



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

46
Mj

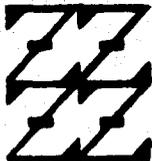
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DEL NUCLEO - EQUIPO $99mTc$ - Ig G
HUMANA PARA LA DETECCION " IN VIVO " DE
PROCESOS INFLAMATORIOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
MARTHA PEDRAZA LOPEZ

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO HUBIERO CAS
DE MONTEA DELERIOS

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. GUILLERMINA FERRO FLORES

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El Presente trabajo se realizó en el Departamento del Reactor y Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, bajo la dirección de la Q.F.B. Guillermina Ferro Flores, en colaboración con el Departamento de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de Pediatría.

Fungiendo como asesor interno la Q.F.B. Patricia Parra Cervantes de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM.

A DIOS.

*Le doy gracias por haberme permitido
lograr una de mis metas en esta vida.*

A MIS PADRES.

*Dedico con mucho cariño este trabajo,
ya que es resultado de la confianza y
apoyo que siempre me han brindado.*

A MIS HERMANOS.

*Por que continien superándose hasta
alcanzar sus metas.*

A MIS AMIGOS.

*Por su valiosa amistad y apoyo que me
han dado siempre.*

AGRADECIMIENTOS

Con gran afecto y admiración, expreso mi especial agradecimiento a la Q.F.B. Guillermina Ferro Flores, por compartir conmigo su tiempo y experiencia, además de haber dirigido este trabajo.

Agradezco la colaboración y valiosa ayuda de la Q.F.B. María Antonia González Zavala del Departamento de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de Pediatría.

Por su colaboración y amable disposición, mi reconocimiento a la Q.F.B. Patricia Parra Cervantes.

Al jurado Q.F.B. Margarita Guzman Arellano

Q.F.B. Guillermina Ferro Flores

Q.F.B. Patricia Parra Cervantes

Q. Francisco Silva Flores

Q.F.B. Ramon Soto Vázquez

Les agradezco todas sus correcciones y sugerencias para conseguir que este trabajo alcanzara una calidad satisfactoria.

Gracias también al personal de Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, que de alguna forma colaboró en la realización de esta Tesis, especialmente al personal del Departamento del Reactor y Materiales Radiactivos por su valiosa ayuda.

ABREVIATURAS

CCFI	Cromatografía en Capa Fina Instantánea
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
c.p.m.	Cuentas por minuto
CV	Coefficiente de variación
EHDP	Etanol-1-hidroxi-1,1-difosfato
HR	Humedad residual
HSA	Seroalbúmina humana
Ig G	Inmunoglobulina G
KeV	Kilo electrón volt (10^3 eV ó 1.6×10^{-16} Joules)
LAL	Lisado de amebocitos de limulus
MBq	Megabecquerels
mCi	Millicurie
Mo	Molibdeno
PR	Pureza radioquímica
r	Coefficiente de correlación
r.p.m.	Revoluciones por minuto
^{99m}Tc	Tecnecio 99 metaestable
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Pertecneciato
UV	Ultravioleta

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
1.1 RADIOFÁRMACOS	3
1.1.1 Definición de radiofármaco	3
1.1.2 Objetivos de los radiofármacos	3
1.1.3 Características de los radiofármacos	4
1.1.4 Clasificación de los radiofármacos	5
1.1.5 Radiofármacos para estudios en medicina nuclear	5
1.1.6 El tecnecio en la medicina nuclear	8
1.1.7 Producción de núcleo-equipos de ^{99m}Tc	9
1.1.8 Control de calidad de radiofármacos	13
1.2 MONOGRAFÍA DEL INGREDIENTE ACTIVO	20
1.3 LIOFILIZACIÓN	23
1.3.1 Definición de liofilización	23
1.3.2 Aplicaciones, ventajas y desventajas	23
1.3.3 Objetivos de la liofilización	24
1.3.4 El proceso de liofilización	25
1.4 VALIDACIÓN	29
1.4.1 Definición de validación	29
1.4.2 Definición de parámetros	29
1.5 ESCINTIGRAFÍA	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. OBJETIVOS	33
4. HIPÓTESIS	34

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
5.1 MATERIALES Y REACTIVOS	35
5.2 EQUIPO.....	36
5.3 MÉTODOS	36
5.3.1 Identificación de la gammaglobulina humana	36
5.3.2 Validación de la cuantificación de la Ig G mediante CLAR y espectrofotometría U.V.	37
5.3.3 Formulación del núcleo-equipo liofilizado	39
5.3.4 Escalamiento del tamaño de lote	42
5.3.5 Elección del ciclo de liofilización.....	43
5.3.6 Control de calidad del núcleo-equipo.....	44
5.3.7 Estudio de estabilidad del núcleo-equipo.	46
5.3.8 Estudios de distribución biológica	47
5.3.9 Formulación del núcleo-equipo Ig G humana.	47
6. RESULTADOS	48
6.1 Cromatograma de la gammaglobulina humana.....	48
6.2 Control de calidad radioquímico	49
6.3 Curva de calibración para proteínas en el U.V.....	50
6.4 Validación de la cuantificación de gammaglobulina mediante CLAR.....	51
6.5 Validación de la cuantificación de gammaglobulina mediante espectrofotometría U.V.....	55
6.6 Formulación del núcleo-equipo liofilizado.....	59
a) Elección del agente reductor	59
b) Elección del ligante	61
6.7 Escalamiento del tamaño de lote	64
6.8 Radiomarcado y estabilidad del complejo ^{99m}Tc -Ig G.....	67
6.9 Elección del ciclo de liofilización.....	70
6.10 Estudio de estabilidad del núcleo-equipo.....	71
6.11 Estudios de distribución biológica.....	73
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	74
8. CONCLUSIONES	78
9. BIBLIOGRAFÍA.....	79
10. ANEXO.....	83

INTRODUCCIÓN

Un absceso es un área localizada de pus y tejido destruido formado por la respuesta inflamatoria. Por lo general éste contiene bacterias patógenas y si no es tratado llega a ser una grave amenaza para el paciente. La localización de un absceso, es a menudo un problema clínico difícil, pero ya que es una acumulación focal de leucocitos, el marcaje de éstos con un emisor gamma hace posible que puedan detectarse externamente con una gamma cámara. Sin embargo, esta técnica implica separar leucocitos autólogos, marcarlos "in vitro" y reinyectarlos al paciente. Este método tiene como principal desventaja la necesidad de contar con una campana de flujo laminar y materiales estériles no siempre disponibles en todos los departamentos de medicina nuclear. Por otro lado, se ha comprobado que la inmunoglobulina G (Ig G) humana radiomarcada, es efectiva para la localización de una gran variedad de organismos infecciosos incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pneumocystis carini*, *Histoplasma capsulatum* y *Candida albicans*. El objetivo de este trabajo fue, por tanto, desarrollar una formulación liofilizada (núcleo-equipo) de Ig G humana para su marcado instantáneo con Tc-^{99m} de tal forma que puedan detectarse procesos inflamatorios y/o infecciosos con la simple inyección del radiofármaco al paciente.

Para el cumplimiento de tal objetivo, la gammaglobulina humana se redujo empleando 2-mercaptoetanol o ácido ascórbico con el fin de separar los puentes disulfuro para poder enlazar el Tc-^{99m} a grupos sulfhidrilo. La solución resultante se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) empleando una columna de exclusión molecular y eluyendo con buffer de fosfatos. La Ig G purificada se colectó y cuantificó mediante espectrofotetría de U.V. y CLAR con detector de U.V. Posteriormente se formuló

empleando un diseño de experimentos de bloques aleatorios para la selección del ligante débil, concentración de estaño y selección del agente reductor. Finalmente se determinó el ciclo de liofilización para la formulación seleccionada.

A la formulación liofilizada se le realizaron pruebas cromatográficas (CLAR y CCFI) para la determinación de la pureza radioquímica, pruebas de esterilidad, humedad, contenido de proteína y de estabilidad acelerada a 37 °C. Todas las técnicas analíticas fueron debidamente validadas.

Dado que la Ig G humana tiene el mismo comportamiento químico que la Ig G de conejo, se realizaron formulaciones de esta última bajo las condiciones previamente descritas. Dichos núcleo-equipos se administraron en 2 conejos a los que se les habían inducido previamente un absceso y se tomaron imágenes gammagráficas.

Los resultados mostraron que la ^{99m}Tc -Ig G humana se obtuvo estéril y con una pureza radioquímica superior al 90 %. Con dicho radiofármaco fue posible obtener imágenes de abscesos en conejos.

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1 RADIOFÁRMACOS

La medicina nuclear y la radiofarmacia son dos disciplinas que, firmemente unidas en sus principios, logran junto con otros campos de investigación un noble objetivo dedicado al mejoramiento de la salud de la humanidad.

En 1920 George Hevesy⁽²⁰⁾, creó el principio de los trazadores radiactivos, lo que en 1927, elucidó el inicio del dinamismo de los componentes orgánico que revolucionó a la bioquímica básica y que posteriormente se tradujo en la medicina nuclear.

Debido a la necesidad de sintetizar moléculas marcadas de mejores características químicas, biológicas y nucleares, nace la RADIOFARMACIA, que en medicina nuclear lleva por objetivo la producción y uso de compuestos radiactivos para el diagnóstico y terapia de importantes enfermedades diseminadas en la población mundial.

1.1.1 DEFINICIÓN DE RADIOFÁRMACO

Toda sustancia química conteniendo un átomo radiactivo dentro de su estructura que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, se administra en humanos con propósitos de diagnóstico y/o terapéuticos.

1.1.2 OBJETIVOS DE LOS RADIOFÁRMACOS

- a) Visualizar la anatomía de un órgano o sistema.
- b) Evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de los tejidos.
- c) Analizar, a través de su metabolismo, el comportamiento bioquímico.

- d) Determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos comparando estos resultados con los obtenidos en una población de seres humanos voluntarios.

1.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS RADIOFÁRMACOS

Como se ha dicho, un radiofármaco está constituido por un radionúclido integrado en un fármaco, eligiéndose al primero de acuerdo a sus características nucleares como son tiempo de vida media, energía de emisión, tipo de radiación emitida, toxicidad y disponibilidad. El fármaco se elige de acuerdo a su selectividad orgánica y/o participación en un proceso fisiológico, factibilidad de ser marcado con un radionúclido sin alterar sus propiedades biológicas y a su toxicidad.

Un radiofármaco presenta varias características:

- a) Salvo algunas excepciones, los radiofármacos son compuestos inyectables, por tanto, deben presentar las características de esta forma farmacéutica como atoxicidad, apirogenicidad, esterilidad, etc.
- b) Si ha de utilizarse para la obtención de imágenes, debe ser un emisor gamma puro.
- c) La actividad específica debe ser alta, con el fin de obtener un promedio de conteo alto en una masa pequeña.
- d) Idealmente debe ser soluble en agua y permanecer soluble al mezclarse con fluidos orgánicos, aunque existen algunos radiofármacos específicos donde la alta liposolubilidad es una característica importante para que el compuesto pueda cumplir la finalidad para la cual fue creado.
- e) Los radiofármacos deben ser estables tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo menos el tiempo mínimo para realizar el examen. Se prefiere que la estabilidad esté en función de la vida media del radionúclido.
- f) Debe permanecer como compuesto libre y unirse a proteínas o células al concentrarse en el órgano de interés.
- g) Un radiofármaco debe poseer una depuración sanguínea alta.
- h) Debe ser de bajo costo y fácil disponibilidad.

1.1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS RADIOFÁRMACOS

- a) Radiofármaco *sustrato no específico*: permite el estudio de ciertos procesos fisiológicos y tienen la característica de no participar en reacciones químicas del organismo.
- b) Radiofármacos *sustrato específico*: participan en una reacción química definida o toman parte de una interacción ligando-sustrato específico, siendo esta reactividad debida a la analogía con los sustratos metabólicos naturales.

Definir el mecanismo específico de la localización de un radiofármaco conduce a una mayor comprensión de la información obtenida al utilizarlos como agentes de diagnóstico, esta información puede estar en desacuerdo con lo esperado debido a factores físicos como la ruta de inyección, la temperatura y pH celular del paciente o a factores químicos como la interacción con otros fármacos.

Actualmente también se clasifican a los radiofármacos como *ANIONICOS*, *CATIONICOS*, *NEUTROS* y *BIFUNCIONALES*. Una molécula bifuncional es aquella que tiene una porción biológicamente activa y otra a través de la cual es capaz de unirse a un radionúclido metálico.

1.1.5 RADIOFÁRMACOS PARA ESTUDIOS EN MEDICINA NUCLEAR

En Medicina Nuclear existe un constante desarrollo para el diseño de nuevos radiofármacos del Tecnecio- 99m , el yodo-131 y otros isótopos, así como la obtención de biomoléculas y células radiomarcadas. Entre los radiofármacos más recientes podemos mencionar que existen agentes óseos, agentes hepatobiliares, agentes cerebrales, agentes cardíacos y agentes renales.

1.1.5.1 BIOMOLECULAS RADIOMARCADAS

Marcación de proteínas: el fibrinógeno marcado con ^{125}Y , es utilizado para la localización de trombos activos, de esta forma puede prevenirse en un paciente una embolia. Otra proteína importante y recientemente empleada es la gaminaglobulina humana marcada con

^{99m}Tc o ^{111}In , este compuesto se emplea para la obtención de imágenes de procesos inflamatorios, también se pueden detectar procesos inflamatorios realizando un marcado *in vivo* de leucocitos. En 1977 Thakur⁽²⁴⁾ publicó el primer reporte de marcado de leucocitos con ^{111}In para la localización de abscesos. Desde entonces, han surgido brillantes técnicas que han mejorado el proceso de obtención de células radiomarcadas; esto debido a la gran expectativa que se ha creado en torno al marcado de células de una forma rápida, sencilla y eficiente para poder realizarlo rutinariamente. M. L. Thakur et al., en 1991⁽⁵⁾ reporta el desarrollo de una técnica que permite el marcado de proteínas con ^{99m}Tc dando altos rendimientos y conservando la inmunoreactividad del anticuerpo; en 1989 D. Blok et al.,⁽⁶⁾ describe un método para el marcado de proteínas con ^{99m}Tc , considerado el radionúclido de elección para el diagnóstico en la medicina nuclear.

Desde 1987, casi todas las técnicas para la preparación de anticuerpos radiomarcados, están encaminadas al uso del ^{99m}Tc con la finalidad de obtener núcleo-equipos para el marcado de dichas proteínas.

1.1.5.2 MARCADO CON ^{99m}Tc

En la bibliografía existe un gran número de artículos reportando métodos para el marcado directo de anticuerpos mediante cambios de pH, buffers, agentes reductores, etc. Sin embargo, existe un pobre conocimiento del mecanismo de marcaje y ello se refleja en la obtención de proteínas marcadas muy inestables. En este tipo de marcajes se encuentra una excesiva acumulación de radiactividad en hígado (formación de coloide), tiroides, estómago e intestino.

El método para el marcado de anticuerpos es directo, por la reducción de los puentes disulfuro de la proteína utilizando 2-Mercaptoetanol, esta técnica fue desarrollada en 1987 por Schwarz et al.,⁽²⁶⁾ El anticuerpo intacto es tratado con 2-mercaptoetanol (Fig. 1). Los puentes disulfuro son convertidos en grupos tiol libres y, en presencia de un ligante débil para llevar a cabo un intercambio de ligantes, se forma un complejo estable de ^{99m}Tc anticuerpo formando enlaces $^{99m}\text{Tc-S-}$. En 1992 Z. M. Zhang et al.,⁽⁸⁾ publicó que la IgG

puede ser marcada con ^{99m}Tc por una prereducción de anticuerpo con 2-mercaptoetanol, para la reducción del pertecneiato se utilizó una alícuota de estaño, demuestran que se puede obtener un eficiente marcado con una variedad de ligantes débiles y que la cantidad óptima de cloruro estanooso es de 2 a 4 μg . Esta técnica es simple reproducible y garantiza una buena evaluación clínica.

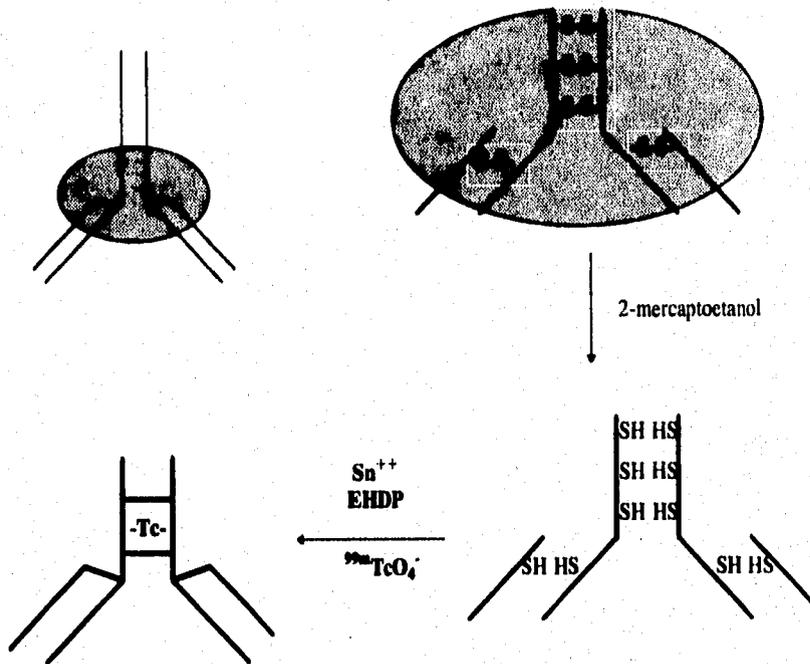


Fig. 1 Marcate de anticuerpos mediante la unión directa del ^{99m}Tc a los puentes disulfuro reducidos del anticuerpo en presencia de un ligante débil.

1.1.6 EL TECNECIO EN LA MEDICINA NUCLEAR

El tecnecio (del griego "technetos" = artificial) fue aislado en 1937 por C. Perrier y E. Segré⁽²⁵⁾, al irradiar molibdeno en el ciclotrón de Berkeley, California. En la actualidad se conocen más de 16 isótopos y seis isómeros nucleares, por supuesto todos radiactivos, con masas de 92 a 107 y vidas medias que oscilan entre cinco segundos para el 103 y 2.6 millones de años para el 97.

TECNECIO - 99

- No. atómico 43, No. másico 99, No. neutrónico 56.
- Metal de transición del grupo VII B de la tabla periódica, entre el manganeso y el renio: su comportamiento químico es más semejante al del renio: forma aniones estables (pertechnetato), sales y heptasulfuros insolubles.
- No. de oxidación: -1, +1, +2, +3, +4, +5, +6 y +7.
- Configuración electrónica: (Kr) $4d^5 5s^2$.
- No. de coordinación: 4 a 10.

TECNECIO - 99m

- Es el radionúclido más utilizado en todos los laboratorios de radiofarmacia del mundo, emite radiaciones gamma de 140 Kev (90%) y su tiempo de vida media física es de seis horas. Se utiliza en forma de pertechnetato y en estado reducido se une a muchas sustancias (radiofármacos). Se utiliza en soluciones nanomolares, 1 mCi (37MBq) representa 0.19 ng de peso.
- Actividad específica: 5300 millones de mCi/g.
- Obtención: Es relativamente fácil por los generadores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. El término "generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ " se refiere al sistema de los dos radionúclidos, que permite la separación del radionúclido hijo, en forma de pertechnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), al hacer pasar solución salina a través de una columna de alúmina que adsorbe fuertemente al molibdeno. Al proceso de extracción se llama elución y a la solución que arrastra al pertechnetato se le llama eluido o eluato. La manipulación del generador se debe

efectuar siguiendo los lineamientos de un programa que garantice la calidad del pertecneciato eluido.

VENTAJAS DEL ^{99m}Tc EN MEDICINA NUCLEAR

- Es de fácil obtención : Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.
- Tiempo de vida media física corto (6 horas).
- La energía de las radiaciones gamma es de 140 Kev, fácilmente detectadas y proporcionan imágenes de alta calidad (monoenergético).
- Desintegración por transición isomérica sin radiaciones beta, por lo que se pueden administrar dosis relativamente altas para efectuar estudios clínicos en menos tiempo y con menor tiempo de exposición.
- Se obtiene como pertecneciato, máximo estado de oxidación (7+).
- En forma reducida ($^{99m}\text{Tc}^{4+}$) se une a los radiofármacos, realizándose dicha reducción, por medio de técnicas relativamente sencillas (la más común con Sn^{2+}).
- Las cantidades en mCi empleadas permiten hacer estudios dinámicos y cinéticos.

1.1.7 PRODUCCIÓN DE NÚCLEO-EQUIPOS DE ^{99m}Tc

Un núcleo-equipo de ^{99m}Tc es simplemente un vial de reacción estéril que contiene reactivos químicos no-radiactivos liofilizados, requeridos para producir un radiofármaco para un estudio clínico específico después de que se le hace reaccionar con un eluato de ^{99m}Tc -pertecneciato. Las sustancias químicas primarias en un núcleo-equipo son el ligante y el agente reductor (por lo general cloruro estanoso), y las sustancias químicas secundarias son estabilizadores y agentes dispersantes.

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. Esta solución ligante-estaño se ajusta a un pH 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}Tc se prepara por simple adición de eluato de pertechnetato en solución salina ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) al núcleo-equipo disolviendo el polvo liofilizado. Al realizar esta mezcla se lleva a cabo las siguientes reacciones químicas en solo unos minutos: el estaño reduce al pertechnetato, éste, en un estado de oxidación menor es capaz de unirse al ligante formándose el radiofármaco deseado (fig. 2).

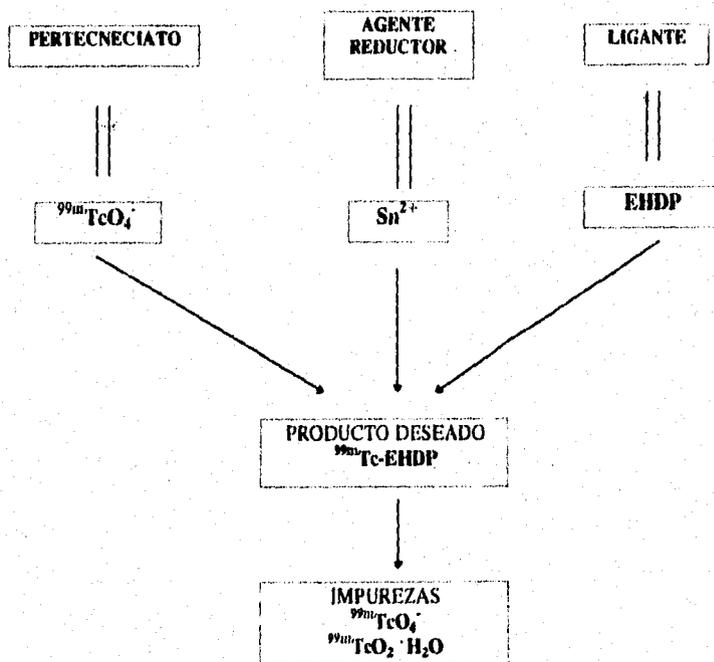
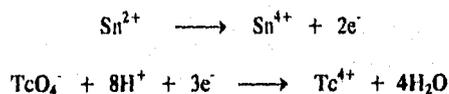


Fig. 2 Reacciones químicas que se llevan a cabo en un núcleo-equipo instantáneo durante el radiomarcado con ^{99m}Tc .

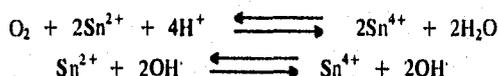
Sin embargo el grado de reducción dependerá de:

- El oxígeno presente.
- La relación estequiométrica Sn/Tc.
- Las condiciones en que se lleve a cabo la reacción.
- La presencia de un ligante.
- La naturaleza química del ligante.

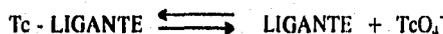
IMPUREZAS FORMADAS EN LA PREPARACIÓN DE RADIOFÁRMACOS DE ^{99m}Tc :

- La presencia de oxígeno y radicales libres pueden provocar que en la preparación quede pertecneciato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) como impureza; ya que se distribuye biológicamente en mucosas y pueden verse imágenes de estómago e intestino cuando no son deseadas, en una solución saturada con oxígeno será mayor la cantidad de Sn^{2+} que se necesite para efectuar la reducción.

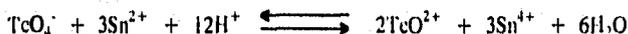
En presencia de oxígeno, el SnCl_2 se oxida y no reduce al $^{99m}\text{TcO}_4^-$



- La descomposición radiolítica del complejo de tecnecio reducido puede ocurrir por la interacción de especies de radicales libres (RO) con el complejo, por un mecanismo no definido:



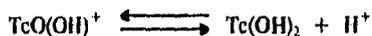
- Otra impureza sería la presencia de tecnecio reducido hidrolizado que se caracteriza por la formación de un coloide insoluble que se distribuye a bajo e hfgado. Esta reacción es favorecida por valores de pH cercanos a la neutralidad y por una baja concentración de ligante:



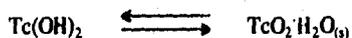
El TcO^{2+} es un catión divalente que se une en mayor proporción al ligante



El $\text{TcO}(\text{OH})^+$ es un catión monovalente que se une poco al ligante

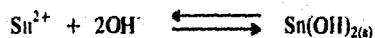


El $\text{Tc}(\text{OH})_2$ es una especie neutra que no entra en compuestos de coordinación



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

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



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

1.1.8 CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFÁRMACOS

1.1.8.1 CONTROLES FÍSICOS

a) *Características organolepticas*

Todo inyectable debe estar libre de partículas visibles a simple vista, con iluminación puntual de lámpara de tungsteno y fondo blanco y negro. Con respecto a la aparición de turbidez, se considera que una solución inyectable debe ser clara y límpida a excepción de las suspensiones coloidales, microagregados, macroagregados y microesferas. El control se implementará por observación directa utilizando un vidrio plomado o indirectamente a través de un espejo.

b) *Tamaño y número de partículas.*

Se consideran dos tipos de partículas en suspensión: a) Coloide y b) Macroagregados, microagregados y microesferas. Dependiendo del grupo de partículas en suspensión se pueden usar distintos métodos, por ejemplo: para coloides, podemos mencionar pasaje a través de membranas, microscopía electrónica o filtración en gel. Para macroagregados, microagregados o microesferas basta con un microscopio de buena resolución y una cámara cuenta glóbulos.

1.1.8.2. CONTROLES RADIONUCLEÍDICOS

a) *Determinación de la actividad*

La actividad de los radiofármacos emisores gamma se mide generalmente en una cámara de ionización. La cámara debe ser calibrada con un estándar adecuado, de actividad conocida y con las mismas características geométricas del radiofármaco. La estabilidad de respuesta del sistema de medición, se comprueba diariamente con un estándar de ^{60}Co , ^{59}Co , u otro isótopo conocido de período de semidesintegración largo.

También puede utilizarse un contador Geiger Muller de ventana delgada, comparando la actividad medida de la muestra con la de un patrón del mismo isótopo de actividad

conocida. Muestra y patrón se preparan en las mismas condiciones con el fin de minimizar los errores por diferencias de geometría, autoabsorción.

b) Concentración de actividad

La actividad frecuentemente se expresa relacionándola con la medida volumétrica o de masa. Se expresa referida al día y hora en que se efectúa la medición.

c) Pureza radionucleídica

Se define como la proporción de la actividad total, que se debe al radionucleído específico. Las impurezas radionucleídicas pueden presentarse como resultado de producción del radionucleído, ya sea por impurezas presentes en el blanco a irradiar, reacciones secundarias producidas en el blanco o subproductos de decaimiento.

Cuando el período de semidesintegración de la impureza es mayor que el del radionucleído de interés, el problema se acentúa, pues en este caso la pureza radionucleídica disminuirá con el tiempo.

El control de la pureza radionucleídica es importante para asegurar que la biodistribución es característica del nucleído en cuestión y no influenciada por alguna impureza y también para minimizar la radiación absorbida por el paciente.

La pureza radionucleídica se determina en el isótopo primario, el que será incorporado a diferentes moléculas. Generalmente el proveedor especifica las impurezas cuantitativamente detectables, indicando los límites de detección.

Determinación de la pureza radionucleídica.

Se lleva a cabo analizando la energía y el tipo de las radiaciones emitidas por la muestra. Cuando se trata de radiación gamma el análisis se realiza por espectrometría gamma o atenuación gamma.

1.1.8.3 CONTROLES QUÍMICOS

a) *Determinación de pH*

Se utilizan los métodos tradicionales como:

- Medidor de pH.
- Papel indicador de pH, de rango adecuado.

Todos los radiofármacos deben tener concentración de iones hidrógeno o pH adecuado para asegurar su estabilidad. El pH 7.4 sería el ideal para un radiofármaco, sin embargo, esto no es crítico y puede variar entre 1.5 y 9.0 debido al alto poder regulador de la sangre y a los pequeños volúmenes de radiofármacos que se administran.

b) *Determinación de fuerza iónica*

Es otro de los factores importantes en la estabilidad de un radiofármaco. Cuando se desea diluir una solución, debe utilizarse preferentemente el mismo solvente de la solución original, especialmente cuando se trata de suspensiones coloidales, dado que al añadir un electrólito pueden producirse agregados del coloide.

1.1.8.4 CONTROLES RADIOQUÍMICOS

a) *Pureza radioquímica*

Se define como la proporción del radionucleido presente en una forma química dada. Tanto la preparación como la purificación de un radiofármaco influyen en su pureza radioquímica. Las impurezas pueden aparecer debido a la descomposición parcial del compuesto, al medio de preparación, concentración de actividad, temperatura y tiempo de almacenamiento.

Los radiofármacos pueden existir como simples soluciones de un solo componente o mezclas más complejas. Para determinar la pureza radioquímica de ellos, es necesario separar los componentes radiactivos del sistema, utilizando métodos sencillos y rápidos como son: cromatografía en papel, CLAR, cromatografía en capa delgada, electroforesis, y filtración en gel, etc.

1.1.8.5 CONTROLES BIOLÓGICOS

a) *Esterilidad*

Se define como tal, la ausencia de toda forma de microorganismos viables.

Todo medicamento que requiere ser administrado por vía intravenosa, necesita cumplir estrictamente con las pruebas de esterilidad, ya que de esta manera se está asegurando de no introducir en el paciente microorganismos al torrente sanguíneo que traería consecuencias lamentables. También el usuario debe tomar precauciones, (técnicas asépticas) en el momento de utilizar el radiofármaco, especialmente en aquellos frascos multidosis los cuales pueden usarse sólo un corto período de tiempo.

Existen varios métodos de esterilización, aplicándose unos u otros, según la naturaleza de la sustancia a esterilizar, por ejemplo:

- Calor húmedo.
- Calor seco.
- Filtración.
- Irradiación gamma.

De acuerdo a la farmacopea, el control de la esterilidad puede realizarse en 3 medios de cultivo: caldo simple o nutritivo, caldo con tioglicolato y medio de Sabouraud.

b) *Toxicidad*

El estudio de toxicidad tiene por objeto excluir la posibilidad de que el radiofármaco resulte tóxico para el paciente, debido a una eventual contaminación química con alguna sustancia nociva manipulada durante el proceso de producción.

Existen por lo menos 3 fuentes esenciales de toxicidad en los radiofármacos: radiotoxicidad, toxicidad química de los componentes no radiactivos y toxicidad de los excipientes.

En la práctica el ensayo de toxicidad se realiza en lotes de 5 ratones de 20 - 30 gramos de peso. Se les inyecta en la vena caudal con 0.1 - 0.2 mL de la solución sin diluir en un tiempo no mayor a 5 segundos. Se esperan 6 horas no debiendo morir ningún animal. Si muere uno o más ratones se repite el ensayo con otro lote de 5 ratones los cuales se

observan durante 24 horas. La actividad inyectada por kg. de peso debe ser 100 - 500 veces la dosis usada en humanos.

c) Isotonicidad

Una solución es isotónica, cuando su concentración osmótica es igual a la del suero sanguíneo sin provocar alteraciones químicas o biológicas en éste y/o en sus componentes. En soluciones inyectables por vía subcutánea o intramuscular, es conveniente usar soluciones isotónicas para mantener la integridad de los tejidos.

El control de la isotonicidad se realiza por descenso crioscópico, por descenso de la presión de vapor o por conductimetría, éste último presenta la ventaja de poder trabajar con microgotas, especialmente cuando se trabaja con soluciones activas.

d) Pirógenos

Los pirógenos son endotoxinas, producto del metabolismo de los microorganismos, que no se eliminan por una esterilización convencional. 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 en un animal homotermo, provocando variación de temperatura basal.

La presencia de pirógenos se determina por el procedimiento descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, modificando solamente el volumen a inyectar.

Se utilizan tres conejos sanos adultos, que no pesen menos de 1500 g. cada uno. Previo ayuno de 4 horas, se les toma la temperatura rectal, que no debe variar en más de 1 °C entre ellos, además no pueden utilizarse animales cuya temperatura basal sea superior a 39.8 °C; También es importante el control de ambientación, frecuencia de uso y dieta de los animales. Generalmente, se inyectan 0.25 a 0.50 mL de la solución de controlar, en la vena marginal de la oreja de cada conejo. Antes de 30 min. post-inyección, se controla nuevamente la temperatura, repitiendo este control cada hora, durante tres horas.

El volumen a inyectar, depende de la concentración de actividad del material que se controla. Este debe ser por lo menos equivalente a la dosis por kilogramo de peso

utilizada en humanos. En la práctica, se inyecta 3 a 5 veces la dosis humana, para tener de esta manera un alto factor de seguridad.

También se puede determinar la presencia de pirógenos utilizando un método *in vitro* de la prueba de Limulus. Este método se basa en la formación del gel o precipitado de ciertas proteínas del Lisado de Amebocitos, cuando este se incuba bajo condiciones asépticas (37 °C pH = 6.8 y tiempo 1 hr.) con una solución que contenga endotoxinas. Su ventaja es su mayor sensibilidad, la cual es seis veces superior al ensayo *in vivo*.

e) *Distribución biológica*

Debido a la necesidad de contar con datos estimativos de la localización biológica de un compuesto radiofarmacéutico, como un instrumento de seguridad antes de ser inyectado a un paciente, se efectúan controles de biodistribución en animales de laboratorio, dichos estudios no son extrapolables a los humanos pero sí ofrecen un buen modelo biológico en el comportamiento de los radiofármacos.

Durante la etapa de desarrollo e investigación de un nuevo radiofármaco, se realiza el estudio de afinidad biológica refiriendo la actividad en cada uno de los órganos y en sangre total a la dosis inyectada.

1.1.8.6 ESTABILIDAD

Debido a la gran variedad estructural de los compuestos usados como radiofármacos, se pueden esperar varios tipos de descomposición, siendo los principales hidrólisis, oxidoreducción y autorradiólisis.

Además de la descomposición por procesos hidrolíticos y oxidativos, los radiofármacos ven disminuida su estabilidad debido a la acción de las radiaciones emitidas por ellos mismos, fenómeno conocido con el nombre de autorradiólisis. La descomposición por radiación depende de las características físicas del radiofármaco, siendo más alta para los isótopos de períodos de semidesintegración largo, emisores β , como el ^{14}C y ^3H debido a su total absorción dentro del conjunto mismo.

La limpieza del material con el cuál está en contacto el radiofármaco y la esterilidad son de considerar, ya que la proliferación de microorganismos en las soluciones puede alterar en forma notable la pureza radioquímica.

a) Estabilidad en núcleo-equipos

En radiofármacos marcados con radionucleídos de corto período de semidesintegración, se utilizan preferentemente los núcleo-equipos para marcación instantánea "in situ". En este caso la estabilidad del radiofármaco es altamente dependiente de la composición de su precursor al tiempo de marcación, ya que la vida útil del precursor no marcado es independiente del decaimiento radionucleídico. Es recomendable, por lo tanto, la elección de formulaciones que presentan la mayor resistencia a la degradación química. Dependiendo de la naturaleza del ligante precursor se pueden realizar pruebas de estabilidad en anaquel y/o aceleradas.

1.2 MONOGRAFÍA DEL INGREDIENTE ACTIVO

NOMBRE. *Ig G Humana. Inmunoglobulina purificada.*

PESO MOLECULAR. *150,000 g/mol.*

TIEMPO DE VIDA MEDIA BIOLÓGICA. *23 días.*

FUNCIÓN BIOLÓGICA. *Fija el complemento. Cruza la placenta. Anticuerpo heterocitotrópico*

RECEPTORES. *Linfocitos polinucleares y monocitos.*

USOS. La Ig G purificada puede ser usada como un antígeno de referencia estándar, un agente de inhibición o una proteína enzimática en una variedad de inmunoensayos; debido a que esta inmunoglobulina contribuye a la inmunidad contra muchos agentes infecciosos que se diseminan por vía sanguínea, incluyendo bacterias, virus, parásitos y algunos hongos, además en un proceso inflamatorio o infeccioso también hay acumulación de gamma-globulina, por esto algunos autores han reportado la obtención de imágenes de procesos inflamatorios con Ig G radiomarcada.⁽⁴⁾

DESCRIPCIÓN. La molécula de la inmunoglobulina Ig G, esta constituida por cuatro cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro (Fig 3). Dos de las cadenas son pequeñas, con pesos moleculares de 22,000 y se denominan cadenas ligeras⁽¹⁷⁾. Las otras dos, con pesos moleculares

de 55,000 se denominan cadenas pesadas. Cada molécula de inmunoglobulina tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas. El extremo aminoterminal está en la parte superior y el carboxiterminal en la parte inferior.

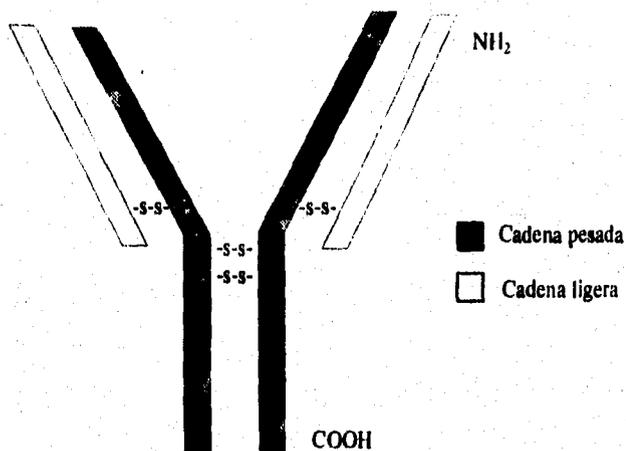


Fig. 3 Esquema de la Ig G humana que muestra la localización de los enlaces disulfuro entre las cadenas

OBTENCIÓN. La Ig G purificada es separada de suero humano normal por fraccionamiento y cromatografía de intercambio iónico este producto es suministrado como polvo blanco liofilizado (menos de 1 % de sodio).

HUMEDAD. 14 %.

- APARIENCIA.** Polvo blanco liofilizado.
- SOLUBILIDAD.** Solución turbia en una solución salina isotónica (50 mg/mL de solución salina isotónica).
- CONTENIDO DE PROTEÍNA.** 97 % por peso.
- IDENTIDAD.** Inmunoelectroforesis. Precipitación en una región y a 50 y 250 μg de inmunoglobina con antígeno de suero humano.
- PUREZA.** No menos del 95 %.
- PRUEBA A HIV.** Negativa.
- CONTENIDO DE SODIO.** Por emisión atómica 0.73 %

1.3 LIOFILIZACIÓN

En la industria química, una de las técnicas especiales de secado, es la liofilización, la cual tiene una aplicación limitada, pero dentro de ciertas limitaciones esta técnica puede proporcionar el mejor método a casos particulares de secado y por lo tanto la conservación de determinados alimentos, productos farmacéuticos y productos biológicos, como en el caso particular que tratamos de la gammaglobulina humana.

1.3.1 DEFINICIÓN DE LIOFILIZACION

La liofilización es un proceso de deshidratación basado en la propiedad que presenta el hielo de sublimar a bajas presiones lo que permite la desecación de productos de alto contenido de agua a temperaturas que no sobrepasan los 0 °C. Los productos liofilizados se identifican por su gran ligereza, y elevada porosidad.

1.3.2 APLICACIONES , VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Por sus especiales características, de todas las técnicas de deshidratación es la que posee una mayor gama de aplicaciones. Debe destacarse que es la única técnica ideada por el hombre que permite conservar VIDA, aunque sólo sea de seres unicelulares.

Aplicaciones: 1) **INDUSTRIA FARMACÉUTICA:**

Vitaminas, antibióticos, enzimas, productos farmacéuticos inyectables inestables en solución acuosa.

2) **INDUSTRIA DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS:**

Sueros terapéuticos, vacunas, plasma humano, derivados de la sangre .

3) **MEDICINA**

Bancos de tejidos (piel, córnea, hueso, arterias, venas, etc.)

4) **MICROBIOLOGÍA:**

Conservación de cepas de bacterias, hongos virus.

5) **INDUSTRIA ALIMENTARIA:**

Conservación de frutas, hortalizas, peces, mariscos, café, etc.

6) **MUSEOLOGIA:**

Conservación de insectos, pequeños mamíferos, peces, etc.

La liofilización presenta las siguientes ventajas:

- Ventajas:**
- 1) Mínimo daño a la estructura y textura del producto; al no intervenir calor en la deshidratación, no se provoca ningún tipo de alteración física (color, forma y apariencia).
 - 2) Máxima retención de las propiedades naturales del producto, el mantiene todas sus propiedades organolépticas.
 - 3) Mantención de las propiedades biológicas y químicas.
 - 4) Fácil reconstitución; gracias a la estructura porosa del producto el cual se disuelve instantáneamente al ser puesto en contacto con el agua.

Desventajas: No todo son ventajas cuando utilizamos la liofilización, también existen desventajas siendo estas:

- 1) Alto capital inicial.
- 2) Complejidad de la técnica.
- 3) Alto costo del proceso.
- 4) Necesidad de utilizar envases especiales.

1.3.3 OBJETIVOS DE LA LIOFILIZACIÓN

Esta es una técnica sofisticada y de alto costo y debe utilizarse cuando se requiera:

- 1) Conservar sin alteración de sus propiedades, productos que por su estructura compleja y alto contenido de agua, no puedan ser deshidratados, mediante métodos tradicionales.
- 2) Conservar alimentos, lográndose con ello:
 - a) Estabilidad de sus propiedades en el tiempo.
 - b) Baja de costo de transporte: evita el uso de la refrigeración, disminuye el peso y volumen por la eliminación del agua.
- 3) Modificar la estructura de ciertos fármacos, con objeto de mejorar su solubilidad, gracias a la característica de los productos liofilizados de presentar una gran superficie interna.

1.3.4 EL PROCESO DE LIOFILIZACION

Usualmente la liofilización es una operación discontinua; el congelamiento inicial puede ser llevado a cabo fuera del liofilizador o también puede ser obtenido por evaporación al vacío. El recipiente que contiene la sustancia a secar se sitúa dentro de una caja de vacío (método usado para secar gran cantidad de recipientes pequeños). Normalmente se eliminan los gases incondensables por bombeo, y el agua por condensación. Debe suministrarse calor a la sustancia para proveer el calor latente de vaporización, pero el flujo debe de ser lo suficientemente pequeño como para que la temperatura del material a secar se mantenga menor a 0 °C⁽¹²⁾.

Es importante durante el proceso de liofilización cada una de las siguientes etapas:

- a) Congelación.
- b) Secado primario, sublimación o propiamente liofilización.
- c) Secado secundario, desorción o secado isotérmico.

1.3.4.1 CONGELACIÓN

Es la más importante de las etapas, ya que de su buena realización depende:

- Toda la marcha posterior del proceso
- La calidad final del producto

Todo producto farmacéutico o biológico es una mezcla compleja de solutos y agua. Al bajar su temperatura a niveles inferiores a 0 °C, en su interior se desarrollan numerosas transformaciones que al completarse el proceso dan origen a la formación de una **MATRIZ** sólida que va a permitir la sublimación del producto, cuando se forma esta matriz, toda el **AGUA LIBRE** existente en el sistema estará congelada. Pero existe en el producto una parte del agua que está fijada a la superficie del sólido por fenómenos de adsorción y que no congelará sea cual sea la baja temperatura a la que se someta el producto y se conoce como **AGUA ADSORBIDA**.

Durante la liofilización se eliminará la totalidad del agua libre y sólo parte del agua adsorbida. La importancia de formar una matriz sólida es evitar que se produzca el fenómeno conocido como PUFFING, que se produce cuando aún existe una parte del producto no congelado totalmente, que al ser sometido a bajas presiones ocasionará la explosión de la matriz al producirse un aumento brusco del volumen del líquido no congelado. Si la cantidad de líquido no congelado es alta al producirse el PUFFING, todo el producto es expulsado fuera de los contenedores y se termina con el proceso.

Si el líquido no congelado está distribuido en centros microscópicos en el interior de la matriz, el proceso terminará bien, pero la calidad del producto se verá afectada por la desnaturalización de éste a nivel de los centros no congelados. Sólo no daremos cuenta de este fenómeno después de los resultados del control de calidad a que será sometido el producto liofilizado.

1.3.4.2 SECADO PRIMARIO O SUBLIMACIÓN

Terminada la etapa de congelación se hace vacío en el interior del liostato comenzando la sublimación del hielo y con ello la deshidratación del producto. Durante el transcurso de esta etapa intervienen en forma paralela dos procesos interdependientes entre sí:

- a) Transferencia de energía calorífica
- b) Transferencia de masa

a) **Transferencia de energía calorífica.** La liofilización será basada en la sublimación del hielo, proceso que requiere aporte de energía, esto parece contradecir la definición de liofilización, que afirma que es un método de deshidratación caracterizado por no utilizar calor, pero no hay tal contradicción ya que el calor aportado al sistema se gasta en la sublimación del hielo, no aumentando la temperatura del producto.

b) **Transferencia de masa.** Al iniciarse la sublimación las moléculas de agua que salen de la superficie del producto congelado, pasan al interior del liostato dónde se mezclan con las moléculas de gases incondensables que ahí se encuentran. Si no retiramos esta mezcla de gases del interior del sistema, su presión irá en aumento dificultándose con ello la sublimación del hielo, al impedir sus moléculas la libre salida de las moléculas de agua de la superficie congelada, como consecuencia se produce un alza en la temperatura del producto lo que llevará a la fusión de este. Se hace necesario eliminar el vapor de agua del sistema, para cumplir esta finalidad el equipo dispone de un aparato llamado **condensador**, que por lo general es un cilindro de acero inoxidable en cuyo interior existe un **serpentín** conectado a un equipo de refrigeración, que enfría sus paredes manteniéndolas a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que permite la condensación del vapor de agua en su superficie fría.

La transferencia de masa, por lo tanto, está regulada por la diferencia de presión, entre la presión de vapor de la superficie congelada del producto y la presión del vapor del condensador.

El vapor de agua que se produce durante la sublimación, es atrapado por el condensador. A la bomba de vacío corresponde la eliminación de los gases incondensables existentes en el interior del equipo que deben ser retirados del sistema para que no impidan la libre salida del vapor de agua de la superficie congelada. Junto a los gases eliminados por la bomba sale el oxígeno, lo que permite una mejor conservación del producto terminado; a medida que avanza el proceso, se van formando dos fases bien definidas: una superior seca y porosa, constituida por el producto ya sublimado y otra inferior constituida por el producto aun congelado. El límite entre ambas fases se conoce como interfase, la que

irá bajando en la medida que avanza la liofilización hasta que desaparece el último cristal de hielo; en este momento termina el secado primario produciéndose un brusco aumento de la temperatura del producto, comenzando con ello la tercera etapa de la liofilización: el secado secundario o desorción.

1.3.4.3 SECADO SECUNDARIO, DESORCIÓN O SECADO ISOTÉRMICO

Al terminar la etapa anterior, el producto se ha transformado en una materia seca y porosa, en su interior queda el agua adsorbida y parte de vapor de agua atrapado en su superficie esponjosa. El objeto del secado secundario es eliminar parcialmente el agua adsorbida y el vapor de agua atrapado en el interior del producto. Cuando comienza el secado secundario, ha sido eliminada toda el agua libre existente en el producto. La humedad residual en este momento fluctúa entre el 2 al 5%, constituida principalmente por agua adsorbida. El producto esta prácticamente seco y puede elevarse su temperatura para eliminar la humedad remanente hasta llegar a los límites de humedad residual deseada, cuidando siempre que el aumento de temperatura no lleve a la desnaturalización. La temperatura de desorción es característica para cada caso en particular.

El objetivo de esta etapa es alcanzar un contenido de humedad residual (H.R.) que permita la buena conservación del producto en el tiempo, no existiendo un valor tipo de H.R., ya que es característico para cada caso.

El conocimiento de la H.R. óptima para cada producto es de vital importancia, ya que si la H.R. es mayor a la óptima, se va producir la descomposición del producto debido a su alto contenido de agua. En cambio, si su humedad es menor a la óptima, va haber un aumento de costos de producción por prolongación innecesaria del proceso, existiendo además grandes posibilidades de alteración de la estructura interna del producto que afectará la calidad del mismo.

1.4 VALIDACIÓN

La Industria Farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

1.4.1 DEFINICIÓN DE VALIDACIÓN

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos. El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

1.4.2 DEFINICIÓN DE PARÁMETROS

Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro

obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **REPETIBILIDAD.** Es la precisión del método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

b) **REPRODUCIBILIDAD.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferente analista, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

Límite de detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

1.5 ESCINTIGRAFÍA

La escintigrafía nació en los años cuarenta asociada al cáncer; las metástasis y los procesos inflamatorios aparecen claramente diferenciados en el monitor; así los médicos contemplan el tamaño, la forma y la localización exacta del problema sin necesidad de intervenir al paciente y deciden si hay que actuar. Con respecto a la instrumentación, el requisito básico consiste en una cámara gamma planar acoplada a una computadora, resulta luego posible visualizar los sitios en que se depositan los anticuerpos mediante la producción de imágenes externas. Este procedimiento conocido como radioinmunoescintigrafía está adquiriendo cada vez mayor difusión a medida que se desarrollan mejores anticuerpos y técnicas de marcación que emplean isótopos más adecuados. El isótopo más utilizado es el tecnecio ^{99m}Tc , que por sus corto período de desintegración es muy apropiado para este tipo de exploraciones. Los requisitos necesario para la escintigrafía son un anticuerpo o un producto químico de buena calidad (elevada afinidad o especificidad), un marcador adecuado con un sistema de marcación que no afecte la inmunoreactividad y un sistema de obtención de imágenes externo para localizar el anticuerpo después de administrarlo al paciente. Esta técnica es relativamente poco invasora. Consiste en la administración del anticuerpo marcado a un paciente (que generalmente no necesita someterse a una preparación especial) y la visualización después de transcurrido un tiempo adecuado (que puede variar entre algunas horas y algunos días), en el caso de un proceso inflamatorio o infeccioso donde hay acumulación de gamma-globulinas, algunos autores han reportado la obtención de imágenes de procesos inflamatorios con Ig G radiomarcada⁽⁶⁾, 4 - 6 y 24 horas después de la inyección, con una dosis de 1.0 mg de Ig G y una actividad de 300 MBq.⁽¹⁶⁾ Los isótopos manifiestan su presencia mediante una emisión muy característica de rayos gamma, que atraviesa los tejidos y puede ser captada con una cámara sensible a estas radiaciones. Sus fotones producen un centelleo especial en la pantalla de la cámara, que es interpretado por un complicado programa informático. La computadora permite comprobar la forma del órgano y su funcionamiento.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha comprobado que la IgG policlonal humana radiomarcada con In-111, es efectiva para la localización de una gran variedad de organismos infecciosos incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pneumocystis carinii*, *Histoplasma capsulatum* y *Candida albicans*.⁽¹⁾

En 1994, Frederick et al.⁽²⁾ estudiaron prospectivamente a 53 pacientes con sospecha de infección mediante el empleo de gammaglobulina policlonal humana radiomarcada. Concluyeron que la IgG policlonal tiene una sensibilidad del 97.9 % y una especificidad del 94 % para la detección de procesos infecciosos e inflamatorios.

Por otro lado, el radiomarcaje con Tc-99m tiene más ventajas sobre el marcado con In-111 en cuanto a dosimetría y costo. Así mismo, el marcado con Tc-99m de la IgG, podría basarse en las técnicas ya descritas para el marcado de anticuerpos monoclonales debido a su estructura proteica. En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, en 1994, G. Ferro y J. Lezama estudiaron el desarrollo de formulaciones liofilizadas para el marcado con ^{99m}Tc de anticuerpos IOR-CEA1 mediante la reducción de los puentes disulfuro en presencia de EHDP como ligante débil.⁽³⁾ En dicho reporte se concluye que la técnica también puede ser aplicada para el marcado de cualquier tipo de proteínas.

Por tanto, se ha elegido este tema de tesis para desarrollar una formulación liofilizada que permita el marcado instantáneo de gamma-globulina humana con ^{99m}Tc y, de esta forma, poder detectar también procesos inflamatorios o infecciosos "in vivo".

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollo de una formulación liofilizada para el marcado de IgG-Humana con ^{99m}Tc , útil en el radioinmuno diagnóstico de procesos inflamatorios.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desarrollar la formulación liofilizada del núcleo-equipo IgG- Sn (conejo)
- b) Llevar a cabo el radiomarcado de la Ig G con ^{99m}Tc y observar la estabilidad del complejo ^{99m}Tc -IgG.
- c) Realizar las pruebas de estabilidad del núcleo-equipo liofilizado.
- d) Realizar los estudios de biodistribución en conejos con procesos inflamatorios.
- e) Desarrollar la formulación liofilizada del núcleo-equipo IgG Humana.

4. HIPÓTESIS

Dado que uno de los principios para la preparación de una formulación instantánea con la que pueda obtenerse una gammaglobulina (IgG) radiomarcada con Tc-99m, se basa en la unión directa de éste a los grupos sulfhidrilo reducidos de la proteína a través de un intercambio de ligantes, entonces, mediante ensayos de formulación, se podrá seleccionar al ligante débil, agente reductor y excipientes así como sus concentraciones necesarias para la obtención de ^{99m}Tc -IgG que cumpla con las especificaciones de poseer una pureza radioquímica mayor al 90 %, permaneciendo estable al menos 24 horas.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 MATERIALES Y REACTIVOS

MATERIALES

Membranas de 0.22 μm , Millipore Co.; Tiras de fibra de vidrio impregnadas con sílica gel (ITLC-SG), Gelman Sciences Inc.; Micropipetas SOCOREX swiss de 5 a 50 μL y de 100 a 1000 μL ; Puntas para las pipetas SOCOREX swiss; frascos viales de 10 mL; Tapones de hule ranurados de 20 mm de diámetro; Retapas de aluminio de 20 mm de diámetro.

REACTIVOS.

2-Mercaptoetanol, Sigma M6250; Gamma globulina de conejo, Sigma G-0260; Nitrógeno de alta pureza LINDE; Cloruro estanoso anhidro, Sigma S2752; Seroalbúmina humana (HSA), Sector Salud 3662, México; Eluato de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtenido de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ GETEC-ININ; Etanol-1-hidroxi-1,1,-difosfato (EHDP), sintetizado en el laboratorio de desarrollo del ININ..

Gammaglobulina humana, Sigma I-4506, Purificado por electroforesis aprox. 99% de pureza, contenido de cloruro de sodio 2-4%, humedad 14 %. Todos los otros reactivos fueron de la marca JT Baker

MATERIAL BIOLÓGICO.

2 conejos de la raza Nueva Zelanda.

5.2 EQUIPO

Espectrofotómetro U.V., Beckman, modelo 35; Detector de centelleo sólido, NaI(Tl) Nuclear Medical Laboratories, Inc.; Cromatógrafo líquido de alta resolución (CLAR), Laboratory Data Control con columna de filtración de gel Protein Pak 300 SW (waters); Colector de fracciones coll-300, Pharmacia; Liofilizadora Virtis, modelo 10-100; Campana de flujo laminar VECO; Detector electrónico para detectar vacío (Electronic self sensing leak detector), modelo BD-60; Gammacámara Anger (en el Instituto Nacional de Pediatría).

5.3 MÉTODOS

5.3.1. IDENTIFICACIÓN DE LA GAMMAGLOBULINA HUMANA

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Se usó un sistema de CLAR Laboratory Data Control con una columna de filtración en gel Protein-Pak 300 SW (waters) y un detector de U.V. a 280 nm. La columna fue lavada con 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 7.5, enfriada a 4 °C y purgada previamente durante 15 minutos con nitrógeno. Este sistema se adaptó a un colector de fracciones donde el flujo fue de 1 mL/min. Posteriormente se inyectaron 500 µL de una solución de Ig G a una concentración de 5.0 mg/mL. Como fase móvil se utilizó amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 con un flujo de 1.0 mL/min, hasta que el pico de la proteína se obtuvo, determinando de esta forma el tiempo de retención. Dado que la gammaglobulina (Ig G) humana tiene el mismo comportamiento químico que la Ig G de conejo, se realizaron formulaciones de esta última bajo las mismas condiciones.

Cromatografía instantánea en capa fina. ITLC-SG. (tiras de 1x 10 cm). Se consideró separar de una forma rápida los cuatro posibles radiocompuestos presentes en la formulación, es decir, el pertecneiato que no se reduce ($^{99m}\text{TcO}_4$), el tecnecio-99m

hidrolizado ($^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), el complejo ^{99m}Tc -ligante débil y el complejo ^{99m}Tc -gammaglobulina. Para este fin se prepararon muestra de 2 mg de gammaglobulina de conejo reducida en un volumen de 4,5 mL más 15 μL de un núcleo-equipo de EHDP-Sn reconstituido con 5 mL de solución salina isotónica. A esta solución se le adicionó 0.5 - 1.0 mL de solución de pertecniato de sodio con una actividad de entre 2 y 5 mCi (74 - 185 MBq) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Posteriormente en tiras de 1x 10 cm de ITLC-SG se les aplicó 1 μL de muestra radiactiva. Después de eluirse en los diferentes sistemas de elución se cortaron en dos fracciones y se leyó su actividad en un detector de centelleo sólido.

Los sistemas de elución utilizados para el análisis fueron:

SOPORTE	SISTEMA ELUYENTE	COMPUESTO A SEPARAR ($R_f = 1$)
ITLC-SG	Solución salina al 0.9 %	$^{99m}\text{TcO}_4^- + ^{99m}\text{Tc}$ -ligante débil
ITLC-SG	Acetona	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
ITLC-SG (HSA)*	Hidróxido de amonio:Etanol: Agua 1:2:5	^{99m}Tc -Ig G + ^{99m}Tc ligante débil + $^{99m}\text{TcO}_4^-$

*Las tiras fueron saturadas con seroalbúmina humana para hacer eluir a la proteína, se prepararon sumergiéndolas en solución salina conteniendo seroalbúmina humana (5 mg/mL) durante 30 minutos⁽³⁾. Posteriormente fueron lavadas con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

5.3.2 VALIDACIÓN DE LA CUANTIFICACION DE LA Ig G MEDIANTE CLAR Y ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

Debido a que el método de purificación es por CLAR este fue validado, los parámetros evaluados fueron:

Linealidad del sistema. Se determinó, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando 50, 80, 100 y 120 % preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis por duplicado para cada dilución. El 100 % correspondió a la formulación del liofilizado cuyo contenido es de 2.5 mg de gammaglobulina por vial bajo el siguiente protocolo.

- Se aplicaron las diluciones correspondientes para la obtención de cada nivel.
- Se inyectaron en el CLAR, por duplicado, 500 microlitros de cada nivel para la cuantificación de la concentración.
- Con los datos obtenidos se calculó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, es decir la ecuación de la recta.

CRITERIO: $CV \leq 1.5 \%$

$r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$

Precisión del sistema. Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar (5 mg/mL) correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

- Se preparó una solución de anticuerpo de 5 mg/mL.
- Se realizó el análisis sextuplicado de la solución mediante la inyección de muestras de 500 microlitros al CLAR.
- Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación.

CRITERIO: $CV \leq 1.5 \%$

Exactitud y repetibilidad al 100 %.

- Se pesaron seis muestras de 50 mg de gammaglobulina aforándose, por separado, a un volumen de 10 mL con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4
- Se inyectaron en el CLAR, 500 microlitros de cada solución para la cuantificación de la concentración.
- Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación.

CRITERIO: El porcentaje recuperado debe ser de 98 - 102 % y el $CV \leq 2 \%$

En forma similar se realizó para el método espectrofotométrico U.V.

5.3.3 FORMULACION DEL NÚCLEO-EQUIPO LIOFILIZADO

a) ELECCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR.

La solución de anticuerpo (5 mg/mL) fue reducida empleando 1.5, 2.5 y 5 μL de 2-mercaptoetanol (2-ME) por cada 2.5 mg de anticuerpo. La mezcla del agente reductor y el anticuerpo se dejó reaccionar por 30, 40 y 45 minutos a temperatura ambiente (18- 20 °C). La solución resultante fue purificada por CLAR con una columna de gel Protein Pak. Como fase móvil se utilizó amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 con un flujo de 1.0 mL/min. La concentración final del anticuerpo reducido obtenido se determinó por espectrofotometría U.V. Utilizando para la curva estándar, gammaglobulina de conejo con una concentración de 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 y 5.0 mg/mL.

Posteriormente a la gammaglobulina de conejo reducida y purificada en un volumen de 4.5 mL, se le adicionó 15 μL de un núcleo-equipo de EHDP-Sn reconstituido con 5 mL de solución salina isotónica. A esta solución se le adicionó 0.5 - 1.0 mL de solución de pectecniato de sodio con una actividad de entre 2 y 5 mCi (74 - 185 MBq) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Posteriormente en tiras de 1x 10 cm de l'TLC-SG se les aplicó 1 μL de muestra radiactiva. Después de eluirse en los diferentes sistemas de elución se cortaron en dos fracciones y se leyó su actividad en un detector de centelleo sólido.

En otras muestras de Ig G de conejo con la misma concentración, se empleó 1.7, 2.8 y 5.6 mg de ácido ascórbico como agente reductor, los tiempos de reducción fueron los mismos pero en este caso no se llevó a cabo una purificación posterior.⁽⁷⁾ Después de reducir se procedió a formular la proteína de la misma forma que para las muestra reducidas con 2-mercaptoetanol.

b) ELECCIÓN DEL LIGANTE DÉBIL.

Se prepararon soluciones de EHDP-Sn con distinta concentración de cloruro estanooso.

Solución A. Se disolvieron 280 mg de EHDP en 16 mL de agua inyectable. Aparte, se pesaron 20 mg de cloruro estanoico anhidro y se disolvieron en 0.4 mL de ácido clorhídrico concentrado bajo atmósfera de nitrógeno, posteriormente la solución se ajustó a un volumen total de 12.5 mL con agua inyectable purgada con nitrógeno, esta solución ácida de cloruro estanoico se adicionó a la solución de EHDP y el pH se ajustó a 7.0 empleando NaOH 0.5 N, sin dejar de agitar se agregó 80 mg de Pluronic y 10 mg de ácido genticico, por último se llevó a un volumen final de 80 mL con agua inyectable. Finalmente se dosificó en 2 mL y liofilizó.

De igual manera se prepararon dos soluciones más, con distintas concentraciones de cloruro estanoico: **solución B** de EHDP-Sn con 40 mg de cloruro estanoico y **solución C** de EHDP-Sn con 100 mg de cloruro estanoico.

Preparación de la solución GLUCONATO-Sn. **Solución A** se disolvieron 280 mg de GLUCONATO en 16 mL de agua inyectable. Aparte, se pesaron 20 mg de cloruro estanoico anhidro y se disolvieron en 0.4 mL de ácido clorhídrico concentrado bajo atmósfera de nitrógeno, posteriormente la solución se ajustó a un volumen total de 12.5 mL con agua inyectable purgada con nitrógeno, esta solución ácida de cloruro estanoico se adicionó a la solución de EHDP y el pH se ajustó a 7.0 empleando NaOH 0.5 N, sin dejar de agitar se agregó 80 mg de Pluronic y 10 mg de ácido genticico, por último se llevó a un volumen final de 80 mL con agua inyectable. Finalmente se dosificó en 2 mL y liofilizó. Se prepararon de igual forma dos soluciones más con 40 y 100 mg de cloruro estanoico **solución B** y **solución C** respectivamente.

FORMULACION (Preparación de las mezclas)

En seis frascos viales conteniendo 4.5 mL de solución de anticuerpo purificado (reducido con 2-mercaptoetanol), a tres frascos (M-1, M-2, M-3) se adicionaron 15 μL de un núcleo-equipo de EHDP-Sn, (solución A, B y C respectivamente). Los núcleo-equipos de EHDP-Sn se reconstituyeron con 5 mL de solución salina. A los tres frascos restantes (M-4, M-5, M-6) se les adicionó 15 μL de un núcleo-equipo de GLUCONATO-Sn (solución A, B, y C

respectivamente). Los núcleo-equipos de GLUCONATO-Sn se reconstituyeron con 5 mL de solución salina. A estas formulaciones se les adicionó 0.5 mL de solución de ptertecnecio de sodio con una actividad entre 2 y 5 mCi (74 - 185 MBq) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Posteriormente en tiras de 1x 10 cm de ITLC-SG se les aplicó 1 μL de muestra radiactiva. Después de eluirse en los diferentes sistemas de elución se cortaron en dos fracciones y se leyó su actividad en un detector de centelleo sólido.

FORMULACION M-1

Ig G policlonal	2.0 mg
SnCl_2	1.5 μg
EHDP	21.0 μg
Pluronic	6.0 μg
Ácido gentísico	0.75 μg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg

FORMULACION M-4

Ig G policlonal	2.0 mg
SnCl_2	1.5 μg
GLUCONATO	21.0 μg
Pluronic	6.0 μg
Ácido gentísico	0.75 μg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg

FORMULACION M-2

Ig G policlonal	2.0 mg
SnCl_2	3.0 μg
EHDP	21.0 μg
Pluronic	6.0 μg
Ácido gentísico	0.75 μg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg

FORMULACION M-5

Ig G policlonal	2.0 mg
SnCl_2	3.0 μg
GLUCONATO	21.0 μg
Pluronic	6.0 μg
Ácido gentísico	0.75 μg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg

FORMULACION M-3

Ig G policlonal	2.0 mg
SnCl_2	7.5 μg
EHDP	21.0 μg
Pluronic	6.0 μg
Ácido gentísico	0.75 μg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg

FORMULACION M-6

Ig G policlonal	2.0 mg
SnCl_2	7.5 μg
GLUCONATO	21.0 μg
Pluronic	6.0 μg
Ácido gentísico	0.75 μg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg

5.3.4 ESCALAMIENTO DEL TAMAÑO DE LOTE

De las muestras que mejor resultado de pureza radioquímica presentó, se seleccionó la muestra M-2 para realizar la formulación por lote de 4 muestras. Para esto se fraccionaron 4 muestras de 500 μL de gammaglobulina, se realizó la reducción con 2-ME en forma individual y posteriormente se purificó cada muestra por CLAR con una columna de gel Protein Pak. Como fase móvil se utilizó amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.4 con un flujo de 1.0 mL/min. Cada muestra purificada se vació dentro de un matraz de tres bocas con una entrada de nitrógeno para crear la atmósfera inerte, (fig. 3) una vez mezcladas las 4 muestras de gammaglobulina reducida y purificada, se adicionó 60 μL de un núcleo-equipo de EHDP-Sn (solución B), reconstituido con 5 mL de solución salina previamente purgada con nitrógeno, la solución se agitó con una velocidad de mezclado de 150 r.p.m., (se realizaron tres lotes de 4 muestras variando los tiempos de agitación que fueron de 1.5, 2.5 y 5.0 min., después de adicionar el EHDP-Sn) finalmente se filtro empleando una membrana de 0.22 micras y se procedió a fraccionar colocando 4.5 mL de solución, en frascos tipo penicilina de 10 mL; a estas formulaciones se les adicionó 0.5 mL de solución de pertechnetato de sodio con una actividad entre 2 y 5 mCi (74 - 185 MBq) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Posteriormente en tiras de 1x 10 cm de ITLC-SG se les aplicó 1 μL de muestra radiactiva. Después de eluirse en los diferentes sistemas de elución se cortaron en dos fracciones y se leyó su actividad en un detector de centelleo sólido. Con el tiempo de mezclado que reportó un mejor porcentaje de marcado se realizó un escalamiento del número de muestras por lote.

Se realizó el mismo procedimiento con lotes de 5, 6 y 7 muestras.

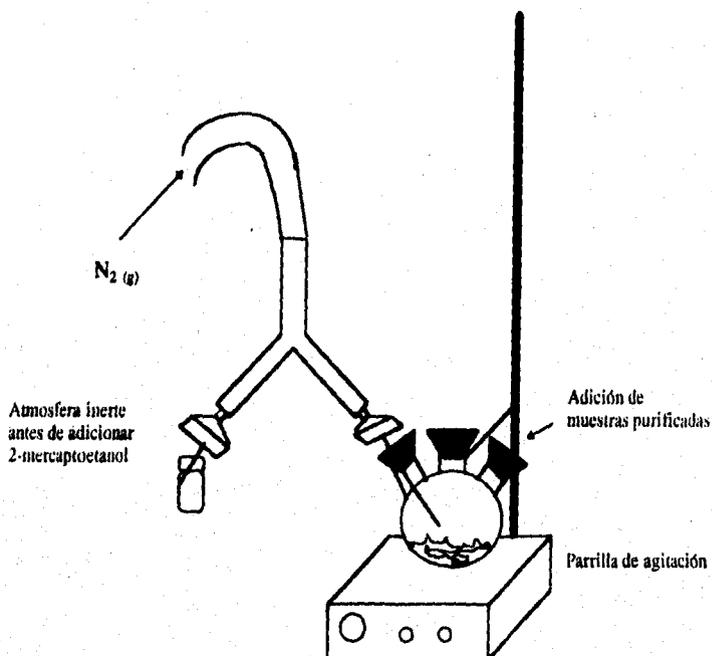


Fig. 4 Sistema de agitación en condiciones inertes.

5.3.5 ELECCIÓN DEL CICLO DE LIOFILIZACIÓN

Se realizó esta prueba con la formulación M-2. Se preparó como solución estéril y libre de Pirógenos. Cada mezcla en solución fue esterilizada por filtración a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$, depositadas en frascos ampula previamente esterilizados y congeladas con nitrógeno líquido. El producto congelado fue liofilizado. Se realizaron dos ciclos de liofilización, en el ciclo A se aumentó el tiempo de secado primario y en el ciclo B se aumentó el tiempo de secado secundario.

CICLO A:	Temperatura del producto (°C)	Tiempo
	-40 a -25	40 min.
	-25 a -10	15 horas
	-10 a 0	1 hora
	0 a 15	3 horas
CICLO B:	Temperatura del producto (°C)	Tiempo
	-40 a -25	40 min.
	-25 a -10	35 min.
	-10 a 0	1 hora
	0 a 15	15 horas

A cada lote prueba que se liofilizó se le realizaron los siguientes controles:

- Prueba de pureza radioquímica (antes y después de liofilizar)
- Pruebas de vacío
- Determinación de humedad
- Prueba de esterilidad y pirógenos

5.3.6 CONTROL DE CALIDAD DEL NÚCLEO-EQUIPO

Control de calidad radioquímico

La pureza radioquímica del anticuerpo marcado fue determinado por cromatografía instantánea en capa fina (ITLC). Los sistemas utilizados para el análisis fueron:

SOPORTE:	ITLC-SG	ITLC-SG	ITLC-SG (HSA)
SOLVENTE:	NaCl 0.9 %	Acetona	NH_4OH :etanol: H_2O (1:2:5)
R_f $^{99m}\text{TcO}_4^-$:	0.9 - 1.0	0.9 - 1.0	0.9 - 1.0
R_f ^{99m}Tc (reducido) :	0.0	0.0	0.0
R_f ^{99m}Tc -Ig G :	0.0	0.0	0.7 - 1.0
R_f ^{99m}Tc -EHDP :	0.9 - 1.0	0.0	0.9 - 1.0

Cromatografía líquida de alta resolución.

100 μL de la solución radiactiva conteniendo el complejo ^{99m}Tc -Ig fueron inyectados a un sistema de CLAR usando una columna de filtración en gel Protein-Pak 300 WS (waters) empleando como fase móvil amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH = 7.4 con un flujo de 1.0 mL/min. obteniéndose un cromatograma. La columna fue adaptada a un colector de fracciones, de tal forma que se colectaron volúmenes de 1.0 mL cuya radiactividad fue medida en un detector de centelleo sólido de NaI(Tl). Graficando radiactividad contra el número de fracciones colectadas se obtuvo un radiocromatograma de anticuerpo marcado con ^{99m}Tc .

Determinación del porcentaje de humedad

A las muestras liofilizadas se les mandó al Departamento de Análisis Químico del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares para determinarles el contenido de agua. El método empleado fue el de valoración yodométrica de Karl Fischer.

Pruebas de esterilidad

Las pruebas de esterilidad se realizaron sembrando asépticamente 1 mL del radiofármaco en tubos conteniendo medios de cultivo líquido de tioglicolato y en tubos con medio de cultivo de caldo digerido de caseína-soya e incubando a 37 °C y 25 °C respectivamente. Los tubos sembrados fueron revisados diariamente por 14 días posteriores a la incubación.

Determinación de Pirógenos

Se realizó *in vitro* empleando el lisado de amebocitos de limulus (LAL) mediante la siguiente técnica.

- a) PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO. Se reconstituyó asépticamente el frasco que contiene endotoxina con 5 mL de agua inyectable estéril y libre de pirógenos. Cada mL de esta solución contiene 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de endotoxina de *E. coli*. Se diluyó ésta

con agua estéril y libre de pirógenos hasta obtener una concentración de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se colocó 0.1 mL de esta solución con 0.1 mL del reactivo LAL en un tubo estéril y libre de pirógenos y se incubó a 37 °C por 60 minutos.

- b) **PREPARACIÓN DEL CONTROL NEGATIVO.** Se colocaron 0.1 mL de agua inyectable con 0.1 mL del reactivo de LAL en un tubo estéril y libre de Pirógenos y se incubó a 37 °C por 60 minutos.
- c) **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.** Se colocaron 0.1 mL de buffer de fosfatos (purificado en el CLAR y mezclado en el mismo matraz en que se formuló la Ig G, siguiendo el mismo procedimiento de formulación para la Ig G sin incluir la proteína, se fraccionó y liofilizó junto con el mismo lote de Ig G y 0.1 mL del reactivo LAL en un tubo estéril y libre de pirógenos, se incubó a 37 °C por 60 minutos. El mismo procedimiento se repitió pero empleando una dilución 1:10 del radiofármaco.
- d) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tubos fueron invertidos 180° cuidadosamente, la presencia de un gel fijo en el tubo conteniendo la muestra, como se presenta en el control positivo, indica la presencia de endotoxinas bacterianas.

5.3.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL NÚCLEO-EQUIPO.

Radiomarcado y estabilidad del complejo ^{99m}Tc -Ig

Se colocó el vial en un blindaje de plomo y se identificó. La reconstitución del núcleo-equipo se llevó a cabo adicionando 2.5 mL de pertecneciato con una actividad de 5 a 8 mCi (185 a 296 MBq) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. El rendimiento y la estabilidad de la solución radiactiva se determinó a los 0, 2, 5, 15, 20, 30 minutos y 1, 2, 3, 4, 24 horas.

Estabilidad del núcleo-equipo a 4°C y 37°C.

Después de obtener la formulación, se preparó un programa de estabilidad del producto liofilizado con muestras sometidas a las siguientes temperaturas: 4°C y 37°C.

Un lote se guardó en refrigeración a 4°C. La pureza radioquímica se determinó el mismo día de la preparación y al primero, tercero y sexto mes posterior a la preparación.

Otro lote se sometió a 37 °C y se muestreo a los 0, 30, 50, 60, 80, 90 y 100 minutos determinándose la pureza radioquímica.

5.3.8 ESTUDIOS DE DISTRIBUCION BIOLÓGICA

a) Inducción de abscesos

Se mezcló 50 µg de *Mycobacterium smegmatis* y 0.5 mL de adyuvante de Freud completo, se adicionó gota a gota albúmina bovina con agitación constante en vortex hasta formar una emulsión; posteriormente se inyectó un conejo por vía intramuscular 0.5 mL de esta emulsión, el conejo estuvo en observación hasta que se formó el absceso.

b) Estudio de distribución biológica

Los estudios de distribución biológica se llevaron a cabo en el Departamento de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de Pediatría, esto con el fin de tener un patrón de distribución así como de evaluar el comportamiento "in vivo" del anticuerpo policlonal, IgG-conejo marcado, éste fue inoculado 30 minutos después de ser reconstituido con 2.5 mL de pertecneciato en la vena marginal de la oreja de dos conejos; a los conejos previamente se les provocó un absceso. Se visualizó la distribución del radiofármaco 5 horas después de la inoculación con ayuda de una cámara gamma planar acoplada a una computadora.

5.3.9 FORMULACION DEL NUCLEO-EQUIPO IgG HUMANA.

Una vez obtenida la formulación del núcleo-equipo IgG-conejo. Se realizó un lote de la formulación M-2 empleando IgG humana y se le determinó los mismos controles.

6. RESULTADOS

6.1 CROMATOGRAMA DE LA GAMMAGLOBULINA HUMANA

Con la finalidad de reducir los puentes disulfuro de la Ig G humana se adicionó 2-mercaptoetanol, posteriormente se purificó la proteína mediante CLAR. La figura 5 muestra el cromatograma de la Ig G humana después de ser reducida.

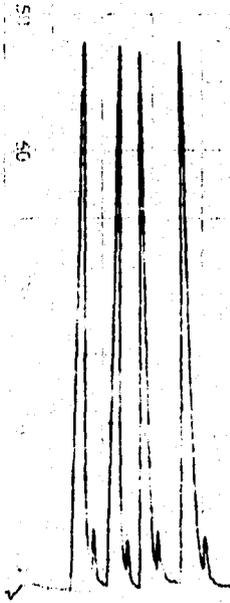


Fig. 5 Cromatograma de la Ig G después de reducir, el pico menor corresponde al 2-mercaptoetanol. Columna Protein Pak 300SW (waters) fosfatos 0.1 M, pH 7.4, 1.0 mL/min. (Tr = 7.0 min.)

6. RESULTADOS

6.1 CROMATOGRAMA DE LA GAMMAGLOBULINA HUMANA

Con la finalidad de reducir los puentes disulfuro de la Ig G humana se adicionó 2-mercaptoetanol, posteriormente se purificó la proteína mediante CLAR. La figura 5 muestra el cromatograma de la Ig G humana después de ser reducida.



Fig. 5 Cromatograma de la Ig G después de reducir, el pico menor corresponde al 2-mercaptoetanol. Columna Protein Pak 300SW (waters) fosfatos 0.1 M, pH 7.4, 1.0 mL/min. (Tr = 7.0 min.)

6.2 CONTROL DE CALIDAD RADIOQUÍMICO

La pureza radioquímica del anticuerpo marcado fue determinado por cromatografía instantánea en capa fina (CCFI). El soporte y los sistemas utilizados para el análisis se muestran en la tabla 1. La variación estadística de los resultados obtenidos por CCFI se observan en la tabla 2.

SOPORTE	SISTEMA ELUYENTE	COMPUESTO A SEPARAR ($R_f=1$)
ITLC-SG	Solución salina al 0.9 %	$^{99m}\text{TcO}_4^- + ^{99m}\text{Tc-EHDP}$
ITLC-SG	Acetona	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
ITLC-SG (HSA)*	Hidróxido de amonio:Etanol: Agua 1:2:5	$^{99m}\text{Tc-Ig G} + ^{99m}\text{Tc-EHDP} + ^{99m}\text{TcO}_4^-$

Tabla 1. Separación de los diferentes compuestos radioquímicos presentes en la formulación de ^{99m}Tc -Ig G humana.

MUESTRAS	% PUREZA RADIOQUÍMICA
1	93.60
2	91.95
3	93.40
4	92.83
5	90.65
6	90.45
7	92.90
8	95.58
9	93.30
10	91.93

$$X = 92.51$$

$$S = 1.51$$

$$\sigma = 1.44$$

$$\text{C.V.} = 1.63 \%$$

Tabla 2. Obtención de la variación estadística de los resultados en el empleo de CCFI.

6.3 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROTEÍNAS EN EL U. V.

En la figura 6 se muestra la curva de calibración para la determinación de la concentración de gammaglobulina mediante espectrofotometría U. V.

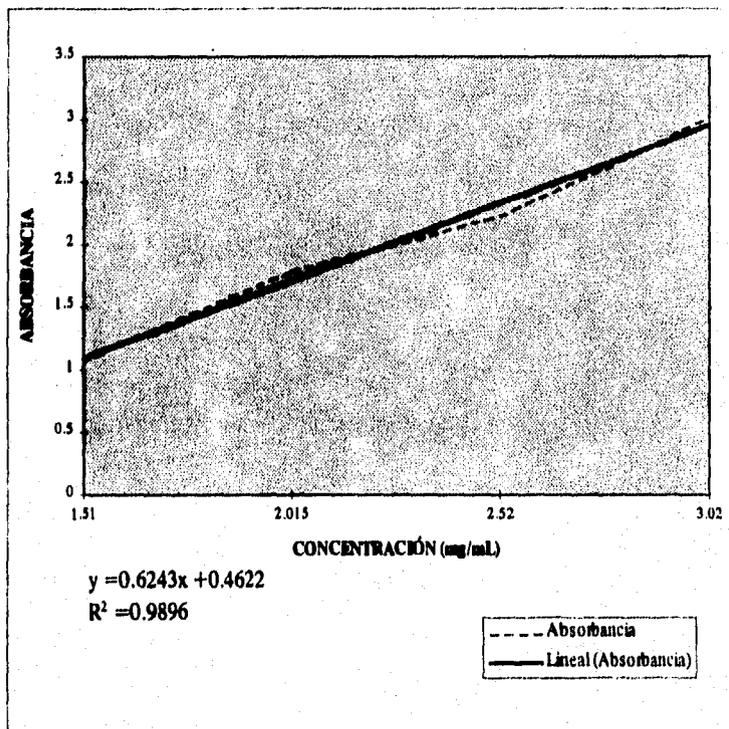


Fig. 6 Curva de calibración para proteínas por espectrofotometría U. V. (Beckman).
ABSORBANCIA: 280 nm. PATRON: Gamma-globulina de conejo.
 r (coeficiente de correlación) = 0.99.

6.4 VALIDACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE GAMMAGLOBULINA MEDIANTE CLAR

Una parte fundamental en el desarrollo de la formulación fue la validación de las técnicas analíticas involucradas en la preparación y evaluación de núcleo-equipos de IgG.

Los resultados obtenidos en la validación de la cuantificación de la gammaglobulina se presentan de las tablas 3 a la 10. La linealidad del sistema se muestran en las tablas 3 y 4. La precisión del sistema fue evaluada con los resultados presentados en las tablas 5 y 6. La evaluación de la repetibilidad se observa en las tablas 7 y 8. Finalmente las tablas 9 y 10 muestran la evaluación de la exactitud.

a) Linealidad del sistema.

% de la concentración de la solución estandar.	% del área CLAR a partir de la solución estandar.
120.3	146.65
100.26	121.72
80.20	97.70
60.16	72.38

Tabla 3. Curva de calibración de gammaglobulina por CLAR.

X vs Y

$$m = 1.1517, \quad b = 5.33, \quad r = 0.9994$$

NIVELES %	CONCENTRACIÓN mg/mL	ÁREA	% DE RECOBRO (ÁREA/CONC.)
120	6.015	3110.37	517.10
100	5.013	2581.71	515.00
80	4.01	2072.18	516.75
50	3.008	1535.32	510.41

Tabla 4. Porcentaje de recobro para evaluar el coeficiente de variación en la linealidad del sistema.

Del porcentaje de recobro se obtiene:

$$X = 514.81 \quad \text{Donde: } CV = S/X \cdot 100$$

$$S = 3.076$$

$$CV = 0.59 \%$$

El sistema cumple el criterio para ser considerado lineal (C. V. < 2 %)

b) Precisión del sistema.

NÚMERO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/mL ANTICUERPO	ÁREA CLAR	% ÁREA CLAR
1	5.0	2367.49	98.88
2	5.0	2375.00	99.19
3	5.0	2437.82	101.82
4	5.0	2330.38	97.33
5	5.0	2444.78	102.11
6	5.0	2409.79	100.65

Tabla 5. Datos del análisis sextuplicado de una misma solución.

χ^2_{cal}	χ^2_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
8.55	12.832	$\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{\text{tablas}}$

Tabla 6. Prueba de hipótesis para evaluar la precisión del sistema

- Contraste de Hipótesis

$$H_0: s^2 < \sigma^2$$

$$H_a: s^2 > \sigma^2$$

- Nivel de significación

$$\text{Alfa} = 0.05$$

- Estadígrafo de prueba

$$\chi^2_1 = (n-1)s^2/\sigma^2$$

CÁLCULOS: Ver anexo 10.1.1

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el método es preciso.

c) Repetibilidad

NÚMERO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/mL ANTICUERPO	AREA CLAR	% AREA CLAR
1	5.02	2132.83	100.56
2	5.07	2182.19	100.00
3	5.03	2111.85	100.00
4	5.00	2157.11	101.70
5	5.02	2120.07	99.95
6	5.03	2121.58	100.03

Tabla 7. Placebos cargados de manera independiente al 100 %

$\bar{X} = 100.37$

$S = 0.68$

C.V. = 1.2 %

χ^2_{cal}	χ^2_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
1.56	12.83	$\chi^2_{cal} < \chi^2_{tablas}$

Tabla 8. Evaluación de la repetibilidad mediante prueba de hipótesis.

- Nivel de significación

$\text{Alfa} = 0.05$

- Estadígrafo de prueba

$\chi^2 = (n-1)s^2/CV$

CÁLCULOS: Ver anexo 10.1.2

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el método es repetitivo.

d) Exactitud del método

NÚMERO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/ml. ANTICUERPO	AREA CLAR	% AREA CLAR
1	5.02	2132.83	100.56
2	5.07	2182.19	100.00
3	5.03	2111.85	100.00
4	5.00	2157.11	101.70
5	5.02	2120.07	99.95
6	5.03	2121.58	100.03

Tabla 9. Placebos cargados de manera independiente al 100 %

$X = 100.37$

$S = 0.68$

$C.V. = 1.2 \%$

t_{calc}	t_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
1.33	2.5706	$t_{calc} < t_{tablas}$

Tabla 10. Evaluación de la exactitud mediante prueba de hipótesis

- Prueba de Hipótesis

$H_0: X = 100$

$H_a: X \neq 100$

- Nivel de significación

$\text{Alfa} = 0.05$

- Estadígrafo de prueba

$t_{calc} = (n-1)s^2/CV$

CÁLCULOS: Ver anexo 10.1.3

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el método es exacto.

6.5 VALIDACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE GAMMAGLOBULINA MEDIANTE ESPETROFOTOMETRÍA U.V.

En la validación para la cuantificación de la gammaglobulina mediante U.V., la linealidad del sistema como del método fue evaluada con los resultados mostrados en la tabla 11 y 12 respectivamente; la evaluación de la precisión del sistema se muestra en las tablas 13 y 14. Los resultados para la evaluación de la repetibilidad se presentan en las tablas 15 y 16. Finalmente las tablas 17 y 18 muestran la evaluación de la exactitud del método.

a) Linealidad

LINEALIDAD DEL SISTEMA

CONCENTRACIÓN mg/mL	ABSORBANCIA
3.02	3.02
2.52	2.74
2.015	2.29
1.51	1.716

Tabla 11. Curva de calibración de gammaglobulina por U.V.

X vs Y

$$m = 0.8606, \quad b = 0.4884, \quad r = 0.99$$

LINEALIDAD DEL MÉTODO

NIVEL %	CONCENTRACIÓN mg/mL	ABSORBANCIA
120	3.02	3.0096
100	2.52	2.223
80	2.02	1.784
50	1.51	1.075

Tabla 12. Curva de calibración de gammaglobulina por U.V.

X vs Y

$$m = 1.2411, \quad b = -0.7914, \quad r = 0.9948$$

b) Precisión del sistema.

NÚMERO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/ml	ABSORBANCIA	% ABSORBANCIA
1	5.0	2.60	94.89
2	5.0	2.65	96.71
3	5.0	2.68	97.81
4	5.0	2.69	98.17
5	5.0	2.65	96.71
6	5.0	2.66	97.08

Tabla 13. Datos del análisis sextuplicado de una misma solución.

χ^2_{cal}	χ^2_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
2.20	12.832	$\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{\text{tablas}}$

Tabla 14. Prueba de hipótesis para evaluar la precisión del sistema

- Contraste de Hipótesis

$$H_0: s^2 < \sigma^2$$

$$H_a: s^2 > \sigma^2$$

- Nivel de significación

$$\text{Alfa} = 0.05$$

- Estadígrafo de prueba

$$\chi^2_{\text{cal}} = (n-1)s^2/\sigma^2$$

CÁLCULOS: Ver anexo 10.2.1

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el método es preciso.

c) Repetibilidad

NÚMERO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/mL	ABSORBANCIA	% ABSORBANCIA
1	5.02	2.63	98.50
2	5.07	2.68	100.37
3	5.03	2.66	99.62
4	5.00	2.69	100.74
5	5.02	2.66	99.62
6	5.03	2.71	101.49

Tabla 15. Placebos cargados de manera independiente al 100 %

$$X = 100.05$$

$$S = 1.04$$

$$\text{C.V.} = 1.03 \%$$

χ^2_{cal}	χ^2_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
1.7	12.83	$\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{\text{tablas}}$

Tabla 16. Evaluación de la repetibilidad mediante prueba de hipótesis.

- Nivel de significación

$$\text{Alfa} = 0.05$$

- Estadígrafo de prueba

$$\chi^2 = (n-1)s^2/\text{CV}$$

CÁLCULOS: Ver anexo 10.2.2

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el método es repetitivo.

d) Exactitud del método

NÚMERO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN mg/mL	ABSORBANCIA	% ABSORBANCIA
1	5.02	2.63	98.50
2	5.07	2.68	100.37
3	5.03	2.66	99.62
4	5.00	2.69	100.74
5	5.02	2.66	99.62
6	5.03	2.71	101.49

Tabla 17. Placebos cargados de manera independiente al 100 %

$$X = 100.05$$

$$S = 1.04$$

$$\text{C.V.} = 1.03 \%$$

t_{calc}	t_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
0.1177	2.5706	$t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$

Tabla 18. Evaluación de la exactitud mediante prueba de hipótesis.

• Prueba de Hipótesis

$$H_0: X = 100$$

$$H_a: X \neq 100$$

• Nivel de significación

$$\text{Alfa} = 0.05$$

• Estadígrafo de prueba

$$t_{\text{calc}} = X - \mu / [S / (n)^{1/2}]$$

CÁLCULOS: Ver anexo 10.2.3

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el método es exacto.

6.6 FORMULACION DEL NÚCLEO-EQUIPO LIOFILIZADO

a) ELECCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR

Los resultados obtenidos experimentalmente para la elección del agente reductor, la concentración adecuada de éste y el tiempo de reducción óptimo se muestran en las tablas 19 y 18. Los resultados con 2-mercaptoetanol fueron sometidos a un análisis de varianza por diseño de bloques aleatorios (Tabla 21, 22 y 23), solo se realizó el tratamiento estadístico con este agente reductor ya que fue el que presentó mejores resultados de pureza radioquímica.

NOTA: El modelo estadístico empleado en todos los tratamientos esta en el anexo 10.3

Tiempo de reducción	ACIDO ASCORBICO		
	1.7 μg	2.8 μg	5.6 μg
30 min.	0.91	0.17	0.19
40 min.	0.10	0.17	0.03
45 min.	0.35	0.39	0.46

Tabla 19. Resultados de la pureza radioquímica de formulaciones empleando ácido ascórbico como agente reductor. (% ^{99m}Tc -Ig G)

Tiempo de reducción	2-MERCAPTOETANOL		
	1.5 μL	2.5 μL	5.0 μL
30 min.	75.50	87.38	81.90
40 min.	81.25	92.30	82.36
45 min.	78.73	90.06	87.10

Tabla 20. Resultados de la pureza radioquímica de formulaciones empleando 2-Mercaptoetanol como agente reductor. (% ^{99m}Tc -Ig G)

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO A LA ELECCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR

(2-MERCAPTOETANOL). Variable analizada: PROTEÍNA (% P.R. $^{99m}\text{Tc-Ig}$ G)

OBS	TIEMPO	CONCENT	PROTEÍNA
1	30	1.5	75.50
2	40	1.5	81.25
3	45	1.5	78.73
4	30	2.5	87.38
5	40	2.5	92.30
6	45	2.5	90.06
7	30	5.0	81.90
8	40	5.0	82.36
9	45	5.0	87.10

Tabla 21. Pureza radioquímica de la proteína, con diferentes concentraciones de 2-mercaptoetanol y distinto tiempo de agitación.

ANÁLISIS DE VARIANZA: Información de las variables y los niveles.

CLASES	NIVELES	VALORES
CONCENT	3	5.0, 1.5, 2.5
TIEMPO	3	30, 40, 45

Número de observaciones en el experimento = 9

FUENTE	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F calc.	Pr > F
MODELO	4	223.450644	55.862661	12.52	0.0156
ERROR	4	17.844978	4.461244		
TOTAL	8	241.295622			

Tabla 22. Análisis de Varianza. Variable Dependiente: PROTEÍNA

$\alpha = 0.05$

$r^2 = 0.926045$

C.V. = 2.512555

MSE = 2.11217

Media de PROTEÍNA = 84.0644

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_k$

H_a : No todas las medias son iguales

Decisión: Si $Pr > F$ es mayor que 0.05 se acepta H_0 y si es menor que 0.05 se acepta H_a .

Conclusión. Se rechaza H_0 por consiguiente hay diferencia significativa al 5% de significación.

FUENTE	g.l.	ANOVA SS	CUADRADOS MEDIOS	F calc.	Pr > F
CONCENT	2	195.971822	97.985911	21.96	0.0070
TIEMPO	2	27.478822	13.739411	3.08	0.1550

Tabla 23. Análisis de Varianza de las Fuentes. Variable Dependiente: PROTEÍNA.

PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA HONESTA (DSH) DE TUKEY.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	CONCENT
A	89.913	3	2.5
B A	83.787	3	5.0
B	78.493	3	1.5

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	TIEMPO
A	85.303	3	40
A	85.297	3	45
A	81.593	3	30

b) ELECCIÓN DEL LIGANTE

Los resultados obtenidos en la elección del ligante empleando EHDP y GLUCONATO, así como tres diferentes concentraciones de SnCl_2 se muestran en las tablas 24 y 25. Estos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza por diseño de bloques aleatorios (Tabla 26, 27 y 28). Esto se realizó para conocer cual es el ligante adecuado y la concentración óptima de SnCl_2 para obtener una formulación liofilizada con un alto rendimiento radioquímico. (>90 %)

*No. muestra	% ^{99m}Tc -Ig G	% ^{99m}Tc -EHDP	% $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	% $^{99m}\text{TcO}_4^-$
M-1	90.00	1.50	3.30	5.30
M-2	97.35	1.44	1.45	0.94
M-3	85.32	0.0	5.58	9.76

Tabla 24. Resultados de la pureza radioquímica de las mezclas conteniendo Ig G, EHDP, SnCl_2 .

*No. muestra	% $^{99m}\text{Tc-Ig G}$	% $^{99m}\text{Tc-GLUCONATO}$	% $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	% $^{99m}\text{TcO}_4$
M-4	31.65	19.25	10.63	38.47
M-5	52.88	3.14	5.25	39.07
M-6	60.30	0.36	38.14	2.33

Tabla 25. Resultado de la pureza radioquímica de las mezclas conteniendo Ig G, GLUCONATO, SnCl_2 .

*No. muestra: M-1 = 1.5 μg de SnCl_2 M-4 = 1.5 μg de SnCl_2
 M-2 = 3.0 μg de SnCl_2 M-5 = 3.0 μg de SnCl_2
 M-3 = 7.5 μg de SnCl_2 M-6 = 7.5 μg de SnCl_2

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO A LA ELECCIÓN DEL LIGANTE

Variable analizada: PROTEÍNA (% P.R. $^{99m}\text{Tc-Ig G}$)

OBS	CONCENT (SnCl_2)	LIGANTE	PROTEÍNA (% P.R. $^{99m}\text{Tc-Ig G}$)
1	1.5	EHDP	90.00
2	3.0	EHDP	97.35
3	7.5	EHDP	85.32
4	1.5	GLUC	31.65
5	3.0	GLUC	52.88
6	7.5	GLUC	60.30

Tabla 26. Pureza radioquímica de la proteína, con diferentes concentraciones de SnCl_2 y distinto agente ligante.

ANÁLISIS DE VARIANZA: Información de variables y valores

CLASES	NIVELES	VALORES
CONCENT (SnCl_2)	3	1.5, 3.0, 7.5
LIGANTE	2	EHDP, GLUC

Número de observaciones en el experimento = 6

FUENTE	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F calc.	Pr > F
MODELO	3	2959.28250	986.42750	7.04	0.1269
ERROR	2	280.30763	140.15382		
TOTAL	5	3239.59013			

Tabla 27. Análisis de Varianza. Variable Dependiente: PROTEÍNA.

$$\alpha = 0.05$$

$$r^2 = 0.913474$$

$$\text{C.V.} = 17.01364$$

$$\text{MSE} = 11.8387$$

$$\text{Media de PROTEÍNA} = 69.5833$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_k$$

H_a : No todas las medias son iguales

Decisión: Si $Pr > F$ es mayor que 0.05 se acepta H_0 y si es menor que 0.05 se acepta H_a .

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente no hay diferencia significativa.

FUENTE	g.l.	ANOVA SS	CUADRADOS MEDIOS	F calc.	Pr > F
CONCENT	2	235.43823	117.71912	0.84	0.5435
LIGANTE	1	2723.84427	2723.84427	19.43	0.0478

Tabla 28. Análisis de Varianza de las Fuentes. Variable Dependiente: PROTEÍNA.

PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA HONESTA (DSH) DE TUKEY.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	CONCENT (SnCl₂)
A	75.12	2	3.0
A	72.81	2	7.5
A	60.83	2	1.5
GRUPO TUKEY	MEDIA	N	LIGANTE
A	90.890	3	EHDP
B	48.277	3	GLUC

6.7 ESCALAMIENTO DEL TAMAÑO DE LOTE

Los resultados obtenidos en el escalamiento del tamaño de lote empleando la formulación M-2 y tres diferentes tiempos de agitación a 150 r.p.m. se muestran en la Tabla 29. Estos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza por diseño de bloques aleatorios (Tabla 30, 31 y 32).

NUMERO DE MUESTRAS POR LOTE	TIEMPO DE MEZCLADO		
	1.5 MIN. (150 r.p.m.)	2.5 MIN. (150 r.p.m.)	5.0 MIN. (150 r.p.m.)
4	85.81	90.98	87.68
5	94.78	91.20	92.86
6	88.82	89.08	92.86 x
7	86.92	88.33	90.71
8	82.21	85.26	87.37
9	80.84	83.14	87.31
10	87.93	80.34	88.24

Tabla 29. Porcentaje de Pureza Radioquímica ($^{99m}\text{Tc-Ig G}$), con diferente número de muestras por lote, para la formulación M-2 con distintos tiempos de agitación después de adicionar el EHDP-Sn

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO AL ESCALAMIENTO DEL LOTE.

Variable analizada: PROTEÍNA (% P.R. ^{99m}Tc -Ig G)

OBS	MUESTRAS	AGITAR	PROTEÍNA
1	4	1.5	85.81
2	4	2.5	90.98
3	4	5.0	87.68
4	5	1.5	94.78
5	5	2.5	91.20
6	5	5.0	92.86
7	6	1.5	88.82
8	6	2.5	89.08
9	6	5.0	87.84
10	7	1.5	86.92
11	7	2.5	88.33
12	7	5.0	90.71
13	8	1.5	82.21
14	8	2.5	85.26
15	8	5.0	87.37
16	9	1.5	80.84
17	9	2.5	83.14
18	9	5.0	87.31
19	10	1.5	87.93
20	10	2.5	86.37
21	10	5.0	88.24

Tabla 30. Pureza radioquímica con diferentes número de muestras por lote y tres distintos tiempos de agitación a 150 r.p.m.

ANÁLISIS DE VARIANZA: Información de variables y valores

CLASES	NIVELES	VALORES
AGITAR	3	1.5, 2.5, 5.0
MUESTRAS	7	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

Número de observaciones en el experimento = 21

FUENTE	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F calc.	Pr > F
MODELO	8	224.378495	28.047312	4.34	0.0115
ERROR	12	77.481400	6.456783		
TOTAL	20	3239.59013			

Tabla 31. Análisis de Varianza. Variable Dependiente: PROTEÍNA

$\alpha = 0.05$
 $r^2 = 0.743320$
 C.V. = 2.895875
 MSE = 2.54102
 Media de PROTEÍNA = 87.7462

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_k$
 Ha: No todas las medias son iguales

Decisión: Si $Pr > F$ es mayor que 0.05 se acepta Ho y si es menor que 0.05 se acepta Ha
 Conclusión. Se acepta Ha por consiguiente hay diferencia significativa.

FUENTE	g.l.	ANOVA SS	CUADRADOS MEDIOS	F calc.	Pr > F
AGITAR	2	35.219467	17.609733	2.73	0.1056
MUESTRAS	6	189.159029	31.526505	4.88	0.0095

Tabla 32. Análisis de Varianza de las Fuentes. Variable Dependiente: PROTEÍNA.

PRUEBA DE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA HONESTA (DSH) DE TUKEY.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	AGITAR
A	89.576	7	5.0
A	86.904	7	2.5
A	86.759	7	1.5

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	MUESTRAS
A	92.947	3	5
B A	90.253	3	6
B A	88.653	3	7
B A	88.157	3	4
B	85.503	3	10
B	84.947	3	8
B	83.763	3	9

6.8 RADIOMARCADO Y ESTABILIDAD DEL COMPLEJO ^{99m}Tc -IgG

Con la finalidad de conocer el tiempo de formación del complejo ^{99m}Tc -IgG así como el comportamiento radioquímico de la gammaglobulina se realizó el marcado de la IgG evaluando la PR a distintos tiempos (Fig. 7 y 8) y se comprobó mediante CLAR la obtención de una P.R. superior al 90 %. (Fig. 9)

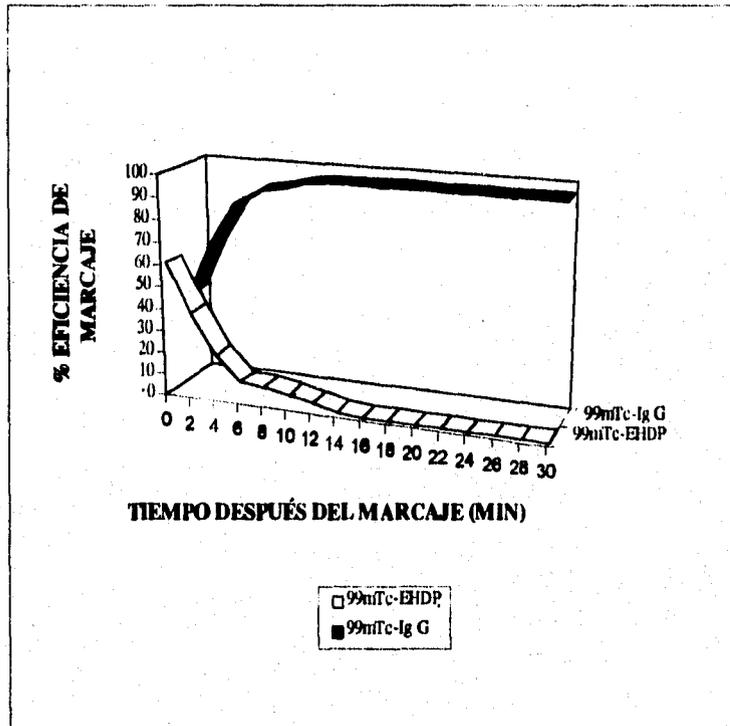


Fig. 7 Durante los primeros 30 minutos después de marcarse la formulación M-2, la eficiencia de marcaje del ^{99m}Tc -Ig G se incrementó, mientras que la del ^{99m}Tc -EHDP decreció con respecto al tiempo.

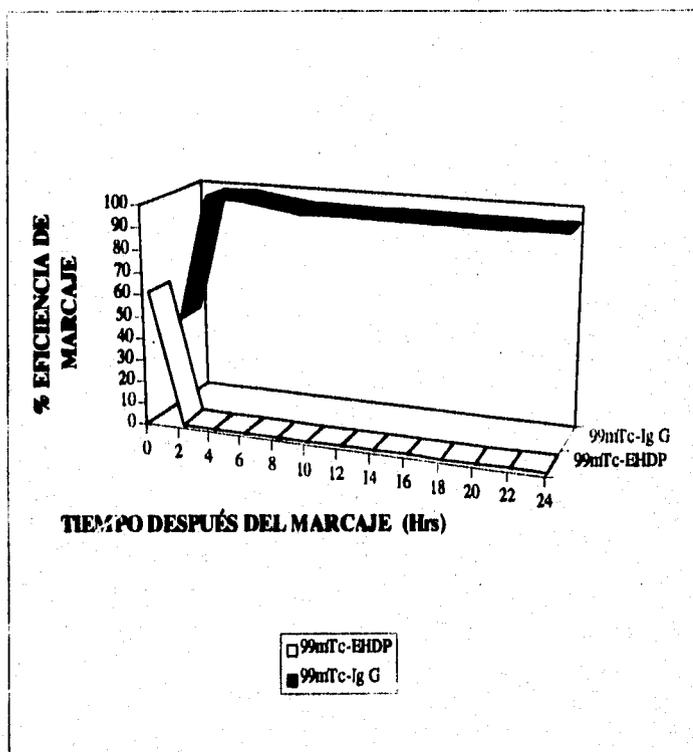


Fig. 8 Durante los primeros treinta minutos después de la preparación, la pureza radioquímica de la ^{99m}Tc -Ig G se incrementó y posteriormente mostró una excelente estabilidad.

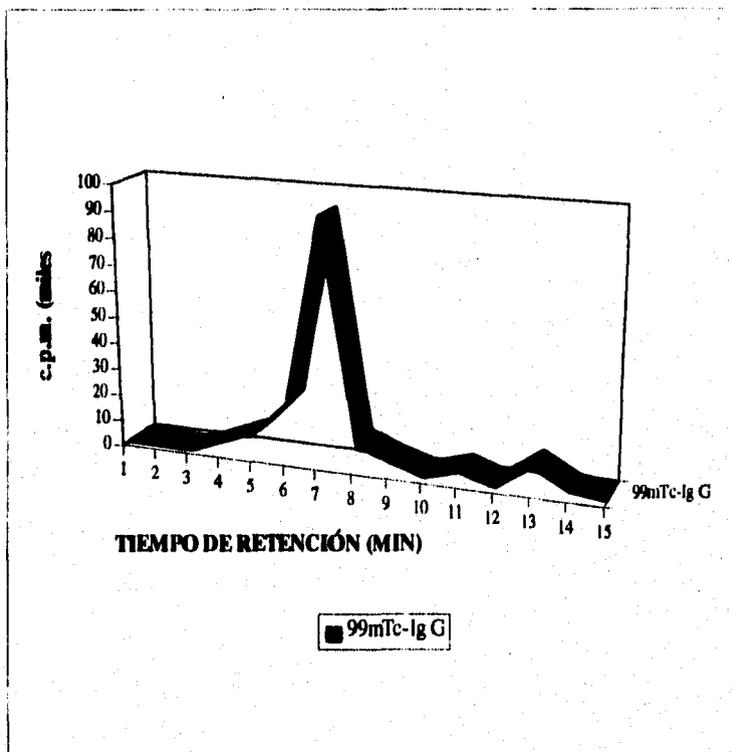


Fig. 9 Radiocromatograma de la inmunoglobulina humana (Ig G) marcada con ^{99m}Tc . El pico menor en el radiocromatograma corresponde al complejo ^{99m}Tc -EHDP, Protein-Pak 300SW, Fosfatos 0.01 M, pH 7.4, 1.0 mL/min.

6.9 ELECCIÓN DEL CICLO DE LIOFILIZACIÓN

Para la elección del ciclo de liofilización se realizó la pureza radioquímica antes y después de liofilizar para tener un patrón de referencia. Los resultados obtenidos experimentalmente para cada ciclo se muestran en la Tabla 33.

	APROBADOS	RECHAZADOS	APROBADOS	RECHAZADOS
PRUEBA DE VACÍO	7	0	6	1
DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	6.81 %	-	14.29 %	-
PUREZA RADIOQUÍMICA	94.75 %	-	94.0 %	-
ESTERILIDAD (Crecimiento bacteriano)	Negativo	-	Negativo	-
PIRÓGENOS (Formación de coágulo)	Negativo	-	Negativo	-

Tabla 33. Resultados promedio de las pruebas analíticas realizadas a cuatro lotes para elegir el ciclo de liofilización (dos lotes para cada ciclo).

6.10 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL NÚCLEO-EQUIPO

Con la finalidad de conocer la resistencia a la degradación se le realizaron a los núcleo-equipo pruebas de estabilidad en anaquel a 4 y 37°C (Fig. 10 y Fig. 11 respectivamente)

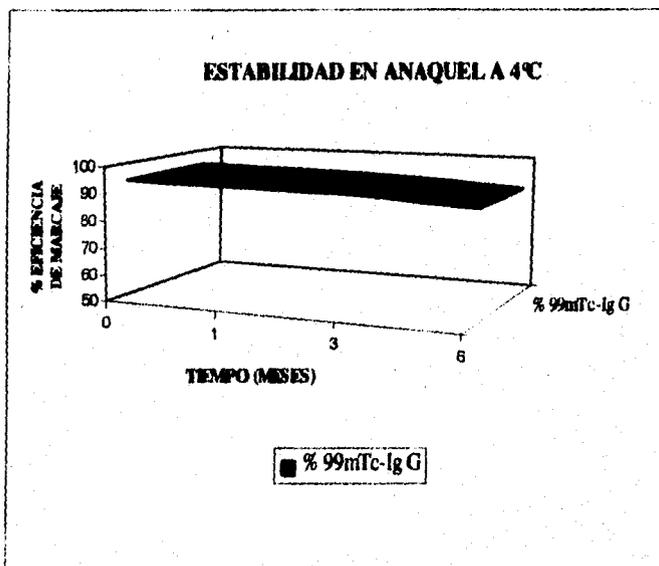


Fig. 10 Estabilidad del núcleo-equipo liofilizado en anaquel a 4 °C

CINÉTICA DE REACCIÓN: Orden cero. $C = C_0 - K t$

$$r = -0.9756$$

$$y = b - m x$$

$$b = 93.91$$

$$m = -0.56$$

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2K}$$

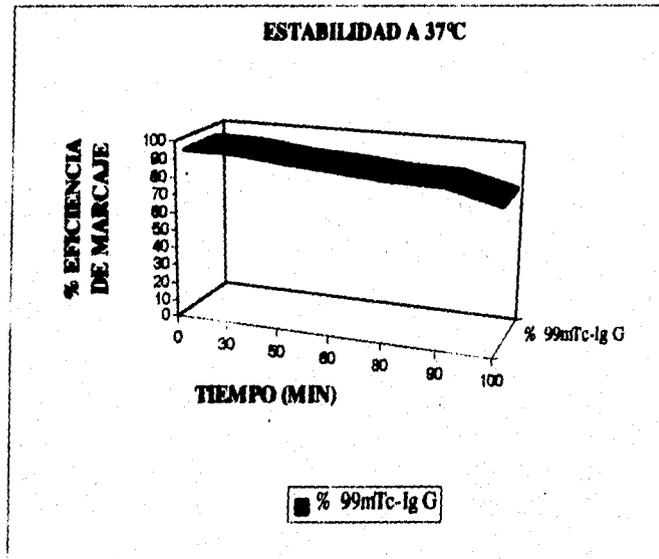


Fig. 11 Estabilidad del núcleo-equipo liofilizado a 37 °C

CINÉTICA DE REACCIÓN: Orden cero. $C = C_0 - K t$

$$r = 0.9619$$

$$y = b - m x$$

$$b = 97.94$$

$$m = - 2.6021$$

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2K}$$

6.11 ESTUDIOS DE DISTRIBUCIÓN BIOLÓGICA

Se visualizó la distribución biológica del núcleo-equipo ^{99m}Tc -IgG 5 horas después de la inoculación (Fig. 12) con el fin de observar las propiedades estructurales e inmunoreactivas del radiofarmaco.

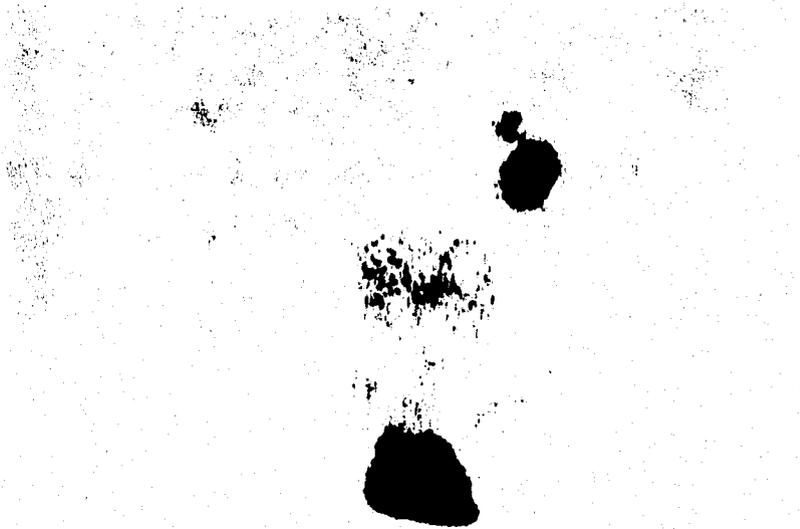


Fig. 12 Imagen de tórax en proyección posterior de un conejo con proceso inflamatorio e infeccioso en oreja y pulmones, obtenidas 5 horas después de la administración de ^{99m}Tc -Ig G

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Identificación de la gamma globulina humana. El tiempo de retención en el CLAR fue de 7.0. El cromatograma por CLAR de la gamma globulina humana, no muestra la presencia de pequeñas impurezas (Fig. 5), después de la reducción, el análisis de las fracciones que se emplean para la formulación muestran un sólo pico por lo que podemos decir que el anticuerpo empleado posee una alta pureza al no detectarse la presencia de otros componentes (proteínas de mayor o menor peso molecular). La curva de calibración para la determinación de la concentración de la Ig G se muestra en la figura 6.

Referente al análisis por ITLC-SG, la Tabla 1 muestra que el sistema saturado de seroalbúmina humana, es posible lograr que el anticuerpo marcado migre a un Rf de 0.7-1.0 y poder calcular el % de ^{99m}Tc -hidrolizado. Con el sistema ITLC-SG acetona se separó al $^{99m}\text{TcO}_4^-$, entonces, combinando a éste con el de ITLC-SG NaCl al 0.9% es posible calcular el % de ^{99m}Tc -EHDP.

La validación de los métodos analíticos para cuantificar la concentración de gaminoglobulina nos permite garantizar que se está obteniendo una proteína purificada con la concentración adecuada.

Formulación del núcleo-equípo liofilizado.

La base teórica para elegir los componentes de la formulación de los núcleo-equipos, se fundamentó en el hecho que al agregar una solución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a una formulación que contiene Sn^{2+} , EHDP ó gluconato de sodio e Ig G reducido, se lleva a cabo las siguientes reacciones: el estaño reduce al pertechnetato, éste forma con el ligante débil el complejo ^{99m}Tc -EHDP ó ^{99m}Tc -gluconato, el cual mediante intercambio de ligantes, acelera la cinética de formación del complejo ^{99m}Tc -Ig G, donde el ^{99m}Tc se une directamente a los grupos

sulfidrilo de los puentes disulfuro reducidos de la gammaglobulina. La preparación de los núcleo-equipos consistió en la mezcla, bajo atmósfera de nitrógeno, de dos soluciones, una conteniendo EHDP-Sn o gluconato-Sn y la otra Ig G reducida.

a) Elección del agente reductor. En el análisis por CLAR, no se encontró ninguna diferencia en los cromatogramas cuando se emplearon diferentes cantidades de agente reductor ni en los diferentes tiempos de incubación. El tratamiento estadístico de los resultados de pureza radioquímica con 2-ME a diferentes concentraciones y distintos tiempos de reducción muestra que hay diferencia significativa entre tratamientos. Por lo tanto se realiza un análisis de varianza de las fuentes y se observa que entre diferentes concentraciones de 2-ME hay diferencia significativa y entre distintos tiempos de reacción no hay diferencia significativa, esto se corrobora con la prueba de TUKEY.

Solo se realizó el tratamiento estadístico con el agente reductor 2-ME ya que fue el que mejor resultados de pureza radioquímica (PR) presentó y nuestro objetivo fue obtener una formulación con una PR mayor del 90 %. En el caso de las preparaciones con ácido ascórbico, no fue posible obtener una adecuada pureza radioquímica, como se observa en la Tabla 19. Esto significa que no se trabajó con la cantidad o el tiempo necesario para llevar a cabo la reducción de los puentes disulfuro de la Ig G. Se decidió elegir la concentración de 2.5 μL de 2-ME ya que en promedio presentó un mejor porcentaje de PR en cuando al tiempo de reacción no hay diferencia significativa pero se decidió emplear un tiempo de reacción de 40 minutos ya que se observó mejores resultados (Tabla 20).

b) Elección del ligante. El análisis estadístico muestra que no hay diferencia significativa entre tratamientos, pero al realizar un análisis de varianza de las fuentes se observa que con diferentes ligantes hay diferencia significativa, esto se corrobora al realizar una prueba de Tukey, donde se muestra que no hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones, no así para los ligantes que sí muestran una diferencia significativa. La Tabla 24 muestra el efecto de utilizar diferentes concentraciones de SnCl_2 en la solución de EHDP-Sn sobre la eficiencia de marcaje de la Ig G. Se puede observar que cuando se utiliza pequeñas cantidades de SnCl_2 (1.5 μg) se produce baja eficiencia de marcaje, debido

a que hay una insuficiente cantidad de SnCl_2 para reducir completamente al pertecneciato y llevar a cabo el intercambio de ligantes, al incrementar la cantidad de SnCl_2 a $3.0 \mu\text{g}$ por vial la eficiencia de marcaje mejoró ya que fue de 97.35 % no obstante un exceso de SnCl_2 ($7.5 \mu\text{g}$) incrementó la formación de el ^{99m}Tc -hidrolizado disminuyendo la eficiencia de marcaje de la Ig G. También es importante la cuidadosa preparación de la solución de cloruro estanoso, con el fin de evitar tanto la oxidación como la hidrólisis del mismo que puedan afectar el marcado de las moléculas; esto es el ion estanoso en solución tiende a oxidarse en poco tiempo a ion estánico; la oxidación se inhibió utilizando una atmósfera de nitrógeno al momento de preparar las formulaciones.

En la misma tabla se muestran los resultados empleando gluconato como ligante débil y se observa que al incrementar la concentración de SnCl_2 se incrementa el porcentaje de ^{99m}Tc -IgG, sin embargo el máximo porcentaje obtenido es de 60.3 %. Aquí la principal impureza encontrada fue el ^{99m}Tc -hidrolizado. Por lo tanto si se quisiera utilizar gluconato como ligante débil es necesario preparar una solución gluconato-Sn aumentando la concentración del ligante débil y optimizar la concentración del cloruro estanoso.

Radiomarcado y estabilidad del complejo ^{99m}Tc -Ig G. El análisis de la estabilidad del complejo ^{99m}Tc -Ig G en todas la formulaciones, muestra que éste se disocia en promedio tan sólo en un porcentaje de 7.1 ± 0.7 % en un período de 24 horas.

El análisis radioquímico de la solución de la gammaglobulina marcada, de la formulación M-2 a diferentes tiempos prueba que el mecanismo de marcaje de la proteína es por intercambio de ligantes; la Fig. 7 muestra como se incrementa la cantidad de ^{99m}Tc -Ig-G mientras que la de ^{99m}Tc -EHDP decrece con respecto al tiempo. Durante los primeros 30 minutos después permanece prácticamente sin cambios Fig. 8. Después de 24 horas, el por ciento de radiactividad asociada a la Ig G, decayó en promedio del 98.02 % al 91.1 %.

El análisis por CLAR de la solución de ^{99m}Tc -Ig G treinta minutos después de ser marcado demostró que la mayor parte de la radiactividad está asociada con un pico de idéntico tiempo de retención que el de la Ig G sin reducir; en el radiocromatograma se puede observar un pico menor (1.0%), el cual corresponde al complejo ^{99m}Tc -EHDP (Fig. 9). También se

comprobó por CLAR la presencia de una pequeña cantidad de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en la formulación (2.0 %) ya que al inyectar a la columna eluato del generador, se observó que el pertecneciato posee un tiempo de retención de 13.4 min.

Elección del ciclo de liofilización. Las formulaciones preparadas en los 4 lotes mostraron un contenido de humedad en promedio de 6.81 y 14.29 , así como ser productos estériles y libres de pirógenos. En la Tabla 33 se muestra el promedio de la pureza radioquímica, con los datos de dicha tabla puede apreciarse que la formulación cumple con las especificaciones para la mayoría de los radiofármacos que es poseer una pureza radioquímica mayor al 90 %, pero el contenido de humedad menor en el ciclo A aumentó un poco la pureza radioquímica, no obstante se decidió utilizar el ciclo de liofilización B, por que en éste se emplea menos energía, además el producto tiene la humedad apropiada para la Ig G de acuerdo a especificaciones para esta proteínas.

Pruebas de estabilidad en anaquel. Durante los seis primeros meses los núcleo-equipos mostraron una excelente estabilidad, ya que la pureza radioquímica después de la preparación fue de 93.84 % y de 93.14 %, 92.72 %, 90.34%, después del primero, tercero y sexto mes respectivamente a 4°C, siguiendo una cinética de reacción de orden cero.

Pruebas de estabilidad a 37°C. Con respecto a la estabilidad acelerada a 37°C muestra una excelente estabilidad, siguiendo una cinética de reacción de orden cero no obstante en necesario realizar pruebas de estabilidad acelerada a distintas temperaturas para poder predecir la constante de degradación a temperatura ambiente.

Estudios de distribución biológica. Los estudios de distribución biológica demostraron una excelente selectividad de procesos inflamatorios después de la administración de ^{99m}Tc -Ig G preparado como se describió anteriormente. La fig. 12 muestra una imagen de tórax de un conejo con proceso inflamatorio e infeccioso en oreja y pulmones.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que la Ig G puede ser marcada utilizando ^{99m}Tc con la simple adición del eluato a la formulación liofilizada, esto es, **en un solo paso**, y que además de obtener un alto rendimiento radioquímico presenta una excelente estabilidad.

Los resultados mostraron que la ^{99m}Tc -Ig G humana se obtuvo estéril y con una pureza radioquímica superior al 90 %. Con dicho radiofármaco fue posible obtener imágenes de abscesos en conejos y con esto se puede afirmar que la reducción de la Ig G con 2-mercaptoetanol no altera sus propiedades estructurales e inmunoreactivas; también los resultados mostraron al EHDP como un excelente ligante débil y al cloruro estanoso como agente reductor; y con la validación de los métodos analíticos para cuantificar la concentración de gammaglobulina se puede garantizar que se está obteniendo una proteína purificada con la concentración adecuada.

La técnica para producir núcleo-equipos en forma liofilizada para el marcaje, en un solo paso, de la inmunoglobulina con ^{99m}Tc que aquí se desarrolló podría también ser aplicada a otra variedad de proteínas que se desee marcar con tecnecio ^{99m}Tc como los anticuerpos monoclonales.

Es necesario realizar los estudios clínicos en pacientes para mostrar la eficiencia en la radioinmunodetección de procesos infecciosos e inflamatorios y poder considerar la producción comercial de este producto.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. H. Rubin R., J. Fischman Alan; " The Use of Radiolabeled Nonspecific Immunoglobulin in the Detection of focal Inflammation"; *Semm. Nucl. Med.*; Vol. 24 No. 2; pp. 169-179; (1994).
2. Frederick L Datz, Anderson, C.E. Ahluwalia R., Whiting J. H., Gabor V., Morton K. A., Crebs K., Neptune M., Rauh D.A; "The Efficacy of Indium-111-Polyclonal IgG for the Detection of Infection and Inflammation"; *J. Nucl. Med.*; Vol. 35. No. 1; pp 74-83; (1994).
3. Ferro F. G., Lezama C. J. "A Freeze Dried Kit Formulation for the Preparation of ^{99m}Tc -EHDP-MoAb-IORCEAl Complex"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 21. No. 7; pp. 1013-1016; (1994).
4. Fischman A. J., Solomon H. F., Babich J. W., Abrams M. J., Callahan R. J., Strauss J. W., Rubin R. H. "Imaging of Focal Sites of Inflammation in Rhesus Monkeys With ^{99m}Tc -labeled Human Polyclonal Ig G"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 21. No. 1; pp. 111-116; (1994).
5. Thakur, J. De Fulvio, C. H. Park, a. Damjanov, H. Yaghsezian, D. Jungkind, A. Epstein, J. G. McAfee; "Technetium-99m-labeled Proteins for imaging Inflammatory Foci"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 18, No 6; pp. 605-612; (1991).

6. Blok D., R. Feitsma, M. N. J. M. Wasser, W. Nieuwenhuizen, E. K. J. Pauwels; "A New Method for Protein Labeling with ^{99m}Tc "; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 16. No. 1; pp. 11-16; (1989).
7. Thakur M. L., De Fulvio J., Richard M. D., Park C. H.; "Technetium-99m Labeled Monoclonal Antibodies: Evaluation of Reducing Agents"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 18. No. 2; pp. 227-233; (1991).
8. Zhang, J. R. Ballinger, K. Sheldon, I. Boxen; "Evaluation of Reduction-mediated Labelling of Antibodies with Technetium-99m"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 19. No. 6; pp. 607-609; (1992).
9. De Ligny C. L., Gelsema W. J., Meijs W. E.; "A Chromatographic Study of the Composition of (^{99m}Tc)Tc(Sn)EHDP Complexes"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 18. No. 2; pp 173-178; (1991).
10. Lind P., Langsteiger W., Költringer P., Dimai H. P., Passl R., Eber O.; "Immunoscintigraphy of Inflammatory Processes with a Technetium-99m-Labeled Monoclonal Antigranulocyte Antibody (MAb BW 250/183); *J. nucl. med.*; Vol. 31. No. 4; pp. 417-423; (1990).
11. Jeannin, C., Mangeot, A., Verain, A.; "Ingeniería Farmacéutica"; El Manual Moderno; México, (1986); pp. 368-410.
12. G. Nonhebel, M. A.; "El Secado de Sólidos en la Industria Química"; Reverte; España, (1979); pp. 327-333.
13. Helman, J; "Farmacotecnia Teoría y Práctica"; Tomo III; CECSA; México, (1981); pp. 969-1048.

14. Montejo de Garcini Guedas V; "Tecnología Farmacéutica, Texto para el Ingeniero Farmacéutico"; Traducción de la 4ª Edición Alemana; Acribia; España, (1981); pp. 246-266;
15. Mallol, E. J.; "Radiofarmacia", Trazadores Radiactivos de Uso Clínico; Interamericana; España, (1989).
16. Hovi Y., Taavitsainen M., Lantto T., Vorne M., Reimes K.; "Technetium-99m-HMPAO-Labeled Human Polyclonal Immunoglobulin G in Diagnosis of focal Purulent Disease"; Vol. 9. No. 34; pp. 1428-1434; (1993).
17. Bellanti, J. A.; "Inmunología"; 3ª Edición; Nueva Editorial Interamericana; México, (1986). pp. 98-116;
18. 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, (1986).
19. Sbarbati, N. E.; "Estabilidad de Medicamentos"; Ateneo; México, (1984).
20. Artega De Murphy C.; "El Tecnecio en la Medicina Nuclear"; Publicación bajo el patrocinio de la Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear; México, (1989).
21. Proulx A., Gerson B., Ballinger J. R., Gulenchyn K. Y.; " A Kit for Labelling Erythrocytes or Leukocytes with Technetium-99m"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 17. No. 5.; pp. 515-517; (1990).

22. Ercan M. T., Aras T., Ünsal Y. S.; "Evaluation of ^{99m}Tc-erythromycin and ^{99m}Tc-streptomycin Sulphate for the Visualization of Inflammatory Lesions"; *Nucl. Med. Biol.*; Vol. 19. No. 7; pp. 803-806; (1992).
23. Ercan M. T., Ünlünen E.; "Accumulation of some Small Molecular Weight Complexes of ^{99m}Tc in Experimental Abscesses"; *Nucl. Med.*; Vol. 21. No. 2; pp. 143-149; (1994).
24. Takur M. L., Coleman R. E., Welch M. J.; "Indium-111-labeled leucocytes for the localization of abscesses: Preparation, analysis, tissue distribution and comparison with gallium-67 citrate in dogs"; *J. Lab. Clin. Med.*; Vol. 82. pp. 217; (1977).
25. Arteaga De Murphy C.; "El Tecnecio, Monografía"; Publicación bajo el patrocinio de la Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear; México, (1989).
26. Schwarz A, Steinstrabber A.; "A novel approach to Tc-99m labeled monoclonal antibodies"; *J. Nucl. Med.* Vol. 28; pp. 721; (1987).
27. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; Secretaría de Salud; México, (1988); pp. 225-227, 1535, 1536.
28. Farmacopea Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios; Vol. 4; Partes I y II; segunda edición; España (1991); pp. 125-125 15, 338-338 7.
29. Ferro F. G., García A. R., González M. A.; "Manual de Radiomarcado de Células Sanguíneas y Anticuerpos Monoclonales"; Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear; México, (1994).

10. ANEXO

10.1.1 Precisión

- Estadígrafo de prueba: $X^2_i = (n-1) S^2/CV$

$$n = 6$$

$$S^2 = (1.85)^2 = 3.42$$

$$CV = 2$$

$$X^2_i = [(5)(3.42)]/2 = 8.55$$

n = Numero de muestras analizadas

S = Desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación

- Estadígrafo de tablas: $X^2_{i, 1-\alpha, n-1}$

$$\text{Alfa} = 0.05$$

$$\text{alfa}/2 = 0.025$$

$$1-\text{alfa}/2 = 0.975$$

$$\text{g.l.} = n-1 = 5$$

$$X^2_{0.975, 5} = 12.832$$

10.1.2 Repetibilidad

- Estadígrafo de prueba: $X^2_i = (n-1) S^2/CV$

$$n = 6$$

$$S^2 = (0.68)^2 = 0.4624$$

$$CV = 2$$

$$X^2_i = [(5)(0.4624)]/2 = 1.156$$

n = Numero de muestras analizadas

S = Desviación estándar

C.V. = Coeficiente de variación

- Estadígrafo de tablas: $\chi^2_{i, 1-\alpha, n-1}$

$$\text{Alfa} = 0.05$$

$$\text{alfa}/2 = 0.025$$

$$1-\text{alfa}/2 = 0.975$$

$$\text{g.l.} = n-1 = 5$$

$$\chi^2_{0.975, 5} = 12.832$$

10.1.3 Exactitud

- Estadígrafo de prueba: $t_{\text{calc}} = (X-\mu) / [S/(n)^{1/2}]$

$$X = 100.37$$

X = media calculada

$$S = 0.68$$

S = Desviación estándar

$$\mu = 100$$

μ = Media teórica equivalente al 100%

$$n = 6$$

n = Número de muestras analizadas

$$t_{\text{calc}} = (100.37 - 100) / [(0.68)(6)^{1/2}] = 1.33$$

- Cálculo del estadígrafo de tablas: $t^2_{i, 1-\alpha, n-1}$

$$\text{Alfa} = 0.05$$

$$\text{alfa}/2 = 0.025$$

$$1-\text{alfa}/2 = 0.975$$

$$\text{g.l.} = n-1 = 5$$

$$t^2_{0.975, 5} = 2.5706$$

10.2.1 Precisión

- Estadígrafo de prueba: $\chi^2_i = (n-1) S^2 / CV$

$$n = 6$$

n = Número de muestras analizadas

$$S^2 = (1.15)^2 = 1.3225$$

S = Desviación estándar

$$CV = 3$$

C.V. = Coeficiente de variación

$$X^2_i = [(5)(1.3225)]/3 = 2.20$$

- Estadígrafo de tablas: $X^2_{1, 1-\alpha, n-1}$

$$\text{Alfa} = 0.05$$

$$\text{alfa}/2 = 0.025$$

$$1-\text{alfa}/2 = 0.975$$

$$\text{g.l.} = n-1 = 5$$

$$X^2_{0.975, 5} = 12.832$$

10.2.2 Repetibilidad

- Estadígrafo de prueba: $X^2_i = (n-1) S^2/\text{CV}$

$$n = 6$$

n = Numero de muestras analizadas

$$S^2 = (0.01)^2 = 1.0201$$

S = Desviación estándar

$$\text{CV} = 3$$

C.V. = Coeficiente de variación

$$X^2_i = [(5)(1.0201)]/3 = 1.7$$

- Estadígrafo de tablas: $X^2_{1, 1-\alpha, n-1}$

$$\text{Alfa} = 0.05$$

$$\text{alfa}/2 = 0.025$$

$$1-\text{alfa}/2 = 0.975$$

$$\text{g.l.} = n-1 = 5$$

$$X^2_{0.975, 5} = 12.832$$

10.2.3 Exactitud

- Estadígrafo de prueba: $t_{\text{calc}} = (X-\mu) / [S/(n)^{1/2}]$

$$X = 100.05$$

X = media calculada

$$S = 1.04$$

S = Desviación estándar

$\mu = 100$

$\mu =$ Media teórica equivalente al 100%

$n = 6$

$n =$ Número de muestras analizadas

$t_{calc} = (100.05 - 100) / [(1.04)(6)^{1/2}] = 0.1177$

- Cálculo del estadígrafo de tablas: $t^2_{1-\alpha/2, n-1}$

Alfa = 0.05

alfa/2 = 0.025

1-alfa/2 = 0.975

g.l. = n-1 = 5

$t^2_{0.975, 5} = 2.5706$

10.3 Tabla de ANDEVA para el Diseño de Bloques Aleatorios. Modelo utilizado en el software THE SAS SYSTEM

FUENTE	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	VARIANZA O CUADRADOS MEDIOS	F _{calc}	F _{teórica}
Tratamientos	K-1	$SC_{trat} = \sum_{j=1}^k X_{.j}^2 - \frac{X_{..}^2}{N}$	$S^2_{trat} = \frac{SC_{trat}}{k-1}$	$F = \frac{S^2_{trat}}{S^2_{error}}$	$F_{1-\alpha, k-1, g.l. error}$
Bloques	n-1	$SC_{bloques} = \sum_{i=1}^n X_{i.}^2 - \frac{X_{..}^2}{N}$	$S^2_{bloques} = \frac{SC_{bloques}}{n-1}$		
Error	(K-1)(n-1)	$SC_{error} = SC_{total} - SC_{trat} - SC_{bloques}$	$S^2_{error} = \frac{SC_{error}}{(k-1)(n-1)}$		
Total	N-1	$SC_{total} = \sum_{j=1}^k \sum_{y=1}^n X_{jy}^2 - \frac{X_{..}^2}{N}$	—		