Dan Beninson
Instituto de Tecnología Nuclear

**ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA Y APLICACIONES NUCLEARES**

# Puesta a punto del Método de control de calidad Radioquímico por TLC del

# [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617

**TRABAJO FINAL**

**Tesista: Farm. Araya Xiomara L.**

**Directora: Esp. Ana Clarisa López Bularte**

**Codirectora: Mg. Noemí N. Nevares**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

CNEA Comisión Nacional de Energía Atómica

# ÍNDICE

## Contenido

1. Objetivo 4
2. Alcance 4
3. Abreviaturas y definiciones 4
3.1 Abreviaturas 4
3.2 Definiciones 5
4. Introducción 8
4.1 Laboratorio de Radiofarmacia. 8
4.2 Lutecio. 8
4.2.1. Producción y desintegración de $^{177}$Lu 0 9
4.2.2 Aplicaciones del Lutecio-177 11
4.3 Cáncer de Próstata 7 12
4.3.1 Cáncer de próstata resistente a la castración 8 12
4.3.2 Tratamiento con [$^{177}$Lu]Lu-PSMA [1], [3] 13
4.4 Validación de métodos analíticos [2], [4], [6] 16
4.4.1 Aspectos Claves de la Validación de Métodos de control de calidad para Radiofármacos: 17
4.5 Cromatografía en capa fina (TLC). [10] 18
5. Reactivos, materiales y equipos 18
5.1 Reactivos 18
5.2 Materiales 19
5.3 Equipos 19
6. Procedimiento de Ensayo 21
6.1 Descripción del método 21
6.1.1 Desarrollo de la corrida cromatográfica (cromatografía en capa fina) 21

6.2 Parámetros a validar 23
6.3 Desarrollo de los parámetros a validar 23
6.3.1 Preparación de los solventes de corrida 23
6.3.2 Determinación de la actividad mínima de trabajo 24
6.3.3 Especificidad y Selectividad 24
6.3.4 Precisión 25
6.3.5 Robustez 25
7. Resultados 28
7.1 Determinación de la actividad mínima de trabajo 28
7.2 Especificidad y Selectividad 28
7.3 Precisión 34
7.3.1 Repetitividad 34
7.3.2 Precisión Intermedia 36
7.4 Robustez 38
7.5 Tabla de Resultados 39
8. Discusión 42
9. Conclusiones 43
10. Agradecimientos 46
11 Bibliografía 48

## 1. Objetivo

Evaluar si el método analítico propuesto para el análisis de pureza radioquímica, presenta resultados que permiten determinar objetivamente la calidad del Radiofármaco [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617, de acuerdo con los parámetros especificados, proporcionando resultados confiables para los análisis rutinarios.

## 2. Alcance

El alcance de este trabajo es el método analítico utilizado para la determinación de la pureza radioquímica del Radiofármaco [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617.

## 3. Abreviaturas y definiciones

### 3.1 Abreviaturas

C.V: coeficiente de Variación

CAE: Centro Atómico Ezeiza

CNEA: Comisión Nacional de Energía Atómica

EANM: Asociación Europea de Medicina Nuclear

FDA: Food and drug administration.

GMP: Good Manufacturing Practices (Buenas Prácticas de Manufactura)

IAEA: International Atomic Energy Agency

ICH: Consejo internacional para la armonización de los Requisitos técnicos para Productos Farmacéuticos para uso humano

TLC: thin layer chromatography (cromatografía de capa fina)

keV: kiloelectrónVolt

LET: transferencia lineal de energía

Lutecio libre: [$^{177}$Lu]$LuCl_3$

Lu-coloide: [$^{177}$Lu]Lu-coloide

mCRPC: Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración

PSMA: Antígeno de membrana especifico de próstata

Radiofármaco: [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617

Rf: relación de frente

TRT: terapia radionucleídica dirigida

u.m.a: unidad de masa atómica

## 3.2 Definiciones

Coeficiente de Variación: medida estadística que sirve para determinar la dispersión de un conjunto de datos respecto a su media. Se calcula dividiendo la desviación estándar por la media y se multiplica por 100, así se expresa en forma de porcentaje.

Desintegración $\beta^-$: son electrones que se originan en el núcleo del átomo. Luego del decaimiento $\beta^-$, el átomo se convierte en otro de número atómico mayor en una unidad.

EANM: Es la principal organización profesional de medicina nuclear en Europa.

Efecto crossfire: capacidad de la radiación $\beta^-$, emitida por el radiofármaco, de alcanzar y destruir la célula tumoral que no está unida directamente al radiofármaco, es decir que la radiación “cruza” de una célula a otra, extendiendo el daño, más allá de las células inicialmente marcadas

Farmacopea: referencia oficial en la cual se establecen estándares de calidad para los medicamentos, incluyendo radiofármacos. Contiene información detallada sobre la composición, identificación, pureza y métodos de análisis de las sustancias utilizadas en la elaboración de medicamentos.

FDA: Es la agencia del Gobierno de Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos (tanto para personas como para animales), medicamentos (humanos y veterinarios), cosméticos, aparatos médicos (humanos y animales), productos biológicos y derivados sanguíneos.

IAEA (OIEA en castellano): El Organismo Internacional de Energía Atómica es el principal foro mundial intergubernamental de cooperación científica y técnica en la esfera nuclear.

LET: medida de la energía transferida al medio cuando la radiación ionizante pasa a través de él. Se utiliza para cuantificar el efecto de la radiación ionizante

sobre un medio. En radiobiología LET indica el daño biológico potencial a causa de la radiación ionizante.

Pureza radioquímica: fracción porcentual de radiactividad del radionucleído declarado que está presente en la preparación radiofarmacéutica en la forma química declarada en relación con la radiactividad total de ese radionucleído.

Reacción (n, γ): reacción también conocida como captura radiactiva, es una reacción producida principalmente por neutrones térmicos.

Relación de frente: relación entre distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por la fase móvil.

ROS: especies reactivas de oxígeno

SBS: rotura de cadena simple

Terapia radionucleídica dirigida (TRT): tipo de tratamiento contra el cáncer que utiliza medicamentos diseñados para "tener como blanco" las células cancerosas sin afectar a las células normales.

Unidad de masa atómica: constante física, equivalente a la doceava parte de la masa atómica del isótopo más abundante del carbono, el carbono 12.

# Introducción

# 4. Introducción

## 4.1 Laboratorio de Radiofarmacia.

Este laboratorio pertenece a la División Radiofarmacia Básica y Aplicada, Gerencia de Área de Producción de Radioisótopos y Aplicaciones de la Radiación, y se encuentra en el edificio de Aplicaciones del Centro Atómico Ezeiza (CAE) de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Este laboratorio se focaliza en la investigación y desarrollo de nuevos radiofármacos basados en radionucleidos de producción nacional.

En particular en el laboratorio, se realizan marcaciones de moléculas, desarrollos de controles de calidad, caracterizaciones in vitro, ensayos en células y biodistribuciones.

El laboratorio también participa del Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos en CNEA (PCEPR RF); que se basa en un enfoque traslacional, adaptando las guías preclínicas de radiofármacos publicadas por la IAEA, EANM y FDA al contexto local.

Este programa se encuentra dividido en diferentes etapas, todas con objetivos específicos, llevadas a cabo por equipos transdisciplinarios.

Cada equipo es responsable de la evaluación de la adaptación de cada etapa, a las guías internacionales preclínicas (diseñan el plan experimental, lo implementan y evalúan su adaptación a dichas guías).

La molécula [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617, se encuentra patentada, con el nombre comercial Pluvicto, por el Laboratorio Novartis.

Esta molécula se utiliza como modelo para desarrollar los modelos preclínicos, para elaborar nuevos análogos de inhibidores de PSMA, incluyendo la marcación, la puesta a punto de los controles de calidad y todos los ensayos in vitro y biológicos (Gold standard)

La molécula [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-I&T, posee patente libre desde 2022 y se utiliza como radiofármaco inhouse en distintos centros de medicina nuclear en Europa, se encuentra en fase III avanzada de ensayo clínico en Estados Unidos.

## 4.2 Lutecio. [(1)]

El lutecio es un elemento químico con un número atómico de 71 y un peso atómico de 174,967 u.m.a., pertenece al grupo de los lantánidos ubicándose en el periodo 6 de la tabla periódica. Es el elemento más pesado y duro dentro de los lantánidos, es un metal de color blanco grisáceo con tonalidades plateadas, resistente a la corrosión y relativamente estable en presencia de aire seco, pero no en aire húmedo.

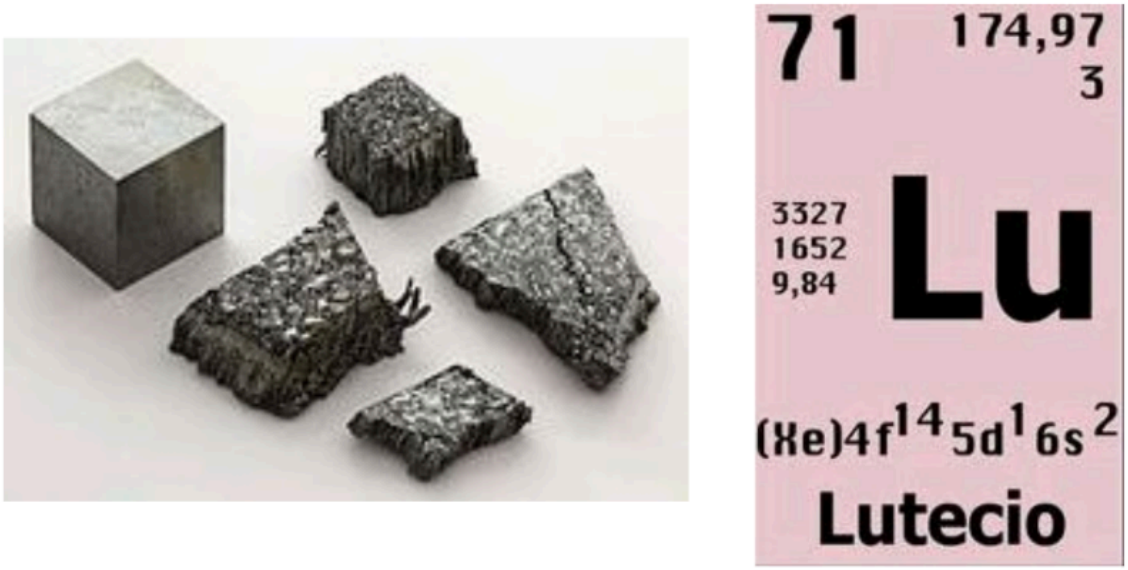



Imagen 1: Lutecio

Fue descubierto en París - Francia en 1907 por el científico francés Georges Urbain y el mineralogista Carol Auer Von Welcbachr, que de manera simultánea estudiaban las impurezas que había en el iterbio.

Su estado de oxidación más común y estable es el +3, el cual le permite formar varios compuestos químicos, tales como óxidos y halogenuros o formando complejos.

En la naturaleza presenta un isótopo estable, el $^{175}$Lu con una abundancia de 97,4%, un isótopo cuasi estable el $^{176}$Lu, con una abundancia de 2,59% y un periodo de semidesintegración de 3,76x10$^{10}$ años y más de 33 isótopos radiactivos, entre los cuales se encuentra el $^{177}$Lu que posee dos isómeros, uno metaestable con un

período de semidesintegración de 160,4 días y el fundamental de 6,64 días (datos tomados de Isotope Browser - IAEA Nuclear Data Section).

### 4.2.1. Producción y desintegración de $^{177}$Lu [(1)]

El $^{177}$Lu se produce en un reactor nuclear irradiando $^{176}$Lu o $^{176}$Yb con neutrones,

cuyas reacciones son las siguientes:

- $^{176}Lu\ (n, \gamma)^{177}Lu$ (método directo)
- $^{176}Yb\ (n, \gamma)^{177}Yb \xrightarrow{\beta^-} {}^{177}Lu$ (método indirecto)

Imagen 2: Métodos de obtención del $^{177}Lu$

Para la obtención del $^{177}Lu$, en el laboratorio de Radiofarmacia, el óxido de lutecio $^{176}Lu_2O_3$ se disuelve en HCl Suprapur concentrado en una concentración final de 2 µg/µL, luego se toma una alícuota de 5 µL y se le adicionan 20 µL de HCl Suprapur, quedando .una concentración de 0,4 µg/µL de $^{176}Lu_2O_3$ Se dosifican entre 1 y 2 µg de ésta última solución en ampollas de cuarzo (el cuarzo se utiliza porque es resistente al calor y a la radiación y no provoca contaminación metálica), se evapora el solvente y se cierran las ampollas mediante fundición en llama y se las coloca dentro de un minican de aluminio de calidad nuclear.

La ampolla contenida en el minican se envía al reactor, para que allí colocada en una posición donde tengan un flujo adecuado de neutrones y se proceda a su irradiación.

Una vez finalizada la irradiación, la ampolla irradiada se devuelve cerrada como se la envió al reactor, pero con el producto activado. En el Laboratorio de Radiofarmacia se abre cortando el cuarzo con un mini torno (Robert Bosch Tool Corporation, Estados Unidos) y se disuelve el contenido en 10 µL de 0,04M HCl Suprapur , el cual se trasvasa a un tubo eppendorf para comenzar con la marcación del PSMA-617.

El $^{177}Lu$ decae por emisión $\beta^-$ para formar $^{177}Hf$ estable, con energías máximas de 498 keV (79,3%), 380 keV (9,1%) y 176 keV (12,2%), emite también radiación gamma (γ) de energías 112,95 keV y 208 keV, entre otras. [(1)]

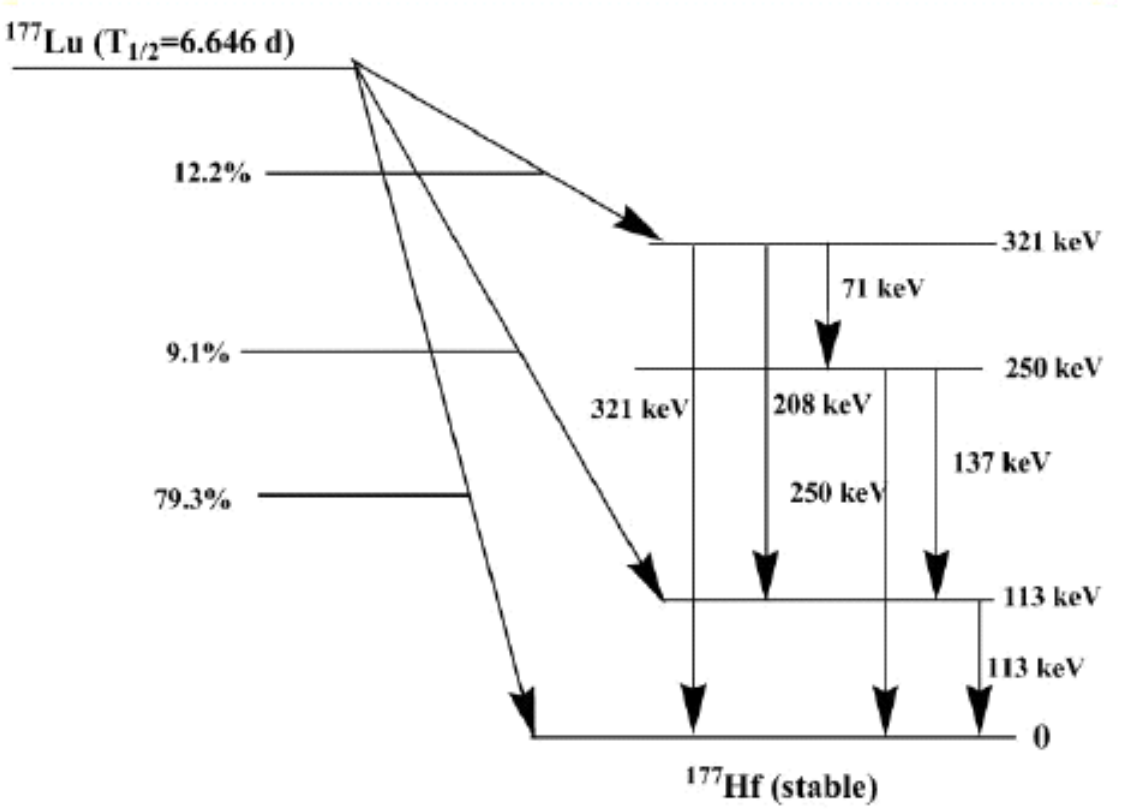



Imagen 3: Esquema de desintegración simplificado del $^{177}$Lu que tiene en cuenta las partículas β− y los fotones γ emitidos (1)

El $^{177}$Lu se utiliza en terapia dirigida debido a sus características radionucleídicas favorables, como ser su emisión $\beta^-$ de baja energía y su periodo de desintegración radiactiva relativamente corto.

Además, la emisión de fotones gamma de baja abundancia ($\mathcal{E}_\gamma$: 113 keV (6.4%) y 208 keV (11%)) permiten obtener imágenes, lo cual brinda una ventaja teragnóstica, que permite ver la extensión del tumor y evaluar la eficacia del tratamiento.

### 4.2.2 Aplicaciones del Lutecio-177

- Tratamiento del cáncer de próstata: El [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617 y el [$^{177}$Lu]Lu-J591 se han utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento del mCRPC.

- Paliación del dolor óseo: El [$^{177}$Lu]Lu-EDTMP se ha utilizado en ensayos clínicos para la paliación del dolor óseo en pacientes con metástasis óseas.

- Otras aplicaciones: El $^{177}$Lu también se está investigando para su uso en el tratamiento de otros tipos de cáncer, como el cáncer de ovario, el linfoma no Hodgkin y el cáncer de mama.

### 4.3 Cáncer de Próstata [7]

La próstata es una glándula sexual, masculina, pequeña, ubicada delante del recto y debajo de la vejiga. Su función principal es la producción de líquido seminal, el cual nutre y transporta el esperma. El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común entre los hombres. En las primeras etapas, los tumores generalmente son asintomáticos y se descubren por la elevación del Antígeno Prostático Específico de membrana (PSMA, por sus siglas en inglés), por un examen rectal alterado (indispensable) o incidentalmente después del tratamiento quirúrgico de la hiperplasia benigna de próstata.

Los síntomas que pueden aparecer a medida que el cáncer progresa, son el aumento de la frecuencia con que se orina y la dificultad o urgencia para orinar, los mismos suelen estar causados por la presión que las células del cáncer ejerce sobre la uretra. El diagnóstico del cáncer de próstata generalmente se basa en los resultados del examen clínico de la próstata y del análisis de sangre en el que se verifican los niveles del antígeno prostático específico, así como por los resultados de una biopsia.

Lo avanzado que se encuentra el cáncer  y cuál puede ser el mejor tratamiento, se determina de acuerdo con el tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos y/o que se haya diseminado a los huesos o a otras partes del cuerpo. Se puede utilizar la resonancia magnética (RM), tomografía por emisión de positrones (PET) o bien tomografía computada (TC), estas metodologías permiten ver hasta dónde se diseminó el cáncer. También se pueden extirpar los ganglios linfáticos en la pelvis para luego realizarles una biopsia para verificar si contienen células cancerosas.

#### 4.3.1 Cáncer de próstata resistente a la castración [8]

El Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCPRC), es un tipo de patología en la cual, al bajar los andrógenos (testosterona) a niveles de castración (<50 ng/dL), el receptor para estos andrógenos se mantiene activo y continúa impulsando la progresión del cáncer. Del 10 al 20% del total de los casos

avanzados progresa a mCPRC, donde el 90% desarrolla metástasis ósea que causa dolor, fracturas y otros problemas que afectan la calidad de vida.

### 4.3.2 Tratamiento con [$^{177}$Lu]Lu-PSMA [(1), (3)]

#### 4.3.2.1 Radiofármacos emisores $\beta^-$.

Los radiofármacos emisores $\beta^-$ juegan un papel crucial en la TRT ofreciendo una forma eficaz de administrar radiación localizada para tratar tumores y otras afecciones.

#### 4.3.2.2 Características de los Emisores $\beta^-$.

- Penetración: Las partículas $\beta^-$ tienen un alcance en tejido que varía entre 1 y 10 mm. Esta característica las hace adecuadas para tratar tumores de tamaño pequeño a mediano, ofreciendo un "efecto crossfire" que permite alcanzar células tumorales adyacentes.
- Eficacia en Tumores Sólidos: El alcance de los emisores $\beta^-$ en tumores sólidos puede ser un factor limitante en su eficacia. Si bien el radiofármaco puede distribuirse homogéneamente en el tumor, las partículas $\beta^-$ pueden no impactar en todas las células tumorales, especialmente en tumores grandes.
- Dependencia de Oxígeno: La citotoxicidad de los emisores $\beta^-$ depende de la concentración de oxígeno en el tejido tumoral. Generan principalmente roturas de cadena simple en el ADN, que son reparables por la célula. Sin embargo, en presencia de oxígeno, también se producen especies reactivas de oxígeno que aumentan el daño al ADN, haciéndolos más eficaces en tumores bien oxigenados.
- LET y Daño al ADN: Los emisores $\beta^-$ tienen una LET menor en comparación con los emisores alfa. Esto significa que depositan menos energía por unidad de longitud recorrida en el tejido, haciéndolos menos eficientes en la generación de daño irreparable al ADN.

#### 4.3.2.3 Radioisótopos $\beta^-$ Utilizados en TRT.

En la TRT se utilizan varios radioisótopos emisores $\beta^-$, cada uno con sus propiedades y aplicaciones específicas:

- Itrio-90 ($^{90}$Y) emisor $\beta^-$ puro con una penetración máxima de tejido de 11 mm y una penetración media de 5,3 mm, lo que lo hace adecuado para tumores de tamaño mediano a grande. Se utiliza en radiofármacos como microesferas de $^{90}$Y para hepatocarcinomas, [$^{90}$Y]$^{90}$Y-DOTA-TATE y [$^{90}$Y]$^{90}$Y-DOTA-TOC para tumores neuroendocrinos, y [$^{90}$Y]$^{90}$Y-Ibritumomab (Zevalin) para linfoma no Hodgkin.

- Lutecio-177 ($^{177}$Lu): características ya descritas anteriormente. 4.2 Lutecio (1)

- Iodo-131 ($^{131}$I): emisor $\beta^-$ utilizado tanto para diagnóstico como para terapia, principalmente en el tratamiento de enfermedades de la tiroides. Su emisión gamma de 364 keV permite obtener imágenes, aunque de menor calidad que otros radioisótopos.

#### 4.3.2.4 Consideraciones para la Radiomarcación de Emisores $\beta^-$

- El proceso de marcación debe ser eficiente para minimizar los costos y obtener una alta actividad específica de marcación (AE [mCi/ug] [MBq/ug] ).

- La marcación y purificación deben asegurar una alta pureza radioquímica para evitar la administración de impurezas radiactivas al paciente.

- El método de marcación debe proporcionar un radiofármaco estable durante el almacenamiento, transporte y administración, y debe mantener su estabilidad *in vivo* para asegurar la acumulación en el tumor.

- El costo del proceso de obtención y marcación debe ser accesible y cumplir con los requerimientos de GMP.

#### 4.3.2.5 Factores que Influyen en la Elección del Radionucleido emisor $\beta^-$

La elección del radionucleido emisor $\beta^-$ adecuado para ser utilizado como radiofármaco, depende de varios factores, como:

- Tamaño del Tumor: Los emisores $\beta^-$ con mayor alcance, como el $^{90}$Y, son más adecuados para tumores grandes, mientras que aquellos con menor alcance, como el $^{177}$Lu, son mejores para tumores pequeños.
- Localización del tumor: La ubicación del tumor y su proximidad a órganos críticos influyen en la elección del radionucleido y la dosis administrada.

- Radiosensibilidad del Tumor: La radiosensibilidad del tumor, es decir, su susceptibilidad a la radiación es un factor importante que debe considerarse.
- Disponibilidad del Radionucleido: La disponibilidad y el costo del radionucleido pueden limitar las opciones de tratamiento.

#### 4.3.2.6 Radiofármacos dirigidos al antígeno PSMA

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) es una glicoproteína transmembrana de próstata que consta de 750 aminoácidos. Se expresa en niveles bajos en el epitelio prostático normal, pero se expresa mucho más en el cáncer de próstata avanzado, metastásico y resistente a la castración.

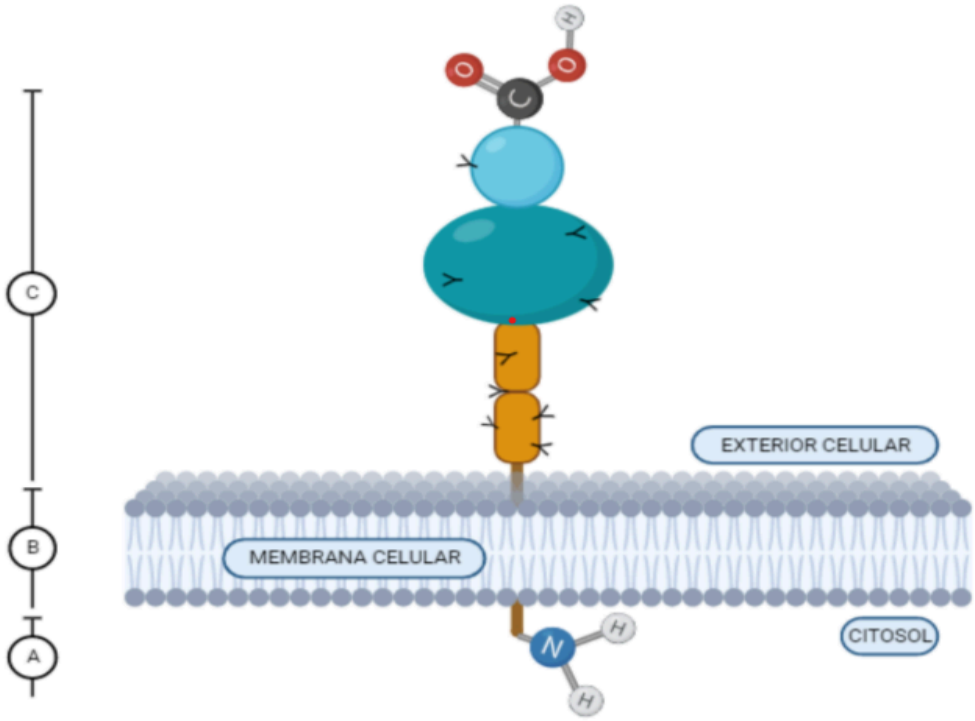



Imagen 4: Esquema realizado con BioRender© 2022. Diagrama de la estructura del antígeno de membrana específico de la próstata. Se muestra el dominio citoplasmático (A) corto con un grupo amino terminal, una región transmembrana hidrofóbica (B) y un dominio extracelular (C) de mayor tamaño con un grupo carboxilo terminal. La región extracelular se encuentra altamente glicosilada (Y) con nueve sitios de N-glicosilación. La región (A) abarca los residuos 1 a 19, la (B) de 20 a 44 y la (C) de 45 a 750 (Rajasekaran A. K. et al. 2005).

Se han desarrollado pequeñas moléculas marcadas que se unen al PSMA con alta afinidad, lo que ha dado lugar a agentes que pueden utilizarse en el diagnóstico y el tratamiento.

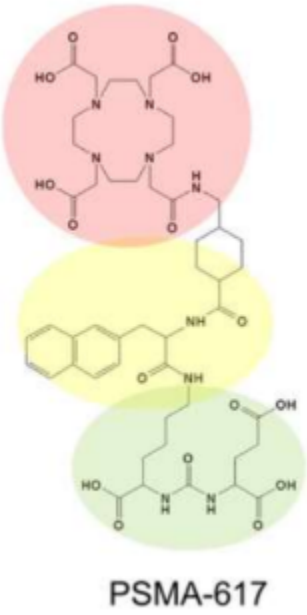



Imagen 5: Estructura química del PSMA-617

En Estados Unidos y Europa se autorizó el uso del [$^{177}$Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto: lutecio-177 vipivotida tetraxetan), luego de demostrarse la seguridad y la eficacia del tratamiento como resultado de los ensayos clínicos multicéntricos que demostraron que no hay inconveniente en la administración de dosis repetidas del radiofármaco.[(10) (11)]

## 4.4 Validación de métodos analíticos [(2), (4), (6)]

La validación de métodos analíticos es un proceso crucial en la industria farmacéutica, incluyendo la producción de radiofármacos. Este proceso garantiza que los métodos utilizados para analizar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos son confiables, precisos y adecuados para su propósito.

### 4.4.1 Aspectos Claves de la Validación de Métodos de control de calidad para Radiofármacos:

#### 4.4.1.1 Cumplimiento de las Normas

Los métodos analíticos utilizados para el control de calidad de fármacos deben validarse o verificarse, para asegurar que cumplen con los requisitos de la Farmacopea Argentina o “Códex Medicamentarius argentino”.
Las monografías de la farmacopea describen métodos de análisis que han sido validados de acuerdo con las prácticas científicas aceptadas y las recomendaciones sobre validación analítica.
Si el método a utilizar está descrito en la farmacopea entonces, no es necesario que el analista lo valide nuevamente, pero sí debe verificar que el método se implemente correctamente en su laboratorio.
Si se utiliza un método que no está descrito en la farmacopea, el analista debe validarlo para demostrar su idoneidad para el propósito previsto.

#### 4.4.1.2 Características Específicas

La validación de métodos para radiofármacos requiere considerar las características únicas de estos productos, como la naturaleza radiactiva del ingrediente activo y su decaimiento con el tiempo; por lo cual se deben utilizar técnicas e instrumentación específicos para la detección, discriminación y cuantificación de la radiactividad en las muestras.

#### 4.4.1.3 Parámetros de Validación

Las directrices de la ICH establecen los parámetros que deben evaluarse durante la validación de métodos analíticos, incluyendo:

- Especificidad: capacidad del método de identificar al analito.
- Exactitud: cercanía del valor medido al valor real.
- Límite de Cuantificación: cantidad mínima de analito que puede cuantificarse con precisión.
- Límite de Detección: cantidad mínima de analito que puede detectarse.
- Linealidad: capacidad del método para producir resultados proporcionales a la concentración del analito.
- Precisión: grado de concordancia entre mediciones repetidas. Se determina mediante dos parámetros, la repetitividad y la precisión intermedia.
- Precisión Intermedia: variabilidad en las mediciones realizadas en diferentes condiciones (diferentes analistas, diferentes días).
- Rango: intervalo de concentraciones en el que el método es válido.
- Repetitividad: variabilidad en las mediciones realizadas bajo las mismas condiciones.

- Robustez: capacidad del método para mantener su rendimiento a pesar de pequeñas variaciones en las condiciones de análisis.
- Selectividad: capacidad del método de discriminar el analito de otros componentes.

Con respecto a los radiofármacos las directrices de la ICH se adaptan a las necesidades específicas de los radiofármacos, considerando aspectos como la identidad del radionucleido, la pureza radioquímica y la pureza radionucleídica.

#### 4.4.1.4 Revalidación

Cuando se realizan cambios en el proceso de producción del radiofármaco, en la composición del producto final o en el procedimiento analítico el método se debe revalidar.

### 4.5 Cromatografía en capa fina (TLC). [(10)]

La cromatografía es una técnica de química analítica que se utiliza para separar diferentes componentes de una mezcla para identificarlos y analizarlos, aprovechando las diferentes propiedades químicas y físicas de cada componente para migrar a lo largo del sistema cromatográfico.

El fundamento de la cromatografía es la separación diferencial de los componentes de la mezcla basándose en las interacciones que éstos tienen con las dos fases (fase móvil y fase estacionaria o fija). La fase estacionaria es un material fijo y la fase móvil fluye sobre la fase estacionaria, transportando la mezcla con los componentes a separar.

En la cromatografía en capa fina (TLC) particularmente la fase estacionaria es una placa plana cubierta con una capa delgada de un material adsorbente y la fase móvil es un solvente líquido que asciende por la placa por capilaridad.

## 5. Reactivos, materiales y equipos

### 5.1 Reactivos

Se emplearon los siguientes reactivos

- Citrato de sodio materia prima 450 (código: 0754) Lote 4020 Marca Mallinckrodt.

- Acetato de amonio materia prima MP-RF006 N° Reg. 005/13B. Lote: BCBH2553V. Marca FLUKA 99,999% pureza.
- Metanol Biopack USO TÉCNICO Título: 99,9%.  Lote: 045/96
- Agua calidad inyectable.

## 5.2 Materiales

Se emplearon los siguientes materiales:

- Tiras de TLC – DC-Fertigfoilen GF-DC. Lote 806003
- Cámaras cromatográficas de vidrio 250 ml y 100 ml
- Pipetas automáticas
- Tips para pipetas automáticas
- Vasos de precipitados 50-100-200 ml
- Matraces volumétricos de vidrio 200-250 ml

## 5.3 Equipos

- Radiocromatógrafo ELYSIA RAY TEST -miniGita OFA probe (BGO/PMY)
- Cámara de ionización de pozo CAPINTEC CRC-ULTRA
- Balanza analítica OHAUS ANALYTICAL PLUS – Modelo AP2500

# Procedimiento de ensayo

## 6. Procedimiento de Ensayo

El presente trabajo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Radiofarmacia, de la División Radiofarmacia Básica y Aplicada, en el edificio de Aplicaciones del Centro Atómico Ezeiza (CAE) de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Los equipos, materiales y reactivos pertenecen al mismo sector.

### 6.1 Descripción del método

El método a poner a punto consiste en realizar diferentes corridas cromatográficas, utilizando como fase fija una placa de TLC y como fases móviles: Citrato de sodio 0,1M y Acetato de amonio 1 M/ metanol (1:1).

#### 6.1.1 Desarrollo de la corrida cromatográfica (cromatografía en capa fina)

1. Colocar en la cuba cromatográfica una cantidad suficiente se fase móvil hasta obtener una capa de 1cm (10 ml).
2. Cerrar la cuba cromatográfica para facilitar la saturación de la misma.
3. Tomar la tira cromatográfica trazar una línea a 1 cm del borde inferior (siembra) y otra a 1 cm del borde superior (frente final del solvente), de la placa.
4. Sembrar 1µl de colorante 0,5 cm antes de la línea trazada como frente final del solvente, dejar secar.
5. Sembrar 3 µl de muestra, utilizando una micropipeta, sobre la línea trazada como siembra y dejar secar.
6. Abrir la cuba cromatográfica, colocar la placa dentro y volver a taparla.
7. Desarrollar el cromatograma hasta que el frente del solvente haya alcanzado la siembra del colorante.
8. Sacar la placa y dejar secar.
9. Leer las tiras cromatográficas obtenidas en el radiocromatógrafo ELYSIA RAY TEST -miniGita OFA probe (BGO/PMY)

10. De cada radiocromatograma obtenido, determinar la relación de frente (Rf) entre el frente del solvente y la distancia recorrida por el componente en particular de la muestra.

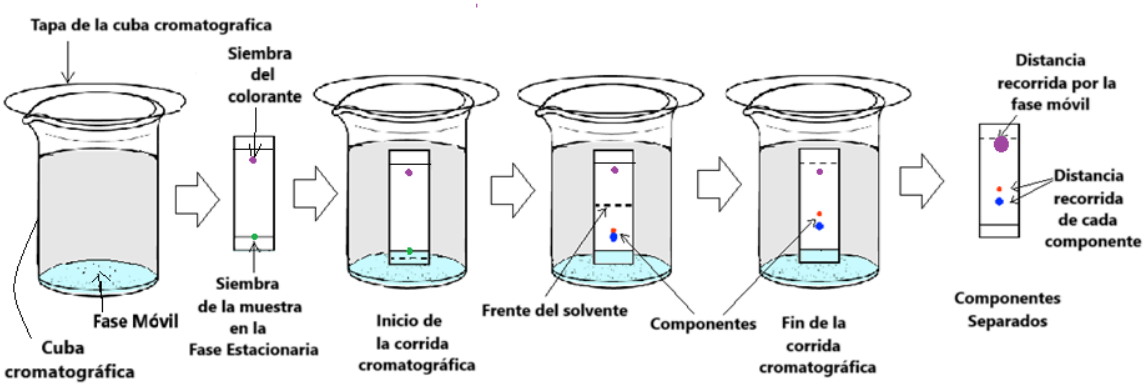



Imagen 6: Desarrollo de la corrida cromatográfica

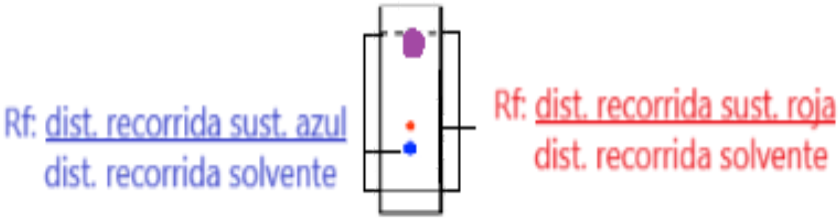



Imagen 7: Determinación del Rf de cada sustancia

NOTA: En nuestro caso cada corrida cromatográfica se realizará por triplicado, lo cual significa que, se siembran tres tiras cromatográficas siguiendo la misma metodología y se desarrollaron juntas en la misma cuba, es por eso que, al determinar los Rf, los mismos se identifican con las letras a, b o c.

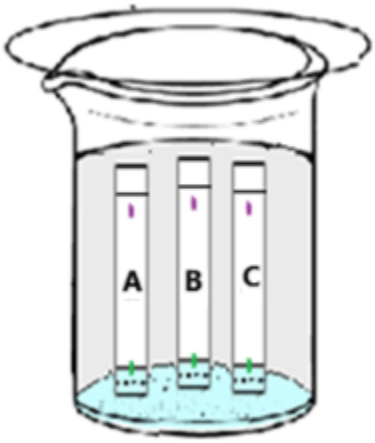



Imagen 8: Corrida cromatográfica por triplicado

## 6.2 Parámetros a validar

Por ser un método no farmacopeico los parámetros a poner a punto para luego validar serán:

| PARÁMETRO A EVALUAR | ESPECIFICACIÓN |
|---|---|
| Especificidad y selectividad | No existe interferencia del contaminante con los resultados de la pureza radioquímica |
| Precisión | C.V ≤ 5% |
| Robustez | C.V ≤ 5% |

## 6.3 Desarrollo de los parámetros a validar

### 6.3.1 Preparación de los solventes de corrida

| Solvente de Corrida | Preparación |
|---|---|
| Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1 | Tomar 19,27 g de Acetato de amonio, marca FLUKA, llevarlo a un volumen de 250 ml con agua destilada.<br>Tomar 25 ml de la solución preparada en un matraz aforado de 50 ml y agregar 25 ml de metanol. |
| Citrato de Sodio 0,1 M | Tomar 5,16 g de Citrato de sodio, Marca Mallinckrodt, llevarlo a un volumen de 200 ml con agua destilada. |

### 6.3.2 Determinación de la actividad mínima de trabajo

Para determinar la mínima actividad con la cual trabajar se siembran 5 gotas, en una tira cromatográfica, cada una con actividades crecientes (1µCi, 5µC,10µCi, 15 µCi y 20 µCi) y se leen en el Radiocromatógrafo.

### 6.3.3 Especificidad y Selectividad

Para determinar cuán específico y selectivo es el método se evalúa el efecto de la presencia de sustancias relacionadas del $^{177}$Lu (como ser Lutecio libre y/o Lu-coloide) en la muestra del radiofármaco; para esto se preparan soluciones estándares de la siguiente manera:

- Estándar 1 de Lutecio-Libre : tomar 250 µCi de una muestra de Lutecio libre y llevar a un volumen final de 80 µl con HCl 0.04N. La concentración final es de 3,13 µCi/ µl.
- Estándar 2 Lu-coloide: tomar 250 µCi de una muestra de Lutecio libre y llevar a un volumen final de 80 µl con NaOH 0.1N. La concentración final es de 3,13 µCi/ µl.
- Muestra de radiofármaco: tomar 3,3 mCi de radiofármaco y llevar a volumen final de 80 µl con buffer de marcación. La concentración final es de 41,25 µCi/µl.
- Muestra de Radiofármaco + Lutecio libre: tomar 308,7 µCi (3,5 µl) de Lutecio libre, agregar 18 µl de HCl 0.04N y luego 3,3 mCi (58,5 µl) de

Radiofármaco.

- Muestra de Radiofármaco + Lu-coloide: tomar 308,7 µCi (3,5 µl) de Lutecio libre, agregar 18 µl NaOH 0.1N y luego 3,3 mCi (58,5 µl) de Radiofármaco.

De cada solución preparada realizar 3 determinaciones de pureza radioquímica por triplicado, en cada una de las fases móviles descritas.

Registrar y evaluar la pureza radioquímica obtenida para cada caso.

### 6.3.4 Precisión

Para determinar si el método es preciso, se analiza por separado la repetitividad y la precisión intermedia.

#### 6.3.4.1 Repetitividad

Realizar 7 determinaciones de la pureza radioquímica del Radiofármaco, por triplicado, en cada una de las fases móviles descritas.

Registrar los resultados y determinar el coeficiente de variación.

#### 6.3.4.2 Precisión Intermedia

Realizar la determinación de la pureza radioquímica en las muestras del Radiofármaco por triplicado, en cada una de las fases móviles descritas. De acuerdo con lo siguiente:

- El analista 1 realizará 5 análisis de pureza radioquímica (TLC), del Radiofármaco.
- El analista 2 realizará 5 análisis de pureza radioquímica (TLC), del Radiofármaco.

Registrar los resultados y determinar el coeficiente de variación.

### 6.3.5 Robustez

Realizar la determinación de la pureza radioquímica del Radiofármaco por triplicado, en cada una de las fases móviles descritas, variando la fase estacionaria:

Dimensión Largo: 10 y 5 cm.

Realizar 5 determinaciones en tiras de 10 cm de largo y 5 en tiras de 5 cm de largo.

Registrar los resultados y determinar el coeficiente de variación.

# Resultados

## 7. Resultados

### 7.1 Determinación de la actividad mínima de trabajo

A continuación, se observa la imagen con los picos correspondientes a las gotas de Radiofármaco sembrado con actividades crecientes:

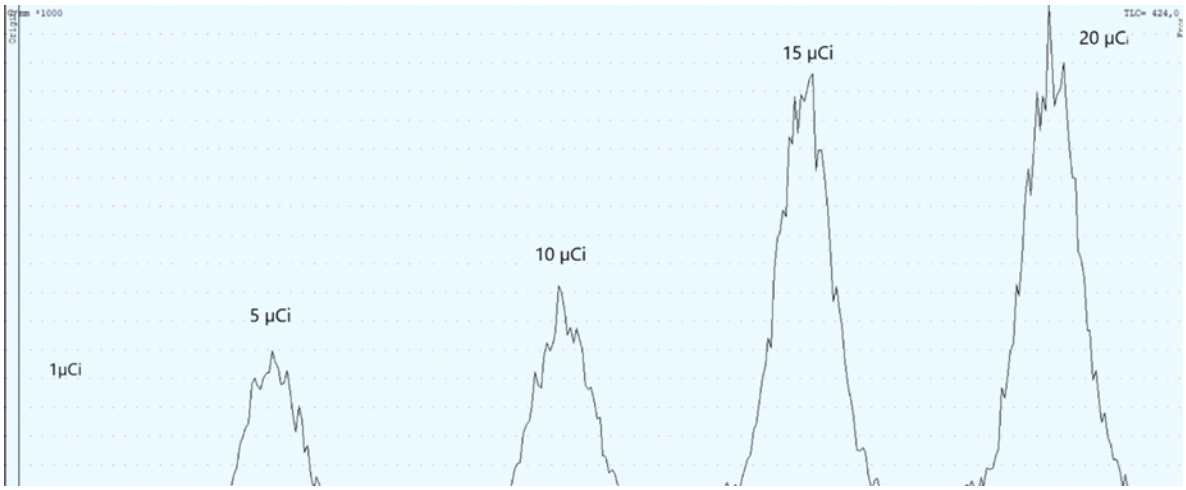



Imagen 8: Picos obtenidos en el radiocromatógrafo luego de siembra del Radiofármaco en actividades crecientes

Se puede observar que a partir de una actividad mayor a 5µCi se pueden discriminar mejor los picos.

Por lo observado en la imagen, se decide trabajar con actividades mayores o iguales a 10 µCi.

- Actividad de trabajo de la muestra: 125 µCi (3 µl= siembra)
- Actividad de estándar sólo: 10 µCi (3 µl= siembra)
- Actividad de estándar agregado a la muestra: 11 µCi (3 µl= siembra) (8% de la Actividad de trabajo de la muestra)

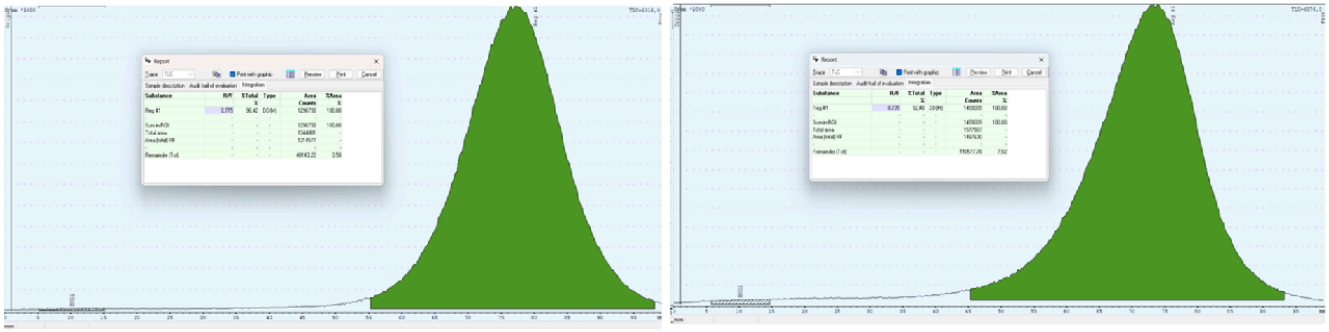
### 7.2 Especificidad y Selectividad

Se determinó realizando 3 corridas cromatográficas, por triplicado (A, B y C), en cada una de las fases móviles descritas. Todas las cromatografías fueron realizadas el mismo día y por el mismo analista.

En las corridas de la muestra de Radiofármaco, se observó un solo pico cromatográfico en ambas fases móviles, cuyos Rf promedios fueron 0,77 y 0,758 en Acetato de amonio 1M /metanol 1:1 y citrato de sodio 0,1 M respectivamente. En la Tabla 1 se detallan los resultados de las cromatografías (figura 1).

| Tabla 1: Radiofármaco | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Acetato de Amonio 1M en metanol 1:1 | | | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,80 | 0,82 | 0,77 | A | 0,75 | 0,76 | 0,76 |
| B | 0,69 | 0,77 | 0,77 | B | 0,74 | 0,76 | 0,74 |
| C | 0,76 | 0,77 | 0,78 | C | 0,76 | 0,73 | 0,75 |
| Promedio | 0,77 | | | Promedio | 0,75 | | |
| Desvío Estándar | 0,03 | | | Desvío Estándar | 0,01 | | |
| C.V. | 4,53 | | | C.V. | 1,51 | | |

**Figura 1: Especificidad Muestra de Radiofarmaco**



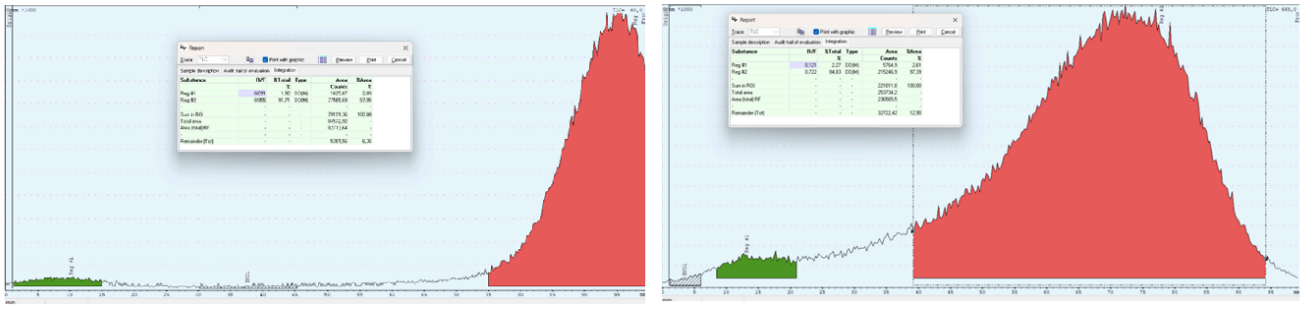
**Fase móvil Acetato de amonio 1M en Metanol 1:1** **Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

Los resultados de las corridas con los estándares 1 y 2 se muestran en las Tablas 2 y 3. Los Rf promedios para Lutecio libre y Lu-coloide en citrato de sodio 0,1M fueron 0,57 y 0,18 respectivamente. En la fase de Acetato de amonio 1M /metanol

1:1 se observó un Rf de  0,97 para Lu-libre y no se pudo discriminar el pico en el caso de Lu-coloide. (Figuras 2 y 3).

| Tabla 2: Lutecio libre | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Acetato de Amonio 1 M en metanol 1:1 | | | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,96 | 0,98 | 0,95 | A | 0,72 | 0,37 | 0,55 |
| B | 0,98 | 0,99 | 0,99 | B | 0,66 | 0,48 | 0,66 |
| C | 0,96 | 0,98 | 0,95 | C | 0,59 | 0,63 | 0,48 |
| Promedio | 0,97 | | | Promedio | 0,57 | | |
| Desvío Estándar | 0,02 | | | Desvío estándar | 0,11 | | |
| C.V. | 1,68 | | | C.V. | 19,82 | | |

**Figura 2: Especificidad Lutecio Libre**

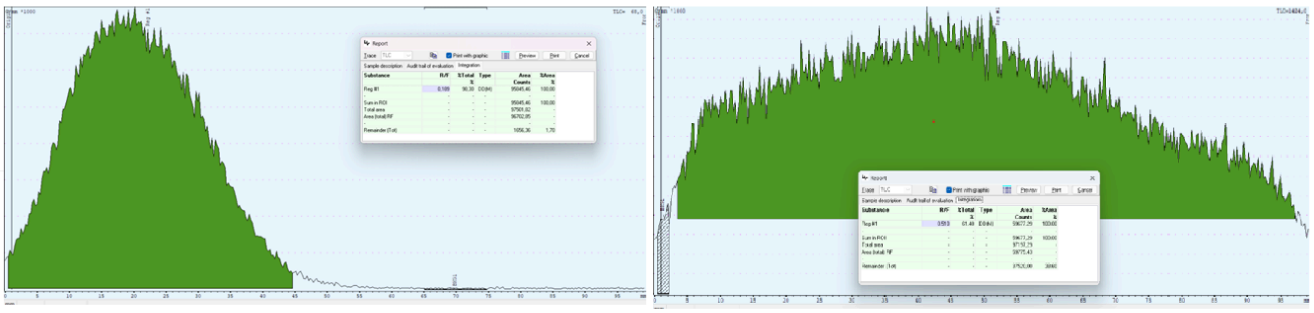


**Fase móvil Acetato de amonio 1M en Metanol 1:1**

**Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

| Tabla 3: Lutecio Coloide | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Acetato de Amonio 1 M en metanol 1:1 | | | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,51 | 0,67 | 0,46 | A | 0,19 | 0,17 | 0,19 |
| B | 0,56 | 0,59 | 0,56 | B | 0,19 | 0,16 | 0,18 |
| C | 0,56 | 0,52 | 0,52 | C | 0,18 | 0,16 | 0,17 |
| Promedio | 0,55 | | | Promedio | 0,18 | | |
| Desvío estándar | 0,06 | | | Desvío estándar | 0,01 | | |
| C.V. | 10,98 | | | C.V. | 6,69 | | |

**Figura 3: Especificidad Lu-Coloide**



**Fase móvil Acetato de amonio 1M en Metanol 1:1**

**Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

En los cromatogramas de la Muestra de Radiofármacos + Lu-Libre se observaron diferentes resultados en las fases móviles. En Acetato de amonio 1M /metanol 1:1

se observaron 3 picos cromatográficos, correspondientes a los Rf 0,10 (Lu-coloide); 0,74 (Radiofármaco) y 0,92 (Lu-libre) (Figura 4). En la fase móvil de citrato de sodio 0,1 M se observaron dos picos cromatográficos cuyos Rf son 0,11 (Lu-coloide) y 0,74 (en este caso, se observa un solo pico que representa al Radiofármaco + Lu-libre) (Figura 4). Los resultados en ambas fases móviles se muestran en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4: Muestra de Radiofármaco + Lutecio libre**

**Fase móvil Acetato de Amonio 1M / metanol 1:1**

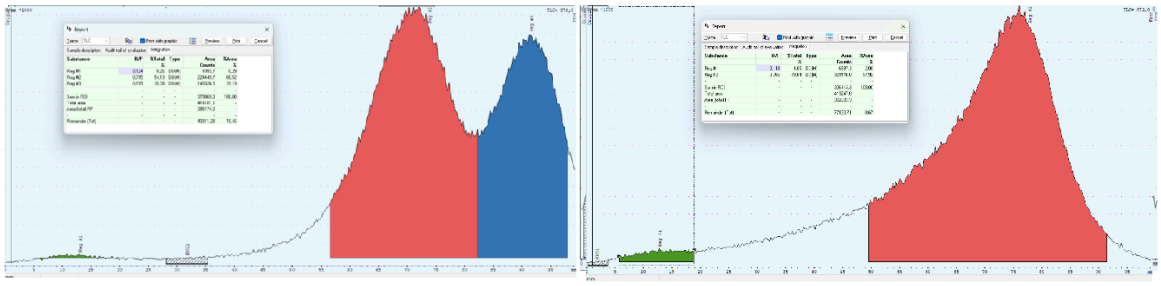
| Radiofármaco | | | | Coloide | | | | Lutecio Libre | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,72 | 0,72 | 0,73 | A | 0,12 | 0,10 | 0,10 | A | 0,92 | 0,88 | 0,90 |
| B | 0,80 | 0,75 | 0,75 | B | 0,11 | 0,08 | 0,09 | B | 0,97 | 0,95 | 0,93 |
| C | 0,72 | 0,74 | 0,71 | C | 0,09 | 0,10 | 0,07 | C | 0,90 | 0,92 | 0,89 |
| Promedio | 0,74 | | | Promedio | 0,10 | | | Promedio | 0,92 | | |
| Desvío estándar | 0,03 | | | Desvío estándar | 0,02 | | | Desvío estándar | 0,03 | | |
| C.V. | 3,81 | | | C.V. | 16,81 | | | C.V. | 3,03 | | |

**Tabla 5: Muestra de Radiofármaco + Lutecio libre**

**Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

| Coloide | | | | Radiofármaco + Lutecio libre | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,12 | 0,12 | 0,12 | A | 0,77 | 0,76 | 0,71 |
| B | 0,12 | 0,12 | 0,11 | B | 0,76 | 0,77 | 0,69 |
| C | 0,10 | 0,10 | 0,12 | C | 0,77 | 0,74 | 0,69 |
| Promedio | 0,11 | | | Promedio | 0,74 | | |
| Desvío estándar | 0,01 | | | Desvío estándar | 0,03 | | |
| C.V. | 6,87 | | | C.V. | 4,53 | | |

**Figura 4: Especificidad Muestra de Radiofármaco + Lutecio libre**



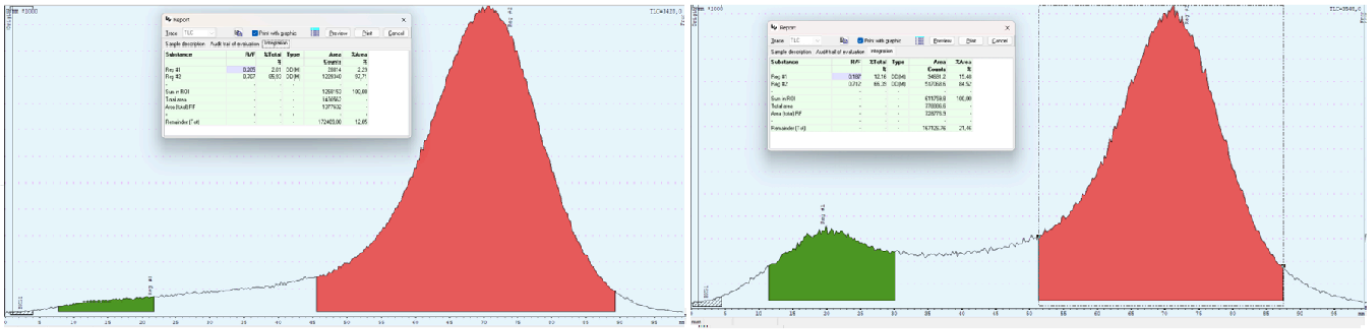
**Fase móvil Acetato de amonio 1M en Metanol 1:1** **Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

Los resultados de la Muestra de Radiofármaco + Lu-coloide también difieren en ambas fases móviles. En Acetato de amonio 1M /metanol 1:1 se observan 2 picos cromatográficos, correspondientes a los Rf 0,14 y 0,75 correspondientes al Lu-coloide y Radiofármaco respectivamente (Figura 5). En la fase móvil de citrato de sodio 0,1 M se observaron dos picos cromatográficos cuyos Rf son 0,18 y 0,70 correspondientes al Lu-coloide y Radiofármaco respectivamente (Figura 5). Los resultados en ambas fases se muestran en las Tablas 6 y 7.

| Tabla 6: Muestra de Radiofármaco + Lu-Coloide | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Acetato de Amonio 1M / metanol 1:1 | | | | | | | |
| Radiofármaco | | | | Coloide | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,71 | 0,72 | 0,74 | A | 0,21 | 0,16 | 0,12 |
| B | 0,74 | 0,74 | 0,74 | B | 0,14 | 0,19 | 0,10 |
| C | 0,77 | 0,80 | 0,80 | C | 0,10 | 0,14 | 0,11 |
| Promedio | 0,75 | | | Promedio | 0,14 | | |
| Desvío estándar | 0,03 | | | Desvío estándar | 0,04 | | |
| C.V. | 4,52 | | | C.V. | 28,20 | | |

| Tabla 7: Muestra de Radiofármaco + Lu-Coloide | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | | | | | | | |
| Radiofármaco | | | | Coloide | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 |
| A | 0,71 | 0,71 | 0,69 | A | 0,22 | 0,19 | 0,20 |
| B | 0,69 | 0,69 | 0,70 | B | 0,15 | 0,12 | 0,14 |
| C | 0,73 | 0,71 | 0,64 | C | 0,20 | 0,25 | 0,14 |
| Promedio | 0,70 | | | Promedio | 0,18 | | |
| Desvío estándar | 0,02 | | | Desvío estándar | 0,04 | | |
| C.V. | 3,46 | | | C.V. | 24,48 | | |

**Figura 5: Especificidad Muestra de Radiofármaco + Lu-coloide**



**Fase móvil Acetato de amonio 1M en Metanol 1:1** **Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

## 7.3 Precisión

La determinación de la precisión del método analítico se realizó evaluando la repetitividad y la precisión intermedia.

### 7.3.1 Repetitividad

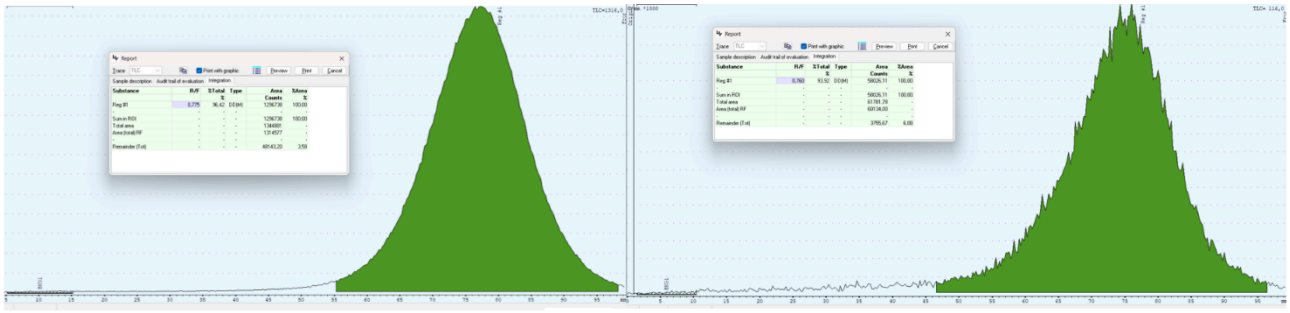
Esta se determinó realizando 7 corridas cromatográficas por triplicado (A, B y C), cada una, el mismo día, por el mismo analista.

Los resultados muestran en la fase móvil Acetato de amonio 1M /metanol 1:1 un Rf promedio de 0,76 y un C.V de 4,63 y en la fase móvil citrato de sodio 0,1 un Rf promedio de 0,76 con un C.V de 3,58 (Figura 6). Los resultados en ambas fases se muestran en las Tablas 8 y 9.

| Tabla 8: Repetitividad Radiofármaco | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Acetato de Amonio 1M /metanol 1:1 | | | | | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Corrida 4 | Corrida 5 | Corrida 6 | Corrida 7 |
| A | 0,80 | 0,82 | 0,77 | 0,67 | 0,81 | 0,72 | 0,77 |
| B | 0,79 | 0,77 | 0,77 | 0,72 | 0,76 | 0,77 | 0,75 |
| C | 0,78 | 0,77 | 0,78 | 0,73 | 0,74 | 0,77 | 0,79 |
| Promedio | 0,76 | | | | | | |
| Desvío Estándar | 0,04 | | | | | | |
| C.V. | 4,63 | | | | | | |

| Tabla 9: Repetitividad Radiofármaco | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | | | | | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Corrida 4 | Corrida 5 | Corrida 6 | Corrida 7 |
| A | 0,72 | 0,76 | 0,80 | 0,75 | 0,77 | 0,79 | 0,78 |
| B | 0,79 | 0,80 | 0,78 | 0,77 | 0,79 | 0,76 | 0,78 |
| C | 0,76 | 0,74 | 0,77 | 0,71 | 0,76 | 0,72 | 0,81 |
| Promedio | 0,77 | | | | | | |
| Desvío Estándar | 0,03 | | | | | | |
| C.V. | 3,58 | | | | | | |

**Figura 6: Repetitividad Radiofármaco**



**Fase móvil Acetato de Amonio 1M en Metanol 1:1**

**Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

### 7.3.2 Precisión Intermedia

Esta se determinó realizando 5 corridas cromatográficas, cada una por triplicado (A, B y C), el mismo día, por dos analistas diferentes.

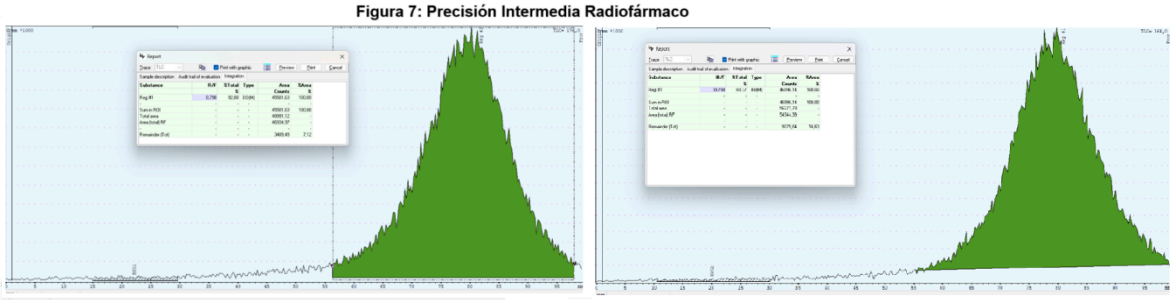
Como resultado en la fase móvil Acetato de amonio 1M /metanol 1:1 se obtiene un Rf promedio de 0,79 con un C.V de 6,15 y en la fase móvil citrato de sodio 0,1 un Rf promedio de 0,77 con un C.V de 4,02 (Figura 7). Los resultados en ambas fases se muestran en las Tablas 10 y 11.

| Tabla 10: Precisión intermedia Radiofármaco |
|---|
| Fase móvil Acetato de Amonio 1M / metanol 1:1 |

| Analista 1 | | | | | | Analista 2 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Corrida 4 | Corrida 5 | Rf | Corrida 1' | Corrida 2' | Corrida 3' | Corrida 4' | Corrida 5' |
| A | 0,89 | 0,76 | 0,80 | 0,77 | 0,81 | A | 0,70 | 0,89 | 0,80 | 0,77 | 0,80 |
| B | 0,80 | 0,75 | 0,82 | 0,76 | 0,76 | B | 0,80 | 0,80 | 0,82 | 0,76 | 0,77 |
| C | 0,74 | 0,76 | 0,88 | 0,78 | 0,74 | C | 0,74 | 0,74 | 0,88 | 0,78 | 0,78 |
| Promedio | 0,79 | | | | | | | | | | |
| Desvío Estándar | 0,05 | | | | | | | | | | |
| C.V. | 6,15 | | | | | | | | | | |

| Tabla 11: Precisión intermedia Radiofármaco | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | | | | | | | | | | | |
| Analista 1 | | | | | | Analista 2 | | | | | |
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Corrida 4 | Corrida 5 | Rf | Corrida 1' | Corrida 2' | Corrida 3' | Corrida 4' | Corrida 5' |
| A | 0,72 | 0,76 | 0,80 | 0,75 | 0,77 | A | 0,80 | 0,81 | 0,77 | 0,77 | 0,79 |
| B | 0,79 | 0,80 | 0,78 | 0,77 | 0,79 | B | 0,77 | 0,78 | 0,67 | 0,77 | 0,82 |
| C | 0,76 | 0,74 | 0,77 | 0,71 | 0,76 | C | 0,72 | 0,76 | 0,77 | 0,75 | 0,77 |
| Promedio | 0,77 | | | | | | | | | | |
| Desvío Estándar | 0,03 | | | | | | | | | | |
| C.V. | 4,02 | | | | | | | | | | |

**Figura 7: Precisión Intermedia Radiofármaco**



**Fase móvil Acetato de Amonio 1M en Metanol 1:1**

**Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

## 7.4 Robustez

Esta se determinó realizando 5 corridas cromatográficas por triplicado (A, B y C), cada una, variando el largo de las tiras (5 y 10 cm). Esta determinación fue realizada el mismo día por el mismo analista, para que solo la variable sea el largo de las tiras.

Como resultado en la fase móvil Acetato de amonio 1M /metanol 1:1 se obtiene un Rf promedio de 0,74 con un C.V de 6,48 y en la fase móvil citrato de sodio 0,1 un Rf promedio de 0,76 con un C.V de 5,20 (Figura 9). Los resultados en ambas fases se muestran en las Tablas 12 y 13.

**Tabla 12: Fase móvil Acetato de Amonio 1 M / metanol 1:1**

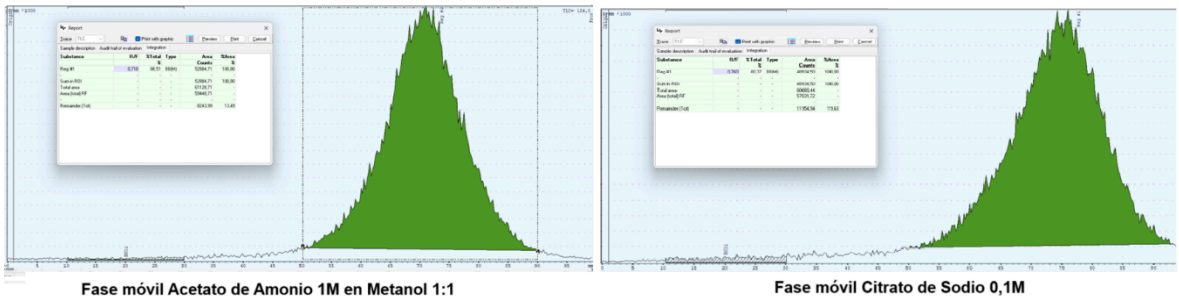
| Tiras 10 cm | | | | | | Tiras 5 cm | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rf | Corrida 1 | corrida 2 | Corrida 3 | Corrida 4 | Corrida 5 | Rf | Corrida 1' | corrida 2' | Corrida 3' | Corrida 4' | Corrida 5' |
| A | 0,74 | 0,76 | 0,73 | 0,67 | 0,81 | A | 0,81 | 0,78 | 0,69 | 0,73 | 0,77 |
| B | 0,69 | 0,75 | 0,64 | 0,72 | 0,76 | B | 0,77 | 0,77 | 0,64 | 0,71 | 0,72 |
| C | 0,71 | 0,76 | 0,70 | 0,73 | 0,74 | C | 0,82 | 0,70 | 0,72 | 0,78 | 0,83 |
| Promedio | 0,74 | | | | | | | | | | |
| Desvío Estándar | 0,05 | | | | | | | | | | |
| C.V. | 6,48 | | | | | | | | | | |

**Tabla 13: Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

| Tiras 10 cm | | | | | | Tiras 5 cm | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rf | Corrida 1 | Corrida 2 | Corrida 3 | Corrida 4 | Corrida 5 | Rf | Corrida 1' | Corrida 2' | Corrida 3' | Corrida 4' | Corrida 5' |
| A | 0,72 | 0,76 | 0,80 | 0,75 | 0,77 | A | 0,71 | 0,71 | 0,83 | 0,80 | 0,72 |
| B | 0,79 | 0,80 | 0,78 | 0,77 | 0,79 | B | 0,75 | 0,81 | 0,66 | 0,82 | 0,73 |
| C | 0,76 | 0,74 | 0,77 | 0,71 | 0,76 | C | 0,81 | 0,81 | 0,79 | 0,79 | 0,74 |
| Promedio | 0,76 | | | | | | | | | | |

| | |
|---|---|
| Desvío Estándar | 0,04 |
| C.V. | 5,20 |

**Figura 9: Robustez Radiofármaco**



**Fase móvil Acetato de Amonio 1M en Metanol 1:1**

**Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M**

## 7.5 Tabla de Resultados

| PARÁMETRO EVALUADO | RESULTADO | ESP. | **CUMPLE / NO CUMPLE** |
|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Especificidad y selectividad | | Fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol: | Radiofármaco Rf: 0.77<br>CV: 4.53 % | C.V ≤ 5% | CUMPLE |
| | | | Lutecio libre Rf: 0,97<br>C.V:1,68 % | C.V ≤ 5% | CUMPLE |
| | | | Lu Coloide. Rf: 0,55<br>C.V.: 10,98 | C.V ≤ 5% | NO CUMPLE |
| | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | Radiofármaco Rf: 0,75<br>CV: 1,51 % | C.V ≤ 5% | CUMPLE |
| | | | Lu libre. Rf: 0,57<br>C.V.: 19,82 | C.V ≤ 5% | NO CUMPLE |
| | | | Lutecio Coloide Rf: 0,18<br>No se discrimina el pico<br>C.V: 6,69 % | C.V ≤ 5% | NO CUMPLE |
| Precisión | Repetitividad | Fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol | C.V: 4,63 % | C.V ≤ 5% | CUMPLE |
| | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M: | C.V: 3,58 % | C.V ≤ 5% | CUMPLE |
| | Precisión Intermedia | Fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1 | C.V: 6,15 % | C.V ≤ 5% | NO CUMPLE |
| | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M | C.V: 4,01 % | C.V ≤ 5% | CUMPLE |
| Robustez | | Fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1 | C.V: 6,42% | C.V ≤ 5% | NO CUMPLE |
| | | Fase móvil Citrato de Sodio 0,1M: | C.V: 4,20 | C.V ≤ 5% | CUMPLE |

# Discusión y Conclusiones

## 8. Discusión

Al evaluar la especificidad y la selectividad en ambos sistemas cromatográficos se puede distinguir la separación entre el Radiofármaco, el Lutecio libre y el Lu-Coloide, solo en la fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1.

Se pudo observar que en el caso del sistema cromatográfico de la fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1, los picos del Radiofármaco y del Lutecio libre se superponen, pero se pueden distinguir ambos, y en el caso del sistema cromatográfico de fase móvil Citrato de Sodio ambos picos están juntos, no se pueden distinguir uno de otro. Por lo expuesto se puede concluir que la fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1, es útil para discriminar el Lutecio libre del Radiofármaco. (Figura 4: Especificidad Muestra de Radiofármaco + Lutecio libre)

En referencia a la discriminación entre el Lu-coloide y el Radiofármaco, el sistema cromatográfico que mejor lo discrimina es el que utiliza la fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1. (Figura 5: Especificidad Muestra de Radiofármaco + Lu-coloide), siendo el C.V. de Lu-coloide 10,984% y el C.V Lu-Coloide en la corrida junto con la muestra de radiofármaco es 24,482 %. En el sistema que utiliza la fase móvil Citrato de Sodio 0,1M, no se distingue un pico asociado al Lu-coloide asociado al estándar 2, observándose una franja de similar intensidad en toda la extensión de la corrida (figura 3). En el caso de la muestra +Lu-coloide, se observa un pico, pero también un elevando fondo de base asociado a lo observado previamente en la figura 3.

Al evaluar la Precisión, en particular el parámetro de repetitividad se puede concluir que en ambos sistemas cromatográficos el método cumple con la especificación, pero en el caso de la precisión intermedia en el sistema cromatográfico que utiliza Acetato de amonio 1 M / Metanol 1:1, el C.V es de 6,150%, superando el valor de especificación, por lo cual NO CUMPLE con la especificación.

Al evaluar la robustez del método, en ambos sistemas cromatográficos, variando el largo de las tiras cromatográficas, se puede ver el método NO CUMPLE con la especificación.

Se continuará optimizando el método analítico para luego, al lograr las condiciones óptimas, se pueda realizar la validación del mismo.

Para continuar con la optimización se podrían realizar los siguientes análisis:

- Al realizar el estudio de especificidad, se podría mejorar la separación entre el radiofármaco y el Lutecio libre, modificado las concentraciones de los solventes de corrida, teniendo en cuenta la polaridad de los reactivos y del solvente.

- En el caso de la Precisión Intermedia se debería implementar un programa de capacitación continua al personal para mejorar el C.V. y que los resultados sean más confiables.

- En el caso del estudio de la robustez se podría evaluar:

- El efecto de la temperatura de la fase móvil, en el caso del trabajo siempre la fase móvil se mantuvo a una temperatura de 20°C.
- El efecto de la saturación de la cuba, en el caso de este trabajo para realizar las corridas cromatográficas se esperó que se saturara la cuba mínimo 15 minutos antes.

## 9. Conclusiones

En lo que respecta a Especificidad y selectividad se puede concluir que la fase móvil Acetato de Amonio 1 M / Metanol 1:1, es útil para discriminar el Lutecio libre del Radiofármaco, y del Lu-coloide, a pesar de que el C.V. para este último es mayor a 5%. Se debe optimizar en este sistema la concentración de solventes para mejorar el C.V. de Lu-coloide y la resolución entre Radiofármaco y Lu-libre.
La fase móvil Citrato de Sodio 0,1M pH 9 no discrimina el Radiofármaco del Lu-libre y se observa una franja de similar intensidad que cubre toda la extensión de la tira cromatográfica asociado al Lu-coloide. Estos resultados muestran que este sistema no es adecuado para el control de Calidad Radioquímico de este radiofármaco. Se propone a futuro evaluar otra fase móvil basada en un Buffer Citrato de sodio 0,1 M pH 5.

En lo referido a Precisión, el método cumple Repetibilidad, pero no Precisión Intermedia, con lo cual se propone optimizar este parámetro a través de Capacitación continua del personal en esta práctica.

En lo referido a Robustez, utilizar una tira de 5 cm no brinda resultados comparables con los de tiras de 10 cm de longitud. Estos resultados demuestran la importancia de la no variación en la longitud de la tira en este sistema para este radiofármaco. Se propone continuar la evaluación de la Robustez variando otros parámetros, como la temperatura de solvente o la saturación de la cuba.

Por todo lo expuesto se puede concluir que el método analítico utilizado para el análisis de pureza radioquímica del Radiofármaco, NO presenta resultados que permitan evaluar objetivamente la calidad del producto (en particular la discriminación del coloide), de acuerdo con los parámetros especificados; por lo cual se debe continuar con la optimización del método.

# Agradecimientos

## 10. Agradecimientos

En principio quiero agradecer a Clarisa y Noemi por brindarme su dedicación y paciencia infinitas. Su confianza en mi capacidad y su ayuda en mis momentos de duda fueron fundamentales para dar forma y finalizar este trabajo.

Agradezco profundamente al Instituto Dan Beninson por la calidad de la enseñanza y por el apoyo constante. A sus autoridades, docentes, personal administrativo y a todos aquellos que contribuyen a la Institución. Gracias por haberme permitido formar parte de la Institución.

A los profesores de la especialización por su dedicación, pasión por la enseñanza y por compartir sus conocimientos con generosidad. Muchas gracias por sus clases, sus consejos y su guía.

A Sandra Siri por su apoyo, buena predisposición, afecto, dedicación y su compromiso con la formación de cada uno de los estudiantes fueron una inspiración para mí.

También quiero agradecer a mis compañeros de Radiofarmacia: Gastón, Miguel y Solange, por su colaboración, sus ideas y perspectivas y su constante disposición para ayudarme, fueron muy importantes para la finalización de este trabajo.

A mis compañeros de la Especialización: Sofi, Gastón, Genesis, Brian, Carla, Lucila, Nino, Cielo y Marina, con los cuales compartimos apuntes, nervios, alegrías y alguna que otra tristeza; momentos de estudio, de esfuerzo y de superación. Su apoyo fue un estímulo constante para llegar hasta la finalización de este trabajo.

A mis compañeras y amigas de Garantía de Calidad: Cari, Marce, Sofi, Yami y Sabri, por su amistad, su comprensión y apoyo en los momentos más desafiantes. Su presencia y su ánimo me dieron las fuerzas necesarias para seguir adelante y alcanzar este logro. Gracias!

A mi mama por su amor incondicional, su apoyo inquebrantable y por ser mi guía en la vida. Gracias por inculcarme el valor de la educación y estar siempre a mi lado, en los momentos de alegría y en los difíciles también.

A toda mi familia Adri, Cari, Sami, Choche, Aili, Mile, Rami, Clau, Lu, Sol, Marce, Titi A, fuente inagotable de amor, apoyo y motivación. Gracias por alentarme y celebrar conmigo cada logro.

A Esteban y a mis hijos hermosos Fede y Rodri por ser mi refugio, mi inspiración, mis amores, mi motivo de orgullo. Gracias por creer en mí. Su amor incondicional fue la fuerza impulsora para superar cada desafío y perseverar para alcanzar esta y cada meta que me propongo.

# Bibliografía

## 11 Bibliografía


1. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. – Sharmila Banerjee – Radiopharmaceuticals Chemistry Section, Bhabha Atomic Research Centre (BARC), Mumbai 400 085, India. Chem Rev. 2015 Apr 22;115(8):2934-74. doi: 10.1021/cr500171e. (https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr500171e)
2. EANM guideline on the validation of analytical methods for radiopharmaceuticals – Nic Gillings, Sergio Todde, Martin Behe, Clemens Decristoforo, Philip Elsinga, Valentina Ferrari, Olaug Hjelstuen, Petra Kolenc Peitl, Jacek Koziorowski, Peter Laverman, Thomas L. Mindt, Meltem Ocak and Marianne Patt. Published: 12 February 2020.
3. Improved quality control of [$^{177}$Lu]Lu-PSMA I&T – Martin Kraihammer, Piotr Garnuszek, Andreas Bauman, Michael Maurin, Manuel Alejandre Lafont, Roland Haubner, Elisabeth von Guggenberg, Michael Gabriel and Clemens Decristoforo. Published: 27 March 2023.
4. Validation of analytical procedures Q2(R") - ICH Harmonized Guideline. Final Version. Adopted on 1 November 2023.
5. Protocolo de Validación del método analítico de Pureza Radioquímica para el producto $^{177}$Lu-DOTATATE inyectable. – Emilia Tejeria, Edith Hernández, Fredy Rivera y Miguel Vázquez. Versión 01. Noviembre 2016
6. Eurolab España, P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1a ed. 2016)
7. ADVANCED PROSTATE CANCER: AUA/SUO GUIDELINE (Published 2020; Amended 2023) American Urological Association (AUA)/ Society of Urologic Oncology (SUO) William Lowrance, MD, MPH, MBA; Rodney Breau, MSc, MD; Roger Chou, MD; Brian F. Chapin, MD; Tony Crispino; Robert Dreicer, MD, MS, MACP; David F. Jarrard, MD; Adam S. Kibel, MD; Todd M. Morgan, MD; Alicia K. Morgans, MD, MPH; William K. Oh, MD; Matthew Resnick, MD, MPH, MMHC; Anthony Zietman, MD; Michael S. Cookson, MD, MMHC.
8. CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN: GUÍA DE LA ASOCIACIÓN UROLÓGICA AMERICANA (AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION, AUA) Michael S. Cookson, Bruce J. Roth, Philipp Dahm, Christine Engstrom, Stephen J. Freedland, Maha Hussain, Daniel W. Lin, William T. Lowrance, Mohammad Hassan Murad, William K. Oh, David F. Penson y Adam S. Kibel. Aprobado por la Junta Directiva de AUA Abril de 2019.

9. Farmacopea Argentina 7ma Edición - Libro Farmacopea Argentina 7ª Ed. | Argentina.gob.ar
10. $^{177}$Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto™): The First FDA-Approved Radiotherapeutical for Treatment of Prostate Cancer. 20 Oct 2022
11. Pluvicto (lutecio (177Lu) vipivotida tetraxetano) Información general sobre Pluvicto y sobre los motivos por los que se autoriza su uso en la UE. European Medicines Agency, 2022