

INSTITUTO DE ONCOLOGIA Y RADIOBIOLOGIA. DEPARTAMENTO DE MEDICINA NUCLEAR

La preparación de radiofármacos marcados con radionúclidos de yodo. I. Un método rápido de producción de ácido o-iodohippúrico-¹³¹I

Ing. Natalia Rovnij, Lic. Francisco Zayas Crespo, Ing. Lee Kronrad, Ing. Pavel Jradilek

Rovnij, N. y otros: La preparación de radiofármacos marcados con radionúclidos de yodo.

I. Un método rápido de producción de ácido o-iodohippúrico-¹³¹I.

Se estudia la reacción de intercambio isotópico o-iodohippúrico y yoduro-¹³¹I de sodio, con el objetivo de la obtención de un KIT, a partir del cual se produce el radiofármaco hippuran-¹³¹I, utilizando Na ¹³¹I de baja actividad específica. Este radiofármaco se usa para determinar el funcionamiento renal. Se investiga la influencia de diferentes parámetros en el desarrollo de la reacción descrita anteriormente. Se realiza control de pureza radioquímica del radiofármaco, su biodistribución y renograma en animales. Se encuentra que el aumento de la concentración del catalizador de la reacción aumenta la velocidad del intercambio. Además, el tiempo en que se termina el marcado de ácido o-iodohippúrico depende de la cantidad del complejo intermediario formado del mismo con los iones Cu⁺. Se obtiene el hippuran-¹³¹I a partir del KIT prescrito con Na ¹³¹I de baja actividad específica con suficiente pureza radioquímica y rendimiento. Los estudios en animales señalan que el radiofármaco obtenido tiene un comportamiento similar que el hippuran-¹³¹I, actualmente usado en Cuba, procedente de la URSS. La aplicación de nuestro trabajo investigativo dará la posibilidad de desarrollar la producción propia de dicho radiofármaco en Cuba sin necesidad de importarlo.

INTRODUCCION

El ácido o-iodohippúrico marcado con radionúclidos de yodo, es uno de los radiofármacos usados con más frecuencia. El mismo marcado con isótopos radiactivos ¹³¹I, ¹²⁵I, o últimamente, ²³¹I se usa para la evaluación del funcionamiento de los riñones y su gammagrafía.

* Laboratorio de Radiofarmacia.

** Jefe del Laboratoire de Radiofarmacia.

*** Jefe de Producción. Instituto de Investigaciones Nucleares, REZ. Checoslovaquia.

**** Instituto de Investigaciones, REZ, Checoslovaquia.

Desde la primera preparación hecha por *Tubis*¹ en 1960, se han desarrollado muchos métodos diferentes del mareaje de éste. Prácticamente todos ellos están basados en la reacción de intercambio isotópico, entre el iodo radiactivo en forma inorgánica y el iodo enlazado a la molécula orgánica.^{2 7} La desventaja de los métodos descritos anteriormente está en su tiempo largo de preparación; en la necesidad de purificar el producto crudo y cuando se usa el iodo radiactivo elemental en la reacción de Intercambio, es posible el escape de la radiactividad en forma volátil.

Sobre la base del estudio detallado, de la influencia de las concentraciones de los componentes individuales de la mezcla de la reacción y el uso de algunos iones metálicos como catalizadores, fue desarrollado por *Kronrad* y *Hradilek*^{8,9} un KIT para la rápida preparación del ácido o-iodohiálico marcado, el cual se puede hacer incluso en los centros de Medicina Nuclear. El KIT fue desarrollado especialmente, con el objetivo de, ser marcado con ¹²³I cuando el tiempo de la preparación desempeña una función importante.

En el KIT descrito se usan muy altas actividades específicas de los isótopos de iodo (1,85-37 GB *q/ml*). Para adaptar el uso de esta técnica muy moderna del mareaje, también en pequeños centros de Medicina Nuclear, donde no está disponible en todos los casos el iodo radiactivo con alta actividad específica, nosotros estudiamos muy detalladamente el mareaje, usando bajas actividades específicas. Esto provoca la dilución de la mezcla reactiva, puede también tener influencia sobre la velocidad de la reacción y mucho más en el rendimiento del mareaje.

MATERIALES Y METODOS

En la preparación se emplean los siguientes reactivos: ácido o-iodohiálico procedente del Instituto de Investigaciones Nucleares de REZ (Checoslovaquia), el mismo está limpio cromatográficamente; cloruro cuproso de la firma Peking's Reagent de calidad analítico y otros de calidad "puro para análisis".

El radioisótopo empleado es Na ¹³¹I, procedente de la URSS de la firma "Isotopo", cuya actividad específica es de 0,4 GB *q/ml*.

El KIT consiste en dos soluciones: A y B. La A en realidad es la principal parte KIT, que contiene ácido orto-iodo-hiálico, el catalizador es CU⁺ y está a pH óptimo para la reacción del intercambio, o sea, para el mareaje con iodo radiactivo. La B se usa para neutralizar la preparación antes de emplearla para los pacientes.

PREPARACION DE LA SOLUCION A

Se pesan 1,5 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y se disuelven en 150 *ml* de agua para inyección, se añade a esta solución 12,0 *g* de ácido o-iodohiálico (OIH) y se calienta hasta que se disuelve el OIH.

Se pesan 2 *mg* de cloruro cuproso (CuCl) finamente pulverizado y se añaden a la mezcla anterior. Se calienta hasta que el agua hierva y se mantiene durante cinco minutos en estas condiciones, se enfría y se ajusta el pH en el pH metro a 4,6-4,9. Se enrasa la solución a 200 *ml*.

Se toman 2,0 ml de la solución y se esteriliza por filtración a través de membranas estériles de 0,22 µm en frascos estériles, los cuales se guardan a la temperatura de 4°C hasta su empleo.

PREPARACION DE LA SOLUCION B

Se toman 0,2 g de NaOH, 55,0 mg de NaF¹⁹PO⁴O⁴ 4 mg de EDTA y se disuelven en 700 ml de agua para inyección.

Se determina el volumen necesario de la solución B que neutraliza los 2,0 ml de la solución A.

Una vez determinado dicho volumen ésta se esteriliza de igual forma que la descrita anteriormente, se guarda a la temperatura de 4°C hasta sus empleos.

Preparación de OIH¹³¹I: Se toma un frasco que contiene la solución A y se le añade el radioioduro de sodio en un volumen de 0,2 ml; el frasco se coloca en un baño de agua hirviendo y se deja 30 minutos en estas condiciones. Concluido éste el frasco se enfría, se hace control de la pureza radioquímica del OIH¹³¹I y se le añade todo el contenido del frasco B. En estas condiciones la solución está lista para su administración.

ESTUDIO DE LA CINETICA DE LA REACCION DE INTERCAMBIO

Utilizamos concentración del catalizador CuCl₂, original, doble y cinco veces mayor (2,10⁻⁴ M; 4,10⁻⁴ M y 1,10⁻⁵ M), para las cuales desarrollamos la reacción con diferentes volúmenes de Na¹³¹I (de 0,1 ml a 32 ml) tomando alícuotas a varios (1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 minutos), calculando el por ciento de OIH¹³¹I formado o la disminución del yodo radiactivo.

Control de pureza radioquímica: se efectúa cromatografía en papel descendente (CPD), en papel Whatman 4, como solvente se emplea un sistema compuesto de benceno-ácido-acético-agua (2:2:1), tal y como se describe en la Farmacopea Checoslovaca no. 3. Para el desarrollo se emplea la fase apolar del solvente, mientras que la fase acuosa se deposita en el fondo de la cámara.

La alícuota que se toma de la mezcla de reacción se aplica en el papel (25 x 1,0 cm), el cual se había humedecido previamente con solución de sodio tiosulfato 0,01 N y se había secado al aire.

La tira de papel una vez seca, se coloca en la cámara cromatográfica y se mantiene durante 10-20 minutos para permitir que se equilibre el sistema, posteriormente se añade la fase apolar en la cubeta y se desarrolla en forma descendente hasta 15 cm. Los R_f para los compuestos individuales son: ¹³¹I-0,0-0,1; ¹³¹I-OIH-0,6 y ¹³¹I-OIB-0,9-1,0. La tira de papel se seca al aire, se corta en tres partes: 2 cm después del punto de aplicación, 10 cm más y el resto del papel.

Estudio de biodistribución; se toman 20 ratas INOR-isogénicas, 10 de ellas se inyectan con 0,1 ml de solución hippuran-¹³¹I procedente de la URSS (Isotop), el resto se inyectan con el hippuran-¹³¹I "hecho en casa".

Transcurridos 5, 10, 15, 20 y 25 minutos, los animales se sacrifican en atmósfera de éter y se extraen sangre, tiroides y ambos riñones.

Se determina la masa de cada órgano y se cuenta la radiactividad en un contador de pozo, los resultados se expresan como por ciento de la dosis por gramo o unidad de volumen.

Además se toman dos conejos, y a cada uno se le coloca 1 colimador en los riñones, se les administra a cada uno 370 KBq de hippuran-¹³¹I importado y hecho en casa y se determina la curva renográfica de los mismos.

RESULTADOS

Para poder usar el hippuran-¹³¹I en la práctica médica se admiten impurezas tales como Na¹³¹I hasta 3% y ácido o-iodobenzoico hasta 1%. La disminución de radiactividad en forma de ¹³¹I- es un factor de control del desarrollo de la reacción de intercambio igual que el aumento de % de ácido o-iodohippúrico-¹³¹I en la mezcla reaccionante.

En la figura 1 se observa el incremento de la actividad en forma de ácido o-iodohippúrico en el tiempo para la reacción prescrita, donde la abscisa representa el tiempo en minutos y la ordenada la actividad de ¹³¹I-OIH en %, se ve que la reacción se termina en 20 minutos.

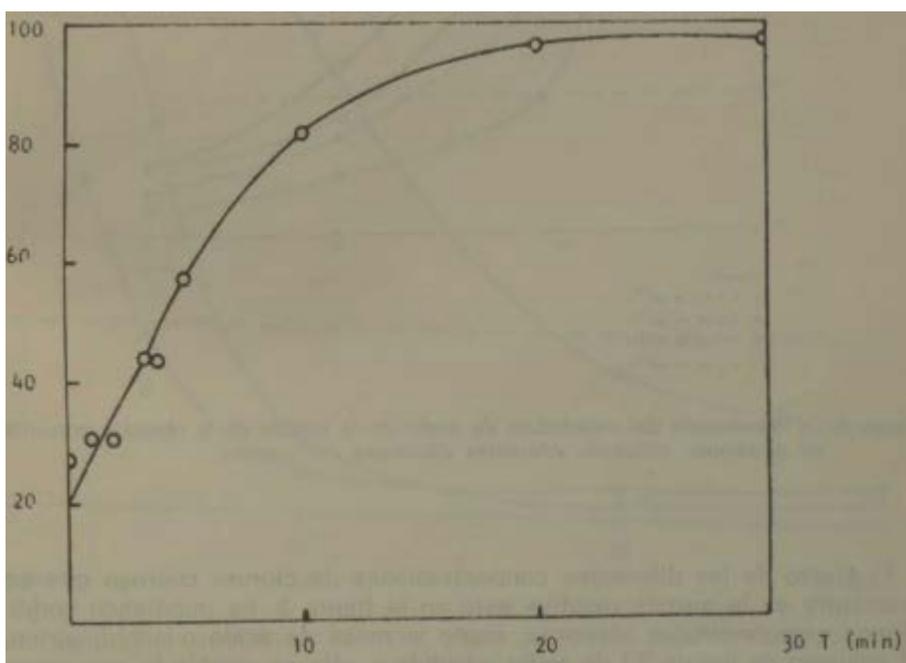


Figura 1. El incremento en la formación de hippuran ¹³¹I en el tiempo.

Utilizando diluciones de Na^{131}I (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 ml) y concentración de CuCl $2,10^{-4}$ M (figura 2), que el uso de 2 ml de ioduro radiactivo provoca el aumento del tiempo de alcance del final práctico de la reacción de intercambio hasta más de 20 minutos.

En la figura 2 se representa la disminución de actividad en forma de Na^{131}I en dependencia del tiempo de calentamiento en la escala semilogarítmica.

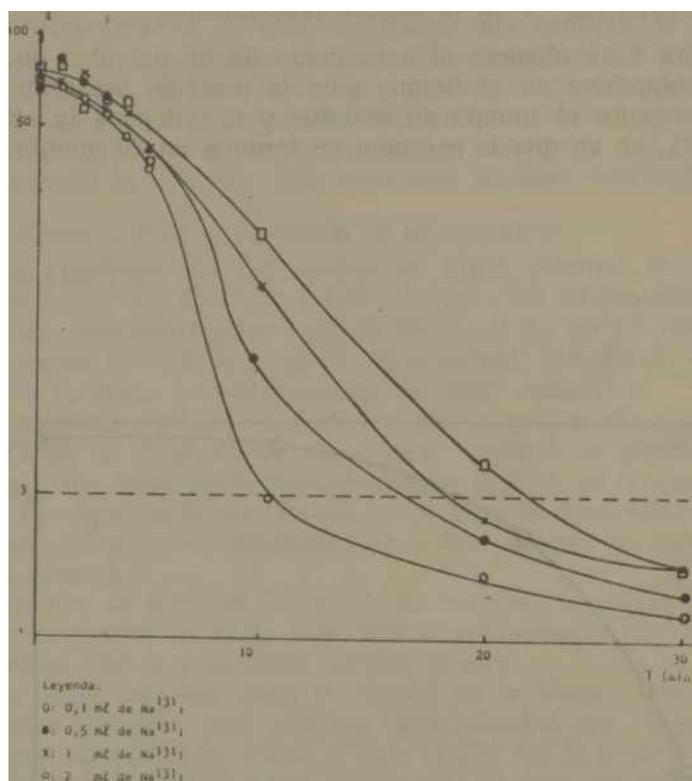


Figura 2. La disminución del radioioduro de sodio de la mezcla de la reacción prescrita en el tiempo, utilizando diferentes diluciones del primero.

El efecto de las diferentes concentraciones de cloruro cuproso que se encuentra en la mezcla reactiva está en la figura 3. Se mantienen condiciones experimentales idénticas, como la masa de ácido o-iodohíppúrico, el volumen de ioduro- ^{131}I de sodio, añadido y sólo se cambia la concentración de cloruro cuproso. Se observa que en el aumento de concentración

de CuCl dos veces la reacción alcanza su final práctico en 7 minutos y para la concentración de CuCl cinco veces mayor en 4,5 minutos. También, se puede ver, que 26,8; 32,5 y 40 por cientos de ácido o-iodohippúrico se marca aún sin el previo calentamiento de la mezcla reactiva, usando normal, la doble y quintuple cantidad del catalizador respectivamente.

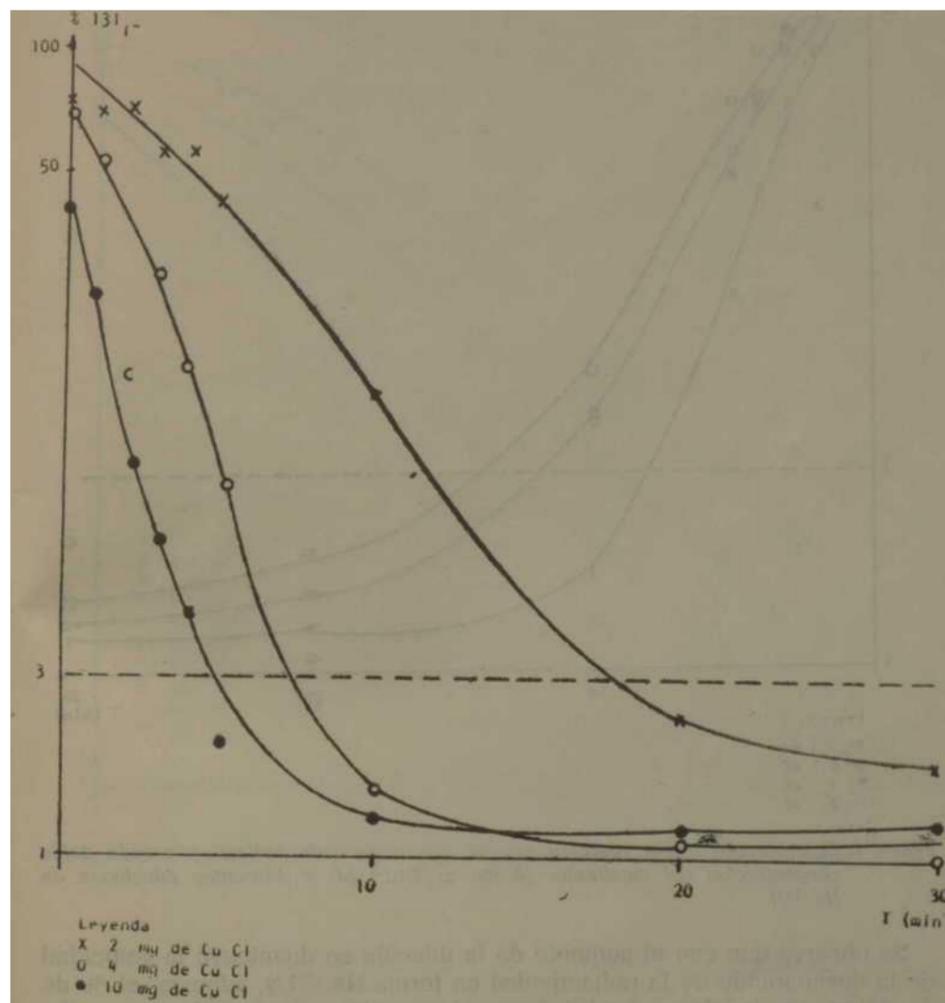


Figura 3. Efecto de la concentración de Cu* en la reacción de intercambio.

En la figura 4 se demuestra el desarrollo de la reacción de intercambio con el mismo indicador en el tiempo para la concentración de $\text{CuCl } 4,10^{-4} \text{ M}$ y diferentes volúmenes de $\text{Na } ^{131}\text{I}$ (0,1; 0,5; 1,0 y 2 ml). Se puede ver que la reacción concluye entre 10 y 20 minutos para todas las diluciones.

El efecto de la dilución de la mezcla reactiva en los primeros 5 minutos de calentamiento utilizando $\text{CuCl } 10^{-3} \text{ M}$ se muestra en la figura 5.

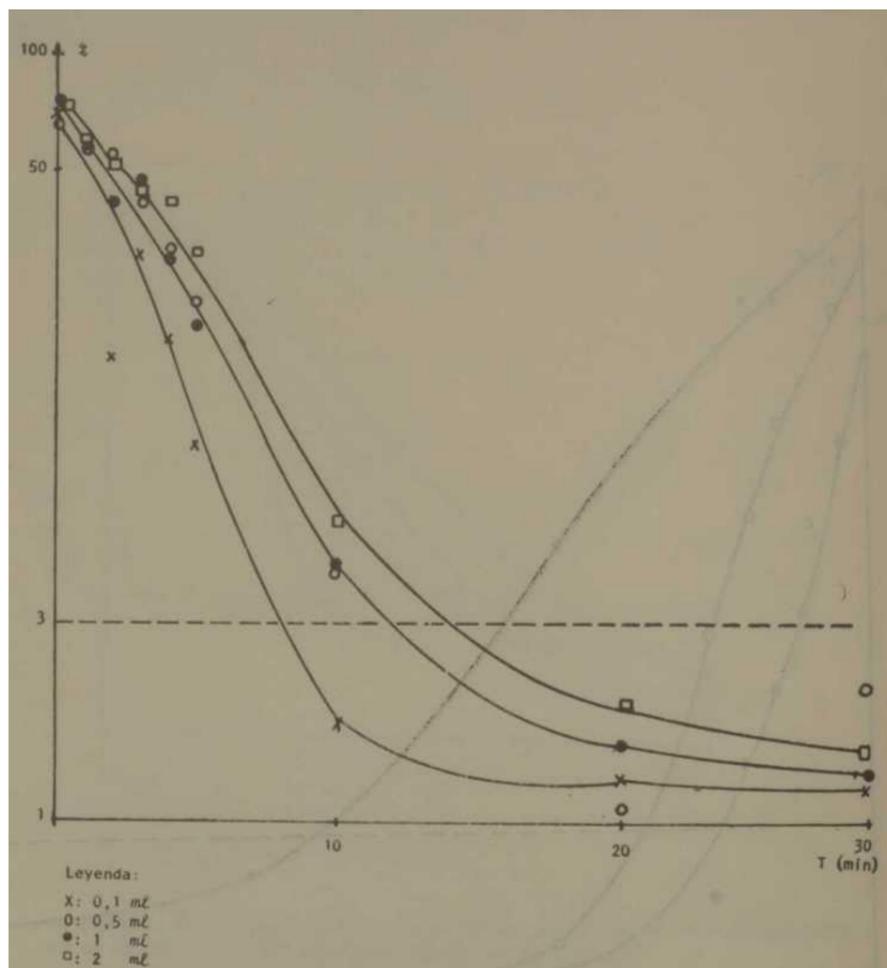
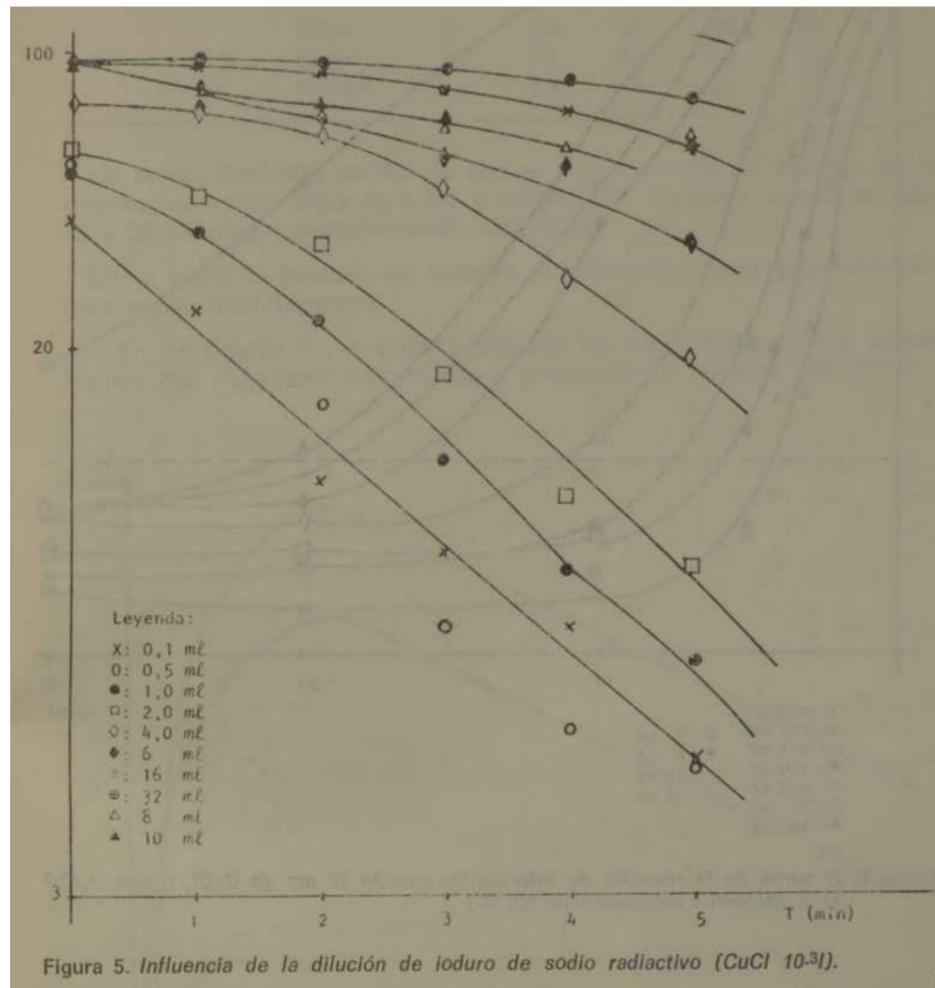


Figura 4. El desarrollo de la reacción en por ciento de yodo radiactivo usando doble concentración del catalizador ($4 \text{ mg} = 4,10^{-4} \text{ M}$) y diferentes diluciones de $\text{Na } ^{131}\text{I}$.

Se observa que con el aumento de la dilución se disminuye la velocidad de la desaparición de la radiactividad en forma $\text{Na } ^{131}\text{I}$ y, además, el % de de ácido orto-iodohippúrico- ^{131}I formando en tiempo o, también, se disminuye.

En la figura 6 las curvas son las mismas que en la figura 5, pero con el prolongamiento de calentamiento hasta 30 minutos. Se ve, que para el volumen de $\text{Na}^+ \text{I}^- 0,1 \text{ ml}$ la reacción alcanza el límite de impureza en menos de 4 minutos y para el volumen mayor (o sea, 32 ml) no se alcanza en 30 minutos.



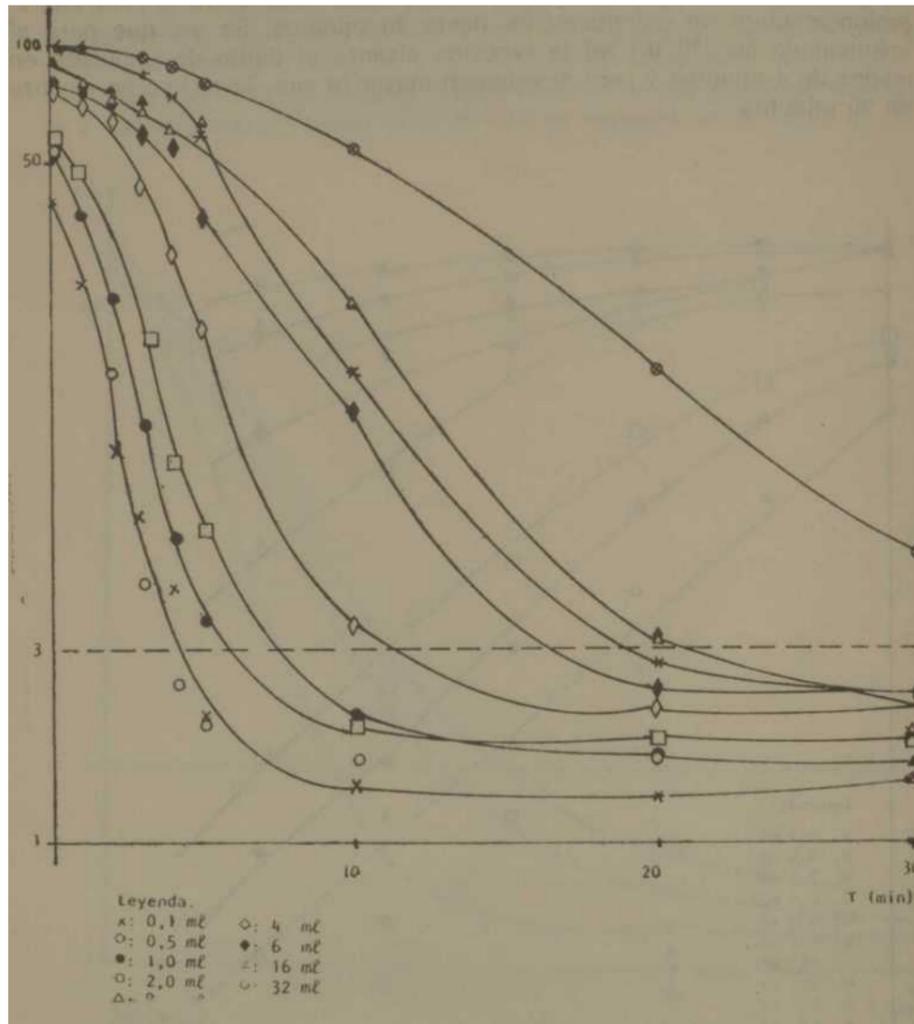


Figura 6. El curso de la reacción de intercambio usando 10 mg de CuCl_2 , o sea, $1,10^{-3} M$ y diferentes volúmenes de Na^{131}I .

La tabla 1 representa los resultados de la biodistribución en ratas. Se observa que para ambos radiofármacos a los 5 minutos todavía hay 0,6- 0,7% de dosis en 1 ml de sangre y en los siguientes minutos se disminuye hasta 0,3% y continúa constante hasta pasar los 25 minutos.

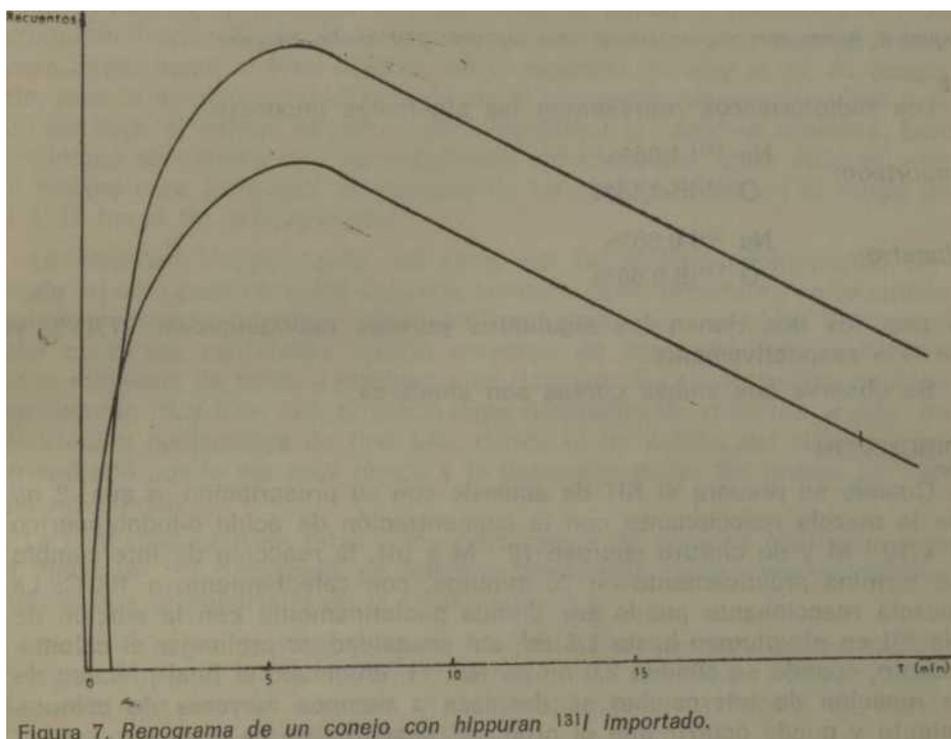
Tabla. Biodistribución de hippuran-¹³¹I importado (1) y hecho en casa (2)

	Tiempo (Minutos)	Organo	% dosis/g o ml de órgano				
			10	15	20	25	
		Riñón	5,9	2,3	3,3	3,5	2,8
1		Sangre	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3
		Tiroides	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2
		Riñón	6,1	3,9	3,2	3,9	2,3
2		Sangre	0,7	0,3	0,3	0,3	0,3
		Tiroides	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1

Un comportamiento similar de ambos radiofármacos se observa en los riñones; la mayor dosis es a los 5 minutos, se mantiene constante entre 10 y 20 minutos y posteriormente disminuye.

En la glándula tiroides se observa una pequeña dosis entre 0,1-0,4% para ambos radiofármacos.

En las figuras 7 y 8 están expuestos los renogramas de los conejos hechos con hippuran-¹³¹I importado y preparado en nuestro laboratorio.



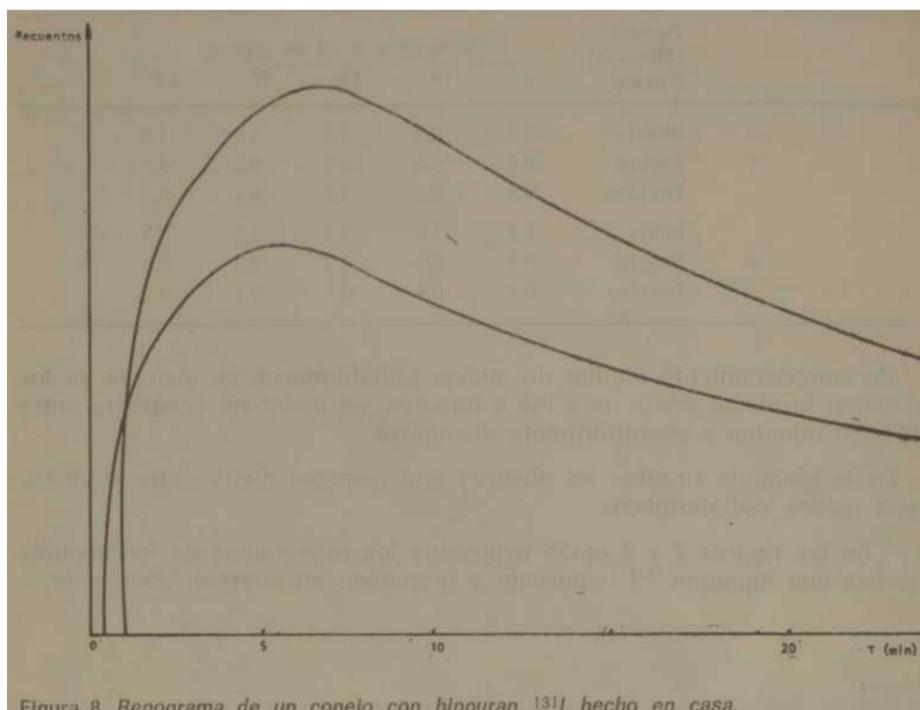


Figura 8. Renograma de un conejo con hippuran ¹³¹I hecho en casa.

Los radiofármacos representan las siguientes impurezas:

<i>Importado:</i>	Na ¹³¹ I-1,96%
	O ¹³¹ IB-0,13%
<i>Nuestro:</i>	Na ¹³¹ I-0,98%
	O ¹³¹ IB-0,68%

o sea, los dos tienen las siguientes purezas radioquímicas: 97,91% y 98,34% respectivamente.

Se observa que ambas curvas son similares.

DISCUSION

Cuando se prepara el KIT de acuerdo con su prescripción, o sea, 2 ml de la mezcla reaccionante con la concentración de ácido o-iodohippúrico 2×10^{-1} M y de cloruro cuproso 10^{-4} M a pH, la reacción de intercambio se termina prácticamente en 20 minutos, con calentamiento a 100°C. La mezcla reaccionante puede ser diluida paulatinamente con la adición de Na ¹³¹I en el volumen hasta 1,5 ml, sin necesidad de prolongar el calentamiento, cuando se añaden 2,0 ml de Na ¹³¹I, entonces, el final práctico de la reacción de intercambio se desplaza a tiempos mayores de calentamiento y puede ocurrir que el producto deseable no se obtiene.

Con el objetivo de demostrar la posibilidad del uso de grandes volúmenes de Na ¹³¹I que se añaden a la mezcla de la reacción, nosotros probamos las concentraciones mayores de cloruro cuproso, el cual se usa como catalizador de la reacción de intercambio. Es evidente que con la mayor concentración de cloruro cuproso la reacción es mucho más rápida y alcanza el límite de pureza (3% de actividad en forma de Na ¹³¹I) en tiempo corto. También, observamos que una cantidad de ácido o-iodohippúrico ¹³¹I se produce inmediatamente al mezclarse los reactivos sin previo calentamiento, y esta cantidad aumenta con la concentración de cloruro cuproso.

Cuando la mezcla reaccionante se diluye por la adición de diferentes volúmenes de la solución de yoduro de sodio ¹³¹I usando doble cantidad de CuCl, la velocidad se cambia, pero aún, en el caso de la solución muy diluida es más rápida que en el caso de utilización de CuCl de $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Una dilución muy elevada se puede hacer en el caso de la mezcla reaccionante, donde la concentración de cloruro cuproso alcanza 10^{-3} M.

Claro está, que el aumento de la dilución disminuye el intercambio de la reacción en unos primeros minutos. De la dilución de la mezcla reaccionante depende también el comienzo de las curvas, donde el equilibrio se establece inmediatamente antes de yoduro ¹³¹I de sodio. Puede ser, que la cantidad de la mezcla reaccionante intercambiada inmediatamente se corresponda con la concentración del complejo intermediario de los iones Cu⁺ y ácido o-iodohippúrico el cual facilita la reacción de intercambio. Para la mezcla de reacción muy concentrada, donde la concentración del complejo intermediario es probablemente muy alta, el tiempo necesario para llegar hasta el final práctico de la reacción es muy corto. Al contrario, para la solución muy diluida donde la concentración del complejo puede ser baja, el tiempo necesario para completar la reacción aumenta. Este fenómeno se explica con los resultados obtenidos por otros autores, que el tiempo para completar la reacción de intercambio está en el rango de 2 a 12 horas de calentamiento.

La cantidad insignificante del complejo Cu⁺-ácido-o-iodohippúrico formado en este caso de iones Cu⁺, que siempre están presentes en reactivos químicos usados, no tiene "capacidad" suficiente para cambiar en tiempo muy corto las cantidades mucho mayores de iones de yodo radiactivo en la molécula de ácido o-iodohippúrico. Los resultados obtenidos también concuerdan muy bien con el mecanismo propuesto de reacción, o sea, de sustitución nucleofílica de tipo SN₂, donde la formación del complejo intermediario puede ser muy rápida y la descomposición del mismo es mucho más lenta.

La biodistribución en ratas y los renogramas de conejos confirman que el hippuran-¹³¹I preparado en nuestro laboratorio tiene comportamiento similar que el importado de la Unión Soviética.

Desde el punto de vista práctico los resultados señalan que se puede preparar el ácido o-iodohippúrico marcado con suficiente pureza y rendimiento, aún cuando se usan grandes volúmenes de yoduro de sodio ¹³¹-I con muy baja actividad específica.

CONCLUSIONES

1. La reacción de intercambio entre ácido o-iodohíppúrico y Na^{131}I depende de la concentración del complejo intermediario con los iones Cu^+ .
2. El aumento de la concentración de CuCl en la mezcla reactiva aumenta la velocidad de la reacción.
3. La utilización de Na^{131}I de baja actividad específica es posible con buenos resultados.
4. El comportamiento en animales del radiofármaco preparado en nuestro laboratorio es idéntico al importado de la URSS.

SUMMARY

Rovnij, N. et al.: *Preparation of iodinated derivatives of labelled radiopharmaceuticals. I. A rapid method for the production of o-iodohippuric- ^{131}I acid.*

Isotopic o-iodohippuric and ^{131}I -labelled sodium iodide exchange reaction is studied in order to obtain a KIT, from which ^{131}I -hippuran is produced, using low specific activity ^{131}I Na. This radiopharmaceutical product is used for the determination of renal function. Influence of different parameters on the development of the reaction, previously described, is investigated. Radiochemical purity control of the radiopharmaceutical, its biodistribution and renogram is performed in animals. It is found that the increase of concentration of the catalyst in the reaction increases the velocity of exchange. In addition, the time in which labelling of o-iodohippuric acid ends depends on the quantity of intermediary complex formed from it with Cu^+ ions. ^{131}I -hippuran is obtained from KIT prescribed with low specific activity ^{131}I Na with enough radiochemical purity and efficiency. The studies in animals point out that the radiopharmaceutical product obtained is similar to ^{131}I hippuran, used now in Cuba, from the USSR. The application of our investigative work should give the possibility of developing our own production in Cuba without import them.

RÉSUMÉ

Rovnij, N. et al.: *La préparation de produits radiopharmaceutiques marqués par radionucléides du iode. I. Une méthode rapide de production d'acide o-iodohippurique- ^{131}I .*

Les auteurs étudient la réaction d'échange isotopique o-iodohippurique et iodure- ^{131}I de sodium, en vue d'obtenir un KIT, à partir duquel on obtient le produit radiopharmaceutique hippuran- ^{131}I , en employant Na^{131}I à faible activité spécifique. Ce produit radiopharmaceutique est utilisé pour déterminer le fonctionnement rénal. On étudie l'influence de différents paramètres dans le développement de la réaction décrite ci-dessus. On réalise le contrôle de pureté radiochimique du produit, sa biodistribution et des renogrammes chez des animaux. Il est constaté que l'augmentation de la concentration du catalyseur de la réaction augmente la vitesse de l'échange. En plus, le temps pendant lequel se réalise le marquage de l'acide o-iodohippurique dépend de la quantité du complexe intermédiaire formé de celui-ci avec les ions Cu^+ . On obtient l'hippuran- ^{131}I à partir du KIT prescrit avec Na^{131}I à faible activité spécifique avec une pureté radiochimique.

et un rendement suffisants. Les études chez l'animal indiquent que le produit obtenu a un comportement similaire à celui de l'hippuran-¹³¹I, actuellement utilisé à Cuba, provenant de l'URSS. L'application de ce travail de recherche rendra possible le développement de la production de ce produit à Cuba.

BIBLIOGRAFIA

1. *Tubls, M. et al.*: The preparation of labelled o-iodohippuric acid and use of the In kidney function test. *Proc Soc Exp Biol Med* 103: 497, 1960.
2. *Anghileri, L. J.*: Simplified method for preparing high specific activity ¹³¹I labelled hippuran. *Int J Appl Radiat Isop* 15: 95, 1964.
3. *Wheeler, O. H. et al.*: Synthesis of labelled o-iodohippuric acid. *J Lab Comp Ra- diopharm* 7: 40, 1971.
4. *Mitta, A.E.A. et al.*: A simplified method for preparing ¹³¹I labelled hippuran. *Int J Appl Radioat Isot* 12: 146, 1961.
5. *Zielinski, F. W. et al.*: Radiopharmaceutical development. *Radiology* 125: 753, 1977,
6. *Belkas, E. P. et al.*: Analytical control of radiopharmaceuticals produced at Nuclear Research Center "Demokritos". *Int J Appl Radiat Isot* 26: 629, 1975.
7. *Gillet, R. et al.*: The preparation of ¹²³I- labelled sodium-orthoiodo hippurate for medical research. *Int J Appl Radiat Isot* 27: 61, 1976.
8. *Hradilek, P. et al.*: C's patent application 207941.
9. *Beyer, G. et al.*: Rapid methods of preparation of o-iodohippurate ¹²³I. *Proceedings of the I Symposium en Radiopharmaceutical Chemistry. Julich, 1982. P. 382.*

Recibido: 27 de febrero de 1984

Aprobado: 16 de octubre de 1984

Ing. *Natalia Rovnij*
Calle 7ma. No. 50
entre Rotaria y A
Habana Nueva, municipio de Guanabacoa
Ciudad de La Habana
Cuba