

## ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA CCK 4 MEDIANTE ENSAYOS ISOTÉRMICOS Y NO ISOTÉRMICOS

*Alexis Oliva, Cristo Álvarez, Marta Hidalgo, José Fariña y Matías Llabrés*

*Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,  
Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife, España*

### Introducción

Un aspecto particularmente importante en los estudios de preformulación de medicamentos es la metodología utilizada para establecer el plazo de validez. La mayor parte de los ensayos de estabilidad realizados hasta la fecha hacen uso de la metodología clásica basada en la ecuación de Arrhenius o de Eyring. Sin embargo, el tiempo requerido para determinar la cinética de degradación de un fármaco y su estabilidad a temperatura ambiente suele ser excesivamente largo ya que las reacciones químicas dependen de la temperatura. Si bien los ensayos a la temperatura de almacenamiento son inevitables, en la industria farmacéutica el tiempo es un factor crítico y, por tanto, se recurre a la realización de ensayos acelerados, donde la estabilidad química del producto se evalúa a diferentes temperaturas, reduciéndose el tiempo necesario para la obtención de información relevante sobre la estabilidad del producto. El plazo de validez del producto a una temperatura dada se calcula de acuerdo con la ecuación de Arrhenius:

$$K = A \cdot e^{(-E_a/RT)} \quad \text{Ec. 1}$$

Si bien es cierto que los ensayos acelerados permiten adelantar información sobre la estabilidad de los medicamentos, el número de ensayos (al menos tres), el número de muestras a analizar, el tiempo de análisis requerido y la validez de la extrapolación a la temperatura de almacenamiento pueden cuestionar dichas ventajas. En el caso de los productos de origen biotecnológico, nos encontramos con el inconveniente adicional del estrecho margen de

temperaturas en el que se mantiene la cinética de degradación y no se produce la desnaturalización del producto. Los ensayos acelerados no isotérmicos constituyen una alternativa válida a los ensayos acelerados isotérmicos presentando una serie de ventajas adicionales; en el caso de los productos biotecnológicos son la reducción de la cantidad de producto necesario para llevar a cabo los ensayos, así como el número de experimentos y el tiempo de análisis [1].

La gastrina y fragmentos de la colecistokinina (CCK) son hormonas que están implicadas en el control de la secreción y motilidad gastrointestinal así como neuromoduladores en el sistema nervioso central. Los receptores de la CCK se encuentran distribuidos en el páncreas, vesícula biliar, mucosa gástrica (subtipo A), en ciertas áreas del sistema nervioso central y periférico (subtipos A y B) y también en las células inmunitarias como los monocitos y linfocitos T (subtipo B) [2].

La sobreexpresión de los receptores del subtipo B en diversos tipos de tumores humanos ha permitido el uso de los fragmentos de la CCK como trazadores para la detección de procesos tumorales tras su marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$ . Un ejemplo lo constituye el tetrapéptido CCK-4, fragmento 30-33 de la colecistokinina, con diversas aplicaciones en medicina nuclear tanto en el campo del diagnóstico como terapéutico [2].

El objetivo del presente trabajo se centró en determinar el plazo de validez de la CCK-4 realizando un estudio de estabilidad en condiciones no isotérmicas. En segundo lugar,

contrastar su utilidad con respecto a los ensayos acelerados tradicionales.

## Materiales y Métodos

### Materiales

Se utilizó el fragmento 30-33 de la colecistokinina (CCK-4) suministrada por Sigma (lote: 101K1393). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### Método analítico

Se utilizó un cromatografo Waters formado por una bomba (W600E), un autoinyector (Wisp717Plus), una columna Nova Pack C18 (4µm, 3,9x150 mm. Lote: W13371M-043), un detector UV-Vis (W2487) a una longitud de onda de 280 nm y como procesador de datos el programa Millennium<sup>3.2</sup>®. La fase móvil fue una mezcla acetonitrilo/agua (30:70) con un 0,05% de trifluoroacético a un flujo de 1,0 ml/min.

El método analítico fue validado de acuerdo con las normas propuestas por la Conferencia Internacional de Armonización [3], indicando que el método analítico es específico y reproducible, presentando una excelente resolución ( $R_s \geq 2,0$ ) y elevada selectividad ( $\alpha=1,3$ ), con una precisión y exactitud adecuadas (RSD < 1%) y robusto. Además, el método desarrollado permite la cuantificación de la CCK-4 obteniéndose una relación lineal entre el área del pico (A) y la concentración preparada de la misma:

( $A = (-1984 \pm 976) + (22100 \pm 125) \cdot C$  (µg/ml);  $r=0,9996$ ) siendo el coeficiente de variación para la concentración predicha inferior al 1,6% [4].

### Ensayos acelerados no isotérmicos

Se empleó una estufa Heraeus (Modelo BR6000) que permite el control de temperaturas a través de una interfase RS232. La variación de la temperatura de la estufa así como la adquisición de datos de la evolución de ésta con el tiempo se realizó utilizando un PC con un programa desarrollado en TestTPoint® 4.0 que permite, entre otras funciones, un incremento lineal de la temperatura con el tiempo. Así, se fijó la temperatura inicial en 40°C, mientras que la temperatura final se estableció en 88°C, obteniéndose una velocidad media de calentamiento de 0,5°C/h.

### Ensayos acelerados isotérmicos

Las muestras fueron almacenadas en una estufa Heraeus (Modelo BR6000) a temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C con variaciones inferiores a 0,1°C.

### Tratamiento de las muestras

La CCK-4 se disolvió en dimetilsulfóxido y se diluyó convenientemente con NaOH 0.01M para obtener una concentración final de 1mg/mL. A intervalos apropiados de tiempo, se tomaron 25µL de muestra y se diluyeron apropiadamente con fase móvil para su posterior análisis cromatográfico. El proceso se llevó a cabo por triplicado.

### Análisis de datos

Los ensayos acelerados no isotérmicos permiten estimar la energía de activación ( $E_a$ ), el factor de frecuencia (A), el orden de la reacción ( $v$ ) y la constante de velocidad de degradación (k) a partir de un simple experimento.

La degradación de un fármaco se puede expresar como:

$$-\left(\frac{dC}{dt}\right)_i = K \cdot C_i^v \quad \text{Ec. 2}$$

donde c es la concentración a tiempo t, k es la constante de velocidad de degradación observada y v el orden de la reacción. Para un proceso de primer orden ( $v=1$ ), la combinación de la ecuación 2 con la ecuación de Arrhenius (1), se obtiene:

$$-\left(\frac{dC}{C_i}\right) = A \cdot e^{-E_a/RT(t)} dt \quad \text{Ec. 3}$$

En los ensayos acelerados no isotérmicos, la temperatura varía con el tiempo, pudiéndose utilizar funciones lineales, exponenciales, logarítmicas, inversas, hiperbólicas, con el fin de simplificar y facilitar el cálculo matemático de los parámetros del proceso. En este estudio se utilizó una función lineal para el incremento de la temperatura con el tiempo como se recoge en la ecuación 4:

$$T = T_0 + v \cdot t \quad \text{Ec. 4}$$

donde v es la velocidad de calentamiento, T y  $T_0$  son la temperatura inicial y a tiempo t,

respectivamente. Dicha función tomó en nuestro caso, los siguientes valores:

$$T = (40,013 \pm 0,01) + (0.505 \pm 0.003) \cdot t; (n=96)$$

Si sustituimos esta función en la ecuación 3, obtenemos:

$$-\left(\frac{dC}{C_i}\right) = A \cdot e^{-Ea/R(40+0,5t)} dt \quad \text{Ec. 5}$$

Para la resolución de esta ecuación se utilizó el programa Matemática (Wolfram Research, Inc., 1988) [5] aplicando la siguiente subrutina:

```
In[1]:= <<Statistics`NonlinearFit
In[2]:= T = Tini+v*t;
        fun[c0_, A_, Ea_, Tini_, tf_] =
        c0*Exp[-Integrate[Exp[A-Ea/(1.987*T)],
        {t, 0, tf}]];
In[3]:= datos = {{0, 100.0},
                {2, 99.70},
                .....
                {96, 27.79}};
In[4]:= análisis = NonlinearRegress[datos,
        fun[c0, A, Ea, 313.15, 0.5, t],
        {{c0, 97.0, 102.0}}, {A, {20.0, 25.0}},
        {Ea, {15000., 20000}}],
        OutputList> {BestFit, PredictedResponse}
```

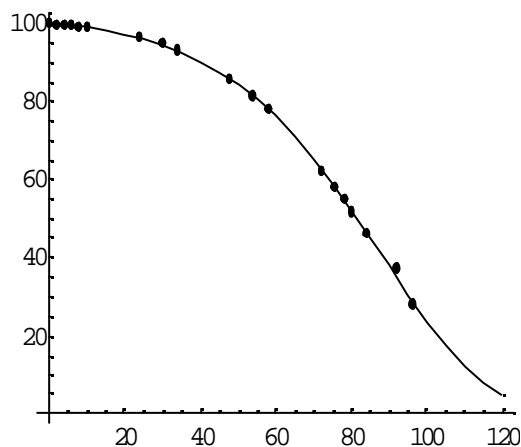


Figura 1 % Remanente de CCK4 vs tiempo en condiciones no isotérmicas

### Resultados y Discusión

La figura 1 muestra la relación entre el porcentaje remanente de CCK-4 frente al tiempo según las condiciones no isotérmicas descritas

en Materiales y Métodos. La Tabla 1 recoge los valores estimados así como los intervalos de confianza del 95% correspondientes a la concentración inicial de fármaco (c0), factor de frecuencia (A) y energía de activación (Ea) obtenidos.

Tabla 1. Valores estimados y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (entre paréntesis) para los distintos parámetros de la ecuación de Arrhenius correspondientes a los ensayos no isotérmicos.

Co (µg/mL)	100,22 [99.92-100,52]
A (h <sup>-1</sup> )	7.36·10 <sup>9</sup> [4,04·10 <sup>9</sup> -1,33·10 <sup>10</sup> ]
Ea (cal/mol)	18483,2 [18077-18889]
t <sub>10%</sub> (25°C)	21 días
t <sub>10%</sub> (5°C)	200 días

Tomándose como base los datos recogidos en la Tabla 1, se estimó el plazo de validez a una temperatura de 25°C, obteniéndose un valor de 21 días frente a los 200 días para una temperatura de 5°C, temperatura de almacenamiento recomendada por el fabricante. En el caso de los ensayos acelerados isotérmicos, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la no idoneidad de la ecuación de Arrhenius en el intervalo de temperaturas estudiado para estimar el plazo de validez, como puede observarse en la figura 2.

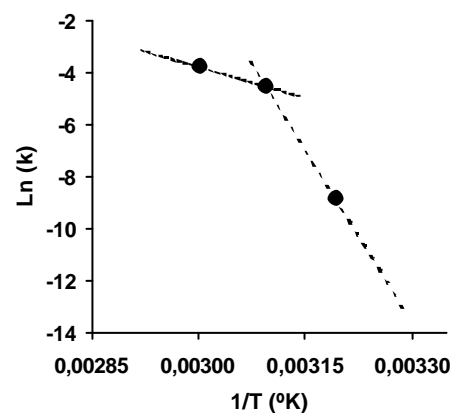


Figura 2. Representación de Arrhenius para los ensayos isotérmicos de la CCK-4 realizados a temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C.

En principio, los resultados sugieren la existencia de dos procesos paralelos con energía de activación y factor de frecuencia diferentes y dependientes de la temperatura. Con el fin de elucidar el intervalo de temperaturas que caracterice a cada proceso se deben realizar ensayos a temperaturas superiores a 60°C así como a temperaturas inferiores a 40°C.

Si solo consideramos los valores correspondientes a los ensayos a 50 y 60°C, se obtiene una energía de activación de 14,90 Kcal/mol, una diferencia del 20% con respecto al valor obtenido en los ensayos no isotérmicos. En el caso del factor de frecuencia, se obtuvo un valor inferior, ( $A=1,08 \cdot 10^8 \text{ h}^{-1}$ ), aunque hay que considerar que pequeñas variaciones en la pendiente de la recta afectan considerablemente a la ordenada en el origen y, por tanto, al factor de frecuencia, de ahí la necesidad de realizar un ensayo a temperaturas superiores a 60°C.

Con estos datos se obtiene un plazo de validez de 3 días si la temperatura es de 25°C frente a los 21 días a una temperatura de 5°C, 10 veces inferior al estimado en los ensayos acelerados no isotérmicos. Estos resultados no son nada sorprendentes ya que a la hora de estimar el plazo de validez se ha asumido que la energía de activación permanece constante en el intervalo de temperaturas considerado (5-60°C), hecho que discrepa con los resultados obtenidos en el intervalo de temperaturas estudiado que parecen indicar la existencia de dos procesos paralelos con energías de activación diferentes.

Así pues la metodología basada en los ensayos acelerados no isotérmicos podría ser válida para estudiar y evaluar la estabilidad de fármacos de naturaleza peptídica con la ventaja de poder reducir el tiempo y el coste de los ensayos.

## Bibliografía

1. Mu-Lan Lee, S. Stavchansky. Isothermal and Nonisothermal decomposition of thymopentin and its analogs in aqueous solution. *Pharm. Res.*, 15, 1702 (1998).
2. R. Rossin, D. Block, R. Visentin, R. Feistma, M. Giron, E. Pauwels, U. Mazzi. <sup>99m</sup>Tc-Labeling experimnts on CCK4 by a direct method. *Nuclear Medicine & Biology* 28, 865 (2001).
3. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, validation of Analytical Procedures: Methodology(ICH-Q2B), November, 1996
4. A. Oliva, G. Bordignon, J. Mallol, U. Mazzi, J. Fariña. Application of the ICH Guidelines in validation of a chromatographic method for CCK fragment of cholecystokinini. *J. Liq. Chromatg. & Rel. Technol.*, 25, 2793 (2002).
5. Matemática: A system for doing Mathematics by computer. Addison-wesley, Redwood City, CA, USA, 1988

## Agradecimientos

*Este trabajo forma parte del Proyecto de Investigación 082/2000 de la Comunidad Autónoma de Canarias.*

*Autor de contacto:*

*Alexis M. Oliva Martín*

*amoliva@ull.es*

*Dpto. Ing. Quim. Y Tecn. Farm. Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna*

*Dirección Avda. Fco Sánchez, s/n, 38200*

*La Laguna, Tenerife*

*Telf.: 922-318452*

*Fax: 922318506*