



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“PREPARACIÓN DEL RADIOFÁRMACO
 ^{99m}Tc -HYNIC -ciclo-Lys-D-Phe-RGD
PARA IMAGEN *IN VIVO* DE INTEGRINAS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
EDITH HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DRA. GUILLERMINA FERRO FLORES
ASESOR EXTERNO

DRA. ARACELI AMAYA CHÁVEZ
ASESOR INTERNO



TOLUCA, MÉXICO

ABRIL DE 2007

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), en el Departamento de Materiales Radiactivos bajo la dirección de la Dra. Guillermina Ferro Flores, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Proyecto SALUD-2004-Col-003.

Índice

Resumen	1	
Introducción	2	
Objetivos	4	
Capítulo 1: Marco teórico		
1.1	Medicina nuclear	6
1.2	Radiofármacos	7
1.2.1	Radiofármacos para imagen molecular diagnóstica y terapia de blancos moleculares	10
1.2.2	Diseño de radiofármacos de tercera generación	12
1.2.3	Radiofármacos del tecnecio	13
1.3	Ligantes empleados para la formación de complejos con tecnecio	16
1.4	Marcaje de biomoléculas con metales	18
1.5	Moléculas transportadoras	19
1.5.1	Péptidos	20
1.5.2	Integrinas	21
1.5.3	Péptidos ligandos para receptores $\alpha\beta\gamma$: marcadores de tumores en angiogenesis	23
1.6	Preparación de núcleo-equipos de ^{99m}Tc	25
1.7	Requisitos de control de calidad para radiofármacos	27
1.8	Caracterización de radiofármacos	32
1.9	Validación de métodos analíticos	34
1.9.1	Cromatografía	35
1.9.1.1	Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	37

1.9.1.2	Cromatografía de líquidos de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).	38
Capítulo 2: Antecedentes		40
Capítulo 3: Metodología		43
3.1	Planteamiento del problema	44
3.2	Materiales, equipos y reactivos	45
3.2.1	Materiales y material biológico	45
3.2.2	Equipo	46
3.2.3	Reactivos	47
3.3	Diagrama de flujo	48
3.4	Cálculos de la mecánica molecular	49
3.5	Conjugación del Boc-HYNIC con el péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD	49
3.6	Desprotección del conjugado Boc-HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	50
3.7	Optimización del método analítico para la caracterización y purificación del conjugado HYNIC-RGD	50
3.8	Purificación y caracterización del conjugado HYNIC-RGD y análisis del péptido c(RGDfK) materia prima mediante RP-HPLC	51
3.9	Marcado <i>in situ</i> del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD empleando como coligantes EDDA/Tricina	52
3.10	Desarrollo de la formulación	52
3.10.1	Selección y optimización de la formulación	52
3.10.2	Fabricación de núcleo-equipos HYNIC-RGD	53
3.11	Validación del sistema y del método analítico	54
3.11.1	Linealidad del sistema	54

3.11.2	Precisión del sistema	55
3.11.3	Exactitud y repetibilidad del método	55
3.11.4	Especificidad del método	56
3.11.5	Linealidad del método	56
3.11.6	Precisión del método (precisión intermedia)	57
3.12	Control de calidad de núcleo-equipos	58
2.14.1	Controles químicos	59
3.12.2	Controles biológicos	60
3.12.3	Prueba de biodistribución en ratones	63
	Capítulo 4 Resultados y discusión	65
4.1	Cálculo de la energía potencial mínima de la molécula	66
4.2	Síntesis y desprotección del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	68
4.3	Optimización del método analítico para la caracterización y purificación del conjugado HYNIC-RGD	69
4.4	Caracterización del conjugado HYNIC-RGD	70
4.5	Purificación del conjugado HYNIC -RGD	71
4.6	Análisis del péptido c(RGDfK) materia prima	72
4.7	Marcado in situ del conjugado HYNIC-RGD empleando como coligantes EDDA/Tricina	73
4.8	Optimización de la formulación	75
4.9	Validación del sistema y del método analítico para la caracterización del conjugado HYNIC-RGD	77

4.9.1	Linealidad del sistema	77
4.9.2	Precisión del sistema	79
4.9.3	Exactitud y repetibilidad del método	79
4.9.4	Especificidad del método	80
4.9.5	Linealidad del método	81
4.9.6	Precisión intermedia del método	85
4.10	Resultados pruebas de control de calidad del núcleo-equipa	85
	Capítulo 5. Conclusiones	91
	Capítulo 6. Perspectivas	94
	Capítulo 7. Referencias bibliográficas	96
	Anexos	103
	Glosario	107

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Esquema de una gammacámara	8
Figura 2	Afinidad del ^{99m}Tc -HYNIC-TOC en membranas celulares de células AE42 que expresan receptores de somatostatina (gráfica de Scatchard)	9
Figura 3	Curva de competencia del ^{99m}Tc -HYNIC-TOC en membranas celulares de células AE42 que expresan receptores de somatostatina (especificidad)	9
Figura 4	Representación esquemática de un radiofármaco de primera generación	11
Figura 5	Representación esquemática de un radiofármaco de segunda generación	11
Figura 6	Representación esquemática del radiofármaco de tercera generación ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD	11
Figura 7	Fisión nuclear del uranio -235	13
Figura 8	Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ producido en México en el ININ	14
Figura 9	Diagrama del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	14
Figura 10	Estructura química del ácido 6-hidroxipiridin-3-carboxílico (HYNIC)	15
Figura 11	Ligantes empleados para formar complejos con ^{99m}Tc -HYNIC	16
Figura 12	Estructuras de complejos de ^{99m}Tc -HYNIC-coligante. A) ^{99m}Tc -HYNIC-(tricina) ₂ ; B) ^{99m}Tc -HYNIC-EDDA-Cl; C) ^{99m}Tc -HYNIC/Tricina-L (L= TPPTS, ácido nicotínico, ácido isonicotínico)	17
Figura 13	Dímero del péptido c(RGDfK) unido a una molécula de HYNIC y marcado con ^{99m}Tc (RP593)	24
Figura 14	Identificación química del radiofármaco HYNIC-TOC radiomarcado con ^{99m}Tc por espectroscopia de masas (arriba) y U.V./radio-HPLC (abajo)	26

Figura 15	Estructura molecular del péptido c(RGDfK)	66
Figura 16	Estructura molecular del conjugado c(RGDfK)HYNIC	67
Figura 17	Estructura molecular del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	67
Figura 18	Síntesis del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	68
Figura 19	Cromatograma del Conjugado HYNIC-RGD	70
Figura 20	Espectro UV-vis del conjugado HYNIC-RGD	71
Figura 21	Cromatograma del conjugado HYN-RGD purificado mediante RP-HPLC	72
Figura 22	Cromatograma del péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD materia prima lote 4052242 a una longitud de onda de 220 nm	73
Figura 23	Cromatograma del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD 25 μg del conjugado HYNIC-RGD	74
Figura 24	Cromatograma obtenidos adicionando diferentes cantidades de conjugado HYNIC-RGD a la formulación liofilizada	76
Figura 25	Curva de linealidad del sistema	78
Figura 26	Cromatograma del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD (No se observó ninguna señal debida a algún componente de la formulación, fase móvil, diluyente o productos de degradación en el tiempo de retención del conjugado)	81
Figura 27	Curva de linealidad del método	82
Figura 28	Curva de Recobro	83
Figura 29	Ratón atímico con tumor inducido con células 4R42J	89
Figura 30	Extracción del tumor de células 4R42J después de la administración del radiofármaco	94

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1	Péptidos sintéticos antagonistas para integrinas. 23
Tabla 2	Técnicas de cromatografía en columna 36
Tabla 3	Relación de la polaridad entre las fases estacionaria y móvil en cromatografía de fase reversa 39
Tabla 4	Gradiente de concentración de la fase móvil 51
Tabla 5	Fracciones recolectadas durante la purificación del conjugado HYNIC- RGD 51
Tabla 6	Fórmula unitaria del núcleo equipo HYNIC-TOC 52
Tabla 7	Fórmula unitaria del núcleo-equipos HYNIC-RGD 53
Tabla 8	Niveles de concentración para evaluar la linealidad del sistema 55
Tabla 9	Niveles de concentración para evaluar la linealidad del método 56
Tabla 10	Pruebas de control de calidad de núcleo equipos HYNIC-RGD 58
Tabla 11	Interpretación de resultados para la prueba de endotoxinas bacterianas 62
Tabla 12	Valores de calor de formación 66
Tabla 13	Resultados de la caracterización del conjugado HYNIC-RGD e impurezas 70
Tabla 14	Pureza química del conjugado HYNIC -RGD sintetizado 72
Tabla 15	Pureza química del péptido c(RGDfK) materia prima 73
Tabla 16	Pureza radioquímica del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando como coligantes EDDA/Tricina 74
Tabla 17	Pureza radioquímica del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando diferentes cantidades de conjugado HYNIC -RGD 75

Tabla 18	Resultados de la linealidad del sistema	78
Tabla 19	Parámetros estadísticos para evaluar la linealidad del sistema	79
Tabla 20	Resultados de la precisión del sistema	79
Tabla 21	Resultados del porcentaje de recobro del conjugado	80
Tabla 22	Resultados de la especificidad del método	80
Tabla 23	Resultados de la linealidad del método	82
Tabla 24	Parámetros estadísticos para evaluar la linealidad del método	83
Tabla 25	Resultados de la cantidad adicionada vs cantidad recuperada de conjugado HYNIC-RGD	84
Tabla 26	Parámetros estadísticos del porcentaje de recobro del conjugado HYNIC-RGD	84
Tabla 27	Resultado de la precisión intermedia	85
Tabla 28	Resultados de las pruebas fisicoquímicas del núcleo-equipo HYNIC-RGD	86
Tabla 29	Resultados de la pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando 3 métodos diferentes	86
Tabla 30	. Impurezas generadas durante el marcado del conjugado HYNIC-RGD con ^{99m}Tc empleando como coligantes EDDA/Tricina	87
Tabla 31	Resultados de la estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD	87
Tabla 32	Resultados de la prueba de esterilidad	88
Tabla 33	Radiactividad promedio en los diferentes órganos de los ratones sacrificados a diferentes tiempos después de la administración del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD	88
Tabla 34	Relación de la radiactividad entre el tumor y diferentes órganos del ratón	90

Lista de abreviaturas

α	Rayos alfa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
β	Rayos beta
b_0	Ordenada al origen
b_1	Pendiente
BN	Bombesina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Bq	Bequerel
BFCA	Agente Quelante Bifuncional
C	Carbono
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celcius
$\text{CH}_3\text{COONH}_3$	Acetato de amonio
CH_3CN	Acetonitrilo
Ci	Curie
cm	centímetros
^{64}Cu	Cobre-64
c(RGDfV)	Pentapéptido ciclico Arginina-Glicina-Asparagina-Fenilalanina-Lisina
CV	Coefficiente de variación
$\text{CV}_{y/x}$	Coefficiente de variación de la regresión
Cys	Cisteína
DMF	Dimetilformamida
DMSA	Ácido dimercaptosuccinico
DTPA	Ácido dietilentriaminopentacético
e^-	electrón
ECM	Membrana celular externa
EDDA	Ácido etilendiaminodiacético
EDTA	Ácido etilendiamotetracético
eV	electronvolt
^{18}F	Fluor-18
γ	Rayos gamma
g	gramo
Gly	Glicina
GRP	Péptido receptor de gastrina
HATU	O-(7-azabenzotriazolil)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)
HCl	Ácido clorhídrico
HEDP	Hidroxietilendiaminofosfonato
HNO_3	Ácido nítrico

H ₂ O	Agua
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión
HPLC-RP	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión en fase Reversa
hr	hora
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HYNIC	Ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico
IC (β ₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC (μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
¹¹¹ In	Indio
IR	Espectrometría por infrarrojo
ITLC	Cromatografía en capa fina
ITLC-SG	Cromatografía instantánea en capa fina
k	Coefficiente de reparto
LAL	Lisado de Amebocitos de <i>Limulus</i>
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
Lys	Lisina
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
MBq	Megabequerel
MBq/g	Megabequerels por gramo
mCi	milicurie
mCi/g	milicuri por gramo
mg	miligramo
μg	microgramo
min	minutos
mL	mililitro
μL	microlitro
⁹⁹ Mo	molibdeno
MoO ₄ ²⁻	molibdato
N	Concentración Normal
NA	Ácido nicotínico
NaCl	Cloruro de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico anhidro
Na ₂ H ₂ PO ₄	Fosfato de sodio monobásico dihidratado
nm	nanometros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NSB	Receptor no específico
pH	Potencial de iones hidronio
PTTPS	Trisodio-trifenil -fosfin -3,3´3´´-trisulfonato
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
RGD	Péptido Arginina-Glicina-Asparagina

RP593	Dímero que contiene dos secuencias RGD
S	Desviación estándar
SB	Receptor específico
SM	Espectrometría de masas
Sn	Estaño
SnCl ₂	Cloruro estanoso
^{99m} Tc	Tecnecio-99 metaestable
^{99m} TcO ₄ Na	Pertecneciato de sodio
TFA	Ácido trifluoroacético
TOC	Octreotido
Trp	Triptofano
t	tiempo
t _r	tiempo de retención
UA	Unidades arbitrarias
Val	Valina
?	Media aritmética

Resumen

El diagnóstico de algunos procesos patológicos mediante imágenes constituye uno de los métodos empleados en la determinación del origen, condición y/o evolución de una enfermedad. El uso de agentes de contraste en conjunción con otras técnicas ayuda a la obtención y visualización de sistemas complejos, entre estos podemos encontrar a los radiofármacos empleados en medicina nuclear para visualizar diversos órganos y sistemas corporales.

Actualmente se pretende desarrollar un radiofármaco de tercera generación que pueda ser utilizado para imagen *in vivo* de integrinas con la finalidad de detectar procesos de angiogénesis, lo cual permitiría diagnosticar de manera específica una amplia gama de tumores primarios y sus metástasis.

En el presente trabajo se desarrolló el radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD, así mismo se determinaron las condiciones óptimas para la formación de dicho complejo. El HYNIC fue empleado como agente quelante, usando como coligantes EDDA y Tricina para completar la esfera de coordinación del ^{99m}Tc .

El conjugado HYNIC-RGD fue sintetizado, purificado, caracterizado y radiomarcado *in situ* con ^{99m}Tc empleando como método de análisis Cromatografía de Líquidos Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC). Así se desarrolló la formulación liofilizada para su marcado instantáneo a la cual se le realizaron pruebas de control de calidad.

El conjugado fue obtenido libre de impurezas, mostrando estabilidad al igual que su complejo formado con ^{99m}Tc . El método de análisis fue validado resultando ser preciso, exacto, lineal y específico para la cuantificación del analito de interés. La formulación liofilizada mostró una pureza radioquímica mayor de 95 %, además de ser estéril y libre de pirógenos. Las pruebas de biodistribución en ratones atímicos con tumores inducidos mostraron que el radiofármaco se unió principalmente al tumor y que éste fue excretado principalmente por vía renal.



Introducción

Los radiofármacos diagnósticos de tercera generación se emplean en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos, son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos específicos tales como receptores y enzimas. Se componen de tres partes: el metal, el agente quelante ó ligante bifuncional y el fragmento bioactivo, el cual puede ser una proteína, un fragmento proteico, un péptido, ADN, ARN u oligonucleótidos [1].

Péptidos como la somatostatina, gastrina y sus análogos han sido radiomarcados, empleándose para imagen de receptores de somatostatina y GRP en pacientes con tumores [2]. Dichos estudios se basan en la alta afinidad que estas moléculas presentan por ciertos receptores, su buena internalización, así como su retención en células y predominante excreción por vía renal [3]. Sin embargo su uso es limitado debido a las diferencias en la expresión de los receptores en los tumores [4].

Recientemente, ha surgido un especial interés por los receptores para imagen *in vivo* de integrinas [5]. Especialmente por los $\alpha_v\beta_3$, los cuales son mediadores en la unión de la matriz extracelular con varias proteínas como la vitronectina, fibronectina y el factor von Willebrand, por lo cual es un blanco importante para el desarrollo de los radiofármacos.

Las integrinas se encuentran involucradas en diferentes procesos patológicos, como la metástasis, angiogénesis tumoral, restenosis, osteoporosis y procesos inflamatorios [6]. Muchos estudios han mostrado que existe una correlación entre la expresión de $\alpha_v\beta_3$ integrina y la metástasis potencial del tumor correspondiente [7]. Ésta es expresada sobre el endotelio celular durante la migración a través de la membrana basal en procesos angiogénicos. Así, varios enfoques sobre la inhibición de la angiogénesis en tumores inducidos se basa en el desarrollo de péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), la cual se encuentra unida a una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular. El pentapéptido cíclico c(RGDfV) [8] es selectivo para receptores $\alpha_v\beta_3$, por lo que ha sido empleado como una ventaja para el desarrollo de radiofármacos [9]. La molécula de RGD ha sido marcada con ^{111}In , ^{90}Y , ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{64}Cu y ^{18}F [5, 6]; la mayoría de estos han mostrado una alta afinidad *in vitro* por los receptores $\alpha_v\beta_3$ y una unión a los receptores en tumores en la evaluación *in vivo* [10].

Uno de los objetivos de este trabajo fue sintetizar el conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD (HYNIC-RGD) para ser marcado con ^{99m}Tc a partir de kits liofilizados y evaluar su estabilidad *in vitro*. Por lo cual, se calculó la energía de formación del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD y del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD (^{99m}Tc -HYNIC-RGD). Se seleccionaron las condiciones adecuadas de reacción para la conjugación del ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC) al péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD [c(RGDfK)]. Su marcado con ^{99m}Tc fue realizado empleando como coligantes ácido etilendiaminodiacético (EDDA) y tricita. Además se eligió un método



analítico para su caracterización y análisis, el cual fue validado. Se desarrolló la formulación liofilizada que diera formación instantánea al complejo ^{99m}Tc -HYNIC-RGD, el cual fue captado *in vivo* en sitios de angiogénesis con sobreexpresión de integrinas. Se determinó la pureza radioquímica del liofilizado y finalmente se realizaron pruebas de estabilidad del complejo, así como estudios *in vivo* lo cual nos permitió determinar la distribución del radiofármaco en ratones con tumores inducidos.

El conjugado HYNIC-RGD y su complejo formado con tecnecio fueron estables, el método analítico empleado para su cuantificación mostró ser específico. Una vez marcado se obtuvo con una pureza radioquímica mayor de 95 % y las impurezas generadas durante el marcaje fueron menores de 5 %, también tuvo una alta estabilidad *in vitro*. Las pruebas de esterilidad y pirógenos resultaron negativas. En la evaluación *in vivo* el radiofármaco se captó principalmente en los tumores inducidos en los ratones por lo cual podemos concluir que el radiofármaco es útil para detectar tumores primarios.



Objetivos

Objetivo general

Sintetizar el conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD para ser marcado con ^{99m}Tc a partir de kits liofilizados y evaluar su estabilidad *in vitro*.

Objetivos específicos

- 1) Calcular la energía potencial y geometría más probable por Mecánica Molecular del péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD, del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD y del complejo $\text{Tc-HYNYC/EDDA-Lys-D-Phe-RGD}$, utilizando el programa de cómputo BioMed CACHE/Fujitsu.
- 2) Sintetizar el conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD
- 3) Optimización y validar de un método analítico para la caracterización y purificación del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD
- 4) Desarrollar formulaciones liofilizadas para el marcado instantáneo de HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD por intercambio de ligantes entre tricina y el EDDA.
- 5) Realizar pruebas de estabilidad acelerada de las formulaciones del complejo preparadas.
- 6) Realizar pruebas de pureza radioquímica del $^{99m}\text{Tc-HYNYC/EDDA-Lys-D-Phe-RGD}$
- 7) Realizar pruebas *in vivo* en animales de experimentación (ratones) para determinar la distribución y estabilidad del complejo.



Capítulo 1. Marco teórico



1.1 Medicina nuclear

El radio se distingue por ser el primer radisótopo utilizado en medicina, ya aplicado en 1901 y el más importante hasta 1946, cuando se obtuvieron grandes cantidades de radisótopos artificiales. Desde entonces ha sido muy rápido el crecimiento de sus aplicaciones médicas, debido a su utilidad en el diagnóstico, la terapéutica y la investigación. Los procedimientos médicos actuales aplican más de 50 radisótopos en una amplia variedad de formas físicas y químicas [11].

La medicina nuclear es una especialidad médica que emplea técnicas seguras y con un alto índice costo/beneficio para obtener información funcional y anatómica de los órganos, frecuentemente permite descubrir alteraciones mucho antes de que las enfermedades sean clínicamente detectables, lo que repercute significativamente en tratamientos tempranos más efectivos y pronósticos favorables.

A principios de la década de los 70's, su desarrollo y evolución se acentuó gracias a la electrónica, al aporte de nuevos instrumentos de detección para el diagnóstico por imágenes y a la aparición de nuevos radionucleidos.

Hoy en día, la medicina nuclear ofrece procedimientos útiles en todas las especialidades de la medicina, desde cardiología a neuropsiquiatría. Existen casi 100 evaluaciones distintas y no hay órgano que no pueda ser explorado mediante esta especialidad donde podemos encontrar otra área que es la **radiofarmacia** [11, 12].

La radiofarmacia en México se inició en el año de 1965, esta rama de las ciencias farmacéuticas se ocupa del diseño, preparación, control de calidad y dispensación de los radiofármacos. Con su desarrollo y apoyando al "Programa de Acuerdos Regionales Cooperativos para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nuclear en América Latina" (ARCAL), patrocinado por el Organismo Internacional de Energía Atómica, a través de su proyecto "*Producción y Control de Radiofármacos*" se ha extendido cada vez más el conocimiento de esta área .

Los radiofármacos requieren de un especial manejo antes de su administración en pacientes y normalmente se preparan en el momento de ser usados. Sólo algunos son enviados a los hospitales listos para su preparación a partir de muestras antólogas de pacientes, la marcación de biomoléculas tales como anticuerpos mono y policlonales, **péptidos** y su preparación en el hospital, son procedimientos que se realizan en una radiofarmacia hospitalaria [11].



1.2 Radiofármacos

La medicina nuclear utiliza cantidades muy pequeñas de radiofármacos, para examinar la función y estructura de un órgano. La generación de imágenes es una combinación de muchas disciplinas diferentes, entre ellas la química, la física, las matemáticas, la tecnología informática y la medicina. Esta rama se utiliza a menudo para ayudar a diagnosticar y tratar a tiempo anormal en la progresión de una enfermedad, como lo es el cáncer.

El método de imágenes nucleares permite la visualización de la estructura y la función de órganos y tejidos. El grado en que estos absorben o captan específicamente el radiofármaco puede indicar su nivel de funcionalidad.

Un **radiofármaco** es toda sustancia conteniendo un átomo radiactivo dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede ser administrado en los seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos. La gran mayoría de estas sustancias se usan para la primera finalidad y sólo unos pocos (entre 5-10 %), son empleados con fines terapéuticos [13].

1) En el caso de **radiofármacos con fines de diagnóstico** estos sirven para realizar un estudio funcional y/o morfológico del órgano. Están compuestos por un radionucleido emisor de radiación procedente del núcleo del átomo (gamma o positron) unido a un ligante formando un complejo estable que a su vez se une a una molécula cuyo comportamiento biológico dentro del organismo es el adecuado para el estudio.

Una vez administrado el radiofármaco se distribuye en el paciente dependiendo de la situación fisiopatológica del organismo; el órgano que lo captó emite la radiación. La emisión radiactiva permite detectar el comportamiento con alteraciones mínimas al medio en el que se encuentra. La detección de la radiactividad administrada al paciente radica en las características físicas del radionucleido que confiere la sensibilidad del método. Los sistemas de detección se basan en la transformación de la radiactividad en luz, esta en corriente eléctrica para finalmente obtener un registro ya sea en forma de dígitos o imágenes (figura 1).

Los principales radiofármacos que actualmente se emplean con fines de diagnóstico se están dirigidos hacia el sistema nervioso, sistema renal, sistema retículo endotelial, sistema cardiovascular, sistema respiratorio, sistema locomotor, sistema endocrino, sistema hematopoyético y tumores sólidos [14].

2) Para los *radiofármacos con fines terapéuticos*, una vez administrados al paciente la radiactividad se acumula sobre el tejido y es la que ejerce el efecto terapéutico pretendido, su radionucleido es un emisor β . Una vez administrado y localizado en la célula o zona



patológica de interés, la energía es cedida provocando el efecto deseado. Según su biodistribución se utiliza en dos tipos de terapia: antiinflamatoria y metabólica [14, 15].

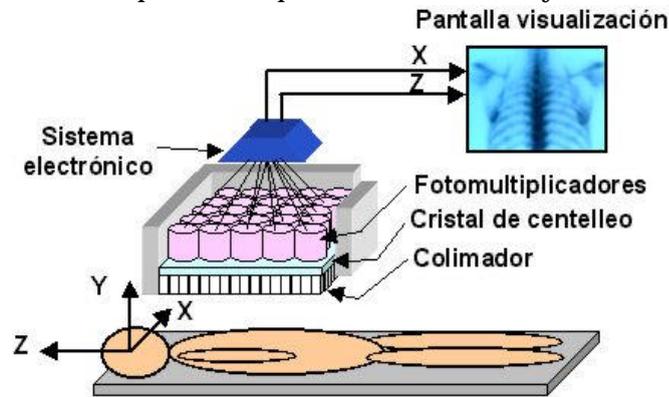


Figura 1. Esquema de una gammacámara [14].

El empleo de dichas sustancias sólo puede justificarse por la obtención de un beneficio neto que compense el riesgo que puede entrañar el uso del trazador radiactivo. Las características deseables en un radiofármaco de diagnóstico para uso humano son [16]:

- 1) Proporcionar una dosis mínima de radiación al paciente
- 2) La radiación emitida debe ser detectada fácilmente y a distancia por instrumentos
- 3) Tener vida media compatible con el tiempo requerido para rastrear el fenómeno biológico estudiado
- 4) Ser de administración única
- 5) Vía de administración intravenosa
- 6) Emitir de preferencia un rayo gamma monocromático con energía entre 100 y 300 KeV y no emitir partículas beta o alfa
- 7) Estar disponible fácilmente, ser económico y conservarse sin contaminarse [16].

Los factores que influyen en el diseño de una formulación radiofarmacéutica son:

- 1) Compatibilidad entre el ligante químico a “marcar” y el radionucleido
- 2) Estequiometría de la formulación la relación molar adecuada entre el ligante fragmento bioactivo, el agente reductor y el radionucleido
- 3) Carga de la molécula, a mayor carga disminuye la solubilidad en medio acuoso
- 4) Especialidad, afinidad y porcentaje de unión a la molécula blanco. Se realizan por lo general pruebas de unión, saturación, internalización y externalización en células que sobreexpresan los receptores o blancos moleculares específicos (figuras 2 y 3) [17]
- 5) Enlace a proteínas, al ser inyectados por vía intravenosa la afinidad a proteínas plasmáticas debe de ser mínima, menor a 25 % (salvo que el estudio sea para componentes sanguíneos)



- 6) Solubilidad, debido a que se aplica como un inyectable debe ser soluble en agua y en membranas biológicas, a un pH compatible con la sangre aproximadamente de 7.4 y poseer osmolalidad adecuada
- 7) Estabilidad química, física y biológica tanto en anaquel como reconstituido [16].

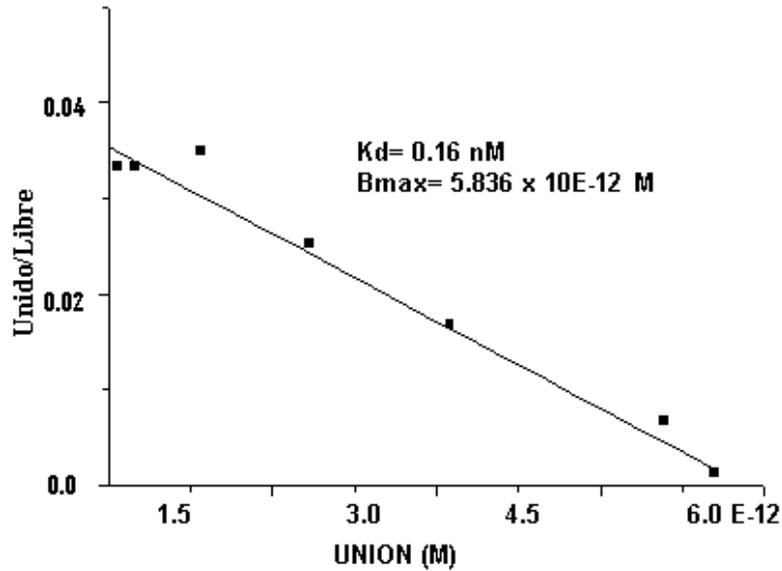


Figura 2. Afinidad del ^{99m}Tc -HYNIC-TOC en membranas celulares de células AE42 que expresan receptores de somatostatina (gráfica de Scatchard) [17]

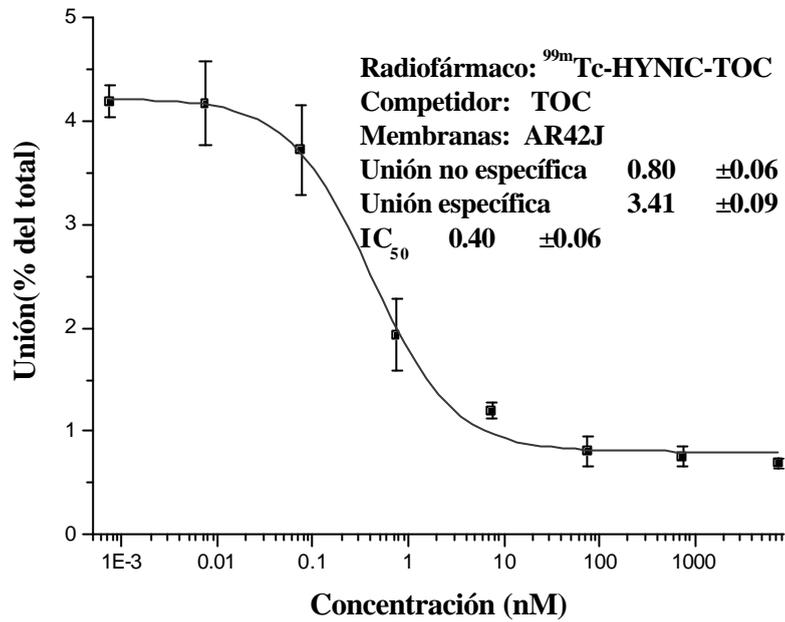


Figura 3. Curva de competencia del ^{99m}Tc -HYNIC-TOC en membranas celulares de células AE42 que expresan receptores de somatostatina (especificidad) [17].



1.2.1 Radiofármacos para imagen molecular diagnóstica y terapia de blancos moleculares

De acuerdo al criterio de diseño, los radiofármacos pueden ser divididos en tres generaciones:

1) Radiofármacos de primera generación (Figura 4): simplemente se marcaban compuestos químicos que pudieran ser captados en un órgano determinado sin un receptor específico ó se administraban radiopartículas que fueran captadas aprovechando procesos fisiológicos que se llevan a cabo normalmente en el cuerpo. Por ejemplo, la fagocitosis fue la base para preparar coloides como el $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$ y el bloqueo capilar para desarrollar ^{99m}Tc -macroagregados de albúmina, dando origen a la gammagrafía hepática y pulmonar respectivamente. Dado que el ^{99m}Tc se obtiene del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ en cantidades de nanogramos, la estructura de los primeros agentes diagnósticos no fue caracterizada por métodos de análisis químico convencional debido a su baja concentración (escala micromolar) [13, 18].

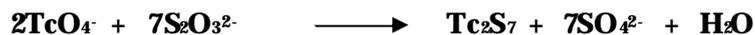


Figura 4. Representación esquemática de un radiofármaco de primera generación ^{99m}Tc -coloide de azúfre) [13].

2) Los radiofármacos de segunda generación (figura 5) surgen en bs años de 1980's como resultado del desarrollo de compuestos de coordinación bien caracterizados, donde un metal se une a un ligante en una geometría definida, por ejemplo los complejos Tc(V) -oxo. La biodistribución de estos complejos era determinada por sus propiedades fisicoquímicas tales como carga, peso molecular, geometría espacial y lipofilia. De estos trabajos emerge el concepto de *agente quelante bifuncional (BFCA)*, los cuales son ligantes que no solo quelan al metal, sino que también pueden mediante otro grupo funcional unirse a otra molécula con actividad biológica, como por ejemplo los derivados del ácido iminodiacético [18, 19]. Este concepto se extendió en los años 1990's para diseñar agentes biquelantes que por un lado se unieran a un radiometal y por otro extremo pudieran unirse a fragmentos bioactivos, iniciando así los estudios sobre el diseño de radiofármacos de tercera generación.

3) Los radiofármacos diagnósticos de tercera generación (figura 6) se emplean en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos específicos tales como receptores y enzimas. Se componen por tres partes: un *metal*, el *agente quelante ó ligante bifuncional* y un *fragmento bioactivo* que puede ser una proteína, un fragmento proteico, un péptido, ADN, ARN y oligonucleótidos [20]. El agente bifuncional se encuentra localizado entre el radionucleido y el fragmento bioactivo, de tal forma que este último sirva como un portador del metal al sitio receptor de la célula ó molécula blanco. Si el ion metálico es



emisor de partículas β ó a el radiofármaco puede utilizarse en la terapia de blancos moleculares. Esta modalidad involucra imágenes y terapia que utilizan herramientas desarrolladas por la biología molecular pero con métodos aplicables *in vivo*

Los radiofármacos de tercera generación, representan un cambio sustancial en los paradigmas del desarrollo farmacéutico, al emplear las propias capacidades orgánicas como fuente de medicamentos, en lugar de considerar al organismo como un simple tubo de ensayo donde actúan moléculas extrañas [21].

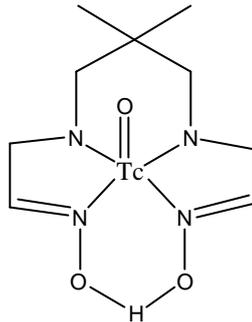


Figura 5. Representación esquemática de un radiofármaco de segunda generación [13].

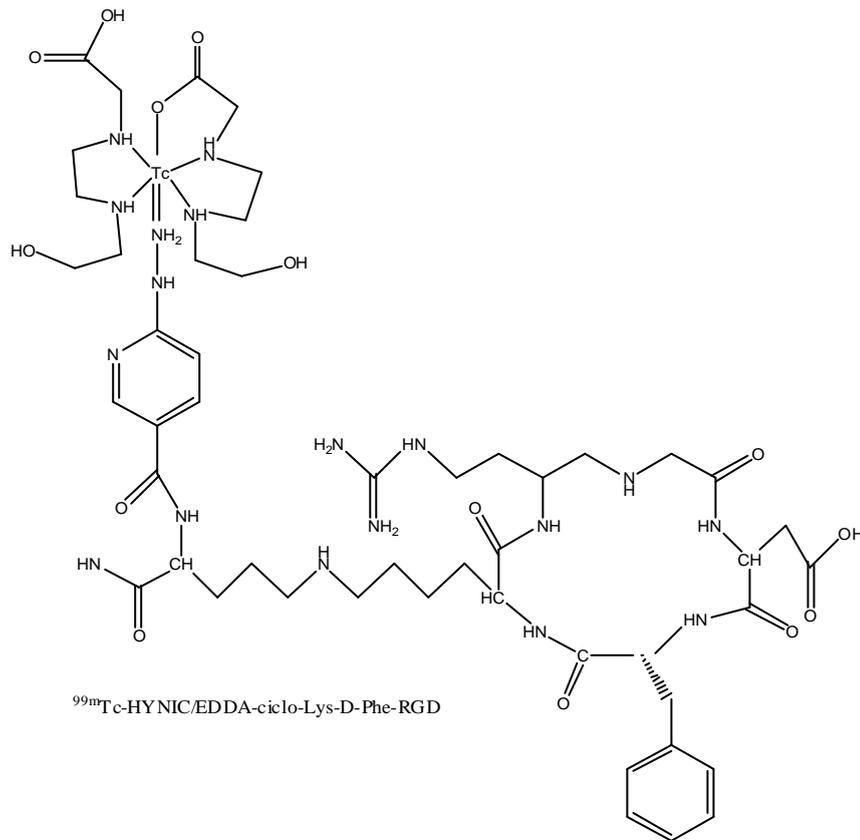




Figura 6. Representación esquemática del radiofármaco de tercera generación ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD [15].



1.2.2 Diseño de radiofármacos de tercera generación

Desde su inicio, el estudio de los radiofármacos se ha dirigido a la química biomolecular y ha adquirido un amplio conocimiento sobre su caracterización estructural, química y bioquímica para los procesos requeridos por las agencias regulatorias de medicamentos.

Los **radiofármacos de tercera generación** son blanco-específicos, únicamente por su capacidad de monitorear los sitios de unión de los receptores y las enzimas *in vivo*. Su diseño ha seguido el llamado “*enfoque bifuncional*” o “*enfoque directo*”. En general, un radiofármaco, diseñado a través de dicho enfoque está compuesto de tres partes [15]:

- 1) El *radionucleido*
- 2) El *agente quelante bifuncional (BFCA)*: ubicado entre el radionucleido y la molécula blanco coordina firmemente al ión metálico y se enlazado covalentemente a la molécula específica del receptor de forma directa o con una molécula de unión.
- 3) Un *fragmento bioactivo* de unión que sirve como un sistema de entrega, el cual transporta al radionucleido hacia el sitio receptor en las células blanco. En el “enfoque bifuncional” el radiometal o la fuente de radiación no interfiere con la parte del receptor.

1.2.3 Radiofármacos y química del tecnecio del tecnecio

Elemento 43, el tecnecio fue descubierto en 1937 por Perrier y Segré [22] en una muestra de molibdeno que había sido irradiada por deuterons. El nuevo elemento fue nombrado tecnecio, proviene de la palabra griega *technetos*, que significa artificial, ya que fue el primer elemento obtenido artificialmente [23].

Existen 21 isótopos del tecnecio, del ^{90}Tc al ^{110}Tc . El ^{110}Tc tiene un tiempo de vida media muy corto (0.86 segundos), mientras que la del ^{97}Tc es muy larga (2.6×10^6 años). Todos los isótopos son radiactivos. En 1939, Seaborg and Segré [24] observaron que el ^{98}Mo irradiado con neutrones lentos daba origen al ^{99}Tc y decaía a su isomero metaestable ^{99m}Tc .

El uso del tecnecio en la clínica fue introducido en la Universidad de Chicago por Harper et.al [25] empleando el generador de tecnecio, obtenido como el ion pertecneciato, $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

El ^{99m}Tc se considera como el radionucleido “ideal” para marcar fármacos debido a que reúne las características siguientes [18]:

- 1) Fácil obtención a partir del generados $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$
- 2) Ausencia de emisión β y su emisión γ de baja energía (140 KeV), que presenta una adecuada penetración en los tejidos
- 3) Vida media corta de 6 horas



4) Eficiencia con que se detecta



- 5) Facilidad y rapidez con que se pueden unir o complejar a diversas sustancias, drogas o fármacos
- 6) Las cantidades en megabequerles (MBq) empleadas permiten hacer estudios dinámicos y estáticos
- 7) Solubilidad: se disuelve en **agua regia** (mezcla de HNO_3 y HCl), **ácido nítrico** (HNO_3) y **ácido sulfúrico** concentrado (H_2SO_4), pero no es soluble en **ácido clorhídrico** (HCl).
- 8) El tecnecio es un metal de transición del segundo periodo de la tabla periódica, localizado entre el molibdeno y el rutenio, pertenece a la familia VIIA entre el manganeso y el renio, es un metal gris plateado, que lentamente pierde brillo en contacto con el aire húmedo [26, 27]

El tecnecio no se encuentra en la corteza terrestre, lo cual sugiere que todo el que se encuentra presente en el planeta es de origen secundario, o sea, que proviene un tanto de la fisión espontánea del molibdeno, niobio y rutenio; por lo cual todo el tecnecio que se encuentra en el ambiente es el isótopo 99, con una actividad específica de 629 MBq/g (17 mCi/g).

El isótopo del tecnecio (^{99m}Tc) es producido como el ion pertechnetato TcO_4^- en un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, el cual contiene al ion molibdato radiactivo, MoO_4^{2-} (producto de la fisión nuclear del uranio-235, figura 7); que se adsorbe en una columna de alúmina, y es puesto en el generador; así el ión pertechnetato TcO_4^- , es obtenido cuando el núcleo de molibdato-99 (MoO_4^{2-}) decae según lo indica la siguiente reacción:

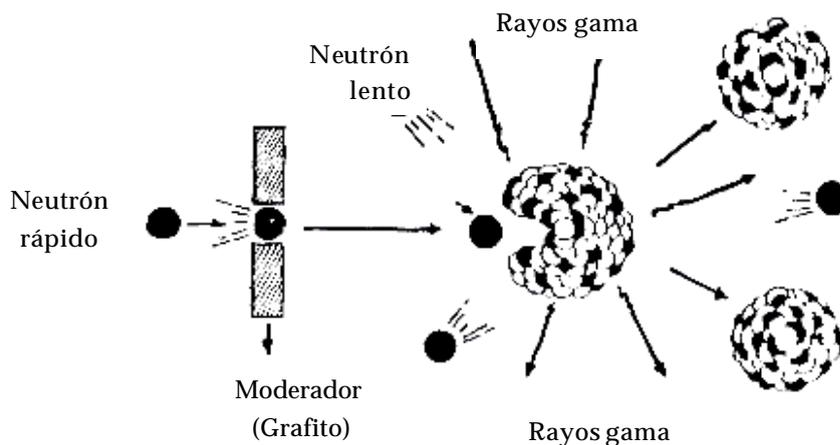


Figura 7. Fisión nuclear del uranio (^{235}U) [28].



El pertecneciato se obtiene en su máximo estado de oxidación (valencia +7) la mayor parte de los compuestos químicos marcados con ^{99m}Tc se llevan a cabo reduciendo a Tc^{3+} , Tc^{4+} , Tc^{5+} y complejando éstos en el compuesto químico adecuado. El agente más comúnmente usado para reducir el tecnecio es el cloruro estanoso (SnCl_2) por presentar las ventajas de baja toxicidad, gran poder reductor y buen rendimiento de radiomarcación [26, 27]

El generador de adsorción $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (figura 8) se fundamenta en la diferencia del comportamiento fisicoquímico de las sales de molibdeno y las del tecnecio. Las primeras se adsorben fuertemente a la superficie de las partículas de algunos óxidos (óxido de aluminio), en cambio las sales del tecnecio al no ser fijadas, son arrastradas fácilmente al pasar una solución de alúmina inerte. En el proceso de extracción, la elución arrastra al $^{99m}\text{TcO}_4$ mediante NaCl 0.9% estéril y libre de pirógenos (figura 9) [18, 29].



Figura 8. Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ producido en México en el ININ.

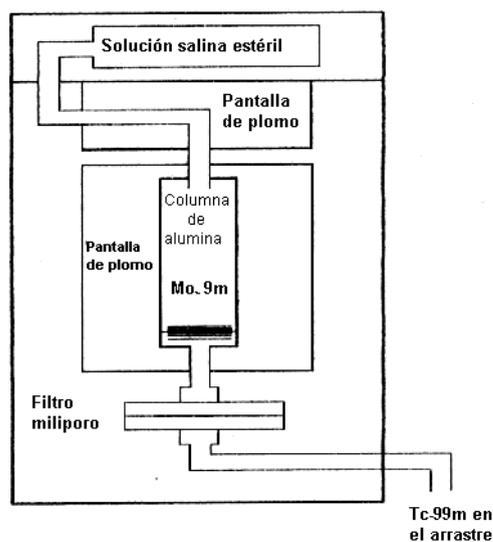
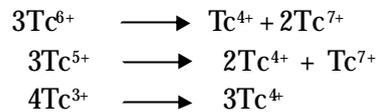




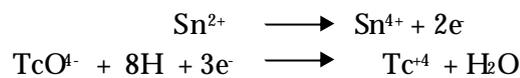
Figura 9. Diagrama del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ [29].



La reducción del tecnecio es un proceso fácil de realizar ya que pasa de un estado de oxidación a otro rápidamente:



En el estado de oxidación (VII) encontramos al anión pertecneciato que se piensa son semejantes a los compuestos correspondientes de ^{99m}Tc , este anión se reduce muy fácilmente en presencia de soluciones ácidas de Sn^{2+} [26]



Sin embargo el grado de reducción dependerá de:

- El oxígeno presente
- La relación estequiométrica Sn/Tc
- Las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción
- La presencia de un ligante así como de su naturaleza [18].

1.3 Ligantes empleados para la formación de complejos de tecnecio

Se ha reportado el uso de numerosos ligantes para la formación de complejos con ^{99m}Tc con utilidad clínica, los cuales se pueden dividir principalmente en cuatro clases:

- La primera clase abarca *ligantes que contienen ácidos carboxílicos, aminas o hidroxilos*. Entre los más empleados se encuentran el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido dietilnetriaminopentacético (DTPA), ácido hidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC) (Figura 10), citrato, manitol, entre otros. La constante de solubilidad y lipofilia de estos ligantes son totalmente diferentes, lo cual es importante dependiendo de la aplicación que se busca [18].

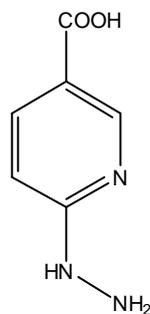


Figura 10. Estructura del ácido 6-hidroxipiridin-3-carboxílico (HYNIC) [18].



- 2) La segunda clase incluye *derivados tiol* que puede complejar ^{99m}Tc ya que tienen una constante de estabilidad alta, incluso más que los de la primera clase. Entre los reportados en esta categoría podemos encontrar al ácido dimercaptosuccínico (DMSA), cisteína, acetilcisteína, etc.
- 3) La tercera clase de ligantes incluye *derivados de fósforo*. Se incluyen a los polifosfonatos, pirofosfonatos, hidroxietilendiaminofosfonato (HEDP), entre otros. Esta clase de complejos se aplica en particular a la investigación de imagen de hueso.
- 4) La cuarta clase son empleados especialmente para el miocardio y agentes de perfusión cerebral. Entre ellos podemos encontrar a los derivados de oximas tales como (2-metoxi-2-metilpropil) isonitrilo (Sestamibi TM).

Uno de los ligantes más prometedores es el HYNIC ya que presenta un alto marcaje con ^{99m}Tc , con la adición de coligantes forma complejos muy estables tanto en solución como *in vivo*. Los coligantes se emplean para complementar la esfera de coordinación del tecnecio el cual puede tener un número de coordinación del 4 al 10, dado que el HYNIC sólo puede ocupar de uno a dos sitios de coordinación. Entre los coligantes se pueden mencionar al ácido etilendiaminodiacético (EDDA), tricina, tricina/ácido nicotínico, tricina/ácido isonicotínico y trisodio-trifenil-fosfin-3, 3'3''-trisulfonato (PTTPS) (Figura 11). Es justamente a las variaciones estructurales de estos coligantes que se pueden modificar las propiedades del complejo obtenido (Figura 12), tales como su hidrofobicidad [18].

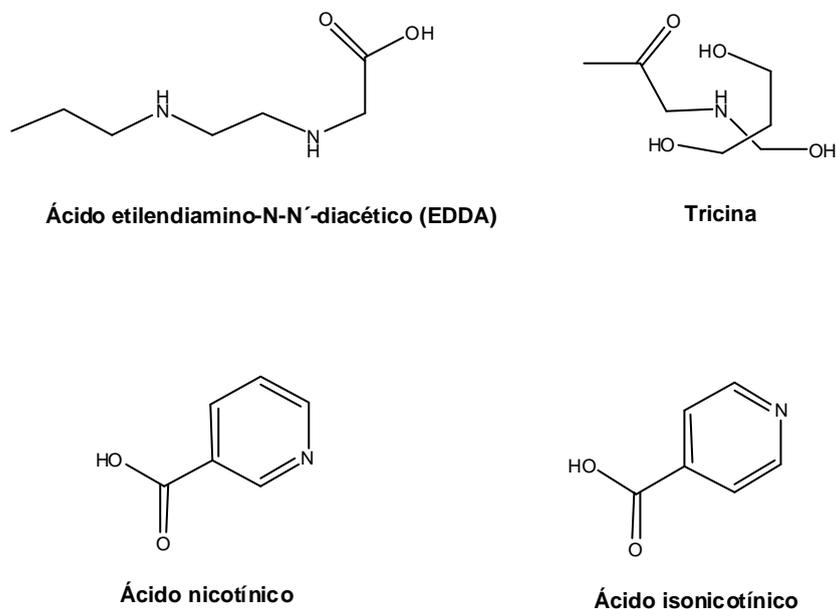


Figura 11. Ligantes empleados para formar complejos con ^{99m}Tc -HYNIC [18].



El uso de coligantes permite modificar la biodistribución, la depuración renal de los complejos, aumentando la estabilidad en el organismo y no son degradados por proteasas plasmáticas.

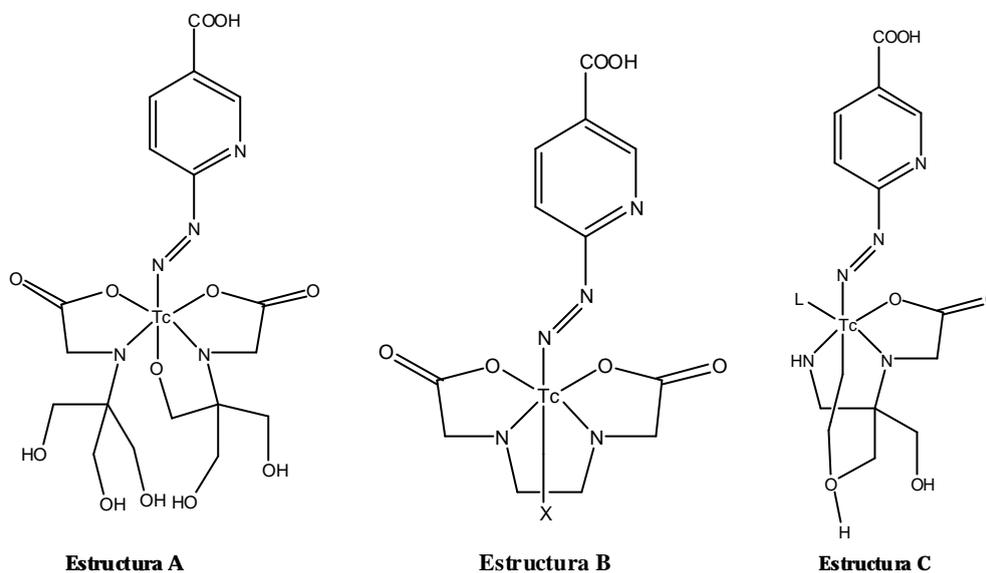


Figura 12. Estructuras de complejos de ^{99m}Tc -HYNIC-coligante. A) ^{99m}Tc -HYNIC-(tricina)₂; B) ^{99m}Tc -HYNIC-EDDA-Cl; C) ^{99m}Tc -HYNIC/Tricina-L (L= TPPTS, ácido nicotínico, ácido isonicotínico) [18].

1.4 Marcaje de biomoléculas con metales

Las técnicas usadas en el marcado de péptidos con radionucleidos de yodo, tecnecio, indio, galio, entre otros, se dividen en dos procedimientos: el marcaje directo y el indirecto.

- 1) El **marcaje directo**, se enfoca usualmente al uso de agentes oxidantes o reductores que generan especies electrofílicas de los átomos radiactivos que luego reaccionan con el grupo funcional del péptido. Normalmente se emplea el SnCl_4 para convertir un número de enlaces disulfuro de una proteína en tioles libres, los cuales pueden enlazar al ^{99m}Tc eficientemente. Este método se aplica solo a proteínas o a sus fragmentos porque muchos péptidos pequeños no tienen enlace disulfuro, o en algunos casos es crítico para mantener sus propiedades biológicas al ser reducido. La ventaja de este método es su facilidad para efectuarse, aunque su restringido uso a proteínas o sus fragmentos suele ser una limitante [15, 18].



- 2) El **marcaje indirecto**, este emplea ligantes bifuncionales que unen el radisótomo y la biomolécula, la cual queda marcada y funciona como transportador del isótopo radiactivo al lugar que se requiera la energía ionizante.

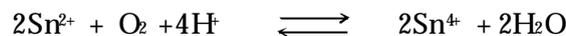


El marcaje puede ser logrado casi por reducción directa del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en presencia de un conjugado BFCA-péptido o por el cambio de un ligante con un complejo intermediario de ^{99m}Tc . Dentro de este método se pueden distinguir los métodos de premarcaje y postmarcaje. El primero se basa en la marcación con el elemento radiactivo de un ligante bifuncional con la subsiguiente activación y conjugación del complejo formado a través de enlaces covalentes a la molécula transportadora. Los pasos del marcaje y conjugación se realizan de forma separada lo cual garantiza que el isótopo radiactivo se une directamente al ligante. La purificación del radiofármaco es complicada y se requiere de mucho tiempo, por lo tanto no es conveniente cuando se emplean radiofármacos que contienen átomos radiactivos de vida media corta.

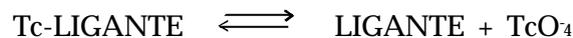
El **método de postmarcaje** es el más popular en la síntesis de radiofármacos, ya que primero se sintetiza el ligante unido a la molécula transportadora y después se une al radisótopo. El ligante se une a un N-terminal de un péptido, proteína o a los grupos tioles y alcoholes que se encuentran dentro de la molécula transportadora [16, 19].

Durante el marcado de los radiofármacos con ^{99m}Tc se puede dar la formación de algunas impurezas. La presencia de oxígeno y radiaciones libres pueden provocar que en la preparación quede *pertecniato* ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) el cual se distribuye en mucosas y propiciando que se vean imágenes de estómago e intestino cuando no son deseadas. En una solución saturada con oxígeno será mayor la cantidad de Sn^{2+} que se necesita para efectuar la reducción [26, 27]

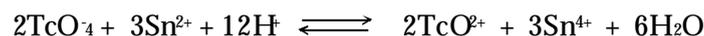
En presencia de oxígeno, el SnCl_2 se oxida y no reduce al $^{99m}\text{TcO}_4^-$



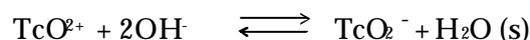
La descomposición radiolítica del complejo de tecnecio reducido puede ocurrir por la interacción de especies radicales libres ($\text{RO}\cdot$) con el complejo, por un mecanismo no definido:



Otra impureza sería la presencia de *tecnecio reducido hidrolizado* que se caracteriza por la formación de un coloide que se distribuye al bazo e hígado. Esta reacción es favorecida por valores de pH cercanos a la neutralidad y por una baja concentración de ligantes [26]:



La hidrólisis del tecnecio forma impurezas las cuales son caracterizadas por la formación de especies insolubles (coloide).

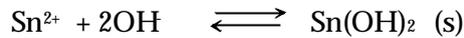




El $\text{TcO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ es el tecnecio reducido o hidrolizado (coloide)



El ion estano también puede hidrolizarse y formar un coloide de hidróxido de estaño que puede unirse al tecnecio reducido y competir con el ligante durante la reacción de marcado:



Las impurezas del coloide pueden ser minimizadas por el uso de un exceso de ligante y un ajuste adecuado del pH. Las impurezas del pertecniato pueden ser minimizadas manteniendo suficiente concentración de cloruro estano, excluyendo al oxígeno (atmósfera de nitrógeno) y utilizando antioxidantes. Las diferentes especies químicas de ^{99m}Tc presentes en los radiofármacos pueden ser determinadas por un simple proceso de cromatografía en capa fina (ITLC) [26, 30]

1.5 Moléculas transportadoras.

Durante los últimos 30 años los investigadores han intentado sintetizar las mejores moléculas para el transporte de complejos a sitios específicos. Así surge el desarrollo de nuevas técnicas para la obtención de complejos estables con ^{99m}Tc y biomoléculas, de tal forma que no se altere la especificidad de estas últimas. Entre las moléculas transportadoras empleadas podemos encontrar las siguientes [31, 32]:

- 1) **Anticuerpos:** los primeros intentos para el desarrollo de sistemas de diagnóstico y terapia bioespecífica surgieron con el empleo de anticuerpos monoclonales marcados con ligantes que enlazan elementos radiactivos. Estos también señalan y atacan los vasos sanguíneos que nutren al tumor, células infecciosas o tejido conectivo que le da soporte y pueden bloquear los factores de crecimiento.
- 2) **Péptidos bioactivos:** los pesos moleculares de los péptidos biológicamente activos son sumamente diversos, ya que pueden estar formados de 3-5 aminoácidos o más de 200. Cuando ocurren modificaciones menores en su estructura, se pueden producir cambios importantes en sus propiedades fisicoquímicas y por tanto su biodistribución en el organismo. Estos se pueden utilizar como moléculas transportadoras ya que pueden ser específicos a receptores de células cancerígenas o tumores, así como a otros receptores [31, 32].

1.5.1 Péptidos

Los péptidos son compuestos que contienen aminoácidos (ácido α -aminocarboxílicos) unidos por enlaces peptídicos, es decir, por la unión del carboxilo terminal de un aminoácido y el amino terminal del siguiente. Diseñados por naturaleza para estimular, regular o inhibir numerosas funciones de la vida, actúan principalmente como



transmisores de información y coordinación de actividades de varios tejidos en el organismo [33, 34].



La síntesis química rápida y la tecnología del DNA recombinante, ha facilitado la fabricación de cantidades importantes de diversos péptidos, muchos de los cuáles existen en el organismo en cantidades relativamente minúsculas, por tanto, son difíciles de aislar en cantidades suficientes para la terapéutica.

La química básica de la síntesis peptídica, desarrollada por el químico alemán Emil Fisher, proporciona los elementos para la activación de los grupos carboxilo, y la adición y retiro de los grupos de bloqueo que evitan las reacciones colaterales indeseables. Años después, Bruce Merrifield revolucionó las técnicas de la síntesis polipeptídica, al desarrollar la síntesis de péptidos en fase sólida, esta técnica permite obtener péptidos sintéticos grandes en periodos cortos [33, 34].

El problema básico de la síntesis peptídica es el de la protección del grupo amino. Al realizar la interacción entre el carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro diferente debe evitarse la reacción entre los grupos de la misma molécula.

Existen muchos grupos de bloqueo; el problema reside en encontrar uno que más tarde pueda ser removido sin destrucción de alguna unión peptídico recién formada. Su uso generalmente está dado por diversos compuestos como el grupo *tert-butoxicarbonilo* (Boc), algunos carbonatos y carbamatos. En la síntesis de fase sólida se emplean grupos de poliestiréno, generalmente se les conoce por el nombre genérico de Boc; para removerlo se emplea ácido trifluoroacético (TFA) y la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente [33].

Los péptidos ofrecen varias ventajas: que son fáciles de sintetizar y modificar, son menos probables a ser inmunogénicos y pueden tener una rápida depuración sanguínea. En muchos casos, la afinidad de los péptidos pequeños por sus receptores es significativamente mayor que la de los anticuerpos o sus fragmentos.

Un radiofármaco ideal utiliza péptidos pequeños, generalmente se usan oligopéptidos de peso molecular menor a 10, 000 Da y deben poseer las siguientes características:

- 1) Alta captación por los órganos blanco.
- 2) Estabilidad metabólica.
- 3) Depuración renal rápida.

Este último punto es de gran importancia para la obtención de imágenes de tumores porque una depuración renal rápida disminuye la radiactividad en el área abdominal y mejora la relación tumor/tejido normal.

Las experiencias que se han obtenido empleando ^{99m}Tc en el marcado de péptidos pequeños se pueden aplicar a otras moléculas que presentan unión a tumores específicos.



Algunos tipos de receptores son sobre expresados en numerosos tipos de cáncer y han sido empleados como blancos moleculares de péptidos radiomarcados para localizar tumores. Durante la última década los estudios clínicos han tenido resultados satisfactorios con las imágenes obtenidas mediante receptores de somatostatina expresados en tumores neuroendócrinos, con ello se han prolongado los estudios de otras moléculas como la gastrina, colestoquinona, ligandos para receptores de integrinas y neurotensina. La mejora de sus análogos es aprobada para la obtención de imágenes específicas de diferentes tipos de cáncer, incluyendo de mama, próstata, intestino, páncreas y tumores cerebrales [35, 36]

1.5.2 Integrinas

Las integrinas son una familia de células de adhesión reportadas por numerosos autores [37, 38]. Son heterodímeros compuestos de una cadena α y una β . Existen 8 subunidades β las cuales forman varias combinaciones con las subunidades α , aproximadamente 16. Ambas son glucoproteínas las cuales se encuentran ancladas a la membrana celular. El grupo amino terminal y la mayor parte de la cadena peptídica son extracelulares, mientras que el fragmento corto del C-terminal es intracelular. La porción extracelular de la cadena alfa y beta interactúan de manera no covalente. Cuando son examinados por microscopía electrónica, la porción extracelular de la integrina aparece como una cabeza globular compuesta por ambas subunidades, conectada o unida a la membrana celular por dos tallos [39]

Una de sus características es su habilidad para convertir ligandos extracelulares en ligandos activos de procesos intracelulares (outside-in signaling) así mismo emplea procesos intracelulares para convertirlos de un estado inactivo a uno activo (inside-out signaling). De dicha forma diferentes ligandos pueden ser unidos a una integrina común desencadenando diferentes respuestas intracelulares [38].

Su principal propiedad es su capacidad para unirse, por un lado, a otros componentes de la membrana celular externa (ECM) y, por otro, a ciertas proteínas específicas integrantes de la misma. Unen a los componentes de la ECM entre sí y a las células. Son la principal familia de receptores de la superficie celular y tienen un papel importante ensamblando los complejos de señalización en los puntos de contacto que existen entre las células y la ECM. Existen determinadas clases de integrinas que sirven también como mediadoras de importantes interacciones celulares involucradas en la adhesión de los leucocitos. Muchas están expresadas ampliamente, y la mayoría de las células tienen más de una integrina en su superficie celular. Su importancia es evidente por las funciones esenciales que desempeñan en una extensa variedad de procesos biológicos. Por ejemplo, su papel en la adhesión las convierte en unos elementos esenciales para la extravasación leucocitaria, la agregación plaquetaria, los procesos del desarrollo y la curación de las heridas. Además algunas células es necesario que estén adheridas para proliferar, y si no se unen a una ECM por medio de integrinas, se produce la apoptosis [40].



Sus porciones extracelulares se unen a muchas sustancias, como por ejemplo; fibronectina, laminina y algunas clases de colágenos gracias al reconocimiento de la **secuencia RGD**.

Los receptores de las integrinas son importantes para organizar el citoesqueleto celular de la actina y para transmitir las señales desde la ECM hasta el interior de la célula. El enganche entre su receptor y los componentes de la ECM produce agrupamiento de los receptores y la formación de *adhesiones locales*, en donde los dímeros se conectan con los complejos del citoesqueleto intracelular. Las proteínas que se fijan con las integrinas en esas adhesiones locales son la talina, vinculina, α -actinina, tensina y paxilina. Una vez ensambladas, los complejos formados por la integrina-citoesqueleto funcionan igual que los receptores activados, y reclutan a los componentes de los sistemas de señalización intracelular [38].

1.5.3 Péptidos ligandos para receptores $\alpha_v\beta_3$: marcadores tumorales en angiogenesis.

Las $\alpha_v\beta_3$ integrinas se encuentran elevadas en la angiogénesis de tumores inducidos y su metástasis. La unión específica de péptidos que contienen el residuo **Arg-Gly-Asp (RGD)** a **receptores $\alpha_v\beta_3$** para integrinas han sido útiles para imagen de tumores específicos, mediante el radiomarcado del péptido RGD [5, 6]

Las integrinas también regulan la formación de complejos de señalización, por lo cual se requieren modificaciones en la expresión de integrinas durante las siguientes etapas de de la generación de metástasis: a) angiogénesis intratumoral; b) desprendimiento del tumor primario; c) interacción de células tumorales con plaquetas; d) adhesión al endotelio [15].

Tanto el bloqueo de integrinas utilizando anticuerpos o péptidos que contienen la secuencia *RGD* (*-Arg-Gly-Asp-*) como modificaciones inducidas en la expresión de moléculas asociadas a estas pueden inhibir la formación de metástasis. En la búsqueda de inhibidores de la diseminación tumoral, estas y algunas moléculas asociadas a ellas son importantes blancos farmacológicos.

Los receptores de integrinas, particularmente $\alpha_v\beta_3$ (también conocido como receptor vitronectina), unen a proteínas y péptidos conteniendo la secuencia RGD [41]. Muchos antagonistas de la vitronectina inhiben la **angiogénesis** [42]. Los estudios clínicos de un péptido lineal sintético con dos secuencias RGD (Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr) marcado con ^{99m}Tc , mostraron que el péptido radiomarcado se elimina rápidamente por vía renal con excelentes imágenes de metástasis en nódulos linfáticos [43]. En forma similar se diseñó un antagonista de la vitronectina con dos secuencias RGD (figura 12) y se marcó de igual forma empleando HYNIC/Tricina/TPPTS como coloigantes [44]. En estudios preliminares con modelos animales, dicha molécula mostró buena depuración sanguínea con una captación tumoral de 5.5% de la actividad inyectada por gramo de tejido una hora después de la administración [5, 15].



Se han encontrado una gran variedad de integrinas sobre la superficie de células tumorales. Por ejemplo, las células de melanoma expresan a β_3 , $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$, en las células de carcinoma pulmonar se expresan a β_5 y en muchas otras células tumorales se encuentran a β_6 .

Existen algunos ligandos nativos para $\alpha\nu\beta_3$, y todos interaccionan con otras integrinas como por ejemplo las $\alpha_{III}\beta_3$, el ligando nativo contiene un fragmento RGD torcido en una conformación flexible enrollada en la cadena polipeptídica. Esto es de gran interés para poder crear un péptido sintético antagonista a partir de éste para sintetizar péptidos pequeños que contengan la secuencia RGD (tabla 1).

Esto puede explicar la restringida movilidad del fragmento RGD en el ciclo de un pentapéptido o hexapéptido observándose el resultado en la gran potencia *in vitro*. En numerosos estudios para desarrollar ligandos para las integrinas $\alpha\nu\beta_3$, se ha encontrado que pequeños péptidos pueden ser más selectivos para $\alpha_{III}\beta_3$ sobre los $\alpha\nu\beta_3$.

Los ligandos nativos aparentemente son más flexibles en la región del péptido RGD y son capaces de ajustarse a varios sitios receptores, por el contrario la estructura cíclica forzada es menos capaz para acomodarse a diferentes receptores [15].

Tabla 1. Péptidos sintéticos antagonistas para integrinas [15].

Nombre	Secuencia
c(RGDfV)	Arg-Gly-Asp-DPhe-Val
c(RGDfY)	Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr
c(RGDfK)	Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys
c(RGDyV)	Arg-Gly-Asp-DTyr-Val
c(RGDyK)	Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys
c(RGDRGD)	Arg-Gly-Asp-Arg-Gly-Asp
RGD-4	Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys
c(CRGDGWC)	Cys-Arg-Gly-Asp-Gly-Trp-Cys
c(CRRETAWAC)	Cys-Arg-Arg-Glu-Thr-Arg-Trp-Arg-Cys
c(CNGRC)	Cys-Asn-Gly-Arg-Cys

Los datos sugieren que los pequeños sitios de unión en los receptores a $\nu\beta_3$ son estrechos y menos flexibles que los encontrados en $\alpha_{III}\beta_3$. Por esto, los pentapéptidos cíclicos son preferidos sobre los hexapéptidos cíclicos. Otra investigación confirma que los receptores a $\nu\beta_3$ de ligantes estrechos, con la secuencia ciclo (RGDRGD), presenta un pequeño espacio Arg-Asp [45].

Se realizaron estudios con péptidos que contienen la secuencia RGD para encontrar aquellos que son específicos para receptores a $\nu\beta_3$ y se encontraron dos: *ciclo*(CNGRC) y el



doble-ciclo ACDRGDCFC ("RGD-4C") [46]. Ambos péptidos mostraron el mismo blanco celular KS1767 [47].

En un modelo de angiogénesis el cyclo(RGDfV) reconoció a los receptores $\alpha v\beta_3$ y $\alpha v\beta_5$ [48] y suprimió el proceso angiogénico de la membrana carioalantoica en pollos (CAM) [49]. Este también suprimió el crecimiento de los vasos sanguíneos de tumores inducidos y promovió la regresión del crecimiento tumoral en un modelo CAM [50].

El RP593 (figura 13) es un dímero que contiene dos secuencias c(RGDfK) unido a una molécula de HYNIC para ser marcado con ^{99m}Tc . En el marcaje con tecnecio se emplea tricina y TPPTS como coligante [51]. Este péptido es antagonista para $\alpha v\beta_3$ y para $\alpha v\beta_5$ con baja afinidad con $\alpha 1\beta_3$ y $\alpha 11\beta_3$ [52].

En un modelo tumoral Neu-Oncomouse, el RP593 se excretó predominantemente por vía renal, con una retención renal mínima (4 % y 6 % ID/g de 2 a 24 hr). En estudios subsecuentes, se comparó el dímero c(RGDfK) con un monómero que contiene una sola secuencia c(RGDfK). Ambos péptidos fueron marcados con ^{99m}Tc utilizando una molécula de HYNIC. Se encontró una diferencia muy pequeña en los tumores en OVCAR-3 entre el monómero y el dímero [53].

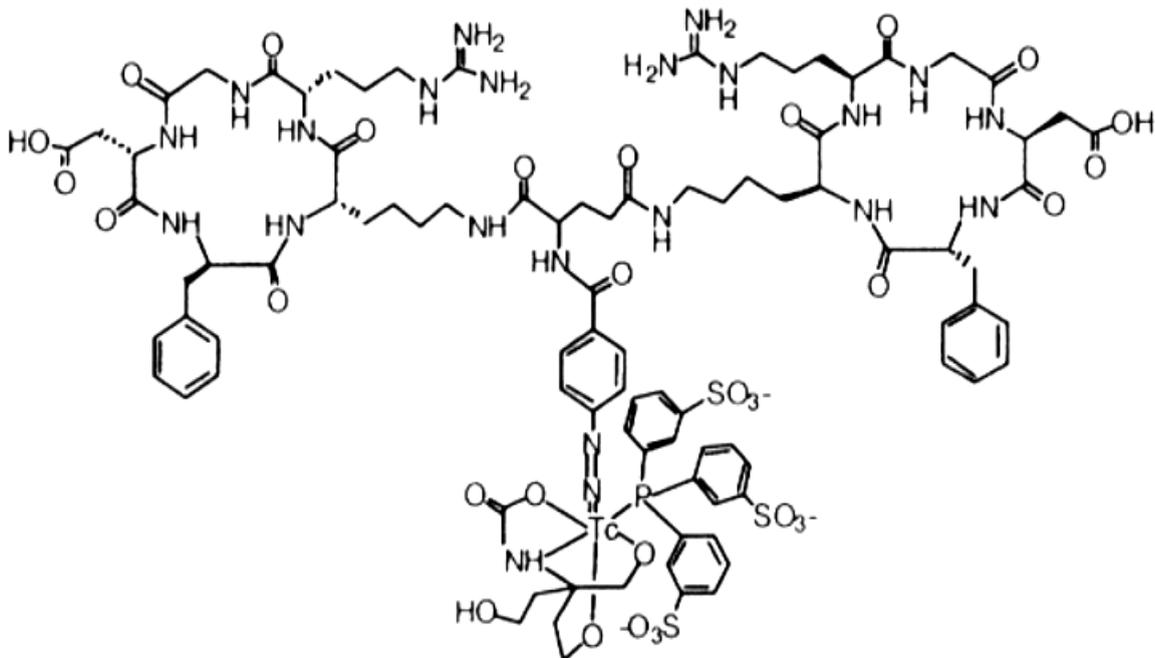




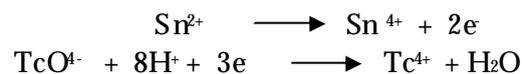
Figura 13. Dímero del péptido c(RGDfK) unido a una molécula de HYNIC y marcado con ^{99m}Tc (RP593) [15].



1.6 Preparación del núcleo-equipo de ^{99m}Tc

Un núcleo-equipo es un juego de reactivos o formulación liofilizada para el marcado instantáneo con ^{99m}Tc , consiste en un vial de reacción estéril que contiene reactivos químicos no radiactivos liofilizados, requeridos para producir un radiofármaco empleado en estudios clínicos específicos después de que se le hace reaccionar con un eluato de pertecneciato. Los núcleo-equipos se preparan por adición de una solución de cloruro estanoso en ácido clorhídrico a pH= 1 (para evitar su hidrólisis) a una solución de pH neutro que contiene al ligante o BFCA-biomolécula [18].

Esta solución ligante-estaño se ajusta a un pH de 5.5-6.0 bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación del cloruro estanoso y finalmente se adiciona el resto de los excipientes. La mezcla se fracciona en alícuotas y posteriormente se liofilizan. Un radiofármaco de ^{99m}Tc se prepara por simple adición del eluato de pertecneciato en solución salina ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) al núcleo-equipo disolviendo el polvo liofilizado. Al realizar esta mezcla el estaño reduce al tecnecio permitiendo su unión al ligante formándose así el radiofármaco deseado [15, 18].



La estructura química final de los complejos formados puede ser caracterizada por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de espectrometría de masas, detector de radiactividad y detector UV (figura 14) [13].

La administración de radiofármacos en humanos hace imperativo que se cumplan los requisitos exigidos a los productos farmacéuticos convencionales, además de los específicos por tratarse de sustancias radiactivas.

Luego de la preparación de un radiofármaco y previo a su utilización en pacientes, es necesario verificar la calidad del mismo, para lo cual deben ser sometidos a una serie de controles [11].

1.7 Requisitos de control de calidad para radiofármacos

Los radiofármacos son establecidos para administración en humanos, por lo que es necesario que pasen por un estricto control de calidad, el cual contempla varias pruebas específicas y medidas que aseguran la pureza, potencia, identidad y la eficiencia del radiofármaco. Las pruebas de control de calidad se dividen en dos categorías:

- 1) **Pruebas biológicas.** Establecen la esterilidad, apirogenicidad y la toxicidad del material



2) Pruebas fisicoquímicas. Aseguran el contenido y la potencia del radiofármaco [11, 12].

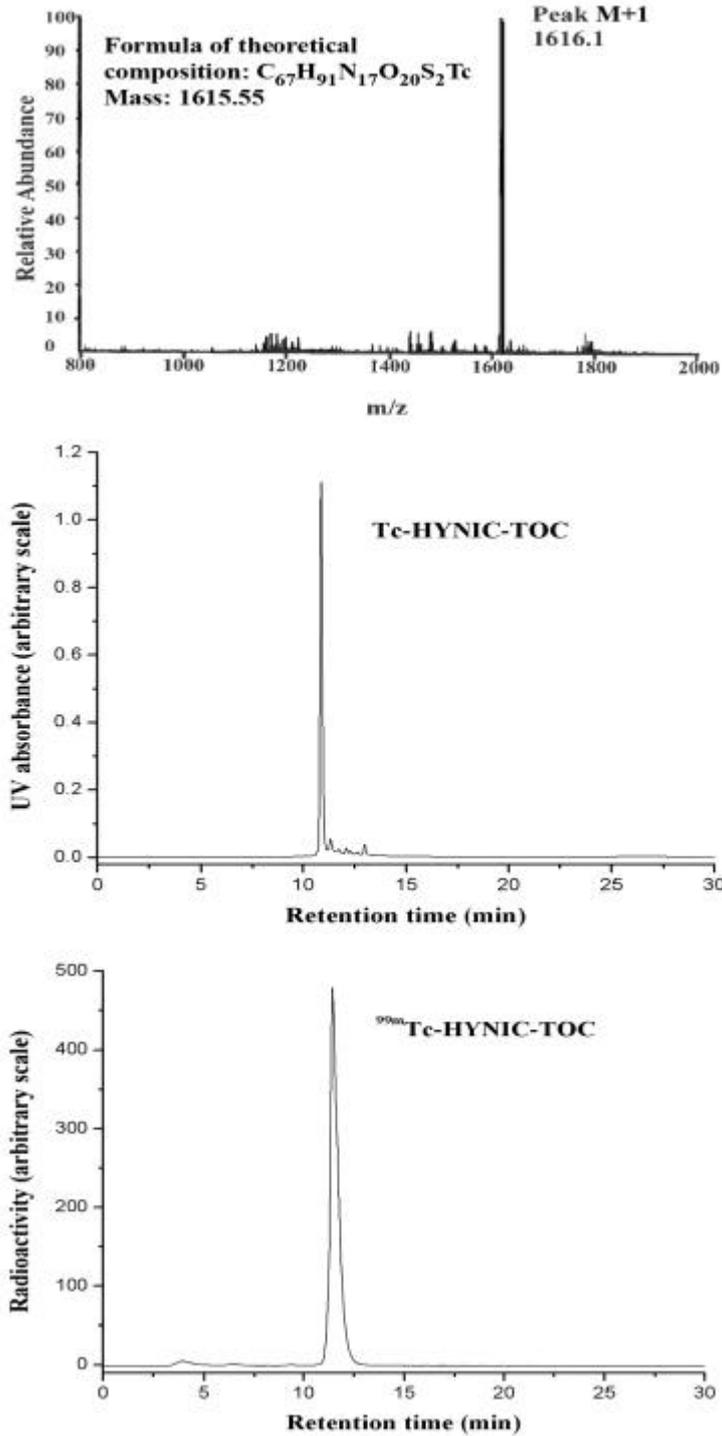




Figura 14. Identificación química del radiofármaco HYNIC-TOC radiomarcado con ^{99m}Tc por espectroscopia de masas (arriba y U.V./radio-HPLC (abajo) [17].



Algunas monografías de radiofármacos precisan que el producto debe ser estéril y estar exento de pirógenos. La semivida de los productos farmacéuticos es tal que, de ordinario, antes de poner el producto en circulación sólo se pueden realizar las pruebas de pirógenos. En general, las pruebas de esterilidad han de completarse retrospectivamente [54]. Entre las **pruebas biológicas** podemos encontrar las siguientes:

a) Esterilidad

Se define como la ausencia de toda forma de microorganismos viables en un radiofármaco preparado. Es necesario tener presente que los ensayos de esterilidad no deben ser la única medida considerada para asegurar que cualquier inyectable sea estéril, tan sólo es parte de un sistema de producción rutinario donde deben controlarse, además, condiciones higiénicas de trabajo, métodos, contaminación previa a la esterilización, eficiencia del proceso, etc. Se deben de tener precauciones técnicas asépticas en el momento de utilizar este tipo de sustancias, especialmente en aquellos frascos multidosis los cuales pueden usarse solo en un periodo de tiempo, los métodos de esterilización son: autoclave y filtración por membrana de tamaño de poro de $0.22\ \mu\text{m}$ [12].

La verificación de esta prueba se efectúa por incubación de una muestra en medios de cultivo que sean capaces de ofrecer condiciones ideales para la multiplicación de los más diversos microorganismos. Los medios de cultivo utilizados son: medio fluido de tioglicolato que permite el crecimiento de aerobios y anaerobios a una temperatura de incubación de $30\text{-}35\ \text{°C}$ por 7-14 días y medio digerido de soya y caseína para microorganismos aerobios, a temperatura ambiente por 7-14 días. Se siembra como mínimo, un volumen de muestra igual o mayor a la dosis administrada [29].

b) Ausencia de Pirógenos.

Los pirógenos son ciertas proteínas y polisacáridos productos del metabolismo de los microorganismos de 0.05 a $1\ \mu\text{m}$ de tamaño. En su gran mayoría son endotoxinas; también existen ciertos compuestos químicos que pueden actuar como sustancias hipertermizantes, generalmente solubles y termoestables. Por ello, la esterilidad no garantiza apirogenicidad.

La fuente más común de pirógenos es el agua, los productos químicos y el material de vidrio, por lo que se recomienda el uso de soluciones estériles recientemente preparadas, reactivos de alta pureza, material despirogenizado y una correcta metodología de trabajo.

Los métodos usuales para la determinación de pirógenos son el método *in vivo* usando conejos y el método *in vitro* usando lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), oficialmente conocido como prueba de endotoxinas bacterianas.

El método *in vivo*, se basa en la respuesta febril en el animal causado por pirógenos después de las 3 horas de la inyección del material [29].



El método *in vitro* es rápido, sensible y un medio específico para detectar y medir la presencia de endotoxinas bacterianas, proveniente de bacterias gramnegativas. Se fundamenta en la gelificación del lisado de amebocitos del líquido circulante de un arácnido, el *Limulus polyphemus* en presencia de pequeñas cantidades de endotoxinas [12, 29].

c) Estabilidad.

La naturaleza particular de los radiofármacos exige establecer un periodo de utilización o de una fecha límite, sobrepasada la cual no se recomienda su empleo. El periodo de tiempo aprovechable comienza en la fecha en la cual se expresa la radiactividad en la etiqueta, y se especifica en días, semanas o meses. Dicho periodo depende de la estabilidad radioquímica y de la cantidad de impurezas radionucleídicas de larga vida que contengan la preparación.

La descomposición química o radioquímica pueden haber reducido la pureza hasta límites inaceptables. Por otra parte, es posible que el contenido en impurezas radionucleídicas sea tal que la dosis de radiaciones resulte excesiva para el paciente [54, 55].

d) Isotonicidad.

Se llama isotónica a las soluciones que tienen igual presión osmótica. En el caso de una solución inyectable se debe considerar la isotonicidad con respecto al suero sanguíneo. En la mayoría de los radiofármacos que se administran por vía endovenosa, el volumen utilizado es tan pequeño que pueden tolerarse desviaciones importantes en este factor, sin que ello ocasione inconvenientes a los pacientes, dada la rápida dilución en la sangre. Debido a que la fuerza iónica y el pH son factores importantes en la estabilidad de un radiofármaco.

e) Biodistribución.

Estudios de biodistribución en animales de experimentación constituyen un control de rutina en radiofarmacia industrial, son evaluaciones esenciales para el establecimiento y eficacia de todo nuevo agente de radiodiagnóstico y radioterapia [56, 57].

Su objetivo es determinar la potencial utilidad en humanos a partir de resultados en animales. Por ello, la elección del modelo debe tener en cuenta las diferencias anatómicas y funcionales de manera que se asemejen lo más posible a la situación clínica a evaluar.

La dosis y el volumen del producto que se desea inyectar dependen del radiofármaco, de la vía de administración y de la finalidad del estudio. Después de la inyección del producto al animal y transcurrido el tiempo predeterminado se le sacrifica (técnica invasiva, usada generalmente con ratas o ratones) para posteriormente extraer los órganos de interés, cuidando de remover todos los tejidos adyacentes.



En caso de disección del animal se determina la radiactividad de los órganos considerando que las muestras sean representativas y que no produzcan errores debido a geometría, conteo, etc. Para evaluar los resultados, se puede determinar relaciones tales como [11]:

- 1) El porcentaje de la radiactividad por órgano en relación a la dosis inyectada en el animal.
- 2) La actividad específica, es decir, porcentaje de dosis/gramo de tejido.
- 3) Correlación entre órganos, es decir, relación por ciento dosis/g en órgano específico por ciento dosis/g en órgano circundante, no específico.

Para calcular la dosis inyectada se considera como 100 % a la sumatoria de la radiactividad en los órganos disectados, más la actividad de la muestra de sangre, carcaza y orina. También puede determinarse midiendo la radiactividad de la jeringa antes y después de la inyección o preparando un estándar [11, 12]

f) Afinidad Biológica

Algunos radiofármacos incluyen marcación de anticuerpos y péptidos, los que requieren controles específicos que garanticen su inmunorreactividad.

La inmunorreactividad se puede determinar midiendo la fracción del anticuerpo unido al antígeno en relación a la concentración del anticuerpo total, en una solución o suspensión de antígeno. La extrapolación a concentración infinita de antígeno dará la fracción inmunorreactiva.

g) Toxicidad.

En el diseño del nuevo radiofármaco es necesario considerar el balance riesgo-beneficio que resulta de su utilización en humanos. El riesgo debe ser considerado en términos de toxicidad, cuyo estudio tiene por objetivo establecer aproximadamente un factor de seguridad y determinar cuál será la reacción para sobredosis [11, 12].

Cuando en los estudios preliminares de un fármaco se encuentra que el compuesto es muy efectivo que parece ser suficientemente seguro, se le somete a una serie de pruebas, entre las cuales podemos encontrar las de toxicidad aguda, subaguda y crónica, cabe mencionar que este tipo de estudios se realiza en animales.

La medida más común de la *toxicidad aguda* es la dosis letal media (DL_{50}), es decir, la dosis que resulta letal para el 50 % de los animales de experimentación. Se determina cuando se administran diversas dosis a distintos grupos de animales. Únicamente se administra una dosis a cada animal. Luego se representa el porcentaje de animales muertos en cada grupo en función de la dosis y a partir de esta curva se calcula la DL_{50} . También se observan los tipos de síntomas tóxicos que desarrollan los animales [56].



En los estudios de *toxicidad subaguda* el modo de administración y la dosificación dependen del ensayo clínico que se desea realizar. Incluye diversos análisis como pruebas funcionales renales, hepáticas, etc.

Los estudios de *toxicidad crónica* son prolongados. Pueden durar muchos meses y extenderse a través de varias generaciones para detectar posibles efectos teratogénicos del compuesto [56, 57].

h) Adición de Bacteriostáticos.

Los radiofármacos inyectables se dispensan generalmente en recipientes cerrados de tal modo que se puedan retirar dosis sucesivas varias veces, es posible que contengan un bacteriostático adecuado en la concentración que convenga.

Algunos bacteriostáticos comunes, como el alcohol bencílico, se destruye gradualmente en las soluciones acuosas por la acción de las radiaciones. La velocidad de la destrucción depende de diversos factores, entre los que cuentan la naturaleza del radionucleido y la concentración radiactiva de la solución.

Las **pruebas fisicoquímicas** indican el nivel de radionucleido, impurezas radioquímicas, pH, la fuerza iónica, la osmolaridad, y el estado físico de la muestra particularmente si es un coloide.

a) Inspección Visual.

La apariencia física de un radiofármaco es importante tanto en el momento de la recepción del producto como antes de ser administrado. En una solución no deben detectarse partículas visibles a simple vista o por medio de iluminación con lámpara de tungsteno, sobre fondo blanco y negro. Se recomienda efectuar la observación directa del producto marcado interponiendo un vidrio plomado o indirectamente a través de un espejo.

Cualquier desviación del color y claridad de una solución debe ser analizada exhaustivamente, ya que puede reflejar cambios en el radiofármaco que podría eventualmente alterar su comportamiento biológico.

b) Tamaño y número de partícula.

Dependiendo del tamaño de partícula en suspensión, se pueden emplear diferentes métodos, como por ejemplo membranas, microscopía electrónica o filtración en gel, como en el caso de los coloides. Para macroagregados, microagregados o microsferas basta con un microscopio de buena resolución y una cámara cuenta glóbulos.

c) pH.

Todos los radiofármacos deben poseer una concentración apropiada de iones hidrógeno, para su estabilidad e integridad. El pH ideal para su administración endovenosa debe ser alrededor de 7.4 (pH de la sangre), aunque puede variar de 2 a 9, debido a la alta



capacidad reguladora de la sangre. Este criterio no es válido para la vía de administración intratecal. El pH de una solución es universalmente medido con un electrodo de vidrio y pHmetro. En el caso de radiofármacos preparados a nivel Radiofarmacia Hospitalaria, la evaluación colorimétrica con papel pH, es el método de elección [11, 12].

d) Fuerza iónica y osmolaridad

Todos los radiofármacos deben tener una apropiada fuerza iónica, osmolaridad e isotonicidad es decir, cuando su concentración osmótica es igual a la del suero sanguíneo sin provocar alteraciones químicas o biológicas en este y/o sus componentes para ser utilizados, por lo que al diluir una solución, debe usarse preferentemente el mismo solvente de la solución original, en especial en soluciones coloidales, dado que al añadir un electrolito pueden producirse agregados del coloide.

e) Determinación de la pureza química.

La pureza química de un radiofármaco es la fracción de masa total presente en una forma química deseada. Las impurezas químicas pueden ser introducidas inadvertidamente en el radiofármaco, antes, durante y después de la marcación, como por ejemplo impurezas de reactivos, productos de descomposición no radiactivos, rotura de la estructura química del producto entre otros.

Fundamentalmente importan las impurezas que pueden alterar el comportamiento fisicoquímico y/o biológico del radiofármaco o producir efectos tóxicos en el paciente [11, 12].

f) Determinación de la pureza radionucleídica.

Es la fracción de la radiactividad total presente en el radiofármaco. Las impurezas radionucleídicas pueden presentarse como resultado del proceso de producción del radionucleido, ya sea por impurezas presentes en el blanco a irradiar o reacciones secundarias de este; por subproductos del decaimiento o de elementos pesados de fisión en el reactor. El método mas utilizado para examinar la pureza radionucleídica en los emisores gamma es la espectrometría gamma.

El alcance de la espectrometría gamma puede ampliarse de dos maneras:

1. Observando los cambios que se producen en el espectro de una preparación a medida que pasa el tiempo, método especialmente útil para detectar la presencia de impurezas de larga vida en una preparación de radionucleidos de vida corta.
2. Mediante separaciones químicas, con lo cual se separa el radionucleido principal y pueden investigarse las impurezas en el residuo, o se separan químicamente estas impurezas y se valoran cuantitativamente



En el caso particular del eluato de un generador de ^{99m}Tc se deberá verificar la ausencia de ^{99}Mo . El método comúnmente utilizado a nivel de Radiofarmacia Hospitalaria es por atenuación gamma en un calibrador de dosis [11, 12].

a) Determinación de la pureza radioquímica.

Es la fracción de la radiactividad total en la forma del radionucleido deseado que se encuentra en la formulación. Puede estudiarse mediante diversas técnicas, pero tiene particular importancia la cromatografía en papel, la cromatografía en capa delgada y la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Después de terminar la separación, se determina la distribución de la radiactividad en el cromatograma.

A nivel de radiofarmacia hospitalaria a diario se preparan los radiofármacos de ^{99m}Tc a partir de juegos de reactivos, debiéndose determinar la eficiencia de marcación. Los métodos usualmente empleados en este caso son cromatografía en papel o en capa fina (TLC), preferiblemente en capa fina instantánea (ITLC).

Además de las pruebas de control de calidad ya mencionadas, es importante resaltar que los radiofármacos también son sometidos a otras pruebas como caracterización bioquímica, pruebas *in vivo* y pruebas químicas para así garantizar la eficiencia del producto [13].

1.8 Caracterización de radiofármacos

Otro aspecto importante en el desarrollo de los radiofármacos es su caracterización y para ello se realizan las siguientes pruebas: caracterización bioquímica, evaluación *in vivo* y la caracterización química.

a) Caracterización bioquímica

Las técnicas de imagen molecular, monitorean directa e indirectamente la distribución de los procesos moleculares o celulares para el diagnóstico bioquímico, biológico o aplicaciones terapéuticas [58]. El blanco molecular debe ser elegido cuidadosamente, teniendo como base ensayos de unión específica (SB); unión no específica (NSB) y de unión a proteínas no blanco; así como la farmacocinética de SB y NSB, metabolismo, diferenciación de especies y sensibilidad [59].

El criterio aplicado en el desarrollo de receptores específicos de radiofármacos es dictado por la localización de proteínas blanco en el órgano o cuerpo; así como por los receptores expresados intra o extracelularmente. Otros parámetros que determinan las cualidades de la imagen incluyen la densidad de estos blancos y la unión no específica [16].

Los estudios de unión al receptor son realizados para determinar la afinidad del radiofármaco por el sitio específico y se realizan en membranas celulares o de tejido, así



como células intactas. Los dos tipos de experimentos de unión son los de saturación y competencia.

b) Evaluación *in vivo*

La evaluación preclínica de los radiofármacos incluye estudios de biodistribución y toxicidad en animales sanos. Los primeros consisten en identificar los patrones de distribución en los órganos así como su excreción. Los animales con tumores malignos inducidos (usualmente ratones atímicos) son utilizados para determinar la unión específica a los receptores que se encuentran sobreexpresados en células cancerosas.



Los estudios de bloqueo se hacen inyectando simultáneamente el radiofármaco y un exceso de ligando sin marcar, esto es de utilidad para determinar el grado de unión específica.

Los estudios de toxicidad en animales usualmente son enfocados a los efectos tóxicos de otros componentes de la formulación, no del radionucleido, ya que el elemento radiactivo se encuentra en concentraciones muy pequeñas [13].

c) Caracterización química

La espectrometría de masas junto con la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) acoplada a un detector de radiación (radio-LC-MS) es una importante técnica en el análisis y desarrollo de los radiofármacos. Los detectores radio-LC-MS rastrean impurezas [60, 61] con determinada actividad específica [62] y confirma la identidad de algunos radiofármacos marcados con ^{99m}Tc [32, 61], además de identificar sus metabolitos [63, 64].

La espectrometría de masas es la técnica adecuada para el análisis de péptidos, esta técnica tiene un gran sensibilidad, por lo cual nos permite detectar cantidades muy pequeñas (en la escala micromolar) de compuestos radiactivos.

Los compuestos obtenidos en cantidades de miligramos, son caracterizados por técnicas fisicoquímicas convencionales como Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y espectrometría por infrarrojo (IR), rayos X para determinación de su estructura cristalina, obteniendo una identificación estructural de las especies en estudio. El siguiente paso es comparar las pruebas químicas del compuesto obtenido en concentraciones milimolares, empleando el isótopo estable.

La especie estable así como la radiactiva son inyectadas conjuntamente en el sistema cromatográfico y los perfiles son obtenidos empleando dos detectores diferentes, el detector de UV-visible para el isótopo estable y un detector de radiaciones para el radionucleido [20].

El tiempo de retención del pico correspondiente a la sustancia de interés obtenido en el cromatograma es comúnmente empleado como una prueba de identidad de las 2 especies. Sin embargo es muy importante mencionar que las técnicas modernas radio-LC-MS ofrecen una mayor sensibilidad. "Radio-LC-MS es una gran ayuda en el control de calidad de radiofármacos" [65] y una herramienta esencial durante los estudios *in vitro* de su estabilidad en buffer, así como en la evaluación *in vivo* en suero humano".

Es muy importante mencionar que los resultados experimentales de la Mecánica Molecular (MM) se encuentran asociados con las fuerzas intermoleculares, fuerzas electrostáticas y de Van de Waals, puentes de hidrógeno, interacciones donador-aceptor y efectos hidrofóbicos [13].



Todas las pruebas mencionadas con anterioridad así como las técnicas empleadas para la caracterización y/o cuantificación de los radiofármacos son de gran importancia, ya que gracias a estas podemos garantizar la calidad de ellos. Una de las herramientas con la que se cuenta para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos y procedimientos de fabricación y control analítico es la validación, por lo cual, la adopción de un método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y un análisis bien documentado, que cumpla con los requisitos establecidos por los organismos regulatorios, como por ejemplo, la Secretaría de Salud (SSA) o la Organización Mundial de la Salud (OMS).

1.9. Validación de métodos analíticos.

El prototipo de la validación se encuentra en la industria farmacéutica. Esto se debe en gran parte a que los métodos analíticos utilizados para medir la calidad de los productos farmacéuticos abarcan casi todo el rango de las tecnologías y técnicas de que se disponen actualmente. Desde el inmunoensayo hasta los métodos cromatográficos y potenciométricos utilizados para evaluar la calidad de moléculas pequeñas [66].

La validación de un método analítico es el proceso de establecer, mediante estudios de laboratorio, que las características de comportamiento del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [67]

Existe una gran diversidad de métodos de análisis y en cada uno de ellos intervienen diversos equipos, sistemas, materiales, reactivos, estándares, etc., que tienen el potencial de aportar errores sistemáticos al proceso de medición [68, 69].

Los *métodos cromatográficos* son los que descansan en mayor medida en los estándares de referencia para proporcionar datos exactos. Un estándar de referencia es un compuesto altamente purificado que está bien caracterizado.

Un aspecto importante dentro de la preparación para la validación es el protocolo de validación. El protocolo describirá los parámetros y requerimientos usados en los estudios de validación del ensayo. No debe considerarse como inflexible e inamovible ya que durante el proceso pueden presentarse características muy particulares para cada método analítico [66, 68].

Los principales parámetros a ser validados en un método analítico son los siguientes [54, 68]:

- a) Especificidad
- b) Linealidad
- c) Rango
- d) Exactitud



- e) Precisión
- f) Límite de Detección (LD)
- g) Límite de cuantificación (LC)
- h) Estabilidad de la Solución



Con el tiempo se ha hecho necesario especificar las condiciones bajo las cuales la industria farmacéutica debe operar, para asegurar que sus productos son seguros para la salud. Dentro del sistema de aseguramiento para la calidad, las Buenas Prácticas de Fabricación Farmacéuticas (BPF) representan aquella parte involucrada con la manufactura, y dentro de ésta el laboratorio de control de calidad sirve a una de las funciones más importantes de la producción y control farmacéutico. Esto hace que una parte de las BPF corresponda al laboratorio de control de calidad y análisis de producto, el cual, debido a las actividades y funciones inherentes y específicas han generado las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), que, aunque no están separadas de las BPF, si tienen sus propias características [67, 69].

1.9.1 Cromatografía.

La cromatografía en general, es un método de separación, de amplio uso por las premisas en que se basa, por el gran desarrollo que ha tenido y por los beneficios en valorar un gran número de sustancias con exactitud, rapidez y alta resolución [70].

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido ([gas](#), [líquido](#) o [fluido supercrítico](#)) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un [sólido](#) o un [líquido](#) fijado en un sólido [71].

Cuando la fase móvil es un gas, se llama cromatografía de gases; si es un líquido se denomina cromatografía de líquidos. Mientras que la primera se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles de peso molecular bajo, la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography) [72] no está limitada por la volatilidad o estabilidad térmica de las muestras, los compuestos que pueden estudiarse con esta metodología incluyen especies iónicas, macromoleculares, polímeros, productos lábiles naturales y compuestos polifuncionales de pesos moleculares entre 10^2 y 10^4 daltones.

En general en la cromatografía los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo atraviesan la fase estacionaria a diferentes velocidades y se van separando, posteriormente pasan por un detector que genera una señal que la cual puede depender de la [concentración](#) y del tipo de compuesto.

Una forma de clasificar a las distintas técnicas cromatográficas es según la disposición de la fase estacionaria [70, 73].

1) Cromatografía plana La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel.

- a) [Cromatografía en papel](#)
- b) [Cromatografía en capa fina](#)



2) **Cromatografía en columna.** La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna, en la tabla 2 se muestra una clasificación de esta técnica.

- a) **Cromatografía de líquidos**
- b) **Cromatografía de gases**
- c) **Cromatografía de fluidos supercríticos**

Tabla 2. Técnicas de cromatografía en columna [73.]

Cromatografía en columna		
Técnica	Fase móvil	Fase estacionaria
<u>Cromatografía de gases</u>	Gas	Sólido o líquido
<u>Cromatografía líquida en fase inversa</u>	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
<u>Cromatografía líquida en fase normal</u>	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
<u>Cromatografía líquida de intercambio iónico</u>	Líquido (polar)	Sólido
<u>Cromatografía líquida de exclusión</u>	Líquido	Sólido
<u>Cromatografía líquida de adsorción</u>	Líquido	Sólido
<u>Cromatografía de fluidos supercríticos</u>	Líquido	Sólido

1.9.1.1 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

La HPLC es la técnica más versátil de todos los tipos de cromatografía de elución, la más útil para separar y determinar las especies presentes en una muestra de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos, emplea una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida. Según la naturaleza de la fase estacionaria se puede clasificar en:

- 1) **Cromatografía de partición ó cromatografía líquido-líquido**
- 2) **Cromatografía de adsorción ó cromatografía líquido-sólido**
- 3) **Cromatografía de intercambio iónico**
- 4) **Cromatografía de exclusión molecular**
- 5) **Cromatografía de afinidad**

Este método de separación deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución, han mejorado mucho el empleo de fases estacionarias muy elaboradas, las cuales están constituidas por micropartículas esféricas cuyo diámetro está comprendido entre 3 y 10 μm , producen una pérdida de presión importante en la columna. Por lo tanto, es necesario aplicar una fuerte



presión a la fase móvil para obtener un caudal conveniente. Para destacar esta particularidad de la técnica, la letra P de las siglas HPLC, durante mucho tiempo ha correspondido a la palabra presión [74].

Inicialmente se empleaban columnas de vidrio con diámetros de 10 a 50 mm y empacadas con partículas que tenían un diámetro de 150 a 200 μm . Hasta la década de los sesentas se tuvo la tecnología para producir y emplear empaques con diámetros de partículas tan pequeñas como 3 a 10 μm [71, 74].

Un sistema cromatográfico está constituido por dos fases no miscibles, una estacionara (sólido o líquido impregnado sobre un soporte) que se encuentra empacada en una columna, a través de la cual se hace fluir en forma continua la fase móvil (disolvente o mezcla de disolventes). Los componentes de la muestra presentan un equilibrio de distribución entre ambas, el cual determina la velocidad con la cual cada componente migra a través del sistema [75].

La elución de una muestra se puede realizar de dos maneras:

- 1) **Isocrática:** cuando no se modifica la composición de la fase móvil durante el análisis
- 2) **Con gradiente:** cuando la composición de la fase móvil varía durante la corrida. En este caso se utilizan dos o más disolventes de diferente polaridad y se programa con cambios en su proporción, en forma continua o escalonada, según la naturaleza de la muestra.

La distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase; refleja la atracción o repulsión relativas que representan las moléculas o iones de las fases competidoras por el soluto y entre sí. Dicho equilibrio se asocia a una constante que se llama **coeficiente de distribución o reparto (k)** y es la relación de equilibrio de distribución del soluto entre las dos fases [70, 75].

Si los componentes de la mezcla tienen diferentes coeficientes de distribución, su velocidad de migración será distinta y podrán ser separados. Si un soluto tiene mayor afinidad por la fase estacionaria, su interacción será mayor y viajará más lentamente. Los solutos con más afinidad por la fase móvil, migrarán más rápidamente, eluyendo primero [75].

Cuando las condiciones elegidas son apropiadas, los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas y emergen de la columna en orden creciente de interacción con la fase estacionaria, hasta un sistema de detección que a su vez da la información a un graficador o una pantalla de computadora o en otro sistema de manejo adicional de información [72, 73].



Un instrumento de HPLC se encuentra fundamentalmente compuesto por:

- 1) **Recipientes para la fase móvil**
- 2) **Bomba**
- 3) **Inyector**
- 4) **Columna cromatográfica**
- 5) **Detector**
- 6) **Integrador**

Los componentes separados en la columna y arrastrados a diferentes tiempos por la fase móvil, llegan al detector que recibe cantidades puntuales de material a un flujo constante. Los detectores son sensibles a diferentes propiedades; por ejemplo, *absorbancia*, índice de refracción, *radiactividad* conductividad, fluorescencia, amperaje, etc., en un tiempo de respuesta unas diez veces mayor que el ancho del pico del soluto, dado en unidades de tiempo [76].

1.9.1.2 Cromatografía de líquidos de alta presión en fase reversa (RP-HPLC)

Esta técnica es la más usada, un 75% de las separaciones que se hacen, emplean cromatografía de fase reversa (RP), la cual utiliza un empaque enlazado hidrofóbico de diferentes longitudes de cadena 2, 8 ó 18 átomos de carbono como fase estacionarias y una fase móvil polar constituidas por mezclas de agua con algún disolvente orgánico y pueden también adicionarse de amortiguadores o sales [70].

La retención de los solutos en este tipo de sistemas puede explicarse con el modelo de Horváth, según el cual la superficie hidrocarbonada de la molécula de soluto, así como las de la fase estacionaria experimentan un efecto de repulsión hacia el eluyente polar, de modo que para disminuir la superficie hidrocarbonada en contacto con la fase móvil, se produce una asociación entre el soluto y las cadenas de la fase estacionaria. De esta manera, la retención no es debida a una atracción entre el soluto y la fase estacionaria, sino a la repulsión que ambas experimentan hacia el eluyente y que las conduce a asociarse. Se tiene entonces que la retención depende fundamentalmente de las siguientes variables [75]:

- 1) Concentración y longitud de las cadenas hidrocarbonadas en la fase estacionaria.
- 2) Superficie hidrocarbonada en el soluto.
- 3) Polaridad de la mezcla que constituye la fase móvil (Tabla 3)

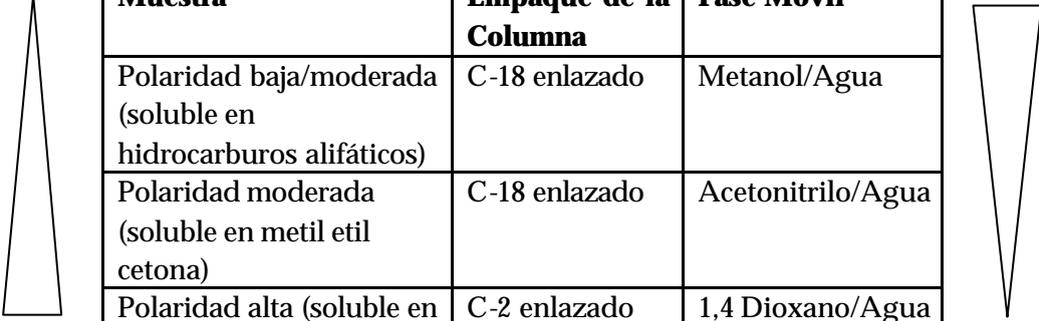
Las sustancias polares prefieren la fase móvil y eluyen primero. Conforme aumenta el carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. Generalmente, a menor polaridad de la fase móvil, mayor es su fuerza eluyente. El orden de elución de las clases de compuestos de la tabla 3 se invierte (de ahí el nombre de cromatografía de fase inversa). Así, el eluyente más débil es el agua. El metanol y el acetonitrilo son disolventes populares porque tienen baja viscosidad y son fáciles de conseguir con excelente pureza [70].



En cromatografía de fase reversa los gradientes se generan con una disminución constante de la polaridad del eluyente, es decir, se aumenta la proporción del solvente orgánico logrando así un incremento continuo en la fuerza de la fase móvil.

En estas condiciones por fase reversa se pueden concentrar trazas, empleando disolventes de inyección con gran proporción de agua que en este caso es débil la elución; después se eluye de la columna generalmente por el empleo de un gradiente [75].

Tabla 3. Relación de la polaridad entre las fases estacionaria y móvil en cromatografía de fase reversa [75].



Muestra	Empaque de la Columna	Fase Móvil
Polaridad baja/moderada (soluble en hidrocarburos alifáticos)	C-18 enlazado	Metanol/Agua
Polaridad moderada (soluble en metil etil cetona)	C-18 enlazado	Acetonitrilo/Agua
Polaridad alta (soluble en los alcoholes inferiores)	C-2 enlazado	1,4 Dioxano/Agua

Las ventajas de esta modalidad cromatográfica se resumen de esta manera:

- 1) Los compuestos no iónicos e ionizables se pueden separar en la misma columna y con la misma fase móvil
- 2) La adsorción irreversible casi no ocurre
- 3) La fuerza de atracción entre la superficie no polar y el soluto es débil
- 4) La utilidad del agua como fase móvil
- 5) Un modificador orgánico muy frecuente es el metanol
- 6) Se puede predecir el orden de elución en función de la hidrofobicidad del analito
- 7) El sistema requiere poco tiempo para llegar al equilibrio, al hacer un cambio de fase móvil

Con frecuencia se emplean además del agua y el metanol, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano. La selectividad se ve afectada por el pH, los aditivos y por el modificador.

Este método es muy empleado en diversos sistemas sobre todo cuando no tienen grupos que establezcan puentes de hidrógeno y sean aromáticos o alifáticos o series de diferentes longitudes de cadena [72, 73].



Capítulo 2. Antecedentes



Antecedentes

La aplicación de las técnicas de investigación empleando radisótopos es una de las razones que explican el notorio avance en la biología celular y molecular, la bioquímica y la farmacología durante los últimos 60 años. Estas técnicas han encontrado un terreno particularmente propicio en los campos del metabolismo, biodistribución de drogas farmacéuticas, farmacodinámica, etc. Los radisótopos y las radiaciones también son frecuentemente utilizados en medicina tanto para el diagnóstico como para la terapia de enfermedades malignas y no malignas.

Hoy en día, dadas las propiedades de emisión los radiofármacos utilizan complejos con el isótopo radiactivo del tecnecio (^{99m}Tc) y son los más empleados para obtener imágenes de órganos del cuerpo humano. Entre los ligantes más usados se encuentra el HYNIC (ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico) y quelantes multidentados [15].

Se han desarrollado una gran variedad de radiofármacos diagnósticos del tecnecio que tienen diferentes aplicaciones, para detección de diversas enfermedades tales como cáncer, trombosis, infección e inflamación [39]. Desde que Abrams y colaboradores reportaron el uso del HYNIC como ligante bifuncional para formar el complejo con ^{99m}Tc éste se ha utilizado para marcar diferentes biomoléculas, entre ellas podemos encontrar a los péptidos.

El primer péptido radiomarcado de uso clínico para obtener imágenes *in vivo* de tumores fue el ^{111}In -DTPA-octreotido, con una adecuada afinidad por receptores de somatostatina de tipo SSTR2 y SSTR5. A pesar de las pobres características del ^{111}In como un radionucleido para imágenes, el péptido radiomarcado se utilizó exitosamente en la localización de tumores de origen neuroendocrino y cáncer pulmonar [13].

Con base en esta estructura, se han sintetizado otros péptidos análogos. Actualmente el depreotide; un péptido cíclico con una amida en lugar de un grupo disulfuro, donde se une el Tc-^{99m} a partir de un intercambio de ligantes con el ^{99m}Tc -glucoheptonato, se encuentra autorizado en Estados Unidos para su uso en humanos

Entre los radiofármacos de tercera generación actualmente desarrollados para el diagnóstico de tumores podemos encontrar al ^{99m}Tc -HYNIC-TOC, específico para receptores de somatostatina y útil en el diagnóstico de tumores neuroendócrinos [17], otro caso es el ^{99m}Tc -HYNIC-BN específico para receptores GRP y para diagnóstico de tumores de mama y próstata [77].

Varios enfoques sobre el cáncer y la inhibición de la angiogénesis en tumores inducidos se basan en el desarrollo de péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), este péptido ha sido marcado con ^{111}In , ^{90}Y , ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{64}Cu y ^{18}F [5, 6]. Se han realizado estudios comparativos entre el monómero, dímero y tetrámero del RGD unido a



una molécula de HYNIC para ser marcado con ^{99m}Tc empleando tricina y TPPTS como coligante [51].

Decristoforo et.al., 2006 [78] realizaron un estudio comparativo en donde el péptido RGD fue marcado con ^{99m}Tc empleando HYNIC y EDDA, Tricina, trifenílfosfin 3,3',3''-trisulfonato (TPPTS) y ácido nicotínico (NA) como coligantes. La investigación de este radiofármaco es reciente por lo cual aún no se ha probado en humanos, lo cual deja un amplio campo para la investigación de este complejo.

Capítulo 3. Metodología



3.1 Planteamiento del problema

La radiofarmacia es una rama de las ciencias farmacéuticas que se ocupa del diseño, preparación, control de calidad y dispensación de los radiofármacos. Con su desarrollo en México desde el año de 1965 ha sido posible el empleo de los radiofármacos en medicina nuclear.

El Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) dentro de sus instalaciones cuenta con el área de Aplicaciones Nucleares en la Salud en donde se lleva a cabo investigación y desarrollo de radiofármacos destinados para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, tal es el caso de el ^{99m}Tc -Octreotide que es útil en la detección del cáncer primario y metastático pulmonar, el ^{99m}Tc -HYNIC-BN útil para detección de cáncer de mama, entre otros.

Actualmente se desea desarrollar un radiofármaco que pueda ser utilizado para imagen *in vivo* de integrinas con el objetivo de detectar procesos de angiogénesis, lo cual permitiría diagnosticar de manera específica una amplia gama de tumores primarios y sus metástasis. Los péptidos que contienen la secuencia RGD (-Arg-Gly-Asp-), al unirse a sitios específicos dentro de las moléculas de integrinas, modifican su expresión provocando la inhibición de la formación de metástasis.

La finalidad de este trabajo es conjugar el ácido ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC) al péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD para su marcado con ^{99m}Tc empleando el ácido etilendiaminodiacético (EDDA) como coligante. Asimismo, se desarrollará un método analítico validado para la caracterización del péptido y una formulación liofilizada adecuada para la formación instantánea del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD que pueda ser captado *in vivo* en sitios de angiogénesis con sobreexpresión de integrinas.

La meta es proporcionar una alternativa para el diagnóstico específico de tumores primarios y sus metástasis, pero al mismo tiempo ofrecer un producto que cumpla con la normatividad y los estándares de calidad.



3.2 Materiales, equipos y reactivos

3.2.1 Materiales y material biológico

Materiales

Agitadores magnéticos
Cartuchos de extracción en fase sólida C-18 (Sep-Pak)
Contenedores de Plomo
Desecador
Equipo de Disección
Frascos Viales de 10 y 20 mL
Gradillas de plástico y metal
Guantes de látex
Jeringas para insulina
Jeringas de 3.0, 5.0 y 10.0 mL
Matraces erlenmeyer de 100 mL
Membranas de 0.22 μm de diámetro
Micropipetas de 5-50, 10-50, 20-200, 200-1000, 1000-5000 μL
Papel pH (pH 0-14)
Pizetas
Probetas de 500 mL
Puntas para micropipeta
Placas para cromatografía instantánea en capa fina (ITLC -SG)
impregnadas con sílica gel.
Tapones de hule de 20 mm de diámetro
Termómetro
Pinzas de metal
Tubos de ensaye
Vasos de precipitado de 25, 50, 100, 200 y 1000 mL
Viales estériles
Viales de plástico de 1, 10 y 50 mL

Material biológico

Ratones atímicos con tumores inducidos (células AR42J)



3.2.2 Equipo

Equipo	Características
Balanza Analítica	Mod 1602 MP
Baño Seco	Lab Line
Bomba de vacío	N/A
Campana de flujo laminar	VECO
Cámara de ionización	Lab Line
Espectrofotómetro UV-VIS	Lambda-bios, Perkin-Elmer
Incubadora	Lab Line
Refrigerador	Mabe
Vórtex	Maxi-Mix 1 Mod 16700 Mixer
Parrilla de agitación y calentamiento	Corning Mod PC-351
Potenciómetro	Methrom
Liofilizadora	Hull
HPLC WATERS	
Bomba	Binaria Mod 1525
Detector	Arreglo de diodos Mod 2996
Inyector	Inyector manual Mod 7725i
Columna	Bondapak C18 3.9x300 mm Waters
Detector de centelleo	NaI (TI) Nuclear Medical laboratorios, Inc.

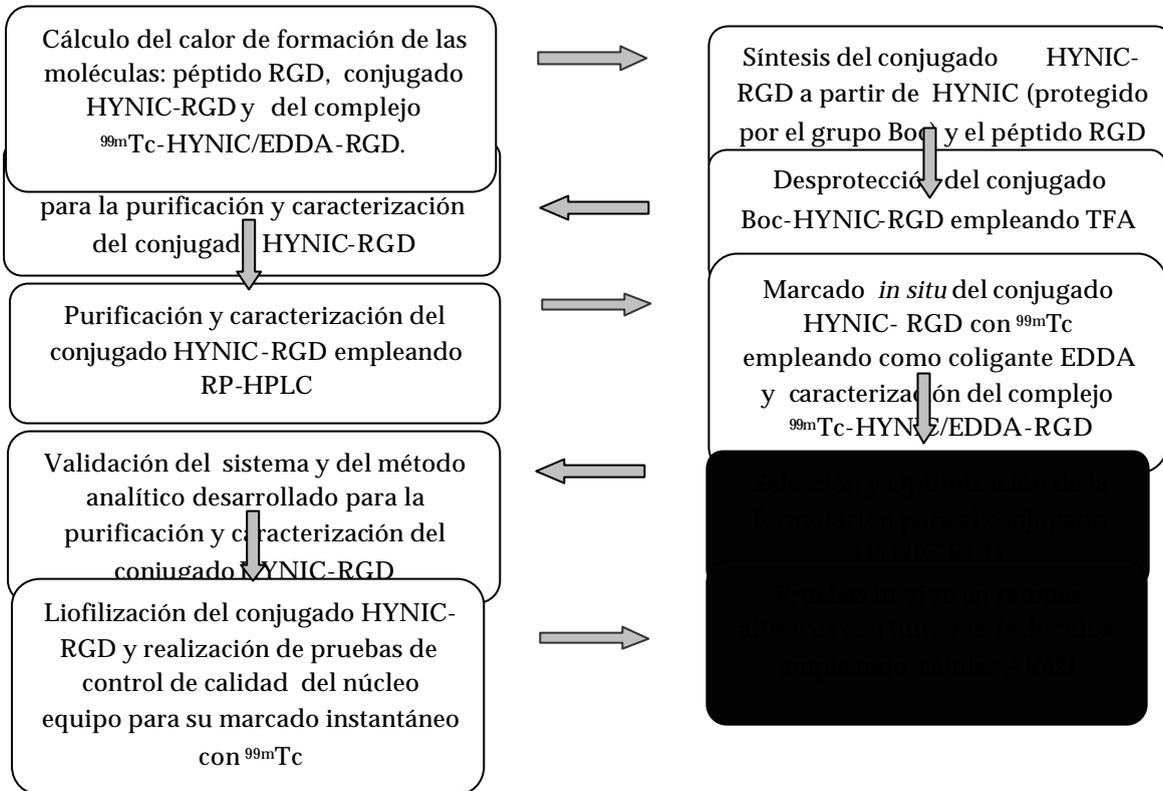


3.2.3 Reactivos

Reactivo	Lote	Pureza	Proveedor
Acetonitrilo (CH_3CN)	2856	Grado HPLC	Mallinckrodt
Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_3$)	0596-01	97.8 %	J.T Baker
Ácido Citrico	2563	RA	J.T Baker
Ácido etilendiaminodiacético (EDDA)	1094814 22704043	98.0 %	Fluka
Ácido trifluoroacético (TFA)	59H3427	RA	Sigma
Acido Clorhídrico (HCL)	T51C01	RA	J.T Baker
Agua (H_2O)	A016039	Grado Inyectable	Pisa
Alcohol Etilico (Et-OH)	M11C55	RA	J.T Baker
Citrato de Sodio	----	RA	Sigma
Cloruro Estanoso (SnCl_2)	17587	RA	Sigma
Diisopropiletilamina	111k3491	RA	Sigma Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	K26790853	RA	Merck
Eluato de pertecneiato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)	N/A	N/A	ININ
Fosfato dibásico de sodio anhidro	M30292	RA	J.T Baker
Fosfato monobásico de sodio	M-33097	RA	J.T Baker
O-(7-azabenzotriazolil)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio hexafluorofosfato {HATU}	Wa11383	98.0 %	Sigma Aldrich
Hidróxido de Sodio (NaOH)	3722-05	98.6%	J.T Baker
Ácido 6-hidrazinopiridin-3-carboxílico (HYNIC)	7908	> 95%	J.T Baker
Manitol	V16618	RA	Sigma Aldrich
Metanol	51565	RA	J.T Baker
Metil Etil Cetona (2-Butanona)	Md558	RA	J.T Baker
Péptido RGD sal de trifluoroacetato (ciclo-Lys-D-Phe-RGD)	BV05026	95.15 %	Bachem Co., USA
Solución salina estéril	SS I0306	Grado Inyectable	Pisa
Tricina	60K5400	99 %	Sigma



3.3 Diagrama de flujo





3.4 Cálculos de la mecánica molecular

Los cálculos de mecánica molecular se realizaron en una computadora personal utilizando el programa de cómputo BioMedCACHe 6.01 (Fujitsu). Las moléculas ciclo-Lys-D-Phe-RGD, HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD y ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD se construyeron tomando en cuenta la valencia, tipo de enlace, carga e hibridación.

Las geometrías optimizadas se obtuvieron utilizando campos de fuerza MM3 aumentados. En todos los casos, la energía potencial mínima ó energía estérica calculada corresponde a la estructura de energía conformacional más baja.

3.5 Conjugación del Boc-HYNIC con el péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD

La conjugación se llevó a cabo a temperatura ambiente, el ácido 6-hidrazinoipiridin-3-carboxílico (HYNIC) se encontraba protegido por el grupo de bloqueo Boc, el cual estaba ubicado en la posición 6. La conjugación del HYNIC-Boc con el péptido RGD se realizó de la siguiente manera:

- 1) **Mezcla de Reacción:** Después de haber transcurrido los 15 min de reacción se tomó una alícuota de 70 μL de la solución D y se transfirió a un vial limpio y seco que contenía 1 mg del péptido RGD, se agregaron 5 μL de agua inyectable y 20 μL de DMF; se mezcló y se dejó reaccionar durante 1.5 horas.
- 2) **Acondicionado del cartucho Sep-Pak:** se acondicionó el cartucho haciendo pasar lentamente y de forma independiente los siguientes solventes 5 mL de etanol, 5 mL de agua inyectable y 5 mL de aire.
- 3) Después de transcurridas 1.5 horas y una vez acondicionado el cartucho Sep-Pak C-18 en un vial limpio y seco se agregó 1.0 mL de agua a la mezcla de reacción.
- 4) Se pasó la solución a través del cartucho Sep-Pak para ser purificada.
- 5) Se lavó con 5 mL de agua inyectable.
- 6) Se realizaron 3 lavados de 5 mL cada uno con acetonitrilo al 20 %.
- 7) Se realizó un lavado con 0.5 mL de acetonitrilo al 50 % y fueron colectados en un vial de boca ancha
- 8) Se hizo un lavado más con 0.5 mL de acetonitrilo al 100 % y también se colectaron en un vial de boca ancha junto con la fracción recolectada en el paso anterior
- 9) Por último se hicieron pasar 2.0 mL de aire a través del cartucho.

Nota: para ver preparación de soluciones empleadas en la síntesis del conjugado Boc-HYNIC-RGD consultar en anexo 1.



3.6 Desprotección del conjugado Boc-HYNIC -ciclo-Lys-D-Phe-RGD

- 1) A las fracciones recolectadas del conjugado Boc-HYNIC-RGD se le agregaron 300 μL de Ácido Trifluoroacético (TFA) y esta solución se mezcló con agitación ligera.
- 2) Se colocó la muestra en el desecador al vacío hasta completa sequedad (aproximadamente 4-6 horas)
- 3) Una vez seca la muestra se disolvió con 200 μL de Acetonitrilo al 50 % y 800 μL de agua, se agitó ligeramente hasta su completa disolución.

3.7 Optimización del método analítico para la caracterización y purificación del conjugado HYNIC-RGD

Ferro-Flores et.al; 2005 [17] reportaron un método analítico empleando cromatografía de líquidos de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) para el análisis del conjugado HYNIC-TOC y su complejo formado con ^{99m}Tc usando como coligantes EDDA y Tricina. Este fue retomado y optimizado para el análisis del conjugado HYNIC-RGD y su complejo con ^{99m}Tc empleando los mismos coligantes.

Se inyectaron 20 μL de la muestra en el cromatógrafo usando las condiciones que a continuación se mencionan, la señal fue detectada empleando un detector UV-vis de arreglo de diodos.

Equipo: HPLC Waters con detector UV-vis de arreglo de diodos y detector de centelleo
Condiciones cromatográficas empleadas [17]:

Vol. de inyección: 20 μL

Longitud de onda: 200-400 nm

Fase Móvil: Fase A (TFA 0.1 % en Acetonitrilo)

Fase B (TFA 0.1 % en Agua)

Flujo: 1 mL/min

Temperatura: 25 °C

Tiempo de corrida: 30 min

Columna: Bondapak C-18 3.9 x 300 mm Waters

Gradiente (Tabla 4)

Se realizaron lecturas a diferentes longitudes de onda: 220, 240, 260 y 280 nm. Así se seleccionó aquella en la cual se presentaba una mayor resolución de la señal detectada.

Una vez obtenido el cromatograma y el espectro UV, así como el área y el tiempo de retención de la muestra, se determinó la longitud de onda adecuada para el análisis del conjugado.



Tabla 4. Gradiente de concentración de la fase móvil.

Tiempo (min)	Flujo mL/min	% Fase A	% Fase B
0	0	0	0
1 a 3	1	0	100
3 a 20	1	50	50
20 a 23	1	70	30
23 a 30	1	0	100

3.8 Purificación y caracterización del conjugado HYNIC-RGD y análisis del péptido c(RGDfK) materia prima mediante RP-HPLC

- 1) Se inyectaron en el cromatógrafo 20 μL de la muestra para la identificación del pico de interés y su tiempo de retención.
- 2) El mililitro de conjugado obtenido anteriormente se inyectó en el cromatógrafo.
- 3) El conjugado fue purificado empleando RP-HPLC y las condiciones establecidas anteriormente; durante la corrida se colectaron 3 fracciones en intervalos de tiempo diferentes como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Fracciones recolectadas durante la purificación del conjugado HYNIC-RGD.

Fracción	Tiempo de recolección de la muestra
1	9.5 a 10.5 min.
2	10.5 a 11.5 min.
3	11.5 a 12.5 min.

- 4) Una vez colectadas las tres fracciones, se inyectaron en el cromatógrafo 20 μL de cada una y se analizaron bajo las mismas condiciones, así se pudo determinar la fracción en la cual se encontraba el conjugado HYNIC-RGD.
- 5) Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, el tiempo de retención y las áreas de cada muestra.

El péptido c(RGDfK) se analizó con el mismo método cromatográfico empleado para la purificación y caracterización del conjugados HYNIC-RGD, la única condición que se cambió fue la longitud de onda, ya que esta fue de 220 nm. Se preparó por triplicado una solución del péptido cuya concentración fue de 1 mg/mL, se inyectaron en el sistema cromatográfico 20 μL de la muestra, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, tiempo de retención, la media de la valoración y el resultado obtenido se comparó con el reportado por el proveedor.



3.9 Marcado *in situ* del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD empleando como coligantes EDDA/Tricina

- 1) En un vial limpio y seco se agregaron 25 μL de la solución del conjugado purificado, cuya concentración fue de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- 2) Se agregaron 0.5 mL de la solución de EDDA/Tricina y 0.5 mL de una solución de pertecniato de sodio con una actividad de 1 mCi aproximadamente.
- 3) Se agregaron 20 μL de la solución de cloruro estano y se colocó en un baño seco a 98 °C durante 15 min.
- 4) El vial se retiró del baño seco y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min.
- 5) Posteriormente se inyectaron volúmenes de 20 μL de la muestra en el cromatógrafo.
- 6) Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes y las áreas para cada pico de interés, así se determinó la pureza radioquímica del conjugado, el porcentaje de coligantes y tecnecio libre.

3.10 Desarrollo de la formulación

3.10.1 Selección y optimización de la formulación

Se tomó como referencia la formulación unitaria del núcleo-equipos HYNIC-TOC para su marcado instantáneo con ^{99m}Tc , la cual fue previamente desarrollada por Ferro-Flores, et.al; 2005 [17]. La formulación se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Formula unitaria del núcleo equipo HYNIC-TOC.

Componente	Contenido
HYNIC-TOC	20 μg
Cloruro estano anhidro	20 μg
EDDA	10 mg
Tricina	20 mg
Manitol	50 mg

- 1) En base a esta formulación se determinó la cantidad de péptido necesaria para obtener una pureza radioquímica mayor del 95 %.
- 2) Se realizaron 3 marcados *in situ* del conjugado HYNIC-RGD. El primero se hizo empleando 25 μg , el segundo con 50 μg y el tercero con 75 μg .
- 3) Se obtuvieron los cromatogramas de cada inyección, el tiempo de retención, el área y la pureza radioquímica para cada caso, así como el porcentaje de coligantes y tecnecio libre.

Nota: ver anexo 2 para la preparación de soluciones para el marcado *in situ* del conjugado HYNIC-RDG.



- 4) Una vez obtenida la pureza radioquímica para las 3 cantidades empleadas del conjugado se seleccionó aquella que fue mayor del 95 %. La cantidad fue 75 μg , por lo cual la fórmula unitaria para el núcleo-equipo HYNIC-RGD quedó como se muestra en la tabla 7

Tabla 7. Fórmula unitaria del núcleo-equipo HYNIC-RGD.

Componente	Contenido
HYNIC-RGD	75 μg
Cloruro estanoso anhidro	20 μg
EDDA	10 mg
Tricina	20 mg
Manitol	50 mg

3.10.2 Fabricación de núcleo-equipos HYNIC-RGD

Se fabricó el primer lote del núcleo-equipo HYNIC-RGD, su tamaño fue de 10 frascos. Posteriormente los núcleo-equipos se sometieron aun proceso de liofilización en el cual el agua se sublima del producto una vez que éste se congeló.

1) Preparación de soluciones para la fabricación del primer lote del núcleo equipo HYNIC-RGD para su marcado con ^{99m}Tc .

a) Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7

En un matraz erlenmeyer de 100 mL se disolvieron 1.15 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) y 310 mg de fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) en 30 mL de agua inyectable, se agito la solución y se calentó ligeramente, se dejó enfriar y se transfirió la solución a un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó a un volumen final de 50 mL con agua inyectable.

b) Solución de HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD

De una solución cuya concentración fue de 1 mg/mL se tomó una alícuota 25 μL .

c) Solución de EDDA

Se pesaron 100 mg de EDDA y los cristales se disolvieron en 4.0 mL de agua con la ayuda de agitación y calentamiento. Se dejó enfriar.

d) Solución de Tricina/Manitol

Se pesaron 200 mg de tricina y se disolvieron con 2.0 mL de agua estéril y libre de pirógenos. Se pesaron 500 mg de manitol y se disolvieron en 2.0 mL de agua estéril, se agitó hasta su completa disolución. Finalmente en un recipiente adecuado se mezclaron las soluciones de tricina y manitol. Se obtuvo un volumen final de 4.0 mL.



e) Solución EDDA/Tricina/Manitol

En un recipiente limpio se mezclaron las soluciones de EDDA y Tricina/Manitol.

f) Solución de SnCl_2

En un vial limpio y seco se pesaron 10 mg de cloruro estanoso anhidro, se disolvieron con 10 μL de ácido clorhídrico concentrado y se añadieron 10 mL de agua inyectable previamente nitrogenada durante al menos 15 minutos

2) Preparación de la formulación de HYNIC-RGD-Sn.

Tamaño del lote: 10 frascos

a) A la solución de EDDA/Tricina/Manitol se agregó lentamente la solución del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD.

b) Posteriormente se agregaron lentamente 200 μL de la solución de cloruro estanoso SnCl_2 . Se midió el pH final de la solución

c) Finalmente esta solución fue filtrada a través de membrana millipore de 0.22 micras de tamaño de poro y se fraccionó en volúmenes de 1 mL en 10 frascos tipo penicilina de 10 ml c/u. Posteriormente los frascos se introdujeron a la liofilizada en ciclo de 16 horas.

3. 11 Validación del sistema y del método analítico

3.11.1 Linealidad del sistema

A partir de una solución cuya concentración fue de 0.375 mg/mL se realizaron diluciones para preparar por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo tabla 8) para evaluar la linealidad del sistema. La concentración central representó el 100 % del conjugado en la formulación (75 μg). Se consideraron dos niveles por arriba y dos niveles por debajo de esta.

Se inyectaron en el sistema cromatográfico 20 μL de cada solución y la respuesta analítica fue medida bajo las mismas condiciones cromatográficas. Se obtuvieron los cromatogramas, el tiempo de retención y el área de la señal detectada en cada caso.

Se reportó la relación concentración (X) vs respuesta analítica (Y), se trazó la gráfica incluyendo la ecuación de la recta y la línea de ajuste, también se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) el cual fue expresado como el porcentaje de la concentración de la solución de referencia.

Criterio de aceptación [68]:

$r^2 > 0.98$

$IC(b_1)$, no debe incluir el cero.



Tabla 8 .Niveles de concentración para evaluar la linealidad del sistema.

Nivel (%)	Alicuota (mL)	Concentración del conjugado (mg/mL)
60	30	45
80	40	60
100	50	75
120	60	90
140	70	105

3.11.2 Precisión del sistema

Se preparó por sextuplicado una solución cuya concentración representa el 100 % del analito en la formulación. Esta se preparó a partir de diluciones de una solución de referencia cuya concentración fue de 0.375 mg/mL.

Se inyectaron en el sistema cromatográfico 20 μL de la solución para evaluar la precisión del sistema y se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, el tiempo de retención y el área de cada inyección. Con estos datos se calculó el coeficiente de variación (CV) entre el área de cada inyección aplicando el siguiente criterio:

Criterio de aceptación [68]: CV < 2.0 % para métodos cromatográficos.

3.11.3. Exactitud y repetibilidad del método

Se preparó el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la formulación (tabla 7). A la cantidad de placebo equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, se le adicionó la cantidad de analito correspondiente al 100% en la muestra (placebo adicionado). Los placebos adicionados se analizaron bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia el conjugado HYNIC-RGD que se adicionó.

Se determinó la cantidad del analito, se calculó el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional (IC(μ)) del porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación [68]:

El IC(μ) debe incluir el 100 % o el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluye en el intervalo: 98-102 % si el método es cromatográfico.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor del 2 % para métodos cromatográficos.



3.11.4 Especificidad del método

Se establecieron las posibles sustancias de interferencia en la muestra, estas fueron: la fase móvil, el diluyente y los componentes de la formulación.

Se inyectaron 20 μL de la fase móvil (fase A y B), diluyente, analito de interés (solución del péptido RGD), una muestra de los componentes presentes en la formulación (placebo) y una solución de péptido RGD más el placebo (placebo cargado)

Se evaluó la respuesta al método de cada solución bajo las mismas condiciones.

Criterio de Aceptación [68]: Las respuestas del método únicamente deben ser debidas al analito

3.11.5 Linealidad del método

Se preparó el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad equivalente a una muestra analítica por triplicado, se le adicionó la cantidad de analito correspondiente al 100% de éste en la formulación. Se seleccionaron 2 niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo tabla 9) y se preparó el placebo adicionado para cada nivel.

Solución de referencia: $\frac{1.5 \text{ mg HYNIC-RGD}}{4 \text{ mL soln. Etanol a } 10 \%}$ \longrightarrow $\frac{\text{Alícuota del conjugado}}{500 \mu\text{L Placebo}}$

La concentración de la solución de referencia fue de 0.375 mg/mL y se realizaron pesadas independientes por triplicado para cada nivel.

Para cada nivel de concentración se tomó una alícuota de la solución de referencia del conjugado y se llevo a un volumen final de 500 μL con la solución del placebo como se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Niveles de concentración para evaluar la linealidad del método.

Nivel (%)	Alícuota de conjugado (mL)	Alícuota de placebo (mL)	Concentración del conjugado (mg/mL)
60	60	440	45
80	80	420	60
100	100	400	75
120	120	380	90
140	140	360	105



Se inyectaron en el sistema cromatográfico 20 μL de los placebos adicionados y se analizaron bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición del placebo analítico. Se obtuvieron los cromatogramas, tiempo de retención, área de cada pico y así se determinó la cantidad recuperada del conjugado empleando la siguiente fórmula:

Cálculo de los mg de conjugado HYNIC-RGD recuperados:

$$\text{mg de Conjugado} = \frac{\text{Área MTA}}{\text{Área STD}} \times \frac{\text{Peso STD}}{4.0 \text{ mL}} \times 0.5 \text{ mL}$$

Cálculo del porcentaje de recobro del conjugado HYNIC-RGD:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg Recuperados}}{\text{mg Adicionados}} \times 100$$

Se reportó la relación cantidad del conjugado adicionada vs cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para pendiente ($\text{IC}(b_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($\text{IC}(b_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($\text{CV}_{y/x}$).

Criterio de aceptación [68]:

1) Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:

$r^2 > 0.98$

El $\text{IC}(b_1)$ debe incluir la unidad

El $\text{IC}(b_0)$ debe incluir el cero

El $\text{CV}_{y/x}$ del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2 % si el método es cromatográfico

2) Porcentaje de recobro:

El $\text{IC}(\mu)$ debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98-102 % para métodos cromatográficos.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2 % si el método es cromatográfico.

3.11.6 Precisión del método (precisión intermedia)

Se analizó por triplicado una muestra homogénea del producto que tenía un nivel igual 100 %, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Se empleó la misma sustancia de referencia, el mismo cromatógrafo e iguales condiciones cromatográficas.



Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, el área, tiempo de retención y el porcentaje de pureza del analito de todas las muestras.

Se calculó la media aritmética (?), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido empleando todos los resultados obtenidos.

Criterio de aceptación [68]:

El CV < 2 % para métodos cromatográficos.

3.12 Control de calidad de núcleo-equipos

El control de calidad de núcleo-equipos HYNIC-RGD contempla tanto pruebas físico-químicas como biológicas. Estas se encuentran descritas en la tabla 10, así como los parámetros que debe cumplir.

Tabla 10. **Pruebas de control de calidad de núcleo equipo s HYNIC-RGD.**

Parámetros a ser evaluados	Especificación
Apariencia	Solución acuosa, transparente e incolora, libre de partículas visibles
pH	5.4 ± 1.0
Pureza radioquímica	No menor al 90%
Prueba de pirógenos	> a 175 eu/mL
Esterilidad	Positiva
Prueba de Toxicidad	Inócuo

Para realizar estas pruebas primero fue necesario el marcado con ^{99m}Tc como se describe a continuación.

Marcado de la formulación liofilizada del conjugado HYNIC-RGD

- 1) El liofilizado fue reconstituido con 1 mL de buffer de fosfatos 0.2 M pH 7 y se agitó ligeramente hasta su completa disolución.
- 2) Inmediatamente se adicionó 1 mL de solución de pertecneciato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) estéril y libre de pirógenos con una actividad aproximada de 1 mCi. Se agitó durante 20 segundos.
- 3) El frasco de reacción se colocó en un baño seco durante 10 min.
- 4) Después de transcurrido ese tiempo se sacó del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. aproximadamente.



Una vez obtenido el complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD se evaluó la pureza radioquímica empleando cromatografía en capa fina, cartucho Sep-pack y HPLC.

3.12.1 Controles químicos

1) Apariencia: Se reconstituyó el liofilizado con 1 mL de buffer de fosfatos 0.2 M pH 7 y se inspeccionó la apariencia de esta solución, el frasco se colocó sobre un fondo negro.

2) Determinación del pH: Esta determinación se realizó en la solución empleando para ello papel pH, este parámetro fue determinado en una muestra representativa (2 viales) según el tamaño del lote.

3) Pureza radioquímica

Determinación de la pureza radioquímica empleando ITLC-SG:

En 3 tiras de papel para ITLC-SG de 0.8 cm por 10.0 cm, se colocó una gota del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD de un volumen aproximado de 5 μL , empleando para ello una jeringa de 25 μL .

Posteriormente cada una de las tiras fue introducida en un tubo de boca ancha conteniendo una fase móvil diferente:

Tubo No 1: 2-butanona para determinar el pertecnecio libre $^{99m}\text{TcO}_4^-$

Tubo No 2: solución de citrato de sodio pH 5 para determinar ^{99m}Tc -coligante y $^{99m}\text{TcO}_4^-$

Tubo No 3 una mezcla de metanol:acetato de amonio 1 M (1:1 v/v) para la determinación del coloide.

La cromatografía ascendente se desarrolló a un frente de 8.0 cm. Se dejó eluir la muestra y las tiras se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas se envolvieron con cinta adhesiva para facilitar su manipulación.

Las tiras fueron seccionadas en 8 partes y se depositaron en cubas para determinar la radiactividad presente en cada una de las fracciones, empleando para ello un detector de centelleo sólido y midiendo la radiactividad de fondo.

A la radiactividad medida de cada fragmento de la tira de papel, se restó la radiactividad de fondo, obteniéndose los porcentajes respectivos; así fue posible determinar la cantidad de pertecnecio libre, coligantes y tecnecio hidrolizado.

Determinación de la pureza radioquímica empleando cartucho Sep-Pak C-18



Acondicionamiento del cartucho Sep-Pak: con la ayuda de una jeringa se hicieron pasar lentamente 10 mL de etanol a través del cartucho Sep-Pak C-18, posteriormente 10 mL de agua destilada y 10 mL de aire.

A través del cartucho se pasó 0.1 mL de la solución del péptido, para ello se empleó una jeringa de insulina. Posteriormente se adicionaron 5 mL de HCl 1 mM a través del cartucho, la fracción se colectó en un tubo de ensaye.

El péptido radiomarcado fue eluido con 3 mL de una solución de etanol: solución salina (1:1), esta fracción fue colectada en tubo de ensaye. El cartucho se colocó en un tubo de ensayo con la misma geometría de aquellos donde se colectaron las diferentes fracciones obtenidas anteriormente.

Se midió la radiactividad de fondo y la de cada una de las fracciones recolectadas empleando un detector de centelleo sólido. Así fue posible determinar el porcentaje de cada una de las impurezas, además de la pureza radioquímica.

Determinación de la pureza radioquímica empleando HPLC:

Se inyectaron 20 μL del conjugado radiomarcado a un sistema cromatográfico acoplado a un detector de centelleo sólido empleando RP-HPLC, una columna C-18, un sistema de gradiente para su elusión y un detector UV-vis a una longitud de onda de 260 nm. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las mismas que se usaron en la caracterización del conjugado HYNIC-RGD.

Se obtuvo el radiocromatograma correspondiente y se determinó la pureza radioquímica del núcleo-equipo empleando el área de cada señal detectada.

4) Estabilidad del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD

El liofilizado se reconstituyó con 1 mL de buffer de fosfatos 0.2 M pH 7 y se marcó con ^{99m}Tc con una actividad aproximada de 1 mCi/mL.

El conjugado radiomarcado fue analizado en el sistema cromatográfico empleando RP-HPLC. Se realizaron inyecciones de la muestra a diferentes tiempos después de ser marcado: 30 min, 1, 2, 3, 4 y 5 horas.

Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, tiempo de retención, el área y el porcentaje de la pureza radioquímica de cada inyección.

3.12.2 Controles biológicos

1) Prueba de endotoxinas bacterianas



Este procedimiento tiene por objetivo establecer la forma en que debe realizarse la prueba de pirógenos “*in vitro*” por medio del método de Lisado de *Amebocitos de limulus* (LAL), a los productos que se administran por vía endovenosa, así como a los accesorios que pueden acompañarlos, como es el caso de jeringas. La prueba de pirógenos debe resultar negativa para todas las muestras ensayadas.

El método *in vitro* es rápido, sensible y específico para detectar y medir presencia de endotoxinas bacteriana provenientes de bacterias gramnegativas. Se fundamenta en la gelificación del lisado de amebocitos del líquido circulante de un arácnido, el *Limulus polyphemus* (LAL) en presencia de pequeñas cantidades de endotoxinas bacterianas.

Procedimiento:

- a) En los tubos de ensayo estériles y libres de pirógenos se depositó una alícuota de 0.1 mL del reactivo de LAL. El número de tubos a dosificar depende de la cantidad que especifique el frasco liofilizado (un frasco reconstituido con 5.2 mL, alcanzará para un grupo de 50 a 52 tubos). Los tubos ya dosificados se guardaron en refrigeración a menos de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- b) A uno de los tubos que contenía el reactivo de LAL, se añadieron 100 μL de agua estéril y libre de pirógenos. Se agitó durante 30 segundos cuidando no hacer espuma. Este tubo constituyó la prueba de control negativa.
- c) En otro tubo que contenía el reactivo de LAL, se adicionaron 100 μL de la solución a analizar, agitando suavemente por 30 segundos sin generar espuma. Este tubo constituía el tubo de prueba
- d) A otro de los tubos que contiene el reactivo de LAL, se agregaron 100 μL de la solución “agua control positivo” y se agitó suavemente durante 30 segundos. Este tubo constituyó la prueba control positivo y representó la prueba para indagar la presencia de alguna sustancia inhibitoria de la reacción de LAL-endotoxina.
- e) Los tubos se colocaron en incubación en reposo absoluto a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 60 minutos ± 0.5 minutos, en una cámara de incubación.
- f) Una vez concluido el tiempo de incubación, los tubos se sacaron de la cámara para su observación e interpretación, evitando cualquier movimiento brusco. Los datos fueron interpretados tomando en cuenta el criterio que se muestra en la tabla 11.



Nota: para ver la preparación de soluciones empleadas en la prueba de pirógenos y esterilidad consultar en anexo 4 y 5.



Tabla 11. Interpretación de resultados para la prueba de endotoxinas bacterianas.

Resultado	Interpretación	Observaciones
Positivo	Si el tubo presenta la formación de un gel firme capaz de mantener su integridad cuando se hierve a 180 °C	Indica la presencia de endotoxinas en concentración por lo menos igual a la sensibilidad del reactivo de LAL
Negativo	Cuando en el tubo de prueba hay ausencia de gelificación o la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se hierve a 180 °C	La concentración de endotoxinas en concentraciones menores del umbral pirogénico puede causar: floculación, granulación o aumento de la viscosidad.

2) Prueba de esterilidad

Este procedimiento tiene por objeto establecer la forma en la que debe efectuarse las pruebas de esterilidad a los productos farmacéuticos y sus accesorios, de manera que cualquier contaminación causada por microorganismos, pueda ser detectada. Esta prueba se aplica a todos los núcleo-equipos, soluciones de moléculas marcadas, generadores de Tecnecio-99m y accesorios que los acompañan. No debe encontrarse proliferación microbiana en los medios de cultivo sembrados e incubados correctamente en cada una de las muestras por analizar.

Preparación de la Muestra.

Los núcleo-equipos deben estar perfectamente sellados con su respectiva tapa de aluminio. Las muestras fueron seleccionadas al azar y las pruebas se practican en 2-6 frascos de cada uno de los lotes según su tamaño y empleando el criterio de las tablas para la inspección por atributos (MGA-MD1241) [11].

Procedimiento:

Una vez preparadas las muestras y después de haber tomado las medidas pertinentes del manejo y de seguridad, se procede a realizar la siembra de la siguiente manera:

Adicionar de manera directa por medio de una jeringa estéril y libre de pirógenos entre 5 y 10 mL de medio de caldo de soya tripticaseína al 50 % de las muestras a analizar. Hacer lo mismo con el tioglicolato.

Interpretación de resultados

- Si durante el tiempo de incubación, en algunos tubos existe desarrollo microbiano, la observación se confirma por medio de un examen microscópico.
- Si no existe desarrollo microbiano el producto satisface las especificaciones de la prueba de esterilidad.



- c) Si hay desarrollo microbiano, la prueba deberá ser repetida, utilizando el doble de las muestras empleadas.
- d) Si la prueba que ha sido repetida confirma la presencia de microorganismos, el producto no es estéril.
- e) Cuando un producto ha sido muestreado y sembrado en los medios de cultivo, debe permanecer en espera de su liberación por lo menos durante 24 horas, al término de las cuales se realiza una observación para verificar que no existan evidencias de proliferación bacteriana.
- f) La prueba dura 14 días.

Durante el periodo de incubación y hasta el término de este, observar si se presenta o no crecimiento microbiano en los medios de cultivo.

3.12.3 Prueba de biodistribución en ratones

Se realizaron pruebas de distribución en ratones atómicos con tumores inducido a partir de líneas celulares AR42J (cáncer de páncreas).

El conjugado HYNIC-RGD fue marcado con una solución de pertecneciato de sodio cuya actividad fue de 2 mCi/mL, se determinó el porcentaje de pertecneciato libre empleando ITLC-SG con tiras de sílica y como fase móvil 2-butanona. La tira se seccionó en 2 partes y se midió la radiactividad de cada fragmento en un detector de centelleo.

Después se pesaron 10 jeringas de insulina vacías, una vez pesadas se tomaron 40 μL del conjugado radiomarcado, se registró el peso de la jeringa con la muestra. Así, ya inoculados los ratones se pesaron de nuevo las jeringas y por diferencia de pesos se calculó la cantidad de radiofármaco inyectada a cada ratón.

Posteriormente se pesaron tubos de plástico vacíos y se registraron los pesos. En estos se colocaron los órganos extraídos de cada ratón.

Los ratones fueron divididos en 3 grupos, cada grupo conformado por tres ratones los cuales fueron inoculados e identificados respectivamente:

Primer grupo: se administró el radiofármaco y se esperó a que transcurriera 1 hora después de la administración para ser sacrificados.

Segundo grupo: fueron sacrificados 3 horas después de la administración del radiofármaco.

Tercer grupo: se sacrificaron 24 horas después de la administración del radiofármaco.

Los ratones fueron sacrificados en el tiempo que correspondía a cada grupo para ello se utilizó una cámara de cloroformo. Se realizó la disección de cada ratón y se extrajeron los siguientes órganos y tejidos, los cuales fueron depositados en los tubos previamente pesados. Los órganos se extrajeron en el siguiente orden:



- 1) Sangre (Punción cardiaca)
- 2) Corazón (Órgano completo)
- 3) Pulmones (Fragmento)
- 4) Hígado (Fragmento)
- 5) Bazo (Órgano completo)
- 6) Páncreas (Fragmento)
- 7) Riñones (Órgano completo)
- 8) Estómago (Fragmento)
- 9) Músculo (Fragmento)
- 10) Hueso (Fragmento)
- 11) Tumor (Órgano completo)

Los órganos se lavaron con agua inyectable para eliminar la mayor cantidad de sangre. Se pesaron los tubos y por diferencia de pesos se calculó el peso de cada órgano y tejido de cada ratón.

Finalmente se midió la radiactividad de cada órgano en un detector de centelleo junto con 6 muestras de 0.5 mL de la solución de referencia diluida representando el 100 % de la actividad inyectada. Se calculó:

- 1) El porcentaje de la radiactividad por órgano en relación a la dosis inyectada en el animal.
- 2) La actividad específica, es decir, porcentaje de dosis/gramo de tejido (% IA/g).
- 3) La relación entre la radiactividad del tumor y cada órgano.



Capítulo 4.

Resultados y Discusión



4.1 Cálculo de la energía potencial mínima de la molécula

Los resultados de calor de formación calculados por mecánica molecular para la molécula de ciclo-Lys-D-Phe-RGD (figura 15), HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD (figura 16) y ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD (figura 17) se presentan en la tabla 12 y representan el nivel termodinámico más estable para cada molécula, lo cual sugiere que la formación del complejo entre el conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD de manera directa con el ^{99m}Tc dará lugar a una molécula estable. Sin embargo esto sólo pudo confirmarse al realizar la síntesis, purificación, caracterización y marcado del conjugado HYNIC-RGD.

Tabla 12. Valores de calor de formación.

Molécula	Energía calculada por Mecánica Molecular
cRGDfK)	114.40 Kcal/mol
c(RGDfK)HYNIC	230.00 Kcal/mol
^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	213.00 Kcal/mol

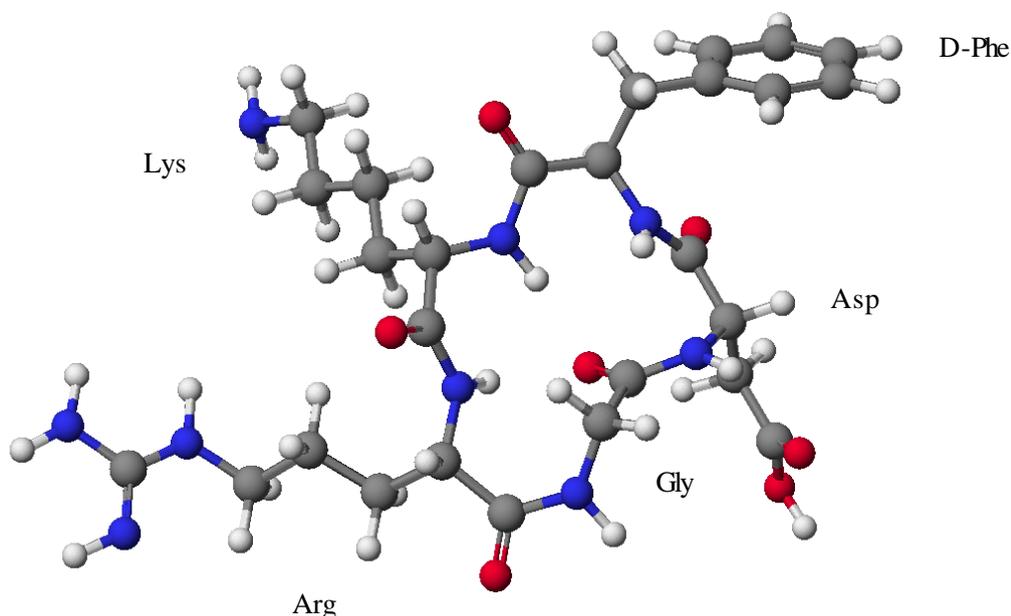


Figura 15. Estructura molecular del péptido *c*(RGDfK).

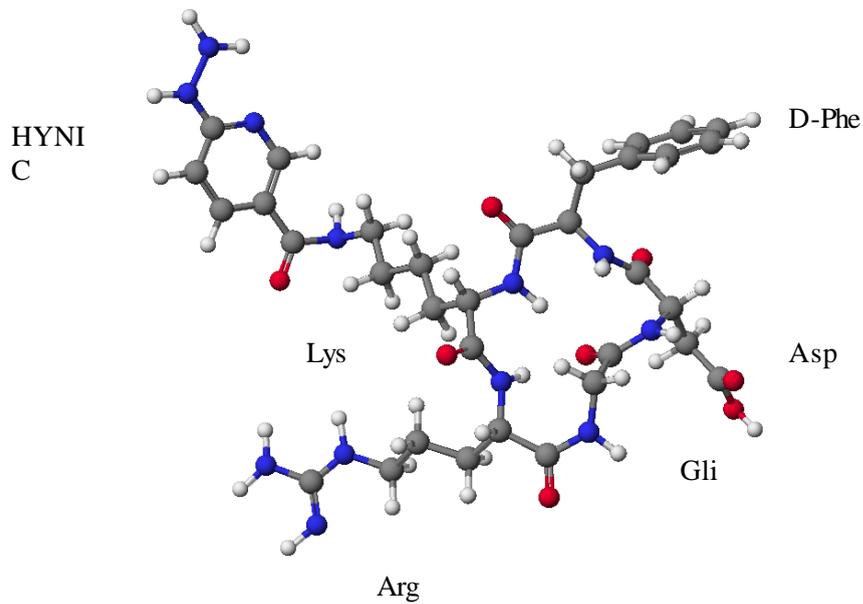


Figura 16. Estructura molecular del conjugado *c*(RGDfK)HYNIC.

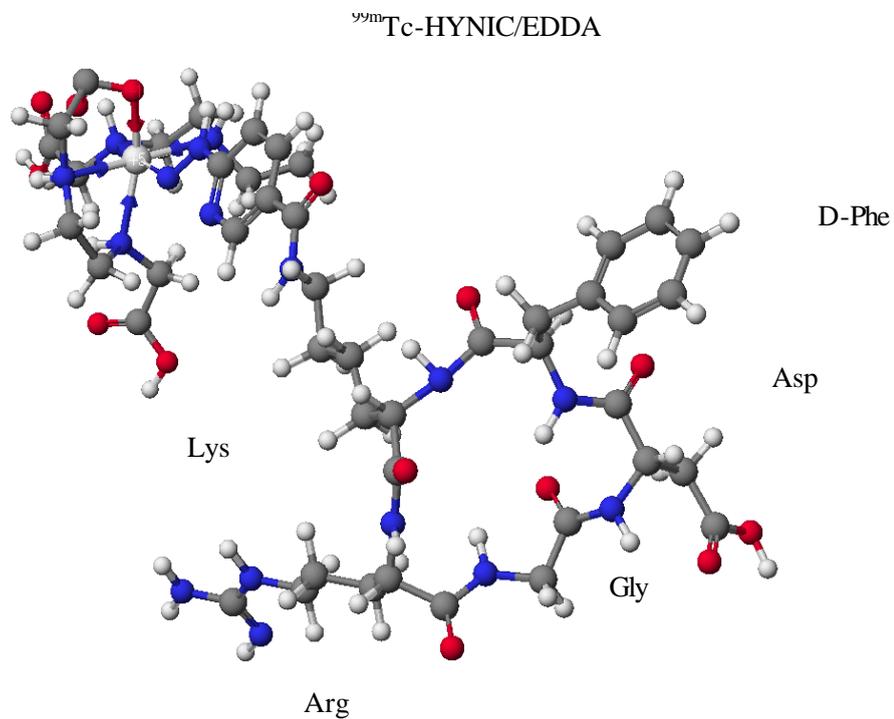


Figura 17. Estructura molecular del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-ciclo-Lys-D-Phe-RGD.



4.2. Síntesis y desprotección del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD

Se realizó la conjugación del péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD con HYNIC, el cual se encontraba protegido por el grupo *ter*-butoxicarbonilo (Boc), obteniéndose como producto el conjugado Boc-HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD como se muestra en la figura 18. Finalmente el grupo Boc fue removido empleando TFA.

Al realizar la interacción entre el carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro diferente, debe de evitarse la reacción entre los grupos carboxilo y amino del mismo aminoácido [34].

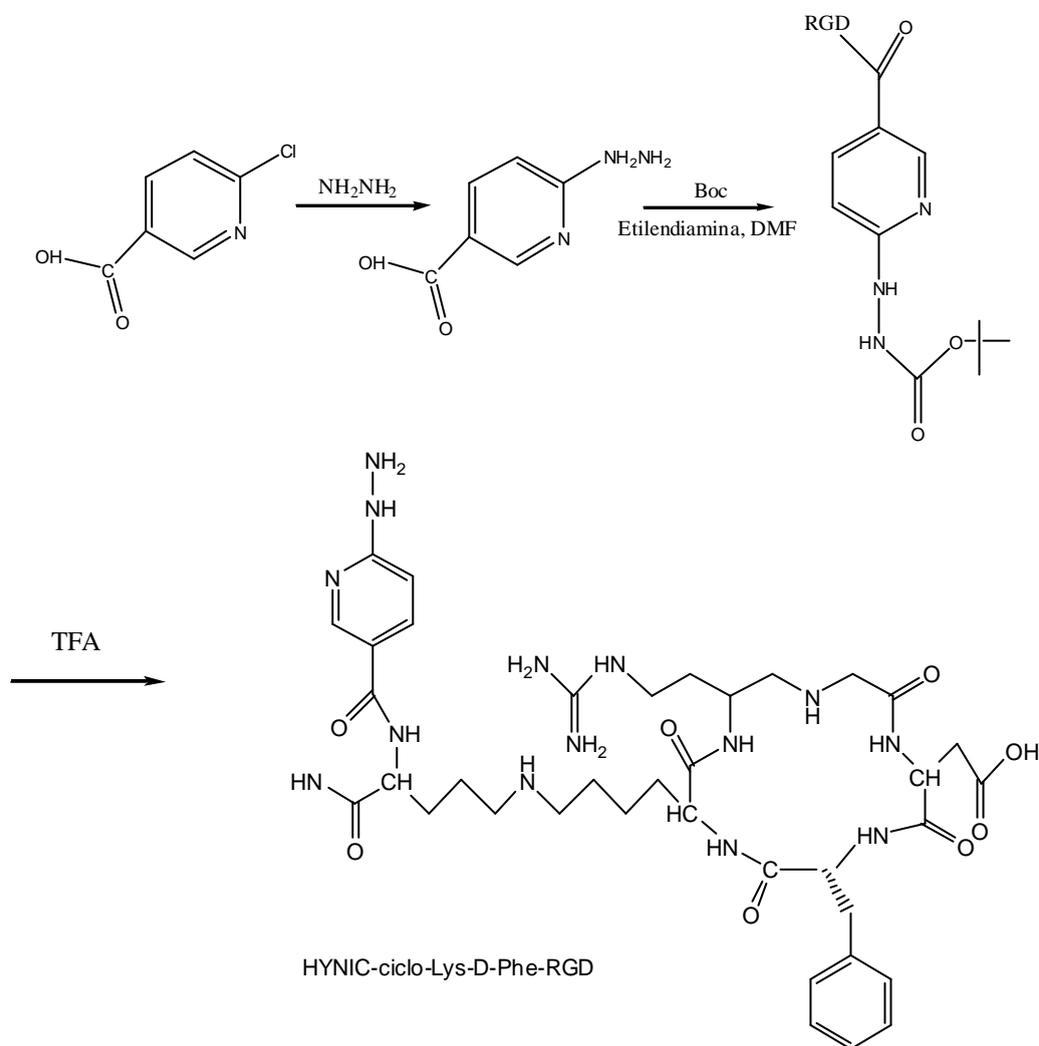


Figura 18. Síntesis del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD.



Se obtuvo el conjugado Boc-HYNIC-RGD, el grupo Boc es un agente de bloqueo, de esta forma el péptido RGD se unió al carboxilo ubicado en la posición número 3 del anillo del HYNIC. Una vez desprotegido la amina ubicada en la posición número 6 del anillo del HYNIC podrá llevarse a cabo la formación del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD.

La conjugación pudo llevarse a cabo ya que la Lys es un aminoácido que contiene una cadena ionizable [33], lo cual permite la modificación y conjugación del péptido c(RGDfK). En su estado no protonado, cada una de las cadenas puede ser un potente nucleófilo en reacciones de adición [79].

La glicina, por ser el aminoácido más pequeño, puede acomodarse en regiones de la estructura tridimensional inaccesible para otros aminoácidos. En consecuencia, se presenta en las regiones en que el péptido tiene dobleces fuertes [33].

4.3 Optimización del método analítico para la caracterización y purificación del conjugado HYNIC-RGD

La optimización del método analítico desarrollado por Ferro-Flores et.al; 2005 [17] para el análisis del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-TOC permitió seleccionar las condiciones cromatográficas adecuadas para el análisis y purificación del conjugado HYNIC-RGD así como del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD. La longitud de onda a la cual se detectó el analito fue a 260 nm. El gradiente, la temperatura, fase estacionaria, fase móvil y demás condiciones se mantuvieron como en el método de referencia.

El método empleado fue RP-HPLC, como fase móvil se usó un empaque C-18, el cual es hidrofóbico y una fase móvil polar parcialmente acuosa. La fase estacionaria es una cadena larga de 18 átomos de carbono, lo cual hace que los solutos disueltos en la fase orgánica sean retenidos fuertemente y que haya una buena resolución, permitiendo así su separación [70, 75].

La RP-HPLC se basa en la elución del conjugado usando una fase estacionaria no polar y una fase móvil con solventes polares. El gradiente empleado permitió un aumento continuo de la polaridad del eluyente durante la separación, ya que se disminuyó gradualmente el contenido de disolvente orgánico (acetonitrilo) [71, 73]. Así, fue posible eluir primero los compuestos de menor polaridad como el HYNIC, a medida que se incrementa la concentración de acetonitrilo y se llega a un 50 % de ambas fases es posible eluir el conjugado HYNIC-RGD.

La longitud de onda del detector UV-vis para el análisis del conjugado HYNIC-RGD fue de 260 nm debido a que los aminoácidos no absorben la luz ultravioleta de longitud de onda superior a 240 nm [33], pero se considera que el HYNIC contribuye a que la molécula absorbiera luz a 260 nm.



4.4 Caracterización del conjugado HYNIC-RGD

El conjugado fue caracterizado empleando RP-HPLC. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 19, mientras que en la tabla 13 se aprecia el tiempo de retención de los diferentes compuestos detectados.

El tiempo de retención para el conjugado (Pico No 3 figura 19) fue de $t_{\text{R}} = 10.64$ min., también se pueden apreciar otros picos, los cuales pudieron deberse a impurezas presentes como HYNIC con un $t_{\text{R}} = 4.05$ ó péptido no conjugado con un $t_{\text{R}} = 10.42$ min, mientras que en la figura 20 podemos observar el espectro UV-vis del conjugado a una longitud de onda de 260 nm (figura 20).

Tabla 13. Resultados de la caracterización del conjugado HYNIC-RGD e impurezas.

	Nombre	t_{R} (min)	Area (UA)	% Area
1	HYNIC	4.05	43914	2.02
2	Péptido RGD	10.42	187710	4.34
3	HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	10.64	4031460	93.64

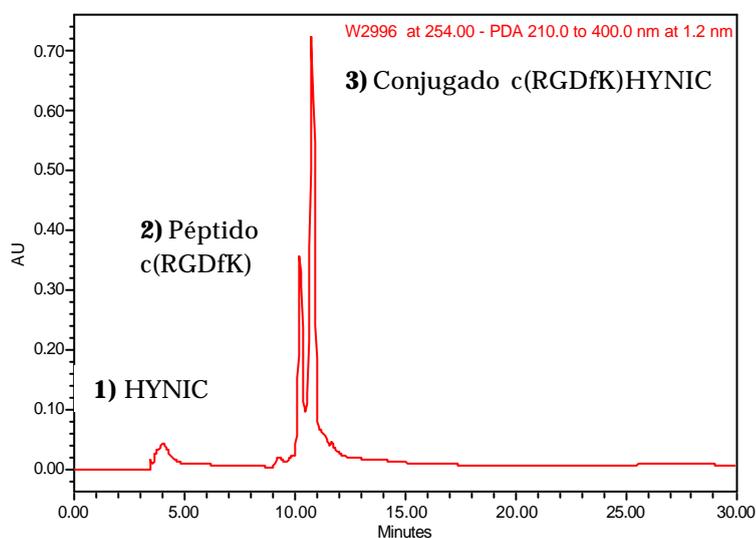


Figura 19. Cromatograma del Conjugado HYNIC-RGD.

Como se mencionó anteriormente, el tiempo de retención de cada compuesto está relacionado con el gradiente empleado. Por lo cual el conjugado HYNIC-RGD tiene un mayor tiempo de retención en comparación con el t_{R} del HYNIC. No obstante, existen otros factores de los cuales depende el tiempo de retención de los distintos compuestos, como lo es la temperatura de la fase móvil o el tamaño de cada molécula [49, 50]. La molécula de mayor



tamaño es el conjugado c(RGDfK)HYNIC, el cual tuvo un mayor tiempo de retención, mientras que la más pequeña es el HYNIC, con un tiempo de retención menor.

La temperatura tiene un efecto importante sobre las separaciones en HPLC, porque a altas temperaturas la viscosidad del disolvente disminuye, dando lugar a que el eluyente fluya más fácilmente. Las velocidades de difusión del soluto aumentan, originando una difusión más rápida en todas las direcciones, es decir, todos los procesos de transporte cambian con la temperatura [73, 75].

Los tiempos de retención de cada compuesto permitieron su caracterización, además de que el espectro UV-vis confirma la presencia del conjugado HYNIC-RGD (figura 20), no sin olvidar, que en este caso el método más recomendado es la espectrometría de masas [20].

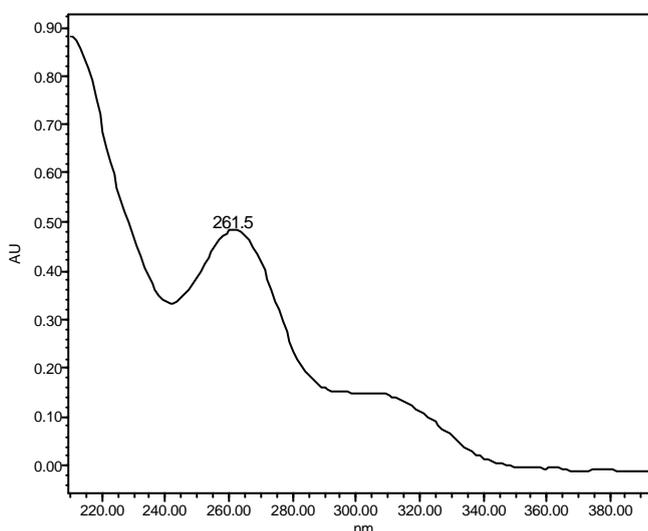


Figura 20. Espectro UV-vis del conjugado HYNIC -RGD.

4.5 Purificación del conjugado HYNIC-RGD

De las tres fracciones colectadas, se determinó que en la fracción 2 (10.5 a 11.5 min) se eluyó el conjugado HYNIC-RGD, mientras que en la fracción 1 y 3 no se encontró el analito de interés. Por lo tanto el tiempo de retención de la muestra fue de t_R 10.66 min y se encuentra dentro del intervalo de tiempo 10.5 a 11.5 min con una pureza de 98.72 %.

Mediante la purificación del conjugado fue posible retirar ciertas impurezas presentes en la muestra como se observa en figura 19, probablemente HYNIC ó péptido no conjugado.

En la figura 21 se muestra el cromatograma del conjugado puro en el cual solo se detectó una señal (un solo pico) el cual corresponde al conjugado HYNIC-RGD y cuyo tiempo de retención fue de 10.66 min con un área de 2628710 UA.



Tabla 14. Pureza química del conjugado HYNIC-RGD sintetizado.

Nombre	t_R	Area (UA)	% Pureza
Conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD	10.66 min	2628710	98.72 %

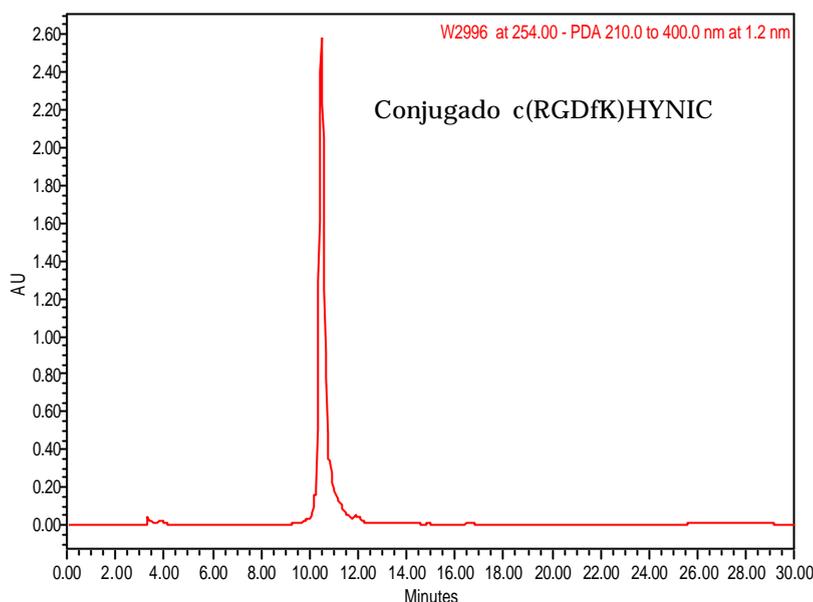


Figura 21. Cromatograma del conjugado HYN-RGD purificado mediante RP-HPLC.

4.6 Análisis del péptido c(RGDfK) materia prima

Se realizó un análisis del péptido ciclo (-Arg-Gly-Asp-D-Phe) sal de trifluoroacetato materia prima lote 4052242 de Bachem y los resultados obtenidos fueron comparados con los reportados en el certificado del proveedor (ver tabla 15). El análisis se realizó por triplicado empleando las mismas condiciones cromatográficas para el análisis del conjugado HYNIC-RGD. La única condición que cambió fue la longitud de onda del detector, ésta fue de 220 nm. La concentración de la muestra fue de 1 mg/mL.

En la figura 22 se presenta el cromatograma obtenido del péptido c(RGDfK) en el cual se observan 2 picos a diferentes tiempos de retención. El pico No 2 corresponde al péptido con una pureza química de 95.95 %, según el resultado obtenido experimentalmente, mientras que el pico No 1 probablemente se debe a la presencia de alguna impureza.

La longitud de onda del detector UV-vis para el análisis del péptido RGD fue de 220 nm debido a que los aminoácidos que lo conforman no absorben la luz ultravioleta de longitud de onda superior a 240 nm [33].

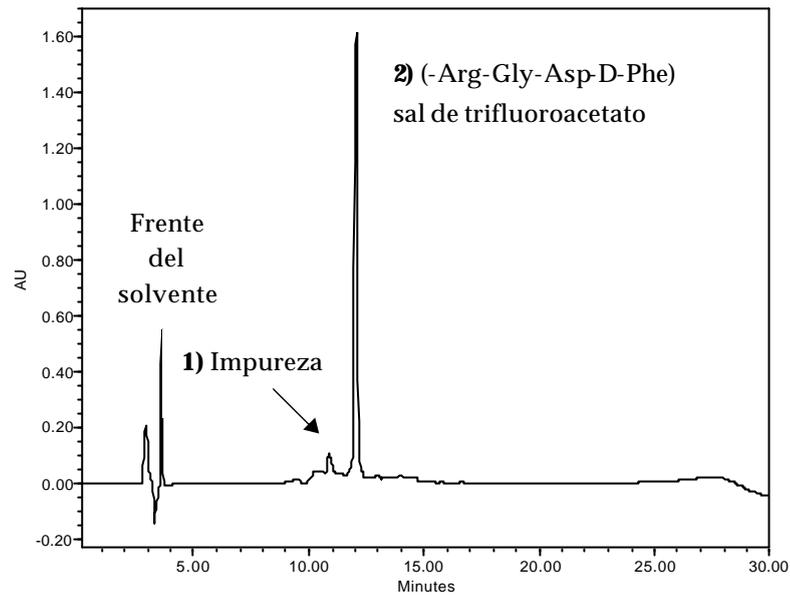


Figura 22. Cromatograma del péptido ciclo-Lys-D-Phe-RGD materia prima lote 4052242 a una longitud de onda de 220 nm.

En la tabla 15 se muestra la pureza química y el t_R del péptido RGD. El coeficiente de variación entre la pureza química reportada por el proveedor y la obtenida experimentalmente es de 0.60, por lo cual no existe una diferencia significativa entre ambas valoraciones [79].

El coeficiente de variación entre los tiempos de retención del compuesto fue de 2.4. Este valor se puede atribuir a diferentes factores, desde el equipo, hasta la columna y las condiciones cromatográficas empleadas, como lo es la velocidad del flujo, la concentración de acetonitrilo así como de agua en la fase móvil, la temperatura y la presión [72, 74].

Tabla 15. Pureza química del péptido c(RGDfK) materia prima.

	Datos reportados en el certificado	Resultados obtenidos	S	C.V.
Pureza química	95.14 %	95.95 %	0.57	0.60
tiempo de retención	10.66 min	11.03 min	0.26	2.4

4.7 Marcado *in situ* del conjugado HYNIC-RGD empleando como coligantes EDDA/Tricina

Para la formación del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD se emplearon 25 μL del conjugado HYNIC-RGD con los cuales se obtuvo una pureza radioquímica de 90.08 % y un tiempo de retención de 10.86 min. Las impurezas se obtuvieron en un 9.22 % (tabla 16). A pesar de que



estas son menores del 10 %, el valor se aproxima mucho al límite, lo cual no es recomendable en un estudio diagnóstico [11, 15].

En la figura 23 se muestra el radiocromatograma del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD en el cual se pueden observar dos señales, la primera corresponde al tecnecio libre y a los coligantes, mientras que el segundo corresponde al analito de interés.

Tabla 16. Pureza radioquímica del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando como coligantes EDDA/Tricina.

Nombre		t_R (min)	Area (UA)	% Area
1	Impurezas	4.53	56894	9.22 %
2	^{99m}Tc - HYNIC/EDDA-RGD	11.06	2658995	90.08 %

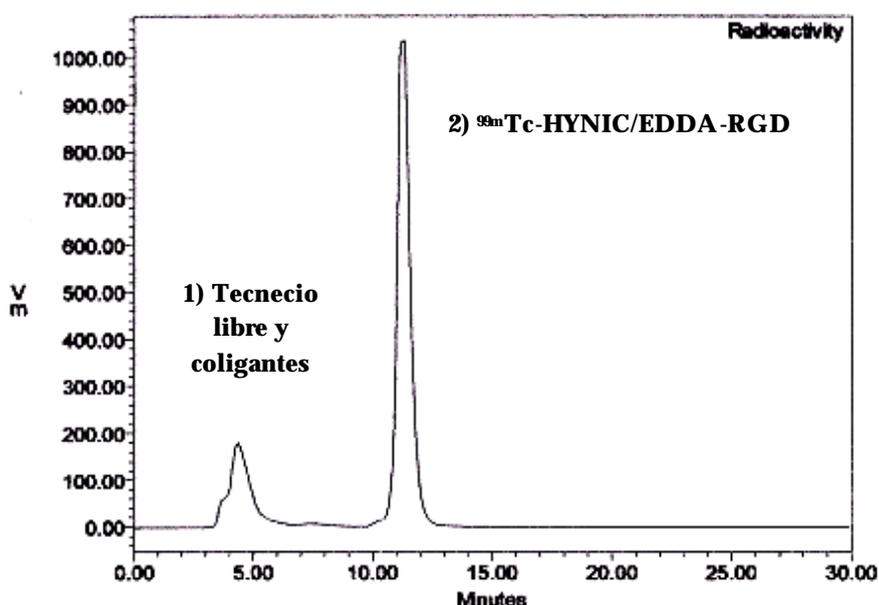


Figura 23. Cromatograma del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD 25 mg del conjugado HYNIC-RGD.

En el mercado del conjugado HYNIC-RGD existen diferentes factores los cuales son muy importantes ya que de ellos depende que se pueda dar la formación de complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD.

La concentración de coligantes (EDDA/Tricina), la cantidad de pertecnecio adicionada, así como el tiempo y temperatura de incubación son factores que ayudan a que se lleve a cabo la unión entre el ^{99m}Tc y el conjugado HYNIC-RGD y hacen que el complejo formado sea estable; por lo cual deben controlarse ya que de no ser así se puede ver afectada la formación de la molécula.



La concentración de cloruro estano también es un factor relevante para la formación del complejo con tecnecio, ya que éste es reducido de su estado de oxidación VII a una valencia menor para posteriormente formar el complejo con el conjugado HYNIC-RGD [26].

Como se mencionó anteriormente se emplearon dos coligantes simultáneamente, EDDA y tricina, así fue posible completar la esfera de coordinación del tecnecio, ya que el EDDA sólo puede ocupar dos sitios de coordinación del tecnecio [19, 22].

La presencia de las impurezas generadas durante el radiomarcaje se debe principalmente a:

Impureza Generadas

Tecnecio libre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Tecnecio hidrolizado ($^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Coligantes (^{99m}Tc -EDDA y ^{99m}Tc -Tricina)

Causa

No hay suficiente agente reductor (SnCl_2)

No existe suficiente ligante reactivo

Hidrofílicos

4.8 Optimización de la formulación

Se tomó como referencia la formulación del núcleo-equipo HYNIC-TOC desarrollada por Ferro-Flores, et.al; 2005 [17], sólo se modificó la cantidad adicionada del conjugado HYNIC-RGD. En la tabla 17 se presenta la pureza radioquímica del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD con diferentes concentraciones de HYNIC-RGD. En la figura 24 se muestran los cromatogramas obtenidos.

Tabla 17. Pureza radioquímica del complejo ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando diferentes cantidades de conjugado HYNIC-RGD.

Cantidad adicionada de conjugado HYNIC-RGD	t_R del complejo (min)	Pureza Radioquímica	% de Impurezas
25 μg	11.06	90.08 %	9.22
50 μg	11.05	94.56 %	5.44
75 μg	11.08	96.76 %	2.24

Se obtuvo una pureza radioquímica mayor de 95 % empleando 75 μg del conjugado por lo cual ésta fue la concentración considerada para la formulación.

En el caso de la formulación del núcleo-equipo ^{99m}Tc -HYNIC-TOC Ferro-Flores, et.al; 2005 [17] obtuvieron una pureza radioquímica mayor de 95 % adicionando 25 μg del conjugado HYNIC-TOC. A pesar de que los componentes de la formulación son los mismos no se puede hacer una comparación, ya que la estructura de ambos péptidos es muy diferente, así como su pureza química de la materia prima. Esto es debido a que la estructura de la bombesina es un péptido lineal, mientras que el RGD es un péptido cíclico [77, 78].

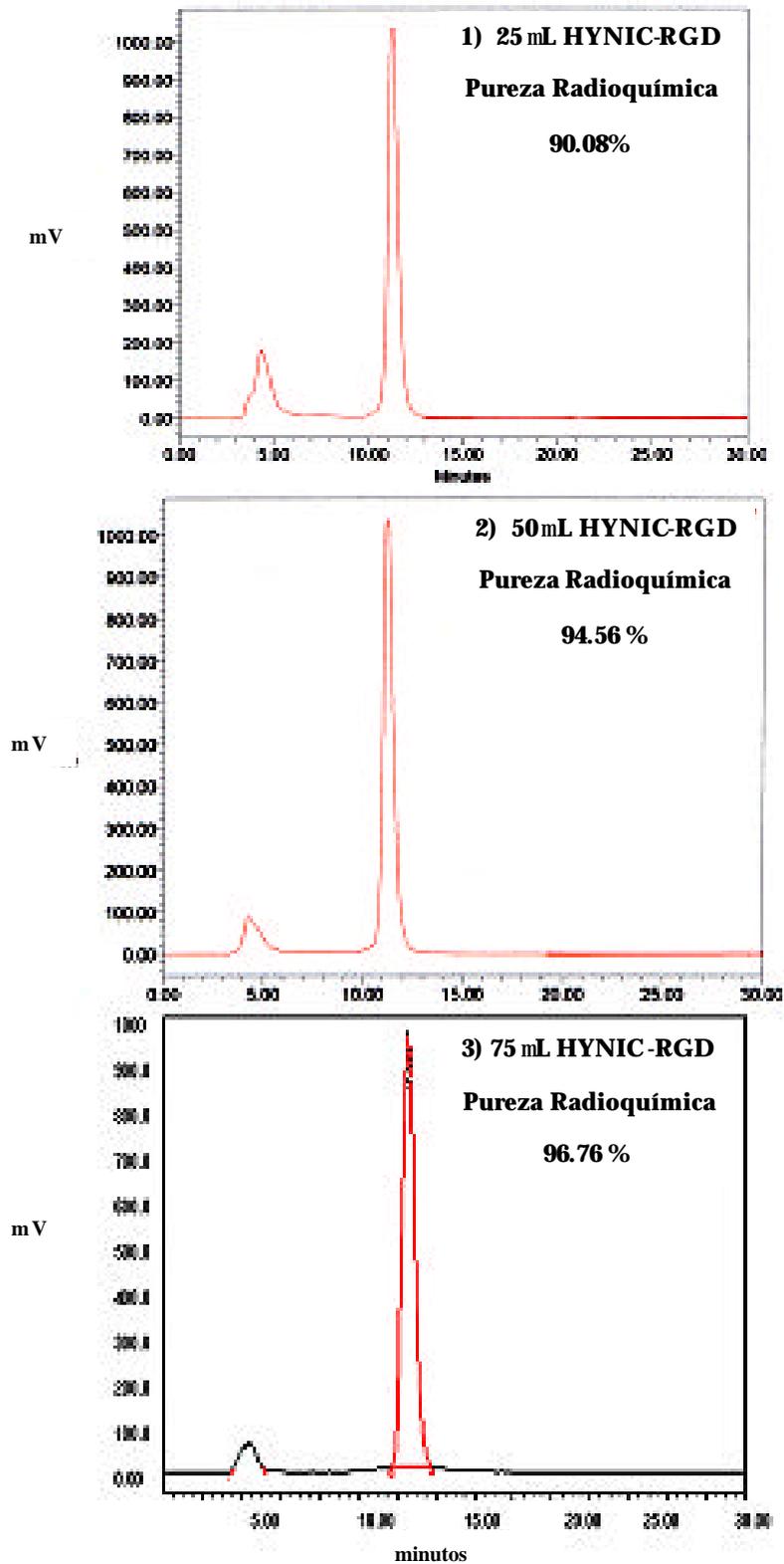


Figura 24. Cromatograma obtenidos adicionando diferentes cantidades de conjugado HYNIC-RGD a la formulación liofilizada.



Para la preparación del núcleo-equipos es importante que la concentración del conjugado HYNIC-RGD presente en la formulación sea la adecuada, así se obtendrá una pureza radioquímica alta y la cantidad de tecnecio libre y coligantes será menor; esto siempre y cuando se cuiden los demás factores antes mencionados. En la tabla 17 se muestra el porcentaje de impurezas presentes según la cantidad adicionada de conjugado, éstas deben ser menores del 10 % [11]. En todos los casos las impurezas fueron menores al 10 % pero se obtuvo una pureza radioquímica mayor al 95 % adicionando 75 μg del conjugado HYNIC-RGD.

4.9 Validación del sistema y del método analítico para la caracterización del conjugado HYNIC-RGD

4.9.1 Linealidad del sistema

La tabla 18 muestra las diferentes concentraciones consideradas para realizar la curva de linealidad del sistema y las áreas obtenidas para cada una. Se consideraron 5 niveles de concentración en donde el punto central corresponde a la cantidad de conjugado presente en la formulación. Para construir la curva de linealidad del sistema (figura 25) se graficó la concentración del conjugado contra el área. Se calcularon diferentes parámetros estadísticos los cuales se muestran en la tabla 19.

Para el análisis de los datos se empleó la regresión lineal, ya que es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables [79,80] en este caso entre la concentración de conjugado HYNIC-RGD (X) y la respuesta analítica (Y).

La figura 25 tiene un comportamiento lineal, la respuesta detectada (área) es directamente proporcional a la concentración del conjugado HYNIC-RGD. Lo cual indica que existe una dependencia de la variable Y con respecto a la variable X [80].

En base a los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB's, en la tabla 19 se observa que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 por lo que el cumple con la especificación. Además el IC para la pendiente no incluye al cero, por lo cual el sistema es lineal [67, 68].



Tabla 18. Resultados de la linealidad del sistema.

Nivel (%)	Concentración del conjugado (mg/mL)	Área (UA)	Área Promedio (UA)
60	45	1864748	1856860.00
		1866129	
		1839703	
80	60	2215496	2214881.67
		2214780	
		2214369	
100	75	2670581	2662660.03
		2656793	
		2660607	
120	90	3118561	3120414.68
		3124354	
		3118329	
140	105	3425689	3412805.00
		3415297	
		3397429	

Ecuación de la recta $y = 26783x + 644813$

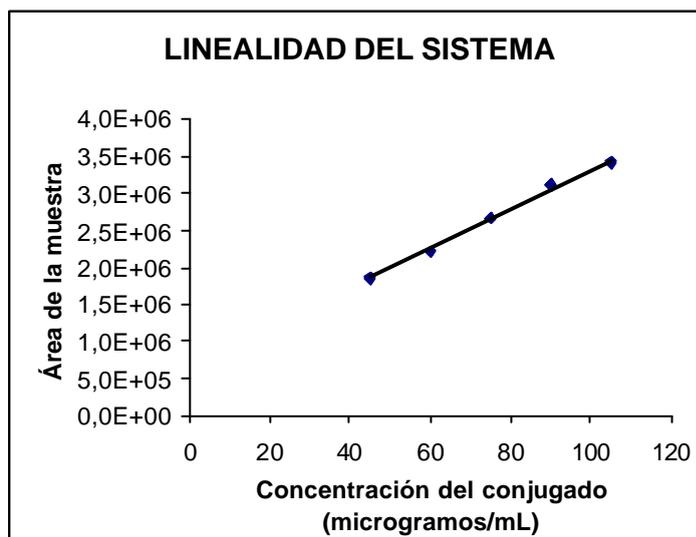


Figura 25. Curva de linealidad del sistema.



Tabla 19. Parámetros estadísticos para evaluar la linealidad del sistema.

Parámetro estadístico	Criterio de aceptación	Resultado
r^2	> 0.98	0.9951
IC para la pendiente (β_1)	No incluye el cero	(10770.94, 78547.47)

4.9.2 Precisión del sistema

De una solución cuya concentración representa el 100 % se inyectó por sextuplicado para determinar la precisión del sistema. En la tabla 20 se registró el área obtenida de cada inyección, se obtuvo la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El coeficiente de variación entre las inyecciones es menor de 1.5%, lo cual indica que el sistema es preciso, es decir, que existe un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos individualmente [68].

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación [79].

Tabla 20. Resultados de la precisión del sistema.

No de muestras	Respuesta (UA)
1	2670581
2	2656793
3	2612473
4	2678322
5	2660607
6	2675076
PROMEDIO	2658975.33
s	24240.91
C.V.	0.91 %

4.9.3 Exactitud y repetibilidad del método

Se analizaron por sextuplicado muestras cuya concentración fue de 75 $\mu\text{g/mL}$. Con las áreas obtenidas para cada muestra se calculó la cantidad recuperada de conjugado así como el porcentaje de recobro, obteniéndose una media de 99.87 % (ver tabla 21). Este valor se encuentra dentro del intervalo de 98-102 % [67, 68], mientras que el coeficiente de variación fue menor de 1.5 % y el intervalo de confianza para la media poblacional incluye al 100 % [67, 69]. Con lo anterior se puede decir que el método es exacto y repetible.



Tabla 21. Resultados del porcentaje de recobro del conjugado.

Muestra	Respuesta (UA)	μg adicionado de conjugado	μg recuperados de conjugado	% de recobro
1	2626689	75	74.1	98.78 %
2	2680893	75	75.6	100.80%
3	2638718	75	74.4	99.23 %
4	2656793	75	74.9	99.91 %
5	2660607	75	75.1	100.06 %
6	2670581	75	75.3	100.43 %
Promedio		----	74.9	99.87%
Desv. Estándar		----	----	0.76
Coefficiente de Variación		----	----	0.75

4.9.4 Especificidad del método

Los resultados obtenidos con el método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa, muestra que este es específico para la detección y cuantificación del analito de interés (conjugado HYNI-RGD) ya que no se observa ninguna señal en el tiempo de retención del conjugado debida a algún componente de la formulación, al diluyente o a la fase móvil.

Por otra parte, la especificidad del método también se puede comprobar mediante la linealidad del sistema, ya que la señal detectada en el tiempo de retención del conjugado aumentó proporcionalmente con la concentración de este [68].

En la figura 26 se presenta el cromatograma obtenido del conjugado, el t_R del analito fue de 10.65 min y se puede apreciar que no existe ninguna otra señal que intervenga con la del compuesto de interés.

En la tabla 22 se muestra el área y el tiempo de retención del conjugado, ya que fue la única señal detectada; al inyectar la fase móvil, el placebo y el diluyente de la muestra sólo se observó ruido; por lo cual los demás componentes de la formulación no intervienen en la señal detectada y el método es específico para la cuantificación del conjugado HYNIC-RGD.

Tabla 22. Resultados de la especificidad del método.

Muestra	Respuesta (areas) t_r
Diluyente	No se detectó señal
Fase Móvil	No se detectó señal
Placebo Total	No se detectó señal
Placebo+Conjugado	t_r 11.2 min y Area =1628710 UA

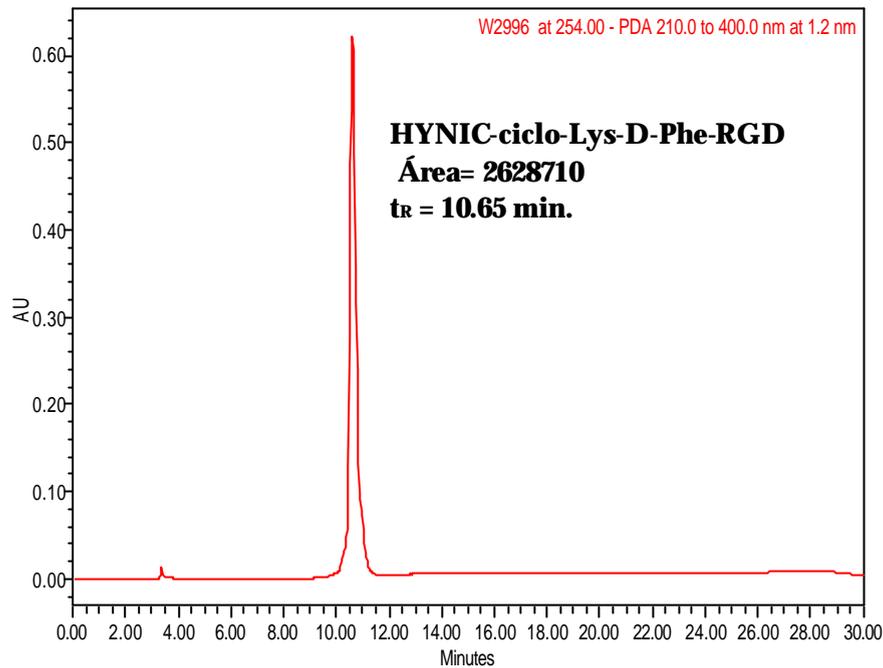


Figura 26. Cromatograma del conjugado HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD (No se observó ninguna señal debida a algún componente de la formulación, fase móvil, diluyente o productos de degradación en el tiempo de retención del conjugado).

4.9.5 Linealidad del método

En el caso de la linealidad del método las muestras fueron preparadas mediante pesadas independientes para cada nivel de concentración. Primero se graficó la concentración de analito presente en la muestra contra la respuesta registrada (figura 28). Además se calculó el porcentaje de recobro del conjugado HYNIC-RGD y se graficó la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada (figura 28).

Para el caso de la curva de linealidad del método se obtuvo la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación y otros parámetros estadísticos que permitieron calcular el intervalo de confianza para la pendiente [$C(\beta_0)$], los cuales se muestran en la tabla 24. El coeficiente de determinación de la curva es mayor a 0.98, mientras que el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero [68], con lo cual se afirma que el método es lineal para la cuantificación del conjugado HYNIC-RGD.

En la figura 27 se observa que el área registrada es proporcional a la concentración del analito y que los demás componentes presentes en la formulación no influyen en la señal registrada del compuesto.



Tabla 23. Resultados de la linealidad del método.

Nivel (%)	Concentración del Conjugado (mg/mL)	Respuesta (UA)	Cantidad de Conjugado recuperado (mg)	Porcentaje de Recobro
60	40	1842005	44.64	99.20 %
		1843243	44.67	99.27 %
		1841592	44.63	99.18 %
80	60	2191995	60.10	100.17 %
		2207129	59.79	99.65 %
		2189780	60.05	100.08 %
100	75	2655205	74.79	99.72 %
		2658045	74.87	99.83 %
		2664790	75.06	100.08 %
120	90	3084703	89.56	99.51 %
		3087487	89.72	99.69 %
		3100652	89.72	99.69 %
140	105	3401104	104.64	99.66 %
		3407280	104.83	99.84 %
		3404354	104.74	99.75 %

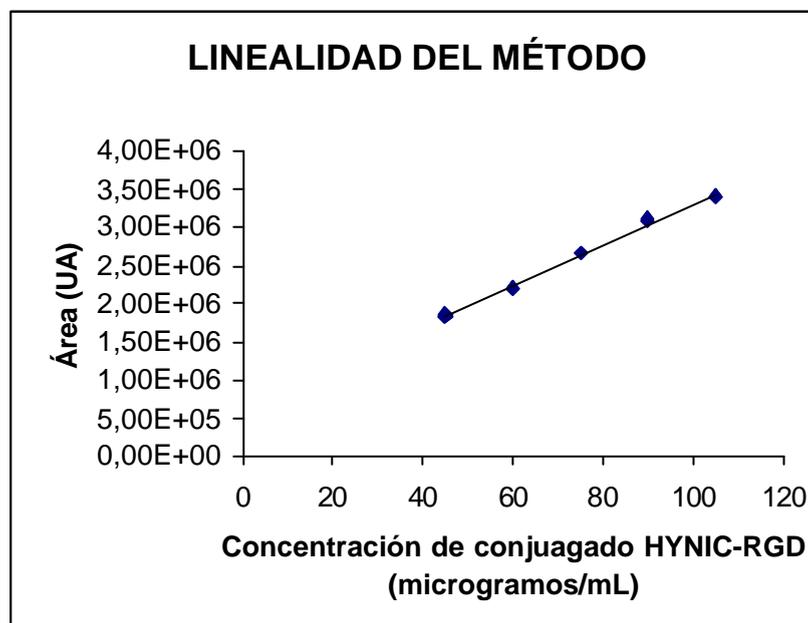


Figura 27. Curva de linealidad del método.



Tabla 24. Parámetros estadísticos para evaluar la linealidad del método.

Parámetro	Resultado
Ecuación de la recta	$y = 26791x + 629335$
r^2	0.9961
b_1	26790.52
b_0	629335.27
Sy/x	40191.85
Sb_1	489.20
Sb_0	38129.33
$IC(\beta_1)$	546960.66, 711709.88

$$IC(b_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} Sb_0$$
$$t_{0.975, n-2} = 2.1604$$

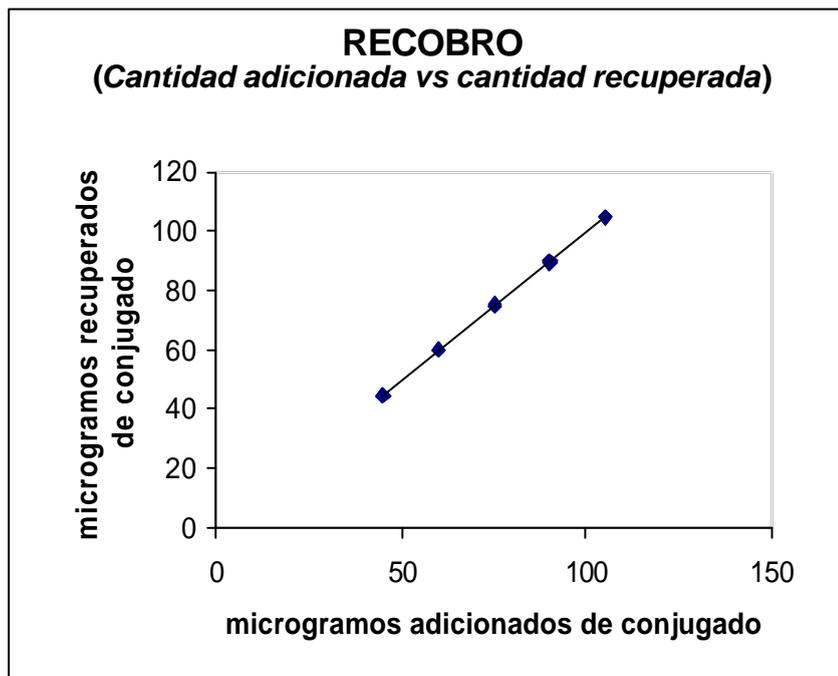


Figura 28. Curva de Recobro.

En la figura 28 se muestra relación entre los μg adicionados y los recuperados del conjugado HYNIC-RGD. Mediante el cálculo de los μg recuperados fue posible calcular el porcentaje de recobro. Por ello se sabe que el porcentaje de recobro está en función de los μg recuperados y estos así mismo de los adicionados, ya que a medida que aumenta la concentración de conjugado en la muestra es mayor la cantidad recuperada.



En la tabla 25 se reportan los resultados de los parámetros estadísticos calculados del conjugado recuperado vs conjugado adicionado, el coeficiente de determinación es mayor de 0.98, el IC (β_1) incluye la unidad y el IC (β_0) incluye al cero. El coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor de 2 %.

En la tabla 26 se presentan los resultados del porcentaje de recobro; el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluye en el intervalo de 98 a 102 % y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor a 2 %.

Mediante el coeficiente de variación fue posible evaluar la variabilidad de los datos, en este caso del porcentaje de recobro [79]. Lo que indica que los resultados obtenidos no se encuentran muy dispersos, ya que el valor de este parámetro estadístico fue de 0.26 %.

Tabla 25. Resultados de la cantidad adicionada vs cantidad recuperada de conjugado HYNIC-RGD.

Parámetro	Resultado
Ecuación de la recta	$y = 0.9991x - 0.146$
r^2	0.9993
b_1	0.9991
b_0	-0.15
$S_{y/x}$	0.20
S_{b_1}	0.0024
IC(β_1)	0.99, 1.00
S_{b_0}	0.19
IC(B_0)	0.26, 0.55
$CV_{y/x}$	0.26

Tabla 26. Parámetros estadísticos del porcentaje de recobro del conjugado HYNIC-RGD.

Parámetro	Resultado
Media aritmética	99.69%
S	0.30
CV	0.30 %
IC(μ)	

En general la validación del sistema y del método analítico permitió saber si el método cromatográfico empleado es el adecuado para la caracterización y cuantificación del analito de interés (conjugado HYNIC-RGD). Según los datos obtenidos el método analítico empleado es lineal, preciso y exacto para la cuantificación del conjugado HYNIC-RGD.



4.9.6 Precisión intermedia del método

De los resultados obtenidos en la precisión del sistema se calculó el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos por los dos analistas en diferentes días (tabla 27). El valor del coeficiente de variación fue de 0.35, el cual es menor de 2 %, por lo que el método es preciso empleando el mismo equipo y las mismas condiciones de trabajo y el error de los analistas no influye significativamente en la cuantificación del analito [68, 69].

Existen muchas fuentes de error las cuales pueden intervenir en un análisis, como por ejemplo el equipo, el analista, entre otros. En este caso se midió que tanto influye el error del analista en la medición, empleándose para ello el coeficiente de variación. Basándose en este dato estadístico se puede ver que no existe una gran diferencia entre el análisis de una muestra homogénea realizado en diferentes días y por diferentes analistas.

Tabla 27. Resultado de la precisión intermedia.

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	99.45 %	98.93 %
		99.38 %	99.32 %
		98.88 %	98.96 %
	2	99.36 %	98.76 %
		98.87 %	99.89 %
		98.93 %	98.86 %
Media aritmética		99.13 %	
S		0.34	
CV		0.35	

4.10 Resultados pruebas de control de calidad del núcleo-equipo

Las pruebas de control de calidad de radiofármacos son muy importantes antes de su administración a los pacientes. Como se mencionó anteriormente las pruebas se dividen en fisicoquímicas y biológicas. En la tabla 28 se muestran los resultados del control de calidad del núcleo-equipo HYNIC-RGD.

Apariencia: La apariencia del liofilizado fue una pastilla bien formada de color blanco y libre de partículas extrañas. Si los componentes no son estables la muestra puede sufrir cambios debido a diferentes reacciones como de reducción, oxidación o absorción de humedad lo cual se vería reflejado en una variación del color, textura, etc [11].



Tabla 28. Resultados de las pruebas fisicoquímicas del núcleo-equipo HYNIC-RGD.

Parámetros a ser evaluados	Especificación	Resultados
Apariencia	Solución acuosa, transparente e incolora, libre de partículas visibles	Cumple con la especificación
pH	5.4 ± 1.0	6.0
Pureza radioquímica	No menor al 90%	Mayor de 95 %
Prueba de pirógenos	> a 175 eu/mL	Negativa
Esterilidad	Positiva	Positiva

Determinación del pH: La medición del pH se realizó empleando papel pHmetro, para ello se reconstituyó el liofilizado con 1mL de solución de buffer de fosfatos 0.2 M pH 7. El control del pH del núcleo-equipo es importante ya que el radiofármaco es administrado por vía intravenosa.

El método más exacto para determinación del pH con un menor grado de error es el potenciométrico, pero en los hospitales la forma más factible es empleando papel pHmetro, además de ser confiable y muy utilizado a nivel de farmacia hospitalaria, en donde se realiza la administración del radiofármaco a los pacientes, por ello es que se decidió emplear este método [11].

Determinación de la pureza radioquímica: La pureza radioquímica se determinó empleando 3 métodos diferentes RP-HPLC, ITLC-SG y cartucho Sep-Pak; en todos los casos fue mayor de 95 %. Los resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Resultados de la pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando 3 métodos diferentes.

Método empleado	Pureza radioquímica
ITLC-SG	96.16 %
Cartucho Sep-Pak	95.74 %
%HPLC	96.18 %

En cuanto a los tres métodos empleados para la determinación de la pureza radioquímica del radiofármaco, podemos observar que la diferencia entre los tres valores obtenidos por distintos métodos no es muy significativa, por lo cual, cualquiera de ellos podría ser empleado. El más exacto y preciso es el de RP-HPLC, pero es más costoso, requiere de un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de centelleo y el tiempo de análisis es largo, lo cual representa un inconveniente a nivel de farmacia hospitalaria, ya que usualmente no se cuenta el equipo necesario para el análisis.



En el caso del método empleando cartucho Sep-Pak el principio del análisis es el mismo, se requiere de un menor tiempo y es más barato que el de RP-HPLC. Para el método de cromatografía en capa fina (ITLC-SG) también se requiere un menor tiempo de análisis y además se pueden determinar específicamente cada una de las impurezas formadas durante el marcado del radiofármaco, lo cual no podemos hacer con la RP-HPLC. Por lo anterior podemos decir que el método más conveniente para la determinación de la pureza radioquímica del radiofármaco es el de cromatografía en capa fina, ya que es un método rápido, barato y que nos brinda resultados confiables, además de que puede ser empleado fácilmente en un hospital antes de administrar al paciente.

También se determinaron las impurezas generadas durante la marcación del núcleo-equipo. En la tabla 30 podemos observar que el porcentaje de impurezas formadas es menor del 10 % [11].

Tabla 30. Impurezas generadas durante el marcado del conjugado HYNIC-RGD con ^{99m}Tc empleando como coligantes EDDA/Tricina.

Fase móvil	Impurezas generadas	Porcentaje (%)
2-Butanona	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1.46 %
Citrato de sodio	^{99m}Tc unido a coligantes	2.12 %
Metanol:acetato de amonio v/v (1:1)	Coloide	0.26 %

La estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD fue evaluada a diferentes tiempos, en la tabla 31 se observa que no presenta gran variación con el paso del tiempo, con lo cual se sabe que el complejo formado es estable en el periodo de tiempo probado (0.5 a 6 horas).

Tabla 31. Resultados de la estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD.

Tiempo (horas)	Pureza Radioquímica
0.5	96.58 %
1.0	96.55 %
2.0	96.56 %
3.0	96.48 %
4.0	96.51 %
5.0	96.47 %
6.0	96.45 %

Prueba de Pirógenos: La determinación de pirógenos se realizó empleando el reactivo de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), el cual se caracteriza por la formación de una masa de gel ante la presencia de endotoxinas. La prueba fue negativa, ya que no se observó la formación de gel.



Tabla 32. Resultados de la prueba de esterilidad.

Medio de cultivo	Tipo de Microorganismo	Resultado
Caldo de soya-tripticaseína	Aerobio	Negativo
Medio fluído de tioglicolato de sodio	Anaerobios facultativos	Negativo

Prueba de esterilidad: Los medios de cultivo fueron incubados durante 14 días y después de este tiempo los resultados obtenidos para la formulación liofilizada en esta prueba demuestran la ausencia de microorganismos viables en los dos medios de cultivo empleados para la determinación de la esterilidad del núcleo-equipos (tabla 32).

Las pruebas de esterilidad y de pirógenos fueron negativas ante el crecimiento bacteriano y los productos de su metabolismo, estas fueron un indicativo de que la fabricación del núcleo-equipos se llevo a cabo bajo condiciones asépticas y se siguieron todos los procedimientos indicados [12].

Evaluación *in vivo*: A continuación en la tabla 33 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación *in vivo* del complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD en ratones atímicos con tumores inducidos a partir de células A4R42J (figura 29).

Tabla 33. Radiactividad promedio en los diferentes órganos de los ratones sacrificados a diferentes tiempos después de la administración del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD.

Órganos	1 h % ID/g	3 h % ID/g	24 h % ID/g
Sangre	2.86 ± 0.87	0.31 ± 0.25	0.07 ± 0.02
Corazón	0.86 ± 0.22	0.33 ± 0.15	0.14 ± 0.01
Pulmón	1.57 ± 0.24	1.05 ± 0.30	0.32 ± 0.03
Hígado	2.79 ± 0.79	2.31 ± 0.80	0.73 ± 0.29
Bazo	1.09 ± 0.35	1.11 ± 0.37	0.50 ± 0.21
Páncreas	0.88 ± 0.23	0.46 ± 0.14	0.16 ± 0.04
Riñones	9.75 ± 3.89	2.65 ± 4.50	1.22 ± 0.39
Intestino	3.42 ± 0.92	3.50 ± 1.39	1.46 ± 0.49
Músculo	1.09 ± 0.38	0.33 ± 0.31	0.17 ± 0.03
Hueso	0.66 ± 0.05	0.80 ± 0.24	0.25 ± 0.04
Tumor	2.84 ± 0.70	2.15 ± 0.68	0.51 ± 0.02



Los órganos con mayor radiactividad fueron sangre, hígado, intestino, tumor y riñones. A la primera hora el radiofármaco se excretó principalmente por vía renal y en menor cantidad vía intestinal. En el caso de la sangre a la primera hora la radiactividad es alta, pero a las 3 y 24 horas el radiofármaco mostró una baja retención sanguínea.

Se detectó una alta captación del radiofármaco en el hígado, lo cual probablemente pudo deberse a la alta polaridad de la molécula. Decristoforo C, et.al., 2006 [78] reportaron un estudio realizado con el radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD empleando como coligantes EDDA y tricina, en donde la D-Phe se sustituyó por la Tyr. Ésta molécula tiene una mayor polaridad, la cual es conferida por la Tyr, lo anterior se confirmó mediante el análisis empleando RP-HPLC, donde el complejo tuvo un tiempo de retención mayor ($t_{R}= 16$ min). A pesar de ello, el radiofármaco tuvo una alta excreción renal, baja captación en hígado y músculo, así como baja excreción intestinal.

Además se han realizado diversos estudios de radiofármacos empleando el péptido c(RGDfK), ya sea con un monómero, dímero o tetrámero [51,52] y se reportó una alta excreción renal y baja captación en hígado, lo cual sugiere que la molécula es poco polar [53]. Los resultados obtenidos en este experimento no concordaron con lo reportado en la bibliografía. Debido a ello se consideró que sería importante realizar una repetición del estudio de biodistribución en ratones atímicos, ya que por un error técnico la medición de la radiactividad no se realizó de forma inmediata al extraer los órganos del ratón, sino hasta el siguiente día, lo cual se considera que puede ser una fuente de error.

La repetición del experimento podría confirmar los resultados obtenidos y de tal forma se descartaría el error en la cuantificación de la radiactividad, así se podría discernir de una mejor manera el comportamiento del radiofármaco.



Figura 29. Ratón atímico con tumor inducido con células 4R42J.

Después de la administración del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD se determinó la actividad promedio de cada uno de los órganos extraídos a diferentes tiempos (1, 3 y 24 horas), también se calculó la relación entre la cantidad captada en el tumor (figura 30) y en cada uno de los órganos con mayor radiactividad (tabla 34).



Figura 30. Extracción del tumor de células 4R42J después de la administración del radiofármaco.

En la tabla 34 podemos apreciar que a la primera hora después de que los ratones fueron administrados la relación entre el tumor/sangre es pequeña (menor de 1), así mismo en el caso del tumor/riñón.

Tabla 34. Relación de la radiactividad entre el tumor y diferentes órganos del ratón.

Relaciones	1 h	3 h	24 h
tumor/sangre	0.99 ± 0.87	6.93 ± 0.25	7.29 ± 0.02
tumor/musc	2.61 ± 2.15	6.52 ± 2.15	3.00 ± 2.15
tumor/ riñón	0.29 ± 3.89	0.81 ± 4.50	0.42 ± 0.39
tumor/hígado	1.02 ± 0.79	0.93 ± 0.80	0.70 ± 0.29
tumor /intestino	0.83 ± 0.92	0.61 ± 1.39	0.34 ± 0.49

A medida que el radiofármaco es absorbido la relación tumor/sangre se incrementa, a las 3 horas es mayor a 6, lo que indica que en una imagen diagnóstica el contraste para visualizar la masa tumoral será excelente puesto que no habrá radiación de fondo elevada debido a la perfusión sanguínea en el organismo [22]. Sin embargo la relación en tumor/riñón es menor a 1 debido a la alta excreción renal conferida por la carga de la lisina, por lo que sería difícil detectar tumores primarios o sus metástasis en riñones. A las 24 horas se observó que la relación tumor /sangre es aún mayor, por lo que sería conveniente si se administrara en pacientes, que se realizara un rastreo de cuerpo entero a las 2 h y otro a las 24 h para asegurar un resultado diagnóstico más confiable.

Las relaciones tumor/músculo y tumor/sangre mayores a 1 indican que habrá contraste para detectar lesiones tumorales por ejemplo usando SPECT (o sea en cortes tomográficos). Si fuera una sola imagen plana y el tumor estuviera sobre el hígado, tal vez sería muy difícil detectar la lesión.



Capítulo 5. Conclusiones



Conclusiones

Las moléculas del péptido RGD, conjugado HYNIC-RGD y complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD mostraron ser estables, esto de acuerdo al calor de formación de cada una y a su comportamiento durante la síntesis y marcado del conjugado.

La síntesis del conjugado se dio de manera adecuada empleando el grupo de bloque Boc y retirándolo posteriormente con TFA sin que ello afectara la unión entre aminoácidos. El conjugado HYNIC-RGD se purificó empleando cromatografía de líquidos en fase reversa como método de análisis. Con la validación del sistema y del método se demostró que es preciso, exacto, lineal y específico para cuantificar y caracterizar el analito de interés.

La optimización de la formulación del núcleo-equipo HYNIC-TOC desarrollada por Ferro-Flores, et.al; 2005 [17]; permitió que el radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD tuviera una pureza radioquímica mayor de 95 %, esto se logró adicionando 75 μg del conjugado. Los factores relevantes para el diseño de la formulación fueron la concentración de coligantes y cloruro estanoso. Es importante mencionar que aunque la combinación de HYNIC y EDDA en las formulaciones de péptidos para diagnóstico ya han sido reportadas anteriormente, cada péptido tiene una secuencia diferente y, en consecuencia, el efecto estérico, la carga, los ángulos de enlace y la distribución de carga puede interferir contundentemente para la obtención final de un radiofármaco con alta pureza radioquímica. En el caso especial del RGD es muy importante mencionar su estructura cíclica en comparación por ejemplo con la bombesina.

El control de calidad del núcleo-equipo mostró una apariencia adecuada, un pH de 6.0, las pruebas de esterilidad y pirógenos fueron negativas.

En cuanto al radiomarcado del conjugado, durante el proceso se generaron impurezas, éstas fueron: tecnecio libre, tecnecio hidrolizado y coligantes libres, generándose en un porcentaje menor al 5 %.

El complejo ^{99m}Tc -HYNIC/EDDA-RGD mostró una buena estabilidad *in vitro* hasta por 6 horas después de su preparación. Las pruebas de biodistribución mostraron que el radiofármaco conserva su reconocimiento biológico ya que tuvo una alta captación por el tumor inducido en los ratones atómicos. Es necesario que para confirmar la unión específica del radiofármaco a sus receptores se realice un estudio de saturación.

La radiactividad detectada en diferentes órganos no se debe a que el radiofármaco se haya unido específicamente a ellos, sino más bien, es a causa de las propiedades fisicoquímicas de la molécula.



El radiofármaco tuvo una alta excreción renal y baja retención en sangre. Su captación fue menor en músculo en comparación con el hígado. La excreción intestinal 3 y 24 horas postinyección fue mayor en comparación con la renal.

En general, se puede concluir que se cumplió el objetivo de este trabajo, ya que se demostró que el radiofármaco es útil para el diagnóstico de tumores primarios. Con lo anterior se puede proponer el uso del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD para la detección de tumores primarios y por ende sus metástasis, los cuales son sitios específicos de angiogénesis.



Capítulo 6. Perspectivas



Una vez que el radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD cumplió con las pruebas de control de calidad y se hicieron estudios de biodistribución en ratones se propone la realización de:

- 1) Corroborar la biodistribución del radiofármaco realizando un segundo experimento, ya que a causa de diversos factores no fue posible su realización. Así podremos confirmar lo reportado en la bibliografía.
- 2) Corroborar la especificidad *in vivo*, administrando el radiofármaco a dos grupos de ratones con tumores inducidos, de los cuales uno de ellos debe ser bloqueado previamente con un exceso de RGD sin marcar con la finalidad de saturar los receptores específicos. La diferencia significativa en la captación de ^{99m}Tc -HYNIC-RGD en el tumor entre ambos grupos, establecerá si existe un mecanismo específico.
- 3) Con la finalidad de evaluar si el ^{99m}Tc -HYNIC-RGD puede ser útil en la detección **específica** de una gran variedad de tumores, sería conveniente realizar un estudio comparativo entre el ^{99m}Tc -HYNIC-RGD, el ^{99m}Tc -HYNIC-TOC (específico para receptores de somatostatina, útil en cáncer pulmonar) y el ^{99m}Tc -HYNIC-Lys3-BN (específico para receptores del péptido liberador de gastrina, útil en cáncer de mama y próstata) en los diferentes tipos de tumores evaluando la captación tumoral de cada radiofármaco.
- 4) Realizar la prueba de seguridad general para fármacos en concordancia con la 8ª. Edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (MGA0795).
- 5) Realizar los estudios de biocinética y de dosimetría en humanos del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-RGD.
- 6) Evaluar la sensibilidad y especificidad de ^{99m}Tc -HYNIC-RGD en estudios clínicos diagnósticos de tumores primarios y sus metástasis.
- 7) Realizar pruebas de estabilidad en anaquel del núcleo-equipos HYNIC-RGD.



Capítulo 7.

Referencias bibliográficas



- 1) Riccabona G, Decristoforo C. Peptide targeted imaging of cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 18:675-87; **(2003)**.
- 2) Heppeler A, Froidevaux S, Eberle AN, Maecke HR. Receptor targeting for tumor localization and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem.* 7: 971-94; **(2000)**.
- 3) Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnostic and therapy. *Endocr Rev.* 24:389-427; **(2003)**.
- 4) Haubner R, Wester HJ. Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis an evaluation of anti-angiogenic therapies. *Curr. Pharm. Des.* 7:971-94; **(2004)**.
- 5) Haubner R. $\alpha\beta_3$ -Integrin imagin: a new approach to characterize angiogénesis? *Eur. J Nucl. Med. Mol. Imaging.* 33 (Suppl 13): 54-63; **(2006)**.
- 6) Felding-Habermann B, Mueller BM, RomerDAHL ca, Cheresch DA. Involvement of integrin $\alpha_v\beta_3$ gene expression in human melanoma tumourigenicity. *J. Clin Invest.* 89:2018-22; **(1992)**.
- 7) Aumailley M, Gurrath M, Muller G, Calvete J, Timpl R, Kessler H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* 291:50-4; **(1991)**.
- 8) Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, et.al. radiolabeled $\alpha\beta_3$ integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* 40: 1061-71; **(1999)**.
- 9) Haubner R, Weber WA, Beer AJ, Vabuliene E, Reim D, Sarbia M, et.al. Noninvasive visualization of the activated $\alpha_v\beta_3$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [^{18}F]galacto-RGD. *PLoS Med.* 2:29; **(2005)**.
- 10) Liu S, Edwards DS. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* 99:2235-68; **(1999)**.
- 11) Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª edición. 2:793-803; **(2006)**.
- 12) Pharmacopeia USP XXI. 16ª ed. US. Pharmacopeical Convention Inc. 3002-331 **(1985)**.
- 13) Ferro-Flores G, Murphy AC and Meléndez AL. Third Generation Radiopharmaceuticals for Imaging and Targeted Therapy. *Current Pharm. Anal.* 1-30; **(2005)**.



- 14)** Félix J. Hospitales NISA. Hospital Universitario Dr. Peset. Medinuc. Manual de Med. Nuc. Valencia, España **(2006)**.
- 15)** Welch J.M and Redvanly S.C. Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and Applications. Editorial WILEY. Britain. 669-675, 3338; **(2003)**.
- 16)** Knight LC. In Handbook of Radiopharmaceuticals. Welch MJ and Redvanly CS eds. John Wiley & Sons. England. 643-684; **(2003)**.
- 17)** Gonzáles A, Ferro-Flores G, Murphy CA, Gutiérrez Z. Biokinetics and dosimetry in patients of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Tyr³-octreotide prepared from lyophilized kits. Appl. Rad. Isot. 64:792-797; **(2005)**.
- 18)** Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. American Pharmacist Association. Washington D.C. 217-220, 252-277, 281-285 **(2002)**.
- 19)** Mahmood A, Jones A.G. Handbook of Radiopharmaceuticals. Eds. John Wiley & Sons. England. 323-362; **(2003)**.
- 20)** Tisato F, Bolzati C, Porchia M, Refosco F. Mass Spectrometry Review. 23, 309; **(2004)**.
- 21)** Haberkorn U, Eisenhut M. Mol. Imaging . Eur. J. Nucl. Med. 32: 1354; **(2005)**.
- 22)** Perrier AC, Segré E. Some chemical properties of element 43. J Chem Physiol. 5:712; **(1937)**.
- 23)** Glasstone S. Sourcebook on Atomic Energy. 3rd ed. New York: Van Nostrand reinhold. 657-658; **(1967)**.
- 24)** Seaborg GR, Segré E. Nuclear isomerism of element 43. Phys Rev. 55: 808-814; **(1939)**.
- 25)** Harper PV, Lathrop KA, Gottschalk A. Pharmacodynamist of some technetium-99m preparations. In: Andrews GA, Knisely RM, Wagner HN Jr, eds. Radioactive Pharmaceuticals. Oak Ridge, TN:US Atomic Energy Commission. 335-358; **(1965)**.
- 26)** Murphy C.A, Ferro-Flores G. Compuestos del Tecnecio. 1^a edición. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran e Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México. 5-15, 115-140 **(2003)**.
- 27)** Zucchini G.L, Tarroni G, Marinelli M, Magon L. Tecnezio ^{99m}Tc Propiedades fisico chimiche. Produzione ed impiego in medicina nucleare. 106-128 **(1982)**.



- 28)** Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). La tecnología nuclear. Producción de radionucleidos. **(2006)**.
- 29)** Gennaro R.A. Remington Farmacia. 20^a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 548-542, 931-933; **(2003)**.
- 30)** Greenland, W.E.P, Blower P.J. Bioconjug. Chem. 16, 939; **(2005)**.
- 31)** Liu, S, Hsieh W.Y, Kim Y.S, Mohammed S.I. Bioconjug. Chem. 16:1580; **(2005)**.
- 32)** Liu, S, Ziegler M.C, Edwards D.S. Bioconjug. Chem. 11:113; **(2000)**.
- 33)** Murray K.R, Mayes A.P, Granner K.D, Rodwell W.V. Bioquímica de Harper. 15^a edición. Editorial Manual Moderno. México. 31-41, 43-54; **(2001)**.
- 34)** Morrison and Boy. Organic Chemistry. 14th edición. Editorial Ally and Bacon. United States of America. 1145-1148; **(1983)**.
- 35)** Reubi J.C. Endocrine reviews. 24:389; **(2003)**.
- 36)** Reubi J.C, Maecke H.R, Krenning E.P. J. Nucl. Med. 67S:46; **(2005)**.
- 37)** Cox D, Aoki T, Seki J, Motoyama Y and Yoshida K. The pharmacology of the integrins. Medicinal Research Reviews. 14:195-228; **(1994)**.
- 38)** Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. Cell. 69:11-25; **(1992)**.
- 39)** Cotran R.S, Kumar V. and Collins T. Pathologic Basis of Disease. 6^a edición. Editorial Interamericana. Philadelphia Pennsylvania. 59-62, 105-113, 316-320; **(1999)**.
- 40)** Bock M, Breuchertseifer F, Haubner R, Senekowitsch-Schmidtke R, Kessler H, Schwaiger M, Wester H.J. J. Nucl. Med. 41, 41P; **(2002)**.
- 41)** Haubner R, Wester HJ, Mang C, Senekowitsch-Schmidtke R, Kessler H and Schwaiger M. Synthesis and first evaluation of a [18F]SAA-labeled RGD-peptide for monitorin the avb3 integrin expression. J. Nucl. Med., 41, 42P; **(1999)**.
- 42)** Strömbland S and Cheresh DA. Cell adhesion and angiogenesis. Trends Cell. Biol. 462-468; **(1996)**.
- 43)** Varner JA and Cheresh DA. Integrins and Cancer. Curr. Opin. Cell. Biol. 8:724-730; **(1996)**.



- 44)** Liu S, Edwards DS, Ziegler MC, Harris AR, Heminway SJ and Barret JA. ^{99m}Tc -labeling of a hidrazino nicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors. *Bioconjugate Chem.* 8:621-636; **(2001)**.
- 45)** Burgess K, Lim D and Mousa SA. Synthesis and solutions conformation of cyclo [RGDRGD]: A cyclic peptide with selectivity for the $\alpha\beta_3$ receptor. *J. Med. Chem.* 39:4520-4526; **(1996)**.
- 46)** Koivunen E, Wang B and Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes. Ligands specificities of the RGD-directed integrins. *Biol Technology.* 13:265-270; **(1995)**.
- 47)** Ellerby HM, Arap W, ellerby LM, andrusiak R, del rio G, Krajewski S, Lombardo CR, Rao R, Ruoslahti E, Bredesen DE and Pasqualini R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature Medicine.* 5:1032-1038; **(1999)**.
- 48)** Pfaff M, Tangemman K, Müller B, Gurrath M, Müller G, Kessler H, Timpl R and Engel J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha\beta_3$ and $\alpha\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.*, 269:2233-2238; **(1994)**.
- 49)** Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA and cheres DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. *Science.* 270:1500-1502; **(1995)**.
- 50)** Brooks PC, Montgomery AMP, Rosendfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G and Cheresch DA. Integrin $\alpha\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.* 79:1157-1164; **(1994)**.
- 51)** Rajodpadhye M, Overoye KL, Nguyen HM, Liu S, Edwards DS, Onthank D and Barrett JA. The synthesis and evaluation of the ^{99m}Tc complexes of cyclic RGD-peptide antagonists of the integrin $\alpha\beta_3$. *Nucl. Med. Commun.* 21:577; **(2000)**.
- 52)** Barret JA, Crocker AC, Onthank DC, Heminway S, Rajopadhye m, Liu S, bartis J and Edwards DS (200) RP593, a ^{99m}Tc -labeled $\alpha\beta_3/\alpha\beta_5$ antagonist, rapidly detects spontaneous tumors in mice and dogs. *J. Nuc. Med.* 471:34P; **(2000)**.
- 53)** Janssen M, Oyen W, Edwards D, Barret J, Rajopadhye M, Liu S, Massuger L, Boonstra H, Corstens F and Boerman O. Comparative Biodistribucion between a monomeric and dimeric analogue of an ^{99m}Tc labeled RGD peptide. *J. Nucl. Med.* 42:126P; **(2001)**.
- 54)** Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-SSA1-2004, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica Dedicados a la Fabricación de Medicamentos.



- 55)** Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos.
- 56)** Clark GW, Craig BD and Johnson RA. *Goth. Farmacología Clínica*. 12ª edición. Editorial Panamericana. México. 48-55; **(1991)**.
- 57)** Katzung GB. *Farmacología Básica y Clínica*. 5ª edición. Editorial Manual Moderno. México. 73-83; 81994).
- 58)** Thakur M, Lentle B.C. *Radiology*. 236, 753; **(2005)**.
- 59)** Eckelman WC, Mathis CA. *Nucl. Med. Biol.* 1-33; **(2006)**.
- 60)** Ma. Y, Eckelman WC, Huang BX, Channing MA. *Nucl. Med. Biol.* 29, 125; **(2002)**
- 61)** Greenland W.E.P, Blower P.J. *Bioconjug. Chem.* 16, 939; **(2005)**.
- 62)** Hyllbrant B, Tyrefors N, Markides K.E, Langstrom B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 493; **(1999)**.
- 63)** Ma. Y. Kiesewetter D.O, Jagoda E.M, Huang B.X, Eckelman W.C. *J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 319-766; **(2002)**.
- 64)** Kieffer D, Cleynhens B.J, Vanbilloen H.P, Rattat D, Terwinghe C.Y, Mortelmans L, Bormans G, Verbruggen A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 382; **(2006)**.
- 65)** Verduyck T, Kieffer D, Huyghe D, Cleynhens B, Verbeke K, Verbruggen A, Bormans G.J. *Pharm. Biomed. Anal.* 32, 669; **(2003)**.
- 66)** Guidline for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation. Food and Drug Administration. Center for Drugs and Biologics. **(1987)**.
- 67)** Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH Harmonised Tripartite Guidline. **(1996)**.
- 68)** Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. A.C. **(2002)**
- 69)** Guidline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures. **(1995)**.
- 70)** Skoog Douglas A. *Química Analítica*. 6ª edición .Ed mcGraw-Hill.México 418-554; **(1995)**.
- 71)** Prado F. Ma, Covarrubias H Ma. *Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución*. UAM-Xoch. México. 56-118; **(1996)**.
-



- 72)** Gary D.C. Analytical Chemistry. 6th edition. Ed. WILEY. United States. 555-574, 604-643; **(2004)**.
- 73)** Rubinson A.K, Rubinson F.J. Análisis Instrumental. 1^a edición. Ed. Prentice Hall. España. 872; **(2001)**.
- 74)** Quatrocchi, OA, Abelaira AS y Laba RF. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Merck. Buenos Aires 55-82 **(1992)**.
- 75)** Willard HH, Meritt JR LL, Dean JA y Settler JR FA. Métodos Instrumentales de análisis. Ed. Iberoamericana. México. 1-60; **(1991)**.
- 76)** Zinder LR. Principles of Adsorption Chromatography. Dekker. New Cork; **(1968)**.
- 77)** Ferro-Flores G, Murphy A.C, Rodríguez-Cortéz J, Pedraza-López M and Ramírez-Iglesias Ma. Preparation and evaluation of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-[Lys³]-Bombesin for imaging gastrin-releasing peptide receptor -positive tumours. J. Nuc. Med. 27: 371 -376; **(2005)**.
- 78)** Decristoforo C, Faintuch L.B, Rey A, von Guggenberg E, Rupprich M, Hernández G.I, Rodrigo T, Haubner R. [^{99m}Tc]HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. J. Nuc. Med and Biol. 33: 945-952; **(2006)**.
- 79)** Daniel W.W. Bioestadística. Bases para el Análisis de Ciencias de la Salud. 1^a edición. Ed. LIMUSA. México. 454-464, 542-548; **(1982)**.
- 80)** Macchi R.L. Introducción a la Estadística en Ciencias de la Salud. 1^a edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 243-270; **(2003)**.



Anexos



Anexo 1. Preparación de soluciones para la síntesis del conjugado Boc-HYNIC-RGD

Solución A: Se pesaron 1.5 mg de HYNIC-BOC y se disolvieron en 100 μL de Dimetilformamida (DMF).

Solución B: Se pesaron 2 mg de o-(7-azabenzotriazolil)-1,1,3,3 tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU) y se disolvieron en 100 μL de Dimetilformamida (DMF).

Solución C. En un vial limpio y seco se agregaron 10 μL de Disopropiletilendiamina y 300 μL de DMF y se mezclaron.

Solución D: En un vial limpio y seco se realizó la siguiente mezcla, dejandola reaccionar 15 min:
80 μL de la solución A + 50 μL de la solución B + 50 μL de la solución C

Anexo 2. Preparación de soluciones para la validación del método y sistema

Fase móvil A: En un recipiente adecuado se mezclaron 500 mL de cetonitrilo con 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA).

Fase móvil B: En un recipiente adecuado se mezcló 500 mL de agua con 1 mL de TFA.

Solución de referencia (conjugado HYNIC-RGD): se pesaron 1.5 mg del conjugado HYNIC-RGD y se disolvieron con 4 mL de solución de etanol al 10 %.

Placebo:

Se pesaron 60 mg de EDDA y se disolvió en 3.0 mL de NaOH 0.1 M

Se pesaron 120 mg de Tricina y se disolvió en 3.0 mL de Buffer de Fosfatos 0.2 M pH 7.0

En un recipiente adecuado se mezclaron la solución de EDDA y la solución de Tricina (para obtener un volumen final de 6 mL)

Solución placebo+conjugado (Preparar por triplicado)

En un vial limpio y seco se transfirió una alícuota de 100 μL de una solución del conjugado cuya concentración fue de 375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (solución de referencia) y se agregaron 400 μL de la solución del placebo (Solución EDDA/Tricitina) y se agitó ligeramente para mezclar.

Anexo 3. Preparación de soluciones para el marcado *in situ* del conjugado HYNIC-RGD

Buffer de Fosfatos 0.2 M pH 7.0

En un matraz erlenmeyer de 100 mL se disolvieron 1.15 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) y 310 mg de fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) en 30 mL de agua inyectable, se agitó la solución y se calentó ligeramente, se dejó enfriar y se



transfirió la solución a un matraz volumétrico de 50 mL y se aforó a un volumen final de 50 mL con agua inyectable.

Solución de EDDA

Se pesaron 60 mg de EDDA y los cristales se disolvieron en 3.0 mL de NaOH 0.1 M

Solución de Tricina

Se pesaron 120 mg de Tricina y se disolvieron en 3.0 mL de Buffer de Fosfatos 0.2 M pH 7.0

Solución de EDDA/Tricina

En un recipiente adecuado se mezclaron la solución de EDDA y la solución de Tricina (para obtener un volumen final de 6 mL)

Solución de Cloruro Estanoso (SnCl_2)

En un vial limpio y seco se pesaron 10 mg de cloruro estanoso anhidro, se disolvieron con 10 μL de ácido clorhídrico concentrado y se añadieron 10 mL de agua inyectable previamente nitrogenada durante al menos 15 minutos.

Solución de Etanol al 10 %: en un recipiente adecuado colocar 10 mL de etanol y llevar a un volumen final de 100 mL con agua.

Anexo 4. Preparación de soluciones para la prueba de LAL

1) Preparación de las muestras.

Las eluciones obtenidas de los generadores de tecnecio, no necesitan ser preparadas, se emplean sin necesidad de realizar diluciones. Sin embargo, si la prueba resulta positiva, se acepta una dilución máxima de 1:100.

Los núcleo-equipos liofilizados se reconstituyen con 10 mL de agua estéril y libre de pirógenos, pueden ser usados tal cual, pero se acepta una dilución máxima de 1:200.

Las soluciones de moléculas marcadas pueden ser probadas como tal, pero se acepta una dilución máxima de 1:200.

Los frascos accesorios al vacío son adicionados de 6 mL de agua o solución salina isotónica estéril y libre de pirógenos. La muestra se utiliza tal cual sin ninguna dilución.

2) Preparación de los controles.

Solución "A": La endotoxina de *E. coli* en forma liofilizada se reconstituyó mediante la adición de 5 mL de agua estéril y libre de pirógenos. La concentración obtenida fue de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se agitó vigorosamente durante 5 minutos en el vórtex.

Solución "B": Bajo condiciones asépticas se realizó la siguiente dilución de la solución "A". Se tomó una alícuota de 100 μL de la solución "A" y se diluyó con 9.9 mL de agua estéril y



libre de pirógenos y se agitó vigorosamente durante 60 segundos. La concentración de esta solución fue de 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Solución “C”: A 900 μL de agua estéril y libre de pirógenos se añadieron 100 μL de la solución “B”. La concentración de esta solución fue de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Control positivo: se tomó una alícuota de 100 μL de la solución “B” y se diluyó con 900 μL de agua estéril y libre de pirógenos. La concentración de esta solución fue de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Solución de endotoxina “D”: de la solución “B” se tomó una alícuota de 10 μL y se diluyó con 90 μL de la muestra a analizar. La concentración de esta solución fue de 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Muestra Control Positivo: de la solución “D” se tomó una alícuota de 100 μL y se diluyó con 900 μL de la muestra a analizar. La concentración de esta solución fue de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Agua Control Positivo: establece que el reactivo LAL reacciona apropiadamente.

Control Negativo: este control lo constituyó el agua libre de pirógenos.

3) Preparación del reactivo de lisado de Amebocitos de *Imulus* (L.A.L): El liofilizado del lisado de amebocitos se reconstituyó añadiendo lentamente 5.2 mL de agua estéril y libre de pirógenos, se agitó suavemente durante 30 s cuidando que no se generara espuma.

Anexo 5. Preparación de medios de cultivo para la prueba de esterilidad

Los medios de cultivo de soya tripticaseína y medio fluido de tioglicolato de sodio, se preparan a partir de ingredientes o formulaciones deshidratadas siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ajustar el pH con soluciones de NaOH 1.0 N ó de HCl 1.0 N para que después de la esterilización se obtenga el valor de pH indicado en cada caso. A menos que se indique lo contrario, esterilizar en autoclave utilizando procesos validados.

Los medios de cultivo deben de cumplir con las pruebas de esterilidad y de promoción de crecimiento, las cuales se llevan a cabo antes o en paralelo con la muestra. En caso de que los resultados no sean satisfactorios, la prueba de esterilidad de la muestra se invalida.

La temperatura de incubación del medio fluido de tioglicolato es de $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y del caldo de soya tripticaseína es de $22.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada uno por no menos de 14 días.



Glosario

Analito: es un componente específico de una muestra a medir en un análisis.

Bequerel: la unidad en el SI de actividad es el becquerel (Bq), nombre especial para una desintegración por segundo (s^{-1}). La expresión de la actividad utilizando el becquerel indica, por tanto, el número de desintegraciones por segundo.

El curie (Ci) es igual a $3,7 \times 10^{10}$ Bq.

Concentración radiactiva: se refiere a la radiactividad por unidad de volumen de la solución (Bq/mL). Como en todas las interacciones que impliquen radiactividad, es preciso hacer referencia a la fecha de calibración.

Especificaciones: descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Especificidad: la capacidad para medir exacta y específicamente el analito en la presencia de componentes que pudieran estar presentes en la matriz de la muestra. La especificidad puede expresarse con frecuencia como el grado de sesgo o desviación de los resultados de la prueba, obtenidos por el análisis de muestras que contienen ingredientes del placebo, cuando se comparan con los resultados de la prueba obtenidos en muestras sin sustancias adicionadas. La investigación de la especificidad debe realizarse durante la validación de las pruebas de identificación, la determinación de impurezas y el ensayo.

Exactitud: es la cercanía de los resultados del análisis obtenidos con el método con el valor verdadero. Se expresa con frecuencia como el porcentaje de recobro por medio del ensayo de cantidades adicionadas, conocidas del analito. Debe de establecerse a lo largo del rango especificado del procedimiento analítico.

Intervalo: concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas) para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

Isótopo: se define así a los elementos con núcleos que tienen el mismo número atómico, pero diferente número de neutrones.

Linealidad: es la capacidad de un método analítico para arrojar resultados de análisis que sean proporcionales ya sea de una manera directa o mediante una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestra, dentro de un rango dado.



Límite de cuantificación (LC): es la menor concentración del analito en una muestra, que puede ser determinado con una precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de Detección (LD): es un parámetro de las pruebas límite. Es la concentración más baja del analito en una muestra que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de detección se expresa como la concentración de analito en la muestra (por ejemplo, porcentaje, partes por billón).

Método analítico: descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Muestra: porción de del material a evaluar.

Nucleido: especie atómica que se caracteriza por su número de masa, su número atómico y su estado energético nuclear, con tal que la duración media de tal estado sea lo suficientemente larga para que pueda ser observada.

Placebo analítico: muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Placebo adicionado: muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.

Precisión: la precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica de manera repetida a muestreos múltiples de una muestra homogénea. Puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método bajo condiciones normales de operación.

Precisión intermedia: precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas en distintos días.

Pureza radionucleídica: la pureza radionucleídica de una preparación es el tanto por ciento de la radiactividad total que existe en la forma del radionucleido declarado. La pureza radionucleídica se refiere a radionucleidos de un mismo elemento (^{124}I en preparaciones de ^{123}I) como a radionucleidos de elementos diferentes (^{99}Mo en soluciones de ^{99m}Tc).

Pureza radioquímica. La pureza radioquímica puede ser definida como tanto por ciento de la radiactividad total en la forma química declarada en el radiofármaco. Como la pureza radioquímica puede cambiar con el tiempo, principalmente por descomposición radiactiva; se debe de especificar el tiempo al que es aplicable el límite de pureza radioquímica.



Pureza química: se refiere a la proporción de la preparación que existe en la forma química especificada, prescindiendo de la presencia de radiactividad; puede determinarse mediante los métodos ordinarios de análisis.

Las impurezas químicas pueden ser introducidas inadvertidamente en el radiofármaco, antes, durante y después de la marcación, como por ejemplo impurezas de reactivos, productos de descomposición no radiactivos, rotura de la estructura química del producto entre otros.

Radiactividad: es la propiedad que tienen ciertos nucleidos de emitir radiaciones cuando sus núcleos se transforman espontáneamente en otros nucleidos.

Radiactividad de fondo: es la radiación debida a materiales de construcción, radiaciones cósmicas y descargas espontáneas de la atmósfera. Todas las medidas de radiactividad deben efectuarse sustrayendo la radiactividad de fondo.

Radiactividad específica (o actividad específica). La actividad específica de una preparación de material radiactivo es la radiactividad por unidad de masa del elemento o del compuesto del que se trate. (Bq/mg ó Bq/mmol).

Radionucleido. Nucleido que es radiactivo.

Rango: el rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior del analito (incluyendo estos) que han demostrado su precisión, exactitud y linealidad utilizando el método tal como está escrito. Normalmente se deriva de los estudios de linealidad y depende de la aplicación que se pretende con el procedimiento.

Recobro: cantidad del analito determinada en el placebo adicionada, empleando el método analítico.

Repetibilidad: precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

Reproducibilidad: precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Sustancia de referencia: sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

Sustancia de referencia primaria: sustancia que es designada o reconocida por tener la más alta calidad petrológica, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.



Sustancia de referencia secundaria: sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científicamente reconocido.

Tiempo de vida media o periodo de semidesintegración. Es el tiempo en el cual la radiactividad decrece hasta la media de su valor primitivo.

Unidades de radiactividad: la actividad de una cantidad determinada de material radiactivo se expresa por el número de transformaciones nucleares que se producen por unidad de tiempo.

Validación del método analítico: proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.