



Universidad Autónoma del Estado de México

---

---

Facultad de Química

“PREPARACIÓN DEL RADIOFÁRMACO  
 $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:  
EDUARDO CONDE SUÁREZ

DRA. GUILLERMINA FERRO FLORES  
Asesor Externo

DR. FERNANDO UREÑA NUÑEZ  
Asesor Interno

Toluca, México.

Febrero de 2007.





## Índice

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Índice                |   |
| Índice de tablas      |   |
| Índice de figuras     |   |
| Resumen               | 1 |
| Introducción          | 3 |
| Objetivo general      | 4 |
| Objetivos específicos | 4 |

## Capítulo 1

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Generalidades</b>   | 6  |
| 1.1. Generalidades de los radiofármacos   | 6  |
| 1.1.1. Diseño de radiofármacos de tercera generación  | 6  |
| 1.2. Caracterización de los radiofármacos   | 8  |
| 1.2.1. Caracterización química  | 8  |
| 1.2.2. Caracterización bioquímica   | 10 |
| 1.2.3. Evaluación In Vivo   | 13 |
| 1.3. Radiofármacos receptor-específicos de tecnecio- $^{99m}$ para obtención de imágenes de blancos moleculares | 13 |
| 1.3.1. Receptores de péptidos reguladores   | 13 |
| 1.3.1.1. Péptidos análogos de bombesina / péptido liberador de gastrina   | 14 |
| 1.4. Radiofármacos receptor-específicos para terapia  | 16 |
| 1.5. Bombesinas y bombesinas radiomarcadas  | 16 |
| 1.6. Monografía del tecnecio  | 20 |
| 1.6.1. Estado Natural   | 20 |
| 1.6.2. Propiedades físicas  | 20 |
| 1.6.3. Isótopos   | 21 |
| 1.6.4. Propiedades químicas   | 22 |
| 1.7. Desarrollo de radiofármacos  | 24 |
| 1.7.1. Impurezas formadas en la preparación de radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$                               | 29 |
| 1.8. Aplicaciones de los radiofármacos  | 30 |
| 1.8.1. Radiofármacos de diagnóstico   | 30 |
| 1.8.1.1. Características del radionúclido de diagnóstico  | 30 |
| 1.8.1.2. Características radioquímicas  | 31 |
| 1.8.1.3. Distribución de In Vivo  | 31 |
| 1.8.2. Radiofármacos terapéuticos   | 31 |
| 1.8.2.1. Características del radionúclido   | 31 |
| 1.8.2.2. Características radioquímicas  | 32 |



|  |    |
|--|----|
| 1.8.2.3. Distribución In Vivo  | 32 |
| 1.9. Control de calidad de los radiofármacos                           | 32 |
| 1.9.1. Controles físicos   | 32 |
| 1.9.1.1. Características organolépticas                                | 32 |
| 1.9.1.2. Tamaño y número de partículas                                 | 32 |
| 1.9.2. Controles fisicoquímicos  | 33 |
| 1.9.2.1. Pureza radionuclídica   | 33 |
| 1.9.2.2. Pureza radioquímica   | 33 |
| 1.9.2.3. Fuerza iónica, pH y osmolalidad                               | 33 |
| 1.9.2.4. Pureza química  | 34 |
| 1.9.3. Controles biológicos  | 34 |
| 1.9.3.1. Esterilidad   | 34 |
| 1.9.3.2. Pirógenos   | 34 |
| 1.9.3.3. Distribución biológica  | 34 |
| 1.9.4. Estabilidad de los radiofármacos                                | 35 |
| <b>Capítulo 2</b>  |    |
| <b>2. Diseño experimental</b>  | 37 |
| 2.1. Planteamiento del problema  | 37 |
| 2.2. Equipos, materiales y reactivos                                   | 38 |
| 2.2.1. Equipos   | 38 |
| 2.2.2. Materiales  | 38 |
| 2.2.3. Reactivos   | 39 |
| 2.2.4. Material biológico  | 39 |
| 2.3. Diagrama de flujo de la metodología                               | 40 |
| 2.4. Caracterización del HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN                  | 41 |
| 2.5. Validación del sistema  | 41 |
| 2.5.1. Linealidad del sistema  | 41 |
| 2.5.2. Precisión del sistema   | 41 |
| 2.5.3. Exactitud del sistema   | 42 |
| 2.5.4. Linealidad del método   | 42 |
| 2.5.5. Especificidad   | 43 |
| 2.6. Conjugación de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN                       | 43 |
| 2.6.1. Purificación por Sep-Pack                                       | 43 |
| 2.6.2. Purificación por HPLC   | 44 |
| 2.7. Selección de la formulación                                       | 44 |
| 2.8. Escalamiento del lote y elaboración de la formulación liofilizada | 44 |
| 2.8.1. Preparación de la solución de EDDA                              | 45 |
| 2.8.2. Preparación de la solución Tricina-Manitol                      | 45 |
| 2.8.3. Preparación de la solución EDDA-Tricina-Manitol                 | 45 |
| 2.8.4. Preparación de la solución de SnCl <sub>2</sub>                 | 45 |



|   |    |
|---|----|
| 2.8.5. Preparación de la solución HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN  | 45 |
| 2.9. Control de calidad del núcleo-equipos  | 46 |
| 2.9.1. Radiomarcado del núcleo-equipos  | 46 |
| 2.9.2. Obtención del eluato $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ del generador Getec-ININ $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ | 46 |
| 2.9.3. Evaluación de la pureza radioquímica   | 46 |
| 2.9.3.1. ITLC-G   | 47 |
| 2.9.3.2. Sep-Pack   | 47 |
| 2.9.3.3. HPLC   | 47 |
| 2.10. Pruebas de esterilidad  | 47 |
| 2.11. Determinación de pirógenos  | 48 |
| 2.11.1. Preparación del control negativo  | 48 |
| 2.11.2. Preparación de la muestra   | 49 |
| 2.12. Estabilidad del complejo HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN   | 49 |
| 2.13. Estabilidad de los núcleo-equipos   | 49 |
| 2.14. Unión a proteínas   | 49 |
| 2.15. Ensayos en líneas celulares   | 49 |
| 2.15.1. Ensayos de internalización y de unión no específica   | 50 |
| 2.16. Modelo animal   | 50 |
| 2.16.1. Inducción de tumores en los ratones atómicos  | 50 |
| 2.16.2. Biodistribución   | 50 |
| 2.16.3. Imagen molecular  | 51 |

### Capítulo 3

|   |    |
|---|----|
| <b>3. Resultados</b>  | 53 |
| 3.1. Caracterización del HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN                       | 53 |
| 3.2. Validación del sistema   | 55 |
| 3.2.1. Linealidad del sistema   | 55 |
| 3.2.2. Precisión del sistema  | 56 |
| 3.2.3. Exactitud del sistema  | 57 |
| 3.2.4. Linealidad del método  | 57 |
| 3.2.5. Especificidad  | 58 |
| 3.3. Conjugación de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN                            | 59 |
| 3.3.1. Reacción general para la conjugación de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 59 |
| 3.3.2. Purificación por HPLC  | 60 |
| 3.4. Selección de la formulación  | 61 |
| 3.4.1. Radiomarcado de 20 $\mu\text{L}$ de conjugado                        | 61 |
| 3.4.2. Radiomarcado de 50 $\mu\text{L}$ de conjugado                        | 62 |
| 3.4.3. Radiomarcado de 100 $\mu\text{L}$ de conjugado                       | 63 |
| 3.4.4. Radiomarcado de 120 $\mu\text{L}$ de conjugado                       | 64 |
| 3.5. Control de calidad del núcleo-equipos                                  | 65 |



|   |    |
|---|----|
| 3.5.1. Determinación de la pureza radioquímica por ITLC-G   | 65 |
| 3.5.2. Determinación de la pureza radioquímica por Sep-Pack | 65 |
| 3.5.3. Determinación de la pureza radioquímica por HPLC     | 66 |
| 3.6. Pruebas de esterilidad                                 | 67 |
| 3.7. Determinación de pirógenos                             | 67 |
| 3.8. Estabilidad del complejo HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN  | 67 |
| 3.9. Estabilidad del kit liofilizado                        | 68 |
| 3.10. Unión a proteínas                                     | 68 |
| 3.11. Ensayos en líneas celulares                           | 68 |
| 3.11.1. Ensayos de internalización y de unión no específica | 68 |
| 3.12. Modelo animal   | 69 |
| 3.12.1. Inducción de tumores en ratones atómicos            | 69 |
| 3.12.2. Biodistribución                                     | 70 |
| 3.12.3. Imagen molecular                                    | 71 |
| <br>  |    |
| <b>Capítulo 4</b>   |    |
| <b>4. Discusión</b>   | 73 |
| 4.1. Caracterización  | 73 |
| 4.2. Validación del sistema y del método                    | 73 |
| 4.3. Conjugación y escalamiento del lote                    | 74 |
| 4.4. Pruebas de esterilidad y estabilidad                   | 75 |
| 4.5. Pruebas In Vivo  | 76 |
| <br>  |    |
| <b>Capítulo 5</b>   |    |
| <b>5. Conclusiones</b>                                      | 79 |
| 5.1. Recomendaciones a futuro                               | 80 |
| <br>  |    |
| <b>Referencias</b>  | 82 |
| <br>  |    |
| <b>Glosario</b>   | 91 |



### Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Constantes físicoquímicas del $^{99}\text{Tc}$  | 20 |
| <b>Tabla 2.</b> Tabla de nuclear de los isótopos de Tc  | 21 |
| <b>Tabla 3.</b> Formulación elegida para la formación del complejo HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN   | 44 |
| <b>Tabla 4.</b> Sistema de gradientes empleados en la evaluación de pureza radioquímica por HPLC  | 47 |
| <b>Tabla 5.</b> Resultados de la caracterización de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN  | 53 |
| <b>Tabla 6.</b> Datos de la curva de calibración  | 55 |
| <b>Tabla 7.</b> Resultados de la precisión del sistema con HYNIC  | 56 |
| <b>Tabla 8.</b> Resultados de la precisión del sistema con BN   | 56 |
| <b>Tabla 9.</b> Resultados de la exactitud del sistema  | 57 |
| <b>Tabla 10.</b> Resultados de la linealidad del método con datos cargados de manera independiente  | 57 |
| <b>Tabla 11.</b> Resultados de la caracterización de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN   | 60 |
| <b>Tabla 12.</b> Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 20 $\mu\text{L}$ de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN        | 61 |
| <b>Tabla 13.</b> Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 50 $\mu\text{L}$ de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN        | 62 |
| <b>Tabla 14.</b> Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 100 $\mu\text{L}$ de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN       | 63 |
| <b>Tabla 15.</b> Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 120 $\mu\text{L}$ de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN       | 64 |
| <b>Tabla 16.</b> Porcentaje de impurezas en el radiomarcado del péptido   | 65 |
| <b>Tabla 17.</b> Pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN determinada por Sep-Pack  | 65 |
| <b>Tabla 18.</b> Resultados de la determinación de la pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN                              | 66 |
| <b>Tabla 19.</b> Resultados de las pruebas de esterilidad de los núcleo-equipos   | 67 |
| <b>Tabla 20.</b> Resultados de la pureza radioquímica a las 24 horas del marcado, que muestra la estabilidad del complejo HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN    | 67 |
| <b>Tabla 21.</b> Resultados de la pureza radioquímica a los 6 meses de preparación del núcleo-equipo  | 68 |
| <b>Tabla 22.</b> Porcentajes de unión a proteínas séricas   | 68 |
| <b>Tabla 23.</b> Biodistribución en ratones con tumores inducidos 2 horas después de la administración de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 70 |



### Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Representación esquemática de radiofármacos de primera, segunda y tercera generación  | 7  |
| <b>Figura 2.</b> Identificación química del radiofármaco HYNIC-TOC radiomarcado con Tc-99m por espectrometría de masas y UV/radio-HPLC   | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Afinidad de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC en membranas de células de cáncer pancreático AR42J que expresan receptores de somatostatina (gráfica de Scatchard)      | 11 |
| <b>Figura 4.</b> Curva de competencia de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC en membranas de células de cáncer pancreático AR42J que expresan receptores de somatostatina (Especificidad) | 12 |
| <b>Figura 5.</b> Captación de $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN en tumores PC-3 en ratones atímicos.  | 16 |
| <b>Figura 6.</b> Diagrama del generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  | 26 |
| <b>Figura 7.</b> Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ producido en México   | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Estructura del agente quelante bifuncional Hidrazinonicotinamida  | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de un núcleo-equipio instantáneo durante el radiomarcado con $^{99m}\text{Tc}$                                    | 28 |
| <b>Figura 10.</b> Cromatograma de dos dimensiones obtenido por HPCL de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN  | 53 |
| <b>Figura 11.</b> Cromatograma de tres dimensiones obtenido por HPLC de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN   | 54 |
| <b>Figura 12.</b> Espectro Infrarrojo de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN  | 54 |
| <b>Figura 13.</b> Gráfica de calibración de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN, en donde se aprecia la linealidad del sistema  | 55 |
| <b>Figura 14.</b> Gráfica de calibración de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN, en donde se aprecia la linealidad del método   | 58 |
| <b>Figura 15.</b> Cromatograma obtenido después de la purificación por HPLC  | 60 |
| <b>Figura 16.</b> Pureza radioquímica obtenida con el macado de 20 $\mu\text{L}$ de conjugado  | 61 |
| <b>Figura 17.</b> Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 50 $\mu\text{L}$ de conjugado   | 62 |
| <b>Figura 18.</b> Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 100 $\mu\text{L}$ de conjugado  | 63 |
| <b>Figura 19.</b> Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 120 $\mu\text{L}$ de conjugado  | 64 |
| <b>Figura 20.</b> Representación gráfica de la pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN  | 66 |
| <b>Figura 21.</b> Internalización de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN dependiente del   | 69 |



tiempo en células PC-3 bloqueadas y no bloqueadas, expresada como porcentaje de la actividad total

**Figura 22.** Imagen de un ratón con un tumor inducido con células PC-3 69

**Figura 23.** Gammagrafía obtenida dos horas después de la inyección del radiofármaco 71



## Resumen

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.

Los receptores de péptidos reguladores están sobreexpresados en numerosas células cancerígenas. Esos receptores han sido usados como blancos moleculares de péptidos radiomarcados para localizar tumores cancerosos. El pequeño péptido bombesina (BN, 14 aminoácidos) fue aislado de la piel de la rana y pertenece a un amplio grupo de neuropeptidos con muchas funciones biológicas. El equivalente humano es el péptido liberador de la gastrina (GRP, 27 aminoácidos) y sus receptores (r-GRP) que están sobre expresados en las membranas de las células de los tumores. El receptor subtipo 2 de bombesina (receptor GRP) está sobre expresado en varios tumores humanos incluyendo mama, próstata, células pulmonares y cáncer pancreático. Se han desarrollado algunos radiofármacos análogos de BN que fueron preparados para ser usados en medicina nuclear para la detección de tumores malignos y para evidenciar cánceres de próstata, seno y de nódulos linfáticos.

Se desarrolló una técnica para permitir la conjugación de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN que permitiera obtener este producto con una alta pureza. Se determinó la identidad por cromatografía HPLC. Fue necesaria la validación del método y el sistema de HPLC, para asegurar que los resultados fueran confiables. Se analizaron parámetros de linealidad, especificidad, exactitud y precisión, que son los requeridos por la farmacopea mexicana para métodos Cromatograficos. Con este conjugado se desarrolló una formulación para kits liofilizados, con la finalidad de obtener una pureza radioquímica, después del marcado con  $^{99m}\text{Tc}$ , mayor al 95%; Iso componentes usados en el núcleo-equipos debían favorecer la conjugación del  $^{99m}\text{Tc}$  por medio de un intercambio de ligantes entre la tricina y el ácido hidrazinnicotinamídico (HYNIC). La formulación que se obtuvo para el escalamiento de los lotes se muestra en la siguiente tabla:



| Reactivo                                       | Cantidad |
|--|----------|
| HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN (HYNIC-Bombesina) | 25 µg    |
| Cloruro estanoso                               | 10 mg    |
| Acido Etilendiamidiacético (EDDA)              | 10 mg    |
| N-tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina)     | 20 mg    |
| Manitol  | 50 mg    |

Se determinó la pureza radioquímica por medio de HPLC acoplado a un detector de radiactividad. Las pruebas de estabilidad demuestran que el conjugado es estable hasta por tres meses; además, la actividad se mantiene por más de 24 horas, lo cual hace muy versátil el uso de los núcleo-equipos en el área clínica.

La incorporación de radioactividad en el páncreas demostró la habilidad del radiofármaco de unirse in vivo a células relacionadas con receptores GRP. Además, los estudios de bloqueo de receptores confirmaron la especificidad del bioconjugado por los GRP-r. La incorporación dentro de las células PC-3 receptores-positivas fue significativamente menor a la del páncreas, pero la incorporación al tumor fue altamente específica.



## Introducción

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 ó terapéuticos. Los radiofármacos se emplean en medicina nuclear como agentes diagnósticos y de terapia. Los radiofármacos de tercera generación son excepcionales por su capacidad de localizar in vivo sitios específicos como receptores en la membrana celular o enzimas. El  $^{99m}\text{Tc}$  es el radionúclido más empleado en medicina nuclear debido a sus características “ideales” como la ausencia de emisión  $\beta$  y su emisión  $\gamma$  de energía baja de 140 KeV, que presenta una adecuada penetración en los tejidos, vida media corta, facilidad de detección además de que es fácilmente acomplejable a un gran número de moléculas; más aún, el  $^{99m}\text{Tc}$  está asequiblemente disponible, a bajo costo a través de un generador  $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ . Los radiofármacos se emplean en medicina nuclear en exploraciones diagnósticas y en radioterapia de blancos moleculares. Su uso sólo puede justificarse por la obtención de un beneficio neto que compense el riesgo que pueda entrañar el empleo del trazador radiactivo.

Los receptores de péptidos reguladores están sobreexpresados en numerosas células cancerígenas. Esos receptores han sido usados como blancos moleculares de péptidos radiomarcados para localizar tumores cancerosos. Los receptores para bombesina (receptor GRP) se encuentran sobreexpresados en varios tumores humanos incluyendo mama, próstata, células pulmonares y cáncer pancreático. De este modo, los radiofármacos análogos de bombesina son de gran utilidad en la detección células positivas para esos receptores, en técnicas de gammagrafía, por medio de la obtención de imágenes de blancos moleculares.

Los radiofármacos para diagnóstico no tienen efectos farmacológicos, pero, por su administración en humanos, la mayoría de las veces por vía intravenosa, deben cumplir con un estricto control de calidad que asegure que la sustancia es segura para el paciente y que obtendrá el beneficio buscado.

El objetivo de este trabajo es sintetizar el conjugado HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN para ser marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  a partir de kits liofilizados y evaluar su estabilidad in vitro.

El objetivo se cumplió a partir del desarrollo de una técnica que permitió obtener el conjugado HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN con un alto grado de pureza. Usando este conjugado, se desarrolló una formulación para la producción de núcleo-equipos liofilizados usando cloruro estanso como agente reductor y otros excipientes. Se analizaron parámetros como estabilidad, esterilidad y apirogenicidad.

Se validó el sistema de Cromatografía líquida de alta resolución para determinar la confiabilidad del mismo. Usando esta técnica, se determinó la identidad del conjugado así como su pureza radioquímica.



### *Objetivo general*

Sintetizar el conjugado HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN para ser marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  a partir de kits liofilizados y evaluar su estabilidad in vitro.

### *Objetivos específicos*

1. Sintetizar del conjugado HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN
2. Desarrollar de un método analítico para la caracterización del HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN
3. Desarrollar de formulaciones liofilizadas para el marcado instantáneo de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN por intercambio de ligantes entre tricina y el EDDA.
4. Realizar pruebas de estabilidad en anaquel de las formulaciones del complejo preparadas.
5. Realizar pruebas de pureza radioquímica del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN.



## Capítulo 1. Generalidades



## Generalidades

### 1.1. Generalidades de los 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 ó terapéuticos” [1]. Los radiofármacos están formulados de tal manera que se dirigen a órganos o tejidos específicamente.

De acuerdo con el criterio de diseño, los radiofármacos pueden ser divididos en tres generaciones. En la primera de ellas, simplemente se radiomarcaban compuestos químicos que pudieran ser dirigidos a un órgano determinado sin un receptor específico, o se administraban radiopartículas que fueran captadas explotando procesos fisiológicos normales en el cuerpo. Por ejemplo, la fagocitosis fue la base para preparar coloides como el  $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$  y el bloqueo capilar para desarrollar  $^{99m}\text{Tc}$ -macroagregados de albúmina, dando origen a la gammagrafía hepática y pulmonar respectivamente. Dado que el  $^{99m}\text{Tc}$  se obtiene del generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  en cantidades de nanogramos, estos agentes no fueron caracterizados por métodos químicos analíticos convencionales debido a las bajas concentraciones (escala micromolar).

La segunda generación de radiofármacos emergió en la década de los 80 como resultado del desarrollo de compuestos que tenían un radiometal unido con ligantes y con una geometría bien definida, como los complejos Tc(V)-oxo. Su biodistribución se establecía por sus características fisicoquímicas como tales como carga total, peso molecular, forma y lipofilia. De este trabajo surgió el concepto de agentes quelantes bifuncionales (BFCA por sus siglas en inglés), que son ligandos que no sólo enlazan al radiometal, sino que también pueden unirse por otro extremo de la molécula a receptores biológicos, por ejemplo los derivados del ácido iminodiacético [1, 2]. El concepto fue expandido en los años 90 para incluir el acoplamiento de radiometales con fragmentos bioactivos usando BFCA a y se iniciaron así los estudios en el diseño de radiofármacos de tercera generación.

#### 1.1.1. Diseño de radiofármacos de tercera generación

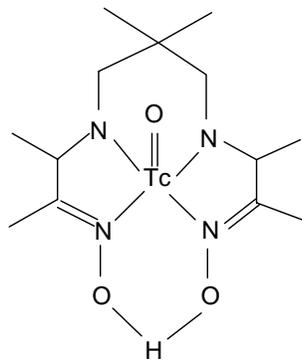
Los radiofármacos diagnósticos de tercera generación se utilizan en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos, y son únicos en su capacidad para detectar *in vivo* sitios bioquímicos determinados tales como receptores y enzimas. El agente bifuncional de encuentra ubicado entre el radionúclido y la molécula blanco, este coordina firmemente al ión metálico y está covalentemente enlazado con la molécula específica del receptor de forma directa o con una molécula de unión. El fragmento bioactivo sirve como un transportador



que lleva al radionúclido al sitio receptor en las células o moléculas blanco [3]. Las moléculas bioactivas específicas de los receptores que pueden ser fracciones de anticuerpos, péptidos, péptido miméticos, análogos de ADN, oligonucleótidos antisentido (antisense) y ligandos no peptídicos. Los agentes de este tipo representan un cambio sustancial en los paradigmas del desarrollo farmacéutico por el empleo de las capacidades propias del organismo como vectores de radiofármacos, en lugar de considerar al organismo como un simple tubo de ensayo donde interactúan moléculas extrañas.



$^{99m}\text{Tc}$ -colide de azufre



Tc-d,l-HM-PAO

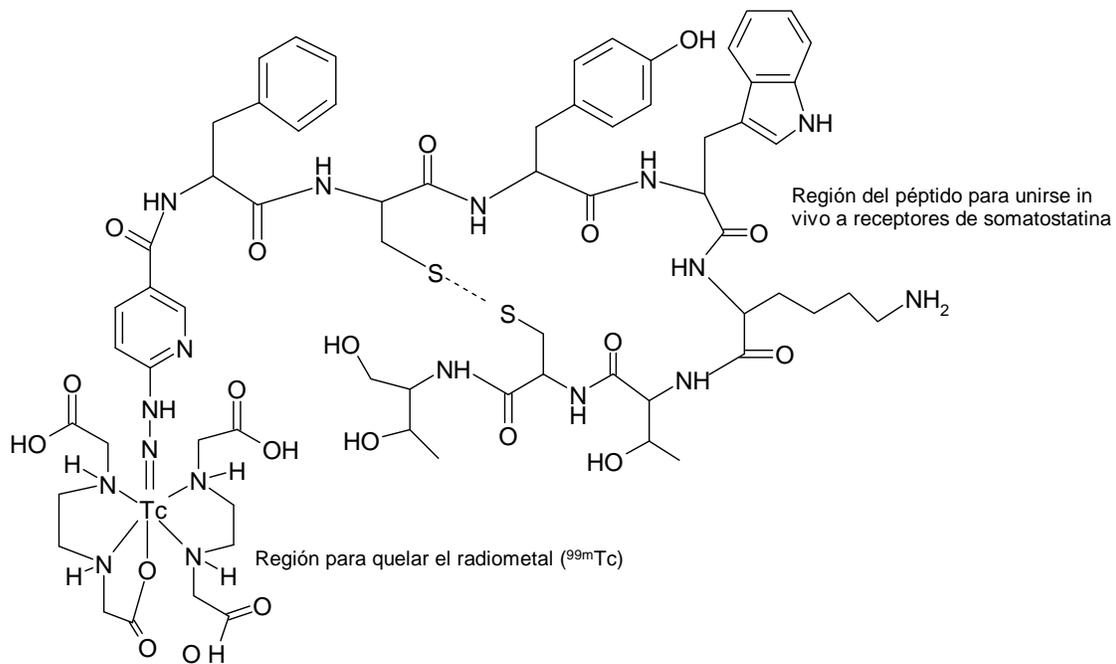


Figura 1. Representación esquemática de radiofármacos de primera generación (arriba) segunda generación (en medio) y tercera generación (abajo) [2].



## 1.2. Caracterización de los radiofármacos

### 1.2.1. Caracterización química

La espectrometría de masas junto con la cromatografía líquida de alta resolución y la detección radiométrica (radio-LC-MS) son importantes técnicas en el análisis de los compuestos que están siendo desarrollados como los radiofármacos. La radio-LC-MS detecta trazas de impurezas [4-11] y determina la actividad específica [5], con lo que se confirma la identidad de la mayoría de los radiofármacos con  $^{99m}\text{Tc}$  [6-11] e identifica sus metabolitos [12-17].

La cantidad de radiofármacos usada en preparaciones para aplicación clínica se encuentra típicamente en el rango micromolar (nanogramos). A esta concentración es difícil elucidar la estructura molecular del compuesto en investigación, lo cual es muy importante en la comprensión de las propiedades de biodistribución del radiofármaco. La química de coordinación convencional, a concentraciones milimolares, es llevada a cabo utilizando cantidades macroscópicas del isótopo natural y estable. Los compuestos, obtenidos en cantidades de miligramos, son caracterizados con técnicas fisicoquímicas convencionales, como la resonancia magnética nuclear, espectroscopia infrarroja, espectrometría de masas y determinación de la estructura cristalina por difracción de rayos X, obteniendo de ese modo una identificación estructural de las especies en estudio. El siguiente paso es comparar la identidad química obtenida a concentración milimolar, usando el isótopo estable, con la obtenida en condiciones de alta dilución (NCA) con el radioisótopo. Ambos, el isótopo estable y el radiactivo, son inyectados juntos en HPLC y los cromatogramas son obtenidos usando dos sistemas de detección diferentes, el detector UV-visible para el isótopo estable y un detector radiométrico para el radionúclido [3]. La correspondencia del tiempo de retención del pico de interés en el cromatograma se acepta como prueba de la identidad química de las dos especies (fig. 2). De todas formas, es importante mencionar que la moderna tecnología de radio-LC-MS ofrece sensibilidad a bajas concentraciones, como Verdyck et al. [9] concluyen, “*la radio-LC-MS puede ser un sensible auxilio en el control de calidad de radiofármacos NCA*”. Es una herramienta esencial durante los estudios in Vitro de estabilidad de radiofármacos en buffer y en suero humano, antes de la evaluación in vivo.

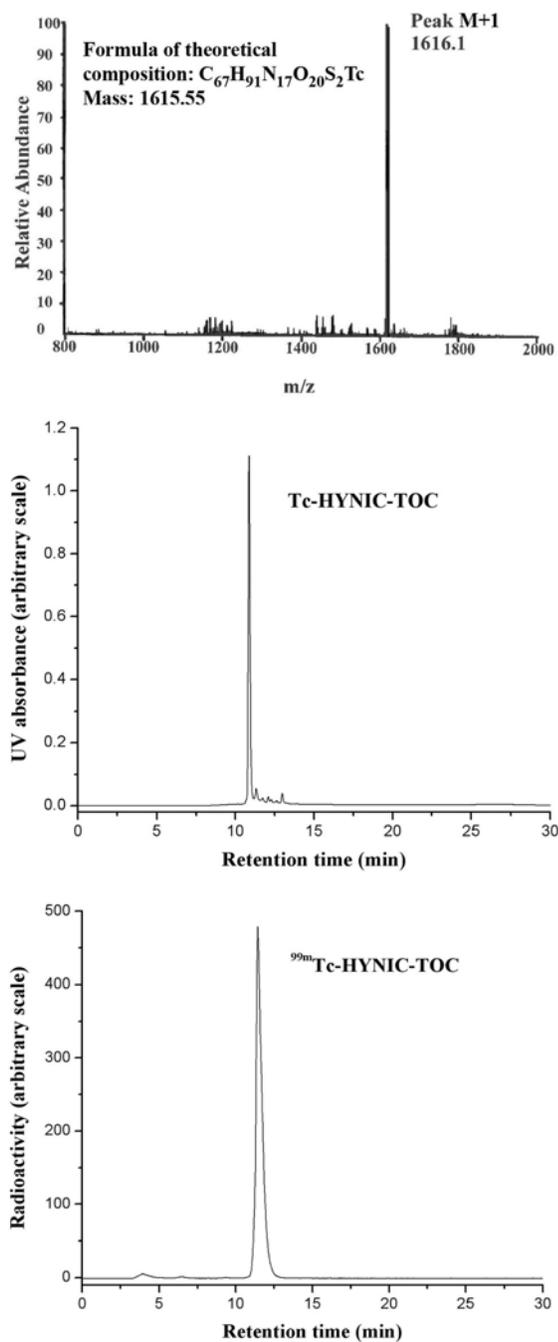


Figura 2. Identificación química del radiofármaco HYNIC-TOC radiomarcado con Tc-99m por espectroscopía de masas (arriba) y U. V./radio-HPLC (abajo) [2].

Es importante mencionar que el cálculo de la Mecánica Molecular (MM) es también una herramienta útil en la explicación de resultados experimentales



asociados con el reconocimiento molecular y estabilidad, debido a que esos fenómenos son regidos por fuerzas intermoleculares como las electrostáticas y las de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones de donador-aceptor y efectos hidrofóbicos. Para que un receptor reconozca un potencial sustrato y, subsecuentemente, se unan, las dos especies deben ser complementarias en tamaño, forma (geometría) y sitio de unión (energía) [18-20].

### 1.2.2. Caracterización bioquímica

*“Las técnicas de obtención de imágenes moleculares, directa o indirectamente, monitorean y registran la distribución espacio temporal procesos moleculares o celulares para aplicaciones bioquímicas, biológicas, de diagnóstico o tratamiento”* [21]. La molécula blanco, para la imagen molecular diagnóstica, debe ser cuidadosamente elegida y la elección debe hacerse teniendo como base ensayos de unión específica (SB), de unión no específica (NSB) y de unión a proteínas no blanco; así como la farmacocinética de la SB y NSB; metabolismo, diferenciación de especies y sensibilidad [22].

Los criterios generales de diseño aplicados al desarrollo de radiofármacos receptor-específicos están dictados por la localización en el cuerpo/órgano de las proteínas blanco, así mismo, por cuales de los receptores son expresados extra o intracelularmente. Además, otros parámetros que determinan la calidad de la imagen incluyen la densidad de estos blancos y la unión no específica [23].

Los estudios de unión a receptores son hechos para determinar la afinidad del radiofármaco por su molécula blanco. Estos ensayos son llevados a cabo en membranas celulares, membranas de tejido o en células intactas de tejido. Los dos principales tipos de experimentos de unión son los estudios de saturación y de competencia.

Los estudios de saturación son llevados a cabo por incubación de las membranas, el competidor y un incremento en la concentración del radioligando, por un periodo de tiempo a temperatura ambiente. A una concentración más alta de la sustancia radiactiva todos los receptores se encuentran ocupados (saturados) por el ligando radiactivo. Las membranas son separadas de la mezcla de incubación por filtración. Cuando los ligantes se unen al tejido, lo hacen usualmente en más de un sitio. La unión específica (SB) es la que se lleva a cabo en el receptor que se está estudiando. Otros sitios de enlace, por ejemplo otros receptores, proteínas de tejido, el tubo de ensaye o los filtros de fibra de vidrio, pueden ser sitios de unión no específica (NSB), la SB es obtenida de la diferencia entre de la unión no específica a la unión total (TB).

La curva de saturación es obtenida por la gráfica de la concentración del radioligando adicionado contra la concentración del ligando unido. Los experimentos de saturación sirven para determinar la constante de disociación



( $K_d$ ), que es una medida de la afinidad de un ligando por su receptor, y  $B_{máx}$ , que es el número total de sitios receptores en la membrana que se estudió. El valor de  $K_d$  es igual a la concentración de radioligando que se requiere para ocupar el 50% de los receptores y es calculada usando una gráfica Scatchard (concentración del ligando unido (M) contra el cociente del ligando unido/libre) (fig. 3). Una baja  $K_d$  indica un alto grado de afinidad del ligando por su receptor.

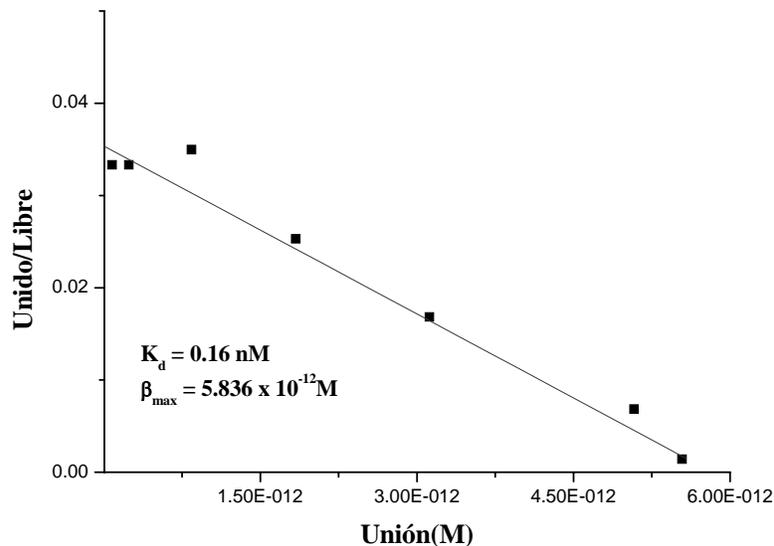


Figura 3. Afinidad del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC en membranas de células de cáncer pancreático AR42] que expresan receptores de somatostatina (gráfica de Scatchard) [2,3].

Los ensayos de competencia están basados en la capacidad de un ligando no marcado de competir con el ligando radiomarcado por el receptor. Como muchos ligandos no se encuentran disponibles en una forma radiactiva y no hay manera directa de medir su afinidad por el receptor, el método indirecto es usado para determinar su habilidad de competir con un radioligando. Las membranas, el radioligando y las concentraciones incrementadas del ligando competidor son incubados por varias horas a temperatura ambiente. Las membranas son entonces separadas de la mezcla de incubación por filtración y lavado. La curva de competición es obtenida graficando el porcentaje de actividad unida a las membranas contra la concentración del competidor (fig. 4). La SB, NSB e  $IC_{50}$  (la concentración del competidor que inhibe el 50% de la unión con el radioligando), puede ser calculada con una regresión no lineal usando la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{NSB + SB}{\left(1 + \frac{X}{IC_{50}}\right)}$$



donde Y es la actividad y X la concentración del competidor (nM).

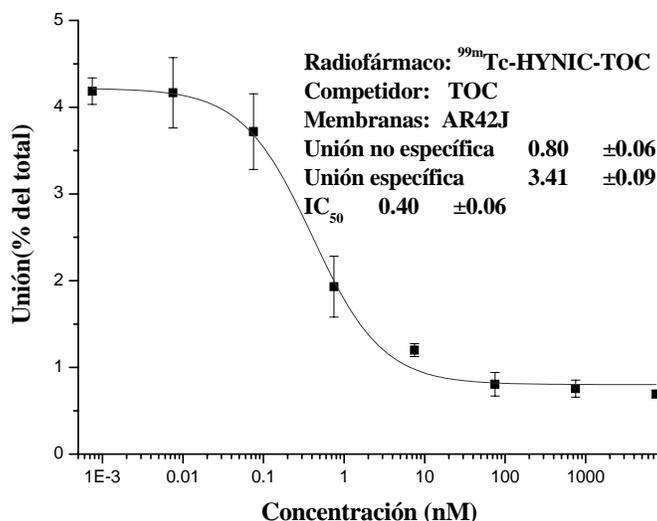


Fig. 4. Curva de competencia del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC en membranas de células de cáncer pancreático AR42J que expresan receptores de somatostatina (Especificidad) [2,3].

La curva de competición obtenida debe mostrar un desplazamiento específico del radioligando por el competidor si el ligando mantiene su afinidad por el receptor. Si la concentración del radioligando y la afinidad por el receptor son conocidas, el valor  $K_i$  (la constante de disociación en el equilibrio por un inhibidor competitivo del receptor) puede ser obtenido del valor  $IC_{50}$  usando la ecuación Cheng-Prusoff [24].

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{D}{K_D}}$$

Donde D es la concentración del radioligando y  $K_D$  es la constante de disociación de la unión del radioligando con el receptor bajo las mismas condiciones experimentales usadas en el experimento de competición. El valor  $K_i$  para un ligando no marcado debe estar en el mismo rango que un valor de  $K_D$  obtenido con el mismo ligando radiomarcado.

La cinética de la unión y el grado de internalización y externalización de los radiofármacos en células vivas son parámetros importantes que se evalúan frecuentemente como parte de la caracterización bioquímica además de las pruebas mencionadas antes [25-33].



### 1.2.3. Evaluación *in vivo*

La evaluación preclínica de los radiofármacos incluye estudios *In vivo* tanto de biodistribución como de toxicidad en animales. Los estudios de biodistribución en un modelo animal normal identifican patrones de distribución en órganos y de excreción. Los animales con tumores malignos inducidos (usualmente ratones atómicos) son usados para determinar la unión específica a los receptores que están sobreexpresados en células cancerosas. Los estudios de bloqueo, inyectando simultáneamente el radiofármaco (radioligando) y un exceso de ligando no radiactivo, son útiles para determinar el grado de asimilación específica mediada o pérdida de unión a otros sitios de unión. Los animales con tumores malignos inducidos son esenciales para evaluar la eficacia terapéutica.

Los estudios de toxicidad están enfocados a la toxicidad potencial química de los componentes, no del radionúclido, ya que son sólo cantidades muy pequeñas del elemento radiactivo son las que están presentes en el radiofármaco.

### 1.3. Radiofármacos receptor-específicos de tecnecio- $^{99m}$ para obtención de imágenes de blancos moleculares

En medicina nuclear, el  $^{99m}\text{Tc}$  es el radionúclido más comúnmente usado para diagnóstico *in vivo* por sus características físicas y químicas ideales, como su corta vida media de 6 horas, radiación gamma monoenergética de 140 keV, ausencia de emisión de partículas durante el decaimiento, así como su fácil acomplejamiento con un gran número de ligandos. Más aún, el  $^{99m}\text{Tc}$  está aseQUIblemente disponible, a bajo costo a través de un generador  $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ .

Muchos de los radiofármacos consisten de un preparado [ $^{99m}\text{Tc}$  quelado] por medio de la adición de una solución estéril de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , (eluído de un generador  $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ ), en un nucleoequipo para radiomarcado. El  $^{99m}\text{Tc}$  es reducido de su estado de oxidación VII ( $^{99m}\text{Tc(VII)O}_4^-$ ) a una valencia menor por medio de la acción de iones estañoso ( $\text{Sn}^{2+}$ ), uno de los constituyentes del nucleoequipo. La reducción puede producir estados de oxidación 5+, 4+ y 1+, dependiendo del ligante presente. El tecnecio reducido es luego unido por el ligando para formar el complejo deseado que es obtenido en un corto tiempo (usualmente 5-30 min) en un alto rendimiento (>90%) [10]. La radio-LC-MS confirma la identidad de la mayoría de los radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  y ofrece sensibilidad cercana a concentraciones NCA.

#### 1.3.1. Receptores de péptidos reguladores

Los receptores de péptidos reguladores están sobreexpresados en



numerosas células cancerígenas. Esas moléculas han sido usadas como blancos moleculares de péptidos radiomarcados para localizar tumores cancerosos. Los exitosos resultados clínicos obtenidos durante la última década con la obtención de imágenes moleculares de los receptores de somatostatina, que se encuentran sobreexpresados en las células de los tumores neuroendocrinos, han sido extendidos al estudio de otros radiopéptidos para hacer blanco en otros asociados al cáncer como el péptido liberador de gastrina, colecistoquinina, péptidos ligandos para receptores de integrinas o neurotensina. La mejora de los radiopéptidos análogos está permitiendo una imagen molecular específica de diferentes tipos de tumores, incluyendo cáncer de mama, próstata, intestino, páncreas y de cerebro [34-35].

#### *1.3.1.1. Péptidos análogos de bombesina / péptido liberador de gastrina*

La bombesina (BN, 14 aminoácidos) fue aislada de la piel de la rana y pertenece a un amplio grupo de neuropeptidos con muchas funciones biológicas. El equivalente humano es el péptido liberador de la gastrina (GRP, 27 aminoácidos) y sus receptores (r-GRP) que están sobreexpresados en las membranas de las células de los tumores. El GRP y la bombesina difieren por sólo uno de los 10 residuos carboxílicos y eso explica una actividad biológica similar de las dos moléculas [34]. La unión fuerte y específica BN-GRP-r es la base del marcado de la BN con radionúclidos [36-40].

El receptor subtipo 2 de bombesina (receptor GRP) está sobreexpresado en varios tumores humanos incluyendo mama, próstata, células pulmonares y cáncer pancreático [34]. Se han desarrollado algunos radiofármacos análogos de BN que fueron preparados para ser usados en medicina nuclear para la detección de tumores malignos y para evidenciar cánceres de próstata, seno y de nódulos linfáticos. Los conjugados de BN radiomarcada hacen blanco en los receptores BN1 y BN3 y han sido desarrollados también para dirigirse a otros tipos de cáncer [43, 44]. No obstante, la mayoría de los análogos de la bombesina marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  tienden a acumularse en el hígado e intestino debido a su alta lipofilia y su aclaramiento hepatobiliar [35, 43-50]. La gran acumulación de radiactividad puede interferir durante la detección de cánceres positivos BN/GRP y sus metástasis en las áreas abdominales.

Se ha reportado a Demobesin-1 como un análogo de BN selectivo con un grupo quelante  $-\text{N}_4-$  para una unión estable con tecnecio- $^{99m}$  y con un bajo aclaramiento hepatobiliar [26]. Esos péptidos, marcados o no, demostraron una alta afinidad en preparaciones de membranas humanas de adenocarcinoma PC-3 humano. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  determinados para Demobesin-1 y Tyr<sup>4</sup>-BN son 0.70 y 1.5 nM respectivamente, mientras que la  $K_d$  definida para  $^{99m}\text{Tc}/^{99}\text{Tc}$ -Demobesin-1 fue de 0.67 nM después de la inyección en ratones sanos,  $^{99m}\text{Tc}$ -Demobesin-1 se



acumuló muy eficientemente en los órganos blanco (páncreas, tracto gastrointestinal) vía mediación GRP-R., como es demostrado por experimentos de bloqueo de receptores *in Vivo*. Igualmente se mostró una alta incorporación mediada por GRP-R después de la inyección a ratones atímicos con tumores PC-3 [27].

Los  $^{99m}\text{Tc}$  Demobesin-3, 4 y 5 se reportaron recientemente como agonistas de la bombesina. Todos ellos demostraron valores de  $\text{IC}_{50} < 0.60$  nM evaluados por ensayos de unión competitiva. Estudios *in Vitro* en células PC-3 mostraron una rápida incorporación e internalización.  $^{99m}\text{Tc}$ -Demobesin-3 y 4 se excretaron primordialmente por vía renal urinaria [51].

Lin et al. [52] reportó otro análogo de BN marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  con alta afinidad, [DTPA<sup>1</sup>, Lys<sup>3</sup>( $^{99m}\text{Tc}$ -Pm-DADT), Tyr<sup>4</sup>]BN, teniendo un modificador farmacocinético incorporado, DTPA y marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  usando un diaminedithiol quelante hidrofílico (Pm-DADT) produce un aclaramiento hepatobiliar más bajo. Los estudios de unión *in Vitro*, usando membranas de células PC-3 de cáncer de próstata humanas, mostraron que  $K_i$  para [DTPA<sup>1</sup>, Lys<sup>3</sup>( $^{99m}\text{Tc}$ -Pm-DADT), Tyr<sup>4</sup>]BN fue de 4.1 nM. Los estudios de biodistribución para [DTPA<sup>1</sup>, Lys<sup>3</sup>( $^{99m}\text{Tc}$ -Pm-DADT), Tyr<sup>4</sup>]BN en ratones normales revelaron una muy baja acumulación de radiactividad en hígado e intestinos. Hubo una incorporación significativa en páncreas, que expresaba receptores BN/GRP [52].

La disponibilidad de un método de radiomarcado simple y reproducible es esencial en el desarrollo de radiofármacos para el uso clínico rutinario, el  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, obtenido a partir de núcleo-equipos liofilizados, ha sido reportado como un radiofármaco con alta estabilidad en suero humano, unión específica a los receptores y rápida internalización. Los datos de biodistribución en ratones mostraron un aclaramiento sanguíneo rápido, con excreción renal predominante y distribución a los tejidos positivos para receptores GRP como el páncreas y tumores PC-3 (fig 5) [53].

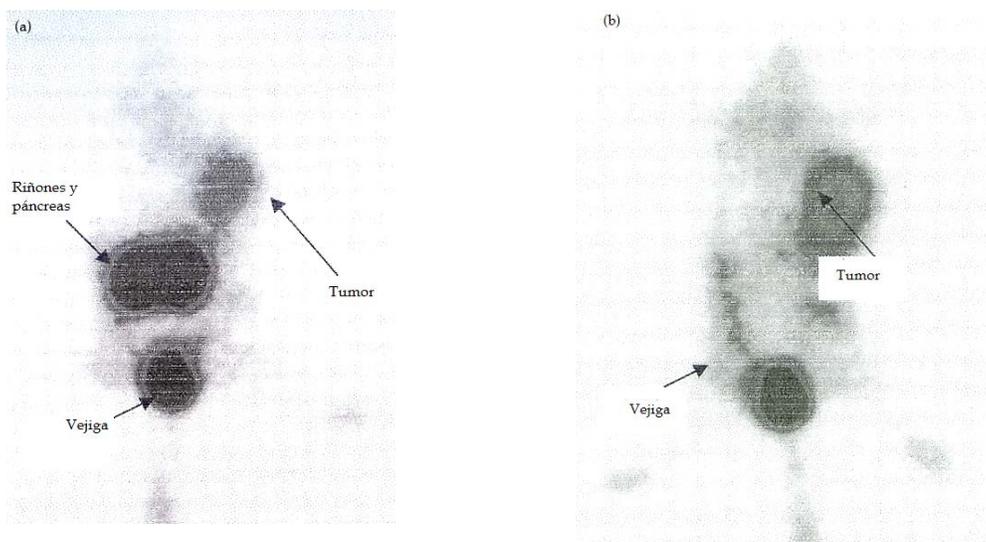


Figura 5. Captación de  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN en tumores PC-3 en ratones atímicos. (a) Ratón completo, (b) ratón con disección de vísceras para resaltar la captación en el tumor [91].

#### 1.4. Radiofármacos receptor-específicos para terapia

Un importante beneficio de los radiofármacos receptor-específicos es su uso para terapia dirigida. Una molécula bioactiva con un radionúclido para obtener imágenes como el  $^{99m}\text{Tc}$  puede ser usada para la identificación de tumores malignos y sitios de metástasis, así como para la planeación dosimétrica de tratamiento (cantidad de energía por unidad de masa a la que se dirige el tratamiento, J/Kg). La misma molécula marcada con un radionúclido emisor de partículas puede ser usada para terapia. Algunos de los elementos radiactivos propuestos para la radioterapia dirigida con moléculas bioactivas receptor específicas son el itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) y renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ).

#### 1.5. Bombesinas y bombesinas radiomarcadas

El grupo de neuropéptidos llamados bombesinas comprende un gran número de péptidos originalmente aislado de la piel de los batracios en quienes estimulan las contracciones del músculo liso y regulan la temperatura. Posteriormente se encontró que también están ampliamente distribuidos en células neurales y endocrinas humanas.

La familia de las bombesinas incluye a las de origen batracio y a las de origen mamífero. Entre las primeras encontramos 3 subfamilias: a) el grupo de las bombesinas propiamente dicho que comprende a la bombesina (BN), un péptido con 14 aminoácidos, aislado en 1971 por Anastasi; potente agente neuroregulador proveniente de los sapillos europeos de vientre colorido: *Bombina bombina*, B.



*variegata* y *B. orientalis*; y la alitesina encontrada en el sapo partero común *Alytes obstetricans*; y, b) el grupo de las ranatensinas, que incluye a la ranatensina aislada de la rana *Rana pipens* que generalmente es utilizada para disección en el laboratorio, las litorinas y las rodeilitorinas y, por último, c) el grupo de las Leu(8) y Phe(8) filolitorinas. Las principales bombesinas de origen mamífero son dos: el péptido liberador de la gastrina (GRP) y la neuromedina B (NMB) cuya función no está perfectamente establecida [54].

En la piel de los batracios coexisten la BN y el GRP lo que demuestra que son diferentes pero con estructura homóloga y actividad biológica semejante, por lo cual se considera que el GRP es el equivalente en los mamíferos a la BN [55].

La función principal de las hormonas peptídicas GRP y BN es liberar a la gastrina secretada a la sangre por las células G que se encuentran principalmente en el antro gástrico. Otras funciones de las GRP y BN son: actuar sobre los tejidos periféricos y Sistema Nervioso Central, estimular la liberación de hormonas gastrointestinales, aumentar las concentraciones de gastrina plasmática, polipéptido pancreático, glucagón, insulina, péptido gastro-inhibidor y mantener los ciclos circadianos.

Los péptidos semejantes a las bombesinas son sintetizados como precursores protéicos y por acción enzimática se transforman a la forma madura con 8-14 aminoácidos. A los últimos 7 aminoácidos de la porción C-terminal se les considera comunes a las bombesinas y representan la porción biológicamente activa, los primeros, los del N-inicial pueden ser modificados sin efecto biológico diferente al de la BN.

La BN tiene la siguiente secuencia de 14 aminoácidos: pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub>. Los aminoácidos en el mismo orden se encuentran en el estómago porcino, pulmones fetales, neuronas del Sistema Nervioso Central y en el plexo intestinal mesentérico. Debido a que la ranatensina y la alitesina tienen cadenas similares a la BN producen los mismos efectos farmacológicos [54].

Así mismo la BN muestra una gran afinidad específica para los receptores del péptido liberador de la gastrina GRP-r, (GRPr, GRP-R, GRPR). Se puede revertir el concepto y decir que los receptores de GRP presentan gran afinidad por la BN.

Se han identificado 4 tipos de receptores de bombesina: el de GRP (GRP-r), frecuentemente expresado en tumores malignos, el de la neuromedina B (NMB), los BB3 (BRS-3) y el BB4, estos dos últimos con mayor afinidad a la BN que para el GRP. Se ha establecido que el GRP-r y el NMB-r determinan la acción de los péptidos semejantes a la BN en los mamíferos. Sin embargo, solamente se había estudiado la farmacología del GRP-r debido a la falta de un ligante apropiado. Recientemente se ha informado que la BN marcada con yodo-125, la  $^{125}\text{I}$ -[D try<sup>8</sup>-beta-Ala<sup>11</sup>-Phe<sup>13</sup>-Nle<sup>14</sup>]-bombesina-(6-14) se une con gran afinidad a todos los



receptores ya mencionados y es utilizada para estudios farmacológicos y pruebas de tamizaje para agonistas o antagonistas de receptores de GRP/BN [56].

Los receptores GRP se expresan de manera abundante en varias estirpes de células cancerosas incluyendo las de cáncer de próstata, medular, gastrointestinal, mama, células pequeñas o avenoides del pulmón, cáncer de tiroides, melanoma, duodenal, de colon, gastrónomas y algunas neoplasias uterinas así como también hipotálamo e hipófisis [54, 57, 58].

Se ha demostrado que los tumores inducidos en ratones atímicos con la línea celular PC-3 de cáncer humano de próstata, se reducen notablemente con la administración de antagonistas de BN [59]. Además, el efecto del GRP sobre la regulación de la angiogénesis y perfusión vascular en tumores inducidos de carcinoma renal en este mismo tipo de animales, llevó a la conclusión de que la expresión de los GRP-r no solamente estimula la proliferación de las células tumorales sino que también afecta la microcirculación [60].

El agonista GRP/BN es llevado al interior de la célula una vez que se ha unido a sus receptores de membrana. Estos son reciclados o degradados mientras que el GRP/BN permanece en el espacio perinuclear. Por lo tanto, la BN conjugada a la 2-pirrolino-doxorubicina, (AN-215), un agente citotóxico para quimioterapia dirigida, inyectada a ratones desnudos con tumores inducidos de próstata humana, ha producido resultados satisfactorios en el tratamiento de éste cáncer [61]. Así mismo, la BN radiomarcada permanecerá en el tejido diana o “blanco” por largos periodos dando como resultado una acumulación de la radiactividad en tejidos ricos en receptores GRP positivos (GRP-r+), sin mucho daño a las células y tejidos circundantes.

En un estudio muy completo, Reubi y col. (2002) analizaron los subtipos de receptores en 161 tumores cancerosos humanos por medio una BN marcada con yodo-125, la  $^{125}\text{I}$ -[D-Tyr<sup>8</sup>, beta-Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup> NIE<sup>14</sup>] bombesina (6-14) que identifica a los cuatro subtipos. El receptor expresado de manera predominante se determinó *in Vitro* con estudios de unión a células (provenientes de tumores resecados o de biopsias) y de desplazamiento por competencia entre el receptor/ligante radiactivo por GRP, BN, NMB y el ligante no radiactivo [D-Tyr<sup>8</sup>, beta-Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>NIE<sup>14</sup>] bombesina (6-14). Encontraron que 12/12 tumores de próstata, 41/57 de mama, y 5/5 gastrinomas expresaban predominantemente GRP-r; en cuanto a carcinoides: 11/24 intestinal, 1/26 bronquial y 1/1 carcinoides de timo presentaban receptores de NMB; 9/26 carcinoides bronquiales y 4/9 de cáncer pulmonar de células pequeñas expresaban, de preferencia, BB3-r y de ellos 3/9 también expresaban GRP-r. Igualmente 6/16 carcinomas renales expresaban BB3-r. Finalmente 2/10 sarcomas de Swing expresaban solamente BB3-r. Con este primer estudio, por medio de técnicas de unión específica, Reubi y col. concluyeron que estos tumores pueden ser diagnosticados y tratados con análogos de la BN radiomarcados [62].

El ligante convencional  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>4</sup>]bombesina muestra resultados similares



con la bombesina no marcada, en cuanto a la afinidad y al número de receptores a los que se une. Al sustituir el yodo-125 por radionúclidos emisores de radiaciones gamma y beta positivas y negativas ( $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{149}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ) se obtienen radiofármacos específicos análogos de la BN utilizados en medicina nuclear para el diagnóstico y/o terapia de tumores GRP-r-positivos [54].

Para fines diagnósticos, el tecnecio-99m sigue siendo el radionúclido preferido por sus características radionucléidas como son la vida media de 6 horas, 85% de las emisiones gamma monoenergéticas de 0.140 MeV, fácilmente asequible y de fácil detección en los equipos de medicina nuclear actuales. En el caso del marcado con tecnecio-99m en forma de pertecneciato ( $^{99m}\text{Tc}(\text{VII})\text{O}_4$ ) se reduce a número de oxidación bajo  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{IV})$ ,  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  previamente a la unión con ligantes específicos [63].

Para el marcado de bombesina se conserva íntegra la porción del C-terminal, que es la parte bioactiva y se forman homólogos por medio de modificaciones al extremo N, como son, aumento, disminución, sustitución de aminoácidos y/o modificación de moléculas ligantes del radionúclido. Una estrategia de marcado con átomos radiactivos es el uso de ligantes quelantes bifuncionales (BFCAs) que enlazan, a manera de puente, en extremo N-inicial con el elemento. Algunas moléculas de este tipo son el ditia-difosfina unida al tecnecio. El  $^{99m}\text{Tc}(\text{V})\text{-P}_2\text{S}_2\text{-COOH}$  (ácido 6,8-bis[3-(bis[hidrometil]fosfanil)propil-sulfanil]-octanóico) se acopla a la BN [64]. Una técnica más complicada consiste en marcar el tricarbonilo con tecnecio y el  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{OH}_2)\text{CO}_3]^+$  se hace reaccionar con el agente quelante bifuncional ácido 2-picolilamina-N,N'-diacético (PADA) que se une a la BN intercalando ácido 5-aminovalérico (AVA) como espaciador [ $^{99m}\text{Tc}(\text{I})\text{-PADA-AVA}$ ]bombesina (7-14) [65].

Otra estrategia de marcado es la de sintetizar el péptido asociado a una molécula que pueda unir directamente al radionúclido. En la síntesis del pentadecapéptido Cys-Aca-bombesina el extremo-N se modificó sustituyendo el ácido piroglutámico por Cys-Aca, (Aca = ácido 6-aminohexanóico) y el conjugado se marca fácilmente con  $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$  formando un complejo estable y con actividad biológica idéntica a la de la BN [66].

En la síntesis peptídica se han utilizado frecuentemente moléculas que se conjugan a la BN y que ofrecen estabilidad termodinámica alta sin interferir con la estereoespecificidad del C-terminal de la BN: HYNIC (6-hidrazino nicotinamida) unido a alguno o algunos de los siguientes coligantes: EDDA (ácido etilendiaminodiacético), tricina (N-[2-hidroxi-1,1'-bis(hidroximetil)etil]glicina), NA (ácido nicotínico) o bien, tricina/EDDA, o tricina/NA [67, 68].

Para la unión de los lantánidos con la BN se requieren ligantes voluminosos, multidentados como el DTPA (ácido etilentriaminopentacético) o macrocíclicos como el DOTA (ácido 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano-N, N', N', N''-tetracético) que estabilicen el radiolantánido y evite la transquelación *in Vivo* con proteínas



séricas [54, 69].

Los análogos de GRP/BN son actualmente de gran interés debido a que sus receptores se encuentran en abundancia en la superficie celular de un gran número de tumores y los radiofármacos-BN han tenido gran éxito en la localización de varios procesos oncológicos. En un futuro próximo se esperan resultados satisfactorios sobre su uso en radioterapia [91].

## 1.6. Monografía del tecnecio

### 1.6.1. Estado natural

Normalmente el tecnecio no se encuentra en la corteza terrestre. Se ha sugerido que todo el Tc presente en nuestro planeta es de origen secundario, esto es, que proviene tanto de la fisión espontánea del uranio como de la activación por la radiación cósmica de alta energía del molibdeno, del niobio y del rutenio.

Casi todo el tecnecio que se encuentra en nuestro ambiente es el isótopo 99, con una actividad específica de 629 MBq/g (17 mCi/g) y que proviene de:

- El decaimiento radiactivo natural,
- Las pruebas de armas nucleares,
- La producción del hexafluoruro de uranio,
- Los desechos de las centrales nucleares.

En cuanto a la presencia de tecnecio en el universo, se ha informado que sus líneas espectrales se encuentran en algunas estrellas del tipo "S", "M" y "N".

### 1.6.2. Propiedades fisicoquímicas

Tabla 1. Constantes físicas  $^{99}\text{Tc}$

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Número atómico                | 43  |
| Peso atómico                  | 98.913 (98.8; 98.906)                               |
| Radio iónico                  | 56 pm   |
| Radio atómico                 | 127 pm  |
| Radio metálico                | 135 pm (136 pm)                                     |
| Densidad                      | 11.50 g/cm <sup>3</sup> (11.487 g/cm <sup>3</sup> ) |
| Punto de fusión               | 2250.9 ± 50°C (2150°C; 2172°C)                      |
| Punto de ebullición           | 4877°C (4567°C)                                     |
| Calor de fusión               | 5.5 kcal/átomo g                                    |
| Calor de vaporización         | 120 kcal/átomo g                                    |
| Temperatura de superconductor | -281.8°C (8.8 K)                                    |



|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Potencial de ionización</b>   | 7.28ev; 0.702 MJ/mol   |
| <b>Electronegatividad</b>        | 1.9 (escala de Pauling)  |
| <b>Electronegatividad</b>        | 24.8 nN (Alred-Rochow)   |
| <b>Afinidad electrónica</b>      | 0.608 (MJ/mol)   |
| <b>Configuración electrónica</b> | (Kr) 4d <sup>6</sup> 5s; [(Kr) 5s <sup>2</sup> 4d <sup>5</sup> ] |
| <b>Números de oxidación</b>      | 3-, 1-, 1+ → 7+  |
| <b>Números de coordinación</b>   | 4 → 10   |
| <b>Radioisótopos informados</b>  | 29   |

### 1.6.3. Isótopos

Los 29 radioisótopos del Tc en la tabla nuclear de Marshall Brucer (1979) van del Tc-90 al Tc-110 e incluyen 8 parejas de isómeros nucleares que son: 90m-90; 93m-93; 94m-94; 95m-95; 96m-96, 97m-97; 99m-99 102m-102.

Algunos datos generales, tomados de la tabla nuclear, respecto a la vida media o tiempo de semidesintegración y tipo de desintegración se anotan a continuación:

Tabla 2. Tabla nuclear para isótopos de Tc

| Tiempo           | Intervalo $t_{1/2}$ | Número total |
|------------------|---------------------|--------------|
| Segundos         | 0.83-50             | 10           |
| Minutos          | 3.2-52              | 9            |
| Horas            | 2.75-20             | 4            |
| Días             | 4.28-87             | 3            |
| Millones de años | 0.214               | 1            |
|                  | 2.6                 | 1            |
|                  | 4.2                 | 1            |

| Tipo de desintegración | Número de isótopos |
|------------------------|--------------------|
| Beta positiva          | 4                  |
| Captura de electrones  | 9                  |
| Transición isomérica   | 8                  |
| Beta negativa          | 3                  |
| Producto de fisión     | 5                  |

El tecnecio aislado por Perrier y Segrè en 1937 resultó ser una mezcla de los isómeros nucleares 95m y 97m con periodos de semidesintegración de 2 y 3 meses aproximadamente, apropiados para sus estudios. Un año después, en junio de 1937, se informó sobre el aislamiento del 99 y del isómero 99-metaestable, que tan útil ha sido en medicina nuclear.

El  $^{94m}\text{Tc}$  es un emisor de positrones (66%  $\beta^+$ ) que en forma de pertecneciato



se ha utilizado para verificar la biodistribución del  $\text{TcO}_4^-$ . Recientemente se ha utilizado el isómero nuclear  $^{95m}\text{Tc}$ , con  $T_{1/2}$  de 61 días, producido por ciclotrón para estudios en ecología en procesos biogeoquímicos y para estudios de producción de radiofármacos.

El  $^{99}\text{Tc}$  que se encuentra en la tierra en cantidades de gramos se ha utilizado en:

- Química analítica
- Química de coordinación, para estudiar el comportamiento de este metal e interpolar los resultados al diseño y producción de radiofármacos
- Como anticorrosivo, para proteger láminas acero aún en concentraciones tan bajas como  $5 \times 10^{-5}\text{M}$
- En sistemas de fase con V, Ta, Cr, W, Mn, Fe, Co, Ni, Pt, Al y tierras raras;
- En amalgamas con el Hg
- En electrónica: las aleaciones con Mo, Zr y Nb tienen propiedades de superconductores
- Química nuclear: para controlar la combustión del combustible en los reactores nucleares, debido a su sección transversal para captura de neutrones y, para la preparación de fuentes de energía beta de 292 KeV

#### 1.6.4. Propiedades químicas

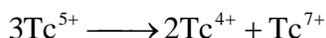
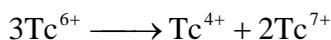
Algunas de las propiedades químicas de los elementos de la familia VIIA son semejantes entre sí, pero hay características que son diferentes y específicas para cada miembro de la familia. A continuación se anotan algunas similitudes y diferencias. El comportamiento químico del tecnecio es más semejante al del renio que al del manganeso; este último es, en general, más estable como divalente ( $\text{Mn}^{2+}$ ) y los otros dos como tetra y heptavalentes; aunque el Re y el Tc muestran valencias que van desde 3-, 1- y 1+ al 7+ los dos números de oxidación más frecuentes son el 7+, representados por los heptaóxidos y por los permetalatos y el 4+ ejemplificado con los dióxidos, tetracloruros y los halogenometalatos; los compuestos de coordinación pentavalentes del Tc y Re son estables, al igual que los tetra, tri y divalente. Con esta multitud de valencias se asemejan ambos al rutenio y al osmio.

Algunas semejanzas entre el tecnecio y el renio son, ambos forman aniones permetalato  $\text{MO}_4^-$  que se combinan con cationes pesados para dar sales insolubles, los dos forman heptaóxidos volátiles y también heptasulfuros insolubles en ácidos, los dos metales, en placa o en lingote, resisten a la oxidación, pero cuando están finamente pulverizados son oxidados fácilmente y por combustión llegan hasta los heptaóxidos, el Tc y el Re metálicos son insolubles en HF o HCl, a diferencia del manganeso metálico, pero ambos sí se disuelven en los ácidos nítrico, sulfúrico y



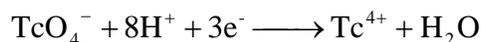
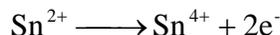
en agua regia concentrados, los dos se combinan a altas temperaturas con el azufre para formar disulfuros y con el carbón para dar carburos, en forma de esponja y dependiendo del grado de pulverización se disueven en soluciones ácidas, neutras o alcalinas, tanto en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 5% como de agua de bromo. La determinación de los potenciales de óxido reducción de los tres elementos no solamente ha sido exacta sino que también confirma la posición intermedia del tecnecio en la familia, muestra el poco poder oxidante del perrenato y del pertecneciato con respecto al permanganato, resalta el hecho de que el Mn se disuelve fácilmente para formar el catión estable divalente, a diferencia del Tc y el Re que solamente se diluyen en presencia de un agente oxidante fuerte, como sería el agua oxigenada, que además los lleva al máximo de oxidación de permetalato (VII) y sugiere que los tecneciatos (VI) serían bastante estables en bases débiles y los renatos (VI) en álcalis fuertes [63].

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



La estabilidad de los compuestos que contienen estos estados reducidos dependerá del agente quelante; para la reducción se han utilizado numerosos agentes reductores, pero normalmente los más usados son el ácido ascórbico y el cloruro férrico; pero sobre todo, el cloruro estano, que es el que en la práctica resulta más habitual. En el estado de oxidación (VII) encontramos al anión pertecneciato  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , a los compuestos iónicos como el heptaóxido  $^{99m}\text{Tc}_2\text{O}_7$  y el heptasulfuro  $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$  que, se piensa, son semejantes a los compuestos correspondientes con  $^{99}\text{Tc}$ .

El anión pertecneciato se reduce muy fácilmente en presencia de soluciones ácidas de  $\text{Sn}^{2+}$ .



Sin embargo el grado de reducción dependerá de:

1. El oxígeno presente
2. La relación estequiométrica Sn/Tc
3. Las condiciones en las que se lleve a cabo la reacción
4. La presencia de un ligante
5. La naturaleza química del ligante



El tecnecio-99m es el radionúclido más utilizado en todos los laboratorios de radiofarmacia del mundo, se utiliza en forma de pertecneciato y al reducirlo a un estado de oxidación más bajo: 3+, 4+ o 5+, en los que es más reactivo; se utiliza para marcar muchas sustancias, como los radiofármacos. Se emplean en soluciones nanomolares, 1mCi (37mBq), representan 0.19ng de peso.

### 1.7. Desarrollo de radiofármacos

Los radiofármacos se emplean en medicina nuclear en exploraciones diagnósticas y en radioterapia de blancos moleculares. Su uso sólo puede justificarse por la obtención de un beneficio neto que compense el riesgo que pueda entrañar el empleo del trazador radiactivo. Las características deseables en un radiofármaco de diagnóstico para uso humano son [15]:

- Proporcionar una dosis mínima de radiación al paciente
- La radiación emitida debe ser detectada fácilmente y a distancia por instrumentos
- Tener vida media compatible con el tiempo requerido para rastrear el fenómeno biológico estudiado
- La vida media efectiva también debe ser corta, ya que el metabolismo es muy rápido, el tiempo en el cuerpo debe ser lo más corto posible
- Emitir de preferencia un rayo gamma monocromático con energía entre 100 y 300 KeV y no emitir partícula beta o alfa
- Estar disponible fácilmente, ser económico y conservarse sin contaminarse.
- Debe ser de bajo costo y fácil disponibilidad

Los factores que influyen en el diseño de una formulación radiofarmacéutica son [16]:

- Compatibilidad entre el ligante químico a “marcar” y el radionúclido.
- Estequiometría de la formulación, la relación molar adecuada entre el ligante-fragmento bioactivo, el agente reductor y el radionúclido.
- Carga de la molécula, a mayor carga disminuye la solubilidad en disoluciones acuosas.
- Especificidad, afinidad y porcentaje de unión a la molécula blanco. Se realizan por lo general pruebas de unión, saturación, internalización y externalización en células que sobreexpresan los receptores o blancos moleculares específicos.



- Enlace a proteínas, al ser de inyección intravenosa la afinidad a proteínas plasmáticas debe ser mínima, menor a 25 % (salvo que el estudio sea para componentes sanguíneos).
- Solubilidad, debido a que se aplica como un inyectable debe ser soluble en agua y soluble en membranas biológicas, a un pH compatible con la sangre aproximadamente de 7.4 y poseer una osmolalidad adecuada.
- Estabilidad química, física y biológica tanto en anaquel como reconstituido.

El  $^{99m}\text{Tc}$  se considera como el radionúclido "ideal" para marcar fármacos debido a que reúne las características siguientes [18]:

- Fácil obtención a partir del generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ .
- Ausencia de emisión  $\beta$  y su emisión  $\gamma$  de energía baja de 140 KeV, que presenta una adecuada penetración en los tejidos.
- Vida media corta de 6 horas.
- Eficiencia con que se detecta.
- Facilidad y rapidez con que se puede unir o complejar a diversas sustancias, drogas o fármacos.
- Las cantidades en MBq empleadas permiten hacer estudios dinámicos y estáticos.

El pertecneiato se obtiene de un generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  en su máximo estado de oxidación (valencia 7+), la mayor parte de los compuestos químicos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  se llevan a cabo reduciéndolo a  $\text{Tc}^{3+}$ ,  $\text{Tc}^{4+}$ ,  $\text{Tc}^{5+}$  y complejando éstos en el compuesto químico adecuado. El agente más comúnmente usado para reducir el Tecnecio es el cloruro estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ) por presentar las ventajas de baja toxicidad, gran poder reductor y buen rendimiento de radiomarcación. [19].

El generador de adsorción  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  se fundamenta en la diferencia del comportamiento fisicoquímico de las sales del Molibdeno y las del Tecnecio. Las primeras se adsorben fuertemente a la superficie de las partículas de algunos óxidos (óxido de aluminio), en cambio las sales del Tecnecio al no ser fijadas, son arrastradas fácilmente al pasar una solución por la alúmina inerte. En el proceso de extracción, la elución arrastra al  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  mediante  $\text{NaCl}$  0.9 % estéril y libre de pirógenos (Fig. 6 y 7) [1].

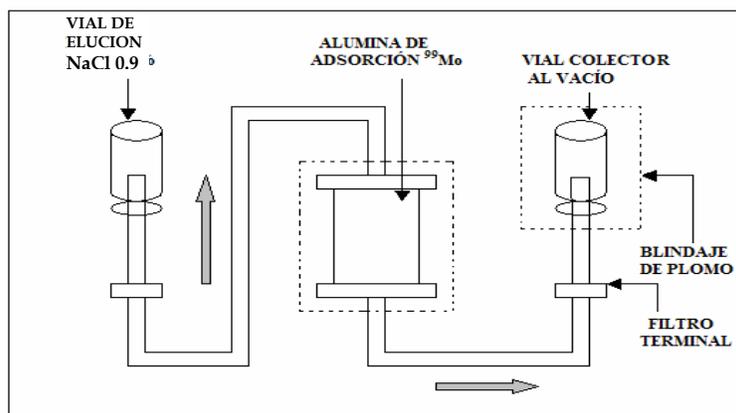


Figura 6. Diagrama del generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$



Figura 7. Generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  producido en México

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

El marcaje directo se enfoca usualmente al uso de agentes oxidantes o reductores que generan especies electrofílicas de los átomos radioactivos que luego reaccionan con el grupo funcional del péptido. Normalmente se emplea el  $\text{SnCl}_2$  para convertir un número de enlaces disulfuro de una proteína en tioles libres, los cuales pueden enlazar al Tc eficientemente. Este método se aplica solo a proteínas o a sus fragmentos porque muchos péptidos pequeños no tiene enlace disulfuro, o en algunos casos este es crítico para mantener sus propiedades biológicas al ser



reducido. La ventaja de este método es su facilidad para efectuarse, aunque su restringido uso a proteínas o sus fragmentos suele ser una limitante.

El marcaje indirecto involucra el uso de agentes quelantes bifuncionales (BFCA, se puede definir como la molécula capaz de enlazar un núcleo metálico mediante enlaces de tipo covalente y a la vez también es capaz de conjugarse a un péptido o anticuerpo monoclonal). El radiomarcado puede ser logrado casi por reducción directa del  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  en presencia de un conjugado BFCA-péptido o por el cambio de un ligante con un complejo intermediario de  $^{99m}\text{Tc}$ . Este método presenta la ventaja que combina la facilidad del marcaje directo con la química bien definida del marcaje por preformación del quelante, por lo que el marcaje indirecto es la técnica más práctica para el desarrollo de radiofármacos basados en péptidos blanco específicos [20].

Los BFCA generalmente son compuestos macrocíclicos poliaminocarboxílicos puede ser unido al lado de la cadena del péptido o incorporado en la columna del péptido. En general estos ligantes tienen una gran habilidad para coordinarse fuertemente con todos los iones metálicos; el BFCA ideal es aquel que puede formar un complejo con el radionucleido estable en una pureza a muy bajas concentraciones del conjugado péptido- BFCA. Su unidad de enlace se debe estabilizar selectivamente. Deben formar un complejo con el radionucleido de alta estabilidad termodinámica y cinética inerte con respecto a la disociación.

El número de BFCA's disponibles para el marcaje de biomoléculas con  $^{99m}\text{Tc}$  con actividades específicas altas, lo que permite su uso farmacológico, es limitado, entre estos se incluyen diamidaditioles, triamidamonitioles, triaminamonitioles, propilenamina oxima e hidrazinonicotinamida (HYNIC) (Fig. 8) [20].

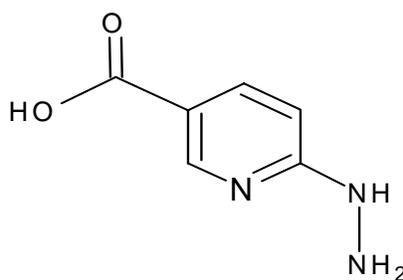


Figura 8. Estructura del agente quelante bifuncional hidrazinonicotinamida (HYNIC)

Un núcleo-equipo o formulación liofilizada para el marcaje instantáneo con  $^{99m}\text{Tc}$ , es un vial de reacción estéril que contiene reactivos químicos no-radioactivos liofilizados, requeridos para producir un radiofármaco para un estudio clínico específico después de que se le hace reaccionar con un eluato de pertecneciato. Los núcleo-equipos son preparados por adición de una solución de cloruro estanoso en



ácido clorhídrico a pH=1 (para evitar su hidrólisis) a una solución de pH neutro que contiene al ligante ó BFCA-biomolécula o fragmento bioactivo [21].

Esta solución ligante-estaño se ajusta a un pH de 5.5-6 bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación del cloruro estanoso y finalmente se adiciona el resto de los excipientes. De esta mezcla se hacen alícuotas que posteriormente se liofilizan. Un radiofármaco de  $^{99m}\text{Tc}$  se prepara por simple adición del eluato de pertecneciato en solución salina ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) al núcleo-equipos disolviendo el polvo liofilizado. Al realizar esta mezcla el estaño reduce al pertecneciato permitiendo su unión al ligante formándose así el radiofármaco deseado [22]. La estructura química final de los complejos formados puede ser caracterizada por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas, un detector de radiactividad y un detector U. V. [2].

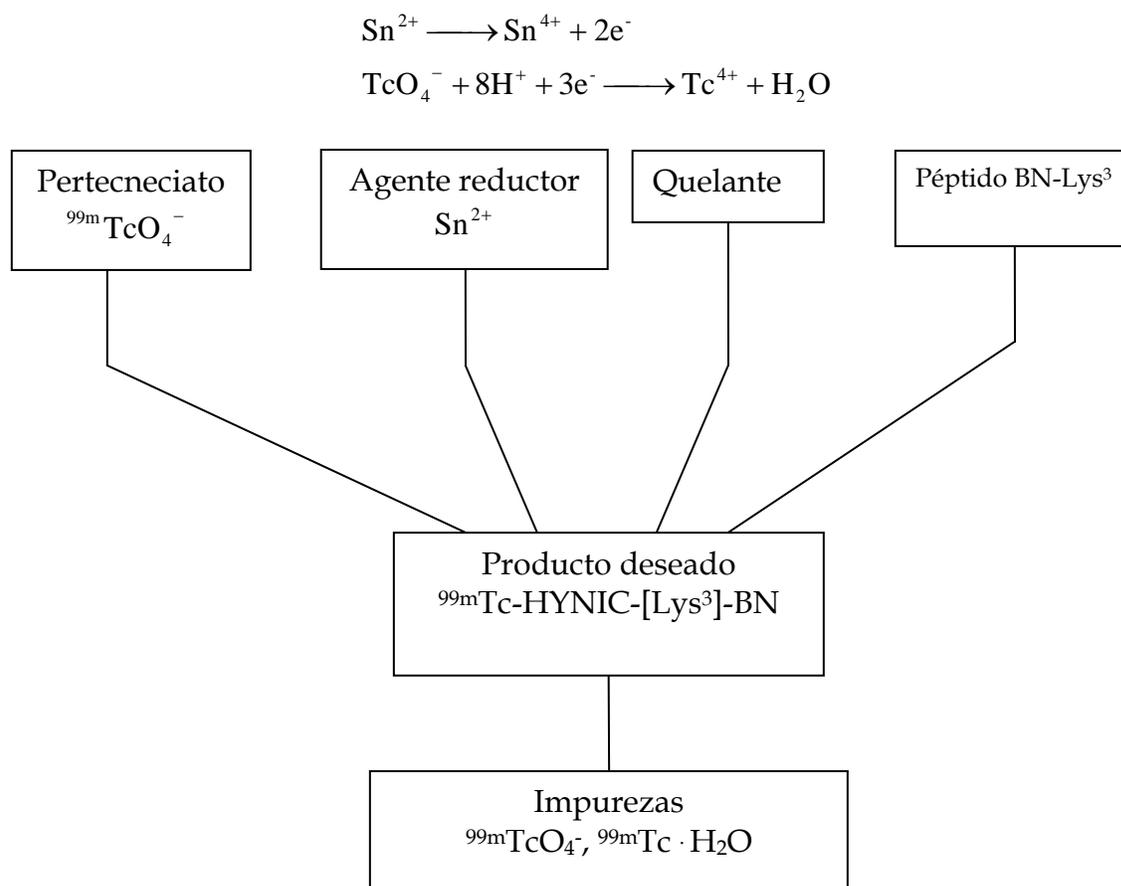


Figura 9. Reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de un núcleo-equipos instantáneo durante el radiomarcado con  $^{99m}\text{Tc}$ .

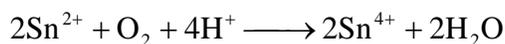


Los radiofármacos son establecidos para administración en humanos, por lo que es necesario que ellos pasen por un estricto control de calidad. Para esto se contemplan varias pruebas específicas y medidas que aseguran la pureza, potencia, identidad del producto y la eficacia del radiofármaco. Estas pruebas se dividen en dos categorías: fisicoquímicas, que indican el nivel de radionúclido, impureza radioquímica, el pH, la fuerza iónica, la osmolalidad, y el estado físico de la muestra particularmente si es un coloide y, la otra categoría son las biológicas, las cuales establecen la esterilidad, apirogenicidad, y la toxicidad del material [22].

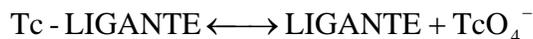
### 1.7.1. Impurezas formadas en la preparación de radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$

La presencia de oxígeno y radicales libres pueden provocar que en la preparación quede pertecneciato como impureza, ya que se distribuye biológicamente en mucosas y pueden verse imágenes de estomago e intestino cuando no son deseadas, en una solución saturada con oxígeno será mayor la cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$  que se necesite para efectuar la reacción [70].

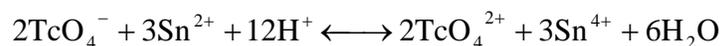
En presencia de oxígeno, el  $\text{SnCl}_2$  se oxida y no reduce al  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ,



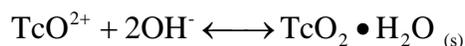
La descomposición radiolítica del complejo del tecnecio reducido puede ocurrir por la interacción de especies radicales libres ( $\text{RO}^\cdot$ ) con el complejo, por un mecanismo no definido:



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



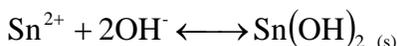
La hidrólisis del tecnecio forma impurezas las cuales son caracterizadas por la formación de especies insolubles (coloide).



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



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



Las impurezas de coloide pueden ser minimizadas por el uso de un exceso de ligante y un ajuste adecuado del pH. Las impurezas del pertecneiato pueden ser reducidas manteniendo la suficiente concentración de cloruro estanoso, excluyendo al oxígeno (atmósfera de nitrógeno) y utilizando antioxidantes. Las diferentes especies químicas de  $^{99m}\text{Tc}$  presentes en los radiofármacos pueden ser determinadas por un simple proceso de cromatografía.

## ***1.8. Aplicaciones de los radiofármacos***

### ***1.8.1. Radiofármacos de diagnóstico***

El radionúclido se incorpora a una molécula orgánica o inorgánica, la cual se dirige selectivamente a un órgano de interés o se incorpora a un proceso metabólico o fisiológico del organismo. Debido a que el radionúclido es un emisor gamma o de positrones, se pueden obtener imágenes externas a través de gamma cámaras y equipos de tomografía de emisión de positrones. Es posible formar diferentes complejos con una biodistribución específica para la obtención de imágenes estáticas o dinámicas con el fin de evaluar fisiopatologías o realizar estudios del metabolismo in vivo [71, 72].

#### ***1.8.1.1. Características del radionúclido de diagnóstico***

Los radioisótopos que se emplean son aquellos que por su combinación óptima de vida media física (minutos, horas), vida media fisiológica, retención en el organismo y cantidad de radioisótopo permitan obtener resultados con la mayor información diagnóstica con el nivel más bajo posible de dosis de radiación en los tejidos. Las emisiones deben ser penetrantes, (rayos  $\gamma$  o rayos  $x$  de alta energía), con la energía adecuada entre 0.1 y 0.2 MeV que permita su detección externa y su medición exacta. Debe evitarse la presencia de componentes no penetrantes (por ejemplo partículas  $\alpha$  rayos  $x$  o rayos  $\gamma$  de baja energía).



### 1.8.1.2. Características radioquímicas

Los complejos con los radioisótopos al ser administrados deben tener una forma química estable in Vitro y debe tener una estabilidad constante in vivo. Debe tener el mínimo de acarreador libre, ya que este puede acomplejarse con el quelante conveniente y/o con los agentes reductores produciendo posibles efectos tóxicos adversos.

### 1.8.1.3. Distribución in vivo

La distribución in vivo de un radioisótopo debe ser tal que después de su administración siga una cinética simple e interpretable cuantitativamente. La velocidad de acumulación del radiofármaco y su depuración del tejido u órgano en estudio debe reflejar los procesos fisiológicos, fisiopatológicos, y bioquímicos para que puedan ser comprendidos. Si la intención es una detallada imagen anatómica, el agente debe acumularse rápidamente en el órgano o tejido de interés en patrones que reflejen la estructura anatómica. Idealmente después de que el estudio es completado, el radiofármaco debería ser excretado rápidamente y el tejido involucrado en el proceso de excreción, debe convenientemente no recibir exposición indebida de radiación, por ejemplo, la excreción por la orina involucran exposición a la radiación a los riñones, vejiga y órganos pélvicos [73].

Los radionúclidos más utilizados con fines de diagnóstico son: galio-67, criptón-81m, tecnecio-99m, yodo-123, yodo-131, talio-201 [74].

## 1.8.2. Radiofármacos terapéuticos

En terapéutica los radionúclidos se usan como fuentes de radiación. Para cumplir con su acción deben acumularse selectivamente en el tejido u órgano en cuestión, donde las radiaciones destruyan de manera total o parcial el tejido circundante impidiendo la formación de tejido nuevo. Se aplica solamente a las enfermedades donde hay gran disfunción metabólica celular o en las que un órgano o tejido causa daños fisiológicos por hiperactividad como es el caso del cáncer [71, 72].

### 1.8.2.1. Características del radionúclido

Cada tipo de partícula emitida tiene un intervalo de diferente energía, distancia efectiva (corta o larga) y efectividad biológica reactiva. El tipo de partícula emitida requerida para aplicaciones terapéuticas particulares dependerá de la microdistribución de la fuente de radiación ionizante relacionado a la radiosensibilidad de los sitios blanco (distribución homogénea o heterogénea en



tumores o localización en la superficie de la célula contra la penetración al núcleo celular i citoplasma) [75, 76]. En general los radionúclido escogidos son aquellos que emiten una radiación no penetrante (por ejemplo  $\alpha$ ,  $\beta^-$ ,  $\beta^+$ , conversión interna, electrones Auger, rayos x o rayos  $\gamma$  de baja energía) y poco frecuentes radiaciones penetrantes (rayos x o rayos  $\gamma$ ).

#### *1.8.2.2. Características radioquímicas*

La naturaleza química del radionúclido es importante en la determinación de los sitios y rutas de una redistribución de radiactividad, así como el metabolismo de la molécula acarreadora, ya que de ello depende el efecto terapéutico del radiofármaco. Por lo general, se emplean elementos emisores beta con una energía máxima entre 1 y 2 MeV. La naturaleza química del átomo radiactivo debe ser considerada primeramente para la determinación del método de adhesión del radionúclido a la molécula acarreadora [77, 78].

#### *1.8.2.3. Distribución in vivo*

Idealmente un radiofármaco debería localizarse en el tejido blanco, células o estructuras subcelulares de interés. La velocidad de acumulación en el tejido u órgano en estudio, así como su depuración debe ser reflejo de los procesos fisiológicos, fisiopatológicos y bioquímicos, de tal manera que puedan ser fácilmente interpretados.

### **1.9. Control de calidad de los radiofármacos**

#### **1.9.1. Controles físicos**

##### *1.9.1.1. Características organolépticas*

Todo inyectable debe estar libre de partículas, visibles a simple vista, con iluminación puntual de lámpara de tungsteno y fondo blanco y negro. La solución debe ser blanca y límpida, exceptuando las soluciones coloidales, microagregados, macroagregados y macroesferas [78].

##### *1.9.1.2. Tamaño y número de partículas*

Se consideran dos grupos de partículas en suspensión:

- Coloides
- Macroagregados, microagregados y microesferas.



## 1.9.2. Controles fisicoquímicos

### 1.9.2.1. Pureza radionuclídica

Se define como la fracción de la radioactividad total en la forma del radionúclido deseado presente en un radiofármaco. Las impurezas radionuclídicas pueden presentarse como resultado del proceso de producción del radioisótopo, ya sea por las presentes en el blanco a irradiar, reacciones secundarias producidas en el blanco, subproductos del decaimiento o de elementos pesados de fisión en el reactor.

### 1.9.2.2. Pureza radioquímica

Se define como la fracción de la radioactividad total en la forma en la forma química deseada en el radiofármaco. Las impurezas surgen por la descomposición parcial del solvente, cambio en la temperatura o pH, luz, presencia de agentes oxidantes o reductores y radiólisis. Para determinar la pureza radioquímica es necesario separar los componentes radiactivos del sistema, usando métodos sencillos y rápidos como son: Cromatografía instantánea de capa delgada (ITLC), Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa acoplado a un detector de radiactividad, Cromatografía GEL, Electroforesis, Intercambio iónico, Destilación y Extracción por solventes.

### 1.9.2.3. Fuerza iónica, pH, y osmolalidad

Todos los radiofármacos deben tener una apropiada concentración de iones de hidrógeno o pH para su estabilidad e integridad, el pH ideal es de 7.4 (pH de la sangre), aunque puede variar entre 2 y 9 debido a la alta capacidad buffer de la sangre, asimismo, deben de tener fuerza iónica, osmolalidad e isotonicidad es decir cuando su concentración osmótica es igual a la del suero sanguíneo sin provocar alteraciones químicas o biológicas en este y/o sus componentes para ser utilizados, por lo que al diluir una solución, debe usarse preferentemente el mismo solvente de la original, en especial en soluciones coloidales, dado que al añadir un electrolito pueden producirse agregados del coloide.



#### 1.9.2.4. Pureza química

Se define como la fracción de la masa total presente en una forma química específica. Puede referirse tanto a la sustancia de la que forma parte el radionúclido, como también a los reactivos usados en la formulación del radiofármaco [77, 79].

### 1.9.3. Controles biológicos

#### 1.9.3.1. Esterilidad

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

#### 1.9.3.2. Pirógenos

Los pirógenos son polisacáridos o proteínas producidas por el metabolismo de microorganismos, son solubles y estables al calor y regularmente presentan un tamaño entre 0.05 a 1  $\mu\text{m}$ . Las endotoxinas son el ejemplo principal de pirógenos, que son producto del metabolismo de los microorganismos, su presencia en soluciones inyectables, ya sea por vía intravenosa o a veces intramuscular, trae consigo una reacción febril que se manifiesta poco después de ser inyectada, provocando variación de la temperatura basal. La determinación de la concentración de pirógenos se realizan por la prueba de lisado de amobocitos limulus (LAL).

#### 1.9.3.3. Distribución biológica

Se efectúan controles de biodistribución como un instrumento de seguridad antes de ser inyectado a un paciente, con la finalidad de contar con datos estimativos de su localización biológica. Dichos controles se realizan generalmente en ratones o ratas de laboratorio, estos estudios no son extrapolables a los



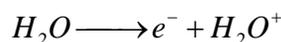
humanos, pero sí ofrecen un buen modelo en el comportamiento de los radiofármacos.

#### 1.9.4. Estabilidad de los radiofármacos

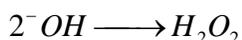
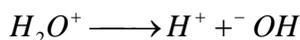
Los radiofármacos al igual que cualquier compuesto no radiactivo, pueden verse alterados por diversos factores químicos, tales como la hidrólisis, oxidación, etc. Para aumentar la estabilidad de las preparaciones farmacéuticas se puede añadir algunos agentes conservadores, como aditivos. Pero por la misma naturaleza radiactiva del fármaco actúan mecanismos de radiólisis. La radiación emitida por un radionúclido, al interactuar con las moléculas del medio, es capaz de inducir reacciones de oxido-reducción.

La interacción de la radiación sobre un medio acuoso, especialmente sobre las moléculas del solvente, puede dividirse en tres fases:

1. **Fase física:** absorción de la radiación con ionización y excitación de moléculas. En esta fase las moléculas de agua resultan ionizadas.



2. **Fase fisicoquímica:** reaccionan los productos del agua originando radicales libres muy oxidantes.



3. **Fase química:** los radicales libres formados actúan sobre otras moléculas induciendo reacciones redox.

Además de este mecanismo de degradación debido al efecto de la radiólisis, los radiofármacos pueden ser afectados por la misma radiactividad del radionúclido que los marca.



## Capítulo 2. Diseño Experimental



## *Diseño experimental*

### *2.1. Planteamiento del problema*

Los radiofármacos se emplean en medicina nuclear como agentes diagnósticos y de terapia. Los radiofármacos de tercera generación son excepcionales por su capacidad de localizar in vivo sitios específicos como receptores en la membrana celular o enzimas. El  $^{99m}\text{Tc}$  es el radionúclido más empleado en medicina nuclear debido a sus características "ideales"; más aún, el  $^{99m}\text{Tc}$  está asequiblemente disponible, a bajo costo a través de un generador  $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ .

Los receptores para bombesina (receptor GRP) se encuentran sobreexpresados en varios tumores humanos incluyendo mama, próstata, células pulmonares y cáncer pancreático. De este modo, los radiofármacos análogos de bombesina son de gran utilidad en la detección células positivas para esos receptores, en técnicas de gammagrafía, por medio de la obtención de imágenes de blancos moleculares.

Los radiofármacos para diagnóstico no tienen efectos farmacológicos, pero, por su administración en humanos, la mayoría de las veces por vía intravenosa, deben cumplir con un estricto control de calidad que asegure que la sustancia es segura para el paciente y que obtendrá el beneficio buscado.

El presente trabajo propone la preparación de una formulación liofilizada que resulte asequible, económica y de una alta pureza radioquímica (mayor al 95%).



## 2.2. Equipos, materiales y reactivos

### 2.2.1. Equipos

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC Waters®).
- Liofilizadora (Hull).
- Balanza semianalítica OHAUS, BRAINWEIGH B 1500D.
- Campana de flujo laminar VECO.
- Agitador tipo vórtex.
- Balanza analítica.
- Detector de centelleo sólido de NaI(Tl) (Nuclear Medical laboratorios, Inc.).
- Cámara de ionización
- Refrigerador.
- Placa de agitación y calentamiento.
- Generador de  $^{99m}\text{Tc}$  (Getec-ININ).

### 2.2.2. Materiales

- Placas de cromatografía instantánea de placa fina de gel de sílica (ITLC-SG, Gelman Sciences).
- Cartuchos de extracción en fase sólida (Sep-Pack C-18).
- Micropipetas Brand de 1, 10 a 100, 100 a 200, 100 a 1000 y 5000  $\mu\text{L}$ .
- Puntas para micropipetas.
- Frascos viales de 10 y 20 mL tipo penicilina.
- Viales de boca ancha.
- Tapones de hule de 20 mm de diámetro.
- Engargoladota para viales.
- Retapas de aluminio de 20 mm de diámetro.
- Guantes de látex.
- Pinzas y tijeras de disección.
- Jeringa para HPLC de 20  $\mu\text{L}$ .
- Membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Co.)
- Jeringas de insulina (1 mL).
- Jeringas de 3, 5 y 10 mL.
- Contenedores de plomo.
- Cámaras cromatográficas.
- Baño de calor seco.
- Desecador.
- Bomba de vacío.



### 2.2.3. *Reactivos*

- Ácido Hidrazinnicotinamídico (HYNIC-BOC)
- O-(7-azabenzotriazolil)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU)
- Disopropiletilonamina.
- Dimetilformamida (DMF).
- Lys<sup>3</sup>-BN
- Ácido etilendiaminodiacético (EDDA)
- Tricina
- Manitol
- Cloruro Estanoso ( $\text{SnCl}_2$ )
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Agua destilada.
- Agua grado HPLC.
- Agua inyectable.
- Etanol grado reactivo.
- Acetonitrilo.
- Acido trifluoroacético (TFA).
- Nitrógeno líquido de alta pureza, INFRA 99.995%
- Eluato de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  obtenido de un generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  Getec-ININ.
- Medio líquido de tioglicolato (Merck).
- Caldo soya tripticaseína (Merck).
- Liofilizado de amebocitos de *limulus* (Endosafe).
- Liofilizado de endotoxinas de *E. coli* (Endosafe).

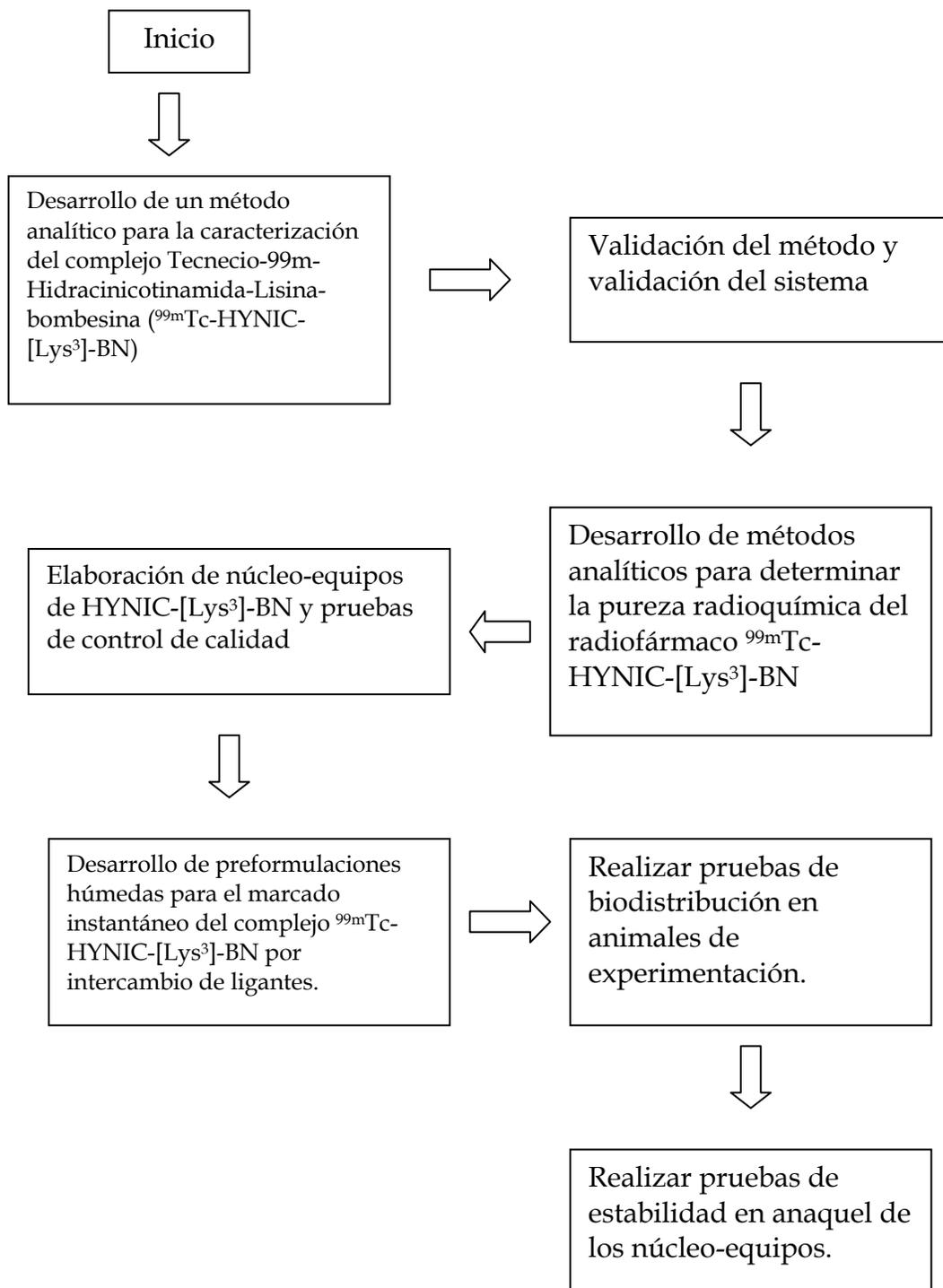
### 2.2.4. *Material biológico*

- Ratones atómicos



### *2.3. Diagrama de flujo de la metodología*

En el diagrama siguiente se muestra la metodología simplificada que se siguió para la realización de este proyecto.





## 2.4. Caracterización de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

Se realizó un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa con un sistema de gradientes, con una columna de separación C-18 acoplado a un detector U. V. con el cual se hizo un barrido para determinar la longitud de onda (280 nm). El sistema de gradientes se corrió con una velocidad de flujo de 1mL/min por 30 minutos, usando como fase móvil 0.1% Ácido trifluoroacético (TFA)/Acetonitrilo. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra.

## 2.5. Validación del sistema

Los parámetros que se determinaron para la validación fueron: precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, exactitud del sistema al 100%, linealidad del método y especificidad del método.

### 2.5.1. Linealidad del sistema

Se determinó por el análisis por triplicado de muestras cargadas con diferentes niveles de concentración del analito (25, 50, 75 y 100%). El 100% corresponde a la formulación cuyo contenido es de 1 mg/mL; se realizó conforme a los siguientes pasos.

1. Se prepararon cada uno de los niveles de concentración del analito (25, 50, 75 y 100%).
2. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de las muestras en el HPLC por triplicado para la determinación de la concentración.
3. Con los datos obtenidos se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $\text{IC}(\beta_1)$ ).

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

$\text{IC}(\beta_1)$  no debe incluir el cero.

### 2.5.2. Precisión del sistema

Se determinó por el análisis por cuadruplicado de soluciones de HYNIC (0.5 mg/mL), de BN (0.5 mg/mL) correspondientes al 100% de la muestra procesada para su medición y se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

1. Se prepararon por cuadruplicado soluciones de HYNIC y BN (0.5 mg/mL).



2. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras al HPLC de cada nivel para determinar la concentración.
3. Con los datos obtenidos se determinó el coeficiente de variación y desviación estándar de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación: C. V.  $\leq 1.5\%$

### 2.5.3. Exactitud del sistema al 100%

Se determinó por cuadruplicado en muestras cargadas independientemente al 100% por un analista en un solo día [29].

1. Se pesaron cuatro muestras de 1mg de HYNIC y se diluyeron en 1mL de agua (1.0 mg/mL).
2. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones en el HPLC para determinar la concentración.
3. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro de cada una de las muestras.

Criterios de aceptación: % de recobro = 98-100%  
C. V.  $\leq 2.0\%$

### 2.5.4. Linealidad del método

Se determinó a partir de placebos marcados cargados independientemente por triplicado con diferentes cantidades del principio activo (25, 50, 75 y 100%). El 100% corresponde a la formulación cuyo contenido es de 1 mg/mL y se realizó conforme a los siguientes pasos:

1. Se prepararon los placebos cargados correspondientemente al 25, 50, 75 y 100%, cada placebo se preparó independientemente.
2. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  por triplicado en el HPLC para la cuantificación de la concentración.
3. Con los datos obtenidos se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $\text{IC}(\beta_1)$ ); además el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.



Criterios de aceptación:  $r^2 \geq 0.98$   
 $\text{IC}(\beta_1)$  no debe incluir el cero.  
 $\text{C.V.} \leq 2.0\%$   
% de recobro: 98 – 102%

### 2.5.5. Especificidad

Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra [80].

### 2.6. Conjugación de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

Para lograr la correcta conjugación del HYNIC con la Lys<sup>3</sup>-BN se siguió el siguiente procedimiento, cuidando todas las condiciones descritas.

1. Se pesaron 1.5 mg de HYNIC-BOC y se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMF. Solución A.
2. Se pesaron 2 mg de HATU y se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMF. Solución B.
3. Se diluyeron 10  $\mu\text{L}$  de disiopropiletilonamina en 300  $\mu\text{L}$  de DMF. Solución C.
4. En un vial aparte, se tomaron 80  $\mu\text{L}$  de la solución A, 50  $\mu\text{L}$  de la solución B y 50  $\mu\text{L}$  de la solución C y se dejan reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. En un vial con 1mg de Lys<sup>3</sup>-BN se agregaron 70  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción anterior, 5  $\mu\text{L}$  de agua inyectable y 20  $\mu\text{L}$  de DMF; esta nueva reacción se llevó a cabo durante 1.5 horas a temperatura ambiente.
6. Se detiene la reacción adicionando 1 ml de agua inyectable.

#### 2.6.1. Purificación por Sep-Pack

7. Se activa previamente un cartucho de extracción en fase sólida con 5 mL de etanol, seguidos de 5 ml de agua y 5 ml de aire.
8. Se hizo pasar en su totalidad la mezcla de la reacción detenida por el cartucho.
9. Se inyectaron luego 5 mL de agua inyectable.
10. Se hicieron 3 lavados con una solución de acetonitrilo al 20% de 5 mL cada uno.
11. Se extrae una fracción con 0.5 mL de una solución de acetonitrilo al 50%.
12. Se extrae otra fracción con acetonitrilo al 100%.



13. Se colectan las fracciones extraídas (pasos 12 y 13) en un frasco de boca ancha, perfectamente limpio y seco.
14. Se pasan 2 mL de aire por el cartucho.
15. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de TFA dentro de una campana de extracción al vial de boca ancha que contiene las fracciones extraídas.
16. Este vial se colocó dentro de un desecador al vacío hasta la sequedad total a temperatura ambiente.
17. Luego del secado, se reconstituyó la muestra con 1 ml de solución de acetonitrilo al 10% (primero se disuelve con 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo al 50% y luego se agregan 800  $\mu\text{L}$  de agua inyectable.)

### 2.6.2. Purificación por HPLC

18. Se inyectó una muestra de 20  $\mu\text{L}$  de la solución de conjugado purificado por Sep-Pack para determinar el tiempo de retención.
19. Se inyecta toda la muestra (1 mL) en el HPLC y se colectaron las fracciones correspondientes a los 11-12 y 12-13 minutos.

### 2.7. Selección de la formulación

Para determinar la cantidad necesaria de conjugado para obtener una pureza mayor al 95%, se hicieron marcados de 20, 50, 100 y 120  $\mu\text{L}$  del conjugado obtenido.

### 2.8. Escalamiento del lote y elaboración de la formulación liofilizada

Después de elegir la cantidad correcta de conjugado para la obtención de una formulación con una pureza radioquímica mayor al 95%. Se selecciona la formulación correcta (tabla 3), de la cual se produjeron lotes de 40 viales.

Todas las operaciones se llevaron a cabo con medidas de seguridad que aseguran la esterilidad y calidad final del producto; entre esas medidas se destacan la esterilización del material usado por calor húmedo, limpieza del área de trabajo con campana de flujo laminar y desplazamiento del oxígeno del agua para evitar la oxidación del  $\text{SnCl}_2$  por medio del burbujeo previo de nitrógeno.

Tabla 3. Formulación elegida para la formación del complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

| Reactivo                                       | Cantidad         |
|--|------------------|
| HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN (HYNIC-Bombesina) | 25 $\mu\text{g}$ |
| Cloruro estano                                 | 10 mg            |
| Acido Etilendiamidiacético (EDDA)              | 10 mg            |
| N-tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina)     | 20 mg            |



|         |       |
|---------|-------|
| Manitol | 50 mg |
|---------|-------|

El procedimiento que se utilizó para la elaboración del lote de núcleo-equipos fue el siguiente:

### ***2.8.1. Preparación de la solución de EDDA***

1. Pesar 100 mg de EDDA.
2. Disolver los cristales en 5 ml de agua inyectable con agitación y calentamiento.
3. Dejar enfriar la solución por 5 minutos a temperatura ambiente.

### ***2.8.2. Preparación de la solución Tricina-Manitol***

1. Pesar 200 mg de tricina.
2. Pesar 0.5 g de manitol.
3. Disolver los cristales de tricina y manitol en 4.0 mL de agua inyectable con agitación.

### ***2.8.3. Preparación de la solución EDDA-Tricina-Manitol***

1. Mezclar en un vaso de precipitado de 50 mL la solución de EDDA y la solución de Tricina-Manitol para un volumen final de 5 mL

### ***2.8.4. Preparación de la solución de SnCl<sub>2</sub>***

1. Pesar 10 mg de cloruro estano anhidro.
2. Disolver los cristales de cloruro estano con 10  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado.
3. Añadir 10 mL de agua inyectable previamente nitrogenada durante al menos 15 minutos.

### ***2.8.5. Preparación de la formulación HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN***

1. Agregar los 750  $\mu\text{L}$  de la solución de HYNIC-Lys<sup>3</sup>-BN más 50  $\mu\text{L}$  de agua inyectable a la solución de EDDA-Tricina-Manitol.
2. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de la solución de SnCl<sub>2</sub> lentamente a la solución de EDDA-Tricina-Manitol y HYNIC-Lys<sup>3</sup>-BN. El pH de la solución es 4.5
3. Esterilizar la solución por filtración en membrana milipore de 0.22  $\mu\text{m}$
4. Fraccionar en volúmenes de 1 mL en 10 frascos tipo penicilina de 10 mL
5. Congelar inmediatamente con nitrógeno líquido.



6. Realizar el procedimiento de liofilización (Liofilizadora marca Hull, ciclo de liofilización de 23 h)
7. Etiquetar los viales.
8. Conservar a 4°C
9. Realizar pruebas de control de calidad.

## 2.9. Control de calidad del núcleo-equipo

### 2.9.1. Radiomarcado del núcleo-equipo

Se reconstituyó el núcleo-equipo con 1mL de buffer de fosfatos 0.2 M pH 7 seguido de 1 mL de solución estéril y libre de pirógenos de pertecneiato de sodio ( $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ ) e incubación de 10 minutos en un baño de calor seco.

### 2.9.2. Obtención del eluato $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ del generador Getec-ININ $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$

La solución estéril y libre de pirógenos de pertecneiato de sodio se obtuvo de un generador Getec-ININ  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  con blindaje de plomo, previamente acondicionado.

1. Se tomó un frasco con eluyente (NaCl al 0.9%) al cual se le desprendí 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. Acto seguido 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 pertecneiato de sodio (vial con blindaje de plomo).
6. La actividad del eluato se midió en un calibrador de dosis (cámara de ionización).

### 2.9.3. Evaluación de la pureza radioquímica



El análisis de pureza radioquímica fue llevado a cabo usando cromatografía instantánea de capa fina en gel de sílica (ITLC-SG, Gelman Sciences), extracción en fase sólida (cartuchos Sep-Pack C-18) y por HPLC de fase reversa.



### 2.9.3.1. ITLC-SG

El ensayo fue llevado a cabo usando tres diferentes fases móviles, 2-butanona para determinar la cantidad de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre, solución 0.1 M de citrato de sodio pH 5 para determinar el  $^{99m}\text{Tc}$  unido al co-ligando y el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  y una solución metanol/agua (1:1 v/v) para el coloide formado.

### 2.9.3.2. Sep-Pack

Los cartuchos fueron preacondicionados con 5 mL de etanol seguidos de 5mL HCl 1 mM y 5 mL de aire. Se cargó una alícuota de 0.1 mL del péptido radiomarcado en el cartucho previamente acondicionado, seguido de 5 mL de HCl 1 mM para eluir el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre. El péptido radiomarcado se eluyó con 3 mL de solución etanol/solución salina (1:1 v/v) mientras que el  $^{99m}\text{Tc}$  reducido y el coloide formado quedaron en el cartucho.

### 2.9.3.3. HPLC

El análisis por cromatografía de alta resolución fue realizado con un sistema Waters® usando software Millenium® con dos detectores, radiación y UV-photodiode arreglados en línea. Columna AYMC ODS-AQ S5 (5 $\mu\text{m}$ , 4.6 X 250mm) con un flujo de 1 mL/min usando el sistema de 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    |

## 2.10. Pruebas de esterilidad

Para el análisis de esterilidad del producto se siguió el siguiente protocolo, utilizando los siguientes medios de cultivo:



- Medio fluido de tioglicolato.
- Caldo de soya tripticaseína.

**Solución 1:** Solución al 0.1% de peptona. Se disolvió 1 g del digerido péptico del tejido animal en 100 mL de agua destilada, se filtro y ajustó el pH a  $7.1 \pm 0.2$ , se distribuyeron 100 mL en cada envase y se esterilizó.

**Prueba testigo:** Filtrar 100 mL de la solución 1.

1. Se filtraron asépticamente 5 mL del producto y se lavó con 100 mL de la solución.
2. Se dividió la membrana en dos mitades y cada una se colocó en un tubo con el medio fluido de tioglicolato y la otra mitad en un tubo con caldo soya tripticaseína.
3. Se incubó durante 7 días a una temperatura de 30-35°C para el tubo de tioglicolato y 20-25°C para el tubo de soya tripticaseína.

### **2.11. Determinación de pirógenos**

Esta prueba se realizó empleando el Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) y tiene por objetivo demostrar la presencia o ausencia de pirógenos ya que los amebocitos reaccionan en presencia de pirógenos formando un gel. La USP ha adoptado límites específicos de 175 UE por dosis de fármaco inyectable.

La determinación se realizó in vitro mediante el método de LAL, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Se reconstituyó asépticamente el frasco que contiene la endotoxina con 5 mL de agua inyectable. Esta solución contiene 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de endotoxina de *E. coli*.
2. Se colocó 0.1 mL de esta solución más 0.1 mL del reactivo de LAL en un tubo estéril y libre de pirógenos. Se incubó a 37°C por una hora.

#### **2.11.1. Preparación del control negativo**

1. Se colocaron 0.1mL de agua inyectable con 0.1 mL de reactivo de LAL en un tubo estéril y libre de pirógenos. Se incubó a 37°C durante una hora.



### **2.11.2. Preparación de la muestra**

1. Las muestras son reconstituidas con 2.5 mL de solución salina. En un tubo estéril y libre de pirógenos se colocaron 0.1 ml de muestra con 0.1 ml de reactivo de LAL, se incubó a 37°C por una hora.
2. El mismo procedimiento se realizó para una dilución 1:10 del radiofármaco.

Una vez transcurridos los tiempos de incubación, los tubos fueron invertidos cuidadosamente y observados, se compararon con los controles, para determinar la presencia o ausencia de endotoxinas bacterianas.

### **2.12. Estabilidad del complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN**

En un contenedor de plomo se colocó un vial identificado, conteniendo el conjugado. Se radiomarcó con una solución de eluato de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  con una actividad de 20 mCi/mL. La evaluación se llevó a cabo mediante la determinación de la pureza radioquímica a las 0.5, 1, 2, 3, 4 y 24 horas.

### **2.13. Estabilidad de los núcleo-equipos**

Una vez finalizada la formulación, los viales se conservaron a 4°C. La pureza radioquímica se determinó a los 6 meses de preparación de los núcleo-equipos.

### **2.14. Unión a proteínas**

Para determinar el porcentaje de péptido que se une a proteínas séricas, se usó la ultrafiltración (Ultrafree-PFL 30000 NMWL, Millipore Co). Se incubaron 10 µL de solución de péptido radiomarcado (0.5 µg/50 µL) a 37°C con 1 mL de suero humano fresco. Se tomaron muestras a diferentes tiempos hasta 24h, esas muestras fueron ultrafiltradas y se midió el porcentaje de radiactividad remanente en el filtro.

### **2.15. Ensayos en líneas celulares**

Las células PC-3 de cáncer de próstata humanas, fueron originalmente obtenidas de la ATCC (USA). Las células fueron cultivadas a 37°C, en una



atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad, en medio RPMI, suplementado con suero de ternero recién nacido al 10% y antibióticos (100 µg/mL de estreptomycin).

### ***2.15.1. Ensayos de internalización y de unión no específica***

Las células PC-3 (1x10<sup>6</sup>) provistas de medio fresco fueron incubadas en 6 cajas con  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN (0.2 nmol), alrededor de 200000 cpm, por 2 horas a 4°C. Después de la preincubación, las células fueron lavadas 3 veces con medio de cultivo helado. El medio templado fue adicionado a las cajas las cuales fueron incubadas por triplicado a 37°C durante 2, 4, 6 y 24 horas para permitir la internalización. El radioligando se eliminó de la superficie de las células en dos lavados de 5 min de lavado ácido (glicina 50 mM HCl/100 mM NaCl, pH 2.8) a temperatura ambiente. Las células fueron solubilizadas con NaOH 1 N a 37°C para determinar el grado de internalización del radioligando. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la actividad total internalizada. La unión no específica fue determinada paralelamente pero con la presencia de 10 µM de Tyr<sup>3</sup>-bombesina.

## ***2.16. Modelo animal***

La incorporación en los tumores y la biodistribución se hicieron de acuerdo con las reglas y regulaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los ratones atímicos (20-22g) fueron puestos en cajas estériles con camas de aserrín estéril, con temperatura, humedad y ruido constantes y periodos de luz de 12:12. Agua y comida estándares fueron suministradas *ad libitum* (Comida estándar PMI 5001).

### ***2.16.1. Inducción de tumores en los ratones atímicos***

Los tumores de próstata fueron inducidos por inyección de células PC-3 por vía subcutánea (1x10<sup>6</sup>) resuspendidas en 0.2 mL de solución salina buffer de fosfatos, en las espaldas de los ratones desnudos de 6-7 semanas de vida. Los sitios de inyección fueron observados en intervalos regulares para la supervisar la formación y apariencia del tumor.

### ***2.16.2. Biodistribución***

Los ratones atímicos con tumores inducidos se usaron para los estudios de biodistribución. Se inyectaron 0.04 mL de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, 1.11 MBq (30



mCi) por la vena de la cola. Los ratones (n=4) fueron sacrificados 2 h después de la inyección. El corazón, bazo, páncreas y riñones se extrajeron completos; además se tomó una muestra de tumor, pulmón, hígado, sangre, intestinos y músculos y todo ello fue enjuagado con solución salina y se secó con papel. Las muestras se pusieron en tubos de plástico previamente pesados. La actividad fue determinada en un detector de centelleo junto con seis muestras de 0.5 mL del estándar diluido representando el 100% de la actividad inyectada. La media de la actividad fue usada para determinar el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido. (%IA/g). Para la absorción no específica dentro del tumor o los órganos receptores positivos, se hizo en paralelo un estudio de biodistribución pero con animales inyectados con 50  $\mu\text{g}$  de Tyr<sup>4</sup>-BN 30 min previamente (grupo de receptores bloqueados n=4).

### *2.16.3. Imagen molecular*

Los ratones desnudos con los tumores implantados fueron escaneados con una cámara de rayos gamma 2 h después de la inyección del radiofármaco en la vena de la cola.



## Capítulo 3. Resultados



## Resultados

### 3.1. Caracterización del HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

La caracterización de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN se logró mediante la obtención de cromatogramas en el equipo HPLC, utilizando un sistema de gradientes de fase reversa y una columna C-18. El tiempo de retención que muestra el cromatograma obtenido es de 13.585 min (fig. 10 y tabla 5).

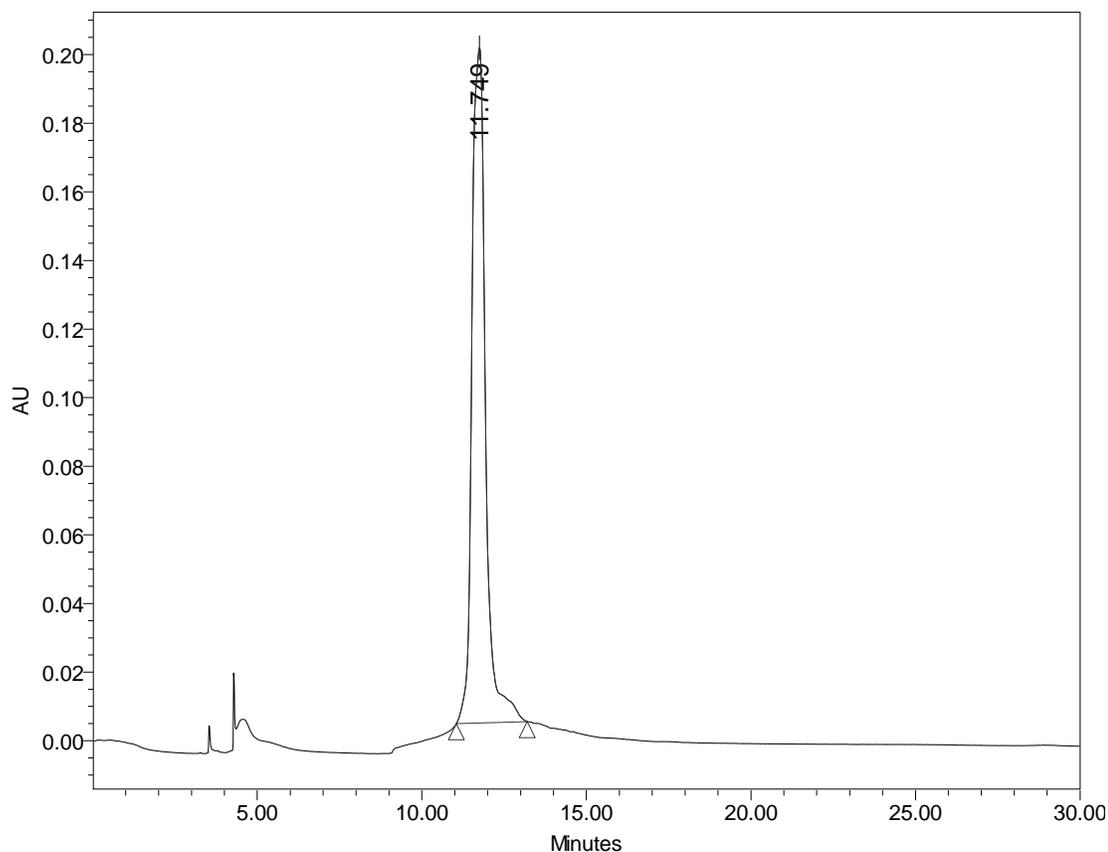


Figura 10. Cromatograma de dos dimensiones obtenido por HPLC de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

Tabla 5. Resultados de la caracterización de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

| Longitud de onda (nm) | Tiempo de retención (min) | Área bajo la curva |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| 280                   | 11.749                    | 27587149 ± 1.455%  |



Asimismo se obtuvo también el cromatograma en tercera dimensión, en donde se observa la presencia del compuesto (fig. 11).

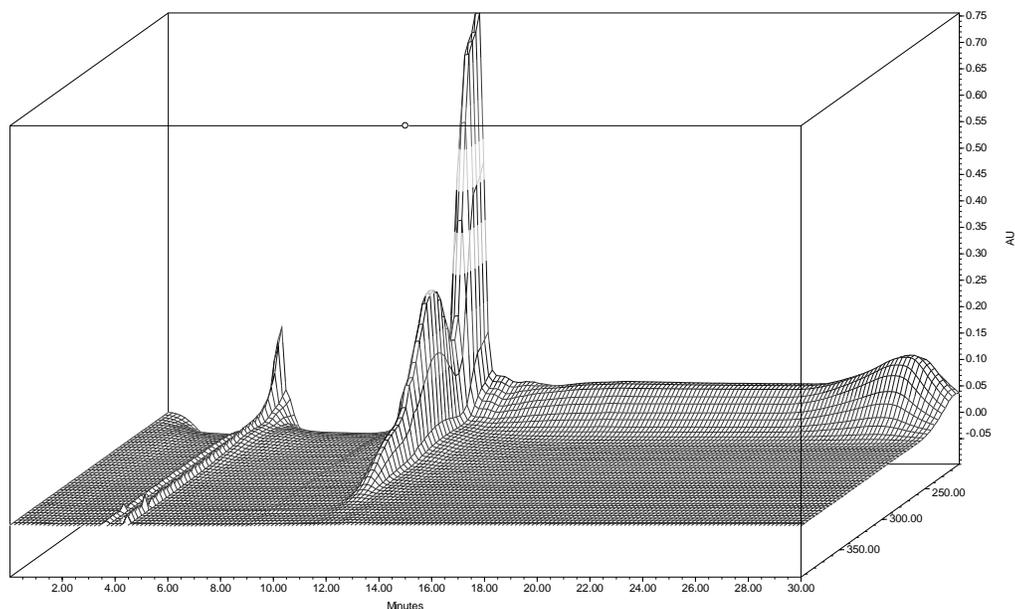


Figura 11. Cromatograma de tres dimensiones obtenida por HPLC de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

En la figura 12 se muestra el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

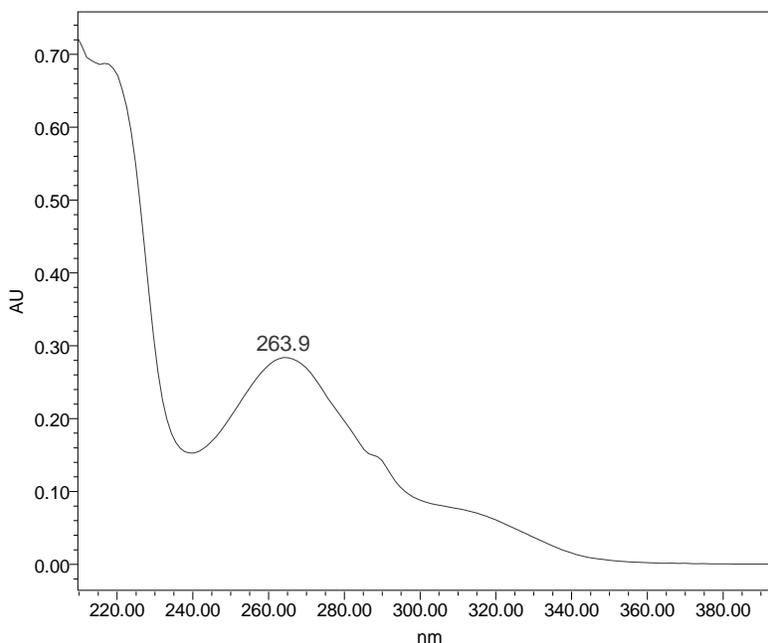


Figura 12. Espectro infrarrojo de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN



### 3.2. Validación del sistema

#### 3.2.1. Linealidad del sistema

Con los datos obtenidos a partir de la curva de calibración de la solución de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, se puede determinar la linealidad del método, mediante una regresión lineal; los resultados se muestran en la tabla 6 y en la figura 13:

Tabla 6. Datos de la curva de calibración

| Concentración de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN (mg/mL) | Área bajo la curva (promedio) |
|---|-------------------------------|
| 1.00  | 63194820.02                   |
| 0.75  | 46255872.3                    |
| 0.50  | 28567466.12                   |
| 0.25  | 16244865.63                   |

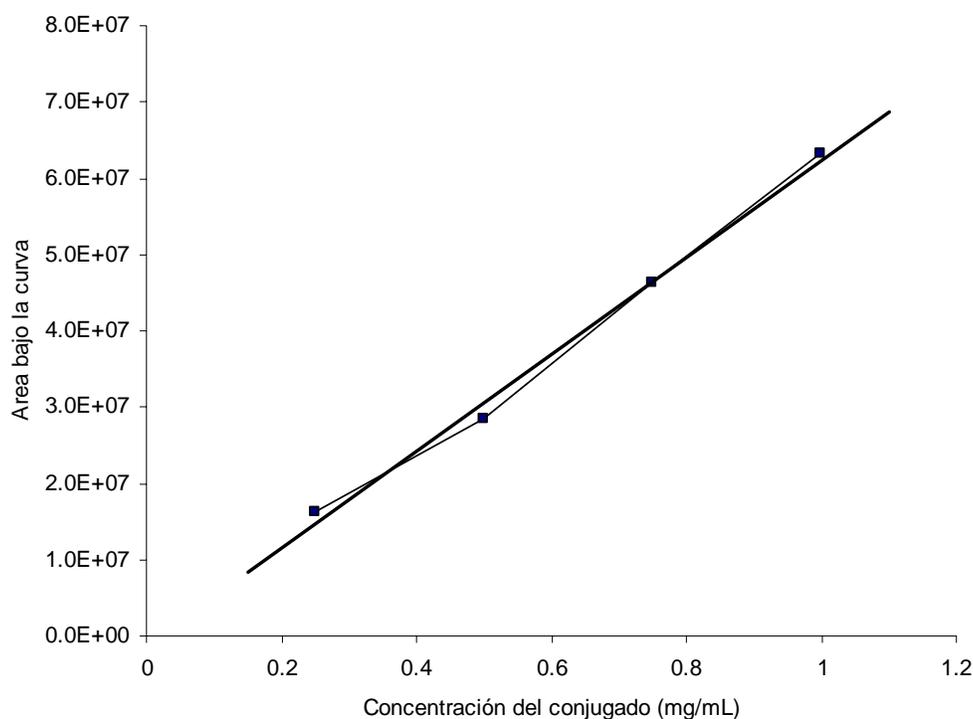


Figura 13. Gráfica de calibración de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, en donde se aprecia la linealidad del sistema

n = 10

$r^2 = 0.9924$

IC( $\beta_1$ ) = (6503849.12; 113496151) no incluye al cero.



Criterios de aceptación:  $r^2 \geq 0.98$   
 $\text{IC}(\beta_1)$  no debe incluir el cero.

El sistema debe ser considerado lineal debido a que  $r^2 \geq 0.98$  y a que el intervalo de confianza para la media no incluye el valor de 0.

### 3.2.2. Precisión del sistema

Al analizar por cuadruplicado las soluciones de HYNIC y BN, se obtuvieron los siguientes datos (tablas 7 y 8) con los que se calculó la precisión del sistema :

Tabla 7. Resultados de la precisión del sistema con HYNIC

| Muestra | Concentración de HYNIC (mg/mL) | Área bajo la curva |
|---------|--------------------------------|--------------------|
| 1       | 0.5                            | 24405765           |
| 2       | 0.5                            | 24791118           |
| 3       | 0.5                            | 23943329           |
| 4       | 0.5                            | 24536781           |

C. V. = 1.455%

Criterios de aceptación: C. V.  $\leq 1.5\%$

Tabla 8. Resultados de la precisión del sistema con BN

| Muestra | Concentración de BN (mg/mL) | Área bajo la curva |
|---------|-----------------------------|--------------------|
| 1       | 0.5                         | 1713620            |
| 2       | 0.5                         | 1752419            |
| 3       | 0.5                         | 1770738            |
| 4       | 0.5                         | 1725498            |

C. V. = 1.485%

Criterios de aceptación: C. V.  $\leq 1.5\%$

El sistema debe ser considerado preciso debido a que C. V.  $\leq 1.5\%$  .

### 3.2.3. Exactitud del sistema



En la tabla 9 se muestran los datos obtenidos para determinar la exactitud del sistema.

Tabla 9. Resultados de la exactitud del sistema

| Numero de muestra | Área bajo la curva | Concentración (mg/mL) | % de recobro |
|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| 1                 | 59254335.9         | 1.00                  | 99.890       |
| 2                 | 57117911.9         | 1.00                  | 96.330       |
| 3                 | 57348295.6         | 1.00                  | 96.714       |
| 4                 | 58674190.6         | 1.00                  | 98.923       |
| 5                 | 58789474           | 1.00                  | 99.116       |

C. V. = 1.623%

% de recobro = 98.194%

Criterios de aceptación:

% de recobro = 98 - 100%

C. V.  $\leq$  2.0%

El sistema debe considerarse exacto debido a que el % de recobro está en el rango de 98-100% y el C. V.  $\leq$  2.0% .

### 3.2.4. Linealidad del método

En la tabla 10 se muestran los datos utilizados para determinar la linealidad del método; en la figura 10 se observa la gráfica que demuestra la linealidad del método.

Tabla 10. Resultados de la linealidad del método con datos cargados de manera independiente

| Concentración de HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN (mg/mL) | Área bajo la curva (promedio) |
|---|-------------------------------|
| 1.00  | 63194820.02                   |
| 0.75  | 46255872.3                    |
| 0.50  | 28567466.12                   |
| 0.25  | 16244865.63                   |

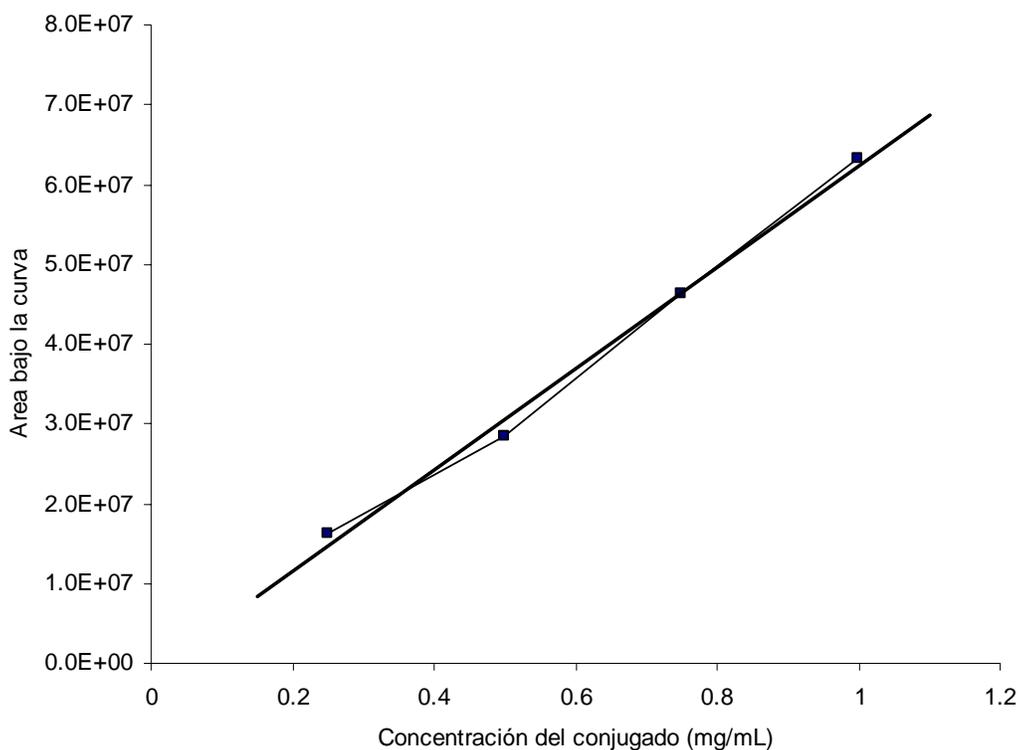


Figura 14. Gráfica de calibración de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, en donde se aprecia la linealidad del método

$n = 10$

$r^2 = 0.9924$

$\text{IC}(\beta_1) = (6503849.12; 113496151)$  no incluye al cero.

Criterios de aceptación:

$r^2 \geq 0.98$

$\text{IC}(\beta_1)$  no debe incluir el cero.

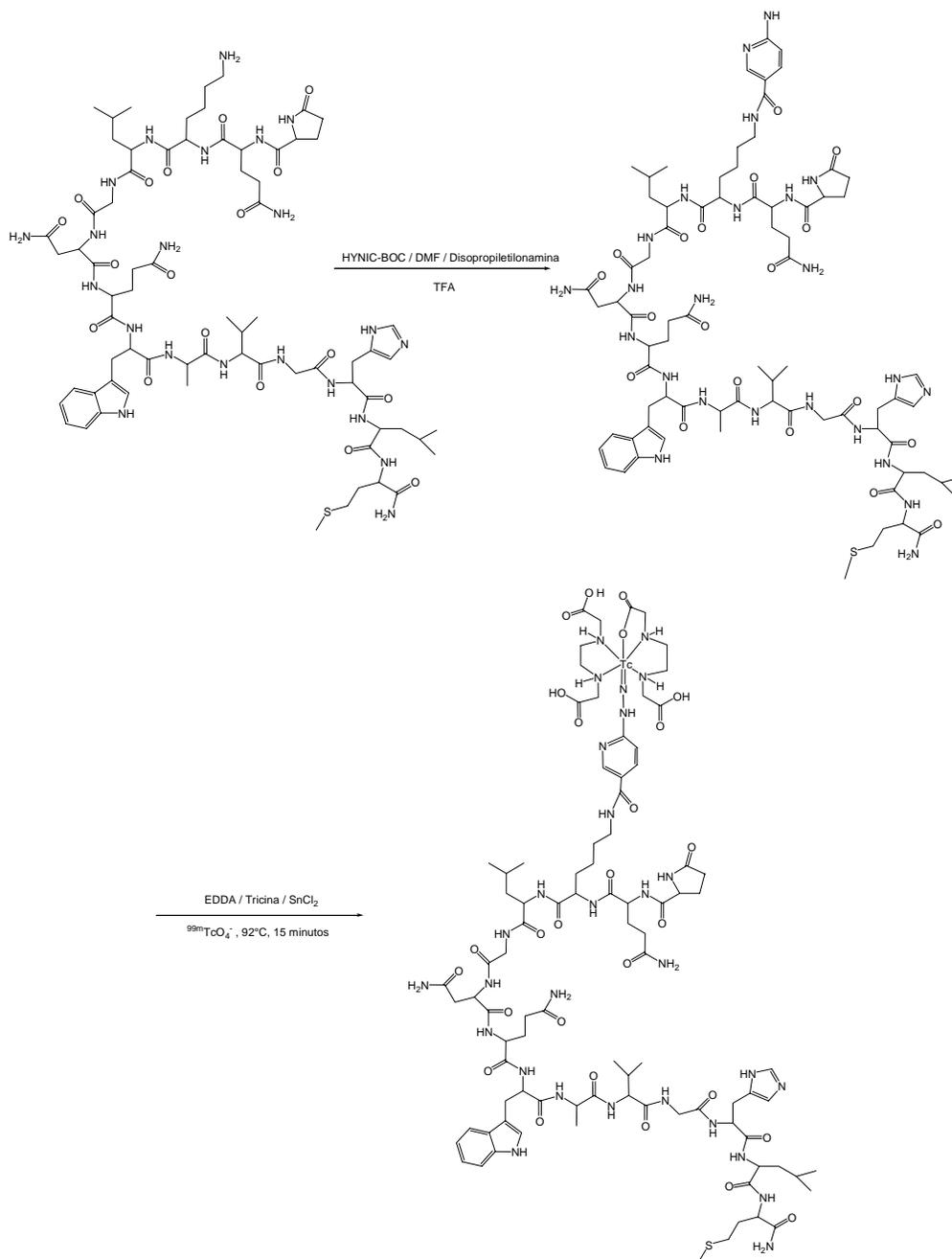
### 3.2.5. Especificidad

Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra [80].



### 3.3. Conjugación de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

#### 3.3.1. Reacción general para la preparación de $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN





### 3.3.2. Purificación por HPLC

La figura 15 y la tabla 11 muestran el cromatograma y los datos obtenidos después de la purificación por Sep-Pack del conjugado.

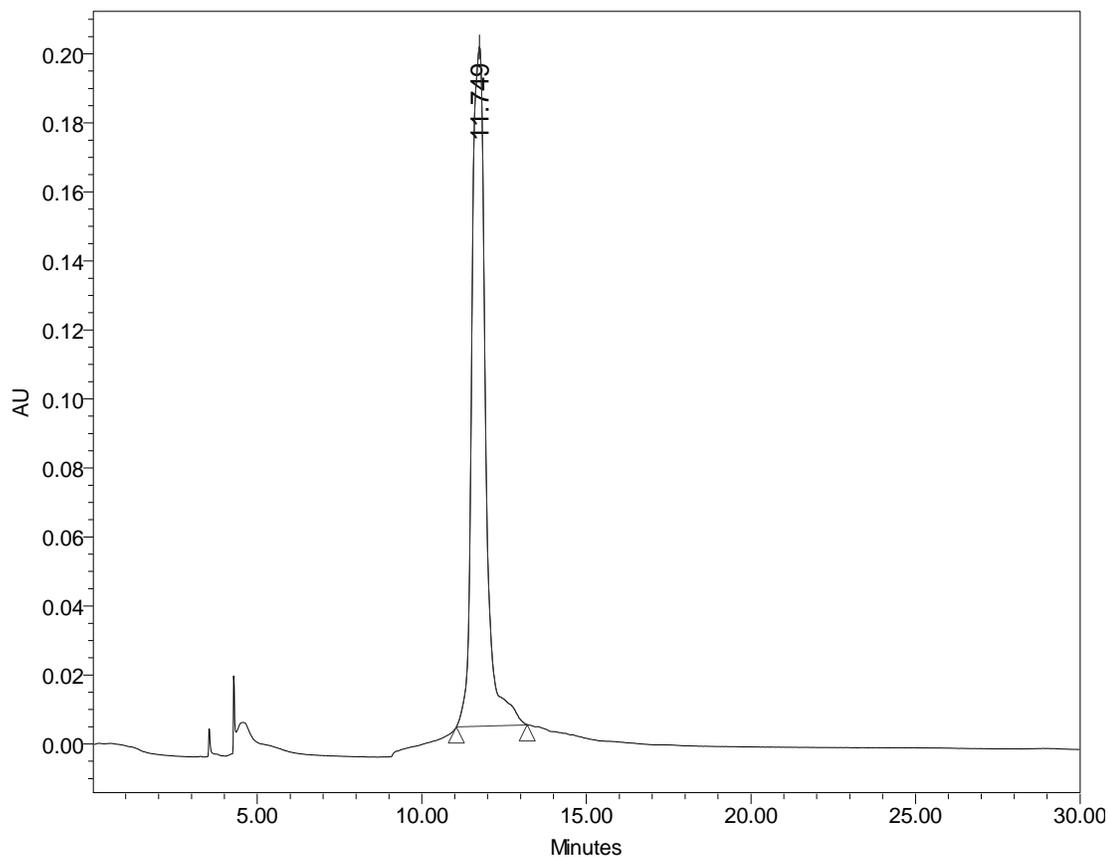


Figura 15. Cromatograma obtenido después de la purificación por HPLC

Tabla 11. Resultados de la caracterización de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

| Longitud de onda (nm) | Tiempo de retención (min) | Área bajo la curva |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| 280                   | 11.749                    | 27587149 ± 1.455%  |



### 3.4. Selección de la formulación

Para determinar la cantidad correcta de conjugado, se marcaron diferentes cantidades de conjugado purificado.

#### 3.4.1. Radiomarcado de 20 $\mu\text{L}$ de conjugado

La figura 16 y la tabla 12 muestran los datos obtenidos al marcar 20  $\mu\text{L}$  del conjugado obtenido.

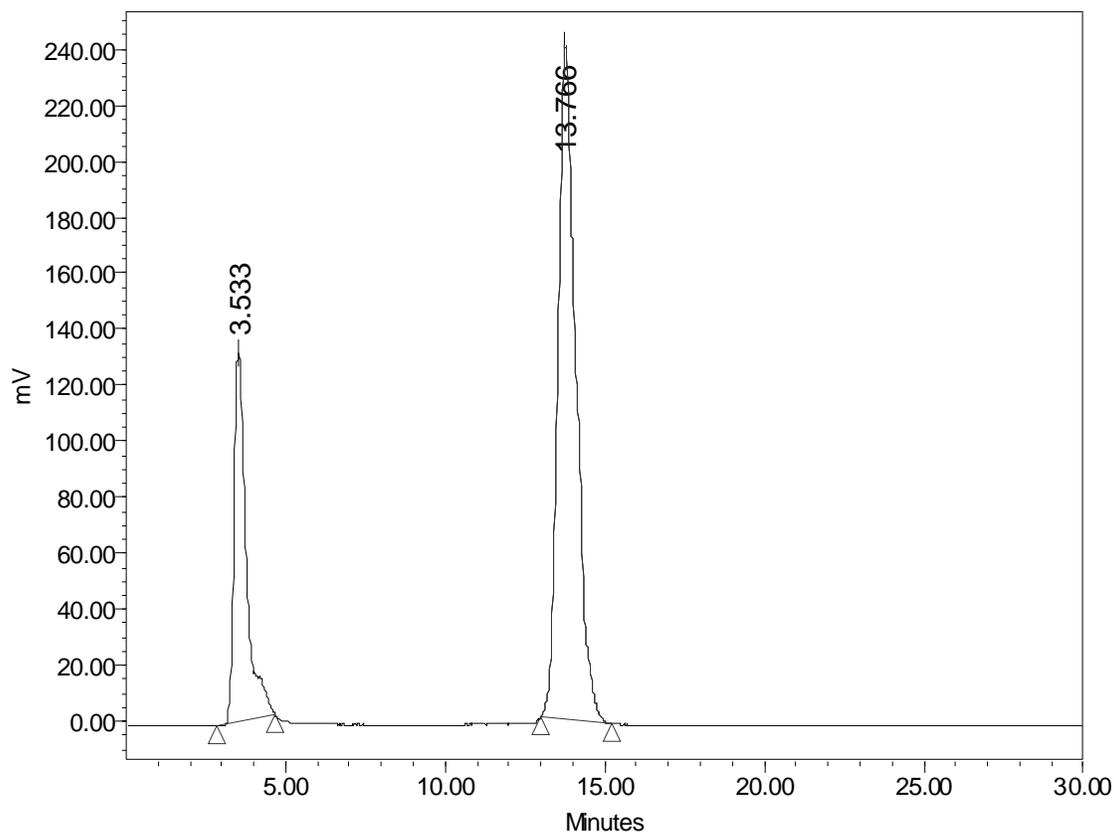


Figura 16. Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 20  $\mu\text{L}$  de conjugado

Tabla 12. Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 20  $\mu\text{L}$  de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

|   | Tiempo de retención (min) | % Área |
|---|---------------------------|--------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$                          | 3.533                     | 27.14  |
| $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 13.766                    | 72.86  |

#### 3.4.2. Radiomarcado de 50 $\mu\text{L}$ de conjugado



La figura 17 y la tabla 13 muestran los datos obtenidos al marcar 50  $\mu\text{L}$  del conjugado obtenido.

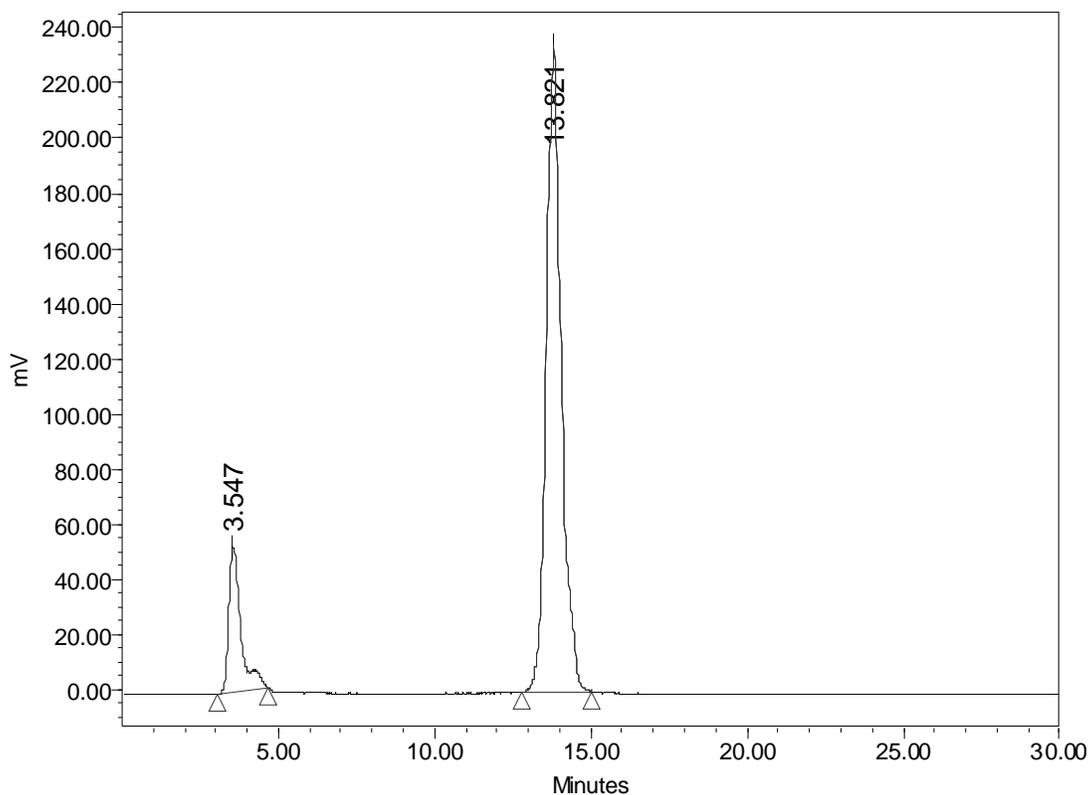


Figura 17. Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 50  $\mu\text{L}$  de conjugado

Tabla 13. Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 50  $\mu\text{L}$  de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

|   | Tiempo de retención (min) | % Área |
|---|---------------------------|--------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$                          | 3.547                     | 15.33  |
| $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 13.821                    | 84.67  |



### 3.4.3. Radiomarcado de 100 $\mu\text{L}$ de conjugado

La figura 18 y la tabla 14 muestran los datos obtenidos al marcar 100  $\mu\text{L}$  del conjugado obtenido.

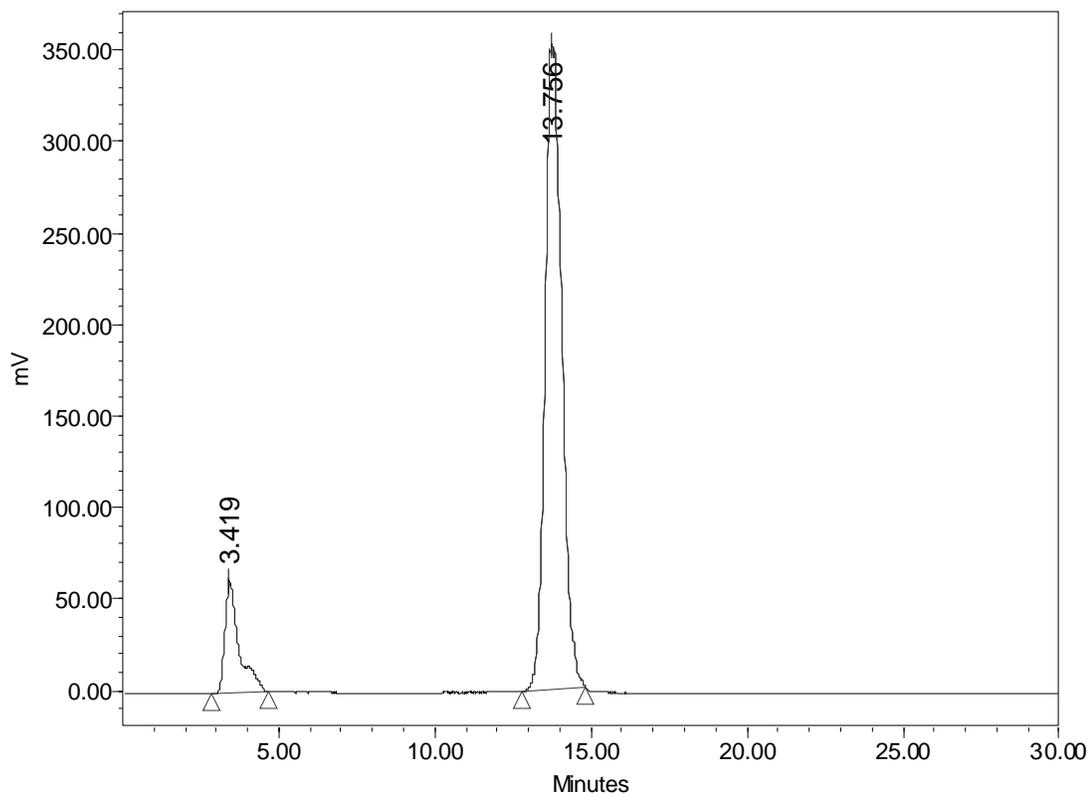


Figura 18. Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 100  $\mu\text{L}$  de conjugado

Tabla 14. Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 100  $\mu\text{L}$  de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

|   | Tiempo de retención (min) | % Área |
|---|---------------------------|--------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$                          | 3.419                     | 12.62  |
| $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 13.756                    | 87.38  |



### 3.4.4. Radiomarcado de 120 $\mu\text{L}$ de conjugado

La figura 19 y la tabla 15 muestran los datos obtenidos al marcar 120  $\mu\text{L}$  del conjugado obtenido.

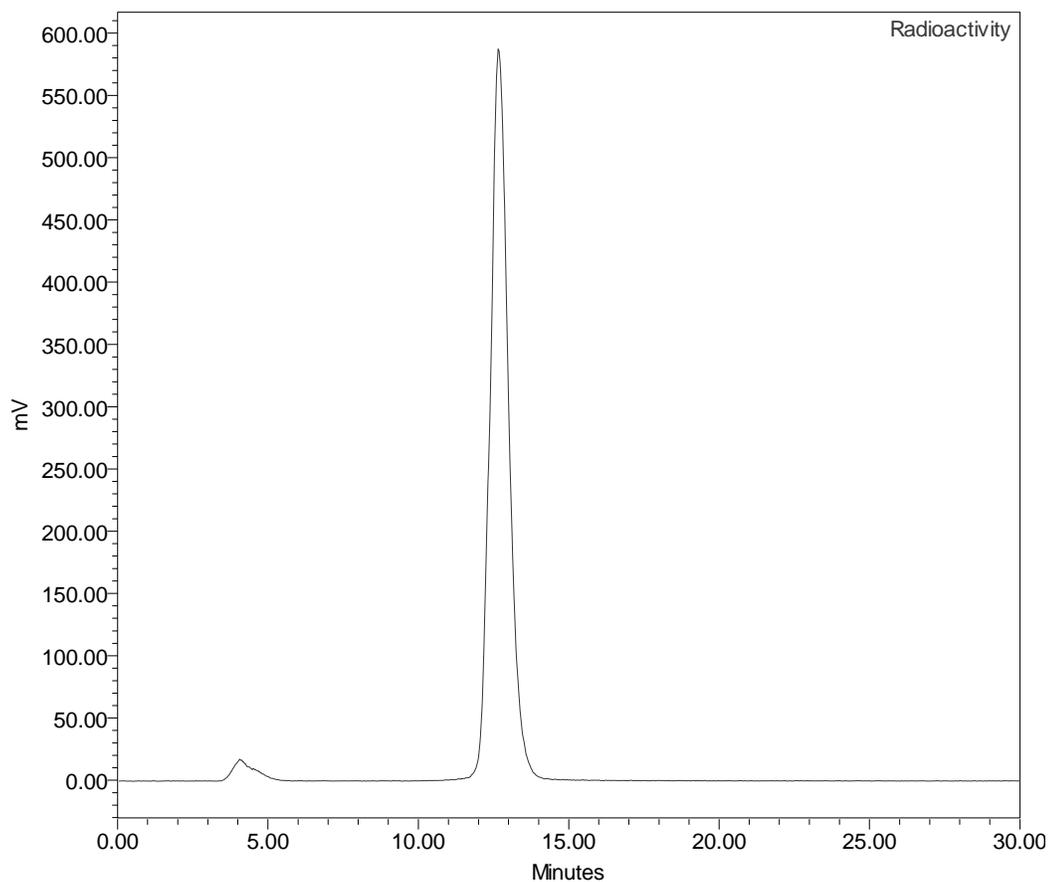


Figura 19. Pureza radioquímica obtenida con el marcado de 120  $\mu\text{L}$  de conjugado

Tabla 15. Resultados de la determinación de la pureza radioquímica obtenida del marcado de 120  $\mu\text{L}$  de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

|   | Tiempo de retención<br>(min) | % Área |
|---|------------------------------|--------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$                          | 4.067                        | 2.23   |
| $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 12.662                       | 97.77  |



### 3.5. Control de calidad del núcleo-equipo

#### 3.5.1. Determinación de la pureza radioquímica por ITLC-SG

En la tabla 16 se muestran los porcentajes de impurezas radioquímicas obtenidas en la separación usando ITLC-SG.

Tabla 16. Porcentaje de impurezas en el radiomarcado del péptido.

| Compuesto   | Fase móvil                       | Rf  | % Pureza |
|---|----------------------------------|-----|----------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre                                      | 2-butanona                       | 1.0 | 0.743    |
| $^{99m}\text{Tc}$ unido al co-ligando y el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ | Citrato de sodio                 | 1.0 | 0.230    |
| Coloide   | Etanol/solución salina (1:1 v/v) | 0.0 | 0.820    |

#### 3.5.2. Determinación de pureza radioquímica por Sep-Pack

En la tabla 17 se muestran los porcentajes de pureza radioquímica obtenida usando Sep-Pack en la separación.

Tabla 17. Pureza radioquímica de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN determinada por Sep-Pack

| Compuesto   | Fase                             | % de pureza |
|---|----------------------------------|-------------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$ libre                            | HCl 1mM                          | 0.152       |
| $^{99m}\text{Tc}$ reducido y coloide                    | Cartucho                         | 1.023       |
| $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC- HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | Etanol/solución salina (1:1 v/v) | 97.650      |



### 3.5.3. Determinación de la pureza radioquímica por HPLC

Se determinó por medio de un equipo de HPLC acoplado a un detector de radiactividad (fig. 20 y tabla 18).

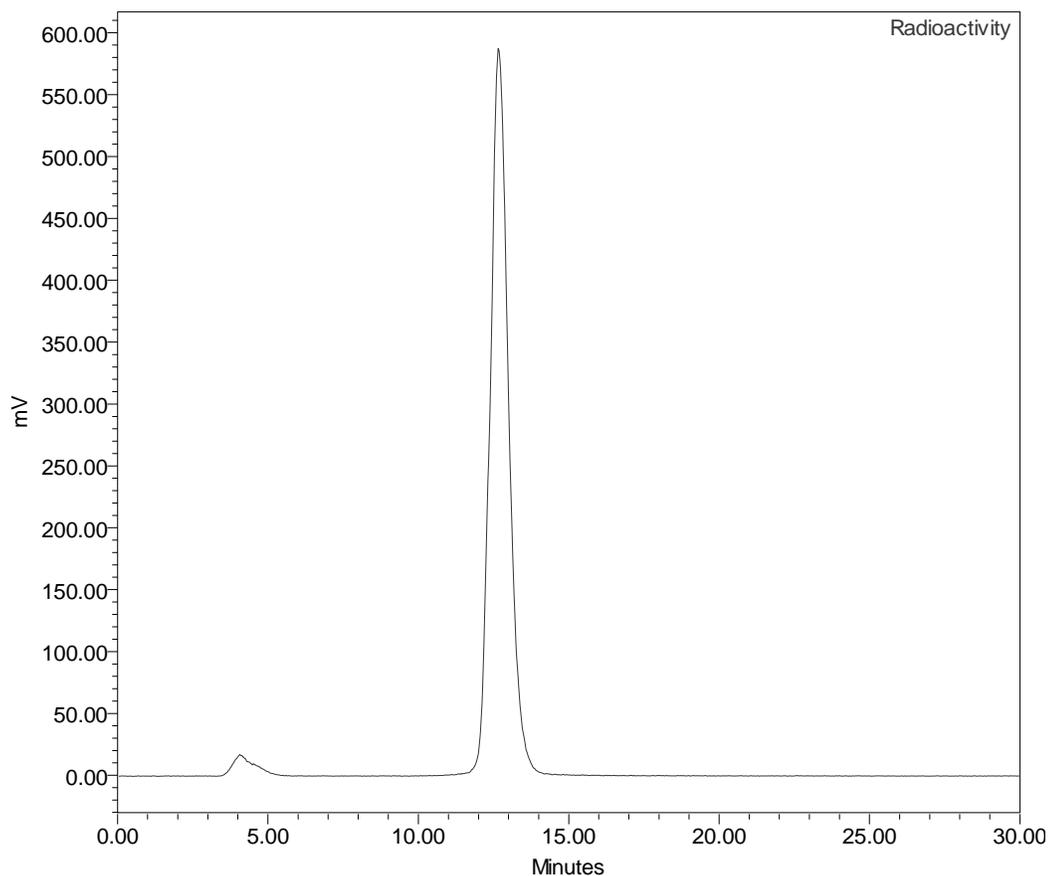


Figura 20. Representación gráfica de la pureza radioquímica del  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC- [Lys<sup>3</sup>]-BN

Tabla 18. Resultados de la determinación de la pureza radioquímica de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

|   | <b>Tiempo de retención<br/>(min)</b> | <b>% Área</b> |
|---|--------------------------------------|---------------|
| $^{99m}\text{TcO}_4^-$                          | 4.067                                | 2.23          |
| $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys <sup>3</sup> ]-BN | 12.662                               | 97.77         |



### 3.6. Pruebas de esterilidad

Los resultados de las pruebas hechas a los núcleo-equipos se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados de las pruebas de esterilidad de los núcleo equipos

| <b>Medio de cultivo</b>      | <b>Crecimiento</b> |
|------------------------------|--------------------|
| Medio fluido de tioglicolato | Negativo           |
| Caldo de soya tripticaseína  | Negativo           |

### 3.7. Determinación de pirógenos

La determinación de presencia de pirógenos resultó negativa. En los resultados se observó la ausencia total de formación de gel o de alguna masa viscosa. La prueba se realizó en presencia de un control positivo y uno negativo.

### 3.8. Estabilidad del complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

En la tabla 20 se muestran los datos obtenidos en la prueba de estabilidad del complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN a las 24 horas.

Tabla 20. Resultados de la pureza radioquímica a las 24 horas del marcado, que muestra la estabilidad del complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

| <b>Tiempo (h)</b> | <b>Pureza Radioquímica (%)</b> |
|-------------------|--------------------------------|
| 0.5               | 97.77                          |
| 1                 | 97.72                          |
| 2                 | 97.73                          |
| 3                 | 97.69                          |
| 4                 | 97.64                          |
| 24                | 97.42                          |



### 3.9. Estabilidad del kit liofilizado

En la tabla 21 se muestran los datos obtenidos en la prueba de estabilidad del complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN de un kit preparado 6 meses antes.

Tabla 21. Resultados de la pureza radioquímica a los 6 meses de preparación del núcleo-equipo.

| Tiempo (h) | Pureza Radioquímica (%) |
|------------|-------------------------|
| 0.5        | 97.38                   |
| 1          | 97.35                   |
| 2          | 97.40                   |
| 3          | 97.33                   |
| 4          | 97.33                   |
| 24         | 97.30                   |

### 3.10. Unión a proteínas

En la tabla 22 se muestran los porcentajes de unión a proteínas séricas.

Tabla 22. Porcentajes de unión a proteínas séricas

| Tiempo (h) | Unión a proteínas (%) |
|------------|-----------------------|
| 1          | 29 ± 1.4              |
| 24         | 34 ± 2.1              |

### 3.11. Ensayos en líneas celulares

#### 3.11.1. Ensayos de internalización y de unión no específica

Los resultados de los experimentos in Vitro mostraron una rápida internalización, 8% a las 2 horas y 11.5% a las 4 horas. También se obtuvieron resultados de la unión específica a receptores que mostraron una diferencia significativa en los porcentajes de asimilación entre los grupos de células bloqueadas y no bloqueadas a diferentes tiempos (fig. 21).

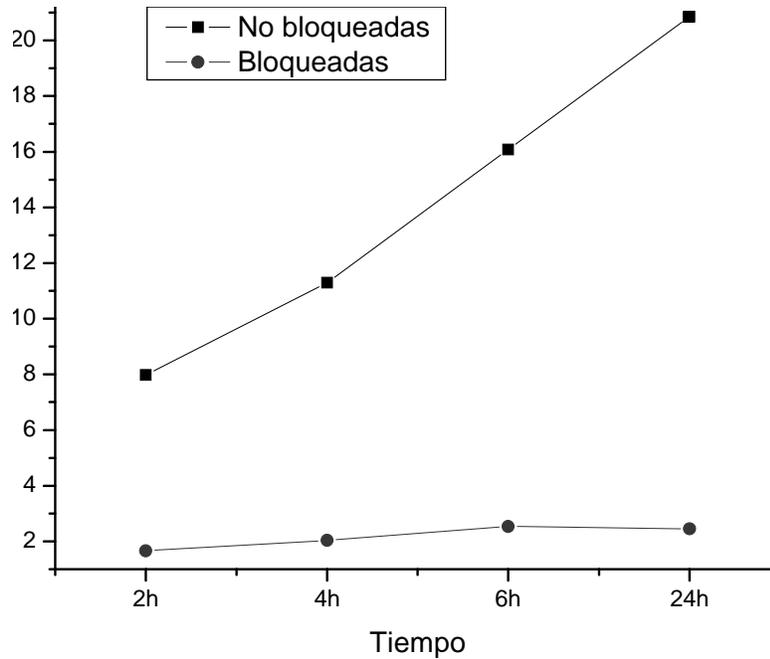


Figura 21. Internalización de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN dependiente del tiempo en células PC-3 bloqueadas y no bloqueadas, expresada como porcentaje de la actividad total (media  $\pm$  desviación estándar, n=3). Las células bloqueadas fueron incubadas con una dosis adicional de Tyr<sup>4</sup>-BN para determinar la unión no específica.

### 3.12. Modelo animal

#### 3.12.1. Inducción de tumores en ratones atómicos



Figura 22. Imagen de un ratón con un tumor inducido con células PC-3

#### 3.12.2. Biodistribución



En la tabla 22 se encuentran los datos de biodistribución en ratones con tumores inducidos a las 2 horas de la administración de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN.

Tabla 23. Biodistribución en ratones con tumores inducidos 2 horas después de la administración de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN

| ÓRGANO    | No bloqueados           |                     | Bloqueados              |                     |
|-----------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
|           | Captación promedio (2h) | Desviación estándar | Captación promedio (2h) | Desviación estándar |
| Sangre    | 0.079                   | 0.032               | 0.130                   | 0.063               |
| Corazón   | 0.050                   | 0.018               | 0.076                   | 0.029               |
| Pulmón    | 0.102                   | 0.043               | 0.110                   | 0.045               |
| Hígado    | 0.168                   | 0.036               | 0.160                   | 0.035               |
| Bazo      | 0.084                   | 0.042               | 0.100                   | 0.051               |
| Páncreas  | 1.112                   | 0.433               | 0.349                   | 0.158               |
| Riñón     | 4.700                   | 1.163               | 6.780                   | 1.782               |
| Intestino | 0.174                   | 0.101               | 0.265                   | 0.112               |
| Músculo   | 0.047                   | 0.048               | 0.038                   | 0.024               |
| Tumor     | 0.269                   | 0.107               | 0.098                   | 0.035               |
| Sangre    | 0.079                   | 0.032               | 0.130                   | 0.063               |
| Corazón   | 0.050                   | 0.018               | 0.076                   | 0.029               |

Existe una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los animales bloqueados y los no bloqueados. Los resultados están expresados como porcentaje de la actividad inyectada por gramo de tejido. (%IA/g). Los animales bloqueados recibieron una dosis adicional de Tyr4-BN como agente bloqueador de GRP-r para determinar la incorporación específica de radiactividad.



### 3.12.3. Imagen molecular

En la figura 23 se puede observar una gammagrafía obtenida 2 horas después de la administración del radiofármaco.

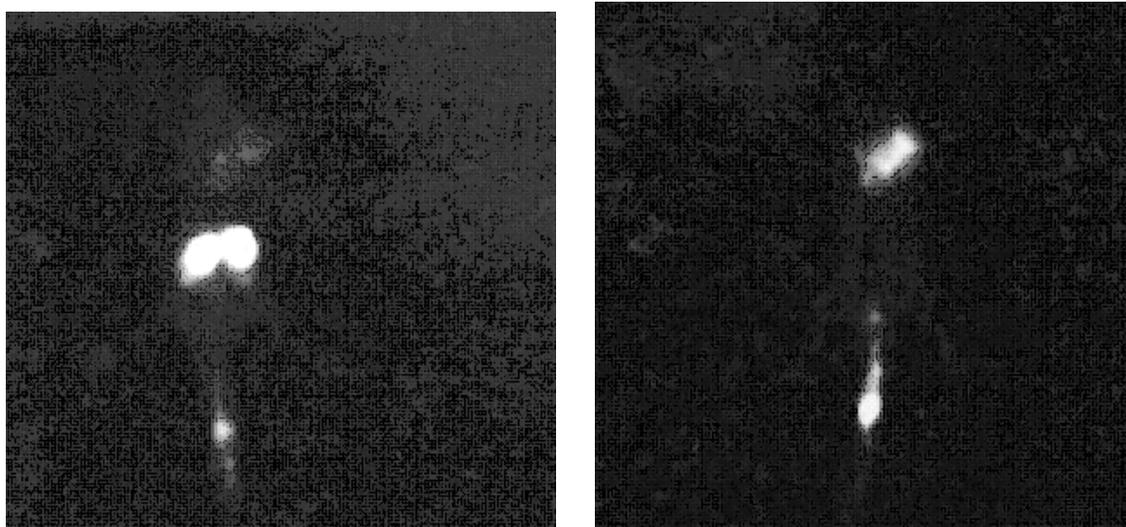


Figura 23. Gammagrafía obtenida 2 h después de la inyección del radiofármaco



## Capítulo 4. Discusión



## Discusión

### 4.1. Caracterización

Los cromatogramas que se obtuvieron muestran un tiempo de retención para el complejo de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN de 11.749 minutos; con el radiocromatograma logrado para el mismo complejo marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  se tiene un tiempo de retención similar, en el caso de estudios de identidad con radiofármacos, esta correspondencia en los tiempos de retención se considera comúnmente suficiente para aceptar la identidad química de la sustancia [9].

La cromatografía de fase reversa es la técnica más empleada para separar mezclas. Ésta técnica emplea un empaque enlazado hidrofóbico con cadenas de diferente longitud, en este caso 18 átomos de carbono, como fase estacionaria y una fase móvil polar constituida por mezclas de agua con algún disolvente orgánico. La retención en este tipo de sistemas puede explicarse con el modelo de Horvát, según el cual la superficie hidrocarbonada de la molécula del soluto, así como las moléculas hidrocarbonadas de la fase estacionaria experimentan un efecto de repulsión hacia el eluyente polar, de modo que para disminuir la superficie hidrocarbonada en contacto con la fase móvil, se produce una asociación entre el soluto y las cadenas de la fase estacionaria. De esta manera, la retención no es debida a una atracción entre el soluto y la fase estacionaria, sino a la repulsión que ambas experimentan hacia el eluyente y que las conduce a asociarse. Cuando se preparan gradientes, estos generan una disminución constante de la polaridad del eluyente, es decir, se aumenta la proporción de solvente orgánico logrando así un incremento continuo en la fuerza de la fase móvil. Según Willard [81] la mezcla acetonitrilo/agua es adecuada para preparaciones de polaridad moderada, solubles en metil etil cetona. El gradiente programado para el intervalo de 10 a 20 minutos en el equipo es una mezcla acetonitrilo/agua 50:50, es en este intervalo de tiempo donde se obtiene el pico del bioconjugado (11.749 min), lo cual indica su lipofilidad, lo cual le permite interactuar con el medio dentro del organismo.

### 4.2. Validación del sistema y del método

Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un analito en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito [80].



### 4.3. Conjugación y escalamiento del lote

Como Baidoo et al. reportaron [82] la modificación de la Lys<sup>3</sup> dentro de la bombesina no tuvo efecto alguno en la función biológica ya que la parte activa, como se dijo, es la porción C-terminal de 8 aminoácidos. El péptido puede ser modificado sin ninguna protección química adicional, debido a que el único grupo susceptible a modificación bajo las condiciones de reacción es este grupo  $\epsilon$  de aminoácidos (pH=9). De cualquier forma, los estudios de mecánica molecular y de mecánica cuántica hechas a la molécula de [Lys<sup>3</sup>]-BN han demostrado que el único lugar disponible para introducir al grupo HYNIC como quelante de Tc es en la Lys<sup>3</sup>, aún si la reacción es llevada a cabo a pH=7. De hecho, la conjugación usando HATU produce altos niveles de conjugación de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, obteniéndose una alta estabilidad termodinámica sin interferir con la estereoespecificidad del extremo C-terminal de 8 aminoácidos, en donde se cree que se encuentra el dominio responsable de la unión con el receptor [83].

Se hicieron pruebas para determinar la cantidad correcta de conjugado HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN que se iba a emplear en la preparación de la formulación liofilizada debido a que es necesario tener una relación estequiométrica entre el conjugado y los otros componentes del núcleo-equipos. En las figuras 16-19 se observa un incremento en la pureza radioquímica conforme la concentración de conjugado es mayor. En medicina nuclear el radionucleido más usado es el  $^{99m}\text{Tc}$  por sus características físicas y químicas ideales. Muchos de los radiofármacos consisten de un preparado [ $^{99m}\text{Tc}$  quelado] por medio de la adición de una solución estéril de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , en un nucleoequipo para radiomarcado. El  $^{99m}\text{Tc}$  es reducido de su estado de oxidación VII ( $^{99m}\text{Tc(VII)O}_4^-$ ) a una valencia menor por medio de la acción de iones estañoso. El tecnecio reducido luego es conjugado a la molécula de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN. El tecnecio libre así como los iones pertecneciato que no se unen a la molécula del conjugado, quedan en solución y son detectados en la cromatografía. En las tablas 11-14 se observan los tiempos de retención de las impurezas en el radiomarcado, que son cercanas a 3.5min, esto confirma que se trata de los mismos compuestos en todos los experimentos. El sistema de gradientes en este intervalo de tiempo usa sólo agua; de ahí que se pueda afirmar que en esa etapa de la purificación sólo son arrastrados de la columna de separación los compuestos que hidrosolubles, como el  $^{99m}\text{Tc}$  libre y el ión pertecneciato. En el caso de este experimento, la variación en la pureza radioquímica se debe a que se aumentó en forma gradual la concentración del conjugado (de 20 hasta 120  $\mu\text{L}$ ) para determinar en donde la presencia de impurezas era menor al 5% ya que es el requisito de la norma. A los 120  $\mu\text{L}$  de conjugado se obtiene una pureza del radiofármaco de 97.77%, a esta concentración, la relación estequiométrica entre el conjugado de HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, el cloruro estañoso y el pertecneciato de sodio es ideal. Otro punto a considerar es que la



preparación hecha debe estar libre de oxígeno, ya que este oxida al  $\text{SnCl}_2$  e impide su función.

Así mismo, es importante cuidar las cantidades presentes de los otros componentes de la formulación, debido a las importantes funciones que cada uno de ellos. Como agente quelante, el EDDA une al complejo HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN al  $^{99m}\text{Tc}$ ; la tricina es un compuesto que ayuda a formar la esfera de coordinación entre el tecnecio y el conjugado. Ambos componentes ayudan a tener una estructura estable del radiofármaco. El manitol es un polisacárido que ayuda a que el kit liofilizado tenga una buena apariencia. Sin este compuesto, no se formaría la pastilla que se deposita cuando la liofilización se concluye; esto ayuda a que el fármaco tenga una apariencia mejor para el paciente. El agua usada para hacer la mezcla previa a la liofilización debe ser nitrogenada para desplazar el oxígeno disuelto y evitar así la oxidación del  $\text{SnCl}_2$ . El proceso de liofilización garantiza la conservación de los componentes de la formulación durante un tiempo prolongado [91]. La humedad es un factor que favorece la descomposición de las sustancias. Debido a que a altas temperaturas las proteínas y los péptidos se desnaturalizan, es necesario buscar un método alternativo de secado que permita conservar las características del conjugado. La solución es bajar la presión atmosférica de tal forma que permita la desecación total a bajas temperaturas (liofilización), método que además tiene algunas ventajas, como es la formación de una pastilla fácilmente soluble, la conservación de la distribución de las sustancias cuando estaban en solución, debido al congelado rápido; lo cual provoca que el núcleo-equipos no necesite de una agitación prolongada cuando se reconstituye.

En la reconstitución, el núcleo-equipos un tuvo mayor problema, la solución que se obtiene es transparente, incolora y sin residuos del liofilizado después de una ligera agitación.

#### ***4.4. Pruebas de esterilidad y estabilidad***

La determinación de la esterilidad y apirogenicidad del producto es de suma importancia, debido a que se trata de un fármaco de administración parenteral, por ello es necesario cumplir con esto y así evitar problemas al paciente. A diferencia de las bacterias, la eliminación de pirógenos no es tan sencilla, debido a que se trata sólo de moléculas provenientes de bacterias o de materiales inertes, esta prueba constata la ausencia de cualquiera de estas partículas [88].

En términos generales las pruebas de estabilidad arrojan resultados favorables, ya que el complejo demostró ser estable a cualquier dosis de actividad durante 24 horas (Tabla 20). El único limitante en el uso de radiofármacos de tecnecio es la vida media del radionucléido; en el caso del  $^{99m}\text{Tc}$  es de 6 horas. Demostrar la estabilidad del radiofármaco 24 horas después brinda un amplio



margen de tiempo entre la preparación del radiofármaco y su administración, al quedar sentado que no hay una disminución en la pureza radioquímica y eso indica que no existe la aparición de impurezas en ese lapso de tiempo. Además, también es importante considerar el tiempo de elución del generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ , ya que este tiempo no debe exceder, recomendablemente, de 24 horas debido a la competencia que existe entre el  $^{99}\text{Tc}$  y el  $^{99m}\text{Tc}$ ; transcurrido este tiempo, la proporción del compuesto estable es mayor y se puede provocar una disminución de la pureza radioquímica [26].

Por otro lado, se probó el efecto que tiene la actividad en la pureza radioquímica del fármaco con la finalidad de conocer la actividad con la que el compuesto puede ser marcado sin que se afecte de alguna manera la pureza radioquímica mayor al 95%, durante el uso común del núcleo-equipos. La actividad que es administrada en los pacientes varía de acuerdo con la aplicación que se quiera del radiofármaco. Un importante beneficio de los radiofármacos receptor-específicos es su uso para terapia dirigida. Una molécula bioactiva con un radionúclido para obtener imágenes como el  $^{99m}\text{Tc}$  puede ser usada para la identificación de tumores malignos y sitios de metástasis, La misma molécula marcada con un radionúclido emisor de partículas puede ser usada para terapia.

Después de 6 meses de almacenamiento a 4°C se hicieron pruebas de estabilidad al complejo, las cuales resultaron favorables para la preparación (tabla 22) para evaluar la estabilidad y se comprobó que el liofilizado se mantiene estable durante ese tiempo. Es recomendable seguir con un estudio de estabilidad a largo plazo para comprobar el comportamiento del producto en un periodo de tiempo más largo, para determinar el periodo de caducidad.

#### 4.5. Pruebas *in vivo*

La conjugación de HYNIC a la bombesina para la preparación de de  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN modifica las propiedades lipofílicas y farmacocinéticas de la bombesina, produciendo un radiofármaco con bajo aclaramiento hepatobiliar y de excreción renal predominantemente. Este es un resultado relevante debido a que la mayoría de los análogos de bombesina marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  tienen la tendencia de acumularse en el hígado e intestino como resultado de su alta lipofilidad y aclaramiento hepatobiliar [82-86]. La gran acumulación de radioactividad puede interferir durante la detección de los sitios bombesina/GRP-r positivos de cáncer y sus metástasis en las áreas abdominales.

La incorporación de radioactividad en el páncreas demostró la habilidad del radiofármaco de unirse *in vivo* a células relacionadas con receptores GRP. Además, los estudios de bloqueo de receptores confirmaron la especificidad del bioconjugado por los GRP-r. La incorporación dentro de las células PC-3



receptores-positivas fue significativamente menor a la del páncreas, pero la incorporación al tumor fue altamente específica.

Como Scopinaro et al. [89, 90] reportaron, el análogo de bombesina  $^{99m}\text{Tc}$ -Leu<sup>11</sup>-BN<sup>1</sup> es capaz de detectar cánceres de mama, de pulmón y de próstata así como la invasión de los nodos pélvicos, incluso aunque este derivado de bombesina se excreta por vía hepatobiliar. Después de los estudios preliminares en humanos, los autores concluyeron que el uso de  $^{99m}\text{Tc}$ -bombesina puede jugar un rol importante en el diagnóstico y tratamiento de cáncer de próstata [90]. Por ello, una de las principales ventajas de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, reportada en este trabajo es la factibilidad de ser obtenido de preparaciones liofilizadas, para el posible uso rutinario en la detección de cánceres de mama y de próstata con una acumulación mínima en el área abdominal.



## Capítulo 5. Conclusiones



## Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fase experimental, es posible dar las siguientes conclusiones.

Las condiciones de reacción empleadas en el laboratorio favorecen una conjugación por intercambio de ligantes entre el EDDA y la Tricina, con un alto grado de pureza.

La metodología de Cromatografía líquida de Alta Resolución empleada para determinar la identidad del conjugado HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, así como para determinar la pureza radioquímica del radiofármaco es confiable, debido a los resultados favorables en su validación.

La formulación utilizada para la elaboración de un núcleo-equipo de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN, con una pureza radioquímica mayor al 95% es:

| Reactivo                                     | Cantidad |
|--|----------|
| HYNIC-Lys <sup>3</sup> -BN (HYNIC-Bombesina) | 25µg     |
| Cloruro estano                               | 10µg     |
| Acido Etilendiamidiacético (EDDA)            | 10mg     |
| N-tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina)   | 20mg     |
| Manitol                                      | 50mg     |

El método de radiomarcado del núcleo-equipo para la obtención de  $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-BN produce una pureza radioquímica mayor al 95%.

El escalamiento del lote permite la fabricación de un producto estable, estéril y libre de pirógenos, ideal para su administración en humanos. Estas condiciones se mantienen estables por un periodo de tres meses desde la fecha de su elaboración.

La actividad usada para marcar el conjugado, no tiene influencia alguna sobre la pureza radioquímica, que es mayor del 95% empleando actividades de 1-20mCi; además esa pureza se mantiene por más de 24 horas.

Se produce un radiofármaco con una baja retención hepatorenal y de excreción renal, lo cual garantiza poca acumulación de radiación que pueda dificultar la localización de células bombesina/GRP-r positivas.

La incorporación de radioactividad en el páncreas demostró la habilidad del radiofármaco de unirse in vivo a células relacionadas con receptores GRP.



Además, los estudios de bloqueo de receptores confirmaron la especificidad del bioconjugado por los GRP-r.

La incorporación dentro de las células PC-3 receptores-positivas fue significativamente menor a la del páncreas, pero la incorporación al tumor fue altamente específica.

### *5.1. Recomendaciones a futuro*

Es importante establecer estudios de toxicidad, tanto aguda, como crónica y subcrónica. Con estos estudios preclínicos es posible establecer parámetros importantes como la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), la dosis mínima de toxicidad; para concluir con la etapa preclínica y pasar a los estudios con humanos.

Un estudio de fase I permitiría obtener resultados en personas sobre la dosis máxima tolerada, así como los probables niveles de toxicidad; se plantearía la fase experimental en un grupo de 20-80 pacientes y se podrían observar, también, posibles reacciones adversas tipo A.

Con estudios clínicos más avanzados, de fase II y III, con un mayor número de pacientes sería posible determinar condiciones de seguridad y más amplias para los pacientes, al igual que se establecería la dosis eficaz; asimismo, se conocerían las reacciones adversas al fármaco y su posible interferencia con otros tratamientos.

Además de determinar la estabilidad durante seis meses, sería deseable el desarrollo de una prueba de estabilidad de anaquel por un periodo de tiempo más prolongado para establecer la fecha de caducidad.



## Referencias



### Referencias

1. Kowalsky, R. J.; Falen, S. W.; *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*; American Pharmacist Association DC, 2004; pp. 256-277.
2. Mahmood, A.; Jones, A. G.; in *Handbook of Radiopharmaceuticals*; Welch, M. J.; Redvanly, C. S. eds.; John Wiley & Sons; England, 2003; pp. 323-362.
3. Tisato, F.; Bolzati, C.; Porchia, M.; Refosco, F.; *Mass Spectrometry Reviews*; 2004, 23, 309.
4. Ma, Y.; Eckelman, W. C.; Huang, B. X.; Channing, M. A.; *Nucl. Med. Biol.*; 2002, 29, 125.
5. Hyllbrant, B.; Tyrefors, N.; Markides, K. E.; Langstrom, B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 20, 493.
6. Liu, S.; Ziegler, M. C.; Edwards, D. S.; *Bioconjug. Chem.*, 2000, 11, 113.
7. Vanbilloen, H. P.; Cleynhens, B.; de Groot, T. J.; Maes, A.; Bormans, G.; Verbruggen, A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 32, 663.
8. Vanderghindte, D.; Van Eckhoudt, M.; Terenwinghe, C.; Mortelmans, L.; Mormans, G.; Verbruggen, A.; Vanbilloen, H. P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2003, 32, 679.
9. Verduyck, T.; Kieffer, D.; Huyghe, D.; Cleynhens, B.; Verbeke, K.; Verbruggen, A.; Bormans, G.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 2003, 46, 669.
10. von Guggenberg, E.; Sarg, B.; Linder, H.; Melendez-Alafort, L.; Mather, S. J.; Moncayo, M.; Decristoforo, C.; *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2003, 46, 307.
11. Greenland, W. E. P.; Blower, p. J.; *Bioconjug. Chem.* 2005, 16, 939.
12. Ma, Y.; Kiesewetter, D. O.; Jagoda, E. M.; Huang, B. X.; Eckelman, W. C.; *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, 766, 319.
13. Bauer, C.; Bauder-Wuest, U.; Mier, W.; Haberkorn U.; Eisenhut, M.; *J. Nucl. Med. Biol.*; 2005, 46, 1066.



14. Boswell, C. A.; McQuade, P.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J.; *Nucl. Med. Biol.* 2005, 32, 29.
15. Toft, K. G.; Oulie, I.; Skotland, T.; *J. Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005, 829, 91.
16. Vanbilloen, H. P., Kieffer, D., Cleynhens, B. J.; Bormans, G.; Mortelmans, L.; Verbruggen, A.; *Nucl. Med. Biol.*; 2005, 32, 607.
17. Kieffer, D.; Cleynhens, B. J.; Vanbilloen, H. P.; Rattat, D.; Terwinghe, C. Y.; Mortelmans, L.; Bormans, G.; Verbruggen, A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16, 382.
18. Ferro-Flores, G.; Ramírez-Cruz, F. M.; Tendilla, J. L.; Pimentel-González, G.; Murphy, C. A.; Meléndez-Alafort, L.; Ascencio, J. A.; Croft B. Y.; *Bioconjug. Chem.*, 1999, 10, 726.
19. Meléndez-Alfort, L.; Ramírez-Cruz, F. M.; Ferro-Flores, G.; Murphy, C. A.; Pedraza-López, M.; Hnalowich, D. J.; *Nucl. Med Biol.*, 2003, 30, 605.
20. Ferro-Flores, G.; Ramírez-Cruz, F. M.; Meléndez-Alafort, L.; Murphy, C. A.; Pedraza-López, M.; *Appl. Rad. Isot.*. 2004, 61, 1261.
21. Thakur, M.; Lentle, B. C.; *Radiology*, 2005, 236, 753.
22. Eckelman, W. C.; Mathais, C. A.; *Nucl. Med. Biol.*, 2006, 33, 1.
23. Knight, L. C.; in *Handbook of Radiopharmaceuticals*; Welch M. J. and Redvanly C. S. eds. John Wiley & Sons: England, 2003; pp. 643-684.
24. Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 3099.
25. Decristoforo, C.; Meléndez-Alafort, L.; Sosabowski, J. K.; Mather, S. J.; *J. Nucl. Med.*, 2004, 41, 1114.
26. Maina, T.; Nock, B.; Nikolopoulou, A.; *Eur. J. Nucl. Mol. Imaging.* 2002, 29, 742.
27. Maina, T.; Nock, B.; Nikolopoulou, A.; Ciotellis, E.; Loudos, G.; Maintas, D.; Reubi, J. C.; Maina, T.; *Eur. J. Med. Mol. Imaging.* 2003, 30, 247.



28. Smith, C. J.; Gali, H.; Sieckman, G. L.; Hayes, D. L.; Owen, N. K.; Mazuru, D. G.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J.; *Nucl. Med. Biol.*, 2003, 30, 101.
29. von Guggenberg, E.; Béhé, M.; Beher, T. M.; Saurer, M.; Seppi, T.; Decristoforo, C.; *Biocojug. Chem.*, 2004, 15, 864.
30. Maina, T.; Nock, B.; Zhang, H.; Nikopoulou, A.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Maecke, H. R.; *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 823.
31. Nock, B.; Maina, T.; Béhé, M.; Nikolopoulou, A.; Gotthard, M.; Schmitt, J. S.; Beher, T. M.; Maecke, H. R.; *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 1727.
32. Storch, D.; Béhé, M.; Walter, M. A.; Chen, J.; Powell, P.; Mikolajczak, R.; Maecke, H. R.; *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 1561.
33. Nikolopoulou, A.; Maina, T.; Sotiriou, P.; Cordopatis, P.; Nock, B.; *J. Pept. Sci.*, 2006, 12, 124.
34. Reubi, J. C.; *Endocrine Reviews*, 2003, 24, 389.
35. Reubi, J. C.; Maecke, H. R.; Krenning, E. P.; *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 67S.
36. Baidoo, K. E.; Lin, K. S.; Zhan, Y.; Finley, P.; Scheffel, U.; Wagner, H. N.; *Biocunjug. Chem.*, 1998, 9, 218.
37. Labella, R.; García-Garayoa, E.; Langer, M.; Bläuenstein, P.; Beck-Sickinger, A. G.; Schubiger, P. A.; *Nucl. Med. Biol.*, 2002, 29, 553.
38. Varvarigou, A. D.; Scopinaro, F.; Leondiadis, L.; Corleto, V.; Schillaci, O.; De Vicentis, G.; *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2002, 17, 317.
39. Scopinaro, F.; Varvarigou, A. D.; Ussof, W.; De Vicentis, G.; Sourlingas, T. G.; Evangelatos, G. P.; *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2002, 17, 327.
40. Scopinaro, F.; De Vicentis, G.; Varvarigou, A. D.; Laurenti, C.; Iori, F.; Remediani, S.; *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2003, 30, 1378.
41. Alves, S.; Paulo, A.; Correia, J. D. G.; Gano, L.; Smith, C. J.; Santos, I.; *Bioconjug. Chem.*, 2005, 16, 438.



42. Faintuch, B. L.; Santos, R. L. S. R.; Souza, A. L. F. M.; Hoffman, T. J.; Greeley, M.; Smith, C. J.; *Synth. Reac. Inorg. Met-Org. Nano-Met. Chem.*, 2005, 16, 438.
43. Smith, J. C.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J.; *Nucl. Med. Biol.*, 2005, 32, 733.
44. Zhang, H.; Chen, J.; Waldherr, C.; Hinni, K.; Waser, B.; Reubi, J. C.; *Cancer Res.*, 2004, 64, 6707.
45. Krenning, E. P.; Breeman, W. A. P.; Kooij, P. M.; Lameris, J. S.; Bakker, W. H.; Koper, J. W.; Ausema, L.; Reubi, J. C.; Lamberts, S. W. J.; *Lancet.*, 1989, 1, 242.
46. Krenning, E. P.; Kwekkeboom, D. J.; Bakker, W. H.; Breeman, W. A. P.; Kooij, P. M.; Oei, H. Y.; va Haggan, M.; Postema, P. T. E.; de Jong, M.; Visser, T. J.; Reijs, A. E. M.; Hofland, L. J.; Koper, J. W.; Lamberts, S. W. J.; *Eur. J. Nucl. Med.*, 1993, 20, 716.
47. de Jong, M.; Breeman, W. A.; Bernard, H. F.; van Gameren, A.; Srinivasa, A.; Krenning, E. P.; *J. Nucl. Med.*, 2000, 41, 41P.
48. Von-Guggenberg, E.; Mikolajczak, R.; Janota, B.; Riccabona, G.; Decristoforo, C.; *J. Pharm. Sci.*, 2004, 93, 2497.
49. González-Vázquez, A.; Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Gutiérrez-García, Z. Dosimetry and biochynetics of  $^{99m}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-Tyr<sup>3</sup>-octreotide prepared from liophilized kits. *Appl. Rad. Isot.*, 64(7):792-797 (2006).
50. Decristoforo, C.; Mather, S. J.; Cholewinski, W.; Donnemiller, E.; Riccabona, G.; Moncayo, R.; *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000, 27, 1318.
51. Nock, B. A.; Nikoloupou, A.; Galanis, A.; Cordopatis, P.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Maina, T.; *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 100.
52. Lin, K. S.; Luu, A.; Baidoo, K. E.; Hashemzadeh-Gargari, H.; Chen, M. K.; Breneman, K.; *Bioconjug. Chem.*, 2005, 16, 43.
53. Ferro-Flores, G.; Murphy, C. A.; Rodríguez-Cortés, J.; Pedraza-López, M.; Ramírez-Iglesias, M. T.; *Nucl. Med. Commun.*, 2006, 27, 371.
54. Varvarigou, A.; Bouziotis, P.; Zikos, C. H.; Scopinaro, F.; De Vicentis, G.; Gastring-Releasing Peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2004, 19, 219-29.



55. Lin, J. T.; Coy, D. H.; Mantey, S. A.; Jensen, R. T.; *Peptide structural requirements for antagonism differ between the two mammalian bombesin receptor subtypes*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995, 275, 285-95.
56. Pradhan, T. K.; Katsuno, T.; Taylor, J. E.; Kim, S. H.; Ryan, R. R.; Mantey, S. A., et al. *Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptors subtypes*. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, Feb. 19; 349 (2-3), 275-87.
57. Schuhmacher, J.; Zhang, H.; Doll, J.; Macke, H. R.; Matys, R.; Hauser, H.; et al. *GRP receptors targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a  $^{68}\text{Ga}$ -labeled bombesin (6-14) analogue*. *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 691-9.
58. Fleischmann, A.; Waser, B.; Gebbers, J. O.; Reubi, J. C. *Gastrin Releasing Peptide Receptors in normal and neoplastic human uterus: involvement of multiple tissue compartments*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 4722-9, resumen electrónico anterior a la publicación.
59. Stangelberger, A.; Schally, A. V.; Varga, J. L.; Zarandi, M.; Szepeshazi, K.; Armatis, P.; et al. *Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone, hormone-releasing, hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice*. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11,49-57.
60. Heuser, M.; Schlott, T.; Schally A. V.; Kahler, E.; Schliephake, R.; Laabs, S. O.; et al. *Expression of gastrin releasing peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion*. *J. Urol.* 2005; 173:2154-9.
61. Stangelberger, A.; Schally, A. V.; Letsch, M.; Szepeshazi, K.; Nagy, A.; Halmos, G.; et al. *Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 inhibits growth of experimental human prostate cancers*. *Int. J. Cancer* 2005; resumen electrónico anterior a la publicación.
62. Reubi, J. C.; Wenger, S.; Schmuckli-Maurer, J.; Schaer, J. C.; Gugger, M. *Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14)*. *Clin. Cancer Res.* 2002 Apr; 8(4):1139-46.



63. Arteaga de Murphy, C.; Ferro-Flores G. *Compuestos de Tecnecio*. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. INCMNSZ. ISBN 968-6499-40-7. México, 2003.
64. Gali, H.; Hoffman, T. J.; Sieckman, G. L.; Owen, N. K.; Katti, K. V.; Volkert, W. A. *Synthesis, characterization and labeling with  $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$  of peptide conjugates containing a dithia-biphosphine chelating agent*. *Bioconjug. Chem.* 2001; 12:354-63.
65. La Bella, R.; Garcia-Garayoa, E.; Langer, M.; Blauenstein, P.; Beck-Sickinger, A. G.; Schubiger A. *In vitro and in vivo evaluation of a  $^{99m}\text{Tc}(1)$ -labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors*. *Nucl. Med. Biol.* 2002; 29:553-60.
66. Varvarigou, A.; Scopinaro, F.; Leondiadis, L.; Corleto, V.; Schillaci, O.; De Vincentis, G.; et al. *Synthesis, chemical, radiochemical and radiobiological evaluation of a new  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled bombesin-like peptide*. *Cancer. Biother. Radiopharm.* 2002; 17: 317-26.
67. Ferro-Flores, G.; Ramírez, F.; De, M.; Meléndez-Alafort, L.; Arteaga de Murphy, C.; Pedraza-López, M. *Molecular recognition and stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -UBI (29-41) based on experimental and semiempirical results*. *Appl. Radiat. Isot.* 2004; 61: 1261-8.
68. Faintuch, B. L.; Santos, R. L. S. R.; Souza, A. L. F.; Hoffman, J.; Greeley, M.; Smith, C. J.  *$^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-bombesin (7-14)NH<sub>2</sub>: Radiochemical evaluation with coligands EDDA (EDDA=ethylenediamine-N,N`-diaetic acid), tricine and nicotinic acid. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-organic and Nano-Metal Chem.* 2005; 35:43
69. Chen, X.; Ryan, P.; Hou, Y.; Tohme, M.; Shahinian, A. H.; Bading, J.; Conti, P. *MicroPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]Bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts*. *J. Nucl. Med.*, 2004; 45: 1390-7.
70. Ferro-Flores, G.; Murphy, C. A.; Pedraza, L. M.; Monroy-Guzmán, F.; Meléndez, A. F.; Tendilla, J. L.; Jiménez, V. R. *Labelling of Biotin with [ $^{166}\text{Dy}$ ]Dy/ $^{166}\text{Ho}$  as a stable in vivo generator system*. *Int. J. Pharm.* 255(1-2): 129-138.



71. Kowalsky, R. J. *Radiopharmaceuticals in nuclear medicine*. Ed. Appleton and Lange, USA. 1991, pp. 1-180.
72. Remington. *Farmacía*. 17° Edición, Ed. Médica Panamericana. Argentina. 1989.
73. Gopal, B. Saha. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 3<sup>rd</sup> ed. Sringer-Verlag. New York. Inc. 1992, pp. 80-107.
74. *Nuclear medicine-factors influencing the choice and use of radionuclides in Diagnosis and therapy (1982)*. National Council on Radiation Protecting and Measurements. Report No. 70.
75. Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. (1987). *Radiobiologic implications of the microscopy distribution of energy from Radionuclides*. *Nucl. Med. Biol. Int. J. Radiat, Appl. Inst. [B]*. 14:165-169.
76. Makrigiorgod, G. M.; Adelstein, S. J.; Kassis, A. I. (1989). *Limitations of conventional internal dosimetry at targeted cellular level*. *J. Nucl. Med.* 30:1856-1864.
77. Mitta, A. E. A.; Robles, A. M.; *Manual de control de calidad de radiofármacos*. Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear. (ALASBIMN), Montevideo.
78. Volkert, W. A. et al. (1991) *Therapeutic radionuclides: production and decae property considerations*. *J. Nucl. Med.* 32:175-185.
79. *Pharmacopeia USP XXI*. 16° Ed. US. *Pharmacopeical Convention inc.* 1985.
80. *Guías de validación de métodos analíticos*. Colegio Mexicano de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
81. *Cromatografía de líquidos de alta resolución*. Universidad Autónoma Metropolitana, división de Ciencias Biológicas y de la salud. México. Pp. 44-45.
82. (1)Baidoo, K. E.; Lin, K. S.; Zhan, Y.; Finley, P.; Scheffel, U.; Wagner, H. N. *Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesina analogues*. *Bioconjugate Chem.*, 1998; 9:218-225.



83. La Bella, R.; Garcia-Garayoa, E.; Langer, M.; Bläüenstein, P.; Beck-Sickinger, A. G.; Schubiger, P. A. *In vitro and in vivo evaluation of a  $^{99m}\text{Tc}$ (I)-labeled bombesina analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. Nucl. Med. Biol.* 2002; 29:553-560.
84. Varvarigou, A. D.; Scopinaro, F.; Leondiadis, L.; Corleto, V.; Schillaci, O.; De Vicentis, G.; et al. *Synthesis, chemical, radiochemical and radiobiological evaluation of a new  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled bombesin-like peptide. Cancer Biother. Radiopharm.* 2002; 17:317-326.
85. Smith, J.C.; Gali, H.; Sieckman, G. L.; Hayes, D. L.; Owen, N. K., Mazuru, D. G.; et al. *Radiochemical investigations of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH<sub>2</sub>: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. Nucl. Med. Biol.* 2003; 29:101-109.
86. Chen, X.; Park, R.; Hou, Y.; Tohme, M.; Shahinian, A. H.; Bading, J. R.; et al. *MicroPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]Bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. J. Nucl. Med.* 2004; 45:1390-1397.
87. Ferro-Flores, G.; Arteaga de Murphy, C.; Ramírez, F. de M.; Pedraza-López, M.; Rodríguez-Cortés, J., Meléndez-Alafort, L. *Preparation and evaluation of third generation technetium radiopharmaceuticals. International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals. IAEA publication IAEA-CN-130. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2005, pp. 10-11.*
88. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea. 8° Ed. México.*
89. Scopinaro, F.; Varvarigou, A. D.; Ussof, W.; De Vicentis, G.; Sourlingas TG, Evangelatos GP, et al. *Technetium labelled bombesin-like peptide: preliminary report on breast cancer uptake in patients. Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17:327-335.
90. Scopinaro, F.; De Vicentis, G.; Varvarigou, A. D.; Laurenti, C.; Iori, F.; Remediani, S.; et al.  *$^{99m}\text{Tc}$ -bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003; 30:1378-1382.
91. Ferro-Flores, G.; Murphy, C. A.; Meléndez-Alafort, L. *Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy. Current Pharmaceutical Analysis.* 2(4):339-352 (2006).



## **Glosario**



## Glosario

**Impureza radioquímica:** Las impurezas radionucleídicas pueden presentarse como resultado del proceso de producción del radionucleído, ya sea por impurezas presentes en el blanco a irradiar, reacciones secundarias producidas en el blanco o subproductos de decaimiento.

**Isotonicidad:** Una solución es isotónica, con respecto al suero sanguíneo o al medio en el que se encuentra, cuando su concentración osmótica es igual a la de éste sin causar efecto tóxico en las células, para mantener la integridad de los tejidos.

**Pirógenos:** Son endotoxinas, productos del metabolismo de los microorganismos. Su presencia en soluciones inyectables trae como consecuencia una reacción febril poco después de haber sido inyectada.

**Pureza química:** Se define como la fracción de la masa total presente en una forma química específica. Puede referirse tanto a la sustancia de la que forma parte el radionucleído, como también a los reactivos usados en la formulación del radiofármaco.

**Pureza radioquímica:** Se define como la proporción del radionucleído presente en la forma química dada.

**Radiofármaco:** 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 ó terapéuticos [1].