



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE
UNA FORMULACIÓN LIOFILIZADA PARA LA
OBTENCIÓN DEL RADIOFÁRMACO
 ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SALVADOR SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Dra. BLANCA ELÍ OCAMPO GARCÍA
ASESOR EXTERNO

Dra. GUILLERMINA FERRO FLORES
ASESOR ADJUNTO

Dr. FERNANDO UREÑA NUÑEZ
ASESOR INTERNO



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

ENERO 2013



Toluca, México, 30 de noviembre de 2012

P. QFB. SALVADOR SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM.

P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad **TESIS**, estará formado por:

Dr. FERNANDO UREÑA NÚÑEZ

PRESIDENTE

Dr. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA

PRIMER VOCAL

Dra. MARÍA DOLORES HERNÁNDEZ NAVARRO

SEGUNDO VOCAL

M. en C. Q. JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN BENÍTEZ

TERCER VOCAL

Dr. ENRIQUE MORALES AVILA

SECRETARIO

Dra. ARACELI AMAYA CHÁVEZ

SUPLENTE

Dr. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

SUPLENTE

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2012, Año Internacional de la Energía Sostenible para Todos"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ
DIRECTORA



c.c.p. Expediente
c.c.p. Archivo.





El presente trabajo se desarrolló en la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud (Departamento de Materiales Radiactivos) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares bajo la dirección académica de la Dra. en C. Blanca Elí Ocampo García, la Dra en C. Guillermina Ferro Flores y el Dr. en C. Fernando Ureña Núñez

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por el apoyo brindado para la realización de este proyecto, en especial al personal del Departamento de Materiales Radiactivos.

A la Dra. en C. Blanca Elí Ocampo García: jamás encontraré la forma de agradecerle todo lo que ha hecho por mi, gracias por ser una gran persona, un ejemplo a seguir, por el tiempo, paciencia y dedicación que me ha brindado.

A la Dra. en C. Guillermina Ferro Flores por transmitir sus conocimientos y los valiosos consejos que me brindo.

Al Dr. Fernando Ureña Núñez por todo el apoyo brindado.

A la UAEMex y a mis profesores por ser parte de mi formación profesional.

A mis compañeros y amigos del Lab. de Radiofármacos: Lety, Myrna, Naye, Andy, Zareth, Fatima, Noé, Mauricio, Enrique, Emanuel por brindarme su amistad, apoyo y compartir momentos muy agradables durante mi estancia en el ININ.

Los ideales que iluminan mi camino y una y otra vez me han dado coraje para enfrentar la vida con alegría han sido: la amabilidad, la belleza y la verdad.
Albert Einstein.

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ

Por ser la persona más importante en mi vida,
por demostrarme que no existe la derrota.
Porque ha dedicado cada segundo de su vida a luchar
para salir adelante ante cualquier situación.
Porque me ha enseñado que la satisfacción se encuentra en mis propios progresos
y no en las apreciaciones de los demás.
Le dedico mis victorias, mi vida y mi ser, porque es la fuente de mi inspiración.

A MI PAPÁ

Padre es quien te guía por buen camino,
que con amor enseña a sus hijos,
hombre trabajador de sacrificio,
que trata a su familia con cariño.
Hombre con virtudes y defectos,
tan grande y con corazón inmenso.
Lo que aprendas estando consigo,
lo recordarás toda tu vida.
Gracias por todo papá.

A MIS HERMANOS

Mis hermanos son
seres queridos para mi,
con ellos cuento en cada momento
siempre presentes en mis pensamientos.

A MIS AMIGOS

Compañeros hay muchos, verdaderos amigos solo son unos pocos.
Un verdadero amigo es aquel que entra cuando todos los demás se van.
Gracias por mantener nuestra amistad durante todo este tiempo: Adriana, Ale, Mireya,
Adrian, Mauricio, Daniel, Andrés, Abimael.

ÍNDICE

Contenido	Página
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	vi
Abreviaturas	vii
RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
Generalidades	3
2.1 Radiofármacos	3
2.2 Química del Tecnecio	4
2.2.1 Propiedades nucleares	4
2.2.2 ^{99m} Tc en Medicina Nuclear	5
2.2.3 Obtención del ^{99m} Tc	5
2.3 Ligantes empleados para la formación de complejos de tecnecio ..6	
2.3.1 Moléculas transportadoras.....	7
2.3.1.1 Péptidos	7
2.3.1.2 Integrinas	8
2.4 Radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/ HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂	9
2.5 Requisitos de control de calidad para radiofármacos.....	11
2.5.1 Pruebas biológicas.....	11
2.5.2 Pruebas fisicoquímicas	16
2.6 Liofilización	18
2.7 Buenas Prácticas de Manufactura	18
2.7.1 Buenas Prácticas de Validación	19
2.7.1.1 Tipos de validación	19
2.8 Legislación sanitaria	19
2.8.1 Requisitos y lineamientos para la obtención del Registro Sanitario	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24

Contenido	Página
6. METODOLOGÍA.....	25
6.1 Diagrama de flujo.....	25
6.2 Procedimiento.....	26
6.2.1 Análisis de las materias primas empleadas en la fabricación del núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn.....	26
6.2.2 Optimización del proceso de fabricación del núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn.....	26
6.2.3 Evaluación de la pureza radioquímica.....	27
6.2.3.1 Obtención de la solución de ^{99m} TcO ₄ Na.....	27
6.2.3.2 Evaluación de la pureza radioquímica.....	28
6.2.4 Análisis de materias primas.....	28
6.2.5 Escalamiento del lote.....	28
6.2.6 Fabricación de lotes de validación de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn.....	30
6.2.7 Estudio de estabilidad de los núcleo-equipos de la formulación farmacéutica liofilizada para la preparación del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	30
6.2.8 Control de calidad de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn liofilizado.....	31
6.2.8.1 Parámetros de control de calidad evaluados en la formulación farmacéutica liofilizada.....	31
6.2.8.2 Parámetros de control de calidad evaluados en el radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	32
6.2.8.2.1 Procedimiento de marcado de la formulación farmacéutica liofilizada.....	32
6.2.8.2.2 Evaluación de la pureza radioquímica.....	33
6.2.8.2.3 Apariencia.....	33
6.2.8.2.4 pH.....	34
6.3 Afinidad del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ por la proteína α_vβ₃.....	34
6.4 Prueba de seguridad general (MGA 0795).....	35
6.5 Obtención de imágenes gammagráficas de pacientes con cáncer de mama.....	35
6.6 Obtención de imágenes gammagráficas de tumores C6 de glioma inducidos en ratones atómicos.....	35
6.6.1 Modelo animal.....	35
6.6.2 Inducción de tumores en modelos atómicos.....	35
6.6.3 Estudios de imagen.....	36
6.7 Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano.....	36
6.8 Proyecto de etiquetas.....	36
6.9 Integración del expediente legal para la Solicitud de registro sanitario.....	36

Contenido	Página
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
7.1 Optimización de la formulación.....	37
7.2 Análisis de materias primas empleadas en la fabricación	40
7.3 Escalamiento del lote y validación del proceso de fabricación de la formulación liofilizada núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn.....	43
7.4 Estudio de estabilidad de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn.....	43
7.5 Control de calidad de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn	45
7.5.1 Parámetros de control de calidad evaluados en la formulación farmacéutica liofilizada	45
7.5.2 Parámetros de control de calidad evaluados en el radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	46
7.5.2.1 Evaluación de la pureza radioquímica	46
7.5.2.2 Apariencia.....	47
7.5.2.3 pH.....	47
7.6 Afinidad del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ por la proteína α_vβ₃	48
7.7 Prueba de seguridad general (MGA 0795)	49
7.8 Obtención de imágenes gammagráficas de pacientes con cáncer de mama.....	49
7.9 Obtención de imágenes gammagráficas de tumores C6 de glioma inducidos en ratones atómicos.....	50
7.10 Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E[c(RGDfK)]₂ en suero humano.....	51
7.11 Informe de validación del proceso de producción de los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn.....	53
7.12 Estudio de estabilidad a largo plazo de los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn	55
7.13 Elaboración de expediente legal para la Solicitud de registro sanitario.....	62
8. CONCLUSIONES.....	63
9. GLOSARIO	64
10. BIBLIOGRAFÍA	67
11. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Descripción del sistema cromatográfico para la determinación de pureza radioquímica del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	11
2	Diseño factorial experimental para la selección de la formulación óptima para la formación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	26
3	Tratamientos del diseño factorial experimental en la selección de la formulación óptima para la formación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	27
4	Sistema de gradientes empleados en la evaluación de pureza radioquímica por HPLC.....	28
5	Interpretación de resultados de la prueba de determinación de endotoxinas bacterianas (MGA 0316).....	32
6	Descripción del sistema cromatográfico para la determinación de pureza radioquímica del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	33
7	Diluciones de DOTA-E-(c[RGDfK]) ₂ para el ensayo de competencia.....	34
8	Pureza radioquímica obtenida del diseño factorial experimental en la selección de la formulación óptima para la formación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	37
9	Análisis de varianza del diseño factorial.....	38
10	Resultados del análisis estadístico del diseño factorial completo.....	38
11	Resultados del análisis estadístico del diseño factorial del contenido de Manitol (mg).....	39
12	Resultados del análisis estadístico del diseño factorial del contenido de SnCl ₂ (µg).....	39
13	Resultados del análisis estadístico del diseño factorial del Tiempo de incubación (min).....	39
14	Asignación de modos vibracionales características del espectro FT-IR del HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	40
15	Asignación de modos vibracionales características del espectro FT-IR del Ácido etilendiaminodiacético.....	41
16	Asignación de modos vibracionales características del espectro FT-IR de la tricina.....	42
17	Resultados de Control de Calidad del producto terminado.....	43
18	Condiciones del estudio de estabilidad.....	45
19	Resultados de las pruebas de esterilidad.....	45
20	Resultados de la prueba de determinación de endotoxinas bacterianas por el método de L.A.L.....	46
21	Resultados de la evaluación de pureza radioquímica.....	46
22	Resultados de apariencia del núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn y del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	47
23	Resultados de pH del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$	47
24	Estabilidad del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ en suero humano.....	51

Tabla		Página
25	Porcentaje de áreas en el estudio de estabilidad del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ en suero humano al tiempo inicial....	52
26	Porcentaje de áreas del estudio de estabilidad del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ en suero humano a las 24h de incubación.....	53
27	Especificaciones de control de proceso.....	53
28	Especificaciones del liofilizado HYNIC-RGD-Sn.....	53
29	Especificaciones del Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.....	54
30	Especificaciones del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	54
31	Resultados de los tres lotes de validación.....	54
32	Resultados del estudio de estabilidad.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura del agente quelante bifuncional ácido hidrazinonicotinámico.....	6
2	Esquema general de la producción de ^{99m} Tc-HYNIC-péptido conjugado	6
3	Integrinas expresadas en células endoteliales (adaptada de RO Hynes, Cell 110:673-687 (2002)).....	8
4	Estructura química del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/ HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	10
5	Esquema de preparación del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	33
6	Espectro FT-IR de HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	40
7	Espectro FT-IR del Ácido etilendiaminodiacético.....	41
8	Espectro FT-IR de la tricina.....	42
9	Diagrama de flujo del desarrollo de estudio de estabilidades.....	44
10	Afinidad del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ por la proteína α _v β ₃	48
11	Imagen de una paciente con cáncer de mama.....	50
12	Imagen transaxial y coronal de un ratón atómico con tumor C6 inducido, 3 horas después de la administración del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	50
13	Estabilidad del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ en suero humano.....	51
14	Estabilidad del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ en suero humano al tiempo inicial.....	52
15	Estabilidad del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ en suero humano a las 24h de incubación.....	52
16	Ciclo de liofilización.....	55
17	Resultados de pH del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	57
18	Resultados de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ del lote 01-2012.....	57
19	Cromatograma obtenido por HPLC del lote 01-2011 al inicio del estudio.....	58
20	Cromatograma obtenido por HPLC del lote 01-2011 al término del estudio.....	58
21	Resultados de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ del lote 02-2011.....	59
22	Cromatograma obtenido por HPLC del lote 02-2011 al inicio del estudio.....	59
23	Cromatograma obtenido por HPLC del lote 02-2011 al término del estudio.....	60
24	Resultados de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂ del lote 03-2011.....	60
25	Cromatograma obtenido por HPLC del lote 03-2011 al inicio del estudio.....	61
26	Cromatograma obtenido por HPLC del lote 03-2011 al término del estudio.....	61

ABREVIATURAS

^{99m}Tc	Tecnecio-99 metaestable
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Ion pertecneciato 99 metaestable
EDDA	Ácido etiléndiaminodiacético
HYNIC	Ácido hidracinonicotinamídico
^{99m}Tc -HYNIC-RGD	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂
RGD	Arg-Gly-Asp: Arginina-Glicina-Ácido aspártico
HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	Hidrazinonicotinil-Glu-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) ₂
DOTA-E-(c[RGDfK]) ₂	1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N''N''' del ácido tetraacético-Glu-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) ₂
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SPECT	Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
MGA	Método General de Análisis
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
BFCA	Agente Quelante Bifuncional
L.A.L.	Lisado de Amebocitos <i>Limulus polyphemus</i>
FT-IR	Infrarrojo por transformada de Fourier
UE	Unidades de endotoxina
AU	Unidades arbitrarias
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
NOM	Norma Oficial Mexicana
ITLC-SG	Cromatografía instantánea de capa delgada de sílica gel
KeV	Kilo electrón volts
MeV	Mega electrón volts
$\alpha_v\beta_3$	Integrinas alfa cinco beta tres
$\alpha_v\beta_5$	Integrinas alfa cinco beta cinco
°C	Grados Celsius
MBq	Megabequerel
Bq	Bequerel
Ci	Curie
Gy	Gray
ECM	Membrana Celular Externa

Resumen

Los péptidos basados en la secuencia cíclica Arg-Gly-Asp (RGD) se han reportado como agentes con gran afinidad para integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ sobre-expresadas en procesos angiogénicos tanto en las células endoteliales como en las células de cáncer de mama y glioblastomas. La integrina $\alpha_v\beta_3$ está expresada en bajos niveles sobre las células epiteliales y endoteliales maduras, pero está altamente expresada sobre las células endoteliales activadas en la neovascularización de tumores, incluyendo osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, melanomas, carcinomas de pulmón y cáncer de mama. La expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ correlaciona bien con la progresión e invasividad del tumor en cánceres de mama, ovario, glioma y melanoma. La angiogénesis es un proceso crítico del tumor para su crecimiento y metástasis. Por su expresión altamente definida durante la iniciación, el crecimiento, invasión y metástasis del tumor, las integrinas representan un blanco molecular importante para el diagnóstico temprano de tumores agresivos de rápido crecimiento y metástasis.

En este trabajo se optimizó el proceso de producción de una formulación farmacéutica liofilizada para la preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, se demostró la unión específica a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ para ser empleada en los gabinetes de medicina nuclear en la obtención de imágenes gammagráficas para la detección oportuna de cáncer de mama.

La formulación farmacéutica liofilizada óptima para la preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se estableció como:

HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	25 μg
Cloruro estannoso (SnCl_2)	20 μg
Ácido Etilendiaminodiacético (EDDA)	10 mg
N-tris(hidroxi metil)metilglicina (Tricina)	20 mg
Manitol	50 mg

Los resultados de pureza radioquímica de la formulación estéril y libre de endotoxinas bacterianas para los tres lotes de validación preparados bajo protocolos de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) fueron $97.62 \pm 1.48 \%$, $96.54 \pm 1.89 \%$, y $97.66 \pm 0.57 \%$, por lo que el procedimiento de producción cumple las especificaciones preestablecidas.

El radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación farmacéutica liofilizada mostró ser estable durante al menos 24 horas, por lo que puede ser empleado en los centros de medicina nuclear molecular.

Se obtuvieron imágenes *in vivo* de la sobre-expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ a partir del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ obtenido de la formulación farmacéutica liofilizada y optimizada.

La formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn) mostró ser estable durante 12 meses, por lo que se solicitó la autorización de este periodo de caducidad a la COFEPRIS (Número de ingreso 123300401A0155).

1. Introducción

La radiofarmacia en México se inició en el año 1965, esta rama de las ciencias farmacéuticas se ocupa del diseño, preparación, control de calidad y dispensación de los radiofármacos. Los radiofármacos son un medicamento especial que contiene un radionúclido, son utilizados en la medicina nuclear para el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades por lo cual, requieren de un especial manejo antes de ser administrados en pacientes y normalmente se preparan en el momento de ser usados. Solo algunos radiofármacos son enviados al hospital listos para su uso [1].

Las técnicas de obtención de imágenes moleculares, directa o indirectamente, detectan y registran la distribución espacio-temporal de procesos moleculares o celulares para aplicaciones bioquímicas, biológicas, diagnósticas o terapéuticas. Las técnicas avanzadas de imagen como la resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET) han sido exitosamente utilizadas para detectar dichos procesos.

De acuerdo con su diseño, los radiofármacos pueden ser divididos en tres generaciones. Los radiofármacos de tercera generación se utilizan 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 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.

El ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se desarrolló previamente en el laboratorio de radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares para la detección de integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre-expresados en procesos angiogénicos [2].

En el presente trabajo se optimizó el proceso de producción de una formulación farmacéutica liofilizada para la preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, así se presentó evidencia documentada la cual provee un alto grado de seguridad de que se genera consistentemente un producto que cumple con sus especificaciones y atributos de calidad preestablecidos y, por lo tanto, asegura su eficiencia y efectividad.

Los radiofármacos de diagnóstico no tienen acción farmacológica, pero su administración en humanos hace imperativo que se cumplan los requisitos exigidos a los productos farmacéuticos convencionales, además de los específicos por tratarse de sustancias radiactivas. En el diseño de un 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, estos resultados se obtuvieron a partir de estudios de seguridad general de acuerdo al Método General de Análisis (MGA) 0795 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM 10^a ed) o versión vigente.

En términos de lo dispuesto por los artículos 204 y 376 de la Ley General de Salud, los medicamentos, equipos médicos, prótesis, ortesis, ayudas funcionales, agentes de diagnóstico, insumos de uso odontológico, materiales quirúrgicos, de curación, productos higiénicos y otros insumos para la salud requieren para su venta o suministro, contar con la autorización sanitaria correspondiente, en su modalidad de registro sanitario.

2. Marco teórico

Generalidades

2.1 Radiofármacos

Un radiofármaco es toda sustancia que contiene 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. El objetivo de los radiofármacos de blancos moleculares específicos es obtener imágenes utilizando herramientas desarrolladas por la biología molecular pero con métodos aplicables *in vivo*. En los últimos años se ha demostrado la utilidad diagnóstica de los péptidos radiomarcados para la detección específica de diversas neoplasias mediante la obtención de imágenes moleculares por técnicas de medicina nuclear [3-4].

El radionúclido se elige de acuerdo a sus características nucleares como son:

- Tiempo de vida media.
- Energía de emisión.
- Tipo de radiación emitida.
- Toxicidad.
- Disponibilidad.

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

1) Radiofármacos de primera generación: Especies moleculares simples liberadas a órganos específicos a través de un mecanismo de localización no específico o partículas que pudieran explotar mecanismos fisiológicos. Como un ejemplo se puede mencionar que la fagocitosis fue la base para preparar coloides como $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$ y el bloqueo de capilares se obtuvo con ^{99m}Tc -macroagregados de albúmina dando lugar a la scintigrafía de hígado y pulmón [3].

2) Radiofármacos de segunda generación: surgen en los años 80'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), que son ligantes que no solo quelan al metal, sino que también pueden mediante otro grupo funcional unirse a una molécula con actividad biológica [5].

3) Radiofármacos de tercera generación: 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 o ligante bifuncional y un fragmento bioactivo que puede ser una proteína, un fragmento proteico, un péptido, ADN, ARN y oligonucleótidos. El agente bifuncional se encuentra localizado entre el radionúclido y el fragmento bioactivo, de tal forma que este último sirva como un portador del metal al sitio receptor de la célula o molécula blanco. Si el ion metálico es emisor de partículas β^- ó α , 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*.

La medicina nuclear diagnóstica se basa en el uso de los radiofármacos, donde un radionúclido se incorpora a una molécula orgánica o inorgánica que se dirige selectivamente a un órgano de interés o que se incorpora a un proceso molecular, metabólico o fisiológico del organismo sin perturbar el sistema bioquímico. Dado que el radionúclido es un emisor gamma o de positrones, se pueden obtener por medio de sistemas de detección externos llamados gammacámaras y equipos de tomografía de emisión de positrones (PET), imágenes *in vivo* del funcionamiento de los diversos órganos o sistemas, las cuales se procesan en sistemas de cómputo [6].

Todos los radiofármacos son agentes de diagnóstico, ya que el término terapéutico no se refiere a un efecto farmacológico, si no a un efecto físico de energía de radiación depositada por unidad de masa, tal y como ocurre en radioterapia convencional [7].

Los radiofármacos de diagnóstico están compuestos por un radionúclido emisor de radiación gamma procedente del núcleo del átomo, el radionúclido se une 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 [8]. Los radiofármacos de diagnóstico utilizan emisiones de rayos gamma con una energía entre 0.1 y 0.2 MeV que permiten su detección externa.

El radionúclido más común en estudios diagnósticos es el Tecnecio-99m (^{99m}Tc), a partir del cual pueden prepararse decenas de diferentes radiofármacos lo que constituye el 65 % de todos los estudios de medicina nuclear que se practican a nivel mundial y aproximadamente el 80 % de los estudios realizados en México [9].

2.2 Química del Tecnecio

El tecnecio es un metal de transición de color gris plateado, perteneciente al grupo VII B (Mn, Tc, y Re) y tiene el número atómico 43. El ^{99}Tc en estado fundamental tiene una vida media de 2.5×10^5 años. La estructura electrónica del átomo neutro es $[\text{Kr}]4d^65s^1$. El tecnecio puede existir en ocho estados de oxidación, -1 a 7+, que resultan de la pérdida de un número dado de electrones en los orbitales 4d y 5s o ganancia de un electrón al orbital 4d. La estabilidad de estos estados de oxidación depende del tipo de ligandos y el medio ambiente químico. Los estados 7+ y 4+ son más estables y existen en óxidos, sulfuros, haluros, y pertecneciatos. Los estados de oxidación más bajos, -1, 1+, 2+, y 3+, normalmente se estabilizan por complejación con ligandos [10].

2.2.1 Propiedades nucleares

Las propiedades nucleares del ^{99m}Tc que hacen de este radionúclido útil en la medicina nuclear diagnóstica, son principalmente la emisión de un fotón de 140 KeV de energía, técnicamente ideal para su detección por gammagrafía y su vida media de tan sólo 6.02 horas, que ofrece la posibilidad de realizar estudios médicos con bajas dosis absorbidas de radiación para los pacientes.

2.2.2 ^{99m}Tc en Medicina Nuclear

El ^{99m}Tc se considera como el radionúclido “ideal” para marcar fármacos de diagnóstico debido a que reúne las características siguientes [11-14]:

- 1) Fácil obtención a partir de generadores $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$.
- 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 de 6.02 horas.
- 4) Eficiencia con que se detecta.
- 5) Facilidad y rapidez con que se pueden unir o complejar a diversas sustancias, o fármacos.
- 6) Las actividades en megabequerels (MBq) empleadas permiten hacer estudios dinámicos y estáticos.

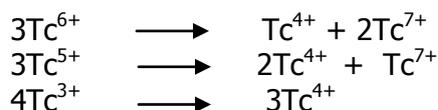
2.2.3 Obtención del ^{99m}Tc

El isótopo del tecnecio (^{99m}Tc) es producido como ion pertecneciato 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); que se adsorbe en una columna de alúmina, y es puesto en el generador; así el ión pertecneciato TcO_4^- , es obtenido cuando el núcleo de molibdeno-99 (MoO_4^{2-}) decae según lo indica la siguiente reacción:



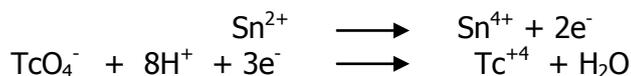
El pertecneciato se obtiene en su máximo estado de oxidación (valencia +7), la mayor parte de los compuestos químicos marcados con ^{99m}Tc se llevan a cabo reduciendo a Tc^{3+} , Tc^{4+} , Tc^{5+} y complejando éstos en el compuesto químico adecuado. El agente comúnmente usado para reducir el tecnecio es el cloruro estanoso (SnCl_2) por presentar las ventajas de baja toxicidad, gran poder reductor y buen rendimiento de radiomarcado [15].

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



Un radiofármaco de ^{99m}Tc se prepara por simple adición de eluato de pertecneciato en solución salina ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) al núcleo-equipos disolviendo el polvo liofilizado.

Al realizar esta mezcla se llevan a cabo las siguientes reacciones químicas en solo unos minutos: el estaño reduce al pertecneciato, éste, en un estado de oxidación menor es capaz de unirse al ligante formándose el radiofármaco deseado.



2.3 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 [16]. Uno de los ligantes más eficientes es el HYNIC (Ácido hidrazinonicotinámico, Figura 1). Es un agente quelante bifuncional para el ^{99m}Tc usado para marcar biomoléculas para imagen. Con la adición de coligantes forma complejos muy estables tanto en solución como *in vivo* [17-19].

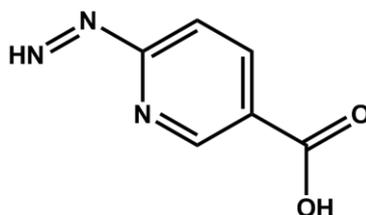


Figura 1. Estructura del agente quelante bifuncional ácido hidrazinonicotinámico.

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) Figura 2, tricina, tricina/ácido nicotínico, tricina/ácido isonicotínico y trisodio-trifenil-fosfin-3, 3'3''-trisulfonato (TPPTS). Es justamente a las variaciones estructurales de estos coligantes que se pueden modificar las propiedades del complejo obtenido, tales como su hidrofobicidad. 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.

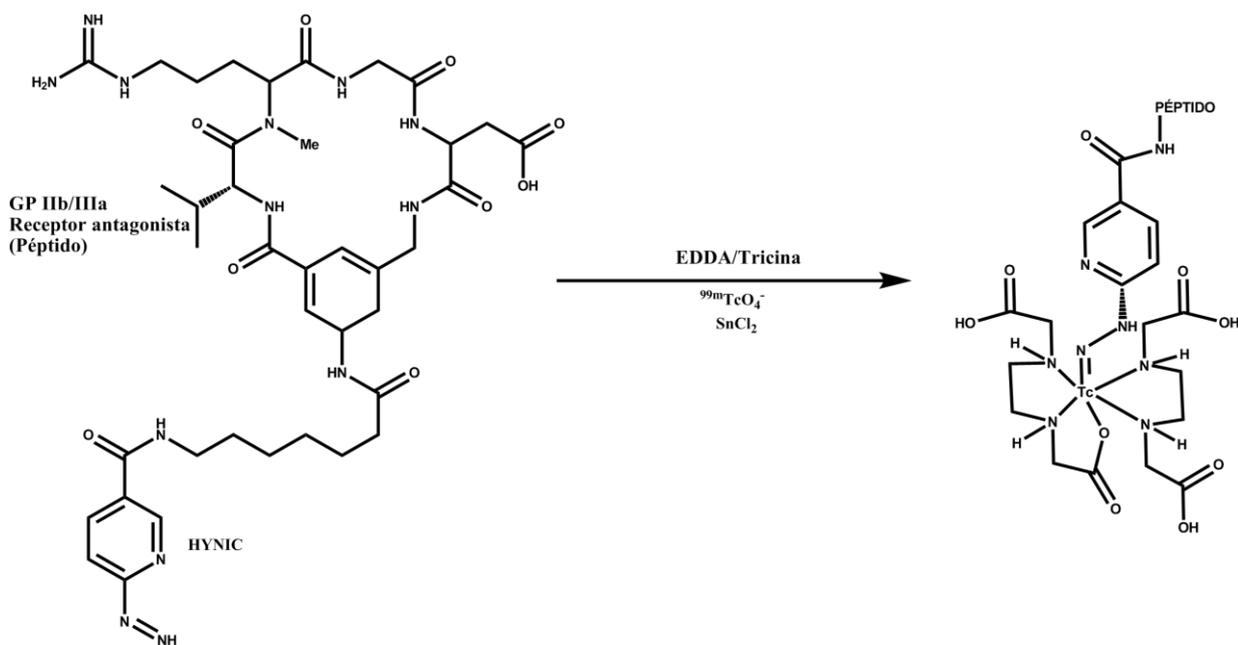


Figura 2. Esquema general de la producción de ^{99m}Tc -HYNIC-péptido conjugado.

2.3.1 Moléculas transportadoras

Durante la última década, se ha demostrado que los receptores de péptidos se pueden utilizar con éxito para el marcado *in vivo* de los cánceres humanos. La base molecular para la orientación se apoya en la observación *in vitro* de que los receptores de péptidos se sobre-expresan en grandes cantidades en ciertos tumores. En gammagrafía de receptores *in vivo* se utilizan péptidos radiomarcados para la localización de tumores y su metástasis [6].

2.3.1.1 Péptidos

Los péptidos son compuestos que contienen de 1 a 50 aminoácidos (ácido α -aminocarboxílicos) unidos por enlaces peptídicos. Diseñados de forma natural 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 [20].

Los péptidos ofrecen varias ventajas: 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.

Una de las principales razones del interés creciente para péptidos y receptores de péptidos en el cáncer es la posibilidad de ser dirigidos a un receptor, debido a que los receptores de péptidos son a menudo expresados en muchos cánceres humanos.

Básicamente, se pueden utilizar estos receptores como blancos moleculares en dos formas:

1) Sitios de unión para radioligantes: Los receptores se utilizan principalmente como sitios de unión para un péptido análogo de consideración, esta estrategia se basa principalmente en la presencia de receptores tumorales capaces de unirse con alta afinidad a los análogos peptídicos. El éxito de las aplicaciones clínicas de este principio son el diagnóstico y radioterapia con la orientación de los receptores peptídicos con péptidos radiomarcados. La internalización del complejo receptor-radioligante proporciona una acumulación importante y útil de radiotrazador en la célula, aumentando así la señal radiactiva en el sitio blanco [21]. Esta estrategia básica puede utilizar cualquiera de los péptidos relacionados con medicamentos citotóxicos [22,23] o péptidos relacionados con isótopos radiactivos [24]. En ambos casos, el ligando internalizado puede ser capaz de destruir selectivamente la célula blanco.

2) Mediación de respuestas funcionales: Alternativamente, se puede tomar ventaja de los receptores funcionales como blancos para provocar una determinada respuesta biológica, se ha demostrado *in vitro* que desempeñan un papel activo en la regulación del crecimiento de muchos tipos de células tumorales [25], lo que sugiere que el tratamiento a largo plazo con análogos peptídicos adecuados puede ser capaz de reducir o detener el crecimiento tumoral *in vivo*.

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

- Alta captación por los órganos blanco.
- Estabilidad metabólica.
- 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 no blanco.

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 receptores 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 [26].

2.3.1.2 Integrinas

Las integrinas son una familia de moléculas de adhesión, son heterodímeros compuestos de una cadena α y una β (Figura 3) [27]. 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 [28].

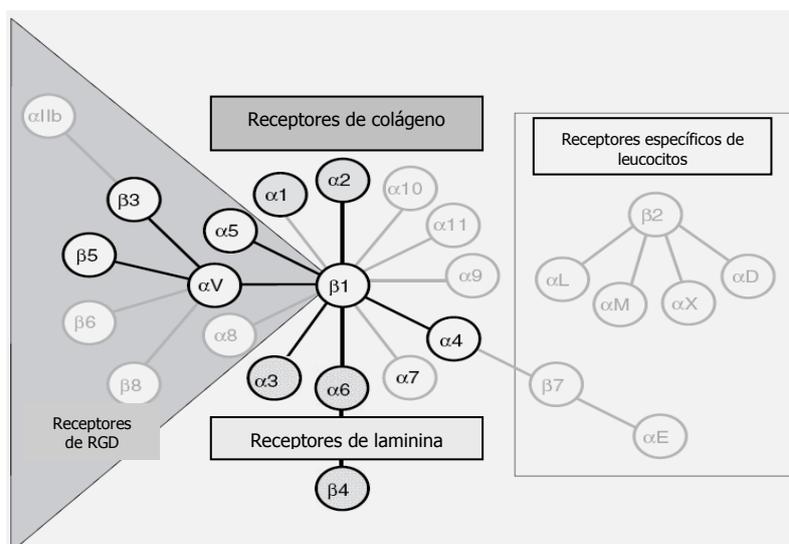


Figura 3. Integrinas expresadas en células endoteliales (adaptada de RO Hynes, Cell 110:673-687 (2002)).

La principal propiedad de las integrinas es su capacidad para unirse, por un lado, a 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. 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 [29,30].

La angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos promueve el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo [31].

Las integrinas $\alpha_v\beta_3$ se encuentran sobre-expresadas en la angiogénesis de tumores y su metástasis. La unión específica de péptidos que contienen el residuo Arg-Gly-Asp (RGD) a receptores $\alpha_v\beta_3$ han sido útiles para imagen de tumores específicos, mediante el radiomarcado del péptido RGD [32,33].

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 la generación de metástasis: a) angiogénesis intratumoral; b) desprendimiento del tumor primario; c) interacción de células tumorales con plaquetas; d) adhesión al endotelio [34-37].

Tanto el bloqueo de integrinas utilizando anticuerpos o péptidos que contienen la secuencia -Arg-Gly-Asp- (RGD) 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 blancos farmacológicos importantes [38].

En las células endoteliales las integrinas modulan la migración celular durante la angiogénesis y en células tumorales potencian la metástasis facilitando la invasión y el movimiento a través de los vasos sanguíneos [39].

2.4 Radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/ HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂

Cuando se hace reaccionar la solución de pertecnecio de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) a pH 7.0 con la mezcla HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, tricina, EDDA y cloruro estano en Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7, se forma el complejo **^{99m}Tc -EDDA/ HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂** (^{99m}Tc -HYNIC-RGD, Figura 4). El ^{99m}Tc (+7), es reducido por el cloruro estano, el cual se compleja al péptido a través del HYNIC y con la tricina se completa la esfera de coordinación del radiometal. Posteriormente con el calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 10 min, se realiza un intercambio de ligantes entre la tricina y el EDDA formándose finalmente el complejo estable de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, comúnmente conocido como ^{99m}Tc -HYNIC-RGD [2].

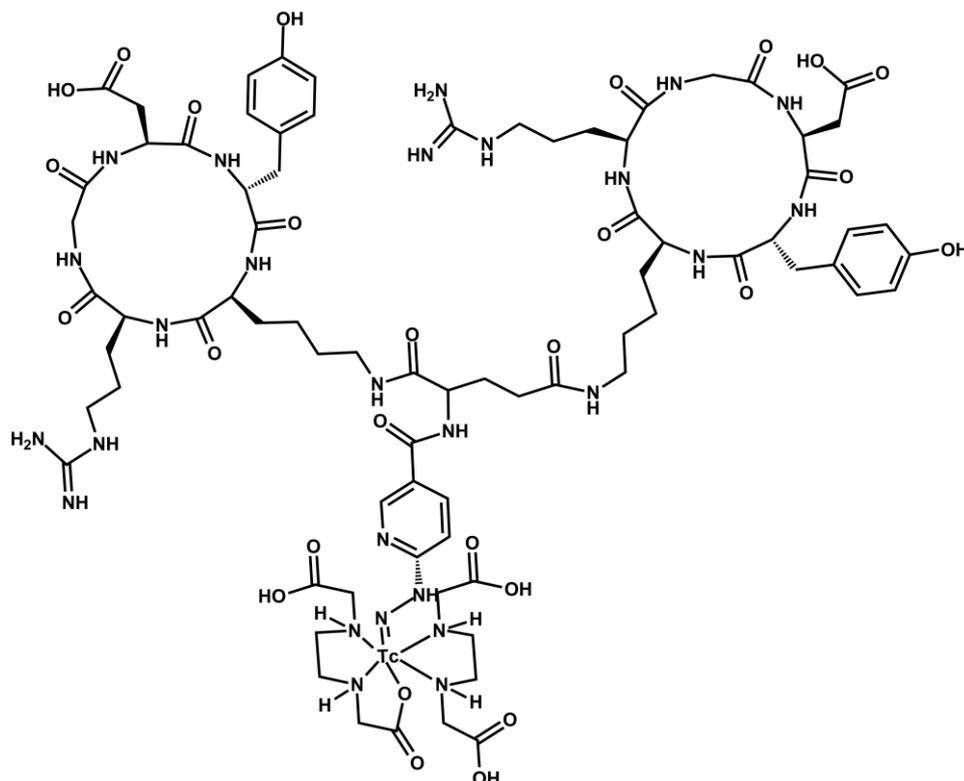


Figura 4. Estructura química del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

La secuencia tripeptídica -Arg-Gly-Asp- (RGD), reconoce de manera específica a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ que están sobre-expresadas sobre células endoteliales en proliferación asociadas a la neovasculatura y en células tumorales de cáncer de mama, glioblastomas, osteosarcomas, neuroblastomas, melanomas, carcinomas de pulmón y cáncer de ovario [40].

Después de la administración intravenosa, el ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se acumula en sitios que sobre-expresan integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ en procesos de angiogénesis.

El ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ es el agente de elección para centellografía de la sobre-expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ en procesos angiogénicos. Útil en la detección de cáncer de mama, glioblastoma, osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, melanomas y cáncer de ovario.

En 2009 Fred L. y cols. realizaron los estudios de biodistribución del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en ratones atómicos con cáncer inducido y presentó rápida depuración sanguínea y eliminación renal, el 79 ± 4 % de la actividad es excretada por esta vía, la actividad se acumula principalmente en el hígado, bazo y riñones [41].

La actividad sugerida para un paciente con un peso promedio de 70 kg es de 555-740 MBq con 25 μg de HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂. La centellografía es óptima después de 2-4 h de la administración. Por la cantidad de péptido requerido para el estudio, cada vial de liofilizado es para una dosis.

La pureza radioquímica deberá ser mayor de 90 %. El compuesto no debe contener más del 10 % de impurezas radioquímicas (^{99m}TcO₄⁻ ó ^{99m}Tc hidrolizado).

En la Tabla 1 se describe el sistema cromatográfico para la determinación de la pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Tabla 1. Descripción del sistema cromatográfico para la determinación de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Especie química	Fase móvil	
	2-butanona	Metanol/acetato de amonio 1 M (1:1 v/v)
Rf ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	0,0	0,9-1,0
Rf ^{99m} Tc-coligante	0,0	0,0
Rf ^{99m} TcO ₄ ⁻	0,9-1,0	0,9-1,0
Rf ^{99m} Tc-reducido-hidrolizado	0,0	0,0

2.5 Requisitos de control de calidad para radiofármacos

Los radiofármacos no tienen acción farmacológica, pero su administración 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 [1].

2.5.1 Pruebas biológicas

Las monografías de radiofármacos inyectables precisan que el producto sea estéril y estar exento de pirógenos. La presencia de pirógenos se mide a través de la prueba de endotoxinas bacterianas [1].

a) Prueba de esterilidad (MGA 0381)

Esta prueba tiene como finalidad investigar la presencia de microorganismos contaminantes en sustancias, preparaciones, o dispositivos médicos que de acuerdo con la Farmacopea, requieren ser estériles.

Esta prueba no asegura por si misma que un lote de producto sea estéril, esto sólo se logra con la validación de los procesos de esterilización y llenado aséptico.

El Medio Líquido de Tioglicolato y Medio de Digerido de Soya Trypticaseína, son los medios que se utilizan para llevar a cabo la prueba de esterilidad. El primero fundamentalmente para el cultivo de bacterias anaeróbicas, sin embargo en este medio de cultivo pueden crecer bacterias aeróbicas a una temperatura de incubación de 32.5 ± 2.5 °C entre 7 y 14 días. El segundo es adecuado para el cultivo de hongos y bacterias aeróbicas a temperatura ambiente de 22.5 ± 2.5 °C entre 7 y 14 días. Se siembra como mínimo, un volumen de muestra igual o mayor a la dosis a administrar.

Para asegurar la esterilidad de un radiofármaco es necesario aplicar las *Buenas Prácticas Radiofarmacéuticas*, que incluyen la utilización de técnicas asépticas para la producción, control de calidad y fraccionamiento de dosis, así como recomendaciones para trabajar en campanas de flujo laminar, limpieza y saneamiento de áreas.

El fabricante debe emprender las pruebas de esterilidad lo antes posible y leer los resultados después de haber expedido el producto. Sobre el fabricante de radiofármacos recae la total responsabilidad de asegurarse por todos los medios posibles de la validez de su método de esterilización, lo que puede abarcar el empleo de indicadores biológicos o químicos, así como la comprobación meticulosa y frecuente de método [42].

b) Determinación de endotoxinas bacterianas (MGA 0316)

Las endotoxinas de bacterias Gram negativas, son la causa más común de reacciones tóxicas asociadas a la contaminación de productos farmacéuticos y artículos médicos. Las exotoxinas son lipopolisacáridos cuya actividad es mayor que la de otras sustancias pirogénicas de estructura diferente.

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 las soluciones estériles recientemente preparadas, reactivos de alta pureza, material despirogenizado y una correcta metodología de trabajo.

La presencia de endotoxinas bacterianas produce diversos síntomas como fiebre, escalofrío, malestar, leucopenia, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza, rubor, dilatación de las pupilas y transpiración. Las reacciones pirogénicas se manifiestan en el paciente entre los 30 minutos y las 2 h después de su administración.

Los métodos usuales para la determinación de pirógenos son el método *in vitro* usando el lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (L.A.L), oficialmente conocido como prueba de endotoxinas bacterianas (MGA 0316).

La sensibilidad del método se expresa en unidades de endotoxina (UE). El límite de endotoxina aceptado para administración parenteral (excepto para intratecal) es de 5 UE/kg, siendo 0.2 UE/kg para administración intratecal. Para productos radiofarmacéuticos que no se administran por vía intratecal, el límite se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Límite de endotoxina} = 175/V$$

La prueba de pirógenos debe resultar negativa para todas las muestras ensayadas, entendiéndose una muestra negativa como aquella en que la concentración de endotoxina está por debajo de 175 UE/dosis para radiofármacos. Para frascos accesorios la muestra debe contener menos de 0.125 UE/mL [1].

c) Estabilidad

La estabilidad es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil [1,43].

La naturaleza particular de los radiofármacos exige establecer un período de utilización o una fecha de caducidad, pasada la cual no se recomienda su empleo. Por esta razón, todos los radiofármacos tienen una fecha de expiración luego de la cual no podrán ser utilizados.

El objetivo de los estudios de estabilidad, es proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o un medicamento varía con el tiempo, bajo la influencia de factores ambientales como: temperatura, humedad o luz. Los estudios permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y vida útil.

El período de tiempo aprovechable comienza en la fecha y hora en la cual se expresa la radiactividad en la etiqueta y se especifica en días, semanas o meses. Para los radionúclidos de vida mas larga, el periodo de utilización no excede de seis meses. Dicho periodo depende de la estabilidad radioquímica y de la cantidad de impurezas radionucleídicas de larga vida que contenga la preparación. En la fecha de caducidad, la radiactividad habrá descendido de tal modo que la que conserva resulta ya insuficiente para los fines a los que se destina. Además la descomposición química y radioquímica pueden haber reducido la pureza radioquímica hasta límites inaceptables. Por otra parte, es posible que el contenido de impurezas radionucleídicas sea tal que la dosis de radiaciones resulte excesiva para el paciente.

En radiofarmacia industrializada se debe llevar a cabo un programa anual de estabilidad de acuerdo a lo indicado en la NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de fármacos y medicamentos” o vigente, aplicando lo referente a la forma farmacéutica correspondiente [1,43].

Se debe elaborar un protocolo de estabilidad que indique como mínimo los siguientes parámetros:

- Nombre del fármaco o medicamento.
- Forma farmacéutica.
- Presentación y concentración.
- Tipo, tamaño y número de lotes.
- Descripción sistema contenedor-cierre.
- Condiciones del estudio.
- Tiempos de muestreo y análisis.
- Parámetros de prueba.
- Especificaciones de estabilidad.
- Referencia de los métodos analíticos por parámetro y su validación, si procede.
- Diseño reducido de análisis, cuando se justifique.
- Nombre y firma del responsable sanitario.

El informe del estudio debe contener:

- Nombre del fabricante del (los) fármaco (s) y/o del medicamento.
- Nombre del fármaco o medicamento.
- Forma farmacéutica, presentación y concentración.
- Número y tamaño del (los) lote(s) y fecha de fabricación.
- Descripción del sistema contenedor-cierre.
- Datos analíticos tabulados por condición de almacenamiento y fecha de inicio y término del estudio.
- Cromatogramas o espectrogramas representativos de los lotes en estabilidad al inicio y al fin del estudio, si procede.
- Conclusiones.
- Propuesta del período de caducidad.
- Nombre y firma del responsable sanitario.
- Para medicamentos con fármacos nuevos, durante los estudios clínicos de fase I, II, III el fabricante debe demostrar la estabilidad del material clínico hasta el tiempo máximo de duración del estudio.

d) Afinidad biológica

Algunos radiofármacos incluyen el marcado de anticuerpos y péptidos, los que requieren controles que garanticen su inmunoreactividad o reconocimiento a receptores específicos.

El reconocimiento biológico de un nuevo radiofármaco al receptor específico o blanco molecular seleccionado, debe ser caracterizado en términos de unión específica, unión a proteínas no blanco (unión inespecífica), farmacocinética y metabolismo. Las pruebas para evaluar la unión específica del radiofármaco al receptor se realizan utilizando membranas celulares o células que sobre-expresen el receptor en estudio. Los dos principales tipos de pruebas de unión a receptores específicos son los ensayos por competencia y saturación [44].

e) Prueba de seguridad general (MGA 0795)

Históricamente las guías internacionales para los ensayos clínicos en oncología recomiendan una dosis-masa inicial en fase I de un décimo de la dosis-masa que causa toxicidad severa o muerte a un 10 % de los animales estudiados (generalmente roedores) para asegurar que esta dosis-masa no causará toxicidad severa e irreversible en otras especies de mamíferos diferentes a roedores [45,46].

En los estudios de dosis única (también llamados microdosis) se administran dosis subfarmacológicas o farmacológicas a un número limitado de pacientes o voluntarios sanos, una “microdosis” está definida como una centésima parte (1/100) de la dosis requerida para producir el efecto farmacológico.

Los factores que determinan la cantidad de dosis absorbida de radiación por un tejido blanco no son efectos farmacológicos. Se llaman terapéuticos porque la energía depositada por unidad de masa (J/Kg=Gray=Gy) pueden producir ablación o disminución de un tejido maligno por un efecto físico y que en todos los radiofármacos será siempre el mismo: la dosis absorbida de radiación.

La prueba de seguridad general permite detectar cualquier toxicidad inesperada e inaceptable que pudiera haberse introducido durante su manufactura o que se hubiese desarrollado durante el almacenamiento del producto. Esta toxigenidad se distingue de la toxicidad intrínseca.

Debe usarse para la prueba ratones sanos (preferiblemente de una cepa conocida por ejemplo: la cepa BALB/c). El día de la prueba, seleccionar cinco ratones que pesen entre 18 g y 25 g. Administrar, a cada uno de los ratones la dosis de prueba apropiada por la vía de elección.

Observar los animales durante 48 h, anotar la mortalidad a las 24 h y 48 h. Si al final del período de observación todos los animales sobreviven, la muestra pasa la prueba de seguridad. Si uno o más ratones mueren, repetir la prueba usando otros diez ratones que pesen 19.5 a 20.5 g, el fármaco pasa la prueba de seguridad en el caso de haber sido necesaria una repetición y si el número total de ratones muertos no excede del 10 % del total de ratones utilizados [47].

f) Etiquetado

Se define a una etiqueta como todo marbete, rótulo, inscripción, marca o imagen gráfica que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado, marcado en relieve o en huecograbado, adherido o precintado en cualquier material susceptible de contener el dispositivo médico incluyendo el envase mismo.

Las etiquetas de los radiofármacos deben cumplir con lo establecido en la Ley General de Salud [48], el Reglamento de Insumos para la Salud [49] y la NOM-137-SSA1-2008 o versión vigente [50]. En el envase primario debe contener la siguiente información:

- Nombre comercial del producto.
- Número de registro otorgado por la Secretaría de Salud.
- Nombre y dirección del fabricante: marca o logotipo, razón social o nombre y domicilio comercial del fabricante y distribuidor registrados ante la Secretaría.
- Radiactividad total existente en la fecha y hora que se indican (cuando el tiempo de vida media es superior a 30 días, basta con especificar la fecha).
- La fecha de caducidad y el período de utilización.
- Número de lote.
- En el caso de una solución, el volumen total de la misma.
- Condiciones de conservación.
 - a) Congelación: inferior a 0 °C.
 - b) Refrigeración: entre 2 y 8 °C.
 - c) Fresco: entre 8 y 15 °C.
 - d) Temperatura ambiente: entre 15 y 30 °C.
- Leyenda “Peligro, material radiactivo para su uso exclusivo en medicina”.
- Indicación de los radionúclidos.
- Vida media.
- Tipo de radiaciones que emiten.
- Logotipo internacional para indicar materiales radiactivos.
- Indicaciones de uso dentro de laboratorio o gabinete.
- Técnica para su empleo.

2.5.2 Pruebas fisicoquímicas

Aseguran el contenido y la potencia del radiofármaco, indicando el nivel de radionúclido, impurezas radioquímicas, pH, la fuerza iónica, la osmolaridad, y el estado físico de la muestra particularmente si es un coloide.

a) Inspección visual

Se consideran partículas a las sustancias extrañas móviles, que no sean burbujas de aire, originadas en forma aleatoria, que no pueden ser cuantificadas por análisis químico por la pequeña cantidad de material que representan y por su composición heterogénea. Las soluciones inyectables, incluyendo a las soluciones reconstituídas a partir de sólidos estériles y destinadas para uso parenteral, no deben contener partículas extrañas que puedan detectarse por simple inspección visual.

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) Determinación de 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. En el caso de radiofármacos preparados a nivel Radiofarmacia Hospitalaria, la evaluación colorimétrica con papel pH, es el método de elección.

c) Determinación de la pureza radionucleídica

El método más utilizado para examinar la pureza radionucleídica en los emisores gammas es la espectrometría gamma.

En el caso particular del eluato de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 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. La presencia de impurezas radionucleídicas puede causar error de dosificación, incremento de radiación absorbida y/o error diagnóstico.

d) Determinación de la pureza radioquímica

La pureza radioquímica puede estudiarse mediante diversas técnicas, pero tienen particular importancia la cromatografía de líquidos en papel, en capa delgada, en capa delgada instantánea y la cromatografía de líquidos de alta resolución (MGA 0241).

1) Cromatografía Instantánea en Capa Fina: por lo general es microfibras de vidrio impregnada de gel de sílice (SG) o ácido polisilícico (SA). Después de terminar la separación, se determina la distribución de la radiactividad en el cromatograma.

La cromatografía se lleva a cabo introduciendo el soporte en un recipiente que contenga el disolvente indicado en la monografía correspondiente. En este tipo de cromatografías cada componente de una determinada muestra es caracterizada por un valor de R_f , el cual se define como la relación de la distancia recorrida por cada componente y la distancia recorrida por el disolvente.

Algunas consideraciones deberán ser observadas antes y durante la realización de los cromatogramas:

- La gota de la muestra debe ser pequeña (1 a 5 μL).
- El soporte cromatográfico debe estar en óptimas condiciones para ser usado (control de humedad si es sílica gel, que no esté dañado, quebrado, doblado).
- El o los disolventes que compongan la fase móvil deben ser de alta pureza, teniendo especial precaución en absorción de humedad o descomposición por efecto de la luz.

Después de la adición de la gota, se introduce el soporte en el recipiente que contiene el disolvente, tomando precaución que solamente la parte inferior de la tira, debajo del punto de aplicación, entre en contacto con el disolvente y que los bordes de la tira no contacten el recipiente.

Cuando el disolvente migra hasta la distancia deseada, se remueve la tira, se seca y se mide la radiactividad en un radiocromatógrafo, bajo la gammacámara o se corta en segmentos y se mide la radiactividad en un contador de centelleo tipo pozo.

2) La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación que implica la transferencia de masa entre la fase estacionaria y móvil, utiliza una fase líquida móvil para separar los componentes de una mezcla. La fase estacionaria puede ser un líquido o una fase sólida. Estos componentes se disuelven primero en un disolvente, y luego fluyen a través de una columna cromatográfica a una presión elevada. En la columna, la mezcla se separa en sus componentes.

La migración diferencial del HPLC es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla móvil entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención (t_r) se mide desde el momento de la inyección de la muestra, hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma [1].

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

- Isocrática: cuando no se modifica la composición de la fase móvil durante el análisis
- 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.

2.6 Liofilización

Liofilización o secado por congelación es un proceso de secado, en el cual el agua se sublimada directamente de un material previamente congelado; esta técnica se aplica cuando el producto en solución es químico, biológico o térmicamente inestable en las condiciones normales de almacenaje [51].

Las ventajas de este proceso son la relativa facilidad de procesar un líquido, la estabilidad mejorada de un polvo seco y, a menudo, rápida disolución que ocurre después de la reconstitución (rehidratación) de la “pastilla” liofilizada.

Para fabricar un producto liofilizado con reconstitución perfecta es muy importante el control del proceso.

La liofilización exitosa depende del conocimiento acerca del comportamiento del producto y sus condiciones de manufactura; así cualquier aditivo, agente formador (relleno), estabilizador, entre otros, altera las características de congelación y por tanto las condiciones de liofilización al ser aplicadas; la solución que se liofilizará debe ser formulada de modo que la “pastilla” obtenida después de secar tenga las siguientes características:

- Invariable con respecto a su actividad biológica, al ser reconstituida.
- Disolución rápida al ser reconstituida.
- Suficientemente fuerte (compacta) para prevenir el agrietamiento y la pulverización.
- Color uniforme.
- Invariable con respecto a su forma y tamaño comparada con la masa congelada de la cual provino.

Los aspectos más importantes del proceso de liofilización, que podrían afectar las características como morfología, cristalinidad, actividad biológica y reconstitución, son las propiedades coligativas del o los ingredientes activos (que tienen acción farmacológica), el o los excipientes (sin acción farmacológica), las características de la etapa de congelación, la velocidad de liofilización (sublimación), de los cambios de temperatura en todas las etapas del proceso y el contenido final de humedad en la “pastilla” liofilizada; determinará cuál de estos parámetros merecen atención dependiendo de la naturaleza del material a ser liofilizado.

El proceso de liofilización puede dividirse en tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario [52-55].

2.7 Buenas Prácticas de Manufactura

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos son controlados y fabricados consistentemente de acuerdo a los estándares de calidad apropiados para cumplir con el fin para el que fueron diseñados y como es requerido para que se autorice su comercialización [4].

Las Buenas Prácticas de Manufactura en Radiofarmacia Industrial comprenden la preparación y manejo de radiofármacos y combinan los principios de las BPM's y aspectos relacionados con protección radiológica. Su objetivo principal es asegurar la calidad de los radiofármacos antes de su administración en un ser humano.

La radiofarmacia industrializada es aquella que produce radiofármacos y precursores (radiactivos y no radiactivos) para su distribución comercial. Es necesario tomar en cuenta que muchos radiofármacos se fabrican en lotes pequeños y que por su corta vida media se liberan antes de realizar determinadas pruebas de control de calidad, por lo que adquiere mucha importancia poseer un sistema de aseguramiento de la calidad en proceso de evaluación continua [1].

La producción industrializada de radiofármacos deberá estar debidamente autorizada por las autoridades sanitarias y de protección radiológica competentes. Cada producto debe tener su registro sanitario de acuerdo a la normatividad vigente [1].

2.7.1 Buenas Prácticas de Validación

Dentro de las BPM se encuentra la validación de procesos, que es el establecimiento de la evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumplirá con sus especificaciones y atributos de calidad preestablecidos y, por lo tanto, asegura la eficiencia y efectividad del producto [56]. Los estudios de validación aplican a métodos analíticos, equipos, sistemas críticos (agua, aire, vapor) y procesos, como pueden ser de manufactura, esterilización, liofilización, llenado aséptico, entre otros. Al mismo tiempo, los estudios de validación verifican que el desempeño del sistema se mantenga bajo control en condiciones de operación extremas [4]. Un proceso exitosamente validado puede reducir la dependencia de las pruebas durante el proceso y de producto terminado [56-59].

La validación se define como la evidencia documentada que proporciona un alto grado de certeza que un proceso, procedimiento, método, equipo o sistema producirá consistentemente un producto o resultado dentro de especificaciones previamente establecidas.

2.7.1.1 Tipos de validación

La validación de procesos se puede establecer a través de diferentes tipos de validación: validación prospectiva, validación concurrente o validación retrospectiva [1].

En este caso, se pretende validar el proceso de producción del precursor liofilizado no radiactivo (HYNIC-RGD-Sn) del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDFK)]₂. El tipo de validación de elección es la validación prospectiva, que es aquella en la que se ejecuta y documenta un protocolo de prueba previamente autorizado, el cual es elaborado para demostrar que un proceso se desempeña de acuerdo a su diseño, previo a la manufactura de un producto. Se empleará este método debido a que es el método de validación más controlado.

2.8 Legislación sanitaria

El registro sanitario, en los términos de la Ley General de Salud (Artículo 368), es una autorización sanitaria, con la cual deberán contar los medicamentos, estupefacientes, sustancias psicotrópicas y productos que los contengan; equipos médicos, prótesis, órtesis, ayudas funcionales, **agentes de diagnóstico**, insumos de uso odontológico, materiales quirúrgicos, de curación y productos higiénicos, estos últimos en los términos de la fracción VI del artículo 262 de la Ley General de Salud.

Los dispositivos médicos también denominados insumos para la salud, pueden abarcar desde un guante de látex para cirujano (material de curación), pasta para blanquear los dientes (insumo odontológico), equipo para ultrasonido (equipo médico) hasta un implante (ayuda funcional) se utilizan para prevenir, diagnosticar o sustituir el funcionamiento de alguna parte del cuerpo. Estos requieren contar con Registro Sanitario para poder ser fabricados, distribuidos, comercializados o usados en nuestro país; este registro es la autorización que el Gobierno Federal otorga una vez que el solicitante ha demostrado ante evidencias documentadas que el producto es seguro, eficaz y de calidad.

2.8.1 Requisitos y lineamientos para la obtención del Registro Sanitario

Para obtener el registro de dispositivos médicos se debe cumplir con las Buenas Prácticas de Fabricación conforme a la legislación sanitaria vigente.

Se debe presentar la solicitud en el Formato General de Solicitudes, adicionando el pago de derechos correspondiente de acuerdo a la clasificación con base al riesgo sanitario del producto conforme a la Ley Federal de Pago de Derechos.

Adicionalmente se debe presentar copia del aviso de funcionamiento del establecimiento y del aviso del responsable sanitario.

Para el caso de dispositivos médicos que utilizan fuentes de radiación, además de lo anterior, presentar copia de la licencia correspondiente expedida por la Secretaría de Energía (Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardas).

Se debe presentar el expediente con la información científica y técnica en idioma español que describa las características del dispositivo médico y demuestre la seguridad y eficacia del mismo así como la documentación legal correspondiente conforme a los siguientes lineamientos:

- 1) Información General, que incluya al menos:
 - Nombre genérico.
 - Nombre comercial.
 - Forma física o farmacéutica.
 - Presentaciones.
 - Finalidad de uso.
 - La categoría y clasificación con base al nivel de riesgo sanitario.
- 2) Listado de accesorios, para el caso de registro de equipos se puede incluir el listado de accesorios que se suministren con el mismo para que sean incluidos en el oficio de registro.
- 3) Etiqueta, presentar por duplicado proyecto de etiqueta o contra etiqueta (marbete) con la información mínima obligatoria en español, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana vigente y demás disposiciones aplicables.
- 4) Instructivo de Uso, para aquellos dispositivos médicos que requieran de instrucciones detalladas para su buen uso o funcionamiento y que no requieran de un manual de operación como tal, se debe presentar por duplicado ejemplar que contenga la siguiente información dependiendo del tipo de producto:

- Descripción del producto.
 - Listado de componentes o partes del producto, según corresponda.
 - Finalidad de uso.
 - Condiciones de conservación y almacenamiento, cuando aplique.
 - Precauciones.
 - Preparación, cuando aplique.
 - Advertencias y leyendas alusivas correspondientes.
 - Contraindicaciones, cuando aplique.
 - Eventos adversos, cuando aplique.
 - Para medios de contraste, se debe indicar la vía de administración, la forma farmacéutica y el contenido del ingrediente activo por unidad de dosis.
- 5) Manual de Operación, para equipos o instrumentos que requieran de instrucciones detalladas para su buen uso o funcionamiento.
- 6) Descripción o diagrama de los componentes funcionales, partes y estructura.
- 7) Declaración de fórmula cuali-cuantitativa por unidad de medida, dosis o porcentual, para productos formulados, incluyendo todos los ingredientes del producto, debidamente firmada por el responsable de la calidad del fabricante en el país de origen, o por el responsable sanitario del establecimiento.
- 8) Materias primas. Para implantes, medios de contraste, agentes de diagnóstico que se administran directamente al paciente (*in vivo*) y agentes de diagnóstico con isótopos radiactivos e inyectables, el solicitante de registro debe proporcionar la siguiente información relacionada con los ingredientes activos y aditivos empleados en la fabricación del producto: ingredientes activos y aditivos.
- 9) Información técnica y científica que soporte las características de atoxicidad, seguridad y eficacia del dispositivo médico, para aquellos productos que por sus condiciones de uso, función o permanencia en el organismo así lo requieran.
- 10) Información sobre el control del producto terminado.
- 11) Estudios de estabilidad. Para aquellos dispositivos médicos que por sus características y finalidad de uso requieran de ostentar una fecha de caducidad, se debe presentar el resumen que contenga las determinaciones a evaluar y las conclusiones de los estudios de estabilidad en el envase primario propuesto. Dicho resumen deberá estar revisado y firmado por el responsable de la unidad de calidad del fabricante o por el responsable sanitario del establecimiento solicitante del registro sanitario en México.
- 12) Reportes de tecnovigilancia (vigilancia de la seguridad de dispositivos médicos). Se debe presentar la información disponible sobre eventos adversos que se hayan presentado durante su comercialización o uso.

3. Justificación

En México el cáncer de mama se ha convertido en un problema de salud pública y un serio desafío para el sistema de salud, colocándose como la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años solo detrás de la diabetes mellitus. Además de las graves implicaciones que supone la sobrevida de las pacientes, retrasar la detección genera también serias presiones sobre el sistema de salud.

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 se ha marcado con ^{111}In , ^{90}Y , ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{64}Cu y ^{18}F [60]. 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 [61].

Decristoforo et.al., 2006 [62] 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 como coligantes. La investigación de este radiofármaco es reciente, lo cual deja un amplio campo para su investigación.

En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares se desarrolló una preformulación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ para imagen *in vivo* de integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Dado que la preformulación se encuentra desarrollada, se requiere la transferencia de una formulación farmacéutica liofilizada eficaz, estable y segura mediante un procedimiento validado a la planta de producción de radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, de manera tal que sea posible aplicar un procedimiento de producción que permita, entre otros requisitos la obtención de su registro sanitario, indispensable para la distribución de este tipo de formulaciones farmacéuticas a los distintos centros de medicina nuclear molecular dentro y fuera del país [1].

4. Hipótesis

La preparación de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfk)]₂ a partir de una formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn), estable y segura permitirá la detección eficaz de la sobre-expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ en pacientes con cáncer de mama mediante la obtención imágenes por técnicas de medicina nuclear molecular.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

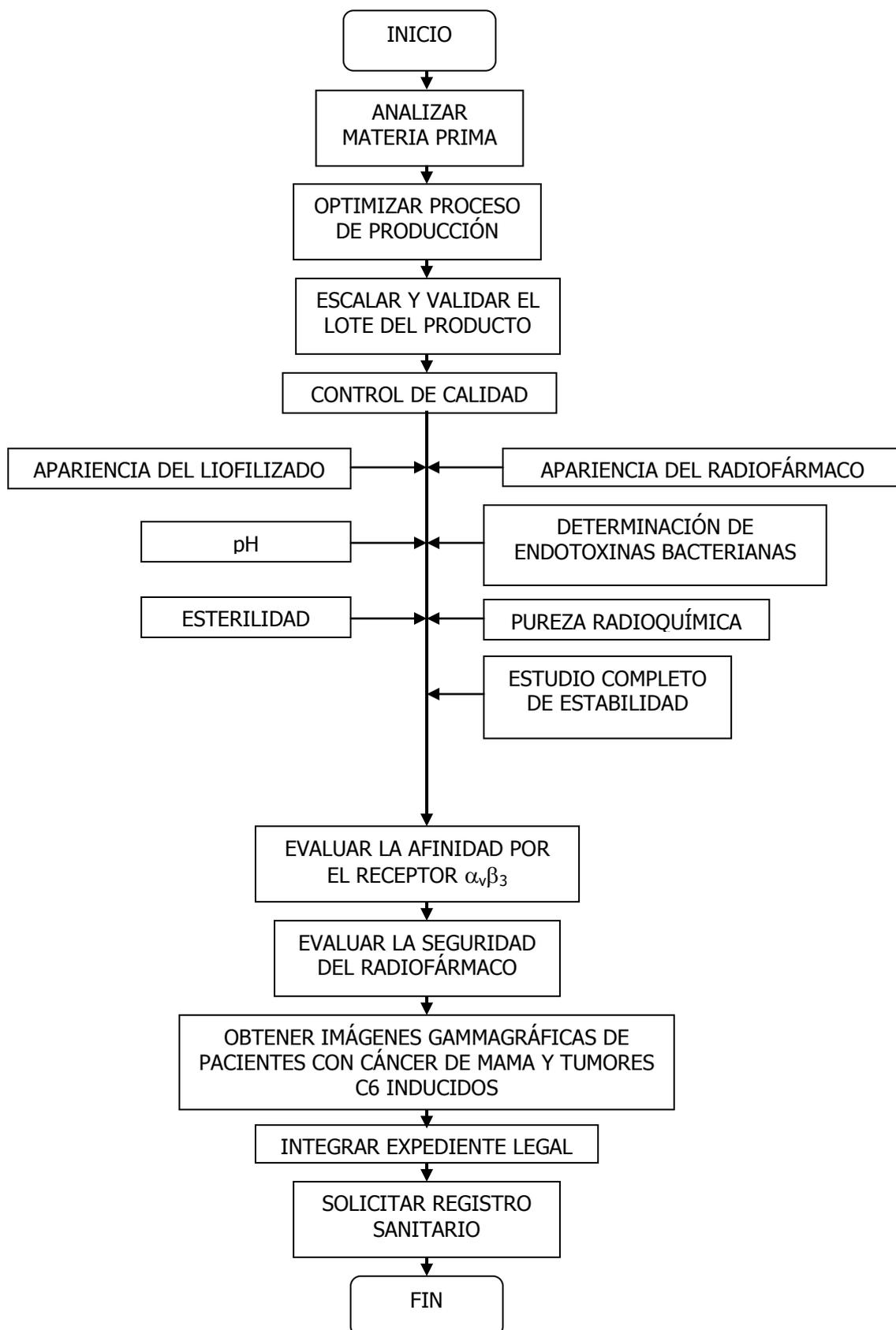
Optimizar el proceso de producción de una formulación farmacéutica liofilizada para la preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ que se una específicamente a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ para ser empleada en los gabinetes de medicina nuclear en la obtención de imágenes gammagráficas para la detección oportuna de cáncer de mama.

5.2 Objetivos específicos

- a) Optimizar el proceso de fabricación de la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn), mediante la evaluación de lotes piloto.
- b) Escalar y validar el lote de la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn) y establecer especificaciones de liberación.
- c) Transferir el proceso de fabricación de la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn) a la planta de producción de radiofármacos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
- d) Elaborar protocolos e informes de validación para la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn).
- e) Elaborar protocolo e informe de estabildades de la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn).
- f) Ejecutar protocolos de estabildades y validación de la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn).
- g) Evaluar la afinidad por el receptor $\alpha_v\beta_3$ del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, mediante ensayos de competencia *in vitro*.
- h) Evaluar la seguridad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación liofilizada optimizada de acuerdo al Método General de Análisis (MGA) 795 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente.
- i) Evaluar el radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación liofilizada optimizada para la obtención de imágenes gammagráficas de pacientes con cáncer de mama y tumores C6 inducidos en ratones atómicos.
- j) Integrar el expediente legal del producto, de acuerdo a la normativa establecida para agentes de diagnóstico.
- k) Solicitar el registro sanitario a la Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios.

6. Metodología

6.1 Diagrama de flujo



6.2 Procedimiento

6.2.1 Análisis de materias primas empleadas en la fabricación del núcleo-equipo HYNIC-RGD-Sn

Se realizó el análisis farmacopéico (FEUM 10^a ed) de manitol y para el resto de los componentes de la formulación se realizó el análisis de acuerdo a los procedimientos establecidos en cada caso; se solicitó el certificado de liberación al Responsable Sanitario.

Los componentes de la formulación liberados se utilizaron para la fabricación de los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn.

6.2.2 Optimización del proceso de fabricación del núcleo-equipo HYNIC-RGD-Sn

Para encontrar la combinación de niveles de los factores que producen un valor óptimo de la variable dependiente (pureza radioquímica), se estableció un diseño factorial de 4 variables (2x2x2x3).

Se evaluaron lotes piloto (10% del tamaño de lote a validar), con el fin de optimizar las condiciones de producción. Las variables evaluadas se definen en la Tabla 2:

Tabla 2. Diseño factorial experimental para la selección de la formulación óptima para la formación del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Variable independiente	Nivel	Valor
SnCl ₂	2	10 µg, 20 µg
Tiempo de incubación	3	10 min, 20 min, 30 min
Manitol	2	25 mg, 50 mg
Réplicas	2	Réplica 1, Réplica 2

En la Tabla 3 se muestran las diferentes combinaciones del diseño factorial 2x2x2x3. El número total de combinaciones fue de 24. Los resultados de pureza radioquímica obtenidos se evaluaron mediante un análisis de varianza para conocer la contribución de cada variable.

La pureza radioquímica del complejo ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se realizó por HPLC.

Tabla 3. Tratamientos del diseño factorial experimental en la selección de la formulación óptima del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Tratamiento	Contenido SnCl₂ (μg)	Contenido manitol (mg)	Tiempo de incubación (min)	Réplica
1	10	25	10	1
2	10	25	10	2
3	20	25	10	1
4	20	25	10	2
5	10	25	20	1
6	10	25	20	2
7	20	25	20	1
8	20	25	20	2
9	10	25	30	1
10	10	25	30	2
11	20	25	30	1
12	20	25	30	2
13	10	50	10	1
14	10	50	10	2
15	20	50	10	1
16	20	50	10	2
17	10	50	20	1
18	10	50	20	2
19	20	50	20	1
20	20	50	20	2
21	10	50	30	1
22	10	50	30	2
23	20	50	30	1
24	20	50	30	2

6.2.3 Evaluación de la pureza radioquímica

6.2.3.1 Obtención de la solución de ^{99m}TcO₄Na

La solución estéril y libre de endotoxinas bacterianas de pertechnetato de sodio se obtuvo de un generador (⁹⁹Mo/^{99m}Tc) Getec-ININ.

1. Se tomó un frasco con eluyente (NaCl al 0.9 %) al cual se le desprendió el centro de la retapa de aluminio y se limpió el centro con alcohol.
2. Se retiró el frasco protector de la cavidad menor del generador y se colocó en su lugar el frasco con solución eluyente con la presión suficiente para que la aguja del generador penetre en el frasco de eluyente.
3. Se retiró el frasco protector de la cavidad mayor del generador y en su lugar se colocó un frasco al vacío dentro de un blindaje de plomo.
4. La elución es evidente por el burbujeo constante en el vial de solución salina.
5. Cuando la elución terminó se retiró el eluato de pertechnetato de sodio (vial con blindaje de plomo).
6. La actividad del eluato se midió en un calibrador de dosis (cámara de ionización).

6.2.3.2 Evaluación de la pureza radioquímica

El análisis por cromatografía de alta resolución se realizó con un sistema Waters® usando software Millenium® un detector de diodos UV-photodiode y un detector de radiactividad. Columna μ Bondapak C-18 (3.9 X 300 MM) con un flujo de 1 mL/min usando el sistema de gradientes que se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Sistema de gradientes empleados en la evaluación de pureza radioquímica por HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% acetonitrilo	% agua
0	1	0	100
3	1	0	100
10	1	50	50
20	1	50	50
23	1	70	30
27	1	0	100
30	1	0	100

6.2.4 Análisis de materias primas

El análisis de los aditivos que cuentan con una monografía en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos edición vigente, (Manitol, EDDA, Fosfato de sodio dibásico y Fosfato de sodio monobásico) se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en cada monografía, a fin de obtener el certificado analítico. Dichos análisis se realizaron con el apoyo de la Gerencia de Ciencias Básicas en el departamento de Química del ININ.

Se realizaron pruebas de identidad de grupos funcionales para las materias primas que no cuentan con una monografía farmacopéica.

6.2.5 Escalamiento del lote

La formulación optimizada se escaló a un tamaño de 40 viales, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Preparación de la solución HYNIC-RGD

- a) Se disolvió 1 mg de HYNIC-RGD en 200 μ L de etanol al 10 %.
- b) Se agregaron 800 μ L de agua inyectable previamente nitrogenada para llevar a 1 mL.

2. Preparación de la solución de Ácido etilendiamino-N, N'-diacético (EDDA).

- a) Se pesaron 400 mg de EDDA.
- b) Se disolvieron los cristales de EDDA en 20 mL de agua inyectable previamente nitrogenada, mediante agitación y calentamiento a una temperatura entre 70-75 °C hasta su completa disolución.
- c) Se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente.

3. Preparación de la solución de Tricina-Manitol.

- a) Se pesaron 800 mg de tricina.
- b) Se pesaron 2.0 g de manitol.
- c) Se disolvieron los cristales de tricina y manitol en 19 mL de agua inyectable previamente nitrogenada mediante agitación hasta su completa disolución.

4. Preparación de la solución de EDDA-tricina-manitol.

- a) Se agregó lentamente la solución de EDDA a la solución de Tricina-Manitol.

5. Preparación de la solución de SnCl_2 .

- a) Se pesaron 10 mg de cloruro estanoso anhidro en un vial limpio y seco.
- b) Se disolvieron los cristales de cloruro estanoso con 20 μL de HCl concentrado.
- c) Se añadieron 10 mL de agua inyectable previamente nitrogenada durante al menos 15 min y homogenizar.

6. Preparación de la formulación de HYNIC-RGD-Sn.

- a) Se agregó 1 mL de la solución de HYNIC-RGD lentamente a la solución de EDDA-Tricina-Manitol.
- b) Se agregó 800 μL de la solución de SnCl_2 lentamente a la solución de EDDA-Tricina-Manitol y HYNIC-RGD.
- c) Se midió el pH de la solución final empleando el potenciómetro previamente calibrado. El pH final de la solución es 4.0-4.5.

7. Esterilización de la formulación HYNIC-RGD-Sn.

Se esterilizó la solución por filtración en membrana Millipore de 0.22 μm .

8. Dosificación de la formulación de HYNIC-RGD-Sn.

- a) La solución se fraccionó en volúmenes de 1 mL en 40 frascos ampula de 10 mL estériles y libres de endotoxinas bacterianas.
- b) Se colocó el tapón de elastómero estéril y libre de endotoxinas bacterianas a cada frasco sin tapar totalmente.

9. Liofilización de la formulación de HYNIC-RGD-Sn.

- a) La liofilización se realizó de acuerdo a las instrucciones internas. La duración del ciclo de liofilización fue de 24 h.
- b) Durante el ciclo de liofilización se colocaron termopares calibrados en el producto. Las gráficas obtenidas se compararon contra las del ciclo establecido. Dichas gráficas se anexaron a la orden de producción correspondiente.

10. Preparación del Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.0.

- a) Se pesaron 2.3 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4).
- b) Se pesaron 620 mg de fosfato de sodio monobásico hidratado ($\text{Na}_2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- c) Se disolvieron mediante agitación magnética y calentamiento.
- d) El pH de la solución se midió con un potenciómetro calibrado.

- e) La solución se transfirió a un matraz volumétrico estéril y libre de endotoxinas bacterianas de 100 mL y se aforó con agua grado inyectable.

La solución se esterilizó por filtración a través de membrana Millipore 0.22 μm y se dosificó en volúmenes de 5 mL en 20 frascos ampula de 10 mL estériles y libres de endotoxinas bacterianas.

La orden de producción fue aprobada por el Encargado de Producción antes de que se efectuara el proceso.

6.2.6 Fabricación de lotes de validación de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn

Se fabricaron tres lotes de producto según la orden de producción y el protocolo de validación previamente aprobados. En la fabricación de los lotes, se mantuvieron las mismas condiciones de producción que garanticen la reproducibilidad del proceso.

En cada lote se evaluaron controles de calidad, verificando las propiedades de uniformidad de lote a lote.

Durante el desarrollo de la validación del proceso se debe tener apego a las Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Documentación.

6.2.7 Estudio de estabilidad de los núcleo-equipos de la formulación farmacéutica liofilizada para la preparación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$

Los lotes de validación se sometieron a pruebas de estabilidad de anaquel por un periodo de un año a partir de su fecha de producción. Se evaluaron mensualmente los siguientes parámetros del liofilizado HYNIC-RGD-Sn y del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ obtenido a partir de la reconstitución y marcado con pertecnecio de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) de la formulación farmacéutica liofilizada: apariencia del liofilizado, apariencia del radiofármaco, color, pH, esterilidad al inicio y al término del estudio siguiendo un diseño de análisis reducido por categoría, endotoxinas bacterianas al inicio y término del estudio siguiendo un diseño de análisis reducido por categoría; y pureza radioquímica siguiendo un análisis reducido factorial fraccionado.

Del estudio de estabilidad completo se obtendrá la información necesaria para proponer un periodo de caducidad tentativo.

Los estudios de estabilidad demostraron la conservación de las características de identidad del producto que garantizan la seguridad, eficacia y calidad durante su periodo de vida útil.

Para la elaboración del protocolo de estabilidades se tomó como referencia la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de Fármacos y Medicamentos” [43].

6.2.8 Control de calidad de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn liofilizado

El control de calidad de los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn se realizó tanto a la formulación farmacéutica liofilizada como al radiofármaco obtenido (^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂). A continuación se describen las pruebas realizadas a cada uno de ellos.

6.2.8.1 Parámetros de control de calidad evaluados en la formulación farmacéutica liofilizada

a) Prueba de esterilidad (MGA 0381)

1. Bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar empleando una jeringa estéril y libre de endotoxinas bacterianas se adiciona 1 mL del liofilizado reconstituido a un tubo que contiene 10 mL de Medio de Digerido de Soya Trypticaseína al 50 % y se homogenizó.
2. Bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar empleando una jeringa estéril y libre de endotoxinas bacterianas se adiciona 1 mL del liofilizado reconstituido a un tubo que contiene 10 mL de Medio Líquido de Tioglicolato y se homogenizó
3. Una vez sembradas las muestras, fueron incubadas bajo las siguientes condiciones durante 14 días:

Medio Líquido de Tioglicolato	30 - 35 °C
Medio de Digerido de Soya Trypticaseína	20 - 25 °C

4. Se observó diariamente si existía o no proliferación bacteriana, la cual es evidenciada por el enturbiamiento del medio.

b) Prueba de determinación de endotoxinas bacterianas por el método de L.A.L. (MGA. 0316)

1. Tubo de prueba: bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar empleando una jeringa estéril y libre de endotoxinas bacterianas se adiciona 0.1 mL del liofilizado reconstituido a un tubo que contiene 0.1 mL del reactivo L.A.L. y se agita suavemente por 30 segundos teniendo la precaución de no generar burbujas.
2. Control positivo: Bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar empleando una jeringa estéril y libre de endotoxinas bacterianas se adiciona 0.1 mL de la solución “Agua control positivo” y se agita suavemente por 30 segundos teniendo la precaución de no generar burbujas.
3. Una vez preparadas las muestras incubar los tubos en reposo absoluto dentro de la cámara de incubación a 37 °C ± 1.0, durante 60 minutos.
4. Terminado el tiempo de incubación observar los tubos evitando cualquier movimiento brusco, en la Tabla 5 se muestra la interpretación de los resultados.
5. Registrar el resultado obtenido.

Tabla 5. Interpretación de resultados de la prueba de determinación de endotoxinas bacterianas (MGA 0316).

Prueba	Método	Observación	Resultado	Interpretación
Determinación de Endotoxinas bacterianas	FEUM MGA 0316	Formación gel firme, capaz de mantener su integridad cuando se invierte 180° con un movimiento suave.	POSITIVO	Indica la presencia de la endotoxina en concentración por lo menos igual a la sensibilidad del reactivo de LAL multiplicada por la dilución con la que se ensayó la muestra.
		Cuando en el tubo de prueba hay ausencia de gelificación o la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se invierte 180° con un movimiento suave.	NEGATIVO	La concentración de endotoxina en concentraciones menores del umbral pirogénico puede causar: floculación, granulación o aumento de la viscosidad; tales efectos se consideran como una prueba negativa.

6.2.8.2 Parámetros de control de calidad evaluados en el radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂

6.2.8.2.1 Procedimiento de marcado de la formulación farmacéutica liofilizada

La prueba se realizó como se describe a continuación y se muestra en la Figura 5:

1. El frasco que contenía el reactivo liofilizado (HYNIC-RGD-Sn) se colocó en un contenedor de plomo.
2. Se adicionó 1 mL exacto del buffer de fosfatos 0.2 M pH 7 y se agitó por aproximadamente 10 segundos.
3. Inmediatamente se adicionó, 1 mL exacto de solución de ^{99m}TcO₄Na (perteneciente de sodio), estéril y libre de endotoxinas bacterianas.
5. Se incubó en un baño seco previamente calibrado a 92 °C durante 10 min.
6. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

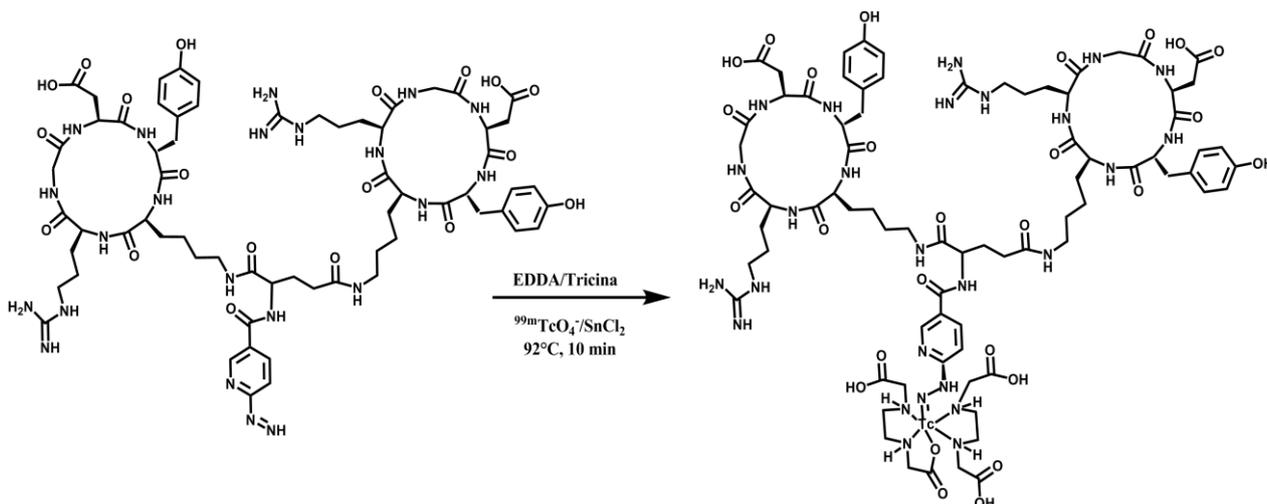


Figura 5. Esquema de preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

6.2.8.2.2 Evaluación de la pureza radioquímica

6. Con una pipeta automática se colocaron 5 μL del radiofármaco en el origen de cada una de dos tiras de ITLC-SG (Cromatografía instantánea de capa delgada de sílica gel).
7. Sin secar la muestra, se desarrollaron las cromatografías a un frente de 8 cm, usando las fases móviles que se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Descripción del sistema cromatográfico para la determinación de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Especie química	Fase móvil	
	2-butanona	Metanol/acetato de amonio 1 M (1:1 v/v)
Rf ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	0,0	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -coligante	0,0	0,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0	0,0

La pureza radioquímica debe ser mayor de 90 %. El compuesto no debe contener más del 10 % de impurezas radioquímicas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ ó ^{99m}Tc hidrolizado).

8. Las tiras se retiraron de los diferentes solventes y se dejaron secar.
9. Se cortaron en fracciones de 1 cm y se contó su actividad en un detector de centelleo Auto In-V-tron[®] 4010.

6.2.8.2.3 Apariencia

Se evaluó por análisis visual de la solución del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ obtenida a partir del núcleo-equipu HYNIC-RGD-Sn.

6.2.8.2.4 pH

De la muestra marcada para determinación de la pureza radioquímica, se tomó con una jeringa una pequeña porción de la muestra y se depositó cuidadosamente sobre una tira de papel indicadora de pH.

6.3 Afinidad del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ por la proteína $\alpha_v\beta_3$

La afinidad por la proteína $\alpha_v\beta_3$ se determinó mediante ensayos de competencia *in vitro*. La determinación se realizó por triplicado.

El perfil de competencia se obtuvo cuantificando el porcentaje de unión de una concentración constante de ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ que permaneció en la muestra a medida que se le añadieron concentraciones crecientes de DOTA-E-(c[RGDfK])₂, según lo indicado en el siguiente procedimiento:

1. Se colocó 100 μ L de la proteína $\alpha_v\beta_3$ (150 ng/mL de Buffer de unión) en cada pozo de la placa.
2. Se incubó a 4 °C por 17 h.
3. Las placas se lavaron 2 veces con Buffer de unión (200 μ L).
4. Se adicionaron 200 μ L de Buffer de bloqueo.
5. Se incubó a temperatura ambiente por 2 h.
6. Las placas se lavaron 2 veces con Buffer de unión (200 μ L).
7. Se adicionaron 70 μ L de ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación farmacéutica liofilizada.
8. Se adicionaron 100 μ L de cada una de las siguientes diluciones de DOTA-E-(c[RGDfK])₂, Tabla 7.

Tabla 7. Diluciones de DOTA-E-(c[RGDfK])₂ para el ensayo de competencia.

DOTA-E-(c[RGDfK])₂	Dilución
[1]	[10 ⁻⁵] μ M
[2]	[10 ⁻⁶] μ M
[3]	[10 ⁻⁷] μ M
[4]	[10 ⁻⁸] μ M
[5]	[10 ⁻⁹] μ M
[6]	[10 ⁻¹⁰] μ M
[7]	[10 ⁻¹¹] μ M
[8]	[10 ⁻¹²] μ M
[9]	[10 ⁻¹³] μ M

9. Se incubaron a 37 °C por 1 h.
10. Las placas se lavaron 3 veces con Buffer de unión (200 μ L).
11. Se cortaron los pozos.
12. Se contó cada pozo en un detector de NaI (TI) acoplado a un analizador monocanal.
13. Se determinó el IC₅₀.

6.4 Prueba de seguridad general (MGA 0795)

1. Se seleccionaron 5 ratones de 18-25 g (cepa BALB/c).
2. Se administraron por vía intraperitoneal 100 μL de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación farmacéutica liofilizada de acuerdo a lo indicado en el Método General de Análisis 0795 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, edición vigente. La dosis administrada fue de 0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
3. Se albergaron en una jaula apropiada con agua y alimento balanceado.
4. Los animales se mantuvieron en observación durante 48 h.
5. Se anotó la mortalidad a las 24 y 48 h.

El estudio se realizó en un laboratorio tercero autorizado por la COFEPRIS.

Criterio de aceptación:

Si al final del período de observación todos los animales sobreviven, la muestra pasa la prueba de seguridad. Si uno o más ratones mueren, se debe repetir la prueba utilizando otros diez ratones que pesen de 19.5 a 20.5 g. Pasa la prueba, si el número total de ratones muertos no excede del 10 % del total de ratones utilizados.

6.5 Obtención de imágenes gammagráficas de pacientes con cáncer de mama

Las gammagrafías se obtuvieron por el personal del departamento de medicina nuclear del Centro Oncológico Estatal según lo indicado en un protocolo previamente aprobado.

6.6 Obtención de imágenes gammagráficas de tumores C6 de glioma inducidos en ratones atímicos

6.6.1 Modelo animal

Los estudios de inducción de tumores y de imagen se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [63]. Los ratones atímicos machos de 20-22 g se mantuvieron en cajas estériles con virutas de madera.

La temperatura, humedad, ruido y períodos de luz/oscuridad de 12/12 h se mantuvieron constantes. El agua y el alimento se administraron *ad libitum*.

6.6.2 Inducción de tumores en modelos atímicos

La línea celular C6 de glioma se obtuvo inicialmente del American Type Culture Collection (ATCC). Las células se incubaron a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ (5 %) y 100 % de humedad en medio RPMI [sistema amortiguador de bicarbonato con aminoácidos y vitaminas suplementado con suero fetal bovino y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)].

La inducción de los tumores se llevó a cabo por administración subcutánea de 1×10^6 células C6 en 100 μL de buffer de fosfatos en solución salina. La inoculación se realizó en el lomo de ratones atímicos de 6-7 semanas. Se inspeccionaron los sitios de inyección a intervalos regulares para revisar la apariencia, formación y progresión del tumor.

6.6.3 Estudios de imagen

El complejo ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se administró vía I.V., los ratones atómicos previamente inyectados se anestesiaron con isoflurano al 3 % usando una unidad de anestesia por inhalación (Bickford, Wales Center, New York, USA). Se obtuvieron imágenes estáticas usando un equipo micro-SPECT/PET/CT (Albira Oncovision) 3 horas después de la administración.

6.7 Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano

La estabilidad en suero del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se determinó como se indica a continuación:

1. Se diluyó suero humano 1:10 (v:v) con agua inyectable.
2. Se realizó una dilución 1:5 (v:v) de 200 μL del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ con suero humano.
3. Las muestras se incubaron a 37 °C y se midieron por espectrofotometría UV-Vis con un equipo Perkin Elmer Lambda Bio al tiempo inicial, 2 h, 5 h y 24 h.

6.8 Proyecto de etiquetas

Los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn son agentes de diagnóstico clasificados como dispositivos médicos. Por lo tanto, los proyectos de etiqueta se elaboraron considerando la información sanitaria mínima obligatoria que deben ostentar las etiquetas de los dispositivos médicos correspondientes a la NOM-137-SSA1-2008 “Etiquetado de dispositivos médicos” [49], además de los lineamientos establecidos en la Ley General de Salud y el Reglamento de Insumos para la Salud.

6.9 Integración del expediente legal para la Solicitud de registro sanitario

El registro sanitario, en los términos de la Ley General de Salud (Artículo 368), es una autorización sanitaria, con la cual deben contar los agentes de diagnóstico.

La solicitud de registro sanitario se presentó en el Formato General de Solicitudes, adicionando el pago de derechos correspondiente de acuerdo a la clasificación con base al riesgo sanitario del producto conforme a la Ley Federal de Pago de Derechos.

Adicionalmente se presentó copia del aviso de funcionamiento del establecimiento y del aviso del responsable sanitario y copia de la licencia correspondiente expedida por la Secretaría de Energía (Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardas).

El expediente fue presentado con la información científica y técnica en idioma español describiendo las características del dispositivo médico y demostrando la seguridad y eficacia del mismo así como la documentación legal correspondiente.

7. Resultados y Discusión de resultados

7.1 Optimización de la formulación

Los resultados de pureza radioquímica determinada por HPLC, de acuerdo al diseño factorial establecido 2x2x3x2 y los resultados se analizaron por análisis de varianza en el programa SPPS (Statistical Package of the Social Sciences). La pureza radioquímica para cada uno de los 24 tratamientos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Pureza radioquímica obtenida del diseño factorial experimental en la selección de la formulación óptima para la formación del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Tratamiento	Contenido de SnCl ₂ (µg)	Contenido de manitol (mg)	Tiempo de incubación (min)	Réplica	Pureza radioquímica (%)
1	10	25	10	1	95.6
2	10	25	10	2	96.2
3	20	25	10	1	96.8
4	20	25	10	2	96.4
5	10	25	20	1	95.8
6	10	25	20	2	95.3
7	20	25	20	1	96.4
8	20	25	20	2	97.3
9	10	25	30	1	97.7
10	10	25	30	2	96.5
11	20	25	30	1	97.2
12	20	25	30	2	96.9
13	10	50	10	1	97.4
14	10	50	10	2	97.8
15	20	50	10	1	98.7
16	20	50	10	2	98.9
17	10	50	20	1	97.3
18	10	50	20	2	97.7
19	20	50	20	1	97.6
20	20	50	20	2	98.1
21	10	50	30	1	96.9
22	10	50	30	2	97.5
23	20	50	30	1	97.8
24	20	50	30	2	98.2

Los resultados que se muestran en la Tabla 9 describen el análisis de varianza (ANOVA) del diseño factorial establecido.

Tabla 9. Análisis de varianza del diseño factorial.

Variable independiente ó Factor	Niveles	Valores
Contenido de SnCl ₂ (µg)	2	10, 20
Contenido de Manitol (mg)	2	25, 50
Tiempo de incubación (min)	3	10, 20, 30
Repeticiones	2	1 ^a , 2 ^a

Variable dependiente: Pureza radioquímica (24 Observaciones)

Para evaluar los resultados de ANOVA se debe considerar:

- a) La variable independiente tiene efecto significativo sobre la pureza radioquímica si $p < 0.05$.
- b) A mayor valor de F las variables tienen mayor efecto sobre la pureza radioquímica.

Los resultados que se presentan en las Tablas 10-14 se interpretan de la siguiente manera:

1. La columna "Sig." Significa que para $p < 0.05$ la variable independiente o factor tiene efecto significativo sobre la variable dependiente.
2. A mayor valor de "F" la variable tiene mayor efecto.
3. Por tanto en este estudio se observa que el contenido de SnCl₂, el contenido de Manitol afectan significativamente la pureza radioquímica del radiofármaco. Sin embargo, la que contribuye más o tiene mayor efecto es el contenido de Manitol seguido del contenido de SnCl₂. Asimismo se observa una interacción estadísticamente significativa entre los factores.

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico del diseño factorial completo.

Origen	Suma de cuadrados tipo I	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	226592.667	1	226592.667	526919.381	.000
Contenido de Manitol (mg)	9.295	1	9.295	21.615	.000
Contenido de SnCl ₂ (µg)	1.547	1	1.547	3.597	.073
Tiempo de incubación (min)	.681	2	.340	.792	.468
Modelo	11.523 ^a	4	2.881	6.699	.002
Error	8.171	19	.430		
Total	226612.360	24			
Total corregida	19.693	23			

^a. R cuadrado = .585

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico del diseño factorial del contenido de Manitol (mg).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Contraste	7.760	1	7.760	18.046	.000
Error	8.171	19	.430		

Cada prueba F contrasta el efecto simple de Contenido Manitol (mg) en cada combinación de niveles del resto de los efectos mostrados.

Tabla 12. Resultados del análisis estadístico del diseño factorial del contenido de SnCl₂ (mg).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Contraste	1.547	1	1.547	3.597	.073
Error	8.171	19	.430		

Cada prueba F contrasta el efecto simple de Contenido SnCl₂ (mg) en cada combinación de niveles del resto de los efectos mostrados.

Tabla 13. Resultados del análisis estadístico del diseño factorial del Tiempo de incubación (min).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Contraste	1.400	2	.700	1.628	.223
Error	8.171	19	.430		

Cada prueba F contrasta el efecto simple de Tiempo de incubación (min) en cada combinación de niveles del resto de los efectos mostrados.

La formulación óptima obtenida se describe a continuación:

- 25 µg de HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂
- 20 µg de cloruro estanoso (SnCl₂)
- 10 mg de ácido etilendiaminodiacético (EDDA)
- 20 mg de N-tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina)
- 50 mg de Manitol

7.2 Análisis de materias primas empleadas en la fabricación

Los excipientes de la formulación obtuvieron sus respectivos Certificados Analíticos. El análisis de FT-IR del HYNIC-RGD-Sn obtenido se muestra en la Figura 6 y Tabla 14.

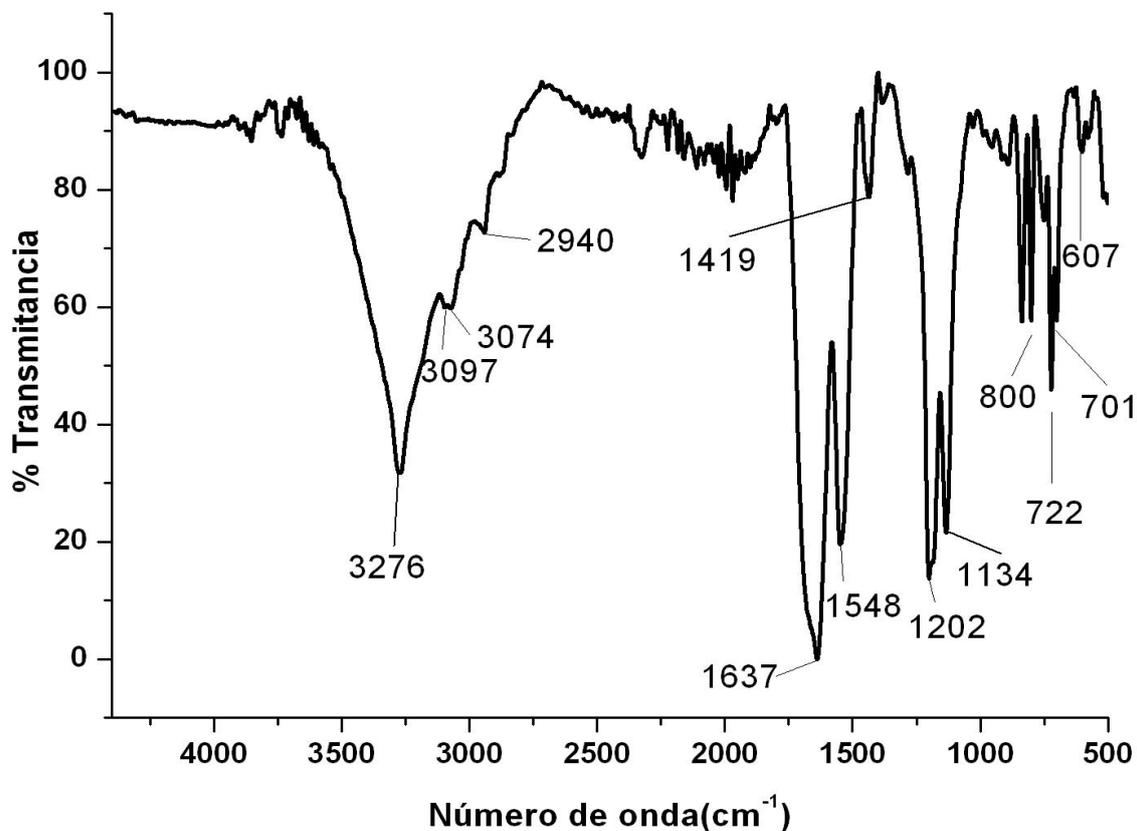


Figura 6. Espectro FT-IR de HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Tabla 14. Asignación de modos vibracionales características del espectro FT-IR del HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Grupo funcional	Número de onda (cm⁻¹)
Amida A ν (N-H)	3276
-OH Ácidos carboxílico	3097
HYNIC ν (C-H)	3074
-CH ₂	2940
Amida I ν (C=O), ν (C-N)	1637
Amida II δ (N-H), ν (C-N)	1548
Phe ν (C-C anillo)	1419
Amida III δ (N-H), ν (C-N)	1134
Aryl-OH Fenoles	722
O-C=O Ácidos carboxílicos	701
C=O Amidas	607

δ : Deformación en el plano, ν tensión o estiramiento

Para las estructuras heteroatómicas como el HYNIC, en el espectro de IR (Figura 6) se puede observar la presencia de vibraciones $\nu(\text{C-H})$ que aparecen en el intervalo $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, la cual es una región característica para las vibraciones C-H en general. La arginina es un aminoácido cargado positivamente a pH neutro, su grupo guanidino presenta una banda relativamente intensa cerca de 1633 cm^{-1} , que se encuentra traslapada con los modos vibracionales C-N de la región de Amida I en las cadenas peptídicas [64].

El análisis de FT-IR Ácido etilendiaminodiacético obtenido se observa en la Figura 7 y Tabla 15.

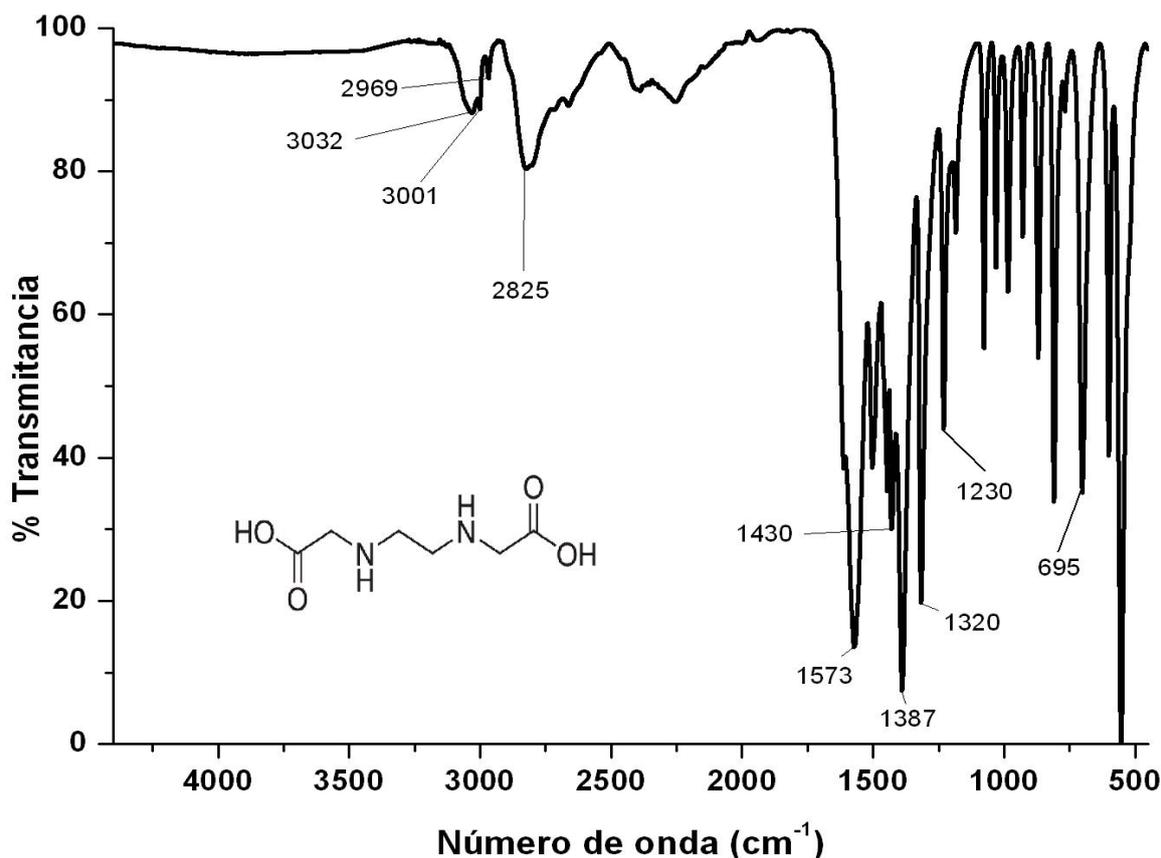


Figura 7. Espectro FT-IR del Acido etilendiaminodiacético.

Tabla 15. Asignación de modos vibracionales características del espectro FT-IR del Ácido etilendiaminodiacético.

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
-OH ν Ácidos carboxílicos	3032
-OH ν Ácidos carboxílicos	3001
-CH ₂	2969
-CH ₂	2825
COOH	1573
-CH ₂	1430
C-N ν_{as}	1387
C=O	1320
C-N (1030-1230)	1230
O-C=O Ácidos carboxílicos	695

ν tensión o estiramiento, ν_{as} tensión o estiramiento asimétrico

7.3 Escalamiento del lote y validación del proceso de fabricación de la formulación farmacéutica liofilizada núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn

Se realizaron 3 lotes de validación con un tamaño por lote de 40 núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn.

Los tres lotes fabricados, fueron sometidos a análisis por la Unidad de Calidad. Se evaluaron los siguientes parámetros del complejo obtenido a partir de la formulación liofilizada: apariencia de la solución marcada con pertecnecio de sodio (^{99m}TcO₄Na), color, pH, esterilidad, endotoxinas bacterianas y pureza radioquímica.

Los resultados de control de calidad del producto terminado para los lotes de validación se muestran en la Tabla 17:

Tabla 17. Resultados de Control de Calidad del producto terminado.

No. Lote	01-2011	02-2011	03-2011
Fecha de producción	2011.03.03	2011.09.06	2011.09.07
Pureza radioquímica	99.91 %	96.79 %	97.9 %
Endotoxinas bacterianas	Negativo <175 EU/mL	Negativo <175 EU/mL	Negativo <175 EU/MI
Prueba de esterilidad	Negativo	Negativo	Negativo
Aspecto	Solución límpida, incolora y estéril	Solución límpida, incolora y estéril	Solución límpida, incolora y estéril
Ph	7.0	7.0	7.0

De acuerdo a la monografía farmacopeica, la pureza radioquímica debe ser mayor a 90 %. El compuesto no debe contener más del 10 % de impurezas radioquímicas (^{99m}TcO₄⁻ ó ^{99m}Tc hidrolizado) [1]. Los tres lotes de validación cumplieron con las especificaciones preestablecidas.

Una vez analizados los 3 lotes, la Unidad de Calidad emitió el certificado analítico de cada uno, en los cuales se documenta la liberación de los mismos.

7.4 Estudio de estabilidad de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn

Se elaboró, revisó y aprobó el Protocolo de Estabilidades que establece los requisitos de los estudios de estabilidad que deben de efectuarse bajo condiciones de almacenamiento controladas para evaluar las características físicas, químicas, biológicas o microbiológicas del radiofármaco. Al final del estudio se elaboró el informe de estabilidades. En la Figura 9 se presenta el diagrama de flujo del desarrollo de estudio de estabilidades.

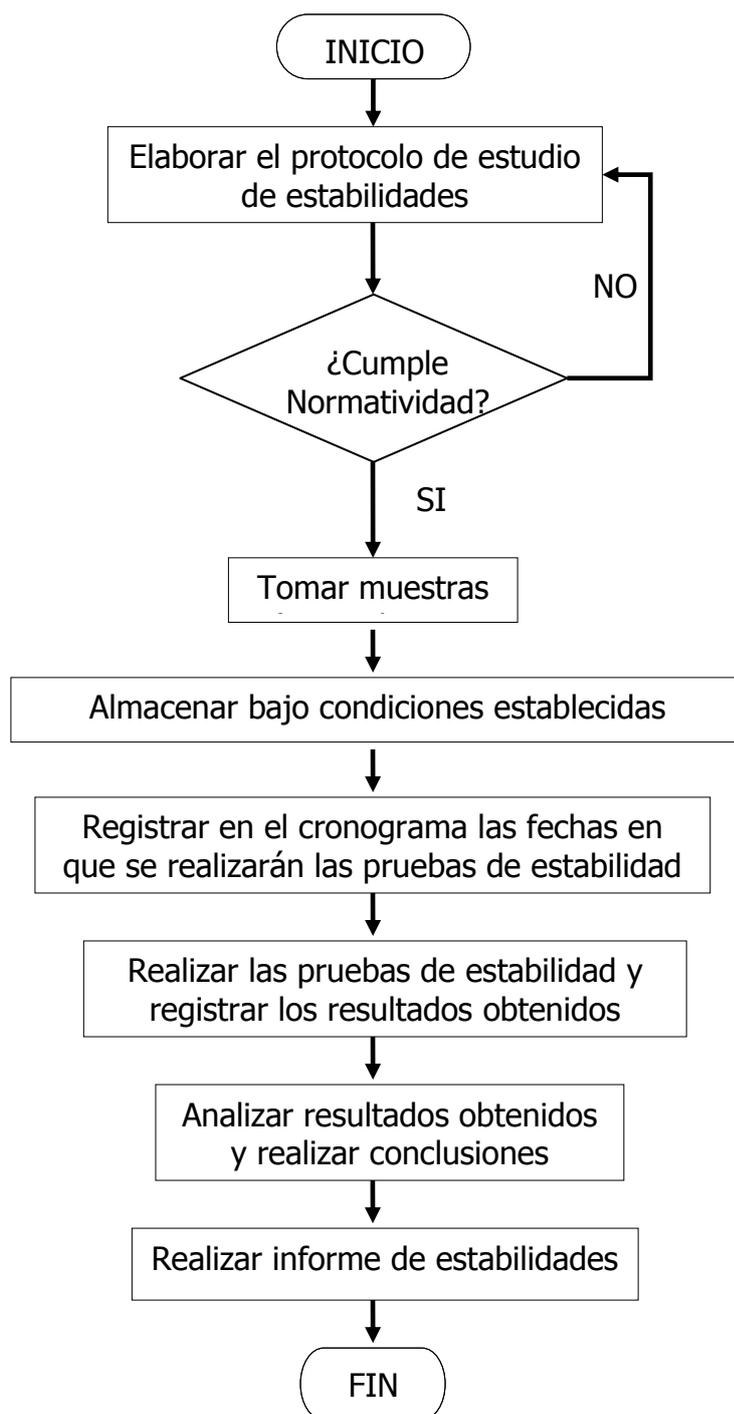


Figura 9. Diagrama de flujo del desarrollo de estudio de estabilidades.

Los análisis del producto se realizaron de acuerdo al cronograma incluido en el protocolo de estabilidad autorizado. Las condiciones del estudio se definen en la Tabla 18.

Tabla 18. Condiciones del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Período de estudio	Frecuencia de análisis	Tipo de estudio
Refrigeración: 5 ± 3 °C	12 meses	Mensual	Estabilidad a largo plazo

7.5 Control de calidad de núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn

7.5.1 Parámetros de control de calidad evaluados en la formulación farmacéutica liofilizada

Se realizó un diseño de análisis reducido por categoría de los parámetros de esterilidad y determinación de endotoxinas bacterianas de los tres lotes de validación.

a) Prueba de esterilidad (MGA 0381)

El período de incubación duró 14 días en los cuales se observó diariamente si existe o no proliferación bacteriana la cual se evidencia por el enturbiamiento del medio o la presencia de una sustancia blanquecina flotando en el medio de cultivo. Si no hay desarrollo microbiano, el producto satisface las especificaciones. Los resultados se muestran en la Tabla 19:

Tabla 19. Resultados de las pruebas de esterilidad.

No. de día posterior a la siembra	Medio Fluido de Tioglicolato	Medio de Soya Trypticaseína
Día 1	Negativo	Negativo
Día 2	Negativo	Negativo
Día 3	Negativo	Negativo
Día 4	Negativo	Negativo
Día 5	Negativo	Negativo
Día 6	Negativo	Negativo
Día 7	Negativo	Negativo
Día 8	Negativo	Negativo
Día 9	Negativo	Negativo
Día 10	Negativo	Negativo
Día 11	Negativo	Negativo
Día 12	Negativo	Negativo
Día 13	Negativo	Negativo
Día 14	Negativo	Negativo

RESULTADO: Negativo, no se observó turbidez.

b) Prueba de determinación de endotoxinas bacterianas por el método de L.A.L. (MGA. 0316)

La prueba de endotoxinas bacterianas resultó negativa para todas las muestras ensayadas, con una concentración de endotoxina está por debajo de 175 UE/mL para radiofármacos, como se muestra en la Tabla 20:

Tabla 20. Resultados de la prueba de determinación de endotoxinas bacterianas por el método de L.A.L.

Ensayo	Observación
Dilución muestra: Sin dilución	S/GEL
Control Negativo	S/GEL
Control Positivo (+) Agua	GEL FIRME
Control Positivo (+) Muestra	-----

RESULTADO: NEGATIVO .

Conc. Endotoxina en Muestra: <0.125 EU/Vol .
(Sensibilidad x Dilución Máxima)

El Producto **Si** Satisface la Prueba de Pirógenos

7.5.2 Parámetros de control de calidad evaluados en el radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDFk)]₂

7.5.2.1 Evaluación de la pureza radioquímica

Se realizó un diseño de análisis reducido factorial fraccionado del parámetro de determinación de pureza radioquímica. De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos la pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDFk)]₂ debe ser mayor a 90 %. En la Tabla 21 se resumen los datos obtenidos de la evaluación mensual de la pureza radioquímica de los tres lotes de validación durante el estudio de estabilidad:

Tabla 21. Resultados de la evaluación de pureza radioquímica.

No. Lote	01-2011	02-2011	03-2011	
Parámetro de prueba	% Pureza radioquímica	% Pureza radioquímica	% Pureza radioquímica	
MES	0	98.91%	98.87%	98.07%
	1	98.70%	97.83%	98.05%
	2	99.27%	98.44%	97.91%
	3	98.80%	98.48%	97.92%
	4	98.89%	98.33%	97.95%
	5	98.21%	97.69%	97.69%
	6	99.30%	96.39%	97.80%
	7	97.33%	95.03%	97.24%
	8	96.54%	96.21%	97.62%
	9	95.90%	95.71%	98.66%
	10	96.10%	94.77%	97.31%
	11	95.67%	94.36%	97.06%
12	95.55%	92.94%	96.36%	
MEDIA	97.62 ± 1.48	96.54 ± 1.89	97.66 ± 0.57	
C.V. (%)	1.51	1.95	0.58	

7.5.2.2 Apariencia

Los resultados de apariencia del núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn y del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se muestran en la Tabla 22:

Tabla 22. Resultados de apariencia del núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn y del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Parámetro de prueba	Especificación	Resultado
Apariencia Liofilizado HYNIC-RGD-Sn	Frasco ampula que contiene un sólido de color blanco, liofilizado. No radiactivo	Corresponde
Apariencia del Radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	Solución acuosa transparente de ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	Corresponde

7.5.2.3 pH

El pH del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ debe ser 7.0 adecuado para ser administrado por vía intravenosa.

El pH del radiofármaco se mantiene estable por doce meses como se muestra en la Tabla 23:

Tabla 23. Resultados de pH del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

No. Lote	01-2011	02-2011	03-2011	
Parámetro de prueba	pH	pH	pH	
MES	0	7.0	7.0	7.0
	1	7.0	7.0	7.0
	2	7.0	7.0	7.0
	3	7.0	7.0	7.0
	4	7.0	7.0	7.0
	5	7.0	7.0	7.0
	6	7.0	7.0	7.0
	7	7.0	7.0	7.0
	8	7.0	7.0	7.0
	9	7.0	7.0	7.0
	10	7.0	7.0	7.0
	11	7.0	7.0	7.0
12	7.0	7.0	7.0	

7.6 Afinidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ por la proteína $\alpha_v\beta_3$

En los últimos años, el grupo de Edwards en Bristol-Myers Squibb (BMS) ha usado HYNIC como agente quelante bifuncional para el radiomarcado de péptidos con la secuencia cíclica RGD con ^{99m}Tc . Se encontró que el conjugado de HYNIC-RGD debe tener una $\text{IC}_{50} \leq 10$ nM en el ensayo de ELISA para que el complejo ternario [^{99m}Tc (HYNIC-RGD) (tricina) (TPPTS)] pueda ser útil como agente para obtener imágenes de tumores que sobre-expresan integrinas $\alpha_v\beta_3$ [61]. A mayor afinidad de unión del conjugado HYNIC-RGD a menudo conduce una mejor captación del tumor para el complejo ternario ^{99m}Tc (HYNIC-RGD) (tricina) (TPPTS)].

El ensayo de competencia muestra que se requiere una concentración de 2.65 nM de DOTA-E-[c(RGDfK)]₂ para poder producir un 50 % de desplazamiento del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, Figura 10.

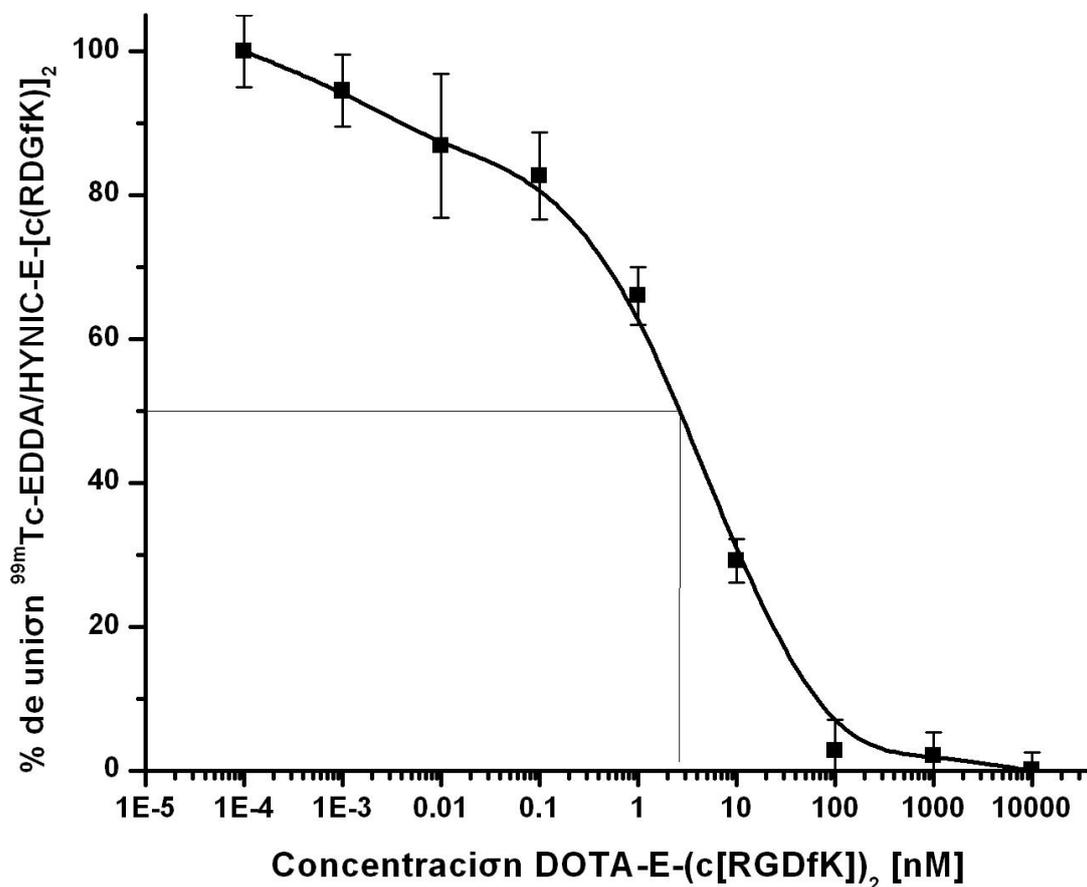


Figura 10. Afinidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ por la proteína $\alpha_v\beta_3$.

Los dos requisitos básicos de un receptor son la *afinidad* elevada por una biomolécula específica, con la que se fija aun cuando haya una concentración muy pequeña del radiofármaco, y la *especificidad*, gracias a la cual puede discriminar una molécula de otra.

Este método permitió analizar el fenómeno de competencia entre el radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ unido a los receptores específicos (integrinas $\alpha_v\beta_3$) y el competidor DOTA-E-(c[RGDfK])₂. El valor obtenido muestra la capacidad de desplazamiento del DOTA-E-(c[RGDfK])₂ frente a la fijación de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂. La disminución de la unión específica de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ es proporcional al aumento de la concentración de DOTA-E-(c[RGDfK])₂, por lo que de esta relación se obtiene una curva en forma de S invertida al representarla en forma semilogarítmica.

7.7 Prueba de seguridad general (MGA 0795)

El radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación liofilizada no mostró evidencias de toxicidad en los ratones evaluados en un laboratorio tercero autorizado.

Las consideraciones de la evaluación de la seguridad se basan en las características de la aplicación del radiofármaco como dosis-masa (masa o peso del ligando o transportador incluyendo el radionúclido), la ruta de administración, frecuencia de uso, constantes físicas y biológicas como tiempos de vida físicos, biológicos y efectivos (para tales casos la FDA recomienda considerar estos parámetros para la predicción de la seguridad y dosimetría de los radiofármacos de diagnóstico) [46].

La mayoría de los radiofármacos de diagnóstico se administran a dosis-masa aproximadas de $10^{-7} - 10^{-9}$ M ó < 10 μg y no tienen como propósito inducir una respuesta farmacológica [19]. Así mismo la frecuencia de uso del radiofármaco es en la mayoría de los casos de uso único o relativamente infrecuente, y por ello los efectos adversos ocasionados por la acumulación del fármaco en el organismo son más improbables en comparación con fármacos de administración crónica. Debido a que los estudios que involucran una exposición única en concentraciones de microgramos o microdosis, se consideran concentraciones a las que está expuesto son comparables con las exposiciones rutinarias ambientales, por lo que no se sugiere la realización de estudios de susceptibilidad farmacológica, de toxicidad o susceptibilidad genética. Sin embargo para radiofármacos de aplicación de dosis-masa repetidas la FDA recomienda de ser posible realizar estudios de seguridad y eficacia en un periodo de estudio de 14 a 28 días [47].

7.8 Obtención de imágenes gammagráficas de pacientes con cáncer de mama

Las imágenes moleculares en pacientes con cáncer de mama muestran captación evidente en el tumor. Dicha captación se debe a la interacción específica del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ preparado a partir de la formulación liofilizada, con los receptores moleculares sobre-expresados en los procesos angiogénicos que se llevan a cabo en procesos tumorales [38]. El gammagrama (Figura 11) se obtuvo en el Centro Oncológico Estatal por el personal del departamento de medicina nuclear.

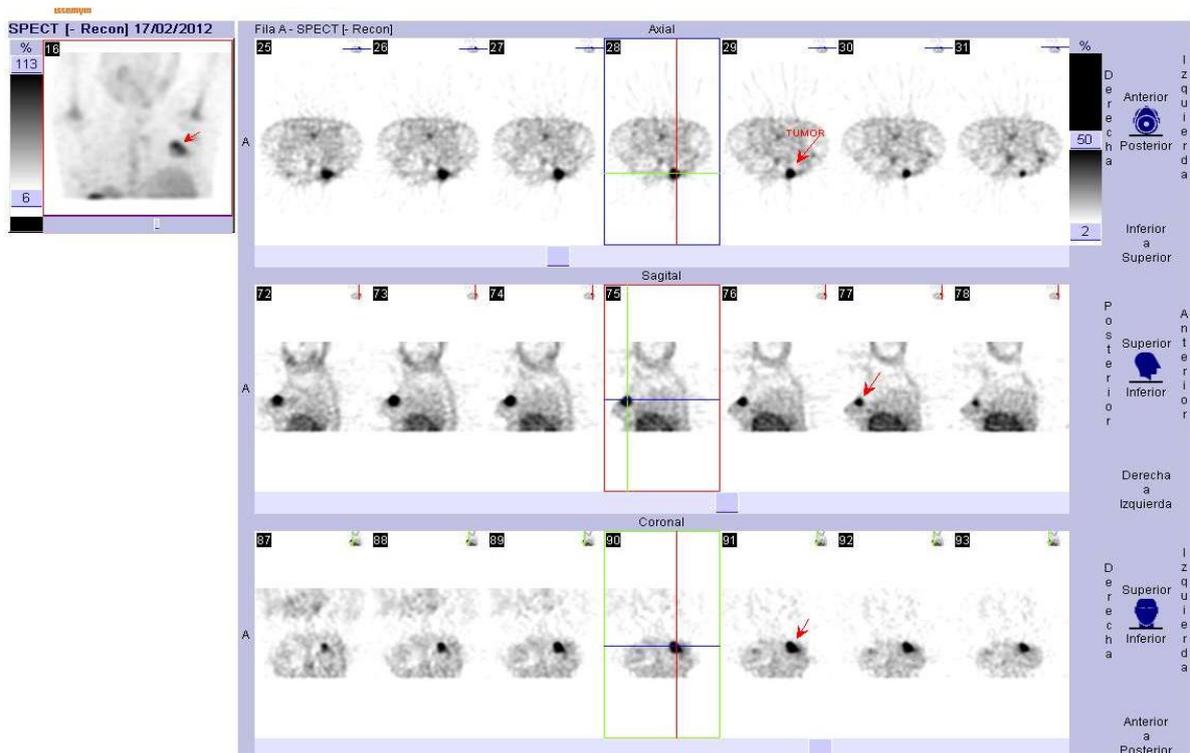


Figura 11. Imagen de una paciente con cáncer de mama

7.9 Obtención de imágenes gammagráficas de tumores C6 de glioma inducidos en ratones atímicos

Después de la administración intravenosa, el radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDFK)]_2$ muestra una elevada acumulación en el tumor atribuido a la secuencia tripeptídica -Arg-Gly-Asp- (RGD) que reconoce de manera específica a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ que están altamente expresadas en células tumorales de glioblastomas como se observa en la Figura 12.

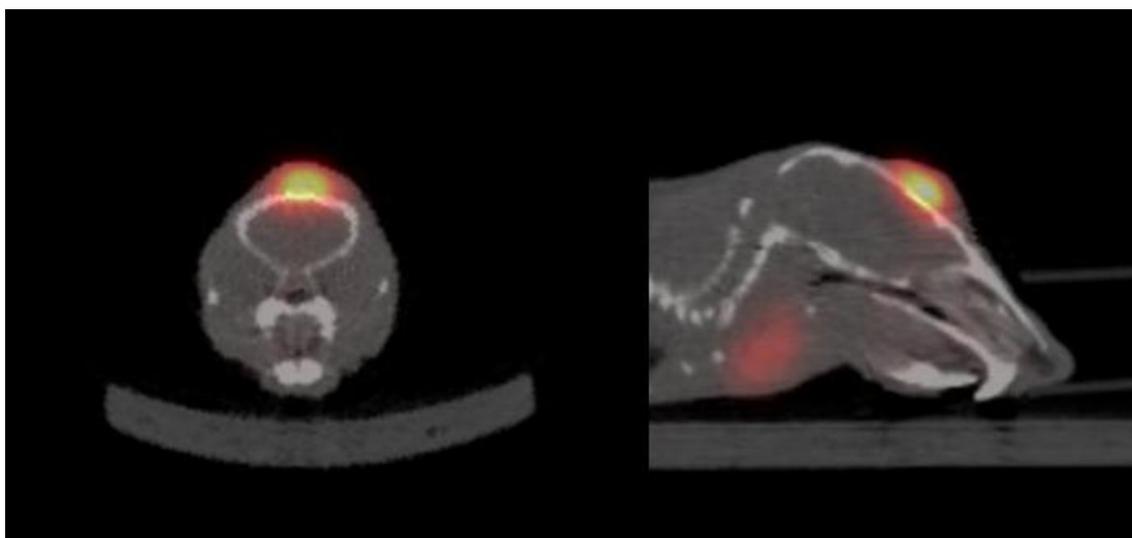


Figura 12. Imagen transaxial y coronal de un ratón atímico con tumor C6 inducido, 3 horas después de la administración del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDFK)]_2$.

7.10 Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano

La estabilidad del radiofármaco se determinó mediante la obtención de la pureza radioquímica, la actividad de la proteína unida fue de 0.88 % al inicio de la incubación en suero humano.

A las 24 h de incubación, la unión a proteínas aumentó a 4.57 %. El 95.47 % permaneció estable en forma de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, lo cual indica que el radiofármaco permanece estable en suero durante 24 h.

Los resultados se muestran en las Tablas 24,25 y 26 y en las Figuras 13,14 y 15.

Tabla 24. Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano.

Muestra	Tiempo (h)	Radiofármaco (%)	Unión a proteínas (%)
1	0	99.12	0.88
2	2	98.91	1.09
3	5	98.45	1.55
4	24	95.43	4.57

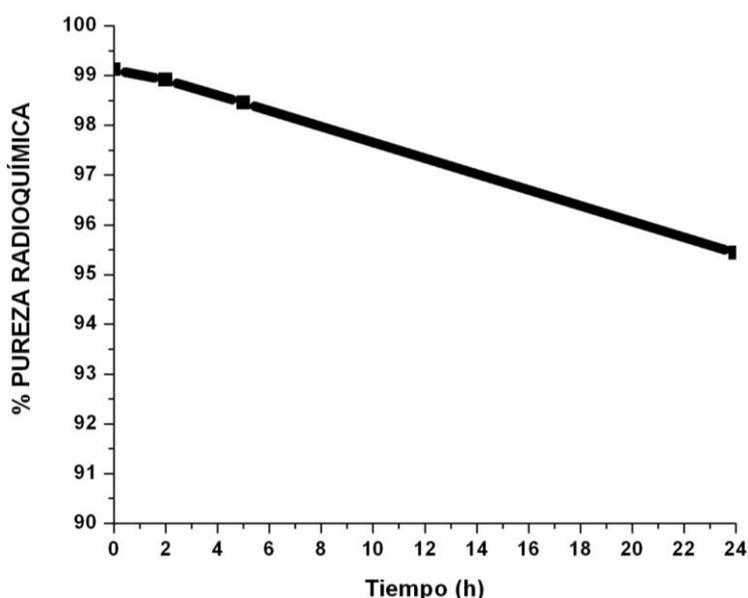


Figura 13. Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano.

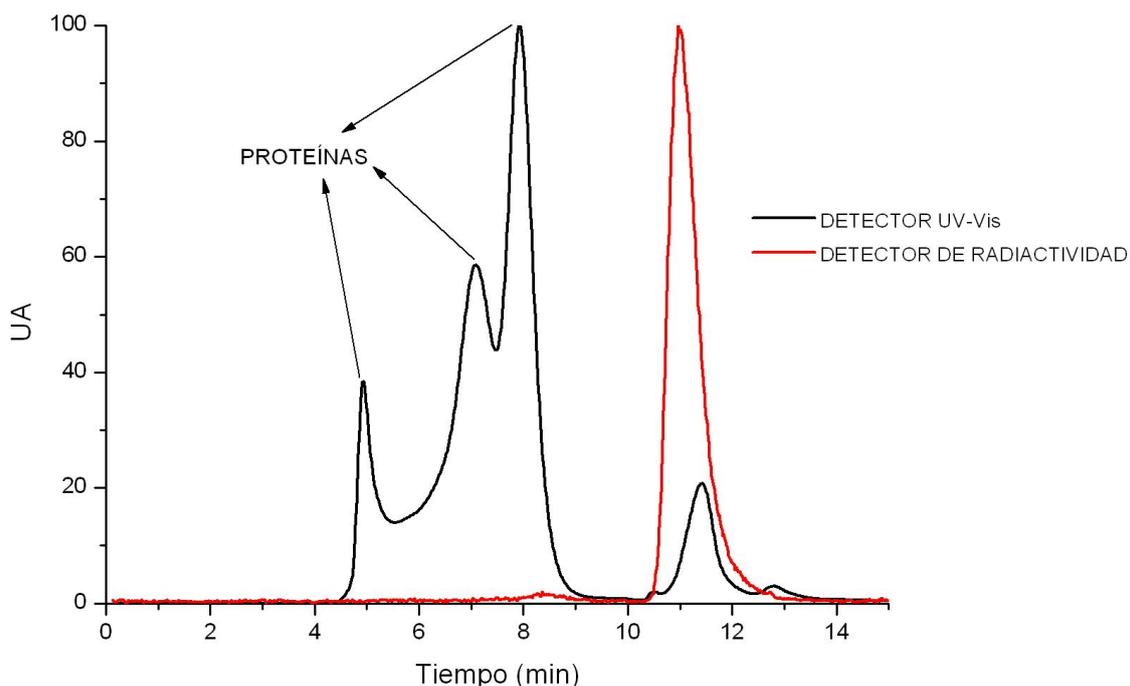


Figura 14. Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano al tiempo inicial.

Tabla 25. Porcentaje de áreas en el estudio de estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano al tiempo inicial.

	Nombre	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	^{99m}Tc unido a proteínas	8.269	0.88
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	10.881	99.12

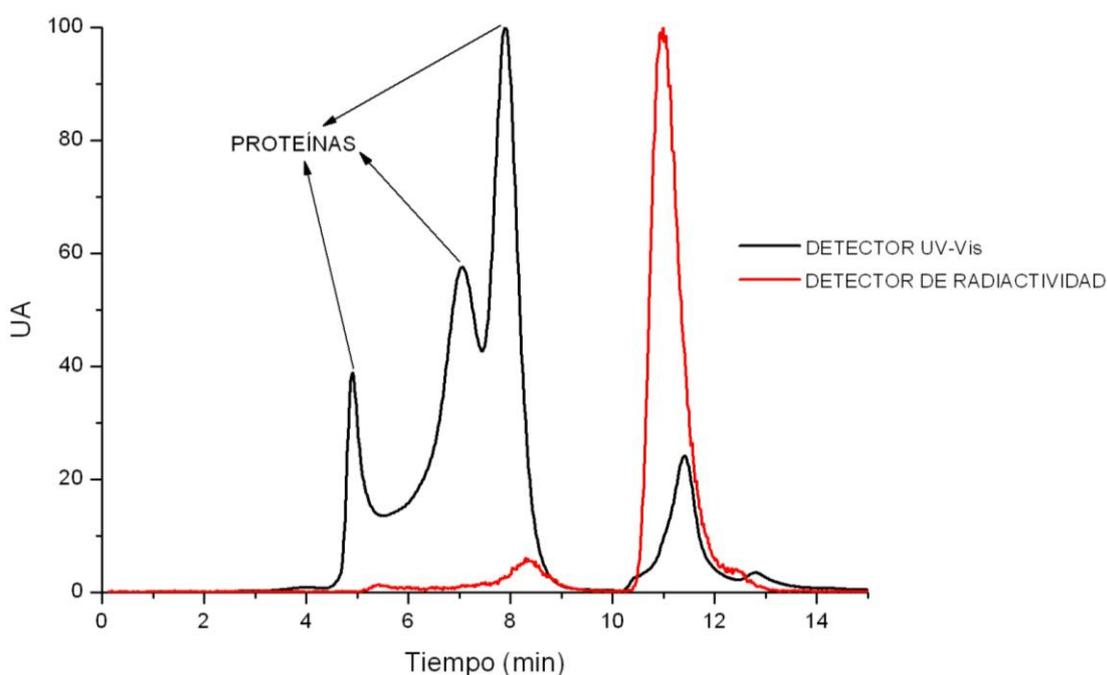


Figura 15. Estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano a las 24h de incubación

Tabla 26. Porcentaje de áreas del estudio de estabilidad del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ en suero humano a las 24h de incubación.

	Nombre	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	^{99m} Tc unido a proteínas	8.198	4.57
2	^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	10.874	95.43

7.11 Informe de validación del proceso de producción de los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn

Los lotes de validación deben cumplir con las siguientes especificaciones, tanto los controles de proceso, como los de producto terminado; los cuales deben estar aprobados en todas las etapas de todos los lotes. Los productos obtenidos de los lotes de validación, obtendrán su certificado analítico de calidad en el cual se verifique el cumplimiento de las especificaciones, los resultados se muestran en las tablas 27-31 y Figura 16.

➤ Control del proceso

Tabla 27. Especificaciones de control de proceso.

Especificaciones de control de proceso	
Pureza Radioquímica del Radiofármaco ^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	> 90 %
pH del Liofilizado	De acuerdo a lo estipulado en la Orden de Producción
Ciclo de Liofilización	Corresponda al perfil de control.
pH del Buffer de Fosfatos 0.2 M	De acuerdo a lo estipulado en la Orden de Producción

➤ Control del producto terminado

Tabla 28. Especificaciones del liofilizado HYNIC-RGD-Sn.

Especificaciones del liofilizado HYNIC-RGD-Sn			
Núcleo-equipo	Apariencia	Pruebas Biológicas	
		Determinación de endotoxinas bacterianas	Esterilidad
HYNIC-RGD-Sn	Frasco ampula que contiene un sólido de color blanco, liofilizado. No radiactivo.	Libre de endotoxinas bacterianas (<175 EU/V).	Estéril

Tabla 29. Especificaciones del Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.

Especificaciones del Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7			
Pruebas Físico-Químicas		Pruebas Biológicas	
Aspecto	pH	Determinación de endotoxinas bacterianas	Esterilidad
Frasco ampula que contiene una solución acuosa transparente. No radiactiva.	7.0 ± 0.2	Libre de endotoxinas bacterianas (<175 EU/V).	Estéril

Tabla 30. Especificaciones del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

Especificaciones del radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂			
Radiofármaco	Pruebas Radioquímicas	Pruebas Físico-Químicas	
	Pureza radioquímica	Aspecto	pH
^{99m} Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	> 90 %	Solución acuosa transparente del radiofármaco	6.0-7.0

Tabla 31. Resultados de los tres lotes de validación.

No. Lote		01-2011	02-2011	03-2011
Fecha de producción		2011.03.03	2011.09.06	2011.09.07
Fecha de caducidad Tentativa		2012.03.03	2012.09.06	2012.09.07
Apariencia	Liofilizado HYNIC-RGD-Sn	Frasco ampula que contiene un sólido de color blanco, liofilizado. No radiactivo	Frasco ampula que contiene un sólido de color blanco, liofilizado. No radiactivo	Frasco ampula que contiene un sólido de color blanco, liofilizado. No radiactivo
	Radiofármaco	Solución acuosa transparente	Solución acuosa transparente	Solución acuosa transparente
pH	Inicio	7.0	7.0	7.0
	Término	7.0	7.0	7.0
Prueba de esterilidad	Inicio	Negativa	Negativa	Negativa
	Término	Negativa	Negativa	Negativa
Endotoxinas bacterianas	Inicio	Negativa	Negativa	Negativa
	Término	Negativa	Negativa	Negativa
Pureza radioquímica	Inicio	98.91 %	98.87 %	98.07 %
	Término	95.67 %	94.36 %	97.06 %

➤ Ciclo de liofilización

Un ciclo de liofilización apropiado garantiza la sublimación y remoción de las partículas de agua presentes en la solución dosificada, a fin de obtener un producto que cumpla las especificaciones de calidad y objetivos para las cuales fue diseñado [53]. Durante el ciclo de liofilización se colocaron termopares calibrados en el producto. Las gráficas de cada ciclo de liofilización se anexaron a cada una de las órdenes de producción.

En la Figura 16 se muestra una comparación entre los registros de temperatura de la propia liofilizadora de cada lote de validación, respecto al Perfil de Control.

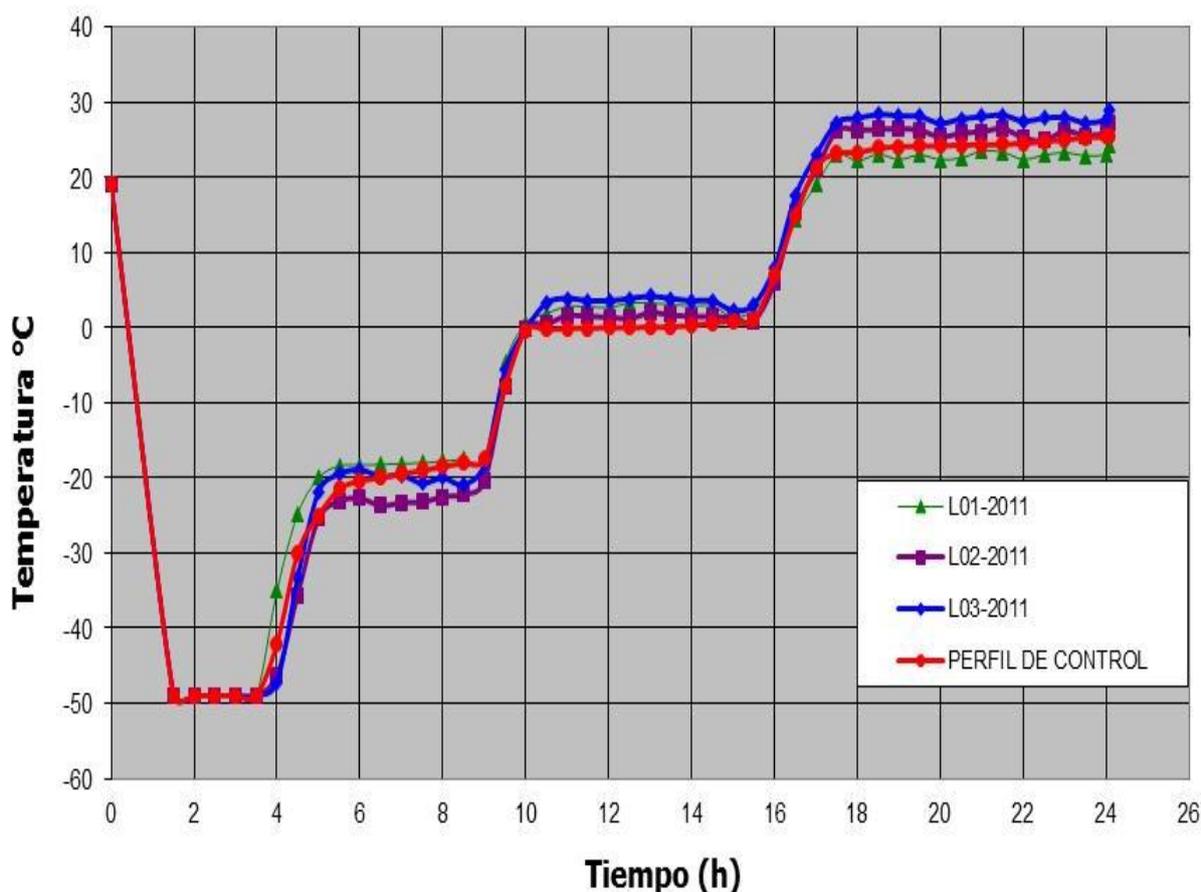


Figura 16. Ciclo de liofilización.

➤ Estudio de estabilidad

7.12 Estudio de estabilidad a largo plazo de los núcleo-equipos de HYNIC-RGD-Sn

Los datos de estabilidad de pH y pureza radioquímica obtenidos de los tres lotes de validación durante el estudio se resumen en la Tabla 32:

Tabla 32. Resultados del estudio de estabilidad.

No. Lote		01-2011		02-2011		03-2011	
Parámetro de prueba		pH	Pureza radioquímica (%)	pH	Pureza radioquímica (%)	pH	Pureza radioquímica (%)
MES	0	7.0	98.91%	7.0	98.87%	7.0	98.07%
	1	7.0	98.70%	7.0	97.83%	7.0	98.05%
	2	7.0	99.27%	7.0	98.44%	7.0	97.91%
	3	7.0	98.80%	7.0	98.48%	7.0	97.92%
	4	7.0	98.89%	7.0	98.33%	7.0	97.95%
	5	7.0	98.21%	7.0	97.69%	7.0	97.69%
	6	7.0	99.30%	7.0	96.39%	7.0	97.80%
	7	7.0	97.33%	7.0	95.03%	7.0	97.24%
	8	7.0	96.54%	7.0	96.21%	7.0	97.62%
	9	7.0	95.90%	7.0	95.71%	7.0	98.66%
	10	7.0	96.10%	7.0	94.77%	7.0	97.31%
	11	7.0	95.67%	7.0	94.36%	7.0	97.06%
12	7.0	95.55%	7.0	92.94%	7.0	96.36%	
MEDIA		7.0	97.62 ± 1.48	7.0	96.54 ± 1.89	7.0	97.66 ± 0.57
C.V. (%)		0	1.51	0	1.95	0	0.58

El núcleo-equipo se mantiene estable durante 12 meses bajo las condiciones de almacenamiento determinadas para el desarrollo del estudio (Condiciones de refrigeración: 5 ± 3 °C). En el informe de estabildades se propuso un periodo de caducidad de 12 meses de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio de estabilidad completo del núcleo-equipo HYNIC-RGD-Sn para la preparación del agente de diagnóstico ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂.

El informe de Validación fue integrado a partir de los resultados de los lotes de liberados por la Unidad de Calidad con el cual se cuenta con una evidencia documentada que proporciona un alto grado de certeza de que el proceso, procedimiento, método, equipo o sistema produce consistentemente el producto dentro de las especificaciones previamente establecidas [57].

Los resultados de cada parámetro evaluado fueron documentados en los formatos de registro de la Unidad de Calidad. De igual manera, mes a mes los resultados obtenidos se descargaron en los cronogramas planteados dentro del protocolo de estabilidad.

Se realizó un diseño de análisis reducido por categoría de los parámetros de esterilidad y determinación de endotoxinas bacterianas las cuales resultaron negativas al inicio y al término del estudio de los tres lotes de validación.

Por otra parte, se establecieron límites inferior y superior de aceptación para el pH considerando las especificaciones del producto, pH 7.0 ± 0.2. Por su parte el pH del complejo ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ se mantuvo en 7.0, con el coeficiente de variación del 0 %, para los 3 lotes respectivamente, como se observa en la Figura 17.

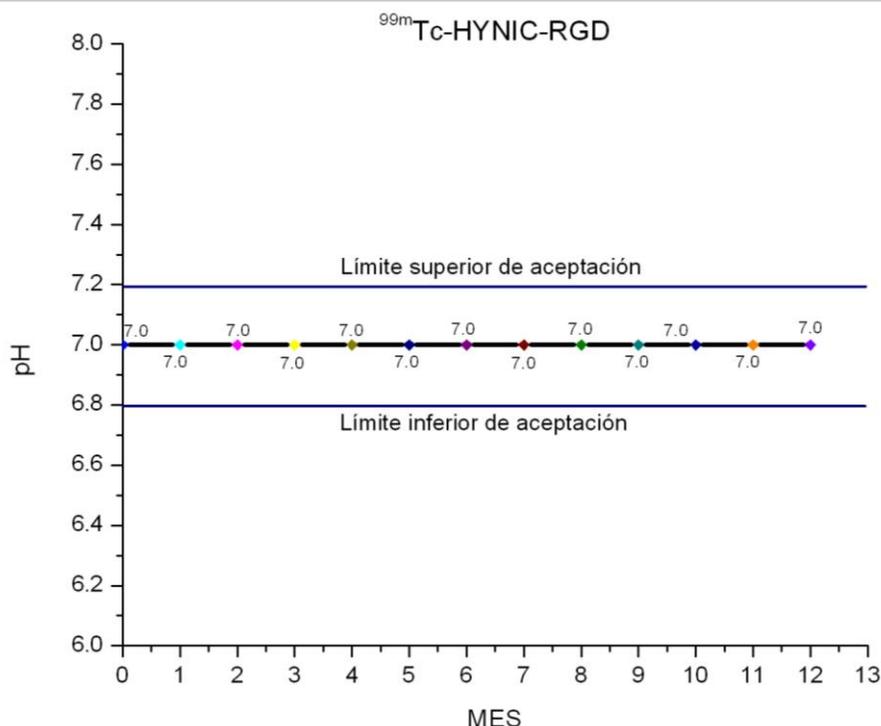


Figura 17. Resultados de pH del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfk)]₂.

Se realizó un diseño de análisis reducido factorial fraccionado del parámetro de determinación de pureza radioquímica, en los 3 lotes se consideraron como límites inferior y superior de aceptación 90 % y 100 %, respectivamente, de acuerdo a las especificaciones indicadas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10^a Ed. 2011, como se observa en las Figuras 18-26.

➤ Lote 01-2011

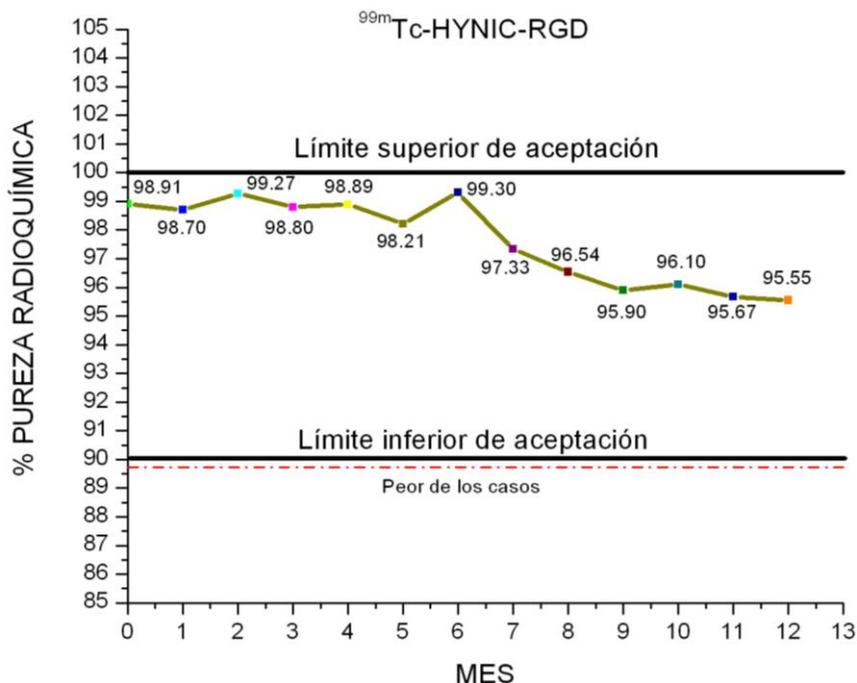
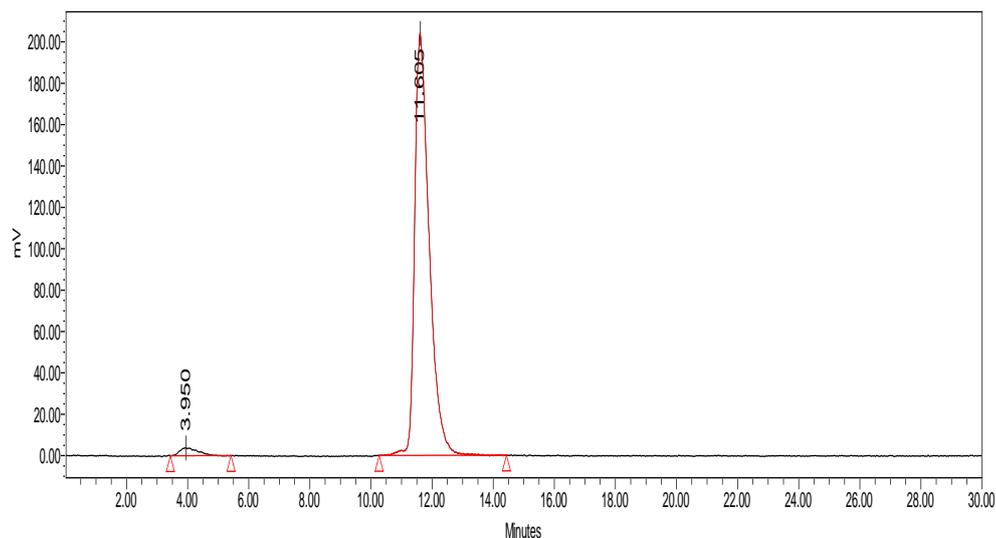
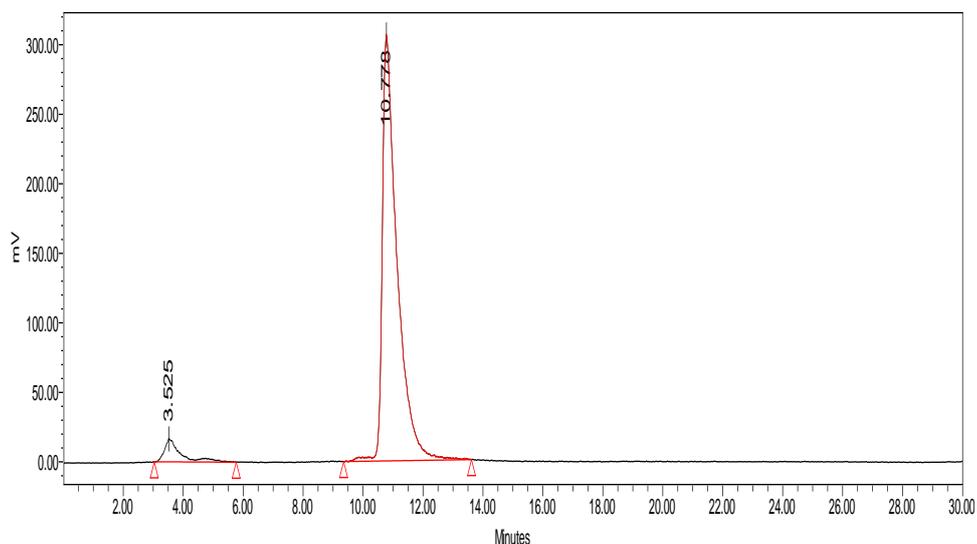


Figura 18. Resultados de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfk)]₂ del lote 01-2012.



	Especie química	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	3.950	2.32
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	11.605	97.68

Figura 19. Cromatograma obtenido por HPLC del lote 01-2011 al inicio del estudio.



	Especie química	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	3.525	5.62
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	10.778	94.38

Figura 20. Cromatograma obtenido por HPLC del lote 01-2011 al término del estudio.

➤ Lote 02-2011

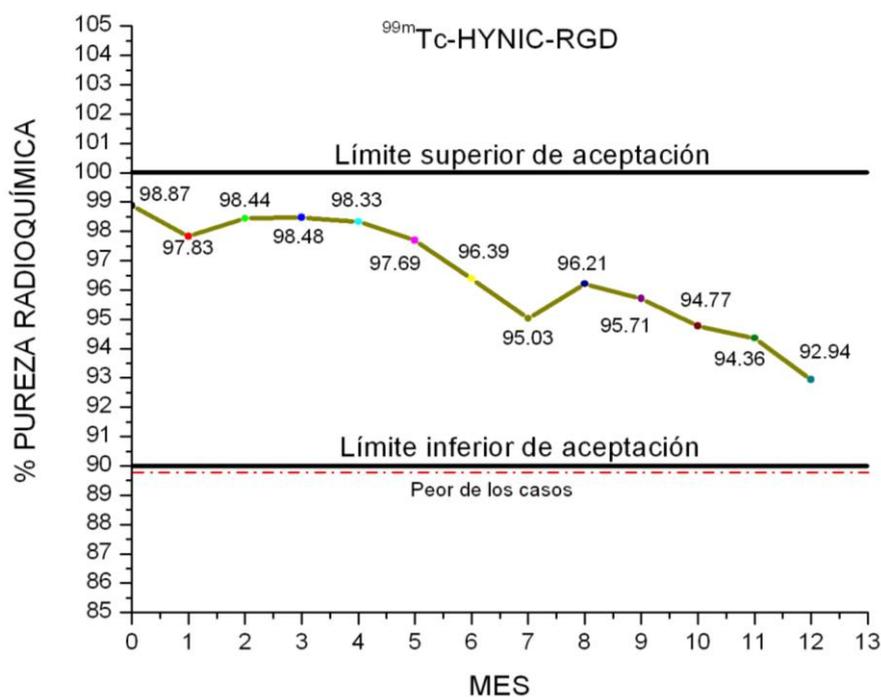
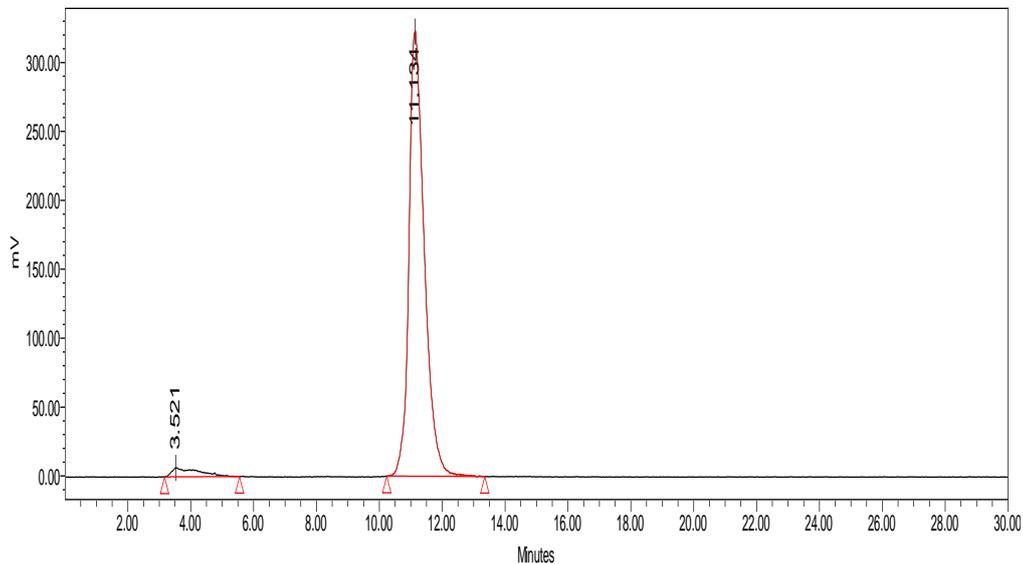
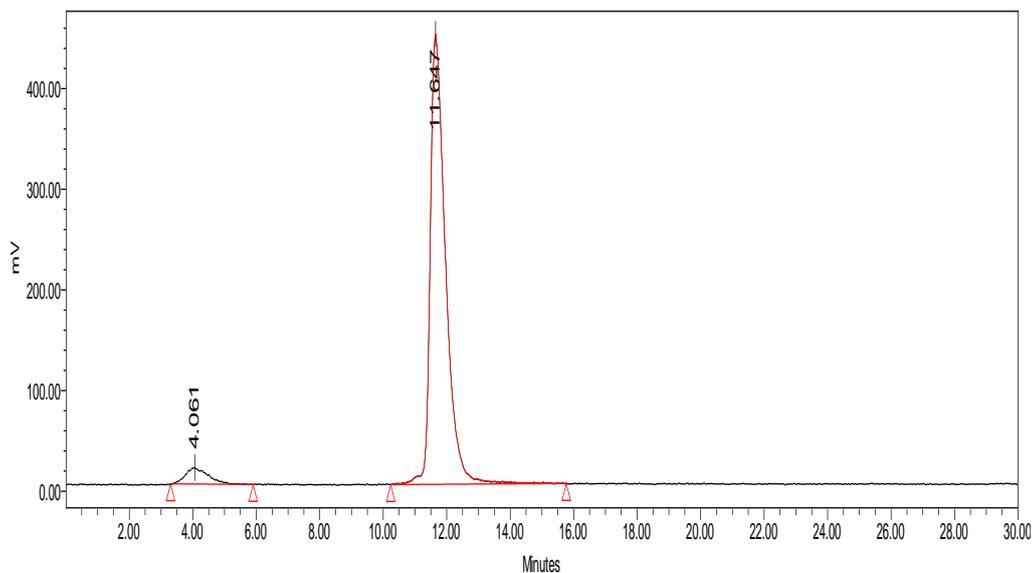


Figura 21. Resultados de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ del lote 02-2011.



	Especie química	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	3.521	3.41
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	11.134	96.59

Figura 22. Cromatograma obtenido por HPLC del lote 02-2011 al inicio del estudio.



	Especie química	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	4.061	5.12
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfk)] ₂	11.647	94.88

Figura 23. Cromatograma obtenido por HPLC del lote 02-2011 al término del estudio.

➤ Lote 03-2011

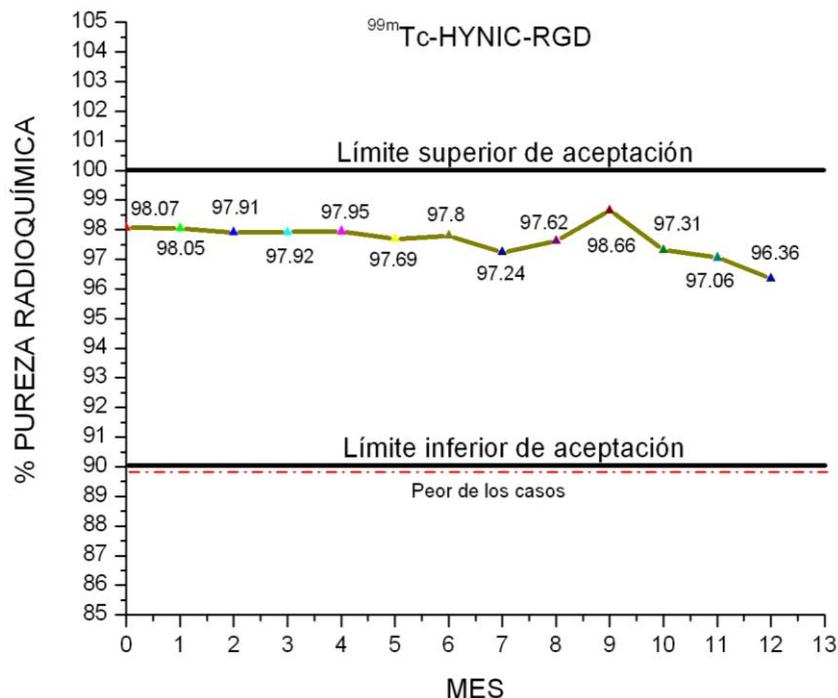
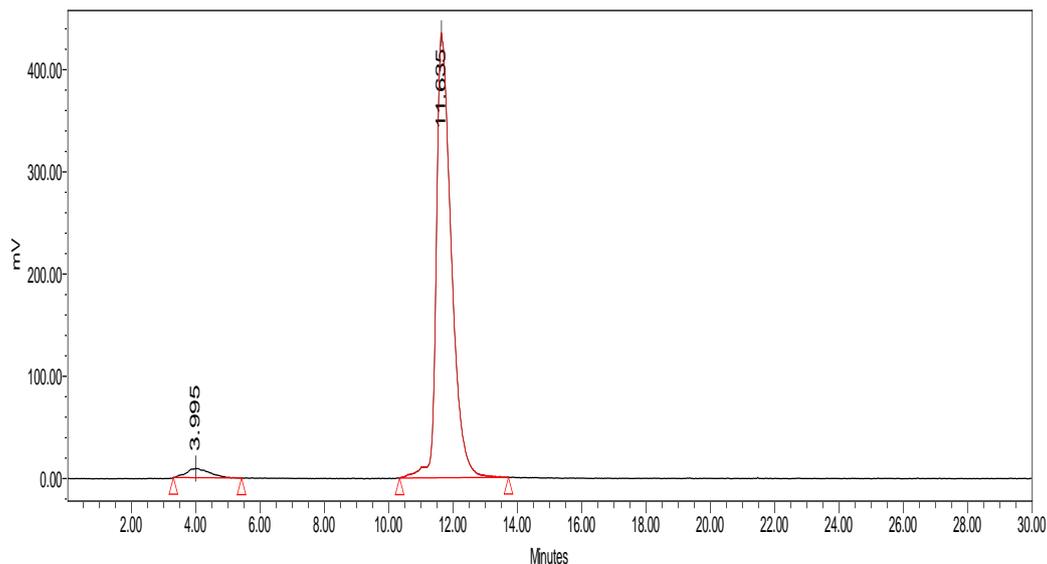


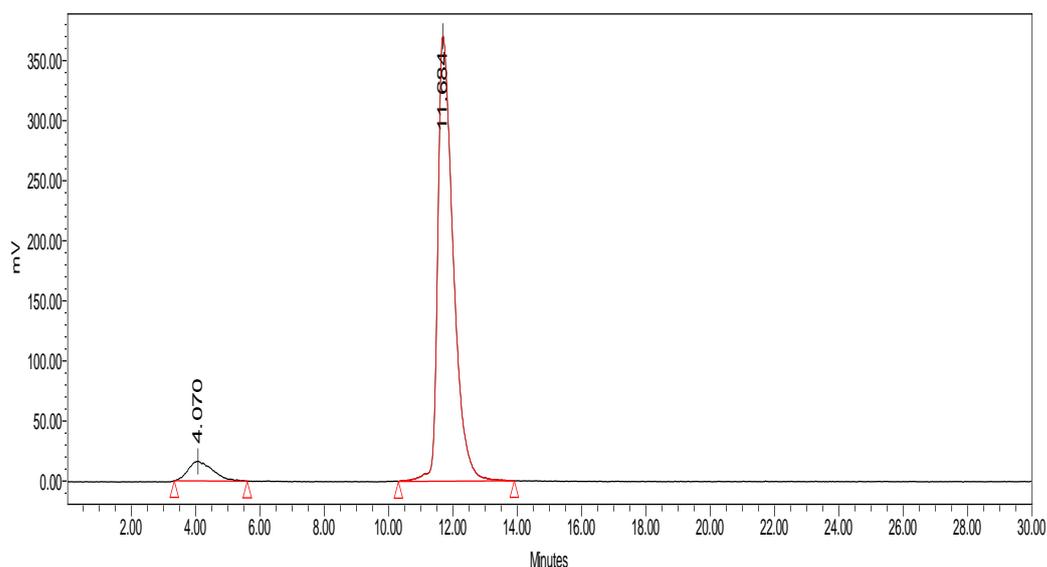
Figura 24. Resultados de pureza radioquímica del radiofármaco ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfk)]₂ del lote 03-2011.

"OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE UNA FORMULACIÓN LIOFILIZADA PARA LA OBTENCIÓN DEL RADIOFÁRMACO ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂"



	Especie química	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	3.995	3.13
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	11.635	96.87

Figura 25. Cromatograma obtenido por HPLC del lote 03-2011 al inicio del estudio.



	Especie química	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	4.070	6.58
2	^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)] ₂	11.650	93.42

Figura 26. Cromatograma obtenido por HPLC del lote 03-2011 al término del estudio.

La variación de la pureza radioquímica se debe a fluctuaciones normales que hay entre frasco y frasco, variaciones de la electrónica en los equipos, y finalmente a la naturaleza estocástica de la radiación.

7.13 Elaboración de expediente legal para la Solicitud de registro sanitario

El expediente legal fue constituido por los siguientes documentos requeridos para la obtención del Registro Sanitario de Agentes de Diagnóstico de acuerdo al Reglamento de Insumos para la Salud y la NOM-137-SSA1-2008:

- Validación del proceso de producción.
 - a) Protocolo e Informe de validación del proceso.
 - b) Estudio de Estabilidad.
- Proyecto de etiqueta.
- Instructivo.
- Procedimiento de producción.
- Instrucción de control de calidad.
- Procedimientos referidos.
- Certificado de buenas prácticas de fabricación.
- Aviso de funcionamiento.
- Aviso de responsable sanitario.
- Licencia de operación.
- Certificado ISO 9001:2000.
- Anexos.
 - a) Certificados de calibración de equipos e instrumentos.

8. Conclusiones

En el presente trabajo se logró obtener la formulación optimizada para la obtención del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$.

El proceso de producción del núcleo-equipos HYNIC-RGD-Sn para la preparación del agente de diagnóstico $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ se declaró validado debido a que a través del protocolo de validación prospectiva elaborado y los resultados obtenidos, se fabricaron tres lotes en condiciones normales de operación contemplando Buenas Prácticas de Manufactura cumpliendo consistentemente con las especificaciones y atributos de calidad establecidos.

Las propiedades físicoquímicas de la formulación farmacéutica liofilizada (HYNIC-RGD-Sn) y el radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ obtenido a partir de ella se conservan íntegras durante doce meses.

La eficacia del sistema contenedor cierre se demuestra con los resultados negativos de las pruebas de esterilidad y endotoxinas bacterianas al término del estudio siguiendo un diseño de análisis reducido por categoría y, por lo tanto, la conservación integral de estas propiedades de la formulación farmacéutica liofilizada.

Las pruebas de pureza radioquímica del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$ obtenido de la formulación farmacéutica liofilizada demuestran la estabilidad del liofilizado durante al menos doce meses.

Las imágenes moleculares obtenidas de pacientes con cáncer de mama y de tumores de C6 inducidos, que sobre-expresan integrinas $\alpha_v\beta_3$ muestran captación específica del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]}_2$, por lo que el producto puede ser usado para obtener imágenes moleculares en cáncer de mama, dada la sobre-expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$.

10. Glosario

Actividad: Es la rapidez de desintegración de los núcleos de un material radiactivo. Se mide en Bq el cual es igual a una desintegración/segundo.

Agentes de Diagnóstico: Todos los insumos incluyendo antígenos, anticuerpos calibradores, verificadores o controles, reactivos, equipos de reactivos, medios de cultivo y de contraste y cualquier otro similar que pueda utilizarse como auxiliar de otros procedimientos clínicos o paraclínicos.

Buenas prácticas de fabricación: Conjunto de lineamientos y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos farmacéuticos elaborados tengan y mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad, requeridas para su uso.

Cámara de ionización: Es un instrumento donde se aplica un campo eléctrico a través de un volumen de gas con el propósito de recoger los iones producidos por un campo de radiación. Los iones positivos y los electrones negativos migran a lo largo de las líneas de fuerza del campo eléctrico y se captan en electrodos, produciendo una corriente de ionización.

Certificado Analítico: Al documento que avala los resultados obtenidos en un estudio para determinar la composición o naturaleza de una muestra, emitido por el fabricante del producto, de conformidad con las disposiciones de la Ley, el presente Reglamento y demás disposiciones aplicables.

Concentración radiactiva: Es la radiactividad por unidad de volumen de la solución (Bq /mL).

Criterio de aceptación: Especificación del producto y el criterio de aceptar o rechazar con base en niveles de calidad de aceptación o rechazo, asociado a un plan de muestreo. Elementos necesarios que forman parte de la liberación o rechazo de un lote o de unidades fabricadas.

Curie (Ci): Es la unidad fundamental de radiactividad y se define como 3.700 x 10¹⁰ transformaciones nucleares por segundo.

Dosis absorbida: Energía depositada por unidad de masa, independientemente de que material que se trate, su unidad es el Gray (1 Gy = 100 rad).

Estabilidad: Es la propiedad de un medicamento contenido en un envase de determinado material para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas entre los límites especificados.

Etiqueta: Al marbete, rótulo, marca o imagen gráfica que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado, marcado en relieve o en hueco, grabado, adherido o precintado en cualquier material susceptible de contener el Insumo incluyendo el envase mismo.

Expediente legal: Conjunto de documentos que demuestran que el medicamento está registrado y cumple con las normas vigentes de la Secretaría de Salud.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: Al documento expedido por la Secretaría que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos y productos biológicos.

Lote: A la cantidad específica de cualquier materia prima o Insumo, que haya sido elaborada en un ciclo de producción, bajo condiciones equivalentes de operación y durante un período determinado.

Lote Piloto: Fabricación de un medicamento, por un procedimiento representativo y que simule aquel que será utilizado durante la producción rutinaria para comercialización.

Impurezas radioquímicas: Impurezas que pueden aparecer en una preparación radiofarmacéutica pueden ser debidas a diferentes factores, en los cuales cabe destacar: solvente, temperatura, pH, luz, radiólisis y oxidación. Lo cual puede ocasionar una baja localización del radiofármaco en el órgano diana y una alta actividad de fondo en los tejidos circundantes obteniéndose una imagen no satisfactoria.

Núcleo equipo: Nombre empleado para designar uno o más frascos, que contienen los reactivos químicos no radiactivos, liofilizados o en forma líquida, en condiciones de esterilidad y apirogenicidad, requeridos para producir un radiofármaco.

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

Orden de producción: Copia de la fórmula maestra de producción a la cual se le asigna un número de lote y se utiliza como guía y registro de las operaciones para la producción de un lote de medicamento.

Periodo de caducidad: Es el tiempo estimado durante el cual el lote de producto permanece dentro de las especificaciones si se conserva bajo condiciones de almacenamiento normales o particulares.

Periodo de caducidad tentativo: Es el periodo de caducidad provisional que la Secretaría de Salud autoriza en base a los resultados de los estudios de estabilidad acelerada presentados en el paquete de registro del producto.

Precursor: Todo radionúclido producido industrialmente para el marcado radiactivo de otras sustancias antes de su administración.

Procedimiento de producción: Documento que contiene las instrucciones detalladas para transformar la materia prima en producto hasta su envase primario.

Pureza Radioquímica: Es el porcentaje de la radiactividad total en la forma química declarada del radiofármaco.

Radiación: Emisión o propagación de energía a través del espacio en forma de ondas electromagnéticas o partículas.

Radiación ionizante: Es cualquier radiación capaz de desplazar electrones de los átomos del material que atraviesa, produciendo iones de esta manera.

Radiactividad: Es la propiedad que tienen ciertos núclidos de emitir radiaciones cuando sus núcleos se transforman espontáneamente en los de otros núclidos. La unidad de actividad empleada por el Sistema internacional de Unidades es el Becquerel (Bq), que indica el número de desintegraciones por segundo. El curie (Ci) es igual a $3,7 \times 10^{10}$ Bq.

Radiactividad de fondo. Es la radiación debida a materiales de construcción, radiaciones cósmicas y descargas espontáneas de la atmósfera.

Radiofármaco: Es una sustancia química que contiene dentro de su estructura un átomo radiactivo, y que por su forma farmacéutica, calidad y cantidad de radiación, puede ser administrado en humanos con fines de diagnóstico o terapéuticos.

Radionúclido: Núclido que es radiactivo.

Vida media: Tiempo requerido para reducir una actividad inicial a la mitad. Es independiente de cualquier condición físico-química y es característica de cada radionúclido.

Vida media efectiva: Es la relación entre la pérdida del radiofármaco debido al decaimiento físico y su eliminación biológica.

Tiempo de vida media física: El tiempo de vida media de un radionúclido es el tiempo requerido para que una actividad dada alcance la mitad de su valor inicial y está relacionado con la constante de desintegración por la ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Donde λ es la constante de desintegración específica para cada radionucleido

11. Bibliografía

- [1] Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10ª Edición. 1:793-803; (2011).
- [2] Hernández Hernández Edith. “Preparación del radiofármaco ^{99m}Tc -HYNIC-ciclo-Lys-D-Phe-RGD para imagen *in vivo* de integrinas”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma del Estado de México. (2007).
- [3] Ferro-Flores G, Murphy AC and Melendez AL. Third Generation Radiopharmaceuticals for Imaging and Targeted Therapy. Current Pharm. Volume 2, Number 4 (2006).
- [4] Guillian Chaloner-Larsson G, Roger Anderson, Anik Egan. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. World Health Organization. Geneva; (1997).
- [5] Banerjee S, Pillai MRA. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. Semin Nud Med. 31(02) 60-77 (2001).
- [6] Reubi J.C. Peptide receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. Endocrine Reviews. 24(4):389-427 (2003).
- [7] International Atomic Energy Agency. Technical Meeting on “Current Status and Future Trends in Tc-Radiopharmaceuticals”. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency; 1-2. (2006).
- [8] Fini, A. González , Ma. L. Aplicaciones farmacológicas de la radiactividad. La Habana, Cuba: Centro de Química Farmacéutica; 106 (2000).
- [9] Ferro-Flores G, Murphy AC. Preparation and Evaluation of Third Generation Technetium-99m Radiopharmaceuticals. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency. International Symposium in Trends in Radiopharmaceuticals; 61-69 (2005).
- [10] Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. American Pharmacists Association. Washintong, D.C. 217-220, 252-277, 281-285 (2004).
- [11] Burke, J. Advances in ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals. Chemistry Paper presented at the 148th Annual Meeting of the American Pharmaceutical Association. San Francisco, California : s.n. 78-82, (2001).
- [12] Comisión Nacional de Energía Atómica. La Tecnología Nuclear, Producción de radionucleótidos. 1-3 (2006).
- [13] Cortés Blanco, PA y Esteban, Gómez J. Radiofármacos de uso humano: marco legal e indicaciones clínicas. Seguridad Nuclear. 26, 5-15 (2003).
- [14] Murphy CA, Ferro-Flores G. Compuestos del tecnecio. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán e Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México. 5-15,115-140; (2003).
- [15] Greenland WEP, Blower PJ. Bioconjug. Chem. 16,939; (2000).

- [16] von Guggenberg E. ^{99m}Tc-labeling and *in vitro* and *in vivo* evaluation of HYNIC- and (N alpha –His)acetic acid-modified [d-Glu1]-mini-gastrin. *Bioconjug Chem.* 15: 864-71 (2004).
- [17] Levente K. Anica Dose. Stefano C. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica Acta* 363, 1059–1069 (2010).
- [18] Bashir M. King R. Stephen J. Technetium-binding in labelled HYNIC-peptide conjugates: Role of coordinating amino acids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103, 971–977 (2009).
- [19] Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1347-1370 (2008).
- [20] Liu, S, Hsieh W.Y, Kim Y.S, Mohammed S.I. *Bioconjug. Chem.* 11:113; (2000)
- [21] Riccabona, G., Decristoforo, C. Peptide targeted imaging of cancer. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals.* 18: 675-68 (2003).
- [22] Beart, A.L., Sartor, K. *Medical Radiology, Diagnostic Imaging.* Christian Schiepers. New York : Springer, 2: 21 (2006).
- [23] Welch, M., Redvanly, C. *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and applications.* Wiley 5: 340-396 (2003).
- [24] Van Hagen, P.M., Breeman, W.A., Bernard, H.F. Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumor imaging and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer,* 90: 186-198, (2000).
- [25] Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, Jensen RT Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des* 9:495–509 (2003).
- [26] Reubi J.C. *Endocrine reviews.* 24: 389; (2003)
- [27] Howard Hughes Medical Institute, Center for Cancer Research, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA. Cell–matrix adhesion in vascular development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis,* 5 (Suppl. 1): 32–40
- [28] Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligands binding to integrins. *J Biol Chem.* 275:21785–8 (2000).
- [29] Jin H and Varner J. Minireview Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer.* 90, 561 – 565 (2004).
- [30] Ingrid D., Cheng-Bin Y., Gerben M. PET imaging of $\alpha v \beta 3$ integrin expression in tumours with ⁶⁸Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:128–137, (2011).
- [31] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and disease. *Nature* 407: 249-257 (2000).

- [32] Haubner, R.; Wester, H.J.; Weber, W.A. Non-invasive imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using 18F-labelled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res.* 61, 1781-5 (2001).
- [33] Luna-Gutierrez M., Ferro-Flores G., Ocampo-García B.E., Jiménez-Mancilla N.P., Morales-Avila E., De León-Rodríguez L.M., Isaac-Olivé K. ^{177}Lu -labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing $\alpha_v\beta_3$ integrins. *J. Label. Compds Radiopharm.* 50, 140-148 (2012).
- [34] R. Hwang, J. Varner. The role of integrins in tumor angiogenesis. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 18: 991–1006 (2004).
- [35] Yingshe Z., Bachelier R, Treilleux I, Pujuguet P. Tumor $\alpha_v\beta_3$ Integrin Is a Therapeutic Target for Breast Cancer Bone Metastases. *Cancer Res* 2007; 67: (12), (2007).
- [36] Andronati, S.A., Karaseva, T.L., Krysko, A.A. Peptidomimetics—antagonists of the fibrinogen receptors: molecular design, structures, properties and therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.* 11, 1183–1211 (2004).
- [37] Liu, S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin alpha v-beta3 Targeted Radiotracers. *Bioconjugate Chem.* 20: 2199-2213 (2009).
- [38] Lopez-Duran FA *et. al.* Radiopharmacokinetics and uptake of ^{99m}Tc -cRGD in $\alpha_v\beta_3$ integrins for imaging angiogenesis in induced malignant tumors in athymic mice *Bioquimia.* 34: 61–68 (2009).
- [39] Deepali G., Bao-Shiang L., Gemeinhart R. In Vitro Evaluation of Functional Interaction of Integrin $\alpha_v\beta_3$ and Matrix Metalloprotease-2. *MOLECULAR PHARMACEUTICS.* 6: 1856–1867, (2009).
- [40] Morales-Avila E., Ferro-Flores G., Ocampo-García B., De León-Rodríguez L.M., Santos-Cuevas C. L., García-Becerra R, Medina L. A, and Gómez-Oliván L., "Multimeric System of ^{99m}Tc -Labeled Gold Nanoparticles Conjugated to c[RGDfK(C)] for Molecular Imaging of Tumor $\alpha_v\beta_3$ Expression". *Bioconj. Chem.* 913–922, 22 (2011).
- [41] López, F., Pedraza, M., Arteaga, C., Hernández, E., García, R., Ordaz, D., Radiopharmacokinetics and uptake of ^{99m}Tc -cRGD in $\alpha_v\beta_3$ integrins for imaging angiogenesis in induced malignant tumors in athymic mice. 34 (2) 61-68 (2009).
- [42] Instrucción "Control de Calidad de núcleo-equipos HYNIC-Bombesina-Sn", I.MR (CC)-26, Revisión 0, Enero de 2008.
- [43] Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, "Estabilidad de fármacos y medicamentos". (Modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996).
- [44] Dijkgraaf I. Yim C. Gerben M. PET imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression in tumours with ^{68}Ga -labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:128–137 (2011).
- [45] DeGeorge, J.J., Ahn, C.H., Andrews, P.A. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 41, 173-185 (1998).

- [46] Kinders R., Ralph E. Phase 0 clinical trials in cancer drug development: from FDA guidance to clinical practice. *Molecular interventions*. 7(6): 325-334, (2007).
- [47] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for industry, Developing Medical Imaging Drug and Biological Products Part 1: Conducting Safety Assessments. June 2004.
- [48] LEY GENERAL DE SALUD Diario Oficial de la Federación 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 7 de junio de 2012.
- [49] REGLAMENTO DE INSUMOS PARA LA SALUD Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 04 de febrero de 1998. Última reforma publicada DOF 19 de octubre de 2011.
- [50] Norma Oficial Mexicana NOM-137-SSA1-2008, “Etiquetado de dispositivos médicos”.
- [51] Fernández B.A. Liofilización de productos farmacéuticos. *UTEHA Noriega*. 9, 121. (1998).
- [52] Torrado,S; Torrado S. Characterization of Physical State of Mannitol after Freeze-Drying:Effect of Acetylsalicylic Acid as a Second Crystalline Cosolute. *Chem. Pharm. Bull.* 50(5) 567—570, (2002).
- [53] Tang, X; Pikal, M. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals:Practical Advice. *Pharmaceutical Research*, 21:191-200, (2004).
- [54] Labconco. A guide to Freeze Drying for the Laboratory. U.S.A. Labconco Corporation. (2004)
- [55] Tang X. Pikal M.J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals Practical Advice. *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 2, February (2004).
- [56] Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos” (modifica a la NOM-059-SSA1-1993, publicada el 31 de Julio de 1998).
- [57] Quality Management Systems-Process Validation Guidance. *GHTF/SG3/N99-10: 2* (2004).
- [58] Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de validación de Métodos analíticos. México (2002).
- [59] Organización Mundial de la Salud. Specifications for Pharmaceutical Preparations. Reporte 37, OMS (2003).
- [60] Haubner R. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin imagin: a new approach to characterize angiogenesis? *Eur. J Nucl. Med. Mol. Imaging*. 33: 54-63, (2006).
- [61] Liu S. Radiolabeled Multimeric Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ Targeted Radiotracers for Tumor Imaging. *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 3: 472-487, (2006).

[62] Decristoforo, C., Faintuch, L.B., Rey, A. [^{99m}Tc]HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. J. Nuc. Med. and Biol. 33: 945-952, (2006).

[63] Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

[64] Morales Ávila Enrique. "Preparación y caracterización de un sistema heterofuncional de nanopartículas de oro marcadas con Tecnecio-99m y conjugadas a la secuencia –Arg-Gly-Asp– para la detección *in vivo* de angiogénesis y la evaluación de su toxicidad en *Hyalella azteca*", Tesis de doctorado. Universidad Autónoma del Estado de México, (2012).

12. Anexos

1. Material usado en el desarrollo experimental del proyecto

- a) Vasos de precipitados de 50 mL.
- b) Una barra magnética de 1/2 X 1/8 pulgadas.
- c) Micropipetas de 10-100 µL con puntas amarillas estériles y desechables.
- d) Micropipetas de 100-1000 µL con puntas azules estériles y desechables.
- e) Micropipetas de 1-5 mL con puntas blancas estériles y desechables.
- f) Matraz volumétrico de 50 mL, estéril y libre de endotoxinas bacterianas.
- g) Filtros Millipore desechables de 0.22 µm, estériles y libres de endotoxinas bacterianas.
- h) Jeringas de 20 mL desechables, estériles y libres de endotoxinas bacterianas.
- i) Frascos ampula de 10 mL, estériles y libres de endotoxinas bacterianas.
- j) Tapones de elastómero gris de 20 mm de diámetro, estériles y libres de endotoxinas bacterianas.
- k) Tapones de elastómero rojo de 20 mm de diámetro, estériles y libres de endotoxinas bacterianas.
- l) Sellos de aluminio de 20 mm de diámetro.

Equipos de laboratorio

- b) Liofilizadora Hull
- c) Campana de flujo laminar VECO
- d) Balanza analítica
- e) Parrilla con agitación magnética y calentamiento
- f) Potenciómetro

Reactivos químicos

- a) Péptido HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂, pureza >95 %
- b) Cloruro estanoso anhidro
- c) Tricina
- d) EDDA
- e) Manitol
- f) Fosfato de sodio monobásico anhidro
- g) Fosfato de sodio dibásico dihidratado
- h) Nitrógeno gas de alta pureza 99.95 %
- i) Ácido clorhídrico
- j) Agua grado inyectable