

ESTIMACIÓN DEL PERFIL pH-VELOCIDAD DEL TETRAPÉPTIDO DE LA COLECISTOQUININA (CCK-4).

C. Angélica Álvarez, Marta Hidalgo, Alexis Oliva, José Fariña y Matías Llabrés

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

Resumen

El perfil pH-velocidad de la CCK-4 fue estimado utilizando ensayos acelerados en condiciones no isotérmicas, observándose tres zonas bien diferenciadas en las que están implicadas, al menos, cinco especies reactivas. El pH de máxima estabilidad se encuentra entre 5 y 8.

Introducción

La CCK-4, fragmento 30-33 de la colecistoquinina, tiene afinidad por los receptores del subtipo A y del subtipo B, a nivel del sistema nervioso central. La sobreexpresión de los receptores especialmente del subtipo B en diversos tipos de tumores humanos ha permitido el uso de la CCK-4 como trazador para la detección de procesos tumorales tras su marcaje con ^{99m}Tc [2]. En este proceso de marcaje juega un papel crucial el pH, dado que el rendimiento de marcaje depende del mismo, siendo superior al 90% a pH 12, descendiendo a valores inferiores al 30% a pH 5. Por ello el objetivo es estudiar la estabilidad de la CCK-4 en función del pH, mediante ensayos acelerados en condiciones no isotérmicas.

Materiales y Métodos

Materiales

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

Método

Se utilizó un sistema cromatográfico de Waters con detección UV-Vis con una

columna de fase inversa (Nova Pack C-18); el control y adquisición de los datos se llevó a cabo con el programa Millennium © 32. La fase móvil fue de una mezcla acetonitrilo/agua (30/70, v/v) con un 0,05% de ácido trifluoroacético (pH=2), a un flujo de 1,0 ml/min a una λ de 280nm siendo el volumen de inyección de 25 μl . El método analítico fue validado de acuerdo con las normas de la ICH.

Ensayos acelerados no isotérmicos

Se empleó una estufa Heraeus (Modelo BR6000) que permite el control de la temperatura a través de una interfase RS232. la variación de la temperatura de la estufa así como la adquisición de su evolución con el tiempo se realizó utilizando un programa de ordenador desarrollado en TestPoint 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 0,251°C/h.

Efecto del pH.

Para determinar el perfil pH-velocidad de la CCK-4 en condiciones no isotérmicas se llevaron a cabo tres experimentos de forma que en el primero se evaluó la estabilidad a pH 2, 4, 6, 8 y 10, En el segundo pH 1, 3, 5, 7 y 8 y en el tercero los pH 5, 11 y 13, Destacando el hecho de que en cada nuevo experimento se repite un pH estudiado anteriormente. Esta estrategia tiene como fin conocer la capacidad de reproducibilidad del ensayo no isotérmico.

Resultados y Discusión

En la figura 1 se representa la variación de la temperatura con el tiempo obteniéndose una velocidad media de calentamiento de $0,251 \pm 0,004^\circ\text{C/h}$ [3],

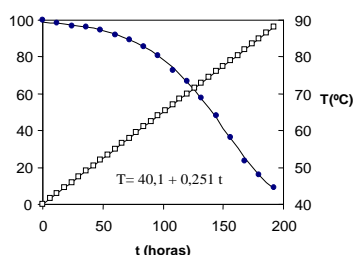


Figura 1. Relación entre la temperatura observada y el porcentaje remanente de la CCK-4 con el tiempo a una velocidad de $0,25^\circ\text{C/h}$.

También se muestra la relación entre el porcentaje remanente de la CCK-4 con el tiempo a pH 12, a partir de estos datos y haciendo uso del programa Mathematica® es posible estimar la energía de activación y el factor de frecuencia y por lo tanto el valor de la constante de velocidad de degradación a 25°C , para cada uno de los pH objeto de estudio, valores recogidos en la tabla 1.

pH	K(25°C)
1	$3,29 \cdot 10^{-4}$
2	$3,54 \cdot 10^{-5}$
3	$1,38 \cdot 10^{-5}$
4	$2,31 \cdot 10^{-5}$
5	$2,88 \cdot 10^{-5}$
5	$1,89 \cdot 10^{-5}$
6	$1,37 \cdot 10^{-5}$
7	$1,81 \cdot 10^{-5}$
8	$2,66 \cdot 10^{-5}$
10	$1,45 \cdot 10^{-4}$
11	$5,76 \cdot 10^{-4}$
12	$4,66 \cdot 10^{-3}$
13	$3,56 \cdot 10^{-2}$

Tabla 1. Valores de las constantes de degradación estimada a 25°C en condiciones no isotérmicas para los distintos pH.

A la hora de la interpretación del perfil pH-velocidad debemos seleccionar el modelo que mejor describa el perfil teniendo en cuenta para ello el número de equilibrios implicados, y en segundo lugar, relacionar cada tramo con las posibles especies, La CCK-4 posee 2 grupos o restos ionizables, como son el ácido carboxílico del resto

Aspártico ($\text{pKa}=3,65$) y la amina del resto Triptófano ($\text{pKa}=9,44$), En base a esto la CCK-4 se encuentra en forma catiónica a $\text{pH}<5$, sufriendo una catálisis ácida a $\text{pH}<2$ y una catálisis acuosa a pH entre 2 y 5, A $\text{pH}>10$, se encuentra en forma aniónica, sufriendo una catálisis básica, mientras que a pH entre 5 y 10 se encuentra bajo la forma anfótera, siendo susceptible de sufrir una catálisis acuosa y básica, Tomando en consideración este hecho la ecuación que mejor describe nuestros datos es la siguiente:

$$K_{obs} = \left[(k_0^H \cdot [H^+]) + k_0^S + \frac{k_1^S}{[H^+]} + \frac{(k_1^{OH} \cdot k_{a1} \cdot k_w) + (k_2^{OH} \cdot k_w \cdot k_{a1} \cdot k_{a2})}{[H^+]^2} + \frac{k_2^S}{[H^+]^3} \right] / \left[1 + \frac{k_{a1}}{[H^+]} + \frac{k_{a1} \cdot k_{a2}}{[H^+]^2} \right] \quad \text{Ec.1}$$

El perfil pH-velocidad se ajustó de acuerdo con la ecuación 1 (ver figura 2) dónde se pueden distinguir tres zonas bien diferenciadas como son una zona de catálisis ácida ($\text{pH}<3$), una zona de catálisis básica ($\text{pH}>10$) y una zona de catálisis acuosa o proceso no catalizado entre 5 y 8.

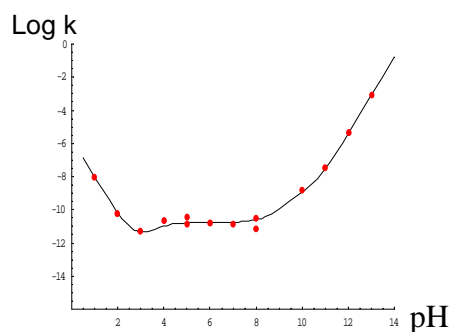


Figura 2. Perfil pH-velocidad de la CCK-4 considerando los dos equilibrios protolíticos

Haciendo uso del programa Mathematica® se obtienen valores para cada una de las constantes de velocidad en cada una de las etapas.

Parámetro	Valor	I.C. 95%
K_0^H	$3,219 \cdot 10^{-3}$	$2,759 \cdot 10^{-3} - 3,680 \cdot 10^{-3}$
K_0^S	$7,555 \cdot 10^{-6}$	$-2,064 \cdot 10^{-6} - 3,575 \cdot 10^{-5}$
K_1^S	$2,305 \cdot 10^{-5}$	$6,374 \cdot 10^{-6} - 3,432 \cdot 10^{-5}$
K_1^{OH}	4,408	3,517-5,298
K_2^{OH}	$4,599 \cdot 10^{-1}$	$4,59 \cdot 10^{-1} - 4,603 \cdot 10^{-1}$

Tabla 2. Constantes de velocidad estimadas de acuerdo con el modelo descrito en la ecuación 1,

Una forma de correlacionar la presencia de estas especies con los distintos tramos consiste en simplificar la ecuación que describe el perfil pH-velocidad reduciendo el número de equilibrios. Teniendo en cuenta que el pka del grupo amino del Triptófano es 9,4, y limitando el pH de trabajo hasta 7, el perfil puede ser descrito teniendo en cuenta un solo equilibrio protolítico [4] descrito por la siguiente ecuación:

$$k_{obs} = k_0^H H^+ + k_0^S + \frac{k_1^S}{[H^+]} \cdot \left[1 + \frac{k_{a1}}{[H^+]} \right]$$

Ec 2.

Este modelo queda perfectamente reflejado en la figura 3:

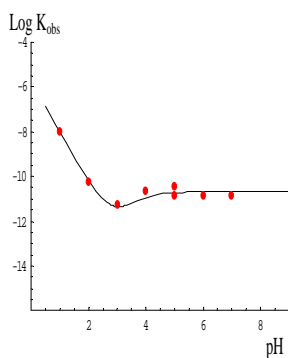


Figura 3. Perfil pH-velocidad estimado considerando un solo equilibrio.

Según este modelo simplificado las nuevas constantes de velocidad estimadas por el programa Matemática quedan recogidas en la tabla 3,

Parámetro	Modelo Total	Modelo Simplificado
$K_0^H (M^{-1} h^{-1})$	$3,230 \cdot 10^{-3}$	$3,235 \cdot 10^{-3}$
$K_0^S (h^{-1})$	$6,560 \cdot 10^{-6}$	$6,148 \cdot 10^{-6}$
$K_1^S (M h^{-1})$	$4,797 \cdot 10^{-9}$	$5,098 \cdot 10^{-9}$

Tabla 3. Comparación de las constantes de velocidad estimada a partir del perfil pH velocidad considerando el modelo total (dos equilibrios) y el modelo simple (un equilibrio)

Siendo la primera constante de velocidad igual a la obtenida en el modelo completo, mientras que las otras constantes de velocidad se encuentran dentro del mismo orden de magnitud.

Bibliografía.

1. Sumie Yoshioka, Valentino J. Stella. Stability of Drugs and Dosage Forms, Ed. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000.
2. R. Rossin, D. Block, R. Visentin, R. Feistma, M. Giron, E. Pauwels, U. Mazzi. ^{99m}Tc -Labeling experiments on CCK4 by direct method. Nuclear Medicine & Biology 28, 865 (2001).
3. Lee, M-L., Stavchansky, S., Isothermal and No-Isothermal Decomposition of Thymopentin and Its analogues in Aqueous Solution. *Pharm. Res.*, 15(11), 1702, (1998).
4. Won, C.M., Molnar, T.E., Windisch, V.L., McKean, R.E., Kinetics and mechanism of degradation of kerval, a pseudo-tetrapeptide. *Int. J. Pharm.* 190, 1, (1999).

Agradecimientos.

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno Autónomo de Canarias. (Proyecto:072/2001)

Autor de contacto:

Nombre y apellidos; C, Angélica Álvarez Brito,
e-mail; crisoangelk@hotmail.com

Institución; Dpto, Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de la Laguna,

Dirección; Avda, Francisco Sánchez s/n 38200

Ciudad; La Laguna, Tenerife,

Tel.: 922318452

Fax: 922318506