

Evaluación y estudio de estabilidad del MAATEC*

Ingrid Petzoldt ipetzoldt@ipen.gob.pe, Anita Robles, Manuel Otero, José Caballero, Guilmer Agurto, Roberto Koga, María Benites, Mario Morote

^a Planta de Producción de Radioisótopos, Instituto Peruano de Energía Nuclear –IPEN
Lima 41, Perú

Resumen

Se realizó una evaluación para la formulación desarrollada del agente para radiodiagnóstico Macroagregado de Albúmina Humana (ARD), liofilizado MAATEC*(MAA), para ser marcado con Tc-99m de acuerdo a las normas vigentes exigidas por la USP y el Manual de Control de Calidad de Radioisótopos y Radiofármacos (MCCRR). Asimismo, se realizó el estudio de estabilidad, tanto del agente para radiodiagnóstico, como del radiofármaco ^{99m}Tc-MAA, complementándolo con pruebas clínicas.

La parte experimental consistió en preparar 6 lotes experimentales de acuerdo al procedimiento desarrollado [1] y según las normas de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Los mismos que fueron almacenados entre 2 a 8 °C. Los parámetros de evaluación fueron: % de humedad, tamaño y cantidad de partículas, concentración de proteínas, esterilidad y endotoxinas bacterianas. Posteriormente, cada vial, conteniendo el MAA liofilizado fue marcado con ^{99m}Tc formándose el complejo ^{99m}Tc-MAA, al que se evaluó el pH, la pureza radioquímica (PRQ) por método cromatográfico, las impurezas radioquímicas (IRQ) por sedimentación y distribución biológica (DB) en ratones sanos. Para el estudio de estabilidad a tiempo real, fueron seleccionados 3 lotes pilotos, que tenían un tiempo de post producción de 2 a 3 años, se evaluó la estabilidad post producción y post marcación. Además, se han realizado estudios pre-clínicos en voluntarios sanos.

Los resultados obtenidos en los 6 lotes experimentales, para el MAATEC* (MAA) fueron los siguientes: Humedad 2,80 ± 0,73 %; tamaño de partículas entre 10 y 90 µm: 94,92 ± 2,48 %; cantidad de partículas: 702 777 ± 61 910 partículas por vial; concentración de proteína: 0,72 ± 0,08 mg de MAA/mL; estéril y libre de pirógenos. Como radiofármaco, el complejo ^{99m}Tc-MAA: PRQ > 97%; IRQ: 6,59 ± 0,60%; pH: 7 ± 0,5; DB > 90% en pulmón. La estabilidad post-producción del MAATEC es mayor de 2 años y la estabilidad post-marcación del ^{99m}Tc-MAA es hasta 6 horas a temperatura menores a 30° C. Los estudios pre-clínicos mostraron buen comportamiento en la obtención de imágenes de perfusión pulmonar y del sistema venoso profundo de las extremidades inferiores.

Conclusión, el MAATEC* es un producto estable que al ser marcado con Tc 99m, cumple con los estándares nacionales e internacionales exigidos para los radiofármacos. El complejo marcado, ^{99m}Tc-MAA, es apto para ser utilizado especialmente en estudios de perfusión pulmonar, con fines de diagnóstico.

1 Introducción

La evaluación técnica del MAATEC* se sustenta en el trabajo “Formulación y evaluación de un kit liofilizado de macroagregado de albúmina, marcado con ^{99m}Tc para centellografía pulmonar” (I. Petzoldt et al. 2003) [1], en el cual se obtiene un ARD conformado por MAA, el cual es lavado (proceso de eliminación de las partículas pequeñas, fuera de los rangos aceptados) y liofilizado, el mismo que marcado con ^{99m}Tc forma el complejo ^{99m}Tc-MAA que es utilizado en centellografía pulmonar para detección de Trombo Embolismo Pulmonar (TEP) y otras aplicaciones.

Para cumplir con las normas estipuladas por las autoridades de salud, que exigen pruebas que garanticen la inocuidad y efectividad del producto, se evaluaron 6 lotes experimentales por un período mayor a 24 meses, en diversos parámetros como: humedad, tamaño y la cantidad de partículas, concentración de proteínas, esterilidad y endotoxinas bacterianas. Asimismo, se evaluó el complejo marcado ^{99m}Tc-MAA en: pH, PRQ, IRQ, DB, estabilidad post-producción y post-marcación. La evaluación técnica del MAATEC* tuvo como objetivo garantizar que este Agente para Radiodiagnóstico cumpla con las características de diseño,

identidad, pureza, concentración, inocuidad y estabilidad requeridos para su uso.

2 Experimental

Pruebas en el MAATEC (MAA)

2.1.1 Humedad: El porcentaje de humedad es determinado por el método de pérdida de peso con estufa de vacío a 70 °C.

2.1.2 Tamaño y número de partículas: Se efectúa en un microscopio óptico con un ocular micrométrico y una cámara de Neubauer.

2.1.3 La determinación de proteína: Los productos liofilizados se reconstituyen con 2 mL de cloruro de sodio al 0,9 % y se determina la proteína por espectrofotometría visible [2] [6].

2.1.4 Esterilidad y endotoxinas bacterianas: Se reconstituye con 1 mL de suero fisiológico estéril, se hace un pool con todos los viales seleccionados y se inocula directamente a los medios de cultivo. Se incuban a 32,5 °C ± 2,5 °C y 22 °C ± 2,5 °C y se realizan las lecturas diarias hasta los 14 días para verificar la presencia o ausencia de crecimiento de microorganismos.

El ensayo de endotoxinas bacterianas sigue el procedimiento descrito en la USP vigente, la cual describe la técnica “in vitro” denominada Limulus Amebocyte Lysate “LAL”.

Pruebas en el complejo marcado ^{99m}Tc-MAA

2.2.1 pH: Evaluación colorimétrica con papel pH se compara la banda de color obtenida en la tira indicadora con la escala patrón.

2.2.2 Marcación: Para la preparación del complejo ^{99m}Tc-MAA, se reconstituye el MAA con un volumen máximo de 2 mL de solución de pertechnetato de sodio ^{99m}Tc (Na^{99m}TcO₄), con la actividad requerida (actividad máxima 50 mCi). Se agita suavemente el contenido del vial, se deja reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente.

2.2.3 Determinación de la pureza radioquímica (PRQ) del ^{99m}Tc – MAA: Se utilizó cromatografía ascendente en papel (CP) según [2] y se midió la radiactividad en

un contador de centelleo gamma. El parámetro que permite identificar la pureza e impurezas radioquímicas, es la relación de frente (Rf). No menos del 90 % de la radiactividad total debe estar localizada en el punto de aplicación o siembra (Rf 0,0).

2.2.4 Impurezas radioquímicas solubles y dispersas del ^{99m}Tc- MAA: Se determinó por medición de la radiactividad neta en el sobrenadante sobre la radiactividad total en la muestra. El sobrenadante contiene las impurezas radioquímicas solubles y dispersas, estas se separan por centrifugación de las partículas agregadas.

2.2.5 Distribución biológica: Se efectúa en ratones cepa CFW sanos, con un rango de peso entre 20 a 40 g cada ensayo se realiza con tres ratones para un tiempo prefijado de sacrificio de 10 minutos post-inyección. El volumen de inyección es de 0,05 a 0,1 mL del radiofármaco. Transcurrido el tiempo prefijado post-inyección, se sacrifican y se extrae la sangre y luego los órganos de interés. Se realiza la medición radiactiva de los tubos que contienen los órganos en un contador gamma con detector de NaI (TI) tipo pozo, empleando la misma geometría de contaje. Se determina el porcentaje de radiactividad en cada órgano, para cada animal. La metodología basada en [2].

2.3 Estudio de estabilidad

Comprende la evaluación post-producción y post-marcación en tiempo real.

2.3.1 Estabilidad post-producción: El parámetro físico-químico crítico es la PRQ, que permite evaluar la estabilidad química de dicha molécula en tiempo real. La evaluación se realizó por un período de 2 a 3 años a tres lotes experimentales (011133, 003014 y 004024) y almacenados en refrigeración entre 2 a 8 °C.

El MAATEC se marcó con ^{99m}Tc y se determinó la pureza radioquímica del ^{99m}Tc-MAA. Se realizó la estadística de los datos de PRQ y se elaboraron gráficos de porcentaje de PRQ versus tiempo de cada lote en estudio, para realizar la evaluación técnica del comportamiento de cada lote.

A cada degradación se le aplicó una transformación por regresión lineal para obtener la pendiente y el punto de

intersección. Para determinar el tiempo de expiración del MAATEC se interpoló un valor de PRQ de corte (en esta evaluación equivale al 97 %) en la curva de regresión lineal de menor valor absoluto y finalmente se determinó la fecha de vencimiento o expiración.

2.3.2 Estabilidad post-marcación:

Se aplicó a los tres lotes experimentales de MAATEC 011133, 003014 y 004024. El objetivo fue determinar el tiempo de estabilidad del complejo $^{99m}\text{Tc-MAA}$, a temperatura de ambiente no mayor a 30 ° C y a una humedad relativa menor al 85 %. Se evaluó la pureza radioquímica (PRQ) por ser un parámetro decisivo en la estabilidad química del complejo. Los tiempos que se evaluaron fueron desde los 15 minutos hasta las 6 horas post-marcación.

3 Resultados y Discusión

3.1 Producto MAATEC* (MAA)

La humedad del liofilizado $2,80 \pm 0,73 \%$, se encuentra en el rango adecuado ($< 10\%$). El tamaño de partículas entre 10 y 90 μm : $94,92 \pm 2,48 \%$ y cantidad de partículas: $702\ 777 \pm 61\ 910$ partículas por vial, se encuentran dentro de los límites (tamaño de partículas: de 10 a 90 $\mu\text{m} \geq 90 \%$ y > 150 : ninguna; y cantidad: de 500 000 a 900 000 partículas por vial). La concentración de proteínas: $0,72 \pm 0,08$ mg de MAA / mL en rango correcto (Especificación: ≤ 1 mg MAA / mL.) . Estéril y libre de pirógenos $< 25,0$ UE / mL (Especificación: $< 87,5$ UE / mL)

3.2 Complejo $^{99m}\text{Tc-MAA}$

3.2.1 pH: Todos los lotes experimentales del radiofármaco presentan un pH de $7,0 \pm 0,5$ que se encuentra en el rango adecuado (especificación: entre 3,8 y 8,0).

3.2.2 Pureza radioquímica: La determinación en todos los lotes experimentales (promedio PRQ $> 97\%$) resulta en valores muy superiores al 90%, que es el establecido como mínimo al $^{99m}\text{Tc-MAA}$ en el punto de aplicación, de acuerdo a lo especificado en la USP vigente.

3.2.3 Impurezas radioquímicas solubles: En la tabla 1 se observan los porcentajes de impurezas radioquímicas menores al 10 %. A los 30 minutos, se observa una disminución

significativa del porcentaje de impurezas radioquímicas de 8,05 % a 6,59 %.

Tabla 1. Impurezas radioquímicas solubles y dispersas del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-MAA}$ (30 minutos post-marcación).

Lote	Impurezas Radioquímicas (%)	$X \pm \sigma-1$
011133	6,89	
003014	5,71	
004024	7,19	$6,59 \pm 0,60$
009025	6,04	
009035	7,11	
010045	6,57	
Especificación USP vigente: $\leq 10 \%$		

En el gráfico 1, se observa que las impurezas radioquímicas del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-MAA}$, en los primeros 15 minutos son menores al 10%, las curvas de estabilidad muestran una tendencia decreciente y se mantiene estable con el tiempo.

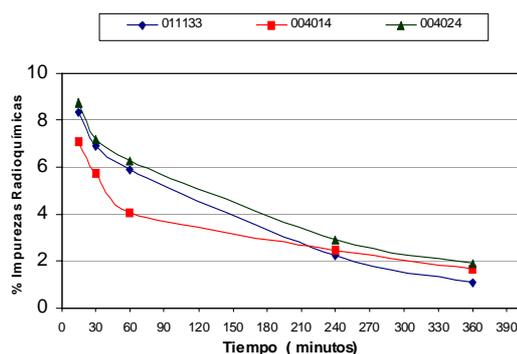


Gráfico 1. Estabilidad del $^{99m}\text{Tc-MAA}$ post-marcación, impurezas radioquímicas

3.2.4 Distribución biológica: La distribución biológica del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-MAA}$ en ratones sanos (tabla 2), indica una buena fijación del radiofármaco en el órgano crítico (pulmones), el resultado promedio de los 6 lotes producidos es mayor al 90% de la radiactividad administrada. Otro órgano de interés es el hígado, donde el porcentaje de radiactividad es menor al 2 % en promedio.

Asimismo, en el resto de órganos evaluados, se tiene un valor inferior al 5% de la radiactividad administrada. Todos los valores obtenidos en la evaluación de distribución biológica de todos los lotes experimentales de radiofármacos, cumplen con las especificaciones establecidas en la USP vigente.

Tabla 2. Distribución biológica del radiofármaco ^{99m}Tc - MAA (10 minutos post-inyección).

Lote	Órgano	
	hígado	pulmón
011133	$0,98 \pm 0,66$	$92,00 \pm 4,73$
003014	$0,66 \pm 0,06$	$96,46 \pm 0,30$
004024	$0,71 \pm 0,04$	$95,45 \pm 1,05$
009025	$0,71 \pm 0,14$	$95,03 \pm 0,97$
009035	$0,71 \pm 0,21$	$94,75 \pm 1,19$
010045	$1,28 \pm 0,15$	$93,19 \pm 0,79$
$X \pm \sigma_{n-1}$	$0,84 \pm 0,24$	$94,48 \pm 1,61$
Especificación	% Radiactividad USP vigente:	
Pulmones $\geq 80\%$, Hígado $\leq 5\%$		

3.2.5 Estabilidad post-producción: En el gráfico 2 se observan 3 curvas de regresión lineal, con tendencia similar decreciente y con pendiente negativa. Basándonos en la tendencia de las curvas de regresión que proyectan una estabilidad mayor de 2 años, interpolamos un valor de pureza radioquímica de corte del 97% sobre la curva de regresión lineal de pendiente con menor valor absoluto; de tal manera, que a los 570 días el MAATEC mantiene una pureza radioquímica superior al 90 % exigido por la USP vigente, conservando sus características organolépticas, físicas, radioquímicas y biológicas, dentro de las especificaciones técnicas establecidas (ver tabla 3).

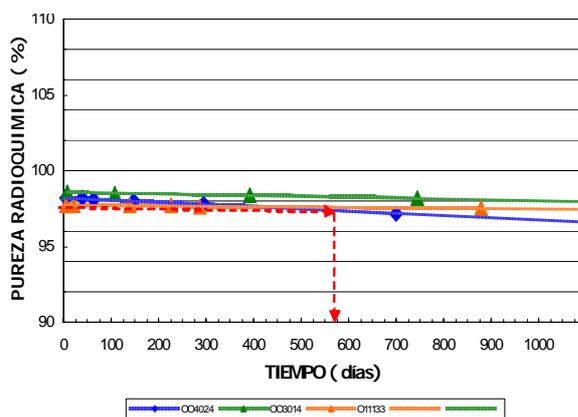


Gráfico 2. Estabilidad post-producción del MAATEC(pureza radioquímica Vs tiempo)

3.2.6 Estabilidad post-marcación: El MACROPULMÓN al ser marcado con Tc-^{99m} alcanza una pureza radioquímica mayor al 97% en los primeros 15 minutos y se mantiene estable hasta las seis horas post-marcación.

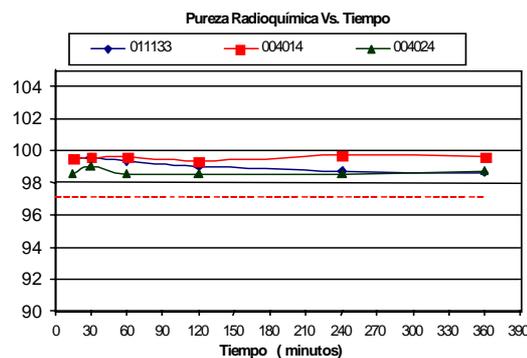


Gráfico 3. Estabilidad del ^{99m}Tc -MAA post-marcación, pureza radioquímica Vs. Tiempo

3.3 Pruebas clínicas

El producto ha sido evaluado pre-clínicamente en humanos. Los estudios mostraron buen comportamiento en la obtención de imágenes de perfusión pulmonar y del sistema venoso profundo de las extremidades inferiores, como se observa en los informes adjuntos.

Inf. 01 - MACROPULMÓN Lote:003014 Fecha: 9 y 13 julio, 2004.

Comentario médico: Los estudios que se realizaron con el liofilizado de macroagregados han permitido una adecuada visualización del sistema venoso profundo (figura 1) y pulmones, con una buena resolución.

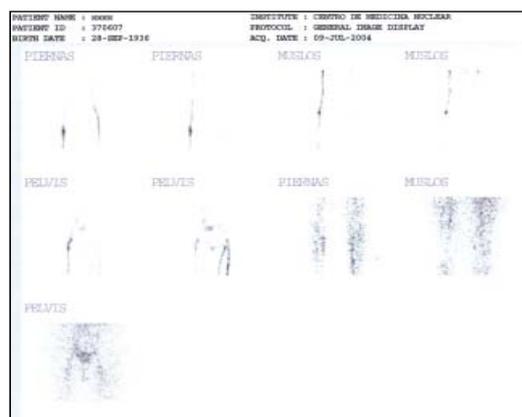


Figura 1. Visualización del sistema venoso profundo.

Inf. 2 - MACROPULMÓN Lote: 004024 Fecha: 13 junio, 2005.

Comentario médico: Se administró estando el paciente, en posición decúbito dorsal, vía EV, macroagregados de Albúmina marcados con ^{99m}Tc . Posteriormente, se adquirieron vistas estáticas en diferentes incidencias de la representación de la perfusión pulmonar. El

comportamiento del macroagregado de albúmina marcado con ^{99m}Tc fue adecuado, no evidenciando tecnecio libre en las imágenes (figura 2).

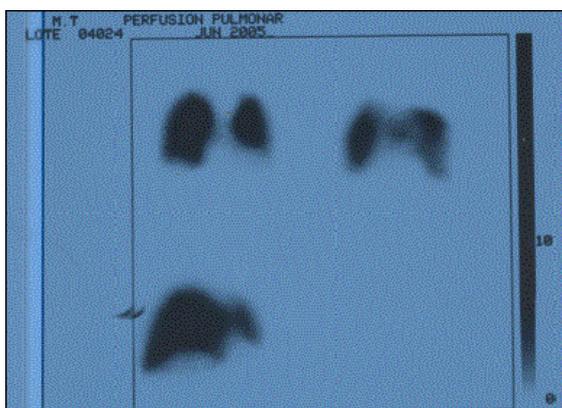


Figura 2. Perfusion pulmonar usando ^{99m}Tc -MAA.

4 Conclusiones

El producto MAATEC, desarrollado en los laboratorios de la Planta de Producción de Radioisótopos, al ser marcado con Tecnecio 99m alcanza una pureza radioquímica mayor al 97% en los primeros 15 minutos y se mantiene estable hasta seis horas post-marcaación. Asimismo, sus impurezas radioquímicas son menores al 10% a los 15 minutos y tienden a disminuir y mantenerse estable con el tiempo.

De acuerdo a los estudios realizados, el MAATEC desarrollado, mantiene sus propiedades físicas, químicas y biológicas por un período mayor a 2 años almacenado entre 2 a 8 °C.

Prudencialmente, hemos asignado al MAATEC un tiempo de expiración de 18 meses a partir de la fecha de producción, almacenado entre 2 a 8 °C.

Concluimos que el periodo de utilización del radiofármaco ^{99m}Tc -MAA es de 6 horas a partir del momento de la marcaación, a temperatura no superiores de 30 °C.

5 Agradecimientos

Agradecemos a los médicos nucleares: Dr. Nelson Alvarado Ruiz, Dra. Rossana Morales y Dr. Carlos Cruz Hurtado por complementar nuestro trabajo con las pruebas pre-clínicas, lo cual permitió evaluar la eficacia de este ARD.

6 Referencias

- [1] Petzoldt I, *et al.* "Formulación y evaluación de un kit liofilizado de macroagregado de albúmina, marcado con ^{99m}Tc , para centellografía pulmonar". En: IPEN. Informe Científico Tecnológico 2003; Lima: Perú; 2004. p. 59-61.
- [2] Monografía General, Albúmina Agregada marcada con Tc-99m, Inyección. USP vigente.
- [3] Planta de Producción de Radioisótopos. Manual de Control de Calidad de Radioisótopos y Radiofármacos (MCCRR).
- [4] Koga R, Morote M. Optimización de la técnica de concentración de proteína en el macroagregado de albúmina (MAA) En: IPEN. Informe Científico Tecnológico 1998-2001; Lima: Perú; 2001. p. 306-308.

Tabla 3. Estabilidad del MAATEC.

Análisis	Especificaciones	Lote Piloto	Tiempo post-producción (meses)				
			Inicial	6	12	18	24
1. MAATEC							
1.1 Características organolépticas	Polvo liofilizado de color blanco	011133	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		003014	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		004024	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
1.2 Partículas extrañas	Ausencia de partículas extrañas	011133	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		003014	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		004024	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
1.3 Tamaño de partículas	10 a 90 µm ≥ 90% > 150 µm Ninguna	011133	97,39%	--	--	--	95,91%
			0%	--	--	--	0%
	003014	90,62%	--	--	--	95,51%	
		0%	--	--	--	0%	
	004024	96,69%	--	--	--	90,91%	
		0%	--	--	--	0%	
1.4 Número de partículas/vial	500 000 a 900 000	011133	770 000	--	--	--	820 000
		003014	640 000	--	--	--	600 000
		004024	620 000	--	--	--	640 000
1.5 Humedad	< 10 %	011133	1,93%	--	--	--	1,89%
		003014	2,69%	--	--	--	3,64%
		004024	2,04%	--	--	--	2,57%
1.6 Esterilidad	Estéril	011133	Conforme	--	--	--	Conforme
		003014	Conforme	--	--	--	Conforme
		004024	Conforme	--	--	--	Conforme
1.7 Endotoxinas Bacterianas	< 87,5 UE/mL	011133	< 25 UE/mL	--	--	--	< 25 UE/mL
		003014	< 25 UE/mL	--	--	--	< 25 UE/mL
		004024	< 25 UE/mL	--	--	--	< 25 UE/mL
2. ^{99m}Tc-MAA							
2.1 Características Organolépticas	Suspensión acuosa de color blanco	011133	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		003014	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		004024	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
2.2 Partículas extrañas	Ausencia de partículas extrañas	011133	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		003014	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
		004024	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
2.3 pH marcación	3,8 a 8,0	011133	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
		003014	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
		004024	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
2.4 Pureza radioquímica	≥ 90%	011133	96,84%	99,73%	95,83%	--	98,85%
		003014	98,98%	--	98,25%	--	99,62%
		004024	98,49%	97,32%	--	--	98,35%
2.5 Impurezas radioquímicas	≤ 10%	011133	5,85%	--	--	--	6,89%
		003014	4,89%	--	--	--	5,71%
		004024	6,76%	--	--	--	7,19%
2.6 Distribución biológica (% radiactividad, 10 m)	Pulmones: ≥ 80% Hígado : ≤ 5%	011133	92,00%	--	--	--	98,16%
			0,98%	--	--	--	0,35%
	003014	96,46%	--	--	--	96,62%	
		0,66%	--	--	--	0,68%	
	004024	95,45%	--	--	--	97,08%	
		0,71%	--	--	--	0,58%	