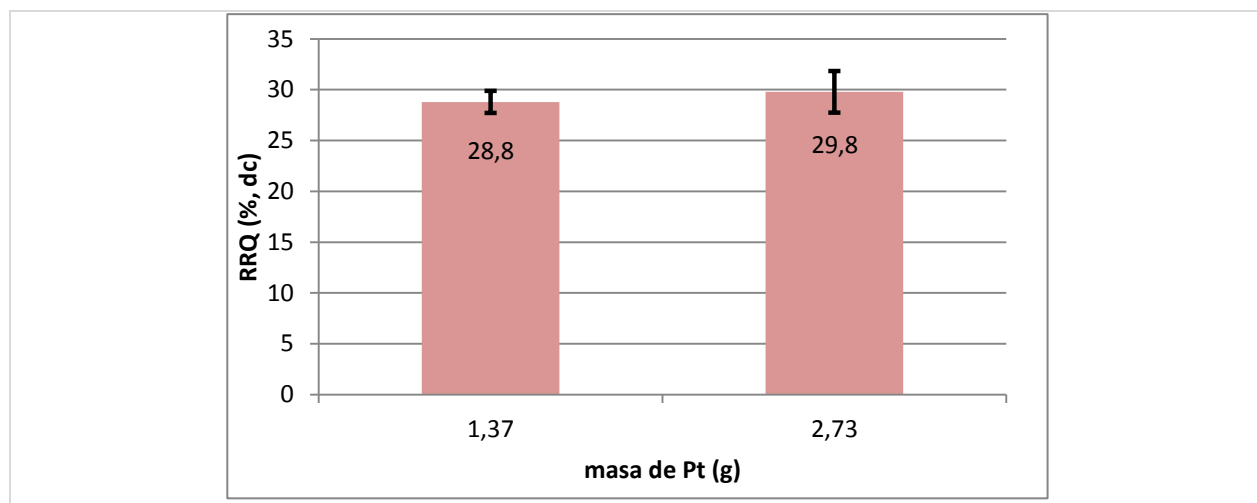


FIGURA 18. Rendimientos radioquímicos (% dc) para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (bajo la forma química $[^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$) en relación a la masa de Pt de OC3B (n=3). Recolección en NaOH 0.01 M (0.5 mL).

3.2.3.4. Obtención de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ bajo la forma $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$

En numerosas marcaciones que emplean $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, tales como las ^{11}C -cianaciones mediadas por Pd^0 o $\text{Pd}^0 / \text{Cu}^I$, el exceso de NH_3 interfiere químicamente y por lo tanto debe disminuirse su concentración en la mezcla gaseosa que transporta el precursor radiactivo. En algunos trabajos¹²⁸ esto es logrado pasando la mezcla gaseosa que transporta el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ por una columna de P_2O_5 . Un procedimiento alternativo consiste en barbotar la mezcla gaseosa en una solución de H_2SO_4 50% (2 mL) a 65 °C, pasando luego el gas emergente por una columna de P_2O_5 .¹²⁹ Usualmente se dice que el $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ está bajo la forma química “[^{11}C]HCN” luego de aplicar este procedimiento.

Ante la posibilidad de requerir el uso de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ se dispuso un sistema para su producción. El mismo se produjo utilizando un tubo de 10 mL conectado a la línea de salida del ProCab® dentro del cual se colocó solución de H_2SO_4 50%. El tubo se sumergió en un baño calefactor mantenido a 50-70 °C (**Figura 19**).

Se ajustó el volumen de solución de H_2SO_4 50% de tal manera que enviando la mezcla portadora desde el ProCab® ($\text{N}_2:\text{H}_2:\text{NH}_3$ 30:8:1.5) y haciéndola burbujear en la solución ácida, no se detectara viraje de una tirilla indicadora de pH (rango 0 – 14) humedecida con agua. Se determinó que el mínimo volumen necesario para neutralizar el NH_3 de la mezcla por aproximadamente 10 min fue 4 mL.

¹²⁸ Andersson Y, Långström B. (1994). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*;11:1395.

¹²⁹ [a] Airaksinen, A. J., Andersson, J., Truong, P., Karlsson, O., & Halldin, C. (2008). *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 51(1), 1-5., [b] Andersson, J. D., Seneca, N., Truong, P., Wensbo, D., Raboisson, P., Farde, L., & Halldin, C. (2013). *Nucl Med Biol.* 40(4), 547., [c]

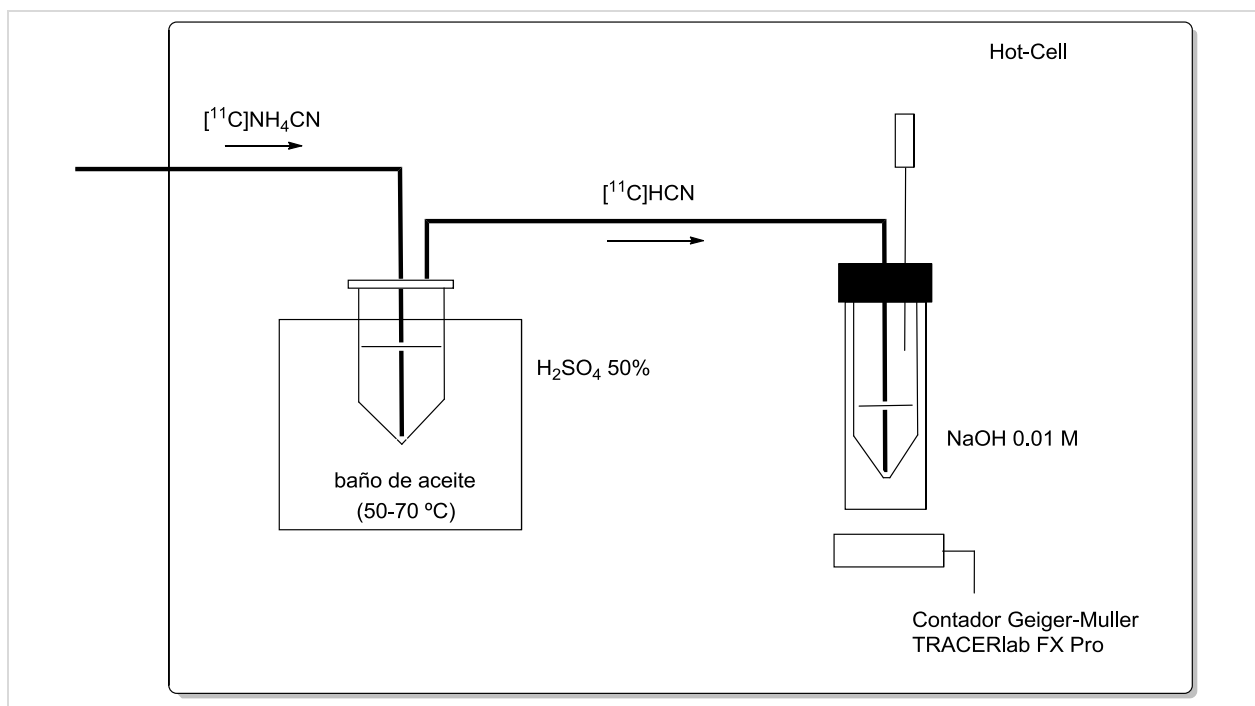


FIGURA 19. Sistema de producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$

A los efectos de estudiar la performance de este sistema para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$, se realizó una producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a partir de 501 mCi de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (EOB). Se colectó en la solución de NaOH 0.01 M aproximadamente 200 mCi, luego de 12 minutos del EOB. En términos de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ producido y capturado, este valor representa un 60% (dc) de la actividad teórica producida como $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

3.2.3.5. Chequeo de fugas

De acuerdo al fabricante, una forma de determinar la hermeticidad del sistema productor de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, consiste en colocar un tapón a la salida del horno OC3B (o de la línea que conecta el ProCab® con la hot-cell), y con el sistema cerrado introducir N_2 a flujo 500 mL/min. La circulación de gas puede monitorearse desde la computadora de servicio, a través de la lectura del flujo a nivel del FC (flowmass controler). Se considera que el sistema no posee fugas si el valor de flujo a nivel del FC baja de 500 mL/min (sistema abierto) a 5-10 mL/min (sistema cerrado).

En la práctica, esta forma de chequear fugas fue poco reproducible y hasta desventajosa. En ocasiones, la alta presión alcanzada cuando se introdujo N_2 a flujo alto, ocasionó que las columnas de cuarzo de los hornos OC3A y/o OC3B cedieran a nivel de las conexiones, perdiéndose incluso su relleno. Cabe aclarar que en condiciones operativas, el ProCab® es un sistema abierto dentro del cual no se generan mayores sobrepresiones de gases. En tal sentido se diseñó un método alternativo para examinar la hermeticidad (parcial) del sistema, a nivel de OC3B, que consistió en detectar fugas de NH_3 (por medio de una tira de pH humedecida)

cuando una mezcla gaseosa idéntica a la usada durante las producciones pasaba a través de dicho horno.

3.2.3.6. Instructivo de producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ a nivel del módulo ProCab®

Con el fin de estandarizar las producciones de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, y teniendo en cuenta todas las consideraciones expuestas en este apartado, se redactó un instructivo según los lineamientos de calidad de CUDIM. Dicho instructivo se presenta en el ANEXO 3 de este capítulo.

3.3. RADIOSÍNTESIS DE D,L-1- $[^{11}\text{C}]$ FENILALANINA

Partiendo aprox. 300 mCi de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, se obtuvo 240.1 mCi ($t = 12$ luego del SOS) de crudo. El análisis del mismo por HPLC (**Figura 20**) permitió, por coinyección con el estándar no radiactivo (**3**) verificar la presencia de 1- $[^{11}\text{C}$]-2-amino-3-fenilpropanonitrilo en el crudo de reacción (pico en detector gamma a 12.9 minutos; estándar no radiactivo a 12.4 minutos), en un 72 % de pureza radioquímica (no corregido). Esto corresponde a la obtención de $[^{11}\text{C}](\mathbf{3})$ en un 84% de rendimiento (corregido por decaimiento) en relación al $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ recogido en solución. Otros picos radiactivos obtenidos minoritarios incluyen especies con $t_R = 2.6, 2.9, 3.1$ y 3.9 minutos (todas menores a 10% de la radiactividad total del crudo) y otro pico con $t_R = 5.8$ minutos (17,4%). Así, la radiosíntesis de 1- $[^{11}\text{C}$]-2-amino-3-fenilpropanonitrilo $[^{11}\text{C}](\mathbf{3})$ constituye la primera marcación exitosa utilizando el precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ en nuestro centro.

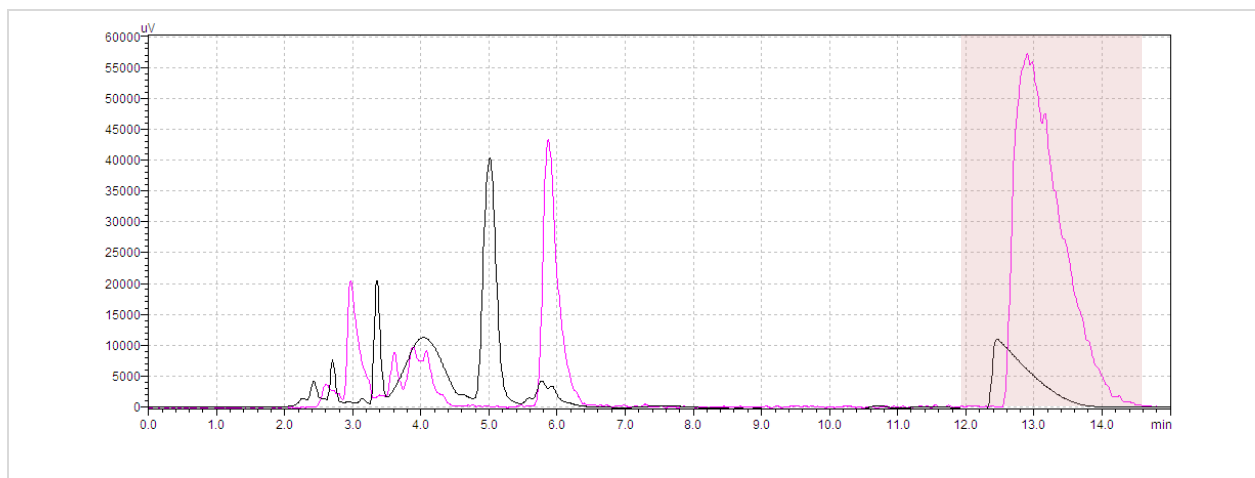


FIGURA 20. Cromatograma para el crudo de reacción de $[^{11}\text{C}]\mathbf{3}$, gamma (línea magenta $t_R = 12.9$ min) y UV-254 nm (línea negra, $t_R = 12.4$ min). La diferencia de tiempos de retención se debe a la disposición de los detectores, estando primero el detector UV y posteriormente el detector gamma.

Un blanco de marcación permitió constatar que los picos en 2.9 y 3.9 minutos están presentes en ausencia de precursor orgánico, y que la proporción de áreas entre ambos no se mantiene constante, desapareciendo más rápidamente el pico de $t_R = 2.9$ minutos, al cual se le atribuyó un carácter de especie volátil. Se desconoce la identidad química de estas dos especies, pero una posible explicación es que el pico de rápida desaparición sea $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ que se pierde del sistema como $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ volátil, o alguna otra especie volátil proveniente del módulo ProCab® ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ o productos de oxidación incompleta con NH_3).

La obtención de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina por hidrólisis básica también fue posible en las condiciones ensayadas. Partiendo de 400 mCi de [¹¹C]CN⁻ se obtuvo un crudo cuya actividad fue de 226.4 mCi (t luego del SOS: 24 minutos). El análisis del mismo por HPLC utilizando el Sistema 1, permitió constatar, por coinyección con L-fenilalanina estándar ($t_R = 4.6$ minutos) la presencia de D,L-1-[¹¹C]fenilalanina ($t_R = 4.9$ minutos) en un 69.0% de pureza radioquímica (**Figura 21**). Esto representó un rendimiento de marcación de 88% desde [¹¹C]CN⁻ (corregido) para la obtención de D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina. Otros picos radiactivos minoritarios aparecieron a $t_R = 2.6$ minutos (4.1%) y $t_R = 3.9$ minutos (26.8%). No se observó presencia de [¹¹C](**3**) sin hidrolizar.

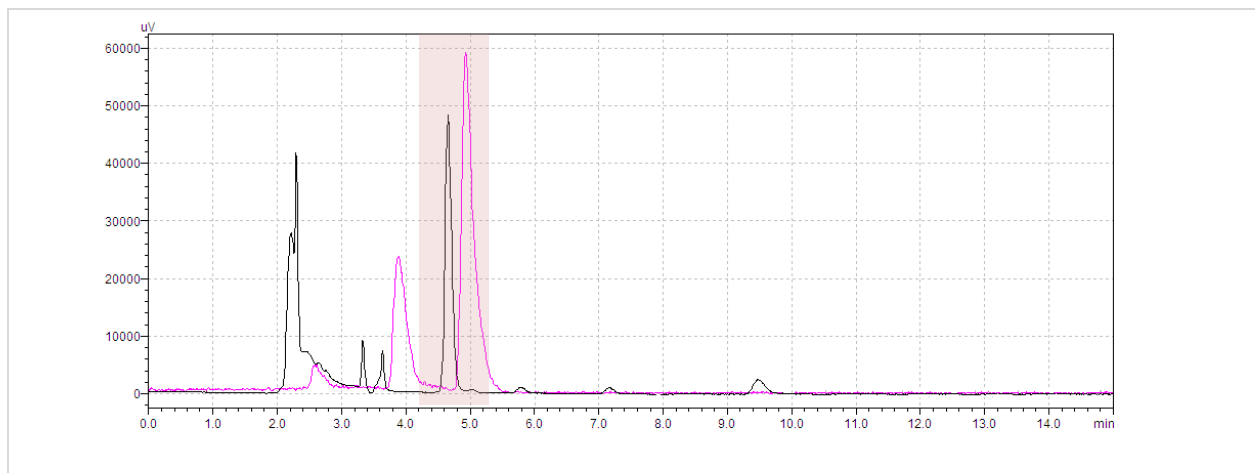


FIGURA 21. HPLC del crudo de reacción de D,L-1-[¹¹C]fenilalanina obtenida por hidrólisis básica, cromatograma gamma (línea magenta, $t_R = 4.9$ min), cromatograma UV-254 nm coinyección con L-Fenilalanina (línea negra, $t_R = 4.6$ min)

Para la hidrólisis ácida también se constató la presencia de D,L-1-[¹¹C]fenilalanina ($t_R = 4.9$ minutos) en el crudo de reacción, por coinyección con L-Fenilalanina estándar ($t_R = 4.6$ minutos), aunque en menor relación al respecto de las otras especies radiactivas que eluyen de la columna. De hecho, en este caso, D,L-1-[¹¹C]Fenilalanina representó el 32.4 % de la actividad total del crudo de reacción, siendo el pico mayoritario el de una especie a $t_R = 5.6$ minutos (41.5 %). También se constató la presencia de los picos a $t_R = 2.9$ minutos y 3.9 minutos (19.9% y 5.2% respectivamente) y una mínima cantidad de [¹¹C](**3**) sin hidrolizar ($t_R = 13.7$ minutos, 0.8 %, **Figura 22**).

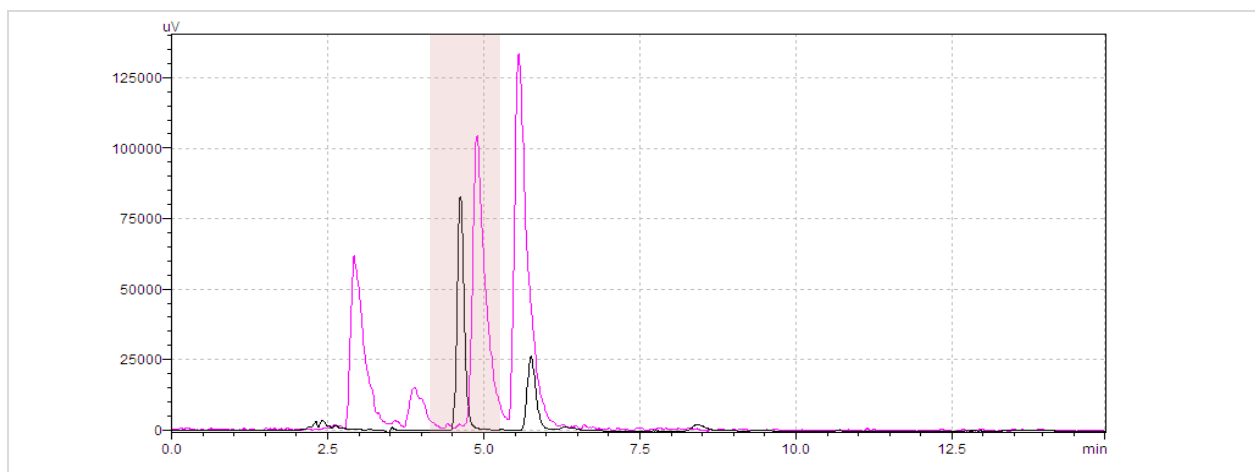
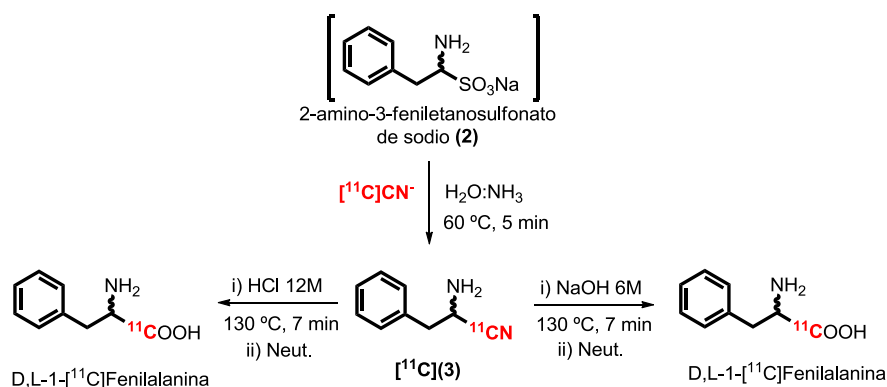


FIGURA 22. HPLC del crudo de reacción de D,L-1- ^{11}C fenilalanina obtenida por hidrólisis ácida, cromatograma gamma (línea magenta, $t_R = 4.9$ min), cromatograma UV-254 nm coinyección con L-Fenilalanina (línea negra, $t_R = 4.6$ min)

Se plantea que el pico mayoritario obtenido pueda ser producto de la hidrólisis parcial de ^{11}C (**3**), esto es: 1- ^{11}C -2-amino-3-fenilpropanamida, aunque ello debería constatarse con estándar no radiactivo de esta especie, o extender el tiempo de hidrólisis ácida de forma de constatar la ausencia de este pico. En relación al rendimiento de esta marcación, partiendo de 450 mCi de ^{11}C CN $^-$, la actividad del crudo fue de 223.5 mCi (t luego de SOS: 20 minutos). Teniendo en cuenta la proporción de D,L-1- ^{11}C fenilalanina en la mezcla de reacción, se calculó un rendimiento de 32% (corregido) a partir de ^{11}C CN $^-$ inicial. Los resultados de esta sección se resumen en la **Tabla 11**.

TABLA 11. Resumen de las radiosíntesis de D,L-1- ^{11}C fenilalanina por hidrólisis de ^{11}C **3**



Reacción	Rendimiento (%dc) en relación a ^{11}C CN $^-$	Pureza radioquímica del producto (%)
Síntesis del ^{11}C (3)	84	70.4
D,L-1- ^{11}C Phe por Hidrólisis básica	88	69.0
D,L-1- ^{11}C Phe por Hidrólisis ácida	32	32.4

4. CONCLUSIONES PRELIMINARES DE ESTA ETAPA

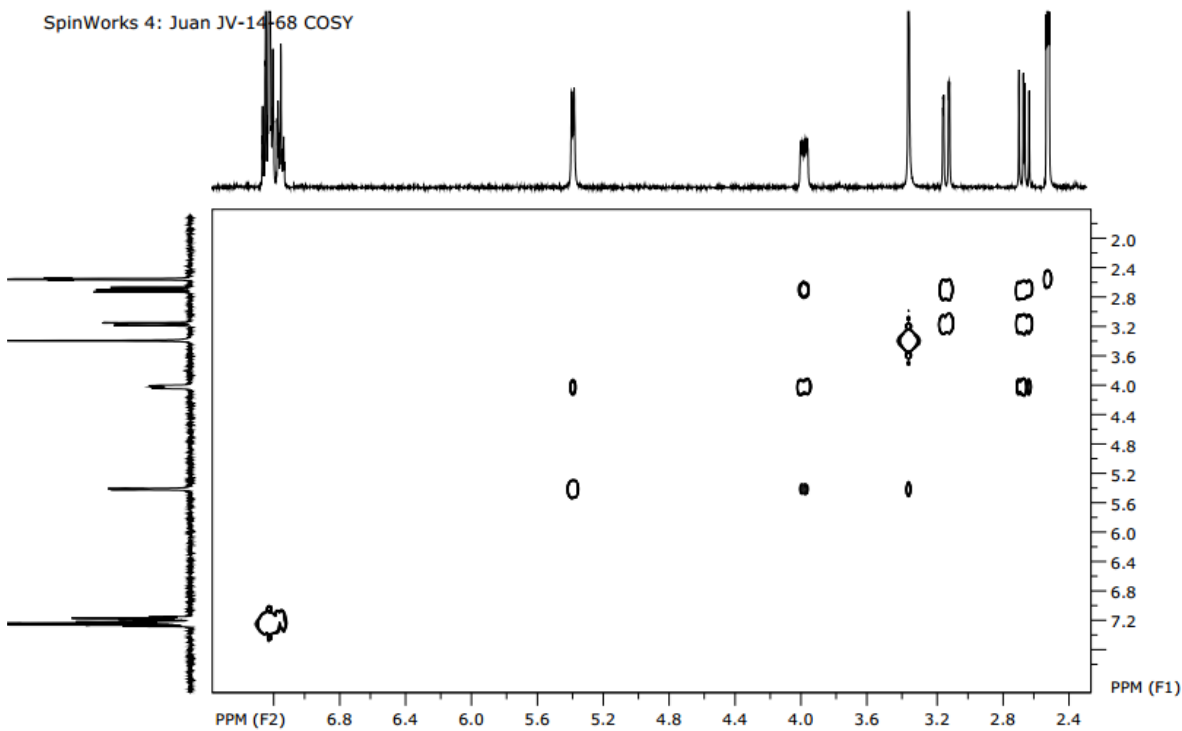
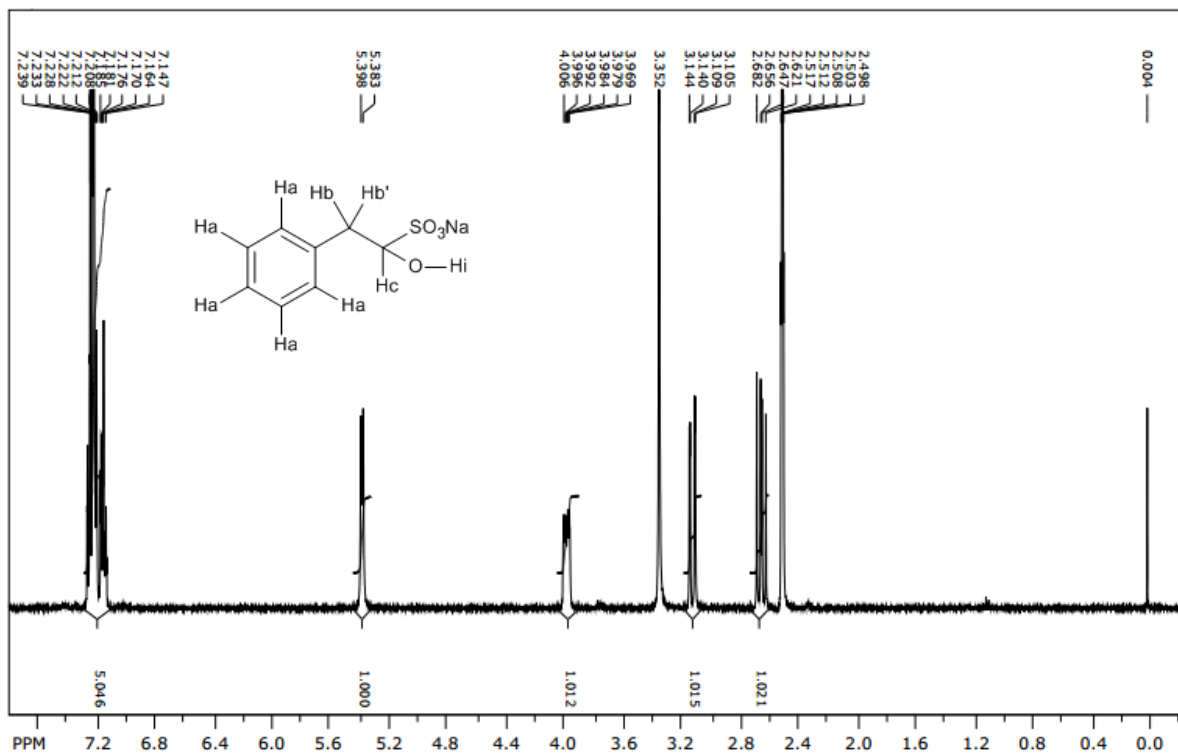
El trabajo desarrollado en esta etapa, permitió llevar a cabo un aprendizaje y perfeccionamiento sobre el uso de la plataforma radiosintética GE ProCab® para la producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$, lo cual hasta el momento no había sido utilizada para tal fin. En tal sentido, nuestro centro cuenta de manera experimental a partir de este trabajo con un nuevo precursor radiactivo de ^{11}C , que, conjuntamente con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, brindan un espectro más amplio de posibilidades radiosintéticas.

La producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ resultó ser compleja desde el punto de vista de la reproducibilidad del método. El ProCab® mostró ser una plataforma poco robusta para uso esporádico. La necesidad de controlar un gran número de parámetros operativos hace que el trabajo con $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ requiera un gran esfuerzo por parte del operador, previo a las operaciones de la radiosíntesis en sí misma. No obstante, cuando se logran ajustar dichos parámetros y la plataforma se encuentra operativa, los rendimientos de producción de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ (esté éste bajo la forma de $[^{11}\text{C}]\text{NH}_4\text{CN}$ o $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$) son adecuados para marcaciones que utilicen este precursor.

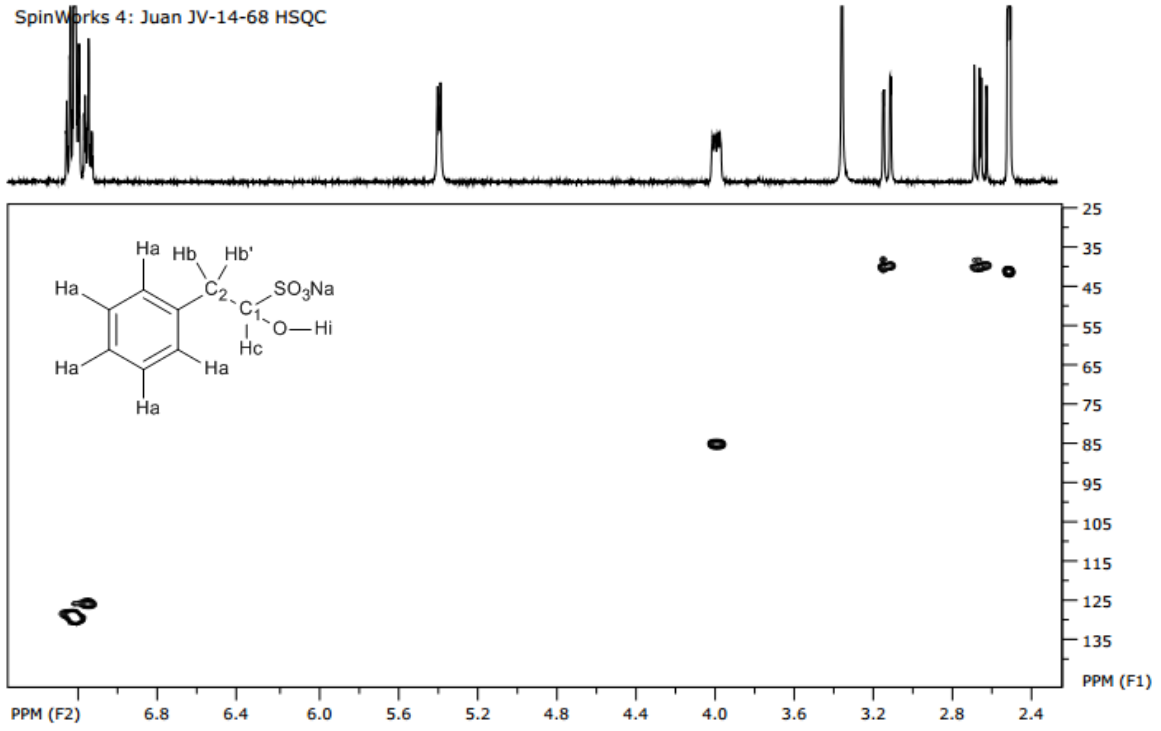
La adaptación del módulo TRACERlab® FX C Pro, para la recolección de $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ y su posterior utilización como precursor radiactivo fue realizada sin inconvenientes, como lo demostró la aplicación de este precursor en la síntesis de D,L-1- $[^{11}\text{C}]\text{Phe}$ como reacción modelo.

ANEXO 1: ESPECTROSCOPÍA

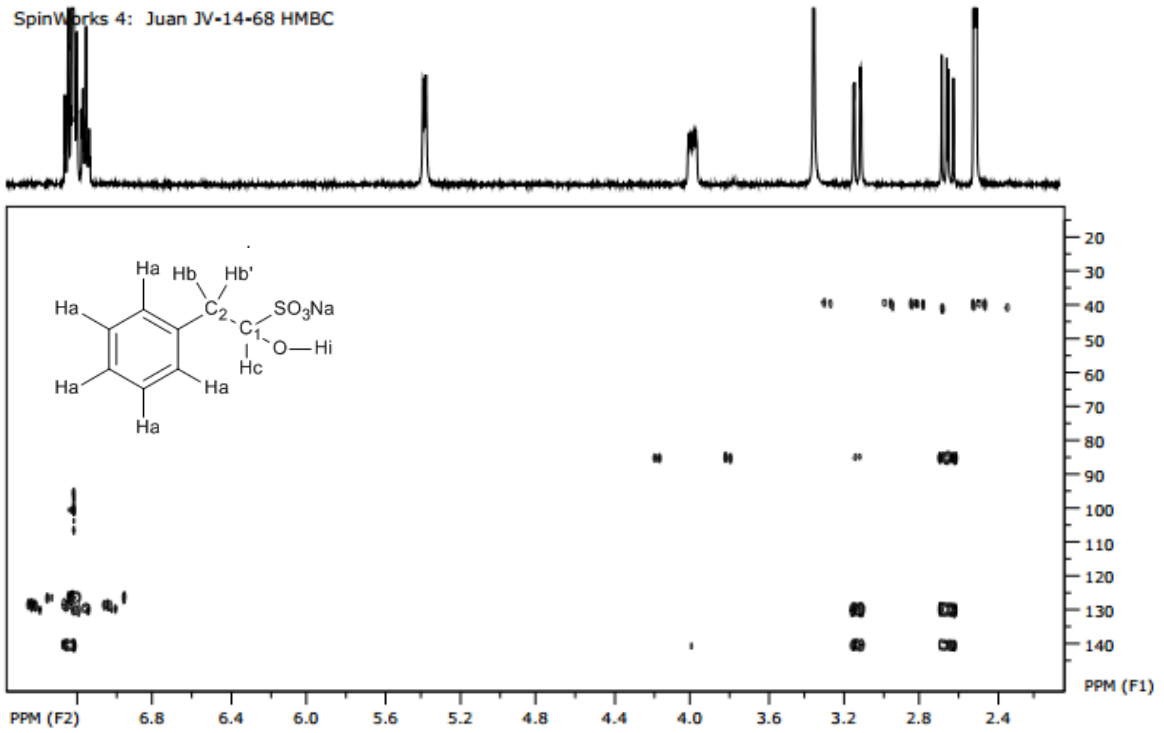
1) 1-hidroxi-2-feniletanosulfonato de sodio

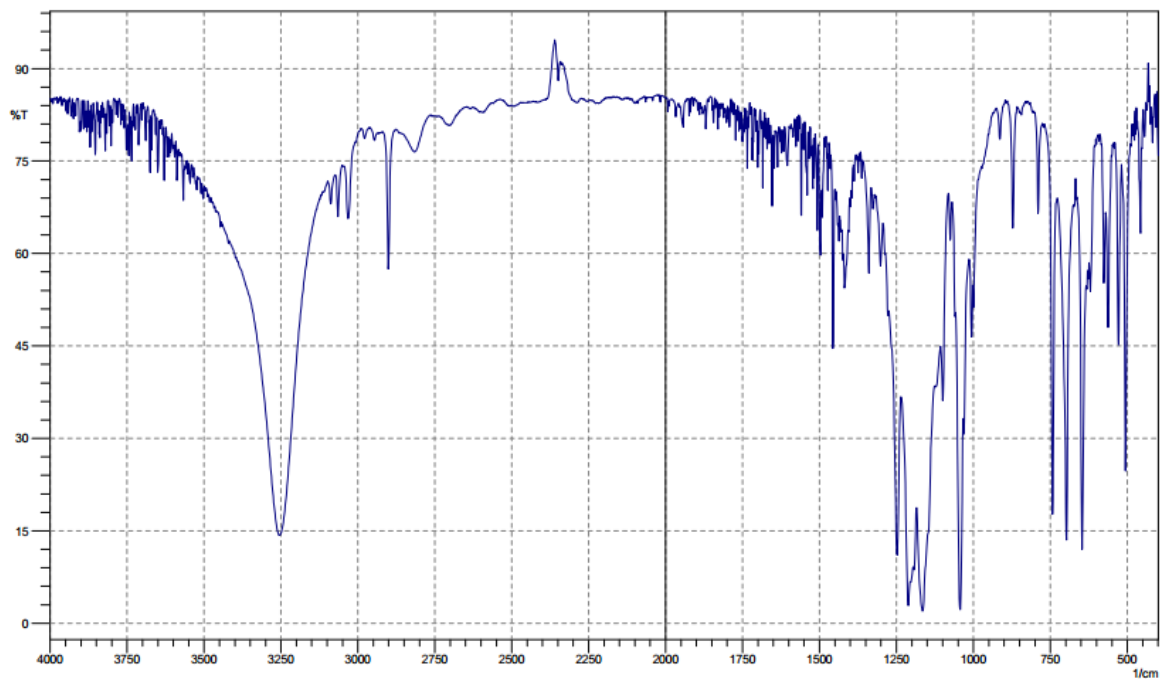


SpinWorks 4: Juan JV-14-68 HSQC

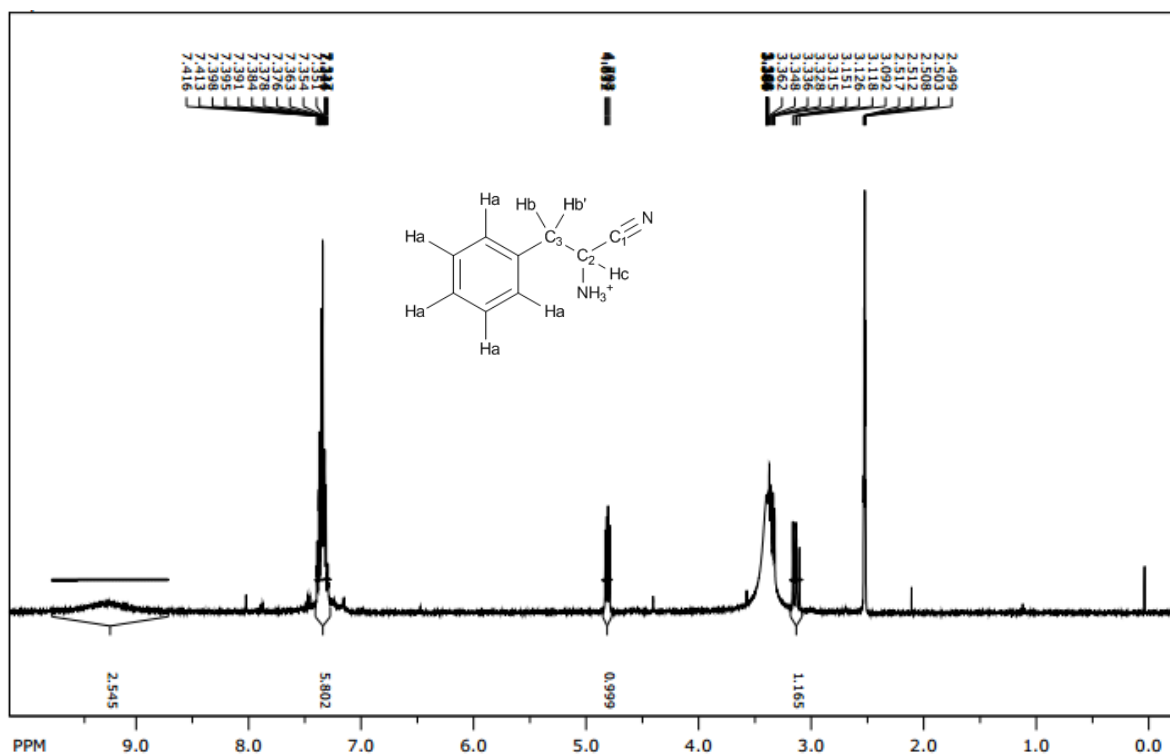


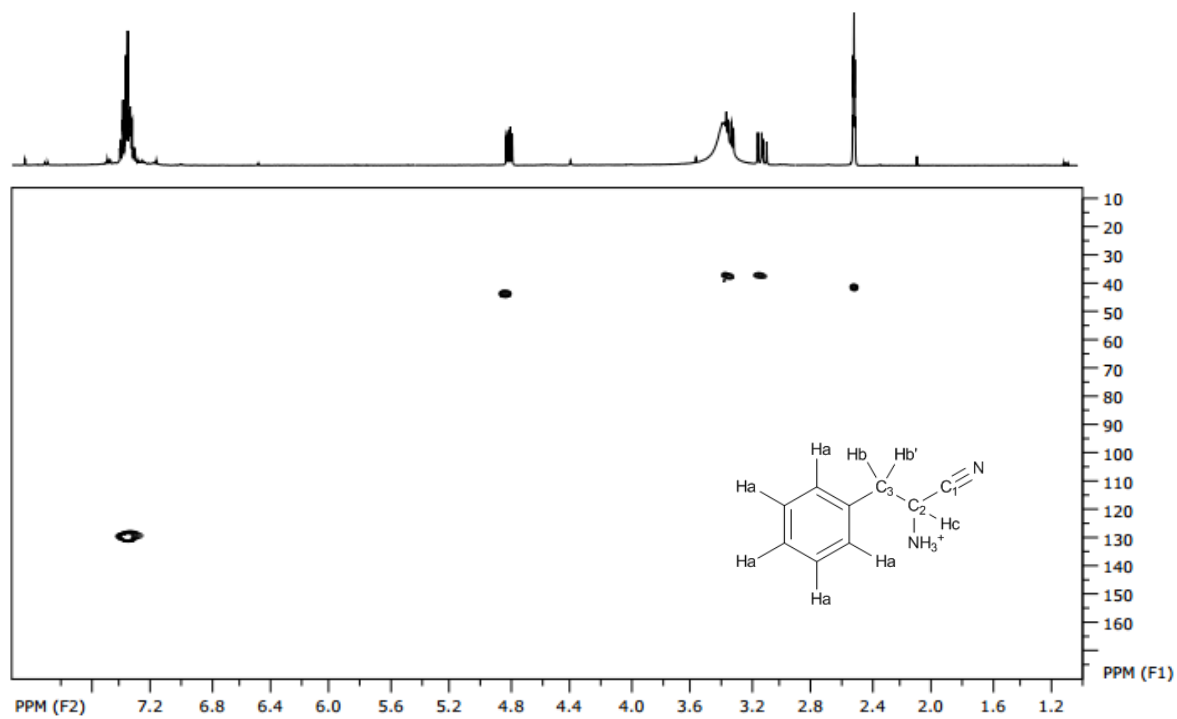
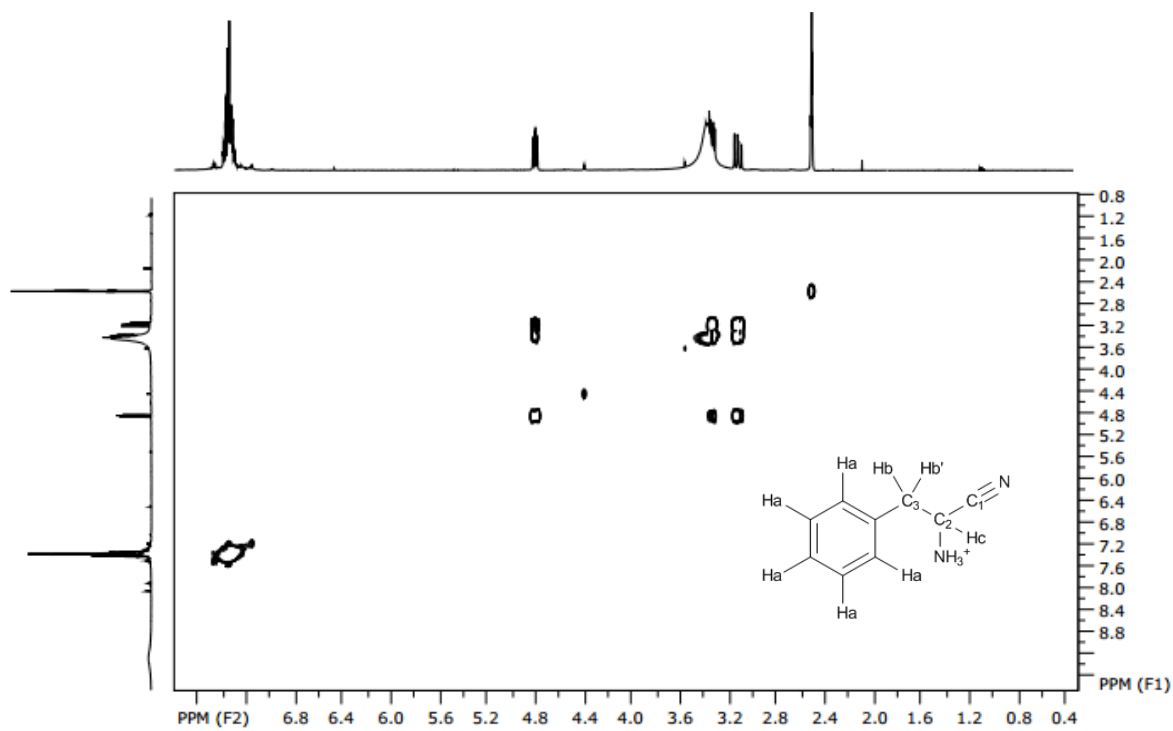
SpinWorks 4: Juan JV-14-68 HMBC

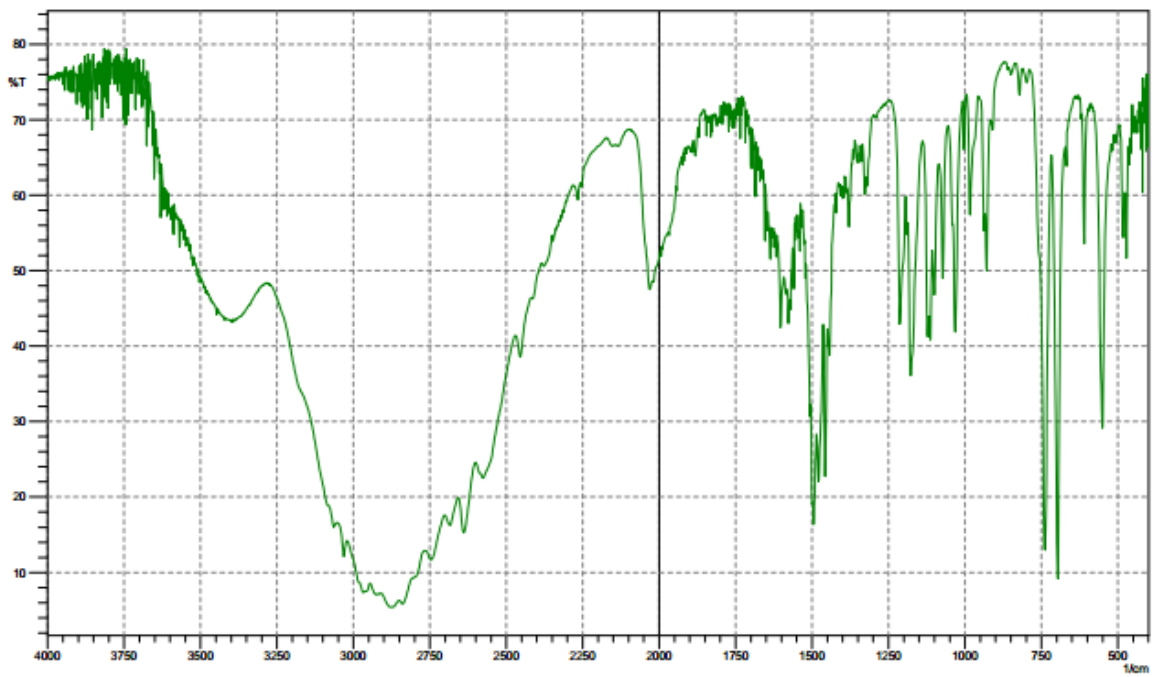
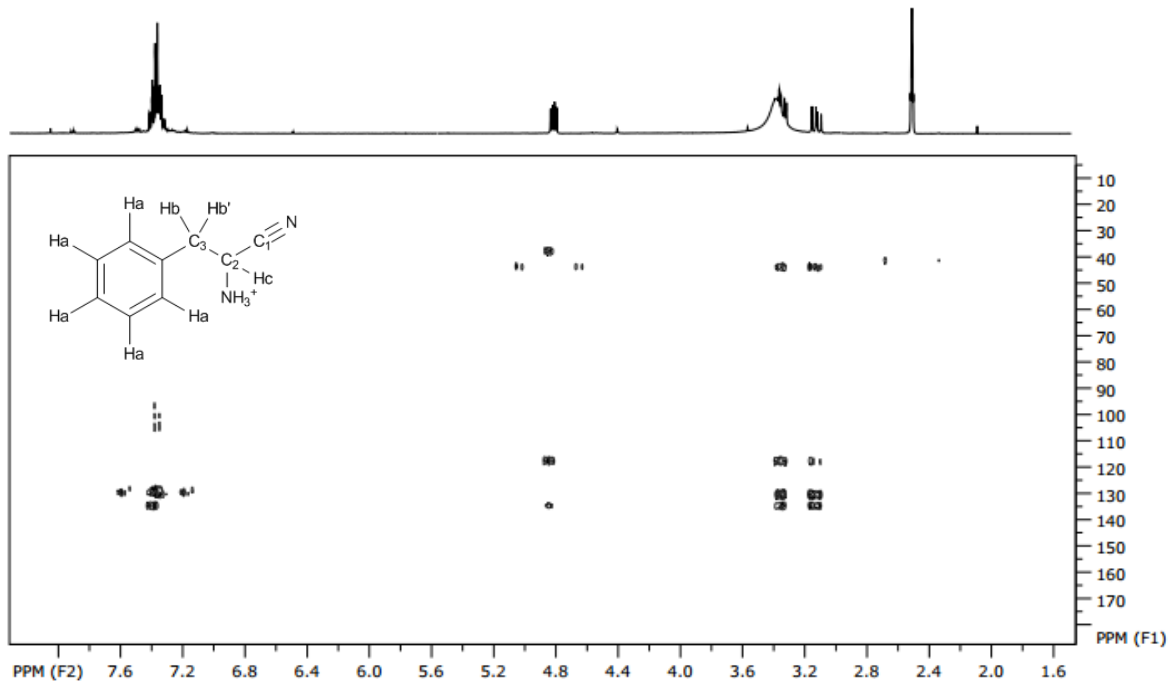




2) 2-amino-3-fenilpropanonitrilo








**ANEXO 2. PRODUCCIONES DE [¹¹C]CN- REALIZADAS DURANTE EL TRABAJO
EXPERIMENTAL DE LA TESIS.**

Lote	Aco previo	Soporte de recolección	Flujo Gas Portador	Act. Inicial	Act. ¹¹ CN	Δt	RRQ (%, dc)	Observaciones
HCN14031201	no	NaOH 2,5 N	300	222	0,16	00:13	0,11	Fallida
HCN14031202	no	NaOH 2,5 N	300	222	0,17	00:12	0,12	Fallida
HCN14033101	si	10 mL H ₂ O	300	505	0,85	00:13	0,26	Fallida
HCN14040901	si	Ascarita 25 cm	300	109	0,11	00:13	0,16	Fallida
HCN14050201	si	Ascarita 25 cm	300	1212	178,7	00:11	21,45	HCN
HCN14050701	si	Ascarita 25 cm	300	1212	156,49	00:11	18,78	HCN
HCN14050901	si	Vial Ascarita	300	1212	16	00:12	1,99	Pérdida de actividad
HCN14051401	si	2 mL H ₂ SO ₄ 50%	300	1212	1,03	00:14	0,14	Fallida
HCN14102801	si	Ascarita 25 cm	30	1212	32,7	00:13	4,20	Fallida
HCN14110401	si	Ascarita 25 cm	30	1212	27,78	00:19	4,38	Fallida
HCN14111301	si	Ascarita 25 cm	300	1212	12	00:05	1,17	Pérdida de actividad
HCN14111801	si	Ascarita 25 cm	300	1212	176,7	00:07	18,51	HCN
HCN14112001	si	Ascarita 25 cm	30	1212	41,68	00:17	6,14	Fallida
HCN14121601	si	Ascarita 25 cm	300	1212	12	00:08	1,30	Fallida
HCN14121701	si	Ascarita 25 cm	300	1212	13,15	00:06	1,33	Pérdida de actividad
HCN14123001	no	Reactor H ₂ O:NH ₃ 600:20	25	1212	8	00:14	1,06	Pérdida de actividad
HCN15010201	no	Reactor H ₂ O:NH ₃ 1200:40	25	1212	6	00:17	0,88	Pérdida de actividad
HCN15010501	no	Reactor H ₂ O:NH ₃ 1200:40	30	4948	20	00:16	0,70	Pérdida de actividad
HCN15010801	si	Reactor H ₂ O:NH ₃ 1200:40	40	1212	6	00:16	0,85	Pérdida de actividad
HCN15032701	no	Ascarita 25 cm	300	1212	10	00:04	0,95	Pérdida de actividad
HCN15040601	no	Ascarita 25 cm	300	1212	11	00:04	1,04	Pérdida de actividad
HCN15040801	si	Ascarita 25 cm	300	1212	8,54	00:05	0,84	Pérdida de actividad
HCN15041501	si	Ascarita 25 cm	300	1212	10,7	00:06	1,08	Pérdida de actividad
HCN15042901	si	Ascarita 25 cm	300	1212	10,5	00:05	1,03	Pérdida de actividad
HCN15050701	si	Ascarita 25 cm	300	1212	284,14	00:07	29,76	Valvula MC3B (NH ₃) ajustada a 15-20 mL/min
HCN15050801	si	Ascarita 25 cm	300	1212	282,99	00:08	30,67	duplicado del anterior
HCN15050802	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	230,4	00:10	26,73	En vial de fondo cónico
HCN15051201	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	280	00:07	29,33	En reactor (lectura aprox de actividad)
HCN15051501	si	Solución de precursor	300	1212	250	00:07	26,18	En reactor (lectura aprox de actividad)
HCN15052101	si	Reactor H ₂ O:NH ₃ 600:20	300	1212	300	00:08	32,51	En reactor (lectura aprox de actividad)
HCN15052201	si	Solución de precursor	300	1212	320	00:07	33,52	En reactor (lectura aprox de actividad)
HCN15060401	si	Solución de precursor	300	1212	310	00:07	32,47	En reactor (lectura aprox de actividad)
HCN15082401	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	233,8	00:11	28,06	En reactor (lectura aprox de actividad)
HCN15090701	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	260,13	00:11	31,22	2 alambres de Pt

HCN15091701	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	145,1	00:12	18,02	2 alambres de Pt
HCN15092101	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	236,11	00:11	28,34	2 alambres de Pt
HCN15100101	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	30	1212	30,7	00:16	4,37	ajuste del flujo desde comp de servicio
HCN15083101	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	20	1212	0	00:10	0,00	Fallida
HCN15100501	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	0,82	00:30	0,19	con delivery frio
HCN15101901	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	1,01	00:11	0,12	Fallida
HCN15101902	si	0,5 mL NaOH 0,01 M	300	1212	1,18	00:11	0,14	Fallida

ANEXO 3: INSTRUCTIVO DE PRODUCCIÓN DE $[^{11}\text{C}]\text{CN}$

 <p>Dr. A. Ricaldoni 2010 Montevideo 11.600 Tel.: 598-2 480 3238 www.cudim.org</p>	Instructivo	IN-XX-0XX-XX
	Producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ en el módulo PROCAB	Entrada en vigencia: XX/XX/XXXX
		Página 1 de 8

	Cargo	Fecha	Firma
Preparado por: Pablo Buccino	Asistente I+D Químico	10/09/2018	
Revisado por: Juan Vázquez	Estudiante Posgrado	12/09/2018	
Aprobado por: Eduardo Savio	Responsable I+D Químico y Biomédico	12/09/2018	

A. Pasos Preliminares

1. Abrir los gases necesarios para la producción de ^{11}C , más los siguientes:
 - a. N_2 alta pureza (ProCab): posición N de la sala de gases **PLANTA BAJA**
 - b. NH_3 alta pureza: posición U de la sala de gases **PLANTA ALTA**
2. Solicitar la computadora de servicio del Ciclotrón.
3. Conectar la computadora de servicio a la consola del ProCab, por medio de los puertos **AUC** y **UUC**.
4. Encender la computadora, y acceder al programa de mantenimiento del Ciclotrón (usuario: **service**, password: **PETtrace**)
5. Abrir la puerta del ProCab, y con cuidado desenroscar la conexión superior del horno **OC3A**, de tal manera que solo quede expuesta la parte superior de la columna de cuarzo.
6. Acceder al panel de C del ProCab por medio de **Subsystem Control > C (target 5)** (Fig.1)

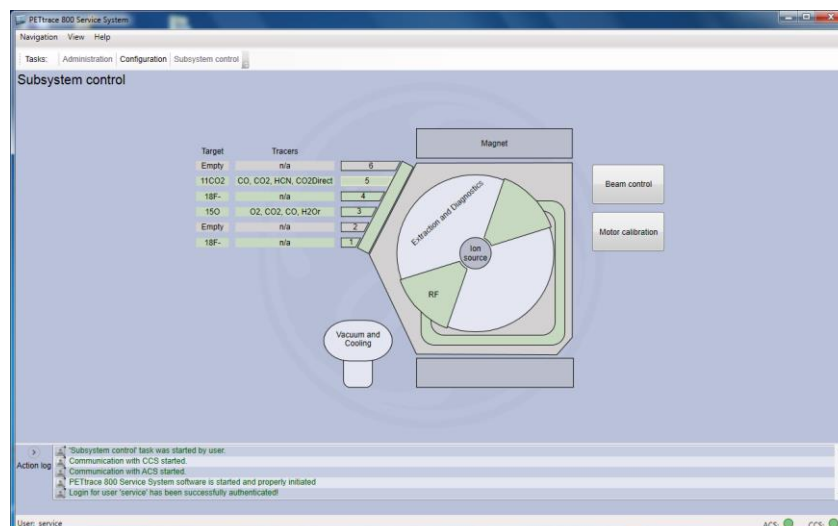


Figura 1: Subsystem Control en PC servicio

B. Acondicionamiento de los hornos y leaktest

1. Establecer un flujo de N_2 de **200 mL/min** que atraviese los hornos **OC1A** (tamices moleculares) y **OC3A** (níquel sobre soporte). Seleccionar manualmente las válvulas para abrirlas tal como se muestra en la Fig. 2.
2. Calentar los hornos antedichos a **200 °C** durante no menos de **20 minutos**.

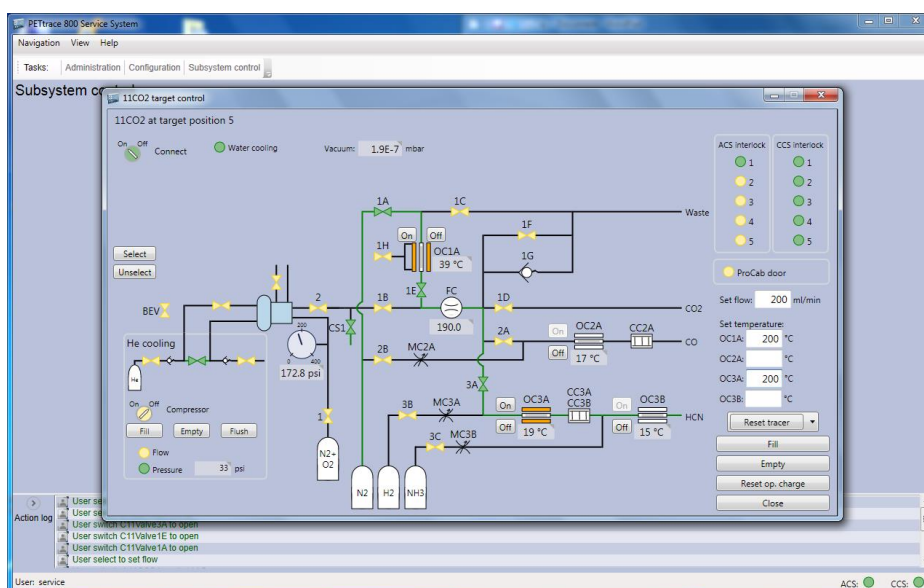


Figura 2: acondicionamiento de OC1A y OC3A

3. Transcurrido ese tiempo, poner a enfriar los hornos seteando la temperatura de los mismos en **25 °C**.
4. Colocar a la salida de la línea de HCN que llega a la celda, una válvula de retropresión, conectada a su vez a una tubuladura PEEK que llegue al fondo de un

vial de 5 mL de fondo cónico. Colocar en el vial 2.5 – 3.0 mL de solución de HCl 1M con unas gotas de indicador rojo de metilo. Colocar aguja de venteo en el vial.

5. Chequear que el Pt se encuentre bien centrado en su columna de cuarzo.
6. Con el horno **OC3A** a menos de 100 °C, colocar con cuidado su conexión superior para cerrar el sistema, a los efectos de proceder a acondicionar el horno **OC3B** (platino). Tener la precaución de corroborar que la salida **OC3B** no se encuentra obstruida, y que está conectada a la línea que llega a la celda.
7. Calentar el horno **OC3B** a 950 °C por **10-20 minutos, bajo corriente de N₂ (200 mL/min) e H₂** (abrir su válvula directamente). Verificar barboteo en el vial conectado a la línea de HCN de la celda.
8. Un minuto antes de finalizar el acondicionamiento de **OC3B**, abrir la válvula de NH₃. Con una tira de pH humedecida, detectar fugas de NH₃ a lo largo del circuito. Detectar que sale NH₃, realizando la misma prueba a la salida de la tubuladura PEEK en la celda (hacerlo rápidamente y con la ventilación de la celda encendida, ya que el NH₃ es nocivo por inhalación).
9. Transcurridos los 10-20 minutos, poner a enfriar el horno **OC3B** y cerrar el programa de mantenimiento del ciclotrón. Cerrar el ProCab y apagar la computadora, desconectando los puertos **AUC** y **UUC**.

C. Verificación y ajuste del flujo de NH₃

PRECAUCIÓN: TRABAJAR SIEMPRE EN UN AMBIENTE BIEN VENTILADO, TENIENDO CUIDADO DE MINIMIZAR LAS EMISIONES DE NH₃

1. Desconectar la línea de NH₃ a nivel de la entrada a **OC3B**, conectar el sistema de medida de flujo de NH₃ (jeringa invertida de 30 mL)
2. Abrir la válvula **3C** (Fig. 2) del NH₃ y determinar el tiempo **t** en que demora la jeringa en llenarse un volumen **V** (15 o 20 mL).
3. Calcular el flujo de amoníaco según: $\phi \text{ (mL/s)} = \mathbf{V \text{ (mL)} / t \text{ (s)}}$. Lo ideal es que dicho flujo esté entre **15 – 25 mL/min**.
4. En caso de que el flujo se encuentre apartado de dicho rango, se deberá ajustar la válvula **MC3B** manualmente, conectándola a un punto de salida de aire comprimido.
5. Colocar un medidor de flujo digital a la salida de la válvula y abrir el aire comprimido.

6. Ajustar la válvula MC3B de tal manera que el flujo medido por el medidor esté entre **7.5 y 10 mL/min** (ya que para dicha válvula se ha demostrado que $\varphi_{aire} = (\varphi_{amóniaco})/2$)
7. Volver a conectar la válvula MC3B ajustada a la línea de NH₃ y reconectar todo el sistema.

D. Verificación y Ajuste del flujo de H₂

PRECAUCIÓN: TRABAJAR SIEMPRE EN UN AMBIENTE BIEN VENTILADO, YA QUE EL H₂ ES EXPLOSIVO.

1. Desconectar la entrada a la trampa de Ascarita.
2. Colocar en dicha tubuladura el medidor de flujo digital.
3. Abrir la válvula 3B (Fig. 2) de H₂.
4. El flujo de H₂ debe estar entre 80-100 mL/min. En caso contrario ajustarlo regulando la válvula MC3A.

E. Recolección y medida de [¹¹C]HCN

E.1. Recolección fuera del módulo (para evaluación de producción de [¹¹C]HCN):

1. Conectar la línea de llegada del HCN a válvula de retropresión, y por ella a una tubuladura PEEK que barbotee en un vial de fondo cónico conteniendo 0.5 mL de **NaOH 0.01 M** (con aguja de venteo). Adicionalmente se puede conectar una trampa de Ascarita a la aguja de venteo para medir [¹¹C]HCN no atrapado.
2. Medir la actividad atrapada en la solución en calibrador de dosis.

E.2. Recolección en el módulo (para síntesis utilizando [¹¹C]HCN):

1. Conectar la línea de llegada del HCN a válvula de retropresión, y ella a la tubuladura “D” del módulo **TRACERlab® FX C Pro**.
2. Colocar en el reactor hasta 0.5 mL de la solución en la que se recogerá el [¹¹C]HCN.
3. Ejecutar en el módulo el programa “**Recolección de HCN – 14123001**” a los efectos de registrar los parámetros del proceso.

F. Producción de [^{11}C]HCN a nivel del CICLOTRÓN-ProCab

1. Desde la consola del ciclotrón seleccionar **Maintenance > Chemistry > (5) 11C-HCN (Fig.3)**
2. Seleccionar **Oven(s) > Preheat** para calentar los hornos **OC3A** y **OC3B**.

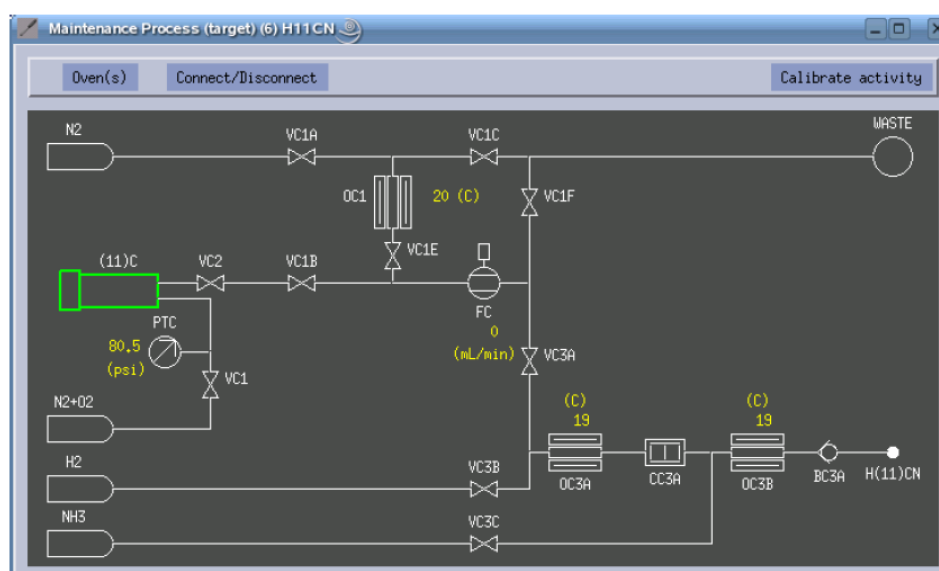


Figura 3. Maintenance Process: Pre calentamiento de los hornos OC3A y OC3B

3. Dado que el **Preheat** se da en corriente de H_2 , corroborar que la salida del sistema no se encuentre obstruida, constatando barboteo de H_2 en el líquido colector de HCN.
4. Opcionalmente se puede activar los tamices moleculares si estos no fueron acondicionados previamente con la función **Oven(s) > Activate Trap**.
5. Desde el menú principal superior seleccionar **Production > 11C-HCN**. El sistema levantará el magneto y una vez listo desplegará la ventana de selección de parámetros.
6. En la ventana de selección de parámetros de irradiación, introducir **Signature:** (“PET”), **Password:** (“pet”), **Current [uA]** (corriente deseada) y **Time/Charge/Activity:** (tiempo deseado en minutos).
7. Se desplegará la ventana de producción de 11C-HCN, donde se debe seleccionar **Start Irradiation** una vez que el sistema esté listo para comenzar la irradiación.

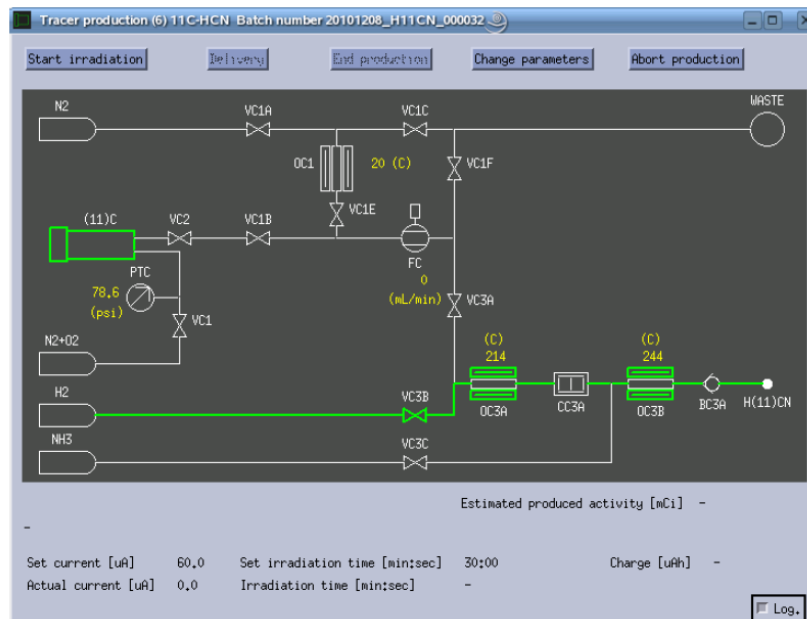


Figura 4: Ventana de Irradiación y producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$

8. Una vez que se complete la irradiación (“end of bombardment”, EOB), el target enviará el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a OC1A para purificarlo, lo cual dura aprox. 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, calentará OC1A hasta 350 °C para desorber el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y enviarlo a 300 mL/min (corroborar en lectura de FC) hacia OC3A y OC3B. Ese tiempo es el “Start of Delivery” (SOD) y a partir de él deberá llegar actividad a la celda. El delivery continua por aproximadamente 6 minutos más. La producción de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$ dura en total unos 9 minutos.
9. Registrar la tasa de dosis de la celda (\bar{D}) al momento del “end of delivery” (EOD)
10. Una vez que termine la producción, registrar la actividad recibida de $[^{11}\text{C}]\text{HCN}$.
11. Apagar el ciclotrón en **Maintenance > Shut Down**.

G. Reemplazo de insumos, llenado de columnas y ajuste de gases

A continuación se da una lista de la frecuencia de reemplazo de los insumos del ProCab, tal como recomienda GE en “PETtrace 800 series OPERATOR GUIDE – Revision 8 (Direction 5397086-100).

1. Reemplazo de columnas y hornos:

Horno/Trampa	Frecuencia de recambio	Observaciones
Ascarita	1 mes / 50 corridas	Chequear cambios de color y aspecto
Tamices moleculares	300 corridas	-
Sicapent	1 mes /50 corridas	Chequear cambios de color: tonos rojos o verdes indican necesidad de recambio
Catalizador de Pt	1 año	-
Catalizador de Ni	6 meses	-

2. Llenado de Columnas (Fig.5):

Horno / Trampa	Cantidad / Relleno	Tipo columna	Proveedor recomendado
OC1A	0.6 g de Tamices moleculares 4A 60-80 Mesh	Metálica	Grace Davison (5622)
Trampa Ascarita	(lleno) Ascarite (II) TM 20-30 (lleno) mesh	Omnifit	Sigma-Aldrich (223921-500G)
Trampa Sicapent	(lleno) Sicapent TM con indicador	Omnifit	Sigma-Aldrich (1005430500)
OC3A	6 - 8 cm de catalizador de Niquel	Tubo de cuarzo	Engelhard (Ni-3266 E 1/8)
OC3B	Bolita de Pt de 1 cm de diámetro hecha con 670 cm de Pt 0.127 mm	Tubo de cuarzo	Sigma-Aldrich (267163-1.3G)

Se recomienda en las columnas Omnifit y tubos de cuarzo colocar 1 cm de lana de cuarzo a cada lado del relleno.



Figura 5: Llenado de columna de Pt (arriba) y de Ni (abajo)

3. Ajuste de los gases:

GAS / Válvula	Flujo (mL/min) (Recomendado CUDIM)	Presión (bar) PdU
N ₂ (5.0 o mayor)	150 – 200	2.5
H ₂ (6.0) / MC3A	30 – 100 (80)	2.5
NH ₃ (anhidro) / MC3B	10 – 20 (15)	2.7

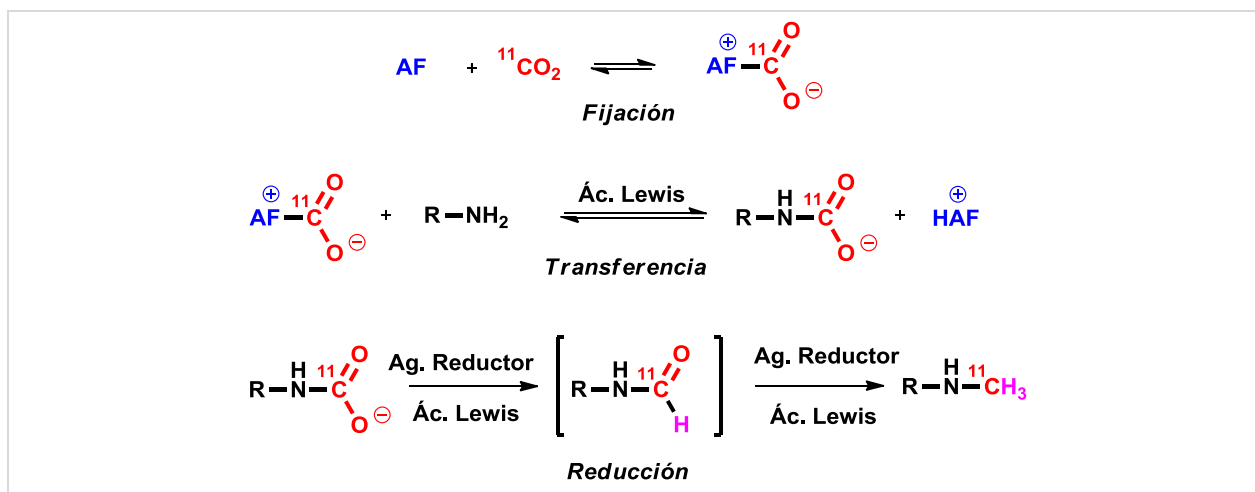
CAPITULO 5: ^{11}C -METILACION DIRECTA CON EL PRECURSOR $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

1. INTRODUCCIÓN

Durante esta instancia, el trabajo se dividió en dos etapas. La primera de ellas consistió en la puesta a punto de sistemas analíticos (HPLC) para el análisis de las marcaciones y preparación de estándares. La segunda etapa se orientó al trabajo con el precursor radiactivo $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, lo cual comprendió el estudio de sus propiedades fisicoquímicas en relación a su captura en diferentes medios (solventes y agentes fijadores) en la plataforma de trabajo elegida (módulo automatizado de síntesis) eventualmente modificada para los fines previstos. También se estudió la radioquímica del proceso, centrándose este punto en la evaluación cualitativa (especies presentes), y cuantitativa (rendimiento y pureza) para diferentes condiciones de marcación. Por último, se aplicó el conocimiento generado en las etapas anteriores, orientado a su aplicación a la radiosíntesis del trazador $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, utilizado en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Si bien los detalles fisicoquímicos de las reacciones de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, particularmente los mecanismos subyacentes en estas transformaciones, aún no han sido completamente dilucidados, es conveniente proponer en base a trabajos previos en este campo,^{95,109} que los procesos constan de tres etapas generales, a saber: i) fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ por medio de un agente fijador (AF), ii) transferencia del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ desde el AF hacia el grupo amina que actúa como nucleófilo, quedando ésta bajo la forma de $[^{11}\text{C}]\text{carbamato}$, iii) reducción del ^{11}C -carbamato a N - $[^{11}\text{C}]\text{metilamina}$. (**Esquema 42**)

La fijación es la etapa reversible en la cual el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ se une covalentemente a un agente fijador, que generalmente actúa como base de Lewis, formándose un $[^{11}\text{C}$ -carboxi]-aducto. Cuando dicha base es una amina, dicho aducto es un ácido $[^{11}\text{C}$ -carboxi]-carbámico. La etapa siguiente es la transferencia reversible del grupo ^{11}C -carboxilo del anteriormente mencionado aducto al sustrato (grupo amina en nuestra propuesta), eventualmente catalizada por ácidos de Lewis que se agregan al medio como aditivos. Finalmente, el grupo ^{11}C -carbámico (estado de oxidación formal +IV) formado sobre la amina sustrato, sufre reducción por parte del agente reductor empleado, a ^{11}C -formamida (estado de oxidación +II), y a su vez, ésta se reduce a ^{11}C -metilo (estado de oxidación -II). También en esta última etapa se plantea la posibilidad de catálisis por medio de los aditivos agregados.



ESQUEMA 42. Mecanismo propuesto de incorporación de [^{11}C]CO $_2$ en moléculas orgánicas para la síntesis de N -[^{11}C]metilaminas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. METODOLOGÍAS ORGÁNICAS Y ANALÍTICAS

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba), de calidad analítica o superior, y utilizados sin posterior purificación a menos que se indique lo contrario. Los análisis en Cromatografía en capa fina (TLC) fueron llevados a cabo en placas de sílica gel 60F-254 y reveladas bajo luz UV. Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker DPX-400 (400 MHz). La asignación de los desplazamientos químicos se realizó en base a experimentos de RMN estándares (^1H). Los desplazamientos químicos fueron expresados en ppm relativos a tetrametilsilano como estándar interno. Los compuestos fueron analizados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un cromatógrafo Shimadzu-UFLC con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie.

2.1.1. Preparación de estándares y puesta a punto del sistema HPLC analítico

2.1.1.1. Sistema de HPLC analítico

Los compuestos obtenidos en este apartado fueron analizados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un cromatógrafo Shimadzu-UFLC con detectores de arreglo de diodos y gamma en serie. Se utilizó una columna Nucleodur 100-5 C18-ec 250 x 4.6 mm column (Macherey-Nagel) en MeCN:Buffer Acetato 0.1M (pH=5) 60:40 (v/v), a flujo = 1.2 mL/min.

2.1.1.2. Síntesis de *N*-metil-4-toluidina (estándar analítico)

A los efectos de contar con estándares analíticos *N*-metilados, para identificar los posibles productos de ^{11}C -metilación de la 4-toluidina, se sometió a la misma a condiciones de *N*-metilación con CH_3I . Para ello se disolvió 4-toluidina (487 mg, 4 mmol) en MeOH (20 mL). Lentamente se agregó CH_3I (0.125 mL, 2 mmol) y se calentó a reflujo la mezcla de reacción. El avance de reacción se controló por TLC (SiO_2 , hexanos:acetato de etilo 95:5) y HPLC (detección UV 237 nm). A los efectos de favorecer la formación de compuestos *N*-metilados, se agregó CH_3I en exceso (6 mmol). Se detuvo el reflujo cuando por HPLC se constató que el pico atribuido a la *N*-metil-4-toluidina comenzó a disminuir su proporción (para dar lugar a compuestos polimetilados) en lugar de aumentar. La mezcla se dejó alcanzar temperatura ambiente y se evaporó el solvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por medio de cromatografía en columna (SiO_2 , hexanos:acetato de etilo 95:5). Se aisló un aceite incoloro (8.7 mg, 2%). ^1H -RMN (400 Hz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 7.09 (0.3H, d, $J = 8$ Hz, ArH), 7.03 (2H, d, $J = 8$ Hz, ArH), 6.77 (0.3H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.58 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 2.94 (0.9H, s, N-(CH_3)₂), 2.84 (3.2H, s, NH- CH_3), 2.29 (0.4H, s, Ar- CH_3), 2.27 (3H, s, Ar- CH_3).

2.1.1.3. Síntesis de *N*-(4-toluil)formamida (estándar analítico)

Dado que es esperable un posible producto de reducción parcial del tipo formamida (ver **Esquema 42**), se sintetizó la *N*-(4-toluil)formamida, por acilación de la 4-toluidina con HCOOH en presencia de ZnCl_2 a 70°C por 1h., siguiendo la metodología reportada por Chandra-Shekhar, A. y col. (2009).¹³⁰ Para ello, sobre una mezcla de 4-toluidina (317 mg, 2.6 mmol) y ZnCl_2 (35.4 mg, 0.26 mmol) se agregó gota a gota HCOOH (0.3 mL, 7.8 mmol) con agitación magnética continua durante 10 min. La solución resultante se calentó a 70 °C, y el avance de reacción se monitoreó por TLC (SiO_2 , hexanos:acetato de etilo 2:1) y HPLC. Cuando la reacción se completó (1h 15 min) la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se diluyó con acetato de etilo (40 mL). La capa orgánica se lavó con agua (2 x 10 mL), solución saturada de NaCl (2 x 10 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El solvente fue removido a presión reducida. Se obtuvo *N*-(4-tolil)formamida (330 mg, R: 94%) como un sólido marrón. ^1H -RMN (400 Hz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 8.93 (1H, s br, OH), 8.65 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, (C=O)H), 8.32 (1H, d, $J = 2$ Hz, (C=N)H), 8.12 (1H, s br, NH), 7.45 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 7.16 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 7.12 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH) 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, ArH), 2.35 (3H, s, CH_3), 2.32 (3H, s, CH_3).

¹³⁰ Chandra-Shekhar, A., Ravi Kumar, A., Sathaiah, G., Luke Paul, V., Madabhushi, S., Shanthan Rao, P. (2009) *Tetrahedron Lett.*50:7099.

2.2. RADIOQUÍMICA CON EL PRECURSOR $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

2.2.1. Plataforma automatizada

Para ensayar las marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ se utilizó el módulo automático TRACERlab® FX C Pro, modificado para tal efecto. Se realizó un by-pass del sistema de yodación, con el propósito de dirigir el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ purificado hacia el reactor del módulo. El $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ producido a nivel del ciclotrón, se purificó en un horno de tamices moleculares (**Figura 23, A**) y posteriormente se envió al reactor del módulo (**Figura 23, B**) en corriente de helio (gas portador), barboteándose en la solución de captura o de reacción (precursor orgánico / agente fijador / agente reductor / aditivos). Existen tres reservorios (viales) (**Figura 23, C**) que conectan con el reactor y permiten el agregado adicional de reactivos durante la síntesis. El contenido del reactor puede calentarse y mediante un detector Geiger-Müller se mide la actividad presente en él. Adicionalmente, para algunos ensayos, se instaló una trampa de Ascarita® contenida en una columna (**Figura 23, D**), para ser usada en los casos que se desee evaluar la actividad de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ no atrapada por la solución (dicha columna deja el reactor como un sistema abierto a la atmósfera, por lo cual es posible removerla y conectar el reactor en su configuración original cuando se desee cerrar el sistema). El agregado de los reactivos en el reactor (soluciones) se realizó a través de una abertura del reactor para tal fin, siempre con atmósfera positiva de helio.

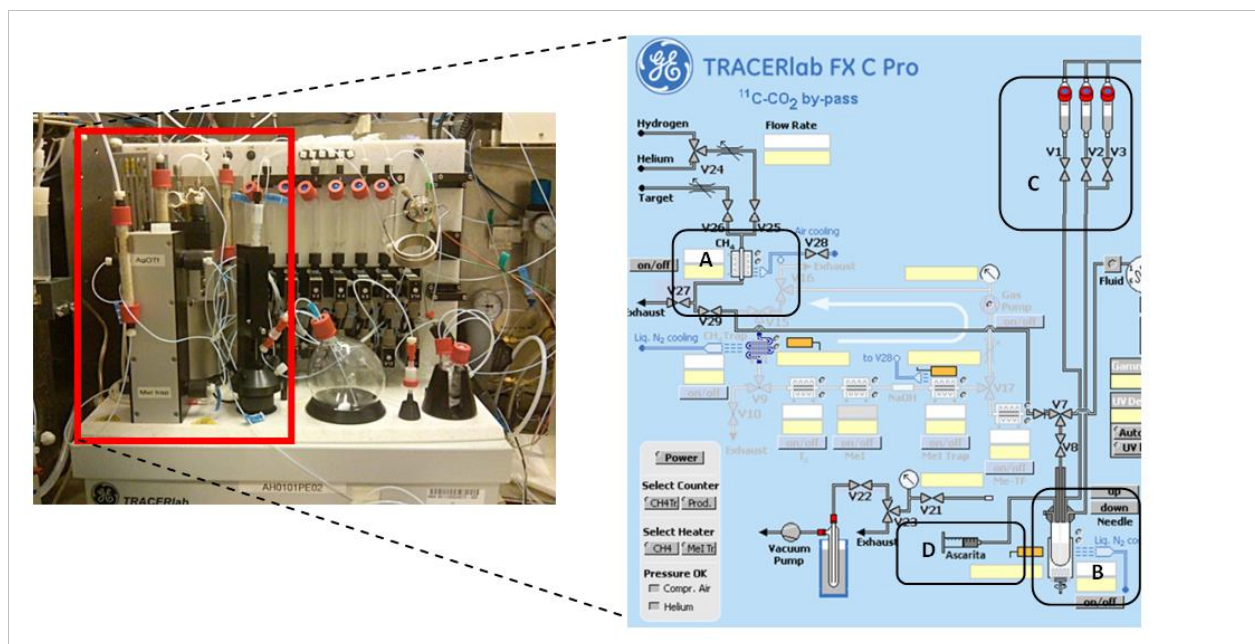


FIGURA 23. Modificaciones de la plataforma comercial TRACERlab® FX C Pro para llevar a cabo las marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

2.2.2. Operaciones preliminares sobre el módulo

A los efectos de maximizar el rendimiento de purificación del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en el horno de tamices moleculares, se implementó un acondicionamiento de los mismos previo a realizar las marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Dicho acondicionamiento tiene como objetivo remover toda traza de humedad, de CO_2 estable y de cualquier otro contaminante volátil que interfieran con la purificación del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. El mismo consistió en calentar los tamices moleculares a $350\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos bajo corriente de helio (40 mL/min), y posteriormente enfriar los tamices hasta temperatura ambiente en atmósfera de helio.

Paralelamente al acondicionamiento, se efectuó el secado del reactor. Éste se enjuagó con acetona ppa. (aproximadamente 15 mL) y luego se secó primero bajo corriente de He (5 min) a $100\text{ }^\circ\text{C}$ y luego vacío a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20-30 min (de tal manera que se alcance una presión de 2-4 kPa). Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar bajo atmósfera de He (260 kPa) hasta alcanzar temperatura ambiente. Un sensor de flujo de He conectado a la entrada de este gas permitió detectar fugas y por lo tanto controlar la hermeticidad del sistema. Si el flujo de He que presuriza el reactor es menor a 1.5 mL/min, se considera que el sistema es hermético.

2.2.3. Purga del target y las líneas target-módulo para la disminución de la concentración de CO_2

Para disminuir la concentración de CO_2 estable del sistema target-líneas-módulo se siguió el protocolo descrito por nuestro grupo en Savio, E. y col. (2012)¹³¹. En resumen: el contenido del target se envió al horno de tamices moleculares del módulo, la cual se encuentra a $350\text{ }^\circ\text{C}$ bajo flujo de helio (40 ml / min) y ser enviado al WASTE ("flush frío"). Inmediatamente antes de comenzar la irradiación para la radiosíntesis, el target se bombardeó a 70 μA durante 5 minutos, y su contenido se envió directamente a al WASTE ("flush caliente").

2.2.4. Preparación de las soluciones de marcación con DBU / PhSiH_3 / ZnCl_2

Sobre una solución de 4-toluidina (3 mg, 0.03 mmol), disuelta en el disolvente elegido (500 μL), se agregó ZnCl_2 (4.0 mg, 0.03 mmol). A dicha solución se añadió posteriormente DBU (7.5 μL , 0.06 mmol de tal manera de lograr una concentración 0.12 M) y por último PhSiH_3 (20 μL , 0.21 mmol), bajo atmósfera inerte. La solución resultante se mezcló con un agitador de vórtex, se tomó con una jeringa, se cargó en el reactor del módulo TRACERlab®.

2.2.5. Preparación de las soluciones de marcación con IPr / PhSiH_3 / ZnCl_2

Sobre una solución de 4-toluidina (3 mg, 0.03 mmol) o 6-OH-BTA-0 (3 mg, 0.01 mmol), disuelta en diglyme (99.5%, 100 μL), se agregó ZnCl_2 (4.0 mg, 0.03 mmol) y por último PhSiH_3 (20 μL , 0.21 mmol), bajo atmósfera inerte. La solución resultante se mezcló con

¹³¹ Savio, E., García, O., Trindade, V., Buccino, P., Giglio, J., Balter, H., & Engler, H. (2012) In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1509, No. 1, pp. 185-189). AIP.

un agitador de vórtex, se tomó con una jeringa, se cargó en el vial 2 del módulo TRACERlab®. Paralelamente, una solución de IPr (97%, 4.4mg, 0.01 mmol) en el disolvente elegido (400 µL) preparada bajo atmósfera inerte, se colocó en el reactor del módulo TRACERlab®.

2.2.6. Preparación de las soluciones de marcación con PhSiH₃ / TBAF.

Sobre una solución de 4-toluidina (5 mg, 0.05 mmol) o 6-OH-BTA-0 (5 mg, 0.02 mmol) se añadió PhSiH₃ (74 uL, 0.6 mmol) lentamente en el disolvente de elección (500 µL), bajo atmósfera inerte. La solución se mezcló vigorosamente usando un agitador de vórtice y luego se añadió cuidadosamente TBAF 1,0 M en THF (10 µL, 0.01 mmol) sobre la mezcla. Evolución del gas o cambios de color se observaron generalmente durante este paso. La solución resultante se mezcló con un agitador de vortex, se tomó con una jeringa, se cargó en el reactor del módulo TRACERlab®. En los experimentos en los cuales se evaluó el parámetro A_M, la solución se desgasificó con helio (40 ml/min) durante 5 minutos, idealmente no más de 5 minutos antes del final del bombardeo (EOB).

2.2.7. Metodología para la radiosíntesis de N-[¹¹C-metil]-4-Toluidina

El [¹¹C]CO₂ producido a nivel del target (Actividad EOB: A₀) se envió al módulo y se atrapó en el horno de tamices moleculares a temperatura ambiente para su purificación. La duración del envío es de aproximadamente 3 min. El horno de tamices moleculares se calentó luego a 350 °C para desorber [¹¹C]CO₂ purificado, que se transfirió bajo corriente de helio (15 ml/min) al reactor donde se colocó la solución conteniendo la amina sustrato a estudiar. La captura se realizó a temperatura ambiente. La actividad de [¹¹C]CO₂ atrapada fue monitoreada y registrada. Una vez que se completó la captura (se alcanza una plateau de actividad máxima A_T), el reactor se selló y la solución se calentó hasta la temperatura elegida. En los casos en que se realizó segregación de reactivos, es en este momento donde sobre la solución de captura del [¹¹C]CO₂ se agregó la solución de precursor orgánico, el agente reductor y el Acido de Lewis. Con el fin de evaluar las eventuales pérdidas de [¹¹C]CO₂ durante el calentamiento de la solución, se registró el "inicio de la actividad de marcado" (A_{SOL}) una vez que la temperatura alcanzó el valor deseado, y de la misma manera, la actividad de "final de marcado" (A_{EOL}) una vez que se terminó el tiempo de marcado. En ese momento, la solución se enfrió aproximadamente a 70 °C y se diluyó con 0.5 ml del mismo disolvente utilizado en la etapa de radiomarcado. La solución se recogió en un vial, se midió su actividad (A_{VIAL}) y se realizaron análisis de HPLC para determinar la proporción radioquímica relativa de las especies generadas.

2.2.8. Radiosíntesis automatizada de [¹¹C] PiB

El mismo protocolo descrito anteriormente se realizó utilizando 6-OH-BTA-0 (>95%) como precursor, disuelto en el disolvente de elección (500 µL). Una vez finalizada la etapa de marcado, la solución se enfrió y se envió al vial de pre-inyección. El reactor se enjuagó con acetona (1 ml) del vial 3 y luego se combinó con el crudo a nivel del vial pre-inyección. Las fracciones combinadas se inyectaron en la HPLC. La separación de [¹¹C]PiB se llevó a cabo

utilizando MeCN: H₂O (50:50 v/v) a un flujo de 4 ml/min (t_R en esas condiciones: 8.5 - 9.5 min). La fracción conteniendo [¹¹C]PiB se recogió en 50 ml de agua para inyección y luego se pasó a través de un cartucho SPE (Sep-Pak® light C18, acondicionado previamente con EtOH 5 mL y H₂O 10 mL, seguido de aire para remover exceso de H₂O). El exceso de disolvente de HPLC se lavó con agua para inyección (10 ml). [¹¹C]PiB se eluyó del cartucho SPE con 0.9 ml de etanol absoluto y se recogió en 5 ml de solución salina precargada. Además, se utilizaron 4 ml de solución salina para enjuagar el cartucho SPE. La solución de [¹¹C]PiB formulado se filtró a través de un filtro esterilizante de 0.22 µm. El volumen total de radiofármaco (~10 ml) se recogió en un vial estéril. El tiempo total de radiosíntesis fue de aproximadamente 32 minutos (desde EOB) o 25 minutos (desde el final de la captura de [¹¹C]CO₂).

2.2.9. Controles de Calidad fisicoquímicos

La PRQ se determinó utilizando HPLC analítico con detección UV y gamma en serie. Para el sustrato modelo 4-toluidina, se utilizó una condición isocrática con buffer CH₃COONH₄ / CH₃COOH 0.1 M, (pH = 5.0) y MeCN (40:60 v/v) a flujo 1.2 mL/min. Para [¹¹C]PiB, se utilizó una condición isocrática con H₂O y MeCN (50:50 v/v) a flujo 1.2 mL/min. El equipo utilizado para estos análisis fue un Shimadzu UFLC equipado con detector UV y gamma (Lablogic Flow RAM HPLC detector).

La PRQ fue calculada considerando el área del pico correspondiente al analito buscado, en relación a la suma de las áreas de todos los picos del cromatograma gamma. La identidad de los productos radiactivos fue confirmada por comparación de sus t_R en relación a la elución de los estándares no radiactivos. La detección UV fue a 270 nm para los experimentos usando 4-toluidina como sustrato, y 340 nm para 6-OH-BTA-0.

2.2.10. Controles de Calidad fisicoquímicos para [¹¹C]PiB en producciones completas

Además de los controles ya mencionados en el apartado anterior, se determinaron otros parámetros de calidad para las producciones completas de [¹¹C]PiB producidos por el método de fijación-reducción con TBAF / PhSiH₃, que se detallan a continuación:

La A_M fue calculada considerando la actividad de [¹¹C]PiB EOS multiplicada por su PRQ en relación a la cantidad molar de PiB en la muestra (determinada a través de una curva de calibración realizada con estándares de PiB, en el rango de concentraciones 1 µg/mL a 500 µg/mL).

Los solventes residuales y reactivos volátiles fueron analizados mediante cromatografía gaseosa (GC) de acuerdo a los lineamientos del capítulo <467> de la USP. Se utilizó una columna DB-WAX 30 m de longitud, 0.53 mm de diámetro y 1.00 mm de espesor de film (Agilent). El programa de temperatura utilizado en el GC fue un gradiente de 40 °C (mantenido por 2 min) aumento de 1 °C/min hasta 44 °C, aumento de 20 °C/min hasta 200 °C (mantenido por 2 minutos), con helio (11.3 mL/min) como gas portador. Los análisis fueron realizados en un Shimadzu GC-2010 Plus equipado con detector de ionización de llama (FID).

La apariencia de la solución se controló por medio de inspección visual. El pH se determinó por medio de tiras reactivas (Merck). La pureza radionucleídica se analizó por medio de espectroscopía gamma en un espectrómetro 1023-channel Ortec con cristal 1"×1" Na(Tl)I. La identidad radionucleídica se determinó midiendo el $t_{1/2}$ físico por medio de medidas a 5 minutos de la actividad de una muestra, en una cámara de ionización Capintec CRC 25.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2. METODOLOGÍAS ORGÁNICAS Y ANALÍTICAS

3.2.1. Síntesis orgánica de estándares

A los efectos de contar con estándares para realizar el seguimiento de la N - ^{11}C -metilación de la 4-toluidina, se sintetizó la N -metil-4-toluidina. Dicho compuesto fue obtenido en bajo rendimiento (2%), pero en cantidad suficiente para ser usado para identificar a la N - ^{11}C -metil-4-toluidina por medio de HPLC.

La estructura química de este compuesto fue verificada por experimentos espectroscópicos de ^1H -RMN monodimensional (ver ANEXO 1 de este capítulo). El análisis por ^1H -RMN evidenció la presencia del compuesto N,N -dimetilado (N,N -dimetil-4-toluidina) como impureza (en relación aproximada respecto a la N -metil-4-toluidina de 1 a 8). A modo de ejemplo los protones del metilo unido al anillo aromático dan señales a dos desplazamientos químicos ligeramente distintos (2.27 ppm y 2.29 ppm) cuya integración resultó ser 0.4H y 3H (relación 1:7.5). Similar relación entre las áreas de integración se observó en los protones aromáticos. La presencia del compuesto N,N -dimetilado como impureza no se consideró desfavorable para la utilización de N -metil-4-toluidina como estándar de identificación de la N - ^{11}C -metil-4-toluidina por medio de HPLC.

El tratamiento de 4-toluidina con HCOOH en presencia de ZnCl_2 permitió obtener N -(4-toluil)formamida con excelente rendimiento (94%). El análisis del espectro ^1H -RMN permitió confirmar su estructura, evidenciándose que la molécula esperada se encuentra en equilibrio tautomérico con su forma imida (ver ANEXO 1 de este capítulo). Se comparó el espectro ^1H -RMN obtenido para la N -(4-toluil)formamida por el reportado por Das, S. y col.¹³² para la misma especie, encontrándose coincidencia en los desplazamientos químicos de las señales de ambos espectros.

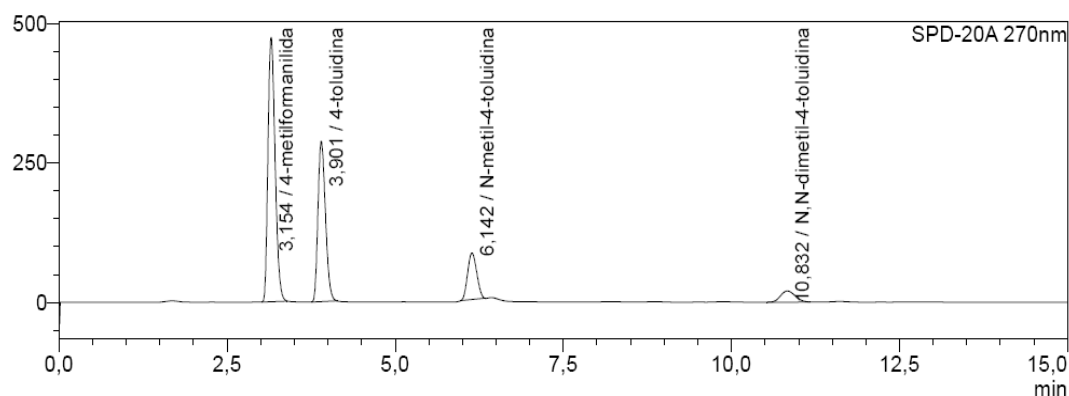
3.2.2. Estándares analíticos en sistema de HPLC

Para el análisis de los estándares analíticos derivados de la 4-toluidina (productos metilados y formilados), se puso a punto un sistema de HPLC utilizando una columna

¹³² Das, S., Bobbink, F.D., Bulut, S., Soudani, M., Dyson, P.J. (2016) *Chem. Commun.*, 52:2497 (Supplementary Information)

Nucleodur 100-5 C18-ec 250 x 4.6 mm column (Macherey-Nagel) en MeCN:Buffer Acetato 0.1M (pH=5) 60:40 (v/v), a flujo = 1.2 mL/min. Los tiempos de retención obtenidos para estos compuestos en este sistema, se muestran en la **Tabla 12**. El sistema de HPLC encontrado permitió resolver en forma satisfactoria todos los compuestos pasibles de ser encontrados en los sistemas radioquímicos a estudiar. El orden de elución obtenido en este sistema de HPLC estuvo en concordancia con el esperado de acuerdo a la polaridad de los compuestos, y su interacción con una fase reversa (C₁₈).

TABLA 12. Tiempos de retención y máximos de absorción UV de los estándares en el sistema HPLC



Especie	t_R (minutos)
4-toluidina	3.9
<i>N</i> -metil-4-toluidina	6.1
<i>N,N</i> -dimetil-4-toluidina	10.8
<i>N</i> -(4-toluil)formamida	3.1

3.2. RADIOQUÍMICA CON EL PRECURSOR $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

3.2.1. Estrategias de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con DBU / PhSiH_3

3.2.1.1. Fisicoquímica de la Captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Inicialmente, se estudió la influencia de determinados factores físicos, tales como volumen de solución, flujo de gas portador y temperatura de recolección) en la captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en un medio que permita atraparlo eficientemente (solución de NaOH 0.1 M, **Esquema 24**). Los resultados se resumen en la **Tabla 13**, en donde se evaluaron parámetros tales como los que se presentan en las **Ecuaciones (4)** a **(7)**:

- el **porcentaje de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ disponible: D (%)**
$$D (\%) = \frac{A_{R(dc)} + A_{a(dc)}}{A_0} \cdot 100$$
 (4)

(Fracción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ total que se recoge en el reactor y la que escapa del mismo y se atrapa en Ascarita®),

- el **rendimiento de captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$: RC (%)**
$$RC (\%) = \frac{A_{R(dc)}}{A_0} \cdot 100$$
 (5)

(Fracción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ producido en el ciclotrón que queda en el reactor),

- el **porcentaje de pérdida: P (%)**
$$P (\%) = \frac{A_{a(dc)}}{A_{R(dc)} + A_{a(dc)}} \cdot 100$$
 (6)

(Fracción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ total que se atrapa en Ascarita®) y

- el **porcentaje de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ atrapado: A (%)**
$$A (\%) = \frac{A_{R(dc)}}{A_{R(dc)} + A_{a(dc)}} \cdot 100$$
 (7)

(Fracción del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ disponible que queda atrapada en el reactor).

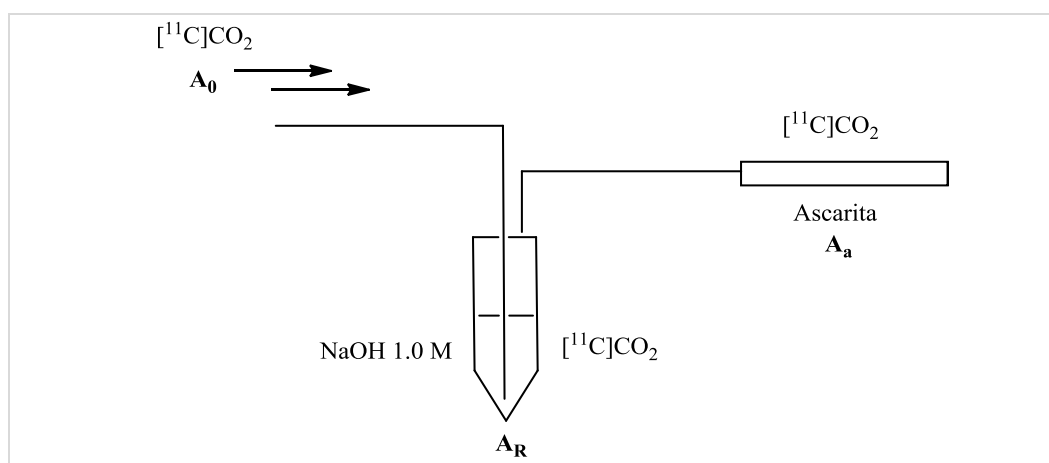


FIGURA 24. Recolección de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en un medio líquido y los parámetros asociados a la misma.

De los resultados obtenidos que se resument en la **Tabla 13**, se evidenció que si bien todas las condiciones resultaron satisfactorias para capturar $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, la condición más adecuada para tal fin se da cuando el volumen de captura se lleva a 500 μL . La disminución en el flujo de gas portador o en la temperatura de captura no tuvieron un impacto positivo en el

atrapamiento del precursor radiactivo. Si bien el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ disponible presenta una variación importante, ello se debe a la performance de los tamices moleculares encargados de la purificación inicial del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a nivel del módulo (de allí que también el RC sea variable). No obstante, en todos los casos el porcentaje atrapado A(%) resultó elevado y poco afectado por las variables estudiadas.

TABLA 13. Influencia de algunos parámetros físicos en la captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Medio de captura	Vol. (μL)	Flujo He (mL/min)	Temp. captura ($^{\circ}\text{C}$)	D (% dc)	RC(% dc)	P (% dc)	A (% dc)
NaOH 1.0 M	400	15	22 - 25	57.6	47.6	7.2	88.9
NaOH 1.0 M	500	15	22 - 25	83.7	57.6	0.1	99.9
NaOH 1.0 M	400	5	22 - 25	40.8	29.6	0.8	98.1
NaOH 1.0 M	400	15	0 - 2	9.4	6.3	0.0	99.7

Un análisis por HPLC de la solución de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en NaOH 1.0 M mostró una especie única de $t_R = 3.8$ min, que fue atribuida a la formación de $[^{11}\text{C}]\text{H}_2\text{CO}_3$ (producto de la reacción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con agua) (**Figura 25**).

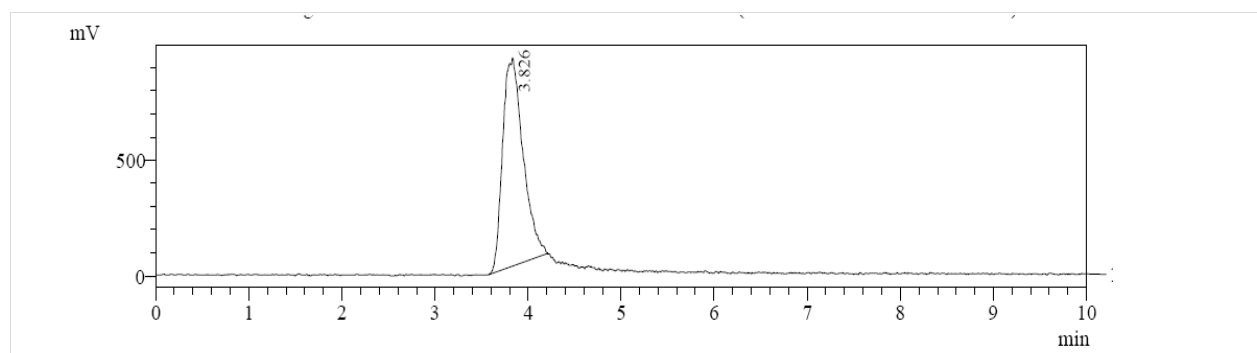


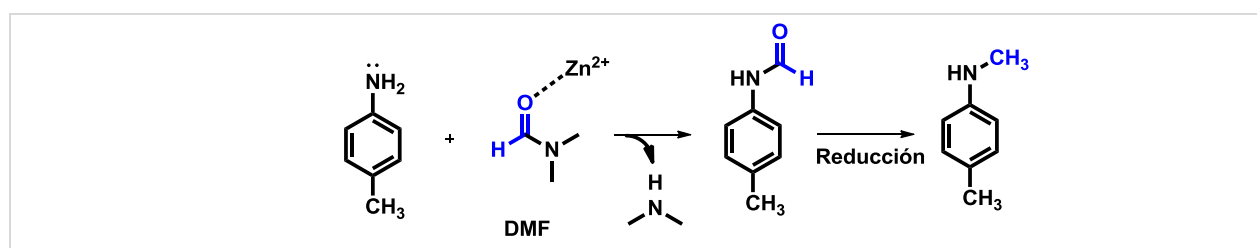
FIGURA 25. Cromatograma gamma correspondiente al atrapamiento de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en NaOH 1.0 M

3.2.1.2. Radioquímica de la Fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con DBU

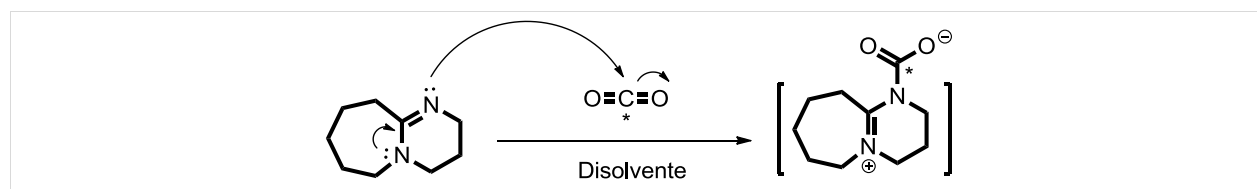
En función de los antecedentes bibliográficos mencionados en el capítulo introducción, respecto al uso de DBU como fijador tanto de CO_2 como de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, se decidió utilizar esta base como agente fijador para las primeras experiencias de fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. En tal sentido, se ensayaron soluciones 0.1 M del mismo en diferentes disolventes como medio de captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. (**Esquema 44**)

En virtud de lo publicado en la literatura, se eligieron disolventes polares apróticos con alto punto de ebullición (MeCN, DMF y diglyme), los cuales pueden presentar en algunos

casos mejor solubilidad hacia el dióxido de carbono, menor competencia de reactividad por el mismo y sus intermedios de reacción, así como mayor rango para ensayos en función de la temperatura. El uso de DMF es, en principio, desfavorable pues se trata de una fuente potencial de C (estable) que compite con el CO₂ a los efectos de producir un intermedio *N*-formilado¹³³ (**Esquema 43**). Es necesario recordar que la incorporación de C estable en las reacciones de marcación conduce en principio a una baja actividad molar y esto no es deseable para los radiotrazadores que se unen *in vivo* a dianas saturables. Es necesario destacar también que al utilizarse [¹¹C]CO₂ en las reacciones de marcación, éste se encuentra en cantidades nanomolares, por lo cual cualquier especie que compita con él estará en notorio exceso estequiométrico. A pesar de esta posible desventaja de la DMF, también se lo incluyó en el estudio considerando su posible utilización en algunos sistemas moleculares en los cuales la A_M no sea un parámetro crítico. Los resultados de estas experiencias se resumen en la **Tabla 14**.



ESQUEMA 43. Mecanismo propuesto para la transformilación de la amina modelo en DMF



ESQUEMA 44. Fijación de [¹¹C]CO₂ (C* = ¹¹C) con DBU, por medio del aducto DBU-[¹¹C]CO₂

¹³³ [a] Srinivas, M., Hudwekar, A. D., Venkateswarlu, V., Reddy, G. L., Kumar, K. A. A., Vishwakarma, R. (2015) *Tetrahedron Lett.* 56: 4775; [b] Da-Wei Gu, Xun-Xiang Guo (2015) *Tetrahedron*.71: 9117; [c] Cai, L.S., Rong, X., Xuelei, G., Pike, V.W. (2012) *Eur. J. Org. Chem.* 13030

TABLA 14. Propiedades fisicoquímicas de diferentes disolventes en ausencia o presencia de DBU^[a]

Solvente	PEb (°C)	D (% dc)	RC (% dc)	P (% dc)	A (% dc)
MeCN	81.6	31.9	1.1	42.2	2.6
MeCN + DBU		37.3	37.3	15.3	68.8
DMF	153.0	33.6	0.9	46.3	2.0
DMF + DBU		26.3	15.3	20.4	42.8
diglyme	162.0	27.2	0.5	36.4	1.3
diglyme + DBU		30.5	0.4	41.0	1.0

[a] Conc. DBU: 0.1 M. Volumen solución: 400 µL. Flujo de He: 15 mL/min. Temperatura de recolección: 25 °C

Se observó que todas las soluciones de DBU (excepto la de diglyme) atraparon significativamente [¹¹C]CO₂ en relación al disolvente puro. En el caso de la diglyme, la actividad de [¹¹C]CO₂ alcanza un máximo y rápidamente decrece (**Figura 26**, [a]) lo que estaría indicando que existe pérdidas de [¹¹C]CO₂ (se espera que la actividad de un precursor de ¹¹C decrezca en función de su t_{1/2}, cualquier disminución cuya cinética no sea la propia del ¹¹C indica fuga o pérdida de la especie radiactiva).

El perfil de actividad en el reactor vs. tiempo para la solución de DBU en MeCN se muestra en la **Figura 26**, [b]. A diferencia del comportamiento observado para la actividad vs. tiempo en diglyme, en este caso se observó que la actividad permanece en el reactor en el intervalo temporal considerado, lo cual se interpretó como una fijación eficaz de [¹¹C]CO₂ en este medio.

Las soluciones de DBU en diglyme y MeCN también se analizaron por HPLC (detección gamma) y en ellas también se observó una especie de t_R = 3.8 min, igual al obtenido para la especie formada por atrapamiento de [¹¹C]CO₂ en NaOH 1.0 M. Se interpretó que esta especie podría ser nuevamente [¹¹C]H₂CO₃, producto de la hidrólisis completa del aducto DBU-[¹¹C]CO₂ en el medio ligeramente ácido (pH = 5) de la fase móvil del sistema de HPLC utilizado (**Figura 27**).

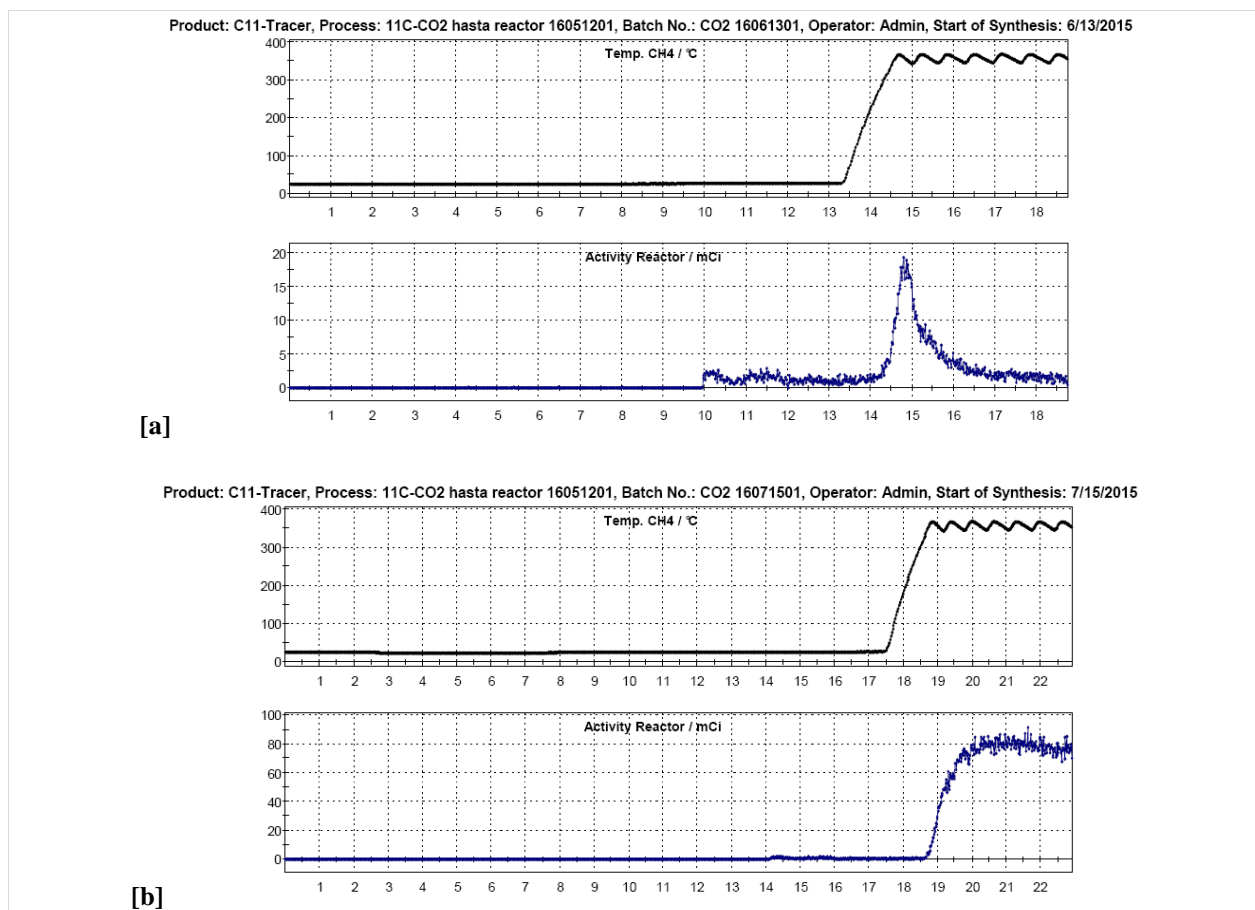


FIGURA 26. Perfiles de Actividad (gráfica “Activity Reactor (mCi)”) para la solución de DBU- $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en [a] diglyme y [b] MeCN.

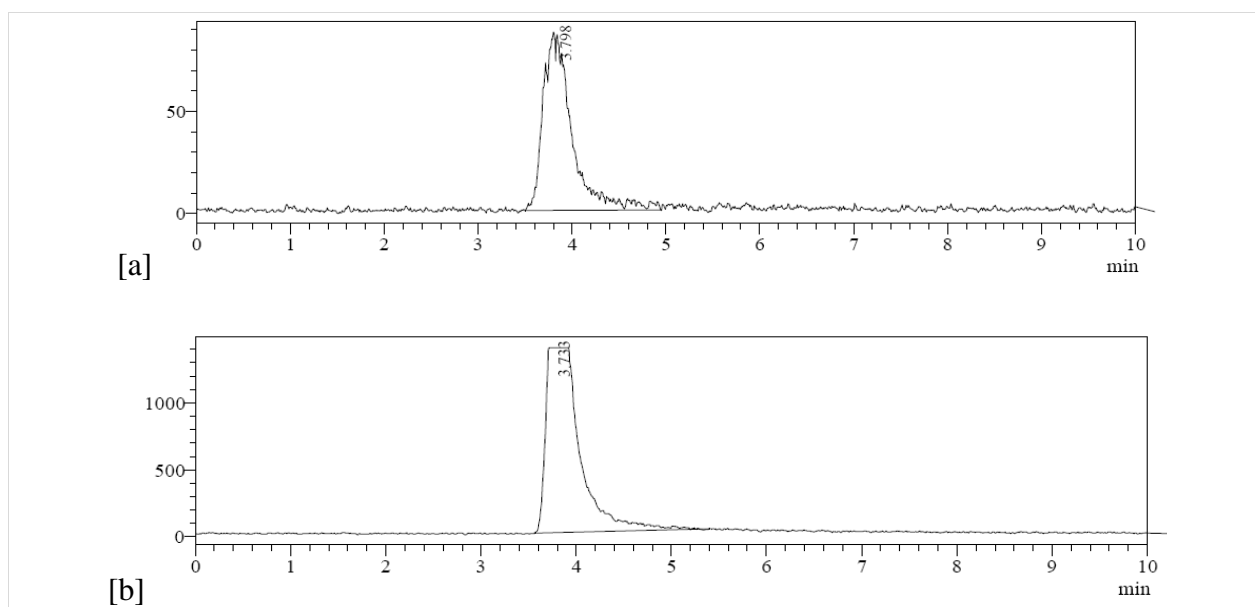
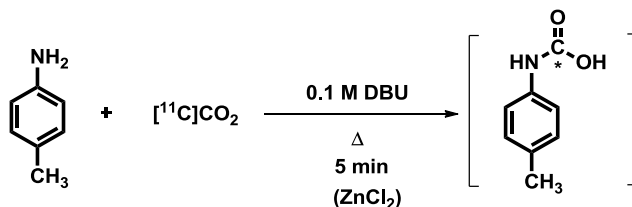


FIGURA 27. Análisis por HPLC gamma de las soluciones de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en [a] diglyme + 0.1M DBU, y [b] MeCN + 0.1M DBU

3.2.1.3. Radioquímica de la fijación-transferencia de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

Con el fin de estudiar la transferencia de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ desde el aducto DBU- $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ a la amina del modelo de reactividad (4-toluidina), se llevaron a cabo tres experimentos incubando masas variables de 4-toluidina en presencia de DBU- $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ y calentando durante 5 minutos a 80 °C o 120 °C (según sea el disolvente MeCN o DMF respectivamente). La mezcla de reacción se analizó por HPLC con detección gamma y los resultados se presentan en la **Tabla 15**. La especie predominante (> 90%) observada en todos los casos fue aquella de $t_R = 3.8$ min, atribuida a $[^{11}\text{C}]\text{H}_2\text{CO}_3$, acompañada de una especie minoritaria de $t_R = 2.2$ min (**Figura 28**). Se planteó como hipótesis que esta especie minoritaria podría corresponder al ácido *N*-(4-toluil)- $[^{11}\text{C}]\text{carbámico}$ (Ver esquema en **Tabla 15**). En base a estos hechos, puede plantearse que, de formarse, el ácido *N*-(4-toluil)- $[^{11}\text{C}]\text{carbámico}$ carece de estabilidad tanto en el medio de reacción (lo que explica las pérdidas de actividad a nivel del reactor durante el calentamiento, **Figura 29**), o bien en el medio ácido de la fase móvil del sistema analítico de HPLC. Un aumento de la masa de la amina sustrato (de 1.0 mg a 3.0 mg), mostró ser ligeramente favorable para la formación de la especie de $t_R = 2.2$ min en MeCN, no así en DMF. El agregado de ZnCl_2 no mostró ser favorable para la formación de dicha especie. Llamó la atención el comportamiento del sistema cuando el solvente fue DMF, donde las pérdidas de actividad por volatilización fueron considerablemente menores que en MeCN.

TABLA 15. Fijación – Transferencia de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ desde su aducto con DBU a la 4-toluidina con el ácido *N*-(4-toluil)- $[^{11}\text{C}]\text{carbámico}$ como producto esperado ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$)



Masa de 4-toluidina (mg)	Solvente	Temperatura de calentamiento (°C)	Perdida de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ durante calentamiento ^[a]	Especies en HPLC gamma (t_R , %)
1.0	MeCN	80	83%	2.17 min (0.9%), 3.76 min (99.1%)
3.0	MeCN	80	75%	2.20 min (5.0%), 3.80 min (95.0%)
3.0	DMF	120	33%	2.24 min (1.1%), 3.84 min (98.9%)
3.0	MeCN ^[b]	80	75%	3.80 min (100%)

[a] Perdida durante calentamiento hace referencia a $[A_{\text{inicial}} - A_{\text{remanente}} (t = 5 \text{ min})] / A_{\text{inicial}}$. De sólo existir decaimiento este valor sería 15.6%. [b] Agregado de 5.0 mg de ZnCl_2

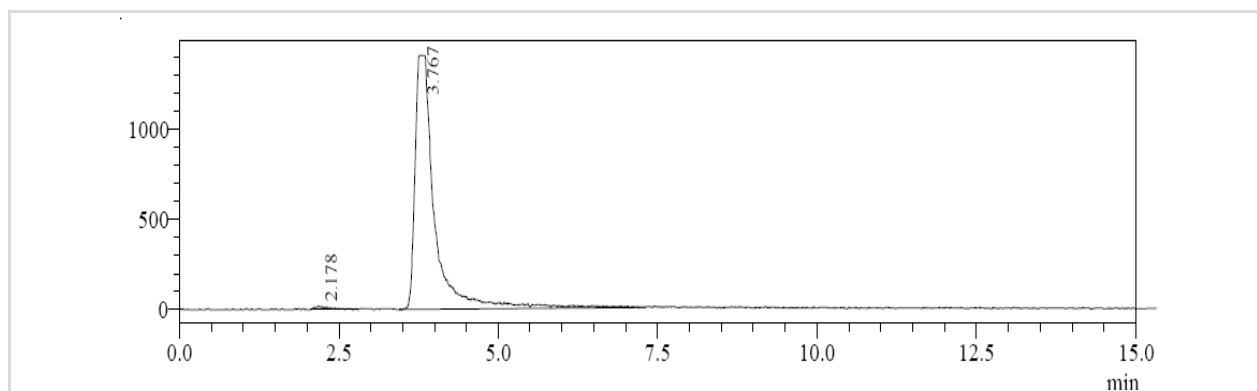


FIGURA 28. 4-Toluidina (1 mg) en MeCN + 0.1M DBU, con 5 min de calentamiento a 80 °C. HPLC gamma de la solución luego del calentamiento.

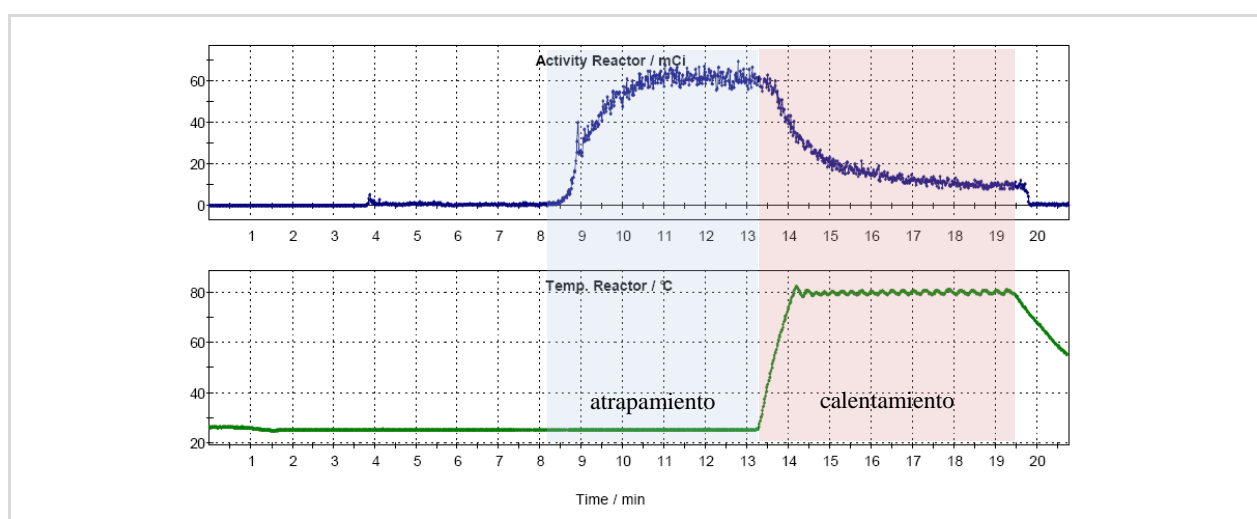


FIGURA 29. 4-Toluidina (1 mg) en MeCN + 0.1M DBU, con 5 min de calentamiento a 80 °C. [a] Perfil de la actividad en el reactor y su temperatura en función del tiempo. Se aprecia la pérdida de actividad a partir del calentamiento a 80 °C.

Es pertinente aclarar que el ácido *N*-(4-toluil)- ^{11}C carbámico no ha sido caracterizado como tal y las referencias a su existencia en la literatura siempre son a modo de hipótesis. Aun cuando los resultados anteriores no fueron alentadores, se continuó adelante asumiendo que en un medio donde el ácido ^{11}C carbámico en cuestión fuera transformado en sus contrapartes reducidas (^{11}C formamida y ^{11}C metilamina) los resultados serían más favorables.

3.2.1.4. Radioquímica del proceso de fijación-transferencia-reducción de ^{11}C CO₂ en el sistema molecular modelo

En esta etapa, se estudió la radioquímica del proceso completo que comprende la fijación de ^{11}C CO₂, su transferencia a la amina en estudio y la reducción a ^{11}C -metilo. Se analizó el crudo de reacción por HPLC (con detección gamma) para evaluar la pureza radioquímica (PRQ) de la *N*- ^{11}C metil-4-toluidina formada. El rendimiento radioquímico (RRQ) se calculó como la relación entre la actividad de *N*- ^{11}C metil-4-toluidina formada y la actividad de ^{11}C CO₂ atrapado en solución (corregido por decaimiento) (**Ecuación 8**).

$$RRQ (\%) = \frac{A_{crudo} \cdot PRQ (\%)}{A_{[^{11}C]CO_2 (atrap,dc)}} \cdot 100 \quad (8)$$

El remanente luego de la marcación se calculó como la actividad presente en el reactor al finalizar el tiempo de calentamiento (A_{EOL}) en relación a la actividad presente en el mismo al comenzar el calentamiento (A_{SOL}) (**Ecuación 9**).

$$Remanente (\%) = \frac{A_{EOL}}{A_{SOL}} \cdot 100 \quad (9)$$

En la **Tabla 16** se resumen los resultados obtenidos en esta etapa, de los cuales se desprende que se obtuvieron muy bajos rendimientos radioquímicos para la reacción de ^{11}C -*N*-metilación bajo las condiciones ensayadas, utilizando DBU-PhSiH₃ como sistema fijador-reductor, salvo cuando se utilizó ZnCl₂ como aditivo y diglyme como disolvente (RRQ 18.8%, entrada 8, **Tabla 16**).

TABLA 16. Estudio de reactividad en el sistema modelo 4-Toluidina con DBU-ZnCl₂-PhSiH₃



Entrada	Aditivo	Disolvente	Temp. (° C)	Tiempo (min)	Remanente (%)	RC (% dc)	PRQ (%)	RRQ (% dc)
1	-	DMF	120	20	50	64.6	1.2	1.2
2	ZnCl ₂	DMF	120	20	41	35.3	5.9	4.7
3	ZnCl ₂	MeCN	80	5	83	~100	0.8	0.6
4	ZnCl ₂	MeCN	80	10	64	49.1	2.6	1.8
5	ZnCl ₂	MeCN	80	20	50	13.1	4.4	3.9
6	-	MeCN	80	20	50	58.1	3.4	3.3
7	ZnCl ₂	MeCN	100	20	42	51.1	6.0	3.1
8	ZnCl ₂	diglyme	150	20	44	17.3	19.6	18.8
9 ^[a]	ZnCl ₂	diglyme	150	20	50	43.3	5.2	3.0

[a] Agregado por separado: DBU/ diglyme (mezcla de captura-fijación en el reactor, 400 µL)// Amina/PhSiH₃/Aditivo (agregados una vez que el [^{11}C]CO₂ fue atrapado, 100 µL)

De los resultados obtenidos se concluyó que la performance de la marcación dependió fundamentalmente de la temperatura de calentamiento (150 °C, entrada 8, **Tabla 16**), cuando la reacción fue llevada a cabo en diglyme por 20 minutos (**Figura 30**). A pesar de la baja performance anteriormente observada para la fijación de [^{11}C]CO₂ utilizando diglyme como disolvente (ver **sección 3.2.1.2**), en este caso el uso de diglyme resultó ser favorable para la formación de producto *N*- ^{11}C -metilado, probablemente gracias a la alta temperatura de calentamiento que permite alcanzar.

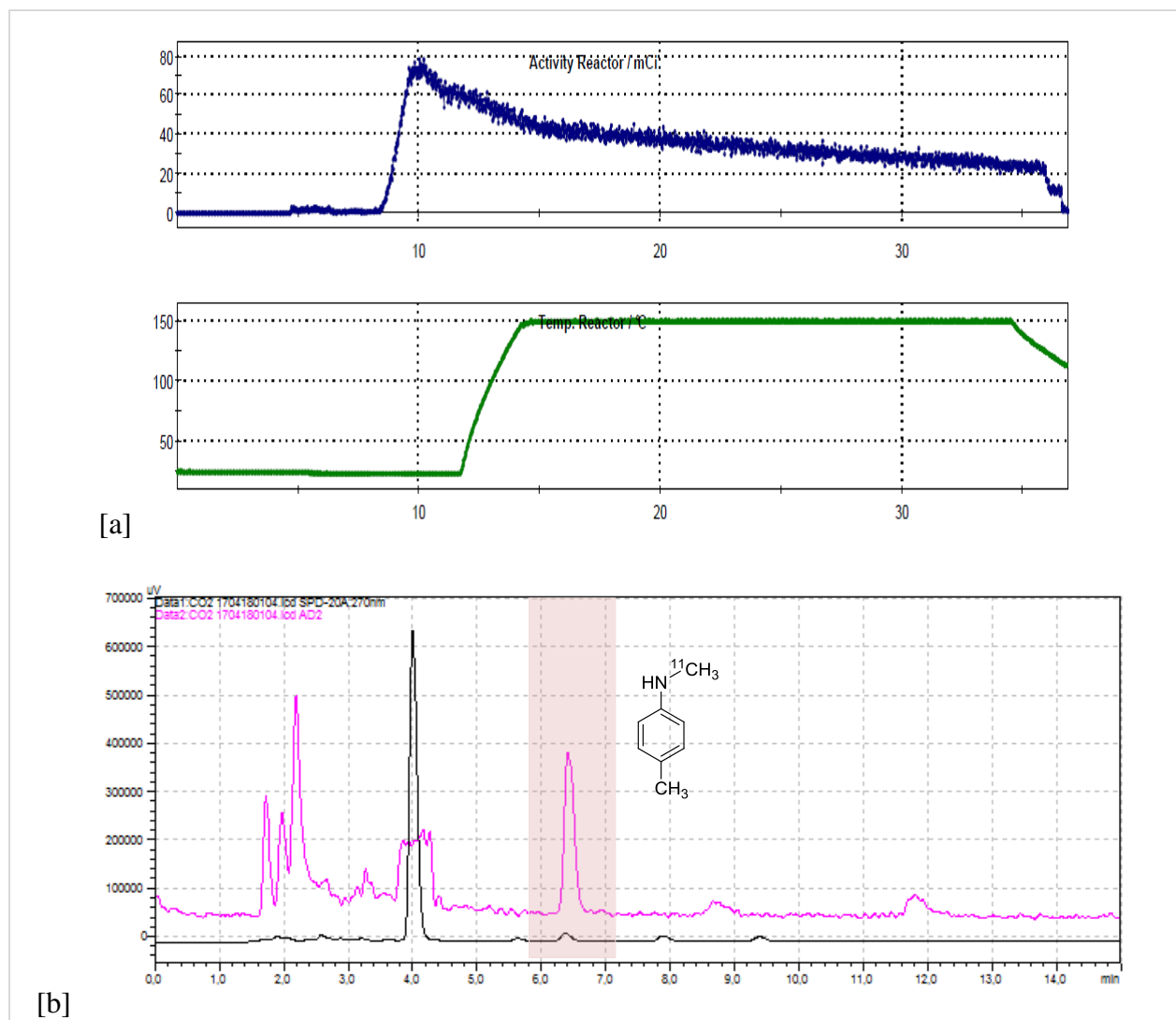


FIGURA 30. Marcación de 4-[^{11}C -metil]-4-toluidina a partir de [^{11}C]CO $_2$ en presencia de DBU/PhSiH $_3$. [a] Perfil de actividad en el reactor vs. tiempo. [b]Cromatograma gamma (magenta) y UV 270 nm (negro). 4-[^{11}C -metil]-4-toluidina: t_R : 6.4 min, PRQ (%): 19.6

En MeCN se observó que el RRQ empeora cuando se utilizan tiempos más cortos (entradas 3, 4 y 5, **Tabla 16**). El agregado de ZnCl $_2$ parece tener cierta relevancia cuando la marcación se lleva a cabo en DMF (entradas 1 y 2, **Tabla 16**), aunque no se constató cambio apreciable cuando el disolvente utilizado fue MeCN (entradas 5 y 6, **Tabla 16**). El agregado de los reactivos Amina/Reductor/Aditivo por separado (entrada 9, **Tabla 16**), a los efectos de no causar posibles interferencias en el proceso de captura-fijación, desfavoreció la reacción de marcación. En la mayoría de los casos, el remanente luego de las marcaciones de 20 minutos es 50% o cercano al 50%, lo cual indica que la radiactividad atrapada disminuye fundamentalmente por decaimiento y no por pérdidas por volatilización, lo que es beneficioso en términos de RRQ.

En la mayoría de los casos, el remanente luego de las marcaciones de 20 minutos es 50% o cercano al 50%, lo cual indica que la radiactividad atrapada disminuye

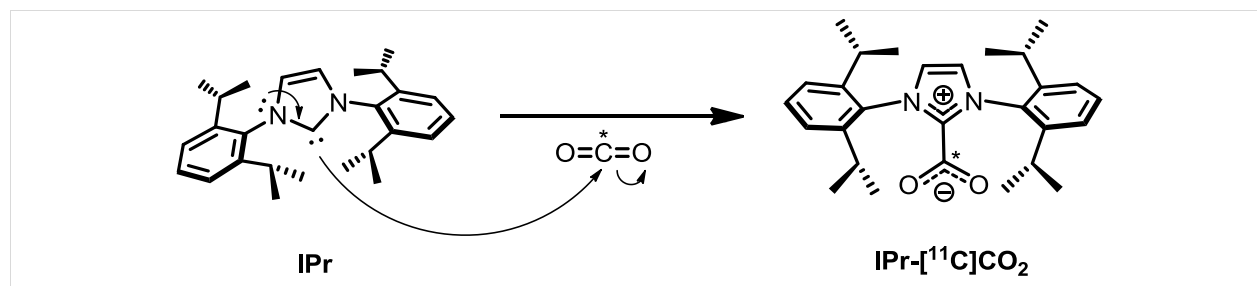
fundamentalmente por decaimiento y no por pérdidas por volatilización, lo que es beneficioso en términos de RRQ.

Con miras a aumentar la PRQ y el RRQ de la fijación-reducción con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, se planteó la posibilidad de explorar otro agente fijador ampliamente reportado en la literatura como lo es el 1,3-bis(2,6-diisopropilfenil)-1,3-dihidro-2*H*-imidazol-2-ilideno (carbeno *N*-heterocíclico, IPr), que por ser una especie portadora de un C sexteto, su basicidad se encuentra incrementada.

3.2.2. Estrategias de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con IPr / PhSiH_3

3.2.2.1. Radioquímica del proceso de fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando IPr

A los efectos de estudiar las propiedades fisicoquímicas del carbeno *N*-heterocíclico como agente fijador, se llevaron a cabo los experimentos que se detallan en las **Tabla 17** y **Tabla 18**. Se debe tener en cuenta que, desde el punto de vista estructural, el aducto $\text{IPr}^+\text{-CO}_2^-$ (**Esquema 45**) puede considerarse un compuesto zwitteriónico formado por el ataque nucleofílico del carbeno sobre carbono electrofílico de la molécula de CO_2 , al igual que el aducto formado por amidinas- CO_2 , del tipo DBU- CO_2 .



ESQUEMA 45. Fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$) con IPr, por medio del aducto $\text{IPr-}[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$

TABLA 17. Fisicoquímica de la fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con carbeno *N*-heterocíclico (IPr) – Ensayos de Captura



Entrada	Agente fijador	Masa (mg)	Solvente	Volumen (μL)	RC (% dc)
1	ASCARITA®	-	-	-	67.9
2	IPr	2.2	diglyme	400	1.5
3	IPr	4.4	diglyme	400	52.7
4	IPr	8.9	diglyme	400	57.1

TABLA 18. Fisicoquímica de la fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con carbeno *N*-heterocíclico (IPr) – Estabilidad térmica e inhibición en medio ácido.^[a]

Entrada	Agente fijador ^[c]	Agente reductor ^[d]	Aditivo ^[e]	RC (% dc)
1	IPr	-	-	50.8
2	IPr	-	HCl conc.	4.5
3	IPr	-	ZnCl ₂	6.2
4 ^[b]	IPr	PhSiH ₃	ZnCl ₂	51.3
5 ^[f]	4-toluidina	-	-	8.1

[a] En diglyme, 500 μL ; 20 min a 150 °C. [b] Agregado por separado: IPr (4.4 mg, 0.01 mmol) / diglyme (mezcla de captura-fijación en el reactor) (400 μL) // PhSiH₃/ZnCl₂ (100 μL , agregados una vez que el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ fue atrapado), [c] masa IPr: 4.4 mg (0.01 mmol), [d] 20 μL (0.21 mmol), [e] HCl conc.: 5 μL (0.055 mmol); ZnCl₂: 4.5 mg (0.035 mmol), [f] masa 4-toluidina: 3.7 mg (0.035 mmol)

La elección de diglyme como disolvente para estudiar la fisicoquímica de la fijación de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con IPr se basó principalmente en el antecedente de Liger, F. y col. (2015) anteriormente citado¹³⁴, así como en los resultados anteriores utilizando DBU (ver apartado anterior).

En primer lugar se observó que la captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ dependió de la masa de carbeno utilizada, aun cuando éste siempre se encuentra en exceso estequiométrico respecto a la especie radiactiva (**Tabla 17**). Si bien derivados de carbeno *N*-heterocíclicos han sido diseñados y aislados como compuestos neutros relativamente estables, generados por la desprotonación de las sales de imidazolio con bases fuertes, estos derivados de carbeno resultan sensibles al aire y la humedad¹³⁵. Por lo tanto, se podría suponer que la pureza del carbeno utilizado sería un factor clave a la hora de promover esta clase de reacciones, condicionando así la masa del producto comercial agregado. La captura utilizando 4.4 mg o 8.9 mg de IPr no presentó grandes diferencias (entradas 3 y 4, **Tabla 17**), y dado que se trata de un reactivo costoso, se decidió trabajar con 4.4 mg en los sucesivos experimentos. La recolección de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ purificado en Ascarita® se realizó para evaluar la performance de los tamices moleculares del módulo utilizado, y tomar el rendimiento de captura obtenido como referencia a tener en cuenta en futuros balances de actividad.

Dado que el carbeno es una base fuerte por su deficiencia electrónica, se estudió el efecto de recoger $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en presencia de otros ácidos. También se estudió la estabilidad térmica de la solución de IPr- $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en las condiciones de marcación establecidas (entrada 1, **Tabla 18**). La solución de IPr- $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ resultó estable térmicamente, permaneciendo un 43% de la actividad atrapada a los 20 minutos (**Figura 31**, [a]).

Observando los rendimientos de captura, se apreció que tanto un medio ácido dado por H^+ o por Zn^{2+} (entradas 2 y 3, **Tabla 18**) desfavorecen la captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, probablemente por competencia de las especies ácidas con el $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ por el carbeno (**Figura 31**, [b] y [c]; **Figura 32**).

¹³⁴ Liger, F. y col. (2015). *Op. cit.*

¹³⁵ Zhou, H.; Zhang, W.Z.; Liu, C.H.; Qu, J.O.; Lu, X.B. (2008) *J. Org. Chem.* 73:8039.

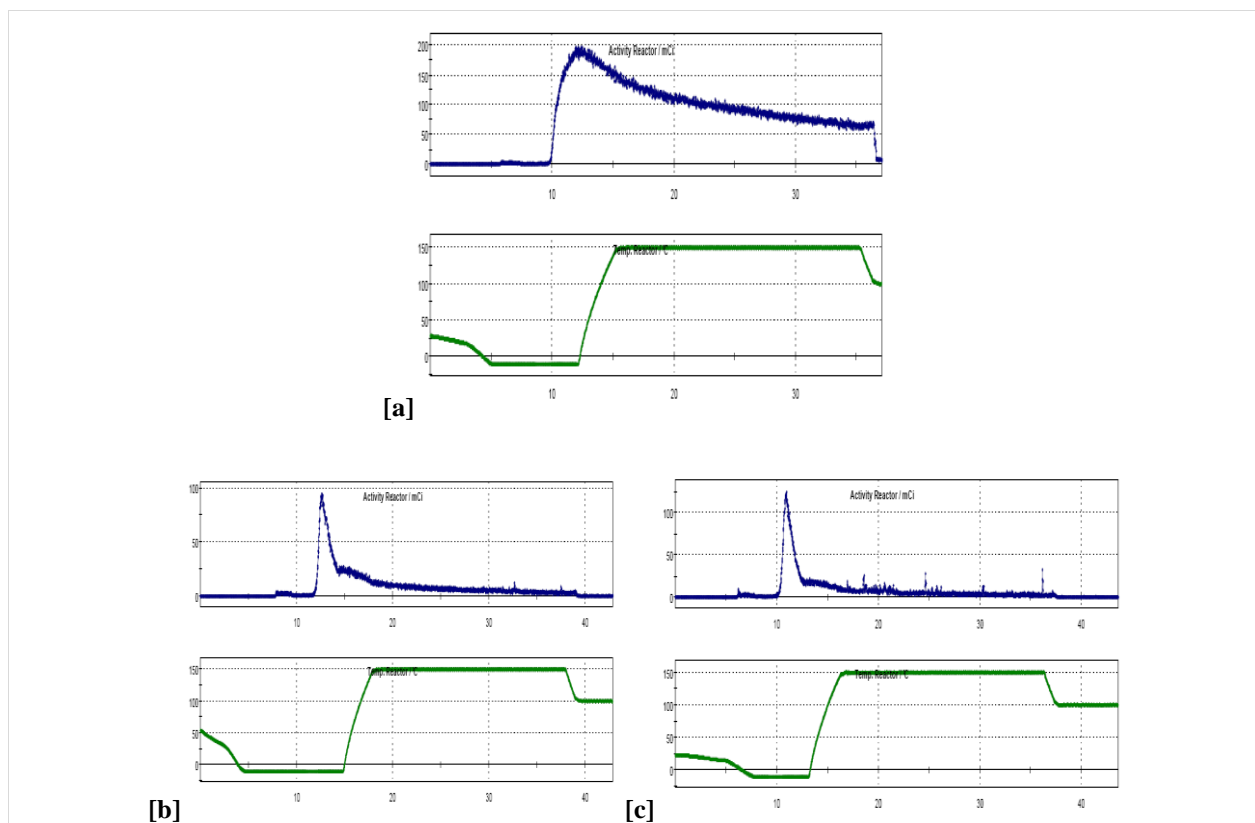


FIGURA 31. Perfiles de actividad vs. temperatura para [a] Solución de IPr- ^{11}C CO $_2$ en diglyme, [b]) ídem [a] pero con agregado de HCl conc. (exceso), [b] ídem [a] pero con agregado de ZnCl $_2$

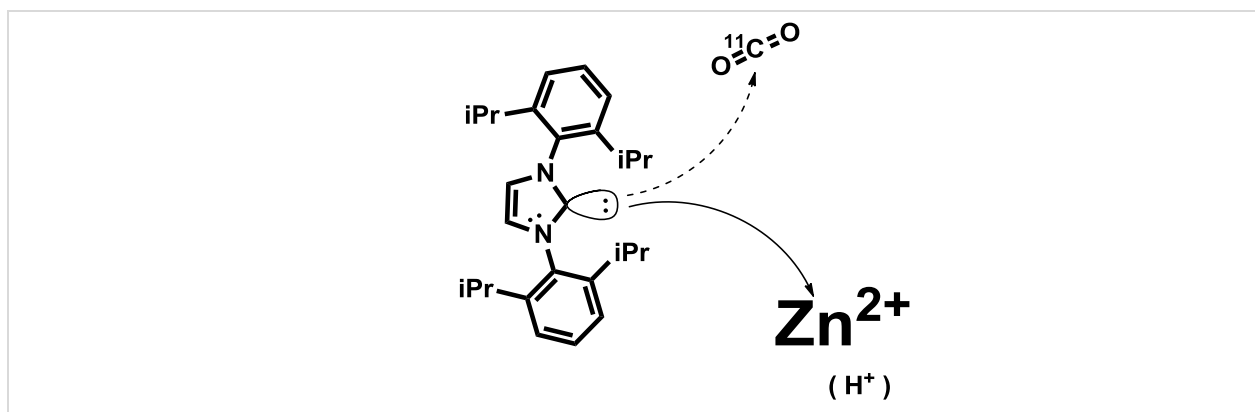
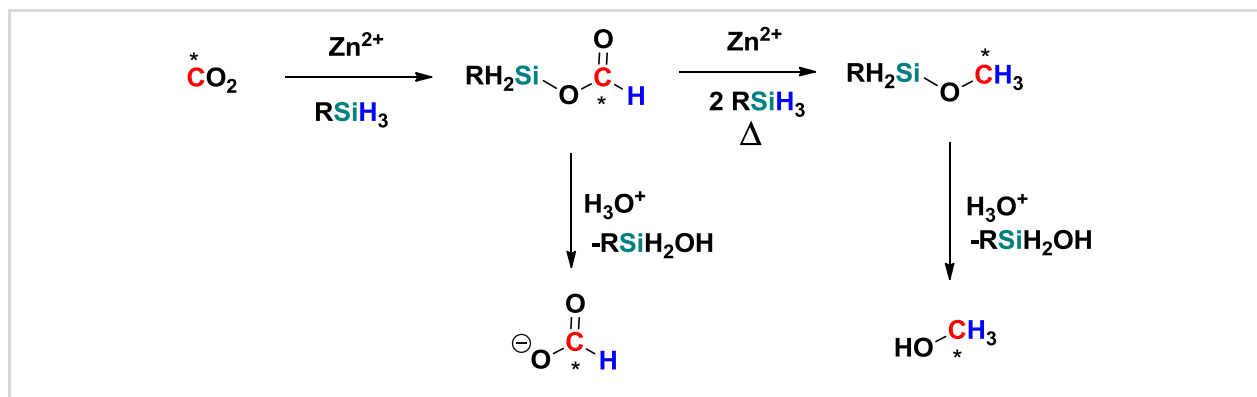


FIGURA 32. Competencia entre Zn $^{2+}$ (o H $^+$) y el ^{11}C CO $_2$ por el carbeno

Cuando en la solución de captura se encontró presente el reductor PhSiH $_3$ y se efectuó el calentamiento a 150 °C por 20 minutos (entrada 4, **Tabla 18**), se observó al HPLC gamma especies no identificadas muy polares de tiempos de retención 1.68 min (16,2%) y 2.15 min (83.7%) (**Figura 33**). Este hecho se interpretó como la presencia de especies reducidas

provenientes de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, derivadas de la eventual hidrólisis de productos ^{11}C -sililados, pasibles de ser formados en tales condiciones¹³⁶ (**Esquema 46**).



ESQUEMA 46. Mecanismo propuesto a partir de las hipótesis mecanísticas planteadas por Jacquet y col. para la metilación de aminas a partir de CO_2 mediada por IPr / ZnCl_2 y RSiH_3 como agente reductor. La hidrólisis del $[^{11}\text{C}]$ formoxisilano y del $[^{11}\text{C}]$ metoxisilano a nivel del HPLC, o bien su descomposición térmica, explicaría la aparición de especies polares tales como $[^{11}\text{C}]$ formiato y $[^{11}\text{C}]$ metanol. ($\text{C}^* = ^{11}\text{C}$)

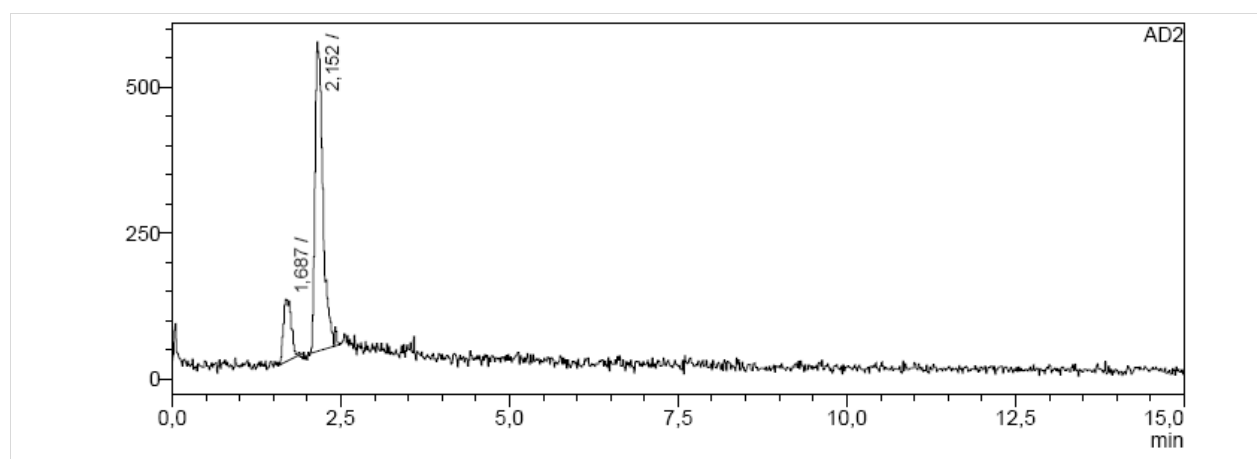


FIGURA 33. IPr- $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en presencia de PhSiH_3 . Las especies polares de $t_R = 1.68$ min y $t_R = 2.15$ min pueden ser atribuidas a productos hidrolizados provenientes del $[^{11}\text{C}]$ formoxisilano y $[^{11}\text{C}]$ metoxisilano respectivamente.

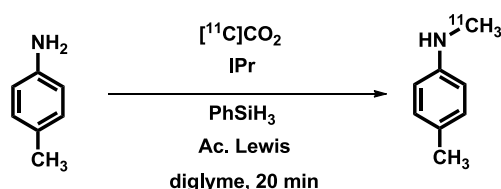
Por último, se observó que la 4-toluidina tiene una pequeña capacidad de capturar $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (entrada 5, **Tabla 18**.) como es de esperar por su baja basicidad en comparación con los agentes fijadores utilizados. Los elevados rendimientos de captura utilizando IPr en relación a aquellos utilizando DBU, impulsaron a centrar la atención en este agente fijador para los futuros experimentos.

¹³⁶ Jacquet, O. y col. (2013) *Op cit.*

3.2.2.2. Radioquímica del proceso de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando IPr / PhSiH_3

Los resultados obtenidos hasta el momento, llevaron a estudiar en profundidad el uso de IPr en diglyme como sistema fijador, conjuntamente con PhSiH_3 como agente reductor, en el sistema modelo 4-toluidina. La **Tabla 19** resume los resultados obtenidos en esta etapa.

TABLA 19. Estudio de la ^{11}C -metilación del sistema modelo a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando IPr/ PhSiH_3 .



Entrada	Aditivo ^[e]	Temp (° C)	RC (%, dc)	Remanente (%)	PRQ (%)	RRQ (%, dc)
1	ZnCl ₂	150	15.2	38	71.3	14.6
2 ^[a]	-	150	92.4	54	31.6	27.6
3 ^[a, d]	ZnCl ₂	150	54.9	66	83.4	81.9
4 ^[a, b]	ZnCl ₂	150	42.3	45	94.0	42.1
5 ^[a]	ZnCl ₂	120	60.9	45	75.0	61.8
6 ^[a]	ZnCl ₂	100	52.5	55	0.0	0.0
7 ^[a]	B(C ₆ F ₅) ₃	150	44.7	16	17.3	0.9
8 ^[a]	CuCl ₂	150	96.4	22	0.0	0.0
9 ^[c]	ZnCl ₂	150	82.5	44	0.0	0.0

[a] Agregado por separado: IPr (4.4 mg, 0.01mmol) / diglyme (400 μL) // Amina (3 mg, 0.03 mmol) / PhSiH_3 (20 μL , 0.20 mmol) / Aditivo (0.03 mmol) en diglyme (100 μL), [b] Agregado el Reductor conjuntamente con IPr, [c] uso de 9-BBN:THF (0.20 mmol) como agente reductor, en lugar de PhSiH_3 , [d] n=2, [e] aditivo: 0.03 mmol

De la **Tabla 19** se observa que en líneas generales, la performance del sistema IPr/ PhSiH_3 es ampliamente superior a la del sistema DBU/ PhSiH_3 en términos de RRQ y PRQ para la radiosíntesis de *N*- $[^{11}\text{C}$ -metil]-4-toluidina, especialmente cuando se utiliza ZnCl_2 y cuando se segregan los componentes del sistema de forma segregada: [IPr + disolvente] para atrapar $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, seguido del agregado de [agente reductor + aditivo + amina] (PRR 83.4% y RRQ 81.9%, entrada 3, **Tabla 19** y **Figura 34**). Se observó además en este experimento puntual, una especie a $t_R = 11.1$ min que se propone sea *N*- $[^{11}\text{C}$ -metil]-*N*-metil-4-toluidina (11% del total de las especies radiactivas), producto de ^{11}C -metilación de la *N*-metil-4-toluidina que se forma con CO_2 estable (**Figura 34**, cromatograma UV), debido a la alta dilución isotópica del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizado.

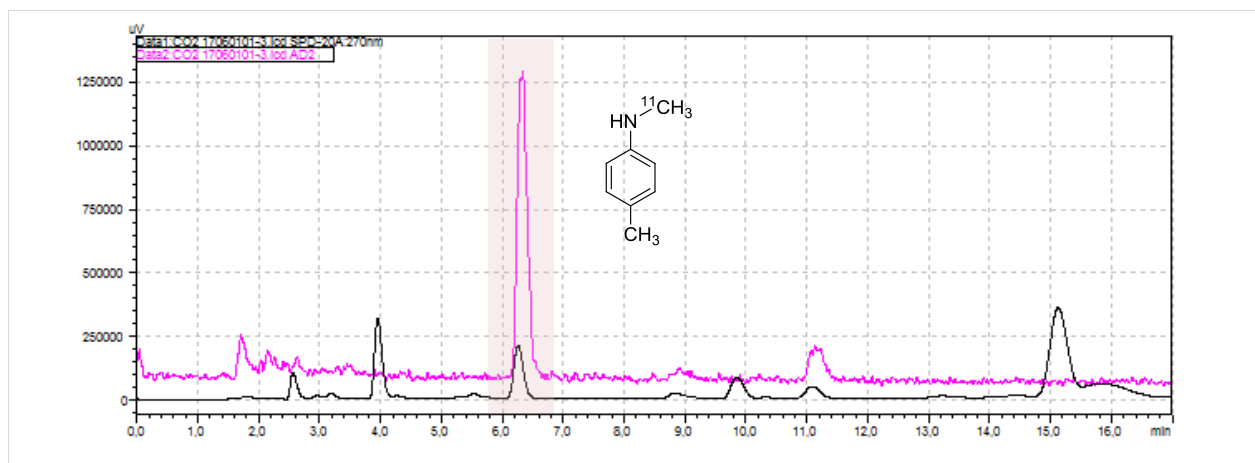


FIGURA 34. Cromatogramas UV 270 (negro) y Gamma (magenta) para la marcación de 4-[^{11}C -metil]-4-toluidina, con [^{11}C]CO $_2$ en presencia de IPr/PhSiH $_3$ /ZnCl $_2$. $t_R = 6.3$ min, PRQ (%) = 81.3 (para este experimento puntual)

La ausencia de ZnCl $_2$ (entrada 2, **Tabla 19**) también permitió obtener la amina ^{11}C -metilada, pero prácticamente a la mitad del RRQ. Cuando el reductor se agregó junto con el IPr en lugar de por separado, se observó un aumento en la PRQ, pero no así el RRQ (entrada 4, **Tabla 19**). La disminución de la temperatura por debajo de 150 °C resultó en detrimento tanto de la PRQ como del RRQ (entradas 5 y 6, **Tabla 19**), evidenciándose bajo estas condiciones la formación de *N*-(4-toluil)[^{11}C]formamida como producto de reducción intermedia (15.6% y 16.3% de la radiactividad total, respectivamente).

Se utilizaron también ácidos de Lewis alternativos utilizados en la literatura para este tipo de metilaciones con CO $_2$, tales como B(C $_6$ F $_5$) $_3$ ¹³⁷ o CuCl $_2$ ¹³⁸, pero su performance no fue satisfactoria (entradas 7 y 8, **Tabla 19**). El uso de 9-borabicyclo[3.3.1]nonano como agente reductor¹³⁹ no resultó efectivo (entrada 9, **Tabla 19**). El uso de CH $_3$ COOAg, actuando como agente fijador y al mismo tiempo ácido de Lewis¹⁴⁰ fue reportado como catalizador para el uso de carbonatos cíclicos a partir de CO $_2$. Cuando se fue utilizado en el sistema aquí estudiado, no resultó satisfactorio en las condiciones ensayadas (**Tabla 20**).

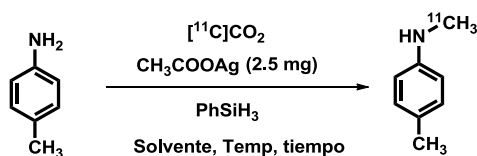
¹³⁷ [a] Yang, Z., Yu, B., Zhang, H., Zhao, Y., Ji, G., Ma, Z., Liu, Z. (2015) *Green Chem.* 17: 4189., [b] Tan, M., Zhang, Y. (2009) *Tetrahedron Lett.* 50:4912.

¹³⁸ Santoro, O., Lazreg, F., Minenkov, Y., Cavallo, L., Cazin, C.S.J. (2015) *Dalton Trans.* 44:18138.

¹³⁹ Blondiaux, E., Pouessel, J., Cantat, T. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* 53:12186.

¹⁴⁰ Yuan, Y., Zeng, C., Song, D., Chaemchuen, S. Chen, C., Verpoort (2017) *Green Chem.* 19: 2936.

TABLA 20. Estudio del CH₃COOAg como agente Fijador / Aditivo metálico, en diglyme, 150 °C, 20 min



Entrada	Volumen (μL)	RC (% dc)	Remanente (%)	PRQ (%)	RRQ (% dc)
1	500	5.2	23	0.0	0.0
2 ^[a]	400/100	4.0	24	0.0	0.0

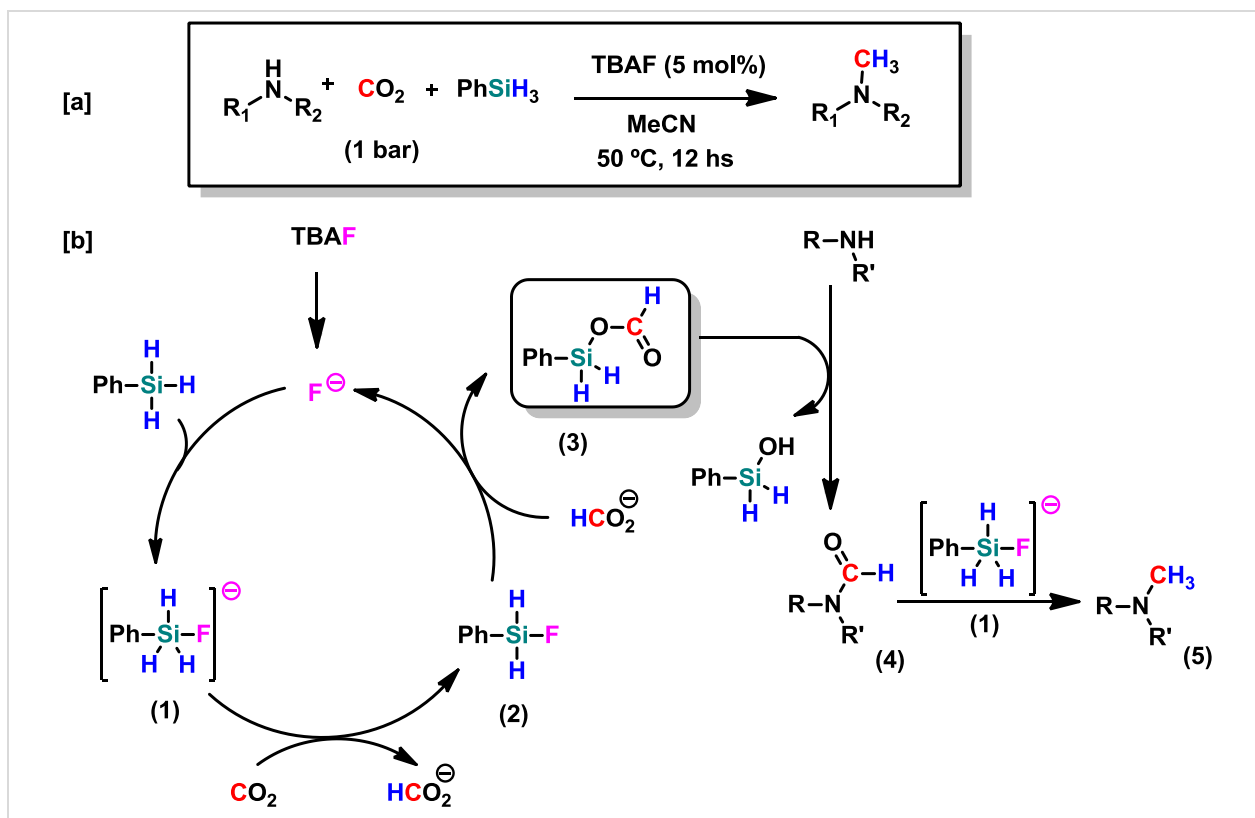
[a] Agregado por separado: AgOAc/ diglyme // Amina/PhSiH₃

3.2.3. Estrategia de fijación-reducción de [¹¹C]CO₂ con TBAF / PhSiH₃

En un intento de simplificar el sistema de fijación-reducción de [¹¹C]CO₂ para la síntesis de *N*-[¹¹C-metil]aminas, se buscaron alternativas que en lo posible fueran libres de metales y evitaran el uso de los carbenos *N*-heterocíclicos. En tal sentido, se enfocó la atención en la estrategia recientemente desarrollada por Liu, X. y col.¹⁴¹. En este trabajo, los autores exploraron la utilidad de la formilación y metilación de las aminas con CO₂ mediante el uso de hidrosilanos / TBAF como sistema catalítico (**Esquema 47** [a]). Este enfoque utiliza condiciones de reacción suaves, y cumple con las condiciones de ser libre de metales y de carbenos. Liu y col. por su lado, y Hulla y col.¹⁴² por otro, propusieron detalles mecanísticos de este proceso. Dos intermedios claves en el mecanismo serían el fluoruro de silicio hipervalente (1) y el formoxisilano (3) (**Esquema 47** [b]). El primero, con una estructura que posibilita el incremento del poder reductor del hidruro, es el responsable de la captura de CO₂ en la solución, mientras que el segundo es responsable de la transferencia del grupo formilo a la amina para rendir la formamida correspondiente y fenilsilanol como subproducto. Posteriormente, se promueve la reducción de la formamida (4) a metilamina (5) por el intermedio fluoruro de silicio hipervalente (1).

¹⁴¹ Liu, X. F., Ma, R., Qiao, C., Cao, H., & He, L. N. (2016) *Chemistry—A European Journal*, 22(46), 16489.

¹⁴² Hulla, M., Bobbink, F. D., Das, S., & Dyson, P. J. (2016). *ChemCatChem*, 8(21), 3338.



Esquema 47. [a] Incorporación reductiva de CO₂ en aminas promovida por el sistema catalítico PhSiH₃ / TBAF, según lo propuesto por Liu y col., [b] Mecanismo de reacción propuesto por Hulla y col.

En esta parte del trabajo, el objetivo fue estudiar la aplicabilidad de la incorporación reductiva mediada por PhSiH₃ / TBAF de [¹¹C]CO₂ para la radiosíntesis ¹¹C-aminas. Se estudió la influencia de algunos parámetros físicos y químicos, tales como el disolvente, la temperatura y el tiempo de marcación, y las cantidades molares de reactivos, entre otras.

3.2.3.1. Radioquímica del proceso de fijación-reducción utilizando TBAF / PhSiH₃

La reactividad del sistema de fijación-reducción TBAF / PhSiH₃ se evaluó a través del RRQ de *N*-[¹¹C-metil]-4-toluidina, cuyos resultados se resumen en la **Tabla 21**. La formación del producto de ¹¹C-metilación deseado se observó en prácticamente todas las condiciones donde la captura de [¹¹C]CO₂ fue considerable, en tiempos relativamente cortos en comparación con el sistema IPr / PhSiH₃.

Sobre la base del trabajo de Liu y col., se comenzó a trabajar utilizando MeCN como disolvente. De esta forma, en MeCN a 80°C, se obtuvo un RRQ modesto de 12% para la utilización de 0.01 mmol de 4-toluidina (entrada 1, **Tabla 21**). Un aumento en la cantidad del 4-toluidina en 5 o 10 veces, condujo a una mejora en el RRQ de *N*-[¹¹C-metil]-4-toluidina (27% y 35%, entradas 2 y 3 respectivamente, **Tabla 21**).

Se obtuvieron resultados similares cuando se aumentaron tanto la temperatura (37%, entrada 4, **Tabla 21**) como el tiempo de reacción (27%, entrada 5). El aumento de la cantidad de TBAF a 0.05 mmol fue en detrimento del RRQ (6%, entrada 6). El aumento tanto de la cantidad de 4-toluidina como en la temperatura de marcación condujo a un RRQ de 42% (entrada 7, **Tabla 21** y **Figura 35**)

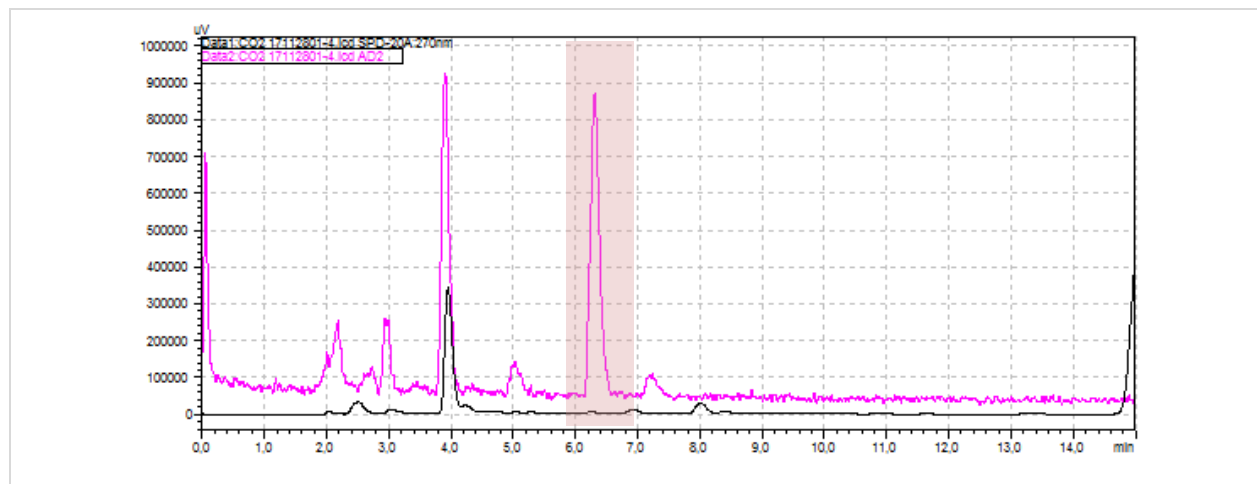


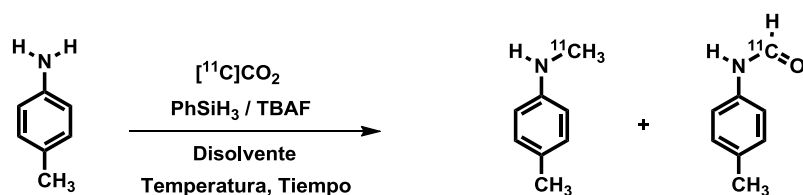
FIGURA 35. HPLC gamma analítico: *N*-[¹¹C-metil]-4-toluidina (t_R : 6,3 min; PRQ: 37%) obtenida en MeCN a 100 °C durante 5 min.

Buscando aumentar el RRQ, se utilizaron DMSO y DMF como disolventes para llevar a cabo la marcación. La elección se basó en el trabajo reciente de Lv y col.¹⁴³, en donde estos solventes, no sólo permiten trabajar a mayores temperaturas que el MeCN, sino que también promueven la *N*-formilación de aminas utilizando CO₂ y PhSiH₃ en condiciones suaves. De esta forma, estos solventes podrían jugar un papel clave en promover la captura de CO₂ y subsecuente interacción de aminas con complejos de PhSiH₃, favoreciendo la reacción de *N*-metilación

Cuando se utilizó DMSO como disolvente, a 150 °C por 5 min, *N*-[¹¹C-metil]-4-toluidina se formó con alto RRQ (71%, entrada 11 de la **Tabla 21**, **Figura 36**), presumiblemente debido a la alta temperatura empleada. En relación a esto último, se observó una caída en los RRQ para *N*-[¹¹C-metil]-4-toluidina en este solvente cuando se usaron menores temperaturas (entradas 8-11, **Tabla 21**).

¹⁴³ Lv, H., Xing, Q., Yue, C., Lei, Z., & Li, F. (2016). *Chem Comm*, 52(39), 6545.

TABLA 21. Estudio de la ^{11}C -metilación del sistema modelo a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando TBAF/PhSiH₃



Entrada	4-toluidina (mmol)	Disolvente	Temp. (°C)	Tiempo (min)	RC ^[a] (% dc)	RRQ ^[b] N-[¹¹ C-metil]-4-toluidina (% dc)	RRQ N-(4-toluidil)- ^{[11} C]formamida (% dc)
1	0.01	MeCN	80	5	92	12	8
2	0.05	MeCN	80	5	84	27	3
3	0.10	MeCN	80	5	88	35	3
4	0.05	MeCN	100	5	48	37	0
5	0.05	MeCN	100	10	70	27	6
6 ^[c]	0.05	MeCN	100	5	60	6	3
7	0.10	MeCN	100	5	65	42	0
8	0.05	DMSO	50	5	89	3	14
9	0.05	DMSO	100	5	76	48	0
10	0.05	DMSO	120	5	81	63	0
11	0.05	DMSO	150	5	82	71	0
12 ^[d]	0.05	DMSO	100	5	2	0	0
13 ^[e]	-	DMSO	25	Solo captura	67	-	-
14 ^[e]	-	DMSO	150	5	63	-	-
15	0.05	DMF	100	5	80	15	26
16 ^[d]	0.05	DMF	100	5	4	0	0

[a] Los experimentos se realizaron utilizando aproximadamente 0.5 Ci de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (actividad EOB en ciclotrón), [b] El RRQ (% dc) se estimó como la actividad final real de $[^{11}\text{C}]_2$ o $[^{11}\text{C}]_3$ con relación al máximo $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (A_T) atrapado (dc), [c] TBAF (0,05 mmol) [d] sin TBAF [e] experimentos blanco en DMSO.

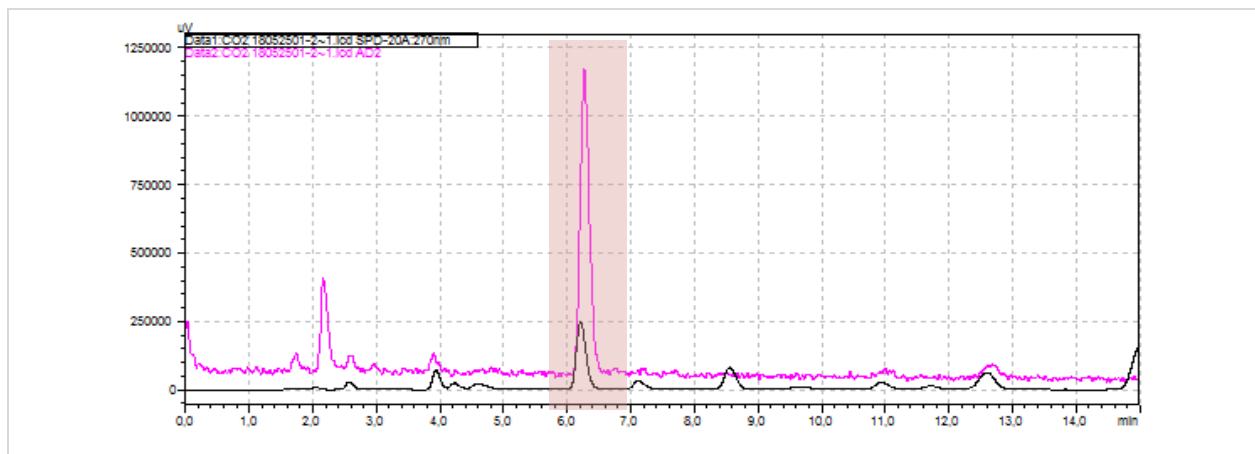
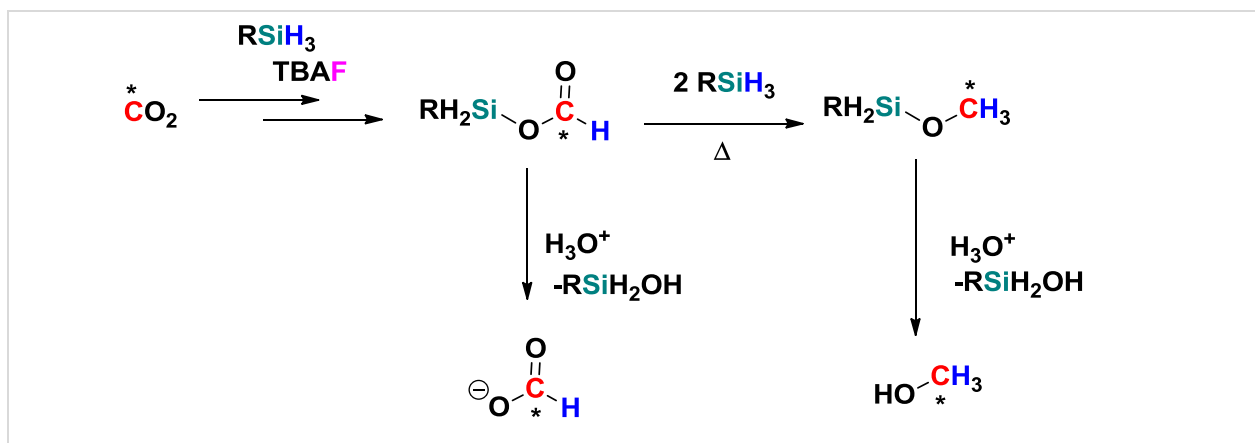


FIGURA 36. HPLC gamma analítico: *N*-[^{11}C -metil]-4-toluidina (t_R : 6,2 min; PRQ: 72%) obtenida en DMSO a 150 °C por 5 min.

La presencia de TBAF resultó esencial para que ocurra el proceso de fijación-reducción. En ausencia de este reactivo, no se observó formación de producto *N*- ^{11}C -metilado (entrada 12, **Tabla 21**), en concordancia con el trabajo de Liu y col.

Se llevaron a cabo dos experimentos blanco de amina en DMSO, con el fin de evaluar qué especies se forman en ausencia de amina. Cuando el [^{11}C]CO $_2$ se capturó en una solución de PhSiH $_3$ /TBAF en DMSO a temperatura ambiente (entrada 13, **Tabla 21**, **Figura 37** [a]), se observó la formación de un solo producto altamente hidrofílico eluyendo a $t_R = 1.68$ min, que podría atribuirse al [^{11}C]HCOO $^-$ formado por reducción del [^{11}C]CO $_2$ por parte del aducto [PhSiH $_3$ F] (**Esquema 47**) o por hidrólisis del [^{11}C]formoxisilano (a nivel de la columna de HPLC). Al calentar la solución de PhSiH $_3$ /TBAF en DMSO durante 5 min a 150 °C (entrada 14, **Tabla 21**, **Figura 37** [b]), se constató la elución de dos compuestos, uno a $t_R = 2.14$ min (69.8%), seguido de otro a $t_R = 7.66$ min (30.2%). Basados en el mecanismo de reacción propuesto, se planteó inicialmente la hipótesis de que alguna de estas dos especies podría ser el intermediario clave formoxisilano (3) (**Esquema 47**). Si se observan los resultados obtenidos en un blanco de amina para el sistema IPr / ZnCl $_2$ / PhSiH $_3$ (150 °C, 20 min; entrada 4, **Tabla 18**) también se aprecia allí una especie de $t_R = 2.15$ min, atribuida en ese entonces a [^{11}C]CH $_3$ OH, proveniente de la hidrólisis del [^{11}C]metoxisilano. En las presentes condiciones, el [^{11}C]metoxisilano también es un posible subproducto esperado, formado por reducción del [^{11}C]formoxisilano, como muestra el **Esquema 48**. En tal sentido, cabe hipotetizar que la especie de $t_R = 7.66$ min pueda corresponder a [^{11}C]formoxisilano o a su producto de reducción [^{11}C]metoxisilano.



ESQUEMA 48. Formación de $[^{11}\text{C}]$ metoxisilano por reducción del $[^{11}\text{C}]$ formoxisilano a alta temperatura, mediada por PhSiH_3 (o $[\text{PhSiH}_3\text{F}]$)

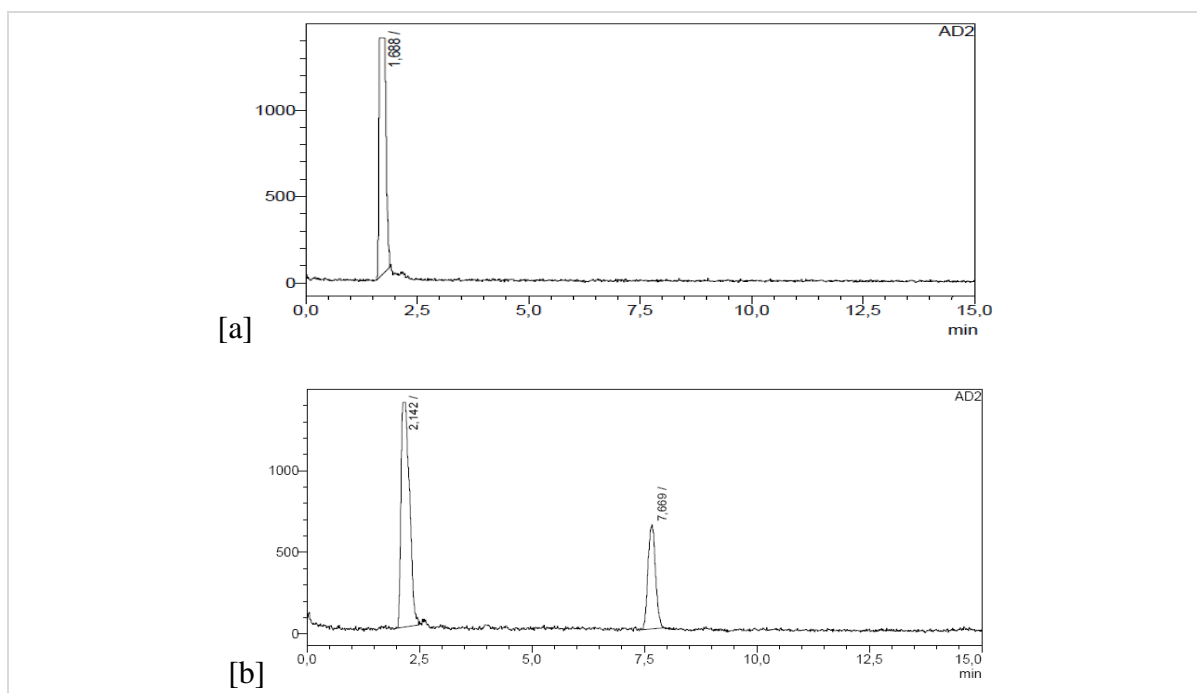


FIGURA 37. Cromatogramas gamma correspondientes a los experimentos blanco de amina en DMSO, PhSiH_3 / TBAF. [a] sin calentamiento, [b] luego de calentamiento (5 min a $150\text{ }^\circ\text{C}$).

Finalmente, cuando se ensayó DMF como disolvente de reacción, se obtuvo un RRQ notoriamente menor en comparación con DMSO (entrada 15, vs. entrada 9, **Tabla 21**, y **Figura 38**). En dichas condiciones, el producto *N*-(4-toluil)- $[^{11}\text{C}]$ formamida se obtuvo en un 26% de RRQ, mientras que la *N*- $[^{11}\text{C}$ -metil]-4-toluidina resultó en un 15%.

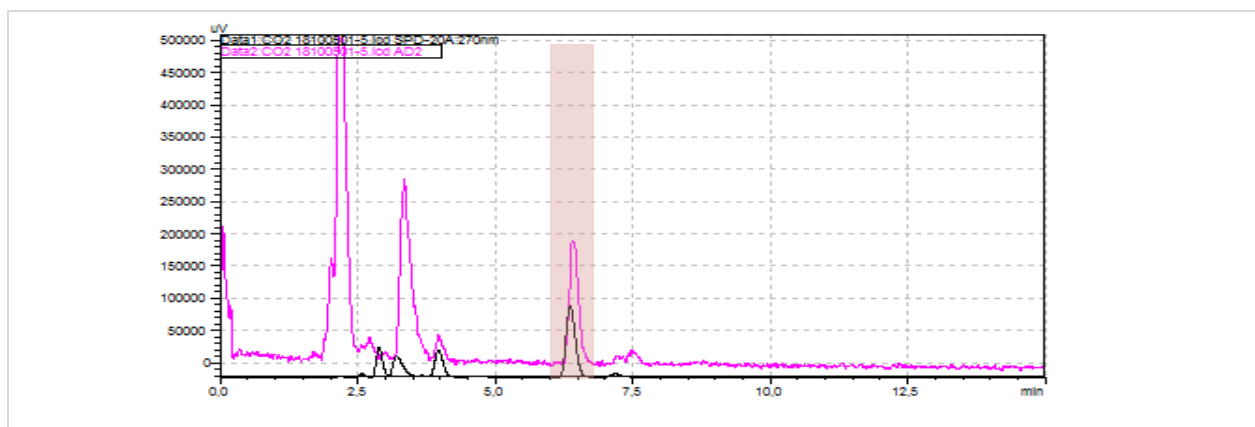


FIGURA 38. HPLC gamma analítico: *N*-[^{11}C -metil]-4-toluidina (t_R : 6,4 min; PRQ: 15%). DMF a 100 °C por 5 min.

El rendimiento de captura (RC) de [^{11}C]CO₂ también fue dramáticamente afectado por la cantidad de TBAF en la solución. Cuando no se agregó TBAF, el RC de [^{11}C]CO₂ fue menos del 5% (entradas 12 y 16, **Tabla 21**). Este hecho es consistente con el mecanismo anteriormente planteado, en el cual el TBAF es necesario para formar el aducto de silicio hipervalente [PhSiH₃F]⁻ que sería el responsable de solubilizar el [^{11}C]CO₂ bajo la forma de [^{11}C]HCOO⁻. Sin embargo, un aumento de la cantidad de TBAF a 0.05 mmol no mostró ser favorable para una mayor captura de [^{11}C]CO₂ (60%, entrada 6). Todos los solventes usados mostraron buena performance de atrapamiento de [^{11}C]CO₂ a temperatura ambiente, cuando se utilizó 0.01 mmol de TBAF, independientemente de la concentración de amina. Sin embargo, en ausencia de amina (experimentos blanco en DMSO) se observó una pequeña disminución del rendimiento de captura (entradas 13 y 14, **Tabla 21**).

No se observaron pérdidas de radioactividad debido a la volatilización de [^{11}C]CO₂ u otros derivados radioactivos durante la etapa de marcado, lo que indica que las especies de ^{11}C se solubilizan cuantitativamente en la solución (**Figura 39**). Las pérdidas de radioactividad se evaluaron a través de la relación entre $A_{\text{EOL}} / A_{\text{SOL}}$ (dc en este caso). En todos los casos, esta relación (remanente) fue aproximadamente 100%.

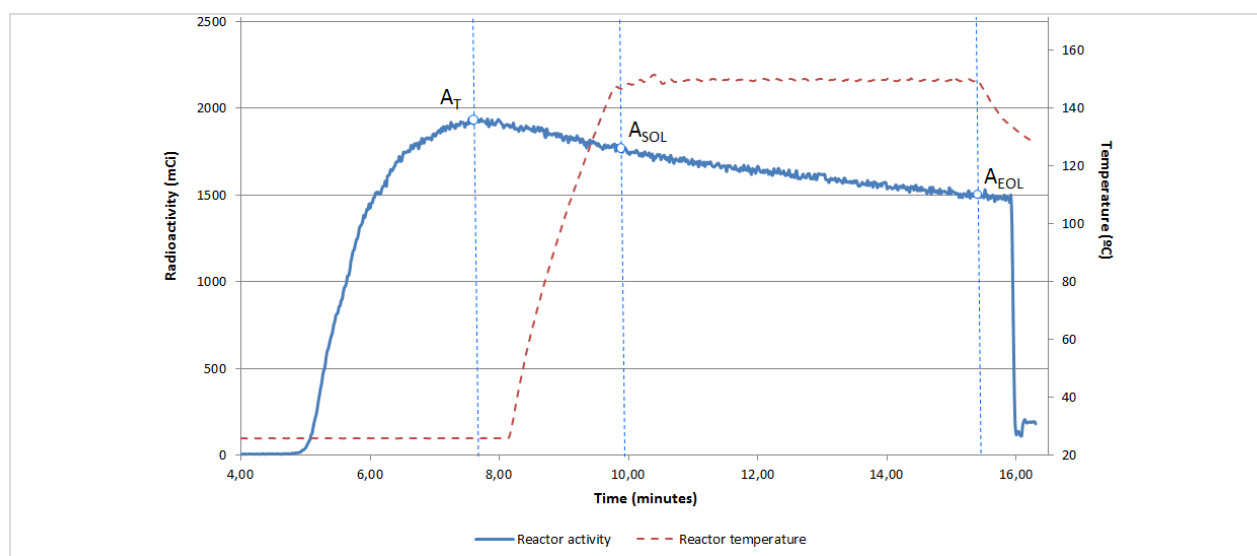


FIGURA 39. Evolución de la radioactividad y temperatura de marcación dentro del reactor del módulo TRACERlab® durante la marcación con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando TBAF/PhSiH₃ en DMSO, 5 min a 150 °C. A_T: máxima radioactividad de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ atrapada en el reactor, A_{SOL}: radioactividad al inicio del marcado, A_{EOL}: radioactividad al final del marcado.

3.3. APLICACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE FIJACIÓN-REDUCCIÓN DE $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ A LA RADIOSÍNTESIS DE $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$

3.3.1. Introducción

El compuesto 2- (4'-N- $[^{11}\text{C}]$ metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol, también conocido como $[^{11}\text{C}]$ 6-OH-BTA-1 o $[^{11}\text{C}]$ Pittsburg Compound B ($[^{11}\text{C}]\text{PiB}$) es reconocido como radiotrazador PET para obtener imágenes de placas beta-amiloide (placas A β) en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y otras formas de demencia¹⁴⁴. El $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ aún es considerado el “gold standard” para la obtención de imágenes en el diagnóstico de EA, debido a la alta afinidad por las placas de A β (Kd = 1.4 nM)¹⁴⁵, su captación rápida y su baja unión inespecífica.

Como se mencionó brevemente en el capítulo Introducción, la radiosíntesis original de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ fue realizada por Mathis y col.¹⁴⁴. La misma consiste en la ^{11}C -N-metilación del precursor 2-(4'-aminofenil)-6-metoximetoxibenzotiazol (6-MOMO-BTA-0) con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ seguido de desprotección ácida de El grupo metoximetilo. El bajo RRQ (12.1% a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, EOS) obtenido a través de este método, y la necesidad de la etapa de desprotección que consume mucho tiempo, llevaron a procedimientos radiosintéticos adicionales con agentes

¹⁴⁴ [a] Herholz, K., Carter, S. F., & Jones, M. (2007) *The British journal of radiology*, 80, S160. [b] Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P. & Ausén, B. (2004). *Annals of Neurology*, 55(3), 306. [c] Nordberg, A. (2004). *The lancet neurology*, 3(9), 519-527. [d] Rabinovici, G. D., & Jagust, W. J. (2009) *Behavioural neurology*, 21(1, 2), 117.

¹⁴⁵ Mathis, C. A., y col. *Op cit.*

y precursores alternativos ^{11}C -metilantes. El uso de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ sobre el precursor desprotegido 2-(4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (6-OH-BTA-0) permitió una ^{11}C -*N*-metilación directa y eficiente, como lo demostraron Wilson y col. y Solbach y col.¹⁴⁶. Durante la década pasada, se han publicado varias versiones alternativas optimizadas para la síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$. A pesar de que las mismas demostraron ser confiables y fácilmente adaptables a una producción compatible con GMP para pacientes, con RRQ y A_M aceptables, todas ellas usan los precursores secundarios $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$, cuya preparación a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ siempre consume tiempo y actividad.¹⁴⁷ El RRQ general de cualquier radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, y por consiguiente la actividad total disponible para pacientes, se ve directamente afectada por estas pérdidas de radioactividad durante la preparación de los antedichos precursores. En este sentido, cualquier enfoque capaz de eliminar los pasos de síntesis de los agentes de ^{11}C -metilación sería ventajoso para un mejor desempeño general en términos de RRQ y actividad disponible para estudios PET.

Es por ello que, durante este trabajo, se planteó la posibilidad de aplicar en forma práctica los resultados obtenidos para la fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, en función de la relevancia que dicho trazador tiene CUDIM.

3.3.1.1. Radioquímica del proceso fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ aplicado al $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ con IPr / PhSiH_3

Si bien la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando el sistema químico IPr / PhSiH_3 / ZnCl_2 fue reportada por Liger y col.¹⁴⁸, consideramos que este proceso es pasible de ser ampliamente mejorado en cuanto a su performance, fundamentalmente en términos de RRQ, A_M y Control de Calidad. En tal sentido, se aplicó la técnica de estos investigadores tal y como fue reportada en su publicación, pues se enmarca dentro del sistema de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando IPr / PhSiH_3 .

Cuando se llevó a cabo, dichas condiciones no fueron satisfactorias ya que con ellas se obtuvo $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ con un RRQ bajo (33%, entrada, 1, **Tabla 22**, vs. 45% descrito por Liger y col.) La captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ en dichas condiciones resultó también pobre (5.7%) probablemente por la presencia conjunta del IPr y el ácido de Lewis ZnCl_2 en el seno de la solución de captura, fenómeno ya demostrado anteriormente durante este trabajo (entrada 3, **Tabla 18**).

Basados en los resultados previos de este trabajo, se llevó a cabo el experimento radiosintético mediante la segregación de los reactivos, utilizando diglyme como solvente y calentando a 150 °C por 15 min, lo cual produjo los mejores resultados en la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, con un 59.1% de PRQ en un 58.0% de RRQ (entrada 3, **Tabla 22** y **Figura 40**).

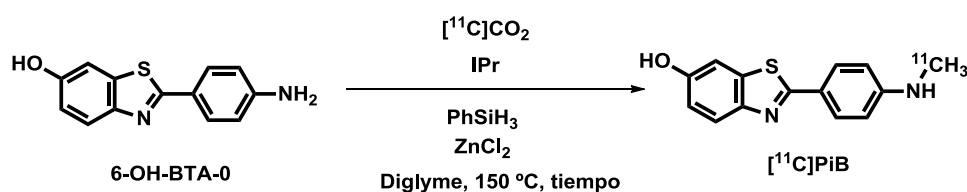
¹⁴⁶ [a] Wilson et al. *Op cit.*, [b] Solbach et al. *Op cit.*

¹⁴⁷ Långström, B., Kihlberg, T., Bergström, M., Antoni, G., Björkman, M., Forngren, B. H., & Ogren, M. (1999). *Acta chemica Scandinavica*. 53(9), 651.

¹⁴⁸ Liger y col. (2016). *Op. cit.*

Extender el calentamiento a 20 min no arrojó resultados significativamente diferentes (entrada 2), aunque disminuirlo a 10 min (entrada 4) fue en detrimento de la performance del método. Las variaciones en la cantidad de agente reductor (entradas 5 y 6) no fueron favorables para mejorar tanto el RRQ como la PRQ del $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ obtenido por esta metodología. El agregado de ZnCl_2 no demostró ser imprescindible para llevar a cabo la marcación, pero en su ausencia el RRQ fue sustantivamente menor (22.6%, entrada 7, **Tabla 22**) que en las mismas condiciones utilizando el catalizador.

TABLA 22. Estudio de la ^{11}C -metilación del 6-OH-BTA-0 a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando IPr/PhSiH₃



Entrada	Volumen PhSiH ₃ (μL)	Volumen (μL)	Tiempo (min)	RC (% dc)	Remanente (% dc)	PRQ $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ (%)	RRQ (% dc)
1 ^[a]	23	400	20	5.7	63	30.0	33.0
2 ^[b]	20	400/100	20	66.3	53	61.8	55.1
3 ^[b]	20	400/100	15	56.3	63	59.1	58.0
4 ^[b]	20	400/100	10	40.4	57	17.9	16.1
5 ^[b]	40	400/100	20	64.2	63	12.8	10.7
6 ^[b]	60	400/100	20	66.0	53	36.1	32.5
7 ^[c]	20	500	20	6.7	40	30.9	22.6

[a] condiciones reportadas por Liger et al. (2016); masa sustrato: 1.7 mg, masa IPr: 3.5 mg; masa ZnCl₂: 1.3 mg [b] agregado por separado: IPr (4.4 mg) / diglyme (400 μL) // Amina (3.0 mg) / PhSiH₃ / ZnCl₂ (4.0-5.0) mg en diglyme (100 μL), [c] sin ZnCl₂

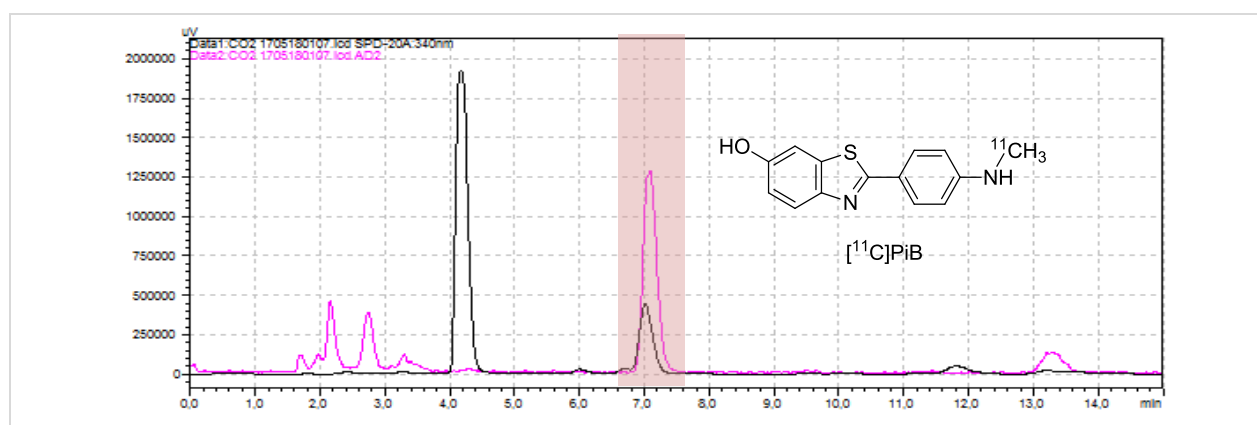


FIGURA 40. $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ sintetizado a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando el sistema IPr/PhSiH₃/ZnCl₂. Cromatograma UV a 340 nm (negro) y gamma (magenta). $t_R = 7.2$ min, PRQ = 59.1%

3.3.1.2. Radioquímica del proceso fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ aplicado al $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ con TBAF / PhSiH_3

Dado los resultados auspiciosos obtenidos para la reacción de ^{11}C -metilación a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando el sistema TBAF / PhSiH_3 sobre 4-toluidina, se planteó llevar a cabo la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ mediante esta metodología. En virtud de los resultados obtenidos previamente con DMSO en el modelo de reactividad, este disolvente fue originalmente elegido para llevar a cabo los experimentos, para los cuales se utilizó 0.02 mmol (5.0 mg) de precursor 6-OH-BTA-0. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 23**. Inicialmente se comenzó variando el tiempo de marcación (entradas 1-5, **Tabla 23** y **Figura 41**), encontrándose el tiempo óptimo a 2.5 minutos para una adecuada fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con buenos RRQ y PRQ (74% y 65% respectivamente, entrada 2, **Tabla 23** y **Figura 42**). Incluso con tan sólo 1 minuto de calentamiento, la obtención de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ es satisfactoria en términos de RRQ y PRQ (62% y 61% respectivamente, entrada 1, **Tabla 23**). Se intentó luego disminuir la cantidad de 6-OH-BTA-0, dado que en las marcaciones con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ se utiliza usualmente 1 mg de precursor. La disminución de la cantidad de 6-OH-BTA-0 a 0.01 mmol (2.5 mg) resultó en detrimento del RRQ (entrada 7, **Tabla 23**) e incluso del RRQ y de la PRQ para 0.005 mmol (1.0 mg) (entrada 6, **Tabla 23**). Sin embargo, en términos de concentración total de PiB (y por consiguiente de A_M) la disminución de la cantidad de precursor resultó ventajosa (entradas 2, 7 y 6, **Tabla 23**, y **Figura 43**).

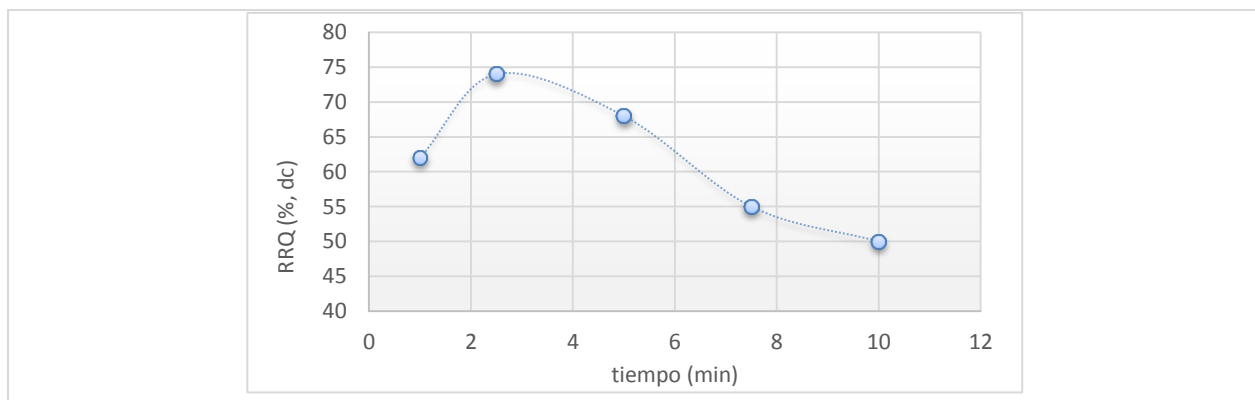


FIGURA 41. Variación del RRQ en función del tiempo de calentamiento (150 °C en DMSO) en la fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ aplicado a $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ con TBAF / PhSiH_3

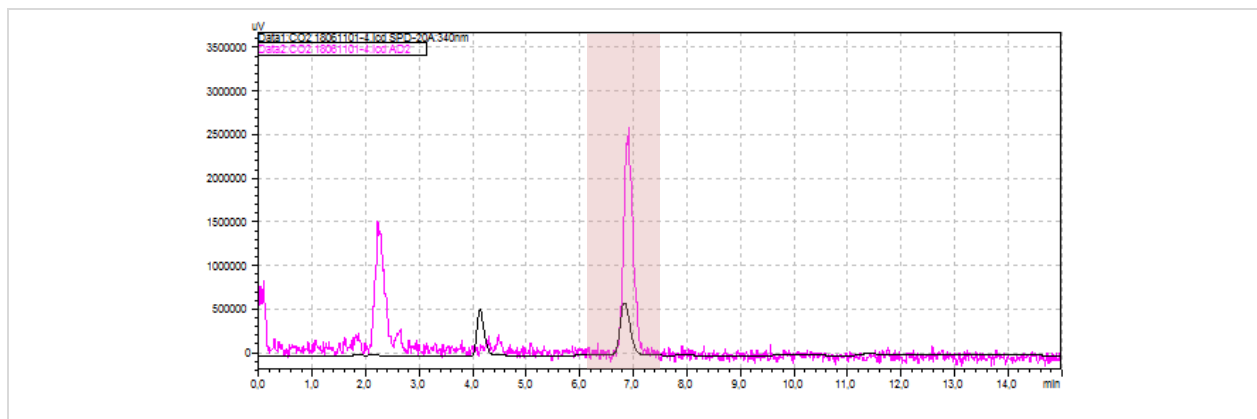


FIGURA 42. $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ sintetizado a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando el sistema TBAF/PhSiH₃. Cromatograma UV a 340 nm (negro) y gamma (magenta). Condición: DMSO 2.5 min a 150 °C (PRQ: 64,6%)

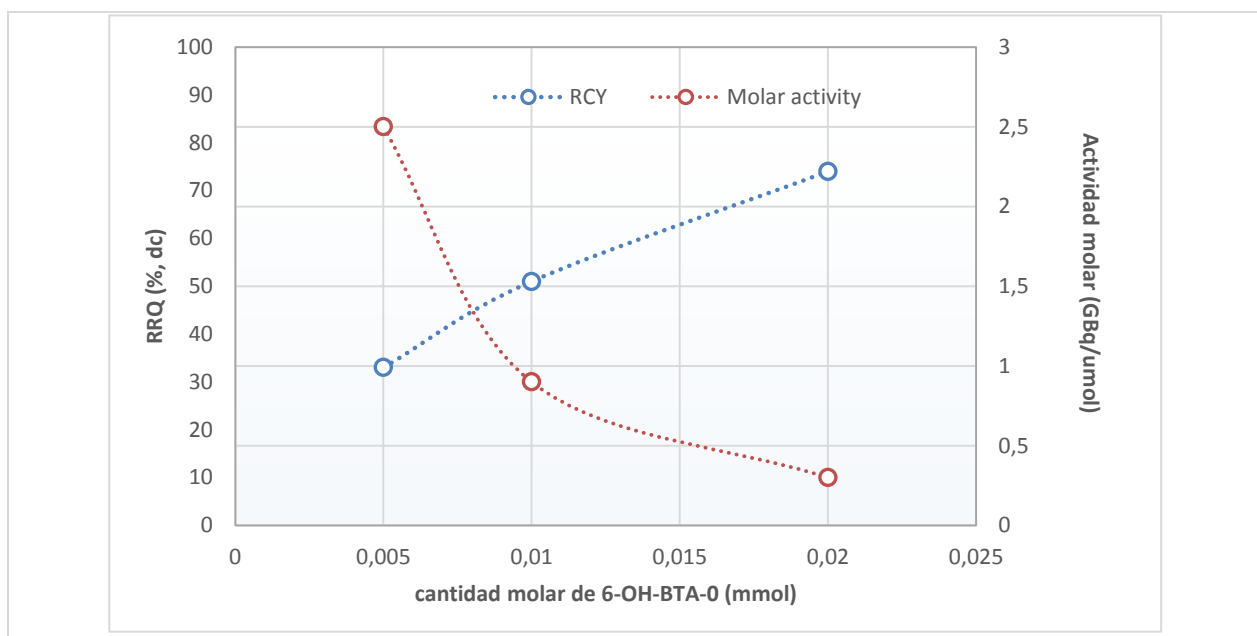
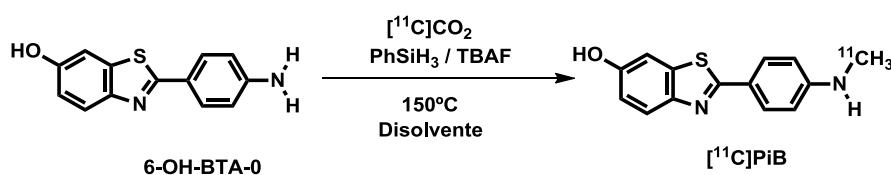


FIGURA 43. Variación del RRQ y de la A_M de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ en función de la cantidad molar de precursor utilizada (DMSO, 2,5 min a 150 °C)

TABLA 23. Optimización de las condiciones de reacción para la marcación de [¹¹C]PiB a partir de [¹¹C]CO₂

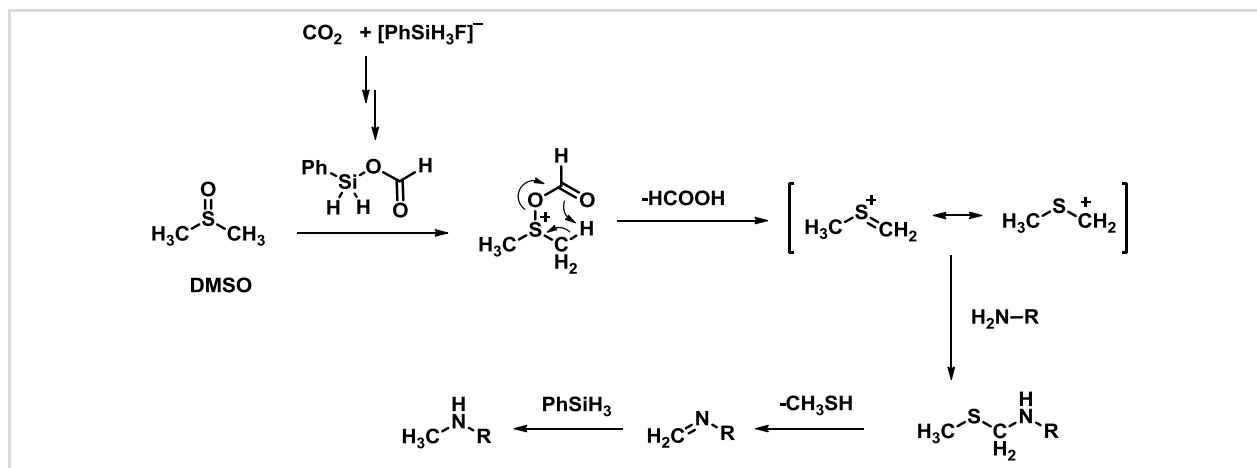


Entrada	6-OH-BTA-0 (mmol)	Solvente	Tiempo (min)	RC ^[a] (% , dc)	PRQ (% [¹¹ C]PiB)	RRQ (% , dc)	Concentración PiB (µg/mL)	A _M (GBq/umol)
1	0.02	DMSO	1	53	61	62	-	-
2	0.02	DMSO	2.5	52	65	74	1511	0.3
3	0.02	DMSO	5.0	59	65	68	-	-
4	0.02	DMSO	7.5	46	69	55	-	-
5	0.02	DMSO	10	55	65	50	-	-
6	0.005	DMSO	2.5	63	32	33	83	2.5
7	0.01	DMSO	2.5	70	67	48	761	0.9
8 ^[b]	0.01	DMSO	2.5	67	44	51	333	1.5
9 ^{[c], [d]}	0.01	DMSO	2.5	-	-	-	375	-
10 ^{[c], [d], [e]}	0,01	DMSO	2.5	-	-	-	44	-
11 ^{[c], [d]}	0,01	dyglime	2.5	-	-	-	56	-
12 ^{[b],[c]}	0.01	diglyme	2.5	40	64	57	105	4.4
13 ^{[b],[c],[f]}	0.01	diglyme	5.0	83	68	72	69	16.2
14 ^{[b],[c],[f]}	0.01	MeCN ^[g]	5.0	92	61	58	53	19.1

[a] Los experimentos se llevaron a cabo utilizando aproximadamente 0.5 Ci de [¹¹C]CO₂ como actividad de partida (SOB), [b] Se llevó a cabo la purga del target y las líneas para reducir la concentración de CO₂ estable, [c] solución degasificada con He (5 min, 40 mL / min), [d] sin [¹¹C]CO₂, [e] sin [¹¹C]CO₂ y sin PhSiH₃ / TBAF, [f] n = 3, [g] 100 ° C.

Esta disminución de la concentración total de PiB (y del consecuente aumento de A_M) puede explicarse considerando un mayor grado de reacción entre cantidades crecientes de precursor y CO₂ ambiental para obtener PiB (considerando un exceso de CO₂ ambiental que diluye el [¹¹C]CO₂ durante los experimentos). Por esta razón se decidió continuar trabajando con 0.01 mmol de precursor, y comenzar a realizar las purgas (“flush”) del target y las líneas a

los efectos de disminuir la concentración de CO₂ estable en todo el sistema, y realizar la degasificación de la solución de reacción previo al radiomarcado. De todos modos, estas medidas no fueron eficientes para disminuir la concentración total de PiB (entrada 8, **Tabla 23**). Dichos valores elevados en la concentración de PiB, indicaron que otros fenómenos además de la incorporación de CO₂ ambiental, podrían estar teniendo lugar, y en ese sentido, se planteó la posibilidad de que la contribución de un grupo metilo del DMSO utilizado como disolvente pudiera ser la causa. De hecho, Jiang. y col.¹⁴⁹ reportaron que el DMSO puede actuar como agente metilante de aminas en presencia de HCOOH a 150 °C. En nuestro sistema, la presencia de formoxisilano no marcado (PhSiH₂OCHO) podría conducir a la activación de DMSO en forma de catión metilmetilsulfonio, quien podría actuar como el agente metilante presentado por los autores (**Esquema 49**). Para demostrar esta posible contribución por parte del DMSO, se llevaron a cabo dos experimentos sin la presencia de [¹¹C]CO₂. Como era esperado, se observó una mayor formación de PiB en presencia de DMSO y PhSiH₃ / TBAF (375 µg/mL, entrada 9, **Tabla 23**) valor similar al obtenido en el experimento con [¹¹C]CO₂, (entrada 8, **Tabla 23**) y una concentración menor de PiB (44 µg/mL, entrada 10, **Tabla 23**) en ausencia de PhSiH₃ / TBAF a la solución de DMSO.



ESQUEMA 49. Mecanismo propuesto para la obtención de PiB mediante metilación por parte del DMSO mediada por el formoxisilano

En vista de estos resultados, se planteó que el uso de otro disolvente con alto punto de ebullición, podría resultar favorable para mejorar la A_M del [¹¹C]PiB obtenido por esta metodología. En tal sentido, el uso de diglyme (el disolvente utilizado por Liger y col. en su trabajo), resultó beneficioso para la disminución de la concentración total de PiB. Un experimento blanco de [¹¹C]CO₂ en diglyme, llevado a cabo en presencia de TBAF / PhSiH₃ arrojó un valor para la concentración de PiB (56 µg/mL, entrada 11, **Tabla 23**) del orden similar al correspondiente en DMSO sin los reactivos fijadores-reductores. La marcación en diglyme con TBAF / PhSiH₃ (150 °C, 2,5 min), con previa purga del target y líneas, permitió

¹⁴⁹ Jiang, X., Wang, C., Wei, Y., Xue, D., Liu, Z., & Xiao, J. (2014) *Chemistry -A European Journal*, 20(1): 58.

obtener una concentración de PiB de 105 $\mu\text{g/mL}$ (entrada 12, **Tabla 23**), y un RRQ de 57%. A los efectos de aumentar este último parámetro, ajustamos nuevamente la variable tiempo a 5 minutos (entrada 13, **Tabla 23**), con lo cual se obtuvieron valores promediales de PRQ, RRQ y A_M promisorios (68%, 72% y 16.2 GBq/ μmol (**Figura 44**), respectivamente, para intentar llevar a cabo la radiosíntesis completa de [^{11}C]PiB.

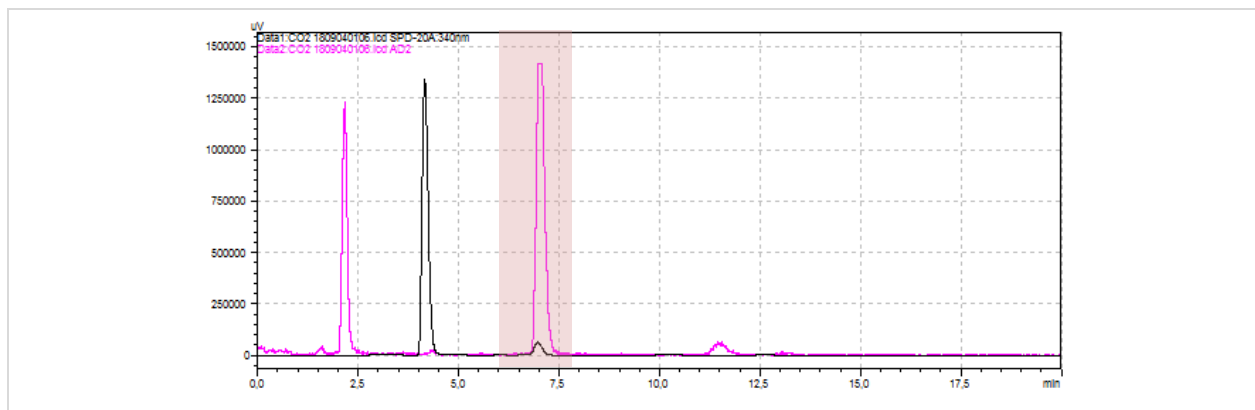


FIGURA 44. [^{11}C]PiB sintetizado a partir de [^{11}C]CO₂ utilizando el sistema TBAF/PhSiH₃. Cromatograma UV a 340 nm (negro) y gamma (magenta). Condición: Diglyme 5.0 min a 150 °C (PRQ: 68%)

Incluso el MeCN (entrada 14, **Tabla 23**, **Figura 45**) mostró ser un disolvente adecuado para este proceso, a pesar de que la máxima temperatura alcanzada en las marcaciones en que fue utilizado no superó los 100 °C. La potencial ventaja del uso de MeCN radica en que es un disolvente analizado durante los controles de calidad, ya que usualmente está presente en las fases móviles utilizadas en la etapa de HPLC semipreparativo. El RC de [^{11}C]CO₂ en este disolvente fue muy elevado (92%), la PRQ obtenida (61%) similar a la del experimento correspondiente en dyglime, aunque el RRQ resultó ligeramente menor (58%). Este disolvente también permitió obtener adecuados valores de concentración total de PiB (53 $\mu\text{g/mL}$) y, por tanto, un valor relativamente elevado de A_M (19.2 %) en relación a los resultados obtenidos en DMSO.

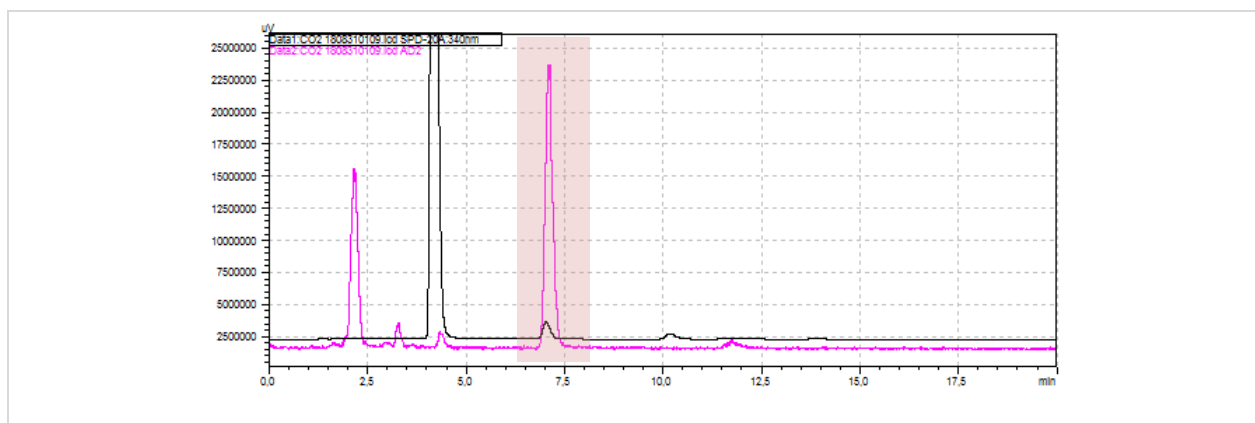


FIGURA 45. [^{11}C]PiB sintetizado a partir de [^{11}C]CO $_2$ utilizando el sistema TBAF/PhSiH $_3$. Cromatograma UV a 340 nm (negro) y gamma (magenta). Condición: MeCN 5.0 min a 100 °C (PRQ: 61%)

Es importante destacar que los productos correspondientes de *N*-formilación y *O*-metilación, 2-(4'-*N*-[^{11}C]formamidofenil)-6-hidroxibenzotiazol y 2-(4'-aminofenil)-6-*O* [^{11}C]metoxibenzotiazol, respectivamente, no se observaron en las condiciones analizadas.

3.3.1.3. Radiosíntesis completa de [^{11}C]PiB por medio de fijación-reducción de [^{11}C]CO $_2$ con TBAF / PhSiH $_3$ y su control de calidad.

Tomando como base los auspiciosos resultados de los experimentos de optimización de *N*- ^{11}C -metilación, empleando el sistema fijación-reducción TBAF / PhSiH $_3$ (**Tabla 22**), se planteó llevar a cabo la radiosíntesis completa de [^{11}C]PiB (marcación, purificación y formulación), utilizando las condiciones de la entrada 13, **Tabla 22**. Los datos de la puesta a punto de esta etapa se resumen en la **Tabla 24**.

Se trabajó con actividades EOB crecientes de [^{11}C]CO $_2$ en el rango de 1 a 5 Ci. El primer hecho que llamó la atención, fue una tendencia del sistema de marcación a disminuir el RC de [^{11}C]CO $_2$ a medida que se utilizaron actividades del mismo más elevadas (**Figura 46**). De hecho, para actividades de [^{11}C]CO $_2$ EOB bajas tales como las usadas en los experimentos de optimización (~0.5 Ci) los rendimientos de captura en diglyme son de alrededor de 80%, valor que disminuye gradualmente hasta un 57% cuando se utilizan ~5 Ci de [^{11}C]CO $_2$ (EOB) (Entradas 1, 4 y 5, **Tabla 24**). Para determinar si esta disminución de la captación de [^{11}C]CO $_2$ era debida a pérdidas de actividad a nivel del reactor, se colocó una trampa de Ascarita® a la salida del mismo con el propósito de atrapar el [^{11}C]CO $_2$ no retenido y medir la actividad del mismo en un calibrador de dosis. Sin embargo, en un experimento donde la [^{11}C]CO $_2$ EOB fue de ~5 Ci, e incluso se aumentó el volumen de diglyme utilizado (750 μL en lugar de 500 μL , ajustando también las cantidades del resto de los reactivos), la actividad retenida en el reactor fue de ~2.1 Ci (RC: 54%, dc) y la actividad atrapada en Ascarita® tan solo 50 mCi. Si bien se continuó trabajando a pesar de este hecho, se necesitan experimentos adicionales para detectar la causa de esta disminución en la captura de [^{11}C]CO $_2$ y corregirla.

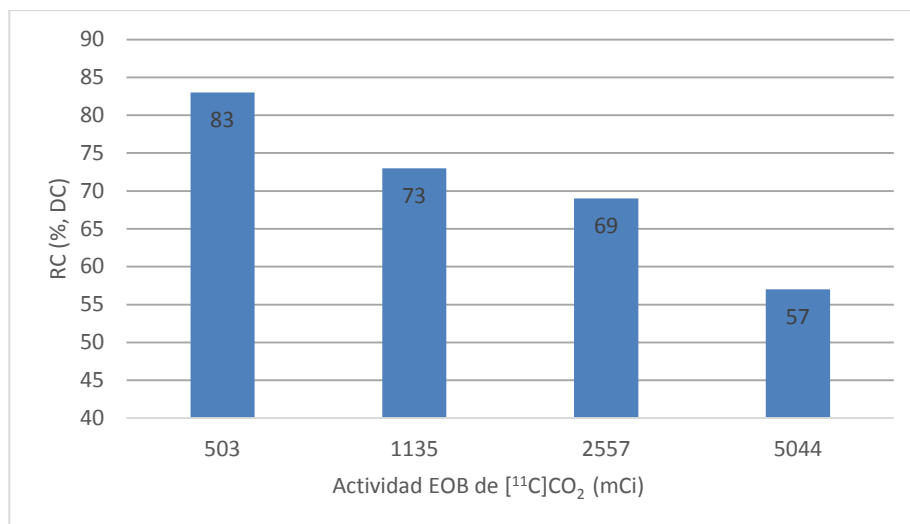


FIGURA 46. Disminución del rendimiento de captura de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con el aumento de la actividad EOB de dicha especie.

Otro fenómeno notorio durante la puesta a punto, fue una disminución dramática en el RRQ luego de la purificación por HPLC semipreparativo (9%, entrada 1, **Tabla 24**). Esto fue debido a una importante disminución de la proporción de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ en el crudo de reacción. Esto se constató utilizando una mezcla MeOH:THF (50/50 v/v), con la cual fue posible eluir al menos una impureza altamente lipofílica presente en el crudo inyectado en la columna semipreparativa (**Figura 47**).

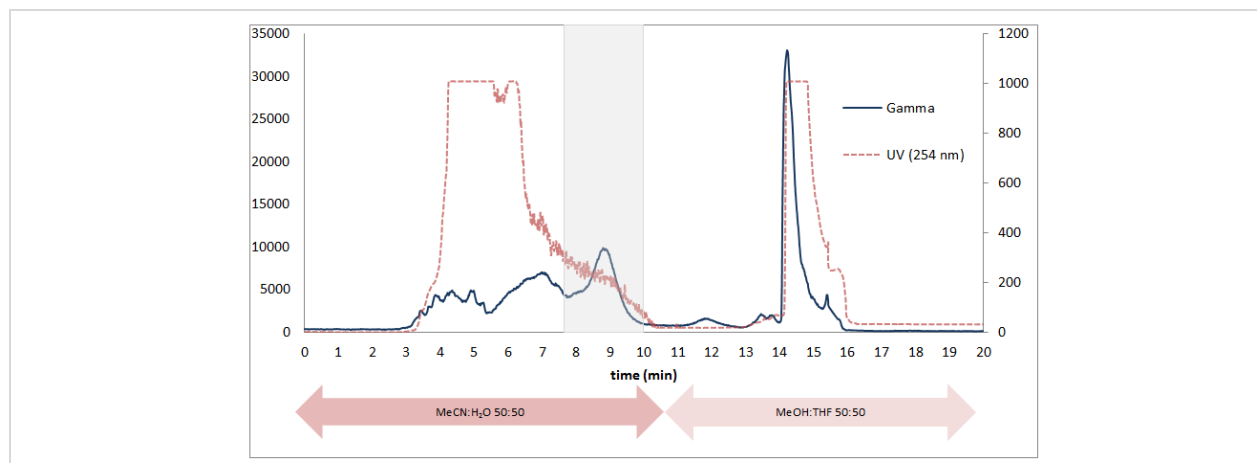
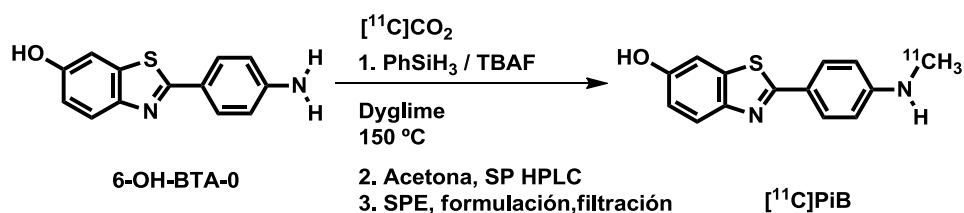


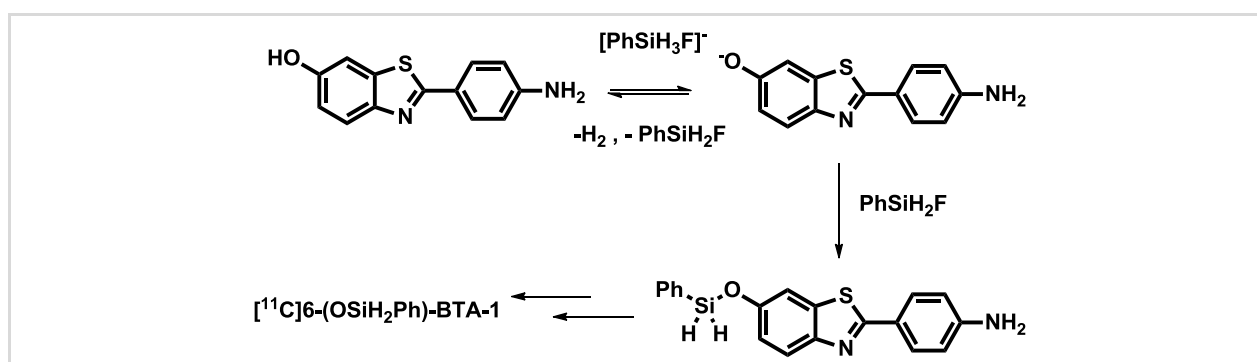
FIGURA 47. Impurezas lipofílicas (t_R entre 14 y 16 min) que eluyen del HPLC semipreparativo con MeOH:THF (50:50 v/v). La fracción conteniendo $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ eluye a t_R 9 min.

TABLA 24. Datos de optimización en la síntesis completa de [^{11}C]PiB



Entrada	Cantidad PhSiH ₃ (mmol)	Cantidad TBAF (mmol)	Tiempo (min)	[^{11}C]CO ₂ EOB (mCi)	RC (% dc)	Actividad [^{11}C]PiB EOS (mCi)	RRQ (% dc)	Conc. PiB (μg/mL)	A _M (GBq/μmol)
1	0.60	0.01	5.0	5044	51	73.1	9	2.2	33.0
2	0.30	0.01	5.0	5044	57	151.2	17	5.4	32.6
3	0.03	0.01	5.0	5044	46	72.6	10	2.5	28.7
4	0.30	0.01	5.0	2557	69	85.2	16	5.1	18.0
5	0.30	0.01	5.0	1135	73	30.2	11	2.3	12.0
6 ^[a]	0.30	0.01	5.0	5044	59	232.1	25	4.7	47.6
7	0.30	0.01	2.5	5044	56	314.0	34	6.1	51.0
8	0.30	0.01	1.0	5044	57	285.0	30	4.6	60.3

[a] +0.29 mmol TBAF, +2.5 min 150°C para desproteger [^{11}C]6-(OSiH₂Ph)-BTA-1.



ESQUEMA 50. Propuesta de formación para un derivado sililado de [^{11}C]PiB, por desprotonaci3n y posterior sililaci3n del precursor 6-OH-BTA-0

Se planteó entonces la hipótesis de que esta impureza puede ser un derivado lipófilo de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ (como $[^{11}\text{C}]$ 6-(OSiH₂Ph)-BTA-1) formado tras la sililación del anión fenóxido 6-(O⁻)-BTA-0 (**Esquema 52**). En tal sentido, con el propósito de eliminar o al menos reducir la formación de tal impureza lipófila, se planteó disminuir la cantidad de PhSiH₃, añadir nuevamente TBAF finalizada la marcación para promover la fluorólisis de los posibles derivados sililados de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, o disminuir nuevamente el tiempo de marcación. La reducción de la cantidad molar de PhSiH₃ a 0.3 mmol y la disminución del tiempo de marcación a 2.5 min y 1.0 min (entradas 7 y 8, respectivamente, **Tabla 24**), resultaron favorables para aumentar el RRQ del proceso hasta un 30%. Un agregado adicional de TBAF para promover la fluorólisis del eventual grupo *O*-sililado del $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ evidenció una cierta mejora en la proporción de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ en el crudo de reacción (entrada 2 vs. 6, **Tabla 24**). Las actividades molares obtenidas a para las marcaciones a 2.5 min y 1.0 fueron 51.0 GBq/μmol y 60.3 GBq/μmol, ambos valores mayores que el criterio de aceptación utilizado en CUDIM (30 GBq/ μmol). A pesar de la baja resolución del cromatograma semipreparativo (**Figura 47**) recoger el pico de $[^{11}\text{C}]$ PiB ($t_R \sim 9$ min) después de que la señal de UV estuviera por debajo de cierto límite arbitrario (400 UA), nos permitió purificar el radiotrazador de otras impurezas químicas y radioactivas (**Figura 48**).

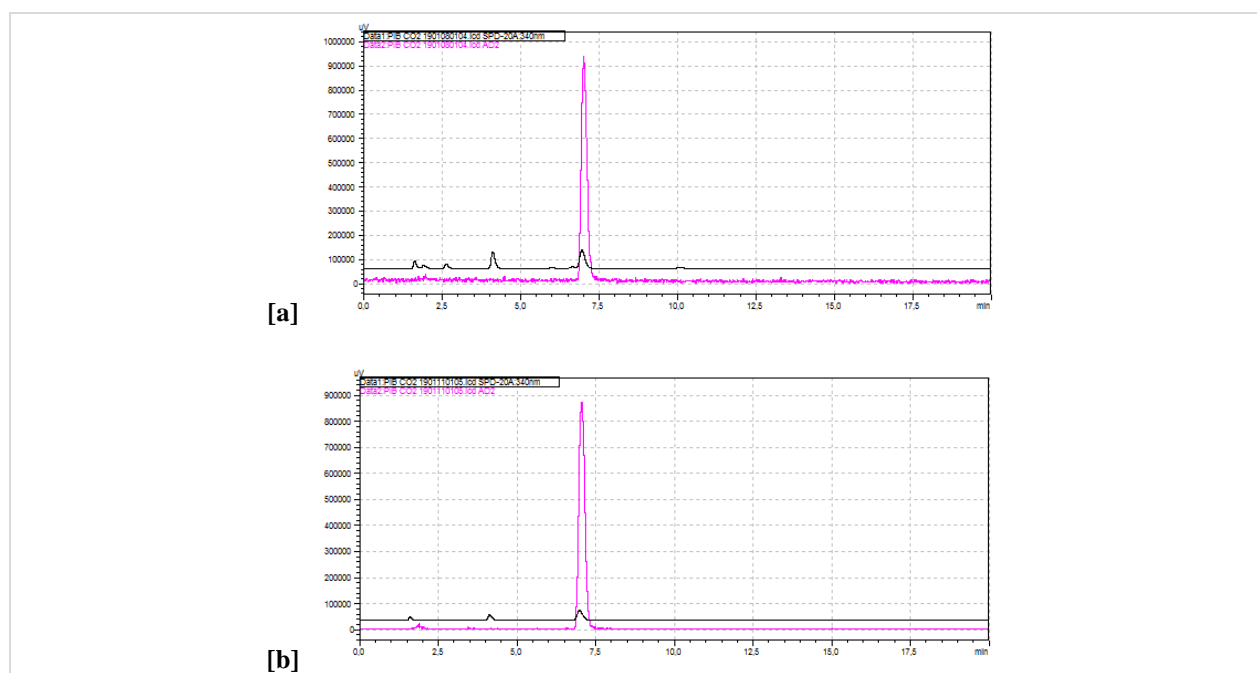
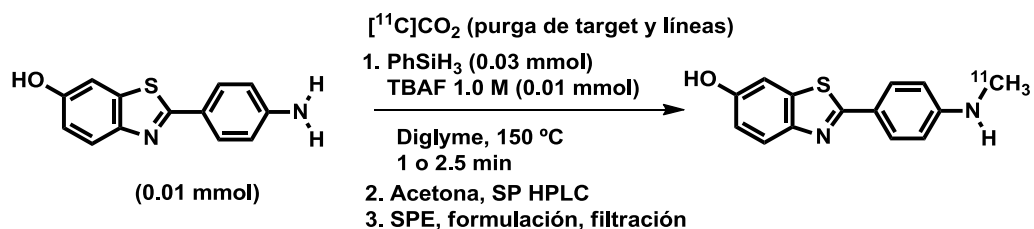


FIGURA 48. $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ purificado y formulado [a] diglyme 150 °C, 2.5 min, [b] diglyme 150 °C, 1.0 min. Negro: UV (340 nm), Magenta: Gamma.

Seguidamente, se realizaron tres lotes consecutivos utilizando las mejores condiciones de reacción determinadas para la radiosíntesis completa de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ (entradas 7 y 8, **Tabla 24**) así como su correspondiente control de calidad. Los resultados de dichos lotes se muestran en la **Tabla 25**. El control de calidad (**Tabla 26**) permitió verificar una PRQ superior al 95% en todos los casos. Las A_M cumplieron en todos los casos con los criterios de liberación utilizados en la radiofarmacia de CUDIM (> 30 GBq / μmol). Se encontró que los disolventes residuales

estaban presentes en cantidades por debajo de su límite respectivo, mientras que diglyme o PhSiH₃ no fueron detectados en el radiofármaco formulado.

TABLA 25. Datos para tres lotes consecutivos de [¹¹C]PiB,



Entrada	Tiempo (min)	PRQ (%)	RC (%. dc)	[¹¹ C]PiB (mCi)	RRQ (%. dc)	Conc. PiB (µg/mL)	A _M (GBq/µmol)
1	2.5	100.0	56	314.0	34	6.1	51.0
2	2.5	100.0	58	250.0	26	4.4	55.3
3	2.5	100.0	56	227.0	25	4.4	50.8
Promedio		100.0	57	263.7	28	5.0	52.4
CV (%)		0.00%	1.67%	17.10%	18.75%	19.76%	4.85%
4	1.0	100.0	57	285.0	30	4.6	60.3
5	1.0	98.6	55	262.3	25	4.2	62.2
6	1.0	98.1	59	254.1	23	4.0	61.6
Promedio		98.9	57	267.1	26	4.0	61.4
CV (%)		1.00%	3.47%	6.00%	13.22%	7.35%	1.58%

TABLA 26. Parámetros de control de calidad fisicoquímico para tres lotes consecutivos de [¹¹C]PiB (se muestran los datos para la marcación de 1 min)

Parámetro	Especificación	Lote 1 (181226)	Lote 2 (190110)	Lote 3 (190111)
Aspecto	Límpido e incoloro	Ok	Ok	Ok
pH	4.5-8.5	5.5	5.0	5.2
Identidad Raquioquímica	Tiempo de retención relativo al estándar: 0.9-1.1	1.02	1.01	1.00
PRQ	≥ 95%	100	98.6	98.1
Concentración PiB (µg/mL)	Sin límite establecido	4.61	4.15	4.06
A _M	≥ 30 GBq/µmol	60.3	62.3	61.6
Concentración 6-OH-BTA-0 (µg/mL)	Sin límite establecido	10.25	3.06	1.63
Otras impurezas (µg/mL)	Sin límite establecido	3.18	2.08	1.50
Solventes residuales y Etanol	Acetona:	0.006	0.003	0.056
	< 0.5 %			
	Etanol:	7.09	7.57	7.67
	< 10 %			
	Acetonitrilo:	0.004	0.008	0.005
	< 0.04%			
	diglyme:	No detected	No detected	No detected
Solventes residuales y Etanol	Sin límite establecido			
	PhSiH ₃ :	No detected	No detected	No detected
	Sin límite establecido			
Identidad radionucleídica (t _{1/2})	19.9 – 20.9 min	20.4	20.1	20.6
Pureza radionucleídica	>99.5% de emisión gamma a 511 keV	Ok	Ok	Ok

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de este nuevo enfoque para la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, comparamos la metodología utilizada en el área de producción de Radiofármacos de uso clínico de CUDIM, con esta nueva radiosíntesis de la incorporación directa de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (**Figura 49**). El método actual de producción de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ mediante N - ^{11}C -metilación con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ permite obtener una actividad promedio de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ (EOS) de aproximadamente 85 mCi (RRQ: 7%, dc), con $A_M = 471 \text{ GBq} / \mu\text{mol}$, a partir de $\sim 4.3 \text{ Ci}$ de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ ($n = 57$, todas las producciones de los últimos 2 años). La aplicación de esta nueva metodología mediante la incorporación directa del precursor $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ permitió obtener más del doble en la actividad de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ EOS, en un tiempo de radiosíntesis global similar utilizando el mismo módulo automatizado con modificaciones mínimas. Como se podría debido a la dilución isotópica con CO_2 ambiental, el uso directo de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ impactó sobre el parámetro A_M , pero en un grado compatible con las especificaciones de CUDIM para este parámetro.

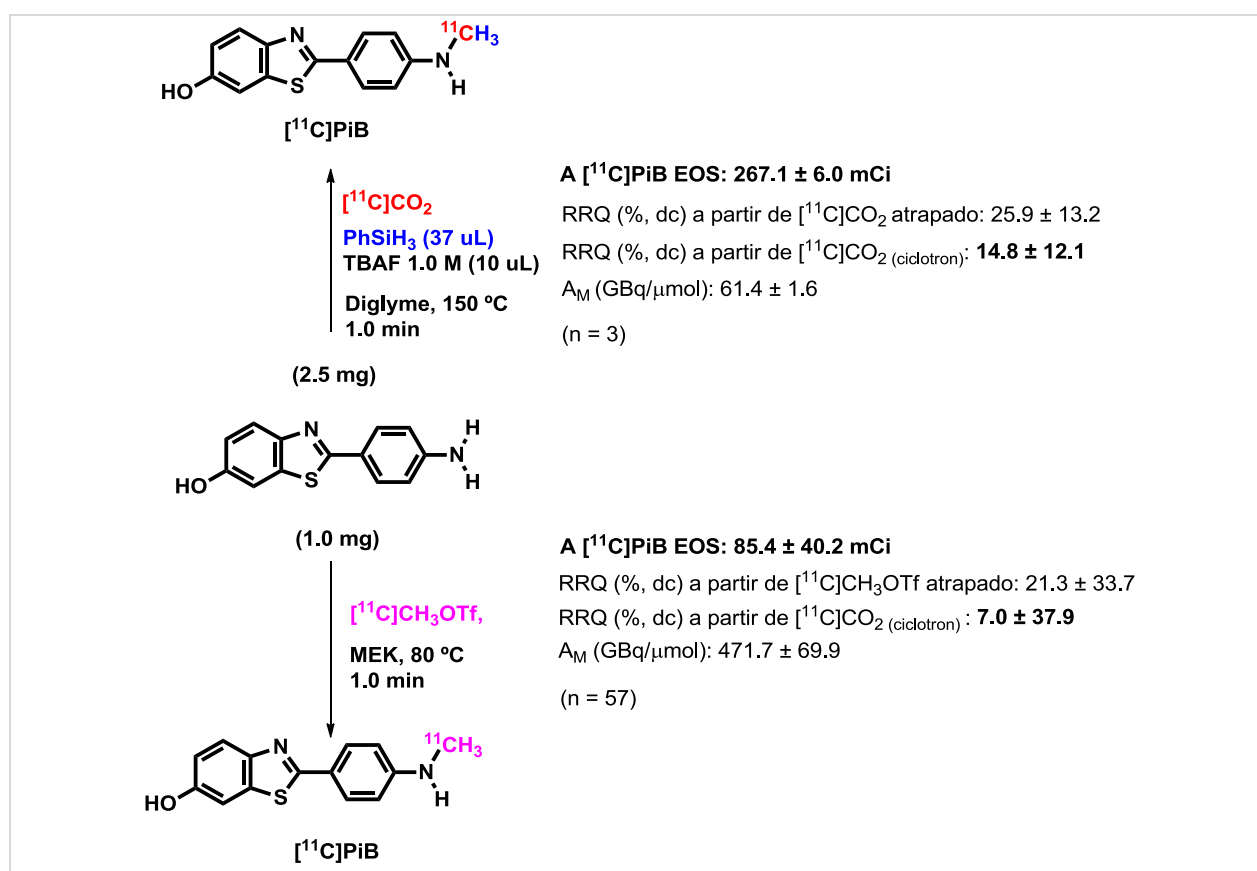


FIGURA 49. Comparación del rendimiento entre la metodología clásica para la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ utilizando $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ y el enfoque presentado en este trabajo, empleando la fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con PhSiH_3 / TBAF . Valores expresados como: (promedio \pm CV (%))

4. FIJACIÓN-REDUCCIÓN DE $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ PARA LA OBTENCIÓN DE OTROS RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS EN CUDIM

La metodología de fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando TBAF / PhSiH_3 fue aplicada a la radiosíntesis de otros radiofármacos utilizados en CUDIM, particularmente el L- $[^{11}\text{C}]\text{Deprenil-D}_2$ ¹⁵⁰ ($[^{11}\text{C}]\text{DED}$), inhibidor irreversible de MAO-B y el agonista adrenérgico $[^{11}\text{C}]\text{Metahidroxiefedrina}$ ¹⁵¹ ($[^{11}\text{C}]\text{MHED}$) (**Figura 50**).

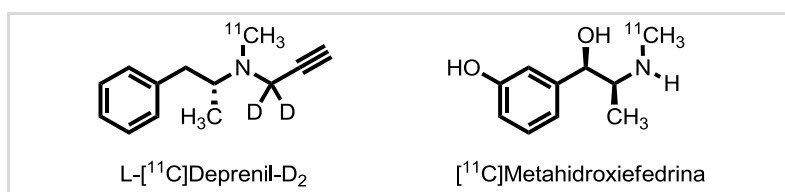
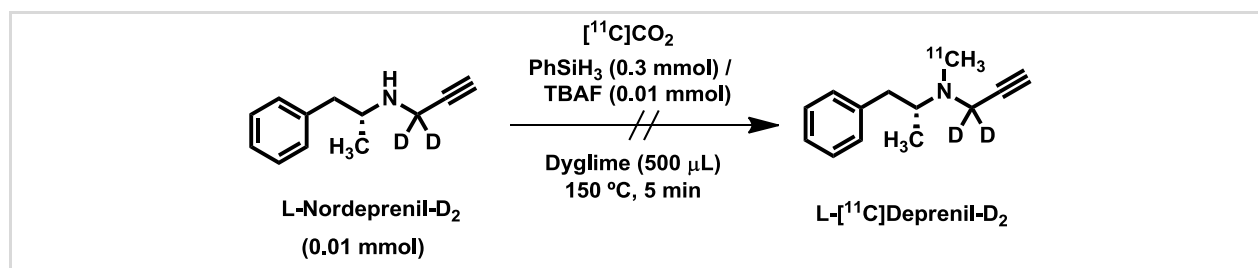


FIGURA 50. Estructuras de los radiofármacos $[^{11}\text{C}]\text{DED}$ y $[^{11}\text{C}]\text{MHED}$

Para el caso del $[^{11}\text{C}]\text{DED}$, la aplicación de la metodología en cuestión utilizando las condiciones indicadas en el **Esquema 51**, no permitió obtener el radiofármaco buscado como se puede evidenciar del cromatograma gamma obtenidos en tales condiciones de marcación, ya que el t_R esperado para $[^{11}\text{C}]\text{DED}$ es de 6.0 min (**Figura 51**)



ESQUEMA 51. Condiciones de N- $[^{11}\text{C}]\text{metilación}$ directa ensayadas para $[^{11}\text{C}]\text{DED}$

¹⁵⁰ Ver aplicaciones y métodos de marcación de $[^{11}\text{C}]\text{DED}$ en: Buccino, P., Kreimerman, I., Zirbesegger, K., Porcal, W., Savio, E., & Engler, H. (2016). *Applied Radiation and Isotopes*, 110, 47.

¹⁵¹ Lodi, F., Carpinelli, A., Malizia, C., Boschi, S. "Synthesis of $[^{11}\text{C}]\text{-meta-hydroxyephedrine}([^{11}\text{C}]\text{MHED})"$. en *Radiochemical Syntheses, Volume 2: Further Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography and New Strategies for their Production*. Editor Peter J.H. Scott. 1st. Ed. John Wiley & Sons. 2015

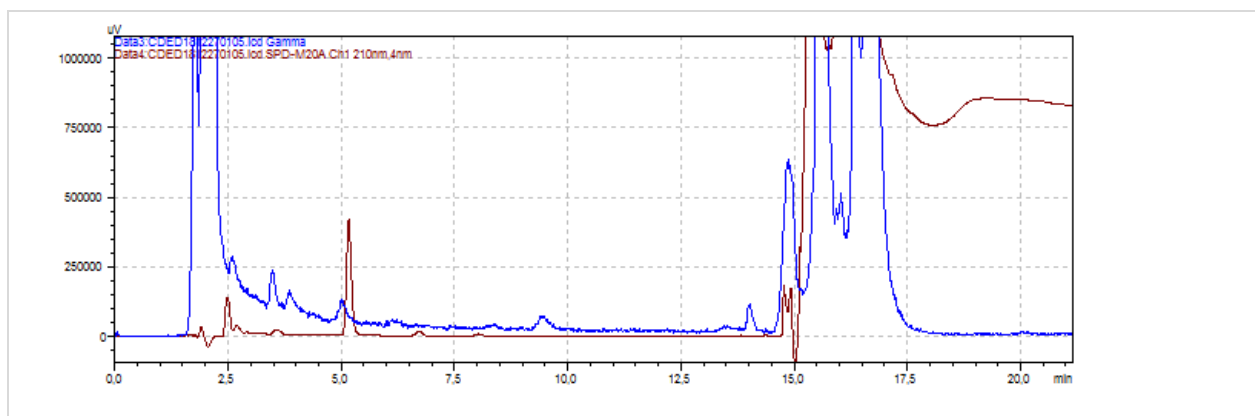
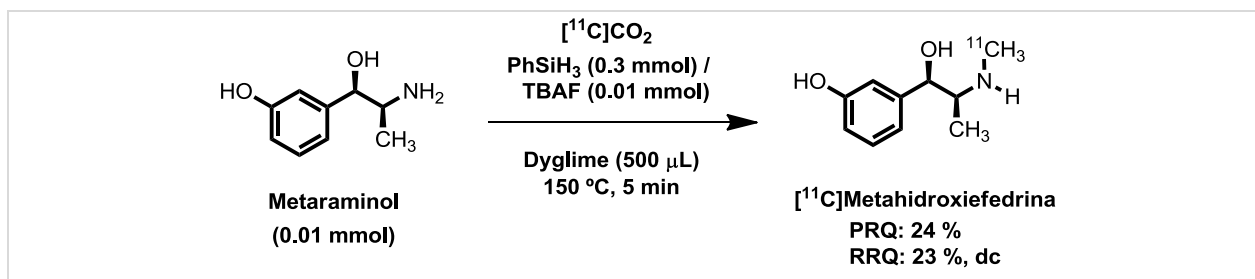


FIGURA 51. Aplicación de la fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ con TBAF / PhSiH_3 para $[^{11}\text{C}]\text{DED}$. Sistema HPLC analítico: Fase estacionaria C18 ec 250 x 4.6 mm. Fase móvil: ác. Trifluoroacético 0.1%:MeCN (75:25 v/v), flujo 1.5 mL/min. Detección gamma (línea azul) y UV 210 nm (línea marrón). t_R esperado para DED: 6.0 min. PRQ: 0%.

En este ejemplo particular, la amina utilizada como precursor para $[^{11}\text{C}]\text{DED}$ es de tipo alifática secundaria, lo que haría pensar a priori en una mayor reactividad con el intermedio formoxisilano (3) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) en la etapa de transferencia, con posterior formación del intermedio formamida correspondiente. Dado que el precursor L-Nordeprenil- D_2 presenta un grupo propargilamina como agrupamiento químico en su estructura, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica con el objetivo de indagar en la reactividad de este sistema en presencia de CO_2 . Así, encontramos que, bajo condiciones suaves de reacción, diferentes propargilaminas son capaces de incorporar CO_2 a presión atmosférica para rendir derivados del sistema heterocíclico 2-oxazolidinonas¹⁵². Basados en estos resultados se decidió abandonar la exploración de esta metodología radiosintética para la obtención de $[^{11}\text{C}]\text{DED}$.

Por otra parte, la aplicación de las mismas condiciones para $[^{11}\text{C}]\text{MHED}$, permitieron obtener esta especie con aproximadamente 24% de PRQ. A partir de 330 mCi de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ aprapado en solución (RC: 60%, dc) se logró obtener 56.2 mCi de $[^{11}\text{C}]\text{MHED}$, lo cual representa un RRQ de 23% (dc) (**Esquema 52 y Figura 52**).

¹⁵² Liu, X., Wang, M. Y., Wang, S. Y., Wang, Q., & He, L. N. (2017) *ChemSusChem*. 10(6), 1210.



ESQUEMA 52. Condiciones de *N*-[¹¹C]metilación directa ensayadas para [¹¹C]MHED

El método de marcación tradicional con [¹¹C]CH₃I optimizado (1 min de marcación a 100 °C, en DMF:DMSO), permite obtener [¹¹C]MHED con un RRQ de 52.2% y un 94% de PRQ. Si bien la marcación directa con [¹¹C]CO₂ no resultó tan eficiente como el método clásico, los resultados obtenidos son preliminares. Como en el caso de [¹¹C]PiB, un estudio exhaustivo de las variables de reacción será necesario para mejorar la performance del método (en términos de RRQ, PRQ y A_M) aplicado a [¹¹C]MHED en particular.

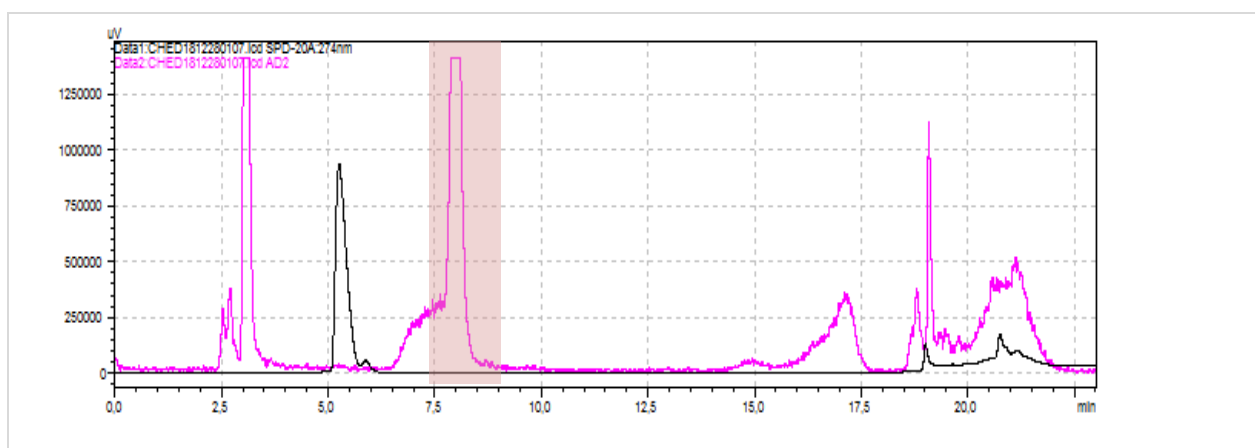


FIGURA 52. Aplicación de la fijación-reducción de [¹¹C]CO₂ con TBAF / PhSiH₃ para [¹¹C]MHED. Sistema HPLC analítico: Fase estacionaria C18 ec 250 x 4.6 mm. Fase móvil: Buffer HCOONH₄:HCOOH 0.2 M (pH=6.0):MeCN (92,5:7,5 v/v), flujo 1.0 mL/min. Detección gamma (línea magenta) y UV 274 nm (línea negra). *t_R* MHED: 7,7 min. PRQ: ~24%.

5. CONCLUSIONES PRELIMINARES DE ESTA ETAPA

Esta etapa del trabajo permitió consolidar un valioso aprendizaje al respecto del uso de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ como precursor radiactivo directo para la radiosíntesis de moléculas orgánicas. Se exploró tanto la fisicoquímica de la captura de esta especie como su comportamiento radioquímico en diferentes disolventes orgánicos y con distintos sistemas fijadores-reductores. Se trabajó con sistemas ya reportados en la literatura tales como IPr / PhSiH₃, y se aplicó nuevos sistemas, tales como DBU / PhSiH₃ o TBAF / PhSiH₃, que hasta el momento no habían sido estudiados para la ^{11}C -metilación de aminas a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$.

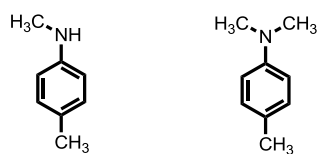
Se demostró la aplicabilidad del sistema TBAF / PhSiH₃ para la radiosíntesis de ^{11}C -aminas con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, en especial para el radiotrazador $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, a través del estudio de la influencia de algunos parámetros físicos y radioquímicos. Utilizando TBAF / PhSiH₃ en diglyme a 150 °C por 1.0 minuto, en la modalidad one-pot, se lograron obtener actividades EOS y rendimientos mayores que las alcanzadas por el método convencional de ^{11}C -metilación con $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$. Ello se logró trabajando en la misma plataforma radiosintética que para las otras marcaciones con ^{11}C , con modificaciones mínimas. También se implementó un control de calidad para los lotes de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ obtenidos mediante esta metodología. Esta parte del trabajo nos motivó a escribir un manuscrito que se presenta en el ANEXO 2 de este capítulo.

La aplicación de la metodología empleada para $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, no mostró resultados favorables para $[^{11}\text{C}]\text{DED}$, pero sí para $[^{11}\text{C}]\text{MHED}$. Queda abierta la posibilidad de mejorar los rendimientos obtenidos para este último radiofármaco, así como continuar explorando la radioquímica de estos procesos, o incluso la aplicación del sistema TBAF / PhSiH₃ para ^{11}C -metilar con $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ otras moléculas de interés radiofarmacéutico.

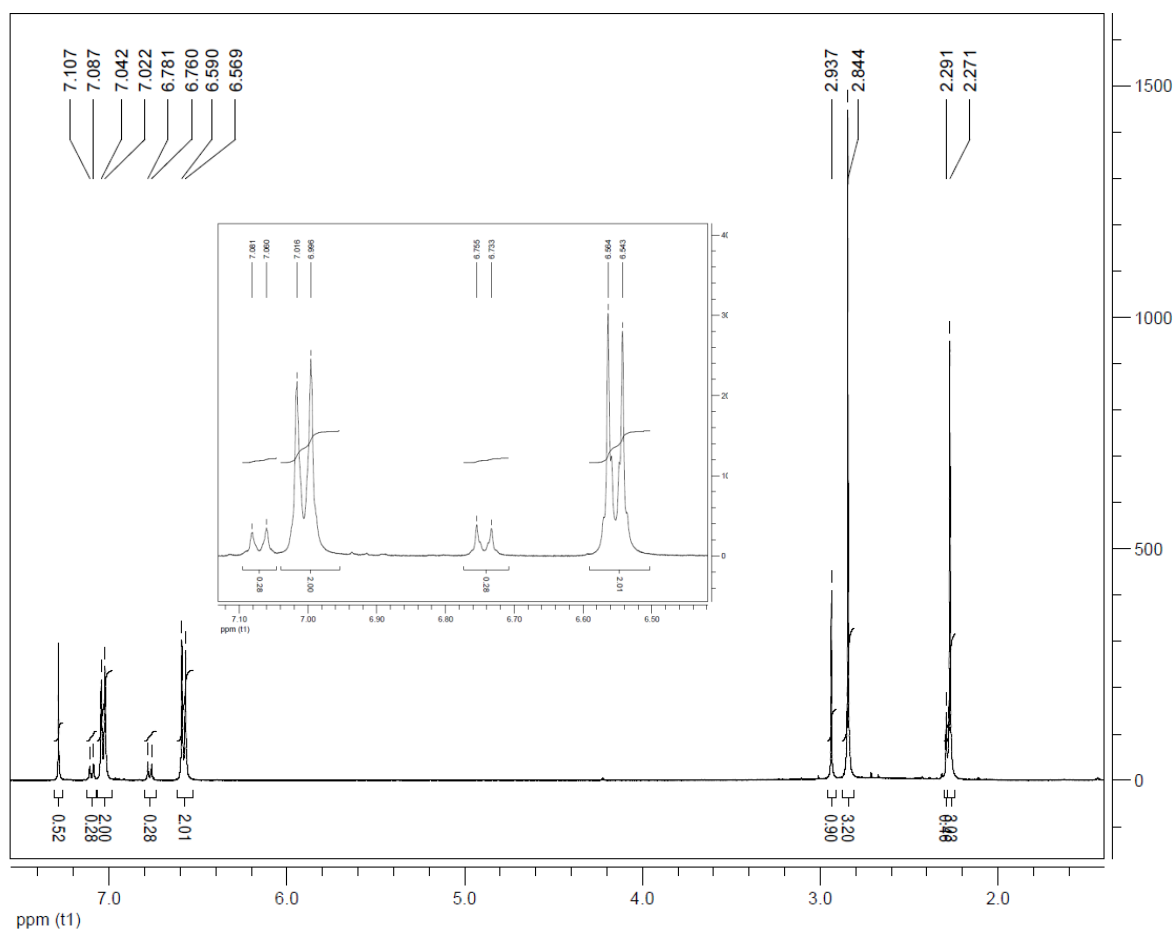
La fijación-reducción de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ es un terreno fértil que, en nuestro grupo, mediante este trabajo, apenas comenzamos a recorrer. Muchos otros agentes fijadores (tales como TBD, BEMP, entre otros) y agentes reductores pueden servir para tales propósitos, e incluso presentar mejoras cuantitativas (mayores rendimientos radioquímicos) o cualitativas (la posibilidad de marcar otros heteroátomos).

ANEXO 1: ESPECTROSCOPÍA

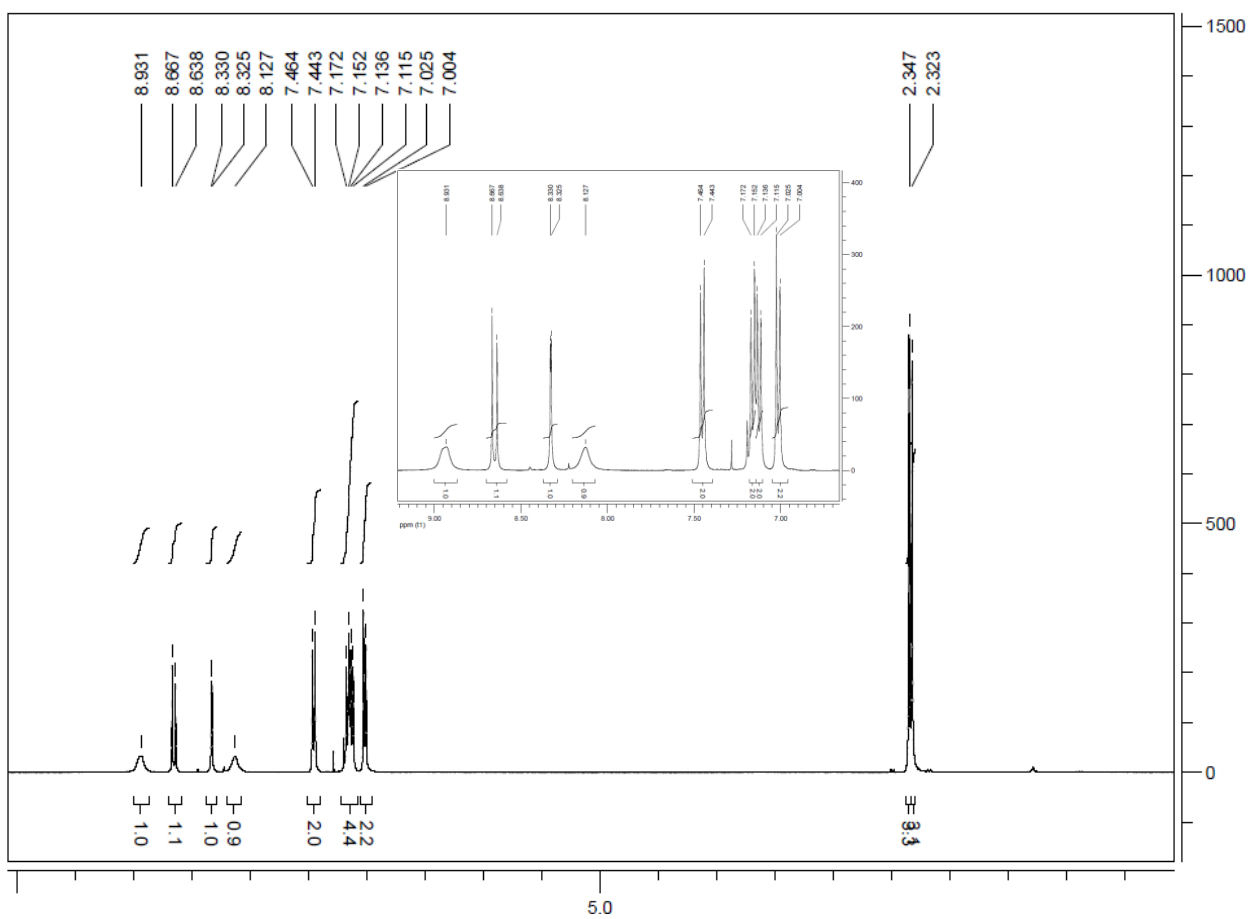
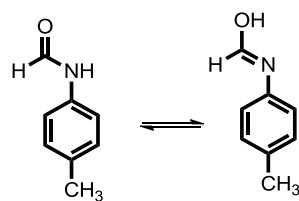
1. Espectro ^1H -RMN correspondiente a la mezcla *N*-metil-4-toluidina, y *N,N*-dimetil-4-toluidina



(8:1)



2. Espectros ^1H -RMN correspondiente a *N*-(4-toluil)-formanilida



ANEXO 2: PUBLICACIÓN

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Fully-automated radiosynthesis of the amyloid tracer [^{11}C] PiB via direct [^{11}C]CO₂ fixation-reduction



Pablo Buccino¹, Eduardo Savio¹ and Williams Porcal^{1,2*}

* Correspondence:

wporcal@gmail.com

¹Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Av. Dr. Américo Ricaldoni 2010, PC 11600 Montevideo, Uruguay

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, PC 11800 Montevideo, Uruguay

Abstract

Background: The β -amyloid radiotracer [^{11}C] PiB is extensively used for the Positron Emission Tomography (PET) diagnosis of Alzheimer's Disease and related dementias. For clinical use, [^{11}C] PiB is produced using the ^{11}C -methylation method ([^{11}C] Methyl iodide or [^{11}C] methyl triflate as ^{11}C -methylation agents), which represents the most employed ^{11}C -labelling strategy for the synthesis of ^{11}C -radiopharmaceuticals. Recently, the use of direct [^{11}C]CO₂ fixation for the syntheses of ^{11}C -tracers has gained interest in the radiochemical community due to its importance in terms of radiochemical versatility and for permitting the direct employment of the cyclotron-produced precursor [^{11}C]CO₂.

This paper presents an optimised alternative one-pot methodology of [^{11}C]CO₂ fixation-reduction for the rapid synthesis of [^{11}C] PiB using an automated commercial platform and its quality control.

Results: [^{11}C] PiB was obtained from a (25.9 \pm 13.2)% (Average \pm Variation Coefficient, $n = 3$) (end of synthesis, decay corrected) radiochemical yield from trapped [^{11}C]CO₂ after 1 min of labelling time using PhSiH₃ / TBAF as the fixation-reduction system in Diglyme at 150 °C. The radiochemical purity was higher than 95% in all cases, and the molar activity was (61.4 \pm 1.6) GBq/ μmol . The radiochemical yield and activity (EOS) of formulated [^{11}C] PiB from cyclotron-produced [^{11}C]CO₂ was (14.8 \pm 12.1)% (decay corrected) and 9.88 GBq (\pm 6.0%), respectively. These are higher values compared to that of the ^{11}C -methylation method with [^{11}C]CH₃OTf (~ 8.3%).

Conclusions: The viability of the system PhSiH₃ / TBAF to efficiently promote the radiosynthesis of [^{11}C] PiB via direct [^{11}C]CO₂ fixation-reduction has been demonstrated. [^{11}C] PiB was obtained through a fully automated radiosynthesis with a satisfactory yield, purity and molar activity. According to the results, the one-pot methodology employed could reliably yield sufficiently high tracer amounts for preclinical and clinical use.

Keywords: [^{11}C] PiB, [^{11}C]CO₂ fixation-reduction, Automated radiosynthesis, PhSiH₃ / TBAF, Alzheimer's disease, PET

Introduction

The compound 2-(4'-N-[^{11}C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole, also known as [^{11}C]6-OH-BTA-1 or [^{11}C] Pittsburgh Compound B ([^{11}C]PiB), has long been recognised as a potent PET radiotracer for beta-amyloid (A β) plaque imaging in the brains of patients with Alzheimer's Disease (AD) and other forms of dementia (Engler et al.

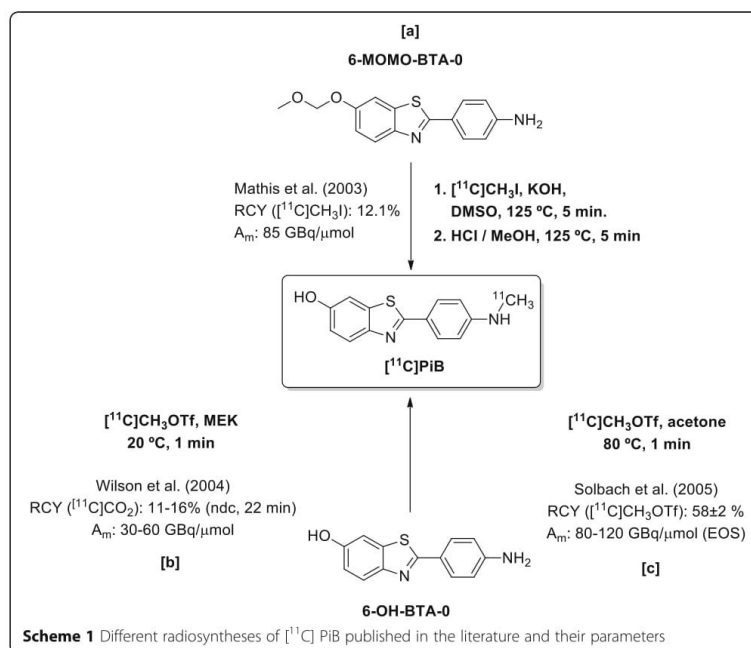


© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

2008; Herholz et al. 2007; Klunk et al. 2004; Nordberg 2004, 2008; Rabinovici and Jagust 2009). [^{11}C] PiB still remains the gold standard for amyloid imaging in AD diagnosis due to its high affinity for A β plaques ($K_d = 1.4 \text{ nM}$) (Mathis et al. 2003), fast uptake and low non-specific binding.

The original radiosynthesis of [^{11}C] PiB was performed by Mathis et al. (2003). It consisted of the ^{11}C -*N*-methylation of the precursor 2-(4'-aminophenyl)-6-methoxy-methoxybenzothiazole (6-MOMO-BTA-0) with [^{11}C] methyl iodide ([^{11}C]CH $_3$ I), followed by an acidic deprotection of the methoxymethyl group. The use of the more reactive ^{11}C -methylating agent [^{11}C] methyl trifluoromethanesulfonate ([^{11}C]CH $_3$ OTf) (Holschbach and Schüller 1993; Jewett 1992) over the unprotected precursor 2-(4'-*N*-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole (6-OH-BTA-0) has permitted a direct and efficient ^{11}C -*N*-methylation, as was demonstrated by Wilson and co-workers (Wilson et al. 2004) and Solbach and co-workers (Solbach et al. 2005) (Scheme 1).

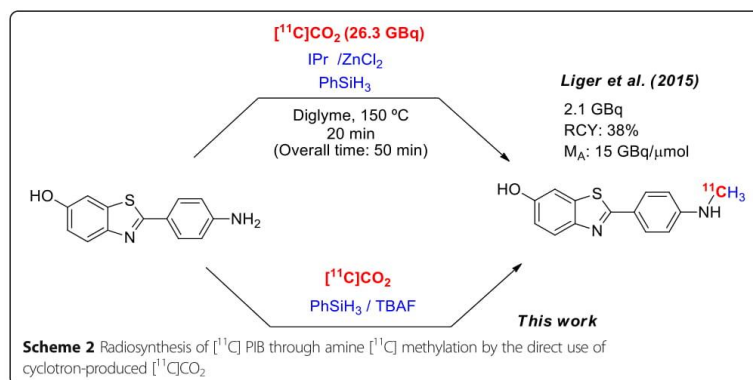
During the last decade, additional optimised radiosyntheses of [^{11}C] PiB have been published in the literature. (Philippe et al. 2011; Coliva et al. 2015; Boudjemeline et al. 2017) Although these radiosyntheses proved to be reliable and easily adaptable to a GMP compliant production for patients, all of them use the secondary precursors [^{11}C] methyl iodide or triflate. The preparation of these secondary precursors from cyclotron-produced [^{11}C]CO $_2$ is always time and activity consuming. (Långström et al. 1999). The overall RCY of any [^{11}C] PiB radiosynthesis, and subsequently the total activity available for patients, is directly affected by these losses of radioactivity during the preparation of [^{11}C]CH $_3$ I or [^{11}C]CH $_3$ OTf. In this sense, any approach capable of eliminating the steps of synthesis of



the ^{11}C -methylating agents would be advantageous for a better overall performance in terms of the RCY and the available activity for PET scans.

$[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ is an attractive starting material for radiolabelling because it is produced directly from the cyclotron with a good yield and with a high A_m . The use of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ via the so-called 'fixation' to synthesise ^{11}C -ureas, ^{11}C -carbamates, ^{11}C -oxazolidinones, ^{11}C -carboxylic acids and ^{11}C -amides is well-documented in the literature, and it is regarded as 'a renaissance of PET radiochemistry' (Rotstein et al., 2013, and references therein). The use of CO_2 as a C_1 building block for the methylation of amines has been recognised and demonstrated (Jacquet et al. 2012, 2013; Li et al. 2013; Das et al. 2014). These approaches have been translated to the ^{11}C radiochemistry field by Liger and co-workers (Liger et al. 2015), which constitutes the first experience of using $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ fixation-reduction for the catalytic methylation of amines. In particular, Liger and co-workers used the approach of Jacquet and co-workers (Jacquet et al. 2013), adapting it to an 'one-pot' procedure involving PhSiH_3 , 1,3-bis (2,6-diisopropylphenyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene (IPr, a *N*-heterocyclic carbene) and ZnCl_2 in Diglyme at 150°C . The authors were able to synthesise a series of aromatic and aliphatic amines with an RCY ranging from 24% to 60% (decay corrected, from trapped $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$) and also applied the methodology for $[^{11}\text{C}]$ PiB preparation. $[^{11}\text{C}]$ PiB was produced after 20 min of incubation at 150°C (50 min overall time), yielding 2.1 GBq of formulated radiopharmaceuticals (RCY = 38% based on trapped $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ and decay corrected, Scheme 2). Although this work demonstrated the considerable potential of the direct $[^{11}\text{C}]$ methylation of amines from $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ fixation-reduction, some weaknesses in this methodology when applied to the radiosynthesis of $[^{11}\text{C}]$ PiB still remains, such as low molar activity (A_m , 15 GBq/ μmol), long reaction times, carbene stability, metal-catalysed *N*-methylation and few or no description of quality control specifications for the so-prepared batches of radiopharmaceuticals.

With an ageing population, there is an increasing demand for $[^{11}\text{C}]$ PiB for clinical applications, and therefore the possibility of applying a methodology of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ fixation-reduction for the routine preparation of $[^{11}\text{C}]$ PiB to increase its radiochemical yield and thus perform more PET studies for each batch of radiopharmaceuticals was devised. In this context, attention was focused on the strategy recently developed by Liu and co-workers (Liu et al. 2016) for the reductive functionalisation of amines with



CO₂. In their work, the authors explored the utility of the formylation and methylation of amines with CO₂ using hydrosilanes / TBAF as the catalytic system.

This approach employed mild reaction conditions because it is a metal-free protocol, and the use of the unstable *N*-heterocyclic carbene was avoided. The radiochemical translation of this methodology was proposed for the radiosynthesis of amines based on radiopharmaceutical interest in particular [¹¹C] PiB (Scheme 2).

The aim of this work was to assess the applicability of the PhSiH₃ / TBAF mediated reductive incorporation of [¹¹C]CO₂ for the radiosynthesis of the β-amyloid tracer [¹¹C]PiB. A fully automated, GMP adaptable, fast radiosynthesis of [¹¹C] PiB by means of [¹¹C]CO₂ fixation-reduction was developed employing the commercially available platform GE TRACERlab® FX C Pro and its quality control.

Materials and methods

Chemicals and materials

All chemicals and reagents used in this work were commercially available products and were used without further purification. Anhydrous solvents MeCN (99.8%), DMF (99.8%), DMSO (99.9%) and bis (2-methoxyethyl) ether (Dyglime, 99.5%) were purchased from Sigma-Aldrich and stored and handled under inert atmosphere. Tetrabutylammonium fluoride (TBAF) 1.0 M in THF and PhSiH₃ (97%) were acquired from Aldrich, stored in a desiccator and handled in an inert atmosphere (N₂). 6-OH-BTA-0 was obtained from Siquimia. 4-Toluidine was purchased from Fluka. 6-OH-BTA-0, 6-OH-BTA-1 and 6-(MeO)-BTA-0 were used as analytical standards and were purchased from ABX (GmbH). *N*-methyl-4-toluidine, *N*-formyl-4-toluidine and 2-(4'-*N*-[¹¹C]formamidophenyl)-6-hydroxybenzothiazole (PiB *N*-formyl derivative) were synthesised using standard organic chemistry procedures described in the literature (Vogel 1956; Shekhar et al. 2009). Absolute Ethanol (99.8%) was purchased from Merck. Saline and Water for Injection (sterile, USP grade) were acquired from Farmaco Uruguayo. Sep-Pak® C₁₈ light cartridges were purchased from Waters and were preconditioned with ethanol (5 mL) followed by water for injection (10 mL) and air (5 mL). Millex® GV sterile filters (0.22 μm, PVDF, 33 mm) were purchased from Millipore. The semipreparative HPLC column used for [¹¹C] PiB purification was a Luna® 5 μm C18(2) 100 Å 250 × 10 mm column (Phenomenex). The analytical HPLC column used for both model amine (4-toluidine) ¹¹C-methylation and [¹¹C] PiB radiosynthesis was a Nucleodur 100–5 C18-ec 250 × 4.6 mm column (Macherey-Nagel). The analytical GC column was a DB-WAX that was 30-m in length, 0.53-mm in diameter and 1.00-mm in film thickness (Agilent).

Instruments

[¹¹C]CO₂ was produced by the ¹⁴N(p,α)¹¹C nuclear reaction in a PETtrace™ 800 16.5 MeV cyclotron (GE Healthcare). A high-performance target was used for [¹¹C]CO₂ production. The target content was a mixture of N₂ and 1.0% O₂ (Praxair). To assess the best labelling conditions, ~ 18.5 GBq of [¹¹C]CO₂ (50 μA, 3 min) were used, and ~ 185 GBq (70 μA, 35 min) were used for complete radiosynthesis (labelling, purification and formulation).

Radiosyntheses were carried out using a TRACERlab® FX C PRO module (GE Healthcare) (see Additional file 1: Figure S1). All valves of the TRACERLab® module were controlled according to the pre-programmed time intervals (time lists) to transfer the reagents from one

part to another part of the instruments. Helium pressure was used to transfer the reagents. The transfer of the radioactivity was traced and recorded with an inbuilt radioactivity detector. A by-pass of the iodination loop was made to redirect the purified [^{11}C]CO $_2$ towards the reaction vessel (reactor). A pre-injection vial (10 mL) was installed before the injection loop, controlled by valve 10 and pressurised with helium from valve 19. The purpose of this vial was to collect the reactor content and the portions of rinse solvent (acetone) added from Vial 3 before the loading of the HPLC loop.

HPLC analyses were performed with a Shimadzu UFLC equipped with UV and a gamma detector (Lablogic Flow RAM HPLC detector). The GC analyses of ethanol, residual reagents and residual solvents were carried out using a Shimadzu GC-2010 Plus equipped with an FID detector. The gamma spectrometry was performed using a 1023-channel Ortec multichannel analyser with a 1" \times 1" NaI (TI) crystal. The activity measurements were performed using a Capintec CRC 25 ionisation chamber.

General procedure for the ^{11}C -methylation of amines with [^{11}C]CO $_2$ using PhSiH $_3$ /TBAF

Preparation of the module

Prior to any radiosynthetic procedure, the molecular sieves (MS, 4 Å, 60–80 mesh) column of the TRACERlab™ FX C Pro was heated to 350 °C under helium flow (40 mL/min) for 15 min and then cooled to room temperature under a helium atmosphere. Simultaneously, the reactor was rinsed with acetone, flushed with helium and further dried under a vacuum to 100 °C for 30 min. The reactor was then cooled to 25 °C and was kept in a positive helium atmosphere (> 300 kPa) until its use in the radiosynthetic experiment.

Flushing of the target and lines

To improve A_m , a protocol described by our group (Savio et al. 2012) was followed. In short, the content of the target was delivered to the molecular sieves column at 350 °C under flowing helium (40 mL/min) to decrease the amount of unlabelled CO $_2$ and to send it to waste ('cold flush'). Immediately before beginning the irradiation for the radiosynthesis, the target was bombarded at 70 μA for 5 min, and its content was directly sent to waste ('hot flush').

Preparation of the reagent solution

PhSiH $_3$ was added slowly over a solution of the amine (4-toluidine or 6-OH-BTA-0) in the desired solvent (0.5 mL) in an inert atmosphere. The solution was vigorously mixed using a vortex agitator, and then TBAF 1.0 M in THF was carefully added over the mixture. The evolution of gas and changes in colour were usually observed during this step. The resulting solution was mixed using a vortex agitator, taken by a syringe, loaded into the reactor of the TRACERlab™ module and sparged with helium (40 mL/min) for 5 min, ideally no more than 5 min before the end of bombardment (EOB).

Optimisation of N-[^{11}C -methyl]-4-toluidine

The cyclotron produced [^{11}C]CO $_2$ (EOB Activity: A_0) was sent to the module and trapped in the MS column at room temperature for further purification. The delivery duration was approximately 3 min. The MS column was then heated to 350 °C to desorb purified [^{11}C]CO $_2$, which was transferred under a helium stream (15 mL/min) to

the reactor where the amine solution was placed. Trapping was performed at room temperature. The trapped $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ activity was monitored and registered. Once trapping was complete (a maximum activity A_T is reached), the reactor was sealed, and the solution was heated to the chosen temperature. For evaluating the losses of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ during the heating step, 'start of labelling activity' (A_{SOL}) was registered once the temperature reached the desired value. Likewise, 'end of labelling activity' (A_{EOL}) was registered once the labelling time was finished. The solution was cooled to approximately 70°C and was diluted with 0.5 mL of the same solvent used in the radiolabelling step. The solution was collected in a vial, its activity (A_{VIAL}) was measured and radio HPLC analyses were performed to determine the relative radiochemical proportion of the expected species.

Automated radiosynthesis of $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$

The same protocol described was conducted using 6-OH-BTA-0 as the precursor amine. Once the labelling step was finished, the solution was cooled and sent to the pre-injection vial. The reactor was then rinsed with acetone (1 mL) from Vial 3, combined with the reaction crude and injected into the HPLC. The separation of $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ was achieved using $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (50,50 v/v) at a flow rate of 4 mL/min (t_R : 8.5–9.5 min). The fraction containing $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ was collected over 50 mL of water for injection and then passed through a Sep-Pak® C18 light cartridge. The excess HPLC solvent was washed with water for injection (10 mL). $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ was eluted from the SPE cartridge with 0.9 mL of absolute ethanol and collected over 5 mL of preloaded saline. In addition, 4 mL of saline were used to rinse the SPE cartridge. The solution of formulated $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ was filtered through a 0.22 μm sterilising filter. The total time of radiosynthesis was about 32 min (since EOB) or 25 min (since the end of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ trapping).

Physicochemical quality control

Radiochemical purity (RCP) was determined using analytical radio-HPLC. An isocratic condition with a $\text{CH}_3\text{COONH}_4 / \text{CH}_3\text{COOH}$ buffer 0.1 M, pH = 5.0 and MeCN (40:60 v/v) at a flow rate of 1.2 mL/min was used for 4-toluidine. For $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, an isocratic condition with H_2O and MeCN (50:50 v/v) at a flow rate of 1.2 mL / min was used. RCP was calculated considering the area of the peak corresponding to the desired analyte in relation to the sum of the areas of all peaks. The identity of radioactive products was confirmed by co-elution with the non-radioactive standard compounds. UV detection was 270 nm for 4-toluidine and 340 nm for PiB. A_m was calculated considering the activity of $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ EOS x RCP in relation to the molar amount of PiB in the sample.

Residual solvents and reagents (such as acetone, acetonitrile, Diglyme and PhSiH_3) and ethanol were analysed by gas chromatography (GC) in accordance with USP general chapter <467>. The temperature programme for GC runs was a gradient of 40°C hold for 2 min, $1^\circ\text{C}/\text{min}$ to 44°C , $20^\circ\text{C}/\text{min}$ to 200°C and 200°C hold for 2 min (total time of 15 min) with helium (11.3 mL/min) as the carrier gas.

The appearance of the solution was checked by visual inspection. The pH level was determined using a calibrated pH-meter. Radionuclidic purity was assessed by recording the corresponding gamma spectrum, and radionuclidic identity was assessed by measuring the physical half-life.

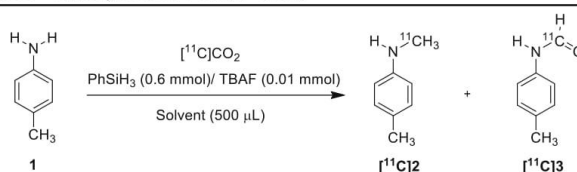
Results and discussion

Optimisation of *N*-[¹¹C-methyl]-4-toluidine

To assess the potential of the [¹¹C]CO₂ reduction-fixation methodology with PhSiH₃ / TBAF, the research began by selecting the primary aromatic amine 4-toluidine (4-methylaniline) as a model substrate. The fixation-reduction reaction in different solvents, temperatures and varying amounts of amine substrates and TBAF catalysts was studied using an automated commercial platform TRACERlab™ FX C PRO. The aim was to maintain an excess of PhSiH₃ (0.6 mmol), which remained constant during the test runs, as well as the total volume of the solution (0.5 mL). Data collected for the radio-synthesis using the reactivity model are summarised in Table 1.

The reactivity of the system was evaluated through the radiochemical yield (RCY) of *N*-[¹¹C-methyl]-4-toluidine ([¹¹C]2). The formation of [¹¹C]2 was observed in practically all conditions where the capture of [¹¹C]CO₂ was considerable. Based on the work of Liu and co-workers (Liu et al. 2016), the experimental conditions began with using MeCN as a solvent. Thus, in MeCN at 80 °C, a radiochemical yield of 14% was obtained for [¹¹C]2 (entry 1, Table 1). An increase in the amount of the amine 1 precursor led to an improvement in the radiochemical yields of [¹¹C]2 (entries 2 and 3). Similar

Table 1 Direct ¹¹C-methylation of 1 with [¹¹C]CO₂



Entry	[1] [mmol]	Solvent	Temperature (°C)	Time (min)	[¹¹ C]CO ₂ ^[a] trapping efficiency (%, dc)	Radiochemical yield ^[b] [¹¹ C]2 (%, dc)	Radiochemical yield [¹¹ C]3 (%, dc)
1	0,01	MeCN	80	5	92	12	8
2	0,05	MeCN	80	5	84	27	3
3	0,10	MeCN	80	5	88	35	3
4	0,05	MeCN	100	5	48	37	0
5	0,05	MeCN	100	10	70	27	6
6 ^[c]	0,05	MeCN	100	5	60	6	3
7	0,10	MeCN	100	5	65	42	0
8	0,05	DMSO	50	5	89	3	14
9	0,05	DMSO	100	5	76	48	0
10	0,05	DMSO	120	5	81	63	0
11	0,05	DMSO	150	5	82	71	0
12 ^[d]	0,05	DMSO	100	5	2	0	0
13 ^[e]	-	DMSO	-	-	67	-	-
14 ^[e]	-	DMSO	150	5	63	-	-
15	0,05	DMF	100	5	80	15	26
16 ^[d]	0,05	DMF	100	5	4	0	0

[a] Experiments were performed using approximately 18.5 GBq of [¹¹C]CO₂ as a starting activity from the cyclotron; [b] Radiochemical yield (% dc) was estimated as the actual final activity of [¹¹C]2 or [¹¹C]3 in relation to trapped [¹¹C]CO₂ (A_T) (decay corrected); [c] TBAF (0.05 mmol) [d] without TBAF [e] blank experiments in DMSO

radiolabelling results were obtained when both the temperature and the reaction time were increased (entries 4 and 5). Nonetheless, under these conditions, the RCY observed was lower than 45% in all cases (entries 1–7, Table 1).

Next, DMSO and DMF were selected as solvents for radiolabelling. The choice was inspired by a recent work in which these solvents promoted the *N*-Formylation of amines using carbon dioxide and phenylsilane under mild conditions (Lv et al. 2016). Thus, these solvents might play a key role in promoting the CO₂ dissolution-insertion and the subsequent interaction of amines with the phenylsilane complexes towards the *N*-methylation reaction. When DMSO was used as a radiolabelling solvent at 150 °C for 5 min, the desired *N*-methylamine [¹¹C]2 was formed with a high radiochemical yield (71%, entry 11, Table 1), presumably due to the higher temperature employed. Indeed, a drop in the RCY for [¹¹C]2 in DMSO was observed as the labelling temperature decreased (entries 8–11, Table 1). It should be noted that the presence of TBAF proved to be essential because the amine [¹¹C]2 was not obtained in its absence (entry 12, Table 1), which is in accordance with the work of Liu and co-workers (Liu et al. 2016). Two blank experiments were carried out in DMSO to determine which species formed in the absence of amine. When [¹¹C]CO₂ was merely collected in a DMSO solution of PhSiH₃/TBAF (entry 13, Table 1), the formation of a single hydrophilic product eluting at $t_R = 1.68$ min was observed, which was presumed to be [¹¹C]HCOO⁻. Upon heating this solution for 5 min at 150 °C (entry 14, Table 1), the predominant radioactive compound eluted at $t_R = 2.18$ min. Based on the proposed reaction mechanism, it was hypothesised that this product could be the key formoxysilane (3) intermediate (See Additional file 1: Scheme S1) because it was the main radiochemical impurity observed in DMSO when amine was present in the labelling crude.

Finally, a significantly lower radiochemical yield was observed when DMF was tested as a reaction solvent compared to DMSO (entry 15 vs entry 9, Table 1). In some cases, the presence of *N*-[¹¹C]-4-tolylformamide ([¹¹C]3) was detected. This is in agreement with the proposed reaction mechanism in which a *N*-¹¹C-formamide would be a precursor for the *N*-¹¹C-methyl amine (Additional file 1: Scheme S1). Thus, when DMF was used as a solvent at 100 °C, ([¹¹C]3) was obtained with an RCY of 26% (entry 15, Table 1), whereas when using MeCN and DMSO as solvents at 80 and 50 °C, [¹¹C]3 was formed in 8 and 14% of RCY, respectively (entries 1 and 8, Table 1).

Another important parameter of the [¹¹C]CO₂ fixation methodology is the trapping efficiency of the reagent solution. This was evaluated as the relationship between maximum trapped [¹¹C]CO₂ activity (A_T) and [¹¹C]CO₂ EOB theoretical activity (A_0), and it was decay corrected. The trapping of [¹¹C]CO₂ was dramatically affected by the amount of TBAF in the solution. When no TBAF was present, the trapping efficiency of [¹¹C]CO₂ was less than 5% (entries 12 and 16, Table 1). This is consistent with the mechanism in which TBAF was necessary to form the adduct [PhSiH₃F]⁻ that would have been responsible for solubilising the [¹¹C]CO₂ in the form of [¹¹C]HCOO⁻ (See Additional file 1: Scheme S1); however, increasing the amount of TBAF to 0.05 mmol did not appear to be favourable for a more efficient trapping (60%, entry 6, Table 1). All the solvents used showed good performance for trapping [¹¹C]CO₂ at room temperature when 0.01 mmol of TBAF was used independently from the amine concentration. Nevertheless, when no amine was added (blank runs in DMSO), a small decrease in the trapping efficiency was observed (entries 13 and 14, Table 1).

No losses of radioactivity due to the volatilisation of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ or other radioactive derivatives were observed during the radiolabelling step, which indicated that the ^{11}C species were quantitatively solubilised into the solution (Fig. 1). The losses of radioactivity were evaluated based on the relationship between $A_{\text{EOL}}/A_{\text{SOL}}$ and were decay corrected. In all cases, this relationship was approximately 100%.

Radiosynthesis of $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$

In accordance with the encouraged results obtained for *N*- $[^{11}\text{C}$ -methyl]-4-toluidine, DMSO was initially chosen for attempting the labelling of $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ with $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$, starting from 0.02 mmol (5.0 mg) of the precursor 6-OH-BTA-0. As shown in Table 2, labelling time varied (entries 1–5, Table 2), and it was found that at 2.5 min, the reductive incorporation of $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ into $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ transpired with good RCY and radiochemical purity (RCP) (74% and 65%, respectively); even at 1.0 min, both parameters were promising (62% and 61%, respectively). To decrease the amount of 6-OH-BTA-0 to a value closer to those used for the $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ labelling methodology, 0.01 mmol (2.5 mg) and 0.005 mmol (1 mg) were used. Lowering the mass of 6-OH-BTA-0 was detrimental for the RCY as well as for RCP when 1 mg was employed (entry 6, Table 2); however, decreasing the molar amount of the precursor proved to be advantageous in terms of A_m (entries 2, 7 and 6, Table 2) (as defined in Coenen et al. 2017).

These results could be correlated with a higher degree of reaction between increasing concentrations of the precursor and environmental CO_2 to obtain PiB (considering an excess of environmental CO_2 that dilutes $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ during the experiments). In this context, a further flushing of the lines and the target lowered the concentration of unlabelled PiB, but the total concentration was still high for the purposes (entry 8, Table 2). The elevated values in the concentrations of PiB led to the assumption that other phenomena could be added to the incorporation of environmental CO_2 , and in this sense, a contribution of a methyl group from the DMSO used as a solvent was

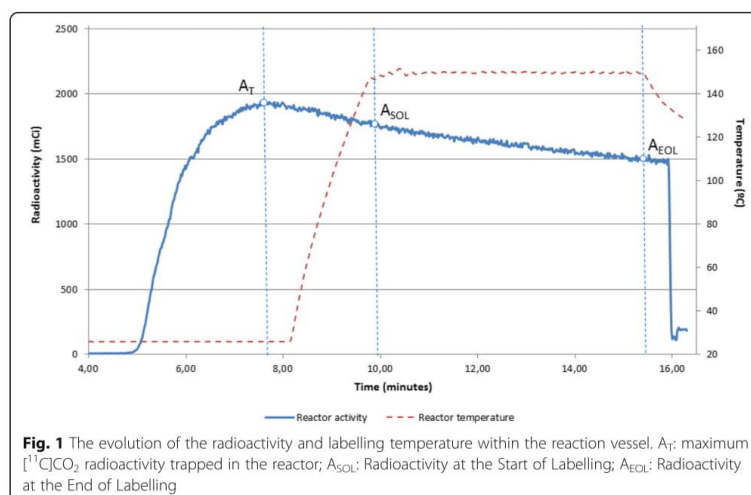
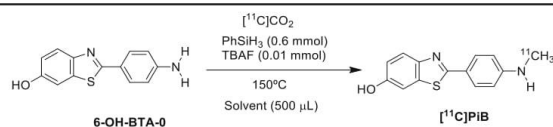


Table 2 Optimisation of reaction conditions for radiolabelling [^{11}C] PiB from direct [^{11}C]CO $_2$ incorporation

Entry	6-OH-BTA-0 [mmol]	Solvent	Time (min)	[^{11}C]CO $_2$ trapping efficiency (% dc)	RCP (%) of [^{11}C]PiB	RCY (% dc)	PiB Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	A_m (GBq/ μmol)
1	0.02	DMSO	1	53	61	62	-	-
2	0.02	DMSO	2.5	52	65	74	1511	0.3
3	0.02	DMSO	5.0	59	65	68	-	-
4	0.02	DMSO	7.5	46	69	55	-	-
5	0.02	DMSO	10	55	65	50	-	-
6	0.005	DMSO	2.5	63	32	33	83	2.5
7	0.01	DMSO	2.5	70	67	48	761	0.9
8 ^[b]	0.01	DMSO	2.5	67	44	51	333	1.5
9 ^{[c], [d]}	0.01	DMSO	2.5	-	-	-	375	-
10 ^{[c], [d], [e]}	0.01	DMSO	2.5	-	-	-	44	-
11 ^{[c], [d]}	0.01	dyglime	2.5	-	-	-	56	-
12 ^{[b], [c]}	0.01	diglyme	2.5	40	64	57	105	4.4
13 ^{[b], [c], [f]}	0.01	diglyme	5.0	83	68	72	69	16.2

[a] Experiments were performed using approximately 18.5 GBq of [^{11}C]CO $_2$ as a starting activity from the cyclotron; [b] 'cold' and 'hot' flushes of targets and lines; [c] solution sparged with He (5 min, 40 mL/min); [d] without [^{11}C]CO $_2$, [e] without [^{11}C]CO $_2$ and without PhSiH $_3$ / TBAF, [f] $n = 3$

suspected. Indeed, as Jiang and co-workers (Jiang et al. 2014) reported, DMSO can be used as a methylating agent for amines in the presence of HCOOH at 150 °C.

In this system, the presence of unlabelled formoxysilane (PhSiH $_2$ OCHO) could lead to the activation of DMSO in the form of a methylmethylenesulphonium cation, which could act as the methylating agent depicted by the authors (as shown in Additional file 1: Scheme S2). To demonstrate the contribution of the methyl group from DMSO, two [^{11}C]CO $_2$ blank experiments were carried out (entries 9 and 10, Table 2). As expected, a higher concentration of PiB was observed in the presence of DMSO and PhSiH $_3$ /TBAF compared to that obtained when no PhSiH $_3$ / TBAF were added to the DMSO solution.

In view of these assumptions, it is proposed that the use of an alternative solvent with a high boiling point might be favourable for improving the A_m of [^{11}C]PiB. Indeed, the work of Liger and co-workers employed Diglyme as a reaction solvent for the direct [^{11}C] methylation of amines from [^{11}C]CO $_2$ (Liger et al. 2015). When using Diglyme in a [^{11}C]CO $_2$ blank experiment carried out in the presence of PhSiH $_3$ / TBAF, the concentration of PiB decreased considerably with respect to the corresponding experiment with DMSO (entry 11, Table 2).

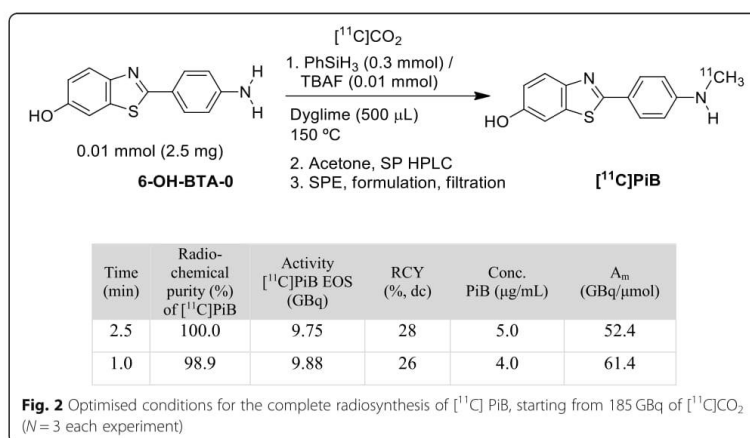
Similar results were obtained in the presence of [^{11}C]CO $_2$ in Diglyme at 150 °C for 2.5 min, decreasing the concentration of PiB to 105 $\mu\text{g/mL}$ (entry 12). The RCY and RCP of the [^{11}C] PiB achieved under these conditions were 57% and 64%, respectively. Further increasing the labelling time to 5 min allowed for obtaining a higher RCY and RCP for [^{11}C] PiB, and the highest A_m achieved (entry 13, Table 2). Furthermore, the [^{11}C]CO $_2$ trapping efficiency was 83% for this condition.

It is important to highlight that the corresponding products of *N*-formylation and *O*-methylation, 2-(4'- ^{11}C]formamidophenyl)-6-hydroxybenzothiazole and 2-(4'-amino-phenyl)-6- ^{11}C] methoxybenzothiazole, respectively, were not observed under the conditions assayed (data not shown).

Full radiosynthesis and quality control of ^{11}C]PiB

Based on the results of the previous experiments, the complete radiosynthesis of ^{11}C] PiB in Diglyme was tested at 150 °C for 5 min using the starting activities of ^{11}C]CO₂ in the range of 37 to 185 GBq. In general, it was observed that RCY dramatically dropped after the semipreparative HPLC separation, and it was found that this was due to a serious decrease in the radiochemical purity of the ^{11}C] PiB formed under these conditions. Indeed, highly lipophilic impurities were found to elute after passing a low polarity mixture through the chromatographic column, such as MeOH:THF (50:50 v/v) (see Additional file 1). Furthermore, an abrupt drop in the trapping efficiency of ^{11}C]CO₂ was noted when 185 GBq of ^{11}C]CO₂ was used as the starting activity. Nevertheless, it was possible to considerably improve the radiochemical yields and molar activities by means of decreasing both the molar amount of PhSiH₃ and the radiolabelling time. The RCY of 28% and 26%, the A_m of 52.4 and 61.4 GBq/μmol and an RCP higher than 95% for ^{11}C] PiB were obtained when 0.30 mmol of PhSiH₃ and labelling times of 2.5 and 1.0 min, respectively, were employed (Figs. 2 and 3). Three consecutive experiments were performed using the optimised radiolabelling condition of 1 min, and physicochemical quality control was performed. An RCP higher than 95% was verified for all the batches (Table 3). In all cases, molar activities were in compliance with the release criteria (> 30 GBq/μmol). Residual solvents were found to be present in quantities below their respective limits, and Diglyme or PhSiH₃ were not detected in the formulated radiopharmaceutical.

To evaluate the applicability of this new approach for the radiosynthesis of ^{11}C] PiB, the classical methodology of nucleophilic ¹¹C-methylation used in the radiopharmacy laboratory was compared with this novel radiosynthesis from direct ^{11}C]CO₂



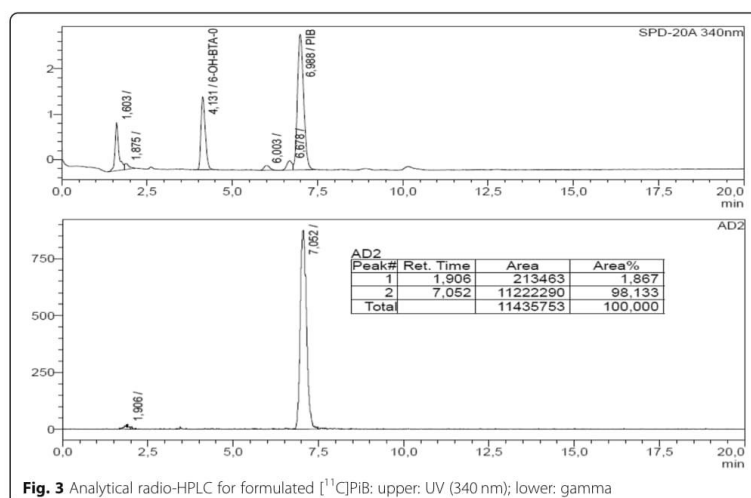
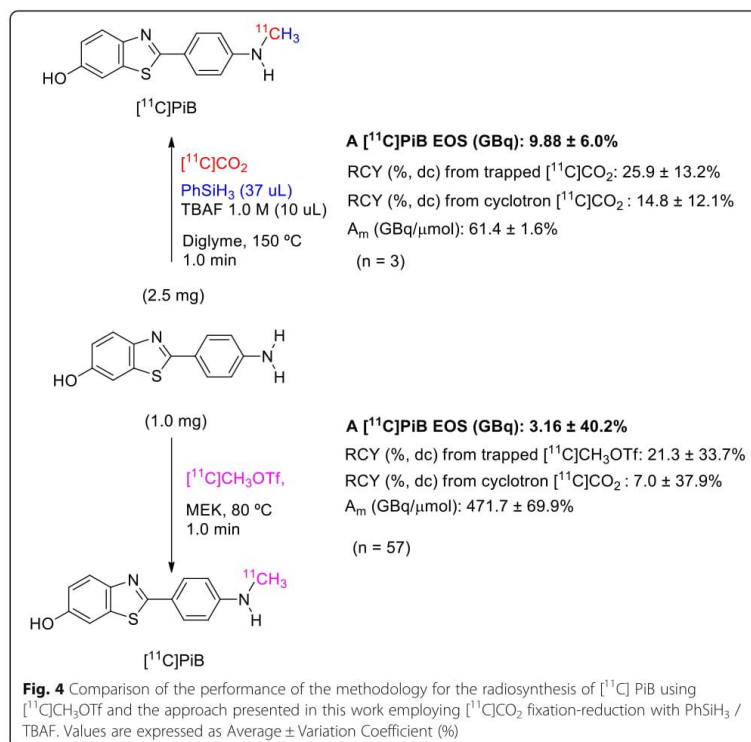


Fig. 3 Analytical radio-HPLC for formulated [^{11}C]PiB: upper: UV (340 nm); lower: gamma

incorporation. The ^{11}C -methylation with [^{11}C]CH₃OTf, as reported by Phillippe and co-workers (Phillippe et al., Phillippe et al. 2011), is currently used, which allows for obtaining an average activity of [^{11}C] PiB (EOS) of about 3.14 GBq (RCY 7%, dc) and an A_m 471 GBq/μmol from ~160 GBq of cyclotron-produced [^{11}C]CO₂ ($N=57$, all productions of the last two years) (Fig. 4). This new approach allows for obtaining a higher activity (more than two-fold) of EOS [^{11}C] PiB with a similar overall radiosynthesis time using the same automated module with minimal modifications. As was expected due to

Table 3 Physicochemical quality control parameters for three consecutive batches of [^{11}C] PiB (labelling time 1 min)

Parameter	Release criteria	1	2	3
Visual inspection	Clear, colourless	Pass	Pass	Pass
pH	4.5–8.5	5.5	5	5.2
Radiochemical identity	Relative retention time: 0.9–1.1	1.02	1.01	1.00
Radiochemical Purity	≥ 95%	100	98.6	98.1
PIB concentration (μg/mL)	No limit established	4.61	4.15	4.06
Molar Activity	≥ 30 GBq/μmol	60.3	62.3	61.6
Precursor concentration (μg/mL)	No limit established	10.25	3.06	1.63
Total impurities concentration (μg/mL)	No limit established	3.18	2.08	1.50
Residual solvents analysis	Acetone: < 0.5%	0.006	0.003	0.056
	Ethanol: < 10%	7.09	7.57	7.67
	Acetonitrile < 0.04%	0.004	0.008	0.005
	Diglyme: < 0.04%	No detected	No detected	No detected
	PhSiH ₃ : < 0.04%	No detected	No detected	No detected
Radionuclidic identity ($t_{1/2}$)	19.9–20.9 min	20.4	20.1	20.6
Radionuclidic purity	> 99.5% gamma emission at 511 keV	Ok	Ok	Ok



isotopic dilution with environmental CO₂, the direct use of [¹¹C]CO₂ affected the A_m, though to a degree compatible with the specifications.

Conclusion

It has been demonstrated that the direct [¹¹C]CO₂ fixation-reduction for the radiosynthesis of [¹¹C] PiB can be achieved using the PhSiH₃ / TBAF system. To obtain knowledge related to the radiochemical nature of the methodology and thus to produce [¹¹C] PiB with good and reproducible RCY and A_m, the influence of physical and radiochemical parameters was investigated. Higher radiochemical yields and activities (EOS) of formulated [¹¹C] PiB from cyclotron-produced [¹¹C]CO₂ were obtained compared to that of the ¹¹C-methylation method using PhSiH₃ / TBAF as a fixation-reduction system in Diglyme at 150 °C for 1 min.

Based on these results, a rapid one-pot methodology for the radiosynthesis of [¹¹C] PiB by means of the direct use of the primary precursor [¹¹C]CO₂ was developed by employing an automated commercial platform along with a physicochemical quality control proposed for its analysis. In this context, the study indicates the advantages of the unique published work in the application of a direct [¹¹C]CO₂ fixation-reduction methodology for the radiochemical productions of [¹¹C] PiB, especially in terms of reaction conditions (carbene- and metal-free), A_m and overall radiosynthesis time.

Additional file

Additional file 1: Semipreparative HPLC chromatogram for [¹¹C]PiB. (DOCX 735 kb)

Abbreviations

6-OH-BTA-0: 2-(4'-N-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole; AD: Alzheimer's Disease; A_m: Molar activity; dc: decay corrected; Diglyme: Bis (2-methoxyethyl) ether; EOB: End of bombardment; EOS: End of synthesis; GC: Gas chromatography; GMP: Good manufacture practice; HPLC: High-performance liquid chromatography; ndc: no decay corrected; PET: Positron emission tomography; PhSiH₃: Phenylsilane; PiB: Pittsburg compound B (2-(4'-N-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole); QC: Quality control; RCP: Radiochemical purity; RCY: Radiochemical yield; TBAF: Tetrabutylammonium fluoride

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Acknowledgements

The authors wish to thank Lucia Tajam, Andrea Boné and Javier Giglio for their collaboration with the HPLC and GC analyses, and to the staff of CUDIM Radiopharmacy for the data of the clinical [¹¹C] PiB batches. CSIC and PEDECIBA Química are also acknowledged for partial financial support.

Authors' contributions

PB designed the methodology, performed the radiolabelling and optimisation of the radiosynthesis and was a major contributor in writing the manuscript. WP designed the methodology, discussed the results, contributed to the manuscript revision and approved its final version. ES approved the methodology design, contributed to the discussion of the results, the manuscript revision and its approval. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Not Applicable.

Availability of data and materials

Please contact author for data request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 6 May 2019 Accepted: 5 July 2019

Published online: 16 July 2019

References

- Boudjemline M, Hopewell R, Rochon PL, Jolly D, Hammami I, Villeneuve S, Kostikov A. Highly efficient solid phase supported radiosynthesis of [¹¹C] PiB using tC18 cartridge as a "3-in-1" production entity. *J Label Compd Radiopharm*. 2017;60(14):632–8.
- Coenen HH, Gee AD, Adam M, Antoni G, Cutler CS, Fujibayashi Y, et al. Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry—Setting the record straight. *Nucl Med Biol*. 2017;55v–xi.
- Coliva A, Monterisi C, Apollaro A, Gatti D, Penso M, Gianolli L, et al. Synthesis optimization of 2-(4-N-[¹¹C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([¹¹C] PiB), β-amyloid PET imaging tracer for Alzheimer's disease diagnosis. *Appl Radiat Isot*. 2015;105:66–71.
- Das S, Bobbink FD, Laurency G, Dyson PJ. Metal-free catalyst for the Chemoselective methylation of amines using carbon dioxide as a carbon source. *Angew Chem Int Ed*. 2014;53(47):12876–9.
- Engler H, Santillo AF, Wang SX, Lindau M, Savitcheva I, Nordberg A, Lannfelt L, Långström B, Kilander L. In vivo amyloid imaging with PET in frontotemporal dementia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35(1):100–6.
- Herholz K, Carter SF, Jones M. Positron emission tomography imaging in dementia. *Br J Radiol*. 2007;80(special_issue_2):S160–7.
- Holschbach M, Schüller M. An on-line method for the preparation of nca [¹¹CH₃] trifluoromethanesulfonic acid methyl ester. *Appl Radiat Isot*. 1993;44(5):897–8.
- Jacquet O, Das Neves Gomes C, Ephritikhine M, Cantat T. Recycling of carbon and silicon wastes: room temperature formylation of N–H bonds using carbon dioxide and polymethylhydrosiloxane. *J Am Chem Soc*. 2012;134(6):2934–7.
- Jacquet O, Frogneux X, Gomes CDN, Cantat T. CO₂ as a C-1-building block for the catalytic methylation of amines. *Chem Sci*. 2013;4(5):2127–31.
- Jewett DM. A simple synthesis of [¹¹C] methyl triflate. *Int J Rad Appl Instrum A Appl Radiat Isot*. 1992;43(11):1383–5.
- Jiang X, Wang C, Wei Y, Xue D, Liu Z, Xiao J. A general method for N-methylation of amines and nitro compounds with Dimethylsulfoxide. *Chem Eur J*. 2014;20(1):58–63.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004;55(3):306–19.

- Långström B, Kihlberg T, Bergström M, Antoni G, Björkman M, Forngren BH, et al. Compounds labelled with short-lived beta (+)-emitting radionuclides and some applications in life sciences. The importance of time as a parameter. *Acta Chem Scand* (Copenhagen, Denmark: 1989). 1999;53(9):651–69.
- Li Y, Fang X, Junge K, Beller M. A general catalytic methylation of amines using carbon dioxide. *Angew Chem*. 2013;125(36):9747–50.
- Liger F, Eijsbouts T, Cadarossanesaib F, Tourvieille C, Le Bars D, Billard T. Direct [¹¹C] CO₂ methylation of amines from [¹¹C] CO₂ for the synthesis of PET radiotracers. *Eur J Org Chem*. 2015;2015(29):6434–8.
- Liu XF, Ma R, Qiao C, Cao H, He LN. Fluoride-catalyzed methylation of amines by reductive functionalization of CO₂ with Hydrosilanes. *Chem Eur J*. 2016;22(46):16489–93.
- Lv H, Xing Q, Yue C, Lei Z, Li F. Solvent-promoted catalyst-free N-formylation of amines using carbon dioxide under ambient conditions. *Chem Commun*. 2016;52(39):6545–8.
- Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem*. 2003;46(13):2740–54.
- Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2004;3(9):519–27.
- Nordberg A. Amyloid plaque imaging in vivo: current achievement and future prospects. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35(1):46–50.
- Philippe C, Haeusler D, Mitterhauser M, Ungersboeck J, Viernstein H, Dudczak R, Wadsak W. Optimization of the radiosynthesis of the Alzheimer tracer 2-(4-N-[¹¹C] methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([¹¹C] PIB). *Appl Radiat Isot*. 2011;69(9):1212–7.
- Rabinovici GD, Jagust WJ. Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behav Neurol*. 2009;21(1, 2):117–28.
- Rotstein BH, Liang SH, Holland JP, Collier TL, Hooker JM, Wilson AA, Vasdev N. ¹¹C CO₂ fixation: a renaissance in PET radiochemistry. *Chem Commun*. 2013;49(50):5621–9.
- Savio E, García O, Trindade V, Buccino P, Giglio J, Balter H, Engler H. Improving production of ¹¹C to achieve high specific labelled radiopharmaceuticals. *AIP Conf Proc*. 2012;1509:185–189.
- Shekhar AC, Kumar AR, Sathaiiah G, Paul VL, Sridhar M, Rao PS. Facile N-formylation of amines using Lewis acids as novel catalysts. *Tetrahedron Lett*. 2009;50(50):7099–101.
- Solbach C, Uebele M, Reischl G, Machulla HJ. Efficient radiosynthesis of carbon-11 labelled uncharged Thioflavin T derivatives using [¹¹C] methyl triflate for β-amyloid imaging in Alzheimer's disease with PET. *Appl Radiat Isot*. 2005;62(4):591–5.
- Furniss BS, Hannaford AJ, Rogers V, Smith PWG, Tatchell AR. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis. ELBS; 1978.
- Wilson AA, Garcia A, Chestakova A, Kung H, Houle S. A rapid one-step radiosynthesis of the β-amyloid imaging radiotracer N-methyl-[¹¹C] 2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([¹¹C]-6-OH-BTA-1). *J Label Compd Radiopharm*. 2004;47(10):679–82.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

**FULLY-AUTOMATED RADIOSYNTHESIS OF THE AMYLOID TRACER [¹¹C]PIB VIA
DIRECT [¹¹C]CO₂ FIXATION-REDUCTION**

Pablo Buccino^{a,*}, Williams Porcal^{a,b,*}, Eduardo Savio^a

SUPPLEMENTARY INFORMATION

1. SUPPLEMENTARY FIGURES AND SCHEMES.....	183
2. DATA FOR OPTIMIZATION OF ¹¹C-LABELING OF [¹¹C]PIB	186
3. DATA FOR THREE BATCHES OF [¹¹C]PIB AT 1 MIN AND 2.5 MIN	187
4. ANALYTICAL HPLC STANDARDS	188
3. CALIBRATION CURVE FOR PIB.....	190
4. ANALYTICAL HPLC	190
5. SEMIPREPARATIVE HPLC CHROMATOGRAM FOR [¹¹C]PIB	194
6. GAS CHROMATOGRAPHY	195

1. SUPPLEMENTARY FIGURES AND SCHEMES

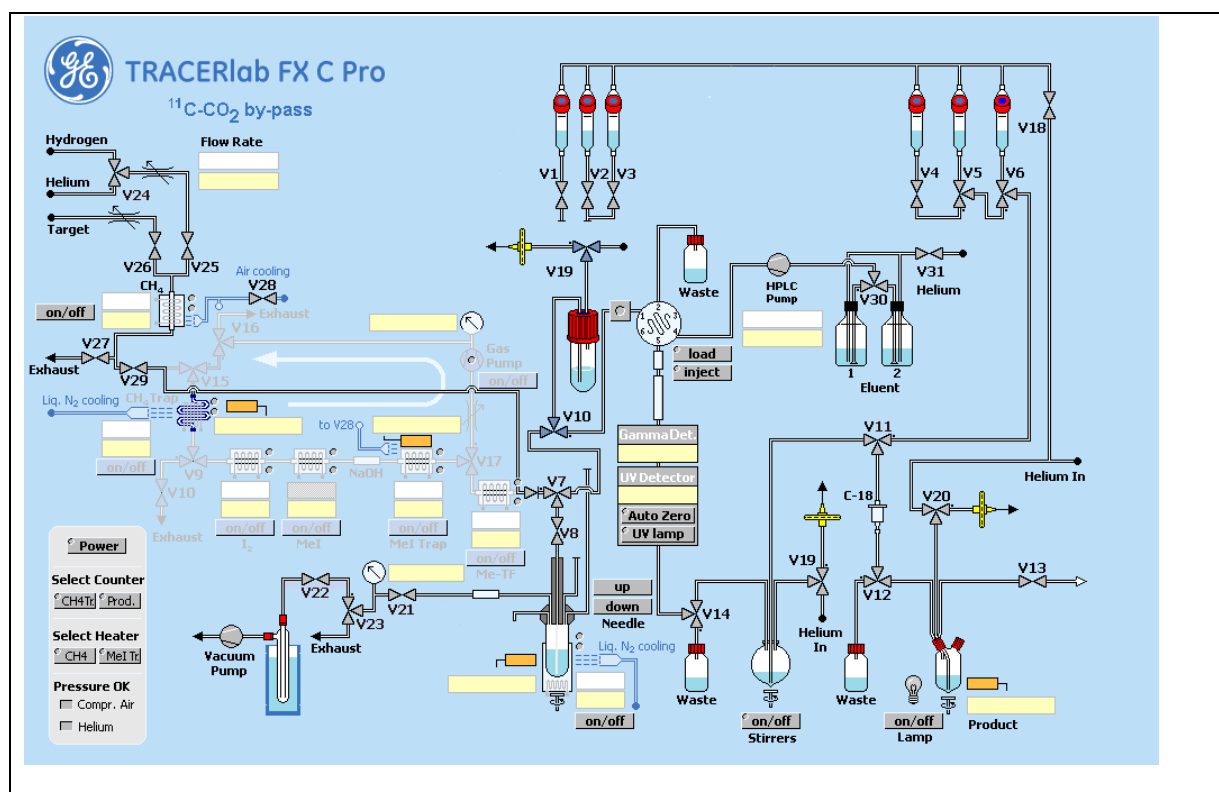
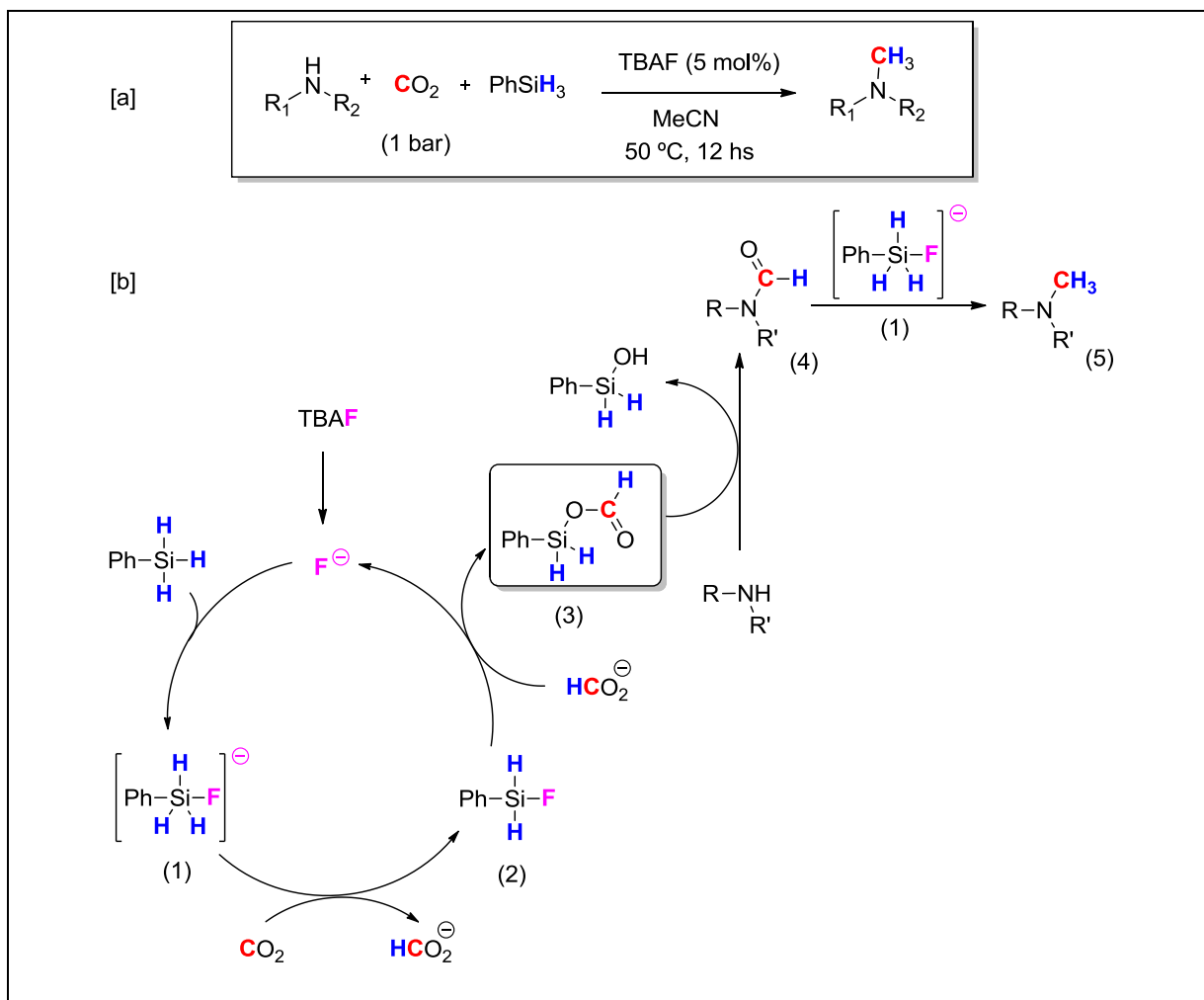
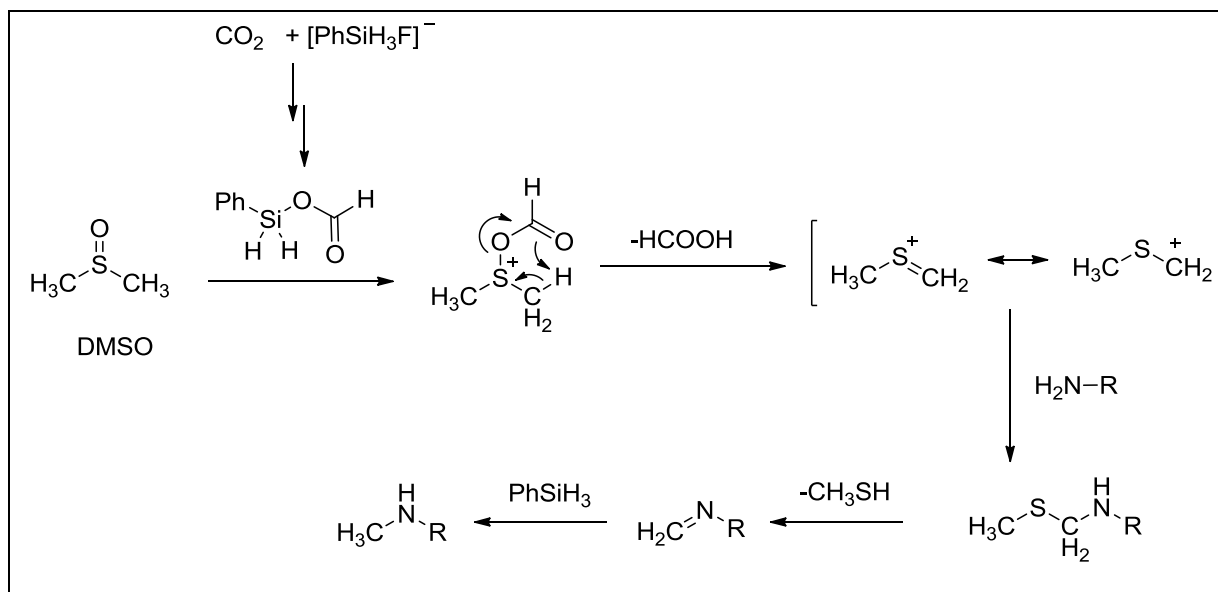


Figure SUP.1. Radiosynthetic Platform: GE TRACERlab® FX C Pro with $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ by-pass and pre-injection vial.



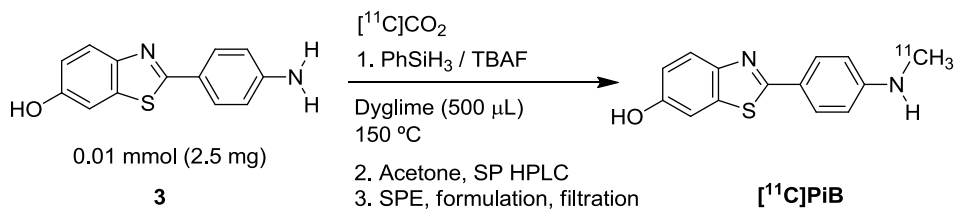
Scheme SUP.1. [a] Reductive incorporation of CO_2 into amines promoted by the catalytic system PhSiH_3 / TBAF , as proposed by Liu and co-workers; [b] Proposed reaction mechanism by Hulla and co-workers.

Mechanistic insights into this process were discussed by the authors and by Hulla and co-workers (Hulla et al., 2016). Two key intermediates in the mechanism are the hypervalent silicon-fluoride intermediate (1) and the formoxysilane (3) (Scheme SUP.1). The first is responsible for the capture of CO_2 into the solution, whereas the second is responsible for the transference of the formyl group to the amine to form the formamide and silanol as a by-product. Subsequently, the reduction of formamide (4) to methylamine (5) by the silicon-fluoride intermediate (1) is promoted.



Scheme SUP.2. Mechanism proposed for the competitive *N*-methylation of 6-OH-BTA-0 from DMSO.

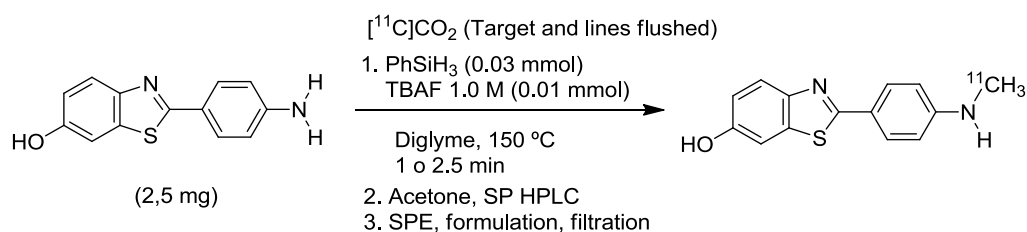
2. DATA FOR OPTIMIZATION OF ¹¹C-LABELING OF [¹¹C]PiB



Entry	Amount PhSiH ₃ (mmol)	Amount TBAF (mmol)	Time (min)	Starting [¹¹ C]CO ₂ (mCi) (EOB)	Radio- chemical purity (%) of [¹¹ C]PiB	Trapping efficiency (%. dc)	Activity [¹¹ C]PiB EOS (MBq)	Radio-chemical Yield (%. dc)	Conc. 6-OH-BTA-1 (µg/mL)	A _m (GBq/µmol)
1	0.6	0.01	5	5044	100	51	2704.7	9	2.2	33
2	0.3	0.01	5	5044	100	57	5594.4	17	5.4	32.6
3	0.03	0.01	5	5044	83.5	46	2686.2	10	2.5	28.7
4	0.3	0.01	5	2557	100	69	3152.4	16	5.1	18
5	0.3	0.01	5	1135	100	73	1117.4	11	2.3	12
6 ^[a]	0.3	0.01	2.5	5044	97.1	59	8587.7	25	4.7	47.6
7 ^[b]	0.3	0.01	2.5	5044	100	57	9756.9	28	5.0	52.4
8 ^[b]	0.3	0.01	1	5044	98.9	57	9882.7	26	4.0	61.4

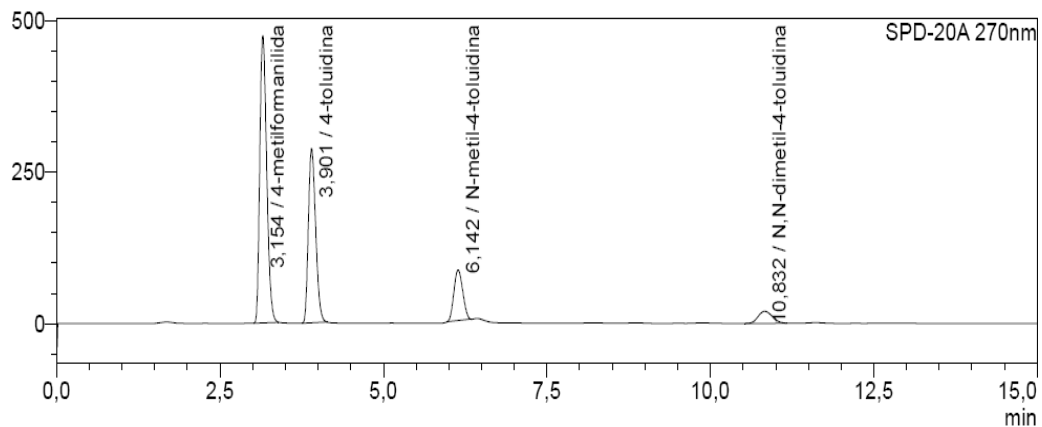
[a] +0.29 mmol TBAF, +2.5 min 150°C in order to deprotect [¹¹C]6-(OSiH₂Ph)-BTA-1, [b] N=3,

3. DATA FOR THREE BATCHES OF [¹¹C]PIB AT 1 MIN AND 2.5 MIN, FROM 185 GBq OF [¹¹C]CO₂

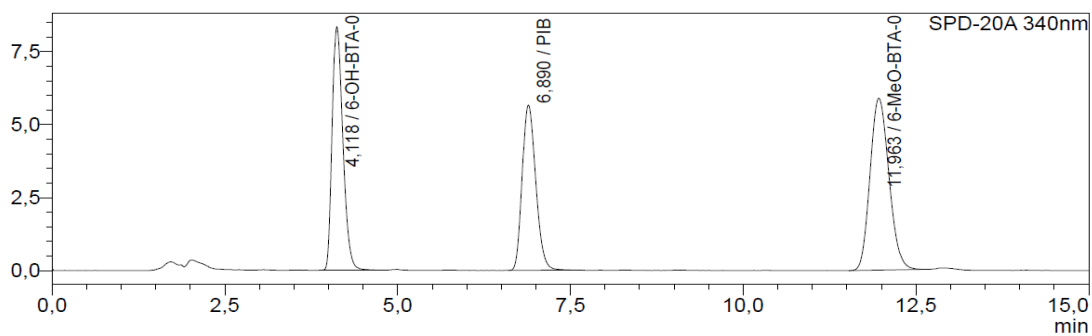


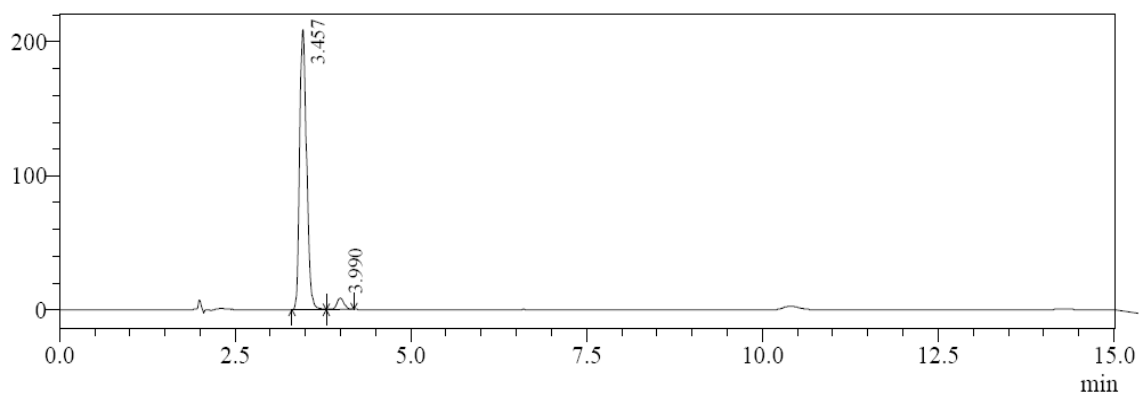
Entry	Time (min)	Radio-chemical purity (%) of [¹¹ C]PiB	Trapping efficiency (%. dc)	[¹¹ C]PiB (GBq)	Radio-chemical Yield (%. dc)	6-OH-BTA-1 (µg/mL)	A _m (GBq/µmol)
1	2.5	100.0	56	11.6	34	6.1	51.0
2	2.5	100.0	58	9.25	26	4.4	55.3
3	2.5	100.0	56	8.40	25	4.4	50.8
Average		100.0	57	9.75	28	5.0	52.4
Variation coefficient		0.00%	1.67%	17.10%	18.75%	19.76%	4.85%
4	1.0	100.0	57	10.5	30	4.6	60.3
5	1.0	98.6	55	9.70	25	4.2	62.2
6	1.0	98.1	59	9.40	23	4.0	61.6
Average		98.9	57	9.88	26	4.0	61.4
Variation coefficient		1.00%	3.47%	6.00%	13.22%	7.35%	1.58%

4. ANALYTICAL HPLC STANDARDS



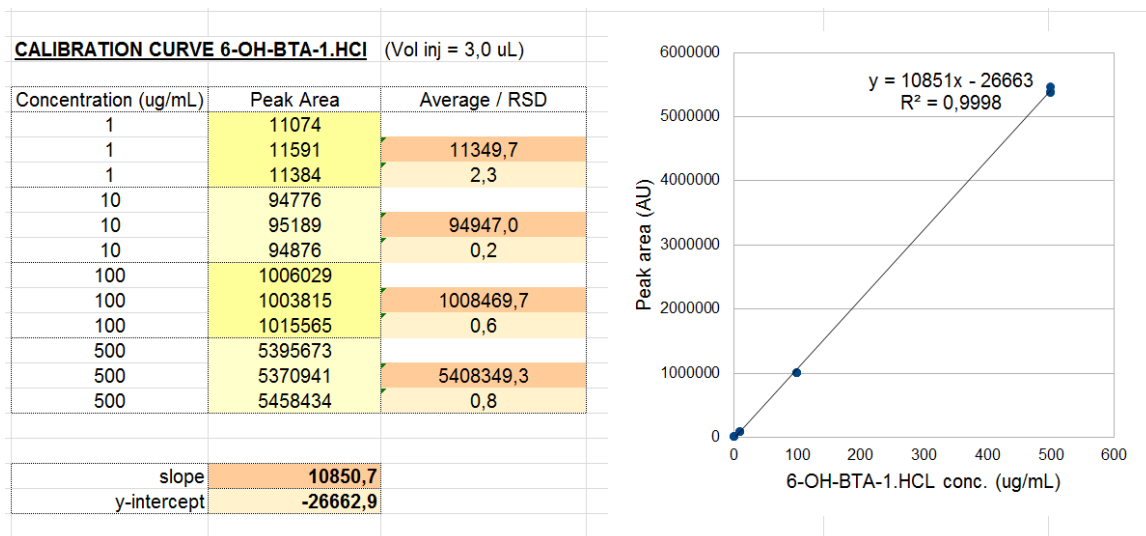
Compound	t_R
N-(4-tolil)formamide	3.15
4-toluidine	3.90
N-methyl-4-toluidine	6.14
N,N-dimethyl-4-toluidine	10.8





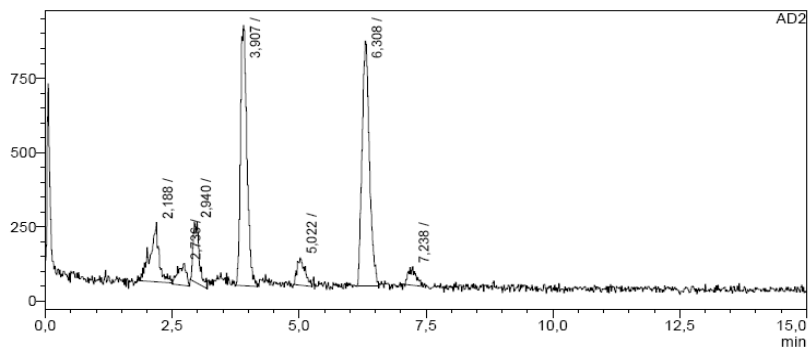
Compound	t_R
PiB <i>N</i>-formamide	3.45
6-OH-BTA-0	4.12
6-OH-BTA-1	6.89
6-MeO-BTA-0	11.9

3. CALIBRATION CURVE FOR PIB



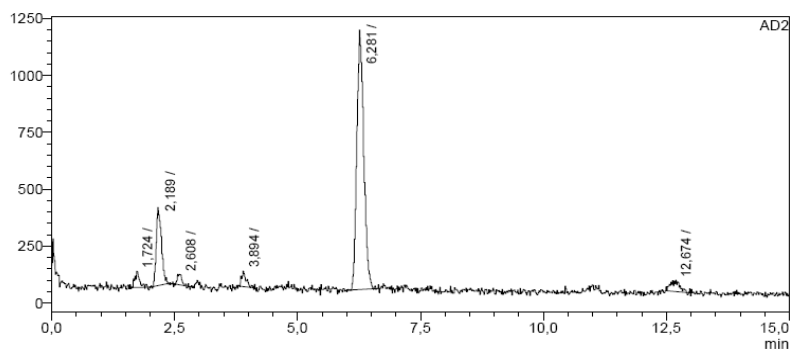
4. ANALYTICAL HPLC

4.1. Analytical gamma HPLC: *N*-[¹¹C-methyl]-4-toluidine in MeCN at 100 °C for 5 min.



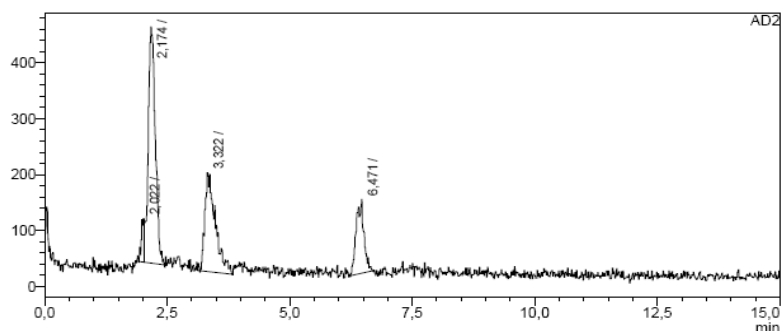
t_R for *N*-[¹¹C-methyl]-4-toluidine = 6,3 min, RCP = 37.1%

4.2. Analytical gamma HPLC: *N*-[¹¹C-methyl]-4-toluidine in DMSO at 150 °C for 5 min.



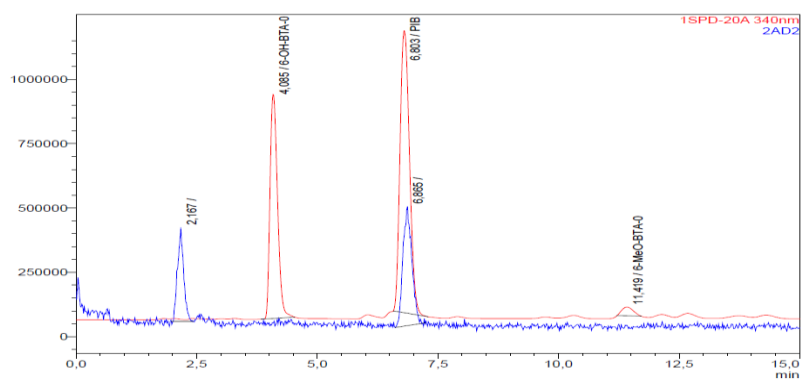
t_R for N -[^{13}C -methyl]-4-toluidine = 6,3 min, RCP = 72.2%

4.3. Analytical gamma HPLC: N -[^{13}C -methyl]-4-toluidine in DMF at 100 °C for 5 min.



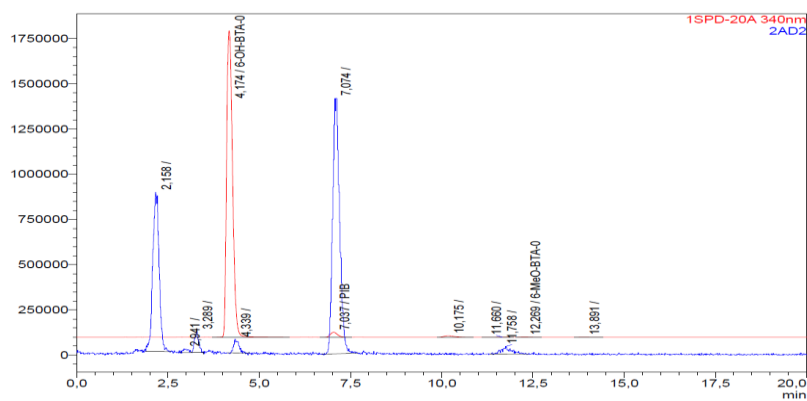
t_R for N -[^{13}C -methyl]-4-toluidine = 6,4 min, RCP = 30.4%

4.4. Analytical gamma and UV HPLC: Optimization of [^{13}C]PiB - DMSO 2,5 min at 150 °C (5 mg) - 180611



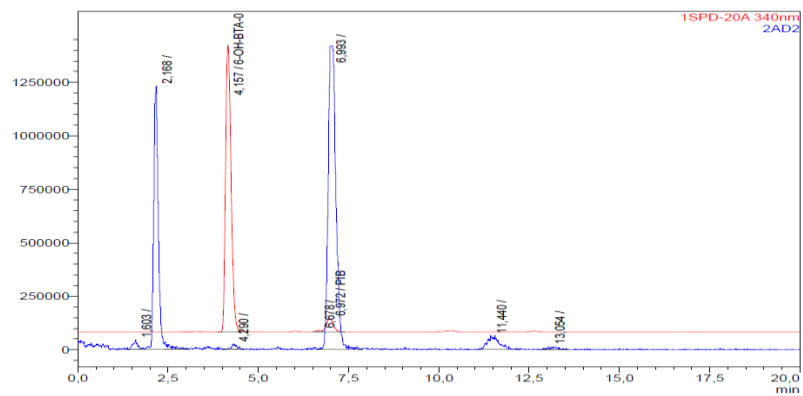
RCP: 64.6%

4.5. Analytical gamma and UV HPLC: Optimization of [^{13}C]PiB - MeCN 5,0 min at 100 °C (2.5 mg) - 180831



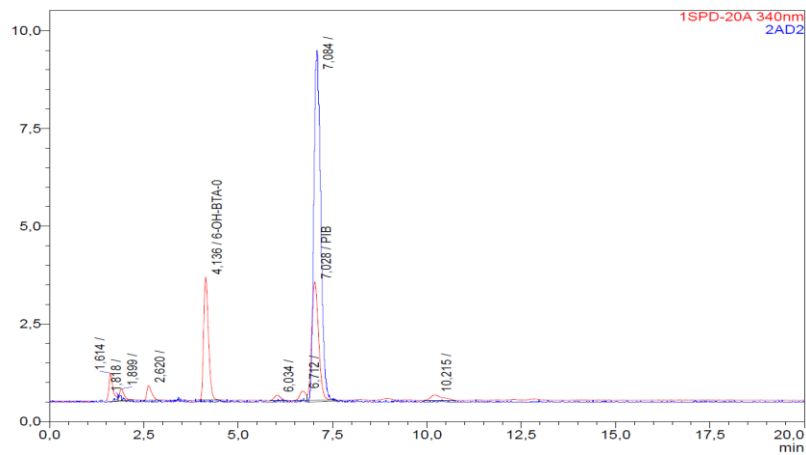
RCP: 58.9%

4.6. Analytical gamma and UV HPLC: Optimization of [¹¹C]PiB – Diglyme 5,0 min at 150 °C (2.5 mg) - 180904

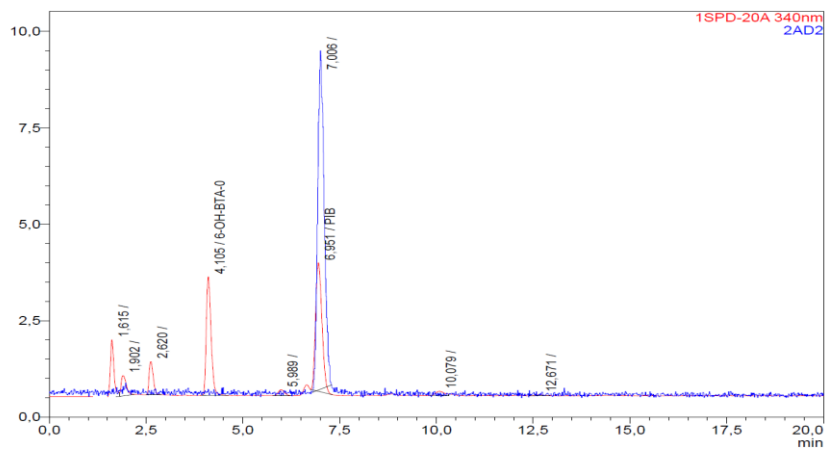


RCP: 61.7%

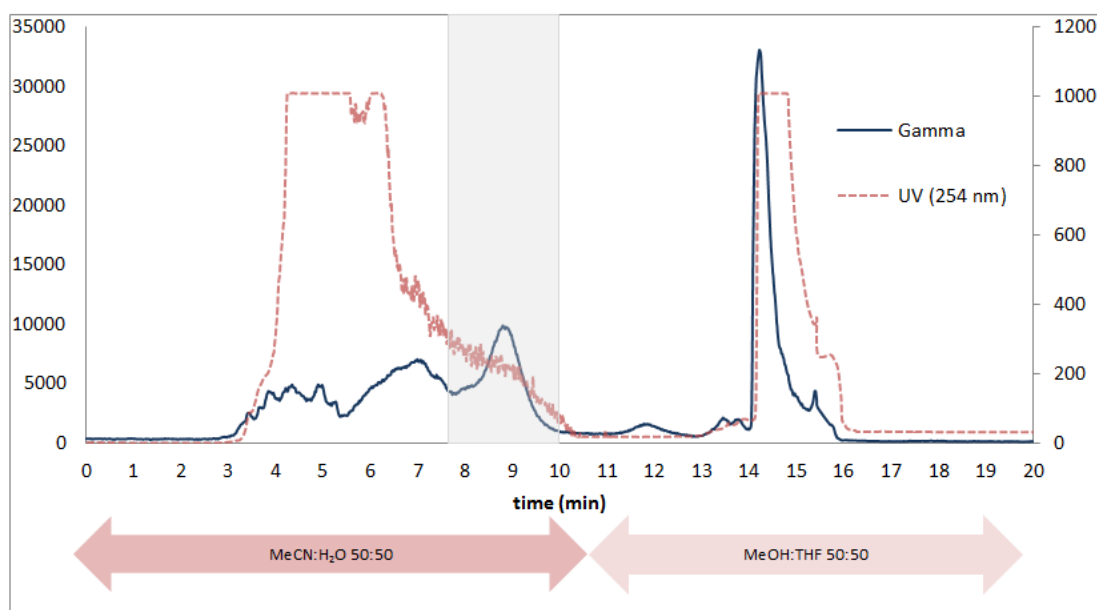
4.7. Complete radiosynthesis of [¹¹C]PiB. Diglyme 150 °C; 2,5 min



4.8. Complete radiosynthesis of [¹¹C]PiB. Diglyme 150 °C; 1.0 min

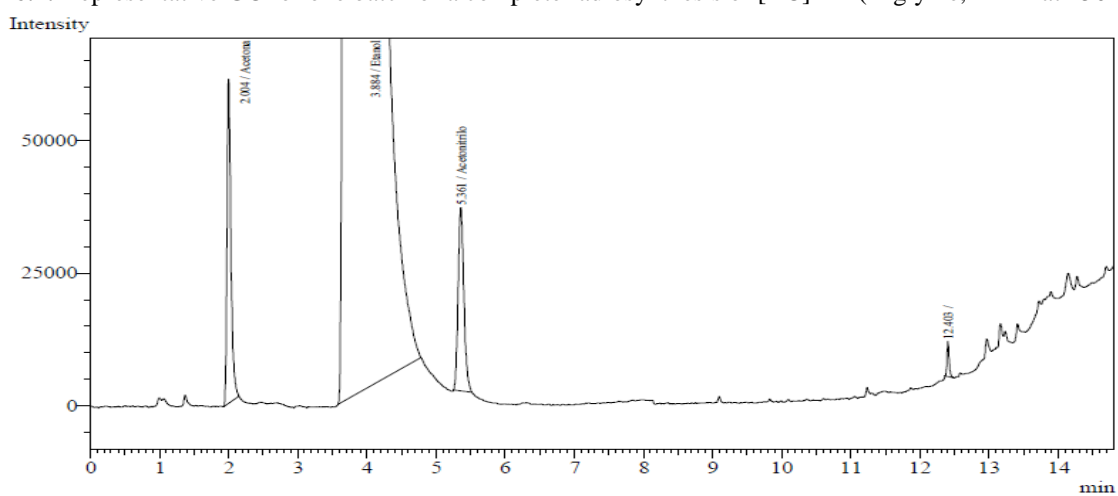


5. SEMIPREPARATIVE HPLC CHROMATOGRAM FOR [¹¹C]PIB



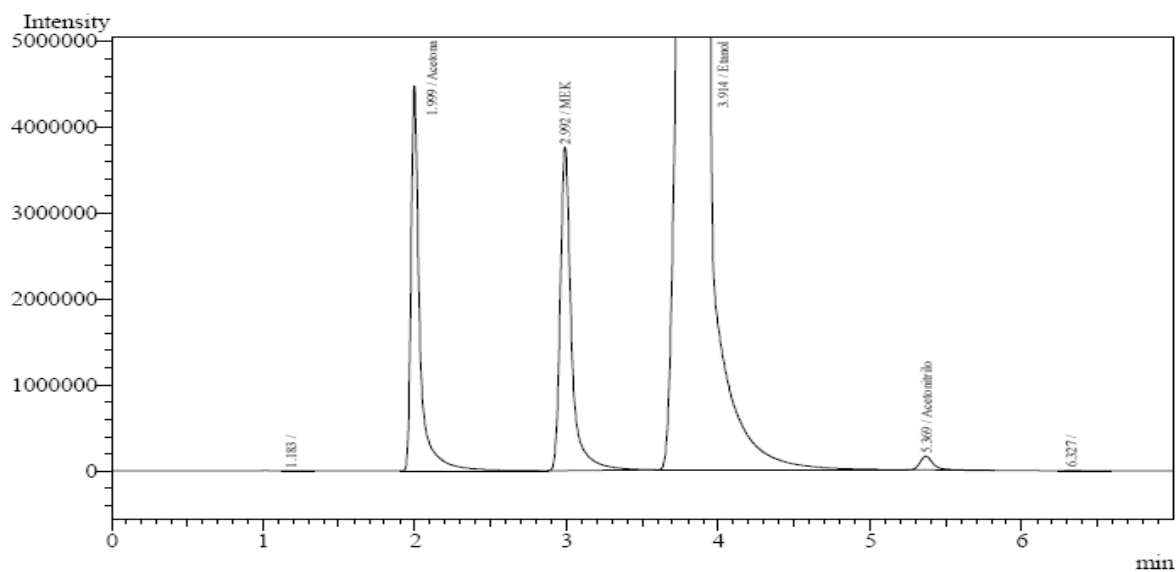
6. GAS CHROMATOGRAPHY

6.1. Representative GC for one batch of a complete radiosynthesis of [^{11}C]PiB (Diglyme, 1 min at 150 °C)

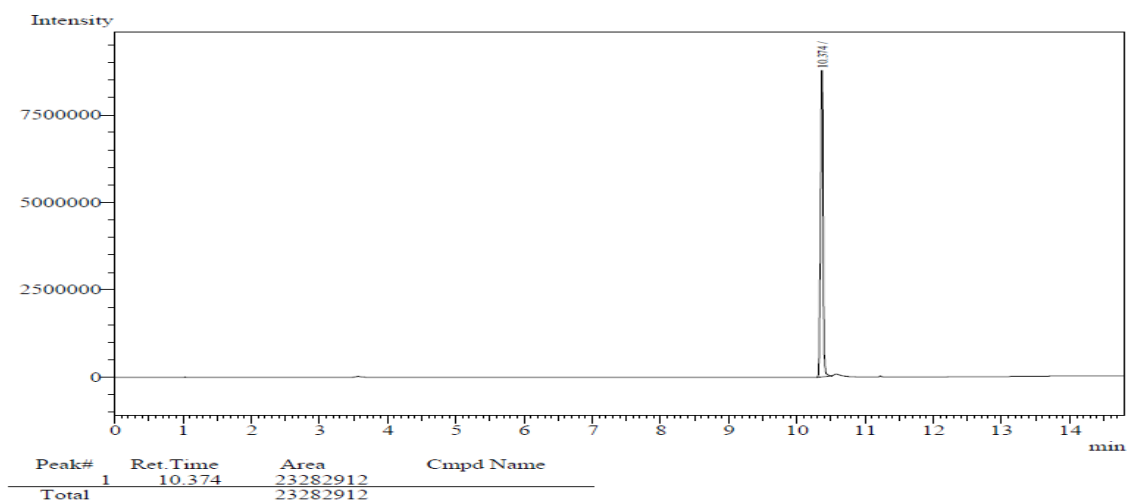


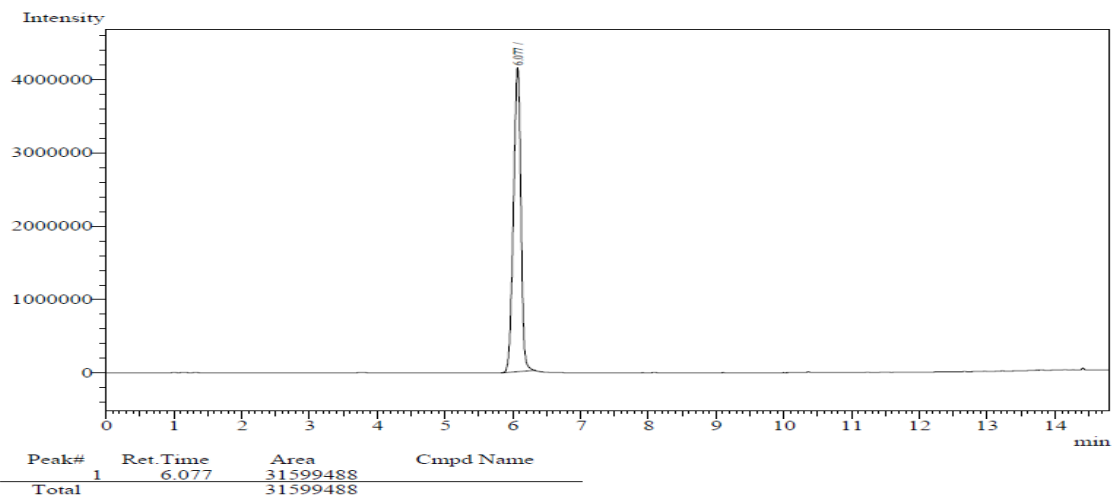
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	2.004	238421	61150	0.000	ppm		3	Acetona
2	3.884	232282252	28597472	0.000	ppm		1	Etanol
3	5.361	200200	34568	0.000	ppm		2	Acetonitrilo
4	12.403	14303	6634	0.000				
Total		232735176	28699824					

6.2. GC analytical standards



Compound	t_R
Acetone	1.99
Methylethylketone	2.99
Ethanol	3.91
Acetonitrile	5.36





Compound	t_R
Diglyme	10.37
PhSiH ₃	6.07

CAPITULO 6: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo cumplió con el objetivo general de generar experiencia con precursores radiactivos de ^{11}C alternativos a los agentes ^{11}C -metilantes ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ y $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) comúnmente usados tanto a nivel mundial como en nuestro centro para la radiosíntesis de ^{11}C -radiofármacos. El aprendizaje generado al respecto del uso tanto del $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ como del $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ amplía el espectro de estrategias radiosintéticas para la preparación de ^{11}C -moléculas disponibles para usos clínicos y preclínicos. Si bien la aplicación de cada una de ellas fue puntual ($[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$ para la síntesis de 1- $[^{11}\text{C}]$ aminoácidos por medio de la síntesis de Strecker-Bücherer, $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ para la síntesis de ^{11}C -aminas por medio de fijación-reducción), la exploración de los aspectos físico-radioquímicos de su producción y su captura, así como de su reactividad en diferentes medios de reacción, brindan la posibilidad de utilizar estos precursores para una gran variedad de estrategias radiosintéticas.

En cuanto a la utilización de las metodologías ensayadas a lo largo de este trabajo, la fijación-reducción a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ utilizando el sistema TBAF / PhSiH_3 aplicada a la radiosíntesis de $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$, permitió desarrollar un método novedoso de preparación para este radiofármaco, junto con su control de calidad en un contexto preclínico. La validación de este proceso en el marco del área de Producción (mediante la realización de como mínimo 3 lotes piloto con sus correspondientes controles de calidad fisicoquímico y microbiológico) permitirá evaluar la aplicabilidad de este método para producciones de rutina.

Los métodos estudiados en el presente trabajo, pudieron ser fácilmente llevados a cabo en nuestras plataformas para radiosíntesis automatizadas mediante la realización de pequeñas modificaciones fácilmente reversibles.

En cuanto a las perspectivas y proyecciones de este trabajo, se destacan las siguientes, en relación al precursor $[^{11}\text{C}]\text{CN}^-$:

- 1) En el marco de la investigación llevada a cabo por la Dra. Florencia Zoppolo, en relación a sustratos de la enzima Glicinia *N*-metiltransferasa pasibles de ser marcados con ^{11}C para el diagnóstico PET del cáncer de próstata, se plantea la radiosíntesis del aminoácido 1- $[^{11}\text{C}]$ glicina. Si bien la misma se encuentra reportada¹⁵³ y utiliza la metodología de Bücherer-Bergs, la aplicación de los conocimientos generados para la radiosíntesis modelo de la D,L- $[^{11}\text{C}]$ fenilalanina serán de ayuda en la rápida puesta a punto del sistema radiosintético.
- 2) En el marco de la tesis de maestría del Q.F. Juan Vázquez Marini, dirigido por Dr. Eduardo Savio y Dr. Pablo Díaz, se plantea la síntesis de derivados de la

¹⁵³ Johnström, P. y col. (1987). *Op. cit.*

nicotinamida marcados con ^{11}C a nivel de la función amida. Los mismos se pueden obtener aplicando la metodología descrita por Andersson y col. (1994)¹⁵⁴ por medio de ^{11}C -cianaciones mediadas por Pd^0 sobre 3-halopiridinas con posterior hidrólisis parcial. Dicho trabajo ya está en marcha en CUDIM, y los resultados son auspiciosos para la radiosíntesis de estas especies.

En relación a la aplicabilidad de la metodología desarrollada para la incorporación reductiva de ^{11}C por medio de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2 / \text{TBAF} / \text{PhSiH}_3$, se puede mencionar que la misma ya ha sido aplicada en otras líneas de investigación de CUDIM, como ser el trabajo de doctorado del Lic. Kevin Zirbesegger, para la radiosíntesis del inhibidor de MAO-A ^{11}C -clorgilina.

¹⁵⁴ Andersson, Y., y col (1994). *Op. cit.*