



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

GUTIERREZ LOPEZ ELIZABETH

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: "DISEÑO Y ESTABILIDAD DE UN NUCLEO-EQUIPO PARA EL MERCADO INSTANTANEO CON Tc-99m DEL AcMo-10Reg/r³".

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. JOSE PONCE GUERRERO
VOCAL	Q.F.B. MA. ANGELICA PEREZ MORA
SECRETARIO	Q.F.B. GUILLERMINA FERRO FLORES
SUPLENTE	Q.F.B. FRANCISCA ROBLES LOPEZ.
SUPLENTE	Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES

Handwritten signatures and initials on the right side of the list, including a large signature at the top and another at the bottom.

ATENTAMENTE,
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a, 14 de NOVIEMBRE de 1995

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

**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.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo.

A. Q.F.B. Guillermina Ferro Flores por haberme guiado en la elaboración del mismo, por su apoyo, amistad y por compartir conmigo sus conocimientos.

A Q.F.B. Ma. Angélica Pérez Mora por transmitirme sus conocimientos y brindarme su tiempo durante la realización de este trabajo.

A DIOS por guiarme en el camino correcto y darme animo con sus oraciones.

A mis padres *Tomás Gutiérrez Mejía* y *María López García* Por haberme dado la vida, cuidarme y apoyarme en los momentos más difíciles de la vida.

A mis hermanos *Sergio, Bety* y *Socorro* por compartir conmigo todas las anécdotas de mi vida.

A la memoria de mi abuelita *Cristina García García* por haber estado conmigo siempre, cuidándome y enseñándome ser una mejor persona para mis semejantes, gracias.

A mis demás *familiares* y amigos con cariño y especial admiración.

GRACIAS.

ELIZABETH.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
1. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	2
1.1 Liofilización	2
1.2 Validación de métodos analíticos.....	10
1.3 Estabilidad.....	14
1.4 Monografía del AcMo IOR egf/r^3	18
1.5 Generalidades de los Radiofármacos	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
3. OBJETIVO	34
3.1 Objetivo general.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. HIPOTESIS	35
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	36
5.1 Materiales.....	36
5.3 Método.....	39
6. RESULTADOS	54
6.1 Curva de calibración para proteínas en el U.V.....	54
6.2 Elección del agente reductor para la reducción del Anticuerpo	55
6.3 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante HPLC y U.V.....	57
6.4 Elección del ligante y concentración del cloruro estanoico para la elaboración de un núcleo-equipó.....	66
6.5 Escalamiento del lote y tiempo de agitación óptimo, para el desarrollo de la formulación.....	67
6.6 Elección del ciclo de liofilización.....	69
6.7 Preparación de la formulación liofilizada para la elaboración del núcleo-equipó $^{99m}Tc-AcMo-10R^{egf/r^3}$ en condiciones estériles.....	71
6.8 Distribución Biológica	72
6.9 Estabilidad.....	72
6.10 Evaluación de la precisión del sistema ITLC.....	73
7. DISCUSION.....	75
8. CONCLUSIONES	81
9. BIBLIOGRAFIA.....	83
10. ANEXO.....	86
10.1 Elección del agente reductor para la reducción del anticuerpo.....	86
10.2 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante HPLC y U.V.....	86
10.3 Diseño Aleatorizado por Bloques Completos.....	95
10.4 Humedad.....	96
10.5 Distribución	96

INTRODUCCION

El objetivo principal de este trabajo, fue el desarrollar una nueva formulación de un núcleo-equipo estable, eficiente y seguro para el marcaje instantáneo con Tc-99m del Anticuerpo Monoclonal designado AcMo-IORegf/r3 para ser empleado en inmunoescintigrafía en el diagnóstico de tumores de origen epidermoide como por ejemplo el cáncer de mama. Para lograr dicho objetivo, se analizaron los diferentes factores que de una u otra forma afectaron la formación del complejo.

Mediante adecuados diseños de experimentos, se seleccionó el agente reductor más eficiente para la reducción del Anticuerpo, así como la obtención de la formulación liofilizada para la preparación del núcleo-equipo ^{99m}Tc-AcMoIORegf/r³ con una pureza mayor del 90%.

Se establecieron condiciones para el escalamiento del lote y su ciclo de liofilización. Así mismo, se demostró que los métodos de cuantificación (CLAR y UV) empleados en el estudio cumplieron con los propósitos para los cuales fueron diseñados.

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1 Liofilización

1.1.1 Antecedentes históricos

La liofilización como fenómeno natural existe prácticamente desde el origen de nuestro planeta, bastó que éste se enfriara lo suficiente para que su superficie se congelara y que una ráfaga de aire no saturado soplara sobre ellas para que el fenómeno se produjera.

Pero fue en 1811 cuando se introduce en el laboratorio como una curiosidad, cuando Leslie al colocar bajo una campana de cristal, un vaso de agua, otro con ácido sulfúrico y al hacer vacío en la campana, observa con sorpresa que el agua se congela, luego el hielo sublima y el vapor de agua es atrapado por el ácido sulfúrico.

Deben pasar algunos años hasta que Wollaston en 1813 realice en su laboratorio una experiencia similar, pero en un aparato ideado por el que no es otra cosa que un Liofilizador rudimentario. El aparato consistía en un balón que contenía agua, conectado a otro balón que estaba inmerso en un baño de hielo y éste a su vez conectado a una bomba de vacío. Se produce el mismo fenómeno observado por Leslie, con la diferencia que ahora el vapor de agua procedente de la sublimación quedará atrapado en las paredes frías del balón refrigerado (condensador).

Para que la liofilización se transformara de una simple curiosidad científica a un método industrial tuvo que transcurrir un periodo largo de tiempo.

Es así que en 1935 los investigadores Flosdorf y Mudd combinan con éxito calor y vacío, para obtener por primera vez plasma deshidratado estéril, que al reconstituirse conserva todas las características del producto original.

Basada en el éxito obtenido, la firma farmacéutica SHARP y DOHME encarga a Flosdorf la construcción del primer liofilizador industrial destinado a la producción en gran escala de plasma y del fármaco estrella de la época, la penicilina, permitiendo como ello salvar miles de vidas en los campos de batalla de La Segunda Guerra Mundial y al mismo tiempo consolidar a la liofilización como un método de Deshidratación Industrial. (1, 2)

1.1.2 Definición

Se puede definir a la liofilización como un método de deshidratación basado en la propiedad que presenta el hielo de sublimar a bajas presiones lo que permite la desecación de productos y alto contenido en agua a temperaturas que no sobrepasan los 0°C.

1.1.3 Ventajas y desventajas

1. Ventajas

La liofilización presenta las siguientes 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.
2. Máxima retención de las propiedades naturales del producto, el que mantiene todas sus características organolépticas.
3. Mantención de las propiedades biológicas y químicas.
4. Fácil reconstitución; gracias a la estructura porosa del producto este se disuelve instantáneamente al ser puesto en contacto con el agua.
5. El producto permanece estable durante toda la vida de almacenamiento.
6. Los productos que se degradan mediante oxidación son más estables porque el proceso se realiza al vacío.

2. Desventajas

No son todas 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.

1.1.4 Factores que influyen sobre la velocidad del proceso

1. Volumen del producto en el recipiente, cuanto mayor es el volumen del producto más habrá de durar el proceso de secado.
2. Presión residual del sistema debe ser mayor que la presión de vapor del hielo que está en el condensador, de lo contrario el hielo se evaporaría y pasaría a la bomba, lo cual sería nocivo para la mayoría de las bombas.
3. Grado de conducción térmica a través del recipiente y del material congelado, que suelen ser conductores relativamente malos del calor, hasta el límite del secado, manteniendo todo el producto por debajo de su temperatura eutéctica.
4. Efecto de la creciente profundidad del producto poroso seco encima del límite del secado.

1.1.5 Fundamento de la liofilización

1 Fundamento de la congelación como método de conservación

En el interior de cada producto de origen vegetal o animal, existen todos los elementos que a la larga llevan a su descomposición. Las reacciones que llevan a la destrucción de estos productos se ven favorecidas por la temperatura ya que a

mayor temperatura mayor será la velocidad de reacción entre las moléculas reaccionantes.

Si bajamos la temperatura haremos que la interacción molecular sea mínima, este objetivo lo logramos mediante el uso de la congelación, retardando así la descomposición del producto que no se activará mientras permanezca congelado.

En Liofilización la congelación es sólo una etapa, al bajar bruscamante la temperatura del producto a liofilizar detenemos todo proceso químico o biológico, eliminándose así uno de los factores que llevan a su destrucción. (2)

2 Fundamento de la deshidratación como método de conservación

Para que una reacción química en un liofilizado se lleve a efecto es imprescindible la presencia de agua, si esta es retirada de un sistema, todas las reacciones que están desarrollándose en su interior se detienen.

En esta propiedad se basa la deshidratación como método de conservación de productos naturales, ya que eliminando el agua contenida en ellos detenemos las reacciones que llevan a su descomposición. Como en liofilización la eliminación del agua se hace por sublimación del hielo, es condición que el producto sea previamente congelado.

De esta manera se conjugan en la liofilización los métodos tradicionales de conservación: Congelación y Deshidratación, con la ventaja que en esta última fase no intervienen altas temperaturas. (2)

1.1.6 Etapas de la liofilización

En el proceso de liofilización, se distinguen diversas etapas interrelacionadas entre sí, dependiendo la calidad del producto, del cuidado con que se realice cada una de ellas.

Clásicamente este método se divide en tres etapas:

- 1. Congelación**
- 2. Secado Primario**
- 3. Secado Secundario**

1 Congelación

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

1. Toda la marcha posterior del proceso
2. 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.

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.

Durante el tiempo transcurrido entre ambas cristalizaciones en la solución coexistirá una mezcla de cristales de hielo y un líquido de alta concentración, al cual se le conoce con el nombre de líquido intersticial.

El tiempo entre ambas cristalizaciones deberá ser el más corto posible, para evitar que el producto, sobre todo si es rico en proteínas, se desnaturalice por la presión osmótica del sistema.

Si a la solución anterior le agregamos una sonda que nos permita determinar su resistencia al paso de la corriente eléctrica, veremos que mientras exista líquido intersticial en el sistema, habrá paso de electricidad. Cuando éste se congele totalmente se producirá un brusco aumento de la resistencia en el interior del producto. La temperatura a la cual se logra la congelación total se conoce con el

nombre de temperatura de completa solidificación (T_{cs}) y es uno de los puntos necesarios de conocer antes de liofilizar un producto. Si ahora aumentamos lentamente la temperatura del producto congelado, cuando en el interior de la matriz aparecen los primeros indicios de líquido intersticial caerá bruscamente la resistencia. La temperatura a la cual se logra este cambio en la resistencia se conoce con el nombre de temperatura de fusión incipiente (T_{fi}) y es el otro punto que es necesario determinar antes de liofilizar. Ambas temperaturas se conocen con el nombre de puntos o temperaturas eutécticas.

La liofilización sólo se produce en el rango de temperatura comprendido entre T_{cs} y T_{fi} , siendo las temperaturas óptimas para llevar el proceso en forma rápida y segura las cercanas al punto T_{fi} . (2)

2 Secado primario

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 calórica
- b. Transferencia de masa

a. Transferencia de energía calórica

La liofilización está basada en la sublimación del hielo, proceso que requiere aporte de energía (calor latente de fusión) 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.

Con el objeto de impedir que el proceso se prolongue indefinidamente es necesario aportar calor al sistema, energía que se gasta en aumentar la velocidad de sublimación del producto, manteniéndose su temperatura constante mientras existan en su interior cristales de hielo.

La sublimación del hielo comienza cuando la presión en el interior del liostato, alcance valores inferiores a la presión de vapor correspondiente a la temperatura de la superficie, del producto congelado. (2)

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 donde se mezclan con las moléculas de gases incondensables que ahí se encuentran. La presión en el interior del equipo es ahora igual a la suma de las presiones parciales de los componentes de la mezcla gaseosa.

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 una alza en la temperatura del producto lo que llevara a la fusión de este.

Se hace necesario entonces eliminar el vapor de agua del sistema, por lo que las bombas de vacío son insuficientes para lograr este objetivo 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 una temperatura de -50°C , lo que permite la condensación del vapor de agua en su superficie fría.

Por tanto 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.

Si nos pudiéramos situar al interior del producto, veríamos que a medida que avanza el proceso, se van formando dos fases bien nítidas: Una superior seca y porosa, constituida por el producto ya sublimado y otra inferior constituida por el producto todavía congelado. El límite entre ambas fases se conoce con el nombre de

interfase, la que irá bajando en la medida que avanza la liofilización hasta que desaparece al sublimar 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.

3 Secado secundario

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 está 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 su desnaturalización.

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 humedad residual, ya que es característico para cada caso y debe determinarse mediante estudios de estabilidad.

Ha llegado el momento de sacar el producto del lioestado donde se encuentra a presiones negativas. Es necesario romper el vacío y hay que tener mucho cuidado en esta sencilla operación si no se quiere malograr todo el proceso anterior.

Con esto se ha terminado la liofilización del producto, el que se conservará indefinidamente en el tiempo, dependiendo que se hayan efectuado todas las operaciones en forma adecuada y de la calidad del envase elegido. (2)

1.2 Validación de métodos analíticos

1.2.1 Importancia de la validación

La validación de un métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica del análisis del control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. (3)

1.2.2 Parámetros a evaluar

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios de laboratorio, la confiabilidad de un método. Generalmente la validación consta de la evaluación de los siguientes parámetros:

1.-Sistema

- a) Precisión
- b) Linealidad

2. Método

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

1. Evaluación del sistema

a) Precisión

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

1) Criterio de aceptación

coeficiente de variación $< 2 \%$

2) Cálculos

ver Anexo sección 10.2.1 (a) y 10.2.2 (a)

b) Linealidad

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando por lo menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. (40,41 y 43)

1) Criterios de aceptación

coeficiente de variación $\leq 1.5\%$

$r \geq 0.99$

2. Evaluación del método

a) Exactitud

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. Se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de

manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración al 100%.

1) Criterios

coeficiente de variación $\leq 2\%$

promedio de recobro 98-102%

2) Cálculos

ver Anexo sección 10.2.1 (b) y 10.2.2 (b)

b) Linealidad

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. Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

1) Criterios

cantidad adicionada vs cantidad recuperada:

$m \approx 1$, $b \approx 0$, $r^2 \geq 0.98$.

c) Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

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

1) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas

bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

1) Criterios

coeficiente de variación $\leq 2\%$

2) Cálculos

ver Anexo sección 10.2.1 (c) y 10.2.2 (c)

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

1) Criterios

coeficiente de variación $\leq 2\%$

2) Cálculos

ver Anexo sección 10.2.1 (d)

d) Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para determinar solamente al (los) componente (s) que se va (n) a analizar. Se demuestran estableciendo experimentalmente que los excipientes y sustancias relacionadas al principio activo, como precursores de síntesis, productos de degradación no interfieran con la medición, es decir, que el método sea capaz de separar y cuantificar sin interferencias únicamente la (s) sustancia (s) de interés.

ver Anexo sección 10.2.2 (d)

1.3 Estabilidad

1.3.1 Importancia de un estudio de estabilidad

Entre los muchos requisitos que debe cumplir un medicamento para que pueda salir al mercado, destacan los estudios de estabilidad del mismo. Estos estudios consisten en poner el medicamento a diferentes concentraciones de temperatura e ir determinando la concentración del principio activo a diferentes tiempos; de los resultados obtenidos, es posible calcular la constante de velocidad de degradación del principio activo en el medicamento y el orden de reacción; ya con estos datos es posible calcular la fecha de caducidad a temperatura ambiente, haciendo uso del modelo matemático de Arrhenius. (6)

1.3.2 Tipos de estabilidad

1. Estabilidad física

En este caso se estudia si ha ocurrido algún cambio en las propiedades físicas tales como color, uniformidad, redispersabilidad, transparencia, solubilidad, etc., ya que durante el almacenamiento puede producirse la aparición de precipitados, cambios en la solubilidad o en la velocidad de disolución, separación de fases en las emulsiones, etc. Esas modificaciones, que aparentemente son inofensivos cambios físicos, pueden tener importancia fundamentalmente en la efectividad terapéutica del medicamento. (6)

2. Estabilidad química

Se basa en la determinación a través del tiempo del mantenimiento de la integridad química del medicamento, así como su potencia establecida en la etiqueta durante el tiempo de vencimiento señalado, empleando para ello métodos de análisis químico-físicos específicos. (6)

1.3.3 Diferentes metodologías empleadas en los estudios de estabilidad

1. Métodos de vida de estante

Es el método más clásico, el cual ha sido empleado desde el comienzo mismo de los estudios de estabilidad. Para ello se seleccionan de la producción toda una serie de muestras conocidas como lotes testigos, las cuales son almacenadas en las mismas condiciones prescritas por el productor.

Posteriormente se selecciona un método analítico específico apropiado y las muestras son valoradas periódicamente organoléptica y química o microbiológicamente, siendo registrados estos resultados hasta que se observa una pérdida de potencia por debajo de lo establecido (10% en la generalidad de los casos), o hasta que las características organolépticas no permisibles o límites de producto de descomposición son alcanzados, no debiendo permanecer por más de 5 años en el mercado, bajo ninguna circunstancia.

Este tipo de estudio tiene como principal limitante la cantidad del tiempo necesario a emplear para poder conocer la fecha de vencimiento, ya que solamente se puede ir alargando la misma de acuerdo al periodo analizado. Tiene también la desventaja de que si la fórmula no es suficientemente estable, esto sólo se conocerá al final del trabajo, lo que significaría una pérdida considerable de tiempo. (6,7)

2. Métodos cinéticos isotérmicos

En este caso se aplican los principios de la cinética química, teniendo como premisa que la velocidad de reacción aumenta con la temperatura.

Para ello se colocan las muestras en homas a diferentes temperaturas y se van realizando valoraciones en el tiempo hasta alcanzar una concentración de producto final cercana al 50% y se obtiene una serie de datos de concentración contra tiempo. Una vez realizado ésto, es necesario comenzar el procesamiento

matemático de los datos a fin de verificar toda una serie de parámetros cinéticos como son:

- Orden de reacción.
- Obtención del valor de la constante de velocidad en las diferentes isoterms.

A fin de obtener el valor del orden de reacción se puede emplear toda una serie de métodos siendo el más usado el método gráfico, aunque pueden ser usados el método de vida media, el método de sustitución, etc. El orden de la reacción es posible obtenerlo solamente a partir de la experimentación.

Los métodos cinéticos no obstante, permiten realizar el estudio de estabilidad en un tiempo mucho más corto que el empleado en la vida de estante y así obtener resultados confiables en un periodo razonable. (6,7)

1.3.4 Aplicación de la cinética a productos liofilizados

En el caso de formas sólidas, la problemática de la aplicación de la cinética se vuelve un tanto más ineficiente debido a toda una serie de factores, que se acentúan aún más por estar ausente de fases líquidas.

Los productos liofilizados, resultan ser un caso especial, ya que el porcentaje de humedad que contienen los mismos debe estar alrededor del 1% si se ha realizado un buen proceso tecnológico, pero esto puede variar y ser muy superior al de las tabletas, con lo que hay productos que se afectan rápidamente, como es el caso de las tetraciclinas; además, por lo general, se encuentran en una atmósfera inerte y deben ser estudiados después de su reconstitución. La aplicación de la cinética, aunque puede verse limitada en el caso del producto sin reconstituir, puede ser muy útil, para predecir la vigencia del producto después de reconstituido, así como la temperatura de almacenamiento adecuada, que se debe emplear para mantenerlo después de la reconstitución. (7,8)

1.3.5 Pruebas del estudio de estabilidad para polvos y liofilizados

Los parámetros a evaluar son: contenido del fármaco, características organolépticas, humedad. Si el producto es para reconstituir se debe preparar de acuerdo a las instrucciones indicadas en la etiqueta y los parámetros a examinar durante el periodo de conservación recomendado son: contenido del fármaco, características organolépticas y pH. (6,7 y 8)

1.4 Monografía del AcMo IOR egf/r³

1.4.1 Descripción

1 Nombre

Anticuerpo Monoclonal antireceptor de EGF lor egf/r³

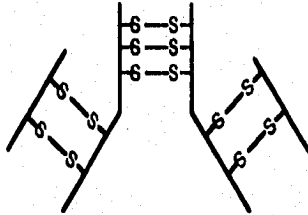


Figura 1 Representación de las dos cadenas pesadas y una ligera, donde se realiza la ruptura de los puentes disulfuro. En la cual se presenta la formación del complejo.

2 Peso Molecular

12000 a 36000

3 Color y Apariencia

El anticuerpo monoclonal es transparente estéril y aprotéica que puede contener algunas partículas finas y translúcidas, las cuales no afectan su efectividad.

4 Historia

En 1975, en los laboratorios de Investigación Médica de Cambridge, en el Reino Unido, los investigadores Georges Kohler y Cesar Milstein diseñaron la tecnología del hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales en grandes cantidades. A partir de entonces se empleó esta tecnología para la obtención de anticuerpos monoclonales con todo tipo de aplicación, básicamente en análisis clínicos. En 1979 el doctor Thomas Waldman, jefe del departamento de Metabolismo del Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda, en Maryland (EE.UU) fue uno de los primeros en emplear el anticuerpo monoclonal para diagnóstico contra el cáncer.

En 1989 Schwarz y cols desarrollaron un método que utiliza los puentes disulfuros en las proteínas para conjugar el Tc-99m a los anticuerpos monoclonales a través de una sal de estaño.

Actualmente el Centro de Inmunología Molecular de la Habana, Cuba, ha generado un hibridoma productor de un Anticuerpo Monoclonal que reconoce el receptor de EGF con alta afinidad, existiendo resultados preliminares de estudios inmunogammagráficos con Anticuerpos Monoclonales IOR egf/r^3 , en tumores neoplásicos de cabeza y cuello que demuestran su especificidad inmunogammagráfica. (9, 10, 11 y 12)

1.4.2 Obtención

El IOR egf/r^3 es un Anticuerpo Monoclonal tipo IgG2a secretado por el hibridoma derivado de la fusión del mieloma de ratón con los linfocitos del bazo de ratones inmunizados con una fracción parcialmente purificada del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este Anticuerpo Monoclonal es purificado a partir del líquido ascítico murino utilizando cromatografía de afinidad Proteína A sefarose. (13,14)

1.4.3 Método de análisis

1 Identificación del AcMo por CLAR con detector de arreglo de diodos

Para la identificación del Anticuerpo Monoclonal IOR egf/r³ ha sido empleada una columna de filtración gel Protein Pak 300 sw y un sistema eluyente de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 con un flujo de 1.0 ml/min a una longitud de onda de 280 nm. En dicho sistema se han obtenido cromatogramas de AcMo IOR egf/r³ con un tiempo de retención entre 6.8 y 7.2 minutos. Una muestra de AcMo IOR egf/r³ es mostrada en el Anexo sección 10.2.2 (d)

2 Identificación del AcMo por cromatografía instantánea en capa fina ITLC-SG

La finalidad de desarrollar este sistema ha sido el de tener la posibilidad de separar las diversas impurezas radioquímicas que se forman al reconstituir un núcleo-equipos de Anticuerpo Monoclonal IOR egf/r³ con el eluato de pertechnetato. Para ello se han empleado tiras de ITLC-SG (Tiras de fibra de vidrio impregnadas con sílica Gel, para cromatografía instantánea de capa fina) de 1 X 10 cm a las que se les ha hecho eluir con tres diferentes sistemas. Posteriormente se han cortado por la mitad y se ha determinado la actividad tanto en el origen como en el frente del sistema mediante el empleo de un contador de centelleo sólido, NaI(Tl). De esta forma, las diferentes especies han sido separadas como se muestra en la siguiente tabla:

SOPORTE	ITLC-SG	ITLC-SG	ITLC-SG(HSA*)
DISOLVENTE	NaCl 0.9%	ACETONA	$NH_4OH:ET-OH:H_2O$ (1:2:5)
$Rf^{99m}TcO_4^-$	0.9-1.0	0.9-1.0	0.9-1.0
$Rf^{99m}TcO_2 \cdot H_2O$	0.0	0.0	0.0
$Rf^{99m}Tc-AcMo$	0.0	0.0	0.7-1.0
$Rf^{99m}Tc-EHDP$	0.9-1.0	0.0	0.9-1.0

* ITLC-SG(HSA) han sido preparadas sumergiendo tiras de ITLC-SG en solución salina conteniendo seroalbúmina (5mg/ml) durante 30 minutos, lavadas y secadas a temperatura ambiente. (15)

1.4.4 Farmacología

El receptor del factor de Crecimiento Epidérmico (R-EGF) ha sido implicado en la transformación maligna debido a varios aspectos: 1) El gen que codifica para el R-EGF se ha encontrado amplificado en carcinomas epidermoides humanos, 2) Su expresión en el cáncer mamario humano está asociado a la malignidad del tumor.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos capaz de estimular la proliferación de células epiteliales y de origen mesenquimatoso. Este receptor (R-EGF) ha despertado un interés creciente en las investigaciones sobre las neoplasias malignas. (14)

1.4.5 Características terapéuticas

1 Presentación Farmacéutica

Liofilizado con 2.5 mg de anticuerpo monoclonal murino IOR egf/r^3 estéril y aplogénico en solución amortiguadora (pH 6.5-7.5) de fosfato monobásico de sodio (2.75mg), fosfato dibásico de sodio (10.32mg), 5.55 mg de etano-1-hidroxi-1,1-difosfonato (EHDP), 0.003mg de cloruro estano (SnCl₂) y 1.875 µg de ácido gentsico y excipiente cbp a 24 mg.

2 Administración y dosis

Cada núcleo-equipo del liofilizado se reconstituye con 5 ml de solución salina estéril, la cual contiene ^{99m}Tc con una actividad de 2.5 mCi, éste es administrado por infusión intravenosa y monitoreado a los 30 minutos de la inyección. (14)

3 Aplicación clínica

Clinicamente el receptor del factor de crecimiento epidérmico (egf/r) es recomendado como diagnóstico en los tumores malignos de origen epitelial tales como los de mama, vejiga, ovario, vulva, esófago, colon y pulmón. (14, 15 y 16)

4 Precauciones

No debe ser administrado a personas embarazadas o personas que actualmente hayan recibido otra dosis con la misma actividad. No deberá administrarse sin estricta vigilancia médica.

5 Toxicología, efectos adversos

En un estudio elaborado por administración aguda del Anticuerpo Monoclonal IOR egfr³ con cuarenta ratas Sprague Dawley hembras de 150-200 gramos de peso corporal y cuarenta ratas macho de 180-240 gramos de peso corporal, empleando una dosis equivalente en la rata de 0.34 mg/Kg (De acuerdo a la dosis total propuesta para la administración en los pacientes), y al ser realizados los siguientes ensayos: 1) Una dosis 10 veces mayor (3.4mg/kg), 2) Una dosis 25 veces mayor (8.5 mg/Kg), se observó que en el estudio en ratas macho el comportamiento de los animales tratados con el IOR egfr³, en ninguno de los grupos se registraron alteraciones del incremento del peso corporal y no indicó la existencia de cambios en el comportamiento o la actividad que pudieran relacionarse con la toxicidad del producto.

En el caso de las ratas hembras tampoco indicó alteraciones en el comportamiento de los animales durante el período de observación.

La evaluación de los índices hematológicos no muestran valores que se comporten diferente de los normales en ninguno de los grupos tratados tanto machos como hembras en relación al control, así mismo el análisis de los datos de la bioquímica sanguínea no muestra tampoco valores que pudieran considerarse fuera de los valores normales en urea, colesterol y proteínas totales.

En conclusión la administración del Anticuerpo Monoclonal IOR egfr³ a ratas de ambos sexos no produce alteraciones del comportamiento de los animales ni del incremento del peso corporal de los mismos en un período de observación de 1 mes posterior a la administración de las dosis de hasta 25 veces superior a la propuesta para el humano. (14)

1.4.6 Biodistribución

En un estudio en ratas Sprague Dawley machos con pesos entre 140-200 gramos, se le inyectó a cada animal 14430 Bqμ de actividad. Los animales fueron sacrificados a los intervalos: 15', 30', 1, 4, 6, 24, 48 y 72 horas post inyección, además de un instante inicial (2-3 min. después de la inyección). El producto fue administrado vía endovenosa. Los órganos que se extrajeron fueron: hígado, bazo, fémur, piel, testículos, riñones, músculo (muestra), tiroides, pulmones, timo, estomago, vejiga, intestinos delgado y grueso, corazón y sangre, los cuales se pesaron y la radiactividad de los mismos se midió en un contador de pozo ZAhLER VA-G-120.

Al ser concluido el estudio se obtuvo que los valores de mayor incorporación aparecen en los pulmones, riñones, piel, vejiga, corazón y sangre en el intervalo de 1-4 horas después de la inyección. No se presentan acumulaciones en ningún órgano. Para los puntos de 48 y 72 horas los valores de incorporación son mínimos en comparación con los anteriores. Obteniéndose un tiempo de vida media aproximado de 45 a 52 horas. (14)

1.5 Generalidades de los Radiofármacos

1.5.1 Definición de radiofármaco

Los radiofármacos son toda sustancia química conteniendo un átomo radiactivo dentro de su estructura que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, son administrados con el fin de visualizar la anatomía de un órgano o sistema, evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de los tejidos, analizar a través de su metabolismo el comportamiento bioquímico o determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos comparando estos resultados con los obtenidos en una población de seres humanos normales voluntarios. (17,18)

1.5.2 Definición de núcleo-equipo

Un núcleo-equipo es un frasco de reacción estéril y libre de pirógenos que contiene sustancias químicas no radiactivas necesarias para la preparación de un radiofármaco cuando se le hace reaccionar con una solución de pertechnetato-Tc-99m.

Los componentes primarios de un radiofármaco son el ligante y el agente reductor, mientras que los secundarios son agentes dispersantes, estabilizadores, diluentes, etc. (19)

1.5.3 Características de los radiofármacos

Los radiofármacos son los trazadores radiactivos de uso interno, que se emplean en medicina nuclear en exploraciones diagnósticas y en radioterapia. Su aplicación es siempre al interior del organismo, por lo que su utilización sólo puede justificarse por la obtención de un beneficio neto que compense el riesgo que pueda entrañar el empleo del trazador radiactivo por pequeño que éste sea. Como se ha dicho, un radiofármaco está constituido por un radionúcleo 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. (17,18 y 20)

1.5.4 Síntesis de moléculas marcadas

1 Trazadores radiactivos de uso "in vivo" e "in vitro"

Los trazadores radiactivos de uso "in vivo" necesitan, para su correcta utilización, cumplir los requisitos exigidos a un fármaco según su F.F. y la vía de administración, mientras que en los trazadores de uso "in vitro" se pueden utilizar sustancias no permitidas para uso interno tales como solventes orgánicos, bactericidas tóxicos etc. Las características para cada uno son las siguientes:

- a) Radionúclidos para trazadores de uso "in vivo": período corto, poco energéticos, emisores gamma.
- b) Radionúclidos para trazadores de uso "in vitro": semiperíodo largo, de energía variable, emisores beta o gamma, que no se distorsionen las moléculas que marcan. (18,20)

2 Técnicas de marcaje

El marcaje consiste en introducir el radionúclido en la molécula a marcar para obtener el trazador radiactivo. Las operaciones de marcaje pueden ser de dos tipos diferentes, marcajes "in vivo" e "in vitro".

- a) Síntesis "in vitro": Son reacciones químicas en presencia del radionúclido elegido durante que el radionúclido se incorpora a la molécula; normalmente son procesos de oxido-reducción.
- b) Síntesis "in vivo": Consiste en incubar a un organismo vivo, normalmente a un microorganismo, en presencia del radionúclido para que ese microorganismo lo

capte del medio y lo utilice en su metabolismo, sintetizando la molécula requerida que quedará marcada. (18,20)

3 Marcaje de moléculas con tecnecio

Para marcar moléculas con el eluido del generador es preciso reducir el tecnecio y pasarlo de valencia 7+ a otro estado de oxidación más bajo: 3+, 4+ ó 5+, estados en los que es más reactivo.

Para la reducción se han utilizado numerosos agentes reductores pero normalmente los más usados son el ácido ascórbico y cloruro férrico, y sobre todo el cloruro estano, que es el que en la práctica resulta más habitual. (19)

1.5.5 Clasificación de los radiofármacos

- a) Radiofármacos "sustrato no específico": permiten 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. (17,18)

1.5.6 El tecnecio en medicina nuclear

El tecnecio (del griego "technetos" = artificial) fue aislado en 1937 por C. Perrier y E. Segré, 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. (19, 21)

1 Tecnecio-99

No. atómico 43, No. másico 99. No. neutrónico 56.

Metal de transición del grupo 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)5s² 4d o bien: (Kr) 5s 4d .

No. de coordinación: 4 a 10. (19, 21)

2 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 1mCi(37MBq) representan 0.19 ng de peso).

Actividad específica: 5300 millones de mCi/g.

Obtención: Es relativamente fácil por los generadores de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. El término "generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc" se refiere al sistema de los dos radionúclidos, que permite la separación del radionúclido hijo, en forma de pertechnetato, al hacer pasar solución salina a través de una columna de alúmina que adsorbe fuertemente al molibdeno. Al proceso de extracción se le 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 pertechnetato eluido. (19, 21)

3 Ventajas del Tc-99m en medicina nuclear

- a. Es de fácil obtención: Generador de Molibdeno-Tecnecio
- b. Tiempo de vida media física corto (6.02 horas).
- c. La energía de las radiaciones gamma es de 140 Kev, fácilmente detectadas y proporcionan imágenes de alta calidad (monoenergético).

- d. 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.
 - e. Se obtiene como pertecneciato, máximo estado de oxidación.
- . (18, 19, 21)

1.5.7 Control de calidad de radiofármacos

1 Controles físicos

a) Características organolépticas

Todo inyectable debe estar libre de partículas visibles a simple vista, con iluminación puntual de lámpara de tungsteno y fondo blanco y negro. 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 microsferas. (17,18)

b) Tamaño y número de partículas

Dependiendo del grupo de partículas en suspensión se pueden usar distintos métodos, por ejemplo: para coloides, podemos mencionar pasar a través de membranas, microscopía electrónica o filtración en gel. Para macroagregados, microagregados o microsferas basta con un microscopio de buena resolución y una cámara cuenta glóbulos. (17,18 y 20)

2 Controles químicos

a) Pureza química.

Se define como la fracción de la masa total presente en una forma química específica. La pureza química puede referirse tanto a la sustancia de la que forma parte el radionucleido, como a los reactivos usados en la formulación del radiofármaco. Además de considerar la pureza química de los blancos a irradiar en la etapa de producción de un radionucleido, es importante considerar la pureza de las soluciones portadoras y de los reactivos utilizados en la preparación de los núcleo-equipos para marcación instantánea con isótopos de corto período de semidesintegración.

Los métodos más comúnmente utilizados para la determinación de pureza química son: espectrofotometría de absorción en el visible y ultravioleta, espectroscopia de absorción atómica, colorimetría, etc. (17,18)

b) Determinación de pH

Todos los radiofármacos deben tener un 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. (17,18)

3 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.

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

Filtración en gel

(18, 21)

4 Controles biológicos

a) Esterilidad

Se define como tal , la ausencia de toda forma de microorganismos viables. Es necesario tener presente que los ensayos de esterilidad no deben ser la única medida considerada para asegurar que cualquier inyectable sea estéril. Tan sólo es parte de un sistema de producción rutinario donde deben controlarse, además, condiciones higiénicas de trabajo, métodos, contaminación previa a la esterilización, eficiencia del proceso de esterilización, etc. 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 período de tiempo. (17,18)

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. (17,18)

c) Isotonicidad

Una solución es isotónica, cuando su concentración osmótica es igual a la del suero sanguíneo sin provocar alteraciones químicas o biológicas en este 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. (17,18)

d) Pirógenos

Los pirógenos son endotoxinas, producto del metabolismo de los microorganismos. Su presencia en soluciones inyectables, ya sea por vía intravenosa o a veces intramuscular, trae consigo una reacción febril que se manifiesta poco después de ser inyectada en un animal homotermo, provocando variación de la temperatura basal. (17,18)

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 si ofrecen un buen modelo biológico en el comportamiento de los radiofármacos. (17,18)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace una década los anticuerpos monoclonales han formado parte del estudio de las ciencias biomédicas, se necesito tiempo, antes de que los anticuerpos monoclonales vinieran a ser útiles en el diagnóstico y terapia de diversas neoplasias y poder disminuir de esa forma a el principal indice de mortalidad en los países desarrollados.

Los anticuerpos monoclonales han tenido un impacto significativo en la práctica de la Medicina Nuclear, debido a que éstos al ser radiomarcados, llegan a ser radiofármacos que se emplean como diagnóstico para realizar la exploración gammagráfica de un determinado órgano.

La radioinmunoescintigrafía es una técnica actual que se utiliza en los países desarrollados para el diagnóstico y tratamiento precoz de cánceres y sus metástasis. En México la escasa utilidad de radiofármacos inmunogammagráficos, así como la poca investigación de estos temas, se conjugan para tener poco difundida dicha técnica. En 1993 el Departamento de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares G. Ferro y cols. desarrollaron una formulación liofilizada para el mercado instantáneo con ^{99m}Tc del anticuerpo monoclonal IOR-CEA1 contra cáncer de colon, con resultados exitosos (G. Ferro et al A Freeze Dried Kit Formulation for the preparation of ^{99m}Tc -EHDP-MoAb-IOCEA1 complex. Nucl. Med. Biol. in press, 1994 MaNo. 0.97).

La idea de continuar con esta línea de investigación es uno de los objetivos de esta tesis ya que se pretende obtener un radiofármaco inmunogammagráfico designado AcMo-10R-*eg/r3*, éste es un conjugado obtenido a partir de un anticuerpo monoclonal murino *lor eg/r3* contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano. Tras su marcado con ^{99m}Tc actúe como un agente Inmunogammagráfico, para estudios pronósticos de cáncer de mama, debido a que una de cada 15 mujeres con masas mamarías tienen cáncer.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo general:

Obtener una formulación liofilizada de la preparación del núcleo-equipos $^{99m}\text{Tc-AcMo-IORegf/r3}$.

3.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar una formulación liofilizada del AcMo-IORegf/r3 para la preparación del núcleo-equipos $^{99m}\text{Tc-AcMo-IORegf/r3}$.
- Validar el método analítico para la cuantificación del anticuerpo monoclonal mediante CLAR y U.V..
- Establecer un estudio de estabilidad acelerada a la formulación obtenida.

4. HIPOTESIS

Si se encuentra la formulación de un núcleo-equipó cuyos componentes primarios son el Anticuerpo Monoclonal (AcMo10Reg1/13), Cloruro Estano (SnCl₂) y Etano-1-hidroxi-1,1-difosfonato (EHDP) así como la aprobación de los controles de calidad de los radiofármacos, entonces la formación del complejo Tc-99m-AcMo (-S-99mtc-S-) tendrá una pureza radioquímica mayor al 90% teniendo una formulación estable, eficiente y segura.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

1. 2-mercaptoetanol, Sigma, lote M6250.
2. Gammaglobulina de conejo, Sigma, lote G-0260.
3. Cloruro estanoso anhidro, Sigma, lote S2752.
4. Nitrógeno de alta pureza, INFRA 99.995% pureza UN1066.
5. Eluato de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ obtenido de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ GETEC-ININ.
6. Anticuerpo monoclonal murino IgG1 IOR-EGF/r³, suministrado por el Centro de Inmunología Molecular (Habana, Cuba) dentro de viales conteniendo 1 ml de una solución neutra estéril y aprotgénica con una concentración de anticuerpo de 5 mg/ml.
7. Etano-1-hidroxi-1, 1-difosfonato (EHDP), sintetizado en el laboratorio.
8. Gluconato, sintetizado en el laboratorio.
9. Acido ascórbico, polvo reactivo, Sigma, lote 778R.
10. Albúmina Humana "Seralbumin", Reg No 89554 S.S.A clave 3662, Cutter, lote 84Y014.
11. Pluronic F-68 muestra de polioles, S.A, lote 121A.3.
12. Acido gentísico, Sigma, lote 6-5254.
13. Etanol "Baker Analyzed" Reactivo, análisis de lote M-31841.
14. Acetona, "Baker Analyzed" Reactivo, pureza 99.5%, análisis de lote 39737, lote 9008-62.
15. Hidróxido de amonio, "Baker Analyzed" Reactivo, análisis de lote C40456, lote 9721-62.
16. Fosfato de sodio dibásico anhidro polvo (Na_2HPO_4), "Baker Analyzed" Reactivo análisis de lote M-30292, lote 3828.
17. Fosfato de sodio monobásico-cristales ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), "Baker Analyzed" Reactivo; análisis de lote M-33097, lote 3818.
18. Acido clorhídrico, "Baker Analyzed" Reactivo, lote 9535-54.
19. Agua Millipore
20. Solución salina

21. Muestra de endotoxinas liofilizado de E. coli.
22. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) con 0.125 EU/mL, lote H45DL.
23. Medio de Tioglicolato Líquido (Pruebas de esterilidad de productos biológicos y farmacéuticos), pH 7.1 ± 0.2 , DIBICO S.A. de C.V., lote 2331054.
24. Medio de Cultivo Caldo de Soya tripticaseína, (cultivo de gérmenes exigentes), pH 7.1 ± 0.2 , DIBICO S.A. de C.V., lote 2333054.

6.1.2 Material

1. Membranas de 0.22 micras, Millipore Co., lote H 4 CM01524.
2. Tiras de fibra de vidrio impregnadas con sílica gel (ITLC-SG), Gelman Sciences Inc. lote 9743.
3. Matraz Erlenmeyer 125 ml.
4. Kitasato de 1000 ml.
5. Vaso de precipitado de 50 ml.
6. Vaso de precipitado de 250 ml.
7. Vaso de precipitado de 150 ml.
8. Vaso de precipitado de 500 ml.
9. Pipeta graduada de 1 ml.
10. Pipeta graduada de 5 ml.
11. Probeta de 100 ml.
12. Probeta de 25 ml.
13. Soporte Universal.
14. Pinzas de tres dedos con nuez.
15. Matraz balón de tres bocas de 250 ml.
16. Tubos de ensayo 150 X20 mm.
17. Piseta.
18. Termómetro -10°C-200°C.
19. Cronómetro Sportex.
20. Guantes estériles hypo-alérgicos Safekin.
21. Micropipeta de 100 -1000 μ l.
22. Micropipeta de 5-50 μ l.
23. Jeringa de inyección (HPLC) Unimetrics.
24. Embudo para filtración (millipore).
25. Gradilla para tubos de ensayo.
26. Pinzas para filtración.
27. Papel filtro Gelman Sciences.

28. Filtro Millipore (swinnex 25).
29. Jeringa plastipak de 10 ml
30. Jeringa plastipak de 5 ml.
31. Jeringa para insulina.
32. Parafilm, laboratory film American National Co.
33. Tabla de disección.
34. Bisturí.
35. Bolsas de plástico (10X5 cm).

5.1.3 Biológico

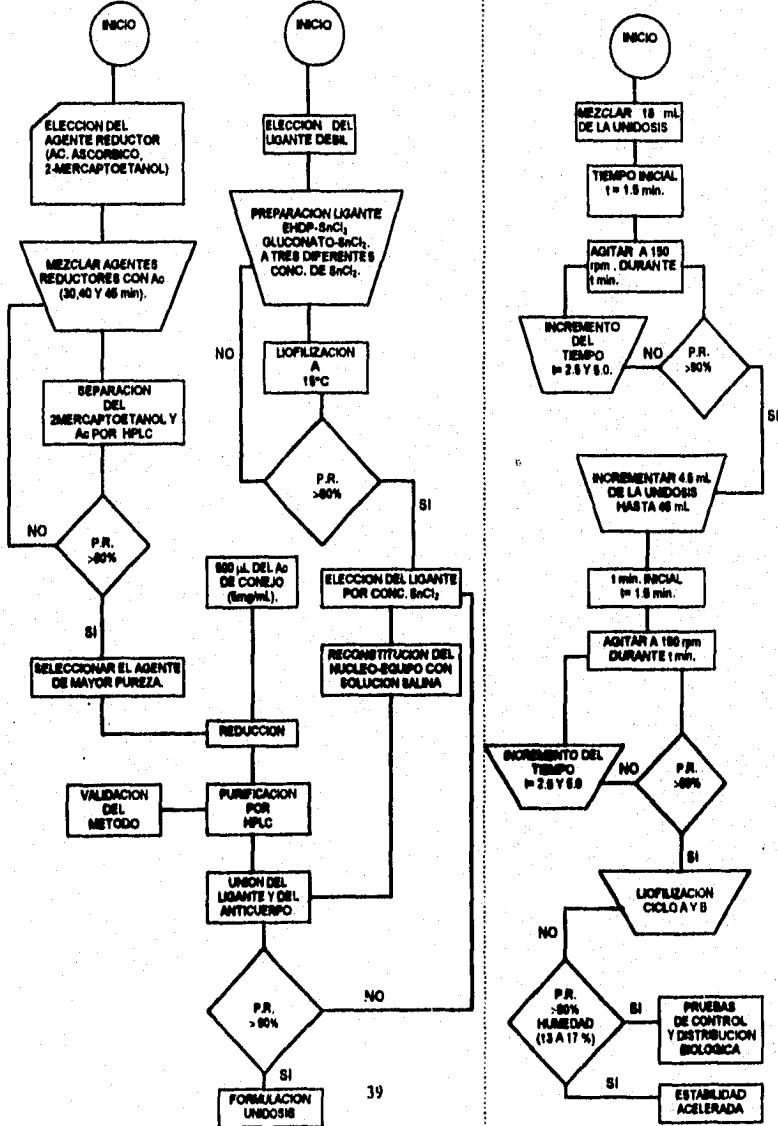
1. Ratones blancos cepa Balb-C

5.2 Equipo

1. Espectrofotómetro U.V., Beckman, modelo 35.
2. Detector de centelleo sólido, NaI(Tl) Nuclear Medical Laboratories, Inc.
3. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Laboratory Data Control con columna de filtración de gel Protein Pak 300 sw (Waters).
4. Liofilizadora Virtis, modelo 10-100.
5. Campana de flujo laminar VECO.
6. Colector de fracciones coll-300, Pharmacia.
7. Balanza Analítica Sartorius 1602MP.
8. Balanza semianalítica OHAUS, BRAINWEIGH B 1500D.
9. Estufa Nacional.
10. Vórtex Maxi Mix 1 Type 16700 Mixer.
11. Parrilla de agitación y calentamiento, Nucriter Thermolyne Pat No. 3388.712

5.3 Método

En el diagrama se esquematiza el método desarrollado en la parte experimental:
FORMULACION POR UNIDOSIS: LIGANTE, AGENTE Y SnCl₄.
ESCALAMIENTO DE LA UNIDOSIS



Debido al costo que presentó el Anticuerpo Monoclonal, para la elaboración de la formulación, primeramente se realizó el ensayo experimental con la gammaglobulina de conejo, el cual tuvo un costo más accesible para que se realizara la investigación.

Posteriormente al llegar a la formulación adecuada se elaboró con el Anticuerpo Monoclonal.

5.3.1 Preparación de soluciones

a. Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos

Se pesaron 1.147 g de Na_2HPO_4 y 0.306 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se disolvieron en 50 ml de H_2O millipore, hasta disolución completa con previo calentamiento. La disolución obtenida se aforó con 500 ml de H_2O millipore, filtrando con membrana de 0.45 μM . La solución filtrada fue sonicada, enriada a 4 °C y después purgada con nitrógeno durante 15 minutos.

b. Preparación de la curva de calibración para proteínas en el U.V.

La concentración obtenida de la proteína después de haber sido purificada fue de 2.5 mg/ml. Para que se realizara esta curva de calibración se partió de esta concentración para la realización de las diluciones, siendo que ésta concentración de la proteína tenía que estar incluida dentro de la curva de calibración.

Entonces se prepararon las siguientes diluciones:

Dilución (V/V)	Concentración (mg/ml)
-----	5
2:4	2.5
2:4	1.25
2:4	0.625
2:4	0.312

c. Preparación del Medio de Tioglicolato Líquido.

Se rehidrataron 29.5 gramos del medio de cultivo en 1000 ml de H_2O destilada, calentando a ebullición hasta disolución completa. Se distribuyeron volúmenes de 15 ml

en tubos de 150 X 20 mm, esterilizando el medio a 121 °C (15 plg^2 de presión) durante 15 minutos. Los medios de cultivo se guardaron en la oscuridad a temperatura ambiente.

d. Preparación del Medio de Cultivo Caldo de Soya Trypticaseína.

Se rehidrataron 30 gramos del medio de cultivo en 1000 ml de H_2O destilada, calentando a punto de ebullición hasta completa disolución. Se distribuyeron 15 ml en tubos de 150 X 20 mm, esterilizando el medio a 121 °C (15 plg^2 de presión) durante 15 minutos. Los medios de cultivo se guardaron a temperatura ambiente.

5.3.2 Elección del agente reductor para la reducción del anticuerpo.

a. Reducción de los puentes S-S utilizando 2-mercaptoetanol.

La gammaglobulina de conejo fue preparada a una concentración de 5 mg/ml, y fraccionada en alícuotas de 500 μl , estas fracciones se saturaron de nitrógeno durante 5 minutos y fueron reducidas con 1.5, 2.5 y 5.0 μl de 2-mercaptoetanol. La mezcla del agente reductor y la gammaglobulina de conejo se dejó reaccionar durante 30', 40' y 45' a temperatura ambiente (18-20 °C), realizando los tres tiempos de reducción para cada concentración de 2-mercaptoetanol y por duplicado. La solución resultante fue purificada en una columna de filtración gel Protein Pak 300 sw (waters) utilizando como fase móvil una solución amortiguadora de fosfatos a 4 °C, pH 7.4 y después purgada con nitrógeno durante 15 minutos, recolectando la solución después de haber sido inyectada durante 4' 5'' que fue el tiempo donde se recolectaba toda la concentración de la gammaglobulina de conejo. La concentración final de la gammaglobulina de conejo reducida se determinó por espectrofotometría U.V. utilizando, para la curva estándar, gammaglobulina de conejo con una concentración de 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 y 5.0 mg/ml.

Posteriormente a la solución de gammaglobulina de conejo, se adicionaron 15 μL de EHDP- SnCl_2 equivalentes a 0.25 mg de SnCl_2 , finalmente se marcó empleando 0.1-0.5 ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (3.7×10^7 - 2.22×10^8 Bq/ml) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. La mezcla de la gammaglobulina de conejo y el pertecnecio se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-20 °C), determinando después de éste intervalo de tiempo la pureza radioquímica de la gammaglobulina de conejo marcada. Esto fue evaluado por una cromatografía instantánea en capa fina (ITLC).

b. Reducción de los puentes S-S utilizando Ácido Ascórbico.

La gammaglobulina de conejo fue preparada a una concentración de 5 mg/ml y fraccionada en alícuotas de 500 μ l, éstas fracciones se saturaron de nitrógeno durante 5 minutos y fueron reducidas con 1.7×10^{-3} , 2.8×10^{-3} y 5.6×10^{-3} gramos de ácido ascórbico. La mezcla del agente reductor y la gammaglobulina de conejo se dejó reaccionar durante 30', 40' y 45' a temperatura ambiente (18-20 °C), realizando los tres tiempos de reducción para cada concentración de ácido ascórbico. Después de haber finalizado el tiempo de reducción se adicionó a cada muestra 4 ml de la solución amortiguadora de fosfatos a 4°C, pH 7.4 y previamente purgado con nitrógeno durante 15 minutos, ésto se realizó para ajustar el volumen a 4.5 ml y fuera semejante al volumen obtenido después de la reducción con 2-mercaptoetanol.

Posteriormente a la solución de gammaglobulina de conejo se adicionaron 15 μ l de EHDP- $SnCl_2$ equivalentes a 0.25 mg de $SnCl_2$, finalmente se marcó empleando 0.1-0.5 ml de pertecneiato (3.7×10^7 - 2.22×10^8 Bq/ml) eluido de un generador GETEC $^{99}Mo/^{99m}Tc$. La mezcla de la gammaglobulina de conejo y el pertecneiato se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-20°C), determinando después de éste intervalo de tiempo la pureza radioquímica de la gammaglobulina de conejo marcada. Esto fue evaluado por una cromatografía instantánea en capa fina (ITLC).

5.3.3 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante HPLC y U.V.

a. Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante HPLC

Las determinaciones que se realizaron fueron las siguientes:

1) Linealidad del sistema.

La Linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando 50,80,100 y 120 % de una misma solución. El 100 % correspondió a la formulación del liofilizado cuyo contenido es de 2.5 mg de gammaglobulina por vial bajo el siguiente protocolo:

- * Se realizaron las diluciones correspondientes para la obtención de cada nivel.
- * Se inyectaron en el HPLC, 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.

2) *Precisión del sistema*

Se determinó por sextuplicado de una misma solución estándar (5 mg/mL) correspondiente al 100%.

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

3) *Exactitud y precisión (repetibilidad)*

- * 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 HPLC, 500 microlitros de cada solución para la cuantificación de la concentración.
- * Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación.

4) *Precisión (reproducibilidad)*

Se determinó de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado, bajo el siguiente protocolo:

- * Se preparó una solución de gammaglobulina de 5 mg/ml.
- * Se inyectaron en el HPLC, por triplicado, 500 µl de la solución de gammaglobulina, realizado por cada analista en dos días diferentes.
- * Con los resultados obtenidos por cada uno de los analistas, en dos días diferentes se utilizó el modelo de Factores Anidados para demostrar si el método es reproducible o no.

5) Especificidad

Se determinó que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés, sin que haya existido interferencia de otra sustancia presente.

- * Se preparó una solución de gammaglobulina de 2.5 mg/ml.
- * Se inyectó la muestra en el HPLC obteniendo el cromatograma de la muestra.

b. Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante espectrofotometría de U.V.

Se realizó el siguiente procedimiento:

1) Linealidad del sistema.

Se construyó una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando 50, 80, 100, 120 % de una misma solución. El 100 % correspondió a la gammaglobulina por vial bajo el siguiente protocolo:

- * Se aplicaron las diluciones correspondientes para la obtención de cada nivel.
- * Se tomaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 272 nm para cada nivel.
- * Con los datos obtenidos se calculó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, es decir, la ecuación de la recta.

2) Precisión del sistema.

Se determinó por sextuplicado de una misma solución estándar (5 mg/ml) correspondiente al 100 %.

- * Se preparó una solución de anticuerpo de 5 mg/ml.
- * Se realizó el análisis sextuplicado de la solución mediante la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro de U.V. a 272 nm.
- * Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación.

3) Exactitud y precisión (repetibilidad).

- * 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 tomaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 272 nm por duplicado.
- * Con los datos obtenidos de absorbancias se calculó el coeficiente de variación.

4) Precisión (reproducibilidad).

Se determinó de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado, bajo el siguiente protocolo:

- * Se preparó una solución de gammaglobulina de 5 mg/ml.
- * Se realizó el análisis por triplicado de la solución de gammaglobulina mediante la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro de U.V. a 272 nm., realizado por cada analista en dos días diferentes.
- * Se utilizó el modelo de Factores Anidados para demostrar si el método es reproducible o no.

5) Linealidad del método

Se determinó a partir de placebos cargados, de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, utilizando 50, 80, 100 y 120 %. El 100 % correspondió a la solución obtenida después de la purificación en el HPLC, cuyo contenido es de 2.5 mg de gammaglobulina por vial. Cada placebo fue elaborado de manera independiente, realizado el análisis por triplicado, bajo el siguiente protocolo:

- * Se prepararon los placebos cargados correspondientes al 50, 80, 100 y 120 %, cada placebo cargado se preparó de manera independiente.
- * Se tomaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro de U.V. a 272 nm para cada placebo cargado.
- * Con los datos obtenidos se calculó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación, es decir, la ecuación de la recta.

6). Especificidad

Se determinó que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés, sin que haya existido interferencia de otra sustancia presente.

- * Se preparó una solución de gammaglobulina de 2.5 mg/ml.
- * Se realizó un barrido en el espectrofotómetro

5.3.4. Elección del ligante y concentración del cloruro estano para la elaboración del núcleo-equiplo.

Se elaboraron seis lotes para la elección del ligante y concentración del cloruro estano SnCl_2 , los primeros tres lotes fueron de EHDP- SnCl_2 y los otros tres del Gluconato- SnCl_2 . La concentración del ligante se mantuvo constante en la preparación de cada lote, variando únicamente la concentración de SnCl_2 , bajo el siguiente protocolo:

a. Preparación del núcleo-equiplo EHDP- SnCl_2 a tres diferentes concentraciones de SnCl_2 .

Se disolvieron 0.28g de EHDP en 16 ml de H_2O inyectable bajo atmósfera de nitrógeno. La solución fue filtrada por membrana de 0.22 μ , realizando esto por triplicado. Posteriormente se pesaron 20, 40 y 100 mg de SnCl_2 , colocando cada cantidad de SnCl_2 en un matraz de 125 ml respectivamente. A estas cantidades fueron adicionadas 0.4 ml de HCl concentrado y 3.6 ml de H_2O inyectable (previamente nitrogenada) bajo atmósfera de nitrógeno hasta disolución completa. Cada solución de SnCl_2 fue filtrada por membrana de 0.22 μ y ajustado el volumen a 12.5 ml con H_2O inyectable (previamente nitrogenada).

A cada solución de EHDP fue adicionada la solución de 20, 40 y 100 mg/ml de SnCl_2 , midiendo el pH (ajustado a 6.5 ± 0.2 con una solución de NaOH 1N y 0.1N) agitando bajo atmósfera de nitrógeno. Sin haber parado de agitar a cada solución de EHDP- SnCl_2 fueron agregados 80 mg de pluronic y 10 mg de ácido gentsísico, ajustando el pH a 6.5 ± 2 con NaOH 0.1N.

Cada solución de EHDP- SnCl_2 fue ajustada a un volumen de 80 ml con H_2O inyectable (previamente nitrogenada) y mezclada.

Finalmente cada solución de EHDP- SnCl_2 fue filtrada y dosificada en 2 ml. Los tres lotes de EHDP- SnCl_2 con una concentración de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/ml de SnCl_2 por vial,

fueron liofilizados por 24 horas a 15°C, realizando como prueba de control la cromatografía por ITLC a cada lote respectivamente.

b. Preparación del núcleo-equipo Gluconato-SnCl₂ a tres diferentes concentraciones de SnCl₂.

Se disolvieron 0.28g de Gluconato en 16 ml de H₂O inyectable bajo atmósfera de nitrógeno. La solución fue filtrada por membrana de 0.22 µ, realizando ésto por triplicado. Posteriormente se pesaron 20, 40 y 100 mg de SnCl₂, colocando cada cantidad de SnCl₂ en un matraz de 125 ml respectivamente. A éstas cantidades fueron adicionadas 0.4 ml de HCl concentrado y 3.6 ml de H₂O inyectable (previamente nitrogenada) bajo atmósfera de nitrógeno hasta disolución completa. Cada solución de SnCl₂ fue filtrada por membrana de 0.22 µ y ajustado el volumen a 12.5 ml con H₂O inyectable (previamente nitrogenada).

A cada solución de Gluconato fue adicionada la solución de 20, 40 y 100 mg/ml de SnCl₂, midiendo el pH (ajustado a 6.5 ± 0.2 con una solución de NaOH 1N y 0.1N) agitando bajo atmósfera de nitrógeno. Sin haber parado de agitar a cada solución de Gluconato-SnCl₂ fueron agragados 80 mg de pluronic y 10 mg de ácido gentísico, ajustando el pH a 6.5 ± 2 con NaOH 0.1N.

Cada solución de Gluconato-SnCl₂ fue ajustada a un volumen de 80 ml con H₂O inyectable (previamente nitrogenada) y mezclada.

Finalmente cada solución de Gluconato-SnCl₂ fue filtrada y dosificada en 2 ml. Los tres lotes de Gluconato-SnCl₂ con una concentración de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/ml de SnCl₂ por vial, fueron liofilizados por 24 horas a 15°C, realizando como prueba de control la cromatografía por ITLC a cada lote respectivamente.

Después de haber elaborado la preparación del núcleo-equipo EHDP-SnCl₂, Gluconato-SnCl₂ a las tres diferentes concentraciones de SnCl₂ para la elección tanto del ligante como la concentración ideal del SnCl₂ se realizó lo siguiente:

La gammaglobulina fue preparada a una concentración de 5 mg/ml, 12 muestras fueron fraccionadas a 500 µl, éstas fracciones se saturaron de nitrógeno durante 5 minutos y fueron reducidas con 2.5 µl de 2-mercaptoetanol. La mezcla del agente reductor y la gammaglobulina de conejo se dejó reaccionar durante 40 minutos a temperatura ambiente (18-20°C). La solución resultante fue purificada en una columna de filtración de gel Protein Pak 300 sw (waters) utilizando como fase móvil buffer de fosfato salino a 4°C, pH 7.4 y previamente purgado con nitrógeno durante 15 minutos, recolectando la

solución a los cinco minutos después de ser inyectada hasta un volumen de 4.5 ml que fue el tiempo donde se recolectó toda la concentración de la gammaglobulina de conejo. Las soluciones de la gammaglobulina de conejo purificadas fueron saturadas de nitrógeno durante cinco minutos y se les adicionaron 15 μ l de cada uno del núcleo-equipos elaborado (conteniendo los 15 μ l 1.5, 3.0 y 7.5 μ g de $SnCl_2$ tanto del núcleo-equipos EHDP como Gluconato respectivamente) previamente reconstituido con 5 ml de solución salina nitrogenada, realizando esto por duplicado.

La mezcla obtenida se marcó empleando 0.1-0.5 ml de pertecneciato (1-6 mCi/ml) eluido de un generador GETEC $^{99}Mo/^{99m}Tc$. La solución marcada se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-20 °C) determinado después de este intervalo de tiempo la pureza radioquímica de la solución marcada. Esto fue evaluado por una cromatografía instantánea en capa fina (ITLC). Los resultados obtenidos fueron tratados por el Diseño Aleatorizado por Bloques Completos.

5.3.5 Escalamiento del lote y tiempo de agitación óptimo, para el desarrollo de la formulación.

Después de haber seleccionado el agente reductor, ligante y concentración de $SnCl_2$ para la obtención de la formulación con una pureza del 90 %. Se continuó con el escalamiento de lote para obtener tanto el volumen como el tiempo de agitación óptimo para el desarrollo de la formulación por lote, realizando lo siguiente:

Se preparó una solución de gammaglobulina de conejo a una concentración de 5 mg/ml, fraccionada a 500 μ l, estas fracciones se saturaron de nitrógeno durante cinco minutos y fueron reducidas con 2.5 μ l de 2-mercaptoetanol. La mezcla se dejó reaccionar durante 40 minutos y la solución resultante fue purificada, el volumen obtenido por cada muestra fue agregado a un matraz balón bajo atmósfera de nitrógeno para realizar el escalamiento del lote. Después de haber recolectado las muestras para la elaboración del lote (empezando desde 4 hasta 10 muestras) se saturó de nitrógeno durante 5 minutos y se adicionó 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 μ l del núcleo-equipos EHDP- $SnCl_2$ para la obtención del lote respectivamente. La solución de gammaglobulina, ligante y $SnCl_2$ fue agitada durante 1.5, 2.5 y 5 minutos a 150 rpm, realizando los 3 tiempos de agitación para cada lote elaborado y por duplicado. Cada lote de gammaglobulina fue filtrado por membrana de 0.22 μ bajo atmósfera de nitrógeno y fraccionado a 4.5 ml, una muestra representativa de cada lote fue marcada empleando 0.1-0.5 ml de pertecneciato (1-6 mCi/ml) eluido de un generador GETEC $^{99}Mo/^{99m}Tc$. La solución marcada se dejó

reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-20 °C) determinando después de éste intervalo de tiempo la pureza radioquímica de la solución marcada. Esto fue evaluado por una cromatografía instantánea en capa fina (ITLC). Los resultados obtenidos fueron tratados por el Diseño Aleatorizado por Bloques Completos .

En la figura 2 se muestra el equipo empleado en la elaboración del lote del anticuerpo Monoclonal.

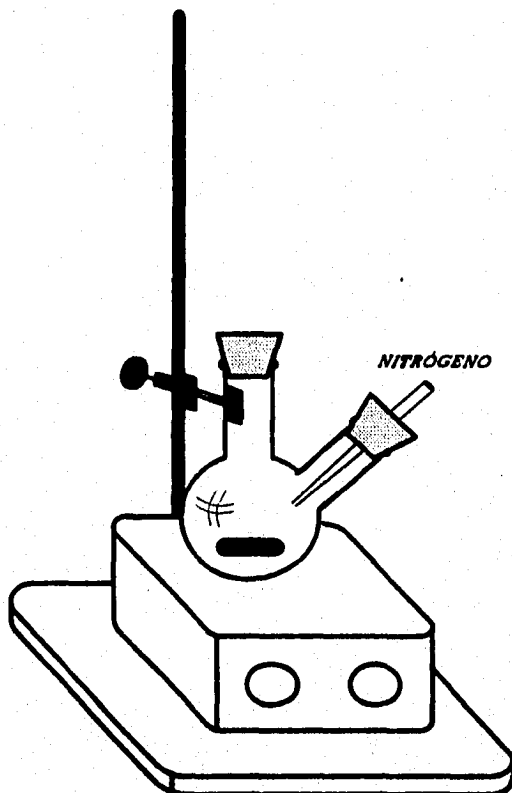


Figura 2

5.3.6 Elección del ciclo de liofilización

Después de haber elegido la formulación adecuada para la preparación del núcleo-equipos fueron preparados 2 lotes de gammaglobulina de conejo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. La mezcla de la solución de gammaglobulina de conejo fue fraccionada a 4.5 ml, cada muestra fue congelada con nitrógeno líquido durante un tiempo de 30, 90 y 120 minutos, realizando los tres tiempos de congelación

para cada ciclo de liofilización, a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 17 horas y $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 horas para el primer ciclo y a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. y $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 17 horas para el segundo ciclo de liofilización, por duplicado. Finalmente a las muestras liofilizadas se les determinó la humedad y pureza radioquímica.

5.3.7 Preparación de la formulación liofilizada para la elaboración del núcleo-equipo $^{99m}\text{Tc-AcMo-IOReg/1r3}$ en condiciones estériles.

La formulación se trabajó con el siguiente protocolo:

- Se esterilizó el material utilizado en la formulación, por calor húmedo ($20\text{ lb/pulg}^2, 26^{\circ}\text{C}$).
- Se limpió el área de trabajo (campana de flujo laminar VECO) empleando cloruro de benzalconio al 10 %.
- Se concentró el Anticuerpo Monoclonal, empleando un filtro (Ultra Free, millipore)
- La solución de Anticuerpo Monoclonal se fraccionó en 7 alícuotas de $500\text{ }\mu\text{l}$.
- Se adicionó a cada muestra $2.5\text{ }\mu\text{l}$ de 2-mercaptoetanol en condiciones inertes en intervalos de 15 minutos.
- La mezcla de Anticuerpo Monoclonal y 2-mercaptoetanol se dejó reaccionar durante 40 minutos a temperatura ambiente ($18-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- La solución resultante fue purificada, empleando un sistema de HPLC con columna de filtración en gel Protein Pak sw acoplada a un detector de U.V. con ajuste en la longitud de onda de 280 nm . Como fase móvil se empleó el sistema amortiguador de fosfatos 0.1M , $\text{pH}=7.4$, previamente purgado con nitrógeno y enfriado a temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La velocidad de flujo del disolvente fue de 1.0 ml/min .
- El volumen obtenido por cada muestra fue agregado a un matraz balón bajo atmósfera de nitrógeno.
- La disolución resultante fue saturada de nitrógeno durante un tiempo de 5 minutos.
- Se adicionaron $105\text{ }\mu\text{l}$ del núcleo-equipo EHDP-SnCl_2 , y se agitó durante 5.0 minutos a 150 rpm , bajo atmósfera de nitrógeno.
- La disolución del Anticuerpo Monoclonal fue filtrada por membrana de $0.22\text{ }\mu\text{m}$, y fraccionada en 4.5 ml .

- * Las muestras fraccionadas fueron congeladas durante 2 horas en nitrógeno líquido.
- * Se procedió a liofilizar durante 24 horas a 15 °C.
- * Se determinó la pureza radioquímica de una muestra tomada como control, empleando 2.5 ml de pertechnetato (1-6 mCi/ml) eluido de un generador GETEC $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. La solución marcada se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-20 °C) determinando después de este intervalo de tiempo la pureza radioquímica de la solución marcada. Esto fue evaluado por una cromatografía instantánea en capa fina (ITLC).
- * Se determinó la esterilidad

5.3.6 Prueba de esterilidad

En la determinación de la esterilidad se emplearon 1 medio de tioglicolato, 1 medio de caldo de soya tripticaseína y dos muestras de Anticuerpo Monoclonal. Las muestras de Anticuerpo Monoclonal fueron reconstituidas con 2.5 ml de solución salina estéril, adicionando a la primera muestra 2 ml del medio de tioglicolato y a la segunda muestra 2 ml del caldo de soya tripticaseína para evitar contaminación con el medio. Finalmente las muestras fueron incubadas a 37 °C y 25 °C respectivamente, durante 48 horas.

5.3.9 Distribución Biológica del núcleo-equiplo $^{99m}\text{TcAcMo-IOReg/r}^3$

En la determinación de este parámetro, se emplearon ratones con una fisiología perfectamente conocida, se inoculó en la vena marginal de la cola 0.1-0.2 ml ($3.7 \times 10^7 \text{ Bq/ml}$) del $^{99m}\text{TcAcMo-IOReg/r}^3$. Después de haber inyectado el radiofármaco se esperó 2 horas para sacrificar a los animales. Se fijaron los ratones sobre la tabla de disección, con la zona ventral hacia arriba y se procedió a abrir la cavidad torácica y la intestinal cuidando de no cortar los órganos interiores.

Se extrajeron sangre, riñones, estómago, intestino, hígado, pulmones, corazón, vejiga y orina. Por último se determinó la actividad en un contador de radiaciones gamma para cada órgano y se calculó el porcentaje de actividad en cada uno de los órganos.

5.3.10 Estudio de estabilidad

Después de haber obtenido la formulación, se prepararon varios lotes y se sometieron a 4 °C y 37 °C. Las muestras fueron analizadas cada 15 minutos a la temperatura de 37 °C, y al primer, tercer y sexto mes a la temperatura de 4 °C.

5.3.11 Evaluación de la precisión (reproducibilidad) en el empleo de ITLC.

a. Evaluación de la reproducibilidad

La evaluación fue analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado, bajo el siguiente protocolo:

- Un núcleo-equipos se reconstituyó con 2.5 ml de solución de pertechnetato de sodio obtenido del generador GETEC, ININ cuya actividad fue de 2.5 mCi/ml (92.5 MBq/ml).
- Después de 30 minutos se determinó el análisis por triplicado, realizado por cada analista en dos días diferentes empleando los sistemas de ITLC previamente descritos.
- Con los resultados obtenidos por cada uno de los dos analistas en dos días diferentes se utilizó el modelo de Factores Anidados para demostrar la reproducibilidad del método.

6. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la parte experimental para el diseño del núcleo-equipo para el marcado instantáneo con Tc-99m del AcMo-IOReg[®]3.

6.1 Curva de calibración para proteínas en el U.V.

En el método se describieron la preparación de las soluciones que se emplearon en el desarrollo de la experimentación así como la preparación de la curva de calibración para la gammaglobulina de conejo en el espectrofotómetro (U.V.) figura 3, la cual contiene la concentración de la proteína purificada, empleandola como prueba de control en las muestras purificadas por el CLAR.

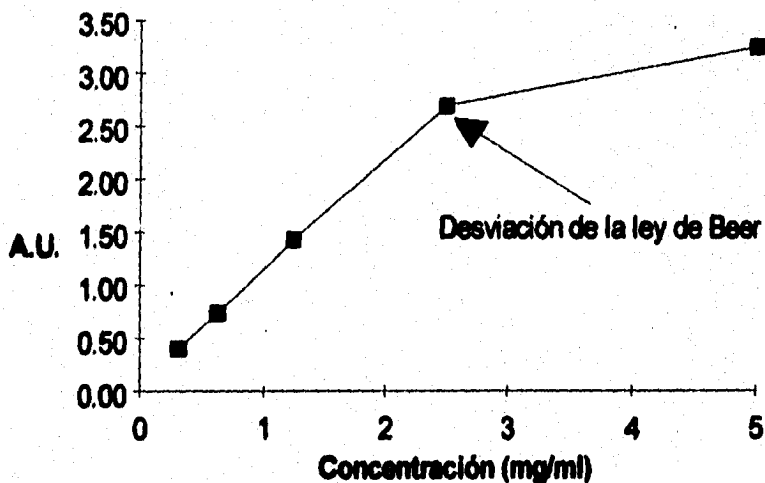


Figura 3 Curva de calibración para la gammaglobulina de conejo en el U.V. a una longitud de onda de 280 nm,

6.2 Elección del agente reductor para la reducción del Anticuerpo

En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos de la parte experimental para la elección del agente reductor. Estos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza por diseños factoriales con niveles mixtos (Tabla 2 y 3), para elegir el mejor agente reductor, concentración de éste y el tiempo de reducción óptimo para la obtención de una pureza radioquímica arriba del 80 %.

NUMERO DE OBS.	*AGENTE	*Cantidad	TIEMPO (minutos)	PUREZA RADIOQUIM. (%)
1	1	1	30	0.91
2	1	1	30	0.87
3	1	1	40	0.10
4	1	1	40	0.80
5	1	1	45	0.35
6	1	1	45	0.37
7	1	2	30	0.17
8	1	2	30	0.20
9	1	2	40	0.17
10	1	2	40	0.15
11	1	2	45	0.39
12	1	2	45	0.43
13	1	3	30	0.19
14	1	3	30	0.16
15	1	3	40	0.03
16	1	3	40	0.07
17	1	3	45	0.46
18	1	3	45	0.50
19	2	1	30	74.0
20	2	1	30	81.0
21	2	1	40	78.3
22	2	1	40	84.0
23	2	1	45	74.4
24	2	1	45	83.1
25	2	2	30	87.4
26	2	2	30	78.7
27	2	2	40	83.3
28	2	2	40	86.6
29	2	2	45	89.7
30	2	2	45	80.4
31	2	3	30	84.0
32	2	3	30	78.8
33	2	3	40	87.2
34	2	3	40	82.4
35	2	3	45	85.4
36	2	3	45	87.1

TABLA 1. Tabla de resultados de la elección del agente reductor empleando tres concentraciones en tres diferentes tiempos para la reducción del anticuerpo, tomando como variable dependiente la pureza radioquímica.

* Agente 1 = Ac. ascórbico

Donde cantidad 1 = 0.0017 g, cantidad 2 = 0.0026 g y cantidad 3 = 0.0056 g.

Agente 2 = 2-mercaptoetanol

Donde cantidad 1 = 1.5 µl, cantidad 2 = 2.5 µl y cantidad 3 = 5.0 µl.

Las concentraciones del ácido ascórbico y 2-mercaptoetanol son las mismas, ver anexo sección 10.1.1

Fuente	G.L.	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Valor F	Pr>F
Modelo	13	63571.8450	4890.1419	586.39	0.0001
Error	22	189.9443	8.6338		
Total	35	83761.7893			

R-C 0.997021 C.V. 6.958672 SME 2.93834 Media de la Pureza 42.2256

Tabla 2 Análisis de varianza. Variable dependiente: Pureza radioquímica

Fuente	G.L.	Anova SC	Media C	Valor F	Pr>F
Agente	1	63124.8875	63124.8875	7311.34	0.0001
Conc	2	132.6325	66.3163	7.66	0.0030
Tiempo	2	60.5230	30.2615	3.50	0.0477
Agente*Conc	2	151.4498	75.7249	8.77	0.0016
Agente*Tiempo	2	66.8950	33.4475	3.87	0.0362
Conc*Tiempo	4	35.4571	8.8643	1.03	0.4155

Tabla 3 Análisis de varianza. Variable dependiente: Pureza radioquímica (Ver anexo sección 10.1.2)

6.3 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante CLAR y U.V.

La validación de los métodos de CLAR y U.V. fueron parte fundamental en el desarrollo de la formulación y cumplieron con los propósitos para los cuales fueron diseñados.

6.3.1 Validación de la cuantificación de la Gammaglobulina mediante CLAR.

De las tablas 4 a la 13 se muestran los resultados obtenidos en la validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante CLAR. En las Tablas 4 y 5 se presenta la linealidad del sistema. La precisión del sistema fue evaluada con los resultados mostrados en las tablas 6 y 7. La exactitud es mostrada en las tablas 8 y 9. Finalmente la repetibilidad (precisión) y reproducibilidad fueron evaluadas en base a los resultados mostrados en las tablas 8 y 10, 11, 12, y 13 respectivamente.

a. Linealidad del sistema

% de la concentración a partir de la solución estándar. (X)	% del Área CLAR a partir de la solución estándar. (Y)
120.3	146.65
100.28	121.72
80.20	97.70
60.16	72.38

Tabla 4 Curva de calibración de gammaglobulina por CLAR.

X vs Y

$$m = 1.23; b = -1.47; r = 0.9999$$

NIVELES %	CONCENTRACION mg/ml	ÁREA	% DE RECUBRO (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 5 Porcentaje de recobro para evaluar el coeficiente de variación en la linealidad del sistema.

Del porcentaje de recobro se obtiene:

$$CV = DE/X$$

Donde:

$$X = 514.61 \quad DE = 3.076 \quad CV = 0.59\%$$

b. Precisión del sistema

NUMERO DE MUESTRA	CONCENTRACION 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	100.85

Tabla 6 Datos del análisis sextuplicado de una misma solución.

$\chi^2_{\text{calc.}}$	χ^2_{Tablas}	CRITERIO DE ACEPTACION
8.55	12.832	$\chi^2_{\text{calc.}} < \chi^2_{\text{tablas}}$

Tabla 7 Prueba de Hipótesis para evaluar la precisión del sistema

Conclusión: Se acepta H_0 por consiguiente el sistema es preciso.
ver Anexo sección 10.2.1 (a)

Del porcentaje del area del CLAR (Tabla 6), se obtiene:

$$CV = DE/X$$

Donde

$$X = 99.99$$

$$CV = 1.85\%$$

$$DE = 1.85$$

Ver anexo sección 10.2.1 (a)

c. Exactitud

NUMERO DE MUESTRA	CONCENTRACION mg/ml ANTICUERPO	ÁREA CLAR	% ÁREA 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	2121.56	100.03

TABLA 8 Placebos cargados de manera independiente al 100%

$$\bar{X} = 100.37$$

$$s = 0.66$$

$$CV = 1.2\%$$

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

Tabla 9 Evaluación de la exactitud mediante prueba de hipótesis

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

Ver anexo sección 10.2.1 (b)

d. Precisión

1 Repetibilidad

De acuerdo a la TABLA 9 Placebos cargados de manera independiente al 100%, se obtiene lo siguiente:

$$\begin{aligned} X &= 100.37 \\ S &= 0.68 \\ CV &= 1.2\% \end{aligned}$$

$\chi^2_{\text{calc.}}$	χ^2_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACION
1.56	12.83	$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{tablas}}$

TABLA 10 Evaluación de la precisión (repetibilidad) mediante prueba de hipótesis.

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

Ver anexo sección 10.2.1 (c)

2 Reproducibilidad

NUMERO DE OBS.	ANALISTA.	DIA	PUREZA RADIOQUIM. (%)
1	1	1	99.85
2	2	1	100.69
3	1	2	99.74
4	2	1	102.15
5	1	2	99.58
6	2	1	99.17
7	1	1	99.19
8	2	2	99.83
9	1	1	100.85
10	2	2	100.10
11	1	2	99.95
12	2	2	99.60

Tabla 11 Resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad con dos analistas en dos días diferentes.

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
MODELO	3	1.81229187	0.53743056	0.37	0.7738
ERROR	8	11.47580000	1.43447500		
TOTAL	11	13.08809187			

R²
0.123188

C.V.
1.201189

MSE
1.19770

MEDIA
PUREZA
RADIOQUIM.
99.7092

Tabla 12 Análisis de varianza.

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA

FUENTE	G.L.	ANOVA SC	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr > F
ANAL	1	0.55040833	0.55040833	0.38	0.5529
DIA	1	0.72520833	0.72520833	0.51	0.4973
ANAL(DIA)	1	0.33867500	0.33867500	0.23	0.6410

Tabla 13 Análisis de Varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA.

Ver anexo sección 10.2.1 (d)

d. Especificidad

ver anexo sección 10.2.2 (d)

6.3.2 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante 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 14 y 23 respectivamente. La precisión del sistema donde el % de absorbancia obtenido para la evaluación del C.V., así como la prueba de hipótesis es mostrada en las tablas 15 y 16. El C.V. como la prueba de hipótesis para la evaluación de la exactitud se presentan en las tablas 17 y 18. Posteriormente para la evaluación de la precisión (repetibilidad) los resultados del C.V. y prueba de hipótesis se presentan en las tablas 17 y 19. La reproducibilidad fue evaluada con los resultados presentes en las tablas 20, 21, y 22. Finalmente la especificidad se muestra en el anexo sección 10.2.2 (d)

a. Linealidad del sistema

CONCENTRACION mg/ml (X)	ABSORBANCIA (Y)
3.02	3.02
2.52	2.74
2.015	2.29
1.51	1.716

Tabla 14 Curva de calibración de gammaglobulina por U.V.

X vs Y

 $m = 0.8606$ $b = 0.4884$ $r = 0.9891$ **b. Precisión del sistema**

NUMERO DE MUESTRA	CONCENTRACION 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 15 Datos del análisis sextuplicado de una misma solución.

 $C.V. = X/s$

Donde:

 $X = 2.655$ $s = 0.03$ $C.V. = 1.13 \%$

X^i_{calc}	X^i_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACION
2.20	12.832	$X^i_{calc} < X^i_{tablas}$

Tabla 16 Evaluación de la precisión del sistema mediante prueba de hipótesis.

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

Ver anexo sección 10.2.2 (a)

c. Exactitud

NUMERO DE MUESTRA	CONCENTRACION 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%

$$X = 100.05$$

$$S = 1.04$$

$$cv = 1.03\%$$

t_{calc}	t_{tablas}	CRITERIO DE ACEPTACION
0.1177	2.5706	$t_{calc} < t_{tablas}$

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

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

Ver anexo sección 10.2.2 (b)

d. Precisión

1. repetibilidad

De acuerdo a la Tabla 17 Placebos cargados de manera independiente al 100%, se obtuvo lo siguiente:

$$X = 100.05$$

$$s = 1.04$$

$$cv = 1.03 \%$$

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

Tabla 19 Evaluación de la precisión (repetibilidad) mediante prueba de hipótesis.

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

Ver anexo sección 10.2.2 (c)

2. reproducibilidad

OBS	ANALISTA	DIA	PUREZA RADIOQUIM.
1	1	1	98.88
2	1	1	98.17
3	1	1	97.08
4	2	1	98.50
5	2	1	98.82
6	2	1	98.97
7	1	2	97.81
8	1	2	94.89
9	1	2	96.71
10	2	2	97.73
11	2	2	98.34
12	2	2	98.88

Tabla 20 Resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad con dos analistas en dos días diferentes.

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
MODELO	3	11.2311333	3.7437111	3.46	0.0712
ERROR	8	8.6551333	1.0818917		
TOTAL	11	19.8862667			
R^2	C.V.	MSE	MEDIA PUREZA RADIOQUIMICA		
0.564768	1.061000	1.04014	98.0333		

Tabla 21 Análisis de varianza.

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA.

FUENTE	G.L.	ANOVA S.C	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
ANAL	1	7.20750000	7.20750000	6.66	0.0326
DIA	1	3.06300000	3.06300000	2.83	0.1311
ANAL(DIA)	1	0.96333333	0.96333333	0.89	0.3730

Tabla 22 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA.

Ver anexo sección 10.2.1 (d)

e. Linealidad del método

NIVEL %	CONCENTRACION mg/ml (X)	ABSORBANCIA (Y)
120	3.02	3.0096
100	2.52	2.223
80	2.02	1.784
50	1.51	1.075

Tabla 23 Curva de calibración de gammaglobulina por U.V.

Donde:

X vs Y

$$m = 1.2411 \quad r = 0.9948$$

$$b = -0.7914$$

f. Especificidad

Ver cromatograma con espectro de U.V. anexo (Detector de arreglo de diodos) sección 10.2.2 (d)

6.4 Elección del ligante y concentración del cloruro estanoso para la elaboración de un núcleo-equipó

En la tabla 24 se presentan los resultados que fueron obtenidos empleando dos ligantes a 3 diferentes concentraciones. En las tablas 25, 26 y 27 se presenta el análisis de varianza empleando el Diseño Aleatorizado por Bloques Completos, para la elección del mejor ligante, la concentración del cloruro estanoso. Para obtener una pureza radioquímica mayor del 90 %.

NUMERO DE OBS.	* LIGANTE	CONCENTRACION μg de SnCl_2	PUREZA RADIOQUIM. %
1	A	1.5	31.85
2	A	3.0	52.88
3	A	7.5	60.30
4	B	1.5	90.00
5	B	3.0	97.35
6	B	7.5	88.24

Tabla 24 Resultados de la pureza radioquímica, empleando dos ligantes con tres concentraciones de SnCl_2 .

*LIGANTE A=Gluconato
LIGANTE B= EHDP

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR F	Pr>F
MODELO	3	3004.84703	1001.61568	7.58	0.1188
ERROR	2	264.40390	132.20195		
TOTAL	5	3269.25093			

R^2 C.V. MSE MEDIA DE PUREZA
0.919124 16.48781 11.4979 69.7367

Tabla 25 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA.

FUENTE	G.L.	ANOVA S.C.	MEDIA CUADRADA	VALOR F	P>F
LIGANTE	1	2763.1890	2763.18960	20.90	0.0447
CONCENTRACION	2	241.65743	120.82872	0.91	0.5225

Tabla 26 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA.

GRUPO TUKEY	MEDIA	N LIGANTE
A	91.197	3B
B	48.277	3A

Tabla 27 Prueba de Tukey.

Medias con la misma letra no tienen una diferencia significativa.
Ver anexo sección 10.3

6.5 Escalamiento del lote y tiempo de agitación óptimo, para el desarrollo de la formulación

En la tabla 28 se presenta la pureza radioquímica obtenida a partir de diferentes volúmenes y 3 tiempos de agitación a 150 rpm. Estos resultados fueron tratados por un análisis de varianza empleando el Diseño Aleatorizado por Bloques Completos (tablas 29, 30 y 31). Para la elección del lote y tiempo de agitación óptimo, para el desarrollo de la formulación.

NUM. OBS.	* VOLUMEN (ml)	TIEMPO DE AGITACION (min) a 150 rpm	PUREZA RADIOQUIM. %
1	1	1.5	85.82
2	1	2.5	91.29
3	1	5.0	87.88
4	2	1.5	94.78
5	2	2.5	80.70
6	2	5.0	92.89
7	3	1.5	88.82
8	3	2.5	88.08
9	3	5.0	87.84
10	4	1.5	88.92
11	4	2.5	88.33
12	4	5.0	80.72
13	5	1.5	88.21
14	5	2.5	87.50
15	5	5.0	88.28
16	6	1.5	88.84
17	6	2.5	83.14
18	6	5.0	87.31
19	7	1.5	87.90
20	7	2.5	87.37
21	7	5.0	88.24

Tabla 28 Pureza radioquímica con diferentes volúmenes y tres tiempos de agitación a 150 rpm.

*Volumen (ml)

1=18

2=22.5

3=27.0

4=31.5

5=36.0

6=40.5

7=45.0

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
MODELO	6	93.1326000	11.6415750	3.13	0.0368
ERROR	12	44.5716667	3.7143056		
TOTAL	20	137.7042667			

R^2 C.V. MSE MEDIA PUREZA
 0.676323 2.182290 1.92725 68.3133

Tabla 29 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA.

FUENTE	G.L.	ANOVA S.C	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
VOLUMEN	6	92.5005333	15.4167556	4.15	0.0173
AGITACION	2	0.8320667	0.3160333	0.09	0.9190

Tabla 30 Análisis de Varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA

GRUPOS Tukey	MEDIA PUREZA RADIOQUIM.	NUMERO DE OBS.	* VOLUMEN (ml)
1	92.780	3	2
21	88.657	3	4
21	88.580	3	3
21	88.253	3	1
21	87.837	3	7
2	86.323	3	5
2	85.763	3	6

Tabla 31 Prueba de Tukey

Media con la misma letra no son significativamente diferentes.

*VOLUMEN (ml)

1=18.0

2=22.5

3=27.0

4=31.5

5=36.0

8=40.5

7=45.0

Ver anexo sección 10.3

6.6 Elección del ciclo de liofilización

En la tabla 32 se muestran los resultados de la pureza radioquímica obtenidos a partir de dos ciclos de liofilización, con tres tiempos de congelación. Estos resultados fueron tratados por un análisis de varianza empleando el Diseño Aleatorizado por Bloques completos (tablas 33, 34 y 35), para la elección del ciclo de liofilización. Esto se corrobora con los resultados de la tabla 36 que muestran el porcentaje de humedad de los dos ciclos de liofilización. Finalmente en el anexo sección 10.4.2 se muestra la curva del ciclo de liofilización.

OBS	*CICLO	TIEMPO (minutos)	PUREZA RADIOQUIM. %
1	A	30	60.35
2	A	90	86.38
3	A	120	91.75
4	B	30	63.52
5	B	90	90.86
6	B	120	94.88

Tabla 32 Pureza radioquímica a diferente ciclo de liofilización con tres tiempos de congelación.

*CICLO A=-10°C durante 17 horas y 15 °C durante 8 horas.

B= -10°C durante 20 min. y 15 °C durante 17 horas.

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRADA	VALOR F	P>F
MODELO	3	1165.25917	388.41972	1316.60	0.0008
ERROR	2	0.59003	0.29502		
TOTAL	5	1165.84920			

R ²	C.V.	MSE	MEDIA PUREZA
0.999494	0.668169	0.54315	81.2900

Tabla 33 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA

FUENTE	G.L.	ANOVA S.C.	MEDIA CUADRADA	VALOR F	P>F
CICLO	1	19.36807	19.36807	65.65	0.0149
TIEMPO	2	1145.89110	572.94555	1942.08	0.0005

Tabla 34 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA

GRUPO Tukey	MEDIA PUREZA RADIOQUIM.	NUMERO DE OBS.	*CICLO
A	83.0867	3	B
B	79.4933	3	A

Tabla 35 Prueba de Tukey

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

*CICLO A=-10°C durante 17 horas y 15 °C durante 6 horas.

B= -10 °C durante 20 min. y 15°C durante 17 horas.

Ver anexo sección 10.3

CICLO -10°C % HUMEDAD (A)	CICLO 15°C % HUMEDAD (B)
5.6	13.52
8.02	17.29
10.12	14.99

Tabla 36 % Humedad

Ver anexo sección 10.4.1 (a)

Curva del ciclo de liofilización B

Ver anexo sección 10.4.2

6.7 Preparación de la formulación liofilizada para la elaboración del núcleo-equipos $^{99m}Tc-AcMo-IOReg/r^3$ en condiciones estériles

Después de haber obtenido tanto el escalamiento del lote como la elección del ciclo de liofilización se realizó la formulación del núcleo-equipos en condiciones estériles. En la tabla 37 se muestran los resultados de la pureza radioquímica antes y después de la liofilización. La prueba de esterilidad de la elaboración del $AcMo-IOReg/r^3$ se presentan en la tabla 38. Finalmente en la tabla 39 se presenta el porcentaje de humedad del liofilizado, empleando un ciclo B..

CONTROL	$^{99m}Tc-AcMo-IOReg/r^3$	$^{99m}TcO_4$ %	$^{99m}TcO_2.H_2O$ %
ANTES LIOFILI.	95.16	1.13	3.35
DESPUES LIOFI.	93.00	6.45	4.65

Tabla 37 Resultados de la pureza radioquímica obtenida antes y después de liofilizar como control de calidad.

MEDIO	OBS. (DESPUES DE 48 Hr)
Caldo de Soya tripticaseina	* Negativa
Tioglicolato	* Negativa

Tabla 38 Resultados de la esterilidad después de 48 horas
* No se observo crecimiento de colonias.

TIEMPO DE CONGELACION (HORAS)	HUMEDAD %
2.5	13.84
2.5	14.12

Tabla 39 Humedad del producto después de liofilizar empleando un ciclo de 15 °C.
++Ver anexo sección 10.4.1 (b)

6.8 Distribución Biológica

En la tabla 40 se presenta la distribución biológica en ratones de la formulación liofilizada del núcleo-equipo $^{99m}\text{Tc-AcMo-IORegf/r}^3$.

ORGANO	% DOSIS RADIACION (cts/min) (1 ^{er} ensayo)	% DOSIS RADIACION (cts/min) (2 ^{do} ensayo)
Sangre	33.93	39.01
Riñones	4.22	5.06
Estómago	1.31	1.64
Intestino	9.18	12.46
Hígado	12.69	16.24
Pulmones	13.51	2.42
Corazón	0.67	1.25
Tiroides	0.32	0.25
Vejiga y Orina	6.93	3.20
Cuerpo	16.93	17.47

Tabla 40 % Dosis radiación por órgano
Ver anexo sección 10.5

6.9 Estabilidad

En la evaluación del estudio de estabilidad del AcMoIORegf/r³. En las tablas 41 y 42 se presenta el porcentaje de pureza radioquímica obtenida a diferentes tiempos, a 37 °C y 4 °C respectivamente.

TIEMPO (minutos)	% PUREZA RADIOQUIM
0	93.83
30	93.56
50	90.11
60	88.10
80	85.56
90	84.50
100	77.10

TABLA 41 Resultados de la pureza radioquímica a 37°C

concentración

$r = -0.9141$

$b = 94.098$

$m = -0.1512$

TIEMPO (meses)	% PUREZA RADIOQUIMICA
0	93.84
1	93.14
3	92.72
6	90.34

TABLA 42 Evaluación de la estabilidad a 4°C

6.10 Evaluación de la precisión del sistema ITLC (cromatografía instantánea de capa fina)

En la tabla 43 se muestra los resultados obtenidos por dos analistas en dos días diferentes para la evaluación de la precisión (reproducibilidad), en base a un análisis de varianza empleando el Diseño Jerárquico de dos etapas los resultados obtenidos se muestran en las tablas 44 y 45.

a. Evaluación de la precisión (reproducibilidad)

NUMERO DE OBS.	ANALISTA	DIA	PUREZA RADIOQUIM. %
1	1	1	90.45
2	1	1	90.65
3	1	1	91.93
4	1	2	90.33
5	1	2	92.73
6	1	2	90.13
7	2	1	90.07
8	2	1	90.50
9	2	1	92.17
10	2	2	93.60
11	2	2	91.83
12	2	2	90.55

Tabla 43 Resultados de la pureza radioquímica evaluada por dos analistas en dos días diferentes.

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
MODELO	3	0.52083333	0.52083333	0.36	0.5607
ERROR	8	14.38266667	1.43826667		
TOTAL	11	14.90350000			

R^2 C.V. MSE MEDIA PUREZA RADIOQUIM.
 0.034947 1.314349 1.19928 91.2450

Tabla 44 Análisis de varianza

Variable dependiente: PUREZA RADIOQUIMICA

FUENTE	G.L.	ANOVA S.C.	MEDIA CUADRADA	VALOR F	Pr>F
ANALISTA	1	0.52083333	0.52083333	0.36	0.5607
DIA	1				
ANAL(DIA)	1				

Tabla 45 Análisis de varianza

Variable dependiente=PUREZA RADIOQUIMICA

Ver anexo sección 10.2.1 (d)

7. DISCUSION

En el diseño del núcleo-equipos para el marcado instantáneo con Tc-99m del AcMo-10Reg/r³ fue necesario evaluar dos agentes reductores (2-mercaptoetanol y ácido ascórbico) empleando tres concentraciones a tres diferentes tiempos (TABLA 1). Los resultados obtenidos fueron evaluados por tratamiento estadístico (SAS System) primero para comprobar si existía una diferencia significativa entre los tratamientos empleados en el estudio y segundo para evaluar todos las variables y tomar decisión de cada uno de ellos. Así, en el análisis de varianza (TABLA 2) se observa que $P_{r>F}$ es de 0.0001 por consiguiente el estudio realizado indica que existe una diferencia en emplear un ligante u otro. En la TABLA 3 se presentan los 3 factores y la interacción entre cada uno de ellos, observando que tanto el agente reductor, la concentración y el tiempo representan un efecto en la pureza radioquímica (debido a que $P_{r>F}$ para los tres factores fue de 0.0001, 0.0030 y 0.0477 respectivamente). En la interacción entre cada uno de los factores se demuestra que el agente*concentración y agente*t tiempo representan un efecto en los resultados obtenidos en la pureza radioquímica obteniendo que $P_{r>F}$ es 0.0016 y 0.0362 respectivamente, lo que indica que hay una variación en la reducción al emplear diferente agente*concentración como agente *tiempo. Por último, la interacción concentración*t tiempo no presenta ningún efecto debido $P_{r>F}$ es de 0.4155. En base a los resultados presentados en la TABLA 1 ya que existe un efecto entre agente*t tiempo, agente*concentración, se eligió el 2-mercaptoetanol a un volumen de 2.5µL y un tiempo de reducción de 40 minutos que fue donde se obtuvo un mayor porcentaje de proteína reducida.

Para probar la efectividad de los métodos analíticos, utilizados tanto para la purificación del Anticuerpo, como la medida de la concentración después de ser purificado, se evaluó la precisión, linealidad y especificidad para proporcionar una medida del comportamiento de los métodos (CLAR y UV).

En la validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante HPLC se observa en la TABLA 4 y 5 la evaluación de la linealidad, en la TABLA 4 se muestran los valores de la curva de calibración donde el coeficiente de correlación (r) es de 0.9994 indicando que los puntos corresponden a una línea recta. Tomando como criterio el coeficiente de variación (CV) que es de 0.59% (TABLA 5) y, sabiendo que para métodos cromatográficos el CV debe ser $< 2\%$, se comprobó que los resultados analíticos son confiables a la concentración de la gammaglobulina dentro de un intervalo determinado.

Para evaluar la precisión del sistema (TABLA 6) se realizó la prueba de X^2 llegando a la conclusión que el método es preciso (TABLA 7) corroborando este resultado con el coeficiente de variación que fue de 1.85% (TABLA 8).

En la evaluación de la repetibilidad también fue realizada una prueba de hipótesis obteniendo como resultados un CV = 1.2 % (TABLA 8), y la aceptación de la hipótesis nula (H_0) que de acuerdo al criterio de aceptación (TABLA 10) el método evaluado es repetible, por lo tanto existe una concordancia en las determinaciones realizadas bajo las mismas condiciones. En la reproducibilidad (TABLAS 11) se observó que los resultados realizados por dos analistas en dos días diferentes, presentan una concordancia entre las determinaciones puesto que $Pr > F$ fue de 0.7738 (TABLA 12) y no presentan una diferencia significativa entre los factores ANAL, DIA, ANAL(DIA) debido a que $Pr > F$ fue 0.5529, 0.4973 y 0.6410 respectivamente. (TABLA 13)

Por último, al realizar el análisis de resultados obtenidos en la exactitud se observó un CV de 1.2 % (TABLA 8) y la aceptación H_0 (TABLA 9) por consiguiente el método evaluado en CLAR presenta una concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

En la validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante espectrofotometría de UV se evaluaron los mismos parámetros citados anteriormente obteniendo lo siguiente:

En la TABLA 14 se observa un coeficiente de correlación de 0.9891 y en la TABLA 23 una $r = 0.9946$, en la linealidad del sistema y método respectivamente, lo que indica que tanto en el sistema y el método los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la gammaglobulina dentro de un rango determinado.

En la precisión del sistema (TABLA 15) se muestra el CV de 1.13 % y la aceptación de H_0 (TABLA 16), lo que indica que el método presenta una concordancia de los resultados obtenidos individualmente cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

Después se muestra que en la repetibilidad el CV fue de 1.03 % (TABLA 17) y al realizarse el contraste de hipótesis fue aceptada H_0 , porque X^2_{calc} cae en la región de aceptación (TABLA 19), por lo tanto el método presenta al igual que el CLAR una concordancia en las determinaciones realizadas bajo las mismas condiciones; finalmente al observar las TABLAS 17 y 18, se concluye que el método es exacto, debido a que presenta un CV de 1.03 % (TABLA 17) y la H_0 cae en la región de aceptación (TABLA 18).

En la reproducibilidad en UV (TABLAS 20), se observa que los resultados presentan una concordancia entre las determinaciones ya que $Pr > F$ fue de 0.0712 (TABLA 21)

ya que no hay diferencia significativa entre DIA, ANAL(DIA) debido a que $Pr > F$ fueron 0.1311 y 0.3730; pero sí existe una diferencia significativa entre analista lo cual indica que el método únicamente es reproducible.

Por último en la evaluación de la especificidad, se demostró que el 2-mercaptoetanol y anticuerpo presentan diferente tiempo de retención ver anexo sección 10.2.2 (d) y el anticuerpo absorbe a 280 nm, por lo que el método fue capaz de separar y cuantificar al anticuerpo, sin interferencias del 2-mercaptoetanol en el CLAR y cuantificar el anticuerpo reducido en el UV. Para ello se realizó una curva de calibración (figura 3), en la cual se observa que la ley de Beer se cumple empleando concentraciones entre 0.312 mg/ml a 2.5 mg/ml, siendo que por arriba de estas concentraciones empieza la desviación de la ley de Beer.

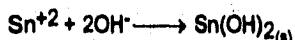
Lo que significa que el método de CLAR y UV reunieron los requisitos para la aplicación analítica deseada.

El fundamento para elegir los componentes de la formulación de los núcleo-equipos, es el hecho que al agregar una solución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a una formulación que contiene Sn^{+2} , EHDP ó gluconato de sodio y anticuerpo reducido se lleva a cabo las siguientes reacciones: el estaño reduce al pertechnetato, éste forma con el ligante débil el complejo ^{99m}Tc -gluconato ó ^{99m}Tc -EHDP, el cual mediante intercambio de ligantes, acelerará la cinética de formación del complejo ^{99m}Tc -AcMoI ORegf/r³, donde el ^{99m}Tc se une directamente a los grupos sulfhidrilo de los puentes disulfuro reducidos del anticuerpo. La TABLA 24 muestra al efecto de utilizar diferentes concentraciones de SnCl_2 , manteniendo constante la concentración de los ligantes sobre la eficiencia del marcaje del anticuerpo. Se puede observar que cuando se utilizó diferentes ligantes con 3 concentraciones de SnCl_2 , no hubo diferencia significativa entre los tratamientos realizados puesto que $Pr > F$ fue de 0.1188 (TABLA 25). Así mismo, al analizar las variables que afectaron a la eficiencia del marcaje por separado, se observó que cuando se utilizaron diferentes cantidades de concentración del SnCl_2 no existió diferencia significativa entre los resultados obtenidos puesto que $Pr > F$ fue de 0.5225 (TABLA 26) debido a que las purezas radioquímicas no variaron demasiado entre los resultados de cada ligante ver (TABLA 24). Sin embargo se seleccionó la concentración de 3.0 μg de SnCl_2 considerando que es la que proporciona mayor estabilidad a la formulación debido a que al aumentar la cantidad de SnCl_2 a 7.5 μg se favorece la formación de cololde da hidróxido de estaño y pertechnetato.

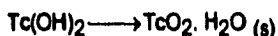
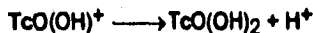
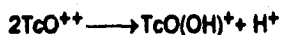
En cuanto a los ligantes empleados en el estudio de la formulación, se observó que hay una diferencia significativa entre la eficiencia del marcaje (TABLA 26) donde $Pr > F$ fue de 0.0447, puesto que cada ligante presenta propiedades diferentes para actuar en la

formación del complejo, éste puede observarse en la prueba de Tukey (TABLA 27) la cual indica que hay diferencia significativa entre los ligantes empleados en el estudio, no obstante el mejor ligante, para la obtención de una mejor eficiencia de marcaje fue el EHDP (TABLA 24), por lo tanto en base al Diseño Aleatorizado por Bloques Completos, realizado en los estudios de selección del ligante y concentración de $SnCl_2$, se eligió como ligante el EHDP con una concentración de $3.0 \mu g$ de $SnCl_2$.

En el escalamiento del lote y tiempo de agitación óptimo (TABLA 28), se muestra los diferentes tiempos de agitación empleados y los diferentes volúmenes que afectaron a la eficiencia del marcaje del anticuerpo. Estos resultados fueron evaluados mediante el Diseño aleatorizado por Bloques Completos (TABLAS 29), con lo que se demostró que al emplear diferentes volúmenes de la solución de anticuerpo con tres tiempos diferentes se obtiene diferencia significativa entre los tratamientos evaluados puesto que $Pr > F$ fue de 0.0368. Al analizar las variables que afectaron a la eficiencia de la pureza radioquímica, se observó que el volumen de la solución del anticuerpo reducido si presentó diferencia significativa puesto que $Pr > F$ fue de 0.0173 (TABLA 30). Esto se explica si consideramos que al incrementar el volumen de anticuerpo, el estaño tenderá a formar un coloide por hidrólisis del cloruro estanoso; el cual puede unirse al tecnecio reducido y competir con el ligante durante la reacción de marcado



Por otra parte, en los tiempos de agitación empleados en el estudio del escalamiento del lote, se observó que no hubo diferencia significativa en la pureza radioquímica, es decir que no afecta directamente a la pureza radioquímica, sin embargo esas pequeñas diferencias no significativas podrían explicarse debido a que al realizar un tiempo mayor de agitación en un volumen mayor se incrementa la probabilidad de la presencia de oxígeno lo que puede provocar oxidación de algunos puentes disulfuro, de tal forma que al realizar la reacción de marcado, el tecnecio reducido no encuentra la cantidad adecuada de ligante donde unirse tendiendo a formar dióxido de tecnecio (coloide):



Se mencionó anteriormente que el volumen si presentó diferencia en el estudio realizado y éste se puede observar en la prueba de Tukey (TABLA 31), la cual indicó

que hubo diferencia significativa entre los volúmenes 2, 5 y 6; no obstante el mejor volumen para la obtención de una mejor pureza radioquímica fueron tanto el 2 y 4 debido a que sus medias fueron de 92.780 % y 88.657 % respectivamente, pero el volumen elegido fue el 4 porque se obtuvo mayor número de muestras empleando un tiempo de agitación de 5 minutos.

Aunque se controlaron los factores que afectaban al desarrollo de la formulación (concentración óptima del ligante y SnCl_2 , ajuste adecuado de pH, uso de un antióxidante y atmósfera de nitrógeno), se vió claro como la solución de AcMo-EHDP- SnCl_2 , sufría una oxidación del estaño por acción del oxígeno disuelto en el agua, debido a esto después de la elaboración de la formulación para liofilizarla, se procedió a congelar empleando 2 ciclos de liofilización, cada uno con tres tiempos de congelación (TABLA 32), de ésta forma se eliminó la oxidación durante el tiempo en que las muestras estaban en la etapa de congelación en la liofilizadora, así mismo en la tabla 32, también se observa el efecto que presentaron los diferentes ciclos de liofilización y los tiempos sobre la eficiencia de la pureza radioquímica.

Estos resultados fueron evaluados mediante el Diseño Aleatorizado por Bloques Completos (TABLAS 33), que demuestra que al utilizar 2 ciclos de liofilización con 3 tiempos diferentes de congelación se obtuvo que hubo diferencia significativa entre los tratamientos evaluados puesto que $Pr > F$ fue de 0.0008. Al realizar un análisis de las variables que afectaron a la eficiencia de la pureza radioquímica se observó que tanto el ciclo, como el tiempo presentaron diferencia significativa puesto que $Pr > F$ fueron 0.0149 y 0.0005 respectivamente (TABLA 34). Esto se debe por una parte que aunque se congelaron las muestras entre sus moléculas quedo agua libre y por consiguiente una cantidad de SnCl_2 se oxidó dando una disminución de la pureza radioquímica.

Este efecto tendía a disminuir conforme se aumentó el tiempo de congelación.

Por otra parte, el secado secundario duró menos para el ciclo de -10°C que para el de 15°C , de ésta forma el agua adsorbida y el vapor de agua atrapado en el interior del producto no se eliminó parcialmente reflejándose esto en la pureza radioquímica (TABLA 32), el secado primario duro más en el ciclo de -10°C incrementándose el tiempo de la sublimación del hielo y obteniendo una fase superior seca y porosa (producto) ya sublimado. Comprobando esto con el porcentaje de humedad (TABLA 36).

Se mencionó anteriormente que el ciclo si presentó diferencia significativa en el estudio realizado, esto se puede observar en la prueba de Tukey (TABLA 35), la cual indica que hay diferencia significativa entre los dos ciclos empleados.

En base a ésto último se elaboró un lote en condiciones estériles para determinar esterilidad y distribución, y otros dos que fueron sometidos a un programa de estabilidad a 37 °C y -4 °C.

Del lote elaborado en condiciones estériles se obtuvo una pureza del 93.00% después de liofilizar utilizando un ciclo de 15 °C (TABLA 37), teniendo un porcentaje de humedad de 13.33 y 14.45 % (TABLA 39) y la observación de los medios de cultivo en la determinación de esterilidad fue negativa (TABLA 38).

En los estudios de distribución en ratones muestra que efectivamente la formulación es la óptima debido a que el valor mas pequeño del porcentaje de la dosis de radiación fue en tiroides, bazo y sistema gastrointestinal, lo que demuestra la estabilidad "in vivo" del complejo. Si el $^{99m}\text{TcAcMo}(\text{ORegf/r})^3$ fuera inestable habría tecnecio libre y/o $\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ los cuales se distribuirían en sistema gastrointestinal y bazo respectivamente (TABLA 40).

En los lotes sometidos a estabilidad se obtuvo que a -4 °C durante seis meses el producto mantiene su pureza radioquímica y empleando una temperatura de 37 °C disminuye la pureza a 77% después de una hora y cuarenta minutos. (TABLA 41 y 42)

La evaluación de la pureza radioquímica fue evaluada por el empleo de ITLC (TABLA 43), siendo el método reproducible con dos analistas en dos días diferentes (TABLAS 44 y 45) debido a que $P_r > F$ fue de 0.5607, lo cual indica que los resultados obtenidos durante las evaluaciones de la pureza radioquímica en el desarrollo de la formulación presentaron una concordancia entre las cuantificaciones.

8. CONCLUSIONES

1. Se logró la obtención de la formulación liofilizada para la preparación del núcleo-equipo $^{99m}\text{Tc-AcMoIOReg/r}^3$ con una pureza mayor al 90 %, empleando:

Anticuerpo Monoclonal	2.0 mg
Fosfato monobásico de sodio	2.75 mg
Fosfato dibásico de sodio	10.32 mg
EHDP	21.0 μg
Cloruro estanoso	3.0 mg
Acido gentsico	0.75 μg
excipiente c.b.p.	mg

2. En base al estudio estadístico presentado en este trabajo se pudo comprobar de manera concertada la influencia de los factores involucrados en la formación del complejo de $^{99m}\text{Tc-AcMoIOReg/r}^3$ como son:

- a) La concentración del ligante, influye en la formación del coloide. Esto se minimizó empleando una concentración de 5.55 mg de EHDP.
- b) El pH influye en la formación del coloide, éste se tuvo que ajustar a la neutralidad, empleando amortiguador de fosfatos, para minimizar la formación de coloide.
- c) Al incrementar el volumen de la solución del Anticuerpo reducido, el esteño tiende a hidrolizarse formando coloide, el cual puede unirse al tecnecio reducido y competir con el ligante durante la reacción de marcado. Esto se minimizó empleando un volumen de 31.5 ml de la solución de Anticuerpo reducido en el escalamiento del lote.
- d) El tiempo de agitación incrementa la probabilidad de la presencia de oxígeno lo que puede provocar oxidación de algunos puentes disulfuro, por lo cual el Tc-99m tiende a formar dióxido de tecnecio (coloide), siendo cinco minutos el tiempo de agitación óptimo para evitar la presencia de esta impureza.
- e) El oxígeno presente en la solución y el medio ambiente, influye en la oxidación del cloruro estanoso. Esto se minimizó empleando una atmósfera nitrógeno durante el proceso de elaboración de la formulación y un tiempo de congelación

- de 2 hrs en nitrógeno líquido, antes de ser liofilizadas las muestras, disminuyendo el porcentaje de pertecneiato en el producto marcado.
- f) El aumento de la concentración de cloruro estanoico favorece la formación de coloide de hidróxido de estaño y pertecneiato, siendo la concentración óptima $3.0 \mu\text{g}$ de SnCl_2 , ya que es la que proporciona mayor estabilidad.
3. Los métodos empleados para demostrar su linealidad, precisión, exactitud y especificidad, en la cuantificación del AcMo en el desarrollo de la formulación (CLAR y UV) cumplieron con los propósitos para los cuales fueron diseñados.
 4. La estabilidad del producto liofilizado (a 4°C) mantiene una pureza radioquímica alrededor del 90 %, por lo que el ciclo de liofilización empleando 2 hrs de congelamiento con nitrógeno líquido, antes del secado a 15°C durante 24 hrs es el óptimo.
 5. Se propone realizar futuras investigaciones acerca de la estabilidad acelerada (empleando diferentes temperaturas) del Anticuerpo Monoclonal, para determinar tanto el orden de la reacción, así como la fecha de caducidad en un estudio de estabilidad acelerada.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Jesús Mallol Escobar "Radiofarmacia", Ed. Interamericana, México, 1989, págs 19-40, 63-65.
2. Taller Regional de Capacitación en Producción y Control de Radiofármacos. Chile, Octubre, 1989.
3. S.S.A Manual de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C.
4. Material de apoyo al curso: "Validación de Métodos Analíticos", Alejandro Alcantara. LUAL, México 1993.
5. Validación de Métodos Analíticos "Boll. Chlm. Farm. 1126 (2), 66-74.
6. Manuel Tubis " Radiopharmacy", A Wiley-Interscience publication, pp 246-251, 316-323.
7. Sbarbati de Nudelman. " Estabilidad de Medicamentos", Ed. El Ateneo, México, págs 77-89.
8. Tim J. Ahern and Mark C. Manning., "Estability of Protein Stabilization", Ed. Series Editori Ronald T. Borchardl, New York and London, 1992. Vol. 3 par B. pp 209-225
9. BLOK, D. et al " A new Method for protein-Labeling with Tc-99m.", Nucl. Med. Biol., 16 (1): 11-16, 1989.
10. ETIENNE J. et al " A New Method for Labeling of Monoclonal Antibodies and Their Fragments with Technetium-99m.", Nucl. Med. Biol., 18 (3): 353-356, 1991
11. ZHANG, Z. M. et al "Evaluation of Reduction-mediated Labelling of Antibodies with Technetium-99m.", Nucl. Med. Biol., 19 (6): 607-609, 1992.
12. MERINO, M.J. et al "Monoclonal Antibodies for Radioimmunosctintigraphy of Breast Cancer.", Nucl. Med. Biol., 18 (4): 437-443, 1991.
13. Gopal B. Saha "Fundamentals of Nuclear Pharmacy" Third Edition, Ed Springer Verlag, New York, 1992, pp 81-104.
14. Reporte Interno de " Anticuerpo Monoclonal" Centro de Inmunología Molecular.
15. Gullemina Ferro Flores, Rosa María García Arreola y María Antonia González Zavala. "Manual de radiomarcado de células sanguíneas y Anticuerpos Monoclonales", Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, México 1994. páginas 30-38.
16. THAKUR, M. L. et al "Technetium-99m Labeled Monoclonal Antibodies: Evaluation of Reducing Agents", Nucl. Med. Biol., 18 (2): 227-233, 1991.

17. SCHWARZ, A. AND STEINSTRASSER, A. " A novel approach to 99m-Tc-labeled Monoclonal Antibodies", J. Nucl. Med., 28:721, 1987. Abstract.
18. " 99m-Technetium Labelling of a Tumor Associated Murine Monoclonal Antibody for Immunoscintigraphic Studies in Man" Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, XXXIV (4): 323-327, 1993.
19. Bellanti "Inmunología", 3a edición. De. Interamericana, México, 1986 págs 98-116.
20. MATHEW, L. et al " Monoclonal Antibodies for Specific Cell Labeling: Considerations, Preparations and Preliminary Evaluation", Nucl. Med. Biol., 14(1):51-58, 1987.
21. Consuelo Arteaga de Murphy., " El tecnecio en la Medicina Nuclear", Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, México, 1989.
22. Charles B. Sampson, " Textbook of Radiopharmacy" Editor Peter H. Cox Gordon And Broach Science Publishers, pp 53-67, 115-146, 273-287.
23. PARK, K. Y. et al. "A rapid and efficient method or labeling IgG antibodies with Tc-99m and comparison Tc-99m FAb antibody fragments.", J. Nucl. Med., 30:793, 1989.
24. RHODES, B. A.; et al "Tc-99m labeling of murine monoclonal antibody fragments.", J. Nucl. Med., 27: 685-693, 1986.
25. SALLY J. D. et al " Quantitative Imaging of Mouse L-6 Monoclonal Antibody in Breast Cancer Patients to Develop a Therapeutic Strategy.", Nucl. Med. Biol., 19 (3): 621-631, 1991.
26. DE LIGNY, C. L. et al " A Chromatographic Study of the Composition of (99mTc)Tc(Sn)EHDP Complexes.", Nucl. Med. Biol., 18 (2): 173-178, 1991.
27. FERRO F. G. and LEZAMA, C. J. " A freeze Dried Kit Formulation for the Preparation of 99mTc-EHDP-MoAb-IOR CEAl Complex.", Nucl. Med. Biol., 21 (7): 1013-1116, 1994.
28. ANDREW M. K. et al. " Monoclonal Antibodies in Nuclear Medicine.", J. Nucl. Med., 26: 531-537, 1985.
29. WILLIAN H. B, "Horizons in Radionuclide Therapy: 1985 Update.", J. Nucl. Med., 26: 421-427, 1985.
30. STEVEN M. L. " Radiolabeled Monoclonal Anti-Tumor Antibodies in Diagnosis and Therapy", J. Nucl. Med., 26: 538-545, 1985.
31. ALLAN H. G. and EDMUND K. E. " Radiolabeled Monoclonal Antibodies Radiochemical Pharmacokinetic and Clinical Challenges", J. Nucl. Med., 26(5): 546-547, 1985.
32. STEPHEN, J. M. and DAVID, E. " Reduction Mediated Technetium-99m Labeling of Monoclonal Antibodies", J. Nucl. Med., 31(5): 692-697, 1990.

33. NICOLI, M. et al " Progress in the Design, Evaluation and Development of Tc-99m Radiopharmaceuticals", Technetium in Chemistry and Nuclear Medicine, 2: 147-154, 1986.
34. W.O. Foye. "Principios de Química Farmacéutica", Ed. Reverté S. A. España, 1988, págs 929-938.
35. Farmacopea Europea, Consejo de Europa, segunda edición, Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 1992 Partes I y II vol 11, pág IV-I a IV-12.
36. The International Pharmacopoeia, third edition, World Health Organization Geneva, 1994. vol. 4 pp 15-22, 36-40.
37. Farmacopea Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, segunda edición, Madrid España, 1991. parte II vol 4, págs 338-338-7.
38. Farmacopea Europea Consejo de Europa, segunda edición, edita y describe Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 1992. parte II vol 10, pág 689 a 689-3.
39. Farmacopea Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, segunda edición, Madrid España 1991. partes I y II, vol 8, págs 125 a 125-15.
40. Farmacopea Europea, Consejo de Europa, segunda edición, Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid 1992. parte II vol 9 pág. 640 a 640-5.
41. Douglas C. Montgomery. "Diseño y Análisis de Experimentos", Ed. Iberoamericana, México 1991.
42. María José Marqués de Cantú " Probabilidad y Estadística", Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1988 pág. 361-385.
43. Remington., " Farmacia", 17a edición, Ed. Médica Panamericana.
44. Consuelo Arteaga de Murphy., El Tecnecio "Monografía", Bajo el patrocinio da la Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, México, 1989.
45. High Pressure Liquid Chromatography Journal of Pharmaceutical Science 162, 1399-1414 (1973).

10. ANEXO

10.1 Elección del agente reductor para la reducción del anticuerpo

10.1.1 Cálculo de la concentración de ác. ascórbico y 2-mercaptoetanol

Equivalencia de μl a gramos del ácido ascórbico

*VOLUMEN μL (Ac. ascórbico)	*MOLES $\times 10^{-5}$ (Ac. ascórbico)	*GRAMOS $\times 10^{-3}$ (Ac. ascórbico)
1.5	2.14	1.7
2.5	3.5	2.8
5.0	7.15	5.6

*Donde

1000 ml = 14.3 mol de ácido ascórbico

$Pm_{\text{Ac. ascórbico}} = 78.3 \text{ g/mol}$

10.1.2 Diseños Factoriales con niveles mixtos

El análisis de varianza se resume en la tabla 12-13, página 368.

Ver (Montgomery, 1991)

10.2 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante CLAR y U.V.

10.2.1 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante CLAR.

a. Precisión del sistema

Prueba de hipótesis para evaluar la precisión del sistema

■ Contraste de Hipótesis

$$H_0: s^2 < \hat{\sigma}^2$$

$$H_a: s^2 > \hat{\sigma}^2$$

■ Nivel de significación

$$\text{Alfa} = 0.05$$

■ Estadígrafo de prueba

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

Donde:

n = número de muestras analizadas

s = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

$$n = 8$$

$$s^2 = (1.85)^2 = 3.4225$$

$$cv = 2$$

Entonces

$$X^2 = (5)(1.85)^2/2 = 8.55 \quad X_{\text{calc}} = 8.55$$

■ Cálculo del estadígrafo en tablas

$$X_{1-\alpha/2, n-1}$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\alpha/2 = 0.025$$

$$1-\alpha/2 = 0.975$$

$$gl = n-1 = 8-1 = 7 \quad X_{1,0.975,7} = 12.832$$

b. Exactitud

■ Prueba de hipótesis

$$H_0: X = 100$$

$$H_a: X = 100$$

■ Nivel de significación

$$\alpha = 0.05$$

■ Estadígrafo de prueba

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

Donde:

X = media calculada

μ = media teórica equivalente al 100%

s = desviación estándar.

n = número de muestras analizadas.

$$X = 100,37$$

$$\mu = 100$$

$$s = 0,68$$

$$n = 6$$

Entonces

$$t_{\text{calc}} = (100,37 - 100) / (0,68 / (6)^{1/2}) = 1,33$$

■ Cálculo del estadígrafo en tablas

$$\text{alfa} = 0,05 \quad t_{0,975,5} = 2,5706$$

$$\text{alfa}/2 = 0,025$$

$$1 - \text{alfa}/2 = 0,975$$

$$gl = n - 1 = 5$$

c. Precisión (repetibilidad)

■ Contraste de hipótesis

$$H_0: s^2 < \hat{\sigma}^2$$

$$H_a: s^2 > \hat{\sigma}^2$$

■ Nivel de significación

$$\text{alfa} = 0,05$$

■ Estadígrafo de prueba

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

Donde:

n = número de muestras analizadas

DE = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

$$n = 6 \quad s^2 = (0,68)^2 = 0,4624$$

$$cv = 2$$

Entonces

$$X_i^2 = (5)(0,4624)/2 = 1,156 \quad X_i^2 \text{calc.}^2 = 1,156$$

■ Cálculo del estadígrafo en tablas

$$\chi^2_{1-\alpha/2, n-1}$$

$$\alpha = 0,05$$

$$\alpha/2 = 0,025$$

$$1-\alpha/2 = 0,975$$

$$gl = n-1 = 6-1 = 5$$

$$\chi^2_{0,975, 5} = 12,832$$

d. Precisión (reproducibilidad)

Diseño jerárquico de dos etapas

El modelo estadístico lineal para el diseño jerárquico en dos etapas es

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_{j(i)} + \varepsilon_{(ijk)}$$

Donde: $i=1,2,\dots,a$

$j=1,2,\dots,b$

$k=1,2,\dots,n$

El subíndice $j(i)$ indica que el j -ésimo nivel del factor B está anidado bajo el i -ésimo nivel del Factor A.

El subíndice (ijk) se usa para el término del error.

Tabla de análisis de varianza para el diseño anidado de dos etapas

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS
A	$\sum_i Y_{i.}^2 / bn - (Y^2) / abn$	$a-1$	MS_A
B dentro de A	$\sum_i \sum_j Y_{ij.}^2 / n - \sum_i Y_{i.}^2 / bn$	$a(b-1)$	$MS_{B(A)}$
Error	$\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}^2 - \sum_i \sum_j Y_{ij.}^2 / n$	$ab(n-1)$	MS_E
Total	$\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}^2 - (Y^2) / abn$	$abn-1$	

10.2.2 Validación de la cuantificación de la gammaglobulina mediante U.V.

a. Precisión del sistema

■ Prueba de hipótesis

$$H_0: s^2 < \hat{\sigma}^2$$

$$H_a: s^2 > \hat{\sigma}^2$$

- Nivel de significación

$$\text{alfa} = 0.05$$

- Estadígrafo de prueba

$$X_i^2 = [(n-1)s^2] / C.V.$$

Donde:

n = número de muestras analizadas.

s = desviación estándar

cv = coeficiente de variación

$$n = 6$$

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

$$CV=3$$

Entonces

$$X_i^2 = [(5)(1.3225)]/3$$

$$X_i^{\text{calc}} = 2.20$$

- Cálculo del estadígrafo en tablas

$$X_{1-\text{alfa}/2, n-1}$$

$$\text{alfa} = 0.05$$

$$\text{alfa}/2 = 0.025 \quad X_{0.975, 5} = 12.832$$

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

$$g_l = n-1 = 5$$

b. Exactitud

- Prueba de hipótesis

$$H_0: X = 100$$

$$H_a: X \neq 100$$

- Nivel de significación

$$\text{alfa} = 0.05$$

- Estadígrafo de prueba

$$t_{\text{cal}} = X - \mu / [(s/\sqrt{n})/2]$$

Donde:

X = media calculada

μ = media teórica equivalente al 100%

s = desviación estándar

n = número de muestras analizadas

$$X = 100.05$$

$$s = 1.04$$

$$\mu = 100$$

Entonces

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

$$t_{\text{calc}} = 0.1177$$

■ Cálculo del estadígrafo en tablas

$$\text{alfa} = 0.05$$

$$gl = n-1$$

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

$$gl = 5$$

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

$$t_{0.975,5} = 2.5708$$

c. Precisión (repetibilidad)

■ Contraste de hipótesis

$$H_0: s^2 < \hat{\sigma}^2$$

$$H_a: s^2 > \hat{\sigma}^2$$

■ Nivel de significación

$$\text{alfa} = 0.05$$

■ Estadígrafo de prueba

$$X^2 = ((n-1)s^2)/cv$$

Donde:

n = número de muestras analizadas

s = desviación estándar

cv = coeficiente de variación

$$n = 6$$

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

$$cv = 3$$

Entonces

$$X^2_{\text{calc}} = [(5)(1.0201)]/3 = 1.7$$

■ Cálculo del estadígrafo en tablas

$$\alpha = 0.05 \quad gI = n-1$$

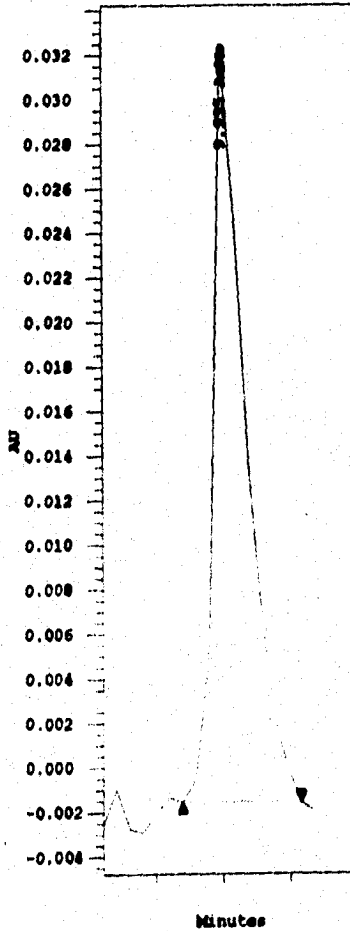
$$\alpha/2 = 0.025 \quad gI = 5$$

$$1-\alpha/2 = 0.975$$

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

d. Especificidad

Figura 4 Cromatograma del AcMo100RegII³ con espectro de UV (Detector de arreglo de Diodos)



Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	% Area
1	AcMo	9.935	5658406	100.00

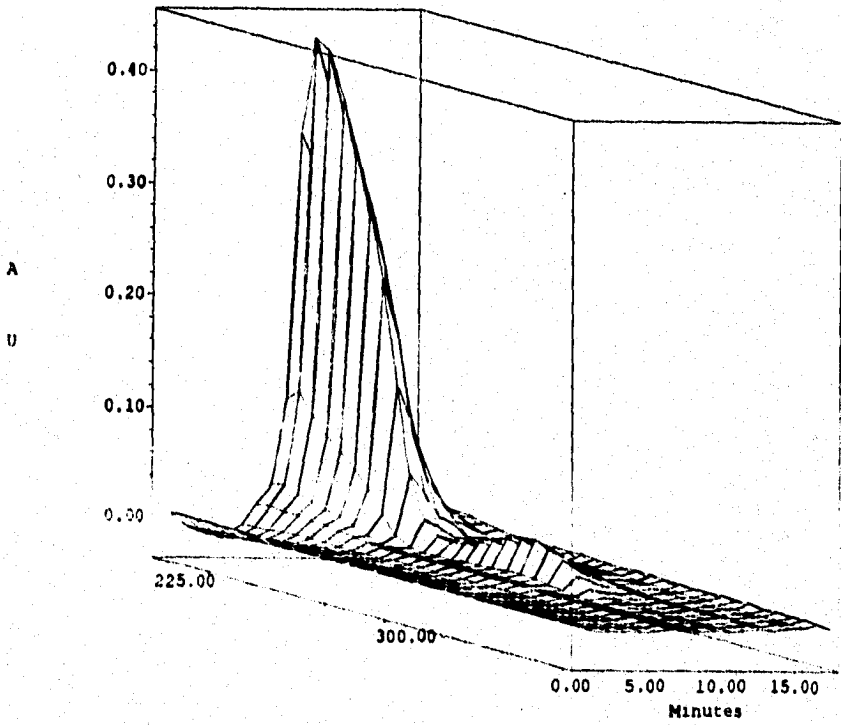


Figura 5 Cromatograma en el CLAR del AcMolIOReg/r³ Columna Protein Pak 300sw (waters).

10.3 Diseño Aleatorizado por Bloques Completos

El modelo estadístico para este diseño es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ = Es una media general.

τ_i = Es el efecto del i -ésimo tratamiento.

β_j = Es el efecto del j -ésimo bloque.

ϵ_{ij} = Es el término usual de error aleatorio.

Se desea probar la igualdad de las medias de tratamiento.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_3$$

$$H_a = \text{al menos una } \mu_i \neq \mu_j$$

Análisis de varianza para un diseño aleatorizado por bloques completos

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F_0
Tratamientos	$\sum Y_{i.}^2/b - Y^2./N$	a-1	$\frac{ss \text{ Tratamientos}}{a-1}$	$\frac{ss \text{ tratamiento}}{MSE}$
Bloques	$\sum Y^2./i - Y^2./N$	b-1	$\frac{ss \text{ bloques}}{b-1}$	
Error	MSE (por diferencia)	(a-1)(b-1)	$\frac{SSE}{(a-1)(b-1)}$	
Total	$\sum \sum Y_{ij}^2 - Y^2./N$	N-1		

Donde:

a = Tratamientos

b = bloques

MSE = Suma de cuadrados medios

10.4 Humedad**10.4.1 Determinación de la humedad del producto después del ciclo de liofilización.**

Cálculo para la determinación de humedad

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Factor} \times 100 \times \text{Vol.}}{\text{mg(mta)}}$$

$$\text{Factor} = \frac{10 \mu \text{L agua}}{\text{vol. gastado}}$$

Volumen gastado=2.01 ml

Donde Factor= 4.95871

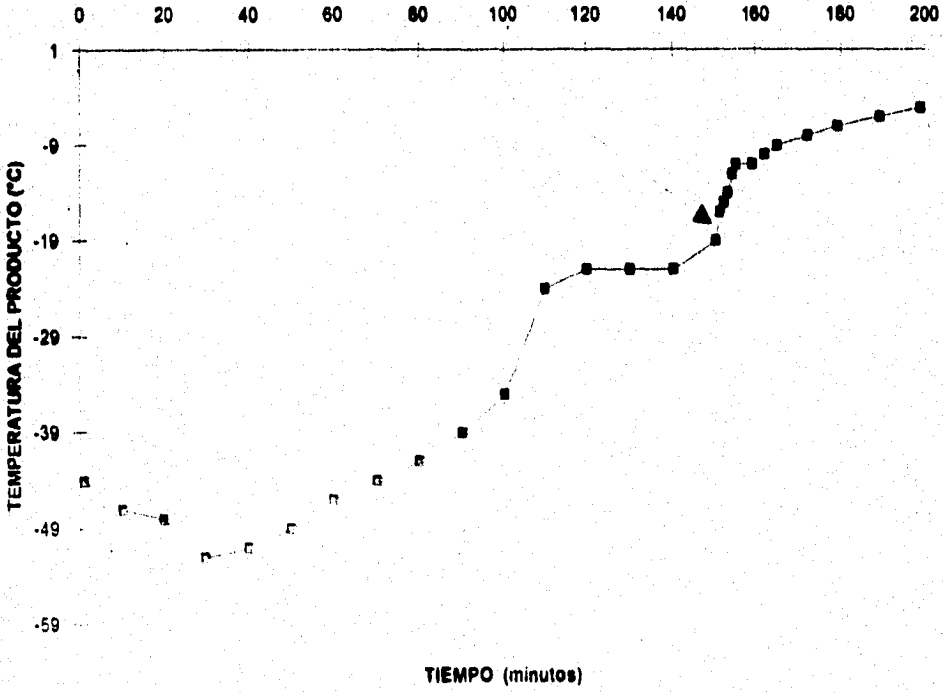
a) Resultados obtenidos de diferente ciclo de liofilización

*NUMERO DE OBS.	REACTIVO KARL FISHER (ml)	MUESTRA (ml)	HUMEDAD %
1	0.05	4.4	5.60
2	0.10	27.6	6.02
3	0.09	3.4	13.12
4	0.30	11.0	13.52
5	0.13	4.3	14.99
6	0.15	4.3	17.29

b) Resultados del producto estéril empleando un ciclo de 15°C

*NUMERO DE OBS.	REACTIVO KARL FISHER (ml)	MUESTRA (mg)	HUMEDAD %
1	0.25	8.96	13.84
2	0.12	4.21	14.12

10.4.2 Curva de liofilización del ciclo B °



10.5 Distribución

Ensayo 1

Inyectado a ratón. Peso 41.4g Fondo: 51 Ctas

ORGANO	CUENTAS MUESTRA	*MUESTRA SIN FONDO	CUENTAS EXTRAPOLACION
Sangre	36156	36105	**95480.48
Riñones	11927	11876	11876.00
Estómago	3748	3697	3697.00
Intestino	25891	25840	25840.00
Higado	35762	35711	35711.00
Pulmones	38080	38029	38029.00
Corazón	1938	1887	1887.00
Tiroides	849.43	900.43	900.43
Vejiga y Orina	19576	19525	19525.00
Cuerpo	47695	47644	47644.00
Cuentas Totales			281384.48

*Muestra sin fondo=Cuentas Muestra-Fondo

** Cuentas de extrapolación=(Muestra_{sin fondo}XFactor extrapolación)/Peso_{muestra}Donde Factor de extrapolación=Peso_{ratón}X0.08

8%=0.08=Volumen de la sangre

Donde:

% Dosis radiación por órgano = (Dosis órganoX100)/(cuentas totales)

Ensayo 2
Injectado a ratón. Peso: 33.0 g Fondo: 56 Clas.

ORGANO	CUENTAS MUESTRA	*MUESTRA SIN FONDO	CUENTAS EXTRAPOLACIÓN
Sangre	29443.00	29387.00	**84631.48
Riñones	11052.00	10996.00	10996.00
Estómago	3619.00	3563.00	3563.00
Intestino	27107.00	27051.00	27051.00
Hígado	35295.00	35239.00	35239.00
Pulmones	5326.00	5270.00	5270.00
Corazón	2768.00	2712.00	2712.00
Tiroides	619.00	563.00	563.00
Vejiga y Orina	7006.00	6950.00	6950.00
Cuerpo	37974.00	37918.00	37918.00
Cuentas Totales		161703.00	216947.48

*Muestra sin fondo=Cuentas Muestra-Fondo

** Cuentas de extrapolación=(Muestra_{sin fondo}XFactor extrapolación)/Peso_{muestra}

Donde Factor de extrapolación=Peso_{ratón}X0.08

8%=0.08=Volumen de sangre

Donde:

%Dosis radiación por órgano=(Dosis órganoX100)/(cuentas totales)