

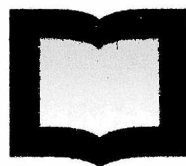
Dan Beninson

Instituto de Tecnología Nuclear

**Evaluación de la adaptación de la Guía “Oncology
Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies
and Labeling Recommendations”, para el desarrollo
preclínico de nuevos radiofármacos para terapia con
radioligandos**

**CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA
Y APLICACIONES NUCLEARES**

Alumno: Ing. Gisele Lencina
Director: Lic. Ana Clarisa López Bularte
Co-Directora: Lic. Noemi Nevares
JULIO 2023



UNSAM

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

ÍNDICE	
	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	3
CAPÍTULO 1: TERAPIA DIRIGIDA CON RADIOLIGANDOS	4
1.1 <i>Introducción a estas terapias</i>	4
1.2. <i>Qué son las terapias dirigidas con radioligandos</i>	4
1.3. <i>Impacto de esta terapia.</i>	5
1.3.1 <i>El caso del ¹¹⁷Lu-PSMA- 617</i>	6
1.4. <i>Desafío al que se enfrenta el desarrollo de estos radiofármacos</i>	11
CAPÍTULO 2: CONTEXTO INTERNACIONAL	13
2.1. <i>Organismos involucrados</i>	13
2.2. <i>Documentos de orientación</i>	14
2.3. <i>¿Qué son las BPL?</i>	16
CAPÍTULO 3: CONTEXTO NACIONAL	19
3.1 <i>La ANMAT</i>	19
3.2 <i>La ANMAT miembro observador del ICH</i>	19
3.3 <i>Disposiciones de la ANMAT de interés para el desarrollo de radiofármacos</i>	20
3.3.1 <i>Monografía del producto de Investigación (MPI)</i>	26
3.4 <i>Planteo de problema y estrategia propuesta</i>	29
CAPÍTULO 4: GUÍA “ONCOLOGY THERAPEUTIC RADIOPHARMACEUTICALS: NONCLINICAL STUDIES AND LABELING RECOMMENDATIONS”	31
4.1 <i>Descripción</i>	31
4.2 <i>Estructura de la guía</i>	31
4.3 <i>Principales requisitos de la guía</i>	32
CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE RADIOFÁRMACOS	36

5.1 Consideraciones generales sobre aspectos preclínicos.	36
5.2 Ensayos in vitro para determinar la Farmacocinética y la Farmacología.	39
5.2.1 Ensayos para Farmacocinética	39
5.2.2 Ensayos para Farmacología	43
5.3 Ejemplo de diseño de evaluación preclínica para ¹⁷⁷Lu PSMA-617	48
CAPÍTULO 6: ADAPTACIÓN DE LA GUÍA PROPUESTA	52
6.1 Metodología de la Colaboración “ADAPTE”	52
6.2 Fase de Establecimiento	53
CONCLUSIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUCCIÓN

La producción de radioisótopos de uso médico ha sido desde hace décadas una de las tareas fundamentales de CNEA en el área de la salud, produciendo prácticamente la totalidad de los radioisótopos empleados en nuestro país, y exportando a varios países de Latinoamérica.

Dentro de sus objetivos estratégicos institucionales relacionados con las aplicaciones de la tecnología nuclear a la salud, la CNEA manifiesta:

Objetivo Estratégico 1: Contribuir a la mejora de la salud pública actuando CNEA como referente en investigación, desarrollo e innovación en producción de radioisótopos y radiofármacos, medicina nuclear y radioterapia, aportando a las actividades asistenciales mediante la promoción y el uso de nuevas tecnologías.

Objetivo Estratégico 2: Proveer radioisótopos y radiofármacos al sistema de salud nacional y fortalecer el rol exportador de CNEA de productos y tecnologías asociadas.(1)

Es de evidente interés entonces para la Institución el desarrollo de nuevos radiofármacos y la evaluación preclínica de los mismos es una etapa fundamental.

En este sentido, para dar cumplimiento a los requerimientos regulatorios por parte de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para la evaluación preclínica de nuevos radiofármacos, la regulación 6677/10 requiere la elaboración de la monografía del producto de investigación (MPI). Con el fin de abordar esta problemática compleja, en este trabajo se postula como estrategia la adaptación de una guía para la evaluación preclínica de radiofármacos terapéuticos de última generación publicada recientemente en agosto del 2019 por la Food and Drug Administration (FDA).

OBJETIVO

Objetivo general: Diseñar un **programa coordinado de evaluación preclínica de radiofármacos para Terapia con Radioligandos (RLT)** basado en la Guía "Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations" que cubra los aspectos regulatorios vigentes y las recomendaciones internacionales para ser implementado en CNEA.

Objetivos específicos: Analizar el contexto regulatorio local e internacional para la evaluación preclínica de Radiofármacos.

Realizar un mapeo de recursos humanos e instalaciones del Centro Atómico Ezeiza de CNEA para implementar las primeras dos etapas.

En base a estos resultados, definir los integrantes de los Equipos de Implementación de Ensayos (EIE) para dichas etapas.

Generar nuevos protocolos experimentales consensuados por los EIE para abordar las etapas 1 y 2.

Evaluar la adaptación de la guía preclínica a través de una encuesta a los profesionales referentes.

CAPÍTULO 1: TERAPIA DIRIGIDA CON RADIOLIGANDOS

1.1 Introducción a estas terapias

La medicina moderna ha vivido múltiples avances en los últimos años que han permitido ampliar los tratamientos en la lucha contra el cáncer, dando pie a un abanico de opciones terapéuticas en oncología tales como la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia, la radioterapia, la terapia dirigida, el trasplante de células madre y la terapia hormonal.

Enmarcada en la terapia dirigida, la medicina nuclear desarrolla igualmente su uso terapéutico en oncología mediante la combinación de diagnóstico y terapia, dando paso a un nuevo paradigma en la lucha contra el cáncer: las terapias dirigidas con radioligandos (RLT, por sus siglas en inglés correspondientes a radioligand therapy).

Las terapias dirigidas con radioligandos suponen un nuevo pilar en oncología ya que representan una opción precisa, eficaz y sostenible mediante el uso de técnicas moleculares tradicionalmente destinadas al diagnóstico. Estas terapias, ya en uso, demuestran mejores resultados de supervivencia y mayor calidad de vida, contribuyendo en gran medida a alcanzar los objetivos de la medicina de precisión y personalizada.

1.2 Qué son las terapias dirigidas con radioligandos

La terapia dirigida con radioligandos es una forma innovadora de terapia oncológica que utiliza las características específicas de las células tumorales como base para su mecanismo de acción. La terapia consiste en administrar una sustancia, el radioligando, que combina un compuesto de precisión, el ligando, localizador de las células cancerosas, con una partícula radioactiva terapéutica, el radioisótopo (Fig.1). De esta manera, el radioligando ubica las células cancerosas en cualquier parte o partes del cuerpo y emite radiación concreta y específicamente dirigida a dichas células. El radioisótopo daña el tumor, alterando su capacidad para replicarse y/o desencadenando el mecanismo de muerte celular.



Fig. 1 Combinación ligando-radioisótopo

Gracias a la alta precisión de los radioligandos al unirse a los receptores de las células tumorales (Fig. 2), el tejido celular sano circundante se ve menos afectado, pudiendo así considerarse como una terapia de precisión, con reducida toxicidad y grandes resultados. Además, ofrecen una química amigable que le da versatilidad para realizar distintas combinaciones de radioisótopos y ligandos respectivamente, en función del tipo de tumor que quiera tratarse o diagnosticarse, ampliando así el potencial de las RLT para otros tumores sólidos.

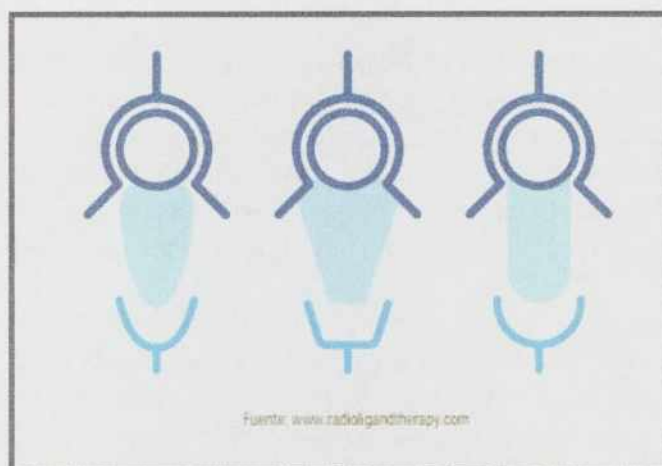


Fig.2 Unión radioligando-receptor

1.3 Impacto de esta terapia

En base a la experiencia actual con el uso de estas terapias, la comunidad especializada y los pacientes defienden la utilidad de las RLT como nueva opción terapéutica que responde a algunas necesidades no cubiertas hasta el momento. La mejora en la calidad de vida, su eficacia clínica y la seguridad en todo el proceso son las claves de su reciente expansión .

Un ejemplo muy relevante al respecto es el de Fernando Acosta, paciente argentino que en el 2018, a los 55 años fue diagnosticado con adenocarcinoma de próstata, Gleason 9, inoperable. Durante 4 años recibió radioterapia y 42 sesiones de quimioterapia cada 21 días, sin más nada que hacer porque no había mejoras en su cuadro. A pesar de que Fernando reunía los requisitos clínicos para ser candidato a RLT, su seguro médico no aceptó pagar el tratamiento.

A través de la Fundación Oncidium, Fernando pudo acceder a la terapia de tratamiento con radioligandos, en este caso el ^{177}Lu -PSMA. Luego de la aplicación de 3 dosis, los estudios realizados en cámara gamma y pet evidenciaron que no había focos neoplásicos en actividad. Fernando manifiesta que no tuvo efectos colaterales serios. Este tratamiento fue realizado por la Dra. María Bastaniello, en el Hospital Universitario CEMIC de Buenos Aires. (2).

Debido al éxito de estos nuevos tratamientos y a su gran desarrollo en los últimos años, la investigación sobre las terapias dirigidas con radioligandos ha aumentado exponencialmente y se está tratando de aplicar el mismo mecanismo de acción a otros tipos de cáncer. Las terapias dirigidas con radioligandos suponen un verdadero nuevo paradigma en el tratamiento contra el cáncer.

En la actualidad se están desarrollando RLT para pacientes con algunos tipos de cáncer de próstata y otros tumores sólidos, como mama, pulmón y páncreas. Dependiendo del éxito de estas prometedoras investigaciones, se lograría aumentar considerablemente las tasas de supervivencia al cáncer. El cáncer de próstata es una de las principales amenazas a la salud de los hombres, siendo el segundo tipo de cáncer más común entre este sector de la población, únicamente por detrás del de pulmón. Existen considerables necesidades terapéuticas en torno a este tumor, por lo que las RLT pueden contribuir a cubrir las en determinados grupos de pacientes, garantizando una alta calidad de vida y supervivencia.

Gracias a la estructura de las terapias dirigidas con radioligandos y la intercambiabilidad de los radioisótopos y los ligandos para adaptarse a distintos tamaños de tumor y a otros tipos de cáncer o incluso otras patologías, este nuevo paradigma de tratamiento tiene el potencial de convertirse en una revolución más allá de la oncología. Así, el uso de radiofármacos dirigidos y de la teragnosis puede llegar a utilizarse en enfermedades no oncológicas, formando parte esencial del futuro de la medicina de precisión (3).

Por ejemplo tenemos el iomab-B, de Actinium Pharmaceuticals, que es un anticuerpo monoclonal marcado con I-131 y se utiliza para ablación controlada de la médula ósea, como pretratamiento para los trasplantes de médula. Es potencialmente curativo al agotar simultánea y rápidamente las células madre del cáncer de la sangre, inmunitarias y de la médula ósea que expresan de forma única CD45.

1.3.1 El caso del ¹⁷⁷Lu-PSMA- 617

El 23 de marzo del 2022, la FDA anunció la aprobación del radiofármaco ¹⁷⁷Lu-vipivotide tetraxetan, mencionado en la literatura como ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (CPRCm) positivo para PSMA, que han sido tratados con terapia hormonal y quimioterapia basada en taxanos. El nombre comercial es Pluvicto™ y la compañía que lo comercializa es Advanced Accelerator Applications USA, Inc, de Novartis. En agosto de 2022 le otorgaron a este radiofármaco la autorización comercial en Gran Bretaña.

Originalmente fue desarrollado por el Centro Alemán de Investigación del Cáncer y el Hospital Universitario de Heidelberg, Alemania.

PSMA-617 es un fármaco altamente específico que se dirige al PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata) sobreexpresado en el tejido del tumor de próstata. Como el PSMA casi no se expresa en tejido no prostático, tiene una acumulación de fondo muy baja en tejido sano, lo que evita efectos secundarios graves y hace que esta terapia sea segura y de baja toxicidad. En comparación con la quimioterapia, el PSMA-617 es altamente específico para la enfermedad y disminuye cualquier daño al tejido circundante.

Para la terapia dirigida con radioligandos, el PSMA-617 se marca con Lu-177. Como ya vimos, la RLT tiene como objetivo administrar radiación ionizante a las células tumorales sin afectar el tejido sano. El principio subyacente es el enlace químico del emisor de partículas a una molécula de reconocimiento de antígeno (por ej., péptidos, antígenos o inhibidores de

moléculas pequeñas). Después de unirse al receptor de PSMA, ^{177}Lu -PSMA-617 se internaliza en las células positivas para PSMA, lo que da como resultado una retención prolongada dentro de estas células; los electrones de alta energía emitidos durante la descomposición pueden inducir selectivamente daños en el tejido y el ADN, lo que lleva a la muerte celular. Los emisores β se usan más comúnmente para RLT, ya que tienen una baja transferencia de energía lineal (LET). La LET es la energía media del emisor de partículas que se deposita por unidad de longitud en su recorrido. La baja energía depositada de los emisores β solo es capaz de producir rupturas de una sola hebra del ADN, pero puede realizar esto en un rango más largo (dependiendo de la energía del electrón emitido), lo que los hace especialmente adecuados para tumores más grandes.

La aprobación de la FDA puede considerarse como el exitoso paso final de la investigación traslacional que comenzó a fines de la década de 1980 con el descubrimiento del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) como un objetivo potencial para el cáncer de próstata.

En la siguiente imagen (Fig. 3) vemos un resumen del desarrollo histórico del PSMA-617.

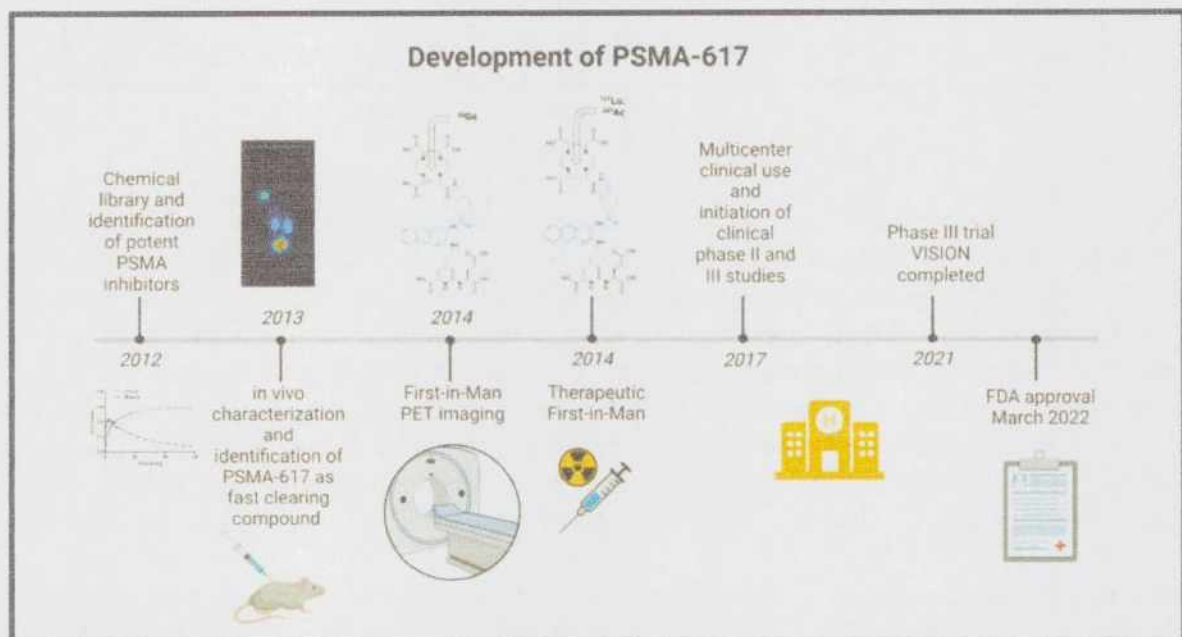


Fig. 3 Desarrollo del PSMA- 617

El ingrediente activo de PluvictoTM es el ligando de unión a PSMA que se muestra en la Figura 4. La molécula consta del sitio de unión a PSMA *Glu-NH-CO-NH-Lys* al que se acopla el resto quelante *DOTA* sobre un linker que contiene el aminoácido *2-naftil-L-alanina (Nal)* así como *ácido tranexámico*.

DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) es un quelante bifuncional capaz de coordinar diferentes radiometales como el *Ga-68*, el *Y-90* o el *Lu-177*. En el caso del *Lu-177*, la coordinación es octadentada.

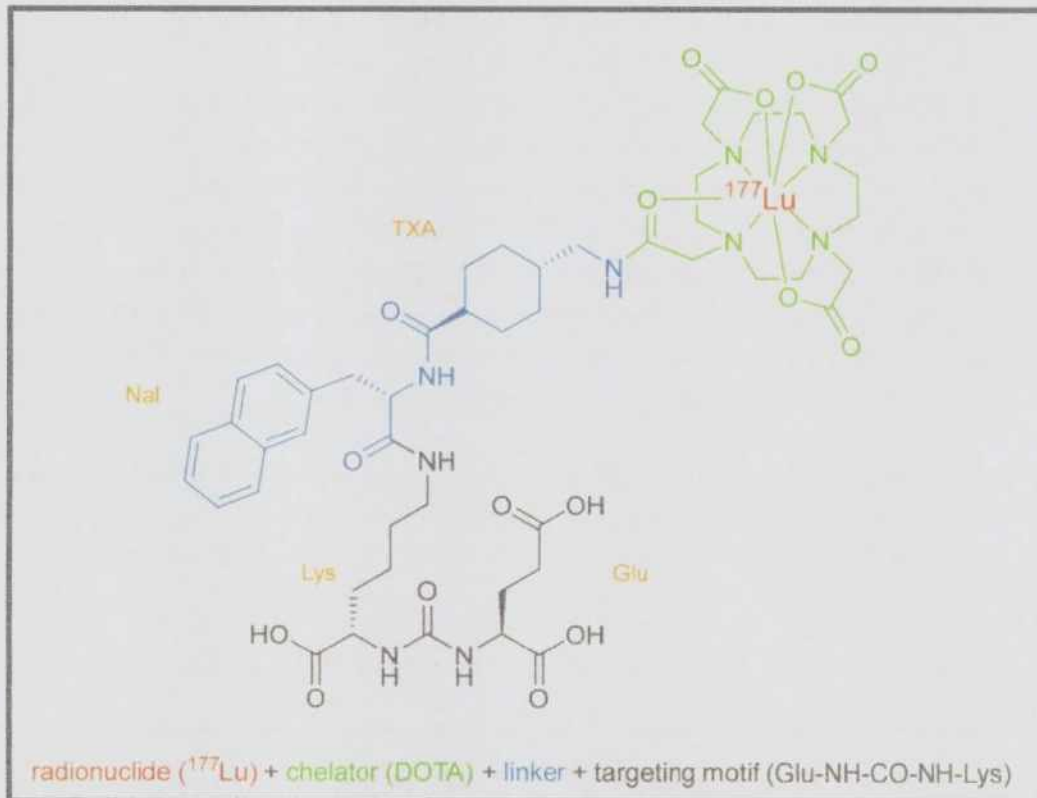


Fig.4 Estructura del Puvicto™ (¹⁷⁷Lu-PSMA- 617)

El Lu-177 es un emisor β que se desintegra al 100 % por emisión de electrones al isótopo estable Hf-177 y tiene un período de desintegración de 6,647 días. Para esta desintegración, la energía β máxima es de 496,8 keV (79,4 %), pero la energía β promedio es de solo 133.6 keV. Dependiendo de la energía de la partícula β , tiene diferentes rangos de penetración en el tejido resultante. En este caso, el alcance máximo es de 2.2 mm, mientras que el alcance promedio es de 0.67 mm. Podemos decir entonces que es un emisor de partículas β de corto alcance. Este alcance permite que la partícula penetre y elimine las células que se quieren eliminar, o sea, aquellas que expresan al PSMA, mientras que muestra efectos limitados en el tejido sano vecino.

Además de la partícula β , durante la desintegración del Lu-177 se emiten rayos γ de baja energía (112.9 keV (6.17 %) y 208.4 keV (10.4 %)), que pueden utilizarse para imágenes SPECT de pacientes después de la inyección de ¹⁷⁷Lu-PSMA- 617 que permite realizar mediciones dosimétricas. Esto hace que Lu-177 sea un radiometal teragnóstico intrínseco.

La producción de Lu-177 se puede lograr por dos rutas diferentes, ya sea comenzando con Lu-176 (ruta directa) o Yb-176 (ruta indirecta). La irradiación de los blancos con neutrones se realiza en un reactor nuclear.

Al tomar la ruta directa, comenzando con Lu-176 enriquecido, el radionucleido producido será carrier-added (c.a.) ya que no es posible separar químicamente el Lu-176 del Lu-177. Esto da como resultado actividades específicas moderadas a bajas. Otro inconveniente de este método es la formación de Lu-177m durante la irradiación, que tiene un período de

semidesintegración de 160 días y puede complicar la protección radiológica y la gestión de residuos. No hay disponible en el mercado Lu-176 con un enriquecimiento mayor al 75% y se necesita que sea mayor al 80% en reactores de media-baja potencia.

Por otro lado, la ventaja de esta ruta de producción es la pequeña cantidad de blanco enriquecido que se necesita, así como las operaciones radioquímicas simples para el procesamiento del blanco irradiado.

Cuando se produce Lu-177 por la vía indirecta, se irradia con neutrones un blanco de Yb-176 altamente enriquecido, formando Yb-177 ($t_{1/2} = 1.92$ h) que posteriormente decae a Lu-177. A partir del blanco irradiado, el Lu-177 se puede separar químicamente para obtener el compuesto sin portador añadido (n.c.a.) con actividades específicas altas. Otra ventaja es que Lu-177m no se forma usando esta ruta de producción. Sin embargo, un inconveniente de este método es la gran cantidad necesaria de Yb-176 enriquecido (del orden del gramo, frente a los microgramos necesarios en la ruta directa), lo que da lugar a dos problemas. Primero, la separación de Lu-177 del blanco tiene que ser muy eficaz. En segundo lugar, hasta ahora el Yb-176 solo está disponible en instalaciones de Rusia. Las crecientes demandas de Lu-177 y la situación política actual de Rusia pueden resultar en un aumento severo de los precios o incluso en la falta de disponibilidad de Lu-177 n.c.a. (4).

Si bien para la producción de Pluvicto™ es preferible partir de Lu-177 n.c.a, la FDA también aprobó el uso del Lu-177 c.a. En la Fig. 5 vemos un ejemplo comercial de la empresa Isotopia Molecular Imaging LTD, de Israel.

Particularmente en la CNEA, actualmente se está usando c.a para el desarrollo y a futuro se está pensando en usar Lu-177 producido por el Método de Blancos Mixtos .

Lutetium (^{177}Lu) Solution for Radiolabeling

Specifications

Chemical Form	LuCl ₃ in HCl 0.04N
Packaging	10 mL molded vial closed with fluorotec septum and open top crimp seal 5 mL V-shaped vial closed with fluorotec septum and open top crimp seal

Test	Specification	
	N.C.A	C.A
Appearance	Clear, colorless solution	Clear, colorless solution
pH	1.0 – 2.0	1.0 – 2.0
Identification A (Gamma spectrometry)	Gamma photons with 208 KeV and 113 KeV present	Gamma photons with 208 KeV and 113 KeV present
Identification B (pH)	1.0 – 2.0	1.0 – 2.0
Identification C (TLC)	The retardation factor of the principal peak in the chromatogram obtained in the test for radiochemical purity is 0.4 to 0.7	The retardation factor of the principal peak in the chromatogram obtained in the test for radiochemical purity is 0.4 to 0.7
Specific Activity (by ICP-OES at end of production)	>3000 GBq/mg (>81 Ci/mg)	>740 GBq/mg (>20 Ci/mg)
Chemical Purity (by ICP-OES at end of shelf life)	Cu ≤ 1.0 µg/GBq Fe ≤ 0.5 µg/GBq Pb ≤ 0.5 µg/GBq Zn ≤ 1.0 µg/GBq Yb ≤ 1.0 µg/GBq	Cu ≤ 1.0 µg/GBq Fe ≤ 0.5 µg/GBq Pb ≤ 0.5 µg/GBq Zn ≤ 1.0 µg/GBq
Radionuclidic Purity (Gamma spectrometry at end of shelf life)	$^{176}\text{Lu} \leq 0.1\%$	$^{177\text{m}}\text{Lu} \leq 0.07\%$
	The total radioactivity due to other radionuclides impurities ≤ 0.01%	The total radioactivity due to other radionuclides impurities ≤ 0.01%
Radiochemical Purity (by iTLC)	^{177}Lu]lutetium(III) ion ≥99%	^{177}Lu]lutetium(III) ion ≥99%
Bacterial endotoxins	< 35 EU/mL	< 35 EU/mL
Sterility	Sterile (by autoclaving)	Sterile (by autoclaving)



Fig.5 Folleto de la empresa Isotopia Molecular Imaging LTD de Israel

1.4 Desafío al que se enfrenta el desarrollo de estos radiofármacos

El desarrollo de radiofármacos, entre los que encontramos a los utilizados en RLT, requieren una extensa evaluación antes de que puedan ser aplicados ya sea en diagnóstico como en terapia. Parámetros químicos, radioquímicos y farmacéuticos deben ser establecidos y verificados para asegurar la calidad de los nuevos productos (Fig.6).

Este proceso se denomina Traslación Clínica y comprende toda la información respecto a la seguridad, calidad y eficacia antes de ser inyectado en humanos, y los ensayos clínicos. Una parte fundamental de la Traslación Clínica son los ensayos denominados preclínicos, que predicen seguridad y eficacia previo al uso en humanos. Compila información farmacológica, toxicología y efectos de la radiación.

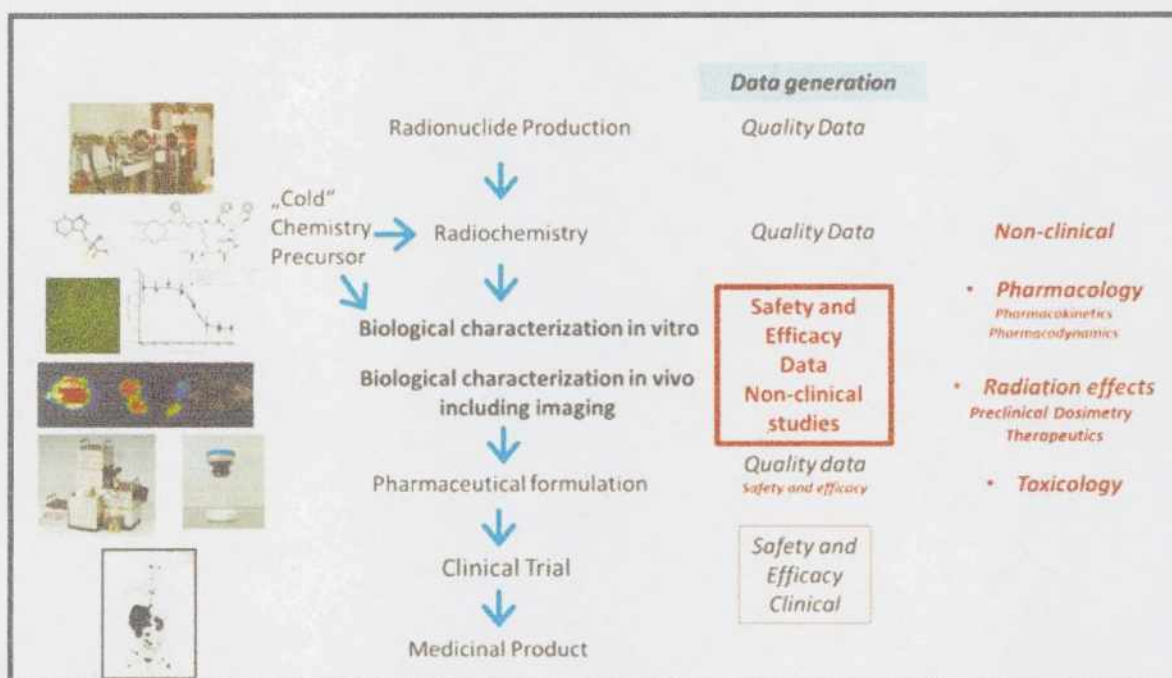


Fig. 6 Traslación clínica de radiofármacos

Sucede que, el problema con el cual se enfrentan los investigadores es que los documentos de orientación específicos para la evaluación preclínica (para la subsecuente traslación clínica), hasta hace unos pocos años eran escasos, no sólo en nuestro país sino también en Europa y EEUU y pueden no cubrir todos los aspectos necesarios para la traslación clínica de nuevos productos. Los documentos existentes para medicamentos convencionales tienen utilidad y aplicabilidad limitada para los radiofármacos.

Además, los marcos regulatorios para la aprobación de la terapia con radioligandos son inconsistentes entre países; en algunos casos, los radioligandos se consideran productos farmacéuticos, en otros están clasificados y regulados como sustancias radiactivas. Tampoco se tienen en cuenta las diferencias entre los radioisótopos de diagnóstico y los radioisótopos terapéuticos. En consecuencia, se termina restringiendo el uso de la terapia con radioligandos, afectando a quienes necesitan el tratamiento. Es necesario que los marcos regulatorios nacionales e internacionales sean claros y estén armonizados(5).

Los investigadores y profesionales involucrados en el desarrollo de radiofármacos encuentran incertidumbres con respecto al diseño apropiado de estudios preclínicos, lo que conlleva el riesgo de recopilar una cantidad insuficiente, irrelevante o redundante de datos.

Entonces tanto los reguladores como los investigadores deben "navegar" a través de múltiples documentos de orientación para extraer la información necesaria para un diseño de estudio (6).

En relación a lo anterior, vamos a analizar en los capítulos siguientes el contexto internacional y nacional para luego presentar una estrategia que dé solución a la dificultad expresada.

CAPÍTULO 2: CONTEXTO INTERNACIONAL

2.1 Organismos involucrados

Tanto en Europa como en Estados Unidos existen distintos organismos o entes reguladores con injerencia en el desarrollo de radiofármacos. Ellos son:

Agencia Europea de Medicamentos: (EMA, por sus siglas en inglés) es una agencia de la Unión Europea descentralizada que se encarga de la evaluación de las solicitudes de autorización de comercialización de medicamentos en la Unión Europea y de su supervisión. Su objetivo es "contribuir a la protección de la salud pública y animal asegurando que los medicamentos para uso humano y veterinario sean seguros, eficaces y de alta calidad en beneficio de la salud pública y animal, dentro de la Unión Europea". La EMA fue creada en 1993.

La Comunidad Europea de Energía Atómica: (Euratom) La Unión Europea (UE) es una comunidad económica y política de naciones soberanas independientes cuyos Estados miembros cooperan democráticamente a través de las instituciones comunitarias para la determinación y consecución de objetivos comunes. Esta cooperación se estructura mediante Tratados, que son acuerdos vinculantes suscritos por los Estados.

Entre éstos, el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea de Energía Atómica (Euratom), firmado en Roma el 25 de marzo de 1957, establece el marco normativo básico para la creación y desarrollo de una industria y un mercado común nucleares en los territorios de sus Estados, en las condiciones de seguridad que eviten todo riesgo para la vida y la salud de las personas y garanticen el uso y abastecimiento con fines pacíficos de los materiales nucleares.

Desde 2014, Suiza también ha participado en programas de la Euratom como un Estado asociado.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) es la agencia del Gobierno de los 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. La FDA fue fundada en 1906.

El Consejo Internacional para la Armonización de Requerimientos Técnicos para Fármacos de Uso Humano (ICH): es el organismo internacional que reúne a agencias regulatorias referentes del mundo y a la industria farmacéutica para discutir y armonizar aspectos científicos y técnicos sobre el registro de los medicamentos. El Consejo cuenta con una trayectoria de 29 años, entre los miembros plenos se encuentran las autoridades de Brasil, Canadá, China, Estados Unidos, Japón y entre otros, y agencias de la Unión Europea.

Esta armonización, a escala casi mundial, pretende conseguir un doble beneficio: la racionalización en el uso de recursos animales, humanos y también materiales para el desarrollo de nuevos medicamentos y la reducción del tiempo de disposición de un nuevo medicamento en el mercado.

La ICH consigue un acercamiento de las regiones haciendo posible la identificación de temas donde existen divergencias que hay que armonizar y el establecimiento de un método de trabajo común para la elaboración de recomendaciones o guías comunes para la industria farmacéutica y las autoridades reguladoras (7).

Otras entidades relacionadas son la EANM (Asociación Europea de Medicina Nuclear) y el IAEA, ampliamente conocido por nosotros.

2.2 Documentos de orientación

A partir del año 2018, estos organismos publicaron distintas guías para la evaluación preclínica de los radiofármacos (Fig.7 y 8) .

Guideline/text	Origin/organization	Topic
EMA/CHMP/SWP/686140/2018: Guidance on non-clinical requirements for radiopharmaceuticals	EMA	Non-clinical requirements for radiopharmaceuticals—draft document
Directive 2013/59/Euratom: BSS for protection against the dangers arising from exposure to ionising radiation	Euratom	Radiation Protection
Guidance on medical exposure in medical and biomedical research	EURATOM	Risk categories for radiation exposure in diagnostics
EMEA/CHMP/QWP/306970 Guideline on radiopharmaceuticals	EMA	Quality requirements for radiopharmaceuticals when aiming for marketing authorization
FDA guidance 2011: nonclinical evaluation of late radiation toxicity of therapeutic radiopharmaceuticals	FDA	Therapeutic Radiopharmaceuticals
FDA guidance document: microdose radiopharmaceutical diagnostic drugs: nonclinical study recommendations, guidance for industry	FDA	Diagnostic Radiopharmaceuticals
FDA/ICH Guidance Document: Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Non-Clinical Studies and Labeling Recommendations, Guidance for Industry	ICH (FDA/EMA)	Therapeutic Radiopharmaceuticals

Fig.7 Documentos de orientación de los organismos reguladores en relación con los radiofármacos (4)

Guideline/text	Origin/organization	Topic	References
Position paper on requirements for toxicological studies in the specific case of radiopharmaceuticals	EANM	Toxicity studies	Koziorowski et al. (2017)
EANM guideline for the preparation of an Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD)	EANM	Guideline for chemical and pharmaceutical part of an IMPD for radiopharmaceuticals	Todde et al. (2014)
Guidelines to PET measurements of the target occupancy in the brain for drug development	EANM	PET occupancy study	Takano et al. (2016)
Guidance for preclinical studies with radiopharmaceuticals	IAEA	Technical consideration for in vitro and in vivo preclinical evaluation of radiopharmaceuticals	Guidance for preclinical studies with radiopharmaceuticals. IAEA radioisotopes and radiopharmaceuticals series (2021)
Acceptance testing for nuclear medicine instrumentation	EANM	Primarily for instrumentation in the clinics, but some instrumentation is also used in non-clinical setting	Busemann Sokole et al. (2010)
IAEA-TECDOC-1782 Good practice for introducing radiopharmaceuticals for clinical use	IAEA	Partly related to IMP/IMD dossier and nonclinical testing	International Atomic Energy Agency (2016)
International Atomic Energy Agency and World Health Organization guideline on good manufacturing practices for radiopharmaceutical products	IAEA	International GMP guidelines or radiopharmaceuticals	Annex 2 International Atomic Energy Agency and World Health Organization guideline on good manufacturing practices for radiopharmaceutical product [Internet]. WHO Technical Report Series (1025)(2020)

Fig. 8 Documentos de orientación sobre radiofármacos de organizaciones profesionales (4)

Luego de analizar las tablas anteriores, vemos que tanto EEUU como la Unión Europea estarían moviéndose en una dirección similar enfocándose en los datos preclínicos de seguridad tanto para radiodiagnóstico como para radioterapia. Sin embargo hay una diferencia fundamental, que destacaremos más adelante.

Las guías principales que la FDA publicó son:

**Microdose Radiopharmaceutical (RP) Diagnostic Drugs: Nonclinical Study Recommendations.*

Esta guía da recomendaciones sobre los estudios preclínicos para radiofármacos de diagnóstico dadas sus características únicas que incluyen microdosificación y uso clínico único o poco frecuente. Reduce o elimina los requisitos toxicológicos adicionales y aclara otros requisitos preclínicos para estudios de fase I a III. Además, la guía proporciona recomendaciones para el desarrollo completo de fármacos, es decir, hasta obtener la autorización de comercialización. Promueve también la reducción del uso de animales. Se espera que esta guía reduzca los requisitos sin comprometer la seguridad del paciente.

**Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations.*

Desarrollada especialmente para radiofármacos terapéuticos (por lo tanto incluye a aquellos empleados en terapias dirigidas con radioligandos), abarca la evaluación de toxicidad por la administración sistémica del ligando, la radiotoxicidad y rotulado del producto. Suplementa a la guía también mencionada en la tabla de la Fig.4, "Nonclinical evaluation of late radiation toxicity of therapeutic Rps." Provee un enfoque consistente para la evaluación preclínica y radiomarcación, y reduce ensayos que no son informativos para el uso del producto.

Esta guía amplía las recomendaciones del ICH, al cubrir temas no abordados por el Consejo, tal como estudios preclínicos en apoyo de los primeros ensayos en humanos (FIH).

Algo importante a resaltar luego del análisis de estas guías es que recientemente la FDA ha permitido que los estudios de toxicología sean realizados en laboratorios que no cumplan con BPL, tales como laboratorios de universidades, lo cual reduce los costos de los ensayos preclínicos.

En la Unión Europea, como documentos de orientación más importantes, tenemos:

**Position paper on requirements for toxicological studies in the specific case of radiopharmaceuticals.*

De la EANM, del año 2017, amplía las limitaciones que presentaba para la evaluación de radiofármacos la guía del ICH (M3) existente en ese momento.

**Guideline on the non-clinical requirements for radiopharmaceuticals*

Publicada en el 2018 por la EMA. Cubre a los radiofármacos para terapia y diagnóstico. Proporciona orientación para evaluar la farmacología y la seguridad de la parte fría de un radiofármaco. Aborda la evaluación preclínica y, en particular, los requisitos de las pruebas de toxicidad, como requisito previo para la autorización de un ensayo clínico y finalmente para una autorización comercial. A diferencia de la guías de la FDA, no aborda la toxicidad inducida por radiación, la cual está cubierta por las Directiva 2013/59 de EURATOM, también detallada en la Fig.4.

Observamos que en esencia, ambas regiones abordan los mismos temas en referencia a la evaluación preclínica de los radiofármacos, sin embargo en Europa no se acepta que los estudios de toxicología se realicen en laboratorios que no cumplan con BPL, lo cual representa esa diferencia fundamental que se menciona unos párrafos antes (8).

2.3 ¿Qué son las BPL?

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), fueron introducidas en 1978 después de que la FDA detectase graves deficiencias en los estudios toxicológicos de años anteriores. En ese entonces, no se escatimaban esfuerzos para lograr por todos los medios la autorización de comercialización de un medicamento, a fin de que el largo tiempo de desarrollo y los costos no fueran en vano. El ejemplo de error más conocido en los estudios toxicológicos es el escándalo del Contergan.

Éste era un medicamento particularmente indicado para mujeres en sus primeras semanas de embarazo. El Contergan combatía el malestar o las náuseas matutinas y aplacaba muchas otras molestias. También ayudaba a conciliar el sueño. La farmacéutica alemana Grünenthal lo sacó a la venta en 1957. Sin receta, porque era "tan inocuo como un caramelo". En 1958 se percibió en Alemania un aumento en el número de niños nacidos con graves malformaciones. Una pediatra se percató entonces del efecto nocivo de la talidomida que contenía el medicamento. Grünenthal lo retiró del mercado un año después. Demasiado tarde para 10.000 recién nacidos en todo el mundo. La mitad de ellos eran alemanes. El 40% murió a edades muy tempranas.

Por ese motivo era preciso crear un sistema de control de calidad que se ocupase del proceso organizativo y de las condiciones generales de las pruebas de seguridad preclínicas. Como pruebas preclínicas se entienden todos los ensayos de laboratorio que no se realizan en seres humanos. Particularmente durante el desarrollo de medicamentos, las pruebas ecotoxicológicas, así como los ensayos toxicológicos y farmacológicos deben llevarse a cabo en conformidad con los principios BPL. Las BPL básicamente han de aplicarse cuando debe elaborarse la documentación para la autorización de comercialización.

Las BPL se introdujeron en todo el mundo con el objetivo de garantizar la fiabilidad de los datos y, por supuesto, el reconocimiento internacional de estos.

Como sistema de control de calidad, recoge todas las estructuras organizativas y procesos de análisis y ensayo para la autorización de comercialización de un medicamento. En el ámbito de las BPL resulta especialmente importante la seguridad frente a la manipulación de datos primarios, ya que dicha manipulación favorecería o aceleraría el proceso de autorización de comercialización.

Por este motivo, las BPL no solo regulan los requisitos relativos al personal, los laboratorios y los equipos, sino también las responsabilidades durante y después de la prueba. Se aplica el principio de supervisión múltiple, por lo que son necesarias varias firmas en los documentos de autorización (9).

Las BPL abarcan todos los eslabones de un estudio o investigación, y para ello se precisa que previamente se haya establecido un "Plan de Garantía de la Calidad". Para verificar que el Plan se cumple a lo largo de todo el estudio, se precisa de "un sistema planificado de actividades", cuyo diseño o finalidad es asegurar que el Plan de Garantía se cumple. Para mejorar los procesos de un laboratorio, se formalizan los Manuales de Buenas Prácticas de Laboratorio en los cuales se implementan las normas BPL que constituyen, en esencia, una filosofía de trabajo, en el sistema de organización de todo lo que de alguna forma interviene en la realización de un estudio o procedimiento encaminado a la investigación de todo producto químico o biológico que pueda tener impacto sobre la especie humana. Las normas inciden en cómo debe trabajar a lo largo de todo el estudio, desde su diseño hasta el archivo.

Todas las buenas prácticas de laboratorio contienen dos elementos comunes: procedimientos operativos estándar y una unidad de certeza de calidad.

Los procedimientos operativos estándar brindan descripciones detalladas de las actividades que realiza el laboratorio. Ejemplos de esto son la cadena de custodia, el manejo y la preparación de muestras, el método analítico, el mantenimiento de los instrumentos, el

archivo (conservación de registros) y aspectos similares. Proporcionan procedimientos detallados para el análisis de muestras que deberán seguir los analistas o técnicos. En general, éstos son más detallados que los métodos desarrollados que aparecen en las publicaciones científicas, ya que pueden variar el nivel de entrenamiento y la experiencia de diferentes miembros del personal de laboratorio, aun cuando los químicos analíticos experimentados puedan requerir menos supervisión.

La unidad de certeza de calidad (UCC) por lo general es independiente del laboratorio y responde a la gerencia de la organización a la que está afiliado el laboratorio y será la responsable de que se efectúen los procedimientos de calidad y su evaluación en forma continua con auditorías frecuentes al laboratorio (10).

CAPÍTULO 3: CONTEXTO NACIONAL

3.1 La ANMAT

En la Argentina, el control y fiscalización sobre la sanidad y calidad de las drogas, productos químicos, reactivos, formas farmacéuticas, medicamentos, elementos de diagnóstico, materiales y tecnología biomédicos y todo otro producto de uso y aplicación en la medicina humana, se encuentra bajo la órbita de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

La ANMAT es un organismo descentralizado que se encuentra dentro del ámbito del Ministerio de Salud de la Nación. Es autárquico, con jurisdicción en todo el territorio de la Nación.

Sus principales funciones, establecidas por el decreto 1490/1992, son:

1. El control y fiscalización sobre la sanidad y calidad de las drogas, productos químicos, reactivos, formas farmacéuticas, medicamentos, elementos de diagnóstico, materiales y tecnología biomédicos y todo otro producto de uso y aplicación en la medicina humana.
2. El control y fiscalización sobre la sanidad y calidad de los alimentos acondicionados, incluyendo los insumos específicos, aditivos, colorantes, edulcorantes e ingredientes utilizados en la alimentación humana, como también de los productos de uso doméstico y de los materiales en contacto con los alimentos.
3. El control y fiscalización sobre la sanidad y calidad de los productos de higiene, tocador y cosmética humana y de las drogas y materias primas que los componen.
4. La vigilancia sobre la eficacia y la detección de los efectos adversos que resulten del consumo y utilización de los productos, elementos y materiales comprendidos en los puntos anteriores, como también la referida a la presencia en los mismos de todo tipo de sustancia o residuos, orgánicos e inorgánicos, que puedan afectar la salud de la población.
5. El contralor de las actividades, procesos y tecnologías que se realicen en función del aprovisionamiento, producción, elaboración, fraccionamiento, importación y/o exportación, depósito y comercialización de los productos, substancias, elementos y materiales consumidos o utilizados en la medicina, alimentación y cosmética humanas.
6. La realización de acciones de prevención y protección de la salud de la población, que se encuadren en las materias sometidas a su competencia.

3.2 La ANMAT miembro observador del ICH

En la reunión del ICH que se realizó en Países Bajos en junio de 2019, la ANMAT logró su ingreso como miembro observador. Este ingreso representa una distinción importante, ya que la etapa de "observador" es la preliminar a formar parte del Consejo como "miembro regulatorio" y consolidar así su posición como una de las agencias nacionales de referencia del mundo.

Luego en noviembre de 2019 el ICH se reunió en Singapur y la ANMAT participó, ya como miembro observador. Este hecho junto al proceso de adopción de documentos del Consejo, representa un avance de la ANMAT en los espacios de decisión de la regulación internacional (11).

3.3 Disposiciones de la ANMAT de interés para el desarrollo de radiofármacos

Disposición 2009/07: PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VIVO

Establece las pautas, documentación y requisitos a presentar para solicitar la autorización de los medicamentos destinados a ser administrados a seres humanos con fines diagnósticos o de monitoreo denominados Productos para Diagnóstico de uso in vivo.

En lo que se refiere a radiofármacos, en el punto 2, Requerimientos del Producto, del Anexo 1 de la Disposición, menciona que los productos nuevos son los únicos que requieren ensayos preclínicos y clínicos. Hace referencia también a Radionucleidos Precursores y Generadores de Radionucleidos.


2	REQUERIMIENTOS DEL PRODUCTO
2.1	<p data-bbox="467 300 608 327">GENERALES</p> <ul data-bbox="616 327 1254 990" style="list-style-type: none"> • Nombre comercial del Producto • Nombre Propio o común. • Principio Activo. • Código ATC. • Fórmula Molecular. • Fórmula Estructural de la molécula marcada o de los Precursores de los Radiofármacos • Indicaciones de Uso • Forma farmacéutica. • Forma de Presentación • Concentración y dosis. • Vía de administración. • Envase primario. • Periodo de vida útil. • Condiciones de conservación • Periodo de vida útil del Radiofármaco preparado. • Condiciones de conservación del Radiofármaco preparado. • Contraindicaciones. • Advertencias y precauciones de uso. • Interacciones con otros medicamentos. • Efectos indeseables. • Propiedades farmacológicas • Propiedades farmacocinéticas. • Datos de biodisponibilidad (si correspondiere). • Datos de estudios preclínicos (sólo para productos nuevos) • Datos de estudios clínicos (sólo para productos nuevos) 1 <p data-bbox="467 990 834 1017">Información complementaria según:</p> <p data-bbox="467 1041 885 1068">1) RADIONUCLEIDOS PRECURSORES</p> <ul data-bbox="616 1068 1254 1249" style="list-style-type: none"> • Identificación del radionucleido indicando nombre y símbolo químico • Pureza radioquímica. • Pureza radionucleídica. • Actividad. • Concentración de actividad • Actividad específica. <p data-bbox="467 1274 926 1300">2) GENERADORES DE RADIONUCLEIDOS</p> <ul data-bbox="616 1300 1254 1451" style="list-style-type: none"> • Descripción general del sistema. • Identificación de los Radionucleidos presentes indicando nombre y símbolo químico. • Instrucciones para la elución. • Características de pureza del eluido. • Dosimetría del eluido



Fig .9 Extracto del Anexo 1 de la Disposición 2009/2007

Disposición 3602/18: GUÍA DE BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN PARA ELABORADORES, IMPORTADORES/EXPORTADORES DE MEDICAMENTOS DE USO HUMANO

Esta disposición hace referencia a la fabricación de radiofármacos en el Anexo 19. Menciona que debe cumplirse con las normas de la ARN y que también este anexo se aplica a los radiofármacos utilizados en ensayos clínicos, radiofármacos usados en PET, generadores de radionucleidos y kits fríos.

Se detalla también el requerimiento de BPF (Buenas Prácticas de Fabricación) en la línea de producción. A continuación (Fig. 10) tenemos los extractos de las partes más relevantes de esta Disposición:

GUIA DE BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACION PARA ELABORADORES, IMPORTADORES/EXPORTADORES DE MEDICAMENTOS DE USO HUMANO	
Parte A - Requerimientos Básicos para la Fabricación, Importación/Exportación de Medicamentos	
Parte B - Requisitos Básicos para Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs) usados como Materiales de Partida	
ANEXOS	
ANEXO 1	Fabricación de medicamentos estériles
ANEXO 2	Toma de muestras de material de partida y acondicionamiento
ANEXO 3	Muestras de referencia y Muestras de retención
ANEXO 4	Patrones de referencia -Estándares para ensayos Físico - Químicos
ANEXO 5	Calificación y Validación
ANEXO 6	Sistemas Informáticos
ANEXO 7	Agua para uso farmacéutico
ANEXO 8	Gestión de riesgos para la calidad
ANEXO 9	Sistema de tratamiento de aire para áreas de productos no estériles
ANEXO 10	Uso de radiación ionizante en la fabricación de medicamentos
ANEXO 11	Liberación paramétrica
ANEXO 12	Fabricación de líquidos y semisólidos
ANEXO 13	Fabricación de medicamentos en aerosol presurizado para inhalación
ANEXO 14	Fabricación de gases medicinales
ANEXO 15	Fabricación de medicamentos herbarios
ANEXO 16	Normas para la identificación por colores de envases de drogas de uso anestesiológico y de soluciones parenterales de gran volumen y soluciones electrolíticas de pequeño volumen
ANEXO 17	Fabricación de productos medicinales de origen biológico
ANEXO 18	Fabricación de medicamentos derivados de la Sangre o plasma humanos
ANEXO 19	Fabricación de radiofármacos 

FABRICACION DE RADIOFARMACOS
1. Principio
La producción de radiofármacos debe ser conducida de conformidad con los principios generales de las buenas prácticas de fabricación de medicamentos. El presente Anexo tiene por finalidad abordar los requerimientos y prácticas específicas aplicables a la producción de radiofármacos, y por lo tanto complementa los requerimientos generales de buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
Nota i La preparación de radiofármacos realizada en radiofarmacias hospitalarias utilizando generadores y kits autorizados para su comercialización por la Autoridad Reguladora Nacional de Medicamentos no se encuentra alcanzada por estos requerimientos, excepto que el establecimiento e instalaciones se encuentren habilitada a nivel nacional
Nota ii La producción de radiofármacos debe cumplimentar con las regulaciones de radioprotección 
Nota iii El presente Anexo aplica también a la producción de radiofármacos utilizados en ensayos clínicos 
Nota iv El transporte de radiofármacos debe cumplimentar con la regulación establecida por la Autoridad Reguladora Nuclear de la Republica Argentina y con la correspondiente a requerimientos de radioprotección
Nota v Cuando sean utilizados prácticas o métodos no descriptos en el presente Anexo pero que resulten aceptables y capaces de cumplimentar los requerimientos de Aseguramiento de calidad para radiofármacos, deben ser validados y demostrar nivel de aseguramiento de calidad al menos equivalente a los establecidos en este Anexo.

1. Introducción

1. La fabricación y manipulación de medicamentos radiofarmacéuticos constituyen operaciones que implican riesgos potenciales.

El nivel de riesgo resulta dependiente al tipo de radiación emitida, la energía de la radiación y del periodo de semidesintegración de los isótopos radiactivos utilizados. Por lo expuesto la elaboración de radiofármacos deben contemplar las precauciones relacionadas con la radioprotección, la prevención de contaminación cruzada y diseminación de contaminantes radiactivos y la eliminación de residuos radiactivos, establecidas en reglamentaciones nacionales e internacionales.

1. Debido al corto periodo de vida útil de ciertos radionucleidos, algunos radiofármacos deben ser liberados y administrados al paciente a poco de su elaboración, antes de que completen todos los ensayos de control de calidad. En estos casos, la descripción exacta y detallada del procedimiento total de liberación, incluyendo las responsabilidades del personal involucrado y la evaluación de la efectividad del Sistema de aseguramiento de calidad resulta fundamental.

2. El presente Anexo aplica a los procedimientos de fabricación utilizados por los productores industriales, centros/institutos de Medicina Nuclear y Centros de Tomografía de Emisión de Positrones para la producción y control de calidad de los siguientes tipos de productos:

(a) Radiofármacos listos para su uso incluyendo los radiofármacos para uso en Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) ←

(b) Generadores de radionucleidos ←

(c) Componentes no radiactivos ("kits fríos" o "juegos de reactivos") utilizados en la preparación de compuestos marcados con un componente radiactivo (generalmente el eluido de un generador de radionucleidos) ←

(d) Precursores radiactivos para su uso en radiofármacos o utilizados en la radiomarcación de otras sustancias previo a su administración (por ejemplo, muestras de pacientes)

Tipo de manufactura	No - BPF *	Requerimientos de BPF generales incluyendo los anexos relevantes y el presente anexo			
Radiofármacos listos para su uso incluyendo Radiofármacos para uso en TPE.					
Componentes no radiactivos	Producción realizada en Reactor/ Ciclotrón	Síntesis química	Pasos de purificación	Procesamiento, formulación y envasado	Esterilización, aséptica o esterilización terminal
Precursores radiactivos					
Generadores de radionucleidos	Producción en Reactor/ Ciclotrón		Proceso producto		

* El Sistema de Target y transferencia desde el ciclotrón hasta el módulo de síntesis puede se considera el primer paso de producción del ingrediente farmacéutico activo.

Figs. 10 Extractos del Anexo 19 de la Disposición 3602/18

Disposición 6677/10: RÉGIMEN DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA PARA ESTUDIOS DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA.

En el año 2010 se aprobó esta Disposición teniendo como objetivo sustantivo garantizar y asegurar el máximo cumplimiento de las reglas establecidas, tanto nacionales como internacionales, en materia de normas y valores éticos y jurídicos. Esta disposición, la 6677/10 tiene la siguiente estructura (Tabla 1):

ÍNDICE**SECCIÓN A: GENERALIDADES**

1. Definiciones
2. Objetivos
3. Ámbito de aplicación y alcances
4. Principios generales
5. Incumplimiento

SECCIÓN B: REQUISITOS DE DOCUMENTACIÓN PARA AUTORIZACIÓN DE ESTUDIOS DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA

1. Objetivo
2. Documentación general
3. Monografía del producto en investigación
4. Protocolo
5. Consentimiento informado
6. Cambios al protocolo, consentimiento informado y MPI
7. Reacciones adversas medicamentosas serias e inesperadas
8. Informes del estudio y otras comunicaciones

SECCIÓN C: GUIA DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA PARA ESTUDIOS DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA

1. Objetivo
2. El investigador
3. El patrocinador
4. El comité de ética en investigación

5. El consentimiento informado
6. Protección del participante del estudio
7. Acuerdos y financiamiento
8. Producto en investigación
9. Informes y comunicaciones
10. Cambios durante el estudio
11. Registro de datos clínicos
12. Documentos esenciales del estudio
13. Monitoreo
14. Auditoría
15. Suspensión o cancelación del ensayo

SECCIÓN D: INSPECCIONES DE ESTUDIOS DE FARMACOLOGIA CLINICA

1. Objetivo
2. Alcance y autoridad
3. Proceso de inspección
4. Selección del estudio y el investigador
5. Selección del inspector
6. Preparación de la inspección
7. Anuncio de inspección
8. Conducción de la inspección
9. Procedimientos de revisión de registros
10. Acta de inspección

11. Informe técnico de inspección
12. Resultado de la inspección
SECCIÓN E: GLOSARIO
SECCIÓN F: FORMULARIOS

Tabla 1: Estructura de la Disposición 6677/10

En esta disposición, la información requerida para la evaluación preclínica, está comprendida en los que se denomina: Monografía del Producto de Investigación (MPI), que es uno de los requisitos de la Sección B: "Requisitos de documentación para autorización de estudios de farmacología clínica".

3.3.1 Monografía del producto de Investigación (MPI)

Es la compilación de datos clínicos y no clínicos del producto con todos los requisitos que debe tener la MPI para los estudios de farmacología en Fase I, II, y III.

Debe constar la Información General siguiendo el ordenamiento internacional del producto, información preclínica, que deberá justificar la naturaleza, escala y duración del ensayo, materiales y métodos, plan experimental detallado, animales sustitutos, condiciones experimentales, dosis, frecuencia, administración, duración, condiciones ambientales, etc.

También debe constar los resultados farmacológicos y tóxicos obtenidos de respuesta a la dosis, con análisis estadístico de resultados.

Farmacología preclínica: Define farmacodinamia y farmacocinética.

Toxicología preclínica general: Toxicidad aguda; aparición y tiempo de duración de efectos tóxicos, relación dosis-efecto, reversibilidad. Toxicidad subaguda a dosis repetidas realizadas en animales; Toxicidad crónica a dosis repetidas.

Toxicología preclínica especial: Estudios sobre la fertilidad, embriotoxicidad, teratogenicidad, toxicidad pre y postnatal, carcinogenicidad in vivo e in vitro, estudios de irritación local y sensibilización en animales.

Productos de origen biológico: Vacunas sangre y derivados, alérgenos, terapia génica, proteínas recombinantes y productos de uso animal con actividad terapéutica.

Información Clínica: Requisitos a presentar sobre Información de los efectos conocidos del producto en seres humanos, farmacocinética, biodisponibilidad, bioequivalencia, interacciones, seguridad, farmacodinamia, eficacia y respuesta, reacciones adversas, etc.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se detalla la información preclínica requerida para la MPI, en la Disposición 6677/10:

INFORMACIÓN PRECLÍNICA	
Materiales y métodos	<p>#plan experimental detallado y fundamentado, indicando la BPL a la que se ajusta;</p> <p>#producto empleado indicando origen, composición, número de lote, número de protocolo de control de calidad y fecha de vencimiento.</p> <p># animales o modelos sustitutivos usados indicando número, especie, cepa, sexo, edad, peso.</p> <p># condiciones experimentales indicando dosis, frecuencia, vías de administración, duración, tipo de alimentación y condiciones ambientales.</p>
Resumen de los resultados obtenidos	<p>Debe incluir la naturaleza, momento de aparición, frecuencia, intensidad, reversibilidad y duración de los efectos farmacológicos y tóxicos y de la respuesta a la dosis, y el análisis estadístico de los resultados.</p>
Discusión de los hallazgos más importantes y las conclusiones	<p>Debe incluir la respuesta a la dosis de los efectos observados, la relevancia para los seres humanos y todo otro aspecto que se estudiará en seres humanos. Si corresponde, se deberán comparar los hallazgos de las dosis efectiva y no tóxica (índice terapéutico) en la misma especie animal y su relación para la dosis humana propuesta.</p>
Farmacología preclínica	<p># Farmacodinamia: se deberá demostrar la actividad terapéutica potencial y describir los mecanismos de acción posibles del producto y/o de sus metabolitos, incluyendo la evaluación de otras acciones farmacológicas diferentes a los efectos terapéuticos buscados.</p> <p>#Farmacodinamia especial: efectos farmacodinámicos según las indicaciones propuestas, curvas dosis/efecto y tiempo/efecto.</p> <p># Farmacodinamia general: estudios sobre sistemas cardiovascular, respiratorio, nervioso central, nervioso vegetativo, neuromuscular, urinario, endocrino, digestivo, etc.</p> <p>#Interacciones farmacodinámicas: estudios que determinen este tipo de relaciones.</p> <p># Mecanismos de acción: descripción de los mecanismos observados.</p> <p>#Farmacocinética: determinación de la velocidad y magnitud de absorción, el modelo de distribución, biotransformación, velocidad y vías de eliminación y localización del IFA en los tejidos. Los estudios incluyen: farmacocinética a dosis única y dosis repetida, distribución en animales normales y gestantes, biotransformación, excreción e interacciones cinéticas.</p>
Toxicología preclínica general	<p>#Toxicidad aguda: estos estudios deben haberse realizado en tres especies, de las cuales una deberá ser no roedora, y haberse probado por lo menos dos vías de administración, una de ellas</p>

	<p>relacionada con la propuesta para el uso humano y la otra debe asegurar la absorción del fármaco. Para un uso humano previsto en una sola dosis, se debe haber utilizado por al menos dos semanas en el ensayo preclínico. El informe debe consignar:</p> <ul style="list-style-type: none"> -tiempo de aparición y duración de efectos tóxicos, relación dosis-efecto y reversibilidad, y diferencias entre las vías de administración (uso terapéutico propuesto y prueba de absorción); -síntomas de toxicidad y causas de muerte; -parámetros bioquímicos y hematológicos; -observaciones clínicas y anatomopatológicas; -dosis tóxica estimada. <p>#Toxicidad subaguda a dosis repetida: estos estudios deben realizarse en al menos dos especies, una de las cuales debe ser no roedora, con una duración de 12 a 24 semanas para un uso humano propuesto de hasta 4 semanas, según la naturaleza del producto, uso terapéutico propuesto y especie animal utilizada. La vía de administración debe ser la misma que la que se propone en el uso clínico. Se deben utilizar por lo menos tres dosis, la mayor de las cuales debe producir efectos tóxicos demostrables y la menor ser equivalente a la dosis terapéutica propuesta, según la sensibilidad de la especie utilizada. Deberá consignarse:</p> <ul style="list-style-type: none"> -tiempo de aparición y duración de efectos tóxicos, relación dosis-efecto y reversibilidad, y diferencias relacionadas con el sexo y la especie; -morbilidad y mortalidad; -parámetros bioquímicos, hematológicos y nutricionales; -observaciones clínicas y anatomopatológicas; -dosis de no efecto tóxico y dosis tóxica; -órganos blanco. <p>#Toxicidad crónica a dosis repetida: estos estudios deben realizarse en dos especies, una de las cuales debe ser no roedora, con una duración mayor a 24 semanas, según la naturaleza del producto, uso terapéutico propuesto y especie animal utilizada. La vía de administración deberá ser la misma que la propuesta en el uso clínico y se deben usar por lo menos tres dosis, la mayor de las cuales debe producir efectos tóxicos demostrables y la menor ser equivalente a la dosis terapéutica propuesta para el uso humano, según la sensibilidad de la especie usada. La información debe consignar los mismos requisitos aplicables a la toxicidad subaguda.</p>
<p>Toxicidad preclínica especial</p>	<p>#Efectos sobre la fertilidad: deben ser determinados antes de iniciar la Fase III.</p> <p>#Embriotoxicidad, teratogenicidad y toxicidad pre y postnatal: estos estudios deben ser realizados en no menos de dos especies, una de ellas no roedora, y con al menos tres dosis, la mayor de las cuales deberá ser subtóxica.</p> <p># Actividad mutagénica in vivo e in vitro, con y sin activación</p>

	<p>metabólica. Los resultados de ensayos in vitro deberán estar disponibles antes de la primera exposición en humanos. La batería de pruebas estándares deberán estar disponibles antes de los estudios de Fase II.</p> <p>#Carcinogenicidad in vivo e in vitro.</p> <p>#Otros estudios: cuando sea solicitado, se presentarán resultados de irritación local y de sensibilización en animales u otros estudios según la naturaleza del producto.</p>
--	---

Tabla 2: Información preclínica del MPI

Como se observa en el inicio de la tabla anterior y en la Sección A, punto 4.4, esta Disposición expresa que los estudios preclínicos deben realizarse según las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), tal como se exige en la Unión Europea.

Podemos decir entonces que tampoco en Argentina el marco regulatorio es claro o específico. Se establece que debe tenerse en cuenta la normativa de la ARN respecto a la radioprotección, y no se tienen en cuenta las características particulares de los radiofármacos terapéuticos.

3.4 Planteo de problema y estrategia propuesta

No habiendo una disposición especial en nuestro país para la evaluación preclínica de los radiofármacos terapéuticos, debemos cumplir con las Disposiciones nacionales descritas en el capítulo anterior para el desarrollo de nuevos productos radiofarmacéuticos, vinculados a la terapia dirigida con radioligandos. Esta situación genera que la compilación de los datos preclínicos pueda ser insuficiente (ya que no contempla la radiotoxicidad por ejemplo) irrelevante (como la evaluación de toxicidad especial) o redundante.

Sin embargo, el requerimiento por parte de la ANMAT de que los estudios preclínicos toxicológicos se realicen según las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) representa un gran problema dado que para la CNEA no es posible actualmente realizar los ensayos relacionados a la radiotoxicidad bajo BPL.

Por otra parte, no existen en Argentina laboratorios que puedan realizar estos ensayos bajo BPL, aunque sí se pueden llevar a cabo estos ensayos en laboratorios bajo un sistema de calidad interno para garantizar la trazabilidad de los resultados.

Para llegar a una solución, vamos a destacar los siguientes puntos:

***Tal como mencionamos en el Capítulo 2, en EEUU la FDA ha permitido recientemente que estos ensayos sean realizados en laboratorios sin certificado de BPL.**

***La guía "Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations" es la más adecuada para aplicar en el desarrollo de radiofármacos para RLT y además amplía lo postulado por el ICH.**

***ANMAT es miembro observador de ICH y está en pleno proceso de adopción de documentos.**

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se propone como estrategia la implementación de un Programa de Evaluación Preclínica Coordinado para la evaluación preclínica de radiofármacos para terapia con radioligandos basado en la adaptación de la guía mencionada al contexto Argentina-CNEA.

Se describirán a continuación la guía elegida y sus principales requisitos.

CAPÍTULO 4: GUÍA “ONCOLOGY THERAPEUTIC RADIOPHARMACEUTICALS: NONCLINICAL STUDIES AND LABELING RECOMMENDATIONS”

4.1 Descripción

En agosto de 2019 la División de Hematología, Oncología y Toxicología del Centro de Evaluación e Investigación de Drogas (CDER) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos publicó una guía para la industria especialmente para radiofármacos terapéuticos para tratamiento de cáncer.

En esta guía, la FDA define radiofármaco terapéutico para oncología a los productos que contienen un radionucleído y son usados para el tratamiento del cáncer o para aliviar los síntomas relacionados.

La guía provee información para asistir a los patrocinadores en el diseño de un programa preclínico apropiado, con un enfoque consistente, antes de iniciar las pruebas en humanos (FIH) y continuar luego con la aprobación del producto. Amplía de este modo lo postulado por el ICH, que no aborda los estudios preclínicos en apoyo a los ensayos FIH.

Habla también sobre la evaluación de las toxicidades por la administración sistémica del ligando, la radiotoxicidad y ciertas recomendaciones de rotulado. Incluye la discusión sobre la duración de la anticoncepción para minimizar el riesgo potencial para un embrión/feto en desarrollo y recomendaciones para mujeres lactantes para minimizar el riesgo potencial en el bebé.

Proporciona además una aclaración adicional de las recomendaciones hechas en la guía: “Nonclinical Evaluation of Late Radiation Toxicity of Therapeutic Radiopharmaceuticals” para el diseño de los estudios tardíos de toxicidad de la radiación.

La guía reduce la realización de estudios preclínicos que no son informativos para el uso del producto.

Algo a destacar también es su apoyo al principio de las 3R: reducir, refinar y reemplazar el uso de animales cuando sea posible (7).

4.2 Estructura de la guía

Su estructura es la siguiente (Tabla 3):

INTRODUCCIÓN
ANTECEDENTES
FARMACOLOGÍA Farmacología primaria Farmacología de seguridad
BIODISTRIBUCIÓN ANIMAL Y DOSIMETRÍA

TOXICOLOGÍA Toxicología general Genotoxicidad, toxicología reproductiva y estudios de carcinogenicidad
SELECCIÓN DE LA DOSIS FIH
RECOMENDACIONES DE ROTULADO
GLOSARIO
REFERENCIAS

Tabla 3. Estructura de la guía "ONCOLOGY THERAPEUTIC RADIOPHARMACEUTICALS: NONCLINICAL STUDIES AND LABELING RECOMMENDATIONS"

4.3 Principales requisitos de la guía

Farmacología

Farmacología primaria:

El patrocinador debe realizar estudios de prueba de concepto antes de iniciar un estudio FIH para demostrar captación por el tumor y actividad antitumoral. La caracterización preliminar del mecanismo de acción puede ser a través de estudios *in vitro* (como la unión al blanco molecular y la actividad antitumoral) y en animales y debe incluir criterios de valoración apropiados. Estos estudios pueden informar la selección de especies para estudios de biodistribución y toxicología. Cuando sea necesario, los estudios de farmacología también podrían usarse para determinar la dosis de radiación máxima tolerada en animales.

Farmacología de seguridad:

No están justificados estudios independientes para evaluar el efecto del fármaco en las funciones de los órganos vitales (sistema cardiovascular, respiratorio y nervioso central) para iniciar estudios en pacientes con cáncer o para su aprobación.

Esta evaluación se puede incorporar en el diseño de estudios de toxicología y/o biodistribución en animales. Las observaciones clínicas detalladas después de la dosificación en roedores y no roedores, y las mediciones electrocardiográficas apropiadas en no roedores, generalmente se consideran evaluaciones de seguridad suficientes. Además, los resultados de ensayos de biodistribución pueden proporcionar más evidencia del potencial de efectos adversos en estos órganos.

Biodistribución y dosimetría animal

El patrocinador debe realizar un estudio de biodistribución y dosimetría en animales para guiar la selección de dosis para el estudio de biodistribución y dosimetría en humanos (normalmente una dosis única del radiofármaco o su par teragnóstico en pacientes). Una sola especie animal, que esté científicamente justificada, suele ser suficiente. Se debe considerar toda la información relevante para la selección de las especies animales, incluidos los datos farmacológicos y la reactividad tisular cruzada para productos

biológicos, según corresponda, para comparar la distribución en tejidos animales y humanos.

El patrocinador debe evaluar la actividad en los órganos durante un tiempo posterior a la administración, por ejemplo, 5 vidas medias. Se podrán generar así curvas de tiempo vs actividad integrada, también denominada actividad acumulada. El intervalo de muestreo debe justificarse científicamente y deben recopilarse los parámetros farmacocinéticos

El patrocinador debe considerar el decaimiento de la hija y sus vidas medias al diseñar el estudio de biodistribución animal. La duración de la recopilación de datos se puede ajustar según sea necesario.

El diseño de un estudio de biodistribución animal debe incorporar aspectos de la dosimetría y biodistribución clínica planificada que puedan afectar la distribución del producto. Por ejemplo, si el estudio clínico planificado incluye pacientes que reciben tratamiento previo con agentes protectores de la tiroides para reducir la absorción de yodo radiactivo por esta glándula, entonces se debe considerar esto mismo en el estudio de biodistribución animal. Además, debido a que la cantidad de radioisótopo y moléculas frías en la mezcla de dosificación puede afectar la biodistribución, la proporción utilizada en estudios con animales debe ser comparable a la propuesta en pacientes o estar justificada.

Los órganos evaluados para la distribución de la actividad integrada en el tiempo generalmente incluyen las glándulas suprarrenales, los huesos, la médula ósea, el cerebro, intestino delgado y grueso, el estómago, el corazón, los riñones, el hígado, los pulmones, los músculos, los ovarios, el páncreas, el bazo, los testículos, el timo y la tiroides, vejiga, útero y cuerpo entero. Se pueden incluir órganos adicionales según corresponda en función de la distribución potencial del radiofármaco en particular (por ejemplo: ojos y piel para los compuestos que se unen a la melanina). Se deben recopilar datos de excreción en orina y heces. El número de órganos evaluados puede abreviarse si se justifica adecuadamente, pero deben estar incluidos la médula ósea y los órganos de excreción, como los riñones y el hígado, porque estos órganos generalmente se ven afectados, independientemente de la unión al receptor.

Deben incluirse tanto animales machos como hembras en el ensayo para la absorción del radiofármaco por órganos específicos masculinos y femeninos, a menos que la indicación sea específica del sexo.

La biodistribución y la dosimetría en animales grandes (por ejemplo, monos) generalmente se realiza con técnicas de imagen; por lo tanto, una pequeña cantidad de animales (tres machos y tres hembras) puede ser suficiente para evaluar los niveles de actividad y la distribución a lo largo del tiempo. Para animales pequeños, como ratones y ratas, debe haber una cantidad suficiente de animales por punto de tiempo cuando se utiliza un método que requiere el sacrificio de animales, como en la autorradiografía.

La curva de tiempo vs actividad en órganos de animales se puede utilizar para estimar el porcentaje administrado de actividad (%ID), tiempo de residencia y actividad integrada en el tiempo en órganos humanos.

Para extrapolaciones de animal a humano; se pueden usar otros métodos que deben describirse. Los valores humanos estimados deben utilizarse para generar las dosis absorbidas en los órganos humanos, mediante cálculos matemáticos o software adecuado. El patrocinador debe describir la metodología de dosimetría y software asociado, incluida la identificación de la versión, en el IND (investigational new drug).

Toxicología

Toxicología general

1. Estudios de toxicología para apoyar la fase terapéutica de FIH

El patrocinador debe evaluar las toxicidades relacionadas con el radioisótopo y los ligandos. Dichas evaluaciones pueden ser a través de estudios de toxicología o estudios de biodistribución, según corresponda. En general, no se justifican estudios de toxicidad antes de un estudio FIH cuando el radiofármaco es un radionucleido puro (es decir, no contiene ligando). Las toxicidades del radiofármaco provienen de la descomposición del radionúclido; por lo tanto, los resultados del estudio de biodistribución en animales con criterios de valoración de seguridad adicionales se pueden utilizar para determinar las toxicidades a corto plazo relacionadas con la radiación. A continuación se presentan recomendaciones para la evaluación de la seguridad relacionada con el radioisótopo y los ligandos.

- Evaluación de la toxicidad inducida por la radiación: El estudio de biodistribución animal, junto con el conocimiento general de las toxicidades inducidas por radiación en órganos específicos, es por lo general suficiente para abordar las toxicidades por la radiación. Artículos publicados sobre toxicidades inducidas en órganos específicos, deben incluirse en la presentación.

- Evaluación de la toxicidad inducida por el ligando: para identificar cualquier toxicidad relacionada con los ligandos, el patrocinador debe realizar un estudio de toxicología general con el medicamento frío en especies relevantes antes de iniciar un estudio FIH. Las toxicidades relacionadas con ligandos han sido observadas, pero por lo general son menores en comparación con las toxicidades inducidas por la radiación; por lo tanto, un estudio en una sola especie generalmente se considera suficiente. Salvo que se justifique lo contrario, las especies seleccionadas para el estudio de toxicología deben ser las mismas que las utilizadas para el estudio de biodistribución y dosimetría de animales.

2. Evaluaciones de toxicidad a largo plazo para respaldar la comercialización

En general, los datos pre clínicos generados para respaldar el estudio FIH y los datos clínicos de la fase I deben ser suficientes para pasar a la fase II. El patrocinador debe realizar estudios de evaluación de toxicidad a largo plazo y debe presentar los resultados con la solicitud de comercialización. Estos estudios deben evaluar las toxicidades relacionadas con los ligandos y la radiación. El período de dosificación en animales puede seguir ICH S9. Para la mayoría de los productos farmacéuticos destinados al tratamiento de pacientes con cáncer avanzado, los estudios preclínicos de 3 meses de duración se consideran suficientes para respaldar la comercialización.

A continuación se presentan recomendaciones para el diseño del estudio y las circunstancias en las que los estudios pueden no ser necesarios.

- Evaluación de la toxicidad inducida por ligandos: estudios de toxicidad crónica del medicamento frío pueden no ser necesario en varias circunstancias: cuando un número limitado de dosis se administran a los pacientes (por ej., dos o tres dosis), cuando el ligando es para solo con fines de "entrega" y la administración resultará en una pequeña dosis (microgramos), o cuando el fármaco frío tiene una vida media corta y la frecuencia de dosificación es baja (por ej., cada 4 a 8 semanas).

Cuando se necesite un estudio crónico (es decir, de 3 meses), el estudio en una sola especie generalmente se considera suficiente. Este estudio se puede combinar con el estudio de toxicidad de radiación tardía.

- Evaluación tardía de la toxicidad por la radiación: se justifica una evaluación tardía de la toxicidad por la radiación cuando los pacientes tienen una esperanza de vida larga que podría verse afectada por efectos adversos de la radiación. La evaluación podría basarse en un resumen integrado que tenga en cuenta la distribución de la radiación (de biodistribución animal y estudios de dosimetría humana) y publicaciones que describan los efectos tardíos de la radiación.

Alternativamente, se puede realizar un estudio con animales. El estudio en una sola especie es generalmente considerado suficiente.

Estudios de genotoxicidad, toxicología reproductiva y carcinogenicidad

No se justifica ningún estudio de carcinogenicidad, toxicidad genética o reproductiva con el radiofármaco o el fármaco frío durante el desarrollo para su aprobación, ya que las radiaciones alfa, beta y gamma causan daño en el ADN y son inherentemente genotóxicas y carcinogénicas. Daña las células germinales masculinas y femeninas y a un feto en desarrollo. Estos riesgos deben comunicarse en el etiquetado del producto.

CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE RADIOFÁRMACOS

Luego de algunas ideas generales con respecto a la evaluación preclínica de los radiofármacos se expondrán ejemplos de ensayos que cumplen con los requisitos de la guía en cuanto a farmacocinética y farmacología.

5.1 Consideraciones generales sobre aspectos preclínicos.

Para un radiofármaco dado, las características físicas del radionucleido (tipo de emisión, energía, vida media, etc) definen su potencial aplicación diagnóstica, terapéutica o terapéutica, mientras que el comportamiento químico y/o biológico de la molécula transportadora (ligando), determina su afinidad, selectividad y generalmente su perfil farmacológico en una determinada aplicación.

Iones inorgánicos, pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, proteínas e incluso partículas y polímeros pueden servir como portadores de radionucleidos en radiofármacos. Como con cualquier otro fármaco, las alteraciones realizadas en la molécula transportadora pueden afectar parámetros como la unión al receptor, distribución o metabolismo, que son factores importantes para el éxito de un radiofármaco y su uso previsto. Idealmente, lo que se espera es que el radiofármaco se acumule en la zona deseada y posea baja probabilidad de unión a cualquier otro tejido.

La evaluación preclínica in vitro de un nuevo radiofármaco, se lleva a cabo para determinar si el producto en desarrollo cumple con los requisitos para una traslación clínica posterior.

Al igual que otros productos farmacéuticos, los radiofármacos terapéuticos deben evaluarse de forma preclínica tanto con pruebas in vitro como con estudios en animales para recopilar datos suficientes sobre el comportamiento potencial del producto en pacientes humanos con respecto a la seguridad y la eficacia. Al igual que con los radiofármacos de diagnóstico, la farmacología, la toxicología y la dosimetría deben evaluarse en una serie de ensayos controlados (12).

La figura 11 muestra el proceso típico de evaluación preclínica de distintos radioligandos candidatos a una traslación clínica.

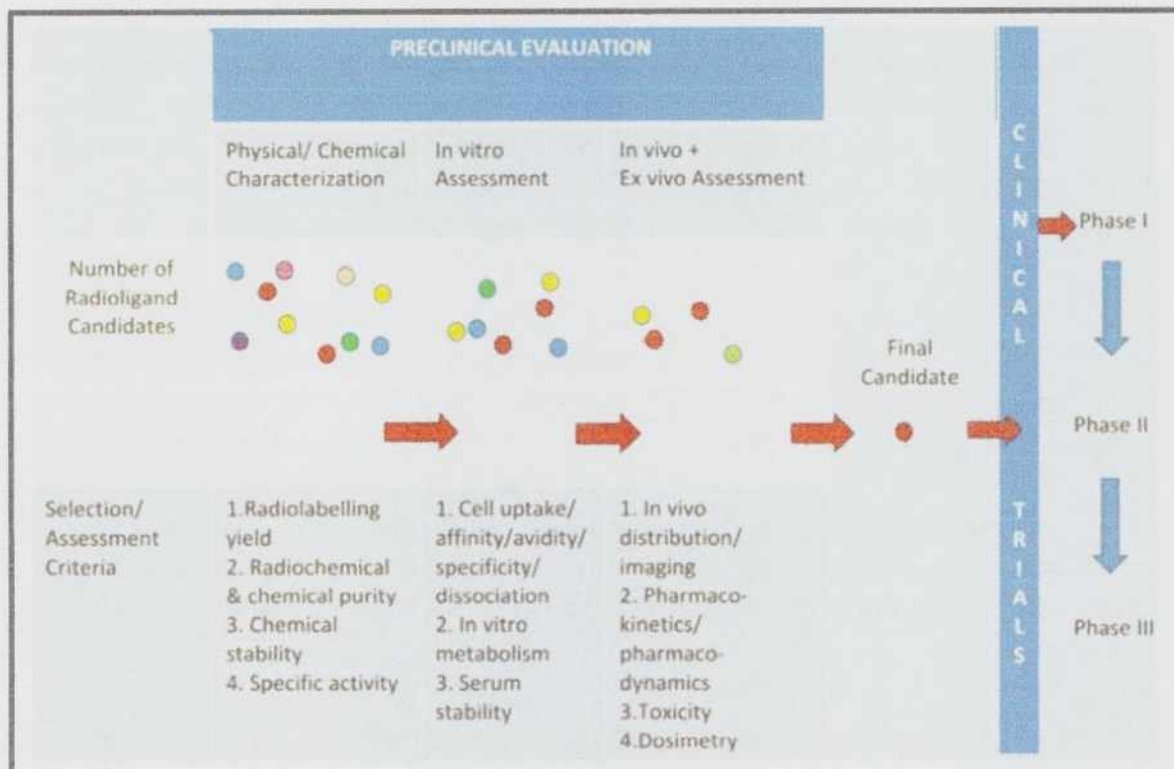


Fig.11: Proceso de selección de radioligandos luego de la evaluación preclínica (12)

Con respecto a la farmacología preclínica, esta tiene que proporcionar información sobre la farmacocinética del radiofármaco. Esto debería incluir pruebas in vitro de estabilidad y otros parámetros, como la lipofilicidad o la unión a proteínas, pero principalmente estudios in vivo en animales sanos y modelos de enfermedades. Estos datos deben complementarse con información sobre la interacción con el blanco molecular, generalmente estudios in vitro sobre afinidad de unión, perfil funcional (agonista o antagonista) y, si es relevante, la especificidad y los efectos fuera del blanco (13).

En primer lugar, se debe evaluar la farmacología in vitro. Estos ensayos implican la evaluación de los parámetros de lipofilicidad (Log D), perfil de unión a proteínas del suero humano y estabilidad in vitro.

A continuación, se debe demostrar que el radiofármaco se acumula en el tumor donde se encuentra el receptor de interés y que los niveles de actividad en esa región son congruentes con la expresión del receptor. Inicialmente, esto se puede evaluar en modelos biológicos in vitro en líneas celulares que sobreexpresan el receptor de interés.

Algunos de los estudios que permiten evaluar estos parámetros son los estudios de internalización, competencia (IC50) y saturación (Kd) y son imprescindibles para radiofármacos que actúan a través de un receptor específico, como es el caso de los radiofármacos para RLT.

Se necesitan estudios de radiometabolismo para determinar en qué medida los metabolitos interfieren con el diagnóstico o la terapia en términos de disminuir la señal del blanco

molecular o aumentar la carga de radiación al tejido sano. Idealmente, los estudios de metabolitos se llevan a cabo tanto en plasma in vitro como in vivo, y podrían incluir estudios in vitro en hepatocitos humanos aislados. Estos últimos permiten determinar tempranamente si existen diferencias en cuanto al metabolismo entre el modelo preclínico y clínico. Los estudios de biodistribución en animales normales son importantes para determinar la distribución en los órganos y la dosimetría. Se pueden realizar a través de imágenes o ensayos ex vivo.

Lo que hace que la evaluación preclínica de productos farmacéuticos terapéuticos sea única es el hecho de que la biodistribución y la dosimetría juegan un papel mucho más importante, ya que estos resultados pueden usarse para evaluar la toxicidad inducida por radiación, a menudo la única toxicidad causada por esta clase de agentes y, al mismo tiempo, dar información sobre la eficacia cuando se realizan estudios de escalada de dosis. Por lo tanto, los estudios de biodistribución y dosimetría deben diseñarse y ejecutarse rigurosamente para imitar el uso previsto del radioligando en la clínica tanto como sea posible (12).

También es importante para los estudios preclínicos minimizar la cantidad de precursor administrado in vivo, ya que el precursor puede tener un perfil de biodistribución similar y puede bloquear al receptor. Los precursores suelen separarse del radiofármaco mediante métodos cromatográficos o de extracción, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la extracción en fase sólida. Sin embargo, en algunos casos la separación del precursor es difícil. En esos casos, la AE del radiofármaco es crítica para establecer un perfil de captación adecuado.

Es importante remarcar que la actividad específica del radiofármaco (AE) puede influir en la biodistribución y en ensayos en líneas celulares del radiofármaco. En general, se requieren candidatos con alta AE para evitar efectos de autobloqueo y aumentar la captación específica mediada por el receptor. La AE del radiofármaco también influye sobre los parámetros de radiotoxicidad y eficacia terapéutica, por lo que se debe tener en cuenta en el diseño de ensayo. Es debido a esta razón que se debe tener en cuenta como primera etapa la optimización de la marcación para lograr la AE requerida para la terapia en pacientes y realizar la evaluación preclínica con esta.

A continuación, se debe desarrollar la formulación farmacéutica final, ajustándose a las BPF. Se debe generar la información respecto a la calidad del producto, validando la metodología analítica utilizada.

En el caso específico de los radiofármacos teragnósticos, se deben considerar además los datos de eficacia terapéutica en modelos animales (12).

Asimismo, se debe complementar la información respecto a la toxicidad de la molécula transportadora "fría" (ensayos LD50, NOAEL).

En la siguiente figura (Fig. 12) veremos un ejemplo de la información preclínica requerida para la traslación de un radiofármaco:

Data	Purpose
Pharmacology	In vitro binding affinity
	Internalization rate
Pharmacokinetics	In vitro stability, protein binding, lipophilicity
	In vivo biodistribution/ imaging
Toxicity	Dosimetry study (biodistribution)
	Acute toxicity
	Extended single dose toxicity

Fig.12 Información preclínica requerida para un radiofármaco (13)

5.2 Ensayos *in vitro* para determinar la Farmacocinética y la Farmacología

5.2.1 Ensayos para Farmacocinética

- *Lipofilicidad*

La lipofilicidad es un parámetro clave para la farmacocinética de un producto farmacéutico ya que determina la permeabilidad a través de las membranas. Además, es una característica esencial que permite penetrar la barrera hematoencefálica y aumentar la unión a proteínas después de la administración sistémica, prolongando así la circulación y reduciendo la tasa de eliminación y muchos más efectos.

La lipofilicidad se caracteriza típicamente a través de la distribución en una fase acuosa y una fase lipídica inmisible (solventes no polares como el n-octanol). Suele definirse como el coeficiente de partición entre estas 2 fases, expresado como el logaritmo del cociente de la concentración en la fase no polar (normalmente n-Octanol) sobre la concentración en la fase acuosa.

Un valor negativo indica propiedades hidrofílicas, mientras que valores positivos un carácter lipofílico. Este coeficiente de partición ($\log P$) es válido para un solo compuesto y puede usarse para compuestos no ionizables. Si los compuestos son ionizables, se formarán diferentes especies dependiendo del pH de la solución utilizada. En este caso, se usa el término coeficiente de distribución, $\log D$, y resume la distribución de todas las formas del compuesto (ionizado y no ionizado), por lo tanto, siempre debe definirse dentro de la combinación de un valor de pH particular (generalmente se usa 7.4 para representar

condiciones fisiológicas). Muchos radiofármacos son compuestos ionizables (complejos, péptidos, etc.), por lo que en la mayoría de los casos se determinan valores de log D.

La determinación de los valores Log D (o log P) para los radiofármacos es bastante fácil de realizar, ya que la medición de la radiactividad permite una medición directa de la distribución de un compuesto (Ver Fig.13). Esto se logra mediante la adición a una muestra de una mezcla de agua (o generalmente una solución buffer) y n-octanol, luego se mezclan las fases, seguido de su separación, por ejemplo, por centrifugación y se toma una alícuota de cada fase, para determinar la actividad generalmente en un contador gamma. La relación logarítmica de la fase de n-octanol sobre la fase acuosa dará como resultado el valor log D o log P respectivo.

Se debe tener cuidado con la pureza de la muestra de radiofármaco utilizada en tales experimentos, ya que en particular para los compuestos lipofílicos, las impurezas hidrofílicas darán resultados erróneos, incluso si está presente en pequeñas cantidades.

A pesar de la simplicidad de este ensayo, se ha cuestionado el valor de log P o log D para predecir claramente ciertas características *in vivo*, en particular para aplicaciones en el sistema nervioso central. Aún así, proporciona una primera caracterización de un radiofármaco y se obtiene información valiosa especialmente cuando se comparan compuestos estructuralmente similares en el proceso de desarrollo del fármaco.

Métodos diferentes, como el análisis con HPLC, pueden agregar información adicional o alternativa.

No hay valores de log P o log D "ideales", pero por lo general se busca una alta hidrofilia para los radiofármacos que se dirigen a receptores extracelulares en la periferia, como péptidos, mientras que para receptores intracelulares o en el sistema nervioso central que requiere el paso a través de la barrera hematoencefálica, se necesita lipofilidad, a menos que estén involucrados mecanismos de transporte específicos.

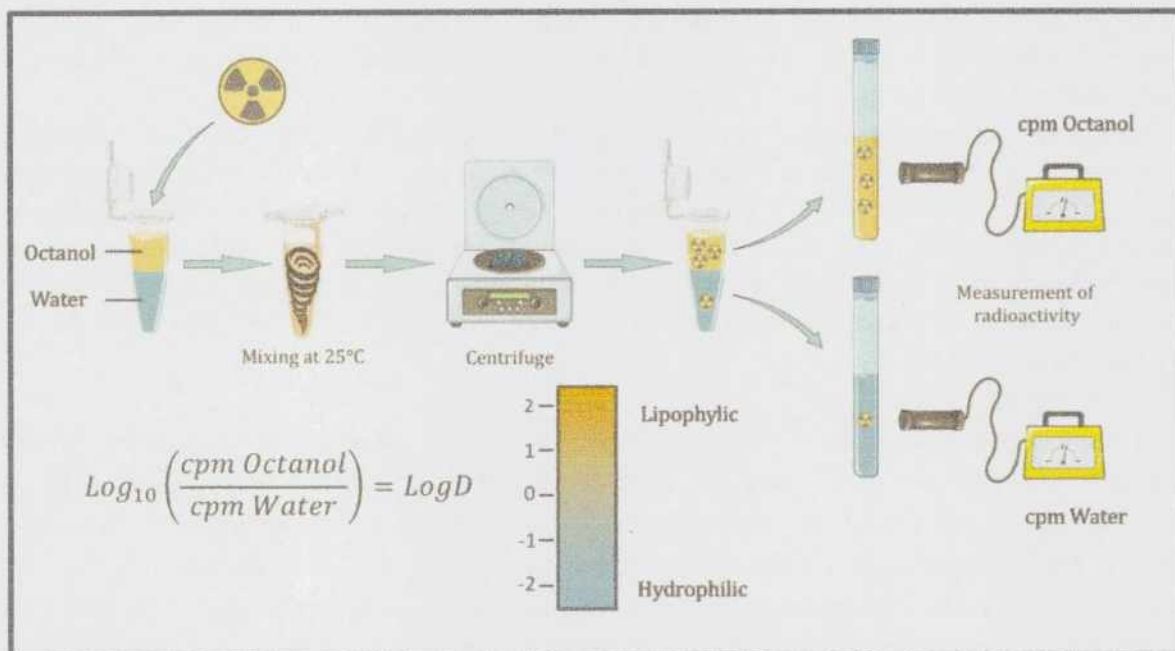


Fig. 13 Determinación de la lipofilicidad (14)

- *Unión a proteínas*

En circulación, el radiofármaco puede unirse a las proteínas del plasma, normalmente de forma reversible. La albúmina sérica humana es la principal responsable de esta unión, posee sitios de unión hidrófobos que pueden unirse en particular a componentes lipófilos con una afinidad parcialmente alta. Este proceso también permite el transporte de componentes que de otro modo no serían solubles en la circulación.

Los componentes unidos a proteínas no pueden excretarse ni metabolizarse por los riñones y tampoco pueden difundirse en los tejidos a menos que se liberen. Por lo tanto, esto conduce a cambios considerables en la farmacocinética con vidas medias biológicas prolongadas (debido a la circulación prolongada y eliminación reducida), pero también interfiere en la interacción con los receptores, ya que solo los compuestos libres pueden interactuar con ellos.

Este efecto se ha aplicado recientemente para alterar la farmacocinética, especialmente para los radiofármacos terapéuticos, para lograr dosis de radiación más altas debido a una farmacocinética más lenta al introducir deliberadamente los llamados aglutinantes de albúmina en la molécula, por ejemplo, en el caso de los ligandos de PSMA.

La unión a proteínas también puede ser indicativa de la inestabilidad in vivo de un radiofármaco, especialmente en el caso de los radiometales. Algunos de ellos se unen parcialmente a las proteínas plasmáticas en su forma libre (por ej., galio-68) así como también, algunos agentes complejantes muestran una alta variabilidad para unirse a las proteínas plasmáticas.

Debido a todos estos efectos, la unión a proteínas plasmáticas es un factor importante que influye en la farmacocinética de los radiofármacos, pero también desempeña un papel en la interacción con los receptores.

Los ensayos para determinar la unión a proteínas se pueden realizar con relativa facilidad incubando al radiofármaco en plasma humano o (si no está disponible) de roedores, generalmente a 37 °C, seguido de la separación de la fracción libre y la unida a proteínas, que luego se puede medir en un contador gamma. La separación de las dos fracciones se puede lograr mediante la precipitación de la proteína en ácido (ácido tricloroacético o ácido trifluoroacético), o en solventes orgánicos (metanol, acetonitrilo), seguida de centrifugación y separación. Ver Fig.14.

Se debe tener cuidado para evitar la coprecipitación del radiofármaco o la alteración del mismo, por ejemplo, en el caso de radioligandos sensibles al pH. Como alternativa, se puede usar la cromatografía de exclusión por tamaño, generalmente usando columnas llenas de gel Sephadex, en las que los componentes de alto peso molecular (proteínas como la albúmina) eluirán con volúmenes más pequeños de solvente que los compuestos de bajo peso molecular (ligando libre). No todos los métodos son adecuados para todos los radiofármacos y se requiere una cuidadosa validación del procedimiento para garantizar resultados fiables.

Para muchos radiofármacos, se considera ventajoso un bajo nivel de unión a proteínas, lo que garantiza una rápida distribución y eliminación del trazador no unido. Sin embargo, en ciertos casos puede ser preferible una mayor unión a proteínas, especialmente cuando la unión específica al receptor es lenta y el radiofármaco se excreta con demasiada rapidez. Por lo tanto, las propiedades óptimas deben ser consideradas en cada caso particular.

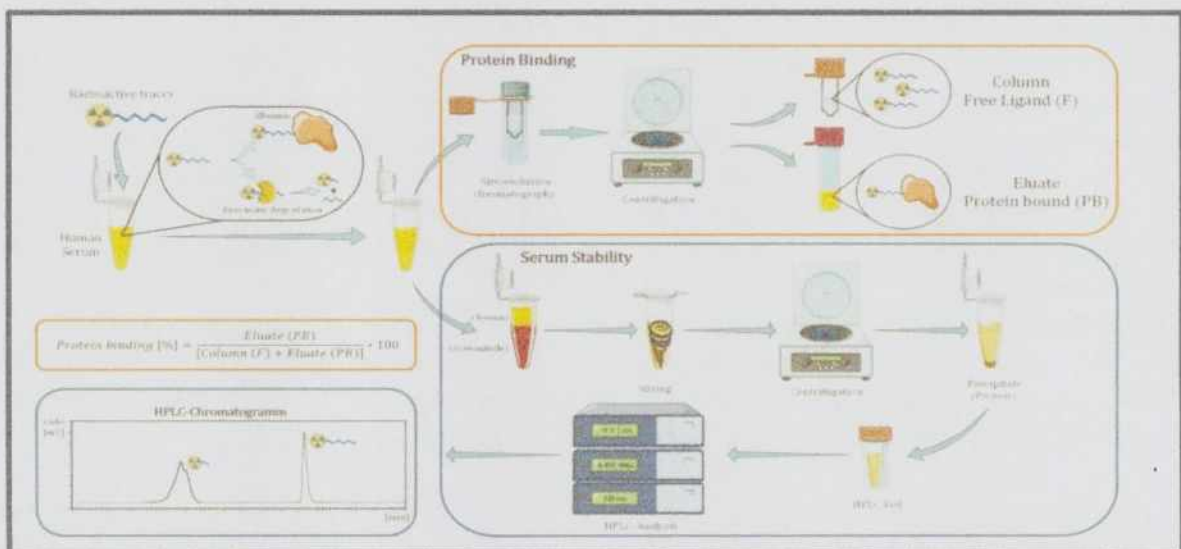


Fig. 14 Esquema experimental para la determinación de la unión a proteínas y estabilidad (14)

- *Estabilidad metabólica*

Un factor importante es la estabilidad de un radiofármaco después de su administración (estabilidad in vivo). La inestabilidad puede estar relacionada con la liberación del radionucleido o con la degradación de la propia molécula radiomarcada. La degradación suele estar relacionada con el metabolismo de los radiofármacos ya en la sangre, pero también en los tejidos, en particular el hígado, pero también en otros órganos como los riñones. Solo el radiofármaco intacto puede interactuar con el blanco y proporcionar la información diagnóstica o el efecto terapéutico deseado.

Los ensayos para predecir la estabilidad in vivo son una herramienta valiosa para seleccionar los candidatos más prometedores en el proceso de desarrollo de un radiofármaco o para predecir características inestables para optimizar la estructura del compuesto.

Estos ensayos no están muy estandarizados y se realizan en gran variedad. Por lo general, el radiofármaco se incuba en suero o plasma a 37 °C, se toman muestras cada cierto tiempo y se determina la integridad con una prueba analítica respectiva, generalmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Ver Fig.15.

Los radiofármacos marcados con radiometales pueden mostrar inestabilidad debido a la transquelación del radiometal a ligandos endógenos.

Por lo tanto, se han descrito ensayos para predecir la tendencia a la transquelación, que implican la incubación de los radiofármacos en soluciones con exceso de un ligando endógeno, por ejemplo, cisteína para radiofármacos de Tc-99 m o ligandos sintéticos de alta afinidad para un radiometal, por ejemplo, DTPA.

5.2.2 Ensayos para Farmacología

- *Unión al blanco/receptor*

Se han descrito y utilizado una variedad de ensayos para estudiar el comportamiento de unión al receptor. La selección del tipo de ensayo depende de muchos factores, como el tipo de blanco (un receptor o antígeno, un proceso metabólico que implica un transportador o enzima u otros) y sobre la disponibilidad y complejidades de los componentes del ensayo.

Para poder estudiar un determinado blanco para un radiofármaco in vitro, éste debe estar disponible, ya sea comercialmente disponible o preparado localmente. Este puede ser el blanco aislado (por ej., cierta proteína aislada que funciona como receptor), más comúnmente a partir de células en cultivo, o incluso preparaciones de tejido. La práctica más común es utilizar líneas celulares que expresen el blanco del radiofármaco bajo investigación.

El cultivo de células hoy en día es una técnica común disponible en la mayoría de los laboratorios. Para muchos objetivos, hay disponibles células tumorales que expresan de forma natural el blanco. Se debe tener cuidado, si las células no son de origen humano, ya que pueden ocurrir diferencias entre especies, por ejemplo, un receptor de la célula humana frente a una célula de roedor (ratón o rata). También es posible usar células que expresen

artificialmente el blanco, en las que la información genética del blanco se transcribe artificialmente en la información genética de la célula.

Ciertos blancos moleculares sólo se pueden expresar en niveles altos bajo ciertas condiciones, por ejemplo, receptores de folato, donde las células deben crecer en medios sin fuentes de folato. El nivel de expresión del blanco se puede verificar, por ejemplo, mediante el uso de exploración de células activadas por fluorescencia (FACS).

Al estudiar radiofármacos para infecciones, los microorganismos cultivados pueden usarse como fuente del blanco. En todos los casos los resultados siempre deben evaluarse con cuidado ya que los cultivos son siempre una fuente artificial y no imitan completamente la situación in vivo.

La forma más sencilla de estudiar la interacción con el blanco es incubar el radiofármaco seguido de la separación de la fracción unida al blanco de la fracción no unida. Debe tenerse en cuenta que la unión total no refleja necesariamente la unión al blanco, ya que también se producen uniones no específicas. Esto puede depender de la fuente del blanco molecular, pero principalmente de las propiedades del propio radiofármaco.

Las altas cargas o la alta lipofiliidad son factores que pueden conducir a una unión no específica pronunciada, no sólo a la matriz asociada al blanco molecular (por ejemplo líneas celulares) en sí, sino también, a los tubos de ensayo. Por lo tanto, es de suma importancia incluir controles en cualquier ensayo de unión al blanco. Los controles deben incluir al menos condiciones con exceso de ligando "frío", ya sea el propio radiofármaco no radiactivo o un compuesto que se sabe que interactúa específicamente con el blanco. Los controles adicionales pueden incluir un modelo sin expresión del blanco molecular o condiciones en las que ciertos blancos no se expresan o están inactivos.

Dichos ensayos proporcionarán sólo un resultado cualitativo, es decir, una prueba de si un determinado radiofármaco se une a un determinado blanco o no. Solo en algunos casos proporcionará un resultado semicuantitativo, cuando se evalúe el grado de unión y se compare con un compuesto principal o compuestos relacionados estructuralmente, lo que indica una mejor o peor interacción con el blanco. Las consideraciones estadísticas apropiadas (suficientes réplicas y repeticiones de ensayo) permitirán proporcionar tales interpretaciones. Sin embargo, tales ensayos proporcionan información inicial muy valiosa, ya sea que un nuevo radiofármaco interactúe con el blanco en cuestión o no.

Se obtiene más información sobre las propiedades de un radiofármaco cuando se generan valores cuantitativos que describen la interacción con el blanco, expresados como afinidad. El diseño de tales ensayos depende del tipo de blanco. Se deben realizar diferentes ensayos dependiendo de si el blanco es un receptor, un antígeno u otra proteína de superficie, un transportador o una enzima.

Muchos radiofármacos, especialmente para aplicaciones oncológicas o neurológicas, se dirigen a receptores, generalmente receptores acoplados a proteínas G, como los análogos de somatostatina, que se aplican ampliamente en la actualidad en el diagnóstico y la terapia de medicina nuclear de rutina. Los ensayos de unión de radioligandos se pueden aplicar para determinar la afinidad de un determinado radiofármaco por su receptor.

Por lo general, se utilizan células completas o membranas celulares como fuente del receptor, en casos especiales también el receptor aislado o cortes de tejido (principalmente en neurología). Es importante entender que la determinación de la afinidad se basa en lograr un equilibrio entre el radioligando unido y no unido. Esto puede ser un desafío cuando se usan células vivas que conducen a la activación del receptor y la internalización del metabolismo de los ligandos, además, la unión no específica suele ser mayor. El uso de membranas o cortes de tejido puede sufrir la degradación del receptor y requiere una buena experiencia en su preparación.

Se pueden realizar dos tipos de ensayos. El llamado ensayo de saturación se basa en la incubación del receptor con un rango de concentraciones del radioligando a estudiar. Con concentraciones crecientes, el receptor se saturará. Para determinar la unión específica, se incuba una serie paralela con la adición de un ligando de receptor no marcado para inhibir la unión del receptor (unión no específica). La unión total se resta de la unión no específica para determinar el radioligando unido específicamente. Después de la incubación, la fracción unida se separa del radioligando no unido, generalmente por medio de filtración y los filtros son lavados con buffer frío. Los filtros se separan y se mide la actividad.

Como alternativa, se puede usar la centrifugación para separar los compuestos unidos de los no unidos. Luego se puede graficar la actividad frente a la concentración del radioligando. Con algún software específico para dichos ensayos (por ej., SigmaPlot, Origin, GraphPad y otros) se pueden aplicar para ajustar una curva y calcular la constante de disociación del ligando K_d , cuanto menor sea K_d , mayor será la afinidad por el receptor. Además, el ensayo proporciona el valor B_{max} , un valor reflejando la densidad del receptor en el blanco. Otra forma de calcular K_d y B_{max} es usar el llamado diagrama de Scatchard, que da como resultado una correlación lineal en la que la actividad unida se representa frente a la libre.

La determinación fiable del valor K_d de un radiofármaco mediante ensayos de saturación requiere una buena experiencia en la realización práctica del ensayo.

Un ensayo más sencillo y generalmente más fácil de realizar son los denominados ensayos de competición.

En este ensayo se determina la afinidad del ligando no marcado. Un radioligando, que se sabe que se une específicamente al receptor, se incuba con concentraciones crecientes del ligando no marcado. A una determinada concentración, el ligando no marcado desplazará al radioligando del receptor; cuanto menor sea esta concentración, mayor será la afinidad del ligando sin marcar por el receptor. Después de la incubación, el radioligando unido se separa, normalmente de nuevo por filtración, se lava y se mide la actividad del filtro. Nuevamente, con un software se puede generar una curva. El punto de inflexión de la curva refleja el valor en el que el 50 % del radioligando ha sido sustituido por el ligando no marcado. La concentración calculada en este punto es el llamado valor IC_{50} , cuanto menor sea el valor IC_{50} , mayor será la afinidad del ligando no marcado (no el radioligando). Si las condiciones de equilibrio se cumplen plenamente, la IC_{50} es idéntica a la constante de disociación K_d , sin embargo, en la práctica deben tenerse en cuenta las desviaciones. Ver Fig 14 y 15.

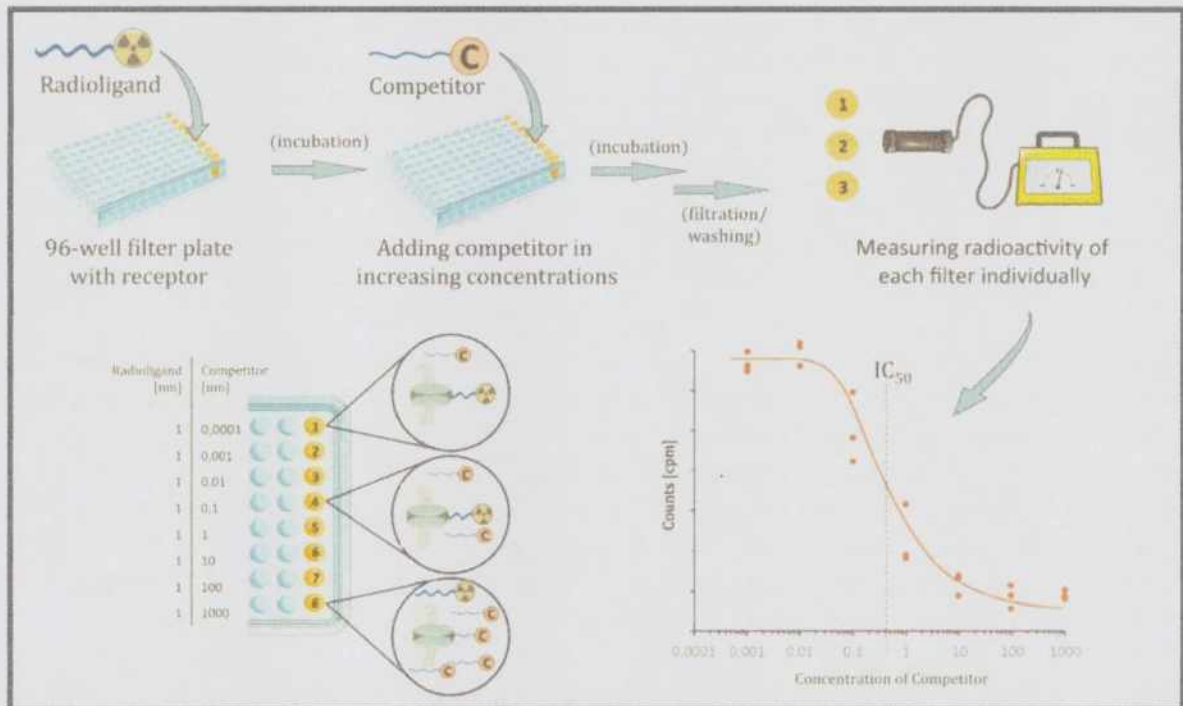


Fig.14 Esquema experimental para determinación del valor IC₅₀

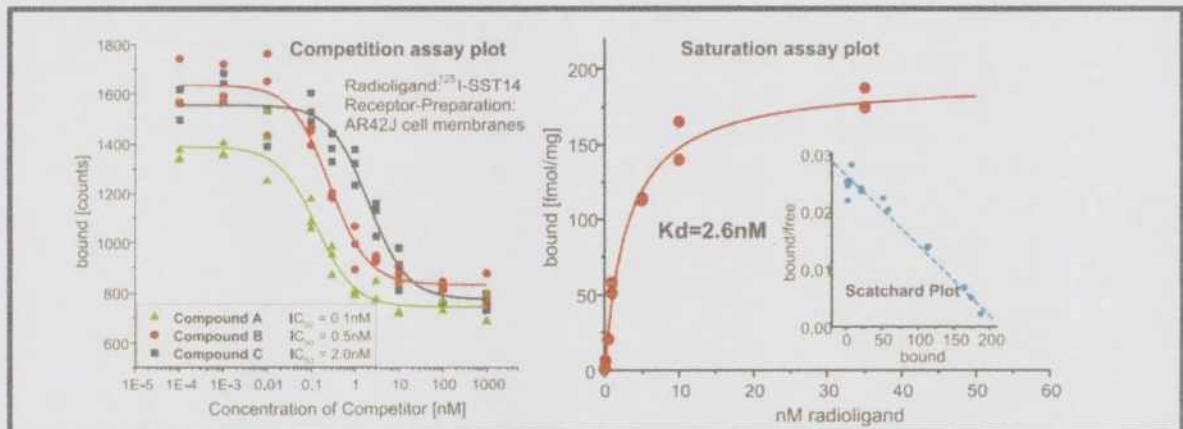


Fig.15 Ejemplos de gráficos de ensayos de competición y saturación (14)

- *Ensayo de internalización*

Además de los ensayos para confirmar la unión a un blanco o para determinar la afinidad con él, es importante cómo se procesa el radiofármaco cuando interactúa con el blanco de una célula en general. Este ensayo se denomina de internalización y se usa especialmente para aplicaciones oncológicas de unión radiofarmacéutica a receptores o antígenos.

Tras la unión de un radiofármaco a un receptor o proteína, se puede desencadenar un mecanismo por el cual es "engullido" y arrastrado dentro de la célula. Esto sucede, por ejemplo, cuando un receptor acoplado a una proteína G, como el receptor de somatostatina, se une a un ligando natural, exhibiendo así un efecto agonista. Por el contrario, los ligandos que se unen a este blanco sin activar este proceso, se denominan ligandos antagonistas.

Mientras que para muchas aplicaciones se postuló que un comportamiento agonista, incluida la internalización, es beneficioso para la orientación eficaz y es especialmente importante para las aplicaciones terapéuticas de los radiofármacos, recientemente se demostró que para algunos blancos los antagonistas pueden incluso ser superiores, ya que pueden dirigirse también a receptores inactivos y finalmente dar como resultado una captación superior in vivo.

Esto se ha demostrado ampliamente, por ejemplo, para los análogos de somatostatina, pero también para otros blancos en oncología.

Para determinar el comportamiento de internalización de un radiofármaco, el blanco debe ser funcional, es decir, se deben usar células completas y no sólo la proteína de membrana como en los ensayos de unión de radioligandos.

Un ensayo típico (Fig. 16) se realiza sembrando una cantidad suficiente de células que expresan el blanco en placas de pozos y luego incubándolas con el radioligando en condiciones fisiológicas (medios de cultivo, 37 °C). Para determinar los efectos no específicos, se incuba en paralelo una serie con un exceso de ligando no marcado.

En puntos de tiempo predefinidos, se elimina el sobrenadante y las células se lavan inicialmente con una solución buffer ligeramente ácida (tampón acetato o glicina). Este proceso elimina el radioligando unido a la superficie, el cual se recoge. Posteriormente, las células se eliminan (típicamente con una solución de hidróxido de sodio) y también se recolectan. La fracción celular ahora contiene la fracción internalizada y la actividad medida se puede graficar a lo largo del tiempo y el porcentaje de radioligando que se une a la superficie versus el internalizado puede ser determinado.

Los controles también se pueden realizar incubando células adicionales a 4 °C donde se bloquea el mecanismo de internalización dependiente de la energía, mientras que todavía tiene lugar la unión a la superficie (14).

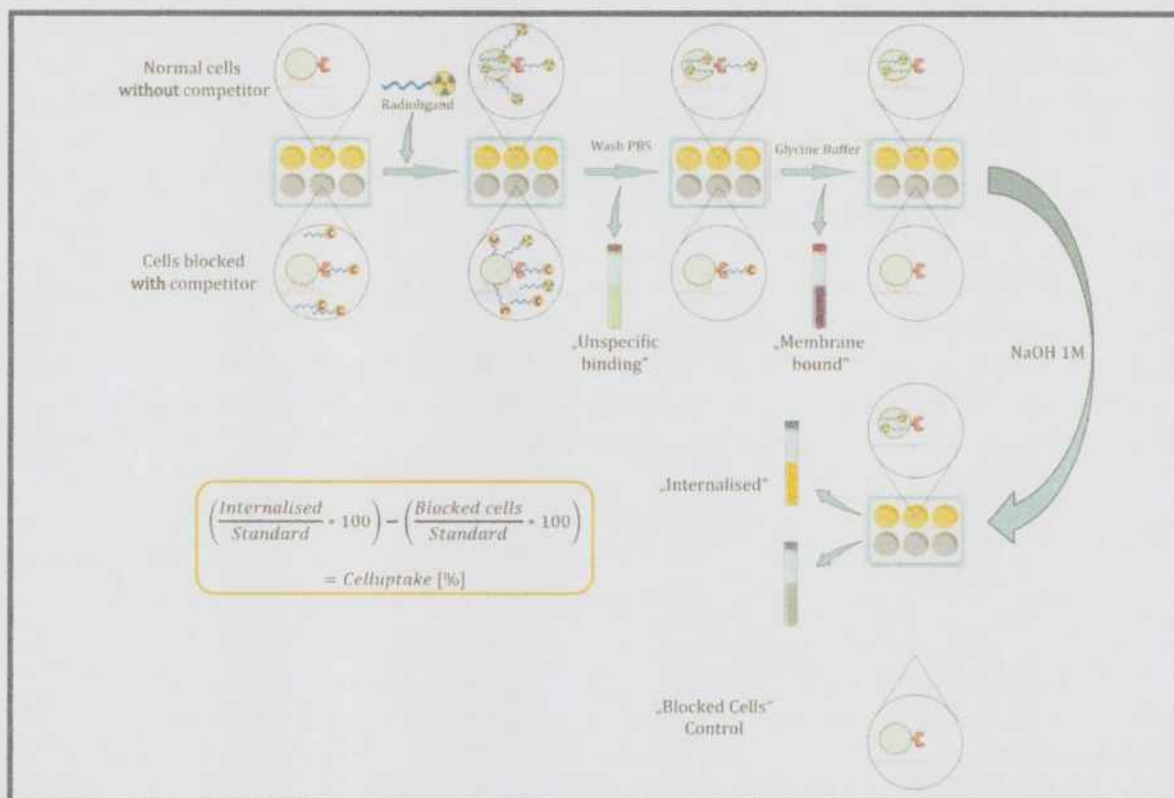


Fig. 16 Ensayo de internalización (14)

5.3 Ejemplo de diseño de evaluación preclínica para ^{177}Lu PSMA-617

A modo de ejemplo se expondrán los pasos seguidos (y los resultados) por científicos del Centro Atómico Bhabha, de Mumbai, para la evaluación preclínica del ^{177}Lu PSMA-617 , radioligando mencionado en el capítulo 1.

-Marcación

Se preparó una solución de PSMA-617 disolviendo 1 mg (0,96 μmol) del ligando en 1 ml de agua Suprapure. Se tomó una alícuota de 100 μL [ligando de 100 μg (0,096 μmol)] de la solución madre y se mezcló con 700–800 μL de buffer de ácido ascórbico (pH 5). Dicha solución de ácido ascórbico se preparó disolviendo 600 mg de ascorbato de sodio y 150 mg de ácido ascórbico en 10 mL de agua Suprapure pasada por un filtro Millipore.

Se preparó PSMA-617 marcado con Lu-177 incubando la solución de ligando en buffer con $^{177}\text{LuCl}_3$ [100-200 μL , 200 mCi], actividad específica 29,5 \pm 1,08 Ci/mg a 95 $^\circ\text{C}$ durante 15 min.

-Control de calidad

La pureza radioquímica del PSMA-617 marcado con Lu-177 se determinó mediante estudios de ITLC y HPLC. La ITLC se llevó a cabo usando acetonitrilo:agua (1:1, v/v) como solvente de elución siguiendo el protocolo que se menciona a continuación. Se colocó una pequeña gota de la mezcla de reacción a 1,5 cm de un extremo de la tira de papel de

cromatografía (10 × 1 cm). La tira se eluyó utilizando el solvente de elución, se secó y se cortó en segmentos de 1 cm. La actividad asociada con cada segmento se determinó usando un detector NaI tipo pozo. Por otro lado, la HPLC se llevó a cabo empleando la técnica de elución en gradiente con agua (A) y acetonitrilo (B) mezclado con ácido trifluoroacético al 0,1% como fase móvil (0-4 min 95% A, 4-15 min 95% A a 5% A, 15-20 min 5% A, 20-25 min 5% A a 95% A, 25-30 min 95% A). El caudal de la fase móvil se mantuvo a 1 ml/min. El perfil de elución se controló detectando la señal de radiactividad asociada con el eluyente.

Se observó que el radiofármaco se movía hacia el frente de solvente ($R_f = 0,7-0,8$) mientras que el $^{177}\text{LuCl}_3$ libre permaneció en el punto de sembrado ($R_f = 0,0$) en condiciones idénticas. Los estudios de ITLC mostraron que el complejo podía prepararse con una pureza radioquímica del 98%. Esto se corroboró adicionalmente mediante estudios de HPLC, en los que se eluyó el radiofármaco a los 17 minutos, mientras que el $^{177}\text{LuCl}_3$ libre se eluyó a los 3,5 minutos. Los cromatogramas se muestran en la Fig. 17 (a) y (b).

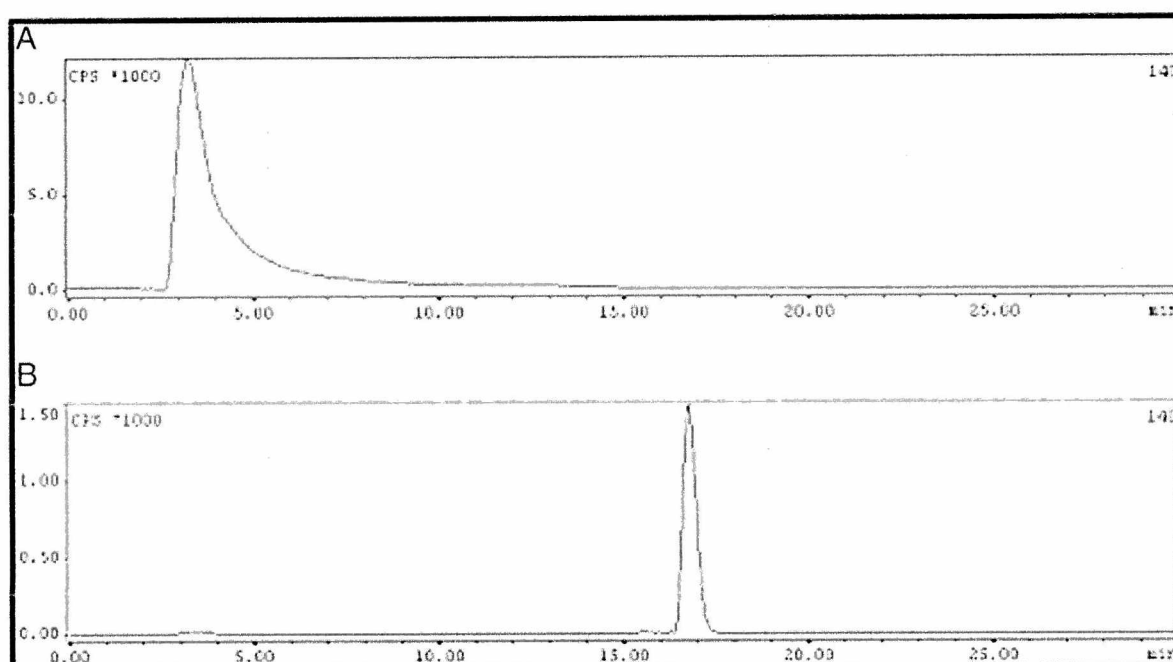


Fig.17 Perfiles típicos de HPLC de $^{177}\text{LuCl}_3$ libre (a) y de $^{177}\text{Lu PSMA-617}$ (b)

-Determinación del coeficiente Log P

Se determinó el coeficiente de partición en un sistema octanol-agua para determinar la lipofilia del complejo siguiendo el protocolo mencionado a continuación.

Se mezcló a fondo una alícuota del radiofármaco (100 μL) con agua (900 μL) y octanol (1 ml) utilizando un mezclador vortex y posteriormente centrifugando a 3000 rpm durante 5 min para obtener una separación clara entre las dos fases. Se tomaron alícuotas iguales (500 μL) de las fases y la actividad asociada con cada una fue determinada utilizando un detector de NaI(Tl) de tipo pozo.

El coeficiente de partición Log P resultó ser -2.68. Esto indica que el radiofármaco es de naturaleza altamente hidrófila.

-Estudios de unión al suero y estabilidad in vitro

Se incubó PSMA-617 marcado con Lu-177 (50 µL) con suero humano (450 µL) a 37 °C durante 3 horas. Para determinar la unión al suero, las proteínas del suero se precipitaron añadiendo un volumen igual de acetonitrilo. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 4 min y los sobrenadantes y el sedimento se midieron por separado en un contador de NaI. El porcentaje de unión al suero se calculó a partir de los recuentos observados en ambas fracciones. Por otra parte, la estabilidad in vitro de la preparación radiomarcada se estudió incubando la preparación (100 µL) con suero humano (400 µL) a 37 °C hasta 48 h. Para determinar la estabilidad, se extrajeron alícuotas (100 µl) a intervalos regulares y las proteínas del suero se precipitaron añadiendo un volumen igual de acetonitrilo. Posteriormente, las mezclas se centrifugaron y los sobrenadantes fueron analizados por HPLC usando el protocolo mencionado anteriormente.

Se obtuvo un porcentaje de unión a proteínas de ~33 %. También se observó que el radiofármaco es adecuadamente estable en suero humano hasta 48 h después de la preparación. Se muestra el perfil de HPLC de ¹⁷⁷Lu PSMA-617, registrado después de 48 h de incubación en suero humano, se muestra en la figura 18.

Las Fig. 17 y 18 muestran que la preparación radiomarcada mantuvo una pureza radioquímica de ~92 % en este punto.

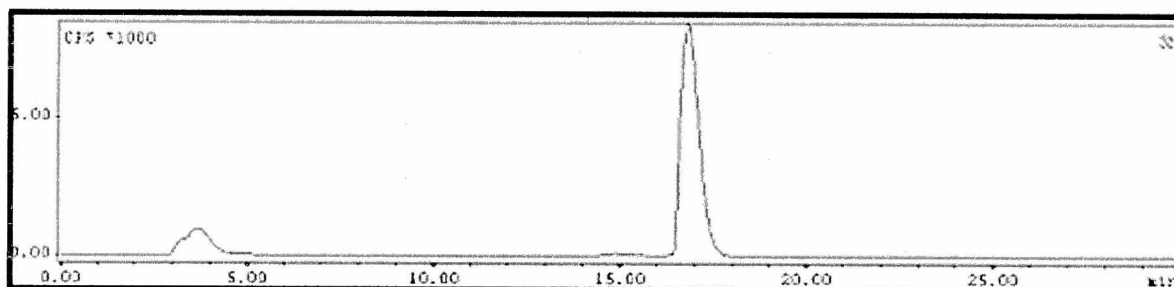


Fig.18 Perfil de HPLC de ¹⁷⁷Lu PSMA-617 luego de 48hs de incubación de suero humano.

-Biodistribución y dosimetría

Se estudió el comportamiento farmacocinético y la distribución biológica del radiofármaco mediante la realización de estudios de biodistribución en ratas Wistar macho normales. A cada animal, que pesaba entre 200 y 250 g, se le inyectó por vía intravenosa ~200 µL (~50 ng, 0,048 nmol) del radiofármaco (~3,7 MBq, 100 µCi) a través de una de las venas laterales de la cola. Se estudió la distribución biológica del radiotrazador para cuatro puntos de tiempo posteriores a la administración, a saber. 3 h, 1 d, 2 d y 7 d usando cinco animales para cada punto de tiempo. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después del período de incubación respectivo por punción cardíaca post-anestesia.

Posteriormente, los órganos/tejidos fueron extirpados, lavados con solución salina, secados, pesados en una balanza y actividad asociada con cada órgano/tejido se midió utilizando un contador NaI de tipo plano.

El porcentaje de actividad inyectada (%IA) en varios órganos, tejidos y tumores se calculó a partir de los datos anteriores y se expresó como %IA por gramo (%IA/g) de órgano/tejido. El porcentaje de actividad excretada se determinó indirectamente restando la actividad contabilizada en todos los órganos de la actividad total inyectada. Todos los datos relativos a la biodistribución de los estudios se expresan en forma de promedio \pm desviación estándar derivados de cinco estudios repetidos.

Los resultados de los estudios de biodistribución, realizados en cuatro puntos de tiempo posteriores a la inyección diferentes, a saber. 3 h, 1 d, 2 d y 7 d están tabulados en la tabla de la Fig. 19. El estudio reveló un aclaramiento sanguíneo rápido con acumulación de actividad en hígado, intestino, riñones, músculo y esqueleto en el punto de tiempo inicial. El radiofármaco exhibió mayor eliminación a través de la vía renal. El 80% de la actividad inyectada fue excretada dentro de las 3 horas posteriores a la inyección. Este comportamiento podría atribuirse a la fuerte naturaleza hidrófila del complejo que es evidente a partir del valor de Log P altamente negativo del radiofármaco.

Aunque la actividad acumulada en la sangre y el músculo fue completamente eliminada a las 24 h después de la administración, se observó retención de actividad en intestino, hígado, riñones y esqueleto en ese momento. Sin embargo, se observó que la captación en estos órganos, excepto el esqueleto, disminuía gradualmente con el paso del tiempo (15).

Organ	% Injected activity (%IA)/Organ			
	3 h	1 d	2 d	7 d
Blood	2.46 \pm 0.45	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Liver	1.02 \pm 0.09	0.57 \pm 0.08	0.58 \pm 0.15	0.25 \pm 0.03
Intestine	1.62 \pm 0.84	2.09 \pm 1.47	0.88 \pm 0.53	0.33 \pm 0.11
Kidneys	3.96 \pm 1.72	1.19 \pm 0.11	0.91 \pm 0.13	0.25 \pm 0.01
Stomach	0.13 \pm 0.01	0.09 \pm 0.06	0.06 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00
Heart	0.03 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Lungs	0.10 \pm 0.10	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Muscle	2.10 \pm 1.18	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Skeleton	1.82 \pm 1.14	2.21 \pm 0.94	1.99 \pm 0.64	2.29 \pm 0.40
Spleen	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.09 \pm 0.00
Excretion [#]	86.12 \pm 3.36	93.46 \pm 1.90	94.54 \pm 0.02	95.60 \pm 3.90

Fig. 19 Patrón de biodistribución de ¹¹⁷Lu PSMA-617 en ratas macho Wistar normales.

CAPÍTULO 6: ADAPTACIÓN DE LA GUÍA PROPUESTA

En los últimos años, se han desarrollado nuevos radiofármacos y terapias con radioligandos. Sin embargo, representa un real desafío llevar un nuevo medicamento a los pacientes, garantizando su seguridad. Hemos visto que se deben cumplir regulaciones estrictas y a veces poco claras.

Las diferencias en los requisitos reglamentarios, a menudo basadas en políticas jurisdiccionales más que en evidencia científica, pueden obstaculizar la cooperación mundial, aumentar los gastos y retrasar el progreso.

En un esfuerzo por superar estas diferencias, profesionales de medicina nuclear, organizaciones, reguladores y agencias internacionales han comenzado a identificar elementos comunes en las reglamentaciones para lograr la armonización para los estudios preclínicos y la fabricación (16).

6.1 Metodología de la Colaboración "ADAPTE"

Siguiendo esta tendencia mundial es que se propone adaptar la guía en base a la metodología de la "Adapte Collaboration", que es un grupo internacional de desarrolladores de guías, investigadores, y médicos que tienen como objetivo promover el desarrollo y uso de guías de práctica clínica a través de la adaptación de guías existentes. La Colaboración ADAPTE nace de dos grupos independientes centrados en la adaptación de guías, el grupo ADAPTE y el grupo de Ciclo de Evaluación y Adaptación de Guías. En base a la similitud de sus conceptos y principios subyacentes y su coincidencia en el proceso, los dos grupos decidieron unir fuerzas y convertirse en la actual Colaboración ADAPTE.

Los especialistas involucrados son de Francia, Canadá, Bélgica, Países Bajos, Suiza entre otros países.

Se define la adaptación de una guía como el enfoque sistemático para considerar el uso y/o la modificación de una guía producida en un entorno cultural y organizacional para su aplicación en un contexto diferente. La adaptación se puede utilizar como una alternativa más eficiente al desarrollo de guías desde cero, cuando puede aprovecharse la existencia de guías que pueden adaptarse al contexto local.

El proceso de adaptación se basa en los siguientes principios básicos:

- Respeto por los principios basados en la evidencia del desarrollo de guías.
- Métodos fiables y coherentes para garantizar la calidad de la guía adaptada.
- Enfoque participativo, que involucre a todas las partes interesadas clave, para fomentar la aceptación de la guía adaptada.
- Consideración del contexto durante la adaptación.
- Informes transparentes para promover la confianza en las recomendaciones de la guía.
- Formato flexible para adaptarse a necesidades y circunstancias específicas.

El proceso de adaptación consta de tres fases principales (Fase de Establecimiento, Fase de Adaptación y Fase de Finalización), cada una con un conjunto de módulos.

Fase de establecimiento: describe las tareas necesarias que deben completarse antes de comenzar el proceso de adaptación (por ej., identificar las habilidades y los recursos necesarios).

Fase de adaptación: ayuda a los usuarios a través del proceso de selección de un tema para identificar preguntas específicas; buscar y recuperar guías; evaluar la consistencia de la evidencia y la calidad, vigencia, contenido y aplicabilidad de la guía; toma de decisiones en torno a la adaptación; y preparar el proyecto de guía adaptada.

Fase final: guía al usuario a través del proceso de obtener retroalimentación sobre el documento de las partes interesadas afectadas por la guía, consulta con los desarrolladores de las guías fuente utilizadas en el proceso de adaptación, establecer un proceso para la revisión y actualización de la guía adaptada y crear un documento final (17).

Siguiendo el marco de la metodología ADAPTE, se puede evaluar sistemáticamente la adecuación de la guía preclínica de la FDA a los requerimientos de la CNEA, asegurando un plan de diseño preclínico bien estructurado y efectivo para radiofármacos terapéuticos oncológicos en Argentina.

Dado el alcance de este trabajo, se abordará la primera fase de adaptación de acuerdo a las recomendaciones de la guía ADAPTE, es decir, la *Fase de Establecimiento*.

6.2 Fase de Establecimiento

Se desarrollarán los pasos que comprende esta fase.

1. Comprobar si la adaptación es factible

Basado en el análisis del contexto regulatorio nacional e internacional y en las búsquedas bibliográficas, se identifica la guía *Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations*, de la FDA para la adaptación de sus recomendaciones al contexto Argentina-CNEA. Es decir, contamos con una guía ya existente y no debemos elaborar una nueva de cero.

2. Establecer un comité

Este comité estará conformado por la Directora, Co directora y autora del presente trabajo. Su función es diseñar un programa coordinado de evaluación preclínica de radiofármacos para Terapia con Radioligandos (RLT) basado en la Guía "Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations" que cubra los aspectos regulatorios vigentes y las recomendaciones internacionales para ser implementado en CNEA.

3. Seleccionar un tema

Se define el Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos para RLT, en base al análisis bibliográfico y a las recomendaciones de la guía seleccionada:

Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos para RLT	
Etapa	
1	Optimización de la marcación
2	Farmacocinética in vitro: evaluación de los parámetros Log D, unión a proteínas del suero humano y estabilidad en distintos medios.
3	Farmacología in vitro; ensayos de unión al blanco molecular y de internalización.
4	Farmacocinética in vivo: Biodistribuciones en animales normales
5	Exploración in vivo de la radiotoxicidad: Dosimetría en animales normales y extrapolación a humanos.
6	Formulación del producto (BPF): adecuación de la metodología de marcación a BPF
7	Calidad del producto: Validación de técnicas analíticas.
8	Toxicidad in vivo: LD50 y NOAEL del ligando.
9	Eficacia terapéutica: evaluación en un modelo animal tumorado. Biodistribuciones e imágenes.
10	Dosimetría en animales tumorados

4. Identificar habilidades y recursos necesarios:

Se realizará el análisis del contexto y mapeo de actores e instalaciones.

Definimos como contexto a: CNEA, CAE, Grupos de I+D/producción, participantes del desarrollo preclínico y Equipos de Implementación de Ensayos (EIE).

La idea es conformar EIE, multidisciplinarios para evaluar cada fase preclínica. Estos equipos tienen como función discutir el plan experimental detallado y los protocolos de ensayo consensuados basados en la evidencia, así como la sistematización de la trazabilidad de los resultados para cada etapa preclínica.

La CNEA cuenta con investigadores en radiofarmacia, instalaciones de desarrollo preclínico, experiencia en investigación preclínica, desarrollo y producción de radioisótopos.

Las habilidades y conocimientos de los integrantes de los EIE serán identificadas según cada fase.

Algo a destacar es que recientemente, el Departamento Investigación y Desarrollo en Radiofarmacia pasó a formar parte de la Gerencia de Área Producción de Radioisótopos y Aplicaciones de la Radiación (GAPRYAR), lo cual favorecerá ampliamente la interacción entre los grupos de desarrollo y producción.

Para definir las habilidades y recursos necesarios se establecen los objetivos y los ensayos propuestos para las etapas 1 y 2 del Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos para RLT.

Etapas	Objetivo	Ensayo requerido	Instalaciones/grupos de trabajo involucrados
1	Optimización de la marcación y desarrollo de controles de calidad.	% Pureza radioquímica: HPLC-RP % de incorporación: ITLC-SG Purificación: Sep pak % Pureza radionucleídica: Espectrometría gamma	RA3 División Radiofarmacia División Radioquímica
2	Evaluación de la Farmacocinética in vitro	Log D Unión a proteínas del SH Estabilidad en SH Estabilidad en Solución Fisiológica	División Radiofarmacia

5. Escribir el plan experimental para cada etapa:

Los EIE redactarán el plan experimental detallado y los protocolos experimentales consensuados para cada etapa de evaluación preclínica.

De acuerdo a los objetivos específicos del presente trabajo, esto se hizo para las etapas 1 y 2 del Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos para RLT, en particular para el radiofármaco ¹⁷⁷Lu-PSMA-617.

Etapas 1: Optimización de la marcación

Esta etapa es determinante para la continuación de la evaluación, ya que de acuerdo a la guía seleccionada, se debe obtener un método de marcación que proporcione un radiofármaco de características similares al producto que será usado en los pacientes.

El parámetro más importante a optimizar es la AE de marcación y se evalúa a través de la Pureza Radioquímica utilizando las técnicas de HPLC- RP e ITLC-SG . Para el caso de los radiofármacos de Lu-177 basados en análogos de PSMA se requiere una elevada AE de marcación, cercana a 1 mCi/ug de ligando, y un %PR mayor al 98%. Los parámetros que se

tuvieron en cuenta durante el proceso de marcación fueron: relación masa/ actividad (representado como AE); buffer, pH, tiempo de incubación; temperatura de incubación, volumen total, actividad total y masa total. También se generaron mejoras en el procedimiento para que la contaminación con metales sea la menor posible, ya que los mismos interfieren en la marcación.

Respecto a las recomendaciones de la ANMAT, se identifican para esta Etapa los siguientes requerimientos principales: plan experimental detallado y un sistema de BPL para asegurar la trazabilidad de los resultados (ver página 28).

Dado que no es posible cumplir el requerimiento de BPL, se propone la siguiente adaptación: implementar un sistema de aseguramiento de la calidad, basado en la norma ISO 17125 para trazabilidad de los resultados obtenidos. Como la implementación del sistema de calidad escapa el objetivo de esta tesis, sólo se considerará proponer el plan experimental, protocolos y los formularios de registro.

Plan experimental de Etapa 1:

Evaluación del buffer de marcación: En base a la bibliografía, se seleccionó el buffer acetato/ acético (conc.) con ácido gentísico (conc.) y se estudió el comportamiento a dos pH diferentes (4,5 y 5). Los parámetros de temperatura y tiempo de incubación, así como el volumen final se mantuvieron fijos. La AE de marcación fue elevándose progresivamente (entre 0,1 a 1 mCi/ug) considerando necesario un rendimiento mayor al 95% para aumentar este parámetro. En la figura 20 se detalla el plan detallado propuesto

Plan Experimental para la etapa 1: Optimización de la marcación.	
Revisión 1	
Pregunta	¿Se puede obtener el radiofármaco ¹⁷⁷ Lu-PSMA-617, de calidad para uso en RLT, utilizando el Lu-177 de AE de producción (AEp) media, producido en CAE bajo el método directo con un blanco enriquecido al 86,9% en Lu-176?
Hipótesis	El Lu-177 producido por método directo en RA-3 puede radiomarcarse PSMA-617 con una AE de marcación (AEm) mayor o igual a 1mCi/ug

Explicación de la hipótesis	<p>El ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de mCRPC. Este tipo de radiofármaco requiere una AE de marcación elevada para su aplicación clínica. En el caso de PLUVICTO y LUTATHERA la EA = 1 mCi/ug.</p> <p>Según la bibliografía, se pueden obtener AEm de esas características con Lu-177 de AEp no menor a 10 mCi/ug.</p> <p>Según los datos experimentales de la Div Radioquímica, la AEp promedio de Lu-177 por el método directo es de 14 mCi/ug al EOB.</p> <p>Dado que recibimos el Lu-177 12 hs posteriores al EOB, se postula que la AEp es suficiente para radiomarcarse PSMA-617 con la AEm igual o mayor a 1 mCi/ug.</p>
Predicción	AE mayor o igual 1 mCi/ug de PSMA-617
Variable independiente	AE; pH, masa total de PSMA-617
Variable dependiente	%PR (HPLC y TLC)
Variable controlada	Temperatura y tiempo de incubación, buffer, volumen total.
Riesgos	<p>Contaminación metálica: se usan soluciones previamente purificadas con Chelex 100. Se lavan tips y eppendorf con HCl. No se usan vidrio ni metales antes de la incubación.</p> <p>Menor concentración de la solución de PSMA-617. Vortex. Adición del buffer al vial conteniendo el PSMA-617.</p> <p>Los componentes de la formulación y metodología de radiosíntesis deben ser adecuados para su uso en humanos.</p>

Materiales	<p>Lu-177 12 hs post EOB</p> <p>- PSMA-617</p> <p>- materiales descartables (Tips, Eppendorf)</p> <p>-drogas y reactivos (acetato de sodio, acido gentísico, HCl Suprapur, Chelex 100, filtros millipore 0,22, micropipetas, tiras de papel pH, ITLC-SG).</p> <p>- equipos (HPLC, autorradiografo digital, placa calefactora, placa de agitación magnética, centrífuga, equipo de agua MilliQ, bunker de marcación, activímetro).</p>
Plan	<p>Se evalúan las variables independientes en los siguientes rangos:</p> <p>AEm: se evalúa entre los rangos 0,1-1,2 mCi/ug</p> <p>pH: 4,5 y 5,0</p> <p>Masa: entre 15 y 50 ug de PSMA-617</p>
Otros	<p>Puesta a punto de las técnicas de HPLC e ITLC.</p> <p>Sistema de documentación para trazabilidad de resultados: Formulario de Marcación y controles de calidad, formulario de registro de apertura y dilución del blanco irradiado; formularios de registro de controles diarios de activímetro y balanza.</p> <p>Procedimientos/ protocolos de ensayos: a)Apertura y dilución del blanco de Lu-177; b) Procedimiento de marcación; c) Protocolo de control de calidad por HPLC; d) Protocolo de control de calidad por ITLC; e) Protocolo de purificación por Sep-Pack c18.</p>

Figura 20: Plan experimental detallado conforme se solicita por la ANMAT

A continuación, se muestra en la siguiente figura (Fig. 21) el formulario guía propuesto para la marcación y registro de resultados consensuado. El mismo está subdividido en 5 partes principales:

- 1- Materiales: incluye los principales reactivos y precursores de la marcación: Buffer, ligando y radionucleído. Describe los parámetros teóricos y permite anotar los reales, como por ejemplo la pesada de los componentes del buffer, la disolución del ligando o la concentración de actividad de la solución de [¹⁷⁷Lu]Lu₂Ci₃.
- 2- Marcación: Permite registrar las condiciones de marcación del ensayo.
- 3- Controles de calidad: Permite registrar las condiciones del método usado y los resultados obtenidos
- 4- Purificación: Permite registrar el método usado y los resultados de la purificación.
- 5- Otros ensayos: permite registrar qué otros ensayos se realizaron con este lote, por ejemplo, ensayo de estabilidad en solución fisiológica.

RF: ^{177}Lu -PSMA-617

FECHA:

M: -

1) Materiales:

SOLUCION A: Acetato de sodio 0,8 M / Acido Gentisico 0,26 M pH 5

	Pesar:	Pesada:	
1- Acetato de sodio	0,325 g		Vol. final: 5 ml agua milliQ(Chelex)
2- Acido Gentisico	0,200 g		
3- Ajustar a pH 4,5-5 con NaOH 5 M			
4- Incubar 30 min. con Chelex 100 y filtrar por 0,22 nm			

Peptido: PSMA-617 (JPT) Fecha: PM: g/mol
Disolucion:

$^{177}\text{LuCl}_3$

Fecha de recepcion:		Lote
Act.=	Hs	Fecha
Act.=	Hs	Fecha
Disolucion:		
Control de pH de HCl:		

2) Marcación:

	PSMA-617	$^{177}\text{LuCl}_3$	Acetato de Sodio 0.8M /Ac Gent. pH4,5-5	Otro
--	----------	-----------------------	---	------

masa/Actividad				
Volumen				
Volumen que se toma para medir pH				

Vol. final:	pH final:	Act. antes de incubación:
Conc. masa/vol.:	Conc. Act/vol.:	
Conc. molar:		
Incubación:	Hs inicial:	Hs final:

3) Controles de Calidad:

3.1- HPLC-RP

METODO:

COLUNA:

CARPETA:

Orden de inyección:

N°	Muestra	Act/vol	Resultado

3.2- ITLC-SG

Solvente:

Rf del radiofarmaco =

Rf de

4) Purificación: Solventes: A: H₂O (o salina) B: EtOH:H₂O 1:1

4.1- SepPak C18 Classic:

FRACCIONES	Act (uCi)	%
A		
B		
C		
SepPack		
TOTAL		

5) Ensayos:

5.1- Ensayo de estabilidad:

6) Resultados:

% PR por:	HPLC-RP	SepPak C-18	ITLC-SG
a 24 hs post-marcaçión			
a días post-marcaçión			
a post-marçión			

Fig.21 Protocolo de marcaçión y controles de calidad del fármaco en estudio.

Se adjunta además un ejemplo de la planilla de Blancos Irradiados de Lu-177 recibidos donde se registra el proceso de apertura y diluçión. (Fig. 22)

PLANILLA DE BLANCOS IRRADIADOS DE $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$						
Nº LOTE: 01/23		Fecha de producción: 22/05/23	Identificación: RF-16			
Masa de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$	Masa corregida por TXRF	Fecha de solicitud de irradiación	Periodo de irradiación		Fecha de recepción en Div. RF	Actividad ampolla cerrada
			Inicio	Fin		
2,0 mg	-	25/04/23	27/05/23	31/05/23	01/06	14,91 mBq
Actividad recibida (Act.R)		% Recuperación de Rec. Respecto a Act.R	Fecha de Ensayo	Comentarios: - MARCACION ENSAYOS CON RAYONES NUDE		
Ampolla cerrada	Actividad recuperada	89,6%	01/06/23			
Act.1: 14,68 mBq	Rec.1: 13,22					
Act.2: 0,064 mBq	Rec.2: -					
Total Act: 14,747	Total Rec: 13,22					
Nº LOTE: 02/23		Fecha de producción: 22/05/23	Identificación: RF-17			
Masa de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$	Masa corregida por TXRF	Fecha de solicitud de irradiación	Periodo de irradiación		Fecha de recepción en Div. RF	Actividad ampolla cerrada
			Inicio	Fin		
3,5 mg	-	01/06/23	04/06/23	14/06/23	17/06/23	23,94 mBq
Actividad recibida (Act.R)		% Recuperación de Rec. Respecto a Act.R	Fecha de Ensayo	Comentarios: - 2 marcaciones con Actm 10 mBq y 970 mBq 65 D Usar ATT Seguro		
Ampolla cerrada	Actividad recuperada	92,1%	14/06/23			
Act.1: 25,0 mBq	Rec.1: 23,1 mBq					
Act.2: 7,27 mBq	Rec.2: -					
Total Act: 32,27 mBq	Total Rec: 23,1 mBq					

Ampolla 14,78 mBq

Ampolla 23,94 mBq

*NOTA. Se cruzó que la ampolla tiene 12 mg de Lu₂O₃

Fig. 22 Planilla de blancos irradiados

Etapa 2: Evaluación de la Farmacocinética in vitro:

Se propone la evaluación de 4 parámetros farmacodinámicos descritos en el capítulo 5: log D, unión a proteínas del suero, estabilidad en SH y Salina. Se adjunta plan experimental propuesto para la etapa 2 (figura 23).

Respecto a las recomendaciones de la ANMAT para esta etapa, se identificaron los mismos requerimientos que para la etapa 1: plan experimental detallado y un sistema de BPL para asegurar la trazabilidad de los resultados.

Al igual que en la etapa anterior, dado que no es posible cumplir el requerimiento de BPL, se propone la siguiente adaptación: implementar un sistema de aseguramiento de la calidad, basado en ISO 17125 para trazabilidad de los resultados obtenidos. Dado que la implementación del sistema de calidad escapa el objetivo de esta tesis, sólo se considerará proponer el plan experimental, protocolos y los formularios de registro.

Plan experimental de Etapa 2:

Plan Experimental para la etapa 2: Evaluación de la farmacocinética in vitro	
Revisión 1	
Pregunta	¿Cuáles son las propiedades farmacocinéticas in vitro del ¹⁷⁷ Lu-PSMA-617 evaluadas en los modelos experimentales propuestos y si estas son similares a las reportadas en la bibliografía?
Hipótesis	Los resultados de los ensayos de farmacocinética in vitro propuestos son comparables a los de la bibliografía.
Explicación de la hipótesis	Se desea establecer las propiedades farmacocinéticas in vitro y compararlas a los valores reportados en la bibliografía para validar el modelo experimental propuesto para evaluar otros análogos de PSMA.
Predicción	Propiedades similares a las de la bibliografía.
Variable independiente	Log D; Unión a Proteínas del suero; estabilidad en suero humano y salina.
Variable dependiente	Coeficiente de partición Log D; % actividad unida el suero; % PR.
Variable controlada	Marcación de AEm igual o mayor a 0,5 Ci/ug.
Riesgos	La AEm no es la referida para uso en pacientes. Dado que no se encontró evidencia bibliográfica donde se observe una dependencia de los resultados a esta variable, se procede a realizar los ensayos con esta AEm (0,5 mCi/ug). Se plantea la necesidad de verificar este postulado con marcaciones de AEm aproximadamente 1 mCi/ug.

Materiales	<p>- ¹⁷⁷Lu- PSMA-617 con una %PR mayor al 98%.</p> <p>-n-Octanol/PBS; tubos eppendorf, centrífuga, micropipetas y tips; contador de pozo.</p> <p>-Suero humano fresco, tubos Eppendorf, micropipetas y tips, acetonitrilo, centrífuga, contador de pozo, placa térmica para tubos Eppendorf.</p> <p>- % PR por HPLC: Sistema HPLC-RP, solventes, detector radiométrico.</p>
Plan	Se evalúan las variables independientes según los protocolos de ensayos.
Otros	Se establece como criterio un n° de ensayos mayor o igual a 5 en lotes independientes para reportar resultados confiables de cada ensayos

Figura 23: Plan experimental propuesto para la Etapa 2:

Ensayo para determinar la lipofilicidad (Log D):

Los coeficientes de distribución (valores de Log D) del radiofármaco ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 se determinaron utilizando extracción líquido-líquido, seguido de la separación de fases. La AE de marcación fue de 5MBq/nmol.

Se muestra a continuación el protocolo consensuado del ensayo de lipofilicidad (Figura 24)

Ensayo Log D

- 1) Preparar ^{177}Lu -PSMA-617 en las siguientes 3 concentraciones:
 - a) $180\ \mu\text{Ci}/50\ \mu\text{mL}$ de PBS
 - b) $90\ \mu\text{Ci}/50\ \mu\text{mL}$ de PBS
 - c) $45\ \mu\text{Ci}/50\ \mu\text{mL}$ de PBS
- 2) Agregar $50\ \mu\text{L}$ de muestra a), b) y c) a un eppendorf con $700\ \mu\text{L}$ de PBS.
- 3) Añadir $750\ \mu\text{L}$ de n-octanol a cada eppendorf.
- 4) Homogeneizar en vortex durante 3 minutos.
- 5) Centrigugar 7 minutos en centrifuga de mesada.
- 6) Tomar $250\ \mu\text{L}$ de cada fase y colocarlas en un tubo de hemolisis.
- 7) Medir 1 minuto en el contador de pozo ($n=3$), realizar 3 mediciones y registrar los datos.
- 8) Calcular la relación de fases como: $\log \frac{\text{cpm } n\text{-octanol}}{\text{cpm } \text{PBS}}$
- 9) Realizar cada ensayo por triplicado (a, b y c).

Fig.24 Protocolo del ensayo para determinar la lipofilidad (Log D)

Se adjunta también el protocolo de ensayo de unión a proteínas del suero humano y estabilidad in vitro en suero humano (figura 25).

Ensayo de unión a proteínas de suero humano

- 1) Centrifugar la sangre a 4°C durante 10 minutos a 1000 xg en un falcon de 15 mL.
- 2) Tomar el suero y transferir 1 mL en tubo eppendorf.
- 3) Agregar el radiofármaco y medir la actividad (concentración en el ensayo de 500 $\mu\text{Ci/mL}$ aproximadamente).
- 4) Incubar a 37°C a distintos tiempos.
- 5) Tomar 150 μL de muestra a distintos tiempos de incubado y colocarlos en otros tubos eppendorf, medir la actividad en contador de pozo.
- 6) Agregarles a estos últimos 150 μL de acetonitrilo, homogeneizar durante 1 minuto en vortex.
- 7) Centrifugar durante 5 minutos a 2000 xg.
- 8) Separar el sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf (T1).
- 9) Realizar un lavado del pellet con 150 μL de acetonitrilo, homogeneizar durante 1 minuto en vortex.
- 10) Centrifugar durante 5 minutos a 2000 xg.
- 11) Separar nuevamente el sobrenadante y agregarlo al tubo T1.
- 12) Medir el tubo T1 y el pellet en el contador de pozo.
- 13) Calcular (actividad del pellet / actividad de la muestra) $\times 100$.

Ensayo de estabilidad *in vitro* en suero humano

- 1) Tomar una muestra del sobrenadante del ensayo de unión a proteínas, medirla en el activímetro.
- 2) Realizar controles por ITLC y HPLC.

Fig.25 Protocolo del ensayo de unión a proteínas SH y de estabilidad *in vitro* en SH

6. Evaluar la adaptación a través de una encuesta a los referentes en cada etapa

Finalmente, evaluaremos la adaptación mediante una encuesta breve a los participantes de los EIE. En base a los resultados se detectarán oportunidades de mejora, siendo esto un proceso iterativo.

El objetivo de la tesis es mostrar la metodología que se usará para evaluar la adaptación, no llevar a cabo la encuesta en sí.

El principal criterio que se tuvo en cuenta para la evaluación de la adaptación de la guía al contexto local (CNEA-ANMAT) fue: la adaptación al contexto local nunca debe implicar el cambio de recomendaciones basadas en la evidencia a menos que haya nueva evidencia de apoyo.

A futuro se puede extender esta evaluación a grupos externos tales como el ente regulador o expertos locales e internacionales .

A continuación se muestra la encuesta propuesta para la evaluación de la adaptación (figura 26):

**ENCUESTA EN EL MARCO DEL PROGRAMA COORDINADO DE EVALUACIÓN
PRECLÍNICA DE RADIOFÁRMACOS PARA RTL**

EVALUACIÓN DE LA ADAPTACIÓN DE LA GUÍA "Oncology Therapeutic
Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations" AL CONTEXTO
ARGENTINA-CNEA.

Información Personal

Nombre:

Disciplina/Especialidad:

Sector:

EIE al que pertenece/Etapa:

Por favor responder las preguntas según su criterio.

- 1 ¿El plan experimental se ajusta a los objetivos de la etapa?
- 2 ¿La hipótesis planteada en el plan experimental se encuentra debidamente justificada?
- 3 ¿El plan experimental contempla las recomendaciones de la guía "Oncology..."?
- 4 ¿Existen adaptaciones al contexto local que difieren de las recomendaciones? ¿Están justificadas en base a la evidencia?
- 5 ¿El plan experimental contempla los requerimientos de las Disposiciones de Anmat?
¿Existen adaptaciones al contexto local que difieren de los requerimientos de la Anmat?
¿Están justificados en base a la evidencia?
- 6 ¿Están descriptos detalladamente los protocolos de ensayo?
- 7 ¿Los protocolos de ensayo propuestos se ajustan al plan experimental?
- 8 ¿Considera factible la implementación de los protocolos en el contexto CNEA?
- 9 ¿Considera que los resultados son trazables en esta etapa?
- 10 Otras consideraciones:

Figura 26: Encuesta para la evaluación de la adaptación de la guía de la FDA al contexto Argentina-CNEA a través del Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos para RTL.

CONCLUSIONES

La CNEA cuenta con vasta experiencia en el desarrollo y producción de radiofármacos, sin embargo, no ha llegado al público ningún nuevo radiofármaco en los últimos años. Por lo tanto es fundamental lograr la traslación clínica de los radiofármacos en desarrollo, siendo esto un objetivo estratégico de la casa. Teniendo en cuenta este contexto, se diseñó un Programa Coordinado de Evaluación Preclínica de Radiofármacos para Terapia con Radioligandos basado en las recomendaciones de la guía preclínica de la FDA "Oncology Therapeutic Radiopharmaceuticals: Nonclinical Studies and Labeling Recommendations", teniendo en cuenta los requerimientos de la Monografía del Producto de Investigación (MPI) de ANMAT, para ser implementado en CNEA.

En este trabajo, se evaluaron los marcos regulatorios nacionales y las recomendaciones internacionales de la FDA, así como también se identificaron las habilidades y recursos necesarios para la conformación de los EIE de las etapas 1 y 2.

Se generaron los planes experimentales de las etapas 1 y 2 tal como se solicita en la MPI. Se tuvieron en cuenta criterios de trazabilidad de resultados pero aún no se cuenta con un sistema de calidad implementado.

Con respecto a los protocolos experimentales, se observó la falta de formalización de alguno de ellos, como los protocolos de marcación, y los relacionados a la evaluación de los métodos de control de calidad, o el de estabilidad en solución fisiológica. A pesar de que el activímetro cuenta con un registro para sus controles diarios, no es el caso de la balanza analítica. Esta se encuentra calibrada pero no se le practican controles diarios.

También se observó la gran necesidad de adoptar un sistema de aseguramiento de la calidad que permita la trazabilidad de los resultados. La ISO 17025 puede ser el marco más adecuado para este objetivo.

A futuro se avanzará con las encuestas para mejorar los planes experimentales y se conformarán los EIE para las etapas 3 a la 10.

A pesar que es un gran desafío para la CNEA el diseño de un programa de diseño preclínico de radiofármacos para RLT coordinado, su implementación permitirá abordar desde un punto de vista traslacional el desarrollo de nuevos radiofármacos, teniendo en cuenta los recursos humanos, infraestructura existente y proyectos en ejecución de la CNEA, optimizando los recursos, facilitando y reduciendo los tiempos para la traslación clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Plan Estratégico 2015-2025. Comisión Nacional de Energía Atómica

(2) <https://www.oncidiumfoundation.org/2023/01/26/dr-fernando-bajoras/>

(3) Terapias dirigidas con radioligandos en oncología. Documento de consenso. José Martínez Olmos (Ex Secretario General de Sanidad) , Manuel Cervera Taulet (Exconseller de Sanidad de la Generalitat Valenciana), Dr. Álvaro Rodríguez-Lescure (Sociedad Española de Oncología Médica), Dr. Joan Castell Conesa (Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular), Dr. Jaume Capdevila Castellón (Grupo Español de Tumores Neuroendocrinos y Endócrinos), Dr. Miguel Ángel Climent (Grupo Español de Oncología Genitourinaria), Antonio Herández Martínez (Sociedad Española de Enfermería Radiológica), José Antonio Cordero Ramajo (Sociedad Española de Enfermería Radiológica), Dra. Blanca Guarás González (Net España), Marcos Martínez Cortés (Grupo Español de Pacientes con Cáncer), Cristina Panera Hernández (Grupo Español de Pacientes con Cáncer), Dra. Dulce Ramírez Puerta (Sociedad Española de Directivos de la Salud), con el apoyo de RPP Group. Septiembre 2020, España.

(4) ¹⁷⁷Lu-Lu-PSMA-617 (Pluvicto™): The First FDA-Approved Radiotherapeutic for Treatment of Prostate Cancer. Ute Hennrich, Matthias Eder. *Pharmaceuticals* (2022), 15, 1292. <https://doi.org/10.3390/ph15101292>.

(5) Realizing the potential of radioligand therapy: policy solutions for the barriers to implementation across Europe. C. Merkel, C. H. Whicher, J. Bomanji, K. Herrmann, J. Ćwikła, N. Jervis, S. Wait, A. Chiti., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (2020) 47:1335–1339.

(6) Practical considerations for navigating the regulatory landscape of non-clinical studies for clinical translation of radiopharmaceuticals. Aruna Korde, Renata Mikolajczak, Petra Kolenc, Penelope Bouziotis, Hadis Westin, Mette Lauritzen, Michel Koole, Matthias Manfred Herth, Manuel Bardiès, Andre F. Martins, Antonio Paulo, Serge K. Lyashchenko, Sergio Todde, Sangram Nag, Efthimis Lamprou, Antero Abrunhosa, Francesco Giammarile and Clemens Decristoforo. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* (2022) 7:18

(7) Las Conferencias Internacionales de Armonización y el Common Technical Document (CTD). Elisabet Montpart, M Pilar Martín *OFFARM* (2003) VOL 22 NÚM 8.

(8) US and EU radiopharmaceutical diagnostic and therapeutic nonclinical study requirements for clinical trials authorizations and marketing authorizations. Sally W. Schwarz and Clemens Decristoforo. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* (2019) 4:10

(9) https://www.quialab.com.ar/notas-tecnicas/buenas-practicas-de-laboratorio-en-que-consisten/#_ftn1

(10) https://www.researchgate.net/publication/363855086_BUENAS_PRACTICAS_DE_LABORATORIO_BPL

(11) <https://www.argentina.gob.ar/noticias/anmat-miembro-observador-de-ich>

(12) Guidance for Preclinical Studies with Radiopharmaceuticals. IAEA RADIOISOTOPES AND RADIOPHARMACEUTICALS SERIES No. 8. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. VIENNA, 2023.

(13) Clinical translation of theranostic radiopharmaceuticals: Current regulatory status and recent examples. Petra Kolenc Peitl, Christine Rangger, Piotr Garnuszek, Renata Mikolajczak, Alicja Hubalewska-Dydejczyk, Theodosia Maina, Paola Erba, Clemens Decristoforo.

Journal of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals. (2019) 62(10):673-683

(14) In vitro studies with radiopharmaceuticals. Clemens Decristoforo and Joachim Pfister. Department of Nuclear Medicine, Medical University Innsbruck, Innsbruck, Austria. (2022) ElsevierInc.A.

(15) Clinical translation of ¹⁷⁷Lu-labeled PSMA-617: Initial experience in prostate cancer patients. Tapas Das, Mohini Guleria, Anil Parab, Chanchala Kale, Hina Shah, Haladhar D. Sarma, Vikram R. Lele, Sharmila Banerjee
Nuclear Medicine and Biology (2016) 43 296–302

(16) Harmonization of U.S., European Union, and Canadian First-in-Human Regulatory Requirements for Radiopharmaceuticals: Is This Possible? Sally W. Schwarz, Clemens Decristoforo, Anne E. Goodbody, Nikhita Singhal, Sarah Saliba, Patrick S. Ruddock, Katherine Zukotynski, and Andrew A. Ross.

The Journal of Nuclear Medicine (2019) Vol. 60, No. 2

(17) The ADAPTE Process: Resource Toolkit for Guideline Adaptation. The ADAPTE Collaboration (2009) Version 2.0. Available from: <http://www.g-i-n.net>.